



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

LUANA MUNIQUE SOUSA RAMOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE
COMPLEXOS DE COBRE(II) E NÍQUEL(II) CONTENDO
LIGANTES DE INTERESSE BIOLÓGICO**

UBERLÂNDIA-MG

2021

LUANA MUNIQUE SOUSA RAMOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE
COMPLEXOS DE COBRE(II) E NÍQUEL(II) CONTENDO
LIGANTES DE INTERESSE BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Wendell Guerra

UBERLÂNDIA-MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R147s Ramos, Luana Munique Sousa, 1990-
2021 Síntese e avaliação do potencial antitumoral de complexos de cobre(ii) e níquel(ii) contendo ligantes de interesse biológico [recurso eletrônico] / Luana Munique Sousa Ramos. - 2021.

Orientador: Wendell Guerra.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.8001>

Inclui bibliografia.

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

CDU: 54

André Carlos Francisco
Bibliotecário – CRB-6/2047



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 DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 122, PPGQUI				
Data:	Vinte e sete de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	[18:55]
Matrícula do Discente:	11713QMI005				
Nome do Discente:	Luana Munique Sousa Ramos				
Título do Trabalho:	Síntese e avaliação do potencial antitumoral de complexos de cobre(II) e níquel(II) contendo ligantes de interesse biológico				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Bioinorgânica, Fotoquímica e Fotobiologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Síntese, caracterização e estudos biológicos envolvendo complexos de Pt(II), Pd(II) E Cu(II) com hidrazidas bifuncionais ou derivadas de ácidos naturais				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Microsoft Teams, link https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3ameeting_YjU5ODM2M2MtZjk0My00MzRmLTk0ODMtZmZkN2I3ZWY2NmI0%40thread.v2/0?context=%7b%22Tid%22%3a%22cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%22%2c%22Oid%22%3a%221391dcb0-cddb-44a3-ae67-35db552961c2%22%7d, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Renata Galvão de Lima e Carolina Gonçalves Oliveira, da Universidade Federal de Uberlândia; Pedro Paulo Corbi, da Universidade Estadual de Campinas; Eduardo Tonon de Almeida, da Universidade Federal de Alfenas e Wendell Guerra, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Wendell Guerra, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à 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):

Aprovada.

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 27/08/2021, às 18:47, 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 27/08/2021, às 18:48, 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 **Renata Galvão de Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 18:48, 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 **Pedro Paulo Corbi, Usuário Externo**, em 27/08/2021, às 18:50, 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 **Eduardo Tonon de Almeida, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 14:06, 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 **2963374** e o código CRC **F4C60881**.

Dedicatória

Aos meus pais Antônio José e Mônica, meu esposo Thiago e a toda minha família por serem meu Porto Seguro. Uma luz em dias nublados. Amo vocês.

Agradecimentos

A Deus, porque dele vem a minha força e é nele que deposito todas as minhas esperanças “(...) *nos gloriamos até nas tribulações. Pois, sabemos que a tribulação produz a paciência; a paciência prova a fidelidade; e a fidelidade comprovada, produz a esperança* (Romanos 5: 3-5). Durante todos esses anos de muito trabalho e dedicação, eu descobri que a ciência cura, traz esperança e nos tira da nossa zona de conforto em busca de tantas respostas e soluções, mas também descobri que foi Deus que me guiou até aqui.

Ao meu orientador Dr. Wendell pelo seu profissionalismo e comprometimento com a pesquisa, sua orientação e amizade foram fundamentais para concluir essa etapa e continuar acreditando em dias melhores.

Aos meus amigos e colegas do Lasfar Mônica, Drielly, Janaína, Letícia, Wesley, Rafael e Maurício, obrigado pela leveza, conversas, trocas científicas, risadas, cafês e congressos. Foi muito saudável dividir o mesmo espaço com todos vocês, não tínhamos competição uns com os outros, mas uma vontade de juntos fazer ciência e conseguimos.

Aos alunos de iniciação científica Daniel e Milena que dividiram comigo muitos experimentos. Obrigada pelo tempo de vocês, esforço e dedicação. Vocês foram fundamentais nessa jornada.

As alunas de pós-graduação Ana Clara e Flávia pelas inúmeras conversas, parceria e amizade, sempre compartilhamos das mesmas aflições e angústias.

Aos meus pais Antônio e Mônica, pessoas maravilhosas de um coração enorme. Todos os conselhos e apoio foram essenciais para encarar e resolver os problemas que surgiram ao longo desses anos. Vocês são meu exemplo, minha admiração, meu porto seguro, que sorte eu tenho. Amo vocês.

Ao meu esposo Thiago pela paciência e por diversas vezes entender as minhas renúncias e superações. Ter pessoas certas ao nosso lado que acreditam nos nossos sonhos e nos incentivam a continuar é raro. Obrigada por ser essa pessoa, pelo seu companheirismo, amizade, cumplicidade e amor. Eu te amo muito.

A minha irmã Moniele que nos meus dias de dúvidas e cansaço esteve ao meu lado consolando com uma palavra amiga e um bom café.

A minha linda e incrível família. Aos meus avós, em especial ao meu avô João Campos (*in memoriam*), que foi muito especial na minha trajetória acadêmica com seus sábios ensinamentos, se um dia eu duvidei da minha capacidade, Ele jamais.

A todos os professores do Instituto de Química pelos ensinamentos, em especial das disciplinas de Química Inorgânica, pois com maestria compartilharam seus conhecimentos.

A secretária Mayta Peixoto e o coordenador Dr. Rodrigo Muñoz do Programa de Pós Graduação em Química (PPGQUI), pela presteza e orientação durante todo o processo do doutorado.

As funcionárias Elimar e Deuzuite por manterem nosso lugar de trabalho limpo e que por muitos meses dividiram comigo no horário do almoço histórias cheias de risadas.

Aos técnicos Roni Santos e Magayver Portela do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química (LAMIQ) pelas análises elementares e de RMN.

Ao Professor Dr. André Luiz Bogado (ICENP/UFU) por ter disponibilizado os reagentes para a síntese dos ligantes iminopiridinícos utilizados neste trabalho.

Aos nossos colaboradores Prof. Dr. Marcos Pivatto (Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia) e Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) pelas análises de espectrometria de massas em alta resolução com ionização por electrospray (ESI).

A professora Dra. Ana Maria da Costa Ferreira e seu aluno Rodrigo Boni Fazzi pelas análises de RPE e susceptibilidade magnética realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Aos professores Dr. Guilherme P. Guedes e Dr. Jackson A.L.C. Resende pelos experimentos realizados no Laboratório de difração de raios X do Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Aos nossos parceiros Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, Profa. Dra. Carla Lopes e a aluna Daiane Y. Tezuka pelos testes *in vitro* de citotoxicidade, apoptose e migração celular realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

A Profa. Dra. Thaise Gonçalves Araújo pelas análises de citotoxicidade avaliadas no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Aos pesquisadores Prof. Dr. Adelino V.G. Netto e Profa. Dra. Mariete B. Moreira pelos ensaios de interação com ADN realizados no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Ao professor Dr. Ronaldo J. De Oliveira da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) pelos estudos de docagem molecular.

Ao professor Dr. Robson J. De Oliveira Júnior e o aluno Ricardo C. Lino da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelos testes de clivagem.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A Rede Mineira de Química e FAPEMIG pelo suporte financeiro durante esse trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT).

Aos professores da banca por aceitarem o convite, pela disponibilidade e toda contribuição científica.

A todos Muito Obrigada!

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender”.

Clarice Lispector

RESUMO

A descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina representou um avanço na luta contra o câncer, uma vez que houve um aumento expressivo nas taxas de cura para alguns tipos de câncer. No entanto, além da cisplatina apresentar efeitos colaterais graves, observa-se também resistência intrínseca ou adquirida, o que compromete a eficiência do tratamento, tornando necessário o desenvolvimento de novos fármacos com diferentes mecanismos de ação que sejam também mais seguros e efetivos. Nesta perspectiva, treze novos complexos de Ni^{II} e Cu^{II} coordenados a diferentes classes de ligantes, tais como β-dicetona, hidrazida e iminopiridina foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade e susceptibilidade magnética, espectrometria de massas em alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS), técnicas espectroscópicas (UV-Vis, reflectância difusa, IV e RPE) e por difração de raios X de monocristal. Posteriormente, a atividade antitumoral destes compostos foi avaliada em diferentes linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Quanto as estruturas dos complexos, os de Ni^{II} coordenados aos ligantes β-dicetona, fenantrolina e nitrato, de fórmula geral [Ni(η²-NO₃)(O,O)(fen)] (O,O = 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (bta), 4-clorofenil-4,4,4-trifluoro-1,3-butanodiona (btc), 4,4,4-trifluoro-1-(2-furil)-1,3-butanodiona (btf) e fen = fenantrolina), apresentaram geometria octaédrica distorcida com todos os ligantes coordenados de modo bidentado, como confirmado pela análise de raios X de monocristal do complexo [Ni(η²-NO₃)(btc)(fen)]. Outros três complexos de Cu^{II} do tipo [Cu(bth)(N-doador)](NO₃)₂ (bth = hidrazida do ácido 4-benzopirano [4,3]tiofeno-2-carboxílico; N-doador = fenantrolina, dimetoxibipiridina ou terpiridina), também foram obtidos e os dados espectroscópicos indicam que os ligantes coordenam de modo bidentado ou tridentado. Posteriormente, uma terceira classe de compostos de Cu^{II} com fórmula geral [Cu(N,N)₂(NO₃)₂] e [Cu(N,N)(N,N,N)](PF₆)₂ (N,N = 4-cloro-N-(piridina-2-metileno)anilina (Clmp), 2,6-dietil-N-(piridina-2-metileno)anilina (diemp), 2,6-diisopropil-N-(piridina-2-metileno)anilina (diipmp), 4-metil-N-(piridina-2-metileno)anilina (memp) e N,N,N = 4-metilfenilterpiridina), foi sintetizada e caracterizada. Quanto a atividade biológica, os resultados mais promissores de citotoxicidade nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram obtidos com os compostos de Ni^{II} e Cu^{II} coordenados a β-dicetona e hidrazida, respectivamente, uma vez que apresentaram valores de IC₅₀ na faixa micromolar. Estudos de ligação ao ADN foram realizados por técnicas de UV-vis, dicroísmo celular e espectroscopia de fluorescência.

Essas técnicas sugerem uma interação eletrostática ou uma ligação no sulco do ADN dos compostos de Ni^{II} e Cu^{II} coordenados a β-dicetona e hidrazida. Os dados de docagem molecular seguido por simulações semi-empíricas reforçam que os compostos de Ni^{II} são capazes de se ligar no sulco menor da dupla hélice do ct-ADN em uma região rica em pares de A-T. Estudos de clivagem do ADN indicaram que o complexo [Ni(η^2 -NO₃)(btc)(fen)] cliva o ADN plasmidial na presença de H₂O₂. Posteriormente, verificou-se que os compostos [Ni(η^2 -NO₃)(bta)(fen)] e [Ni(η^2 -NO₃)(btc)(fen)] induzem apoptose tardia em células MCF-7. Adicionalmente, estudos *in vitro* de migração celular demonstraram que os compostos de Cu^{II} com a hidrazida bth têm notável atividade antimetastática nas células MCF-7 e MDA-MB-231.

ABSTRACT

The discovery of the antitumor properties of cisplatin represented an advance in the fight against cancer, since there has been a significant increase in cure rates for some cancers. However, besides the cisplatin having serious side effects, there is also intrinsic or acquired resistance, which compromises the efficiency of the treatment, making it necessary to develop new drugs with different mechanisms of action that are also safer and more effective. In this perspective, thirteen new Ni^{II} and Cu^{II} complexes coordinated to different classes of ligands such as β -diketone, hydrazide and iminopyridine were synthesized and characterized by elemental analysis, conductivity and magnetic susceptibility measurements, high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS), spectroscopy techniques (UV-vis, diffuse reflectance, FT-IR and EPR) and by single crystal X-ray analysis. Afterwards, the antitumoral activity of these complexes were evaluated against different breast cancer cell lines (MCF-7 e MDA-MB-231). As to the structures, the Ni^{II} complexes coordinated to the β -diketone, phenanthroline and nitrate ligands of the type [Ni(η^2 -NO₃)(O,O)(phen)] (O,O = 4,4, 4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione (bta), 4-chlorophenyl-4,4,4-trifluoro-1,3-butanedione (btc), 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (btf) and phen = phenanthroline), showed a distorted octahedral geometry with all ligands coordinated in a bidentate mode, as verified by single crystal analysis of the complex [Ni(η^2 -NO₃)(btc)(phen)]. Three other Cu^{II} complexes of the type [Cu(bth)(N-donor)](NO₃)₂ (bth = 4-benzopyran[4,3]thiophene-2-carboxylic acid hydrazide; N-donor = phenanthroline, dimethoxybipyridine or terpyridine) were also obtained and the spectroscopic data indicate that the ligands coordinate in a bidentate or tridentate mode. Posteriorly, the third class of Cu^{II} compounds of the type [Cu(N,N)₂(NO₃)₂] and [Cu(N,N)(N,N,N)](PF₆)₂ (N,N = 4-chloro-*N*-(pyridine-2-methylene) aniline (Clmp), 2,6-diethyl-*N*-(pyridine-2-methylene) aniline (diemp), 2,6-diisopropyl-*N*-(pyridine-2-methylene) aniline (diimp), 4-methyl-*N*-(pyridine-2-methylene) aniline (memp) and *N,N,N* = 4-methylphenylterpyridine) was synthesized and characterized. Regarding biological activity, the most promising results of cytotoxicity against cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were obtained with the Ni^{II} and Cu^{II} complexes coordinated to β -diketone and hydrazide, respectively, since they exhibited IC₅₀ values in the micromolar range. DNA binding studies were performed by the techniques such as UV-vis, dichroism and fluorescence spectroscopy. These techniques suggest an electrostatic interaction or/and a bond in the DNA groove of the

Ni^{II} and Cu^{II} compounds coordinated to β -diketone and hydrazide. The data from molecular docking followed by semi-empirical simulations of the Ni^{II} compounds reinforce that they are capable of binding in the minor groove of the double helix of ct-DNA in an A-T rich region. DNA cleavage studies indicated that the complex [Ni(η^2 -NO₃)(btc)(phen)] cleaves plasmid DNA in the presence of H₂O₂. Posteriorly, it was verified that the compounds [Ni(η^2 -NO₃)(bta)(phen)] and [Ni(η^2 -NO₃)(btc)(phen)] induces late apoptosis in MCF-7 cells. Additionally, *in vitro* cell migration studies have shown that Cu^{II} compounds with both hydrazide have remarkable antimetastatic activity in the MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1- Representação do mecanismo de desenvolvimento de tumores malignos.	2
Figura 2- Esquema das etapas do ciclo celular.....	4
Figura 3 - Estágios da morte celular apoptótica.	7
Figura 4 - Vias de mecanismo que conduzem a apoptose.....	8
Figura 5- Oxidação na porção guanina do ADN causada pelo radical hidroxila.	10
Figura 6- Representação das estruturas otimizadas dos complexos de Cu com AG em solução aquosa.....	10
Figura 7- Compostos de arsênio utilizados no tratamento da sífilis.....	12
Figura 8- Mecanismo de ação da cisplatina.....	13
Figura 9- Principais adutos formados entre cisplatina e ADN.	14
Figura 10- Compostos de platina utilizados e em fase de testes clínicos no tratamento do câncer.....	15
Figura 11 - Compostos de rutênio como potenciais agentes anticâncer.....	17
Figura 12- Estrutura molecular do composto Auranofina.	17
Figura 13- Representação das possíveis geometrias do íon Cu^{II}	19
Figura 14- Transporte de Cu e dos componentes celulares envolvidos nos níveis de regulação de Cu dentro de uma célula.....	21
Figura 15- Representação da clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio na presença do complexo de Cu^{II}	23
Figura 16- A) Nuclease de Cu^{II} coordenado à fenantrolina. B) Esquema da quebra da fita de ADN por espécies ativas de oxigênio geradas por $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$	24
Figura 17- A) Estrutura dos compostos de cobre coordenado a ligantes tiossemicarbazonas via átomos $k^4 \text{N}, \text{N}', \text{S}, \text{S}'$. B) da classe Triapina via átomos $k^3 \text{N}, \text{O}, \text{S}$	25
Figura 18- Estrutura de complexos de cobre coordenados a antibióticos de fórmulas $[\text{Cu}(\text{tetraciclina})(\text{fen})(\text{H}_2\text{O})\text{ClO}_4]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{doxiciclina})(\text{fen})(\text{H}_2\text{O})\text{ClO}_4]\text{ClO}_4$	26
Figura 19- Estrutura química das Casiopeínas Cas II-gly e Cas III-ia 26	26
Figura 20- Estruturas dos complexos derivados das Casiopeínas mantendo o fragmento $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})]^{2+}$ 27	27
Figura 21- Estrutura química de compostos de coordenação de cobre coordenado a beta-dicetonas e <i>N,N</i> -doadores. 28	28
Figura 22- Estrutura química de compostos ternários de cobre(II) e hidrazida. 29	29

Figura 23- Complexos de cobre(II) coordenados a terpiridina substituídas.....	30
Figura 24- Estruturas dos complexos $[\text{Cu}(\text{mftpy})(\text{NO}_3)_2]$ e $[\text{Cu}(\text{mftpy})_2]^{2+}$	30
Figura 25- Estrutura do complexo de fórmula $[\text{Cu}(\text{gly})(\text{mftpy})\text{NO}_3]^+$	31
Figura 26- Estruturas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{Fc-tpy})(\text{N-O})]$	32
Figura 27- Estrutura dos complexos de Cu^{II} com trimetoxi terpiridina e diferentes <i>N,N</i> - doadores.....	32
Figura 28- Estrutura dos complexos $[\text{Ni}(\text{CR})]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{salen})]^{2+}$	35
Figura 29- Estrutura dos complexos $[\text{Ni}(\text{dimetilbipy})_3]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{dimetoxibipy})_3]^{2+}$	35
Figura 30- Estrutura dos complexos $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{tisata})_2]^{2+}$	36
Figura 31- Estrutura química dos anti-inflamatórios utilizados como ligantes em complexos ternários de Ni^{II}	36
Figura 32- Estrutura dos complexos de níquel(II) coordenados a benzil hidrazida.....	37
Figura 33- Esquema reacional de obtenção dos ligantes iminopiridinícos.....	38
Figura 34- Compostos de platina(II) coordenados a ligantes iminopiridinícos.....	39
Figura 35- Série de compostos de platina(II) coordenados a iminopiridinícos.....	39
Figura 36- Compostos de platina(II) coordenados a iminopiridinícos de cadeia lipofílica.	40
Figura 37- Complexos de irídio(III) e rutênio(II) coordenados a iminopiridinícos.....	41
Figura 38- Complexo de cobre(II) coordenado via átomos <i>N,N,N</i> do ligante iminopiridiníco.....	41
Figura 39- Esquema reacional dos ligantes iminopiridinícos com os substituintes nas posições orto/para da anilina.....	51
Figura 40- Esquema reacional para obtenção dos complexos de Ni^{II}	53
Figura 41- Rotas sintéticas utilizadas na obtenção do composto $[\text{Cu}(\text{bth})(\text{tpy})](\text{NO}_3)_2$	55
Figura 42- Esquema reacional para obtenção dos complexos de Cu^{II} coordenados as Iminopiridinas.....	56
Figura 43- Esquema reacional para obtenção dos complexos de Cu^{II}	58
Figura 44- Estrutura proposta dos complexos de fórmula $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{O,O})(\text{fen})]$	59
Figura 45- Espectro de massas do complexo III.....	62
Figura 46- Espectro de massas do complexo I.....	63
Figura 47- Espectro de massas do complexo II.....	63
Figura 48- Diagramas de desdobramento de campos cristalinos de íon com configuração d^8 com geometrias octaédrica (A) e plano quadrado (B) - diamagnético.....	64

Figura 49- Representação estrutural do complexo II (elipsóides com nível de probabilidade de 50%).	65
Figura 50- Representação da interação C9 – H9 ... O13 e C12 – H12 ... F12 do complexo II.	67
Figura 51- Espectros UV-vis dos compostos I, Hbta e fen em solução de acetonitrila na concentração 1×10^{-5} M.	68
Figura 52- Espectro de reflectância difusa do composto I.	69
Figura 53- Representação do tautomerismo ceto-enólico das β -dicetonas.	71
Figura 54- Espectro de IV expandido na região entre $1700-1400 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos I, Hbta e fen.	72
Figura 55- Espectro de IV expandido na região entre $1350-1000 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos I, Hbta e fen.	73
Figura 56- Modos de ligação do nitrato na simetria C_{2v} .	73
Figura 57- Espectro de IV expandido na região entre $1550-1000 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos I, Hbta e fen.	74
Figura 58- Estruturas propostas dos complexos de Cu^{II} com a hidrazida bth e diferentes <i>N</i> -doadores.	76
Figura 59- Espectro de massas do composto IV.	78
Figura 60- Espectro de massas do composto V.	78
Figura 61- Espectros de RPE do complexo IV no estado sólido à 298 e 77 K.	80
Figura 62- Espectros de RPE do complexo IV em solução de DMSO à 298 e 77 K.	81
Figura 63- Espectros de RPE do complexo V no estado sólido à 298 e 77 K.	81
Figura 64- Espectro de RPE do complexo V em solução de DMSO à 298 e 77 K.	81
Figura 65- Espectros UV-vis dos compostos VI, tpy e bth nos solventes DMSO e ACN e concentração 1×10^{-5} M.	83
Figura 66- Diagramas de desdobramento de campos cristalinos de íon com configuração d^9 para uma geometria plano quadrado, gerada a partir do octaédrico.	84
Figura 67- Espectros UV-vis dos compostos IV e VI em DMSO e ACN na concentração 1×10^{-2} M.	85
Figura 68- Espectro de IV expandido na região entre $1650-1400 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos VI, bth e tpy.	87
Figura 69- Estruturas propostas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{N,N})_2(\text{NO}_3)_2]$.	89
Figura 70- Estruturas propostas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{N,N})(\text{N,N,N})](\text{PF}_6)_2$.	89
Figura 71- Espectro de massas do composto VIII.	91

Figura 72- Espectros UV-vis dos compostos VII e Clmp em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.....	93
Figura 73- Espectros UV-vis dos compostos XI, mftpy e Clmp em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.....	94
Figura 74- Gráficos de refletância difusa e UV-vis do complexo $[\text{Cu}(\text{diemp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (IX).	96
Figura 75- Gráficos de refletância difusa e UV-vis do complexo $[\text{Cu}(\text{memp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (X).	97
Figura 76- Espectros de refletância difusa e UV-vis do $[\text{Cu}(\text{mftpy})(\text{diemp})](\text{PF}_6)_2$ (XII).	98
Figura 77- Espectros de IV expandidos na região entre $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos X e memp.	99
Figura 78- Espectros de IV expandidos na região entre $1650 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos XI, Clmp e mftpy.....	100
Figura 79- Espectros UV-vis do complexo III ($3,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN ($1,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[\text{ADN}]$	107
Figura 80- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo III ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em DMSO) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$	108
Figura 81- Espectros de fluorescência após adição de concentrações crescentes do complexo III ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em DMSO) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$	109
Figura 82- Espectros UV-vis do complexo V ($4,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN ($1,21 \times 10^{-4}$ M) em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[\text{ADN}]$	110
Figura 83- Espectros UV-vis do complexo VI ($2,5 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN ($1,21 \times 10^{-4}$ M) em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[\text{ADN}]$	111
Figura 84- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo V ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$	112
Figura 85- Ancoragem molecular seguidas de simulações semi-empíricas dos complexos I-III com ct-ADN. A) representa o complexo II (bastões) ligado no sulco menor do ct-	

ADN (desenho e superfície) em uma região rica em A-T. B) representa a ligação dos complexos I (azul), II (rosa) e III (amarelo) no sulco menor do ct-ADN.	113
Figura 86- Representação esquemática das 3 formas das moléculas de ADN plasmidial.	114
Figura 87- Clivagem representativa do plasmídeo siSTRIKE™ pelo complexo II. Resultados quantitativos densitométricos da eletroforese em gel de agarose. Os dados são expressos como média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas foram determinadas utilizando testes ANOVA de uma via e o de comparações múltiplas de Tukey. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001 (em comparação com o tratamento de controle com H2O2 15 mM). **** p <<0,0001. ns não significativo.	115
Figura 88- Resultado da eletroforese em gel, mostrando o aumento da forma II e III do plasmídeo induzido pelo co-tratamento com o complexo II e H ₂ O ₂	116
Figura 89- A) Tratamento das células MCF-7 com os complexos I e II leva à apoptose tardia. B) mas sem efeitos sobre a necrose ou C) apoptose precoce. Os resultados são apresentados como uma média dos experimentos em triplicata. O teste t de Student e os dados não paramétricos foram comparados com o teste U de Mann-Whitney. Diferenças significativas em comparação com o meio são denotadas * p < 0,05.	117
Figura 90- Imagens dos riscos obtidas após 0, 24 e 48 h de incubação do composto IV (5µM) nas células tumorais de mama MDA-MB-231, em comparação com o controle e a cisplatina (5µM).	118
Figura 91- Determinação do efeito inibitório da migração celular induzida pelos complexos IV-VI, o ligante tpy e a cisplatina em células tumorais MDA-MB-231.	119
Figura 92- Determinação do efeito inibitório da migração celular induzida pelos complexos IV-VI, o ligante tpy e a cisplatina em células tumorais MCF-7.	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Relação das principais classes de agentes antineoplásicos.	6
Tabela 2- Dados da variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG° , kcal mol ⁻¹) e a constante de velocidade aparente (k_{ap} , M ⁻¹ s ⁻¹) para a reação inicial do ciclo de Haber – Weiss com os complexos de cobre(II)-AG que levam às reações de redução mais lentas em relação à reação de referência em solução aquosa a 298,15 K.	11
Tabela 3- Principais metaloenzimas de cobre.	20
Tabela 4- Dados e procedência dos reagentes utilizados nesse trabalho.	43
Tabela 5- Valores teóricos e experimentais de CHN dos complexos de Ni ^{II}	60
Tabela 6- Parâmetros de condutividade molar para diferentes tipos de eletrólito proposto por Geary e Velho.	60
Tabela 7- Valores de condutividade molar dos complexos de Ni ^{II} obtidos a partir de soluções 1×10 ⁻³ mol L ⁻¹ sob temperatura ambiente (T~25 °C).	61
Tabela 8- Valores do padrão isotópico teórico e experimental obtidos para os complexos carregados observados nos EMs dos compostos I-III.	62
Tabela 9- Dados de magnetismo dos compostos de níquel(II), a 25 °C.	65
Tabela 10- Comprimentos de ligação selecionados [Å] e ângulos [°] para o complexo II.	66
Tabela 11- Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{m\acute{a}x}$) e valores de absorvidade ($\epsilon_{m\acute{a}x}$) dos complexos sintetizados I-III.	70
Tabela 12- Valores das bandas de estiramentos N-O presente em complexos de Ni ^{II} coordenado a nitrato mono e bidentado.	74
Tabela 13- Atribuições de alguns modos de estiramento na região do infravermelho dos ligantes livres e dos complexos de Ni ^{II}	75
Tabela 14- Dados de análise elementar e condutimétrica (soluções 1×10 ⁻³ M) dos compostos de Cu ^{II}	77
Tabela 15- Valores de condutividade molar dos complexos ternários de Cu ^{II} obtidos a partir de soluções 1.10 ⁻³ mol L ⁻¹ sob temperatura ambiente (T~25 °C).	77
Tabela 16- Valores do padrão isotópico teórico e experimental obtidos para os complexos carregados observados nos EMs dos compostos IV e V.	79
Tabela 17- Dados de RPE para os compostos de cobre(II).	82
Tabela 18- Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{m\acute{a}x}$) e valores de absorvidade ($\epsilon_{m\acute{a}x}$) dos complexos sintetizados IV-VI.	85

Tabela 19- Atribuições de alguns modos de estiramento na região do infravermelho dos ligantes livres e dos complexos de Cu ^{II} com a hidrazida bth.	87
Tabela 20- Valores experimentais de análise elementar e condutimétrica dos complexos de Cu ^{II} coordenados aos ligantes iminopiridínicos.....	90
Tabela 21- Parâmetros de condutividade molar para diferentes tipos de eletrólito proposto por Geary e Velho.....	90
Tabela 22- Valores do padrão isotópico teórico e experimental obtidos para o complexo carregado observado no EMs do composto VIII.	92
Tabela 23- Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e valores de absorvidade ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos complexos sintetizados VII-XIII.....	94
Tabela 24- Valores de deslocamento da deformação do anel fora do plano e no plano dos ligantes iminopiridínicos e seus respectivos complexos de Cu ^{II}	99
Tabela 25- Atribuições de alguns modos de estiramento na região do infravermelho dos ligantes livres iminopiridínicos e dos complexos VII-XIII.	101
Tabela 26- Atividade antitumoral dos complexos de Ni ^{II} e seus ligantes.	103
Tabela 27- Atividade antitumoral dos complexos ternários de Cu ^{II} e seus ligantes.....	104
Tabela 28- Atividade antitumoral dos complexos ternários de Cu ^{II} e seus ligantes.....	105
Tabela 29- Constantes de ligação do ADN (K_b) e pontos isobésticos dos complexos de níquel(II).	108
Tabela 30- Constantes de ligação do ADN (K_b) e pontos isobésticos dos complexos ternários de cobre(II).	111
Tabela 31- Cálculos semi-empíricos obtidos a partir da interação dos compostos I-III com ct-ADN.	113

ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA = Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos
ADN = Ácido desoxirribonucleico
ct-ADN = ADN de timo de bezerro
IC₅₀ = concentração necessária para inibir 50% das células tumorais
FITC = Isotiocianato de fluoresceína
MM = massa molar (g mol⁻¹)
RPE = Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
HRESIMS = Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray*
UV-Vis = Espectroscopia no ultravioleta-visível
IV = Infravermelho
 ν = Vibração de estiramento axial
 ϵ = Coeficiente de extinção molar
A = absorvância
DMSO = dimetilsulfóxido
ACN = acetonitrila
PBS = tampão fosfato-salino
MTT = 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium.
WHO = Organização Mundial de Saúde
INCA = Instituto Nacional do câncer
bth = -benzopirano [4,3] tiofeno-2-ácido carboxílico hidrazida
fen = 1,10-fenantrolina
dmt = 4-4'-dimetóxi-2-2'-bipiridina
tpy = terpiridina
mftpy = 4-metilfenilterpiridina
bta = 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona
btc = 4-clorofenil-4,4,4-trifluoro-1,3-butanodiona
btf = 4,4,4-trifluoro-1-(2-furil)-1,3-butanodiona
Clmp = 4-cloro-N-(piriridina-2-metileno)anilina
diemp = 2,6-dietil-N-(piriridina-2-metileno)anilina
diipmp = 2,6-diisopropil-N-(piriridina-2-metileno)anilina
memp = 4-metil-N-(piriridina-2-metileno)anilina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer: Definição, causas, dados e tratamentos	1
1.2 Ciclo Celular e Agentes Neoplásicos	4
1.3 Apoptose.....	6
1.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Carcinogênese.....	8
1.5 Complexos Metálicos na terapia do Câncer	11
1.6 Aspectos químicos e biológicos do cobre	18
1.7 Metalofármacos de Cu ^{II} como potenciais agentes antitumorais.....	22
1.8 Breve aspectos químicos e biológicos do níquel.....	33
1.9 Complexos de Ni ^{II} como potenciais agentes terapêuticos.....	34
1.10 Iminopiridinas como ligantes de interesse biológico	37
2. OBJETIVO.....	42
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	43
3.1. Reagentes e Solventes.....	43
3.2. Instrumentação.....	44
3.2.1 Análise Elementar.....	44
3.2.2 Análise Condutimétrica	44
3.2.3 Difração de raios X de monocristal	44
3.2.4 Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS)	45
3.2.5 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	45
3.2.6 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis) e reflectância difusa.....	45
3.2.7 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)	45
3.2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	46
3.3. Métodos dos Estudos Biológicos.....	46
3.3.1 Citotoxicidade contra células de câncer de mama.....	46
3.3.2 Interação com ct-ADN via absorção UV-visível.....	47
3.3.3 Interação com ct-ADN por dicróismo celular	47
3.3.4 Interação com ADN por Fluorescência	48
3.3.5 Estudos de interação com ADN por Docagem Molecular	48

3.3.6	Estudos de Clivagem por eletroforese em gel de agarose	49
3.3.7	Detecção de apoptose por citometria de fluxo.....	49
3.3.8	Ensaio de Migração Celular – Método Wound Healing	50
3.4.	Síntese das Iminopiridinas	50
3.5.	Síntese dos Complexos	52
3.5.1	Complexos de Ni ^{II} coordenados a β-dicetonas e fenantrolina.....	52
3.5.2	Complexos de Cu ^{II} coordenados a hidrazida e N-doadores.....	54
3.5.3	Complexos de Cu ^{II} coordenados a iminopiridinas e 4-metilfenilterpiridina	55
4.	Resultados e Discussão	59
4.1.	Complexos de Ni ^{II} coordenados a β-dicetonas e fenantrolina	59
4.1.1	Análise Elementar e Condutimétrica.....	59
4.1.2	Espectrometria com ionização por electrospray de alta resolução	61
4.1.3	Suscetibilidade magnética	63
4.1.4	Difração de raios X de monocristal	65
4.1.5	Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis).....	67
4.1.6	Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	71
4.2.	Complexos de Cu ^{II} coordenados a hidrazida e N-doadores	76
4.2.1	Análise Elementar e Condutimétrica.....	76
4.2.2	Espectrometria com ionização por electrospray de alta resolução	77
4.2.3	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	79
4.2.4	Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)	82
4.2.5	Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	86
4.3.	Complexos de Cu ^{II} coordenados a iminopiridinas e terpiridina	88
4.3.1	Análise Elementar e Condutimétrica.....	89
4.3.2	Espectrometria com ionização por electrospray de alta resolução	90
4.3.3	Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)	92
4.3.4	Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	98
4.4.	Atividade Antitumoral <i>in vitro</i> dos complexos de Ni ^{II} e Cu ^{II}	101
4.5.	Interação com ADN	105
4.5.1	Interação com ADN dos complexos de Ni ^{II} por UV-vis e dicroísmo celular.....	107

4.5.2	Interação com ADN dos complexos de Cu ^{II} por UV-vis e dicroísmo celular.....	109
4.6.	Ancoragem Molecular dos complexos de Ni ^{II}	112
4.7.	Clivagem dos complexos de Ni ^{II}	114
4.8.	Apoptose dos complexos de Ni ^{II}	117
4.9.	Ensaio de migração celular dos complexos de Cu ^{II} coordenados a hidrazida e N-doadores – método Wound Healing	118
5.	CONCLUSÃO	121
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
7.	ANEXOS.....	148
8.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	171

1. INTRODUÇÃO

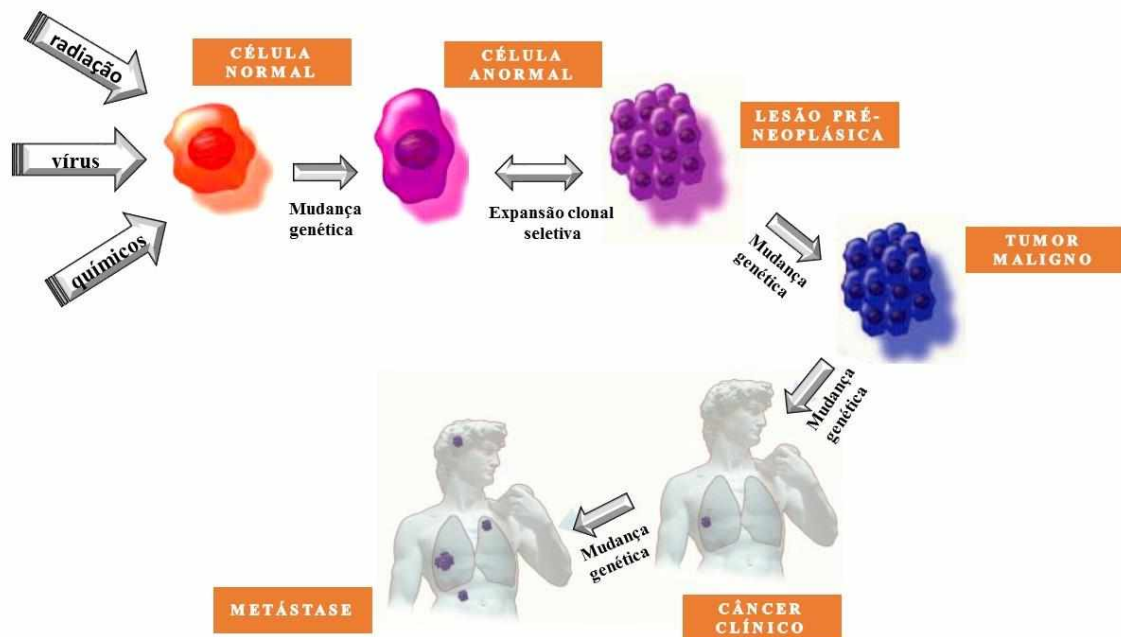
1.1 Câncer: Definição, causas, dados e tratamentos

Câncer é um termo utilizado especificamente para tumores malignos que pode ser definido como um conjunto de doenças crônico-degenerativas, desencadeadas pelo crescimento desordenado de células que passam a sofrer mutação, provocando danos em um ou mais genes de uma única célula (LIBENSON; JENA, 1978; VINEIS, 1993; MALARKEY; HOENERHOFF; MARONPOT, 2013). Os dois genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes que estimulam o crescimento celular, impedindo a diferenciação e a morte celular e os genes supressores de tumor que limitam a proliferação das células (MALARKEY; HOENERHOFF; MARONPOT, 2013).

O processo de formação do câncer denominado carcinogênese é atribuído ao acúmulo progressivo de alterações gênicas em decorrência de fatores externos (químicos, tabaco, radiações e infecções tais como hepatite e papilomavírus humano) ou internos (mutações herdadas ou que podem ocorrer durante o metabolismo, hormônios e condições imunológicas) que atuando juntos ou em sequência desencadeiam alterações genéticas que impulsionam a transformação progressiva de células normais em malignas, como demonstrado por Hanahan e Weinberg em seus trabalhos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A transformação de uma célula normal em célula tumoral pode ser dividida em diferentes fases, classificadas em iniciação, promoção e progressão (DE ALMEIDA et al., 2005), Figura 1. A fase inicial do desenvolvimento do tumor ocorre quando em alguma fase do ciclo celular os genes sofrem alguma anomalia, por exemplo, algum dano no ADN e os inibidores do ciclo celular falham na tarefa de destruir e limitar essas células anormais. A fase de promoção inclui a proliferação clonal das células devido às novas se tornarem cada vez mais anormais, eventualmente marcadas pelas células cancerosas que invadem órgãos e tecidos dando origem ao tumor maligno (células que se empilham umas sobre as outras, formando uma massa de tecido) (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004). Por último, a fase progressiva que inclui a etapa agressiva da doença, metástase, que é quando as células cancerosas têm a capacidade de migrar para outras partes do corpo e promover a angiogênese, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1- Representação do mecanismo de desenvolvimento de tumores malignos.



Fonte: Adaptado de (“Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/situacao/arquivos/carcinogenese.pdf> Acesso em: 26/01/2021”)

Diferentes tipos de câncer envolvem diferentes tipos de mutação e cada tumor individual tem um conjunto único de alterações genéticas. Atualmente, existem mais de 200 tipos de câncer na literatura médica mundial que são classificados de acordo com o tipo de célula normal que os originou e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou_ (“CANCER RESEARCH UK. Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer> Acesso em: 26/01/2021”). Cânceres originados de células epiteliais são denominados carcinomas e aqueles originados a partir de tecidos conjuntivos são classificados como sarcomas. Por sua vez, os linfomas originam-se a partir de células conhecidas como linfócitos, a leucemia a partir das células da medula óssea, o mieloma tem sua origem nas células plasmáticas da medula óssea, os tumores das células germinativas desenvolvem-se a partir de células dos testículos e/ou dos ovários, os melanomas originam-se das células da pele, gliomas a partir das células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal e neuroblastomas e o tumor pediátrico que é derivado de células malignas embrionárias (DE ALMEIDA et al., 2005).

A discussão sobre o câncer envolve questões mundiais de saúde pública pelo aumento expressivo no número de pacientes oncológicos, como mostra os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Somente em 2020, aproximadamente 10 milhões de pessoas no mundo morreram em decorrência de diversas neoplasias. Destaque para o câncer de pulmão, o

maior em números de casos tanto em incidência quanto em mortalidade. Nos países de baixa e média renda os índices são mais preocupantes devido à falta de programas eficazes e acessíveis de diagnóstico precoce, triagem, tratamento e cuidados paliativos disponíveis no setor público. Em 2017, por exemplo, apenas 30% dos países de baixa renda relataram ter serviços adequados de tratamento para o câncer. Por outro lado, 90% dos países de alta renda possuem serviços de tratamento contra o câncer à disposição da população (“World Health Organization (WHO). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>. Acesso em: 26/01/2021”).

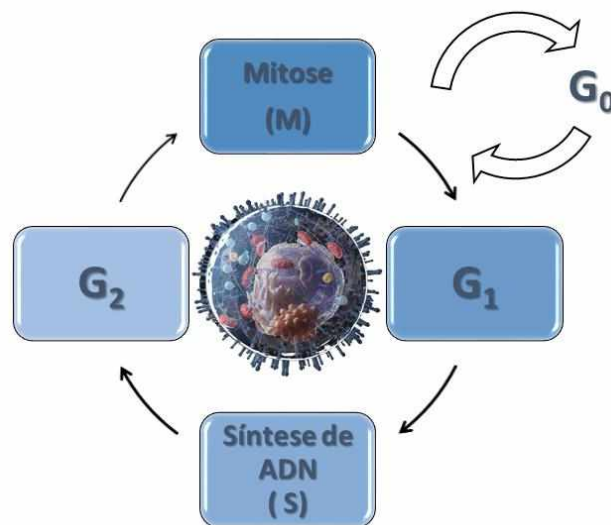
Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, as estratégias utilizadas como formas de tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia alvo, terapia hormonal e transplante de medula óssea (“National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. Acesso em: 26/01/2021”). Contudo, a forma de tratamento indicada depende da localização, do tipo de tumor, da condição clínica do paciente e do estágio em que a doença se encontra, de forma que na maioria das vezes é preciso combinar mais de uma forma de tratamento com a finalidade de obter a cura. A cirurgia é considerada a forma mais eficaz na tentativa de remover totalmente o tumor, principalmente quando o tumor se encontra na fase inicial. A radioterapia é um tratamento contra o câncer que utiliza radiação ionizante (na faixa dos raios X) para matar células cancerígenas e impedir que as células do tumor aumentem, podendo ser usada em combinação com a quimioterapia ou outros métodos. Na quimioterapia de tumores sólidos, o fármaco antitumoral é transportado na corrente sanguínea até alcançar e destruir as células tumorais. Vários fatores como composição, estrutura, tamanho, configuração, carga e hidrofobicidade são importantes para que o agente terapêutico exerça sua função de matar ou impedir a divisão das células cancerosas que formam um determinado tipo de tumor (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). O tratamento pode ser feito por via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal ou tópico. A questão atualmente é que nem sempre estes métodos de tratamento são úteis e os resultados clínicos são aceitáveis. Alguns obstáculos como: i) resistência do tumor ao fármaco em nível de barreiras fisiológicas (mecanismos não celulares) ii) resistência do tumor ao fármaco em nível celular e, iii) a distribuição, biotransformação e eliminação dos fármacos pelo organismo (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002) precisam ser superados para que o tratamento da quimioterapia ocorra como esperado. Deste modo, necessita-se de novas abordagens terapêuticas para que estes obstáculos sejam superados.

1.2 Ciclo Celular e Agentes Neoplásicos

Para que uma célula normal se torne maligna ou anormal é necessário transpor uma série de fatores fisiológicos do corpo e os diversos mecanismos de reparos. Uma vez que os mecanismos de reparo das células podem ser executados a partir do ciclo celular, a falha persistente nesses mecanismos leva a carcinogênese (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008).

O ciclo celular é uma sequência complexa de eventos onde ocorre o processo de replicação do ADN em que a divisão celular pode ser descrita como uma série de cinco etapas estabelecidas em G₁, S (síntese do ADN), G₂, M (divisão celular) e G₀ que ocorrem em uma ordem fixa, controlada ou estimulada através de vias sinalizadoras (fatores extracelulares) como mostra a figura 2 (WARD, 2002). As vias sinalizadoras são importantes para garantir a replicação correta do material genético, segregação dos cromossomos e coordenar a diferenciação, senescência e morte celular. Falhas nessas vias favorecem o surgimento de mutações genéticas capazes de causar câncer (MALUMBRES; BARBACID, 2009; JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017).

Figura 2- Esquema das etapas do ciclo celular.



Fonte: Adaptada de (JINGWEN; YAOCHEN; GUOJUN, 2017)

As células que deixaram o ciclo e que não estão se replicando apresentam-se na fase G₀. Nesta fase, o ADN está superenovelado com atividade metabólica baixa. Quando as células passam para a fase G₁, há a preparação da célula para a multiplicação e a produção de constituintes celulares como fosfatos, riboses, sínteses de nucleotídeos, aminoácidos, síntese de proteínas, enzimas dentre outros componentes que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de ADN na fase S.

Na fase G₂ há a síntese de componentes para a mitose como a produção do fuso mitótico que é feita na fase M. Após a divisão do material nuclear há a citocinese, que é a separação da célula mãe gerando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares, finalizando assim o ciclo de replicação celular e retornando à fase G₀.

O princípio do ciclo celular e as passagens por suas fases são controlados e regulados por proteínas, como as ciclinas codificadas por genes supressores tumorais e as quinases dependentes de ciclinas (CDK) codificadas por proto-oncogenes que atuam de forma positiva induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, mantendo as células em divisão e levando-as à apoptose (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997). A progressão pelo ciclo celular é, em parte, controlada, pelas CDKs, particularmente nas transições de fases, tanto de G₁ para S quanto de G₂ para M. Estes mecanismos reguladores garantem que as células com ADN modificado na fase G₁ não passem para a fase S (JINGWEN; YAOSHEN; GUOJUN, 2017). Caso ocorra a mutação no gene dessas proteínas, os reguladores positivos podem ser superativados a oncogenes aumentando a possibilidades do surgimento de tumores.

Um dos mais importantes supressores de tumor é a proteína p53, que desempenha um papel-chave na resposta celular ao dano no ADN. A p53 age primeiramente ao final da fase G₁ (controlando a transição de G₁ para S), onde ela bloqueia a progressão do ciclo celular em resposta a um ADN danificado e a outras condições desfavoráveis, evitando assim que a informação genética incorreta seja transmitida para as células-filhas. Portanto, mutações em genes supressores de tumor que inibem a proliferação celular ou induzem a apoptose podem alterar o ciclo celular e favorecer o aparecimento de tumores (MASSAGUÉ, 2004).

Os medicamentos utilizados na quimioterapia atuam sobre as células em diferentes fases do ciclo celular, por isso, é importante compreender o mecanismo de ação desses fármacos e a divisão do ciclo celular, ajudando a prever quais medicamentos provavelmente funcionarão em conjunto e com que frequência as doses de cada fármaco devem ser administradas com base no tempo das fases celulares.

A maioria desses agentes antineoplásicos são classificados de acordo com sua estrutura ou sob a ação que exercem sobre as células que se encontram no ciclo celular. Existem dois grupos de agentes antineoplásicos listados na Tabela 1. Os que atuam no ciclo celular denominados como ciclo celular-específicos (CCS, “Cell cycle-Specific”) atuando na fase S e bloqueando bioquimicamente a síntese do ADN como: metotrexato (MXT), 5-fluorouracil (5-FU) e 6-mercaptopurina (6-MP). Aqueles que agem em células tumorais independentemente de estarem no ciclo celular ou na fase G₀, classificados como agentes de ciclo-celular não específicos (CCNS, “Cell Cycle-Non Specific”). Os CCNS atuam de diversas maneiras

possibilitando distintos mecanismo de ação, como por exemplo: i) interagem diretamente com o ADN, como os complexos de coordenação de Pt; ii) formam radicais livres que interagem com o ADN fragmentando suas hélices, como a bleomicina; iii) interagindo com o suco menor do ADN, como os fármacos berenil, pentamidina e análogos; iv) alterando as propriedades de pareamento das bases, como os agentes intercalantes proflavina, acridina, amsacrina v) inibindo a topoisomerase, como a doxorubicina (DE ALMEIDA et al., 2005; MANGUEIRA, 2015).

Os agentes antineoplásicos podem interagir quimicamente com o ADN e não serem ativos somente no processo de divisão celular. Na literatura são descritos muitos alvos biológicos que podem ser estudados com o intuito de se estabelecer novos candidatos a fármacos antitumorais, sendo o ADN um dos alvos mais estudados.

Tabela 1- Relação das principais classes de agentes antineoplásicos.

Agentes ciclo-celular específicos	Agentes ciclo-celular não específicos
1. Antimetabólitos	4. Complexos de Coordenação de Platina
2. Hormonais	5. Agentes Alquilantes Diversos
3. Produtos Naturais:	6. Produtos Naturais:
3.1. Alcaloides vegetais	6.1. Antibióticos Naturais
3.2. Enzimas	6.2. Alcalóides pirrolizidínicos

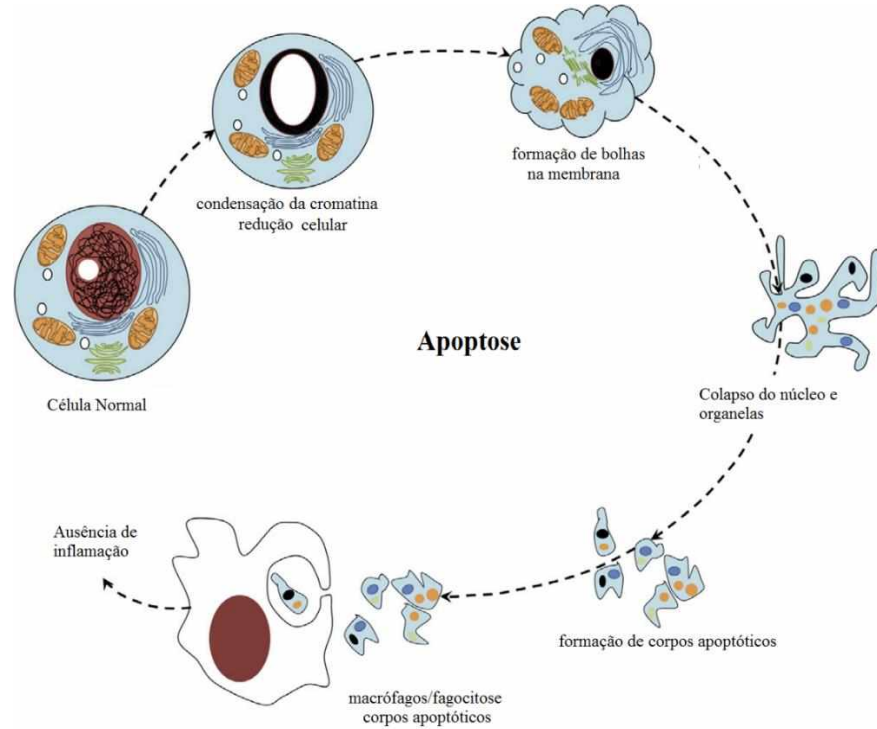
1.3 Apoptose

Na maioria das vezes, a atividade neoplásica está relacionada com a capacidade de induzir morte celular como resposta a estímulos intra ou extracelulares. Os processos de morte celular são classificados morfológica e bioquimicamente em: apoptose, autofagia, necrose e mitose catastrófica (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Discutiremos detalhadamente a apoptose, processo de morte celular programada caracterizado por distintas mudanças morfológica e mecanismo bioquímico. Esse mecanismo é considerado um componente vital em vários processos, tal como no desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, renovação celular normal e manutenção da homeostase em tecidos adultos (ELMORE, 2007).

Os diferentes estágios da morte celular apoptótica, Figura 3, iniciam-se pela quebra da cromatina no núcleo levando à sua condensação e encolhimento celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a próxima fase é caracterizada pela formação de bolhas na membrana celular, alterando o posicionamento de seus lipídios constituintes. Nas fases finais é observado formação de corpos apoptóticos oriundos de organelas, fragmentos do núcleo e

bolhas que são eventualmente absorvidos por macrófagos ou células vizinhas pelos processos de endocitose/fagocitose. A falta de liberação de componentes celulares no fluido extracelular resulta na ausência de inflamação ou necrose (ABOU-GHALI; STIBAN, 2015; KADAM; ABHANG, 2016).

Figura 3 - Estágios da morte celular apoptótica.



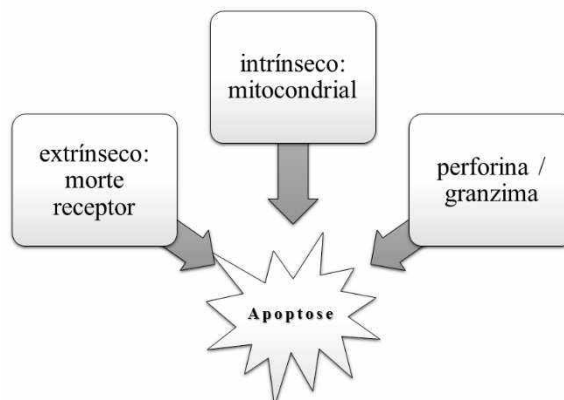
Fonte: Adaptado de (ABOU-GHALI; STIBAN, 2015)

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e envolvem duas vias apoptóticas. As vias extrínsecas (receptor de morte), onde receptores específicos à morte celular localizados na membrana celular são ativados e as vias intrínsecas (mitocondriais), nas quais sinais de morte originados por estresse intracelular, incluindo radiação e drogas quimioterapêuticas, ativam um programa intrínseco de apoptose que é mediado amplamente pelas mitocôndrias. No entanto, existem evidências de que essas vias estão interligadas e moléculas de uma via pode influenciar na outra. Existe um caminho adicional que pode induzir apoptose e envolve citotoxicidade mediada por células T, denominada via perforina-granzima A ou B (GrA ou GrB) (ELMORE, 2007).

As vias extrínseca, intrínseca e de granzima B (GrB) convergem no mesmo caminho que conduz a apoptose (Fig. 4). Este caminho é iniciado pela clivagem da caspase-3 e resulta na fragmentação do ADN, degradação de proteínas citoesqueléticas e nucleares, reticulação de proteínas, formação de corpos apoptóticos, fagocitose e, finalmente, captação pelas células

fagocíticas. A via granzima A (GrA) ativa uma via paralela de morte celular independente da caspase por danos no ADN de fita simples (KADAM; ABHANG, 2016).

Figura 4 - Vias de mecanismo que conduzem a apoptose.



Fonte: Adaptado de (KADAM; ABHANG, 2016)

Quando o ADN de uma célula é danificado, a próxima etapa é a sua reparação, caso não ocorra, a célula entra em processo de apoptose, o que garante a não transmissão de seu ADN danificado. A falha na maquinaria apoptótica leva a evolução neoplásica que ocorre pela somatória de fatores de proliferação celular desregulada juntamente com o comprometimento dos pontos de verificação da apoptose (KADAM; ABHANG, 2016).

Mesmo que a resistência a apoptose seja considerada uma das causas da evolução tumoral, estudos recentes mostraram que a apoptose desempenha um papel importante no tratamento do câncer, pois esse mecanismo contribui para a atividade antitumoral de muitos fármacos quimioterapêuticos, permitindo repensar um novo mecanismo de resistência intrínseca para os fármacos antitumorais. Assim, a indução a apoptose é considerada um importante alvo em muitas estratégias de tratamento.

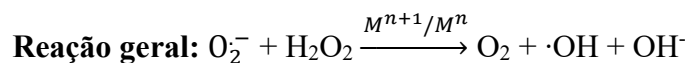
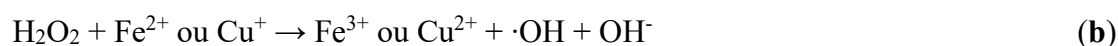
1.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Carcinogênese

Em uma célula normal, existe uma condição de homeostase entre a formação de radical livre e a defesa antioxidante. Essas espécies oxidante e antioxidante são importantes para manter a funcionalização do metabolismo celular, na transdução de sinal e regulação das funções das células. A perturbação nesse equilíbrio gera estresse oxidativo, o que favorece o ambiente oxidante levando à perda de funções celulares tendo como consequência o desenvolvimento de doenças como o câncer, como exemplo. (LIOU; STORZ, 2010; KUMARI et al., 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas radicalares e não radicalares

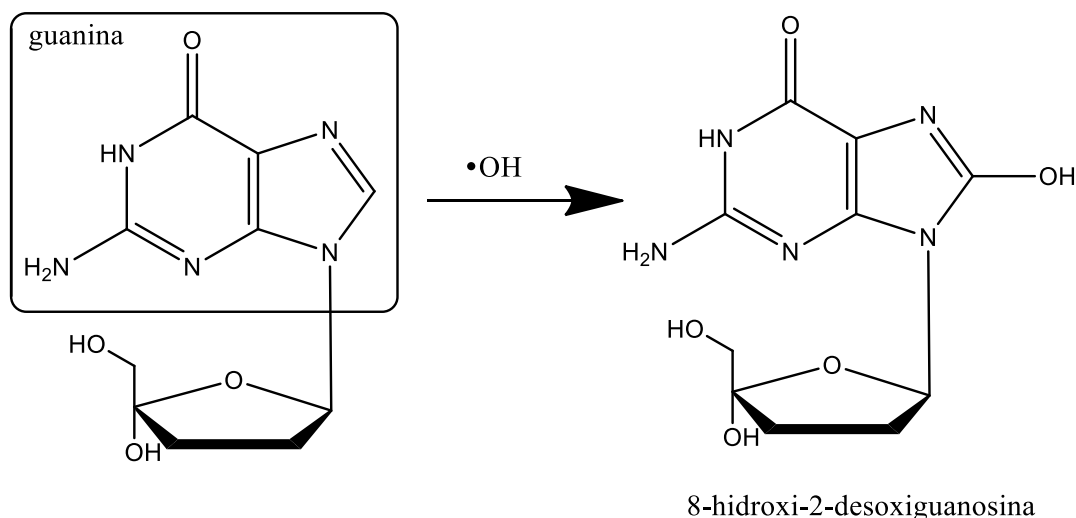
como o ânion radical superóxido (O_2^-), radical hidróxido ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que desempenham um papel vital em todas as fases no desenvolvimento do câncer. O aumento dos níveis intracelulares de EROs pode resultar na ativação de oncogenes e sinais oncogênicos, que participam da proliferação celular e inativação de genes supressores de tumor, angiogênese e disfunção mitocondrial. O alto metabolismo de EROs também pode desencadear maior potencial metastático (KUMARI et al., 2018).

O peróxido de hidrogênio, por exemplo, é considerado um importante componente na toxicidade das células, pois pode se acumular formando EROs. A toxicidade do H_2O_2 é baseada na sua conversão ao radical hidroxila ($\cdot OH$), como mostrado na reação **a**, como em **b** (reação de Fenton) para alguns metais de transição (Fe^{II} , Cu^I , Cr^{III} , Co^{II} , Ni^{II} , V^V) ou pela reação de Haber-Weiss com o ânion-radical superóxido, reação **c**. A combinação das reações (**d**) e (**b**) com o radical superóxido resulta na formação do radical hidroxila (reação geral), onde os metais nessas etapas atuam como catalisadores da reação (GUPTE; MUMPER, 2009).



O radical hidroxila ($\cdot OH$) é o radical mais oxidante gerado no corpo humano e pode causar danos ao ADN, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares. A interação de EROs com ADN resulta na ruptura da cadeia da 2-desoxiguanosina (2dG), pela oxidação da base nucleotídica da guanina no ADN, acarretando na formação da 8-hidroxi-2-desoxiguanosina ou 8-OHdG conforme Figura 5 (GUPTE; MUMPER, 2009).

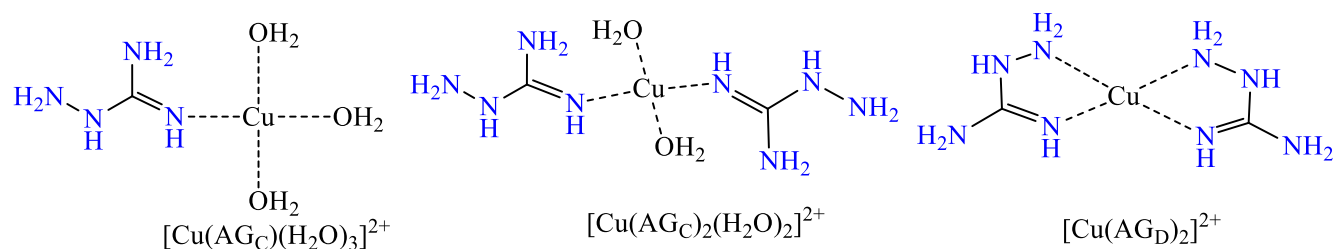
Figura 5- Oxidação na porção guanina do ADN causada pelo radical hidroxila.



Fonte: Adaptado de (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006)

É importante enfatizar o papel do Cu^{2+} no processo de danificar a fita do ADN, como um catalisador na formação de EROs, uma vez que na sua ausência, danos menores foram observados (CERVANTES-CERVANTES et al., 2005). O estudo termodinâmico e cinético envolvido no processo de formação de EROs foi relatado recentemente por García-Díez e colaboradores ao explorar a relação termodinâmica e a cinética de redução dos complexos de Cu^{II} coordenados a aminoguanidina (AG) em suas diferentes formas (Figura 6). O complexo mais estável termodinamicamente, $[\text{Cu}(\text{AG}_D)_2]^{2+}$, com valor de ΔG_f^0 próximo a $-29,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ pode diminuir em 2,8 vezes a primeira etapa do ciclo de Haber-Weiss em comparação com a reação de referência. Os autores concluíram, conforme os dados dispostos na Tabela 2, que quanto menor a espontaneidade da reação de redução e sua constante de velocidade (K e K_{ap}), menores serão os danos causados, por exemplo ao ADN ao diminuir a velocidade da reação de Haber-Weiss e assim formar radicais $\bullet\text{OH}$ (GARCÍA-DÍEZ; RAMIS; MORA-DIEZ, 2020).

Figura 6- Representação das estruturas otimizadas dos complexos de Cu com AG em solução aquosa.



Fonte: Adaptado de (GARCÍA-DÍEZ; RAMIS; MORA-DIEZ, 2020)

Tabela 2- Dados da variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG° , kcal mol⁻¹) e a constante de velocidade aparente (k_{ap} , M⁻¹ s⁻¹) para a reação inicial do ciclo de Haber – Weiss com os complexos de cobre(II)-AG que levam às reações de redução mais lentas em relação à reação de referência em solução aquosa a 298,15 K.

Reação	ΔG° (Kcal mol ⁻¹)	K_{ap} (M ⁻¹ s ⁻¹)
$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+} + \text{O}_2^- \rightarrow [\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2]^+ \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (referência)	-32,6	$7,71 \times 10^9$
$[\text{Cu}(\text{AG}_C)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+} + \text{O}_2^- \rightarrow [\text{Cu}(\text{AG}_C)(\text{H}_2\text{O})]^+ \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	-31,4	$7,67 \times 10^9$
$[\text{Cu}(\text{AG}_C)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} + \text{O}_2^- \rightarrow [\text{Cu}(\text{AG}_C)_2]^+ \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	-29,4	$7,96 \times 10^9$
$[\text{Cu}(\text{AG}_D)_2]^{2+} + \text{O}_2^- \rightarrow [\text{Cu}(\text{AG}_D)_2]^+ + \text{O}_2$	-11,6	$2,80 \times 10^9$

Fonte: Adaptado de (GARCÍA-DÍEZ; RAMIS; MORA-DIEZ, 2020)

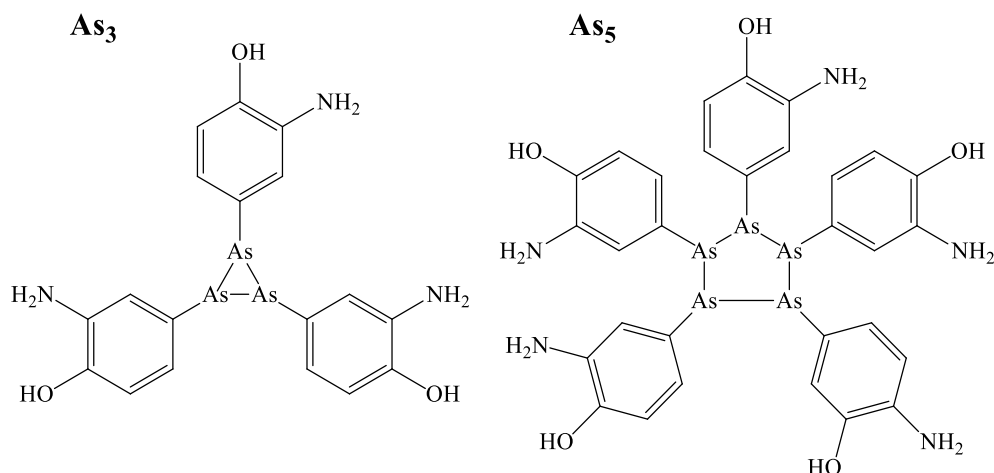
A busca por novas estratégias no tratamento do câncer mostrou que a produção de EROs (H₂O₂ e/ou superóxido) em células cancerígenas por compostos orgânicos ou metálicos pode ser uma boa alternativa contra o câncer. Verificou-se que um composto de ocorrência natural contendo enxofre, o isotiocianato de β -feniletil (PEITC), induz EROs provocando a morte programada das células tumorais. O que chama a atenção é o fato de que o composto não provocou apoptose em células normais, sugerindo a possibilidade de usar essa estratégia para melhorar a seletividade contra células cancerígenas (WU; HUA, 2007). Comprovadamente, alguns quimioterápicos como TRISENOX® (trióxido de arsênio), aprovado no ano de 2000 pela U.S. Food e Drug Administration (FDA) para tratamento de leucemia promielocítica aguda, foi relatado como indutor de ERO (GUPTE; MUMPER, 2009). De fato, muitos outros quimioterápicos, como a antraciclina, doxorubicina, bleomicina e complexos de coordenação de platina (SHALOAM; TCHOUNWOU, 2014), também visam mitocôndrias e induzem a geração de EROs celular (CONKLIN, 2004).

1.5 Complexos Metálicos na terapia do Câncer

A introdução de compostos metálicos na quimioterapia ocorreu no início do século XX com o Salvarsan (As₁), uma mistura de compostos 3-amino-4-hidroxifenil-As^{III} contendo as espécies acíclicas As₃ e As₅ (Fig.7). Salvarsan, desenvolvido por Paul Ehrlich, foi comercializado pela Hoechst para tratar sífilis dando início a quimioterapia moderna (WILLIAMS, 2009). Contudo, foi com a descoberta das propriedades antitumorais de compostos de coordenação de platina feita por Barnett Rosenberg em 1965 que trouxe uma

nova concepção para utilização de compostos metálicos no tratamento do câncer.

Figura 7- Compostos de arsênio utilizados no tratamento da sífilis.



Fonte: A autora.

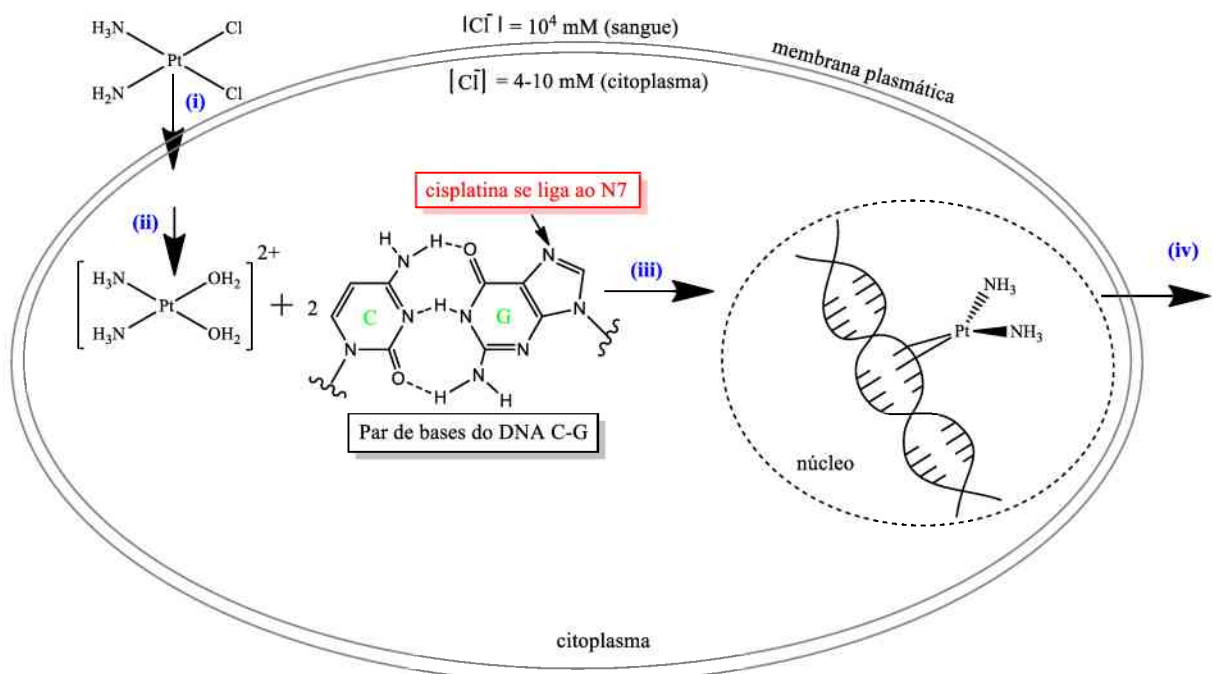
Em seus trabalhos, Rosenberg descobriu de forma acidental que complexos de platina eram capazes de inibir a divisão da *Escherichia coli*. Dentre estes, o isômero *cis*-[Pt(NH₃)₂(Cl)₂] era o mais ativo. Além da atividade antibacteriana, Rosenberg descobriu posteriormente, que o isômero *cis* apresentava propriedades antitumorais e que o isômero *trans* exibia pouca atividade antitumoral em células de sarcoma 180 e leucemia L1210 (MAKOVEC, 2019). Como resultado de seus trabalhos, em 1971 a cisplatina foi administrada pela primeira vez em um paciente oncológico.

A inserção de compostos de platina como agentes quimioterápicos no tratamento do câncer foi um grande avanço na medicina moderna, sendo que a implementação da cisplatina em 1978 possibilitou que pacientes diagnosticados com câncer de testículo em estágio inicial tivessem até 95% de chances de cura da doença. Além disso, a cisplatina é eficaz no combate a diferentes tipos de câncer, incluindo sarcomas, câncer dos tecidos moles, ossos, músculos e vasos sanguíneos (KELLAND, 2007; SHALOAM; TCHOUNWOU, 2014).

O mecanismo de ação da cisplatina ocorre em quatro etapas e a sua atividade antitumoral está relacionada com a labilidade dos ligantes cloridos no meio intracelular, que levam a formação de adutos cisplatina-ADN. Mesmo o ADN sendo o principal alvo no mecanismo, sabe-se que mais de 90% da dose de cisplatina administrada por via intravenosa é desativada por ligações com proteínas do plasma sanguíneo, como a albumina sérica humana. Uma molécula de albumina se liga a cinco moléculas de cisplatina. O fragmento *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl]⁺ se liga ao átomo de nitrogênio da His105 e His288 e aos átomos de enxofre da Met329, Met298 e Met548 da albumina (NIKOLAOU; SILVA, 2018; OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018; MAKOVEC, 2019).

As etapas do mecanismo da cisplatina podem ser descritos como (i) internalização (ou “uptake” celular), (ii) aquação, (iii) platinação e (iv) apoptose, como apresentado no esquema da Figura 8. Na primeira etapa, o composto entra na célula por difusão passiva ou transporte ativo. Uma vez dentro da célula, a concentração de íons cloretos (4-10 nM) diminui, de modo que a cisplatina passa por reações de substituições, processo descrito como aquação, em que há a saída dos ligantes cloridos e entrada de moléculas de água formando espécies catiônicas como $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ e $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Essas espécies ativas interagem com o ADN substituindo as moléculas de água por nitrogênios das bases purinas. Os sítios mais nucleofílicos do ADN, que são preferencialmente platinados, são os átomos de nitrogênio sete (N7) da guanina. A velocidade média de formação de adutos monofuncionais entre a platina e o par de bases guanina do ADN é de aproximadamente $10,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, enquanto que a velocidade de formação dos adutos bifuncionais, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{pGpG})\}]$, é de $9,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. A meia-vida para aquação e ligação ao ADN é, portanto, aproximadamente 2 h (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2015). Os danos causados no ADN induz a parada no ciclo celular na fase G2 e estudos sugerem que a parada da divisão celular nessa fase é essencial para causar a apoptose (SORENSEN; EASTMAN, 1988; SHALOAM; TCHOUNWOU, 2014).

Figura 8- Mecanismo de ação da cisplatina.

