



Serviço Público Federal

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Programa de Pós-Graduação em Química



TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOINORGÂNICA
DE NOVOS COMPLEXOS DE COBRE(II) COM LIGANTES
BASEADOS EM NÚCLEOS PIRAZOLÍNICOS SUBSTITUÍDOS**

KÁTIA VERONICA TENORIO

Campo Grande – MS

2023

Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n – Fone (67) 3345-7011

Av. Senador Filinto Muller nº 1555 – CEP: 79074-460 – Campo Grande (MS)

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Programa de Pós-Graduação em Química



KÁTIA VERONICA TENORIO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOINORGÂNICA
DE NOVOS COMPLEXOS DE COBRE(II) COM LIGANTES
BASEADOS EM NÚCLEOS PIRAZOLÍNICOS SUBSTITUÍDOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Doutorado da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutora em Química (área de concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Gleison Antônio Casagrande

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Pizzuti

Campo Grande – MS

2023

Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n – Fone (67) 3345-7011

Av. Senador Filinto Muller nº 1555 – CEP: 79074-460 – Campo Grande (MS)

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

– Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar constantemente o meu caminhar, por estar presente em todos os momentos da minha vida e nunca deixar faltar forças para seguir adiante.

Aos meus pais, Darci Paulo Tenorio e Vera Inês Tenorio, pelo carinho, apoio e amor, por serem minha base e sempre confiarem no meu potencial.

As minhas amigas Amanda Caroline Nava Pinheiro, Estefane Isis Teixeira e Leticia Barbosa de Oliveira por todos os momentos bons e ruins, de diversão e trabalho, pelos dias infindáveis no laboratório, por toda a ajuda e pela amizade sincera.

Aos meus colegas de laboratório, pelos momentos de estudo e trabalho juntos e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gleison Antônio Casagrade por todos os ensinamentos, tempo, dedicação e apoio em cada etapa dessa jornada, não somente relacionada ao trabalho, mas também nos churrascos e nos momentos de descontração.

Aos professores Dr. Lucas Pizzuti e Dr. Bernardo Almeida Iglesias, por abrirem as portas de seus laboratórios e contribuírem com o trabalho colocando a mão na massa e dedicando seu precioso tempo para me ensinar em cada síntese ou técnica necessária para realizar as medidas e análise de dados.

Ao professor Dr. Victor Marcelo Deflon pelas medidas de difratometria de raios-X.

A professora Heveline Silva pela contribuição nas análises da atividade citotóxica.

Ao professor Leandro Moreira de Campos Pinto pela contribuição no estudo e elucidação das transições eletrônicas envolvidas nos processos fotofísicos dos complexos sintetizados.

A banca examinadora por aceitarem fazer parte deste momento especial e ajudarem na melhoria do trabalho.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aos órgãos de fomento CAPES e CNPQ, pela oportunidade da formação em Doutora em Química.

Meu muito obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte da minha jornada na execução deste trabalho contribuindo para que o mesmo chegasse nesta fase de finalização e por todas as oportunidades que tive até aqui.

RESUMO

Este trabalho consiste no estudo relacionado a síntese, caracterização estrutural, estudo da atividade citotóxica e interação com DNA e HSA de dois novos complexos de Cobre(II) com pirazolininas 1,3,5-trissubstituídas como ligantes. Os complexos foram obtidos a partir do sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com ligante pirazolínico 1,3,5-trissubstituído na proporção de (1:1) em uma mistura de solventes $\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$. Os complexos foram obtidos na forma de cristais verdes, os quais podem ser representados simplificadaamente na fórmula geral $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Para a caracterização utilizou-se das técnicas de difratometria de raios X em monocristal que demonstraram que o ligante pirazolínico se coordena de forma tridentada pelos átomos de N e um de O e completando a esfera de coordenação ao metal por um átomo de Cl, formando uma geometria quadrática levemente distorcida, a espectroscopia por ressonância eletrônica paramagnética corroborou quanto a geometria dos complexos e ainda pudemos observar que a análise em DMSO congelado não ocorre a coordenação do DMSO nos complexos. Realizou-se cálculos de orbital molecular a partir do método da Teoria de Densidade Funcional Dependente do Tempo (TD-DFT) para auxiliar na interpretação das transições eletrônicas observadas na espectroscopia de absorção molecular UV-Vis, observou-se transições eletrônicas mistas do tipo MLCT (transição do metal para o ligante), LMCT (transição do ligante para o metal) e IL (intraligante). Avaliou-se a atividade citotóxica dos complexos sintetizados, observou-se uma ação superior dos complexos se comparado aos ligantes livres para testes realizados *in vitro*. Avaliou-se também a interação dos complexos e ligantes com DNA e HSA e observou-se que ocorre uma interação de fraca a moderada, tanto para os ligantes livres quanto para os complexos, além de apresentarem elevadas constantes de ligação (K_b), os quais foram na ordem de 10^3 para os complexos e 10^2 para os ligantes, e ocorrem espontaneamente, uma vez que foi constatado que a variação da energia livre de Gibbs foi negativo ($\Delta G < 0$). Por espectroscopia de fluorescência, a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi utilizada para determinar a capacidade interativa dos compostos. Os valores de K_{sv} determinados foram: na ordem de 10^3 para os complexos e ligantes para a interação com DNA e para os complexos na interação com HSA, já os ligantes com HSA foram na ordem de 10^1 . Também, com o auxílio de estudos teóricos de *docking* molecular, foi possível estimar a posição preferencial dos compostos ao interagirem com DNA que indicaram o sulco menor como sítio preferencial do e que a principal interação é por forças de van der Waals. Para HSA a interação se dá preferencialmente pelo sítio III e o principal tipo de interação é por forças de van der Waals.

Palavras chaves: Complexação, Cu^{II} , metalofármacos, citotoxicidade, DNA, HSA.

ABSTRACT

This work consists of a study related to the synthesis, structural characterization, study of the cytotoxic activity and interaction with DNA and HSA of two new Copper(II) complexes with 1,3,5-trisubstituted pyrazolines as ligands. The complexes were obtained from the $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ salt with 1,3,5-trisubstituted pyrazolinic linker in the ratio (1:1) in a mixture of $\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ solvents. The complexes were obtained in the form of green crystals, which can be represented simply in the general formula $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$. For the characterization, single-crystal X-ray diffraction techniques were used, which demonstrated that the pyrazoline ligand is coordinated in a tridentate way by atoms of N and one of O and completing the sphere of coordination to the metal by a Cl atom, forming a slightly distorted quadratic geometry, paramagnetic electron resonance spectroscopy corroborated the geometry of the complexes and we could also observe that the analysis in frozen DMSO does not occur the coordination of DMSO in the complexes. Molecular orbital calculations were performed using the Time-Dependent Functional Density Theory (TD-DFT) method to assist in the interpretation of electronic transitions observed in UV-Vis molecular absorption spectroscopy, mixed electronic transitions of the MLCT type were observed. (metal to ligand transition), LMCT (ligand to metal transition) and IL (intraligand). The cytotoxic activity of the synthesized complexes was evaluated, a superior action of the complexes was observed when compared to free ligands for tests performed in vitro. The interaction of the complexes and ligands with DNA and HSA was also evaluated and it was observed that there is a weak to moderate interaction, both for free ligands and for the complexes, in addition to presenting high binding constants (K_b), which were in the order of 10^3 for the complexes and 10^2 for the ligands, and they occur spontaneously, since it was verified that the variation of the Gibbs free energy was negative ($\Delta G < 0$). By fluorescence spectroscopy, the Stern-Volmer constant (K_{sv}) was used to determine the interactive capacity of the compounds. The determined K_{sv} values were: in the order of 10^3 for the complexes and ligands for the interaction with DNA and for the complexes in the interaction with HSA, since the ligands with HSA were in the order of 10^1 . Also, with the help of theoretical studies by Molecular docking, it was possible to estimate the preferential position of the compounds when interacting with DNA that indicated the minor groove as the preferential site of the and that the main interaction is by van der Waals forces. For HSA, the interaction occurs preferentially through site III and the main type of interaction is through van der Waals forces.

Keywords: Complexation, Cu(II), metallopharmaceuticals, cytotoxicity, DNA, HSA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV-Vis: ultravioleta-visível	nm: nanômetro
IV: infravermelho	Å: unidade de medida de comprimento
CIM ₉₀ : concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano	DFT: teoria do funcional da densidade
IC ₅₀ : concentração do composto capaz de inibir 50% do crescimento celular	TD-DFT: teoria do funcional da densidade dependente do tempo
IL: transições eletrônicas intraligantes	DNA: ácido desoxirribonucleico
MLCT: transferência de carga metal-ligante	HSA: albumina humana
LMCT: transferência de carga ligante-metal	DRX: difratometria de raios X
LLCT: transferência de carga ligante-ligante	EPR: ressonância paramagnética eletrônica
XLCT: transferência de carga halogênio-ligante	ΔG° : energia livre de Gibbs
(M+X)LCT: transferência de carga metal+haleto-ligante	ΔH° : entalpia
OM: orbital molecular	ΔS° : entropia
TOM: teoria do orbital molecular	DMSO: dimetilsulfóxido
ϕ : rendimento quântico de fluorescência	EtOH: álcool etílico
τ : tempo de vida	CH ₂ Cl ₂ : diclorometano
p.f: ponto de fusão	CH ₃ CN: acetonitrila
v: estiramento	Et ₃ N: trietilamina
λ : comprimento de onda	K _a : constante de associação
IS: índice de seletividade	K _b : constante de ligação
EROs: espécies reativas de oxigênio	K _{sv} : constante de Stern-Volmer
μ s: microssegundo	k _q : constante cinética de supressão biomolecular
	((: sonda ultrassônica
	AO: alaranjado de acridina
	DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
	MG: verde de metila

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desdobramento do campo cristalino nos sistemas: octaédrico, alongamento e encurtado em z e quadrado-planar.....	24
Figura 2 –	Representação da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	25
Figura 3 –	Representação esquemática da absorção do cobre.....	27
Figura 4 –	Representação da estrutura do complexo Cu^{II} -Elesclomol. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	29
Figura 5 –	Representação da estrutura do ácido ascórbico.....	29
Figura 6 –	Representação da estrutura dos complexos de Cu^{II} com hidrazonas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	30
Figura 7 –	Representação da estrutura do complexo de Cu^{II} com pirazol. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	31
Figura 8 –	Representação da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2$. Os átomos de hidrogênio e as moléculas de contra-íon foram omitidos para maior clareza.....	32
Figura 9 –	Representação da estrutura dos a) Pirazóis b) Pirazolinas.....	33
Figura 10 –	Representação das a) 1-pirazolinas b) 2-pirazolinas e c) 3-pirazolinas.	33
Figura 11 –	Representação da estrutura dos complexos de Cobalto(II) com ligantes tiocarbamoil-pirazolina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	34
Figura 12 –	Representação da estrutura calculada do a) ligante pirazolina-piridina e do b) complexo de prata(I). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.....	35
Figura 13 –	Representação da estrutura das pirazolinas 1,3,5-trissubstituídas.....	36
Figura 14 –	Representação da estrutura do DNA.....	37
Figura 15 –	Representação da estrutura A-DNA e B-DNA.....	38
Figura 16 –	Representação do HSA com seus respectivos domínios e subdomínios.	40
Figura 17 –	Projeção ORTEP da unidade assimétrica do Complexo 1 . Para maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas com 50% de probabilidade ocupacional.....	59
Figura 18 –	Projeção ORTEP da unidade assimétrica do Complexo 2 . Para maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas com 50% de probabilidade ocupacional.....	61

Figura 19 –	Poliedro para o centro metálico de Cu ^{II} para os Complexos 1 e 2	62
Figura 20 –	Operadores de simetria contidos na cela unitárias triclínica vinculada ao grupo espacial P $\bar{1}$ (esquerda) e a projeção Diamond do conteúdo de cela unitária triclínica do Complexo 1 (direita). Para maior clareza, foram omitidos os átomos de hidrogênio.....	64
Figura 21 –	Operadores de simetria contidos na cela unitárias triclínica vinculada ao grupo espacial C2/c (esquerda) e a projeção Mercury do conteúdo de cela unitária triclínica do Complexo 2 (direita). Para maior clareza, foram omitidos os átomos de hidrogênio.....	65
Figura 22 –	Espectro vibracional no infravermelho para o Ligante 1	66
Figura 23 –	Espectro vibracional no infravermelho para o Ligante 2	66
Figura 24 –	Espectro vibracional no infravermelho para o Complexo 1	67
Figura 25 –	Espectro vibracional no infravermelho para o Complexo 2	68
Figura 26 –	Representação das estruturas evidenciando os átomos de hidrogênios ligados a nitrogênio a) Complexo 1 e b) Complexo 2	69
Figura 27 –	Espectro de ressonância paramagnética eletrônica para os Complexos 1 e 2	70
Figura 28 –	Comparação dos espectros teórico e experimental para o Complexo 1 ...	71
Figura 29 –	Espectro de ressonância paramagnética eletrônica em DMSO a 100 K..	72
Figura 30 –	Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo 1 e Ligante 1	73
Figura 31 –	Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo 2 e Ligante 2	73
Figura 32 –	Diagrama dos Orbitais de Fronteira para o Complexo 1 de acordo com o cálculo de TD-DFT.....	76
Figura 33 –	Espectro eletrônico de absorção molecular teórico (–) e experimental (–) para o Complexo 1	80
Figura 34 –	Diagrama dos Orbitais de Fronteira para o Complexo 2 de acordo com o cálculo de TD-DFT.....	81
Figura 35 –	Espectro eletrônico de absorção molecular teórico (–) e experimental (–) para o Complexo 2	83
Figura 36 –	Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo 1 no estado sólido e em solução utilizando o solvente DMSO.....	84

Figura 37 –	Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo 2 no estado sólido e em solução utilizando o solvente DMSO.....	85
Figura 38 –	Espectros de emissão para os Ligantes e Complexos em DMSO (λ_{290} nm).....	87
Figura 39 –	Comparação dos espectros de tempo de vida de fluorescência dos Complexos e Ligantes a) no estado sólido e b) em solução.....	88
Figura 40 –	<i>Fitting</i> monoexponencial dos ligantes e complexos em a) em solução b) no sólido.....	89
Figura 41 –	Voltamogramas cíclicos dos a) Complexo 1 Ligante 1 b) Complexo 2 Ligante 2 em solução de DMF. Utilizando como eletrólito suporte 0,1 mol.L ⁻¹ de TBAPF ₆ , eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo auxiliar de platina e <i>pseudo</i> -referência de platina e velocidade de varredura de 150 mV.s ⁻¹	91
Figura 42 –	Compostos utilizados no ensaio citotóxico <i>versus</i> valores de IC ₅₀ (μ mol L ⁻¹) frente às células tumorais.....	93
Figura 43 –	Compostos utilizados no ensaio citotóxico <i>versus</i> valores de (IS) frente às células normais MSF-10.....	94
Figura 44 –	Espectros de absorção eletrônica dos ligantes e complexos após adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4. a) Ligante 1 b) Ligante 2 c) Complexo 1 d) Complexo 2	95
Figura 45 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e os compostos em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). a) Ligante 1 , b) Ligante 2 , c) Complexo 1 e d) Complexo 2	97
Figura 46 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e os compostos em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). a) Ligante 1 , b) Ligante 2 , c) Complexo 1 e d) Complexo 2	98
Figura 47 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e os compostos em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). a) Ligante 1 , b) Ligante 2 , c) Complexo 1 e d) Complexo 2	99

- Figura 48 –** Superposição da melhor posição de encaixe para DNA:Ligantes no sulco menor. Bases nitrogenadas selecionadas (verde), Ligante **1** (amarelo), Ligante **2** (rosa), Complexo **1** (salmão), Complexo **2** (roxo). Cor dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro, cloro: verde claro e Cu(II): marrom..... **101**
- Figura 49 –** Espectros de absorção eletrônica dos ligantes e complexos após adições de HSA, em DMSO/PBS pH 7,4.**a)** Ligante **1** **b)** Ligante **2** **c)** Complexo **1** **d)** Complexo **2**..... **103**
- Figura 50 –** Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes dos compostos à 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de Kb..... **105**
- Figura 51 –** Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes dos compostos à 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_{sv}..... **106**
- Figura 52 –** Superposição da melhor posição de encaixe para **a)** HSA:Ligantes e **b)** HSA:Complexos. Ligante **1** (amarelo), Ligante **2** (rosa), Complexo **1** (salmão), Complexo **2** (roxo). Cor dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro, cloro: verde claro e Cu(II): marrom..... **108**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Processos associados aos parâmetros termodinâmicos.....	42
Tabela 2 –	Principais reagentes utilizados na síntese dos complexos e sua procedência.....	46
Tabela 3 –	Dados de CHN, ponto de fusão e rendimento de reação.....	56
Tabela 4 –	Dados da coleta de intensidades de difração e do refinamento das estruturas cristalinas calculadas para os Complexos 1 e 2	57
Tabela 5 –	Condições de reflexão pertinentes ao grupo especial $P\bar{1}$ ($N^\circ 2$), sistema cristalino triclinico.....	58
Tabela 6 –	Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do Complexo 2 pertinente ao grupo especial $C2/c$	60
Tabela 7 –	Principais ângulos de ligação para os Complexos 1 e 2 . Desvio padrão entre parênteses.....	62
Tabela 8 –	Comprimentos de ligação selecionados para os Complexos 1 e 2 . Desvio padrão entre parênteses.....	63
Tabela 9 –	Principais bandas no infravermelho médio para os ligantes e complexos.....	69
Tabela 10 –	Valores referentes ao comprimento de onda de máxima absorção das bandas I e II.....	74
Tabela 11 –	Níveis de energia calculados, força do oscilador (f) e análise das transições eletrônicas para o Complexo 1	77
Tabela 12 –	Níveis de energia calculados, força do oscilador (f) e análise das transições eletrônicas para o Complexo 2	82
Tabela 13 –	Comprimento de onda de $\lambda_{\max}$ das bandas I, II e III no estado sólido e em solução.....	86
Tabela 14 –	Tempos de vida de fluorescência para os Complexos e ligantes no estado sólido e em solução.....	88
Tabela 15 –	Condutividade molar em DMSO dos Complexos 1 e 2	90
Tabela 16 –	Potenciais redox dos compostos em solução de DMF. Utilizando como eletrólito suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TBAPF_6 , eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo auxiliar de platina, <i>pseudo</i> -eletrodo de referência de platina, e velocidade de varredura de 150 mV.s^{-1}	91
Tabela 17 –	Atividade citotóxica frente a linhagens celulares.....	92

Tabela 18 –	$\Delta\lambda$ de absorção dos ligantes e complexos antes e após adição de CT-DNA, constantes de ligação (K_b) e valores de ΔG para os ligantes e complexos.....	96
Tabela 19 –	Constantes de Stern-Volmer obtidos para os ligantes e complexos após interação com DNA, em DMSO, à 37 °C.....	100
Tabela 20 –	Pontuação de <i>docking</i> molecular para interação dos compostos com o DNA.....	100
Tabela 21 –	Resultados de <i>docking</i> molecular para a interação entre DNA e compostos.....	102
Tabela 22 –	Parâmetros de associação para a interação entre HSA e os compostos em temperatura de 37 °C e pH = 7,4.....	106
Tabela 23 –	Pontuação de <i>docking</i> molecular para interação dos compostos com o HSA.....	107
Tabela 24 –	Resultados de <i>docking</i> molecular para a interação entre HSA e compostos.....	108

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 –	Rota sintética para o preparo das chalconas.....	43
Esquema 2 –	Rota sintética para a produção dos Ligantes 1 e 2	44
Esquema 3 –	Rota sintética para os Complexos 1 e 2	45

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 –	Fotos dos cristais a) Complexo 1 b) Complexo 2	119
Anexo 2 –	Espectro de UV-Vis de 500 – 800 nm elucidando a banda <i>d-d</i> do Cu ^{II} para o Complexo 1 (Concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹).....	119
Anexo 3 –	Espectro de UV-Vis de 500 – 800 nm elucidando a banda <i>d-d</i> do Cu ^{II} para o Complexo 2 (Concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹).....	120
Anexo 4 –	Espectro de absorção eletrônica do Ligante 1 com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.....	120
Anexo 5 –	Espectro de absorção eletrônica do Ligante 2 com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.....	121
Anexo 6 –	Espectro de absorção eletrônica do Complexo 1 com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.....	121
Anexo 7 –	Espectro de absorção eletrônica do Complexo 2 com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.....	122
Anexo 8 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Ligante 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	122
Anexo 9 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Ligante 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	123
Anexo 10 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Complexo 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	123
Anexo 11 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Complexo 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	124
Anexo 12 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Ligante 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	124
Anexo 13 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Ligante 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	125
Anexo 14 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Complexo 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	125
Anexo 15 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Complexo 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	126
Anexo 16 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Ligante 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	126

Anexo 17 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Ligante 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	127
Anexo 18 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Complexo 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	127
Anexo 19 –	Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Complexo 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).....	128
Anexo 20 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 1 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Kb.....	128
Anexo 21 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 2 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Kb.....	129
Anexo 22 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 1 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Kb.....	129
Anexo 23 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 2 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Kb.....	130
Anexo 24 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 1 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Ksv.....	130
Anexo 25 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 2 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Ksv.....	131
Anexo 26 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 1 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Ksv.....	131
Anexo 27 –	Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 2 a 37 °C, em DMSO com <i>plot</i> para cálculo de Ksv.....	132

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1. A QUÍMICA DO COBRE	23
3.2. A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO COBRE.....	25
3.3. COMPLEXOS DE COBRE COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	28
3.4. AS PIRAZOLINAS	32
3.5. INTERAÇÃO COM DNA.....	37
3.6. INTERAÇÃO COM HSA	39
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	43
4.1. SÍNTESE DOS LIGANTES E COMPLEXOS	43
4.1.1. Síntese dos Ligantes 1 e 2	43
4.1.2. Síntese dos Complexos 1 e 2.....	45
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.2.1. Materiais.....	46
4.2.2. Métodos e Instrumentação.....	47
4.2.2.1. Análise elementar de CHN.....	47
4.2.2.2. Ponto de fusão	47
4.2.2.3. Difratomia de raio X	47
4.2.2.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	48
4.2.2.5. Espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica.....	48
4.2.2.6. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível	48
4.2.2.7. Teoria do funcional da densidade e teoria do funcional da densidade dependente do tempo	49
4.2.2.8. Espectroscopia de emissão de fluorescência	49
4.2.2.9. Investigação da atividade antitumoral através de estudos de citotoxicidade e determinação do IC ₅₀	50
4.2.2.10. Ensaios de interação com DNA	51
4.2.2.10.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis.....	51
4.2.2.10.2. Espectroscopia de fluorescência	52
4.2.2.10.3. Estudo da interação com DNA via docking molecular	52
4.2.2.11. Ensaios de interação com HSA	53
4.2.2.11.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis.....	53

4.2.2.11.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário	54
4.2.2.11.3. Estudo da interação com HSA via docking molecular	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESPECTROSCÓPICA DOS COMPOSTOS.....	56
5.1.1. Análise de CHN, ponto de fusão e rendimentos de reação	56
5.1.2. Determinação da estrutura cristalina dos Complexos 1 e 2.....	56
5.1.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	65
5.1.4. Espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica	70
5.1.5. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível	72
5.1.5.1. Estudo em solução.....	72
5.1.5.2. Estudo no estado sólido.....	84
5.1.6. Fluorescência.....	86
5.1.6.1. Emissão de fluorescência no estado estacionário.....	86
5.1.6.2. Tempo de vida de fluorescência.....	87
5.1.7. Estudo de condutividade	90
5.1.8. Voltametria cíclica	90
5.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	92
5.2.1. Ensaio de citotoxicidade	92
5.2.2. Interação com DNA	94
5.2.2.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis	94
5.2.2.2. Ensaio de competição por espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário.....	96
5.2.2.3. Interação com DNA: Estudo de <i>docking</i> molecular.....	100
5.2.3. Interação com HSA	103
5.2.3.1. Estudo de interação por espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	103
5.2.3.2. Estudo de interação por espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário.....	104
5.2.3.3. Interação com HSA: Estudo de <i>docking</i> molecular	107
6. CONCLUSÕES	110
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
8. ANEXOS	119

1. INTRODUÇÃO

Novas pesquisas em química inorgânica estão relacionadas, em maioria, à química de coordenação, que se desenvolveu de forma consistente a partir de meados do século XX, devido principalmente as novas técnicas de caracterização e potenciais aplicações.

Atualmente, dentro da química de coordenação, destacam-se pesquisas voltadas a complexação de ligantes bioativos a metais de transição, visando à síntese de novos metalofármacos, os quais tem apresentado relevantes resultados em ensaio *in vitro* frente a diversos micro-organismos e também em células tumorais [1, 2].

A bioinorgânica é um ramo interdisciplinar que envolve a química, medicina e biologia, tendo como principal objetivo descobrir e compreender as funções, aplicações e mecanismos de ação de moléculas inorgânicas biologicamente ativas, além de buscar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças [3].

O uso de compostos inorgânicos como agentes terapêuticos é relatado desde a antiguidade, porém o destaque da área de bioinorgânica começou a ocorrer somente no século XX, a partir da descoberta de novos compostos de arsênio pelo químico Paul Ehrlich, que se tornaram base no desenvolvimento de drogas para o tratamento de sífilis e, ainda, com a síntese do complexo *cis*-diaminodicloreto de platina(II), mais conhecido como o fármaco cisplatina, o qual demonstrou grande eficiência como agente antitumoral e ainda é utilizado na terapia de diferentes tipos de câncer. Desde então, diversos complexos metálicos com propriedades biológicas foram desenvolvidos e são utilizados na terapia e diagnóstico de diferentes doenças, tais como, complexos de ouro utilizados no tratamento de artrite reumatoide, complexos de prata utilizados como agentes antibacterianos e compostos de gadolínio que atuam como agentes de contraste no imageamento por ressonância magnética nuclear [4 – 8].

Complexos metálicos estão presentes em vários processos biológicos em organismos vivos. Por isso, novos complexos estão sendo estudados, com o interesse em desenvolver potenciais medicamentos que possam ser utilizados na terapia de algumas doenças.

Algumas propriedades de complexos de cobre(II) colocam o cobre como um metal bastante estudado na química de coordenação. Um exemplo é sua versatilidade em formar compostos de coordenação com diferentes geometrias e número de coordenação variando de quatro a seis, além de apresentar fácil disponibilidade e custo relativamente baixo [9].

O cobre é um metal presente no organismo humano na forma de metaloenzimas responsáveis por importantes reações biológicas que envolvem processos de oxidação e redução. Como exemplo, a enzima superóxido dismutase, a qual apresenta como sítio ativo em sua principal estrutura um átomo de cobre, sendo responsável pelo controle da ação de radicais livres no organismo. O estado de oxidação mais estável para íons cobre é o II. Segundo a teoria de Pearson é classificado como um ácido intermediário e, por isso, pode apresentar afinidade com diversos tipos de ligantes com diferentes sítios de coordenação [10 – 12].

As pirazolininas são compostos heterocíclicos não aromáticos pertencentes à família dos 1,2-azóis, formadas por um anel contendo três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio adjacentes. Estes compostos são considerados ligantes promissores na química de coordenação, visto a possibilidade de substituições nas posições 1, 3 e 5 do anel pirazolínico que possibilita maior versatilidade quanto aos seus modos de coordenação frente a metais de transição. Esses compostos exibem um amplo espectro de atividades biológicas como por exemplo, atividades antitumorais, antibacterianas, antivirais, analgésicas, antifúngicas entre outras [13 – 15].

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização estrutural e espectroscópica de novos complexos de Cobre(II) com pirazolinas 1,3,5-trissubstituídas, bem como, o estudo da atividade citotóxica e a interação destes compostos com biomoléculas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a síntese e as caracterizações estruturais de novos complexos de Cobre(II) com pirazolinas 1,3,5-trissubstituídas;
- Investigar as estruturas dos compostos sintetizados no estado sólido através da técnica de difratometria de raios X em monocristais e análise elementar de CHN;
- Analisar o comportamento óptico dos compostos preparados, utilizando-se de técnicas como a espectroscopia vibracional no infravermelho médio, espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis e espectroscopia de fluorescência;
- Verificar as transições eletrônicas envolvidas nos processos fotofísicos via cálculos computacionais pelo método TD-DFT;
- Avaliar a atividade antitumoral dos compostos sintetizados através dos estudos de citotoxicidade em células tumorais e não tumorais murinas na determinação da Concentração Inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) e viabilidade celular;
- Avaliar a interação dos compostos com o ácido desoxirribonucleico (DNA) e com albumina humana (HSA) por meio de parâmetros obtidos experimentalmente como a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), a constante cinética biomolecular de Stern-Volmer (K_q), de Ligação (K_b), de Associação (K_a), além dos termos termodinâmicos como variação da energia livre de Gibbs (ΔG);
- Comparar os resultados obtidos experimentalmente da interação com DNA e HSA com aqueles obtidos a partir de cálculos teóricos de *docking* molecular.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A QUÍMICA DO COBRE

O cobre (Cu) é um metal de transição de cor laranja-avermelhada pertencente ao 4º período do grupo 11 da tabela periódica, sua distribuição eletrônica é $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ e a estrutura cristalina é cúbica de empacotamento compacto. É um metal macio, maleável, dúctil e possui alta condutividade térmica e elétrica. Entre os metais puros à temperatura ambiente, o cobre tem a segunda maior condutividade elétrica e térmica, depois da prata [16, 17].

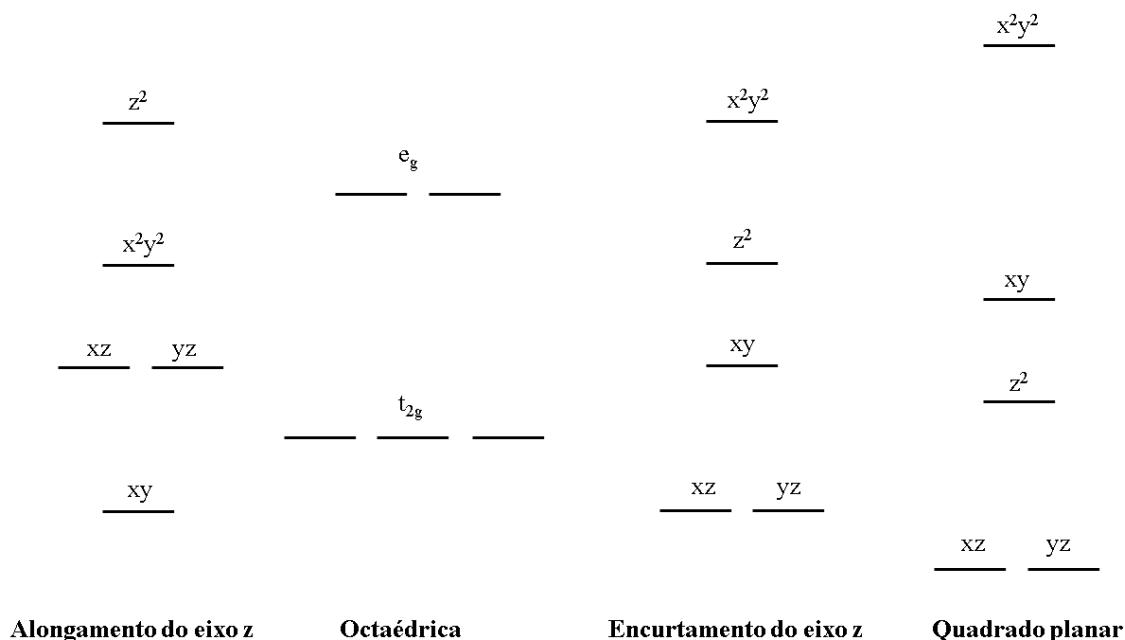
O cobre possui 29 isótopos, ^{63}Cu e ^{65}Cu são estáveis, sendo que o ^{63}Cu é o mais abundante, correspondendo a aproximadamente 69% do Cu de ocorrência natural. Os demais isótopos são radioativos, sendo o ^{67}Cu com maior tempo de meia vida com aproximadamente 62 horas [18].

O cobre pode apresentar número de oxidação de 0 a +4, sendo o +2, configuração eletrônica $[\text{Ar}]3d^9$, o mais estável. O íon Cu^{2+} apresenta o subnível *d* semipreenchido, que permite transições eletrônicas internas do tipo *d-d* que influenciam diretamente na coloração dos complexos formados, bem como nas suas propriedades magnéticas. Os complexos de cobre(II) são paramagnéticos e normalmente coloridos, azuis ou verdes, em função destas transições. A camada *d* incompleta possibilita a hibridização e, por isso, os complexos apresentam geometrias bastante variadas. O número de coordenação do cobre(II) varia entre 4 e 8, sendo que os predominantes são 4 (quadrado planar ou tetraédrico), 5 (bipirâmide trigonal ou pirâmide de base quadrada) e 6 (octaédrica distorcida ou tetragonal) [19].

Os complexos com geometria octaédrica de íons d^9 e d^4 (spin alto) são frequentemente distorcidos, de maneira que o comprimento das duas ligações axiais podem ser mais longas (octaedro alongado) ou mais curtas (octaedro comprimido), do que aquelas encontradas no plano equatorial. Este comportamento é conhecido como distorção de Jahn-Teller e é acompanhado de uma variação na simetria (O_h para D_{4h}) e de um desdobramento dos conjuntos de orbitais t_{2g} (menor energia) e e_g (maior energia). Quando as ligações axiais estão alongadas, os orbitais *d* que possuem componente no eixo *z* são estabilizados, enquanto os demais são desestabilizados. Quando as ligações axiais estão encurtadas, os orbitais *d* que possuem componente no eixo *z* são desestabilizados, enquanto os demais são estabilizados. Quando

ocorre a ausência de ligantes no eixo z o orbital mais estabilizado será o dz^2 [20, 21]. A Figura 1 mostra os efeitos do campo cristalino para as distorções de Jahn-Teller.

Figura 1 – Desdobramento do campo cristalino nos sistemas: octaédrico, alongamento e encurtado em z e quadrado-planar.

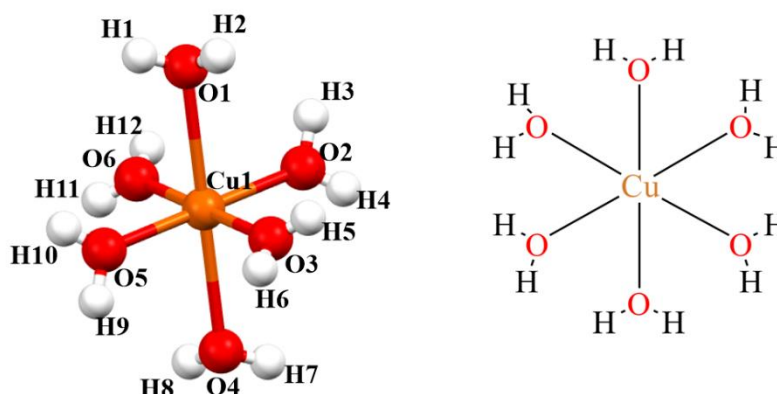


Os sais metálicos de Cu^{2+} são extremamente versáteis, apresentando elevada reatividade, alta disponibilidade, baixo custo e alta solubilidade, além de serem facilmente manipulados.

A maioria dos sais de cobre se dissolvem em água formando cátions livres Cu^{2+} , que é um forte agente oxidante, e tem tendência a hidrólise, formando o complexo hexaaquocobre (II), $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (Figura 2). O cobre é um ácido de Lewis intermediário, altamente reativo com bases moles e duras. O Cobre(II) forma complexos fortes com grupos doadores de elétrons em compostos orgânicos, oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S) [22, 23].

Na Figura 2 é possível observar um exemplo do efeito Jahn-Teller, onde as ligações com o **O1** e **O2** são mais longas que as demais.

Figura 2 – Representação da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$



Acredita-se que o cobre foi o primeiro metal a ser manipulado pelo homem, e que a humanidade já o conhece desde o período neolítico, quando era utilizado para produção de instrumentos de trabalho, armas e utensílios. O cobre foi importante no desenvolvimento da civilização principalmente a partir da idade do bronze, liga metálica de cobre e estanho, que foi um período de uso intenso dos metais marcando o desenvolvimento do comércio [24]. Atualmente, o uso do cobre se destina principalmente a produção de fios elétricos e cabos de comunicação.

3.2. A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO COBRE

Além do uso em materiais o cobre tem um importante papel biológico, pois é um micronutriente essencial para animais e humanos, desempenhando um papel importante nos transportadores celulares, chamados cuproenzimas, que servem como cofatores para uma variedade de enzimas. Assim, o cobre é essencial no organismo humano para o bom funcionamento dos órgãos e processos metabólicos como síntese de hemoglobina, oxidação de

ferro, biossíntese de neurotransmissores, respiração celular, pigmentação da pele, amidação do peptídeo de defesa antioxidante e formação de tecido conjuntivo [25 – 27].

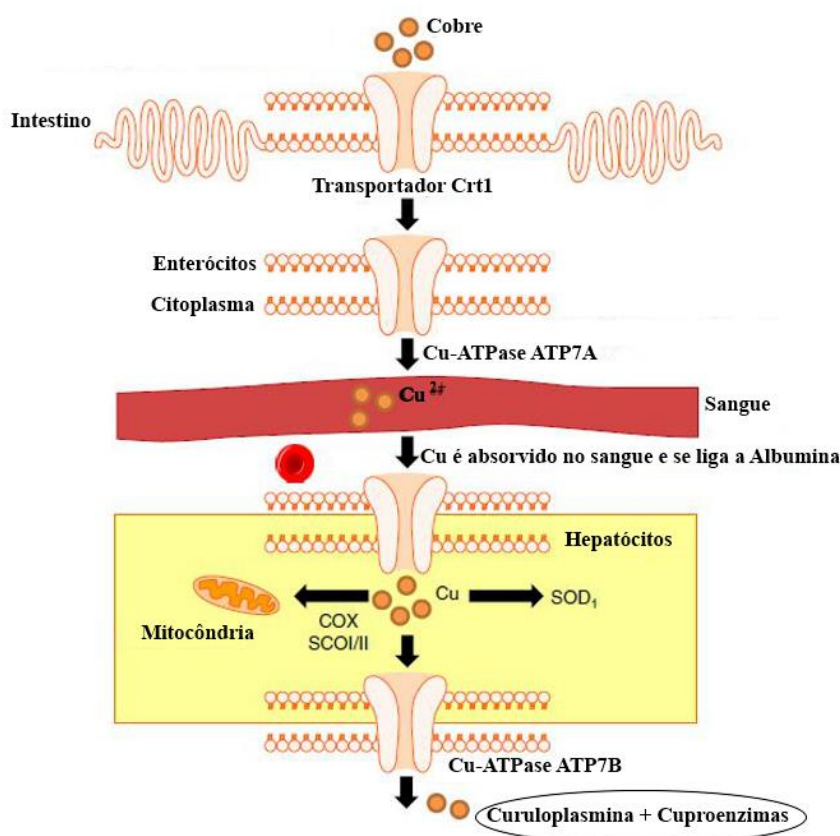
O valor medicinal do cobre foi reconhecido há muitos séculos. Na época de Hipócrates, misturas de cobre eram usadas para tratamento de distúrbios pulmonares e mentais [28], e a medicina ayurvédica recomenda armazenar água potável em vasos de cobre devido às suas propriedades antibacterianas [29].

O cobre foi reconhecido como um mineral essencial em 1928, quando demonstrou-se que ele é necessário para a síntese de glóbulos vermelhos em ratos. Alguns ratos que sofriam de anemia foram alimentados com dietas à base de animais ou vegetais suplementadas com cinzas e conseguiram se recuperar da doença. Foi posteriormente descoberto que as cinzas continham sulfeto de cobre. Essa descoberta levou a novas pesquisas que demonstraram que o cobre era essencial não apenas para prevenir a anemia, mas também para manutenção e crescimento dos ratos [30, 31]. Bost e colaboradores [32] demonstraram que a quantidade de íons cobre presentes no organismo afeta o crescimento de crianças, os mecanismos de defesa e o desenvolvimento do cérebro e que a suplementação de cobre nos alimentos e na água potável é de extrema importância para os organismos vivos.

