



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Janaína do Couto Almeida

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE COMPLEXOS DE
COBRE(II) CONTENDO DERIVADOS DOS ÁCIDOS PICOLÍNICO E NICOTÍNICO**

Uberlândia – MG

2019

JANAÍNA DO COUTO ALMEIDA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE COMPLEXOS DE COBRE(II) CONTENDO DERIVADOS DOS ÁCIDOS PICOLÍNICO E NICOTÍNICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Guerra

Uberlândia – MG

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A447 Almeida, Janaína do Couto, 1990-
2019 Síntese, caracterização e estudos biológicos de complexos de
cobre(II) contendo derivados dos ácidos picolínico e nicotínico
[recurso eletrônico] / Janaína do Couto Almeida. - 2019.

Orientador: Wendell Guerra.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2486>
Inclui bibliografia.

1. Química. I. Guerra, Wendell , 1977-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química.
III. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP
38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 97, PPQUI				
Data:	dois de dezembro de dois mil e dezenove	Hora de início:	[14:00]	Hora de encerramento:	[18:10]
Matrícula do Discente:	11523QMI006				
Nome do Discente:	Janaína do Couto Almeida				
Título do Trabalho:	Síntese, caracterização e estudos biológicos de complexos de cobre(II) contendo derivados dos ácidos picolínico e nicotínico.				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Bioinorgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Preparação e caracterização de complexos e óxidos metálicos para aplicação em catálise, novos fármacos e conversão de energia.				

Reuniu-se no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones , Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Carolina Gonçalves Oliveira e Gustavo Von Poelhsitz da Universidade Federal de Uberlândia - UFU; Denise de Oliveira Silva, da Universidade de São Paulo - USP; Flávia Cristina Silva de Paula da Universidade Federal de Viçosa - UFV e Wendell Guerra, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, o Prof(a). Dr(a). Wendell Guerra, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Guerra, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/12/2019, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Gonçalves Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/12/2019, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Von Poelhsitz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/12/2019, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise de Oliveira Silva, Usuário Externo**, em 04/12/2019, às 06:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **FLÁVIA CRISTINA SILVA DE PAULA, Usuário Externo**, em 06/12/2019, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1727295** e o código CRC **2CCFC0A3**.

Dedico essa tese ao meu filho, Emanuel.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cláudia e César, pelo amor incondicional, apoio e por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu filho Emanuel, pelo amor puro, pelas brincadeiras e inúmeros momentos divertidos e alegres. Você é o motivo da minha felicidade.

Ao meu marido Shauciny, pela paciência, por saber escutar meus desabafos e por acreditar em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wendell Guerra pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa ao longo destes sete anos, pela confiança, por todo o aprendizado e amizade.

Aos meus amigos, Ana Clara, Flávia, Luana, Raphael, Wesley, do Laboratório de Síntese de Potenciais Fármacos (LASFAR) pela descontração, muita conversa boa e cafezinho ao fim de tarde.

Aos professores Ana Maria da Costa Ferreira (USP), Fernando Pavan (UNESP), Elene Cristina Pereira Maia (UFMG), Veridiana de Melo Rodrigues (UFU), Marcos Pivatto (UFU), Norberto Peporine Lopes (USP) e Adelino Vieira de Godoy Netto (UNESP) por toda a contribuição durante o trabalho.

Ao professor Gustavo Von Poelhsitz (UFU) por ter disponibilizado os ligantes que foram utilizados neste trabalho e por aceitar compor a banca de qualificação e tese.

As professoras Carolina Gonçalves Oliveira (UFU), Denise de Oliveira Silva (USP) e Flávia Cristina Silva de Paula (UFV) por aceitar compor a banca de defesa da tese.

À Rede Mineira de Química, ao Grupo de Pesquisa em Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), CAPES e FAPEMIG.

À Mayta, secretária da Pós-Graduação, pelo apoio em todos os momentos necessários.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela disponibilidade de recursos que me ajudaram a concluir esse trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A persistência é o caminho do êxito.

- Charlie Chaplin

RESUMO

Desde a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, diversos complexos à base de platina foram desenvolvidos como novos agentes quimioterápicos. Apesar de serem amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, ainda há limitações devido aos efeitos colaterais graves e a resistência celular intrínseca ou adquirida. Devido a estas desvantagens, uma das alternativas é o desenvolvimento de potenciais agentes antitumorais tendo como base metais encontrados naturalmente no organismo, como exemplo, o cobre. Assim, este trabalho descreve a síntese e caracterização de complexos de cobre(II) com ácidos hidroxipiridinacarboxílicos e ligantes *N,N*-doadores como potenciais agentes antitumorais e antimicobacterianos. Os complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$ e $[\text{Cu}(\text{L-L})_2]$, onde L-L = ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), ácido quináldico (QNA), ácido 2-hidroxinicotínico (2-HNA), ácido 2-mercaptonicotínico (2-MNA) ou ácido 6-hidroxinicotínico (6-HNA) e N-N = 2,2-bipiridina ou 1,10-fenantrolina foram caracterizados por análise elementar, condutimétrica, espectroscopia no infravermelho (IV), no ultravioleta-visível (UV-Vis), ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray* (HRESIMS). Os resultados indicam que os ligantes 3-HPA e QNA coordenam-se ao íon cobre(II) de maneira bidentada por meio dos átomos de nitrogênio e oxigênio do grupo carboxilato. Já os ligantes 2-HNA, 2-MNA e 6-HNA se coordenam pelo átomo de oxigênio do grupo carboxilato e pelos átomos de oxigênio da carbonila, enxofre e oxigênio do carboxilato, respectivamente. Para os complexos de cobre do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$, os valores de condutividade molar das soluções 10^{-3} M estão na faixa do eletrólito 1:1, o que indica a labilização dos ligantes axiais em solução (ânion perclorato) resultando em espécies do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})]^+$. Para averiguar o potencial farmacológico, a atividade citotóxica dos compostos foi investigada em três células tumorais (A549, K562, MDA-MB-231) e duas células normais (MRC-5, MCF-10A). Para a linhagem celular K562, os complexos $[\text{Cu}(3\text{-HPA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ e $[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ com 1,10-fenantrolina exibiram boa atividade citotóxica com valores de IC_{50} de 2,3 e 2,1 μM , respectivamente, sendo mais ativos que a carboplatina (10 μM) e os ligantes livres. Em relação à linhagem celular MDA-MB-231, os complexos $[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-MNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(6\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ e $[\text{Cu}(6\text{-HNA})(\text{bipy})\text{ClO}_4]$ foram mais ativos que a carboplatina ($> 100 \mu\text{M}$) e os ligantes livres. Os complexos $[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-MNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ e $[\text{Cu}(6\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ se ligam ao ct-ADN com valores de K_b em torno de 10^3 M^{-1} . De acordo com dados de dicroísmo circular

(CD) e espectroscopia de fluorescência, os complexos provavelmente se ligam ao sulco do ADN. A atividade antituberculose de doze complexos também foi avaliada contra a linhagem sensível MTB H37Rv e os complexos [Cu(QNA)(phen)ClO₄], [Cu(2-HNA)(phen)ClO₄] e [Cu(2-MNA)(phen)ClO₄] apresentaram boa atividade com valores de CIM inferiores a 2,7 µg mL⁻¹, menores que aqueles encontrados para os respectivos ligantes livres. Assim, os complexos sintetizados apresentaram boa atividade citotóxica e antimicobacteriana e são candidatos promissores para estudos posteriores.

Palavras-chave: complexos de cobre(II), ácidos hidroxipiridinacarboxílicos, bases heterocíclicas, atividade citotóxica, atividade antituberculose.

ABSTRACT

Since the discovery of cisplatin antitumor properties, several platinum-based complexes have been developed as new chemotherapeutic agents. Although they are widely used to treat various types of cancer, there are still limitations due to serious side effects and the intrinsic or acquired cellular resistance. Due to these disadvantages, one of the alternatives is the development of potential antitumor agents based on metals found naturally in the body, such as copper. Thus, this work describes the synthesis and characterization of copper(II) complexes with hydroxypyridinecarboxylic acids and *N,N*-donor ligands as potential antitumor and antimicrobial agents. Complexes of the type $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$ and $[\text{Cu}(\text{L-L})_2]$, where L-L = 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA), quinaldic acid (QNA), 2-hydroxynicotinic acid (2-HNA), 2-mercaptosuccinic acid (2-MNA) ou 6-hydroxynicotinic acid (6-HNA) and N-N = 2,2-bipyridine or 1,10-phenanthroline were characterized by elemental analysis, conductivity measurements, infrared spectroscopy (FT-IR), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), electronic paramagnetic resonance (EPR) and high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS). The results indicate that the 3-HPA and QNA ligands coordinate to the copper(II) ion in a bidentate manner via nitrogen and oxygen atoms of the carboxylate. In turn, the 2-HNA, 2-MNA and 6-HNA ligands coordinates via oxygen atom of carboxylate and oxygen atom of carbonyl, sulfur and oxygen atom of the carboxylate, respectively. For copper complexes of type $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$, the molar conductivity values of 10^{-3} M solutions are in the range of 1:1 electrolytes, this indicates the labilization of the axial ligands in solution (perchlorate anion) resulting in species of the type $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})]^+$. To ascertain their pharmacological potential, the cytotoxic activity of the compounds was investigated in three tumor cell lines (A549, K562, MDA-MB-231) and two normal cell lines (MRC-5, MCF-10A). For the K562 cell line, the $[\text{Cu}(3\text{-HPA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ and $[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ complexes with 1,10-phenanthroline exhibited good cytotoxic activity with IC_{50} values of 2.3 and 2.1 μM , respectively, being more active than carboplatin (10 μM) and free ligands. In relation to the MDA-MB-231 cell line, the $[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-MNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(6\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ and $[\text{Cu}(6\text{-HNA})(\text{bipy})\text{ClO}_4]$ complexes were more active than carboplatin (> 100 μM) and free ligands. The $[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, $[\text{Cu}(2\text{-MNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ and $[\text{Cu}(6\text{-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ complexes bind to ct-DNA with K_b values in the range of 10^3 M^{-1} . According to data from circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy the complexes appear to bind to the DNA groove. The antituberculese activity

of twelve complexes was also evaluated against the sensitive strain MTB H37Rv and the [Cu(QNA)(phen)ClO₄], [Cu(2-HNA)(phen)ClO₄] and [Cu(2-MNA)(phen)ClO₄] complexes showed good activity with MIC values inferior than 2.7 µg mL⁻¹, values lower than those found for the respective free ligands. Thus, the synthesized complexes showed good cytotoxic and antimicrobial activity and are promising candidates for further studies.

Keywords: copper(II) complexes, hydroxypyridinecarboxylic acids, heterocyclic bases, cytotoxic activity, antituberculosis activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Compostos utilizados como agentes terapêuticos ou de diagnóstico.....	2
Figura 02. Estrutura dos fármacos taxol e vimblastina.....	4
Figura 03. Representação esquemática do mecanismo de ação da cisplatina.....	5
Figura 04. Compostos de platina disponíveis para uso clínico: (1) cisplatina, (2) carboplatina, (3) oxaliplatina, (4) lobaplatina, (5) heptaplatina (6) nedaplatina. Compostos de platina em fase de teste clínicos: (7) picoplatina e (8) satraplatina.....	6
Figura 05. Estruturas dos complexos KP46, maltolato de gálio, KP1019, NAMI-A e TOOKAD® solúvel.....	8
Figura 06. Números de casos confirmados de tuberculose por 100 mil habitantes, de acordo com as regiões brasileiras em 2018.....	9
Figura 07. Número de óbitos por tuberculose entre 1996 e 2016, no Brasil.....	10
Figura 08. Fármacos de primeira linha para o tratamento de tuberculose.....	12
Figura 09. Fármacos de segunda linha para o tratamento de tuberculose.....	13
Figura 10. Estrutura dos fármacos bedaquilina e delamanida.....	14
Figura 11. Estrutura dos complexos <i>cis</i> -[Ru(pic)(dppm) ₂]PF ₆ e <i>cis</i> -[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	15
Figura 12. Estrutura proposta para o complexo [Pt(dmsO)(cpl)Cl]Cl e estruturas dos ligantes ofloxacina (ofl), ciprofloxacina (cpl) e esparfloxacina (spf).....	15
Figura 13. Complexos de manganês e cobre contendo ligantes dicarboxilatos e 1,10-fenantrolina.....	16
Figura 14. Estrutura dos complexos [Cu(GTSC)] e [Cu(GTSCl)].....	19
Figura 15. Estrutura dos complexos C1, C2 e C3.....	19
Figura 16. Complexos de cobre com derivados de hidroxiflavona.....	20
Figura 17. Complexos de cobre(II) contendo hidrazonas derivadas de isoniazida.....	21
Figura 18. Estrutura do complexo [Cu(phen) ₂] ²⁺	22
Figura 19. Estrutura do composto CBP-01.....	23
Figura 20. Mecanismo de ação do complexo CBP-01.....	23
Figura 21. Estruturas das Casiopéínas®.....	24
Figura 22. Estrutura do complexo CuLA.....	25
Figura 23. Estruturas dos [CuL(o-phen)] 1 e [CuL(Imz)] 2	26
Figura 24. Complexos de Cu(II) contendo 4-aminoantipirina e ligantes <i>N,N</i> -doadores.....	26
Figura 25. Ácido nicotínico e ácido picolínico.....	27
Figura 26. Complexos de rutênio(II) com 2-OHnicH, 6-OHnicH e 3-OHpicH.....	28

Figura 27. Equilíbrio tautomérico que ocorre em 2-HNA, 6-HNA e 2-MNA.....	29
Figura 28. Representação esquemática do método de síntese para o complexo I (A) e III (B).....	37
Figura 29. Estruturas dos ligantes utilizados neste trabalho.....	43
Figura 30. Estruturas propostas para os complexos sintetizados.....	44
Figura 31. Estruturas cristalinas dos complexos III (A) e IX (B).....	45
Figura 32. Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo II e seus respectivos ligantes, em solução etanólica ($1,0 \times 10^{-4}$ M).....	51
Figura 33. Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo VI e seu respectivo ligante, em solução etanólica ($1,0 \times 10^{-4}$ M).....	52
Figura 34. Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo VII e seus respectivos ligantes, em solução metanólica ($5,0 \times 10^{-5}$ M).....	52
Figura 35. Diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d.....	53
Figura 36. Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo I em solução metanólica ($1,0 \times 10^{-3}$ M) e no estado sólido.....	54
Figura 37. Diferentes modos de coordenação de metais ao grupo carboxilato.....	56
Figura 38. Espectros na região do infravermelho ($1800-1600\text{ cm}^{-1}$) do complexo II e seus respectivos ligantes.....	57
Figura 39. Espectros na região do infravermelho ($3600-2600\text{ cm}^{-1}$) do complexo VIII e seus respectivos ligantes.....	58
Figura 40. Espectros na região do infravermelho ($2600-1800\text{ cm}^{-1}$) do complexo X e seus respectivos ligantes.....	58
Figura 41. Espectros na região do infravermelho ($1100\text{ e }620\text{ cm}^{-1}$) do complexo X	59
Figura 42. Espectro de massas para o complexo II	60
Figura 43. Espectro de massas para o complexo VII	61
Figura 44. Espectro de massas para o complexo VI	61
Figura 45. Espectro de RPE para o complexo I no estado sólido e em solução de acetonitrila congelada (77 K).....	64
Figura 46. Espectros de RPE para os complexos VI e IX no estado sólido em temperatura ambiente (A), no estado sólido a 77K (B) e em soluções de DMSO congeladas a 77 K (C).....	64
Figura 47. Espectros de RPE para os complexos IV , V , XIII e XIV no estado sólido em temperatura ambiente (A), no estado sólido a 77K (B) e em soluções de DMSO congeladas a 77 K (C).....	65

Figura 48. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo I em diferentes intervalos de tempo.....	72
Figura 49. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo IV em diferentes intervalos de tempo.....	72
Figura 50. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo VII em diferentes intervalos de tempo.....	73
Figura 51. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo X em diferentes intervalos de tempo.....	73
Figura 52. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo XIII em diferentes intervalos de tempo.....	72
Figura 53. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo IV ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$	75
Figura 54. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo VII ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$	76
Figura 55. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo X ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$	76
Figura 56. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo XIII ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$	77
Figura 57. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo VII ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ($[\text{complexo}]/[\text{ADN}]$).....	79
Figura 58. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo XIII ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ($[\text{complexo}]/[\text{ADN}]$).....	80
Figura 59. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo IV ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ($[\text{complexo}]/[\text{ADN}]$).....	80

Figura 60. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo X ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ([complexo]/[ADN]).....	81
Figura 61. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo IV . $\lambda_{ex} = 338$ nm, [Hoechst] = $6,0 \times 10^{-6}$ M, [ADN] = $6,0 \times 10^{-5}$ M, [Complexo] = 0- $6,0 \times 10^{-5}$ M.....	82
Figura 62. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo VII . $\lambda_{ex} = 338$ nm, [Hoechst] = $6,0 \times 10^{-6}$ M, [ADN] = $6,0 \times 10^{-5}$ M, [Complexo] = 0- $6,0 \times 10^{-5}$ M.....	83
Figura 63. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo X . $\lambda_{ex} = 338$ nm, [Hoechst] = $6,0 \times 10^{-6}$ M, [ADN] = $6,0 \times 10^{-5}$ M, [Complexo] = 0- $6,0 \times 10^{-5}$ M.....	83
Figura 64. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo XIII . $\lambda_{ex} = 338$ nm, [Hoechst] = $6,0 \times 10^{-6}$ M, [ADN] = $6,0 \times 10^{-5}$ M, [Complexo] = 0- $6,0 \times 10^{-5}$ M.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01. Principais causas de morte no Brasil em 2017.....	3
Tabela 02. Dados de análise elementar (CHN) para os complexos sintetizados obtidos.....	45
Tabela 03. Faixa de valores de condutividade molar.....	46
Tabela 04. Valores de condutividade molar para os complexos sintetizados obtidos.....	47
Tabela 05. Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e respectivos valores de absorvidade molar ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos ligantes e dos seus respectivos complexos.....	48
Tabela 06. Atribuições dos principais modos vibracionais no infravermelho, para o ligante e os seus respectivos complexos.....	55
Tabela 07. Dados das análises por espectrometria de massas dos complexos I-VIII , X e XI	62
Tabela 08. Parâmetros espectroscópicos RPE.....	66
Tabela 09. Valores de IC_{50} (μM) e CC_{50} (μM) dos complexos e seus respectivos ligantes, para a linha celular A549 (câncer de pulmão), K562 (leucemia mielóide crônica) e MRC-5 (células de fibroblastos pulmonares normais).....	67
Tabela 10. Valores de IC_{50} (μM) e CC_{50} (μM) dos complexos e seus respectivos ligantes, para a linha celular MDA-MB-231 (câncer de mama) e MCF-10A (células de mama não tumorigênica).....	68
Tabela 11. Comparação da citotoxicidade de diferentes complexos de cobre do tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})\text{L}]\text{X}$ (onde N-N = 1,10-fenantrolina ou 2,2-bipiridina e X = NO_3^- ou ClO_4^-).....	69
Tabela 12. Valores de CIM contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv dos complexos e seus respectivos ligantes.....	70
Tabela 13. Constantes de ligação ao ADN (K_b) para os complexos de cobre(II).....	77
Tabela 14. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para os complexos de cobre(II).....	84

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN = ácido desoxirribonucleico

HIV = Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

OMS = Organização Mundial da Saúde

2-HNA = ácido 2-hidroxicotínico

2-MNA = ácido 2-mercaptocotínico

3-HPA = ácido 3-hidroxipicolínico

6-HNA = ácido 6-hidroxicotínico

QNA = ácido quináldico

phen = 1,10-fenantrolina

bipy = 2,2-bipiridina

DMSO = dimetilsulfóxido

DMF = dimetilformamida

INCA = Instituto Nacional do Câncer

UV-Vis = ultravioleta-visível

IV = infravermelho

ATR = attenuated total reflection (Reflectância total atenuada)

HRESIMS = espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray*

RPE = ressonância paramagnética eletrônica

λ = comprimento de onda

ε = absorvidade molar

ν = vibração de estiramento

CC₅₀ = concentração necessária para causar a morte de 50% das células viáveis

IC₅₀ = concentração necessária para inibir 50% das células tumorais

CIM = concentração inibitória mínima

IS = índice de seletividade

MTB H37Rv = *Mycobacterium tuberculosis*

K562 = células de leucemia mielóide crônica

MCF-10A = células de mama não tumorigênica

MDA-MB-231 = células de adenocarcinoma de mama humano metastático

MRC-5 = células de fibroblastos pulmonares normais

A549 = células de adenocarcinoma de pulmão

BCG = Bacillus Calmette-Guérin

ct-ADN = solução de ADN de timo de bezerro

FDA = Food and Drug Administration (Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos)

EMA = European Medicines Agency (Agência Europeia de Medicamentos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Quimioterapia do câncer.....	2
1.2. Quimioterapia da tuberculose.....	8
1.2.1. Transmissão, manifestações clínicas e sintomas.....	10
1.2.2. Tratamento da tuberculose.....	11
1.3. Cobre.....	17
1.3.1. Complexos de cobre(II) e a química medicinal	17
1.4. Ácidos hidroxipiridinacarboxílicos.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.1. Reagentes e solventes.....	31
3.2. Métodos instrumentais.....	31
3.2.1. Análise Elementar (CHNS).....	31
3.2.2. Análise Condutimétrica.....	31
3.2.3. Espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis e reflectância difusa.....	31
3.2.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	32
3.2.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).....	32
3.2.6. Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por <i>electrospray</i> (HRESIMS).....	32
3.3. Estudos biológicos.....	33
3.3.1. Estudo da atividade citotóxica.....	33
3.3.2. Estudos da atividade antituberculose.....	35
3.3.3. Interação com ADN.....	35
3.4. Síntese dos complexos.....	37
3.4.1. Complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$	37
3.4.2. Complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})_2]$	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
4.1. Análise elementar.....	45
4.2. Análise condutimétrica.....	46
4.3. Espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis e reflectância difusa.....	47

4.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	54
4.5. Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por <i>electrospray</i>	60
4.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.....	62
4.7. Estudos biológicos.....	66
4.7.1. Atividade citotóxica.....	66
4.7.2. Atividade anti- <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	70
4.8. Teste de estabilidade.....	71
4.9. Interação com ADN.....	74
5. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	108
PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	134

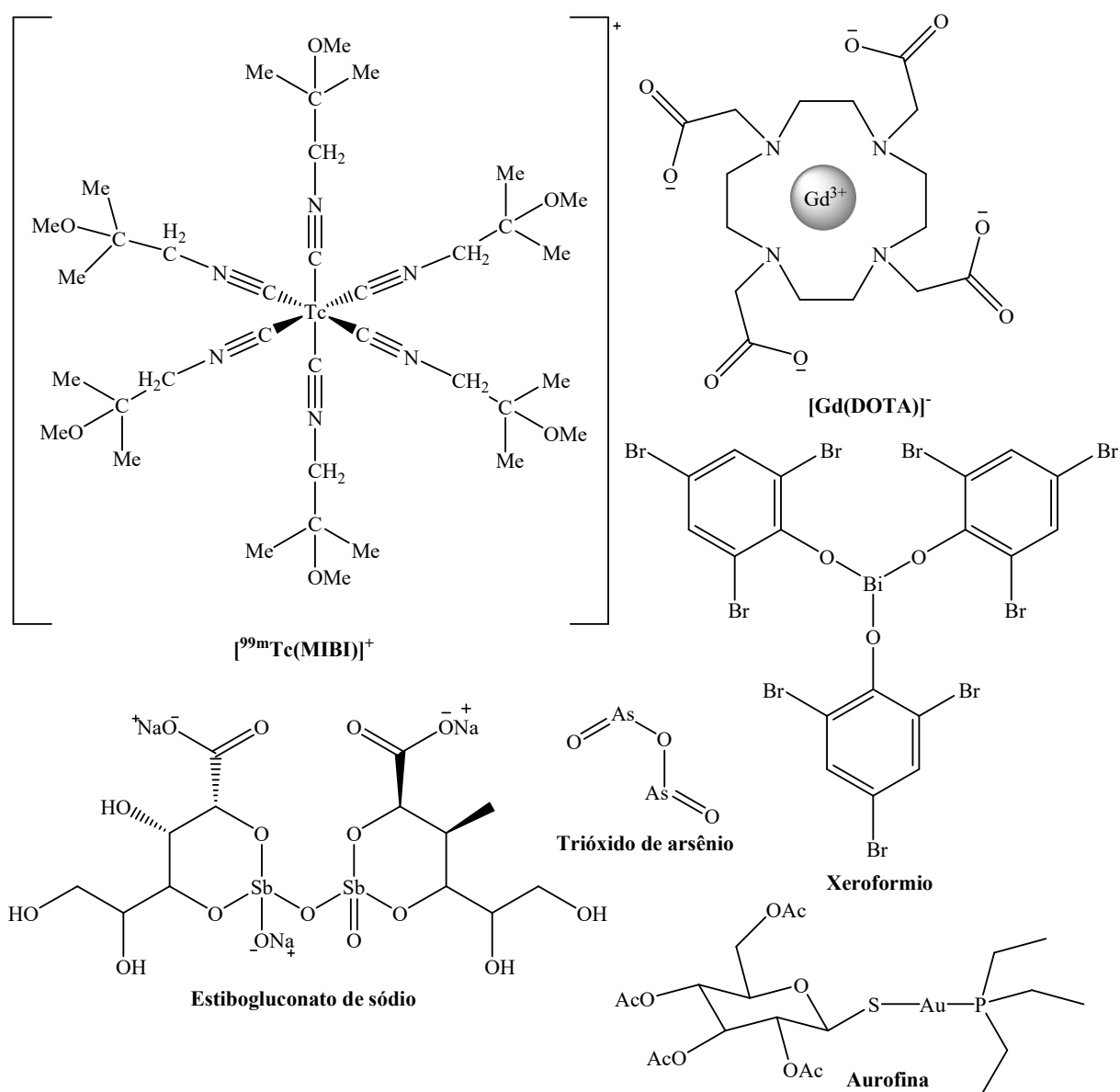
1. INTRODUÇÃO

Diversos compostos metálicos são relatados, desde a antiguidade, por serem utilizados como fármacos. Porém, o uso racional destas substâncias na medicina moderna foi bastante restrito até a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, que é um quimioterápico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como os de ovário, garganta e testículo (ROSENBERG, et al., 1967; BERALDO, 2005; SILVA, et al., 2011; CUEVAS, et al., 2012; MJOS, ORVIG, 2014; TRUDU, et al., 2015; MEDICI, et al., 2015).

A partir da introdução da cisplatina na clínica médica, deu-se o início a um vigoroso desenvolvimento de complexos metálicos com potenciais aplicações no campo farmacológico, principalmente como agentes antitumoral, antiinflamatório, antibacteriano, antirreumático e antimalárico (HELM, et al., 1995; CABANTCHIK, et al., 1996; SCHWIETERT, MCCUE, 1999; FARRELL, 2002; FONTES, CÉSAR, BERALDO, 2005; DIAS, et al., 2006; BARRY, SADLER, 2014; MEDICI, et al., 2015; CHEFF, HALL, 2017). Como consequência destes esforços, diversos compostos metálicos atualmente são utilizados como agentes terapêuticos, de imagem e de diagnóstico. Por exemplo, os radiofármacos de ^{99m}Tc são bastante utilizados em diagnóstico por imagem e em tomografia, enquanto que os de Gd^{3+} são utilizados em ressonância magnética nuclear. Por sua vez, compostos de ouro são utilizados no tratamento da artrite reumática; os de antimônio no tratamento da leishmaniose; os de bismuto no tratamento de úlceras e os de arsênio no tratamento da leucemia promielocítica aguda, dentre outros (Figura 01) (BERMAN, 1997; SCHAEFER, 1997; ORVIG, ABRAMS, 1999; SUN, et al., 2001; FARRELL, 2002; THOMPSON; ORVIG, 2003; ZANG, LIPPARD, 2003; FRICKER, 2006; FRICKER, 2007; CUEVAS, et al., 2012; MJOS, ORVIG, 2014; MEDICI, et al., 2015; DILRUBA, KALAYDA, 2016; CHEFF, HALL, 2017; DEO, et al., 2018; HOONJAN, JADHAV, BHATT, 2018).

Apesar do sucesso destes compostos na clínica médica, algumas desvantagens, como o aparecimento de resistência celular, além de efeitos colaterais graves, ocorrem frequentemente. Assim, a busca por medicamentos a base de metais mais seguros e eficazes é um desafio para os cientistas, além de novos usos, principalmente em doenças em que não há boas opções de tratamento ou cujo arsenal de fármacos está em constante declínio.

Figura 01. Compostos utilizados como agentes terapêuticos ou de diagnóstico.



Fonte: A autora.

1.1. Quimioterapia do câncer

Câncer é o nome dado a um grupo de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que se multiplicam rapidamente, de forma agressiva e incontrolável. As células cancerosas invadem os tecidos e órgãos podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. A metástase é a principal causa de morte por câncer (INCA, 2018; WHO, 2018a).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. Os tipos de câncer que apresentaram maior taxa de incidência foram os de pulmão (2,1 milhões), mama (2,1 milhões), colorretal (1,8 milhões), próstata (1,3 milhões) e de estômago (1,0 milhão). Globalmente, cerca de uma em cada seis mortes estão relacionadas à doença (WHO, 2018a). No Brasil, em 2017 houve aproximadamente 222 mil mortes em decorrências das neoplasias, tornando o câncer a segunda causa de morte ficando atrás apenas dos óbitos causados por doenças do aparelho circulatório (Tabela 01) (INCA, 2018).

Tabela 01. Principais causas de morte no Brasil em 2017.

Grupo de causas	Total (%)
Doenças do aparelho circulatório	27,34
Neoplasias (tumores)	16,90
Causas externas de morbidade e mortalidade	12,09
Doenças do aparelho respiratório	11,86
Doenças endócrinas nutricionais e metabólicas	6,07
Sintomas, sinais e achados anormais de exames clínicos e laboratoriais	5,47
Doenças do aparelho digestivo	5,03
Algumas doenças infecciosas e parasitárias	4,18
Demais causas	11,06
Total	100

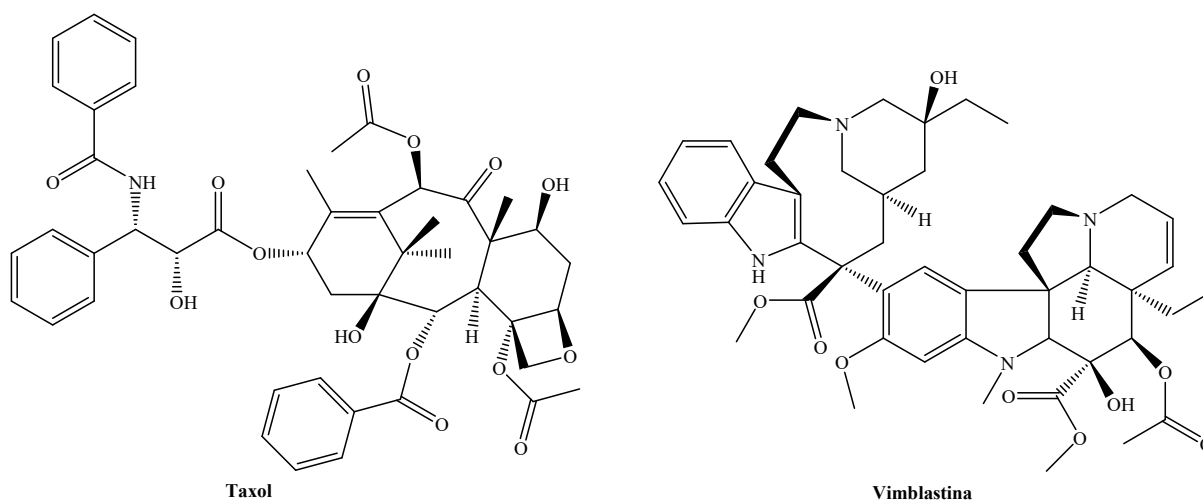
Fonte: Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM.

Os principais tratamentos para o câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Na maioria das vezes é preciso combinar mais de uma técnica, com a finalidade de obter a cura. O intuito da cirurgia é remover permanentemente o tumor, o que é difícil na maioria dos casos. A radioterapia faz uso de radiações para combater o tumor ou impedir que suas células aumentem e a quimioterapia utiliza-se de medicamentos para matar ou impedir a divisão das células cancerosas que formam um determinado tipo de tumor. O tratamento pode ser feito por via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal ou tópico. (SUDHAKAR, 2009; INCA, 2011).

Os quimioterápicos podem ser orgânicos, como exemplos, o taxol e a vimblastina (Figura 02) ou inorgânicos, como a cisplatina (Figura 04), que é um dos fármacos mais utilizados na terapia antineoplásica desde 1978 quando foi aprovada para uso clínico pela

FDA (Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos). A cisplatina é utilizada em cerca de 50% dos tratamentos quimioterápicos, incluindo câncer de bexiga, cabeça, pescoço, pulmão, ovário e testículo. É eficaz contra vários tipos de câncer, como carcinomas, linfomas e sarcomas (DASARI, TCHOUNWOU, 2014; WEAVER, 2014; PETROVIĆ, TODORVIĆ, 2016; LAZAREVIĆ, RILAK, BUGARČIĆ, 2017; CHEFF, HALL, 2017).

Figura 02. Estrutura dos fármacos taxol e vimblastina.



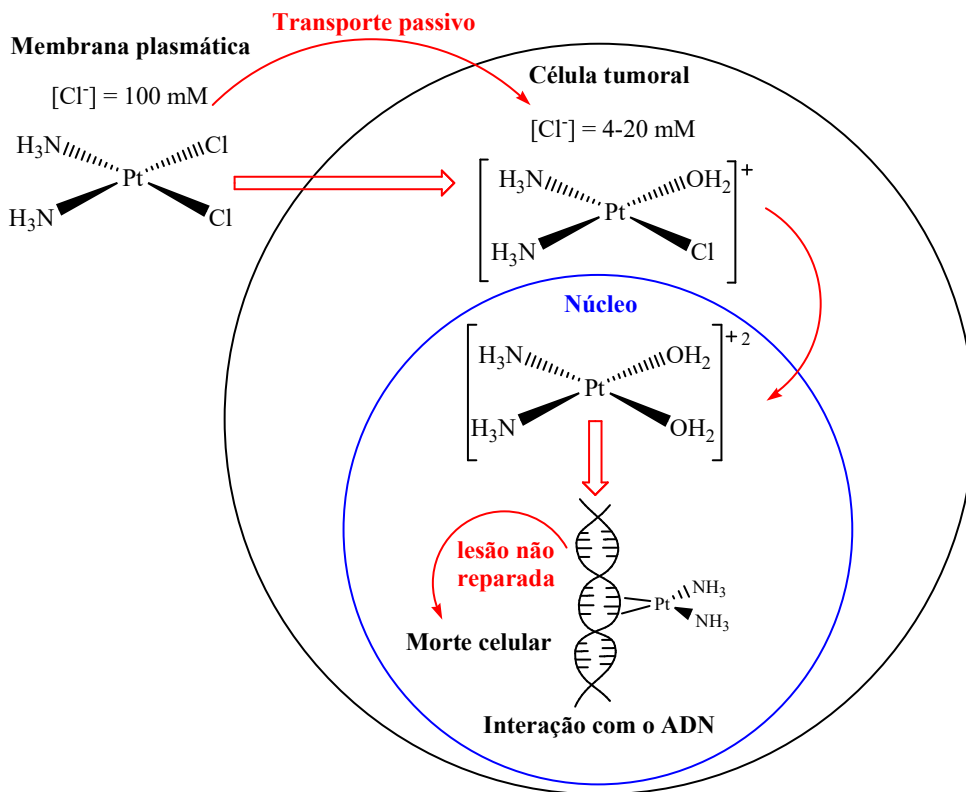
Fonte: A autora.

A cisplatina é geralmente administrada por via intravenosa, devido a sua baixa solubilidade em água. Em razão da alta concentração de íons cloreto (100 mM) no meio externo da célula, esta permanece intacta, ou seja, não sofre hidrólise. No meio intracelular ocorre a substituição dos íons cloretos da cisplatina por moléculas de água, formando as espécies positivamente carregadas $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ e $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{+2}$. Assim a cisplatina sofre hidrólise devido à baixa concentração de íons cloreto (4-20 mM) no interior das células (FREZZA, et al., 2010; GÓMEZ-RUIZ et al., 2012). Estas espécies carregadas interagem com o ácido desoxirribonucleico (ADN) de diversas formas, mas a principal se dá por meio dos átomos N7 das bases nitrogenadas (guanina ou adenina) (NEVES, VARGAS, 2011; ALMEIDA, 2014; DASARI, TCHOUNWOU, 2014; PRANCZK, et al., 2014, DILRUBA, KALAYDA, 2016). A representação esquemática do mecanismo de ação da cisplatina está ilustrada na Figura 03.

Os diferentes tipos de adutos que são gerados entre a cisplatina e o ADN provocam distorções significativas na dupla hélice do ADN. Estas distorções são responsáveis pela inibição do processo de replicação mais precisamente no processo de transcrição; indução de

parada no ciclo celular; reparo do ADN e apoptose (MJOS, ORVIG, 2014; DILRUBA, KALAYDA, 2016; JOHNSTONE, SUNTHARALINGAM, LIPPARD, 2016).

Figura 03. Representação esquemática do mecanismo de ação da cisplatina.

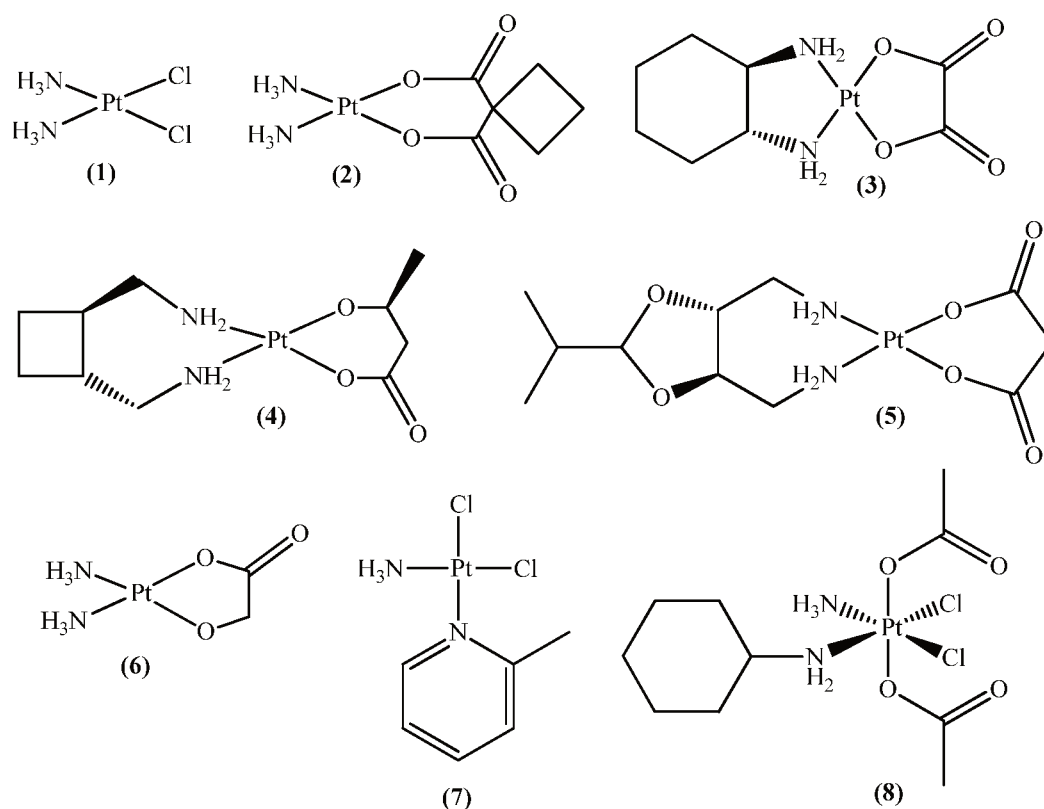


Fonte: Adaptado NEVES, VARGAS, 2011.

Desde a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina e da sua relevância no tratamento do câncer, novos compostos inorgânicos a base de platina foram produzidos e introduzidos na clínica médica, como a carboplatina e oxaliplatina (Figura 04) que são de uso mundial e possuem efeitos colaterais mais brandos. A carboplatina é um fármaco de segunda geração e difere da estrutura da cisplatina pela presença do grupo abandonador dicarboxilato no lugar dos ligantes abandonadores cloreto. O mecanismo de ação é semelhante ao da cisplatina, mas devido ao ligante dicarboxilato, o fármaco possui menor toxicidade, resultando em efeitos colaterais menos pronunciados. Atualmente, a carboplatina é utilizada no tratamento de câncer de ovário, pulmão, cabeça e pescoço (DASARI, TCHOUNWOU, 2014; DILRUBA, KALAYDA, 2016). A oxaliplatina é considerada um fármaco de terceira geração e possui grupo abandonador oxalato e ligante bidentado 1,2-diaminociclohexano (DACH), ao invés de duas aminas. A oxaliplatina não apresenta resistência cruzada com a cisplatina e pode ser usada como uma terapia combinada com outros agentes

quimioterapêuticos no tratamento do câncer de cólon e câncer de pulmão (NDAGI, MHLONGO, SOLIMAN, 2017; DEO, et al., 2018). Há também a nedaplatina, a lobaplatina e a heptaplatina (Figura 04), que estão atualmente em testes clínicos nos EUA, mas que já são empregadas no Japão, na China e na Coreia do Sul, respectivamente. A nedaplatina possui os mesmos ligantes amins da cisplatina e se difere pela presença do ligante bidentado que forma um anel de cinco membros com a platina. Este fármaco é menos nefrotóxico que a cisplatina e é usado como terapia combinada no tratamento de câncer de pulmão, cabeça e pescoço e esôfago. A lobaplatina, fármaco da terceira geração da cisplatina é utilizada no tratamento de câncer de mama, leucemia mielóide crônica e pulmão. A heptaplatina é estável em solução e não apresenta toxicidade notável. Atualmente, a heptaplatina é utilizada no tratamento de câncer gástrico. Por outro lado, a picoplatina está em fase I e II e a satraplatina está em fase I, II e III de testes clínicos como terapia combinada para tratamento de câncer de próstata (MJOS, ORVIG, 2014; DILRUBA, KALAYDA, 2016; NDAGI, MHLONGO, SOLIMAN, 2017).

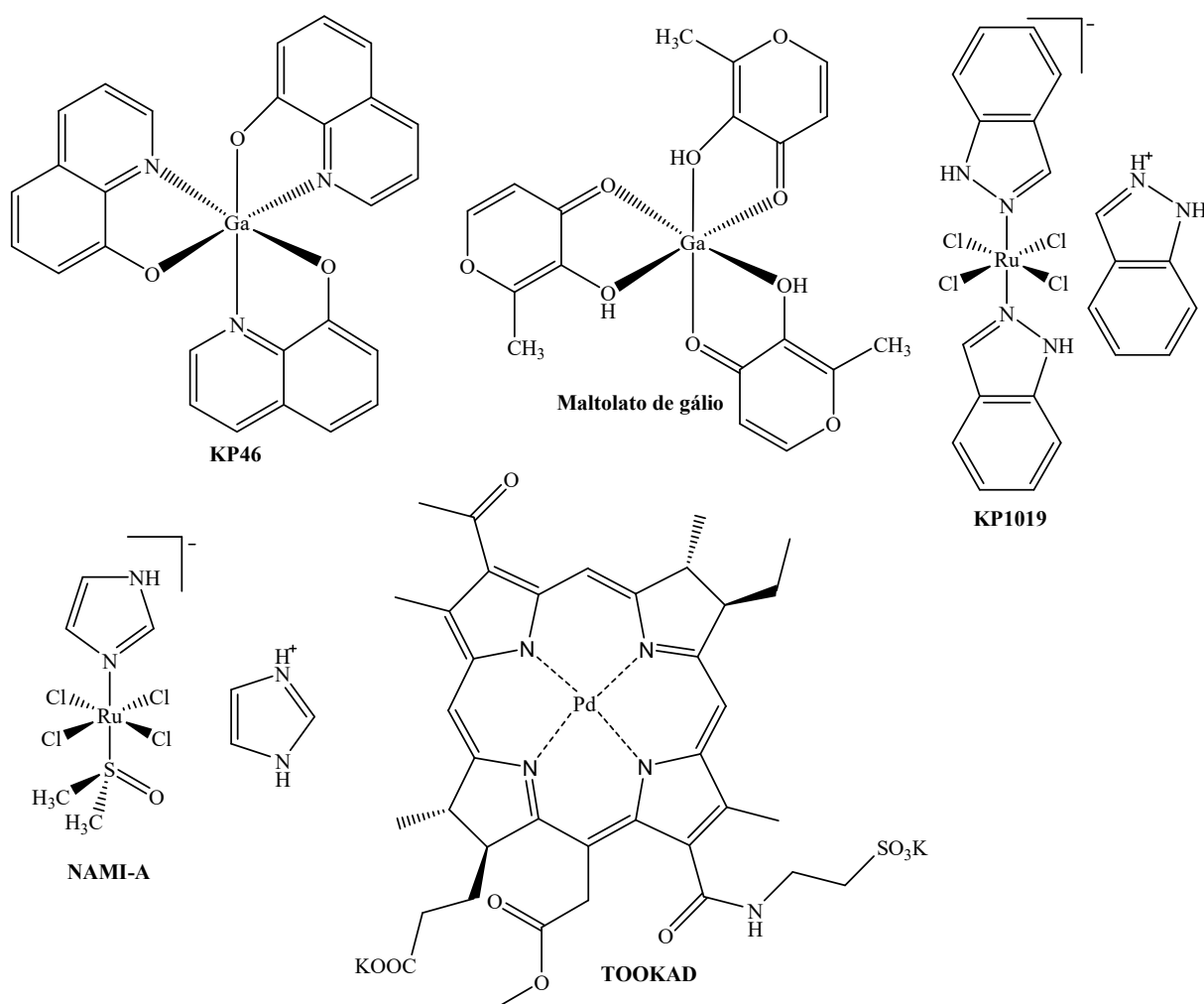
Figura 04. Compostos de platina disponíveis para uso clínico: (1) cisplatina, (2) carboplatina, (3) oxaliplatina, (4) lobaplatina, (5) heptaplatina (6) nedaplatina. Compostos de platina em fase de teste clínicos: (7) picoplatina e (8) satraplatina.



Fonte: A autora.

Apesar de muito utilizada, a cisplatina e seus derivados não são eficientes no tratamento de alguns tipos de câncer, pois há várias adversidades que limitam o uso clínico destas substâncias, como a resistência adquirida ou intrínseca apresentada em alguns tipos de tumores. Além disso, estes fármacos apresentam diversos efeitos colaterais, como supressão da medula óssea, neurotoxicidade e nefrotoxicidade que são associados principalmente à falta de seletividade dos mesmos. Devido a essas desvantagens, diversos complexos metálicos têm sido estudados com o objetivo de obter novos fármacos para tratar o câncer, como, por exemplo, os complexos de rutênio, gálio e paládio. O NAMI-A (Figura 05), complexo de rutênio com imidazol e DMSO, foi o primeiro complexo de rutênio a participar de teste clínico. Esteve em fase I/II de testes clínicos e é capaz de inibir o processo de metástase no câncer de pulmão, colorretal, melanoma, ovário e pâncreas. O KP1019 (Figura 05) é um complexo de rutênio com indazol que esteve em fase II de teste clínico e é indicado para o tratamento de câncer colorretal avançado (BERGAMO, 2012; TRUDU, et al., 2015; NDAGI, MHLONGO, SOLIMAN, 2017). Complexos de gálio também são estudados como agente anticâncer, como por exemplo, o maltolato de gálio (Figura 05) que está em fase I de testes clínicos e é eficaz no tratamento de carcinoma hepatocelular avançado. Outro exemplo interessante é o tris(8-quinolinolato)gálio(III), conhecido como KP46 (Figura 05), um composto de gálio desenvolvido para administração oral que está em fase II de testes clínicos para o tratamento de câncer renal e por enquanto não apresentou efeitos colaterais graves (TIMERBAEV, 2009; BERNSTEIN et al., 2011; DABROWIAK, 2017). O complexo de paládio, conhecido como TOOKAD® solúvel (Figura 05) está em fase III de testes clínicos e é indicado para o tratamento fotodinâmico do câncer de próstata (AZZOUZI, et al., 2015).

Figura 05. Estruturas dos complexos KP46, maltolato de gálio, KP1019, NAMI-A e TOOKAD® solúvel.



Fonte: A autora.

1.2. Quimioterapia da tuberculose

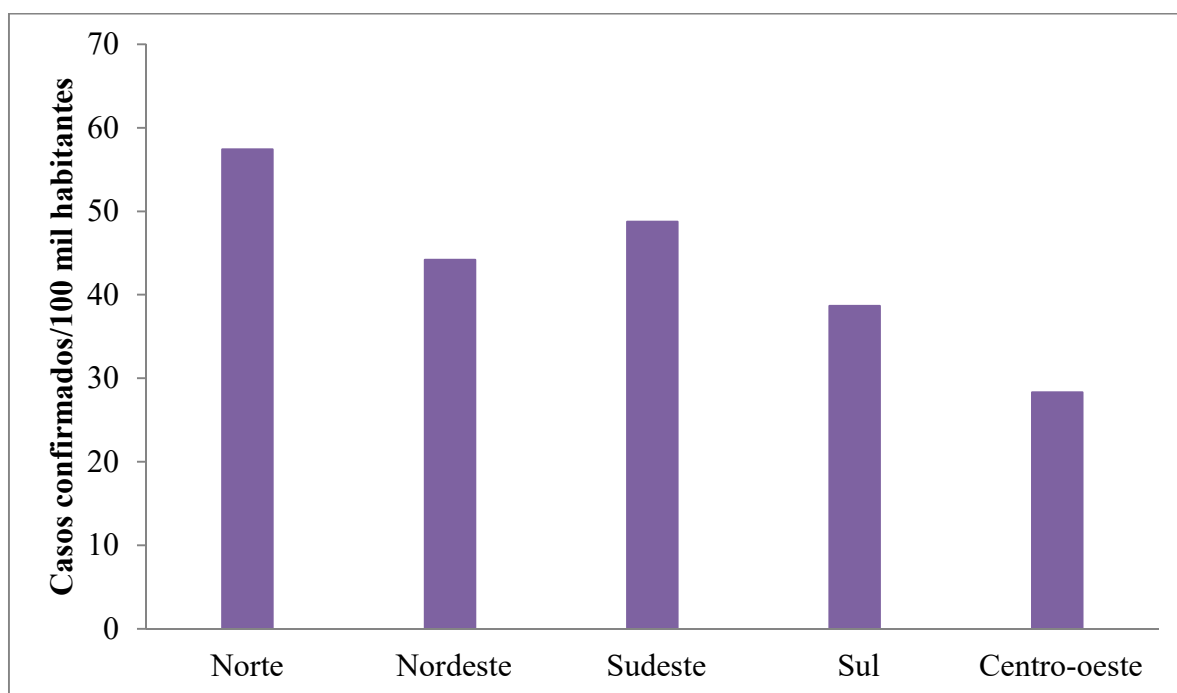
A tuberculose (TB) é uma doença causada por uma bactéria denominada *Mycobacterium tuberculosis* que pode afetar uma série de órgãos, principalmente os pulmões podendo levar à morte. Esta enfermidade pode ser prevenida por meio de medidas de proteção individual, como a vacinação com Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e tem cura, desde que o tratamento seja seguido corretamente (KOUL, et al., 2011; FERRI, et al., 2014).

A organização mundial da saúde (OMS) estima que cerca de um terço da população mundial tem tuberculose latente, o que significa que as pessoas foram infectadas pelas bactérias, mas não adoeceram. As pessoas infectadas têm um risco vitalício de 5 a 15% de manifestar a doença. No entanto, pessoas com sistemas imunológicos comprometidos, como

portadores do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), desnutrição, diabetes e fumantes têm risco muito maior de adoecer (WHO, 2018b).

Em 2017, 10 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose e 1,6 milhões morreram em decorrência da doença (entre elas, 0,3 milhões tinham HIV). Mais de 95% dessas mortes ocorreram em países de média e baixa renda. No Brasil foram confirmados em 2018 mais de 94 mil casos de tuberculose, sendo que as maiores ocorrências aconteceram nas regiões Nordeste e Sudeste, com 25059 e 42668 casos, respectivamente (Figura 06) (WHO, 2018b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

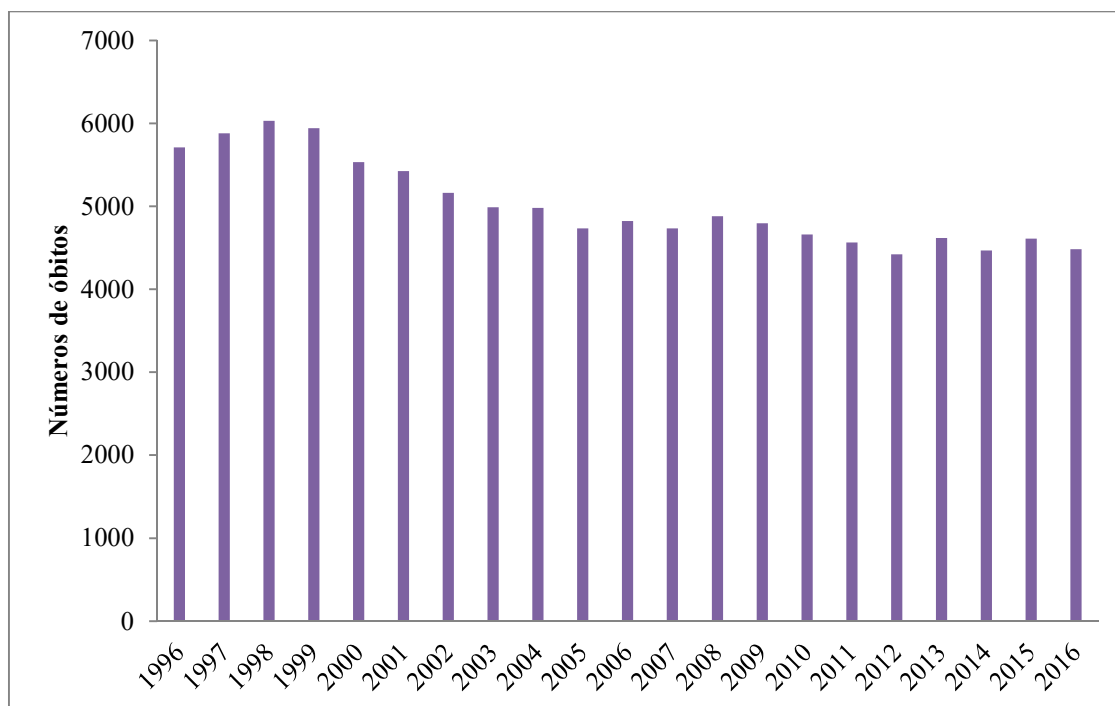
Figura 06. Números de casos confirmados de tuberculose por 100 mil habitantes, de acordo com as regiões brasileiras em 2018.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.

Ainda no Brasil, entre 1996 e 2016, foram registradas mais de 105 mil mortes por tuberculose, envolvendo casos pulmonares com confirmação bacteriológica, casos pulmonares sem confirmação bacteriológica, casos de tuberculose do sistema nervoso e outras formas extrapulmonares. Neste período, o número de óbitos por tuberculose diminuiu 22%, contudo a mortalidade por esta doença ainda apresenta números alarmantes (Figura 07).

Figura 07. Número de óbitos por tuberculose entre 1996 e 2016, no Brasil.



Fonte: Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM).

1.2.1. Transmissão, manifestações clínicas e sintomas

A tuberculose é transmitida de forma direta, de pessoa a pessoa, principalmente por via aérea. Quando pessoas com tuberculose pulmonar falam, tosse ou espirram, elas expõem para o ar bacilos de diversos tamanhos, sendo que os de maior diâmetro caem no solo, enquanto que os de menor diâmetro podem ficar suspensos no ar por diversas horas. Somente os bacilos com diâmetro de até 5 μm e em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos pulmonares e então iniciar a multiplicação. Uma pessoa precisa inalar apenas alguns desses bacilos para se infectar (BRASIL, 2011; NOGUEIRA, et al., 2012; WHO, 2018b).

A tuberculose pode-se apresentar sob a forma primária (primo-infecção), pós-primária (ou secundária) ou miliar. A TB pulmonar primária ocorre em indivíduos que ainda não tiveram contato com o bacilo, sendo, portanto, mais comum em crianças. A TB pulmonar pós-primária desenvolve-se a partir de uma nova infecção ou da reativação de bacilos latentes, podendo ocorrer em qualquer idade, embora seja mais frequente em adolescentes e jovens adultos. A TB miliar é a forma grave da doença e ocorre quando os bacilos estão disseminados na corrente sanguínea, causando lesões em diversos órgãos. Esse tipo de

tuberculose é mais comum em pacientes com HIV (BOMBARDA, et al., 2001; BRASIL, 2011).

Esta doença é de evolução crônica ou subaguda, sendo assim, os sintomas têm intensidade crescente e podem ser indolores; algumas vezes há diminuição destes sinais, causando uma sensação de bem-estar. Por conseguinte, os pacientes demoram até três meses para procurar auxílio médico. Os sintomas mais frequentes da tuberculose pulmonar são: tosse, hemoptise (expectoração de sangue provenientes do pulmão, traqueia e brônquios), dor torácica, rouquidão, dispneia (dificuldade para respirar), perda de peso, febre e sudorese (VERONESI, FOCACCIA, 2015).

1.2.2. Tratamento da tuberculose

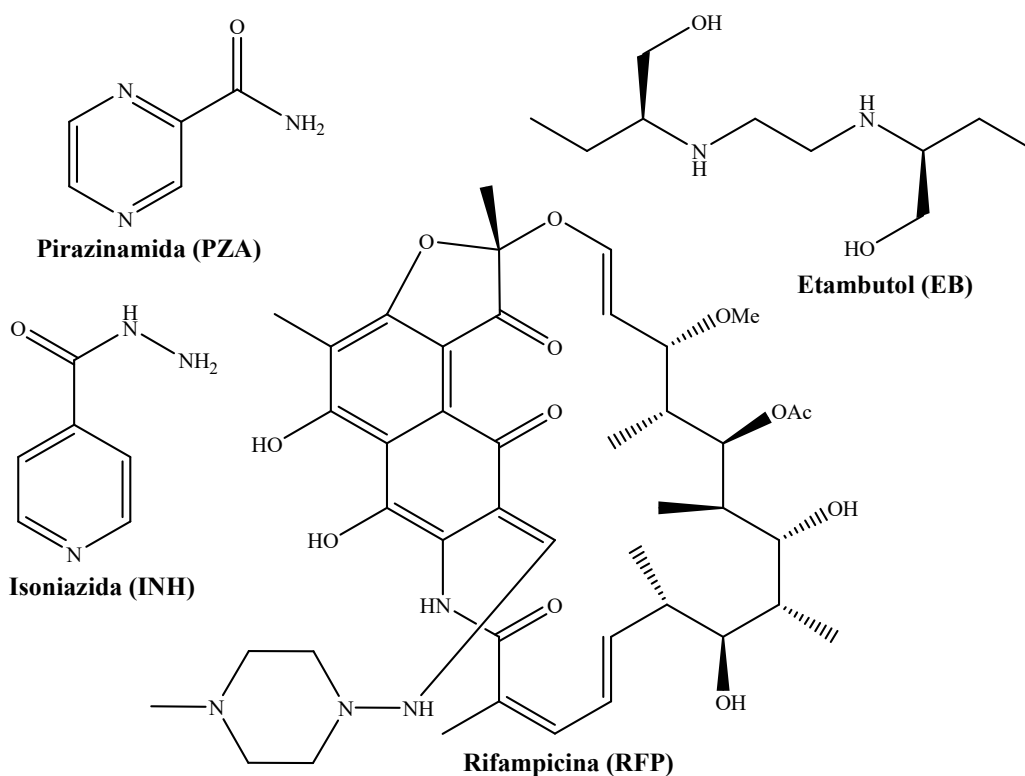
Um dos desafios para a quimioterapia moderna é o desenvolvimento de fármacos eficientes contra o *Mycobacterium tuberculosis*, uma vez que a bactéria desenvolve resistência espontânea para praticamente todos os medicamentos em uso, com mais de meio milhão de casos de TB resistente por ano (VIGANOR, et al., 2015; WHO, 2018b). O atual regime para o tratamento de adultos com TB utilizado no Brasil, consiste de uma fase intensiva de 2 meses com o esquema RHZE, que é uma combinação dos medicamentos rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E), seguido por uma fase de manutenção de 4 meses com esquema RH, ou seja, uma combinação de rifampicina e isoniazida (RABAHI, et al., 2017). Estes medicamentos são classificados como fármacos de primeira linha (Figura 08). Quando há resistência a estes medicamentos, são utilizados os fármacos de segunda linha, como o amicacina, capreomicina, ciprofloxacina, etionamida, ofloxacina, ácido p-aminosalicílico e protionamida (Figura 09). Eles são denominados desta forma, porque possuem eficácia limitada em relação aos primeiros, além de apresentarem efeitos colaterais severos ou não terem sido avaliados em diversos países (TIBERI, et al., 2017; OLIVEIRA, 2018).

O tratamento efetivo da tuberculose depende da combinação de vários fármacos por um período adequado. Devido à longa duração do tratamento e aos efeitos colaterais graves, muitos pacientes não tomam a medicação durante os seis meses, o que pode levar ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos. As linhagens resistentes podem ser classificadas como tuberculose multirresistente (MDR-TB), tuberculose extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB) e tuberculose totalmente resistente a fármacos (TDR-TB). A MDR-TB é uma forma da tuberculose que é resistente a isoniazida e

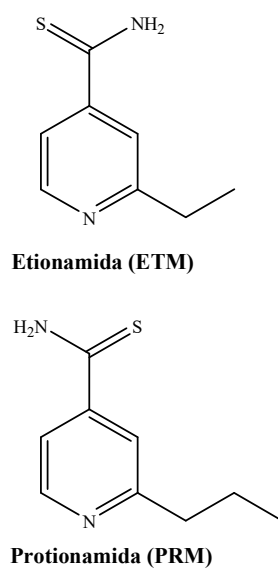
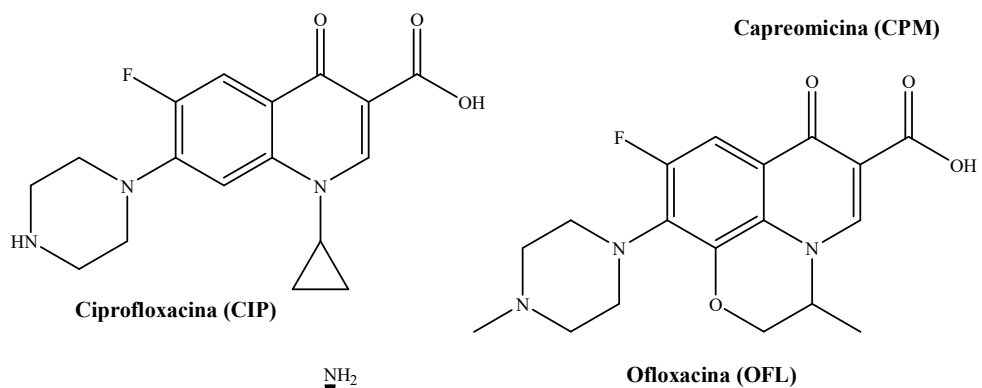
rifampicina; a XDR-TB é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniazida e rifampicina e pelo menos um fármaco injetável de segunda linha e a qualquer fluoroquinolona; a TDR-TB é ocasionada pelas micobactérias resistentes a todos os fármacos de primeira e segunda linha (HOAGLAND, et al., 2016; MISHRA, et al., 2017; TIBERI, et al., 2018).

Recentemente, dois novos medicamentos foram aprovados para o tratamento da tuberculose multirresistente, bedaquilina e delamanida (Figura 10). Em 2012, o FDA aprovou o uso da bedaquilina. Em 2014, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou o uso do delamanida. No entanto, ambos os medicamentos estão associados a efeitos colaterais graves e são recomendados apenas para pacientes que não tem outra opção de tratamento (BRIGDEN, HEWISON, VARAINE, 2015; HOAGLAND, et al., 2016; QUAN, et al., 2017).

Figura 08. Fármacos de primeira linha para o tratamento de tuberculose.

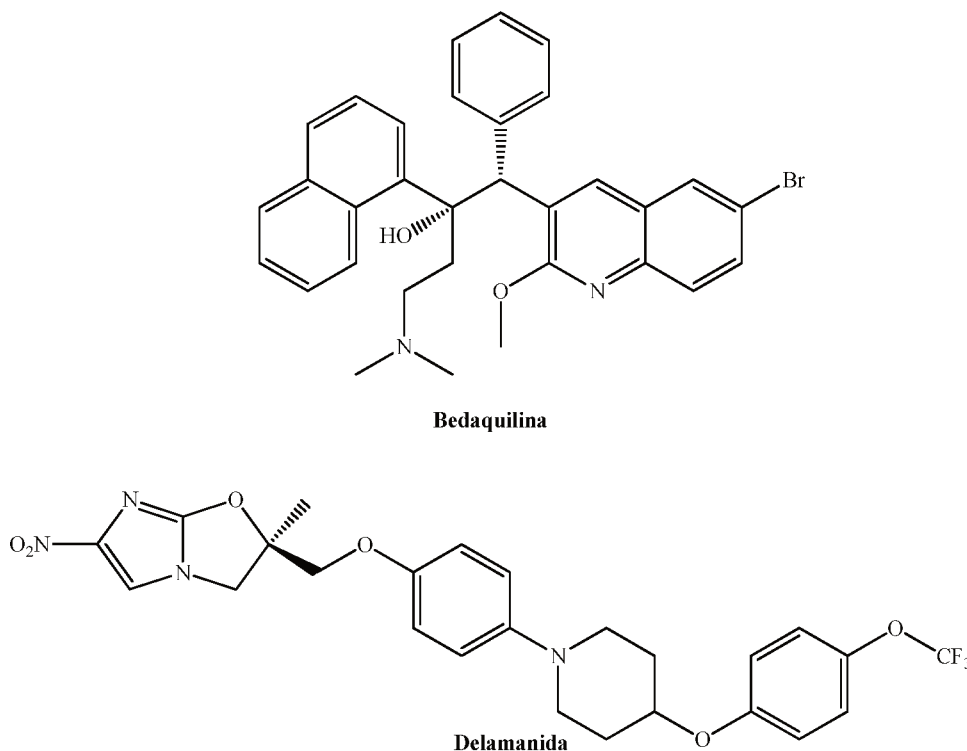


Fonte: A autora.



Fonte: A autora.

Figura 10. Estrutura dos fármacos bedaquilina e delamanida.



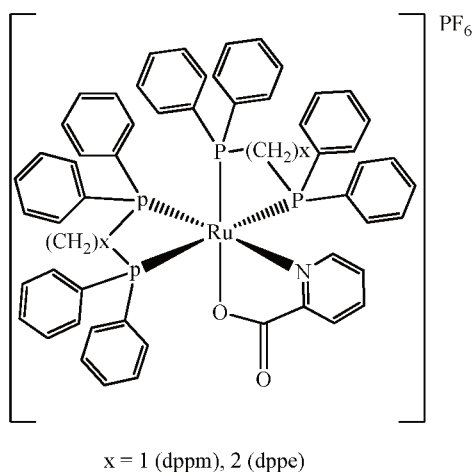
Fonte: A autora.

O tratamento para pacientes com tuberculose resistente a medicamentos é longo, podendo durar 24 meses ou mais e os efeitos colaterais são severos. Além disso, o tratamento é de alto custo e há baixa chance de cura. Assim, é evidente que os métodos atuais de tratamento e controle para tuberculose não são suficientes no que se refere a TB altamente resistente a fármacos (QUAN, et al., 2017). Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver novos medicamentos para tuberculose que sejam eficazes contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos, bem como estratégias para reduzir a duração dos regimes de tratamento. Neste sentido, complexos metálicos têm sido avaliados, como exemplo, complexos do tipo *cis*-[Ru(pic)(dppm)₂]PF₆ (**1**) e *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (**2**) (Figura 11), onde pic = 2-piridinacarboxilato, dppm = bis(difenilfosfina)metano e dppe = 1,2-bis(difenilfosfina)etano, foram sintetizados e avaliados contra *Mycobacterium tuberculosis*. Os compostos exibiram potente atividade antimicobacteriana, cujos valores de CIM foram de 0,69 e 0,22 µM para os complexos (**1**) e (**2**), respectivamente. Além disso, o complexo (**2**) foi mais ativo do que o fármaco de primeira linha, isoniazida (CIM = 0,36 µM) (PAVAN, et al., 2010).

Complexos de platina também parecem ser promissores contra *Mycobacterium tuberculosis*. Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA, et al., 2018) sintetizaram complexos do

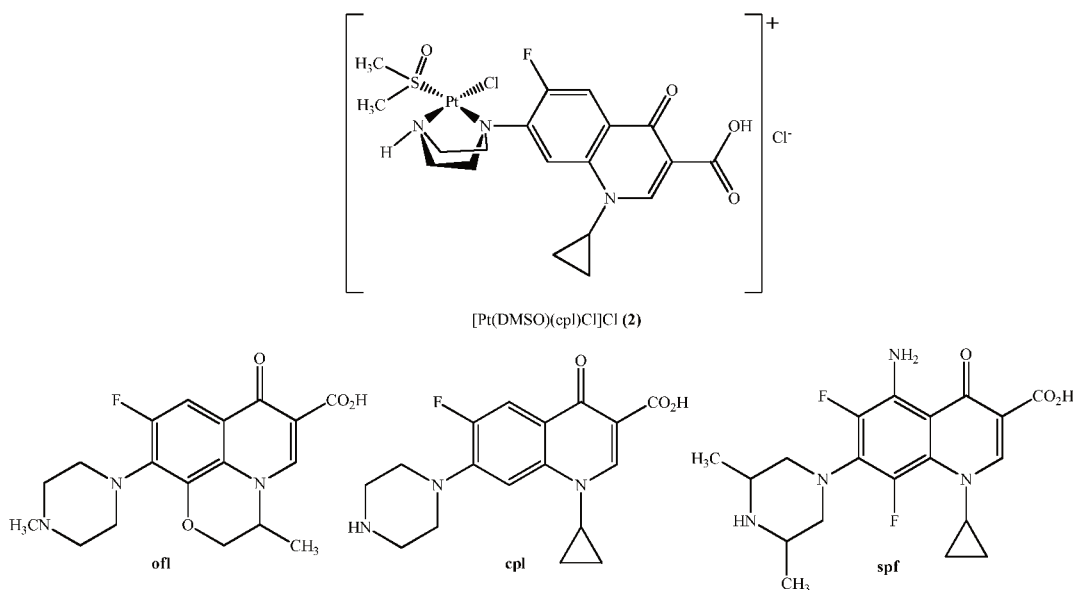
tipo $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{ofl})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**2**) e $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{spf})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**3**), onde ofl = ofloxacin, cpl = ciprofloxacina e spf = esparfloxacina (Figura 12), que exibiram potente atividade, com valores de CIM igual a 1,78 μM , 0,95 μM e 0,46 μM para os complexos **1**, **2** e **3**, respectivamente. Os complexos **2** e **3** exibiram atividade antimicobacteriana comparável ao fármaco de primeira linha isoniazida (CIM = 0,72 μM) e a amicacina (CIM = 0,75 μM), um fármaco de segunda linha e estreptomicina (CIM = 0,78 μM). Quanto às cepas resistentes, o complexo com esparfloxacina, $[\text{Pt}(\text{DMSO})(\text{spf})\text{Cl}]\text{Cl}$ exibiu o melhor potencial contra a maioria das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 11. Estrutura dos complexos $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.



