Amandha Kaiser da Silva

**Complexos Heterolépticos de Ouro(III) como Potenciais Antitumorais e
*Anti-Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos como parte dos
requisitos para a obtenção do título de mestre
em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon.

São Carlos-SP

2015

“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito”.

(Romanos 8: 28)

“Dedico este trabalho em especial aos meus pais Juarez Severino da Silva e Nádia Cristina Kaiser da Silva e ao meu irmão Allan Victor Kaiser da Silva que em todos os momentos de minha vida têm me apoiado e incentivado com todo amor e carinho. Dedico-lhe essa conquista com muita gratidão.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que tem me abençoado e protegido durante toda a minha caminhada, com todo Seu amor e misericórdia;

Aos meus pais Juarez e Nádia e ao meu irmão Allan Victor por estarem sempre presentes na minha vida fornecendo toda estrutura necessária através de confiança e amor para que me tornasse a pessoa que sou hoje;

Aos familiares que em todos os momentos têm me apoiado e intercedido junto a Deus pela minha felicidade;

Ao Professor Dr. Victor Marcelo Deflon pela sua confiança, compreensão e orientação o qual me proporcionou crescimento profissional e pessoal;

Ao Professor Dr. Pedro Ivo da Silva Maia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo auxílio nas sínteses e apoio dado durante todo este período;

Ao Professor Dr. Alzir Azevedo Batista da Universidade Federal de São Carlos e aos membros do laboratório LERCI, em especial às alunas de doutorado Kátia Mara de Oliveira e Legna Andreina Colina Vegas, pelo apoio na realização dos experimentos com DNA-ct e HSA;

Ao Professor Dr. Fernando Rogério Pavan e aluna de doutorado Érica de Oliveira Lopes, da Faculdade de Ciências Farmacêutica na Universidade Estadual de São Paulo – Araraquara - SP, pela realização dos experimentos de citotoxicidade;

À Doutora Zumira Aparecida Carneiro e o Professor Dr. João Santana da Silva, da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto - SP, pela realização dos ensaios biológicos anti-*Trypanosoma cruzi*;

Aos membros da banca, pelas contribuições dadas a esse trabalho;

Aos atuais e antigos membros do GQIEB (Pedro, Mônica, Murilo, Vanessa, Viviana, Carolina, Rafaela, Henrique, Rommel, Zumira e Gabriela) pela amizade, auxílio no aprendizado e, principalmente, por terem sido minha segunda família. Obrigada pelo carinho de vocês.

Aos amigos Bruna Aranha, Brendha Kaiser, Wellington Douglas Gonçalves, Monize Martins, Larissa Macedo, André Malmegrim, Rodrigo Garcia, Isac Rosset, Manoel Camilo Cabrera, Prof. Dr. Eduardo Arruda, Carla Suzana Marinho, Nelson Alves Júnior, Jean Lucas Oliveira, Brás Nobre e aos pastores André Luis Corbanezi e Maria Aparecida Corbanezi por terem vivenciado comigo cada passo desta caminhada, me dando todo apoio que necessitava

nos momentos difíceis, todo carinho, respeito e confiança na minha pessoa. Obrigada por tornar cada dia mais feliz através da amizade e companheirismo;

Aos secretários da pós-graduação, Silvia, Andreia e Gustavo, pela atenção e eficiência;

Ao Instituto de Química de São Carlos/USP, pelo apoio institucional;

À FAPESP pelo auxílio dado ao GQIEB durante a execução do projeto;

À CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese de complexos de ouro(III) com ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila-morfolinil-tiossemicarbazona e co-ligante L variando entre Cl^- , CN^- , SCN^- , $\text{C}_3\text{H}_5\text{OS}_2^-$ e $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$. Para a caracterização destes complexos foram envolvidas diversas técnicas, como espectroscopia na região do infravermelho e do UV-Vis, ponto de fusão, condutividade, espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas ESI(+)-MS e análise elementar (C,H,N). O estudo consiste na avaliação da influência do ligante L frente a atividade antitumoral e anti-*Trypanossoma cruzi*, assim como na avaliação de sua influência em interações com possíveis alvos biológicos (DNA e albumina). Nos experimentos biológicos foi verificada a potencial atividade antitumoral destes complexos em células HepG2, HeLa, DU-145 e MDA-MB-231, dando destaque aos resultados obtidos para os complexos do tipo $[\text{AuCl}(\text{dmstc})]$ ($\text{IC}_{50} = 8,05 \mu\text{molL}^{-1}$) e $[\text{Au}(\text{xant})(\text{dmstc})]$ ($\text{IC}_{50} = 28,5 \mu\text{molL}^{-1}$) frente à célula MDA-MB-231, ao complexo $[\text{AuCl}(\text{dmstc})]$ ($\text{IC}_{50} = 8,37 \mu\text{molL}^{-1}$) frente à célula DU-145 e ao complexo $[\text{AuSCN}(\text{dmstc})]$ o qual apresentou resultados promissores para todas as linhagens celulares tumorais avaliadas. Os ensaios *in vitro* contra cepas Tulahuen LacZ de *Trypanossoma cruzi* apresentaram resultados promissores, demonstrando uma elevada atividade contra o parasita e citotoxicidade geral negligenciável frente à células de baço de camundongo Swiss para todos os complexos avaliados, com exceção do complexo $[\text{Au}(\text{xant})(\text{dmstc})]$. Através do estudo de interação destes complexos com DNA-ct e albumina humana (HSA), é possível descartar o DNA como principal alvo biológico responsável pelas atividades observadas e sugerir uma adequada distribuição *in vivo* por meio da HSA.

ABSTRACT

This work describes the synthesis of gold(III) complexes with the ligand (diethylaminocarbonyl)benzimidoyl-morpholiny l thiosemicarbazone and the co-ligand L varying between Cl^- , CN^- , SCN^- , $\text{C}_3\text{H}_5\text{OS}^{2-}$ and $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$. The complexes characterization involved various techniques such as melting point, conductivity, infrared, UV-Vis, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopies, ESI(+)-MS mass spectrometry and elemental analysis (C, H, N). The study consists on the evaluation of the influence of the ligand L front anti-tumor and anti-*Trypanosoma cruzi* activities, as well as in assessing their influence on interactions with possible biological targets (DNA and albumin). The biological experiments showed potential antitumor activity for the complexes against HepG2, HeLa, DU-145 and MDA-MB-231 cells, especially the results obtained for the complexes of the type $[\text{AuCl}(\text{dmstc})]$ ($\text{IC}_{50} = 8,05 \mu\text{molL}^{-1}$) and $[\text{Au}(\text{xant})(\text{dmstc})]$ ($\text{IC}_{50} = 28,5 \mu\text{molL}^{-1}$) against the MDA-MB-231 cell, the complex $[\text{AuCl}(\text{dmstc})]$ ($\text{IC}_{50} = 8,37 \mu\text{molL}^{-1}$) against the DU-145 cell, and the complex $[\text{AuSCN}(\text{dmstc})]$ which showed promising results for all tumor cells lines evaluated. *In vitro* assays against LacZ Tulahuen *Trypanosoma cruzi* presented promising results, showing high activity against the parasite with negligible general cytotoxicity against the Swiss mouse spleen cells in all evaluating complexes, except for complex $[\text{Au}(\text{xant})(\text{dmstc})]$. Through the studies of interaction of the complexes with DNA-ct and human albumin (HSA) can discard the DNA as the primary biological target responsible for the observed activities and suggest a proper distribution *in vivo* through the HSA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1 - Compostos de platina utilizados para o tratamento de câncer.	3
Figura 1.2.2 - Captação celular da cisplatina por difusão passiva e através do transportador de cobre Ctr1.	4
Figura 1.2.3 – Ativação intracelular da cisplatina.	5
Figura 1.2.4 – Comportamento fisiológico da cisplatina <i>in vivo</i> . Reação aquosa seguida pela ligação no N7 da guanina.	6
Figura 1.2.5 - Principais adutos bifuncionais DNA-cisplatina: (a) ligação cruzada interfitas; (b) ligação cruzada 1,2-intrafita; (c) ligação cruzada 1,3-intrafita e (d) ligação cruzada com DNA e proteína.....	6
Figura 1.2.6 - Estruturas de adutos cisplatina-DNA: (a) 1,2-intrafita; (b) 1,3-intrafita e (c) ligação cruzada interfita.....	7
Figura 1.2.7 – Representação esquemática da entrada da cisplatina na célula e dos principais mecanismos de resistência tumoral.	8
Figura 1.2.8 – Compostos com atividade antitumoral com metais gálio (KP46) e rutênio (NAMI-A).....	9
Figura 1.3.1 - Auranofina [®] , (2,3,4,6,-tetra-O-acetil-1-tiol-β-D-glucopiranosato) (trietilfosfina)ouro(I).....	10
Figura 1.3.2 - Compostos usados no tratamento da artrite reumatoide.	10
Figura 1.3.3 – Complexos de ouro(III) utilizados em estudos contra o câncer <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	12
Figura 1.3.4 – Modelo que descreve o mecanismo de ação de indução de morte celular por compostos de ouro(I/III).....	13
Figura 1.3.5 – Complexo dicloro[2-(dimetilaminometil)fenil-C', N]ouro(III).	14
Figura 1.4.1 - Estrutura química das tiossemicarbazonas.....	15
Figura 1.4.2- Estrutura química geral das tiossemicarbazonas piridina carboxaldeído (PCT). 15	
Figura 1.4.3– Estruturas dos primeiros complexos de ouro(III) com ligante tiossemicarbazonas.	16
Figura 1.4.4 – Estrutura química geral dos complexos de ouro(III) com ligantes tiossemicarbazonas.	17
Figura 1.5.1– Números estimados de pessoas infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> morando em países não endêmicos.....	18

Figura 1.5.2– Triatomíneo (Barbeiro): inseto vetor do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 1.5.3– Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 1.5.1.1 - Estruturas químicas dos compostos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.....	22
Figura 1.5.1.2 - Ligantes clotrimazol (CTZ) e cetoconazol (KTZ) e complexo $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ com propriedades tripanocida.....	24
Figura 1.5.1.3 - Exemplos de complexos de platina(II) ativos contra o <i>Trypanosomas</i>	24
Figura 1.5.1.4 - Estrutura s de tiossemicarbazonas ativas contra o <i>T. cruzi</i>	25
Figura 1.6.1 - Estrutura química geral dos complexos de ouro(III) com R_1 e R_2 variando: CH_3 , fenil, morfolinil, $(\text{CH}_2)_4$ e <i>n</i> -propil; e, o grupo L variando: Cl^- , CN^- e SCN^-	25
Figura 1.6.2 - Estrutura química do ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofila–morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc).	26
Figura 1.6.3 – Valores de IC_{50} do ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofila–morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) livre e complexado ao ouro(III) contra células de câncer de mama humano não invasivo MCF-7.	27
Figura 2.1 - Complexos de ouro onde L: Cl^- , CN^- , SCN^- , $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$ e $\text{C}_3\text{H}_5\text{OS}_2^-$	28
Figura 4.1.1 – Representação esquemática para a síntese dos complexos de ouro.....	43
Figura 4.2.2.1 - Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofila-morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) em pastilha de KBr.....	46
Figura 4.2.2.2- Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (2) em pastilha de KBr.....	47
Figura 4.2.2.3- Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (3) em pastilha de KBr.....	48
Figura 4.2.2.4- Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (4) em pastilha de KBr.....	48
Figura 4.2.3.1- Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (1) em CH_2Cl_2 . Absorbância <i>versus</i> comprimento de onda (nm).....	50
Figura 4.2.3.2- Espectro de absorção na região do UV-vís dos complexos $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (5) em CH_2Cl_2 . Absorbância <i>versus</i> comprimento de onda (nm).....	50
Figura 4.2.4.1 - Espectro de ^1H RMN do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofila-morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) em CDCl_3 ($\delta = \text{ppm}$).....	51

Figura 4.2.4.2 - Estrutura molecular do agente complexante H ₂ dm ₂ sc.	52
Figura 4.2.4.3 - Espectro de ¹ H RMN do complexo [Au ^{III} Cl(dm ₂ sc)] (1) em CDCl ₃ (δ = ppm).	53
Figura 4.2.4.4 - Espectro de ¹ H RMN do complexo [Au ^{III} (xant)(dm ₂ sc)] (4) em CDCl ₃ (δ = ppm).	55
Figura 4.2.4.5 - Espectro de ¹³ C RMN do complexo [Au ^{III} (xant)(dm ₂ sc)] (4) em CDCl ₃ (δ = ppm).	56
Figura 4.2.4.6 - Espectro de ¹ H RMN do complexo [Au ^{III} (damp)(dm ₂ sc)] (5) em CDCl ₃ . (δ = ppm).	57
Figura 4.2.4.7 - Espectro de ¹³ C RMN do complexo [Au ^{III} (damp)(dm ₂ sc)] (5) em CDCl ₃ . (δ = ppm).	58
Figura 4.2.5.1 – Estrutura proposta para o composto <i>N</i> -(hexametileno)- <i>N</i> '-1-(5-dietilamina-3-fenil-1,2,4-traizolil)tioréia.	59
Figura 4.2.5.2 - Espectro de massa ESI ⁺ MS do complexo [Au ^{III} xant(dm ₂ sc)] (4) (δ = ppm). ..	60
Figura 4.2.5.3 - Espectro de massa ESI ⁺ MS do complexo [Au ^{III} damp(dm ₂ sc)] (5) (δ = ppm).	60
Figura 4.3.3.1 – Gráfico referente <i>r/C_L versus r</i> pela Equação de Scatchard.	68
Figura 4.3.3.2 - Forma de interação entre complexos metálicos e DNA sem o estabelecimento de ligações covalentes: Interação por intercalação.	70
Figura 4.3.3.3 - Espectros de titulações espectroscópicas dos complexos com DNA-ct. (1) [Au ^{III} Cl(dm ₂ sc)], (2) [Au ^{III} CN(dm ₂ sc)], (3) [Au ^{III} SCN(dm ₂ sc)], (4) [Au ^{III} (xant)(dm ₂ sc)] e (5) [Au ^{III} (damp)(dm ₂ sc)] nas concentrações 1.10 ⁻³ molL ⁻¹ , [DNA] = 6.10 ⁻³ molL ⁻¹ em pH = 7,1. ..	71
Figura 4.3.4.1 – Estrutura nativa da albumina de soro humano (HSA).	74
Figura 4.3.4.2 - Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo 1, com λ _{exc} = 280 nm e λ _{em} = 330 nm em diferente temperaturas (295, 300, 305 e 310 K).	76
Figura 4.3.4.3 – Espectros de emissão da HSA em concentrações crescentes dos compostos. (1) [Au ^{III} Cl(dm ₂ sc)], (2) [Au ^{III} CN(dm ₂ sc)], (3) [Au ^{III} SCN(dm ₂ sc)], (4) [Au ^{III} (xant)(dm ₂ sc)], (5) [Au ^{III} (damp)(dm ₂ sc)] e H ₂ dm ₂ sc. [HSA] = 2,6 μmolL ⁻¹ , λ _{ex} 280 nm, pH = 7,4 e T = 310 K.	77
Figura 4.3.4.4 – Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] versus log[composto] do complexo 1 obtido para λ _{exc} = 280 nm e λ _{em} = 330 nm em diferente temperaturas (295, 300, 305 e 310 K).	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.5.1 - Reação de síntese do ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila– morfolinil-tiossemicarbazona (H ₂ dm ₂ sc).....	32
Esquema 3.6.1- Reação da síntese do complexo [Au ^{III} Cl(dm ₂ sc)].....	33
Esquema 3.6.2 - Reação da síntese do complexo [Au ^{III} CN(dm ₂ sc)].	34
Esquema 3.6.3 - Reação da síntese do complexo [Au ^{III} SCN(dm ₂ sc)].	35
Esquema 3.6.4 - Reação da síntese do complexo [Au ^{III} (xant)(dm ₂ sc)].	36
Esquema 3.6.5 – Reação da síntese do complexo [Au ^{III} (xant)(dm ₂ sc)].....	37
Esquema 3.7.1 - Estrutura da solução reveladora Resazurina (coloração azul) e Resorufina (coloração rosa).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.2.1.1- Ponto de fusão e Condutividade molar à $1.10^{-3} \text{ molL}^{-1}$	44
Tabela 4.2.1.2 – Dados percentuais para os teores de C, H, N, teóricos e experimentais, para os compostos sintetizados.....	45
Tabela 4.2.2.1- Bandas de absorção do espectro na região do infravermelho (IV).....	47
Tabela 4.2.3.1- Bandas de absorção no espectro eletrônico na região do UV-vís.	49
Tabela 4.2.4.1 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofila-morfolonil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc).....	52
Tabela 4.2.4.2 – Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados em H_2dmtsc	53
Tabela 4.2.4.3 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (1).	54
Tabela 4.2.4.4 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (2).....	54
Tabela 4.2.4.5 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (3).	54
Tabela 4.2.4.6 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (4).....	55
Tabela 4.2.4.7 - Deslocamento químico do espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (4).....	56
Tabela 4.2.4.8 - Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (5) em CDCl_3 ($\delta = \text{ppm}$).....	58
Tabela 4.2.4.9 - Deslocamento químico do espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (5).....	59
Tabela 4.3.1.1 - Valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) dos compostos frente às células tumorais e célula VERO (linhagem de célula saudável).....	61
Tabela 4.3.1.2 - Índice de seletividade (IS) para os compostos. $\text{IS} = \text{IC}_{50}(\text{VERO})/\text{IC}_{50}(\text{linhagem tumoral})$	64
Tabela 4.3.2.1 – Valores de $\text{IC}_{50\text{try}}$ (μmolL^{-1}) dos compostos obtidos sobre as formas tripomastigotas da cepa Tulahuen LacZ de <i>T. cruzi</i>	65
Tabela 4.3.3.1 – Resultados obtidos para as constantes de interação dos compostos com DNA.....	72

Tabela 4.3.4.1 – Resultados obtidos para a constante K_{sv} e K_q com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm, em diferentes temperaturas (295, 300, 305 e 310 K).....	78
Tabela 4.3.4. 2- Resultados obtidos para as constantes de ligação K_b e números de sítios de ligação do supressor (n).	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4.3.4.3 – Parâmetros termodinâmicos para os compostos estudados: energia livre de Gibbs (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°), e variação de entropia (ΔS°).	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.1 – Quantidade de mortes (1.10^5) no mundo relatadas no ano de 2012 <i>versus</i> Tipos de cânceres.....	2
Gráfico 4.3.1.1 - Compostos utilizados para estudos <i>versus</i> valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) frente às células tumorais.....	62
Gráfico 4.3.1.2 – Complexos utilizados para estudo e composto de referência cisplatina <i>versus</i> valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) frente às células tumorais.....	62
Gráfico 4.3.1.3 - Compostos utilizados para estudo <i>versus</i> valores de IS frente às células VERO.	64
Gráfico 4.3.2.1 – Porcentagem de atividade tripanocida em diferentes concentrações para os complexos 1 , 2 , 3 , 4 e 5 , do ligante $H_2\text{dmtsc}$ e do fármaco de referência BZ sobre a cepa Tulahuen LacZ de <i>T. cruzi</i> . Porcentagem de atividade tripanocida <i>versus</i> concentração para os composto.....	66
Gráfico 4.3.2.2 – Porcentagem da citotoxicidade em diferentes concentrações para os complexos 1 , 2 , 3 , 4 e 5 , do ligante $H_2\text{dmtsc}$ e o fármaco de referência BZ sobre células do baço de camundongos. Porcentagem de citotoxicidade <i>versus</i> concentração para os composto.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%H	porcentagem de hipocromismo
Å	comprimento de ligação
BZ	Benzonidazol
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CH ₂ Cl ₂	ciclorometano
CHCl ₃	clorofórmio
CPRG	chlorophenol red β-D-galactopyranoside
CTZ	Clotrimazol
damp	2[(dimetilamino)metil]fenil
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-ct	DNA do timo de bezerro
DU-145	carcinoma de prótata humano
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI(+)MS	espectrometria de massas com ionização por “ <i>electrospray</i> ”
Et ₂ bzCl	<i>N, N'</i> -[(dietilamino)(tiocarbonil)]benzimidofla
Et ₃ N	trietilamina
f	fraca
F	forte
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
GQIEB	Grupo de Química Inorgânica Estrutural e Biológica
H ₂ dmtsc	(dietilaminotiocarbonil)benzimidofla–morfolinil-tiossemicarbazona
HeLa	carcinoma cervical humano
HepG2	carcinoma humano hepatocelular
HIV	vírus da Imunodeficiência Humana
HSA	albumina de soro humano
IC ₅₀	concentração requerida do composto capaz de inibir 50% do crescimento celular
IC _{50try}	concentração inibitória de 50% para formas tripomastigotas

IS	Índice de Seletividade
IV	espectroscopia na região do infravermelho
J774	células de macrófagos
Kb	constante de interação composto-DNA
K_b	constante de interação composto-albumina
K_{dif}	constante difusional
KP46	tris(8-quinolinolato)gálio(III)
K_q	constante bimolecular de supressão
K_{SV}	constante de supressão molecular de Stern-Volmer
KTZ	Cetoconazol
m	multipeto
MCF-7	câncer de mama humano não invasivo
m	média
MDA-MB-231	carcinoma de câncer humano invasivo
MeCN	acetonitrila
MeOH	metanol
mf	muito fraca
mF	muito forte
morf	morfolinil
n	número de sítios de interação da albumina
NAMI-A	<i>trans</i> -imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato(III) de imidazólio
NE	Neighbor Exclusion
NFX	Nifurtimox
P.F.	ponto de fusão
PCT	tiossemicarbazonas piridina carboxaldeído
Ph	fenil
PI	iodeto de propídio
Prx	peroxirredoxina
q	quarteto
REA	Relação estrutura/atividade
RMN	ressonância magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
RR	enzima ribonucleotídeo redutase

SFB	soro fetal bovino
t	triplete
T	temperatura
<i>T.cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
TCLM	Transferência de Carga do Ligante para o Metal
THF	tetraidrofurano
Tir	tirosina
Trp-124	triptofano da albumina de soro humano
Trx	tiorredoxina
Trx1	enzima tiorredoxina citosólica
Trx2	enzima tiorredoxina mitocondrial
TrxR	enzima tiorredoxina redutase
TSC	tiossemicarbazona
u.a.	unidade arbitrária
UV-vís	espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível
VERO	célula epitelial renal de primata
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>
xant	xantato
δ	deslocamento química em ppm
ΔG°	variação da energia livre de Gibbs
ΔH°	variação de entalpia
ΔS°	variação de entropia
ε	coeficientes de extinção molar
λ	comprimento de onda em nm
λ_{em}	comprimento de onda de emissão em nm
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação em nm
τ_0	tempo de vida no estado excitado das biomoléculas na ausência do supressor
ν	vibração de estiramento em cm^{-1}

