



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAQUEL OLIVEIRA NASCIMENTO DE FREITAS

**Prospecção Química e Biológica de Novos Complexos de Cu^{2+} e Ag^+
Baseados em Ligantes Contendo o Grupo Farmacofórico 1,4-dioxo-butenil**

Dourados - MS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAQUEL OLIVEIRA NASCIMENTO DE FREITAS

**Prospecção Química e Biológica de Novos Complexos de Cu^{2+} e Ag^+
Baseados em Ligantes Contendo o Grupo Farmacofórico 1,4-dioxo-butenil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira

Dourados - MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F866p Freitas, Raquel Oliveira Nascimento De
Prospecção química e biológica de novos complexos de Cu²⁺ e Ag⁺
baseados em ligantes contendo o grupo farmacofórico 1,4-dioxo-butenil /
Raquel Oliveira Nascimento De Freitas -- Dourados: UFGD, 2018.
66f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva Gomes
Co-orientador: Cláudio Rodrigo Nogueira

Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e
Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. Síntese. 2. Cobre. 3. Prata. 4. 1,4-dioxo-butenil. 5. Câncer. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Prospecção Química e Biológica de Novos Complexos de Cu^{2+} e Ag^+ Baseados em Ligantes Contendo o Grupo Farmacofórico 1,4-dioxo-butenil", de autoria de Raquel Oliveira Nascimento de Freitas, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Roberto da Silva Gomes (Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Vieira de Lima
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 06 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família e meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando a seguir os meus próprios caminhos, que com muita compreensão e amor nunca deixaram de acreditar no meu potencial.

“Quando Deus está presente em nossas vidas, a nossa fé é maior que nossos medos e a nossa determinação é maior do que quaisquer obstáculos.”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me deixar faltar as forças necessárias para seguir em frente, nem mesmo nos momentos mais difíceis. À minha família e amigos de dentro e fora da Universidade, em especial a meu marido, Lucas, por me apoiar na decisão de continuar a estudar, com o objetivo de obter um futuro melhor, e aos meus pais, por sempre me incentivarem a estudar, enquanto eles não tiveram a mesma oportunidade.

Agradeço ao professor Dr. Roberto da Silva Gomes, pela orientação durante a realização deste trabalho, sempre com muita compreensão e flexibilidade.

Ao professor Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira pela coorientação, por todos os ensinamentos e apoio.

A todos os professores que de uma forma ou de outra me ajudaram a concluir este trabalho, transferindo conhecimento, incentivo e confiança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AA	- 4-Aminoantipirina
δ	- Deslocamento químico
v	- Estiramento
aa	- Aminoácido
AAA	- Acetilaminoantipirina
Ala	- Alanina
Dmg	- 2,2-dimetilglicina
FAA	- Formolaminoantipirina
Gly	- Glicina
IC ₅₀	- Concentração que inibe 50% da viabilidade das células
IV	- Infravermelho
MAA	- 4-Metilaminoantipirina
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHC	- Carbenos <i>N</i> -heterocíclicos
Phen	- 1,10-fenantrolina
RMN de ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
Sar	- Sarcosina
TG	- Análise termogravimétrica
Trp	- Triptofano
UFMS	- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de IV do ligante 1.	37
Tabela 2 – Dados de IV do ligante 2.	38
Tabela 3 – Dados de IV do ligante 3.	40
Tabela 4 – Dados de IV do ligante 4.	41

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Síntese dos ligantes.....	30
Esquema 2 – Mecanismo proposto para a obtenção dos ligantes 1-4.	34
Esquema 3 – Redução do MTT à Formazan.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das substâncias derivadas do ácido maleâmico.....	15
Figura 2 – Estrutura da cisplatina.....	17
Figura 3 – Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{NO}_3$	19
Figura 4 – Estrutura dos complexos $\text{Cu}(\text{L}1)\text{Cl}_2$, $\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}_2$ e $\text{Cu}(\text{L}3)\text{Cl}_2$	20
Figura 5 – Estrutura dos complexos $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{aa})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ (1-4).....	21
Figura 6 – Estrutura dos ligantes análogos à neocriptolepina.....	21
Figura 7 – Estrutura do complexo $\text{CuSn}_2(\text{Trp})$	22
Figura 8 – Estrutura dos complexos de $\text{Ag}(\text{I})$ com ligantes de piridina 2,6-dissubstituídos.....	23
Figura 9 – Estrutura dos complexos com NHC.....	23
Figura 10 – Estrutura do complexo de prata ($\text{Ag}8$).....	24
Figura 11 – Estrutura da 4-AA.....	24
Figura 12 – Metabolismo da dipirona.....	25
Figura 13 – Estrutura das substâncias análogas à 4-AA.....	25
Figura 14 – Estrutura das substâncias heterocíclicas baseadas na 4-AA.....	26
Figura 15 – Estrutura do complexo de cobre (II) formado com análogo da 4-AA.....	26
Figura 16 – Estrutura das chalconas.....	27
Figura 17 – Estrutura dos derivados M2 e M7.....	28
Figura 18 – Estrutura química dos ligantes 1-4.....	34
Figura 19 – Mecanismo proposto para a obtenção dos ligantes 1-4. Erro! Indicador não definido.	
Figura 20 – Espectros de IV do ligante 1 e seus complexos com Cu e Ag.....	36
Figura 21 – Espectros e IV do ligante 2 e seus complexos de Cu e Ag.....	38
Figura 22 – Espectros de IV do ligante 3 e seus complexos com Cu e Ag.....	40
Figura 23 – Espectros de IV do ligante 4 e seu complexo com Cu.....	41
Figura 24 – Curva TG do complexo $\text{CuL}1$	43
Figura 25 – Curva TG do complexo $\text{CuL}2$	44
Figura 26 – Curva TG do complexo $\text{CuL}3$	44
Figura 27 – Curva TG do complexo $\text{CuL}4$	45
Figura 28 – Curva TG do complexo $\text{AgL}1$	46
Figura 29 – Curva TG do complexo $\text{AgL}2$	47
Figura 30 – Curva TG do complexo $\text{AgL}3$	47
Figura 31 – Histograma da atividade biológica anticâncer pelo ensaio do MTT.....	49

RESUMO

O câncer é um grande problema de saúde pública, sendo necessário um constante esforço no desenvolvimento de novas formas de combatê-lo. Neste trabalho foi realizada a síntese de novos complexos de cobre (II) e prata (I), os quais contêm o grupo 1,4-dioxo-butenil, com o objetivo de se obter fármacos quimioterápicos tão eficientes quanto a cisplatina, porém com menor toxicidade às células saudáveis. As sínteses foram efetuadas em duas etapas, em que a primeira consiste na obtenção dos ligantes a partir da reação do anidrido maleico com anilinas substituídas e com a 4-aminoantipirina e a segunda se trata da obtenção dos complexos a partir da reação dos ligantes com os sais de cobre (II) e prata (I). A caracterização das substâncias foi realizada por meio de dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , por Espectroscopia de Infravermelho e Análise Termogravimétrica. A avaliação biológica das substâncias foi feita pelo método do brometo de tetrazólio contra as células de adenocarcinoma mamário murino (4T1), em que as substâncias sintetizadas, testadas nas concentrações de 6,25 a 500 $\mu\text{g/mL}$, mostraram atividade citotóxica e podem ser mais eficientes do que a cisplatina em causar morte celular na linhagem 4T1.

Palavras-chave: Síntese, Cobre, Prata, 1,4-dioxo-butenil, Câncer.

ABSTRACT

Cancer is a major public health problem which requires constant efforts to develop new ways of fighting it. Here, the synthesis of new copper (II) and silver (I) complexes, containing 1,4-dioxo-butenyl group was performed to obtain chemotherapeutic drugs as efficient as cisplatin and lower toxicity to healthy cells. The syntheses were carried out in two stages; the first consisted in obtaining the ligands from the reaction of maleic anhydride with substituted anilines and with 4-aminoantipyrine and the second one is the obtainment of the complexes from the reaction of the ligands with the copper (II) and silver (I) salts. The characterization of the substances was carried out by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR), by Infrared Spectroscopy and Thermogravimetric Analysis data. Biological evaluation of the substances was done by the tetrazolium bromide method against murine mammary adenocarcinoma cells (4T1), which the synthesized substances, tested at concentrations of 6.25 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showed cytotoxic activity and may be more efficient than cisplatin in causing death of 4T1 cell line.

Keywords: Synthesis, Copper, Silver, 1,4-dioxo-butenyl, Cancer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Câncer.....	16
2.2	Cisplatina.....	17
2.3	Cobre	18
2.4	Prata.....	22
2.5	4-Aminoantipirina	24
2.6	Derivados do ácido maleâmico	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	30
4.1	Síntese dos Ligantes	30
4.2	Síntese dos Complexos.....	30
4.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
4.4	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	31
4.5	Análise Termogravimétrica	32
4.6	Avaliação da Atividade Biológica Anticâncer	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Síntese	34
5.2	Caracterização.....	35
5.2.1	RMN.....	35
5.2.2	Infravermelho (IV)	36
5.2.3	Análise Termogravimétrica (TG).....	42
5.3	Avaliação da Atividade Biológica Anticâncer	48
6	CONCLUSÃO	51
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	52
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

Especialmente nos países em desenvolvimento, o câncer é um grande problema de saúde pública. Nesses países é estimado que o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025. Assim, há uma frequente busca pelo desenvolvimento de novas formas de combatê-lo. A radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia, são os três principais tipos de tratamento, sendo a quimioterapia o foco das pesquisas nas últimas quatro décadas [1].

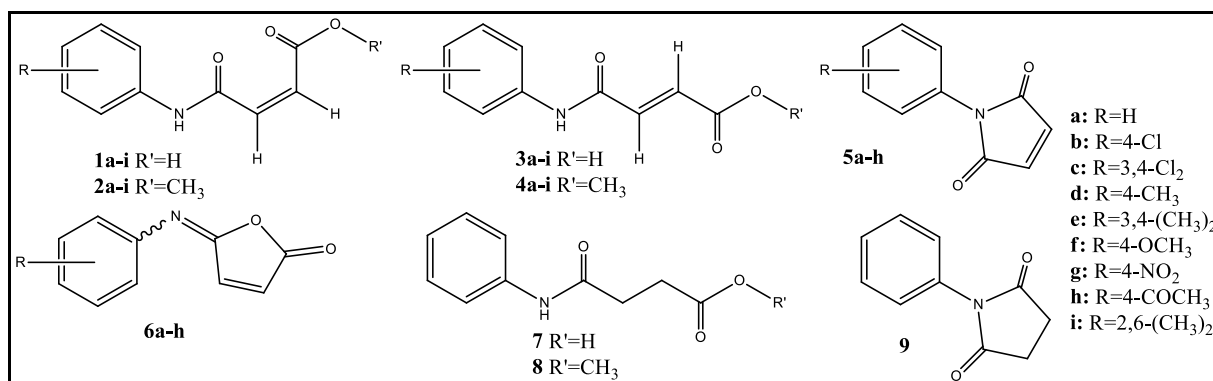
Um dos agentes quimioterápicos mais utilizados para o tratamento diversos tipos de tumores é a Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina; CDDP). Sua ação biológica se relaciona diretamente à sua interação com o DNA da célula, inibindo a replicação do mesmo, desencadeando a morte celular. No entanto, têm sido relatados diversos efeitos colaterais, como a diminuição do reflexo vestibulo-ocular (VOR) [2], além de colocar em risco espécies aquáticas até mesmo em mínimas quantidades [3].

Já existem comercialmente alguns medicamentos análogos à cisplatina que são eficientes, como por exemplo a carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina [4]. Inspirado nesses fármacos, há um constante interesse no desenvolvimento de novos complexos de platina com a mesma efetividade, porém com menor toxicidade [5-8]. Entretanto, estudos recentes apontam um grande potencial no desenvolvimento de novos complexos com um perfil de ação terapêutico diferente da cisplatina com a variação do metal e consequente alteração das suas propriedades químicas [9].

Atualmente na literatura existem diversos relatos de complexos de cobre e prata que estão sendo sintetizados e suas propriedades anticâncer estão sendo testadas, apresentando bons resultados [10-13].

A coordenação de metais a fármacos apresenta uma ótima possibilidade de aumento do arsenal de medicamentos disponíveis para tratamento de uma série de enfermidades [14]. A 4-Aminoantipirina (4-AA) é resultado da metabolização da dipirona no fígado. Este metabólito já é conhecido na literatura por suas várias atividades biológicas, tais como analgésica, antipirética e propriedades anti-inflamatórias [15].

Diversas substâncias, as quais contêm o grupo 1,4-dioxo-2-butenil, ilustradas na Figura 1, foram sintetizadas como candidatas a citotoxinas. Os resultados demonstraram que os *N*-aril-fumaramatos de metila (4a-i) apresentaram os maiores potenciais, demonstrando uma potência maior ou equivalente com a droga de referência [16].

Figura 1 - Estrutura das substâncias derivadas do ácido maleâmico

Fonte: JHA *et al.*, 2010.

Diante do exposto, complexos de metais como o cobre e a prata, formados com substâncias já ditas anteriormente como possuidoras de potenciais biológicos, como a 4-aminoantipirina e as derivadas do ácido maleâmico, possuem uma grande probabilidade de demonstrar um ótimo resultado frente a avaliações biológicas, levando à possibilidade de se tornarem novos agentes anticâncer eficientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer está presente na vida humana tanto como um fenômeno biológico quanto como um relacionamento social, inspirando estados contraditórios de esperança e desespero, renascimento e ruína. As células cancerosas resultam em uma infinidade de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, de forma patológica e incontrolável, se multiplicam e geram metástase, transformando pessoas saudáveis em doentes, dividindo os indivíduos em aqueles que vencem essa guerra e aqueles que sucumbem. Encoberto em seu potencial para apressar a morte, o câncer é uma única palavra que ao tempo que conecta células, pessoas, comunidades e populações [17].

O câncer é uma das principais causas de morte tanto em países economicamente desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos. É esperado que a incidência de casos aumente mundialmente devido ao envelhecimento da população, especialmente em países menos desenvolvidos, em que aproximadamente 82% da população mundial reside. A adoção de comportamentos que são conhecidos por aumentar o risco de câncer, tais como o hábito de fumar, dieta pobre em nutrientes, inatividade física e mudanças na reprodução (incluindo o primeiro parto em idade muito tenra ou muito tardia) têm aumentado significativamente a incidência em países menos desenvolvidos [18].

Para o Brasil, o perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata em homens e mama em mulheres são os mais frequentes. É fundamental que o monitoramento da morbimortalidade por câncer incorpore-se na rotina da gestão da saúde de modo a tornar-se instrumento essencial para o estabelecimento de ações de prevenção e controle do câncer e de seus fatores de risco [19].

A definição de “cura” do câncer é difícil e, para muitos, considerada impossível. Uma situação em que essa definição é utilizada é quando um grupo de pacientes têm uma experiência de sobrevivência idêntica à da população com a mesma distribuição de fatores demográficos, ou seja, quando há uma relação de sobrevivência relativa. Alguns preferem o termo “recuperado” para os pacientes que teriam uma baixa probabilidade de morte em consequência da neoplasia inicial. Outra opção para a definição de cura é quando o paciente sobrevive em um estado “livre da doença” tempo o suficiente para ser classificado como baixa probabilidade de reincidência [20].

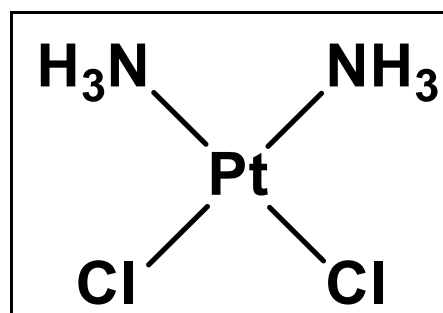
O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea e em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. Entre os tratamentos, a quimioterapia é o tratamento que utiliza medicamentos para combater a doença. Eles são aplicados, em sua maioria, na veia, podendo também ser dados por via oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intratecal. Os medicamentos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo [21].

A quimioterapia é uma das principais formas de intervenções terapêuticas do câncer. Mas apesar dos avanços nos protocolos de descoberta e tratamento, é comum pacientes que adquirem resistência a múltiplos medicamentos, fazendo com que a resposta à quimioterapia esteja abaixo das expectativas. Os mecanismos de resistência aos fármacos, adaptados pelas células cancerosas, incluem modificação no metabolismo e transporte do fármaco e mutação genética, o que pode levar ao reparo do gene, impedindo a apoptose [22].

2.2 Cisplatina

A cisplatina (cis-diaminadichloroplatina; CDDP) foi sintetizada pela primeira vez por Michael Peyrone em 1845. Alfred Werner, 50 anos depois, elucidou a configuração estérica da molécula, mostrada na Figura 2, pela qual lhe rendeu um Prêmio Nobel em 1913 [23]. Na década de 60 o biofísico Barnett Rosenberg descobriu inesperadamente que a cisplatina poderia inibir a divisão celular da *Escherichia coli* [24]. Essa descoberta deixou Rosenberg interessado em testar a cisplatina como agente anticâncer e, conseqüentemente, conseguiu demonstrar a potente atividade antiproliferativa da molécula em um modelo de sarcoma murino [25].

Figura 2 – Estrutura da cisplatina.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A Cisplatina foi administrada pela primeira vez em um paciente com câncer em 1971 e se tornou disponível para prática de oncologia geral em 1978, primeiro no Canadá, pouco depois nos Estados Unidos e seguido eventualmente pelo restante do mundo [26].

É um dos agentes anticancerígenos mais eficazes na quimioterapia, amplamente utilizada no tratamento de tumores sólidos. Foi muito utilizada para a cura de diferentes tipos de neoplasias, incluindo câncer de cabeça, pescoço, ovário, leucemia, câncer de mama, cérebro, rim e testicular. Em geral, a cisplatina e outras substâncias à base de platina, são consideradas citotóxicas por conseguirem matar células cancerosas danificando o DNA (ácido desoxirribonucleico), inibindo a síntese e a mitose do DNA e induzindo a apoptose celular [27].

No entanto a cisplatina e os fármacos derivados de platina têm efeitos colaterais debilitantes em tecidos normais e induzem a ototoxicidade, neurotoxicidade e nefrotoxicidade. Nos rins, a cisplatina se acumula preferencialmente em células tubulares renais causando lesão e morte celular, resultando em lesão renal aguda [28]. Outro grande problema que dificulta o uso da cisplatina como medicamento anticâncer é o desenvolvimento de resistência celular [29-32].

Os fármacos de platina continuam a ser os mais importantes e mais usados na quimioterapia e, provavelmente, não serão substituídos clinicamente muito em breve. Porém eles têm diversas desvantagens, como os efeitos colaterais graves que limitam a dose que pode ser administrada aos pacientes, além do desenvolvimento da resistência medicamentosa para muitos tipos de câncer. Embora novas drogas de platina continuem a ser desenvolvidas, é provável que sofram dos mesmos problemas e, como tal, há um foco considerável no desenvolvimento de novas formulações mais estáveis e mais seletivas para o câncer [33].

2.3 Cobre

O cobre é um metal de transição macio e maleável. Ele tem uma cor laranja-avermelhada, mas com o tempo, ao ser oxidado, exibe uma superfície verde. É amplamente utilizado para vários fins, incluindo fabricação de moedas, joias, encanamento, aplicações dentárias, esmaltes cerâmicos e fios elétricos [34].