Fonte: A autora.

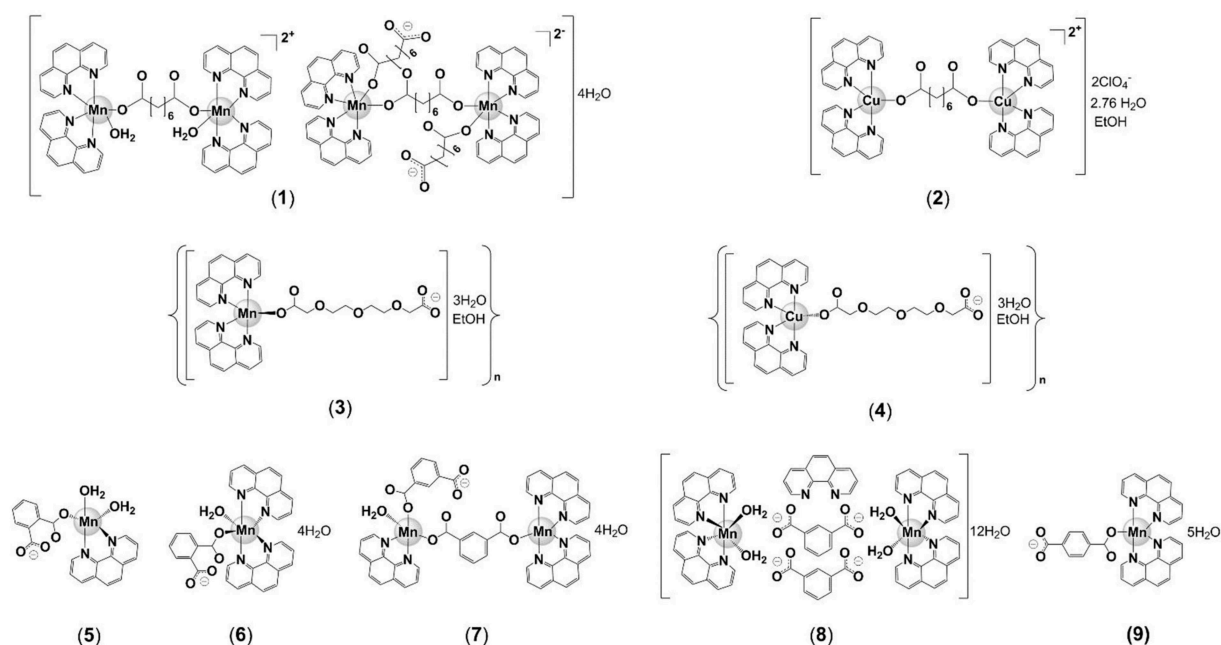
Figura 12. Estrutura proposta para o complexo $[\text{Pt}(\text{dmsO})(\text{cpl})\text{Cl}]\text{Cl}$ e estruturas dos ligantes ofloxacin (ofl), ciprofloxacina (cpl) e esparfloxacina (spf).



Fonte: A autora.

A atividade antimicobacteriana de complexos de manganês e cobre contendo ligantes dicarboxilatos e 1,10-fenantrolina foi avaliada contra as linhagens H37Rv e CDC1551 (Figura 13). Os estudos *in vitro* mostraram que os complexos de manganês foram mais ativos do que os complexos análogos de cobre(II) e do que os ligantes livres, com valores de CIM entre 0,19 e 3,41 μM . Os complexos de Mn(II) exibiram um significativo índice de seletividade de até 1347. A atividade citotóxica também foi avaliada contra a linhagem celular A549 (câncer de pulmão) e os complexos de cobre(II) foram mais ativos do que os complexos análogos de manganês e do que os ligantes livres, com valores de IC_{50} entre 0,98 e 1,06 μM . Já os complexos de Mn(II) apresentaram valores de IC_{50} maiores que 234 μM . A atividade antimicrobiana também foi avaliada e estudos *in vivo* utilizando larvas de *Galleria mellonella* indicaram que os complexos metálicos eram minimamente tóxicos para as larvas. Portanto, estes resultados indicam que os complexos de manganês são candidatos eficazes, seletivos e seguros para novos medicamentos para o tratamento da tuberculose (McCARRON, et al., 2018).

Figura 13. Complexos de manganês e cobre contendo ligantes dicarboxilatos e 1,10-fenantrolina.



Fonte: McCARRON, et al., 2018.

1.3. Cobre

O cobre é um metal de transição dútil, maleável, cuja configuração eletrônica é $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$. Quando combinado com outros elementos, apresenta número de oxidação +1, +2 e +3, sendo que o estado de oxidação +2 é o mais comum e o +3 bastante raro, ocorrendo em poucos compostos que geralmente são fortes agentes oxidantes. Em geral, sais de cobre +1 são insolúveis, diamagnéticos e de cor branca, enquanto que os sais de cobre +2 tendem a ser solúveis, paramagnéticos e coloridos (TISATO, et al., 2010; RODRIGUES, SILVA, GUERRA, 2012; SANTINI, et al., 2014). Complexos de cobre(II) podem apresentar geometrias bastante variadas, devido a configuração eletrônica do íon cobre(II), visto que a camada d incompleta possibilita a hibridização. As mais comuns são quadrado planar (NC = 4), bipirâmide trigonal ou pirâmide de base quadrada (NC = 5) e octaédrica distorcida ou tetragonal (NC = 6) (TISATO, et al., 2010; SANTINI, et al., 2014; PAIXÃO, 2019).

O cobre é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos aeróbios e importante para a função de várias enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo energético, respiração celular e síntese do ADN. É também um cofator em processos catalíticos mediados por enzimas como a citocromo oxidase, lisil oxidase, superóxido dismutase, tirosinase, dopamina β -monooxygenase, que são enzimas necessárias para a respiração mitocondrial, transporte de elétrons, síntese de colágeno, elastina, formação de melanina, biossíntese de catecolamina e sinalização celular. Além das funções essenciais do elemento nos meios biológicos, o íon cobre(II) também possui um papel importante na prevenção de anemia, doenças ósseas, danos celulares, entre outros. (MARZANO, et al., 2009; DENOYER, et al., 2015; NDAGI, MHLONGO, SOLIMAN, 2017).

O íon cobre(II) tem sido amplamente utilizado em compostos de coordenação, por ser bastante reativo, solúvel em solventes comuns e de fácil manuseio, além do baixo custo e grande disponibilidade e variedade de sais metálicos. Apesar disso, se não eficientemente coordenado, íons de cobre podem sofrer processo redox e provocar danos oxidativos a muitas biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas-chave e ADN (LOPES, et al., 2013, ALMEIDA, 2014).

1.3.1. Complexos de cobre(II) e a química medicinal

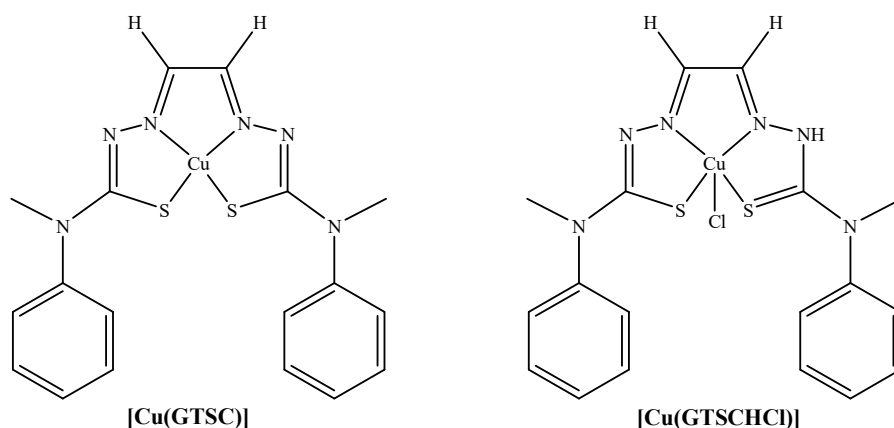
Devido à toxicidade apresentada por alguns fármacos atuais, uma alternativa seria o desenvolvimento de novos compostos baseados em metais essenciais encontrados

naturalmente no organismo, supondo serem menos tóxicos para células normais em relação às células cancerígenas. Portanto, o cobre é uma alternativa e os complexos de cobre estão sendo amplamente investigados. Efetivamente, estes compostos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena e anti-inflamatória. Além disso, pesquisas mostram que a coordenação ao íon cobre(II) aumenta consideravelmente a atividade biológica de vários tipos de fármacos, tais como agentes antitumorais e antiinflamatórios (GZIUT et al., 2013; CHANDRALEKA et al., 2014; DHAVEETHU et al., 2014; KONARIKOVA, et al., 2016; LIAN, et al., 2016; CHYLEWSKA, et al., 2018).

Complexos de cobre(II) com tiossemicarbazona derivada da glioxal-bis(4-metil-4-fenil-3-tiossemicarbazona) foram ativos em várias linhagens celulares tumorais e *in vivo*. Dentre estes, [Cu(GTSC)] e [Cu(GTSCl)] (Figura 14) apresentaram atividade citotóxica potente ($IC_{50} \leq 0,2 \mu M$) nas linhagens MCF-7 (câncer de mama), A-2780 (câncer de ovário) e HepG2 (câncer de fígado). Por fim, o complexo [Cu(GTSC)] exibiu uma excelente atividade antitumoral *in vivo*, em camundongos inoculados com células tumorais HCT116 (câncer colorretal) e foi obtido $95 \pm 3,9\%$ de inibição do crescimento do tumor (PALANIMUTHU, et al., 2013).

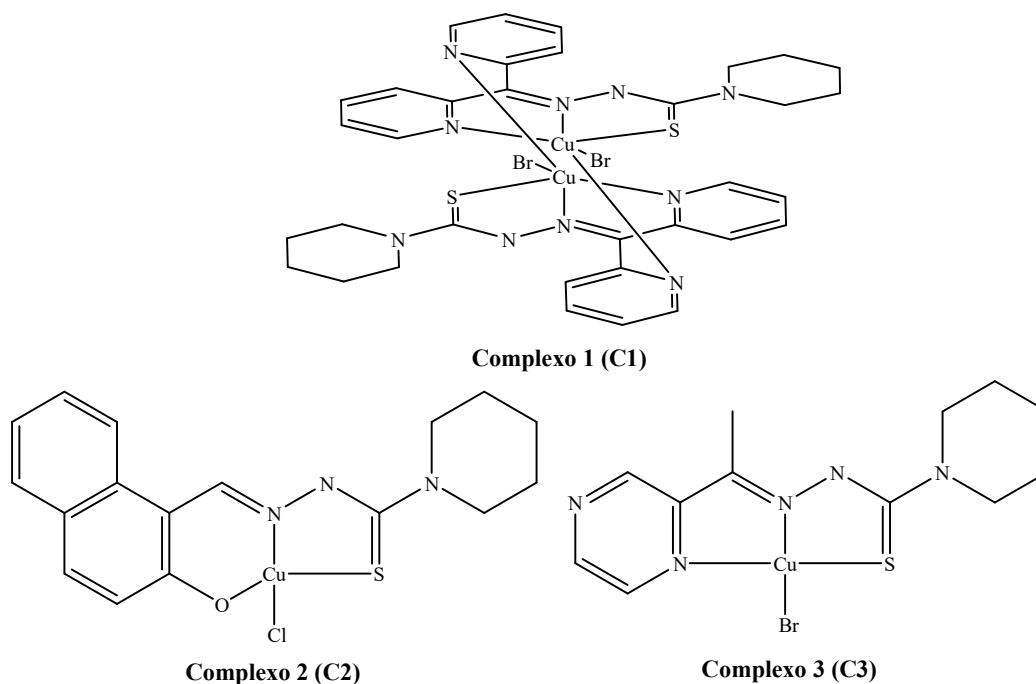
Três complexos de cobre(II) contendo *N'*-(di(piridin-2-il)metileno)piperidina-1-carbotiohidrazida, *N'*-((2-hidroxinaftalen-1-il)metileno)piperidina-1-carbotiohidrazida e *N'*-(1-(pirazin-2-il)etilideno)piperidina-1-carbotiohidrazida foram sintetizados (Figura 15). Estes compostos induziram a apoptose significativamente, promovendo atividade em concentrações nanomolares, nas linhagens celulares de câncer de bexiga (T-24), câncer cervical (HeLa), câncer de pulmão (NCI-H460) e câncer de fígado (BEL-7404). O complexo **1** (C1) apresentou valores de IC_{50} de 9,0 nM, 1,3 nM, 11,0 nM e 12,0 nM nas linhagens celulares HeLa, T-24, BEL-7404 e NCI-H460, respectivamente. Os complexos C2 e C3 obtiveram valores de IC_{50} menores que $0,1 \mu M$ para todas as linhagens analisadas. Em particular, a atividade antitumoral de C1 aumentou em mais de 150 vezes em relação ao ligante, o que mostra que os complexos de cobre têm vantagens significativas sobre os ligantes orgânicos (QI, et al., 2018).

Figura 14. Estrutura dos complexos [Cu(GTSC)] e [Cu(GTSCHCl)].



Fonte: A autora.

Figura 15. Estrutura dos complexos C1, C2 e C3.

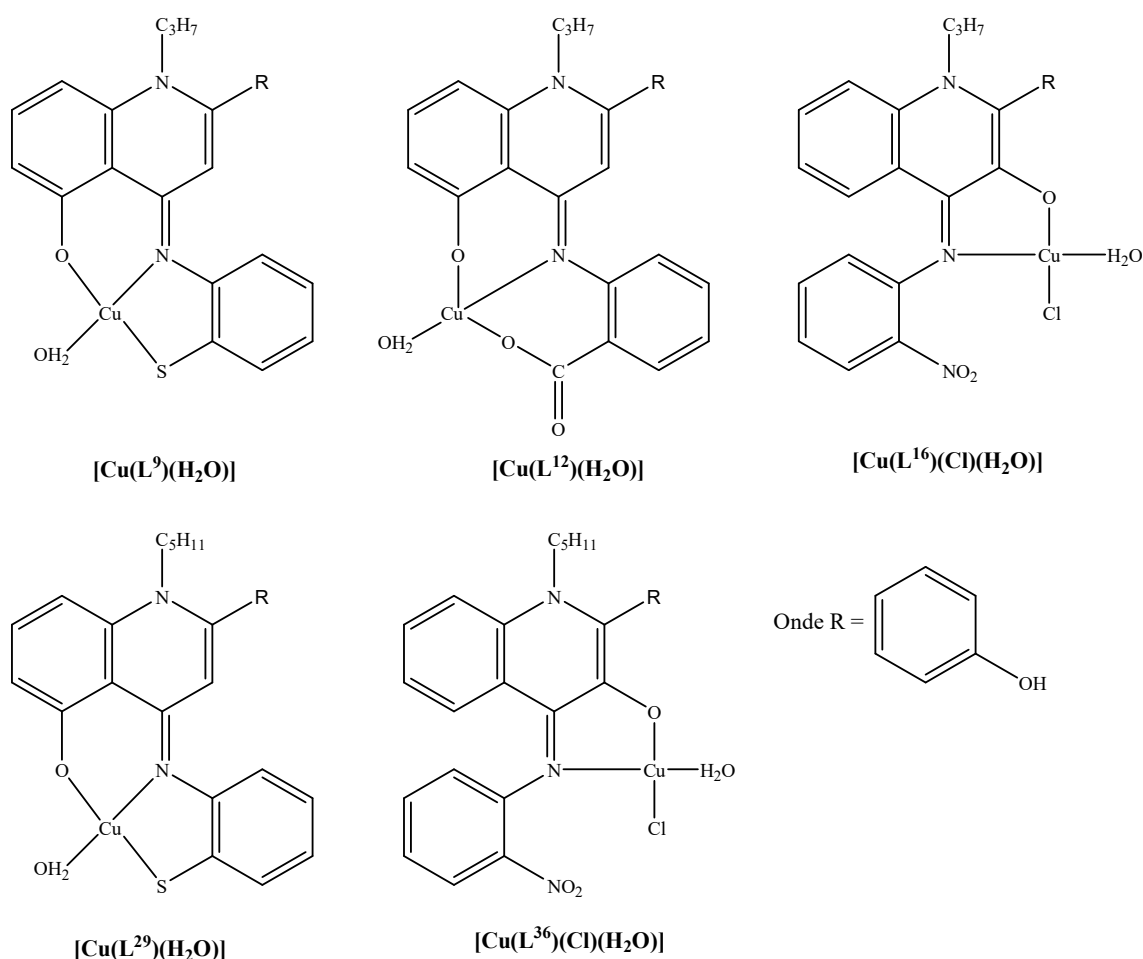


Fonte: A autora.

Complexos de cobre contendo derivados de hidroxiflavona exibiram boa atividade antimicobacteriana. Os complexos $[\text{Cu}(\text{L}^9)(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{Cu}(\text{L}^{12})(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{Cu}(\text{L}^{16})(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{Cu}(\text{L}^{29})(\text{H}_2\text{O})]$ e $[\text{Cu}(\text{L}^{36})(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]$ (Figura 16) apresentaram valores de CIM de $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,55 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,68 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (JOSEPH, NAGASHRI, SUMAN, 2016). Complexos de cobre(II) contendo as hidrazonas 2-piridinacarboxaldeido-isonicotinoil hidrazona (HPCIH) e 2-acetilpiridina-isonicotinoil hidrazona (HAPIH) foram testados nas linhagens celulares OVCAR-8 (câncer do ovário), SF-295 (glioblastoma multiforme) e HCT-116 (adenocarcinoma do cólon) e também contra

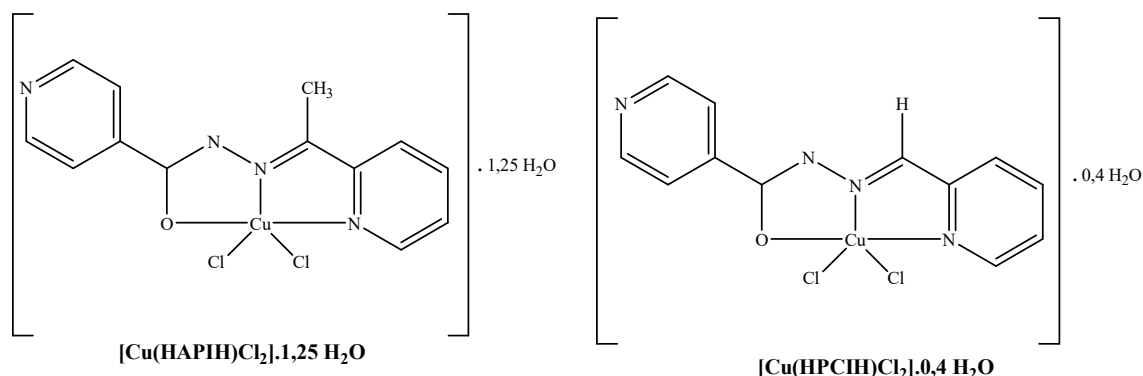
Mycobacterium tuberculosis. Os complexos $[\text{Cu}(\text{HPCIH})\text{Cl}_2] \cdot 0,4\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{HAPIH})\text{Cl}_2] \cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ (Figura 17) apresentaram CIM de $0,85 \mu\text{M}$ e $1,58 \mu\text{M}$ respectivamente, menor que o da isoniazida ($2,27 \mu\text{M}$) e dos ligantes livres. O complexo $[\text{Cu}(\text{HAPIH})\text{Cl}_2] \cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ também apresentou boa atividade citotóxica, com valores de IC_{50} de $0,39 \mu\text{M}$, $0,48 \mu\text{M}$, $0,86 \mu\text{M}$ para as linhagens HCT-116, OVCAR-8 e SF-295, respectivamente. Este complexo possui atividade antitumoral semelhante à doxorrubicina, fármaco utilizado no tratamento de câncer (FIRMINO, et al., 2016).

Figura 16. Complexos de cobre com derivados de hidroxiflavona.



Fonte: A autora.

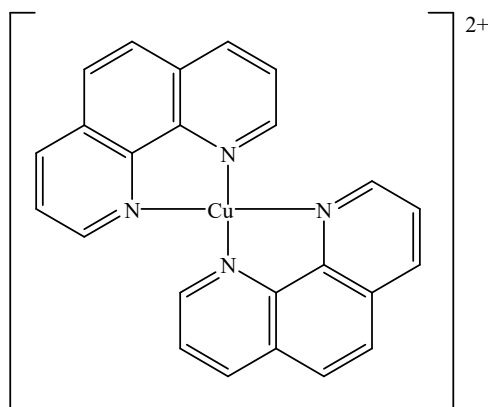
Figura 17. Complexos de cobre(II) contendo hidrazonas derivadas de isoniazida.



Fonte: A autora.

Complexos de cobre(II) contendo 1,10-fenantrolina também apresentam interessantes atividades farmacológicas, incluindo atividade antitumoral, antimicobacteriana, antimicrobiana e tripanocida (DEEGAN, et al., 2006; GARCÍA-GIMÉNEZ, et al., 2009; MANIKANDAMATHAVAN, et al., 2011; SILVA, et al., 2014; ALMEIDA, et al., 2015; FERREIRA, et al., 2016; KOSTELIDOU, et al., 2016; PAIXÃO, et al., 2017; OLIVEIRA, et al., 2017; McCARRON, et al., 2018; EREMINA, et al., 2019; PAIXÃO, et al., 2019). O grande número de complexos com fenantrolina se devem ao complexo $[Cu(phen)_2]^{+2}$ (Figura 18) que apresenta atividade nuclease, ou seja, é um composto capaz de clivar eficientemente o ADN (SIGMAN, et al., 1979). A atividade nuclease foi descoberta acidentalmente quando estudavam inibidores da polimerase I do ADN de *Escherichia coli* utilizando 1,10-fenantrolina, mas em vez disso observaram que o ADN foi clivado na presença de Cu(II) e então, os produtos da clivagem inibiram a enzima. Para exercer a atividade nuclease, o composto $[Cu(phen)_2]^{2+}$ é reduzido *in situ* originando a espécie $[Cu(phen)_2]^+$, que liga-se ao sulco menor do ADN, combina-se com o oxigênio molecular, levando à formação de espécies oxidantes que induzem a clivagem da fita do ADN pela abstração de um hidrogênio da desoxirribose (SILVA, et al., 2011; SILVA, 2013; WENDE, LÜDTKE, KULAK, 2014).

Figura 18. Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$.

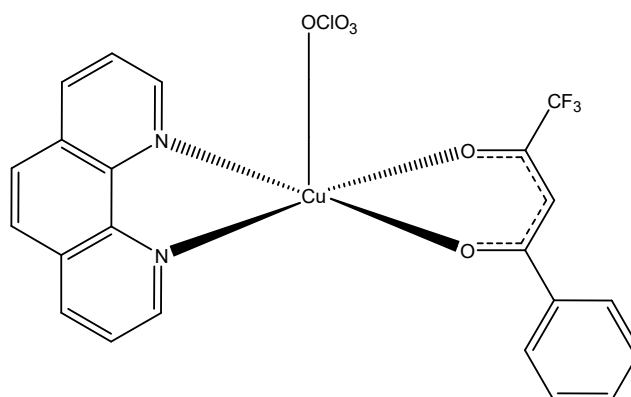


Fonte: A autora.

Portanto, complexos metálicos com o ligante 1,10-fenantrolina e derivados podem ser bons agentes antitumorais. Nesse aspecto, complexos de cobre foram sintetizados e avaliados quanto à atividade citotóxica e apresentaram resultados promissores na inibição do crescimento das células tumorais. Por exemplo, complexo de cobre do tipo $[\text{Cu}(\text{O-O})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$, no qual O-O = 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (Hbta) e N-N = 1,10-fenantrolina (phen), cujo nome genérico é CBP-01 (Figura 19) apresentou atividade antitumoral contra as linhagens celulares sarcoma 180 e C2C12 (células de mioblastos de murino), com valores de IC_{50} de 7,4 μM e 26,4 μM , respectivamente. Esse composto exibiu seletividade para a célula tumoral testada *in vitro* ($\text{IS} > 3$). Além disso, o CBP-01 apresentou maior citotoxicidade contra células do sarcoma 180 que a mitomicina C ($\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$), um composto antitumoral conhecido (ALMEIDA, et al., 2015; POLLONI, et al., 2019).

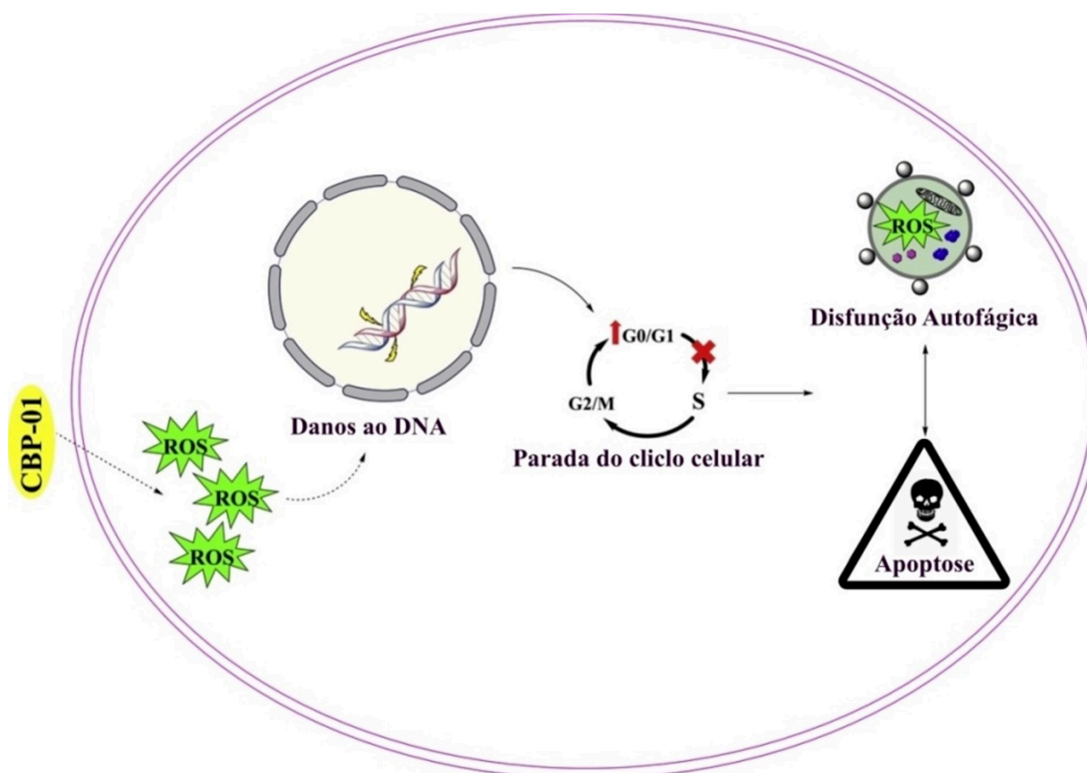
O mecanismo de ação (Figura 20) desse composto pode ser atribuído ao seu estado redox que provocou um aumento significativo dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS). O excesso de ROS gerado pode estar associado à capacidade do CBP-01 de induzir danos ao ADN, causando a parada do ciclo celular, portanto, as células se acumularam no ponto de controle G0/G1 com consequente diminuição do número de células nas fases S e G2/M. Em resposta ao estresse oxidativo, a autofagia foi induzida para reduzir os níveis intracelulares de ROS a fim de proteger as células. Contudo, as espécies reativas de oxigênio atingiram níveis que não poderiam ser neutralizados por mecanismos de proteção celular e isso pode ter acarretado em uma disfunção autofágica resultando em apoptose ou morte celular autofágica (POLLONI, et al., 2019).

Figura 19. Estrutura do composto CBP-01.



Fonte: A autora.

Figura 20. Mecanismo de ação do complexo CBP-01.

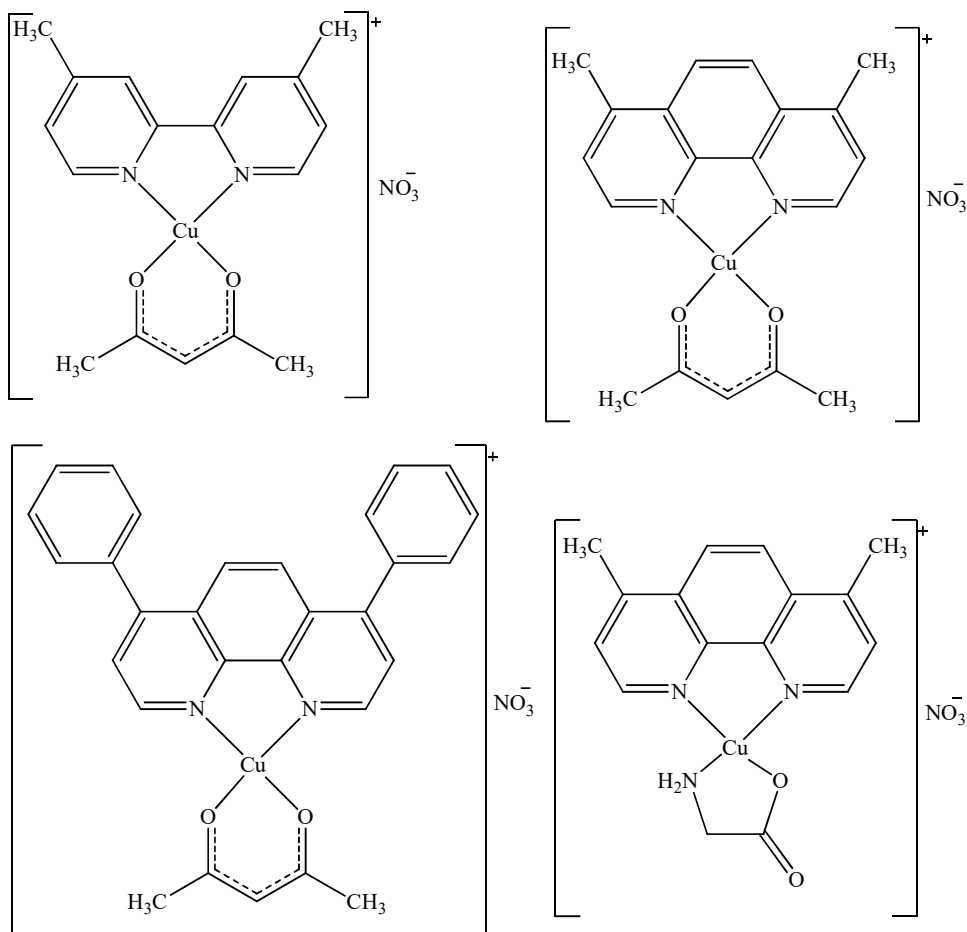


Fonte: Adaptado de POLLONI, et al., 2019.

Uma das classes mais promissoras de complexos de Cu(II) são as Casiopéinas®, que são uma mistura de quelatos de cobre (II) de fórmula geral $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ ou $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$, onde N-N = 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina e derivados, N-O = α -aminoácido ou peptídeo e O-O = acetilacetato ou o salicilaldeído (Figura 21). As Casiopéinas® foram avaliadas *in vitro* e *in vivo* e apresentaram atividades antiproliferativas, citotóxicas, citostáticas, genotóxicas e antitumorais, com resultados promissores. O mecanismo de ação

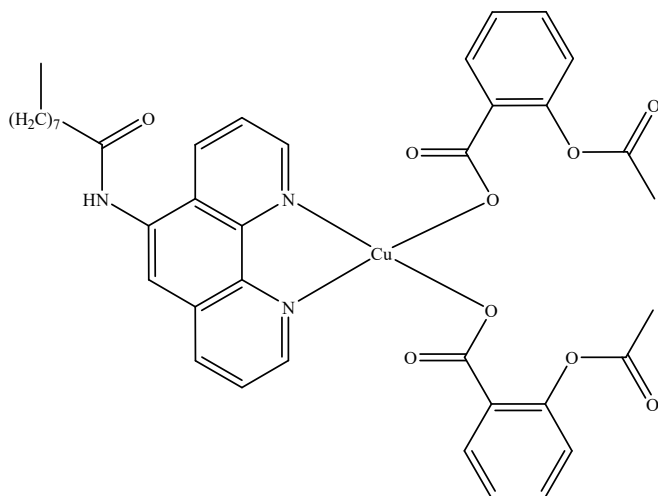
dessa classe ainda não foi completamente esclarecido, mas evidências sugerem que esses compostos são capazes de inibir a proliferação celular causando morte celular por apoptose através de espécies reativas do oxigênio (ROS), toxicidade mitocondrial ou interação direta com o ADN (KACHADOURIAN, et al., 2010; RUIZ-AZUARA, BRAVO-GÓMEZ, 2010; SERMENT-GUERRERO, et al., 2017).

Figura 21. Estruturas das Casiopeínas®.



Fonte: A autora.

O complexo de cobre(II) contendo *N*-(1,10-fenantrolin-5-il)-nonanamida e aspirina possui potente atividade citotóxica. O composto CuLA (Figura 22) inibiu as células cancerígenas e apresentou excelente citotoxicidade, capacidade anti-inflamatória e de clivagem do ADN. Este composto promove a apoptose precoce nas células SKOV-3 (câncer de ovário). Os resultados demonstram que CuLA inibiu a proliferação das células cancerígenas envolvendo danos no ADN e disfunção mitocondrial. Particularmente, o CuLA é altamente citotóxico contra as células SKOV-3, apresentando IC₅₀ igual a 1,1 µM, valor menor que o da cisplatina (IC₅₀ = 7,08 µM) (SHI, et al., 2019).

Figura 22. Estrutura do complexo CuLA.

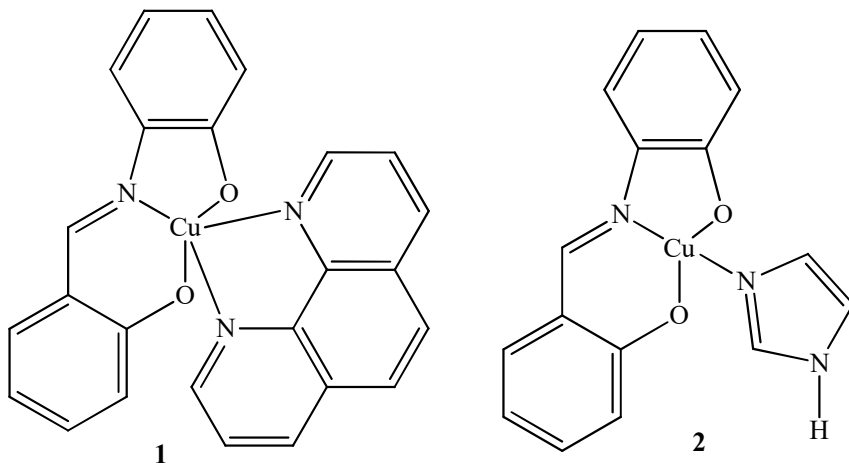
Fonte: A autora.

Complexos de cobre(II) com derivados nitroaromáticos de bases Schiff, imidazol e 1,10-fenantrolina do tipo [CuL(o-phen)] **1** e [CuL(Imz)] **2** (Figura 23), onde o-phen = 1,10-fenantrolina e Imz = imidazol foram sintetizados e possuem atividade antitumoral com resultados promissores. Os complexos **1** e **2** foram avaliados contra as linhagens celulares A549 (câncer de pulmão) com valores de IC_{50} iguais a 0,67 e 0,59 μM , respectivamente e MCF7 (câncer de mama) com valores de IC_{50} iguais a 6,30 e 8,88 μM , respectivamente. Para a linha celular A549, ambos os complexos apresentaram boa atividade em relação à cisplatina ($IC_{50} = 4,13 \mu M$). Por outro lado, para a linha celular MCF7 os valores de IC_{50} para os complexos são ligeiramente superiores ao relatado para a cisplatina ($IC_{50} = 3,92 \mu M$) e muito inferiores ao relatado para a carboplatina ($IC_{50} = 36,65 \mu M$). Os complexos **1** e **2** apresentaram baixa toxicidade quando testados na linhagem L132 (células normais do pulmão), com valores de IS igual a 11,3 e 15,2, respectivamente (KOLEY, et al., 2018).

Dois complexos de cobre(II) solúveis em água contendo 4-aminoantipirina e ligantes *N,N*-doadores (1,10-fenantrolina ou 2,2'-bipiridina) foram sintetizados e avaliados contra uma linhagem celular tumoral de leucemia mielóide crônica (K562) (Figura 24). A capacidade dos complexos de clivar o ADN através de um mecanismo oxidativo está relacionada com o ligante *N,N*-doador presente. Os compostos induzem dano oxidativo ao ADN pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ambos os complexos inibem o crescimento de células K562 com valores de IC_{50} inferiores aos ligantes livres correspondentes. O complexo com 1,10-fenantrolina possui um valor de IC_{50} de 1,8 μM . Por outro lado, o complexo contendo 2,2'-bipiridina teve um efeito significativamente menor na mesma linha celular ($IC_{50} = 26 \mu M$). Significativamente, o complexo mais citotóxico (com 1,10-fenantrolina) apresentou alta

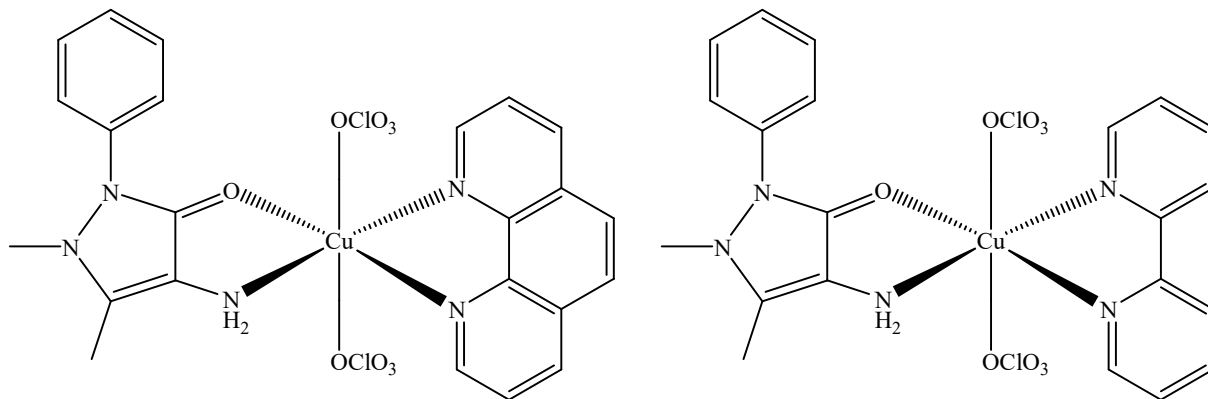
atividade nucleolítica *in vitro* por gerar quebras de fitas simples e duplas, além de inibir fortemente a atividade enzimática da topoisomerase I em concentração micromolar. (SOUZA, et al., 2019).

Figura 23. Estruturas dos [CuL(o-phen)] **1** e [CuL(Imz)] **2**.



Fonte: A autora.

Figura 24. Complexos de Cu(II) contendo 4-aminoantipirina e ligantes *N,N*-doadores.



Fonte: A autora.

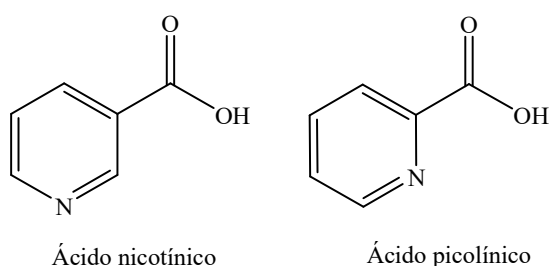
1.4. Ácidos hidroxipiridinacarboxílicos

Os ácidos hidroxipiridinacarboxílicos e seus derivados estão presentes em muitos produtos naturais e muitas vezes são interessantes para a química medicinal, devido à grande variedade de propriedades biológicas (KISS, et al., 2000; BARBOSA, et al., 2015). Por exemplo, o ácido picolínico (Figura 25) é um metabólito do aminoácido triptofano e auxilia na absorção de íons zinco(II) através da membrana intestinal. Este ácido também é um suplemento alimentar aprovado. Além disso, Chromax® é o nome comercial do complexo

$\text{Cr}(\text{pic})_3$, que atualmente está sendo usado como aditivo alimentar e tem demonstrado auxiliar os pacientes diabéticos na manutenção do controle glicêmico (FENG, TSANGARIS, BARTON, 1990; ROSAS, et al., 2010).

Outro exemplo é o ácido nicotínico (Figura 25), também conhecido como Niacina ou vitamina B₃ que é um fármaco modulador lipídico de amplo espectro que aumenta os níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e diminui os níveis de triglicérides, diminuindo assim as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Por conseguinte, o ácido nicotínico foi o primeiro fármaco redutor de colesterol que também demonstrou diminuir os eventos cardiovasculares e a mortalidade cardiovascular. Estes efeitos modificadores de lipídeos são acompanhados por efeitos antiateroscleróticos, e, portanto o ácido nicotínico também tem sido usado há décadas para prevenir e tratar a aterosclerose (LUKASOVA, et al., 2011; JULIUS, FISCHER, 2013).

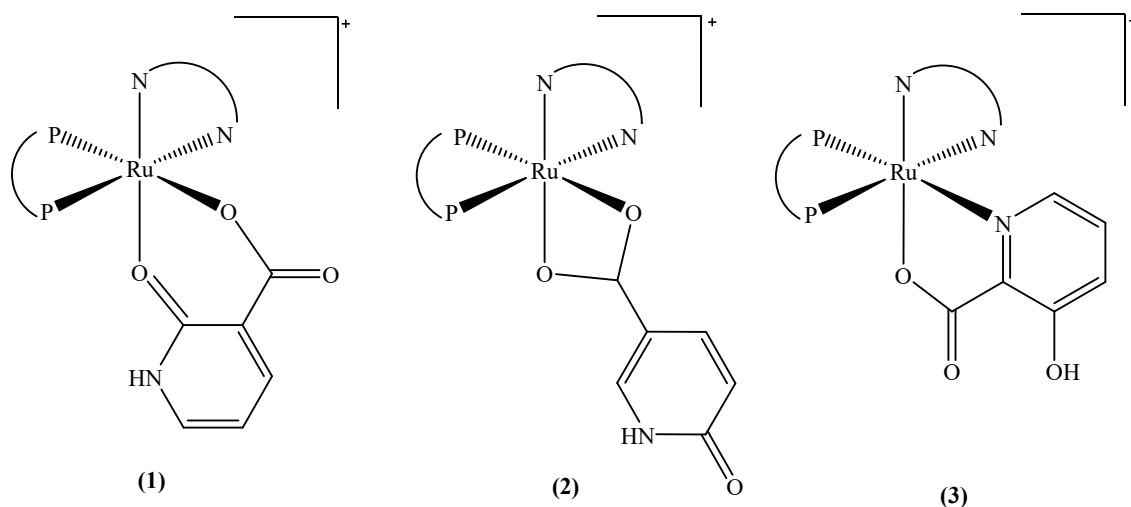
Figura 25. Ácido nicotínico e ácido picolínico.



Fonte: A autora.

Os complexos $[\text{Ru}(2\text{-OHnic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (1), $[\text{Ru}(6\text{-OHnic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (2) e $[\text{Ru}(3\text{-OHpic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (3) (Figura 26) com os ligantes desprotonados ácido 2-hidroxinicotínico (2-OHnicH), ácido 6-hidroxinicotínico (6-OHnicH) e ácido 3-hidroxipicolínico (3-OHpicH) foram avaliados contra *Mycobacterium tuberculosis* e contra a linhagem celular VERO CCL-81. Todos os compostos sintetizados exibiram boa atividade antimicobacteriana e ausência de toxicidade, indicando um bom índice de seletividade. Os compostos exibiram valores de CIM igual a 0,4 μM , 6,4 μM e 3,2 μM para os complexos 1, 2 e 3, respectivamente. Todos os compostos foram mais ativos que os ligantes livres. Os complexos 1 e 3 apresentaram atividade *in vitro* mais potente que o etambutol (CIM = 5,6 μM), sendo o complexo 1 mais ativo que a gatifloxacina (CIM = 0,9 μM). O complexo 1 também mostrou atividade bastante semelhante ao medicamento isoniazida (CIM = 0,4 μM), fármaco de primeira linha no tratamento da tuberculose (BARBOSA, et al., 2015).

Figura 26. Complexos de rutênio(II) com 2-OHnicH, 6-OHnicH e 3-OHpichH.

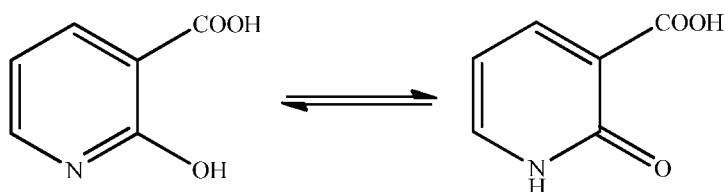


Fonte: A autora.

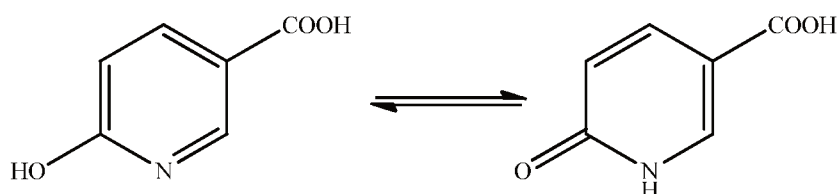
Estes ácidos foram considerados agentes quelantes úteis no tratamento de vários distúrbios, incluindo a doença de Alzheimer. Além disso, parecem apresentar baixa toxicidade. Devido a estas propriedades promissoras, é cabível o estudo de derivados de ácidos hidroxipiridinacarboxílicos. Por exemplo, o ácido 3-hidroxi-4-piridinocarboxílico, foi relatado como antiinflamatório não tóxico, aliás, alguns derivados exibem efeitos tóxicos insignificantes ($IC_{50} > 0,1 \text{ mM}$) para linhagens de células de câncer e células humanas primárias, após uma exposição por três dias (DI MARCO, et al., 2004; DI MARCO, et al., 2006; DEAN, et al., 2011; BRUN, et al., 2013; DEAN, et al., 2014).

Os ligantes multidentados, hidroxipiridinacarboxílicos, contém três grupos funcionais: átomo de nitrogênio piridínico, dois átomos de oxigênio do grupo carboxila e um átomo de oxigênio do grupo hidroxila, levando à formação de complexos com várias possibilidades de estruturas, devido aos diferentes modos de coordenação. Os ligantes 2-hidroxinicotínico (2-HNA) e 6-hidroxinicotínico (6-HNA) apresentam tautomerismo (Figura 27), tanto no estado sólido quanto em solução, devido à mobilidade do átomo de hidrogênio do grupo OH, que está próximo do átomo de nitrogênio básico. Portanto pode ser facilmente transferido. Um tautomerismo semelhante ocorre também no ácido 2-mercaptonicotínico (2-MNA) (Figura 27). Os diferentes modos de coordenação destas moléculas incluindo monodentado, em ponte, quelatos N,O e O,O, além de quelatos O,S e N,S referente ao ligante 2-MNA, podem resultar em uma grande diversidade de compostos de coordenação (QUINTAL, et al., 2002; YUE, et al., 2007; MIKLOVIC, et al., 2008; BARBOSA, et al., 2015; SINGH, et al., 2017).

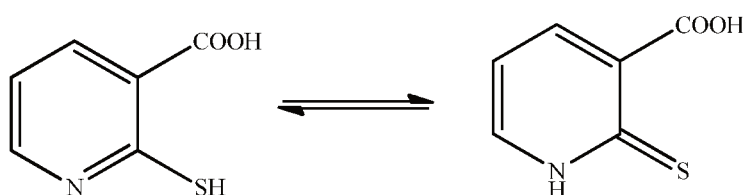
Figura 27. Equilíbrio tautomérico que ocorre em 2-HNA, 6-HNA e 2-MNA.



Tautomerismo enol-ceto de 2-HNA



Tautomerismo enol-ceto de 6-HNA



Tautomerismo tiol-tiona de 2-MNA

Fonte: A autora.

Apesar das extensas pesquisas realizadas nos últimos anos, poucos novos medicamentos foram aprovados para testes clínicos e, além disso, ainda há limitações dos fármacos utilizados atualmente, devido aos efeitos colaterais graves e a resistência celular intrínseca ou adquirida. Portanto, há necessidade de obter complexos metálicos como potenciais agentes antitumorais e antimicobacterianos que apresentam baixa toxicidade, efeitos colaterais brandos e que possuam atividade em linhagens celulares resistentes aos medicamentos utilizados na clínica médica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade citotóxica e antimicobacteriana de novos complexos de cobre(II) contendo ácidos hidroxipiridinacarboxílicos e ligantes *N,N*-doadores.

2.2. Objetivos específicos

- i) Sintetizar e caracterizar novos complexos de cobre(II) contendo os ácidos 2-mercaptonicotínico, 3-hidroxipicolínico, 6-hidroxipicolínico, 2-hidroxinicotínico, 6-hidroxinicotínico, quináldico e ligantes *N,N*-doadores, a saber, 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina.
- ii) Caracterizar os complexos sintetizados por análise elementar e condutimétrica, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e na região do infravermelho (IV), reflectância difusa, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), e espectrometria de massas em alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS).
- iii) Avaliar a estabilidade por espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis.
- iv) Avaliar a atividade citotóxica in vitro (IC_{50}) destes complexos e de seus respectivos ligantes, em células tumorais e normais.
- v) Realizar estudos de interação com o ADN para alguns compostos selecionados.
- vi) Avaliar a atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis* destes complexos e de seus respectivos ligantes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e solventes

Todos os sais metálicos e ligantes empregados neste trabalho foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich). Os solventes utilizados foram adquiridos de diferentes fontes e possuíam grau de pureza analítico sendo utilizados sem tratamento prévio.

3.2. Métodos Instrumentais

3.2.1. Análise Elementar (CHNS)

As porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presentes nas amostras foram determinadas utilizando um analisador CHNS/O, modelo 2400 (serie 2) da Perkin-Elmer.

3.2.2. Análise Condutimétrica

As medidas de condutividade molar dos complexos foram realizadas à temperatura ambiente utilizando-se um condutivímetro modelo Tec-4MP da Tecnal com constante de célula igual a $1,196 \text{ cm}^{-1}$. As soluções ($1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$) foram preparadas em dimetilformamida, dimetilsulfóxido e etanol, grau espectroscópico. A condutividade dos solventes puros foi de 6,49, 1,49 e $0,92 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, respectivamente.

3.2.3. Espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis e reflectância difusa

Para analisar a absorção dos compostos na região do ultravioleta-visível foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu UV-2501 PC. As análises no estado sólido foram realizadas utilizando o acessório de reflectância difusa e o sulfato de bário como referência. Os espectros em solução foram realizados em concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ utilizando os solventes acetonitrila e DMF.

3.2.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho para os compostos foram obtidos em um espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range-MIR da Perkin-Elmer. Esta análise foi realizada no estado sólido dos complexos e ligantes e com o uso do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, na região entre 4000 e 220 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de RPE foram realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em parceria com a Prof^a Dr^a Ana Maria da Costa Ferreira. O equipamento utilizado foi o espectrômetro da Bruker, modelo EMX, operando na banda X ($\nu = 9,50 \text{ GHz}$) com potência de 20 mW e modulação de frequência de 100 kHz a baixa temperatura (77K). Esta análise foi realizada no estado sólido e em soluções de acetonitrila congeladas em tubos de quartzo da marca Wilmad. DPPH (α, α' -difenil- β -picrilhidrazil; $g = 2,0036$) foi usado como calibrador de frequência para todas as amostras. Os espectros foram usualmente interpretados através de simulações utilizando o pacote EasySpin (STOLL, SCHWEIGER, 2006), do software Matlab R2015a.

3.2.6. Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray* (HRESIMS)

Os espectros de massas foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e o Prof. Dr. Marcos Pivatto (IQ-UFU). O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI). Os compostos foram solubilizados em metanol e injetados utilizando seringa (100 μL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os espectros foram obtidos no modo positivo e os valores de m/z teóricos para os complexos carregados foram calculados no software ChemDraw Ultra 12.0.

3.3. Estudos biológicos

3.3.1. Estudo de atividade citotóxica

Os testes para as células MDA-MB-231, MCF-10A foram realizados no Instituto de Biotecnologia da UFU, em colaboração com a Prof^a Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues. Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano metastático (MDA-MB-231) e células de mama não tumorigênica (MCF-10A) obtidas do “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em garrafas de cultura e mantidas em estufa à 37 °C e 5% CO₂. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura IMDM (Sigma, Brasil) suplementado com 10% SFB, 25mM de HEPES e gentamicina. Células MCF-10A foram mantidas em meio F12 DMEM (Sigma, Brasil), suplementado com 50 µL de EGF a (200 µg mL⁻¹), 250 µL de hidrocortisona a (1 mg mL⁻¹), insulina 10 ug mL⁻¹ (Invitrogen, Brasil), 0,1% de penicilina/estreptomicina, 50 µL de toxina colérica a (1 mg mL⁻¹) e 10% de SFB. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT conforme proposto por Mosmann (1983), com as devidas modificações efetuadas por Sieuwerst et al. (1995). Para verificar a citotoxicidade dos complexos de cobre(II) foram utilizadas as linhagens MCF-10A e MDA-MB-231, onde 3×10^4 células mL⁻¹ foram adicionadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa à 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos **IV-XIV** e seus ligantes (diluição seriada de 100 µM a 1,5625 µM) por 24 h à 37 °C e 5% CO₂. Ao término do tempo de tratamento foi adicionado 10 µL do reagente colorimétrico MTT (5 mg mL⁻¹), e após 4 h de incubação foi adicionado 100 µL de SDS 10% HCl por poço. Após 18 h, foi realizada a leitura das absorbâncias a 570 nm.

Os testes para a célula K562 foram realizados no Departamento de Química da UFMG, em colaboração com a Profa Dra. Elene Cristina Pereira Maia. As células tumorais foram adquiridas em um Banco de células do Rio de Janeiro (número CR083 do acervo do BCRJ). Para realizar este teste as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB, São Paulo, Brasil) a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As culturas cresceram exponencialmente de 10⁵ células mL⁻¹ para cerca de 8×10^5 células mL⁻¹ em três dias. A viabilidade celular foi verificada por exclusão, utilizando corante azul de tripan (que cora somente as células mortas), e o número de células viáveis foram determinadas em um contador de partículas (modelo 22, série AK32252 da BECKMAN COULTER). Para o estudo

citotóxico, 1×10^5 células mL^{-1} foram incubadas por 72h na ausência e presença de diferentes concentrações dos compostos testados (complexos e ligantes livres). A sensibilidade para os compostos foi avaliada pela concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, (IC_{50}). Soluções estoque foram preparadas em DMSO e diluídas com o intuito de obter a concentração ideal para ser utilizada nos ensaios citotóxicos. A concentração final de DMSO nos experimentos foi inferior a 0,5% e foi verificado que nessas condições o solvente não tem nenhum efeito sobre a viabilidade ou o crescimento celular.

Os testes para as células MRC-5 e A549 foram realizados no Departamento de Ciências Biológicas da UNESP, em colaboração com o Prof Dr. Fernando Rogério Pavan. Linhagem celular de fibroblastos pulmonares normais (MRC-5) e células de adenocarcinoma de pulmão (A549) obtidas do “American Type Culture Collection” (Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina (100 U/mL)-estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$). As células foram mantidas num ambiente umidificado à 37 °C contendo 5% de CO_2 e sub-cultivadas duas vezes por semana. Um ensaio de redução da resazurina foi usado para investigar a citotoxicidade de vários complexos para as linhagens celulares MRC-5 e A549. O ensaio baseia-se na redução do corante indicador, resazurina, para a resorufina que é altamente fluorescente para células viáveis. Células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica para reduzir a resazurina e, portanto, não produzem sinal fluorescente. Resumidamente, as células foram destacadas por tratamento com 0,25% tripsina/EDTA (VitroCell, Brasil) e $2,5 \times 10^4$ células foram adicionadas em placas de 96 poços em um volume total de 100 μL . As células foram tratadas com diferentes concentrações de complexos. Após 24 h ou 72 h de incubação na presença dos compostos, o meio foi removido e adicionou-se 50 μL de resazurina 0,01 % m/v em meio DMEM por poço a 37 °C por 3 h. A fluorescência foi medida no leitor de placas Biotek Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT) usando um comprimento de onda de excitação de 530 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. As células não tratadas constituíram o controle negativo (células viáveis), e células tratadas com doxorrubicina a 100 nmol constituíram o controle positivo (controle de morte). Todos os testes foram realizados em três ensaios independentes. Foi feito um teste em placas sem células para verificar se a reação não pode ocorrer entre os compostos e o reagente para evitar resultados falso-positivos (dados não mostrados). Os valores de IC_{50} representam as concentrações de amostras necessárias para inibir 50% da proliferação celular e foram calculados a partir de uma curva de calibração por curvas de regressão utilizando o Microsoft Excel.

3.3.2. Estudo de atividade antituberculose

Os estudos de atividade antituberculose foram realizados na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Araraquara, em colaboração com o Prof. Dr. Fernando R. Pavan.

A atividade antituberculose dos compostos foi determinada pelo método REMA (ensaio de microplaca com resazurina) (PALOMINO, et al., 2002). As soluções estoque dos compostos testados foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco®), suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC) para obtenção de concentrações finais de 0,098-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A rifampicina (Sigma-Aldrich®) é um antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose e foi utilizada como controle no experimento (concentração inicial de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, 100 μL da solução bacteriana previamente ajustada em 5×10^5 unidades de formação de colônias por mL em caldo Middlebrook 7H9 (Difco®) suplementado com (OADC) foram adicionados em 100 μL da solução dos compostos em placas de 96 poços (Kasvi®). As culturas foram incubadas durante 7 dias a 37 °C e foram adicionados 30 μL de solução de resazurina (Sigma-Aldrich) (0,01% em água) em cada poço. Após 24 h foi feita a leitura para alteração de cor e de fluorescência (excitação/emissão de 530 e 590 nm respectivamente) utilizando o equipamento Cytation 3 (Biotek®). A CIM (concentração inibitória mínima) foi definida como a menor concentração resultando em 90% de inibição do crescimento de *M. tuberculosis*.

3.3.3. Interação com ADN

Os estudos de interação com ADN foram realizados na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Araraquara, em colaboração com o Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto e Dra. Mariete Barbosa Moreira.

A solução de ADN de timo de bezerro (ct-ADN) usada no experimento foi preparada em tampão Tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M e NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M em pH = 7,3. A razão entre as bandas de absorção de 260 e 280 nm foi encontrada na faixa de 1,8-1,9 indicando que o ct-ADN estava livre de proteínas. A concentração de ADN foi determinada espectrofotometricamente usando o coeficiente de absorção molar de 6600 $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ em 260 nm (RIBEIRO, et al., 2019).

Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para amostras de ADN na presença de quantidades crescentes de complexo. As medidas foram registradas usando uma célula de quartzo padrão de 10 mm de comprimento em um espectropolarímetro JASCO (J-

815) de 235 a 320 nm, com acúmulo de 5 varreduras no modo de varredura contínua e velocidade de varredura de 100 nm/min a 298 K. A concentração da solução de ADN no tampão Tris-HCl foi mantida constante em todas as amostras ($5,0 \times 10^{-5}$ M), enquanto que a solução dos complexos, preparada recentemente em DMSO ($1,0 \times 10^{-3}$ M), variou de 0 a $2,0 \times 10^{-5}$ M para atingir a razão molar complexo/ADN de 0 a 0,4. A porcentagem de solvente foi mantida abaixo de 2%. Todas as amostras foram incubadas a 310 K por 24 h antes da coleta dos espectros de DC (VILLARREAL, et al., 2017).

A interação entre os complexos e o ADN foi observada por análise espectrofotométrica de absorção utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution Array UV-Visible. Os experimentos foram realizados em uma célula de quartzo com 10 mm de comprimento com tampão Tris-HCl e 2% de DMSO. A concentração do complexo fixada em $2,0 \times 10^{-5}$ M, enquanto a concentração de ADN aumentou de 0 para $6,0 \times 10^{-5}$ M. Os espectros de UV-vis foram obtidos após adição de ct-ADN, tanto na solução do composto quanto na referência. A constante de ligação intrínseca (K_b) dos complexos ao ct-ADN foi obtida pela equação de Benesi-Hildebrand (SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013).

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

Nesta equação, A e A_0 são absorbância da solução do complexo na presença e ausência de ct-ADN, respectivamente. Os coeficientes ϵ_G e ϵ_{H-G} são os coeficientes de absorção molar do complexo livre e do complexo com ct-ADN, respectivamente. A partir do gráfico de $A_0/(A-A_0)$ versus $1/[ADN]$, a constante K_b foi calculada pela razão entre o coeficiente linear e angular. Para uma melhor compreensão de como funciona a interação ADN-complexo, o ensaio Hoeschst 33258 de deslocamento competitivo foi realizado em um espectropolarímetro JASCO (J-815), usando uma célula de quartzo de 10 mm de comprimento, de 358 a 660 nm, com comprimento de onda de excitação de 338 nm e largura da banda de 5,0 nm. No experimento, as concentrações de ADN e Hoechst 33258 foram fixadas em $6,0 \times 10^{-5}$ M e $6,0 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. A solução do complexo foi preparada recentemente em DMSO ($2,0 \times 10^{-3}$ M) e depois adicionada à solução ADN-Hoechst 33258, a fim de obter concentrações de 0 a $6,0 \times 10^{-5}$ M, mantendo a porcentagem de DMSO abaixo de 3%. Todos os espectros foram registrados após 5 minutos entre cada adição do complexo (RUIZ, et al., 2013; ÎNCI, et al., 2019). Para avaliar a extinção da fluorescência Hoechst 33258 ligada ao ADN pelos complexos foi aplicada a equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

Onde F_0 e F são a intensidade de fluorescência do aduto Hoechst-ADN antes e depois da adição do complexo, respectivamente. A constante de extinção de Stern-Volmer é o K_{sv} enquanto $[Q]$ é a concentração do agente extintor. O valor da constante foi obtido através da inclinação do gráfico linear de F_0/F versus $[Q]$.

3.4. Síntese dos complexos

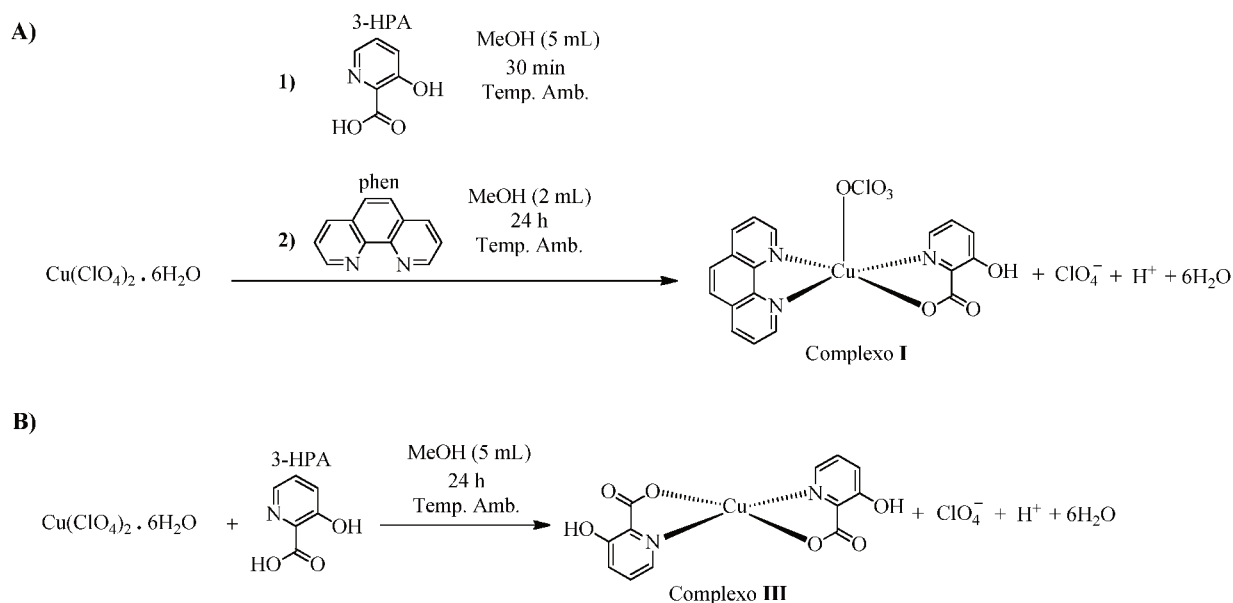
3.4.1. Complexos do tipo $[Cu(L-L)(N-N)ClO_4]$

Os complexos de cobre(II) foram preparados pela reação de $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (0,0926 g, 0,25 mmol) com 0,25 mmol do ácido, ambos dissolvidos em 5 mL de metanol, sob agitação constante por 30 minutos. Para os ligantes 2-HNA, 2-MNA e 6-HNA foi necessária a adição da trietilamina para favorecer a dissolução. Em seguida foi adicionado lentamente (gota a gota) 2 mL de uma solução metanólica do ligante *N,N*-doador (0,25 mmol). A mistura foi mantida em agitação durante 24 horas, a temperatura ambiente. O sólido formado foi separado por filtração, lavado com éter e seco em dessecador sob pressão reduzida. A Figura 28 (A) representa a rota sintética do complexo $[Cu(3-HPA)(phen)ClO_4]$ **I**.

3.4.2. Complexos do tipo $[Cu(L-L)_2]$

Os complexos de cobre(II) foram preparados pela reação de $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (0,0926 g, 0,25 mmol) com 0,50 mmol do ácido, ambos dissolvidos em 5 mL de metanol, sob agitação constante por 24 horas, a temperatura ambiente. Para os ligantes 2-HNA, 2-MNA e 6-HNA foi necessária a adição da trietilamina para favorecer a desprotonação. O sólido formado foi separado por filtração, lavado com éter e seco em dessecador sob pressão reduzida. A Figura 28 (B) representa a rota sintética do complexo $[Cu(3-HPA)_2]$ **III**.

Figura 28. Representação esquemática do método de síntese para o complexo **I** (A) e **III** (B).