O cobre não pode ser produzido pelo corpo humano, portanto, deve ser ingerido a partir de fontes alimentares. Segundo a Organização Mundial da Saúde, é necessário em pequenas quantidades para prevenir quaisquer danos à saúde. Para adultos, o mínimo recomendado é de 0,9 mg/dia, sendo o ideal de 2,6 mg/dia. Mulheres grávidas e crianças com menos de cinco anos requerem quantidades maiores, sendo necessário de 0,3 – 0,5 µg/kg/dia [33 – 35].

O mecanismo de absorção do cobre se dá principalmente nas células intestinais com auxílio do transportador Ctr1, em seguida o cobre é liberado no sangue através do gene Cu-ATPase, ATP7A, onde se liga a proteínas plasmáticas como a ceruplasmina, transcupreína e a albumina, que transportam os íons Cu^{2+} para a membrana plasmática. Então sofre a redução a Cu^{1+} por redutase cúprica e é liberado para proteínas que requerem cobre como a citocromo C oxidase (COX), Cu/Zn superóxido dismutase (SOD) e proteína antioxidante 1 (Atox1). A excreção do cobre do organismo é realizada pelo gene Cu-ATPase, ATP7B [36, 37]. A Figura 3 apresenta o mecanismo de absorção do cobre no organismo humano de forma simplificada.

Figura 3 – Representação esquemática da absorção do cobre



Abreviações: COX: Citocromo c oxidase; SOD₁: Superóxido dismutase.

Assim como o ferro, a ausência ou excesso de cobre no organismo causa alguns problemas de saúde. A deficiência de cobre em adultos pode ocorrer, mas é rara. No entanto, sua deficiência em humanos pode ter efeitos adversos no sistema hematopoiético, sistema nervoso e sistema cardiovascular [38 – 42].

Defeitos nos genes ATP7A e ATP7B, levam à doença de Menkes e doença de Wilson, respectivamente. Ambas as doenças são caracterizadas pelo efeito do cobre nos tecidos, embora com diferenças específicas levando a quadros clínicos distintos e opostos. A doença de Menkes mostra deficiência grave de cobre enquanto a doença de Wilson é caracterizada pela toxicidade do cobre. Os sintomas cerebrais são proeminentes em ambas as doenças [43 – 45].

Os sintomas da doença de Menkes se devem a uma má distribuição do cobre, que o torna não disponível para a função das enzimas cobre-dependentes. Na forma clássica, as manifestações clínicas são hipotermia, escasso aumento ponderal, alterações do cabelo, que se torna frágil, fino, quebradiço e de cor acinzentada clara e, nos primeiros meses de vida convulsões e deterioração neurológica. Não existe tratamento eficaz e foram propostas diversas terapias com sais de cobre. Na Doença de Wilson, ocorre uma anomalia no gene ATP7B responsável por regular a excreção do excesso de cobre do organismo, e este não desempenha a sua função. Desta forma, ocorre o acúmulo de cobre levando à lesão do tecido e subsequentemente à hepatite, entre outros danos [46 – 48].

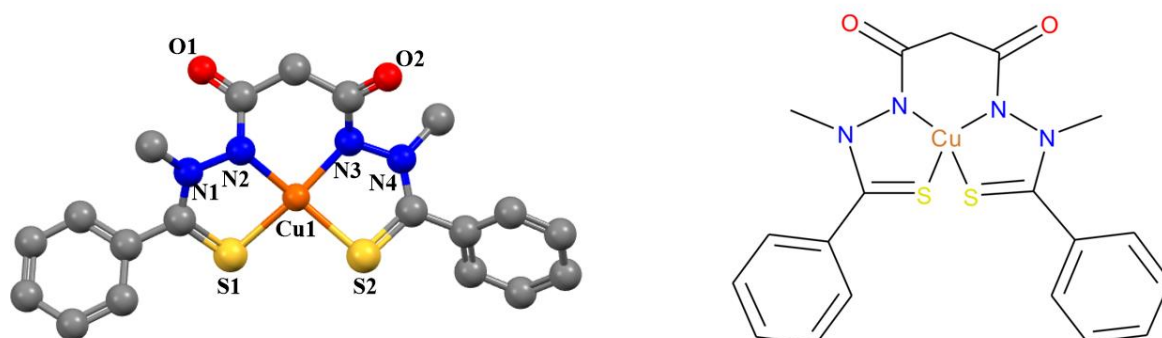
3.3. COMPLEXOS DE COBRE COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

Considerando as propriedades físico-químicas e biológicas do metal, vários complexos de cobre(II) têm sido delineados com o intuito de avaliar seu potencial biológico e propor novos fármacos para diversas enfermidades.

A síntese e o desenvolvimento de complexos de cobre como agentes anticancerígenos foram apresentados em várias revisões nas últimas década. Nos últimos 20 anos, os complexos de cobre se consolidaram na química medicinal, devido a um aumento no número de compostos que se mostraram eficazes em modelos de câncer em animais [49].

Vo, N. H. e colaboradores [50] sintetizaram um complexo de cobre(II) com o medicamento anticâncer Elesclomol® (Figura 4), que entrou em um ensaio clínico de fase I para tratar a leucemia mielóide aguda e apresentou um perfil de segurança muito favorável, mas nenhum resultado na dose máxima avaliada de 400 mg/m². Essa mesma droga também foi testada em um estudo de fase II contra cânceres de ovário, trompas de falópio e peritônio [51, 52]. É importante ressaltar que demonstrou exercer sua atividade anticancerígena como um complexo com cobre(I), indicando que Elesclomol® é de fato uma pró-droga [53, 54].

Figura 4 – Representação da estrutura do complexo Cu^{II}-Elesclomol. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza



Um dos principais mecanismos propostos para explicar a citotoxicidade celular induzida pelo cobre vem da propensão dos íons de cobre em participar da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os íons Cu²⁺ na presença de agentes redutores, como o ácido ascórbico estrutura representada na Figura 5, são reduzidos a Cu¹⁺ que é capaz de catalisar a formação de radicais hidroxila (HO•) a partir de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da reação de Haber-Weiss [55]:

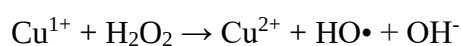
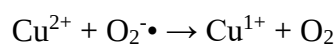
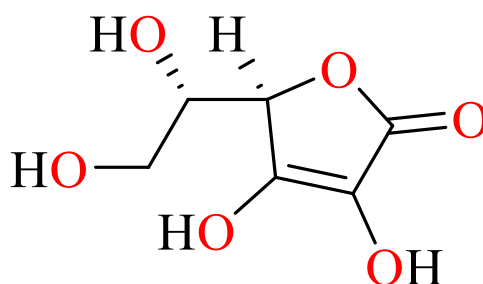


Figura 5 – Representação da estrutura do ácido ascórbico

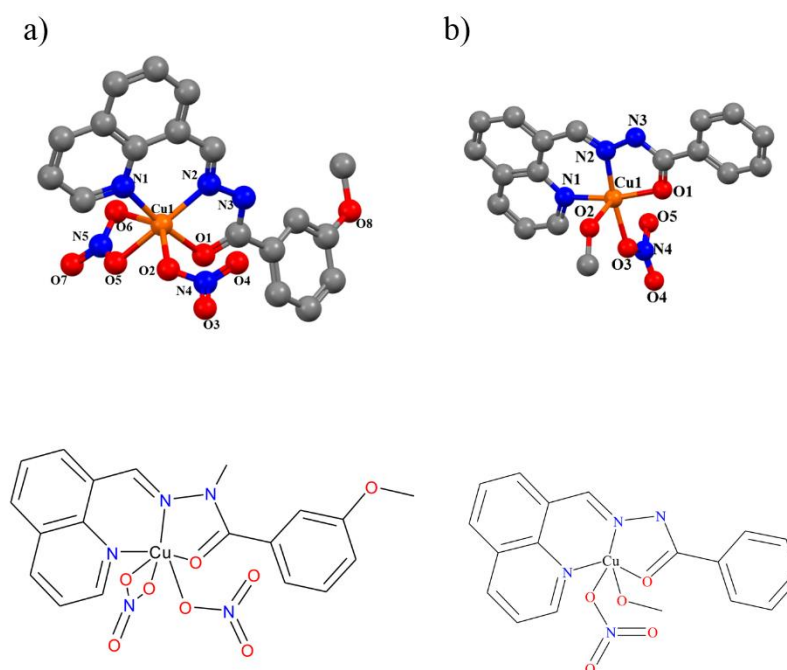


O radical hidroxila, altamente reativo, é capaz de interagir com qualquer molécula biológica, abstraindo o hidrogênio de uma proteína ou ácido graxo da célula causando estresse oxidativo. Isso resulta em dano oxidativo das células [56]. Em particular, foi demonstrado que o cobre é capaz de induzir quebras de hélice do DNA e oxidar suas bases nitrogenadas produzindo EROs [57].

Desta forma o Elesclomol® se liga ao Cu^{II} que é reduzido a Cu^{I} uma vez dentro das células cancerígenas, onde induz a quebra na dupla hélice do DNA e catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio em maior quantidade em células cancerígenas que em células saudáveis, explicando porque esta droga é mais citotóxica para células cancerígenas do que para células normais [58].

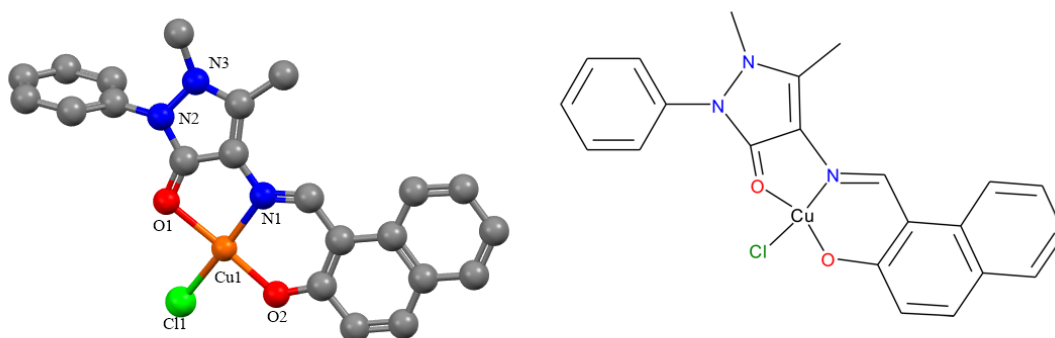
Hu, K. e colaboradores [59] sintetizaram dois complexos de Cu^{II} com hidrazonas (Figura 6) que se mostraram promissores para atividade citotóxica, muito semelhantes a cisplatina, frente a células cancerígenas do tipo HeLa induzindo a parada da fase G2 nas células e, finalmente, levando à apoptose celular por via mediada por mitocôndrias, além de apresentarem forte interação com albumina humana (HSA) e interação na forma de intercalação com o DNA.

Figura 6 – Representação da estrutura dos complexos de Cu^{II} com hidrazonas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza



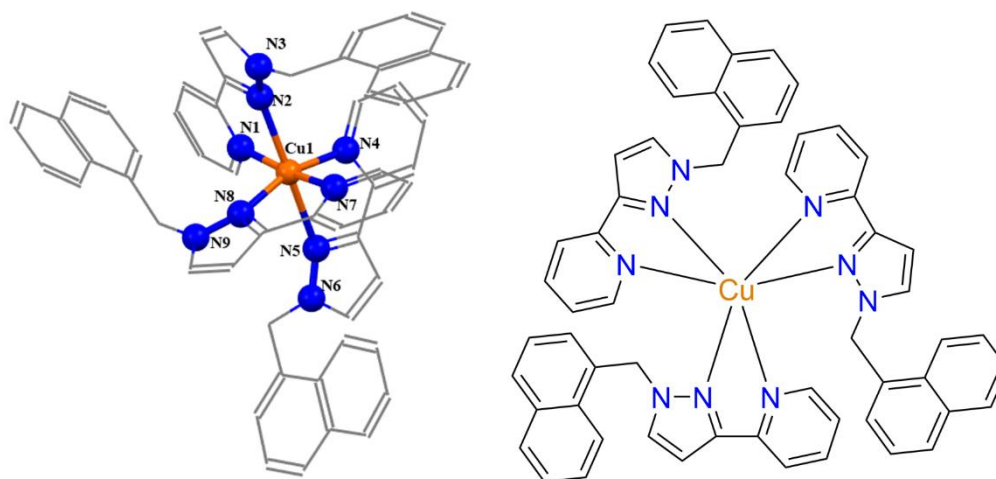
Azam, M. e seus colaboradores [60] sintetizaram um complexo de Cu^{II} com pirazol (Figura 7) e testaram sua atividade antibacteriana e antifúngica frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium notatum*, onde observaram que o complexo apresentou atividade superior que os medicamentos padrões, amoxicilina e fluconazol.

Figura 7 – Representação da estrutura do complexo de Cu^{II} com pirazol. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza



Zhang, H. e colaboradores [61] relataram a síntese e caracterização do ligante 2-[1-(naftalen-1-il)metil]-1H-pirazol-3-il]piridina (L) e seus complexos $[\text{M}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2$, onde $\text{M} = \text{Cu}^{\text{II}}, \text{Zn}^{\text{II}}$. Descobriu-se que o complexo cobre possui uma maior afinidade com o DNA e uma citotoxicidade superior contra células de leucemia HL-60, câncer gástrico BGC-823 e câncer de glândula mamária MDA5, em comparação com o complexo isoestrutural de Zn^{II} . O complexo $[\text{Cu}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2$ (Figura 8) também foi avaliado por Chen, R. e colaboradores [62] contra seis diferentes linhagens celulares tumorais (HL-60, células tumorais de próstata humana PC-3M-1E8, células BGC-832, células MDA, células de hepatoma humano Bel-7402 e células de câncer de colo de útero humano HeLa) mostrando uma taxa inibitória considerável e especificidade citotóxica. Também avaliaram a interação com DNA que demonstrou uma clivagem com o DNA pelo modo de intercalação.

Figura 8 – Representação da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{L})_3](\text{ClO}_4)_2$. Os átomos de hidrogênio e as moléculas de contra-íon foram omitidos para maior clareza

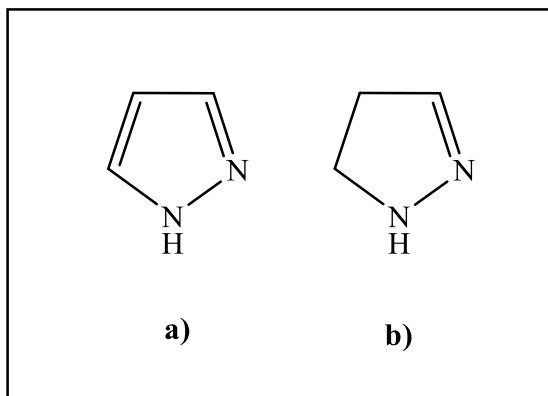


3.4. AS PIRAZOLINAS

As pirazolinas são um importante grupo constituído por um anel heterociclo de cinco membros, com 2 nitrogênicos e 3 carbonos adjacentes, que tem sido extensivamente pesquisado. O anel é bastante estável e inspirou os químicos a realizar várias variações estruturais no anel. Isso impulsionou o desenvolvimento de pirazolinas distintas com uma série de atividades farmacológicas tais como anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, anticancerígena e antidepressiva, entre outras [13].

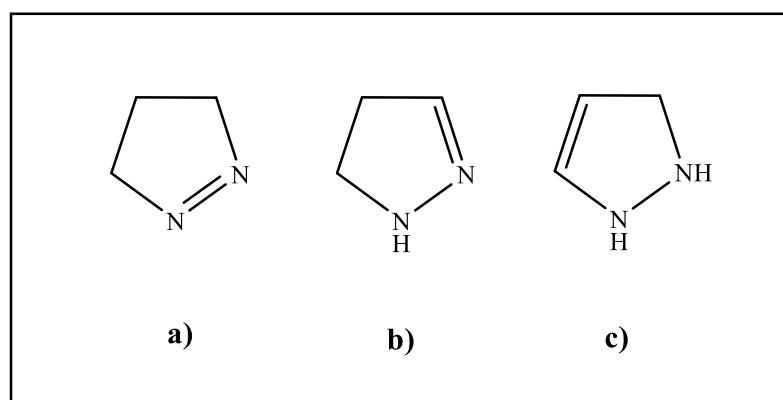
São derivadas dos pirazóis, que pertencem a classe dos 1,2-azóis, mas diferem dos pirazóis por possuírem uma insaturação a menos no ciclo e, desta forma, não serem aromáticas, conforme evidenciado na Figura 9 [14].

Figura 9 – Representação da estrutura dos **a)** Pirazóis **b)** Pirazolinas



As 2-pirazolinas (Figura 10) são as mais estudadas desta classe e apresentam muitas aplicações, como medicamentos e seu uso industrial como corantes para lã e nylon.

Figura 10 – Representação das **a)** 1-pirazolinas **b)** 2-pirazolinas e **c)** 3-pirazolinas

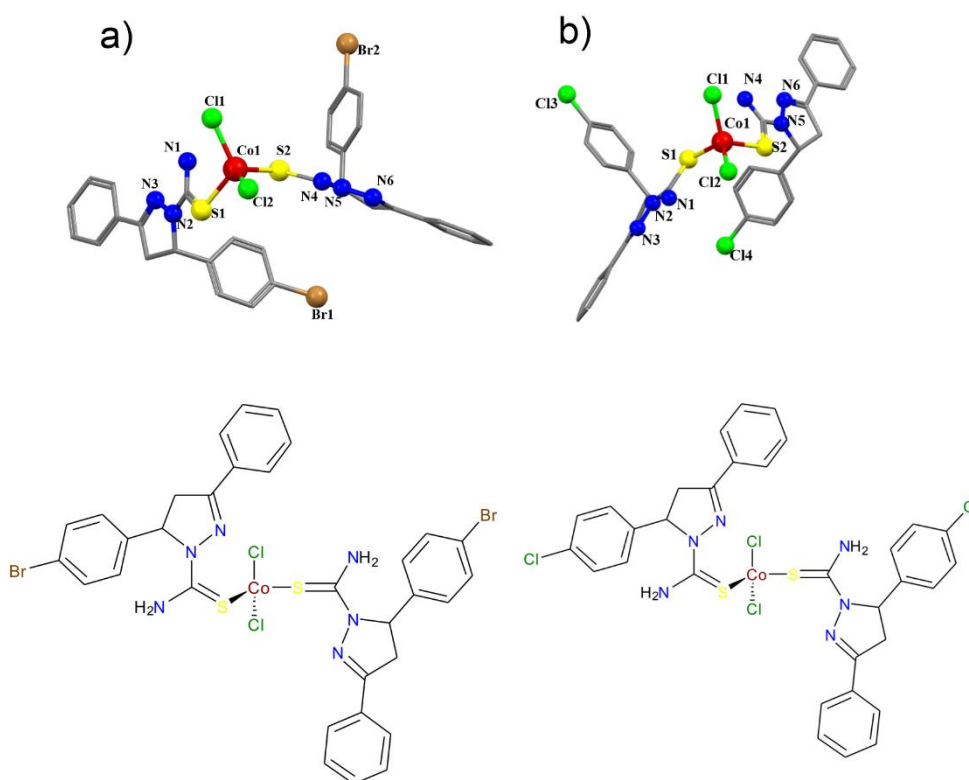


Derivados de pirazolina são considerados blocos de construção úteis e versáteis na síntese orgânica para a concepção de produtos farmacêuticos e agroquímicos [15].

Um exemplo de trabalho com núcleos pirazolínicos é o de Dias, B. B. e colaboradores [63] que sintetizaram dois complexos de cobalto(II) (Figura 11) com ligantes tiocarbamoil-pirazolina que apresentaram potencial atividade antifúngica e antibiofilme no controle de

Candida glabrata ATCC 2001 e do isolado clínico resistente *C. glabrata* CG66 obtido a partir de uma amostra de urina, apresentando um valor de CIM de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra os isolados clínicos, valor inferior ao apresentado pelo medicamento fluconazol ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$).

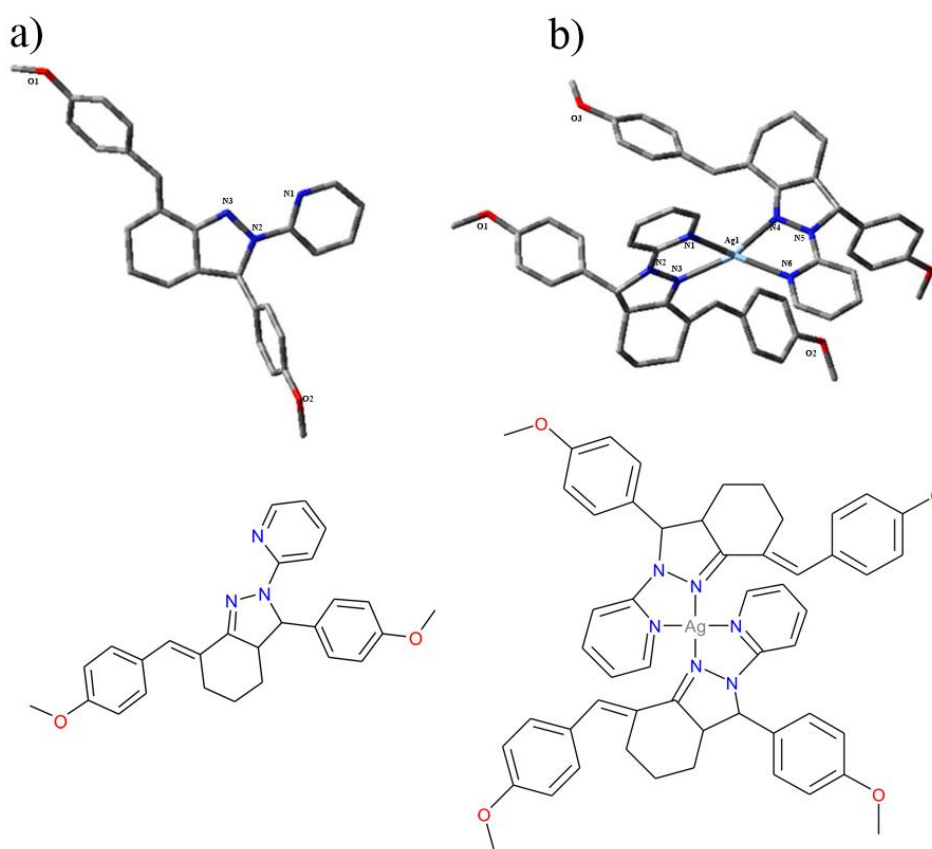
Figura 11 – Representação da estrutura dos complexos de Cobalto(II) com ligantes tiocarbamoil-pirazolina. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza



Matiadis, D. e seus colaboradores [64] relatam a síntese de um novo ligante contendo pirazolina-piridina utilizado para a formação de um novo complexo de prata(I) (Figura 12). O ligante livre não apresentou atividade antibacteriana, mas quando complexado com prata(I) observou-se uma alta potência contra três bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* com a concentração inibitória mínima CIM₉₀ variando entre 4 e $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, e excelente atividade contra os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (CIM₉₀ $\leq 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além da inibição do crescimento

planctônico, a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* foi significativamente reduzida pelo complexo. O complexo também apresentou forte ligação ao DNA com grande queda na viscosidade do DNA indicando a ausência de intercalação clássica e sugerindo a participação do íon prata na ligação ao DNA o que pode estar relacionado à sua atividade antibacteriana. Em conjunto, os resultados revelaram que os complexos de prata com pirazolina-piridina são de grande interesse como novos agentes antibacterianos.

Figura 12 – Representação da estrutura calculada do **a)** ligante pirazolina-piridina e do **b)** complexo de prata(I). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza

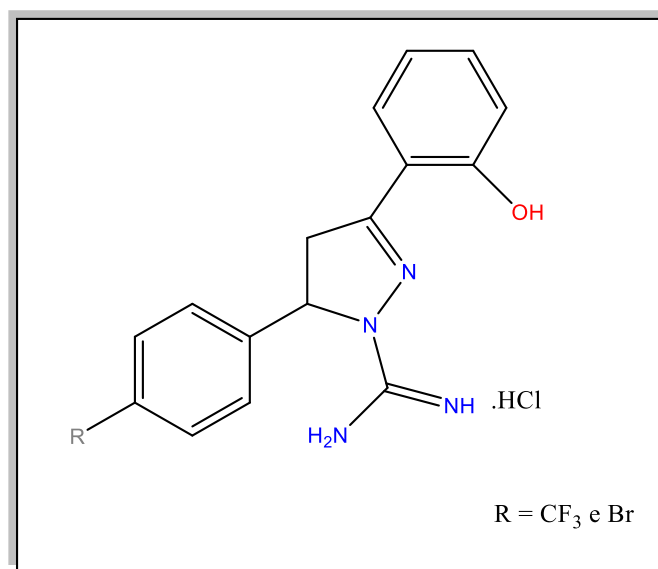


As pirazolinas podem ser sintetizadas adotando-se várias metodologias sintéticas, uma que se mostrou promissora é a ciclocondensação de chalconas. com cloridrato de aminoguanidina.

Pizzuti e colaboradores [65] realizaram a ciclocondensação de chalconas com cloridrato de aminoguanidina, comparando a eficiência da sonoquímica, a fim de melhorar o tempo e os rendimentos das reações, em relação às sínteses realizadas em refluxo. Em relação à metodologia clássica, a técnica de ultrassom proporcionou pirazolinas com rendimentos de 75 à 99 % em 30 minutos reação e sem necessidade de purificação. Enquanto que as mesmas sínteses realizadas sob refluxo proporcionaram rendimentos de 57 à 69 % e exigiu tempos de reação mais longos de 3 à 6 horas.

Damim e colaboradores [66], sintetizaram e caracterizam duas pirazolinas, estrutura representada na Figura 13, e testarem contra *Salmonella* spp observaram que ambas exibiram atividade antimicrobiana. Para o composto com substituinte CF_3 , CIM_{90} contra todas as espécies de *Salmonella* foram $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o composto com substituinte Br, CIM_{90} contra todas as espécies de *Salmonella* testadas foram de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção de *S. infantis*, que foi mais sensível ao composto, com CIM_{90} de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com relação ao controle interno, todas as *Salmonella* spp. testados resultaram em sensibilidade ao cloranfenicol, com CIM_{90} de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 13 – Representação da estrutura das pirazolinas 1,3,5-trissubstituídas



3.5. INTERAÇÃO COM DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma molécula orgânica em dupla hélice na qual cada uma é formada por uma sequência de nucleotídeos contendo um grupo fosfato, uma pentose (desoxirribose) e uma base nitrogenada (timina, guanina, citosina ou adenina). As hélices interagem entre si através de ligações de hidrogênio presentes entre as bases nitrogenadas (Figura 14) [67].

O DNA pode adotar pelo menos duas formas de arranjo da dupla hélice, A-DNA e B-DNA (Figura 25), a estrutura do B-DNA, proposta por Watson e Crick [68], é mais estável e surge da organização estrutural que tende a garantir uma maior aproximação entre as bases nitrogenadas além de evitar o maior acúmulo de água possível no interior da dupla-hélice. Devido a esse arranjo, formam-se cavidades ao longo da sequência de nucleotídeos. Estas cavidades são conhecidas como sulco maior e sulco menor [69 – 74].

Figura 14 – Representação da estrutura do DNA

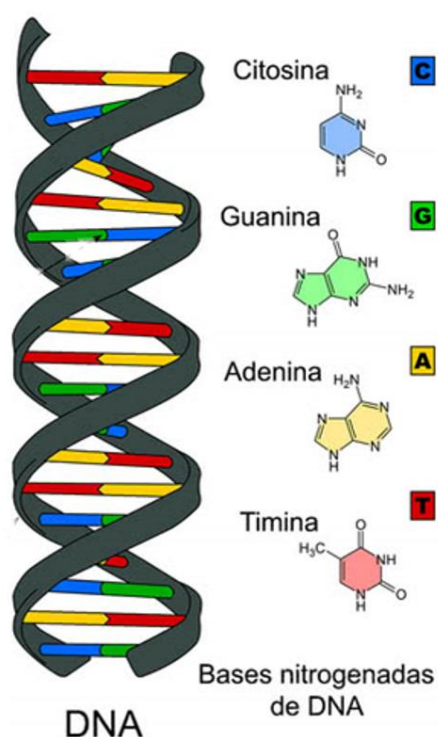
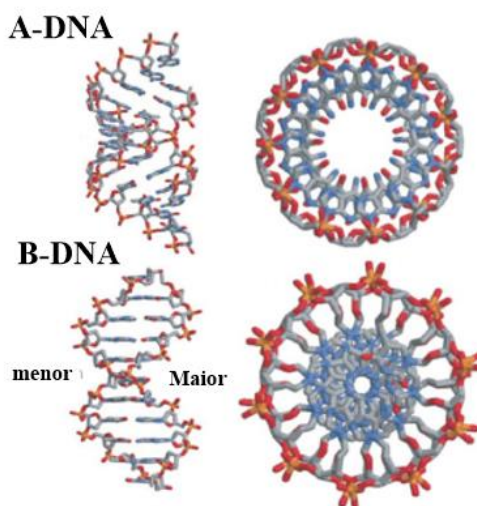


Figura 15 – Representação da estrutura A-DNA e B-DNA



Como a molécula do DNA é bastante complexa e possibilita a interação com outras moléculas em diversas regiões ao longo da sua estrutura. Duas grandes classes de interação não covalentes são mais vastamente estudadas, os intercaladores e os ligantes de sulcos. Os intercaladores se ligam por inserção de um cromóforo aromático planar entre os pares das bases nitrogenadas do DNA, enquanto que os ligantes em sulcos têm maior afinidade em se encaixar em um dos sulcos do DNA (sulco maior ou menor). Além dessas duas classes, também é possível a interação por ligação covalente, onde a molécula se liga em alguma região do DNA, geralmente nas bases nitrogenadas, modificando assim a estrutura do DNA [75, 76].

É possível avaliar a interação entre a espécie e o DNA por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Visível observando os deslocamentos batocrômicos/hipsocrômicos nas transições eletrônicas da espécie química, além de variações nas intensidades das respectivas absorbâncias. Podemos determinar a constante de ligação (K_b) entre DNA e uma espécie química, e para isso são imprescindíveis a concentração de DNA (mol L^{-1}) ao fim do ensaio, a absorbância da espécie química na ausência de DNA (A_0) e da espécie após todas as adições de DNA (A). Para obter esta constante (K_b) se faz necessário a construção de um gráfico utilizando um plot de $A_0/(A-A_0)$ (eixo Y) e $1/[\text{DNA}]$ (eixo X), no qual o K_b é determinado pelo inverso do coeficiente angular ($1/\text{Slope}$) [70].

A constante de Stern-Volmer é utilizada, em espectroscopia de fluorescência, para calcular a força de interação entre DNA e espécie química, através da supressão da fluorescência. Se a espécie apresentar emissão fluorescente, a supressão de sua fluorescência pela presença de DNA pode ser investigada. Neste caso, avalia-se o efeito do DNA sobre a molécula em seu estado excitado.

Para estes ensaios, se faz uso da presença de moléculas que servem como competidores pelos sítios de interação do DNA. Desta forma, como o DNA isoladamente não apresenta fluorescência, a formação de um aduto DNA:Competidor possibilita que a emissão seja observada. Assim, a espécie química é adicionada à solução contendo o aduto e observa-se o efeito espectroscópico causado pela sua presença. O valor de K_{sv} determina se a espécie química é capaz de deslocar o competidor presente e alojar-se no respectivo sítio de ligação, comprovando uma maior afinidade com o DNA em relação ao competidor [70, 71].

Três competidores são utilizados para este tipo de análise: alaranjado de acridina ($\lambda_{excitação} = 492 \text{ nm}$; $500 < \lambda_{emissão} < 700 \text{ nm}$), o qual se localiza entre as bases nitrogenadas, o verde de metila para competições entre os sulcos maiores ($\lambda_{excitação} = 318 \text{ nm}$; $330 < \lambda_{emissão} < 600 \text{ nm}$), e o DAPI (4',6-(diamidino)-2-(fenil)indol), para sulcos menores ($\lambda_{excitação} = 359 \text{ nm}$; $380 < \lambda_{emissão} < 600 \text{ nm}$). Os testes são realizados independentes um do outro [70 – 73].

3.6. INTERAÇÃO COM HSA

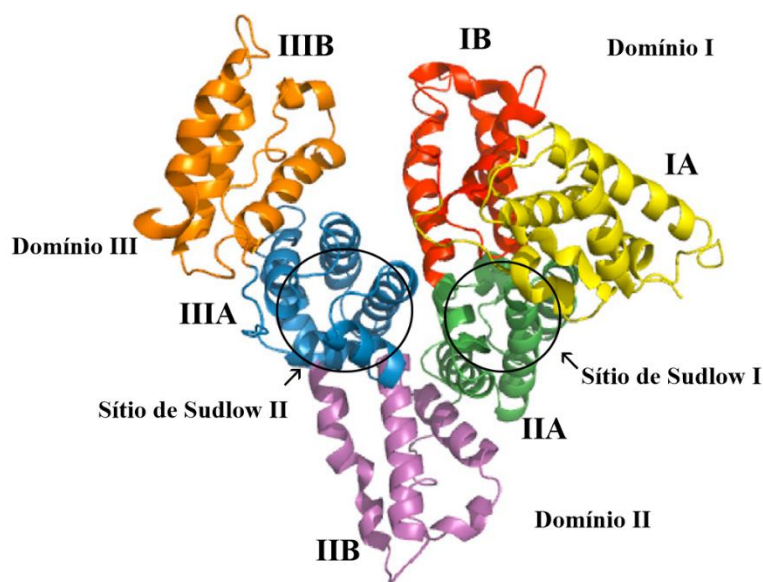
A albumina (HSA) é uma proteína globular, solúvel em água, carregada negativamente, sintetizada endogenamente no fígado e catabolizada no endotélio, bem como degradada nos músculos, pele e outros órgãos. É uma proteína altamente abundante no plasma sanguíneo, com concentração de 35-50 g/L, aproximadamente, compreendendo assim, aproximadamente 60% do total de proteínas plasmáticas [77, 78].

O HSA é o principal responsável pela regulação da pressão osmótica plasmática e pH, e pela ligação de várias substâncias endógenas ou exógenas (por exemplo, ácidos graxos, colesterol e muitos medicamentos). Além disso, o HSA serve como antioxidante, regula o metabolismo lipídico e sequestra toxinas [77, 79].

O HSA é composto por 585 aminoácidos, com peso molecular de 66 kDa, aproximadamente. A análise da estrutura cristalina mostrou que HSA possui uma estrutura esférica em forma de “coração” (Figura 16) compreendendo aproximadamente 67% de α -hélices, 23% de cadeias estendidas e 10% de folhas β . HSA contém três domínios de helicoidais similares (I, II e III), cada um desses domínios contém dois subdomínios (A e B) [78].

Esta biomolécula apresenta dois sítios principais de interação, conhecidos como Sítios de Sudlow [80], os quais têm características hidrofóbicas, ou seja, interagem preferencialmente com regiões hidrofóbicas das moléculas. Desta forma, moléculas aromáticas e heterocíclicas tendem a se localizar nestes sítios.

Figura 16 – Representação do HSA com seus respectivos domínios e subdomínios.



Diversas informações podem ser obtidas em relação a interação entre a biomoléculas e os compostos, entre elas está a determinação do sítio de interação preferencial do composto. Para isto, algumas moléculas tratadas como sondas são utilizadas para alguns sítios específicos do HSA como a varfarina (agente anticoagulante), que se localiza preferencialmente no subdomínio IIA (Sítio de Sudlow I) e o ibuprofeno (anti-inflamatório), o qual se encontra no subdomínio IIIA (Sítio de Sudlow II). Há também um terceiro sítio (subdomínio IB) o qual

também se avalia a interação com o HSA, que geralmente utiliza-se a digitoxina como sonda [81, 82].

Também pode-se avaliar a força dessa interação. Este estudo ocorre, principalmente, por espectroscopia de fluorescência, na qual é avaliada a supressão da emissão de fluorescência do HSA após adições sucessivas de uma espécie química. A investigação é realizada excitando-se o HSA em 290 nm e observando sua emissão fluorescente no intervalo entre 300 a 500 nm. Este comprimento de onda de excitação é escolhido devido ao resíduo de aminoácido de triptofano (Trp²¹⁴), que está no localizado no Sítio de Sudlow I e absorve nesta região [81, 82].

Conhecendo termos como intensidade relativa do HSA na ausência do supressor (F_0), intensidade relativa do HSA na presença do supressor (F), constante de Stern-Volmer (K_{sv}), concentração do supressor ao fim das adições ($[Q]$), constante cinética de supressão bimolecular (k_q) e o tempo de vida do HSA ($\tau_0 = 0,567$ ns), é possível realizar uma estimativa da força de interação entre aduto HSA:composto [83, 84].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

Outra forma de estimar o valor de K_{sv} é a partir de um plot de [composto] (eixo X) e F_0/F (eixo Y), no qual a constante de Stern-Volmer é igual ao coeficiente angular. De acordo com a literatura, uma constante de Stern-Volmer de, aproximadamente, 10^4 L mol⁻¹ é considerada uma interação forte [85].

A determinação do termo k_q define a natureza da interação HSA:Composto, em uma supressão por difusão controlada, ou seja, no decaimento da fluorescência ideal após contato entre as espécies. A interação será estática se o $k_q > 10^{10}$ L mol⁻¹ s⁻¹ e será dinâmica se $k_q < 10^{10}$ L mol⁻¹ s⁻¹. A determinação do k_q ocorre pela razão entre o K_{sv} e τ_0 . Em outras palavras, a constante de supressão bimolecular fornece informações a respeito da acessibilidade do supressor ao fluoróforo [86].

Se o modo de interação for estático, a constante de associação, K_a (L mol⁻¹), pode indicar a força de interação entre ambas as moléculas. Esta constante pode ser determinada pelo plot de $F_0/(F_0-F)$ (eixo Y) por $1/[composto]$ (eixo X), no qual K_a corresponde ao quociente entre coeficiente linear e angular. As forças de interação são: $< 10^4$ L mol⁻¹ (fraca), 10^4 L mol⁻¹

(intermediária) e $> 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (forte). Ressalta-se aqui que a força de interação ideal é a intermediária, pois uma interação forte entre o aduto pode fazer com o que o HSA mantenha retida a molécula, dificultando sua biodistribuição no plasma sanguíneo [87].

Utilizando parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), pode-se definir os modos de interação principais. Desta forma, a equação de van't Hoff e a equação da Variação da Energia Livre de Gibbs são utilizadas, nas quais R é a constante termodinâmica dos gases ideais ($8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura em Kelvin e K_a é a constante de associação (L mol^{-1}) [88]. Baseado na equação de van't Hoff, há uma forma alternativa de determinar o ΔH e o ΔS plotando um gráfico de $(1/T)$ (eixo X) por $(\ln K_a)$ (eixo Y), onde o coeficiente angular obtido corresponde à $-\Delta H^\circ/R$ e o coeficiente linear à $\Delta S^\circ/R$.

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Uma vez determinados, os parâmetros termodinâmicos possibilitam estimar como ocorre a formação do aduto HSA:composto. Sob condições normais de temperatura e pressão, a Tabela 1 apresenta estes parâmetros associados aos possíveis processos que podem ocorrer em meio proteico [89].

Tabela 1 – Processos associados aos parâmetros termodinâmicos.