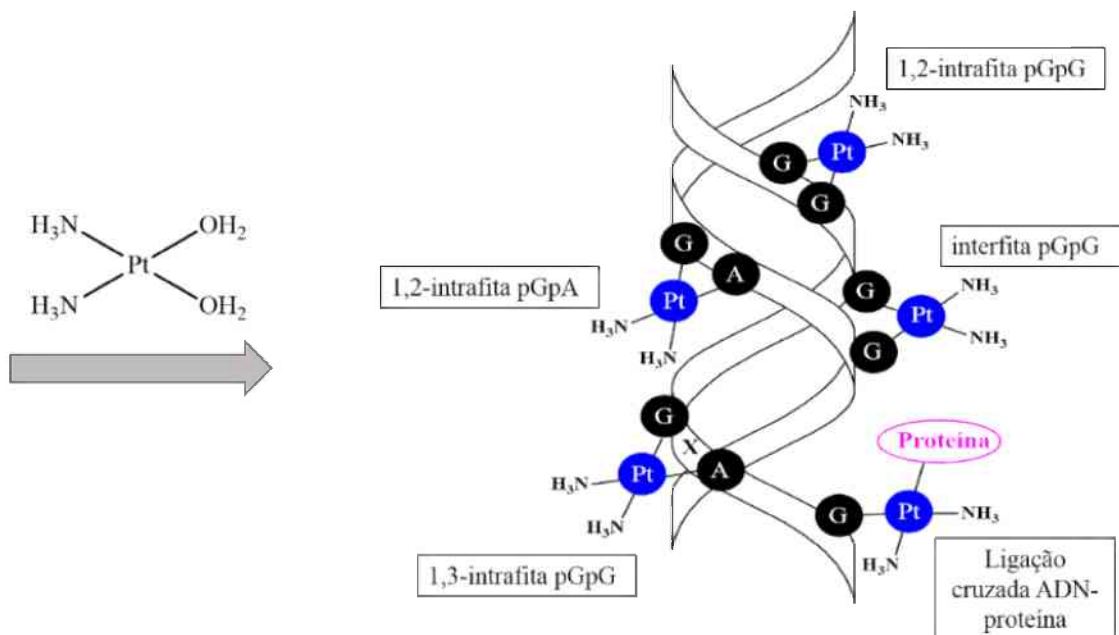


Fonte: Adaptado de (KELLAND, 2007; JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2015).

Os principais adutos formados entre a cisplatina e o ADN são os monofuncionais no qual cada átomo de platina faz uma ligação ao ADN e os bifuncionais onde cada platina se liga em duas posições ao ADN. A Figura 9 traz as principais representações dos adutos formados

entre a platina e o ADN. O efeito citotóxico da cisplatina baseia-se na formação de adutos entre a cisplatina e as purinas guanina (G) ou adenina (A) que se encontram na mesma fita do ADN, formando ligações cruzadas do tipo 1,2-ou 1,3-intrafita pGpG e ligação cruzada intrafita pApG, promovendo lesões de difícil reparo. As demais ligações são representadas por ligações cruzadas interfita (fitas diferentes do ADN) e ligação cruzada ADN-proteína (GONZALEZ et al., 2001).

Figura 9- Principais adutos formados entre cisplatina e ADN.



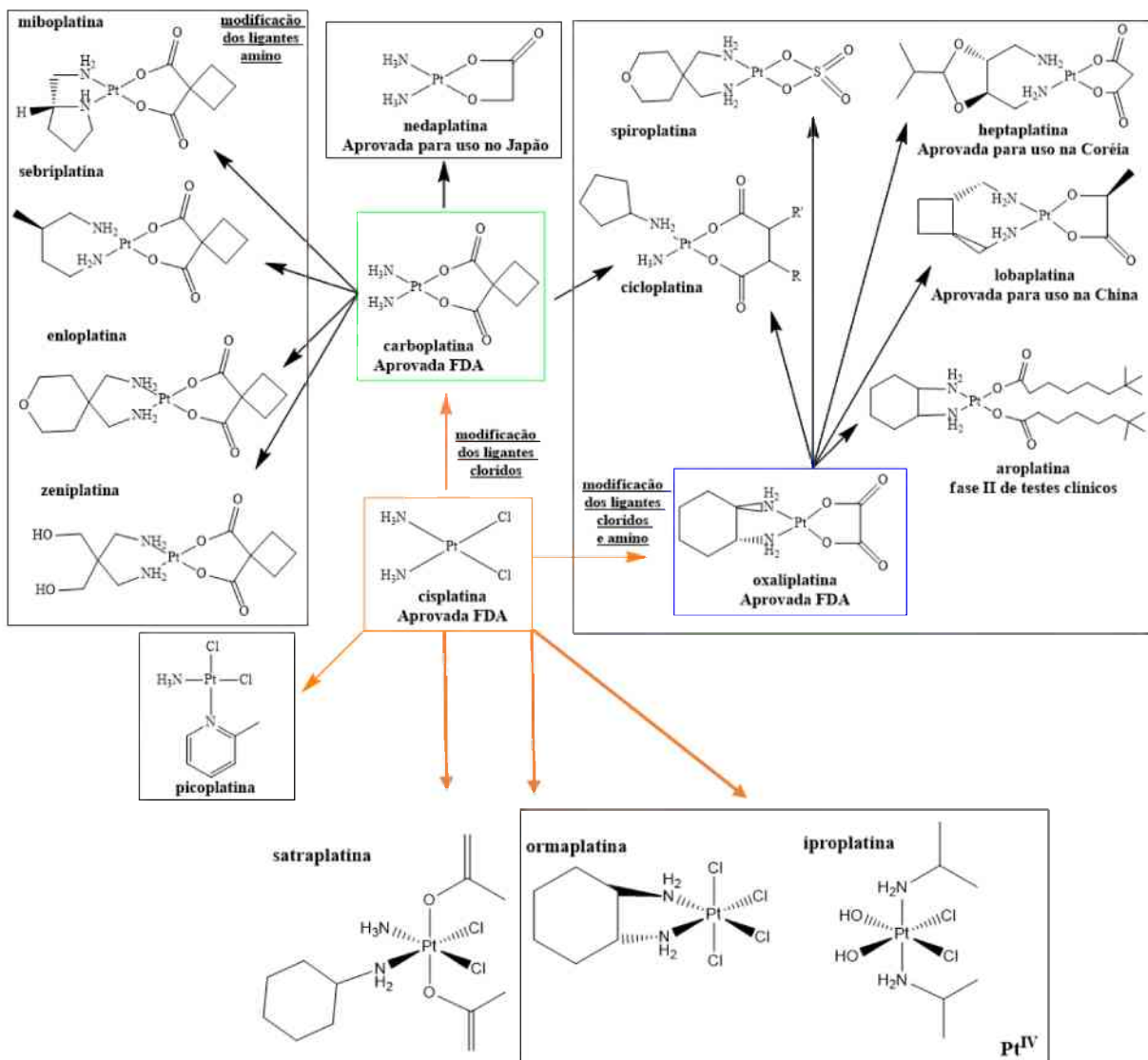
Fonte: Adaptado de (GONZALEZ et al., 2001)

Apesar de ser amplamente empregada no tratamento do câncer, o uso da cisplatina é restrito devido as reações adversas indesejáveis que são decorrentes da absorção indiscriminada do medicamento por todas as células do corpo, ocasionando, por exemplo, a diminuição na produção de medula óssea (mielossupressão) e nefrotoxicidade (WHEATE et al., 2010), além de neurotoxicidade, ototoxicidade e toxicidade gastrointestinal, incluindo-se aí náusea, vômito e dispepsia (refluxo) (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018).

Em função das limitações e o surgimento a resistência à cisplatina, a busca por novos compostos de platina com propriedades anticancerígenas e farmacocinéticas aprimoradas foram fundamentais. Os compostos análogos à cisplatina apresentados na Figura 10, como a carboplatina, nedaplatina e oxaliplatina são classificados como fármacos da segunda geração e a satraplatina e picoplatina como fármacos da terceira geração. Os demais compostos lobaplatina, cicloplatina, heptaplatina, spiroplatina, aroplatina, enloplatina, zeniplatina,

sebriplatina, miboplatina e iproplatina são produtos de extensas pesquisas e foram planejados de acordo com seus derivados, como mostra a Figura 10 (KELLAND, 2007; BARNARD, 2017; NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017). A maioria dos compostos foram preparados com base na relação toxicidade de um fármaco e seu nível de reatividade. A carboplatina é um exemplo desse planejamento, pois os ligantes cloridos foram substituídos pelo ligante bidentado bis-carboxilato induzindo uma redução significativa da aquação devido a menor labilidade do grupo de saída e com isso, os resultados de toxicidade foram menores em comparação à cisplatina (WHEATE et al., 2010).

Figura 10- Compostos de platina utilizados e em fase de testes clínicos no tratamento do câncer.



Fonte: Adaptado de (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017)

Dos compostos de platina(II) apresentados na Figura 10, apenas treze foram avaliados em ensaios clínicos e somente cinco receberam aprovação em vários países: carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina, esta última, utilizada apenas no Japão para tratar câncer de cabeça,

lobaplatina na China e heptaplatina na Coréia. Com destaque, a oxaliplatina que é o único fármaco capaz de superar a resistência adquirida pela platina, pela formação de diferentes adutos com o ADN quando comparado à cisplatina e carboplatina (WEHBE et al., 2017). Mesmo exibindo menor nefrotoxicidade e ototoxicidade, os fármacos carboplatina e oxaliplatina ainda são considerados menos eficientes que a cisplatina.

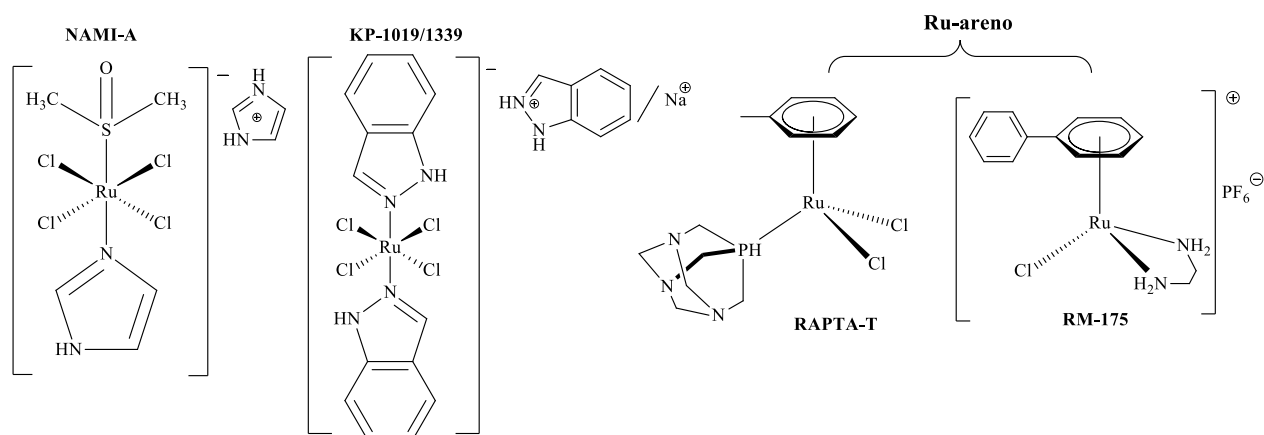
O sucesso da cisplatina na quimioterapia do câncer despertou um grande interesse em obter complexos com diferentes metais e ativos, principalmente em células resistentes e com diferentes alvos biológicos, que permita superar os mecanismos de resistência aos complexos de platina (SANTINI et al., 2014; BRISSOS; CAUBET; GAMEZ, 2015).

O uso de medicamentos baseados em complexos metálicos oferece a possibilidade de versatilidade estrutural e química, em comparação com moléculas orgânicas. De fato, enquanto o átomo de carbono é restrito às geometrias linear, trigonal planar e tetraédrica, complexos metálicos com números de coordenação maiores que quatro permitirão obter maiores diversidades estruturais possibilitando uma ampla gama de vantagens para os metais interagirem e coordenarem a moléculas biológicas. As características químicas desses íons são atribuídas por serem ácidos de Lewis e apresentarem propriedades redox no meio intracelular. A utilização de pró-fármacos é uma estratégia utilizada por serem reduzidos em ambientes hipóxicos como das células tumorais, originando então as espécies ativas, que atacariam o alvo mais facilmente (ZHANG; SADLER, 2017; ANTHONY et al., 2020). Portanto, o caráter redutor das células cancerígenas ao promover a redução dos metais o que não é possível em células normais, fornece assim uma oportunidade terapêutica para direcionar os tumores (TABTI et al., 2017).

Dentre os íons metálicos considerados centros de coordenação de potenciais agentes anticâncer, os de platina e rutênio, são os mais amplamente investigados. Compostos de Ru^{III} como NAMI-A e KP1019/1339 (Figura 11), foram examinados a ensaios clínicos e os resultados mostraram que o composto NAMI-A se liga a proteínas séricas e fracamente ao ADN e RNA e sua principal característica é impedir a metástase, porém o composto foi descartado e saiu da fase II de testes clínicos, pois apresentou alta toxicidade (ALESSIO; MESSORI, 2019). Enquanto isso, o complexo KP1019 entrou na fase I de testes clínicos. Os resultados mostraram que o composto é menos tóxico em humanos, porém devido sua baixa solubilidade os testes da fase I continuaram com o seu derivado mais solúvel contendo sódio, KP1339, que apresentou moderada atividade antitumoral em pacientes com tumor neuroendócrino e baixa toxicidade (ALESSIO; MESSORI, 2019). Os compostos organometálicos de rutênio se mostram promissores como metalofármacos e isso pode ser observado no grande número de artigos

publicados contendo síntese, citotoxicidade e ligação ao ADN dessa classe de compostos, inclusive os compostos RM-175 (DOUGAN; SADLER, 2007) e RAPTA-T (Figura 11) (SCOLARO et al., 2005) mostraram atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo*. Os compostos do tipo RAPTA-T visam principalmente proteínas, enquanto os compostos do tipo RM175 têm como alvo o ADN (ADHIREKSAN et al., 2014).

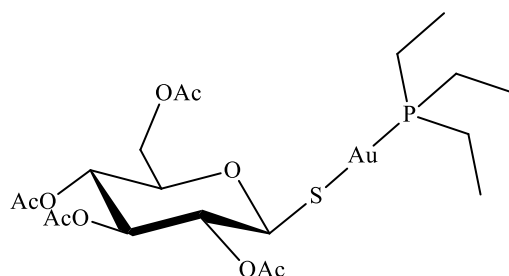
Figura 11 - Compostos de rutênio como potenciais agentes anticâncer.



Fonte: A autora.

Outros complexos contendo diferentes íons metálicos como ouro, ródio, irídio e titânio vem sendo estudados pois apresentam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, além de diferentes mecanismos de ação apresentados pela cisplatina (NDAGI; MHLONGO; SOLIMAN, 2017; ANTHONY et al., 2020). Por exemplo, o complexo de Au^I conhecido como Auranofina, Figura 12, pelo seu uso no tratamento de artrite reumatoide, está sob investigação clínica e pré-clínica (fase II) para o tratamento de cânceres, incluindo leucemia (FISKUS et al., 2014; LIU et al., 2014) e neoplasias ovarianas (MARZANO et al., 2007; WANG; HILL; FIELDS, 2013; LANDINI et al., 2017). Mesmo que uma das principais vias do mecanismo de ação da Auranofina ocorra pela inibição de enzimas, como a tiorredoxina redutase (TrxR), o mecanismo de ação do composto de Au^I ainda não é totalmente elucidado (LANDINI et al., 2017).

Figura 12- Estrutura molecular do composto Auranofina.



Fonte: A autora.

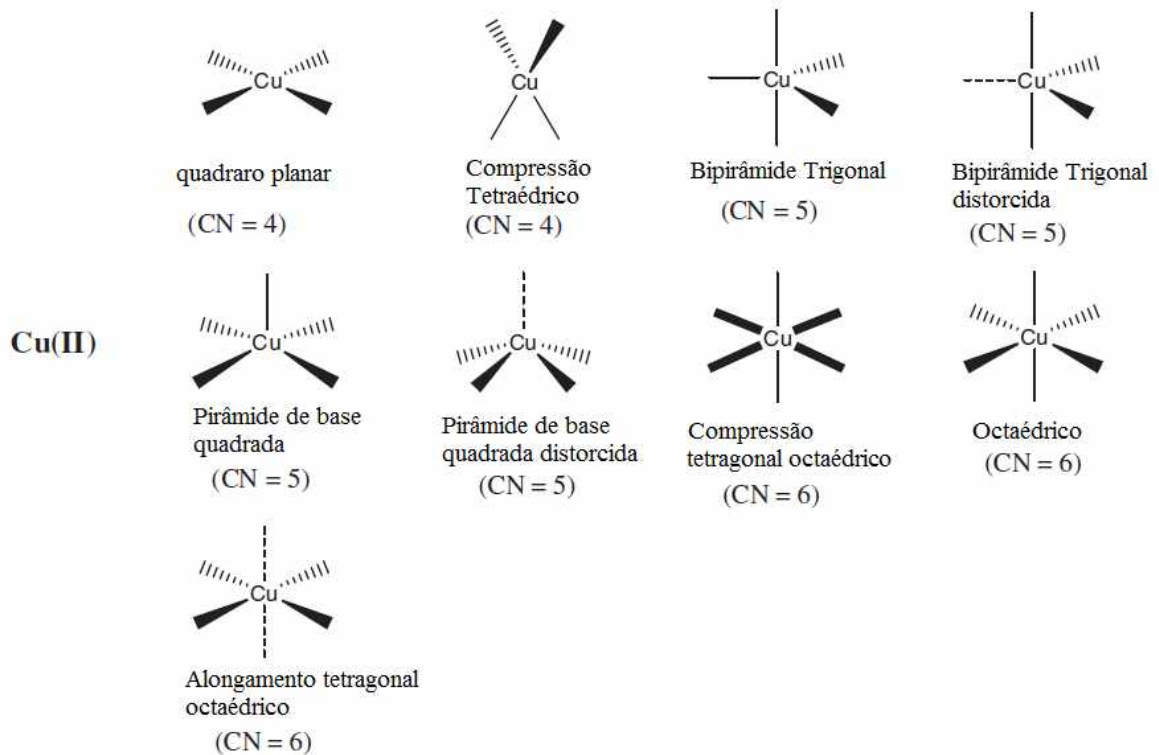
1.6 Aspectos químicos e biológicos do cobre

O cobre está entre os trinta elementos mais abundantes da crosta terrestre e existe como dois isótopos estáveis (^{63}Cu e ^{65}Cu) e nove isótopos radioativos. O cobre tem desempenhado um papel importante na história da humanidade, pois seus compostos têm sido empregados na catálise, na agricultura como fungicidas e pigmento, dentre outras aplicações. Estudos recentes sugerem o uso de superfícies contendo cobre em ambientes de saúde para reduzir a propagação de micróbios (CASEY et al., 2010) (MOLTENI; ABICHT; SOLIOZ, 2010; HONG et al., 2012; MATHEWS et al., 2013).

Devido à sua natureza redox, o Cu pode facilmente se interconverter entre íon cúprico (Cu^{II}) e cuproso (Cu^{I}), permitindo a formação de uma ampla variedade de complexos de coordenação com estados de oxidação +2 e +1. O potencial redox do par $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ pode variar significativamente dependendo dos ligantes coordenados, da geometria do complexo, bem como dos componentes eletrônicos e das influências dos substituintes. Por exemplo, na oxidação de complexos de Cu^{I} com O_2 , uma ampla gama de potenciais de redução (de -1,5 a +1,3 V vs eletrodo de hidrogênio padrão) são conhecidas (MARZANO et al., 2009; MCGIVERN; AFSHARPOUR; MARMION, 2018).

O íon Cu^{I} possui configuração eletrônica $[\text{Ar}]3d^{10}$ e atua como um ácido mole de Lewis, coordenando preferencialmente a bases de Lewis macias com átomos doadores P, C, S de tioéter e aminas aromáticas. Os complexos de Cu^{I} com número de coordenação igual a 2, 3 e 4 adotam geometrias linear, trigonal planar e tetraédrica, respectivamente. Por sua vez, complexos de Cu^{II} apresentam número de coordenação entre quatro e seis, em que as geometrias quadradas planar, bipiramidal trigonal e octaédrica são as mais frequentes. A configuração eletrônica $[\text{Ar}]3d^9$ do Cu^{II} é propensa ao efeito Jahn-Teller devido ao estado degenerado dos orbitais e_g (d_z^2 e $d_{x^2-y^2}$). Deste modo, uma variedade de estruturas distorcidas podem ser obtidas. A distorção mais comumente observada consiste no alongamento das ligações axiais e na compressão das ligações equatoriais, quando o elétron desemparelhado encontra-se no orbital $d_{x^2-y^2}$. Também pode ocorrer um encurtamento das ligações ao longo do eixo z e alongamento no plano xy. Neste caso, o elétron desemparelhado encontra-se no orbital d_z^2 . A possibilidade de diferentes geometrias permite uma grande variedade na escolha dos ligantes (de quelatos mono- a hexacoordenados) e de átomos doadores (N, O, S e halogenetos) como representado na Figura 13.

Figura 13- Representação das possíveis geometrias do íon Cu^{II} .



Fonte: A autora.

O cobre é um elemento essencial para a maioria dos organismos aeróbicos. Por exemplo, cerca de 100 mg estão presentes no corpo humano. O cobre é empregado como cofator estrutural e catalítico de metaloenzimas como superóxido dismutase, citocromo C oxidase, tirosinase, peptidilglicina monooxigenase alfa-amidante e lisil oxidase, e conseqüentemente, está envolvido em muitas vias biológicas (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013), como na respiração celular (HORN; BARRIENTOS, 2008), biossíntese e degradação de neurotransmissores, produção de matriz colágena, defesa antioxidante, sinalização redox, angiogênese, remoção do radical superóxido (LONNERDAL, 1996) e no metabolismo do ferro (HATORI; INOUE; AKAGI, 2017). O papel fisiológico das principais metaloenzimas de cobre – sua estrutura, função e localização na célula e no organismo - e sua expressão gênica tem sido ativamente estudada por muitas décadas como mostra a Tabela 3 (PUCHKOVA et al., 2018).

Tabela 3- Principais metaloenzimas de cobre.

Metaloenzimas	Localização	Funções
SOD1 (Cu(II)/Zn(II) superóxido dismutase)	citossol, matriz nuclear, lisossomos, peroxissomos, mitocôndrias	Dismutação dos ânions superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio
SOD3 (Cu(II)/Zn(II) superóxido dismutase)	Líquidos extracelulares (soro sanguíneo, esclera, etc.)	Funções antioxidantes, sinalização, estimulação da proliferação celular, diminuição da apoptose e inflamação
COX (citocromo C oxidase)	Membrana mitocondrial interna	Transferência de elétrons da cadeia respiratória ao oxigênio molecular
Proteína - lisina 6-oxidase (lisil oxidase)	Matriz extracelular	Oxidação de resíduos de lisina em aldeídos em precursores de colágeno e elastina
DBH (dopamina-β-hidroxilase)	Vesículas ligadas à membrana, e formas solúveis	Conversão de dihidroxifenilalanina (DOPA) em noradrenalina
Tirosinase (fenol oxidase)	Melanossomas	Síntese de melanina a partir de tirosina
Ceruloplasmina	Soro sanguíneo, leite, líquido cefalorraquidiano e outros líquidos extracelulares	Oxidação de Fe(II) a Fe(III), oxidação de aminas aromáticas, transportador de cobre
GPI-Cp ¹	Membrana plasmática, cérebro	Oxidação de Fe(II) a Fe(III)

¹ âncora de glicosilfosfatidilinositol

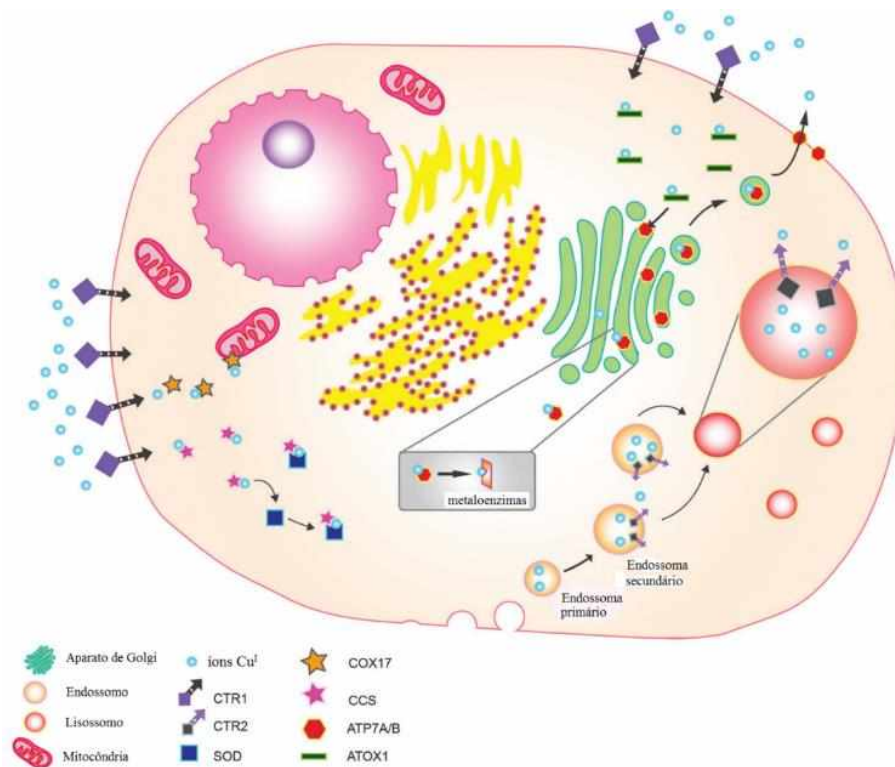
Fonte: (PUCHKOVA et al., 2018)

A ingestão diária recomendada de Cu está em torno de algumas miligramas e suas principais fontes alimentícias são as carnes, ostra, lagosta, cogumelos e amêndoas (ZORODDU et al., 2019). A ingestão de íons cobre pode geralmente exceder, mas há os mecanismos homeostáticos que são capazes de regular e minimizar as suas propriedades tóxicas, mantendo o cobre ligado a proteínas carreadoras ou aminoácidos, evitando assim que fique livre dentro da célula causando danos a biomoléculas (SOLOMON et al., 2014).

A regulação celular dos níveis de cobre é um processo complicado e depende de vários fatores como mostra a Figura 14. Durante o processo de captação celular do cobre, o íon Cu^{II} é reduzido a Cu^I e a entrega do íon na célula ocorre pela proteína transportadora de cobre (CTR1). Uma vez dentro da célula, o cobre é ligado aos receptores para posterior distribuição. Por exemplo, a proteína chaperona de cobre antioxidante 1 (AtOX 1) é responsável por fornecer cobre às bombas de cobre ATP7A / B localizadas na rede *trans* do aparelho de golgi, onde o cobre é transferido para metaloenzimas que requerem cobre como cofator. A chaperona de cobre da superóxido dismutase (CCS) é responsável pela entrega de cobre à enzima Cu,Zn

superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD ou SOD 1) e inúmeras chaperonas como Cox17. A COX17 é um importante transportador de cobre que leva o cobre até as mitocôndrias, processo vital para os organismos que necessitam de respiração aeróbica para sobreviver, pois o cobre nesse local é crucial para o bom funcionamento do citocromo c oxidase e da cadeia de transporte de elétrons. Finalmente, o CTR2, outro transportador de cobre, reside nos endossomos e lisossomos tardios. Este transportador auxilia na regulação dos níveis de cobre no interior do citosol. As chaperonas de cobre estão presentes para entregar o Cu a proteínas-alvo específicas dentro da célula.

Figura 14- Transporte de Cu e dos componentes celulares envolvidos nos níveis de regulação de Cu dentro de uma célula.



Fonte: Adaptado de (WEHBE et al., 2017)

No entanto, existem doenças nas quais os transportadores de cobre que são cruciais para a homeostase são comprometidos, resultando em uma grande acumulação de cobre. As doenças de Wilson e Menkes são dois desses casos. A doença de Wilson (degeneração hepatolenticular) é um distúrbio autossômico recessivo que resulta em acúmulo extremo de cobre no fígado com depósitos em outras partes do corpo. Menkes é caracterizada por uma deficiência sistêmica de cobre (diferente do fígado especificidade da doença de Wilson) e é o resultado de uma mutação recessiva em um transportador de cobre (DANIEL et al., 2004). Sabe-se também que um desequilíbrio na homeostase do cobre implica em doenças neurodegenerativas, como a doença

de Parkinson e de Alzheimer, que estão associadas a uma distribuição anormal de cobre no cérebro.

Levando isso em consideração, muita atenção foi dada as pesquisas sobre os mecanismos de absorção (LONNERDAL, 1996; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005; WANG; GUO, 2006), distribuição (LINDER et al., 1998; HELLMAN; GITLIN, 2002; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003), metabolismo e excreção de cobre (LINDER; HAZEGN-AZAM, 1996; KIM; NEVITT; THIELE, 2008), bem como sobre seu papel no desenvolvimento do câncer e outras doenças (GOODMAN; BREWER; MERAJVER, 2004; BREWER, 2005; GUPTE; MUMPER, 2009). Algumas pesquisas mostraram que em vários tecidos cancerosos (mama, próstata, pulmão e cérebro), a concentração de cobre excede a dos tecidos normais, sugerindo fortemente que o cobre desempenha um papel fundamental no crescimento (angiogênese) e proliferação celular (metástase) (DANIEL et al., 2004; GUPTE; MUMPER, 2009; BRISSOS; CAUBET; GAMEZ, 2015).

Em contrapartida, controlando os níveis de cobre com o auxílio de agentes quelantes, complexos de cobre podem apresentar atividade antiangiogênica e/ou antimetastática (GUPTE; MUMPER, 2009), como demonstraram Shi e colaboradores ao apresentarem uma nova série de complexos de cobre(II) coordenados a fenantrolina e diferentes cadeias alquil com excelente atividade antimetastática contra células cancerígenas de ovário humano (SHI et al., 2018).

1.7 Metalofármacos de Cu^{II} como potenciais agentes antitumorais

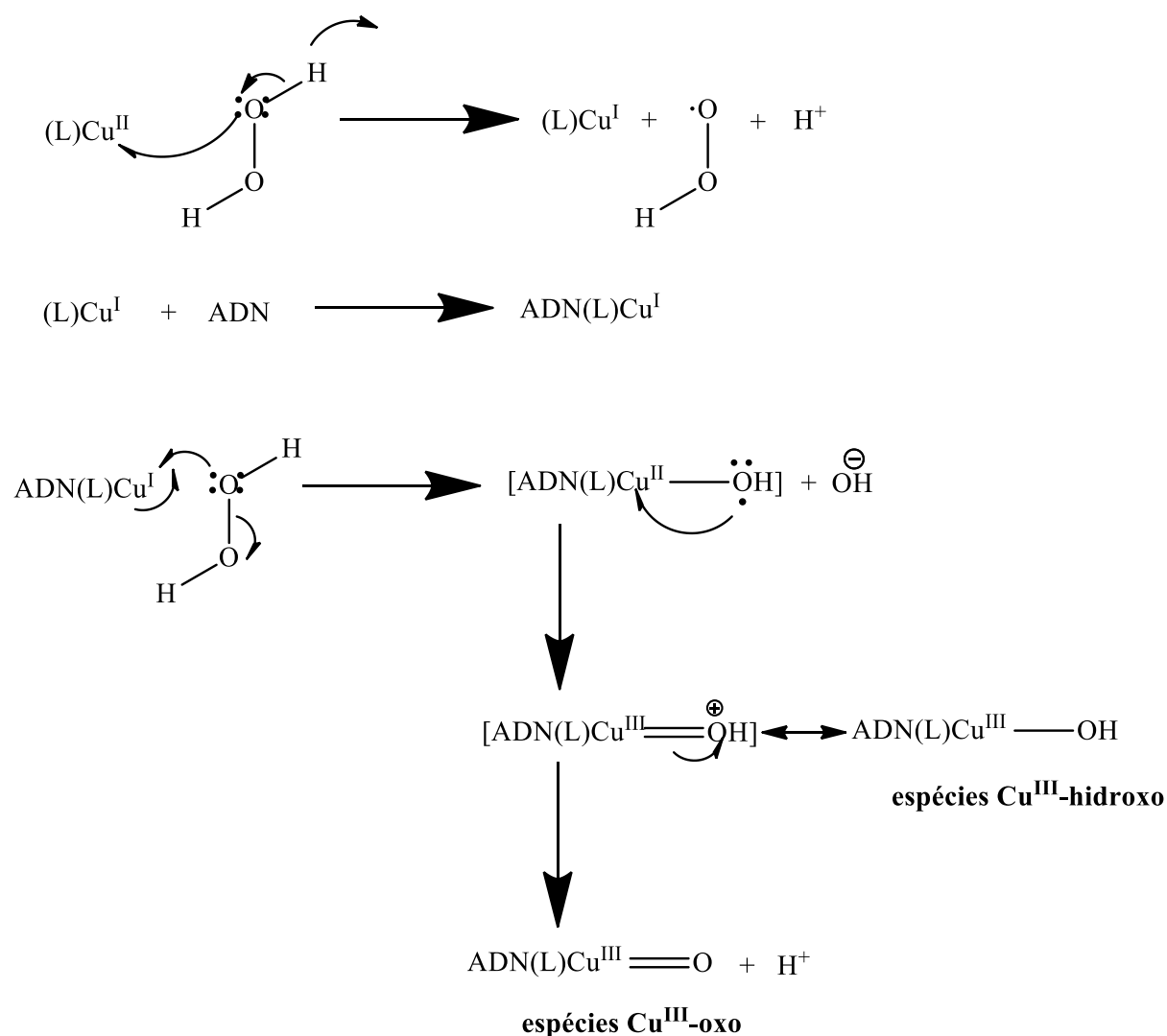
As características químicas do cobre, sua natureza redox e alta afinidade por nucleobases possibilita a obtenção de candidatos a fármacos que apresentem um maior espectro de ação, menor toxicidade, uma vez que é um elemento endógeno e com diferentes mecanismos de ação em relação aos fármacos de platina. Complexos de cobre podem promover a morte celular por diferentes maneiras, como a formação de adutos no ADN; ligação e/ou inibição de proteínas pela sua capacidade em substituir outros íons metálicos; produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzir eficientes clivagem do ADN e RNA; interrompendo/atrasando o ciclo celular em qualquer uma das fases; ou causando despolarização da membrana (PEDROSA et al., 2018).

Um dos principais alvos biológicos estudados é o ADN, devido a sua função fisiológica na replicação e transcrição celular (ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007). Assim, pesquisas envolvendo interação e clivagem de ADN (via mecanismos hidrolíticos e/ou oxidativos) por complexos de cobre despertaram considerável interesse, pois os mecanismos de ação desses

compostos se assemelham aos empregados pelas nucleases de ocorrência natural (WENDE; LÜDTKE; KULAK, 2015).

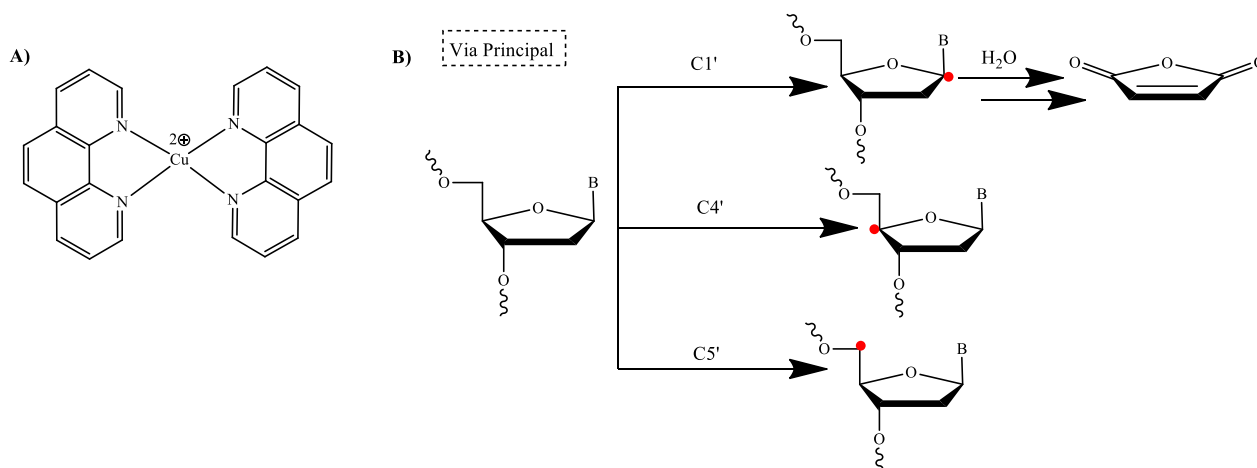
Em geral, metalonucleases de Cu^{II} podem clivar o ADN via mecanismo de clivagem oxidativo, em que a atividade é mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela oxidação do Cu^{II} a Cu^{III} pela adição de agentes oxidantes (por exemplo, peróxido de hidrogênio, oxigênio molecular) ou através da redução de Cu^{II} a Cu^{I} por um reagente redutor (por exemplo, ácido ascórbico, ácido 3-mercaptopropiônico) (GHOSH et al., 2012; SANTOS et al., 2014). As espécies cobre(III)-oxo e Cu(III)-hidroxo formadas nesses processos de oxidação do Cu^{II} na presença de H_2O_2 são responsáveis pela cisão na fita de ADN, como mostrou Rajarajeswari *et al* em seu trabalho ao estudar a atividade nuclease de complexos de Cu^{II} (RAJARAJESWARI et al., 2013), apresentado no esquema da Figura 15.

Figura 15- Representação da clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio na presença do complexo de Cu^{II} .



Fonte: Adaptado de (RAJARAJESWARI et al., 2013)

Em 1979, Sigman e colaboradores foram os primeiros a relatar que o complexo de cobre(II) com 1,10-fenantrolina, $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$ (Figura 16A), possui atividade nuclease. A proposta de uma clivagem oxidativa é baseada na formação da espécie $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$ pela redução de $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$, na presença de um agente redutor, como L-ascorbato, NADH, GSH ou outros tióis. O complexo, $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$ se liga ao sítio menor do ADN gerando espécies reativas de oxigênio que são responsáveis pela oxidação do C1' da desoxirribose no ADN induzindo a cisão da fita. Além desta via, o ataque de oxidantes na porção açúcar também pode acontecer em C4' e C5' como mostra o esquema da Figura 16B (WENDE; LÜDTKE; KULAK, 2015). A pesquisa pioneira de Sigman gerou um grande avanço nos estudos envolvendo interação e clivagem de ADN por complexos de cobre com aplicação terapêutica no campo da oncologia. **Figura 16-** A) Nuclease de Cu^{II} coordenado à fenantrolina. B) Esquema da quebra da fita de ADN por espécies ativas de oxigênio geradas por $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$.



Fonte: Adaptado de (WENDE; LÜDTKE; KULAK, 2015).

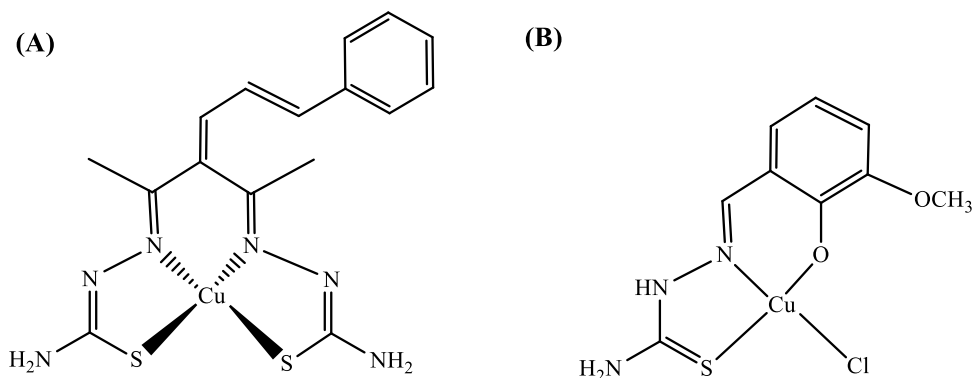
Complexos de cobre(II) com *N*-heterocíclicos (imidazol, fenantrolina, bipyridina, terpiridina e derivados), β -dicetonas, hidrazidas, base de Schiff, tiossemicarbazonas entre outros, são explorados como potenciais agentes antitumorais pela sua eficácia na ligação/intercalação ao ADN (SANTINI et al., 2014).

As tiossemicarbazonas (TSCs) são compostos do tipo $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{N}-\text{NH}-(\text{C}=\text{S})-\text{NR}^3\text{R}^4$ e são consideradas quelantes interessantes devido à sua versatilidade estrutural e amplo espectro de atividade biológica. O composto de Cu^{II} coordenado a tiossemicarbazona tetradentada $k^4\text{N}_2\text{S}_2$ (Figura 17A) apresentou excelente atividade citotóxica contra as células tumorais MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 0,45 \mu\text{g ml}^{-1}$), HCT-116 ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{g ml}^{-1}$) e NCI-H 23 ($\text{IC}_{50} = 24 \mu\text{g ml}^{-1}$). Além disso, durante nove dias, após inoculação do tumor, foi administrada uma dose de 100 mg Kg^{-1} do composto em camundongos e os resultados mostraram que o

composto foi capaz de prolongar significativamente o tempo de vida de camundongos portadores de carcinoma de Ehrlich Ascites (EAC). Os efeitos antitumorais foram menos pronunciados do que os obtidos com o medicamento padrão 5-fluorouracil (5-FH) (RAMAN et al., 2009).

Recentemente, uma nova série de compostos de Cu^{II} com tiossemicarbazonas substituídas, destacaram-se pela alta atividade *in vitro* em linhagens tumorais HCT-15, PSN-1 e A375 com valores de IC_{50} na faixa nanomolar iguais a 0,004, 0,008 e 0,003 respectivamente. Estudos sobre mecanismos de ação mostraram que estes complexos são capazes de inibir potencialmente a proteína dissulfeto isomerase, uma proteína ligada ao cobre que está emergindo como um novo alvo terapêutico para o tratamento do câncer. Além disso, estudos preliminares *in vivo* do composto $[\text{Cu}(\text{TSCs})\text{Cl}]$, Figura 17B, em camundongos C57BL com células de adenocarcinoma de pulmão (LLC), indicaram que houve uma redução de 75% do tumor (dose diária igual a $6 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$) similarmente a cisplatina administrada a $1,5 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$. Contudo, o composto não induz perda de massa corporal nessa dosagem como a cisplatina (CARCELLI et al., 2020).

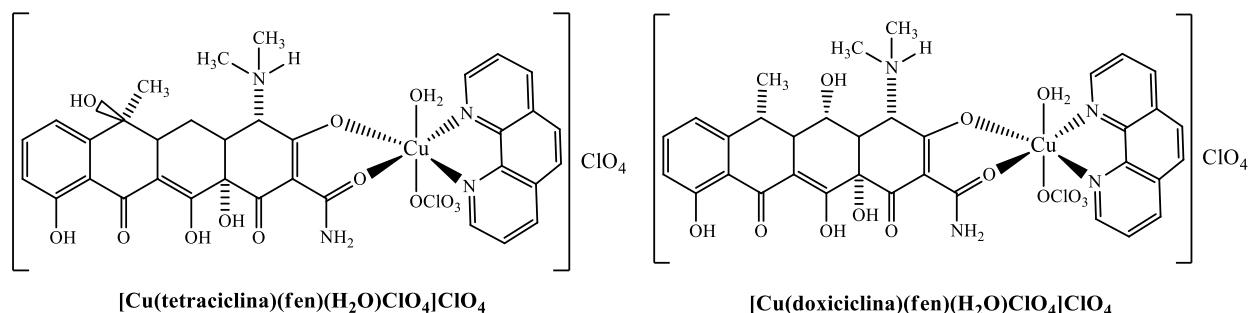
Figura 17- A) Estrutura dos compostos de cobre coordenado a ligantes tiossemicarbazonas via átomos $k^4 \text{ N,N',S,S'}$. B) da classe Triapina via átomos $k^3 \text{ N,O,S}$.



Fonte: A autora.

Pereira-Maia e colaboradores mostraram a capacidade dos complexos de Cu^{II} como potentes agentes clivadores empregando 1,10-fenantrolina e os antibióticos tetraciclina e doxiciclina. Foi demonstrado que estes complexos de cobre se ligam ao ADN preferencialmente pelo sítio menor e clivam a fita de ADN por um mecanismo oxidativo, que envolve a geração de EROs. Os compostos de Cu^{II} , Figura 18, apresentaram alta eficiência em danificar o ADN, praticamente 100 vezes mais alta do que quando comparado à $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$ (SILVA et al., 2011).

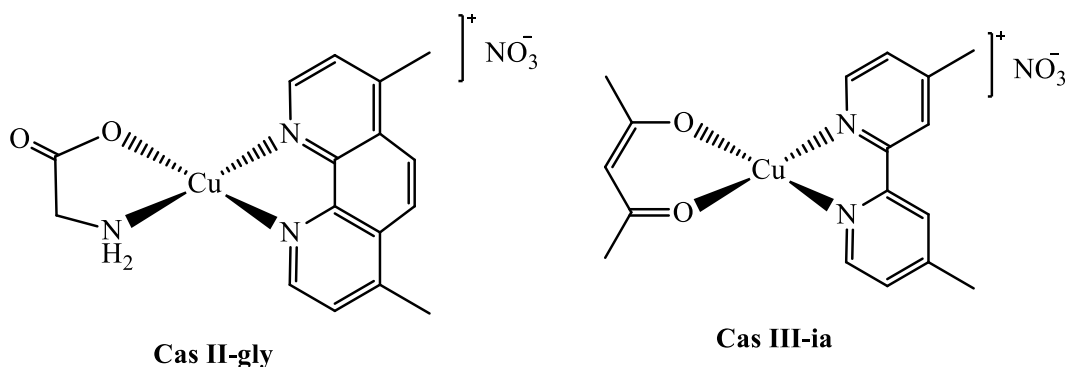
Figura 18- Estrutura de complexos de cobre coordenados a antibióticos de fórmulas $[\text{Cu}(\text{tetraciclina})(\text{fen})(\text{H}_2\text{O})\text{ClO}_4]\text{ClO}_4$ e $[\text{Cu}(\text{doxiciclina})(\text{fen})(\text{H}_2\text{O})\text{ClO}_4]\text{ClO}_4$.



Fonte: A autora.

Ruiz-Azuara *et al.* produziram e investigaram as propriedades antineoplásicas de compostos denominados por eles Casiopeínas®, de fórmulas $[\text{Cu}(\text{N-N})(\alpha\text{-L-aminoacido})][\text{NO}_3]$ e $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{A-A})][\text{NO}_3]$ {N-N = substituinte aromático diimínico, A-A = aminoácido ou acetilacetonato}. Os compostos Cas II-gly $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]$ e Cas III-ia $[\text{Cu}(4,4\text{-dimetil-2,2-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]$, Figura 19, clivam o ADN quando EROs são geradas após a redução do cobre na presença de ascorbato e danos ao ADN por meio do processo de intercalação (RIVERO-MULLER *et al.*, 2007; KACHADOURIAN *et al.*, 2010; VÁZQUEZ-AGUIRRE *et al.*, 2019). Além disso, com resultados promissores em camundongos portadores de células HCT-15, o composto Cas III-ia entrou para a fase I de testes clínicos contra leucemia mieloide aguda (TABTI *et al.*, 2017). A Cas II-gly é um dos fármacos mais promissores, pois apresenta forte inibição da proliferação celular contra uma linhagem de células C6 de glioma, tanto *in vivo* como *in vitro*. Recentemente, Hernández-Lemus e colaboradores demonstraram que o composto Casiopeína II-Gly está pronto para iniciar a fase I de testes clínicos (ESPINAL-ENRÍQUEZ *et al.*, 2016).

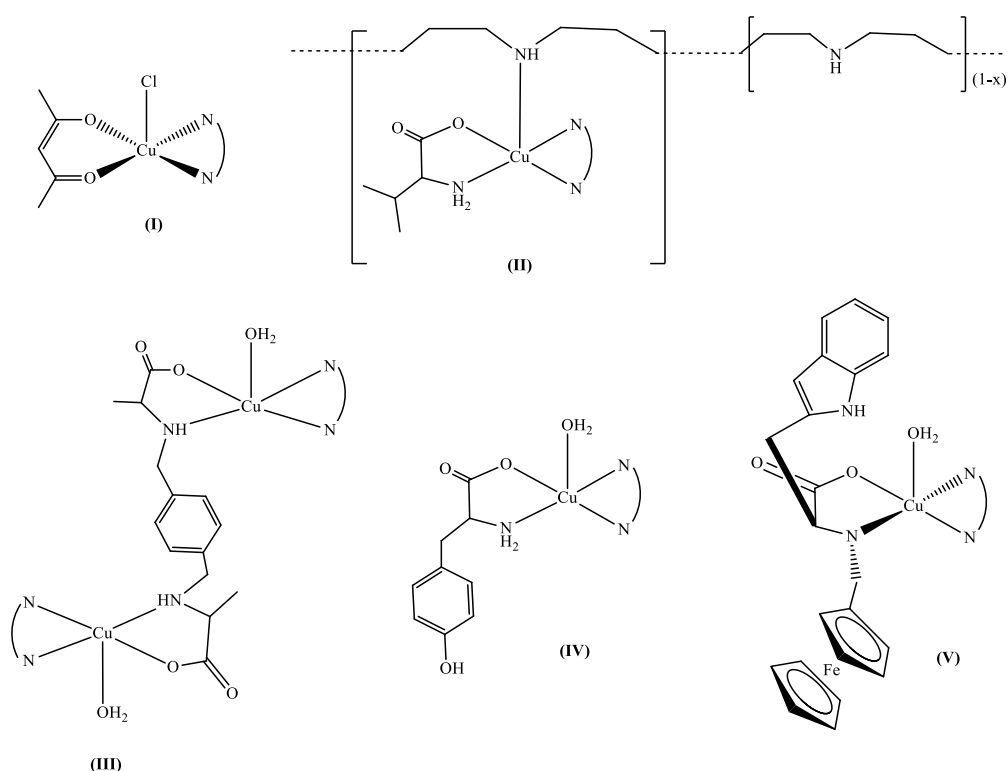
Figura 19- Estrutura química das Casiopeínas Cas II-gly e Cas III-ia



Fonte: A autora.

A fim de entender relações entre estrutura e atividade biológica das Casiopeínas e derivados, diferentes grupos de pesquisa alteraram os substituintes do fragmento $[Cu(N,N)]^{2+}$, matendo o acac como coligante **[I]** (CHEN et al., 2011), ou substituindo o aminoácido gly por outros como L-val **[II]** (LAKSHMIPRABA et al., 2011), L-phe **[III]** (KUMAR; ARUNACHALAM, 2009; JIA et al., 2010), L-tyr **[IV]** (RAMAKRISHNAN et al., 2009), e L-trp **[V]** (GOSWAMI et al., 2011) em combinação com vários diaminados (*N,N*) e observaram que todos os complexos de Cu, Figura 20, se ligam e clivam o ADN gerando EROs.

Figura 20- Estruturas dos complexos derivados das Casiopeínas mantendo o fragmento $[Cu(N,N)]^{2+}$.



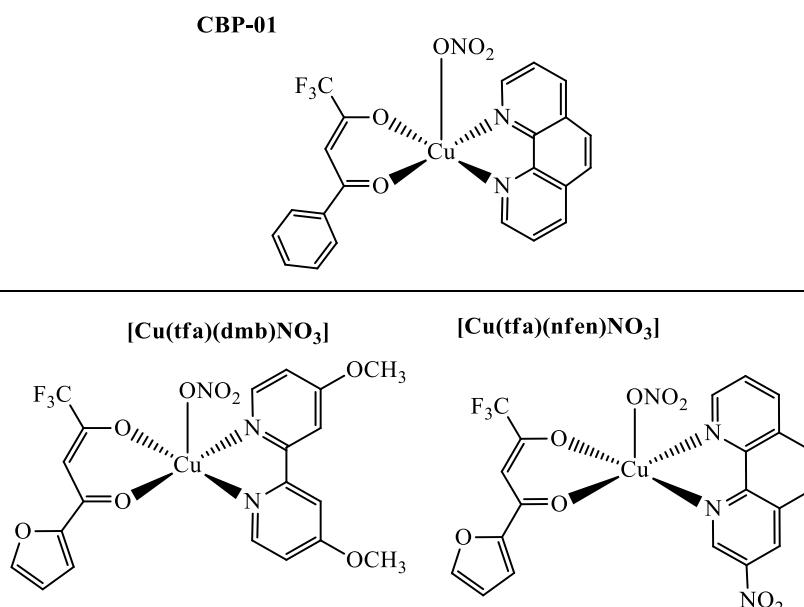
Fonte: A autora.

Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que o composto CBP-01 (Figura 21) apresenta atividade antitumoral contra a célula tumoral sarcoma 180 ($IC_{50}=7,4 \mu M$) e na linhagem não tumoral C2C12 ($IC_{50}=26,4 \mu M$), além de ser seletivo para a célula tumoral testada *in vitro* ($IS > 3$) (ALMEIDA et al., 2015). Estudos nas células do sarcoma 180, revelaram que o composto CBP-01 apresenta maior citotoxicidade do que o composto antitumoral mitomicina C. O mecanismo de ação desse composto pode ser atribuído a um aumento significativo dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando a parada do ciclo celular. As células se acumularam no ponto de controle G0/G1 com consequente diminuição do número de células nas fases S e G2/M, resultando em apoptose ou

morte celular autofágica (POLLONI et al., 2019).

Com objetivo de melhorar os resultados do CBP-01, uma nova série de compostos de Cu^{II} (Figura 21) foi obtida substituindo o anel aromático da β -dicetona pelo grupo furano e diferentes N,N -doadores. A atividade citotóxica de $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{dmb})\text{NO}_3]$ e $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{nfen})\text{NO}_3]$ foi investigada em duas células tumorais (tumor de Ehrlich e sarcoma 180) e uma não tumoral (mioblasto C2C12). Os resultados mais promissores foram com o composto $[\text{Cu}(\text{tfa})(\text{nfen})\text{NO}_3]$ que apresentou boa atividade ($\text{IC}_{50\text{Ehrlich}} = 15,75 \mu\text{M}$ e $\text{IC}_{50\text{sarcoma 180}} = 16,90 \mu\text{M}$) e seletividade ($\text{IS} > 4$) em ambas as linhagens de células tumorais (PAIXÃO et al., 2019a).

Figura 21- Estrutura química de compostos de coordenação de cobre coordenado a beta-dicetonas e N,N -doadores.

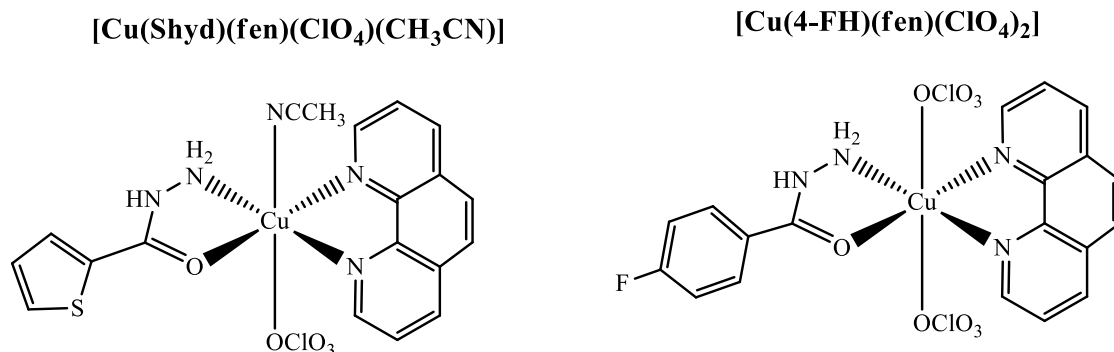


Fonte: A autora.

Hidrazidas (N,O) representam uma classe de ligantes com propriedades biológicas relevantes e efeito quelante propício para obtenção de complexos ternários de cobre, como relatado por Silva, 2014. O composto $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{fen})(\text{ClO}_4)(\text{CH}_3\text{CN})]$ (Shyd = hidrazida do ácido 2-tiofeno-carboxílico e fen = fenantrolina), Figura 22, apresentou citotoxicidade nas células tumorais de leucemia mieloide crônica (K562), atividade nuclease e capacidade de interação com o ADN (SILVA et al., 2014). Uma vez que complexos de Cu^{II} com hidrazidas mostram potencial antitumoral, nosso grupo de pesquisa vem explorando a síntese e atividade antitumoral afim de encontrar um composto que seja candidato a fármaco. Assim mostramos que o complexo de fórmula $[\text{Cu}(4\text{-FH})(\text{fen})(\text{ClO}_4)_2]$ (Figura 22), em que 4-FH = hidrazida do ácido 4-fluorofenoxiacético e fen = 1,10-fenantrolina, possui atividade antitumoral *in vitro* com valores de IC_{50} de $1,8 \mu\text{M}$, $8,8 \mu\text{M}$ e $6,5 \mu\text{M}$ contra as linhagens celulares K562, MCF-7 e

MDA-MB-231, respectivamente. A atividade citotóxica do complexo é superior à atividade de todos os ligantes livres correspondentes, carboplatina e $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$ (PAIXÃO et al., 2017).

Figura 22- Estrutura química de compostos ternários de cobre(II) e hidrazida.



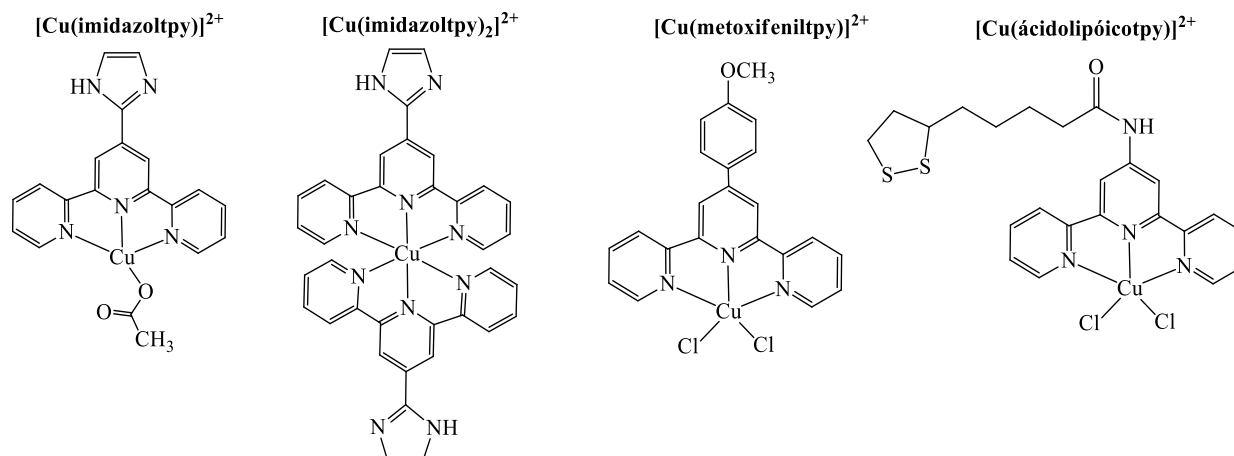
Fonte: A autora.

As modificações estruturais que ocorrem na fita do ADN provocadas por complexos de Cu^{II} não são causadas apenas por reações de hidrólise ou oxidação promovendo a clivagem da fita do ADN, mas também por interações de complexos metálicos com ADN. Para algumas classes desses compostos as interações podem ocorrer por meio de interação eletrostática, ligação covalente coordenada, intercalação, ligação nos sulcos do ADN e ligação de hidrogênio (SANTINI et al., 2014).

O ligante 2,2':6',2''-terpiridina (tpy) e seus derivados substituídos na posição 4 do anel são de especial interesse devido sua capacidade em formar complexos metálicos de alta estabilidade (CETIN et al., 2017; SAVIC et al., 2019), como os complexos de platina(II) e terpiridina que estabilizam estruturas G-quadruplex (YU et al., 2009). A química de coordenação da tpy inclui complexos mono(tpy) que podem ser complexos mono- ou polinucleares com estequiometria 1:1 e complexos bis(tpy) correspondentes à razão molar 1:2 entre o íon metálico e o ligante (GLIŠIĆ et al., 2018).

Além da química de coordenação, a sua capacidade de intercalação devido à inserção dos anéis aromáticos planares de complexos contendo tpy entre as bases do ADN implica em interações de empilhamento π - π . Por exemplo, terpiridinas com substituintes imidazol (Fig. 23) (UMA et al., 2005; MANIKANDAMATHAVAN et al., 2014), metoxifenil (Fig. 23) (LIANG et al., 2014) e ácido lipóico (Fig. 23) (VELUGULA; KUMAR; CHINTA, 2020) coordenadas ao íon cobre(II) mostraram efeitos citotóxicos contra linhagens tumorais devido aos diferentes comportamentos na interação com o ADN.

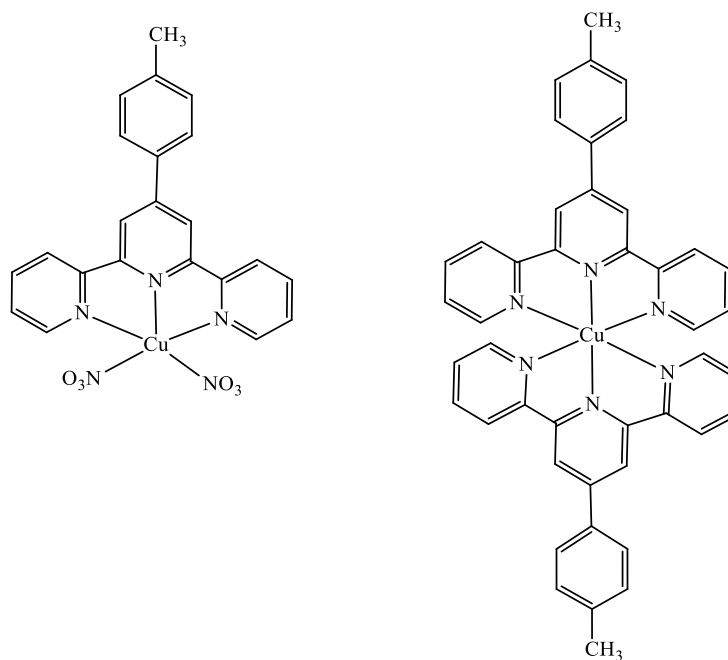
Figura 23- Complexos de cobre(II) coordenados a terpiridina substituídas.



Fonte: A autora.

O composto $[\text{Cu}(\text{mftpy})(\text{NO}_3)_2]$, no qual $\text{mftpy} = 4'$ -metilfenil-2,2':6',2'-terpiridina (Figura 24), se liga ao ADN (JIANG et al., 2008) e estudos *in vivo* com o composto $[\text{Cu}(\text{mftpy})_2]\text{Cl}_2$ (Figura 24), indicaram inibição significativa do crescimento de tumores em células de carcinoma de Ehrlich ascites (EAC) em camundongos albinos suíços. O mecanismo proposto implica em níveis crescentes de EROs que apoiam apoptose por uma via dependente de mitocôndrias (MAHENDIRAN et al., 2017).

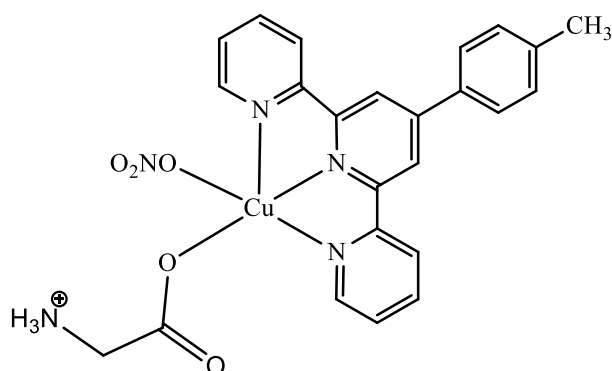
Figura 24- Estruturas dos complexos $[\text{Cu}(\text{mftpy})(\text{NO}_3)_2]$ e $[\text{Cu}(\text{mftpy})_2]^{2+}$.



Fonte: A autora.

A introdução de co-ligantes como aminoácidos (ZHOU et al., 2013), fármacos sintéticas (YILMAZ et al., 2017), hidroxiquinolina (DEKA et al., 2017) e diimínicos (MANIKANDAMATHAVAN et al., 2011; RAJALAKSHMI et al., 2011; ABDI et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SALIMI et al., 2015; INAMDAR; SHEELA, 2016; TUMMALAPALLI et al., 2017; JAIN et al., 2020) apresenta uma boa estratégia no design de novos fármacos baseados em complexos de cobre(II) com terpiridina, como mostra Zhou *et al.* ao propor a substituição do diimínico fenantrolina no composto Cas II-gly por um ligante *N*-heterocíclico tridentado, a 4'-metilfenil-2,2':6',2'-terpiridina (mftpy) mantendo o aminoácido glicina (gly). O complexo de fórmula $[\text{Cu}(\text{gly})(\text{mftpy})\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (Fig.25) apresentou um aumento na atividade nuclease e maior solubilidade em água, o que pode ter facilitado sua interação com o ADN, onde ligações de hidrogênio com o açúcar-fosfato da espinha dorsal da dupla hélice do ADN foram observados (ZHOU et al., 2013).

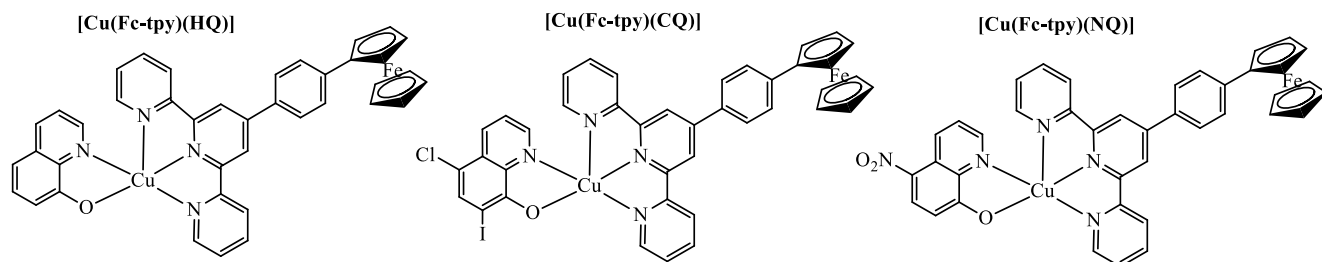
Figura 25- Estrutura do complexo de fórmula $[\text{Cu}(\text{gly})(\text{mftpy})\text{NO}_3]^+$.



Fonte: A autora.

Também foi reportado na literatura a inserção de ligantes hidroxiquinolina (N,O) a complexos de Cu^{II} contendo terpiridinas substituídas com ferrocenil (Fc-tpy). Os compostos de fórmula $[\text{Cu}(\text{Fc-tpy})(\text{N-O})]\text{NO}_3$, no qual N-O são os ânions 8-hidroxiquinolina (HQ), 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (CQ) e 5-nitro-8-hidroxiquinolina (NQ), Figura 26, são citotóxicos em células tumorais HeLa e MCF-7 e se ligam ao ct-ADN e a proteína HSA com valores significativos de constantes de ligação K_b e K_{HSA} . A afinidade pelo ADN sugere que o alvo do composto $[\text{Cu}(\text{Fc-tpy})(\text{CQ})]\text{NO}_3$ pode ser o ADN mitocondrial (mt-ADN) das células HeLa e o mecanismo apoptótico de morte celular envolve a formação de EROs (DEKA et al., 2017).

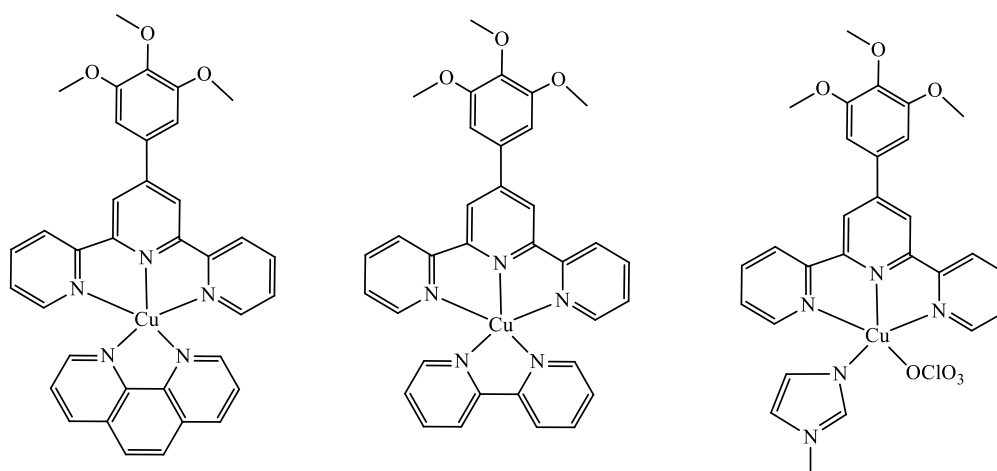
Figura 26- Estruturas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{Fc-tpy})(\text{N-O})]$.



Fonte: A autora.

Jain e col. mostraram que complexos ternários de cobre contendo em sua esfera de coordenação terpiridinas substituídas em combinação com ligantes bidentados do tipo diiminas possuem propriedades biológicas tais como citotoxicidade, atividade nuclease e interação com ADN e proteína ASB (albumina de soro bovino). Os complexos de Cu^{II} com trimetoxi terpiridina e *N,N*-doadores (fenantrolina, bipyridina e imidazol), Figura 27, apresentaram atividade antitumoral na faixa 0,5 – 3,6 μM contra a linhagem de câncer de pulmão A549. A similaridade nas constantes de ligação do ADN/ASB dos complexos indica que o ligante trimetoxi terpiridina apresenta maior influência na ligação do que os diiminos, porém os efeitos dos co-ligantes nos estudos biológicos são pronunciados nos resultados de atividade de clivagem e citotoxicidade. O complexo contendo fenantrolina apresentou maior atividade nuclease, porém menor citotoxicidade (3,6 μM), mostrando que mais de um mecanismo é responsável pela morte celular (JAIN et al., 2020).

Figura 27- Estrutura dos complexos de Cu^{II} com trimetoxi terpiridina e diferentes *N,N*-doadores.



Fonte: A autora.

1.8 Breve aspectos químicos e biológicos do níquel

O elemento níquel foi descoberto em 1751 por Axel Frederik Cronstedt na Suécia. Os estados de oxidação relatados para o níquel variam de 0 a +4, com Ni^{II} sendo o mais comum. A química de coordenação do níquel é influenciada pela natureza dos ligantes, bem como pelas geometrias de coordenação adotadas pelo centro metálico. O íon Ni^{II} possui configuração eletrônica $[\text{Ar}] 3d^8$ apresentando propriedades intermediárias entre ácidos mole e duro de Lewis, formando complexos estáveis com ligantes duros (OH^- , H_2O , e NH_3) e moles (RS^- , CO , e CN^-) (COTTON, F. A.; WILKINSON, 1972).

Em termos de química de coordenação, complexos de Ni^{II} adotam uma variedade de geometrias com números de coordenação variando entre 4 e 6. Complexos de Ni^{II} com número de coordenação igual a 4 adotam as geometrias quadrado planar ou tetraédrica. Os de geometria quadrado planar são diamagnéticos com oito elétrons emparelhados nos orbitais d_{yz} , d_{xz} , d_z^2 e d_{xy} , ressaltando que essa geometria só ocorre na presença de ligantes de campo forte, como o CN^- . Por outro lado, aqueles que adotam a geometria tetraédrica são paramagnéticos com dois elétrons desemparelhados nos orbitais t_2 . Os compostos de Ni^{II} pentacoordenados não são muito frequentes, mas quando ocorrem, a condição mais importante é a natureza estereoquímica do ligante, de modo que o volume e a disposição do ligante permitam a aproximação de cinco centros coordenantes ao íon metálico. A formação destes compostos é favorecida por ligantes polidentados e também por solventes de baixo poder coordenante. Compostos com NC igual a 5 apresentam geometrias bipirâmide trigonal e são frequentemente de spin alto, enquanto compostos com geometria piramidal de base quadrada tendem a ser spin baixo. Complexos de níquel com NC igual a 6 adquirem geometria octaédrica e são invariavelmente de spin alto com dois elétrons não emparelhados em seus orbitais e_g , além de exibir uma preferência por ligantes de campo mais forte, como ligantes doadores contendo átomos de nitrogênio ou tiolato (COTTON, F. A.; WILKINSON, 1972).

Presume-se que o níquel seja um elemento essencial aos organismos vivos, pois está presente no corpo humano. Por exemplo, um adulto de 70 kg contém aproximadamente 15 mg de níquel (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013). Alguns dos alimentos em que o níquel se encontra presente são castanha de caju, nozes, produtos de soja, legumes e os vegetais que contêm a enzima urease, como por exemplo, vagem e feijão, são as principais fontes (CEMPEL; NIKEL, 2006).

A absorção de níquel(II) pelo corpo humano pode ocorrer por inalação ou por via oral, posteriormente sendo distribuído para todos os órgãos. A maior parte do níquel

absorvido é excretado na urina (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2005; KUMAR; TRIVEDI, 2016), como mostrou os estudos de curto e longo prazo com animais, vários sais de níquel foram administrados por via oral, e os resultados mostraram que os rins absorvem a maior quantidade de níquel seguido dos pulmões, fígado, coração e testículos (KUMAR; TRIVEDI, 2016).

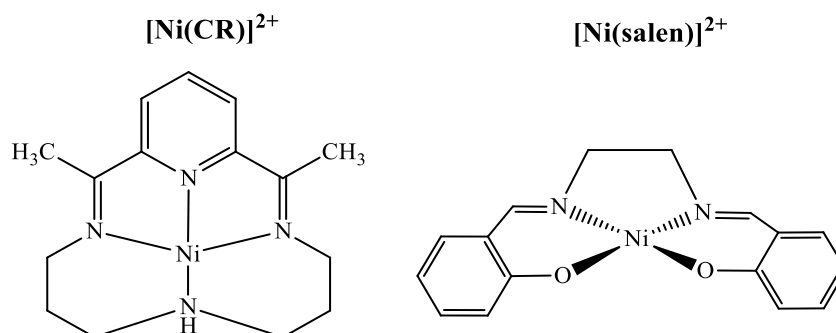
Além disso, o níquel desempenha papel vital em bactérias, arqueias e fungos pois está presente em múltiplas enzimas (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013). Uma enzima bem conhecida que contém Ni é a urease, que catalisa a hidrólise da ureia. Com a descoberta do níquel como sítio ativo de uma variedade de enzimas e sua contribuição significativa em determinados processos biológicos, tais como: cofator de proteínas, aminoácidos, albuminas, transporte de oxigênio e estimulante do metabolismo (KAIM; SCHWEDERSKI; KLEIN, 2013), um crescente interesse entre os químicos bioinorgânicos começou a surgir não apenas devido à presença de níquel em enzimas, mas também pela atividade biológica encontrada em complexos de níquel.

