

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE II
COM LIGANTES N,O-DOADORES**

WAGNER DA SILVA TERRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
AGOSTO- 2016**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE II
COM LIGANTES N,O-DOADORES**

WAGNER DA SILVA TERRA

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.”

Orientador: Prof. Dr. Adolfo Horn Jr.

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
AGOSTO- 2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

171/2016

Terra, Wagner da Silva

Síntese, caracterização e prospecção da atividade antitumoral de compostos de coordenação de cobre II com ligantes *N,O*-doadores / Wagner da Silva Terra. – Campos dos Goytacazes, 2016.

xxvi, 210 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Adolfo Horn Júnior.

Área de concentração: Bio-inorgânica.

Bibliografia: f. 179-190.

1. COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO 2. COBRE 3. ATIVIDADE ANTITUMORAL I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

CDD 572.51

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROSPECÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE II
COM LIGANTES N,O-DOADORES**

WAGNER DA SILVA TERRA

“Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.”

Aprovada em 04 de Agosto de 2016

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Franz Viana Borges (Dr. em Ciências Naturais)
Instituto Federal Fluminense *Campus* Campos-Centro – IFF

Prof^a. Dr^a Josane Alves Lessa (Dr^a. em Química)
Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Nicolás Adrian Rey (Dr. em Química)
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC-RJ

Prof. Dr. Adolfo Horn Jr. (Dr. em Química)
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF
ORIENTADOR

Ou Isto ou Aquilo

*“Ou se tem chuva e não se tem sol
ou se tem sol e não se tem chuva!”*

*Ou se calça a luva e não se põe o anel,
ou se põe o anel e não se calça a luva!*

*Quem sobe nos ares não fica no chão,
quem fica no chão não sobe nos ares.*

*É uma grande pena que não se possa
estar ao mesmo tempo nos dois lugares!*

*Ou guardo o dinheiro e não compro o doce,
ou compro o doce e gasto o dinheiro.*

*Ou isto ou aquilo: ou isto ou aquilo...
e vivo escolhendo o dia inteiro!*

*Não sei se brinco, não sei se estudo,
se saio correndo ou fico tranquilo.*

*Mas não consegui entender ainda
qual é melhor: se é isto ou aquilo.”*

Cecília Meireles

Expresso de maneira especial, o meu profundo reconhecimento e gratidão:

*Aos meus pais Valter e Ivânia pelo amor, cuidado e dedicação, vocês foram
os faróis que me orientaram até chegar aqui.
Homenageio!*

*A todos que sofreram as mazelas do câncer, sucumbindo a todas as condutas
médicas para vencer essa batalha desleal.
Dedico!*

*Ao meu único e eterno Deus, por te chegado até aqui, pois “todas
as coisas foram feitas por Ele, e sem Ele nada
do que foi feito se fez.” (João 1:3)
Ofereço!*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças ao apoio de pessoas e instituições que aqui rendo nominalmente meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter dirigido meus passos me dando força e coragem para suportar os obstáculos do dia-a-dia durante toda essa caminhada;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, pela oportunidade de realizar uma pós-graduação de excelente qualidade.

Ao prof. Dr. Adolfo Horn Jr. pelos ensinamentos, paciência e principalmente pela orientação durante todos esses anos de doutorado, certamente levarei um pouco do seu profissionalismo, de sua competência e de sua inteligência. Sou imensamente grato por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse concretizar um sonho.

À prof^a Dr. Christiane Fernandes pelos ensinamentos e suporte durante todos esses anos.

Aos profs. Dr. Roberto Franco (Laboratório de Ciências Físicas –LCFIS-UENF), Dr. Adailton Bortoluzzi (Departamento de Química da UFSC), Dr. Nicolás Adrian Rey (Departamento de Química da PUC) e Dr. Jacson Lamounier Resende (Departamento de Química da UFF) pelas colaborações nos processos de caracterização dos compostos de coordenação.

Ao Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR-UENF) por tornar possível a realização dos ensaios *in vitro* com células cancerígenas. Também agradeço imensamente ao prof. Dr. Franz Viana Borges pelo auxílio na realização dos testes biológicos.

Ao Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida e à Laura Maciel pela realização dos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Aos técnicos Marcelo, Juliana, Rita e Núbia, por contribuírem com este trabalho e por estarem sempre disponíveis para me auxiliar, inclusive nos finais de semana.

Às minhas grandes companheiras de testes biológicos: Érika Bull, Samila Morcelli e Rafaela Oliveira. Eu agradeço pela excelente equipe que formamos e pelos resultados que conquistamos. Vocês foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

À Luísa Mendes por me auxiliar no início das minhas atividades experimentais no laboratório de Química de Coordenação.

Aos meus queridos amigos do setor de Química de Coordenação e Bio-Inorgânica do LCQUI: Érika Bull, Samila Morcelli, Clícia Gomes, Luísa Mendes, Sarah Ferreira, Ísis Leal, Leonardo Lube, Rafaela Oliveira, Luana Batista, Rafael Costa, Vagner Assis, Bianca Viana, Diógenes Neto, Larissa Reis e Nathália Florêncio. Agradeço pelas contribuições profissionais e pelo agradável convívio durante toda essa jornada.

Essa grande família não estaria completa sem a presença dos grandes amigos que dividiram, não somente espaço físico, mas também seus conhecimentos e competências: Polyana Barcelos, Camila Nunes, Thayana Pontal, Monique Curcio, Ruth Evelyn, Thiago Araújo, Samira Vidal e Ronan Facini. Também sou imensamente grato aos colegas do Laboratório de Biologia do Reconhecer, os quais em vários momentos me ajudaram a compreender melhor a parte biológica, dentre estes gostaria de citar Laura Maciel, Marina Meireles e Jacques Coimbra.

Aos meus pais Valter Duarte Terra e Ivânia da Silva Terra, por cada ensinamento durante toda a minha vida e por terem dedicado suas vidas a mim e aos meus irmãos. Agradeço pelo incentivo a ir sempre adiante e pela compreensão pelos momentos que estive ausente. Vocês formaram os pilares que me trouxeram até aqui. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Ivanete, Vanessa, Vanusa, Hyago e Yasmim, pelo amor, companheirismo e amizade que deram mais alegria a minha simples vida. Certamente o carinho que compartilhamos foi fundamental para chegar até onde sempre sonhei.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram com a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ANEXOS	XIX
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS.....	XXII
RESUMO.....	XXV
ABSTRACT.....	XXVI
1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1. Desenvolvimento do Câncer.....	30
2.2. Tratamento de Neoplasias	35
2.3. Principais Mecanismos de Morte Celular.....	36
2.4. Metalofármacos com atividade antitumoral	40
2.5. Atividade antitumoral da Cisplatina e seus derivados	42
2.6. Compostos de coordenação com atividade antitumoral e com centros metálicos diferentes de platina (Pt)	45
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivo Geral	56
3.2. Objetivos Específicos.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1. Técnicas empregadas para sínteses e caracterizações dos ligantes e compostos de coordenação.....	58
4.1.1. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN).....	58
4.1.2. Determinação do ponto de fusão (P.F.).....	58
4.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	59
4.1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	59
4.1.5. Difratometria de Raios X de monocristal (DRX).....	59

4.1.6. Espectroscopia eletrônica (UV-Vis).....	60
4.1.7. Condutivimetria	60
4.1.8. Voltametria Cíclica	60
4.1.9. Espectroscopia de Massas com ionização por Electrospray (ESI – MS/MS).....	61
4.1.10. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	61
4.2. Sínteses Orgânicas	62
4.2.1. Síntese do ligante 1,4- <i>bis</i> (propanamida)etilenodiamina (BCEN) (L ₁).....	62
4.2.2. Síntese do ligante 1,4- <i>bis</i> (propanamida)piperazina (BPAP) (L ₂).....	62
4.2.3. Síntese do ligante 1,4- <i>bis</i> (propanamida)homopiperazina (BPAH) (L ₃)	63
4.2.4. Síntese do precursor <i>N,N</i> -bis(salicilideno)etilenodiamina (H ₂ Salen) (P ₁).....	64
4.2.5. Síntese do ligante <i>N,N</i> -bis(2-hidroxibenzil)etilenodiamina (H ₂ Salam) (L ₄).....	64
4.2.6. Síntese do ligante <i>N,N</i> -bis(2-hidroxibenzil)- <i>N,N'</i> - <i>bis</i> [3-(1-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina (H ₂ Salandi α) (L ₅).....	65
4.2.7. Síntese do novo ligante <i>N,N</i> -bis(2-hidroxibenzil)- <i>N,N'</i> - <i>bis</i> [3-(2-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina (H ₂ Salandi β) (L ₆)	66
4.3. Sínteses dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo amida	67
4.3.1. Síntese do composto de coordenação [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O (C ₁)	67
4.3.2. Síntese do novo composto de coordenação [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂ (C ₂).....	68
4.3.3. Síntese do novo composto de coordenação [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂ (C ₃).....	69
4.3.4. Síntese do composto de coordenação [Cu(Salam)]•H ₂ O (C ₄)	70
4.3.5. Síntese do composto de coordenação [Cu ₂ (Salandi α)Cl ₂] (C ₅).....	70
4.3.6. Síntese do composto de coordenação [Cu ₂ (Salandi β)Cl ₂]•2H ₂ O (C ₆)	71
4.4. Avaliação da atividade antineoplásica , in vitro, dos compostos	71
4.4.1. Descongelamento, cultura e congelamento das linhagens de células selecionadas.....	72
4.4.2. Diluição e armazenamento dos compostos avaliados	73
4.4.3. Ensaio Metabólico com MTT (brometo de 3-(4,5-17 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltretazólio).....	73
4.4.4. Cultura da linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	75

4.4.5. Confirmação do processo de morte celular programada através de marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP)	76
4.4.6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1) ...	76
4.4.7. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)	77
4.4.8. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET)	78
4.4.9. Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9	78
4.6.10. Avaliação da atividade da caspases 12	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	80
5.1. Sínteses dos ligantes contendo grupos amida	80
5.2. Sínteses dos ligantes derivados do H ₂ Salen.....	81
5.3. Caracterização dos ligantes contendo grupos amida	83
5.4. Caracterização dos ligantes derivados do H ₂ Salen	97
5.5. Sínteses dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.....	125
5.6. Caracterizações dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.	126
5.7. Sínteses dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes derivados do H ₂ Salen	145
5.8. Caracterizações dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes derivados do H ₂ Salen.....	146
5.9. Avaliação da atividade antitumoral de compostos	156
5.9.1. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (brometo de 3-(4,5-17 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltretazólio).....	156
5.9.2. Avaliação da externalização de fosfatidilserina (marcação com anexina V e iodeto de propídio) para a linhagem H460 quando tratada com o complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	158
5.9.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial para a linhagem de H460 quando tratada com o complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	160
5.9.4. Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo para a linhagem de H460 quando tratada com o complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	162
5.9.5. Avaliação da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a linhagem de H460 quando tratada com o complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂ ...	164

5.9.6. Avaliação da externalização de fosfatidilserina (marcação com anexina V e iodeto de propídio) para as linhagens de MOLT-04 e U937 quando tratadas com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	167
5.9.7. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	169
5.9.8. Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	170
5.9.9. Avaliação da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	172
5.9.10. Avaliação da ativação das caspases 3, 6, 8, 9, 12 para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	174
6. CONCLUSÕES.....	177
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
ANEXOS.....	191

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativas para os anos de 2016 e 2017 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária (INCA, 2016).	28
Figura 2. Esquema do ciclo celular destacando a atividade dos complexos Ciclina-CDK de mamíferos e os pontos de checagem.	31
Figura 3. Diferença entre a morte celular por apoptose e por necrose.	37
Figura 4. Esquema ilustrando as etapas das principais vias apoptóticas de morte celular. ...	39
Figura 5. Estrutura da cisplatina (a) e seus análogos carboplatina (b) e oxiplatina (c).	41
Figura 6. Mecanismos de ação e resistência à cisplatina.....	43
Figura 7. Estrutura dos análogos da cisplatina: carboplatina (a), oxaliplatina (b), nedaplatina(c), lobaplatina (d) e heptaplatina (e).....	44
Figura 8. Estrutura química dos complexos de rutênio(III) NAMI-A, KP1019 e NKP1339....	46
Figura 9. Estrutura química dos complexos de rutênio(III) $[\text{RuCl}_3(\text{dbtp})_3]$ e $[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{dbtp})_2]$	47
Figura 10. Complexos de Ga (III) com atividade antitumoral.	48
Figura 11. Estrutura dos compostos de coordenação dos compostos Fe(III)-salen e Fe(III)salphen.....	49
Figura 12. Complexos de ferro (III) obtidos pelo grupo de Química de Coordenação da UENF.....	50
Figura 13. Candidato a metalofármaco de titânio (Ti) empregado em fase clínica.	51
Figura 14. Composto de coordenação de ouro com ligante fosfol.....	52
Figura 15. Compostos coordenação de cobre (II) com atividade antitumoral avaliados pelo grupo de Química de Coordenação da UENF.....	53
Figura 16. Complexo de cobre (II) com atividade anticancerígena denominado Casiopeína II-gli.....	54
Figura 17. Provável mecanismo de ação dos compostos de coordenação de cobre (II) denominados de casiopeínas.....	55
Figura 18. Estrutura dos ligantes utilizados neste trabalho.....	56
Figura 19. Esquema de síntese do ligante BCEN.....	62
Figura 20. Esquema de síntese do ligante BPAP.....	63

Figura 21. Esquema de síntese do ligante BPAH.....	63
Figura 22. Esquema de síntese do precursor H ₂ Salen.....	64
Figura 23. Esquema de síntese do ligante H ₂ Salan.....	65
Figura 24. Esquema de síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano.....	65
Figura 25. Esquema de síntese do novo ligante H ₂ Salandiα.....	66
Figura 26. Esquema de síntese do 2-(2-naftiloximetil)oxirano.....	67
Figura 27. Esquema de síntese do ligante H ₂ Salandiβ.....	67
Figura 28. Esquema de síntese do complexo [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O.....	68
Figura 29. Esquema de síntese do complexo [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂	69
Figura 30. Esquema de síntese do complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	69
Figura 31. Esquema de síntese do complexo [Cu(Salam)]•H ₂ O.....	70
Figura 32. Esquema de síntese do complexo [Cu ₂ (Salandiα)Cl ₂].....	71
Figura 33. Esquema de síntese do complexo [Cu ₂ (Salandiβ)Cl ₂]•2H ₂ O.....	71
Figura 34. Esquema da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.....	74
Figura 35. Esquema de Síntese dos ligantes BCEN, BPAP e BPAH.....	80
Figura 36. Esquema de Síntese dos ligantes H ₂ Salam, H ₂ Salandiα e H ₂ Salandiβ.....	82
Figura 37. Espectros de infravermelho dos ligantes contendo grupos amida.....	84
Figura 38. Espectro de RMN ¹ H do ligante BCEN (500 MHz, D ₂ O).....	87
Figura 39. Espectro de RMN ¹³ C do ligante BCEN (500 MHz, D ₂ O).....	88
Figura 40. Espectro de HMQC do ligante BCEN (D ₂ O).....	89
Figura 41. Espectro de HMBC do ligante BCEN (D ₂ O).....	89
Figura 42. Espectro de RMN ¹ H do ligante BPAP (500 MHz, DMSO-D ₆).....	90
Figura 43. Espectro de RMN ¹³ C do ligante BPAP (125 MHz, D ₂ O).....	91
Figura 44. Espectro de HMQC do ligante BPAP (DMSO-D ₆).....	92
Figura 45. Espectro de HMBC do ligante BPAP (DMSO-D ₆).....	92
Figura 46. Espectro de RMN ¹ H do ligante BPAH (500 MHz, DMSO-D ₆).....	93
Figura 47. Espectro de RMN ¹³ C do ligante BPAH (125 MHz, DMSO-D ₆).....	94

Figura 48. Espectro de HMQC do ligante BPAH (DMSO-D ₆).	95
Figura 49. Espectro HMBC do ligante BPAH (DMSO-D ₆).	95
Figura 50. Espectros de Infravermelho do precursor H ₂ Salen e do ligante H ₂ Salam.	97
Figura 51. Espectro de RMN ¹ H do precursor H ₂ Salen com ampliação da região de interesse . (500 MHz, CDCl ₃).	99
Figura 52. Espectro de RMN ¹ H do precursor H ₂ Salam com ampliação da região de interesse . (500 MHz, CDCl ₃).	100
Figura 53. Espectros de Infravermelho dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano e 2-(2-naftiloximetil)oxirano.	102
Figura 54. Espectro RMN ¹ H do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P ₂) com ampliações das regiões de interesse. (500 MHz, CDCl ₃).	104
Figura 55. Espectro RMN ¹ H do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P ₃) com ampliações das regiões de interesse (500 MHz, CDCl ₃).	106
Figura 56. Espectro de Infravermelho dos ligantes H ₂ Salandiα e H ₂ Salandiβ.	108
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H do ligante H ₂ Salandiα com ampliações das regiões de interesse (500 MHz, DMSO-D ₆).	111
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C do ligante H ₂ Salandiα com ampliação da região de interesse (500 MHz, DMSO-D ₆).	112
Figura 59. Espectro de HMQC do ligante H ₂ Salandiα.	114
Figura 60. Ampliações do espectro de HMQC do ligante H ₂ Salandiα.	114
Figura 61. Espectro de HMBC do ligante H ₂ Salandiα.	115
Figura 62. Ampliações do espectro de HMBC do ligante H ₂ Salandiα.	115
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H do ligante H ₂ Salandiβ com ampliações das regiões de interesse (500 MHz, DMSO-D ₆).	117
Figura 64. Espectro de RMN ¹³ C do ligante H ₂ Salandiβ com ampliação da região de interesse (500 MHz, DMSO-D ₆).	118
Figura 65. Espectro de HMQC do ligante H ₂ Salandiβ.	119
Figura 66. Ampliações do espectro de HMQC do ligante H ₂ Salandiβ.	119
Figura 67. Espectro de HMBC do ligante H ₂ Salandiβ.	120
Figura 68. Ampliações do espectro de HMBC do ligante H ₂ Salandiβ.	120
Figura 69. Análise de Espectroscopia de Massas com ionização por <i>eletrospray</i> (ESI-MS) para o ligante H ₂ Salandiα.	123

Figura 70. Análise de Espectroscopia de Massas com ionização por <i>eletrospray</i> (ESI-MS) para o ligante H ₂ Salandiβ.....	123
Figura 71. Proposta de fragmentação do ligante H ₂ Salandiβ após ionização em meio ácido por espectroscopia de ionização por <i>eletrospray</i> (ESI-MS).	124
Figura 72. Esquema de sínteses dos complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.....	125
Figura 73. Estruturas moleculares resolvidas por difração de raios X dos complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida. [A] [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O, [B] [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂ e [C] [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	128
Figura 74. Empacotamentos dos complexos contendo grupos amida obtidos por difração de raios X . [A] [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O, [B] [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂ e [C] [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	131
Figura 75. Espectros de infravermelho dos complexos de cobre com ligantes contendo grupos amida.	133
Figura 76. Espectro eletrônico do CuCl ₂ •2H ₂ O em DMSO [A] e em água [B].	136
Figura 77. Espectro eletrônico do complexo [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O em DMSO [A] e em água [B].....	136
Figura 78. Espectro eletrônico do complexo [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂ em DMSO [A] e em água [B].....	136
Figura 79. Espectro eletrônico do complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂ em DMSO [A] e em água [B].	137
Figura 80. Voltamogramas cíclicos dos complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.....	139
Figura 81. Resultados de ESI(+)-MS para o complexo [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O.....	140
Figura 82. Resultados de ESI(+)-MS para o complexo [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂	141
Figura 83. Resultados de ESI(+)-MS para o complexo [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	142
Figura 84. Espectros de ressonância paramagnética eletrônica para os complexos de cobre (II) com ligantes com grupos amida em solução de DMSO, a 100 K, sendo linha preta para espectros experimentais e linha vermelha para espectros simulados. O MgO:Cr (III) (g= 1,9797) foi utilizado como sinal de referência.	144
Figura 85. Esquema de sínteses dos complexos de cobre (II) com ligantes derivados do H ₂ Salen.	145
Figura 86. Espectros de infravermelho dos complexos de cobre (II) com ligantes derivados do H ₂ Salen.....	147
Figura 87. Espectro eletrônico para os compostos de coordenação derivados do H ₂ Salen com grupos naftóis em DMSO, [Cu ₂ (Salandiα)Cl ₂] [A] e [Cu ₂ (Salandiβ)Cl ₂]• 2H ₂ O [B].	149

- Figura 88. Voltamogramas cíclicos para os compostos de coordenação $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 151
- Figura 89. ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ 152
- Figura 90. ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot \text{H}_2\text{O}$ 153
- Figura 91. Espectros de ressonância paramagnética eletrônica para os complexos de cobre(II) com ligantes com grupo naftóis em solução de DMSO, a 100 K, sendo linha preta para espectros experimentais e linha vermelha para espectros simulados. O MgO:Cr (III) ($g=1,9797$) foi utilizado como sinal de referência. 155
- Figura 92. Marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) para as células de H460 incubadas por 30 h. [A] (controle); [B] Utilizando uma vez a IC_{50} da Cisplatina; [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} da Cisplatina; [D] Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$; [E] Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e [F] Utilizando $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 160
- Figura 93. Análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de H460 submetida a incubação de 30 horas com os compostos de coordenação ($[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e Cisplatina). [A] controle; [B] Utilizando uma vez a IC_{50} da Cisplatina; [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} da Cisplatina; [D] Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$; [E] Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e [F] Utilizando $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 161
- Figura 94. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linhagem de H460 submetida a incubação de 30 horas com os compostos de coordenação $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e Cisplatina. [A] Controle; [B] Utilizando uma vez a IC_{50} da Cisplatina; [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} da Cisplatina; [D] Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$; [E] Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e [F] Utilizando $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 163
- Figura 95. Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem de carcinoma de pulmão H460 (Células controle). 164
- Figura 96. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de carcinoma de pulmão H460 incubadas com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. [A] Na concentração de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 4 horas; [B] Na concentração de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 8 horas e [C] Na concentração de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 4 horas. 165
- Figura 97. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de carcinoma de pulmão H460 incubadas com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. [A] Na concentração de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 8 horas; [B] Na concentração de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 4 horas e [C] Na concentração de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 8 horas. 166
- Figura 98. Marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) para as células de MOLT-04 incubadas por 24 h. [A] células controle; [B] Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 168

Figura 99. Marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) para as células de U937 incubadas por 24 h. [A] Células controle; [B] Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ e [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ 169

Figura 100. Análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de U937 submetida a incubação de 24 horas com os compostos de coordenação para o complexo $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$. [A] Células controle; [B] Utilizando uma vez a IC_{50} de $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ e [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} de $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ 170

Figura 101. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linhagem de U937 submetida a incubação de 24 horas com os compostos de coordenação $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$. [A] Células controle; [B] Utilizando uma vez a IC_{50} de $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ e [C] Utilizando duas vezes a IC_{50} de $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$. .. 171

Figura 103. Micrografias eletrônicas de transmissão das células de U937 tratadas com o complexo $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ nos tempos de 4 e 8 h nas concentração de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$. [A] Células controle; [B] Utilizando metade da IC_{50} de $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ após 4 h de tratamento e [C] Utilizando metade da IC_{50} de $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ após 8 h de tratamento..... 173

Figura 104. Micrografias eletrônicas de transmissão das células de U937 tratadas com o complexo $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ nos tempos de 4 e 8 h nas concentração de $1 \times IC_{50}$. [A] Após 4 h de tratamento e [B] Após 8 h de tratamento. 174

Figura 105. Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 em células de U937 após incubação com o composto $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ por 3, 6 e 12 h. 175

Figura 106. Avaliação da atividade da caspase 12 em células de U937 após incubação com o composto $[Cu_2(Salandi\beta)Cl_2] \cdot 2H_2O$ por 24 h. 176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de IC50 dos complexos de cobre (II) e seus respectivos ligantes contra às linhagens de células PBMC, U937 e THP-1 (FERNANDES, et al., 2015).....	54
Tabela 2. Resultado da análise elementar para os ligantes contendo grupos amida.....	83
Tabela 3. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos ligantes BCEN (L ₁), BPAP (L ₂) e BPAH (L ₃).	86
Tabela 4. Dados de RMN ¹³ C (125 MHz) e ¹ H (500 MHz) para os ligantes BCEN e BPAP (D ₂ O) e BPAH (DMSO-D ₆), incluindo resultados obtidos por correlações bidimensionais 2D HMQC (¹ J _{HC}) e HMBC (ⁿ J _{HC} n = 2 e 3). Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.	96
Tabela 5. Principais bandas dos espectros de infravermelho dos compostos H ₂ Salen e H ₂ Salam.....	98
Tabela 6. Dados observados de RMN ¹ H (500 MHz) do precursor H ₂ Salen e do ligante H ₂ Salam em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.	101
Tabela 7. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P ₂) e 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P ₃).....	103
Tabela 8. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P ₂) e 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P ₃) em CDCl ₃ . Descolamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.	107
Tabela 9. Resultado das análises elementares para os ligantes H ₂ Salandiα e H ₂ Salandiβ.	108
Tabela 10. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos compostos H ₂ Salandiα e H ₂ Salandiβ.	109
Tabela 11. Dados de RMN ¹³ C (125 MHz) e ¹ H (500 MHz) para os ligantes H ₂ Salandiα (DMSO-D ₆) e H ₂ Salandiβ (DMSO-D ₆), incluindo resultados obtidos por correlações bidimensionais 2D HMQC (¹ J _{HC}) e HMBC (ⁿ J _{HC} n = 2 e 3). Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.	121
Tabela 12. Resultado da análise elementar para os ligantes contendo grupos amida.....	126
Tabela 13. Parâmetros cristalográficos para os complexos de cobre com grupo amida.	127
Tabela 14. Comprimentos de ligação [Å] e ângulos [°] selecionados para os complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.	130
Tabela 15. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos ligantes contendo grupos amida e seus respectivos complexos de cobre (II).	134

Tabela 16. Dados de espectroscopia na região do UV-Vis para os complexos [Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O, [Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂ , [Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂ e CuCl ₂ •2H ₂ O em água e DMSO.....	135
Tabela 17. Resultados da análise de condutividade molar dos compostos de cobre (II) com ligantes contendo amida.	138
Tabela 18. Dados da simulação dos espectros de RPE para os compostos de cobre com ligantes contendo amida.	143
Tabela 19. Resultado da análise elementar para os complexos de cobre (II) derivados do H ₂ Salen.	146
Tabela 20. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos ligantes derivados do H ₂ Salen e seus respectivos complexos de cobre (II).	148
Tabela 21. Dados da simulação dos espectros de RPE para os compostos de cobre (II) com ligantes contendo grupos naftóis.	154
Tabela 22. Resultados de IC ₅₀ dos ligantes, complexos de cobre (II), CuCl ₂ •2H ₂ O e Cisplatina frente às linhagens de células PBMC, H460, MOLT-4, U937, THP-1 e COLO 205 em 36 h de tratamento.	157

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{42}H_{45}N_2O_6)^+$ com sua proposta estrutural.....	192
Anexo 2. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{35}H_{39}N_2O_5)^+$ com sua proposta estrutural.....	192
Anexo 3. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{29}H_{33}N_2O_4)^+$ com sua proposta estrutural.....	193
Anexo 4. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{28}H_{33}N_2O_4)^+$ com sua proposta estrutural.....	193
Anexo 5. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{42}H_{46}N_2O_6)^{2+}$ com sua proposta estrutural.	194
Anexo 6. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{15}H_{18}NO_2)^+$ com sua proposta estrutural.	194
Anexo 7. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_7H_7O)^+$ com sua proposta estrutural.	195
Anexo 8. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[Cu(BCEN)]^{2+}$ com sua proposta estrutural.	195
Anexo 9. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[Cu(BCEN)Cl]^+$ com sua proposta estrutural.....	196
Anexo 10. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[Cu(C_8H_{17}N_4O_2)]^+$ com sua proposta estrutural.....	196
Anexo 11. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[Cu(C_4H_8N_2O_2)]^+$ com sua proposta estrutural.	197
Anexo 12. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_4H_9N_2O)^+$ com sua proposta estrutural.....	197
Anexo 13. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 300 para o complexo $[Cu(BCEN)]Cl_2 \cdot 2H_2O$.198	
Anexo 14. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 264 para o complexo $[Cu(BCEN)]Cl_2 \cdot 2H_2O$.198	
Anexo 15. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 181 para o complexo $[Cu(BCEN)]Cl_2 \cdot 2H_2O$.198	
Anexo 16. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 132,5 para o complexo $[Cu(BCEN)]Cl_2 \cdot 2H_2O$	199
Anexo 17. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_9H_{13}N_3O)^+$ com sua proposta estrutural.	199

Anexo 18. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_6\text{Cl}_3]^+$ e [C] para a espécie $[\text{Cu}_4(\text{BPAP})_4(\text{CH}_3\text{OH})_{12}\text{Cl}_6]^{2+}$	200
Anexo 19. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_4\text{Cl}_3]^+$	201
Anexo 20. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})\text{Cl}_3]^+$	201
Anexo 21. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{BPAP})(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{Cl}]^+$	202
Anexo 22. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{Cl}]^+$ com sua proposta estrutural.....	202
Anexo 23. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 817 para o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$	203
Anexo 24. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{Cl}]^+$ com sua proposta estrutural.....	203
Anexo 25. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{CuHSalandi}\alpha]^+$ com sua proposta estrutural.....	204
Anexo 26. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{H}_3\text{Salandi}\alpha]^+$ com sua proposta estrutural.....	204
Anexo 27. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_2)]^+$ com sua proposta estrutural.....	205
Anexo 28. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{CuH}_2\text{Salandi}\alpha]^+$ com sua proposta estrutural.....	205
Anexo 29. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N})^+$ com sua proposta estrutural.....	206
Anexo 30. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 734 para o complexo $[\text{CuSalandi}\alpha\text{Cl}_2]$	206
Anexo 31. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{CuHSalandi}\beta]^+$ com sua proposta estrutural.....	207
Anexo 32. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(\text{H}_3\text{Salandi}\beta)^+$ com sua proposta estrutural.....	207
Anexo 33. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{Salandi}\beta)]^{2+}$ com sua proposta estrutural.....	208
Anexo 34. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5)^+$ com sua proposta estrutural.....	208
Anexo 35. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_2)]^+$ com sua proposta estrutural.....	209

Anexo 36. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{21}H_{22}NO_2)^+$ com sua proposta estrutural.	209
Anexo 37. ESI(+)/MS/MS do sinal com m/z de 734 para o complexo $[CuSalandi\beta Cl_2]$	210

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

² J_{CH} : Constante de acoplamento a longa distância (duas ligações)

³ J_{CH} : Constante de acoplamento a longa distância (três ligações)

ANOVA: Análise de Variância Entre Grupos

APAF-1: Protease de ativação apoptóticas de fator 1 (do inglês, *ativar Apoptotic protease activating factor 1*)

ATCC: Coleção de Cultura de Tipo Americano (do inglês, *American Type Culture Collection*)

BAX: Proteína associada X BCL2 (do inglês, *BCL2 Associated X Protein*)

BCEN: Ligante 1,4-*bis*(propanamida)etilenodiamina (L₁)

BPAH: Ligante 1,4-*bis*(propanamida)homopiperazina (BPAH) (L₃)

BPAP: Ligante 1,4-*bis*(propanamida)piperazina (BPAP) (L₂)

CCDA: Cromatografia em camada delgada analítica

CDK: Quinases ciclina-dependente (do inglês, *Cyclin-Dependent kinases*)

CHAPS: Tampão: 3-[(3-Cholamidopropil)dimetilammonio]-1-propanosulfonato

CHN: Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)

CisPt: Cisplatina

COLO-205: Linhagem celular humana estabelecida de adenocarcinoma colorretal.