Processo	ΔH°	ΔS°
Associação hidrofóbica	>0	>0
van der Waals	<0	<0
Ligação de hidrogênio	<0	<0
Eletrostática	<0	>0
Protonação	<0	<0

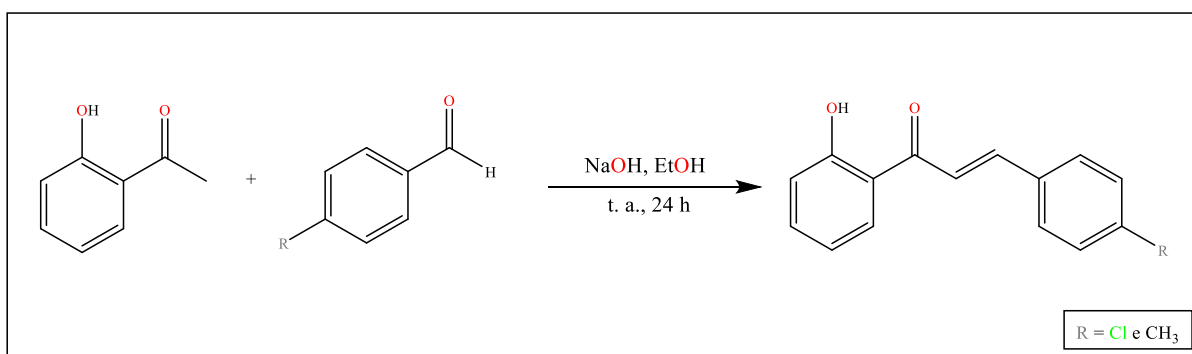
4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. SÍNTESE DOS LIGANTES E COMPLEXOS

4.1.1. Síntese dos Ligantes 1 e 2

Os ligantes foram sintetizados na Universidade Federal da Grande Dourados em parceria com o prof. Dr. Lucas Pizzuti e seu grupo de pesquisa, segundo metodologia própria [96, 97].

A primeira etapa da síntese dos ligantes é a produção de chalconas utilizadas como material de partida. O Esquema 1 ilustra de forma genérica a rota sintética das chalconas utilizada.

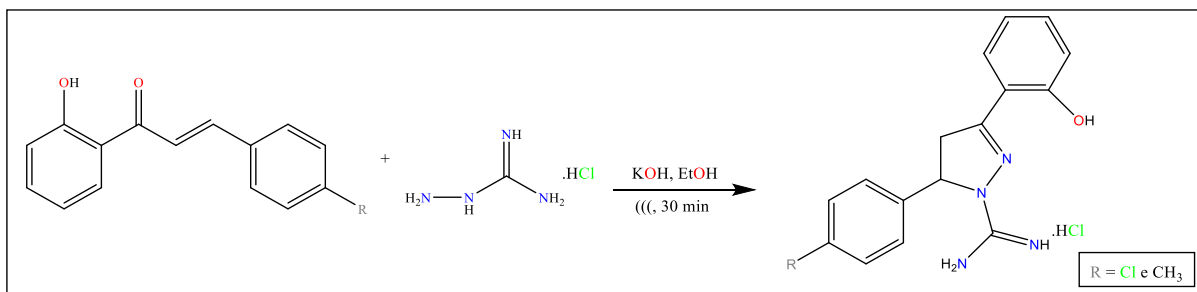


Esquema 1 – Rota sintética para o preparo das chalconas

Em um balão de 250 mL foram adicionados 2-hidroxiacetofenona (10 mmol, 1,36 g) e o 4-metilbenzaldeído (10 mmol, 1,20 g) para a chalcona (*p*-CH₃) (utilizada para síntese do **L1**) ou 4-clorobenzaldeído (10 mmol, 1,41 g) para a chalcona (*p*-Cl) (utilizada para síntese do **L2**), em 30 mL de etanol. Sob agitação, adicionou-se na solução 15 mmol de NaOH e a mistura resultante foi então mantida sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, a reação foi resfriada em banho de gelo e acidificada pela adição gota a gota de HCl

concentrado, seguido pela adição de 50 mL de água destilada. A solução ficou em agitação em banho de gelo durante 30 minutos, para a obtenção do produto precipitado amarelo. Após a precipitação, o produto foi filtrado à vácuo e seco em um dessecador.

O Esquema 2 apresenta a rota sintética genérica para o preparo dos Ligantes **1** e **2**.



Esquema 2 – Rota sintética para a produção dos ligantes

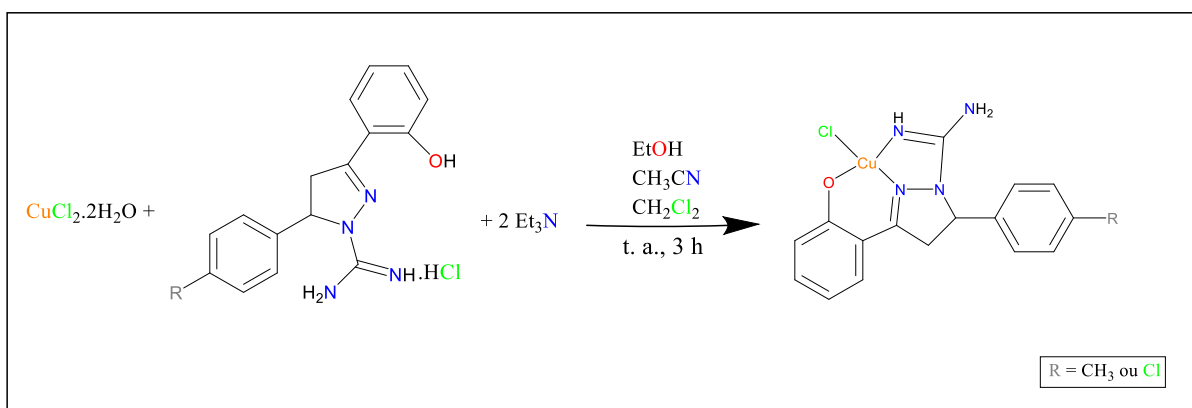
Os ligantes cloridrato de 3-(2-hidroxifenil)-5-*p*-toluil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (Ligante **1**) e cloridrato de 5-(4-bromofenil)-3-(2-hidroxifenil)-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboximidamida (Ligante **2**) foram sintetizados via reação de ciclocondensação da chalcona de interesse com cloridrato de aminoguanidina na presença de hidróxido de potássio. O mesmo produto pode ser obtido de duas maneiras diferentes, via reação em refluxo ou por sonicação.

Em um balão de 50 mL, foi adicionado 15 mL de etanol, a chalcona (*p*-CH₃) para o Ligante **1** (3 mmol, 71 mg) e (*p*-Cl) para o Ligante **2** (3 mmol, 77 mg), o cloridrato de aminoguanidina (6 mmol, 66 mg) e o KOH (6 mmol, 34 mg). A mistura foi submetida a refluxo por 6 horas. Em seguida a mistura foi resfriada, filtrada diretamente para um funil de extração ao qual foi adicionado HCl 10% (15 mL) e então, extraída com clorofórmio (3 x 30 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, seguido de filtração e evaporação sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo. Após a completa evaporação do solvente, o produto desejado foi purificado com a adição de uma solução de AcOEt e MeOH 10/1, seguido de uma filtração.

Em um béquer de 30 mL, foi adicionado 15 mL de etanol, a chalcona (*p*-CH₃) para o Ligante **1** (3 mmol, 71 mg) e (*p*-Cl) para o Ligante **2** (3 mmol, 77 mg), o cloridrato de aminoguanidina (6 mmol, 66 mg) e o KOH (6 mmol, 34 mg). A mistura foi levada a sonda ultrassônica e sonicada por 30 minutos, com frequência de 20 KHz, à temperatura ambiente. Após o término da sonicação, a mistura foi resfriada, filtrada diretamente para um funil de extração ao qual foi adicionado HCl 10% (15 mL) e então, extraída com clorofórmio (3 x 30 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, seguido de filtração e evaporação sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo. Após a completa evaporação do solvente, o produto desejado foi purificado com a adição de uma solução de AcOEt e MeOH 10/1, seguido de uma filtração.

4.1.2. Síntese dos Complexos 1 e 2

Os Complexos **1** e **2** foram sintetizados conforme o Esquema 3.



Esquema 3 – Rota sintética para os Complexos **1** e **2**

Em um balão foi adicionado 2 mL de etanol e solubilizado o ligante para o Complexo **1** adicionou-se o Ligante **1** (0,1 mmol, 33 mg) e para o Complexo **2** o Ligante **2** (0,1 mmol, 35 mg) e a este foi adicionado trietilamina (0,1 mmol, 10 mg) e deixado reagir por 10 minutos. Em

seguida adicionou-se cloreto de cobre^{II} dihidratado (0,1 mmol, 17 mg) e deixou-se reagir. Após 20 minutos, observou-se que ocorreu formação de precipitado e a este foi adicionado 2 mL de acetonitrila e 2 mL de diclorometano. Então deixou-se reagir por 4 horas a temperatura ambiente. Filtrou-se e deixou-se em repouso para cristalizar. Entre 5 a 8 dias cristais verde-escuros foram obtidos e caracterizados.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Materiais

Os reagentes e solventes empregados nas sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados com purificação prévia, quando necessário, de acordo com métodos descritos na literatura [90]. A Tabela 2 traz os principais reagentes utilizados na síntese dos complexos.

Tabela 2 – Principais reagentes utilizados na síntese dos complexos e sua procedência

Reagente	Pureza (%)	Procedência
Cloreto de cobre II ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	99,99	Sigma-Aldrich
Trietilamina (C_2H_5) ₃ N)	99,0	Sigma-Aldrich
Álcool Etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	99,5	Sigma-Aldrich
Diclorometano (CH_2Cl_2)	99,5	Sigma-Aldrich
Acetonitrila (CH_3CN)	99,5	Sigma-Aldrich

4.2.2. Métodos e Instrumentação

4.2.2.1. Análise elementar de CHN

A determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo em um analisador elementar VARIO EL (Elementar Analysensysteme GmbH), a partir das amostras devidamente purificadas de cada composto.

4.2.2.2. Ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão (p.f.) foram determinados em um aparelho Fisatom-431.

4.2.2.3. Difractometria de raio X

As medidas de DRX foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo pelo prof. Dr. Victor Marcelo Deflon e seu grupo de pesquisa.

Os monocristais obtidos a partir da cristalização dos Complexos **1** e **2** foram analisados em um equipamento de difração de raios X (DRX) em monocristal marca Bruker Kappa Apex II Duo. A fonte de radiação utilizada foi um alvo de molibdênio com comprimento de onda de radiação igual a 0,71076 Å ($K\alpha$). O método multi-scan foi aplicado para a correção de absorção. As estruturas foram resolvidas com o software SHELXS97 usando métodos diretos e todos os átomos não hidrogenóides foram refinados com parâmetros anisotrópicos em SHELXL2014. Os átomos de hidrogênio foram refinados com fatores de deslocamentos térmicos isotrópicos individuais fixos, utilizando o método “riding model” do programa SHELXL2014 [91].

4.2.2.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro FT/IR Frontier - PerkinElmer, na janela espectral de 4000 até 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , acumulação de 6 ciclos, velocidade de varredura 0,2 cm/s . As amostras foram preparadas por dispersão em KBr de grau espectroscópico e prensadas (~6 toneladas) com o auxílio de prensa mecânica.

4.2.2.5. Espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica

As medidas de EPR foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Klaus Krambrock na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em um espectrômetro comercial MiniScope MS400 (Magnettech, Alemanha) operando em banda X (frequência de micro-ondas aproximadamente igual a 9,4 GHz). Os parâmetros experimentais utilizados nas medidas foram: 10 mW de potência de micro-ondas, um campo de modulação de 100 kHz com amplitude de 0.2 mT, campo centrado em 305 mT com intervalo de aplicação de 150 mT, tempo de varredura de 60 s e 4096 pontos de integração. Todos os espectros de EPR foram medidos em temperatura ambiente. Em caso de medidas de sólidos em pó certa quantidade foi pesada em um tubo de quartzo da Wilmad Labglass (EUA). Para medidas em solução de DMSO as medidas foram realizadas em um capilar de vidro (50 microlitros) acondicionado em tubo de quartzo.

4.2.2.6. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível

Os espectros eletrônicos de absorção molecular nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) foram obtidos em um espectrofotômetro Lambda 60S-PerkinElmer. As análises foram realizadas utilizando-se soluções dos compostos em dimetilsulfóxido com concentrações de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em cubeta de quartzo com capacidade para 3,0 mL com 1 cm de caminho

óptico. As análises espectroscópicas no estado sólido foram realizadas através da técnica de reflectância difusa. Os espectros obtidos foram utilizados após a transformação da porcentagem de reflectância em absorbância em espectrofotômetro Lambda 60S–PerkinElmer com esfera integradora.

4.2.2.7. Teoria do funcional da densidade e teoria do funcional da densidade dependente do tempo

Os cálculos teóricos, utilizados para interpretação dos resultados, foram realizados em parceria com o professor Leandro M. C. Pinto da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, utilizando como metodologia a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT). Para os cálculos foram empregados o funcional B3LYP (funcional) [92, 93], a base SDD para o elemento metálico Cu, e a base de 6-31G* para os demais elementos, C, N, O, Cl e H. Em todos os cálculos foi utilizado o programa Gaussian 09 [94]. As coordenadas atômicas, determinadas para as estruturas moleculares individuais por análise cristalográfica de raios X, foram utilizadas como parâmetros para os cálculos DFT, sendo realizada inicialmente a otimização dessas coordenadas, em busca da estrutura de menor energia. Essa estrutura de energia mínima global foi confirmada por cálculos de frequência, que possibilitaram a obtenção dos espectros de UV-Vis. As energias de excitação vertical foram calculadas utilizando o método TD-DFT. Os diagramas de orbitais moleculares (OM) foram produzidos usando o programa Avogadro (versão 1.2.0) [95].

4.2.2.8. Espectroscopia de emissão de fluorescência

Os ensaios para determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) foram realizados na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com o prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias por espectroscopia de emissão de fluorescência no estado

estacionário em um espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, em uma faixa entre 350 e 550 nm, utilizando como abertura de feixe 5,0 cm (slit – Emissão/Excitação) e excitação em 290 nm. A concentração de composto utilizada foi de Complexo **1** = $4,3 \times 10^{-5}$, Complexo **2** = $3,8 \times 10^{-5}$, Ligante **1** = $4,8 \times 10^{-5}$, Ligante **2** = $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em solução de DMSO(2%)/H₂O.

Os tempos de vida de fluorescência (τ_f) foram obtidos por espectroscopia de emissão de fluorescência resolvida no tempo pelo método de contagem de fóton único (TCSPC, do inglês *Time-Related Single Photon Counting*), com Controlador DeltaHub em conjunto com o espectrofluorímetro Horiba citado anteriormente. Os dados foram processados com o software DAS6 e Origin® 8.5 utilizando ajuste monoexponencial dos dados brutos. Foi empregada como fonte de excitação uma fonte de NanoLED (Horiba) (1,0 MHz, largura de pulso <1,3 ns em comprimento de onda de excitação de 284 nm).

4.2.2.9. Investigação da atividade antitumoral através de estudos de citotoxicidade e determinação do IC₅₀

Os ensaios antitumorais foram realizados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em parceria com a professora Heveline Silva e seu grupo de pesquisa.

Para determinação da viabilidade celular foram utilizadas as linhagens tumorais humanas de adenocarcinoma de mama (MDA e MCF-7) e linhagem de célula normal de fibrocisto mamário humano (MCF-10). As células foram distribuídas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, em densidades que variaram conforme a linhagem celular entre $0,7 \times 10^3$ e $1,2 \times 10^3$ células/poço/100 μ L em placas com 96 poços que foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida a 5% de CO₂ por 24 horas para total aderência.

Nos poços da placa contendo as células já aderidas, foram distribuídos 100 μ L de concentrações decrescentes (100, 50, 10, 5 e 1 μ M) da substância a ser testada, em quadruplicatas. As soluções dos compostos foram preparadas em DMSO e posteriormente diluídas em meio de cultura concentração máxima de DMSO de 1% v/v. Para controle negativo foi utilizado 100 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de FBS.

Após a exposição aos compostos de investigação por 72h, as células foram incubadas com MTT (5 $\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{L}/\text{poço}$) durante 4 horas. A seguir, todo o líquido sobrenadante foi removido por aspiração e foram adicionados 100 μL de DMSO/poço, sendo a viabilidade celular (proporcional à concentração dos sais de formazan – produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis) determinada pela medida de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas [96]. Os dados obtidos através dos ensaios citotóxicos foram normalizados considerando-se a viabilidade celular do controle negativo como 100% utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

4.2.2.10. Ensaios de interação com DNA

As análises de interação com DNA foram realizadas na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com o prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias.

O DNA de timo de bezerro (Calf-Thymus, CT-DNA), alaranjado de acridina (*Orange Acridine*, OA), 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e o verde de metila (*Methyl Green*, MG) foram adquiridos comercialmente sem posterior purificação. A água utilizada em todos os procedimentos estava em nível milliQ.

4.2.2.10.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis

A interação entre cada composto e CT-DNA foi registrada em espectrofotômetro de absorção eletrônica na região do UV-visível de modelo Shimadzu UV2600, utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, em temperatura ambiente (310 K), em solução tamponada (pH = 7,4) com mistura de DMSO(2%)/H₂O/Tris-HCl. A faixa espectroscópica escolhida foi 250 – 800 nm.

A concentração do CT-DNA foi determinada utilizando a absorvidade molar de 6.600 $\text{mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$, em $\lambda_{\text{abs}} = 260\text{ nm}$. A concentração de composto utilizada foi de Complexo **1** =

$4,3 \times 10^{-5}$, Complexo **2** = $3,8 \times 10^{-5}$, Ligante **1** = $4,8 \times 10^{-5}$, Ligante **2** = $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em solução de DMSO(2%)/H₂O e foram realizadas adições sucessivamente de 10 µL de CT-DNA (0 a 100 µL)(solução estoque: $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), o tempo de interação foi de três minutos por cada adição de CT-DNA

4.2.2.10.2. Espectroscopia de fluorescência

Os ensaios de competição pelos sítios de ligação do CT-DNA foram realizados em espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus, utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

Os compostos de concentrações estoque (Complexo **1** = $8,50 \times 10^{-4}$, Complexo **2** = $8,08 \times 10^{-4}$, Ligante **1** = $9,50 \times 10^{-4}$, Ligante **2** = $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em DMSO, foram gradualmente adicionados 10 µL (até um máximo de 100 µL) a soluções de CT-DNA ($3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em Tris-HCl e pH = 7,4), na presença de um dos competidores por vez: alaranjado de acridina, AO (intercalador), DAPI (sulco menor) ou verde de metila, MG (sulco maior), todos abrangendo concentração $2,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O tempo de interação foi de três minutos por cada adição de composto..

As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e constantes cinética de supressão bimolecular (k_q) foram determinadas. Para isto, utilizou-se como tempos de vida (τ₀) dos fluoróforos que, neste caso, são os adutos formados como sendo $1,70 \times 10^{-9}$ s (CT-DNA:AO), $2,20 \times 10^{-9}$ s (CT-DNA:DAPI) e $2,80 \times 10^{-9}$ s (CT-DNA:MG) [97, 98].

4.2.2.10.3. Estudo da interação com DNA via docking molecular

O estudo teórico de *docking* molecular foram conduzidos na Universidade de Coimbra em Portugal pelo Dr. Otávio Augusto Chaves. As estruturas dos compostos foram construídas por cálculos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com potencial B3LYP e conjunto de

bases 6-13G*, disponíveis em programa Spartan'18 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, USA) [99]. A estrutura cristalográfica do DNA foi obtida do banco de dados de proteínas pelo código BNA [100]

Os estudos de *docking* molecular foram realizadas com programa GOLD 2020.2 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, UK) [101]. Os átomos de hidrogênio foram adicionados aos estados tautoméricos e ionizados do HSA de acordo com os dados do programa GOLD 2020.2 em pH 7,4. Para a estrutura cristalográfica do DNA foi definido um raio de 5,0 Å em torno dos sulcos menor e maior da dupla hélice [102].

O número de operações genéticas (cruzamento, migração, mutação) em cada corrida de ancoragem usada no procedimento de pesquisa foi definido como 100.000. A função de pontuação usada foi “ChemPLP”, que é uma função padrão do programa GOLD 2020.2 [103 – 105]. Os resultados de *docking* foram gerados pelo PyMOL Molecular Graphics System 1.1.1 (programa Delano Scientific LLC, Palo Alto, CA, EUA) [106].

4.2.2.11. Ensaios de interação com HSA

As análises de interação com HSA foram realizadas na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com o prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias.

O HSA, varfarina, ibuprofeno, digitoxina, solução tampão de PBS foram adquiridos comercialmente sem posterior purificação. A água utilizada em todos os procedimentos estava em nível milliQ.

4.2.2.11.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis

A interação entre cada composto e HSA foi registrada em espectro de absorção eletrônica na região do UV-visível de modelo Shimadzu UV2600, utilizando cubeta de quartzo

de 1,00 cm de caminho óptico, em temperatura ambiente (310 K), em solução tamponada (pH = 7,4) com mistura de DMSO(2%)/PBS. A faixa espectroscópica escolhida foi 250 – 800 nm.

A concentração de composto utilizada foi de Complexo **1** = $4,3 \times 10^{-5}$, Complexo **2** = $3,8 \times 10^{-5}$, Ligante **1** = $4,8 \times 10^{-5}$, Ligante **2** = $4,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em solução de DMSO(2%)/H₂O e foram realizadas adições sucessivamente de 10 µL de HSA (0 a 100 µL) (solução estoque: $3,85 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹), o tempo de interação foi de três minutos por cada adição de HSA

4.2.2.11.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário

Os ensaios de competição pelos sítios de ligação do HSA foram realizados em espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FluoroMax Plus, utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

Os compostos de concentrações estoque (Complexo **1** = $8,50 \times 10^{-4}$, Complexo **2** = $8,08 \times 10^{-4}$, Ligante **1** = $9,50 \times 10^{-4}$, Ligante **2** = $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em DMSO, foram gradualmente adicionados 10 µL (até um máximo de 100 µL) a soluções de HSA ($3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em PBS pH = 7,4), na presença de um dos competidores por vez: varfarina (subdomínio IIA), ibuprofeno (subdomínio IIIA) e digitoxina (subdomínio IB). As concentrações do HSA e do competidor foram fixadas em razão 1:1. O tempo de interação foi de três minutos por cada adição de composto.

Para avaliar a capacidade e os modos de interação dos corróis com o HSA, as constantes de Stern-Volmer, de associação e os parâmetros termodinâmicos foram determinados.

4.2.2.11.3. Estudo da interação com HSA via docking molecular

O estudo teórico de *docking* molecular foram conduzidos na Universidade de Coimbra em Portugal pelo Dr. Otávio Augusto Chaves. As estruturas dos compostos foram construídas por cálculos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com potencial B3LYP e conjunto de

bases 6-13G*, disponíveis em programa Spartan'18 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, USA) [100]. A estrutura cristalográfica do HSA foi obtida do banco de dados de proteínas pelo código HSA [107]

Os estudos de *docking* molecular foram realizadas com programa GOLD 2020.2 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, UK) [101]. Os átomos de hidrogênio foram adicionados aos estados tautoméricos e ionizados do HSA de acordo com os dados do programa GOLD 2020.2 em pH 7,4. Para a estrutura cristalográfica do HSA foi definido um raio de 10,0 Å em torno dos três principais sítios de ligação: subdomínios IIA, IIIA e IB [108].

O número de operações genéticas (cruzamento, migração, mutação) em cada corrida de ancoragem usada no procedimento de pesquisa foi definido como 100.000. A função de pontuação usada foi “ChemPLP”, que é uma função padrão do programa GOLD 2020.2 [103 – 105]. Os resultados de *docking* foram gerados pelo PyMOL Molecular Graphics System 1. level (programa Delano Scientific LLC, Palo Alto, CA, EUA) [106].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESPECTROSCÓPICA DOS COMPOSTOS

5.1.1. Análise de CHN, ponto de fusão e rendimentos de reação

Na Tabela 3, abaixo, encontram-se os dados de CHN, ponto de fusão e rendimento de reação para os Complexos **1** e **2**, que possuem fórmulas moleculares $C_{17}H_{17}CuN_4OCl$ e $C_{16}H_{18}CuN_4O_2Cl_2 \cdot 1,5H_2O$, respectivamente. É possível observar que para os dados de CHN os valores calculados e obtidos experimentalmente estão bem próximos, indicando a pureza dos cristais obtidos.

Tabela 3 – Dados de CHN, ponto de fusão e rendimento de reação.

Compostos	C (%)		H (%)		N (%)		P.F. (°C)	Rend (%)
	Cal	Exp	Cal	Exp	Cal	Exp		
Complexo 1	52,04	52,06	4,38	4,39	14,28	14,30	230	66
Complexo 2	46,56	47,12	3,98	3,58	14,30	14,86	255*	52

C: carbono; H: hidrogênio; N: nitrogênio; P.F.: ponto de fusão; Rend.: rendimento (em cristais); Cal: calculado; Exp.: experimental; *decomposição.

5.1.2. Determinação da estrutura cristalina dos Complexos **1** e **2**

Os cristais foram obtidos a partir da reação do sal cloreto de cobre(II) com os ligantes pirazolínicos para o Complexo **1** utilizou-se o Ligante **1** e para o Complexo **2**, o Ligante **2**, conforme o Esquema 3, disponível na sessão 4. A cristalização se deu por evaporação lenta do solvente à temperatura ambiente, onde obteve-se a formação de cristais verde-escuros. Na Tabela 4 encontra-se os dados de refinamento e parâmetros cristalinos para os complexos.

Tabela 4 – Dados da coleta de intensidades de difração e do refinamento das estruturas cristalinas calculadas para os Complexos **1** e **2**.

	Complexo 1	Complexo 2
Fórmula Molecular	C ₁₇ H ₁₇ CuN ₄ OCl	C ₁₆ H ₁₈ CuN ₄ O _{2,5} Cl ₂
Massa Molecular (g/mol)	392,34	440,78
Radiação utilizada λ (Å)	Mo K α = 0,71076	Mo K α = 0,71076
T° (K)	296	296
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo Espacial	P $\bar{1}$	C2/c
Parâmetros de cela		
<i>a</i> (Å)	11,0474(12).	22,949(16)
<i>b</i> (Å)	11,9080(11)	13,803(11)
<i>c</i> (Å)	13,5203(15)	14,981(10)
α (°)	96,124(4)	90
β (°)	93,204(4)	130,00(3)
γ (°)	98,489(3)	90
Volume (Å³)	1744,5(3)	3635(5)
Número de Fórmulas Elementares	Z = 4	Z = 8
Densidade Calculada (Mg/m³)	1,494	1,611
Coefficiente de Absorção (mm⁻¹)	1,416	4,598
F (000)	804	1800
Dimensão do Cristal (mm)	0,47 x 0,19 x 0,10	0,34 x 0,25 x 0,23
Região de Varredura θ (°)	2,32 a 27,60	4,07 a 72,52
Índice de Varredura	-14<= <i>h</i> <=14, -15<= <i>k</i> <=14, -15<= <i>l</i> <=17	-28<= <i>h</i> <=28, -17<= <i>k</i> <=16, -18<= <i>l</i> <=18
Número de Reflexões Coletadas	52552	23482
Número de reflexões independentes	8082 [R int) = 0,0484]	3605 [R int) = 0,0245]
Correção de absorção	Multi-scan	Multi-scan
Dados/Restrições/Parâmetros	8082/0/433	3605/1/231
Goodness-of-fit (F²)	1,021	1,112
Índice R Final [<i>I</i>> 2sigma(<i>I</i>)]	R1 = 0,0511, wR2 = 0,1345	R1= 0,0437, wR2= 0,1363
Índice R (dados totais)	R1 = 0,0718, wR2 = 0,1437	R1= 0,0449, wR2= 0,1375
Densidade eletrônica residual. (e/Å³)	0,537 e -1,049	0,595 e -0,653

*R1= $|F_0 - F_c|/|F_0|$; wR2= $[w(F_0^2 - F_c^2)^2/(wF_0^2)]^{-1/2}$.

O Complexo **1** apresentou-se na forma de monocristais verde-escuros e, através dos dados de difratometria de raios X, verificou-se que o complexo cristaliza no sistema triclinico. A ausência de uma sistemática nas condições de reflexão da classe integral (hkl) das reflexões coletadas indicou um tipo de Bravais P para a cela do complexo analisado. Realizou-se uma análise das condições de reflexão e não foi possível encontrar uma simetria de Laue superior a $\bar{1}$. De acordo com as informações extraídas da *International Tables for Crystallography* [111], referentes às condições de reflexão, pode-se afirmar que o Complexo **1** pertence ao grupo espacial $P\bar{1}$ (número do grupo espacial 2). O grupo espacial $P\bar{1}$ é centrossimétrico e apresenta como único operador de simetria, centros de inversão. A unidade assimétrica do complexo é composta por duas moléculas cristalograficamente independentes (não relacionadas por simetria).

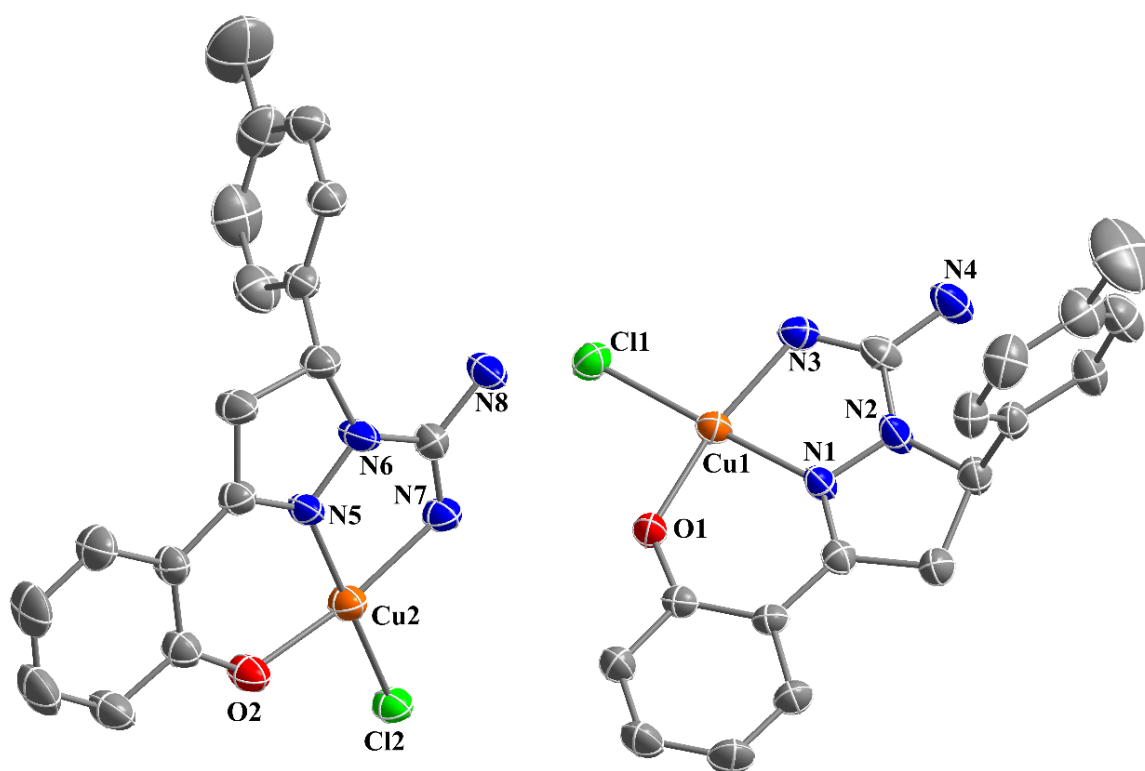
As representações gráficas das estruturas cristalinas foram executadas através dos programas DIAMOND [112] e ORTEP [113]. A Tabela 5 reúne as informações de reflexão do grupo espacial $P\bar{1}$.

Tabela 5 – Condições de reflexão pertinentes ao grupo espacial $P\bar{1}$ (Nº2), sistema cristalino triclinico.

Domínio da Condição	Reflexão	Condição Observada	Interpretação/Direção Cristalográfica
Integral	hkl	-	Tipo Bravais P

Uma solução da estrutura baseada no grupo espacial $P\bar{1}$ foi obtida empregando-se métodos diretos, através do programa SHELXS [114], utilizando a interface WinGX v2018.1 [115]. Posteriormente procedeu-se o refinamento, utilizando-se o programa SHELXL e-2018/1 [114]. As representações gráficas das estruturas cristalinas foram executadas através dos programas Diamond 4.6.8 [112], ORTEP-3 [113] e Mercury 2022.1.0 [116] e a representação ORTEP encontra-se na Figura 17.

Figura 17 – Projeção ORTEP da unidade assimétrica do Complexo 1. Para maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas com 50% de probabilidade ocupacional.



O Complexo 2 apresentou-se na forma de cristais verde-escuros e, através dos dados de difratometria de raios X, constatou-se que o complexo cristaliza no sistema monoclinico. Observando-se a sistemática das condições de reflexão da classe integral (hkl) das reflexões coletadas, indicou-se um tipo de Bravais C para a cela unitária em questão. As condições zonal ($k0l$, $0kl$, $hk0$) e serial ($0k0$, $h00$, $00l$) observadas estão vinculadas aos elementos de simetria c , b , n e 2_1 . De acordo com as informações extraídas da *International Tables for Crystallography* [111], referentes às condições de reflexão, pode-se afirmar que o Complexo 2 pertence ao grupo espacial $C2/c$ (número do grupo espacial 15). Esse grupo espacial é centrossimétrico e apresenta uma simetria de Laue $2/m$. As condições de reflexão observadas para a determinação do grupo espacial se encontram listadas na Tabela 6.

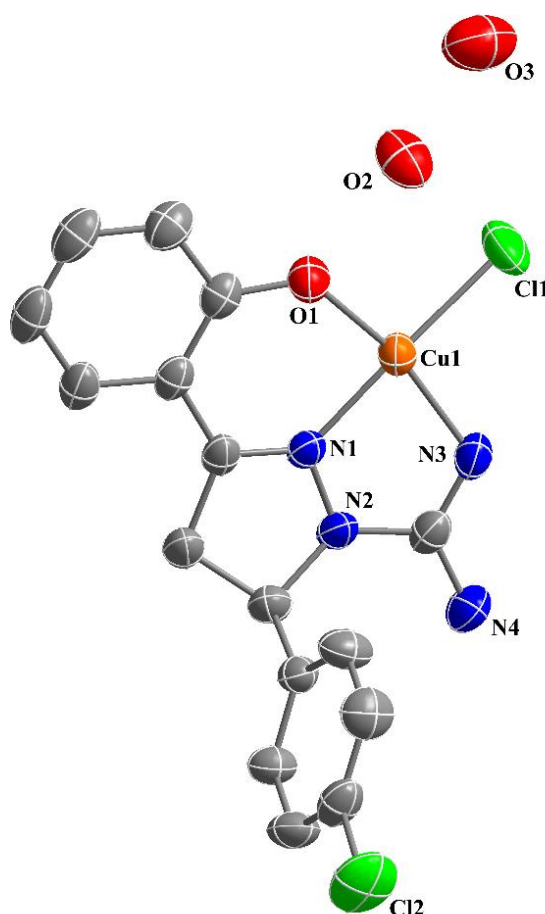
Tabela 6 – Condições de reflexão observadas para a rede com simetria monoclinica do Complexo **2** pertinente ao grupo especial C2/c.

Domínio da condição	Reflexão	Condição de reflexão	Interpretação
Integral	hkl	$h + k = 2n$	Tipo de Bravais C
Zonal	$h0l$	$l = 2n$	Operador $c \perp [0\ 1\ 0]$
Zonal	$0kl$	$k = 2n$	Operador $b \perp [1\ 0\ 0]$
Zonal	$hk0$	$h + k = 2n$	Operador $n \perp [0\ 0\ 1]$
Serial	$0k0$	$k = 2n$	Operador $2_1 // [0\ 1\ 0]$
Serial	$h00$	$h = 2n$	Operador $2_1 // [1\ 0\ 0]$
Serial	$00l$	$l = 2n$	Operador $2_1 // [0\ 0\ 1]$

Uma solução da estrutura baseada no grupo espacial C2/c foi obtida empregando-se métodos diretos, através do programa SHELXS [114], utilizando a interface WinGX v2018.1 [115]. Posteriormente procedeu-se o refinamento, utilizando-se o programa SHELXL e-2018/1 [114]. As representações gráficas da estrutura cristalina foram executadas através dos programas Diamond 4.6.8 [112], ORTEP-3 [113] e Mercury 2022.1.0 [116] e a representação ORTEP encontra-se na Figura 18.

Os dois complexos preparados se diferenciam pelos substituintes na posição *para* do anel aromático presente na estrutura do ligante. Ambas as moléculas podem ser descritas como complexos de cobre(II) do tipo $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}]$, sendo que o Complexo **2** apresenta como solvato uma molécula e meia de água $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$. Os ligantes atuam de forma tridentada, com três sítios de ligação, pelos átomos de nitrogênio e oxigênio ao centro metálico de cobre(II) que tem sua esfera de coordenação completada por um átomo de cloro.

Figura 18 – Projeção ORTEP da unidade assimétrica do Complexo **2**. Para maior clareza os átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas com 50% de probabilidade ocupacional.



Pode-se observar que o centro de cobre(II) apresenta número de coordenação igual a quatro, conferindo para os Complexos **1** e **2** uma geometria quadrática levemente distorcida, representada pelo poliedro na Figura 19, evidenciada pelos ângulos de ligação para o Complexo **1**, N(1)-Cu(1)-Cl(1) de $178,70(9)^\circ$ e O(1)-Cu(1)-N(3) de $168,05(1)^\circ$ e para o Complexo **2**, N(1)-Cu(1)-Cl(1) de $178,70(9)^\circ$ e O(1)-Cu(1)-N(3) de $168,05(1)^\circ$. Os demais valores de ângulos de ligação para ambos os complexos se encontram disponíveis na Tabela 7 abaixo.

Figura 19 – Poliedro para o centro metálico de Cu^{II} para os Complexos **1** e **2**.

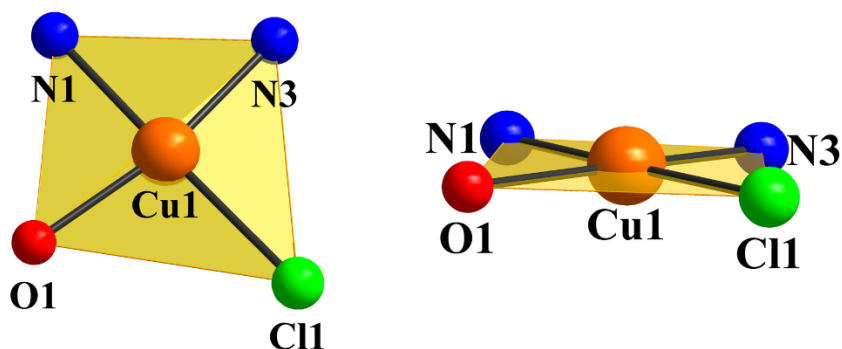


Tabela 7 – Principais ângulos de ligação para os Complexos **1** e **2**. Desvio padrão entre parênteses.