É um micronutriente essencial, envolvido em diversos processos biológicos vitais. Devido à sua capacidade de mudar os estados de oxidação $\text{Cu (I)} \rightarrow \text{Cu (II)}$ e a competência para formar esferas de coordenação com aminoácidos que contém os grupos: hidrossulfeto (-SH), amino (-NH₂), carboxila (-COOH), tiometila (-SCH₃) e imidazol, o cobre é utilizado pelas enzimas controlando vários processos celulares: fosforilação oxidativa; desintoxicação de

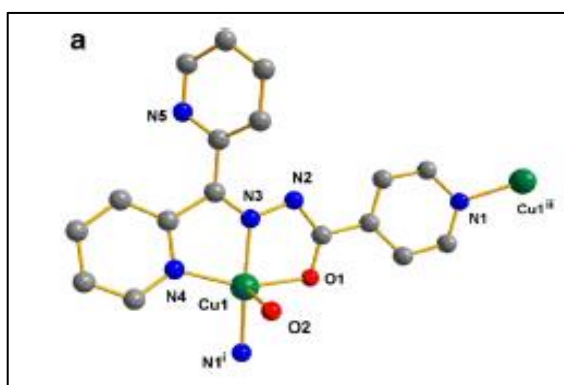
espécies reativas de oxigênio; processamento pós-tradução de colágeno, elastina e neuropeptídeos; síntese de neurotransmissores e transferência bidirecional de íons de ferro em membranas plasmáticas [35].

O déficit de cobre pode prejudicar a produção de energia, causar metabolismo anormal de glicose e colesterol, aumento do dano oxidativo, aumento do acúmulo de ferro no tecido, estrutura e função do sangue circulante e das células imunes alteradas, síntese e processamento anormal de neuropeptídeos, eletrofisiologia cardíaca anômala, comprometimento da contratilidade miocárdica e efeitos persistentes sobre os sistemas neurocomportamental e imunológico. O nível de cobre aumentado foi encontrado em vários distúrbios, como por exemplo na doença de Wilson ou doença de Menke [36].

A capacidade desse metal para catalisar reações de óxido-redução pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio. O uso de cobre para substituir a platina em complexos de coordenação, atualmente utilizados como quimioterápicos convencionais, tem sido investigado. Em comparação com fármacos baseados em platina, esses complexos de cobre podem ser agentes anticancerígenos mais potentes, com toxicidade reduzida em relação às células normais e podem potencialmente contornar a quimiorresistência, associada ao tratamento recorrente com platina [37].

Testes *in vitro* da atividade anticâncer para o complexo de cobre (II) com ligante di-2-piridil cetona isonicotinoil hidrazona (L) $\{[Cu(L)(H_2O)] \cdot H_2O \cdot NO_3\}$, mostrado na Figura 3, exibiram resultados 3-18 vezes melhores do que a cisplatina contra as linhagens de células cancerosas de fígado, mama e cervical, além de demonstrar uma atividade anticâncer significativamente maior do que o ligante. Investigações a respeito do mecanismo de ação mostram que o complexo exibiu uma forte capacidade de promover produções de espécies reativas de oxigênio, conduzindo a morte celular por apoptose [38].

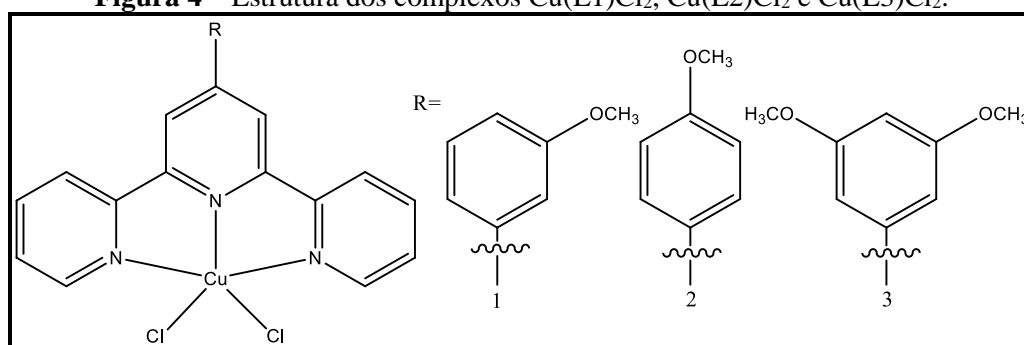
Figura 3 – Estrutura do complexo $[Cu(L)(H_2O)] \cdot H_2O \cdot NO_3$.



Fonte: DENG, CHEN e DENG, 2016.

Estudos a respeito da ligação com o DNA e a atividade citotóxica *in vitro* de complexos de cobre (II) {Cu(L1)Cl₂ (L1= 4'-(3-metóxfenil)-2,2':6'-2"-terpiridina), Cu(L2)Cl₂ (L2= 4'-(4-metóxfenil)-2,2':6'-2"-terpiridina) e Cu(L3)Cl₂ (L3= 4'-(3,5-dimetóxfenil)-2,2':6'-2"-terpiridina), ilustrados na Figura 4, mostraram que a atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais de carcinoma cervical (HeLa), carcinoma hepatocelular (Hep-G2) e carcinoma hepatocelular humano (BEL-740) do complexo deve estar associada não somente à sua habilidade de interagir com o DNA via intercalação, mas também à produção de espécies reativas de oxigênio que, de alguma forma, seu nível desempenha um papel mais importante [39].

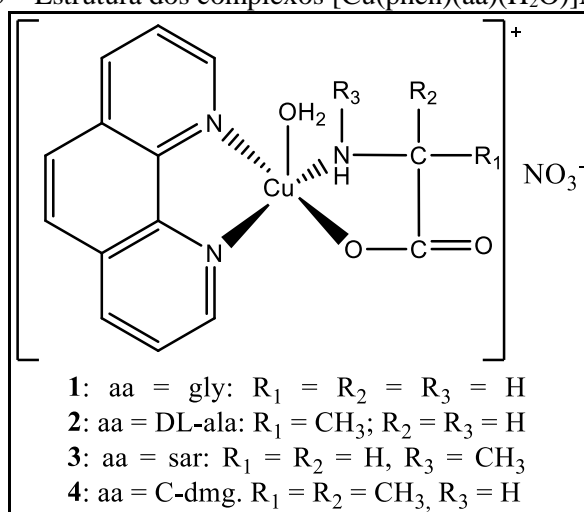
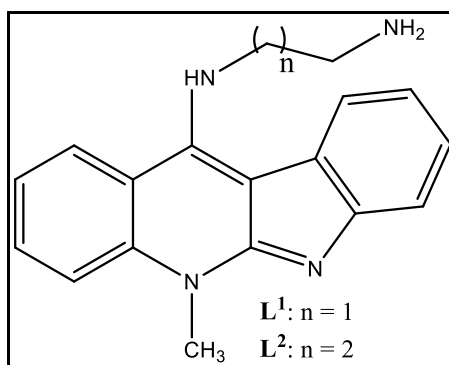
Figura 4 – Estrutura dos complexos Cu(L1)Cl₂, Cu(L2)Cl₂ e Cu(L3)Cl₂.



Fonte: LIANG *et al.*, 2014.

As propriedades antiproliferativa e indutora de apoptose dos complexos [Cu(phen)(aa)(H₂O)]NO₃ (1-4), mostrados na Figura 5, foram seletivas contra a linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) em relação à linhagem de células saudáveis de mama (MCF10A). O complexo 4 ainda se mostrou efetivo contra várias linhagens de células: cervical (Hela), ovário (SKOV3), pulmão (A549, PC9), carcinoma nasofaríngeo (Hone1, HK1, C666-1), mama (MCF7, T47D), linfoma e leucemia (Nalmawa, HL60) e colorretal (SW480, SW48, HCT118) com valores de IC₅₀, que é a concentração que inibe 50% da viabilidade das células, entre 1,7-19 µM, além de se mostrar bem mais efetivo do que a cisplatina na triagem NC160 de dose única [40].

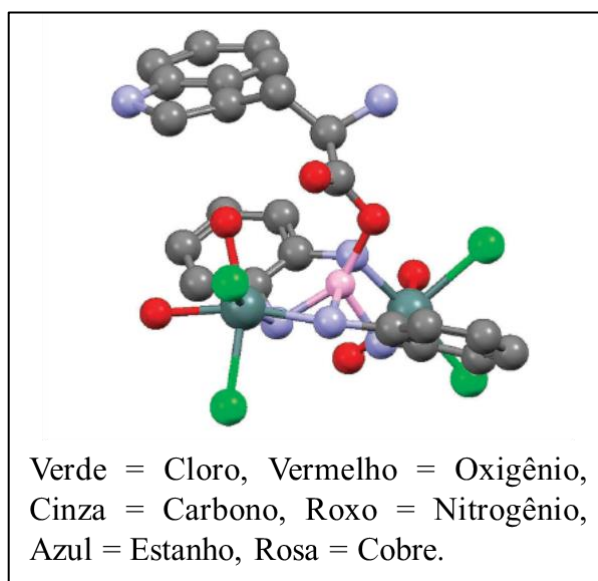
Complexos de Cu(II) formados com ligantes bidentados de aminoalquilaminoneocriptolepina, foram testados *in vitro* como agentes anticâncer contra a linhagem de células de carcinoma de cólon humano (HT-29) e exibiram atividade biológica maior do que seus ligantes livres, indicados na Figura 6 [41].

Figura 5 – Estrutura dos complexos $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{aa})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ (1-4).Fonte: NG *et al*, 2014.**Figura 6** – Estrutura dos ligantes análogos à neocriptolepina.

Fonte: EMAM, EL SAYED IEL e NASSAR, 2015.

O complexo $\text{CuSn}_2(\text{Trp})$, ilustrado na Figura 7, causou morte celular para várias linhagens de células cancerosas: teratocarcinoma de ovário humano (PA-1), adenocarcinoma de próstata (PC-3), carcinoma cervical (HeLa), osteosarcoma (U2OS), hepatocarcinoma (HepG2) e carcinoma de mama (MCF-7), sendo mais potente do que a cisplatina para a linhagem HepG2. Para os testes *in vivo* realizados em ratas Wistar saudáveis, mostrou menor toxicidade, em que a dose letal é bem mais significativa ($98,11 \text{ mg kg}^{-1}$) do que a cisplatina (12 mg kg^{-1}), além de não demonstrar nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade em contraste com doses equivalentes de cisplatina [42].

Figura 7 – Estrutura do complexo $\text{CuSn}_2(\text{Trp})$.



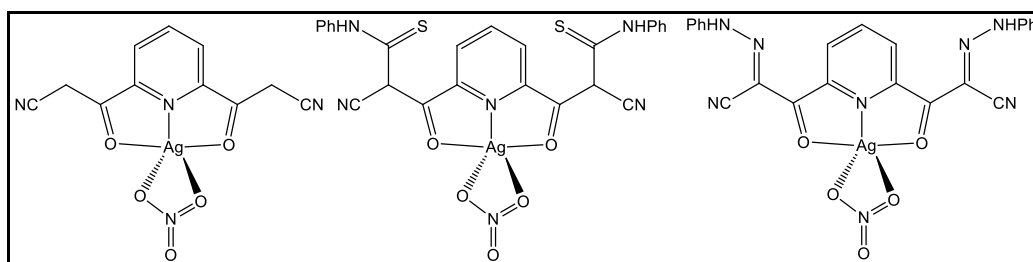
Fonte: ZAIDI *et al.*, 2014.

2.4 Prata

A Prata (Ag), de número atômico 47, massa atômica 107,86, densidade 10490 kg.m^{-3} e ponto de fusão de $961,78^\circ\text{C}$, é encontrada na natureza em seu estado livre e em minerais como argentita. É um metal branco prateado, com condutividade térmica e elétrica muito boas. A prata foi extraída pela primeira vez em 2500 a.C. na Ásia Menor [43].

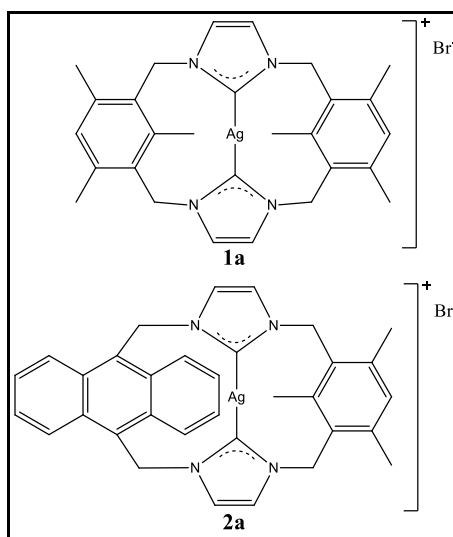
A prata era conhecida por suas propriedades antibacterianas na antiguidade. Os gregos revestiam pratos e copos com prata para parar a propagação de doenças e colocaram moedas de prata em baldes de água para ampliar o frescor da água. Eles também deram colheres de prata para crianças chuparem, o que se acreditava que as protegiam de doenças. A primeira substância de prata que foi usada como medicamento foi o nitrato de prata, sendo usado para o tratamento de queimaduras, que foi descoberto por Basilius Valentinus no século XV [44].

Diversos relatos da literatura mostram que complexos de prata têm sido sintetizados e avaliados contra o câncer. Os ligantes de piridina 2,6-disubstituídos e seus complexos de Ag(I) , mostrados na Figura 8, foram testados contra linhagens de células humanas cancerosas, incluindo carcinoma hepatocelular (HePG2), adenocarcinoma de pulmão (A549), carcinoma de cólon (HT29) e adenocarcinoma de mama (MDF7), em que todos os complexos exibiram atividade significativa maior do que seus ligantes e do que a doxorubicina, utilizada como droga de referência [45].

Figura 8 – Estrutura dos complexos de Ag(I) com ligantes de piridina 2,6-disubstituídos.

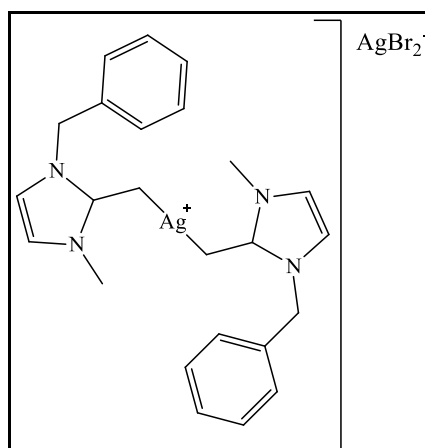
Fonte: ALI, ABD-ELZAHER e MAHMOUD, 2013.

A atividade citotóxica de complexos contendo carbenos *N*-heterocíclicos (NHC), mostrado na Figura 9, e seus ligantes foi feita para as linhagens de células cancerosas de carcinoma cervical humano (HeLa), adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549), cisplatina-resistente A549 (A549R), carcinoma de mama humano (MDA-MB-231) e fígado saudável (LO2), em que demonstraram atividade comparável ou superior contra as células cancerosas e menor toxicidade contra as células saudáveis de fígado, se comparados à cisplatina. Além disso, os complexos foram mais ativos do que a cisplatina contra a linhagem de células A549R, indicando que esses complexos podem superar a resistência à cisplatina [46].

Figura 9 – Estrutura dos complexos com NHC.

Fonte: LI *et al.*, 2014.

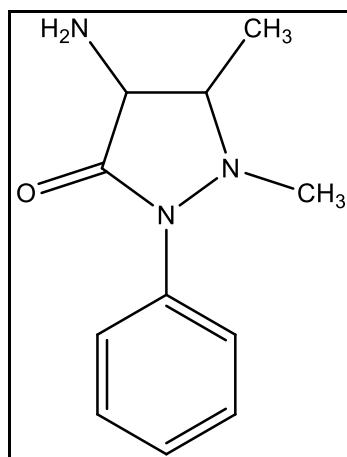
Um complexo de prata (Ag⁸), ilustrado na Figura 10, com ligante bis(carbeno *N*-heterocíclico) exibiu maior seletividade para células cancerosas do que para células normais em testes *in vitro*, de forma superior à cisplatina, mostrando múltiplos mecanismos de ação. Além disso, foi bem tolerado *in vivo*, especialmente em um esquema de dosagem dividido e obteve uma atividade anticâncer *in vivo* significativa contra fibras vazias implantadas por via intraperitoneal [47].

Figura 10 – Estrutura do complexo de prata (Ag8).

Fonte: ALLISON *et al*, 2017.

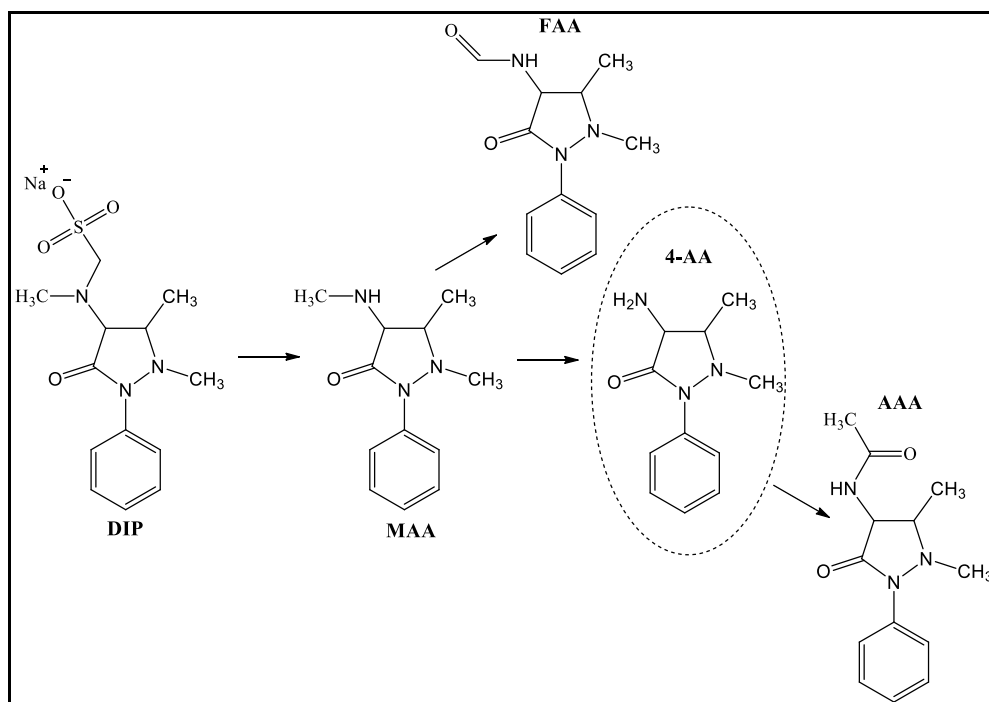
2.5 4-Aminoantipirina

4-Aminoantipirina (4-AA), ilustrada na Figura 11, é um metabólito já conhecido na literatura por suas diversas atividades biológicas que incluem a analgésica, antipirética, antimicrobiana e propriedades anti-inflamatórias [48-52].

Figura 11 – Estrutura da 4-AA.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

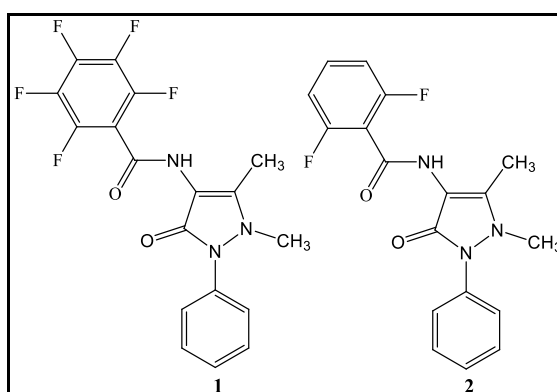
A 4-AA pertence ao grupo das antipirinas e das imidas cíclicas e sua via de metabolização envolve a hidrólise da dipirona por um mecanismo (Figura 12) não-enzimático para a formação da 4-metilaminoantipirina (MAA). Posteriormente a MAA é metabolizada no fígado por meio de desmetilação formando a 4-AA. Relata-se ainda que MAA e 4-AA geram dois outros metabólitos inativos {formilaminoantipirina (FAA) e acetilaminoantipirina (AAA)} [53].

Figura 12 – Metabolismo da dipirona.

Fonte: BUITRAGO-GONZÁLEZ, CALDERÓN-OSPINA e VALLEJOS-NARVÁEZ, 2014.

As atividades genotóxica, mutagênica, apoptótica e imunomoduladora, *in vivo* em camundongos machos, da 4-AA e seus efeitos em combinação com os fármacos antineoplásicos doxorrubicina, cisplatina e ciclofosfamida foram testadas. Os resultados mostraram que a 4-AA não causa genotoxicidade, dano mutagênico ou fagocitose esplênica. Entretanto, apesar de seus efeitos analgésicos, quando combinada com os fármacos antineoplásicos, pode diminuir os efeitos quimioterápicos destes [54].