DISC: Complexo de sinalização de morte (do inglês, *Death inducing signaling complex*)

DMEM-F12: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco: mistura de nutriente F-12 (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12*)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DRX: Difractometria de Raios X de monocristal

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EPH: Eletrodo padrão de hidrogênio

EPON: resina epóxi

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

ESI: Ionização por *eletrospray*

FADD: Fas Associado ao Domínio de Morte (do inglês, *Fas-Associated Death Domain*)

- FDA:** Administração de alimentos e fármacos (do inglês, *Food and Drug Administration*)
- FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína
- FL1:** Fluorescência 1
- FL2:** Fluorescência 2
- H₂Salen:** Precursor *N,N*-bis(salicilideno)etilenodiamina (P₁)
- H₂Salam:** Ligante *N,N*-bis(2-hidroxibenzil)etilenodiamina (L₄)
- H₂Salandi α :** Ligante *N,N*-bis(2-hidroxibenzil)-*N,N*-bis[3-(1-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina (L₅)
- H₂Salandi β :** Ligante *N,N*-bis(2-hidroxibenzil)-*N,N*-bis[3-(2-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina (L₆)
- H460:** linhagem celular humana estabelecida de carcinoma de pulmão
- HEPES:** Tampão: ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
- HMBC:** Correlação heteronuclear entre múltiplas ligações conectadas (do inglês, *Heteronuclear multiple-bond correlation*)
- HMQC:** Correlação heteronuclear a longa distância (do inglês, *Heteronuclear multiple-quantum coherence*)
- IARC:** Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)
- IC₅₀:** Índice de Citotoxicidade de 50%
- INCA:** Instituto Nacional do Câncer
- IP:** Iodeto de Propídio
- IV:** Infravermelho
- J:** Constante de acoplamento
- JC-1:** Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina
- MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MOLT-4:** linhagem celular humana estabelecida leucemia linfóide aguda
- MS:** Espectrometria de massas (do inglês, *spectroscopy mass*)
- MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio
- m/z:** Massa sobre carga
- NCCD:** Comité de Nomenclatura de Morte Celular (do inglês, *Nomenclature Committee on Cell Death*)
- PBMC:** células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*)

PMSF: Fluoreto de Fenilmetanosulfonila (do inglês, *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

PBS: Tampão Salino Fosfato (pH 7,2) (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*)

P.F.: Ponto de fusão

RMN: Ressonância magnética nuclear

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAase: Ribonuclease A

RPE: Ressonância Paramagnética Eletrônica

RPMI: Meio do Instituto parque Roswell (do inglês, Roswell Park Memorial Institute medium)

SEB: enterotoxina B de *Staphylococcus* (do inglês, *Staphylococcal enterotoxin B*)

SFB: Soro Fetal Bovino

THP-1: linhagem celular humana estabelecida de leucemia monocítica aguda

TMS: tetrametilsilano

TNF: Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

RCBP: Registros de câncer de base populacional

U937: linhagem celular humana estabelecida de linfoma histiocítico

UICC: União Internacional de Controle do Câncer (do inglês, *Union International Cancer Control*)

UV-Vis: Região do Ultravioleta-Visível

WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês, *The World Health Organization*)

δ_C : Deslocamento químico de carbono em ppm

δ_H : Deslocamento químico de hidrogênio em ppm

RESUMO

O câncer é uma enfermidade com altas taxas de incidência, permanência e mortalidade, sendo responsável por mais de 12 % de todas as causas de óbito no mundo. Por essa razão existe um grande interesse no desenvolvimento de compostos com atividade citotóxica, para sanar, principalmente, o problema da resistência e da toxidez dos medicamentos convencionais. Baseado neste contexto este trabalho teve por objetivo a síntese, caracterização e prospecção da atividade antitumoral de compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes *N,O*-doadores. Depois de sintetizados, os ligantes foram caracterizados por meio de espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional (HMQC e HMBC). Em seguida, foram realizadas reações de complexação, levando a formação de compostos com centro metálico de cobre (II), os quais foram caracterizados por diferentes técnicas instrumentais (CHN, DRX, IV, UV-Vis, ESI-MS, RPE, Condutividade e voltametria cíclica). Os dados obtidos neste trabalho indicaram que os ligantes com grupo amida formaram compostos mononucleares com uma unidade do ligante orgânico, enquanto que as propostas dos compostos com grupos naftóis indicam a formação de complexos binucleares com apenas um único ligante orgânico. Após indicação das propostas estruturais dos compostos de coordenação, os mesmos foram utilizados no ensaio de viabilidade celular por metabolização do MTT para cinco linhagens tumorais distintas, sendo três delas linhagens não aderentes (U937, THP-1 e MOLT-04) e duas linhagens de tumores sólidos (H460 e COLO 205). Os resultados de viabilidade celular indicaram que o composto com ligante BPAH foi o mais ativo da série de complexos com ligantes contendo amida, apresentado valor de IC_{50} de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ para uma linhagem de pulmão resistente a cisplatina (H460). Em contrapartida os compostos com ligantes derivados do H_2Salen apresentaram melhores resultados para as linhagens não aderentes, resultando em valores de IC_{50} inferiores a $13 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, com destaque para o complexo com ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$. Neste trabalho também verificou-se o mecanismo de ação dos dois compostos mais ativos de cada uma das séries avaliadas e ambos apresentaram morte celular preferencialmente por apoptose.

Palavras-chave: compostos de coordenação, cobre e atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is a disease with a high incidence rate, prevalence and mortality, accounting for over 12 % of all causes of death in the world. For this reason there is great interest in developing compounds with cytotoxic activity, to remedy, mainly the problem of resistance and toxicity of conventional drugs. Based on this context, this study aimed to the synthesis, characterization and evaluation of the antitumor activity of copper coordination compounds (II) with ligands *N,O*-donors. Once synthesized, the ligands were characterized by spectroscopy in the infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) dimensional (^1H and ^{13}C) and bidimensional (HMQC and HMBC). Then, complexation reactions were performed, leading to the formation of compounds with the metal center copper (II), which were characterized by different instrumental techniques (CHN, XRD, IR, UV-Vis, ESI-MS, RPE, Conductivity and cyclic voltammetry). The data obtained in this study indicate that the ligands with the amide group formed mononuclear compounds with one unit of the organic compound, while the proposals of the compounds of naphthols groups indicate the formation of binuclear complexes with only one organic ligand. After indication of structural of coordination compounds, they were used in the cell viability assay for metabolism of MTT to five different tumor lines, three of them non retainer cell lines (U937, THP-1 and MOLT-04) and two solid tumor (H460 and COLO 205). The cell viability results indicated the compound with ligand BPAH was the most active of the series of complexes with ligands containing amide, displayed IC_{50} of $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ for a lung cisplatin-resistant line (H460). Conversely compounds derived from H_2Salen showed better results for the non solid lines, resulting in IC_{50} values below $13 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, highlighting the complex with $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ binder. This work also found that the mechanism of action of the two most active compounds of each of the series evaluated and both showed apoptotic cell death preferentially.

Keywords: coordination compounds, copper and antitumor activity.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é representado por um conjunto heterogêneo de doenças que mais causam temor na sociedade atual, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. Apesar deste fato, este conjunto de doenças possui como característica unificadora a criação de células anormais que crescem além de seus limites naturais de maneira descontrolada, desobedecendo aos processos normais da divisão celular (ALMEIDA, et al., 2005 e GUTSCHNER, T. e DIEDERICHS, 2012). As células cancerígenas são próprias do organismo, porém, as alterações genéticas pelas quais passaram resultaram na perda da funcionalidade e, assim, tais células prejudicam o funcionamento normal do organismo (KUMAR, 2005).

Existem aproximadamente 200 tipos de cânceres que são decorrentes da grande variedade de células presentes no corpo humano, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA, et al., 2005). Para que o câncer se origine basta somente que um pequeno grupo de células sofra mutações durante o processo de duplicação do DNA, resultando na agressividade e malignidade das células após os processos de mutação (TOMASETTI e VOGELSTEIN, 2015).

O câncer é uma doença crônica de importante repercussão na saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 12 % de todas as causas de óbito no mundo. A ocorrência mundial desta doença distribui-se de forma homogênea entre os sexos, com 6,6 milhões de casos em homens (52,4 %) e 6,1 milhões em mulheres (47,6 %), enquanto a mortalidade acometeu mais o sexo masculino (4,2 milhões em homens, 55,8 %; contra 3,4 milhões em mulheres, 44,2 %). Essa diferença pode ser explicada por fatores sociais, dos quais pode-se destacar o diagnóstico tardio em homens (INCA, 2015).

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA, indicam que as taxas de incidência, para a maioria dos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), assumem valores medianos, para ambos os sexos. Entretanto, algumas localidades apresentam taxas de incidência similares às apresentadas por países desenvolvidos (IARC, 2013 e INCA, 2016).

Uma estimativa, realizada pelo INCA, para os anos de 2016 e 2017 destaca que os dez tipos de câncer mais frequentes em homens brasileiros serão: próstata, órgãos do sistema respiratório (pulmão, brônquio e traquéia), cólon e reto, estômago, cavidade oral, esôfago, laringe, bexiga, leucemias e sistema nervoso central. Nas mulheres, os dez tipos mais frequentes serão: mama, cólon e reto, colo do útero, órgãos do sistema respiratório (pulmão, brônquio e traquéia), glândula tireóide, estômago, corpo do útero, ovário, linfoma de Hodgkin e leucemias (INCA, 2016). As porcentagens relativas a cada neoplasia e o número de novos casos para cada 100 mil habitantes são apresentados na **Figura 1**.

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Estimativas para os anos de 2016 e 2017 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária (INCA, 2016).

A incidência de câncer, estimada pela *Union International Cancer Control* (UICC) para 2020 é de mais de 15 milhões de novos casos, enquanto que para a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos da doença, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. A explicação para este crescimento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco, tais como: a redefinição dos padrões de vida, nutrição e as alterações demográficas (INCA, 2013).

As causas do câncer, no entanto, são variadas e condicionais. Elas podem ser internas ou externas ao organismo, estando ambas diretamente relacionadas. A maioria dos casos de câncer é provocada por causas externas (cerca de 80 %), sendo relacionada ao meio ambiente, onde é encontrada uma diversidade de fatores de risco. Neste sentido, as causas externas estão relacionadas ao meio em geral (água, terra e ar), ao meio ocupacional (quando

insalubre), ao meio social e cultural (estilos e hábitos de vida) e aos tipos de consumíveis (alimentos e medicamentos) (ALMEIDA, et al., 2005 e TOMASETTI e VOGELSTEIN, 2015). As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2012 e TOMASETTI e VOGELSTEIN, 2015).

Diante dessa problemática a inserção de novos compostos orgânicos ou inorgânicos no tratamento antineoplásico mostra-se como uma alternativa para minimizar ou eliminar a atuação das células mutadas nos organismos vivos. Sendo assim, o presente trabalho abordará a síntese e caracterização de compostos com elevado potencial antitumoral, os quais serão testados frente a diferentes linhagens antitumorais, mostrando-se uma possível alternativa para futuros tratamentos quimioterápicos

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Desenvolvimento do Câncer

A compreensão dos mecanismos celulares associados à formação do câncer é fundamental para o desenvolvimento de agentes antitumorais. Diante desse fato será iniciada uma breve discussão sobre o funcionamento do ciclo celular e sua relação com a carcinogênese, buscando assim, pontos de prováveis atuações de quimioterápicos, incluindo os metalofármacos.

O corpo humano é formado por diferentes tipos de células que se agrupam formando tecidos e órgãos. Sabe-se que estas células se multiplicam, amadurecem e morrem, levando a formação de um processo natural que responde as necessidades específicas do organismo (INCA , 2006). No decorrer deste processo as células passam por uma sequência organizada de eventos em que a célula duplica o seu conteúdo e então se divide em duas, sendo este processo denominado de ciclo celular (MURRAY e KIRSCHNER, 1989). Existem diversos processos relacionados à transformação de uma célula normal a uma célula potencialmente maligna, no entanto a maior parte destes mecanismos interfere na divisão celular (HAHN e WEINBERG, 2002; ALMEIDA, et al., 2005 e INCA, 2006).

O processo de duplicar a imensa quantidade de DNA nos cromossomos e segregar, com precisão, as cópias idênticas de duas células filhas são funções básicas do ciclo celular. Estes processos definem as duas principais fases deste ciclo, denominadas de fase *S* (*S* de síntese de DNA) e fase *M* (*M* de mitose) (**Figura 2**). A fase *S* demanda de dez a doze horas em células típicas de mamíferos e é responsável pela duplicação dos cromossomos, enquanto que a fase *M* demanda aproximadamente uma hora e corresponde à divisão celular. Esta última etapa compreende dois eventos principais: a divisão nuclear, ou mitose (subdivida em: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase), durante a qual os cromossomos copiados são distribuídos em um par de núcleos-filhos e a divisão citoplasmática, denominada de citocinese, quando a própria célula se divide em duas (HARTWELL e WEINERT, 1989 e LODISH, et al., 2005).

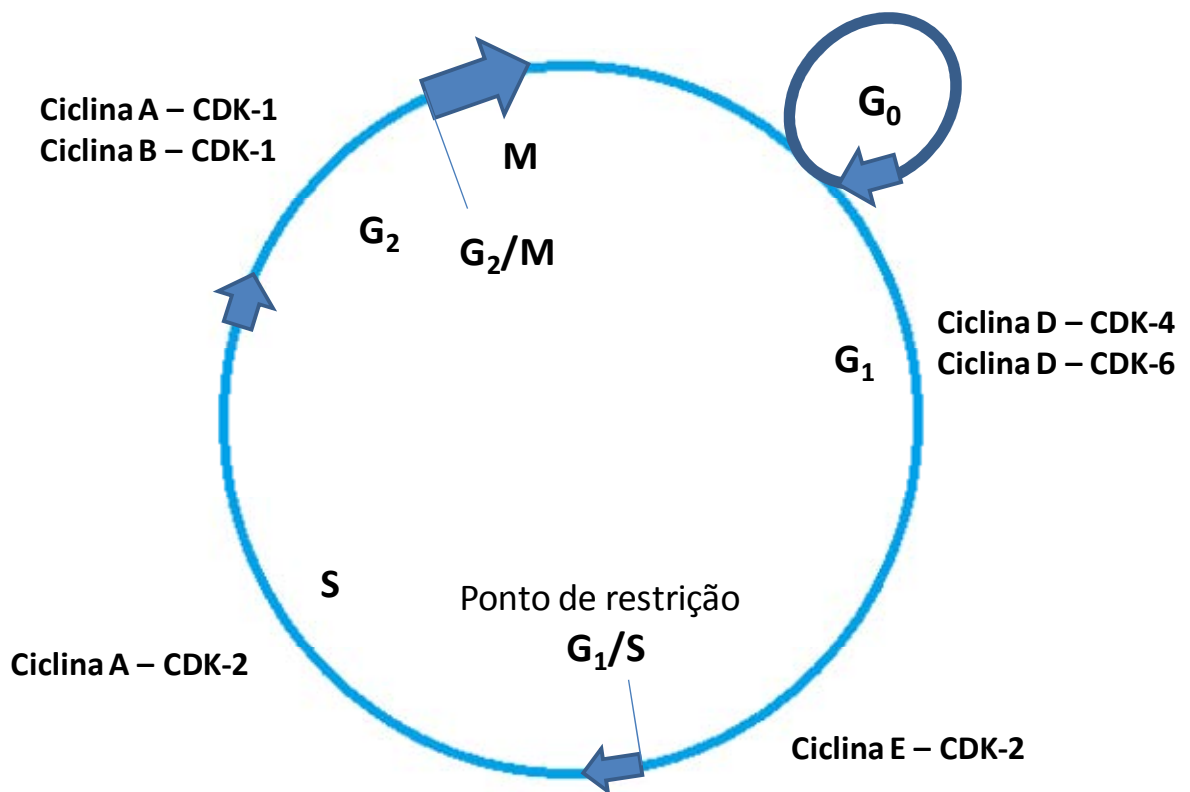


Figura 2. Esquema do ciclo celular destacando a atividade dos complexos Ciclina-CDK de mamíferos e os pontos de checagem. Fonte: O autor.

A maioria dos ciclos celulares eucarióticos possui fases de intervalo extras, sendo estas: a fase G_1 , entre as fases M e S , e a fase G_2 , entre as fases S e M (**Figura 2**). Estas fases de intervalo fornecem tempo para que a célula monitore o ambiente interno e externo a fim de assegurar que as condições são adequadas e os preparativos estejam completos antes que a célula se comprometa com as principais transformações das fases S e M . Neste sentido, na fase G_1 a célula executa normalmente suas funções sem se ocupar com a divisão celular e sua transcrição ocorre normalmente, é também no decorrer deste período que a célula vai aumentando sua massa. A duração desta fase pode variar, dependendo das condições externas e dos sinais extracelulares de outras células. Quando a quantidade de DNA da célula encontra-se duplicada (após a fase S), inicia-se o último período de interfase, denominado de fase G_2 , no qual a célula certifica-se de que toda a duplicação do DNA foi realizada (HARTWELL e WEINERT, 1989; ALBERTS, et al., 2010 e LODISH, et al., 2005).

Se as condições extracelulares são desfavoráveis, as células retardam a progressão a G_1 e podem entrar em um estado de repouso especializado, conhecido como G_0 , no qual podem permanecer por dias, semanas ou mesmo anos antes que a proliferação seja retomada (ALBERTS, et al., 2010).

Dentro da célula, uma complexa rede de proteínas reguladoras, conhecida como sistema de controle, monitora a progressão do ciclo celular, retardando eventos futuros até que eventos prévios tenham sido completados. Além disso, esse sistema monitora as condições extracelulares, estimulando ou inibindo o crescimento celular (ALBERTS, et al., 2010).

Na atualidade, sabe-se que existem dois tipos de controles moleculares que regulam a passagem das células através das fases específicas do ciclo celular. Sendo o primeiro representado por uma cascata de vias de fosforilação protéicas, envolvendo um grupo de proteínas denominadas de ciclinas, as quais desempenham suas funções ao formarem complexos com um grupo de proteínas, denominado de quinases ciclina-dependente (CDK), e o segundo por um conjunto de pontos de controle que monopolizam a conclusão dos eventos moleculares e, se necessário, retardam a progressão para a fase seguinte do ciclo (MORGAN, 1995; LODISH, et al., 2005 e KUMAR, et al., 2005; SHERR, 1996)

Além da síntese e degradação, os complexos de CDK ativos são regulados através de sua ligação aos inibidores da CDK, compostos de três proteínas denominadas de p21, p27 e p57. Os inibidores controlam o ciclo celular ao equilibrarem a atividade das CDK, determinando se uma célula irá progredir através do ciclo celular ou não. As alterações nos níveis desses inibidores favorecem o surgimento de tumores ou, possivelmente, a iniciação de células senescentes, devido à alteração do progresso normal do ciclo celular. Mutações nos genes que codificam esses reguladores foram observadas em diversos cânceres humanos (SHERR e ROBERTS, 1999 e KUMAR, et al., 2005).

Os pontos de controle representam um segundo modo de regulação do ciclo celular e fornecem um mecanismo de vigilância para garantir a ocorrência de transições críticas na sequência correta, bem como a conclusão de eventos importantes com fidelidade. Os pontos de controle identificam os problemas na replicação e reparo do DNA e na segregação dos cromossomos no ciclo (TAO, et

al., 2012 e CONLY, 2011). Na maioria das células eucarióticas, o sistema de controle do ciclo celular ativa a progressão em três principais pontos (**Figura 2**). O primeiro ponto de verificação é denominado de ponto de restrição, no final de G_1 , onde a célula se compromete à entrada no ciclo celular. O segundo é o ponto de verificação G_2/M , onde o sistema de controle desencadeia os eventos mitóticos iniciais que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico. O terceiro é a transição entre metáfase e a anáfase, onde o sistema de controle estimula a separação das cromátides-irmãs, levando a conclusão da mitose e da citocinese (ALBERTS, et al., 2010). Os pontos de controle permitem um maior tempo para reparo, diminuindo a possibilidade de mutações. Por conseguinte, a perda de pontos de controle pode resultar em instabilidade genômica, como aquela observada em certas síndromes de câncer hereditárias e nos estágios iniciais da evolução de células normais em células cancerosas (KUMAR, et al., 2005).

Em última análise, enquanto os pontos de controle promovem o funcionamento do ciclo celular, os produtos dos genes supressores tumorais atuam como freios contra a proliferação celular. Dentre esses supressores pode-se citar os genes pRb e o p53. As células quiescentes em G_0 (ou no início de G_1) contêm a forma hipofosforilada ativa da pRb. Nesse estado, a pRb impede a replicação celular ao ligar-se à família E2F de fatores de transcrição (COSETTA, et al., 2013). Outro supressor tumoral bem estudado é o p53, sendo este o alvo mais comum de alterações genéticas nos tumores humanos (50 % dos tumores humanos apresentam mutações nesse gene). A p53 percebe a presença da lesão do DNA e auxilia no processo de reparo ao produzir interrupções na fase G_1 e a induzir os genes de reparo do DNA. A célula com o DNA danificado, cuja reparação é impossível, é direcionada pela p53 para sofrer apoptose. Em vista dessas atividades, a p53 tem sido corretamente denominada “guardiã do genoma”. Com a perda de p53, não há reparo no DNA danificado, as mutações tornam-se fixas nas células em divisão e a célula segue em uma via unidirecional que leva à transformação maligna (LIU, et al., 2014, MARINE e LOZANO, 2010; MOMAND, et al., 1992 e HAUPT, et al., 1997).

A ruptura do orquestrado sistema de controle do ciclo celular faz com que as células comecem a crescer e dividir-se desordenadamente, criando um grupo

de células independentes, levemente anormais, descendentes de uma célula ancestral com uma única mutação, que evoluem em ciclos sucessivos de mutações e seleção natural. Ou seja, essas células apresentam-se de forma insensível aos mecanismos reguladores normais. Em cada estágio, uma célula adquire mais uma mutação ou mudança genética que lhe confere uma seletiva vantagem em relação às células vizinhas, tornando-a mais apta em um ambiente, muitas das vezes inóspito, devido ao baixo nível de oxigênio, escassez de nutrientes e com barreiras naturais ao crescimento. A descendência dessas células muito bem adaptadas levará a formação de um tumor com células clones dominante na lesão em desenvolvimento (ALBERTS, et al., 2010). Em geral, esse crescimento dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável.

Uma célula anormal que cresce e prolifera fora de controle dará origem a um tumor, ou *neoplasia* (novo crescimento). Entretanto, o tumor é considerado benigno se as células neoplásicas não se tornem invasivas, sendo possível haver remissão completa pela destruição ou remoção da massa tecidual localizada. Um tumor é considerado um câncer apenas se for maligno, ou seja, se suas células tiverem adquirido a capacidade de invadir tecidos adjacentes. A invasibilidade é uma característica das células cancerosas que permite à célula maligna se desprender do tecido, penetrar à corrente sanguínea ou os vasos linfáticos, levando a formação de tumores secundários, denominados metástases, em outros locais do corpo. Cabe ressaltar que o câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Quanto mais um tumor se dispersar, mais difícil será erradicá-lo. Em geral são as metástases que matam os pacientes (ALBERT, et al., 2010 e KUMAR, et al., 2000).

A característica das células cancerígenas faz com que a massa de células transformadas cresça sem controle imunológico efetivo. Esse fato é proveniente da similaridade fenotípica das células mutadas em comparação as células normais (MAPARA e SYKES, 2004). Além disso, as células cancerosas possuem, geralmente, menos especialização nas suas funções originais e conforme estas vão se espalhando, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. O ápice deste quadro acontece quando há a disfunção orgânica que

pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves, à morte do paciente, caso a neoplasia não possa ser erradicada com um tratamento adequado (ALMEIDA, et al., 2005 e CHU e SARTORELLI, 2014).

2.2. Tratamento de Neoplasias

Existem diversos tipos de tratamentos antineoplásicos, sendo que em todos eles o objetivo principal é erradicar o câncer, destruindo as células tumorais da forma mais seletiva possível. Para isso, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de encontrar peculiaridades existentes entre as células tumorais e as normais (CASCIATO, 2006).

Os três principais tipos de tratamento para o câncer, de forma geral, são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia. Outros métodos, também utilizados hoje em dia são: o de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) e a imunoterapia (MACHADO, 2000 e SALMONN, 1998). Geralmente os tratamentos são feitos com uma combinação de métodos, de forma a potencializar os resultados. Essas combinações dependem do tipo de célula cancerígena e do grau de avanço da doença (ALMEIDA, et al., 2005).

As duas grandes questões que envolvem os métodos de tratamento são a eficiência e a seletividade. As células tumorais são naturais do organismo com características próprias deste, o que faz com que as células normais do paciente também fiquem sujeitas aos tratamentos utilizados, principalmente aquelas dos tecidos normais que proliferam rapidamente, como as mucosas e os anexos epidérmicos (FREITAS, 2011 e CASCIATO, 2006). Isso causa sérios efeitos colaterais, desequilíbrio físico e psicológico demonstrado através da repulsa, revolta, descontentamento e sofrimento (ROSAS, 2013). Sendo assim, busca-se medicamentos que causam o menor impacto ao paciente, preferencialmente atuando por vias de morte celular regulada.

2.3. Principais Mecanismos de Morte Celular

A transição entre a vida de um organismo e sua morte é extremamente complexa, mesmo quando o organismo em questão é a unidade básica da vida, a célula. De um ponto de vista conceitual, a morte celular é definida como a degeneração permanente de funções vitais das células. No entanto, verifica-se uma dificuldade na diferenciação entre as alterações reversíveis na homeostase e a perda irreversível de atividades celulares. Devido a essa dificuldade o *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) propôs os seguintes critérios para a identificação de células mortas: (1) A perda permanente da função de barreira da membrana plasmática e (2) a quebra completa das células em fragmentos discretos (GALLUZZI, et al., 2014 e BERGHE et al., 2013).

Existem vários tipos de morte celular com diferentes características, dos quais pode-se citar: apoptose, necrose, ferroptose (descoberta em 2012 por Dixon e colaboradores), autofagia, piroptose e necroptose (GALLUZZI, et al., 2012; GALLUZZI, et al., 2014; DIXON, et al., 2012 e BERGHE et al., 2013). Neste trabalho serão abordados com mais detalhes os dois primeiros tipos citados, devido à importância destes para a compreensão dos mecanismos de ação dos quimioterápicos.

A necrose é caracterizada por uma rápida expansão do citoplasma culminando com a ruptura da membrana plasmática e extravasamento das organelas (**Figura 3**) (BERGHE, et al., 2013 e KANDUC, et al., 2012). Esse tipo de morte celular, descrito como acidental, tem sido relacionado aos estresses físicos e químicos, tais como: mudanças bruscas de temperatura, choque osmótico, estresse mecânico e oxidativo. No entanto, muitos estímulos celulares diferentes podem induzir um processo de necrose, seguindo etapas definidas e eventos de sinalização comumente encontrados em mortes celulares programadas (BERGHE et al., 2013).

Em contraste à necrose, existem outros tipos de morte celular independentes da existência de um trauma. Os tecidos de organismos adultos, por exemplo, não diminuem devido à proporcionalidade entre os mecanismos de divisão e morte celular. Sabe-se que essas mortes, consideradas como “normais”,

são suicídios, nos quais as células ativam um programa de morte intracelular e “matam a si mesmas” de uma maneira controlada (ALBERTS, et al., 2010 e KANDUC, et al., 2012). Esse processo é conhecido como morte celular regulada, tendo como principal representante a morte por apoptose.

A morte celular por apoptose foi descoberta pelo patologista australiano John Kerr e colaboradores escoceses em 1972. Essa nomenclatura foi estipulada para indicar uma forma morfológicamente estereotipada de morte celular, caracterizada pela contração do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, alterações mínimas em outras organelas e a formação de alguns fragmentos discretos que mantinham a integridade da membrana plasmática, denominados de corpos apoptóticos (**Figura 3**) (KERR, et al., 1972; KANDUC, et al., 2012; ELMORE, 2007; GALLUZZI, et al., 2014; BERGHE, et al., 2013 e GRIVICICH, et al., 2007).