	Complexo 1	Complexo 2
Ligações	Ângulos (°)	
N(1)-Cu(1)-O(1)	88,26(1)	88,22(1)
N(1)-Cu(1)-N(3)	80,18(1)	79,73(1)
N(3)-Cu(1)-Cl(1)	98,53(1)	95,49(1)
Cl(1)-Cu(1)-(1)	93,03(8)	97,84(9)
N(1)-Cu(1)-Cl(1)	178,70(9)	169,63(8)
O(1)-Cu(1)-N(3)	168,05(1)	163,48(1)
N(5)-Cu(2)-O(2)	88,48(1)	-
N(5)-Cu(2)-N(7)	80,40(1)	-
N(7)-Cu(2)-Cl(2)	97,61(9)	-
Cl(2)-Cu(2)-O(2)	93,67(8)	-
N(5)-Cu(2)-Cl(2)	173,01(1)	-
O(2)-Cu(2)-N(7)	168,67(1)	-

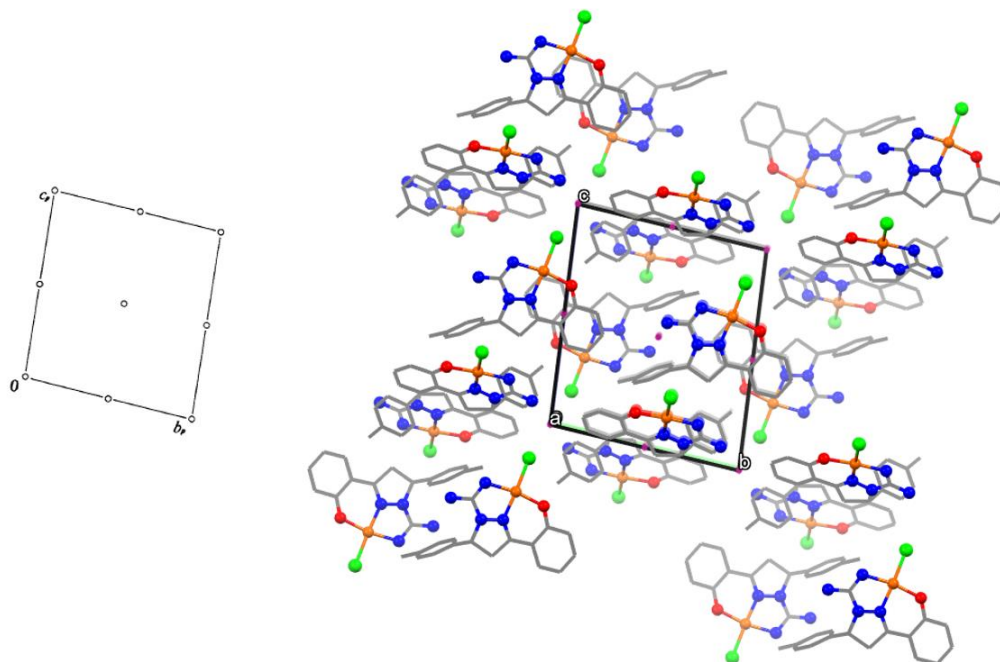
Os comprimentos de ligação das ligações para os Complexos **1** e **2** se encontram na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8 – Comprimentos de ligação selecionados para os Complexos **1** e **2**. Desvio padrão entre parênteses

	Complexo 1	Complexo 2
Ligações	Distâncias (Å)	
Cu(1)-O(1)	1,922(2)	1,924(2)
Cu(1)-N(1)	1,919(3)	1,927(3)
Cu(1)-N(3)	1,957(3)	1,945(3)
Cu(1)-Cl(1)	2,230(1)	2,228(2)
N(1)-N(2)	1,379(4)	1,385(3)
N(1)-C(7)	1,288(4)	1,289(4)
N(3)-H(3)	0,859(2)	0,935(2)
Cu(2)-O(2)	1,928(3)	-
Cu(2)-N(5)	1,896(2)	-
Cu(2)-N(7)	1,987(3)	-
Cu(2)-Cl(3)	2,242(1)	-
N(5)-N(6)	1,377(4)	-
N(5)-C(24)	1,282(5)	-
N(7)-H(7)	0,859(3)	-

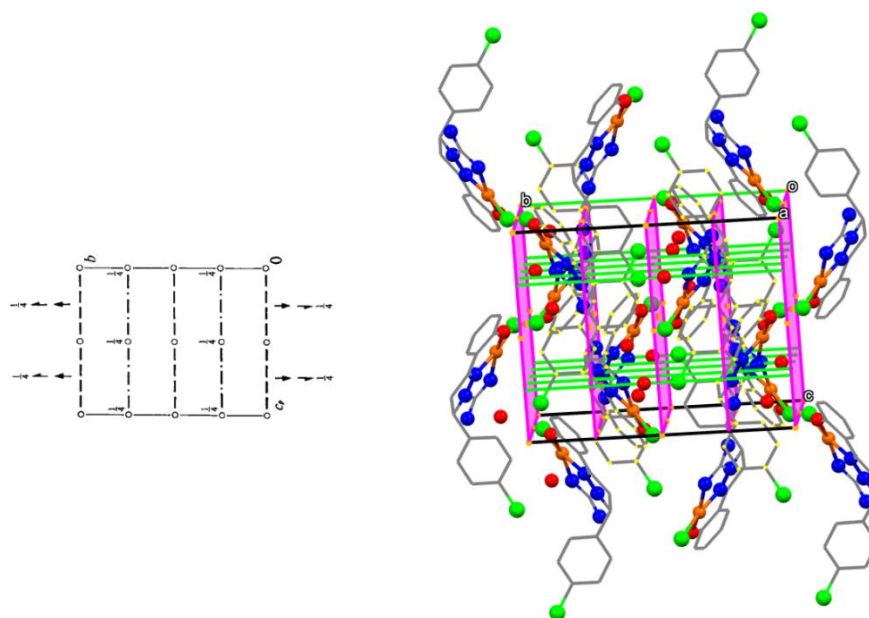
Ao comparar-se o diagrama do grupo espacial $P\bar{1}$ (grupo espacial número 2), extraído da *International Tables for Crystallography*, com a projeção do conteúdo da cela do Complexo **1**, verifica-se a presença do elemento de simetria centro de inversão ($\bar{1}$), localizado na origem, no centro geométrico, nos vértices e no centro das arestas da cela unitária, conforme representado na Figura 20.

Figura 20 – Operadores de simetria contidos na cela unitárias triclínica vinculada ao grupo espacial $P\bar{1}$ (esquerda) e a projeção Diamond do conteúdo de cela unitária triclínica do Complexo **1** (direita). Para maior clareza, foram omitidos os átomos de hidrogênio.



Ao comparar-se o diagrama do grupo espacial $C2/c$ (grupo espacial número 15), extraído da *International Tables for Crystallography*, com a projeção do conteúdo da cela do Complexo **2**, verifica-se a presença dos elementos de simetria: plano de espelhamento-deslizamento (c) perpendicular na direção cristalográfica $[0\ 1\ 0]$, plano de espelhamento-deslizamento (n) perpendicular na direção cristalográfica $[0\ 1\ 0]$, eixo de rotação-translação de ordem 2 (2_1) paralelos a direção cristalográfica $[0\ 1\ 0]$, eixo de rotação de ordem 2 (2) paralelo a direção cristalográfica $[0\ 1\ 0]$ e centros de inversão ($\bar{1}$), conforme na Figura 21.

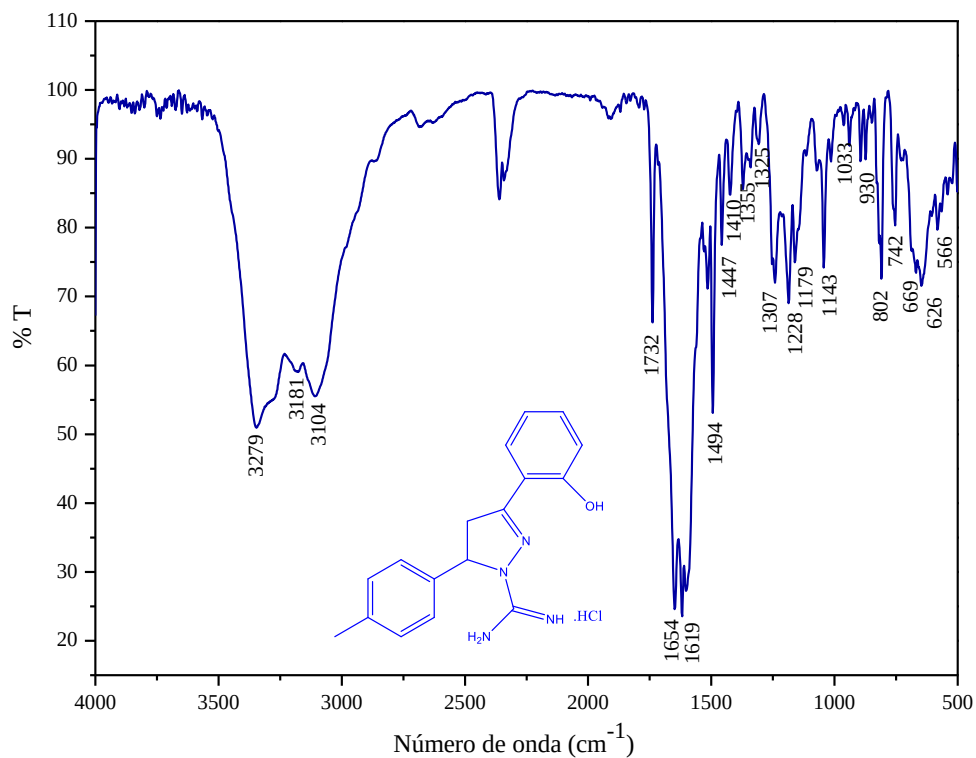
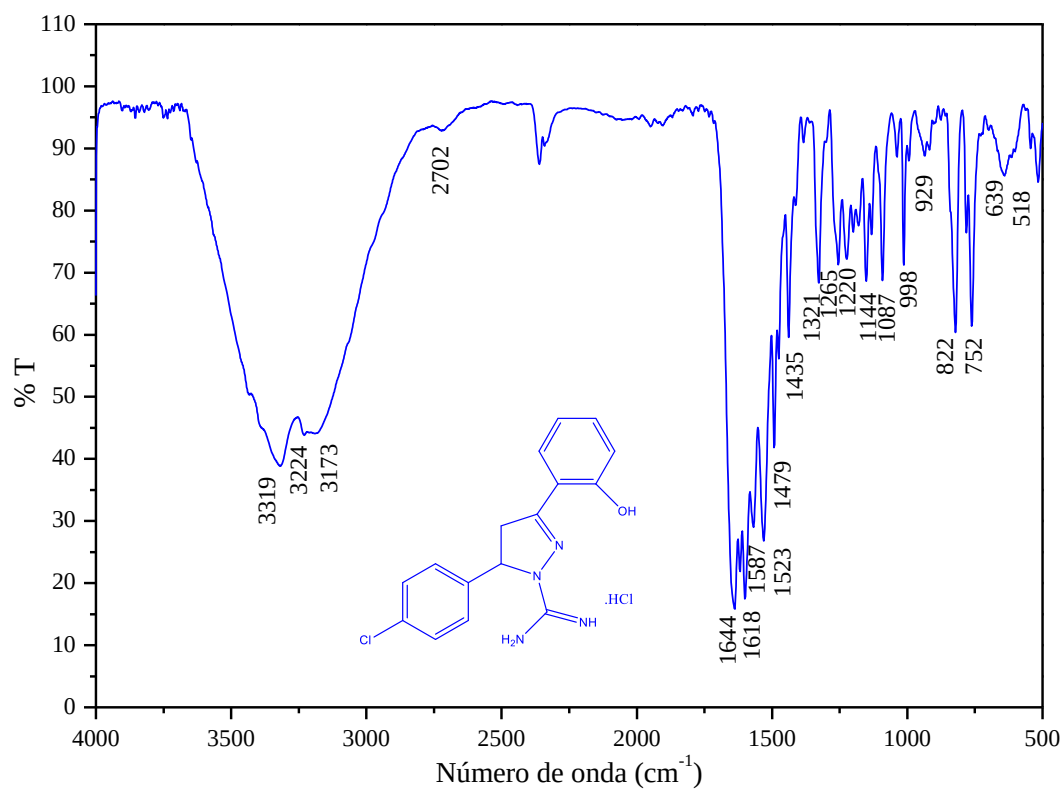
Figura 21 – Operadores de simetria contidos na cela unitárias triclínica vinculada ao grupo espacial $C2/c$ (esquerda) e a projeção Mercury do conteúdo de cela unitária triclínica do Complexo 2 (direita). Para maior clareza, foram omitidos os átomos de hidrogênio.



5.1.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A partir da análise estrutural feita através da difração de raios X, a espectroscopia no infravermelho foi utilizada como ferramenta complementar para a caracterização dos respectivos complexos sintetizados, sendo de fundamental importância na determinação do modo de coordenação dos ligantes, pois alguns modos vibracionais, como por exemplo, $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=N})$, $\nu(\text{C-O})$, dentre outros, são relevantes para se determinar a maneira que os ligantes se coordenam ao centro metálico.

Os espectros de infravermelho dos Ligantes 1 e 2 encontram-se representados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22 – Espectro vibracional no infravermelho para o Ligante 1.**Figura 23** – Espectro vibracional no infravermelho para o Ligante 2.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho médio dos Ligantes **1** e **2** são caracterizados por apresentarem estiramento do tipo $\nu(\text{N-H})$ dos grupamentos amino terminais, que aparecem na região de $3300\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$. Essas vibrações normalmente geram bandas finas e intensas, mas nos ligantes aparecem menos intensos e definidos por se apresentarem na mesma região do estiramento $\nu(\text{O-H})_{\text{fenol}}$ entre $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$. Uma banda de forte intensidade aparece na região de 1654 cm^{-1} para o Ligante **1** e 1644 cm^{-1} para o Ligante **2**, proveniente do estiramento $\nu(\text{C=N})$ do anel pirazolínico, seguida de uma banda de maior intensidade relativa ao estiramento $\nu(\text{C=C})$ dos anéis aromáticos na faixa de $1479\text{--}1447\text{ cm}^{-1}$. As bandas de dobramento fora do plano $\delta(\text{C-H})$ de anel aromático são observadas em torno de 694 cm^{-1} .

Nas Figuras 24 e 25 se encontra representado os espectros de infravermelho para os Complexos **1** e **2**, respectivamente.

Figura 24 – Espectro vibracional no infravermelho para o Complexo **1**.

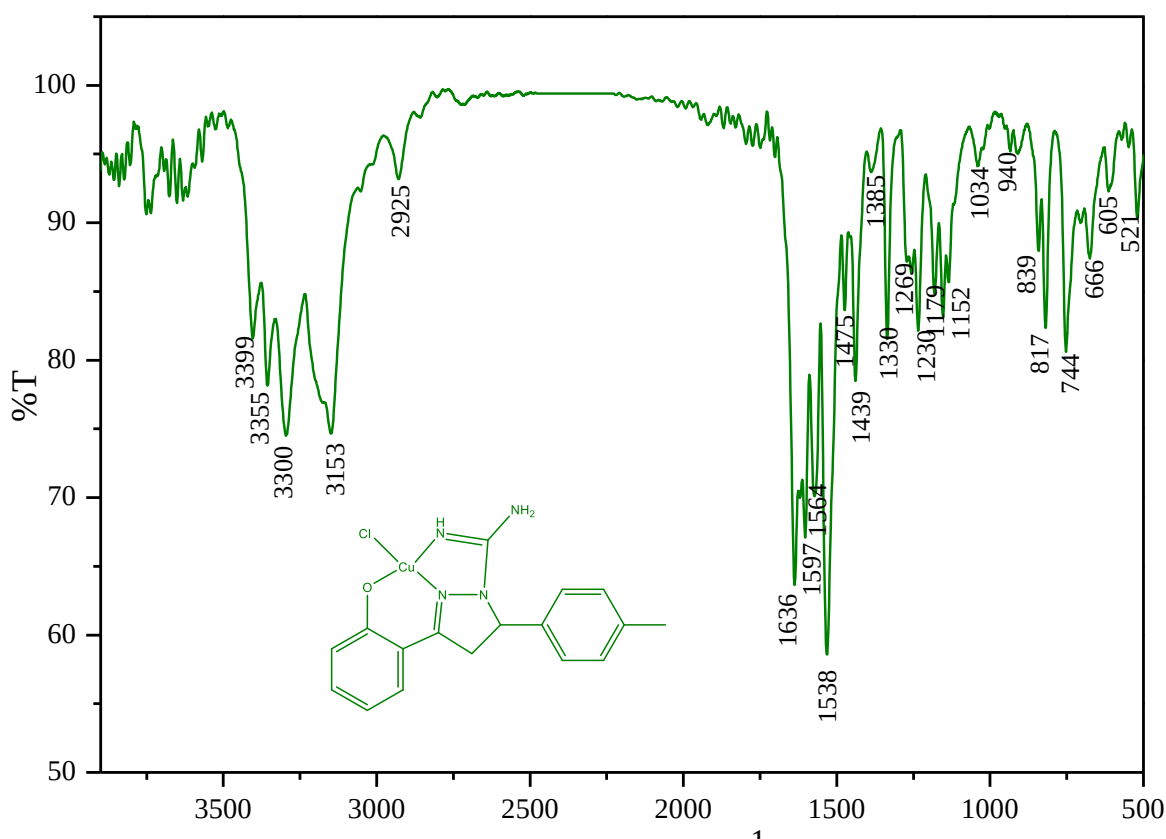
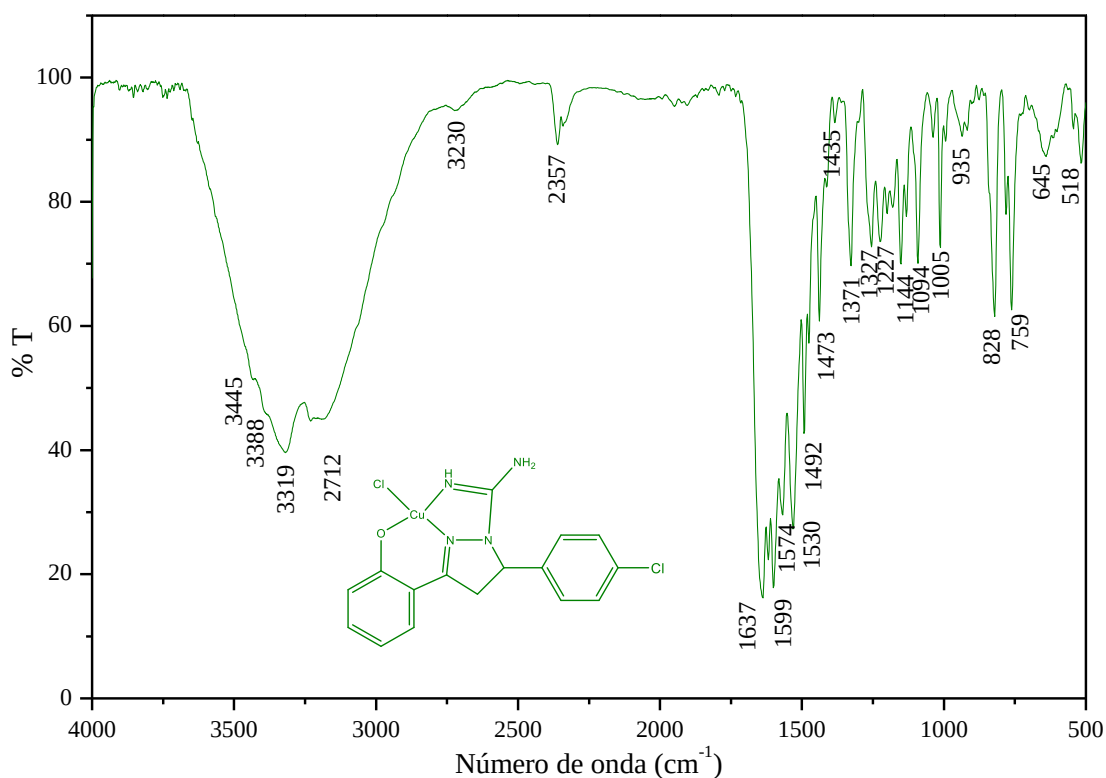


Figura 25 – Espectro vibracional no infravermelho para o Complexo 2.

Para os complexos foi possível observar o deslocamento das bandas do ligante após a coordenação com o Cu^{II} , principalmente quando se discute o deslocamento das bandas relacionadas com os $\nu(\text{C}=\text{N})$ e $\nu(\text{N}-\text{H})$. Tal comportamento já era esperado, uma vez que a coordenação do ligante se dá através dos átomos de nitrogênio e oxigênio.

Outro ponto importante da análise é que mesmo após a complexação as bandas relacionadas ao $\nu(\text{N}-\text{H})$ no ligante, permanece nos complexos, indicando, como já observado no DRX, que não ocorre a desprotonação no nitrogênio para a complexação (Figura 26). Para os Complexos é importante destacar que se observa uma definição nas bandas ente 3300 - 3100 características do estiramento do tipo $\nu(\text{N}-\text{H})$ dos grupamentos amino terminais, devido a desprotonação do OH_{fenol} , mas para o Complexo 2 essa definição não se torna evidente devido a presença de água de hidratação no composto.

Na Tabela 9 se encontram as atribuições mais características dos ligantes e dos complexos.

Figura 26 – Representação das estruturas evidenciando os átomos de hidrogênios ligados a nitrogênio **a) Complexo 1** e **b) Complexo 2**.

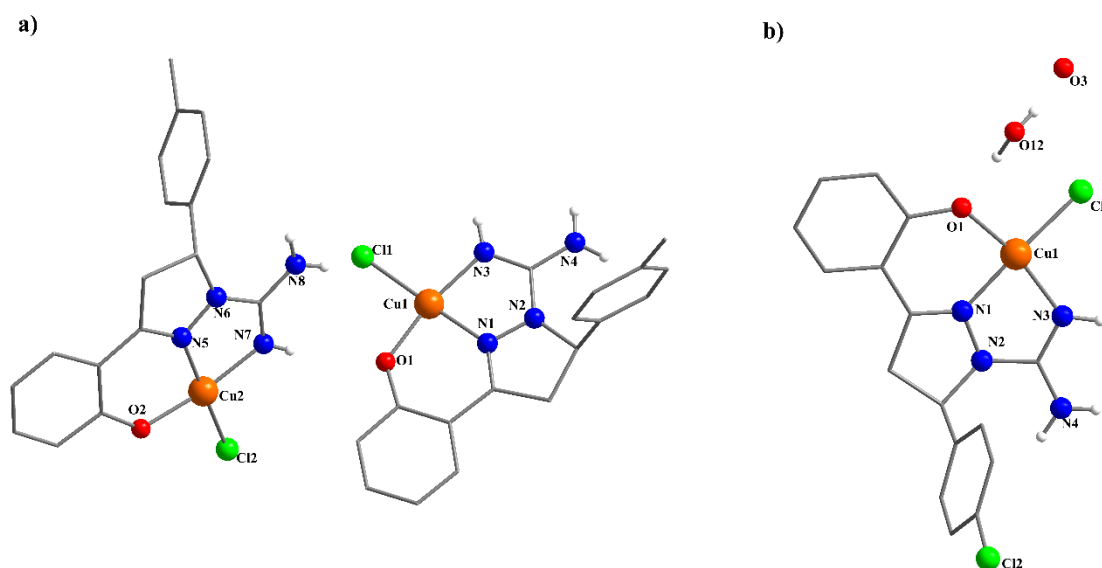


Tabela 9 – Principais bandas no infravermelho médio para os ligantes e complexos

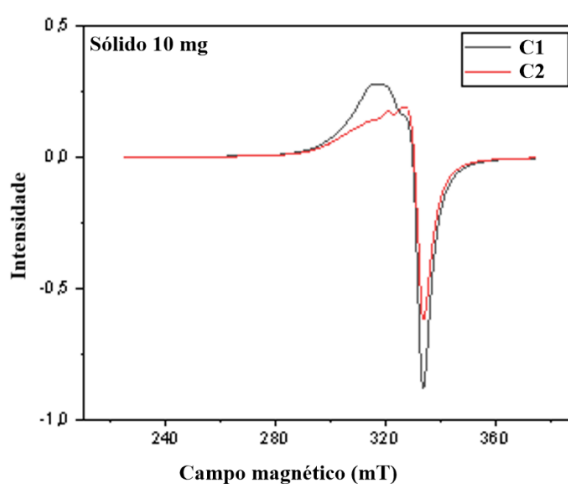
Frequências vibracionais (cm ⁻¹)	Compostos Analisados			
	Ligante 1	Ligante 2	Complexo 1	Complexo 2
$\nu(\text{O-H})$	3400 – 3200	3400 – 3200	-	3400 – 3200
$\nu(\text{N-H})$	3279 – 3104	3319 – 3173	3300 – 3153	3319 – 3200
$\nu(\text{C=N})$	1654	1644	1636	1637
$\nu(\text{C=C})$ Ar	1494	1479	1474	1492
$\nu(\text{C-H})$	1447	1435	1439	1435
$\delta(\text{C-H})$	900 – 690	900 – 690	900 – 690	900 – 690
$\delta(\text{C-H})$ Ar	669	639	666	645
$\nu(\text{C-Cl})$	-	752	-	759

5.1.4. Espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica

Com finalidade de confirmar o estado de oxidação do cobre nos complexos e para definir a geometria de coordenação ao centro metálico de cobre(II), realizou-se medidas de espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica.

Realizou-se medidas de ambos os complexos no estado sólido (Figura 27), nota-se que os complexos apresentam espectros muito semelhantes, o que evidencia a similaridade dos complexos, bem como já evidenciada no DRX.

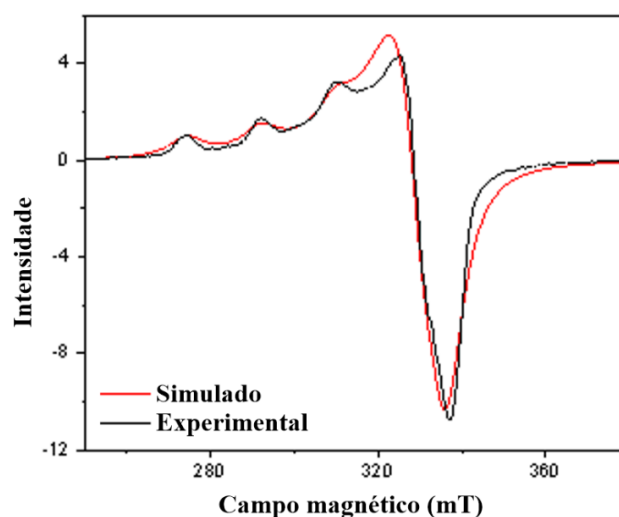
Figura 27 – Espectro de ressonância paramagnética eletrônica para os Complexos **1** e **2**.



Assumindo-se somente interação de spin eletrônico de $S = 1/2$ com campo magnético e interação hiperfina (^{63}Cu e ^{65}Cu : $I = 3/2$) gerou-se um espectro de simulação para Cu^{2+} , o qual foi comparado com o espectro experimental para o Complexo **1** (Figura 28), e foi possível observar consistência dos espectros, podendo-se assim concluir que o cobre permanece com oxidação $2+$. Observou-se que a geometria do complexo é no plano quadrático em simetria quase axial com $g_{xx} = 2,055$, $g_{yy} = 2,074$ (g perpendicular) e $g_{zz} = 2,258$ (g paralelo) indicando uma pequena distorção no plano, que também pode ser constatado no DRX [117].

A interação hiperfina do cobre também é axial sendo o $A_{zz} = 558,9$ MHz (A paralelo) e os outros dois valores quase axiais $A_{xx} \approx A_{yy} < 60$ MHz (A perpendicular). Nota-se uma certa ondulação, uma interação não bem resolvida. Essa ondulação provavelmente é causada por interação hiperfina de ligantes como N e/ou Cl.

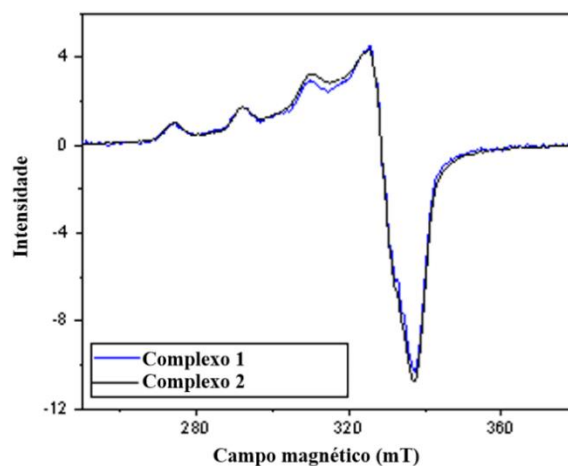
Figura 28 – Comparação dos espectros teórico e experimental para o Complexo 1.



Devido ao fato de as análises biológicas, estudo de citotoxicidade e interação com as biomoléculas de DNA e HSA serem realizadas na presença de DMSO e este ser um solvente coordenante, realizou-se medidas de EPR em solução congelada de DMSO, a fim de verificar se o solvente modificaria a esfera de coordenação do cobre (Figura 29).

Nota-se uma similaridade quando comparado os espectros no estado sólido e em DMSO a 100 K, evidenciando que o DMSO não se coordena ao complexo, desta forma, não afetando a geometria dos complexos.

Figura 29 – Espectro de ressonância paramagnética eletrônica em DMSO a 100 K.



5.1.5. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta-visível

5.1.5.1. Estudo em solução

Os espectros de absorção referentes aos complexos e ligantes foram realizados em DMSO na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A seguir são apresentados os espectros de UV-Vis em solução para o Complexo 1 e Ligante 1 (Figura 30) e para o Complexo 2 e Ligante 2 (Figura 31).

Figura 30 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo 1 e Ligante 1

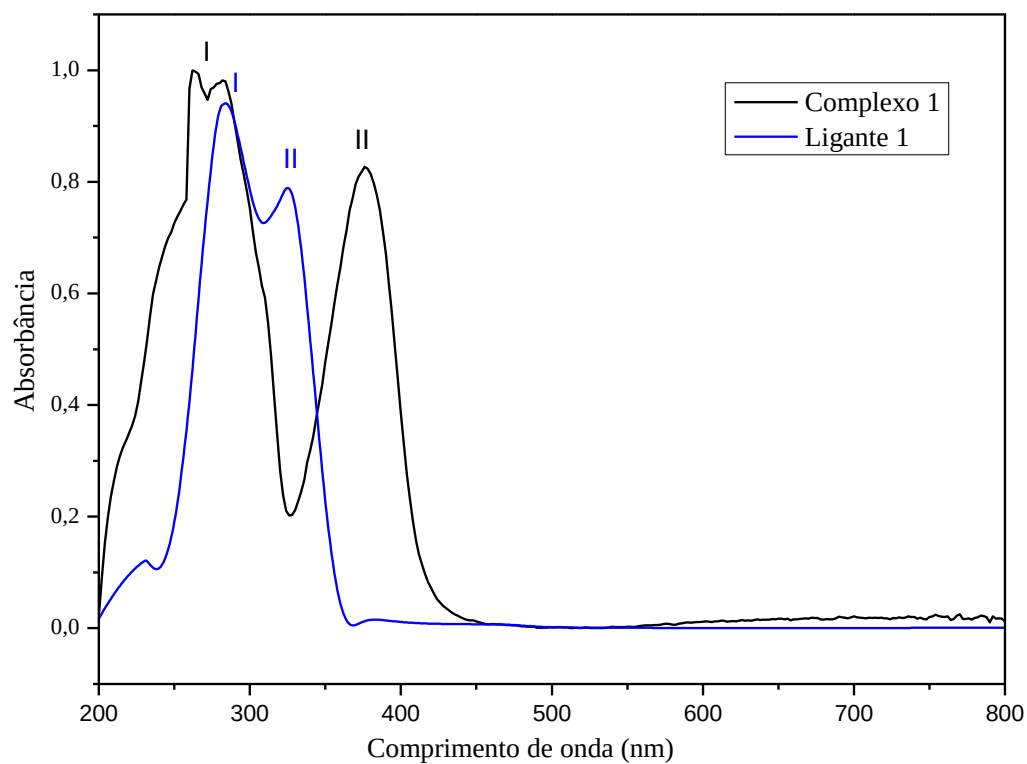
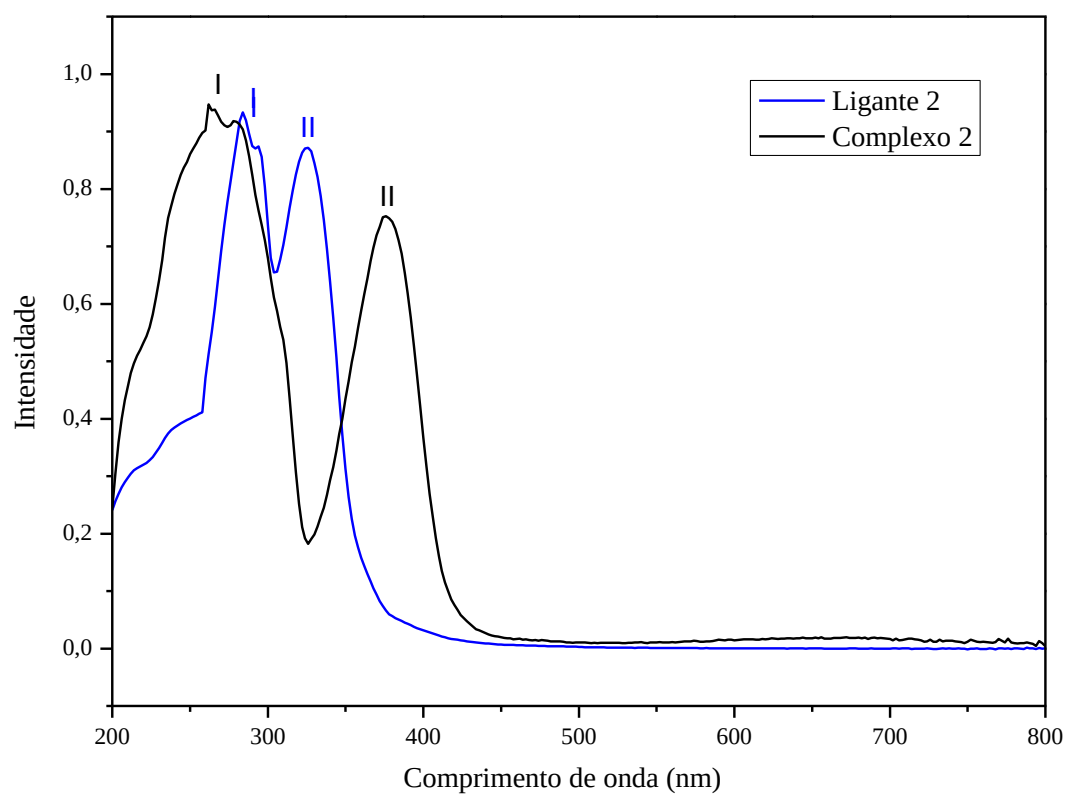


Figura 31 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo 2 e Ligante 2.



Nos ligantes é possível observar duas bandas de absorção na região do ultravioleta referentes às transições intraligantes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ oriundas dos anéis aromáticos (banda I) e do tipo $n \rightarrow \pi^*$ relacionadas ao grupamento (N=C=NH) (banda II). Nos espectros de UV-Vis dos Complexos **1** e **2** as bandas referentes aos ligantes se mantiveram com máximos de absorção na região do ultravioleta, seguindo como tendência, duas bandas bem definidas, uma localizada na região de maior energia (~250 nm) e outra na região de menor energia (~375 nm). A banda I, que aparece na região de maior energia do espectro, é caracterizada por transições eletrônicas intraligantes (IL) do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ pertencentes aos anéis aromáticos. Já a banda II, localizada na região de menor energia, geralmente, é atribuída a transições do tipo LMCT ((N=C=NH) $\pi^* \rightarrow \text{Cu}$) com contribuições de transições eletrônicas do tipo IL.

Após a coordenação, podemos observar um leve efeito hipercrômico nas bandas I e II para o Complexo **1** e para o Complexo **2** um leve efeito hipercrômico para a banda I e hipocrômico para a banda II. Em relação ao deslocamento a banda (I) apresenta um deslocamento para a região do azul enquanto a banda (II) para a região do vermelho para os Complexos **1** e **2**.

A Tabela 10 traz os valores de comprimento de onda máximos referentes às bandas I e II para todos os ligantes e complexos.

Tabela 10 – Valores referentes ao comprimento de onda de máxima absorção das bandas I e II.

Compostos	Comprimentos de onda (nm)	
	Banda I	Banda II
Ligante 1	280	325
Ligante 2	283	325
Complexo 1	265	375
Complexo 2	268	375

Os cálculos de orbital molecular utilizando o método TD-DFT foram elaborados baseados nos dados estruturais oriundos da difratometria de raios X e são utilizados para auxiliar na interpretação e elucidação da natureza das transições eletrônicas envolvidas nas absorções moleculares dos Complexos **1** e **2**. A Figura 32 traz as regiões de absorção e a representação dos orbitais moleculares para o Complexo **1** e a Tabela 11 os resultados da análise das principais transições eletrônicas.

Figura 32 – Diagrama dos Orbitais de Fronteira para o Complexo 1 de acordo com o cálculo de TD-DFT.

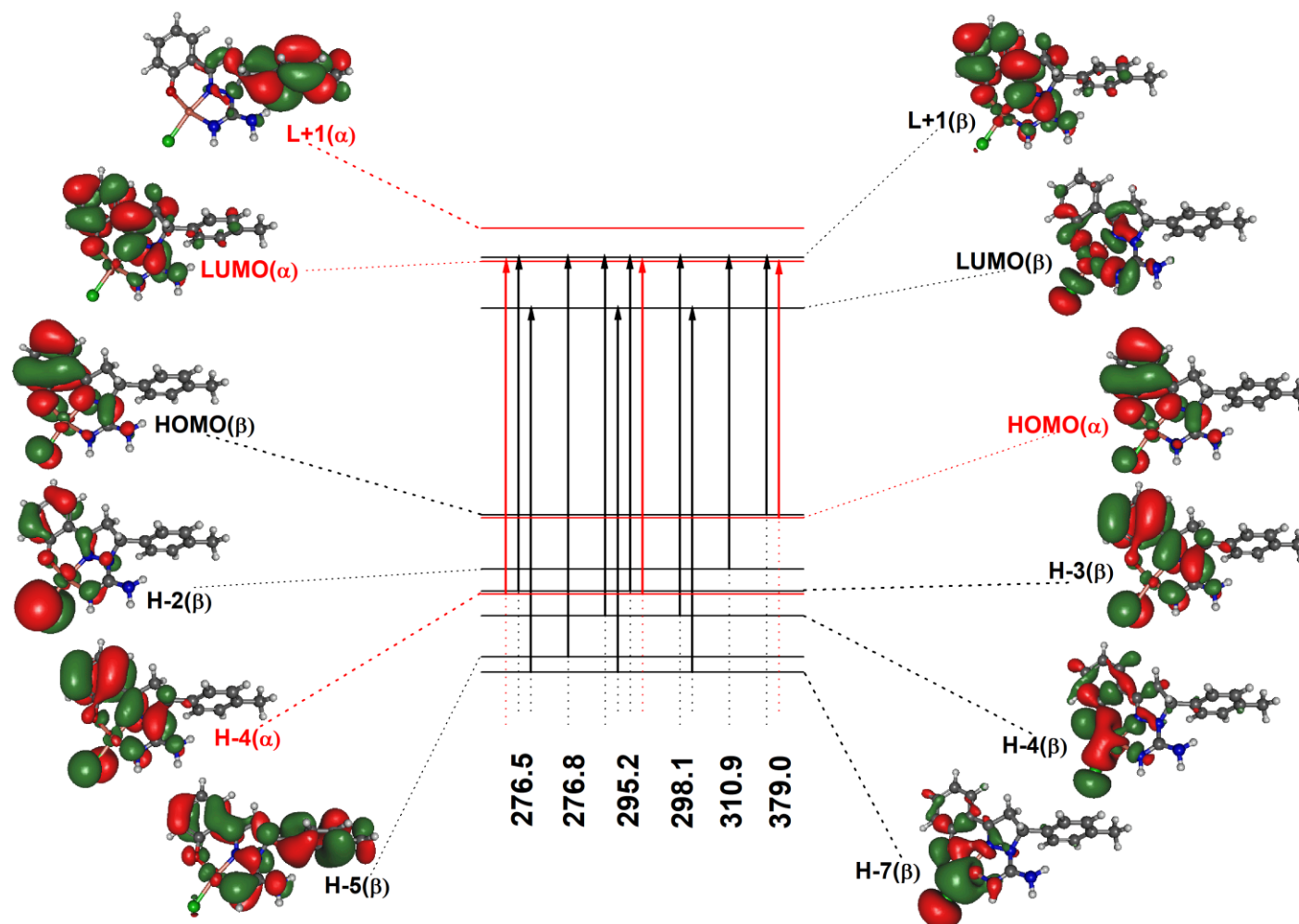


Tabela 11 – Níveis de energia calculados, força do oscilador (f) e análise das transições eletrônicas para o Complexo **1**.