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer.....	1
1.2	Compostos metálicos no tratamento de câncer.....	3
1.3	Complexos de ouro.....	9
1.4	Tiossemicarbazonas.....	14
1.5	Doença de Chagas.....	17
1.5.1	Compostos com potenciais atividades tripanocida.....	21
1.6	Justificativa.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.1	Materiais.....	30
3.2	Instrumentos.....	30
3.3	Preparação do cloreto de <i>N,N'</i> -[(dietilamino)(tiocarbonil)]benzimidofla (Et ₂ bzCl).....	30
3.4	Preparação da morfolina-tiossemicarbazida.....	31
3.5	Preparação do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofla–morfolinil-tiossemicarbazona (H ₂ dmtsc).....	31
3.6	Síntese dos complexos de Ouro.....	32
3.6.1	Síntese do complexo [Au ^{III} Cl(dmtsc)] (1).....	32
3.6.2	Síntese do complexo [Au ^{III} CN(dmtsc)] (2).....	33
3.6.3	Síntese do complexo [Au ^{III} SCN(dmtsc)] (3).....	34
3.6.4	Síntese do complexo [Au ^{III} xant(dmtsc)] (4).....	35
3.6.5	Síntese do complexo [Au ^{III} damp(dmtsc)] (5).....	36
3.7	Ensaio de atividade antitumoral dos compostos <i>in vitro</i>	37
3.8	Ensaio de citotoxicidade dos compostos <i>in vitro</i> para células do baço de camundongos Swiss.....	39
3.9	Ensaio para avaliação do potencial anti- <i>Trypanossoma cruzi</i> dos compostos.....	39
3.10	Estudo de interação dos compostos com DNA-ct por espectroscopia UV-Vis.....	40
3.11	Estudo de interação dos compostos com albumina de soro humano (HSA).....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

4.1	Síntese dos compostos de interesse.....	42
4.2	Caracterização dos compostos de interesse.....	44
4.2.1	Ponto de fusão, condutimetria e análise elementar.....	44
4.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho.....	45
4.2.3	Espectroscopia na região do UV-Visível.....	49
4.2.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C	50
4.2.5	Espectrometria de massas ESI(+)-MS.....	59
4.3	Atividades biológicas.....	61
4.3.1	Ensaio de atividade antitumoral dos compostos <i>in vitro</i>	61
4.3.2	Avaliação do potencial anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade dos compostos.....	65
4.3.3	Estudo de interação dos compostos com DNA-ct por espectroscopia UV-Vis.....	67
4.3.4	Estudo de interação dos compostos com albumina de soro humano (HSA).....	73
5	CONCLUSÕES.....	85
6	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

É denominado câncer um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo através de um processo conhecido como metástase, onde elas começam a crescer e invadir os tecidos normais. Esse comportamento de proliferação anormal é conhecido como neoplasia e estas células tendem a ser determinantes na formação de tumores malignos por serem incontrolláveis e causarem efeitos agressivos ao indivíduo. De outro modo, um tumor benigno, definido como uma massa localizada de células semelhantes ao tecido normal, que se multiplicam vagarosamente, raramente constitui um risco de vida [1].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*) no ano de 2012 foram relatadas cerca de 8 milhões de mortes causadas por câncer, sendo os de maior ocorrência os cânceres de pulmão, fígado, estômago, colorretal, mama e esôfago (Gráfico 1.1). O câncer tem sido uma das principais causas de mortes no mundo e estima-se que os casos anuais aumentarão de 14 milhões no ano de 2012 para 22 milhões até o ano de 2030. Estudos correlacionam os riscos comportamentais como uma das causas das mortes por câncer. Estes riscos incluem, por exemplo, o alto índice de massa corporal, o sedentarismo, a alimentação inadequada, o tabagismo e o consumo de álcool. Também há maior predisposição para o desenvolvimento desta doença por hereditariedade, porém, os danos na informação genética destas células podem ser potencializados por fatores externos como exposição às radiações ou agentes químicos mutagênicos [2].

Gráfico 1.1 – Número de mortes (1.10^5) no mundo relatadas no ano de 2012 *versus* Tipos de cânceres.

Fonte: Adaptação da referência [2].

Neste ponto, é interessante ressaltar que as mortes causadas pelos diferentes tipos de câncer podem ser reduzidas através das intervenções, tal como sua prevenção ou mesmo por meio de sua detecção precoce com o tratamento adequado [2]. O tratamento pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Porém, em muitos casos é necessário combinar mais de uma modalidade, com o objetivo de curar a doença ou prolongar consideravelmente a vida do paciente [1].

Entre os tratamentos mencionados acima, pode-se dizer que a quimioterapia seja a mais utilizada. Define-se quimioterapia como o tratamento que utiliza medicamentos para destruir, controlar ou inibir o crescimento das células doentes que formam o tumor. Sua administração pode ser feita por via oral (na forma de comprimidos, cápsulas ou líquidos), intravenosa (injetados na corrente sanguínea), intramuscular (injetado no músculo), subcutânea (sob a pele) ou intratecal (injetado na espinha dorsal) [1]. Contudo, existem alguns problemas relacionados ao uso dos medicamentos, visto que estes em geral atuam de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, acarretando efeitos colaterais tais como: náuseas, vômitos, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções [3]. Além disto, as células tumorais desenvolvem resistência aos compostos utilizados, seja ela intrínseca ou adquirida por exposição contínua [4]. Diante dos fatos mencionados, nos últimos anos se tem a motivação no desenvolvimento de novos fármacos, que sejam mais eficazes e menos agressivos ao organismo, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente.

1.2 Compostos metálicos no tratamento de câncer

A pesquisa de fármacos à base de complexos metálicos para o tratamento de câncer surgiu em meados da década de 1960, quando o biofísico Rosenberg [5] estudava a influência do campo elétrico no crescimento de células bacterianas em solução. Durante o experimento, ele observou a inibição da divisão celular da bactéria *Escherichia coli*. Esta inibição da divisão celular foi causada a partir da formação de compostos de platina(II) e platina(IV) ocorrida pela reação dos eletrodos de platina com o caldo de nutriente presente na célula eletroquímica. Estes compostos, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] e *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂], em particular, também causaram a inibição da divisão celular na ausência de qualquer corrente elétrica. Diante desta descoberta, Rosenberg postulou que estes compostos poderiam ser agentes antitumorais. Então, em 1972, a *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (cisplatina) foi testada pela primeira vez em ensaios clínicos com pacientes humanos e, no ano de 1979, a mesma foi aprovada pela *U.S Food and Drug Administration* para o tratamento antitumoral [6].

A cisplatina e seus análogos (Figura 1.2.1) são largamente utilizados para o tratamento de câncer de ovário e testículo, e têm sido cada vez mais utilizados contra outros tipos de tumores sólidos [7]. Entretanto, a utilização destes compostos é dificultada em razão dos efeitos colaterais causados, os quais incluem: náuseas, alopecia, ototoxicidade, mielossupressão, neurotoxicidade e nefrotoxicidade. Neste aspecto, o motivo da pesquisa de novos compostos, que possuam um perfil de toxicidade mais aceitável e com maior atividade, se justifica também pela resistência à cisplatina, seja uma resistência natural, seja uma resistência desenvolvida após o tratamento [5]; como também o modo de administração intravenoso do medicamento o qual causa objeção ao paciente para continuar o tratamento [7].

Figura 1.2.1 - Compostos de platina utilizados para o tratamento de câncer.

Fonte: Referência [8].

INTRODUÇÃO

No que diz respeito à ação biológica da cisplatina, o principal mecanismo é a partir da captação celular da molécula. Este mecanismo da cisplatina é influenciado por alguns fatores, como por exemplo, as concentrações de íons sódio e potássio, pH e agentes redutores presentes nas células [9]. Embora haja contestação, acredita-se que o mecanismo de captação ocorra por difusão passiva pelo fato de ser uma molécula neutra. Contudo, esta molécula também pode entrar nas células através do transporte ativo mediado pelo transportador de cobre na membrana plasmática (Ctr1), presente em leveduras e mamíferos, como se pode observar na Figura 1.2.2 [8].

Figura 1.2.2 - Captação celular da cisplatina por difusão passiva e através do transportador de cobre Ctr1.

Fonte: Adaptação da referência [8].

A cisplatina pode ser aplicada por meio de uma administração intravenosa. Sabe-se que na corrente sanguínea a concentração de Cl^- é elevada ($\approx 100 \text{ mM}$), enquanto que a concentração intracelular é menor ($\approx 30 \text{ mM}$). Esta queda na concentração dos íons cloreto quando o fármaco entra no citoplasma configura em um percurso para a ativação do composto (Figura 1.2.3). Deste modo, quando a cisplatina se encontra na corrente sanguínea, esta molécula conserva seus íons cloreto e quando entra no citoplasma, equilíbrios são estabelecidos para a hidrólise, uma vez que Cl^- é um bom grupo de saída, podendo então ser substituído por água; ao contrário da amônia, a qual possui uma ligação covalente cineticamente mais estável com íons metálicos. Entretanto, este mecanismo de ativação é

mais complexo do que o mencionado porque são possíveis várias combinações de grupos HO⁻ e de ligantes H₂O em pH fisiológico [6].

Figura 1.2.3 – Ativação intracelular da cisplatina.

Fonte: Adaptação da referência [8].

A ativação da cisplatina favorece a interação da molécula com nucleófilos celulares, como por exemplo, o DNA, o RNA, fosfolipídios de membrana, citoesqueleto e moléculas contendo o grupo tiol. Ainda que apenas 1% deste fármaco no meio intracelular reaja com o DNA nuclear [10], os ligantes aqua presentes no composto são substituídos pelas nucleobases do DNA as quais são cineticamente estáveis. A ligação formada ocorre na posição N7 da guanina, como se pode observar na Figura 1.2.4 [6], e produz uma variedade de adutos DNA-Composto que incluem ligações cruzadas interfitas, intrafita e ligações cruzadas com DNA e proteína (Figura 1.2.5) [10]. Entre os adutos formados, o aduto com ligação cruzada 1,2-intrafita (Figura 1.2.5b) é o responsável mais provável pela citotoxicidade da cisplatina. Quando ocorre esta ligação cruzada entre o DNA nuclear e o composto, há uma distorção significativa na estrutura helicoidal do DNA, sendo distinta para cada tipo de aduto formado (Figura 1.2.6). Esta distorção da hélice do DNA tem como resultado a inibição da sua replicação e transcrição, seguido pela indução à morte celular por apoptose e necrose [8].

Figura 1.2.4 – Comportamento fisiológico da cisplatina *in vivo*. Reação aquosa seguida pela ligação no N7 da guanina.

Fonte: Referência [6].

Figura 1.2.5 - Principais adutos bifuncionais DNA-cisplatina: (a) ligação cruzada interfitas; (b) ligação cruzada 1,2-intrafitas; (c) ligação cruzada 1,3-intrafitas e (d) ligação cruzada com DNA e proteína.

Fonte: Adaptação da Referência [10].

Figura 1.2.6 - Estruturas de adutos cisplatina-DNA: (a) 1,2-intrafita; (b) 1,3-intrafita e (c) ligação cruzada interfita.

Fonte: Referência [11].

Acredita-se que a apoptose seja o principal mecanismo de morte celular causada pela cisplatina, por dano de DNA. A apoptose é definida como “morte celular programada”, ou seja, indução de morte das células. Contudo, há evidências de que, dependendo da dose da cisplatina e dos danos causados nas células, a morte celular pode ocorrer por necrose, seja diretamente seja como consequência de um programa de apoptose inacabado. Ainda que apoptose e necrose sejam conceitos distintos de mortes celulares, tanto no que se diz da morfologia quanto das características bioquímicas, estes dois tipos de mortes podem ocorrer simultaneamente [10].

Entretanto, devido a alta afinidade de platina(II) pelo grupo tiol, a espécie aqua da cisplatina formada no citoplasma celular reage preferencialmente com as moléculas que contém enxofre, como a glutathione e metalotioneínas, por exemplo. Geralmente, as células cancerígenas resistentes ao fármaco possuem altos níveis de glutathione e metalotioneína, o que inviabiliza a disponibilidade do composto no citoplasma para que se ligue ao DNA, no núcleo. A exportação celular do composto também contribui para a resistência da célula frente ao fármaco e pode ocorrer tanto pelos exportadores de cobre ATP7A e ATP7B quanto pela bomba GS-X glutathione (Figura 1.2.7) [9].

Até os dias atuais, ainda não há o conhecimento detalhado das interações da cisplatina com os componentes celulares, devido à complexidade na investigação desses processos no meio intracelular. Porém, acredita-se que estas interações estejam sob controle cinético e não termodinâmico, como consequência da velocidade de substituição lenta dos ligantes no composto [11]. Esta proposição explica a ligação da cisplatina com o DNA no

núcleo ao invés de reagir unicamente com os ligantes S doadores presentes no citoplasma, os quais formam complexos estáveis [11].

Figura 1.2.7 – Representação esquemática da entrada da cisplatina na célula e dos principais mecanismos de resistência tumoral.

Fonte: Adaptação das referências [8,9]

Além dos compostos à base de platina, outros complexos com diferentes centros metálicos, como por exemplo o gálio e o rutênio, têm sido investigados quanto a sua aplicação na terapia do câncer desde 1990. Pode-se citar os compostos KP46, tris(8-quinolinolato)gálio(III), e NAMI-A, *trans*-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato(III) de imidazólio, (Figura 1.2.8). O KP46 tem apresentado propriedade antitumoral relevante e sua formulação oral está na Fase I de ensaios clínicos nos EUA. A eficácia dos compostos de gálio pode ser explicada pela sua absorção celular específica quando administrados oralmente [12], enquanto que o composto NAMI-A, desenvolvido por Alessio e colaboradores [13], foi

o primeiro composto de rutênio a iniciar ensaios clínicos. Uma vantagem da utilização dos compostos de rutênio para o tratamento do câncer esta na sua eficácia contra a metástase, além de sua alta atividade contra uma variedade ampla de tumores.

Figura 1.2.8 – Compostos com atividade antitumoral com metais gálio (KP46) e rutênio (NAMI-A).

Fonte: Referência [14].

1.3 Complexos de ouro

O uso do ouro na medicina tem origem no trabalho do médico alemão Robert Koch, o qual relatou o uso do cianeto de ouro contra a tuberculose. Esta descoberta levou à experimentação de outros compostos de ouro para o tratamento da doença, mas não proporcionaram uma terapia eficaz [15]. Contudo, o grande impulso para a utilização medicinal dos compostos com este metal ocorreu no ano de 1985 com a aprovação do uso clínico do complexo Auranofina[®], (2,3,4,6,-tetra-O-acetil-1-tiol-β-D-glucopiranosato) (trietilfosfina)ouro(I) (Figura 1.3.1), o qual possui atividade antiartrítica [16].

Figura 1.3.1 - Auranofina[®], (2,3,4,6,-tetra-O-acetil-1-tiol-β-D-glucopiranosato) (trietilfosfina)ouro(I).

Fonte: Referência [17].

A artrite reumatóide é uma doença crônica autoimune que causa inflamação e erosão articular progressivamente. É importante ressaltar que ainda hoje esta doença é tratada com vários compostos à base de ouro como o Solganol[®] (aurotioglucose), Miocrin[®] (aurotiomalato de dissódio), Allochrysin[®] (aurotiopropanol sulfonato de sódio), entre outros (Figura 1.3.2). Porém, ao contrário dos demais compostos, os quais possuem administração intravenosa, a Auranofina[®] possui maior interesse pelo fato de ser administrada oralmente. Este tipo de tratamento em pacientes com artrite reumatóide é chamado de “crisoterapia” [18]. Ademais, desde a aprovação do uso clínico dos compostos mencionados anteriormente, a investigação de compostos de ouro na medicina se expandiu para possíveis utilidades como agentes antitumorais, agentes anti-HIV, antimicrobianos, anti-inflamatórios, entre outros [15,19].

Figura 1.3.2 - Compostos usados no tratamento da artrite reumatoide.

Fonte: Referência [18].

Em meados de 1979, a Auranofina[®] apresentou resultados satisfatórios para a inibição da proliferação das células HeLa (carcinoma cervical humano) *in vitro*. Estes

resultados desencadearam a busca de novos compostos de ouro para o tratamento do câncer e vários análogos da Auranofina[®], assim como complexos de fosfina-ouro(I) contendo ligantes S doadores, foram desenvolvidos. Porém, estes compostos exibiram cardiotoxicidade nos estudos *in vivo* tornando-os desfavoráveis para prosseguir nas fases pré-clínicas e clínicas [20].

O uso de compostos de ouro(III) para estudo da atividade antitumoral são atraentes por mostrar características químicas próximas aos derivados de platina(II), tais como a coordenação quadrático-planar, com configuração eletrônica d^8 [21]. Durante as últimas décadas, a obtenção destes compostos de ouro têm se baseado na ideia da complexação do metal com ligantes que possuem atividade conhecida; tendo como objetivo a obtenção de novos compostos com melhor estabilidade e menor toxicidade em relação à cisplatina [22].

Os mecanismos responsáveis pela citotoxicidade dos complexos de ouro e seus alvos biológicos ainda são em grande parte desconhecidos, mas estudos realizados até o momento indicam que alguns destes alvos sejam as mitocôndrias [17], incluindo a inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) [18]. Pelo fato do ouro(III) ser isoeletrônico a platina(II), é possível também que tenham o DNA como alvo, assim como a cisplatina [14].

Em meados de 1990, novas classes de complexos de ouro(III) apresentaram resultados promissores em estudos *in vitro* e *in vivo* contra o câncer (Figura 1.3.3). Algumas hipóteses mecanicistas foram formuladas para determinadas classes destes compostos. Ditiocarbamatos de ouro(III) (Figura 1.3.3), por exemplo, podem induzir a morte celular através de ambos os mecanismos, apoptose e necrose. Ademais, estes compostos inibem a atividade da tiorredoxina redutase (TrxR), geram radicais livres e modificam algumas funções mitocondriais. Em suma, estas observações levaram à conclusão de que a desregulamentação do sistema tiorredoxina é um importante mecanismo envolvido na atividade antitumoral [23].

A Figura 1.3.4 descreve o mecanismo de ação da morte celular causada por compostos de ouro(I/III) pela inibição da TrxR. A TrxR quando inibida pelos complexos de ouro(I/III), é incapaz de reduzir a tiorredoxina (Trx) oxidada, tendo como consequência o acúmulo de concentração de H_2O_2 na mitocôndria. Este acúmulo ocasiona uma mudança simultânea no estado redox dos tióis presentes na Trx. De fato, a inibição da TrxR na presença de grande quantidade de H_2O_2 conduz a formação da peroxirredoxina (Prx), a qual é mediada pela reação de oxidação da Trx. A Trx oxidada se acumula junto com H_2O_2 e ambos atuam sobre vários alvos intramitocondriais diferentes, levando à abertura do poro de permeabilidade de transição mitocondrial e/ou ao aumento da permeabilidade da membra

externa. Assim sendo, o H_2O_2 é então liberado para o citosol, onde provoca a oxidação da Trx1, que, de forma semelhante à tioredoxina mitocondrial (Trx2), não pode ser reduzida novamente, devido a inibição ocasionada pelos complexos de ouro(I/III). A tioredoxina oxidada estimula as vias de MAP quinases, as quais conduzem à morte celular. Ainda no citosol, o H_2O_2 ativa várias vias de sinalização que estimulam ainda mais a morte celular por apoptose [23].

Figura 1.3.3 – Complexos de ouro(III) utilizados em estudos contra o câncer *in vivo* e *in vitro*.

Figura 1.3.4 – Modelo que descreve o mecanismo de ação de indução de morte celular por compostos de ouro(I/III).

Fonte: Adaptação da referência [23].

No que diz respeito à distribuição e o metabolismo dos compostos durante a quimioterapia, sabe-se que ambos ocorrem por intermédio da albumina. Esta é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e funciona como agente de transporte [24]. No caso da Auranofina[®], sugere-se que a via metabólica envolve a clivagem da ligação Au-S seguida pela coordenação com a albumina presente no sangue e, em consequente, ocorre a redução da albumina. No entanto, também pode ocorrer a coordenação do átomo de ouro da Auranofina[®] com mais um grupo tiol, podendo este grupo ser da glutatona ou da própria albumina, e a oxidação da fosfina seria causada pela clivagem da ligação Au-P [25].

Em condições fisiológicas, os complexos de ouro(III) são reduzidos para ouro(I) ou ouro(0) *in vivo* através dos redutores naturais como os tióis (cisteína) e tio éteres (metionina) [26]. Por este motivo, estes compostos são considerados pró-fármacos, pois possuem alteração *in vivo* formando as espécies ativas [22].

Apesar da estabilidade relativamente fraca dos complexos de ouro(III) em condições fisiológicas, nos últimos anos, uma série de estratégias tem sido utilizada para estabilizar o

estado de oxidação do ouro(III) e várias classes diferentes de compostos têm apresentado significantes propriedades antitumorais [17,23]. Entre estas classes, pode-se ressaltar a série de complexos de ouro(III) com o ligante damp, *N,N*-dimetil-1-fenilmetanamina, onde a ligação σ do grupo aril ligado ao anel quelato de cinco membros estabiliza o estado de oxidação do metal quando coordenado (Figura 1.3.5). Estes compostos apresentaram atividade citotóxica equivalente ou maior quando comparados à cisplatina contra várias linhagens de células tumorais, incluindo aquelas resistentes à cisplatina [25].

Figura 1.3.5 – Complexo dicloro[2-(dimetilaminometil)fenil-*C'*, *N*]ouro(III).

Fonte: Referência [27].