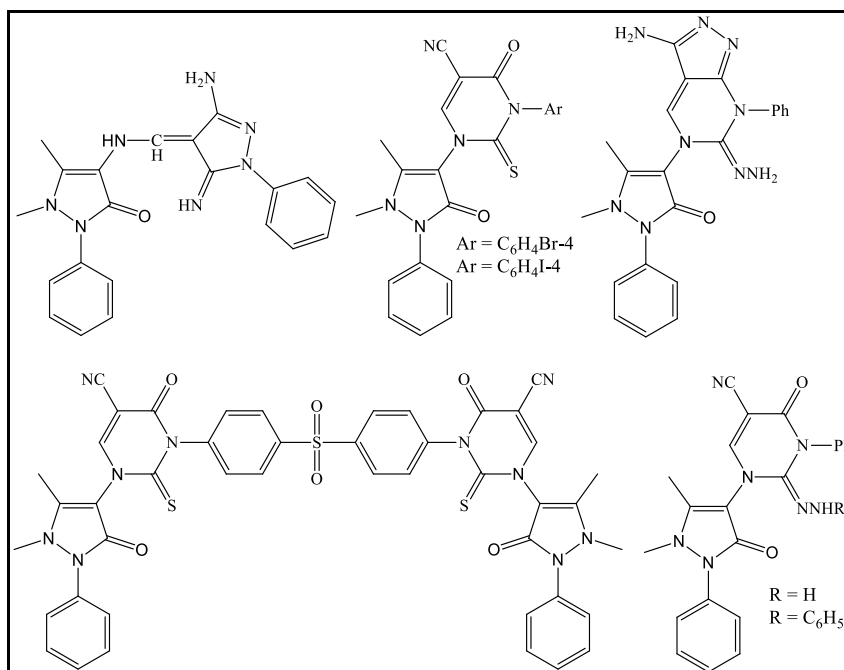
Substâncias análogas à 4-AA, ilustradas na Figura 13, mostraram citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem de células cancerosas cervicais (SiHa) semelhante ao Pazopanib, utilizado como droga de referência [55].

Figura 13 – Estrutura das substâncias análogas à 4-AA.

Fonte: PREMNATH *et al*, 2016.

Substâncias heterocíclicas baseadas na 4-AA, ilustradas na Figura 14, foram sintetizadas e demonstraram atividade anticâncer promissora, sendo mais efetivas do que a doxorubicina, utilizada como droga de referência, contra a linhagem de células de câncer de mama humano (MCF7) [56].

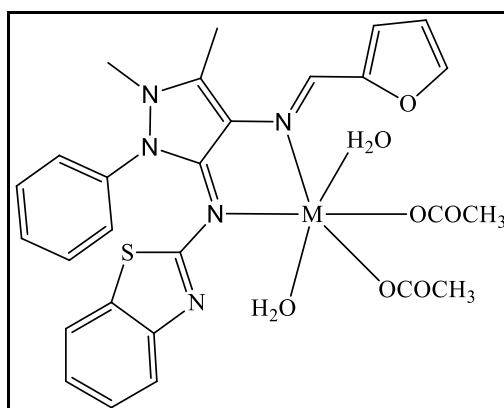
Figura 14 – Estrutura das substâncias heterocíclicas baseadas na 4-AA.



Fonte: GHORAB, EL-GAZZAR e ALSAID, 2014.

Um complexo de cobre (II) formado com análogo da 4-AA, mostrado na Figura 15, exibiu forte afinidade de ligação com o DNA através de mecanismo de intercalação, além de clivar o DNA via mecanismo hidrolítico [57].

Figura 15 – Estrutura do complexo de cobre (II) formado com análogo da 4-AA.

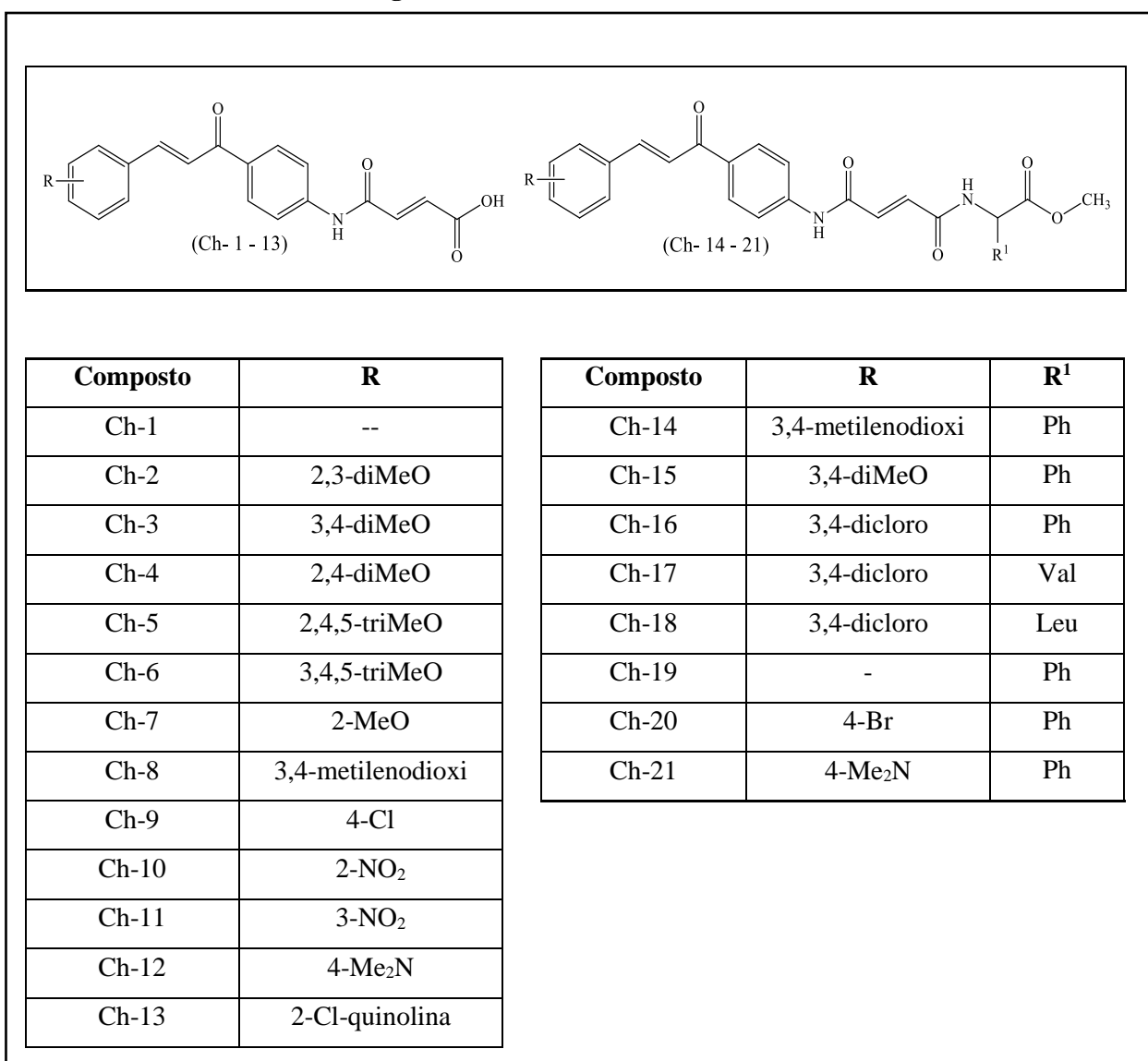


Fonte: LEELAVATHY e ARUL ANTONY, 2013.

2.6 Derivados do ácido maleâmico

Derivados de ácidos maleâmicos são utilizados em testes biológicos por apresentarem alto grau de citotoxicidade, o que inclui um alto nível de atividade fungicida e bactericida. Essas substâncias possuem não somente o grupo farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil, mas também um grupo arila em que diferentes substituintes podem ser colocados para modificar a potência citotóxica. Por exemplo, as chalconas (1-21), ilustradas na Figura 16, que contêm o grupo 1,4-dioxo-2-butenil, demonstraram uma potente atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* e diferentes tipos de mecanismos de ataque às células, além de não terem sido observados efeitos tóxicos nos camundongos nas doses testadas [58].

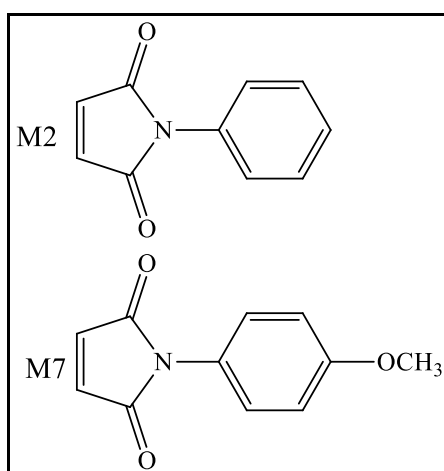
Figura 16 – Estrutura das chalconas.



Fonte: RODRIGUES *et al*, 2011.

Derivados da *N*-fenilmaleimida (M2 e M7), ilustrados na Figura 17, apresentaram relevante atividade citotóxica contra as linhagens de melanoma humano (MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-147), sendo que para a linhagem SK-MEL-147 foram três vezes mais seletivos do que para a linhagem de células saudáveis de melanócito humano (NGM). Essa atividade pode estar relacionada à presença do anel imídico e à modulação adipogênica [59]. E ainda, algumas maleimidias e seus derivados possuem diferentes atividades biológicas, as quais destacam-se as propriedades antifúngicas, antibacterianas e antitumorais [60-62].

Figura 17 – Estrutura dos derivados M2 e M7.



Fonte: ROSOLEN, CRECZYNSKI-PASA e MONTEIRO, 2014.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a síntese e avaliação biológica anticâncer de novos complexos de Cu(II) e Ag(I) contendo o grupo farmacofórico 1,4-dioxo-butenil, incluindo a 4-aminoantipirina.

3.2 Objetivos específicos

- Síntese dos ligantes derivados do ácido maleâmico;
- Síntese dos complexos metálicos de Cu(II) e Ag(I);
- Caracterização das substâncias sintetizadas através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) e Análise termogravimétrica (TG).
- Avaliação biológica anticâncer dos complexos sintetizados através do ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) .

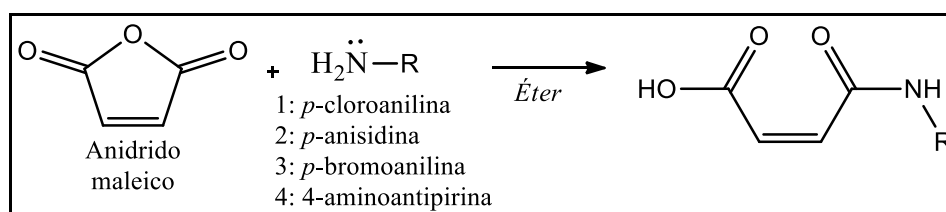
4 PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes e solventes utilizados foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

4.1 Síntese dos Ligantes

Para a síntese dos ligantes, conforme o Esquema 1, foram adicionados 10 mmol de anidrido maleico a diferentes anilinas *p*-substituídas (cloro, metoxila e bromo respectivamente), obtendo os ligantes 1-3 e, para a obtenção do ligante 4, foram reagidos 10 mmol de 4-AA com anidrido maleico. As reações foram desenvolvidas em 50 mL de éter etílico, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 h, sendo utilizada a aparelhagem de refluxo a fim de evitar a evaporação do solvente. Os precipitados obtidos foram filtrados e lavados com água gelada.

Esquema 1 - Síntese dos ligantes.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

4.2 Síntese dos Complexos

Para a obtenção dos complexos de Cobre (II) inicialmente foram reagidos 3 mmol de cada um dos ligantes com hidróxido de potássio (KOH) na proporção de 1:1, em metanol em quantidade o suficiente para solubilizar os reagentes, à temperatura ambiente por aproximadamente 40 min. Após isso, foram adicionados 1,5 mmol de cloreto de cobre (II) di-hidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e deixou reagir por aproximadamente 1 h. Os precipitados obtidos foram filtrados. Foram obtidos os complexos $\text{CuL}(1-4)$.

Para a síntese dos complexos de Prata (I), 3 mmol de cada um dos ligantes foram reagidos com hidróxido de potássio (KOH), na proporção de 1:1, em metanol, à temperatura ambiente por aproximadamente 40 min. Depois, foram adicionados 1,5 mmol de nitrato de prata (AgNO_3) na ausência de luz, onde reagiu por aproximadamente 1 h. Os precipitados obtidos foram filtrados e depois de secos à temperatura ambiente, foram armazenados em frascos âmbar. Foram obtidos os complexos $\text{AgL}(1-3)$.

4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos ligantes 1-4 foram obtidos à temperatura ambiente em espectrômetro Bruker 300, no Instituto de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), em solução 10% com dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) a 25°C , operando em 300.132 e 75.476 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) de ^1H e de ^{13}C foram dados na escala de ppm (parte por milhão) e foram referenciados ao tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (J) são descritas em hertz (Hz) e as abreviações s, sl, d, e m foram usadas para singleto, singleto largo, dubleto, e multipletto, respectivamente.

(1) RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 3,35 (s, NH), 6,29 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 6,45 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 7,37 (m, 2H), 7,64 (m, 2H), 10,45 (sl, OH). **RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm):** 117,1 (C), 121,5 (CH), 128,9 (CH), 130,6 (CH), 131,8 (CH), 137,5 (C), 163,8 (C=O), 167,4 (C=O).

(2) RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 3,33 (s, NH), 3,72 (s, 3H), 6,25 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 6,45 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 6,92 (m, 2H), 7,51 (m, 2H), 10,35 (sl, OH). **RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm):** 55,3 (CH_3), 114,1 (C), 121,5 (CH), 121,6 (CH), 131,0 (CH), 131,8 (CH), 156,0 (C), 163,1 (C=O), 166,9 (C=O).

(3) RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 3,32 (s, NH), 6,30 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 6,46 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 7,51 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 10,46 (sl, OH). **RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm):** 116,3 (C), 117,4 (CH), 122,2 (CH), 132,2 (CH), 132,3 (CH), 138,5 (C), 164,1 (C=O), 167,7 (C=O).

(4) RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 2,14 (s, 3H), 3,02 (s, 3H), 6,26 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 6,48 (d, 1H, $J_{cis} = 12$ Hz), 7,30 (m, 3H), 7,46 (m, 2H), 9,78 (sl, OH). **RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm):** 11,7 (CH_3), 36,3 (CH_3), 106,6 (C), 124,2 (CH), 127,0 (CH), 129,6 (CH), 131,6 (CH), 131,6 (CH), 135,3 (C), 152,6 (C), 161,7 (C=O), 164,6 (C=O), 167,0 (C=O).

4.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do IV foram registrados à temperatura ambiente em Espectrômetro de Absorção no IV - Jasco IR-6200, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras foram preparadas por dispersão em brometo de potássio (KBr) e prensadas formando pastilhas, as quais foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento para respectiva leitura do percentual de transmitância (%T).

4.5 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TG) dos complexos CuL(1-4) e AgL(1-3) foi realizada em parceria com o Professor Dr. Claudio Teodoro de Carvalho, através de equipamento termogravimétrico da marca NETZSCH, modelo STA449F3 com forno de carvão de silício, nas seguintes condições de análise: atmosfera de ar sintético com vazão de 50 mL.min⁻¹, intervalo de aquecimento de 30 a 1000°C, razão de aquecimento de 20°C min⁻¹, cadinho de alfa-alumina como suporte e massa de aproximadamente 5,00 mg para cada complexo.

4.6 Avaliação da Atividade Biológica Anticâncer

Ensaio do MTT

O ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ou simplesmente brometo de tetrazólio) foi realizado segundo Pesarini et. al. (2017) com modificações [63], em parceria com o Professor Dr. Rodrigo Juliano Oliveira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As células de carcinoma mamário murino (4T1) foram semeadas em cinco poços contendo 0,33 cm² de área de crescimento (placa de cultivo celular de 96 poços), na concentração de 2,5x10⁴ células. Após estabilização por 24 h, as células foram tratadas com cisplatina (Libbs®, Lote 16E0311) e com os complexos, em concentrações de 6,25; 12,5; 25,00; 50,00; 100,00; 250,00 e 500,00 µg.mL⁻¹ por 24 h. Ao final desse período o meio de cultura foi descartado e as células foram submetidas à solução de MTT (Invitrogen® CT N° M6494; 0,005 g de MTT; 5,00 mL de tampão fosfato-salino; 10,00 mL de meio HDMEM, sem SBF) por 4 h em estufa a 37°C contendo 5% de gás carbônico. Em seguida, o meio de cultura contendo o MTT foi removido e então acrescentado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para diluição do Formazan formado. Para cada dose, foram realizadas triplicatas independentes com 5 poços para cada repetição. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 540 nm (ELISA Plate Analyzer ROBONIK®).

A viabilidade celular (expressa em porcentagem) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

Viabilidade Celular (%)

$$= \frac{\text{Média de absorbâncias do grupo tratado}}{\text{Média de absorbâncias do grupo sem tratamento (controle)}} \times 100$$

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad InStat v.2.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos), considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foram utilizados os testes t-Student e ANOVA/Tukey.

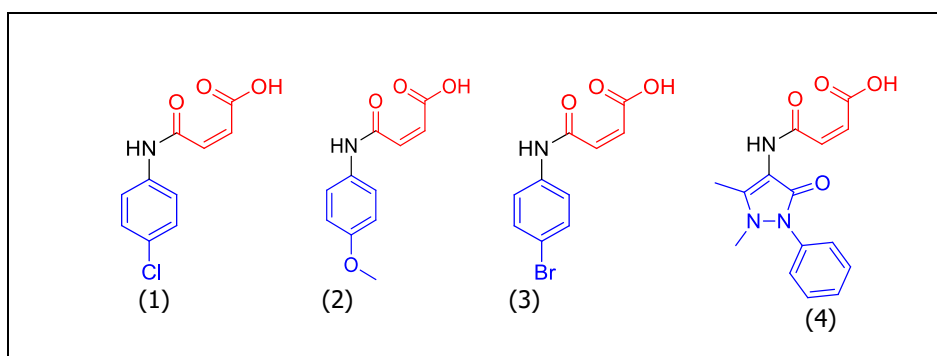
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese

Os ligantes obtidos são derivados de ácido maleâmico, os quais contêm o grupo farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil e um grupo arila, no qual diferentes substituintes foram colocados para modular a potência citotóxica. A síntese de todos os ligantes alcançou bons rendimentos (**1**: 89,8%; **2**: 88,1%; **3**: 91,1%; **4**: 71,3%), evidenciando a eficácia do método.

As substâncias sintetizadas mostraram diferentes colorações: ligantes 1 e 3 – amarelo claro, ligante 2 – verde e ligante 4 – alaranjado. As estruturas dos ligantes (1-4) estão ilustradas na Figura 18.

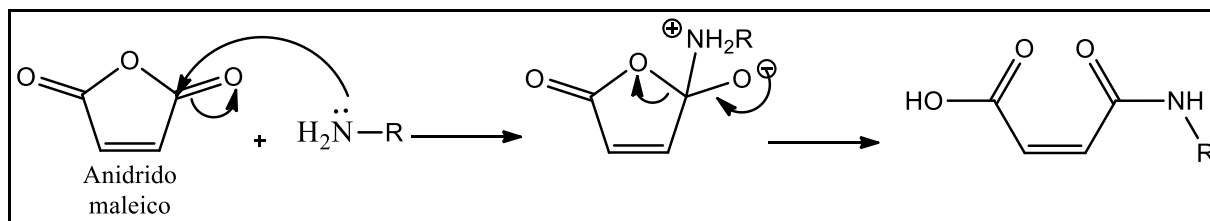
Figura 18 – Estrutura química dos ligantes 1-4.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O mecanismo geral proposto para a síntese dos ligantes a partir do anidrido maleico com anilinas *p*-substituídas e com a 4-aminoantipirina está representado no Esquema 2.