1.9 Complexos de Ni^{II} como potenciais agentes terapêuticos

Na literatura há relatos de complexos de níquel(II) contendo atividades antiparasitária (HERNÁNDEZ-AYALA et al., 2020), antibacteriana (ALEXIOU et al., 2003), antifúngica (RISANA et al., 2020), antimicrobiana (BASU BAUL et al., 2020) e antitumoral (BANASPATI; RAZA; GOSWAMI, 2020) com capacidade de intercalar ou clivar o ADN (POORNIMA; GUNASEKARAN; KANDASWAMY, 2015).

Janet Morrow foi uma das primeiras a estudar a clivagem de ADN utilizando complexos de níquel. Em seus experimentos, ele observou que a clivagem ocorreu somente na presença de um agente oxidante. A conversão do plasmídeo superenovelado (FI) para a forma circular aberto (FII) foi observada para dois complexos de níquel, $[\text{Ni}(\text{CR})]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{salen})]^{2+}$ (Figura 28)(MORROW; KOLASA, 1992).

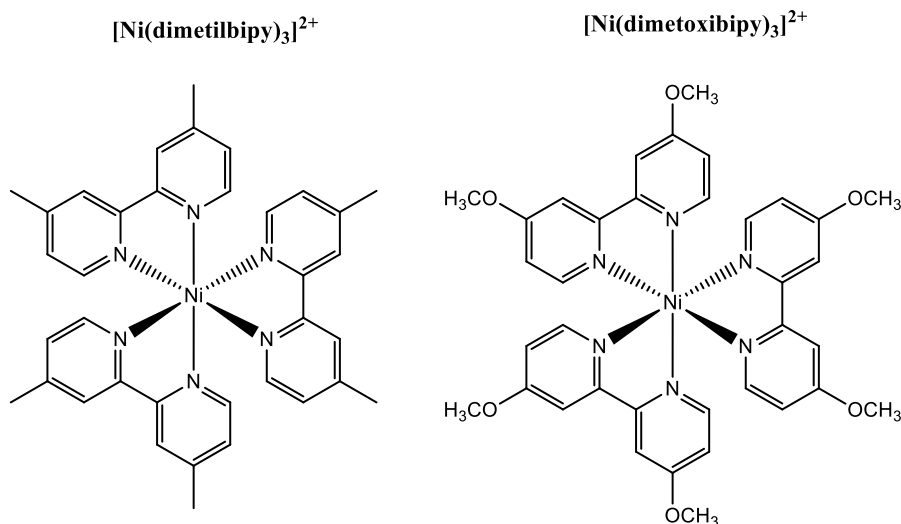
Figura 28- Estrutura dos complexos $\text{Ni}(\text{CR})^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{salen})]^{2+}$.



Fonte: A autora.

Complexos de níquel(II) coordenados a *N,N*-doadores mostraram propriedades de interação com ADN via suco e intercalação, além de clivar o ADN via mecanismo oxidativo na presença e ausência de H_2O_2 . Na presença de H_2O_2 , os complexos $[\text{Ni}(\text{dimetilbipy})_3]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{dimetoxibipy})_3]^{2+}$ (Figura 29) apresentaram conversão da forma F I para F II e o mecanismo de clivagem oxidativo pode estar associado na primeira etapa com a formação dos supostos intermediários Ni^{III} -oxo e Ni^{III} -hidroxo. Essas espécies de radicais hidroxila associadas ao metal são responsáveis pela clivagem do ADN (ANJOMSHOA et al., 2019).

Figura 29- Estrutura dos complexos $[\text{Ni}(\text{dimetilbipy})_3]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{dimetoxibipy})_3]^{2+}$.

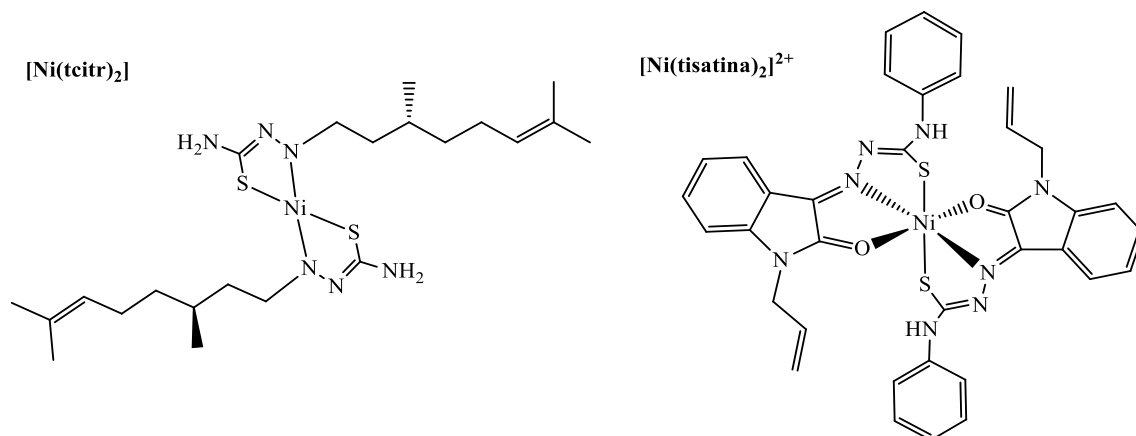


Fonte: A autora.

Buschini e colaboradores relataram que o composto $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]^{2+}$ (Figura 30), no qual tcitr = S-citronelatiosemicarbazona (BUSCHINI et al., 2009) induz a parada do ciclo celular na fase G_2/M levando as células de sarcoma histiocítico (U937) a apoptose (BUSCHINI et al., 2014). O composto também interage covalentemente com o peptídeo histona da classe H2A, possivelmente um diferente alvo biológico do mecanismo de ação (BISCEGLIE et al., 2019). Outro mecanismo de ação relatado na literatura recentemente por complexos de Ni^{II}

coordenados a tiossemicarbazonas, mostrou que o composto $[\text{Ni}(\text{tisatina})_2]^{2+}$, no qual tisatina = isatina tiossemicarbazona, (Fig.30), induz apoptose através da via de sinalização mitocondrial e parada do ciclo celular G0/G1 em células de mieloma IM-9 (BALACHANDRAN et al., 2018).

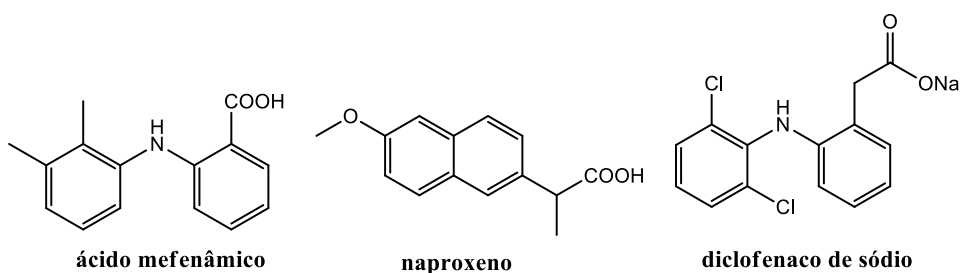
Figura 30- Estrutura dos complexos $[\text{Ni}(\text{tcitr})_2]^{2+}$ e $[\text{Ni}(\text{tisatina})_2]^{2+}$.



Fonte: A autora.

Complexos ternários de Ni^{II} octaédricos coordenados aos anti-inflamatórios ácido mefenâmico (TOTTA et al., 2015), naproxeno (TOTTA et al., 2017) e diclofenaco de sódio (KYROPOULOU et al., 2013), Figura 31, e a ligantes heterocíclicos *N,N*-doadores, foram estudados quanto a capacidade de se ligarem ao ADN ou albumina. As constantes de ligação dos complexos, na ordem de $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$, revelam o potencial destes de se ligarem e serem transportados pelas albuminas. Os complexos interagem com o ADN pela interação de empilhamento $\pi \rightarrow \pi$ entre o cromóforo aromático (do anti-inflamatório e/ou dos ligantes *N*-doador) do complexo e os pares de bases do ADN levando a um modo de interação por intercalação (KYROPOULOU et al., 2013; TOTTA et al., 2015, 2017).

Figura 31- Estrutura química dos anti-inflamatórios utilizados como ligantes em complexos ternários de Ni^{II} .

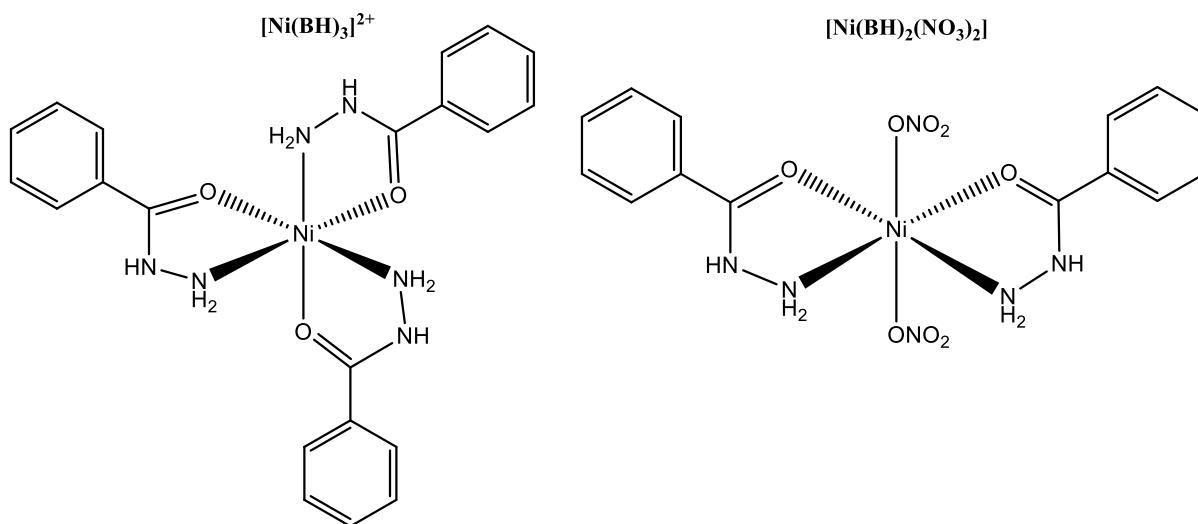


Fonte: A autora.

Quanto a compostos de níquel(II) contendo hidrazida (PATEL et al., 2011), Patel e

colaboradores mostraram que o complexo de fórmula $[\text{Ni}(\text{BH})_3]^{2+}$ (Fig.32), no qual BH = benzil hidrazida, apresenta melhor atividade antitumoral que o composto $[\text{Ni}(\text{BH})_2(\text{NO}_3)_2]$ (Fig.32) (PATEL et al., 2011).

Figura 32- Estrutura dos complexos de níquel(II) coordenados a benzil hidrazida.

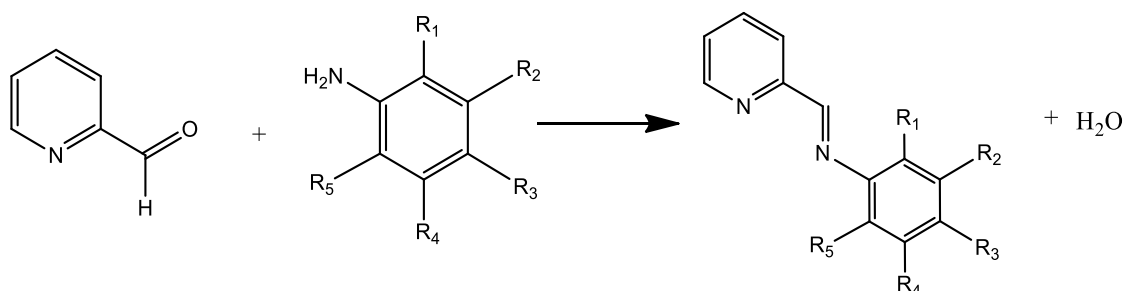


Fonte: A autora.

1.10 Iminopiridinas como ligantes de interesse biológico

Os compostos imínicos, base de Schiff, possuem uma ligação dupla entre um átomo de carbono e um átomo de nitrogênio. Tais moléculas dão origem a uma grande variedade de classe de compostos, dentre elas as iminopiridinas. Atualmente surgiu um enorme interesse na química de coordenação dos ligantes quelantes iminopiridinícos (N,N) devido sua propensão a formar complexos estáveis com uma variedade de íons metálicos, além de possuir propriedades biológicas (BRUNNER; SCHMIDT; SCHÖNENBERGER, 1986). Essa classe de ligantes N,N pode ser obtida com grande variedade estrutural pela condensação de aldeídos com anilinas, como mostra o esquema da Figura 33. O uso de diferentes substituintes R com perfis antiproliferativos contra células tumorais é uma estratégia utilizada ao sintetizar ligantes iminopiridinícos alterando a lateral R por substituintes alquil-(CONRAD et al., 2005), aril-(HUANG et al., 2013) ou carboidratos modificados (CUCCIOLITO et al., 2010).

Figura 33- Esquema reacional de obtenção dos ligantes iminopiridinícos.

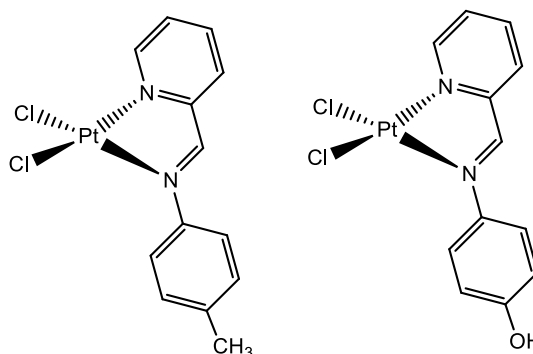


Fonte: A autora.

A síntese e avaliação da atividade antitumoral de compostos metálicos da primeira (Cu), segunda (Ru, Pd e Ag) e terceira série de transição (Pt, Ir) coordenados a iminopiridinas foram relatados na literatura (GARCÍA-FRIAZA et al., 2006; NJOGU; OMONDI; NYAMORI, 2017; ADELEKE et al., 2021; CARLONI et al., 2021), porém, estudos mais aprofundados envolvendo a relação entre estrutura e atividade antitumoral e o mecanismo de ação são poucos e recentes. Os primeiros compostos que apresentaram atividade antitumoral foram os de Pt^{II} e atualmente ganharam uma notável visibilidade pelo número de moléculas com diferentes propriedades antitumorais.

Bruner e Conrad foram os primeiros a relatar atividade antitumoral *in vitro* de complexos de Pt^{II} coordenados as iminopiridinas em linhagens celulares MDA-MB 231 (carcinoma mamário), OV2008 (célula ovariana sensível a cisplatina) e C13 (célula resistente a cisplatina). Ambos pesquisadores mostraram uma influência importante dos padrões de substituintes na atividade dos complexos principalmente em células resistentes a cisplatina (CONRAD et al., 2005). García-Friaza *et al.* ao verificar a influência dos padrões de substituição dos ligantes na atividade antitumoral contra as linhagens tumorais A270 e A270cisR concluíram que a substituição de um grupo -CH₃ por um grupo -OH, Figura 34, não tem efeito na cinética da reação, mas melhora a interação entre o complexo metálico e o ADN, devido a formação de ligações de hidrogênio. Todos os complexos de Pt^{II} induziram a morte celular apoptótica, mas também é observada uma porcentagem de morte celular necrótica (GARCÍA-FRIAZA et al., 2006).

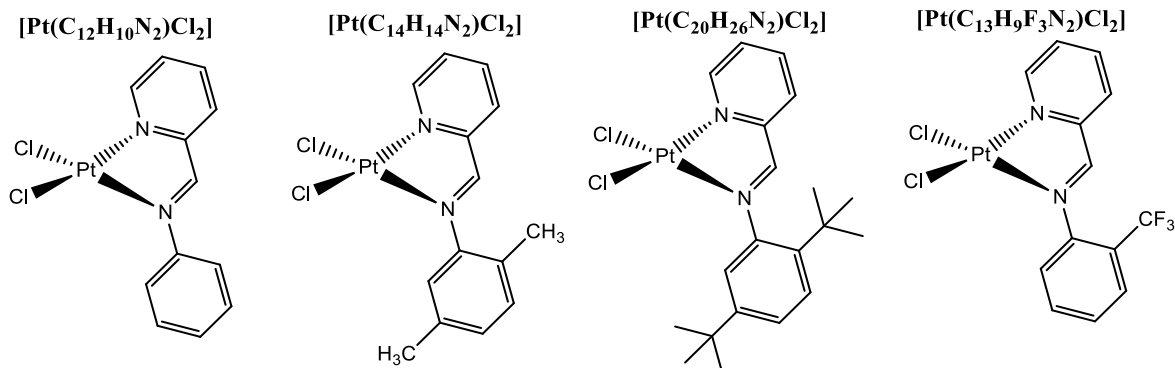
Figura 34- Compostos de platina(II) coordenados a ligantes iminopiridinícos.



Fonte: A autora.

Posadas em 2017 publicou outra série de compostos de Pt^{II} com os ligantes iminopiridinícos, Figura 35, e relatou que o composto [Pt(C₁₄H₁₄N₂)Cl₂] exibe semelhante indução de morte celular em relação ao composto de referência utilizado clinicamente (cisplatina) e significativa inibição da proliferação celular de glioblastoma multiforme (C6). Além disso, este composto apresenta menor citotoxicidade em células não tumorais do que a cisplatina (POSADAS et al., 2017).

Figura 35- Série de compostos de platina(II) coordenados a iminopiridinícos.

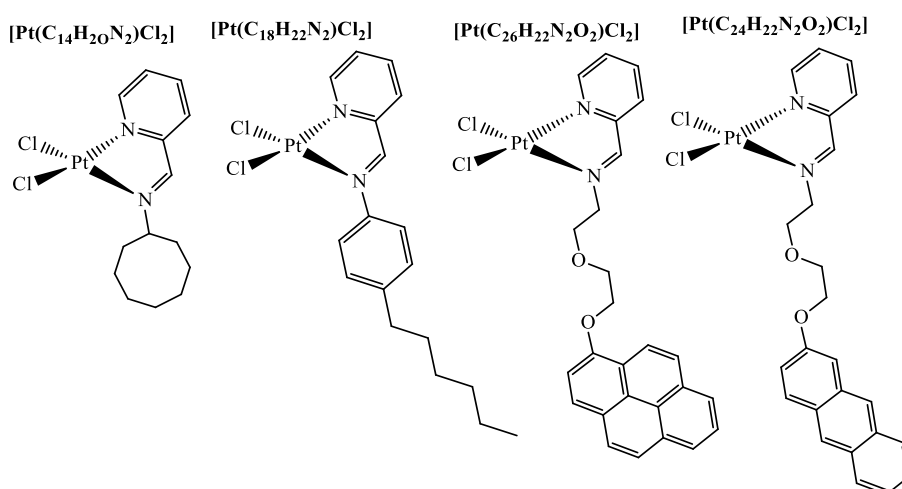


Fonte: A autora.

O uso de substituintes lipofílicos de cadeia longa e flexível em iminopiridinícos coordenados a íons de Pt^{II}, surge como uma nova proposta por apresentarem maior citotoxicidade em linhagens resistentes quando comparados aos seus análogos de cadeia curta e rígida (CONRAD et al., 2005). Westcoot sintetizou dois compostos de Pt^{II}, [Pt(C₁₄H₂₀N₂)Cl₂] e [Pt(C₁₈H₂₂N₂)Cl₂] (Figura 36). A atividade antitumoral destes complexos em células de tumores cerebrais (LN18 and LN405) revelaram valores de IC₅₀ menores que 4 μM, sendo os compostos aproximadamente 10 vezes mais ativos que a cisplatina na célula tumoral LN405 (MILES et al., 2016). Recentemente, novos compostos de Pt^{II} coordenados a iminopiridinas com substituintes polinucleares pireno e antraceno de fórmulas [Pt(C₂₆H₂₂N₂O₂)Cl₂] e

[Pt(C₂₄H₂₂N₂O₂)Cl₂] (Figura 36) foram avaliados em diferentes células tumorais e em célula normal (Met-5A). O que chama atenção nos resultados é o fato de que os compostos apresentaram IC₅₀ maiores que 16 µM nas linhagens tumorais HeLa, MSTO-211H, HT29 e A549, enquanto nas células tumorais A-2780 e A-2780cis de carcinoma de ovário humano os valores de IC₅₀ são menores que 6,8 µM. Os resultados sugerem uma certa capacidade dos compostos, em especial do composto [Pt(C₂₄H₂₂N₂O₂)Cl₂] (IC₅₀A-2780cis = 3,72 µM), em contornar a resistência adquirida à cisplatina (IC₅₀A-2780cis = 6,61 µM) pela citotoxicidade causada em ambas linhagens (BONDI et al., 2020, 2021).

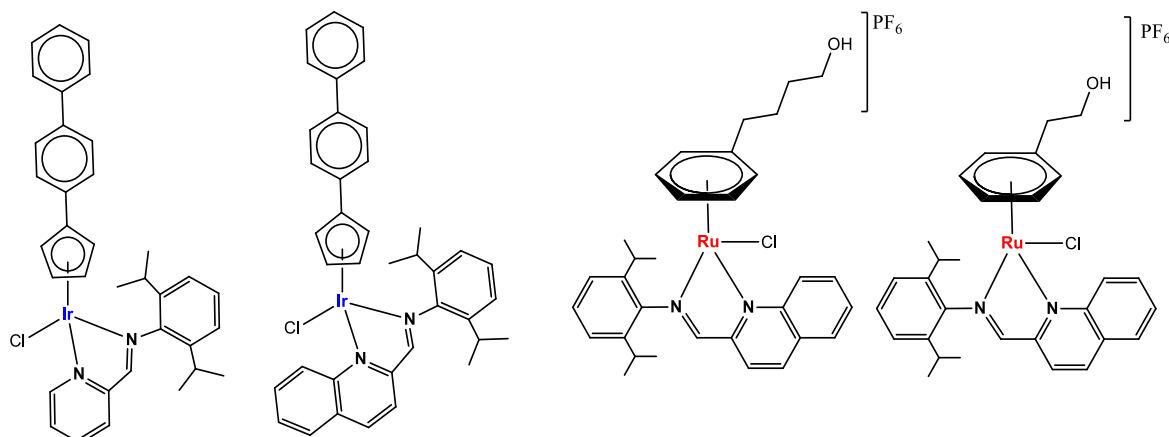
Figura 36- Compostos de platina(II) coordenados a iminopiridínicos de cadeia lipofílica.



Fonte: A autora.

Complexos de irídio(III) e rutênio(II) coordenados a iminopiridínicos, Figura 37, também são considerados fortes candidatos no tratamento do câncer. Testes *in vitro* com valores de IC₅₀ menores que 1,4 µM em células A549 e HeLa foram observados para os compostos de Ir^{III}. O mecanismo de ação proposto mostra que os compostos induzem apoptose celular em células A549 e HeLa interrompendo os ciclos celulares na fase S e G₂/M em direção às células cancerígenas A549, segundo os autores o ADN não é o principal alvo como na cisplatina (LI et al., 2017). Devido à baixa seletividade citotóxica apresentada pelos compostos acima, houve a substituição da porção irídio ciclopentadienil por rutênio areno. Os dados mostraram uma diminuição na citotoxicidade dos compostos com valores de IC₅₀ < 23 µM em células A549 e HeLa, não sendo tão potentes quanto os complexo de Ir^{III}, mas com uma grande seletividade citotóxica, aproximadamente 7 vezes mais ativos em relação às células não cancerosas (TIAN et al., 2018).

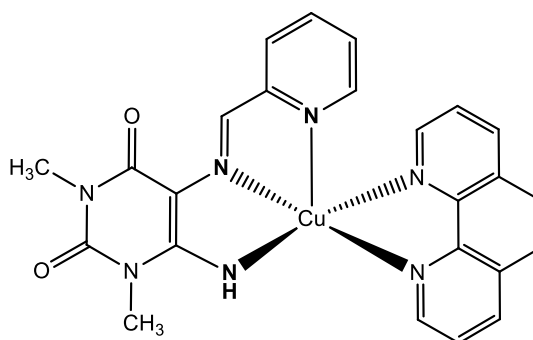
Figura 37- Complexos de irídio(III) e rutênio(II) coordenados a iminopiridinícos.



Fonte: A autora.

Complexos de cobre(II) coordenado ao ligante tridentado via átomos *N,N,N* derivado da reação de condensação entre piridina-2-carboxaldeído e a amina 5,6-diamino-1,3-dimetiluracil, Figura 38, inibem o crescimento das células de glioma C6 alterando a fase S do ciclo celular e induzindo a parada da fase G2/M, apoptose e, em menor extensão, autofagia, ambos modulados pela geração de ROS devido à sua propriedade de afetar o sistema de defesa antioxidante da enzima nessas células (ILLÁN-CABEZA et al., 2020).

Figura 38- Complexo de cobre(II) coordenado via átomos *N,N,N* do ligante iminopiridiníco.



Fonte: A autora.

Nesta perspectiva, os estudos de complexos metálicos com aplicação medicinal são de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, com menor toxicidade e resistente a células tumorais. Baseado nessas informações os complexos de Cu^{II} e Ni^{II} com beta-dicetona, hidrazida, iminopiridina e ligantes *N*-doadores podem ser candidatos promissores para testes farmacológicos *in vivo* como as Casiopeínas.

2. OBJETIVO

Pretendeu-se neste trabalho como objetivo geral a síntese, caracterização e o estudo da atividade antitumoral de novos compostos metálicos de Ni^{II} e Cu^{II}. Mais especificamente os objetivos específicos foram:

- i) Sintetizar novos complexos ternários de Ni^{II} coordenados a β -dicetonas e fenantrolina.
- ii) Sintetizar novos complexos ternários de Cu^{II} contendo a hidrazida benzopirano[4,3]tiofeno-2-ácido carboxílico (bth) e diferentes *N*-doadores.
- iii) Sintetizar e caracterizar os ligantes iminopiridinícos por RMN ¹H, UV-vis e IV.
- iv) Sintetizar duas novas séries de complexos de Cu^{II} com os ligantes iminopiridinícos na estequiometria 1:2 (sal de cobre/iminopiridiníco) e 1:1:1 (sal de cobre/iminopiridiníco/4-metilfenilinterpiridina).
- v) Caracterizar os complexos sintetizados, conforme a técnica necessária, por análise elementar, medidas de condutividade, difração de raios X de monocristal, medidas de susceptibilidade magnética, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), espectrometria de massas em alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS), espectroscopia de UV-Vis, reflectância difusa e infravermelho (IV).
- vi) Determinar os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%) de todos os novos compostos e dos respectivos ligantes em células tumorais de mama MCF-7 (linhagem do lúmen epitelial de tecido mamário derivada de sítios metastático de adenocarcinoma) e MDA-MB-231 (linhagem altamente agressiva, basal do epitélio mamário derivado de adenocarcinoma invasivo).
- vii) Realizar estudos de interação dos compostos mais promissores (menores valores de IC₅₀) com ct-ADN empregando técnicas de UV-vis e dicróismo celular seguido de estudos de ancoragem molecular.
- viii) Avaliar a atividade nuclease dos complexos selecionados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose;
- ix) Estudar o mecanismo pelo qual os complexos selecionados induzem morte celular através do ensaio *in vitro* de apoptose com Anexina V conjugada com FITC.
- x) Investigar o efeito dos complexos selecionados na migração celular de células cancerosas de mama MCF-7 e MDA-MB-231 pelo método Wound Healing.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Solventes

Os sais metálicos e os ligantes da classe β -dicetona, hidrazida e *N*-doador empregados neste trabalho foram obtidos comercialmente pela empresa Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. Os ligantes iminopiridinícos foram sintetizados a partir dos reagentes comercializados pela empresa Sigma-Aldrich. Os solventes foram obtidos comercialmente, com grau de pureza analítico, de procedência Sigma-Aldrich ou Vetec e foram utilizados sem tratamento prévio. A Tabela 4 apresenta informações sobre os reagentes utilizados neste trabalho.

Tabela 4- Dados e procedência dos reagentes utilizados nesse trabalho.

Reagentes	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Procedência
Nitrato de cobre(II) trihidratado	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	241,60	Sigma-Aldrich
Nitrato de níquel(II) hexahidratado	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	290,79	Sigma-Aldrich
1,10-fenantrolina monohidratada (fen)	C ₁₂ H ₈ N ₂	180,21	Sigma-Aldrich
4-4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina (dmb)	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	216,24	Sigma-Aldrich
2,2'.6',2''-terpiridina	C ₁₅ H ₁₁ N ₃	233,27	Sigma-Aldrich
4'(4-metilfenil)2,2'.6',2''-terpiridina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃	323,39	Sigma-Aldrich
2,6-diisopropilnilina	C ₁₀ H ₁₅ N	149,23	Sigma-Aldrich
2,6-dietilnilina	C ₁₀ H ₁₅ N	149,23	Sigma-Aldrich
4-cloroanilina	C ₆ H ₆ ClN	127,57	Sigma-Aldrich
4-metilnilina	C ₇ H ₉ N	107,15	Sigma-Aldrich
2-piridinacarbaldéido	C ₆ H ₅ NO	107,11	Sigma-Aldrich
Ácido para-toluenosulfônico	C ₇ H ₈ O ₃ S	172,20	Sigma-Aldrich
4,4,4-trifluoro-1-(2-furil)butanodiona	-1,3- C ₈ H ₅ F ₃ O ₃	206,12	Sigma-Aldrich
4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona	C ₁₀ H ₇ F ₃ O ₂	216,15	Sigma-Aldrich
4,4,4-trifluoro-1-(4-clorofenil)-1,3-butanodiona	C ₁₀ H ₆ ClF ₃ O ₂	250,60	Sigma-Aldrich
hidrazida do ácido 4-benzopirano [4,3]tiofeno-2-carboxílico	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	246,28	Sigma-Aldrich

3.2. Instrumentação

3.2.1 Análise Elementar

A análise quantitativa dos teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio foi realizada no laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU) utilizando um analisador elementar CHNS/O, modelo 2400 (serie 2) da Perkin-Elmer.

3.2.2 Análise Condutimétrica

As medidas de condutividade molar foram realizadas em um condutivímetro Tec-4MP da Tecnal à temperatura ambiente (27°C) e na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As soluções dos complexos foram preparadas nos solventes apropriados de grau espectroscópico (Sigma-Aldrich) com uma constante de célula igual a $1,03236 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.2.3 Difração de raios X de monocristal

Os experimentos de difração foram realizados no Laboratório de difração de raios X do Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense (UFF) em colaboração com os professores Dr. Guilherme P. Guedes e Dr. Jackson A.L.C. Resende (UFMT). Os monocristais do complexo **II** foram obtidos pela adição dos ligantes (previamente dissolvidos em 2 mL de metanol) ao sal de níquel $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,125 mmol) previamente solubilizado em metanol. A mistura foi agitada por 1 h e mantida por evaporação lenta durante cinco dias até a formação de cristais azuis. Os cristais foram então recolhidos e deixado sob temperatura ambiente. Assim, um único cristal foi montado em um difratômetro Bruker D8-Venture e os dados de difração de raios X foram coletados usando $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,710731 \text{ \AA}$) à temperatura ambiente. A coleta, redução e integração dos dados foram realizadas por meio do software APEX3.0 (BRUKER, 2016). A estrutura foi resolvida por métodos diretos e o refinamento pelo método dos mínimos quadrados completos utilizando matriz completo sobre F^2 com o “software” SHELX (SHELDRICK, 2015). Os átomos não-hidrogenoides foram refinados anisotropicamente enquanto as posições dos átomos de hidrogênio foram geradas e refinadas usando o método “riding model”.

3.2.4 Espectrometria de massas em alta resolução com ionização por electrospray (HRESIMS)

Os espectros de massas foram obtidos utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics), com ionização por electrospray (ESI), em colaboração com o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP - USP) e o Prof. Dr. Marcos Pivatto (IQ-UFU). As amostras foram solubilizadas em metanol ou acetonitrila e introduzidas utilizando seringa (100 μL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados foram adquiridos no modo positivo. Os valores teóricos para os complexos carregados foram calculados utilizando o software ChemDraw Ultra 12.0.

3.2.5 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

As análises de RPE foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em parceria com a Profa Dra. Ana Maria da Costa Ferreira. Os espectros de RPE foram registrados no espectrômetro da Bruker, modelo EMX, operando na banda X ($\nu = 9,50$ GHz) com potência de 20 mW e modulação de frequência de 100 kHz. As amostras foram introduzidas em tubos de quartzo (4 mm de diâmetro interno), e medidas no estado sólido ou em solução de DMSO, à temperatura ambiente ou a 77 K. DPPH (α,α' -difeníl- β -picrilhidrazil; $g = 2,0036$) foi usado como calibrador de frequência para todas as amostras.

3.2.6 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis) e reflectância difusa

Os espectros de absorbância na região do UV-Vis dos complexos foram registrados em diferentes concentrações utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2501 PC. Soluções dos complexos na concentração 1×10^{-2} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foram preparadas e posteriormente diluídas em soluções de concentrações 1×10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 1×10^{-5} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As análises no estado sólido foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2501 PC utilizando o acessório de reflectância difusa e o sulfato de bário como referência.

3.2.7 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais no infravermelho para os complexos e ligantes livres foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da Perkin-Elmer. As análises das amostras foram realizadas no estado sólido, utilizando o acessório de

Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante, na região compreendida entre 4000 e 220 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H (400 MHz) foram obtidos no laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), em um espectrômetro Bruker (400 MHz), modelo AscendTM 400 Avance III HD spectrometer (9,2 T) a 30 °C. As amostras dos ligantes foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ($\delta \text{ TMS} = 0,00$).

3.3. Métodos dos Estudos Biológicos

3.3.1 Citotoxicidade contra células de câncer de mama

Os testes *in vitro* de citotoxicidade dos compostos em estudo foram avaliados por diferentes grupos de pesquisa. Os estudos de atividade citotóxica dos complexos ternários de Ni^{II} e Cu^{II} e os ligantes livres *N*-doadores, β -dicetonas e hidrazida foram realizados no laboratório de pesquisa do Prof^o. Dr. Sérgio de Albuquerque na Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com a Profa. Dra. Carla D. Lopes. Enquanto os complexos de Cu^{II} e os ligantes iminopiridinícos e 4-metilfeniltepiridina foram avaliados no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob supervisão da Profa. Dra. Thaise Gonçalves Araújo. Para avaliar os efeitos antitumorais dos ligantes e complexos foi utilizado o teste MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método descrito por Mosman consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática de oxirredutases das células vivas. Para o teste, $1,0 \times 10^5$ células de câncer de mama das linhagens MDA-MB231 e MCF-7 foram semeadas em microplacas de 96 poços. Após 24 horas, os ligantes e complexos (250 a 0,024 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ou cisplatina (nas mesmas concentrações) foram adicionados sob a monocamada de células e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO_2 , por 24 ou 48 horas. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 10 μL de MTT (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) na concentração de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e após 3 horas de incubação, foi acrescentado à solução 50 μL de DMSO para dissolver os cristais de azul de formazana. A absorbância (A) foi determinada em 570 nm usando espectrofotômetro

de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da equação abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (A \text{ do tratamento}) / (A \text{ do controle negativo}) \times 100$$

O valor de IC_{50} (concentração ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) que inibe 50% o crescimento celular) foi determinado por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.3.2 Interação com ct-ADN via absorção UV-vísível

Os estudos de interação com ADN foram realizados no grupo de pesquisa do Prof^o. Dr. Adelino V.G. Netto no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em colaboração com a Prof^a. Dra. Mariete B. Moreira.

Foi preparada uma solução estoque de ct-ADN (calf thymus DNA) em solução tampão Tris-HCl $1,0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ / $10,0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl (pH = 7,2). A pureza do ct-ADN foi verificada por meio de medidas de UV-vis através da razão das absorbâncias de 260 nm e 280 nm ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$), a qual foi observada próximo ao valor descrito na literatura de 1,89, o que indicou que o ADN está livre de proteína (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

A concentração da solução ct-DNA foi determinada espectrofotometricamente usando a Lei de Lambert Beer ($\epsilon_{260\text{nm}} = 6600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) sendo $1,21\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os complexos metálicos foram preparados em concentrações fixas de $3,0\times 10^{-5}$, $4,0\times 10^{-5}$ e $2,5\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /DMSO, posteriormente foram titulados com alíquotas da solução estoque de ct-ADN em uma faixa de concentração de $5,76\times 10^{-6} - 4,98\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

O valor da constante de ligação (K_b) para a interação entre o DNA e os complexos metálicos foram obtidos por meio da equação de Benesi-Hildebrand:

$$\frac{A}{(A - A_0)} = \frac{\epsilon_C}{(\epsilon_{D-C} - \epsilon_C)} \times \frac{1}{K_b [DNA]}$$

onde A e A_0 são as absorbâncias do complexo livre e do aduto complexo-DNA respectivamente. ϵ_C e ϵ_{D-C} são os coeficientes de absorção do complexo livre e do aduto complexo-DNA, K_b é a constante de ligação.

3.3.3 Interação com ct-ADN por dicroísmo celular

Os espectros de dicroísmo circular do ct-ADN na presença dos complexos metálicos foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco, modelo J 815, na região entre 216 – 300 nm,

com velocidade de varredura de 100 nm/min e 8 acumulações. A solução estoque de ct-ADN foi preparada em solução tampão Tris-HCl $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ / $10,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ NaCl (pH = 7,2) em concentração fixa de $7,09 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Alíquotas crescentes na concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ dos complexos de níquel(II) foram adicionadas ao ct-ADN de modo que as razões molares (r) foram 0,04; 0,07 e 0,1. Para os complexos de cobre(II) alíquotas crescentes foram adicionadas em concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ de modo que as razões molares (r) foram 0,02; 0,05 e 0,09. $r = [\text{Complexo}]/[\text{ADN}]$.

3.3.4 Interação com ADN por Fluorescência

Nos experimentos de deslocamento de fluorescência Hoechst 33.258, 3mL de uma solução 20×10^{-6} mol L⁻¹ ADN e 2×10^{-6} mol L⁻¹ Hoechst 33.258 (em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} mol L⁻¹ / NaCl 100×10^{-3} mol L⁻¹, pH = 7,2) foram tituladas com alíquotas sucessivas de soluções dos compostos de Ni^{II} coordenados a fenantrolina e β-dicetona ($0 - 1,20 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Os espectros de emissão foram registrados na faixa de 358 – 660 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 338$ nm), usando um espectrofluorofotômetro Horiba Jobin Yvon modelo Fluorolog-3 FL3-122. As amostras foram incubadas por 5 min a 298 K.

3.3.5 Estudos de interação com ADN por Docagem Molecular

Os dados de docagem molecular foram obtidos em colaboração com o professor Dr. Ronaldo J. De Oliveira da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), apenas para os compostos de Ni^{II}. A melhor resolução dos dados cristalográficos de raios X do ct-ADN foram baixados do Protein Data Bank (PDB, código: 1BNA). Todas as moléculas de água foram removidas e, na etapa final, átomos de hidrogênio foram adicionados a uma molécula receptora antes de iniciar o processo de docagem. As simulações de docagem molecular foram realizadas com o software GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) suit versão 5.5. As estruturas binárias ct-ADN / Ni^{II} tiveram a energia otimizada pelo Software MOPAC2016TM (<http://openmopac.net/>) com método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013). A partir das estruturas otimizadas, as simulações semi-empíricas foram realizadas, afim de calcular a entalpia de interação entre as estruturas binárias ct-ADN e Ni^{II} (ΔH_{int}) de acordo com a equação abaixo, como descrito anteriormente (GONÇALVES et al., 2017)

$$\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{B}} - (\Delta H_{\text{ADN}} + \Delta H_{\text{Ni}^{\text{II}}})$$

onde ΔH_{B} , ΔH_{ADN} e $\Delta H_{\text{Ni}^{\text{II}}}$ são as entalpias de formação das estruturas binárias (complexos ct-ADN / Ni^{II}), ct-ADN e complexos de Ni^{II}, respectivamente.

3.3.6 Estudos de Clivagem por eletroforese em gel de agarose.

Os estudos de clivagem do ADN foram feitos no grupo de pesquisa do Prof^o. Dr. Robson J. De Oliveira Júnior na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O plasmídeo siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System - hMGFP utilizado nos estudos com sítio único de restrição à enzima NheI na posição do nucleotídeo 1654 foi obtido pela Promega. As misturas reacionais (volume total de 20 µL) foram preparadas a partir da adição de 30 ng / µL de plasmídeo, posteriormente o complexo de Ni^{II} em diferentes concentrações (30 µmol·L⁻¹ e 120 µmol·L⁻¹), em tampão PBS 1X com ou sem H₂O₂ (15 mmol·L⁻¹) e dimetilsulfóxido (DMSO 0,05%). Em seguida, as reações foram incubadas a 37 °C por 12 h e finalizadas pela adição de 10 µmol·L⁻¹ de tampão (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 30% de glicerol, 10 mmol·L⁻¹ de EDTA). As reações foram aplicadas em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio (10 µg·mL⁻¹) em tampão TBE (Tris-borato 90 mmol·L⁻¹, pH 8,0, EDTA 20 mmol·L⁻¹) e submetidas à eletroforese a 80 V por 3 h e fotografado sob luz ultravioleta. A quantificação dos produtos de clivagem foi realizada pelo software Image J 1.52a.

3.3.7 Detecção de apoptose por citometria de fluxo

O teste de apoptose foi realizado no laboratório de pesquisa do Prof^o. Dr. Sérgio de Albuquerque na Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com a Profa. Dra. Carla D. Lopes. Para avaliar os eventos de apoptose, $5,0 \times 10^6$ células de câncer de mama da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24 h de incubação, as placas foram tratadas com os complexos de níquel (10 µmol·L⁻¹) ou cisplatina (10 µmol·L⁻¹) como controle positivo de indução de apoptose por 48 h. Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS gelado e ressuspensas em tampão, de acordo com as instruções do kit. As células foram então incubadas com anexina V conjugada ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) na proporção (1:100) por mais 15 min, conforme recomendado pelo kit de detecção de apoptose de anexina FITC (BD Pharmingen™). Imediatamente, o iodeto de propídio (1 µg·mL⁻¹) foi adicionado antes da análise do citômetro de fluxo BD FACSCANTO™. A excitação / emissão usada para a anexina V conjugada com FITC foi de 494/518 nm, enquanto para o iodeto de propídio, a excitação foi de 585/617 nm. Foram contados 10.000 eventos por amostra e a fluorescência emitida por cada corante foi quantificada no software BD FACSDiva (BD Bioscience).

3.3.8 Ensaio de Migração Celular – Método Wound Healing

O ensaio de migração celular foi realizado no laboratório de pesquisa do Prof^o. Dr. Sérgio de Albuquerque na Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com a Profa. Dra. Carla D. Lopes utilizando o método Wound Healing. As linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^5 céls·mL⁻¹) mantidas na estufa com 5% de CO₂ até obter 100% de confluência. Com o auxílio de uma ponteira de micropipeta foram realizados riscos nas placas, com 3 lavagens usando o meio de cultura para a remoção das células que se soltaram. Os três compostos de Cu^{II} com hidrazida e *N*-doadores foram testados nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a MCF-7 e 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para a linhagem MDA-MB-231. A substância utilizada como controle foi a cisplatina nas concentrações 1, 5 e 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para ambas as linhagens. As substâncias de interesse foram adicionadas e as imagens dos riscos foram obtidas no tempo 0, 24 e 48 horas. Com o auxílio do software Image J foi possível medir a área do risco nos diferentes tratamentos e tempos e sua porcentagem foi calculada com a seguinte fórmula:

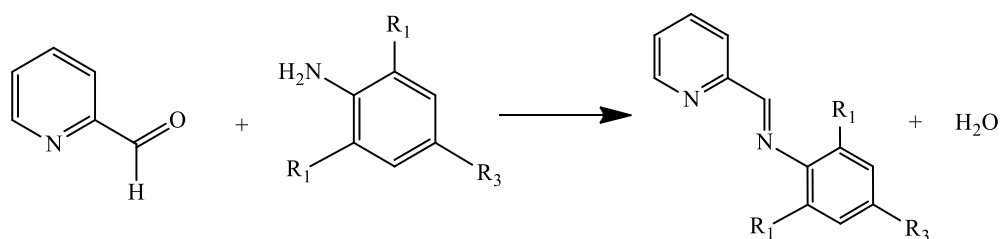
$$\% \text{ fechamento da risca} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{A_{t=0h}} \times 100$$

Onde $A_{t=0h}$ é a área no tempo inicial e $A_{t=\Delta h}$ é a área após o intervalo de tempo de incubação.

3.4. Síntese das Iminopiridinas

Os reagentes utilizados na síntese dos ligantes iminopiridinícos foram disponibilizados pelo prof^o Dr. André Luís Bogado da Universidade Federal de Uberlândia (ICENP/UFU). A partir das anilinas orto/para substituídas, Figura 39, as rotas sintéticas foram testadas na presença e ausência do catalisador e então empregadas de acordo com a literatura (RAMOS et al., 2019).

Figura 39- Esquema reacional dos ligantes iminopiridínicos com os substituintes nas posições orto/para da anilina.



LIGANTE	R ₁	R ₃
4-cloro- <i>N</i> -(piridina-2-metileno)anilina (Clmp)	H	Cl
2,6-dietil- <i>N</i> -(piridina-2-metileno)anilina (diemp)	CH ₂ CH ₃	H
2,6-diisopropil- <i>N</i> -(piridina-2-metileno)anilina (diipmp)	CH(CH ₃) ₂	H
4-metil- <i>N</i> -(piridina-2-metileno)anilina (memp)	H	CH ₃

Fonte: A autora.

4-cloro-*N*-(piridina-2-metileno)anilina, Clmp: A síntese do ligante Clmp foi reproduzida conforme relatado na literatura (RAMOS et al., 2019). Em um balão reacional 5 mmol de 2-piridinocarboxialdeído foram dissolvidos em 5 mL de éter dietílico e deixado em agitação com 10% em mol do ácido *p*-toluenosulfônico (0,5 mmol), então a 4-cloroanilina (5 mmol) dissolvida em 15 ml de éter dietílico foi adicionada na mistura. A solução resultante ficou sob agitação por 2 horas quando uma mudança na coloração da solução de bege para amarelo foi observada. O produto foi levado ao rotaevaporador (T = 40°C) e após evaporação do solvente, foi adicionado hexano e deixado em temperatura abaixo de zero até obtenção do sólido cristalino. O produto final foi filtrado, lavado com éter e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 36% (0,39 g). Cor: Amarelo. MM (g mol⁻¹): 216,66. RMN ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ (ppm): 8,74 (d, 1H, ³J_{H-H} 5,1 Hz), 8,60 (s, 1H), 8,21 (d, 1H, ³J_{H-H} 7,4 Hz), 7,85 (t, 1H), 7,40 (m, 3H), 7,25 (s, 2H). IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3331, 3298, 3196, 3064, 3050, 3003, 2934, 2918, 1624, 1587, 1566, 1478, 1463, 1434, 1405, 1349, 1090, 1006, 991, 967, 833, 773, 736, 697, 540, 427, 406, 362, 328, 310, 261, 252. UV-Vis (ACN), λ_{max} (nm/ L mol⁻¹ cm⁻¹): 323 (7,1 x 10³), 282 (1,3 x 10³), 232 (1,3 x 10³).

2,6-dietil-*N*-(piridina-2-metileno)anilina, diemp: Foram solubilizados 5 mmol de 2-piridinocarboxialdeído em 8 mL de diclorometano e deixado em agitação durante 5 min. Em seguida, 5 mmol da 2,6-dietilanilina em diclorometano foi adicionada gota-a-gota na mistura reacional. A solução resultante foi mantida em agitação por 24 horas. O produto foi levado ao rotaevaporador (T = 40°C) e após evaporação do solvente por vácuo, foi adicionado hexano e

deixado em temperatura abaixo de zero, até obtenção do sólido cristalino. O produto final foi filtrado, lavado com éter e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 68% (0,81 g). Cor: Amarelo. MM (g mol^{-1}): 238,33. RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ (ppm): 8,75 (m, 1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ 4,8 Hz), 8,36 (s, 1H), 8,30 (dt, 1 H, $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ 8,0 Hz), 7,87 (m, 1H), 7,44 (m, 1H, $^4\text{J}_{\text{H-H}}$ 1,3 Hz), 7,11 (m, 3H), 2,54 (q, 4H), 1,17 (t, 6H). IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3057, 2965, 2931, 2870, 1640, 1584, 1565, 1467, 1454, 1435, 1375, 1354, 1294, 1256, 1188, 1146, 1099, 1088, 1061, 1040, 992, 874, 773, 753, 745, 703, 617, 563, 407, 357, 324, 250. UV-Vis (ACN), λ_{max} ($\text{nm/L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 364 ($3,8 \times 10^3$), 275 ($1,3 \times 10^4$).

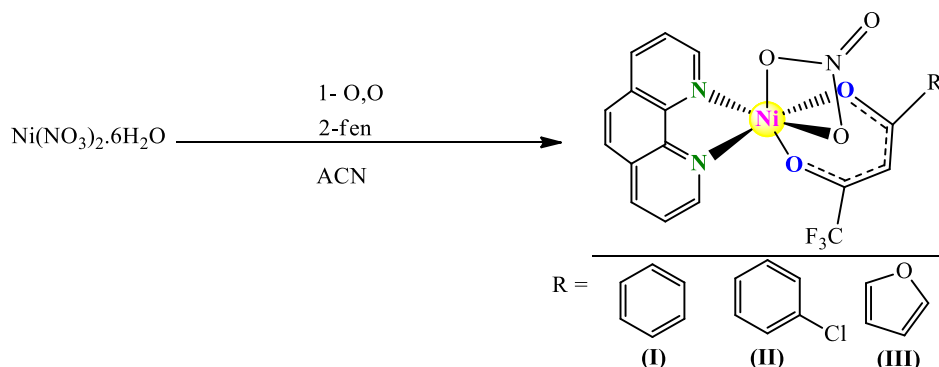
2,6-diisopropil-N-(piridina-2-metileno)anilina, diipmp: O ligante diipmp foi cedido pelo professor Dr. André Luís Bogado (RAMOS et al., 2019).

4-metil-N-(piridina-2-metileno)anilina, memp: Mesmo procedimento do ligante Clmp (RAMOS et al., 2019). Rendimento: 84% (0,83 g). Cor: Amarelo. MM (g mol^{-1}): 196,25. RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ (ppm): 8,73 (m, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,22 (d, 1H, $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ 7,9 Hz), 7,83 (m, 1H), 7,39 (m, 1H, $^4\text{J}_{\text{H-H}}$ 1,4 Hz), 7,25 (s, 4H), 2,41 (s, 3H). IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3052, 3006, 2986, 2916, 2856, 1626, 1601, 1583, 1567, 1504, 1464, 1439, 1350, 1200, 1148, 1042, 991, 977, 884, 823, 785, 772, 765, 741, 712, 616, 541, 522, 498, 460, 405, 383, 345, 301, 256. UV-Vis (ACN), λ_{max} ($\text{nm/L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 333 ($6,2 \times 10^3$), 283 ($9,7 \times 10^3$), 234 ($1,1 \times 10^4$).

3.5. Síntese dos Complexos

3.5.1 Complexos de Ni^{II} coordenados a β -dicetonas e fenantrolina

As sínteses dos complexos são relatadas como se segue e conforme o esquema da Figura 40: 0,5 mmol (0,1425 g) do ligante β -dicetona (4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (**bta**), 4-clorofenil-4,4,4-trifluoro-1,3-butanodiona (**btc**) ou 4,4,4-trifluoro-1-(2-furil)-1,3-butanodiona (**btf**)) foi adicionado a 0,5 mmol (0,1454 g) do sal $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ previamente solubilizado em acetonitrila (2 mL). A reação ficou em agitação durante 30 min quando 0,5 mmol (0,0901 g) de fenantrolina (fen) previamente dissolvida em acetonitrila (1 mL) foi adicionada gota a gota. A mistura resultante foi agitada por 24 h quando o produto final foi removido por filtração, lavado com acetonitrila e seco sob pressão reduzida.

Figura 40- Esquema reacional para obtenção dos complexos de Ni^{II}.

Complexo **I** - $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{bta})(\text{fen})]$: MM (g mol^{-1}): 516,05. Rendimento: 62%. Análise elementar para $\text{NiC}_{22}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5$: C, 51,20; H, 2,73; N, 8,14%; Encontrado: C, 51,26; H, 2,69; N, 8,33%. (+)-HRESIMS (acetonitrila), m/z : 453,0355 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$ (calc. para $\text{NiC}_{22}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$, 453,0356 (Δ -0,22 ppm)). IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3226, 3193, 3157, 3072, 3029, 3007, 2970, 1623, 1613, 1596, 1576, 1537, 1518, 1488, 1464, 1426, 1316, 1278, 1181, 1127, 1079, 1025, 849, 808, 763, 724, 707, 646, 583, 526, 505, 445, 427, 396, 298, 270, 255. UV-Vis (acetonitrila), λ_{max} (ϵ): 338 ($2,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 291 ($2,30 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 268 ($5,14 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 224 ($5,80 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $\Lambda_{\text{M}}(\text{ACN}) = 141,3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Complexo **II** - $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{btc})(\text{fen})]$: MM (g mol^{-1}): 550,50. Rendimento: 62%. Análise elementar para $\text{NiC}_{22}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_5$: C, 48,00; H, 2,38; N, 7,63%; Encontrado: C, 48,43; H, 2,32; N, 7,79%. (+)-HRESIMS (acetonitrila), m/z : 486,9967 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$ (calc. para $\text{NiC}_{22}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2$, 486,9966 (Δ 0,20 ppm)). IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3326, 3103, 3128, 3089, 3076, 3031, 2971, 2942, 1614, 1590, 1715, 1566, 1538, 1518, 1461, 1424, 1291, 1280, 1252, 1225, 1182, 1148, 1129, 1089, 1066, 1025, 1014, 849, 784, 737, 723, 669, 647, 575, 486, 444, 429, 301, 268, 255, 242. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 340 ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 291 ($2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 269 ($5,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 223 ($5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $\Lambda_{\text{M}}(\text{acetonitrila}) = 133,9 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Complexo **III** - $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{btf})(\text{fen})]$: MM (g mol^{-1}): 506,01. Rendimento: 70%. Análise elementar para $\text{NiC}_{20}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$: C, 47,47; H, 2,39; N, 8,30%; Encontrado: C, 47,17; H, 2,13; N, 8,20%. (+)-HRESIMS (acetonitrila), m/z : 443,0148 $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$ (calc. para $\text{NiC}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$, 443,0148). IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3155, 3144, 3125, 3067, 1606, 1581, 1537, 1515, 1488, 1437, 1427, 1391, 1317, 1286, 1261, 1240, 1187, 1140, 1123, 1087, 1074, 1025, 954, 913, 886, 724,

684, 645, 595, 586, 428, 406, 353, 297, 263, 247, 226. UV-Vis (ACN), λ_{\max} (ϵ): 355 ($2,47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 342 ($2,57 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 290 ($2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 269 ($4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 224 ($5,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $\Lambda_M(\text{acetonitrila}) = 133,7 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

3.5.2 Complexos de Cu^{II} coordenados a hidrazida e *N*-doadores

Complexo **IV** – [Cu(bth)(fen)](NO₃)₂·3H₂O: Uma suspensão 0,5 mmol do ligante bth foi adicionada em 0,5 mmol de nitrato de cobre (II) formando um precipitado verde claro. Após 24 h em agitação, uma solução metanólica 0,5 mmol de fenantrolina foi adicionada lentamente ao balão da reação. Após 48 h de agitação, o precipitado verde formado foi filtrado, lavado com metanol e éter e seco sob pressão reduzida. MM (g mol⁻¹): 668,09. Rendimento: 65%. Análise elementar para CuC₂₄H₂₄N₆O₁₁S: C, 43,15; H, 3,62; N, 12,58%; Encontrado: C, 43,45; H, 3,54; N, 12,43%. (+)-HRESIMS (metanol), *m/z*: 488,0346 [M–2NO₃–H]⁺ (calc. para CuC₂₄H₂₄N₆O₁₁S, 488,0368). IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3537, 3410, 3161, 3094, 3062, 1647, 1607, 1583, 1566, 1524, 1490, 1467, 1432, 1396, 1315, 1302, 1218, 1184, 1108, 1041, 1034, 1008, 972, 875, 849, 821, 794, 767, 719, 689, 567, 554, 489, 434, 403, 355, 332, 303, 265, 249. UV-Vis (ACN e DMSO), λ_{\max} (ϵ): 345 ($3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 296 ($3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 270 ($7,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 654 ($65 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $\Lambda_M(\text{metanol}) = 172,9 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

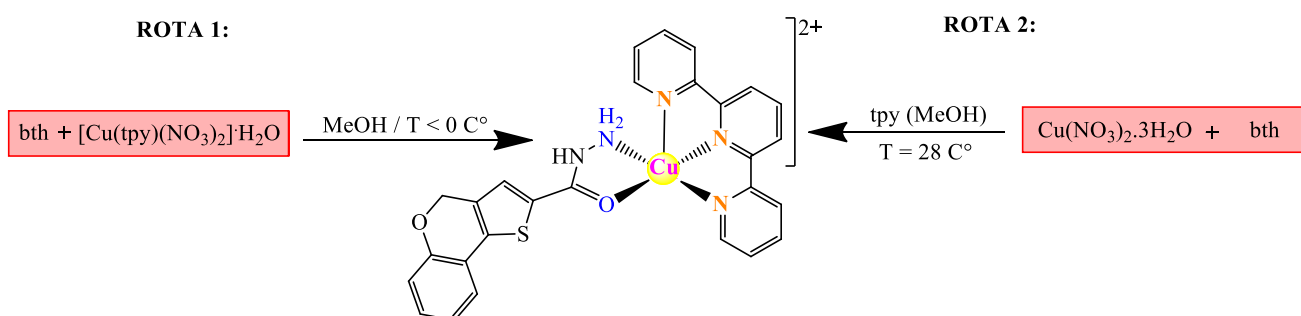
Complexo **V** – [Cu(bth)(dmb)](NO₃)₂: Mesmo procedimento do complexo **IV**. MM (g mol⁻¹): 650,07. Rendimento: 70%. Análise elementar para CuC₂₄H₂₂N₆O₁₀S: C, 44,34; H, 3,41; N, 12,93%; Encontrado: C, 44,42; H, 3,33; N, 12,51%. (+)-HRESIMS (metanol), *m/z*: 524,0555 [M–2NO₃–H]⁺ (calc. para CuC₂₄H₂₂N₆O₁₀S, 524,0575). IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3133, 3075, 3030, 2852, 1650, 1621, 1612, 1586, 1573, 1532, 1501, 1471, 1439, 1409, 1395, 1331, 1317, 1299, 1260, 1232, 1197, 1175, 1106, 1048, 1040, 1027, 1009, 973, 921, 879, 872, 850, 837, 821, 794, 741, 691, 533, 491, 479, 433, 404, 358, 332. UV-Vis (ACN e DMSO), λ_{\max} (ϵ): 345 ($4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 298 ($5,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 287 ($5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 248 ($5,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 653 ($65 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $\Lambda_M(\text{metanol}) = 166,2 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Complexo **VI** – [Cu(bth)(tpy)](NO₃)₂: Duas rotas sintéticas foram utilizadas na síntese do composto, Figura 41, para obtenção do produto com maior rendimento e pureza como relatado a seguir.

Método 1 $[\text{Cu}(\text{bth})(\text{tpy})](\text{NO}_3)_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$: 0,5 mmol do ligante bth solubilizado em metanol foi adicionado no balão contendo uma solução metanólica 0,5 mmol do complexo $[\text{Cu}(\text{tpy})(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ previamente sintetizado. A síntese ficou sob agitação durante 2 h em temperatura abaixo de zero. O precipitado verde formado foi filtrado, lavado com metanol e éter e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 61%. MM (g mol^{-1}): 703,13. Análise elementar para $\text{CuC}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}$: C, 46,12; H, 3,58; N, 13,94%; Encontrado: C, 46,66; H, 3,52; N, 13,84%. IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3440, 3078, 1586, 1515, 1476, 1448, 1392, 1365, 1333, 1297, 1251, 1082, 1040, 1023, 926, 879, 775, 732, 649, 437, 417, 378, 278, 252, 237, 223. UV-Vis (ACN e DMSO), λ_{max} (ϵ): 339 ($6,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 327 ($6,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 302 ($3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 286 ($5,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 276 ($4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 266 ($4,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 253 ($4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 686 ($74 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Λ_{M} (acetonitrila) = $224,7 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Método 2 $[\text{Cu}(\text{bth})(\text{tpy})](\text{NO}_3)_2$: 0,5 mmol do sal de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em metanol foi adicionado no balão com 0,5 mmol de terpiridina e deixado sob agitação. Em seguida, na mesma proporção estequiométrica 0,5 mmol do ligante bth em suspensão de metanol foi adicionado gota-a-gota durante um período de 2 h. Após 48 h de agitação o precipitado verde formado foi filtrado, lavado com metanol e éter e seco sob pressão reduzida. Rendimento: 42%. MM (g mol^{-1}): 667,10. Análise elementar para $\text{CuC}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}$: C, 48,61; H, 3,17; N, 14,70%; Encontrado: C, 48,21; H, 2,87; N, 13,91%.

Figura 41- Rotas sintéticas utilizadas na obtenção do composto $[\text{Cu}(\text{bth})(\text{tpy})](\text{NO}_3)_2$.

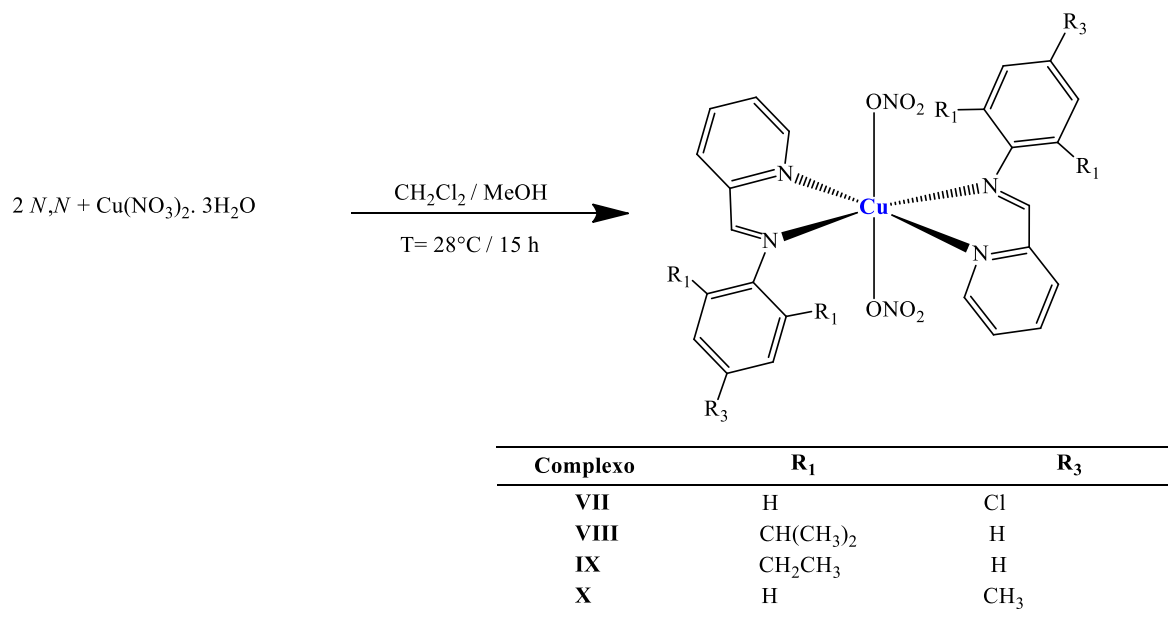


3.5.3 Complexos de Cu^{II} coordenados a iminopiridinas e 4-metilfenilterpiridina

Complexo VII – $[\text{Cu}(\text{Clmp})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: O procedimento experimental descrito para o complexo VII é o mesmo empregado na síntese dos complexos VII – X como representado na Figura 42. Em um balão 0,25 mmol do ligante Clmp (0,049 g) foi solubilizado em 10 mL de

diclorometano e deixado em agitação. Posteriormente, uma solução etanólica 0,25 mmol (0,0302 g) do sal de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foi preparada e adicionada gota-a-gota sob o ligante em agitação. Após 15 h de agitação, a solução foi retirada e todo o solvente foi removido a vácuo. O pó de cor verde cristalino foi obtido com adição de éter ao balão, então foi filtrado, lavado com diclorometano e etanol e seco à vácuo. MM (g mol^{-1}): 656,92. Rendimento: 98%. Análise elementar para $\text{CuC}_{24}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_8$: C, 43,88; H, 3,88; N, 12,79%; Encontrado: C, 43,66; H, 2,90; N, 12,41%. (+)-HRESIMS (metanol), m/z : 595,2853 $[\text{M}-2\text{NO}_3]^+$ (calc. para $\text{CuC}_{24}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_8$, 595,2857). IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3478, 3092, 3066, 3032, 1596, 1487, 1383, 1325, 1309, 1296, 1235, 1204, 1156, 1089, 1057, 1026, 1011, 909, 839, 823, 780, 702, 650, 562, 541, 524, 491, 413, 382, 323, 302, 264, 253, 246, 237, 233. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 325 ($1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 290 ($1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 239 ($3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 662, 691 ($92,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Λ_{M} (metanol) = $179,79 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Figura 42- Esquema reacional para obtenção dos complexos de Cu^{II} coordenados as Iminopiridinas.



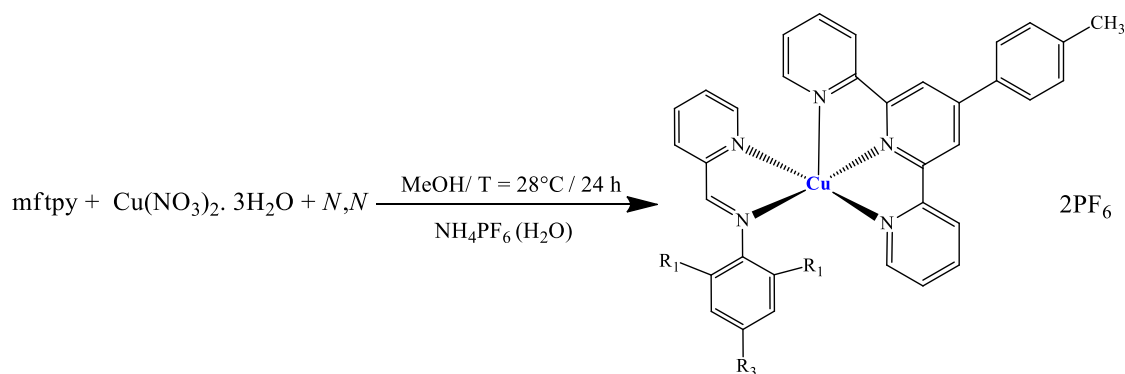
Complexo **VIII** – $[\text{Cu}(\text{diipmp})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$: MM (g mol^{-1}): 738,33. Rendimento: 88%. Análise elementar para $\text{CuC}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_7$: C, 58,56; H, 6,28; N, 11,38%; Encontrado: C, 58,78; H, 5,92; N, 11,31%. IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3438, 3102, 3066, 3033, 2965, 2870, 1634, 1600, 1462, 1447, 1388, 1329, 1282, 1228, 1178, 1110, 1028, 909, 801, 777, 759, 657, 572, 543, 501, 473, 428, 315, 281, 277, 253, 245, 236, 232. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 336

($1,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 278 ($1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 684, 735 ($131,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Λ_{M} (metanol) = $136,37 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Complexo **IX** – $[\text{Cu}(\text{diemp})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: MM (g mol^{-1}): 700,24. Rendimento: 77%. Análise elementar para $\text{CuC}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_8$: C, 54,89; H, 5,76; N, 12,00%; Encontrado: C, 55,28; H, 5,52; N, 12,21%. IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3452, 3075, 3030, 2970, 2936, 2878, 1635, 1599, 1572, 1454, 1327, 1276, 1225, 1179, 1160, 1109, 1057, 1027, 909, 868, 812, 772, 655, 504, 428, 380, 309, 253, 248, 246, 237, 224. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 333 ($4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 285 ($1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 690, 736 ($179,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Λ_{M} (metanol) = $155,87 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Complexo **X** – $[\text{Cu}(\text{memp})_2(\text{NO}_3)_2]$: MM (g mol^{-1}): 580,05. Rendimento: 88%. Análise elementar para $\text{CuC}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6$: C, 53,84; H, 4,17; N, 14,49%; Encontrado: C, 54,34; H, 4,30; N, 14,35. IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3646, 3388, 3053, 3031, 2956, 2927, 1633, 1598, 1571, 1506, 1444, 1506, 1445, 1331, 1280, 1232, 1201, 1109, 1021, 910, 817, 785, 710, 654, 645, 556, 547, 524, 510, 473, 424, 415, 349, 310. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 329 ($1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 289 ($2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 716, 696 ($91,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Λ_{M} (metanol) = $229,66 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Complexo **XI** – $[\text{Cu}(\text{Clmp})(\text{mftpy})](\text{PF}_6)_2$: A rota sintética utilizada para obter o composto **XI** é semelhante para os compostos **XII** e **XIII** conforme descrito a seguir e representado na Figura 43. 0,25 mmol do sal de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado ao balão contendo 0,25 mmol (0,081 g) do ligante 4-metilfenilinterpiridina (mftpy) em metanol. Após 30 min em agitação 0,25 mmol do ligante Clmp foi adicionado à solução que mudou de coloração azul para verde. A mistura reacional ficou em agitação por 24 h e após esse período quase todo o solvente foi removido a vácuo. Então, uma solução aquosa 0,5 mmol de NH_4PF_6 foi adicionada ao balão, formando um precipitado verde que foi filtrado, lavado com água, metanol e éter e deixado para secar a vácuo. Posteriormente, o composto foi purificado em água, filtrado e seco a vácuo. MM (g mol^{-1}): 893,53. Rendimento: 90%. Análise elementar para $\text{CuC}_{34}\text{H}_{26}\text{ClF}_{12}\text{N}_5\text{P}_2$: C, 45,70; H, 2,93; N, 7,84%; Encontrado: C, 45,80; H, 2,73; N, 7,90. IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3102, 3038, 2971, 2921, 2861, 1620, 1605, 1558, 1490, 1478, 1447, 1432, 1406, 1369, 1315, 1249, 1197, 1167, 1098, 827, 815, 790, 772, 743, 728, 659, 555, 503, 473, 441, 412. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 326 ($2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 286 ($3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 230 ($4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 617, 616 ($46,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Λ_{M} (acetonitrila) = $281,75 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Figura 43- Esquema reacional para obtenção dos complexos de Cu^{II}.

Complexo	R ₁	R ₃
XI	H	Cl
XII	CH ₂ CH ₃	H
XIII	H	CH ₃

Complexo **XII** – [Cu(diemp)(mftpy)](PF₆)₂: MM (g mol⁻¹): 915,19. Rendimento: 60%. Análise elementar para CuC₃₈H₃₅F₁₂N₅P₂: C, 50,20; H, 3,22; N, 7,70%; Encontrado: C, 49,85; H, 3,99; N, 7,72. IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3086, 2971, 2934, 2876, 1603, 1573, 1556, 1476, 1452, 1429, 1404, 1367, 1312, 1249, 1166, 1113, 1097, 1057, 1032, 1021, 827, 789, 555, 502, 425, 414. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 327 (2,1 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 285 (3,0 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 229 (4,6 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 638, 625 (33,0 M⁻¹ cm⁻¹). Λ_{M} (acetonitrila) = 304,55 S cm² mol⁻¹.

Complexo **XIII** – [Cu(memp)(mftpy)](PF₆)₂: MM (g mol⁻¹): 915,18. Rendimento: 75%. Análise elementar para CuC₃₈H₃₅F₁₂N₅P₂: C, 48,15; H, 3,35; N, 8,02%; Encontrado: C, 48,20; H, 3,31; N, 8,06. IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3126, 3096, 3034, 2922, 2865, 1605, 1573, 1558, 1508, 1479, 1447, 1432, 1406, 1369, 1250, 1198, 1164, 1100, 1058, 1022, 818, 788, 765, 744, 728, 691, 691, 658, 648, 555, 503, 471, 428, 415. UV-Vis (ACN), λ_{max} (ϵ): 329 (2,9 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 287 (3,4 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 228 (4,9 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 611, 612 (45,0 M⁻¹ cm⁻¹). Λ_{M} (acetonitrila) = 298,38 S cm² mol⁻¹.

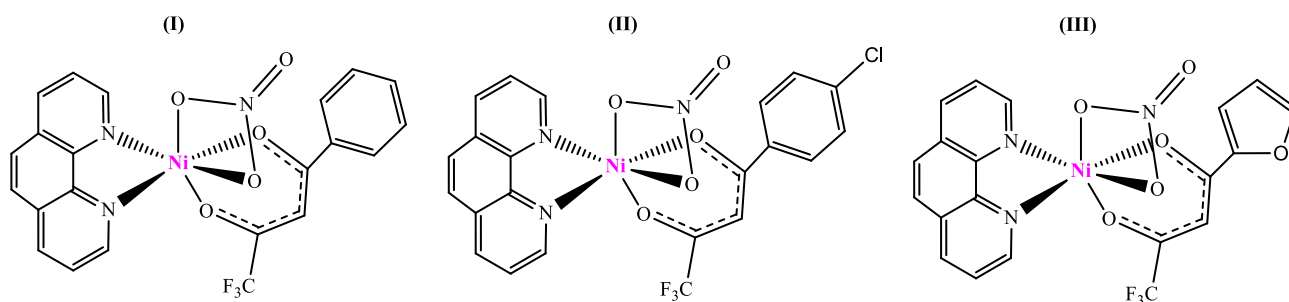
4. Resultados e Discussão

Neste trabalho três diferentes séries de compostos de Cu^{II} e Ni^{II} foram obtidas a partir de diferentes rotas sintéticas, as estruturas elucidadas e sua atividade biológica avaliada em células tumorais de mama. Assim, para uma melhor discussão, nesta seção os resultados de caracterização e estudos biológicos foram separados de acordo com a classe de ligantes: β-dicetonas, hidrazidas e iminopiridinas.