1.4 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (TSCs) (Figura 1.4.1) são ligantes versáteis devido à deslocalização π e flexibilidade configuracional, possibilitando variados modos de coordenação [28]. Esta classe de compostos possui interesse científico devido a sua versatilidade de obtenção e importantes propriedades químicas e biológicas. Além de serem excelentes agentes quelantes, possuem atividade antitumoral [29], antiviral [30], antimicrobacteriana [31], antidiabética [32], antitripanocida [33], entre outras. As propriedades antitumorais das TSCs são atribuídas a alta capacidade em inibir a biossíntese de DNA, a qual ocorre, possivelmente, por bloquear a enzima ribonucleotídeo redutase (RR) e por se ligar às bases nitrogenadas presentes no DNA. Desta maneira, a replicação de base é dificultada ou impedida de ocorrer e/ou são criadas lesões nas fitas de DNA por ruptura oxidativa [34].

Figura 1.4.1 - Estrutura química das tiossemicarbazonas.

Fonte: Referência [31].

A investigação de compostos relacionados às tiossemicarbazonas piridina carboxaldeído (PCT; Figura 1.4.2) forneceu maiores informações sobre o modo de ação das tiossemicarbazonas, envolvendo a inibição da enzima RR [35]. A estabilização da enzima ocasionada pelo centro de ferro não-heme, é essencial para sua atividade catalítica. E, na presença do PCT, ocorre a inibição da RR devido à coordenação do composto ao centro metálico de ferro [36]. As células cancerígenas expressam níveis elevados de RR em relação às células normais, devido a sua maior taxa de proliferação e, por este motivo, elas se tornam mais susceptíveis para tal coordenação [35].

Figura 1.4.2- Estrutura química geral das tiossemicarbazonas piridina carboxaldeído (PCT).

Fonte: Referência [35].

As propriedades biológicas dos complexos com TSCs estão frequentemente relacionadas com suas propriedades físico-químicas. Como exemplo, tais complexos possuem maior lipofilicidade (propriedade que controla a entrada da molécula para dentro da célula) quando comparados as TSCs livres, podendo diminuir os efeitos colaterais [37].

Os primeiros compostos de ouro(III) com ligantes tiossemicarbazonas [38] (Figura 1.4.3) foram publicados em 1998 e, após esta data, outros complexos têm sido relatados,

mostrando citotoxicidade *in vitro* comparável ou maior do que a cisplatina frente a uma série de linhagens de células tumorais humanas [27, 39].

Figura 1.4.3– Estruturas dos primeiros complexos de ouro(III) com ligante tiossemicarbazonas.

Fonte: Referência [38].

O trabalho de Maia *et al.* [40,41], descreve os primeiros complexos neutros de ouro(III) com tiossemicarbazonas (Figura 1.4.4) os quais apresentaram alta inibição do crescimento celular contra células de câncer de mama humano não invasivo MCF-7. Cabe ressaltar o resultado de IC_{50} obtido para o complexo $[\text{AuCN}(\text{L1c})]$, o qual foi de $0,025 \mu\text{molL}^{-1}$. Este complexo apresentou maior atividade frente à MCF-7 quando comparados os demais complexos avaliados.

Figura 1.4.4 – Estrutura química geral dos complexos de ouro(III) com ligantes tiossemicarbazonas.

- a: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{Ph}$ $L = \text{Cl}^-$, CN^- , SCN^-
b: $R_1R_2 = (\text{CH}_2)_4$
c: $R_1R_2 = (\text{CH}_2)_4\text{O}$
d: $R_1R_2 = (\text{CH}_2)_6$
e: $R_1=R_2 = \text{Me}$
f: $R_1=R_2 = \text{n-prop}$

Fonte: Adaptação das referências [40,41].

1.5 Doença de Chagas

Tripanossomíase americana, mais comumente conhecida como Doença de Chagas, é uma doença parasitária endêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). O nome foi dado em homenagem ao cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que a descreveu pela primeira vez em 1909. Antigamente, era considerada uma doença endêmica da América Latina, porém, com a imigração de pessoas infectadas, a doença tem se alastrado para outros continentes, como se pode observar na Figura 1.5.1 [42]. Apesar de ser reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*) como uma doença negligenciada, uma vez que recebe pouco financiamento ou atenção de órgãos públicos e privados, estima-se que a incidência anual nas Américas seja de 28.000 mil casos e cerca de 12.000 mortes. Devido a sua alta morbidade, a Doença de Chagas continua sendo um problema médico social grave [43]. Contudo, a predominância, a incidência e mortalidade causada pela doença de Chagas mudam constantemente como consequência da migração e mudanças nas condições socioeconômicas de cada região geográfica.

Figura 1.5.1– Números estimados de pessoas infectadas com *Tripanosoma cruzi* morando em países não endêmicos.

Fonte: Referência [44].

Dependendo da área geográfica, a transmissão da doença para os seres humanos ocorre, principalmente, pelo contato direto com as fezes de triatomíneos (inseto vetor), mais conhecidos como “barbeiros” (Figura 1.5.2). A transmissão com menor ocorrência é através da transfusão de sangue e transplante de órgãos, transmissão congênita (passagem da mãe infectada para filho recém-nascido) e contaminação por via oral devido à ingestão acidental do inseto triturado aos alimentos (caldo de cana de açúcar e sucos de açaí e goiaba, por exemplo) [42].

Figura 1.5.2– Triatomíneo (Barbeiro): inseto vetor do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Referência [45].

Os insetos vetores geralmente vivem nas frestas de casas em áreas rurais ou suburbanas. Habitualmente, ele é ativo à noite e se alimenta de sangue humano picando áreas expostas da pele, como a face, por exemplo. Neste momento, ele defeca ao lado da picada e os parasitas (formas tripomastigotas metacíclicas) presentes nas fezes atingem a corrente sanguínea [42].

O ciclo de vida do *T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre três formas principais: epimastigota (forma replicativa e não infectante), amastigota (forma replicativa) e tripomastigota (forma infectante e não replicativa). Como se pode observar na Figura 1.5.3, o ciclo se inicia com a contaminação do barbeiro (1) com formas tripomastigotas no sangue (2) de um mamífero infectado. Os tripomastigotas são conduzidos ao lúmen do intestino do inseto, onde se transformam nas formas epimastigotas (3). As epimastigotas começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária (4) e, na porção final do intestino, se transformam em tripomastigotas metacíclicos (5), os quais são liberados nas fezes do inseto durante o repasse sanguíneo (6). Os parasitas presentes nas fezes penetram na pele lesionada devido ao instinto da vítima em coçar este local (7), chegando então até a corrente sanguínea. Tais parasitas invadem várias células nucleadas como macrófagos (8), células musculares e epiteliais. Em células de macrófagos, eles são fagocitados ocorrendo a formação do vacúolo parasitóforo (9). No interior deste vacúolo, a forma tripomastigota se transforma na forma amastigota, rompendo a membrana do vacúolo (10) e, no citoplasma, esta se multiplica por sucessivas divisões binárias (11). Em seguida, os amastigotas iniciam a diferenciação passando por uma forma de transição (12) e transformam na forma tripomastigota. A ruptura da célula hospedeira (13) pode ocorrer antes da total transformação de amastigotas para tripomastigotas por causa do excesso de parasitas, gerando o aparecimento de ambas formas no meio externo (14). Consequentemente, estando presentes no meio extracelular, os tripomastigotas (15a) podem infectar novas células. [46, 47].

Figura 1.5.3– Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Referência [46].

A doença de Chagas possui duas fases: aguda e crônica. A fase aguda (fase inicial) tem a duração de aproximadamente dois meses, após a infecção, podendo ser assintomática ou sintomática. Geralmente, os sintomas são: inchaço no local da infecção, febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, inchaço e dor abdominal ou torácica, dificuldade na respiração, entre outros [42]. Nesta fase, a infecção é muitas vezes diagnosticada, porém, na ausência de um tratamento específico, ocasiona uma taxa de mortalidade de 2-8%, especialmente em crianças. Um aspecto importante é que, após algum tempo da fase inicial e sem um tratamento adequado, o paciente entra na fase crônica [47]. Neste estágio crônico, os parasitas se encontram principalmente no coração e músculo

digestivo, diferentemente da fase aguda, a qual os parasitas circulam no sangue. Inicialmente, esta fase é assintomática, mas passado um certo período de tempo os pacientes sofrem distúrbios cardíacos ou digestivos (alargamento do esôfago ou do cólon), assim como alterações neurológicas, podendo ocorrer também a morte súbita [42].

1.5.1 Compostos com potenciais atividades tripanocida

Devido à grande quantidade de animais silvestres infectados pelo *T. cruzi*, a doença não pode ser erradicada. Por esta razão, o controle mais eficaz consiste na atenuação da transmissão e cuidados da saúde para a população infectada e doente [42]. No que se refere aos cuidados dos pacientes com a Doença de Chagas, os únicos medicamentos licenciados até o presente momento são o Nifurtimox (NFX) e o Benzonidazol (BZ) (Figura 1.5.1.1). Nos Estados Unidos estes dois medicamentos não são aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) e estão disponíveis somente a partir de Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) ao abrigo de protocolos de medicamentos experimentais [47].

Ambos os compostos, o NFX e o BZ, possuem atividade tripanocida na fase aguda (80% de cura parasitológica nos pacientes tratados) contra todas as formas do parasita. Embora sua eficácia varie de acordo com a região geográfica, devido à susceptibilidade das diferentes cepas do *T. cruzi* frente a estes compostos, eles apresentam baixa atividade antiparasitária na fase crônica da doença. A decisão do tratamento do paciente nesta fase, com estes medicamentos, deve ser analisada individualmente, avaliando principalmente os possíveis riscos e benefícios [47].

A produção do NFX foi interrompida no Brasil em 1997 e logo depois foi interrompida também na Argentina, Chile e Uruguai. Dois outros medicamentos, Alopurinol e Itraconazol (Figura 1.5.1.1), têm sido utilizados em certos casos selecionados. Contudo, atualmente o BZ é o único medicamento disponível comercialmente na maioria dos países endêmicos [47].

Figura 1.5.1.1 - Estruturas químicas dos compostos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.

Fonte: Referência [47].

O BZ foi comercializado na América Latina pela primeira vez em 1978, com o nome Rochagan[®] no Brasil e Radanil[®] na Argentina. Seu mecanismo de ação envolve interações dos radicais intermediários formados pela redução do grupo nitro com as macromoléculas do *T. cruzi* (DNA e citocromo P450, por exemplo). Apesar de apresentar alta eficácia clínica, se administrado na fase aguda, podendo prevenir ou retardar o desenvolvimento da Doença de Chagas, sua utilização não é ideal devido à baixa eficácia na fase crônica e suas reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados. Dentre as possíveis reações adversas, pode-se destacar: dermatite, intolerância digestiva (vômitos e dor abdominal), dor de cabeça, anorexia, insônia, entre outros [42,47].

Atualmente, não há um tratamento para a doença na fase crônica. Portanto, estudos *in vitro* contra o parasita têm sido uma alternativa para a descoberta de novos medicamentos antiparasitários. Outra estratégia utilizada consiste no conhecimento da bioquímica do *T. cruzi*, com recentes progressos na compreensão e validação de vários alvos para a terapia da Doença de Chagas (inibidores da cisteína proteinase, metabolismo de esteróis, entre outros.) [47].

Neste contexto, uma das prioridades na pesquisa em Doença de Chagas consiste na busca de novos compostos com atividade tripanocida, no intuito de tornar o tratamento da

doença mais eficaz, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, e com menos efeitos colaterais. Por esta razão, novos compostos sintéticos ou naturais têm sido desenvolvidos e estudados.

A utilização de complexos metálicos para estudos contra o *T. cruzi* têm sido concebido por diferentes estratégias e alguns destes possuem resultados promissores. Por exemplo, os complexos de rutênio(II) com ligantes como clotrimazol (CTZ) e cetoconazol (KTZ) (Figura 1.5.1.2), ligantes com atividade inibidora da enzima citocromo P450 envolvido na produção de ergosterol (enzima essencial para o parasita), foram estudados e apresentaram capacidade de inibir 90% da proliferação da forma epimastigota do *T. cruzi*. O mecanismo de ação deste complexo tem sido investigado e supõe-se que envolva a hidrólise dos ligantes cloretos, formando o intermediário $[\text{Ru}(\text{CTZ})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{+2}$, o qual interage com o DNA por ligação covalente. Isto resulta na liberação do ligante CTZ, que exerce, por conseguinte, sua função inibidora condicionando a maior atividade e menor toxicidade deste composto [48].

Os complexos de platina(II) se tornaram conhecidos por inibir 78% do crescimento do *T. cruzi* na forma amastigota numa concentração de $1 \mu\text{molL}^{-1}$. Assim, novos compostos de platina(II) com ligantes derivados de 5-nitrofuril e 5-nitrotienil foram sintetizados (Figura 1.5.1.3) pela analogia com NFX, o qual gera espécies de radicais tóxicos ao parasita [47, 48].

Tendo conhecimento de algumas semelhanças bioquímicas entre os tripanossomas e células tumorais, em termos de metabolismo, estudos dirigidos à utilização de agentes antitumorais como possíveis tripanocidas foram realizados. Os primeiros complexos antitumorais a serem estudados foram a cisplatina e carboplatina (Figura 1.2.1). Estas duas moléculas apresentaram atividade tripanocida *in vitro*, mas não *in vivo* [48].

Por conseguinte, complexos de rênio, rutênio, paládio e platina com ligantes semicarbazonas e tiossemicarbazonas com grupos nitrofuril têm sido estudados [47]. Um estudo mais recente mostrou a eficácia de TSCs como agentes anti- *T. cruzi*, podendo destacar neste trabalho duas TSCs (Figura 1.5.1.4), as quais apresentaram alta atividade tripanocida ao se comparar com o BZ [49].

Figura 1.5.1.2 - Ligantes clotrimazol (CTZ) e cetoconazol (KTZ) e complexo $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ com propriedades tripanocida.

Fonte: Referência [48, 50].

Figura 1.5.1.3 - Exemplos de complexos de platina(II) ativos contra o *Trypanosomas*.

Fonte: Referência [47,48].

Figura 1.5.1.4 - Estruturas de tiossemicarbazonas ativas contra o *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Referência [49].

1.6 Justificativa

Complexos de ouro com tiossemicarbazonas vêm sendo um dos focos de estudo do nosso grupo de pesquisa GQIEB (Grupo de Química Inorgânica Estrutural e Biológica).

Em virtude das dificuldades encontradas no tratamento quimioterápico do câncer, se tem a motivação em buscar novos fármacos que sejam mais eficazes e menos agressivos ao organismo do paciente.

Neste contexto, resultados obtidos com as células MCF-7 (câncer de mama humano não invasiva) e J774 (células de macrófagos) indicaram que modificações nos grupos R₁, R₂ e L da tiossemicarbazona (Figura 1.6.1) afetam na sua atividade biológica [40].

Figura 1.6.1 - Estrutura química geral dos complexos de ouro(III) com R₁ e R₂ variando: CH₃, fenil, morfolinil, (CH₂)₄ e *n*-propil; e, o grupo L variando: Cl⁻, CN⁻ e SCN⁻.

Fonte: Adaptação da referência [40].

Portanto, o ligante TSC utilizado para estudo neste trabalho foi o (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila–morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) (Figura 1.6.2) o qual possui o morfolinil nos grupos R_1 e R_2 . O mesmo apresentou valores de IC_{50} mais atrativos contra a célula MCF-7, tanto no estado livre quanto complexado (Figura 1.6.3), em relação às demais tiossemicarbazonas analisadas no trabalho de Maia *et al.* [40].

Estudos apontam a potencial utilização de fármacos antitumorais para o tratamento da Doença de Chagas [47,48], de forma que os complexos de ouro(III) com H_2dmtsc deste trabalho também foram avaliados como possíveis agentes anti-*T. cruzi*.

Figura 1.6.2 - Estrutura química do ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila–morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc).

Fonte: Referência [41].

Figura 1.6.3 – Valores de IC_{50} do ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóla–morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) livre e complexado ao ouro(III) contra células de câncer de mama humano não invasivo MCF-7.

Fonte: Adaptação da referência [40].

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a avaliação da influência do ligante L em complexos do tipo $[\text{AuL}(\text{dmtsc})]$ (Figura 2.1) frente a atividade antitumoral e anti-*T. cruzi*, assim como a avaliação de sua influência em interações com possíveis alvos biológicos (DNA e albumina).

Para isto, os ligantes L utilizados incluíram: Cl^- , CN^- , SCN^- ; damp ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$) (Figura 1.3.5) e xantato ($\text{C}_3\text{H}_5\text{OS}_2^-$), por serem quimicamente bem conhecidos e por possuírem citotoxicidade seletiva para células tumorais (Figura 1.6.3) [38, 40, 51].

Figura 2.1 - Complexos de ouro onde L: Cl^- , CN^- , SCN^- , $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}$ e $\text{C}_3\text{H}_5\text{OS}_2^-$.

Fonte: O autor.

Este objetivo geral inclui os seguintes objetivos específicos:

- 1) Síntese e caracterização de complexos de ouro contendo o ligante H_2dmtsc e co-ligantes cloro, ciano, tiocianato, xantato e damp.
- 2) Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* dos compostos em diversas linhagens de células cancerígenas: HepG2, HeLa, DU-145 e MDA-MB-231.
- 3) Avaliação da atividade biológica *in vitro* dos compostos contra cepa Tulahuen LacZ de *T. cruzi* para determinação do ($\text{IC}_{50\text{try}}$)
- 4) Estudo de interação dos compostos com DNA-ct.
- 5) Estudo de interação dos compostos com albumina de soro humano (HSA).

OBJETIVOS

6) Determinação da citotoxicidade (IC_{50}) dos compostos contra a célula VERO (dita célula saudável) e células de baço de camundongo Swiss, para realização do cálculo do índice de seletividade (IS) dos compostos.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich) e utilizados sem purificações adicionais. Os solventes foram utilizados sem destilação prévia, exceto THF que, quando necessário, foi secado e destilado sobre CaH_2 . O complexo de partida $[\text{AuCl}_2(\text{damp})]$, previamente disponível no laboratório, foi preparado através de procedimento padronizado por Mack *et.al.* [52].

3.2 Instrumentos

Os espectros na região do infravermelho foram medidos em pastilhas de KBr entre 400 e 4000 cm^{-1} , em um espectrofotômetro do tipo Shimadzu IRPrestige-21 com resolução de 4 cm^{-1} . As abreviações utilizadas para descrever a intensidade das bandas são: mf = muito fraca, f = fraca, m = média, F = forte e mF = muito forte. As condutividades dos complexos foram medidos em DMSO e CH_2Cl_2 , com um condutivímetro Orion Star Series. Os espectros na região do UV-Vísivel foram medidos em um espectrofotômetro Shimadzu, em soluções de CH_2Cl_2 utilizando cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Os espectros de massa com ionização em modo positivo, ESI(+)-MS, foram medidos com um equipamento Agilent 6210 ESI-TOF (Time Of Flight). Todos os dados dos espectros de massa são apresentados na forma: m/z , atribuições. Os espectros de RMN do H_2dmtsc e dos complexos foram adquiridos usando um equipamento Bruker DRX-400 de 9.4 T, operando à 399,88 MHz para ^1H e 125,70 MHz para ^{13}C . As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um analisador CHN modelo EA 1108 da FIONS.

3.3 Preparação do cloreto de *N, N'*-(dietilamino)(tiocarbonil)benzimidazóla (Et_2bzCl)

A síntese seguiu o procedimento padrão de Beyer *et al.* [53]. A uma solução de 28,5 mmol (15 g) de *bis*-(*N*-(dietilcarbamoil)benzamida)níquel(II) em 100 mL de CCl_4 foram adicionadas, gota a gota, 56,5 mmol de cloreto de tionila (6,7 g, 4 mL) dissolvido em 25 mL de CCl_4 sob agitação durante 1 hora a 50 °C. O precipitado verde resultante foi filtrado e

descartado. A solução amarela resultante foi completamente evaporada sob pressão reduzida para obtenção do produto em estado sólido. Rendimento: 18% (2,6 g; 56 mmol).

3.4 Preparação da morfolina-tiossemicarbazida

A síntese seguiu o procedimento de Scovil *et al.* [54]. Primeiramente, a 0,1 mol (6 mL, 7,6 g) de CS₂, sob agitação em banho de gelo, foram adicionados gota a gota, 0,1 mol (8,5 mL, 8,6 g) da morfolina, ocorrendo formação de gás e produção de calor. Consequente, 0,1 mol (4 g) de NaOH em 125 mL de água foram adicionados. A mistura bifásica foi agitada durante a noite à temperatura ambiente, até a mudança de cor de amarelo para laranja e redução da fase orgânica. A solução foi tratada com 0,1 mol de cloroacetato de sódio e agitada durante 10 minutos. O cloroacetato de sódio foi preparado pela seguinte reação: foi adicionado 0,1 mol (9,5 g) de ClCH₂COO₂H a uma solução contendo NaOH (0,1 mol, 4 g) em 37,5 mL de água sob agitação durante 10 minutos. Esta mistura foi acidificada com 12,5 mL de HCl concentrado, levando a formação do ácido 2-(alquilcarbamtioiltio)acético, o qual foi filtrado e seco.

Em segundo passo, o ácido 2-(alquilcarbamtioiltio)acético foi dissolvido em excesso de hidrazina monohidratada (5 mL, 0,1 mol) e 2,5 mL de água foram adicionados. A mistura reacional foi refluxada (80 °C) durante 2 horas e deixada durante a noite, sob temperatura ambiente. O produto na forma de pó branco foi recristalizado em mistura de água/etanol quente e posterior evaporação à temperatura ambiente. Rendimento: 24 % (3,8 g; 0,1 mol).

3.5 Preparação do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila–morfolinil-tiossemicarbazona (H₂dmstc)

A síntese da tiossemicarbazona H₂dmstc foi realizada de acordo com os estudos já publicados pelo nosso grupo de pesquisa [41]. A uma solução de 4 mmol (0,7 g, 20 mL) da morfolinil-tiossemicarbazida dissolvido em 20 mL de THF seco foram adicionados 24 mmol (3,5 mL, 2,5 g) de Et₃N. Em seguida, 4 mmol (1 g) do cloreto de *N*-(*N'*,*N'*-dietilaminotiocarbonil)benzimidóila foram adicionados (Esquema 3.3.1). Após agitação de 4 horas à temperatura ambiente, houve a formação de um precipitado branco, o qual foi filtrado e descartado. A solução resultante foi completamente evaporada sob pressão reduzida e o

resíduo obtido de coloração amarelo claro, foi dissolvido em 15 mL de éter etílico e estocado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após um dia de estocagem, o produto depositado de coloração branca foi filtrado, lavado com metanol gelado e n-hexano e, posteriormente, seco sob vácuo. Rendimento: 59% (903 mg; 4 mmol).