Fonte: A autora.

a) [Cu(3-HPA)(phen)ClO₄] I

M.M.: 481,30 g mol⁻¹. Rendimento: 62 %. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₁₈H₁₂N₃O₇Cl): C, 44,92; H, 2,51; N, 8,73 %. Encontrado: C, 44,98; H, 2,37; N, 8,69 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 381,0184 [M – ClO₄]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3447, 3105, 3068, 2374, 2338, 1653, 1646, 1637, 1629, 1608, 1560, 1522, 1508, 1457, 1429, 1397, 1388, 1340, 1320, 1275, 1239, 1219, 1150, 1110, 1087, 900, 872, 847, 832, 820, 809, 777, 767, 736, 720, 692, 623, 588, 453. UV-Vis (metanol), λ_{max} (nm) = 342, 294, 272, 265, 227, 670. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 700. $\Delta M = 39,12 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

b) [Cu(3-HPA)(bipy)ClO₄] II

M.M.: 457,28 g mol⁻¹. Rendimento: 50 %. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₁₆H₁₂N₃O₇Cl): C, 42,02; H, 2,65; N, 9,19 %. Encontrado: C, 41,77; H, 2,37; N, 9,01 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 357,0176 [M – ClO₄]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3450, 2375, 2344, 1653, 1647, 1637, 1629, 1624, 1616, 1608, 1473, 1465, 1458, 1448, 1319, 1276, 1240, 1217, 1152, 1122, 1089, 899, 832, 819, 809, 769, 729, 691, 621, 590, 452. UV-Vis (etanol), λ_{max} (nm) = 345, 309, 297, 288 (ombro), 243 (ombro), 224, 661. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 633. ΔM (etanol) = 35,93 S cm² mol⁻¹.

c) [Cu(3-HPA)₂] III

M.M.: 339,22 g mol⁻¹. Rendimento: 51 %. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₁₂H₈N₂O₆): C, 42,45; H, 2,36; N, 8,25 %. Encontrado: C, 42,84; H, 2,51; N, 8,13 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 361,9571 [M + Na]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3453, 3100, 3069, 2376, 2344, 1653, 1647, 1608, 1576, 1570, 1559, 1508, 1456, 1394, 1388, 1321, 1309, 1275, 1240, 1217, 1153, 1128, 1058, 903, 833, 819, 810, 765, 691, 588, 452. UV-Vis (etanol), λ_{max} (nm) = 302, 653. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 599. ΔM (etanol) = 0,69 S cm² mol⁻¹.

d) [Cu(QNA)(phen)ClO₄]·0,5H₂O IV

M.M.: 533,38 g mol⁻¹. Rendimento: 61%. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₂₂H₁₅N₃O_{6,5}Cl): C, 50,39; H, 2,88; N, 8,01 %. Encontrado: C, 50,23; H, 3,01; N, 7,86 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 415,0379 [M – ClO₄]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3069, 2971, 1739, 1674, 1660, 1605, 1593, 1562, 1521, 1497, 1473, 1463, 1428, 1416, 1372, 1366, 1352, 1342, 1327, 1271, 1227, 1217, 1183, 1172, 1149, 1070, 995, 976, 931, 900, 893, 974, 845, 827, 806, 787, 777, 769, 737, 718, 651, 621, 601, 561, 540, 524, 510, 498, 457, 436, 413, 399, 378, 356, 323, 311, 284, 274, 261, 250, 235. UV-Vis (ACN), λ_{max} (nm) = 294 (ombro), 270, 234. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 699. ΔM (etanol) = 35,36 S cm² mol⁻¹.

e) [Cu(QNA)(bipy)ClO₄]·H₂O V

M.M.: 509,36 g mol⁻¹. Rendimento: 60 %. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₂₀H₁₆N₃O₇Cl): C, 47,16; H, 3,17; N, 8,25 %. Encontrado: C, 47,17; H, 2,66; N, 8,05 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 391,0377 [M – ClO₄]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3246, 3120, 3088, 3030, 2970, 2162, 1738, 1632, 1611, 1603, 1568, 1514, 1498, 1476, 1462, 1448, 1376, 1346, 1320, 1270, 1253, 1218, 1179, 1159, 1080, 1063, 1034, 1022, 979, 931, 903, 884, 856, 848, 806, 768, 730, 665, 645, 620, 606, 569, 525, 508, 494, 469, 443, 424, 411, 381, 368, 318, 301, 282, 254, 229, 223. UV-Vis (etanol), λ_{max} (nm) = 310, 299, 238. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 717. ΔM (etanol) = 42,79 S cm² mol⁻¹.

f) [Cu(QNA)₂]·H₂O VI

M.M.: 425,88 g mol⁻¹. Rendimento: 63%. Cor: Verde. Análise Elementar para (CuC₂₀H₁₄N₂O₅): C, 56,40; H, 3,31; N, 6,58 %. Encontrado: C, 56,18; H, 3,42; N, 6,29 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 429,9984 [M + Na]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3251, 3061, 3029, 2971, 1980, 1739, 1630, 1618, 1567, 1513, 1461, 1437, 1374, 1345, 1306, 126900, 1219, 1210, 1189, 1183, 1155, 1138, 1124, 1003, 995, 987, 977, 963, 955, 903, 885, 856, 847, 806, 798, 770, 741, 645, 628, 606, 569, 525, 507, 494, 403, 382, 367, 321, 280, 261, 230. UV-Vis (etanol), λ_{max} (nm) = 311, 240. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 689. ΔM (etanol) = 0,43 S cm² mol⁻¹.

g) [Cu(phen)(2-HNA)ClO₄]·1,5H₂O VII

M.M.: 481,30 g mol⁻¹. Rendimento: 82%. Cor: Verde. Análise Elementar para (CuC₁₈H₁₅N₃O_{8,5}Cl): C, 42,53; H, 2,97; N, 8,27 %. Encontrado: C, 42,28; H, 2,55; N, 8,21 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 381,0170 [M – ClO₄]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3393, 3068, 1602, 1555, 1515, 1474, 1458, 1445, 1426, 1364, 1343, 1329, 1249, 1207, 1143, 1105, 1073, 915, 872, 843, 829, 809, 786, 754, 722, 703,, 693, 653, 639, 599, 545, 504, 489, 467, 450, 438, 425, 314, 305, 268, 245. UV-Vis (metanol), λ_{max} (nm) = 315(ombro), 293, 272, 222, 631. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 660. ΔM (DMF) = 75,62 S cm² mol⁻¹.

h) [Cu(bipy)(2-HNA)ClO₄] VIII

M.M.: 457,28 g mol⁻¹. Rendimento: 71%. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₁₆H₁₂N₃O₇Cl): C, 42,02; H, 2,65; N, 9,19 %. Encontrado: C, 42,38; H, 2,42; N, 9,18 %. HRESIMS (metanol), *m/z*: 357,0177 [M – ClO₄]⁺. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3079, 2992, 2922, 2604, 2471, 1705, 1633, 1605, 1591, 1555, 1522,1496, 1471, 1430, 1414, 1340, 1315, 1281, 1260, 1227, 1150, 1066, 1003, 977, 930, 909, 873, 845, 778, 737, 718, 653, 643, 620, 554, 503, 474, 436, 383, 311, 289, 265. UV-Vis (metanol), λ_{max} (nm) = 309, 300, 228, 615. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 622. ΔM (DMF) = 65,06 S cm² mol⁻¹.

i) [Cu(2-HNA)₂]·H₂O IX

M.M.: 357,76 g mol⁻¹. Rendimento: 75%. Cor: Azul. Análise Elementar para (CuC₁₂H₁₀N₂O₇): C, 41,33; H, 2,60; N, 8,03 %. Encontrado: C, 40,85; H, 1,89; N, 7,74 %. IV

(ATR) ν (cm^{-1}): 3071, 1636, 1612, 1577, 1571, 1523, 1459, 1421, 1351, 1313, 1228, 1206, 1142, 1090, 1058, 996, 908, 837, 770, 734, 667, 641, 584, 574, 542, 484, 427, 362, 331, 327, 318, 310, 295, 278, 264, 249, 227. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 657. ΔM (DMF) = 7,59 S $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

j) $[\text{Cu}(\text{phen})(2\text{-MNA})\text{ClO}_4] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ X

M.M.: 515,38 g mol^{-1} . Rendimento: 68%. Cor: Verde. Análise Elementar para ($\text{CuC}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_{6,5}\text{SCl}$): C, 42,69; H, 2,59; N, 8,30 %. Encontrado: C, 42,50; H, 2,88; N, 8,28 %. HRESIMS (metanol), m/z : 396,9942 $[\text{M} - \text{ClO}_4]^{+}$. IV (ATR) ν (cm^{-1}): 3515, 3290, 3201, 3131, 3092, 3040, 3004, 2908, 1688, 1631, 1594, 1578, 1519, 1496, 1428, 1404, 1373, 1347, 1321, 1249, 1226, 1207, 1149, 1123, 1107, 1100, 1084, 1043, 986, 958, 922, 906, 871, 855, 825, 781, 769, 758, 738, 723, 649, 622, 617, 578, 546, 504, 485, 457, 445, 429, 411, 385, 362, 339, 307, 264, 255, 238, 227. UV-Vis (metanol), λ_{max} (nm) = 351, 292 (ombro), 271. ΔM (DMF) = 101,41 S $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

k) $[\text{Cu}(\text{bipy})(2\text{-MNA})\text{ClO}_4]$ XI

M.M.: 473,35 g mol^{-1} . Rendimento: 70%. Cor: Verde. Análise Elementar para ($\text{CuC}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_6\text{SCl}$): C, 40,60; H, 2,56; N, 8,88 %. Encontrado: C, 41,35; H, 2,66; N, 9,11 %. HRESIMS (metanol), m/z : 372,9942 $[\text{M} - \text{ClO}_4]^{+}$. IV (ATR) ν (cm^{-1}): 3115, 3088, 1639, 1626, 1602, 1557, 1497, 1474, 1445, 1439, 1409, 1384, 1331, 1318, 1313, 1286, 1269, 1243, 1198, 1172, 1156, 1118, 1099, 1046, 1029, 1018, 981, 943, 931, 924, 906, 869, 816, 776, 757, 729, 663, 640, 627, 618, 557, 542, 496, 442, 420, 413, 397, 372, 345, 319, 285, 272, 255, 244, 230, 225. UV-Vis (metanol), λ_{max} (nm) = 347, 309 (ombro), 298, 243. UV-Vis (sólido), λ_{max} (nm) = 603. ΔM (DMF) = 117,72 S $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.

l) $[\text{Cu}(2\text{-MNA})_2] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ XII

M.M.: 370,87 g mol^{-1} . Rendimento: 58%. Cor: Marrom. Análise Elementar para ($\text{CuC}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_{4,5}\text{S}_2$): C, 37,84; H, 2,38; N, 7,35 %. Encontrado: C, 37,83; H, 1,92; N, 7,33 %. IV (ATR) ν (cm^{-1}): 3088, 2597, 2161, 2093, 2003, 1897, 1700, 1597, 1548, 1502, 1433, 1408, 1369, 1342, 1235, 1200, 1151, 1138, 1074, 1065, 946, 869, 820, 757, 705, 664, 638, 556, 541,

495, 419, 405, 383, 344, 279, 250, 244, 237, 229, 226. UV-Vis (metanol), λ_{\max} (nm) = 399, 300, 266. ΔM (DMF) = 11,77 S cm² mol⁻¹.

m) [Cu(phen)(6-HNA)ClO₄]·H₂O XIII

M.M.: 499,32 g mol⁻¹. Rendimento: 78%. Cor: Verde. Análise Elementar para (CuC₁₈H₁₄N₃O₈Cl): C, 43,30; H, 2,83; N, 8,42 %. Encontrado: C, 42,95; H, 2,92; N, 8,28 %. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3488, 3076, 1651, 1616, 1571, 1540, 1520, 1494, 1428, 1397, 1342, 1280, 1254, 1225, 1212, 1146, 1081, 930, 874, 845, 795, 789, 740, 719, 691, 662, 650, 621, 544, 493, 442, 430, 320, 308, 297, 268, 253, 243, 223. UV-Vis (ACN), λ_{\max} (nm) = 293 (ombro), 271, 224. UV-Vis (sólido), λ_{\max} (nm) = 643. ΔM (DMF) = 83,51 S cm² mol⁻¹.

n) [Cu(bipy)(6-HNA)ClO₄]·1,5H₂O XIV

M.M.: 457,28 g mol⁻¹. Rendimento: 49%. Cor: Verde. Análise Elementar para (CuC₁₆H₁₅N₃O_{8,5}Cl): C, 39,68; H, 3,12; N, 8,68 %. Encontrado: C, 39,88; H, 3,05; N, 8,78 %. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3614, 3126, 3085, 1651, 1612, 1603, 1575, 1568, 1497, 1474, 1444, 1377, 1320, 1283, 1252, 1218, 1173, 1161, 1120, 1069, 1031, 1019, 1007, 981, 930, 899, 872, 849, 794, 769, 729, 692, 662, 649, 643, 619, 548, 512, 460, 436, 413, 371, 291, 286, 276, 263, 254, 242, 232, 222. UV-Vis (etanol), λ_{\max} (nm) = 299, 245, 229. UV-Vis (sólido), λ_{\max} (nm) = 626. ΔM (DMF) = 86,62 S cm² mol⁻¹.

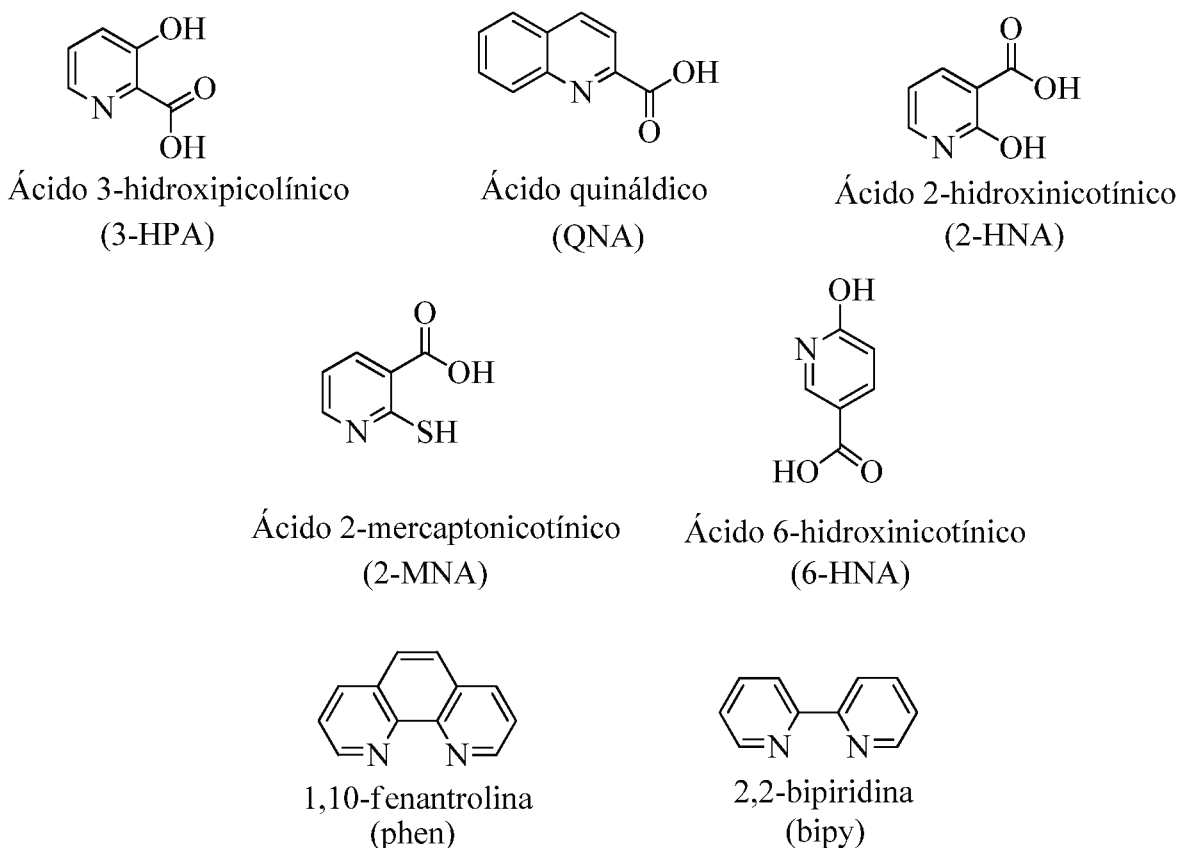
o) [Cu(6-HNA)₂]·3,5H₂O XV

M.M.: 457,21 g mol⁻¹. Rendimento: 75%. Cor: Verde. Análise Elementar para (CuC₁₂H₁₅N₂O_{9,5}): C, 35,78; H, 3,75; N, 6,95 %. Encontrado: C, 35,90; H, 3,57; N, 6,90 %. IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3301, 379, 1288, 1222, 1127, 1031, 868, 844, 792, 743, 687, 653, 441, 283, 276, 243, 234, 227. UV-Vis (sólido), λ_{\max} (nm) = 651. ΔM (DMF) = 36,06 S cm² mol⁻¹.

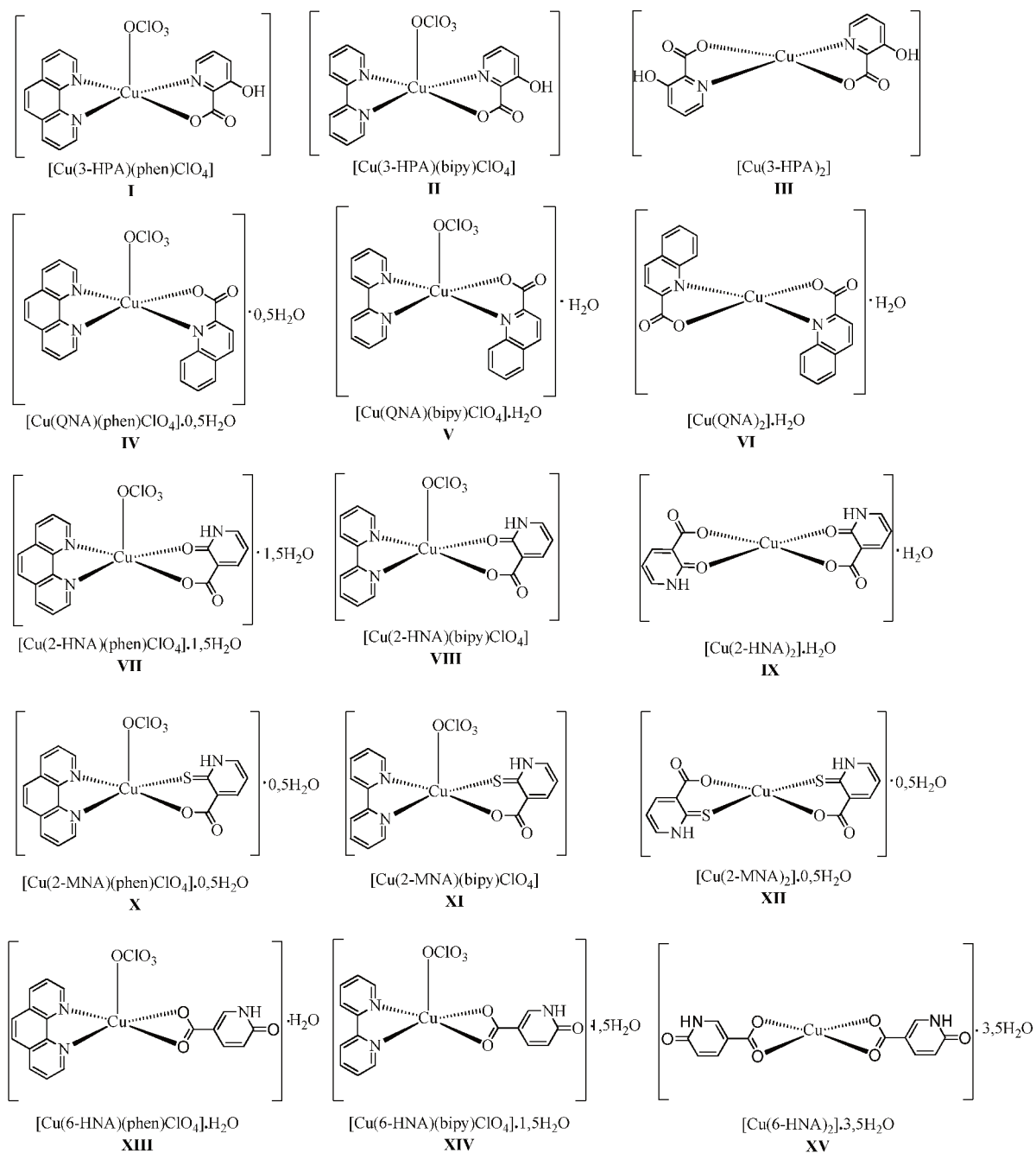
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foram sintetizados dez novos complexos de cobre(II) contendo ligantes derivados dos ácidos nicotínico e picolínico. Os complexos **III**, **VI**, **IX**, **XII** e **XV** previamente reportadas na literatura (ZUROWSKA, et al., 2004; GIRGINOVA, et al., 2005; YANG, CHEN, GAO, 2007; SINGH, et al., 2017) foram preparados com o intuito de comparar suas estruturas e potencial farmacológico em relação aos complexos inéditos. As Figuras 29 e 30 ilustram as estruturas dos compostos orgânicos utilizados e as estruturas propostas para os complexos de cobre(II) inéditos. As estruturas cristalinas dos complexos **III** e **IX** foram reportadas na literatura e podem ser visualizadas na Figura 31.

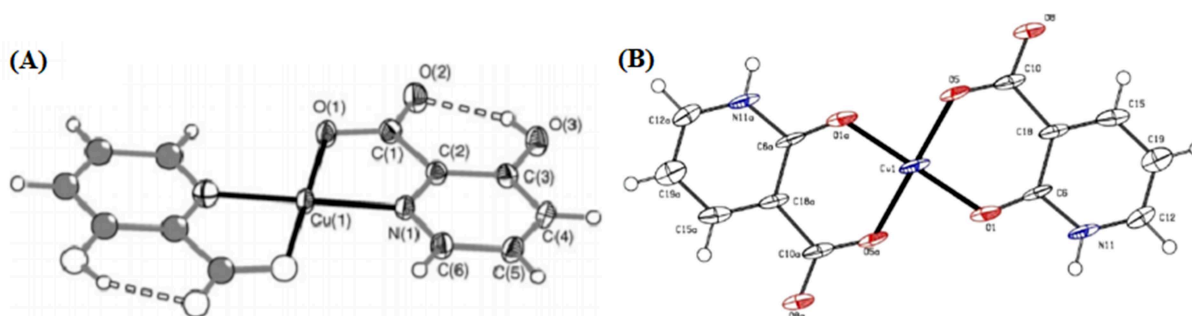
Figura 29. Estruturas dos ligantes utilizados neste trabalho.



Fonte: A autora.

Figura 30. Estruturas propostas para os complexos sintetizados.

Fonte: A autora.

Figura 31. Estruturas cristalinas dos complexos **III** (A) e **IX** (B).

Fonte: GIRGINOVA, et al. 2005 e SINGH, et al. 2017.

Os complexos foram sintetizados a partir do precursor $\text{CuClO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ previamente dissolvido em metanol. Após a adição dos respectivos ligantes e agitação por 24 horas, os sólidos formados foram isolados por filtração e devidamente secos sob pressão reduzida. Os novos compostos de Cu(II) são coloridos, estáveis ao ar, à luz, solúveis em solventes polares como o DMSO, DMF, etanol e metanol. As propostas estruturais foram feitas tendo como base os resultados de análise elementar, condutividade molar, de espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray* e por técnicas espectroscópicas, tais como UV-Vis, infravermelho e RPE. A atividade citotóxica dos complexos **I-VIII**, **X**, **XI**, **XIII** e **XIV** e seus respectivos ligantes foi avaliada contra células tumorais e normais. A atividade antimicrobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* dos complexos **I-XII** e seus respectivos ligantes também foi avaliada contra a linhagem sensível MTB H37Rv.

4.1. Análise elementar

Os dados de análise elementar (CHN) para os complexos sintetizados (Tabela 02) corroboram com as estruturas propostas e indicam que os compostos estão puros.

Tabela 02. Dados de análise elementar (CHN) para os complexos sintetizados obtidos.

Complexos	%C _{teór}	%C _{exp}	%H _{teór}	%H _{exp}	%N _{teór}	%N _{exp}
[Cu(3-HPA)(phen)ClO ₄] I	44,92	44,98	2,51	2,37	8,73	8,69
[Cu(3-HPA)(bipy)ClO ₄] II	42,02	41,77	2,65	2,37	9,19	9,01
[Cu(3-HPA) ₂] III	42,42	42,84	2,37	2,51	8,25	8,13
[Cu(QNA)(phen)ClO ₄]·0,5H ₂ O IV	50,39	50,23	2,88	3,01	8,01	7,86
[Cu(QNA)(bipy)ClO ₄]·H ₂ O V	47,16	47,17	3,17	2,66	8,25	8,05

[Cu(QNA) ₂]·H ₂ O VI	56,40	56,18	3,31	3,42	6,58	6,29
[Cu(2-HNA)(phen)ClO ₄]·1,5H ₂ O VII	42,53	42,28	2,97	2,55	8,27	8,21
[Cu(2-HNA)(bipy)ClO ₄] VIII	42,02	42,38	2,65	2,42	9,19	9,18
[Cu(2-HNA) ₂]·H ₂ O IX	40,29	40,69	2,82	2,53	7,83	7,82
[Cu(2-MNA)(phen)ClO ₄]·0,5H ₂ O X	42,69	42,50	2,59	2,88	8,30	8,28
[Cu(2-MNA)(bipy)ClO ₄] XI	40,60	41,35	2,56	2,66	8,88	9,11
[Cu(2-MNA) ₂]·0,5H ₂ O XII	37,84	37,83	2,38	1,92	7,35	7,33
[Cu(6-HNA)(phen)ClO ₄]·H ₂ O XIII	43,30	42,95	2,83	2,92	8,42	8,28
[Cu(6-HNA)(bipy)ClO ₄]·1,5H ₂ O XIV	39,68	39,88	3,12	3,05	8,68	8,78
[Cu(6-HNA) ₂]·3,5H ₂ O XV	35,78	35,90	3,75	3,57	6,95	6,90

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2. Análise condutimétrica

As medidas de condutividade molar dos complexos foram realizadas logo após o preparo de soluções $1,0 \times 10^{-3}$ M, utilizando etanol, DMSO ou DMF como solventes. Para determinar se os complexos são eletrólitos ou não, foram utilizadas faixas de valores de condutividade relatadas na literatura, conforme Tabela 03 (GEARY, 1971; VELHO, 2006).

Tabela 03. Faixa de valores de condutividade molar.

Solvente	Eletrólito	(S cm ² mol ⁻¹) ^a	(S cm ² mol ⁻¹) ^b
DMF	1:1	65 – 90	37 – 122
DMSO	1:1	50 – 70	20 – 62
ETANOL	1:1	35 – 45	-

Fonte: Adaptado de ^aGEARY (1971) e ^bVELHO (2006).

Os valores de condutividade molar (Tabela 04) para os complexos **III**, **VI**, **IX**, **XII**, **XV** e **XVIII** foram inferiores a 36,06 S cm² mol⁻¹, o que indica que eles são neutros e que os ligantes bidentados não sofrem reação de troca com o solvente. Comparando os resultados obtidos para os demais complexos com dados da literatura, foi possível classificá-los como eletrólitos 1:1. Portanto, em solução, os complexos ternários perdem um perclorato gerando compostos do tipo [Cu(L-L)(N-N)]⁺, comportamento bastante comum para complexos deste tipo (ALMEIDA, et al., 2015).

Tabela 04. Valores de condutividade molar para os complexos sintetizados obtidos.

Complexos	Solvente	Condutividade ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
[Cu(3-HPA)(phen)ClO ₄] I	etanol	39,12
[Cu(3-HPA)(bipy)ClO ₄] II	etanol	35,93
[Cu(3-HPA) ₂] III	etanol	0,39
[Cu(QNA)(phen)ClO ₄]·0,5H ₂ O IV	etanol	35,37
[Cu(QNA)(bipy)ClO ₄]·H ₂ O V	etanol	42,78
[Cu(QNA) ₂]·H ₂ O VI	etanol	0,42
[Cu(2HNA)(phen)ClO ₄]·H ₂ O VII	DMF	75,62
[Cu(2HNA)(bipy)ClO ₄] VIII	DMF	65,06
[Cu(2HNA) ₂]·0,5H ₂ O IX	DMF	7,59
[Cu(2MNA)(phen)ClO ₄]·0,5H ₂ O X	DMSO	28,01
[Cu(2MNA)(bipy)ClO ₄] XI	DMSO	34,99
[Cu(2MNA) ₂]·0,5H ₂ O XII	DMSO	3,22
[Cu(6HNA)(phen)ClO ₄]·H ₂ O XIII	DMF	83,51
[Cu(6HNA)(bipy)ClO ₄]·1,5H ₂ O XIV	DMF	86,62
[Cu(6HNA) ₂]·3,5H ₂ O XIV	DMF	36,06

Fonte: Dados da pesquisa.

4.3. Espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis e reflectância difusa

Os espectros na região do UV-Visível foram analisados no intervalo compreendido entre 200 e 800 nm, utilizando-se os solventes metanol ou acetonitrila grau espectroscópico no preparo de soluções $1,0 \times 10^{-5}$ M. Os valores de comprimentos de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) e absorvidade molar ($\epsilon_{\text{máx}}$) para os ligantes livres e respectivos complexos estão descritos na Tabela 05.

As principais bandas de absorção envolvendo complexos metálicos são atribuíveis a três tipos de transições eletrônicas. As absorções na região do ultravioleta, de alta energia, frequentemente estão relacionadas com as transições intraligantes (IL), transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Novas bandas na região do ultravioleta próximo/visível podem estar relacionadas às transições de transferência de carga, TC, que são sensíveis a variação da polaridade do solvente. Por fim, as transições observadas na região do visível estão relacionadas com as transições d-d, que são de menor intensidade ($\epsilon \approx 10$ a $10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)

e são características de metais com subcamada d não totalmente preenchida (SHRIVER; ATKINS, 2008; ALMEIDA et al., 2015).

Para os ligantes phen e bipy, transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ relacionadas aos grupos cromóforos C=N e C=C ocorrem na região entre 230 e 281 nm com altos coeficientes de absorvidade molar ($\epsilon > 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), o que indica transições completamente permitidas pelas regras de seleção (SHRIVER; ATKINS, 2008; ALMEIDA et al., 2015; PAIXÃO, 2017). Os ligantes derivados dos ácidos picolínico e nicotínico utilizados apresentam bandas entre 225 e 378 nm com valores de absorvidade molar entre 10^3 e $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Estas bandas são referentes às transições próprias dos ligantes, chamadas intraligantes ($n-\pi$ e $\pi-\pi^*$).

Tabela 05. Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e respectivos valores de absorvidade molar ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos ligantes e dos seus respectivos complexos.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$)	Transição
Phen	230	$5,9 \times 10^4$	IL
	263	$3,8 \times 10^4$	
Bipy	235	$5,5 \times 10^4$	IL
	281	$7,2 \times 10^4$	
3-HPA	226 (ombro)	$5,0 \times 10^3$	IL
	303	$6,2 \times 10^3$	
[Cu(3-HPA)(phen)ClO ₄] I	227	$7,8 \times 10^3$	IL
	265	$5,0 \times 10^3$	
	272	$4,6 \times 10^3$	
	294	$1,9 \times 10^3$	
	342	$4,8 \times 10^2$	
	670	$3,0 \times 10^1$	d-d
[Cu(3-HPA)(bipy)ClO ₄] II	224	$2,6 \times 10^4$	IL
	243 (ombro)	$1,6 \times 10^4$	
	288 (ombro)	$1,4 \times 10^4$	
	297	$1,5 \times 10^4$	
	309	$1,3 \times 10^4$	
	345	$2,6 \times 10^3$	TCML
	661	$3,1 \times 10^1$	d-d

[Cu(3-HPA) ₂] III	302	$1,2 \times 10^4$	IL
	653	$3,5 \times 10^1$	d-d
QNA	238	$4,1 \times 10^4$	IL
	291	$4,0 \times 10^3$	
[Cu(QNA)(phen)ClO ₄]·0,5H ₂ O IV	234	$9,3 \times 10^4$	IL
	270	$5,5 \times 10^4$	
	294 (ombro)	$2,3 \times 10^4$	
[Cu(QNA)(bipy)ClO ₄]·H ₂ O V	238	$3,1 \times 10^4$	IL
	299	$1,5 \times 10^4$	
	310	$1,3 \times 10^4$	
[Cu(QNA) ₂]·H ₂ O VI	240	$1,8 \times 10^4$	IL
	311	$2,2 \times 10^3$	
2-HNA	225	$2,6 \times 10^3$	IL
	295	$2,2 \times 10^3$	
	319	$1,6 \times 10^3$	
[Cu(2-HNA)(phen)ClO ₄]·1,5H ₂ O VII	222	$9,8 \times 10^3$	IL
	272	$9,2 \times 10^3$	
	293	$4,2 \times 10^3$	
	315 (ombro)	$2,8 \times 10^3$	
	631	$6,3 \times 10^1$	d-d
[Cu(2-HNA)(bipy)ClO ₄] VIII	228	$2,4 \times 10^4$	IL
	300	$2,5 \times 10^4$	
	309	$2,7 \times 10^4$	
	615	$6,7 \times 10^1$	d-d
2-MNA	300	$4,3 \times 10^4$	IL
	378	$8,6 \times 10^3$	
[Cu(2-MNA)(phen)ClO ₄]·0,5H ₂ O X	271	$3,5 \times 10^4$	IL
	292 (ombro)	$1,6 \times 10^4$	
	351	$8,8 \times 10^3$	
[Cu(2-MNA)(bipy)ClO ₄] XI	243	$2,4 \times 10^4$	IL
	298	$2,8 \times 10^4$	
	309 (ombro)	$2,5 \times 10^4$	
	347	$1,6 \times 10^4$	

[Cu(2-MNA) ₂]·0,5H ₂ O XII	266	$2,9 \times 10^4$	IL
	300	$2,6 \times 10^4$	
	399	$1,9 \times 10^4$	
6-HNA	251	$2,2 \times 10^4$	IL
	299	$8,1 \times 10^3$	
[Cu(6-HNA)(phen)ClO ₄]·H ₂ O XIII	224	$7,0 \times 10^4$	IL
	271	$8,2 \times 10^4$	
	293 (ombro)	$3,0 \times 10^4$	
[Cu(6-HNA)(bipy)ClO ₄]·1,5H ₂ O XIV	229	$2,2 \times 10^4$	IL
	245	$2,3 \times 10^4$	
	299	$2,4 \times 10^4$	

Fonte: Dados da pesquisa.

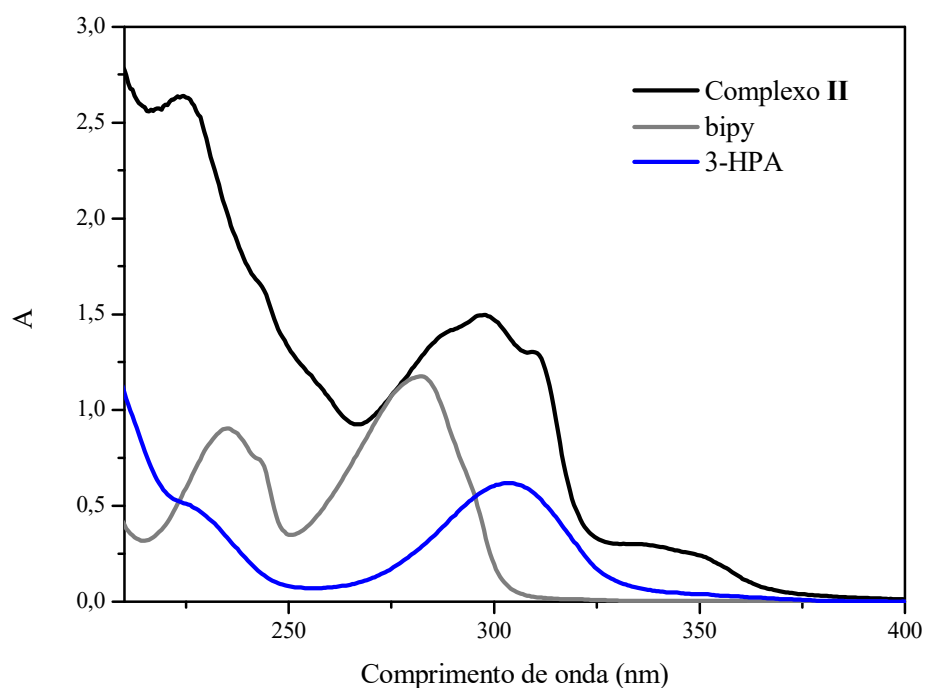
A Figura 32 corresponde aos espectros de absorção do complexo **II** e seus respectivos ligantes, em soluções etanólicas de concentrações $1,0 \times 10^{-4}$ M. O complexo **II** possui bandas em 224, 243, 288, 297, 309 e 345 nm. As bandas em 235 e 281 nm, encontradas para o ligante livre bipy, também foram observadas no complexo, porém deslocadas para 224 nm e 297 nm, respectivamente. Por sua vez, a banda em 303 nm encontrada para o ligante livre 3-HPA está deslocada para 309 nm. O complexo apresenta uma banda em 345 nm atribuída à transferência de carga TCML. Quando correlacionamos os espectros do complexo com os dos ligantes correspondentes, foram observados deslocamentos para maior e menor comprimento de onda, ou seja, deslocamentos batocrômico e hipsocrômico, respectivamente, confirmando a presença do complexo em solução.

A Figura 33 corresponde aos espectros de absorção do complexo **VI** e seu respectivo ligante, em soluções etanólicas de concentrações $1,0 \times 10^{-4}$ M. O complexo **VI** possui bandas em 240 e 311 nm e no ligante livre QNA, estas bandas foram observados em 238 e 291 nm. Os deslocamentos para maior comprimento de onda, ou seja, deslocamentos batocrômico, indicam a presença do complexo em solução.

A Figura 34 corresponde aos espectros de absorção do complexo **VII** e seus respectivos ligantes, em soluções metanólicas de concentrações $5,0 \times 10^{-5}$ M. O complexo **VII** possui bandas em 222, 272, 293 e 315 nm. A banda encontrada em 222 nm para o complexo pode ser considerada uma sobreposição das bandas em 230 nm para o ligante livre phen e 225 nm para o ligante livre 2-HNA. A banda em 263 nm, encontrada para o ligante livre phen, também foi observada no complexo, porém deslocada para 272 nm. Por sua vez, as

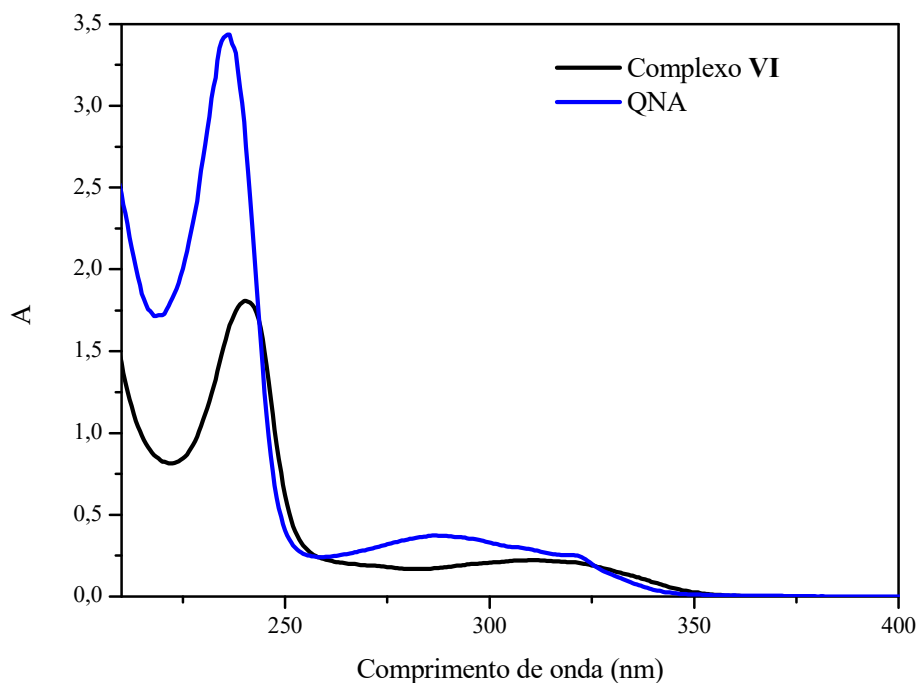
bandas em 295 e 319 nm encontradas para o ligante livre 3-HNA estão deslocadas para 293 e 315 nm. Quando correlacionamos os espectros do complexo com os dos ligantes correspondentes, foram observados deslocamentos para maior e menor comprimento de onda, ou seja, deslocamentos batocrômico e hipsocrômico, respectivamente, confirmando a presença do complexo em solução.

Figura 32. Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo **II** e seus respectivos ligantes, em solução etanólica ($1,0 \times 10^{-4}$ M).



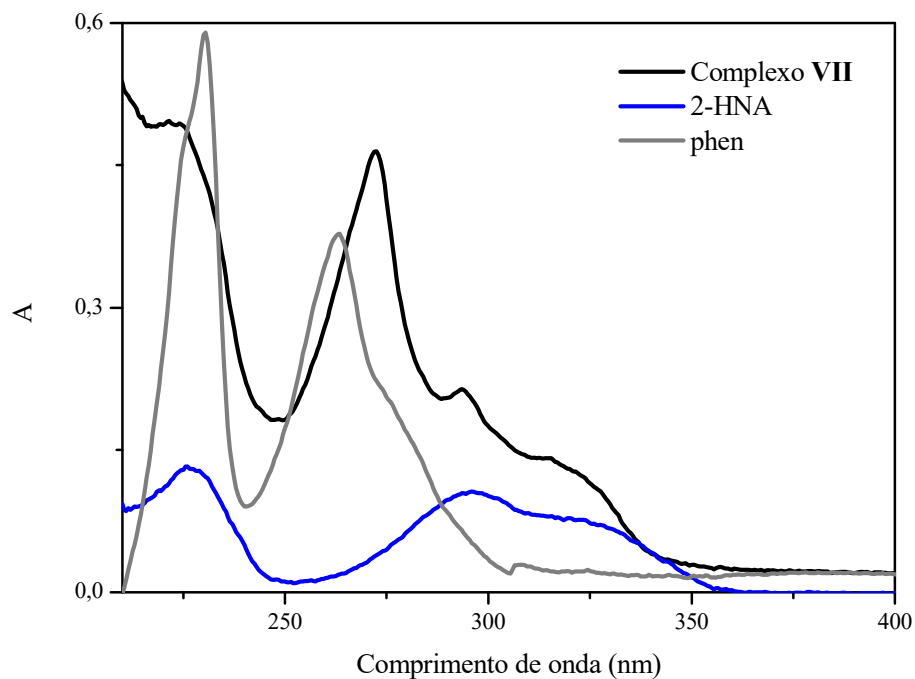
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 33. Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo **VI** e seu respectivo ligante, em solução etanólica ($1,0 \times 10^{-4}$ M).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 34. Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo **VII** e seus respectivos ligantes, em solução metanólica ($5,0 \times 10^{-5}$ M).

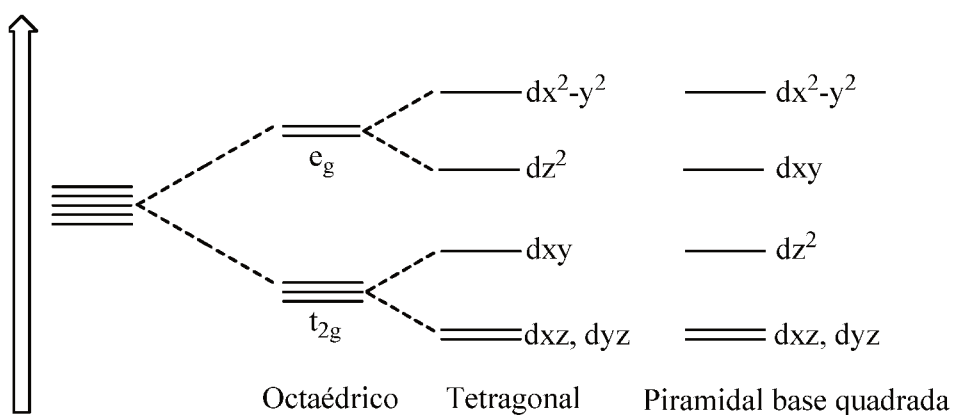


Fonte: Dados da pesquisa.

Os complexos também foram caracterizados no estado sólido utilizando acessório para medidas de reflectância difusa de modo a observar as transições d-d. O íon cobre(II) livre,

configuração d^9 , possui nove elétrons distribuídos em cinco orbitais d degenerados. Estes orbitais sofrem um desdobramento em diferentes níveis de energia quando são submetidos à influência de um campo ligante, o que favorece a ocorrência das transições eletrônicas do tipo d-d. A Figura 35 ilustra o diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d para algumas geometrias. Estas transições são facilmente reconhecidas em um espectro de absorção eletrônica de amostras concentradas ou sólidas, pois geram bandas largas com baixos valores de absortividade molar (ϵ) (SHRIVER; ATKINS, 2008).

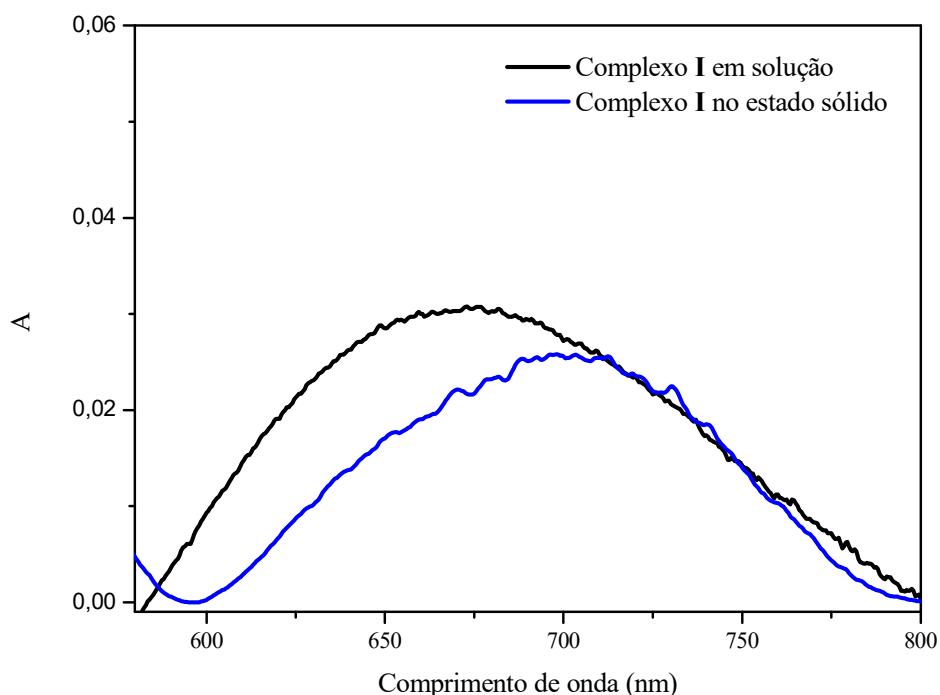
Figura 35. Diagrama de desdobramento dos níveis de energia dos orbitais d.



Fonte: Adaptado SHRIVER; ATKINS (2008).

O espectro de absorção do complexo **I** em concentração $1,0 \times 10^{-3}$ M, utilizando o solvente metanol, exibiu apenas uma banda larga e assimétrica centrada em 670 nm ($\epsilon = 30 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$), que pode ser atribuída a uma transição do tipo d-d. Estes valores e o perfil da banda são consistentes com uma geometria piramidal quadrada distorcida, devido ao efeito de Jahn-Teller. No estado sólido (reflectância difusa), esta banda encontra-se centrada em 700 nm, indicando que a geometria do complexo em solução difere da que é encontrada no estado sólido. (LOPES, et al., 2013; ALMEIDA, et al., 2015). A Figura 36 apresenta as transições do tipo d-d, no estado sólido e em solução, que foram observadas para o complexo **I**.

Figura 36. Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo **I** em solução metanólica ($1,0 \times 10^{-3}$ M) e no estado sólido.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho dos ligantes livres foram realizados para posterior comparação com os correspondentes complexos isolados, a fim de se obter informações a respeito do modo de coordenação dos ligantes ao metal. Para o ligante 1,10-fenantrolina, as bandas presentes na região entre 1504 e 1421 cm^{-1} compreendem os modos vibracionais $\nu_{\text{ass}}\text{C}=\text{C}$ ou $\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}-\text{N}$ do anel aromático. As absorções características na região de 3062 e 3033 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação C-H, respectivamente. Para o ligante 2,2-bipiridina, as bandas presentes na região entre 1628 - 1465 cm^{-1} são devidos aos estiramentos dos grupos C=C e C-N do anel aromático, enquanto que as absorções na região de 3136 e 3105 cm^{-1} são atribuíveis aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação C-H, respectivamente.

Os ácidos utilizados neste trabalho apresentam bandas relacionadas ao grupo carboxilato, O-H_{fenólico}, S-H, como também vibrações relacionadas ao átomo de nitrogênio do anel piridínico. Os ligantes 3-HPA e QNA apresentam uma banda próximo de 1610 cm^{-1} que é atribuível ao estiramento da ligação C=N. Bandas fracas em 3100 e 3000 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos C-H do anel aromático (ZUROWSKA, et al., 2004; GIRIGINOVA, et al.,

2005). Para o ligante 2-HNA, bandas características dos estiramentos N-H e C=O de cetona aparecem em 3230 e 1737/1711 cm^{-1} , respectivamente. Para o ligante 2-MNA, bandas presentes na região entre 1800 e 2400 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos S-H. As absorções características na região de 3188 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento N-H e a banda próxima a 1140 cm^{-1} é característica do estiramento C=S. Estas observações sugerem que há a presença de ambos os tautômeros, representados na Figura 27 (YANG, CHEN, GAO, 2007). Para o ligante 6-HNA, a banda próxima a 3450 cm^{-1} indica presença de um grupo OH e as bandas em 3229 e 1738/1726 cm^{-1} são características dos estiramentos N-H e C=O de cetona, respectivamente, sugerindo também uma mistura de tautômeros (NAKAMOTO, 1997; QUINTAL, et al.; 2002; SILVA, 2017). A Tabela 06 ilustra as principais atribuições observadas para os complexos e seus respectivos ligantes.

Tabela 06. Atribuições dos principais modos vibracionais no infravermelho, para o ligante e os seus respectivos complexos.

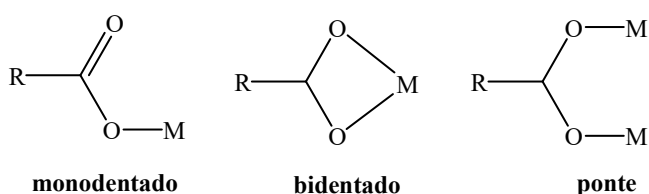
Composto	νNH (cm^{-1})	$\nu\text{C=O}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ (cm^{-1})	$\nu\text{C=N}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (cm^{-1})	$\Delta\nu_{\text{as}}\text{COO}^- - \nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (cm^{-1})	Outras bandas (cm^{-1})
3-HPA	-	1680	1697	1606	1323	374	
I	-	-	1648	1609	1321	327	
II	-	-	1649	1610	1320	329	
III	-	-	1645	1609	1326	319	
QNA	-	1692	1584	1619	1372	212	
IV	-	1633	1590	1568	1345	245	
V	-	1634	1611	1569	1377	234	
VI	-	1632	1599	1568	1375	224	
2-HNA	3230	1737/1711	1623	1605	1396	227	
VII	n.d.	1645	1581	1603	1364	217	
VIII	3232	1704	1633	1607	1340	293	
IX	n.d.	1634	1574	-	1313	261	
2-MNA	3188	1677	1621	1598	1419	202	$\nu(\text{C=S})$ 1141
X	3177	1687	1610	1578	1405	205	1149
XI	3205	1691	1626	1602	1409	217	1155

XII	3147	1707	1619	-	1409	210	1151
6-HNA	3229	1705	1602	1555	1228	374	
XIII	n.d.	1656/1651	1457	1540	1316	141	
XIV	3148	1650	1569	1575	1422	147	
XV	3224	1704	1469	-	1330	139	

n.d. = não determinado. Fonte: Dados da pesquisa.

Para entender o modo de coordenação dos ligantes é de conhecimento que o grupo carboxilato pode coordenar-se aos íons metálicos de modo monodentado, bidentado ou em ponte (Figura 37). A diferença das frequências entre os modos vibracionais simétrico e assimétrico desse grupo [$\Delta\nu = \nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$] pode ser usada para distinguir os diferentes modos de coordenação. Quando o valor de $\Delta\nu$ do complexo for maior do que 200 cm^{-1} , o grupo carboxilato se coordena de modo monodentado. Quando o modo de coordenação ao grupo carboxilato for bidentando, o valor de $\Delta\nu$ do complexo será menor do que 200 cm^{-1} e quando o valor de $\Delta\nu$ do complexo for próximo a 200 cm^{-1} tem-se grupo carboxilato em ponte (NAKAMOTO, 1997).

Figura 37. Diferentes modos de coordenação de metais ao grupo carboxilato.



Fonte: A autora.

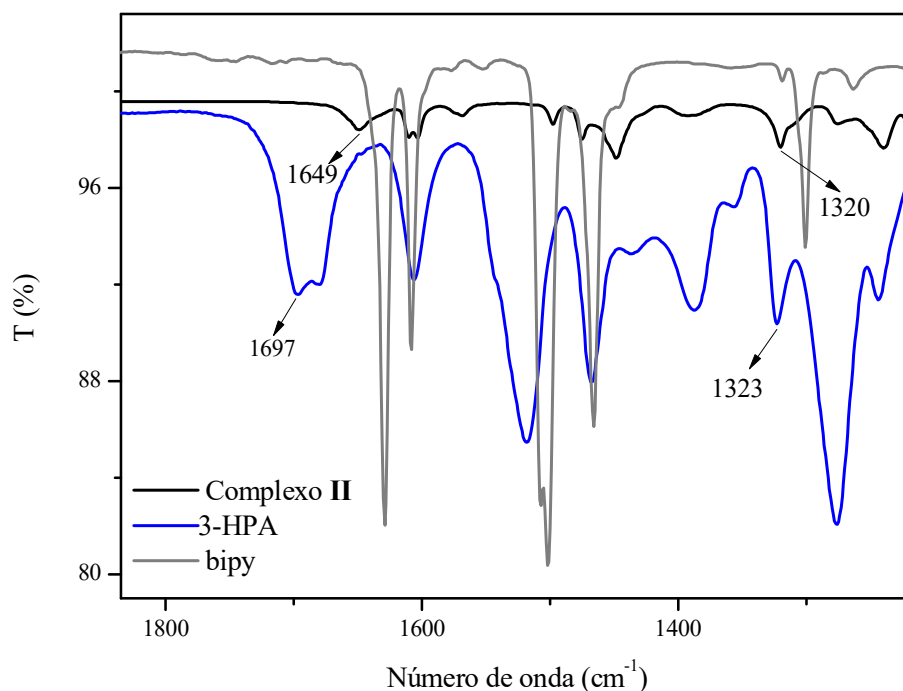
Para os complexos com o ligante 3-HPA e QNA, o modo de coordenação ao íon cobre(II) ocorre por meio do grupo carboxilato e nitrogênio. Foi observado que os valores de $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ acima de 200 cm^{-1} indicam a presença do grupo carboxilato monodentado. Por exemplo, no espectro de infravermelho do complexo **II** (Figura 38) as bandas correspondentes aos modos vibracionais $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ apareceram perto de 1649 (1697 cm^{-1} no ligante livre) e 1320 cm^{-1} (1323 cm^{-1} no ligante livre), respectivamente. O valor de $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}}) = 329 \text{ cm}^{-1}$ indica a presença do grupo carboxilato monodentado (MARTINS, et al., 2008).

Para os complexos com o ligante 2-HNA, o modo de coordenação ao íon cobre(II) ocorre por meio dos oxigênios da carbonila do anel e do carboxilato, ou seja, o ligante estará na forma ceto. Novamente os valores de $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ acima de 200 cm^{-1} indicam a presença do grupo carboxilato monodentado. Além disso, a banda na região de 3232 cm^{-1} foi atribuída aos

estiramentos N-H, indicando a presença do ligante na forma ceto. O espectro do complexo **VIII** ilustra a banda característica do ν_{NH} (Figura 39) (YUE, et al.; 2007; KUKOVEC, et al., 2008; CHEN, 2008; XU, et al.; 2012; SINGH, et al.; 2017).

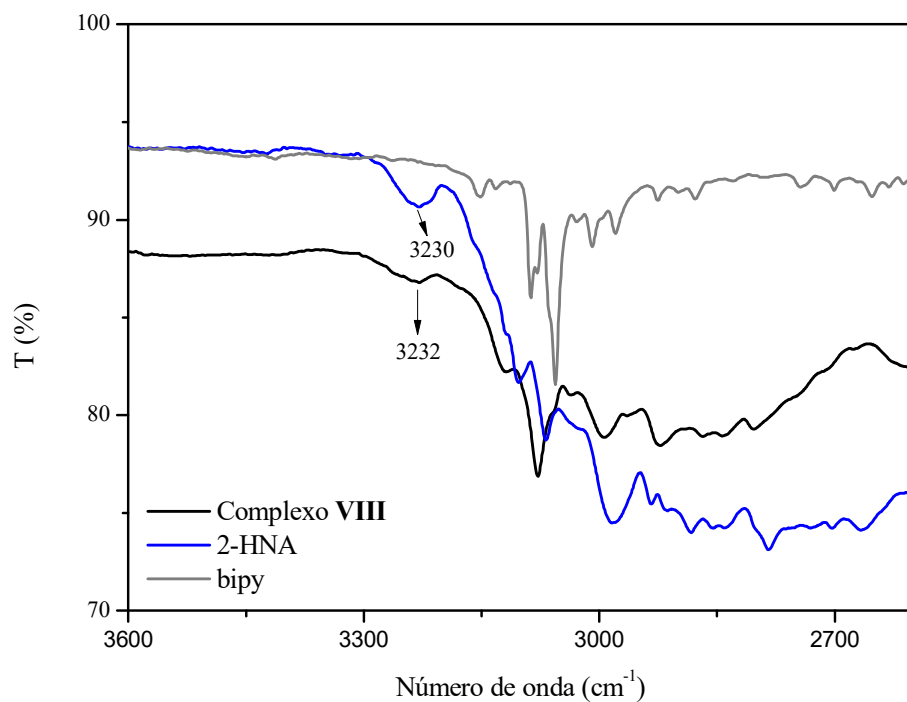
Para os complexos com o ligante 2-MNA, foi proposto que o modo de coordenação ao íon cobre(II) ocorre por meio do grupo carboxilato e enxofre. Foi observado que os valores de $\Delta(\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}})$ acima de 200 cm^{-1} indicam a presença do grupo carboxilato monodentado, assim como as bandas na região de $3205\text{-}3147 \text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas aos estiramentos N-H, sugerindo a coordenação ao ligante pelo grupo tiol. A ausência de bandas entre 1800 e 2400 cm^{-1} é indicativo do envolvimento do enxofre na coordenação ao centro metálico (Figura 40).

Figura 38. Espectros na região do infravermelho ($1800\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$) do complexo **II** e seus respectivos ligantes.



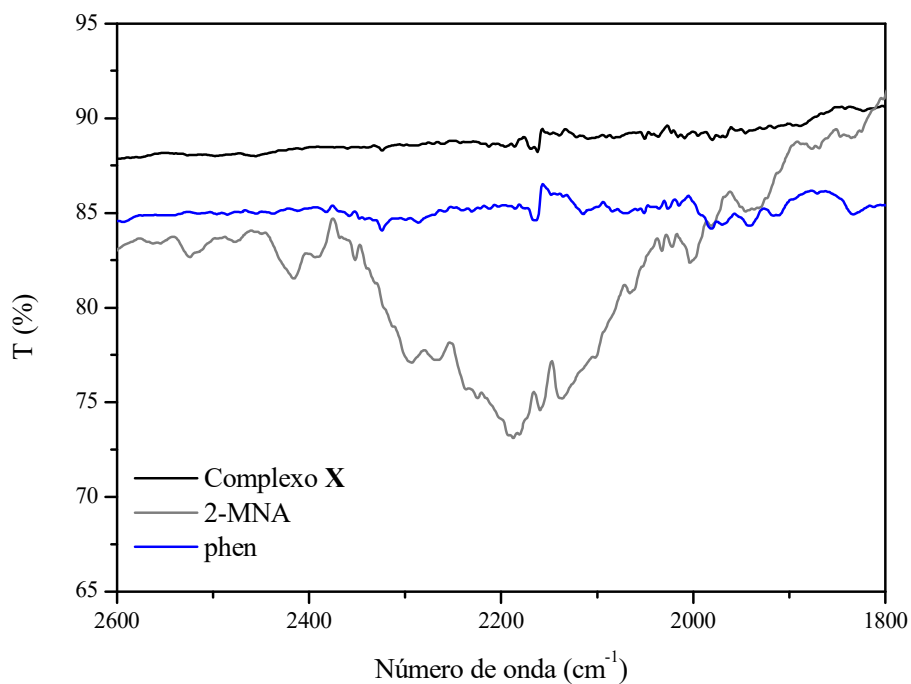
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 39. Espectros na região do infravermelho ($3600\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$) do complexo **VIII** e seus respectivos ligantes.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 40. Espectros na região do infravermelho ($2600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) do complexo **X** e seus respectivos ligantes.

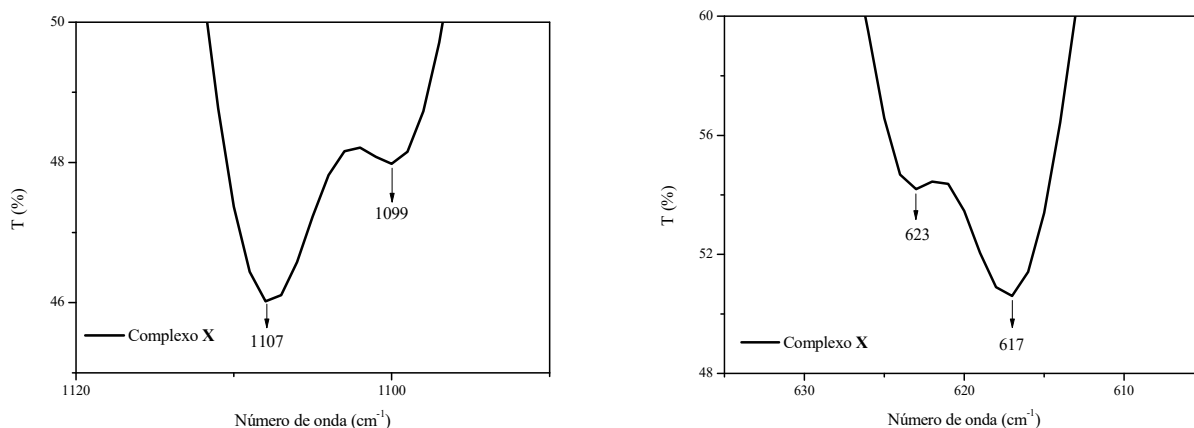


Fonte: Dados da pesquisa.

Para os complexos com o ligante 6-HNA, o modo de coordenação ao íon cobre(II) ocorre por meio dos dois oxigênios do grupo carboxilato, pois os valores de $\Delta(\nu_{as} - \nu_s)$ abaixo de 200 cm^{-1} indicam a presença do grupo carboxilato bidentado. Picos de intensidade média em torno de $1700\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos ao $\nu(\text{C=O})$ do ligante coordenado, enquanto que as bandas na região de $3224\text{-}3148\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas aos estiramentos N-H, indicando a presença do ligante na forma ceto (KUKOVEC, et al., 2008; ZOU, et al., 2011; XU, et al., 2012; SINGH, et al., 2017).

O íon perclorato apresenta estrutura tetraédrica com simetria pertencente ao grupo de ponto T_d . Este íon pode coordenar-se ao metal de modo monodentado ou bidentado. Se o íon perclorato coordena-se de maneira monodentada, a sua simetria original T_d é baixada para C_{3v} e duas bandas são ativas no infravermelho e se o íon coordena-se de maneira bidentada a simetria do grupo perclorato é baixada para C_{2v} e três bandas são ativas no infravermelho, com isso as vibrações antes degeneradas são desdobradas (HATHAWAY, UNDERHILL, 1961; LEWIS, ESTES, DEREK, 1975; NAKAMOTO, 1997). Assim, o comportamento do íon perclorato nos complexos pode ser inferido pelos modos vibracionais dos estiramentos Cl-O. Quando coordenado de modo monodentado, cada um destes estiramentos é desdobrado em duas bandas no infravermelho, que são encontrados em duas regiões, 1100 e 620 cm^{-1} . Assim, complexos contendo perclorato coordenado podem ser distinguidos daqueles não coordenados. A Figura 41 representa o espectro de infravermelho do complexo **X**, que apresenta duas bandas na região próxima a 1100 cm^{-1} (1107 e 1099 cm^{-1}) e duas bandas na região próxima a 620 cm^{-1} (623 e 617 cm^{-1}) sugerindo um comportamento monodentado do grupo perclorato. Em alguns complexos, bandas fracas encontradas no intervalo de $500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, podem ser atribuídas aos estiramentos Cu-O e Cu-N (NAKAMOTO, 1997).

Figura 41. Espectros na região do infravermelho (1100 e 620 cm^{-1}) do complexo **X**.

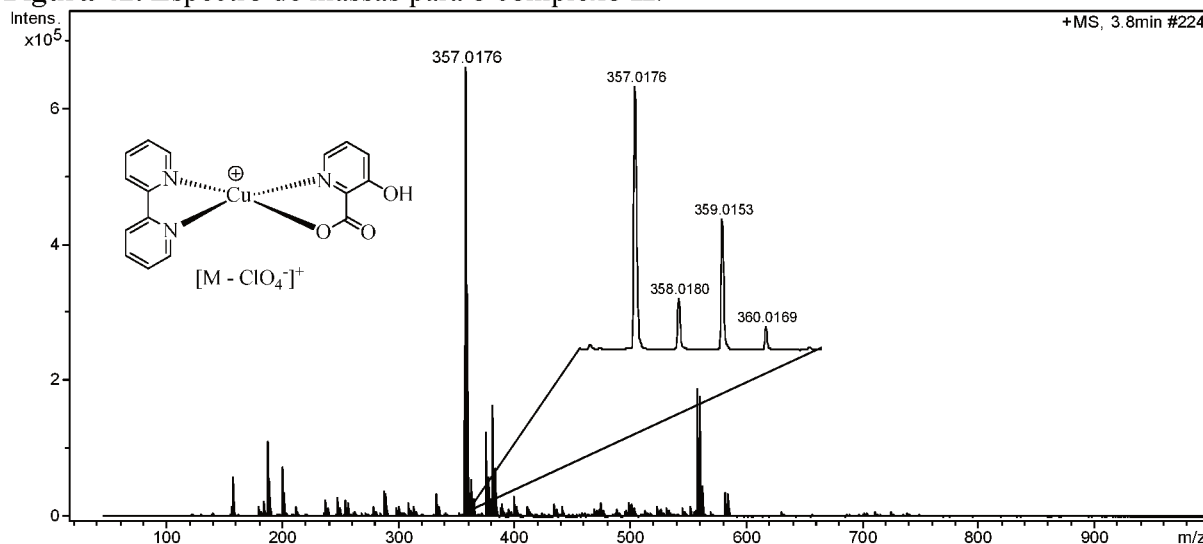


Fonte: Dados da pesquisa.

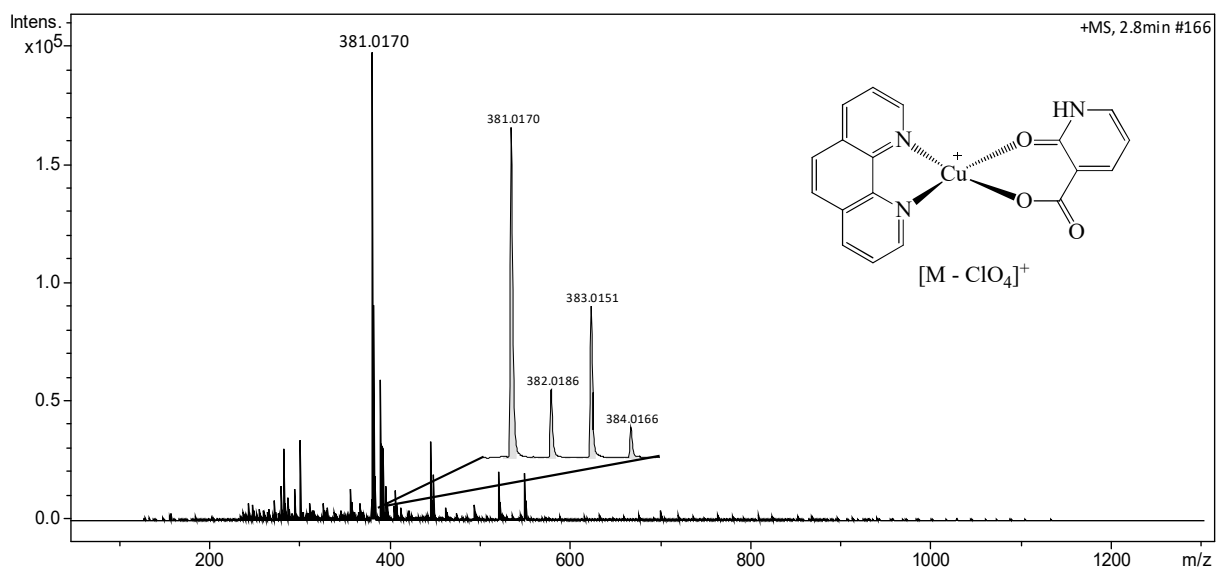
4.5. Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray*

Os espectros de massas em alta resolução dos complexos dissolvidos em metanol foram registrados no modo positivo. Conforme discutido anteriormente nos experimentos de condutimetria, também foi observado neste estudo a relativa facilidade da perda do ligante perclorato em solução, tendo como resultado a presença de sinais referente às espécies $[M - \text{ClO}_4]^+$ nos EMs. Os valores de m/z listados na Tabela 07 são referentes aos picos contendo o isótopo mais abundante de cobre (^{63}Cu) e corroboram com as estruturas propostas. Como exemplo, o EM (Figura 42) do complexo **II**, apresenta um sinal de m/z 357,0176, que representa o complexo com a perda do contra-íon ClO_4^- , cujo valor foi calculado para $[\text{CuC}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3]^+$, 357,0175 ($\Delta = 0,28$ ppm). O complexo **VII** (Figura 43) apresenta um sinal de m/z 381,0170, que também representa o complexo com a perda do íon ClO_4^- , cujo valor foi calculado para $[\text{CuC}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3]^+$, 381,0170 ($\Delta = 0,00$ ppm). Portanto, o mesmo padrão foi encontrado para todos os complexos com perclorato. Este resultado corrobora que a geometria dos complexos em solução difere daquela encontrada no estado sólido. Por outro lado, o espectro de massas (Figura 44) do complexo **VI** cujo sinal de m/z é 429,9984 indica que o complexo está cationizado com sódio, calculado para $[\text{CuC}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3]^+$ é 429,9986 ($\Delta = 0,47$ ppm). Na espectrometria de massas, moléculas neutras, como o complexo **VI**, podem ser convertidas em íons carregados positivamente por combinação com íons Na^+ ou K^+ levando a formação de moléculas cationizadas. Os valores de m/z referentes às espécies carregadas observadas nos espectros de massas assim como os respectivos valores de m/z teórico são descritos na Tabela 07.

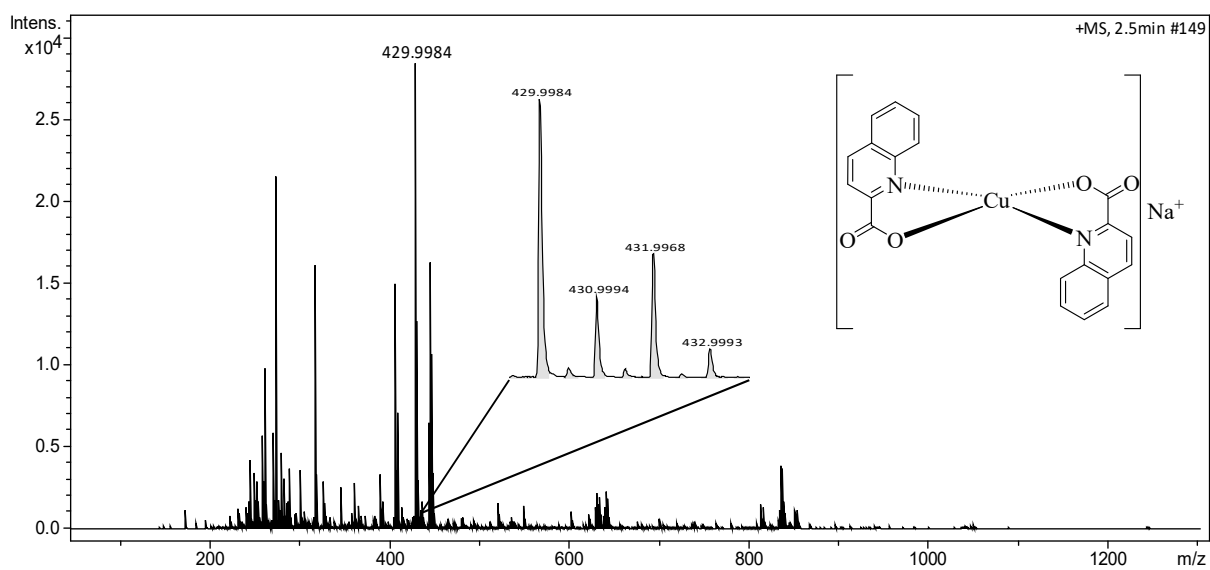
Figura 42. Espectro de massas para o complexo **II**.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 43. Espectro de massas para o complexo VII.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 44. Espectro de massas para o complexo VI.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 07. Dados das análises por espectrometria de massas dos complexos **I-VIII, X e XI**.

Complexo	Espécie carregada	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórico	Erro (ppm)
I	$[M - ClO_4]^{+}$	381,0184	381,0170	3,67
II	$[M - ClO_4]^{+}$	357,0176	357,0175	0,28
III	$[M + Na]^{+}$	361,9571	361,9571	0,00
IV	$[M - ClO_4]^{+}$	415,0379	415,0377	0,48
V	$[M - ClO_4]^{+}$	391,0377	391,0377	0,00
VI	$[M + Na]^{+}$	429,9984	429,9986	0,47
VII	$[M - ClO_4]^{+}$	381,0170	381,0170	0,00
VIII	$[M - ClO_4]^{+}$	357,0177	357,0170	1,96
X	$[M - ClO_4]^{+}$	396,9942	396,9941	0,25
XI	$[M - ClO_4]^{+}$	372,9942	372,9941	0,27

Fonte: Dados da pesquisa.

4.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica bastante empregada no estudo de amostras sintéticas ou de origem natural, desde que contenham espécies paramagnéticas tais como radicais livres, birradicais. É útil também para analisar compostos de coordenação contendo metais paramagnéticos como o cobre(II), como exemplo. No que se refere aos complexos de cobre(II), uma análise criteriosa da forma do espectro, número e posições das linhas RPE, suas intensidades e larguras permitem inferir informações importantes sobre o centro metálico, como, por exemplo, a composição da sua esfera de coordenação ou a presença de múltiplos centros metálicos (HOUSECROFT, SHARPE, 2013). Reações de óxido-redução podem também ser prontamente inferidas, uma vez que cobre(I) não apresenta sinal no espectro de RPE.