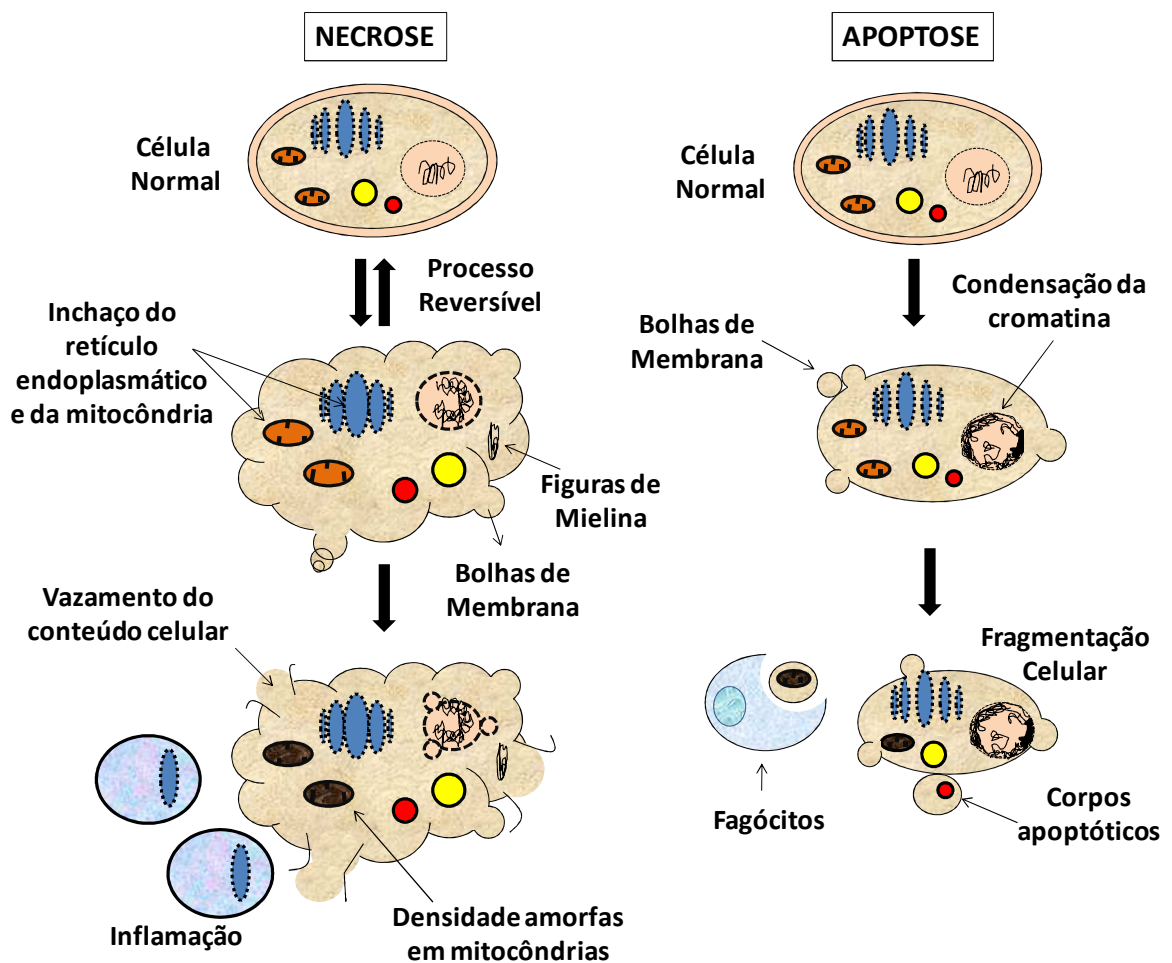


Figura 3. Diferença entre a morte celular por apoptose e por necrose. Fonte: O autor.

A apoptose é o ponto final de uma cascata de eventos moleculares dependente de energia, desencadeada como resposta a estímulos específicos ou diversas formas de dano celular, inclusive o estresse em nível molecular (KUMAR, et al., 2000 e ELMORE, 2007). A maquinaria intracelular responsável por esse tipo de morte é dependente de uma família de proteases, denominadas de caspases, que apresentam uma cisteína no seu sítio ativo e clivam suas proteínas alvo em ácidos aspárticos específicos. Essas proteases são sintetizadas na célula como precursores inativos, ou procaspases, as quais são tipicamente ativadas por clivagem proteolítica (KANDUC, et al., 2012; ALBERTS et al., 2010 e LODISH, et al., 2005).

Algumas das caspases atuantes na apoptose agem no início da cascata proteolítica e são denominadas de iniciadoras, as quais em mamíferos são representadas pelas caspases-8, 9 e 10. Quando essas são ativadas, se clivam e ativam as executoras, representadas pelas caspases-3, 6 e 7. Além disso, o exame detalhado dos padrões de ativação das caspases indica a via apoptótica preferencial da morte celular, sendo as mais compreendidas denominadas de vias extrínseca e intrínseca (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

A via extrínseca é iniciada por proteínas de sinalização extracelular que se ligam aos receptores de morte presentes na superfície externa da membrana celular. O receptor homotrímero Fas é um dos mais estudados na indução da morte celular por apoptose. Esse receptor, na superfície da célula alvo, é ativado pelo ligante Fas na superfície de um linfócito. Quando ativado, o receptor Fas recruta proteínas adaptadoras intracelulares (FADD), as quais por sua vez recrutam procaspases iniciadoras, formando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC – *Death Inducing Signaling Complex*). Em seguida, as caspases iniciadoras ativam procaspases executoras para induzirem a apoptose (**Figura 4**) (ALBERTS, et al., 2010 e LODISH, et al., 2005).

A morte celular por apoptose também pode ser ativada internamente, geralmente em resposta a algum dano ou estresse celular, como radiação, quimioterápicos, quebra do DNA, falta de oxigênio e/ou nutrientes e sinais de sobrevivência extracelulares. Este programa de apoptose é mediado em grande parte pelas mitocôndrias, sendo denominado de via intrínseca. Em resposta ao dano que não pode ser reparado, a proteína supressora tumoral p53 se acumula

e interrompe o ciclo celular (na fase G_1) para conceder tempo adicional para reparo. Contudo, se o processo de reparo falhar, a p53 desencadeia a apoptose, por meio da transcrição de proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bad) da família Bcl2. Essas induzem a liberação mitocondrial do citocromo c, uma proteína da cadeia transportadora de elétrons, para o citoplasma, levando a formação de um complexo oligomérico com o Apaf-1 (fator-1 de ativação da protease apoptótica). Este complexo, chamado de apoptossomo, suporta a ativação catalítica da caspase-9, que por sua vez ativa a caspase efetora 3 (**Figura 4**), resultando na morte celular por apoptose (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005 e HENGARTNER, 2000).

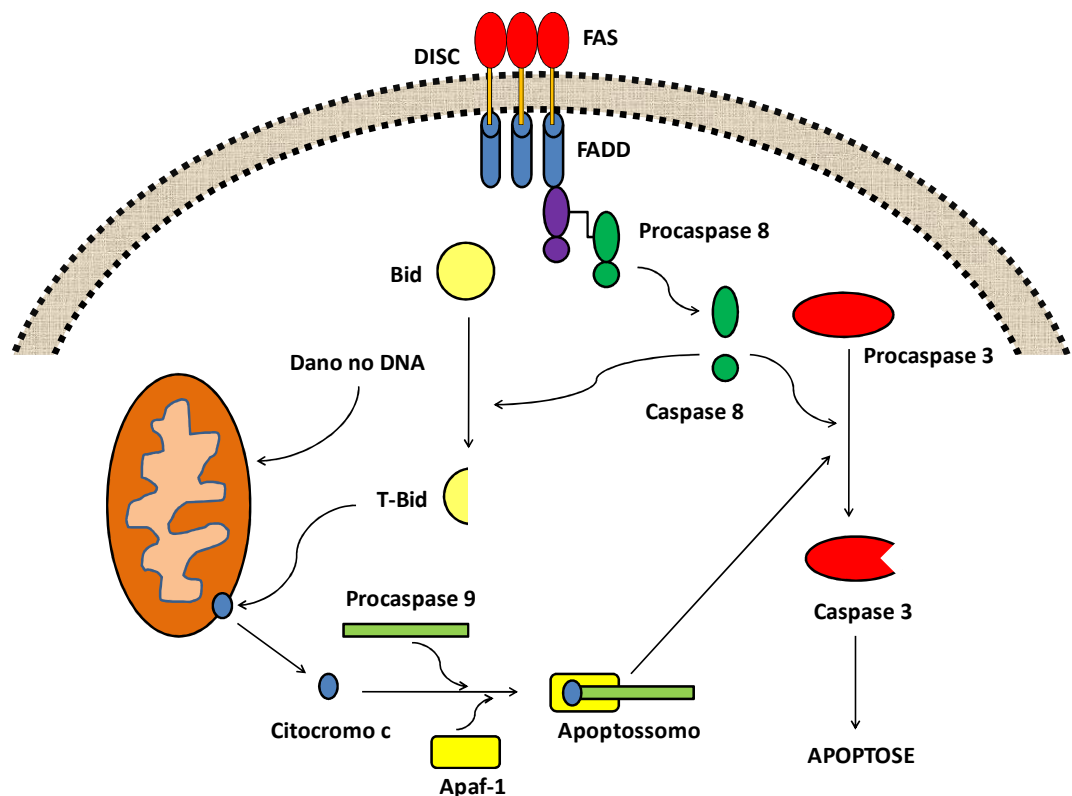


Figura 4. Esquema ilustrando as etapas das principais vias apoptóticas de morte celular. Fonte: O autor.

A via mitocondrial também pode ser ativada pela via extrínseca por meio da clivagem da proteína Bid (um membro proapoptótico da família Bcl2) mediado pela caspase iniciadora 8. Uma vez clivada, a T-Bid se desloca para a

mitocôndria, onde favorece a liberação do citocromo c (**Figura 4**) (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005 e HENGARTNER, 2000).

A identificação destes marcadores bioquímicos e morfológicos de apoptose torna possível distingui-la de outras formas de morte celular. No entanto, é necessário ressaltar que caspases também são ativadas em muitos ambientes que não estão relacionados à morte celular, e que a apoptose intrínseca, também pode ocorrer na ausência de atividade de caspases (BERGHE, et al., 2013).

Diante dos tipos de morte apresentados anteriormente, é preferível que os quimioterápicos atuem por vias apoptóticas, visando um menor impacto aos indivíduos. Do ponto de vista químico, esses compostos podem ser classificados como: agentes alquilantes, compostos de coordenação (metalofármacos), agentes antimicrotúbulos, antibióticos e antimetabólitos (BOULIKAS, et al., 2007).

2.4. Metalofármacos com atividade antitumoral

Elementos metálicos desempenham papéis cruciais em processos biológicos. Além disso, é sabido que vários compostos orgânicos usados na medicina são ativados ou bio-transportados por íons metálicos, incluindo metaloenzimas (FERNANDES, et al., 2010). As inúmeras atividades exercidas por elementos inorgânicos têm estimulado o desenvolvimento de fármacos à base de metais (GUERRA, et al., 2009).

Compostos contendo metais são utilizados na medicina há cerca de 5 000 anos, como exemplo o cobre, utilizado pelos egípcios para esterilização de ferimentos, o ouro e posteriormente o ferro, empregados na fabricação de medicamentos para úlceras e dores reumáticas e o zinco, utilizado desde a antiguidade até os dias de hoje como agente cicatrizante (ORVIG e ABRAMS, 1999).

Dependendo da sua disponibilidade, os metais foram selecionados para melhorar os processos bioquímicos envolvidos nos sistemas celulares. Embora os

metais possuam características específicas que incluem a atividade redox, número de coordenação variável e a capacidade de interagirem com diversos substratos orgânicos, a disponibilidade intracelular é estreitamente regulada. Assim, as concentrações de íons metálicos são associadas a várias perturbações patológicas, incluindo o câncer (FLOREA e DÜSSELBERG, 2011).

Embora o uso de compostos inorgânicos para o tratamento de enfermidades seja muito antigo, até a descoberta da atividade antitumoral do complexo denominado cisplatina, $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, por Rosenberg e colaboradores em 1965 quando estudavam os efeitos do campo elétrico em culturas da bactéria *Escherichia coli*, não havia grande interesse em sintetizar ou entender as bases moleculares responsáveis pelo mecanismo de ação destes compostos. De fato, a descoberta de Rosenberg e o sucesso clínico da cisplatina e seus análogos (**Figura 5**) impulsionou a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos à base de metais (GUERRA, et al., 2009 e FLOREA e DÜSSELBERG, 2011).

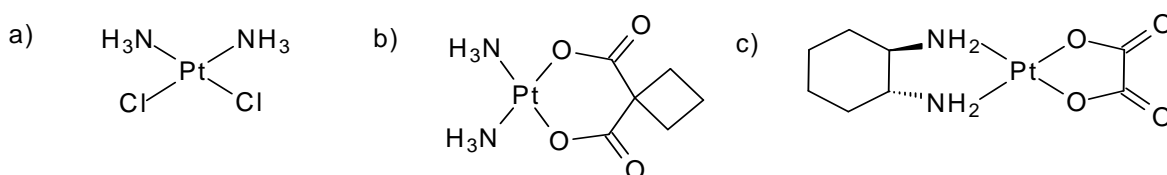


Figura 5. Estrutura da cisplatina (a) e seus análogos carboplatina (b) e oxiplatina (c).

Devido a sua resposta promissora, no início da década de setenta, a cisplatina começou a ser submetida a testes clínicos, primeiro em pacientes terminais e, posteriormente em paciente com tumores localizados, sendo aprovada em 1978 pelo FDA (*"American Food and Drug Administration"*) (SILVA e VARGAS, 2012).

Atualmente a cisplatina é um dos principais antineoplásicos existentes, sendo utilizada principalmente no tratamento dos cânceres de ovário, testículo, pulmão, cabeça, esôfago, estômago e melanoma, sendo comercializada pelo nome de Platinil® ou Platinol®. Desde então vários trabalhos se dedicaram a investigar o mecanismo de ação da cisplatina e de seus compostos correlatos no

organismo, sendo observado que o mecanismo de ação destes compostos está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA (FONTES, et al., 2005 e CULLEN, et al., 2007), além de alterações no gene supressor tumoral p53 (BOUCHET, et al., 2006 e MILLER, et al., 2010).

2.5. Atividade antitumoral da Cisplatina e seus derivados

Evidências experimentais indicam que a cisplatina provavelmente entra na célula por meio de duas principais vias: a difusão passiva (HALL, et al., 2008 e SPRECKELMEYER, et al., 2014) e a absorção facilitada por proteínas de transporte, incluindo as CTR's, responsáveis principalmente pelo transporte de cobre (**Figura 6**) (WANG, et al., 2012; BURGER, et al., 2011; HOWEL, et al., 2010 e SPRECKELMEYER, et al., 2014). Outros estudos também apontaram que a cisplatina permeia a célula via mecanismos comuns de transporte de substâncias, incluindo transportadores de Na (I) dependentes de glicose (IKARI, et al., 2005 e SPRECKELMEYER, et al., 2014).

O plasma sanguíneo possui uma concentração de cloreto de aproximadamente 100 mmol.dm^{-3} , considerada relativamente alta. Essa característica peculiar faz da espécie dicloro da cisplatina a mais abundante no meio extracelular. No entanto, no interior da célula há uma concentração menor de íons cloreto ($3 \text{ a } 20 \text{ mmol.dm}^{-3}$), o que faz da espécie hidrolisada da cisplatina a mais abundante (**Figura 6**). Esta espécie hidrolisada interage de forma mais eficiente à estrutura do DNA, sendo este um processo essencial na ativação do complexo (FONTES, 2005; MILLER, et al., 2010 e JUNG e LIPPARD, 2007).

Após permear a membrana citoplasmática e ser hidrolisada, a cisplatina pode reagir com espécies contendo grupamentos químicos com enxofre, como cisteína ou metionina. Estas espécies incluem a glutatona e as metalotioneínas (KELLAND, 2008). Em algumas células cancerosas resistentes à cisplatina, os níveis de glutatona e metalotioneínas são relativamente elevados, diminuindo a quantidade da forma ativa do composto no meio intracelular (KELLAND, 2008).

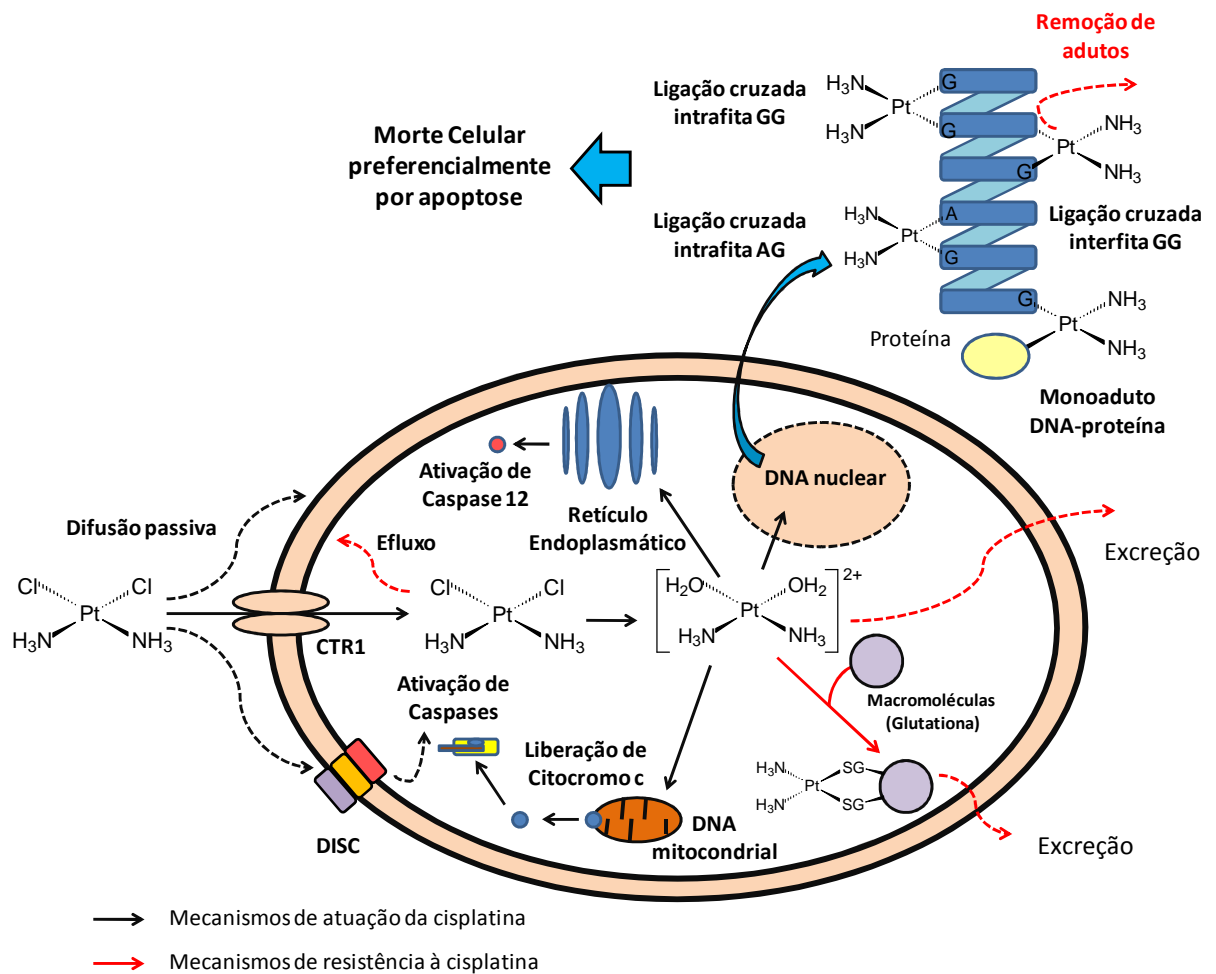


Figura 6. Mecanismos de ação e resistência à cisplatina. Fonte: O autor.

A descoberta de que as células deficientes em reparação do DNA são mais sensíveis à cisplatina, embasa o conceito de que este composto medeia os seus efeitos antitumorais por meio do dano no DNA (MILLER, et al., 2010 e WANG, et al., 2005). No entanto, a primazia de que o DNA nuclear era o único alvo da cisplatina foi contestada recentemente. Inclusive, alguns autores questionam a participação do núcleo no programa apoptótico da célula quando tratada com cisplatina. De fato, apenas uma pequena quantidade do composto de platina ativado (< 1%) se liga ao DNA nuclear (MILLER, et al., 2010; CULLEN, et al., 2007; GALUZZI, et al., 2012; GRANVILLE e COTTLIEB, 2002 e BURGER, 1997). Para confirmar essa proposta, Mandic e colaboradores utilizaram células enucleadas para demonstrar que a sinalização de apoptose, induzida pela cisplatina, ocorre independentemente dos danos no DNA nuclear (MANDIC, et al., 2003).

Além do DNA nuclear e mitocondrial, a cisplatina atinge outros componentes celulares, tais como retículo endoplasmático, RNA, proteínas e fosfolípidios (PERES e CUNHA, 2013; MILLER, et al., 2010 e FLOREA e BÜSSELBERG, 2011). Dentre essas macromoléculas, destaca-se o gene supressor tumoral p53, sendo um potente ativador da apoptose por meio da parada do ciclo celular e ativação das caspases efetoras (3, 6 ou 7) (LIU, et al., 2014; MILLER, et al., 2010; BASSETT, et al., 2008 e FLOREA e BÜSSELBERG, 2011). Contribuindo para essa afirmação Gallagher e colaboradores indicaram que células deficientes na proteína p53 apresentam respostas pouco significativas a esse metalofármaco (GALLAGHER, et al., 1997).

Apesar do grande sucesso da cisplatina no tratamento de diversos tumores sólidos, os seus efeitos secundários graves, tais como nefrotoxicidade (PERES e CUNHA, 2013), neurotoxicidade (GREGG, et al., 1992) e ototoxicidade (ZOCOLI, et al., 2003) tem limitado a sua aplicação (WANG, et al., 2012). Desde a descoberta inicial da atividade anticancerígena deste composto, grandes esforços têm sido dedicados a elucidar seus mecanismos de atividade antitumoral, como apresentado anteriormente, a fim de projetar novos medicamentos à base de platina e outros elementos metálicos com perfis farmacológicos superiores. Mais de vinte anos de trabalho intenso resultou na introdução da carboplatina e oxaliplatina (**Figura 7a e b**) (BOULIKAS, et al., 2007). Após esses medicamentos, outros fármacos foram desenvolvidos e subsequentemente introduzidos no uso clínico, tais como: lobaplatina (c), nedaplatina (d) e heptaplatina (e) (**Figura 7**) (WANG, et al., 2012; MONNERET, 2010; FARRELL, 2003 e BOULIKAS, et al., 2007).

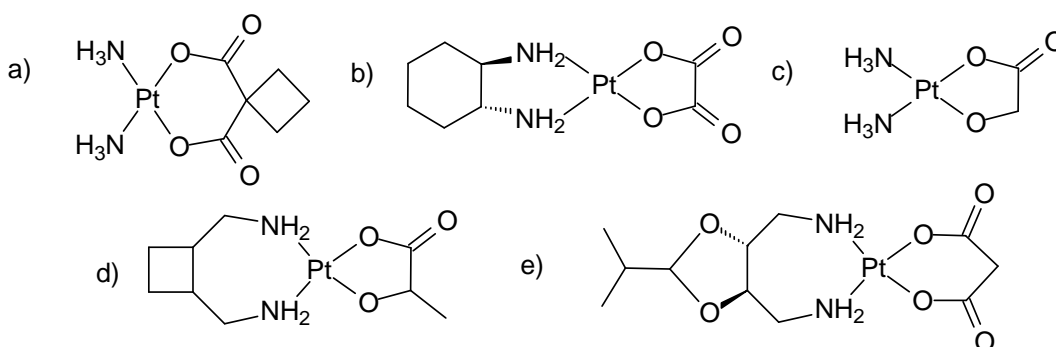


Figura 7. Estrutura dos análogos da cisplatina: carboplatina (a), oxaliplatina (b), nedaplatina(c), lobaplatina (d) e heptaplatina (e).

Apesar dos efeitos significativos da cisplatina e seus análogos de Pt (II), existem células que se apresentam resistentes a atuação destes metalofármacos. Os mecanismos de resistência estão baseados no aumento do efluxo dos compostos não ativados, no acúmulo intracelular, no aumento da inativação destes compostos por moléculas contendo grupos tióis e no aumento da reparação de danos no DNA (**Figura 6**) (ADANS, et al., 2014; TANIDA, et al., 2012; KARTALOU e ESSIGMANN, 2001 e FLOREA e BÜSSELBERG, 2011). No tratamento de alguns cânceres é possível observar uma resposta inicial dos pacientes, no entanto, com o passar do tempo algumas células malignas adquirem resistência e continuam se proliferando. Embora a resistência adquirida tenha sido atribuída às mutações, observações indicam que a rápida indução da resistência envolve mudanças epigenéticas (STEWART, 2007).

2.6. Compostos de coordenação com atividade antitumoral e com centros metálicos diferentes de platina (Pt)

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina impulsionou a busca por novos compostos de coordenação com atividade antitumoral. Estes compostos com variadas estruturas de ligantes e diferentes centros metálicos têm sido estudados com diferentes objetivos, como por exemplo simular a ação de nucleases naturais, resultando em um aumento da atividade citotóxica contra células tumorais, além de serem estudados com a finalidade de redução dos efeitos colaterais apresentados pelos fármacos empregados atualmente na quimioterapia. Dentre os centros metálicos, diferentes de platina, mais discutidos e trabalhados pode-se destacar os seguintes elementos: rutênio (Ru), gálio (Ga), ferro (Fe), paládio (Pd), ouro (Au), zinco (Zn), titânio (Ti) e cobre (Cu) (SPRECKELMEYER, et al., 2014; HORN et al., 2013; FERNANDES et al., 2014, MORCELLI et al., 2016a e BULL, 2016).

Ao longo dos anos, a investigação sobre metalofármacos, para o tratamento quimioterápico, tem produzido vários compostos a base de rutênio. O complexo *trans*-[tetracloro(DMSO)(imidazol)rutenato(III)] (NAMI-A) (**Figura 8**) demonstrou uma elevada seletividade para metástases de tumores sólidos,

possuindo uma baixa toxicidade em doses farmacológicas, sendo o primeiro complexo de rutênio a entrar em ensaios clínicos (SPRECKELMEYER, et al., 2014 e BERGAMO e SAVA, 2007). Outros compostos de rutênio bastante citados são o *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazol)rutenato (III)] (KP1019) e o seu análogo de sal de sódio NKP-1339 (**Figura 8**), que apresentaram significativa atividade *in vivo* e *in vitro* frente a diversos modelos tumorais, incluindo uma linhagem de carcinoma de cólon resistente a cisplatina (SPRECKELMEYER, et al., 2014 e KAPTIZA, et al., 2004).

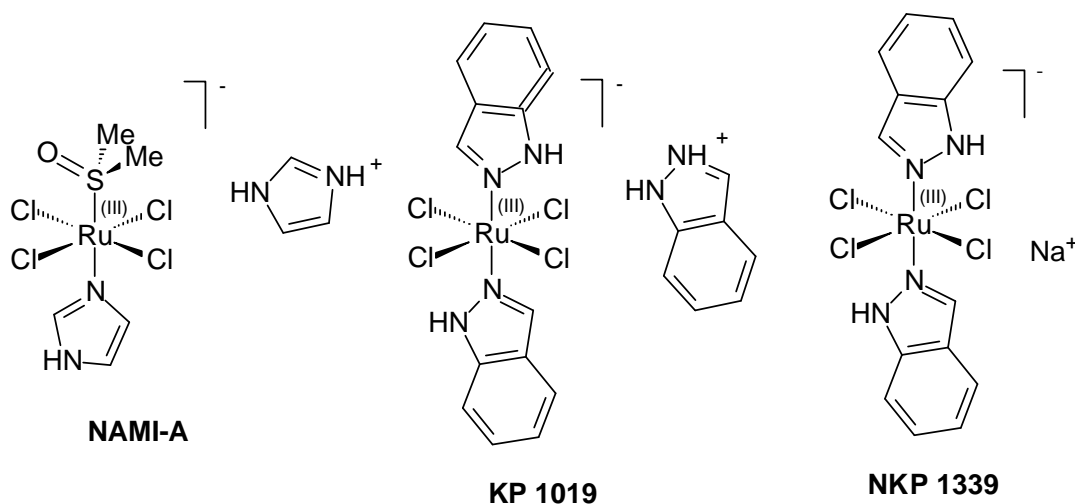


Figura 8. Estrutura química dos complexos de rutênio(III) NAMI-A, KP1019 e NKP1339.

A avaliação do mecanismo, *in vitro*, indicou que o composto KP1019 induz morte celular programada por apoptose predominantemente por meio da via intrínseca mitocondrial. Também verificou que os compostos NAMI-A e KP1019 podem formar adutos com o DNA, porém, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado (PICCIOLI, et al., 2004 e TAN et al., 2014). O composto NKP1339 apresenta atividade similar ao KP1019, contudo verifica-se que este apresenta maior solubilidade em água, o que favorece a introdução deste candidato a metalofármaco no uso clínico (SPRECKELMEYER, et al., 2014, BARRY e SADLER, 2013; TAN et al., 2014).

Diante da atividade significativa dos primeiros complexos de rutênio, vários autores iniciaram a síntese, caracterização e avaliação antitumoral de novos complexos contendo este metal. Dentre estes pode-se citar os complexos, [RuCl₃(dbtp)₃] e [RuCl₃(H₂O)(dbtp)₂], que contêm o ligante 5,7-di-*tert*-butil-1,2,4-

triazol[1,5]pirimidina (dbtp) (**Figura 9**). Estes apresentaram atividade citotóxica superior a cisplatina para linhagem de carcinoma de pulmão (A-549) e carcinoma de mama (T47D), com valores de IC_{50} entre 0,02 e 2,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Os autores correlacionaram esta elevada atividade ao maior caráter lipofílico dos complexos de rutênio, apresentando maior facilidade de transpassar a membrana citoplasmática e atingir o DNA nuclear (MUHAMMAD e GUO, 2014 e LAKOMSKA, et al., 2013).

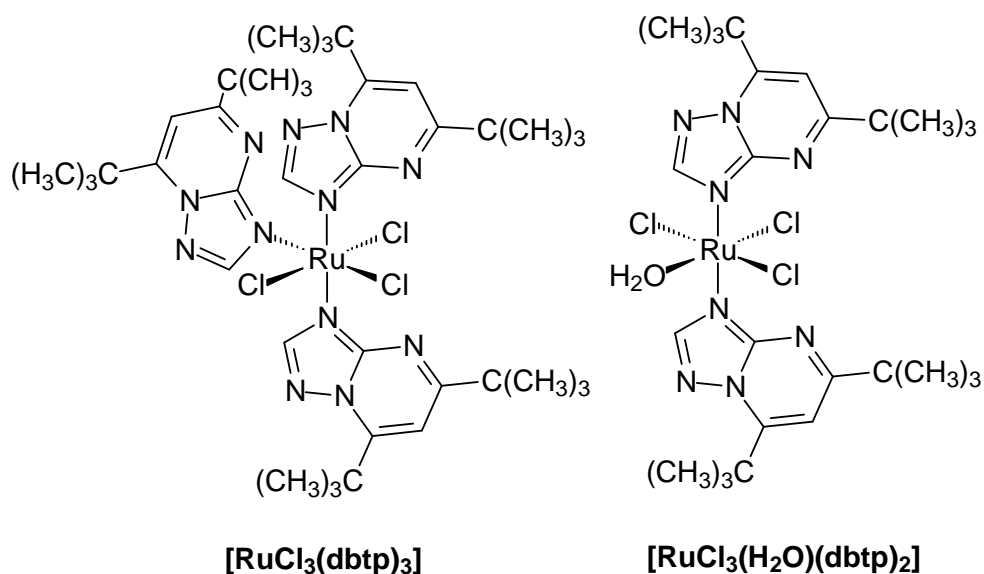


Figura 9. Estrutura química dos complexos de rutênio(III) $[\text{RuCl}_3(\text{dbtp})_3]$ e $[\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{dbtp})_2]$.