Esquema 3.5.1 - Reação de síntese do ligante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofla-morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc).

Dados para H_2dmtsc ($379, 54\text{ g mol}^{-1}$), sólido branco. Análise Calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{OS}_2$: C, 51,36; H, 6,85; N, 17,62 %. Encontrado: C, 54,85; H, 8,27; N, 19,19%. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 3192 md (NH), 1637 mF (C=N), 1502 mF e 14525 mF (C=C), 1354 F (C-N), 1205 F (C-O), 844 f (C=S). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1,12 (t, $J = 6,8\text{ Hz}$, 3H, CH_3); 1,29 (t, $J = 6,8\text{ Hz}$, 3H, CH_3); 3,59 (q, $J = 6,8\text{ Hz}$, 2H, CH_2); 3,76 (t, $J = 4,9\text{ Hz}$, 4H, N- CH_2morf); 3,93 (m, 6H, $\text{CH}_2 + \text{O-CH}_2$); 7,50 (m, 3H, Ph); 7,93 (m, 2H, Ph). P.F.: $108-110\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 Síntese dos complexos de Ouro

3.6.1 Síntese do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (1)

A síntese seguiu o procedimento de Maia *et al.* (Esquema 3.4.1) [41]. A uma solução contendo 0,2 mmol (103 mg) de $\text{Na}[\text{AuCl}_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 2 mL de MeOH, foi adicionado 0,2 mmol (99 mg) de H_2dmtsc . Após 1 hora de agitação à temperatura ambiente, ocorre a precipitação de sólido verde, o qual é filtrado. Este sólido é dissolvido em 2 mL da mistura de MeOH/ CH_2Cl_2 (1:1) para obtenção do produto na forma cristalina de coloração verde. Rendimento: 25% (40 mg; 0,2 mmol).

Esquema 3.6.1- Reação da síntese do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl(dmtsc)}]$.

Dados para $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl(dmtsc)}]$ (**1**) ($609, 95 \text{ g mol}^{-1}$), sólido verde. Análise Calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{AuClN}_5\text{OS}_2$: C, 33,48; H, 3,80; N, 11,48 %. Encontrado: C, 33,40; H, 4,07; N, 11,33%. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 1556 md (C=N), 1500 mF e 1423 mF (C=C), 1357 F (C-N), 1226 F (C-O), 846 f (C=S). Dados de UV-Vis, solução de CH_2Cl_2 [$\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$] ($\log \epsilon$): 310 nm (4,20; $\pi \leftarrow \pi^*$ e $\pi^* \leftarrow n$); 374 nm (3,97; TCLM). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1,23 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3); 1,32 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_3); 3,25 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H, N- CH_2 morf); 3,63 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H, O- CH_2); 3,74 (q, 4H, $J = 7,1$ Hz, CH_2); 7,36 (m, 3H, Ph); 7,59 (m, 2H, Ph). Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, CH_2Cl_2): $0,24 \mu\text{Scm}^{-1}$. Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, DMSO): $0,23 \mu\text{Scm}^{-1}$. P.F.: 120-123 °C.

3.6.2 Síntese do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN(dmtsc)}]$ (**2**)

A síntese deste complexo seguiu o procedimento de Maia *et.al.* (Esquema 3.4.2) [41]. Em uma solução contendo 0,1 mmol (80 mg) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl(dmtsc)}]$ em 1 mL de CH_2Cl_2 , foram adicionados 2 equivalentes de KCN (0,2 mmol, 13 mg), dissolvidos em 1 mL de MeOH. Após 30 minutos de agitação à temperatura ambiente ocorreu a precipitação do produto (sólido marrom) e a evaporação da solução forneceu microcristais marrom-avermelhados. Rendimento: 25% (20 mg; 0,1 mmol).

Esquema 3.6.2 - Reação da síntese do complexo $[Au^{III}CN(dmtsc)]$.

Dados para $[Au^{III}CN(dmtsc)]$ (2) ($600, 51 \text{ g mol}^{-1}$), sólido marrom-avermelhado. Análise Calculada para $C_{18}H_{23}AuN_6OS_2$: C, 36,00; H, 3,86; N, 13,99 %. Encontrado: C, 37,80; H, 3,74; N, 13,58%. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 2173 f ($C\equiv N$); 1562 md ($C=N$), 1506 mF e 1431 mF ($C=C$), 1355 F ($C-N$), 1226 F ($C-O$), 844 fr ($C=S$). Dados de UV-Vis, solução de CH_2Cl_2 [$\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$] ($\log \epsilon$): 289 nm (4,23; $\pi \leftarrow \pi^*$ e $\pi^* \leftarrow n$); 385 nm (4,12; TCLM). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm): 1,25 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3); 1,34 (t, 3H, $J=7,0 \text{ Hz}$, CH_3); 3,31 (t, $J = 4,9 \text{ Hz}$, 4H, N- CH_2 morf); 3,65 (t, $J = 4,9 \text{ Hz}$, 4H, O- CH_2); 3,77 (m, 4H, CH_2); 7,37 (m, 3H, Ph); 7,60 (m, 2H, Ph). Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, CH_2Cl_2): $0,07 \mu\text{Scm}^{-1}$. Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, DMSO): $0,08 \mu\text{Scm}^{-1}$. P.F.: 162-163 °C.

3.6.3 Síntese do complexo $[Au^{III}SCN(dmtsc)]$ (3)

A metodologia foi baseada no procedimento descrito na literatura (Esquema 3.4.3) [41]. Em uma solução contendo 0,05 mmol (31 mg) do complexo $[Au^{III}Cl(dmtsc)]$ em 1 mL de CH_2Cl_2 , foi adicionado 0,1 mmol (9,7 mg) de KSCN dissolvido em 1 mL de MeOH. Após 1 hora de agitação à temperatura ambiente, ocorreu a precipitação do produto. Evaporação da solução forneceu um sólido microcristalino do produto de coloração verde escura. Rendimento: 39% (13 mg; 0,05 mmol).

Esquema 3.6.3 - Reação da síntese do complexo [Au^{III}SCN(dmtsc)].

Dados para [Au^{III}(SCN)dmtsc] (**3**) (632, 58 g mol⁻¹), sólido verde-escuro. Análise Calculada para C₁₈H₂₃AuN₆OS₃·H₂O: C, 33,23; H, 3,87; N, 12,92 %. Encontrado: C, 33,50; H, 3,45; N, 12,56%. IV (ν_{máx}/cm⁻¹): 2129 md (CN, SCN), 1558 md (C=N); 1508 mF e 1421 mF (C=C), 1348 F (C-N), 1224 F (C-O), 844 f (C=S). Dados de UV-Vis, solução de CH₂Cl₂ [λ_{máx}/nm] (log ε): 261 nm (4,66; π←π* e π*←n); 375,50 nm (4,19; TCLM). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH₃); 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH₃); 3,28 (t, J = 4,9 Hz, 4H, N-CH₂morf); 3,64 (t, J = 4,9 Hz, 4H, O-CH₂); 3,76 (m, 4H, CH₂); 7,38 (m, 3H, Ph); 7,62 (m, 2H, Ph). Condutividade molar (10⁻³ mol L⁻¹, CH₂Cl₂): 0,29 μScm⁻¹. Condutividade molar (10⁻³ mol L⁻¹, DMSO): 0,81 μScm⁻¹. P.F.: 121-123 °C.

3.6.4 Síntese do complexo [Au^{III}xant(dmtsc)] (**4**)

A rota sintética seguiu o procedimento baseado na literatura [55] (Esquema 3.4.4). A uma solução contendo 0,15 mmol (92 mg) do complexo [Au^{III}Cl(dmtsc)] em 1 mL de CH₂Cl₂ foi adicionado 1 equivalente (0,15 mmol, 24 mg) de KS₂COCH₂CH₃ em 1 mL de etanol. Após 4 horas de agitação à temperatura ambiente, a solução é deixada sob evaporação para obtenção do produto em forma de cristais de coloração verde escuro. Rendimento: 24% (25 mg; 0,15 mmol).

Esquema 3.6.4 - Reação da síntese do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$.

Dados para $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (5) ($695, 70 \text{ g mol}^{-1}$), sólido verde escuro. Análise Calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{AuN}_5\text{O}_2\text{S}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 33,66; H, 4,24; N, 9,81 %. Encontrado: C, 33,87; H, 3,87; N, 9,54%. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$): 1550 md (C=N), 1492 mF e 1421 mF (C=C), 1354 F (C-N), 1203 F (C-O), 1037 F (CS_2), 869 mf (C=S). Dados de UV-Vis, solução de CH_2Cl_2 [$\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$] ($\log \epsilon$): 289 nm (4,62; $\pi \leftarrow \pi^*$ e $\pi^* \leftarrow n$); 382 nm (4,22; TCLM). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1,24 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3); 1,32 (t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3); 1,39 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3xant); 3,33 (t, $J = 4,9 \text{ Hz}$, 4H, $\text{N-CH}_2\text{morf}$); 3,65 (t, $J = 4,9 \text{ Hz}$, 4H, O-CH_2); 3,76 (q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 4H, N-CH_2); 4,61 (q, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2xant); 7,36 (m, 3H, Ph); 7,65 (m, 2H, Ph). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 12,9 (2C, CH_3); 13,9 (1C, CH_3xant); 47,1 (2C, $\text{N-CH}_2\text{morf}$); 49,8 (2C, N-CH_2); 66,6 (2C, O-CH_2); 70,5 (1C, CH_2xant); 127,20 – 137,9 (6C, Ph); 156,4 e 157,5 (2C, C=N); 162,4 e 213,9 (2C, C=S). ESI(+)MS (m/z , atribuição): 696,08 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, CH_2Cl_2): $0,23 \mu\text{Scm}^{-1}$. Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, DMSO): $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$. P.F.: 139-142 °C.

3.6.5 Síntese do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (5)

Em uma solução contendo 0,1 mmol (40 mg) $[\text{AuCl}_2(\text{damp})]$ dissolvido em 4 mL de MeCN foi adicionado 0,1 mmol (38 mg) do ligante H_2dmtsc . Após 1 hora de agitação ocorre a precipitação do produto de coloração alaranjada. O solvente é completamente removido sob pressão reduzida e, após a obtenção do produto sólido, é realizada uma extração em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ para obtenção do complexo neutro. A fase aquosa é removida, e é adicionado 1 mL MeCN na solução contendo 1 mL CH_2Cl_2 para obtenção do complexo neutro na forma de pó (coloração alaranjada). Rendimento: 48% (34 mg; 0,1 mmol).

Esquema 3.6.5 - Reação da síntese do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$.

Dados para $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (**4**) (708, 69 g mol^{-1}), sólido laranjado. Análise Calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{AuN}_6\text{OS}_2$: C, 44,06; H, 4,98; N, 11,86 %. Encontrado: C, 44,60; H, 5,41; N, 11,86%. IV ($\nu_{\text{máx}} / \text{cm}^{-1}$): 1550 md (C=N), 1490 mF e 1419 mF (C=C), 1352 F (C-N), 1222 md (C-O), 867 f (C=S). Dados de UV-Vis, solução de CH_2Cl_2 [$\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$] (log ϵ): 284 nm; 381 nm (4,01; TCLM). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1,24 (m, 6H, CH_3); 2,62 (s, 6 H, CH_3damp); 3,37 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H, N- CH_2morf); 3,70 (m, 8H, O- $\text{CH}_2 + \text{CH}_2$); 4,16 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, N- CH_2damp); 4,20 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, N- CH_2damp); 7,20 – 7,38 (m, 5H, Ph); 7,49 - 7,85 (m, 4H, Ph-damp). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 12,5 (2C, CH_3); 12,7 (2C, N- CH_3); 43,5 (2C, N- CH_2morf); 49,4 (2C, CH_2); 64,3 (2C, O- CH_2); 66,4 (1C, N- CH_2damp); 126,8 e 129,5 (6C, Ph); 131,1 e 135,7 (5C, Ph); 137,8 (1C, Ph); 155,6 (1C, C=N); 157,1 (1C, C=N); 162,6 (1C, C=S). ESI(+)-MS (m/z , atribuição): 709,20 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, CH_2Cl_2): 0,04 μScm^{-1} . Condutividade molar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, DMSO): 0,72 μScm^{-1} . P.F.: 175-178 $^{\circ}\text{C}$.

3.7 Ensaios de atividade antitumoral *in vitro*

Os complexos sintetizados foram avaliados quanto sua capacidade de citotoxicidade frente às linhagens HepG2 (carcinoma humano hepatocelular), HeLa (carcinoma cervical humano), DU-145 (carcinoma de próstata humano), MDA-MB-231 (carcinoma de mama humano invasiva) e linhagem saudável VERO (célula epitelial renal de primata).

As células foram cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), sulfato de gentamicina (50 mg L^{-1}) e anfotericina B (2 mg L^{-1}), e mantidas incubadas em estufa a 37°C (5% CO_2). Para a realização dos ensaios de

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

citotoxicidade, as células foram coletadas utilizando uma solução de tripsina/EDTA (VitreCell®), centrifugadas (2000 rpm por 5 min) e contadas. Foram utilizadas concentrações de $7,5 \cdot 10^4$ por mL para as linhagens tumorais e $3,4 \cdot 10^5$ por mL para a linhagem VERO. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços permitindo um volume final de 200 μL ($1,5 \cdot 10^4$ por poço) e ($6,8 \cdot 10^4$ por poço), respectivamente, e incubadas por 24 horas a 37°C com 5% CO_2 . Após o período de incubação, os complexos, em concentrações de 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram preparados em DMSO e submetidos à diluição seriada 1:5 em meio DMEM com intervalo de 500 a 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As células foram expostas aos compostos nas diferentes concentrações por 24 horas. Após esta segunda incubação, foi adicionado 30 μL de resazurina (concentração de 0,01% em água destilada estéril) em toda a microplaca, e esta solução final foi incubada por 6 horas. No meio celular, ocorre a redução da Resazurina (composto azul e não fluorescente) em Resorufina (composto rosa e fluorescente) em resposta ao metabolismo celular (Esquema 3.5.1). Se o composto químico testado não apresentar atividade sobre as células avaliadas, a Resazurina é reduzida para Resorufina, assumindo então a coloração rosa. Esta mudança de coloração pode ser quantificada por espectroscopia de fluorescência e o grau de atividade do composto determinada.

A leitura final foi realizada por meio de espectroscopia de fluorescência no SpectraFluor Plus (TECAN®). De acordo com a FDA (*U.S Food and Drug Administration*), o IC_{50} representa a concentração requerida do composto capaz de inibir 50% do crescimento celular. Para verificar o efeito do solvente DMSO, a solução controle foi realizada em uma diluição na proporção 1:5 em relação ao solvente e o meio de cultura, respectivamente.

Esquema 3.7.1 - Estrutura da solução reveladora Resazurina (coloração azul) e Resorufina (coloração rosa) [56].

3.8 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* para células do baço de camundongos Swiss

As células do baço foram isoladas a partir de camundongos Swiss (20-25 g), maceradas em meio RPMI 1640 (Gibco) e depois filtradas em um filtro com poros de 100 micrometros. As células isoladas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos e os eritrócitos foram lisados com tampão de lise por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas, contadas e ressuspensas a $6.5 \cdot 10^6/\text{mL}$, em meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino. As células do baço foram plaqueadas em placas de 96 poços ($n = 2$) e incubadas durante 24 horas com os complexos (concentrações 500 - $3,75 \mu\text{molL}^{-1}$ em diluições seriadas). O Benzonidazol (BZ) foi usado como medicamento de referência e o Tween-20 foi utilizado como controle positivo de morte celular. Após o período de incubação, as células foram incubadas com $1 \mu\text{L}$ de iodeto de propídio (PI) (concentração final $10 \mu\text{gmL}^{-1}$), à temperatura ambiente e no escuro por 5 minutos. Após a incubação, imediatamente foi feito a análise da amostra no citômetro de fluxo. Utilizando o PI foi possível a obtenção da contagem celular em células totais, vivas e mortas [57].

3.9 Ensaio para avaliação do potencial anti- *Trypanossoma cruzi* dos compostos

A cepa Tulahuen LacZ foi gentilmente cedida pelo Dr. Jean J. Silva, a qual expressa de maneira estável o gene da β -galactosidase de *E. coli*. A viabilidade desta cepa de *T. cruzi* é observada ao adicionar o substrato da β -galactosidase em cultura.

As células LLCMK₂ foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos e os tripomastigotas derivados da cultura foram utilizados nos ensaios *in vitro*. O sobrenadante obtido deste cultivo, contendo as formas tripomastigotas juntamente com algumas células, foi submetido à centrifugação (1200 rpm por 10 minutos, a 4 °C). O sedimento, contendo principalmente células, foi desprezado e o sobrenadante foi novamente centrifugado (3000 rpm por 30 minutos, a 4 °C). Após esta etapa, o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI sem vermelho de fenol e as formas tripomastigotas foram submetidas à contagem para ajustar as quantidades de parasitas utilizadas nos procedimentos experimentais. As formas tripomastigotas ($1 \cdot 10^6$ parasitas/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e os complexos foram adicionados em diferentes concentrações (500 - $3,75 \mu\text{molL}^{-1}$ - diluições seriadas). As placas foram mantidas em estufa de CO₂ a 5% e a 37 °C durante 24 horas. Após este período, $50 \mu\text{L}$ da solução de CPRG (Chlorophenol red β -D-galactopyranoside, $400 \mu\text{molL}^{-1}$ em 0,3%

Triton X-100, pH 7.4) foram então adicionados e a placa incubada a 28 °C, em estufa de CO₂ a 5% durante 6 horas. A absorbância obtida foi lida em 570 nm. Como controle positivo, foi utilizado o Benzonidazol (BZ) nas mesmas concentrações e como controle negativo foi utilizado meio de cultura RPMI incolor. Os resultados expressos como IC_{try50} foram calculados pelo método estatístico de curva concentração-resposta sigmoidal, por meio do software GraphPad prisma 4.0.

3.10 Estudo de interação com DNA-ct por espectroscopia UV-Vis

O estudo da interação dos complexos com o DNA foi realizado através de titulação espectroscópica à temperatura ambiente utilizando espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A. Primeiramente, a solução de DNA foi preparada pela adição de DNA-ct (40 mg) em solução tampão Trizma (20 mL) com pH = 7,1 (4,5 mM Trizma HCl, 0,5mM de Trizma base e 50 mM NaCl). A concentração exata do DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis, onde em uma cubeta com 2000 µL de tampão foi adicionado 80 µL da solução de DNA para realizar a medida. Sabe-se que a absorvidade molar do DNA em 260 nm é 6600 mol⁻¹cm⁻¹L, de forma que a partir deste valor é possível determinar a concentração do DNA por meio da lei de Lambert-Beer (Equação 3.8.1):

$$\text{Equação 3.10.1} \quad A_{260} = \varepsilon_{260} \times b \times C$$

De acordo com a Equação 3.8.1, A (u.a.) se refere à absorbância do cromóforo sendo neste caso, o DNA-ct; ε (mol⁻¹cm⁻¹L) é a absorvidade molar, b é o caminho óptico (cm) e c (molL⁻¹) é a concentração molar;

As titulações foram realizadas adicionando, em uma cubeta, 1950 µL de tampão Trizma e 100 µL de complexo na concentração de 1.10⁻³ molL⁻¹, em DMSO. O volume do complexo é determinado de maneira que a absorbância da solução final (tampão + complexo) não ultrapasse o valor de 1 com o intuito de obedecer as limitações reais descritas para a Lei de Lambert Beer. Foi feita a mesma adição de DMSO e de tampão na cubeta de referência com a finalidade de subtrair este espectro do espectro amostra. Em seguida, foram realizadas sucessivas adições de 5 µL de DNA-ct em ambas as cubetas. As soluções foram homogeneizadas por cerca de 1 minuto e, em seguida, foram registrados os espectros. Vale ressaltar que o DNA-ct foi adicionado tanto na cubeta de referência quanto na cubeta conteúdo

o complexo para garantir que toda a variação espectral fosse proveniente da interação do complexo com o DNA-ct, podendo descontar qualquer possível interação que ocorra entre o DMSO e DNA-ct.

A titulação foi finalizada quando não foram observadas maiores alterações na absorvância da banda do complexo após a adição sucessiva do DNA-ct. O DNA-ct, a solução tampão Trizma e o solvente foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich.

3.11 Estudo da interação com albumina de soro humano (HSA)

O estudo da interação dos complexos sintetizados foi realizado por meio da medida de supressão da fluorescência dos resíduos triptofano e tirosina presentes na albumina ($2,5 \mu\text{molL}^{-1}$) em tampão Trizma pH 7.4. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 280 nm e sua monitoração foi realizada utilizando os complexos como supressores em diferentes concentrações ($7,81 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), solubilizados em DMSO.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 180 μL de albumina e 20 μL de solução do complexo, com a finalidade de não exceder a quantidade de 0,1% de DMSO presente em cada amostra. Esta porcentagem de DMSO é utilizada como padrão para atenuar a interferência do solvente na obtenção dos resultados. Como referência, foram adicionados em um dos poços, 180 μL de albumina e 20 μL de DMSO. As medidas foram efetuadas em quatro temperaturas de incubação (295, 300, 305 e 310° K), a fim de avaliar o mecanismo de supressão deste sistema. Os espectros de fluorescência foram obtidos a partir de um fluorímetro SpectraMax M3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos compostos de interesse

A síntese do ligante H₂dm₂sc consiste em uma reação de substituição do cloro proveniente do cloreto de *N*-(*N*',*N*'-dietilaminotiocarbonil)benzimidazóla pela morfolinil-tiossemicarbazida (Esquema 3.3.1), fornecendo o produto de coloração branca. Este foi caracterizado por métodos espectroscópicos (IV e ¹H RMN) e ponto de fusão. O composto é solúvel em CHCl₃, DMSO, MeCN, acetona, CH₂Cl₂, tolueno, THF e insolúvel em H₂O e hexano.