4.1. Complexos de Ni^{II} coordenados a β-dicetonas e fenantrolina

Três novos complexos de Ni^{II} contendo β-dicetonas e 1,10-fenantrolina (fen) como ligantes foram preparados a partir do sal de níquel nitrato de níquel (II) hexahidratado (Ni(NO₃)₂·6H₂O) e dos ligantes quelantes em proporção equimolar, ambos solubilizados em acetonitrila à temperatura ambiente. Os compostos obtidos foram caracterizados por análise elementar (CHN), IV, UV-Vis, reflectância difusa, espectrometria com ionização por eletrospray de alta resolução (HRESIMS), RPE e medidas magnéticas e de condutividade. Além disso, a estrutura cristalina do complexo **II** também foi determinada. Todos os complexos de Ni^{II} isolados são sólidos azuis, solúveis em DMSO ou acetonitrila, em que as β-dicetonas (O,O), o íon nitrato (O,O) e a fenantrolina (fen) atuam como ligantes bidentados, formando complexos de fórmula geral [Ni(η²-NO₃)(O,O)(fen)] como representado na Figura 44.

Figura 44- Estrutura proposta dos complexos de fórmula [Ni(η²-NO₃)(O,O)(fen)].



4.1.1 Análise Elementar e Condutimétrica

Os valores calculados de CHN das estruturas propostas para os complexos de Ni^{II} estão em acordo com os dados experimentais, apresentados na Tabela 5, é possível inferir que os compostos estão puros, uma vez que os desvios foram menores que ±0,5%.

Tabela 5- Valores calculados e experimentais de CHN dos complexos de Ni^{II}.

Complexos	%C _{calc.}	%C _{exp.}	%H _{calc.}	%H _{exp.}	%N _{calc.}	%N _{exp.}
I	51,10	51,26	2,92	2,69	8,13	8,33
II	47,91	48,43	2,56	2,32	7,62	7,79
III	47,38	47,17	2,58	2,13	8,29	8,20

Fonte: Dados de pesquisa.

Os valores de condutividade dos complexos de Ni^{II} foram obtidos a partir de soluções 1×10^{-3} M em acetonitrila e foram comparados com os trabalhos de Geary (GEARY, 1971) e Velho (VELHO, 2006) apresentados na Tabela 5.

Tabela 6- Parâmetros de condutividade molar para diferentes tipos de eletrólito proposto por Geary e Velho.

Solvente	Eletrólito	Faixa proposta por Geary (S cm ² mol ⁻¹)	Faixa proposta por Velho (S cm ² mol ⁻¹)
Acetonitrila	1:1	100–160	57–204
Acetonitrila	2:1	220–300	162–345
Dimetilsulfóxido	1:1	50-70	20-62
Dimetilsulfóxido	2:1	-	54-110

Fonte: (GEARY, 1971; VELHO, 2006)

Os valores encontrados para os compostos, Tabela 7, são maiores que $133,7 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ e estão de acordo com os dados propostos na literatura para complexos em solução que são classificados como eletrólitos 1:1. Este comportamento pode ser justificado pela presença da β -dicetona desprotonada, que mesmo em solução permanece coordenada ao centro metálico, bem como ao ânion nitrato (NO_3^-) que em solução se encontra na forma livre, o que leva à formação de íons complexos de fórmula geral $[\text{Ni}(\text{O},\text{O})(\text{fen})]^+$. Adicionalmente, foram realizados testes de estabilidade dos complexos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) durante um período de 3 h. Nesse intervalo, os valores de condutividade permaneceram constantes para os complexos **I**, **II** e **III**, conforme os valores apresentados na Tabela 7, comprovando que apenas o íon nitrato abandona a esfera de coordenação do cátion Ni^{II} que permanece coordenado ao ânion β -dicetonato e a fenantrolina - $[\text{Ni}(\text{O},\text{O})(\text{fen})]^+$.

Tabela 7- Valores de condutividade molar dos complexos de Ni^{II} obtidos a partir de soluções $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sob temperatura ambiente ($T \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Complexos	Solvente	Condutividade ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
I	Acetonitrila	141,3
II	Acetonitrila	133,9
III	Acetonitrila	133,7
I	Dimetilsulfóxido	36,40
II	Dimetilsulfóxido	36,18
III	Dimetilsulfóxido	33,37

Fonte: Dados de pesquisa.

4.1.2 Espectrometria com ionização por electrospray de alta resolução

Os complexos sintetizados foram analisados por espectrometria de massas em alta resolução utilizando metanol e água na proporção 9:1 ou 7:3, V/V. Os espectros foram registrados no modo positivo. Os valores de m/z são referentes ao isótopo ^{58}Ni , que apresenta abundância isotópica de 68,08%.

O pico do íon molecular dos complexos de Ni^{II} está relacionado com a razão massa/carga do complexo, atribuído à perda do nitrato. Para o complexo **III**, é possível observar a presença do pico do íon molecular em m/z 443,0148 (calc. para $[\text{NiC}_{20}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3]^+$, m/z 443,0148) referente à espécie $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$, como mostra a Figura 45. Já para os complexos **I** e **II** o pico do íon molecular é encontrado em m/z 453,0355 (calc. para $[\text{NiC}_{22}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2]^+$, m/z 453,0356) e m/z 486,9967 (calc. para $[\text{NiC}_{22}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}]^+$, m/z 486,9966), Figuras 46 e 47 respectivamente. É interessante ressaltar que o erro calculado para cada pico de íon molecular, Tabela 8, é menor que 5, sugerindo que as fórmulas moleculares propostas para os complexos de níquel(II) estão corretas.

A intensidade dos picos do íon molecular nos espectros dos complexos **I**, **II** e **III** pode estar relacionada com o grupo substituinte das β -dicetonas que influencia nas estabilidades dos complexos de Ni^{II} como destacado por Patel e Woods (WOODS; PATEL, 1994). O padrão isotópico teórico de todos complexos de Ni^{II} foi obtido utilizando o programa ChemDraw Ultra 12.0 e os valores teóricos estão em concordância com os experimentais conforme Tabela 8, apresentando um valor de erro aceitável para o método utilizado.

Levando em consideração os sinais em m/z 623,0821 (calc. para $[\text{NiC}_{32}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3]^+$, m/z 623,0836), 633,1045 (calc. para $[\text{NiC}_{34}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2]^+$, m/z 633,1043) e 667,0648 (calc. para

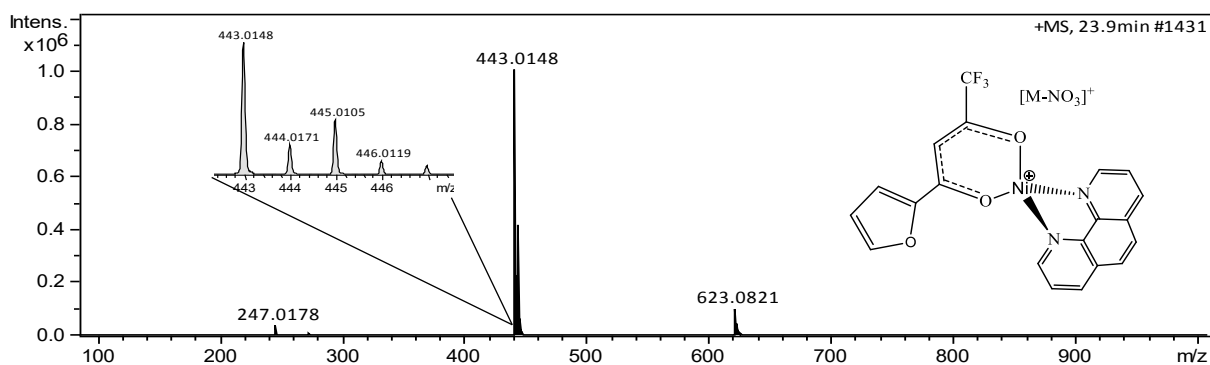
$[\text{NiC}_{34}\text{H}_{21}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_2]^+$, m/z 667,0654) nos espectros de massas dos complexos **III**, **I** e **II**, respectivamente, pode-se propor que durante os experimentos de ionização por eletrospray, ocorreu a formação de complexos de níquel(II) coordenados a duas fenantrolinas e a uma β -dicetona, espécies $[\text{Ni}(\text{fen})_2(\beta\text{-diona})]^+$ (GASQUE; MORENO-ESPARZA; RUIZ-RAMÍREZ, 1992). Contudo, de acordo com os dados de análise elementar (CHN) os compostos de Ni^{II} estão puros, descartando assim a possibilidade de mais de um produto na etapa final da síntese dos compostos.

Tabela 8- Valores do padrão isotópico calculado e experimental obtidos para os complexos carregados observados nos EMs dos compostos **I-III**.

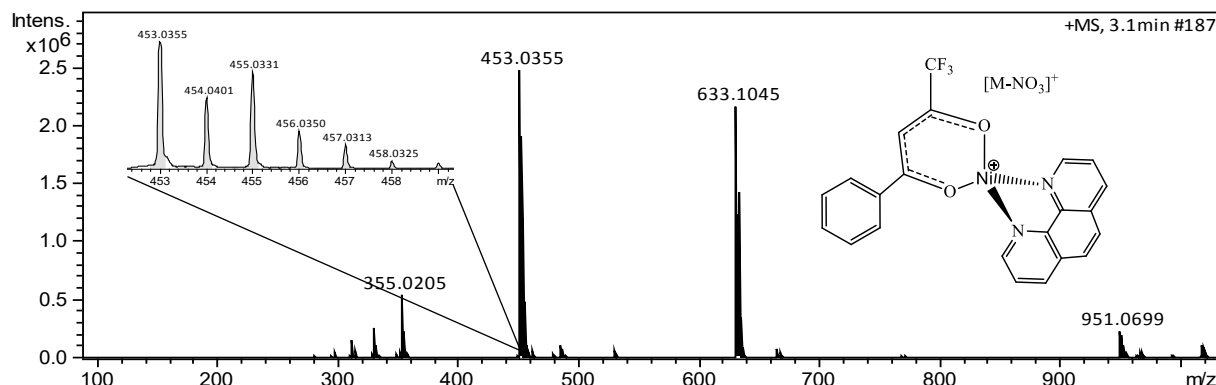
Complexos	Padrão Isotópico Calc.	Padrão Isotópico Experimental	erro
I	453,0356(100%)	453,0355	-0,22
	454,0389(23.8%)	454,0401	2,64
	455,0310(38.5%)	455,0331	4,61
	456,0344 (9.2%)	456,0350	1,31
	457,0286 (5.3%)	457,0313	5,90
	458,0319 (1.3%)	458,0325	1,31
II	486,9966(100%)	486,9967	0,20
	488,9921(38.5%),	488,9934	2,65
	490,9891(12.3%)	490,9901	2,04
III	443,0148(100%)	443,0148	0,00
	444,0182(21.6%)	444,0171	-2,47
	445,0103(38.5%)	445,0105	0,45
	446,0136(8.3%)	446,0119	-3,81

Fonte: Dados de pesquisa.

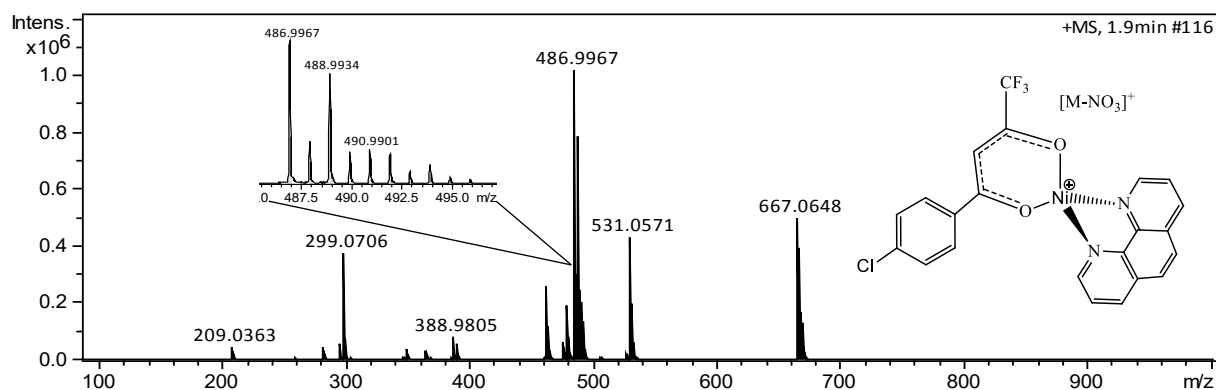
Figura 45- Espectro de massas do complexo **III**.



Fonte: Dados de pesquisa.

Figura 46- Espectro de massas do complexo I.

Fonte: Dados de pesquisa.

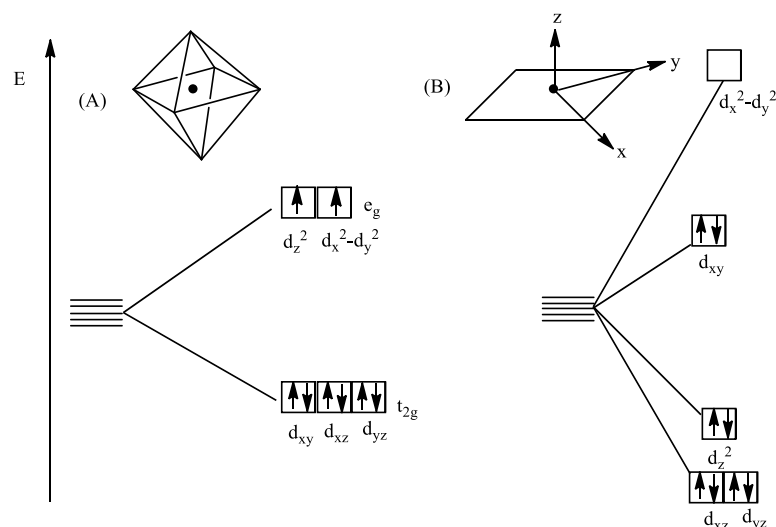
Figura 47- Espectro de massas do complexo II.

Fonte: Dados de pesquisa.

4.1.3 Suscetibilidade magnética

Complexos de níquel(II) apresentam configuração eletrônica [Ar]3d⁸ e preferencialmente número de coordenação (NC) igual a 6 ou 4. Com o objetivo de correlacionar estrutura eletrônica, geometria e magnetismo, medidas de suscetibilidade magnética foram realizadas a fim de concluir se os compostos poderiam ser paramagnéticos, com os elétrons desemparelhados no orbitais e_g, ou diamagnéticos, com todos os elétrons emparelhados. A Figura 48 representa os desdobramentos do campo cristalino de complexos d⁸ para cada caso.

Figura 48- Diagramas de desdobramento de campos cristalinos de íon com configuração d^8 com geometrias octaédrica (A) e plano quadrado (B) - diamagnético.



Fonte: Adaptado de (TOMA, 2016)

A balança de Gouy, método utilizado para medir a susceptibilidade magnética (χ_m), leva em consideração a interação entre elétrons desemparelhados e o campo magnético. Um material diamagnético é repelido por um campo magnético enquanto um material paramagnético é atraído por ele. Quando os compostos paramagnéticos são atraídos por esse campo, a variação do peso causada pelo movimento da amostra é registrada e, a partir da força associada, é possível calcular a susceptibilidade magnética do composto e então o momento magnético efetivo (μ_{ef}) que é calculado utilizando a equação abaixo:

$$\mu_{ef} = 2,828 (\chi_m \cdot T)^{1/2}$$

onde χ_m = susceptibilidade magnética ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)

T = temperatura (K)

Para determinar a susceptibilidade magnética de todos os compostos foi utilizado o método de Gouy no estado sólido, à temperatura ambiente (GIRERD; JOURNAUX, 2010). Com os dados da Tabela 9, pode-se observar um aumento aparente na massa das amostras, na presença do campo magnético, com momentos magnéticos $\mu_{ef} = 3,09, 3,31$ e $3,02$ MB para os complexos **I**, **II** e **III**, respectivamente. Estes resultados afirmam que os compostos são paramagnéticos com dois elétrons desemparelhados, o que implica em uma configuração d^8 na qual a simetria em torno do metal é preferencialmente estabilizada pelo campo ligante em geometria octaédrica distorcida à temperatura ambiente (TOMA, 2016). Os valores de momentos magnéticos obtidos estão na faixa de outros complexos de Ni^{II} relatados na literatura (HERNÁNDEZ-AYALA et al., 2020).

Tabela 9- Dados de magnetismo dos compostos de níquel(II), a 25 °C.

	I	II	III
$\chi_m, 10^{-3} (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1})$	3,99	4,57	3,57
$\mu_{\text{ef}}, (\text{M.B.})$	3,09	3,31	3,02
Nº e ⁻ desemparelhados	2	2	2

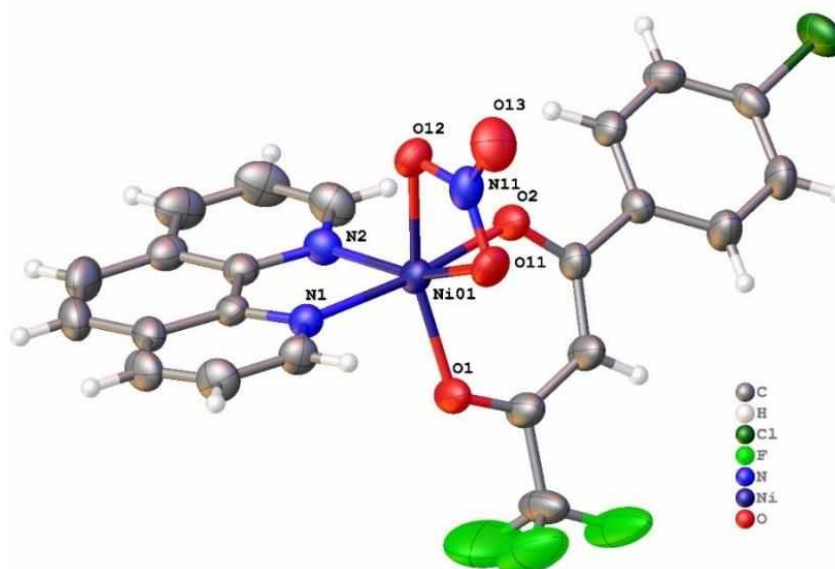
Fonte: Dados de pesquisa.

4.1.4 Difração de raios X de monocristal

A estrutura molecular do complexo **II** foi determinada por análise de raios X de monocristal. Monocristais adequados à técnica foram obtidos a partir da síntese do complexo **II** conforme procedimento experimental.

Verificou-se que o complexo **II** cristaliza no sistema triclinico, grupo espacial P1 com uma molécula independente por unidade assimétrica, apresentando uma geometria octaédrica distorcida, na qual os ligantes se coordenam ao íon metálico de forma bidentada com os seguintes ângulos: 80,69 (8) ° para fen; 90,89 (7) ° para o ligante btc; e 60,34 (7) ° para o ligante nitrato. A representação molecular de **II** é apresentada na Figura 49 e os dados cristalográficos para este complexo se encontram no anexo A.

Figura 49- Representação estrutural do complexo **II** (elipsóides com nível de probabilidade de 50%).



Fonte: Dados de pesquisa.

Os comprimentos e ângulos de ligação mais importantes são apresentados na Tabela 10. No complexo **II**, as posições axiais são ocupadas por dois átomos de oxigênio (O12 e O1) ligados a uma distância de 2,136(2) e 1,997(2) Å. Nos eixos equatoriais as distâncias das ligações entre o átomo de Ni e os átomos de oxigênio O2 e O11 são de 2,001(2) e 2,136(2) Å. Enquanto que as ligações dos átomos de nitrogênio (N1 e N2) da fenantrolina ao Ni^{II} estão a 2,072(2) e 2,045(2) Å de distância. Pela estrutura de raios X, a coordenação bidentada do nitrato ao centro metálico confere as duas ligações Ni-O_{NO3} uma distância maior (2.136(2) Å), de modo que essas duas ligações são mais fracas do que as demais. Por outro lado, a distância da ligação Ni-O1_{btc} no eixo axial é menor do que o esperado para compostos com geometria octaédrica distorcido, que apresentam ligações mais longas nesse eixo. Essa diminuição na distância da ligação Ni-O1_{btc} é justificada pela formação do anel de seis membros com a coordenação bidentada da β-dicetona.

Tabela 10- Comprimentos de ligação selecionados [Å] e ângulos [°] para o complexo **II**.

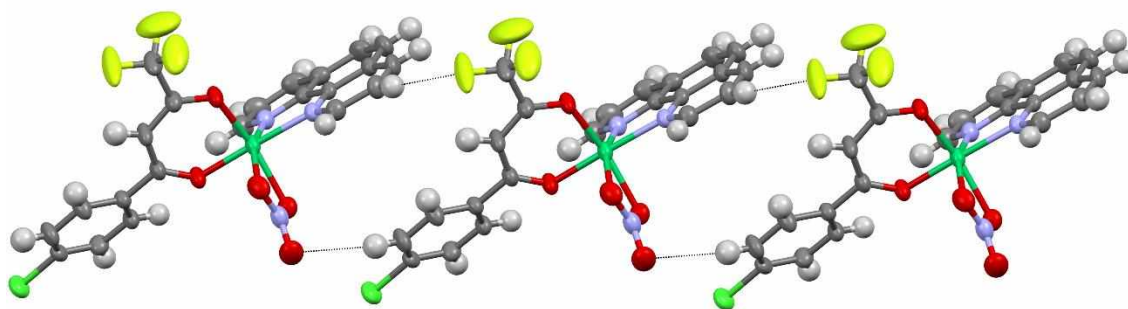
Átomo	Átomo	Átomo	Distância/Å	Ângulo/°
Ni01	O1	-	1,997(2)	-
Ni01	O2	-	2,001(2)	-
Ni01	N1	-	2,072(2)	-
Ni01	N2	-	2,045(2)	-
Ni01	O11	-	2,136(2)	-
Ni01	O12	-	2,136(2)	-
O1	Ni01	O2	-	90,89(7)
O1	Ni01	N1	-	93,35(8)
O1	Ni01	N2	-	102,16(9)
O1	Ni01	O11	-	98,05(8)
O2	Ni01	N2	-	92,91(8)
O2	Ni01	O12	-	87,39(8)
O2	Ni01	O11	-	91,96(8)
N1	Ni01	O12	-	90,73(8)
N1	Ni01	O11	-	93,02(8)
N2	Ni01	O12	-	99,60(8)

N2	Ni01	N1	-	80,69(8)
O11	Ni01	O12	-	60,34(7)

Fonte: Dados da pesquisa.

O empacotamento cristalino é estabilizado por interações do tipo π - π stacking, que são contatos hidrofóbicos que ocorrem entre a nuvem eletrônica de dois anéis e por “short contacts” (Anexo A). O átomo de oxigênio O13 estabelece três interações (Figura 50), uma com o hidrogênio H9 do ligante btc e duas com a fenantrolina através dos átomos de hidrogênio H12 e H19. As interações C9-H9 \cdots O13 e C12-H12 \cdots F2 formam uma cadeia no eixo b. Há também uma interação intermolecular π - π entre os átomos C11 \cdots C15 e C13 \cdots C22 da fenantrolina com distâncias de 3,358 (4) e 3,321 (4) Å.

Figura 50- Representação da interação C9 – H9 \cdots O13 e C12 – H12 \cdots F12 do complexo **II**.



Fonte: Dados de pesquisa.

4.1.5 Espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-vis)

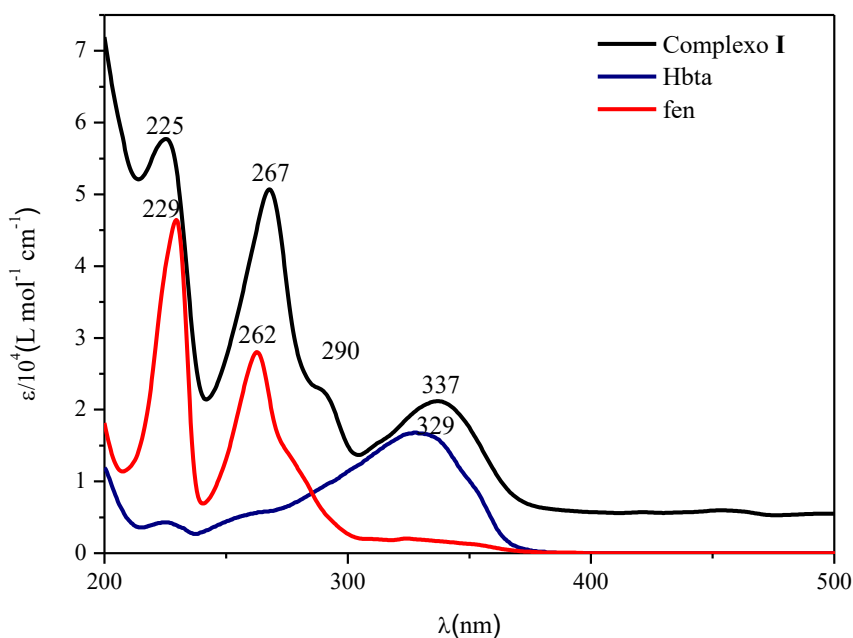
Os espectros na região do ultravioleta visível dos compostos foram obtidos em acetonitrila em concordância com a lei de Lambert-Beer no intervalo entre 200-800 nm. Para uma melhor compreensão, os espectros dos ligantes e dos complexos são apresentados juntos a fim de correlacionar as bandas presentes nos ligantes e nos complexos e deste modo sugerir a coordenação da fenantrolina e das β -dicetonas ao centro metálico de Ni^{II}.

Os compostos orgânicos como fenantrolina e β -dicetonas apresentam grupos cromóforos que são responsáveis pelas transições eletrônicas na região do ultravioleta visível. As ligações pi (π) presentes nas conjugações C=C do anel aromático e na ligação dupla entre o átomo de carbono e o átomo de oxigênio permitem transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, ambas permitidas pelas regras de seleção. Nos espectros de UV-Vis a fenantrolina apresenta duas bandas com valores de absorvidade molar maior que $1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 263 e 230 nm e um ombro em 278 nm, todas atribuídas como transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ (SILVA et al., 2011), Figura 51. As β -dicetonas, por sua vez, apresentam espectros similares com bandas

alargadas e de comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) na região entre 400-200 nm, sendo a banda de maior energia atribuída a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (intra-ligante) envolvendo o grupo carbonila, bem como a conjugação e deslocalização de todo sistema eletrônico do ligante (LOPES et al., 2013; ALMEIDA et al., 2015). Considerando a banda de menor energia nos espectros de UV-vis atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ envolvendo o grupo carbonila representado pelos tautômeros ceto-enol (ALMEIDA et al., 2015; PAIXÃO et al., 2019a).

As bandas de absorção observadas no espectro eletrônico dos complexos metálicos na região do UV-Vis são decorrentes de transições envolvendo elétrons entre níveis de energia diferentes, tais como transições $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ (intra-ligante), d-d ou bandas de transferência de carga (TOMA, 2016). Como exemplo, no espectro da Figura 51, o complexo **I** apresentou bandas de transição eletrônica intra-ligante $\pi \rightarrow \pi^*$ em 337 e 267 nm. Ambas as bandas encontram-se deslocadas para frequências mais altas quando comparadas com as bandas dos ligantes livres fenantrolina e bta, revelando um efeito batocrômico após a coordenação dos ligantes ao centro metálico de Ni^{II} . Por outra lado, um efeito hipsocrômico foi observado em 225 nm no espectro do complexo **I**. Tanto o efeito batocrômico quanto o hipsocrômico sugerem a quelação dos ligantes ao metal.

Figura 51- Espectros UV-vis dos compostos **I**, Hbta e fen em solução de acetonitrila na concentração 1×10^{-5} M.



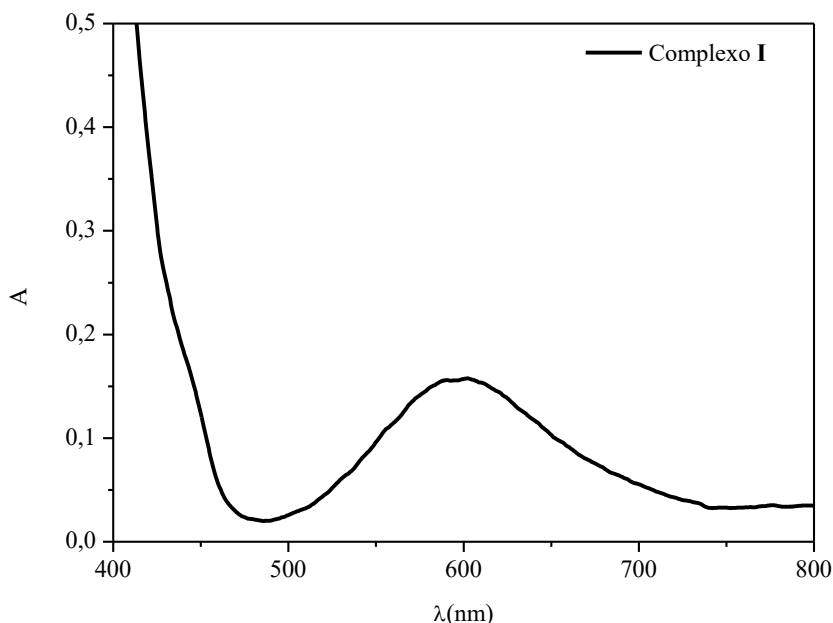
Fonte: Dados de pesquisa.

Nos espectros de absorção eletrônica de complexos d^8 octaédricos, como no composto $[\text{Ni}(\text{en})_3]^{2+}$ onde en = etilenodiamina, três transições eletrônicas podem ser observadas. As

transições são do estado fundamental para o excitado, e todas são permitidas por spin. Essas absorções ocorrem em aproximadamente 900, 550 e 325 nm (HOUSECROFT; SHARPE, 2013). Para os complexos de Ni^{II}, no estado sólido, apenas uma banda em torno de 600 nm foi observada, como exemplo, o complexo **I** apresentou uma banda centrada em 596 nm, Figura 52. Essa banda é atribuída a transição d-d de complexos octaédricos distorcidos. Os deslocamentos observados em 596, 602 e 596 nm para os complexos **I**, **II** e **III**, respectivamente, está relacionado com o nível de energia do desdobramento dos orbitais d em um campo octaédrico influenciado pela natureza eletrônica do ligante. Este comportamento pode ser justificado pela presença dos substituintes no anel aromático da β -dicetona, uma vez que ligantes π -doadores como o cloro, contribuem para o aumento da doação π e a estabilização do nível t_{2g} , assim diminui a separação de energia entre os orbitais e conseqüentemente o comprimento de onda da banda d-d aumenta, desta forma o complexo **II** apresenta a banda d-d centrada em uma região de maior comprimento de onda.

A Tabela 11 traz os dados de absorvidade molar e as atribuições das bandas em solução e no estado sólido dos complexos e seus ligantes livres. Os espectros de UV-vis e reflectância difusa dos compostos **II** e **III** podem ser encontrados no anexo B e C.

Figura 52- Espectro de reflectância difusa do composto **I**.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 11- Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e valores de absorvidade ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos complexos sintetizados **I-III**.

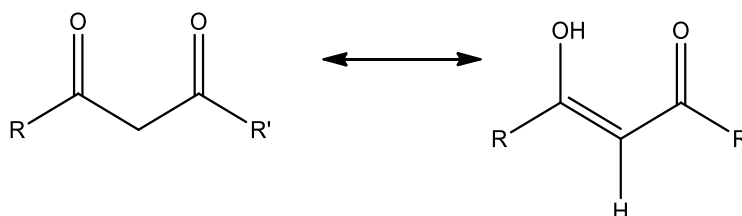
Composto	λ (nm)	$\epsilon/10^4$ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Atribuição
fen	278(om)	1,1	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	263	2,8	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	230	4,7	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
bta	328	1,6	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	258(om)	0,5	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	225	0,4	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
I	337	2,1	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	290	2,2	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	267	5,1	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	225	5,7	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	596	-	d-d
btc	330	2,2	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	262	0,8	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	226	0,7	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
II	340	2,1	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	266	4,6	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	223	5,5	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	602	-	d-d
btf	347	7,2	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	320	7,5	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	229	1,3	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
III	354	2,4	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	343	2,6	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	291	2,5	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	269	4,4	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	226	5,2	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	596	-	d-d

Fonte: Dados de pesquisa.

4.1.6 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os ligantes β -dicetonas apresentam uma mistura das formas tautôméricas ceto e enol, como apresentado na Figura 53. Na forma ceto os modos vibracionais referentes ao estiramento simétrico e assimétrico da carbonila, aparecem em regiões de 1723 cm^{-1} e 1706 cm^{-1} , respectivamente. Na sua forma enol essas absorções de cetonas conjugadas não aparecem no infravermelho. Em vez disso, o estiramento da carbonila é observado como uma banda larga e intensa por volta de 1622 cm^{-1} . Essa absorção intensa e deslocada é resultado do estiramento assimétrico das ligações conjugadas C-C e C-O da forma enólica e da deformação angular das ligações O-H estabilizada por ressonância, gerando um caráter de ligação simples na forma enólica (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Figura 53- Representação do tautomerismo ceto-enólico das β -dicetonas.



Fonte: A autora.

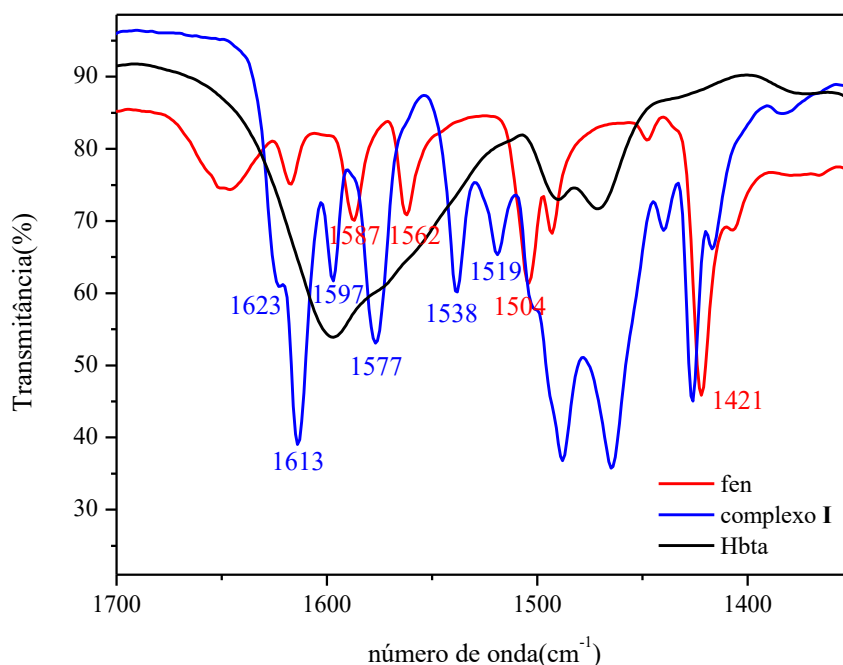
Nos espectros de IV dos ligantes livres β -dicetonas foi observada uma banda intensa e alargada entre $1605\text{-}1583\text{ cm}^{-1}$ condizente com o tautômero na forma enol uma vez que as absorções se encontram em região de menor frequência quando comparado com a forma ceto. Assim as absorções em 1596 , 1583 , 1605 cm^{-1} observadas para os ligantes Hbta, Hbtc e Hbtf, respectivamente, são atribuídas ao grupo C=O. As diferentes regiões de absorção dessas ligações podem estar relacionadas com o grupo retirador dos ligantes β -dicetonas, uma vez que o efeito eletrônico provocado pelos substituintes aromáticos ligados à carbonila leva a uma maior deslocalização eletrônica. Conseqüentemente, a introdução de grupos retiradores de elétrons fortes provoca uma diminuição de energia do estiramento C=O na ordem Hbtc < Hbta < Hbtf. A banda larga na região de 3400 cm^{-1} dos ligantes Hbta, Hbtc e Hbtf é atribuída ao estiramento da ligação O-H na forma enólica. Esses valores de absorção dos ligantes livres encontram-se na Tabela 13.

O espectro da fenantrolina apresenta forte absorção na região entre $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$. Dentro desta faixa caem as frequências vibracionais características do anel aromático. No caso de compostos heterocíclicos de nitrogênio, como piridina e quinolina, essas absorções são associadas aos estiramentos assimétricos (ν_{ass}) e simétricos (ν_{s}) das ligações C=C e C=N

(SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Como pode ser observado no espectro da Figura 53, as bandas em 1587, 1562, 1504 e 1421 cm^{-1} são atribuídas as vibrações C=C e C=N do anel aromático da fenantrolina.

Os espectros dos ligantes livres e dos complexos foram analisados em conjunto a fim de comparar os deslocamentos das bandas e propor a coordenação ao centro metálico. Os dados mais relevantes de infravermelho e todos os gráficos são apresentados na Tabela 13 e no anexo D. Neste aspecto, a região entre 1600-1400 cm^{-1} fornece maiores informações. Nos espectros do complexo **I** e do ligante livre Hbta, Figura 54, os estiramentos da carbonila foram observados em 1613 cm^{-1} e 1597 cm^{-1} , respectivamente. Esse deslocamento para uma região de maior frequência no complexo ($\Delta = 16 \text{ cm}^{-1}$) sugere a coordenação do ligante via átomos de oxigênio. Ao comparar essa região no complexo **I**, observa-se que essas bandas também se deslocam significativamente para maiores números de onda em 1597, 1577, 1538 e 1519 cm^{-1} , corroborando com a hipótese de coordenação da fenantrolina via átomos de nitrogênio. Todas essas informações podem ser observadas nos espectros da Figura 54. Estas análises também foram realizadas para os complexos **II** e **III** e seus respectivos ligantes.

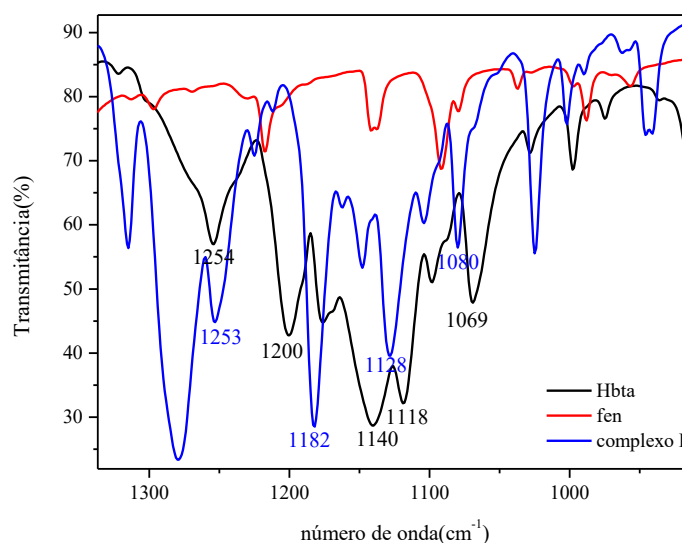
Figura 54- Espectro de IV expandido na região entre 1700-1400 cm^{-1} dos compostos **I**, Hbta e fen.



Fonte: Dados da pesquisa.

Compostos contendo flúor apresentam forte absorção em uma ampla faixa, geralmente entre $1400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, devido aos modos de estiramento C-F. O grupo CF_3 presente nas β -dicetonas apresentam forte absorção na região entre $1350\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$. No ligante Hbta, por exemplo Figura 55, as frequências de absorção da ligação C-F apresentam-se como bandas de forte intensidade em 1254 , 1200 , 1140 , 1118 e 1069 cm^{-1} . No complexo, Figura 55, essas bandas são observadas em 1253 , 1182 , 1128 e 1080 cm^{-1} .

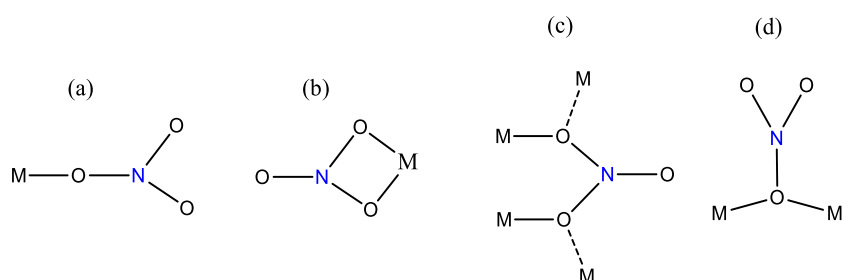
Figura 55- Espectro de IV expandido na região entre $1350\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ dos compostos **I**, Hbta e fen.



Fonte: Dados da pesquisa.

O íon nitrato quando coordenado a centros metálicos apresentam diferentes modos de coordenação, tais como o monodentado (a), bidentado (b) e em ponte mono (c) ou bidentado (d) (ADDISON et al., 1971), como mostra a Figura 56. Entretanto, fazer a distinção entre os modos de coordenação mono- e bidentado utilizando espectros de infravermelho é, geralmente, difícil, pois na maioria dos casos, os grupos coordenados $-\text{ONO}_2$ e $-\text{O}_2\text{NO}$ possuem a mesma simetria (C_{2v}) (KARAYANNIS et al., 1974).

Figura 56- Modos de ligação do nitrato na simetria C_{2v} .



Fonte: Adaptado de (KARAYANNIS et al., 1974)

Os modos mono e bidentado do nitrato apresentam três bandas de estiramento N-O no

infravermelho, como esperado para simetria C_{2v} . A Tabela 12, correlaciona os estiramentos e deslocamentos de íon nitrato em complexos de níquel octaédrico, em que o ligante esteja monodentado, como no complexo $[\text{Ni}(\text{en})_2(\text{NO}_3)_2]$, e bidentado, como no complexo $[\text{Ni}(\text{en})_2\text{NO}_3]\text{ClO}_4$ (NAKAMOTO, 1986).

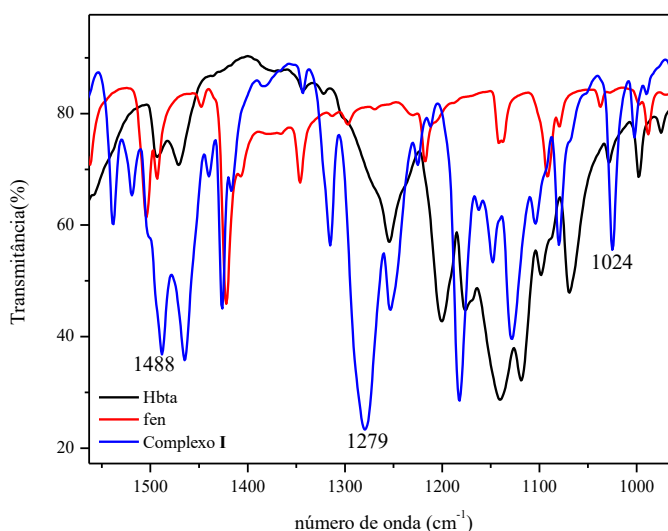
Tabela 12- Valores das bandas de estiramentos N-O presente em complexos de Ni^{II} coordenado a nitrato mono e bidentado.

$[\text{Ni}(\text{en})_2(\text{NO}_3)_2]$	$[\text{Ni}(\text{en})_2\text{NO}_3]\text{ClO}_4$
ν_5 1420 cm^{-1} $\nu_a(\text{NO}_2)$	ν_1 1476 cm^{-1} $\nu(\text{N}=\text{O})$
ν_1 1305 cm^{-1} $\nu_s(\text{NO}_2)$	ν_5 1290 cm^{-1} $\nu_a(\text{NO}_2)$
ν_2 1008 cm^{-1} $\nu(\text{NO})$	ν_2 1025 cm^{-1} $\nu_s(\text{NO}_2)$

Fonte: (NAKAMOTO, 1986).

De um modo geral, a diferença ($\Delta = \nu_5 - \nu_1$) entre as bandas de maior absorção é tomada como uma medida aproximada da covalência do grupo nitrato e um valor de $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ para os complexos estudados sugere forte covalência para a ligação metal-nitrato (AGARWAL et al., 2006). A diferença entre essas bandas é geralmente menor para complexos com nitrato ligados na forma mono- em vez de bidentada (KARAYANNIS et al., 1974). De acordo com os espectros da Figura 57, a presença de bandas intensas em 1488, 1279 e 1024 cm^{-1} no complexo **I** indica que o nitrato coordenou-se ao níquel de maneira bidentada, uma vez que a diferença $\nu_5 - \nu_1$ é igual a 209 cm^{-1} . O mesmo padrão foi observado nos compostos **II** ($\Delta = 171 \text{ cm}^{-1}$) e **III** ($\Delta = 169 \text{ cm}^{-1}$).

Figura 57- Espectro de IV expandido na região entre 1550-1000 cm^{-1} dos compostos **I**, Hbta e fen.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 13- Atribuições de alguns modos de estiramento na região do infravermelho dos ligantes livres e dos complexos de Ni^{II}.

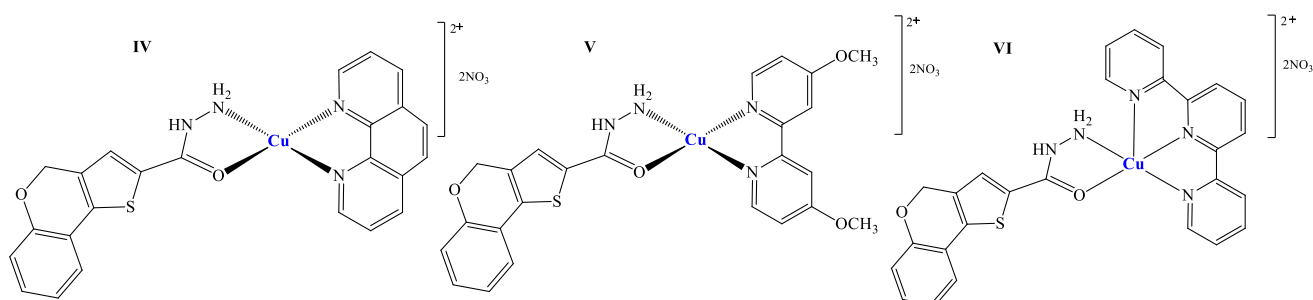
Atribuições	Compostos						
	fen	Hbta	I	Hbtc	II	Hbtf	III
V _{O-H}	3484	3460	-	3404	-	3420	-
	3369						
V _{CHar}	3061	3124	3072	3117	3130	3139	3155
	3033	3070		3070	3075		3145
							3125
							3067
V _{C=C}	-	1575	-	1569	-	1541	
		1557		1533		1469	
		1493				1441	
		1470					
V _{C=N+V_{C=C}}	1587	-	1597	-	1591	-	1582
	1562		1577		1566		1535
	1504		1538		1538		1516
	1493		1519		1519		1438
	1421		1426				1426
V _{C=O}	-	1596	1623	1589	1614	1605	1605
			1613				
V _{C-F}	-	1254	1253	1245	1252	1259	1285
		1200	1182	1199	1182	1194	1260
		1140	1128	1144	1129	1145	1187
		1118	1080	1091	1089	1104	1142
		1069				1087	1123
V _{C-Cl}	-	1254	1253	1245	1252	1259	1285
		1200	1182	1199	1182	1194	1260
		1140	1128	1144	1129	1145	1187
		1118	1080	1091	1089	1104	1142
		1069				1087	1123
V _{N-O}	-	-	1488	-	1461	-	1487
			1279		1290		1318

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2. Complexos de Cu^{II} coordenados a hidrazida e *N*-doadores

Compostos de cobre contendo hidrazidas vêm sendo explorados pelo nosso grupo de pesquisa de modo que a escolha da hidrazida do ácido 4-benzopirano [4,3]tiofeno-2-carboxílico (bth) foi realizada como uma estratégia para melhorar as propriedades farmacológicas de compostos com potencial quimioterápico direcionados ao ADN, anteriormente obtidos pelo grupo (LOPES et al., 2013; PAIXÃO et al., 2017, 2019b). Sendo assim, três novos complexos de Cu^{II} foram sintetizados a partir de diferentes rotas sintéticas com estequiometria 1:1:1 (metal/hidrazida/*N*-doadores). As técnicas de análise elementar e condutimétrica, susceptibilidade magnética, ressonância paramagnética eletrônica (RPE), IV, UV-Vis e massas foram utilizadas para propor as estruturas dos complexos de cobre(II) (ver Figura 58). Os sólidos obtidos possuem coloração verde e foram solúveis em DMSO, metanol e acetonitrila.

Figura 58- Estruturas propostas dos complexos de Cu^{II} com a hidrazida bth e diferentes *N*-doadores.



4.2.1 Análise Elementar e Condutimétrica

De acordo com os dados apresentados na Tabela 14, os dados de CHN obtidos experimentalmente estão em concordância com os valores calculados de porcentagem para C, H e N levando em consideração as moléculas de água (hidratação) nos complexos **IV** e **VI**. Além disso, os erros calculados entre as porcentagens calculada e experimental de C, H e N foram menores que 0,5, permitindo concluir que os compostos estão puros.

Tabela 14- Dados de análise elementar e condutimétrica (soluções 1×10^{-3} M) dos compostos de Cu^{II} .

Complexo	%C _{calc.}	%C _{exp.}	%H _{calc.}	%H _{exp.}	%N _{calc.}	%N _{exp.}	ΔM (S cm ² mol ⁻¹)
IV	43,15	43,45	3.62	3,54	12,58	12,43	172,9 (MeOH)
V	44.34	44,42	3.41	3,33	12.93	12,51	166,2 (MeOH)
VI	46,72	46,66	3,49	3,52	14,13	13,84	224,7 (ACN)

Fonte: Dados da pesquisa.

A fim de verificar se os complexos de Cu^{II} são espécies neutras ou carregadas em solução, medidas de condutividade molar foram realizadas (Tabela 14) e comparadas com a literatura (Tabela 15). De acordo com as Tabelas 14 e 15, todos os complexos comportam-se como eletrólitos do tipo 2:1, o que sugere que independente do complexo avaliado, ambos os íons nitratos são perdidos em solução e como resultado, espécies do tipo $[\text{Cu}(\text{bth})(\text{N},\text{N})]^{2+}$ (complexos **IV** e **V**) ou $[\text{Cu}(\text{bth})(\text{N},\text{N},\text{N})]^{2+}$ (complexo **VI**), são geradas em solução.

Tabela 15- Valores de condutividade molar dos complexos ternários de Cu^{II} obtidos a partir de soluções 1.10^{-3} mol L⁻¹ sob temperatura ambiente (T~25 °C).

Solvente	Eletrólito	Faixa proposta por Geary (S cm ² mol ⁻¹)	Faixa proposta por Velho (S cm ² mol ⁻¹)
Acetonitrila	1:1	100–160	57–204
Acetonitrila	2:1	220–300	162–345
Metanol	1:1	80-115	62-123
Metanol	2:1	160-220	87-204

Fonte: (GEARY, 1971; VELHO, 2006)

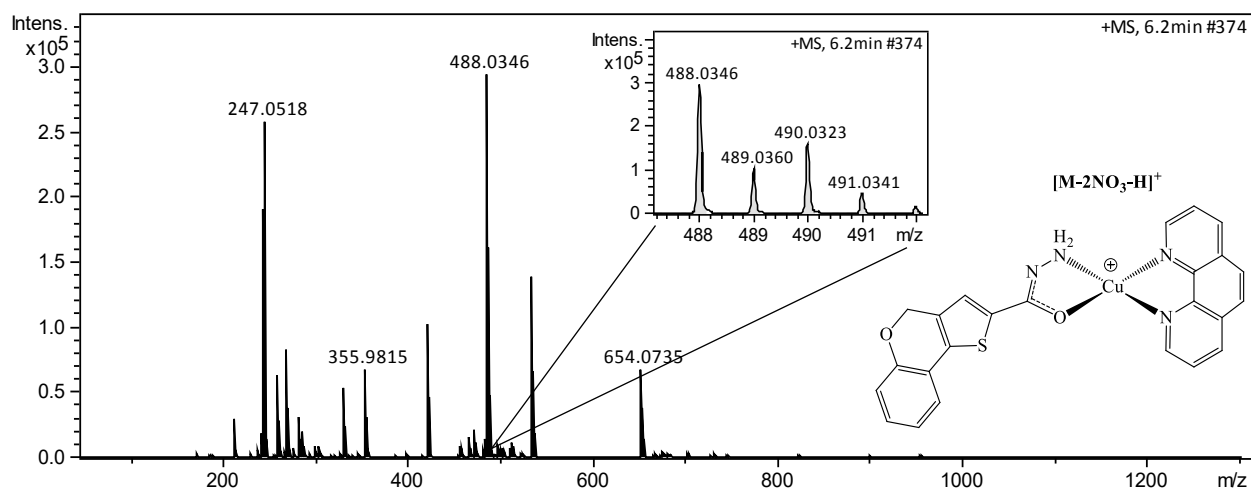
4.2.2 Espectrometria com ionização por electrospray de alta resolução

Os complexos de cobre com bth também foram analisados por espectrometria de massas em alta resolução no modo positivo utilizando metanol como solvente. Os valores de m/z são referentes ao isótopo ⁶³Cu, que apresenta abundância isotópica de 69,15%. Neste experimento, as moléculas de água (sugeridas como de hidratação) presentes nas fórmulas moleculares dos complexos **IV** e **VI** não foram consideradas por não fazerem parte da primeira esfera de coordenação.

Os espectros de massas dos complexos **IV** e **V** nas Figuras 59 e 60, apresentaram um

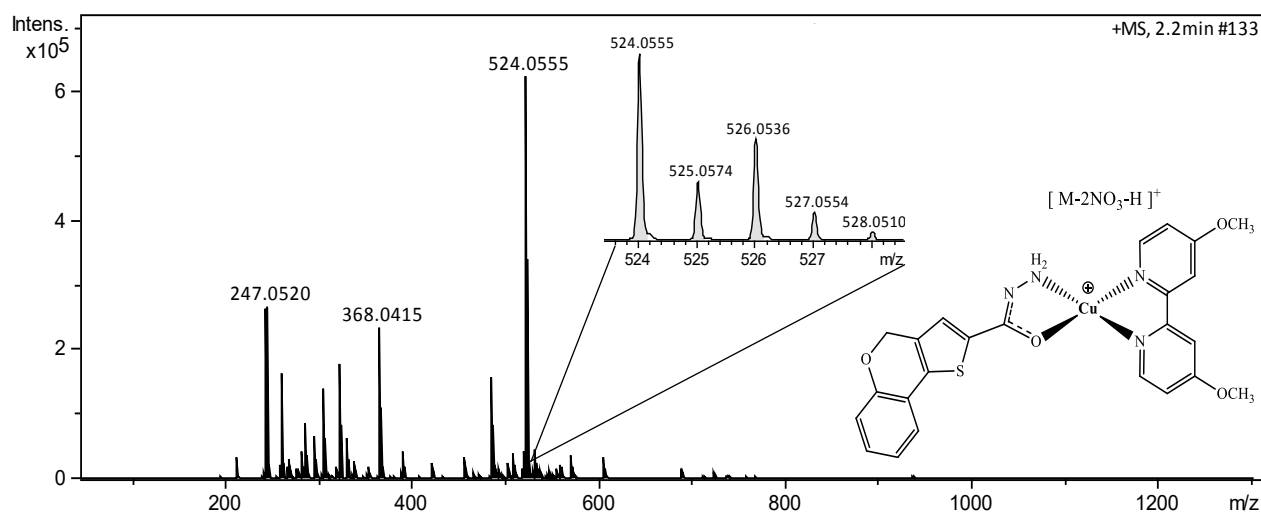
pico atribuído ao íon $[C_{12}H_{11}N_2O_2S]^+$, que refere-se ao ligante bth. A presença do pico do íon molecular nos espectros dos complexos **IV** e **V** em m/z 488,0346 (calc. para $[CuC_{24}H_{17}N_4O_2S]^+$, m/z 488,0363) e m/z 524,0555 (calc. para $[CuC_{24}H_{21}N_4O_4S]^+$, m/z 524,0575), respectivamente, representa a perda dos ligantes nitrato e de um hidrogênio formando o íon $[M-2NO_3-H]^+$ (PAIXÃO et al., 2017), confirmando assim as estruturas propostas pela análise de CHN. O padrão isotópico teórico dos complexos de Cu^{II} está em acordo com o obtido experimentalmente (Tabela 16) e o erro associado ao pico de 100% é menor do que 5%.

Figura 59- Espectro de massas do composto **IV**.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 60- Espectro de massas do composto **V**.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 16- Valores do padrão isotópico calculado e experimental obtidos para os complexos carregados observados nos EMs dos compostos **IV** e **V**.

Complexos	Padrão Isotópico	Padrão Isotópico	Erro (%)
	Calculado	Experimental	
IV	488,0363(100,0%)	488,0346	-3,48
	489,0402 (26,0%)	489,0360	-8,58
	490,0350 (44,6%)	490,0323	-5,51
	491,0384 (11,6%)	491,0341	-8,75
V	524,0575 (100.0%)	524,0555	-3,82
	525,0608 (26.0%)	525,0574	-6,47
	526,0556 (44.6%)	526,0536	-3,80
	527,0590 (11.6%)	527,0554	-6,83

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os complexos **IV** e **V** foram analisados por RPE no estado sólido e em solução de DMSO em diferentes temperaturas à 298 e 77 K. Todos os dados obtidos com a análise estão dispostos na Tabela 17.

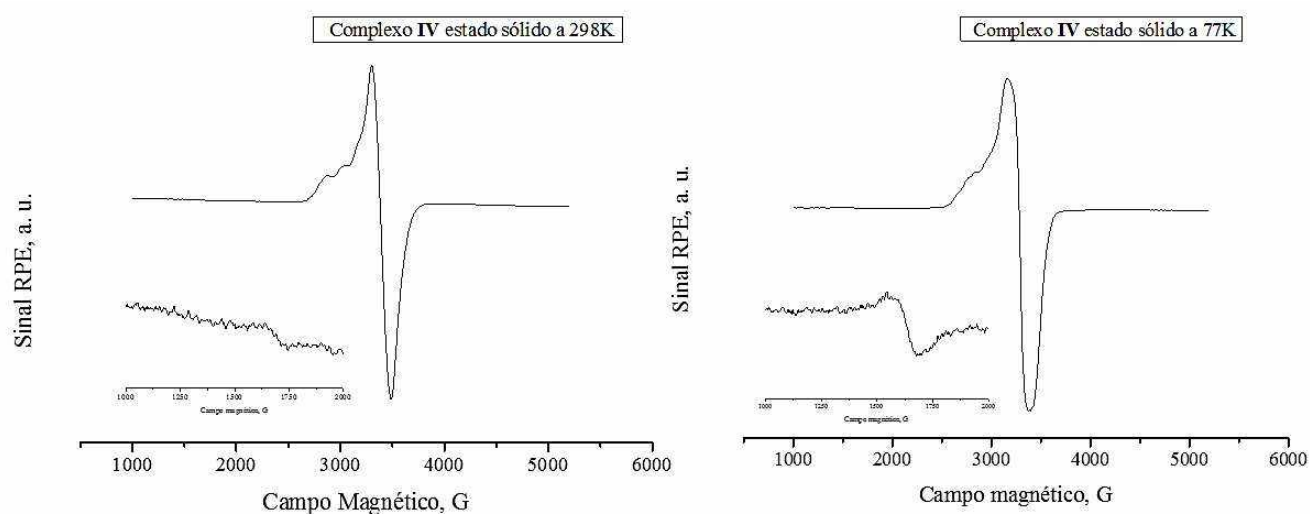
No estado sólido, os complexos **IV** e **V** (Figuras 61 e 63) apresentaram um sinal característico de cobre(II) com uma estrutura hiperfina proveniente do acoplamento do spin eletrônico do complexo com o spin nuclear do metal ($l=3/2$). No complexo **IV** o desdobramento hiperfino pode ser observado com valores $g_{\perp} = 2,071$, $g_{\parallel} = 2,257$ e $A_{\parallel} = 148$ G à 298 K e $g_{\perp} = 2,068$, $g_{\parallel} = 2,416$ e $A_{\parallel} = 100$ G à 77 K. Enquanto no complexo **V** esses desdobramentos apresentam valores de $g_{\perp} = 2,071$, $g_{\parallel} = 2,240$ e $A_{\parallel} = 172$ G à 298 K e $g_{\perp} = 2,071$, $g_{\parallel} = 2,242$ e $A_{\parallel} = 169$ G à 77 K. Como o valor de A_{\parallel} é maior a temperatura ambiente pode-se dizer que o elétron desemparelhado tem uma interação maior com o spin nuclear do metal a temperatura ambiente. Os valores de g_{iso} (ver tabela 17) em 298 e 77 K dos complexos **IV** e **V** indicam que ambos os sinais são provenientes da mesma espécie de complexo e que as mudanças nos valores são referentes apenas à mudança de temperatura.

Em solução a 298 K, Figuras 62 e 64, foram obtidos espectros característico de cobre(II) com a presença de duas espécies de cobre com os mesmos valores de g_{iso} 2,104 para o complexo **IV** e 2,091 para o complexo **V**. Em 77 K também é possível observar a presença de duas

espécies de cobre(II) com diferentes valores de g_{iso} (Tabela 17). A partir desses dados em solução, pode-se concluir que os dois sinais presentes nas diferentes temperaturas são correlatos, pois apresentam pequeno desvio. Além disso, esses resultados mostram que a presença de mais de uma espécie de cobre pode ser referente a coordenação do DMSO (mesma estrutura apresenta mesmo g), devido à labilidade do nitrato em solução.

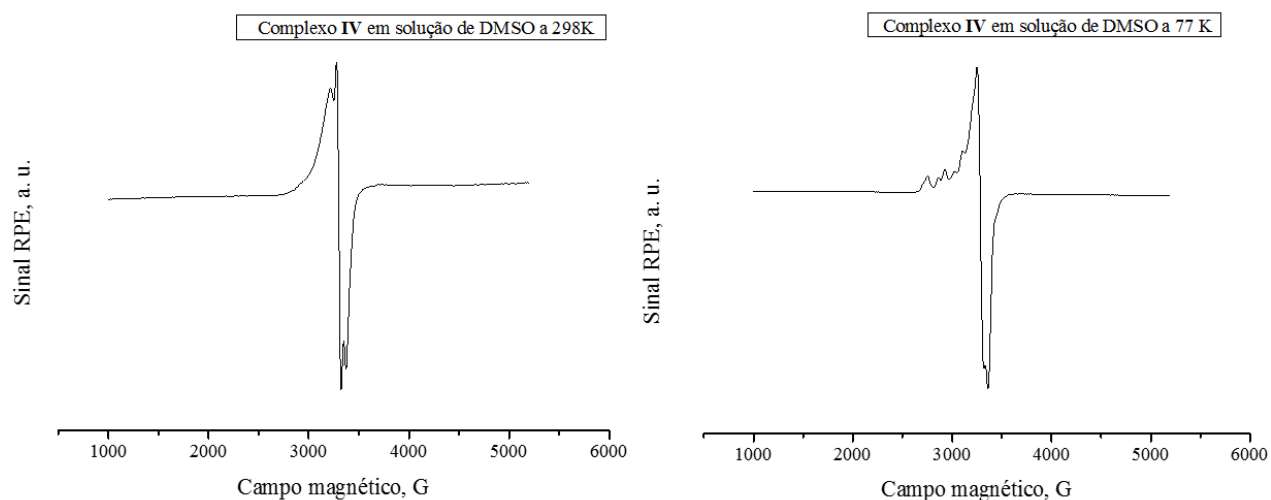
Nos espectros de RPE dos complexos **IV** e **V** no estado sólido à 298 e 77 K, Figuras 61 e 63, também é possível observar um sinal característico em aproximadamente 1600 G. Esse sinal é referente ao $\Delta m_s = 2$ proveniente do acoplamento magnético entre dois centros metálicos de cobre gerando um spin total igual a 1. Essa interação magnética entre os centros metálicos cobre-cobre deve ser facilitada pelas interações π - π ou π -stacking entre os anéis aromáticos, devido ao centro metálico estar em um arranjo quase planar. Como a intensidade desse sinal foi maior em baixa temperatura, pode-se inferir que o acoplamento entre os dois elétrons apresenta características ferromagnéticas. Em solução, o sinal característico do $\Delta m_s = 2$ não foi observado para o complexo **IV** (Fig. 62), portanto o acoplamento existente é desfeito na presença do solvente o que leva a concluir que essa interação magnética não é muito forte, uma vez que à temperatura maior (298 K) ela desaparece, indicando também uma possível coordenação do solvente DMSO. Já para o complexo **V**, Fig. 64, é possível ver que o sinal característico de $\Delta m_s = 2$ não aparece na solução a temperatura de 298 K, porém quando esta é resfriada à 77 K o sinal é observado. O acoplamento entre essas espécies parece ter um comportamento ferromagnético em solução.

Figura 61- Espectros de RPE do complexo **IV** no estado sólido à 298 e 77 K.



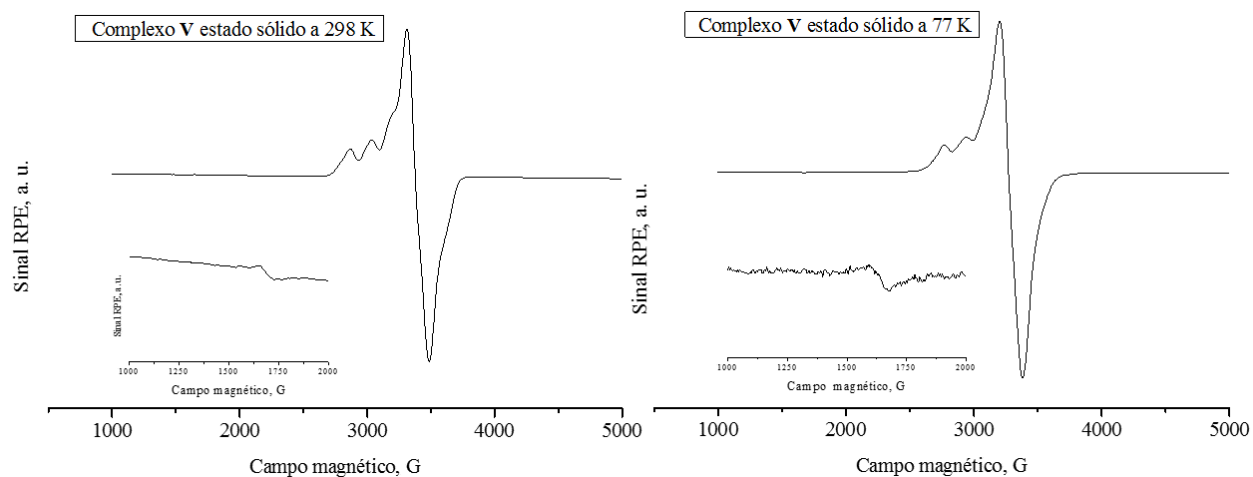
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 62- Espectros de RPE do complexo IV em solução de DMSO à 298 e 77 K.



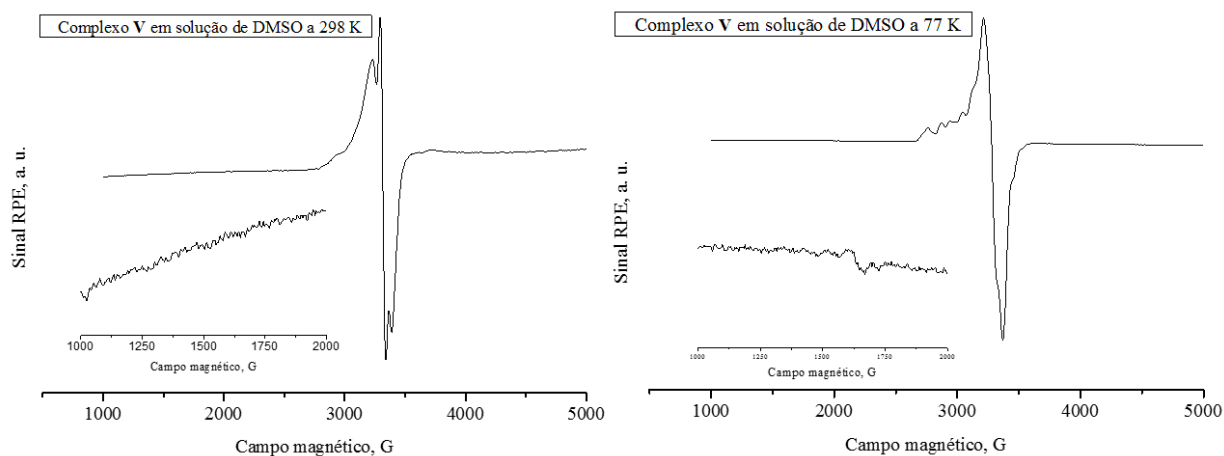
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 63- Espectros de RPE do complexo V no estado sólido à 298 e 77 K.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 64- Espectro de RPE do complexo V em solução de DMSO à 298 e 77 K.



Fonte: Dados da pesquisa.

Nos espectros de RPE observa-se que os valores de g seguem a ordem $g_{//} > g_{\perp} > 2,0023$ consistentes com a geometria octaédrica alongada segundo o eixo z indicando que o orbital $d(x^2-y^2)$ é o mais ocupado. O cálculo da razão empírica $g_{//}/A_{//}$ estima a extensão da distorção tetraédrica em compostos de cobre^{II} com estrutura tetragonal (DA SILVEIRA et al., 2011; ACILAN et al., 2017). Valores que variam entre 100-150 cm^{-1} indicam uma estrutura planar ou tetragonal, enquanto valores mais altos até 200-250 cm^{-1} são indicativos de uma simetria já bastante distorcida quase tetraédrica em torno do íon cobre(II). As razões empíricas $g_{//}/A_{//}$ (ver Tabela 17) estimadas para composto **IV** e **V** (ver Tabela 17) indicam que o íon metálico Cu^{II} tem uma vizinhança tetragonal proporcionada pelo arranjo dos ligantes.

Tabela 17- Dados de RPE para os compostos de cobre(II).

Complexos	298 K						77 K					
	$\Delta m s_2$	g_{iso}	g_{\perp}	$g_{//}$	$A_{//}, G$	$g_{//}/A_{//}^*$	$\Delta m s_2$	g_{iso}	g_{\perp}	$g_{//}$	$A_{//}, G$	$g_{//}/A_{//}^*$
IV (sólido)	4,133	2,133	2,071	2,257	148	-	4,144	2,184	2,068	2,416	100	-
IV (solução)	-	2,104	-	-	-	-	-	2,124	2,068	2,236	176	121
		2,104						2,141	2,068	2,288	155	138
V (sólido)	4,151	2,127	2,071	2,240	172	-	4,155	2,128	2,071	2,242	169	-
V (solução)	-	2,091	-	-	-	-	4,141	2,125	2,070	2,235	179	119
		2,091						2,102	2,070	2,167	172	124

* $A_{//}$ (em unidades 10^{-4} cm^{-1}) = $g_{//} \beta A_{//}$ (em unidades G) = $0,46686 \times 10^{-4} g_{//} A_{//}$ (em unidades G); sendo $\beta = 1,39969 \text{ MHz/G}$

Fonte: Dados de pesquisa.

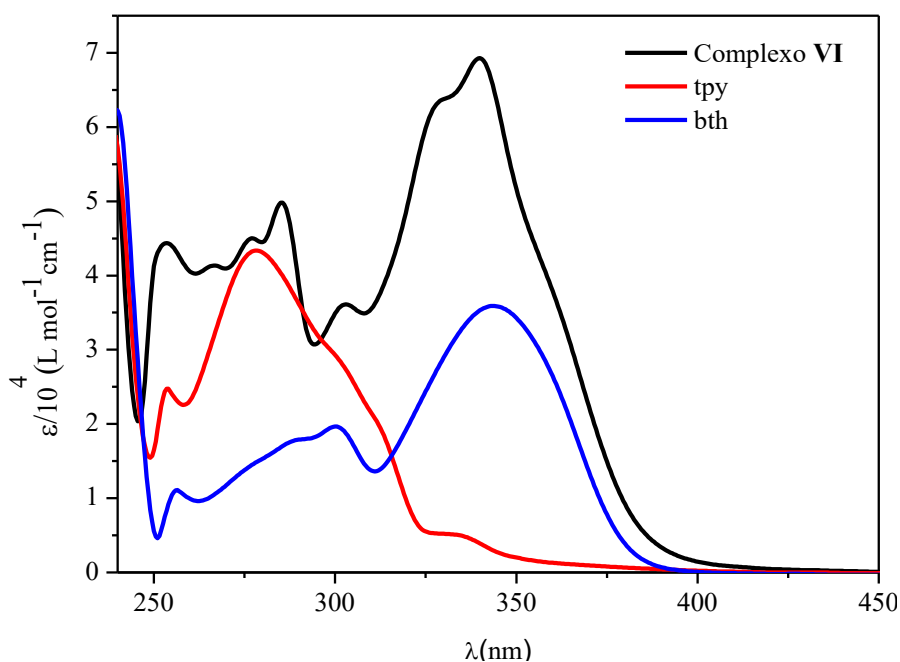
4.2.4 Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do UV-Vis dos complexos e seus respectivos ligantes foram analisados no intervalo entre 200-800 nm, utilizando os solventes DMSO e ACN de grau espectroscópico. Os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e absorvidade molar ($\epsilon_{\text{máx}}$) para todos os ligantes livres e os respectivos complexos são apresentados na Tabela 18 e, de acordo com os dados, os ligantes *N*-heterocíclicos fen, dmt e tpy possuem bandas com altos coeficientes de absorvidade molar ($\epsilon > 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) atribuídas às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ que são permitidas pelas regras de seleção. Essas transições são mais energéticas, e, portanto, estão localizadas na região de menor comprimento de onda do espectro UV-vis. O ligante hidrazida bth também apresenta bandas com valores de absorvidade molar

maiores que $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$, sendo que a banda de maior energia, em 343 nm, pode ser atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático.

Nos espectros de todos os complexos preparados (espectros dos compostos **IV** e **V** no anexo B), as bandas na região do ultravioleta possuem valores de absorvidade molar maior que $7,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e são atribuíveis às transições intraligante. No espectro do complexo **VI** (Fig.65), uma banda alargada e centrada em 339 nm pode ser atribuída como uma banda de transferência de carga metal ligante (TCML). No caso de ligantes derivados da piridina, como a terpiridina, essas transições de maior energia podem ocorrer devido ao orbital vazio π^* de baixa energia. Assim, a capacidade do ligante π -receptor receber esse elétron do centro metálico aumenta, caracterizando uma transição do tipo TCML (TOMA, 2016). Quando os espectros dos complexos e dos ligantes livres são comparados, é possível observar pequenos deslocamentos das bandas, sugerindo a coordenação do centro metálico aos ligantes hidrazida e *N*-doadores, como mostrado no espectro do complexo **VI**, Figura 65.