Estado	λ (nm)	f	Maior contribuição	Menor contribuição	Descrição
S1	379,0	0,107	H(β) $\rightarrow$ L+1(β) (40%); H(α) $\rightarrow$ L(α) (37%)	H-3(β) $\rightarrow$ L(β) (4%); H-2(α) $\rightarrow$ L(α) (2%); H-1(α) $\rightarrow$ L(α) (2%); H-18(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-1(β) $\rightarrow$ L(β) (2%)	XLCT + IL
S2	310,9	0,028	H-2(β) $\rightarrow$ L+1(β) (43%)	H(β) $\rightarrow$ L+6(β) (10%); H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (5%); H-3(α) $\rightarrow$ L(α) (2%); H(α) $\rightarrow$ L+5(α) (8%); H-18(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-14(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-4(β) $\rightarrow$ L(β) (5%); H-4(β) $\rightarrow$ L+1(β) (2%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (7%); H-1(β) $\rightarrow$ L+1(β) (4%)	XLCT + IL
S3	298,1	0,063	H-4(β) $\rightarrow$ L+1(β) (50%); H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (29%); H-4(β) $\rightarrow$ L+1(β) (26%);	H-10(β) $\rightarrow$ L(β) (4%); H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (2%); H-12(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-6(β) $\rightarrow$ L(β) (2%)	XLCT
S4	295,2	0,030	H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (24%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (17%); H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (12%)	H-18(β) $\rightarrow$ L(β) (3%)	XLCT
S5	276,8	0,079	H-5(β) $\rightarrow$ L+1(β) (11%)	H-7(α) $\rightarrow$ L(α) (10%); H-5(β) $\rightarrow$ L(β) (9%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (8%); H-6(β) $\rightarrow$ L+1(β) (7%); H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (7%); H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (6%); H-6(α) $\rightarrow$ L(α) (5%); H-9(α) $\rightarrow$ L(α) (3%); H-13(β) $\rightarrow$ L(β) (3%); H-11(β) $\rightarrow$ L(β) (3%);	IL

S6	276,5	0,166	H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (23%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (19%); H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (13%)	H-9(β) $\rightarrow$ L+1(β) (4%); H(β) $\rightarrow$ L+6(β) (3%); H-6(β) $\rightarrow$ L(β) (2%)	XLCT + IL
				H-5(α) $\rightarrow$ L(α) (5%); H-7(α) $\rightarrow$ L(α) (5%); H-6(α) $\rightarrow$ L(α) (3%); H(α) $\rightarrow$ L+5(α) (2%); H-6(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-6(β) $\rightarrow$ L+1(β) (2%); H-5(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-5(β) $\rightarrow$ L+1(β) (2%)	

H: HOMO; L: LUMO

Com base na interpretação do diagrama dos orbitais de fronteira pelo cálculo de TD-DFT é possível sugerir a natureza das transições eletrônicas para os estados de energia com maior força de oscilador (f).

As transições que ocorrem na região de menor energia de 379,0 nm (S1) e 310,9 nm (S2) correspondem às transições do tipo XLCT ($\text{Cl} \rightarrow \pi^*(\text{N}=\text{C}=\text{NH})$) com contribuição IL ($\text{N} \rightarrow \text{N}=\text{C}=\text{NH} \pi^* + \text{Ph}$) envolvendo majoritariamente os orbitais moleculares ($\text{H}(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$; $\text{H}(\alpha) \rightarrow \text{L}(\alpha)$ e $\text{H}-2(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$), respectivamente. Para a região de 298,1 nm (S3) e de 295,2 (S4) também são atribuídas transições do tipo XLCT com contribuição dos orbitais ($\text{H}-4(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$; $\text{H}-7(\beta) \rightarrow \text{L}(\beta)$ e $\text{H}-4(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$; $\text{H}-7(\beta) \rightarrow \text{L}(\beta)$; $\text{H}-3(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$; $\text{H}-4(\alpha) \rightarrow \text{L}(\alpha)$).

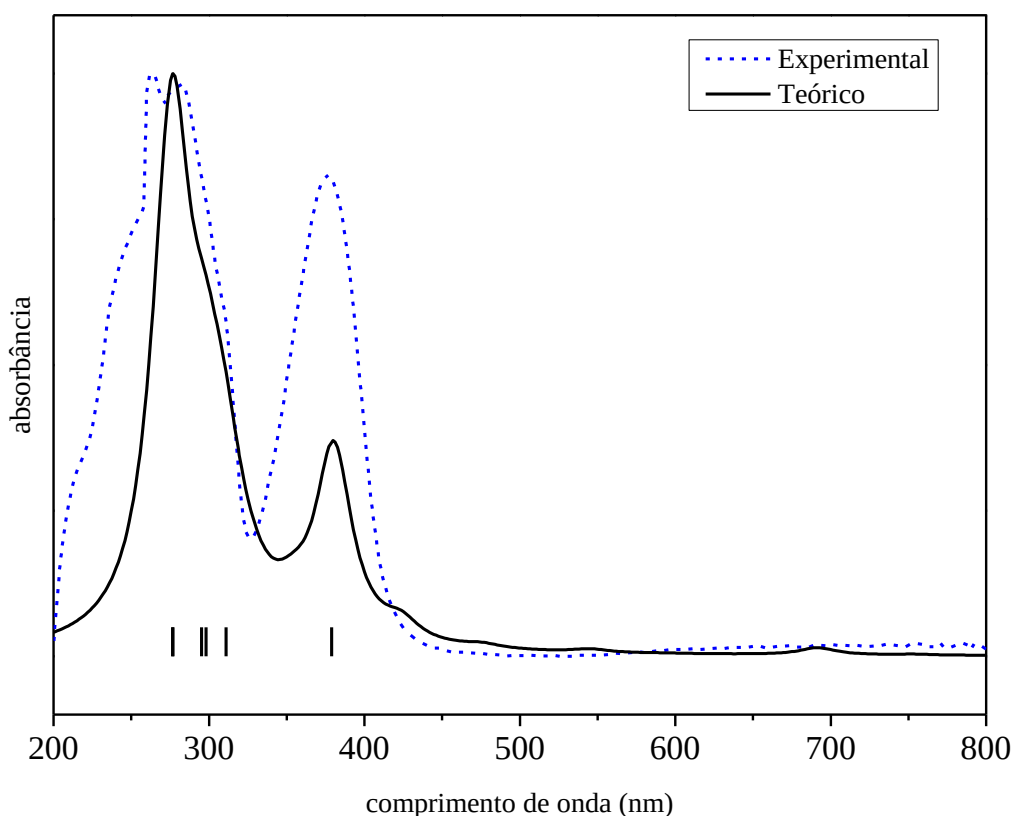
Para as transições que ocorrem na região de maior energia de 279,1 nm (S4) e 277,8 nm (S5) correspondem às transições do tipo XLCT ($\text{Cl} \rightarrow \pi^*(\text{N}=\text{C}=\text{NH})$) com contribuição IL ($\text{N} \rightarrow \text{N}=\text{C}=\text{NH} \pi^* + \text{Ph}$) envolvendo majoritariamente os orbitais moleculares ($\text{H}-2(\beta) \rightarrow \text{L}+3(\beta)$) e ($\text{H}-3(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$; $\text{H}-4(\alpha) \rightarrow \text{L}(\alpha)$; $\text{H}-7(\beta) \rightarrow \text{L}(\beta)$).

De acordo com a interpretação dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), as transições podem ser descritas como mistas do tipo XLCT + IL para todos os seis estados energéticos calculados.

A Figura 33 traz o espectro eletrônico de absorção teórico e experimental do Complexo **1** em DMSO.

A simulação do espectro de UV-Vis teórico apresentou uma banda bem definida com máximo de intensidade na região de 382 nm, bem como os demais comprimentos de onda encontrados para os seis estados energéticos de acordo com o cálculo de TD-DFT. A similaridade entre os espectros teórico e experimental sugere que as regiões analisadas representam bem as transições eletrônicas previstas para o complexo em estudo.

Figura 33 – Espectro eletrônico de absorção molecular teórico (—) e experimental (---) para o Complexo 1.



De acordo com cálculo e a interpretação dos orbitais de fronteira para o Complexo 2 (Figura 34 e Tabela 12) os comprimentos de onda de 277,8 nm (S5) e 382,0 nm (S1) estão próximos dos valores experimentais encontrados no estudo de UV-Vis em solução. As transições que ocorrem nas regiões de 382,0 nm (S1) e 299,1 (S3) correspondem às transições mistas do tipo XLCT ($Cl \rightarrow \pi^*(N-C=NH)$) com contribuição IL ($N \rightarrow N-C=NH \pi^* + Ph$) envolvendo majoritariamente os orbitais moleculares ($H(\beta) \rightarrow L+1(\beta)$; $H(\alpha) \rightarrow L(\alpha)$ e $H-4(\beta) \rightarrow L+1(\beta)$; $H-7(\beta) \rightarrow L(\beta)$).

Para as região de 312,0 nm (S2), 279,1 nm (S4) e 277,8 nm (S5) são atribuídas transições mistas do tipo XLCT + IL com contribuição dos orbitais ($H-2(\beta) \rightarrow L+1(\beta)$; $H(\beta) \rightarrow L+7(\beta)$), ($H-2(\beta) \rightarrow L+3(\beta)$) e ($H-3(\beta) \rightarrow L+1(\beta)$ (25%); $H-4(\alpha) \rightarrow L(\alpha)$; $H-7(\beta) \rightarrow L(\beta)$), respectivamente.

Figura 34 – Diagrama dos Orbitais de Fronteira para o Complexo 2 de acordo com o cálculo de TD-DFT.

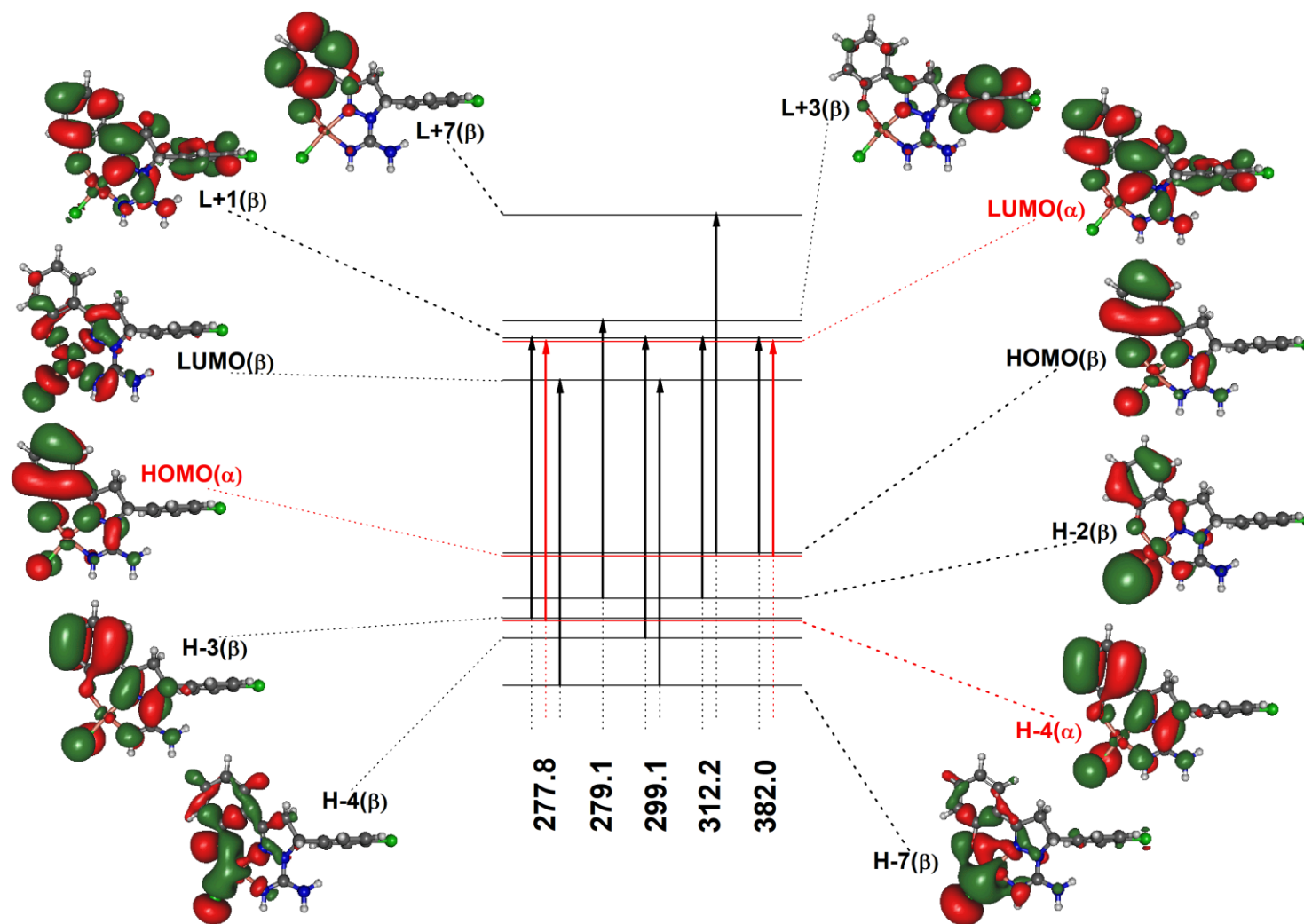


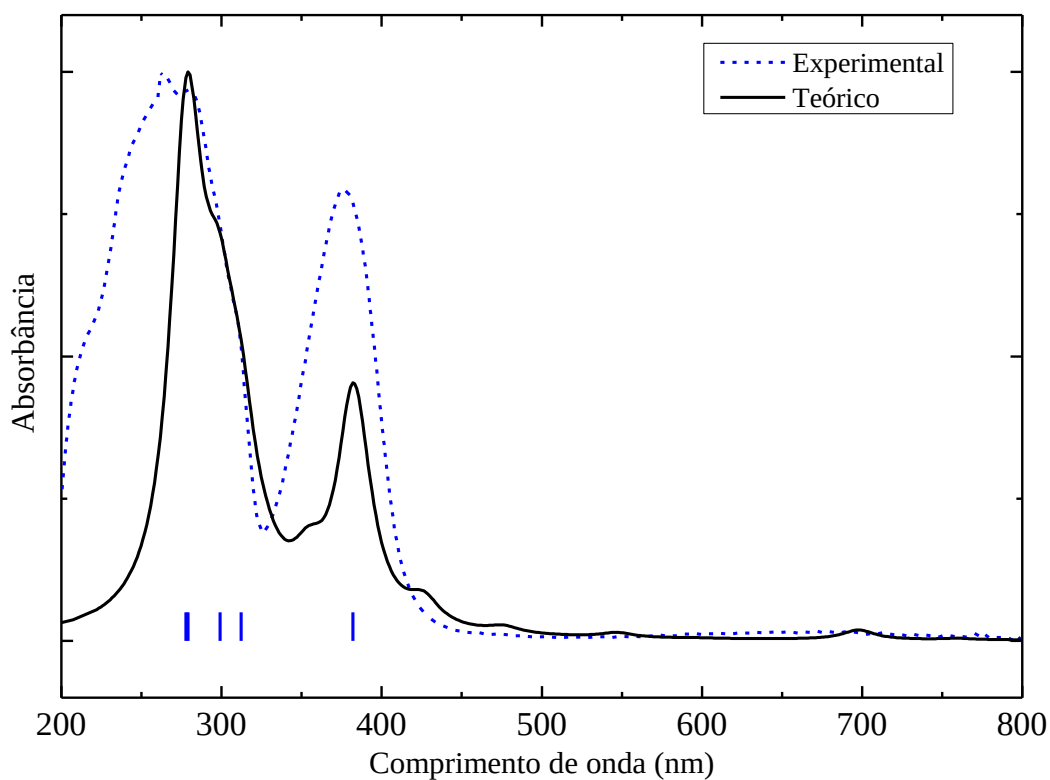
Tabela 12 – Níveis de energia calculados, força do oscilador (f) e análise das transições eletrônicas para o Complexo 2.

Estado	λ (nm)	f	Maior contribuição	Menor contribuição	Descrição
S1	382,0	0,095	H(β) $\rightarrow$ L+1(β) (39%); H(α) $\rightarrow$ L(α) (35%)	H-2(α) $\rightarrow$ L(α) (3%); H-19(β) $\rightarrow$ L(β) (3%); H-12(β) $\rightarrow$ L(β) (3%); H-3(β) $\rightarrow$ L(β) (5%)	XLCT + IL
S2	312,0	0,036	H-2(β) $\rightarrow$ L+1(β) (29%); H(β) $\rightarrow$ L+7(β) (11%)	H(α) $\rightarrow$ L+6(α) (10%); H-4(β) $\rightarrow$ L(β) (8%); H-3(α) $\rightarrow$ L(α) (7%); H-1(β) $\rightarrow$ L+1(β) (6%); H-19(β) $\rightarrow$ L(β) (4%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (4%); H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (3%); H-4(β) $\rightarrow$ L+1(β) (3%); H-17(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-15(β) $\rightarrow$ L(β) (2%)	XLCT + IL
S3	299,1	0,069	H-4(β) $\rightarrow$ L+1(β) (40%); H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (33%)	H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (3%); H-12(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-10(β) $\rightarrow$ L(β) (5%); H-6(β) $\rightarrow$ L(β) (3%); H-4(β) $\rightarrow$ L+2(β) (2%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (2%)	XLCT + IL
S4	279,1	0,021	H-2(β) $\rightarrow$ L+3(β) (75%)	H-1(α) $\rightarrow$ L+2(α) (7%); H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (2%); H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (3%); H-3(β) $\rightarrow$ L+3(β) (3%)	XLCT + IL
S5	277,8	0,167	H-3(β) $\rightarrow$ L+1(β) (25%); H-4(α) $\rightarrow$ L(α) (22%); H-7(β) $\rightarrow$ L(β) (14%)	H-5(α) $\rightarrow$ L(α) (3%); H-1(α) $\rightarrow$ L+2(α) (3%); H-3(β) $\rightarrow$ L+2(β) (9%); H-2(β) $\rightarrow$ L+3(β) (6%)	XLCT + IL

H: HOMO; L: LUMO

Os espectros de absorção teórico e experimental para Complexo **2** são apresentados na Figura 35 abaixo.

Figura 35 – Espectro eletrônico de absorção molecular teórico (—) e experimental (---) para o Complexo **2**.



Observa-se nos espectros de UV-Vis teórico e experimental que tanto as regiões de absorção quanto o perfil das bandas analisadas apresentaram uma boa correlação entre si, sendo possível analisar e sugerir com maior confiabilidade a natureza das transições eletrônicas previstas para os estados de energia do Complexo **2**.

5.1.5.2. Estudo no estado sólido

As análises de absorção no UV-Vis para o estado sólido foram obtidas a partir dos cristais macerados dos complexos. Os espectros eletrônicos de absorção tanto em solução como no estado sólido foram normalizados, a fim de se analisar o deslocamento das bandas e a influência do solvente no processo de absorção. A Figura 36 traz os espectros normalizados do Complexo **1** e a Figura 37 os espectros normalizados do Complexo **2** no estado sólido e no solvente DMSO.

Figura 36 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo **1** no estado sólido e em solução utilizando o solvente DMSO

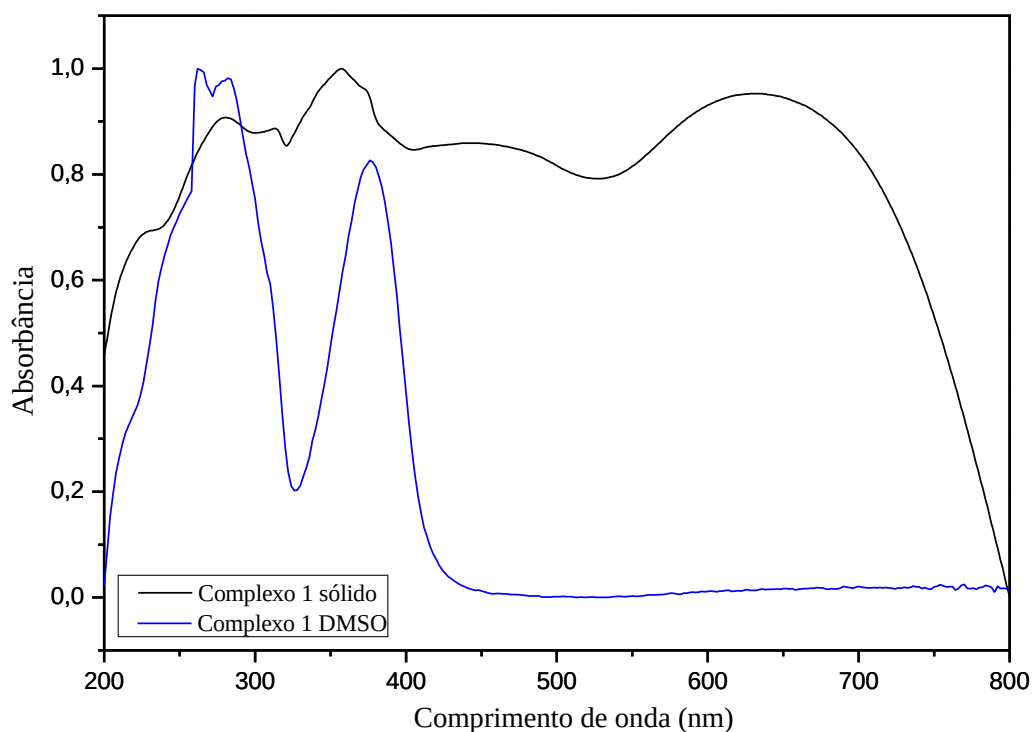
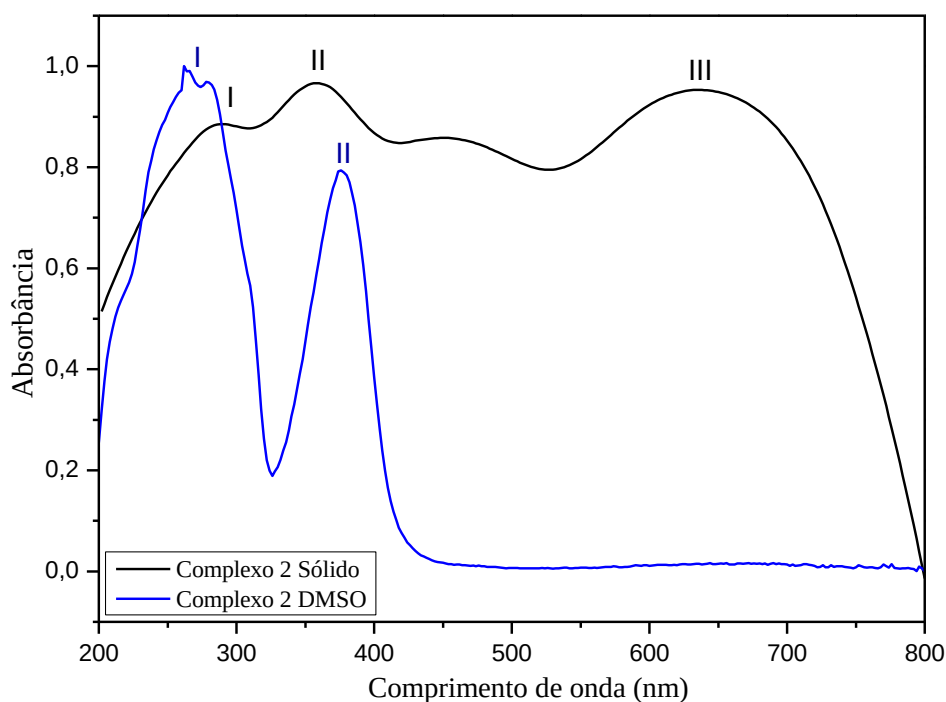


Figura 37 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do Complexo **2** no estado sólido e em solução utilizando o solvente DMSO



A comparação entre os espectros de UV-Vis em solução e no estado sólido mostra um deslocamento hipercrômico e a supressão da resolução vibracional no estado sólido. Este resultado permite concluir que no estado sólido (maior rigidez estrutural) os graus de liberdade para mudanças de geometria molecular no processo de excitação são reduzidos, conferindo assim, um menor desdobramento das bandas.

Nota-se que quando o experimento foi realizado no estado sólido, o surgimento de uma banda larga na região de 635 nm que são devidas as transições do tipo *d-d*, visto que o íon Cu^{2+} apresenta distribuição eletrônica $[\text{Ar}]3d^9$. Os valores apresentados de λ_{max} para as transições do tipo *d-d* estão dentro do esperado para compostos tetracoordenados de cobre (II) com geometria quadrática [118].

A Tabela 13 traz os valores de λ_{max} para as bandas I, II e III no estado sólido e em solução.

Tabela 13 – Comprimento de onda de $\lambda_{\max}$ das bandas I, II e III no estado sólido e em solução.

Complexos	Comprimento de onda (nm)				
	Sólido			Solução	
	Banda I	Banda II	Banda III	Banda I	Banda II
1	281	356	635	265	375
2	287	360	635	268	375

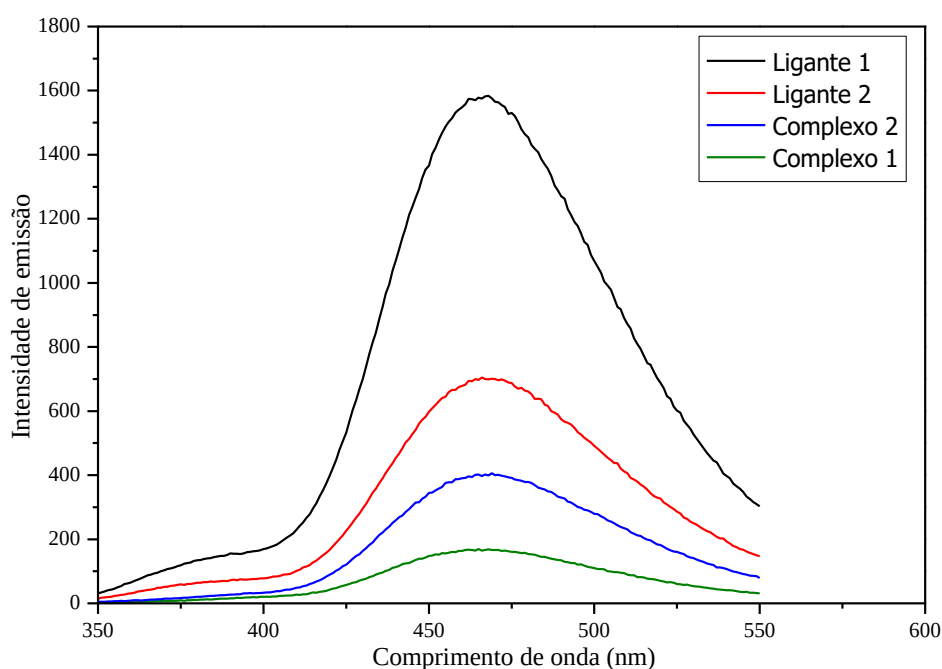
5.1.6. Fluorescência

5.1.6.1. Emissão de fluorescência no estado estacionário

O estudo das propriedades luminescentes dos complexos e seus respectivos ligantes foi realizado a temperatura ambiente em solução de DMSO com comprimento de onda de excitação de 290 nm. A Figura 38 apresenta os espectros de fluorescência dos complexos e dos ligantes.

É possível observar que os ligantes e os complexos apresentaram uma emissão quando excitados em 290 nm, que pode ser atribuída a transição $\pi - \pi^*$ oriundas dos anéis aromáticos presentes nos ligantes. Pode-se observar uma supressão dessa emissão de fluorescência quando complexada ao cobre(II), o que pode estar relacionado, em parte, com a coloração escura dos complexos, assim como com o efeito de Transferência de Elétrons Fotoinduzidos (PET). PET consiste em um processo de desativação que envolve uma reação interna de oxirredução entre o estado excitado do fluoróforo e outra espécie capaz de doar ou aceitar um elétron. Esse tipo de efeito ocorre quando o par de elétrons isolado dos átomos coordenados (por exemplo, N, O, S, P) passa para o HOMO do fluoróforo excitado. A presença de um íon metálico coordenado diminui a energia do par isolado envolvido na coordenação, causando, assim, a desativação da fluorescência [119].

Figura 38 – Espectros de emissão para os Ligantes e Complexos em DMSO (λ_{290} nm).



5.1.6.2. Tempo de vida de fluorescência

Quando uma molécula absorve um fóton de energia apropriada, ocorre uma série de eventos fotofísicos, como relaxamento vibracional (perda de energia na ausência de emissão de luz), fluorescência, cruzamento intersistema (do estado singlete para um estado tripleto), fosforescência, entre outros. Cada um dos processos ocorre com uma probabilidade determinada, caracterizada por constantes de taxa de decaimento (k). Pode ser mostrado que a duração média de tempo (τ) para o conjunto de moléculas para decair de um estado para outro é proporcional à taxa de decaimento: $\tau = 1/k$. Este comprimento médio de tempo é chamado de tempo de vida [120].

Também se pode dizer que o tempo de vida de um processo fotofísico é o tempo necessário para uma população de n moléculas excitadas sejam reduzidas por um fator de e . Desta forma, podemos dizer que o tempo de vida da fluorescência é o tempo necessário por

uma população de fluoróforos excitados para diminuir exponencialmente para N/e através da perda de energia por fluorescência e outros processos não radiativos.

A Figura 39 mostra a comparação dos tempos de vida de fluorescência para os complexos e ligantes no estado sólido e em solução. E a Tabela 14 traz os tempos de fluorescências dos complexos e ligantes.

Figura 39 – Comparação dos espectros de tempo de vida de fluorescência dos Complexos e Ligantes **a)** no estado sólido e **b)** em solução.

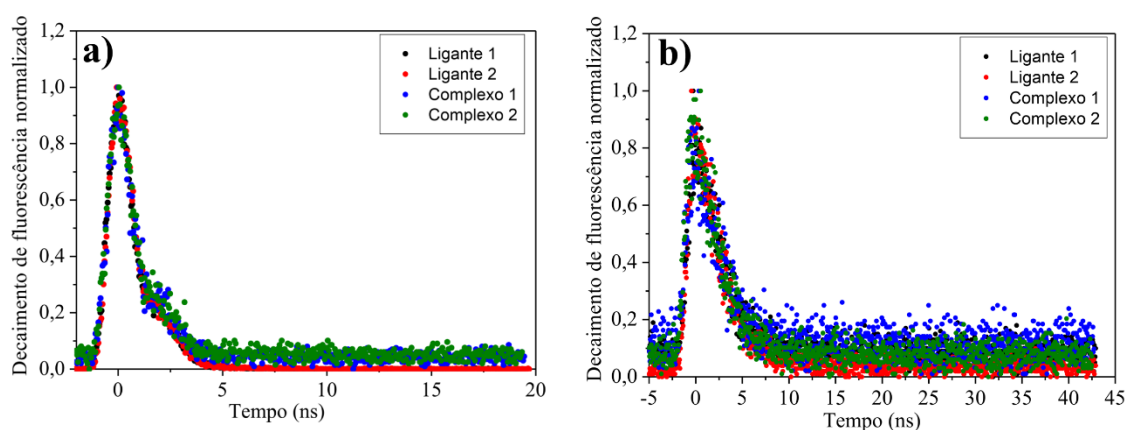
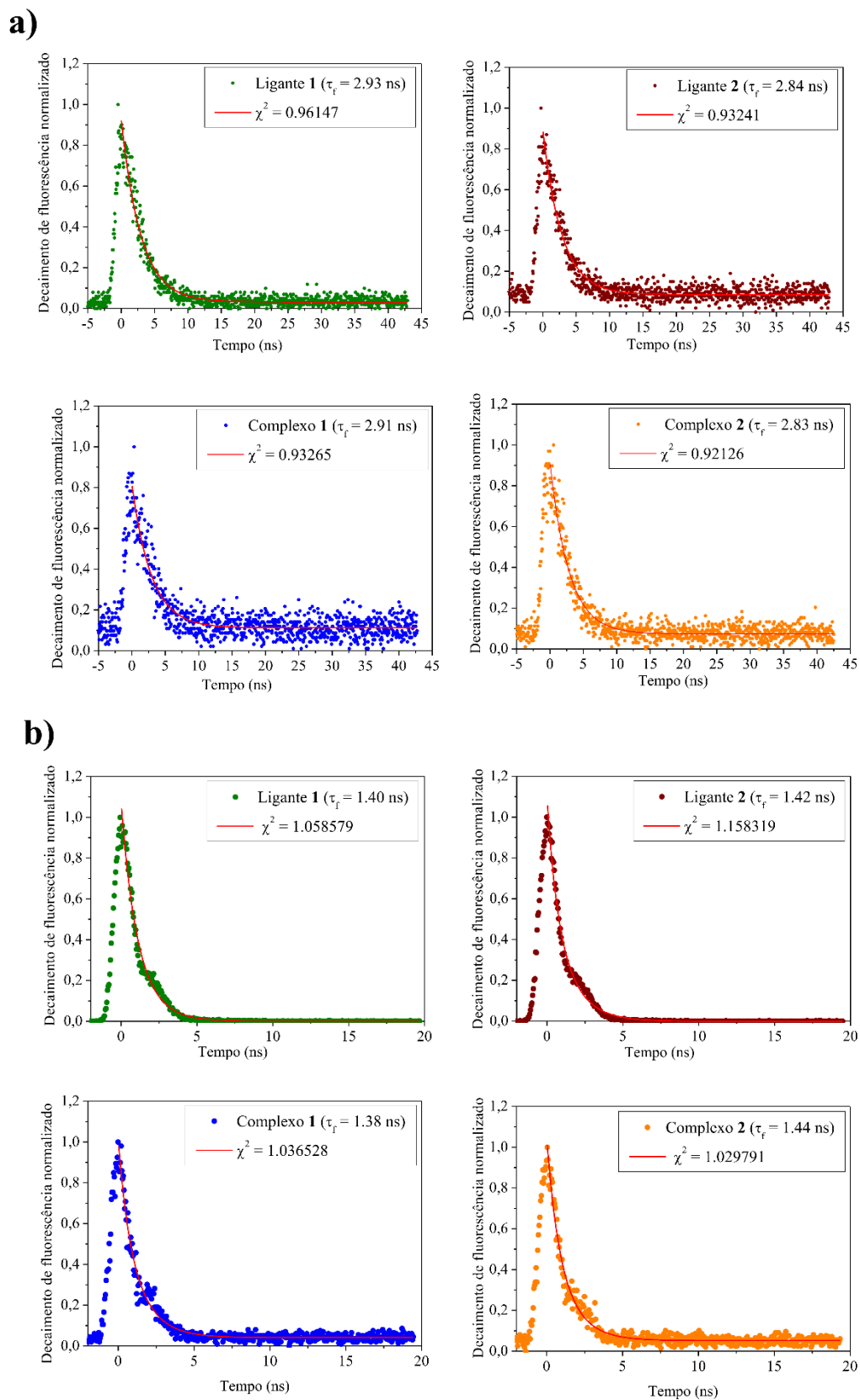


Tabela 14 – Tempos de vida de fluorescência para os Complexos e ligantes no estado sólido e em solução.

	Tempos de vida de fluorescência τ (ns)	
	Estado sólido	Solução
Ligante 1	1,40	2,93
Ligante 2	1,42	2,84
Complexo 1	1,38	2,91
Complexo 2	1,44	2,83

Os tempos de vida de fluorescência são obtidos partir do *fitting* monoexponencial, que são apresentados nas Figura 40 a seguir.

Figura 40 – *Fitting* monoexponencial dos ligantes e complexos em **a)** em solução **b)** no sólido



5.1.7. Estudo de condutividade

A condutância molar dos complexos de cobre(II) em solução de DMSO foi medida usando uma ponte de condutividade de leitura direta. Os complexos **1** e **2** foram dissolvidos em DMSO e as condutividades molares das soluções a 25°C foram medidas e estão apresentadas na Tabela 15.

A partir dos resultados conclui-se que os complexos de cobre(II) apresentam valores de condutância molar de 59,0 a 80,0 S.cm².mol⁻¹, indicando que esses complexos são não eletrólitos (1:1).

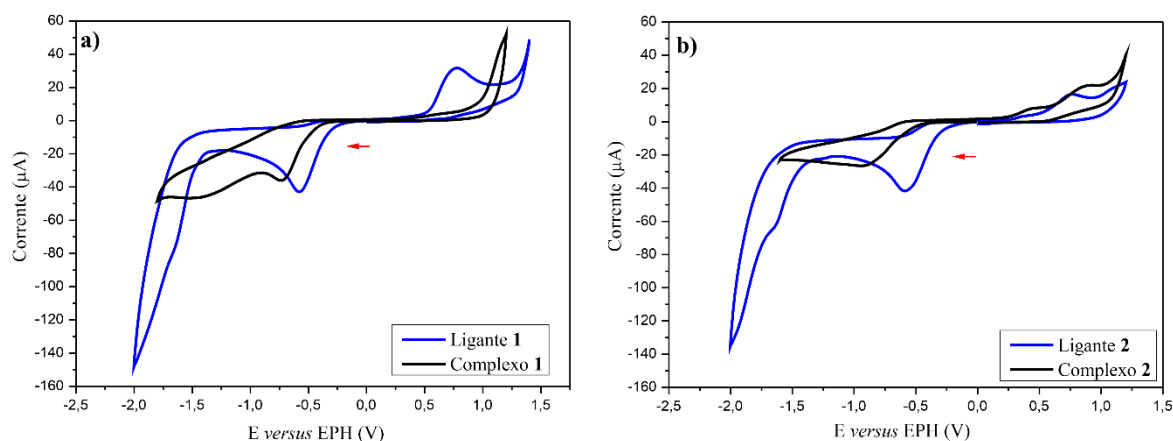
Tabela 15 – Condutividade molar em DMSO dos Complexos **1** e **2**.

Compostos	Condutividade Molar (S.cm².mol⁻¹)
Complexo 1	67,5
Complexo 2	72,4
DMSO	0,0

5.1.8. Voltametria cíclica

O perfil dos voltamogramas para os ligantes e complexos, em solução de DMF, mostra processos de transferência de elétrons entre -2,0 e +2,0 *versus* EPH (eletrodo padrão de hidrogênio), a uma velocidade de varredura de 150 mV.s⁻¹, apresentado na Figura 41 abaixo.

Figura 41 – Voltamogramas cíclicos dos **a) Complexo 1 Ligante1** **b) Complexo 2 Ligante 2** em solução de DMF. Utilizando como eletrólito suporte $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de TBAPF₆, eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo auxiliar de platina e *pseudo*-referência de platina e velocidade de varredura de 150 mV.s^{-1} .



Os valores de potenciais redox dos compostos são apresentados na Tabela 16 a seguir.

Tabela 16 – Potenciais redox dos compostos em solução de DMF. Utilizando como eletrólito suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TBAPF₆, eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo auxiliar de platina, *pseudo*-eletrodo de referência de platina, e velocidade de varredura de 150 mV.s^{-1} .

Compostos	E _{Red1} (V)	E _{Red2} (V)	E _{Ox1} (V)	E _{Ox2} (V)	E _{HOMO} (eV)	E _{LUMO} (eV)	ΔE
Ligante 1	-0,57	-1,64	+0,76	-	-5,16	-3,83	1,33
Ligante 2	-0,59	-1,62	+0,39	+0,75	-4,79	-3,81	0,98
Complexo 1	-0,72	-1,39	-	-	-4,4	-3,68	0,72
Complexo 2	-0,91	-	+0,44	+0,88	-4,84	-3,49	1,35

$E_{\text{HOMO}} = -[4.4 + E_{\text{ox1}} (\text{versus EPH})] \text{ eV}$; $E_{\text{LUMO}} = -[4.4 + E_{\text{red1}} (\text{versus EPH})] \text{ eV}$; $\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$.

Podemos observar que o primeiro pico nos complexos trata-se da redução de Cu^{II} para Cu^{I} , enquanto que o segundo trata-se da redução do ligante.

5.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.2.1. Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica dos ligantes e complexos foi avaliada em duas linhagens de células tumorais diferentes de adenocarcinoma mamário (MDA e MCF-7) e em uma linhagem de célula normal de fibrocisto mamário humano (MCF-10) que foi utilizada para avaliar a seletividade. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Atividade citotóxica frente a linhagens celulares.