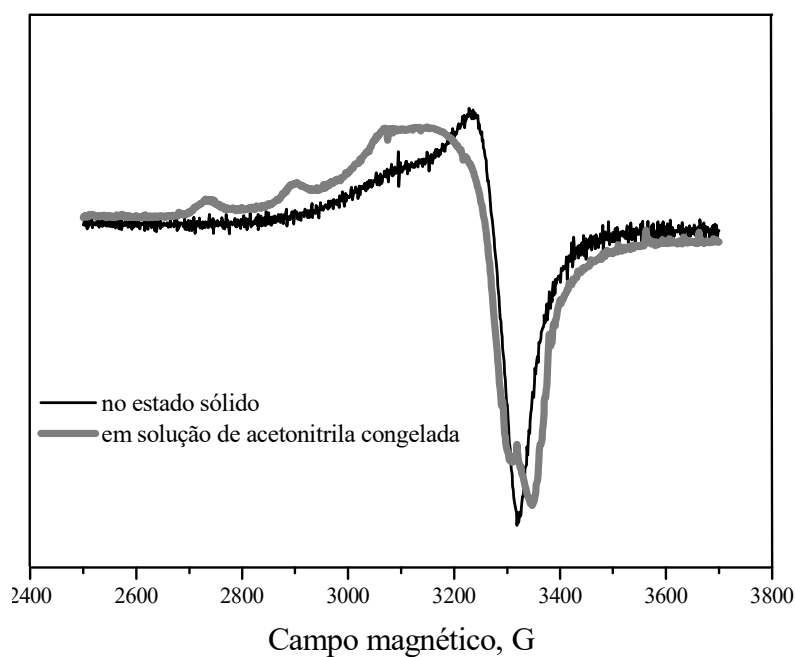
Diante do exposto acima, os espectros de RPE dos complexos **I, IV, V, VI, IX, XIII e XIV** foram realizados no estado sólido (temperatura ambiente e 77K) e em solução (77K) e podem ser prontamente visualizados junto aos seus espectros simulados (Figuras 45, 46 e 47). Os parâmetros espectroscópicos oriundos destes espectros podem ser encontrados na Tabela 08. A presença de quatro linhas no espectro de RPE é característica do íon Cu(II), pois o sinal hiperfino sofre um desdobramento em $n=4$, ($n= 2I + 1$), devido ao spin nuclear $I = 3/2$. O desdobramento hiperfino pode ser observado nos espectros de RPE com valores de A entre

140 e 167 G. Nos espectros de RPE para os complexos **I**, **IV**, **V**, **VI**, **IX**, **XIII** e **XIV** os valores de g seguem a ordem $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ que são coerentes com as geometrias octaédrica alongada segundo o eixo z , piramidal quadrática ou quadrática (GARRIBBA, MICERA, 2006). Nesses casos ocorre a simetria axial típica de configuração d^9 no estado fundamental, com um elétron desemparelhado ocupando o orbital $d_{x^2-y^2}$.

A ausência de sinais na região em torno de 1500G para os complexos **I**, **IV**, **V**, **VI** e **IX** indica que não ocorrem interações magnéticas entre átomos de cobre ($\text{Cu}\cdots\text{Cu}$), o que sugere a presença de espécies monoméricas (GARRIBBA, MICERA, 2006). Por outro lado, os complexos **XIII** e **XIV** apresentam um sinal a 1500G em baixa temperatura, o que indica uma interação magnética entre dois centros de cobre no estado sólido, que pode ser devida a uma interação π - π entre anéis aromáticos. Este sinal não apareceu em solução para ambos os complexos, o que evidencia que em solução, estas espécies ocorrem como monômeros.

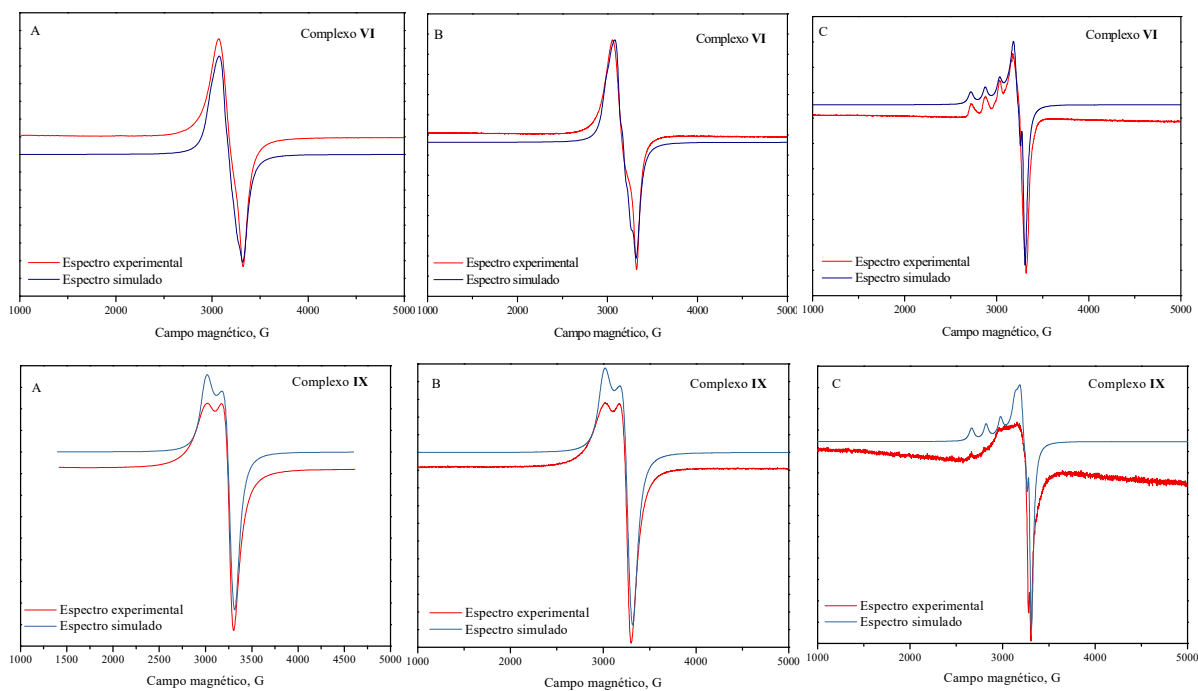
Os espectros de RPE no estado sólido dos complexos **I**, **IV**, **V**, **XIII** e **XIV** corroboram com a presença de um ânion perclorato ligado na posição apical, proporcionando um ambiente penta-coordenado ao redor do íon metálico. Por outro lado, os complexos **VI** e **IX** apresentam geometria quadrado planar. Para os complexos de cobre(II), a razão empírica $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ é frequentemente utilizada para avaliar a extensão da distorção tetraédrica em compostos em um ambiente tetragonal ao redor do metal. Se esta razão estiver na faixa entre 105 e 135 cm, a geometria observada será provavelmente quadrado planar, se a relação for >250 cm indica uma geometria tetraédrica. Em solução, os complexos **I**, **XIII** e **XIV** exibiram uma razão $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ igual a 128, 138 e 144 cm, respectivamente, indicando uma geometria tetragonal dos ligantes em torno do íon Cu(II), com uma pequena distorção tetraédrica. Os complexos **IV**, **V** e **VI** apresentaram uma razão $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ igual a 140, 138 e 153 cm, respectivamente, sugerindo uma geometria tetragonal distorcida dos ligantes em torno do íon Cu(II). O complexo **IX** não apresentou solubilidade o suficiente para determinar todos os parâmetros espectroscópicos RPE, mas provavelmente possui geometria tetraédrica dos ligantes em torno do íon Cu(II).

Figura 45. Espectro de RPE para o complexo **I** no estado sólido e em solução de acetonitrila congelada (77 K).



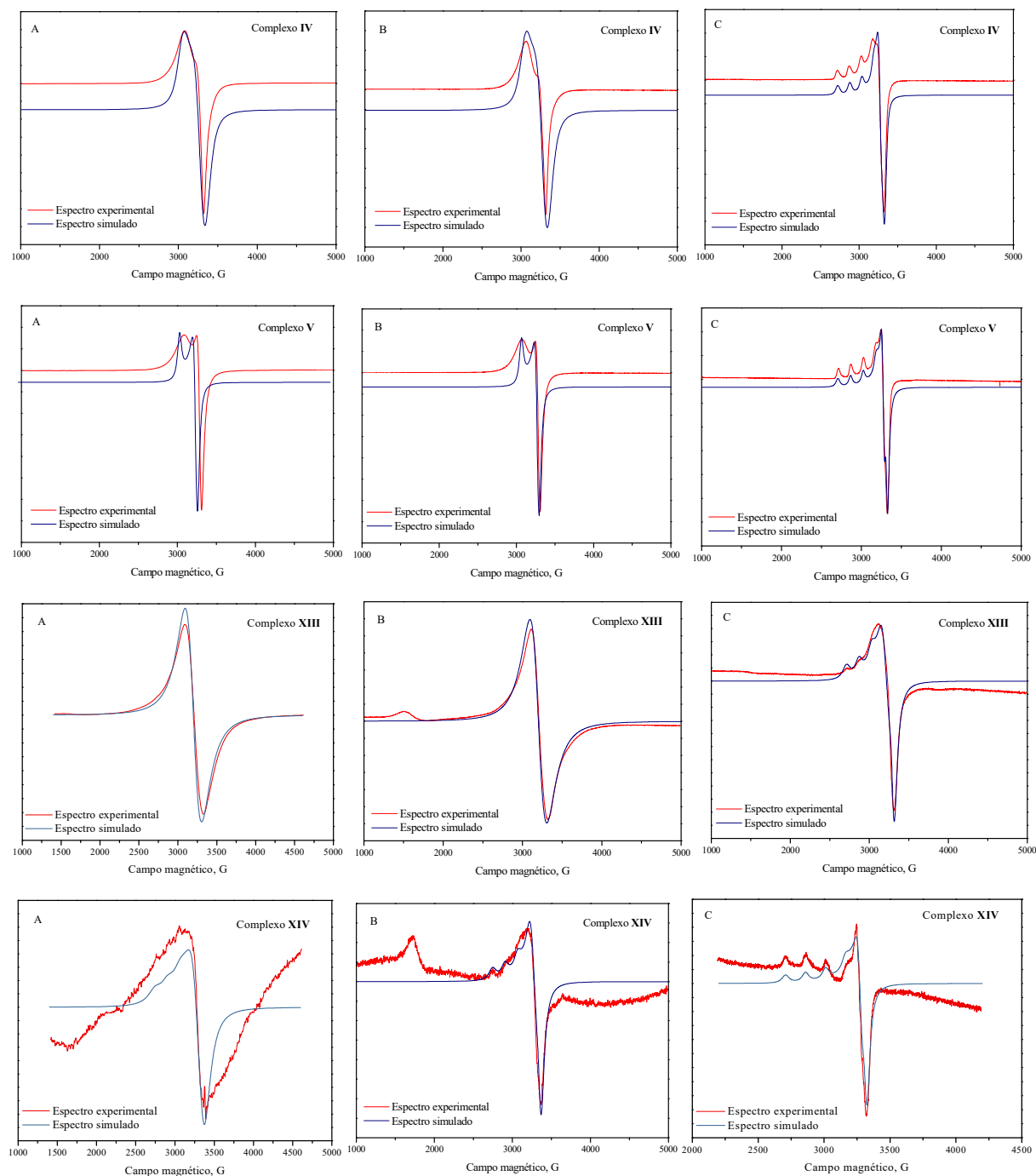
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 46. Espectros de RPE para os complexos **VI** e **IX** no estado sólido em temperatura ambiente (A), no estado sólido a 77K (B) e em soluções de DMSO congeladas a 77 K (C).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 47. Espectros de RPE para os complexos **IV**, **V**, **XIII** e **XIV** no estado sólido em temperatura ambiente (A), no estado sólido a 77K (B) e em soluções de DMSO congeladas a 77 K (C).



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 08. Parâmetros espectroscópicos RPE.

Complexo	g_{iso}	g_{\perp}^a	g_{\parallel}^a	A_{\perp}^a (G)	A_{\parallel}^a (G)	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\perp} (G)	A_{\parallel} (G)	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (cm)
I	—	2,050	2,162	—	—	2,079	2,271	—	167	128
IV	—	2,057	2,219	3,47	3,22	2,070	2,293	3,45	152	140
V	—	2,068	2,213	10,4	3,20	2,068	2,302	—	155	138
VI	—	2,105	2,205	57,7	61,6	2,089	2,296	23,9	140	153
IX	—	2,067	2,257	20,7	19,0	2,082	2,337	24,0	15,3	—
XIII	2,123	—	—	—	—	2,093	2,298	34,1	155	138
XIV	—	2,058	2,275	24,3	157	2,068	2,310	6,91	148	144

^aEstado sólido

Fonte: Dados da pesquisa.

4.7. Estudos biológicos

4.7.1. Atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos complexos **I-VIII**, **X**, **XI**, **XIII**, **XIV** e de seus respectivos ligantes foi avaliada contra as células de adenocarcinoma de mama humano metastático (MDA-MB-231) e células de mama não tumorigênica (MCF-10A). Além disso, os complexos **I-VI** e seus respectivos ligantes, também foram avaliados contra as células de leucemia mielóide crônica (K562) e os complexos **I-III** em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e células de pulmão não tumorigênica (MRC-5). Nas Tabelas 09 e 10 estão representados os valores de IC_{50} que são referentes à concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular, CC_{50} que são referentes à concentração requerida para causar a morte de 50% das células viáveis e os valores do índice de seletividade (IS). O IS é obtido a partir da razão entre o valor de CC_{50} e o valor de IC_{50} e quanto maior for o resultado menor a toxicidade do composto analisado. Para fins de comparação e para avaliar o potencial citotóxico destes complexos, os resultados obtidos foram comparados com dois fármacos de referência (cisplatina e carboplatina), quando possível.

Tabela 09. Valores de IC₅₀ (μM) e CC₅₀ (μM) dos complexos e seus respectivos ligantes, para a linha celular A549 (câncer de pulmão), K562 (leucemia mielóide crônica) e MRC-5 (células de fibroblastos pulmonares normais).

Compostos	IC ₅₀ A549 (24 h)	CC ₅₀ MRC-5 (24 h)	IS (A549)	IC ₅₀ K562 (72 h)	CC ₅₀ MRC-5 (72 h)	IS (K562)
Phen	77,6	305,0	3,9	3,2	166,4	52
Bipy	> 2560,9	320,1	< 0,12	30,0	> 2560,9	> 85,4
3-HPA	2264,4	2228,4	0,9	130,0	2767,6	21,3
I	8,3	4,8	0,6	2,3	0,4	0,17
II	52,5	43,7	0,8	21,8	32,8	1,5
III	82,4	53,0	0,6	20,8	70,6	3,4
QNA	-	-	-	126,0	-	-
IV	-	-	-	2,1	-	-
V	-	-	-	30,5	-	-
VI	-	-	-	109,0	-	-
Carboplatina	-	-	-	10	-	-
Cisplatina	-	-	-	1,1	-	-

Fonte: Dados da pesquisa.

Para a linha celular A549, os ligantes 3-HPA, phen e bipy exibiram baixa atividade citotóxica. Os complexos inibiram o crescimento de células com valores de IC₅₀ entre 8,3 e 82,4 μmol L⁻¹, sendo que a ordem decrescente de atividade é **I** > **II** > **III**. De acordo com os resultados encontrados, o complexo de cobre com 1,10-fenantrolina (phen) foi mais ativo do que aquele com ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) e 2,2-bipiridina (bipy). O complexo **I** foi 9,3 vezes mais ativo do que a phen e 273 vezes mais ativo do que o 3-HPA.

Quanto à linha celular K562, os ligantes 3-HPA, QNA e bipy exibiram baixa a moderada atividade citotóxica. Por sua vez, a phen é mais ativa do que a carboplatina e os demais ligantes livres. Os complexos inibiram o crescimento de células com valores de IC₅₀ entre 2,1 e 109,0 μmol L⁻¹, sendo que a ordem decrescente de atividade é **IV** > **I** > **III** > **II** > **V** > **VI**. De acordo com os resultados encontrados, os complexos de cobre com 1,10-fenantrolina (phen) foram mais ativos do que aqueles com ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), ácido quináldico (QNA) e 2,2-bipiridina (bipy). Os complexos **I** e **IV** foram 1,4 e 1,5 vezes mais ativos do que a phen, 56,5 e 60 vezes mais ativos do que os seus respectivos ácidos, além de serem 4,3 e 4,8 vezes mais ativos do que a carboplatina, respectivamente.

A substituição de uma molécula de 3-HPA por uma molécula de phen aumenta significativamente a atividade citotóxica, porém, não melhora o índice de seletividade, que é baixo e sugere uma toxicidade genérica.

Tabela 10. Valores de IC₅₀ (μM) e CC₅₀ (μM) dos complexos e seus respectivos ligantes, para a linha celular MDA-MB-231 (câncer de mama) e MCF-10A (células de mama não tumorigênica).

Compostos	CC ₅₀ MCF-10A	IC ₅₀ MDA-MB-231	IS (MDA-MB-231)
Phen	-	> 100 ^a	-
QNA	> 100,0	> 100,0	-
IV	15,1	10,2	1,5
V	117,1	107,1	1,1
VI	134,8	n.d.	-
2-HNA	> 100,0	> 100,0	-
VII	14,4	8,5	1,7
VIII	n.d.	n.d.	-
2-MNA	> 100,0	> 100,0	-
X	16,9	12,0	1,4
XI	n.d.	132,4	-
6-HNA	> 100,0	> 100,0	-
XIII	25,8	17,2	1,5
XIV	127,1	86,1	1,5
Carboplatina	-	> 100 ^a	-

n.d. = não determinado. ^a(PAIXÃO, et al., 2017).

Fonte: Dados da pesquisa.

Para a linha celular MDA-MB-231, os ligantes QNA, 2-HNA, 2-MNA, 6-HNA e phen exibiram baixa atividade citotóxica. Os complexos inibiram o crescimento de células com valores de IC₅₀ entre 8,5 e 132,4 μmol L⁻¹, sendo que a ordem decrescente de atividade é **VII** > **IV** > **X** > **XIII** > **XIV** > **V** > **XI**. Os complexos com 1,10-fenantrolina (phen) foram mais ativos do que aqueles com 2,2-bipiridina (bipy) e seus respectivos ligantes. Os complexos **IV**, **VII**, **X** e **XIII** se mostraram promissores, pois foram 10, 12, 8 e 6 vezes mais ativos do que a phen, respectivamente, além de serem mais ativos do que a carboplatina. O motivo dos complexos com fenantrolina serem mais ativos pode ser explicado pelo fato que a fenantrolina

interagir melhor com o ADN, por ser mais plana (BRAVO-GÓMEZ, et al., 2009). Comparando os resultados apresentados nas Tabelas 09 e 10 com compostos semelhantes contendo ligantes *N,N*-doadores já descritos na literatura, conclui-se que os complexos de cobre(II) contendo os ácidos 3-HPA, QNA, 2-HNA, 2-MNA e 6-HNA apresentam atividade citotóxica similar àqueles contendo β -dicetonas, antibióticos (doxiciclina e tetraciclina), casiopeínas e hidrazidas, como mostra a Tabela 11. (PAIXÃO, et al., 2017; ALMEIDA et al., 2015; SILVA et al., 2011; KACHADOURIAN, et al., 2010).

Tabela 11. Comparação da citotoxicidade de diferentes complexos de cobre do tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})\text{L}]\text{X}$ (onde N-N = 1,10-fenantrolina ou 2,2-bipiridina e $\text{X} = \text{NO}_3^-$ ou ClO_4^-).

Complexos	IC ₅₀ (μM)	Citotoxicidade	Referência
$[\text{Cu}(\text{3-HPA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$	2,3	K562	Este trabalho
$[\text{Cu}(\text{3-HPA})(\text{bipy})\text{ClO}_4]$	21,8	K562	Este trabalho
$[\text{Cu}(\text{QNA})(\text{phen})\text{ClO}_4] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$	2,1	K562	Este trabalho
$[\text{Cu}(\text{2-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$	8,5	MDA-MB-231	Este trabalho
$[\text{Cu}(\text{2-MNA})(\text{phen})\text{ClO}_4] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$	12,0	MDA-MB-231	Este trabalho
$[\text{Cu}(\text{6-HNA})(\text{phen})\text{ClO}_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$	17,2	MDA-MB-231	Este trabalho
$[\text{Cu}(\text{4-FH})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]$	1,8	K562	PAIXÃO, et al., 2017
$[\text{Cu}(\text{4-NH})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6	K562	PAIXÃO, et al., 2017
$[\text{Cu}(\text{4-NH})(\text{bipy})(\text{ClO}_4)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	28	K562	PAIXÃO, et al., 2017
$[\text{Cu}(\text{BTA})(\text{phen})\text{NO}_3]$	2,9	K562	ALMEIDA, et al., 2015
$[\text{Cu}(\text{BTA})(\text{bipy})\text{NO}_3]$	13,7	K562	ALMEIDA, et al., 2015
$[\text{Cu}(\text{BTACl})(\text{phen})\text{NO}_3]$	2,1	K562	ALMEIDA, et al., 2015
$[\text{Cu}(\text{BTACl})(\text{bipy})\text{NO}_3]$	9,2	K562	ALMEIDA, et al., 2015
$[\text{Cu}(\text{doxiciclina})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4$	1,9	K562	SILVA, et al., 2011
$[\text{Cu}(\text{tetraciclina})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]\text{ClO}_4$	2,6	K562	SILVA, et al., 2011
$\text{Cu}(\text{4,7-dimetilphen})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$	6	A549	KACHADOURIAN, et al., 2010

4.7.2. Atividade anti-*Mycobacterium Tuberculosis*

A atividade anti-MTB dos complexos **I-XII** e de seus respectivos ligantes foi avaliada contra a linhagem sensível MTB H37Rv (ATCC 27294). Esta linhagem é sensível, visto que responde mais facilmente aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (OLIVEIRA, 2018). Para fins de comparação e para avaliar o potencial antimicobacteriana destes complexos, os resultados obtidos foram comparados com um fármaco de referência, rifampicina, um dos mais potentes utilizados na clínica médica. Na Tabela 12 estão representados os valores de CIM.

Tabela 12. Valores de CIM contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dos complexos e seus respectivos ligantes.

Compostos	CIM (µg/mL)	CIM (µM)
Phen	0,78 ± 0,08	4,33
Bipy	17,59 ± 0,23	112,64
3-HPA	> 25	> 179
I	11,9	24,73
II	> 25	> 54,67
III	24,2	71,23
QNA	> 25	> 144
IV	2,64 ± 0,70	5,03
V	22,86 ± 1,54	44,88
VI	> 25	> 58,70
2-HNA	> 25	> 179
VII	2,06 ± 1,04	4,13
VIII	13,16 ± 0,07	28,77
IX	> 25	> 69,88
2-MNA	> 25	> 161
X	1,56 ± 0,01	3,07
XI	14,66 ± 1,82	30,96
XII	> 25	> 65,64
Rifampicina	0,047 ± 0,002	0,06

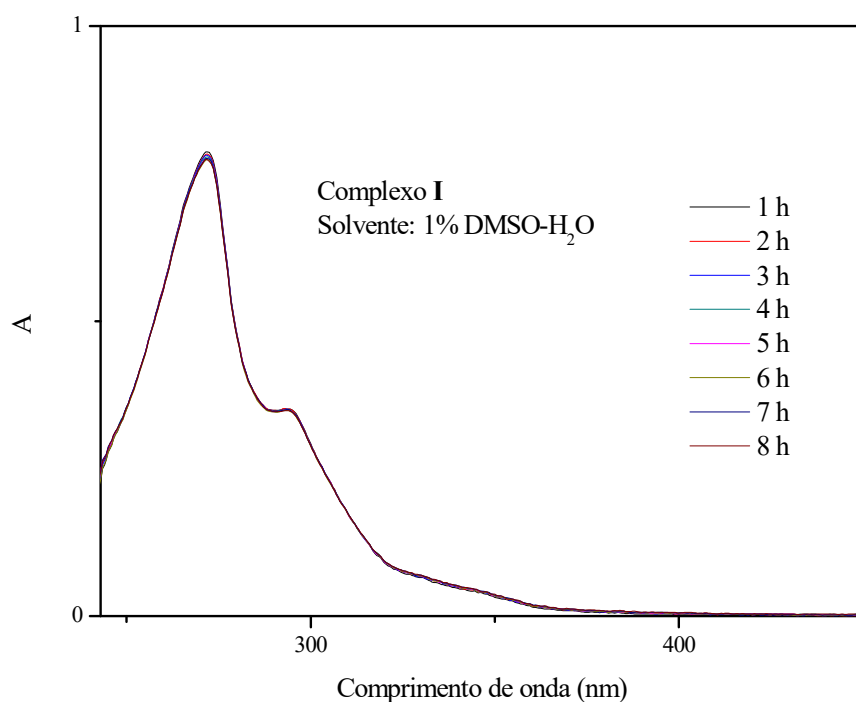
Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com os resultados obtidos foi observado que os ligantes 3-HPA, QNA, 2-HNA, 2-MNA e bipy exibiram baixa atividade anti-MTB. Por sua vez, a phen é mais ativa do que os demais ligantes livres. Em relação a 1,10-fenantrolina (phen), essa molécula e seus derivados foram reconhecidos como potenciais agentes antimicobacterianos (PAVAN, et al., 2011; DANAC, MANGALAGIU, 2014; DANAC, et al., 2015). Os complexos, por sua vez, apresentaram valores de CIM entre 1,56 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a ordem de atividade é **X > VII > IV > I > VIII > XI > V > III > II > VI > XII > IX**. Os complexos com 1,10-fenantrolina (phen) foram mais ativos do que aqueles com 2,2-bipiridina (bipy) e seus respectivos ligantes. Os complexos **IV**, **VII** e **X** apresentaram boa atividade, com valores de CIM menores que 2,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foram 9, 12 e 16 vezes mais ativos que os respectivos ligantes livres QNA, 2-HNA e 2-MNA, respectivamente. Como previsto, a rifampicina sendo um fármaco de referência de primeira linha, apresenta excelente atividade anti-MTB e por essa razão é tão utilizada no tratamento da tuberculose.

4.8. Teste de estabilidade

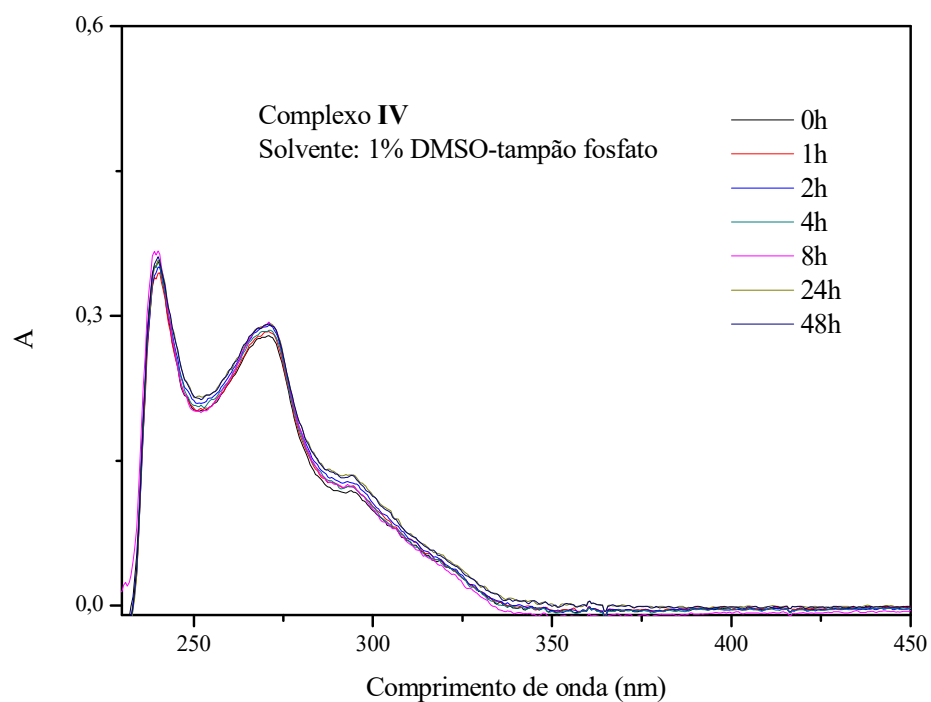
A estabilidade é um fator muito importante para o desenvolvimento de complexos metálicos para fins medicinais, visto que a maioria dos quimioterápicos é administrada em solução por via intravenosa. Assim, a estabilidade dos complexos mais promissores, **I**, **IV**, **VII**, **X**, **XIII**, foi avaliada por espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis em diferentes intervalos de tempos utilizando uma mistura contendo DMSO/tampão fosfato (1:99 v/v) ou DMSO/água (1:99 v/v). Os valores de absorbância e comprimento de onda não sofreram alterações (Figuras 48, 49, 50, 51 e 52). Estes resultados indicam que os complexos são estáveis em solução por pelo menos 24 h sob as condições do ensaio.

Figura 48. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo **I** em diferentes intervalos de tempo.



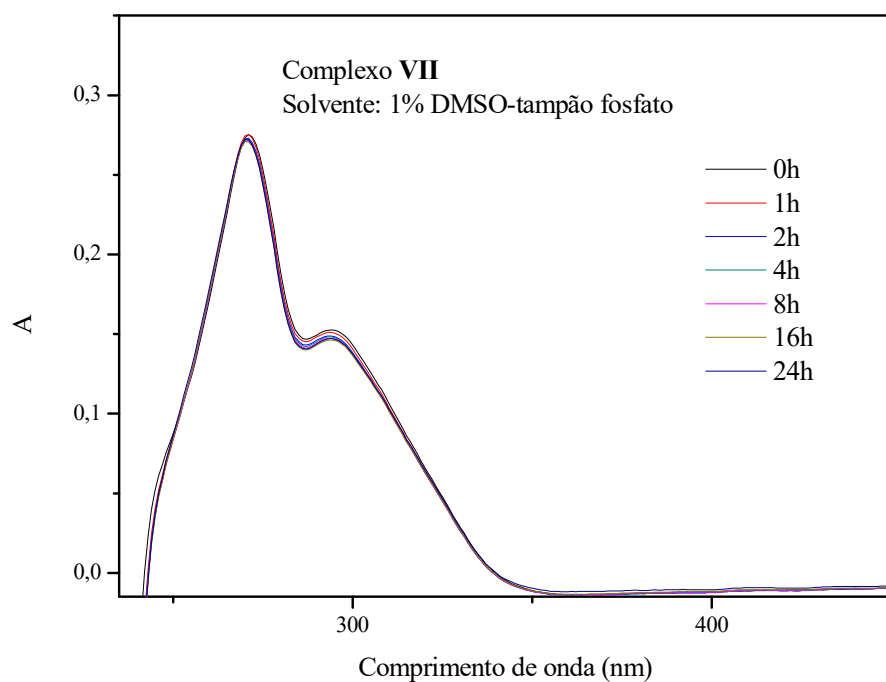
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 49. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo **IV** em diferentes intervalos de tempo.



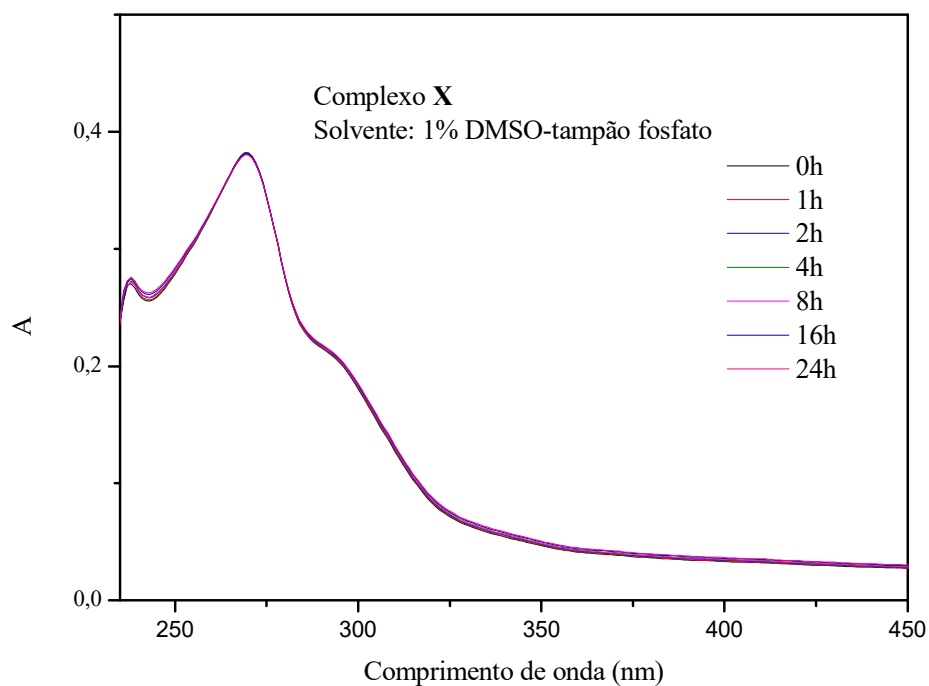
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 50. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo **VII** em diferentes intervalos de tempo.



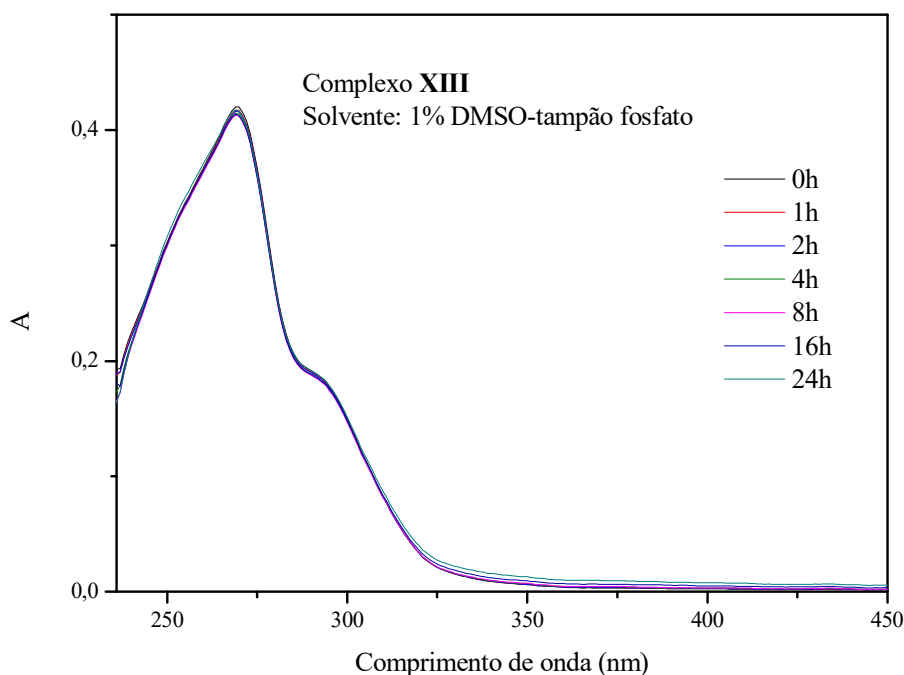
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 51. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo **X** em diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 52. Espectros de absorção na região do UV-Vis para o complexo **XIII** em diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Dados da pesquisa.

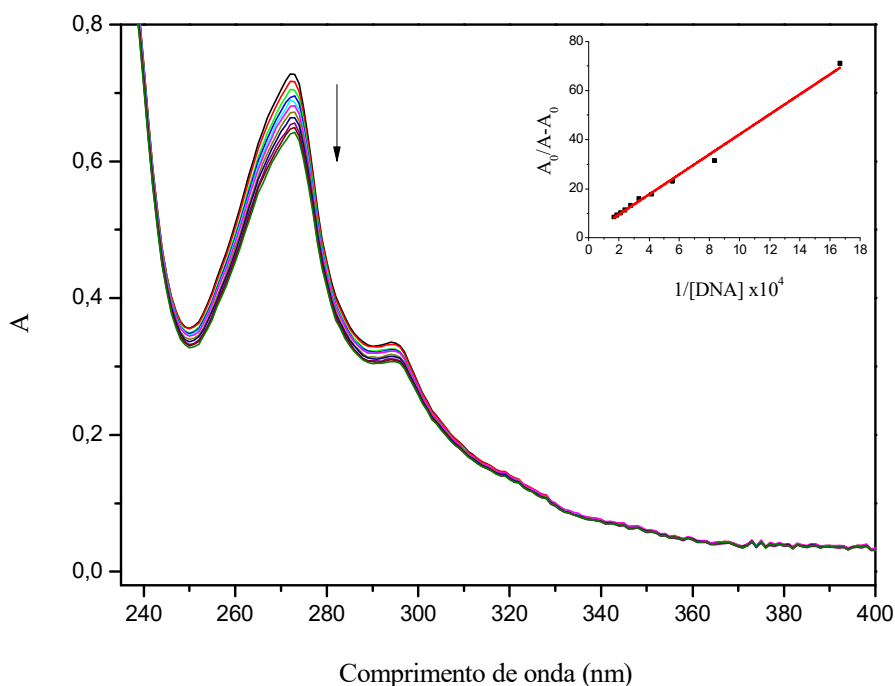
4.9. Interação com ADN

A interação entre complexos metálicos com atividade biológica e ADN tem sido alvo de vários estudos, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação e a eficácia desses compostos (BRABEC, KASPARKOVA, 2018). O modo de ligação envolvido na interação entre um complexo metálico e o ADN pode ser covalente, através da ligação direta do complexo ao ADN, por meio de suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato, ou não covalente, através de interações eletrostática, intercalação e ligação ao sulco menor do ADN (SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013). A interação entre complexos metálicos e ct-ADN tem sido estudada com frequência utilizando espectroscopia na região UV-Vis. Durante a interação entre um complexo metálico e o ADN, são observadas alterações no perfil do espectro de absorção na região do UV-Vis, o que pode dar indícios importantes sobre o modo de ligação. De acordo com a literatura, quando a interação do complexo com o ADN ocorre por intercalação, envolve interação π - π^* entre um cromóforo aromático do ligante e o par de bases nitrogenadas do ADN, causando uma diminuição na energia da transição π - π^* , que resulta em um efeito hipocrômico frequentemente acompanhado de um desvio para o

vermelho (batocromismo) (SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013; KAZEMI, et al., 2015; REHMAN, et al., 2015; BARRA, et al., 2016). O efeito hipercrômico pode ser atribuído ao modo de ligação ao sulco, que está associado à desnaturação da estrutura de dupla hélice do ADN (KAZEMI, et al., 2015; REHMAN, et al., 2015). Além disso, o hipercromismo também pode ser resultado da ligação eletrostática entre compostos catiônicos e grupos fosfato do ADN (SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013).

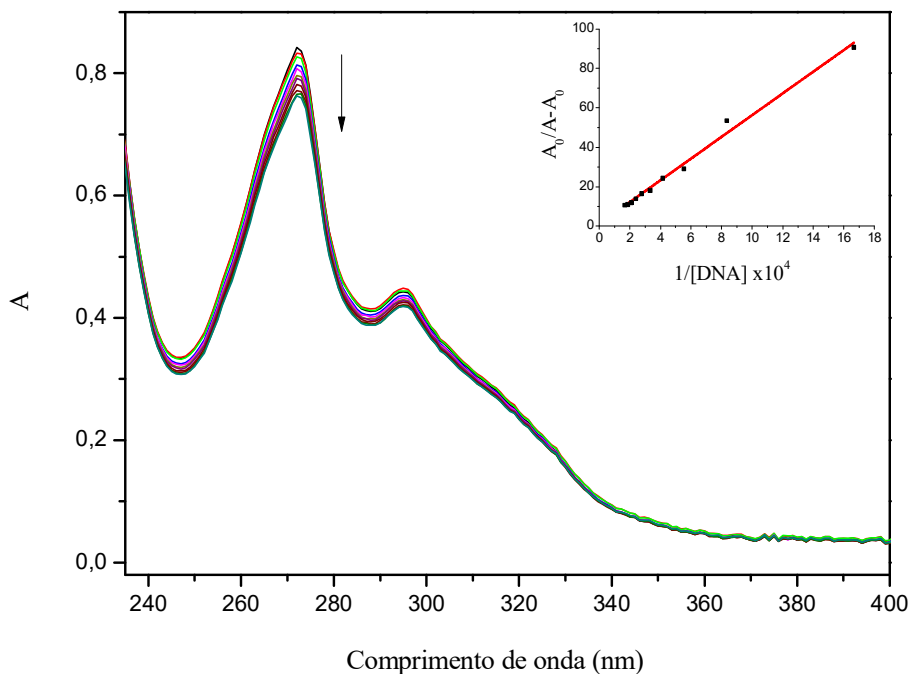
As Figuras 53, 54, 55 e 56 mostram os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível dos complexos **IV**, **VII**, **X** e **XIII** com ct-ADN. O aumento na concentração de ct-ADN resultou em um efeito hipocrômico na banda intraligante localizada próxima a 270 nm para todos os complexos. Os valores da constante de ligação intrínseca (K_b) dos complexos foram obtidos por meio da equação de Benesi-Hildebrand (duplo-recíproco) (Tabela 13).

Figura 53. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo **IV** ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$.



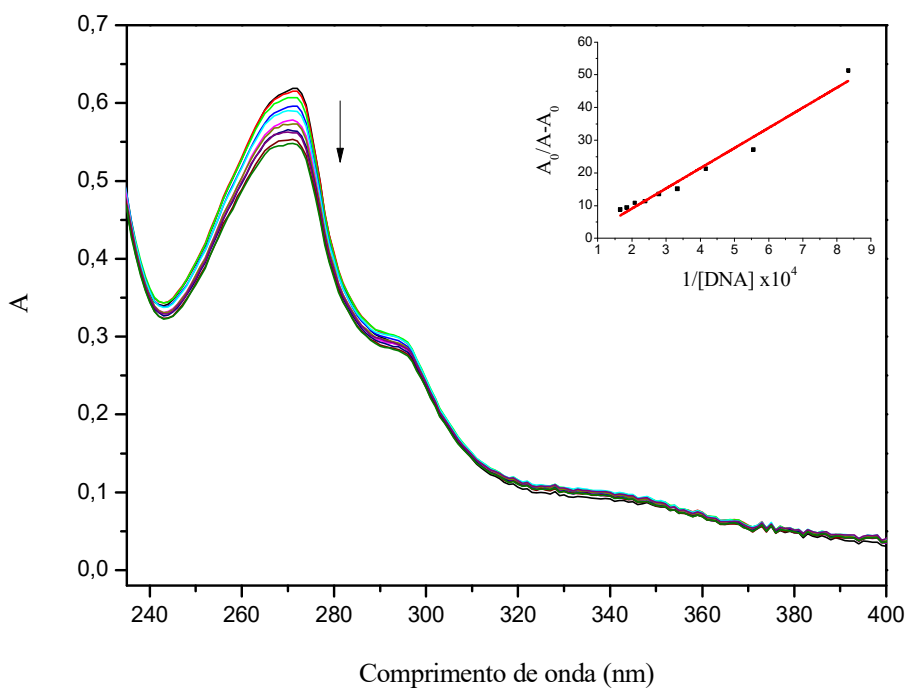
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 54. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo **VII** ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$.



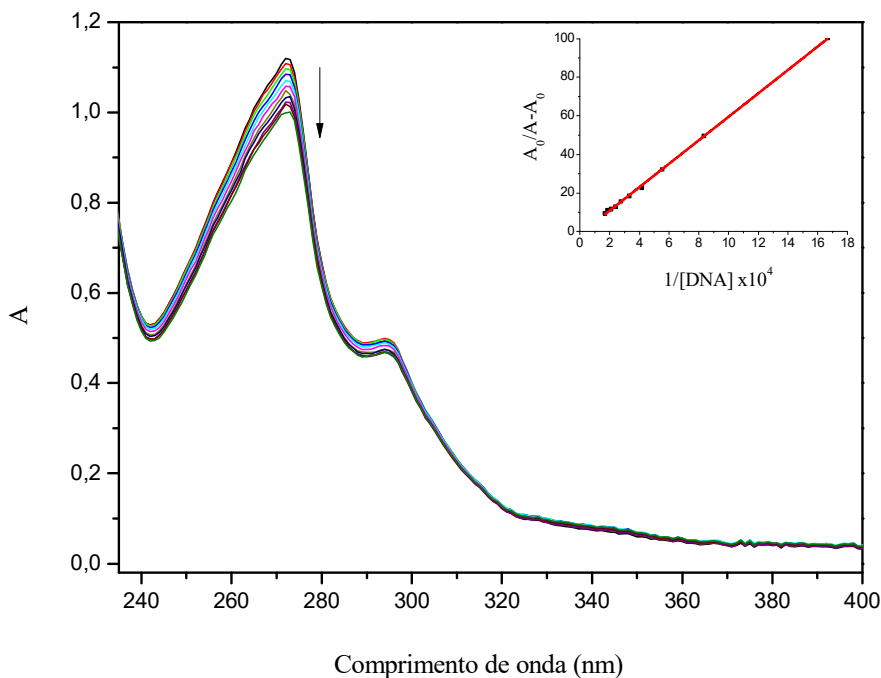
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 55. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo **X** ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH=7,3). Requadro: $A_0/A-A_0$ versus $1/[ADN]$.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 56. Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções contendo o complexo **XIII** ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e concentrações crescentes de ct-ADN, variando de 0 a $3,0 \times 10^{-4}$ M, em tampão (pH = 7,3). Requadro: $A_0/A - A_0$ versus $1/[\text{ADN}]$.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 13. Constantes de ligação ao ADN (K_b) para os complexos de cobre(II).

Complexo	K_b (M^{-1})	R^*
IV	$3,34 \times 10^3$	0,9927
VII	$2,17 \times 10^3$	0,9892
X	$5,26 \times 10^3$	0,9708
XIII	$2,13 \times 10^3$	0,9994

* coeficiente de correlação.

Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a literatura, metalintercaladores e intercaladores clássicos apresentam valores de K_b na faixa de 10^5 a 10^7 M^{-1} (WHEATE, et al., 2007). Os valores de K_b obtidos para os complexos de cobre(II) são inferiores aos valores de K_b relatados. Entretanto, em trabalhos anteriores, obtivemos valores semelhantes de K_b para complexos de cobre(II) (10^3 e 10^4 M^{-1}) (PAIXÃO, et al., 2017; PAIXÃO, et al. 2019). Os compostos de Cu(II) descritos neste trabalho apresentam natureza catiônica em solução, sendo possível a ocorrência da

interação por meio de forças eletrostáticas com o grupo fosfato da estrutura do ADN. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de ocorrer ligação ao sulco do ADN.

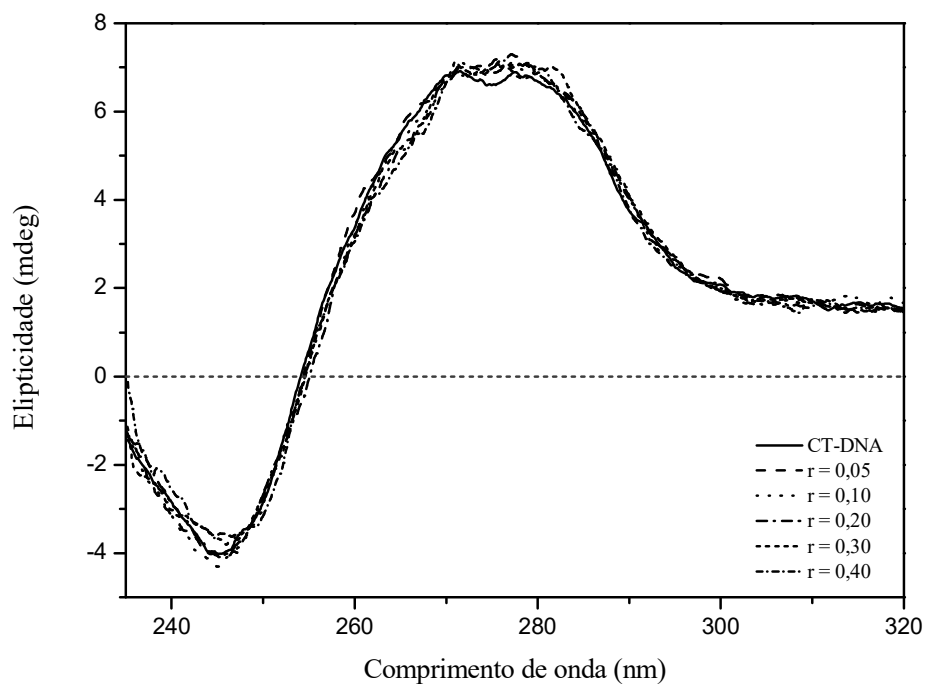
A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é uma técnica altamente sensível para investigar alterações na morfologia do ADN causadas por interações com fármacos (CHANG, CHEN, HOU, 2012). O espectro de DC do ADN livre é composto por duas bandas características na região de 220 a 300 nm, que fornecem informações sobre a estrutura secundária do ADN. Uma banda negativa em aproximadamente 245 nm associada à helicidade da forma B do ADN e outra banda positiva em torno de 275 nm atribuída ao empilhamento π - π^* das bases nitrogenadas do ADN (RODGER, NORDÉN, 1997; REHMAN, et al., 2015; PAIXÃO, et al., 2019). Geralmente, o efeito hipocrômico na banda positiva (~ 275 nm) é observado na intercalação, enquanto pouca ou nenhuma alteração nos espectros de DC indica a ocorrência de ligação ao sulco ou interação eletrostática (REHMAN, et al., 2015; PAIXÃO, et al., 2017).

Os espectros obtidos para os complexos **VII** e **XIII** (Figuras 57 e 58) na presença de concentrações crescentes dos derivados metálicos não resultou em alterações significativas nas bandas positiva e negativa. Esse perfil espectral de DC sugere uma interação não intercalativa, como interação eletrostática ou simples ligação ao sulco. Além disso, é razoável assumir a ocorrência de ligações de hidrogênio na interação com o ADN, uma vez que esses compostos possuem grupos OH na estrutura de seus ligantes. No caso dos outros complexos foram observados diferentes perfis de DC, em que no espectro do complexo **IV** (Figura 59) foi observado hipercromismo a 275 nm (banda positiva) e no espectro do complexo **X** (Figura 60) foi observado o mesmo efeito nas duas bandas (positiva e negativa).

Na estrutura dos complexos **IV** e **X**, a presença dos anéis aromáticos dos ligantes pode levar à acomodação no sulco menor da biomolécula, envolvendo interação hidrofóbica e causando grandes danos ao ADN, o que justifica o efeito hipercrômico observado. Curiosamente, esses compostos apresentam os maiores valores de K_b (Tabela 13). De acordo com a literatura, um aumento na absorbância reflete danos à estrutura helicoidal do ADN, como desenrolamento parcial da estrutura helicoidal do ADN, que expõe mais bases da biomolécula (ALI, et al., 2013; DORRAJI, JALALI, 2013; SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013). Além disso, espécies catiônicas, como os complexos investigados neste estudo, podem se ligar ao ADN por meio da cadeia do grupo fosfato, causando contração e danos gerais à estrutura secundária do ADN (SIRAJUDDIN, ALI, BADSHAH, 2013). Assim, os resultados de DC obtidos sugerem uma interação não intercalativa, como interação eletrostática e/ou

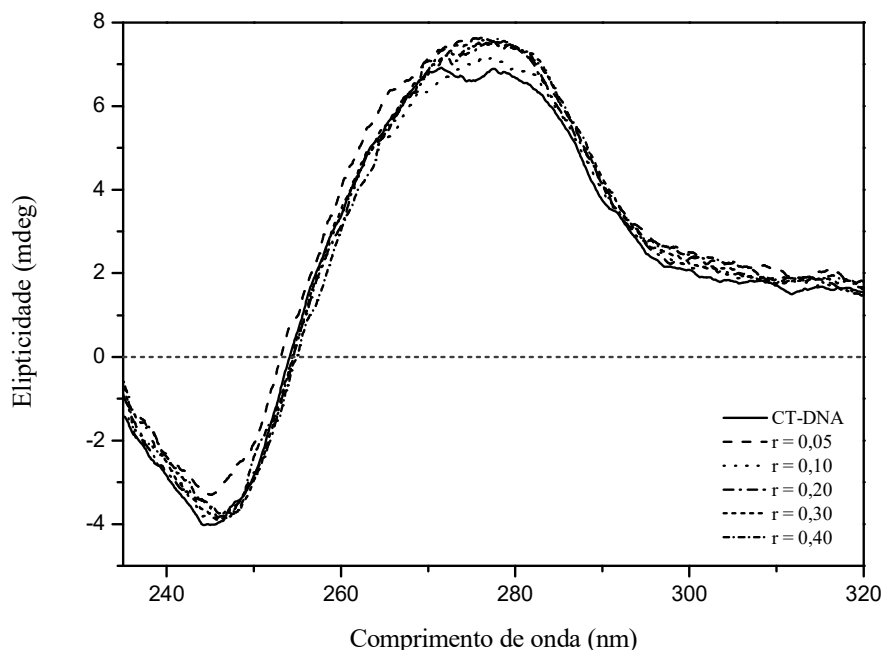
ligação simples ao sulco para todos os complexos, esse comportamento é consistente com os resultados de absorção por UV-Vis previamente relatados.

Figura 57. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ /NaCl $5,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ na presença de concentrações crescentes do complexo **VII** ($1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ([complexo]/[ADN]).



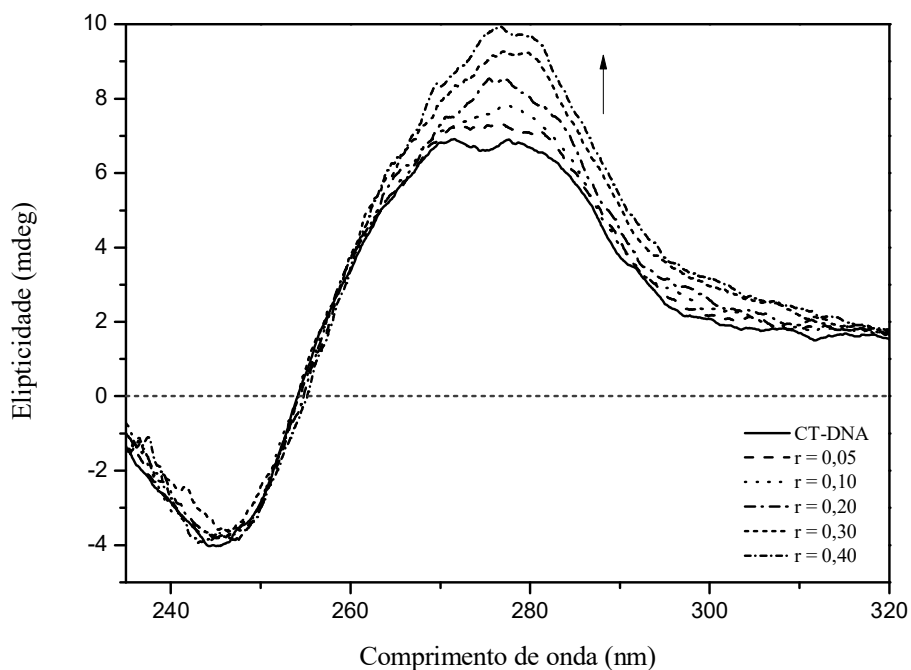
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 58. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo **XIII** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ([complexo]/[ADN]).



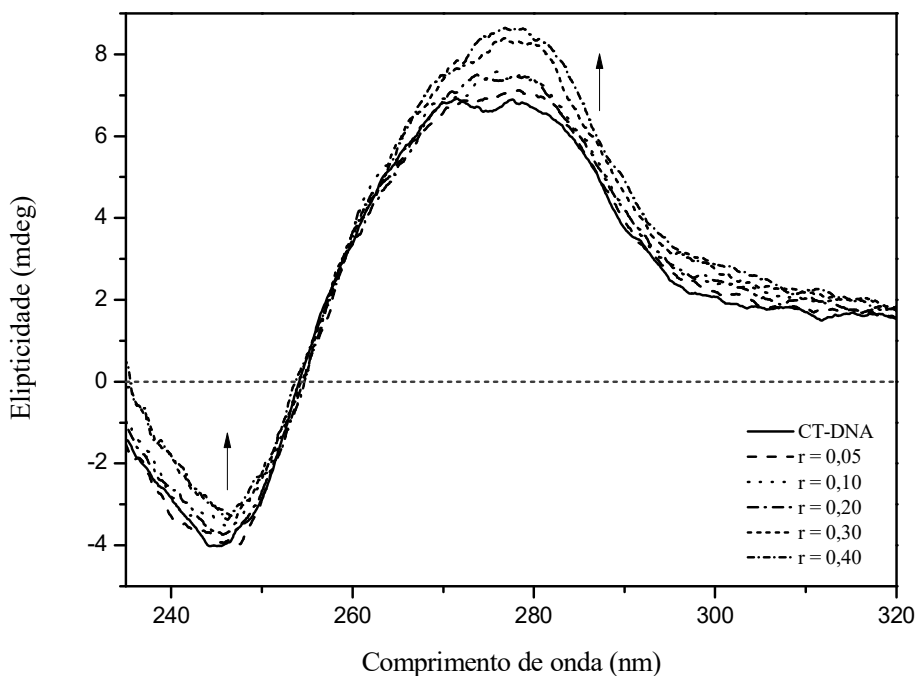
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 59. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo **IV** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ([complexo]/[ADN]).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 60. Espectro de dicroísmo circular de ct-ADN ($5,0 \times 10^{-5}$ M) em tampão tris-HCl $5,0 \times 10^{-3}$ M/NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M na presença de concentrações crescentes do complexo **X** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, DMSO), r = razão molar entre as concentrações de complexo e ADN ([complexo]/[ADN]).



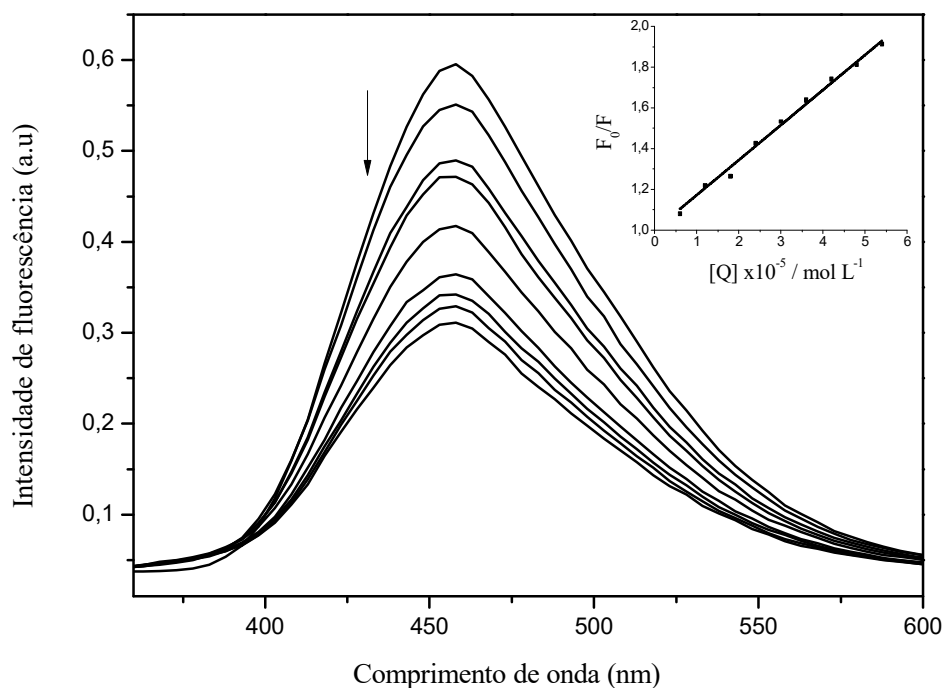
Fonte: Dados da pesquisa.

O modo de ligação entre ct-ADN e os complexos cobre(II) também foi investigado por meio do experimento de competição por fluorescência com Hoechst 33258, que é uma sonda de fluorescência sensível, que se liga ao sulco menor da hélice de ADN, resultando em um aumento significativo da intensidade da fluorescência do sistema Hoechst-ADN (RUIZ, et al., 2013; REHMAN, et al., 2015).

A Figura 61 mostra o espectro de fluorescência da solução de Hoechst-ADN com concentrações crescentes do complexo **IV**, o que resultou em extinguir progressivamente a fluorescência. Esse comportamento também foi observado para os complexos **VII**, **X** e **XIII**, revelando que os complexos de cobre(II) são capazes de se ligar ao sulco menor do ADN, liberando Hoechst 33258 da estrutura da biomolécula. Os espectros de fluorescência dos complexos **VII**, **X** e **XIII** estão representados nas Figuras 62, 63 e 64. Os valores da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) obtidos para os complexos estão entre 10^3 - 10^4 M^{-1} (Tabela 14) e são consistentes com os relatados na literatura (JALALI, RASAEI, 2015). Os resultados obtidos neste ensaio estão de acordo com os resultados previamente relatados de absorção por UV-Vis

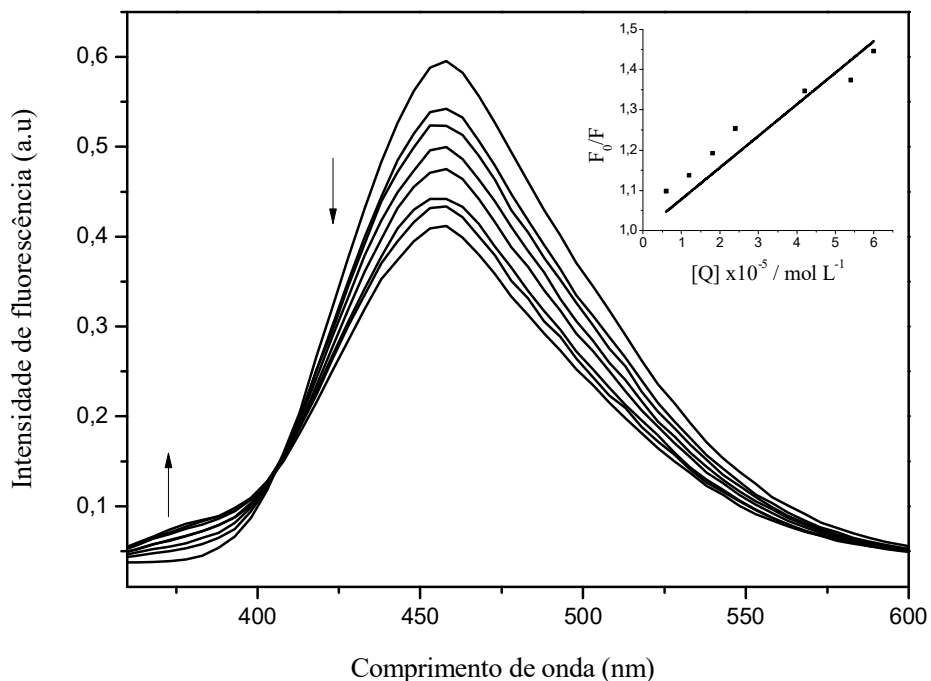
e dicroísmo circular. Embora testes adicionais devam ser realizados, é possível inferir que os complexos alteram a estrutura do ADN tendo como efeito a inibição do crescimento celular.

Figura 61. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo **IV**. $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$, $[\text{Hoechst}] = 6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{ADN}] = 6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Complexo}] = 0-6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$.



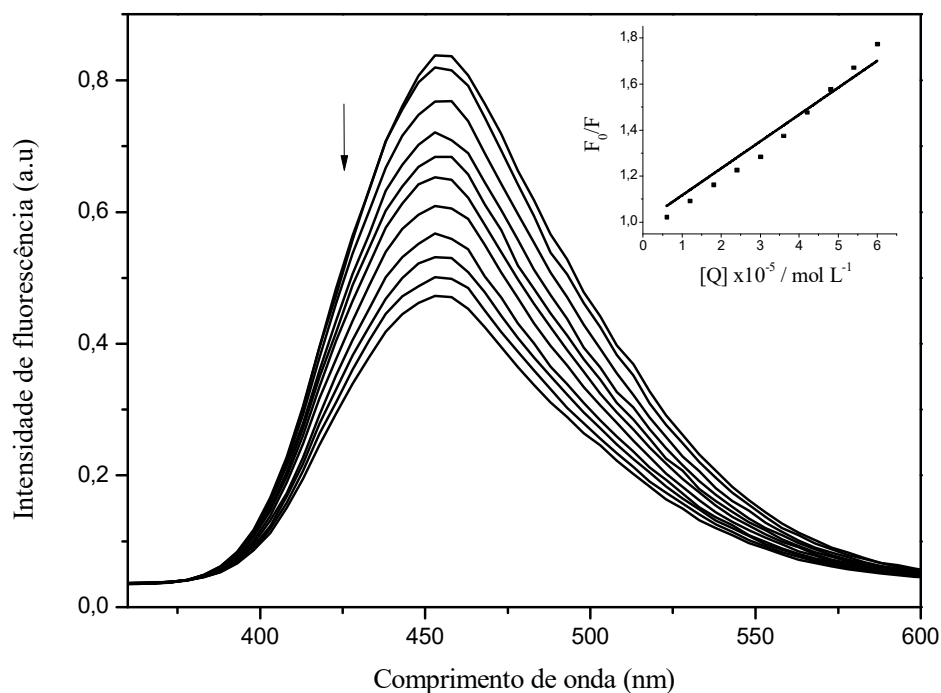
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 62. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo **VII**. $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$, $[\text{Hoechst}] = 6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{ADN}] = 6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Complexo}] = 0-6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$.



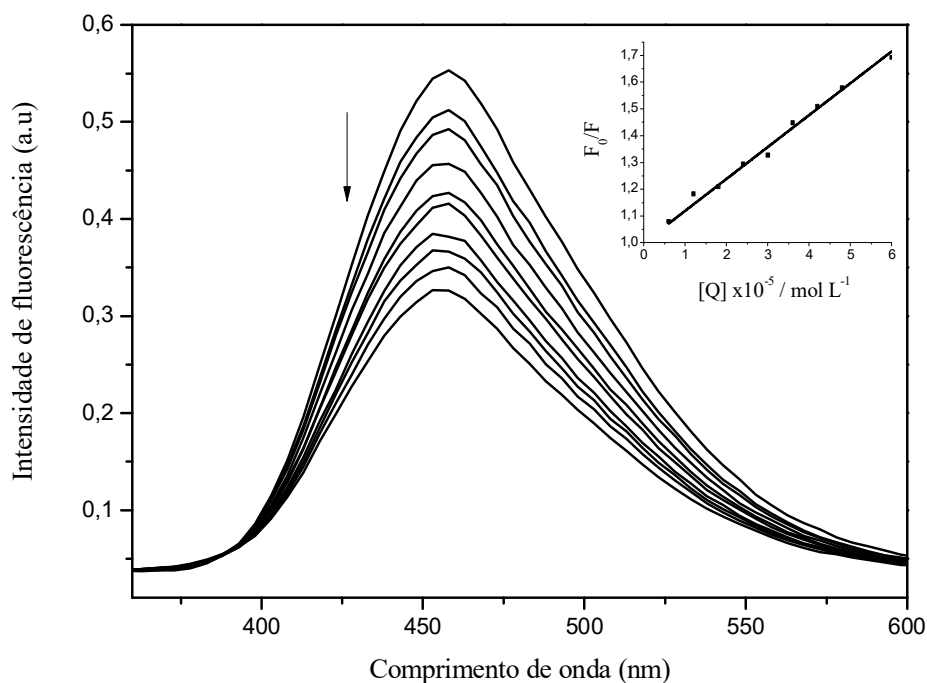
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 63. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo **X**. $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$, $[\text{Hoechst}] = 6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{ADN}] = 6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Complexo}] = 0-6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 64. Espectros de fluorescência dos sistemas Hoechst-ADN em tampão aquoso na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo **XIII**. $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$, $[\text{Hoechst}] = 6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{ADN}] = 6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Complexo}] = 0-6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 14. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}) para os complexos de cobre(II).

Complexo	$K_{\text{sv}} (\text{M}^{-1})$	R^*
IV	$1,72 \times 10^4$	0,9998
VII	$7,84 \times 10^3$	0,9985
X	$1,17 \times 10^4$	0,9986
XIII	$1,19 \times 10^4$	0,9998

* coeficiente de correlação.

Fonte: Dados da pesquisa.

5. CONCLUSÕES

Quinze complexos de cobre(II) do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$ e $[\text{Cu}(\text{L-L})_2]$, onde L-L é um derivado dos ácidos picolínico ou nicotínico e N-N é uma base heterocíclica (fenantrolina ou bipyridina), foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, condutimétrica, IV, UV-Vis, RPE e espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray* (HRESIMS). Para os complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})(\text{N-N})\text{ClO}_4]$, os resultados mostraram que o íon cobre está coordenado aos dois ligantes de modo bidentado e a esfera de coordenação é completada por um grupo perclorato fracamente ligado, no estado sólido, portanto o íon metálico tem uma geometria piramidal quadrada distorcida. Para os complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{L-L})_2]$, os resultados indicaram que o íon cobre está coordenado a dois ligantes de modo bidentado, contudo o íon metálico tem uma geometria quadrada planar. O estudo de estabilidade por UV-Vis feito em diferentes intervalos de tempo em condições semelhantes às utilizadas nos ensaios biológicos indicam que as espécies $[\text{Cu}(\text{N-O})(\text{N-N})]^+$ mantém inalteradas em solução, mesmo após 24 horas. A atividade citotóxica dos complexos e seus respectivos ligantes foi avaliada contra três células tumorais (A549, K562, MDA-MB-231) e duas células normais (MRC-5, MCF-10A). Os complexos de cobre(II) contendo fenantrolina foram mais eficazes do que os ligantes livres, complexos de cobre contendo bipyridina e carboplatina, exibindo atividade citotóxica promissora. Considerando os complexos mais promissores (IV, VII, X e XIII), seus mecanismos de interação com o ADN foram analisados por dicroísmo circular, UV-Vis e espectroscopia de fluorescência. Os complexos de cobre(II) se ligam ao ct-ADN com valores de K_b na faixa de 10^3 M^{-1} . De acordo com dados do DC e espectroscopia de fluorescência, os complexos parecem se ligar ao sulco do ADN, o que acarreta o efeito biológico observado. A atividade antimicobacteriana dos complexos e seus respectivos ligantes também foi avaliada contra a linhagem sensível MTB H37Rv (ATCC 27294). Os complexos com fenantrolina foram mais ativos do que os ligantes livres e complexos de cobre contendo bipyridina. Considerando nossos estudos, conclui-se que os complexos de cobre(II) contendo fenantrolina apresentam boa atividade citotóxica e antimicobacteriana e são candidatos promissores para estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ALI, I.; WANI, W. A.; SALEEM, K.; HSEIH, M. Design and synthesis of thalidomide based dithiocarbamate Cu(II), Ni(II) and Ru(III) complexes as anticancer agents. **Polyhedron**. v. 56, p. 134–143, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.03.056>
- ALMEIDA, J. C. **Síntese, caracterização e atividade citotóxica de complexos de Pt(II), Pd(II) e Cu(II) contendo β -dicetonas**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- ALMEIDA, J. C.; PAIXÃO, D. A.; MARZANO, I.; ELLENA, J. M.; PIVATTO, M.; LOPES, N. P.; FERREIRA, A. M. D. C.; PEREIRA-MAIA, E. C.; GUILARDI, S.; GUERRA, W. Copper(II) complexes with β -diketones and N-donor heterocyclic ligands: Crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity. **Polyhedron**. v. 89, p. 1–8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.12.026>
- AZZOUZI, A. R.; BARRET, E.; BENNET, J.; MOORE, C.; TANEJA, S.; MUIR, G.; VILLERS, A.; COLEMAN, J.; ALLEN, C.; SCHERZ, A.; EMBERTON, M. TOOKAD® Soluble focal therapy: pooled analysis of three phase II studies assessing the minimally invasive ablation of localized prostate cancer. **World Journal of Urology**. v. 33, n. 7, p. 945–953, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00345-015-1505-8>
- BARBOSA, M. I. F.; CORRÊA, R. S.; POZZI, L. V.; LOPES, E. O.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; ELLENA, J.; MACHADO, S. P.; VON POELHSITZ, G.; BATISTA, A. A. Ruthenium(II) complexes with hydroxypyridinecarboxylates: Screening potential metallodrugs against *Mycobacterium tuberculosis*. **Polyhedron**. v. 85, p. 376–382, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2014.08.057>
- BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; MOREL, L.; GAUTIER, A.; GARRIDO, S. S.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G.; NETTO, A. V. G. DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium(II) complexes with 1,10-phenanthroline and thioureas. **Inorganica Chimica Acta**. v. 446, p. 54–60, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.02.053>

BARRY, N. P.; SADLER, P. J. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. **Pure and Applied Chemistry**. v. 86, n. 12, p. 1897–1910, 2014. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-0504>

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n. 6, p. 4–6, 2005.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H.; SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 106, n. 1, p. 90–99, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030>

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**. v. 24, p. 684–703, 1997. <https://doi.org/10.1093/clind/24.4.684>

BERNSTEIN, L. R.; VAN DER HOEVEN, J. J. M.; BOER, R. O. Hepatocellular carcinoma detection by gallium scan and subsequent treatment by gallium maltolate: Rationale and case study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 11, n. 6, p. 585–590, 2011. <https://doi.org/10.2174/187152011796011046>

BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C. M.; FUNARI, M. B. G.; SOARES JÚNIOR, J.; SEISCENTO, M.; TERRA FILHO, M. Imagem em tuberculose pulmonar. **Jornal de Pneumologia**. v. 27, n. 6, p. 329–340, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0102-35862001000600007>

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 376, p. 75–94, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.07.012>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 288p.