Figura 65- Espectros UV-vis dos compostos **VI**, tpy e bth nos solventes DMSO e ACN e concentração $1 \times 10^{-5} \text{ M}$.

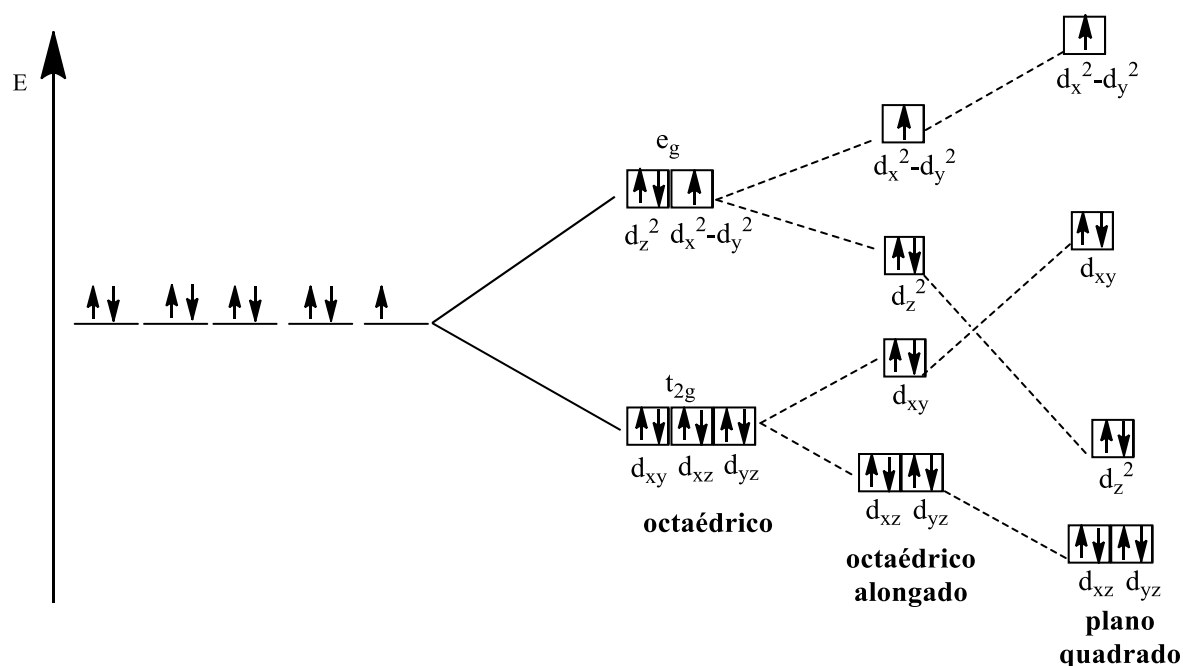


Fonte: Dados de pesquisa.

O íon cobre(II) apresenta configuração eletrônica $[\text{Ar}] 3d^9$ e dependendo do ligante forma complexos com diferentes geometrias, como revela o diagrama de desdobramento dos orbitais d^9 , Figura 66. O desdobramento de orbitais d favorece a ocorrência de transições $d-d$ características de metais com subcamada d incompleta. Em uma configuração d^9 , o estado fundamental D se desdobra em E_g e T_{2g} no campo O_h e uma única transição envolvendo esses

dois estados é esperada no espectro eletrônico. Jahn e Teller mostraram que moléculas não lineares que apresentam um estado eletrônico degenerado, devem sofrer distorções para diminuir a simetria da molécula e quebrar a degenerescência (TOMA, 2016). Dessa forma, em um composto com geometria tetragonal as duas ligações metal-ligantes (axial) são de comprimentos diferentes das quatro restantes (equatoriais) (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014).

Figura 66- Diagramas de desdobramento de campos cristalinos de íon com configuração d^9 para uma geometria plano quadrado, gerada a partir do octaédrico.

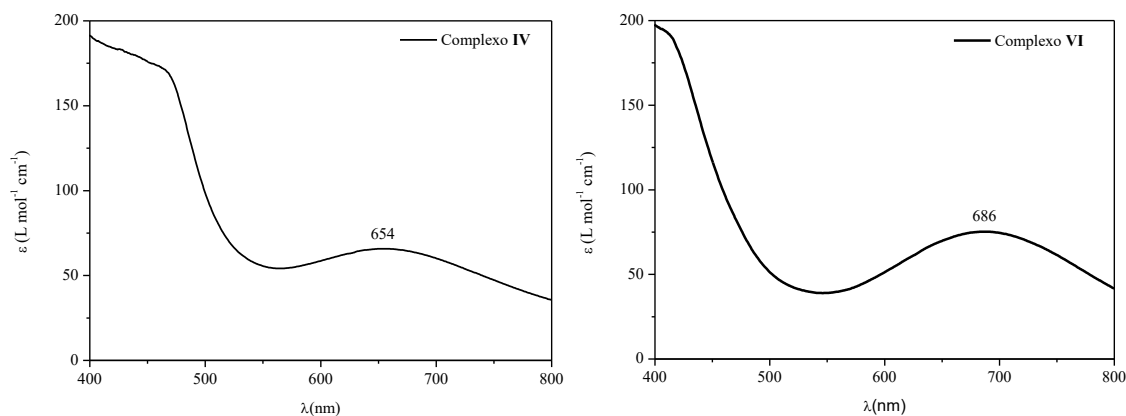


Fonte: Adaptado de (TOMA, 2016).

As transições envolvendo orbitais d são facilmente reconhecidas em um espectro eletrônico, pois geram bandas largas e de baixa intensidade ($\epsilon \approx 10$ a $10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). Soluções de concentrações $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ foram preparadas utilizando os solventes DMSO e ACN, a fim de avaliar a banda $d-d$ dos complexos de Cu^{II} . Os espectros UV-Vis dos complexos **IV** e **VI** (espectro do composto **V** no anexo B) apresentados na Figura 67, mostraram uma banda larga e assimétrica centrada em 654 nm ($65 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 686 nm ($74 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente, atribuídas à transição $d-d$ do cobre(II). Valores semelhantes foram encontrados na literatura como relatado por Drielly *et al.* ao analisar a banda $d-d$ de uma série de compostos de Cu^{II} coordenados a hidrazidas e bases heterocíclicas (PAIXÃO *et al.*, 2017). Como os espectros dos complexos foram obtidos em DMSO, solvente coordenante, provavelmente, a geometria em torno do íon metálico é piramidal de base quadrada ou

tetragonal devido ao efeito Jahn-Teller (ALMEIDA et al., 2015).

Figura 67- Espectros UV-vis dos compostos **IV** e **VI** em DMSO e ACN na concentração 1×10^{-2} M.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 18- Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e valores de absorvidade ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos complexos sintetizados **IV-VI**.

Composto	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Atribuição
bth	343	$3,5 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	300	$1,9 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	288(ombro)	$1,8 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	254(ombro)	$1,1 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	239	$6,2 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
dmt	274	$3,9 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	261	$4,3 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	237	$6,1 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
fen	276(om)	$1,5 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	263	$2,3 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	240	$6,2 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
tpy	335	$0,5 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	277	$4,3 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	252	$2,5 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	238	$6,0 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
IV	345	$3,7 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	296	$3,9 \times 10^4$	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	270	$7,6 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	654	65,0	d-d
V	345	$4,4 \times 10^4$	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	298	$5,3 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	287	$5,6 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	248	$5,3 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)

	653	65,0	d-d
VI	339	$6,9 \times 10^4$	TCML
	327	$6,3 \times 10^4$	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	302	$3,6 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	286	$5,3 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	276	$4,6 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	266	$4,2 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	253	$4,4 \times 10^4$	IL ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$)
	686	74,0	d-d

Fonte: Dados de pesquisa.

4.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

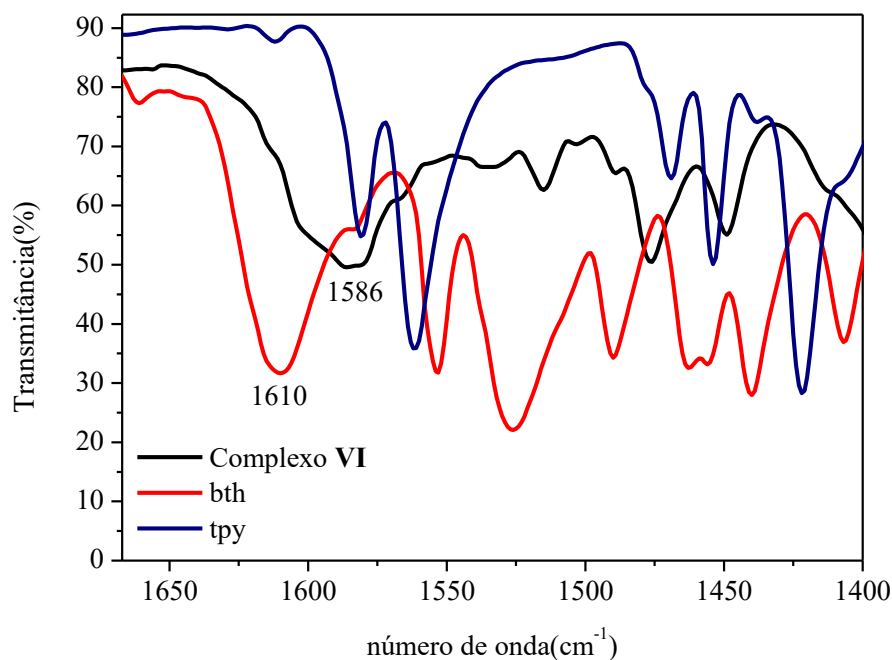
Os compostos ternários de cobre(II) contendo hidrazida e bases heterocíclicas apresentaram absorções características na região do infravermelho que são correlacionadas com as bandas existentes nos respectivos ligantes. As principais atribuições no infravermelho são apresentadas na Tabela 19 e os espectros de IV dos compostos **IV** e **V** podem ser visualizados no anexo D.

A hidrazida bth apresenta três absorções em 3289, 3263 e 3175 cm^{-1} que correspondem aos estiramentos (simétrico e assimétrico) dos grupos NH_2 e NH . Uma banda atribuída ao grupo $\text{C}=\text{O}$ foi observada em 1610 cm^{-1} . A presença dos anéis aromáticos confere ao espectro da bth um conjunto de absorções na região entre 1553 e 1406 cm^{-1} que são características de estiramentos $\text{C}=\text{C}$. As bases nitrogenadas também apresentaram nessa mesma região três bandas intensas atribuídas aos estiramentos $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{N}$ do anel aromático.

Bandas largas centradas entre 3488 – 3444 cm^{-1} confirmam a presença de moléculas de água nos complexos **IV** e **VI**. Embora o perfil dos espectros no infravermelho dos complexos de Cu^{II} sejam ligeiramente semelhantes aos espectros dos respectivos ligantes livres, as bandas referentes aos grupos NH_2 e NH foram observadas em regiões de menor número de onda, como já relatado em trabalhos anteriores publicados pelo grupo (RODRIGUES et al., 2015; SOUSA et al., 2015; PAIXÃO et al., 2017). Outro deslocamento importante refere-se aos estiramentos dos grupos $\text{C}=\text{O}$, que também aparecem em frequências bem distintas nos espectros dos complexos em relação ao ligante livre bth. Como exemplo, no espectro do complexo **V**, Figura 68, essa banda ocorre em 1586 cm^{-1} e no ligante em 1610 cm^{-1} , um deslocamento de 24 cm^{-1} . Esse deslocamento para região de menor energia no infravermelho está relacionado com a coordenação do $\text{Cu}(\text{II})$ ao oxigênio da carbonila, que provoca a diminuição da densidade eletrônica da ligação $\text{C}=\text{O}$. Além disso, observa-se também nos espectros dos complexos

mudanças nas posições das bandas na região compreendida entre $1650 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ em relação aos ligantes livres. Considerando estas observações, é possível propor que a coordenação da hidrazida bth ao centro metálico ocorre via átomos de nitrogênio e oxigênio para os complexos de cobre e, como esperado, todos os ligantes *N,N*- e *N,N,N*-doadores comportam-se como quelantes bi-e tridentado, respectivamente (PAIXÃO et al., 2017, 2019b).

Figura 68- Espectro de IV expandido na região entre $1650-1400 \text{ cm}^{-1}$ dos compostos VI, bth e tpy.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 19- Atribuições de alguns modos de estiramento na região do infravermelho dos ligantes livres e dos complexos de Cu^{II} com a hidrazida bth.

Atribuições	Compostos						
	bth	fen	dmt	tpy	IV	V	VI
$\nu_{\text{O-H}}$	-	-	-	-	3444	-	3488
$\nu_{\text{NH}_2, \text{VNH}}$	3289 3263 3175	-	-	-	3159	3133	3198
ν_{CHar}	3046	3062 3033 3010	3048	3051 3013	3092 3062	3075 3028	3073
ν_{CH_2}	2948 2867 2845	-	-	-	2968 2849	2986 2951 2851	-
$\nu_{\text{C=O}}$	1610 i	-	-	-	1582	1612	1586

$V_{C=C+C=N}$	-	1586	1584	1581	1583	1621	1515
		1562	1557	1561	1566	1612	1476
		1504	1452	1469	1526	1586	1448
		1493		1454	1490	1573	1393
		1421		1421	1468	1562	1365
					1432	1558	
						1533	
						1501	
						1470	
						1439	
$V_{C=Car}$	1553	-	-	-	1562	1558	1535
	1526				1526	1532	1515
	1490				1490	1501	1502
	1462				1468	1471	1448
	1455				1442	1439	
	1439				1432		
	1406						

Fonte: Dados de pesquisa.

4.3. Complexos de Cu^{II} coordenados a iminopiridinas e terpiridina

Os ligantes iminopiridinicos foram obtidos a partir da reação de condensação entre aldeído e anilinas substituídas nas posições 1 e 4 com grupos doadores e retirados de elétrons. Os sólidos cristalinos de coloração amarelo são solúveis em solventes apolares e polares e foram caracterizados por RMN 1H em $CDCl_3$, UV-vis e IV. Os espectros de RMN 1H dos ligantes encontram-se no anexo E. A partir da síntese dos ligantes duas novas séries de compostos de cobre contendo ligantes iminopiridinicos e terpiridina foram obtidas. A primeira série de compostos do tipo $[Cu(N,N)_2(NO_3)_2]$, em que $N,N=$ 4-cloro- N -(piriridina-2-metileno)anilina (Clmp), 2,6-dietil- N -(piriridina-2-metileno)anilina (diemp), 2,6-diisopropil- N -(piriridina-2-metileno)anilina (diipmp) ou 4-metil- N -(piriridina-2-metileno)anilina (memp), foi obtida na proporção 1:2 (metal/iminopiridina) utilizando diclorometano e metanol como solventes. Os sólidos cristalinos obtidos possuem coloração verde e são solúveis tanto em solventes polares como em apolares e estáveis ao ar. As técnicas de CHN, análise condutimétrica, UV-Vis, reflectância difusa, IV e espectrometria por massas foram utilizadas para caracterizar os compostos e propor suas respectivas estruturas da Figura 69. A segunda série de compostos do tipo $[Cu(N,N)(N,N,N)](PF_6)_2$, no qual $N,N=$ 4-cloro- N -(piriridina-2-metileno)anilina (Clmp), 2,6-dietil- N -(piriridina-2 metileno)anilina (diemp), 4-metil- N -(piriridina-2-metileno)anilina (memp) e $N,N,N =$ 4-(4-metilfenil)-terpiridina (mftpy), foi obtida na proporção 1:1:1 a partir da reação da mftpy com nitrato de cobre (II) trihidratado ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$) e posterior adição

do ligante iminopiridiníco em metanol. Sólidos de coloração verde ou azul foram isolados a partir de uma solução aquosa contendo NH_4PF_6 e caracterizados por análise elementar (CHN) e condutimétrica, massas, UV-Vis, reflectância difusa e IV. As estruturas propostas dos complexos são apresentadas na Figura 70.

Figura 69- Estruturas propostas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})_2(\text{NO}_3)_2]$.

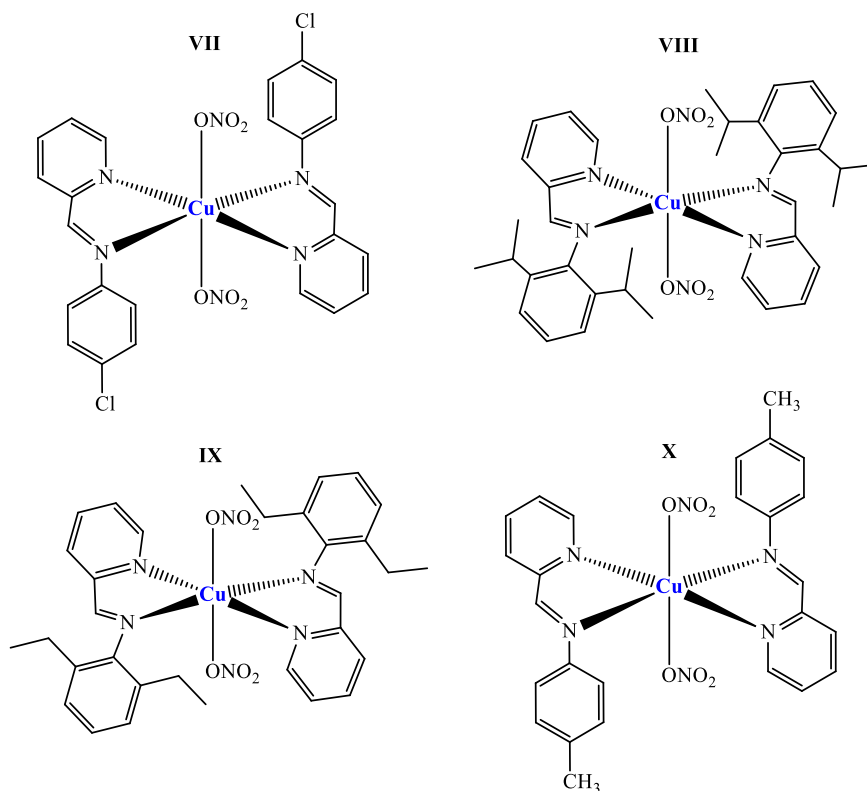
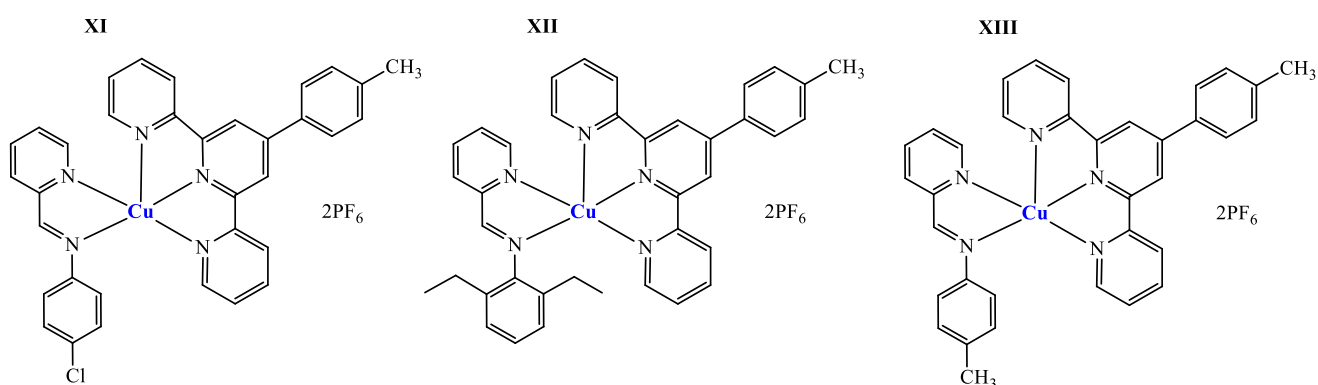


Figura 70- Estruturas propostas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})(\text{N},\text{N},\text{N})](\text{PF}_6)_2$.



4.3.1 Análise Elementar e Condutimétrica

Os dados de análise elementar (CHN) experimentais estão em concordância com os dados calculados, Tabela 21. Tais dados permitem concluir que as fórmulas moleculares

propostas estão corretas e que os compostos estão puros.

Tabela 20- Valores experimentais de análise elementar e condutimétrica dos complexos de Cu^{II} coordenados aos ligantes iminopiridínicos.

Complexo	%C _{calc.}	%C _{exp.}	%H _{calc.}	%H _{exp.}	%N _{calc.}	%N _{exp.}	ΛM (S cm ² mol ⁻¹) ¹⁾
VII	43,88	43,66	3,38	2,90	12,79	12,41	179,79
VIII	58,56	58,78	6,28	5,92	11,38	11,31	136,37
IX	54,89	55,28	5,76	5,52	12,00	12,21	155,87
X	53,84	54,34	4,17	4,30	14,49	14,35	229,66
XI	45,70	45,80	2,93	2,73	7,84	7,90	281,75
XII	50,20	49,85	3,22	3,99	7,70	7,72	304,55
XIII	48,15	48,20	3,35	3,31	8,02	8,06	298,38

Fonte: Dados de pesquisa.

As análises condutimétricas dos compostos **VII** a **X** foram realizadas em metanol (1×10^{-3} M) e os dados da Tabela 21 indicam que os compostos estão na faixa de eletrólito 2:1, como observado por Geary (GEARY, 1971) e por Velho (VELHO, 2006), Tabela 21. Com isso pode-se inferir que em solução os compostos se encontram carregados $[Cu(N,N)_2]^{2+}$ com os dois nitratos fora da esfera de coordenação. Os dados de condutimetria dos compostos **XI**, **XII** e **XIII** foram obtidos em solução de acetonitrila (1×10^{-3} M) e os valores experimentais indicam que os compostos são eletrólitos do tipo 2:1. Com isso podemos dizer que em solução o PF₆ atua como contra íon e os complexos em solução são do tipo $[Cu(N,N)(N,N,N)]^{2+}$.

Tabela 21- Parâmetros de condutividade molar para diferentes tipos de eletrólito proposto por Geary e Velho.

Solvente	Eletrólito	Faixa proposta por Geary (S cm ² mol ⁻¹)	Faixa proposta por Velho (S cm ² mol ⁻¹)
Acetonitrila	1:1	100–160	57–204
Acetonitrila	2:1	220–300	162–345
Metanol	1:1	80-115	62-123
Metanol	2:1	160-220	87-204

Fonte: (GEARY, 1971; VELHO, 2006)

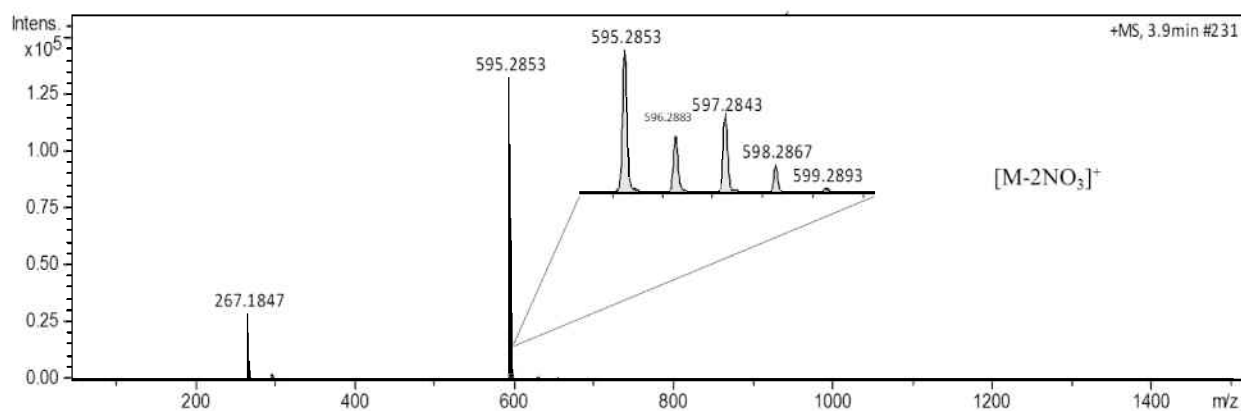
4.3.2 Espectrometria com ionização por electrospray de alta resolução

O complexo **VIII** foi analisado por espectrometria de massas em alta resolução no modo

positivo utilizando metanol como solvente. Ao analisar o espectro de massas do composto **VIII**, Figura 71, o pico do íon molecular em m/z 595,2853 é relativo a espécie $[M-2NO_3]^+$, revelando que o metal reduziu durante a análise. De acordo com a literatura, complexos de cobre(II) analisados por espectrometria com ionização por eletrospray no modo positivo podem sofrer um processo inesperado de redução. Uma hipótese para explicar a redução do Cu^{II} é que elétrons gasosos produzidos por uma descarga elétrica entre o capilar ESI e o cone de amostragem pode reduzir os íons de metal na superfície de uma gota ou na fase gasosa (SATTERFIELD; BRODBELT, 2001; NAKAHATA, 2016).

O padrão isotópico teórico para o sinal de 100% do fragmento $[M-2NO_3]^+$ corresponde a m/z 595,2857, ou seja, um erro de -0,67 associado ao pico do íon molecular. Além disso, o padrão isotópico do íon molecular está em concordância com os dados teóricos, como mostra a Tabela 22. Com base nessa análise, pode-se afirmar que o composto **VIII** sofre redução em solução de metanol. O sinal em m/z 267,1847 é referente ao fragmento $[C_{18}H_{23}N_2]^+$ atribuído ao ligante livre diimpmp protonado. O cálculo teórico para esse fragmento corresponde a m/z 267,1856 e o erro associado corresponde a -3,37.

Figura 71- Espectro de massas do composto **VIII**.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 22- Valores do padrão isotópico calculado e experimental obtidos para o complexo carregado observado no EMs do composto **VIII**.

Padrão Isotópico calculado	Padrão Isotópico experimental
595,2857(100,0%)	595,2853
597,2839 (44.6%)	597,2843
596,2891 (38.9%)	596,2883
598,2872 (17.4%)	598,2867
599,2906 (3.3%)	599,2893

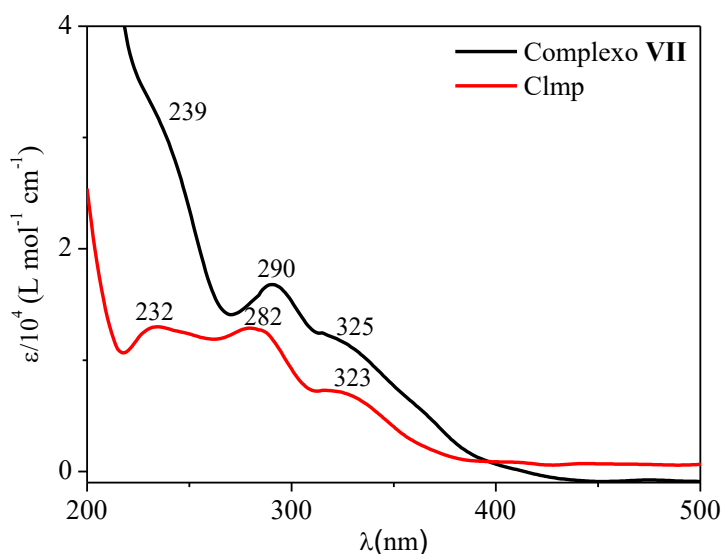
Fonte: Dados de pesquisa.

4.3.3 Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Nos espectros dos ligantes livres iminopiridinícos aparecem duas ou três bandas na região do ultravioleta visível que são referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo imino de maior energia, $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático da piridina e $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo fenil (QIU et al., 2009). Nos ligantes Clmp e memp as bandas em 232 e 243 nm são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo imino. As absorções em 282, 275 e 283 nm observadas para os ligantes Clmp, diemp e memp, respectivamente, são referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel aromático da piridina. Enquanto que as bandas observadas em maiores comprimento de onda 330 (Clmp), 364 (diemp) e 333 nm (memp) são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo fenil (QIU et al., 2009). O deslocamento e o máximo de absorção das bandas atribuídas ao grupo fenil está relacionado com o efeito estérico e eletrônico do grupo R ligado ao anel aromático. Por apresentar um caráter estérico e eletrônico maior, a banda em 364 nm do ligante diemp encontra-se em maior comprimento de onda em comparação com os demais ligantes (QIU et al., 2009).

A partir da análise feita dos espectros de absorção dos ligantes foi possível relacionar a energia dos ligantes às transições eletrônicas dos complexos de fórmula $[\text{Cu}(\text{N,N})_2(\text{NO}_3)_2]$. No espectro do complexo **VII**, Figura 72, as bandas em 325 nm ($1,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 290 nm ($1,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 239 nm ($3,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) são atribuídas às transições intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante iminopiridiníco. O efeito batocrômico observado nos deslocamentos das bandas do complexo indica a coordenação do ligante ao centro metálico. Os demais espectros dos compostos **VIII**, **IX** e **X** podem ser encontrados no anexo B.

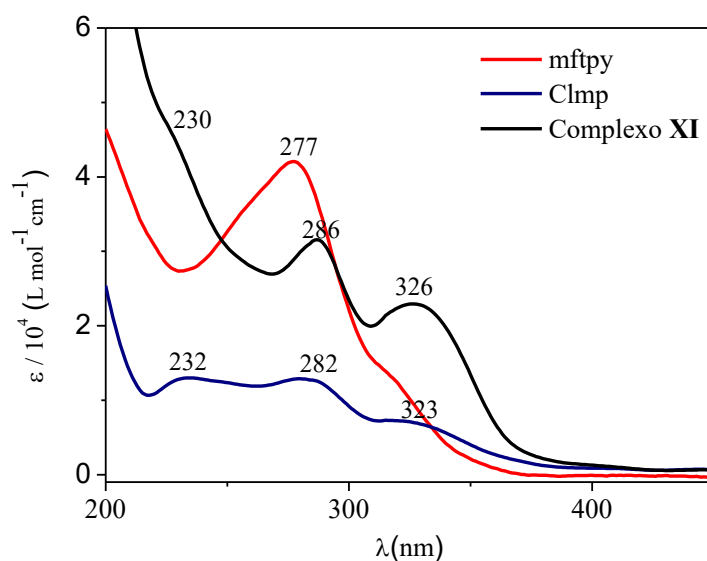
Figura 72- Espectros UV-vis dos compostos **VII** e Clmp em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.



Fonte: Dados de pesquisa.

Os complexos de cobre com iminopiridinas e a terpidina substituída (mftpy) apresentam bandas na região entre 200 a 300 nm com valores de absorvidade molar maior do que 1×10^4 L mol⁻¹ cm⁻¹, indicando que as transições que ocorrem nessa região são de predominância intraligante (IL, $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$). As bandas entre 300 a 400 nm são atribuídas como transições de transferência de carga metal ligante (TCML), devido ao caráter π receptor da 4-metilfenilterpidina (mftpy). Os deslocamentos dessas bandas quando comparados com os respectivos ligantes livres indicam a coordenação ao centro metálico. Por exemplo, no espectro do complexo **XI**, Figura 73, as bandas em 326 e 286 nm apresentam pequeno deslocamento para a região do vermelho em relação aos ligantes mftpy e Clmp. Os dados referentes aos espectros UV-Vis tanto para os ligantes quanto para seus respectivos complexos podem ser consultados na Tabela 23. Os espectros dos demais complexos e os ligantes encontram-se no anexo B.

Figura 73- Espectros UV-vis dos compostos **XI**, mftpy e Clmp em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 23- Atribuição das bandas observadas ($\lambda_{\text{máx}}$) e valores de absorvidade ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos complexos sintetizados **VII-XIII**.

Composto	λ (nm)	ϵ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Atribuição
mftpy	320	$1,2 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	277	$4,2 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
Clmp	323	$7,1 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (fenil)
	282	$1,3 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático da piridina)
	232	$1,3 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (imino)
VII	325	$1,2 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	290	$1,7 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	239	$3,1 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	662	-	d-d
	691	92,0	d-d
XI	326	$2,3 \times 10^4$	TCML
	286	$3,1 \times 10^4$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	230	$4,4 \times 10^4$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	617	-	d-d
	616	46,4	d-d

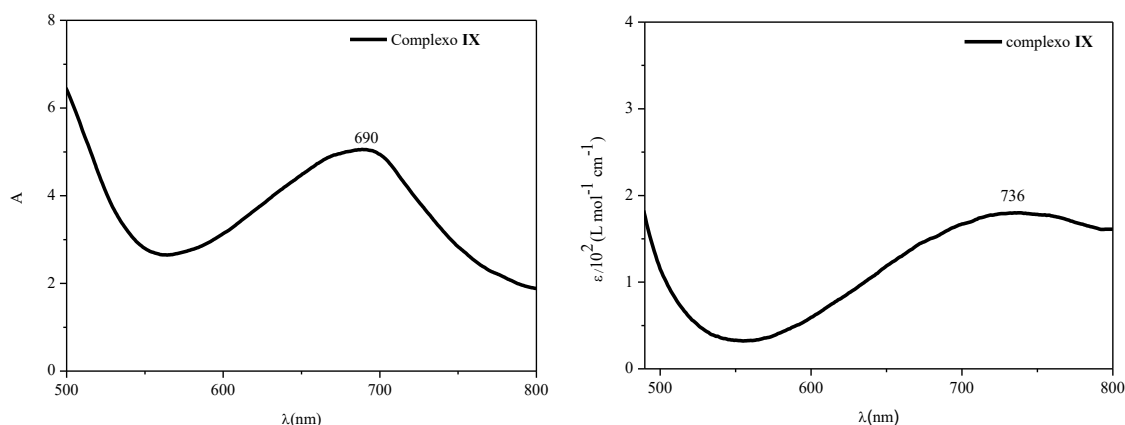
VIII	336	$1,7 \times 10^3$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	278	$1,0 \times 10^4$	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	684	-	d-d
	735	131,0	d-d
Diemp	364	$3,8 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (fenil)
	275	$1,3 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático da piridina)
IX	333	$4,5 \times 10^3$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	285	$1,7 \times 10^4$	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	690	-	d-d
	736	179,0	d-d
XII	327	$2,1 \times 10^4$	TCML
	285	$3,0 \times 10^4$	IL($\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$)
	229	$4,6 \times 10^4$	IL($\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$)
	638	-	-
	625	33,0	d-d
memp	333	$6,2 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (fenil)
	283	$9,7 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$ (anel aromático da piridina)
	234	$1,1 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$ imino
X	329	$1,8 \times 10^4$	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	289	$2,3 \times 10^4$	IL ($\pi^* \rightarrow \pi^*$)
	716	-	d-d
	696	91,0	d-d
XIII	329	$2,9 \times 10^4$	TCML
	287	$3,4 \times 10^4$	IL($\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$)
	228	$4,9 \times 10^4$	IL($\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$)
	611	-	d-d
	612	45,0	d-d

Fonte: Dados de pesquisa.

Os complexos de cobre contendo as iminopirinas foram caracterizados por refletância difusa e UV-Vis com o objetivo de analisar o arranjo estrutural adotado pelos complexos no estado sólido e em solução. O perfil da banda d-d nesses complexos no estado sólido é caracterizado por uma banda assimétrica e larga na região entre 550 – 800 nm centrada em 662, 684, 690 e 716 nm para os compostos **VII**, **VIII**, **IX** e **X**, respectivamente. Segundo a literatura,

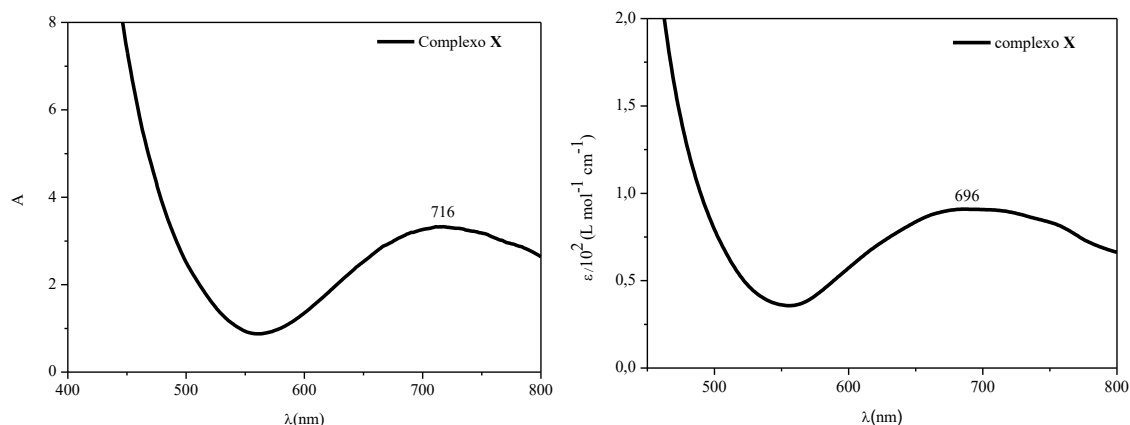
as transições d-d de complexos de Cu^{II} com geometria tetragonal ocorrem nessa mesma região (SILVA et al., 2014). Em solução, os espectros dos complexos $[\text{Cu}(\text{N,N})_2(\text{NO}_3)_2]$ foram obtidos em ACN ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) e diferentes perfis foram observados. Por exemplo, no espectro da Figura 74, a banda d-d no complexo $[\text{Cu}(\text{diemp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**IX**) desloca-se para maior comprimento de onda (centrada em 736 nm) com valor de ϵ igual a $179 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, enquanto que no espectro do complexo $[\text{Cu}(\text{memp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**X**), Figura 75, a banda d-d ocorre em 696 nm com valor de ϵ igual a $92,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Comparando os espectros das Figuras 74 e 75, no primeiro caso há um indício de que em solução ocorra a perda de centrossimetria da molécula, pois, de acordo com Toma as transições eletrônicas com valores de absorvidade molar entre 10 a $100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a complexos d^n em campo O_h e complexos d^n tetraédricos ou sem centro de inversão apresentam valores entre 100 a $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (TOMA, 2016). No segundo caso, ocorreu um deslocamento hipsocrômico indicando que a geometria em solução difere daquela observada no estado sólido (tetragonal), sendo justificada pela substituição do ligante axial nitrato (NO_3^-) por moléculas do solvente ou mudança de geometria.

Figura 74- Gráficos de refletância difusa e UV-vis do complexo $[\text{Cu}(\text{diemp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**IX**).



Fonte: Dados de pesquisa.

Figura 75- Gráficos de refletância difusa e UV-vis do complexo $[\text{Cu}(\text{memp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**X**).

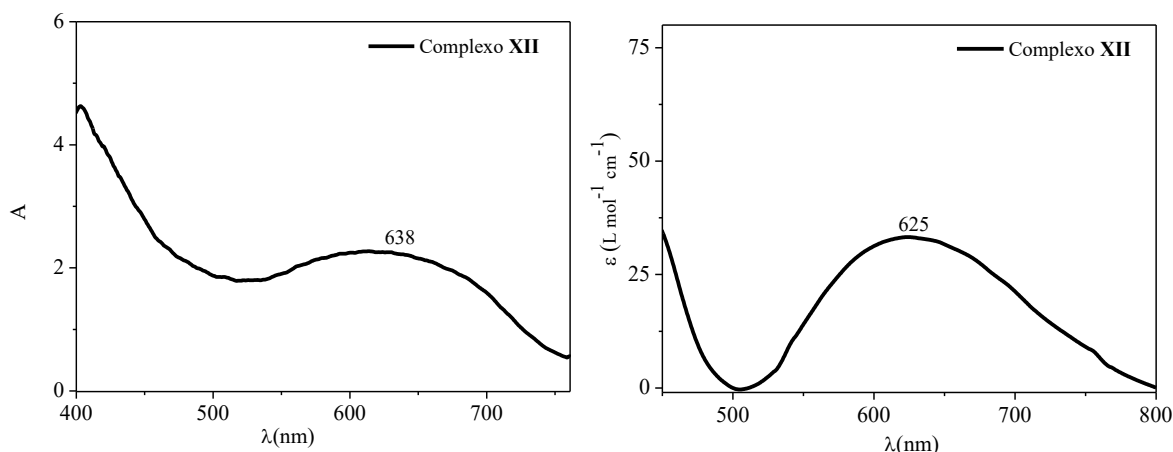


Fonte: Dados de pesquisa.

Os espectros de reflectância difusa dos complexos **XI**, **XII** e **XIII** apresentaram uma banda larga na região entre 500 – 700 nm, centradas em 617, 638 e 611 nm, respectivamente. Já em solução de ACN, essas bandas encontram-se centradas em 616, 625 e 612 nm, respectivamente. Em geral, essas bandas são atribuídas às transições d-d de complexos de Cu^{II} pentacoordenados. Os valores de deslocamento estão em concordância com os encontrados na literatura (bandas centradas na região entre 645 – 770 nm) como descrito por Massoud *et al.* ao discutir os espectros UV-vis das estruturas de complexos de Cu^{II} em ACN com número de coordenação igual a cinco (DONIZ KETTENMANN *et al.*, 2021). Além disso, os espectros UV-Vis dos complexos em acetonitrila ($1,0 \times 10^{-2}$ M) revelaram que apenas a banda d-d do complexo $[\text{Cu}(\text{mftpy})(\text{diemp})]^{2+}$ (**XII**) deslocou-se para menor comprimento de onda (625 nm, $\epsilon = 33 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Figura 76, indicando uma possível mudança na geometria do complexo. Para os demais complexos os deslocamentos foram menores do que 1 nm, como pode ser visto na Tabela 23 e nos espectros do anexo C, indicando que não houve mudança de geometria ou coordenação de solvente ao centro metálico.

A influência que a 4-metilfenilterpidina exerce no desdobramento dos orbitais d é consideravelmente maior do que as iminopiridinas, implicando em bandas d-d em regiões de menor comprimento de onda, isso pode ser observado nas bandas atribuídas a transição d-d nos complexos de cobre(II) com iminopiridinas na região do UV-vis, dados na Tabela 23. Nos compostos **VII**, **VIII**, **IX** e **X** essas transições encontram-se em regiões de maiores comprimentos de onda quando comparando com os compostos **XI**, **XII** e **XIII**.

Figura 76- Espectros de refletância difusa e UV-vis do [Cu(mftpy)(diemp)](PF₆)₂ (**XII**).



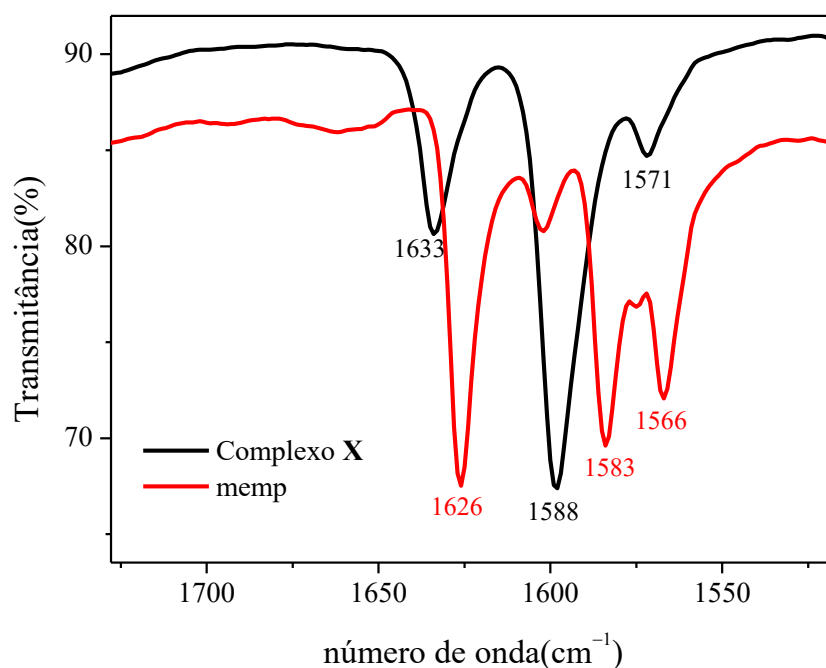
Fonte: Dados de pesquisa.

4.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

De acordo com os dados de CHN, os complexos de cobre(II) contendo derivados de iminopiridina são hidratados e pelos espectros de infravermelho as bandas largas características de estiramentos O-H foram observadas entre 3600 – 3300 cm⁻¹, permitindo inferir que as moléculas de água não estão coordenadas (NAKAMOTO, 1986).

As iminopiridinas apresentam absorções intensas na região do IV como os estiramentos das ligações -C=N- da imina. Nos ligantes livres Clmp, memmp, diimpmp e diemp esses estiramentos ocorreram em 1623, 1626, 1632 e 1640 cm⁻¹, e nos seus respectivos complexos essas bandas estão deslocadas para região de maior energia (1628, 1633, 1634, 1634 cm⁻¹) como pode ser observado nos espectros da Figura 77 para o composto [Cu(mempp)₂]²⁺ (**X**). As absorções intensas na região entre 1600 – 1550 cm⁻¹ são atribuídas ao conjunto de estiramentos C=N e C=C do anel aromático na piridina. No ligante mempp essas bandas estão em 1583 e 1566 cm⁻¹ e no complexo [Cu(mempp)₂]²⁺ (**X**) esses estiramentos foram encontrados em 1588 e 1571 cm⁻¹, respectivamente (Figura 77). Essas atribuições mostram que os ligantes iminopiridinícos coordenam via átomos de nitrogênio do grupo imino e piridina ao íon metálico de Cu^{II}.

Figura 77- Espectros de IV expandidos na região entre 1700 – 1500 cm^{-1} dos compostos **X** e **memp**.



Fonte: Dados de pesquisa.

As principais variações espectrais dos complexos em comparação com o ligante livre são encontradas nas regiões de deformação do anel fora do plano e deformação do anel no plano, onde a absorção dos anéis da piridina ocorre. Estas vibrações nos ligantes livres ocorrem em torno de 400 cm^{-1} e 620 cm^{-1} e nos complexos as bandas deslocam-se para maior número de onda, como pode ser observado na Tabela 24. As diferenças nos deslocamentos dessas bandas variam entre 7 e 38 cm^{-1} , dependendo do modo vibracional e do ligante, sugerindo assim a coordenação do nitrogênio da piridina ao metal.

Tabela 24- Valores de deslocamento da deformação do anel fora do plano e no plano dos ligantes iminopiridinícos e seus respectivos complexos de Cu^{II} .

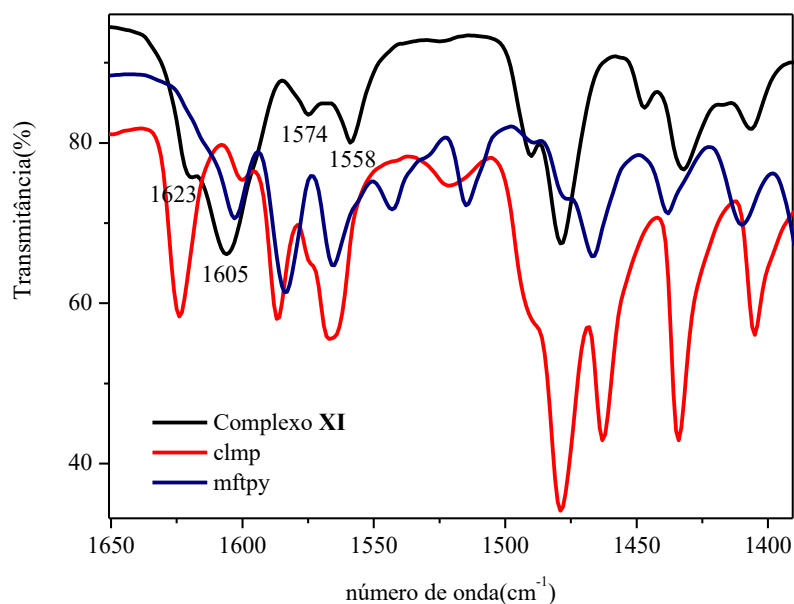
Compostos	Vibração do anel da piridina	
	Deformação do anel	Deformação do anel
	fora do plano	no plano
Clmp	405	626
IX	414	650
diipmp	407	621
X	428	657
diemp	407	617

XI	429	655
memp	405	616
XII	424	654

Fonte: Dados de pesquisa.

Os espectros de IV dos complexos de cobre contendo iminopiridinas e terpiridina também indicaram a coordenação dos ligantes ao centro metálico pelos átomos de nitrogênio, uma vez que as bandas de estiramento carbono nitrogênio da imina e da piridina encontram-se deslocadas para região de menor número de onda. Por exemplo, no espectro do ligante Clmp, Figura 78, a banda de $\nu_{C=N}$ da imina encontra-se em 1623 cm^{-1} e no complexo $[\text{Cu}(\text{mftpy})(\text{Clmp})](\text{PF}_6)_2$ (**XI**) em 1620 cm^{-1} . Enquanto os estiramentos das ligações $C=N$ e $C=C$ da piridina nos ligantes Clmp e 4-metilfenilterpiridina encontram-se em 1602 , 1584 e 1564 cm^{-1} , essas bandas no espectro do composto **XI** são atribuídas em 1605 , 1574 e 1558 cm^{-1} . Além disso, os estiramentos $C=C$ do anel aromático do composto **XI** estão em 1490 , 1478 , 1447 , 1432 e 1406 cm^{-1} . As atribuições dos ligantes e dos complexos estão listados na Tabela 25 e os seus respectivos espectros podem ser encontrados no anexo D.

Figura 78- Espectros de IV expandidos na região entre $1650 - 1400\text{ cm}^{-1}$ dos compostos **XI**, Clmp e mftpy.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 25- Atribuições de alguns modos de estiramento na região do infravermelho dos ligantes livres iminopiridinícos e dos complexos VII-XIII.

Atribuições	Compostos											
	mftpy	Clmp	diipmp	diemp	memp	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
ν_{O-H}	-	-	-	-	-	3471	3445	3446	3645	-	-	-
									3392			
$\nu_{C=Nimino}$	-	1623	1632	1640	1626	1628	1634	1634	1633	1620	1617	1620
$\nu_{C=N+C=C}$	1602	1600	1587	1584	1602	1596	1600	1599	1598	1605	1603	1605
	1584	1586	1567	1565	1583		1574	1572	1571	1574	1573	1573
	1565	1565			1566					1558	1556	1558
$\nu_{C=Car}$	1514	1478	1471	1467	1505	1487	1462	1470	1506	1490	1477	1509
	1466	1462	1440	1454	1489	1449	1440	1462	1480	1478	1451	1479
	1438	1434		1435	1464	1435		1454	1444	1447	1429	1447
	1410	1405			1438	1411				1432	1404	1431
										1406		1405
ν_{C-Har}	3064	3083	3075	3057	3053	3092	3101	3076	3054	3101	3112	3127
	3051	3067	3058	3010	3032	3066	3066	3029	3027	3040	3084	3097
	3029	3050	3013		3006	3033	3033				3041	3033
	3019											
ν_{CH_3}	-	-	2959	2965	2917	-	2965	2970	2955	-	2970	2970
			2926	2932	2856		2930	2935	2928		2935	2922
			2868	2870			2868	2877			2876	2864
ν_{CH_2}												
ν_{P-F}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	827	828	819
										814		

Fonte: Dados de pesquisa.

4.4. Atividade Antitumoral *in vitro* dos complexos de Ni^{II} e Cu^{II}

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo. Para classificar pacientes com câncer de mama, uma série de fatores clínicos e patológicos são considerados a fim de avaliar o prognóstico e determinar a terapia adequada. Os tumores de mama são categorizados em três principais classes: os que apresentam receptor de estrogênio (ER+) ou

receptor de progesterona (PR+), os que apresentam fator de crescimento epidérmico humano, termo conhecido em inglês como Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2+) com ou sem ER+, e o triplo-negativo (TN) definido pela ausência desses receptores (PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001). Geralmente, os tumores triplo negativo possuem um pior prognóstico quando comparados a outros subtipos de tumores, pois apresentam maior risco de recorrência no período de três anos, maiores taxas de mortalidade e são altamente metastáticos, com disseminação para órgãos sólidos como fígado, pulmão e cérebro (RAKHA; ELLIS, 2009; MAYER et al., 2014; ABRAMSON et al., 2015; POPOLIN, 2016).

Com base nessas informações, a atividade antitumoral dos ligantes e seus complexos foi analisada em duas linhagens metastáticas de mama, a saber, MCF-7, uma linhagem celular positiva de receptor hormonal e a MDA-MB-23, uma linhagem celular triplo negativa. Para facilitar a discussão, os resultados da atividade citotóxica *in vitro* dos compostos serão discutidas separadamente, de acordo com as diferentes classe de ligantes utilizadas neste trabalho. Os complexos de fórmula $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{O-O})(\text{fen})]$ foram testados em diferentes concentrações (250 – 3,9 μM) e incubados com células MCF-7 e MDA-MB-231, durante 48 h. Da mesma forma que a cisplatina, todos os complexos de níquel foram mais eficazes contra a linhagem celular MCF-7 do que contra as células MDA-MB-231 (Tabela 26). Mais especificamente, os complexos **I** e **II** foram 1,62 e 2,18 vezes mais eficientes do que a cisplatina contra a linhagem MCF-7 (IC_{50} complexo **I** = 29,94 μM ; IC_{50} complexo **II** = 22,33 μM e IC_{50} cisplatina = 48,78 μM). Uma vez que os valores de IC_{50} para os complexos **I** e **II** são próximos, podemos especular que o mecanismo de morte celular de **I** e **II** em células MCF-7 deve ser semelhante. Com exceção do complexo **III**, os demais compostos de Ni^{II} foram mais ativos do que o fármaco de referência (cisplatina) na linhagem MDA-MB-231. Curiosamente, todos os ligantes livres também foram mais ativos nas células MDA-MB-231 do que nas células MCF-7, mas apenas a fen foi mais eficaz do que a cisplatina. Contudo, foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa que complexos ternários de Cu^{II} com β -dicetonas, fenantrolina e derivados foram seletivos (índice de seletividade > 3) ao passo que a fenantrolina e seus derivados não foram (POLLONI et al., 2019; SOUSA et al., 2020). Quanto às células MCF-7, os complexos de níquel aqui relatados apresentaram atividade semelhante ou superior quando comparados a outros complexos de níquel já descritos na literatura (SUKANYA; VENKATA RAMANA REDDY, 2018; ANJOMSHOA et al., 2019; DEVI et al., 2019; KUMAR et al., 2019).

Tabela 26- Atividade antitumoral dos complexos de Ni^{II} e seus ligantes.

Compostos	IC ₅₀ (MCF-7) (μM)	IC ₅₀ (MDA-MB-231) (μM)
Hbta	237,50 ± 3,63	161,00 ± 5,78
Hbtc	166,90 ± 6,20	51,35 ± 0,64
fen	49,78 ± 3,78	7,44 ± 2,55
[Ni(η ² -NO ₃)(bta)(fen)](I)	29,94 ± 1,97	50,86 ± 0,99
[Ni(η ² -NO ₃)(btc)(fen)](II)	22,33 ± 3,25	37,30 ± 1,97
[Ni(η ² -NO ₃)(btf)(fen)](III)	61,71 ± 5,20	86,82 ± 2,3
cisplatina	48,78 ± 1,63	60,24 ± 2,54

Fonte: Dados de pesquisa.

A atividade antitumoral dos compostos de Cu^{II} contendo a hidrazida bth e os diferentes ligantes *N*-doadores também foi analisada nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 em diferentes concentrações (50 a 0,024 μM) por 48 h (Tabela 27). De acordo com os resultados, os ligantes fenantrolina (fen) e dimetoxibipiridina (dmt) foram mais ativos na linhagem MDA-MB-231, enquanto que nas células MCF-7, a terpiridina foi o único ligante a apresentar alta atividade (IC₅₀ < 10 μM), sendo 45 vezes mais potente do que o ligante bth, que apresentou um valor de IC₅₀ superior a 160 μM em ambas linhagens tumorais. Ao analisar os valores de IC₅₀ dos complexos, conclui-se que a quelação exerceu um papel fundamental no aumento da atividade citotóxica, uma vez que os complexos metálicos apresentaram alta atividade citotóxica, superior à da cisplatina e seus respectivos ligantes livres, exceto o complexo **IV** que foi menos ativo que a fen. Os resultados contra a linhagem MCF-7 demonstraram que os compostos **IV** e **V** possuem boa capacidade em inibir a proliferação das células tumorais com valores de IC₅₀ de 13,3 e 12,0 μM, respectivamente. Comparando os resultados obtidos, verifica-se ainda que o composto **IV** foi 3 vezes mais ativo do que a fenantrolina enquanto o composto **V** foi 25 vezes mais ativos do que o ligante dmt. Os compostos **IV** e **V** também apresentaram boa atividade antitumoral na linhagem MDA-MB-231, sendo que o composto **V** (IC₅₀ = 11,3 μM) foi mais ativo que o ligante dmt (IC₅₀ = 25,0 μM) e a cisplatina (IC₅₀ = 58,1 μM). Dos três complexos analisados, o complexo **VI** foi o mais ativo, com valores de IC₅₀ iguais a 3,3 μM e 8,38 μM nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente. Considerando a linhagem MDA-MB-231, o composto **VI** foi 2 vezes mais citotóxico do que a terpiridina (tpy). De um modo geral, a introdução da terpiridina na esfera de coordenação do cobre^{II} contendo a hidrazida bth melhorou os resultados de

citotoxicidade em comparação com os complexos **IV** e **V** e aos compostos obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, dentre eles $\text{Cu}(4\text{-FH})(\text{fen})(\text{ClO}_4)_2$ e $\text{Cu}(4\text{-NH})(\text{fen})(\text{ClO}_4)_2$ (4-FH = 4-fluoro-fenóxiacético-hidrazida, 4-NH = 4-nitro-benzil-hidrazida e fen = 1,10-fenantrolina), que apresentaram valores de IC_{50} de 6,5 e 4,6 μM , respectivamente, contra linhagem de câncer de mama MCF- 7 (PAIXÃO et al., 2017).

Tabela 27- Atividade antitumoral dos complexos de Cu^{II} com hidrazida e seus ligantes.

Compostos	$\text{IC}_{50}(\text{MCF-7})(\mu\text{M})$	$\text{IC}_{50}(\text{MDA-MB-231})(\mu\text{M})$
bth	$167,2 \pm 1,13$	$349,9 \pm 0,50$
fen	$49,8 \pm 2,32$	$7,4 \pm 0,34$
dmt	$312,7 \pm 1,83$	$25,0 \pm 0,23$
tpy	$3,7 \pm 0,56$	$17,26 \pm 1,06$
$[\text{Cu}(\text{bth})(\text{fen})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2$ (IV)	$13,3 \pm 0,33$	$12,08 \pm 0,44$
$[\text{Cu}(\text{bth})(\text{dmt})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2$ (V)	$12,0 \pm 0,001$	$11,3 \pm 0,60$
$[\text{Cu}(\text{bth})(\text{tpy})](\text{NO}_3)_2$ (VI)	$3,3 \pm 0,28$	$8,38 \pm 1,52$
cisplatina	$65,6 \pm 0,50$	$58,1 \pm 0,8$

Fonte: Dados de pesquisa.

A atividade antitumoral das duas séries de compostos de Cu^{II} contendo iminopiridinas também foi avaliada nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 em diferentes concentrações (1,25 a 160 μM) e no período de 24 h a 48 h como mostra a Tabela 28. Conforme os gráficos no Anexo F, os testes de viabilidade celular indicaram que os ligantes iminopiridinícos e mftpy não inibem em pelo menos 50% a proliferação das células tumorais de mama, impossibilitando assim o cálculo do IC_{50} . Os complexos $[\text{Cu}(\text{clmp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**VII**) e $[\text{Cu}(\text{diipmp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**VIII**) também não exibiram atividade antitumoral contra as células MCF-7 e MDA-MB-231, apresentando valores de IC_{50} maiores do que 160 μM . No período de 24h, o composto $[\text{Cu}(\text{diemp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**IX**) apresentou valor de IC_{50} igual a 77,80 μM na linhagem MDA-MB-231, porém no tempo de 48 h o composto não inibe de maneira eficiente a proliferação dessas células com $\text{IC}_{50} > 160 \mu\text{M}$. Esses resultados indicam que um mecanismo de reparo eficiente foi acionado contra o complexo ou as células tumorais adquiriram resistência a ele, como na cisplatina (ROCHA et al., 2018). O composto $[\text{Cu}(\text{memp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**X**) também apresentou atividade antitumoral moderada contra as células MCF-7, porém também houve diminuição de sua atividade com o tempo. Na linhagem MDA-MB-23, após 48 h, foi possível determinar um valor de $\text{IC}_{50} = 129,9 \mu\text{M}$ contra a linhagem tumoral MDA-MB-231.

Os complexos de Cu^{II} contendo os ligantes iminopiridinícos e 4-metilfeniltepiridina

(mftpy) apresentaram moderada atividade antitumoral somente nas linhagens MDA-MB-231. O composto [Cu(diemp)(mftpy)](PF₆)₂ (**XII**) apresentou um mecanismo de ação diferente do composto [Cu(clmp)(mftpy)](PF₆)₂ (**XI**), pois após 48 h de incubação foi observada uma inibição mais eficaz contra a proliferação das células tumorais (IC₅₀ = 100,7 μM). Essa eficácia também pode ser observada ao comparar a atividade citotóxica dos complexos [Cu(diemp)₂(NO₃)₂] (**IX**) e [Cu(diemp)(mftpy)](PF₆)₂ (**XII**) por 48 h. O complexo **XII** foi mais citotóxico que o **IX**, devido provavelmente ao seu mecanismo de ação que consegue romper os mecanismos de reparo e a resistência adquirida pelas células tumorais. Comparando os complexos [Cu(memp)₂(NO₃)₂] (**X**) e [Cu(memp)(mftpy)](PF₆)₂ (**XIII**) a introdução da mftpy neste caso não foi relevante, uma vez que, por 48 h os compostos apresentaram valores próximos de IC₅₀ contra as células MDA-MB-231. A avaliação da citotoxicidade em outras linhagens celular é desejável, afim de avaliar melhor o potencial antitumoral destes compostos.

Tabela 28- Atividade antitumoral dos complexos de Cu^{II} com iminopirinas.

Compostos	24 horas		48 horas	
	IC ₅₀ (MCF-7)	IC ₅₀ (MDA-MB-231)	IC ₅₀ (MCF-7)	IC ₅₀ (MDA-MB-231)
[Cu(clmp) ₂ (NO ₃) ₂] (VII)	ND	ND	ND	ND
[Cu(diimp) ₂ (NO ₃) ₂] (VIII)	ND	ND	ND	ND
[Cu(diemp) ₂ (NO ₃) ₂] (IX)	ND	77,80	ND	ND
[Cu(memp) ₂ (NO ₃) ₂] (X)	50,31	ND	ND	129,9
[Cu(clmp)(mftpy)](PF ₆) ₂ (XI)	ND	135,9	ND	ND
[Cu(diemp)(mftpy)](PF ₆) ₂ (XII)	ND	ND	ND	100,7
[Cu(memp)(mftpy)](PF ₆) ₂ (XIII)	ND	123,4	ND	138,2

Legenda - ND: Não determinado. IC₅₀ > 160 μM. Fonte: Dados de pesquisa.

4.5. Interação com ADN

Os complexos metálicos dependendo de sua estrutura e da natureza dos ligantes podem ter diferentes modos de interação com o ADN e serem considerados bons candidatos a metalofármacos. Mais especificamente, quando ligantes lábeis estão ligados ao metal, eles podem ser deslocados por um átomo de nitrogênio da base purina resultando na formação de uma ligação covalente entre o metal e o átomo de nitrogênio da base do ADN, como no caso da cisplatina. No caso de complexos estáveis ou inertes, eles podem se ligar ao ADN de forma não-covalente ao quebrar a hélice do ADN, dependente de suas estruturas; por interação eletrostática, quando um complexo catiônico pode interagir com os grupos fosfato do ADN de

carga negativa. Outra forma de interação é por intercalação quando complexos com ligantes fenantrolina e/ou terpiridina que apresentam anéis aromáticos planares, podem interagir devido a inserção desses anéis entre as bases do ADN e a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio ou forças de van der Waals entre o complexo e a superfície externa do ADN resulta em interações de ligação ao sulco maior ou menor da hélice do ADN. (NIKOLAOU; SILVA, 2018). Portanto, essas interações podem ser exploradas para fins medicinais, bloqueando ou impossibilitando a replicação do ADN por meio de ligação ou clivagem oxidativa ou hidrolítica.

Uma gama de técnicas espectroscópicas e físico-químicas são utilizadas para estudar a interação de complexos metálicos com ácidos nucleicos para distinguir possíveis modos de ligação (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; KELLETT et al., 2019). As espectroscopias usadas rotineiramente incluem: UV-Vis, emissão de fluorescência e dicroísmo linear (DL) e circular (DC) (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; KELLETT et al., 2019).

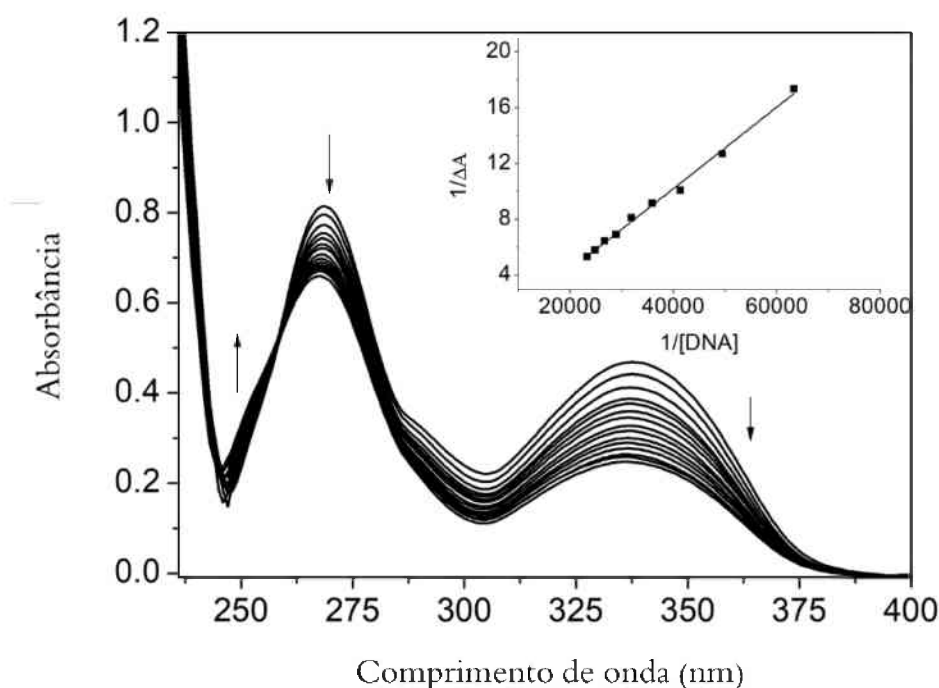
A espectroscopia UV-Vis é frequentemente usada para investigar a interação entre compostos metálicos e ADN (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; REHMAN et al., 2015). De acordo com a literatura, mudanças no perfil espectral durante a interação entre o ADN e um complexo metálico podem oferecer informações relevantes sobre o modo de ligação envolvido (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Complexos metálicos que se ligam através de intercalação exibem efeito hipocrômico (diminuição da absorbância) frequentemente acompanhado por batocromismo (desvio para o vermelho) (LI et al., 2014). Este tipo de interação envolve a interação de empilhamento π - π * entre o par de bases do ADN e um cromóforo aromático (LI et al., 2014; KAZEMI et al., 2015; BARRA et al., 2016), enquanto o efeito do hiperocrômico é atribuído ao modo de ligação do sulco, que pode ser o resultado da desnaturação da estrutura de dupla hélice e / ou à ligação eletrostática como resultado da interação entre compostos catiônicos e grupos fosfato da estrutura do ADN (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Mudanças na morfologia do ADN induzidas pela presença de complexos metálicos podem ser monitorado com alta sensibilidade usando a técnica de dicroísmo circular (DC) (CHANG; CHEN; HOU, 2012). Os espectros de DC do ADN mostram duas bandas entre 220 – 300 nm, uma banda negativa em ~ 245 nm atribuída à forma B do lado direito do ADN e uma banda positiva em ~ 275 nm relacionada com o empilhamento π - π * da base (DA SILVEIRA et al., 2011; REHMAN et al., 2015). Um aumento no sinal elíptico nas bandas positivas e negativas indica intercalação (KELLETT et al., 2019), enquanto ligação no sulco ou interação eletrostática é observada quando pouca ou nenhuma mudança ocorre nos espectros de DC (ZHAO et al., 2014; REHMAN et al., 2015).

4.5.1 Interação com ADN dos complexos de Ni^{II} por UV-vis e dicroísmo celular

A Fig. 79 mostra o espectro eletrônico do complexo **III** (os espectros dos complexos **I** e **II** são mostrados no anexo G). Ao aumentar a concentração de ct-ADN, foi observado um efeito hipocrômico nas bandas de transferência de carga intraligante (ILCT) na faixa entre 334 – 350 nm para todos os complexos de Ni^{II}. Além disso, o aparecimento de pontos isobésticos para os complexos **I** e **III** (Tabela 29) sugere a presença de, pelo menos, duas espécies em equilíbrio na solução (complexo livre e ligado ao ADN)(GAO et al., 2010; ZEHRA et al., 2018). Os valores das constantes de ligação intrínseca (K_b) para todos os complexos de Ni^{II} foram obtidos por meio do gráfico de Benesi-Hildebrand e são mostrados na Tabela 29.

Figura 79- Espectros UV-vis do complexo **III** ($3,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN ($1,21 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[ADN]$.



Fonte: Dados de pesquisa.

Os valores das constantes de ligação, K_b , obtidos para todos os complexos de Ni^{II} são menores do que os valores das constantes de ligação relatados na literatura para metalintercaladores e intercaladores clássicos (por exemplo, 10^7 M⁻¹) (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Sendo assim, uma interação por meio de ligação no sulco e/ou forças eletrostáticas com o grupo fosfato na estrutura do ADN não pode ser descartada, uma vez que os complexos são catiônicos em solução.

Tabela 29- Constantes de ligação do ADN (K_b) e pontos isobésticos dos complexos de níquel(II).

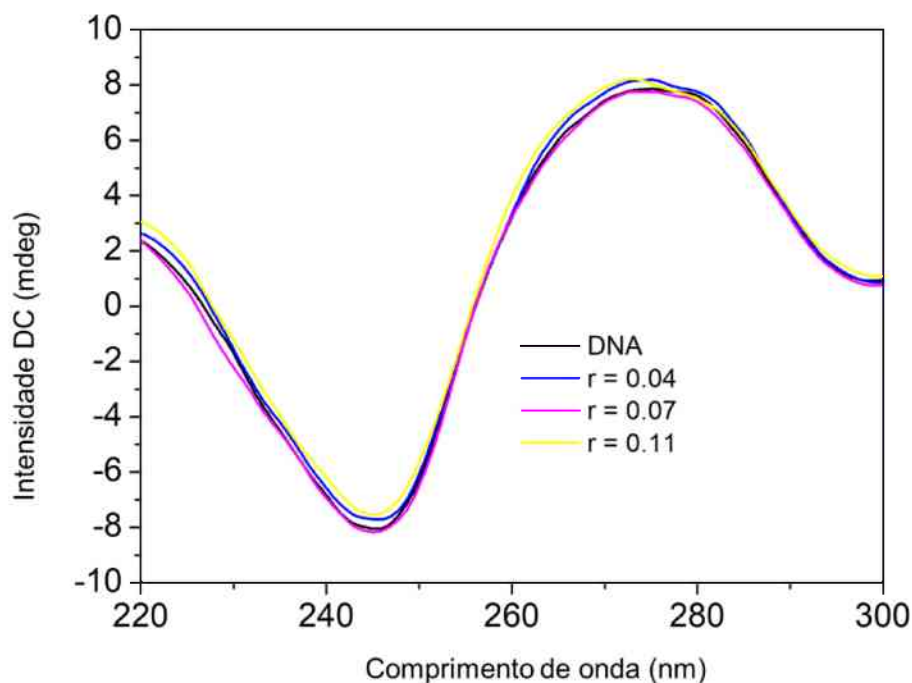
Complexos	Ponto Isobéstico (nm)	K_b (M^{-1})	R^*
I	257	$6,05 \times 10^3$	0,9936
II	-	$1,31 \times 10^4$	0,9450
III	259	$4,94 \times 10^3$	0,9942

*coeficiente de correlação.

Fonte: Dados de pesquisa.

Ao analisar os espectros de dicroísmo celular dos compostos de Ni^{II} , pouca ou nenhuma mudança no perfil espectral de DC foi detectado ao aumentar a concentração dos complexos de níquel(II), sugerindo uma interação eletrostática e/ou ligação no suco, como pode ser observado no espectro de DC do composto **III**, Figura 80.

Figura 80- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo **III** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em DMSO) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.

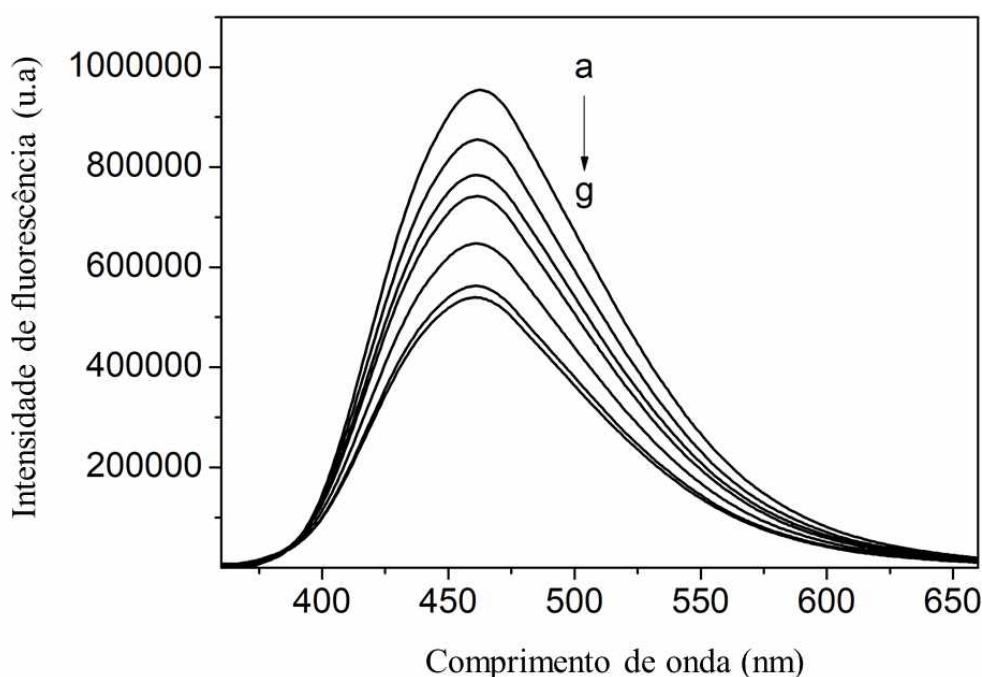


Fonte: Dados de pesquisa.