Compostos	Células Tumorais				Células Não-Tumorais
	IC ₅₀ (μM±DP)				IC ₅₀ (μM±DP)
	MDA	IS	MCF-7	IS	MCF-10
Ligante 1	19,6±2,2	0,7	16,1±0,1	0,9	13,8±1,9
Ligante 2	42,3±5,8	0,3	26,2±0,3	0,6	14,8±1,0
Complexo 1	25,1±1,4	0,5	14,7±0,2	0,8	11,9±2,0
Complexo 2	15,5±1,4	1,0	12,3±0,1	1,2	15,2±0,3
CuCl ₂ .H ₂ O	54,1±0,1	0,5	58,9±0,7	0,6	34,6±3,0

DP: Desvio-padrão considerando um ensaio em triplicata; IS: Índice de Seletividade (IS= IC₅₀ linhagem celular saudável/ IC₅₀ linhagem celular tumoral)

Podemos avaliar que o Ligante **1** ao ser usado para formar o Complexo **1** não favoreceu de forma significativa a atividade citotóxica em nenhuma das linhagens testadas. Porém o Ligante **2** ao se ligar ao cobre formando o Complexo **2**, favoreceu a atividade citotóxica diminuindo a concentração inibitória em aproximadamente 3 vezes para a MDA e em 2 vezes para a MCF-7.

Importante ressaltar que esse aumento de atividade não ocorreu nas células normais (MCF-10) o que reflete em uma melhora da seletividade. Podemos notar ainda que os ligantes e complexos apresentaram ser mais citotóxicos (menores valores de IC_{50}) que o composto $CuCl_2 \cdot H_2O$, utilizado como fonte de cobre na síntese dos complexos. Especialmente o Complexo **2** que se mostrou de 4 a 5 vezes mais ativo que o sal de cobre nas linhagens tumorais.

As Figuras 42 e 43 trazem os resultados de forma gráfica dos valores de IC_{50} frente às células tumorais MDA e MCF-7 e os valores de índice de seletividade (IS) frente às células normais MCF-10.

Figura 42 – Compostos utilizados no ensaio citotóxico *versus* valores de IC_{50} ($\mu mol L^{-1}$) frente às células tumorais.

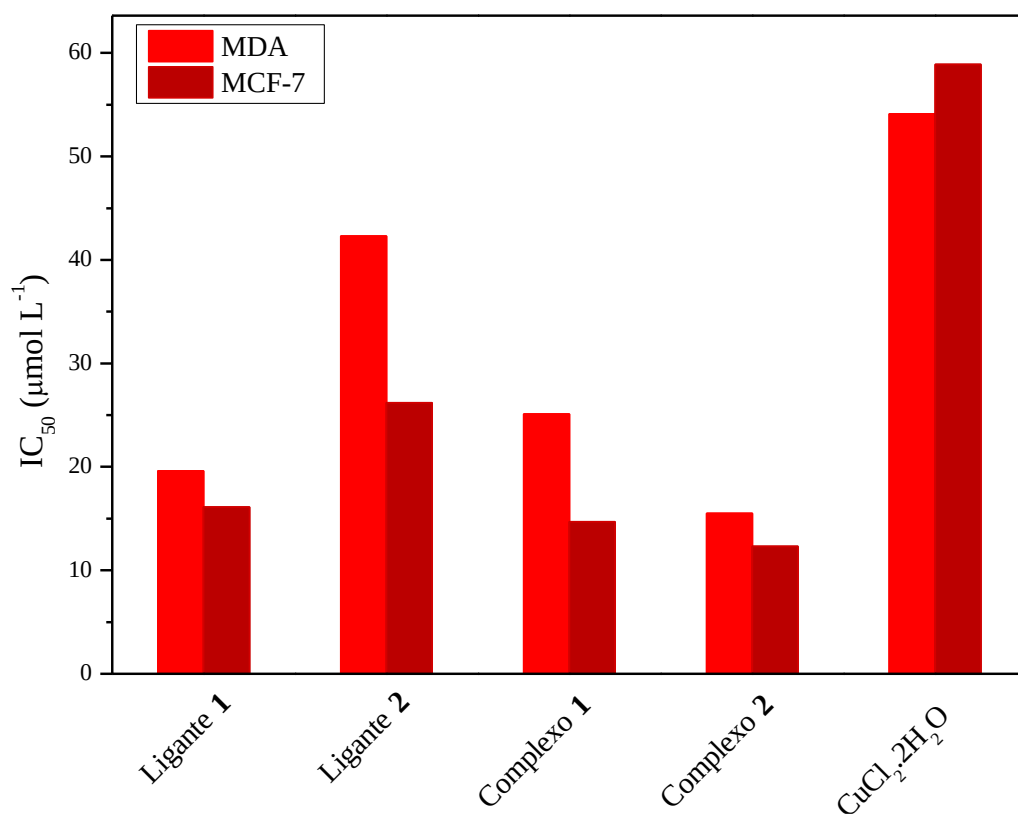
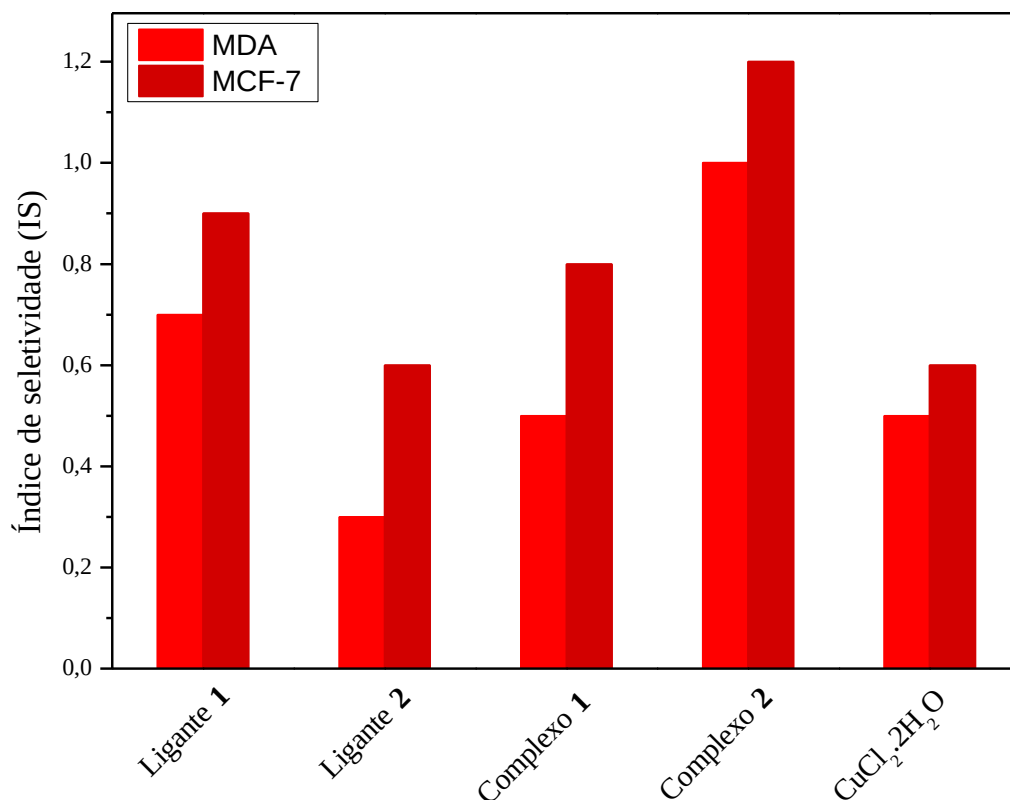


Figura 43 – Compostos utilizados no ensaio citotóxico versus valores de (IS) frente às células normais MSF-10.

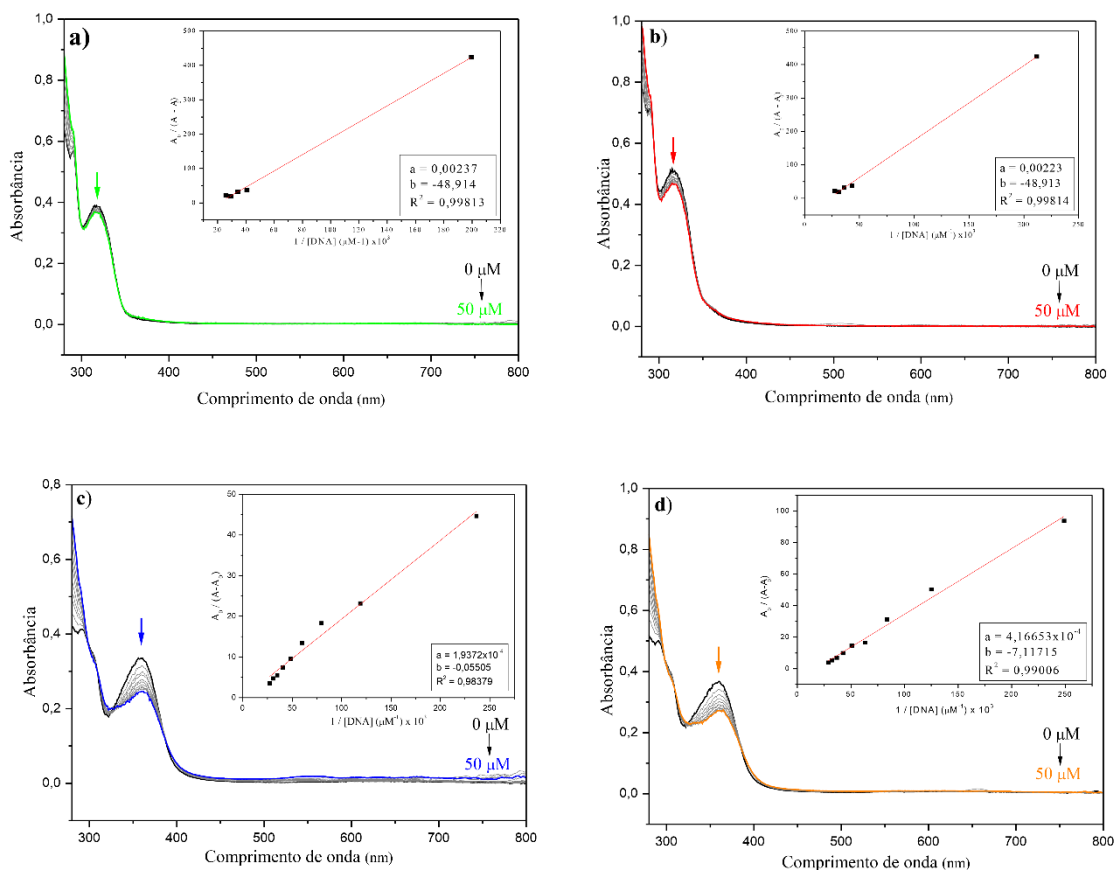


5.2.2. Interação com DNA

5.2.2.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

A espectroscopia de absorção molecular pode ser utilizada para investigar a interação do DNA com compostos, inorgânicos (complexos metálicos) e orgânicos. Assim, utilizou-se a espectroscopia de absorção na região do UV-visível com o objetivo de entender as mudanças espectrais causadas pela interação entre DNA e os ligantes e complexos. A Figura 44 apresenta os espectros de UV-Vis dos ligantes e complexos na ausência e na presença de sucessivas adições de DNA de timo de bezerro (CT-DNA).

Figura 44 – Espectros de absorção eletrônica dos ligantes e complexos após adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4. **a)** Ligante **1** **b)** Ligante **2** **c)** Complexo **1** **d)** Complexo **2**.



Analisando os espectros podemos perceber que para todos os compostos apresentaram um hipocromismo nas transições eletrônicas. O efeito de hipocromicidade (H%) pode ser calculado a partir da equação abaixo, e foram de 5,95% para o Ligante **1**, 7,73% para o Ligante **2**, 26,11% para o Complexo **1** e 25,87% para o Complexo **2**.

$$H\% = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100$$

São indícios de interação via sulcos ou intercalação os deslocamentos batocrômico e hipocrômico [121]. Como os espectros de absorção eletrônica apresentam, essencialmente, pouco hipocromismo, há indícios para afirmar que o modo principal de interação com o DNA é o de interação via sulcos. Os complexos também apresentaram pouco deslocamento

batocrômico (2 e 3 nm), apresentado na Tabela 18, mas como este deslocamento é pequeno, é pouco provável que este fato indique uma intercalação.

A partir dos espectros é possível calcular as constantes de ligação (K_b) para os ligantes e complexos com DNA, obtidos a partir do *plot* das absorbâncias com o inverso da concentração de DNA adicionada, o valor de K_b por esse método é calculado pelo inverso do coeficiente angular (*slope*), realizou-se também cálculos de ΔG para verificar se a interação dos compostos com DNA era espontânea, a partir da equação abaixo, os resultados se encontram na Tabela 16.

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

Tabela 18 – $\Delta\lambda$ de absorção dos ligantes e complexos antes e após adição de CT-DNA, constantes de ligação (K_b) e valores de ΔG para os ligantes e complexos.

Compostos	$\Delta\lambda$ (nm)	K_b (L.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)
Ligante 1	0	3,45x10 ²	-1,4485x10 ⁴
Ligante 2	0	3,64x10 ²	-1,4618x10 ⁴
Complexo 1	2	5,16x10 ³	-2,1191x10 ⁴
Complexo 2	3	2,40x10 ³	-1,9293x10 ⁴

5.2.2.2. Ensaio de competição por espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário

Com o objetivo de determinar qual é a localização preferencial de interação dos compostos com o DNA, realizou-se ensaios de competição utilizando alaranjado de acridina (AO), DAPI e verde de metila (MG) como competidores pela intercalação de bases nitrogenadas, sulco menor e sulco maior do DNA, respectivamente. Para isto, observou-se o efeito da adição do respectivo composto à mistura de CT-DNA:competidor. Pelo *plot* de [composto] (eixo X) e (F_0/F) (eixo Y), calculou-se a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), principal parâmetro utilizado para predizer qual a localização preferencial de interação.

Observando as Figuras 45, 46 e 47, pode-se constatar que as adições sucessivas dos compostos às misturas de CT-DNA:competidor causaram redução na emissão fluorescente da

solução, indicando que os compostos têm a capacidade de estarem em qualquer um dos sítios de interação possíveis.

Figura 45 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e os compostos em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). **a)** Ligante 1, **b)** Ligante 2, **c)** Complexo 1 e **d)** Complexo 2.

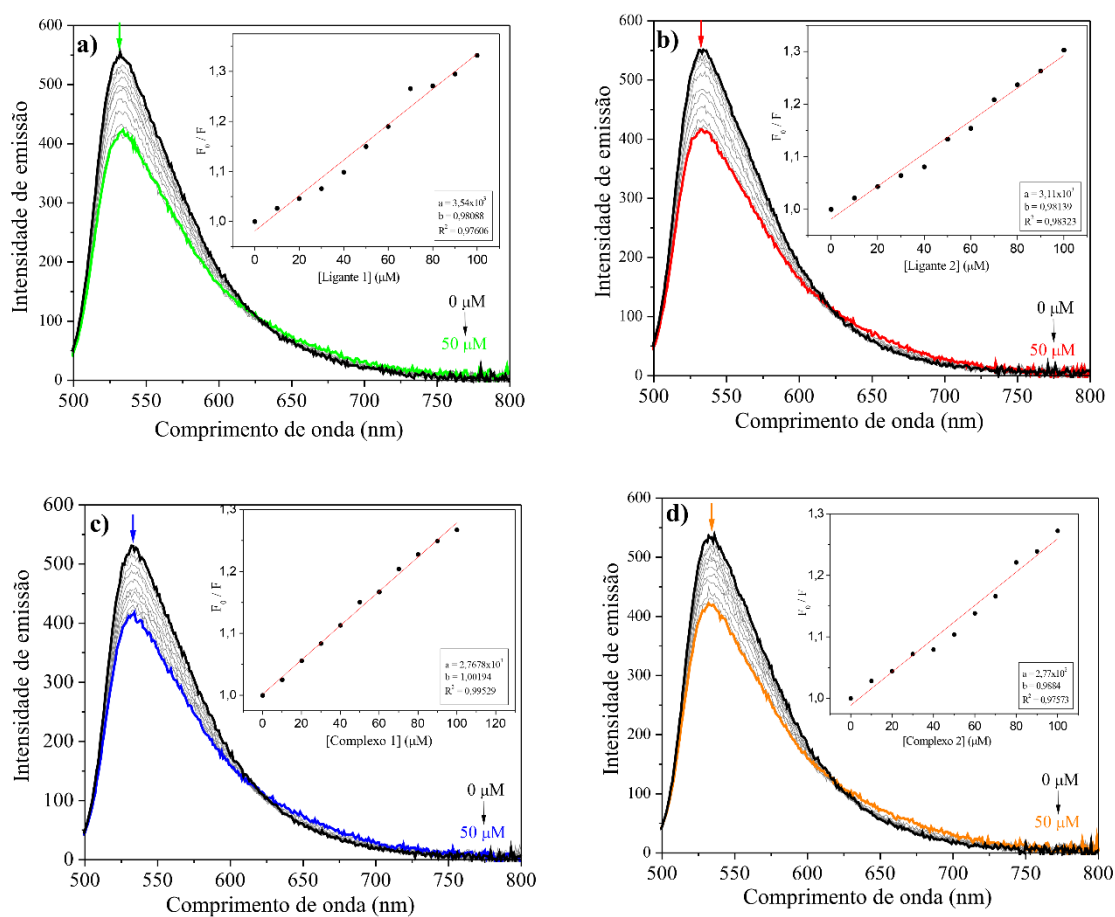


Figura 46 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e os compostos em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). **a)** Ligante 1, **b)** Ligante 2, **c)** Complexo 1 e **d)** Complexo 2.

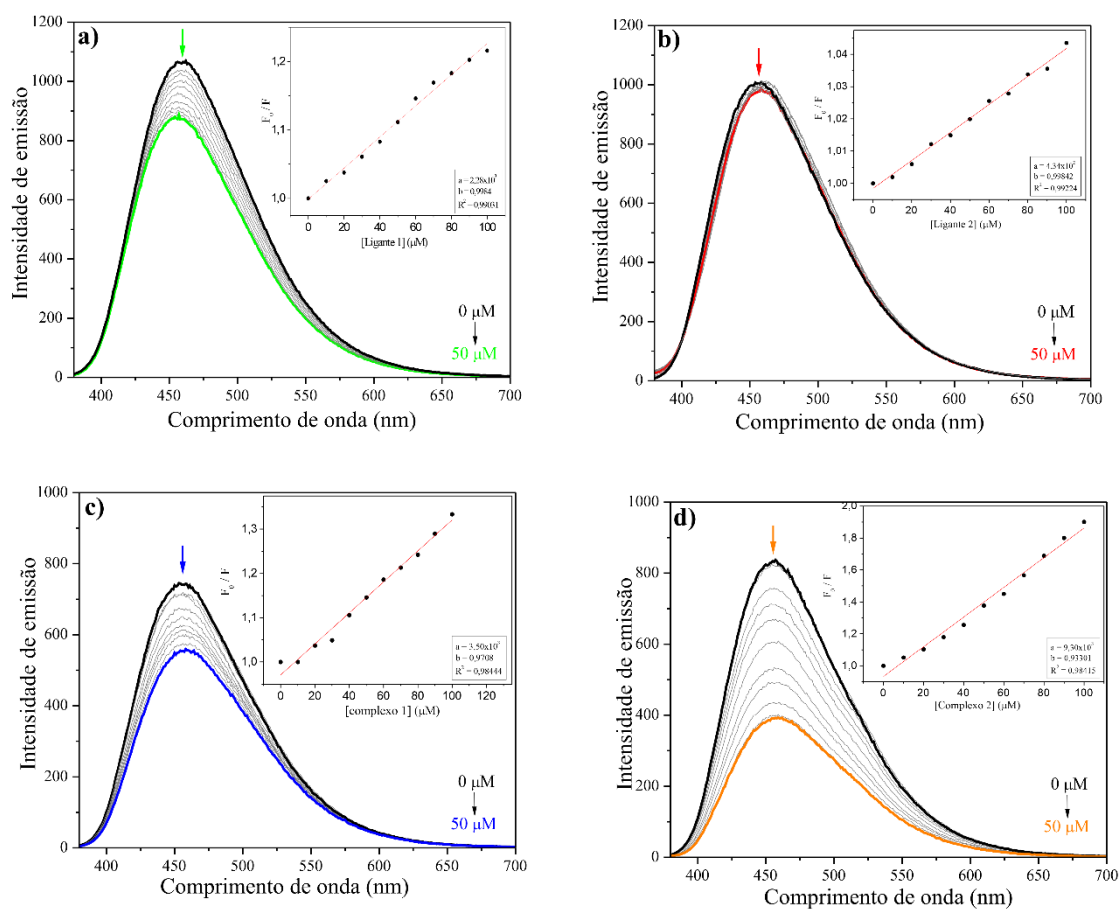
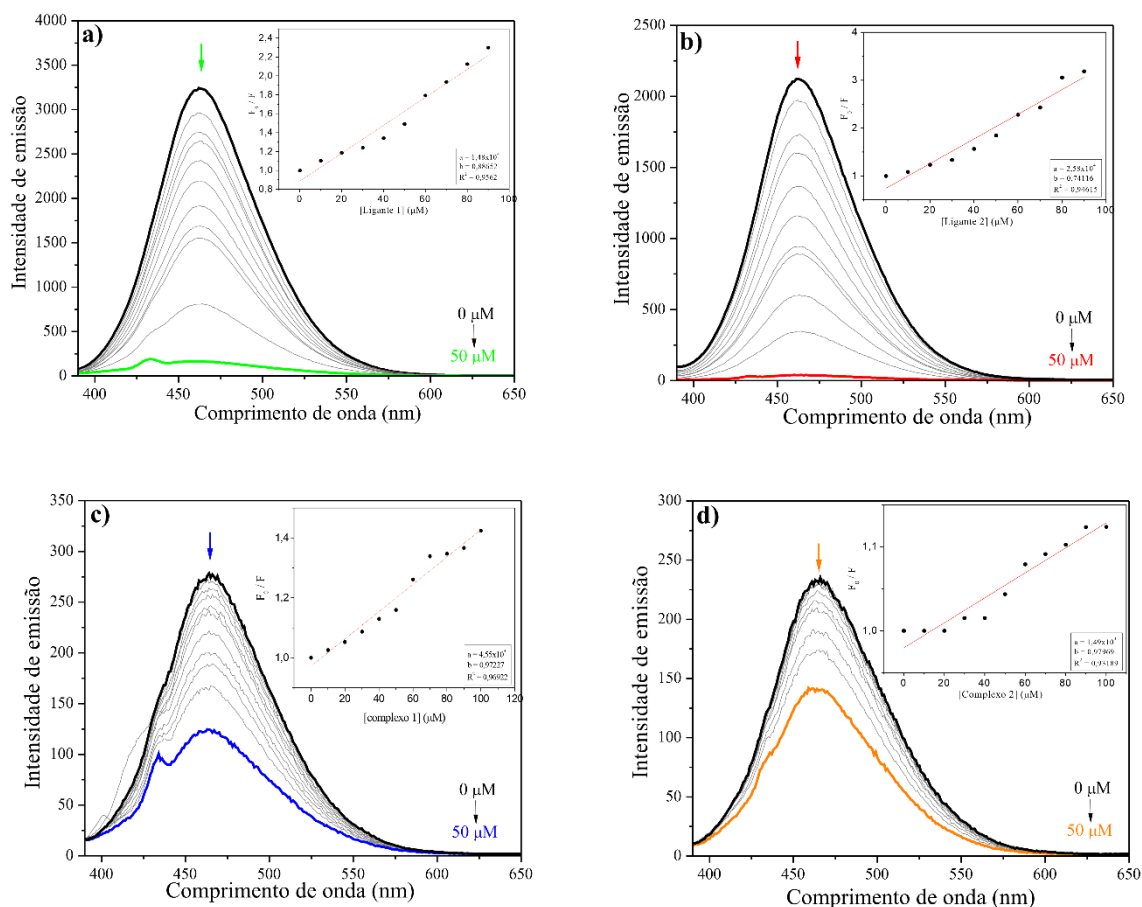


Figura 47 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e os compostos em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). **a)** Ligante 1, **b)** Ligante 2, **c)** Complexo 1 e **d)** Complexo 2.



Os valores de Ksv calculados para as interações estão dispostas na Tabela 19 e indicam que o DAPI sofre maior competição com os compostos pelo sulco menor do DNA, uma vez que a constante de Stern-Volmer obtida é a maior entre os ensaios de competição. Além disso, os valores da constante cinética de supressão bimolecular (k_q) indicam que as interações são estáticas pois todos os termos calculados foram acima da constante de difusão controlada ideal ($10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Tabela 19 – Constantes de Stern-Volmer obtidos para os ligantes e complexos após interação com DNA, em DMSO, à 37 °C.

Compostos	Ksv			kq		
	AO	DAPI	MG	AO	DAPI	MG
Ligante 1	3,54x10 ³	2,28x10 ³	1,48x10 ⁴	2,08x10 ¹²	1,04x10 ¹²	5,28x10 ¹³
Ligante 2	3,11x10 ³	4,34x10 ²	2,58x10 ⁴	1,83x10 ¹²	1,97x10 ¹¹	9,21x10 ¹³
Complexo 1	2,77x10 ³	3,50x10 ³	4,55x10 ³	1,63x10 ¹²	1,59x10 ¹²	1,62x10 ¹³
Complexo 2	2,71x10 ³	9,30x10 ³	1,49 x10 ³	1,59x10 ¹²	4,23x10 ¹²	5,32x10 ¹²

5.2.2.3. Interação com DNA: Estudo de *docking* molecular

Cálculos de *docking* molecular também foram empregados para oferecer uma explicação em nível molecular entre cada composto e DNA. Assim como pode ser visto na Tabela 20, a pontuação atribuída aos compostos indica uma preferência dos compostos em se encaixar nos sulcos menores do DNA. Corroborando os ensaios realizados por fluorescência utilizando os competidores *Methyl Green* (MG) e DAPI.

Tabela 20 – Pontuação de *docking* molecular para interação dos compostos com o DNA.

Compostos	Sulco Menor	Sulco Maior
Ligante 1	59,25	47,18
Ligante 2	55,44	48,36
Complexo 1	56,83	39,09
Complexo 2	56,38	34,13

A Figura 48 apresenta a melhor posição para cada ligante e complexo dentro das fitas de DNA e a Tabela 21 mostra as principais forças intermoleculares envolvidas na interação. Os resultados de *docking* molecular sugerem interações de van der Waals como a principal forças

entre os nucleotídeos e os compostos, exceto para o Ligante 2, no qual detectou-se ligações de hidrogênio.

Figura 48 – Superposição da melhor posição de encaixe para DNA:Ligantes no sulco menor. Bases nitrogenadas selecionadas (verde), Ligante 1 (amarelo), Ligante 2 (rosa), Complexo 1 (salmão), Complexo 2 (roxo). Cor dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro, cloro: verde claro e Cu(II): marrom.

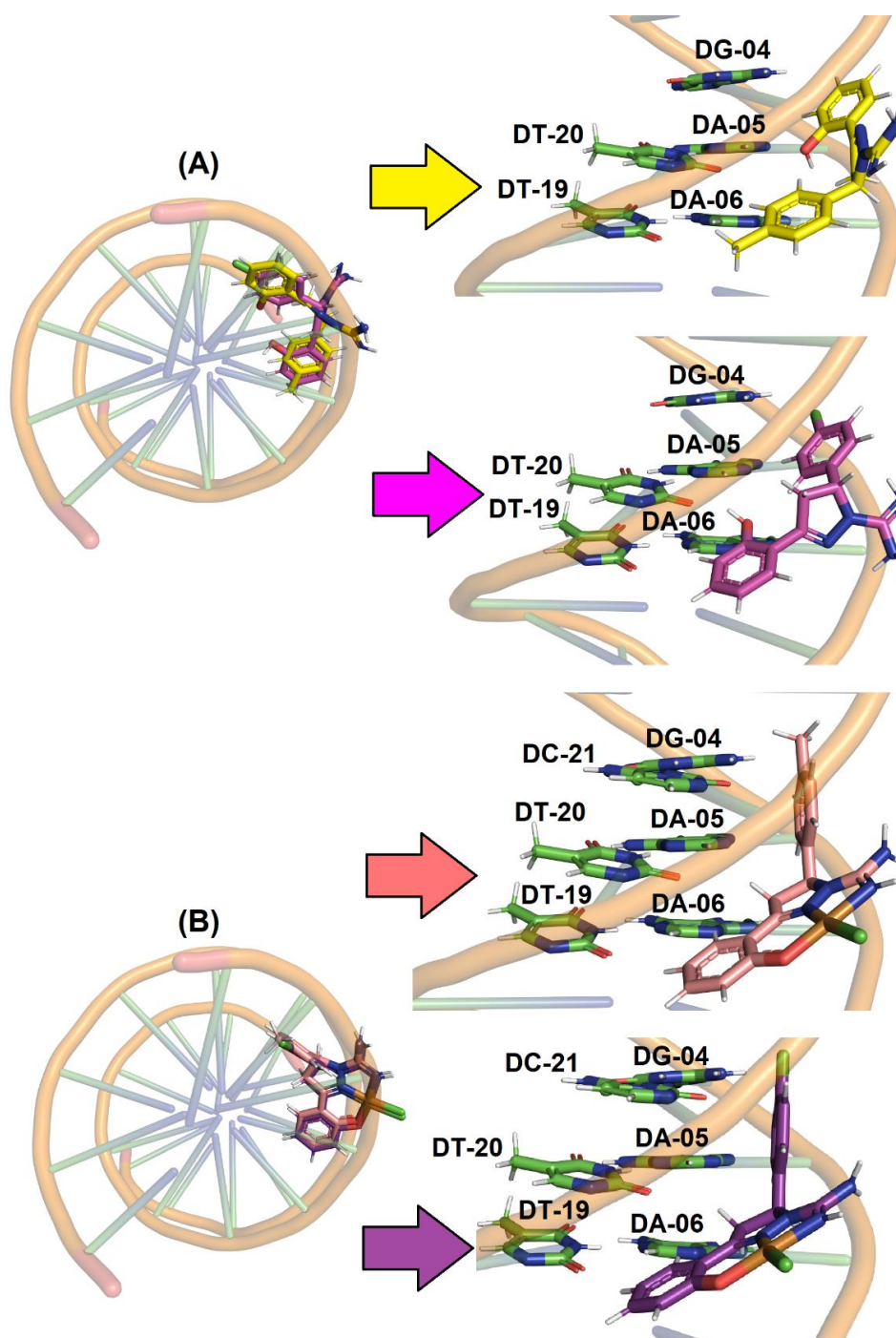


Tabela 21 – Resultados de *docking* molecular para a interação entre DNA e compostos.

Compostos	Base nitrogenada	Interação	Distância (Å)
Ligante 1	DG-04	Van der Waals	2.60
	DA-05	Ligação de Hidrogênio	2.90
	DA-06	Van der Waals	3.40
	DT-19	Van der Waals	3.70
	DT-20	Van der Waals	3.60
Ligante 2	DG-04	Ligação de Hidrogênio	2.30
	DA-05	Van der Waals	2.10
	DA-06	Van der Waals	2.20
	DT-19	Van der Waals	3.60
	DT-20	Ligação de Hidrogênio	1.80
Complexo 1	DG-04	Van der Waals	2.10
	DA-05	Van der Waals	3.70
	DA-06	Van der Waals	2.40
	DT-19	Van der Waals	2.70
	DT-20	Van der Waals	2.60
	DC-21	Van der Waals	3.20
Complexo 2	DG-04	Ligação de Hidrogênio	2.90
	DA-05	Van der Waals	3.10
	DA-06	Van der Waals	2.00
	DT-19	Van der Waals	2.60
	DT-20	Van der Waals	2.90
	DC-21	Van der Waals	3.30

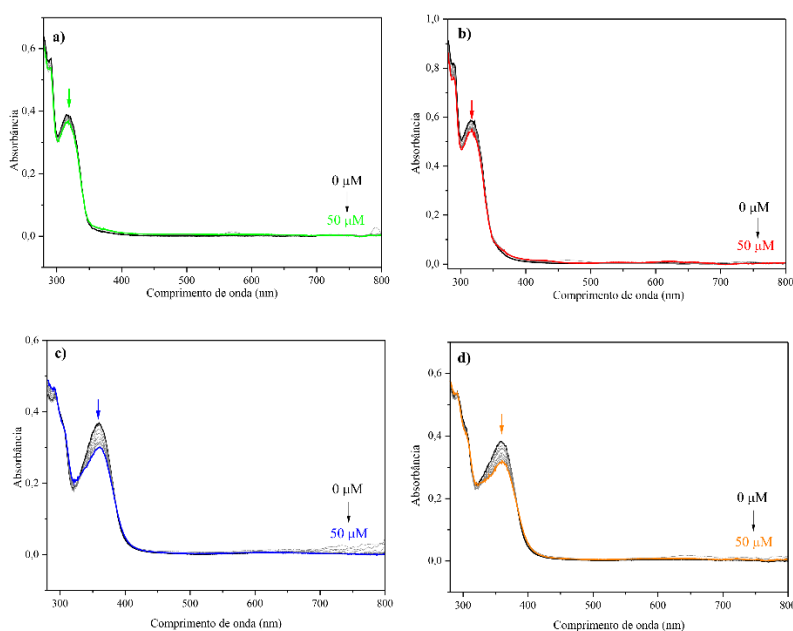
5.2.3. Interação com HSA

5.2.3.1. Estudo de interação por espectroscopia de absorção no UV-Vis

Com o objetivo de obter informações sobre as interações entre os compostos e o HSA, foram registrados espectros de: HSA na ausência e na presença de sucessivas adições dos compostos (Figura 49). Após a adição dos compostos ao HSA, houve hipocromismo (diminuição de absorbância). O efeito de hipocromicidade (H%) pode ser calculado a partir da equação abaixo, e foram de 5,22% para o Ligante **1**, 7,10% para o Ligante **2**, 18,36% para o Complexo **1** e 17,77% para o Complexo **2**. Observou-se também um leve deslocamento batocrômico indicando que a interação entre compostos e HSA parece acontecer via mecanismo estático, sem ocasionar perturbação no microambiente nos arredores dos resíduos de aminoácidos da albumina [123].

$$H\% = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100$$

Figura 49 – Espectros de absorção eletrônica dos ligantes e complexos após adições de HSA, em DMSO/PBS pH 7,4. **a)** Ligante **1** **b)** Ligante **2** **c)** Complexo **1** **d)** Complexo **2**.



5.2.3.2. Estudo de interação por espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário

De modo geral, os parâmetros de ligação entre os compostos e o HSA podem ser determinados pela técnica de fluorescência no estado estacionário através da diminuição da fluorescência intrínseca da proteína HSA (resíduo de triptofano Trp²¹⁴). Desta forma, a interação entre a albumina e os ligantes e complexos foi determinada através da supressão da fluorescência do HSA. A Figura 50 representa a emissão de fluorescência no estado estacionário do HSA na ausência e na presença de sucessivas adições dos ligantes e complexos à 37 °C (310K). Observa-se que o HSA exibiu uma banda de emissão intensa em 340 nm, conforme já esperado. As intensidades de fluorescência do HSA diminuíram gradualmente com o aumento da concentração dos compostos e um pequeno desvio hipsocrômico também pode ser observado sugerindo que os compostos podem estar interagindo com o resíduo Trp²¹⁴.

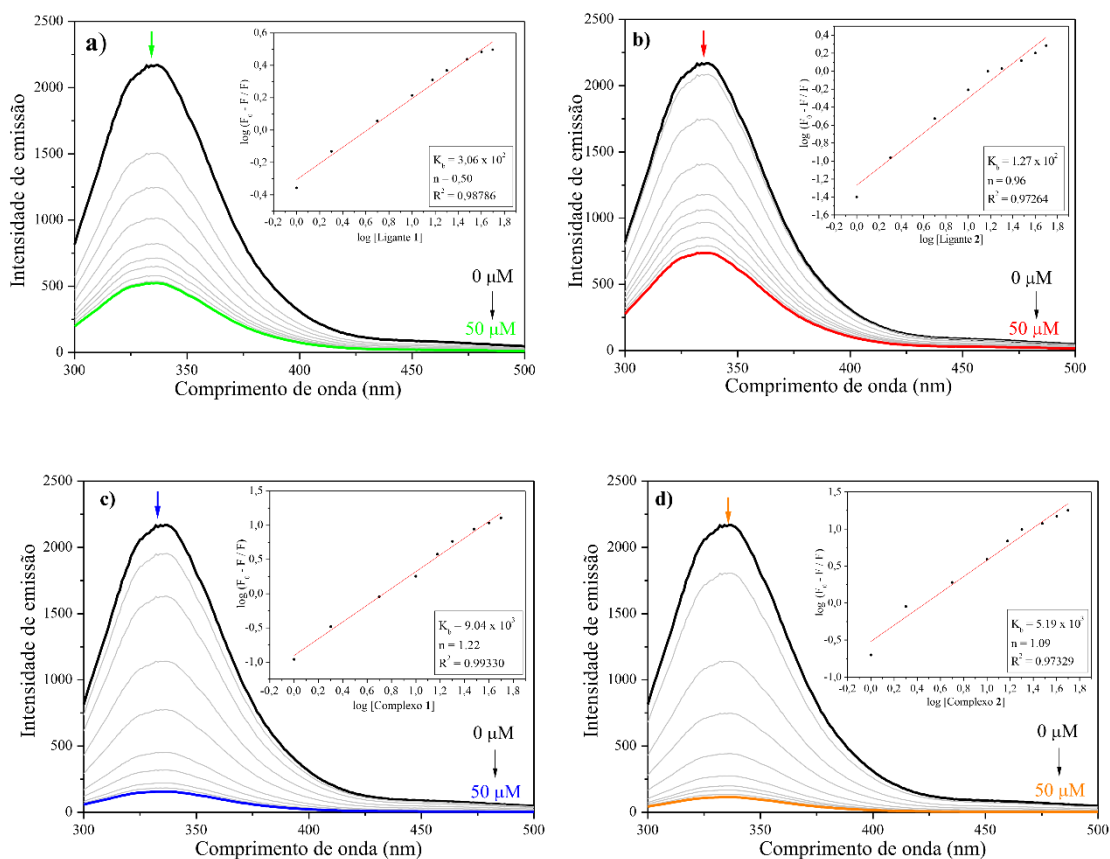
A literatura descreve dois mecanismos diferentes que podem ser responsáveis pela interação entre o triptofano e o supressor: processo dinâmico e/ou estático. A análise de Stern-Volmer é útil na elucidação do mecanismo envolvido no processo de supressão de fluorescência e a constante de Stern-Volmer pode ser obtida pelas seguintes equações [70, 122]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0}$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência no estado estacionário do HSA na ausência e na presença de cada composto, respectivamente. K_{SV} e k_q são as constantes de fluorescência de Stern-Volmer e a constante cinética de fluorescência biomolecular, respectivamente. Os $[Q]$ e τ_0 são a concentração dos compostos e o tempo de vida de fluorescência do HSA na ausência do supressor ($\tau_0 = 5,47 \times 10^{-9}$ s) [122]. Na Tabela 22 estão apresentados os valores de K_{SV} , k_q e K_b para a interação entre HSA e cada ligante e complexo.

Figura 50 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes dos compostos a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_b .



Os valores de K_b para os ligantes e complexos indicam uma interação fraca com o HSA pelo resíduo de triptofano (Trp²¹⁴), visto que se encontram na faixa de 10^3 , as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e a constante cinética biomolecular de Stern-Volmer (k_q) obtidas indicam um mecanismo interação dinâmica para todos os compostos, visto que os valores estão acima de 10^{10} .

Figura 51 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes dos compostos a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_{SV} .