Além da provável facilidade em permear a membrana citoplasmática, estudos indicam que o mecanismo de ação antitumoral mais aceito para os complexos de rutênio está baseado na redução do Ru (III) a Ru (II) pelo ascorbato ou pela glutatona, favorecendo a formação de adutos com o DNA (GRAF e LIPPARD, 2012).

O gálio (III) é outro elemento que apresenta resultados antitumorais promissores. Esse fato deve-se à similaridade entre as propriedades deste elemento e as apresentadas pelo Fe (III). Dentre as características comuns entre esses dois metais destacam-se o raio atômico, eletronegatividade, afinidade eletrônica e geometria de coordenação. Ambos os íons atuam como ácidos de Lewis duros, mostrando uma forte afinidade por ligantes *N,O*-doadores. Portanto, acredita-se que o Ga (III) apresenta vias bioquímicas semelhantes às encontradas no metabolismo do Fe (III). Essa similaridade associada à configuração eletrônica

do Ga (III) (d^{10}) permite a utilização deste íon como um agente terapêutico, aumentando a atuação intracelular deste candidato a metalofármaco (JAKUPEC, et al., 2007).

Notavelmente, o Ga (III) exerce efeitos antineoplásicos na forma de sais simples, tais como $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e GaCl_3 . A interferência com o metabolismo do ferro celular parece ser crucial para esta atividade. Estes sais e os complexos de Ga (III) permeiam a membrana citoplasmática pelos mesmos mecanismos de entrada do Fe (III), levando a interação com um receptor específico (TfR). Assim, a entrada de complexos de Ga (III) em células tumorais é favorecida pelo fato dessas expressarem níveis muito mais altos de TfR quando comparadas às células saudáveis (JAKUPEC, et al., 2007).

Baseados nesse mecanismo muitos grupos de pesquisa tem intensificado a busca por novos compostos contendo gálio, dentre estes podem ser destacados o Maltolato de Gálio (III) e o *tris*(8-quinolinolato) de gálio (III), conhecido como KP46 (**Figura 10**). Estes compostos apresentaram resultados significativos para câncer de bexiga e atualmente estão sendo utilizados em testes clínicos. Além dos bons resultados nesta fase, estudos demonstram que esses compostos apresentaram alta biodisponibilidade mesmo quando administrados por via oral em animais de pequeno porte (JAKUPEC, et al., 2007 e TAN et al., 2014).

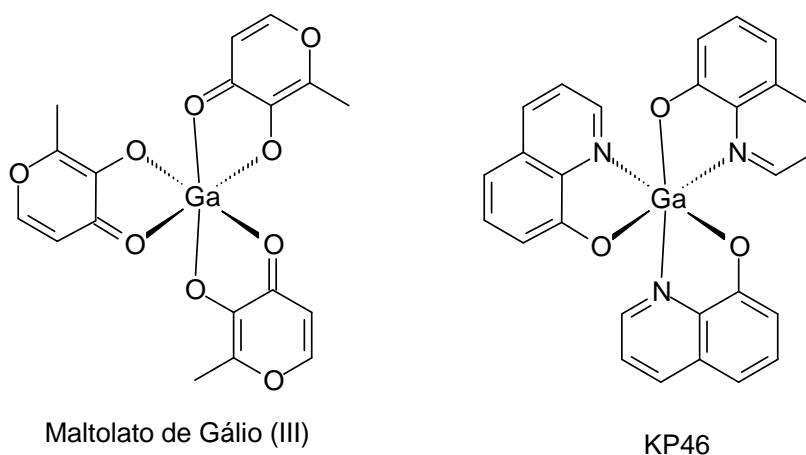


Figura 10. Complexos de Ga (III) com atividade antitumoral.

Outro grupo de compostos de coordenação que merece destaque contém centros metálicos de ferro com ligantes *N,O*-doadores. De modo geral, os

organismos tratados com essa classe de compostos apresentam maior tolerância quando comparado aos metalofórmacos de platina. A influência na atividade citotóxica de derivados do grupo salen [*N,N*-bis(salicilideno)-1,2-etilenodiamino] coordenados ao centro metálico de ferro (III) também foi avaliada por Ansari e colaboradores (**Figura 11**). Os resultados demonstram que estes complexos diminuem a viabilidade celular e induzem a fragmentação nuclear de células tumorais de mama (MCF-7) e colón (CCL228), com valores de IC₅₀ para os complexos mais ativos entre 0,3 e 22 µmol.dm⁻³. Além de inviabilizarem as células tumorais, os complexos de ferro analisados induziram a morte celular por apoptose, sendo verificada a ativação das caspases 3 e 7, além de provocarem a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. Os autores também destacaram que a natureza dos substituintes e o espaçamento entre os dois grupos em ponte diamino desempenham papéis cruciais nas atividades apoptóticas (ANSARI et al, 2011).

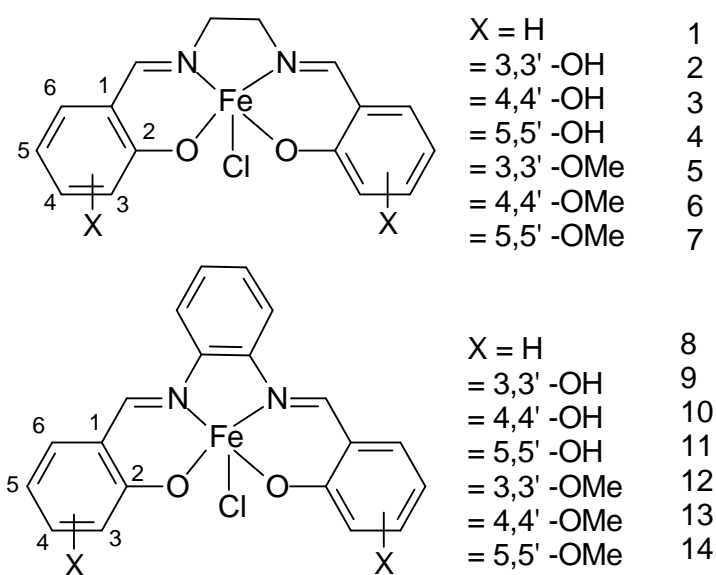


Figura 11. Estrutura dos compostos de coordenação dos compostos Fe(III)-salen e Fe(III)salphen.

Horn e colaboradores avaliaram a atividade de nuclease, utilizando DNA de plasmídeo, e citotóxica de três complexos de ferro contendo o ligante *N,O*-doador HPCINOL [1-(bis-piridina-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol] (**Figura 12**) frente às linhagens tumorais humanas (U937, HL-60, JURKAT e THP-1).

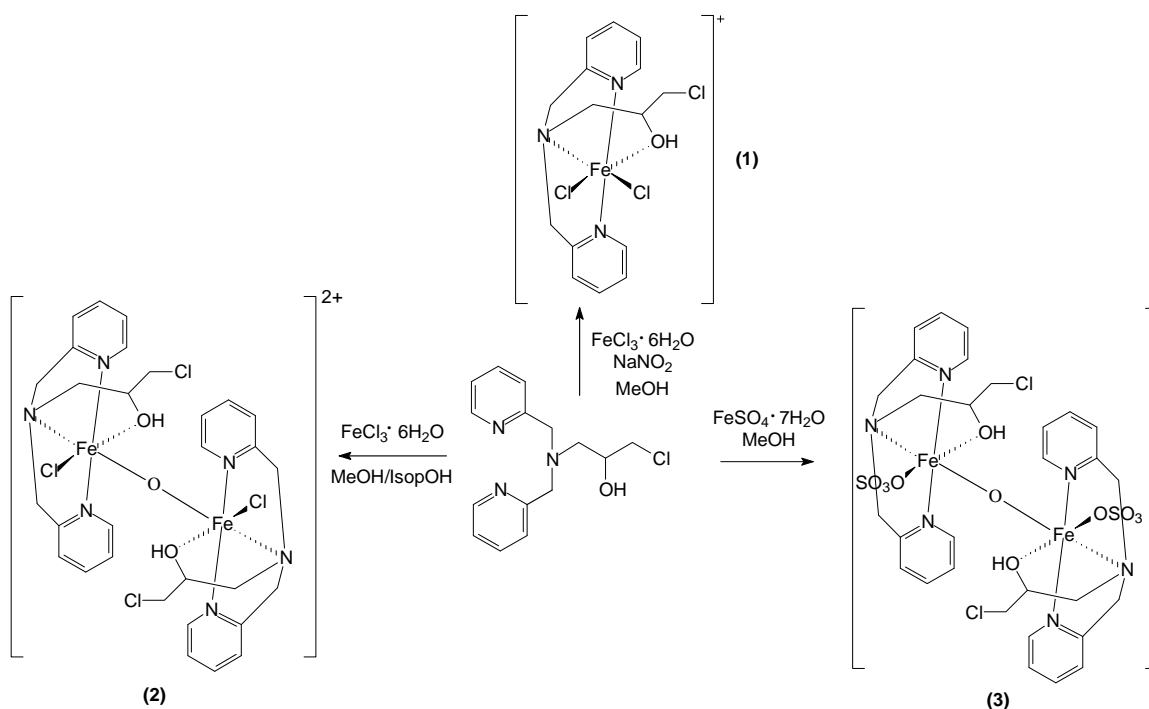


Figura 12. Complexos de ferro (III) obtidos pelo grupo de Química de Coordenação da UENF. Contra-ions e moléculas de hidratação foram omitidos por fins de clareza.

Os dados cinéticos revelaram que os complexos, $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\text{NO}_3$ (1), $[\text{Cl}(\text{HPCINOL})\text{Fe}(\mu\text{-O})\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2) e $[(\text{SO}_4)(\text{HPCINOL})\text{Fe}(\mu\text{-O})\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3) (**Figura 12**), aumentaram a taxa de hidrólise do DNA em cerca de 278, 192 e 339 milhões de vezes, respectivamente. Além disso, os pesquisadores verificaram que em pH 7,0 todos os compostos apresentaram atividades de nuclease semelhantes, o que reforça um estudo anterior que propõe formas binucleares para todos os três complexos, inclusive o composto $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\text{NO}_3$ (1) que se apresenta na forma mononuclear em estado sólido (**Figura 12**) (HORN, et al., 2013 e FERNANDES, et al., 2010). Os autores verificaram que todos os compostos foram capazes de promover a clivagem do DNA de plasmídeos, alterando sua forma de superenovelada para as formas circulares e lineares (HORN, et al., 2013).

A atividade citotóxica dos complexos frente às linhagens U937, HL-60, JURKAT e THP-1 foi estudada utilizando-se o brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O tratamento com o complexo (2) apresentou os menores valores de IC_{50} para as linhagens U937, HL-60 e JURKAT, enquanto que para a linhagem de THP-1 o complexo (3) foi o que apresentou um melhor

resultado. Esses dados foram associados aos valores de IC_{50} para as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), após tratamentos com os três complexos obtidos. Nesta etapa foi observada que o complexo (3) apresentou os melhores resultados quando comparado aos demais (HORN, et al., 2013).

A microscopia eletrônica de transmissão da linhagem de U937, quando tratadas com os complexos, indica características típicas de células em apoptose, como a fragmentação nuclear, formação de vacúolos no citoplasma, presença de corpos apoptóticos e condensação da cromatina. Esse tipo de morte foi confirmado por meio da técnica de Anexina V/PI. Além disso, o estudo revelou que em uma fase precoce, durante o tratamento com o complexo (2), mitocôndrias perdem o seu potencial transmembranar, resultando na liberação de citocromo c (HORN, et al., 2013).

A quantificação das caspases 3, 9 (via intrínseca da apoptose) e 8 (via extrínseca da apoptose) indica que tanto a via intrínseca (por meio de mitocôndrias) quando a via extrínseca (através de receptores de morte) estão envolvidos nos estímulos apoptóticos (HORN, et al., 2013).

A atividade antitumoral de compostos de titânio e ouro também se destacam no meio científico. Dentre os compostos de titânio o dicloro titanoceno $[Ti(Cp)_2Cl_2]$ (**Figura 13**) apresentou resultados promissores *in vitro* e *in vivo*, inclusive para linhagens de câncer de mama. Porém, resultados em testes clínicos fase I indicaram que o referido complexo provoca nefrotoxicidade nos pacientes (KÖPF-MAIER, 1994; CHRISTODOULOU, et al., 1998).

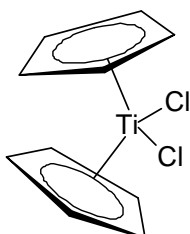


Figura 13. Candidato a metalofármaco de titânio (Ti) empregado em fase clínica.

Compostos de ouro estão despertando o interesse da comunidade científica, devido à potente atividade anticancerígena de novas moléculas com centros metálicos deste elemento (SPRECKELMEYER, et al. 2014).

A pesar de grande parte dos compostos de coordenação apresentarem interações com DNA, estudos indicam que os compostos de ouro não apresentam esta macromolécula como alvo principal. Estudos indicam que compostos como o complexo de ouro com ligante fosfol (**Figura 14**) interagem fortemente com proteínas alterando as funções mitocondriais, levando a morte celular programada (MCKEAGE, et al., 2002). Tanto o centro metálico de ouro (I) quanto o de ouro (III) estão sendo estudados atualmente, sendo verificado que os complexos de Au (I) apresentam atividades antitumorais mais promissoras (SPRECKELMEYER, et al. 2014 e CASINI, et al., 2008).

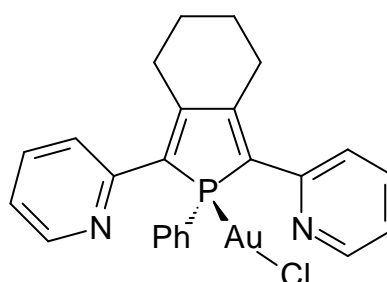


Figura 14. Composto de coordenação de ouro com ligante fosfol.

Outro grupo de compostos de coordenação que vêm se destacando como promissores candidatos a metalofármacos são os complexos de cobre (II). Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses compostos, porém eles têm atraído a atenção de vários pesquisadores devido aos menores efeitos colaterais comparados aos complexos de platina. O cobre (II) é encontrado em organismos vivos, sendo um elemento fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos mesmos. Esse elemento é importante para o funcionamento de várias enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo, fazendo parte de vários processos biológicos, tais como: desintoxicação de radicais livres, respiração mitocondrial e auxílio ao metabolismo do ferro (AZUARA, L. R. e GÓMEZ, M. E. B., 2010 e SPRECKELMEYER, et al., 2014). Estudos indicam que esses compostos são inseridos nas células por mecanismos de transporte via CTR1 e em seguida agem por meio de processos redox (SPRECKELMEYER, et al., 2014).

A homeostase do cobre no interior da célula é mantida por uma complexa rede de proteínas Cu-dependentes, que se coordenam a este elemento

diminuindo a toxicidade da forma intracelular do cobre [Cu (I)]. Essa forma é extremamente tóxica, pois reage com o oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio para produzir radicais livres (SPRECKELMEYER, et al., 2014).

Devido a sua importância biológica e o mecanismo de diminuição da toxicidade do Cu (I) em células normais, complexos contendo esse elemento tornam-se promissores para o tratamento quimioterápico. Neste contexto pesquisadores do grupo de Química de Coordenação da Universidade Estadual do Norte Fluminense, coordenado pelos professores Adolfo Horn Jr. e Christiane Fernandes, verificaram que compostos de coordenação de cobre (II) com os ligantes BMPA e HBPA (**Figura 15**) induziram a morte celular por apoptose em células de origem leucêmicas (BULL, 2008, BULL, 2016 e FERNANDES, et al., 2015).

Em seguida os mesmos pesquisadores verificaram que a inserção de grupamentos químicos planos resulta em um aumento da atividade dos compostos citados anteriormente, sendo destacados os compostos com ligantes HBPA α -naftol e HBPA β -naftol (**Figura 15 e Tabela 1**).

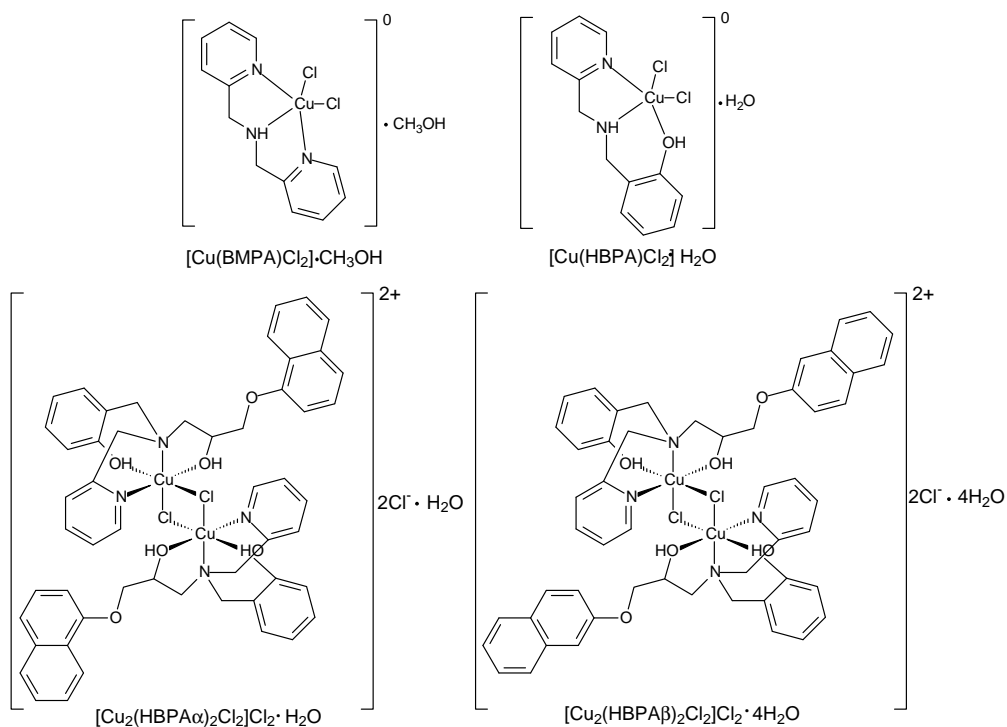


Figura 15. Compostos coordenação de cobre (II) com atividade antitumoral avaliados pelo grupo de Química de Coordenação da UENF.

Tabela 1. Resultados de IC₅₀ dos complexos de cobre (II) e seus respectivos ligantes contra às linhagens de células PBMC, U937 e THP-1 (FERNANDES, et al., 2015).

	IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)		
	U937	THP-1	PBMC
Ligante α -BMPA	43,67 \pm 1,09	32,22 \pm 1,11	> 100
Cu(α -BMPA)	30,72 \pm 1,09	58,51 \pm 1,09	79,64 \pm 1,1
Ligante α -HBPA	66,97 \pm 1,07	30,95 \pm 1,06	> 100
Cu(α -HBPA)	11,30 \pm 1,06	8,20 \pm 1,04	16,35 \pm 1,11
Ligante β -BMPA	87,79 \pm 1,09	38,56 \pm 1,17	> 100
Cu(β -BMPA)	25,44 \pm 1,07	54,75 \pm 1,19	86,99 \pm 1,13
Ligante β -HBPA	> 100	> 100	> 100
Cu(β -HBPA)	34,03 \pm 1,04	39,34 \pm 1,04	36,25 \pm 1,10

Compostos de cobre (II) conhecidos como casiopeínas (na **Figura 16** é apresentada a estrutura da casiopeína II-gly) também tem apresentado satisfatória atividade na terapia anticancer. As alterações dos ligantes influenciam drasticamente na atividade biológica, porém verificou-se que a mudança da glicina possui menor efeito na atividade do que a mudança do grupo fenatrolina. O mecanismo de ação das casiopeínas sugere que essa classe de compostos é capaz de inibir a proliferação celular e produzir morte celular por apoptose, devido à interação com o DNA e mimetismo da superóxido dismutase (SOD) (AZUARA e GÓMEZ, 2010).

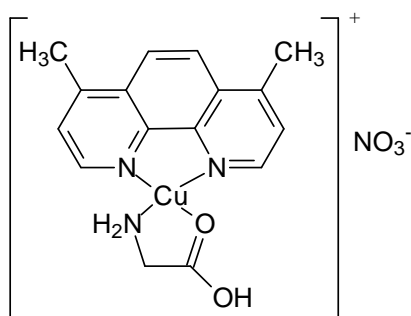


Figura 16. Complexo de cobre (II) com atividade anticancerígena denominado Casiopeína II-gli.

Um estudo realizado por Connor e colaboradores indicou que complexos de casiopeínas contendo ligantes derivados do ácido salicílico mimetizam o sítio ativo da superóxido dismutase (SOD). Esses complexos atuam de forma a

transformar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio, que posteriormente poderá ser convertido em radical hidroxila (HO^{\bullet}). Este último radical está associado diretamente à ruptura do DNA de células mutadas de mama (MCF-7), próstata (DU145), colón (HT29) e ovário (SK-OV-30), sendo a última caracterizada pela resistência à cisplatina (**Figura 17**) (CONNOR, et al., 2012).

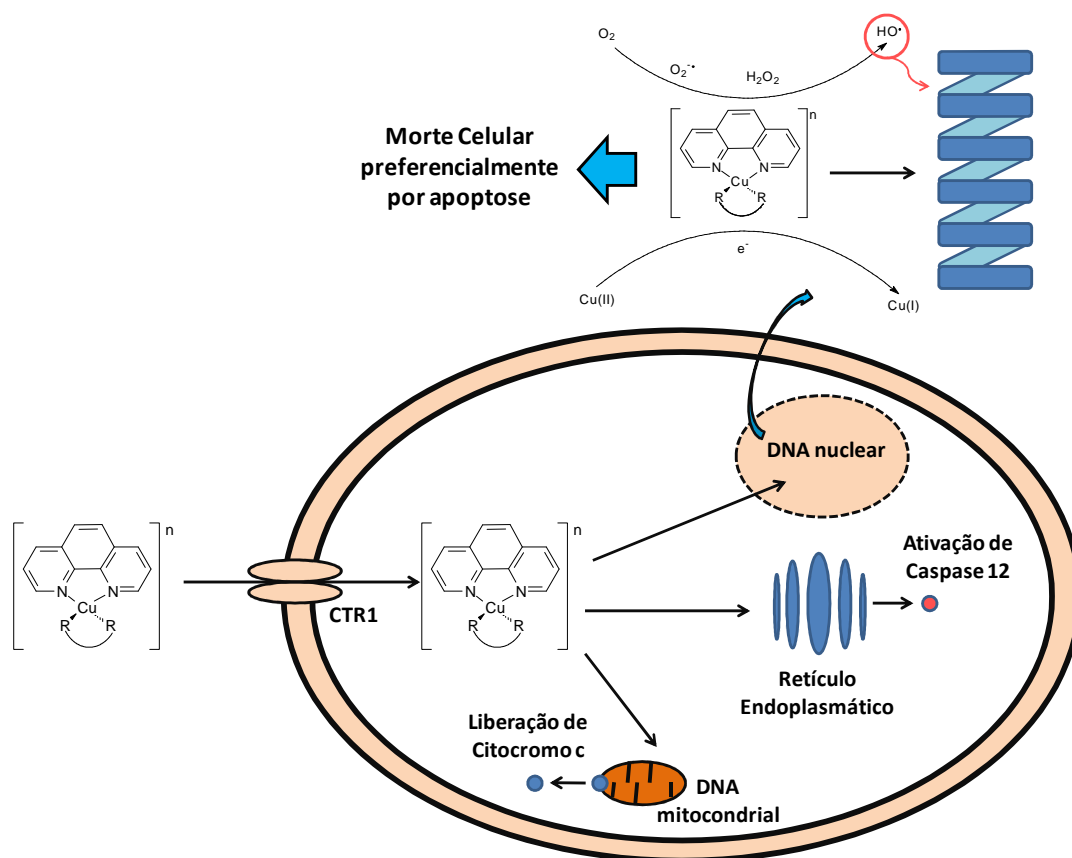


Figura 17. Provável mecanismo de ação dos compostos de coordenação de cobre (II) denominados de casiopeínas. Fonte: O autor.

Estudos relatam que as casiopeínas com ligantes dicarboxilatos intercalam com o DNA levando a formação de adutos e consequente parada na divisão celular, mecanismo semelhante ao apresentado pelos compostos de platina (KELLETT, et al., 2012 e KELLETT, et al., 2011).

Diante do que foi apresentado, a síntese e caracterização de novos compostos de coordenação tem se mostrado uma estratégia interessante na busca por compostos com atividade antitumoral. Tais estudos são de grande relevância e visam a ampliação do espectro de fármacos usados no combate ao câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal a síntese e caracterização de compostos de coordenação de cobre (II) contendo ligantes *N,O*-doadores, bem como a avaliação da atividade citotóxica dos mesmos frente a diferentes linhagens de células cancerígenas (U937, THP-1, MOLT-04, H460 e COLO 205).

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar ligantes *N,O*-doadores e caracterizá-los por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear unidimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional (HMQC e HMBC) (**Figura 18**);

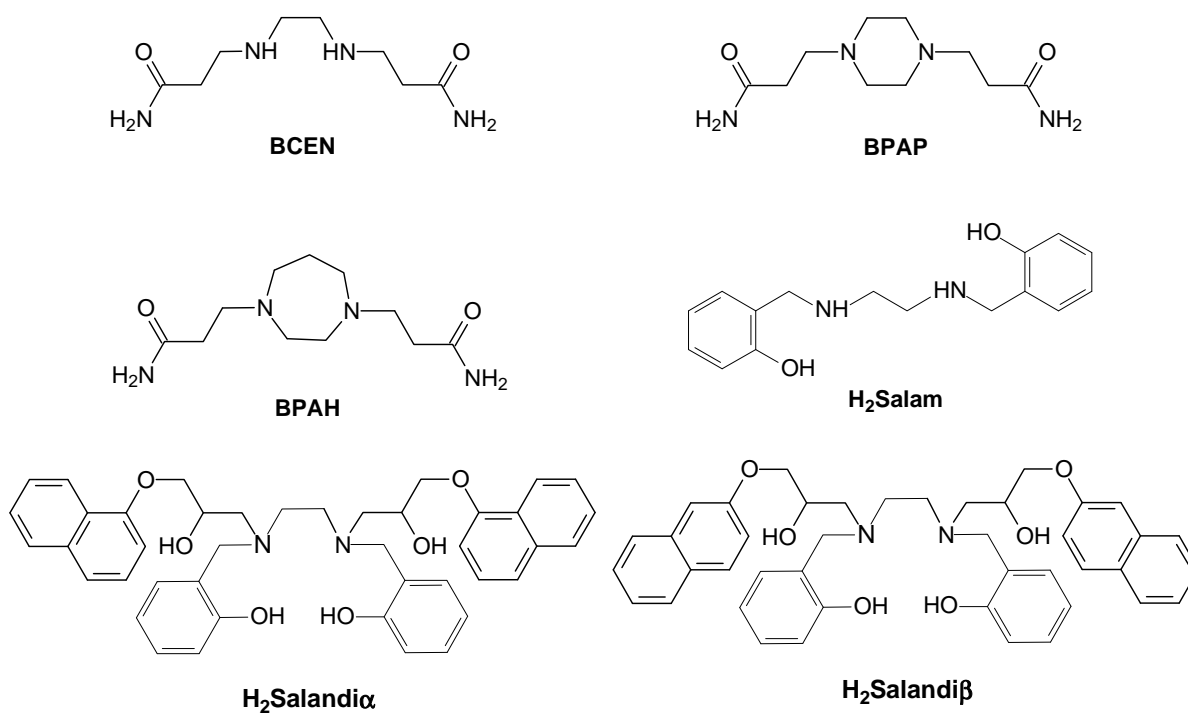


Figura 18. Estrutura dos ligantes utilizados neste trabalho.

- Sintetizar compostos de coordenação a partir de reações de complexação entre os ligantes obtidos e o cobre (II);

- Caracterizar os compostos de coordenação obtidos através das técnicas de espectroscopia de infravermelho, análise elementar de CHN, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* [ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS], difração de raios X, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, espectroscopia na região do ultra-violeta, medidas condutivimétricas e eletroquímicas;

- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos de coordenação e seus respectivos ligantes frente às linhagens humanas de células leucêmicas (THP-1 e MOLT-4), de linfoma (U937), de pulmão (H460) e de colón (COLO 205) empregando-se o ensaio de metabolização do MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio].

- Determinar a toxicidade dos compostos frente às células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC);

- Para os compostos mais ativos, avaliar o mecanismo de morte celular através das técnicas de marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP), avaliação do potencial da membrana mitocondrial, avaliação do ciclo celular, microscopia eletrônica de transmissão e avaliação da ativação das caspases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Técnicas empregadas para sínteses e caracterizações dos ligantes e compostos de coordenação

As sínteses dos ligantes e dos compostos de coordenação foram realizadas utilizando-se solventes de grau P.A. e reagentes de fontes comerciais (*Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck*), sem prévia purificação. As reações orgânicas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (sílica gel 60 F₂₅₄ – *Merck*), utilizando-se solventes adequados como eluentes e uma combinação de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e iodo molecular como reveladores. Foram utilizadas placas de agitação com aquecimento das marcas *Fisher* ou *Go stirrer*, para realizar a agitação e o aquecimento, quando necessário, das reações de síntese orgânica e inorgânica. Quando se fez necessária a evaporação de solventes nas sínteses orgânicas, esta foi realizada empregando-se evaporador rotatório da marca *Fisatom*.

4.1.1. Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN)

As análises dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos ligantes e complexos foram determinadas por dois analisadores da marca *Thermo Scientific*, modelo FLASH 2000 CHNS/O *Analyser* (LCQUI-UENF e *The University of Queensland* – Austrália).

4.1.2. Determinação do ponto de fusão (P.F.)

Os ligantes foram adicionados em capilares de vidro e seus pontos de fusão foram obtidos em um aparelho da marca *Microquímica*, modelo MQAPF-301 (LCQUI-UENF).

4.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

As análises de infravermelho dos compostos sintetizados foram realizadas em forma de pastilhas, previamente prensadas em KBr, utilizando-se o espectrofotômetro de infravermelho da marca *Shimadzu*, modelo IRA *Infinitty-1* (LCQUI-UENF).

4.1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos ligantes e seus precursores foram registrados em um espectrômetro marca *Bruker*, modelo *Ascend™ 500* (LCQUI-UENF), operando a uma frequência de 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , utilizando-se clorofórmio, água, metanol ou DMSO deuterados como solventes. As soluções foram preparadas a partir de aproximadamente 15 mg de amostra em 900 μL de solvente em tubos de 2,5 mm, sendo utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e/ou os sinais residuais dos solventes deuterados. Para os ligantes contendo amidas e para os novos ligantes derivados do H_2Salen foram realizadas as correlações bidimensionais entre os espectros de ^1H e ^{13}C a uma ligação $^1J_{\text{CH}}$ (HMQC) e a duas ou três ligações $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ (HMBC).