O experimento de competição de fluorescência com Hoechst 33.258 foi também realizado para investigar o modo de ligação entre os complexos de níquel e ct-DNA (RUIZ et al., 2013; REHMAN et al., 2014). A sonda Hoechst 33258 liga-se ao sulco menor do ADN,

resultando em um aumento significativo na intensidade de fluorescência do sistema ADN-Hoechst (REHMAN et al., 2014). O experimento de competição com Hoechst 33258 empregando o complexo **III**, Fig. 81, mostrou que ao aumentar a concentração do **III** na solução Hoechst-ADN, a fluorescência Hoechst-ADN diminui. O mesmo comportamento também foi observado para os compostos **I** e **II** (os espectros de fluorescência **I** e **II** estão disponíveis no anexo G). Esses resultados sugerem que os complexos de níquel são capazes de se ligar ao sulco menor do ADN, deslocando o Hoechst 33258 ligado a estrutura do ADN. Este comportamento é consistente com os resultados de absorção UV-Vis e DC relatados anteriormente. Até agora, uma conclusão que pode ser tirada é que a atividade citotóxica de complexos de níquel (ver Tabela 26) se correlaciona com afinidades de ligação ao ADN, no qual os complexos com constantes de ligação mais fortes exibem maior citotoxicidade.

Figura 81- Espectros de fluorescência após adição de concentrações crescentes do complexo **III** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em DMSO) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.



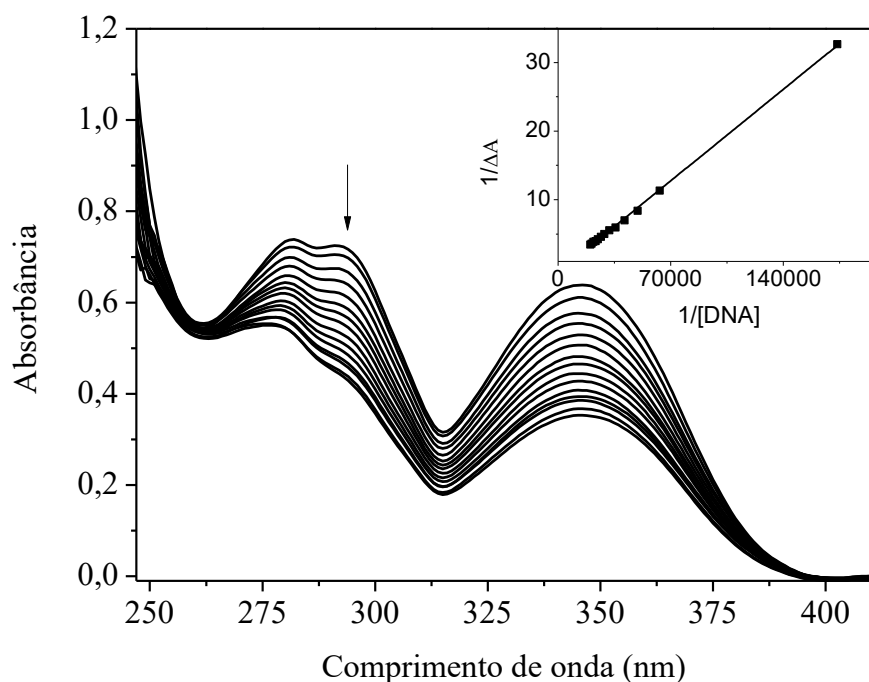
Fonte: Dados de pesquisa.

4.5.2 Interação com ADN dos complexos de Cu^{II} por UV-vis e dicroísmo celular

Os modos de ligação dos complexos **IV**, **V** e **VI** foram avaliados pela curva de titulação espectrofotométrica com ct-ADN e os espectros de UV-vis dos complexos foram obtidos na ausência e com incrementos sucessivos de ct-ADN. Na Fig. 82, ao aumentar a concentração de ct-ADN o efeito hipocrômico fica evidenciado nas bandas de transferência de carga intraligante

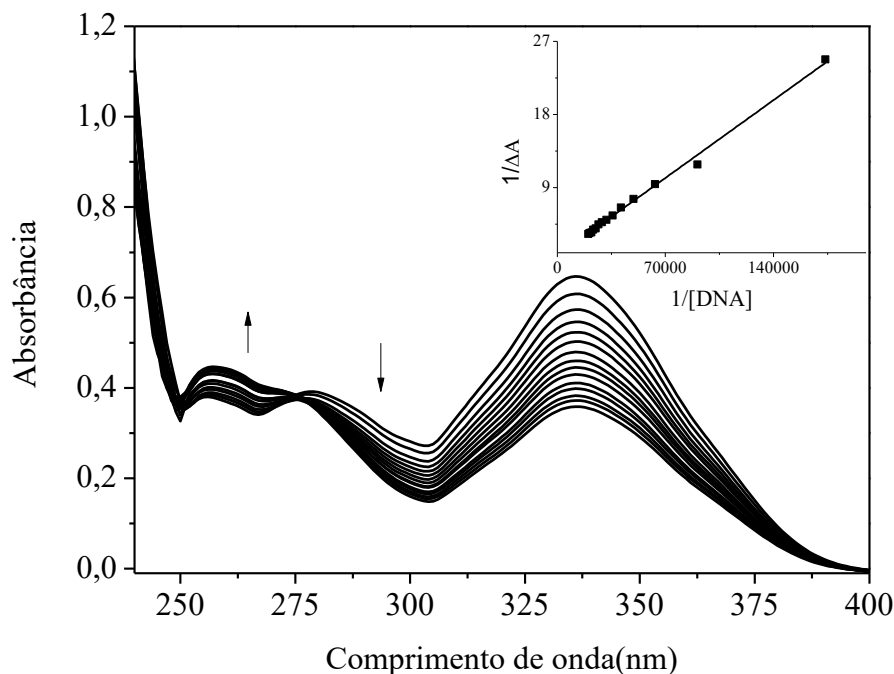
(ILCT) na faixa entre 281– 350 nm dos compostos **IV** e **V** (espectro UV-vis do complexo **IV** no anexo G). Um comportamento diferente foi observado no espectro UV-vis do composto **VI**, Fig. 83, um deslocamento hipercrômico na banda de transferência de carga intraligante (ILCT) em 255 nm seguido de um efeito hipocrômico na região entre 281 – 336 nm na banda de TCML. Além disso, somente esse composto apresentou um ponto isobéstico em 275 nm (Tabela 30) sugerindo a presença de pelo menos duas espécies, complexo livre e ligado ao ADN, em equilíbrio na solução (GAO et al., 2010; ZEHRA et al., 2018). Os valores das constantes de ligação intrínseca (K_b) para todos os complexos de cobre foram obtidos por meio do gráfico de Benesi-Hildebrand e são mostrados na Tabela 30.

Figura 82- Espectros UV-vis do complexo **V** ($4,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN ($1,21 \times 10^{-4}$ M) em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[ADN]$.



Fonte: Dados de pesquisa.

Figura 83- Espectros UV-vis do complexo **VI** ($2,5 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN ($1,21 \times 10^{-4}$ M) em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[ADN]$.



Fonte: Dados de pesquisa.

Tabela 30- Constantes de ligação do ADN (K_b) e pontos isobésticos dos complexos ternários de cobre(II).

Complexos	Ponto Isobéstico (nm)	K_b (M^{-1})	R^*
IV	-	$4,22 \times 10^2$	0,9960
V	-	$3,09 \times 10^3$	0,9991
VI	275	$9,24 \times 10^3$	0,9968

*coeficiente de correlação.

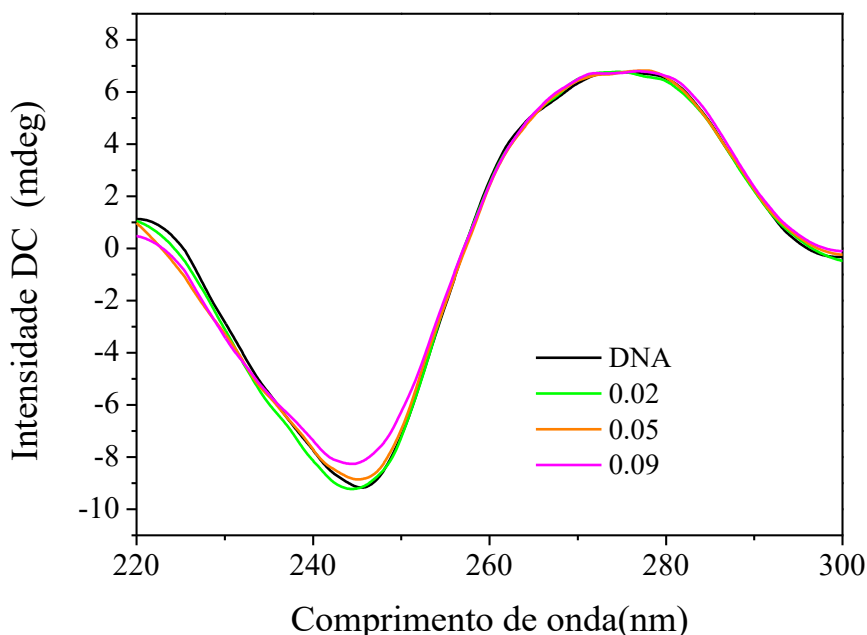
Fonte: Dados de pesquisa.

No espectro de DC do composto **V**, Figura 84, pode-se observar que não houve alterações significativas com a adição de crescentes concentrações do complexo **V** ao ct-ADN. O perfil do espectro continua o mesmo, sugerindo uma interação eletrostática e/ou ligação no suco. O mesmo pode ser observado para os demais compostos (espectros no anexo G). Como o composto **VI** apresentou o maior valor de K_b e maior citotoxicidade (ver Tabela 27), podemos inferir que existe uma relação entre o modo de ligação do composto e sua atividade antitumoral.

Os testes de competição de fluorescência com a sonda Hoechst 33.258 não foram realizados para os complexos **IV**, **V** e **VI**, pois tais compostos absorvem na mesma região da

sonda.

Figura 84- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo **V** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.



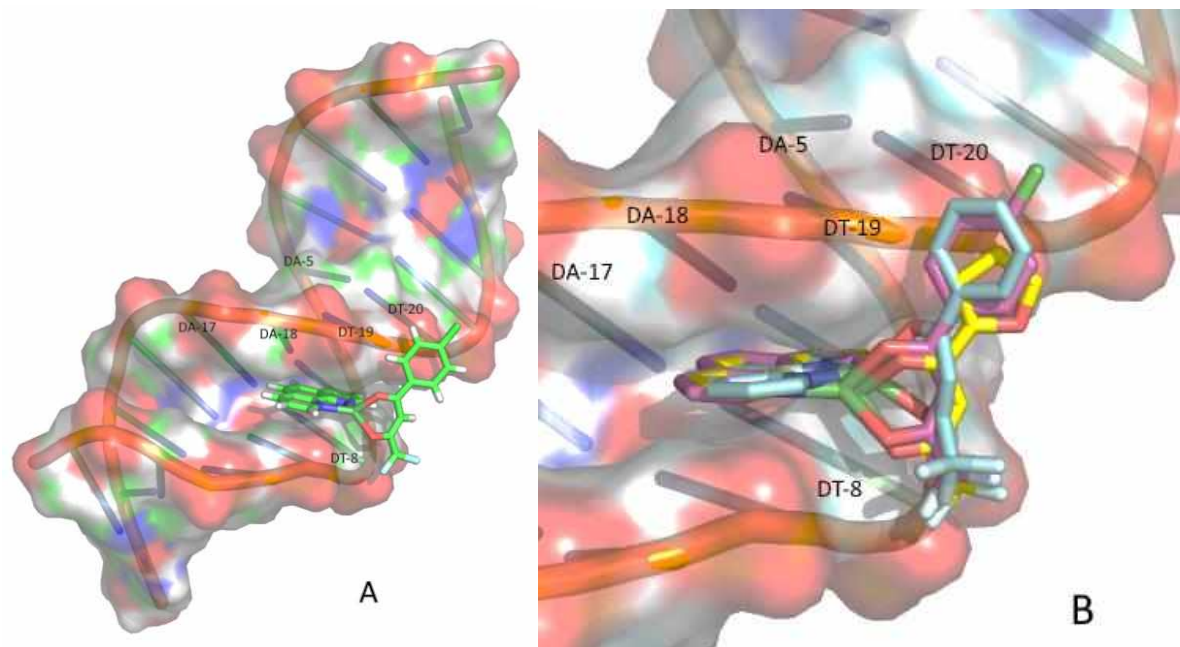
Fonte: Dados de pesquisa.

4.6. Ancoragem Molecular dos complexos de Ni^{II}

Para melhor entender as diferenças nos valores de IC₅₀ apresentados pelos complexos de Ni^{II} simulações de ancoragem molecular, termo comumente conhecido em inglês como molecular docking, seguidas de simulações semi-empíricas foram executadas a fim de estudar a energia e a interação dos compostos **I-III** com ct-ADN.

Nos estudos por docking molecular foi utilizado a sequência do ct-ADN d(CGCGAATTCGCG)₂ (PDB ID: 1BNA), e os resultados indicam que os compostos se ligam no sulco menor em uma região rica em pares de bases A-T como mostra a Figura 85A (THAKUR et al., 2019). A geometria das interações é estabilizada por interações hidrofóbicas no sulco menor da região ct-ADN (Figura 85B) e, neste caso não foi observado formação de ligação de hidrogênio por nenhum composto. Os resultados sugerem que a introdução de um substituinte cloro no anel aromático do composto **II** melhorou a interação com ct-ADN, indicando uma geometria de interação mais favorável em comparação com os outros complexos (Figura 85B). Os estudos de docking e semi-empíricos não foram capazes de prever a interação eletrostática, porém essa interação não pode ser descartada devido ao caráter iônico do composto em solução.

Figura 85- Ancoragem molecular seguidas de simulações semi-empíricas dos complexos **I-III** com ct-ADN. A) representa o complexo **II** (bastões) ligado no sulco menor do ct-ADN (desenho e superfície) em uma região rica em A-T. B) representa a ligação dos complexos **I** (azul), **II** (rosa) e **III** (amarelo) no sulco menor do ct-ADN.



Fonte: Dados de pesquisa.

A Tabela 31 traz os dados da energia de interação (ΔH_{int}) dos compostos de Ni^{II} com ct-ADN obtidos a partir do docking molecular. Os dados indicam que o composto **II** apresenta o menor valor de energia de interação (17 kcal mol^{-1}), corroborando com os resultados de citotoxicidade e interação com ADN, considerando que o composto **II** foi mais ativo nas linhagens tumorais e possui o maior valor de K_b .

Tabela 31- Cálculos semi-empíricos obtidos a partir da interação dos compostos **I-III** com ct-ADN.

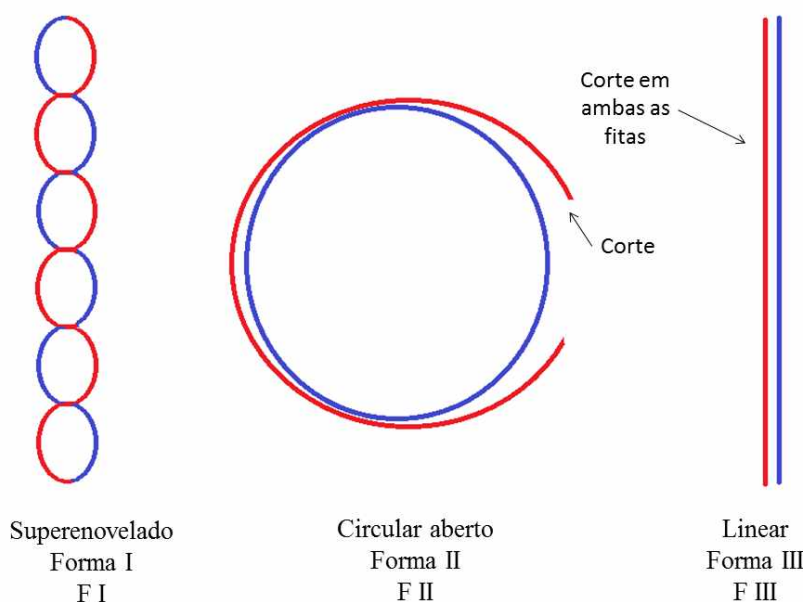
Compostos	$\Delta H_{\text{int}} (\text{kcal mol}^{-1})$
I	24
II	17
III	36

Fonte: Dados de pesquisa.

4.7. Clivagem dos complexos de Ni^{II}

O ADN plasmidial pode apresentar três conformações distintas que estão esquematicamente representadas na Figura 86 (SILVA, 2013). Na forma superenovelada do ADN plasmidial (Forma I, F I), os plasmídeos são geralmente representados como um círculo estendido, mas, na verdade, estão intactos mantendo sua fita de ADN de forma superenrolada. Essa é a forma mais rápida de migração em gel na maioria das condições de eletroforese. Quando FI sofre uma quebra simples (em apenas umas das fitas) durante o isolamento do plasmídeo ou no tratamento com compostos que interagem com o ADN, ocorre o relaxamento da estrutura superenovelada e o ADN plasmidial assume a forma circular aberta (Forma II, F II). Essa é a forma do plasmídeo de migração mais lenta. Se houver outro evento de clivagem na cadeia complementar perto do local da primeira quebra, há a formação de uma quebra dupla e o ADN plasmidial fica na sua forma linear (Forma III, F III). Na maioria das condições em gel, o ADN plasmidial linear migra a uma taxa intermediária entre a forma superenrolada e a circular. As três formas possuem mobilidade eletroforéticas diferentes, portanto, podem ser separadas por eletroforese em gel de agarose e então analisadas conforme a quantidade e a forma de ADN clivado.

Figura 86- Representação esquemática das 3 formas das moléculas de ADN plasmidial.

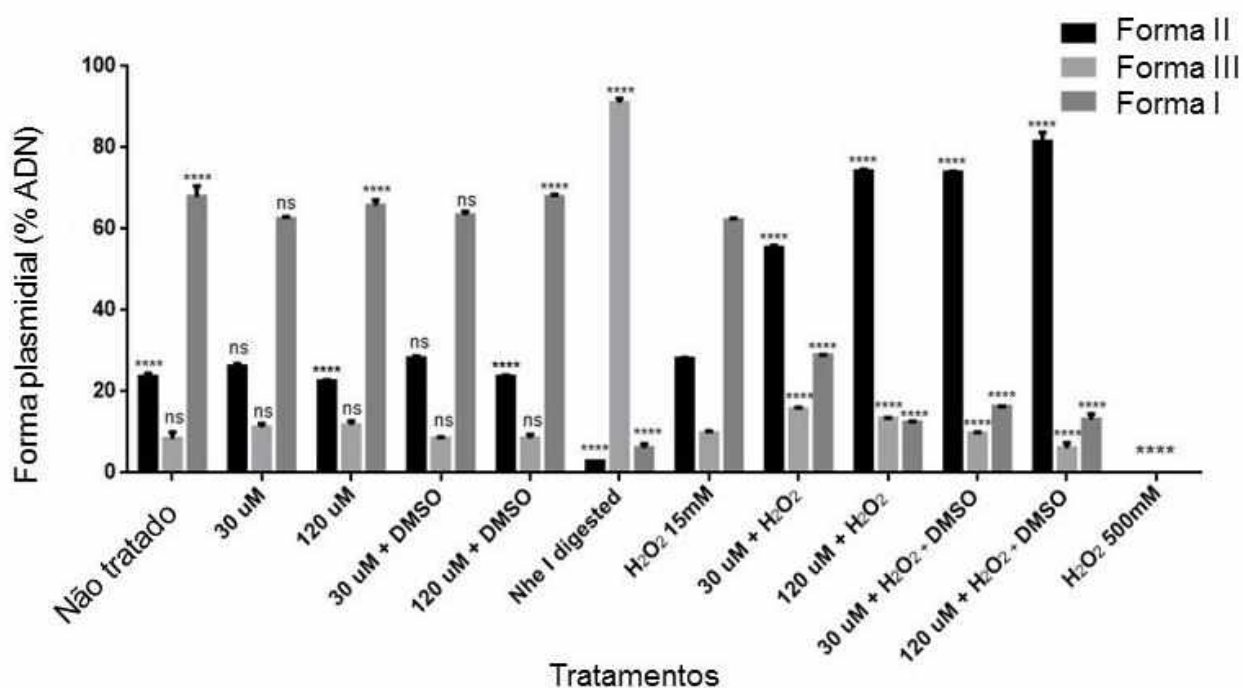


Fonte: Adaptado de (SILVA, 2013)

Diferentes concentrações do complexo **II** no tratamento do plasmídeo mostram sua capacidade em clivar o ADN (Fig. 87 e 88). Porém, foi apenas na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que o complexo foi capaz de induzir cortes na dupla hélice do ADN, produzindo plasmídeos lineares (forma III), conforme observado no controle tratado com a

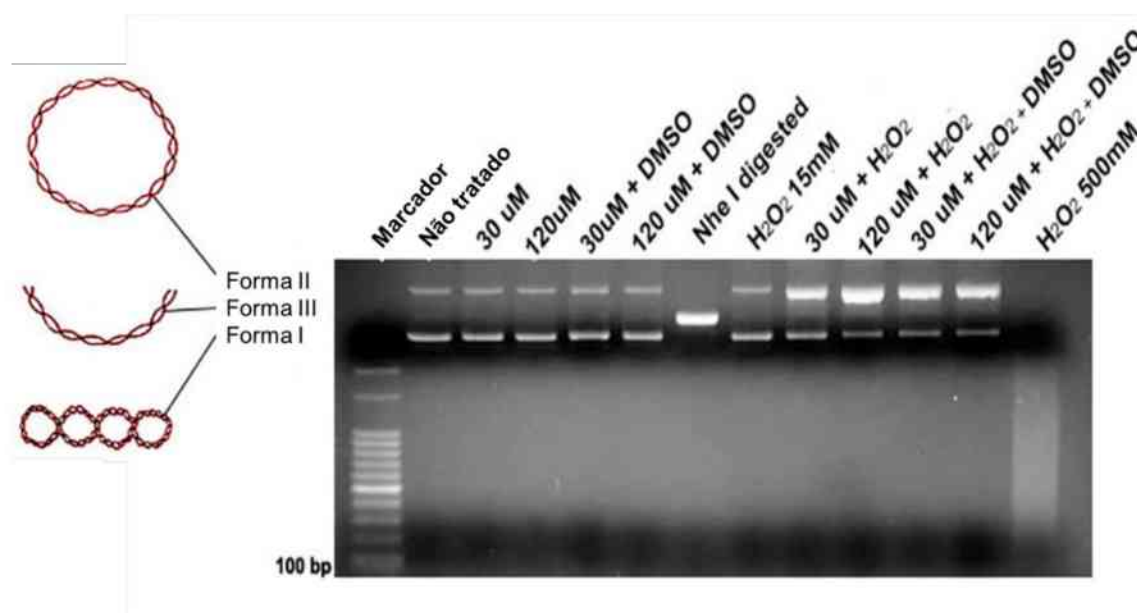
enzima de restrição NheI (NheI digested). Também foi observado na eletroforese em gel de agarose que a presença de H₂O₂ potencializou o surgimento das bandas nas Formas II (cortes na fita simples) e III (cortes na dupla fita), uma vez que todas as bandas divergiram estatisticamente do controle tratado apenas com H₂O₂. Além disso o DMSO, um sequestrador de espécies reativas de oxigênio, foi capaz de reduzir a quantidade de quebras na fita de ADN nas concentrações utilizadas.

Figura 87- Clivagem representativa do plasmídeo siSTRIKE™ pelo complexo II. Resultados quantitativos densitométricos da eletroforese em gel de agarose. Os dados são expressos como média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas foram determinadas utilizando testes ANOVA de uma via e o de comparações múltiplas de Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 (em comparação com o tratamento de controle com H₂O₂ 15 mM). **** p < 0,0001. ns não significativo.



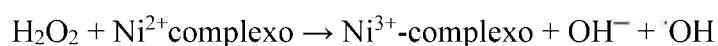
Fonte: Dados de pesquisa.

Figura 88- Resultado da eletroforese em gel, mostrando o aumento da forma II e III do plasmídeo induzido pelo co-tratamento com o complexo II e H₂O₂.



Fonte: Dados de pesquisa.

Kong *et al.* utilizaram diferentes condições reacionais para investigar a influência dos complexos de níquel ao danificar o ADN e concluíram que a maioria precisava de um agente externo para induzir rupturas (KONG *et al.*, 2008). Ali *et al.* também observaram que complexos de Ni^{II} podem degradar o plasmídeo pBR322 através da clivagem oxidativa na presença de H₂O₂ induzido pela formação de radicais hidroxila. Os autores observaram que a adição de um sequestrador de radical hidroxila, como o DMSO, inibe completamente a atividade de clivagem do ADN dos complexos estudados (ALI *et al.*, 2014). Segundo esses autores, as reações do tipo Fenton ou de Haber-Weiss podem explicar como ocorre essa quebra oxidativa. Assim, inicialmente o íon níquel é oxidado por H₂O₂ para produzir o radical hidroxila, e na segunda etapa, o Ni³⁺ formado é reduzido de volta. Os radicais hidroxila são responsáveis pela quebra do ADN. As seguintes equações podem explicar como os complexos de níquel induzem a formação desses radicais:



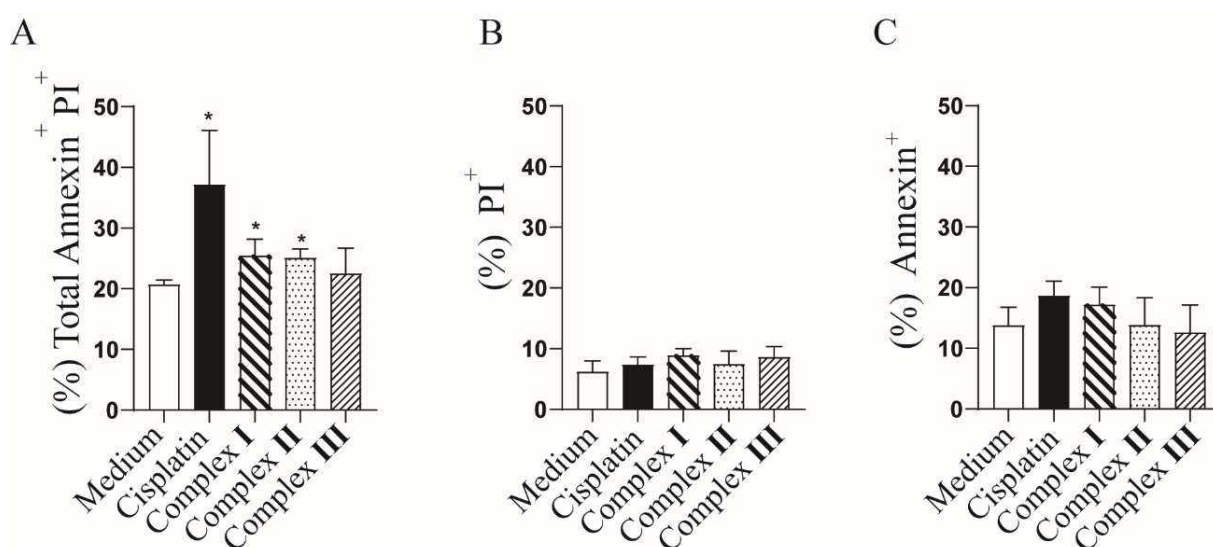
Bedier *et al.* também estudaram a interação de complexos de Fe^{III}, Ni^{II}, Zn^{II} e Hg^{II} coordenados a benzil α -monoxima piridiltiosemicarbazona com ADN. Eles trataram o ADN de timo de bezerro com os complexos e realizaram análises de eletroforese em gel. Os resultados

mostraram que o complexo de Ni^{II} exibiu a maior e mais completa atividade de clivagem do ADN e que o mecanismo de quebra foi dependente da presença de H₂O₂ (BEDIER et al., 2017).

4.8. Apoptose dos complexos de Ni^{II}

Uma vez que os complexos de níquel mostraram atividade antitumoral contra a linhagem celular MCF-7, eles foram selecionados para estudos de apoptose a fim de elucidar o mecanismo pelo qual induzem a morte celular. Em uma abordagem simples, a detecção de apoptose por Anexina V/iodeto de propídio (IP) por citometria de fluxo consiste na ligação da Anexina V à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo de morte celular apoptótica, e na ligação do IP ao ADN das células que não apresentam integridade de membrana, ou seja, células que estão em processo final de apoptose e/ou células necróticas. De acordo com a Fig. 89A os complexos I e II induziram apoptose tardia semelhante à cisplatina, fenômeno esse que pode ser explicado pela possibilidade desses complexos interagirem com o ADN. Da mesma forma, Polloni *et al.* mostraram que complexos semelhantes de Cu^{II} também induziram apoptose tardia em células de sarcoma 180 (POLLONI et al., 2019). Em 48 h, não foi observada necrose (Fig. 89B) ou apoptose precoce (Fig. 89C) para os complexos de Ni^{II}.

Figura 89- A) Tratamento das células MCF-7 com os complexos I e II leva à apoptose tardia. B) mas sem efeitos sobre a necrose ou C) apoptose precoce. Os resultados são apresentados como uma média dos experimentos em triplicata. O teste t de Student e os dados não paramétricos foram comparados com o teste U de Mann-Whitney. Diferenças significativas em comparação com o meio são denotadas * p < 0,05.



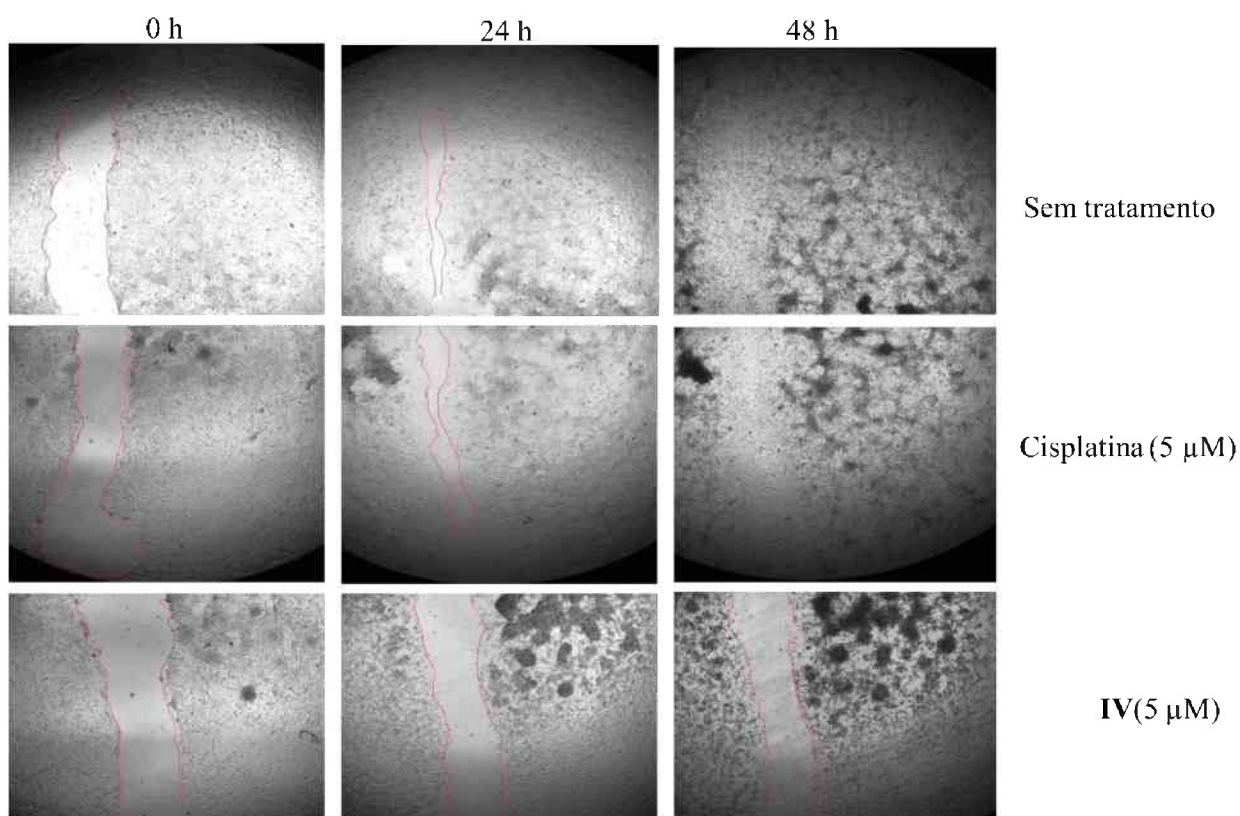
Fonte: Dados de pesquisa.

4.9. Ensaio de migração celular dos complexos de Cu^{II} coordenados a hidrazida e *N*-doadores – método Wound Healing

A migração celular é essencial para muitos processos biológicos, como reparo e regeneração tecidual. Entretanto, o processo descontrolado impulsiona a progressão de muitas doenças, incluindo a invasão e metástase do câncer (CONDEELIS; SINGER; SEGALL, 2005; ALMEIDA; AMORIM, 2019). Para avaliar os efeitos dos complexos **IV**, **V** e **VI** sobre a migração celular, foi realizado um ensaio de Wound Healing nas células MCF-7 e MDA-MB-231.

Conforme mostrado na Fig. 90, a taxa de fechamento do risco em uma área definida representa a capacidade migratória das células após o tratamento com os compostos de $\text{Cu}(\text{II})$ e a cisplatina. As células cancerosas não tratadas no grupo de controle migram rapidamente para a área da ferida. O mesmo pode ser observado quando as células foram tratadas com o fármaco de referência (cisplatina). Em contraste, a mobilidade das células cancerosas tratadas com o composto **IV** é marcadamente reduzida.

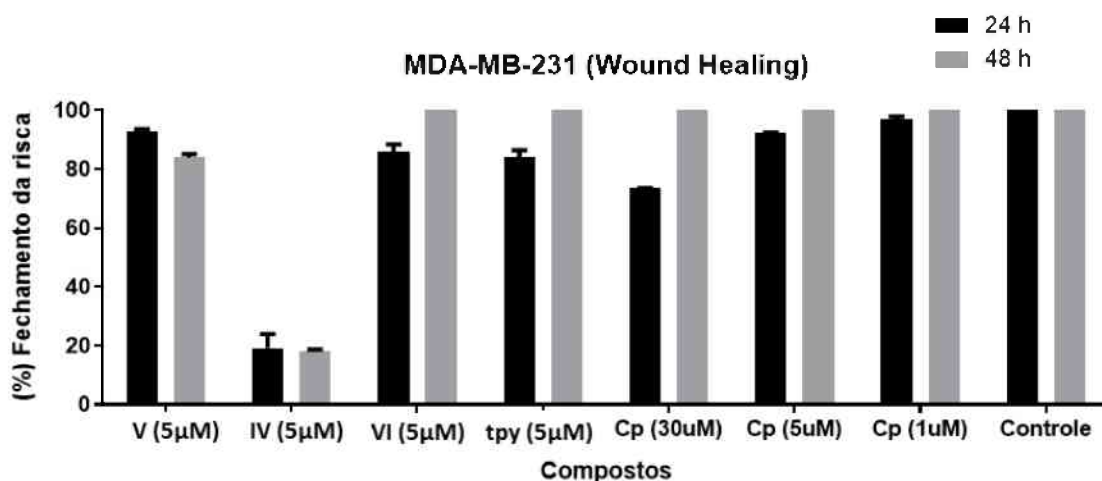
Figura 90- Imagens dos riscos obtidas após 0, 24 e 48 h de incubação do composto **IV** ($5\mu\text{M}$) nas células tumorais de mama MDA-MB-231, em comparação com o controle e a cisplatina ($5\mu\text{M}$).



Fonte: Dados de pesquisa

Os resultados na Figura 91, permitem observar que após o tempo de incubação de 24 horas na concentração de $5\mu\text{M}$, os complexos **V** e **VI** inibem em aproximadamente 5% a 10%, respectivamente, o fechamento da risca em comparação com o controle de células sem tratamento. O mesmo pode ser observado para a cisplatina nesse mesmo intervalo de tempo e concentração, permitindo assim concluir que as células migraram rapidamente em ambos os casos. Ao contrário, o complexo **IV** inibiu 80% da migração celular em relação ao controle e a cisplatina, nas mesmas condições descritas acima, o que implica que o composto **IV** pode inibir efetivamente a capacidade migratória das células MDA-MB-231.

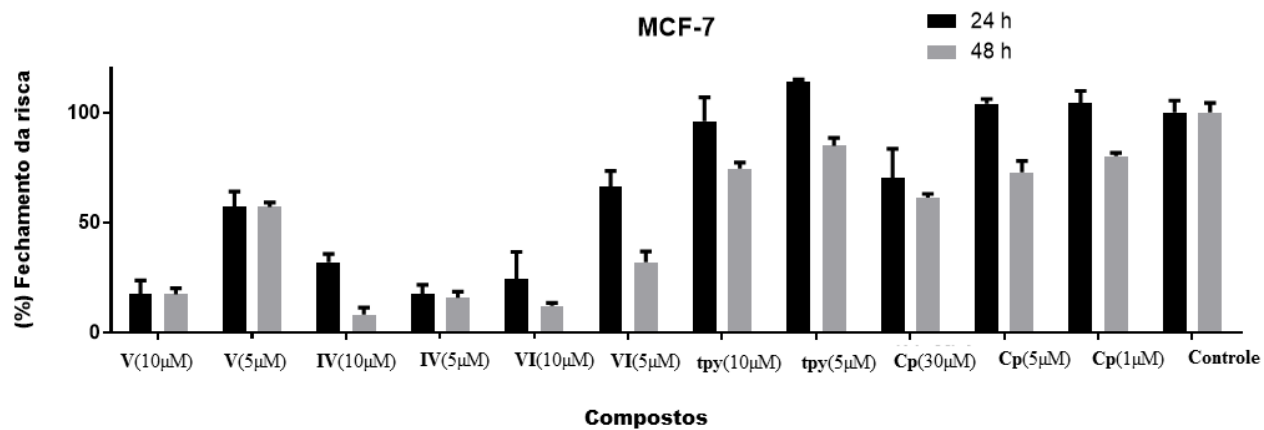
Figura 91- Determinação do efeito inibitório da migração celular induzida pelos complexos **IV-VI**, o ligante tpy e a cisplatina em células tumorais MDA-MB-231.



Fonte: Dados de pesquisa.

Os resultados do ensaio wound healing nas células MCF-7, como observado na Figura 92, mostram que os complexos de Cu^{II} exibiram melhores resultados em concentrações menores do que a cisplatina. Em comparação com o controle, o composto **IV** inibiu 95% da migração celular, enquanto a cisplatina nas mesmas condições inibiu 25% da migração celular, utilizando as condições de 48 h de incubação e na concentração de $5\mu\text{M}$. Quanto ao complexo **VI**, apesar do resultado de citotoxicidade do ligante tpy nessa linhagem ser equivalente do complexo **VI** (Tabela 27), o ensaio de wound healing mostrou que o complexo **VI** inibe de modo mais eficiente a migração celular do que o ligante livre. Esses dados indicam que o complexo exerce maior influência na atividade antimetastática do que o ligante livre. O melhor resultado com o composto **V** foi obtido na concentração de $10\mu\text{M}$, inibindo em 82% o fechamento da risca em comparação com o controle de células sem tratamento. Além disso, na concentração de $10\mu\text{M}$ e 48 h os resultados sugerem que os compostos seguem a seguinte ordem em relação à diminuição de emissão de metástases **IV** > **VI** > **V**.

Figura 92- Determinação do efeito inibitório da migração celular induzida pelos complexos IV-VI, o ligante tpy e a cisplatina em células tumorais MCF-7.



Fonte: Dados de pesquisa.

5. CONCLUSÃO

Treze novos compostos metálicos foram sintetizados e caracterizados. Destes, três são compostos de Ni^{II} coordenados a diferentes β-dicetonas e ao ligante diimínico fenantrolina com fórmula geral [Ni(η²-NO₃)(O,O)(fen)]. A análise de raios X de monocristal permitiu determinar a estrutura do complexo [Ni(η²-NO₃)(btc)(fen)] (**II**) de modo que o ligante nitrato (NO₃) coordenado bidentado completa a esfera octaédrica distorcida do centro metálico. Os dados de citotoxicidade mostraram que os complexos de Ni^{II} foram mais eficazes contra a linhagem celular MCF-7 do que contra as células MDA-MB-23. Considerando que o composto [Ni(η²-NO₃)(btc)(fen)] (**II**) foi mais ativo nas duas linhagens tumorais, a ancoragem molecular mostrou que a introdução do cloro no anel aromático da β-dicetona leva a uma geometria de interação com o ADN mais favorável do que os compostos [Ni(η²-NO₃)(bta)(fen)] (**I**) e [Ni(η²-NO₃)(btf)(fen)] (**III**), além disso os dados de interação com ADN por UV-vis mostraram que o composto [Ni(η²-NO₃)(btc)(fen)] (**II**) possui maior valor de constante de interação com ADN, K_b. Estudos de interação com o ADN levaram a concluir que o ADN é um dos possíveis alvo biológico dos compostos de Ni^{II} devido as técnicas de microscópio celular e fluorescência indicarem interação eletrostática e/ou ligação no sulco, hipótese reforçada com a docagem molecular que mostrou que os complexos se ligam no sulco menor da dupla hélice do ct-ADN. Os estudos de clivagem mostraram que esses compostos se comportam como nucleases artificiais pelo mecanismo oxidativo na presença de H₂O₂. O mecanismo de morte celular estudado para os compostos de Ni^{II} indica que os compostos [Ni(η²-NO₃)(bta)(fen)] (**I**) e [Ni(η²-NO₃)(btc)(fen)] (**II**) induzem apoptose tardia em células MCF-7.

Três complexos de Cu^{II} com a hidrazida bth e *N*-doadores bi-tridentados (fenantrolina, dimetoxibipiridina e terpiridina) de fórmula geral [Cu(bth)(*N*-doador)](NO₃)₂ foram obtidos e caracterizados pelas técnicas de CHN, análise condutimétrica, espectrometria de massas, RPE, UV-Vis e IV. Os estudos de RPE no estado sólido indicaram que os compostos [Cu(bth)(fen)](NO₃)₂ (**IV**) e [Cu(bth)(dmt)](NO₃)₂ (**V**) apresentam interação magnética entre dois centros metálicos. Como essa interação é muito fraca ela é desfeita em solução de DMSO à 298 K. Com relação a atividade citotóxica os complexos são mais ativos do que a cisplatina, inclusive na linhagem resistente MDA-MB-231. Esses complexos também podem se ligar ao ADN por interações eletrostática e/ou se ligação no sulco e os estudos preliminares de migração celular demonstraram que esses compostos inibem a migração de células MCF-7 e MDA-MB-231 de forma mais eficaz que o fármaco de referência cisplatina e o ligante livre tpy. Com isso, a introdução da terpiridina na esfera de coordenação do Cu^{II} com hidrazida mostrou ser uma

boa estratégia no desenvolvimento de candidatos a fármacos devido aos promissores resultados *in vitro* de citotoxicidade e de migração celular.

Os três ligantes iminopiridinícos Clmp, diemp e memp foram sintetizados e caracterizados por RMN de ^1H , UV-Vis e IV. As reações de complexação levaram a duas diferentes séries de compostos com estruturas do tipo $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})_2(\text{NO}_3)_2]$ e $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})(\text{N},\text{N},\text{N})](\text{PF}_6)_2$. Os valores de CHN experimentais e teóricos corroboram com as estruturas propostas e indicam pureza dos produtos. Os dados de condutividade molar mostraram que esses compostos são eletrólitos do tipo 2:1 com fórmulas geral $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})_2]^{2+}$ ou $[\text{Cu}(\text{N},\text{N})(\text{N},\text{N},\text{N})]^{2+}$. Quanto aos resultados de citotoxicidade, os ligantes iminopiridinícos não são ativos nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, somente os compostos $[\text{Cu}(\text{memp})_2(\text{NO}_3)_2]$ (**X**), $[\text{Cu}(\text{diemp})(\text{mftpy})](\text{PF}_6)_2$ (**XII**) e $[\text{Cu}(\text{memp})(\text{mftpy})](\text{PF}_6)_2$ (**XIII**) apresentaram moderada atividade antitumoral na linhagem MDA-MB-231.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, K. et al. Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu(tpy)(dppz)]²⁺: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. **Polyhedron**, v. 31, n. 1, p. 638–648, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.10.028>

ABOU-GHALI, M.; STIBAN, J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 760–772, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.005>

ABRAMSON, V. G. et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8–16, 2015. <https://doi.org/10.1002/cncr.28914>

ACILAN, C. et al. Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, p. 218–234, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.014>

ADDISON, C. C. et al. Structural aspects of co-ordinated nitrate groups. **Quarterly Reviews, Chemical Society**, v. 25, n. 2, p. 289–322, 1971. <https://doi.org/10.1039/qr9712500289>

ADELEKE, A. A. et al. Aryl variation and anion effect on CT-DNA binding and in vitro biological studies of pyridinyl Ag(I) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 214, p. 111266, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111266>

ADHIREKSAN, Z. et al. Ligand substitutions between ruthenium-cymene compounds can control protein versus DNA targeting and anticancer activity. **Nature Communications**, v. 5, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms4462>

AGARWAL, R. et al. Synthesis, biological, spectral, and thermal investigations of cobalt(II) and nickel(II) complexes of N-isonicotinamido- 2', 4'- dichlorobenzalaldimine. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2006, p. 1–9, 2006. <https://doi.org/10.1155/BCA/2006/29234>

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Public Health Statement for Nickel. **Public Health**, v. 3, p. 11–20, 2005.

ALESSIO, E.; MESSORI, L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry Enzo. **Molecules**, v. 24, p. 1–20, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>

ALEXIOU, M. et al. High nuclearity nickel compounds with three, four or five metal atoms showing antibacterial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 93, n. 3–4, p. 256–264, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00591-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00591-3)

ALI, A. Q. et al. Synthesis of nickel(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: in vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, p. 3380–3400, 2014. <https://doi.org/10.1080/00958972.2014.959943>

ALMEIDA, J. D. C. et al. 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>

ALMEIDA, V. M.; AMORIM, L. M. F. Triagem de drogas anticâncer : padronização do ensaio de ranhura in vitro. **J Bras Patol Med Lab**, v. 55, n. 6, p. 613–619, 2019. <http://www.dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20190054>

ANJOMSHOA, M. et al. Tris-chelated complexes of nickel(II) with bipyridine derivatives: DNA binding and cleavage, BSA binding, molecular docking, and cytotoxicity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 15, p. 3887–3904, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1534700>

ANTHONY, E. J. et al. Metallodrugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development. **Chemical Science**, v. 11, n. 48, p. 12888–12917, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>

BALACHANDRAN, C. et al. Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, p. 208–221, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.02.014>

BANASPATI, A.; RAZA, M. K.; GOSWAMI, T. K. Ni(II) curcumin complexes for cellular

imaging and photo-triggered in vitro anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, p. 112632, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112632>

BARNARD, C. Platinum Group Metal Compounds in Cancer Chemotherapy. **Johnson Matthey Technol**, v. 61, n. 1, p. 52–59, 2017. <https://doi.org/10.1595/205651317X693624>

BARRA, C. V. et al. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2016.02.053>.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

BASU BAUL, T. S. et al. Synthesis, crystal structures, magnetic properties and antimicrobial screening of octahedral nickel(II) complexes with substituted quinolin-8-olates and pyridine ligands. **Journal of Molecular Structure**, v. 1200, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127106>

BEDIER, R. A. et al. Synthesis, structural, optical band gap and biological studies on iron (III), nickel (II), zinc (II) and mercury (II) complexes of benzyl α -monoxime pyridyl thiosemicarbazone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1139, p. 436–446, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.03.054>

BISCEGLIE, F. et al. Cytotoxic activity of copper(ii), nickel(ii) and platinum(ii) thiosemicarbazone derivatives: Interaction with DNA and the H2A histone peptide. **Metalomics**, v. 11, n. 10, p. 1729–1742, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9MT00166B>

BONDI, R. et al. DNA interaction of a fluorescent, cytotoxic pyridinimino platinum(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 202, p. 110874, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110874>

BONDI, R. et al. Cytotoxicity and DNA interaction in a series of aryl terminated iminopyridine Pt(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 216, p. 111335, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111335>

BREWER, G. J. Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 16, p. 1103–1109, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03541-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03541-5)

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631–651, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00044-3)

BRISSOS, R. F.; CAUBET, A.; GAMEZ, P. Possible DNA-interacting pathways for metal-based compounds exemplified with copper coordination compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 16, p. 2633–2645, 2015. <https://doi.org/10.1002/ejic.201500175>

BRUKER. **APEX3, SAINT and SADABS. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.**

BRUNNER, H.; SCHMIDT, M.; SCHÖNENBERGER, H. Synthesis and in vitro antitumour activity of PtCl₂ complexes of pyridine- and quinoline-amine and -imine ligands and of carbocyclic ethylenediamine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 123, n. 4, p. 201–207, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)85674-1](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)85674-1)

BUSCHINI, A. et al. Synthesis, characterization and deepening in the comprehension of the biological action mechanisms of a new nickel complex with antiproliferative activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 666–677, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.016>

BUSCHINI, A. et al. Unravelling mechanisms behind the biological activity of bis(S-citronellalthiosemicarbazonato)nickel(ii). **Metallomics**, v. 6, n. 4, p. 783–792, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3mt00345k>

CANCER RESEARCH UK. Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer> Acesso em: 26/01/2021.

CARCELLI, M. et al. In vitro and in vivo anticancer activity of tridentate thiosemicarbazone copper complexes: Unravelling an unexplored pharmacological target. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 112266, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112266>

CARLONI, R. et al. Elaborated study of Cu(II) carbosilane metallodendrimers bearing substituted iminopyridine moieties as antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 215, p. 113292, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113292>

CASEY, A. L. et al. Role of copper in reducing hospital environment contamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, p. 72–77, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.08.018>

CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 3, p. 375–382, 2006.

CERVANTES-CERVANTES, M. P. et al. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. **Biological Trace Element Research**, v. 103, n. 3, p. 229–248, 2005. <https://doi.org/10.1385/BTER:103:3:229>

CETIN, Y. et al. A palladium(II)-saccharinate complex of terpyridine exerts higher anticancer potency and less toxicity than cisplatin in a mouse allograft model. **Anti-Cancer Drugs**, v. 28, n. 8, p. 898–910, 2017. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000531>

CHANG, Y. M.; CHEN, C. K. M.; HOU, M. H. 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>

CHEN, G. J. et al. Synthesis, DNA binding, photo-induced DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis studies of copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 119–126, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.008>

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 2776–2778, 1997. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.2776>

CONDEELIS, J.; SINGER, R. H.; SEGALL, J. E. The great escape: When cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 695–718, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120306>

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic

effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, n. 4, p. 294–300, 2004. <https://doi.org/10.1177/1534735404270335>

CONRAD, M. L. et al. Synthesis, characterization, and cytotoxicities of platinum(II) complexes bearing pyridinecarboxaldimines containing bulky aromatic groups. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 63–69, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2004.07.039>

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Advanced Inorganic Chemistry**. 3^a ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 1972.

CUCCIOLITO, M. E. et al. Hydrophilic ligands derived from glucose: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic activity on cancer cells of Pt(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, p. 741–747, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2009.11.031>

DA SILVEIRA, V. C. et al. Binding of oxindole-Schiff base copper(II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 1692–1703, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.016>

DANIEL, K. G. et al. COPPER STORAGE DISEASES: MENKES, WILSON'S, AND CANCER. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 2652–2662, 2004. <https://doi.org/10.2741/1424>

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

DEKA, B. et al. Novel mitochondria targeted copper(ii) complexes of ferrocenyl terpyridine and anticancer active 8-hydroxyquinolines showing remarkable cytotoxicity, DNA and protein binding affinity. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 396–409, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6DT03660K>

DEVI, J. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, biological screening and in vitro cytotoxic studies of 4-methyl-3-thiosemicarbazone derived Schiff bases and their Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1–23, 2019. <https://doi.org/10.1002/aoc.5154>

DONIZ KETTENMANN, S. et al. Copper(II) complexes with tetradentate piperazine-based Ligands: DNA cleavage and cytotoxicity. **Inorganics**, v. 9, n. 2, p. 1–23, 2021. <https://doi.org/10.3390/inorganics9020012>

DOUGAN, S. J.; SADLER, P. J. The design of organometallic ruthenium arene anticancer agents. **Chimia**, v. 61, n. 11, p. 704–715, 2007. <https://doi.org/10.2533/chimia.2007.704>

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

ESPINAL-ENRÍQUEZ, J. et al. Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1–13, 2016. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00406>

FISKUS, W. et al. Auranofin induces lethal oxidative and endoplasmic reticulum stress and exerts potent preclinical activity against chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Research**, v. 74, n. 9, p. 2520–2532, 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2033>

GAO, E. et al. Impact of the carbon chain length of novel palladium(II) Complexes on interaction with DNA and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3261–3270, 2010. <https://doi.org/10.1021/ic902176e>

GARCÍA-DÍEZ, G.; RAMIS, R.; MORA-DIEZ, N. Theoretical Study of the Copper Complexes with Aminoguanidine: Investigating Secondary Antioxidant Activity. **ACS Omega**, v. 5, n. 24, p. 14502–14512, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01175>

GARCÍA-FRIAZA, G. et al. Synthesis and characterization of palladium(II) and platinum(II) complexes with Schiff bases derivatives of 2-pyridincarboxyaldehyde. Study of their interaction with DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 8, p. 1368–1377, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.03.011>

GASQUE, L.; MORENO-ESPARZA, R.; RUIZ-RAMÍREZ, L. Stability of ternary copper and nickel complexes with 1,10-phenanthroline. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 121–127, 1992. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(92\)80021-M](https://doi.org/10.1016/0162-0134(92)80021-M)

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

GHOSH, K. et al. Nuclease activity via self-activation and anticancer activity of a mononuclear copper(II) complex: Novel role of the tertiary butyl group in the ligand frame. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 3343–3345, 2012. <https://doi.org/10.1021/ic2016676>

GIRERD, J.-J.; JOURNAUX, I. **Molecular Magnetism in Bioinorganic Chemistry, In: Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism**. [s.l.] University Science Books, 2010.

GLIŠIĆ, B. et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA-binding properties of copper(II) complexes with terpyridine. **Polyhedron**, v. 139, p. 313–322, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.11.008>

GONÇALVES, A. C. R. et al. PtII, PdII and AuIII complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 615–631, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.013>

GONZALEZ, V. M. et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 657–663, 2001. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>

GOODMAN, V. L.; BREWER, G. J.; MERAJVER, S. D. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, n. 2, p. 255–263, 2004. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0110255>

GOSWAMI, T. K. et al. Ferrocene-conjugated l-tryptophan copper(II) complexes of phenanthroline bases showing DNA photocleavage activity and cytotoxicity. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 8452–8464, 2011. <https://doi.org/10.1021/ic201028e>

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335–343, 2007. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801>

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. de S. CÂNCER : UMA DOENÇA GENÉTICA. **Revista Genética na Escola**, v. 3, nº1, p. 4–7, 2008.

GUPTE, A.; MUMPER, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, p. 32–46, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HATORI, Y.; INOUE, S.; AKAGI, R. Thiol-based copper handling by the copper chaperone Atox1. **IUBMB Life**, v. 69, n. 4, p. 246–254, 2017. <https://doi.org/10.1002/iub.1620>

HELLMAN, N. E.; GITLIN, J. D. CERULOPLASMIN METABOLISM AND FUNCTION. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 439–458, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457>

HERNÁNDEZ-AYALA, L. F. et al. Heteroleptic NiII complexes: Synthesis, structural characterization, computational studies and amoebicidal activity evaluation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 206, p. 111043, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111043>

HONG, R. et al. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1776–1784, 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.07068-11>

HORN, D.; BARRIENTOS, A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome C oxidase. **IUBMB Life**, v. 60, n. 7, p. 421–429, 2008. <https://doi.org/10.1002/iub.50>

HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A. . **Química Inorgânica**. 4ª ed. [s.l.] LTC, 2013.

HUANG, K. Bin et al. Platinum(II) complexes with mono-aminophosphonate ester targeting group that induce apoptosis through G1 cell-cycle arrest: Synthesis, crystal structure and antitumour activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 76–84, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.055>

ILLÁN-CABEZA, N. A. et al. Relationship between the antiproliferative properties of Cu(II) complexes with the Schiff base derived from pyridine-2-carboxaldehyde and 5,6-diamino-1,3-dimethyluracil and the redox status mediated by antioxidant defense systems on glioma tumoral cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 207, p. 111053, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111053>

INAMDAR, P. R.; SHEELA, A. Spectroscopic investigations on partial intercalative binding behaviour of terpyridine based copper(II) complexes with DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 133–141, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.007>

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/situacao/arquivos/carcinogenese.pdf> Acesso em: 26/01/2021.

JAIN, S. et al. Homo- and Heteroleptic trimethoxy terpyridine-Cu(II) complexes: Synthesis, Characterization, DNA/BSA Binding, DNA Cleavage and Cytotoxicity Studies. **Dalton Transactions**, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0DT00209G>

JIA, L. et al. Synthesis, crystal structures, DNA-binding properties, cytotoxic and antioxidation activities of several new ternary copper(II) complexes of N,N'-(p-xylylene)di-alanine acid and 1,10-phenanthroline. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, p. 855–865, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2009.12.047>

JIANG, Q. et al. Effect of adenine moiety on DNA binding property of copper(ii)-terpyridine complexes. **Dalton Transactions**, v. 23, p. 3054–3060, 2008. <https://doi.org/10.1039/b719010g>

JINGWEN, B.; YAOCHEEN, L.; GUOJUN, Z. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 348, 2017. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0033>

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. Third row transition metals for the treatment of cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 373, n. 2037, 2015. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0185>

KACHADOURIAN, R. et al. 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>

KADAM, C. Y.; ABHANG, S. A. Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 74, p. 143-193, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.0031>

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B.; KLEIN, A. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**. [s.l: s.n.]

KARAYANNIS, N. M. et al. 2-, 3-, and 4-Picoline N-Oxide Complexes with Cobalt(II), Nickel(II), and Copper(I) Nitrates. **Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1146–1151, 1974. <https://doi.org/10.1021/ic50135a026>

KAZEMI, Z. et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.04.033>

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 573–584, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>

KELLETT, A. et al. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 4, p. 971–988, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8CS00157J>

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 3, p. 176–185, 2008. <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>

KONG, D. M. et al. Oxidative DNA cleavage by Schiff base tetraazamacrocyclic oxamido nickel(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 824–832, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.002>

KUMAR, K. et al. The influence of the tertiary butyl group in the ligand frame on the catalytic

activities, DNA cleavage ability and cytotoxicity of dinuclear nickel(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 495, p. 118993, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.118993>

KUMAR, R. S.; ARUNACHALAM, S. DNA binding and antimicrobial studies of polymer-copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and l-phenylalanine ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1878–1883, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.11.001>

KUMAR, S.; TRIVEDI, A. V. A review on role of fuzzy logic in Psychology. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, p. 719–727, 2016. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.084>

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v. 13, 2018. <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>

KYROPOULOU, M. et al. Ni(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Structure and interaction with DNA and albumins. **Polyhedron**, v. 61, p. 126–136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.05.043>

LAKSHMIPRABA, J. et al. Synthesis, nucleic acid binding and cytotoxicity of polyethyleneimine- copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and l-valine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3013–3021, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.033>

LANDINI, I. et al. Selection and characterization of a human ovarian cancer cell line resistant to auranofin. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 96062–96078, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21708>

LI, G. Y. et al. DNA condensation induced by metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 281, p. 100–113, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.09.005>

LI, J. et al. Novel half-sandwich iridium(III) imino-pyridyl complexes showing remarkable: In vitro anticancer activity. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 15520–15534, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7DT03265J>

LIANG, J. W. et al. Synthesis, DNA interaction and anticancer activity of copper(II) complexes with 4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine derivatives. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 141, p. 17–27, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.006>

LIBENSON, L.; JENA, M. On the definition, cause and nomenclature of cancer. **Medical Hypotheses**, v. 4, n. 3, p. 277–281, 1978. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(78\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0306-9877(78)90008-7)

LINDER, M. C. et al. Copper transport. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 5 SUPPL., p. 965–971, 1998. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.965S>

LINDER, M. C.; HAZEGN-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **Am J Clin Nutr**, v. 63, n. 5, p. 797S–811S, 1996. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.797>.

LIU, G. Y.; STORZ, P. **Reactive oxygen species in cancer**. [s.l: s.n.]v. 44. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>

LIU, N. et al. Clinically used antirheumatic agent auranofin is a proteasomal deubiquitinase inhibitor and inhibits tumor growth. **Oncotarget**, v. 5, p. 5453–5471, 2014. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2113>

LONNERDAL, B. Bioavailability of copper. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 821S–829S, 1996. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.821>

LOPES, P. S. et al. 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>

MAHENDIRAN, D. et al. In vitro and in vivo anti-proliferative evaluation of bis(4'-(4-tolyl)-2,2':6',2''-terpyridine)copper(II) complex against Ehrlich ascites carcinoma tumors. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 1109–1122, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1488-6>

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 53, n. 2, p. 148–158, 2019. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>

MALARKEY, D. E.; HOENERHOFF, M.; MARONPOT, R. R. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. Third Edit ed. [s.l: s.n.]

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>

MANGUEIRA, V. M. **Estudo da toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich**. 2015. 2015.

MANIKANDAMATHAVAN, V. M. et al. 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>

MANIKANDAMATHAVAN, V. M. et al. DNA/protein interaction and cytotoxic activity of imidazole terpyridine derived Cu(ii)/Zn(ii) metal complexes. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 34, p. 13018–13031, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4DT01378F>

MARZANO, C. et al. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 872–881, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.021>

MARZANO, C. et al. Copper Complexes as Anticancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 185–211, 2009. <https://doi.org/10.2174/187152009787313837>

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 298–306, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature03094>

MATHEWS, S. et al. Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2605–2611, 2013. <https://doi.org/10.1128/AEM.03608-12>

MAYER, I. A. et al. New strategies for triple-negative breast cancer-deciphering the heterogeneity. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 782–790, 2014.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0583>

MCGIVERN, T. J. P.; AFSHARPOUR, S.; MARMION, C. J. Copper complexes as artificial DNA metallonucleases: From Sigman's reagent to next generation anti-cancer agent? **Inorganica Chimica Acta**, v. 472, p. 12–39, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.08.043>

MESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química inorgânica**. 5^a ed. [s.l.] PEARSON, 2014.

MILES, B. A. et al. Synthesis, characterization, and anticancer activities of lipophilic pyridinecarboxaldimine platinum(II) complexes. **Polyhedron**, v. 108, p. 23–29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.07.039>

MOLTENI, C.; ABICHT, H. K.; SOLIOZ, M. Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 4099–4101, 2010. <https://doi.org/10.1128/AEM.00424-10>

MORROW, J. R.; KOLASA, K. A. Cleavage of DNA by nickel complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 195, n. 2, p. 245–248, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)85319-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)85319-0)

NAKAHATA, D. H. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E BIOATIVIDADE DE COMPLEXOS DE COBRE(II) COM N-HETEROCICLOS**. 2016. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2016.

NAKAMOTO, K. **Infrared And Raman Spectra Of Inorganic And Coordination Compounds**. Fourth ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 1986.

National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. Acesso em: 26/01/2021.

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

NIKOLAOU, S.; SILVA, C. Considerações Sobre Textos Que Tratam Do Desenvolvimento De Metalofármacos De Rutênio. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 833–838, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170228>

NJOGU, E. M.; OMONDI, B.; NYAMORI, V. O. Silver(I)-pyridinyl Schiff base complexes: Synthesis, characterisation and antimicrobial studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1135, p. 118–128, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.01.061>

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645–6653, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>

PAIXÃO, D. A. et al. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, n. April, p. 138–146, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.024>

PAIXÃO, D. A. et al. Crystal structure, anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of Cu(II) complexes bearing β -diketone and α -diimine ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 499, p. 1–8, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119164>

PAIXÃO, D. A. et al. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of ternary copper(II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, p. 157–166, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.057>

PATEL, R. N. et al. Synthesis, characterization and biological activity studies of octahedral nickel(II) complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 179–187, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11243-010-9451-1>

PEDROSA, P. et al. Inorganic Coordination Chemistry: Where We Stand in Cancer Treatment? In: **Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordination Chemistry**. [s.l.: s.n.]p. 38–65. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80233>

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. <https://doi.org/10.1038/35021093>

POLLONI, L. et al. Action of copper(II) complex with β -diketone and 1,10-phenanthroline (CBP-01) on sarcoma cells and biological effects under cell death. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108586, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.047>

POORNIMA, S.; GUNASEKARAN, K.; KANDASWAMY, M. Nuclease activity and interaction studies of unsymmetrical binuclear Ni(II) complexes with CT-DNA and BSA. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 37, p. 16361–16371, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4DT01744G>

POPOLIN, C. P. **Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama.** 2016. 2016.

POSADAS, I. et al. Synthesis, characterization, DNA interactions and antiproliferative activity on glioblastoma of iminopyridine platinum(II) chelate complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 168, p. 46–54, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.032>

PUCHKOVA, L. V. et al. Copper Metabolism of Newborns Is Adapted to Milk Ceruloplasmin as a Nutritive Source of Copper: Overview of the Current Data. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–21, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10111591>

QIU, C. J. et al. Novel Schiff-base complexes of methyltrioxorhenium (VII) and their performances in epoxidation of cyclohexene. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 694, n. 21, p. 3418–3424, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2009.06.034>

RAJALAKSHMI, S. et al. Anomalous behavior of pentacoordinate copper complexes of dimethylphenanthroline and derivatives of terpyridine ligands: Studies on DNA binding, cleavage and apoptotic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 608–617, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.041>

RAJARAJESWARI, C. et al. Copper(ii) complexes with 2NO and 3N donor ligands: Synthesis, structures and chemical nuclease and anticancer activities. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 23, p. 8347–8363, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3dt32992e>

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Triple-negative/basal-like breast cancer: Review. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 40–47, 2009. <https://doi.org/10.1080/00313020802563510>

RAMAKRISHNAN, S. et al. Induction of cell death by ternary copper(II) complexes of l-tyrosine and diimines: Role of coligands on DNA binding and cleavage and anticancer activity. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1309–1322, 2009. <https://doi.org/10.1021/ic801144x>

RAMAN, N. et al. Metal-based antitumor, cytotoxic and antimicrobial activity: Pharmacological evaluation of Knoevenagel condensate β -diketone Schiff base thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 283–290, 2009. <https://doi.org/10.1002/aoc.1512>

RAMOS, T. S. et al. Ruthenium-cymene containing pyridine-derived aldiimine ligands: Synthesis, characterization and application in the transfer hydrogenation of aryl ketones and kinetics studies. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 892, p. 51–65, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.04.022>

REHMAN, S. U. et al. Interaction of 6 mercaptopurine with calf thymus DNA - Deciphering the binding mode and photoinduced DNA damage. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093913>

REHMAN, S. U. et al. 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>

RISANA, M. M. et al. Synthesis, Spectral Characterization and Biopotential Significance of Co(II) and Ni(II) Complexes With Biologically Active Ligands. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 12, n. 1, p. 22–28, 2020. <https://doi.org/10.25004/IJPSDR.2020.120104>

RIVERO-MULLER, A. et al. **Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity**, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.002>

ROCHA, C. R. R. et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. **Clinics**, v. 73, n. 8, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>

RODRIGUES, M. A. et al. Platinum(II) complexes with carbazates and hydrazides: Synthesis,

spectral characterization, computational modeling, and biological studies. **Polyhedron**, v. 98, p. 146–153, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.06.025>

RUIZ, J. et al. 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>

SALIMI, M. et al. Antiproliferative effects of copper(II)-polypyridyl complexes in breast cancer cells through inducing apoptosis. **BioMetals**, v. 28, n. 2, p. 267–278, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10534-015-9820-5>

SANTINI, C. et al. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 815–862, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400135x>

SANTOS, I. et al. New ternary bipyridine-terpyridine copper(ii) complexes as self-activating chemical nucleases. **RSC Advances**, v. 4, n. 106, p. 61363–61377, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4RA12085J>

SATTERFIELD, M.; BRODBELT, J. S. Relative binding energies of gas-phase pyridyl ligand/metal complexes by energy-variable collisionally activated dissociation in a quadrupole ion trap. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 21, p. 5393–5400, 2001. <https://doi.org/10.1021/ic010356r>

SAVIC, A. et al. New platinum(II) and palladium(II) complexes with substituted terpyridine ligands: synthesis and characterization, cytotoxicity and reactivity towards biomolecules. **BioMetals**, v. 32, p. 33–47, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0155-x>

SCOLARO, C. et al. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 4161–4171, 2005. <https://doi.org/10.1021/jm050015d>

SHALOAM, D.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. Md, p. 3–8, 2015. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>

SHI, X. et al. Hypotoxic copper complexes with potent anti-metastatic and anti-angiogenic activities against cancer cells. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 14, p. 5049–5054, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8DT00794B>

SILVA, P. P. et al. 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 diamina e de Ru(II) com diaminas. 2013. 2013.

SILVA, P. P. et al. 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>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. [s.l: s.n.]

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>

SOLOMON, E. I. et al. Copper active sites in biology. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3659–3853, 2014. <https://doi.org/10.1021/cr400327t>

SORENSEN, C. M.; EASTMAN, A. Mechanism of cw-Diamminedichloroplatinum (II) - induced Cytotoxicity : Role of G2. **Cancer Research**, v. 48, n. 16, p. 4484–4488, 1988.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses

with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 10869–10874, 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

SOUSA, L. M. et al. Spectroscopic characterization and molecular modeling of novel palladium(II) complexes with carbazates and hydrazides. **Journal of Molecular Structure**, v. 1097, p. 15–22, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.05.012>

SOUSA, L. M. et al. DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 511, p. 119824, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>

SUKANYA, P.; VENKATA RAMANA REDDY, C. Synthesis, characterization and in vitro anticancer, DNA binding and cleavage studies of Mn (II), Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes of Schiff base ligand 3-(2-(1-(1H-benzimidazol-2-yl)ethylidene)hydrazinyl)quinoxalin-2(1H)-one and crystal structure o. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 11, p. 1–11, 2018. <https://doi.org/10.1002/aoc.4526>

TABTI, R. et al. Progress in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Medicinal chemistry**, v. 07, n. 05, p. 875–879, 2017. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000445>

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 386–398, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00012-X)

THAKUR, Y. et al. Exploring the DNA binding efficacy of Cobalt(II) and Copper(II) complexes of hydroxamic acids and explicating their anti-cancer propensity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1197, p. 691–706, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.099>

TIAN, Z. et al. Lysosome-Targeted Chemotherapeutics: Half-Sandwich Ruthenium(II) Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 17, p.

10498–10502, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01944>

TOMA, H. E. **Química de Coordenação, Organometálica e Catálise**. 2^a ed. [s.l.] Blucher, 2016. v. 4

TOTTA, X. et al. Synthesis, structure and biological activity of nickel(II) complexes with mefenamato and nitrogen-donor ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 145, p. 79–93, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.009>

TOTTA, X. et al. Nickel(II)-naproxen mixed-ligand complexes: Synthesis, structure, antioxidant activity and interaction with albumins and calf-thymus DNA. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 4478–4492, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7NJ00257B>

TUMMALAPALLI, K. et al. Evaluation of DNA/Protein interactions and cytotoxic studies of copper(II) complexes incorporated with N, N donor ligands and terpyridine ligand. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, n. 11, p. 1254–1266, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.022>

UMA, V. et al. Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper (II) terpyridine complex: Crystal structure and DNA binding studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 12, p. 2299–2307, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.08.011>

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161–1208, 2005. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>

VÁZQUEZ-AGUIRRE, A. et al. Autophagy promotes survival of CHP-212 neuroblastoma cells treated with Casiopeínas®. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3687–3695, 2019. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13517>

VELHO, R. G. **Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico**. 2006. 2006.

VELUGULA, K.; KUMAR, A.; CHINTA, J. P. Nuclease and anticancer activity of antioxidant conjugated terpyridine metal complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 507, p. 119596, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119596>

VINEIS, P. Definition and classification of cancer: Monothetic or polythetic? **Theoretical Medicine**, v. 14, n. 3, p. 249–256, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00995166>

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 789–799, 2004. <https://doi.org/10.1038/nm1087>

WANG, T.; GUO, Z. Copper in Medicine: Homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 525–537, 2006. <https://doi.org/10.2174/092986706776055742>

WANG, Y.; HILL, K. S.; FIELDS, A. P. PKCi maintains a tumor-initiating cell phenotype that is required for ovarian tumorigenesis. **Molecular Cancer Research**, v. 11, n. 12, p. 1624–1635, 2013. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0371-T>

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000400006>

WEHBE, M. et al. A Perspective-can copper complexes be developed as a novel class of therapeutics? **Dalton Transactions**, v. 46, n. 33, p. 10758–10773, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7DT01955F>

WENDE, C.; LÜDTKE, C.; KULAK, N. Copper complexes of N-donor ligands as artificial nucleases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2014, n. 16, p. 2597–2612, 2015. <https://doi.org/10.1002/ejic.201400032>

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113–8127, 2010. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>

WILLIAMS, K. J. The introduction of “chemotherapy” using arsphenamine - The first magic bullet. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 102, n. 8, p. 343–348, 2009. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2009.09k036>

WOODS, J. A. O.; PATEL, K. S. Nickel(ii) complexes of some 3-substituted-2,4-pentanediones and their adducts with 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 1557–1571, 1994. <https://doi.org/10.1080/00945719408002580>

World Health Organization (WHO). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>. Acesso em: 26/01/2021.