Esquema 2 - Mecanismo proposto para a obtenção dos ligantes 1-4.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Para a realização da síntese dos complexos foram exploradas diferentes condições de reação, as quais envolveram variações de temperatura, refluxo, maiores tempos reacionais, diferentes solventes, bases mais fracas como o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e ainda meio reacional sem a utilização de base, porém não houve êxito em nenhuma dessas condições.

Ao reagir os ligantes com uma base forte, como o KOH, foi observado que os ligantes se tornaram propícios à complexação com os metais, isso porque o KOH foi capaz de executar a desprotonação da carboxila, deixando-a reativa, obtendo êxito na formação dos complexos, mesmo em temperatura ambiente. Porém, não foi possível a obtenção do complexo entre a prata e o ligante 4 nas mesmas condições reacionais.

Os complexos de cobre apresentaram colorações azul e verde, características do estado de oxidação do Cu^{2+} . Já os complexos formados com a prata se apresentaram claros, características da Ag^{1+} , porém com uma leve coloração correspondente a cada um dos ligantes.

5.2 Caracterização

5.2.1 RMN

Os espectros (Anexos) de RMN de ^1H dos ácidos *N*-aril-maleâmicos (Ligantes 1, 2, 3 e 4) apresentam dois dubletos (d) entre 6,24 – 6,50 ppm característicos aos hidrogênios olefínicos na orientação *Z* e um singlete largo na região de 9,70 - 10,50 ppm, referente ao hidrogênio da hidroxila presente na função ácido. As duplas ligações olefínicas dos ácidos *N*-arilmaleâmicos (Ligantes 1, 2, 3 e 4) sintetizados apresentaram configuração *Z* o que pôde ser confirmado pelos espectros RMN de ^1H que revelaram constantes de acoplamento dos hidrogênios olefínicos em 12,0 Hz.

Para os ligantes 1, 2 e 3, os hidrogênios, presentes no anel aromático, se diferenciam apenas nos deslocamentos devido à presença dos grupos substituintes na posição *para*, com δ em 7,37 - 7,64 ppm para o ligante 1; em 6,92 - 7,51 ppm para o ligante 2; em 7,51 – 7,60 ppm para o ligante 3. Para o ligante 4 os sinais em 7,30 - 7,46 ppm são referentes aos hidrogênios do grupo fenil. Observa-se que os sinais na faixa de ~7 são típicos de compostos aromáticos, devido a desblindagem provocada pela anisotropia diamagnética do anel. É observado ainda, para o ligante 2, um singlete em 3,72 ppm referente aos hidrogênios do grupo metóxi, e para o ligante 4 dois singletos em 2,14 e 3,02 ppm referentes aos hidrogênios da metila, que produzem uma maior blindagem ao próton.

Todos os sinais nos espectros de ^1H apresentaram integração condizente com a quantidade de hidrogênios proposta nas estruturas.

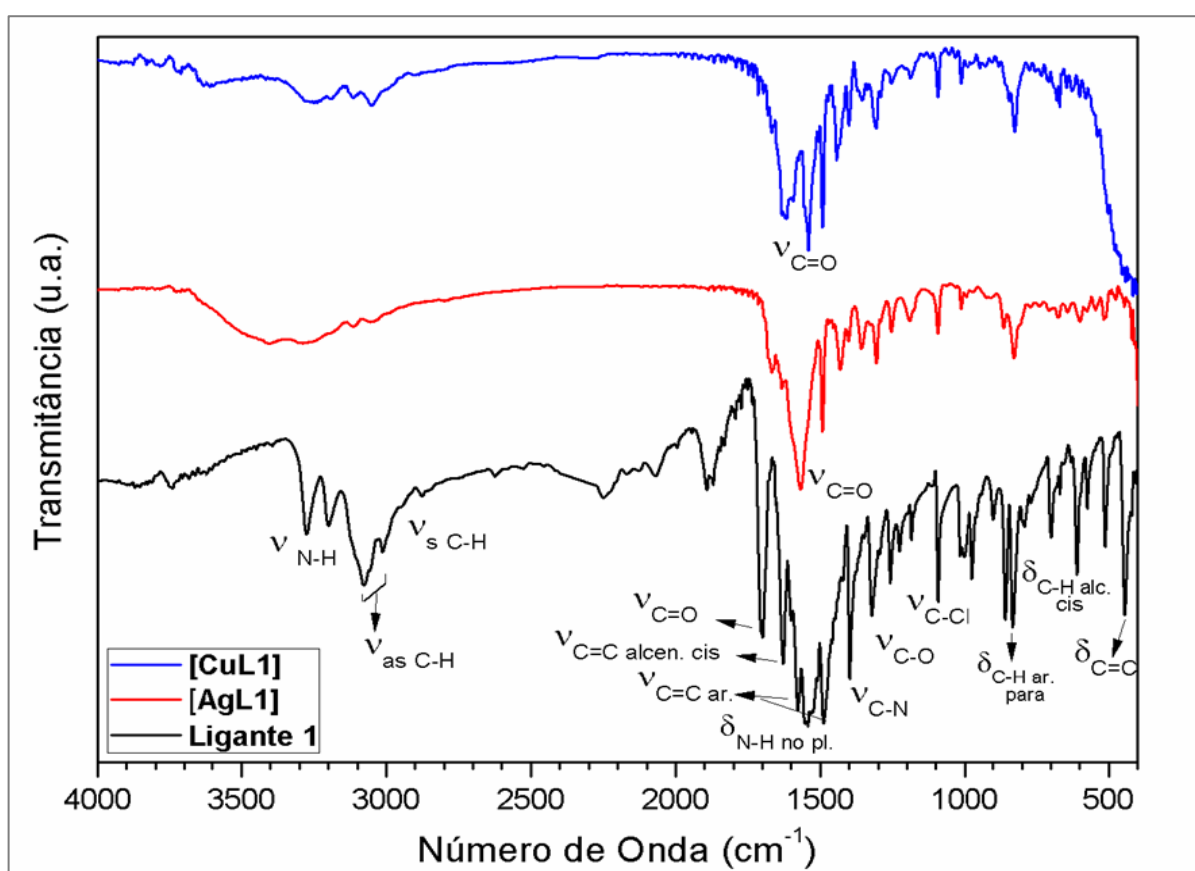
Nos espectros de ^{13}C realizados para os ligantes, os sinais mais importantes para a caracterização dos ácidos maleâmicos são os observados em ~131-135 ppm para os carbonos

olefínicos (C=C) e em 164 e 167 ppm para os átomos de carbonos das carbonilas (C=O) presentes no grupo amida e ácido carboxílico respectivamente.

5.2.2 Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região de IV do ligante 1 (ácido *N*-fenil-(4-cloro)maleâmico) e de seus complexos com cobre e prata estão mostrados na Figura 19.

Figura 19 - Espectros de IV do ligante 1 e seus complexos com Cu e Ag.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

No espectro do ligante 1, nota-se a presença de banda de estiramento da ligação N-H de amida secundária (ν_{N-H}) em 3274 cm^{-1} ; estiramentos assimétricos da ligação C-H ($\nu_{\text{ass}=\text{C-H}}$) em 3077 , 3057 e 3012 cm^{-1} e simétricos ($\nu_{s=\text{C-H}}$) em 2975 e 2876 cm^{-1} de carbonos do anel aromático e do alceno; bandas de harmônicos ou de combinação em 3200 cm^{-1} e entre 2251 e 1733 cm^{-1} ; estiramentos das carbonilas ($\nu_{C=O}$) de ácido carboxílico e de amida (bandas superpostas) em 1705 e 1699 cm^{-1} ; estiramento da ligação C=C de alceno *cis* dissustituído (ν

C=C alceno *cis*) em 1627 cm^{-1} ; estiramentos das ligações C=C de anel aromático *para*-substituído ($\nu_{\text{C=C}} \text{ aromático } para\text{-substituído}$) em 1601 e 1488 cm^{-1} ; deformação angular no plano da ligação N-H ($\delta_{\text{N-H no plano}}$) entre 1552 e 1522 cm^{-1} ; estiramentos das ligações C-N ($\nu_{\text{C-N}}$) em 1398 e 1320 cm^{-1} ; estiramentos das ligações C-O da carboxila ($\nu_{\text{C-O}}$) entre 1294 e 1198 cm^{-1} ; estiramento da ligação C-Cl de cloreto de arila ($\nu_{\text{C-Cl}}$) em 1093 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano da ligação O-H ($\delta_{\text{O-H fora do plano}}$) em 972 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano da ligação C-H de anel aromático *para*-substituído ($\delta_{\text{C-H aromático fora do plano, } para\text{-substituído}}$) em 858 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano da ligação C-H de alceno *cis* dissustituído ($\delta_{\text{C-H alceno } cis \text{ fora do plano}}$) em 699 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano da ligação N-H ($\delta_{\text{N-H fora do plano}}$) entre 669 e 609 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano das ligações C=C do anel aromático e do alceno ($\delta_{\text{C=C alceno ou aromático fora do plano}}$) em 512 e 444 cm^{-1} . Todos esses dados estão dispostos na Tabela 1 e confirmam a estrutura do ligante.

Tabela 1 – Dados de IV do ligante 1.

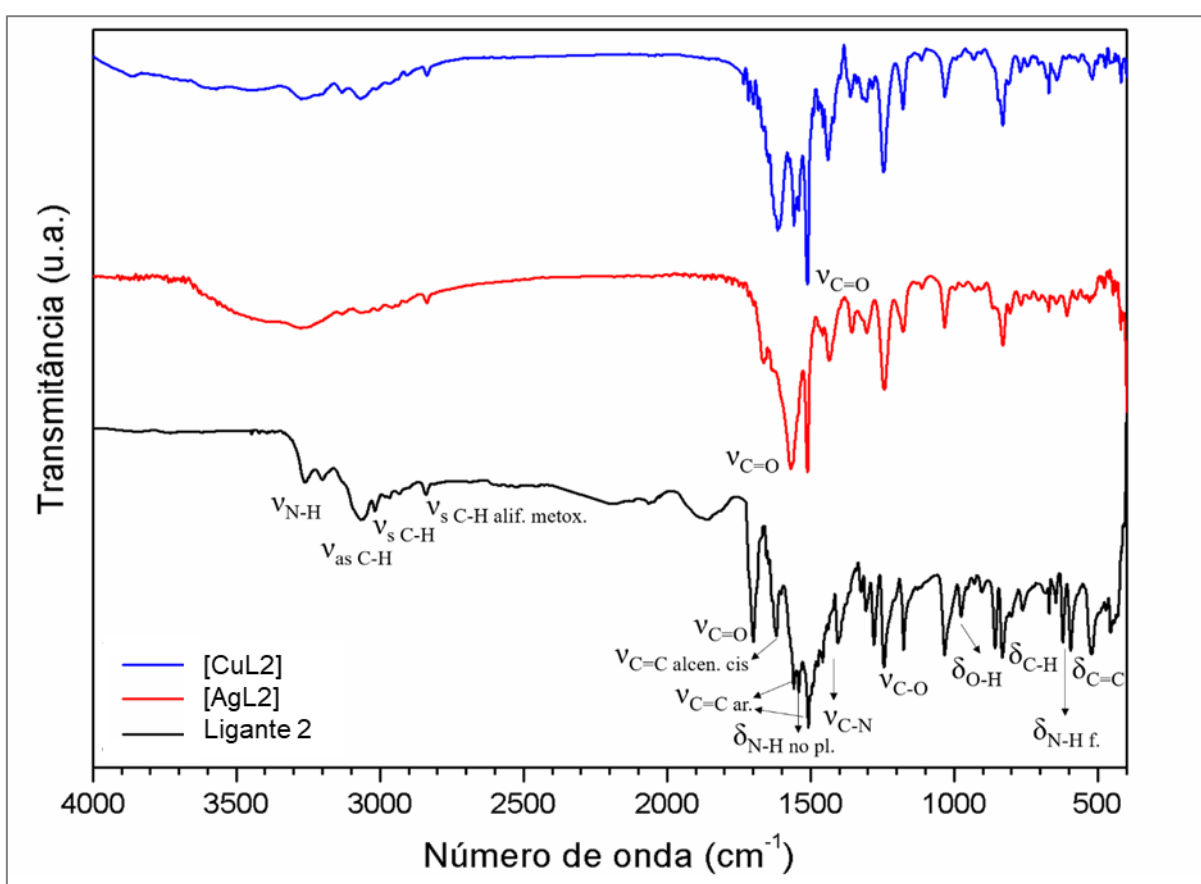
Modo vibracional	Número de Onda (cm^{-1})
$\nu_{\text{N-H}}$	3274
$\nu_{\text{ass}} = \text{C-H}$	3077, 3057, 3012
$\nu_{\text{s}} = \text{C-H}$	2975, 2876
Bandas de combinação ou harmônicas	3200, 2251 a 1733
$\nu_{\text{C=O}}$	1705, 1699
$\nu_{\text{C=C alceno cis}}$	1627
$\nu_{\text{C=C aromático } para\text{-substituído}}$	1601 e 1488
$\delta_{\text{N-H no plano}}$	1552, 1522
$\nu_{\text{C-N}}$	1398 a 1320
$\nu_{\text{C-O}}$	1294 a 1198
$\nu_{\text{C-Cl}}$	1093
$\delta_{\text{O-H fora do plano}}$	972
$\delta_{\text{C-H aromático fora do plano, } para\text{-substituído}}$	858
$\delta_{\text{C-H alceno } cis \text{ fora do plano}}$	699
$\delta_{\text{N-H fora do plano}}$	669 a 609
$\delta_{\text{C=C alceno ou aromático fora do plano}}$	512 e 444

Por outro lado, os espectros de IV dos complexos de cobre e prata, além de apresentarem as principais bandas do ligante 1, mostraram evidentes deslocamentos da banda de $\nu_{\text{C=O}}$ da carboxila de 1705 cm^{-1} para 1557 - 1541 cm^{-1} no complexo de cobre e para 1567 cm^{-1} no complexo de prata, indicando a possível formação de ligação de coordenação por esses grupos do ligante, uma vez que os complexos são formados através da desprotonação da carboxila.

Pode-se ainda perceber a presença de bandas menos intensas em torno de 1690 a 1640 cm^{-1} , atribuídas a ν C=O de amida. Para essas bandas não houve deslocamentos significativos, sugerindo que estes grupos interagem pouco com os metais e que provavelmente não há formação de ligação coordenada por esta região da molécula do ligante 1.

Os espectros de absorção na região de IV do ligante 2 (ácido *N*-fenil-(4-metóxi)maleâmico) e de seus complexos com cobre e prata estão mostrados na Figura 20.

Figura 20 – Espectros e IV do ligante 2 e seus complexos de Cu e Ag.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os dados de infravermelho obtidos para o ligante 2, relacionando os modos vibracionais e os números de onda das bandas principais estão elencados na Tabela 2, de modo que se confirma a estrutura da substância.

Tabela 2 – Dados de IV do ligante 2.

Modo vibracional	Número de Onda (cm^{-1})
------------------	-------------------------------------

V N-H	3260
V _{ass} =C-H	3067, 3017
V _s =C-H	2967, 2933, 2903
V _s C-H alifático (metoxila)	2838
Bandas de combinação ou harmônicas	2400 a 1760
V C=O	1699
V C=C alceno cis	1619
V C=C aromático <i>para</i> -substituído	1603 e 1507
δ N-H no plano	1558, 1541
V C-N	1458, 1404
V C-O (ácido carboxílico)	1325, 1307 e 1280
V _{ass} C-O (aril-alkil éter)	1245
V _s C-O (aril-alkil éter)	1034
δ O-H fora do plano	975
δ C-H aromático fora do plano, <i>para</i> -substituído	857
δ C-H alceno <i>cis</i> fora do plano	687
δ N-H fora do plano	622 a 594
δ C=C alceno ou aromático fora do plano	520, 451

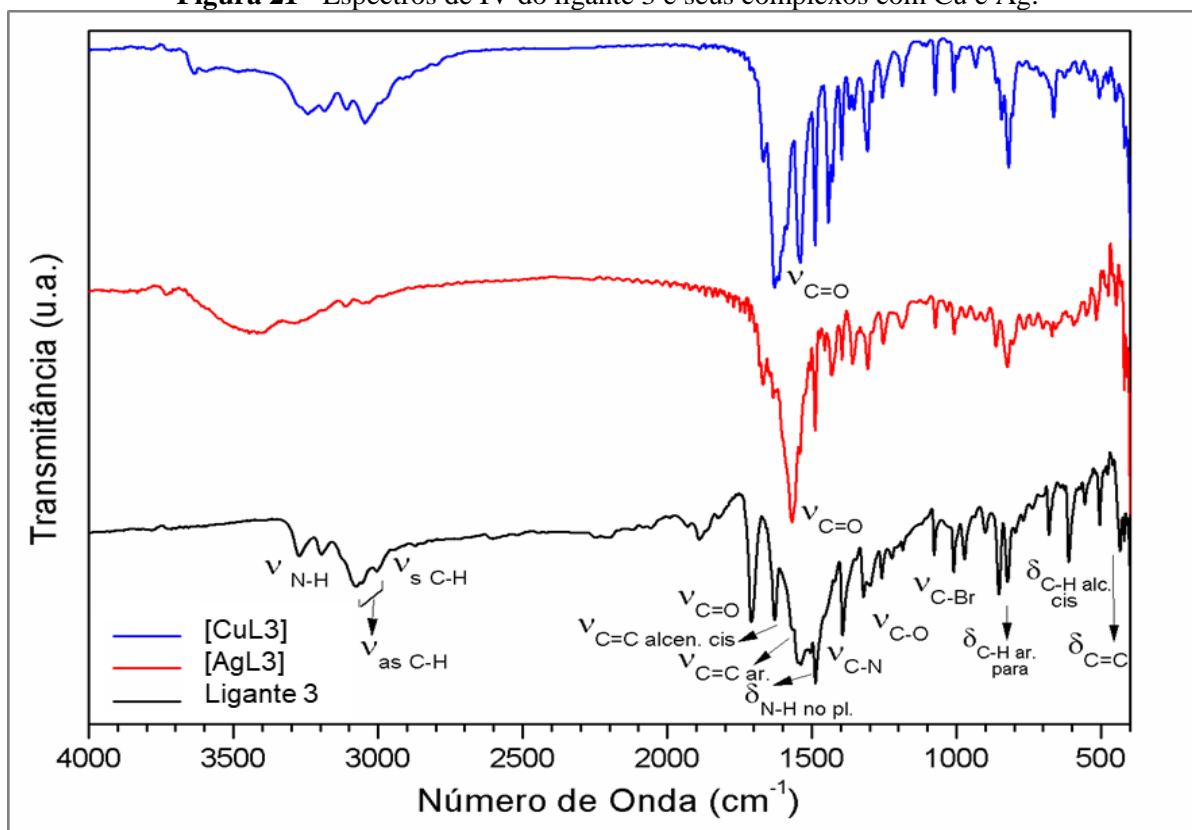
Novamente foram constatados deslocamentos das bandas de ν C=O de 1700 cm^{-1} para os valores de 1597 e 1610 cm^{-1} , respectivamente, indicando a possível coordenação desses íons pela carboxila do ligante 2. Similarmente ao comportamento do ligante anteriormente discutido, nota-se a presença de bandas em torno de 1690 cm^{-1} , atribuídas às carbonilas de amida, as quais possivelmente não formaram ligação de coordenação com os metais, conforme sugerem os resultados de IV.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) do ligante 3 (ácido *N*-fenil-(4-bromo)maleâmico) e de seus complexos com cobre e prata estão mostrados na Figura 21.

Os respectivos dados de infravermelho obtidos para o ligante 3, relatando os modos vibracionais e os números de onda das principais bandas estão listados na Tabela 3, em que se constata a estrutura da substância.

Para os complexos de cobre e prata, verificou-se deslocamentos das bandas de ν C=O de 1708 cm^{-1} para os valores de 1541 e 1567 cm^{-1} , respectivamente, indicando a plausível coordenação desses íons pela carboxila do ligante 3. Semelhante ao comportamento do ligante 1, nota-se a presença de bandas em torno de 1670 cm^{-1} , atribuídas às carbonilas da amida, o que sugere que provavelmente não formaram ligação de coordenação com os metais.