4.1.5. Difratometria de Raios X de monocristal (DRX)

Os dados de Difração de Raios X para os monocristais obtidos do complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**C₁**) foram coletados pelo Prof^o. Jackson A. L. C. Resende, da Universidade Federal Fluminense, em um difratômetro da marca *Bruker*, modelo D8 Venture (DQ-UFF). Para a análise foi utilizado tubo de radiação Mo-K α e uma microfona de raios X.

Os dados de difração de raios X para os complexos $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**C₂**) e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**C₃**) foram coletados pelo Prof^o. Adailton J. Bortoluzzi, da Universidade Federal de Santa Catarina, em um difratômetro da marca *Bruker*, modelo APEX II DUO (DQ-UFSC).

Os dados para todos os monocristais obtidos foram registrados utilizando o software APEX2 e corrigidos pelo método SADABS de multi-varredura semi-empírico. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas aplicando o método de matriz completa dos mínimos quadrados usando o pacote SHELXL – 2014.

4.1.6. Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos dos compostos de coordenação foram obtidos em um espectrofotômetro de UV-Vis *Varian*, modelo *Cary 50 Bio* (LCQUI-UENF). As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, sendo utilizando DMSO de grau espectroscópico e água ultra-pura como solventes.

4.1.7. Condutivimetria

As medidas condutivimétricas para os complexos $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**C₁**), $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**C₂**) e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**C₃**) foram realizadas em um condutímetro de bancada microprocessado *Biocristal* modelo PHN, a 25 °C (LCQUI-UENF). Para os complexos $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ (**C₅**) e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**C₆**) as análises de condutividade foram obtidas em um condutímetro MS 12 *Tecnopon1* a 25 °C (LCQUI-UENF). Ambos os equipamentos foram previamente calibrados com uma solução padrão de KCl ($1412 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 25 °C). Em seguida, as análises de condutividade foram realizadas com uma concentração de $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ para cada um dos compostos.

4.1.8. Voltametria Cíclica

A análise de voltametria cíclica para os complexos de cobre $\text{Cu}(\text{BCEN})\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**C₁**), $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ (**C₅**) e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**C₆**) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato *Omnimetra* PG-39 acoplado a

um microcomputador (LCQUI-UENF). Para os complexos de cobre [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂ (**C₂**) e [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ (**C₃**), utilizou-se um potenciostato/galvanostato *Autolab* PGSTAT 10 também acoplado a um microcomputador (LCQUI-UENF). Todas as análises foram realizadas em DMSO grau espectroscópico sob atmosfera de argônio. Utilizando-se um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo auxiliar de platina e um fio de platina como eletrodo de pseudo referência. Uma solução 0,1 mol.dm⁻³ de perclorato de tetrabutilamônio (TBAClO₄) foi utilizada como eletrólito suporte. Devido à sobreposição dos sinais dos compostos estudados com o sinal do padrão ferroceno, a determinação do potencial do mesmo foi realizada em separado, utilizando as mesmas condições empregadas para os compostos de coordenação.

4.1.9. Espectrometria de Massas com ionização por *Electrospray* (ESI – MS/MS)

Os espectros de massas foram obtidos empregando-se espectrômetro de massas microTOF da marca *Bruker* (LCQUI-UENF). A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray*, em modo positivo (ESI(+)-MS) e ESI(+)-MS/MS), empregando-se metanol/água (1:1) como solvente. Para as análises, utilizou-se uma pressão de nebulização de 0,4 bar, uma vazão de gás de 4,0 dm³.min e uma diferença de potencial da célula de nebulização de 650 Vpp.

4.1.10. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

As análises de RPE foram obtidas com a orientação do professor Dr. Roberto W. Franco e os espectros foram coletados com uma frequência de banda X de 9 GHz, a 100 K, usando uma fonte de microondas de 5 mW, uma frequência de modulação de 100 kHz, uma amplitude de modulação de 2 G em um espectrômetro *Bruker* E500 com cavidade cilíndrica de alta sensibilidade (LCFIS-UENF). As análises foram realizadas em DMSO de grau espectroscópico com uma concentração de 0,25 mmol.dm⁻³. Além disso, o fator *g* foi referenciado por

um uma amostra de MgO:Cr (III) ($g = 1,9797$) como padrão interno ligado à amostra analisada. Por fim, o programa Qpow foi utilizado para simular os espectros de RPE.

4.2. Sínteses Orgânicas

4.2.1. Síntese do ligante 1,4-*bis*(propanamida)etilenodiamina (BCEN) (L₁)

O Ligante 1,4-*bis*(propanamida)etilenodiamina, também conhecido na literatura como *N,N'*-bis(carbamoiletil)etilenodiamina (BCEN) foi sintetizado em um balão de fundo redondo de 250 cm³, por meio da reação entre a acrilamida (7,2 g, 100 mmol) e a etilenodiamina (3,0 g, 50 mmol) em 50 cm³ de metanol (**Figura 19**). A metodologia empregada foi similar a descrita por Hay e colaboradores, alterando o tempo de reação em refluxo de 3 para 36 h e o solvente de acetonitrila para metanol. O sólido branco obtido foi filtrado a vácuo utilizando um funil de placa porosa, seco a temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN e 2D-RMN). Rendimento: 3,3 g; 33 %.

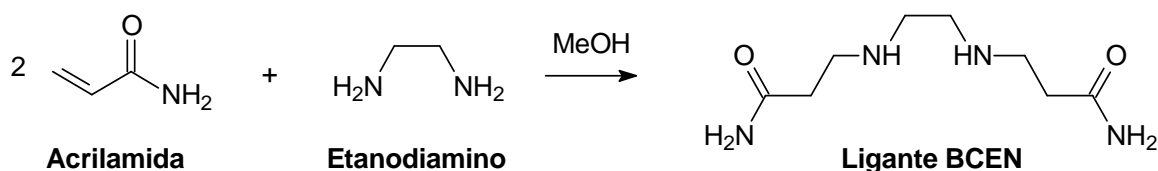


Figura 19. Esquema de síntese do ligante BCEN.

4.2.2. Síntese do ligante 1,4-*bis*(propanamida)piperazina (BPAP) (L₂)

O Ligante 1,4-*bis*(propanamida)piperazina (BPAP) foi sintetizado de forma similar ao ligante anterior. Utilizando um balão de fundo redondo de 250 cm³, realizou-se a reação entre a acrilamida (3,3 g, 46 mmol) e a piperazina (2,0 g, 23 mmol) em 50 cm³ de metanol (**Figura 20**). Após 36 h em refluxo, o sólido branco obtido foi filtrado a vácuo utilizando um funil de placa porosa, seco a temperatura

ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e 2D-RMN). Rendimento: 5,2 g; 98 %.

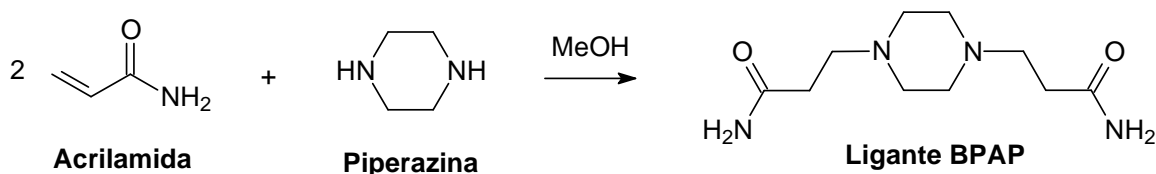


Figura 20. Esquema de síntese do ligante BPAP.

4.2.3. Síntese do ligante 1,4-*bis*(propanamida)homopiperazina (BPAH) (L_3)

O ligante 1,4-*bis*(propanamida)homopiperazina (BPAH) foi sintetizado em um balão de fundo redondo de 250 cm^3 , por meio da reação entre a acrilamida (3,4 g, 48 mmol) e a homopiperazina (2,0 g, 20 mmol) em 50 cm^3 de metanol (**Figura 21**). A mistura reacional esteve em refluxo durante 36 h, resultando em uma solução amarela, a qual foi concentrada utilizando um evaporador rotativo e em seguida foram adicionados 20 cm^3 de acetona. A solução resultante foi mantida sobre refrigeração durante uma semana, sendo observada a formação de um sólido levemente amarelado, o qual foi filtrado a vácuo utilizando um funil de placa porosa, seco a temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e 2D-RMN). Rendimento: 4,5 g; 92,8 %.

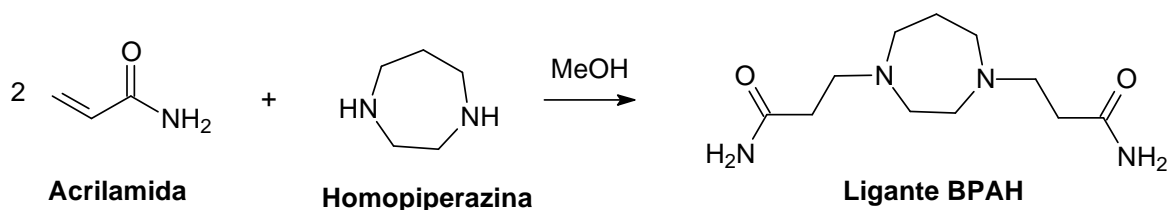


Figura 21. Esquema de síntese do ligante BPAH.

4.2.4. Síntese do precursor *N,N*-bis(salicilideno)etilenodiamina (H_2Salen) (P_1)

. A reação para a obtenção do precursor H_2salen foi realizada em um balão de fundo redondo de 250 cm^3 , utilizando 100 cm^3 de metanol como solvente. O sistema reacional foi formado pela adição de $1,0\text{ cm}^3$ (10 mmol) de salicilaldeído e $0,4\text{ cm}^3$ (6 mmol) de etilenodiamina, como é observado na **Figura 22**. A mistura reacional foi mantida em refluxo com constante agitação durante 4 horas, resultando na formação de um sólido amarelo, o qual foi isolado, por meio de filtração a vácuo com funil de placa porosa, seco em temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, 1H -RMN). Rendimento: 1,38 g; 55 %.

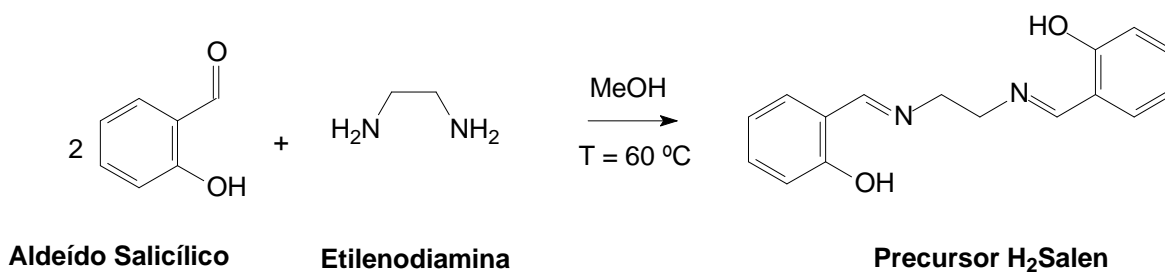


Figura 22. Esquema de síntese do precursor H_2Salen .

4.2.5. Síntese do ligante *N,N*-bis(2-hidroxi-benzil)etilenodiamina (H_2Salam) (L_4)

Visando sintetizar o ligante H_2Salam , adicionou 1,34 g do precursor H_2Salen em um balão de fundo redondo de 500 cm^3 , seguido da adição de 100 cm^3 de metanol. Após alguns minutos foi adicionado lentamente 0,38 g de boridreto de sódio ($NaBH_4$), mantendo o sistema reacional em banho de gelo (**Figura 23**). Assim como nos ligantes anteriores, o sólido branco obtido foi filtrado a vácuo utilizando um funil de placa porosa, seco a temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, 1H -RMN). Rendimento: 0,80 g; 61 %.

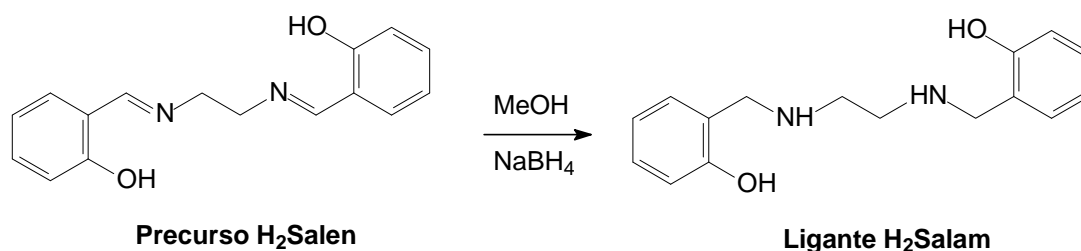


Figura 23. Esquema de síntese do ligante H₂Salan.

4.2.6. Síntese do ligante *N,N*-bis(2-hidroxibenzil)-*N,N*-bis[3-(1-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina (H₂Salandi α) (L₅)

A rota sintética do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**), apresentado na **Figura 24**, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por LOPES em 2012. Inicialmente realizou-se a desprotonação da hidroxila do grupo α -naftol (10,0 g; 0,087 mol) utilizando hidróxido de potássio (4,9 g; 0,87 mol) em 200 cm³ de etanol. Após aproximadamente 10 minutos foram adicionados 33,6 cm³ de 1-cloro-2,3-epoxipropano, mantendo a solução à temperatura ambiente durante 48 horas. Após o tempo estipulado, o solvente da solução resultante foi retirado por meio de evaporador rotativo, dissolvida em 50 cm³ de água, transferida para um funil de decantação e extraída três vezes com 30 cm³ de éter etílico gelado. Em seguida, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. Por fim, o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, levando a formação de um óleo castanho. O óleo foi posteriormente caracterizado por algumas técnicas instrumentais (IV e ¹H-RMN). Rendimento: 7,1 g; 56 %.

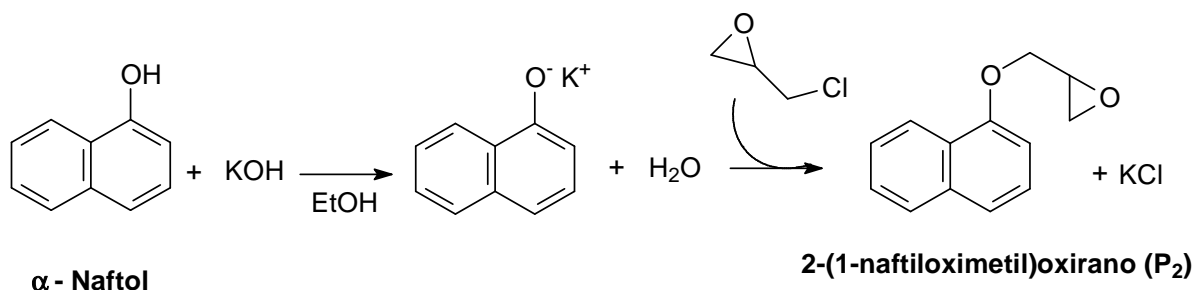


Figura 24. Esquema de síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano.

Após a síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**), 1,1 g (5,4 mmol) desse composto foi colocado em um balão de fundo redondo de 500 cm³ e em seguida foram adicionados 200 cm³ de metanol e 0,73 g (2,7 mmol) do ligante H₂Salam. A reação foi realizada sob refluxo durante 36 h, levando à formação do ligante denominado de H₂Salandiα (**Figura 25**). O ligante foi filtrado a vácuo utilizando um funil de placa porosa, seco à temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, 2D-RMN e ESI/MS). Rendimento: 0,88 g; 49 %.

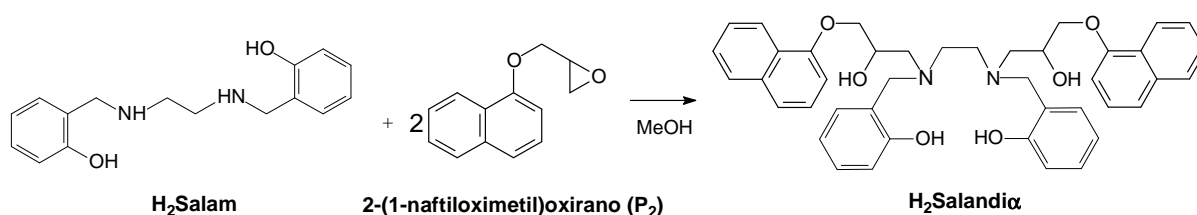


Figura 25. Esquema de síntese do novo ligante H₂Salandiα.

4.2.7. Síntese do novo ligante *N,N*-bis(2-hidroxi-benzil)-*N,N*-bis[3-(2-naftiloxi)-2-ol-propil]etilenodiamina (H₂Salandiβ) (L₆)

A rota sintética do 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P₃**) foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por LOPES em 2012. A referida rota é muito similar à apresentada no item anterior, sendo a única diferença a substituição do reagente α-naftol pelo β-naftol (10,0 g; 0,087 mol) (**Figura 26**). Após 48 h de reação a solução resultante foi concentrada em evaporador rotativo, levando a formação de um óleo castanho, o qual se solidificou após três dias. O produto obtido foi recristalizado em *n*-hexano a quente, resultando em um sólido branco, que foi seco a temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (IV e ¹H-RMN). Rendimento: 7,3 g; 58 %.

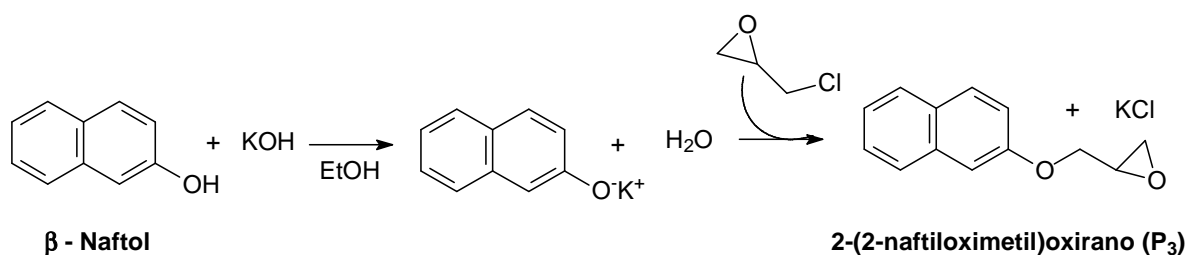


Figura 26. Esquema de síntese do 2-(2-naftiloximetil)oxirano.

Após recristalização do 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P₃), um grama desse composto foi colocado em um balão de fundo redondo de 500 cm³ e em seguida foram adicionados 200 cm³ de metanol e 0,73 g do ligante H₂Salam (**Figura 27**). A reação foi realizada sob refluxo durante 36 h, levando a formação do novo ligante denominado de H₂Salandiβ. Assim como na síntese dos demais ligantes, o sólido branco formado foi filtrado a vácuo utilizando-se um funil de placa porosa, seco a temperatura ambiente em dessecador e posteriormente caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (P.F., IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, 2D-RMN e ESI/MS). Rendimento: 0,64 g; 36 %.

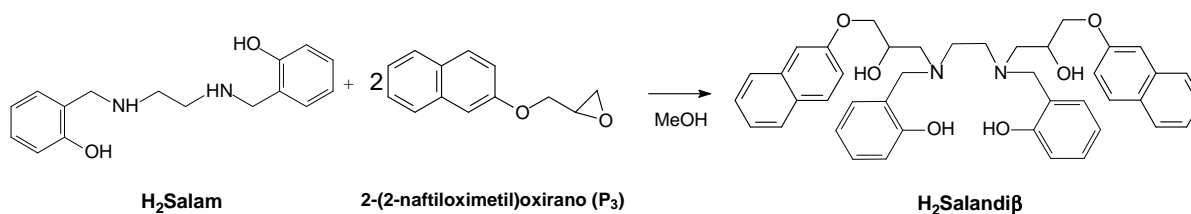


Figura 27. Esquema de síntese do ligante H₂Salandiβ.

4.3. Sínteses dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo amida

4.3.1. Síntese do composto de coordenação [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O (C₁)

Em um béquer contendo uma suspensão formada por 0,202 g (1 mmol) do ligante BCEN (L₁) e 40 cm³ de metanol, foi adicionado 0,170 g (1 mmol) de CuCl₂•2H₂O (**Figura 28**). A reação foi realizada em temperatura ambiente com agitação constante. Após a adição do CuCl₂•2H₂O verificou-se a formação de um

precipitado azul claro. Depois de 30 minutos a solução foi filtrada em funil de placa porosa, sendo verificada a formação de um sólido azul escuro. Em seguida, o sólido obtido foi seco à temperatura ambiente e caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (análise elementar de CHN, IV, ESI-MS/MS, UV-Vis, condutividade, voltametria cíclica e RPE). Rendimento: 0,184 g; 54 %. A solução foi deixada por vários dias em temperatura ambiente, sendo observada a formação de monocristais, que foram cuidadosamente coletados e analisados por difração de raios X.

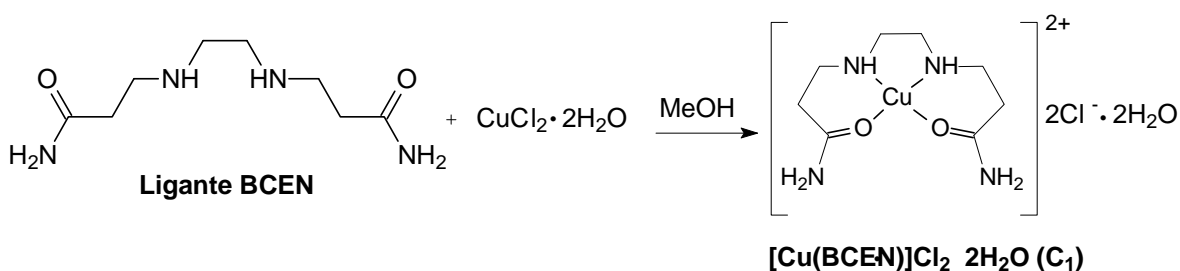


Figura 28. Esquema de síntese do complexo [Cu(BCEN)]Cl₂·2H₂O.

4.3.2. Síntese do novo composto de coordenação [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂ (C₂)

Em um béquer contendo uma suspensão formada por 0,228 g (1 mmol) do ligante BPAP (L₂) e 40 cm³ de metanol, foi adicionado 0,170 g (1 mmol) de CuCl₂·2H₂O (**Figura 29**). A reação foi realizada em temperatura ambiente com agitação constante. Após a adição do CuCl₂·2H₂O, verificou-se a formação de um precipitado azul. Após 30 minutos o sistema reacional foi filtrado em funil de placa porosa, o sólido azul obtido foi seco a temperatura ambiente e caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (análise elementar de CHN, IV, ESI-MS/MS, UV-Vis, condutividade, voltametria cíclica e RPE). Rendimento: 0,300 g; 79 %. O filtrado foi deixado em repouso por vários dias, sendo observada a formação de monocristais. Estes foram cuidadosamente coletados e caracterizados por difração de raios X.

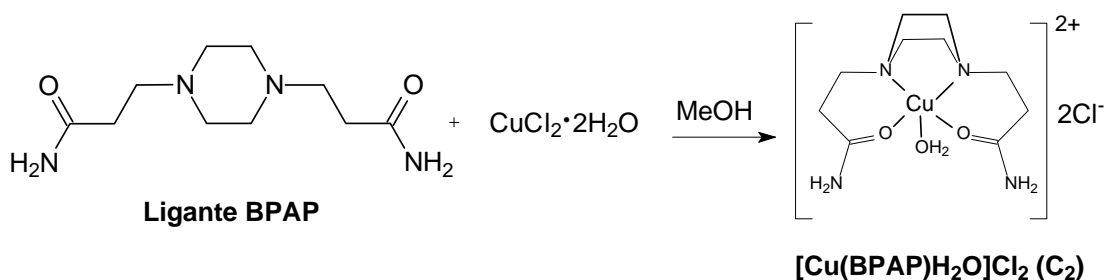


Figura 29. Esquema de síntese do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

4.3.3. Síntese do novo composto de coordenação $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**C₃**)

Em um béquer, contendo uma suspensão formada por 0,242 g (1 mmol) do ligante BPAH (**L₃**) e 40 cm³ de metanol, foi adicionado 0,170 g (1 mmol) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 30**). A reação foi realizada em temperatura ambiente com agitação constante durante aproximadamente 30 minutos. Após a adição do $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, verificou-se a formação de um precipitado azul intenso, que foi filtrado em funil de placa porosa, seco em temperatura ambiente e caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (análise elementar de CHN, IV, ESI-MS/MS, UV-Vis, condutividade, voltametria cíclica e RPE). Rendimento: 0,310 g; 79 %. De forma similar aos compostos de coordenação anteriores, o filtrado foi deixado em repouso por vários dias em temperatura ambiente, sendo observada a formação de monocristais. Estes foram cuidadosamente coletados e caracterizados por difração de raios X.

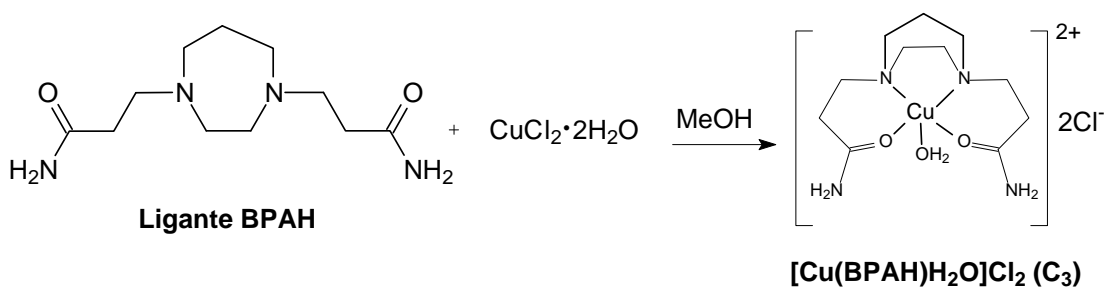


Figura 30. Esquema de síntese do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

4.3.4. Síntese do composto de coordenação [Cu(Salam)]•H₂O (C₄)

A síntese do complexo [Cu(Salam)]•H₂O foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Aidyn e colaboradores em 2001. Em um béquer contendo uma solução formada por 0,544 g (2 mmol) do ligante H₂Salam e 30 cm³ de etanol, foi adicionada uma mistura contendo Cu(OH)₂, preparada previamente por uma solução de CuSO₄•5H₂O (0,62 g; 2,5 mmol) com 30 cm³ de uma solução aquosa de 5 % de NaOH. Após algumas horas em agitação à temperatura ambiente verificou-se a presença de um sólido com coloração verde escura, sendo este composto de coordenação denominado de [Cu(Salam)]•H₂O (**Figura 31**). O sólido obtido foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com isopropanol gelado, seco em temperatura ambiente e caracterizado por algumas técnicas instrumentais (análise elementar de CHN e IV). Rendimento: 0,492 g; 70 %.

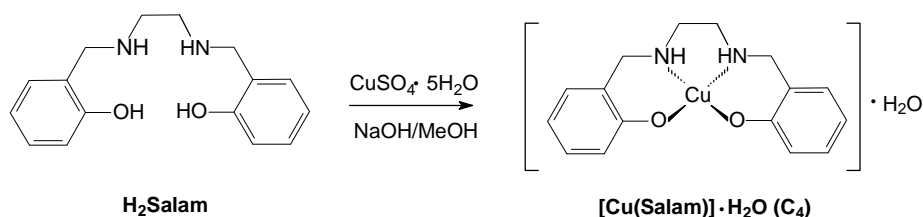


Figura 31. Esquema de síntese do complexo [Cu(Salam)]•H₂O.

4.3.5. Síntese do composto de coordenação [Cu₂(Salandiα)Cl₂] (C₅)

Em um béquer contendo uma suspensão formada por 0,673 g (1 mmol) do ligante H₂Salandiα e 40 cm³ de metanol, foi adicionado 0,170 g (1 mmol) de CuCl₂•2H₂O (**Figura 32**). A reação foi realizada em temperatura ambiente com agitação constante durante aproximadamente 30 minutos. Em seguida, a solução resultante permaneceu à temperatura ambiente por vários dias, sendo observada a formação de um precipitado verde intenso, que foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com isopropanol gelado, seco em temperatura ambiente e caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (análise elementar de CHN, IV, ESI-MS/MS, UV-Vis, condutividade, voltametria cíclica e RPE). Rendimento: 0,359 g; 49 %.

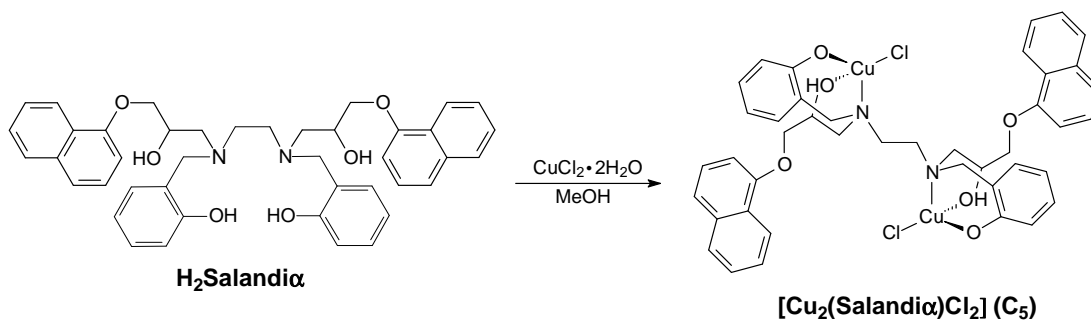


Figura 32. Esquema de síntese do complexo [Cu₂(Salandi α)Cl₂].

4.3.6. Síntese do composto de coordenação [Cu₂(Salandi β)Cl₂] \cdot 2H₂O (C₆)

Em um béquer contendo uma suspensão formada por 0,673 g (1 mmol) do ligante H₂Salandi β e 40 cm³ de metanol, foi adicionado 0,340 g (2 mmol) de CuCl₂ \cdot 2H₂O (**Figura 33**). A reação foi realizada em temperatura ambiente com agitação constante durante aproximadamente 30 minutos. Em seguida, a solução resultante permaneceu a temperatura ambiente por vários dias, sendo observada a formação de um precipitado verde intenso, que foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com isopropanol gelado, seco em temperatura ambiente e caracterizado por diferentes técnicas instrumentais (análise elementar de CHN, IV, ESI-MS/MS, UV-Vis, condutividade, voltametria cíclica e RPE). Rendimento: 0,366 g; 40 %.