WU, X. J.; HUA, X. Targeting ROS: Selective killing of cancer cells by a cruciferous vegetable derived pro-oxidant compound. **Cancer Biology and Therapy**, v. 6, n. 5, p. 646–647, 2007. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.4092>

YILMAZ, V. T. et al. Synthesis, structures, DNA/protein binding, molecular docking, anticancer activity and ROS generation of Ni(II), Cu(II) and Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with bis(2-pyridylmethyl)amine and terpyridine. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 16, p. 8092–8106, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7NJ00887B>

YU, C. et al. Nucleic acid-induced self-assembly of a platinum(ii) terpyridyl complex: Detection of G-quadruplex formation and nuclease activity. **Chemical Communications**, v. 1, n. 25, p. 3756–3758, 2009. <https://doi.org/10.1039/b903080h>

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, v. 7345, n. 44, p. 4565–4579, 2007. <https://doi.org/10.1039/b710949k>

ZEHRA, S. et al. A zwitterionic Zn(II) benzothiazole nanohybrid conjugate as hydrolytic DNA cleavage agent. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 93, n. March, p. 69–72, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2018.05.008>

ZHANG, P.; SADLER, P. J. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1541–1548, 2017. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600908>

ZHAO, T. et al. In vitro studies on the behavior of salmeterol xinafoate and its interaction with calf thymus DNA by multi-spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta - Part A**:

Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 132, p. 198–204, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.158>

ZHOU, W. et al. Improving nuclease activity of copper(II)-terpyridine complex through solubilizing and charge effects of glycine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 121, n. 3, p. 114–120, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.018>

ZORODDU, M. A. et al. The essential metals for humans: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, n. November 2018, p. 120–129, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>

7. ANEXOS

Difração de raios X (ANEXO A)

Tabela A1- Dados cristalográficos do complexo II.

Fórmula Empírica	NiC ₂₂ H ₁₃ ClF ₃ N ₃ O ₅
Massa Molar (g/mol)	550,51
Temperatura de coleta (K)	298
Sistema cristalino	triclínico
Grupo espacial	P1
Parâmetros da célula unitária	a/Å = 10,4668(4) b/Å = 10,6658(4) c/Å = 11,3277(5) $\alpha/^\circ = 109,7310(10)$ $\beta/^\circ = 109,8380(10)$ $\gamma/^\circ = 94,4580(10)$
Volume (Å ³)	1092,98(8)
Z	2
densidade calc. (g/cm ³)	1,673
coeficiente de absorção/mm ⁻¹	1,077
F(000)	556,0
Tamanho do cristal (mm ³)	0,534 × 0,315 × 0,146
Radiação	MoK α ($\lambda = 0,71073$)
Faixa de 2 Θ para coleta de dados (°)	4,238 a 52,044
	-12 ≤ h ≤ 12
Intervalo de <i>hkl</i>	-13 ≤ k ≤ 13
	-13 ≤ l ≤ 13
Reflexões coletadas	33217
Reflexões únicas	4285 [R _{int} = 0,0413; R _{sigma} = 0,0221]
Dados / restrições / parâmetros	4285/18/317
Qualidade do ajuste em F ²	1,057

Índices R finais [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0364$; $wR_2 = 0,0847$
Índices R finais [todos os dados]	$R_1 = 0.0493$; $wR_2 = 0.0942$
Densidade residual máx e min ($e \text{ \AA}^{-3}$)	0,81/-0,44

Tabela A2- Distâncias e ângulos de interações intermoleculares do composto **II**.

	d (A–H)	d (A \cdots R)	\angle (A–H \cdots R)	Symmetry
C9–H9 \cdots O13	0,929	3,382(5)	155,6	x, 1+y, z
C10–H10 \cdots O11	0,931	3,467(4)	171,2	1-x, 1-y, 1-z
C12–H12 \cdots O13	0,930	3,323(5)	130,2	1-x, -y, 1-z
C12–H12 \cdots F2	0,930	3,509(4)	154,3	x, -1+y, z
C15–H15 \cdots F1	0,929	3,461(5)	160,0	-x, -y, 1-z
C19–H19 \cdots O13	0,930	3,382(5)	157,5	1-x, 1-y, 2-z

ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VÍSEL (ANEXO B)

Figura B1- Espectros de UV-Vis do composto **II** e dos ligantes btc e fen em solução de acetonitrila na concentração 1×10^{-5} M.

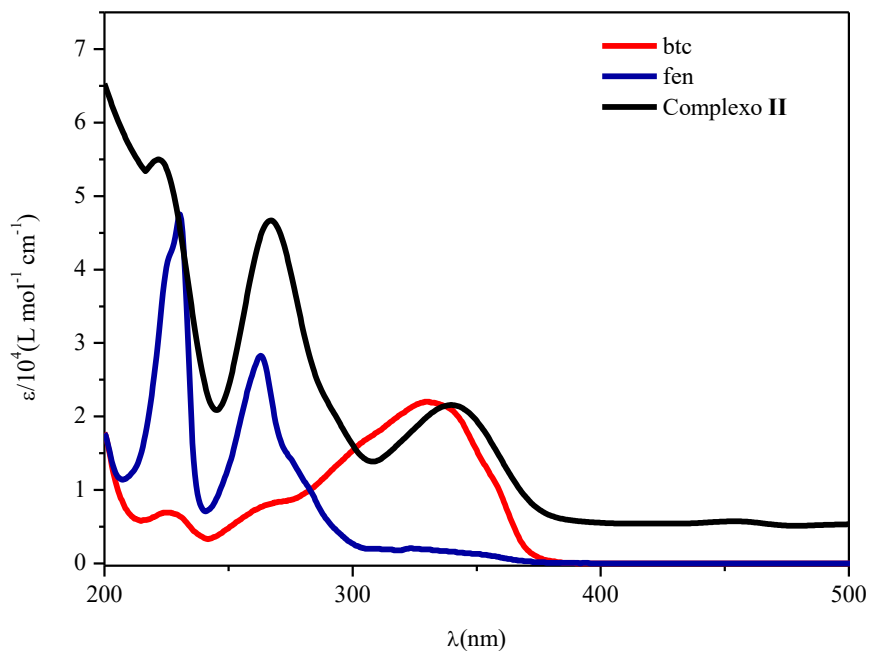


Figura B2- Espectros UV-Vis do composto **III** e dos ligantes btf e fen em solução de acetonitrila na concentração 1×10^{-5} M.

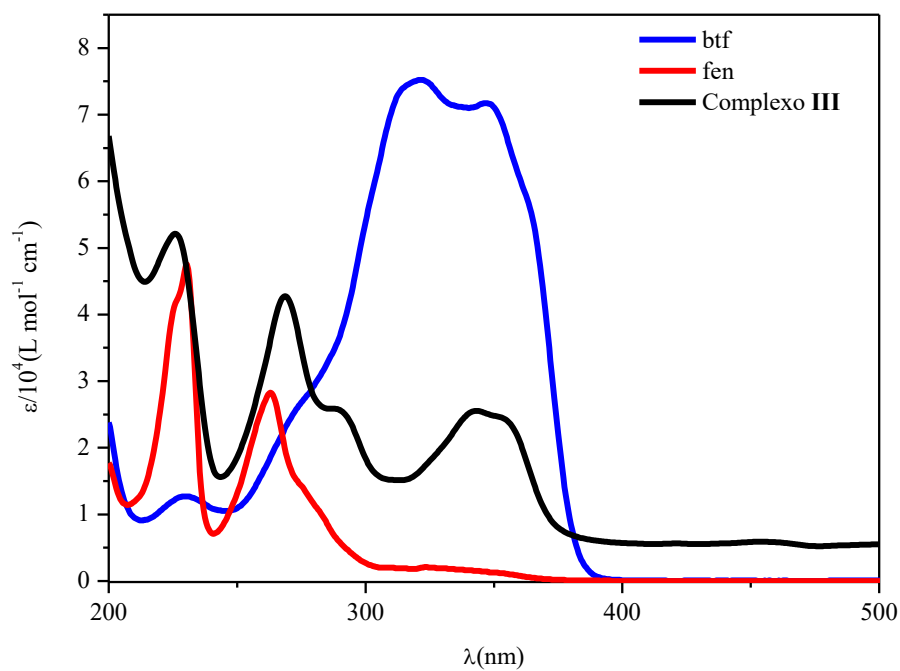


Figura B3- Espectros UV-Vis dos compostos **IV**, fen e bth em solução de DMSO e ACN na concentração 1×10^{-5} M.

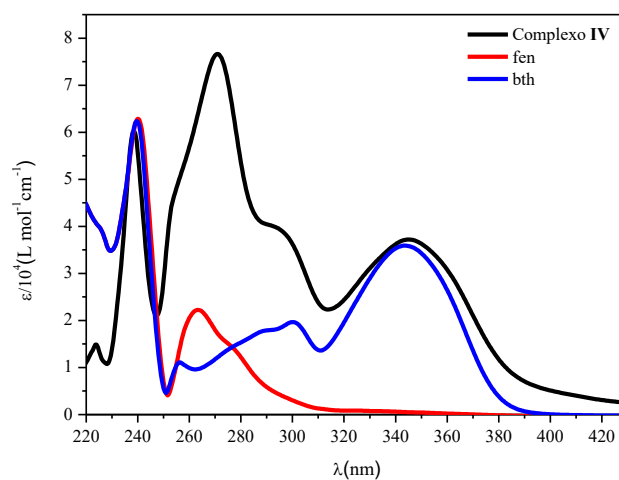


Figura B3- Espectros UV-Vis dos compostos **V**, dmt e bth em solução de DMSO e ACN na concentração 1×10^{-5} M.

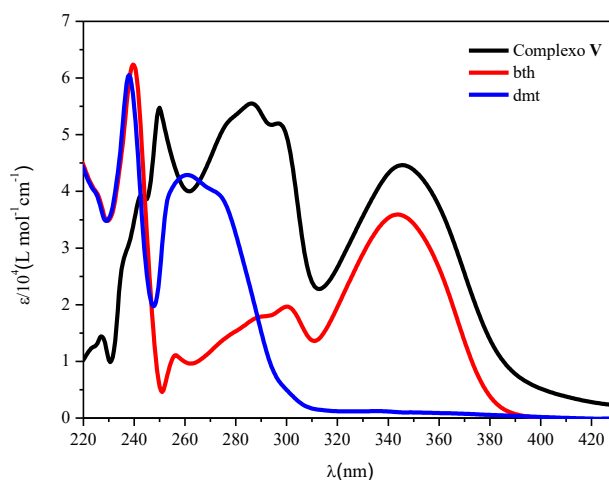


Figura B4- Espectro UV-Vis do composto **VIII** em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.

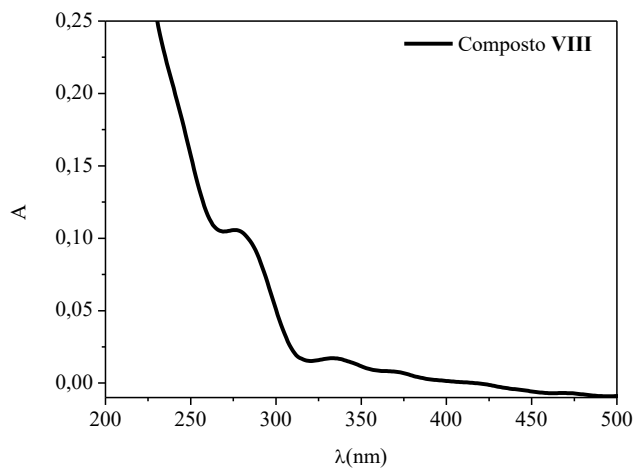


Figura B5- Espectros UV-Vis dos compostos **IX** e diemp em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.

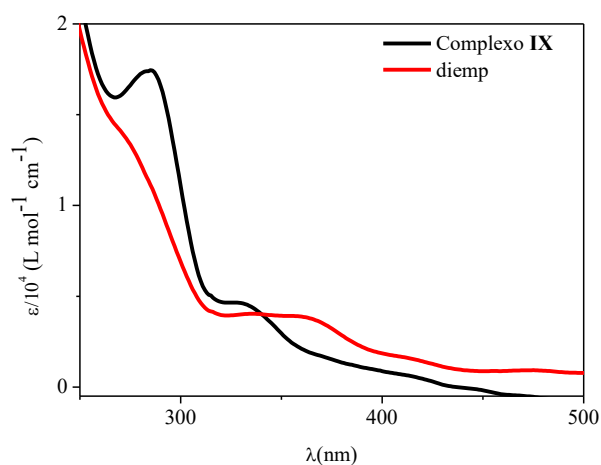


Figura B6- Espectros UV-Vis dos compostos **X** e memp em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.

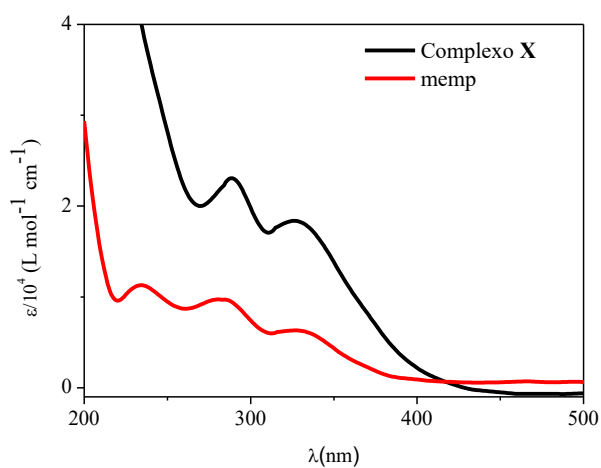


Figura B7- Espectros UV-Vis dos compostos **XII**, diemp e mftpy em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.

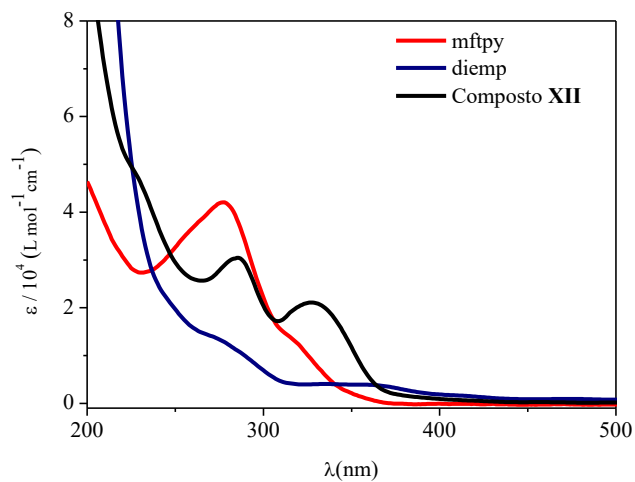


Figura B8- Espectros UV-Vis dos compostos **XIII**, memp e mftpy em solução de ACN na concentração 1×10^{-5} M.

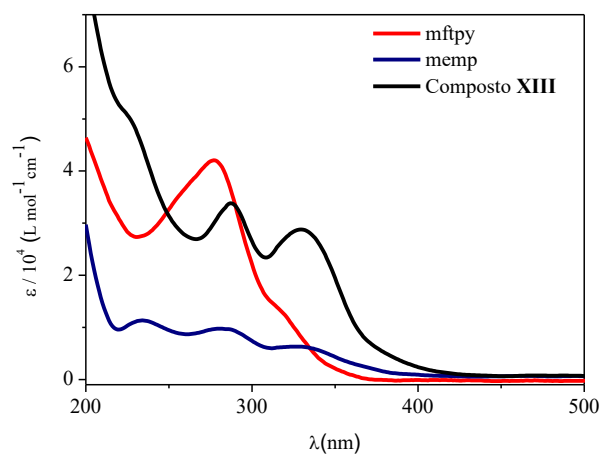


Figura B9- Espectro UV-Vis do composto **V** em solução de ACN (1×10^{-3} M)

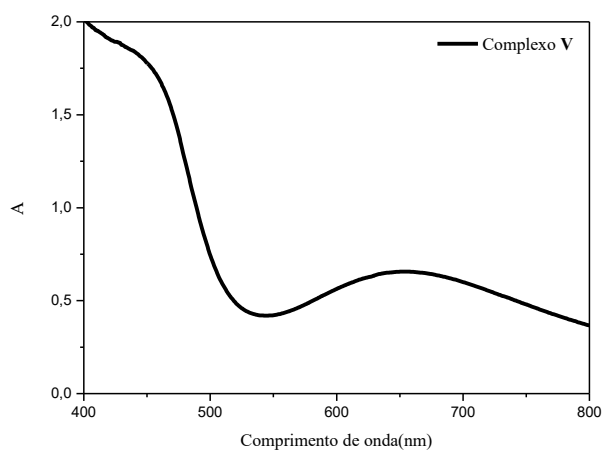


Figura B10- Espectro UV-Vis do composto **VII** em solução de ACN (1×10^{-3} M)

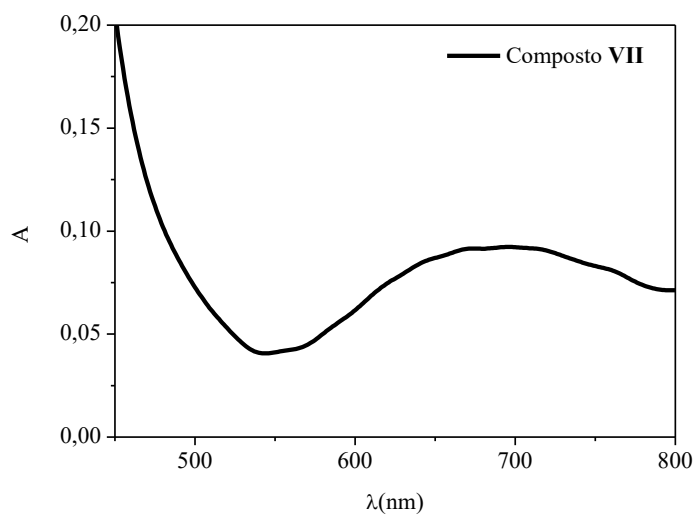
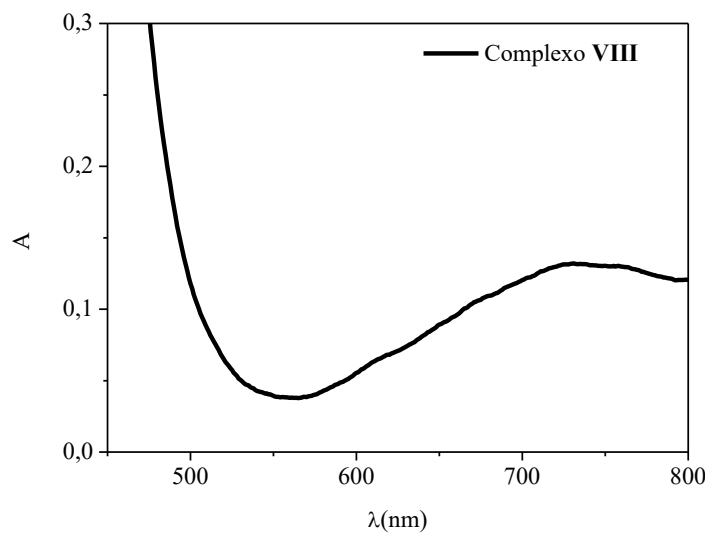
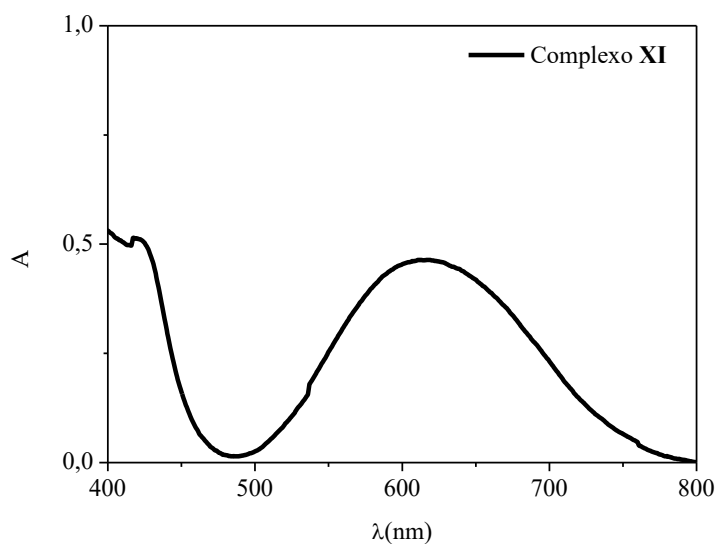
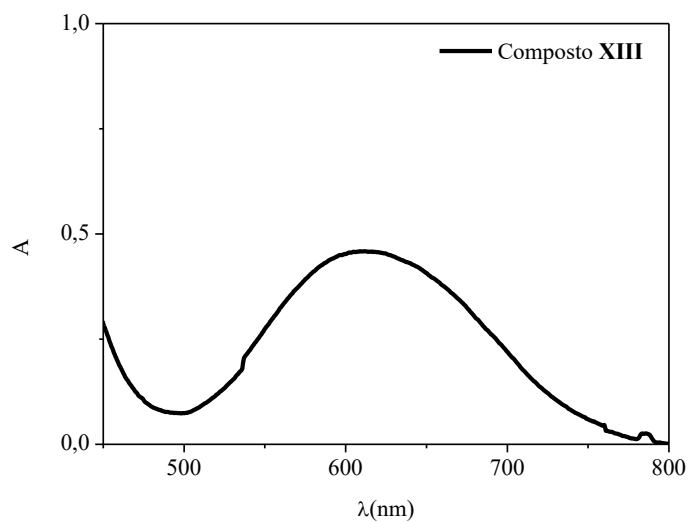


Figura B11- Espectro UV-Vis do composto **VIII** em solução de ACN (1×10^{-3} M)**Figura B12-** Espectro UV-Vis do composto **XI** em solução de ACN (1×10^{-2} M)**Figura B13-** Espectro UV-Vis do composto **XIII** em solução de ACN (1×10^{-2} M)

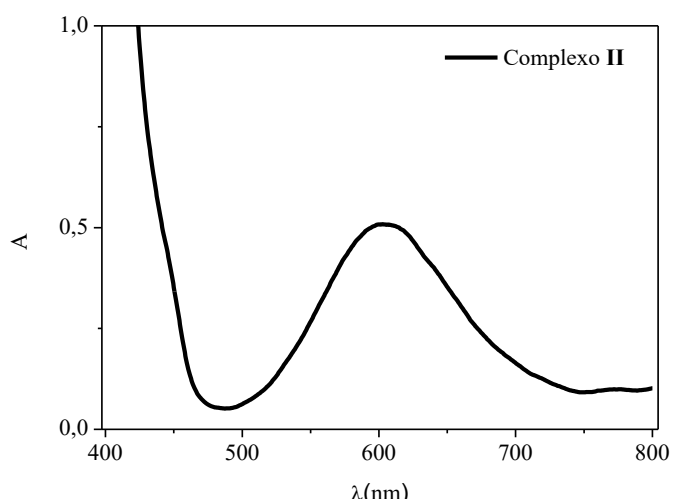
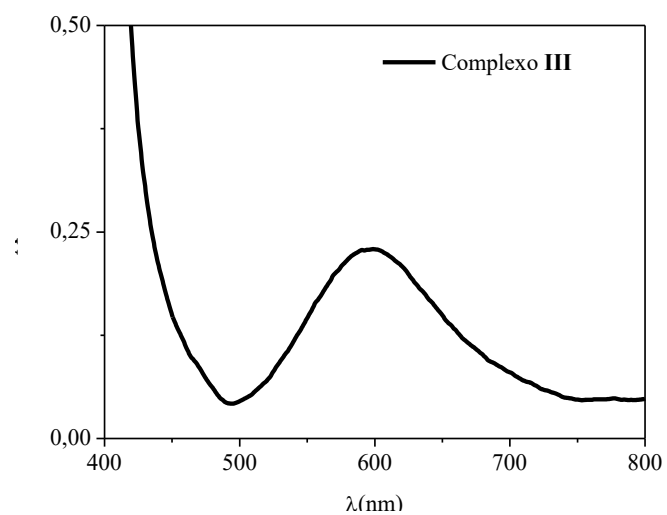
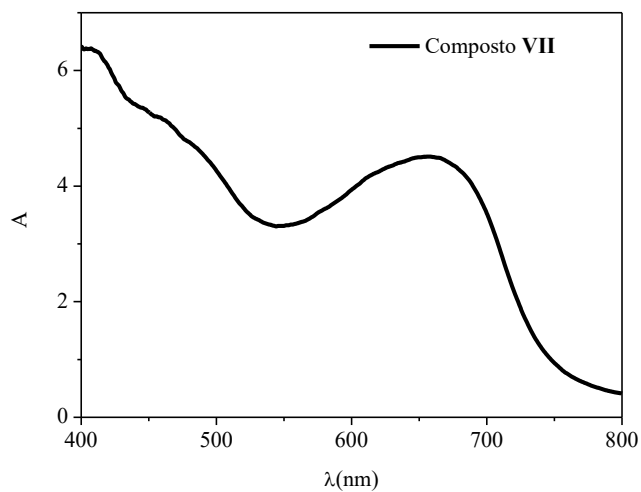
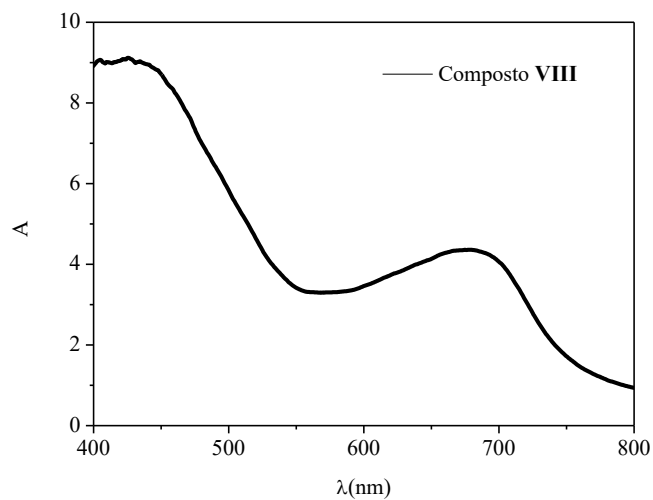
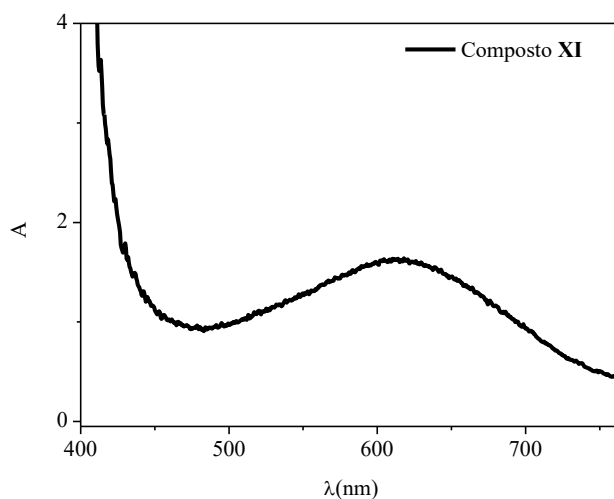
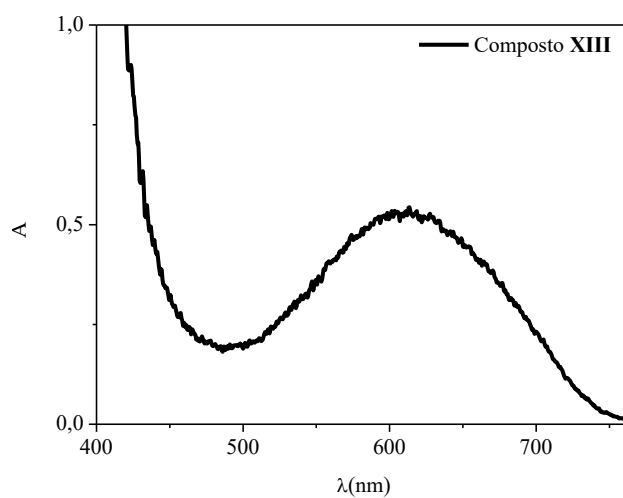
REFLECTÂNCIA DIFUSA (ANEXO C)**Figura C1-** Espectro de reflectância difusa do composto **II**.**Figura C2-** Espectro de reflectância difusa do composto **III**.**Figura C3-** Espectro de reflectância difusa do composto **VII**.

Figura C4- Espectro de reflectância difusa do composto **VIII**.**Figura C5-** Espectro de reflectância difusa do composto **XI**.**Figura C6-** Espectro de reflectância difusa do composto **XIII**.

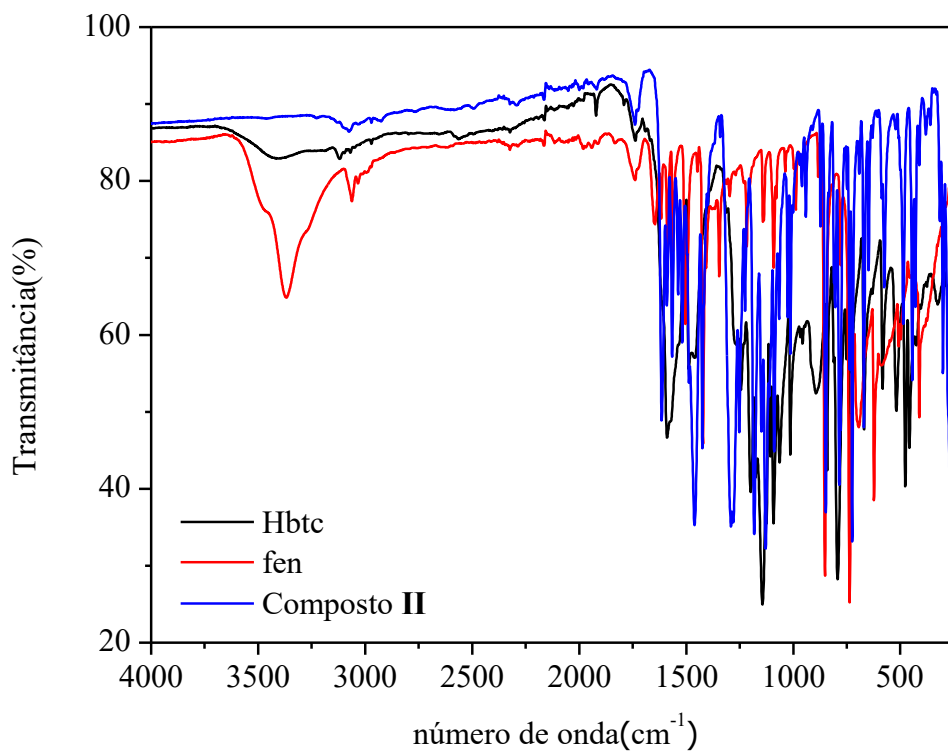
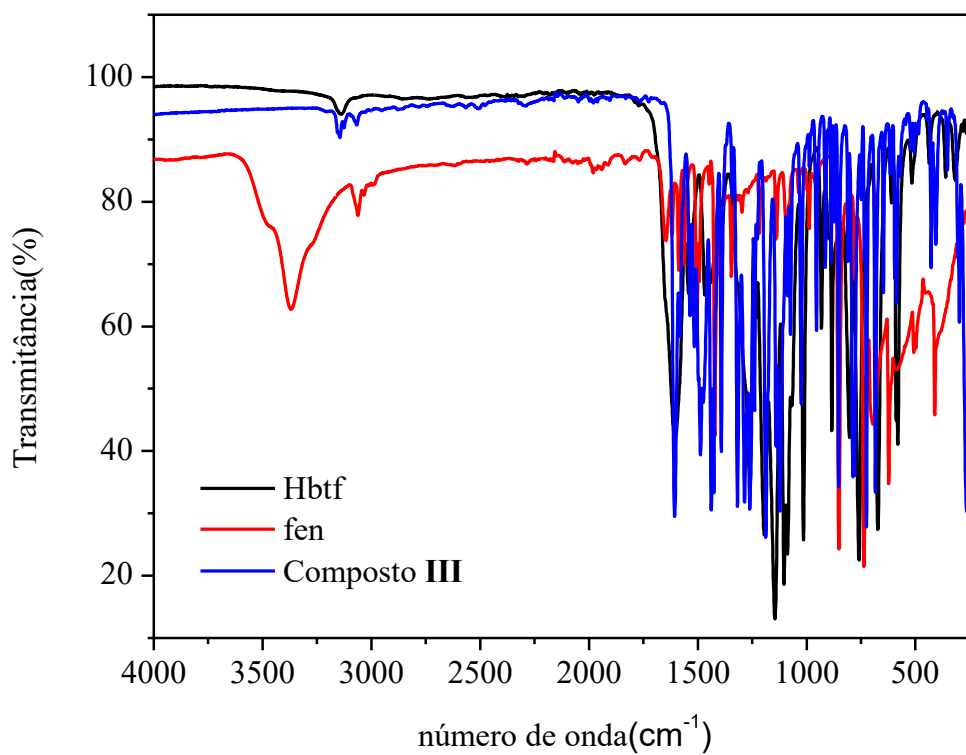
ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV) (ANEXO D)**Figura D1-** Espectros de IV dos compostos **II**, fen e Hbtc.**Figura D2-** Espectros de IV dos compostos **III**, fen e Hbtf.

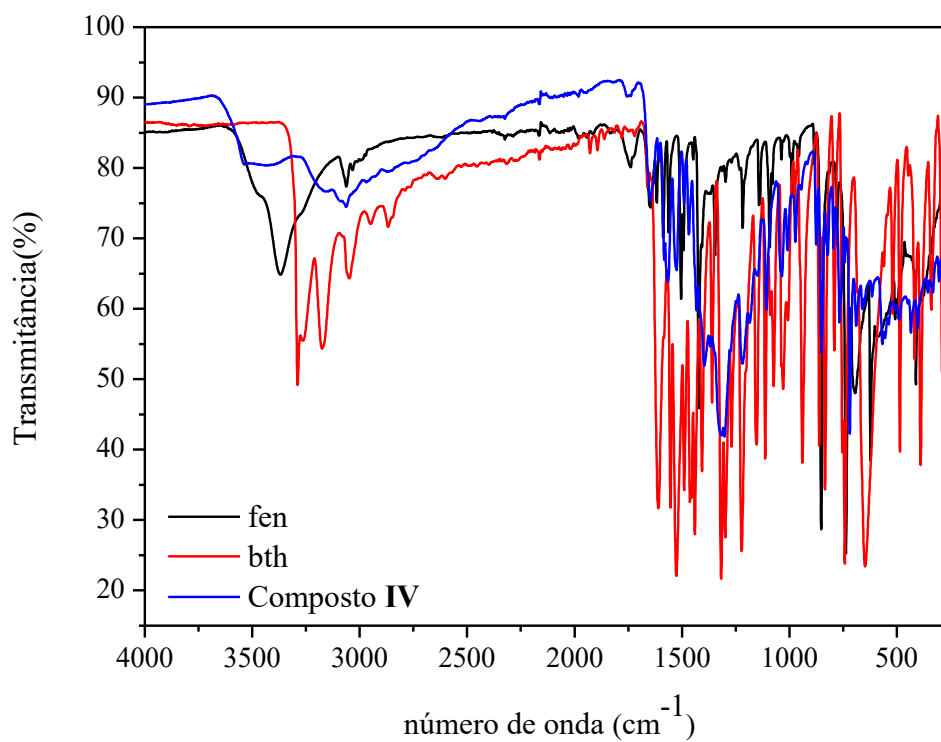
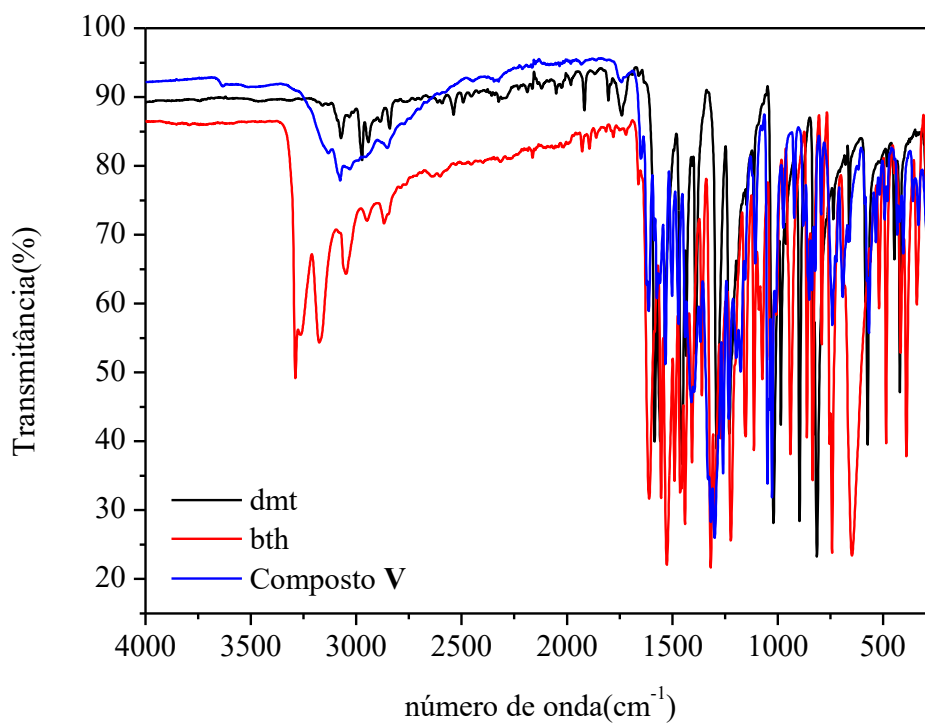
Figura D3- Espectros de IV dos compostos **IV**, bth e fen.**Figura D4-** Espectros de IV dos compostos **V**, bth e dmt.

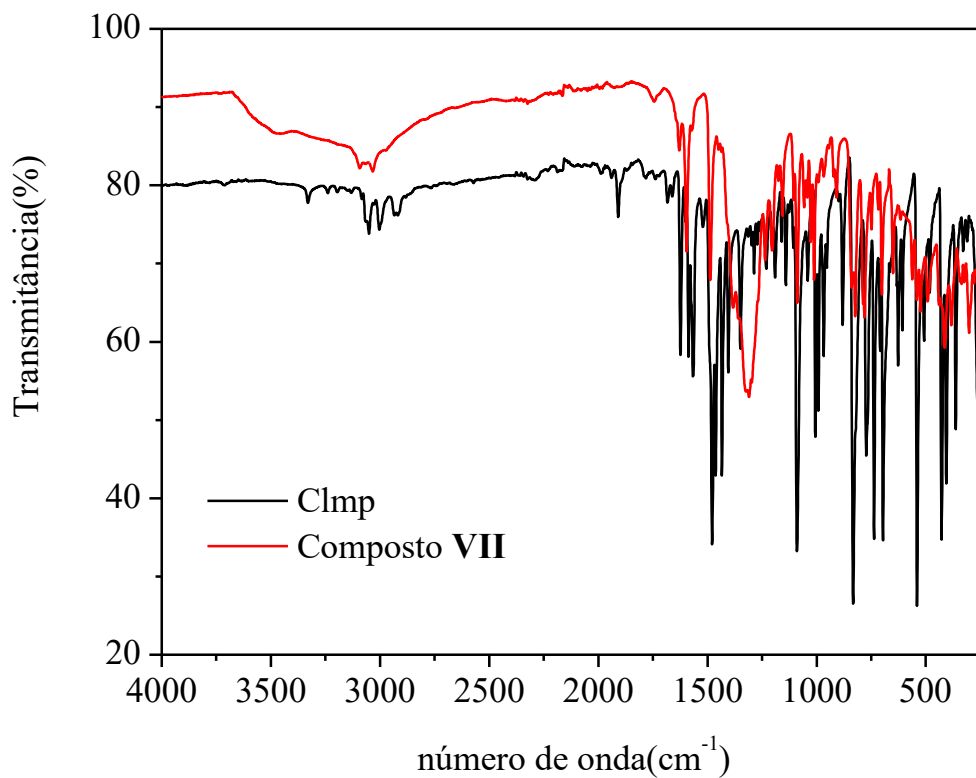
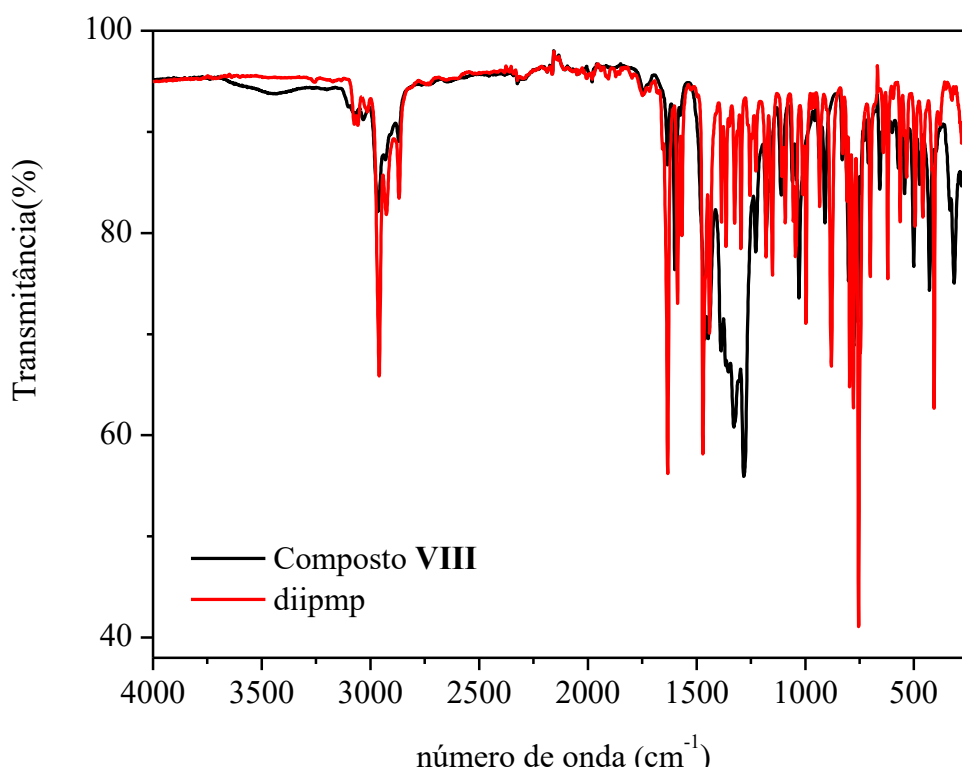
Figura D5- Espectros de IV do composto **VII** e do ligante Clmp.**Figura D6-** Espectros de IV do composto **VIII** e do ligante diipmp.

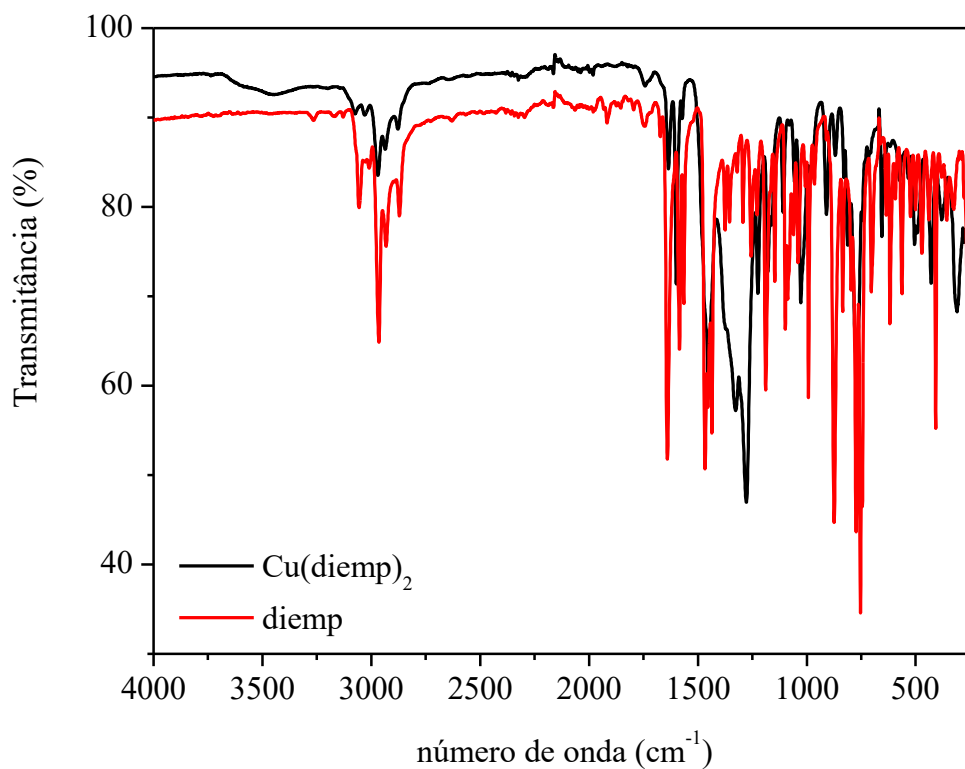
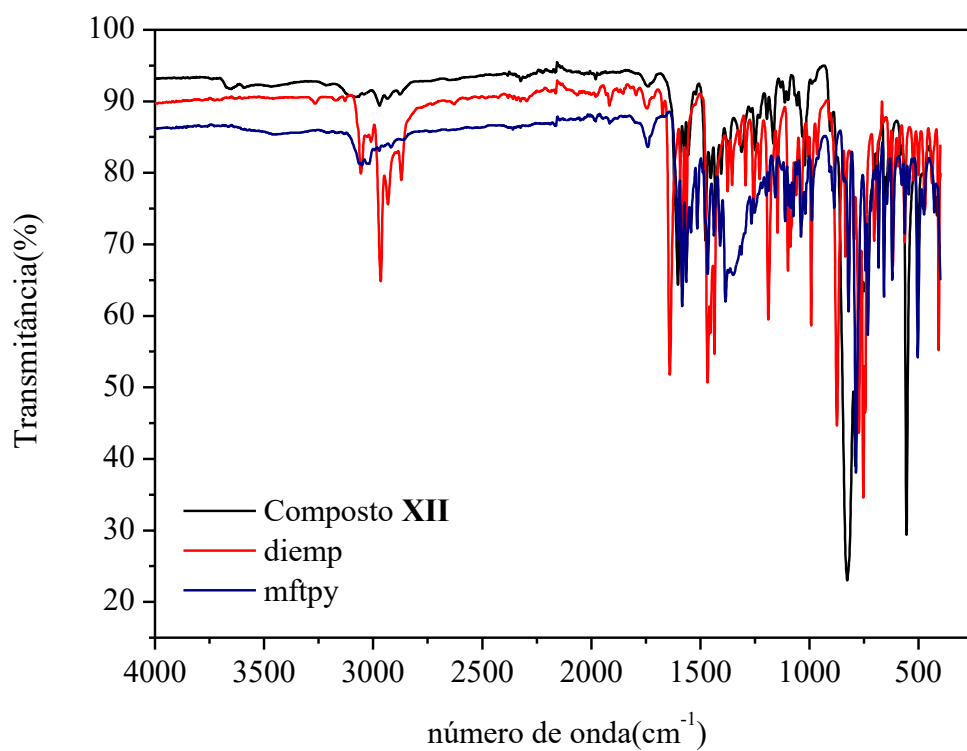
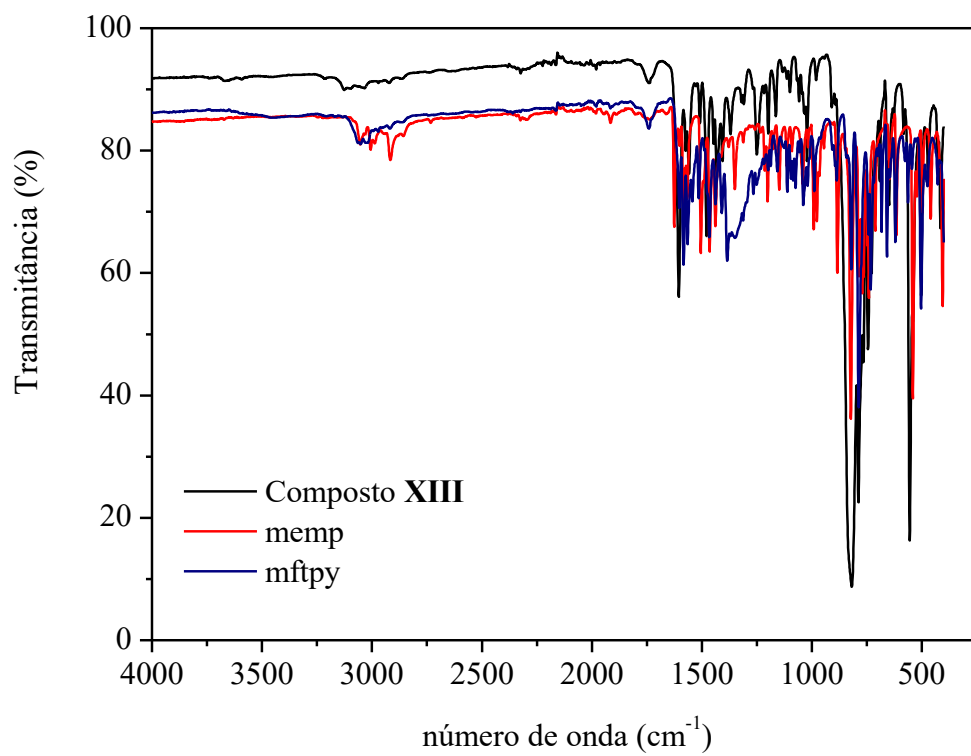
Figura D7- Espectros de IV do composto **IX** e do ligante diemp.**Figura D8-** Espectros de IV dos compostos **XII**, diemp e mftpy.

Figura D9- Espectros de IV dos compostos **XIII**, memp e mftpy.



**ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. NUCLEAR DE
HIDROGÊNIO -RMN ^1H (ANEXO E)**

Figura E1- Espectro de RMN ^1H do ligante livre Clmp em CDCl_3 .

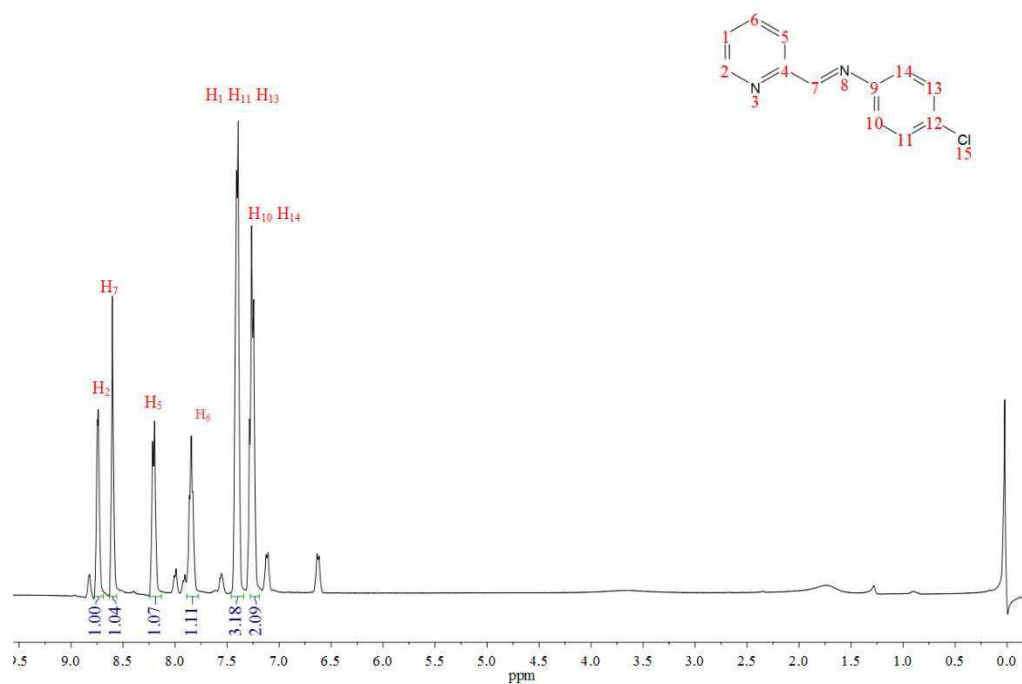


Figura E2- Espectro de RMN ^1H do ligante livre diemp em CDCl_3 .

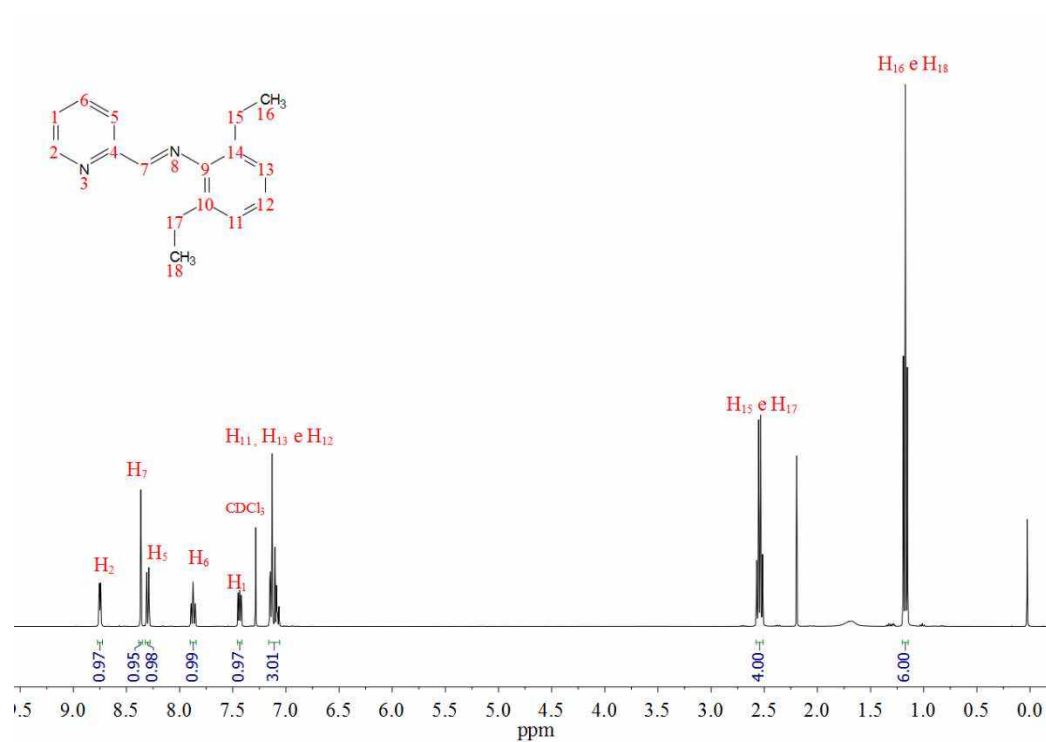
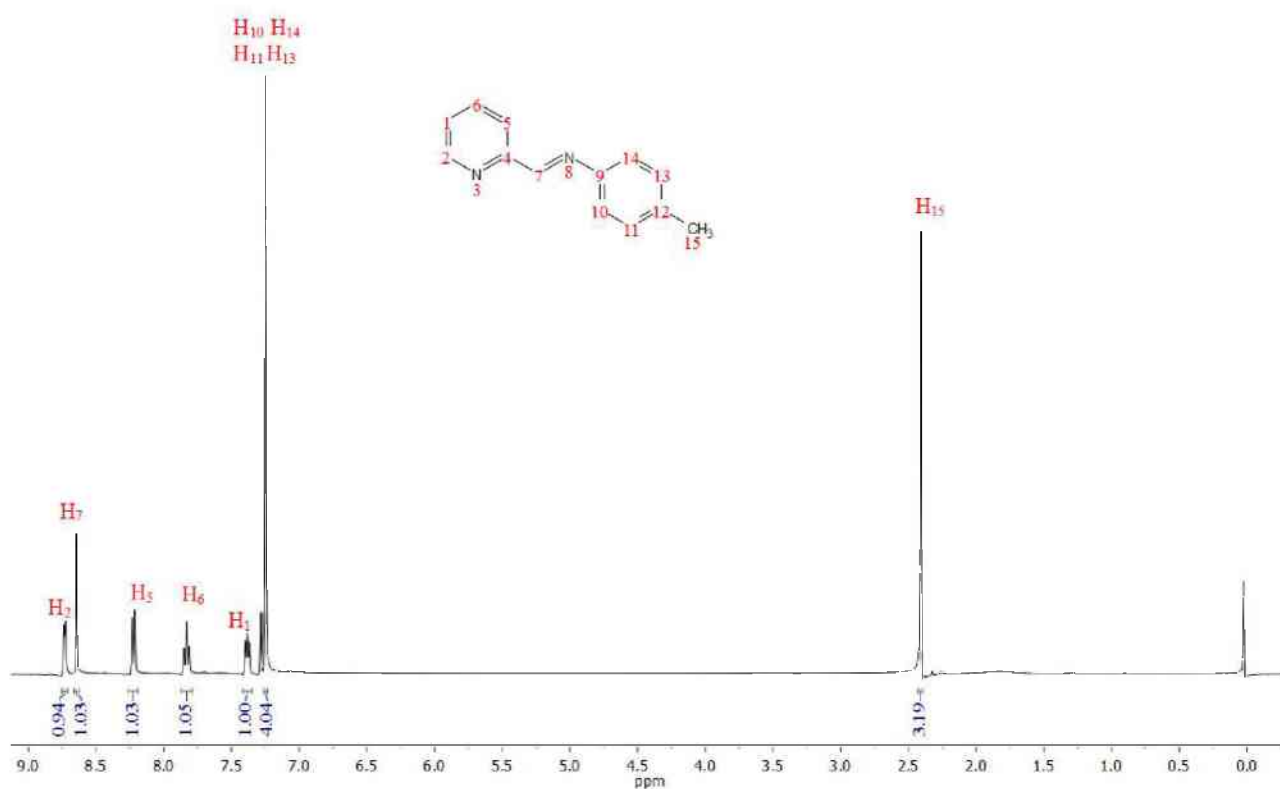


Figura E3- Espectro de RMN ^1H do ligante livre memp em CDCl_3 .

CITOTOXICIDADE (ANEXO F)

Figura F1- Viabilidade celular em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) após 24 e 48 horas de exposição ao ligante Clmp em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 μM), avaliada pelo método MTT.

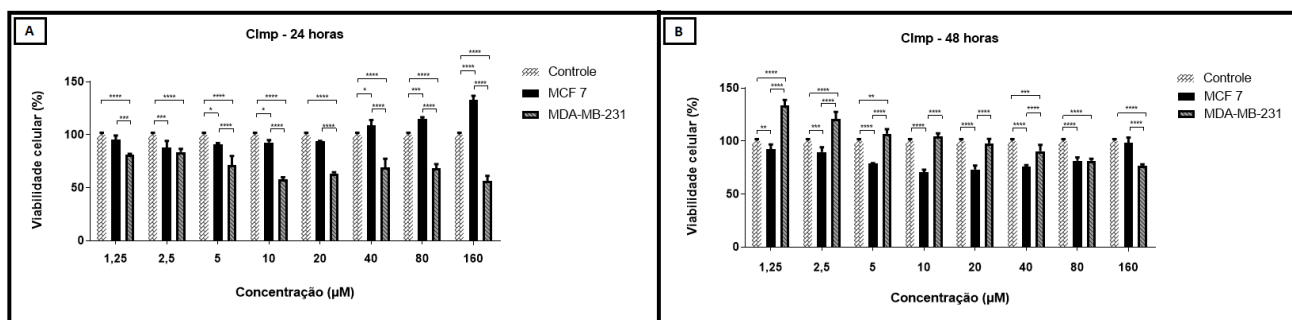


Figura F2- Viabilidade celular em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) após 24 e 48 horas de exposição ao ligante diemp em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 μM), avaliada pelo método MTT.

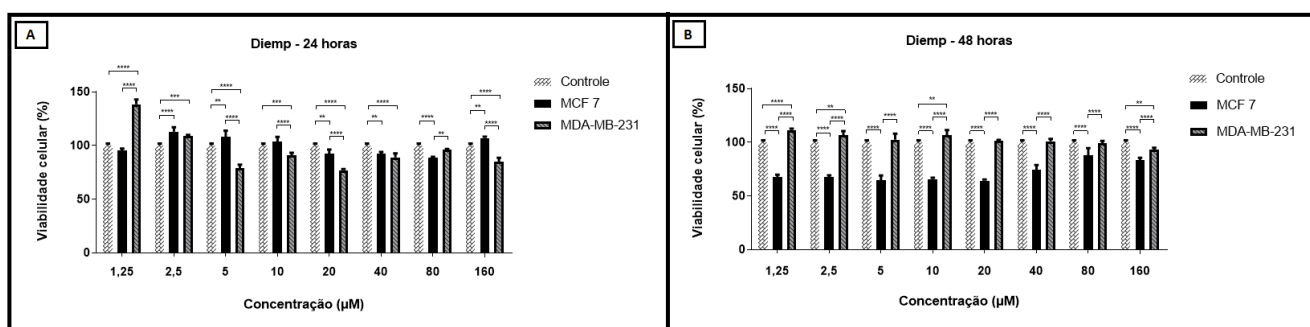


Figura F3- Viabilidade celular em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) após 24 e 48 horas de exposição ao ligante diimpmp em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 μM), avaliada pelo método MTT.

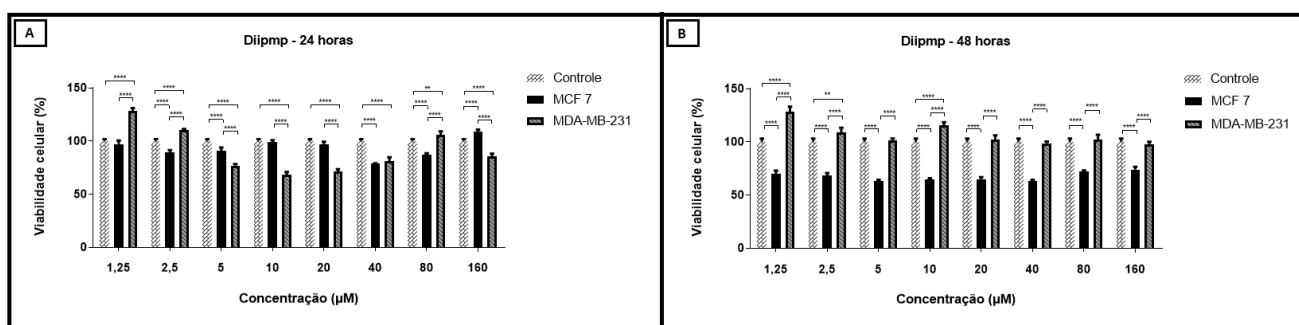


Figura F4- Viabilidade celular em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) após 24 e 48 horas de exposição ao ligante memp em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 μM), avaliada pelo método MTT.

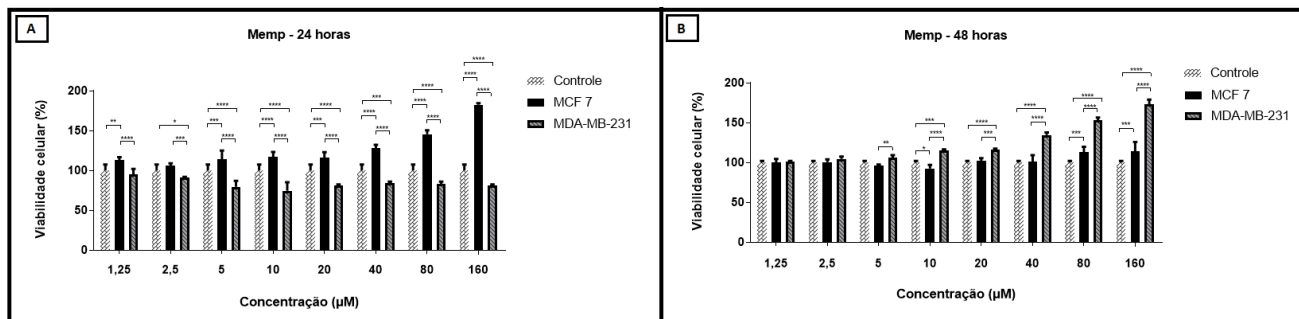
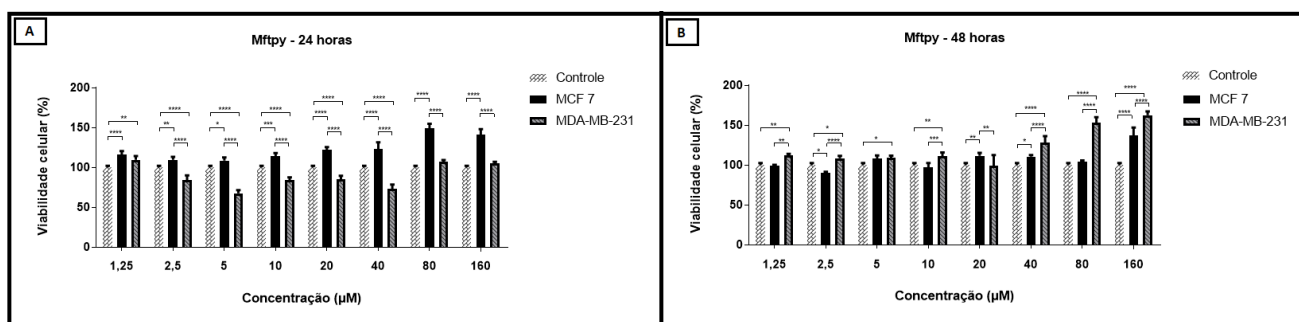


Figura F5- Viabilidade celular em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) após 24 e 48 horas de exposição ao ligante mftpy em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 μM), avaliada pelo método MTT.



INTERAÇÃO COM ADN POR UV-Vis E DICROÍSMO CELULAR (ANEXO G)

Figura G1- Espectros UV-vis do complexo I ($3,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[ADN]$.

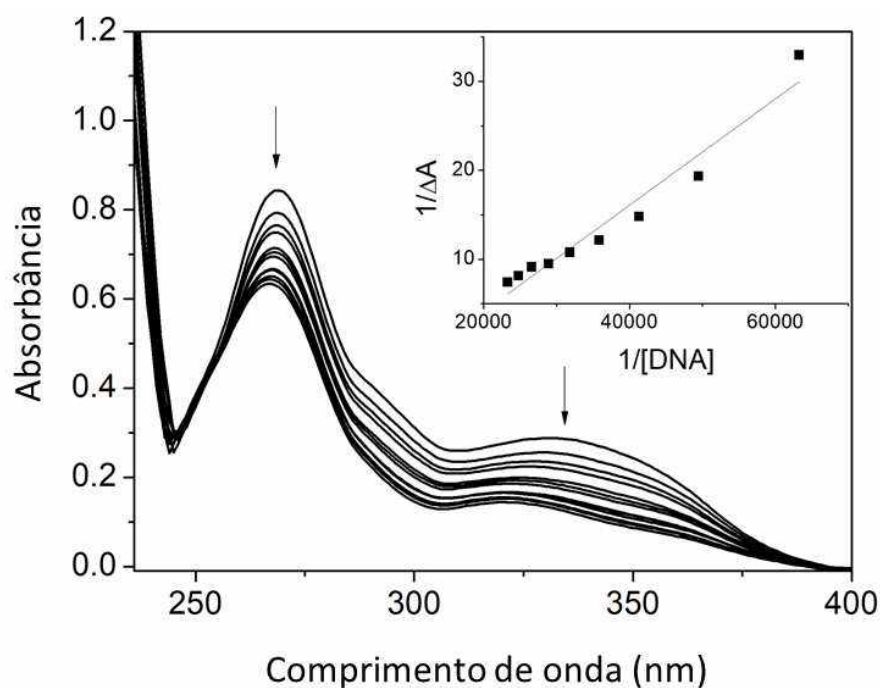


Figura G2- Espectros UV-vis do complexo II ($3,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[ADN]$.

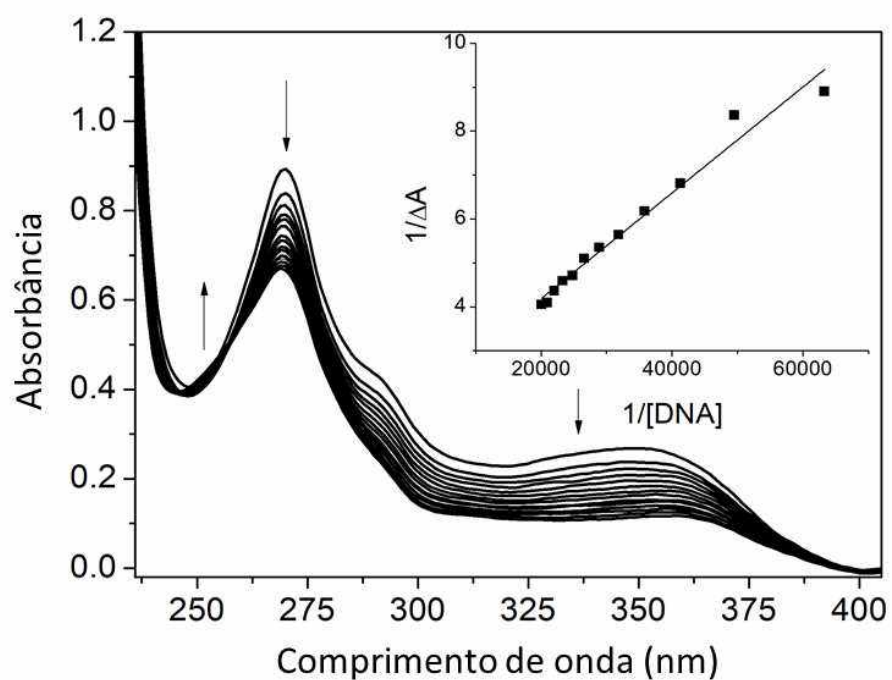


Figura G3- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo **I** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.

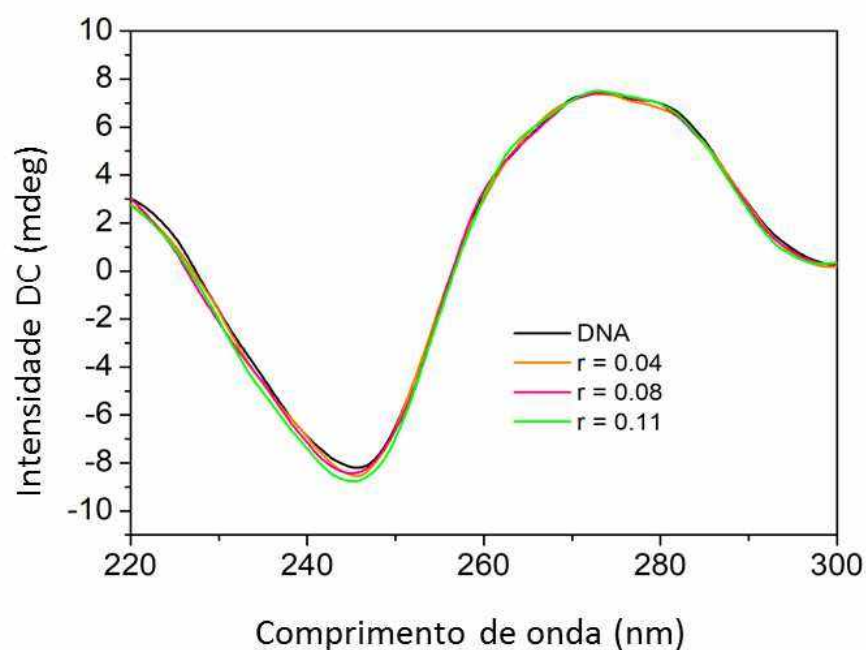


Figura G4- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo **II** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.

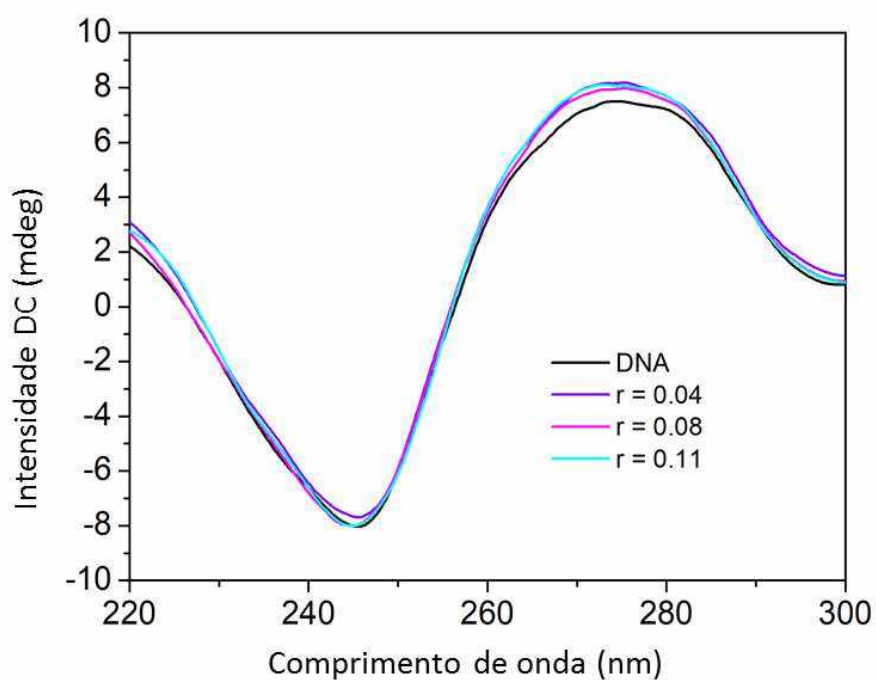


Figura G5- Espectros de fluorescência após adição de concentrações crescentes do complexo **I** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{DNA}]$.