Figura 21 - Espectros de IV do ligante 3 e seus complexos com Cu e Ag.



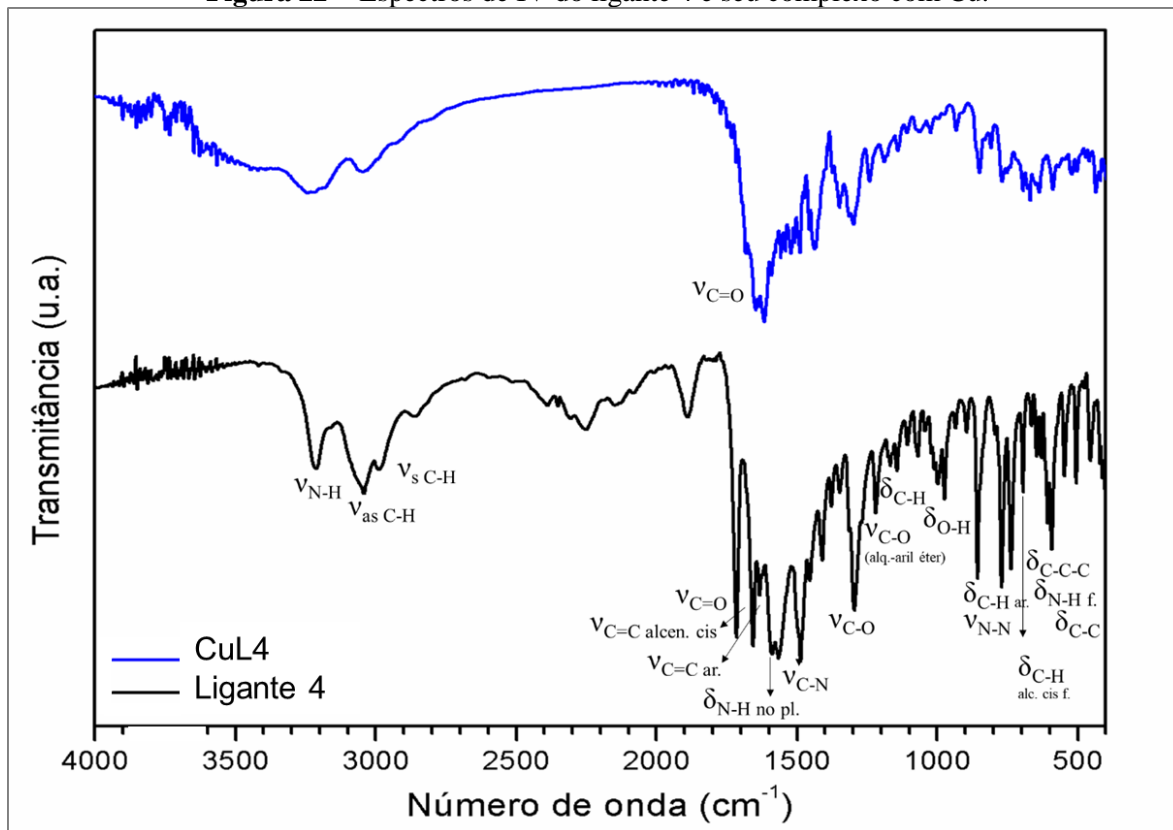
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Tabela 3 – Dados de IV do ligante 3.

Modo vibracional	Número de Onda (cm ⁻¹)
ν N-H	3271
ν _{ass} =C-H	3123, 3076, 3055, 3005
ν _s =C-H	2946, 2868
ν _s C-H alifático (metoxila)	2057 a 1823
Bandas de combinação ou harmônicas	1708
ν C=O	1629
ν C=C alceno cis	1565 e 1488
ν C=C aromático <i>para</i> -substituído	1538, 1505
δ N-H no plano	1394 a 1347
ν C-N	1320 a 1298
ν C-O	1077
ν C-Br	1010 a 973
δ O-H fora do plano	853
δ C-H aromático fora do plano, <i>para</i> -substituído	681
δ C-H alceno <i>cis</i> fora do plano	611 a 556
δ N-H fora do plano	504, 478, 434, 420
δ C=C alceno ou aromático fora do plano	3271

Os espectros de absorção na região do IV do ligante 4 (ácido *N*-(4-aminoantipirinil) maleâmico) e de seu complexo com cobre encontram-se na Figura 22.

Figura 22 - Espectros de IV do ligante 4 e seu complexo com Cu.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os dados de infravermelho obtidos para o ligante 4, elencando os modos vibracionais e os números de onda das bandas principais estão dispostos na Tabela 4, os quais confirmam a estrutura da substância.

Tabela 4 – Dados de IV do ligante 4.

Modo vibracional	Número de Onda (cm ⁻¹)
ν N-H	3212
ν _{ass} =C-H aromático	3042
ν _s =C-H	2990, 2860
Bandas de combinação ou harmônicas	2500 a 1830
ν C=O	1715, 1655
ν C=C alceno cis	1633, 1622
ν C=C aromático	1588
δ N-H no plano	1566 a 1523

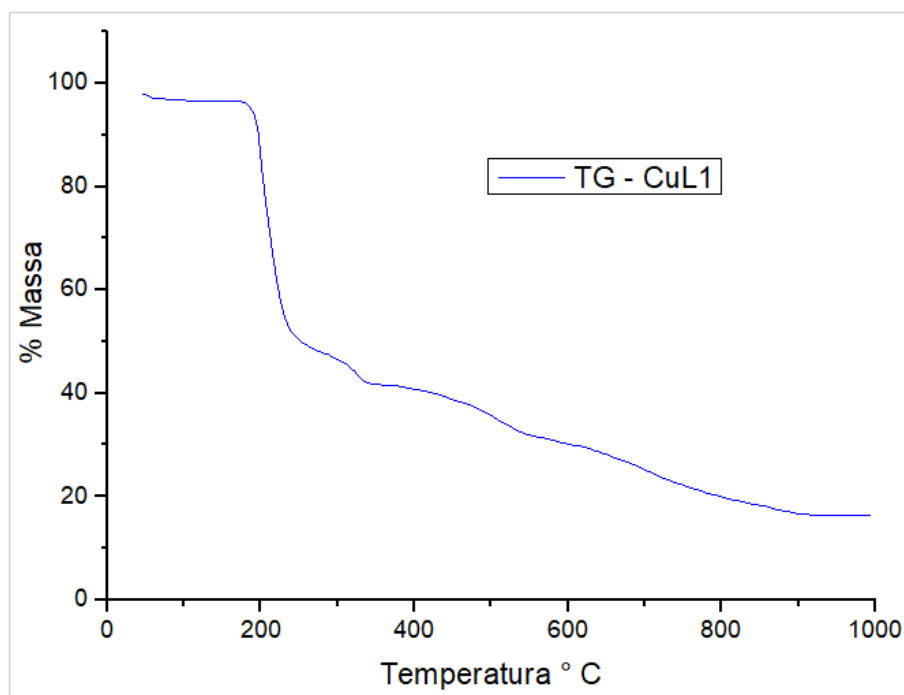
ν C-N	1455, 1410, 1377
ν C-O	1347, 1296, 1269, 1220
ν_{ass} C-O (aril-álquil-éter)	1245
δ C-H	1230 a 1100
δ O-H fora do plano	975
δ C-H aromático fora do plano, mono-substituído	770 e 737
ν N-N	737-720 (sobreposto por δ C-H aromático)
δ C-H alceno <i>cis</i> fora do plano	694
δ C-C-C	650 a 550
δ N-H fora do plano	607 e 592
δ C=C alceno ou aromático fora do plano	520, 455

Para o complexo de cobre, foi observado o deslocamento da banda de ν C=O de 1715 cm^{-1} para 1616 cm^{-1} , indicando a provável coordenação desse íon pela carboxila do ligante 4. Nota-se ainda a presença de bandas em torno de 1683 e 1669 cm^{-1} , atribuídas à carbonila da amida, o que sugere que provavelmente não forma ligação de coordenação com o metal nessa região.

5.2.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica se baseia no monitoramento contínuo da variação da massa de uma amostra enquanto essa é sujeita a um controle de temperatura. A curva TG obtida expressa a porcentagem de perda de massa em razão da variação de temperatura. Essa análise foi efetuada para os complexos sintetizados com o objetivo de distinguir etapas de degradação, estabilidade térmica e hidratação, possibilitando constatar uma possível estrutura através de cálculos estequiométricos utilizando a porcentagem dos resíduos óxidos obtidos para apontar a relação de proporção entre metal e ligante.

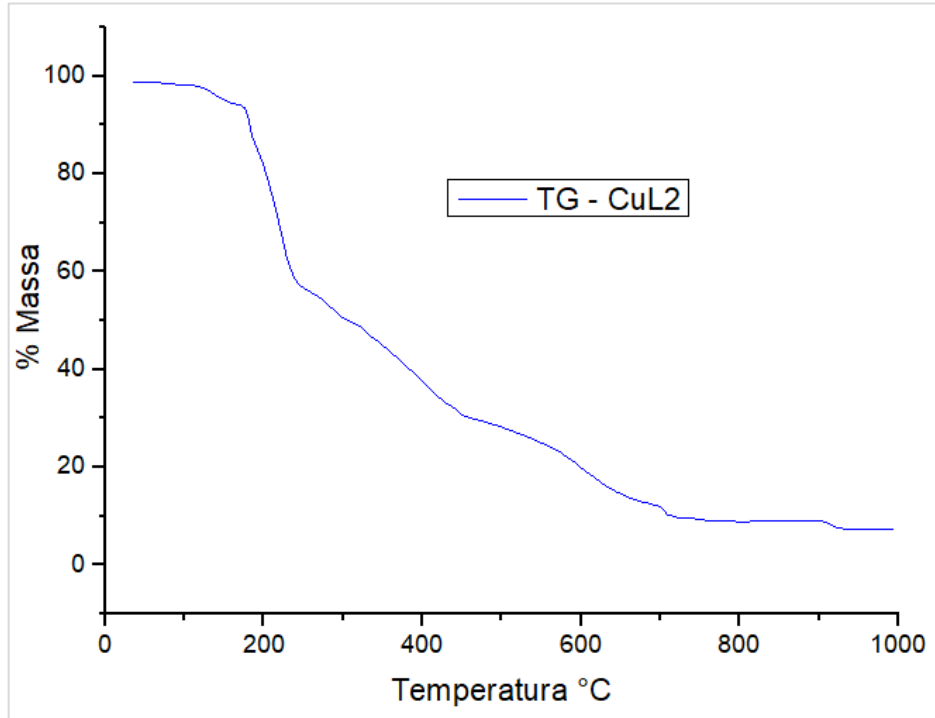
A curva TG para o complexo CuL1 está ilustrada na Figura 23. O complexo mostrou estabilidade térmica até $\sim 182^\circ\text{C}$ e a partir dessa temperatura até $\sim 900^\circ\text{C}$ ocorre uma perda de massa de $\sim 83,61\%$, atribuída à degradação do ligante 1. Após essa temperatura ocorre a formação do óxido de cobre (CuO) residual, estável até o final da curva, que representa aproximadamente 16,39% da massa inicial. Os cálculos estequiométricos em função da perda de massa, da massa molecular do ligante 1 (L1) e do CuO formado indicam uma proporção 1:2 metal:ligante, o que sugere a fórmula molecular $\text{Cu}(\text{L1})_2$.

Figura 23 – Curva TG do complexo CuL1.

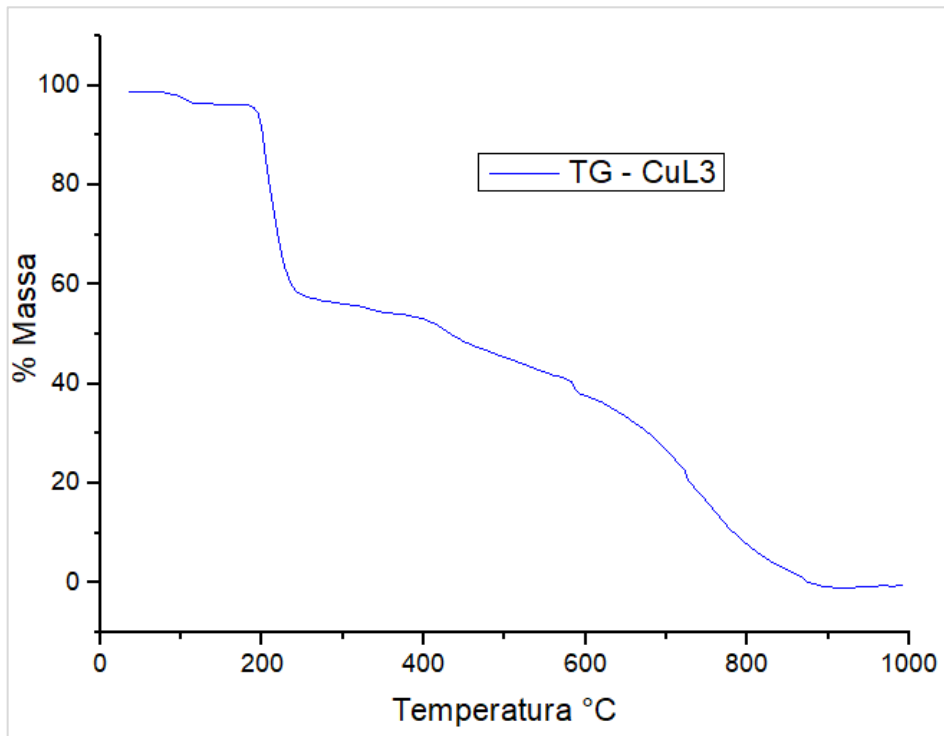
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A curva TG para o complexo CuL2 está demonstrada na Figura 24. É observada uma perda de massa de 5,85% em 115°C até 155°C, atribuída a 3 moléculas de água de hidratação presentes no complexo. Após isso, entre 175°C e 920°C verificou-se uma acentuada perda de massa de ~86,88%, atribuída à degradação do ligante 2. Após essa temperatura ocorre a formação do óxido de cobre (CuO) residual, estável até o final da curva, que representa aproximadamente 7,27% da massa inicial. Os cálculos estequiométricos em função da perda de massa, da massa molecular do ligante 2 (L2) e do CuO formado indicam uma proporção 1:4 metal:ligante, o que sugere a fórmula molecular $\text{Cu}(\text{L}2)_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

A curva TG para o complexo CuL3 está demonstrada na Figura 25. É observada uma perda de massa a partir de 95°C até 115°C, que poderia ser atribuída a moléculas de água de hidratação presentes no complexo. Após isso, ocorre uma acentuada perda de massa a partir de 188°C, atribuída à degradação do complexo. Porém essa perda de massa é continuada até valores próximos de 0,00% em 1000°C, onde não se verifica a estabilização da curva referente a formação do óxido de cobre (CuO) residual. Desta forma não foi possível a realização dos cálculos estequiométricos para sugerir a possível proporção metal:ligante e consequente fórmula molecular.

Figura 24 – Curva TG do complexo CuL2.

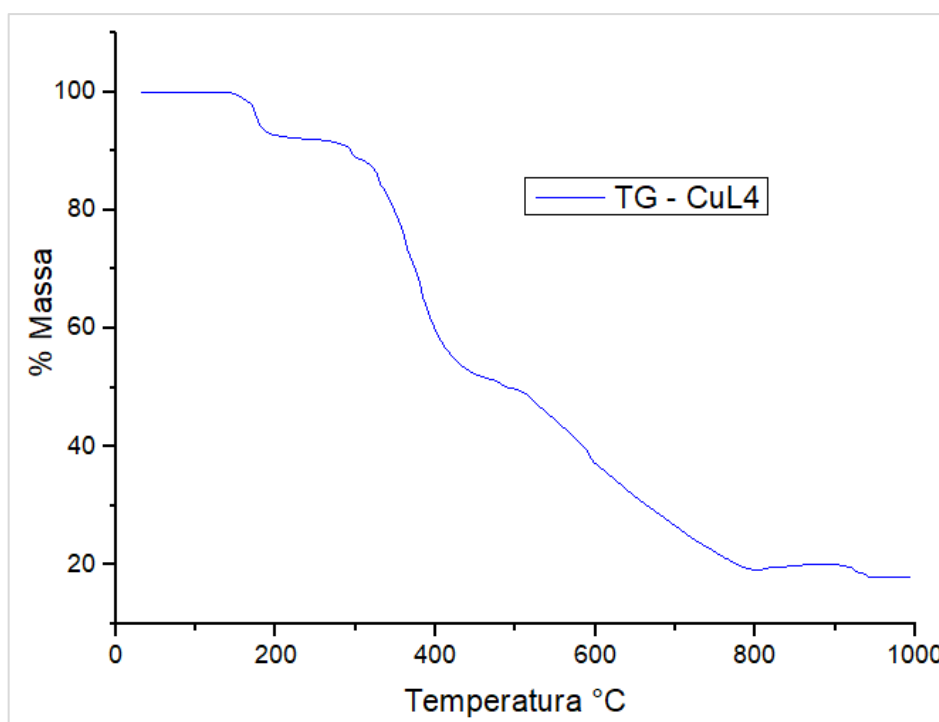
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Figura 25 – Curva TG do complexo CuL3.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A curva TG para o complexo CuL4 está demonstrada na Figura 26. É observada uma perda de massa de 7,28% em 99,95°C até 190°C, atribuída a 2 moléculas de água de hidratação presentes no complexo. Após isso, verificou-se uma acentuada perda de massa de ~74,89% de 260°C a 800°C, atribuída à degradação do ligante 4. Após essa temperatura ocorre um aumento de massa de aproximadamente 1,35% relacionado à oxidação da substância, a qual provavelmente formou resíduo. A partir de ~900°C ocorre novamente a perda de massa e posterior estabilização a 940°C devido à possível formação do óxido de cobre (CuO) residual, estável até o final da curva, que representa aproximadamente 17,83% da massa inicial. Os cálculos estequiométricos em função da perda de massa, da massa molecular do ligante 4 (L4) e do CuO formado indicam uma proporção 1:1 metal:ligante, o que sugere a fórmula molecular CuL4.2H₂O.

Figura 26 – Curva TG do complexo CuL4.

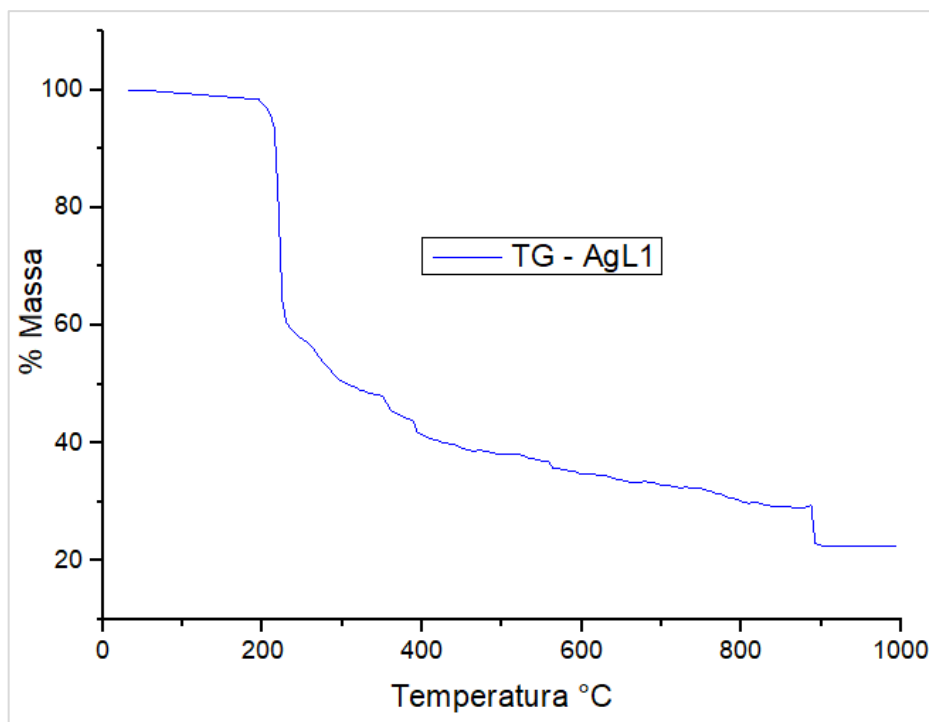


Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A curva TG para o complexo AgL1 está ilustrada na Figura 27. O complexo mostrou certa estabilidade térmica até ~195°C e a partir dessa temperatura até ~900°C ocorre uma perda de massa de ~77,63%, atribuída à degradação do ligante 1. Após essa temperatura ocorre a formação do óxido de prata (Ag₂O) residual, estável até o final da curva, que representa aproximadamente 22,37% da massa inicial. Os cálculos estequiométricos em função da perda

de massa, da massa molecular do ligante 1 (L1) e do Ag_2O formado indicam uma proporção 1:2 metal:ligante, o que sugere a fórmula molecular $\text{Ag}(\text{L}1)_2$.