A reação entre H₂dm₂sc e Na[AuCl₄].2H₂O em MeOH, à temperatura ambiente, fornece o precipitado microcristalino do complexo **1** de coloração verde escuro (Esquema 3.4.1). A partir deste complexo, é possível obter os complexos **2**, **3** e **4** por meio da reação de substituição do co-ligante cloro pelos ligantes CN⁻, SCN⁻ e C₃H₅OS₂⁻, respectivamente (Figura 4.1.1 e Esquemas 3.4.2 à 3.4.4). Entretanto, o complexo **5** é obtido através da reação entre H₂dm₂sc e o precursor metálico [AuCl₂(dmp)], onde ocorre a dupla desprotonação do H₂dm₂sc, seguida da coordenação pelos átomos *SNS* ao centro metálico, fornecendo o produto de coloração alaranjada (Figura 4.1.1 e Esquema 3.4.5). Esses complexos são solúveis em CHCl₃, DMSO, CH₂Cl₂, acetona, DMF e insolúveis em H₂O e hexano. Os mesmos foram caracterizados por métodos espectroscópicos (IV, UV-Vís, ¹H e ¹³CRMN), espectrometria de massas, condutimetria, ponto de fusão e análise elementar.

Figura 4.1.1 - Representação esquemática para a síntese dos complexos de ouro.

Fonte: O autor.

4.2 Caracterização dos compostos de interesse

Os dados experimentais discutidos nas próximas seções podem ser encontrados em Procedimento Experimental e os espectros, assim como os gráficos, discutidos podem ser encontrados em anexo: infravermelho (**Anexo-A**), ^1H e ^{13}C RMN (**Anexo-B**), Espectro de UV-vís (**Anexo-C**), Gráficos plotados para interação de DNA-ct (**Anexo-D**), Gráficos plotados para interação com HSA (**Anexo-E**).

4.2.1 Ponto de fusão, condutimetria e análise elementar

Os dados obtidos pela condutividade molar, tanto em CH_2Cl_2 quanto em DMSO, de todos os complexos estudados neste trabalho, são apresentados na Tabela 4.2.1. Nota-se que os valores são em torno de $0\ \mu\text{Scm}^{-1}$ sendo indício da formação de complexos neutros. A mesma tabela contém os valores obtidos para o ponto fusão, com variação de no máximo $3\ ^\circ\text{C}$.

Tabela 4.2.1.1- Ponto de fusão e Condutividade molar à $1.10^{-3}\ \text{molL}^{-1}$.

Composto	Ponto de fusão	Condutividade (μScm^{-1})	
		DMSO	CH_2Cl_2
H_2dmtsc	109-110 $^\circ\text{C}$	-	-
1	120-123 $^\circ\text{C}$	0,23	0,24
2	162-163 $^\circ\text{C}$	0,08	0,07
3	121-123 $^\circ\text{C}$	0,81	0,29
4	139-142 $^\circ\text{C}$	0,10	0,23
5	175-178 $^\circ\text{C}$	0,72	0,04

Os resultados para a análise elementar (%C, H, N) são apresentados na Tabela 4.2.1.2. Os valores obtidos estão de acordo com as composições esperadas.

Tabela 4.2.1.2 – Dados percentuais para os teores de C, H, N, calculados e encontrados, para os compostos sintetizados

Composto	Análise elementar (calculado) encontrado		
	% C	%H	%N
H ₂ dm ₂ sc C ₁₇ H ₂₅ N ₅ OS ₂	(53,80) 54,85	(6,64) 8,27	(18,45) 19,19
1 C ₁₇ H ₂₃ AuClN ₅ OS ₂	(33,48) 33,40	(3,80) 4,07	(11,48) 11,33
2 C ₁₈ H ₂₃ AuN ₆ OS ₂	(36,00) 37,80	(3,86) 3,74	(13,99) 13,58
3 C ₁₈ H ₂₃ AuN ₆ OS ₃ ·H ₂ O	(33,23) 33,50	(3,87) 3,45	(12,92) 12,56
4 C ₂₀ H ₂₈ AuN ₅ O ₂ S ₄ ·H ₂ O	(33,66) 33,87	(4,24) 3,82	(9,81) 9,54
5 C ₂₆ H ₃₅ AuN ₆ OS ₂	(44,06) 44,60	(4,98) 5,41	(11,86) 11,86

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de infravermelho do ligante livre H₂dm₂sc é caracterizado por uma banda forte e larga relativa à $\nu(\text{N-H})$ em 3192 cm⁻¹, uma banda muito forte relativa à $\nu(\text{C=N})$ em 1637 cm⁻¹, uma banda forte em 1354 cm⁻¹ relativa à $\nu(\text{C-N})$, uma banda forte em 1205 cm⁻¹ referente à $\nu(\text{C-O})$ e uma banda fraca em 844 cm⁻¹ referente à $\nu(\text{C=S})$ [41], conforme é observado na Figura 4.2.2. O espectro também apresenta uma banda de estiramento $\nu(\text{C-H})$ alifático em 2966 cm⁻¹; enquanto que a banda de estiramento $\nu(\text{C=C})$ em anel aromático é observada em 1502 cm⁻¹ e 1425 cm⁻¹. A vibração de dobramento C-H fora do plano em anel aromático monossustituído é encontrado em 696 cm⁻¹.

Figura 4.2.2.1 - Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila-morfolinil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) em pastilha de KBr.

No espectro de IV dos complexos, (Tabela 4.2.2.1 e Figuras A.2 à A.6, Anexos) a absorção relativa à $\nu(\text{NH})$, banda forte e larga, não é observada conforme o esperado para a dupla desprotonação do ligante com formação de compostos neutros. Também é observado o deslocamento da banda de estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ ao se comparar com o ligante não coordenado. Este comportamento é um indicativo da formação de complexos quelatos com alto grau de deslocalização eletrônica π .

De acordo com o espectro de IV do complexo **2** (Figura 4.2.2.2), a absorção em 2173 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$. O CN^- age como forte doador σ e fraco aceptor π e, como consequência da coordenação ao metal, o estiramento $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ é observado em uma frequência relativamente alta. Tal comportamento é um indicativo da forte doação σ neste complexo, pois os elétrons são removidos do orbital 3σ , o qual é fracamente antiligante [41]. O contrário seria observado no caso da retrodoação π , pois a frequência da $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ tenderia a decrescer devido a população de elétrons no orbital antiligante $2p\pi^*$ [58].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.2.2.1- Bandas de absorção do espectro na região do infravermelho (IV).

Composto	$\nu(\text{NH})$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}=\text{C})$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}=\text{N})$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}-\text{N})$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}-\text{O})$ cm^{-1}	$\nu(\text{CS}_2)$ cm^{-1}	$\nu(\text{C}=\text{S})$ cm^{-1}
H ₂ dmtsc	3192	-	1502 e 1425	1637	1358	1205	-	844
1	-	-	1500 e 1423	1556	1357	1226	-	846
2	-	2173	1506 e 1431	1562	1355	1226	-	844
3	-	2129	1508 e 1421	1558	1348	1224	-	844
4	-	-	1492 e 1421	1550	1354	1203	1037	869
5	-	-	1490 e 1419	1550	1352	1222	-	867

Figura 4.2.2.2- Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (**2**) em pastilha de KBr.

No caso do complexo **3** (Figura 4.2.2.3), a absorção em 2129 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ referente à coordenação do tiocianato pelo átomo de enxofre (SCN). A banda característica da coordenação via átomo de nitrogênio do isotiocianato (NCS), banda na região de 2060 cm^{-1} , não foi observada [41,58].

Figura 4.2.2.3- Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (**3**) em pastilha de KBr.

Como se pode observar na Figura 4.2.2.4, a banda característica do grupo xantato no complexo **4** foi observada em 1037 cm^{-1} , sendo referente ao estiramento assimétrico do grupo CS_2 [59].

Figura 4.2.2.4- Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (**4**) em pastilha de KBr.

4.2.3 Espectroscopia na região do UV-Visível

Ao contrário do ligante H₂dmtsc, o qual não apresenta bandas com máximos de absorção na região do visível (Figura B.1, Anexos), todos os complexos possuem absorções quase idênticas com duas bandas bem definidas e com altos valores de coeficientes de extinção molar (ϵ) (Tabela 4.2.3.1 e Anexo B). O complexo **1**, por exemplo, possui duas bandas intensas em 310 e 374 nm, com coeficientes de extinção molar (ϵ) no valor de 15.925 L⁻¹mol⁻¹cm⁻¹ e 9.501 L⁻¹mol⁻¹cm⁻¹, respectivamente (Figura 4.2.3.1). Contudo, de acordo com a Figura 4.2.3.2, o espectro de UV-Vís do complexo **5** possui apenas uma banda bem definida em 381 nm com ϵ no valor de 10.306 L⁻¹mol⁻¹cm⁻¹.

De acordo com a Tabela 4.2.3.1, a banda I possui alto valor de ϵ e se encontra na região de maior energia (menor comprimento de onda). Sua atribuição é dada pela combinação de bandas intraligantes $\pi^* \leftarrow \pi$ e $\pi^* \leftarrow n$, localizadas principalmente nos fragmentos – NCS (n = orbital não ligante localizado nos átomos de enxofre). A banda referente à transição $\pi^* \leftarrow n$ possui baixa intensidade e por este motivo nem sempre é detectada devido à sobreposição com a banda $\pi^* \leftarrow \pi$, a qual possui maior intensidade. Por outro lado, a banda II se encontra na região de menor energia (maior comprimento de onda) com altos valores ϵ podendo ser atribuída à transferência de carga $Au \leftarrow S$ ($dx^2-y^2 \leftarrow p$) [40, 60].

Tabela 4.2.3.1- Bandas de absorção no espectro eletrônico na região do UV-vís.

Composto (1.10 ⁻⁵ molL ⁻¹)	$\lambda_{\max}(\text{nm})$ (log ϵ)	
	Banda I	Banda II
1	310,00 (4,20)	374,50 (3,97)
2	289,50 (4,23)	385,00 (4,12)
3	261,50 (4,66)	375,50 (4,19)
4	289,00 (4,62)	382,50 (4,22)
5	284,50	381,00 (4,01)

Figura 4.2.3.1- Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (**1**) em CH_2Cl_2 . Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Figura 4.2.3.2- Espectro de absorção na região do UV-vís dos complexos $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (**5**) em CH_2Cl_2 . Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

4.2.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C

No que diz respeito ao espectro de ^1H RMN do H_2dmtsc (Figura 4.2.4.1 e Tabela 4.2.4.1), este apresenta um conjunto de sinais não equivalentes para os grupos etil (sinais **a** e **b**), no fragmento tiouréia [41]. Este comportamento ocorre como consequência da rotação restrita das ligações $\text{C}-\text{NEt}_2$ [61].

Conforme a estrutura molecular do H₂dm₂sc (Figura 4.2.4.2), a deslocalização de elétrons das ligações π (C(1)-S(1) e N(1)-C(2)) se torna possível devido à simetria dos orbitais p no átomo N(1) e à planaridade da estrutura. Esta deslocalização de elétrons é responsável pela rotação restrita das ligações C-NEt₂ [62]. Os dados cristalográficos confirmam este efeito, pois, de acordo com a Tabela 4.2.4.2 [40], as ligações N(5)-C(1), C(1)-N(1) e N(1)-C(2) possuem caráter parcial de ligação dupla enquanto a ligação C(1)-S(1) possui caráter parcial de ligação simples devido ao comprimento desta ligação ser ligeiramente maior quando comparado a típica ligação dupla, a ligação C(3)-S(2), por exemplo.

Os sinais dos grupos metílenos do grupo morfolinil (sinais **e,f** e **g,h** – Figura 4.2.4.1) são quimicamente equivalentes devido à rotação não restrita em torno das ligações C-N_{morf} no fragmento da tiossemicarbazida.

Figura 4.2.4.1 - Espectro de ¹H RMN do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidofla-morfolinil-tiossemicarbazona (H₂dm₂sc) em CDCl₃ (δ = ppm).

Tabela 4.2.4.1 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóila-morfolonil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc).

	δ ppm	Multiplicidade	Integral
a	1,12	t, J = 6,8 Hz	3H
b	1,29	t, J = 6,8 Hz	3H
c	3,59	q, J = 6,8 Hz	2H
e,f	3,76	t, J = 4,9 Hz	4H
d,g,h	3,93	m	6H
j,k,l	7,50	m	3H
i,m	7,93	m	2H

Figura 4.2.4.2 - Estrutura molecular do agente complexante H_2dmtsc .

Fonte: Referência [40].

Tabela 4.2.4.2 – Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados em H₂dmtsc [40].

C(1)-S(1)	1.7164(19) / 1.7117(19)
C(3)-S(2)	1.6705(18) / 1.6758(17)
N(2)-N(3)	1.3774(18) / 1.3765(18)
C(3)-N(3)	1.362(2) / 1.364(2)
C(2)-N(1)	1.2902(19) / 1.2917(19)
C(1)-N(5)	1.331(2) / 1.329(2)
C(2)-N(2)	1.345(2) / 1.345(2)
C(3)-N(4)	1.349(2) / 1.344(2)
C(1)-N(1)	1.367(2) / 1.366(2)
N(5)-C(1)-N(1)	115.95(16) / 115.26(16)
N(3)-C(3)-S(2)	120.52(13) / 120.52 (12)
N(1)-C(1)-S(1)	122.01 (13) / 122.05(13)

Os deslocamentos δ nos espectros de ¹H RMN dos complexos de ouro (Tabelas 4.2.4.3 à 4.2.4.9 e Anexo C) são similares ao do ligante livre H₂dmtsc e suas integrais e multiplicidades estão de acordo com as estruturas propostas para cada complexo, conforme citado por Maia *et al.* [41]. Como por exemplo, o espectro de ¹H RMN do complexo **1** (Figura 4.2.4.3 e Tabela 4.2.4.2) apresenta o conjunto de sinais não equivalentes previsto para os grupos etil (sinais **a** e **b**) e os demais sinais se encontram nos deslocamentos δ esperados, assim como suas respectivas integrais e multiplicidades estão de acordo com a estrutura do complexo. O mesmo comportamento nos espectros de ¹H RMN é observado para os demais complexos.

Figura 4.2.4.3 - Espectro de ¹H RMN do complexo [Au^{III}Cl(dmtsc)] (**1**) em CDCl₃ (δ = ppm).

Tabela 4.2.4.3 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (1).

	δ ppm	Multiplicidade	Integral
a	1,23	t, J = 7,1 Hz	3H
b	1,32	t, J = 7,1 Hz	3H
e,f	3,25	t, J = 4,9 Hz	4H
g,h	3,63	t, J = 4,9 Hz	4H
c,d	3,74	q, J = 7,1 Hz	4H
j,k,l	7,36	m	3H
i,m	7,59	m	2H

Tabela 4.2.4.4 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (2).

	δ ppm	Multiplicidade	Integral
a	1,25	t, J = 7,0 Hz	3H
b	1,34	t, J = 7,0 Hz	3H
e,f	3,31	t, J = 4,9 Hz	4H
g,h	3,65	t, J = 4,9 Hz	4H
c,d	3,77	m	4H
j,k,l	7,37	m	3H
i,m	7,60	m	2H

Tabela 4.2.4.5 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (3).

	δ ppm	Multiplicidade	Integral
a	1,25	t, J = 7,1 Hz	3H
b	1,34	t, J = 7,1 Hz	3H
e,f	3,28	t, J = 4,9 Hz	4H
g,h	3,64	t, J = 4,9 Hz	4H
c,d	3,76	m	4H
j,k,l	7,38	m	3H
i,m	7,62	m	2H

No caso do complexo **4**, sua estrutura pode ser confirmada através dos espectros de ^1H RMN (Figura 4.2.4.4 e Tabela 4.2.4.6) e ^{13}C RMN (Figura 4.2.4.5 e Tabela 4.2.4.7).

Figura 4.2.4.4 - Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (**4**) em CDCl_3 (δ = ppm).

Tabela 4.2.4.6 - Deslocamento químico do espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (**4**).

	δ ppm	Multiplicidade	Integral
a	1,24	t, J = 7,0 Hz	3H
b	1,32	t, J = 7,0 Hz	3H
o	1,39	t, J = 7,1 Hz	3H
e, f	3,33	t, J = 4,9 Hz	4H
g, h	3,65	t, J = 4,9 Hz	4H
c, d	3,76	q, J = 7,0 Hz	4H
n	4,61	q, J = 7,1 Hz	2H
j, k, l	7,36	m	3H
i, m	7,65	m	2H

Figura 4.2.4.5 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (**4**) em CDCl_3 ($\delta = \text{ppm}$).

Tabela 4.2.4.7 - Deslocamento químico do espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ (**4**).

	δ ppm
C_1, C_2	12,9
C_{20}	13,9
$\text{C}_{14}, \text{C}_{17}$	47,1
C_3, C_4	49,8
$\text{C}_{15}, \text{C}_{16}$	66,6
C_{19}	70,5
C_7 à C_{12}	127,2 à 137,9
$\text{C}_6, \text{C}_{13}$	156,4 e 157,5
$\text{C}_5, \text{C}_{18}$	162,4 e 213,9

O espectro de ^1H RMN do complexo **5** apresenta o deslocamento δ e as integrais de acordo com o esperado (Figura 4.2.4.6 e Tabela 4.2.4.8). A diferença de deslocamento químico encontrado nos sinais referentes à N-CH₃ no fragmento damp (sinais **s** e **t**) em comparação aos sinais **a** e **b** (CH₃) no fragmento tiouréia, ocorre devido aos hidrogênios α ao N serem levemente desblindados por causa da eletronegatividade do elemento. No mesmo espectro, também se pode observar uma pequena diferença de deslocamento químico para o sinal **r**, referente ao N-CH₂ do fragmento damp, em relação aos demais N-CH₂ (sinais **c**, **d**, **e**, **f**) nos fragmentos tiouréia e tiossemicarbazida o qual é ocasionado pela desblindagem dos hidrogênios devido ao campo anisotrópico gerado pelo anel do fragmento damp. No espectro de ^{13}C RMN (Figura 4.2.4.7 e Tabela 4.2.4.9), os sinais estão de acordo com a estrutura proposta.

Figura 4.2.4.6 - Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (**5**) em CDCl_3 . (δ = ppm).

Tabela 4.2.4.8 - Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (**5**) em CDCl_3 (δ = ppm).

	δ ppm	Multiplicidade	Integral
a,b	1,24	m	6H
s,t	2,62	s	6H
e,f	3,37	t, J = 4,9 Hz	4H
c,d,g,h	3,70	m	8H
r	4,16 e 4,20	d, J = 12 Hz e d, J = 12 Hz	2H
i,j,k,l,m,	7,20 à 7,38	m	5H
n,o,p,q	7,49 à 7,85	m	4H

Figura 4.2.4.7 - Espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (**5**) em CDCl_3 . (δ = ppm).

Tabela 4.2.4.9 - Deslocamento químico do espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ (**5**).

	δ ppm
C_1, C_2	12,5
C_{25}, C_{26}	12,7
C_3, C_4	43,5
C_{14}, C_{17}	49,4
C_{15}, C_{16}	64,3
C_{24}	66,4
C_7 à C_{12}	126,8 e 129,5
C_{18} à C_{22}	131,1 e 135,7
C_{23}	137,88
C_6	155,6
C_{13}	157,1
C_5	162,6

4.2.5 Espectrometria de massas ESI(+)-MS

A Figura 4.2.5.2 apresenta o espectro de massas do complexo **4** onde o pico referente à $[M+H]^+$ se encontra com o valor de 696,08, conforme o esperado. Além deste pico molecular, é possível observar o pico em 346,16 referente ao derivado do triazol, *N*-(hexametileno)-*N'*-1-(5-dietilamina-3-fenil-1,2,4-triazolil)tioréia (Figura 4.2.5.1). De acordo com Maia *et al.* [41], em condições de alta energia há o favorecimento para a ciclização do ligante tiossemicarbazona juntamente com a redução do centro metálico. Neste caso, a espécie heterocíclica é formada após a abstração do átomo de enxofre, desulfurização, devido à contração do anel.

Figura 4.2.5.1 – Estrutura proposta para o composto *N*-(hexametileno)-*N'*-1-(5-dietilamina-3-fenil-1,2,4-traizolil)tioréia.

Fonte: Referência [41]

Figura 4.2.5.2 - Espectro de massa ESI⁺MS do complexo [Au^{III}xant(dmtsc)] (**4**) (δ = ppm).

Para o complexo **5**, o valor do pico do íon molecular referente à $[M+H]^+$ é de 709,20 conforme ilustrado na Figura 4.2.5.3. Este espectro não forneceu informação relativa à ciclização da tiossemicarbazona e redução do ouro, sendo um indício da estabilização do centro metálico ocasionada pela ligação σ do grupo aril referente ao ligante damp.

Figura 4.2.5.3 - Espectro de massa ESI⁺MS do complexo [Au^{III}damp(dmtsc)] (**5**) (δ = ppm).

4.3 Atividades Biológicas

4.3.1 Ensaios de atividade antitumoral dos compostos *in vitro*

Compostos com diferenças sistemáticas, combinando ligantes e metal com potenciais biológicos, foram desenvolvidos a fim de obter uma visão geral da influência da estrutura molecular na atividade biológica.

A atividade antitumoral do ligante H₂dmtsc e dos complexos sintetizados, assim como seus precursores, foram comparados por meio dos valores obtidos de IC₅₀. Quanto menor o valor de IC₅₀, maior é a atividade do composto. Desta maneira, compostos que apresentam menores valores de IC₅₀ quando comparado ao composto de referência, a cisplatina, são selecionados para estudos *in vivo*.

Na Tabela 4.3.1.1 estão listados os valores de IC₅₀ (μmolL⁻¹) de atividade antitumoral dos complexos sobre as linhagens HepG2 (carcinoma humano hepatocelular), HeLa (carcinoma cervical humano), DU-145 (carcinoma de próstata humano) e MDA-MB-231 (carcinoma de mama humano invasiva).

De acordo com a Tabela 4.3.1.1 e os Gráficos 4.3.1.1 e 4.3.1.2, os ensaios de atividade antitumoral sobre às células tumorais avaliadas mostraram altos valores de IC₅₀ para o ligante livre H₂dmtsc. Contudo, o mesmo não foi observado para os valores de IC₅₀ dos respectivos complexos, indicando a interferência do metal na atividade antitumoral.

Tabela 4.3.1.1 - Valores de IC₅₀ (μmolL⁻¹) dos compostos frente às células tumorais e célula VERO (linhagem de célula saudável).