BRAVO-GOMEZ, M. E.; GARCIA-RAMOS, J. C.; GRACIA-MORA, I.; RUIZ-AZUARA, L. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(*N,N*)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(*N,N*)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®).

Journal of Inorganic Biochemistry. v. 103, n. 2, p. 299–309, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006>

BRIGDEN, G., HEWISON, C., VARAINE, F. New developments in the treatment of drug-resistant tuberculosis: clinical utility of bedaquiline and delamanid. **Infection and Drug**

Resistance. v. 8, p. 367–378, 2015. <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S68351>

BRUN, P.; DEAN, A.; DI MARCO, V.; SURAJIT, P.; CASTAGLIUOLO, I.; CARTA, D.; FERLIN, M. G. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ mediates the anti-inflammatory effect of 3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic acid derivatives: Synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 62, p. 486–497, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.024>

CABANTCHIK, Z. I.; GLICKSTEIN, H.; GOLENSER, J.; LOYEVSKY, M.; TSAFACK, A. Iron chelators: mode of action as antimalarials. **Acta Haematol.** v. 95, p. 70-7, 1996.

<https://doi.org/10.1159/000203952>

CHANDRALEKA, S.; RAMYA, K.; CHANDRAMOHAN, G.; DHANASEKARAN, D.; PRIYADHARSHINI, A.; PANNEERSELVAM, A. Antimicrobial mechanism of copper (II) 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens. **Journal of Saudi Chemical Society.** v. 18, p. 953–962, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.020>

CHANG, Y.; CHEN, C. K.; HOU, M. Conformational changes in DNA upon ligand binding monitored by circular dichroism. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 13, n. 3, p. 3394–3413, 2012. <https://doi.org/10.3390/ijms13033394>

CHEFF, D. M., HALL, M. D. A Drug of Such Damned Nature. Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research. **Journal medicinal chemistry.** v. 60, n. 11, p. 4517–4532, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01351>

CHEN, G. Structure and Fluorescence Properties of a Novel Supramolecular Zinc Complex. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 63b, p. 1357–1360, 2008.

<https://doi.org/10.1515/znb-2008-1203>

CHYLEWSKA, A., BIEDULSKA, M., SUMCZYŃSKI, P., MAKOWSKI, M. Metallopharmaceuticals in therapy - A new horizon for scientific research. **Current Medicinal Chemistry**. v. 25, 1729–1791, 2018.

<https://doi.org/10.2174/0929867325666171206102501>

CUEVAS, O. A.; RAMIREZ, R. C.; GARCIA, J. J. S.; LOPEZ-SANDOVAL, H.; BARBA-BEHRENS, N. Química Inorgánica Medicinal: vanadio, platino, oro. **Educación Química**. v. 23, n. 1, p. 33–40, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(17\)30095-2](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(17)30095-2)

DABROWIAK, J. C. Metals in Medicine. Segunda edição. John Wiley & Sons, 2017.

<https://doi.org/10.1002/9781119191377>

DANAC, R.; MANGALAGIU, I. I. Antimycobacterial activity of nitrogen heterocycles derivatives: Bipyridine derivatives. Part III [13], [14]. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 74, p. 664-670, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.061>

DANAC, R.; AL MATANEH, M.; SHOVA, S.; DANILOAIA, T.; BALAN, M.; MANGALAGIU, I. I. New indolizines with phenanthroline skeleton: Synthesis, structure, antimycobacterial and anticancer evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 23, n. 10, p. 2318-2327, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.077>

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**. v. 740, p. 364–78, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DEAN, A.; FERLIN, M. G.; BRUN, P.; CASTAGLIUOLO, I.; YOKEL, R. A.; VENZO, A.; BOMBI, G. G.; DI MARCO, V. B. Evaluation of 4-hydroxy-6-methyl-3-pyridinecarboxylic acid and 2,6-dimethyl-4-hydroxy-3-pyridinecarboxylic acid as chelating agents for iron and aluminium. **Inorganica Chimica Acta**. v. 373, p. 179–186, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.04.009>

DEAN, A.; FERLIN, M. G.; CVIJOVIC, M.; DJURDJEVIC, P.; DOTTO, F.; BADOCCO, D.; PASTORE, P.; VENZO, A.; DI MARCO, V. B. Evaluation of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic acid and of other 3-hydroxy-4-pyridinecarboxylic acid derivatives for possible application in iron and aluminium chelation therapy. **Polyhedron**. v. 67, p. 520–528, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.10.007>

DEEGAN, C.; COYLE, B.; MCCANN M.; DEVEREUX M.; EGAN, D. A. *In vitro* anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione(phendione), [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂·4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelial cell lines. **Chemico-Biological Interactions**. v. 164 p. 115–125, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.08.025>

DENOYER, D.; MASALDAN, S.; LA FONTAINE, S.; CATER, M. A. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’. **Metallomics**. v. 7, 1459–1476, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5mt00149h>

DEO, K. M.; ANG, D. L.; MCGHIE, B.; RAJAMANICJAM, A.; DHIMAN, A.; KHOURY, A.; HOLLAND, J.; BJELOSEVIC, A.; PAGES, B.; GORDON, C.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Platinum coordination compounds with potent anticancer activity. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 375, p. 148–163, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.014>

DHAVEETHU, K.; PADMAVATHY, S.; RAMACHANDRAMOORTHY, T.; THIRUNAVUKKARASU, K. Green synthesis, spectral, thermal and biological investigations of Cr (III), Ni (II) and Cu (II) complexes of 4-aminopyridine and nitritoligands. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 7, p. 1381–1401, 2014.

DI MARCO, V. B.; TAPPARO, A.; DOLMELLA, A.; BOMBI, G. G. Complexation of 2-hydroxynicotinic and 3-hydroxypicolinic acids with zinc(II). Solution state study and crystal structure of *trans*-diaqua-*bis*-(3-hydroxypicolinato)zinc(II). **Inorganica Chimica Acta**. v. 357, p. 135–142, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00500-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00500-0)

DI MARCO, V. B.; DEAN, A.; FERLIN, M. G.; YOKEL, R. A.; LI, H.; VENZO, A.; BOMBI, G. G. Methyl-Hydroxypyridinecarboxylic Acids as Possible Bidentate Chelating Agents for Aluminium(III): Synthesis and Metal–Ligand Solution Chemistry. **European**

Journal of Inorganic Chemistry, v. 2006, n. 6, p. 1284–1293, 2006. <https://doi.org/10.1002/ejic.200500986>

DIAS, H. V. R.; BATDORF, K. H.; FIANCHINI, M.; DIYABALANAGE H. V. K.; CARNAHAN, S.; MULCAHY, R.; RABIEE, A.; NELSON, K.; VAN WAASBERGEN, L. G. Antimicrobial properties of highly fluorinated silver(I) tris(pyrazolyl)borates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 158–160, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.10.003>

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, p. 1103–1124, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>

DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Investigation of the interaction of sertraline with calf thymus DNA by spectroscopic methods. **Journal of the Brazilian Chemical Societ.** v. 24, n. 6, p. 939–945, 2013. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130123>

EREMINA, J. A.; LIDER, E. V.; SAMSONENKO, D. G.; SHELUDYAKOVA, L. A.; BEREZIN, A. S.; KLYUSHOVA, L. S.; OSTROVSKII, V. A.; TRIFONOV, R. E. Mixed-ligand copper(II) complexes with tetrazole derivatives and 2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline: Synthesis, structure and cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 487, p. 138–144, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.12.011>

FARRELL, N. Biomedical uses and applications of Inorganic Chemistry. An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 1–4, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00100-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00100-5)

FENG, T. L.; TSANGARIS, J. M.; BARTON, A. R. Complexes of Aluminium(III) with Picolinic and Pipicolinic Acids: An ^{27}Al -NMR Investigation. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 121, p. 113–118, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00809523>

FERREIRA, B. J. M. L.; BRANDÃO, P.; MEIRELES, M.; MARTEL, F.; CORREIA-BRANCO, A.; FERNANDES, D. M.; SANTOS, T. M.; FÉLIX, V. Synthesis, structural characterization, cytotoxic properties and DNA binding of a dinuclear copper(II) complex.

Journal of Inorganic Biochemistry. v. 161, p. 9–17, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.04.026>

FERRI, A. O.; AGUIAR, B.; WILHELM, C. M.; SCHMIDT, D.; FUSSIEGER, F.; PICOLI, S. U. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p. 105–212, 2014. <https://doi.org/10.31514/RLiberato.2014v15n24.p145>

FIRMINO, G. S. S.; SOUZA, M. V. N; PESSOA, C.; LOURENÇO, M. C. S.; RESENDE, J. A. L. C.; LESSA, J. A. Synthesis and evaluation of copper(II) complexes with isoniazid-derived hydrazones as anticancer and antitubercular agentes. **Biometals.** v. 29, p. 953–963, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9968-7>

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** n. 6, p.13–18, 2005.

FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; DOU, Q.P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. **Current Pharmaceutical Design.** v. 16, n. 16, p. 1813–1825, 2010. <https://doi.org/10.2174/138161210791209009>

FRICKER, S. P. The therapeutic application of lanthanides. **Chemical Society Reviews.** v. 35, n. 6, p. 524–533, 2006. <https://doi.org/10.1039/b509608c>

FRICKER, S. P. Metal based drugs: from serendipity to design. **Dalton Transactions.** v. 43, p. 4903–4917, 2007. <https://doi.org/10.1039/b705551j>

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M.; LIU-GONZÁLEZ, M.; MACÍAS, B.; BORRÁS, J.; ALZUET, G. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of *p53* and *Bcl-2* proteins in the apoptotic mechanism. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 103, p. 923–934, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.04.003>

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 7, n. 1, p. 81–122, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0)

GIRGINOVA, P. I.; PAZ, F. A. A.; NOGUEIRA, H. I. S.; SILVA, N. J. O.; AMARAL, V. S.; KLINOWSKI, J.; TRINDADE, T. Synthesis, characterisation and magnetic properties of copper(II) complexes with 3-hydroxypicolinic acid (HpicOH): the crystal structure of $[\text{Cu}(\text{picOH})_2(\text{BPE})]_2 \cdot [\text{Cu}(\text{picOH})_2(\text{BPE})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. **Journal of Molecular Structure**. v. 737, p. 221–229, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.10.035>

GÓMEZ-RUIZ, S.; MAKSIMOVIĆ-IVANIĆ, D.; MIJATOVIĆ, S.; KALUDEROVIĆ, G.N. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2012, p. 1–14, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/140284>

GZIUT, M.; MACGREGOR, H. J.; NEVELL, T. G.; MASON, T.; LAIGHT, D.; SHUTE J. K. Anti-inflammatory effects of tobramycin and a copper-tobramycin complex with superoxide dismutase-like activity. **British Journal of Pharmacology**. v. 168, p. 1165–1181, 2013. <https://doi.org/10.1111/bph.12018>

HATHAWAY, B. J.; UNDERHILL, A. E. The infrared spectra of some transition-metal perchlorates. *Journal of the Chemical Society*. n. 0, p. 3091–3096, 1961. <https://doi.org/10.1039/JR9610003091>

HELM, K. F.; MARKS, J. G.; LEYDEN, J. J.; GUZZO, C.; KRUEGER, G. G.; GRIFFITHS, T. W.; GRIFFITHS, C. E. M. Topical auranofin ointment for the treatment of plaque psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 33, p. 517-9, 1995. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(95\)91402-1](https://doi.org/10.1016/0190-9622(95)91402-1)

HOAGLAND, D. T.; LIU, J.; LEE, R. B.; LEE, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 102, p. 55–72, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.026>

HOONJAN, M.; JADHAV, V.; BHATT, P. Arsenic trioxide: insights into its evolution to an anticancer agent. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. v. 23, p. 313–329, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s00775-018-1537-9>

HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A.G. Química inorgânica. Volume 2. ISBN: 9788521613281. 4. ed. Rio de Janeiro. LTC, 2013.

İNCI, D.; AYDIN, R.; VATAN, O.; ŞAHİN, O.; ÇINKILIÇ, N. Water-soluble binary and ternary palladium(II) complexes containing amino acids and intercalating ligands: synthesis, characterization, biomolecular interactions and cytotoxicities. **New Journal of Chemistry**. v. 43, p. 4681–4697, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8NJ05934A>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA)-**ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2011. 128 f. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - Ministério da Saúde. **O que é câncer**. 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em out. 2018.

JALALI, F.; RASAEI, G. Electrochemical, spectroscopic, and theoretical studies on the interaction between azathioprine and DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 81, p. 427–434, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.025>

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. The next generation of platinum drugs: Targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. **Chemical Reviews**. v. 116, p. 3436–3486, 2016. [https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acs.chemrev.5b00597](https://doi.org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acs.chemrev.5b00597)

JOSEPH, J.; NAGASHIRI, K.; SUMAN, A. Synthesis, characterization and pharmacological studies of copper complexes of flavone derivatives as potential anti-tuberculosis agents. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 162, p. 125–145, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.033>

JULIUS, U.; FISCHER, S. Nicotinic acid as a lipid-modifying drug – A review.

Atherosclerosis Supplements. v. 14, p. 7–13, 2013.

<https://doi.org/10.106/j.atherosclerosisissup.2012.10.036>

KACHADOURIAN, R.; BRECHBUHL, H. M.; RUIZ-AZUARA, L.; GRACIA-MORA, I.; DAY, B. J. Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. **Toxicology.** v. 268, n. 3, p. 176–183, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.010>

KAZEMI, Z.; RUDBARI, H. A.; MIRKHANI, V.; SAHIHI, M.; MOGHADAM, M.; TANGESTANINEJAD, S.; MOHAMMADPOOR-BALTORK, I. Synthesis, characterization, Crystal structure, DNA- and HSA-binding studies of a dinuclear Schiff base Zn(II) complex derived from 2-hydroxynaphtaldehyde and 2-picolyamine. **Journal of Molecular Structure.** v. 1096, p. 110–120, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.04.033>

KISS, E.; PETROHAN, K.; SANNA, D.; GARRIBBA, E.; MICERA, G.; KISS, T. Solution speciation and spectral studies on oxovanadium(IV) complexes of pyridinecarboxylic acids. **Polyhedron.** v. 19, p. 55–61, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(99\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(99)00323-X)

KOLEY, M. K.; PARSEKAR, S. U.; DURAI PANDY, N.; KIRAN, M. S.; VARGHESE, B.; MANOHARAN, P. T.; KOLEY, A. P. DNA binding and cytotoxicity of two Cu(II) complexes containing a Schiff base ligand along with 1,10-phenanthroline or imidazole as a coligand. **Inorganica Chimica Acta.** v. 478, p. 211–221, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.04.017>

KONARIKOVA, K.; PERDIKARIS, G. A.; GBELCOVA, H.; ANDREZALOVA, L.; SVEDA, M.; RUMIL, T.; LAUBERTOVA, L.; REZNAKOVA, S.; ZITNANOVA, I. Autophagy in MCF-7 cancer cells induced by copper complexes. **Pharmacological Reports.** v. 68, p. 1221–1224, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.07.011>

KOSTELIDOU, A.; KALOGIANNIS, S.; BEGOU, O.A.; PERDIH, F.; TUREL, I.; PSOMAS, G. Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with gatifloxacin. **Polyhedron.** v. 119, p. 359–370, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.09.012>

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**. v. 469, p. 483–490, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature09657>

KUKOVEC, B.; POPOVIC, Z.; PAVLOVIC, G.; LINARIC, M. R. Synthesis and structure of cobalt(II) complexes with hydroxyl derivatives of piridinecarboxylic acids: Conformation analysis of ligands in the solid state. **Journal of Molecular Structure**. v. 882, p. 47–55, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.09.011>

LAZAREVIĆ, T.; RILAK, A.; BUGARČIĆ, Z. D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 142, p. 8–31, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>

LEWIS, D. L.; ESTES, E. D.; DEREK J. H. The infrared spectra of coordinated perchlorates. **Journal of Molecular Structure**. v. 5, p.67-74, 1975. <https://doi.org/10.1007/BF01202553>

LIAN, W. J.; WANG, X. T.; XIE, C. Z.; TIAN, H.; SONG, X. Q.; PAN, H. T.; QIAO, X.; XU, J. Y. Mixed-ligand copper(II) Schiff base complexes: the role of the co-ligand in DNA binding, DNA cleavage, protein binding and cytotoxicity. **Dalton Transactions**. v. 45, p. 9073–9087, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6DT00461J>

LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. A.; PAULA, F. C. S.; FERREIRA, A. M. D. C.; ELLENA, J.; GUILARDI, S.; PEREIRA-MAIA, E. C.; GUERRA, W. A new copper(II) complex with 2-thenoyltrifluoroacetone and 2,2-bipyridine: Crystal structure, spectral properties and cytotoxic activity. **Journal of Molecular Structure**. v. 1034, p. 84–88, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.022>

LUKASOVA, M.; HANSON, J.; TUNARU, S.; OFFERMANN, S. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 32, p. 700–707, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.08.002>

MANIKANDAMATHAVAN, V. M.; PARAMESWARI, R. P.; WEYHERMÜLLER, T.; VASANTH, H. R.; NAIR, B. U. Cytotoxic copper (II) mixed ligand complexes: Crystal structure and DNA cleavage activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 4537–4547, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.030>

MARTINS, N. D.; SILVA, M. S.; SILVA, A. S.; BEJA, A. M.; SOBRAL, A. J. F. N. (Benzoato- κ^2 O,O')(quinoline-2-carboxylato- κ^2 N,O)(quinoline-2-carboxylic acid- κ^2 N,O)copper(II). **Acta Crystallographica**. v. E64, p. m829–m830, 2008. <https://doi.org/10.1107/S1600536808014268>

MARZANO, C.; PELLEI, M.; TISATO, F.; SANTINI, C. Copper Complexes as Anticancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 185–211, 2009. <https://doi.org/10.2174/187152009787313837>

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.002>

MCCARRON, P.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; KAVANAGH, K.; SKERRY, C.; KARAKOUSIS, P. C.; AOR, A. C.; MELLO, T. P.; SANTOS, A. L. S.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R. Unprecedented *in Vitro* Antitubercular Activity of Manganese(II) Complexes Containing 1,10-Phenanthroline and Dicarboxylate Ligands: Increased Activity, Superior Selectivity, and Lower Toxicity in Comparison to Their Copper(II) Analogs. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 1432–1441, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01432>

MIKLOVIC, J.; SEGLA, P.; MIKLOS, D.; TITIS, J.; HERCHE, R.; MELNIK, M. Copper(II) and cobalt(II) hydroxypyridinecarboxylates: Synthesis, crystal structures, spectral and magnetic properties. **Chemical Papers**. v. 62, n. 5, p. 464–471, 2008. <https://doi.org/10.2478/s11696-008-0056-5>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS. **Informações de Saúde, Sistema de Informações sobre Mortalidade**. 2018. Disponível em < <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937> >. Acesso em out. 2018.

MISHRA, S. K.; TRIPATHI, G.; KISHORE, N.; SINGH, R. K.; SINGH, A.; TIWARI, V. K. Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 137, p. 504–544, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.005>

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**. v. 114, p. 4540–4563, 2014. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr400460s>

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 5th ed. New York: JOHN WILEY & SONS, 1997.

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy-an update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy-Dovepress**. v. 11, p. 599–616, 2017. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**. v. 3, p. 196–209, 2011. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110023>

NOGUEIRA, A. F.; FACCHINETTI, V.; SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 93, p. 3–9, 2012.

OLIVEIRA, L. P. **Síntese, caracterização, atividade citotóxica e antimicobacteriana de complexos metálicos com fluoroquinolonas**. 2018. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

OLIVEIRA, L. P.; CARNEIRO, Z. A.; RIBEIRO, C. M.; LIMA, M. F.; PAIXÃO, D. A.; PIVATTO, M.; SOUZA, M. V. N.; TEIXEIRA, L. R.; LOPES, C. D.; ALBUQUERQUE, S.; PAVAN, F. R.; GUERRA, W. Three new platinum complexes containing fluoroquinolones and DMSO: Cytotoxicity and evaluation against drug-resistant tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 183, p. 77–83, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.010>

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**. v. 99, n. 9, p. 2201–2204, 1999. <https://doi.org/10.1021/cr980419w>

PAIXÃO, D. A. **Síntese, caracterização e estudos biológicos envolvendo complexos de cobre(II) contendo hidrazidas e ligantes *N,N*-doadores**. 2017. 207 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

PAIXÃO, D. A.; MARZANO, I. M.; JAIMES, E. H. L.; PIVATTO, M.; CAMPOS, D. L.; PAVAN, F. R.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. S.; FERREIRA, A. M. C.; UEHARA, I. A.; SILVA, M. J. B.; BOTELHO, F. V.; PEREIRA-MAIA, E. C.; GUILARDI, S.; GUERRA, W. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 172, p. 138–146, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

PAIXÃO, D. A.; LOPES, C. D.; CARNEIRO, Z. A.; SOUSA, L. M.; OLIVEIRA, L. P.; LOPES, N. P.; PIVATTO, M.; CHAVES, J. D. S.; ALMEIDA, M. V.; ELLENA, J.; MOREIRA, M. B.; NETTO, A. V. G.; OLIVEIRA, R. J.; GUILARDI, S.; ALBUQUERQUE, S.; GUERRA, W. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of ternary copper(II) complexes and *in vivo* evaluation of the most promising complex. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 109, p. 157–166, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.057>

PALANIMUTHU, D.; SHINDE, S. V.; SOMASUNDARAM, K.; SAMUELSON, A. G. In Vitro and *in vivo* Anticancer Activity of Copper Bis(thiosemicarbazone) Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 56, p. 722–734, 2013. <https://doi.org/10.1021/jm300938r>

PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46, p. 2720–2722, 2002. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II)

phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 598–601, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.049>

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.023>

PETROVIĆ, M.; TODORVIĆ, D. Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. **Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology**. v. 18, n. 1, p. 12–18, 2016.

POLLONI, L.; SILVA, A. C. S.; TEIXEIRA, S. C.; AZEVEDO, F. V. P. V.; ZÓIA, M. A. P.; SILVA, M. S.; LIMA, P. M. A. P.; CORREIA, L. I. V.; ALMEIDA, J. C.; SILVA, C. V.; AVILA, V. M. R.; GOULART, L. R. F.; MORELLI, S.; GUERRA, W.; OLIVEIRA JUNIOR, R. J. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 112, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>

PRANCZK, J.; JACEWICZ, D.; WYRZYKOWSKI, D.; CHMURZYŃSKI, L. Platinum(II) and Palladium(II) Complex Compounds as Anti-cancer Drugs . Methods of Cytotoxicity Determination. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 10, p. 2–9, 2014. <https://doi.org/10.2174/157341291001140102103324>

QI, J.; YAO, Q.; TIAN, L.; WANG, Y. Piperidylthiosemicarbazones Cu(II) complexes with a high anticancer activity by catalyzing hydrogen peroxide to degrade DNA and promote apoptosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 158, p. 853–862, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.034>

QUAN, D.; NAGALINGAM, G.; PAYNE, R.; TRICCAS, J. A. New tuberculosis drug leads from naturally occurring compounds. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 56, p. 212–220, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.12.024>

QUINTAL, S. M. O.; NOGUEIRA, H. I. S.; FELIX, V.; DREW, M. G. B. Coordination modes of 2-mercaptonicotinic acid: synthesis and crystal structures of palladium(II), platinum(II), rhenium(III) and molybdenum(VI) complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**. v. 23, p. 4479–4487, 2002. <https://doi.org/10.1039/B206101E>

RABAHI, M. F.; SILVA JUNIOR, J. L. R.; FERREIRA, A. C. G.; TANNUS-SILVA, D. G. S.; CONDE, M. B. Tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 43, n. 5, p. 472–486, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37562016000000388>

REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; ISHQI, H. M.; TABISH, M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 576, p. 49–60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.024>

RIBEIRO, G. H.; COLINA-VEGAS, L.; CLAVIJO, J. C. T., ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. Ru(II)/N-N/PPh₃ complexes as potential anticancer agents against MDA-MB-231 cancer cells (N-N = diimine or diamine). **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 193, p. 70–83, 2019. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.01.006. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.006>

RODGER, A.; NORDÉN, B. Circular dichroism and linear dichroism. Volume 1. ISBN: 9780198558972. Oxford University Press, Oxford, 1997.

RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Cobre. **Química Nova na Escola**. v. 34, n.3, p. 161–162, 2012.

ROSAS, H.; SARMIENTO, L. E.; RODRIGUEZ, M.; LUBES, V. Study of the Ternary Complex Formation Between Vanadium(III)-Picolinic Acid and the Amino Acids: Cysteine, Histidine, Aspartic and Glutamic Acids. **Journal of Solution Chemistry**. v. 39, p. 1021–1029, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10953-008-9264-4>

ROSENBERG, B.; RENSHAW, E.; VANCAMP, L.; HARTWICK, J.; DROBNIK, J. Platinum-Induced filamentous growth in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 93, n.2, p. 716–721, 1967.

RUIZ, J.; VICENTE, C.; DE HARO, C.; BAUTISTA, D. Novel Bis-C,N-cyclometalated Iridium(III) thiosemicarbazide antitumor complexes: Interactions with human serum albumin and DNA, and inhibition of cathepsin B. **Inorganic Chemistry**. v. 52, n. 2, p. 974–982, 2013.

<https://doi.org/10.1021/ic302219v>

RUIZ-AZUARA, L.; BRAVO-GÓMEZ, M. E. Copper compounds in cancer chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 3606–3615, 2010.

<https://doi.org/10.2174/092986710793213751>

SANTINI, C.; PELLEI, M.; GANDIN, V.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; MARZANO, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**. v.114, p.

815–862, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400135x>

SCHAEFER M. Properties of paramagnetic metals in MRI. **Metal Based Drugs**. v. 4: p. 159-71, 1997. <http://dx.doi.org/10.1155/MBD.1997.159>

SCHWIETERT, C. W.; MCCUE, J. P. Coordination compounds in Medicinal Chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 184, p. 67–89, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00205-7](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00205-7)

SENGUL, A.; BUYUKGUNGOR, O. Trans-Diaquabis(6-hydroxypicolinato- $\kappa^2\text{N},\text{O}^2$)copper(II). **Acta Crystallographica Section C**. v. C61, p. m119–m121, 2005.

<https://doi.org/10.1107/S0108270104031178>

SERMENT-GUERRERO, J.; BRAVO-GOMEZ, M. E.; LARA-RIVERA, E.; RUIZ-AZUARA, L. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 166, p. 68–75,

2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.007>

SHI, X.; FANG, H.; GUO, Y.; YUAN, H.; GUI, Z.; WANG, X. Anticancer copper complex with nucleus, mitochondrion and cyclooxygenase-2 as multiple targets. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 190, p.38–44, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.10.003>

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SIGMAN, D. S.; GRAHAM, D. R.; D'AURORA, V.; STERN, A. M. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline. cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. **Journal of Biological Chemistry**. v. 254, n. 24, p. 12269–12272, 1979.

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SILVEIRA, J. N.; FERREIRA, A. M. C.; BORTOLOTTI, T.; FISCHER, F. L.; TERENCEZI, H.; NEVES, A.; PEREIRA-MAIA, E. C. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: Cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic Chemistry**. v. 50, n. 14, p. 6414–6424, 2011. <https://doi.org/10.1021/ic101791r>

SILVA, P. P. **Síntese, caracterização físico-química e estudo da atividade antitumoral de complexos ternários de Cu(II) com um antibiótico e uma α,α -diamina e de Ru(II) com α,α -diaminas**. 2013. 184 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SANTOS, G. C.; FERNANDES, N. G.; SILVEIRA, J. N.; FERREIRA, A. M. C.; BORTOLOTTI, T.; TERENCEZI, H.; BORTOLUZZI, A. J.; NEVES, A.; PEREIRA-MAIA, E. C. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 132, p. 67–76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.014>

SILVA, P. A. B. **Atividade Leishmanicida de novos complexos de rutênio(II) contendo dppm e ligantes N-S, N-O ou O-O doadores**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SINGH, S. K.; SRIVASTAVA, K.; BANERJEE, R.; PRASAD, J. Syntheses and single crystal X-ray diffraction studies of hydroxynicotinic acid based complexes involving supramolecular interactions. **Polyhedron**. v. 133, p. 222–230, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.05.041>

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 124, p. 1–19, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>

SOUZA, I. P.; MACHADO, B. P.; CARVALHO, A. B.; BINATTI, I.; KRAMBROCK, K.; MOLPHY, Z.; KELLETT, A.; PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA-CALDEIRA, P.P. Exploring the DNA binding, oxidative cleavage, and cytotoxic properties of new ternary copper(II) compounds containing 4-aminoantipyrine and N,N-heterocyclic co-ligands. **Journal of Molecular Structure**. v. 1178, p.18–28, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.10.004>

STOLL, S.; SCHWEIGER, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. **Journal of Magnetic Resonance**. v. 178, n. 1, p. 42–55, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science and Therapy**. v. 1, p. 1–4, 2009. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>

SUN, H.; LI, H.; MASON A. B.; WOODWORTH, R. C.; SADLER, P. J. Competitive binding of bismuth to transferrin and albumin in aqueous solution and in blood plasma. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 8829–8835, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004779200>

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 936–939, 2003. <https://doi.org/10.1126/science.1083004>

TIBERI, S.; SCARDIGLI, A.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; MUÑOZ-TORRICO, M.; SALAZAR-LEZAMA, M. A.; SPANEVELLO, A.; VISCA, D.; ZUMLA, A.; MIGLIORI, G. B.; LUNA, J. A. C. Classifying new anti-tuberculosis drugs: rationale and future perspectives. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 56, p. 181–184, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.10.026>

TIBERI, S.; MUÑOZ-TORRICO, M.; DUARTE, R.; DALCOLMO, M.; D'AMBROSIO, L.; MIGLIORI, G. B. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens.

Pulmonology. v. 24, n. 2, p. 86–98, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.009>

TIMERBAEV, A. R. Advances in developing tris(8-quinolinolato)gallium(III) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects. **Metallomics**. v. 1, p. 193–198, 2009.

<https://doi.org/10.1039/B902861G>

TISATO, F.; MARZANO, C.; PORCHIA, M.; PELLEI, M.; SANTINI, C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. **Medicinal Research Reviews**. v. 30, n. 4, p. 708–749, 2010. <https://doi.org/10.1002/med.20174>

TRUDU, F.; AMATO, F.; VANHARA, P.; PIVETTA, T.; PENA-MENDEZ, E.M.; HAVEL, J. Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. **Journal of Applied Biomedicine**. v. 13, p. 79–103, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2015.03.003>

VELHO, R. G. **Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico**. 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R (Vários autores). Tratado de Infectologia. 5ª ed. rev. e atual. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. Obra em 2 vol. ISBN: 978-85-388-0648-6.

VIGANOR, L.; SKERRY, C.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M. Tuberculosis: An Inorganic Medicinal Chemistry Perspective. **Current Medicinal Chemistry**. v. 22, p. 2199–2224, 2015. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150408112357>

VILLARREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; VISBAL, G.; CORONA, O.; CORRÊA, R. S.; ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A.; NAVARRO, M. Copper(I)–Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. **Inorganic Chemistry**. v. 56, n.7, p. 3781–3793, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02419>

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**. v. 25, p. 2677–2681, 2014. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916>

WENDE, C.; LÜDTKE, C.; KULAK, N. Copper Complexes of N-Donor Ligands as Artificial Nucleases. **European Journal of Inorganic Chemistry**. v. 16, p. 2597–2612, 2014. <https://doi.org/10.1002/ejic.201400032>

WHEATE, N. J.; BRODIE, C. R.; COLLINS, J. G.; KEMP, S.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 7, n.6, p. 627–648, 2007. <https://doi.org/10.2174/138955707780859413>

World Health Organization (WHO). **Cancer**. 2018a. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em out. 2018.

World Health Organization (WHO). **Tuberculosis**. 2018b. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>>. Acesso em out. 2018.

XU, N.; WANG, C.; CHENG, P.; LIAO, D. Ferro-/antiferromagnetic interactions in two one-dimensional Cu(II) complexes: Syntheses, crystal structures and magnetic studies. **Inorganic Chemistry Communications**. v. 23, p. 85–89, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2012.06.014>

YANG, Q.; CHEN, S.; GAO, S. Syntheses and thermal properties of some complexes with 2-mercaptonicotinic acid. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 90, p. 881–885, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10973-007-8245-y>

YUE, Y.; SUN, W.; GAO, E.; FANG, C.; XU, S.; YAN, C. Syntheses and crystal structures of three Mn(II) complexes with 2-hydroxynicotinate. **Inorganica Chimica Acta**. v. 360, p. 1466–1473, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.08.014>

ZANG, C.; LIPPARD, S. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in chemical biology**. v.7, p. 481–489, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00081-4)

ZOU, Y.; WEI, Q.; GUO, Z.; CHEN, S.; GAO, S. Syntheses, structures and luminescent properties of lanthanide complexes with 6-hydroxynicotnic acid. **Inorganica Chimica Acta**. v. 375, p. 181–186, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.04.045>

ZUROWSKA, B.; OCHOCKI, J.; MROZINSKI, J.; CIUNIK, Z.; REEDIJK, J. Synthesis, spectroscopic and magnetostructural evidence for the formation of Cu(II) complexes of pyridyl-2-carboxylate (2-pca) and quinolyl-2-carboxylate (2-qca) as a result of a novel oxidative P-dealkylation reaction of diethyl 2-pyridylmethylphosphonate (2-pmpe) and diethyl 2-quinolylmethylphosphonate (2-qmpe) ligands. **Inorganica Chimica Acta**. v. 357, p. 755–763, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2003.06.017>

ANEXOS

Anexo A: Espectros de UV-Vis dos ligantes e dos complexos de Cu(II)

Figura A1. Espectro de UV-Vis do complexo I e seus respectivos ligantes.

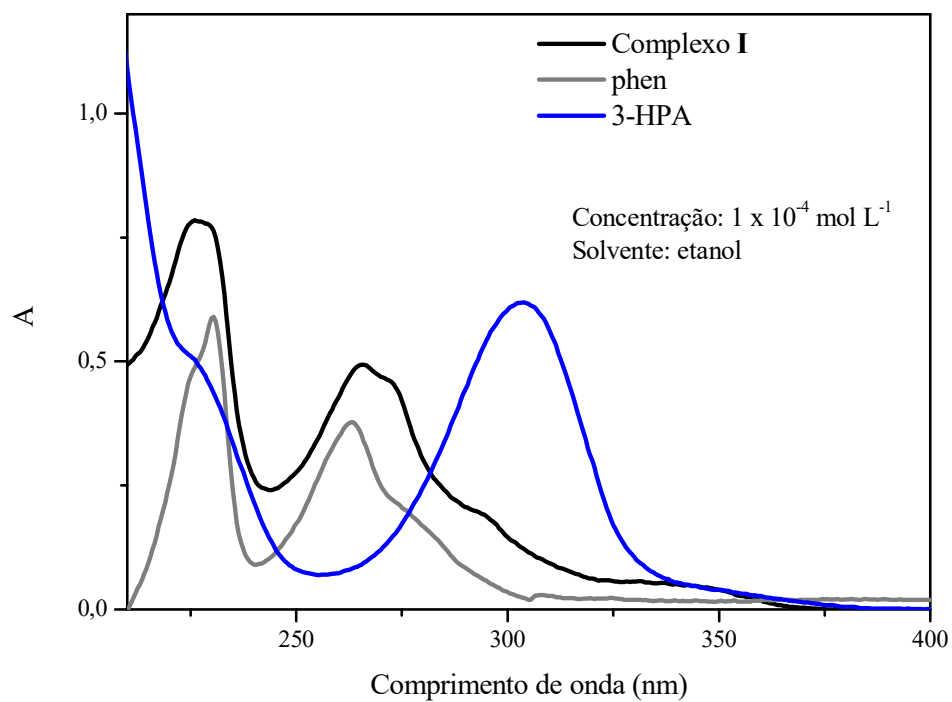


Figura A2. Espectro de UV-Vis do complexo III e seus respectivos ligantes.

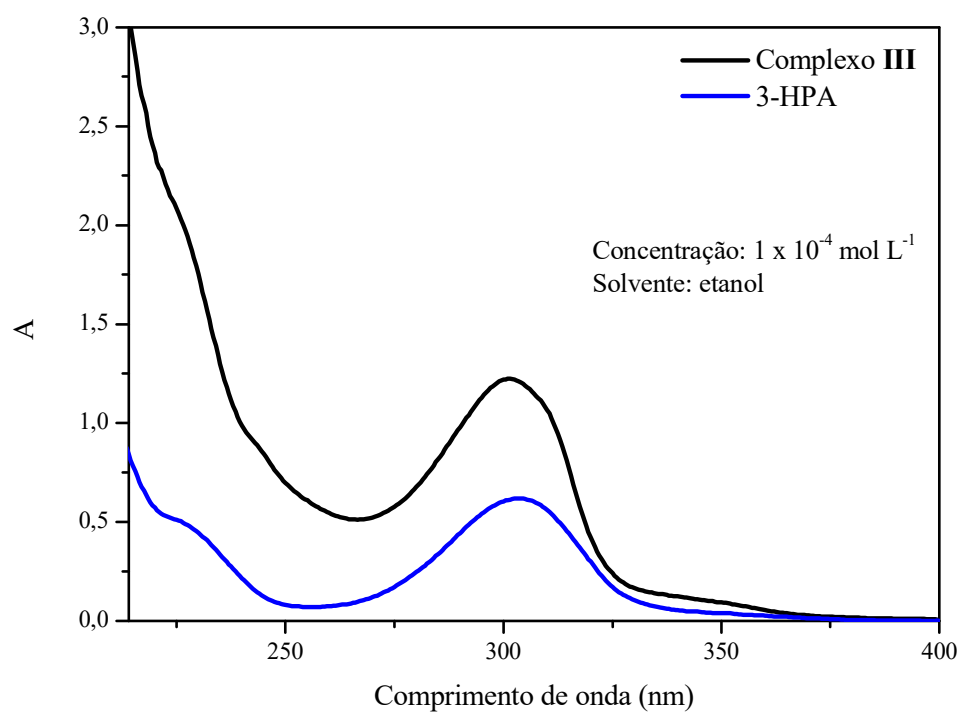


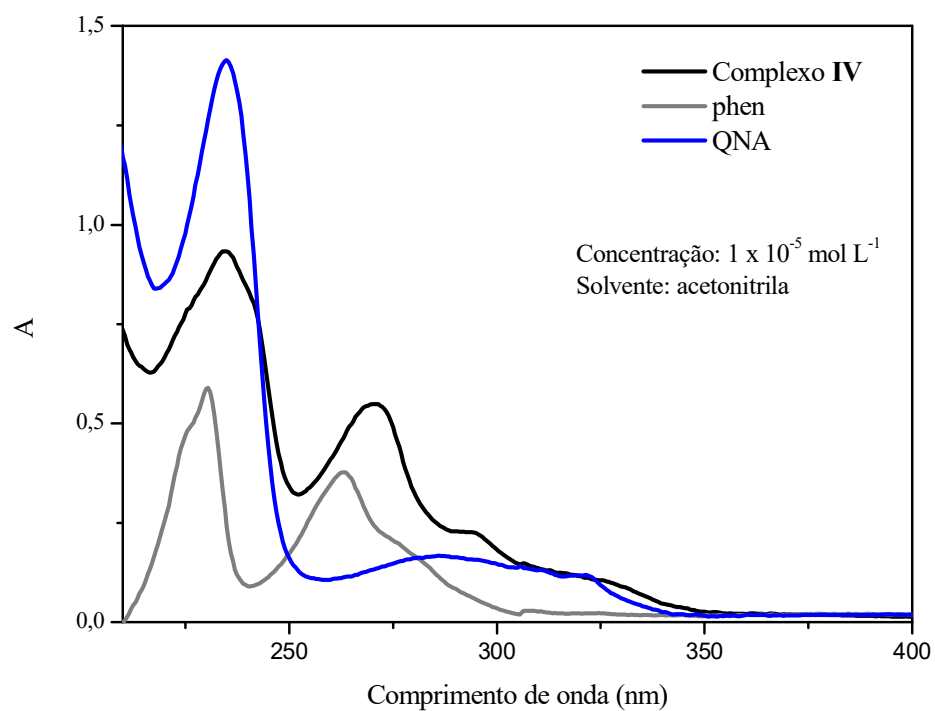
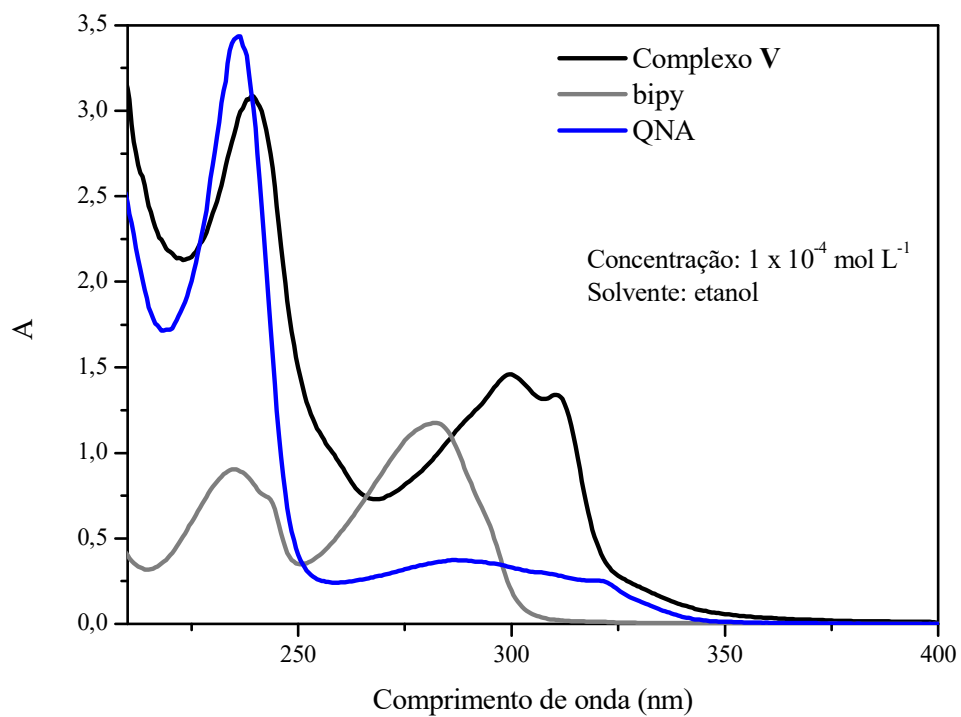
Figura A3. Espectro de UV-Vis do complexo **IV** e seus respectivos ligantes.**Figura A4.** Espectro de UV-Vis do complexo **V** e seus respectivos ligantes.

Figura A5. Espectro de UV-Vis do complexo **VIII** e seus respectivos ligantes.

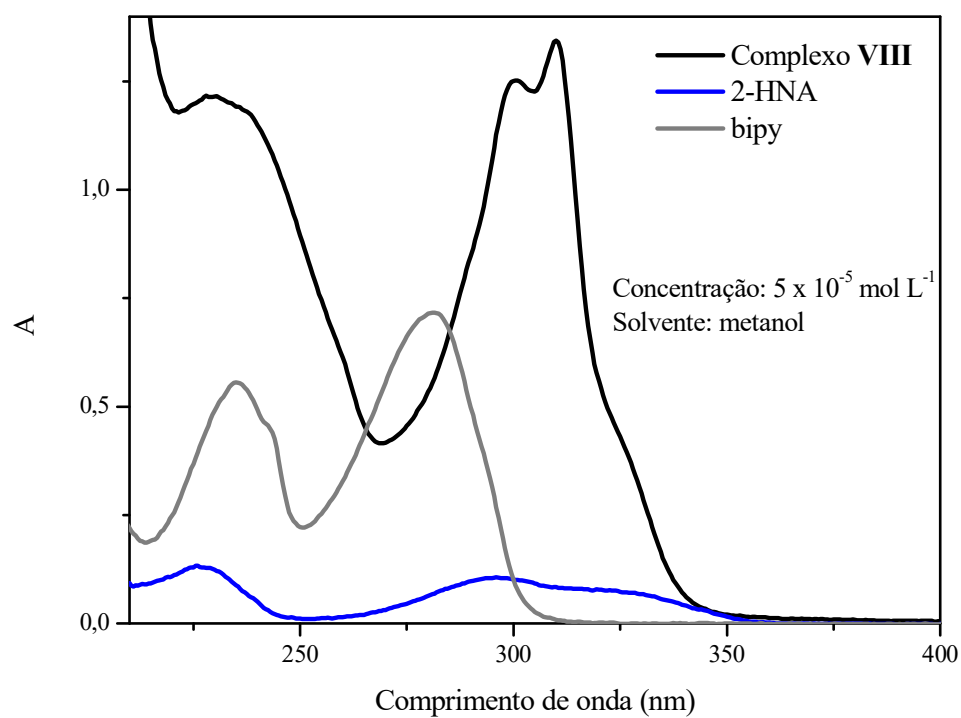


Figura A6. Espectro de UV-Vis do complexo **X** e seus respectivos ligantes.

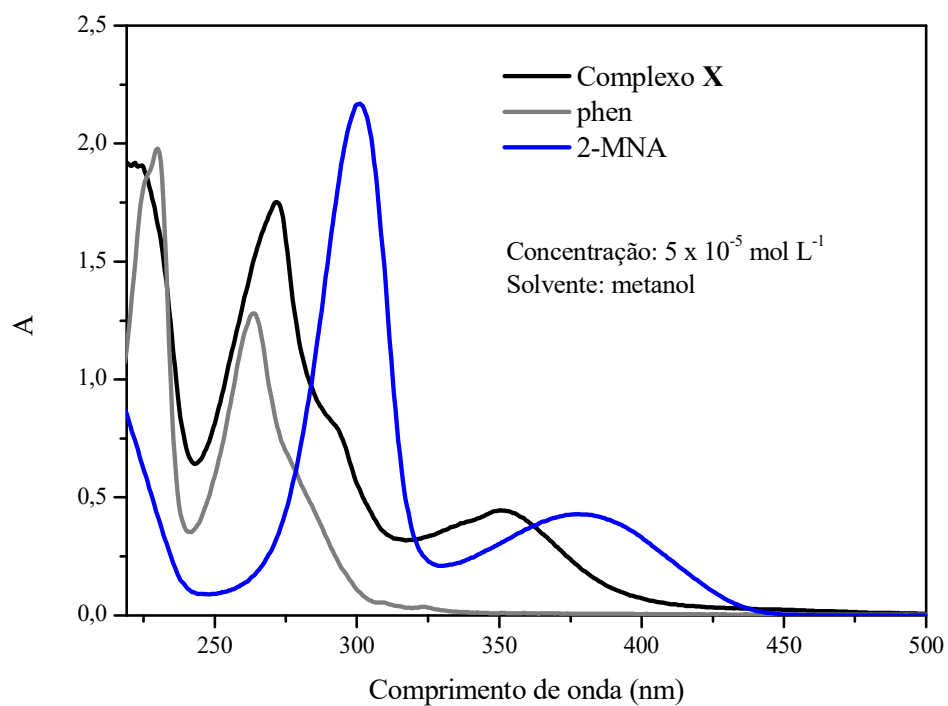


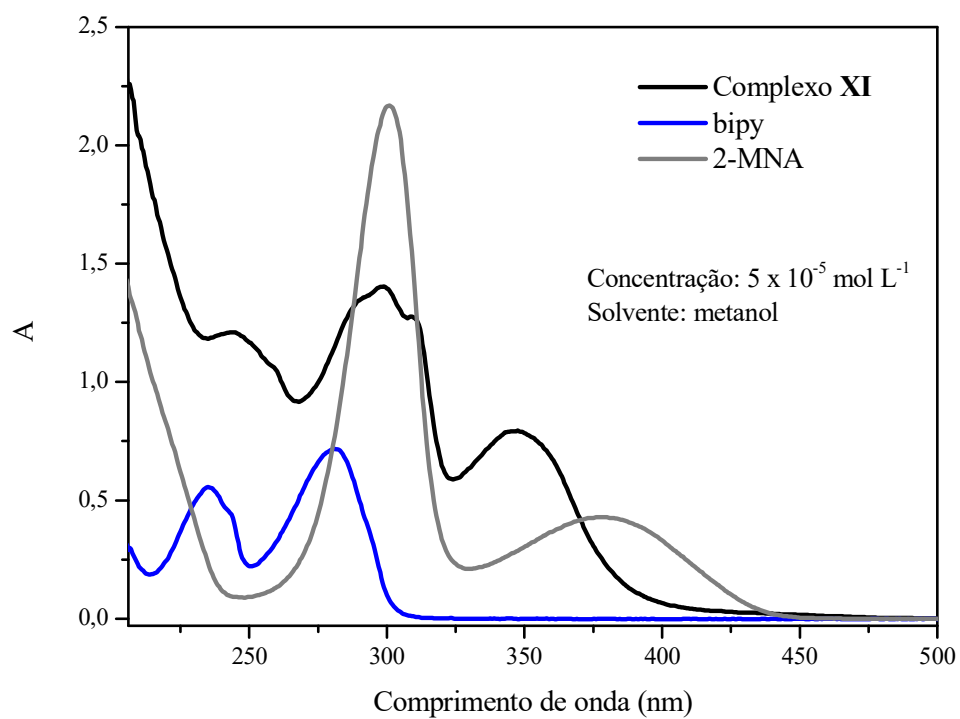
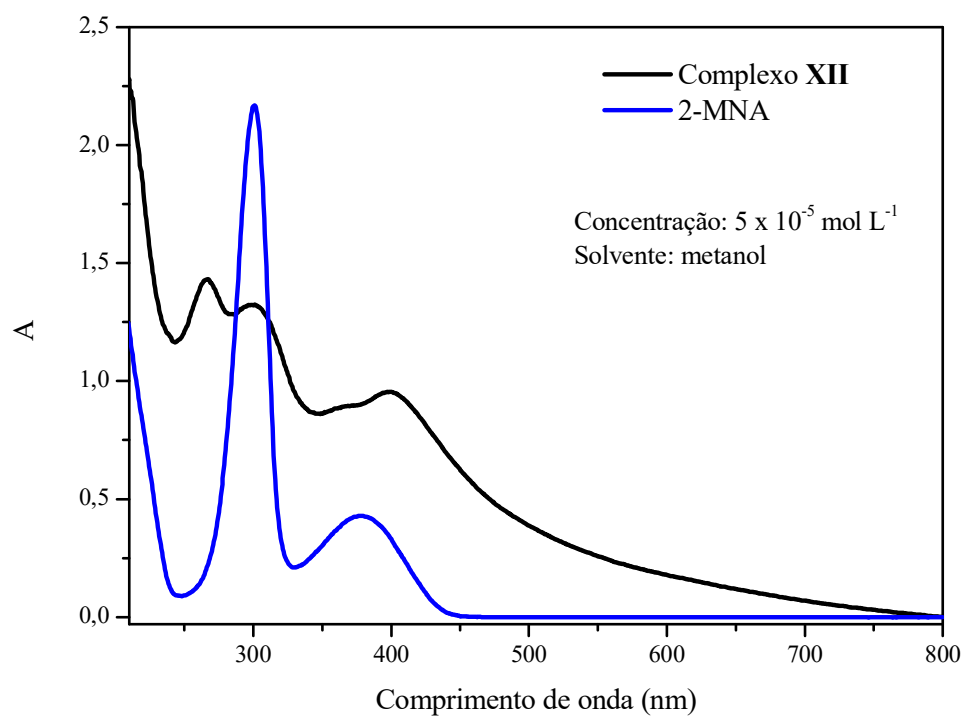
Figura A7. Espectro de UV-Vis do complexo **XI** e seus respectivos ligantes.**Figura A8.** Espectro de UV-Vis do complexo **XII** e seus respectivos ligantes.

Figura A9. Espectro de UV-Vis do complexo **XIII** e seus respectivos ligantes.

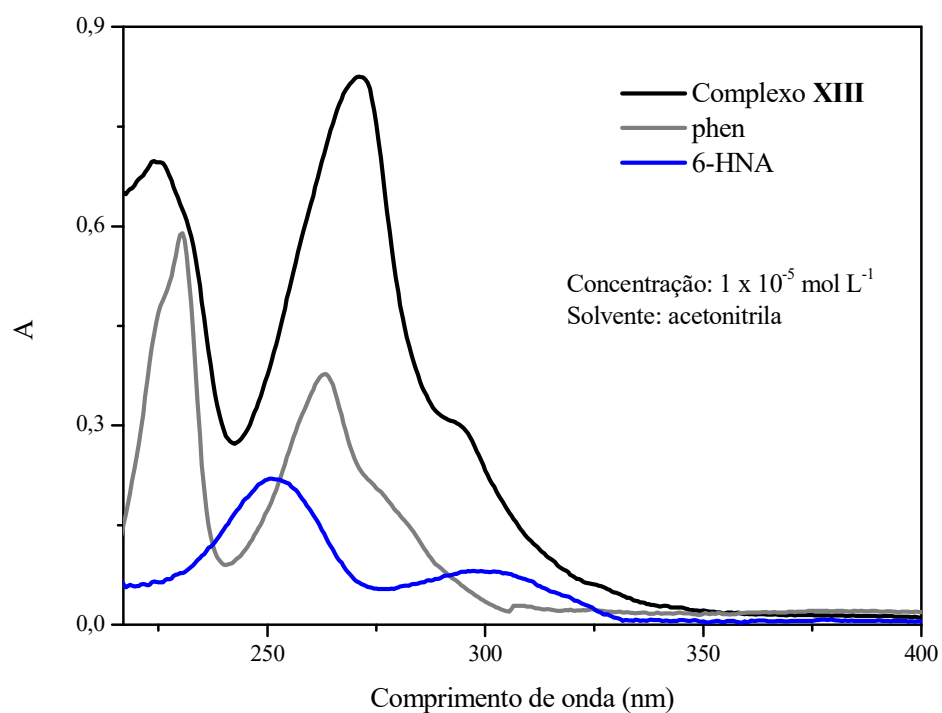


Figura A10. Espectro de UV-Vis do complexo **XIV** e seus respectivos ligantes.

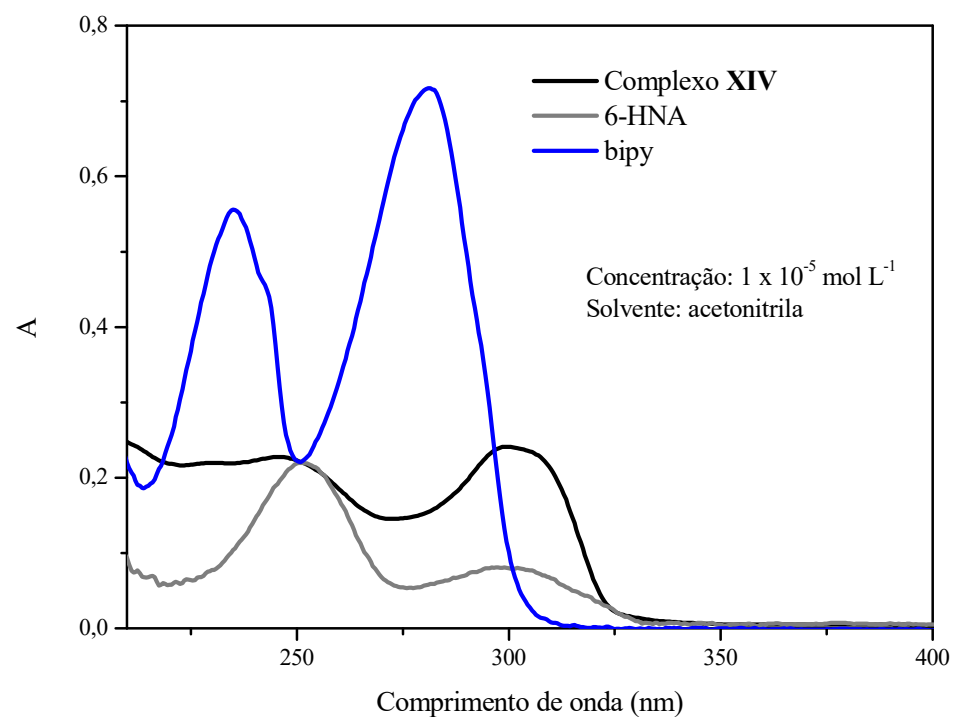


Figura A11. Espectro de UV-Vis do complexo **I** em solução metanólica.

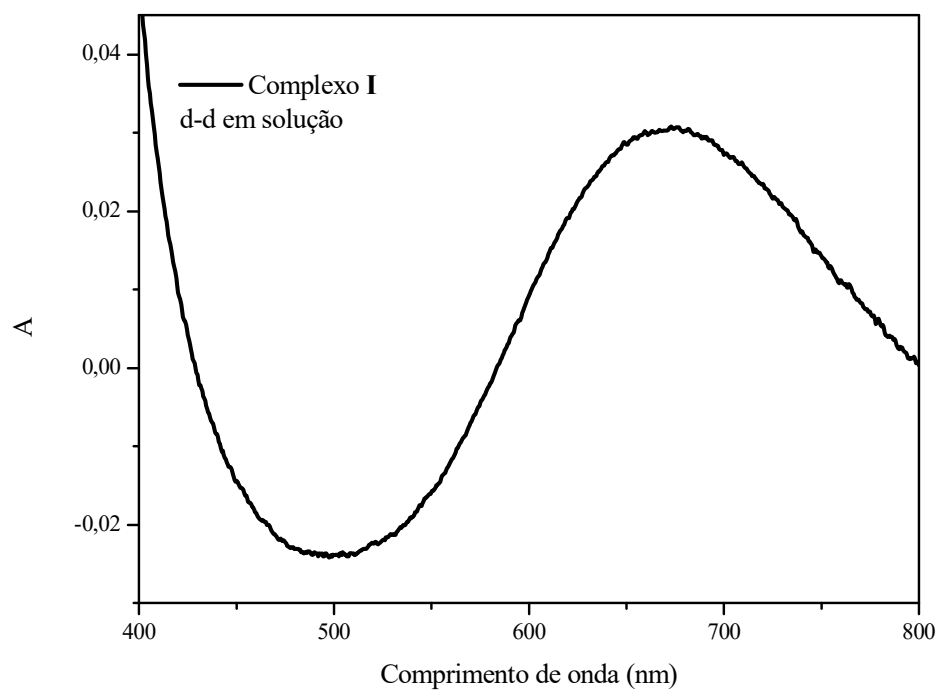


Figura A12. Espectro de UV-Vis do complexo **I** no estado sólido.

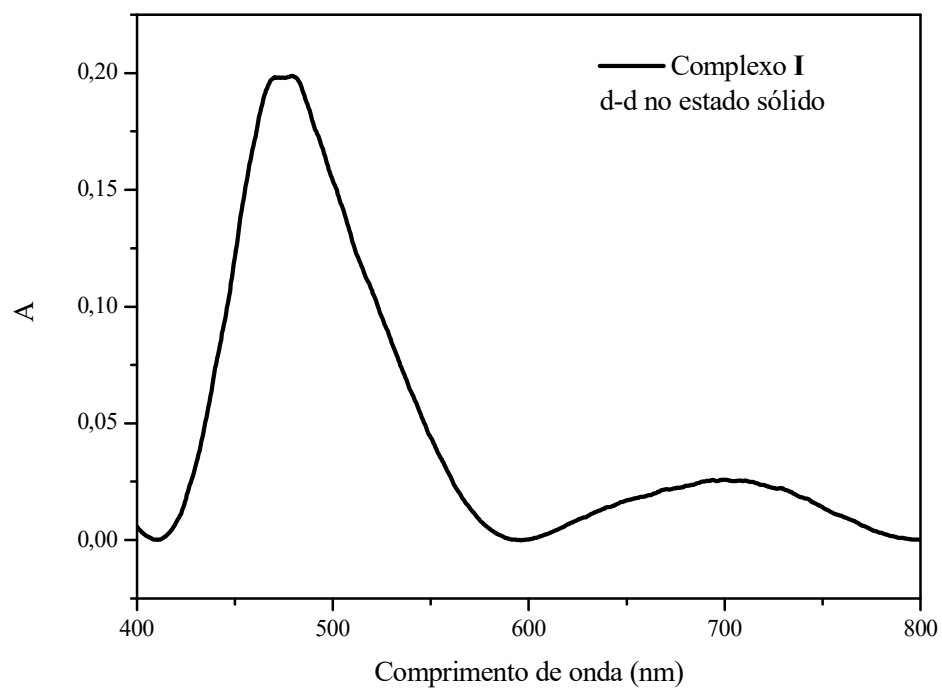


Figura A13. Espectro de UV-Vis do complexo **II** em solução metanólica.

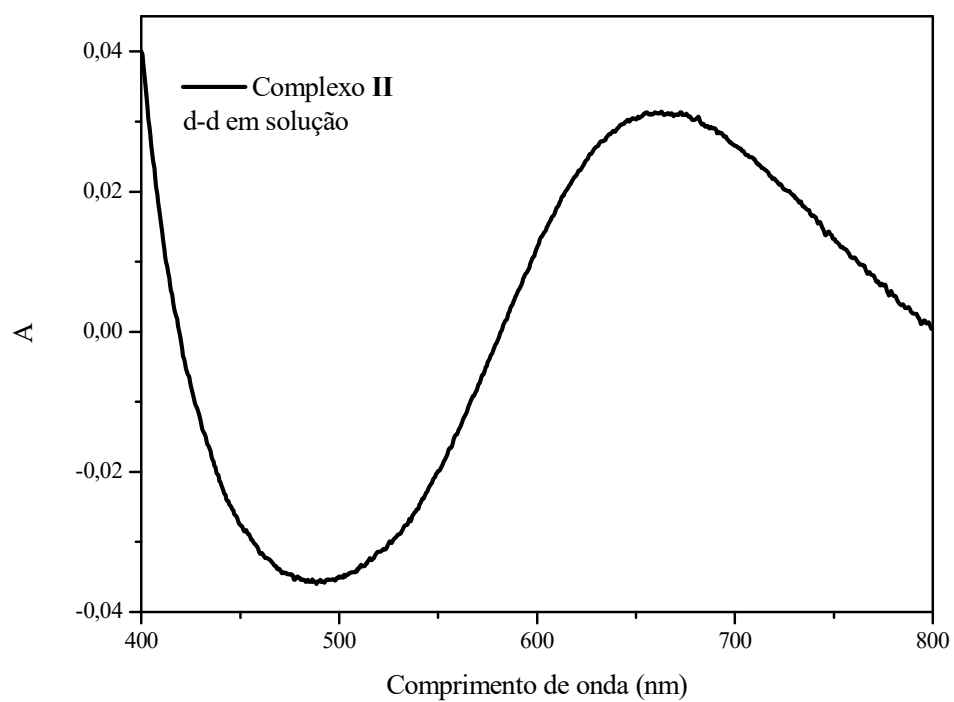


Figura A14. Espectro de UV-Vis do complexo **II** no estado sólido.

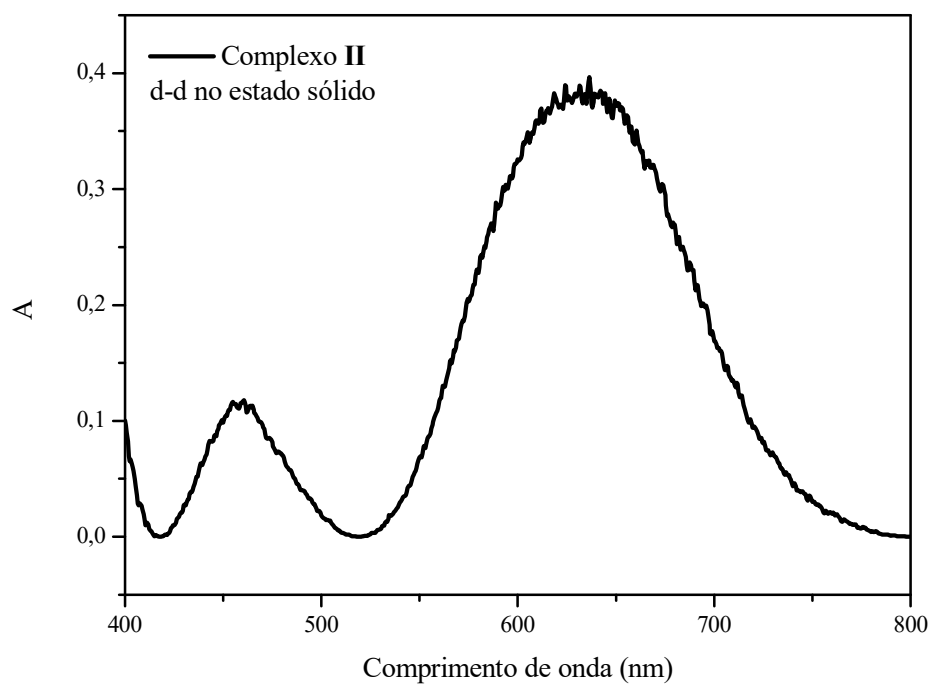


Figura A15. Espectro de UV-Vis do complexo **III** em solução metanólica.

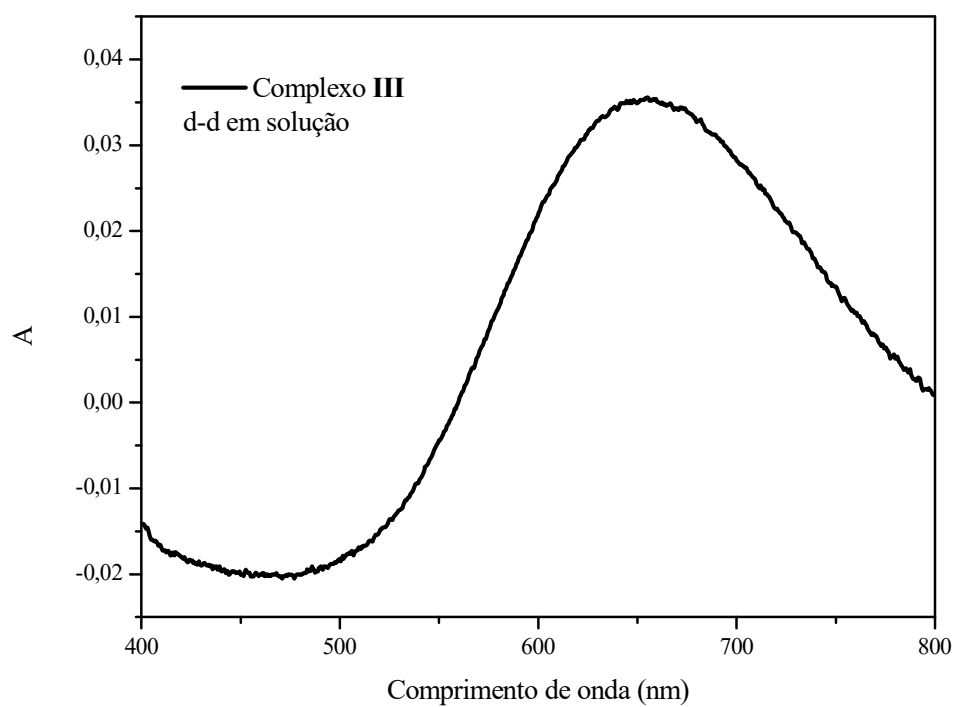


Figura A16. Espectro de UV-Vis do complexo **III** no estado sólido.

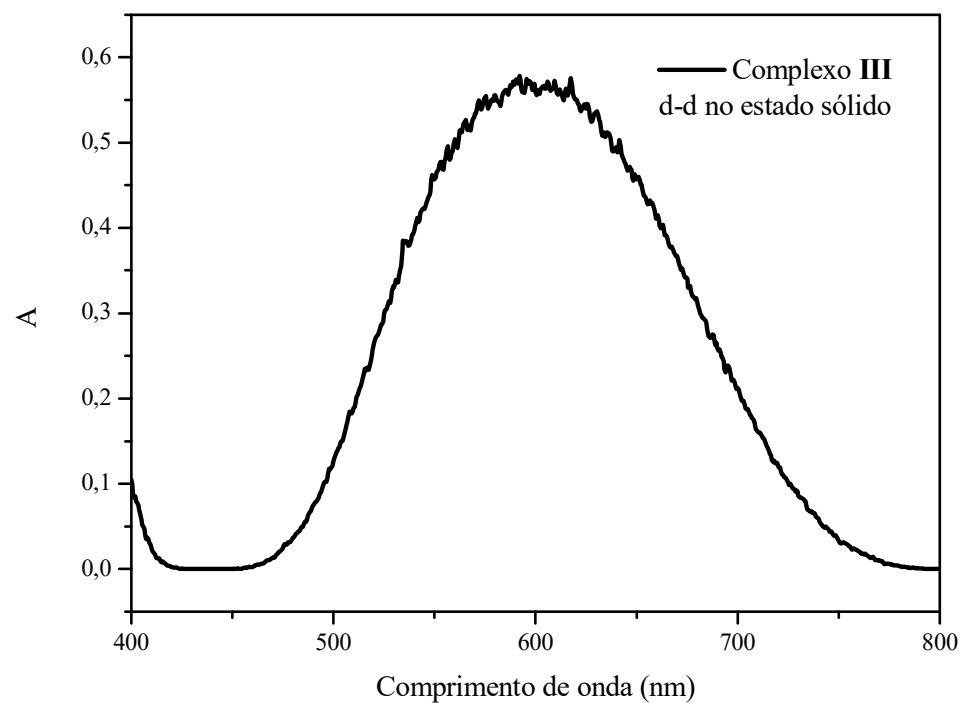


Figura A17. Espectro de UV-Vis do complexo **IV** no estado sólido.