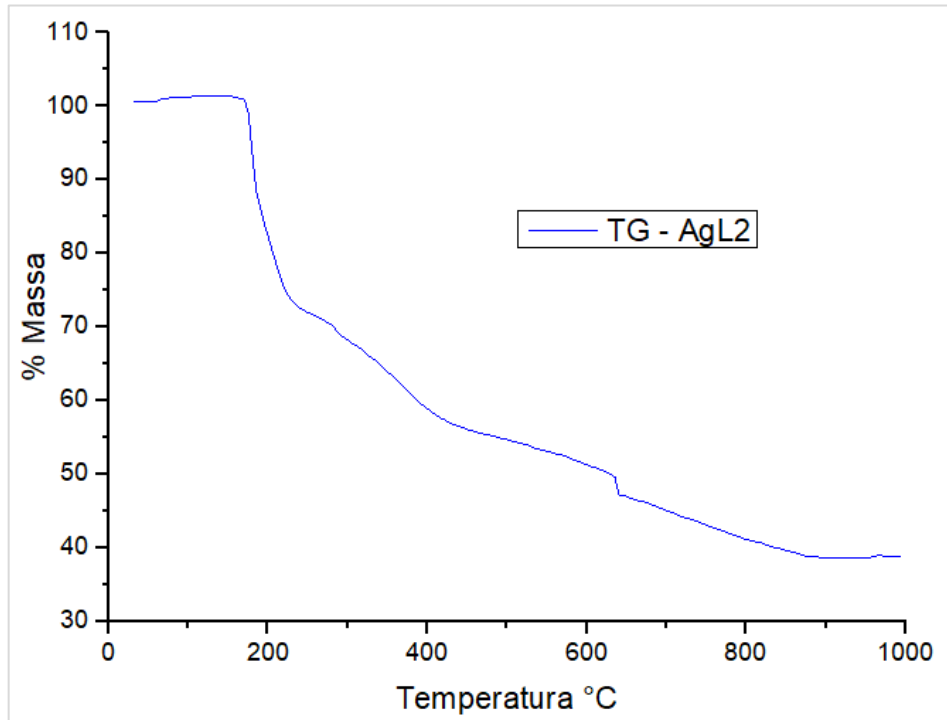
Figura 27 – Curva TG do complexo $\text{AgL}1$.



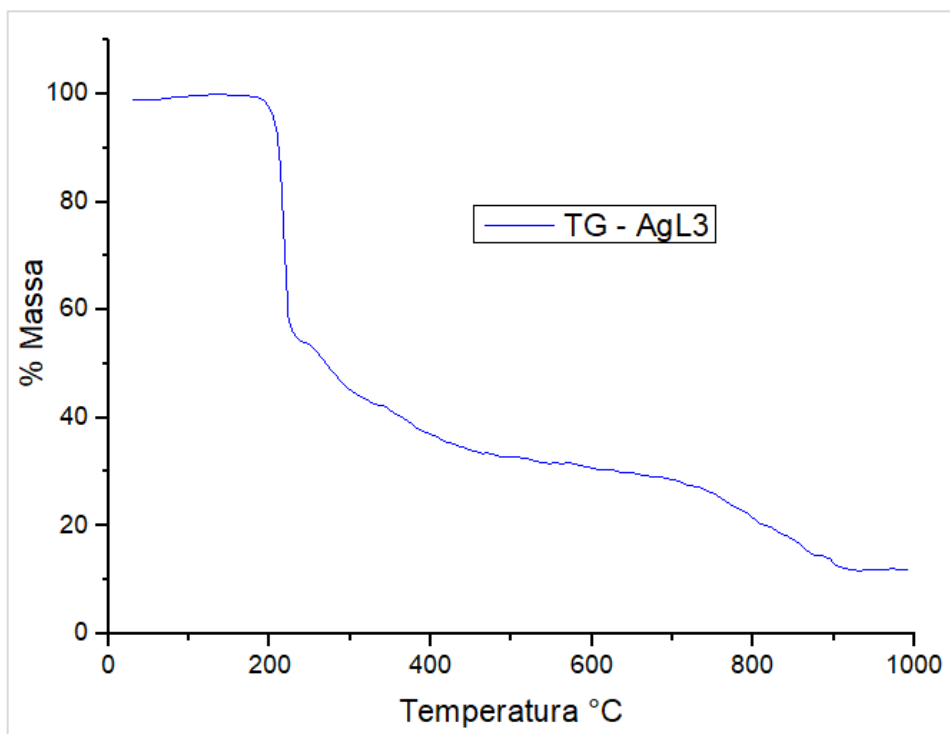
Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A curva TG para o complexo $\text{AgL}2$ está ilustrada na Figura 28. O complexo mostrou certa estabilidade térmica até $\sim 170^\circ\text{C}$ e a partir dessa temperatura até $\sim 880^\circ\text{C}$ ocorre uma acentuada perda de massa de $\sim 61,42\%$, atribuída à degradação do ligante 2. A partir de 880°C ocorre a formação do óxido de prata (Ag_2O) residual, estável até o final da curva, que representa aproximadamente $38,58\%$ da massa inicial. Os cálculos estequiométricos em função da perda de massa, da massa molecular do ligante 2 (L2) e do Ag_2O formado indicam uma proporção 1:1 metal:ligante, o que sugere a fórmula molecular $\text{AgL}2$.

Para o complexo $\text{AgL}3$, a curva TG está ilustrada na Figura 29. O complexo mostrou certa estabilidade térmica até $\sim 192^\circ\text{C}$ e a partir dessa temperatura até $\sim 910^\circ\text{C}$ ocorre uma acentuada perda de massa de $\sim 88,15\%$, correspondente à degradação do ligante 3. A partir de 910°C ocorre a provável formação do óxido de prata (Ag_2O) residual, estável até o final da curva, que representa aproximadamente $11,85\%$ da massa inicial. Os cálculos estequiométricos em função da perda de massa, da massa molecular do ligante 3 (L3) e do Ag_2O formado indicam uma proporção 1:3 metal:ligante, o que sugere a fórmula molecular $\text{Ag}(\text{L}3)_3$.

Figura 28 – Curva TG do complexo AgL2.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

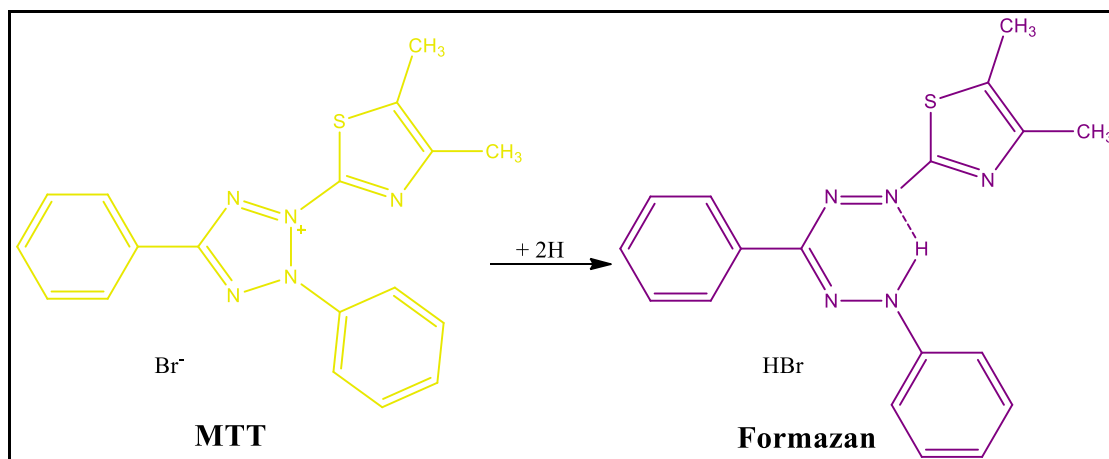
Figura 29 – Curva TG do complexo AgL3.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

5.3 Avaliação da Atividade Biológica Anticâncer

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que consiste na redução do brometo de tetrazólio (amarelo) em formazan (roxo) pelas células viáveis, conforme o Esquema 3, o que fornece diferenças de absorbância, possibilitando a determinação da concentração pela densidade ótica.

Esquema 3 - Redução do MTT à Formazan.

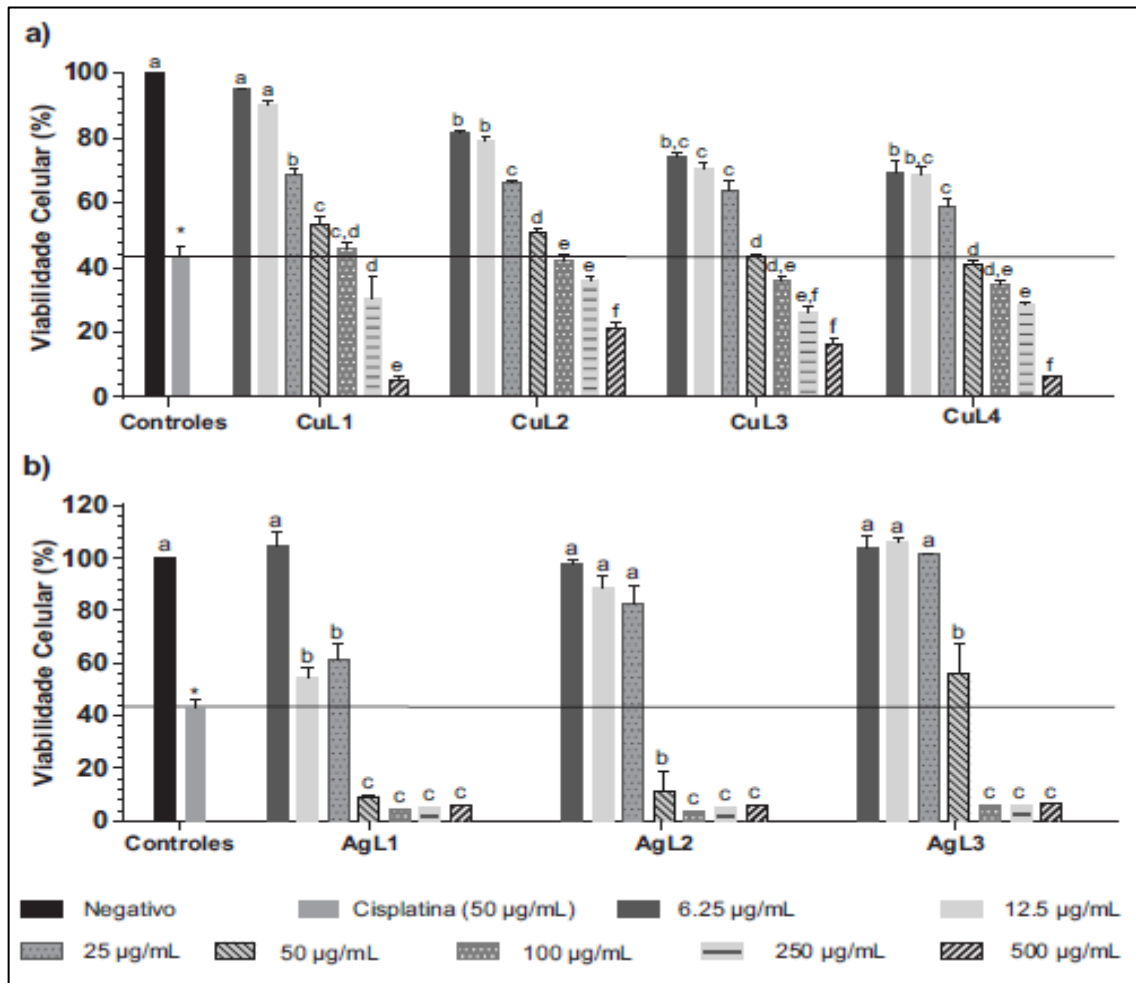


Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Este ensaio foi realizado contra a linhagem de células de adenocarcinoma mamário murino (4T1). A cisplatina causou uma redução de 56,58% ($p < 0,05$) da viabilidade das células 4T1 após 24 h de tratamento, validando o ensaio realizado e, provocou citotoxicidade na concentração de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo utilizada como controle positivo.

A indução de morte celular, causada pelos diferentes compostos testados, foi evidenciada em relação ao controle negativo e foi feita a comparação da eficiência em diferentes concentrações. A linha de referência foi traçada de acordo com a citotoxicidade da cisplatina, a qual foi utilizada para deduzir quais concentrações dos diferentes compostos possuem a mesma eficiência citotóxica ou efeito mais pronunciado do que a droga de referência, tomando como base as barras do histograma localizadas abaixo da linha de referência. De acordo com o teste estatístico ANOVA/Tukey realizado, as diferentes letras, representadas acima das barras do histograma, indicam diferenças estatisticamente significativas. Os resultados da avaliação da atividade anticâncer pelo ensaio do MTT estão demonstrados na Figura 30.

Figura 30 – Histograma da atividade biológica anticâncer pelo ensaio do MTT.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Quando as células foram tratadas com o composto-teste CuL1 a viabilidade celular foi reduzida a partir da concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Já para os compostos CuL2, CuL3 e CuL4 todas as concentrações foram citotóxicas.

Uma análise mais minuciosa, e em comparação com a cisplatina, pode-se inferir que resultados iguais ou melhores que os observados para o quimioterápico de referência (controle positivo; barras do histograma menores que a barra da cisplatina, ou seja, abaixo da linha de referência da atividade citotóxica) foram obtidos nas concentrações de 100-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para CuL1 e CuL2 e 50-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para CuL3 e CuL4.

Em relação aos compostos AgL(1-4) foram observadas reduções significativas da viabilidade celular para todos os compostos testados a partir de $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para AgL1 e $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para AgL2 e AgL3. Ao comparar os compostos testados e a cisplatina, pode-se afirmar que resultados iguais ou melhores que os observados para o quimioterápico de referência foram

obtidos nas concentrações de 50-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para AgL1 e AgL2 e 100-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o AgL3.

Na comparação entre os ligantes, foi observado que, para o ligante 1, o complexo formado com a prata obteve melhores resultados, sendo que a partir da concentração de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ houve redução significativa da viabilidade celular e a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi mais ativo do que a cisplatina, enquanto que no complexo de cobre esses resultados se deram na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

Para o ligante 2, o complexo formado com cobre reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que no complexo de prata essa redução da viabilidade ocorreu a partir de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Por outro lado, para este mesmo ligante, resultados melhores do que o fármaco de referência foram obtidos para o complexo de prata a partir da concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ao passo que para o complexo de cobre esse resultado se obteve a partir de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para o ligante 3, o complexo formado com o cobre demonstrou melhores resultados, sendo que uma redução significativa da viabilidade celular a partir de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, à medida que para o complexo de prata essa redução iniciou na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E ainda, a partir da concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi verificada uma melhor atividade do complexo de cobre em relação à cisplatina, sendo que para o complexo de prata esse resultado foi observado a partir de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

6 CONCLUSÃO

Foi possível a síntese dos ligantes e dos complexos a partir de condições reacionais relativamente brandas e com bons rendimentos.

Os dados obtidos pelos espectros na região do infravermelho dos complexos, em comparação com os ligantes, indicam a possível formação de ligação de coordenação dos metais pelos grupos C=O da carboxila do ligante.

Os dados obtidos através da análise termogravimétrica sugerem as seguintes fórmulas moleculares para os complexos sintetizados: Cu(L1)_2 , $\text{Cu(L2)}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CuL4 , Ag(L1)_2 , AgL2 , Ag(L3)_3 . Não foi possível prever a fórmula molecular do complexo de cobre formado com o ligante 3 através da análise da curva TG.

Todos os complexos de cobre e prata sintetizados, testados nas concentrações de 6,25 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram atividade citotóxica através do ensaio do MTT e podem, inclusive, ser mais eficientes do que a cisplatina em causar morte celular na linhagem de células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de outras técnicas, tais como análise elementar e absorção na região do ultravioleta para a confirmação estrutural dos complexos;
- Avaliação biológica dos ligantes a fim de analisar o efeito da complexação na potência citotóxica das substâncias;
- Avaliação biológica dos complexos em células normais, a fim de investigar a seletividade citotóxica dos complexos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. STEWART, BERNARD W.; WILD, CHRISTOPHER P. **World Cancer Report 2014/** International Agency for Research on Cancer - França: IARC, 2014.
- [2]. TAKIMOTO, Y.; IMAI, T.; KONDO, M.; HANADA, Y.; UNO, A.; ISHIDA, Y.; KAMAKURA, T.; KITAHARA, T.; INOHARA, H.; SHIMADA, S. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibule-ocular reflex. **Toxicology Letter**. v. 262, p. 49-54, 2016.
- [3]. FONSECA, T.G.; MORAIS, M. B.; ROCHA, T.; ABESSA, D. M.; AURELIANO, M.; BEBIANNO, M. J. Ecotoxicological assessment of the anticancer drug cisplatin in the polychaete *Nereis diversicolor*. **Science of The Total Environment**. v. 575, p. 162-172, 2016.
- [4]. NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**. v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.
- [5]. SHAHSAVANI, M. B.; AHMADI, S.; ASEMAN, M. D.; NABAVIZADEH, S. M.; RASHIDI, M.; ASADI, Z.; ERFANI, N.; GHASEMI, A.; SABOURY, A. A.; NIAZI, A.; BAHAOODINI, A.; YOUSEFI, R. Anticancer activity assessment of two novel binuclear platinum (II) complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 161, p. 345-354, 2016.
- [6]. SHARMA, N. K., AMETA R. K., SINGH, M. Spectrophotometric and physicochemical studies of newly synthesized anticancer Pt (IV) complexes and their interactions with CT-DNA. **Journal of Molecular Liquids**. v. 222, p. 752-761, 2016.
- [7]. ANASAMY, T.; THY, C. K.; LO, K. M.; CHEE, C. F.; YEAP, S. K.; KAMALIDEHGHAN, B.; CHUNG, L.Y. Tribenzyltin carboxylates as anticancer drug candidates: Effect on the cytotoxicity, mobility and invasiveness of breast cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 125, p. 770-783, 2016.
- [8]. WANG, Q. W.; LAM, P. L.; WONG, R. S.; CHENG, G. Y.; LAM, K. H.; BIAN, Z. X.; HO, C. L.; FENG, Y. H.; GAMBARI, R.; LO, Y. H.; WONG, W. Y.; CHUI, C. H. Synthesis of platinum (II) and palladium (II) complexes with 9,9-dihexyl-4,5-diazafluorene and their in vivo antitumor activity against Hep3B xenografted mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 124, p. 537-543, 2016.
- [9]. MATOS, M.R.P.N. Complexos metálicos na terapêutica do cancro. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**. v. 85, 2002.
- [10]. THALAMUTHU, S.; ANNARAJ, B.; VASUDEVAN, S.; SENGUPTA, S.; NEELAKANTAN, M. A. DNA binding, nuclease, and colon cancer cell inhibitory activity of a Cu(II) complex of a thiazolidine-4-carboxylic acid derivative. **Journal of Coordination Chemistry**. v. 66, n. 10, p. 1806-1819, 2013.
- [11]. PIVETTA T.; ISAIA, F.; VERANI, G.; CANNAS, C.; SERRA, L.; CASTELLANO, C.; DEMARTIN, F.; PILLA, F.; MANCA, M.; PANI, A. Mixed-1,10-phenanthroline-Cu(II) complexes: Synthesis, cytotoxic activity versus hematological and solid tumor cells and

complex formation equilibria with glutathione. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 114, p. 28-37, 2012.