Compostos	HepG2	HeLa	DU - 145	MDA-MB-231	VERO
1	15,9 ± 5,59	31,7 ± 2,90	8,37 ± 1,63	8,05 ± 0,64	7,88 ± 1,84
2	48,5 ± 2,83	29,3 ± 3,82	45,8 ± 9,19	15,7 ± 3,46	33,1 ± 9,26
3	8,85 ± 5,09	7,43 ± 1,41	7,11 ± 1,98	< 3,16	7,90 ± 4,24
4	111 ± 50,2	179 ± 0,35	489 ± 70,1	28,5 ± 8,49	15,0 ± 0,92
5	48,8 ± 30,6	66,7 ± 3,68	213 ± 26,4	120 ± 4,10	239 ± 89,2
Na[AuCl ₄].2H ₂ O	276 ± 50,1	117 ± 25,7	< 5,03	< 5,28	6,79 ± 0,99
KS ₂ COCH ₂ CH ₃	731 ± 69,8	2474 ± 2,62	> 3119	> 3119	> 3119
KCN	> 7678	7369 ± 30,5	6967 ± 65,5	> 7678	6139 ± 55,0
KSCN	4937 ± 28,5	4898 ± 33,9	4975 ± 23,1	4665 ± 26,9	4937 ± 28,5
H ₂ dmtsc	> 1317	> 1317	> 1317	> 1317	1243 ± 5,52
[AuCl ₂ (damp)]	23,9 ± 0,78	28,6 ± 0,92	20,2 ± 1,13	13,9 ± 0,85	26,9 ± 2,62
Cisplatina	60,3 ± 4,53	85,0 ± 1,48	48,7 ± 4,03	143 ± 0,99	110 ± 8,06

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Gráfico 4.3.1.1 - Compostos utilizados para estudos *versus* valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) frente às células tumorais.

Gráfico 4.3.1.2 – Complexos utilizados para estudo e composto de referência cisplatina *versus* valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) frente às células tumorais.

Fazendo uma relação entre resultados de IC_{50} para as linhagens estudadas, observou-se que o complexo **4** possui baixa atividade antitumoral sobre às linhagens HepG2, HeLa e DU-145, ao contrário do observado para a linhagem MDA-MB-231. O complexo **4** apresentou um IC_{50} cinco vezes menor quando comparado à cisplatina. Este resultado mostrou uma maior eficiência do composto às células de câncer de mama invasivo. Contudo, o complexo **3** apresentou resultados promissores para todas as linhagens estudadas, com valores de IC_{50} até onze vezes menor quando comparado à cisplatina, se destacando dentre os complexos estudados neste trabalho. Também se deve ressaltar o resultado obtido para o complexo **1** frente à linhagem MDA-MB-231, o qual apresentou um IC_{50} dezoito vezes menor em relação ao composto de referência; ademais, o mesmo complexo apresentou valores promissores também para as outras células cancerígenas avaliadas. Através dos resultados obtidos, se pode concluir que os co-ligantes L possuem interferência significativa nas atividades biológicas dos complexos $[AuL(dmtsc)]$, em vista da variação verificada para os valores de IC_{50} .

A fim de selecionar candidatos a fármacos como antitumorais para os futuros estudos *in vivo*, o Índice de Seletividade foi calculado ($IS = IC_{50}$ linhagem celular saudável/ IC_{50} linhagem celular tumoral). Como linhagem celular saudável fez-se o uso de células VERO, cujos valores de IC_{50} são apresentados na Tabela 4.3.1.1.

De acordo com os valores de IS obtidos (Tabela 4.3.1.2 e Gráfico 4.3.1.3), tanto o ligante H_2dmtsc quanto o precursor $Na[AuCl_4] \cdot 2H_2O$ não apresentaram seletividade quando comparados com a cisplatina. Entretanto, considerando todos os complexos avaliados, o complexo **5** foi o que apresentou maior seletividade para todas as linhagens de células estudadas. Apesar do complexo **5** apresentar menor atividade antitumoral sobre as células DU-145 e MDA-MB-231, sua seletividade o torna interessante para futuros estudos *in vivo*. Contudo, os demais compostos avaliados neste trabalho não devem ser descartados nos estudos *in vivo* pois suas atividades podem ser diferenciadas ao do observado no experimento *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.3.1.2 - Índice de seletividade (IS) para os compostos. $IS = IC_{50}(VERO) / IC_{50}(\text{linhagem tumoral})$.

Compostos	HepG2	HeLa	DU - 145	MDA-MB-231
1	0,49	0,25	0,94	0,98
2	0,68	1,13	0,72	2,12
3	0,89	1,06	1,11	> 2,5
4	0,13	0,08	0,03	0,53
5	4,90	3,59	1,12	1,98
Na[AuCl ₄].2H ₂ O	0,02	0,06	> 1,35	> 1,29
KS ₂ COCH ₂ CH ₃	> 4,00	> 1,30	-	-
KCN	< 0,80	0,83	0,88	< 0,80
KSCN	1,00	1,01	0,99	1,06
H ₂ dmtsc	< 0,94	< 0,94	< 0,94	> 0,90
[AuCl ₂ (damp)]	1,13	0,94	1,33	1,93
Cisplatina	1,83	1,30	0,04	0,01

Gráfico 4.3.1.3 - Compostos utilizados para estudo *versus* valores de IS frente às células VERO.

4.3.2 Avaliação do potencial anti-*Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade dos compostos

A atividade tripanocida dos compostos foi avaliada sobre a forma tripomastigota da cepa Tulahuen LacZ de *T. cruzi*. A atividade é apresentada através dos valores de IC_{50try}, o qual representa a concentração inibitória de 50% para formas tripomastigotas. Assim, quanto menor for o valor obtido de IC_{try50}, maior é atividade do composto estudado. Por esta razão, são almejados menores valores de IC_{try50} em relação ao composto de referência (BZ).

De acordo com a Tabela 4.3.2.1 e o Gráfico 4.3.2.1, nota-se que com exceção do complexo **4**, os demais complexos e o ligante H₂dmtsc apresentaram maior atividade tripanocida quando comparado ao BZ.

Tabela 4.3.2.1 – Valores de IC_{50try} (μmolL⁻¹) dos compostos obtidos sobre as formas tripomastigotas da cepa Tulahuen LacZ de *T. cruzi*.

Compostos	IC _{try50}
1	< 3,5
2	4,5
3	4,5
4	46,4
5	< 3,5
H ₂ dmtsc	5,2
BZ	8,3

Gráfico 4.3.2.1 – Porcentagem de atividade tripanocida em diferentes concentrações para os complexos **1**, **2**, **3**, **4** e **5**, do ligante H₂dm₂sc e do fármaco de referência BZ sobre a cepa Tulahuen LacZ de *T. cruzi*. Porcentagem de atividade tripanocida *versus* concentração para os compostos.

Com o intuito de determinar o IS destes compostos, de maneira que o composto possa potencialmente ser utilizado no combate ao *T. cruzi* em concentrações que não causem efeitos tóxicos às células normais, foi realizado o experimento com as células de baço de camundongos Swiss.

No Gráfico 4.3.2.2, se pode observar que em todas as concentrações analisadas tanto o complexo **1** quanto o ligante H₂dm₂sc possuem citotoxicidade próxima de 18%. Esta porcentagem se refere à morte natural das células devido ao estresse sofrido durante o experimento, assim, verifica-se que ambos compostos não são citotóxicos às células de baço. Contudo, as porcentagens de citotoxicidade obtidas para os demais complexos nestas concentrações não apresentou o comportamento necessário para que se pudesse determinar a curva utilizada nos cálculos de IC₅₀. Assim, tanto o IC₅₀ quanto o IS não foram possíveis de serem calculados. No entanto, a atividade tripanocida não foi associada a uma citotoxicidade frente a estas células de baço, mas, sim, a uma atividade específica contra o parasita.

Gráfico 4.3.2.2 – Porcentagem da citotoxicidade em diferentes concentrações para os complexos 1, 2, 3, 4 e 5, do ligante H₂dmtsc e o fármaco de referência BZ sobre células do baço de camundongos. Porcentagem de citotoxicidade *versus* concentração para os compostos.

4.3.3 Estudo de interação com DNA-ct por espectroscopia UV-Vis

A determinação exata do mecanismo de ação de um composto promissor a fármaco é algo complexo, considerando a possibilidade de diversos mecanismos ocorrerem simultaneamente no organismo vivo. Entretanto, o estudo avaliativo de interações com biomoléculas isoladas pode esclarecer possíveis alvos biológicos para estes compostos.

De acordo com a literatura, o DNA é uma das principais biomoléculas responsáveis pelas propriedades antitumorais e antitripanocida de compostos avaliados como possíveis fármacos [34, 47, 63]. Por esta razão, foi realizado o estudo de interação entre os compostos sintetizados neste trabalho com o DNA, por titulação espectroscópica, com o intuito de obter informações de suas propriedades biológicas.

A técnica de titulação espectroscópica para estudo de interação com DNA é amplamente reportada na literatura. Através desta metodologia, é possível determinar a magnitude da afinidade entre os compostos e o DNA por meio da determinação da constante de ligação K_b . Esta constante foi determinada com base nos máximos de absorção para cada

complexo, empregando dois modelos teóricos: Scatchard (Equação 4.3.3.1) e Neighbor Exclusion (Equação 4.2.3.2).

Equação 4.3.3.1
$$\frac{r}{[C_L]} = K (n - r)$$

Segundo a Equação 4.3.3.1, r é o número de mols do composto ligado para 1 mol de DNA; n é o número de sítios potencialmente ligados por molécula de composto; K é afinidade do composto em interagir com os sítios disponíveis no DNA; a concentração do composto livre e ligado (C_L e C_E) é calculado a partir de $C_L = C (1-\alpha)$ e $C_E = C - C_L$, respectivamente, onde C é a concentração total do composto. A fração molar do composto ligado (α) é calculada a partir de $\alpha = (A_L - A)/(A_L - A_E)$, onde A_L e A_E são as absorvâncias do composto livre e ligado ao DNA em um comprimento de onda específico, e A é a absorvância em qualquer ponto da titulação. Plotando o gráfico r/C_L versus r , encontra-se duas constantes de interação a partir da inclinação da curva (Figura 4.3.3.1) [64].

Figura 4.3.3.1 – Gráfico referente r/C_L versus r pela Equação de Scatchard.

Fonte: Adaptação da referência [65].

De acordo com a Figura 4.3.3.1, a linha tracejada representa a ligação do composto nos sítios de interação do DNA com efeitos cooperativos. Esta é avaliada como mostrado na figura, onde a curva tracejada possui duas vertentes distintas podendo ser decomposta em duas retas. Logo, se obtêm dois valores de K_b (K_{b1} e K_{b2}), correspondentes às duas principais interações com DNA [65].

A Equação 4.3.3.2 descreve a equação de Neighbor Exclusion (NE), onde: ε_a é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorbância medida e a concentração do composto ($A_{\text{observado}}/[\text{Composto}]$); ε_f é a absorvidade molar do composto livre (sem adição de DNA); ε_b é a absorvidade molar do composto ligado ao DNA e K_b é a constante de ligação. Plotando gráfico $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ é possível calcular apenas um valor de K_b através da razão do coeficiente angular e o coeficiente linear da reta [66].

$$\text{Equação 4.3.3.2} \quad \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)]}$$

Ambas as equações são utilizadas para interações do tipo composto-macromolécula. Contudo, a equação de Scatchard somente é válida quando o ligante se liga a uma única unidade de repetição de estrutura, seja uma base ou pares de bases [67]. Quando há mais de um resíduo ligado ao composto, é necessário utilizar outro tratamento matemático, sendo neste caso a NE [68].

Como se pode observar nas bandas de absorção dos espectros ilustrados na Figura 4.3.3.3, a adição sucessiva de DNA-ct à solução do complexo provoca hipocromismo (diminuição do coeficiente de extinção molar do complexo) acompanhado por batocromismo (deslocamento para maiores comprimentos de onda). Este fenômeno ocorre devido à intercalação do complexo ao DNA, onde o orbital π^* do complexo intercalado pode acoplar com o orbital π dos pares de bases do DNA, sendo este então parcialmente preenchido por elétrons. Este preenchimento ocasiona a diminuição da energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$, resultando em hipocromismo e a estabilização deste acoplamento de orbitais sucede em batocromismo [69,70,71]. No caso de interação por meio de intercalação, o complexo se posiciona entre dois pares de bases adjacentes no DNA, provocando o desenrolamento local e distorção da dupla hélice do DNA, conforme ilustrado na Figura 4.2.3.2 [72].

Figura 4.3.3.2 - Forma de interação entre complexos metálicos e DNA sem o estabelecimento de ligações covalentes: Interação por intercalação.

Fonte: Adaptação da referência [72].

Com base nos valores das constantes calculadas, pode-se mencionar a magnitude da intercalação entre Composto-DNA. Os resultados obtidos através das equações de Scatchard e Neighbor Exclusion são apresentados na Tabela 4.3.3.1 e os gráficos plotados para a determinação das constantes se encontram no Anexo D.

Figura 4.3.3.3 - Espectros de titulações espectroscópicas dos complexos com DNA-ct. (1) $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$, (2) $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$, (3) $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$, (4) $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$ e (5) $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ nas concentrações $1.10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, $[\text{DNA}] = 6.10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em $\text{pH} = 7,1$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.3.3.1 – Resultados obtidos para as constantes de interação dos complexos com DNA.

Absorção λ_{max} (nm)		Scatchard				NE*
Complexo sem DNA-tc*	Complexo com DNA-ct	$\Delta\lambda$	% H*	Kb_1 (molL ⁻¹)	Kb_2 (molL ⁻¹)	Kb (molL ⁻¹)
Complexo 1						
318	320	2	$10,9 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,34 \cdot 10^{-6}$	$4,42 \pm 0,32 \cdot 10^{-5}$	$3,49 \pm 0,43 \cdot 10^{-4}$
400	406	6	$1,97 \pm 0,01$	$7,73 \pm 0,74 \cdot 10^{-4}$	$1,65 \pm 0,62 \cdot 10^{-4}$	$3,63 \pm 0,03 \cdot 10^{-4}$
Complexo 2						
300	307	7	$39,7 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,06 \cdot 10^{-6}$	$1,12 \pm 0,05 \cdot 10^{-4}$	$2,26 \pm 0,48 \cdot 10^{-4}$
398	410	12	$45,1 \pm 0,03$	$7,99 \pm 0,79 \cdot 10^{-4}$	$1,91 \pm 0,52 \cdot 10^{-4}$	$3,32 \pm 0,32 \cdot 10^{-4}$
Complexo 3						
383	385	2	$7,35 \pm 0,08$	$1,05 \pm 0,04 \cdot 10^{-5}$	$1,87 \pm 0,77 \cdot 10^{-4}$	$1,47 \pm 0,42 \cdot 10^{-5}$
Complexo 4						
300	305	5	$45,0 \pm 0,01$	$1,10 \pm 0,85 \cdot 10^{-6}$	$1,32 \pm 0,85 \cdot 10^{-5}$	$1,30 \pm 0,05 \cdot 10^{-5}$
396	403	7	$44,0 \pm 0,01$	$2,52 \pm 0,21 \cdot 10^{-4}$	$1,79 \pm 0,43 \cdot 10^{-4}$	$3,17 \pm 0,29 \cdot 10^{-5}$
Complexo 5						
389	396	6	$20,0 \pm 0,06$	$8,78 \pm 0,12 \cdot 10^{-3}$	$3,12 \pm 1,98 \cdot 10^{-3}$	$1,71 \pm 0,21 \cdot 10^{-5}$

*Complexo sem DNA-ct: absorção do complexo em solução tampão sem a adição de DNA, %H: Porcentagem de hipocromismo, NE: Neighbor Exclusion.

Em relação aos valores de Kb_1 e Kb_2 da equação de Scatchard, observam-se variações na grandeza das constantes de cada complexo. Como exemplo, no caso do complexo **1**, a variação ocorreu na grandeza de $10^{-4} \text{ mol}^{-1}\text{L}$ à $10^{-6} \text{ mol}^{-1}\text{L}$. Possivelmente esta variação seja o indício que tais complexos interajam com mais de uma unidade de repetição na estrutura do DNA-ct. Além disto, os gráficos plotados para a realização destes cálculos (Anexo D) não tiveram o comportamento esperado para uma típica ligação à uma única unidade da estrutura do DNA.

Portanto, a equação de NE foi utilizada para a determinação das constantes de interação. Os valores obtidos para o Kb foram da ordem de $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ à $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ para todos os complexos, mostrando a similaridade da interação com o DNA-ct apesar da variação do grupo co-ligante L. Ao comparar os valores das constantes com os valores de Kb do brometo de etídio ($Kb = 10^{-6} \text{ mol}^{-1}\text{L}$), clássica molécula intercaladora com o DNA-ct, tais

complexos avaliados neste trabalho se encontram em um intervalo de interação com afinidade intermediária [73].

A intensidade de intercalação intermediária destes complexos com o DNA-ct e a não correlação com as respectivas atividades, antitumorais e tripanocidas, são indícios que o DNA não seja o principal alvo biológico responsável pelas atividades biológicas destes complexos.

4.3.4 Estudo de interação com albumina de soro humano (HSA)

A albumina de soro humano (HSA), ilustrada na Figura 4.3.4.1, é uma proteína monomérica globular composta por 585 aminoácidos. Contêm três domínios helicoidais estruturalmente similares (I, II, III). Cada domínio é dividido em dois subdomínios (A e B) e é estabilizada por 17 pontes do tipo dissulfeto. Os principais sítios de ligação da proteína são o Sítio-I (localizado no subdomínio IIA, com preferência por ânions heterocíclicos) e o Sítio-II (localizado no subdomínio IIIA, com preferência por compostos aromáticos com grupos carboxílicos). O único resíduo triptofano (Trp-124) está localizado no subdomínio IIA o qual é capaz de se ligar a fármacos por interações hidrofóbicas [74,75].

A HSA é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, constituindo cerca da metade das proteínas encontradas no plasma do sangue humano [76,74]. Tem como principal função a manutenção da pressão osmótica e o pH do sangue, além de ser responsável pelo transporte, distribuição e metabolismo de várias substâncias. Ademais, ela é reconhecida por se acumular em tumores, podendo ser tomada em altos níveis pelas células tumorais em relação às células normais [75,77].

A capacidade do composto de se ligar reversivelmente à proteína influencia diretamente na sua concentração no sangue e, deste modo, contribui para a sua farmacocinética e farmacodinâmica. Comumente, uma interação muito fraca induz a má distribuição do composto *in vivo* enquanto que uma interação muito forte diminui a concentração do composto livre no plasma [78]. Diante do exposto, o estudo de interação de compostos com a HSA *in vitro* tem sido considerado um modelo para o estudo de comportamento composto-proteínas plasmáticas, podendo determinar a eficácia terapêutica do composto.

Figura 4.3.4.1 – Estrutura nativa da albumina de soro humano (HSA).

Fonte: Adaptação da referência [79].

Uma maneira de monitorar esta interação e, conseqüentemente, obter parâmetros físico-químicos consiste no acompanhamento da supressão da fluorescência da albumina na presença do composto de interesse. Esta é uma técnica sensível e amplamente usada em estudos de interação composto- proteína devido à emissão de fluorescência dos resíduos de aminoácidos presente na HSA fenilalanina, tirosina e triptofano. O resíduo de triptofano (Trp-124) é mais comumente estudado para este tipo de avaliação de interação [76].

A supressão de fluorescência refere-se a qualquer processo que diminua sua intensidade de fluorescência em uma amostra, podendo ser por reações no estado excitado, reajunção molecular, transferência de energia, supressão estática e supressão dinâmica. Quando ocorre um encontro entre o fluoróforo (responsável pela emissão de fluorescência) e o supressor (responsável pela diminuição da intensidade de fluorescência), o processo é denominado de supressão estática ou dinâmica (ou colisional). A supressão dinâmica é um processo não radioativo de transferência de energia onde o supressor interage com o fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado; neste momento, o fluoróforo retorna para o estado fundamental sem emissão de fóton. Comumente, esta supressão ocorre sem nenhuma modificação permanente na molécula, ou seja, sem nenhuma reação fotoquímica. No caso da supressão estática, há a formação de um complexo não fluorescente entre supressor e o fluoróforo. Quando este absorver luz, volta ao seu estado fundamental sem que haja emissão de fóton. Ao contrário do processo de supressão dinâmica, este processo ocorre devido à redução do número de moléculas fluorescentes [80].

Uma análise quantitativa do processo de supressão de fluorescência pode ser realizada utilizando a equação de Stern-Volmer (Equação 4.3.4.1) [76]:

$$\text{Equação 4.3.4.1} \quad \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

F_0 equivale à intensidade de fluorescência na ausência do supressor (o complexo); F é a intensidade de fluorescência na presença do supressor; K_{SV} a constante de supressão molecular de Stern-Volmer e $[Q]$ é concentração do supressor. Portanto, K_{SV} é obtida pelo gráfico (F_0/F) versus $[Q]$.

Os dados de supressão de fluorescência permitem também a determinação da constante bimolecular de supressão K_q , a qual informa a eficiência da supressão e a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores (Equação 4.2.4.2) [76]:

$$\text{Equação 4.2.4.2} \quad K_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0}$$

Sendo τ_0 o tempo de vida no estado excitado das biomoléculas na ausência do supressor. Para a HSA, $\tau_0 = 10^{-8}$ s [76].

Observações experimentais mostram que é possível a distinção entre os supressores dinâmicos e estáticos através da relação de dependência de K_{SV} em função da temperatura. Uma supressão dinâmica depende da colisão entre o fluoróforo e o supressor, resultando na diminuição de fluorescência do sistema. Assim, pelo motivo deste processo ser controlado pela difusão, altas temperaturas resultam em alto coeficiente de difusão e consequentemente, as constantes de supressão (K_{SV}) devem aumentar com o aumento da temperatura. Ao contrário, na supressão estática, há a formação de um complexo entre o supressor e o fluoróforo. Este complexo formado tem sua formação desfavorecida com o aumento da temperatura devido a menor estabilidade do complexo. Desta maneira, o aumento de temperatura resulta em baixos valores de K_{SV} [81,82,83].

Por esta razão, os espectros de emissão da HSA foram registrados em diferentes temperaturas (295, 300, 305 e 310° K), para determinação do processo de supressão. Nas condições deste trabalho, os espectros foram obtidos na presença de diferentes quantidades dos compostos, numa faixa de 300 e 400 nm, com excitação em 280 nm.