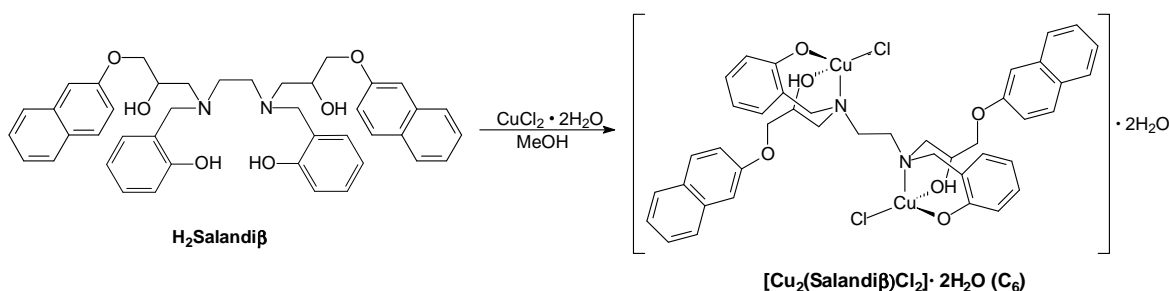


Figura 33. Esquema de síntese do complexo [Cu₂(Salandi β)Cl₂] \cdot 2H₂O.

4.4. Avaliação da atividade antineoplásica , *in vitro*, dos compostos

Após as sínteses e a confirmação das estruturas básicas dos ligantes e compostos de coordenação de cobre (II), cinco linhagens de células cancerígenas

humanas foram selecionadas, de acordo com a disponibilidade, para avaliação da atividade citotóxica dos compostos. A escolha das células também se baseou na resistência das mesmas ao tratamento com a cisplatina e nos dados de incidência e mortalidade informados por órgãos internacionais (WHO e IARC) e nacionais (INCA). Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens leucêmicas, sendo estas: MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e THP-1 (leucemia monocítica aguda). Além de uma linhagem de linfoma: U937 (linfoma histiocítico), e duas linhagens aderentes: H460 (carcinoma de pulmão) e COLO 205 (adenocarcinoma colo retal). Os dados de atividades biológicas foram obtidos em parceria com o Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) sob supervisão dos professores Dr^o Milton Masahiko Kanashiro e Dr^o João Carlos de Aquino Almeida.

4.4.1. Descongelamento, cultura e congelamento das linhagens de células selecionadas

As linhagens cancerígenas selecionadas estavam armazenadas em nitrogênio líquido em criotubos. As mesmas foram descongeladas com água a aproximadamente 37 °C e em seguida, transferidas para 5 cm³ de meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, BRL), suplementado com 20 µg cm⁻³ de gentamicina (Gibco, BRL) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Os tubos com as células recém-transferidas foram centrifugados por 5 minutos a 400 g. Os sobrenadantes foram descartados e aos “*pellets*” foram adicionados 5 cm³ de meio de cultura DMEM/F12 suplementado. As células foram cuidadosamente transferidas para garrafas de cultura estéreis e mantidas em estufa (*Forma Scientific Inc.*, modelo 3159) a temperatura de 37 °C com 5 % de CO₂ e umidade controlada. O meio de cultura foi renovado diariamente ou conforme a necessidade das linhagens observadas.

Visando a manutenção do estoque das células, partes das linhagens foram congeladas. Para cada uma das linhagens, 5 cm³ de cultura celular foram transferidos para tubos graduados de 15 cm³ e centrifugados por 5 minutos a 400 g. Os sobrenadantes foram descartados e as células presentes nos “*pellets*” foram ressuspensas com 0,9 cm³ de meio de cultura suplementado e 0,1 cm³ de DMSO para cultura (Hybri-Max, Sigma). Por fim, as células foram transferidas

para criotubos e condicionadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre 24 e 72 horas e, em seguida, transferidas imediatamente para nitrogênio líquido.

4.4.2. Diluição e armazenamento dos compostos avaliados

Neste trabalho foram avaliados seis ligantes orgânicos, o sal utilizado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e sete compostos de coordenação, sendo seis com centros metálicos de cobre (II) e a cisplatina, como controle positivo. Para cada um desses, foram preparadas soluções na concentração de $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ utilizando água ultrapura ou DMSO como solventes. As soluções recém preparadas foram estocadas em geladeira (2 a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$) e utilizadas nos ensaios biológicos, apresentados nas próximas etapas.

4.4.3. Ensaio Metabólico com MTT (brometo de 3-(4,5-17 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltretazólio)

Antes de iniciar o ensaio metabólico com MTT, a integridade de cada uma das culturas celulares foi confirmada por meio de um microscópio invertido (*Axiovert 135M*).

Depois de confirmada a integridade das culturas celulares, as células não aderentes foram homogeneizadas e coradas com Trypan Azul (Sigma, T6146) na concentração de $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (50 mm^3 do meio de cultura com células + 50 mm^3 do corante em um frasco de 2 cm^3). Uma alíquota das células coradas de cada cultura foi quantificada utilizando câmara de Neubauer (Boeco), em seguida a cultura foi centrifugada (400 g durante 5 min), a fim de ressuspender as células em novo volume de meio de cultura DMEM/F12 completo, de modo a obter-se a concentração de $1,0 \times 10^6 \text{ células} \cdot \text{cm}^{-3}$. Além disso, esse procedimento visa adicionar um novo meio de cultura às células, evitando assim a ausência de nutrientes e consequentes mortes por inanição.

Para as células do tipo H460 e COLO 205, aderentes, foi necessário o uso de tripsina completa ($2,0 \text{ cm}^3$ de EDTA 2,5 %, $7,0 \text{ cm}^3$ de PBS e $1,0 \text{ cm}^3$ de tripsina) a fim de desaderir as células da parede da garrafa de cultura (1 cm^3 de tripsina completa para uma garrafa média com 15 cm^3 de células, após retirada do

sobrenadante). Movimentos repetidos foram feitos de forma a desaderir as células do fundo da garrafa. Acrescentou-se 5 cm³ de meio de cultura e, em seguida, as células foram coradas e quantificadas utilizando o mesmo procedimento descrito para as linhagens não aderentes.

O ensaio metabólico com MTT foi realizado de acordo com metodologia descrita por Lopes (2012), que tem por base a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, chamado MTT com coloração amarela, a formazan, um composto de cor púrpura, através da enzima succinato desidrogenase mitocondrial (**Figura 34**).



Figura 34. Esquema da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.

Para os testes de citotoxicidade, utilizou-se placas de 96 poços onde em cada poço colocou-se 100 mm³ de células em meio de cultura com a concentração ajustada para 1,0x10⁶ células.cm⁻³. As placas foram deixadas em repouso na estufa, a fim de que as células voltassem à atividade normal. Para as linhagens não aderentes utilizou-se um intervalo de repouso de 2 a 4 horas, enquanto que, para as linhagens aderentes a faixa estipulada foi de 4 a 6 horas. Além desse intervalo, averiguou-se se as células estavam aderidas no fundo dos poços da placa utilizada.

A diluição das soluções dos compostos foi realizada em meio DMEM/F12 (Gibco, BRL) suplementado com soro fetal bovino e gentamicina (meio DMEM/F12 completo). Os compostos foram então diluídos até as concentrações de 400,0; 200,0; 100,0; 50,0; e 25,0 µmol.dm⁻³ em frascos de 2 cm³. Nos casos dos compostos mais ativos, necessitou-se reduzir a concentração de trabalho para 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,2 µmol.dm⁻³. Após o tempo de repouso estipulado,

foi acrescentado um volume de 100 mm^3 de cada uma das soluções recém preparadas aos poços contendo as linhagens celulares, levando a uma redução das concentrações anteriores pela metade.

As células foram submetidas ao tratamento por 36 horas e, em seguida, a viabilidade foi avaliada pelo teste de metabolização do MTT. A cada poço, foram acrescentados 20 mm^3 de uma solução de MTT ($5,0 \text{ mg cm}^{-3}$ dissolvido em tampão fosfato salino pH 7,2). Após 4 horas de incubação, foram retirados 120 mm^3 do sobrenadante das culturas de células tumorais e os cristais púrpuras precipitados de formazan foram solubilizados em 150 mm^3 de solução de 0,6 % (v/v) de HCl em isopropanol.

As placas foram submetidas à centrifugação por 10 min a $400 g$ e 100 mm^3 do sobrenadante foram transferidos para outra placa de cultura de 96 poços e lida na sequência em espectrofotômetro multicanal com comprimento de onda ajustado para 570 nm. Os resultados obtidos foram convertidos para valores de IC_{50} através do programa GraphPadPrism versão 4.0, utilizando-se teste estatístico One-way ANOVA.

4.4.4. Cultura da linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue de diferentes voluntários saudáveis quanto a neoplasias sanguíneas foi coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (*Becon Dickinson*) contendo heparina sódica. Cada uma das amostras de sangue coletadas foi lentamente adicionada sobre o Ficoll-Paque™ Plus ($1,08 \text{ g cm}^{-3}$), na proporção de 2:1 (20 cm^3 de sangue para 10 cm^3 de Ficoll), em tubos de 50 cm^3 , e centrifugado (Centrifuga Sorval, RT7) a $400 g$ por 40 min, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. O plasma, que compõe a primeira camada do gradiente obtida, foi descartado e o anel de células mononucleares foi removido, lavado três vezes com meio de cultura (RPMI) gelado e centrifugado a $400 g$ por 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o processo de lavagem, o "pellet" formado foi ressuscitado em RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e $20 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-3}$ de gentamicina. Por fim, realizou-se o ensaio de viabilidade celular via metabolização do MTT da mesma forma apresentada no item anterior, substituindo as células tumorais pelas células mononucleares do sangue periférico.

4.4.5. Confirmação do processo de morte celular programada através de marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP)

As linhagens de células leucêmicas foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células. cm^{-3} em placas de 24 poços e tratadas com $1 \times \text{IC}_{50}$ e $2 \times \text{IC}_{50}$ do composto mais ativo para cada linhagem, durante 24 horas. A marcação com anexina V/IP foi realizada de acordo com o protocolo do *kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich). Após incubação, as células foram lavadas duas vezes com $0,5 \text{ cm}^3$ de PBS e ressuspensas em $0,5 \text{ cm}^3$ do tampão de ligação fornecido pelo kit ($100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HEPES/NaOH, pH 7,5, contendo $1400 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de NaCl e $25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de CaCl_2). A cada um dos frascos contendo as células em tampão de ligação foram adicionados 5 mm^3 de anexina V e 10 mm^3 de iodeto de propídio (IP). As amostras foram deixadas no escuro por exatamente 10 minutos, e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os histogramas e as porcentagens de células em cada quadrante foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

Um procedimento similar foi realizado para a linhagem de células de H460, sendo este realizado em placas de 12 poços com uma concentração de 5×10^5 células. cm^{-3} e um tempo de incubação de 30 horas para o composto mais ativo ($1 \times \text{IC}_{50}$, $2 \times \text{IC}_{50}$ e $200 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), visto que em 24 horas não foi observada atividade significativa. A redução na concentração das células aderentes e o aumento do tamanho dos poços utilizados foram necessários, devido a aderências das células no fundo dos poços. Sem esses ajustes o controle positivo apresentava uma porcentagem de morte superior a 10 %.

4.4.6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)

As células de U937 e H460 foram plaqueadas nas mesmas condições apresentadas no experimento anterior com um volume de 1 cm^3 . Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos de 2 cm^3 e centrifugado por 5 minutos a 400 g. O sobrenadante foi desprezado e as células

incubadas por 15 minutos em estufa (37 °C e 5 % de CO₂) com 0,5 cm³ de solução de JC-1 (25 µg.cm⁻³ diluído 1:1000 em meio de cultura DMEMF12). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 400 g e lavadas duas vezes com 2 cm³ de meio de cultura DMEMF12. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 0,5 cm³ de meio DMEMF12 sem soro. A leitura das amostras foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os gráficos *Dot-plot* e a porcentagem de células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

4.4.7. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)

As células da linhagem U937 foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células.cm⁻³ em placas de 24 poços, tratadas com 1xIC₅₀ e 2xIC₅₀ do composto mais ativo e incubadas por 24 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Enquanto que as células H460 foram plaqueadas na concentração 5x10⁵ células.cm⁻³ em placas de 12 poços, tratadas com 1xIC₅₀, 2xIC₅₀ e 200 µmol.dm⁻³ do composto mais promissor avaliado por MTT. Em seguida, as células controle foram incubadas apenas com meio DMEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg.cm⁻³ de gentamicina (Gibco, BRL). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (2 cm³) foi transferido para tubos de 2 cm³ e centrifugado por 5 minutos a 800 g. As células foram lavadas duas vezes com PBS. Após a lavagem foi adicionado lentamente 1 cm³ de etanol 70 % gelado e as células foram submetidas a fixação por 30 minutos a 4 °C. Após o período de fixação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 800 g por 5 min e lavadas com tampão fosfato-citrato (200 mmol.dm⁻³, pH = 7,8). O sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 50 mm³ de RNase A (100 µg.cm⁻³ Sigma) à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foi adicionado 0,4 cm³ de iodeto de propídio (concentração final 50 µg.cm⁻³; Sigma). As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur) onde foram contados 10 000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em sub-G1 foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

4.4.8. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas para as células da linhagem U937 na concentração de 1×10^6 células. cm^{-3} e para as células H460 na concentração de 5×10^5 células. cm^{-3} . Ambas as linhagens foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm^2 por 12 horas. Em seguida, as células U937 foram incubadas com o complexo de cobre mais ativo para a linhagem nas concentrações de $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$ e $1 \times \text{IC}_{50}$ no período de 4 e 8 horas. Para a linhagem H460 utilizou-se o mesmo período, porém as concentrações utilizadas foram de $1 \times \text{IC}_{50}$ e $2 \times \text{IC}_{50}$. As células foram suspensas e centrifugadas por 10 minutos com 400 g. Em seguida, as mesmas foram lavadas com tampão PBS (pH = 7,2). O “*pellet*” foi fixado por 2 horas em 2,5 % de glutaldeído em $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do tampão de cacodilato de sódio e deixado por 20 minutos em uma solução de tetróxido de ósmio (1:1) (1,0 %) e ferrocianeto de potássio (0,8 %). Por fim, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções de acetona (30-100%), aderidas em uma resina de epóxida (Poly/Bed 8120), moldadas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas e observadas em microscópio de transmissão TEM-900 (Zeiss).

4.4.9. Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9

Visando avaliar qual a via apoptótica induzida pelo composto mais ativo para a linhagem U937, utilizou-se o ensaio de ativação das caspases por meio do kit *Colorimeter Sampler (Invitrogen)*, contendo substratos para as caspases 3 e 6 (efetoras para ambas as vias), 9 (ativadora da via mitocondrial) e 8 (ativadora da via dos receptores de morte). Foram seguidos os procedimentos descritos pelo fabricante. As células da linhagem U937 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células. cm^{-3} , e incubadas com uma concentração de $2 \times \text{IC}_{50}$ do composto mais ativo por 3, 6, 12 horas. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 200 g e ressuspendidas em 100 mm^3 do tampão de lise (1,0 % de triton X-100, $0,32 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, de sacarose, $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de EDTA, $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tris-HCl, $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de dithiothreitol, $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ de PMSF). As amostras foram

centrifugadas por 1 min (800 g) e, em seguida, foram adicionados 50 mm³ do tampão de reação (200 mmol.dm⁻³ de HEPES, 20,0 % de sacarose, 0,2 % de CHAPS, 0,2 mg.cm⁻³ de albumina bovina e 20,0 mmol.dm⁻³ de DTT). As amostras foram incubadas a 37 °C, no escuro, durante 1 h e foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 450 nm nos tempos de 0; 1 e 2 horas após a incubação. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.6.10. Avaliação da atividade da caspase 12

As células de U937 foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células.cm⁻³ em placas de 24 poços, tratadas com 2xIC₅₀ do composto mais ativo e incubadas por 6, 12 e 24 horas em estufa (37 °C e 5 % de CO₂), enquanto que as células H460 foram plaqueadas na concentração 5x10⁵ células.cm⁻³ em placas de 12 poços, tratadas com 2xIC₅₀ do composto mais promissor avaliado por MTT por 24 h. Após o término do tempo estipulado, 300 mm³ da solução contendo as células tumorais foram transferidas para frascos de 2 cm³. A cada um dos tubos foram adicionados 1 mm³ do marcador FITC-ATAD-FMK e os tubos foram incubados durante 30 min a 37 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 g durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas e lavadas duas vezes em 0,5 cm³ de tampão fornecido pelo kit. Por fim, a quantificação da caspase 12 foi realizada por citometria de fluxo utilizando o canal FL-1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Sínteses dos ligantes contendo grupos amida

Os ligantes BCEN, BPAP e BPAH foram selecionados com intuito de averiguar as diferenças nas propriedades estruturais, espectroscópicas e antitumorais, associadas às mudanças na unidade diamínica central. Para esse propósito foram realizadas reações de Michael entre a acrilamida e diferentes unidades diamínicas (etilenodiamina, piperazina e homopiperazina), como apresentado na **Figura 35**.

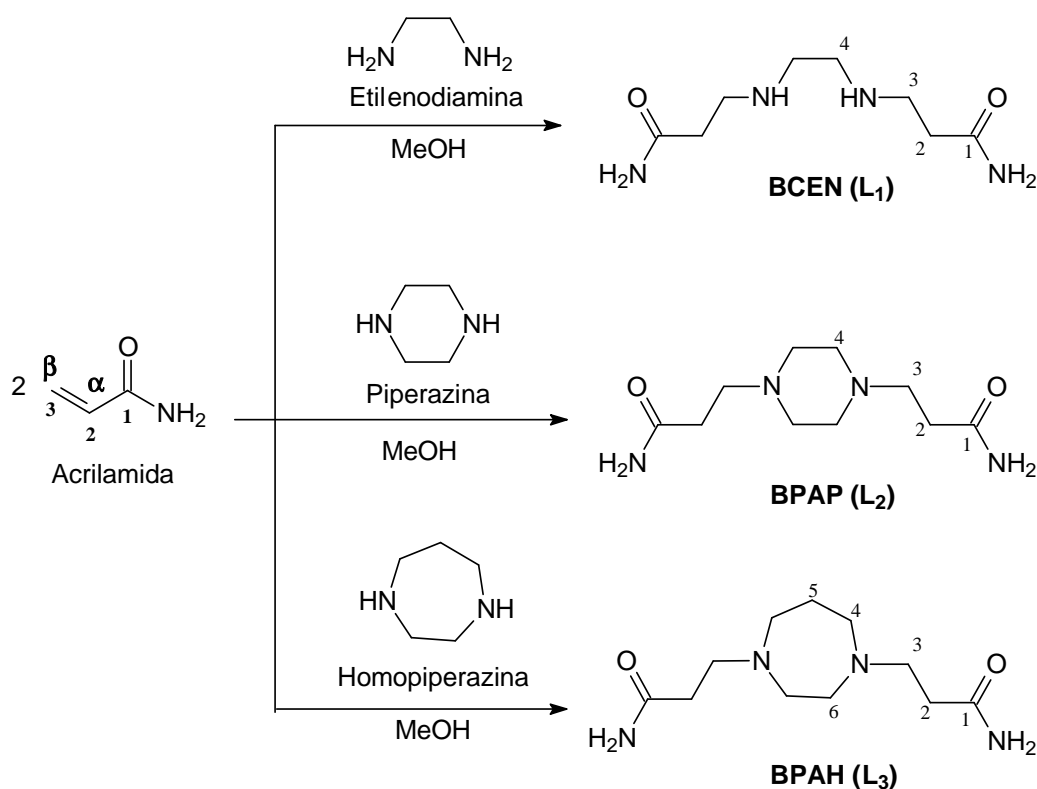


Figura 35. Esquema de Síntese dos ligantes BCEN, BPAP e BPAH.

A reação de Michael ocorre devido à presença de uma insaturação entre os carbonos α e β ao carbono da carbonila. Esse processo é facilitado devido aos efeitos de ressonância provocados pelo átomo de oxigênio da amida, resultando em uma deslocalização eletrônica dentro da molécula e gerando um potencial

positivo no carbono β (**C-3**). O referido átomo de carbono se torna susceptível a ataques de nucleófilos, tais como os ataques das bases diamínicas utilizadas, resultando assim nas sínteses dos ligantes BCEN, BPAP e BPAH (MATTOS e MARZORATI, 1999).

Os três ligantes sintetizados apresentaram-se como sólidos a temperatura ambiente com faixas estreitas de fusão, o que indica uma elevada pureza dos compostos obtidos. O ligante BPAP apresentou uma faixa de temperatura de fusão de 223 – 224 °C, enquanto que os demais ligantes apresentaram faixas inferiores: 162 – 163 °C para o ligante BCEN e 82 – 83 °C para o ligante BPAH.

5.2. Sínteses dos ligantes derivados do H₂Salen

A atividade antitumoral de vários compostos de coordenação está associada ao tipo de metal e ao tipo de ligante utilizado, sendo observado em diferentes trabalhos que a inserção de grupos aromáticos, como fenolatos, piridinas e naftóis aumenta significativamente a atividade antineoplásica dos compostos de coordenação (MORCELLI et al., 2016a; FERNANDES et al, 2015; FERNANDES et al, 2014 e HORN et al., 2013). Diante dessa afirmação, foram acrescentados grupos fenóis e naftóis a unidade central etilenodiamina. O acréscimo destes grupos não foi possível para as unidades centrais piperazina e homopiperazina, visto que ambas são aminas secundárias e seu mecanismo reacional leva à formação de enaminas, as quais alterariam as unidades centrais.

Para a síntese do ligante denominado de H₂Salam (**L₄**), foi necessário realizar uma reação entre o aldeído salicílico e a etilenodiamina, levando a formação de uma imina, também denominada de base de Schiff (**Figura 36**). Esse tipo de reação é específico para aminas primárias, sendo representado pela formação da ligação C=N presente na estrutura do ligante H₂Salen. Essa reação se processa, devido ao caráter nucleofílico da etilenodiamina e do caráter eletrofílico do carbono da carbonila do aldeído salicílico. Como resultado dessa síntese, tem-se a formação do precursor H₂Salen (**P₁**), que foi transformado no ligante H₂Salam, por meio da reação de aminação redutiva promovida pela adição de NaBH₄ (**Figura 36**).

A presença de duas aminas secundárias no ligante H₂Salam possibilita a realização de novas reações sobre as mesmas. Assim, foram realizadas as sínteses dos novos ligantes H₂Salandiα e H₂Salandiβ (**Figura 36**), pela adição dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**) e 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P₃**). Essa reação ocorre devido à presença de um anel epóxido, sendo este bastante tensionado. O ataque nucleofílico ocorre no carbono menos impedido devido aos efeitos estéricos e a presença de um meio levemente básico.

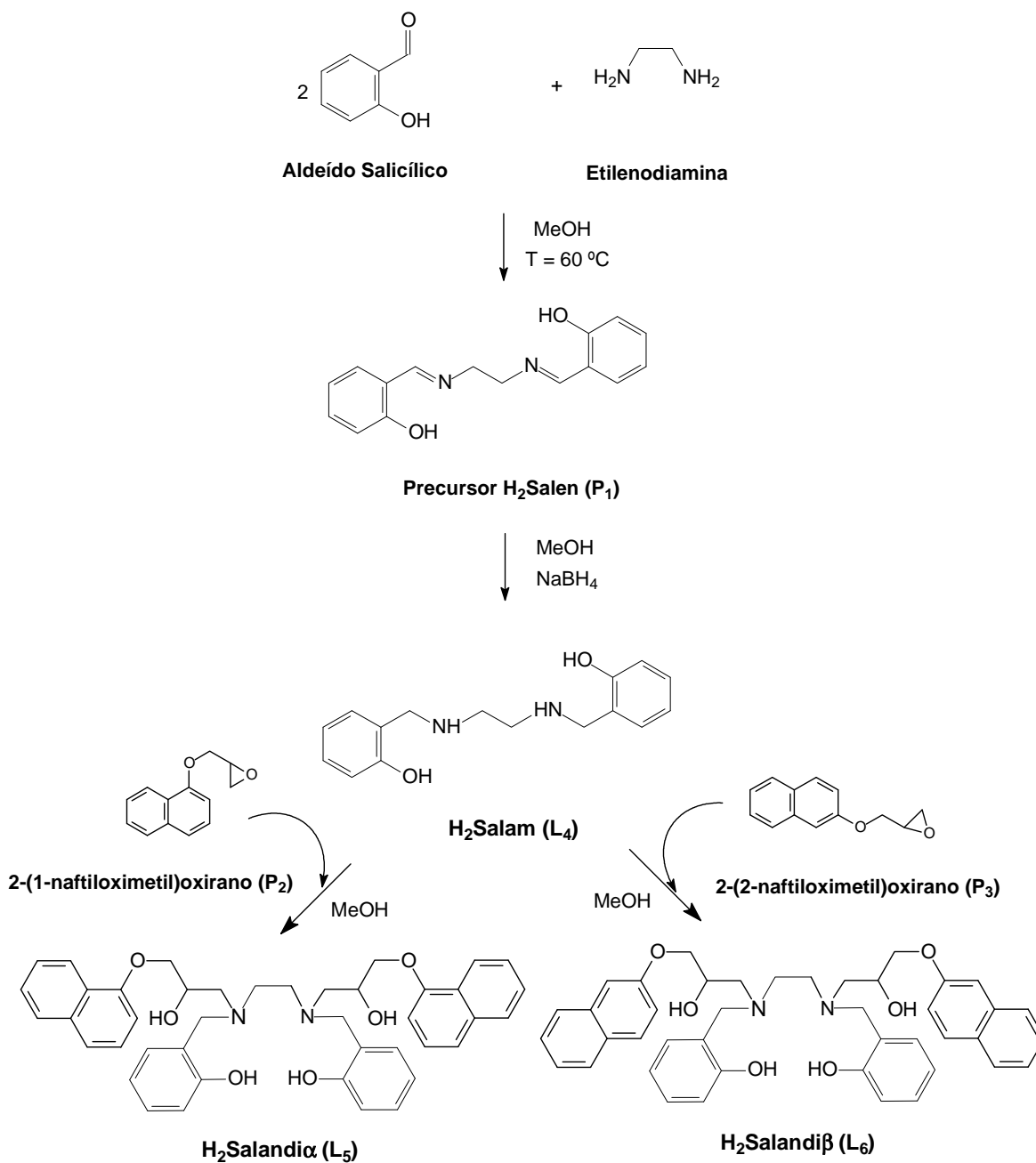


Figura 36. Esquema de Síntese dos ligantes H₂Salam, H₂Salandiα e H₂Salandiβ.

Apesar da diferença estrutural entre o precursor H₂Salen (**P**₁) e o ligante H₂Salam (**L**₄), não se observou valores muito distintos entre seus pontos de fusão. Para o primeiro, foi obtido um valor de 123 °C, enquanto que para o segundo verificou-se um valor de 120 °C.

Para os novos ligantes com grupos naftóis não se verificou distinção significativa entre suas faixas de fusão. Sendo de 154-155 °C para o ligante com o naftol na posição α e de 155-156 °C para o ligante com o mesmo grupamento na posição β . O aumento nos valores de fusão dos ligantes com grupamento naftol comparado aos valores de seus precursores é justificado pelo aumento da massa molar provocado pela inserção dos grupos naftóis.

5.3. Caracterização dos ligantes contendo grupos amida

Após as sínteses dos ligantes, os mesmos foram caracterizados por análise elementar de CHN, técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os dados das três técnicas corroboraram para confirmação das propostas estruturais apresentadas anteriormente, além de indicarem que todos os três ligantes foram obtidos com elevado grau de pureza.

Por meio da análise elementar de CHN foi possível determinar as porcentagens em massa de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes em cada uma das amostras dos ligantes, conforme apresentado na **Tabela 2**. Esses dados corroboraram para a determinação da composição elementar de todos os ligantes e conseqüentemente suas massas moleculares.

Tabela 2. Resultado da análise elementar para os ligantes contendo grupos amida.

Ligante	C _{exp./C_{calc.}(%)}	H _{exp./H_{calc.}(%)}	N _{exp./N_{calc.}(%)}	Fórmula Molecular	MM (g.mol ⁻¹)
BCEN	47,41 / 47,51	9,19 / 8,97	27,78 / 27,70	C ₈ H ₁₆ O ₂ N ₄	202,26
BPAP	52,59 / 52,61	8,80 / 8,83	24,66 / 24,54	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ N ₄	228,29
BPAH	54,49 / 54,52	9,16 / 9,15	23,08 / 23,12	C ₁₁ H ₂₂ O ₂ N ₄	242,32

Os três ligantes contendo grupos amida (BCEN, BPAP e BPAH) apresentam estruturas bastante semelhantes, logo seus espectros de infravermelho também o são. Os espectros obtidos podem ser observados na **Figura 37**.