[12]. BANTI, Christina N. e HADJIKAKOU, Sotiris K. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(I) compounds. **Metallomics**. v. 5, p. 569-596, 2013.

[13]. IQBAL M. A.; UMAR, M. I.; HAQUE, R.A.; KHADEER AHAMED, M. B.; ASMAWI, M. Z.; MAJID, A. M. Macrophage and colon tumor cells as targets for a binuclear silver (I) N-heterocyclic carbene complex, and anti-inflammatory and apoptosis mediator. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 146, p. 1-13, 2015.

[14]. ROCHA, D.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; DE OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; e PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**. v. 34, p. 111-118, 2011.

[15]. BURDULENE, D.; PALAIMA, A.; STUMBRYAVICHYUTE, Z.; TALAIKITE, Z. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-aminoantipyrine derivatives of succinamides. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 33, n. 4, p. 191-193, 1999.

[16]. JHA, A.; MUKHERJEE, C., PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; VADAPARTI, M.; DAS, U.; DE CLERCQ, E.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P.; SHRIVASTAV, A.; SHARMA, R. K.; DIMMOCK, J. R. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1,4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**. v. 20, p. 1510-1515, 2010.

[17]. MCMULLIN, Juliet. Cancer. **Annual Review of Anthropology**. v. 45, p. 251–266, 2016.

[18]. TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics, 2012. **A Cancer Journal for Clinicians**. v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

[19]. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2015. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 09/12/2017.

[20]. MILLER, A. B., HOOGSTRATEN, B., STAQUET, M. e WINKLER, A. Reporting results of cancer treatment. **Cancer**. v. 47, p. 207–214, 1981.

[21]. Tratamento do câncer/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 09/12/2017.

[22]. MITRA, A.K.; AGRAHARI, V.; MANDAL A.; CHOLKAR, K.; NATARAJAN, C.; SHAH, S.; JOSEPH, M.; TRINH, H. M.; VAISHYA, R.; YANG, X.; HAO, Y.; KHURANA, V.; PAL, D. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. **Journal of controlled release**. v. 219, n. 10, p. 248-268, 2015.

[23]. DE BIASI, A. R.; VILLENA-VARGAS, J.; ADUSUMILLI, P. S. Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence. **Clinical Cancer Research**. v. 20, n. 21, p. 5384-5391, 2014.

- [24]. ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; GRIMLEY, E. B.; THOMSON, A. J. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 242, p. 1347–1352, 1967.
- [25]. ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V.H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**. v. 222, p. 385–386, 1969.
- [26]. LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. **European Journal of Cancer**. v. 34, n. 10, p. 1522-1534, 1998.
- [27]. DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**. v. 5, n. 740, p. 364-378, 2014.
- [28]. ZHU, S.; PABLA, N.; TANG, C.; HE, L.; DONG, Z. DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Archives of Toxicology**. v. 89, n. 12, p. 2197-2205, 2015.
- [29]. ZHU, H.; LUO, H.; ZHANG, W.; SHEN, Z.; HU, X.; ZHU, X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Design Development and Therapy**. v. 7, n. 10, p. 1885-1895, 2016.
- [20]. ELJACK, N. D.; MA, H. Y.; DRUCKER, J.; SHEN, C.; HAMBLEY, T. W.; NEW, E. J.; FRIEDRICH, T.; CLARKE, R. J. Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. **Metallomics**. v. 6, n. 11, p. 2126-2133, 2014.
- [31]. CHEN, Y.; GAO, Y.; ZHANG, K.; LI, C.; PAN, Y.; CHEN, J.; WANG, R.; CHEN, L. MicroRNAs as Regulators of Cisplatin Resistance in Lung Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 37, n. 5, p.1869-1880, 2015.
- [32]. AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacology Research**. v. 106, p. 27-36, 2016.
- [33]. APPS, M.G.; CHOI, E.H.; WHEATE, N.J. The state-of-play and future of platinum drugs. **Endocrine Related Cancer**. v. 22, n. 4, p. 219-233, 2015.
- [34]. FAGE, S. W.; FAURSCHOU, A.; THYSEN, J. P. Copper hypersensitivity. **Contact Dermatitis**. v. 71, n. 4, p. 191-201, 2014.
- [35]. ZATULOVSKAIA, Y. A.; ILYECHOVA, E. Y.; PUCHKOVA, L. V. The Features of Copper Metabolism in the Rat Liver during Development. **PLoS One**. v. 16, n. 10, p. 10, 2015.
- [36]. HORDYJEWSKA, A.; POPIOLEK, L.; KOCOT, J. The many "faces" of copper in medicine and treatment. **Biometals**. v. 27, n. 4, p. 611-621, 2014.
- [37]. DENOYER, D.; MASALDAN, S.; LA FONTAINE, S.; CATER, M. A. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. **Metallomics**. v. 7, n. 11, p. 1459-1476, 2015.
- [38]. DENG, J.; CHEN, W.; DENG, H. Synthesis of Dipyridyl Ketone Isonicotinoyl Hydrazone Copper(II) Complex: Structure, Anticancer Activity and Anticancer Mechanism. **Journal of Fluorescence**. v. 26, n. 6, p. 1987-1996, 2016.

- [39]. LIANG, J. W.; WANG, Y.; DU, K. J.; LI, G. Y.; GUAN, R. L.; JI, L. N.; CHAO, H. Synthesis, DNA interaction and anticancer activity of copper(II) complexes with 4'-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine derivatives. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 141, p. 17-27, 2014.
- [40]. NG, C. H.; KONG, S. M.; TIONG, Y. L.; MAAH, M. J.; SUKRAM, N.; AHMAD, M.; KHOO, A. S. Selective anticancer copper(II)-mixed ligand complexes: targeting of ROS and proteasomes. **Metallomics**. v. 6, n. 4, p. 892-906, 2014.
- [41]. EMAM S. M.; EL SAYED IEL, T.; NASSAR, N. Transition metal complexes of neocryptolepine analogues. Part I: synthesis, spectroscopic characterization, and invitro anticancer activity of copper(II) complexes. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 5, n. 138, p. 942-953, 2015.
- [42]. ZAIDI, Y.; ARJMAND, F.; ZAIDI, N.; USMANI, J. A.; ZUBAIR, H.; AKHTAR, K.; HOSSAIN, M.; SHADAB, G. G. A comprehensive biological insight of trinuclear copper(II)-tin(IV) chemotherapeutic anticancer drug entity: in vitro cytotoxicity and in vivo systemic toxicity studies. **Metallomics**. v. 6, n. 8, p. 1469-1479, 2014.
- [43]. MARKOWSKA, A.; KASPRZAK, B.; JASZCZYŃSKA-NOWINKA, K.; LUBIN, J.; MARKOWSKA, J. Noble metals in oncology. **Contemporary Oncology**. v. 19, n. 4, p. 271-275, 2015.
- [44]. KLASSEN H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**. v. 26, n. 2, p. 131-138, 2000.
- [45]. ALI, K. A.; ABD-ELZAHER, M. M.; MAHMOUD, K. Synthesis and Anticancer Properties of Silver(I) Complexes Containing 2,6-Bis(substituted)pyridine Derivatives. **International Journal of Medicinal Chemistry**. v. 2013, 2013.
- [46]. LI, Y.; LIU, G.; TAN, C. P.; JI, L. N.; MAO, Z. W. Antitumor properties and mechanisms of mitochondria-targeted Ag(I) and Au(I) complexes containing N-heterocyclic carbenes derived from cyclophanes. **Metallomics**. v. 6, n. 8, p. 1460-1468, 2014.
- [47]. ALLISON, S. J.; SADIQ, M.; BARONOU, E.; COOPER, P. A.; DUNNILL, C.; GEORGOPOULOS, N. T.; LATIF, A.; SHEPHERD, S.; SHNYDER, S. D.; STRATFORD, I. J.; WHEELHOUSE, R. T.; WILLANS, C. E.; PHILLIPS, R. M. Preclinical anti-cancer activity and multiple mechanisms of action of a cationic silver complex bearing N-heterocyclic carbene ligands. **Cancer Letters**. v. 10, n. 403, p. 98-107, 2017.
- [48]. TENG, Y.; LIU, R. Insights into potentially toxic effects of 4-aminoantipyrine on the antioxidant enzyme copper-zinc superoxide dismutase. **Journal of Hazardous Materials**. v. 262, p. 318-324, 2013.
- [49]. MAIONE, S.; RADANOVA, L.; DE GREGORIO, D.; LUONGO, L.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V.; IMMING, P. Effects of metabolites of the analgesic agent dipyrone (metamizol) on rostral ventromedial medulla cell activity in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 748, p. 115-122, 2015.
- [50]. DOS SANTOS, G. G.; DIAS, E. V.; TEIXEIRA, J. M.; ATHIE, M. C. P.; BONET, I. J. M.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue

involves two different mechanisms: Neuronal KATP channel opening and CB1 receptor activation. **European Journal of Pharmacology**. v. 741, p. 124-131, 2014.

[51]. MOHANRAM, I. e MESHRAM, J. Synthesis and biological activities of 4-aminoantipyrine derivatives derived from betti-type reaction. **ISRN Organic Chemistry**. v. 4, 2014.

[52]. ADAM, A. M. Structural, thermal, morphological and biological studies of proton-transfer complexes formed from 4-aminoantipyrine with quinol and picric acid. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 104, p. 1-13, 2013.

[53]. BUITRAGO-GONZÁLEZ, T. P.; CALDERÓN-OSPINA, C. A.; VALLEJOS-NARVÁEZ, A. Dipirona: ¿Beneficios subestimados o riesgos sobredimensionados? Revisión de la literatura. **Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas**. v. 43, p. 173-195, 2014.

[54]. BERNO, C. R.; RÓS, B. de T.; DA SILVEIRA, I. O.; COELHO H. R.; ANTONIOLLI, A. C.; BEATRIZ, A.; DE LIMA, D. P.; MONREAL, A. C.; SOUSA, F. G.; DA SILVA, R. G.; OLIVEIRA, R. J. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutation Research*. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 805, p. 19-24, 2016.

[55]. PREMNATH, D.; SELVAKUMAR, P. M.; RAVICHANDIRAN, P.; SELVAN, G.; INDIRALEKA, M.; VENNILA, J. J. Synthesis and spectroscopic characterization of fluorescent 4-aminoantipyrine analogues: Molecular docking and in vitro cytotoxicity studies. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 15, n. 153, p. 118-123, 2016.

[56]. GHORAB, M. M.; EL-GAZZAR, M. G.; ALSAID, M. S. Synthesis, characterization and anti-breast cancer activity of new 4-aminoantipyrine-based heterocycles. **International Journal of Molecular Science**. v. 15, n. 5, p. 7539-7553, 2014.

[57]. LEELAVATHY, C. e ARUL ANTONY, S. Synthesis, spectral characterization and biological activity of metal(II) complexes with 4-aminoantipyrine derivatives. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 113, p. 346-355, 2013.

[58]. RODRIGUES, J.; ABRAMJUK, C.; VÁSQUEZ, L.; GAMBOA, N.; DOMÍNGUEZ, J.; NITZSCHE, B.; HÖPFNER, M.; GEORGIEVA, R.; BÄUMLER, H.; STEPHAN, C.; JUNG, K.; LEIN, M.; RABIEN, A. New 4-maleamic acid and 4-maleamide peptidyl chalcones as potential multitarget drugs for human prostate cancer. **Pharmaceutical Research**. v. 28, n. 4, p. 907-919, 2011.

[59]. ROSOLEN, D.; CRECZYNSKI-PASA, T. B., e MONTEIRO, F. B. F. **Citotoxicidade de derivados maleimídicos: relação entre a atividade antitumoral e antiadipogênica**. Florianópolis – SC, Programa de Pós-Graduação em Farmácia - UFSC, 2014. Dissertação de mestrado, 101 p.

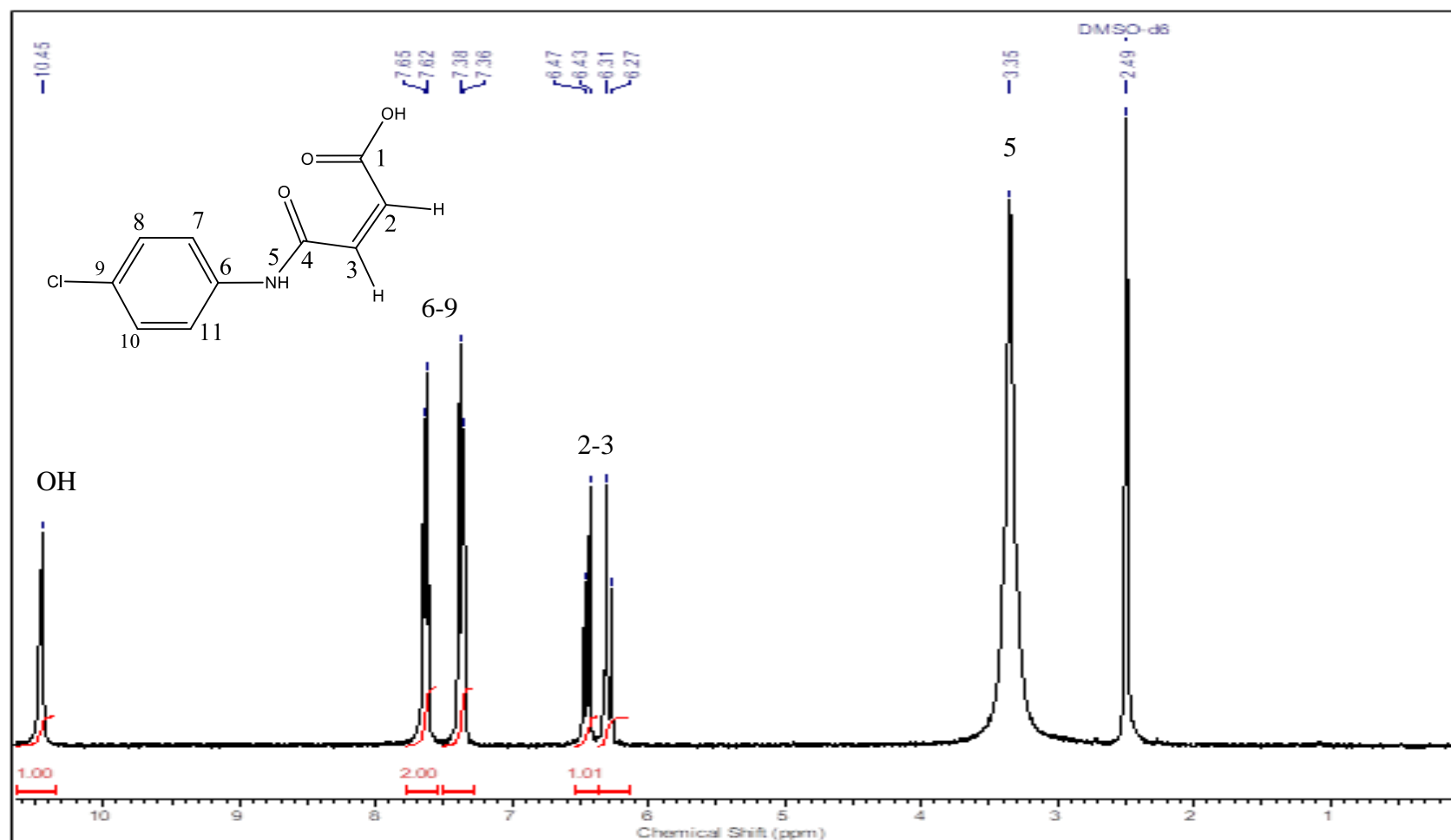
[60]. SORTINO, M. CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; ZACCHINO, S. *N*-Phenyl and *N*-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida spp.*: Time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, n. 1, 2008.

[61]. CECHINEL FILHO, V.; PINHEIRO, T.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E. Antibacterial activity of *N*-phenylmaleimides, *N*-phenylsuccinimides and related compounds. Structure-activity relationships. **Farmaco**. v. 49, n. 10, p. 675-677, 1994.

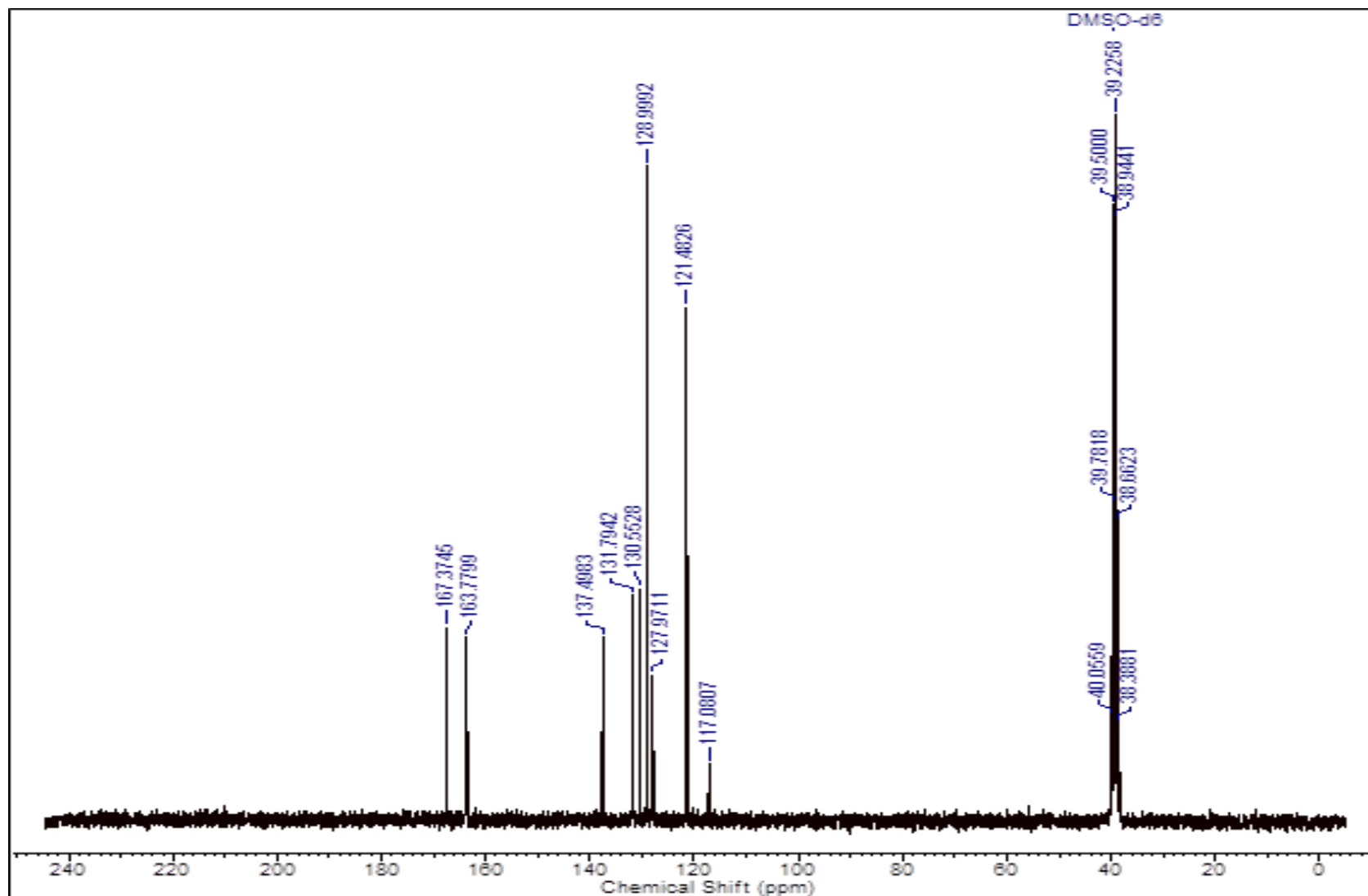
[62]. YUNESA, J. A.; CARDOSO, A. A.; YUNES, R. A.; CORRÊA, R.; DE CAMPOS-BUZZI, F.; FILHO, V. C. Antiproliferative Effects of a Series of Cyclic Imides on Primary Endothelial Cells and a Leukemia Cell Line. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**. v. 63, n. 9-10, p. 675-680, 2008.