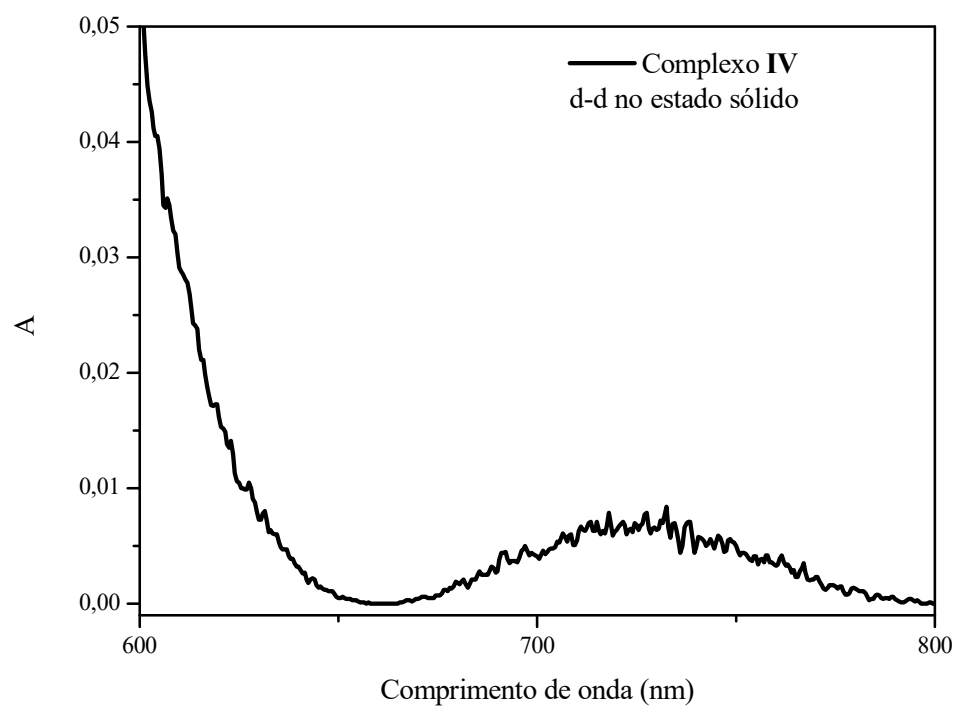


Figura A18. Espectro de UV-Vis do complexo **V** no estado sólido.

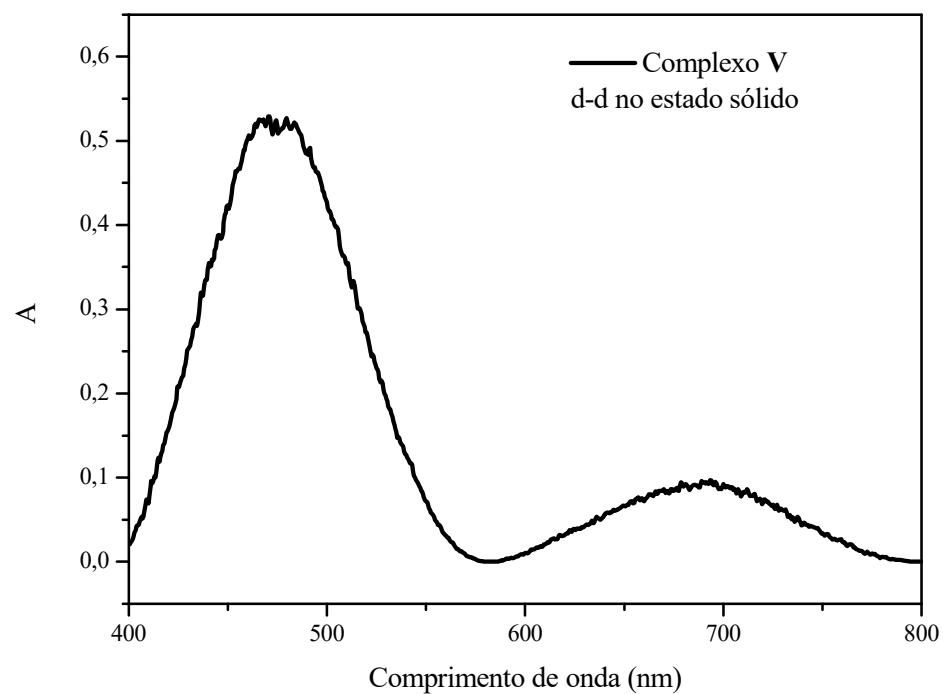


Figura A19. Espectro de UV-Vis do complexo **VI** no estado sólido.

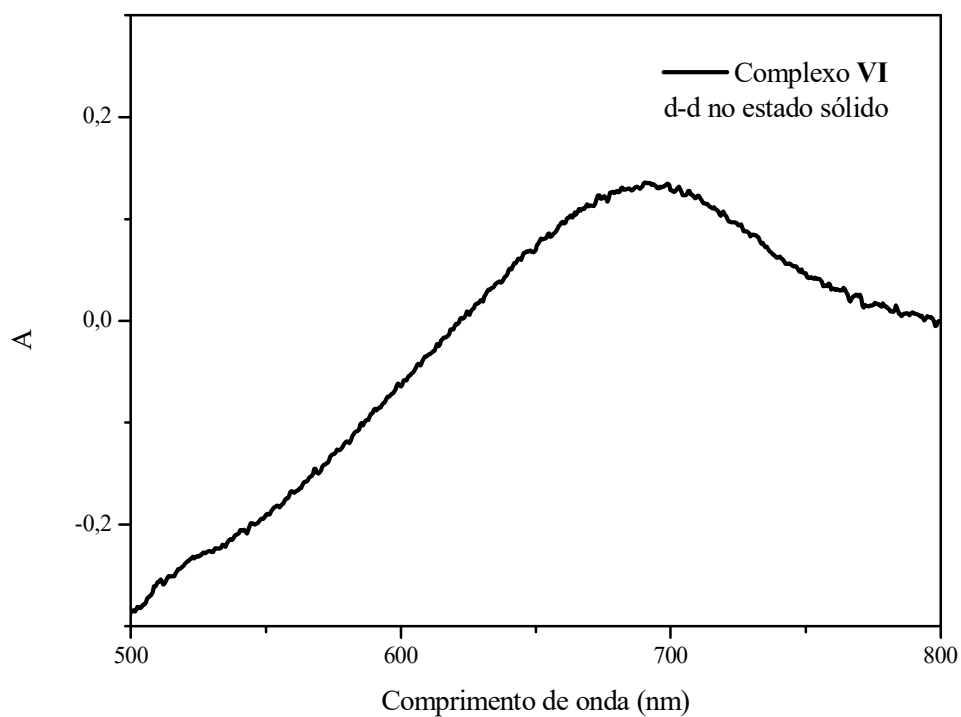


Figura A20. Espectro de UV-Vis do complexo **VII** em solução de DMF.

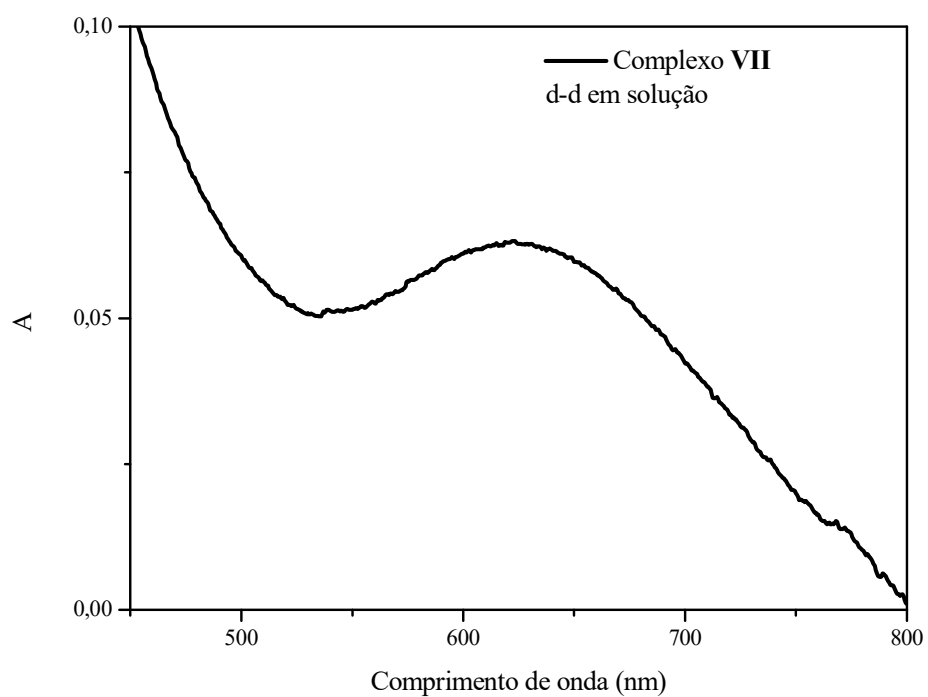


Figura A21. Espectro de UV-Vis do complexo **VII** no estado sólido.

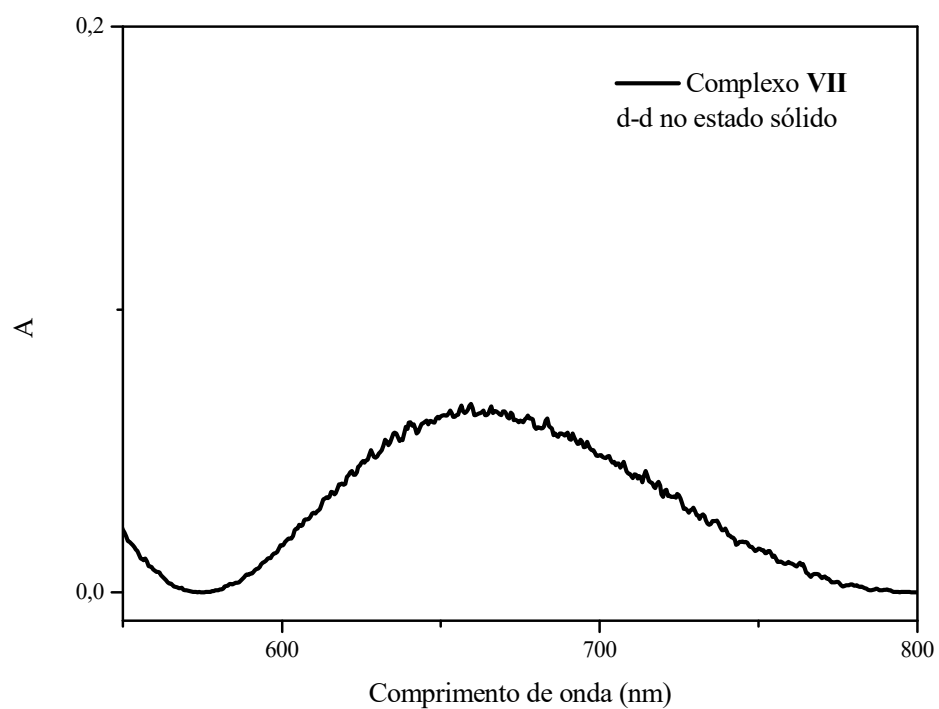


Figura A22. Espectro de UV-Vis do complexo **VIII** em solução de DMF.

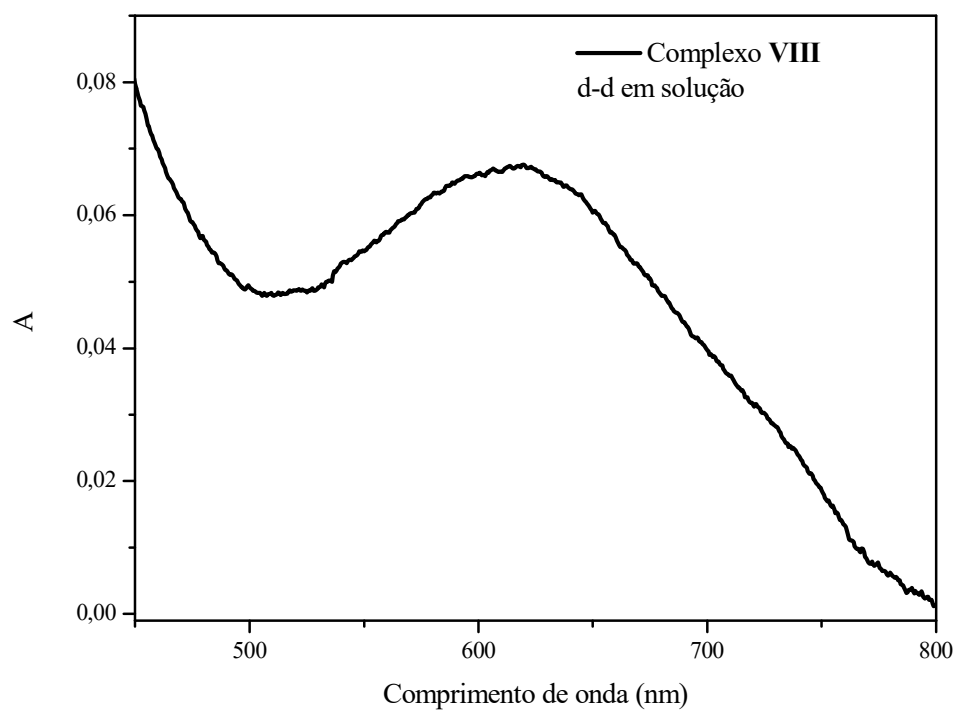


Figura A23. Espectro de UV-Vis do complexo **VIII** no estado sólido.

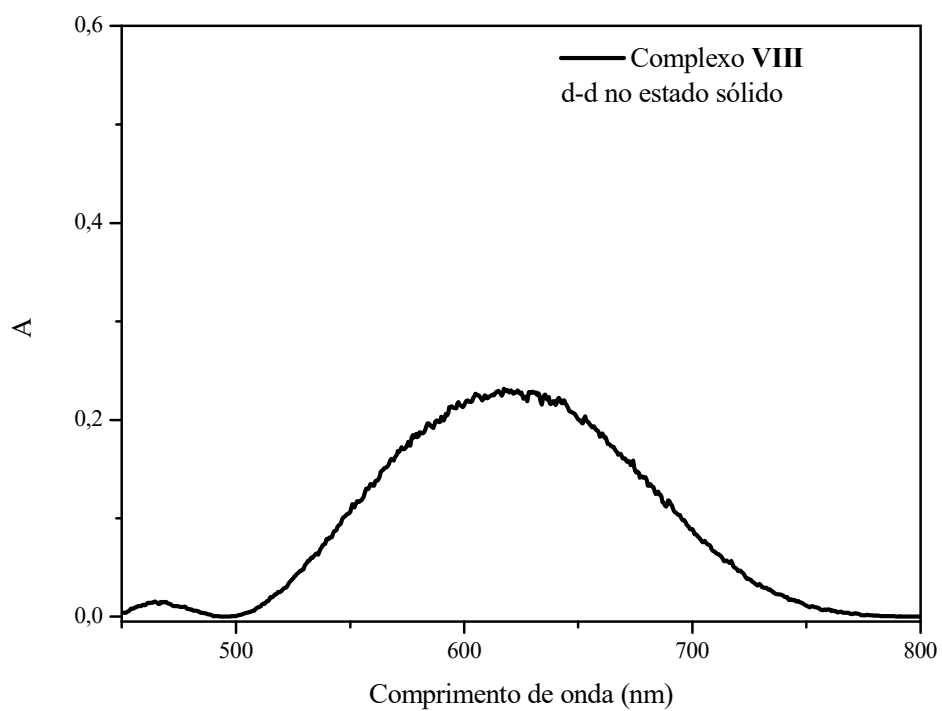


Figura A24. Espectro de UV-Vis do complexo **IX** no estado sólido.

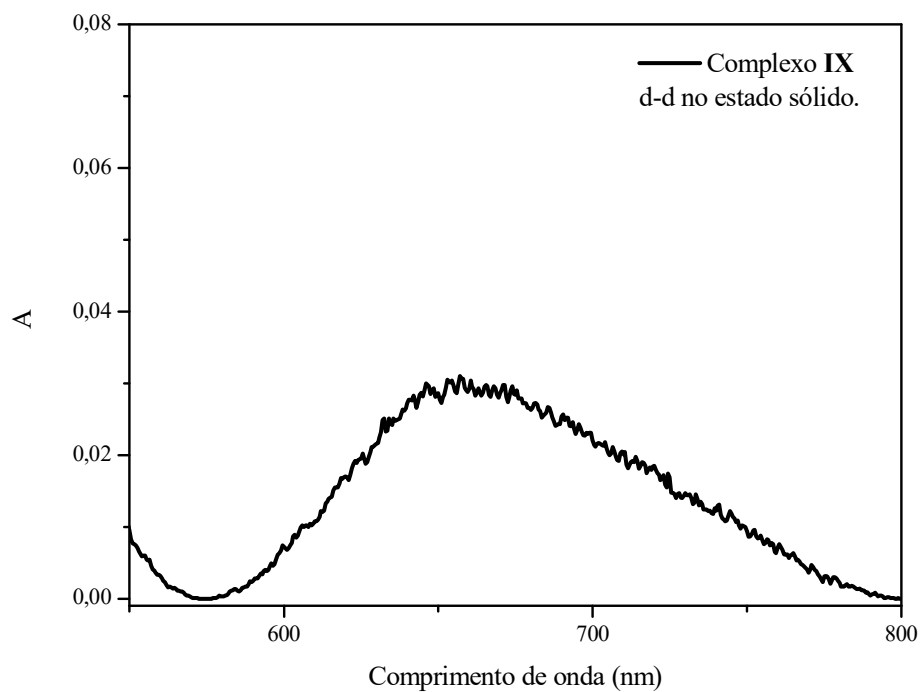


Figura A25. Espectro de UV-Vis do complexo **XI** no estado sólido.

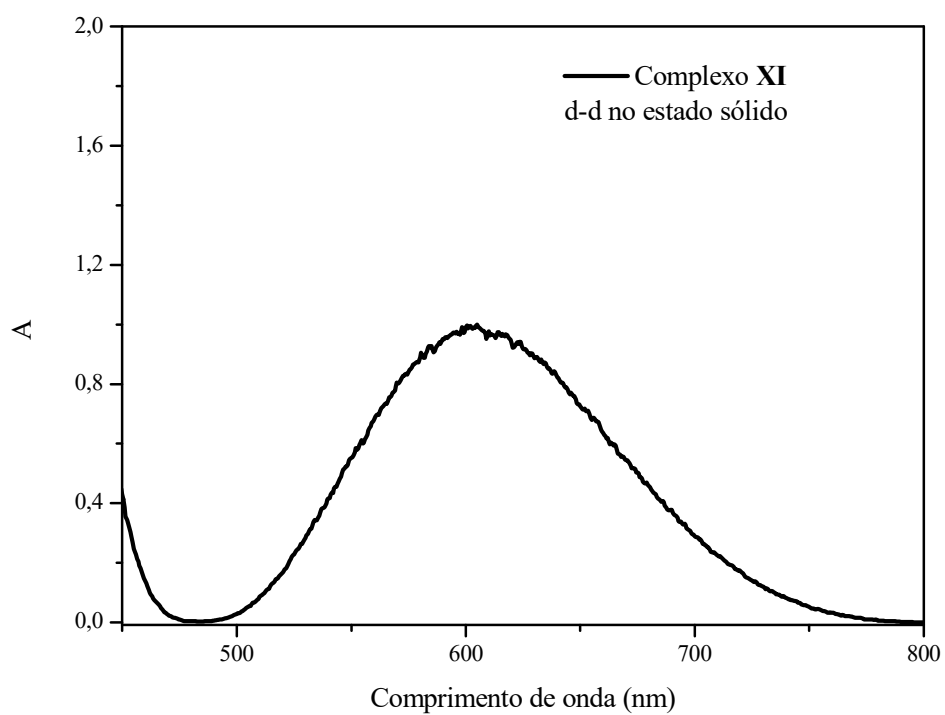


Figura A26. Espectro de UV-Vis do complexo **XIII** no estado sólido.

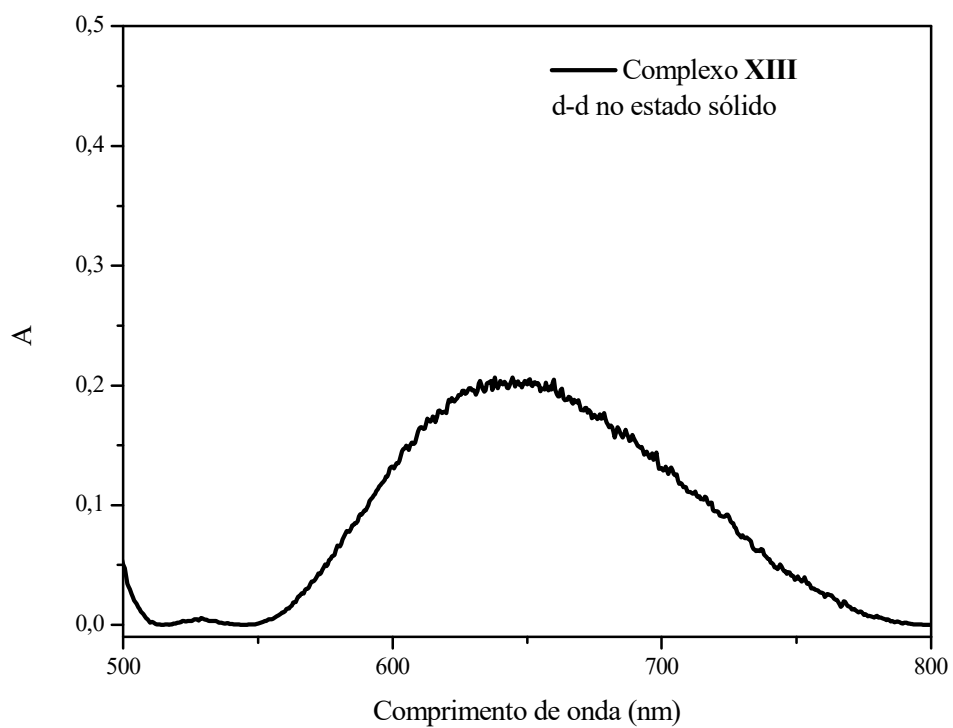


Figura A27. Espectro de UV-Vis do complexo **XIV** no estado sólido.

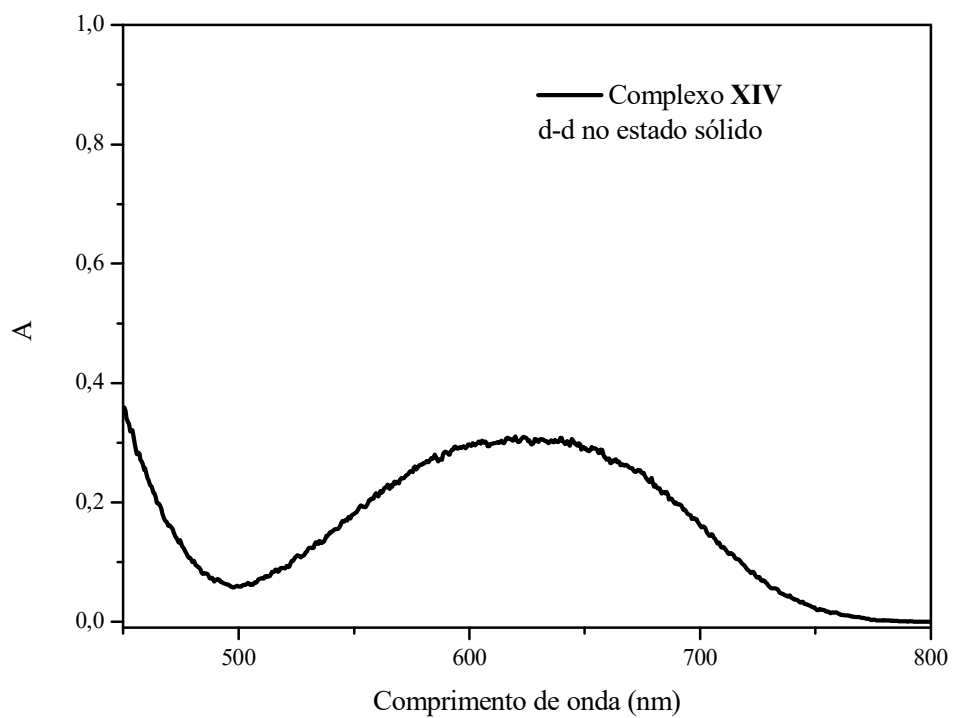
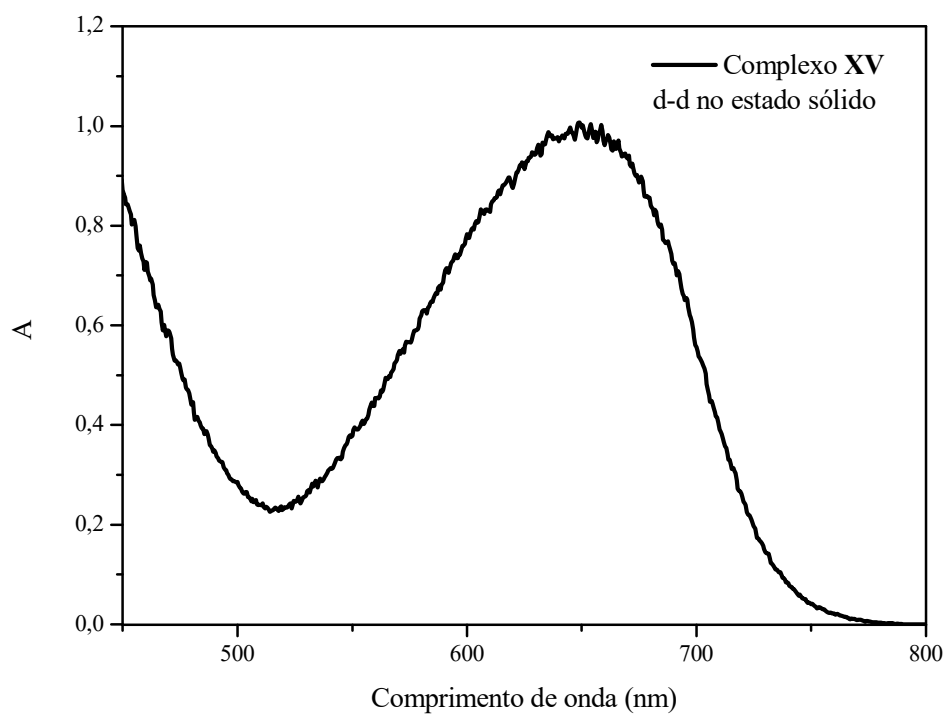


Figura A28. Espectro de UV-Vis do complexo **XV** no estado sólido.



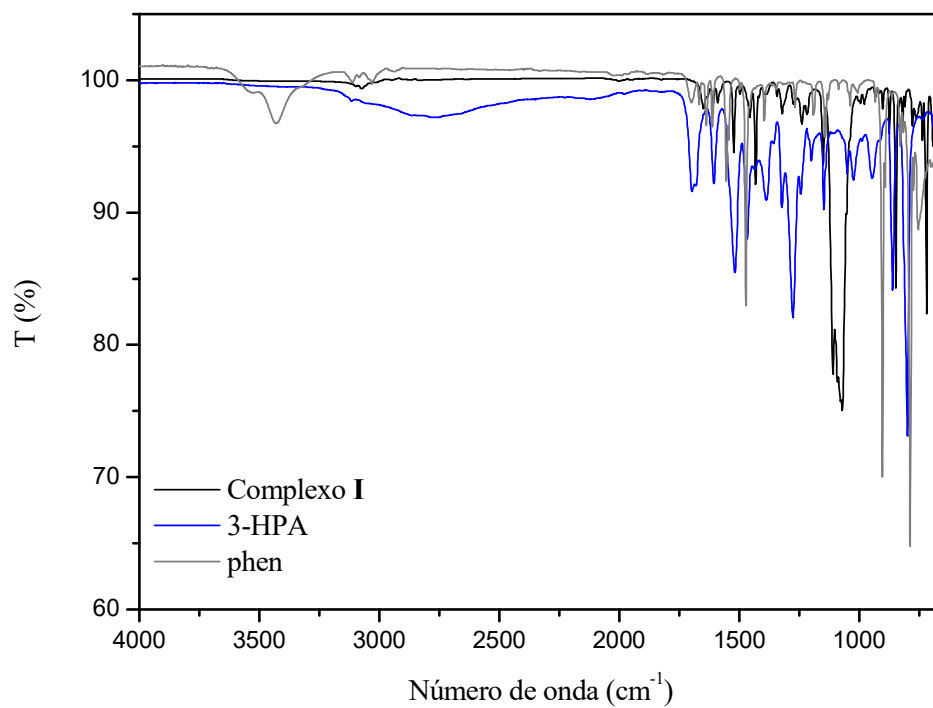
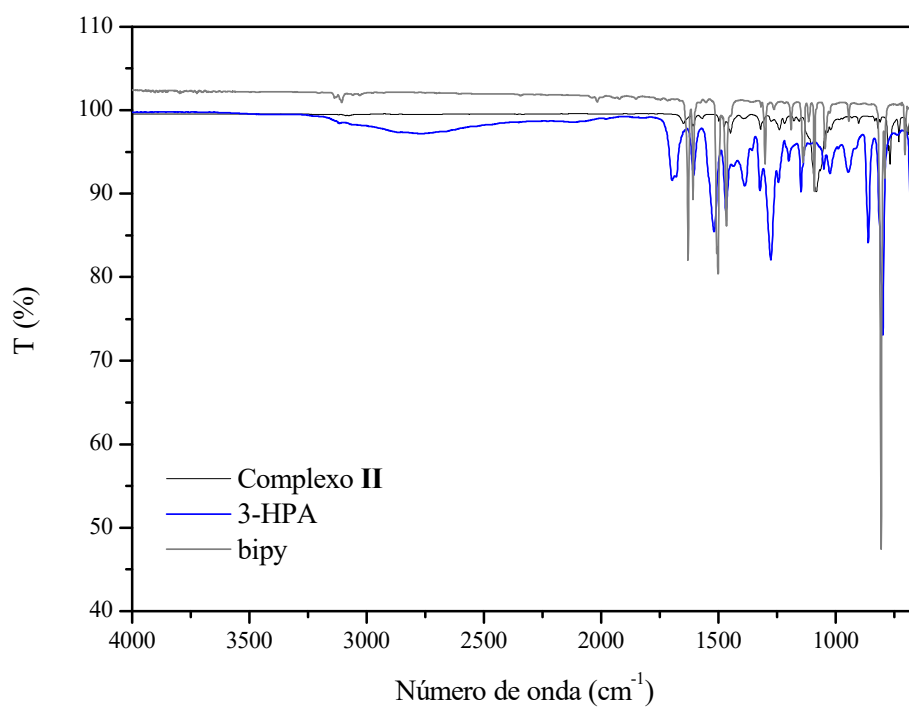
Anexo B: Espectros de IV dos ligantes e dos complexos de Cu(II)**Figura B1.** Espectros IV sobrepostos do complexo **I** e seus respectivos ligantes.**Figura B2.** Espectros IV sobrepostos do complexo **II** e seus respectivos ligantes.

Figura B3. Espectros IV sobrepostos do complexo **III** e seus respectivos ligantes.

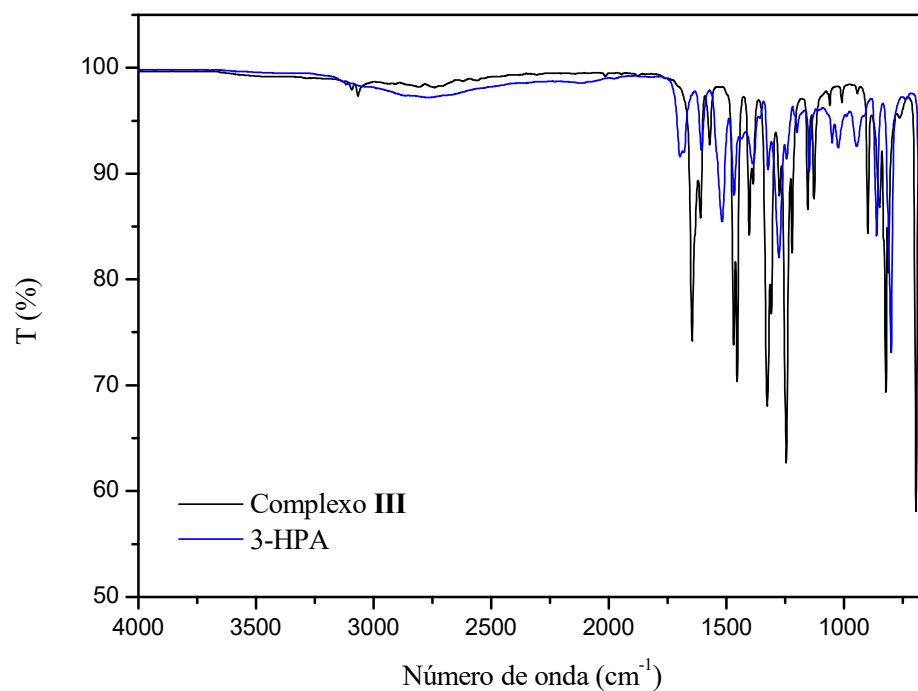


Figura B4. Espectros IV sobrepostos do complexo **IV** e seus respectivos ligantes.

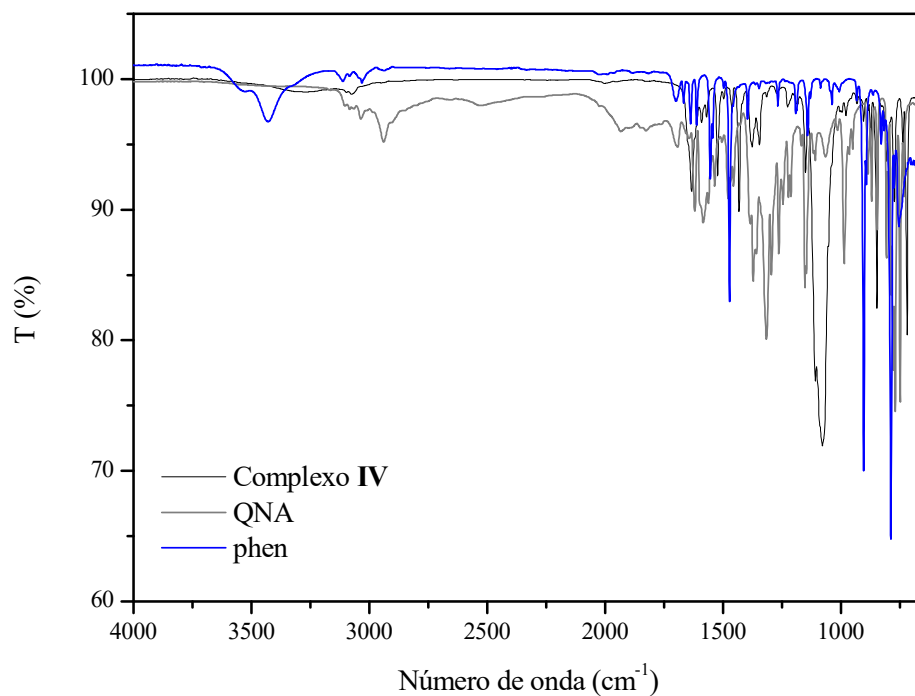


Figura B5. Espectros IV sobrepostos do complexo **V** e seus respectivos ligantes.

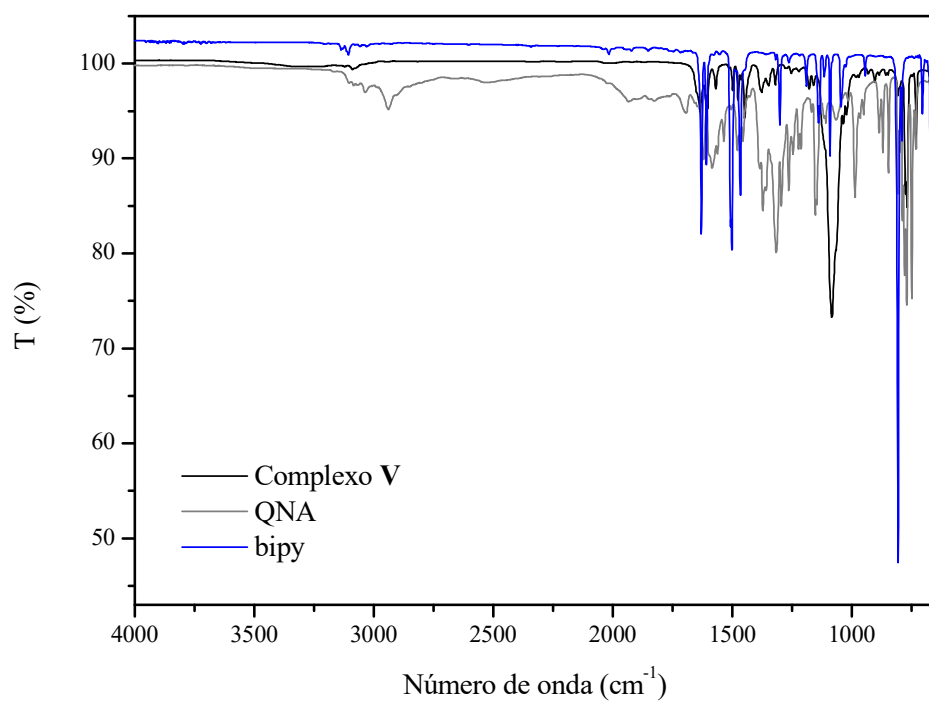


Figura B6. Espectros IV sobrepostos do complexo **VI** e seus respectivos ligantes.

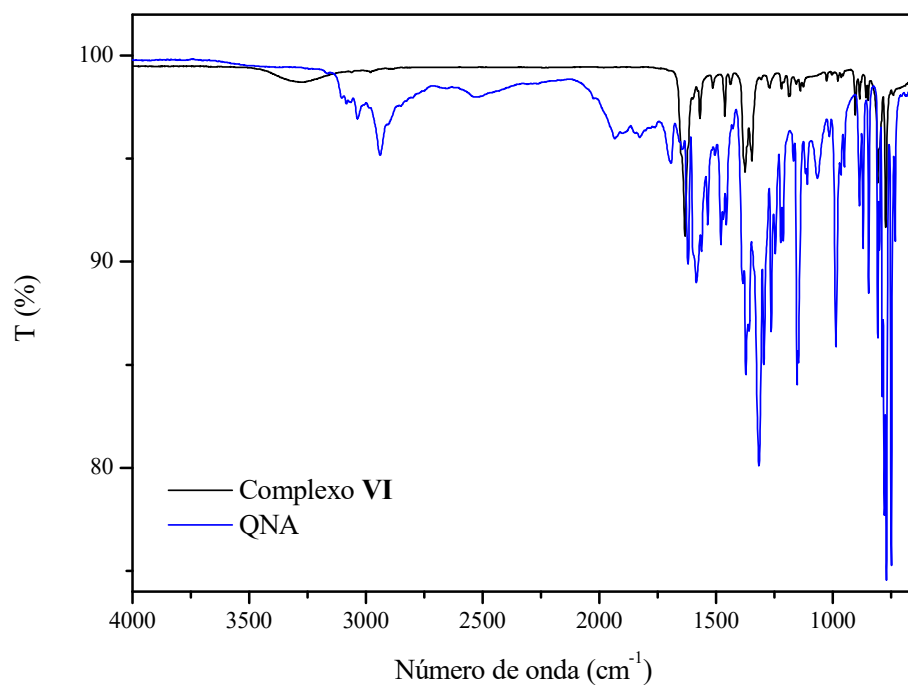


Figura B7. Espectros IV sobrepostos do complexo **VII** e seus respectivos ligantes.

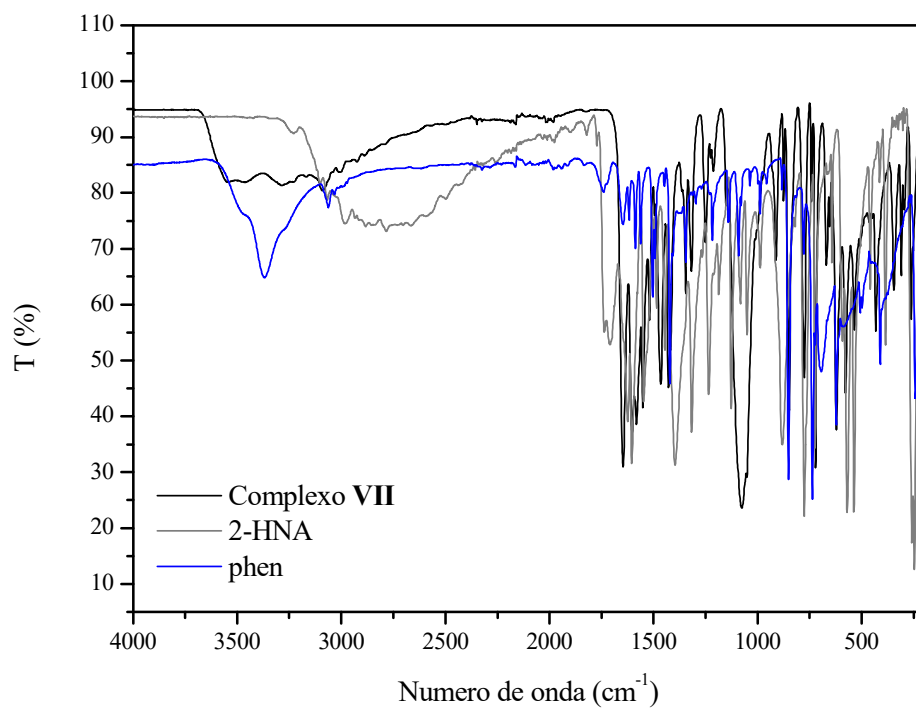


Figura B8. Espectros IV sobrepostos do complexo **VIII** e seus respectivos ligantes.

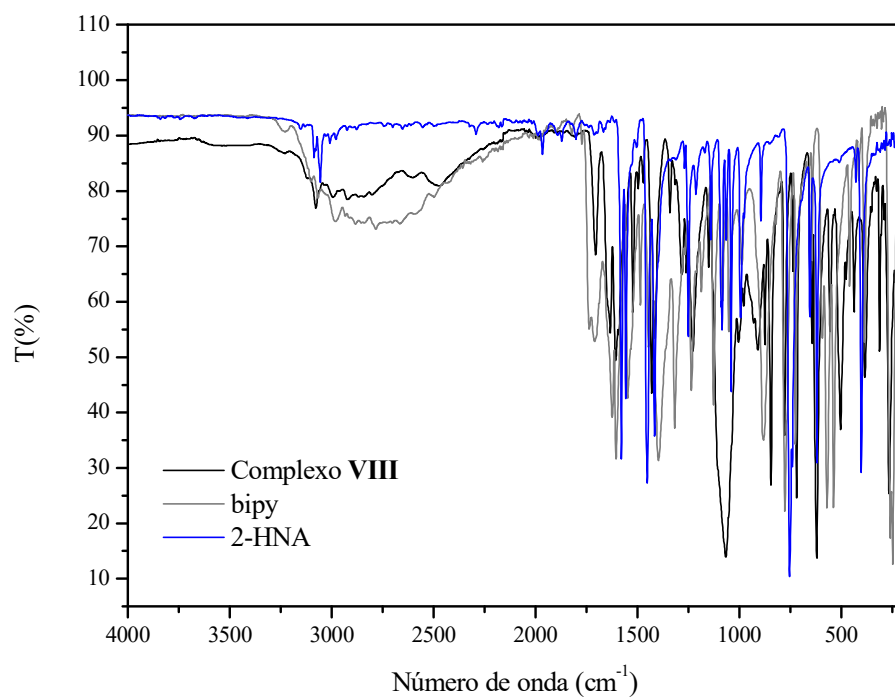


Figura B9. Espectros IV sobrepostos do complexo **IX** e seus respectivos ligantes.

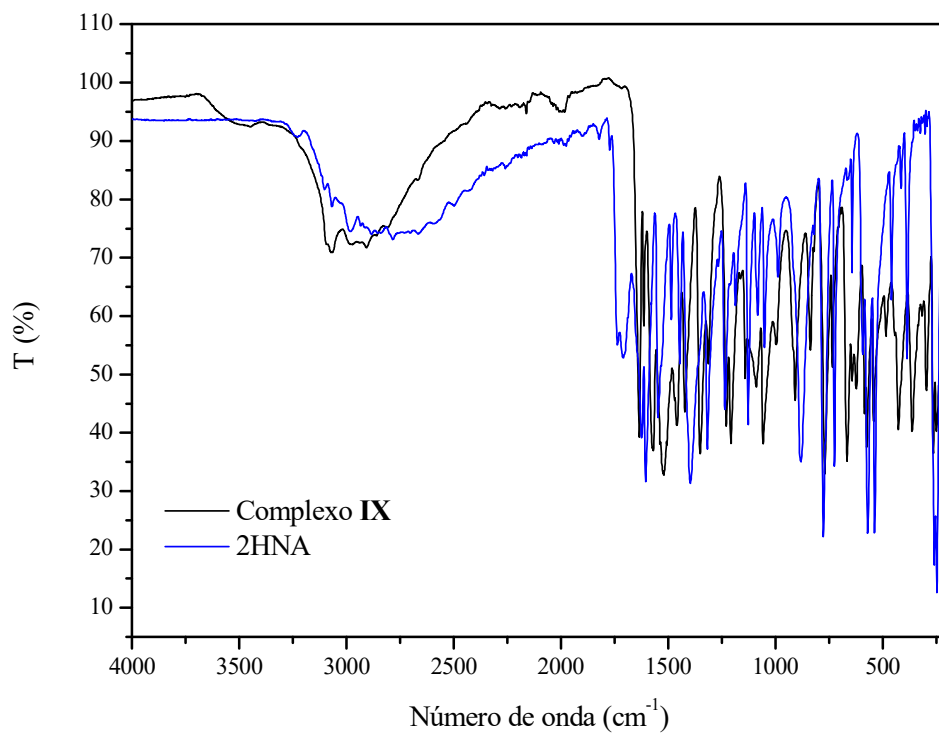


Figura B10. Espectros IV sobrepostos do complexo **X** e seus respectivos ligantes.

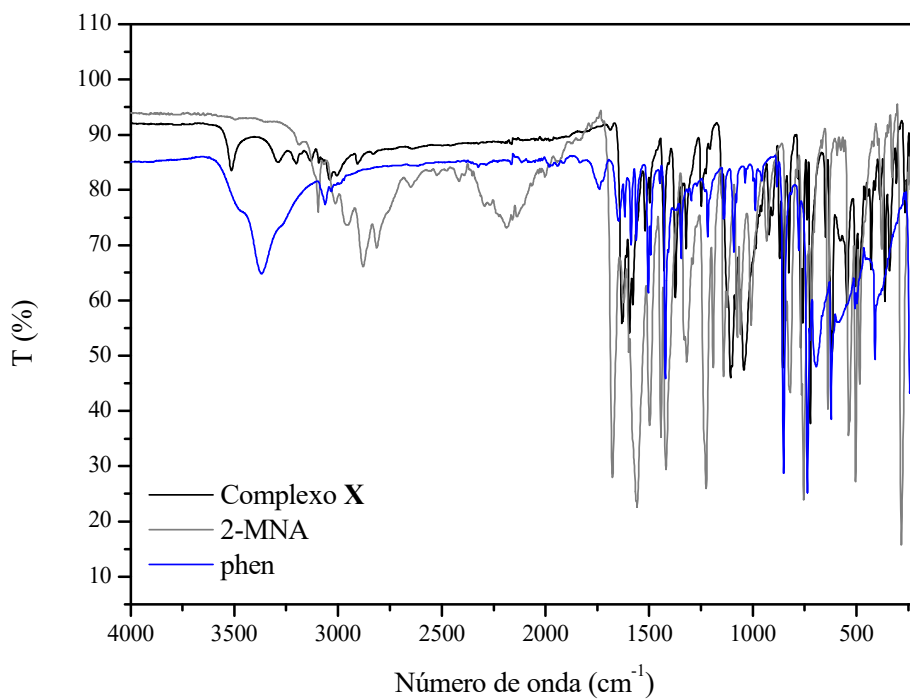


Figura B11. Espectros IV sobrepostos do complexo **XI** e seus respectivos ligantes.

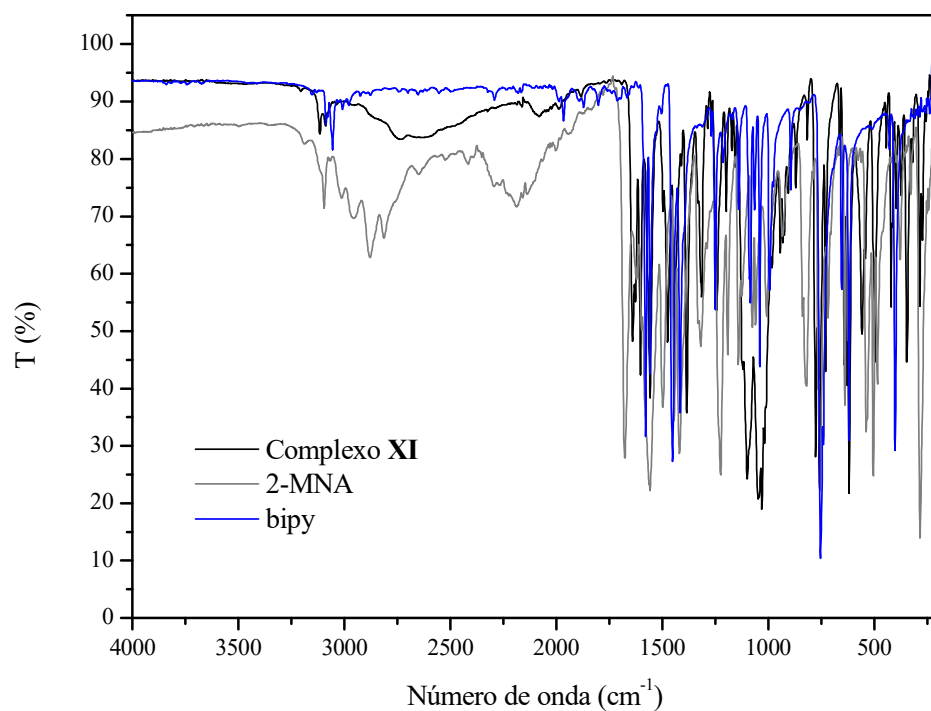


Figura B12. Espectros IV sobrepostos do complexo **XII** e seus respectivos ligantes.

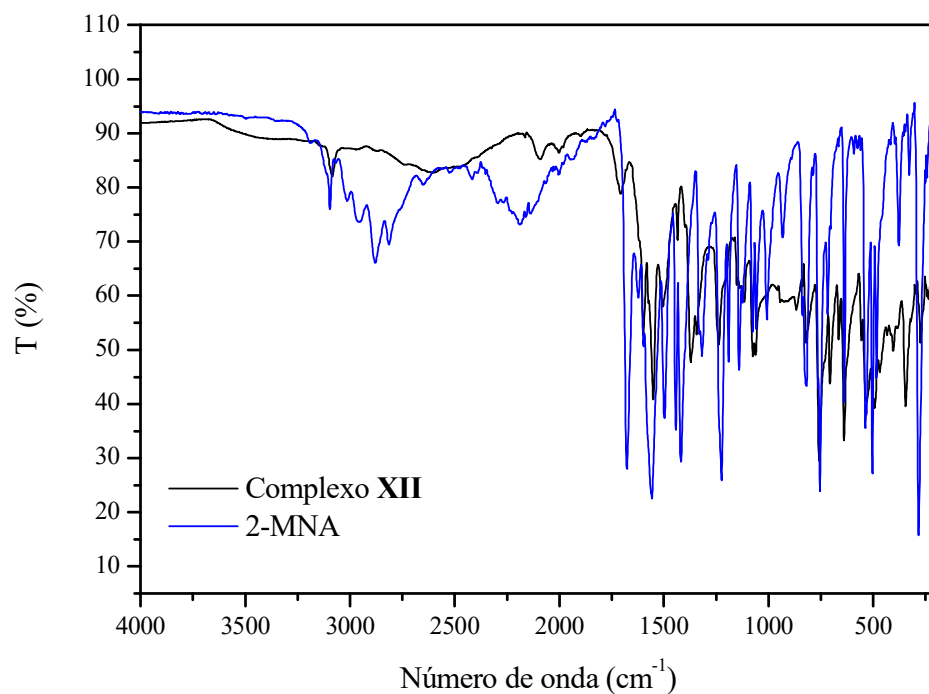


Figura B13. Espectros IV sobrepostos do complexo **XIII** e seus respectivos ligantes.

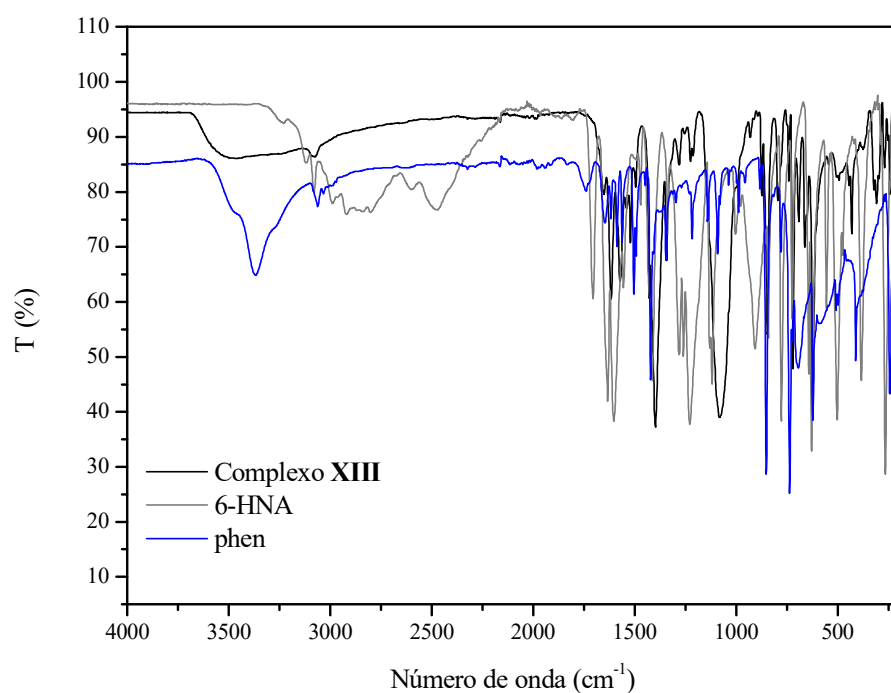


Figura B14. Espectros IV sobrepostos do complexo **XIV** e seus respectivos ligantes.

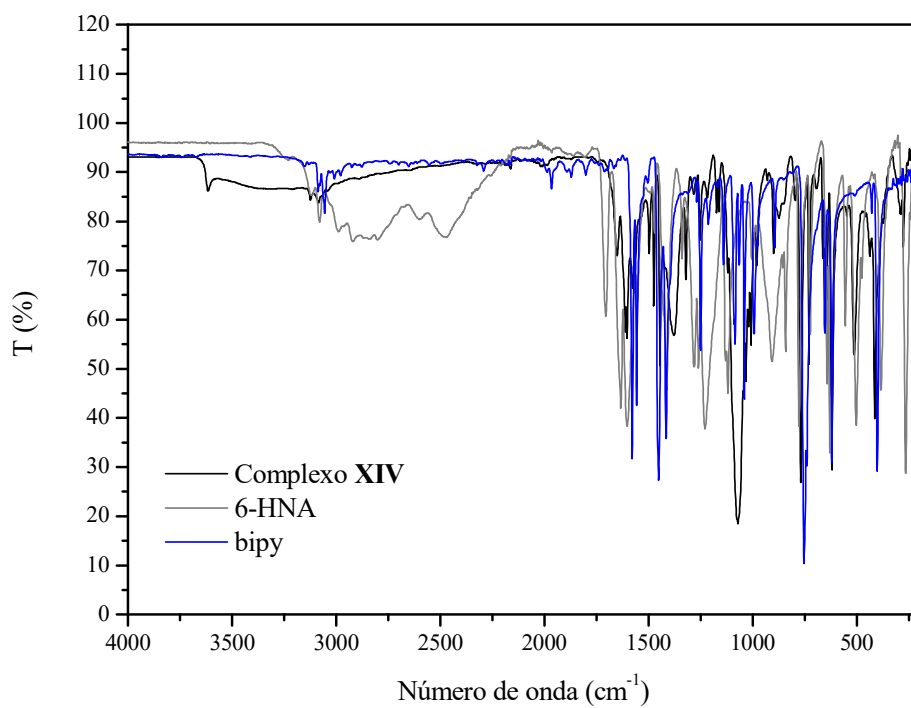
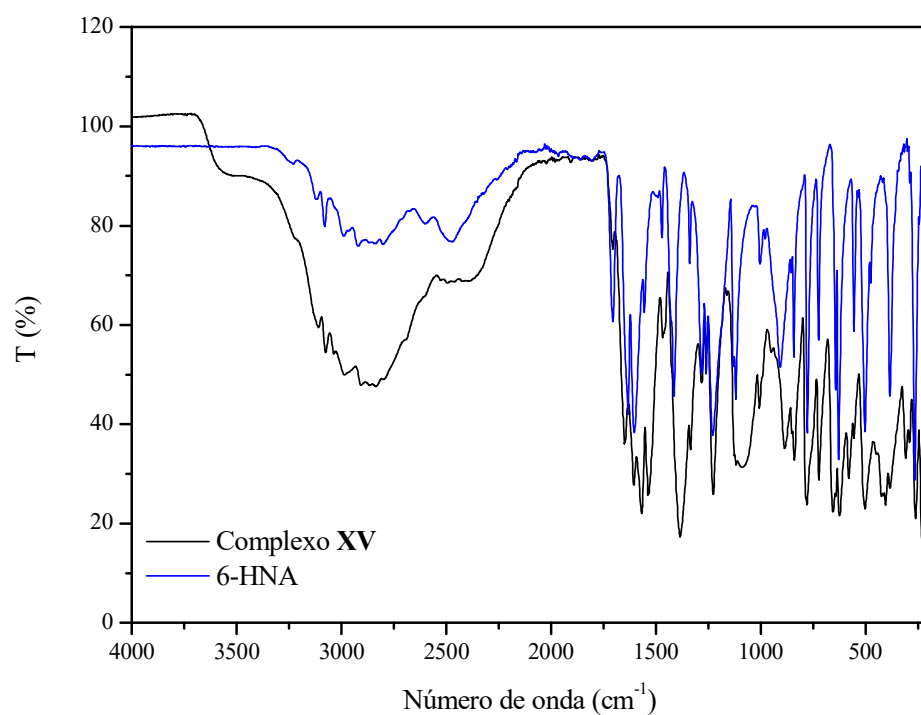


Figura B15. Espectros IV sobrepostos do complexo **XV** e seus respectivos ligantes.



Anexo C: Espectros de massas dos complexos de Cu(II)

Figura C1. Espectro de massas para o complexo I.

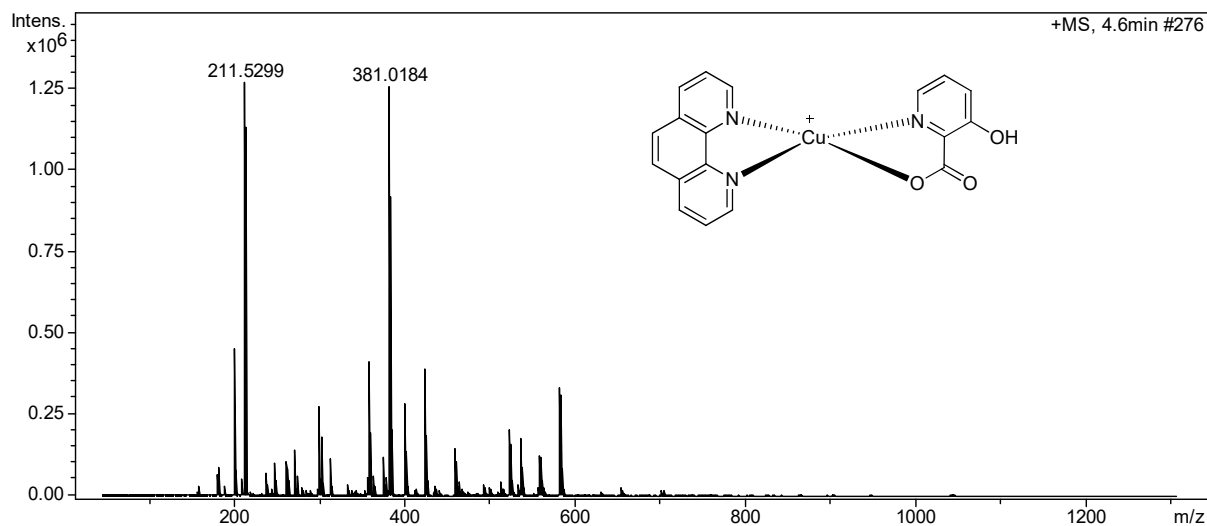


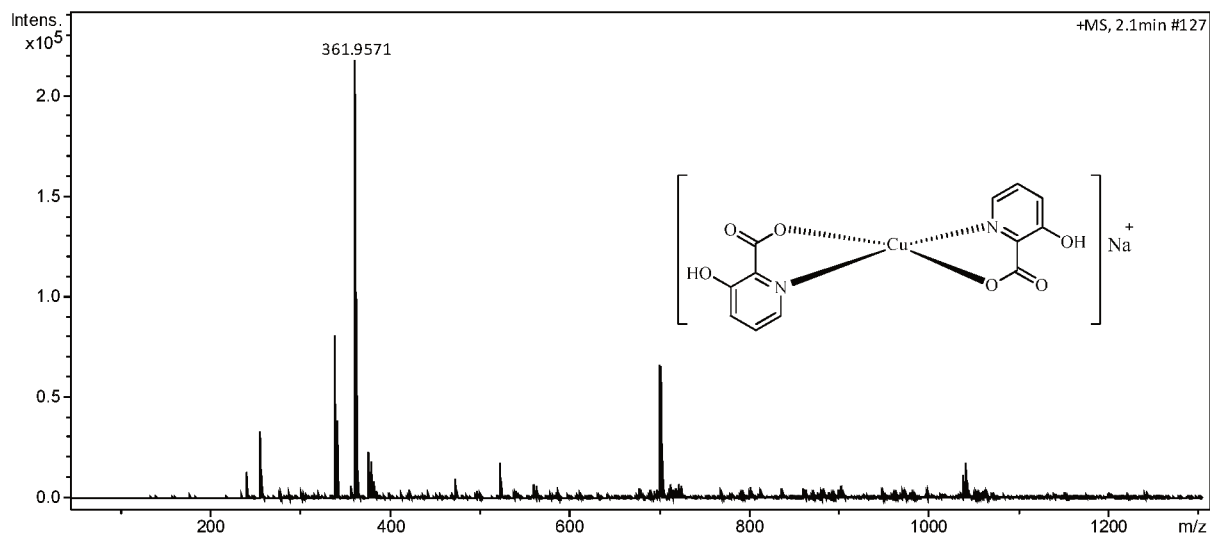
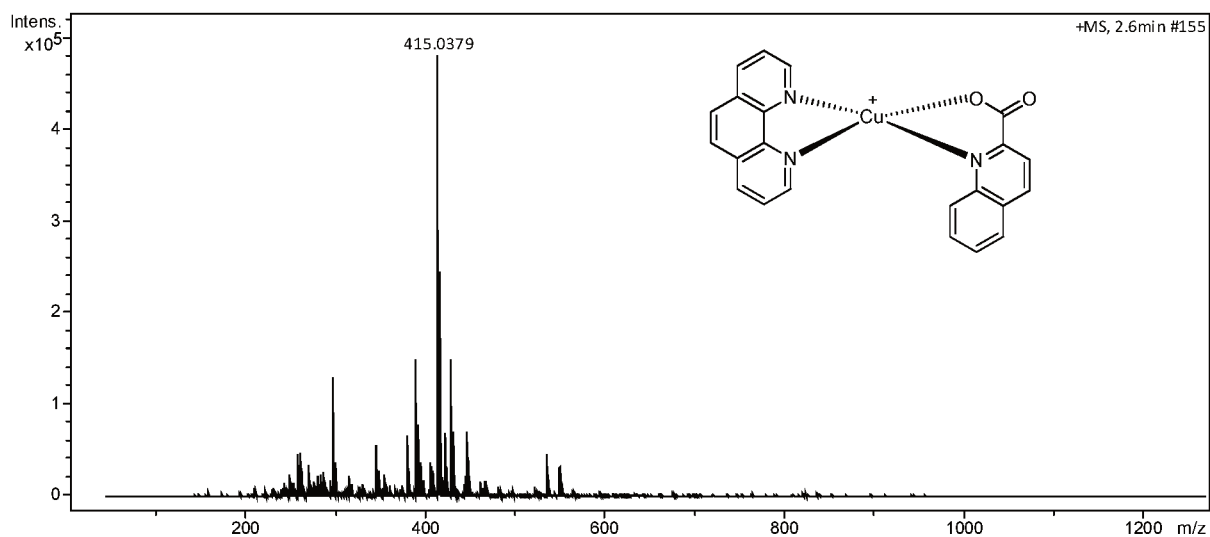
Figura C2. Espectro de massas para o complexo **III**.**Figura C3.** Espectro de massas para o complexo **IV**.

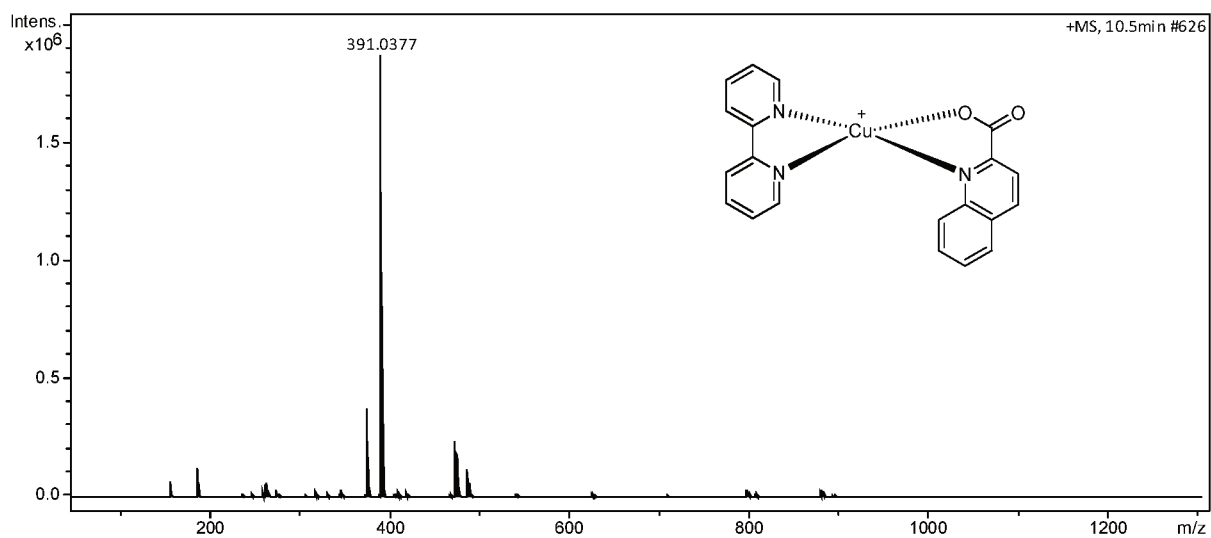
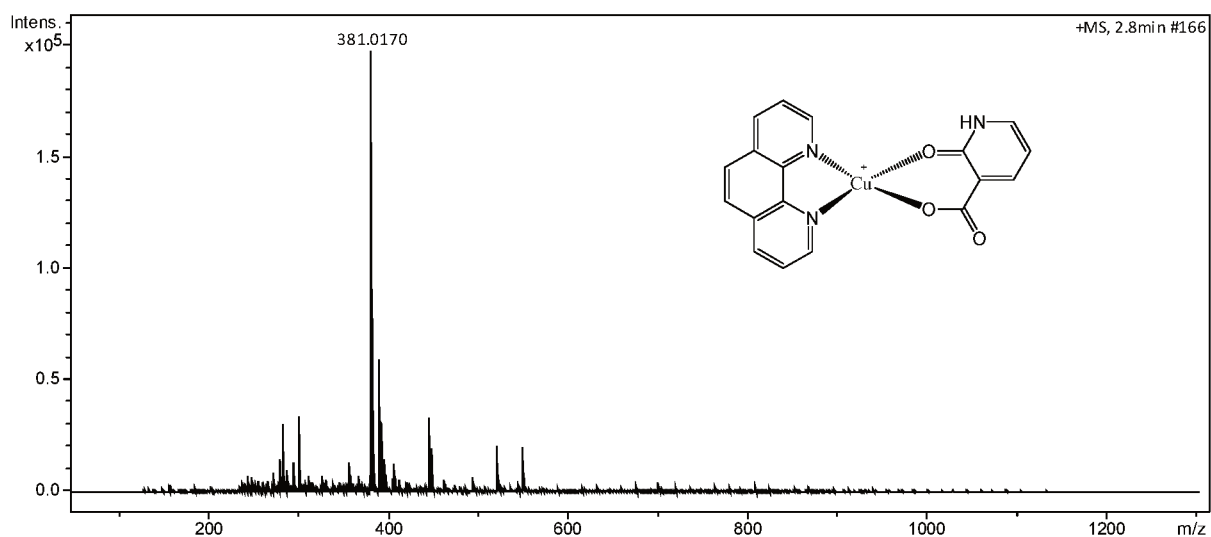
Figura C4. Espectro de massas para o complexo V.**Figura C5.** Espectro de massas do complexo VII.