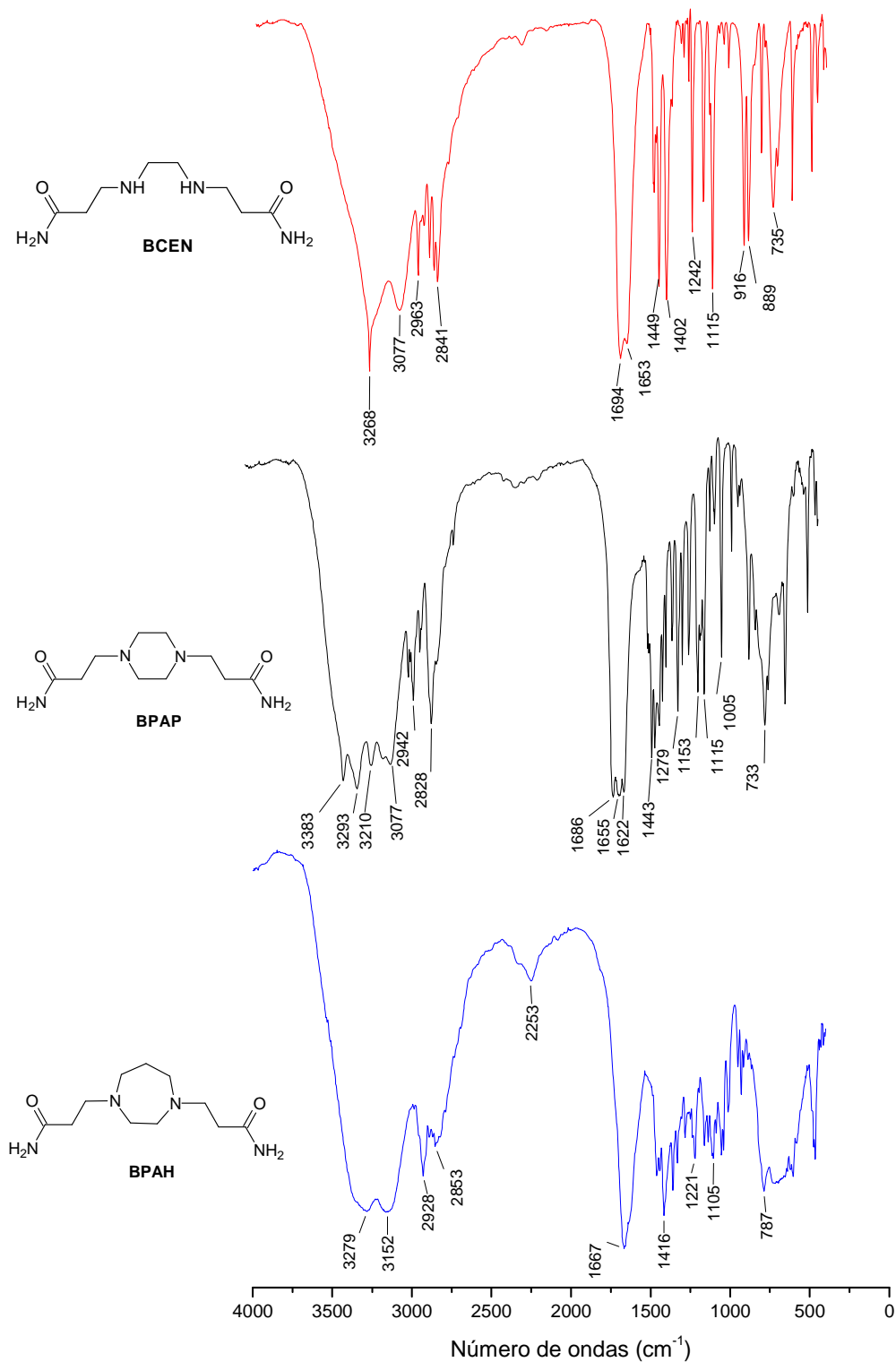


Figura 37. Espectros de infravermelho dos ligantes contendo grupos amida. O espectro de infravermelho do ligante BCEN (L_1) apresenta uma banda

em 3268 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H das aminas secundárias. Esta banda é a principal diferença entre o ligante BCEN e os demais ligantes contendo grupos amida, visto que, os ligantes BPAP e BPAH não possuem aminas secundárias. A banda intensa em 3077 e a outra próxima a 3268 cm^{-1} são referentes às deformações axiais das ligações N-H das amidas primárias. A última banda encontra-se sobreposta ao sinal da amina secundária. A presença das carbonilas das amidas foi confirmada através da banda em 1694 cm^{-1} , sendo esta devido ao estiramento das ligações C=O. Também foi possível observar uma banda estreita em 1653 cm^{-1} , a qual é característica de deformações angulares de $-\text{NH}_2$ de amidas primárias. Outras características importantes no espectro de infravermelho do ligante BCEN é a presença das bandas em 1449 e 1402 cm^{-1} referentes às deformações axiais das ligações C-N das amidas. A banda em 735 cm^{-1} observada no espectro do ligante BCEN é consequência da deformação angular simétrica fora do plano de ligações N-H das amidas. Observam-se também bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H alifáticos em 2963 , 2861 e 2841 cm^{-1} , confirmando a presença dos grupos metilênicos (CH_2) na estrutura do ligante (SILVERSTEIN, et al., 2012 e PAVIA, et al., 2015).

O espectro na região do infravermelho do ligante BPAP (L_2) apresenta bandas fortes em 3383 , 3293 , 3210 e 3077 cm^{-1} , as quais indicam a presença das amidas primárias. A presença das ligações C=O foi confirmada através da banda em 1686 cm^{-1} . Esta banda somada à presença das bandas estreitas em 1655 e 1622 cm^{-1} , provenientes das deformações angulares dos grupos $-\text{NH}_2$, confirmam a existência das amidas primárias. De forma similar ao apresentado para o ligante BCEN, também foi possível observar a presença de bandas referentes aos estiramentos axiais das ligações C-N das aminas terciárias em 1443 e 1446 cm^{-1} . Contribuindo com os dados acima, também observou-se a existência da banda característica da deformação angular fora do plano de N-H em 733 cm^{-1} . As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H alifáticos em 2974 , 2942 , 2901 , 2828 e 2798 cm^{-1} confirmam a presença dos grupos metilênicos (CH_2) (SILVERSTEIN, et al., 2012 e PAVIA, et al., 2015).

Para o ligante BPAH (L_3) verificou-se formação das mesmas bandas características do ligante anterior, sendo observadas duas bandas largas em 3279 e 3152 cm^{-1} , as quais indicam a presença das ligações N-H das amidas

primárias. As bandas referentes à deformação axial das ligações C=O das amidas e à deformação angular dos grupos -NH_2 foram observadas sobrepostas em 1667 cm^{-1} . De forma similar ao ligante BPAP outra característica importante no espectro do ligante BPAH é a presença da banda em 1416 cm^{-1} referente aos estiramentos axiais das ligações C-N das aminas terciárias, confirmando a reação entre a acrilamida e a homopiperazina. A presença dos grupos amidas também foi confirmada pela banda larga em 787 cm^{-1} . As bandas de deformação axial assimétrica e simétrica de C-H alifáticos entre 2930 e 2853 cm^{-1} confirmam a presença dos grupos metilênicos (CH_2). Os dados relatados acima foram resumidos na **Tabela 3**, sendo possível observar as principais diferenças entre os três ligantes discutidos.

Tabela 3. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos ligantes BCEN (L_1), BPAP (L_2) e BPAH (L_3).

Atribuição	BCEN (cm^{-1})	BPAP (cm^{-1})	BPAH (cm^{-1})
$\nu\text{NH}_{\text{amina}}$	3268	-	-
$\nu\text{NH}_{\text{amida}}$	3077 e 3268	3383, 3293, 3210 e 3077	3279 e 3152
$\nu\text{C=O}$	1694	1686 e 1655	1667
$\nu_{\text{angular}}\text{NH}_2$	1653	1655 e 1622	1667
$\nu\text{C-N}$	1449 e 1402	1443 e 1446	1416
$\nu\text{C-H}$	2963, 2861 e 2841	2942, 2901, 2828 e 2798	2930 a 2852
$\nu_{\text{angular}}\text{NH}_{\text{fora do plano}}$	735	733	787

Os dados de RMN ^1H para o ligante BCEN (L_1) (**Figura 38**) indicam a presença de três grupos de hidrogênios quimicamente distintos. Neste espectro foi possível observar a presença de um simpleto em 2,68 ppm e dois tripletos em 2,43 e 2,82 ppm. O simpleto é referente aos quatros hidrogênios da unidade diamínica central, enquanto que os tripletos são referentes aos hidrogênios 2H-2 e 2H-3 dos carbonos próximos as carbonilas. Os hidrogênios em 2,82 ppm estão mais desblindados do que os demais hidrogênios detectados, visto que, os grupos metilênicos (CH_2)-3 e 3' encontram-se ligados diretamente aos átomos de

nitrogênio da unidade diamínica. Os tripletos são decorrentes dos acoplamentos entre 2H-2 e 2H-3, resultando em uma constante de acoplamento 5,0 Hz (J_{2-3}).

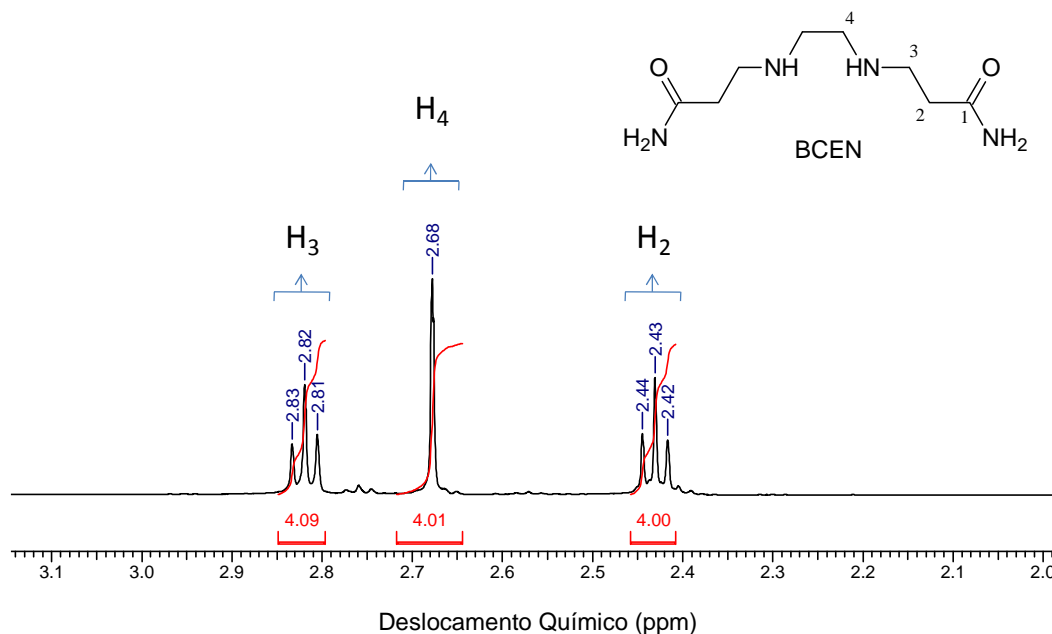


Figura 38. Espectro de RMN ^1H do ligante BCEN (500 MHz, D_2O).

O espectro desacoplado de RMN ^{13}C para o ligante BCEN (L_1) (**Figura 39**) também confirmou o centro de simetria apresentado pela molécula, resultando em apenas quatro sinais. O sinal observado em 177,78 ppm é referente ao átomo C-1 da carbonila, sendo este de menor intensidade devido a relaxação mais lenta dos *spins* nucleares do ^{13}C de carbonos des hidrogenados. Os sinais em 44,44 e 47,17 ppm são referentes aos átomos de carbono ligados diretamente ao nitrogênio da unidade diamínica, sendo o primeiro sinal proveniente do C-3 e o segundo do C-4. Por fim, o sinal em 34,67 ppm é representado pelo átomo de carbono mais blindado (C-2).

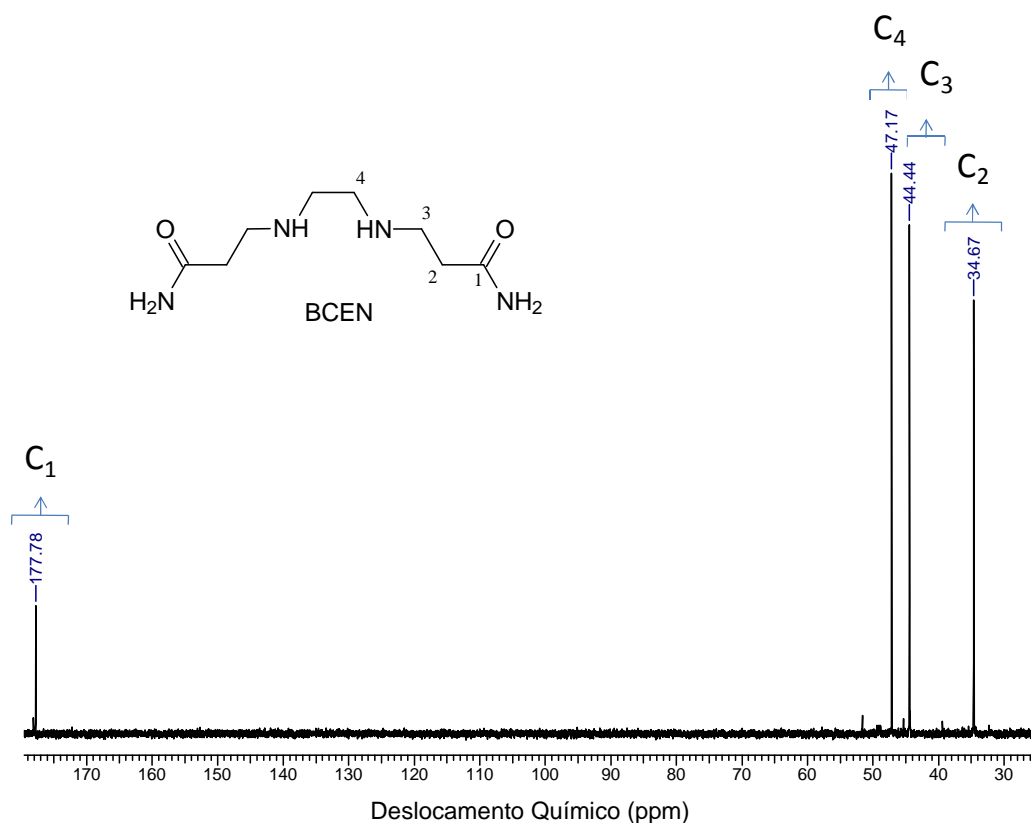


Figura 39. Espectro de RMN ¹³C do ligante BCEN (500 MHz, D₂O).

O espectro de HMQC para o ligante BCEN (**Figura 40**) apresentou três correlações a curta distância entre núcleos de carbono e hidrogênio, confirmando as ligações entre os hidrogênios e seus respectivos átomos de carbono (2H-2)-(C-2); (2H-3)-(C-3) e (2H-4)-(C-4).

Para corroborar os dados descritos acima, realizou-se a análise bidimensional de RMN a longas distâncias entre os núcleos de carbono e hidrogênio (²J_{HC} e ³J_{HC}). Por meio desta técnica foi, possível confirmar as atribuições indicadas anteriormente. No espectro de HMBC (**Figura 41**) observou-se quatro correlações a duas ligações (²J_{HC}), (2H-2)-(C-1); (2H-3)-(C-2); (2H-2)-(C-3) e (2H-4)-(C-4), e três correlações a três ligações (³J_{HC}), (2H-3)-(C-1); (2H-4)-(C-3) e (2H-3)-(C-4).

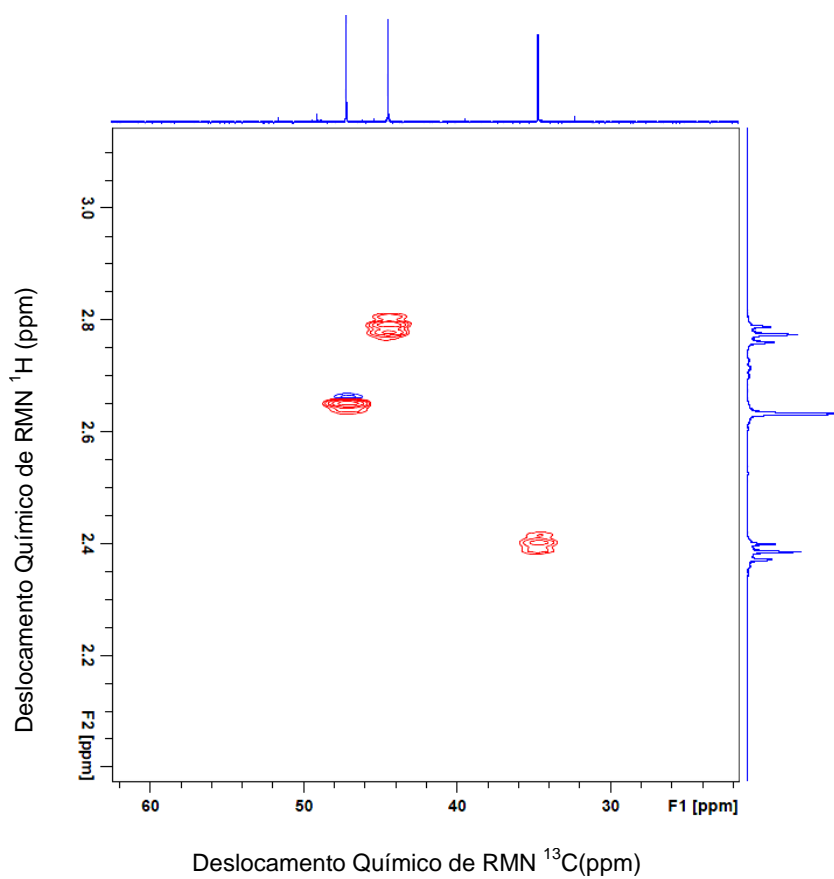


Figura 40. Espectro de HMQC do ligante BCEN (D_2O).

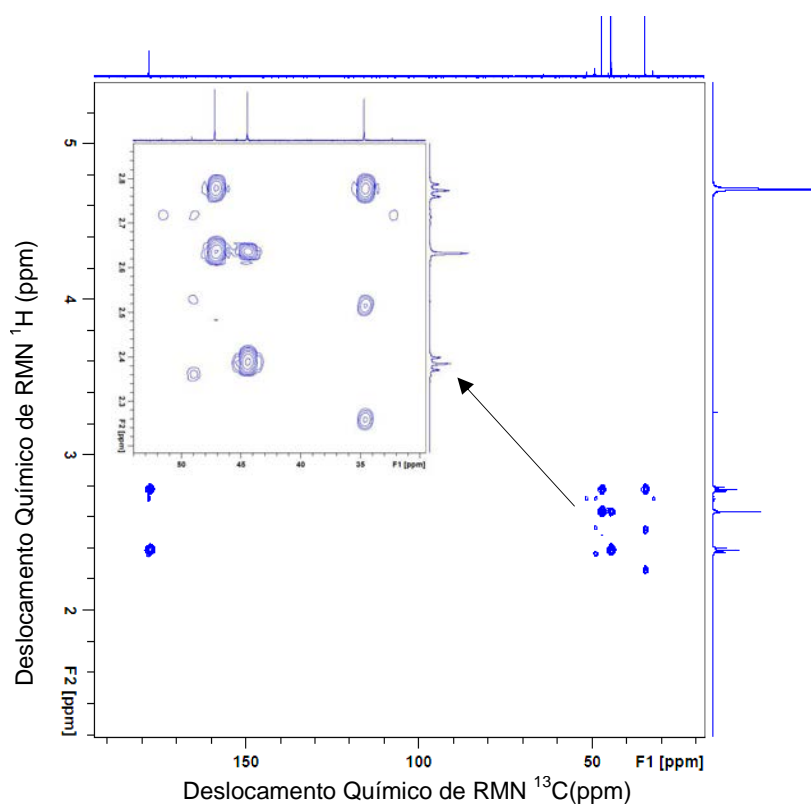


Figura 41. Espectro de HMBC do ligante BCEN (D_2O).

Os dados de RMN ^1H apresentados para o ligante BPAP (L_2) (**Figura 42**) indicam a presença de dois tripletos em diferentes ambientes químicos (2,49 e 2,71 ppm). O sinal menos desblindado, em 2,49 ppm é referente aos hidrogênios presentes no C-2, enquanto que o segundo tripleto, em 2,71 ppm corresponde aos hidrogênios em C-3. Estes tripletos são decorrentes dos acoplamentos entre 2H-2 e 2H-3, resultando em uma constante de 7,5 Hz (J_{2-3}). Devido a tensão do anel central, o sinal referente aos hidrogênios do grupo diazocíclico apresentou-se bastante alargado entre 2 e 3 ppm.

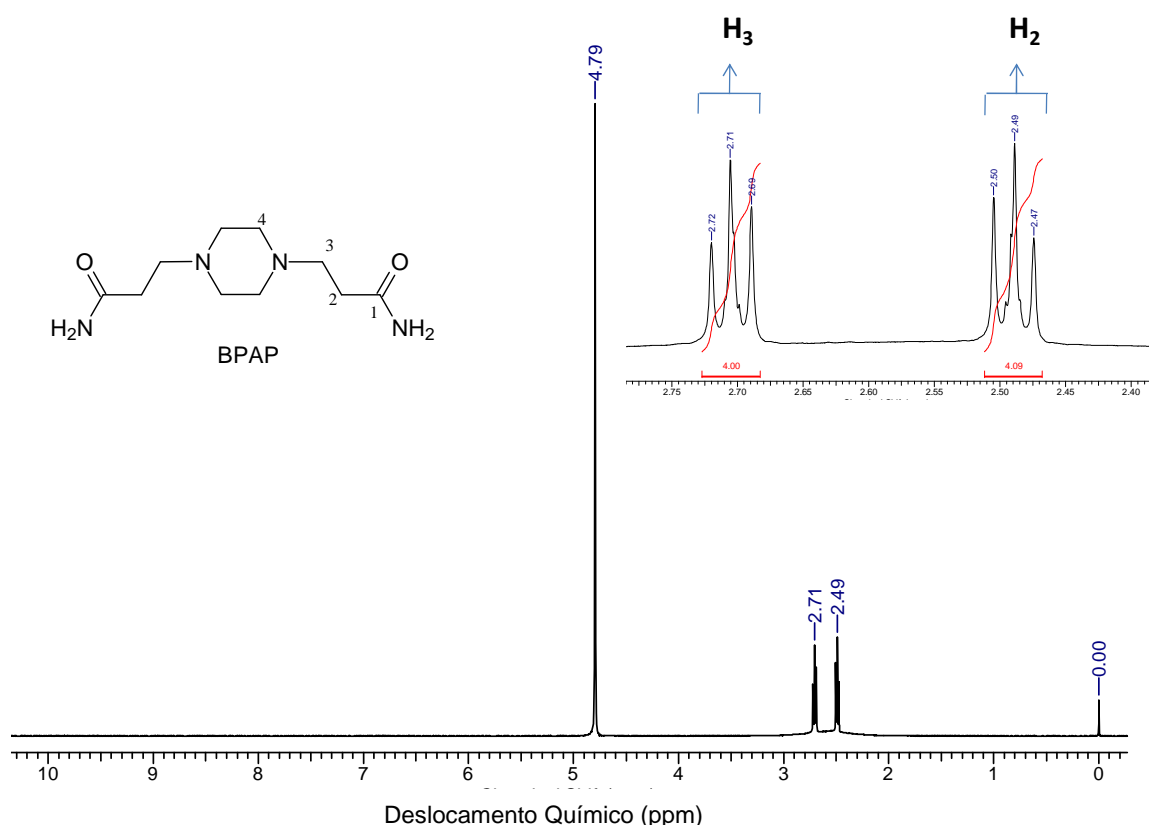


Figura 42. Espectro de RMN ^1H do ligante BPAP (500 MHz, D_2O).

Os dados de RMN ^{13}C para o ligante BPAP (L_2) (**Figura 43**) indicam a presença de quatro sinais em 34,87; 54,18; 55,99 e 180,56 ppm. O sinal mais desblindado é referente ao átomo C-1 da carbonila, visto que o mesmo apresenta menor intensidade e sofre efeito indutivo retirador de elétrons tanto do grupo $-\text{NH}_2$ quanto do oxigênio da carbonila. Os sinais em 54,18 e 55,99 ppm são referentes aos átomos de carbono ligados diretamente ao nitrogênio da unidade diamínica, sendo o primeiro sinal proveniente do C-4 e o segundo do C-3. O último sinal observado (34,87 ppm) é corresponde ao átomo de carbono mais blindado (C-2).

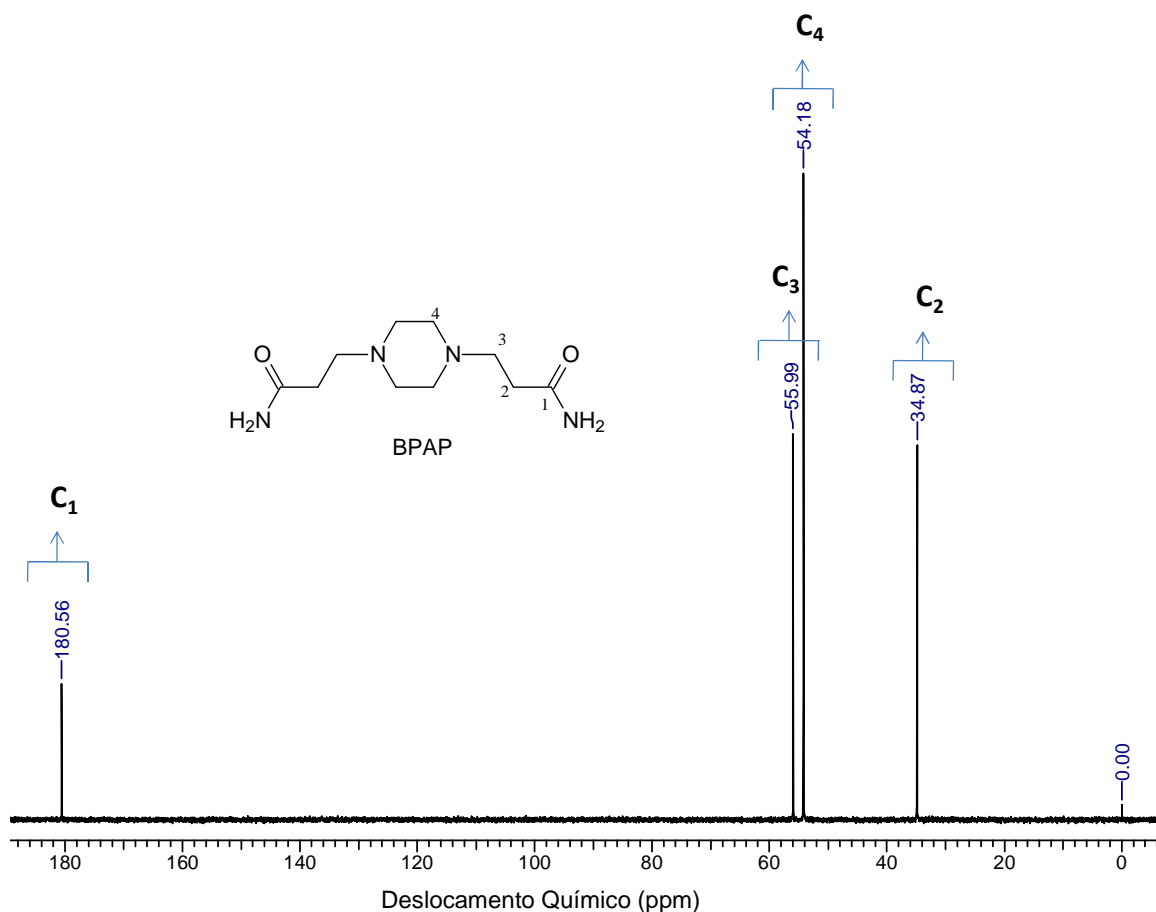


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C do ligante BPAP (125 MHz, D_2O).

As correlações a curta distância entre os núcleos de carbono e hidrogênio obtidas pelo espectro de HMQC do ligante BPAP (**Figura 44**) apresentou duas correlações, confirmando as ligações entre os hidrogênios e seus respectivos átomos de carbono (2H-2)-(C-2); (2H-3)-(C-3).

Visando obter uma confirmação estrutural mais sólida para o ligante, realizou-se a análise bidimensional de RMN a longas distâncias entre os núcleos de carbono e hidrogênio ($^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$) (**Figura 45**). Por meio desta técnica foi possível observar três correlações a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$), (2H-2)-(C-1); (2H-3)-(C-2) e (2H-2)-(C-3), e duas correlações a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$), (2H-3)-(C-1) e (2H-4)-(C-3).

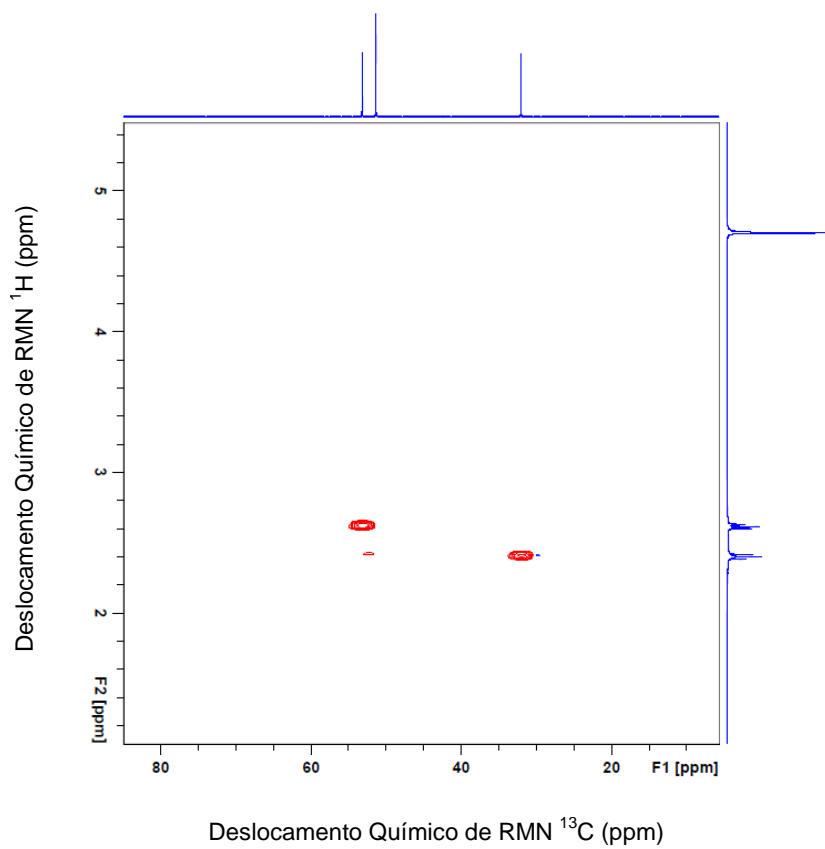


Figura 44. Espectro de HMQC do ligante BPAP (D_2O).

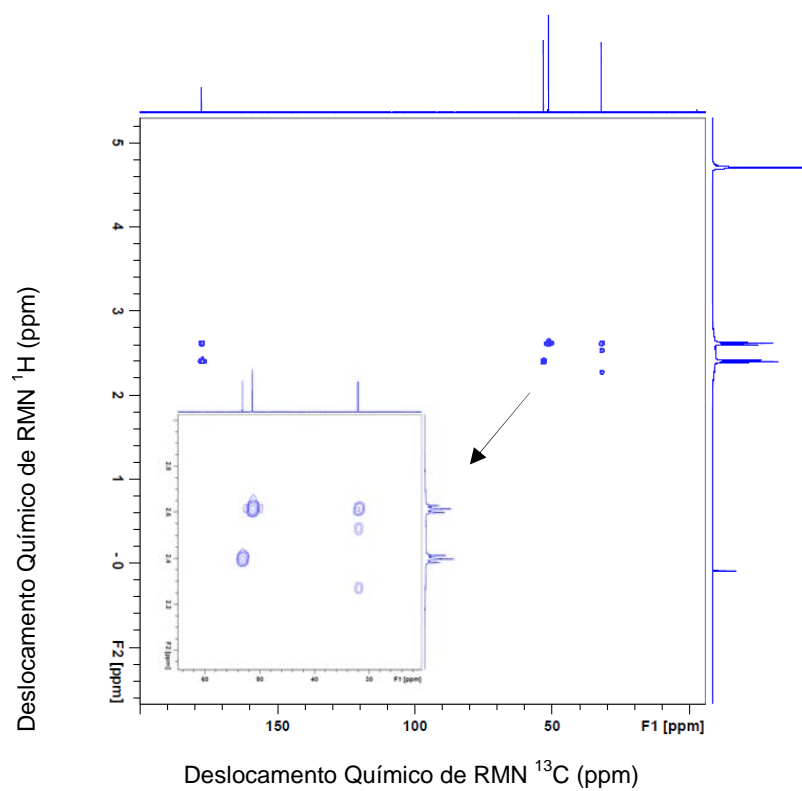


Figura 45. Espectro de HMBC do ligante BPAP (D_2O).