Na Figura 4.3.4.3, é possível observar nos espectros uma banda de fluorescência relativamente intensa e larga na região de 330 nm, proveniente da HSA. O espectro inicial refere-se à HSA na ausência do complexo (em tampão Trizma e DMSO, pH = 7,4). Com o aumento da concentração do composto presente na amostra, nota-se uma diminuição de intensidade. Essa supressão ocorre devido à mudanças conformacionais do microambiente proteico, sendo uma evidência de interação composto-HSA.

Uma análise quantitativa do processo de supressão de fluorescência da HSA foi realizada com o auxílio das Equações 4.3.4.1 e 4.3.4.2. Ao plotar os gráficos de F_0/F versus [composto] (Anexo E), foi possível observar o comportamento não linear para todos os compostos, na faixa de concentração analisada. Um traçado curvando-se para baixo na direção do eixo x no gráfico, conforme ilustrado na Figura 4.3.4.2, é uma característica da presença de dois fluoróforos [80]. No comprimento de onda de excitação, em 280 nm, tanto o triptofano quanto a tirosina possuem emissão de fluorescência, onde há uma contribuição de aproximadamente 20% das tirosinas no espectro de emissão [84,85]. Assim, ao avaliar tal comportamento dos gráficos, foi possível observar que o processo global pode ser tomado como duas retas.

Figura 4.3.4.2 - Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo **1**, com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm em diferentes temperaturas (295, 300, 305 e 310 K).

Figura 4.3.4.3 – Espectros de emissão da HSA em concentrações crescentes dos compostos. (1) $[\text{AuCl}^{\text{III}}(\text{dmtsc})]$, (2) $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$, (3) $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$, (4) $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{xant})(\text{dmtsc})]$, (5) $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{damp})(\text{dmtsc})]$ e H_2dmtsc . $[\text{HSA}] = 2,6\mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4.3.4.1, são apresentados os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constantes de velocidade de supressão biomolecular (K_q), calculadas considerando o valor de tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s).

Tabela 4.3.4.1 – Resultados obtidos para a constante K_{SV} e K_q com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm, em diferentes temperaturas (295, 300, 305 e 310 K).

Compostos	T (°K)	K_{SV1} (molL ⁻¹)	K_{SV2} (molL ⁻¹)	K_{q1} (10 ¹² Lmol ⁻¹ s ⁻¹)	K_{q2} (10 ¹² Lmol ⁻¹ s ⁻¹)
1	295	$1,34 \pm 0,03 \cdot 10^5$	$3,41 \pm 0,52 \cdot 10^4$	13,4	3,41
	300	$1,43 \pm 0,03 \cdot 10^5$	$3,23 \pm 0,49 \cdot 10^4$	14,3	3,23
	305	$1,49 \pm 0,03 \cdot 10^5$	$3,02 \pm 0,29 \cdot 10^4$	14,9	3,02
	310	$1,50 \pm 0,03 \cdot 10^5$	$2,97 \pm 0,18 \cdot 10^4$	15,0	2,97
2	295	$5,00 \pm 0,16 \cdot 10^4$	$3,51 \pm 0,21 \cdot 10^4$	5,00	3,51
	300	$4,92 \pm 0,11 \cdot 10^4$	$3,07 \pm 0,31 \cdot 10^4$	4,92	3,07
	305	$4,81 \pm 0,14 \cdot 10^4$	$3,18 \pm 0,28 \cdot 10^4$	4,81	3,18
	310	$4,87 \pm 0,19 \cdot 10^4$	$3,09 \pm 0,27 \cdot 10^4$	4,87	3,09
3	295	$1,15 \pm 0,03 \cdot 10^5$	$3,88 \pm 0,42 \cdot 10^4$	11,5	3,88
	300	$1,22 \pm 0,04 \cdot 10^5$	$3,87 \pm 0,48 \cdot 10^4$	12,2	3,87
	305	$1,25 \pm 0,04 \cdot 10^5$	$3,47 \pm 0,37 \cdot 10^4$	12,5	3,47
	310	$1,29 \pm 0,04 \cdot 10^5$	$3,13 \pm 0,17 \cdot 10^4$	12,9	3,13
4	295	$5,40 \pm 0,12 \cdot 10^4$	$2,81 \pm 0,20 \cdot 10^4$	5,40	2,81
	300	$5,38 \pm 0,01 \cdot 10^4$	$2,79 \pm 0,41 \cdot 10^4$	5,38	2,79
	305	$5,42 \pm 0,06 \cdot 10^4$	$2,73 \pm 0,29 \cdot 10^4$	5,42	2,73
	310	$5,37 \pm 0,09 \cdot 10^4$	$2,60 \pm 0,36 \cdot 10^4$	5,37	2,60
5	295	$3,77 \pm 0,08 \cdot 10^4$	$2,41 \pm 0,12 \cdot 10^4$	5,44	2,41
	300	$3,69 \pm 0,11 \cdot 10^4$	$2,36 \pm 0,17 \cdot 10^4$	5,46	2,36
	305	$3,53 \pm 0,05 \cdot 10^4$	$2,32 \pm 0,11 \cdot 10^4$	5,27	2,32
	310	$3,42 \pm 0,09 \cdot 10^4$	$2,18 \pm 0,09 \cdot 10^4$	5,15	2,18
H ₂ dmstsc	295	$5,44 \pm 0,11 \cdot 10^4$	$2,82 \pm 0,08 \cdot 10^4$	3,77	2,82
	300	$5,46 \pm 0,09 \cdot 10^4$	$2,72 \pm 0,05 \cdot 10^4$	3,69	2,72
	305	$5,27 \pm 0,12 \cdot 10^4$	$2,75 \pm 0,15 \cdot 10^4$	3,53	2,75
	310	$5,15 \pm 0,08 \cdot 10^4$	$2,56 \pm 0,15 \cdot 10^4$	3,42	2,56

A partir da tabela acima, pode se observar que os valores de K_{SV1} e K_{SV2} dos complexos **2**, **4**, **5** e do H₂dmstsc diminuem com o aumento da temperatura, sugerindo um mecanismo de supressão de fluorescência estático. Contudo, para os complexos **1** e **3** os valores de K_{SV1} e K_{SV2} não possuem o mesmo comportamento com a variação da temperatura. Ou seja, os K_{SV1} de ambos complexos, possuem comportamento típico para supressão dinâmico, enquanto que os K_{SV2} possuem comportamento típico para supressão estática. Pela diferença de mecanismos de supressão presentes no mesmo complexo, pode se pressupor que os complexos estejam interagindo em outras regiões além daquela onde o Trp-214 está

situado. Possivelmente, estes complexos estejam interagindo também com a tirosina presente na HSA. Os resíduos tirosina da HSA estão localizados principalmente nas regiões do domínio I (Tir-30, Tir-138, Tir-140 e Tir-161) e no domínio III (Tir-401, Tir-411 e Tir-452) [85].

Contudo, esta metodologia não permite a determinação da eficiência do processo de supressão, pois as variações dos valores das constantes com o aumento da temperatura ocorrem em casas decimais. Se o valor de K_{SVI} , por exemplo, aumentasse em números inteiros conforme o aumento da temperatura, maior seria a eficiência do processo de supressão da fluorescência, pois a conformação da macromolécula de HSA se tornaria mais favorável à interação do composto. Assim, torna-se necessário o estudo de tempo de vida de fluorescência destes compostos com a HSA, a fim de fazer distinções entre os mecanismos estático e dinâmico.

Porém, através da comparação entre os resultados obtidos para K_q e a constante difusional ($K_{dif} = 2,0 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ Ls}^{-1}$), constante relacionada com a limitação do processo biomolecular, também é possível determinar por qual mecanismo a supressão de fluorescência ocorre.

O K_q está relacionado com K_{dif} e com a eficiência de choques promovidos pela supressão (γ) conforme demonstrado na Equação 4.3.4.3. Assim, em processos de supressão dinâmicos os valores de K_q serão menores que os valores de K_{dif} , visto que os valores de γ sempre terão valores menores que um. Ou seja, o tempo de contato entre o fluoróforo e o supressor é muito curto para que o supressor se difunda ao fluoróforo e forme um complexo [83].

$$\text{Equação 4.3.4.3} \quad K_q = \gamma \cdot K_{dif}$$

Então, conforme mostrado na Tabela 4.3.4.1, os valores de K_q destes compostos avaliados são significativamente maiores que o valor de K_{dif} , o que sugere que a razão principal da supressão de fluorescência ocorre pela formação de uma nova espécie intermediária não fluorescente (mecanismo de supressão estática) [86].

Considerando que a supressão da fluorescência ocorra pela formação de uma espécie intermediária entre HSA e o composto, os parâmetros de ligação podem ser determinados pela Equação 4.3.4.4:

Equação 4.3.4.4
$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

F_0 e F se referem às intensidades de fluorescência na presença e ausência do supressor, respectivamente; K_b é a constante de ligação entre o supressor e a HSA; n é o número de potenciais sítios de ligação à HSA e $[Q]$ é a concentração do supressor.

Como ilustrado na Figura 4.3.4.4, o gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ teve o mesmo comportamento que o gráfico F_0/F versus [composto] e, por esta razão, este foi avaliado da mesma maneira. Assim, os valores de K_b foram obtidos a partir do coeficiente linear da reta do gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ (Anexo E) e o número de sítios de ligação do complexo (n) também foi calculado a partir do coeficiente angular desta mesma equação da reta [75].

Figura 4.3.4.4 – Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{composto}]$ do complexo **1** obtido para $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm em diferentes temperaturas (295, 300, 305 e 310 K).

Na Tabela 4.3.4.2 são apresentados os resultados obtidos para a constante de ligação K_b e o número de sítios de ligação (n). Os valores de K_b obtidos para todos os compostos estão na ordem de grandeza de 10^6 e 10^3 molL⁻¹, variando entre forte e fraca intensidade de interação composto-HSA. A partir desses valores nota-se que a grandeza de K_{b1} e K_{b2} é distinta para cada composto.

O número de sítios de ligação (n) para todos os compostos, em todas as temperaturas, está próximo de 1. Este valor sugere que os compostos se ligam à HSA na proporção 1:1, ou seja, a ligação ocorre em apenas uma região dos resíduos da proteína, seja na região do

triptofano ou na região da tirosina. Todavia, são necessários estudos complementares com o intuito de analisar minuciosamente qual resíduo da HSA estes compostos interagem e a sua afinidade de interação.

Tabela 4.3.4. 2- Resultados obtidos para as constantes de ligação K_b e números de sítios de ligação do supressor (n).

Compostos	T (°K)	K_{b1} (molL ⁻¹)	K_{b2} (molL ⁻¹)	$n (K_{b1})$	$n (K_{b2})$
1	295	$1,95 \pm 0,25 \cdot 10^5$	$1,40 \pm 0,60 \cdot 10^3$	1,05	0,50
	300	$2,55 \pm 0,51 \cdot 10^5$	$1,10 \pm 0,40 \cdot 10^3$	1,07	0,47
	305	$3,05 \pm 0,65 \cdot 10^5$	$0,80 \pm 0,20 \cdot 10^3$	1,08	0,44
	310	$3,30 \pm 0,74 \cdot 10^5$	$0,70 \pm 0,20 \cdot 10^3$	1,09	0,43
2	295	$5,12 \pm 0,27 \cdot 10^5$	$1,71 \pm 0,41 \cdot 10^4$	1,25	0,89
	300	$5,33 \pm 0,28 \cdot 10^5$	$1,23 \pm 0,47 \cdot 10^4$	1,26	0,85
	305	$7,17 \pm 0,40 \cdot 10^5$	$1,40 \pm 0,32 \cdot 10^4$	1,29	0,87
	310	$9,02 \pm 0,48 \cdot 10^5$	$1,22 \pm 0,36 \cdot 10^4$	1,31	0,85
3	295	$1,36 \pm 0,26 \cdot 10^6$	$2,90 \pm 0,70 \cdot 10^3$	1,28	0,61
	300	$1,77 \pm 0,42 \cdot 10^6$	$2,60 \pm 0,70 \cdot 10^3$	1,30	0,59
	305	$2,21 \pm 0,56 \cdot 10^6$	$1,80 \pm 0,40 \cdot 10^3$	1,32	0,55
	310	$2,42 \pm 0,44 \cdot 10^6$	$1,30 \pm 0,01 \cdot 10^3$	1,33	0,51
4	295	$5,73 \pm 0,43 \cdot 10^5$	$6,40 \pm 0,60 \cdot 10^3$	1,26	0,77
	300	$6,84 \pm 0,72 \cdot 10^5$	$6,30 \pm 3,10 \cdot 10^3$	1,28	0,77
	305	$8,19 \pm 0,10 \cdot 10^5$	$5,80 \pm 1,90 \cdot 10^3$	1,30	0,76
	310	$9,37 \pm 0,88 \cdot 10^5$	$4,90 \pm 1,70 \cdot 10^3$	1,31	0,74
5	295	$8,44 \pm 1,25 \cdot 10^4$	$8,60 \pm 1,60 \cdot 10^3$	1,09	0,83
	300	$8,61 \pm 1,04 \cdot 10^4$	$8,50 \pm 1,80 \cdot 10^3$	1,09	0,83
	305	$12,0 \pm 0,80 \cdot 10^4$	$9,10 \pm 1,40 \cdot 10^3$	1,13	0,84
	310	$14,0 \pm 3,30 \cdot 10^4$	$8,20 \pm 1,50 \cdot 10^3$	1,15	0,83
H₂dmtsc	295	$2,66 \pm 0,10 \cdot 10^4$	$4,90 \pm 0,70 \cdot 10^3$	0,91	0,71
	300	$2,83 \pm 0,18 \cdot 10^4$	$4,40 \pm 0,40 \cdot 10^3$	0,92	0,69
	305	$2,79 \pm 0,08 \cdot 10^4$	$4,50 \pm 1,00 \cdot 10^3$	0,92	0,70
	310	$2,62 \pm 0,21 \cdot 10^4$	$4,00 \pm 0,70 \cdot 10^3$	0,91	0,69

Há vários tipos de forças responsáveis pela interação de pequenas moléculas com macromoléculas biológicas. Como exemplo, pode citar as forças eletrostáticas, forças de van der Waals, forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular parâmetros termodinâmicos, como energia livre de Gibbs (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°) e variação de entropia (ΔS°). Os valores de ΔG° descreve a espontaneidade do processo, enquanto ΔH° e ΔS° caracterizam os tipos de ligações que estão sendo formadas com a proteína. Portanto, a fim de avaliar o tipo de interação entre

os compostos analisados neste trabalho e a HSA, os parâmetros termodinâmicos foram determinados com base na Equação de van't Hoff (Equação 4.3.4.5) [86]:

$$\text{Equação 4.3.4.5} \quad \ln K_b = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Sendo R a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); K_b a constante de interação com a HSA e T a temperatura em Kelvin.

A variação de energia livre foi calculada de acordo com a Equação 4.3.4.6 [86]:

$$\text{Equação 4.3.4.6} \quad \Delta G^\circ = -RT \ln K_b$$

Os tipos de interação que atuam entre os compostos e albumina podem ser indicados pelo sinal e magnitude dos parâmetros termodinâmicos:

- I. $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$: indicam o envolvimento de forças hidrofóbicas entre composto e albumina;
- II. $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$: correspondem a forças de van der Waals e interações por ligações de hidrogênio;
- III. $\Delta H^\circ \cong 0$ e $\Delta S^\circ > 0$: indicam interação eletrostática [86,87].

Valores positivos de ΔS° indicam um aumento da “desordem” do sistema em estudo, enquanto, valores negativos de ΔS° indicam a diminuição da “desordem” ou, em outras palavras, indicam a organização do sistema. Quando ocorre a formação de aglomerados de moléculas hidrofóbicas em meio aquoso, as moléculas do solvente estão livres para se movimentar. Assim, ocorre uma desorganização por parte do solvente e, por conseguinte, um aumento na entropia do sistema ($\Delta S^\circ > 0$). Portanto, as ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas de água serão quebradas e ΔH° será maior que zero (baixo valor positivo). Quando a somatória da energia da quebra das ligações é maior que a somatória da energia necessária para formação das mesmas, ΔH° possui valores positivos e o processo é denominado endotérmico [88].

Considerando as ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, a formação das ligações de hidrogênio entre as moléculas ($\Delta H^\circ < 0$, processo exotérmico) diminui a entropia

do sistema devido à organização que ocorre entre as moléculas que estão se ligando ($\Delta S^\circ < 0$). O mesmo ocorre com as interações de van der Waals, pois a aproximação/interação entre moléculas polarizadas ocorre por um processo exotérmico ($\Delta H^\circ < 0$) e, de certa maneira, ocorre uma organização do sistema ($\Delta S^\circ < 0$) [89].

Para que ocorra uma interação eletrostática entre duas moléculas, é necessária a reorganização da esfera de solvatação dos íons. Neste caso, a somatória da energia necessária para as interações/ligações formadas entre as espécies iônicas é maior que a somatória da energia necessária para o rompimento entre as moléculas de água da esfera de solvatação. Assim, $\Delta H^\circ < 0$ e o processo é exotérmico. A quebra da esfera de solvatação dos íons provoca a desorganização do sistema, consequentemente, $\Delta S^\circ > 0$ [89].

Na Tabela 4.3.4.3 são apresentados os resultados obtidos para os parâmetros termodinâmicos dos compostos avaliados.

Tabela 4.3.4.3 – Parâmetros termodinâmicos para os compostos estudados: energia livre de Gibbs (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°), e variação de entropia (ΔS°).

Compostos	ΔG° (kJmol ⁻¹) K_{b1} / K_{b2}				ΔS° (Jmol ⁻¹) K_{b1} / K_{b2}	ΔH° (kJmol ⁻¹) K_{b1} / K_{b2}
	295 K	300 K	305 K	310 K		
1	-30,0/-17,7	-31,0/-17,5	-31,9/-17,3	-32,9/-17,1	193/-40,0	26,8/-29,5
2	-32,1/-23,7	-33,2/-23,9	-34,2/-24,1	-35,3/-24,2	211/34,5	30,3/-13,5
3	-34,7/-19,8	-35,8/-19,4	-36,9/-19,0	-38,0/-18,6	219/-79,9	29,8/-43,4
4	-32,5/-21,6	-33,5/-21,7	-34,5/-21,9	-35,5/-22,0	196/29,4	25,2/-12,9
5	-27,7/-22,3	-28,6/-22,6	-29,6/-23,0	-30,5/-23,3	189/72,0	28,1/-0,99
H ₂ dmtsc	-25,1/-20,8	-25,5/-21,0	-25,9/-21,3	-26,3/-21,5	82,1/42,0	-0,85/-8,43

Os valores de ΔG° , para todos os compostos, são menores que zero, evidenciando que o processo de ligação composto-HSA seja espontâneo. Para o ligante H₂dmtsc, o caráter da força de ligação com a HSA foi determinado como interação eletrostática com intensidade intermediária tanto para o K_{b1} quanto para o K_{b2} . Provavelmente, esta interação ocorra devido à desprotonação do ligante. Em relação aos complexos **2**, **4** e **5**, em maiores concentrações (K_{b2}), a ligação com a albumina envolve interações eletrostáticas de fraca intensidade, enquanto que em menores concentrações (K_{b1}) indicam uma ligação envolvendo forças hidrofóbicas de intensidade intermediária. Os complexos **1** e **3**, em menores concentrações (K_{b1}), se ligam a albumina através de interações hidrofóbicas de forte intensidade. Contudo,

em maiores concentrações (K_{b2}), as interações envolvidas na ligação são forças de van der Waals e ligações de hidrogênio com baixas intensidades.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados com sucesso complexos de ouro(III) tendo com ligante tiossemicarbazona H₂dm₂sc e co-ligantes Cl⁻, CN⁻, SCN⁻, damp e xantato. Tanto o H₂dm₂sc quanto os complexos tiveram suas purezas e estruturas confirmadas por meio de resultados de espectroscopia de IV, UV-Vís, ¹H RMN, ¹³C RMN, espectrometria de ESI(+)-MS, condutividade molar, ponto de fusão e análise elementar.

A realização dos testes biológicos foi possível ter as seguintes conclusões:

Os resultados de atividade antitumoral demonstraram a seletividade dos compostos **1** e **4** para a linhagem MDA-MB-231, sendo estes mais ativos que a cisplatina. Contudo, o complexo **3** apresentou resultados promissores para todas as linhagens tumorais estudadas, com valores de IC₅₀ até onze vezes menor quando comparado à cisplatina.

Apesar da baixa atividade tumoral do complexo **5**, este apresentou maior IS para todas as linhagens de células tumorais.

Com excessão do complexo **4**, os demais complexos e o H₂dm₂sc apresentaram resultados anti-*Trypanossoma cruzi* promissores com atividade específica contra o parasita, podendo ser desconsiderada a citotoxicidade geral frente à células de baço de camundongo Swiss.

A não correlação das atividades antitumorais e tripanocida dos complexos com os resultados obtidos pela interação com o DNA-ct por titulação espectrocópica, é indício que o DNA não seja o principal alvo biológico responsável pelas atividades biológicas.

No geral, as interações composto-HSA possuem intensidade intermediária. Assim, se pode sugerir que tais compostos estudados poderão apresentar uma distribuição *in vivo* adequada para que sejam liberados.

Com a avaliação isolada dos experimentos é possível observar a influência dos grupos co-ligantes L dos complexos, onde as atividades biológicas variaram de complexo para complexo sem similaridades entre si. Contudo, com apenas estes resultados não é possível determinar a razão destas influências.

Todos estes complexos não devem ser descartados para futuros estudos *in vivo*, pois suas atividades podem ser diferentes das atividades *in vitro* determinadas neste trabalho.

CONCLUSÕES

Por fim, de modo geral, os objetivos propostos para este trabalho foram alcançados, com complexos de ouro(III) tendo potencial atividade biológica contra diferentes tipos de câncer e o *Trypanosoma cruzi*. Como futuras perspectivas deste trabalho, se tem a realização de novos estudos biológicos *in vitro* destes complexos, com o intuito de elucidar seus possíveis mecanismos de ação e a realização de estudos *in vivo* para avaliar as atividades antitumorais e anti-*Trypanosoma cruzi*. Podendo assim, obter um possível fármaco para o tratamento quimioterápico destas doenças.

6 REFERÊNCIAS

[1] INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER (INCA). **Câncer**. 2013. Disponível em: <www2.inca.gov.br>. Acesso em: 22 fev. 2013.

[2] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Câncer**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

[3] MSD Brasil. **Câncer**. 2009. Disponível em: <<http://pacientes.msdonline.com.br/doencas/cancer/cancer.xhtml>>. Acesso em: 8 fev. 2014.