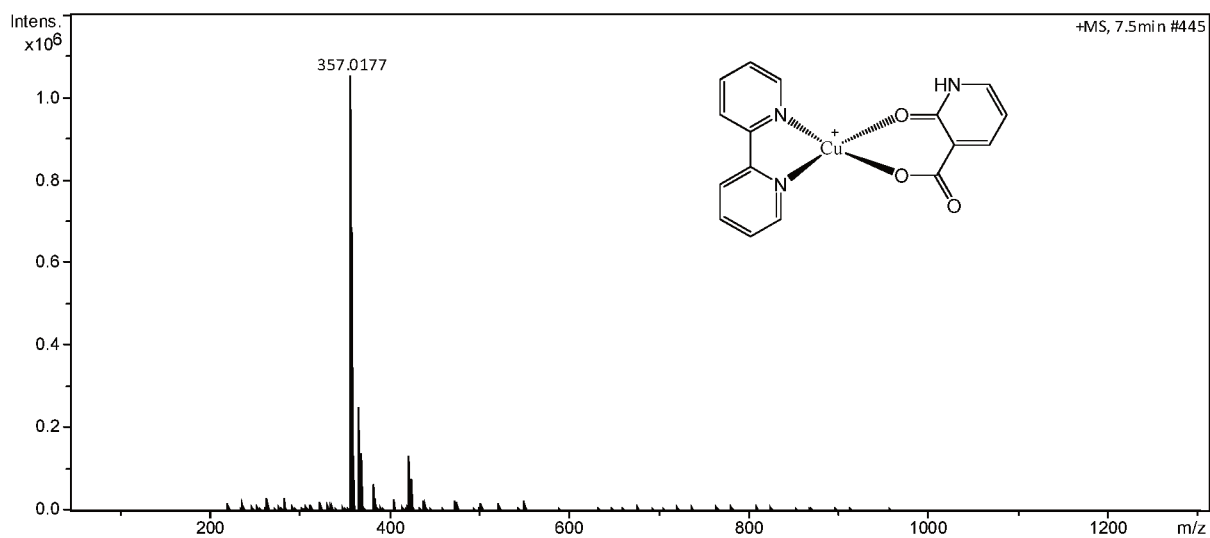
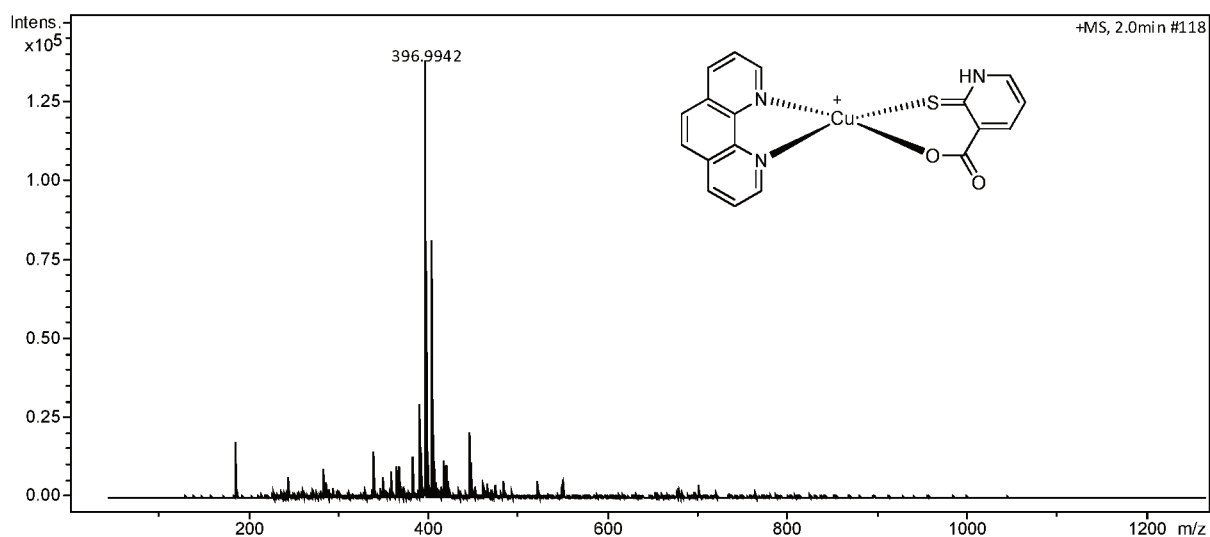
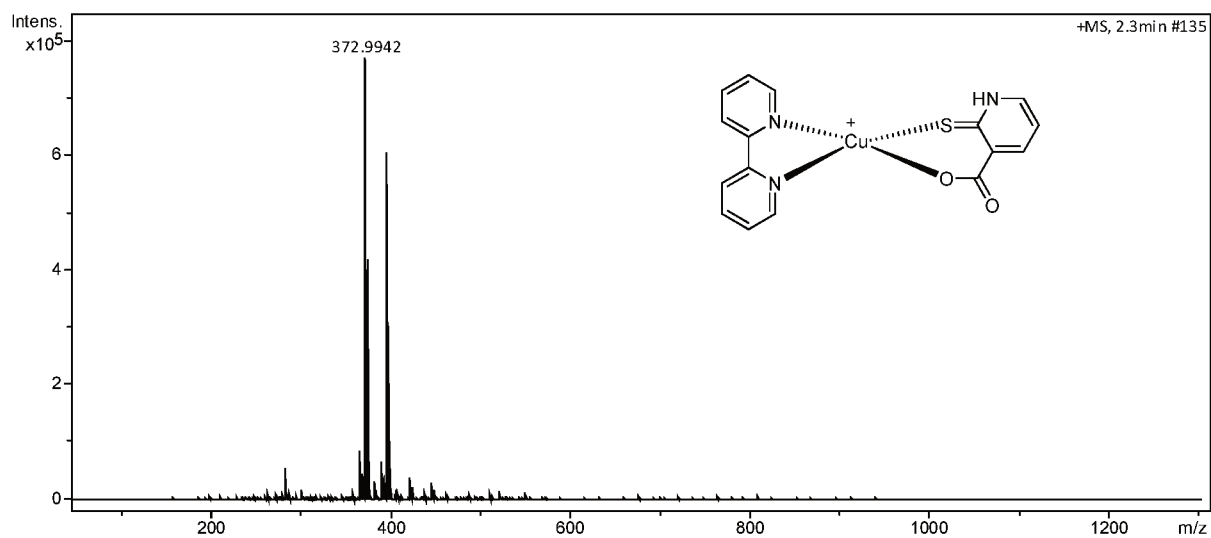
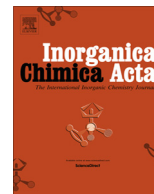
Figura C6. Espectro de massas para o complexo VIII.**Figura C7.** Espectro de massas do complexo X.

Figura C8. Espectro de massas para o complexo **XI**.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA



Synthesis, cytotoxic and antitubercular activities of copper(II) complexes with heterocyclic bases and 3-hydroxypicolinic acid



Janaina do Couto Almeida^a, Ivana M. Marzano^b, Marcos Pivatto^a, Norberto P. Lopes^c, Ana M. Da Costa Ferreira^d, F.R. Pavan^e, I.C. Silva^e, Elene C. Pereira-Maia^b, G. Von Poelhsitz^a, Wendell Guerra^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14.040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara, 14.801-902 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2016

Received in revised form 29 February 2016

Accepted 3 March 2016

Available online 9 March 2016

Keywords:

Copper complexes

N-donor heterocyclic ligands

Antimycobacterial activity

3-Hydroxypicolinic acid

Cytotoxicity activity

ABSTRACT

Two new copper(II) complexes with the deprotonated ligand 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) and heterocyclic bases (1,10-phenanthroline – phen or 2,2'-bipyridine – bpy) were synthesized. [Cu(3-HPA)(phen)ClO₄] **I** and [Cu(3-HPA)(bpy)ClO₄] **II** were characterized by elemental analyses, conductivity measurements, FT-IR, UV–Vis, EPR and High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HRESIMS). The results indicate that the geometry around the copper ion is distorted square-pyramidal, and that the copper ion is coordinated to 3-HPA via oxygen and nitrogen atoms, and to heterocyclic bases via their two nitrogen atoms. A perchlorate ion weakly bonded occupies the apical position, completing the metal coordination sphere. In this work, the compound [Cu(3-HPA)₂] **III** was also synthesized using a new method, different from that described in the literature. The cytotoxic activity of these compounds against tumor and normal cell lines was investigated. Complex **I** exhibited a strong antitumor activity, being the most active in the series of studied complexes. The compounds were also evaluated for activity against *Mycobacterium tuberculosis*, and the complex **I** displays good antimycobacterial activity, while compounds **II** and **III** were only moderately active.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metal complexes are useful as drugs in the treatment of a series of diseases, mainly in cancer chemotherapy. Since the discovery of the antitumoral activity of cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], in 1965, a great number of coordination compounds have been synthesized and tested in order to develop clinically more effective and safe drugs [1]. Although all approved drugs are based in platinum, having a *cis*-[PtX₂(amine)₂] chemotype (where X = leaving group, amine = neutral or carrier group) [2], some ruthenium compounds, as KP1019 and NAMI-A, have also entered clinical tests [3]. Other examples of metal complexes as candidates to therapeutic agents include gold [4] and cobalt [5], showing different mechanisms of action. Copper is very promising in the development of new

pharmacological agents, because is an essential trace element important for the function of several enzymes involved in energy metabolism, respiration and DNA synthesis in the cell, having its homeostasis strictly regulated [6,7]. Therefore, copper complexes have been investigated for many therapeutic purposes, such as antitumoral, antimalarial, antifungal, and antibacterial agents, in the treatment of Alzheimer's disease, diabetes, rheumatoid arthritis, skin wounds, cardiovascular diseases, and leishmaniasis and more recently as potential drugs to combat Parkinson's disease [8]. Two copper complexes developed by Ruiz and co-workers, are already approved for clinical trials as antitumor drugs [9], and many copper complexes with N-donor heterocyclic ligands, such as 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine were described to cleave DNA and inhibit tumoral cell growth [10–13]. We have previously reported the DNA cleavage ability of copper(II)-phenanthroline complexes with tetracycline and doxycycline [14]. These compounds inhibit the growth of a chronic myelogenous leukemia cell line and cleave DNA in mild conditions, in the absence of additional

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, João Naves de Ávila Avenue, 2121, Campus Santa Mônica, 38.400-902 Uberlândia, MG, Brazil. Tel.: +55 34 3239 4143.

E-mail address: wg@iqufu.ufu.br (W. Guerra).

agents [14]. In other studies, our research group also showed that copper complexes containing β -diketones or hydrazides and 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline are promising antitumoral agents [15–17]. Indeed, the synthesis of new copper(II) complexes with potential pharmacological activity is highly desired.

Here, our strategy to obtain new active compounds was to use the 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) as ligand to synthesize complexes of the type $[\text{Cu}(3\text{-HPA})(\text{N}-\text{N})\text{ClO}_4]$, in which N–N = 1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine. The compound $[\text{Cu}(3\text{-HPA})_2]$ was also synthesized using a different method from that described in the literature. The complexes were characterized by elemental analyses, conductivity measurements, FT-IR, UV-Vis, EPR and High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HRESIMS). Regarding the 3-hydroxypicolinic acid, Barbosa et al. [18] reported a ruthenium(II) complex with 3-HPA that showed a good activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. These findings encourage us to prepare a new series of copper complexes and to evaluate its potentiality as antitumoral and antimycobacterial agents.

2. Experimental

2.1. Starting materials

The reagents (ligands and metallic salts) are commercially available (Aldrich).

2.2. Preparation of the complexes

The complexes with heterocyclic bases were synthesized following the same general procedure. For example, $[\text{Cu}(3\text{-HPA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ was prepared by the reaction of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (60.4 mg, 0.25 mmol) with 0.25 mmol of 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) in methanol (5 mL). The mixture was stirred for 20 min followed by the slow addition of 1,10-phenanthroline (0.25 mmol) previously dissolved in methanol. After 48 h, the solid formed was separated by filtration, washed with water and dried under reduced pressure.

2.2.1. $[\text{Cu}(3\text{-HPA})(\text{phen})\text{ClO}_4]$ I

M.M.: 481.30 g mol⁻¹. Yield: 62%. Color: Blue. *Anal. Calc.* for $(\text{CuC}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_7\text{Cl})$: C, 44.92; H, 2.51; N, 8.73. Found: C, 44.98; H, 2.37; N, 8.69%. HRESIMS (methanol), m/z : 381.0184 $[\text{M}-\text{ClO}_4]^+$. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3447, 3105, 3068, 2374, 2338, 1653, 1646, 1637, 1629, 1608, 1560, 1522, 1508, 1457, 1429, 1397, 1388, 1340, 1320, 1275, 1239, 1219, 1150, 1110, 1087, 900, 872, 847, 832, 820, 809, 777, 767, 736, 720, 692, 623, 588, 453. UV-Vis (methanol), λ_{max} (nm) = 342 (4.8×10^2 mol⁻¹ L cm⁻¹), 294 (1.9×10^3 mol⁻¹ L cm⁻¹), 272 (4.60×10^3 mol⁻¹ L cm⁻¹), 265 (5.00×10^3 mol⁻¹ L cm⁻¹), 227 (7.80×10^3 mol⁻¹ L cm⁻¹), 670 (3.00×10^1 mol⁻¹ L cm⁻¹), 700 (solid). EPR parameters, in solid: g_{\perp} 2.051, g_{\parallel} 2.164; in frozen acetonitrile solution: g_{\perp} 2.079, g_{\parallel} 2.271, A_{\parallel} 167 G, or $177 \cdot 10^{-4}$ cm⁻¹, $g_{\parallel}/A_{\parallel}$, 128 cm. Molar conductivity, ΛM (ethanol) = 39.12 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

2.2.2. $[\text{Cu}(3\text{-HPA})(\text{bpy})\text{ClO}_4]$ II

M.M.: 457.2814 g mol⁻¹. Yield: 50%. Color: Blue. *Anal. Calc.* for $(\text{CuC}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_7\text{Cl})$: C, 42.02; H, 2.65; N, 9.19. Found: C, 41.77; H, 2.37; N, 9.01%. HRESIMS (ethanol), m/z : 357.0176 $[\text{M}-\text{ClO}_4]^+$. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3450, 2375, 2344, 1653, 1647, 1637, 1629, 1624, 1616, 1608, 1473, 1465, 1458, 1448, 1319, 1276, 1240, 1217, 1152, 1122, 1089, 899, 832, 819, 809, 769, 729, 691, 621, 590, 452. UV-Vis (ethanol), λ_{max} (nm) = 309 (1.30×10^4 mol⁻¹ L cm⁻¹), 297 (1.50×10^4 mol⁻¹ L cm⁻¹), 224 (2.63×10^4 mol⁻¹ L cm⁻¹), 661 (3.10×10^1 mol⁻¹ L cm⁻¹), 633 (solid). ΛM (ethanol) = 35.93 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

2.2.3. $[\text{Cu}(3\text{-HPA})_2]$ III

This complex was synthesized by Girginova et al. using a different method [19]. In this work, $[\text{Cu}(3\text{-HPA})_2]$ was prepared by the reaction of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (60.4 g, 0.25 mmol) with 0.50 mmol of 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) in methanol (5 mL). The mixture was stirred for 48 h and the crystalline solid formed was separated by filtration, washed with water and dried under reduced pressure.

M.M.: 339.7477 g mol⁻¹. Yield: 51%. Color: Dark blue. *Anal. Calc.* for $(\text{CuC}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_6)$: C, 42.42; H, 2.37; N, 8.25. Found: C, 42.84; H, 2.51; N, 8.13%. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3453, 3100, 3069, 2376, 2344, 1653, 1647, 1608, 1576, 1570, 1559, 1508, 1456, 1394, 1388, 1321, 1309, 1275, 1240, 1217, 1153, 1128, 1058, 903, 833, 819, 810, 765, 691, 588, 452. UV-Vis (ethanol), λ_{max} (nm) = 302 (1.21×10^4 mol⁻¹ L cm⁻¹), 653 (3.5×10^1 mol⁻¹ L cm⁻¹), 598 (solid). ΛM (ethanol) = 0.69 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

2.3. Physical measurements

Conductivity studies were carried out with a Digimed DM 31 conductivity meter using a cell of constant 0.95 cm⁻¹, and spectroscopic grade ethanol (ΛM = 0.93 $\mu\text{S cm}^{-1}$) as solvent.

Elemental analyses were performed using a Perkin-Elmer 2400 CHN Elemental Analyser.

IR spectra were registered in KBr pellets on a Shimadzu FTIR-Irprestige-21 spectrometer.

Diffuse reflectance spectra and UV-Vis were obtained on a Shimadzu UV-2501 PC spectrophotometer.

High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HRESIMS) were measured on an ultratOF (Bruker Daltonics) spectrometer, operating in the positive mode. Methanol–water (1:1, v/v) was used as solvent system and the samples were infused into the ESI source at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The calculated values for the charged complex ions were made using ChemDraw Ultra 14.0.

For the EPR spectra registration, a Bruker instrument (Karlsruhe, Germany), model EMX, operating at X-band (9.50 GHz frequency, 20 mW power, 100 kHz modulation frequency) was used. Measurements were performed at 77 K, with samples in solid state or in frozen acetonitrile solution, using Wilmad quartz tubes. DPPH (α,α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) was used for frequency calibration (g = 2.0036).

2.4. Cells and culture

2.4.1. K562 cells

The K562 cell line was purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (number CR083 of the RJCB collection). This cell line was established from pleural effusion of a 53 year-old female with chronic myelogenous leukemia in terminal blast crisis. Cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) medium supplemented with 10% fetal calf serum (CULTILAB, São Paulo, Brazil) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cultures grow exponentially from 10^5 cells mL⁻¹ to about 8×10^5 cells mL⁻¹ in three days. Cell viability was checked by Trypan Blue exclusion. The cell number was determined by coulter counter analysis.

For cytotoxicity assessment, 1×10^5 cells mL⁻¹ was cultured for 72 h in the absence and presence of a range of concentrations of tested compounds. The sensitivity to compound was evaluated by the concentration that inhibits cell growth by 50% (IC₅₀). Stock solutions were prepared in DMSO and diluted accordingly to obtain the concentrations used in the cytotoxic assays. The final concentration of DMSO in the experiments was below 0.5% and we have checked that the solvent has no effect on cell growth at this concentration.

2.4.2. MRC-5 and A549 cells

MRC-5 (normal fibroblast pulmonary cells) and A549 (human lung adenocarcinoma epithelial) cells line were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and incubated in DMEM medium with supplemented with 10% FBS and 1% penicillin (100 U/ml)–streptomycin (100 µg/ml). Cells were maintained in a humidified environment at 37 °C with 5% CO₂ and sub-cultured twice per week.

A resazurin reduction assay was used to investigate cytotoxicity of several drugs toward MRC-5 and A549 cells. The assay is based on reduction of the indicator dye, resazurin, to the highly fluorescent resorufin by viable cells. Nonviable cells rapidly lose the metabolic capacity to reduce resazurin and thus do not produce a fluorescent signal.

Briefly, the cells were detached by treatment with 0.25% trypsin/EDTA (VibroCell, Brazil) and 2.5×10^4 cells were placed in each well of a 96-well cell culture plate (Costar, USA) in a total volume of 100 µL. Cells were allowed to adhere overnight and then were treated with different concentrations of drugs. After 24 h or 72 h incubation in the presence of the compounds, the medium was removed and 50 µL resazurin (Sigma–Aldrich, Germany) 0.01% w/v in DMEM, was added to each well and the plates were incubated at 37 °C for 3 h.

The fluorescence was measured on Biotek Synergy H1 plate reader (Biotek, Winooski, VT) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Untreated cells constituted the negative control (viable cells), and cells treated with doxorubicin at 100 nmol (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) constituted the positive control (death control, DC). All the tests were performed in three independent assays. A test was done on plates without cells to verify that the reaction cannot occur between the compounds and the reagent to avoid false-positive results (data not shown).

The IC₅₀ values represent the samples concentrations required to inhibit 50% of cell proliferation and were calculated from a calibration curve by regression curves using Microsoft Excel.

2.5. Anti-Myco**acterium tuberculosis** activity assay

The anti-MTB activity of the compounds was determined by the REMA (Resazurin Microtiter Assay) method [20]. Stock solutions of the tested compounds were prepared in DMSO and diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC), performed by Precision XS (Biotek®) to obtain the final drug concentration range of 0.09–25 µg/mL. Isoniazid was dissolved in distilled water and rifampicin in DMSO, and both were used as standard drugs. A suspension of MTB H₃₇Rv ATCC 27294 was cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC and 0.05% Tween 80. The cultures were frozen at –80 °C in aliquots. After two days the CFU per mL (colony formation unit per mL) of an aliquot was determined. The concentrations were adjusted by 5×10^5 CFU per mL and 100 µL of the inoculum were added to each well of a 96-well microplate (Kasvi®) together with 100 µL of the compounds. Samples were set up in triplicate. The plates were incubated for 7 days at 37 °C. Resazurin (solubilized in water) was added (30 µL of 0.01%). The fluorescence of the wells was read after 24 h with a Cytation 3 (Biotek®). The MIC was defined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of growth of MTB.

3. Results and discussion

Copper(II) complexes with the deprotonated ligand 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) were synthesized and characterized by elemental analyses, conductivity measurements, FT-IR, UV–Vis,

High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HRESIMS) and EPR. All the copper complexes are colourful, non hygroscopic, stable to air and light and soluble in organic solvents such as DMSO, ethanol and acetonitrile. The chemical structures of the complexes with 3-HPA are presented in Fig. 1.

The results of the elemental analyses are in good agreement with the proposed structures. The molar conductivity values of solutions (10^{–3} M; ethanol) for all complexes with heterocyclic bases fall in the range observed for 1:1 electrolytes [21]. The labilization of the axial ligands in solution (perchlorate anion) results in the generation of compounds of type [Cu(3-HPA)(N–N)]⁺. On the other hand, as expected, the molar conductivity value for **III** indicates that this compound is nonelectrolyte. The crystal structure of the complex **III** has been described in the literature [19] and it will not be discussed further here. Nevertheless, for this complex, the metal ion is coordinated to two N,O-chelating anionic ligands and exhibits a distorted square planar coordination geometry [19].

The high-resolution mass spectra of the synthesized complexes were performed and the obtained data are according to the proposed structures. In this work, the *m/z* values listed in the text (see Section 2) refer to the peak containing the most abundant isotope (⁶³Cu). For example, mass spectrum of the complex **II** (Fig. S1) exhibited the charged ion at *m/z* 357.0176 [M–ClO₄]⁺ (calcd. 357.0175). The experimental isotopic patterns for [Cu(3-HPA)(bpy)]⁺ and [Cu(3-HPA)(phen)]⁺ ions match the theoretical isotopic patterns considering the proposed compositions.

The UV–Vis spectra of the complexes were recorded in ethanol (10^{–4} M) in the range of 200–900 nm. A bathochromic shift in relation to free ligands confirms the presence of the complexes in solution. The absorption spectra of the complex **II** and of the corresponding ligands are shown in Fig. 2. The splitting observed in the spectrum of the complex is also consistent with the coordination of the ligand to metal. Complexes **I** and **II** exhibit only one broad and asymmetric d–d band centered at ≈660 nm. For example, the complex **II** exhibits a d–d band (Fig. S2) centered at 661 nm ($\epsilon = 31 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). These observations are consistent with a distortion from the square-pyramidal geometry, due to the Jahn–Teller effect [15]. In the solid state (diffuse reflectance), the complexes **I** and **II** exhibit the d–d band centered at 633 and 700 nm, respectively, indicating that the geometry of the complexes in solution differs from that in solid state [17].

The IR spectra of the new complexes are in accordance with the presence of 3-HPA coordinated to the copper(II) ions via the carboxylate group and nitrogen. The carboxylate group may coordinate to a metal atom in one of the unidentate, bidentate or bridging modes. For all complexes, bands corresponding to the $\nu(\text{COO}^-)$ and $\nu_s(\text{COO}^-)$ vibrational modes appeared close to 1654 (1703 cm^{–1} in the uncoordinated ligand) and 1320 cm^{–1} (1295 cm^{–1} in the uncoordinated ligand), respectively. The value of $\Delta(\nu_s - \nu) = 331 \text{ cm}^{-1}$ indicates the presence of monodentate carboxylate group. Peaks of medium intensity around 1580 cm^{–1} are assigned to $\nu(\text{C}=\text{N})$ of the coordinated ligand, in good agreement with the N,O-chelation [19,22]. The same coordination mode was observed in previous works for some complexes containing 3-HPA as ligands [18,19,22–24]. The stretching vibrations of the uncoordinated hydroxyl group of ligand appear in the range 3448–3455 cm^{–1}. The weak bands at 3100 and 3000 cm^{–1} are attributed to the stretching vibrations of aromatic C–H bonds. Infrared spectroscopy is very useful to determine the mode of coordination of the ClO₄ ligand. The behavior of the weakly coordinating perchlorate ion can be distinguished by the Cl–O stretching frequencies [14]. The infrared spectra of **I** and **II** indicate the presence of one unidentate perchlorate ion. Bands in the region 578–559 and 443–437 cm^{–1} were assigned to $\nu_{\text{Cu–N}}$ and $\nu_{\text{Cu–O}}$.

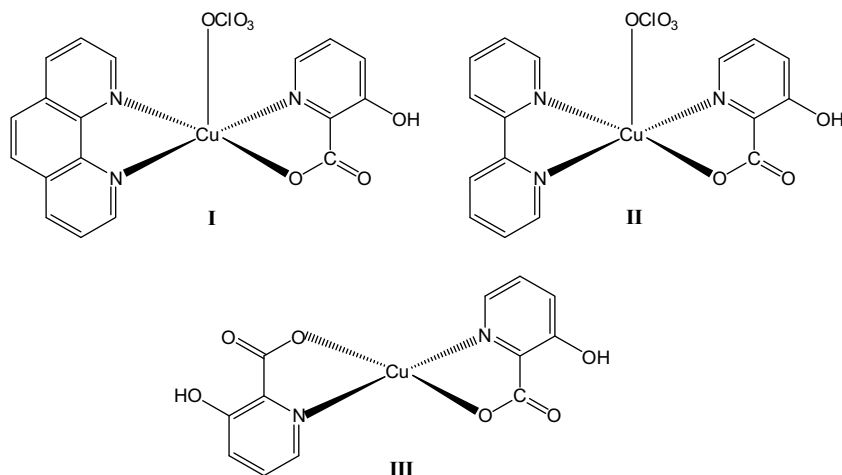


Fig. 1. Proposals structures for the complexes I–III.

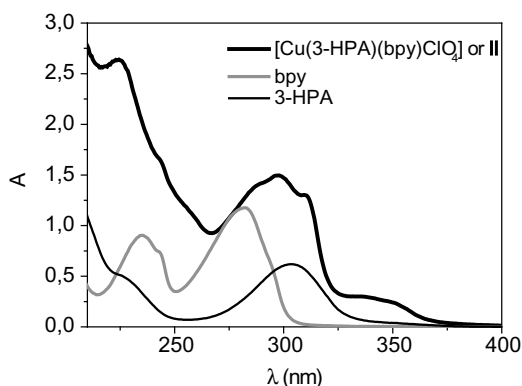


Fig. 2. Electronic spectra of $[\text{Cu}(\text{3-HPA})(\text{bpy})\text{ClO}_4]$, 3-HPA, and bpy, in ethanol (1.0×10^{-4} M).

Table 1

EPR spectroscopic parameters.

Compound	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\perp} (G)	A_{\parallel} (10^{-4} cm^{-1})	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (cm)
$[\text{Cu}(\text{3-HPA})(\text{Phen})\text{ClO}_4]$ I					
In frozen acetonitrile solution	2.079	2.271	167	177	128
In solid state	2.050	2.162			

3.1. Stability of complexes

Stability is a very important factor for the development of clinical metal complexes [13]. Thus, the stability of the complex I was evaluated by UV–Vis spectral analysis at different times in a mixture containing $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:99 v/v). According to the Fig. 4, the values of absorbance and wavelength were not affected. These observations indicate that the complex is stable in solution for at least 8 h under the test conditions [26].

3.2. Cytotoxic studies

The cytotoxic activity of compounds is depicted in Table 2. IC_{50} values obtained for two platinum complexes used in chemotherapy, cisplatin and carboplatin, are also shown for the sake of comparison.

As it can be seen in Table 2, phenanthroline (phen) displays high activity and selectivity index (SI) against the K562 cell line.

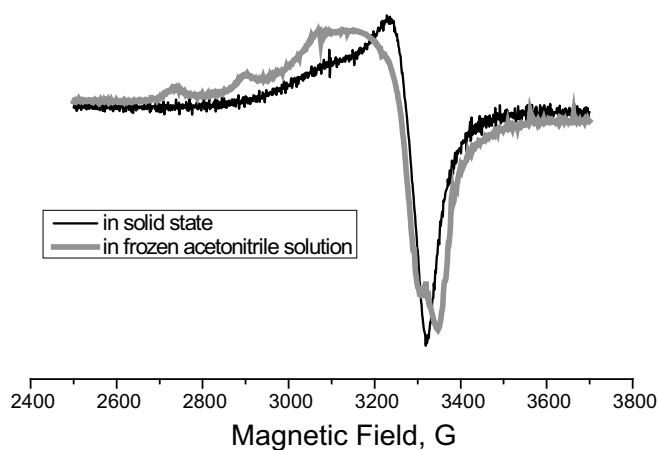


Fig. 3. EPR spectra of the complex I (solution and in solid-state).

EPR spectra for complex I (Fig. 3) in solid state and in frozen acetonitrile solution corroborate the change of geometry observed in electronic spectra. In the solid, a perchlorate anion is bound at the apical position, providing a penta-coordinate environment around the metal ion, while in solution a tetragonal geometry with little tetrahedral distortion is observed, as indicated by the spectroscopic parameters ratio obtained, $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (128 cm) [17,25] (see Table 1).

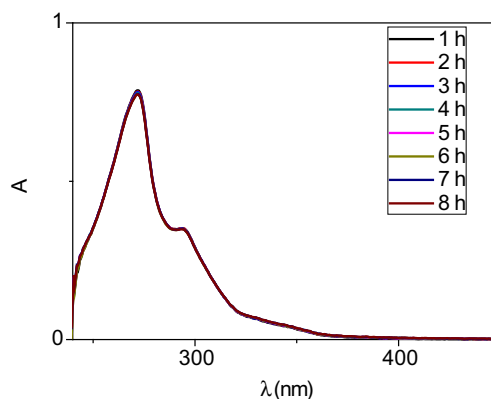


Fig. 4. Ultraviolet spectra of complex I as a function of time.

Table 2^aIC₅₀ (μM) values for ligands, cisplatin, carboplatin and complexes.

Compound	K562 (72 h)	MRC-5 (72 h)	^b SI	MRC-5 (24 h)	A549 (24 h)	^b SI
3-HPA	130.0	2767.6	21.3	2228.4	2264.4	0.9
phen	3.2	166.4	52	305.0	77.6	3.9
bpy	30.0	>2560.9	>85.4	320.1	>2560.9	<0.12
I	2.3	0.4	0.17	4.8	8.3	0.6
II	21.8	32.8	1.50	43.7	52.5	0.8
III	20.8	70.6	3.40	53.0	82.4	0.6
Carboplatin	10.0	–	–	–	–	–
Cisplatin	1.1	–	–	–	–	–

K562: chronic myelogenous leukemia cell line.

MRC-5: lung cell line (normal).

A549: human lung adenocarcinoma epithelial cell line.

^a IC₅₀ – concentration required to inhibit 50% of cell growth.^b SI – selectivity index.

However, in the literature, for the phenanthroline and its derivatives, it is assumed that the sequestering of trace metals in situ is involved and that the resulting metallic complexes are the active species [27]. All organic compounds exhibited low activity against A549 and MRC-5.

The copper complexes inhibit the growth of K562 and A549 cells with IC₅₀ values between 2.3 and 82.4 μM. The results showed that activity of the complexes follows the order **I** > **II** = **III**. Copper coordination improves the cytotoxic activity: all complexes are more potent than the corresponding free ligands. The substitution of one molecule of 3-HPA by one molecule of phen significantly increases the cytotoxic activity; though, it does not improve the selectivity index, which is low and suggests a generic toxicity. Regarding the complexes **I** and **II**, compared to similar compounds containing aromatic diimine ligands (N–N) already described, they show very similar results, as shown in Table 3. In the complexes with heterocyclic bases, the substitution of bpy by phen increases the activity. As a general behaviour of those aromatic diamine ligands, copper complexes with phenanthroline are more reactive than similar ones with bipyridine ligands [8c,14]. An accepted explanation for this order of reactivity is that the planar polycyclic phen ring interacts better with DNA [28]. However, the mode of action of these complexes can be quite different. Casiopines [Cu(N–N)LX], for example, have been described as interacting with mitochondria, inhibiting oxidative phosphorylation and, eventually, also cellular ATP depletion, in addition to DNA binding [30].

Table 3Comparison of the cytotoxicity of different copper complexes with the chemotype [Cu(N–N)LX] (where N–N = 1,10-phen or 2,2'-bpy, and X = counterion, NO₃[–], or ClO₄[–]).

Complex	IC ₅₀ (μmol/L)	Cytotoxicity	References
[Cu(3-hydroxypicolinic acid)(phen)ClO ₄]	2.3 ± 0.2	K562 cells	This work
[Cu(3-hydroxypicolinic acid)(bpy)ClO ₄]	21.8 ± 2.2	K562 cells	This work
[Cu(BTA)(phen)NO ₃]	2.9 ± 0.3	K562 cells	[17]
[Cu(BTA)(bpy)NO ₃]	13.7 ± 1.4	K562 cells	[17]
[Cu(BTACl)(phen)NO ₃]	2.1 ± 0.2	K562 cells	[17]
[Cu(BTACl)(bpy)NO ₃]	9.2 ± 1.0	K562 cells	[17]
[Cu(doxycycline)(1,10-phen)(H ₂ O)(ClO ₄)ClO ₄]	1.93 ± 0.2	K562 cells	[14]
[Cu(tetracycline)(1,10-phen)(H ₂ O)(ClO ₄)ClO ₄]	2.59 ± 0.3	K562 cells	[14]
[Cu(phen)(α-glycinate)]NO ₃	13.9 ± 1.3	HeLa	[28]
	27.3 ± 2.2	MCF-7	
[Cu(5,6-dimethylphen)(α-glycinate)]NO ₃	5.3 ± 0.1	HeLa	[28]
	4.4 ± 0.3	MCF-7	
[Cu(4,7-dimethylphen)(glycinate)]NO ₃	6	A549	[29]

Table 4

Anti-MTB activity (MIC) of the copper complexes and their free ligands.

Compound	MIC ₉₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μM)
phen	4.1	22.7
bpy	>25	>160.0
3-HPA	>25	179.7
[Cu(3-HPA)(phen)ClO ₄] I	11.9	24.72
[Cu(3-HPA)(bpy)ClO ₄] II	>25	>54.7
[Cu(3-HPA) ₂] III	24.2	71.23

3.3. Anti-M. tuberculosis activity

The antimycobacterial activity of compounds was evaluated in vitro against *M. tuberculosis* H37Rv strains by the REMA (Resazurin Microtiter Assay) method. As can be seen in Table 4, phen shows good activity against the *M. tuberculosis* H37Rv strain with MIC value equal to 22.7 μM. Regarding the phenanthroline (phen), this molecule and its derivatives have been identified as new agents with antimycobacterial activity [24,31,32]. Concerning the complexes, the results showed that the activity of the complex **I** was higher than that of free 3-HPA, displaying good antimycobacterial activity, while compounds **II** and **III** were only moderately active. Regarding the activity of compound **I**, this should be more lipophilic than complex **II**, consequently it has a higher ability to diffuse into the cell membrane and reach their biological target [33].

4. Concluding remarks

Two new copper(II) complexes containing 3-hydroxypicolinic acid and heterocyclic bases were prepared and characterized. For these complexes, the results indicate a distorted square-pyramidal geometry around the copper ion in the solid, where the copper ion is penta-coordinated to 3-HPA ligand via their oxygen and nitrogen atoms, and to the heterocyclic bases by its nitrogen atoms. The axial position is occupied by a perchlorate ion. However, in solution this anion acts only as counter-ion, and the geometry around copper becomes tetragonal, as attested by UV–Vis and EPR spectra (in the case of [Cu(3-HPA)(Phen)]ClO₄ species). The biological activities of the copper complexes make them good candidates for further studies, once small structural modifications may result in an increase of the selectivity index. Indeed, these complexes can be useful for the design of new antitumoral and antibacterial agents.

Acknowledgments

To CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Brazil), and INCT-Catálise by financial support and fellowships. The authors are also thankful to the Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo – GMIT research group supported by FAPEMIG (APQ-00330-14). This work is a collaboration research project of members of the Rede Mineira de Química (RQ-MG) supported by FAPEMIG (Project: CEX – RED-00010-14).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2016.03.005>.

References

- [1] F. Trudu, F. Amato, P. Vañhara, T. Pivetta, E.M. Peña-Méndez, J. Havel, J. Appl. Biomed. 13 (2015) 79.
- [2] N.P. Farrell, Chem. Soc. Rev. (2015), <http://dx.doi.org/10.1039/c5cs00201j>.

- [3] R. Trondl, P. Heffeter, C.R. Kowol, M.A. Jakupiec, W. Berger, B.K. Keppler, *Chem. Sci.* 5 (2014) 2925.
- [4] T. Zou, C.T. Lum, C.-N. Lok, J.-J. Zhang, C.-M. Che, *Chem. Soc. Rev.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1039/c5cs00132c>.
- [5] M.C. Heffern, N. Yamamoto, R.J. Holbrook, A.L. Eckermann, T.J. Meade, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17 (2013) 189.
- [6] C. Duncan, A.R. White, *Metalomics* 4 (2012) 127.
- [7] (a) A.K. Boal, A.C. Rosenzweig, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4760;
(b) M.J. Burkitt, *Arch. Biochem. Biophys.* 394 (2001) 117;
(c) E.R. Stadtman, R.L. Levine, *Amino Acids* 25 (2003) 207.
- [8] (a) S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, J.I. Lachowicz, G. Crisponi, M.A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev.* 284 (2015) 329;
(b) C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815.
- [9] R. Galindo-Murillo, J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T.E. Cheatham, F. Cortés-Guzmán, *Nucleic Acids Res.* 4 (2015) 5364.
- [10] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, *Anticancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 185.
- [11] L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gomez, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 3606.
- [12] S. Tardito, L. Marchio, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1325.
- [13] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Med. Res. Rev.* 30 (2010) 708.
- [14] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.D.C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414.
- [15] P.S. Lopes, D.A. Paixão, F.C.S. de Paula, A.M.D.C. Ferreira, J. Ellena, S. Guillard, E. C. Pereira-Maia, W. Guerra, *J. Mol. Struct.* 1034 (2013) 84.
- [16] P.P. Silva, W. Guerra, G.C. dos Santos, N.G. Fernandes, J.N. Silveira, A.M. da Costa Ferreira, T. Bortolotto, H. Terenzi, A.J. Bortoluzzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.* 132 (2014) 67.
- [17] J.C. Almeida, D.A. Paixão, I.M. Marzano, J. Ellena, M. Pivatto, N.P. Lopes, A.M.D. C. Ferreira, E.C. Pereira-Maia, S. Guillard, W. Guerra, *Polyhedron* 89 (2015) 1.
- [18] M.I.F. Barbosa, R.S. Corrêa, L.V. Pozzi, E.O. Lopes, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, J. Ellena, S.P. Machado, G.V. Poelhsitz, A.A. Batista, *Polyhedron* 85 (2015) 376.
- [19] P.I. Girginova, F.A.A. Paz, H.I.S. Nogueira, N.J.O. Silva, V.S. Amaral, J. Klinowski, T. Trindade, *J. Mol. Struct.* 737 (2005) 221.
- [20] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720.
- [21] W. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.
- [22] C. Sun, X. Zheng, L.P. Jin, *J. Mol. Struct.* 646 (2003) 201.
- [23] M. Boris-Marko Kukovec, *Croat. Chem. Acta* 85 (2012) 479.
- [24] F.R. Pavan, G.V. Poelhsitz, M.I.F. Barbosa, S.R.A. Leite, Alzir.A. Batista, J. Ellena, L. S. Sato, S.G. Franzblau, V. Moreno, D. Gambino, C.Q.F. Leite, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5099.
- [25] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A.L. Alonso-Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Álamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortes-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, L. Ruiz-Azuara, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 13730.
- [26] B. Li-Jun Li, *Inorg. Chim. Acta* 419 (2014) 135.
- [27] (a) R.A. MacLeod, *J. Biol. Chem.* 197 (1952) 751;
(b) F.P. Dwyer, I.K. Reid, A. Shulman, G.M. Laycock, S. Dixon, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 47 (1969) 203;
(c) M. McCann, A.L.S. Santos, B.A. da Silva, M.T.V. Romanos, A.S. Pyrrho, M. Devereux, K. Kavanagh, I. Fichtner, A. Kellet, *Toxicol. Res.* 1 (2012) 47.
- [28] M.E. Bravo-Gómez, J.C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 299.
- [29] R. Kachadourian, H.M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B.J. Day, *Toxicology* 268 (2010) 176.
- [30] A. Marín-Hernandez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, R. Moreno-Sanchez, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1979.
- [31] R. Danac, C.M.A. Matarneh, S. Shova, T. Daniloia, M. Balan, I.I. Mangalagiu, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 2318.
- [32] R. Danac, I.I. Mangalagiu, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 664.
- [33] J.C. Almeida, I.M. Marzano, F.C. Silva de Paula, M. Pivatto, N.P. Lopes, P.C. de Souza, F.R. Pavan, A.L.B. Formiga, E.C. Pereira-Maia, W. Guerra, *J. Mol. Struct.* 1075 (2014) 370.



Original article

Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death



Lorena Polloni^{a,*}, Ana Carolina de Seni Silva^a, Samuel Cota Teixeira^b,
Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo^a, Mariana Alves Pereira Zóia^a,
Marcelo Santos da Silva^{c,d}, Paula Marynella Alves Pereira Lima^a, Lucas Ian Veloso Correia^a,
Janaina do Couto Almeida^e, Claudio Vieira da Silva^b, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila^a,
Luiz Ricardo Filho Goulart^a, Sandra Morelli^a, Wendell Guerra^e, Robson José de Oliveira Júnior^{a,*}

^a Biotechnology Institute, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

^b Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

^c Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

^d The Wellcome Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom

^e Chemistry Institute, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Copper complex
Cytotoxicity
Apoptosis
Cell cycle
ROS

ABSTRACT

This work reports the biological evaluation of a copper complex of the type $[\text{Cu}(\text{O}-\text{O})(\text{N}-\text{N})\text{ClO}_4]$, in which $\text{O}-\text{O} = 4,4,4$ -trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione (Hbta) and $\text{N}-\text{N} = 1,10$ -phenanthroline (phen), whose generic name is CBP-01. The cytotoxic effect of CBP-01 was evaluated by resazurin assay and cell proliferation was determined by MTT assay. DNA fragmentation was analyzed by gel electrophoresis. Cell cycle progression was detected through propidium iodide (PI) staining. Apoptosis and autophagy were determined by, respectively, Annexin V and 7-AAD staining and monodansylcadaverine (MDC) staining. The changes in intracellular reactive oxygen species levels were detected by DCFDA analysis. The copper complex CBP-01 showed in vitro antitumor activity with IC_{50} s values of 7.4 μM against Sarcoma 180 and 26.4 against murine myoblast cells, displaying selectivity toward the tumor cell tested in vitro ($\text{SI} > 3$). An increase in reactive oxygen species (ROS) generation was observed, which may be related to the action mechanism of the complex. The complex CBP-01 may induce DNA damage leading cells to accumulate at G0/G1 checkpoint where, apparently, cells that are not able to recover from the damage are driven to cell death. Evidence has shown that cell death is initiated by autophagy dysfunction, culminating in apoptosis induction. The search for new metal-based drugs is focused on overcoming the drawbacks of already used agents such as acquired resistance and non-specificity; thus, the results obtained with CBP-01 show promising effects on cancer cells.

1. Introduction

Copper complexes have attracted a great deal of attention as chemotherapeutic agents, especially after the spectacular discovery that the $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ complex cleaves deoxyribonucleic acid (DNA). Since then, many copper complexes have been proposed as promising anticancer agents [1,2]. For instance, copper(II) complexes known as Casiopeins®, developed by L. Ruiz and colleagues, are already approved for clinical trials as antitumor drugs [2]. It is interesting to note that casiopeins present the general formula $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{N}-\text{O})]\text{NO}_3$ and $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})]\text{NO}_3$, in which N-N indicates a substituted bipyridine or phenanthroline, N-O denotes an α -aminoacidate or peptide and O-O

represents acetylacetonate or salicylaldehyde [3].

In fact, there are many reasons to conduct research to investigate the use of copper complexes in cancer chemotherapy, especially those containing *N,N*-heterocyclic ligands, such as 1,10-phenanthroline, 2,2'-bipyridine and derivatives that facilitate intercalation into DNA [2]. It is noteworthy that copper is an essential trace element important for the functioning of several enzymes involved in energy metabolism, respiration and DNA synthesis in the cell [4]. Furthermore, copper plays a central role in angiogenesis, a process critical for tumor growth, invasion, and metastasis, which makes it interesting for the development of anticancer drugs [1]. Considering the abovementioned reasons, our research group has a great interest in the synthesis and biological

* Corresponding authors at: Para Avenue, 1720, CEP: 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil.

E-mail addresses: oliveirajunior@ufu.br (L. Polloni), robson_jurn@yahoo.com.br (R.J.d. Oliveira Júnior).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2019.01.047>

Received 5 October 2018; Received in revised form 20 December 2018; Accepted 16 January 2019

0753-3322/ © 2019 Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

studies of ternary complexes of copper [5–9]. In previous works, we showed that copper complexes bearing heterocyclic bases and β -diketonates as ligands are promising anticancer agents, display IC_{50} values in a low concentration range, and inhibit the growth of K562 cells [8,9]. Indeed, the very promising results obtained by employing the copper (II) complexes with 1,10-phenanthroline has positioned them as candidates for further mechanistic and cytotoxicity studies of other cell lines. Thus, we report, for the first time, the anticancer potential of the $[Cu(bta)(1,10\text{-phenanthroline})(ClO_4)]$ complex, whose generic name is CBP-01, by demonstrating its cytotoxicity and cell death pathways.

2. Material and methods

2.1. Procedure for synthesis of compound CBP-01

The copper(II) complex with 1,10-phenanthroline (CBP-01) was synthesized according to the methodology described by Almeida (2015). Elemental analysis was employed to verify the compound's purity [9]. The complex synthesis resulting in the chemical structure is shown in the Supplementary Figure.

2.2. Cell lines and culture conditions

The cell line C2C12 (murine myoblast) was cultivated in a 25cm² flask in complete RPMI-1640 medium (Cultilab®, Brazil), which was supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco®, Paisley, UK) and antibiotics (100 U mL⁻¹ penicillin, 100 μ g mL⁻¹ streptomycin) (Sigma®, Brazil), in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The sarcoma 180 (murine sarcoma) was maintained in mice by intraperitoneal inoculation (i.p.). All mice were kept under specific pathogen-free conditions with free access to autoclaved food and water. All procedures for the handling, use and euthanasia of these animals were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia, Brazil (CEUA/UFU N. 141/16), and every effort was made to minimize suffering.

2.3. Viability assay

The viability was evaluated by the resazurin assay [10]. Cells were seeded into a 96-well microplate at a density of 1×10^5 cells per well. After incubation, cells were exposed to medium supplemented with FBS in the presence of CBP-01 at different concentrations (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M; 12.5 μ M; 25 μ M and 50 μ M) for 24 h at 37 °C in 5% CO₂. Negative control group cells were incubated in medium supplemented with 10% FBS and positive control group cells were treated with Mytomicin C (20 μ M). After exposure, cells were incubated with resazurin solution (0.1 mg mL⁻¹, 20 μ L/well) at 37 °C for 4 h. To obtain the cellular viability, the resazurin reduction was measured in a microplate reader at 570 and 600 nm. All experiments were carried out in triplicate. Cell viability was determined according to the product protocol described in the following equation: viability (%) = $\frac{((80,586 \times Abs_{570} \text{ sample}) - (117,216 \times Abs_{600} \text{ sample}))}{((80,586 \times Abs_{570} \text{ control}) - (117,216 \times Abs_{600} \text{ control}))} \times 100$. The same assay procedure was carried out for the ligands bta and phen.

2.4. Selectivity index (SI)

The selectivity degree of the CBP-01 was evaluated as previously reported [11], as shown in the equation: $SI = IC_{50} \text{ non-tumorigenic cell} / IC_{50} \text{ tumor cell}$, where IC_{50} corresponds to the half maximal inhibitory concentration induced by the CBP-01 in the cells. The SI demonstrates the differential activity of CBP-01, in which an SI value equal to or greater than 2 is considered selective toward tumor cells [11].

2.5. MTT cell proliferation assay

The proliferation of CBP-01-treated sarcoma 180 cells was evaluated by the MTT assay [12,13]. Cells (1×10^5 cells/well) were seeded on a 96-well plate with RPMI medium supplemented with 10% FBS in the presence of different CBP-01 concentrations (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M; 25 μ M and 50 μ M) for 24 h and 48 h at 37 °C in 5% CO₂. Positive control group cells were incubated in medium supplemented with 10% FBS whereas the negative control group cells were incubated in medium without FBS. After treatment, the cells were incubated with MTT reagent (5 mg/mL, 20 μ L/well) for 3 h. The formazan crystals were dissolved by 100 μ L of phosphate buffered saline (PBS) containing 10% SDS and 0.01 N HCl for 18 h until complete dissolution of crystals was achieved. The optical density was determined at 570 nm in a plate reader (Multiskan GO Thermo Scientific, USA).

2.6. DNA fragmentation assessment by gel electrophoresis

Sarcoma 180 cells were seeded at the density of 2×10^6 cells/well in 6-well plates and then incubated with CBP-01 at concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M for 24 h in RPMI medium supplemented with 10% SFB under 5% CO₂ at 37 °C. Control group cells were incubated in medium supplemented with 10% FBS. After treatment, cells were collected and DNA extraction was performed using a cells/tissue genomic DNA isolation kit (Quiagen), with some modifications. DNA fragmentation was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis for 2 h at 100 V. The DNA was stained with ethidium bromide then bands were visualized by UV transilluminator and photographed.

2.7. Cell cycle analysis

Sarcoma 180 cells were plated at a density of 2×10^5 cells/well in 24-well microplates. Next, the cells were treated with CBP-01 at concentrations of 1, 10 and 50 μ M for 24 h at 37 °C under 5% CO₂. Control group cells were incubated in medium supplemented with 10% FBS. Then the cells were harvested and fixed in 70% (v/v) ethanol and kept overnight at 4 °C. Cells were collected and washed with PBS. To ensure that only DNA was stained, cells were incubated with RNase A (100 μ g mL⁻¹) and propidium iodide (PI) (10 μ g mL⁻¹) for 45 min at 37 °C. Cell distribution across the cell cycle was determined immediately by utilizing the flow cytometer FACSCantoII (BD, USA).

2.8. Apoptosis measurement by annexin V-PE staining

Sarcoma 180 cells (10^6 cells per well) were seeded in a 6-well microplate. Next, cells were incubated for 24 h with complete medium in the absence (control group) or presence of CBP-01 (1, 10 and 50 μ M). At the end of incubation, cells were harvested and washed with PBS, and resuspended in 100 μ L of binding buffer containing 5 μ L 7-Aminocinostinomycin D (7-AAD) and 5 μ L Annexin V-PE for 15 min under darkness. Then, all of the samples were analyzed immediately using an Accure flow cytometer (BD, United States) and the data were obtained via the software FlowJo (version 10). The CBP-01-triggered apoptosis of sarcoma 180 cells was also observed under an EVOS fluorescence microscope (Thermo Fisher Scientific®, United States).

2.9. Autophagy assay - Acidic vesicular organelles labeled by Monodansylcadaverine (MDC)

Sarcoma 180 cells were plated into 24-well plates at a density of 2×10^5 cells/well and then exposed to CBP-01 (1, 10 and 50 μ M) or culture medium (control group) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were then incubated with 0.05 mmol L⁻¹ MDC at 37 °C for 10 min. Next, the cells were harvested by centrifugation and the pellet was washed with PBS (2 times). After removing the monodansylcadaverine, the cells were washed with glycine 0.1 M/PBS and the samples were

observed using fluorescence microscopy (Zeiss LSM510, Germany). Four randomly selected microscopic fields at 200 × magnification were employed to quantify the fluorescence intensity with the software Image J.

2.10. Determination of intracellular reactive oxygen species (ROS)

All reactive oxygen species (ROS) were measured with the non-fluorescent probe 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Briefly, sarcoma 180 cells (0.5×10^5) were seeded in a 12-well microplate. Then, cells were treated with CBP-01 (1, 10 and 50 μM) or culture medium (control group) for 24 h in a CO_2 incubator at 37 °C. After treatment, cells were harvested and washed with PBS; the pellet was resuspended in 100 μL of PBS containing DCFH-DA probe (20 μM) and incubated for 45 min at 37 °C under darkness. To verify whether the cells that were producing ROS were dead or alive, 2 μL of 7-AAD was added to the same samples stained with DCFH-DA probe, at 15 min before the end of incubation. Finally, DCF fluorescence intensity was detected immediately by a Cytotflex flow cytometer (Beckman Coulter, United States) and the data were obtained using the software Kaluza (version 1.5). The CBP-01-induction of ROS of sarcoma 180 cells was also observed through an EVOS fluorescence microscope (Thermo Fisher Scientific®, United States).

2.11. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error (SEM) of experiments performed at least two times in triplicate. Significance differences were determined by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test (GraphPad Prism Software version 6.0). Data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. CBP-01 induced cytotoxicity and inhibited cell proliferation

The CBP-01 complex was previously synthesized and characterized (Supplementary Figure) [9]. To verify the bioactivity effect of CBP-01 and its ligands (bta and phen) on the cell viability, we treated sarcoma 180 cell line and a non-tumor cell line (C2C12) with different concentrations for 24 h, prior to performing the resazurin assay.

It was observed that CBP-01 clearly decreased cell viability of cancerous cells in a concentration-dependent manner in comparison with the control (Fig. 2). The half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) for Sarcoma 180 was 7.4 μM (Table 1). Interestingly, the capacity for reducing the cell viability of CBP-01 was significantly lower against C2C12, a non-tumorigenic murine myoblast cell line. The IC_{50} for C2C12 was 26.4 μM , indicating that CBP-01 exhibits cytotoxic selectivity (Table 1). Indeed, we obtained a selectivity index higher than 3, which is considered selective [14]. On the other hand, the ligands bta and phen did not significantly reduce growth viability in comparison with the control (Fig. 1). Thus, the complexation of copper(II) with ligands (bta and phen) has provided the CBP-01 cytotoxic activity. Moreover, the CBP-01 showed higher cytotoxicity than Mytomicin C (positive control, a known antitumor compound) against sarcoma 180 cells (Supplementary Fig. 2). These findings showed the effect of CBP-01 on cell viability; therefore, we performed other assays in order to

Table 1
Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and selectivity index of CBP-01.

Cell line	IC_{50} (95% CI*)	Selectivity Index
C2C12	26.4 (17.63 to 39.50)	3.7
Sarcoma 180	7.4 (6.21 to 8.92)	

* Confidence Intervals.

elucidate its action mechanism.

The proliferation of CBP-01-treated sarcoma 180 cells, evaluated by the MTT assay, and the concentration- and time-response curves are shown in Fig. 2. A reduction was detected in the number of proliferating cells after receiving different treatment concentrations of CBP-01 (1, 5, 10, 25 and 50 μM), compared to the positive control at 24 and 48 h. However, a similar profile was observed between CBP-01 treatments (1, 5, 10, 25 and 50 μM) and negative control. Taken together, according to cellular metabolic activity, these findings suggest that CBP-01 inhibited the proliferation of sarcoma 180 cells, since MTT reduction only occurs in metabolically active cells [15,16].

3.2. CBP-01 induced DNA fragmentation

In order to evaluate whether CBP-01 induces DNA damage in sarcoma 180 cells, a DNA gel electrophoresis was conducted since this assay has been widely used to study DNA fragmentation [17–19]. Fig. 3 shows that the highest CBP-01 concentration (50 μM) in sarcoma 180 cells was the only one that led to DNA fragmentation compared to the control. The DNA degradation was not observed in the untreated cells (control) confirming the efficiency of this experiment. This result indicates that the copper complex herein studied may cause DNA damage, which is a prerequisite for a genotoxic agent. The DNA is considered an important target of multiple pathologies due to its role in controlling cellular functions [20].

The evidence that CBP-01 may cause DNA damage could be due to the presence of 1,10-phenanthroline in the structure of this compound, which is considered an intercalating agent of DNA and an artificial nuclease when associated with copper(II). It is widely shown that bis-(1,10-phenanthroline) copper(II) performs an efficient DNA cleavage activity in the presence of some molecules, such as thiol and hydrogen peroxide [21], corroborating our data that demonstrated an induction of intracellular reactive oxygen species (ROS) formation after CBP-01 treatment, as shown in Section 3.5.

3.3. CBP-01 induced G0/G1 cycle arrest

The effect of CBP-01 on cell cycle progression was evaluated. Sarcoma 180 cells were treated with CBP-01 for 24 h, stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. As shown in Fig. 4, 24 h after CBP-01 exposure we identified an accumulation of the cell population in the G0/G1 phase from 32.1% in the control to 35.1% and 36.3% at 1 and 10 μM of CBP-01, respectively. It is well known that cell cycle progression is strictly regulated by surveillance mechanisms called checkpoints, which monitor the integrity and fidelity of the main events during the cell cycle [22]. The inhibition of cell cycle progression can be elicited by DNA damage, such as single- or double-strand DNA breaks, which induces cell cycle arrest at the G1 or G2 checkpoint [23]. Our data demonstrate that CBP-01 treatment induces DNA fragmentation (Fig. 3) and consequently cell cycle arrest in the G0/G1 phase (Fig. 6), which corroborates other studies where the G0/G1 checkpoint is caused by DNA breaks [24–26].

After the CBP-01 50 μM treatment for 24 h, it was possible to detect a subG1 cell population, probably derived from DNA fragmentation observed in apoptosis, which explains the decrease in G0/G1 rates to 30.2%. It is known that when irreversible damage is detected the cell undergoes apoptosis, resulting in the accumulation of cells in the subG1 phase [27]. The subG1 cell population observed after CBP-01 treatment at 50 μM for 24 h is in agreement with the increased apoptosis rates observed in these same conditions, as shown in Section 3.4. Taken together, these findings suggest an anti-proliferative activity of CBP-01, since we observed a significant inhibition of DNA synthesis, due to the decrease in the number of cells in S and G2/M phases.

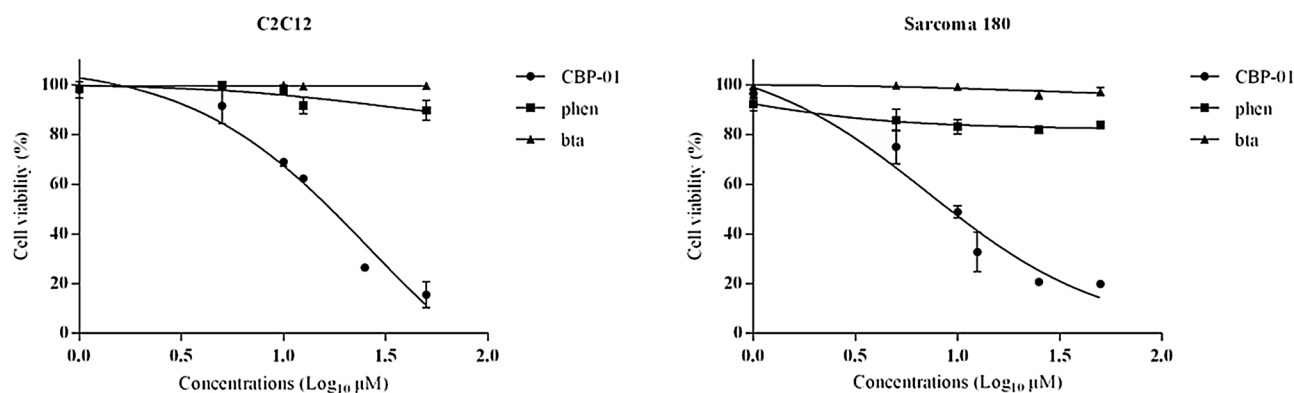


Fig. 1. Viability assay of CBP-01. Concentration-response curve depicting cell viability after treatment with CBP-01 and ligands (bta and phen) in myoblast murine cells (C2C12) and in sarcoma 180 cells. The results represent the mean \pm standard error of experiments performed in triplicate.

3.4. CBP-01 induced autophagy and apoptosis

To identify which cell-death pathway was triggered by CBP-01, sarcoma 180 cells were treated with different concentrations of this copper complex prior to performing the autophagy and apoptotic assays. We analyzed autophagic vacuoles by monodansylcadaverine (MDC) staining, for autophagy detection. As shown in Fig. 5, CBP-01 stimulated autophagic processes in sarcoma 180 cells as evidenced by the fluorescent density (Fig. 5A) and the presence of more MDC-labeled particles inside the cells after CBP-01 treatment (1, 10 and 50 μ M), whereas no fluorescence was observed in the control group (non-treated cells) (Fig. 5B). This experiment indicated that CBP-01 increased MDC recruitment to autophagosomes in the cytoplasm in a concentration-dependent manner. In fact, autophagy is generally considered a protective response that occurs at a basal level in all cells. It is well known that autophagy maintains cellular homeostasis by regulating the catabolic process that eliminates cytoplasmic contents, organelles and proteins to generate nutrients and macromolecular precursors [28]. However, autophagy can be associated with cell death, representing a general cellular and tissue response to oxidative stress. In response to oxidative stress, autophagy is induced to reduce the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in order to protect cells from ROS-induced damage. Nevertheless, when ROS reaches levels that

cannot be neutralized by cellular protective mechanisms, an autophagy dysfunction occurs by means of excessive autophagy induction or the inhibition of autophagy flux, resulting in either apoptosis or autophagic cell death [29].

In order to verify the possibility of cell death by apoptosis, sarcoma 180 cells were stained with PE-labeled Annexin V and 7-AAD. As shown in Fig. 6, CBP-01 triggered cell apoptosis in a concentration-dependent manner, since apoptosis rates were significantly increased from 1.11% in the control to 1.63%, 90.5% and 96.7% at 1, 10 and 50 μ M treatments of CBP-01, respectively (Fig. 6A). We also identified apoptotic bodies after CBP-01 50 μ M treatment of sarcoma 180 cells for 24 h (Fig. 6B), reinforcing our result that CBP-01 triggered apoptosis cell death.

Autophagy and apoptosis have been considered two major pathways activated in response to metabolic stress [30]. Substantial evidence has shown that autophagy and apoptosis occur in the same cell, where autophagy is induced as an attempt by the cell to mitigate the stress before ultimately leading to apoptosis [31,32]. In general, apoptosis is an essential programmed cell death employed in response to cell damage or stress defense, and also during normal development and morphogenesis [30]. Cells undergoing apoptosis show typical morphological and biochemical changes such as chromatin condensation, formation of apoptotic bodies, changes in the kinetics of

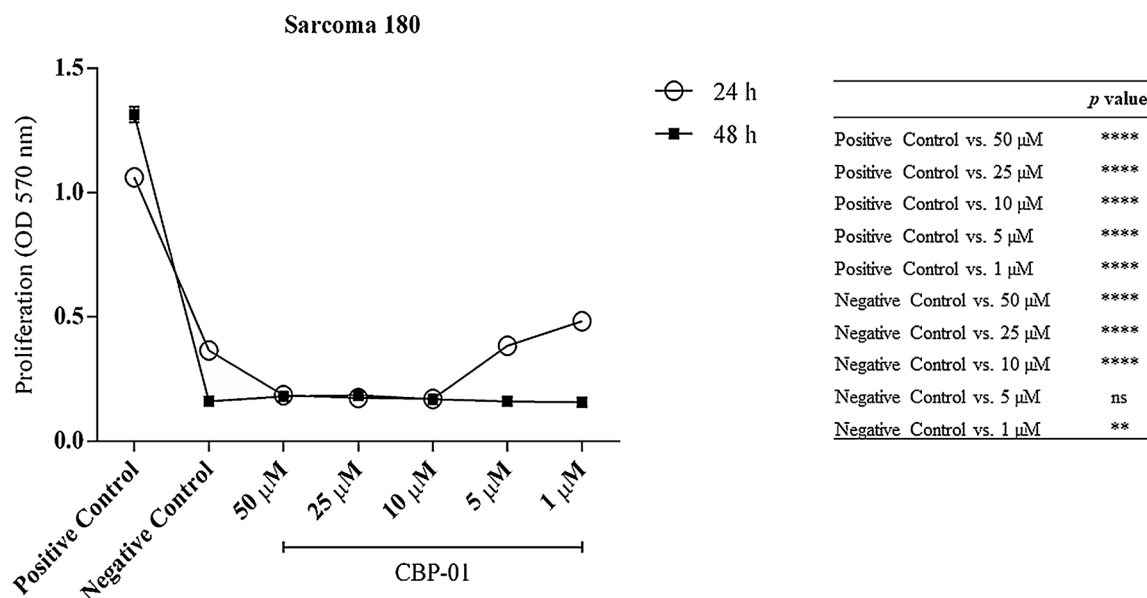


Fig. 2. Anti-proliferative effect of CBP-01 on sarcoma 180 cells. CBP-01 (1, 5, 10, 25 and 50 μ M) inhibited proliferation of sarcoma 180 cells at 24 and 48 h. ns: not significant, ** p < 0.01 and **** p < 0.0001.

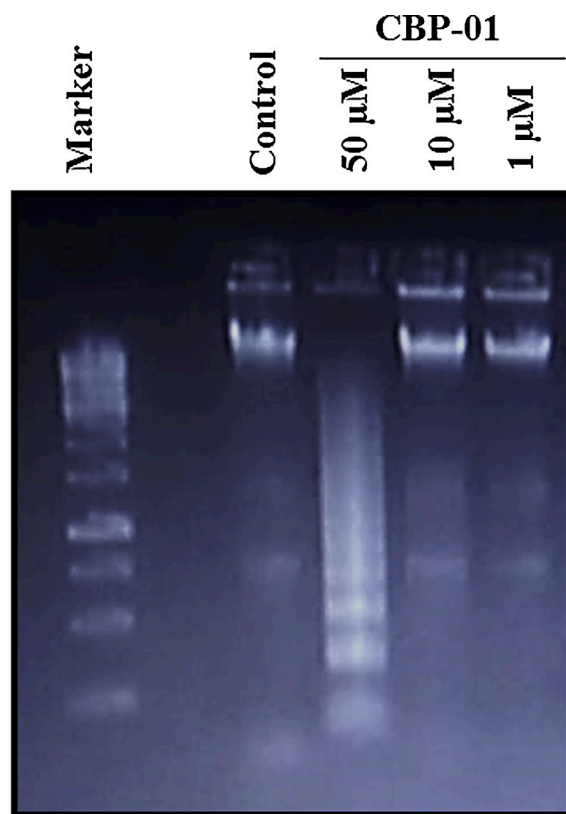


Fig. 3. CBP-01 induced DNA fragmentation in sarcoma 180 cells. CBP-01 at 50 μ M lead to DNA degradation compared to control (untreated cells) analyzed by agarose gel electrophoresis.

phosphatidylserine (PS) and alterations in mitochondrial membrane permeability [33]. Studies suggest that apoptosis is an important indicator for detecting the ability of antitumor drugs to inhibit tumor growth [34]. Our data suggest that autophagy plays an important role in the initiation of sarcoma 180 cell death by CBP-01, whereas the switch from autophagy to apoptosis may be ROS-mediated since our

compound induced ROS formation, as detailed in the next section.

3.5. CBP-01 induced reactive oxygen species (ROS) formation

Many studies have shown that cytotoxic activity of copper(II) complexes can be mediated by ROS formation. To investigate whether CBP-01 is able to induce changes at intracellular ROS levels, we detected the fluorescence of DCF in CBP-01-treated sarcoma 180 cells by flow cytometry. In addition, we also stained sarcoma 180 cells with 7-AAD to verify whether the cells that were producing ROS were dead or alive. The result showed that ROS formation was increased along with the CBP-01 concentration as detected by high fluorescence intensity compared to the control. Furthermore, the high inductions of ROS at 1 and 10 μ M of CBP-01 were associated with viable cells (7-AAD negative) whereas at 50 μ M we observed an exacerbating increase in ROS formation in unviable cells (7-AAD positive), as shown in Fig. 7A. In Fig. 7B, we can observe fluorescence microscopy images of untreated (control) and the treated cells (CBP-01 1, 1 and 50 μ M), stained with 7-AAD (red) and ROS probe (green), that corroborate fluorescence intensity results.

ROS are small and highly reactive particles that at low levels are correlated with maintenance of cellular homeostasis by regulating not only cell cycle progression but also the proliferation, differentiation, migration and death of cells [35,36]. However, excessive cellular levels of ROS can cause damage to proteins, lipids, nucleic acids and organelles [37], through oxidative stress. In summary, low ROS levels are correlated with cell survival, but high levels can lead to activation of cell death processes such as apoptosis [35]. As noted, the CBP-01 induced significant intracellular ROS formation, observed in viable cells at low concentrations of the compound (1 and 10 μ M), whereas the continuous generation of ROS led to cell death after treatment with 50 μ M of CBP-01. These findings suggest that oxidative stress may be involved in the entire process of CBP-01 cytotoxicity.

4. Conclusions

The copper complex (CBP-01) showed in vitro antitumor activity and cytotoxic selectivity toward the sarcoma 180 cells. According to our data, we propose that the action mechanism of this compound may

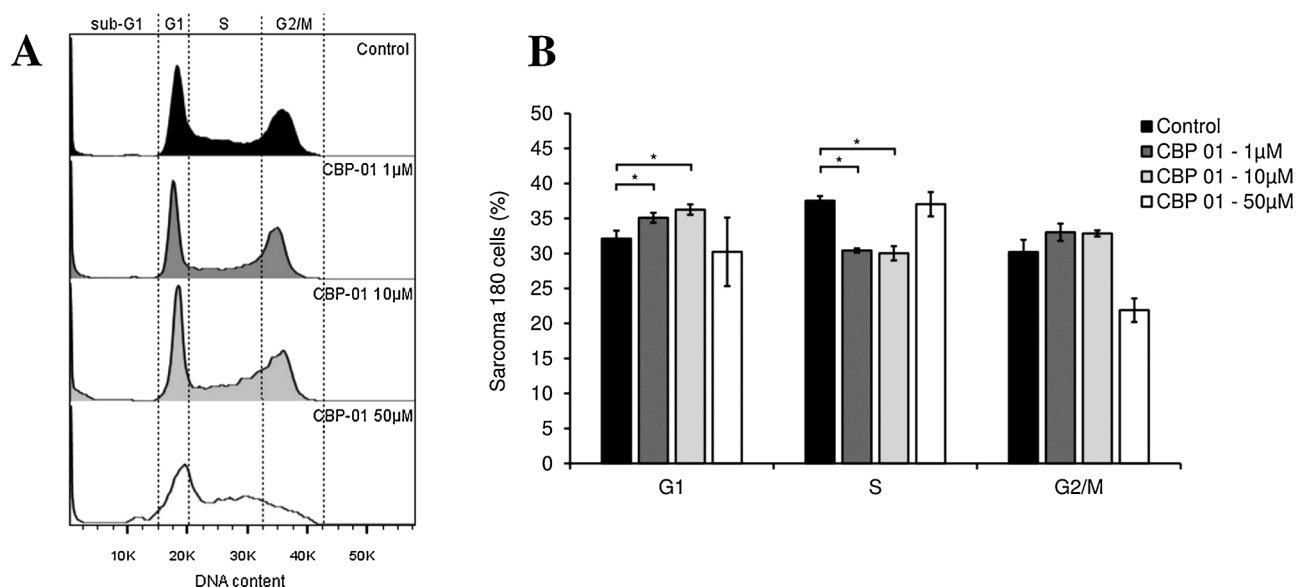


Fig. 4. CBP-01 interferes in sarcoma 180 cell cycle. A) Cell cycle histograms profile of sarcoma 180 cells in the presence of different concentrations of CBP-01 (1, 10 and 50 μ M) for 24 h. B) CBP-01 promoted a significant augmentation in the G0/G1 phase after treatment with CBP-01 1 and 10 μ M for 24 h. Data are expressed as mean \pm standard error of experiments performed in triplicate. Significant differences were determined using one way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, (compared to control).