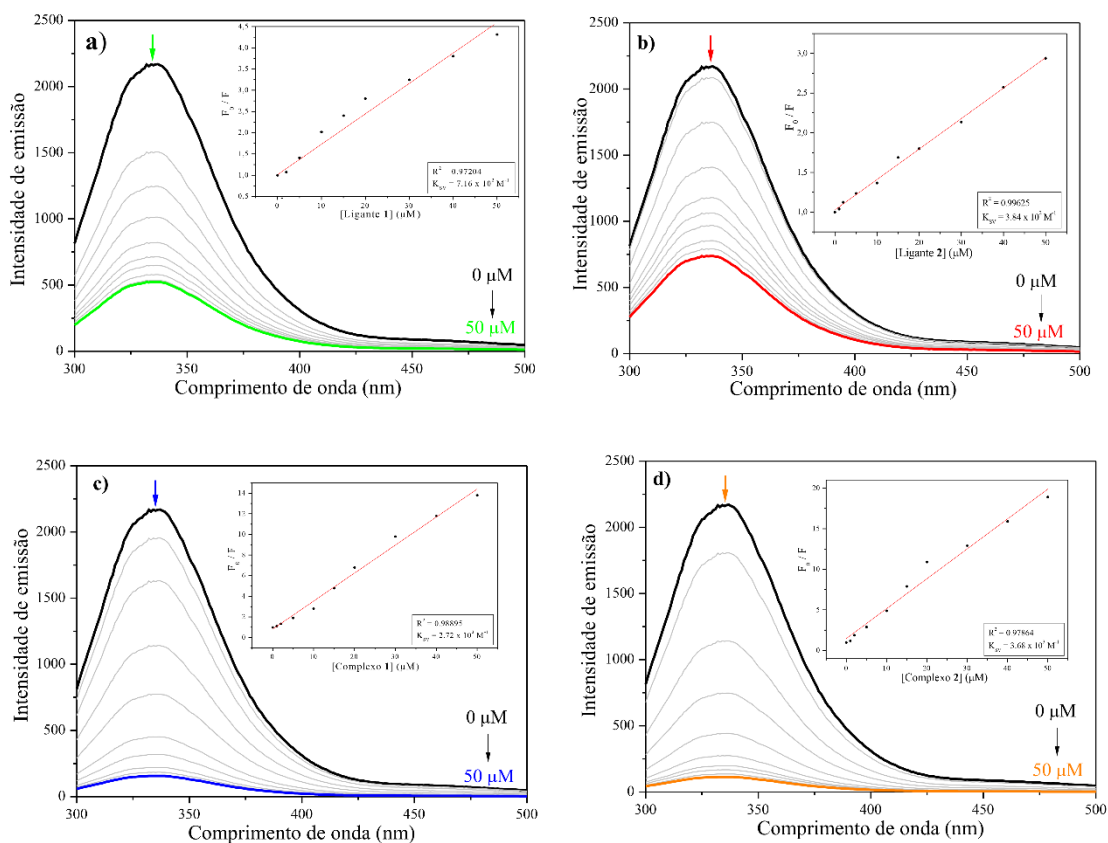


Tabela 22 – Parâmetros de associação para a interação entre HSA e os compostos em temperatura de 37 °C e pH = 7,4.

Compostos	K_b (L.mol ⁻¹)	n	K_{sv} (L.mol ⁻¹)	k_q (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)
Ligante 1	$3,06 \times 10^2$	0,50	$7,16 \times 10^2$	$1,31 \times 10^{11}$	$-1,47 \times 10^4$
Ligante 2	$1,27 \times 10^2$	0,96	$3,84 \times 10^2$	$7,02 \times 10^{10}$	$-1,24 \times 10^4$
Complexo 1	$9,04 \times 10^3$	1,22	$2,72 \times 10^3$	$4,97 \times 10^{11}$	$-2,34 \times 10^4$
Complexo 2	$5,19 \times 10^3$	1,09	$3,68 \times 10^3$	$6,73 \times 10^{11}$	$-2,20 \times 10^4$

5.2.3.3. Interação com HSA: Estudo de *docking* molecular

Cálculos de *docking* molecular também foram empregados para oferecer uma explicação em nível molecular entre cada composto e HSA. Assim como pode ser visto na Tabela 23, a pontuação atribuída aos compostos indica uma preferência dos compostos em se encaixar no sítio III do HSA.

Tabela 23 – Pontuação de *docking* molecular para interação dos compostos com o HSA.

Compostos	Sítio I	Sítio II	Sítio III
Ligante 1	53,86	69,54	85,81
Ligante 2	54,32	69,72	86,58
Complexo 1	46,79	58,71	69,31
Complexo 2	51,51	57,59	67,18

A Figura 52 apresenta a melhor posição para cada ligante e complexo dentro das fitas de DNA e a Tabela 24 mostra as principais forças intermoleculares envolvidas na interação. Os resultados de *docking* molecular sugerem interações de van der Waals como a principal forças entre os resíduos de aminoácidos e os compostos.

Figura 52 – Superposição da melhor posição de encaixe para **a)** HSA:Ligantes e **b)** HSA:Complexos. Ligante **1** (amarelo), Ligante **2** (rosa), Complexo **1** (salmão), Complexo **2** (roxo). Cor dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro, cloro: verde claro e Cu(II): marrom.

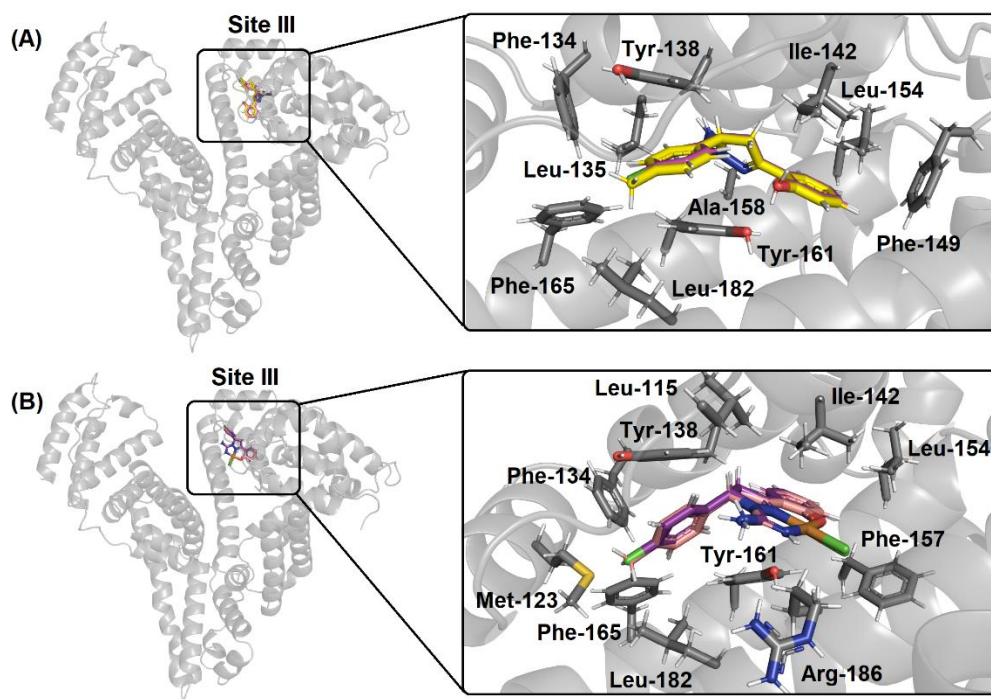


Tabela 24 – Resultados de *docking* molecular para a interação entre HSA e compostos.

Compostos	Resíduo de aminoácido	Interação	Distância (Å)
Ligantes 1 e 2	Phe-134	Van der Waals	2.80
	Leu-135	Van der Waals	2.90
	Tyr-138	Van der Waals	1.10
	Ile-142	Van der Waals	1.80
	Phe-149	Van der Waals	3.50
	Leu-154	Van der Waals	1.70
	Ala-158	Van der Waals	2.00
	Tyr-161	Hydrogen bonding	1.80
	Phe-165	Van der Waals	2.80
	Leu-182	Van der Waals	2.10

Complexos 1 e 2	Leu-115	Van der Waals	2.00
	Met-123	Van der Waals	1.70
	Phe-134	Van der Waals	3.70
	Tyr-138	Van der Waals	2.80
	Ile-142	Van der Waals	3.60
	Leu-154	Van der Waals	3.90
	Phe-157	Van der Waals	2.30
	Tyr-161	Van der Waals	3.70
	Phe-165	Van der Waals	3.40
	Leu-182	Van der Waals	1.60
	Arg-186	Van der Waals	2.40

6. CONCLUSÕES

Sintetizamos dois cristais de Cu^{II} com ligantes pirazolínicos que cristalizaram de forma isoestrutural com geometria aproximadamente quadrática através de dois átomos de nitrogênio e um de oxigênio do ligante, completando a esfera de coordenação por um átomo de cloro.

Os dados obtidos nas medidas de difratometria de raios X estão em consonância com as análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, análise elementar de CHN e espectroscopia de ressonância paramagnética.

No UV-Vis observamos que a banda I correspondente às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ oriundas dos anéis aromáticos, enquanto que a banda (II) está associada a transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$ relacionadas ao grupamento (N-C=NH), tanto nos ligantes livres quanto nos complexos.

Os cálculos de TD-DFT podemos observar que os espectros experimental e teórico corroboram e obtivemos os orbitais de fronteira, sendo que as maiores contribuições são as transições de $\text{H}-4(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$ (50%) e $\text{H}-2(\beta) \rightarrow \text{L}+1(\beta)$ (43%);

Ensaio de fluorescência no estado sólido e em solução demonstraram que todos os compostos apresentam fluorescência e também que esta fluorescência está relacionada as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ oriundas do ligante. Os de tempo de vida de fluorescência mostraram que todos os compostos apresentam tempos de vida muito semelhantes, ou seja, a presença do metal não influencia na fluorescência do ligante. Sendo que em solução os tempos de vida são maiores que no estado sólido. Quando analisamos no estado sólido observamos que este tempo de vida cai pela metade, provavelmente pelo empacotamento no sólido;

No ensaio de toxicidade observamos que para o Complexo **1** e Ligante **1** a complexação não se mostrou favorável, diminuindo os valores de IC_{50} quando comparados. Já para o Complexo **2** e Ligante **2** mostrou-se favorável aumentando os valores de IC_{50} em até 3 vezes. Quando comparamos os complexos com seu sal de partida observamos um aumento significativo na toxicidade.

Ensaio de interação com DNA por absorbância demonstraram que os compostos apresentam uma interação moderada com o DNA. Nos ensaios de competitividade de agentes colorimétricos e os compostos mostraram que ocorre uma interação com maior afinidade pelo sulco menor do DNA.

Os cálculos computacionais demonstraram uma maior afinidade de interação pelo sulco menor. Demonstrando que para o Ligante **1** essa interação ocorria pela DG-4, para o Ligante **2** pela DT-20, para o Complexo **1** pela DG-04 e para o Complexo **2** pela DA-06.

Ensaio de interação com HSA por fluorescência demonstraram que os compostos apresentam uma interação fraca com o HSA com resíduos de triptofano (Trp²¹⁴).

Os cálculos computacionais demonstraram uma maior afinidade de interação pelo sulco III.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MA, Z. MOULTON, B., **Coordination Chemistry Reviews**, 2011, 255, 1623 – 1641.
- [2] DREWRY, J. A., GUNNING, P. T., **Coordination Chemistry Reviews**, 2011, 255, 459 – 472.
- [3] KEPP, K. P., **Chemical Reviews**, 2012, 112 (10), 5193 – 5239.
- [4] KALINOWSKI, D. S., et al., **Journal of Medicinal Chemistry**, 2008, 51 (2), 331 – 344.
- [5] KALINOWSKI, D. S., et al., **Pharmacological Reviews**, 2005, 57 (4), 547 – 583.
- [6] COHEN, S. M., **Current Opinion in Chemical Biology**, 2007, 11 (2), 115 – 120.
- [7] KAIM, W., SCHWEDERSKI, B. KLEIN, A., **Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An introduction and guide**. 2^a Ed. Nova Jersey, EUA: Wiley, 2013.
- [8] MOHAMED, A. A., **Coordination Chemistry Reviews**, 2010, 254 1918 – 1947.
- [9] DEVI, C. S., **Journal of Fluorescence**, 2018, 28, 1195 – 1205.
- [10] ARMSTRONG, C. M., et al. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2003, 6, 1145 – 1156.
- [11] BERNHARDT, P. V., et al. **Dalton Transactions**, 2007, 14, 3232 – 3244.
- [12] NASR, T. et al., **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014, 76, 539 – 548.
- [13] MANTZANIDOU, M., et al., **Molecules**, 2021, 26 (11), 3439 – 3457.
- [14] SHAABAN, M. R., et al., **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 2012, 22 (3), 253 – 291.
- [15] ALEX, K. et al., **Organic Letters**, 2008, 10 (12), 2377 – 2379.
- [16] LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão Concisa**. 5^a Ed., São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2000.
- [17] SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4^a Ed., Porto Alegre – RS: Bookman, 2008.

- [18] REHMAN, M., et al., **Environmental Science and Pollution Research**, 2019, 26, 18003 – 18016.
- [19] SANTINI, C., et al., **Chemical Reviews**, 2014, 114 (1), 815 – 862.
- [20] SILVA, P. P. et al., **Inorganic Chemistry**, 2011, 50 (14), 6414 – 6424.
- [21] PAIXÃO, D. A., et al., **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2017, 172, 138 – 146.
- [22] LINNIK, P. N., BI, N., **Acta Hydrochim: Hydrobiol**, 1984, 12 (4), 335 – 361.
- [23] FLEMMING, C. A., TREVORS, J. T., **Water, Air, and Soil Pollution**, 1989, 44, 143 – 158.
- [24] DAUNTON, M., **The English Historical Review**, 2021, 136, (583), 1665 – 1667.
- [25] TARNOWSKA, M., KRAWCZYK, T., **Biosensors and Bioelectronics**, 2020, 169 (1), 112614.
- [26] BALAMURUGAN, K., SCHAFFNER, W., **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, 1763 (7), 737 – 746.
- [27] COLLINS, J. F., **Present Knowledge in Nutrition**, 2020, 11 (1), 409 – 427.
- [28] BABAK, M. V., AHN, D., **Biomedicines**, 2021, 9 (8), 852.
- [29] PANDEY, M. M., RASTOGI, S., RAWAT, A. K. S., **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 376327.
- [30] HART, E. B., et al., **Journal of Biological Chemistry**, 1928, 77 (2), 797 – 812.
- [31] BOWEN, W. J., **Biological Bulletin**, 1940, 79 (1), 114 – 130.
- [32] BOST, M., et al., **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2016, 35, 107 – 115.
- [33] KAYA, H., et al., **Indian Journal of Animal Research**, 2018, 52 (11), 1623 – 1627.
- [34] YUAN, Y., et al., **Fish & Shellfish Immunology**, 2019, 84, 1059 – 1067.
- [35] JIANG, Y., et al., **Journal of Experimental Medicine**, 2007, 204 (3), 657 – 666.
- [36] MYINT, Z. W., et al., **Annals of Hematology**, 2018, 97, 1527 – 1534.
- [37] BABAK, M. V., AHN, D., **Biomedicines**, 2021, 9 (8), 852.

- [38] JAISER, S. R., WINSTON, G. P., **Journal of Neurology**, 2010, 257 (6), 869 – 881.
- [39] LUTSENKO, S., et al., **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2019, 24, 1179 – 1188.
- [40] PERCIVAL, S. S., **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1998, 67 (suppl), 1064S – 1068S.
- [41] AL-BAYATI, M. A., JAMIL, D. A., AL-AUBAIDY, H. A., **North American Journal of Medical Sciences**, 2015, 7 (2), 41 – 46.
- [42] REHMAN, M., et al., **Environmental Science and Pollution Research**, 2019, 26, 18003 – 18016.
- [43] HORN, N., et al., **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2019, 190, 98 – 112.
- [44] HORN, N., WITTUNG-STAFSHEDE, P., **Biomedicines**, 2021, 9 (4), 391.
- [45] CZŁONKOWSKA, A., et al., **Nature Reviews Disease Primers**, 2018, 4 (21), 1 – 20.
- [46] VAIRO, F. P., et al., **Molecular Genetics and Metabolism**, 2019, 126 (1), 6 – 13.
- [47] STÄTTERMAYER, A. F., et al., **European Journal of Clinical Investigation**, 2019, 49 (8), e13147.
- [48] TAYLOR, A. A., et al., **Environmental Management**, 2019, 65, 131 – 159.
- [49] TABTI, R., et al., **Medicinal Chemistry**, 2017, 7 (5), 875 – 879.
- [50] VO, N. H., et al., **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2014, 130, 69 – 73.
- [51] HADLEY, D., et al., **Leukemia & Lymphoma**, 2016, 57, 2437 – 2440.
- [52] MONK, B. J., et al., **Gynecologic Oncology**, 2018, 151 (3), 422 – 427.
- [53] HASINOFF, B. B., et al., **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2014, 137, 22 – 30.
- [54] HASINOFF, B. B., et al., **Biochemical Pharmacology**, 2015, 93, 266 – 276.
- [55] KOPPENOL, W. H., **Redox Report**, 2001, 6 (4), 229 – 234.
- [56] OWOADE, O., ADETUTU, A., OLORUNNISOLA, O., **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, 2019, 14 (2), 57 – 64.

- [57] GALARIS, D.; EVANGELOU, A., **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 2002, 42 (1), 93 – 103.
- [58] NAGAI, M., et al., **Free Radical Biology and Medicine**, 2012, 52 (10), 2142 – 2150.
- [59] HU, K., et al., **New Journal of Chemistry**, 2017, 41, 2062 – 2072.
- [60] AZAM, M., et al., **Polyhedron**, 2021, 195 (1), 114991.
- [61] ZHANG, H., et al., **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2005, 99 (5), 1119 – 1125.
- [62] KUMAR, K. A., GOVINDARAJU, M., **International Journal of ChemTech Research**, 2015, 8 (1), 313 – 322.
- [63] DIAS, B. B., et al., **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2020, 213, 111277.
- [64] MATIADIS, D., et al., **BioMetals**, 2021, 34, 67 – 85.
- [65] PIZZUTI, L., et al., **Ultrasonics Sonochemistry**, 2010, 17,
- [66] DAMIM, A. C., et al., **Journal of Chemistry**, 2021, 2021, 1 – 9.
- [67] GREENBERG, M. V. C., BOURC'HIS, D., **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2019, 20, 590 – 607.
- [68] WATSON, J. D., CRICK, F. H. C., **Nature**, 1953, 171, 737 – 738.
- [69] TRAVERS, A., MUSKHELISHVILI, G., **The FEBS Journal**, 2015, 282 (12), 2279 – 2295.
- [70] ACUNHA, T. V., CHAVES, O. A., IGLESIAS, B. A., **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 2021, 25, 75 – 94.
- [71] FRANÇA L. T. C., CARRILHO, E., KIST, T. B. L., **Quarterly Reviews of Biophysics**, 2002, 35 (2), 169 – 200.
- [72] NAVARRO, M., et al., **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2003, 8, 401 – 408.
- [73] SHARMA, V., et al., **Current Pharmaceutical Design**, 2021, 27 (1), 15 – 42.
- [74] DONG, Y., et al., **Chemical Reviews**, 2020, 120 (147), 9420 – 9481.
- [75] CHAIRES, J. B., **Current Opinion in Structural Biology**, 1998, 8 (3), 314 – 320.

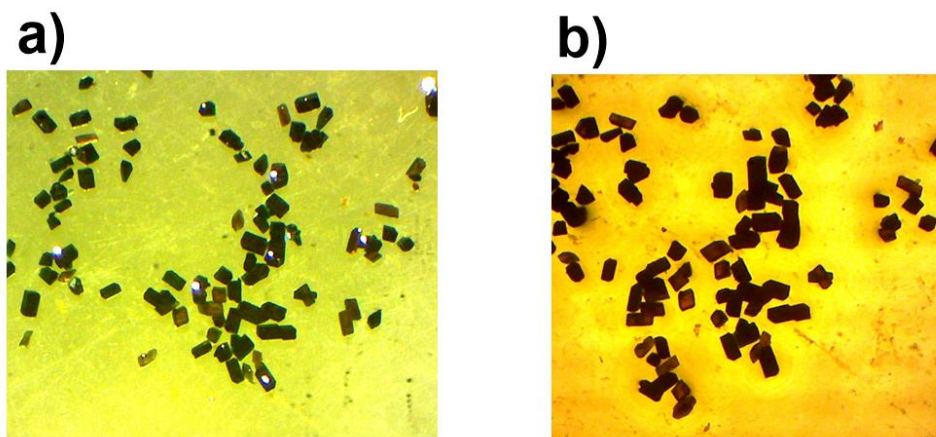
- [76] HARDIE, M. E., HIERONIMUS; K. W., MURRAY, V., **Current Pharmaceutical Design**, 2016, 22 (44), 6645 – 6664.
- [77] RABBANI, G., AHN, S. N., **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019, 123 (15), 979 – 990.
- [78] ARQUES, S., **European Journal of Internal Medicine**, 2018, 52, 8 – 12.
- [79] QIU, H. Y., et al., **World Journal od Diabetes**, 2021, 12 (7), 1057 – 1069.
- [80] SUDLOW, G., BIRKETT, D. J., E WADE, D. N. **Molecular Pharmacology**. 1975, 11, 824 – 832.
- [81] WŁOCH, A. et al., **Scientific Reports**, 2021, 11, 16003.
- [82] YAMASAKI, K., et al., **Biochimica et Biophysica Acta**, 2013, 1830 (12), 5435 – 5443.
- [83] TOPALĂ, T., **Clujul Medical**, 2014, 87 (4), 215 – 219.
- [84] KRAGH-HANSEN, U., **Biochimica et Biophysica Acta**, 2013, 1830 (12) 5535 – 5544.
- [85] NA, N., et al. **Molecules**, 2016, 21, 1 – 14.
- [86] CHAVES, O. A., et al. **Molecules**, 2015, 20, 19526 – 19539.
- [87] SAEIDIFAR, M., MANSOURI-TORSHIZI, H., SABOURY, A. A., **Journal of Luminescence**, 2015, 167, 391 – 398.
- [88] WEBB, M. I., **Chemistry - A European Journal**, 2013, 19 (50), 17031 – 17042.
- [89] ROSS, P. D. E SUBRAMANIAN, S., **Biochemistry**, 1981, 20, 3096 – 3102.
- [90] ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. D., **Purification of Laboratory Chemicals**, 4^a Ed. Grã Bretanha: Butterworth-Heinemann, 2000.
- [91] SHELDRICK, G. M. SHELXS-97 E SHELXL2014, programs for the solution and refinement of crystal structures. Goettingen, 1997 e 201.
- [92] LEE, C., YANG, W., PARR, R. G., **Physical Review B**, 1988, 37 (2), 785 – 789.
- [93] BECKE, A. D. **Journal Chimical Physics**, 1993, 98, 5648 – 5652.
- [94] M. J. FRISCH, et. al., **Gaussian 09**, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

- [95] HANWELL, M. D; CURTIS, D. E; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R.; CHEMINFOR, J. 2012.
- [96] MOSMANN, T., **Journal of Immunological Methods**, 1983, 65 (1 – 2), 55 – 63.
- [97] SAYED, M., KRISHNAMURTHYA, B.,PAL, H., **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2016, 18, 24642 – 24653.
- [98] ESTANDARTE, A. K., et al., **Scientific Reports**, 2016, 6, 31417.
- [99] DREW, H. R., et al., **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1981, 78 (4), 2179 – 2183.
- [100] <http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>, accessed in February 2022.
- [101] BESSEGA, T., et al., **Inorganica Chimica Acta**, 2019, 496, 119049.
- [102] CHAVES, O. A., MENEZES, L. B., IGLESIAS, B. A., **Journal of Molecular Liquids**, 2019, 294 (15), 111581.
- [103] CHAVES, O. A., et al., **Journal of Molecular Liquids**, 2020, 301, 112466.
- [104] DE BARROS, W. A., et al., **Current Research in Toxicology**, 2021, 2, 386 – 398.
- [105] ACUNHA, T. V., et al., **Journal of Molecular Liquids**, 2021, 340, 117223.
- [106] <https://pymol.org/2/>, accessed in February 2022
- [107] WARDELL, M., et al., **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 2002, 291, 813 – 819.
- [108] CÂMARA, V. S., et al., **Journal of Molecular Liquids**, 2022, 349, 118084.
- [109] PIZZUTI, L., et al. **Ultrason Sonochem**, 2010, 17 (1), 34 – 37.
- [110] ALBUQUERQUE, D. Y, et al. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020, 31(4), 746-755.
- [111] HAHN, T.; **International Tables for Crystallography**, Vol. A Space-Group Symmetry, 2nd ed.; The International Union of Crystallography, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1987.

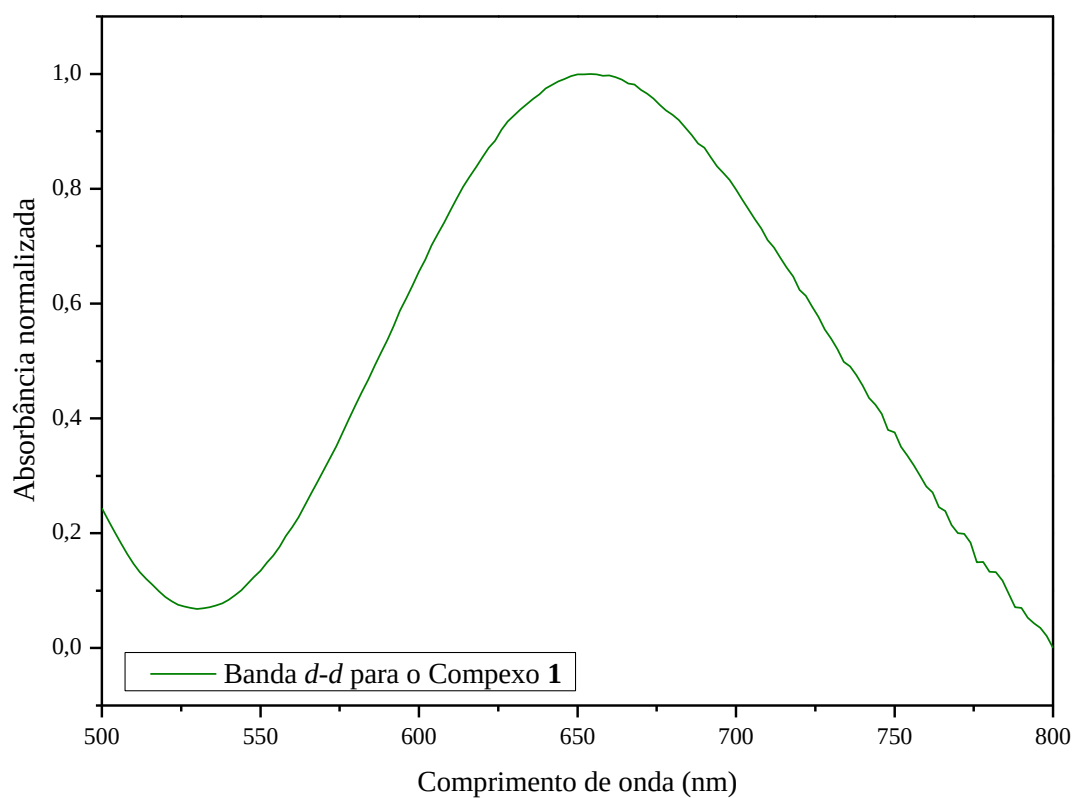
- [112] BRANDEMBURG, K.; BERNDT, M.; Journal of Applied Crystallography. 1999 (32) 1028. “**DIAMOND**: Visual Crystal Structure Information System”.
- [113] FARRUJIA, L. J.; **ORTEP-3**, Program for Ellipsoid Representation of Crystal Structures, J. Appl. Cryst. 1997
- [114] SHELDRICK, G. M., **Acta Crystallographica Section C**, 2015, C71, 3 – 8.
- [115] FARRUGIA, L. J., **Journal of Applied Crystallography**, 2012, 45, 849 – 854.
- [116] MACRAE, C. F., et al., **Journal of Applied Crystallography**, 2020, 53, 226 – 235.
- [117] GODLEWSKA, S., et al., **Polyhedron**, 2013, 65 (28), 288 – 297.
- [118] FORMICA, M., et al., **Coordination Chemistry Reviews**, 2012, 256 (1 – 2), 170 – 192.
- [119] BEREZIN, M. Y., ACHILEFU, S., **Chemical Reviews**, 2010, 110 (5), 2641 – 2684.
- [120] ZHANG, Y., et al. **Luminescence**, 2015, 30, 1045 – 1054.
- [121] SOHRABI, N. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2015, 7, 533 – 537.
- [122] STEFANELLO, F. S., et al., **Journal of Molecular Liquids**, 2021, 324, 114729.
- [123] WEI, Y., THYPARAMBIL, A. A., LATOUR, R. A., **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014, 1844 (12), 2331 – 2337.

8. ANEXOS

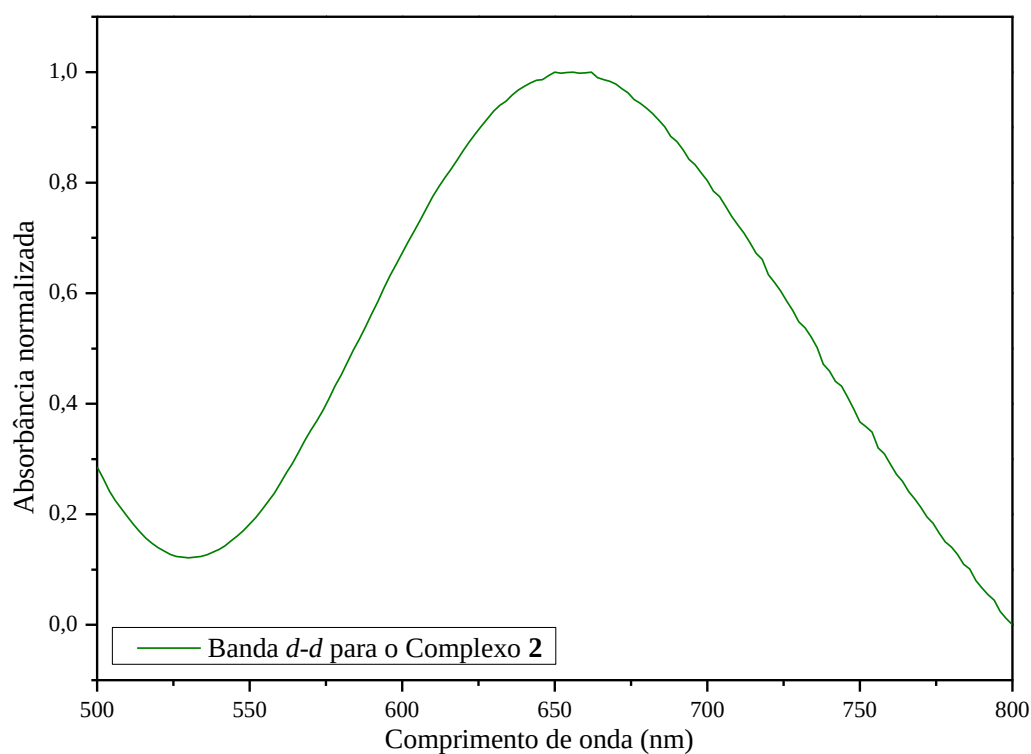
Anexo 1 – Fotos dos cristais **a)** Complexo 1 **b)** Complexo 2.



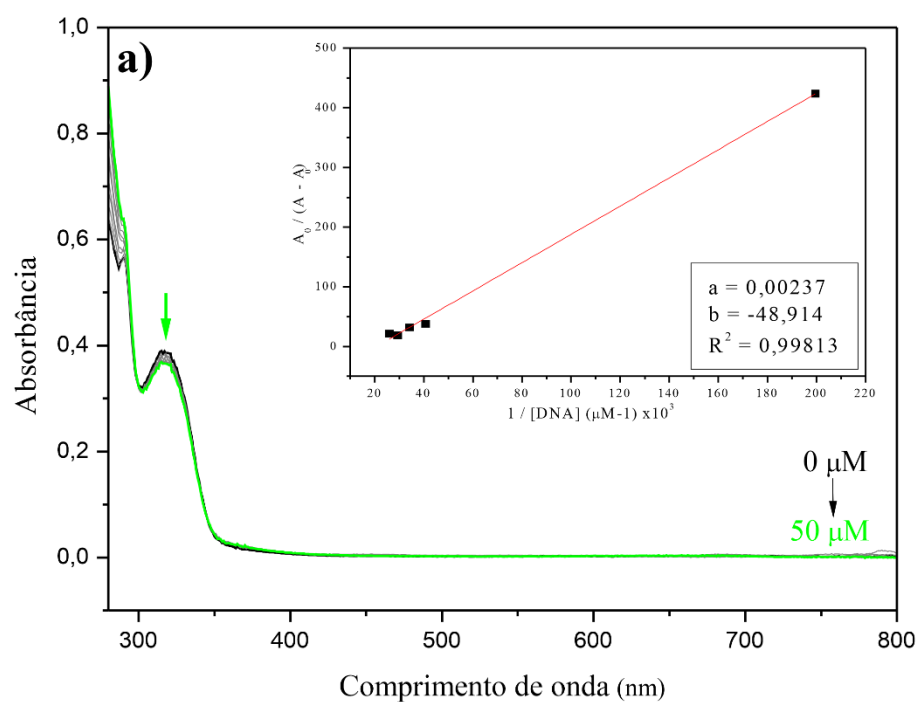
Anexo 2 – Espectro de UV-Vis de 500 – 800 nm elucidando a banda *d-d* do Cu^{II} para o Complexo 1 (Concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)



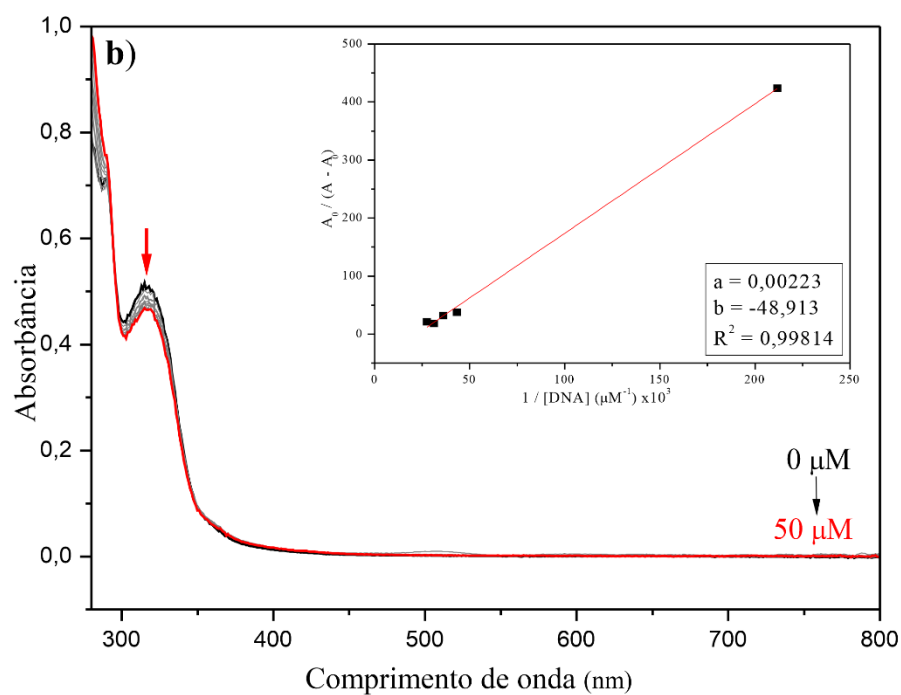
Anexo 3 – Espectro de UV-Vis de 500 – 800 nm elucidando a banda *d-d* do Cu^{II} para o Complexo 2 (Concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)



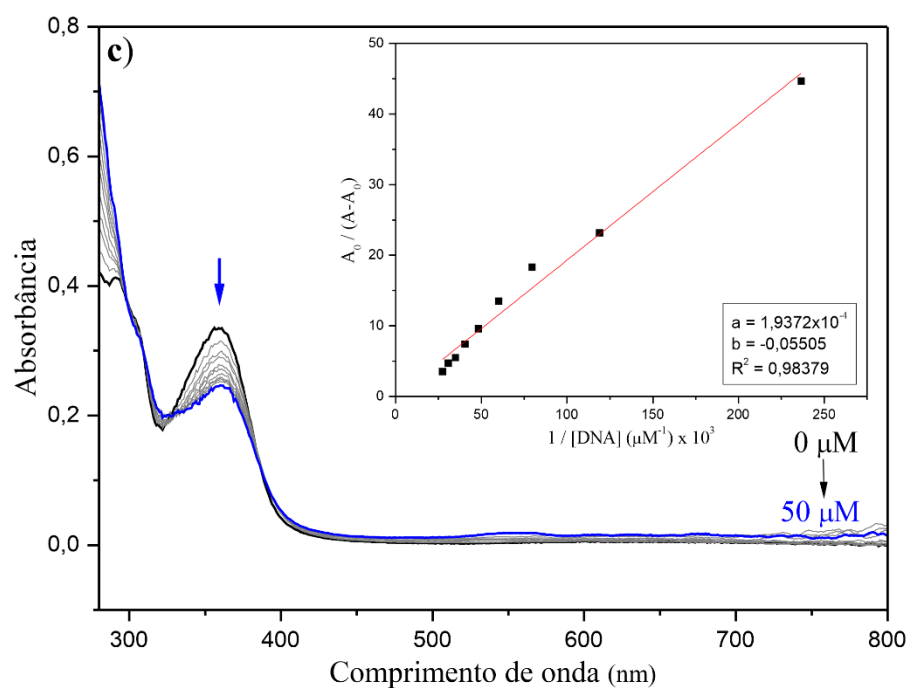
Anexo 4 – Espectro de absorção eletrônica do Ligante 1 com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.



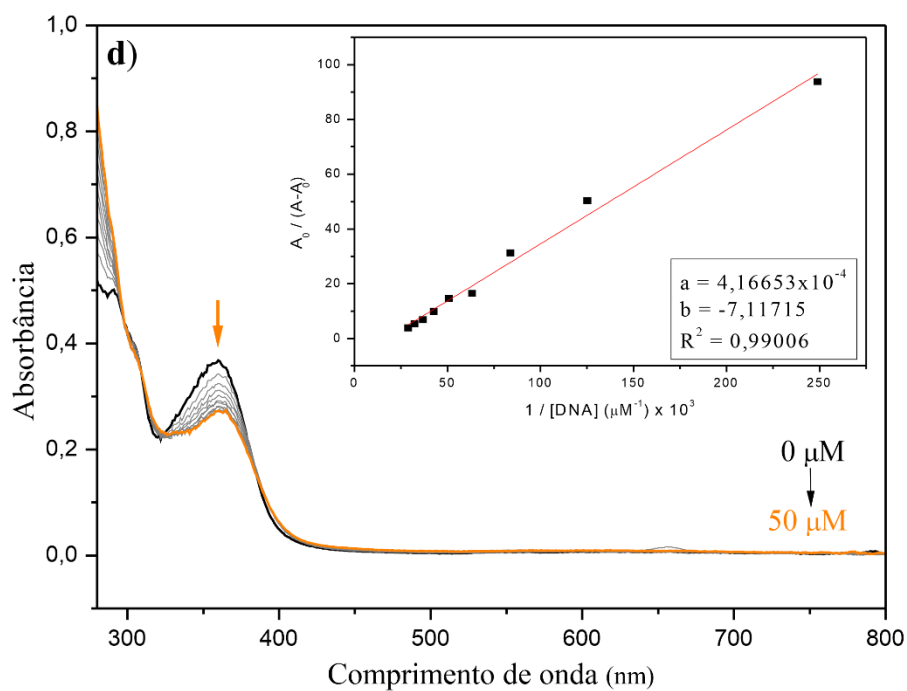
Anexo 5 – Espectro de absorção eletrônica do Ligante **2** com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.