[4] HEFFETER, P.; JUNGWIRTH, U.; JAKUPE, M.; HARTINGER, C.; GALANSKI, M.; ELBLING, L.; MICKSCHE, M. Resistance against novel anticâncer metal compounds: differences and similarities. **Drug Resistance Updates**, v. 11, p. 1-16, 2008.

[5] MARZANO, C.; RONCONI, L.; CHIARA, FEDERICA. Gold(III)-dithiocarbamate anticâncer agentes: activity, toxicology and histopathological studies in rodents. **International Journal of Cancer**, v. 129, p. 487-496, 2011.

[6] ROAT-MALONE, R. M. **Bioinorganic chemistry** – a short course. New York: Wiley, 2002. p. 280-282.

[7] CRICHTON, R. R. **Biological inorganic chemistry**: an introduction. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 341-342.

[8] DHAR, S.; LIPPARD, S. J. Current status and mechanism of action of platinum – based anticancer drugs. In: ALESSIO, E.(Ed.). **Bioinorganic medicinal chemistry**. New York: WILEY, 2011. p. 82-85.

[9] KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews – Cancer**, v. 7, p. 573-584, 2007.

[10] GONZALEZ, V. M.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 657-663, 2001.

[11] JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 5, p. 1387-1403, 2007.

- [12] MENDES, I. C.; SOARES, M. A.; DOS SANTOS, R. G.; PINHEIRO, C.; BERALDO, H. Gallium (III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1870-1877, 2009.
- [13] SAVA, G.; CAPOZZI, I.; CLERICI, K.; GAGLIARDI, G.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. Pharmacological control of lung metástases of solid tumours by a novel ruthenium complex. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 16, p. 371-379, 1998.
- [14] GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine**. New York: Wiley, 2005. p. 270-516.
- [15] PACHECO, E. A.; TIEKINK, E. R. T.; WHITEHOUSE, W. Gold compounds and their applications in medicine. In: MOHR, F. (Ed.). **Gold chemistry: applications and future directions in the life sciences**. New York: Wiley, 2009. p. 283-319.
- [16] QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina. **Química Nova**, v. 9, p. 651-659, 1996.
- [17] FARRER, N. J.; SADLER, P. J. Medicinal inorganic chemistry: state of the art, new trends, and a vision of the future. In: ALESSIO, E. (Ed.). **Bioinorganic medicinal chemistry**. New York: Wiley, 2011. p. 21-31.
- [18] OTT, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticâncer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1670-1681, 2009.
- [19] LEIBFARTH, J.H.; PERSELLIN, R.H. Review: mechanisms of action of gold. **Agents and Actions**, v.11, p. 458- 472, 1981.
- [20] SUN, R. W.; CHE, C. The anti-cancer properties of gold(III) compounds with dianionic porphyrin and tetradentate ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1682-1691, 2009.
- [21] WANG, S.; SHAO, W.; LI, H.; LIU, C.; WANG, K.; ZHANG J. Synthesis, characterization and cytotoxicity of the gold (III) complexes of 4,5 dihydropyrazole-1-carbothioamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1914-1918, 2011.

- [22] SHAW III, C. F. Gold-based therapeutic agents. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2589-2600, 1999.
- [23] BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P.; SCUTARI, G.; GABBIANI, C.; CASINI, A.; MESSORI, L. Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potencial anticâncer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1692-1707, 2009.
- [24] SANDHYA, B.; HEGDE, A. H.; KALANUR, S. S.; KATRAHALLI, U.; SEETHARAMAPPA, J. Interaction of triprolidine hydrochloride with serum albumins: Thermodynamic and binding characteristics, and influence of site probes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 1180-1186, 2011.
- [25] MILACIC, V.; DOU, Q. P. The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: implications for breast câncer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1649-1660, 2009.
- [26] BERNERS-PRICE, S. J. Gold-based therapeutic agents: a new perspective. In: ALESSIO, E. (Ed.). **Bioinorganic medicinal chemistry**. New York: Wiley, 2011. p. 202-210.
- [27] CASTIÑEIRAS, A.; DEHNEN, S.; FUCHS, A.; GARCÍA-SANTOS, I.; SEVILLANO, P. Stabilization of gold(I) and gold(III) complexes by pyridil bis(3-hexamethylene-iminythiosemicarbazone): spectroscopic, structural and computational study. **Dalton Transactions**, v. 15, p. 2731-2739, 2009.
- [28] SREEKANTH, A.; FUN, H-K.; KURUP, M. R. P. Formation of first gold (III) complex of an *N*(4)-disubstituted thiosemicarbazone derived from 2-benzoylpyridine: structural and spectral studies. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 7, p. 1250-1253, 2004.
- [29] FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 50, p. 223, 2002.
- [30] TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- β -4':4' diethylthiosemicarbazone and N-allyl isatin- β -4':4' diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Research.** v. 24, p. 305-314, 1994.

- [31] PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANSBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p.1898-1905, 2010.
- [32] VANCO, J.; MAREK, J.; TRÁVNÍČEK, Z.; RACANSKÁ, E.; MUSELÍK, J.; SVAJLENOVÁ, O. Synthesis, structural characterization, antiradical and antidiabetic activities of copper(II) and zinc(II) Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and β -alanine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 595-605, 2008.
- [33] RODRIGUES, C.; BATISTA, A. A.; AUCÉLIO, R. Q.; TEIXEIRA, L.R.; VISENTIN, L. C.; BERALDO, H. Spectral and electrochemical studies of ruthenium(II) complexes with N^4 -methyl-nitrobenzaldehyde and N^4 -methyl-4-nitrobenzophenone thiosemicarbazone: potential anti-trypanosomal agents. **Polyhedron**, v. 27, p.3061-3066, 2008.
- [34] KOVALA-DEMERTZI, D.; DEMERTZIS, M. A.; MILLER, J. R.; FRAMPTON, C. S.; JASINSKI, J. P.; WEST, D. X. Structure of bis(2-acetylpyridine 3-hexamethyleneiminylthiosemicarbazone) palladium (II), a potential antitumor complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, p. 137-140, 2002.
- [35] KALINOWSKI, D. S.; QUACH, P.; RICHARDSON, D. R. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v.1, n. 6, p. 1143-1151, 2009.
- [36] FINCH, R. A.; LIU, M.; CORY, A. H.; CORY, J. G.; SARTORELLI, A. C. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3- ap): Na inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. **Advances Enzyme Regulation**, v. 39, p. 3-12, 1999.
- [37] KOVALA-DEMERTZI, D.; PAPAGEORGIOU, A.; PAPATHANASIS, L.; ALEXANDRATOS, A.; DALEZIS, P.; MILLER, J. R.; DEMERTZIS, M. A. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of platinum (II) complexes with thiosemicarbazones derived from 2-formyl and 2-acetyl pyridine and containing ring incorporated at N(4)-position: synthesis, spectroscopic study and crystal structure of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones, potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1296-1302, 2009.
- [38] ORTNER, K.; ABRAM, U. Reactions of dichloro [2-(dimethylaminomethyl)phenyl- C^I, N] gold (III), $[Au(damp-C^I, N)Cl_2]$, with aromatic thiosemicarbazones. Structures and spectroscopical data of the first gold (III) thiosemicarbazone complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 1, p. 251-253, 1998.

- [39] LESSA, J. A.; FERRAZ, K. S. O.; GUERRA, J. C.; MIRANDA, L. F.; ROMEIRO, C. F. D.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; BARBEIRA, P. J. S.; BERALDO, H. Spectroscopic and electrochemical characterization of gold(I) and gold(III) complexes with glyoxaldehyde *bis*(thiosemicarbazones): cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. **Biometals**, v. 25, p. 587-598, 2012.
- [40] MAIA, P. I. S. **Complexos de interesse medicinal em terapia ou diagnóstico, envolvendo os elementos Au, Pd, Pt, Re e Tc, com tiossemicarbazonas S,N,S-tridentadas**. 2011. 200f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- [41] MAIA, P. I. S.; NGUYEN, H. H.; PONADER, D.; HAGENBACH, A.; BERGEMANN, S.; GUST, R.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Neutral gold complexes with tridentate SNS thiosemicarbazide ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 1604-1613, 2012.
- [42] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2014. Disponível em:
< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 19 dez. 2014.
- [43] PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Chagas disease**. 2014. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en>. Acesso em: 19 dez. 2014.
- [44] RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**. v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- [45] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **DPDx – Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern**, 2013. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html#vector>>. Acesso em: 19 dez. 2014.
- [46] OPENLEARN WORKS. **Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi***. 2013. Disponível em:
<<http://www.open.edu/openlearnworks/mod/page/view.php?id=40788>>. Acesso em: 19 dez. 2014.
- [47] SÁNCHEZ-SANCHO, F.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A. Chagas disease: progress and new perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 423-452, 2010.

- [48] SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 23-30, 2004.
- [49] MOREIRA, D.R.M.; OLIVEIRA, A. D. T.; GOMES, P.A.T.M.;SIMONE, C.A.; VILLELA, F.S.; FERREIRA, R. S.; SILVA, A. C.; SANTOS, T. A. R.; CASTRO, M. C. A. B.; PEREIRA, V. R. A.;LEITE, A. C. L. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potente and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014.
- [50] NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; LEHMANN, T.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; ATENCIO, R.; SILVA, P.; LIRA, R.; URBINA, J.A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases: synthesis and characterization of new copper(II) and gold(I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. **Inorganic Chemistry**, v. 40, p. 6879-6884, 2001.
- [51] GANDIN, V.; FERNANDES, A. P.; RIGOBELLO, M. P.; DANI, B.; SORRENTINO, F.; TISATO, F.; BJÖRNSTEDT, M.; BINDOLI, A.; STURARO, A.; RELLA, R.; MARZANO. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 90-101, 2010.
- [52] MACK, J.; ORTNER, K.; ABRAM, U. Darstellung and kristallstrukturen von [Au(damp-C,N)Cl₂], [Au(damp-C,N)(OOCCH₃)₂] und [Au(damp-C,N)(mnt)] (mnt²⁻ = 1,2-Dicyanoethen-1,2-dithiolat). **Zeitschrift für anorgaische und allgemeine Chemie**, v. 623, p. 873-879, 1997.
- [53] BEYER, L.; WIDEIRA, R. N-(aminothiocarbonyl)benzimidide chlorides. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 1881-1882, 1982.
- [54] SCOVILL, J. P. A Facile synthesis of thiosemicarbazides and thiosemicarbazones by the transamination of 4-Methyl-4-fenil-3-thiosemicarbazida. **Phosphorus, Sulfur, and Sificon**, v. 60, p. 15-19, 1991.
- [55] VOS, D. DE; HO, S. Y.; TIEKINK, E. R.T. Triorganophosphinegold(I) dithiocarbamates and triorganophosphinegold(I) xanthates. **Bioinorganic Chemistry and Application**, v. 2, p. 141-154, 2004.
- [56] O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of th alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

- [57] MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CAMPO, V. L.; BIONDO, M.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, J. S.; CARVALHO, I. α -Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 1978-1987, 2013.
- [58] NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds**. New York: Wiley, 2009. p. 272 - 287.
- [59] HAO, F. P.; SILVESTER, E.; SENIOR, G. D. Spectroscopic characterization of ethyl xanthate oxidation products and analysis by ion interaction chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 4836-4845, 2000.
- [60] RONCONI, L.; GIOVAGNINI, L.; MARZANO, C.; BETTIO, F.; GRAZIANI, R.; PILLONI, G.; FREGONA, D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in Vitro antitumor activity. **Inorganic Chemistry**, v. 44, p. 1867-1881, 2005.
- [61] GOMEZ, J. D. C.; NGUYEN, H. H.; HAGENBACH, A.; ABRAM, U. Oxidorhenium(V) complexes with tetradentate thiourea derivatives. **Polyhedron**, v. 43, p. 123-130, 2012.
- [62] JANCZAK, J.; PERPÉTUO, G. J. 1-(Diaminomethylene)thiourea: a tautomer of 2-imino-4-thiobiuret. **Acta Crystallographica Section C**, v. 64, p. 114-116, 2008.
- [63] GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metal in medicine**. New York: Wiley, 2005. p. 270-516.
- [64] MARTÍNEZ, A.; RAJAPAKSE, C. S. K.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; VARELA-RAMIREZ, A.; LEMA, C.; AGUILERA, R. J. Arene-Ru(II)-chloroquine complexes Interact with DNA, induce apoptosis on human lymphoid cell lines and display low toxicity to normal mammalian cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 967-977, 2010.
- [65] BOYER, R. **Biochemistry laboratory: modern theory and techniques**. 2. ed. Sedan: PrenticeHall, 2012. p. 246.
- [66] GOUVEA, L. R.; GARCIA, L. S.; LACHTER, D. R.; NUNES, P. R.; PEREIRA, F. C.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; LOURO, S. R. W.; BARBEIRA, P. J. S.; TEIXEIRA, L. R. Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potencial anticancer agentes: relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 67-73, 2012.

- [67] MCGHEE, J. D.; HIPPEL, P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. **Journal of Molecular Biology**, v. 86, p. 469-489, 1974.
- [68] RAO, S. N.; KOLLMAN, P. A. Molecular mechanical simulations on double intercalation of 9-amino acridine into d(CGCGCGC)·d(GCGCGCG): analysis of the physical basis for the neighbor-exclusion principle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 5735-5739, 1987.
- [69] AHMAD, M.; AFZAL, M.; TABASSUM, S.; KALINSKA, B.; MROZINSKI, J.; BHARADWAJ, P. K. Synthesis and structure elucidation of a cobalto(II) complex as topoisomerase I inhibitor: *in vitro* DNA binding, nuclease and RBC hemolysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-11, 2013.
- [70] SAMPATH, K.; SATHIYARAJ, S.; JAYABALAKRISHNAN, C. DNA binding, DNA cleavage, antioxidante and cytotoxicity studies on ruthenium(II) complexes of benzaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 105, p. 582-592, 2013.
- [71] RAJA, D. S.; BHUVANESH, N. S. P.; NATARAJAN, K. Effect of N(4)-phenyl substitution in 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde semicarbazones on the structure, DNA/protein interaction and antioxidative and cytotoxic activity of Cu(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 50. p. 12852-12866, 2011.
- [72] ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4549-4696, 2007.
- [73] ICSEL, C.; YILMAZ, V. T. DNA Binding and cleavage studies of two Palpladium(II) saccharinate complexes with terpyridine. **DNA and Cell Biology**, v. 32, n. 4, p. 165- 172, 2013.
- [74] ABOU-ZIED, O. K.; AL-LAWATIA, N.; ELSTNER, M.; STEINBRECHER, T. B. binding of hydroxyquinoline probes to human serum albumin: combining molecular modeling and Förster's resonance energy transfer spectroscopy to understand flexible ligand binding. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 117, p. 1062-1074, 2013.
- [75] TABASSUM, S.; AL-ASBAHY, W. M.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with human serum albumin (HAS): spectroscopic and molecular docking investigations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 114, p. 132-139, 2012.

- [76] WANG, Y. X.; LI, L.; SHENG, L. J.; SONG, G. W.; XU, Z. S. Spectroscopic study on the inherent binding information of cationic perfluorinated surfactant with bovine serum albumin. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 132, p. 489-494, 2011.
- [77] TUNÇ, S.; DUMAN, O.; SOYLU, I.; BOZOGLAN, B. K. Spectroscopic investigation of the interactions of carbofuran and amitrol herbicides with human serum albumin. **Journal of Luminescence**, v. 151, p. 22-28, 2014.
- [78] SAMARI, F.; HEMMATEENEJAD, B.; SHAMSIPUR, M.; RASHIDI, M.; SAMOUEI, H. Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt(II) complexes to human and Bovine serum albumins: a spectroscopic approach. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 3454-3464, 2012.
- [79] BHATTACHARYA, A. A.; CURRY, S.; FRANKS, N. P. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38731-38738, 2000.
- [80] LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Singapore: Springer, 2006. p. 277-289.
- [81] CHENG, Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 9493-9508, 2012.
- [82] GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RUYASDEEN, A.; AKBARSHA, A.; PALANIANDAVAR, M. New ruthenium(II) arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 1203-1219, 2014.
- [83] SHEEHAN, D. **Physical biochemistry: principles and applications**. New York: Willey, 2009. p. 69-71.
- [84] PETERS, T. **All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications**. London: Academic Press, 1996. p. 39-42.
- [85] XIE, M.; XU, X.; WANG, Y. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 215-224, 2005.

[86] DANESHGAR, P.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; NOROUZI, P.; GANJALI, M. R.; MADADKAR-SOBHANI, A.; SABOURY, A.A. Molecular interaction of human sérum albumin with paracetamol: spectroscopic and molecular modeling studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 129-134, 2009.

[87] BOZOGLAN, B. K.; TUNÇ, S.; DUMAN, O. Investigation of neohesperidin dihydrochalcone binding to human serum albumin by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**. v. 155, p. 198-204, 2014.

[88] ATKINS, P.; PAULA, J. **Physical chemistry**. Oxford : Oxford University Press, 2006, p. 635-636.

[89] GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. Belmont: Thomas Brooks/Cole, 2005. p. 635-636.

ANEXOS

Espectro de Absorção na Região do Infravermelho (Anexo A)

Figura A.1: Espectro de absorção do infravermelho (cm⁻¹) do agente complexante (dietilaminotiocarbonyl)benzimidofila-morfolonil-tiossemicarbazona ($H_2dmitsc$) em pastilha de KBr.

Figura A.2: Espectro de absorção do infravermelho (cm⁻¹) do complexo $[Au^{III}Cl(dmitsc)]$ (1) em pastilha de KBr.

Figura A.3: Espectro de absorção do infravermelho (cm⁻¹) do complexo [Au^{III}CN(dmtsc)] (**2**) em pastilha de KBr.

Figura A.4: Espectro de absorção do infravermelho (cm⁻¹) do complexo [Au^{III}SCN(dmtsc)] (**3**) em pastilha de KBr.

Figura A.5: Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (**4**) em pastilha de KBr.

Figura A.6: Espectro de absorção do infravermelho (cm^{-1}) do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (**5**) em pastilha de KBr.

Espectro de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vís) (Anexo B)

Figura B.1: Espectro de absorção na região do UV-vís do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidóla-morfolonil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) em CH_2Cl_2 . Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Figura B.2: Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[Au^{III}Cl(dmtsc)]$ (**1**) em CH_2Cl_2 . Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Figura B.3: Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (2) em CH_2Cl_2 . Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Figura B.4: Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (3) em CH_2Cl_2 . Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Figura B.5: Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (4). Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Figura B.6: Espectro de absorção na região do UV-vís do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (5). Absorbância *versus* comprimento de onda (nm).

Espectro de ^1H RMN e ^{13}C RMN (Anexo C)

Figura C.1: Espectro de ^1H RMN do agente complexante (dietilaminotiocarbonyl)benzimidofolamorpholonil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc) em CDCl_3 (δ = ppm).

Figura C.2: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (1) em CDCl_3 (δ = ppm).

Figura C.3: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (2) em CDCl_3 (δ = ppm).

Figura C.4: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (3) em CDCl_3 (δ = ppm).

Figura C.5: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (**4**) ($\delta = \text{ppm}$).

Figura C.6: Espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (**4**) ($\delta = \text{ppm}$).

Figura C.7: Espectro de ^1H RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (**5**) em CDCl_3 . (δ = ppm).

Figura C.8: Espectro de ^{13}C RMN do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (**5**) em CDCl_3 . (δ = ppm).

GRÁFICOS PLOTADOS PARA INTERAÇÃO COM DNA-ct PELA EQUAÇÃO DE SCATCHARD E NEIGHBOR EXCLUSION (Anexo D)

Figura E.1: Gráfico de r/C_f versus r pela Equação de Scatchard (à esquerda) e Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ pela Equação de Neighbor Exclusion (à direita) do complexo $[Au^{III}Cl(dmtsc)]$ (1).

Figura E.2: Gráfico de r/C_f versus r pela Equação de Scatchard (à esquerda) e Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ pela Equação de Neighbor Exclusion (à direita) do complexo $[Au^{III}CN(dmtsc)]$ (2).

Figura E.3: Gráfico de r/C_f versus r pela Equação de Scatchard (à esquerda) e Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ pela Equação de Neighbor Exclusion (à direita) do complexo $[Au^{III}SCN(dmtsc)]$ (3).

Figura E.4: Gráfico de r/C_f versus r pela Equação de Scatchard (à esquerda) e Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ pela Equação de Neighbor Exclusion (à direita) do complexo $[Au^{III}xant(dmtsc)]$ (4).

Figura E.5: Gráfico de r/C_f versus r pela Equação de Scatchard (à esquerda) e Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ pela Equação de Neighbor Exclusion (à direita) do complexo $[Au^{III}damp(dmtsc)]$ (5).

GRÁFICOS PLOTADOS PARA INTERAÇÃO COM HSA

(Anexo E)

Figura E.1: Gráfico de F_0/F versus [composto], à esquerda, e Gráfico de $\log(F-F_0)/F$ versus $\log[\text{composto}]$, à direita, do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}(\text{dmtsc})]$ (1).

Figura E.2: Gráfico de F_0/F versus [composto], à esquerda, e Gráfico de $\log(F-F_0)/F$ versus $\log[\text{composto}]$, à direita, do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{CN}(\text{dmtsc})]$ (2).

Figura E.3: Gráfico de F_0/F versus [composto], à esquerda, e Gráfico de $\log(F-F_0)F$ versus $\log[\text{composto}]$, à direita, do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{SCN}(\text{dmtsc})]$ (3).

Figura E.4: Gráfico de F_0/F versus [composto], à esquerda, e Gráfico de $\log(F-F_0)F$ versus $\log[\text{composto}]$, à direita, do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{xant}(\text{dmtsc})]$ (4).

Figura E.5: Gráfico de F_0/F versus [composto], à esquerda, e Gráfico de $\log(F-F_0)/F$ versus $\log[\text{composto}]$, à direita, do complexo $[\text{Au}^{\text{III}}\text{damp}(\text{dmtsc})]$ (5).

Figura E.6: Gráfico de F_0/F versus [composto], à esquerda, e Gráfico de $\log(F-F_0)/F$ versus $\log[\text{composto}]$, à direita, do agente complexante (dietilaminotiocarbonil)benzimidazole-morfolonil-tiossemicarbazona (H_2dmtsc).