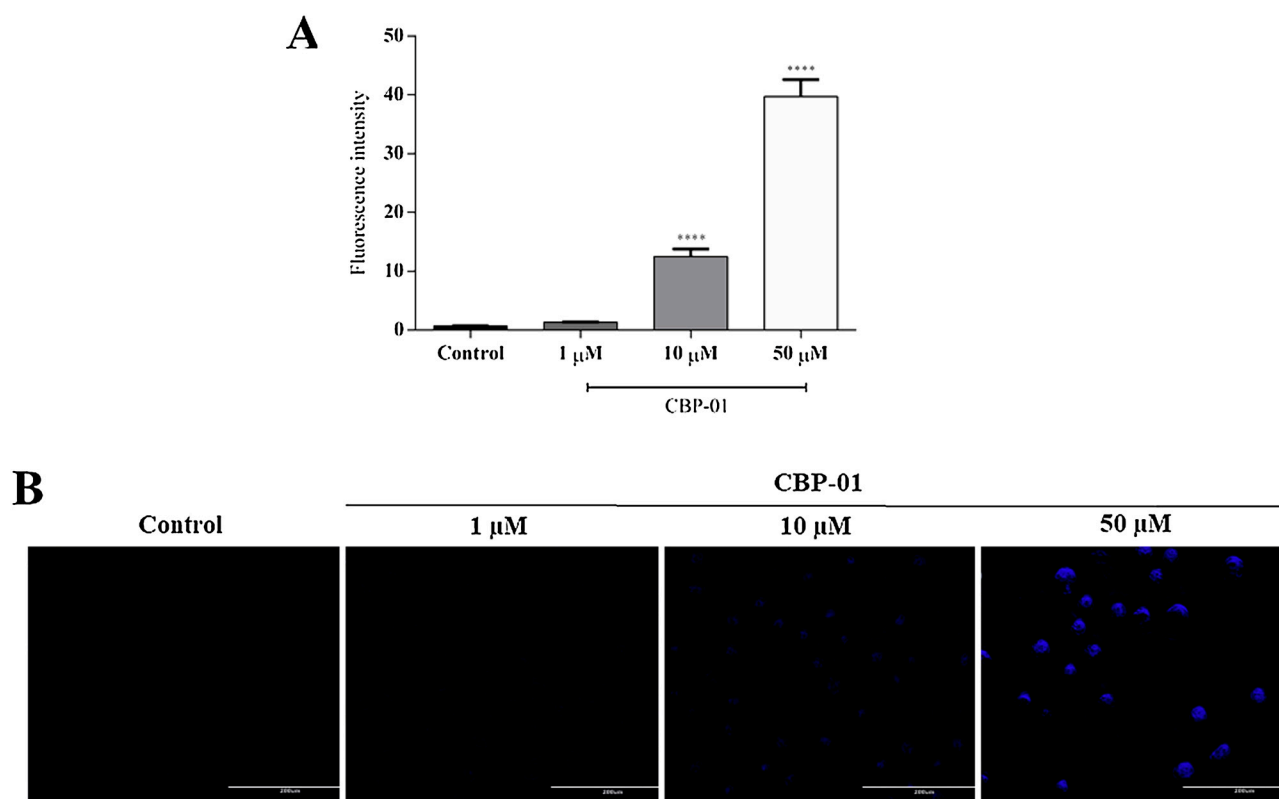


Fig. 5. Autophagic vacuoles evidenced by Monodansylcadaverine (MDC) staining after CBP-01 exposure in sarcoma 180 cells. A) Graph representing the fluorescence intensity of MDC at autophagic vacuoles measured post-treatment by the software Image J. The data are represented as the mean of fluorescence \pm standard error. Significant differences were determined using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test. $**p < 0.01$ and $****p < 0.0001$ (compared to the control). B) Photomicrography of sarcoma 180 cells treated with CBP-01 (1 μ M, 10 and 50 μ M) and untreated cells (control), stained with MDC (blue) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

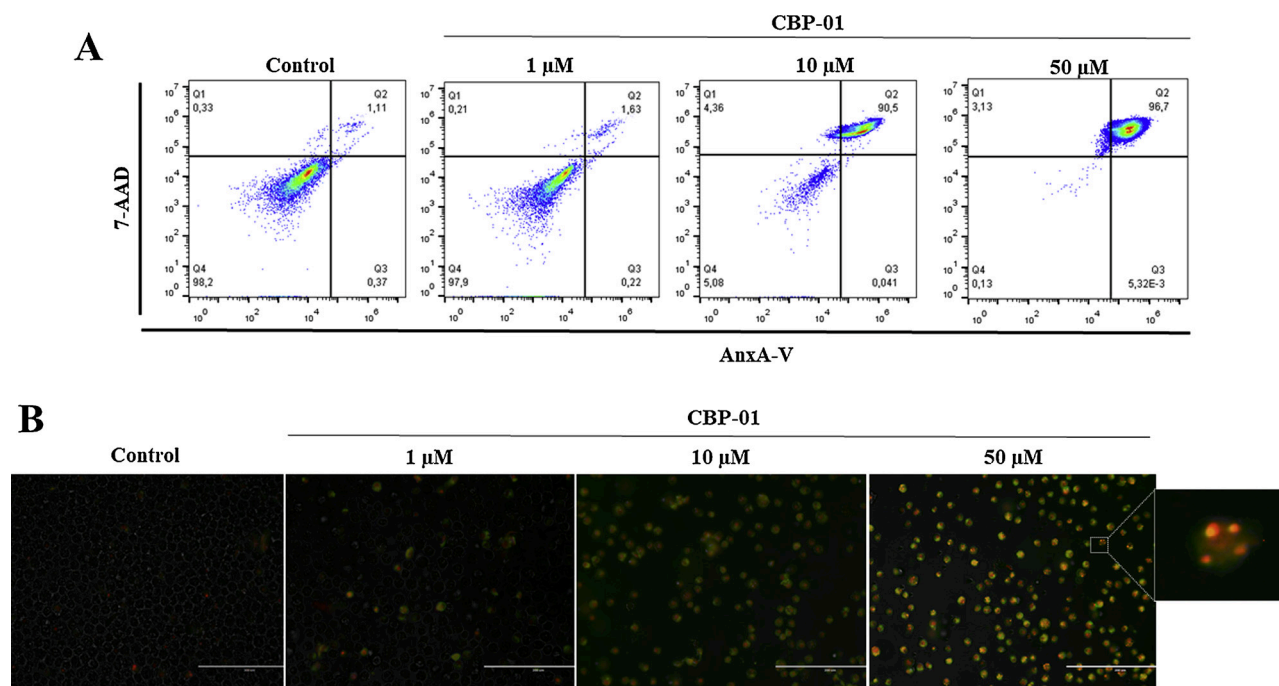


Fig. 6. Sarcoma 180 cell death induced by CBP-01. A) Analysis of apoptosis by flow cytometry: representative plot cytograms of sarcoma 180 cells stained with Annexin V and 7-Amino-Actinomycin (7 AAD) after treated with CBP-01 (1, 10 and 50 μ M) or medium (control). B) Photomicrography of sarcoma 180 cells treated with CBP-01 (1 μ M, 10 and 50 μ M) and untreated cells (control), stained with Annexin V (red) and 7 AAD (green). The zoomed view shows the apoptotic bodies, a typical morphological change in cell undergoing apoptosis (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

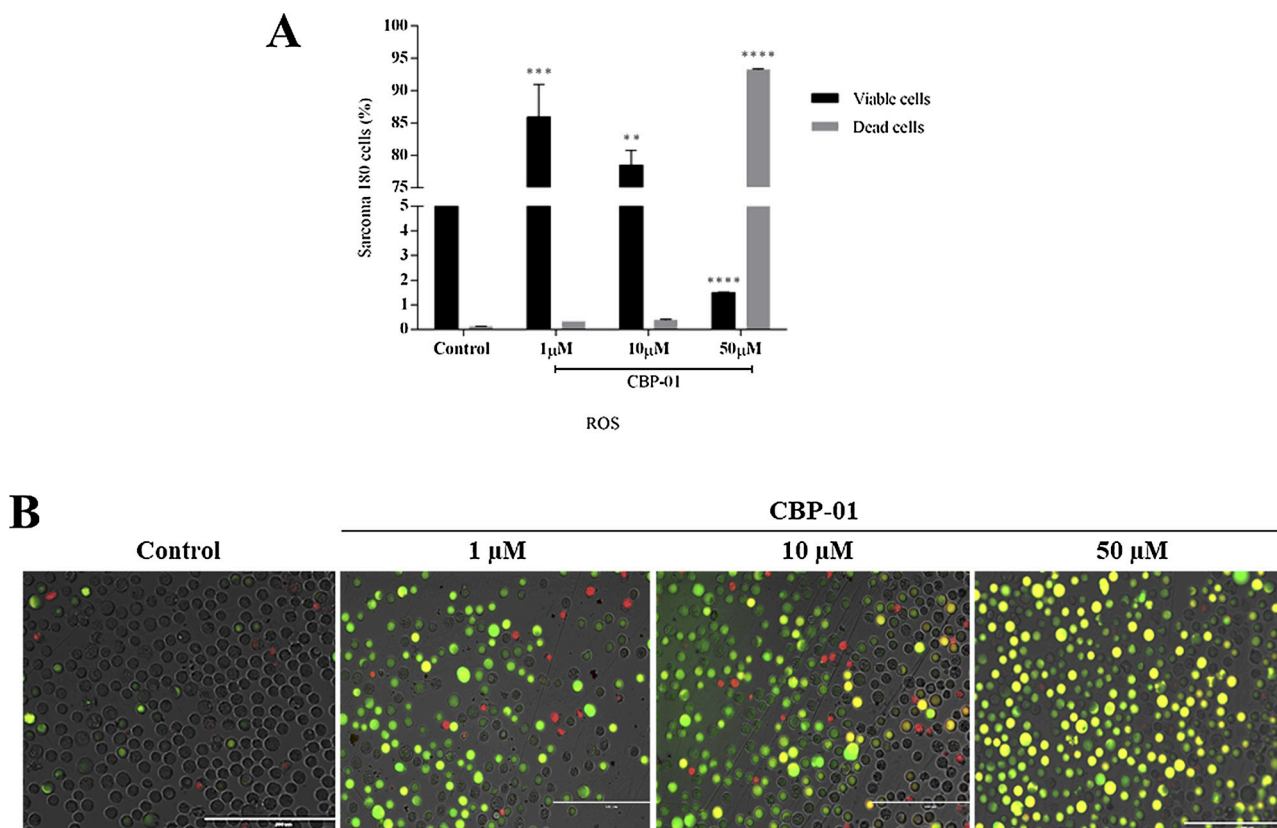


Fig. 7. CBP-01 induced intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in sarcoma 180 cells. A) Representative graph of changes in ROS levels of viable cells and dead cells, measured by flow cytometry. Cells were stained with the probe 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and 7-Amino-Actinomycin (7 AAD). Data are expressed as mean \pm standard error of experiments performed in triplicate. Significant differences were determined using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ (compared to the control). B) Fluorescence photomicrography of sarcoma 180 cells treated with CBP-01 (1 μ M, 10 μ M and 50 μ M) and untreated cells (control), stained with ROS probe (red) and 7 AAD (green) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

be attributable to its redox state that induces an intracellular ROS augmentation. The excess of ROS generated may be associated with the ability of CBP-01 to induce DNA damage leading cells to accumulate at the G0/G1 checkpoint where, apparently, cells that are not able to recover from the damage are driven to cell death. Our data suggest that the cell death pathway is initiated by an autophagy dysfunction that leads to apoptosis. Finally, these findings obtained are very promising and should instigate further molecular and mechanistic studies.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and UFU (Universidade Federal de Uberlândia) for financial support and fellowships.

Appendix A. Supplementary data

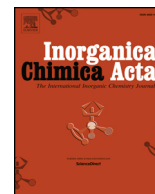
Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>.

References

- [1] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, T. Sez,

- U. Camerino, S. Agostino, U. Padova, *Advances in copper complexes as anticancer agents*, *Chem. Rev.* 114 (1) (2013) 815–862.
- [2] D.A. Paixão, I.M. Marzano, E.H.L. Jaimes, M. Pivatto, D.L. Campos, F.R. Pavan, V.M. Deflon, P.I. da S. Maia, A.M. Da Costa Ferreira, I.A. Uehara, M.J.B. Silva, F.V. Botelho, E.C. Pereira-Maia, S. Guillard, W. Guerra, Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: synthesis, structure and biological studies, *J. Inorg. Biochem.* 172 (2017) 138–146, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>.
- [3] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, π -Stacking between Casiopeínas® and DNA bases, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 14510–14515, <https://doi.org/10.1039/c1cp20183b>.
- [4] J.J.R. Fraústo da Silva, R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements - the Inorganic Chemistry of Life*, Oxford University Press, Oxford, 1991, p. 561.
- [5] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A. Maria, C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, A. Neves, E.C. Pereira-maia, Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-Phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414–6424.
- [6] J. Do Couto Almeida, I.M. Marzano, M. Pivatto, N.P. Lopes, A.M. Da Costa Ferreira, F.R. Pavan, I.C. Silva, E.C. Pereira-Maia, G. Von Poelhsitz, W. Guerra, Synthesis, cytotoxic and antitubercular activities of copper(II) complexes with heterocyclic bases and 3-hydroxypicolinic acid, *Inorg. Chim. Acta Rev.* 446 (2016) 87–92, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.03.005>.
- [7] P.P. Silva, W. Guerra, G.C. Dos Santos, N.G. Fernandes, J.N. Silveira, A.M. Da Costa Ferreira, T. Bortolotto, H. Terenzi, A.J. Bortoluzzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands, *J. Inorg. Biochem.* 132 (2014) 67–76, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.014>.
- [8] P.S. Lopes, D.A. Paixão, F.C.S. De Paula, A.M. Da Costa Ferreira, J. Ellena, S. Guillard, E.C. Pereira-Maia, W. Guerra, A new copper(II) complex with 2-thienyltrifluoroacetone and 2,2-bipyridine: crystal structure, spectral properties and cytotoxic activity, *J. Mol. Struct.* 1034 (2013) 84–88, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.022>.
- [9] J.D.C. Almeida, D.A. Paixão, I.M. Marzano, J. Ellena, M. Pivatto, N.P. Lopes, A.M.D.C. Ferreira, E.C. Pereira-Maia, S. Guillard, W. Guerra, Copper(II) complexes with β -diketones and N-donor heterocyclic ligands: crystal structure, spectral properties, and cytotoxic activity, *Polyhedron*. 89 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.12.026>.

- [10] S.N. Rampersad, Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors (Switzerland)*. 12 (2012) 12347–12360, <https://doi.org/10.3390/s120912347>.
- [11] R.B. Badisa, S.F. Darling-Reed, P. Joseph, J.S. Cooperwood, L.M. Latinwo, C.B. Goodman, Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells, *Anticancer Res.* 29 (2009) 2993–2996.
- [12] S.N.C. Gimenes, D.S. Lopes, P.T. Alves, F.V.P.V. Azevedo, K.A.G. Yoneyama, R.A. Oliveira, V.D.M. Rodrigues, Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA 2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K / Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell, *Sci. Rep.* (2017) 15–18, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07082-2>.
- [13] M. Almeida, D. Silva, S. Cota, S. Natalie, C. Gimenes, F. Van Petten, V. Azevedo, L. Polloni, B. Cristina, M. Santos, M. José, R. José, D.O. Júnior, M. Carolina, C. Vieira, K. Aparecida, G. Yoneyama, V. De Melo, R. Santos, International Journal of Biological Macromolecules Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A 2 (PLA 2) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 311–319, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082>.
- [14] W. Mahavorasirikul, V. Viyanant, W. Chaijaroenkul, A. Itharat, K. Na-Bangchang, Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro, *BMC Complement. Altern. Med.* 10 (2010) 55, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-55>.
- [15] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [16] M. Boncler, M. Rózsalski, U. Krajewska, A. Podswdek, C. Watala, Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 69 (2014) 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.09.003>.
- [17] H.-F. Lu, Triptolide induced DNA damage in A375.S2 human malignant melanoma cells is mediated via reduction of DNA repair genes, *Oncol. Rep.* (2012) 613–618, <https://doi.org/10.3892/or.2012.2170>.
- [18] B.-C. Ji, C.-C. Yu, S.-T. Yang, T.-C. Hsia, J.-S. Yang, K.-C. Lai, Y.-C. Ko, J.-J. Lin, T.-Y. Lai, J.-G. Chung, Induction of DNA damage by deguelin is mediated through reducing DNA repair genes in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells, *Oncol. Rep.* 27 (2012) 959–964, <https://doi.org/10.3892/or.2012.1622>.
- [19] G.-H. Wei, J. Zhang, D.-Q. Liao, Z. Li, J. Yang, N.-F. Luo, Y. Gu, The common anesthetic, sevoflurane, induces apoptosis in A549 lung alveolar epithelial cells, *Mol. Med. Rep.* 9 (2014) 197–203, <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1806>.
- [20] Y. Gilad, H. Senderowitz, Docking studies on DNA intercalators, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 96–107, <https://doi.org/10.1021/ci400352t>.
- [21] S. Zhang, Y. Zhu, C. Tu, H. Wei, Z. Yang, L. Lin, J. Ding, J. Zhang, Z. Guo, A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 2099–2106, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.09.014>.
- [22] K.J. Barnum, M.J. O'Connell, Cell Cycle Regulation by Checkpoints, HHS Public Access, 2014, pp. 29–40, <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2>.
- [23] K.A. Conklin, Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness, *Integr. Cancer Ther.* 3 (2004) 294–300, <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>.
- [24] V. Lafarga, A. Cuadrado, I. Lopez de Silanes, R. Bengoechea, O. Fernandez-Capetillo, A.R. Nebreda, p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 4341–4351, <https://doi.org/10.1128/MCB.00210-09>.
- [25] C. Deng, P. Zhang, J.W. Harper, S.J. Elledge, P. Leder, Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell* 82 (1995) 675–684, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90039-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90039-X).
- [26] I.A. Shaltiel, L. Krenning, W. Bruinsma, R.H. Medema, The same, only different—DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle, *J. Cell. Sci.* 128 (4) (2015) 607–620.
- [27] M. Ahamed, M.J. Akhtar, H.A. Alhadlaq, A. Alshamsan, Copper ferrite nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative stress in human breast cancer MCF-7 cells, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 142 (2016) 46–54, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.043>.
- [28] M.L. Goodall, B.E. Fitzwalter, S. Zahedi, M. Wu, D. Rodriguez, J.M. Mulcahy-Levy, D.R. Green, M. Morgan, S.D. Cramer, A. Thorburn, The autophagy machinery controls cell death switching between apoptosis and necroptosis, *Dev. Cell* 37 (2016) 337–349, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.018>.
- [29] Y.-H. Lee, F.-Y. Cheng, H.-W. Chiu, J.-C. Tsai, C.-Y. Fang, C.-W. Chen, Y.-J. Wang, Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts, *Biomaterials* 35 (2014) 4706–4715, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.021>.
- [30] V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis, Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 3448–3459, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>.
- [31] A.D. Rubinstein, A. Kimchi, Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis, *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 5259–5268, <https://doi.org/10.1242/jcs.115865>.
- [32] G. Marino, M. Niso-Santano, E.H. Baehrecke, G. Kroemer, Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 81–94, <https://doi.org/10.1038/nrm3735>.
- [33] M. Jayakaran, Apoptosis-biochemistry: a mini review, *J. Clin. Exp. Pathol.* 5 (2015) 8–11, <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000205>.
- [34] A. Haleel, D. Mahendiran, V. Veena, N. Sakthivel, A.K. Rahiman, Antioxidant, DNA interaction, VEGFR2 kinase, topoisomerase i and in vitro cytotoxic activities of heteroleptic copper(II) complexes of tetrazolo[1,5-a]pyrimidines and diimines, *Mater. Sci. Eng. C* 68 (2016) 366–382, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.120>.
- [35] M. Redza-Dutordoir, D.A. Averill-Bates, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 2977–2992, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>.
- [36] P.D. Ray, B.W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell. Signal.* 24 (2012) 981–990, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- [37] W. jie Guo, S. si Ye, N. Cao, J. Huang, J. Gao, Q. yun Chen, ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex, *Exp. Toxicol. Pathol.* 62 (2010) 577–582, <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.08.001>.



Research paper

Crystal structure, *anti-Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of Cu(II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands



Drielly A. Paixão^a, Barbara C.A. de Oliveira^a, Janaina do Couto Almeida^a, Luana M. Sousa^a, Carla D. Lopes^b, Zumira A. Carneiro^b, Daiane Y. Tezuka^b, Juan Carlos T. Clavijo^c, Javier Ellena^d, Lorena Polloni^e, Pedro H.A. Machado^e, Sérgio de Albuquerque^b, Robson J. de Oliveira Júnior^e, Silvana Guilardi^a, Wendell Guerra^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^d Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

^e Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Copper(II) complexes

β -Diketones

Cancer

Cytotoxic activity

Chagas disease

ABSTRACT

Three novel copper(II) complexes were synthesized: $[\text{Cu}(\text{tfa})_2]$ (**I**), $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{dmb})(\text{NO}_3)] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**II**) and $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{nphen})(\text{NO}_3)]$ (**III**), where $\text{tfa} = 4,4,4$ -trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione, $\text{nphen} = 5$ -nitro-1,10-phenanthroline and $\text{dmb} = 4,4$ -dimethoxy-2,2-bipyridine. They were characterized by elemental analysis, conductivity measurements, FT-IR, UV-Vis and single-crystal X-ray diffraction. The X-ray crystal structures of **I**, **II** and **III** reveal that the β -diketone coordinates via the oxygen atoms, while the heterocyclic bases coordinate via their two nitrogen atoms. The cytotoxic activity of **I**, **II** and **III** was investigated in two tumor cell lines (Ehrlich tumor and sarcoma 180) and in a non-tumor cell line (myoblast C2C12). Complex **III** exhibited good activity (IC_{50} Ehrlich = $15.75 \mu\text{M}$ and IC_{50} sarcoma 180 = $16.90 \mu\text{M}$) and selectivity ($\text{SI} > 4$) in both tumor cell lines. Subsequently, it was found that **III** also present good activity against *Trypanosoma cruzi*.

1. Introduction

Nowadays, many copper complexes are being developed as potential anticancer agents [1]. An interesting example is the family of complexes known as Casiopéinas®, recently approved for clinical trials [2,3]. As to the metal ion, copper is an essential trace element important for the function of various biologically important enzymes [4]. It is also involved in the development and progression of cancer, which makes it very interesting in the design and development of safe and effective chemotherapeutic agents [1]. In view of these facts, we have designed and carried out biological studies with Cu(II) complexes [2,5–9]. For instance, we showed that Cu(II) complexes bearing α -diimines and β -diketones as chelating ligands are very active against the K562 cell line, displaying IC_{50} values in the micromolar range [8,9]. One of them, $[\text{Cu}(\text{bta})(\text{phen})\text{ClO}_4]$, [$\text{bta} = 4,4,4$ -trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione) and ($\text{phen} = 1,10$ -phenanthroline)], was selected for further studies due to its potential to induce DNA-damage and lead to

G0/G1 checkpoint arrest, with consequent induction of cell death. This phenomena might be a result of autophagy dysfunction, culminating in apoptosis induction [10] and would indicate that ternary copper complexes containing β -diketones are promising anticancer agents. Indeed, in recent years, other research groups have also evaluated the anticancer potential of Cu(II) complexes with β -diketones and obtained good results [11–13].

Considering other possibilities, we have verified that copper complexes containing α -diimine ligands showed potent activity against *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the etiologic agent of Chagas disease [14,15]. For example, a copper complex containing 4-4'-dimethoxy-2-2'-bipyridine and 4-methoxybenzhydrazide as co-ligand was able to reduce parasitemia by 64% at the peak of infection, which indicates that such compounds can be useful for the design of new antichagasic drugs [15]. Previously, we demonstrated that analogous complexes are promising anticancer agents [2,7]. In the literature, it is speculated that metabolic pathways of kinetoplastid parasites are supposed to be

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, João Naves de Ávila Avenue, 2121, Campus Santa Mônica, 38.400-902, Uberlândia, MG, Brazil.

E-mail address: wendell.guerra@ufu.br (W. Guerra).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>

Received 18 June 2019; Received in revised form 19 September 2019; Accepted 20 September 2019

Available online 21 September 2019

0020-1693/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

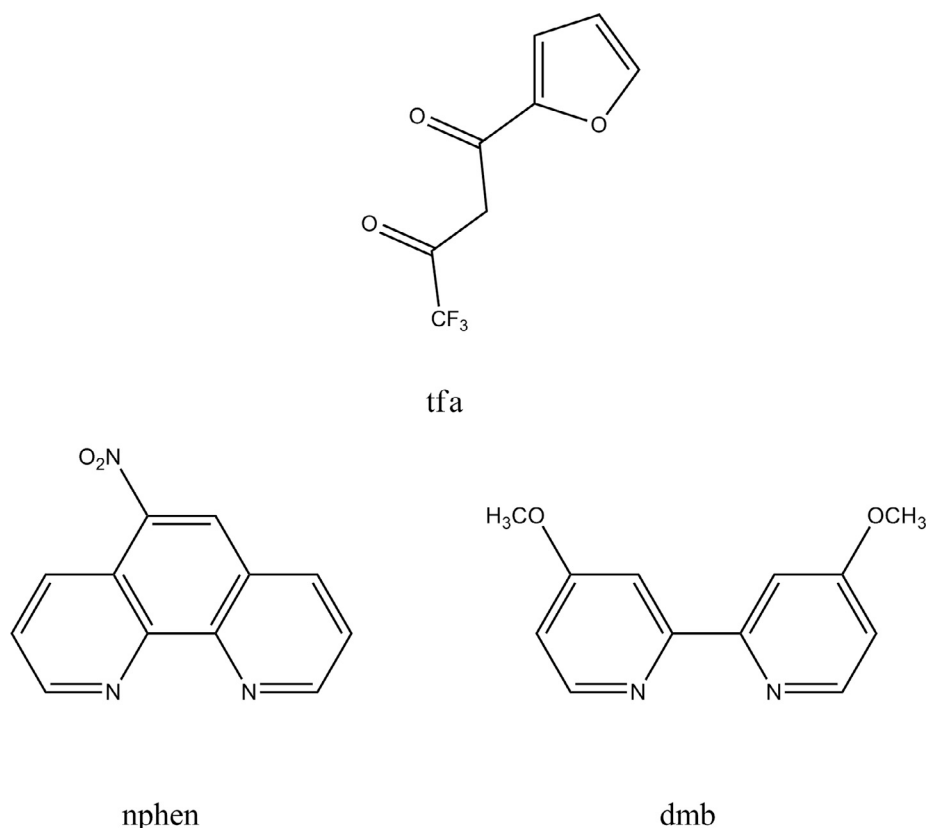


Fig. 1. Organic compounds used in this work.

similar to those present in tumor cells, which suggests a possible correlation between anti-chagasic and antitumor activities [16]. Considering these facts, we report herein not only the crystal structure, but also the anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-tumoral activities of novel Cu (II) complexes bearing 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (tfa) and α -diimine ligands (Fig. 1).

2. Experimental section

2.1. Starting materials

All reagents and solvents were purchased from Merck and used without prior purification.

2.2. Preparation of the Cu(II) complexes

2.2.1. Complex I – [Cu(tfa)₂]

0.25 mmol (0.0604 g) of Cu(NO₃)₂·3H₂O was added to 0.5 mmol (70 μ L) of 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (tfa) in methanol (4 mL). The solution was stirred at room temperature for 48 h. After several days, green crystals were removed by filtration, washed with methanol and dried under reduced pressure.

MM: 473.77 g mol⁻¹. Yield: 71%. Anal. Calc. for (CuC₁₆H₈F₆O₆): C, 40.56; H, 1.70. Found: C, 40.60; H, 1.59%. ATR-FTIR, ν (cm⁻¹): 3165, 3143, 1598, 1572, 1541, 1520, 1465, 1443, 1398, 1385, 1311, 1259, 1231, 1186, 1137, 1099, 1015, 949, 916, 895, 884, 848, 806, 785, 768, 689, 594, 518. UV-Vis (methanol), λ_{max} (ϵ) = 229 (7.8×10^3 M⁻¹ cm⁻¹), 306 (2.2×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 335 (4.6×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 350 (3.5×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 674 (2.9×10^1 M⁻¹ cm⁻¹), 710 (solid state) nm. Λ M (acetonitrile) = 4.90 S cm² mol⁻¹.

2.2.2. Complex II – [Cu(tfa)(dmb)(NO₃)]·1.5H₂O

0.25 mmol of Cu(NO₃)₂·3H₂O was added to 0.25 mmol (37 μ L) of

4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (tfa) in acetonitrile (4 mL). The solution was stirred for 4 h at room temperature. Next, 0.25 mmol (0.0540 g) of 4,4-dimethoxy-2,2'-bipyridine (dmb) previously dissolved in acetonitrile was added dropwise. This new mixture was stirred for another 24 h. After some days at room temperature, a green precipitate was removed by filtration, washed with acetonitrile and dried under reduced pressure.

MM: 573.92 g mol⁻¹. Yield: 85%. Anal. Calc. for (CuC₂₀H₁₆F₃N₃O₈)·1.5H₂O: C, 41.85; H, 3.34; N, 7.32%. Found: C, 41.89; H, 2.91; N, 8.08%. ATR-FTIR, ν (cm⁻¹): 3128, 3083, 1589, 1567, 1519, 1503, 1474, 1442, 1421, 1375, 1320, 1287, 1265, 1230, 1191, 1132, 1103, 1078, 1040, 955, 912, 879, 843, 835, 780, 687, 591, 578, 434. UV-Vis (methanol), λ_{max} (ϵ) = 228 (4.7×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 287 (1.9×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 298 (1.9×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 341 (1.8×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 354 (1.9×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 626 (4.3×10^1 M⁻¹ cm⁻¹), 639 (solid state) nm. Λ M (methanol) = 106.20 S cm² mol⁻¹.

2.2.3. Complex III – [Cu(tfa)(nphen)(NO₃)]

0.25 mmol of Cu(NO₃)₂·3H₂O was added to 0.25 mmol (37 μ L) of 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (tfa) in methanol (4 mL). The solution was stirred for 4 h at room temperature when 0.25 mmol (0.0540 g) of 5-nitro-1,10-phenanthroline (nphen) dissolved in methanol was added dropwise. After 24 h, a green precipitate was removed by filtration, washed with methanol and dried under reduced pressure.

MM: 555.86 g mol⁻¹. Yield: 88%. Anal. Calc. for (CuC₂₀H₁₁F₃N₄O₈): C, 43.21; H, 1.99; N, 10.08%. Found: C, 43.55; H, 1.82; N, 10.13%. ATR-FTIR, ν (cm⁻¹): 3126, 3099, 1599, 1571, 1535, 1518, 1460, 1418, 1388, 1367, 1348, 1297, 1259, 1194, 1138, 1101, 1025, 947, 913, 883, 840, 824, 807, 772, 753, 735, 720, 686, 615, 591, 538, 436. UV-Vis (methanol), λ_{max} (ϵ) = 277 (1.3×10^5 M⁻¹ cm⁻¹), 341 (19.1×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 354 (9.3×10^4 M⁻¹ cm⁻¹), 641

($3.7 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 618 (solid state) nm. ΛM (methanol) = $91.80 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

2.3. Physical measurements

The UV-Vis spectra were obtained in a UV-2501 PC Shimadzu spectrophotometer. The IR spectra were registered on an FTIR Spectrum Two spectrometer in the region between 4000 and 400 cm^{-1} . Elemental analyses (CHN) were measured using a Perkin-Elmer 2400 analyzer. Conductivity studies were carried out with a Tecnopon mCA-150 conductivity meter using a cell of constant 1.03 cm^{-1} , spectroscopic grade methanol ($\Lambda\text{M} = 0.95 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) or acetonitrile ($\Lambda\text{M} = 0.64 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$).

2.4. Crystal structure

Single crystals of **I** were obtained during the synthesis process by slow evaporation of its methanol solvent, whereas single crystals of **II** and **III** suitable for X-ray study, were grown upon recrystallization from methanol/toluene solution at room temperature. The crystals thereby formed were collected, washed with water and dried. The best crystals of copper complexes were selected for data collection. The data collection was performed at room temperature using Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) on a Bruker APEX-II diffractometer (complexes **I** and **II**). The data were corrected for Lorentz and polarization. Absorption correction (multi-scan) was applied using the program SORTAV [17]. For complex **III** the X-ray intensity data were collected on a Bruker AXS Proteum X8 diffractometer using ϕ and ω scans. The diffractometer was equipped with a Bruker FR591 Cu Rotating Anode and multilayer X-ray optics. An Oxford Cryosystems 700 controller was utilized to keep the temperature at 100 K during data collection. The software APEX2 [18] was employed to operate the diffractometer and plan the data collection strategy. The data were integrated using the program SAINT [19], corrected for absorption effects using Gaussian numerical integration and scaled with the program SADABS [20]. The crystal structures were solved by direct methods and refined by the full-matrix least-squares methods against F^2 with SHELXL-2014 [21]. The non-hydrogen atoms were refined anisotropically while the hydrogen atoms were placed geometrically and refined with isotropic thermal parameters. The CF_3 group in complex **III** contained two fluorine atoms disordered over three different orientations with occupancies of 40%, 40% and 20%, and one fluorine atom disordered over two different orientations, each with 50% occupancy. The crystallographic illustrations were prepared using ORTEP-3 [22] and MERCURY [23]. The corresponding crystallographic and refinement data for complexes **I-III** are summarized in Table 1. The CIF file of all structures was deposited in the Cambridge Structural Data Base under the code numbers 1900219, 1900220 and 1900221 for **I-III**, respectively. The supplementary crystallographic data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk.

2.5. Cells and culture

Two tumor cell lines (Ehrlich tumor and sarcoma 180) and a non-tumor cell line (myoblast C2C12) were used in this study. Cell lines were grown *in vitro* using RPMI-1640 medium, with 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES, 1% penicillin-streptomycin, and 2 mM L-glutamine kept in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C .

2.5.1. In vitro anti-tumoral activity using resazurin assay

Cultured cells were seeded in 96-well plates (1×10^5 cells/well) and incubated with different concentrations of complexes **I**, **II** and **III**, their free ligands (ranging from $50 \mu\text{M}$ to $1 \mu\text{M}$) and cisplatin for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . After treatment, cells were incubated with resazurin solution (0.1 mg mL^{-1} , $20 \mu\text{L}$ /well) at 37°C for 6 h, and the absorbance was read at 570 nm and 600 nm. All experiments were carried out in triplicate. Cell viability was determined according to the product

protocol described in the following equation: viability (%) = $((80586 \times \text{Abs}_{570} \text{ sample}) - (117216 \times \text{Abs}_{600} \text{ sample})) / ((80586 \times \text{Abs}_{570} \text{ control}) - (117216 \times \text{Abs}_{600} \text{ control})) \times 100$. The selectivity index (SI) was obtained using the formula $\text{SI} = \text{IC}_{50}$ of non-tumor cells/ IC_{50} of tumor cells [24].

2.6. Trypanocidal activity and selectivity of ligands and complexes

Trypanocidal activity of the free ligands, their respective complexes (**I**, **II** and **III**) and benznidazole (BZN) was evaluated against amastigote forms of the CL Brener strain as previously described [25]. Briefly, L929 cells (2.5×10^4 cells. mL^{-1}) were resuspended in RPMI-1640 medium without phenol red (Sigma-Aldrich), supplemented with 5% bovine fetal serum (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100 IU mL^{-1} penicillin G, and 100 mg mL^{-1} streptomycin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) and seeded in 96-well microplates. After 3 h, the cells were infected with 5.0×10^5 trypomastigote forms of *T. cruzi* CL Brener strain stably expressing the β -galactosidase gene from *Escherichia coli* (clone B5 from CL Brener strain) and incubated for 48 h. After the infection period, the plates were washed to remove the free trypomastigote forms of *T. cruzi*. The infected cells with the intracellular amastigote forms were incubated with the compounds or benznidazole (BZN), in serial concentrations from 500 to $3.9 \mu\text{M}$. After 72 h, $50 \mu\text{L}$ of PBS (phosphate buffered saline) containing 0.3% of Triton X-100 and $400 \mu\text{M}$ chlorophenol Red- β -D-galactoside (CPRG) were added. Plates were incubated at 37°C for 4 h and the absorbance was read at 570 nm. The BZN was used as positive control and the culture media as negative control. The concentration of the compound corresponding to 50% trypanocidal activity in amastigote forms was expressed as the $\text{IC}_{50\text{amastigote}}$.

The L929 cell viability was assessed using the classical [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) colorimetric assay [26] in order to determine selectivity against *T. cruzi*. For this propose, the same protocol established for trypanocidal activity was maintained. Briefly, 2.5×10^4 cells were incubated for 48 h in a 96-well microplate for cell culture. After this incubation period, the compounds or BZN was added (concentrations 500 to $3.9 \mu\text{M}$ in serial dilution/compounds solubilized in DMSO 0.5%) in a final volume of $200 \mu\text{L}$. Cells were incubated for 72 h at 37°C . After incubation with the ligands and their complexes, the medium was removed and supplemented with $50 \mu\text{L}$ of MTT (5.0 mg mL^{-1}) diluted in phosphate buffered saline (PBS). The precipitated blue MTT formazan was then dissolved in $50 \mu\text{L}$ of DMSO, and the absorbance was measured at 570 nm in a VARIAN CARY-50 plate reader MPR multiwell. Cell viability was expressed as the percentage of absorption values in treated cells compared with untreated (control) cells. CC_{50} (cytotoxic concentration of 50% of the cells) was also calculated. Thus, SI is defined by the ratio of CC_{50} to IC_{50} .

2.7. Statistical analysis

The IC_{50} or Half Maximal Inhibitory Concentration (concentration that inhibits 50% of cell growth) was determined using the program GraphPad Prism 6.0, from a non-linear regression, where the percentage of cell viability was determined as a logarithmic function of tested concentrations, assuming a 95% confidence interval (p less than 0.05).

3. Results and discussion

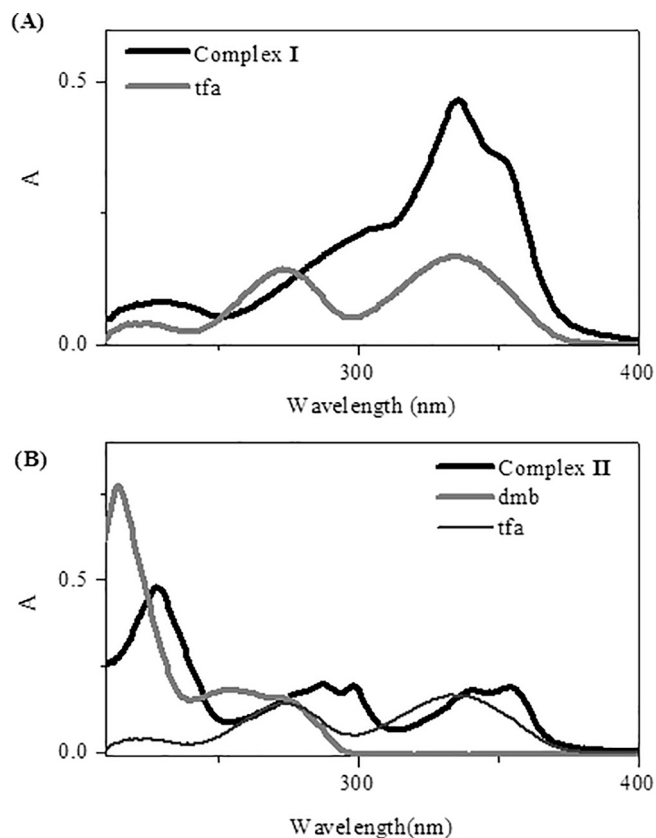
Three new copper(II) complexes, $[\text{Cu}(\text{tfa})_2]$ (**I**), $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{dmb})(\text{NO}_3)] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**II**) and $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{nphen})(\text{NO}_3)]$ (**III**), in which $\text{tfa} = 4,4,4$ -trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione, $\text{nphen} = 5$ -nitro-1,10-phenanthroline and $\text{dmb} = 4,4$ -dimethoxy-2,2-bipyridine were prepared. All copper complexes (powder, non-crystalline samples) were characterized by elemental analysis, conductivity measurements, FT-IR and UV-Vis spectroscopy.

As to the molar conductivity values (10^{-3} M ; methanol), **I** is non-

Table 1

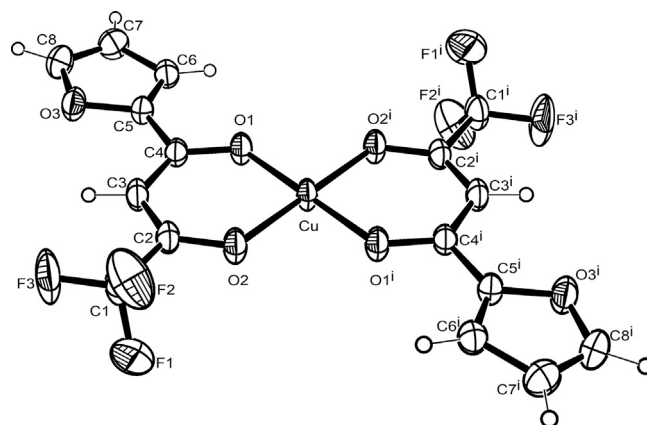
Crystal data, data collection and structure refinement details for complexes I–III.

Complex	I	II	III
Empirical formula	C ₁₆ H ₈ Cu F ₆ O ₆	C ₂₀ H ₁₆ Cu F ₃ N ₃ O ₈	C ₂₀ H ₁₁ Cu F ₃ N ₄ O ₈
Formula weight (g.mol ⁻¹)	473.76	546.90	555.87
Crystal system	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P $\bar{1}$	P 2 ₁ /n	P 2 ₁ /n
Unit cell dimensions (Å, °)	a = 5.7732(2) b = 7.4917(2) c = 10.6689(3) α = 86.390(2) β = 75.814(1) γ = 76.908(1)	a = 9.3200(3) b = 13.2950(5) c = 17.1150(7) α = 90 β = 92.980(1) γ = 90	a = 7.5070(15) b = 20.558(4) c = 13.459(3) α = 90 β = 102.742(3) γ = 90
Volume (Å ³)	435.73(2)	2117.84(14)	2025.9(7)
Z	1	4	4
Calculated density (mg/m ³)	1.805	1.715	1.822
μ (mm ⁻¹)	1.348	1.113	1.167
F(0 0 0)	235	1108	1116
Crystal size (mm ³)	0.25 × 0.10 × 0.02	0.24 × 0.18 × 0.15	0.28 × 0.08 × 0.06
θ range for data collection (°)	1.969–26.453	3.504–25.694	2.517–33.364
Index ranges	–6 ≤ h ≤ 7 –9 ≤ k ≤ 9 –13 ≤ l ≤ 13	–11 ≤ h ≤ 10 –16 ≤ k ≤ 16 –20 ≤ l ≤ 20	–11 ≤ h ≤ 10 –31 ≤ k ≤ 31 –20 ≤ l ≤ 20
Reflections collected	6691	21,250	62,191
Reflections unique [R _{int}]	1801 [0.0246]	3995 [0.1201]	7821 [0.0576]
Reflexões Observadas [I > 2 σ (I)]	1703	1919	6106
Parameters	133	316	330
S	1.114	1.028	1.160
R [I > 2 σ (I)]; wR ₂	0.0394; 0.1102	0.0658; 0.1544	0.0741; 0.1753
R(all data); wR ₂	0.0413; 0.1118	0.1686; 0.2035	0.0959; 0.1859
$\Delta\rho_{\text{max}}$; $\Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0.463; –0.354	0.527; –0.431	1.209; –0.835

**Fig. 2.** UV–Vis spectra of complexes I (A) and II (B) and their respective ligands (MeOH, 10⁻⁵ M).**Table 2**

Selected bond lengths [Å] and angles [°] for complexes I, II and III.

	Complex I	Complex II	Complex III
Cu–O1	1.917(2)	1.932(4)	1.921(3)
Cu–O2	1.912(2)	1.923(4)	1.927(2)
Cu–N1	–	1.980(5)	2.007(3)
Cu–N2	–	1.978(5)	1.991(3)
Cu–O4	–	2.342(5)	2.231(3)
O1–Cu–O2	93.49(9)	93.4(2)	93.05(10)
N1–Cu–N2	–	81.9(2)	82.22(11)
O1–Cu–O1 ⁱ	180.0	–	–
O1–Cu–O2 ⁱ	86.51(9)	–	–
O1–Cu–N1	–	92.5(2)	89.86(10)
O1–Cu–N2	–	168.3(2)	167.21(11)
O2–Cu–N1	–	171.6(2)	171.89(11)
O2–Cu–N2	–	91.2(2)	93.54(11)

Symmetry code: (i) $-x + 1, -y + 1, -z + 1$.**Fig. 3.** ORTEP drawing of the complex I showing atom labeling scheme and displacement ellipsoids at the 25% probability level. Symmetry code: (i) $-x + 1, -y + 1, -z + 1$.

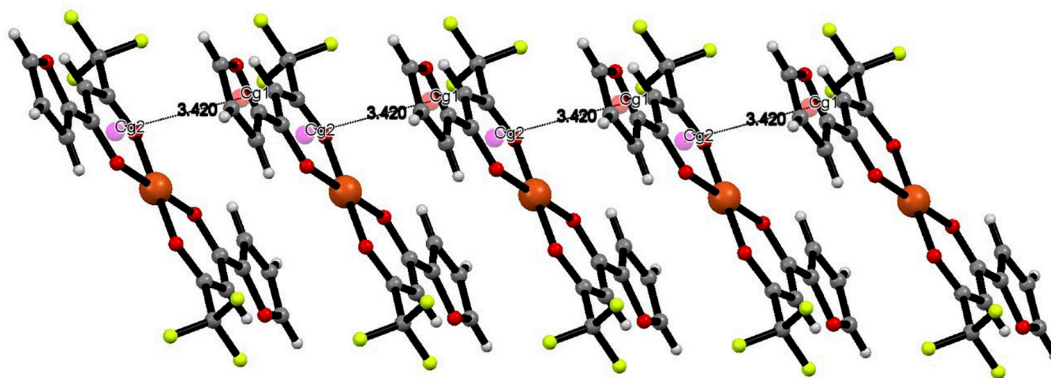


Fig. 4. A packing diagram of complex I viewed along the [1 0 0] direction, where the molecules are linked by π - π interactions (dashed lines), leading to a bidimensional chains.

Table 3

Intramolecular interactions [\AA and $^\circ$] present in complex I.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
C3-H3...F3	0.93	2.36	2.718(4)	102.5
C3-H3...O3	0.93	2.48	2.823(4)	102

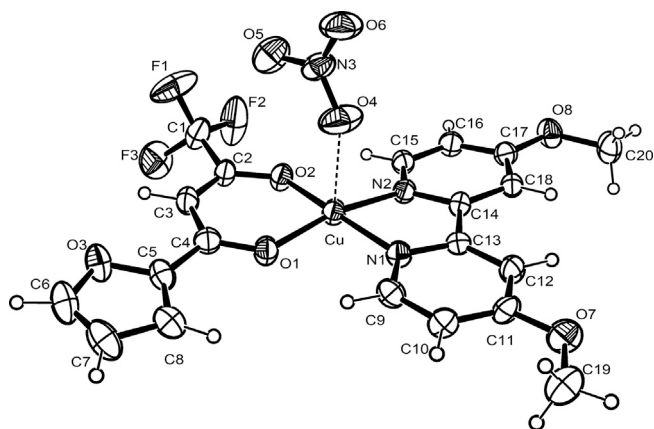


Fig. 5. ORTEP diagram of complex II with thermal ellipsoids at 30% probability.

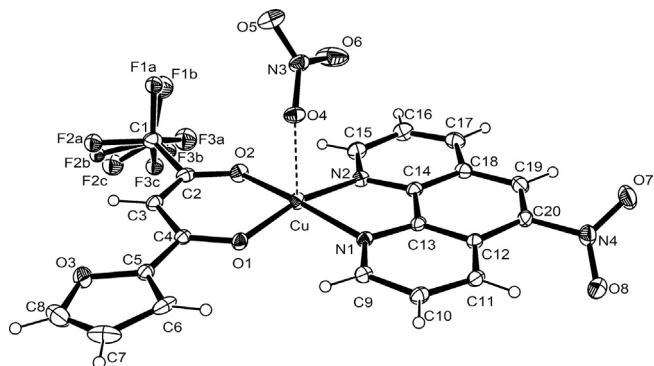


Fig. 6. ORTEP diagram of complex III, with displacement ellipsoids drawn at the 30% probability level.

electrolyte [27]. In turn, II and III are 1:1 electrolytes, which suggest a labilization of the nitrate group in solution [8,9].

In the IR spectra of the complexes, the C=O stretching frequency of the tfa ligand is shifted to lower frequencies ($> 15 \text{ cm}^{-1}$), which indicates a coordination via oxygen atoms [8,9,28]. Two absorptions

Table 4

Hydrogen bonds and selected short contacts geometry [\AA and $^\circ$] for complex II.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
C12-H12...O6 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0.96	2.54	3.494(9)	169.7
C18-H18...O6 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0.96	2.45	3.412(8)	176.1
C8-H8...O4 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0.96	2.51	3.261(9)	134.8
C10-H10...O5 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0.96	2.54	3.435(9)	155
C20-H203...F2 ^(iv)	0.96	2.46	3.406(9)	167.4
C3-H3...O3	0.96	2.49	2.817(9)	99.8
C9-H9...O1	0.96	2.48	2.999(8)	113.8
C15-H15...O2	0.96	2.46	2.964(8)	112.7

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: ⁽ⁱⁱⁱ⁾ $3/2-x, -1/2+y, 1/2-z$; ⁽ⁱⁱⁱ⁾ $2-x, -y, 1-z$; ^(iv) $1/2-x, -1/2+y, 1/2-z$.

Table 5

Hydrogen bonds and selected short contacts geometry [\AA and $^\circ$] for complex III.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
C6-H6...O4 ^(v)	0.93	2.34	3.238 (4)	161.1
C7-H7...F1B ^(vi)	0.93	2.35	3.112(9)	139.4
C9-H9...O4 ^(v)	0.93	2.39	3.043(4)	127
C16-H16...O7 ^(vii)	0.93	2.47	3.280(5)	145.8
C17-H17...O5 ^(viii)	0.93	2.38	3.208(5)	147.5
C19-H19...O5 ^(viii)	0.93	2.57	3.344(5)	140.7
C11-H11...O8	0.93	2.35	2.876 (5)	115.7
C3-H3...O3	0.93	2.52	2.849 (5)	101.2
C9-H9...O1	0.93	2.48	2.964(4)	112.5
C15-H15...O2	0.93	2.60	3.075(5)	112.6

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: ^(v) $-x, -y+1, -z+1$; ^(vi) $-x+1/2, y+1/2, -z+3/2$; ^(vii) $x+1/2, -y+1/2, z+1/2$; ^(viii) $x+1/2, -y+1/2, z-1/2$.

around 1416 and 1300 cm^{-1} confirm the presence of a coordinated monodentate nitrate group in complexes II and III. Considering the CF_3 group, the symmetric and asymmetric stretching frequencies are observed at ≈ 1135 and $\approx 1310 \text{ cm}^{-1}$, respectively [9,11]. The absorption around 1025 cm^{-1} should be assigned to $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$. In addition, absorption bands between 3082 and 3165 are assigned to the $\nu(\text{C}-\text{H})$.

As to the UV-Vis spectra performed in methanol (10^{-5} M), all organic compounds display two or three bands in the region below 400 nm , which are assignable to $\pi \rightarrow \pi^*$ or $n \rightarrow \pi^*$ transitions [8,9,28]. For all the Cu(II) compounds, a red shift in relation to free organic compounds reveals the presence of the complexes in solution (Fig. 2). Lastly, the complexes exhibited only one broad and asymmetric d-d band between 626 and 674 nm , which are accordance with geometries suggested [9,29]. These observations are consistent with the degree of distortion from geometries found in the X-ray structural analysis (see Section 3.1).

Table 6

IC₅₀ values for free ligands and complexes **I–III** on tumor (Ehrlich and Sarcoma 180) and non-tumor (C2C12) cell lines.

Compound	IC ₅₀ ^a (μM)			SI	
	Ehrlich	Sarcoma 180	C2C12		
tfa	> 50.00	> 50.00	> 50.00	n.d.	
nphen	> 50.00	10.42 ± 2.30	6.26 ± 2.30	n.d.	
dmb	> 50.00	> 50.00	> 50.00	n.d.	
[Cu(tfa) ₂] I	> 50.00	> 50.00	> 50.00	n.d.	
[Cu(tfa)(dmb)(NO ₃)] 0.1.5H ₂ O II	36.96 ± 0.14	14.12 ± 0.05	15.52 ± 2.18	0.42 ^b	1.10 ^c
[Cu(tfa)(nphen)(NO ₃)] III	15.75 ± 2.68	16.90 ± 2.42	76.69 ± 7.30	4.87 ^b	4.54 ^c
cisplatin	6.40 ± 1.45 [*]	2.44 ± 0.47	18.31 ± 1.95	2.86 ^b	7.50 ^c

n.d. Not determined value.

^a Concentration required to inhibit 50% of cell growth ± SD.

^b SI (Selectivity Index) = IC_{50C2C12}/IC_{50Ehrlich}.

^c SI (Selectivity Index) = IC_{50C2C12}/IC_{50Sarcoma 180}.

^{*} Devegowda et al. [37].

Table 7

Trypanocidal activity (IC_{50amastigote}) against the amastigote form of the clone B5 from CL Brener strain of *Trypanosoma cruzi* and cytotoxicity (CC_{50L929}) of the free ligands, their respective complexes and benznidazole (BZN).

Compound	IC _{50amastigote} (μM)	CC _{50L929} (μM)	SI
tfa	107.9 ± 3.3	169.4 ± 3.7	1.5
nphen	5.9 ± 0.45	75.2 ± 2.9	12.7
dmb	11.6 ± 0.5	102.3 ± 9.6	8.8
[Cu(tfa) ₂] I	29.9 ± 1.16	184.7 ± 3.2	6.1
[Cu(tfa)(dmb)(NO ₃)]0.1.5H ₂ O II	13.0 ± 0.7	27.9 ± 1.6	2.1
[Cu(tfa)(nphen)(NO ₃)] III	6.3 ± 0.07	34.7 ± 1.4	5.5
BZN	9.8	367.3	37.5

3.1. Crystal structure

The copper(II) complexes **I**, **II** and **III** were characterized by X-ray single crystal analysis and the data results showed that the complex **I** crystallizes in the space group $P\bar{1}$ (triclinic crystal system) whereas the complexes **II** and **III** crystallize in the monoclinic system, space group $P2_1/n$. Selected bond lengths and bond angles of complexes **I–III** are presented in Table 2.

The asymmetric unit of complex **I**, consists of one copper(II) atom

and one 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (tfa) ligand. In this complex, the Cu(II) ion is located on a crystallographic inversion center while two tfa ligands coordinate the metal center via the oxygen atoms (O1 and O2) in a *trans*-square-planar configuration as imposed by the crystal symmetry. The oxygen atoms of the tfa ligand coordinate the copper(II) atom with Cu–O distances of 1.917(2) and 1.912(2) Å. The coordination environment of the Cu(II) atom for complex **I** is shown in Fig. 3.

In the complex **I**, the tfa ligand exhibits bidentate chelating coordination via two oxygen atoms, O1 and O2, and forms a six-membered chelate ring, Cu/O2/C2/C3/C4/O1, with a root mean square (r.m.s) deviation of 0.0120 Å from the corresponding least-squares plane defined by the six constituent atoms. The deviation from the mean plane through the furyl ring (C5/C6/C7/C8/O3) is 0.0025 Å while the angle between the mean planes formed by chelate and furyl ring is 8.9(2)°. The O1–Cu–O2 angle is 93.49(9)° whereas the *trans* angles are 180°. These values reflect that the coordination geometry around the copper(II) atom adopts a distorted square planar configuration.

The crystal packing of the complex **I** does not present classical hydrogen bonds, but it was possible to verify the existence of π – π stacking interactions. These interactions link the molecules into a bidimensional network along the [1 0 0] direction, with centroid–centroid distance (Cg1–Cg2) of 3.4193(1) Å for Cg1 (generated by the ring C5/C6/C7/C8/O3) and Cg2 (generated by ring Cu/O2/C2/C3/C4/O1), as shown in Fig. 4. There are also C3–H3...O3 and C3–H3...F3 intramolecular interactions, as shown in Table 3.

The coordination sphere of the Cu(II) ion in complexes **II** and **III** is observed to be penta-coordinated by one nitrate group (apical position) and two bidentate ligands (equatorial plane), which are the O1 and O2 atoms from the tfa ligand and two nitrogen atoms (N1 and N2) from the neutral ligand dmb (for complex **II**) or nphen (for complex **III**). The copper(II) atom is situated in a distorted square-pyramidal environment, defined by the bidentate coordination of the chelate ligands and O4 atom from the nitrate group in the apical position, as indicated by the τ descriptor value of 0.057 (**II**) and 0.078 (**III**) [30]. The respective molecular structures of complexes **II** and **III** are shown in Figs. 5 and 6.

In complexes **II** and **III**, the bidentate chelate of the tfa ligand also leads to formation of six-membered planar rings and the r.m.s deviations to the fitted atoms are 0.0622 and 0.0528 Å, respectively. In both complexes, the furyl ring of the tfa ligand are planar and the dihedral angle between them and the chelate ring is almost 7.0°. The nphen ligand of complex **III**, with exception of the nitro substituent, is nearly planar and the r.m.s deviation from the mean plane of non-hydrogen

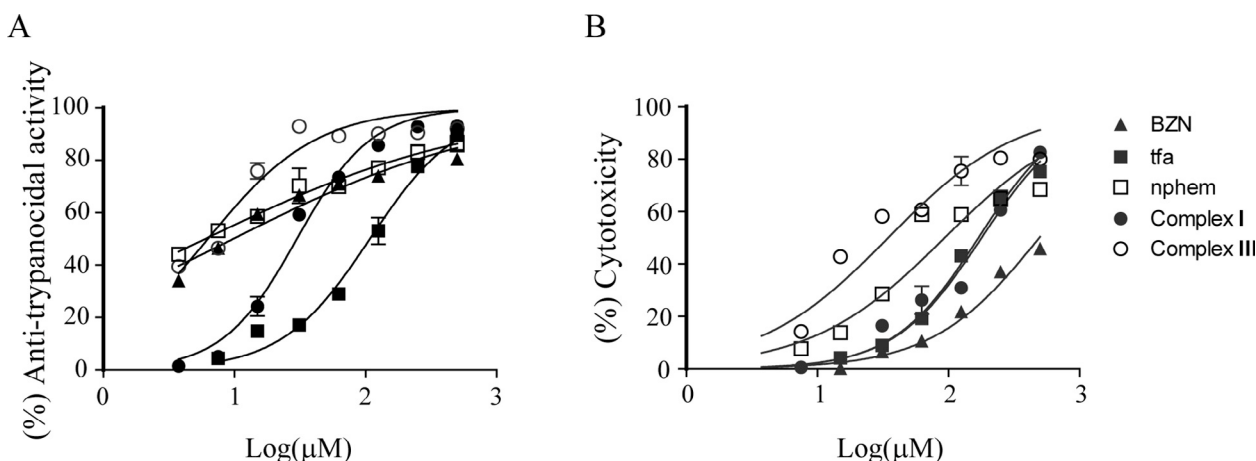


Fig. 7. Anti-trypanocidal activity and cytotoxicity of ligands and copper complexes. (A) Ligands and complexes of copper(II) were evaluated against intracellular amastigotes forms of CL Brener β -galactosidase of *T. cruzi*. The IC_{50amastigote} was determined based on dose–response regression curve within a concentration range of 500 μM to 3.75 μM. (B) The same trypanocidal protocol was followed for the cytotoxicity assay while the CC_{50L929} was calculated according the regression curve generated by dose–response. The IC_{50amastigote} and CC_{50L929} data are displayed in Table 7.

atoms is 0.0279 Å. The copper ion is displaced about $-0.271(2)$ Å in relation to this plane.

In both complexes, the bite angle N1–Cu–N2 of the chelating ligands is significantly less than 90° and the bond angles around the copper ion range from $81.9(2)$ to $171.89(11)^\circ$ in the basal plane. The O1–Cu–O2 angles are $93.4(2)^\circ$ for **II** and $93.05(10)^\circ$ for **III**. The bond lengths involving the Cu(II) atom range from 1.978(5) to 2.007(3) Å for the Cu–N and from 1.921(3) to 1.932(4) Å for the equatorial Cu–O bonds, respectively. The apical position in the pyramid is occupied by the O4 atom and, due to the Jahn–Teller effect, a significantly longer distance compared to other Cu–O1 and Cu–O2 distances is observed. The Cu–O4 bond lengths are 2.342(5) and 2.231(3) Å for complexes **II** and **III**, respectively. In all cases, the bond lengths and angles fall within the normal range for known analogous complexes [8,9,31,32].

The crystal packing of complexes **II** and **III** are respectively stabilized by three or four intramolecular interactions and several intermolecular interactions (listed in Tables 4 and 5) of the type C–H...O and C–H...F.

In the complex **II**, the O6 oxygen atom of the nitrate group is an acceptor in two intermolecular interactions of the type C–H...O, involving the C12 and C18 carbon atoms from the dmb ligand, resulting in chains that extend along the *ac* plane as depicted in Fig. S1 (Supplementary Material). These interactions generate $R_2^1(7)$ ring motifs [33] and the chains connect into a three-dimensional architecture by two intermolecular interactions of the type C–H...O and one of the type C–H...F.

In the crystal of complex **III**, the molecules are linked by intermolecular C17–H17...O5 and C19–H19...O5 interactions into a layered network extending parallel to the *ac* plane (Fig. S2, Supplementary Materials). These interactions generate $R_2^1(6)$ ring motifs [33]. The C9–H9...O4 and C6–H6...O4 interactions connecting two molecules related by inversion of different networks form graph-set motifs, $R_2^2(10)$ and $R_2^2(14)$, respectively [33]. The C16–H16...O7 and C7–H7...F1B interactions consolidate the crystal packing.

3.2. Cytotoxic studies

Cell viability was measured by resazurin metabolization capacity using two tumor cell lines (Ehrlich tumor and sarcoma 180) and a non-tumor cell line (myoblast C2C12). Cells were treated with complexes **I**, **II**, and **III**, their free ligands and cisplatin. Our results indicated that Cu (II) complexes induced different cytotoxicity levels in the tested cell lines (Table 6). Complex **I** showed low cytotoxicity and it was not possible to define its exact IC_{50} values, being defined as $> 50 \mu\text{M}$. Complex **II** presented moderated cytotoxicity to Ehrlich tumor ($IC_{50}^{\text{Ehrlich}} = 36.96 \mu\text{M}$) and high cytotoxicity to sarcoma 180 cell line ($IC_{50}^{\text{Sarcoma 180}} = 14.12 \mu\text{M}$), but was not selective. Complex **III** was highly cytotoxic against tumor cell lines ($IC_{50}^{\text{Ehrlich}} = 15.75 \mu\text{M}$ and $IC_{50}^{\text{Sarcoma 180}} = 16.90 \mu\text{M}$). Interestingly, the cytotoxic effect of complex **III** was significantly lower against C2C12 ($IC_{50} = 76.69 \mu\text{M}$), suggesting that complex **III** exhibits selective cytotoxicity. Indeed, we obtained a selectivity index of 4.87 for Ehrlich and 4.54 for Sarcoma 180, values very interesting given that selectivity indices ≥ 3 are considered significant by some authors [34]. In addition, complex **III** showed higher selectivity than cisplatin (positive control, a known antitumor compound) against the Ehrlich cell line, as shown in Table 6. Cytotoxicity evaluation of the free ligands dmb and tfa found no reduction of cell viability in the cell lines tested. Therefore, they showed no cytotoxic activity at the tested concentrations ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$) [35,36]. In turn, the free ligand nphen showed activity against Sarcoma 180 and C2C12 cell lines, but it did not show selectivity to tumor cells.

Lastly, one conclusion we can draw from these results is that among the analyzed complexes, **III** is a very promising candidate for further studies.

3.3. Evaluation of copper complexes and their ligands against amastigote forms of *T. cruzi*

The trypanocidal activity of three free ligands (tfa, dmb and nphen) and their respective complexes were evaluated against amastigote forms of the CL Brener strain of *T. cruzi*. Benzimidazole (BZN) was used as a positive control. Complex **I** and its free ligand exhibited moderate or poor activity against intracellular parasite forms, while neither presented toxicity to mammalian cells (Table 7, Fig. 7A and B). As to complex **II** and dmb, both exhibited good activity against intracellular forms of the parasite, although **II** showed a low SI value (see Table 7). Lastly, nphen ($IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$) and its copper complex (Complex **III**, $IC_{50} = 6.3 \mu\text{M}$) were 1.5 times more effective against amastigote forms of *T. cruzi* than BZN ($IC_{50} = 9.7 \mu\text{M}$) (Table 7, Fig. 7A). However, complex **III** was approximately 2 times more toxic to cells than the ligand, which also reduced its selectivity potential (Table 7, Fig. 7B). On the other hand, nphen demonstrated a mild cytotoxicity but a selectivity index (SI) higher than 12 (Table 7). Compounds with a selectivity index (SI) above 10 can be selected for further studies and have potential for *in vivo* studies according the rules of DNDi (Drugs for Neglected Disease initiative) [38].

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Brazil). This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Financing Code 001. The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq for funding the research and fellowships (grant 305190/2017-2 to JE). JCT and JE thank Prof. Dr. Christian Lehmann and all the staff of the Chemical Crystallography Department from Max-Planck Institute for Coal Research (Mülheim a.d. Ruhr – Germany) for the use of X-ray diffractometer equipment and FAPESP (Grants 2016/08823-4 & 2013/07581-3).

Appendix A. Supplementary data

Crystallographic data for the structural analysis have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary publication. CCDC 1900219 (complex **I**), CCDC 1900220 (complex **II**) and CCDC 1900221 (complex **III**). Copies of the data can be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-1223-336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or www: <http://www.ccdc.cam.ac.uk>). Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>.

References

- [1] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Chem. Rev. 114 (2014) 815–862.
- [2] D.A. Paixão, I.M. Marzano, E.H.L. Jaimes, M. Pivatto, D.L. Camposc, F.R. Pavan, V.M. Defflon, P.I.S. Maia, A.M.D.C. Ferreira, I.A. Uehara, M.J.B. Silva, F.V. Botelho, E.C. Pereira-Maia, S. Guillard, W. Guerra, J. Inorg. Biochem. 172 (2017) 138–146.
- [3] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza, PCCP 13 (2011) 14510–14515.
- [4] J.J.R. Fraústo da Silva, R.J.P. Williams, The Biological Chemistry of the Elements – The Inorganic Chemistry of Life, Oxford University Press, Oxford, 1991.
- [5] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M. Da Costa Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, Inorg. Chem. 50 (2011) 6414–6424.
- [6] J.C. Almeida, I.M. Marzano, M. Pivatto, N.P. Lopes, A.M. Da Costa Ferreira, F.R. Pavan, I.C. Silva, E.C. Pereira-Maia, G. Von Poelhsitz, W. Guerra, Inorg. Chim. Acta 446 (2016) 87–92.
- [7] P.P. Silva, W. Guerra, G.C. dos Santos, N.G. Fernandes, J.N. Silveira, A.M. da Costa Ferreira, T. Bortolotto, H. Terenzi, A.J. Bortoluzzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, J. Inorg. Biochem. 132 (2014) 67–76.
- [8] P.S. Lopes, D.A. Paixão, F.C.S. de Paula, A.M. Da Costa Ferreira, J. Ellena,

- S. Guillard, E.C. Pereira-Maia, W. Guerra, *J. Mol. Struct.* 1034 (2013) 84–88.
- [9] J.C. Almeida, D.A. Paixão, I.M. Marzano, J. Ellena, M. Pivatto, N.P. Lopes, A.M. Da Costa Ferreira, E.C. Pereira-Maia, S. Guillard, W. Guerra, *Polyhedron* 89 (2015) 1–8.
- [10] L. Polloni, A.C.S. Silva, P.M.A.P. Lima, S.C. Teixeira, M.A.P. Zóia, F.V.P.V. Azevedo, J.C. Almeida, C.V. da Silva, V.M.R. Ávila, L.R.G. Filho, S. Morelli, W. Guerra, R.J.O. Júnior, *Biomed. Pharmacother.* 112 (2019) 108586.
- [11] M.R. Eshaghi, S. Mehdi, K. Maciej, A. Khaleghian, *J. Coord. Chem.* 72 (2019) 1697–1714.
- [12] P. Nath, M.K. Bharty, R.K. Dani, M.S. Tomar, A. Acharya, *Chem. Select* 2 (2017) 10449–10458.
- [13] T.V. Deepthi, P. Venugopalan, *Inorg. Chim. Acta* 450 (2016) 243–250.
- [14] D.A. Paixão, L.P. de Oliveira, P.I.S. Maia, V.M. Defflon, Z.A. Carneiro, K.J. de Almeida, N.P. Lopes, M. Pivatto, J.D.S. Chaves, S. de Albuquerque, M.V. de Almeida, S. Guillard, W. Guerra, *J. Saudi Chem. Soc.* 22 (2018) 809–815.
- [15] D.A. Paixão, C.D. Lopes, Z.A. Carneiro, L.M. Sousa, L.P. Oliveira, N.P. Lopes, M. Pivatto, J.D.S. Chaves, M.V. Almeida, J. Ellena, M.B. Moreira, A.V.G. Netto, R.J. Oliveira, S. Guillard, S. Albuquerque, W. Guerra, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 157–166.
- [16] L. Becco, A. Rodríguez, M.E. Bravo, M.J. Prieto, L. Ruiz-Azuara, B. Garat, V. Moreno, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* 109 (2012) 49–56.
- [17] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, *J. Appl. Crystallogr.* 27 (1994) 435.
- [18] APEX2 version 2.1.0, Bruker AXS Inc. Madison, 2004.
- [19] SAINT version 7.46a, Bruker AXS Inc. Madison, 2004.
- [20] G.M. Sheldrick, SADABS, University of Göttingen, Göttingen, 1996.
- [21] G.M. Sheldrick, SHELXL2014, Programs for the Refinement of Crystal Structures, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2014.
- [22] L. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849.
- [23] C.F. Macrae, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G.P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, *J. Appl. Cryst.* 39 (2006) 453.
- [24] F.C. Pereira, B.A.V. Lima, A.P. de Lima, W.C. Pires, T. Monteiro, L.F. Magalhães, W. Costa, A.E. Graminha, A.A. Batista, Javier Ellena, E.P. Silveira-Lacerda, *J. Inorg. Biochem.* 149 (2015) 91–101.
- [25] F.S. Buckner, C. Verlinde, A.C. LaFlamme, W.C. VanVoorhis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 2592–2597.
- [26] T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [27] W. Geary, *J. Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.
- [28] J.C. Almeida, I.M. Marzano, F.C. Silva de Paula, M. Pivatto, N.P. Lopes, P.C. de Souza, F.R. Pavan, A.L.B. Formiga, E.C. Pereira-Maia, W. Guerra, *J. Mol. Struct.* 1075 (2014) 370.
- [29] J. Oyarce, L. Hernández, G. Ahumada, J.P. Soto, M.A. del Valle, V. Dorcet, D. Carrillo, C. Jean-René Hamon, Manzur, *Polyhedron* 123 (2017) 277–284.
- [30] A.W. Addison, T.N. Rao, J. Reedijk, J. Van Rijn, G.C. Verschoor, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 7 (1984) 1349–1356.
- [31] R.E. Malekshah, M. Salehi, M. Kubicki, A. Khaleghian, *J. Coord. Chem.* 71 (2018) 952–968.
- [32] H.M. Krishnegowda, C.S. Karthik, M.H. Marichannegowda, K. Kumara, P.J. Kudigana, M. Lingappa, P. Mallu, L.K. Neratur, *Inorg. Chim. Acta* 484 (219) (2019) 227–236.
- [33] M. Etter, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 120–126.
- [34] W. Mahavorasirikul, V. Viyanant, W. Chaijaroenkul, A. Itharat, K. Na-Bangchang, *BMC Complement. Altern. Med.* 10 (2010) 55.
- [35] D. Salvador-Gil, L. Ortego, R.P. Herrera, I. Marzo, M.C. Gimeno, *Dalton Trans.* 46 (2017) 13745–13755.
- [36] L. Ortego, M. Meireles, C. Kasper, A. Laguna, M.D. Villacampa, M.C. Gimeno, *J. Inorg. Biochem.* 156 (2016) 133–144.
- [37] P.S. Devegowda, K.S. Balaji, D.S. Prasanna, T.R. Swaroop, S. Jayarama, L. Siddalingaiah, K.S. Rangappa, *Asian J. Chem.* 29 (2017) 896–904.
- [38] E. Chatelain, *J. Biomol. Screen.* 20 (2015) 22–35.