[63]. PESARINI, J.R.; OLIVEIRA, R.J.; PESSATO, L.R.; ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B. et al. Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 91, p. 861-871, 2017.

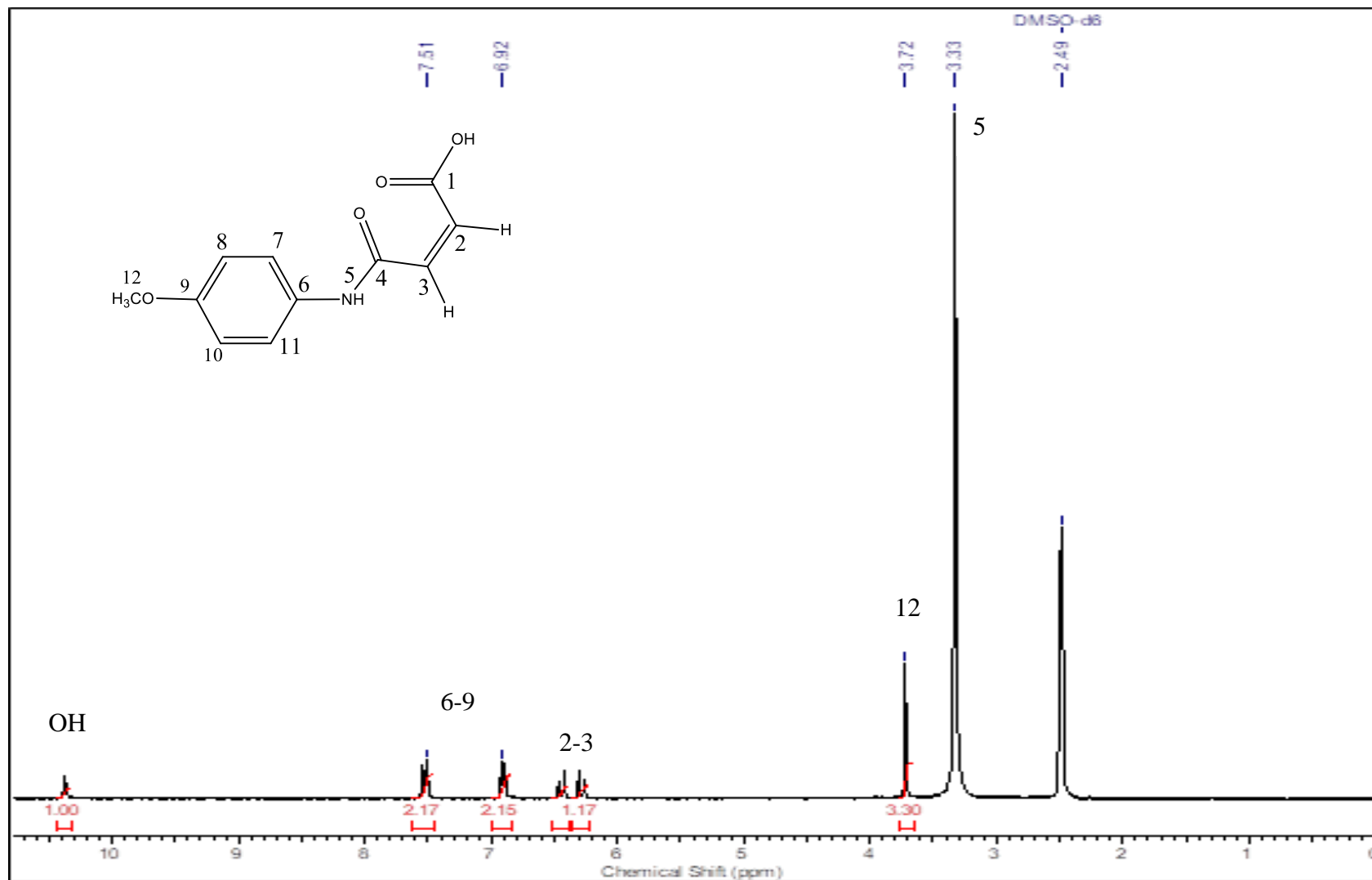
ANEXOS

A) Espectro de RMN de ^1H do ligante (1) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz.

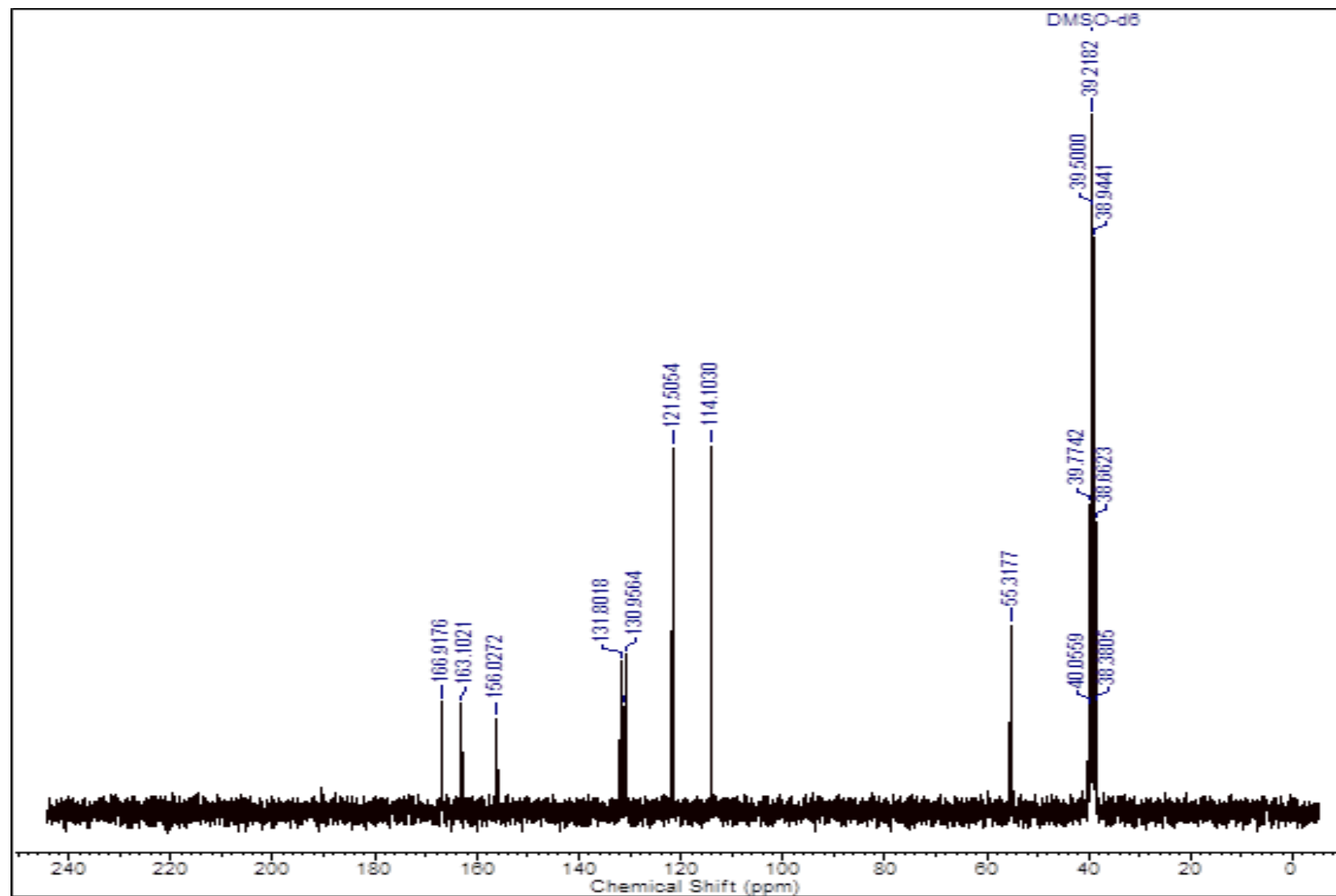
B) Espectro de RMN de ^{13}C do ligante (1) em $\text{DMSO-}d_6$ a 75 MHz.

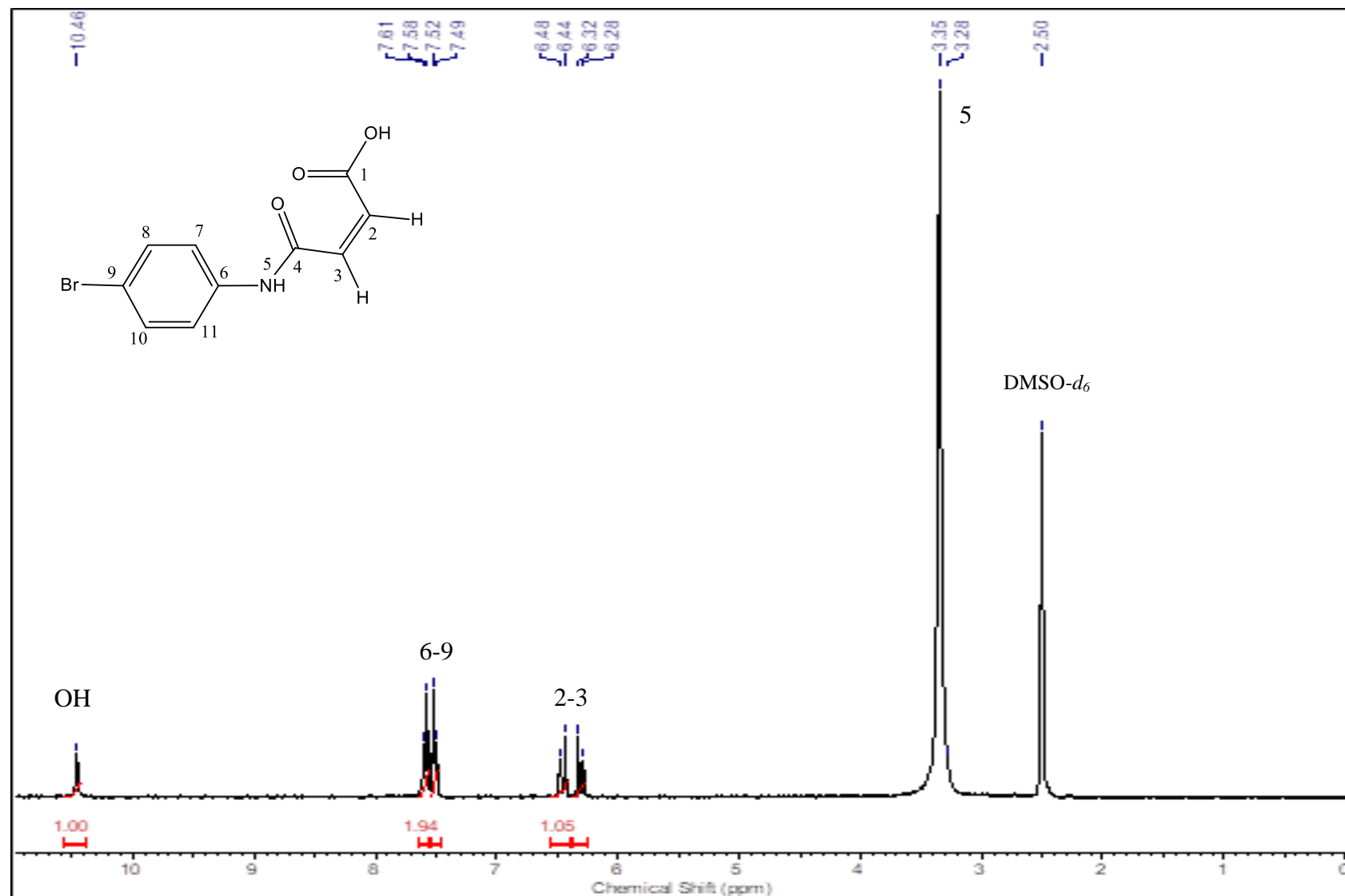


C) Espectro de RMN de ^1H do ligante (2) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz.

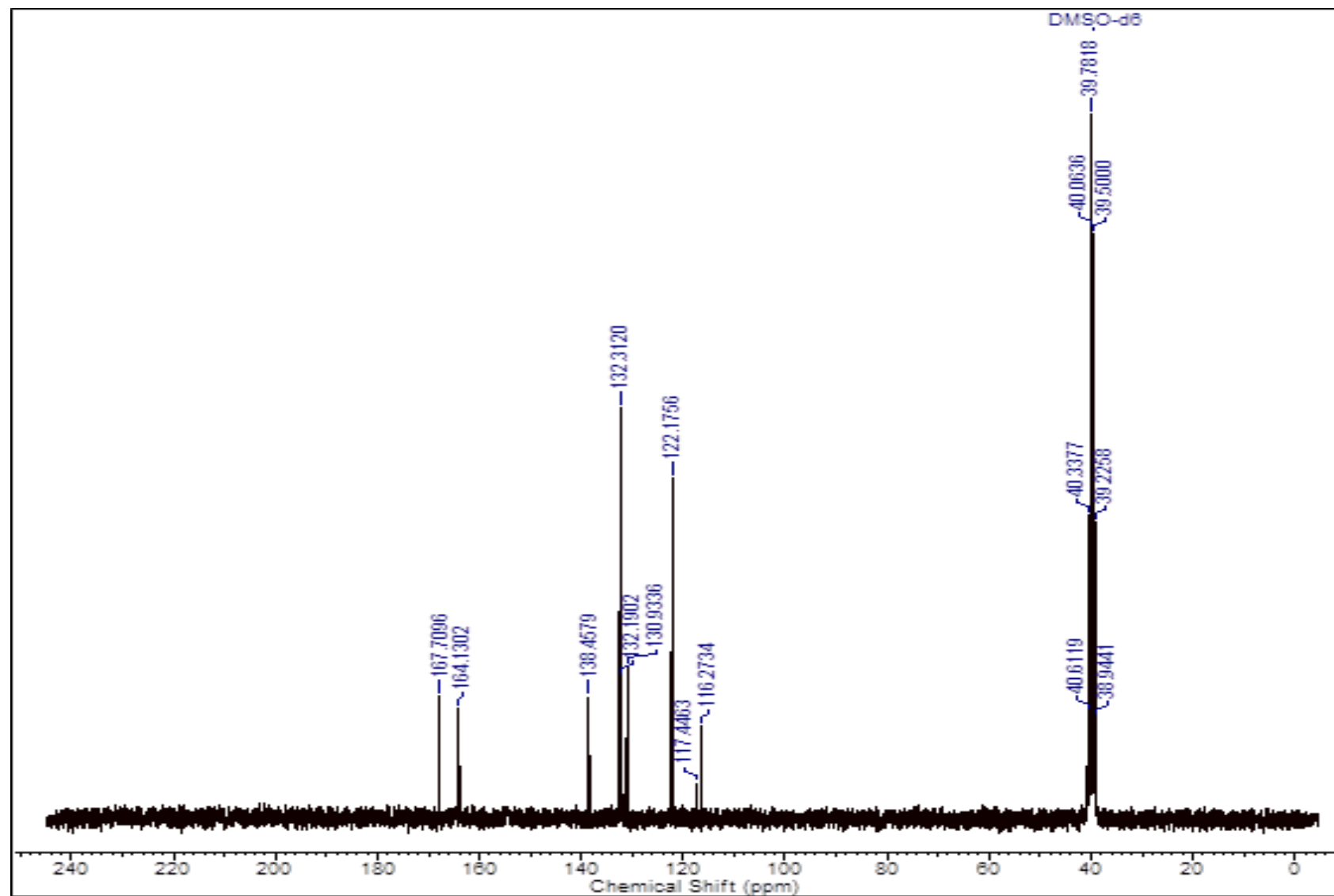


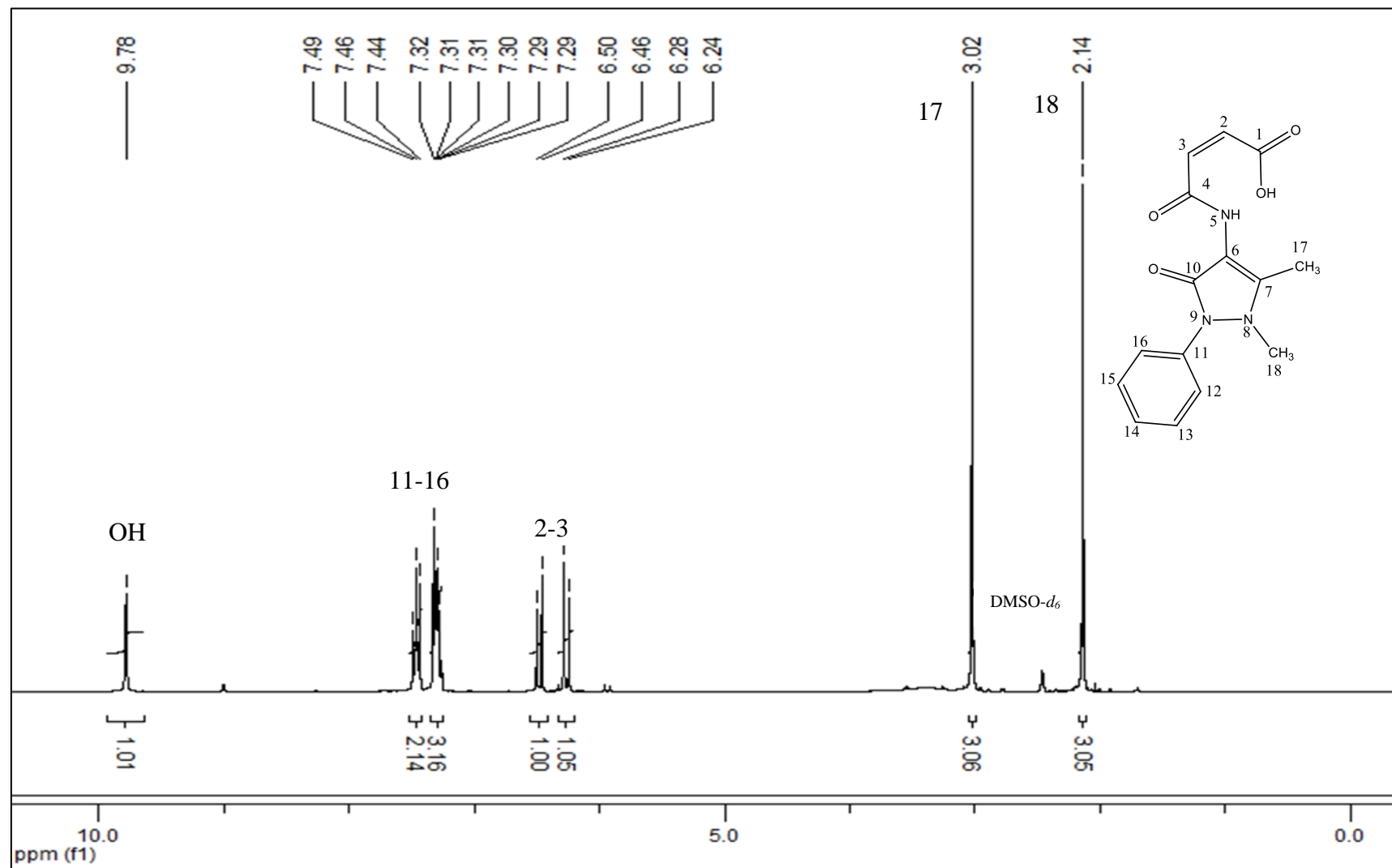
D) Espectro de RMN de ^{13}C do ligante (2) em $\text{DMSO-}d_6$ a 75 MHz.



E) Espectro de RMN de ^1H do ligante (3) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz.

F) Espectro de RMN de ^{13}C do ligante (3) em $\text{DMSO-}d_6$ a 75 MHz.



G) Espectro de RMN de ^1H do ligante (4) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz.

H) Espectro de RMN de ^{13}C do ligante (4) em $\text{DMSO-}d_6$ a 75 MHz.