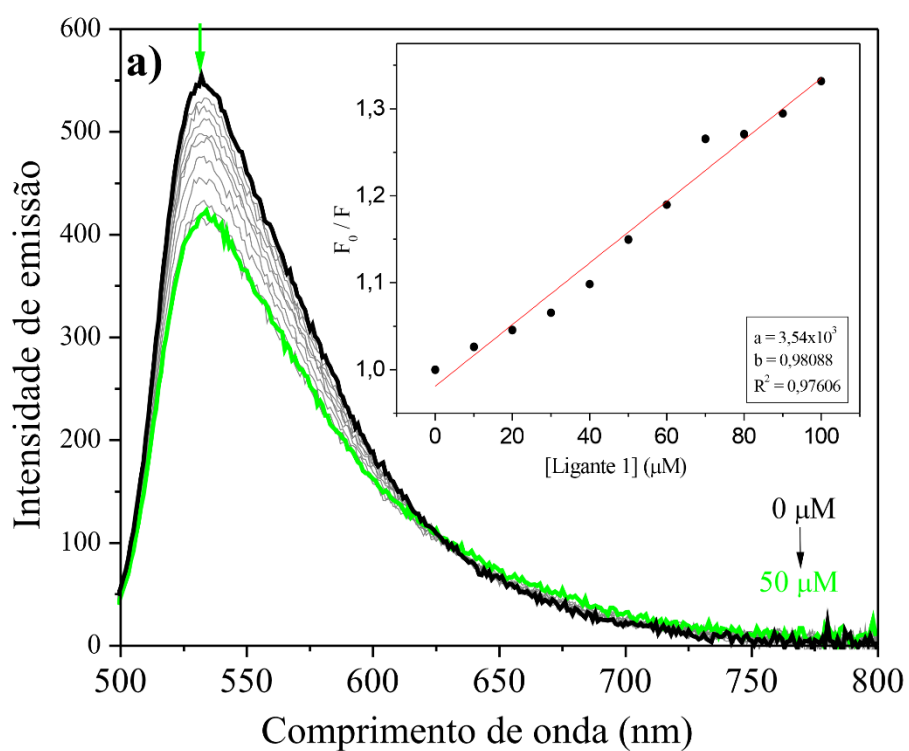
Anexo 6 – Espectro de absorção eletrônica do Complexo **1** com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.



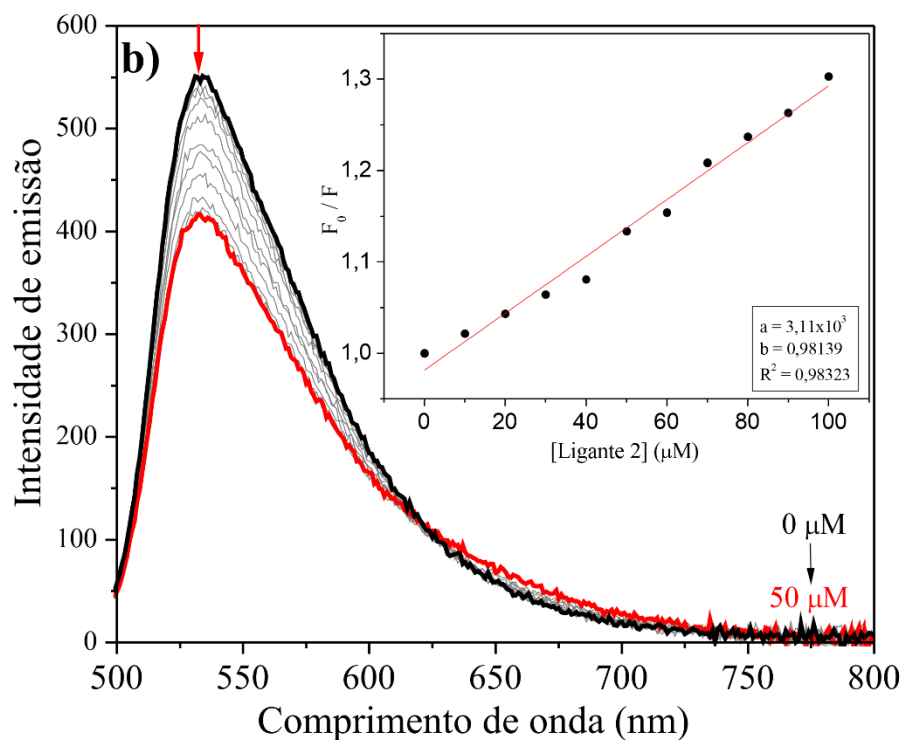
Anexo 7 – Espectro de absorção eletrônica do Complexo **2** com adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.



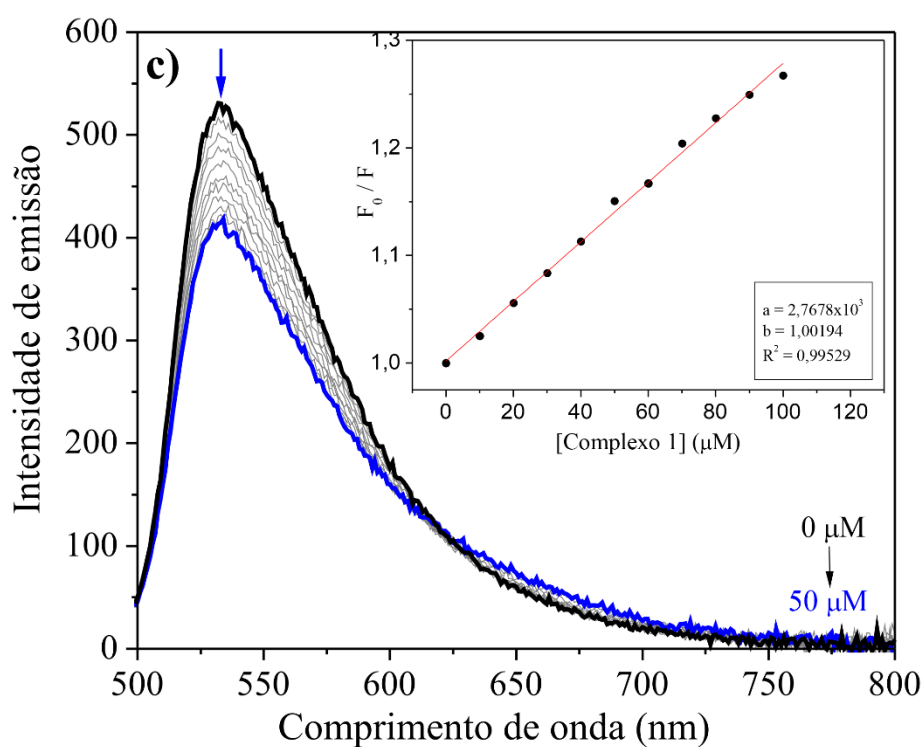
Anexo 8 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Ligante **1** em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4)..



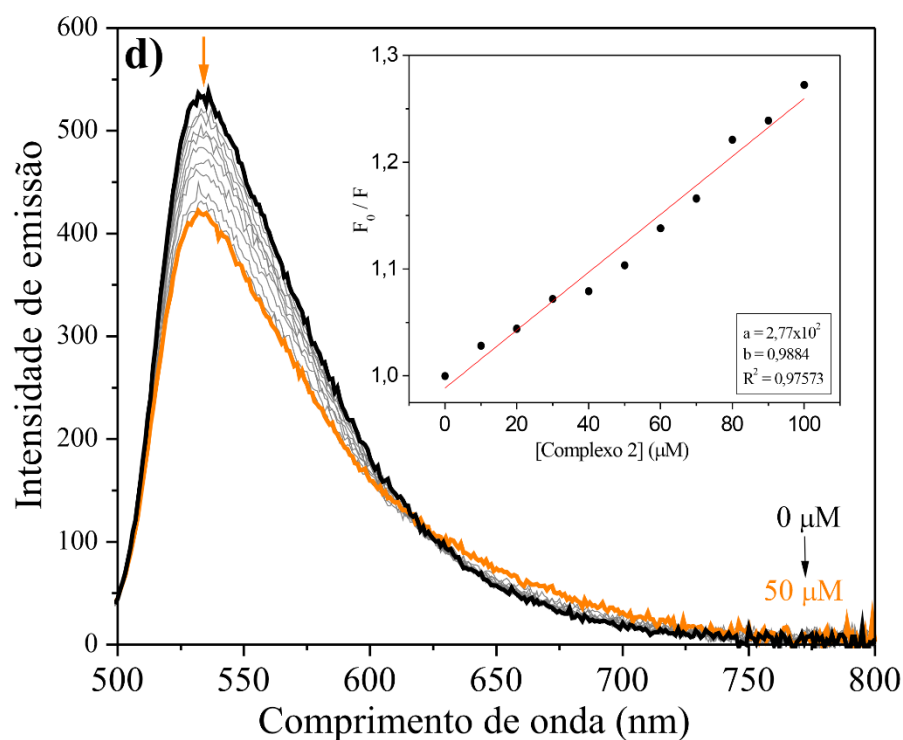
Anexo 9 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Ligante 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



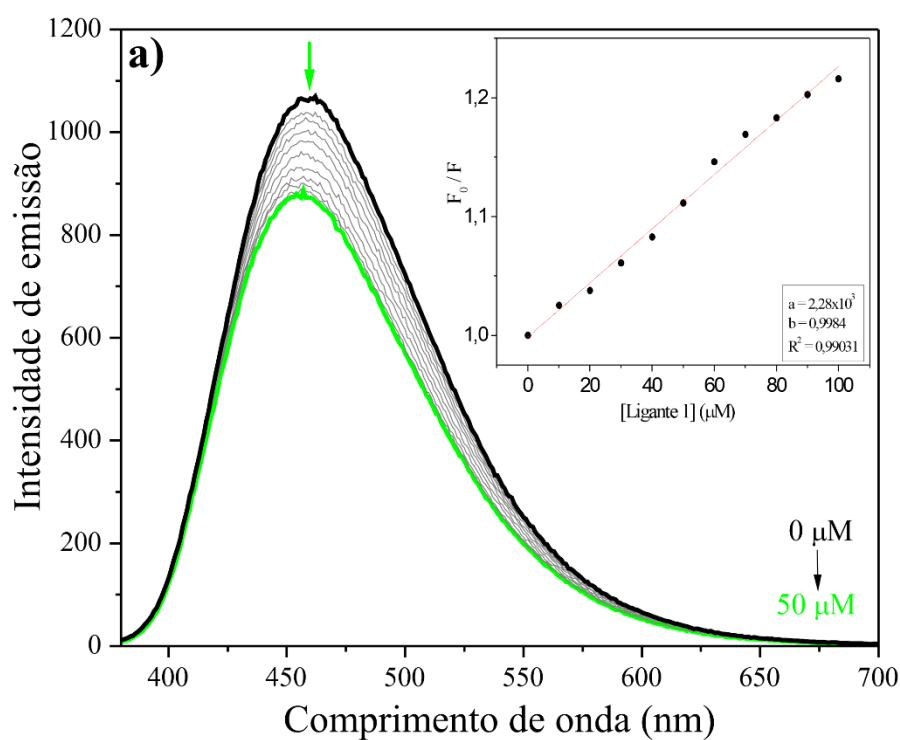
Anexo 10 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Complexo 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



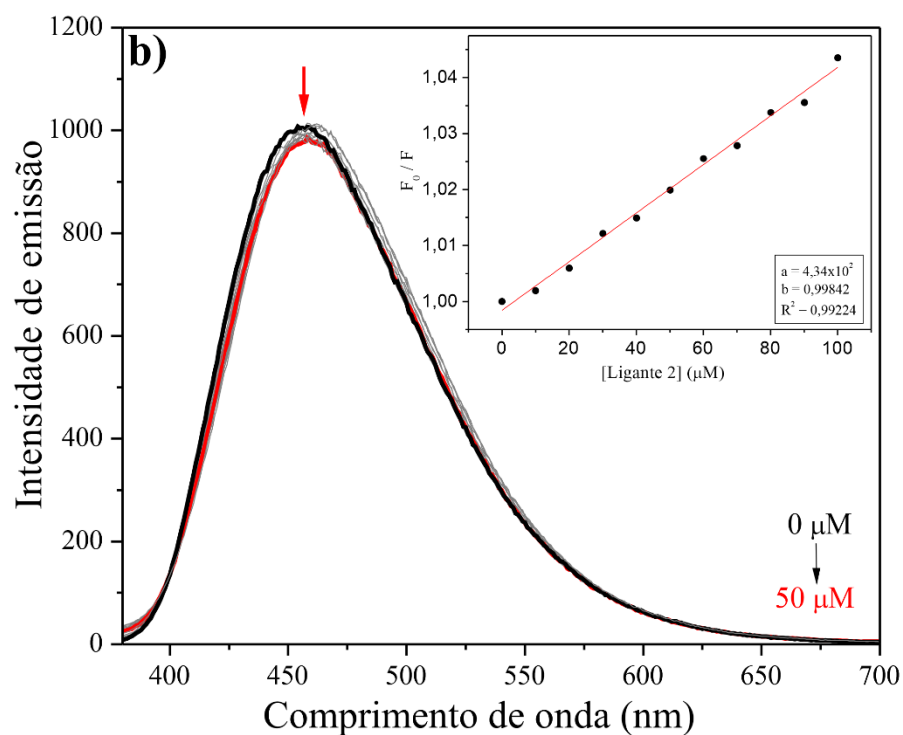
Anexo 11 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:AO e Complexo 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



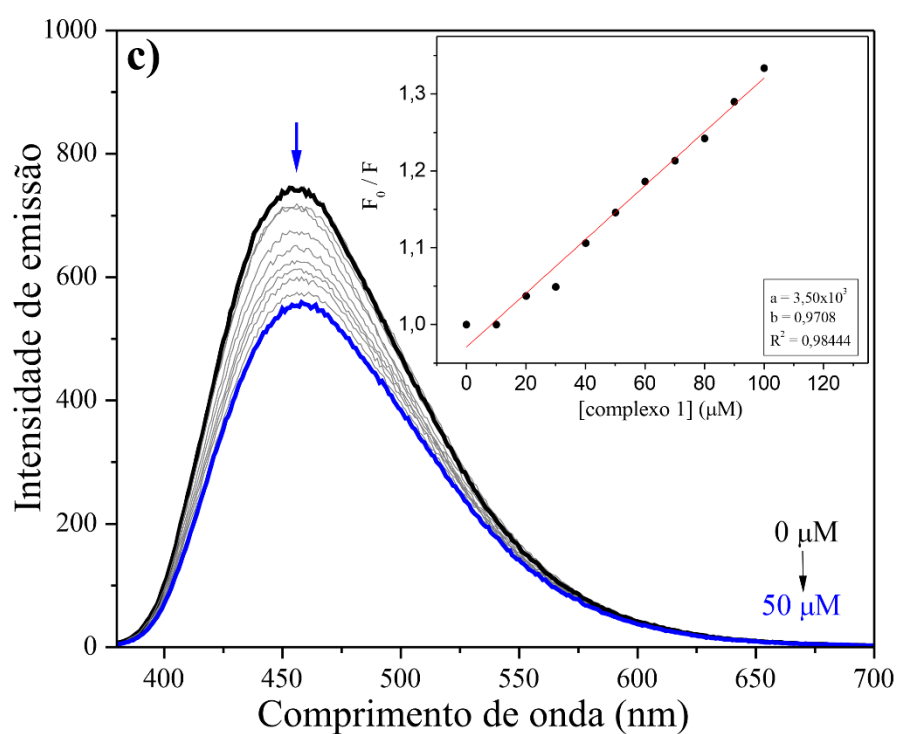
Anexo 12 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Ligante 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



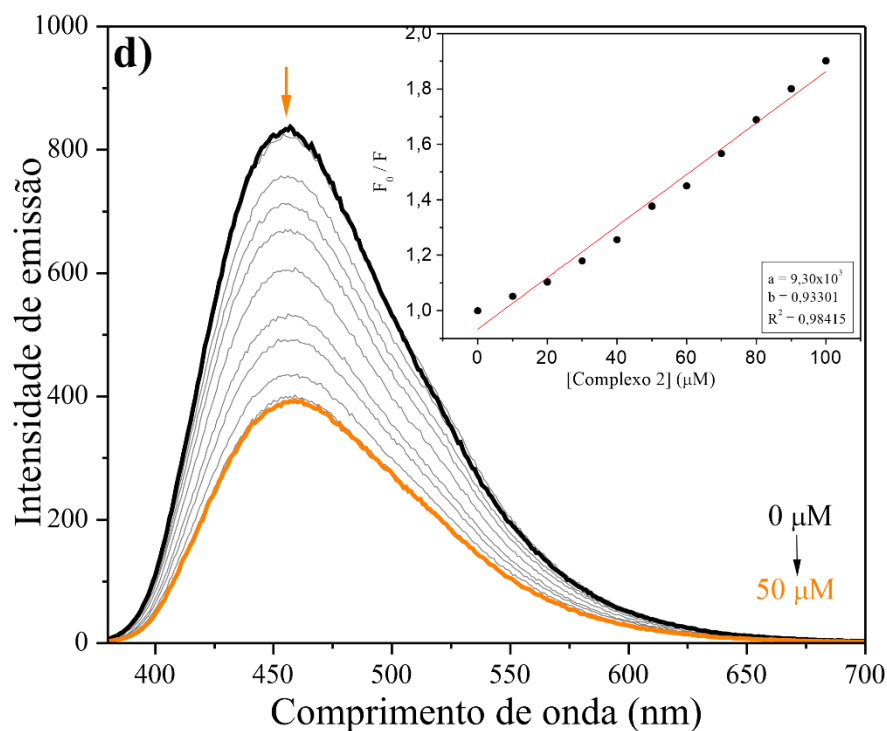
Anexo 13 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Ligante 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



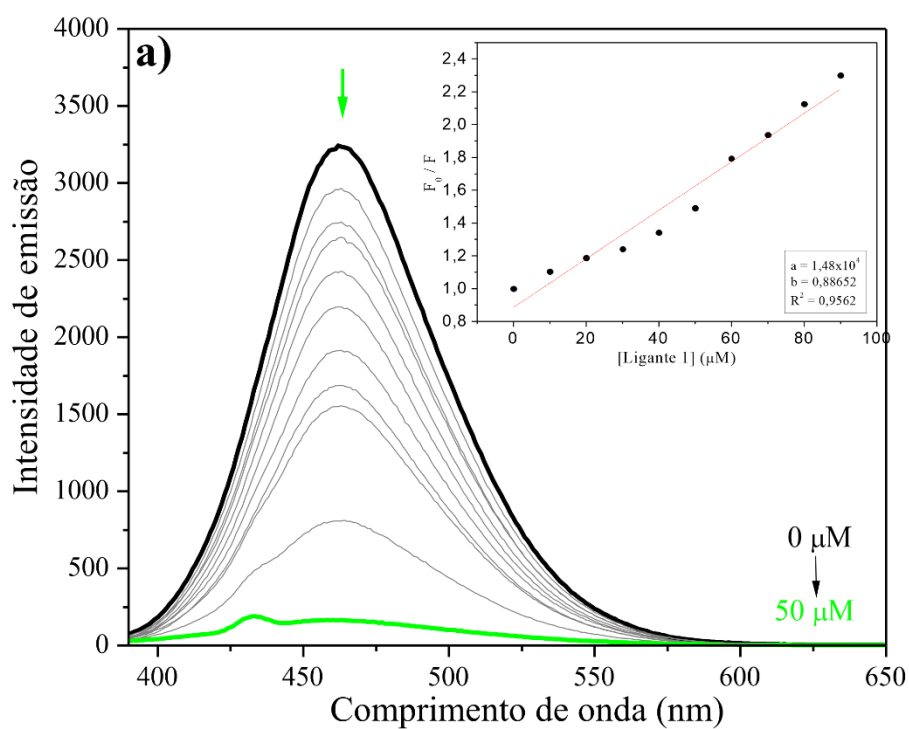
Anexo 14 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Complexo 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



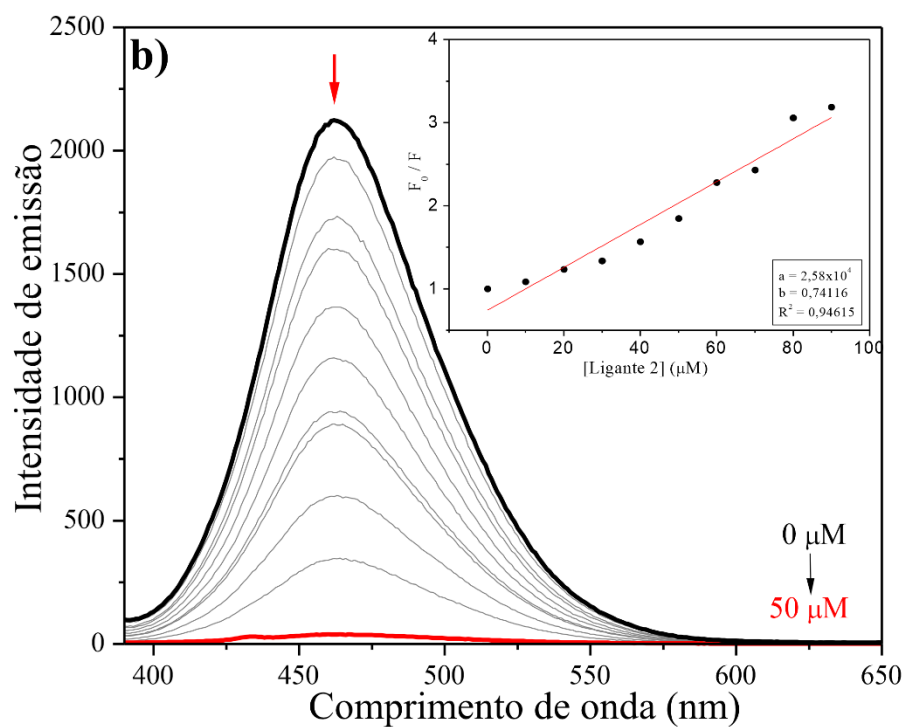
Anexo 15 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:DAPI e Complexo 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



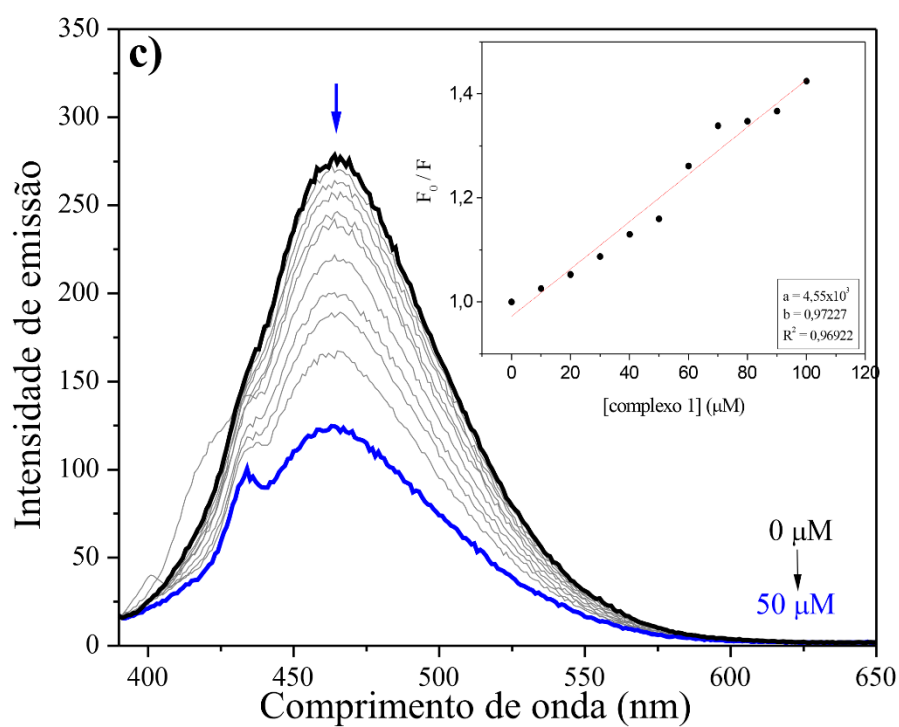
Anexo 16 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Ligante 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



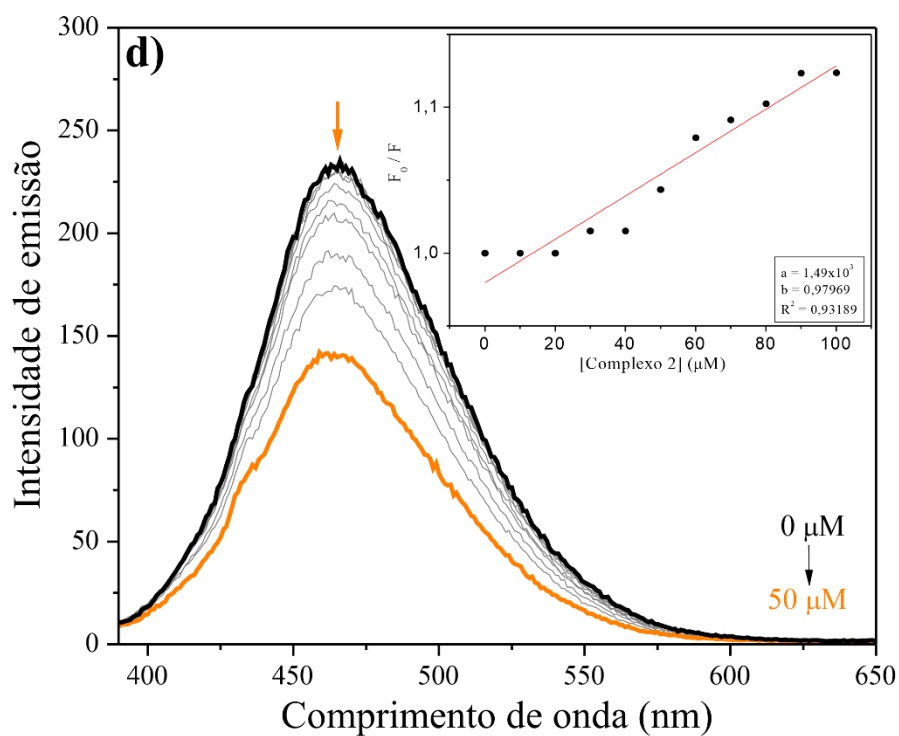
Anexo 17 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Ligante 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



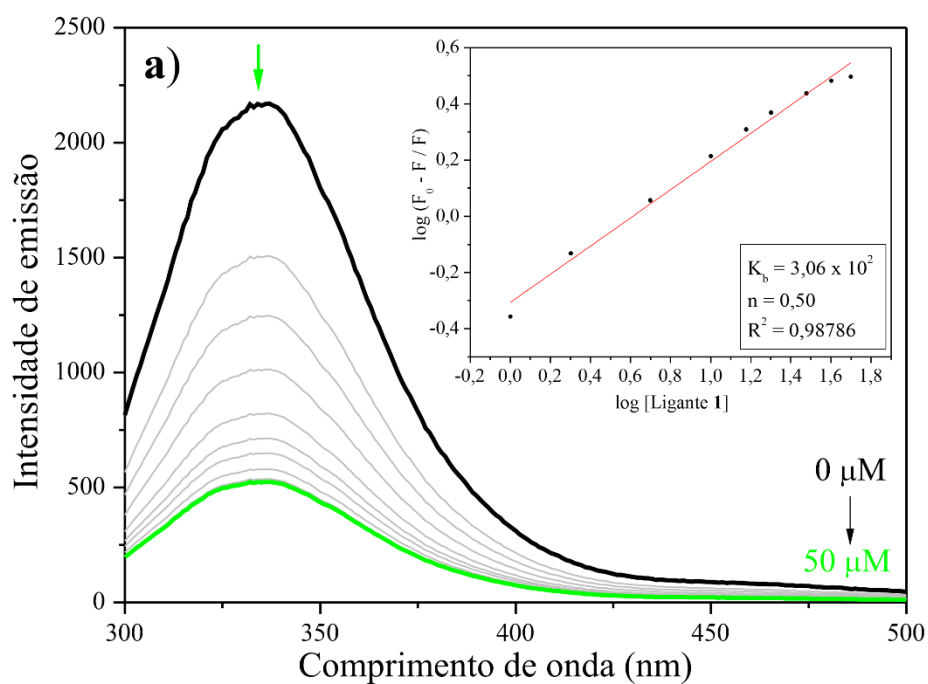
Anexo 18 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Complexo 1 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



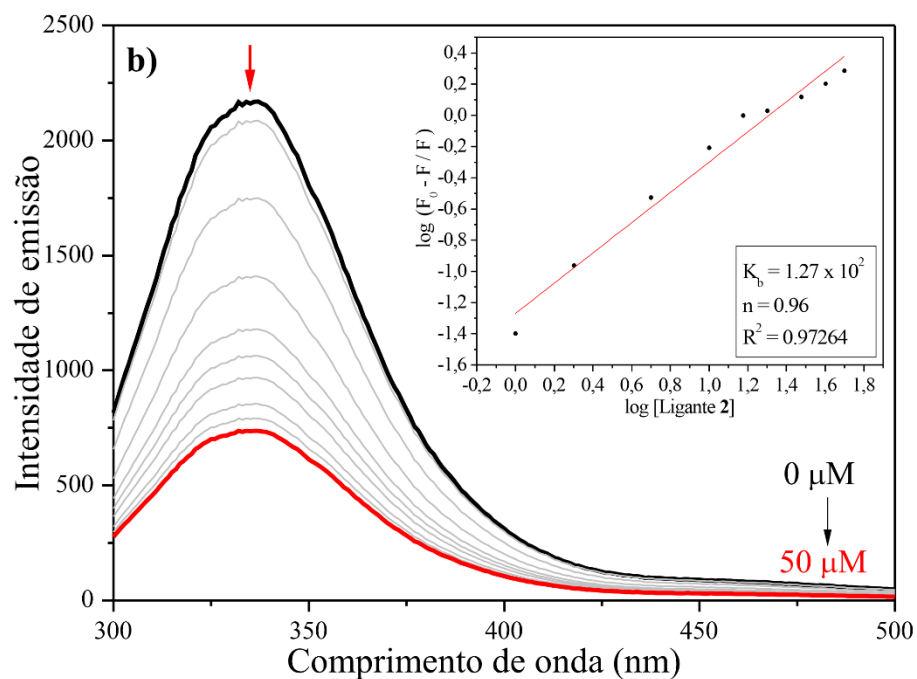
Anexo 19 – Espectros de fluorescência resultantes da interação entre o aduto DNA:MG e Complexo 2 em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4).



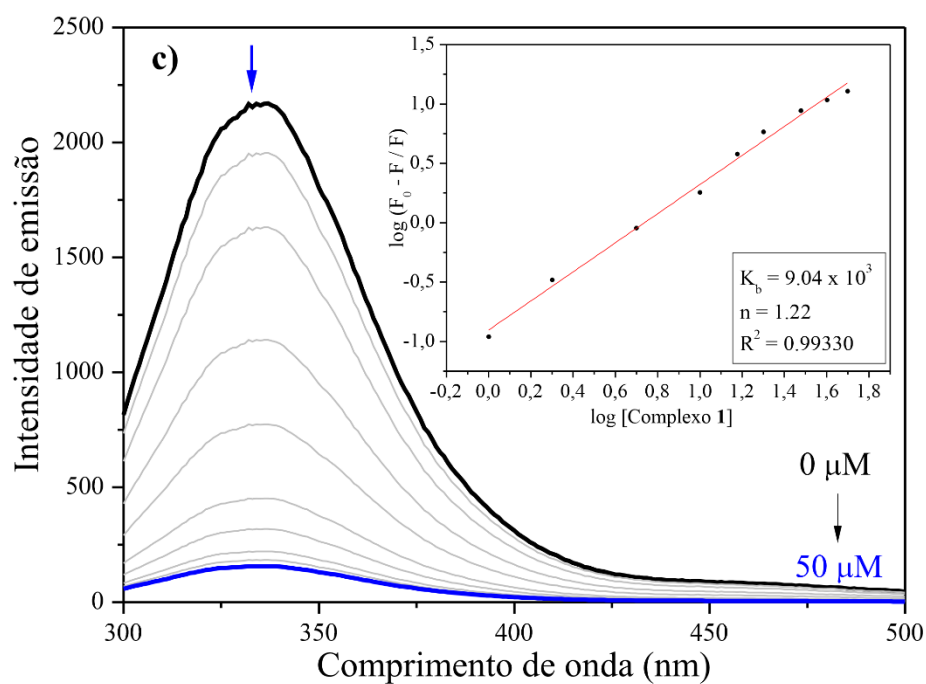
Anexo 20 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 1 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_b .



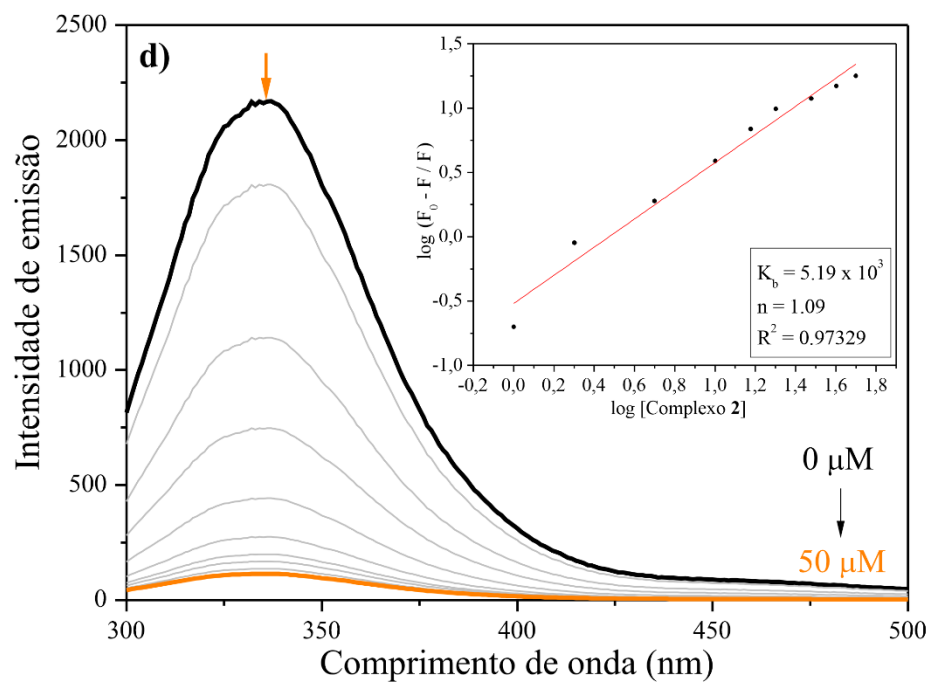
Anexo 21 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 2 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_b .



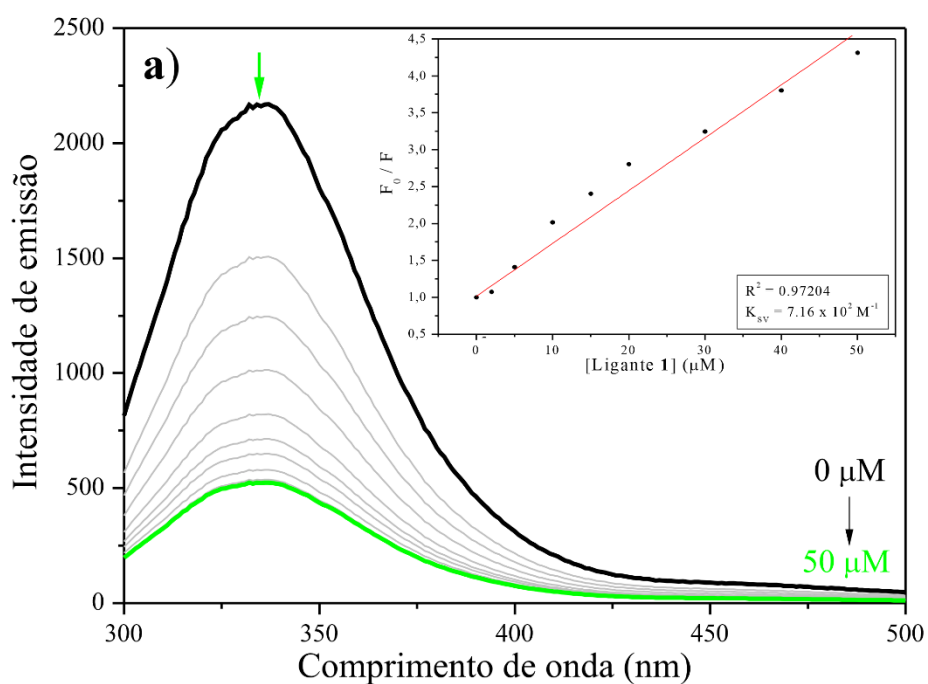
Anexo 22 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 1 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_b .



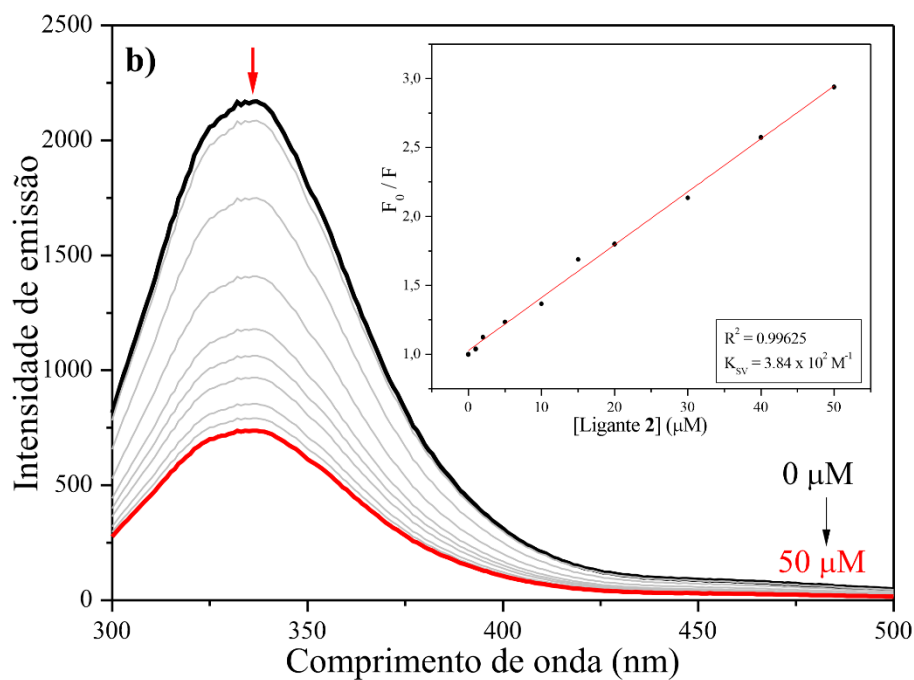
Anexo 23 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 2 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_b .



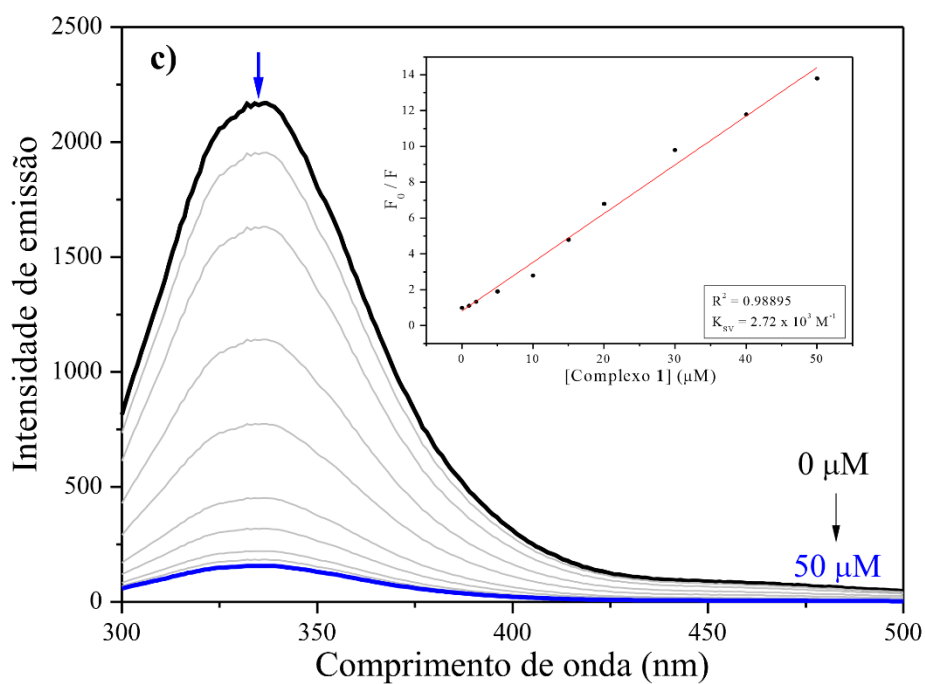
Anexo 24 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 1 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_{sv} .



Anexo 25 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Ligante 2 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de Ksv.



Anexo 26 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 1 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de Ksv.



Anexo 27 – Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes do Complexo 2 a 37 °C, em DMSO com *plot* para cálculo de K_{sv}.