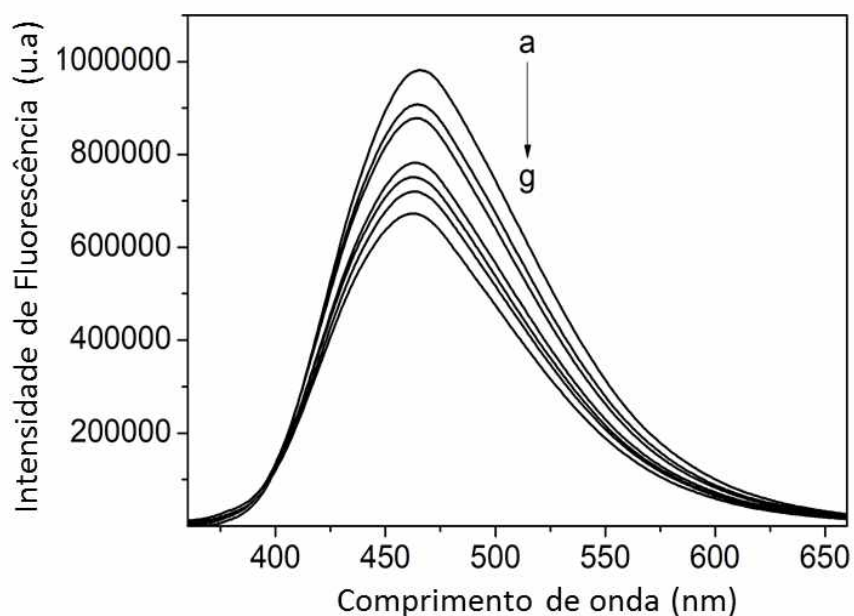


Figura G6- Espectros de fluorescência após adição de concentrações crescentes do complexo **II** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{DNA}]$.

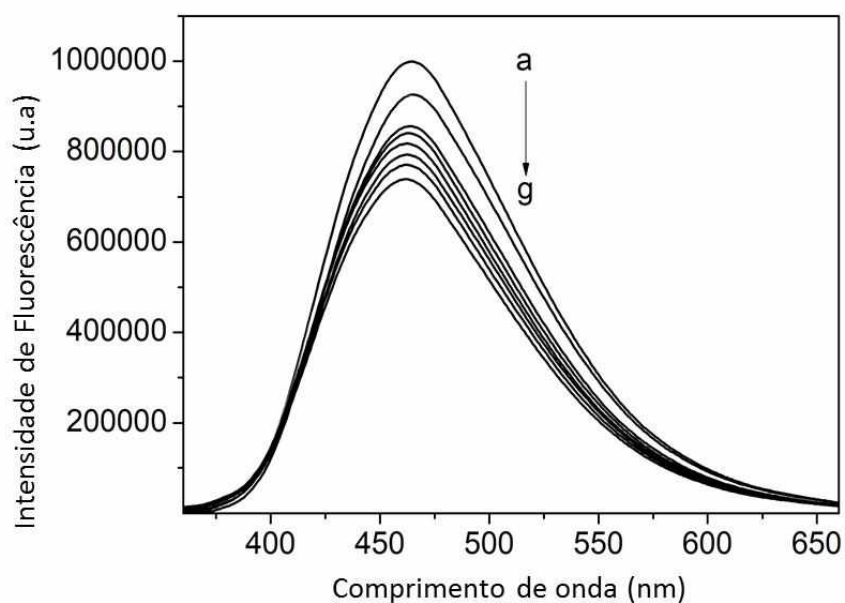


Figura G7- Espectros UV-vis do complexo **IV** ($3,0 \times 10^{-5}$ M) obtidos a partir de concentrações crescentes de ct-ADN em solução tampão (pH 7,2). Requadro: $1/\Delta A$ versus $1/[\text{ADN}]$.

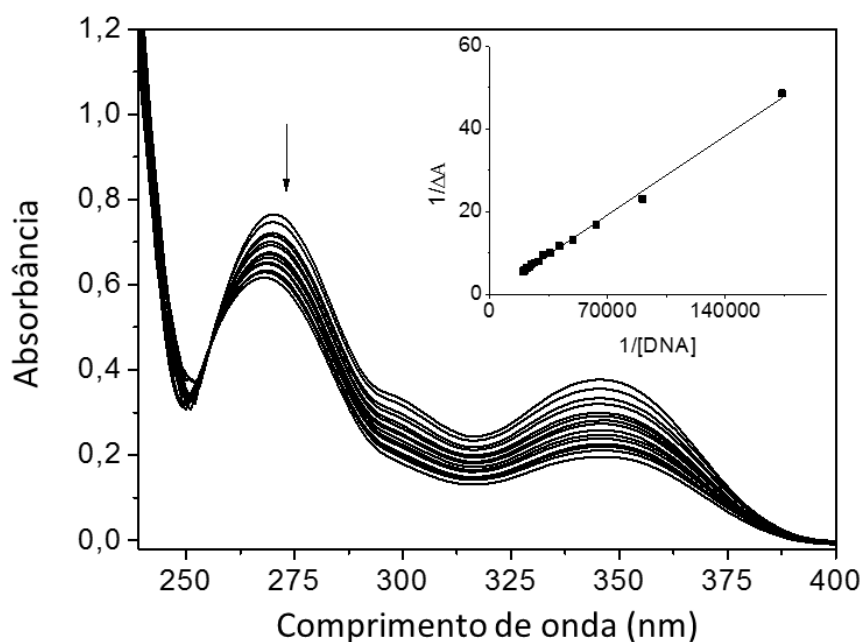


Figura G8- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo **IV** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.

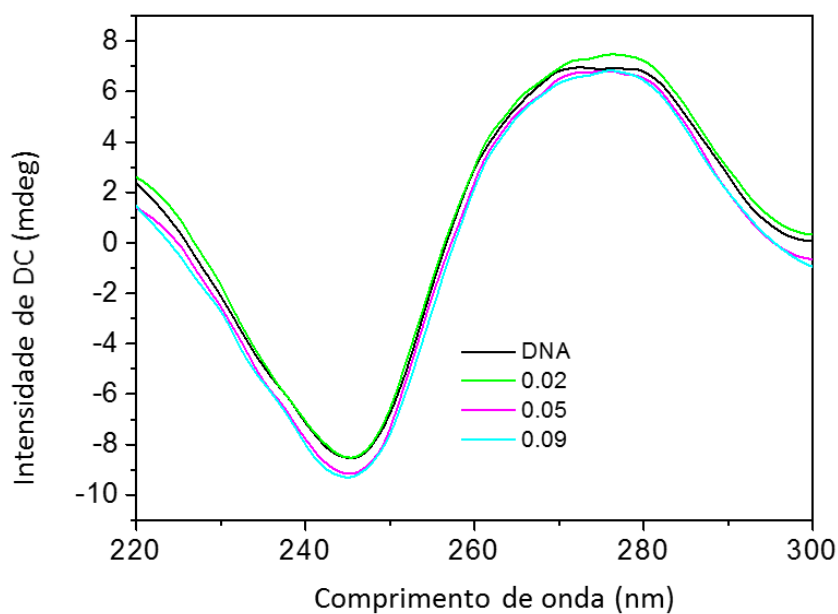
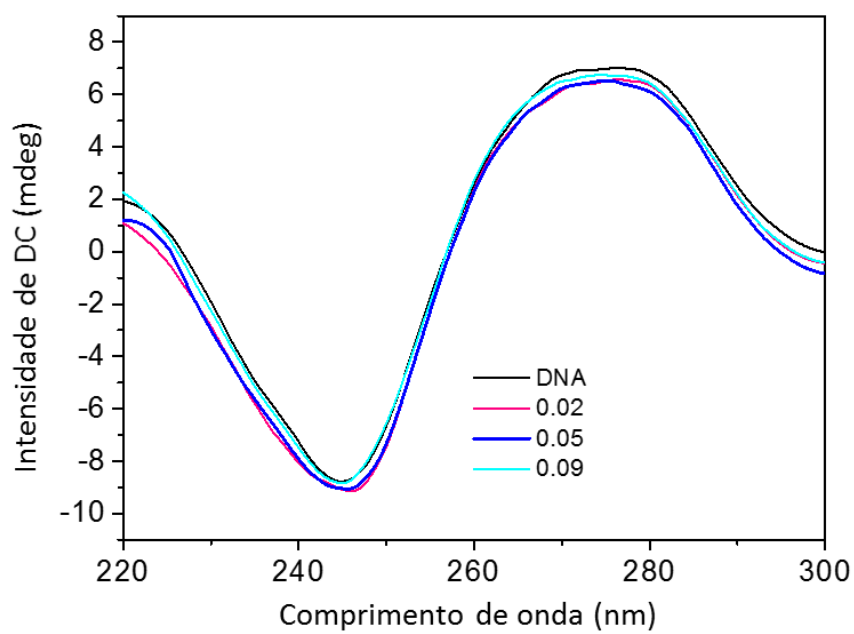


Figura G9- Espectros de DC após adição de concentrações crescentes do complexo **VI** ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em ACN) ao ct-ADN ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl 10×10^{-3} M / NaCl 100×10^{-3} M, $r = [\text{complexo}]/[\text{ADN}]$.



8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA



Research paper

DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones

Luana M. Sousa^a, Wesley A. Souza^{a,h}, Drielly A. Paixão^a, Rodrigo B. Fazzi^b, Daiane Y. Tezuka^c, Carla D. Lopes^c, Zumira A. Carneiro^c, Mariete B. Moreira^{d,e}, Marcos Pivatto^a, Adelino V.G. Netto^d, Sérgio de Albuquerque^c, Francis B. Ferreira^f, Ronaldo J. De Oliveira^g, Jackson A.L.C. Resende^h, Ricardo C. Linoⁱ, Robson J. De Oliveira Júniorⁱ, Ana M. Da Costa Ferreira^b, Wendell Guerra^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica, Uberlândia, MG, Brazil

^b Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

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

^d Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

^e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Capivari, Capivari, SP, Brazil

^f Faculdades Associadas de Uberaba, Uberaba, MG, Brazil

^g Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil

^h Instituto de Ciências Exatas e da Terra - CUA, Universidade Federal de Mato Grosso, Pontal do Araguaia, MT, Brazil

ⁱ Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nickel complexes
 β -diketones
 DNA binding
 DNA cleavage
 Apoptosis
 Cancer

ABSTRACT

In this work, three nickel(II) complexes, namely, $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{bta})(\text{phen})]$ (I), $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{btc})(\text{phen})]$ (II), and $[\text{Ni}(\eta^2\text{-NO}_3)(\text{btf})(\text{phen})]$ (III) (bta = 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione anion, btc = 1-(4-chlorophenyl)-4,4,4-trifluoro-1,3-butanedione anion, btf = 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione anion, phen = 1,10-phenanthroline) were prepared and fully characterized by magnetic susceptibility measurements, spectroscopic methods and single-crystal X-ray diffraction. The spectral and structural data confirm that the β -diketones anions coordinate via the oxygen atoms, whilst the heterocyclic base coordinates through the nitrogen atoms. A nitrate coordinated in bidentate mode completes the coordination sphere around the metal center. The anticancer activity of chelating ligands and their nickel complexes was evaluated against two tumor cell lines, MCF-7 (a hormone responsive cancer cell) and MDA-MB-231 (triple negative breast cancer cell). The complexes I and II were more active than cisplatin and interacted more effectively with DNA, with K_b values in the range of 10^3 – 10^4 M^{-1} . According to data from circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy, these complexes appear to bind to the DNA groove and/or by electrostatic forces. Molecular docking followed by semiempirical simulations reinforce that they are capable of binding in the minor groove of the double helix of ct-DNA in an A-T rich region. DNA cleavage studies indicated that the complex II cleaves the plasmid DNA in the presence of H_2O_2 . Subsequently, we found that I and II induce late apoptosis in MCF-7 cells.

1. Introduction

Metal complexes containing β -diketones have attracted strong interest as potential pharmacological agents, since such compounds have significant biological properties. In this sense, it is interesting to note that the compound *cis*-diethoxy(1-phenylbutane-1,3-dionato)titanium (IV) was the first non-platinum-based metal anticancer drug to enter clinical trials [1]. More recently, Wilson *et al.* reported three Pt^{II}

complexes with β -diketone that exhibited anticancer activity comparable to cisplatin towards several different cell lines. It was also reported that the uptake in HeLa cells increases as the lipophilicity of the investigated Pt^{II} complex increases [2]. In previous studies, we also reported Pt^{II} complexes containing β -diketones more active than carboplatin against the K562 cell line [3], and in the literature, other complexes with platinum group metals have been evaluated in recent years [4].

* Corresponding author: Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Av. João Naves de Ávila, 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.2020.119824>

Received 28 April 2020; Received in revised form 8 June 2020; Accepted 9 June 2020

Available online 12 June 2020

0020-1693/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

In previous works, we verified that Cu^{II} complexes bearing heterocyclic bases and β -diketones as ligands are promising anticancer agents, displaying selective cytotoxicity against tumor cell lines [5–7]. One of them, [Cu(bta)(phenanthroline)ClO₄] (bta = 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione anion), induces DNA-damage and leads to G0/G1 checkpoint arrest, with consequent induction of cell death [8]. These findings indicate that metal complexes with β -diketones and *N*-donor ligands are promising anticancer agents, although there are few reports in the literature. In order to continue our search for bioactive compounds, this work describes biological studies involving three Ni^{II} complexes. More specifically, DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies were carried out to assess the anticancer potential of these complexes. Nickel is an essential component of several enzymes, which make it interest for the design of bioactive compounds, since endogenous metals may be less toxic [9,10]. Several studies have revealed that nickel complexes possess promising anticancer activity [11,12]. For example, four Ni^{II} complexes containing thiosemicarbazone exhibited significant degree of cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cell line (A549). These complexes also induced the apoptosis in A549 cells and inhibited the migration of lung cancer cells [13].

2. Experimental section

2.1. Reagents and solvents

All chemicals, including the ligands 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione (Hbta), 1-(4-chlorophenyl)-4,4,4-trifluoro-1,3-butanedione (Hbtc) and 4,4,4-trifluoro-1-(2-furyl)-1,3-butanedione (Hbtf) were purchased from Merck and used without prior treatment.

2.2. Syntheses

2.2.1. Complex I - [Ni(η^2 -NO₃)(bta)(phen)]

0.5 mmol (0.1425 g) of 4,4,4-trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione (Hbta) dissolved in 1 mL of acetonitrile was added to 0.5 mmol (0.1454 g) of Ni(NO₃)₂·6H₂O previously solubilized in 1 mL of acetonitrile. The mixture was kept under magnetic stirring for 30 min at room temperature. Next, 0.5 mmol (0.0901 g) of 1,10-phenanthroline (phen) dissolved in 1 mL of acetonitrile was added dropwise. After 24 h, a precipitate was isolated by filtration, washed with acetonitrile and dried under reduced pressure.

MM (g mol⁻¹): 516.05. Yield: 62%. Anal. Calc. for NiC₂₂H₁₄F₃N₃O₅: C, 51.20; H, 2.73; N, 8.14%; Found: C, 51.26; H, 2.69; N, 8.33%. (+)-HRESIMS (methanol), *m/z*: 453.0355 [M–NO₃]⁺ (calc. for NiC₂₂H₁₅F₃N₂O₂, 453.0356 (Δ –0.22 ppm)). ATR-FTIR, ν (cm⁻¹): 3226, 3193, 3157, 3072, 3029, 3007, 2970, 1623, 1613, 1596, 1576, 1537, 1518, 1488, 1464, 1426, 1316, 1278, 1181, 1127, 1079, 1025, 849, 808, 763, 724, 707, 646, 583, 526, 505, 445, 427, 396, 298, 270, 255. UV–Vis (ACN), λ_{\max} (ϵ): 338 (2.13 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 291 (2.30 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 268 (5.14 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 224 (5.80 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹). Λ_M (acetonitrile) = 141.3 S cm² mol⁻¹.

Similar procedures were used to prepare the complexes II and III, using the corresponding ligands btc and btf, respectively.

2.2.2. Complex II - [Ni(η^2 -NO₃)(btc)(phen)]

MM (g mol⁻¹): 550.50. Yield: 62%. Anal. Calc. for NiC₂₂H₁₃ClF₃N₃O₅: C, 48.00; H, 2.38; N, 7.63%; Found: C, 48.43; H, 2.32; N, 7.79%. (+)-HRESIMS (acetonitrile), *m/z*: 486.9967 [M–NO₃]⁺ (calc. for NiC₂₂H₁₄ClF₃N₂O₂, 486.9966 (Δ 0.20 ppm)). ATR-FTIR, ν (cm⁻¹): 3326, 3103, 3128, 3089, 3076, 3031, 2971, 2942, 1614, 1590, 1715, 1566, 1538, 1518, 1461, 1424, 1291, 1280, 1252, 1225, 1182, 1148, 1129, 1089, 1066, 1025, 1014, 849, 784, 737, 723, 669, 647, 575, 486, 444, 429, 301, 268, 255, 242. UV–Vis (ACN), λ_{\max} (ϵ): 340 (2.1 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 291 (2.3 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 269 (5.1 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 223 (5.6 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹). Λ_M

(acetonitrile) = 133.9 S cm² mol⁻¹.

Complex III - [Ni(η^2 -NO₃)(btf)(phen)]

MM (g mol⁻¹): 506.01. Yield: 70%. Anal. Calc. for NiC₂₀H₁₂F₃N₃O₆: C, 47.47; H, 2.39; N, 8.30%; Found: C, 47.17; H, 2.13; N, 8.20%. (+)-HRESIMS (acetonitrile), *m/z*: 443.0148 [M–NO₃]⁺ (calc. for NiC₂₀H₁₃F₃N₂O₃, 443.0148). ATR-FTIR, ν (cm⁻¹): 3155, 3144, 3125, 3067, 1606, 1581, 1537, 1515, 1488, 1437, 1427, 1391, 1317, 1286, 1261, 1240, 1187, 1140, 1123, 1087, 1074, 1025, 954, 913, 886, 852, 724, 684, 645, 595, 586, 428, 406, 353, 297, 263, 247, 226. UV–Vis (ACN), λ_{\max} (ϵ): 355 (2.47 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 342 (2.57 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 290 (2.6 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 269 (4.46 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹), 224 (5.2 \times 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹). Λ_M (acetonitrile) = 133.7 S cm² mol⁻¹.

2.3. Physical measurements

The UV–Vis absorption spectra (200–800 nm) were performed on a UV-2501 PC Shimadzu spectrophotometer. Infrared spectra (IR) were obtained on a PerkinElmer Frontier MIR spectrometer equipped with an attenuated total reflectance – ATR – sample holder with a diamond crystal in the region 4000–220 cm⁻¹. High-resolution electrospray ionization mass spectra – HRESIMS – were measured on a micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics) spectrometer, operating in the positive mode. Methanol or acetonitrile (ACN) were used as solvent system and the samples were infused into the ESI source at a flow rate of 3 μ L/min. The values for the charged complex ions were calculated via software ChemDraw Ultra 15.0. EPR spectroscopic measurements were registered in a Bruker EMX instrument (Kalsruhe, Germany), working at X-band (9.5 GHz, 100 kHz modulation amplitude, and 20 mW power). Samples were introduced in quartz tubes (4 mm internal diameter), and measured in solid state or in DMSO solution, at room temperature or at 77 K. For magnetic susceptibility measurements, the Gouy method was used, through weighing in an analytical balance (sensitivity 0.00001 g) coupled to a permanent 6000 Gauss magnet. The percentage of carbon, hydrogen and nitrogen (CHN) present in the samples was determined on a Perkin-Elmer 2400 elemental analyzer. Conductivity measurements were performed using a Tecnonon mCA-150 conductivity meter with acetonitrile or dimethyl sulfoxide as solvents.

2.4. Crystal structure

Single crystals of II were obtained by the addition of the ligands (previously dissolved in 2 mL methanol) to 0.125 mmol of Ni(NO₃)₂·6H₂O. The mixture was stirred for 1 h and kept for slow evaporation during five days until the formation of blue crystals. The crystals thereby formed were collected and dried. Thus, a single crystal was mounted on a Bruker D8-Venture diffractometer and the X-ray diffraction data were collected using MoK α (λ = 0.710731 Å) at room temperature. Data collection, reduction and integration were performed using the software APEX3.0 [14]. The structure was solved by direct methods and refinement by the full square least squares method over F² using SHELX software [15]. The non-hydrogen atoms were refined anisotropically while the positions of hydrogen atoms were generated and refined using the riding model. The crystallographic data are summarized in Table 1. CCDC 1957945 contains the supplementary crystallographic data for the complex II. They can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk.

2.5. Cytotoxicity against breast cancer cells

The cell viability was assessed using the classical [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) colorimetric assay [16]. Herein, 5.0 \times 10⁵ cells (MCF-7 and MDA-MB231) were incubated for 24 h in 96-well cell culture plates. After this incubation period, the nickel complexes, their ligands or cisplatin were added (concentrations from 500 to 3.9 μ M in serial dilution; compounds solubilized in DMSO 0.5%) in a final volume of 200 μ L. Cells

Table 1
Data refinement and crystal structure for complex II.

Empirical formula	C ₂₂ H ₁₃ ClF ₃ N ₃ NiO ₅
Formula weight	550.51
Temperature/K	298
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
a/Å	10.4668(4)
b/Å	10.6658(4)
c/Å	11.3277(5)
α/°	109.7310(10)
β/°	109.8380(10)
γ/°	94.4580(10)
Volume/Å ³	1092.98(8)
Z	2
ρ _{calc} /cm ³	1.673
μ/mm ¹	1.077
F(0 0 0)	556.0
Crystal size/mm ³	0.534 × 0.315 × 0.146
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	4.238 to 52.044
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 12, -13 ≤ k ≤ 13, -13 ≤ l ≤ 13
Reflections collected	33,217
Independent reflections	4285 [R _{int} = 0.0413, R _{sigma} = 0.0221]
Data/restraints/parameters	4285/18/317
Goodness-of-fit on F ²	1.057
Final R indexes [I > 2σ (I)]	R ₁ = 0.0364, wR ₂ = 0.0847
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0493, wR ₂ = 0.0942
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.81/-0.44

were incubated for 48 h at 37 °C. After incubation with the compounds, the medium was removed, followed by the addition of 50 μL of MTT (2.0 mg/mL) diluted in phosphate buffered saline (PBS). The precipitated blue MTT formazan was then dissolved in 50 μL 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. IC₅₀ curve fitting was carried out using GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

2.6. DNA binding studies

2.6.1. DNA solution

UV-Vis absorption spectra were recorded in a spectrophotometer Thermo Scientific at room temperature. Calf thymus (ct) DNA was purchased from Sigma Chemical Co. (USA) and used as received. All DNA samples were dissolved in Tris-HCl buffer 10 × 10⁻³ M / NaCl 100 × 10⁻³ M, pH = 7.2. The ct-DNA concentrations was determined spectrophotometrically using ε = 6600 M⁻¹ cm⁻¹ at 260 nm, ratio UV absorbance at 260 and 280 nm. The ratio (A₂₆₀/A₂₈₀) was found between 1.80 and 1.91, indicating that the ct-DNA was free of proteins.

2.6.2. UV-Vis spectroscopy

The intrinsic binding constants (K_b) for the interaction of the Ni^{II} complexes with ct-DNA were determined by UV-Vis absorption titration experiments. The titrations were carried out adding increasing amounts of DNA (from 5.76 × 10⁻⁶ to 4.98 × 10⁻⁵ M) to a fixed amount of the complex (3.0 × 10⁻⁵ M). DNA binding studies were performed spectrophotometrically by recording the spectrum after each addition of DNA. Changes in absorbance were monitored at the maximum wavelengths of 350, 334 and 338 nm for complexes I, II and III, respectively.

The intrinsic binding constants (K_b) values for the binding of the complexes to DNA were determined using Benesi-Hildebrand equation:

$$\frac{A}{(A - A_0)} = \frac{\epsilon_C}{(\epsilon_{D-C} - \epsilon_C)} x \frac{1}{K_b [DNA]}$$

Where A and A₀ are absorbances of free compound and the compound-

DNA, respectively. ε_C and ε_{D-C} are the absorption coefficients of the free compound and the compound-DNA adduct respectively. K_b is given by intercept-to-slope ratio of 1/(A-A₀) vs 1/[DNA] plots.

2.6.3. Circular dichroism (CD) spectroscopy

The ct-DNA concentration (Tris-HCl buffer 10 × 10⁻³ M / NaCl 100 × 10⁻³ M, pH = 7.2) was 7.09 × 10⁻⁵ M, whereas concentrations of complexes varied from 2.58 × 10⁻⁶ to 1.44 × 10⁻⁵ M. CD spectra of DNA were recorded at room temperature using a Jasco spectropolarimeter, model 815 J, in the region 216–300 nm, scan rate of 100 nm/min, 6 accumulations. The samples (DNA and complexes) were incubated for 48 h at 310 K.

2.6.4. Fluorescence spectroscopy

In the Hoechst 33,258 fluorescence displacement experiments, 3 mL of a solution, that is, 20 × 10⁻⁶ M DNA and 2 × 10⁻⁶ M Hoechst 33,258 (in Tris-HCl buffer 10 × 10⁻³ M / NaCl 100 × 10⁻³ M, pH = 7.2) were titrated with successive aliquots of compounds solutions (0 – 1.20 × 10⁻⁵ M). The emission spectra were recorded over the range 358–660 nm (λ_{exc} = 338 nm), using a Horiba Jobin Yvon model Fluorolog-3 FL3-122 spectrofluorophotometer. The samples were incubated for 5 min at 298 K.

2.7. Theoretical studies protocol

The best resolution of X-ray crystallographic data from ct-DNA were downloaded from the Protein Data Bank (PDB, code: 1BNA). All the water molecules were removed and, in the final stage, hydrogen atoms were added to a receptor molecule before initiating the docking process. Molecular docking simulations were performed with the GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) suit version 5.5. The binary ct-DNA/Ni^{II} complexes had the energy optimized by the MOPAC2016TM software [17] with semiempirical orbital method PM7 [18]. The semiempirical simulations were performed in the best ranked docking solution to calculate the interaction enthalpy between ct-DNA and Ni^{II} complexes (ΔH_{int}) according to the equation (1) as previously describe [19]:

$$\Delta H_{int} = \Delta H_B - (\Delta H_{DNA} + \Delta H_{Ni^{II}})$$

where ΔH_B, ΔH_{DNA} and ΔH_{Ni^{II}} are the enthalpies of formation of the binary structure (ct-DNA/Ni^{II} complexes), ct-DNA and Ni^{II} complexes, respectively.

2.8. DNA cleavage studies

In order to evaluate interactions of Ni^{II} complexes with DNA, the most active complex (II) was mixed with plasmid DNA samples. It was used the plasmid siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System – hMGFP (Promega), which has a single restriction site to the enzyme *NheI* at nucleotide position 1654. The reaction mixtures (20 μL total volume) contained 30 ng/μL of plasmid, metal complex in different concentrations (30 μM and 120 μM) in PBS 1X with or without H₂O₂ (15 mM) and dimethyl sulfoxide (DMSO 0.05%). Reaction mixtures were incubated at 37 °C for 12 h, and then quenched by the addition of 10 μL of loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol, 10 mM EDTA). Samples were loaded onto a 0.8% agarose gel containing ethidium bromide (10 μg/mL) in TBE buffer (90 mM Tris-borate, pH 8.0, 20 mM EDTA). The gel was run at 80 V for 3 h and photographed under UV light. Quantitation of cleavage products was performed by ImageJ 1.52a software.

2.9. Apoptosis

To evaluate the apoptosis events, MCF-7 cells were seeded in 12-well plates at 5.0 × 10⁶ cells/well for 24 h. Next, they were treated with nickel complexes (10 μM) or cisplatin (10 μM) as positive control

for 48 h. After, the cells were trypsinized, washed with ice-cold PBS and resuspended in binding buffer, according to the kit instructions. The cells were then incubated with FITC-conjugated Annexin V (1:100) for another 15 min as recommended by FITC Annexin Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™). Propidium iodide (1 µg/mL) was added immediately before BD FACSCANTO™ flow cytometer analysis. The excitation/emission used for FITC-conjugated Annexin V was 494/518 nm, while to propidium iodide, the excitation was 585/617 nm. A total of 10,000 events were counted per sample, and analyzed by the software BD FACSDiva (BD Bioscience).

3. Results and discussion

In this work, Ni^{II} complexes containing a deprotonated β-diketone ligand were prepared and characterized by elemental analysis (CHN), conductivity, FT-IR, UV-Vis, High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HRESIMS), EPR and magnetic measurements. Additionally, the crystal structure of **II** was also determined. In all Ni^{II} complexes, isolated as blue solids soluble in DMSO or acetonitrile, β-diketones (O–O), nitrate and 1,10-phenanthroline (N–N) act as bidentate ligands forming complexes of general formula [Ni(η²-NO₃)(O–O)(N–N)].

Regarding the structural aspects, the molar conductivity values (10⁻³ M; acetonitrile) indicate that all complexes are 1:1 electrolytes, which attest the loss of the nitrate anion in solution [6,7]. These complexes also behave as 1:1 electrolytes when dissolved in DMSO (10⁻³ M), even after 2 h. In this study, the conductivity values did not vary significantly with time, suggesting that the species [Ni(O–O)(N–N)]⁺ are stable in DMSO. The mass spectra of these compounds exhibit the corresponding molecular ion [M–NO₃]⁺. For example (see Fig. 1), the spectrum of complex [Ni(NO₃)(btf)(phen)] **III** exhibits the cationized ion at *m/z* 443.0148 [M–NO₃]⁺ (calc. for NiC₂₂H₁₄ClF₃N₂O₂, 443.0148). The infrared spectra of the complexes indicate the coordination via oxygen atoms of the β-diketonato ligand, since the carbonyl stretching frequency presents a significant shift [6,7]. Three bands observed at ≈ 1470, 1290 and 1025 cm⁻¹ corroborate with a bidentate nitrate group. Two absorptions around 1135 and 1260 cm⁻¹ are due to the symmetric and asymmetric stretching frequencies of the CF₃ group. New bands at ≈ 520 and ≈ 427 cm⁻¹ can be assigned to ν_{Ni–O} and ν_{Ni–N}, respectively. As to the UV-Vis spectra (acetonitrile, 10⁻⁵ M), β-diketones and 1,10-phenanthroline exhibited two or three bands between 200 and 400 nm (π → π* or n → π* transitions) [20]. As can be seen in Fig. 2, a red shift or blue shift in comparison to the free ligands confirms the presence of nickel complexes in solution [3,6,7,21,22].

A “silent” EPR spectra was obtained for the complexes **I** to **III** in solid state, at room temperature (Fig. S1, Supplementary Material),

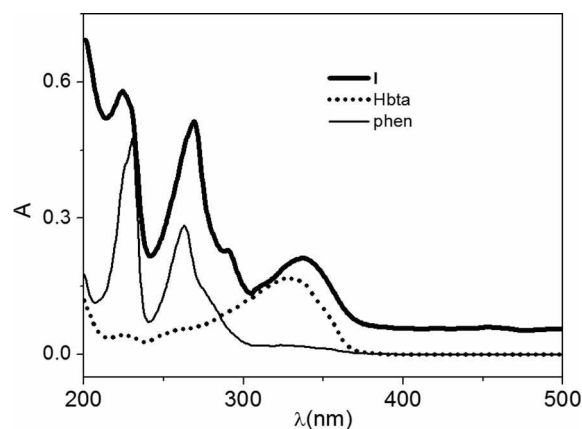


Fig. 2. UV-Vis spectra of complex **I**, Hbta and phen (ACN, 10⁻⁵ M).

indicating that the metal ion is in a distorted octahedral or in a square planar geometry in all these samples, or alternatively the signal is not observed in a CW-EPR X-band instrument. The EPR signal for a Ni^{II} ion in a pseudo-octahedral environment has a Zeeman energy bigger than the X-band frequency, so the spectra show a false diamagnetic behaviour. In the case of a square planar environment in a D_{4h} symmetry group, all the 3d electrons are paired, leading also to a “silent” spectrum. At 77 K, in solid and also in DMSO solution only the complex **I**, [Ni(bta)(phen)NO₃], showed an isotropic signal, as shown in Fig. S2, Supplementary Material. This behaviour indicates that under low temperature this compound changes its geometry, and consequently was detected by EPR. The other compounds remain silent, and probably do not show changes in the metal geometry with the temperature. Therefore, based on the crystallographic data, these complexes keep its distorted octahedral structure, except complex **I**.

To verify the actual symmetry around the metal, the magnetic susceptibility of all the compounds were measured in the solid state, at room temperature, using the Gouy method [23]. Results indicated an apparent increase in the samples mass, in the presence of the magnetic field, with magnetic moments μ_{ef} = 3.09, 3.31 and 3.02 MB (magneton Bohr) respectively for complexes **I**, **II** and **III**, as shown in the Table 2. These results attested that all of them are paramagnetic, with two unpaired electrons expected for a d⁸ configuration. These data indicate that all the complexes have a distorted octahedral geometry around the nickel ion at room temperature, corroborating the X-ray diffraction data (see below). In solution, the nitrate ions are labile, not bound, substituted by water molecules, and acting as counter-ions. For complex **I** the geometry around the nickel ion is changed to tetrahedral. Otherwise, if it was square planar or tetragonal it would be diamagnetic.

The molecular structure of complex **II** was determined by single-

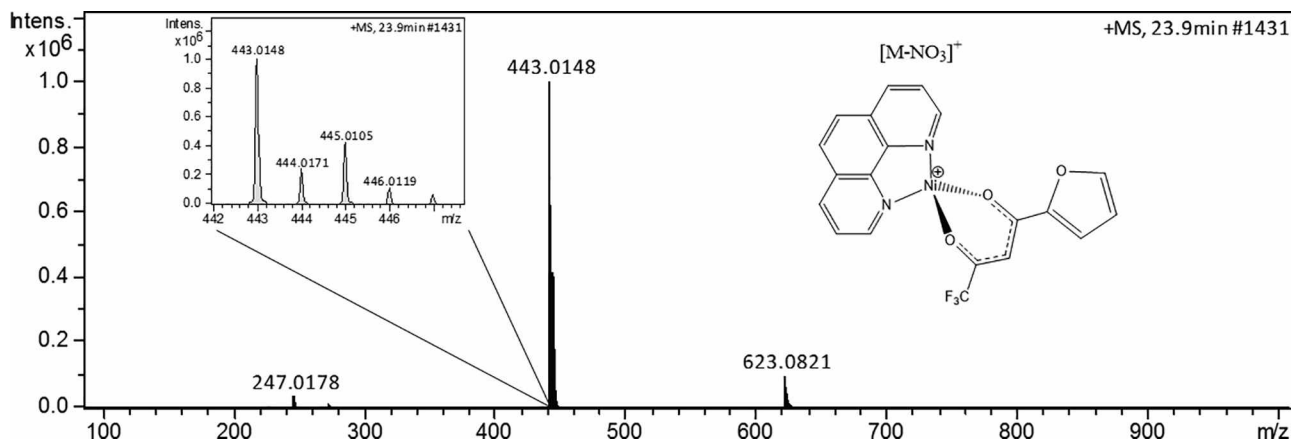


Fig. 1. (+)-HRESIMS spectrum of **III** (charged complex ion observed was [M–NO₃]⁺).

Table 2

Magnetic susceptibility of the compounds [Ni(NO₃)(bta)(phen)] **I**, [Ni(NO₃)(btc)(phen)] **II** and [Ni(NO₃)(btf)(phen)] **III** measured by Gouy method, at room temperature.

	I	II	III
$\chi_m, 10^{-3}$ CGS units	3.99	4.57	3.57
$\mu_{\text{ef, M.B.}}$	3.09	3.31	3.02
unpaired e ⁻	2	2	2

crystal X-ray analysis. It was found that **II** crystallizes in the triclinic space group *P1*, with one molecule independent per asymmetric unit. The molecular representation of **II** is shown in Fig. 3. This complex presents a distorted octahedral geometry, in which the ligands are coordinated to the metal ion in a bidentate manner, with the following bite angles: 80.69(8)° for phen; 90.89(7)° for the btc ligand; and 60.34(7)° for nitrate ion. The most important bond lengths and bond angles are presented in Table 3.

Crystal packaging is stabilized by $\pi - \pi$ stacking and short contacts (Table 4). Oxygen atom O13 establishes three interactions, one with hydrogen H9 of the btc ligand and two with phenanthroline through hydrogen atoms H12 and H19. The interactions C9-H9 \cdots O13 and C12-H12 \cdots F2 form a chain on the b-axis, Fig. 4. There is also $\pi - \pi$ intermolecular interaction between the atoms C11 \cdots C15 and C13 \cdots C22 from phenanthroline, with distances of 3.358(4) and 3.321(4) Å.

3.1. In vitro anti-tumoral activity

We evaluated the potential of nickel complexes and their ligands against two metastatic breast cell lines, namely, MCF-7, a hormone-responsive breast cancer cell line and MBA-MB-231, a cell line that is more sensitive to chemotherapy treatment [24,25]. For this, the compounds were tested in different concentrations (250–3.9 μM) and incubated with MCF-7 and MBA-MB-231 cells for 48 h. In the same way as cisplatin, all nickel complexes were more effective against the MCF-7 cell line than against the MBA-MB-231 cell line (see Table 5). More specifically, the complexes **I** and **II** were 1.62 and 2.18 times more effective than cisplatin against the MCF-7 line ($\text{IC}_{50 \text{ complex I}} = 29.94 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50 \text{ complex II}} = 22.33 \mu\text{M}$ and $\text{IC}_{50 \text{ cisplatin}} = 48.78 \mu\text{M}$). Due to similar

Table 3

Selected bond lengths [Å] and angles [°] for complex **II**.

Atom	Atom	Atom	Length/Å	Angle/°
Ni01	O1	–	1.997(2)	–
Ni01	O2	–	2.001(2)	–
Ni01	N1	–	2.072(2)	–
Ni01	N2	–	2.045(2)	–
Ni01	O11	–	2.136(2)	–
Ni01	O12	–	2.136(2)	–
O1	Ni01	O2	–	90.89(7)
O1	Ni01	N1	–	93.35(8)
O1	Ni01	N2	–	102.16(9)
O1	Ni01	O11	–	98.05(8)
O2	Ni01	N2	–	92.91(8)
O2	Ni01	O12	–	87.39(8)
O2	Ni01	O11	–	91.96(8)
N1	Ni01	O12	–	90.73(8)
N1	Ni01	O11	–	93.02(8)
N2	Ni01	O12	–	99.60(8)
N2	Ni01	N1	–	80.69(8)
O11	Ni01	O12	–	60.34(7)

Table 4

Geometric parameters for intermolecular interactions present in complex **II**.

	d (A – H)	d (A–R)	< (A – H–R)	Symmetry
C9 – H9–O13	0.929	3.382(5)	155.6	x, 1 + y, z
C10 – H10–O11	0.931	3.467(4)	171.2	1-x, 1-y, 1-z
C12 – H12–O13	0.930	3.323(5)	130.2	1-x, -y, 1-z
C12 – H12–F2	0.930	3.509(4)	154.3	x, -1 + y, z
C15 – H15–F1	0.929	3.461(5)	160.0	-x, -y, 1-z
C19 – H19–O13	0.930	3.382(5)	157.5	1-x, 1-y, 2-z

anti-tumorigenic activity between these two complexes, the molecular mechanism underlying the cytotoxic effect of **I** and **II** on MCF-7 cells may be similar. Interesting, all free ligands were more active in MBA-MB-231 cells than in MCF-7 cells, but only phen was more effective than the cisplatin. However, we have shown that diketone complexes are selective (selectivity index > 3) and that phenanthroline and its derivatives are not selective or active for some cell lines [5,8]. As to the MCF-7 cells, the complexes reported here possess similar or higher

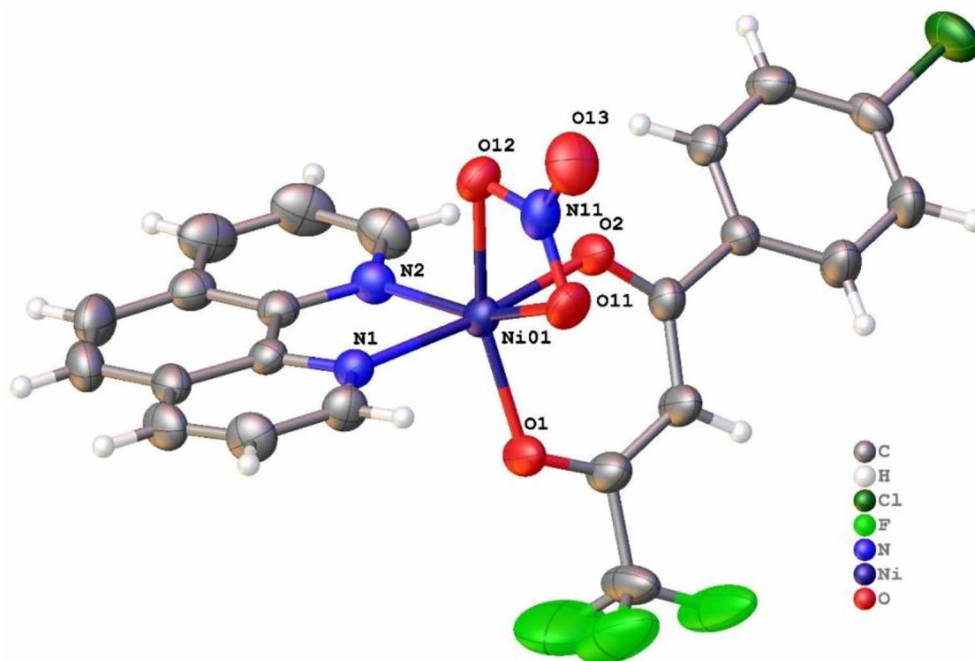


Fig. 3. Structural representation of complex **II** (ellipsoids with 50% probability level).

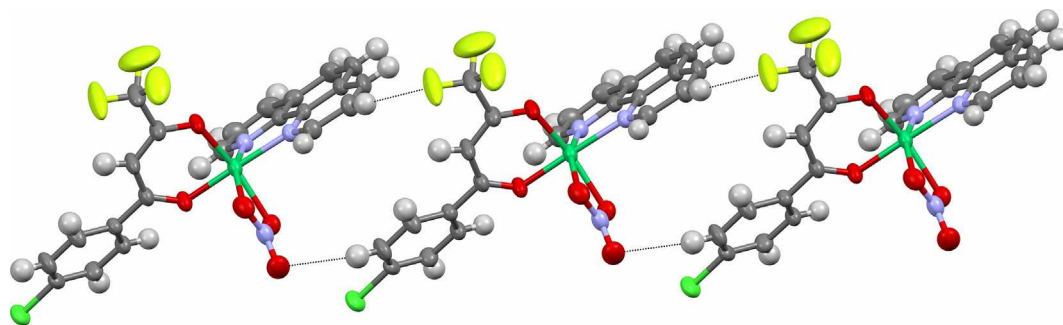


Fig. 4. View of an infinite 1-D chain motif of the complex II along the b axis.

Table 5
Antitumoral activity of nickel complexes and their ligands.

Compound	IC ₅₀ (MCF-7)	IC ₅₀ (MBA-MB-231)
I	29.94 ± 1.97	50.86 ± 0.99
II	22.33 ± 3.25	37.30 ± 1.97
III	61.71 ± 5.2	86.82 ± 2.3
Hbta	237.50 ± 3.63	161.00 ± 5.78
Hbtc	166.90 ± 6.2	51.35 ± 0.64
phen	49.78 ± 3.78	7.44 ± 2.55
cisplatin	48.78 ± 1.63	60.24 ± 2.54

IC₅₀: Concentration required for 50% inhibition of cell growth.

activity when compared to other nickel complexes already described [26–29].

3.2. DNA-binding

Several anticancer drugs exert their antitumor activity causing damage the DNA structure [30–32]. UV–Vis spectroscopy is often used to investigate the interaction between metal-based compounds and DNA [33,34]. According to the literature, changes in the spectral profile during the interaction between DNA and a metal complex can offer relevant information about the binding mode involved [33]. Metal complexes that bond through of intercalation exhibit hypochromic effect often accompanied by bathochromism (red shift) [35]. This type of interaction involves π - π^* stacking interaction between DNA base pair and an aromatic chromophore [35–37], while hyperchromism effect is attributed to groove binding mode, which may be the result of denaturation of the double helix structure and/or to electrostatic binding as a result from of interaction between cationic compounds and phosphate groups of DNA backbone [33].

The Fig. 5 shows electronic spectrum of the representative complex III (spectra of complexes I and II are shown in the Supplementary Material, S3 e S4, respectively). On increasing ct-DNA concentration, it was noticed a hypochromic effect on the intraligand charge transfer (ILCT) bands observed in the range of 334–350 nm for all nickel(II) complexes. Furthermore, the appearance of isosbestic points for complexes I and III (Table 6) suggests the presence of, at least, two species in equilibrium in the solution (free and DNA bound complex) [38,39]. The values of intrinsic binding constants (K_b) for all nickel complexes were obtained by means of double reciprocal Benesi-Hildebrand plot (Insert in Fig. 5) and are shown in Table 6.

The intrinsic binding constants values obtained for all nickel(II) complexes are lower than the binding constants values reported in the literature for metallointercalators and classical intercalators (ca. 10^7 M⁻¹) [33]. On the other hand, an interaction by means of groove binding and/or electrostatic forces with phosphate group of DNA structure cannot be ruled out since the complexes are cationic in solution. Similar binding constants (K_b) values (10^3 and 10^4 M⁻¹) were observed for copper(II) complexes containing similar ligands (10^4 M⁻¹) [40,41].

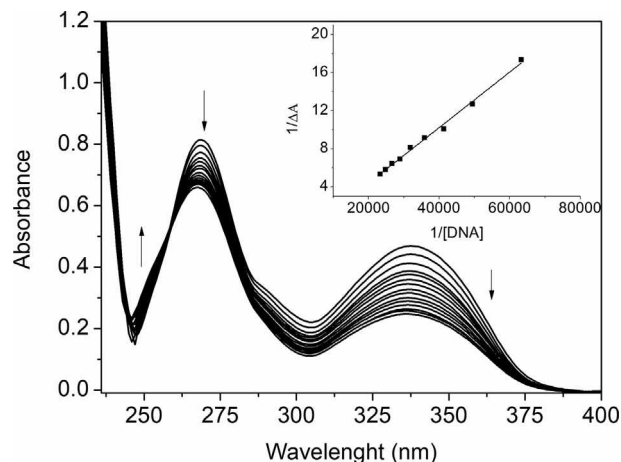


Fig. 5. UV spectra solutions containing complex III (3.0×10^{-5} M) and increasing concentration of ct-DNA in buffer solution (pH 7.2). Insert: $1/\Delta A$ versus $1/[DNA]$.

Table 6
DNA-binding constants K_b and isosbestic points of nickel(II) complexes.

Complexes	Isosbestic Points (nm)	K_b (M ⁻¹)	R*
I	257	6.05×10^3	0.9936
II	–	1.31×10^4	0.9450
III	259	4.94×10^3	0.9942

*Correlation coefficient.

DNA morphology changes induced by presence of drugs can be monitored with high sensitivity by means of circular dichroism (CD) technique [42]. CD spectra of DNA exhibit two bands studied (in 220–300 nm): a negative band at ~245 nm attributed to the right-handed helicity B form of DNA and a positive band at ~275 nm due to π - π^* base stacking [34,43,44]. An increase in the elliptical signal at positive and negative bands is indicative of the intercalation mode [45], whilst groove binding or electrostatic interaction is expected when little or no change is observed in CD spectra [34,46]. In the present case (Fig. 6) (CD spectra of I and II, S5 and S6 respectively, are available in the Supplementary Material), on increasing the concentration of nickel (II) complexes, few or no changes on CD spectral profile was detected, suggesting an electrostatic interaction and/or groove binding.

The fluorescence competition experiment with Hoechst 33,258 was also performed to investigate the binding mode between nickel complexes and ct-DNA [47,48]. Hoechst 33258 binds to the minor groove of DNA helix resulting in a significant increase of fluorescence intensity of DNA-Hoechst system [48]. The competition experiment with Hoechst 33258 and complex III, Fig. 7, showed that on increasing the concentration of nickel complex to Hoechst-DNA solution, the fluorescence of DNA-Hoechst complex is progressively quenched by complex III. The same behaviour was also noticed for compounds I and II (fluorescence

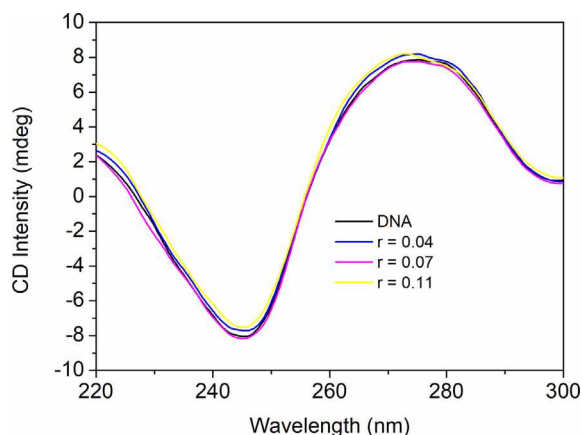


Fig. 6. CD spectra after addition of increasing of complex III (1.0×10^{-3} M, in acetonitrile) to ct-DNA (7.09×10^{-5} M) in Tris-HCl buffer 10×10^{-3} M/ NaCl 100×10^{-3} M, r = molar ratio concentrations [complex]/[DNA].

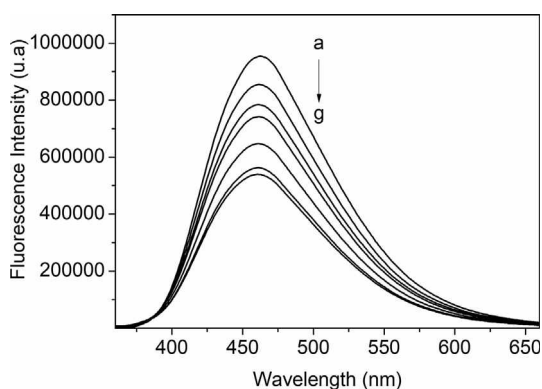


Fig. 7. Fluorescence spectra of the Hoechst-DNA systems in aqueous buffer in absence and presence of increasing amounts of complex III. $\lambda_{\text{ex}} = 338$ nm, [Hoechst] = 2.0×10^{-6} M, [DNA] = 20×10^{-6} M, [Complex] = $1.33\text{--}10,70 \times 10^{-6}$ M.

spectra of I and II are available in the supplementary material, S7 and S8 respectively). This finding suggests that the nickel complexes are capable of binding in the minor groove of DNA, displacing bound Hoechst 33258 from DNA structure. This behaviour is consistent with previously reported UV-visible absorption and circular dichroism results.

So far, one conclusion that can be drawn is that the cytotoxic activity of the nickel complexes correlates with the DNA binding affinities, where more strongly binding complexes exhibit higher cytotoxicity.

4. Computational analysis of complexes I-III

The molecular docking followed by semiempirical simulations of the ct-DNA/complexes I-III was carrying out to explore energy and geometry of interaction. The ΔH_{int} results are shown in Table 7. The energy of interaction corroborates with IC_{50} results, both shows

Table 7
Semiempirical calculations of the ct-DNA/compound I to III binary.

Compound	ΔH_{int} (kcal mol $^{-1}$)
I	24
II	17
III	36

compound II more active against ct-DNA, but with low energy of interaction.

The compounds I-III successfully bounded to a minor groove of ct-DNA in an A-T rich region as show in Fig. 8A, corroborating with other authors [49]. The geometry of interactions is stabilized by hydrophobic interactions in minor groove of ct-DNA region (Fig. 8B). There was no hydrogen bond formation by any compound. Introducing a chlorine substituent on the aromatic ring of the compound II improved interaction with ct-DNA and seems to have a more favorable interaction geometry compared to other (Fig. 8B). The docking and semiempirical studies were not able to predict the electrostatic interaction, but this interaction cannot be ruled out, since similar groove interaction mechanisms have been reported elsewhere [50,51].

5. Cleavage of plasmid DNA by complex II

The electrophoresis of plasmid DNA in agarose gel generates three distinct band patterns, in which is found 3 different plasmid forms (Fig. 9B): Form I (Supercoiled) - Plasmids are generally represented as an extended circle, but, in fact, intact plasmids hold its DNA strand in a supercoiled way. This compact molecular form makes the supercoiled plasmid the fastest form of gel migration in most electrophoresis conditions. Therefore, it is assumed that the fastest migration band of the uncut plasmid corresponds to the supercoiled form. Form II (single break, nicked or relaxed circle) - Physical breaks, enzymatic cuts that occur during plasmid isolation or treatment with compounds that interact with DNA introduce breaks into one of the supercoiled DNA strands, giving rise to the open circular structure or nicked plasmids. This relaxed circle is the form of the slowest migrating plasmid. Form III (double break or linear form) - Linear DNA is produced when a restriction enzyme cuts the plasmid at a single recognition site, or when damage results in breaks in double strands directly opposite each other on the DNA helix. Under most gel conditions, linear plasmid DNA migrates at an intermediate rate between the supercoiled and circular form.

Treatments of plasmid with different concentrations of complex II showed the ability of this compound to cleave DNA (Fig. 9A and B). However, only in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) the complex was able to induce cuts in DNA double helix, producing linear plasmids (plasmid form III), as observed into control treated with the restriction enzyme *NheI*. It is also observed in agarose gel that the presence of H_2O_2 enhanced the bands emergence of Forms II (single strand cuts) and III (double strand cuts), being that all bands diverged statistically from control treated only with H_2O_2 . It was also observed that DMSO, a reactive oxygen species scavenger, was able to reduce the amount of DNA breaks in the used concentrations.

We demonstrated in the experiments with UV-Vis spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, fluorescence spectroscopy and molecular docking that these complexes are able to bind to DNA minor groove. In these biological experiments of interaction with DNA we showed that complex II is able to induce DNA cleavage in both ways, single and double breaks. However, the complex alone is less effective in cleaving DNA than when it is associated with H_2O_2 . In this way, we propose that complex II binds to minor groove of DNA and triggers breaks through a redox mechanism as reported by several authors [52-58].

Kong *et al.* used different reaction conditions to investigate the influence of redox cofactors in DNA-damaging potential of the nickel complexes and concluded that most complexes needed an external agent to induce breaks [54]. Ali *et al.* also observed that Ni^{II} complexes can degrade pBR322 plasmid through oxidative cleavage in the presence of H_2O_2 inducing formation of hydroxyl radical species. The authors also observed that the addition of hydroxyl radical scavenger, like DMSO, completely inhibits DNA cleavage activity of the studied complexes [52]. According to these authors, Fenton-type or Haber-Weiss-type reactions can explain how this oxidative break occurs. Thus,

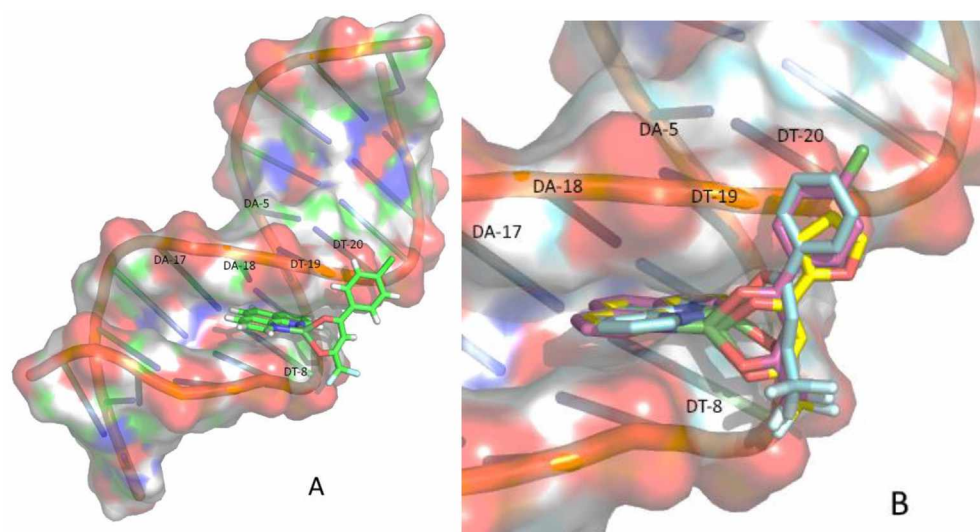


Fig. 8. Molecular docking followed by semiempirical simulations of the complexes I-III/ct-DNA. Compounds are interacting with the dodecamer duplex sequence d(CGCGAATTCGCG)2 (PDB ID: 1BNA) of ct-DNA. A) represents the docked pose of Complex II (sticks) bounded in the minor groove of ct-DNA (cartoon and surface) in an A-T rich region. B) shows a close-up of complexes I (cyan), II (pink) and III (yellow) in the minor groove of ct-DNA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

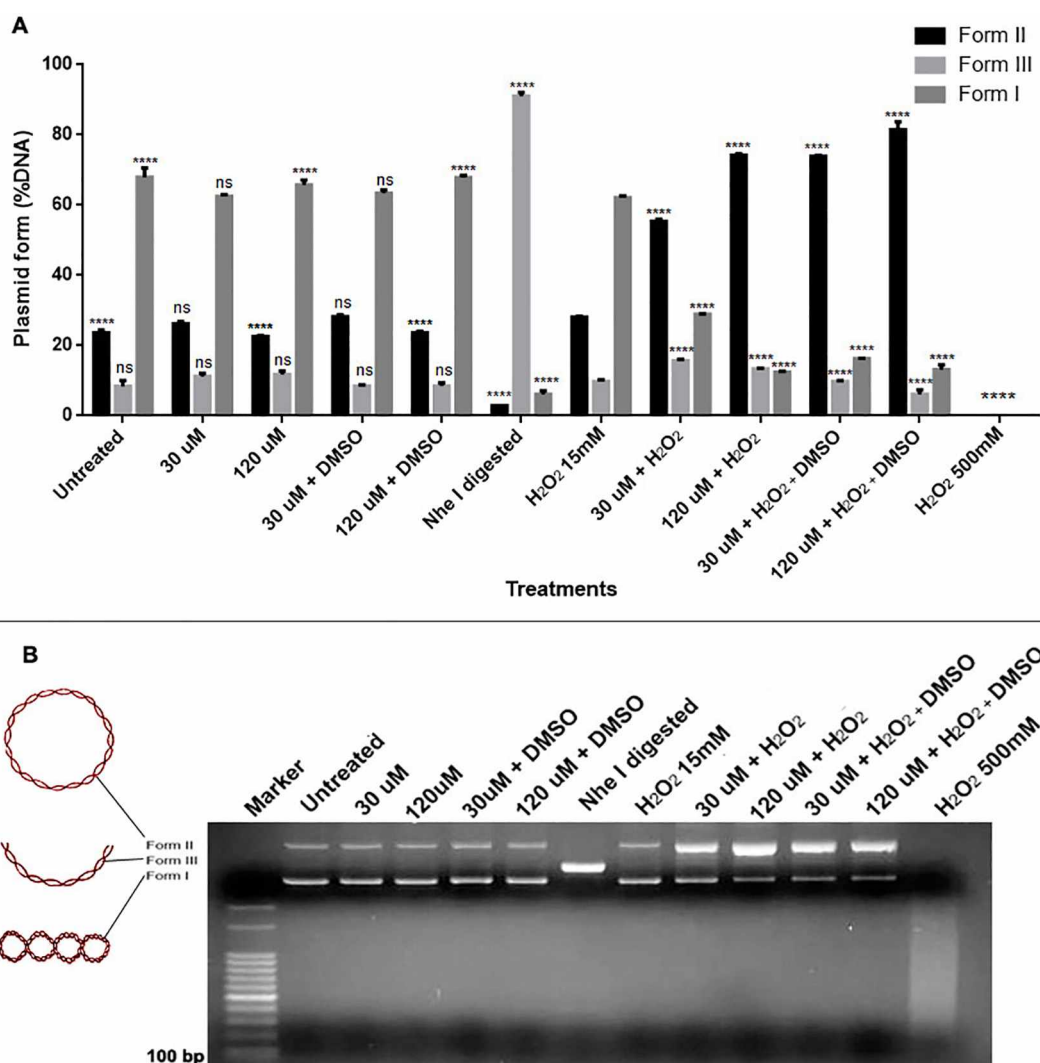


Fig. 9. Representative cleavage of siSTRIKE™ plasmid by complex II. A) Densitometric quantitative results of the agarose gel electrophoresis. Data are expressed as mean \pm standard deviation of experiments performed in triplicate. Significant differences were determined using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ (compared to the control H₂O₂ 15 mM treatment). ***** $p < 0.0001$. ns Not significant. B) Gel electrophoresis results, showing an increasing in plasmid form II and III induced by co-treatment with complex II and H₂O₂.

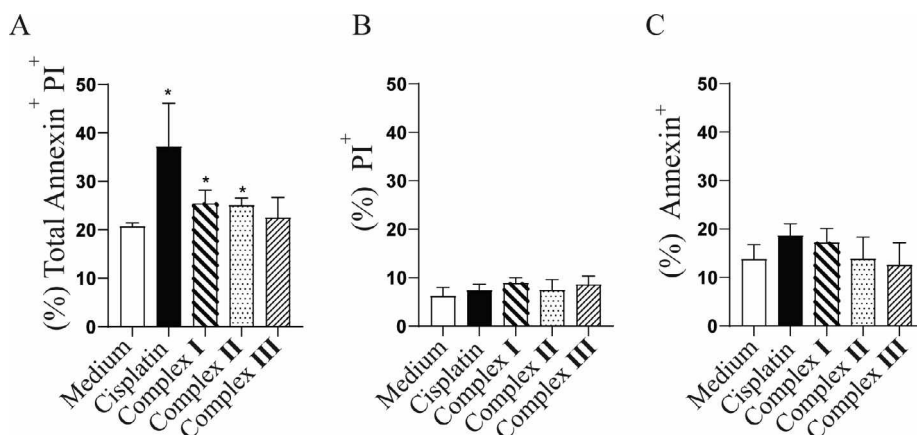


Fig. 10. Nickel complexes lead to later apoptosis in breast cancer cells. A) Treatment of MCF-7 cells with complex I and II leads to later apoptosis. B) but no have effects on necrosis or C) early apoptosis. Results are presented as the mean of triplicated experiments. Student's *t*-test and nonparametric data were compared with the Mann-Whitney *U* test. Significant differences compared to the medium are denoted **p* < 0.05.

initially nickel ion is oxidized by H_2O_2 to yield hydroxyl radical, and in a second step the formed Ni^{3+} is reduced back. Hydroxyl radicals are responsible for DNA strand breakage. The following equations can explain how nickel complexes induce radical formation:

$$H_2O_2 + \text{complex-Ni}^{2+} \rightarrow \text{complex-Ni}^{3+} + OH^- + \cdot OH \text{ Fenton-type reaction}$$

$$H_2O_2 + \text{complex-Ni}^{3+} \rightarrow \text{complex-Ni}^{2+} + 2H^+ + \cdot O_2^-$$

Bedier *et al.* also studied the interaction of Fe^{III} , Ni^{II} , Zn^{II} and Hg^{II} complexes of benzyl α -monoxime pyridyl thiosemicarbazone complex with DNA. They treated DNA isolated from calf thymus with the complexes and performed gel electrophoresis analyses. It was observed that Ni^{II} complex exhibited the most powerful and complete degradation effect on DNA and that breakage mechanism was dependent of H_2O_2 presence [53].

6. Nickel complexes induce late apoptosis

Since nickel complexes showed high tumorigenic activity against the MCF-7 cell line, they were selected for further studies to elucidate the mechanism by which they induce cell death. In a simple approach, the detection of the externalization of phosphatidylserine was performed using the Annexin V/ propidium iodide (PI) staining (Fig. 10) by flow cytometry. In accordance with antitumorigenic activity (Table 6), complex III was not a good inducer of necrosis or apoptosis and has a low cytotoxic activity as compared with other two complexes. On the other hand, complexes I and II induced a late apoptosis similar to cisplatin (Fig. 10A), this phenomenon can be explained by the possibility of these complexes interacted with DNA (Fig. 9). Likewise, Polloni *et al.* showed that similar Cu^{II} complexes also induced late apoptosis in sarcoma 180 cells [8]. In 48 h, was not observed necrosis (Fig. 10B) or early apoptosis (Fig. 10C) by Ni^{II} complexes.

7. Conclusions

In summary, we have successfully prepared the first nickel complexes containing β -diketones and 1,10-phenanthroline that were shown to be effective against two breast cancer cell lines, namely, MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The structures of these complexes were proposed using spectroscopic techniques, high resolution mass spectrometry, EPR, magnetism, and X-ray diffraction. While complexes II and III exhibit a distorted octahedral structure, as attested by the X-ray in the case of complex II, or by EPR and magnetic measurements, complex I showed a tetrahedral geometry in solution. Despite their different structural features, all these complexes are able to bind to DNA minor groove as well as to induce later apoptosis (complexes I and II). According to our results, complexes I and II here described present a great potential as anticancer agents and should instigate additional *in vivo* studies.

8. Author statement

Luana Munique Sousa, Wesley de Almeida Souza, Jackson Antônio Lamounier Camargos Resende and Drielly Aparecida Paixão: These authors prepared and characterized all nickel complexes. Rodrigo Bozzi Fazzi and Ana Maria da Costa Ferreira: These authors carried out EPR and magnetism measurements. Daiane Yukie Tezuka, Carla Duque Lopes, Zumira Aparecida Carneiro and Sérgio de Albuquerque conducted experiments on apoptosis and cytotoxicity. Francis Barbosa Ferreira and Ronaldo José De Oliveira performed theoretical studies. Ricardo Campos Lino and Robson José de Oliveira Júnior conducted studies on DNA cleavage.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) by financial support and fellowships. We thank Dr. Guilherme P. Guedes and LDRX-UFF for the collection of the crystallographic data. Computational resources were provided by GridUNESP and CENAPAD-SP. J.A.L.C.R thanks CNPq for grants number 311142/2017-6.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>.

References

- [1] J. Kljun, I. Turel, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) 1655–1666.
- [2] J.J. Wilson, S.J. Lippard, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5326–5336.
- [3] 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.
- [4] R. Pettinari, F. Marchetti, C. Di Nicola, C. Pettinari, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2018) 3521–3536.
- [5] D.A. Paixão, B.C.A. de Oliveira, J. do Couto Almeida, L.M. Sousa, C.D. Lopes, Z.A. Carneiro, D.Y. Tezuka, J.C.T. Clavijo, J. Ellena, L. Polloni, P.H.A. Machado, S. de Albuquerque, R.J. de Oliveira Júnior, S. Guillard, W. Guerra, *Inorg. Chim. Acta* 449 (2020) 119164.
- [6] 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.

- [7] 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. Guilardi, W. Guerra, *Polyhedron* 89 (2015) 1–8.
- [8] 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.
- [9] T.V. Deepthi, P. Venugopalan, *Inorg. Chim. Acta* 450 (2016) 243–250.
- [10] U. Ndagi, N. Mhlongo, M.E. Soliman, *Drug Des. Devel. Ther.* 11 (2017) 599–616.
- [11] C. Balachandran, J. Haribabub, K. Jeyalakshmi, N.S.P. Bhuvanesh, R. Karvembu, N. Emia, S. Awal, *J. Inorg. Biochem.* 182 (2018) 208–221.
- [12] Jing-Mei Yang, S. Yan-Hong Zhu, X.Lu. Chen, Wu. Yi-Ming, Feng-E Ma, Y. Liang-Ping Li, Zhen-Hao Shi Yang, X. Kun-Yuan Huang, P. Hong, Y. Peng Jiang, *Med. Chem. Commun.* 9 (2018) 100–107.
- [13] P. Kalaivani, S. Saranya, P. Poornima, R. Prabhakaran, F. Dallemer, V. Vijaya Padma, K. Natarajan, *Eur. J. Med. Chem.* 82 (2014) 584–599.
- [14] Bruker, APEX3, SAINT and SADABS. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2016.
- [15] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8.
- [16] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [17] Stewart Computational Chemistry - MOPAC Home Page [Internet]. [cited 15 Sep 2017]. Available: <http://openmopac.net/>.
- [18] J.J.P. Stewart, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 1–32.
- [19] A.C.R. Gonçalves, Z.A. Carneiro, C.G. Oliveira, A. Danuello, W. Guerra, R.J. Oliveira, F. Ferreira, L. Veloso-Silva, Laudimir, A.H. Fernanda, J.C. de Borges, S. Albuquerque, V.M. Deflon, P.I.S. Maia, *Eur. J. Med. Chem.* 141 (2017) 615–631.
- [20] Z. Chen, Y. Wu, F. Huang, D. Gu, F. Gan, *Spectrochim. Acta Part A* 66 (2007) 1024.
- [21] S.S. Massoud, L.L. Quan, K. Gatterer, J.H. Albering, R.C. Fischer, F.A. Mautner, *Polyhedron* 31 (2012) 601–606.
- [22] P.J. Desrochers, R.W. Cutts, P.K. Rice, M.L. Golden, J.B. Graham, T.M. Barclay, A.W. Cordes, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 5690.
- [23] J.-J. Girerd, I. Journaux, *Molecular magnetism in bioinorganic chemistry*, in: L. Que (Ed.), *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism*, University Science Books, 2010, chap. 7, pp. 321–374.
- [24] A.S. Levenson, V. Craig Jordan, *Cancer Res.* 57 (1997) 3071–3078.
- [25] M. Dean, T. Fojo, S. Bates, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 275–284.
- [26] J. Devi, M. Yadav, D.K. Jindal, D. Kumar, Y. Poornachandra, *Appl Organometal. Chem.* 33 (2019) 5154.
- [27] M. Anjomshoa, M. Torkzadeh-Mahani, M. Sahihi, C. Rizzoli, M. Ansari, J. Janczak, S.S. Esfahani, F. Ataei, M. Dehkhodaie, B. Amirheidar, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 37 (2019) 3887–3904.
- [28] K. Kumar, A.K. Dhara, V.K. Chaudhary, N. Sandip, P. Roy, Pankaj Verma, K. Ghosh, *Inorg. Chim. Acta* 495 (2019) 118993.
- [29] P. Sukanya, C.V.R. Reddy, *Appl Organometal. Chem.* 32 (2018) 4526.
- [30] V. Brabec, O. Hrabina, J. Kasparkova, *Coord. Chem. Rev.* 351 (2017) 2–31.
- [31] E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2011.
- [32] D. Woods, J.J. Turchi, *Cancer Biol. Ther.* 14 (2013) 379–389.
- [33] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photochem. Photobiol. B* 124 (2013) 1–19.
- [34] S.U. Rehman, T. Sarwar, M.A. Husain, H.M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* 576 (2015) 49–60.
- [35] G. Li, R. Guan, L. Ji, H. Chao, *Coord. Chem. Rev.* 281 (2014) 100–113.
- [36] Z. Kazemi, H.A. Rudbari, V. Mirkhani, M. Sahihi, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, I. Mohammadpoor-Baltork, *J. Mol. Struct.* 1096 (2015) 110–120.
- [37] C.V. Barra, F.V. Rocha, L. Morel, A. Gautier, S.S. Garrido, A.E. Mauro, R.C.G. Frem, A.V.G. Netto, *Inorg. Chem. Acta* 446 (2016) 54–60.
- [38] E. Gao, M. Zhu, L. Liu, Y. Huang, L. Wang, C. Shi, W. Zhang, Y. Sun, *Inorg. Chem* 49 (2010) 3261–3270.
- [39] S. Zehra, S. Tabassum, H.A. Al-Lohedan, F. Arjmand, *Inorg. Chem. Commun* 93 (2018) 69–72.
- [40] D.A. Paixão, I.M. Marzano, E.H.L. Jaimes, M. Pivatto, D.L. Campos, F.R. Pavan, V.M. Deflon, P.I.S. Maia, A.M.C. Ferreira, I.A. Uehara, M.J.B. Silva, F.V. Botelho, E.C. Pereira-Maia, S. Guilardi, W. Guerra, *J. Inorg. Biochem.* 172 (2017) 138–146.
- [41] D.A. Paixão, C.D. Lopes, Z.A. Carneiro, L.M. Sousa, L.P. de Oliveira, N.P. Lopes, M. Pivatto, J.D.S. Chaves, M.V. de Almeida, J. Ellena, M.B. Moreira, A.V.G. Netto, R.J. de Oliveira, S. Guilardi, S. Albuquerque, W. Guerra, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 157–166.
- [42] Y. Chang, C.K. Chen, M. Hou, *Int. J. Mol. Sci* 13 (2012) 3394–3413.
- [43] A. Rodger, B. Nordén, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [44] V.C. da Silveira, H. Benezra, J.S. Luz, R.C. Georg, C.C. Oliveira, A.M.C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1692–1703.
- [45] A. Kellet, Z. Molply, C. Slator, V. Mckee, N.P. Farrell, *Chem. Soc. Rev.* 48 (2019) 971–988.
- [46] T. Zhao, S. Bi, Y. Wang, T. Wang, B. Pang, T. Gu, *Spectrochim. Acta, Part A* 132 (2014) 198–204.
- [47] J. Ruiz, C. Vicente, C. Haro, D. Bautista, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 974–982.
- [48] S.U. Rehman, Z. Yassn, M.A. Husain, T. Sarwar, H.M. Ishqi, M. Tabish, *Plos One* 9 (2014) 1–11.
- [49] Y. Thakur, R. Agrawal, M. Tripathi, M.K. Siddigia, E. Mohapatra, R.H. Khan, R.J. Pand, *Mol. Struct.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.099>.
- [50] A. Mukherjee, B. Singh, *J. Luminescence* 190 (2017) 319–327.
- [51] E.J. Gao, Y.H. Feng, J.K. Su, B. Meng, B. Jia, Z.Z. Qi, T.T. Peng, M.C. Zhu, *Appl. Organometal. Chem.* 32 (2018) e4164.
- [52] A.Q. Ali, S.G. Teoh, N.E. Eltayeb, M.B.K. Ahamed, A.A. Majid, *J. Coord. Chem.* 67 (2014) 3380–3400.
- [53] R.A. Bedier, T.A. Yousef, G.M. Abu El-Reash, O.A. El-Gammal, *J. Mol. Struct.* 1139 (2017) 436–446.
- [54] De-Ming Kong, J. Wang, Li-Na Zhu, Ya-Wei Jin, Xiao-Zeng Li, Han-Xi Shen, Huai-Feng Mi, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 824–832.
- [55] Grant A. McLachlan, James G. Muller, Steven E. Rokita, Cynthia J. Burrows, *Inorg. Chim. Acta* 251 (1996) 193–199.
- [56] P.R. Reddy, K.S. Rao, *Chem. Biodiver.* 3 (2006) 231–244.
- [57] D.S. Sigman, *Acc. Chem. Res.* 19 (1986) 180–186.
- [58] Q. Yu-Min Song, Wu, Pei-Ju Yang, Ni-Na Luan, Liu-Fang Wang, Ying-Mei Liu, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1685–1691.