Os dados de RMN obtidos para o ligante BPAH (L_3) (**Figura 46**) indicaram a presença de cinco grupos de hidrogênios. No espectro do composto foi possível observar a presença de um simpleto em 2,57 ppm referente aos hidrogênios presentes em C-6, além de três tripletos com deslocamentos químicos em 2,16; 2,59 e 2,63 ppm, os quais são referentes aos hidrogênios presentes nos carbonos C-2, C-4 e C-3, respectivamente, sendo os hidrogênios em C-3 e C-4 mais desblindados devido à ligação química entre os grupos metilenos (CH_2) e os átomos de nitrogênios da unidade central. A análise dos tripletos revelou a presença de acoplamentos com 7,5 Hz entre os hidrogênios 2H-2 e 2H-3 e entre os hidrogênios 2H-5 e 2H-4, confirmando as posições indicadas. No espectro também se observou a presença de um quintupeto ($J=2$ Hz) oriundo dos dois hidrogênios presentes em C-5.

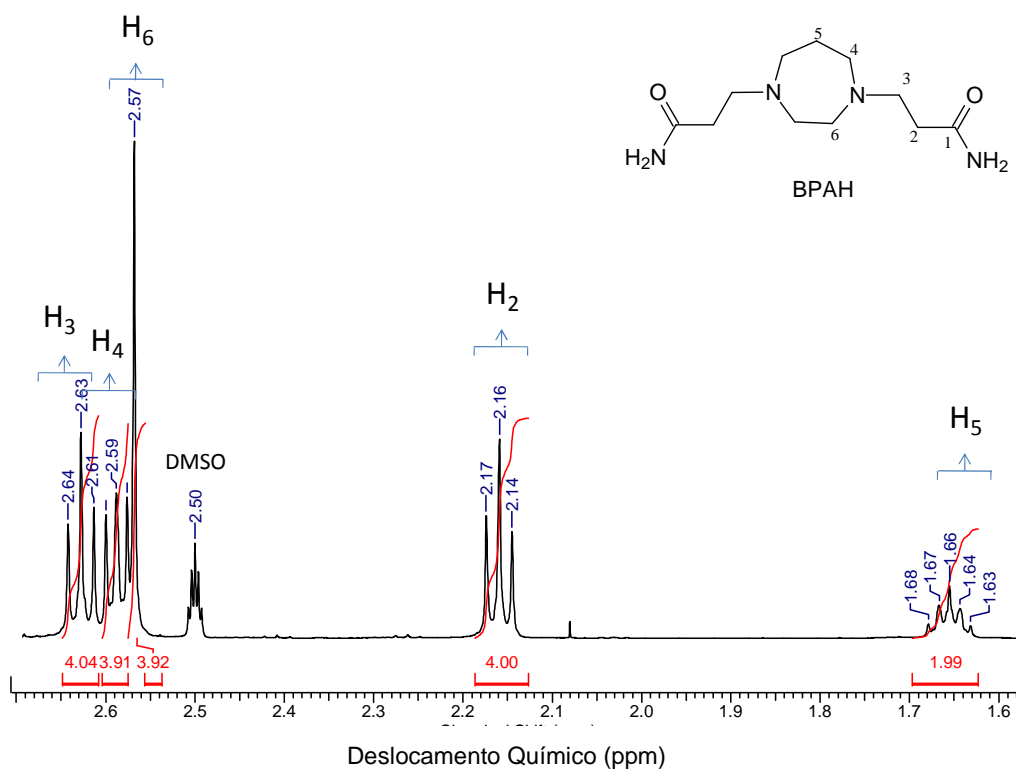


Figura 46. Espectro de RMN 1H do ligante BPAH (500 MHz, $DMSO-D_6$).

No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 47**) para o ligante BPAH observou-se a presença de seis sinais distintos. Dentre eles, o sinal mais desblindado, em 174,06 ppm, corresponde aos carbonos das carbonilas (C-1 e 1'), enquanto que os sinais mais blindados em 27,68 e 33,98 ppm estão relacionados aos carbonos C-5 e C-2, respectivamente. Os sinais em 53,83; 54,30 e 54,88 ppm são

referentes aos carbonos ligados diretamente aos átomos de nitrogênio em C-4, C-3 e C-6, respectivamente.

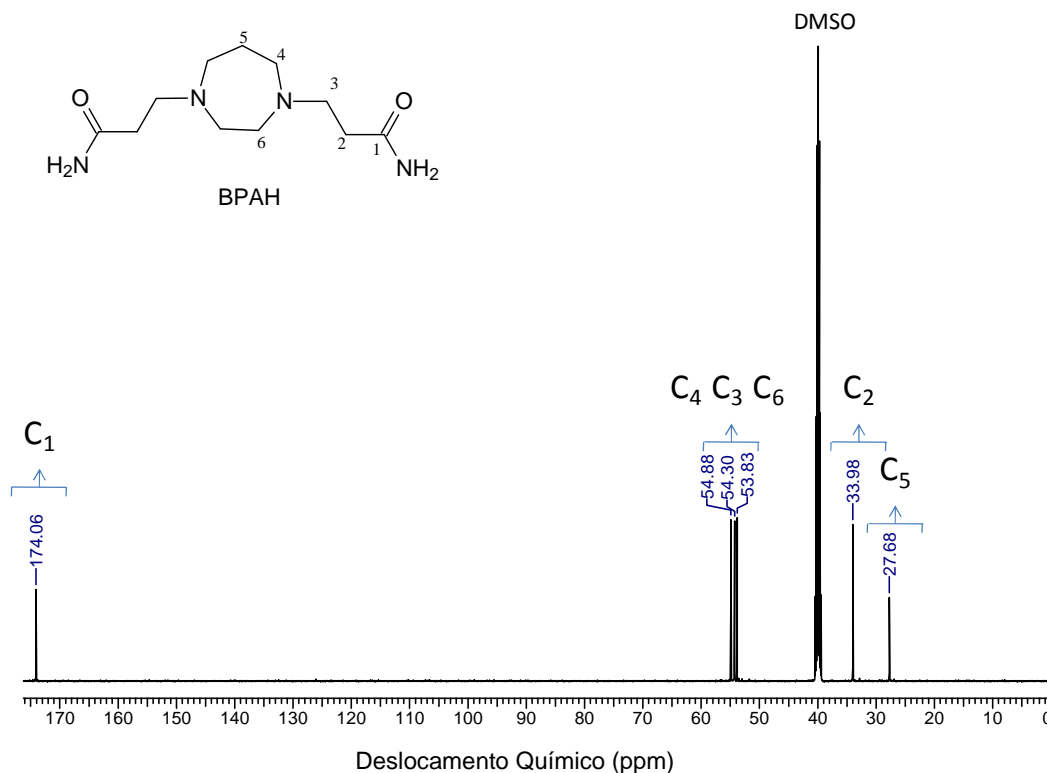


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C do ligante BPAH (125 MHz, DMSO- D_6).

A confirmação das atribuições indicadas pelos espectros unidimensionais foi realizada por meio das análises bidimensionais de RMN. No espectro de HMQC (**Figura 48**) foram observadas cinco correlações entre núcleos de carbono e hidrogênio, confirmando as ligações químicas entre os átomos de carbono C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 com seus respectivos átomos de hidrogênio.

As correlações a duas e três ligações ($^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$) entre os átomos de carbono e hidrogênio foram determinadas e são apresentadas no espectro de HMBC (**Figura 49**). Por meio desta técnica foi possível observar seis correlações a duas ligações ($^2J_{\text{HC}}$), (2H-2)-(C-1); (2H-3)-(C-2); (2H-2)-(C-3); (2H-5)-(C-4); (4H-4)-(C-5) e (2H-6)-(C-6) e sete correlações a três ligações ($^3J_{\text{HC}}$), (2H-3)-(C-1); (2H-4)-(C-3); (4H-6)-(C-3); (2H-3)-(C-4); (4H-6)-(C-4); (2H-3)-(C-6) e (2H-4)-(C-6). Os dados de RMN para todos os ligantes foram agrupados e são apresentados de forma comparativa na **Tabela 4**.

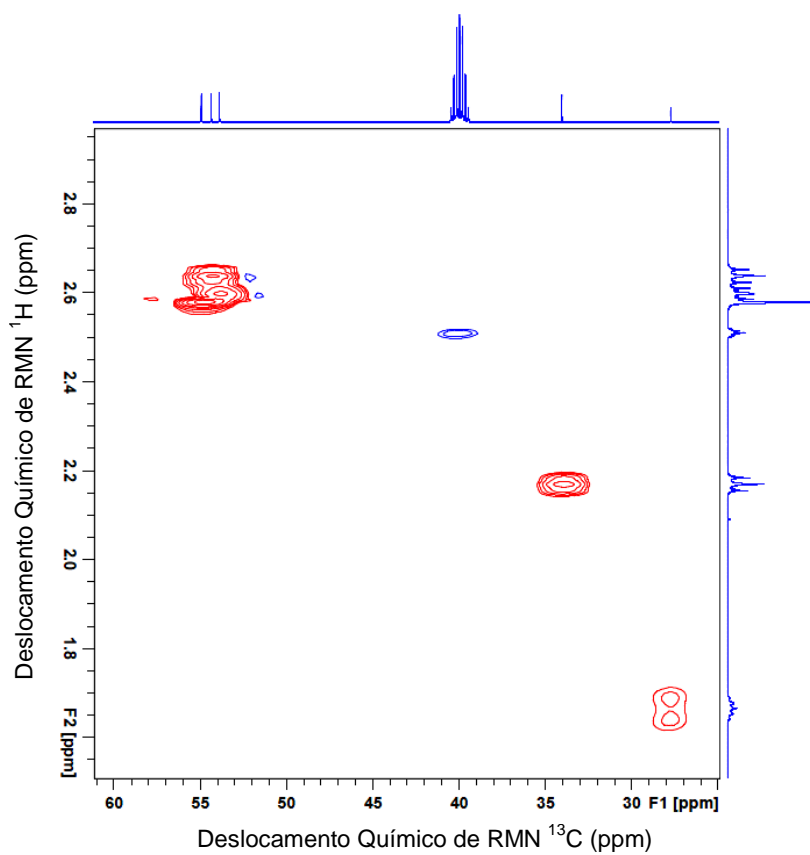


Figura 48. Espectro de HMQC do ligante BPAH (DMSO-D₆).

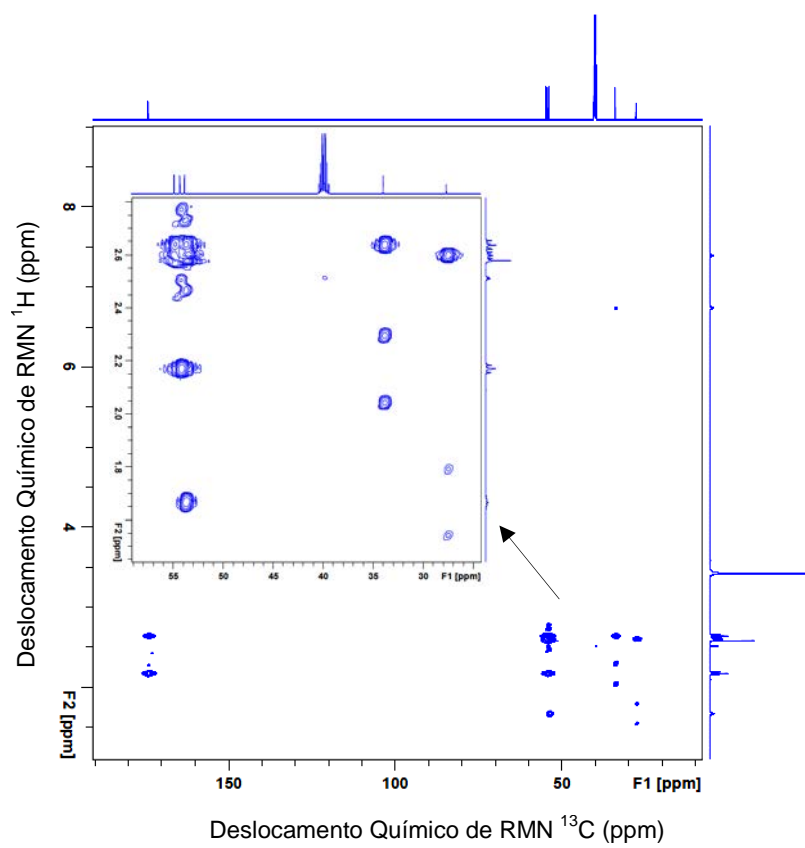
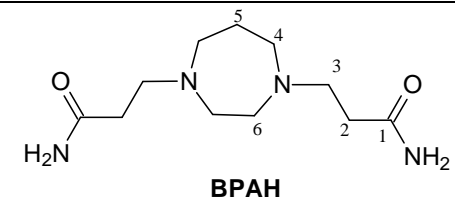
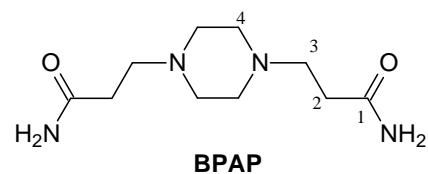
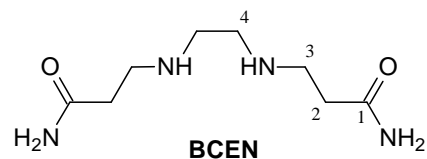


Figura 49. Espectro HMBC do ligante BPAH (DMSO-D₆).

Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) para os ligantes BCEN e BPAP (D_2O) e BPAH (DMSO-D_6), incluindo resultados obtidos por correlações bidimensionais 2D HMQC ($^1J_{\text{HC}}$) e HMBC ($^nJ_{\text{HC}}$ n = 2 e 3). Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



	HMQC		HMBC		HMQC		HMBC		HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$
C												
1	177,78	-	2H-2	2H-3	180,56	-	2H-2	2H-3	174,1	-	2H-2	2H-3
CH₂												
2	34,67	2,43 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-3	-	34,87	2,14 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-3	-	33,94	2,16 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-3	
3	44,44	2,82 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-2	2H-4	55,99	2,43 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-2	-	54,30	2,63 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-2	2H-4 2H-6
4	47,17	2,68 (<i>s</i>)	2H-4	2H-3	54,18	2-3 (<i>s</i>)	-	2H-3	53,83	2,59 (<i>t</i> ; $J=7,5$ Hz)	2H-5	2H-3 2H-6
5	-	-	-	-	-	-	-	-	27,68	1,66 (<i>quin</i> , $J=2$ Hz)	2H-4	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	54,88	2,57(<i>s</i>)	2H-6	2H-3 2H-4

5.4. Caracterização dos ligantes derivados do H₂Salen

Visando confirmar a obtenção dos ligantes H₂Salam, H₂Salandi α e H₂Salandi β foram realizadas as caracterizações por IV e RMN ¹H dos precursores H₂Salen (**P**₁), 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P**₂) e 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P**₃). Os valores observados por estas técnicas foram comparados com os dados descritos na literatura (LOPES, 2012 e CARRADORI et al., 2013), confirmando as estruturas dos compostos sintetizados. Na **Figura 50** e na **Tabela 5** são apresentados os resultados obtidos pela análise de espectroscopia na região do IV para o precursor H₂Salen (**P**₁) e para o ligante H₂Salam (**L**₄).

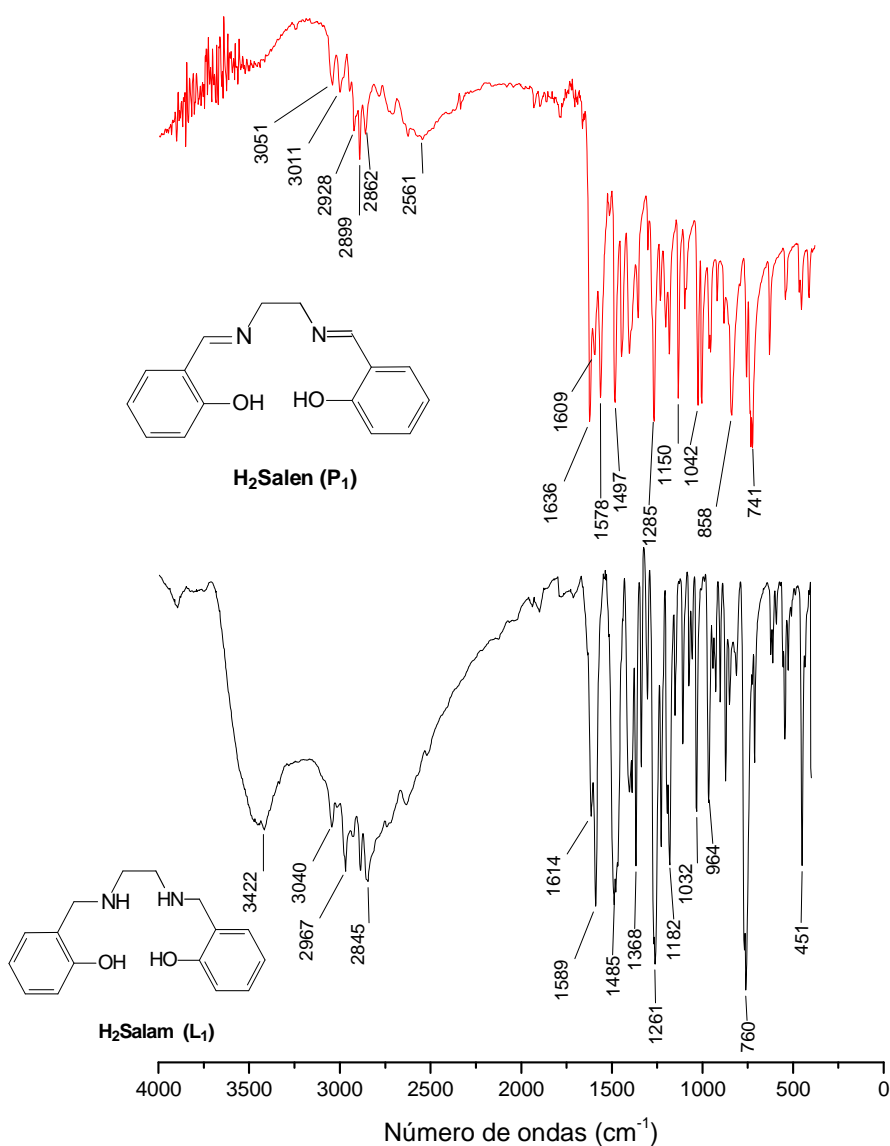


Figura 50. Espectros de Infravermelho do precursor H₂Salen e do ligante H₂Salam.

Tabela 5. Principais bandas dos espectros de infravermelho dos compostos H₂Salen e H₂Salam.

Atribuição	H ₂ Salen (cm ⁻¹) (Observado)	H ₂ Salen (cm ⁻¹) (Literatura)*	H ₂ Salam (cm ⁻¹) (Observado)	H ₂ Salam (cm ⁻¹) (Literatura)*
vOH	2561	-	2500-3500	2500-3500
vNH	-	-	3422	2500-3500
vCH _{aromático}	3051, 3011	3050, 3008	3040	3042
v _{as} CH ₂	2928	2920	2967	2970
v _s CH ₂	2899, 2862	2899, 2868	2887, 2845	2889, 2856
vC-N	1497	1496	1485	1487
vC=N	1636	1664	-	-
vC-O _{fenol}	1285	1281	1261	1262

* CARRADORI et al., 2013.

O precursor H₂Salen (**P**₁) possui em sua estrutura grupos hidroxila nas posições *orto* aos grupos imina, dessa forma esperava-se uma banda forte na região de 3600-3100 cm⁻¹ característica do estiramento O-H (LOPES e FASCIO, 2004). Sua ausência pode ser justificada pelo deslocamento dessa banda para regiões de menor frequência causada pela interação de ligação de hidrogênio (OH...N=C), resultando em deslocamento da frequência de estiramento para menores números de ondas (2561 cm⁻¹) (ROMERA, 2007).

Na região do espectro de energia intermediária do precursor H₂Salen encontram-se quatro bandas que confirmam a presença das ligações C=C dos anéis aromáticos (1150 e 1042 cm⁻¹) e da ligação C=N do grupamento imina (C=N—R) em 1636 cm⁻¹.

A redução do H₂Salen levou à transformação da ligação dupla entre o carbono C-2 e o nitrogênio da unidade central para uma ligação simples. Essa redução leva a formação da ligação N—H, a qual pode ser facilmente detectada no espectro em 3422 cm⁻¹. Também observa-se o desaparecimento da banda vC=N em 1636 cm⁻¹.

O espectro de RMN ¹H (**Figura 51**) para o precursor H₂Salen (**P**₁) apresentou dois simpletos em 3,97 e 8,39 ppm. O primeiro é referente aos hidrogênios presentes na unidade diamínica central (H-1), enquanto o segundo, mais desblindado, corresponde aos hidrogênios das iminas (H-2). Na região aromática foram observados quatro sinais, sendo dois duplodupletos (*dd*) e dois

duplotripletos (*dt*), com constantes de acoplamentos orto (J_{orto}) de 10 Hz. Esses sinais indicam a presença de um anel aromático *orto* substituído, sendo os hidrogênios H-6 e H-8 mais desblindados, pois os mesmos encontram-se nas posições *meta* ao grupo hidroxila. Os dados de RMN ^1H obtidos foram transcritos para a **Tabela 6** e comparados com valores encontrados na literatura.

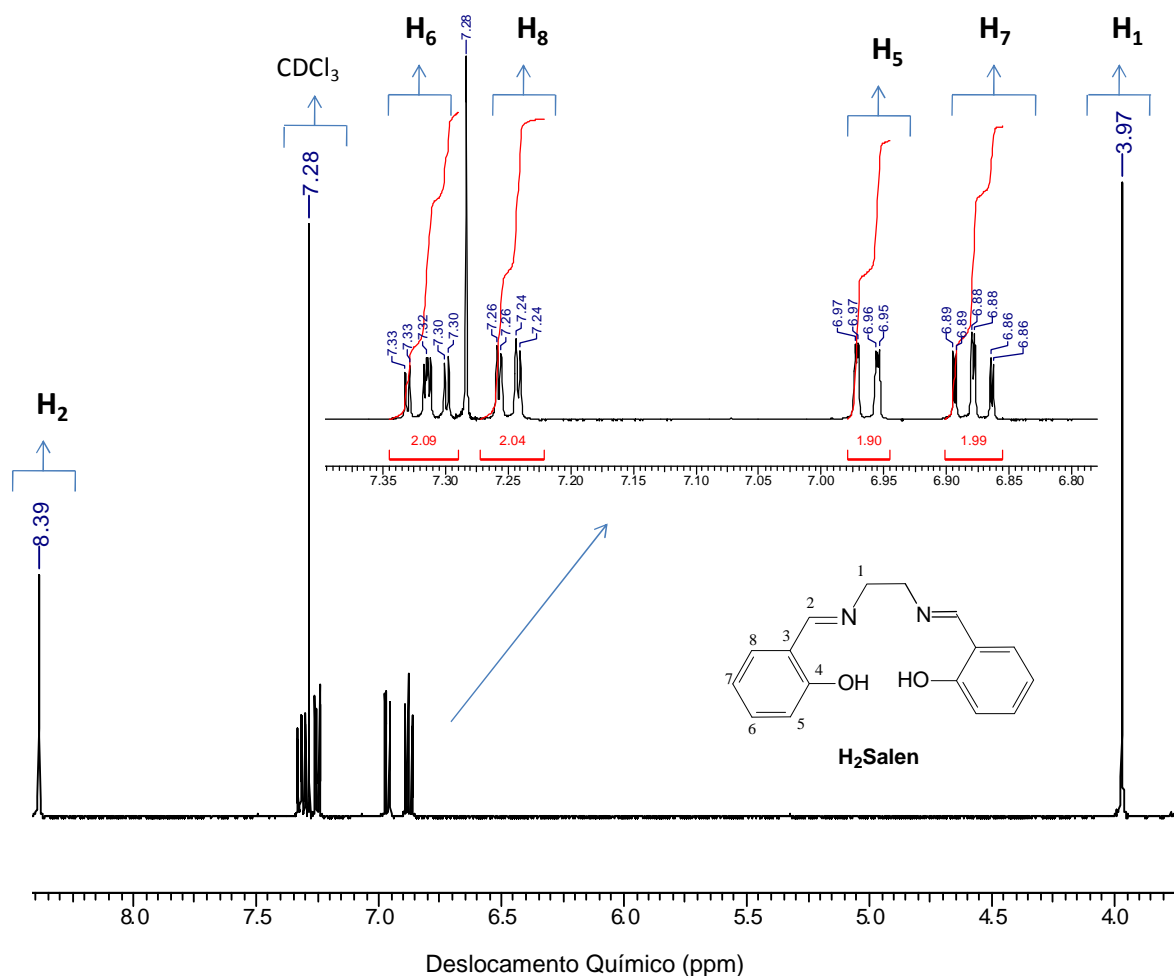


Figura 51. Espectro de RMN ^1H do precursor H_2Salen com ampliação da região de interesse . (500 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN ^1H (**Figura 52**) para o ligante H_2Salam (L_1) apresentou dois simpletos em 2,86 e 4,01 ppm referentes aos hidrogênios H-1 e H-2, respectivamente, e confirmam a redução da ligação imínica do H_2Salen . Assim como para o precursor H_2Salen , na região aromática foram observados quatro sinais, sendo dois duplodupletos (*dd*) e dois duplotripletos (*dt*), com constantes de acoplamentos orto (J_{orto}) de 10 Hz, indicando a presença de um anel aromático *orto* substituído. Os dados de RMN ^1H obtidos foram transcritos

para a **Tabela 6** e comparados com valores observados para o precursor H₂Salen e com dados descritos na literatura.

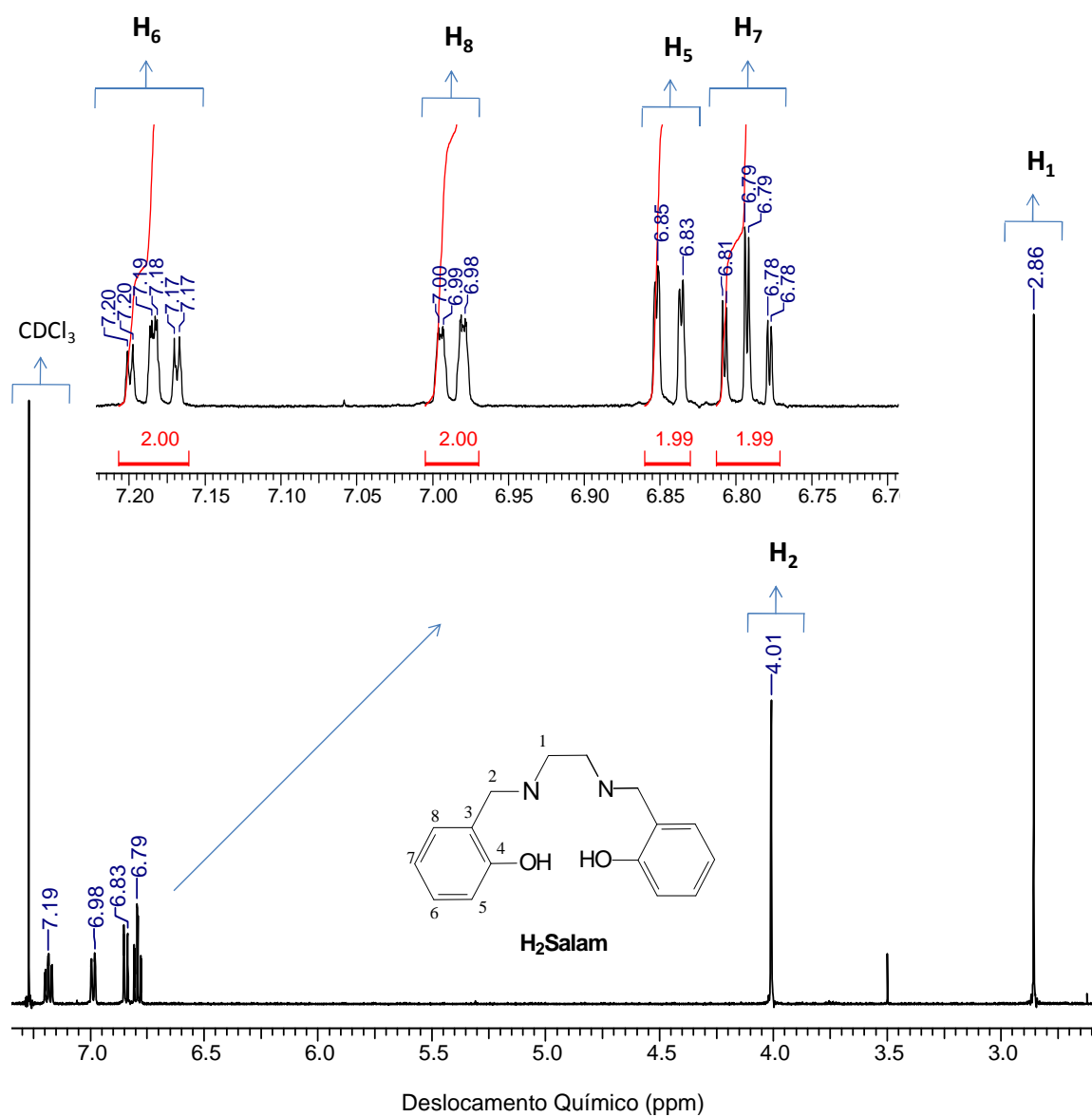
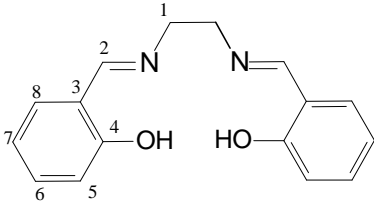
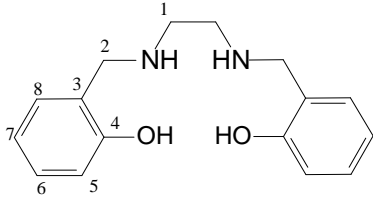


Figura 52. Espectro de RMN ¹H do precursor H₂Salam com ampliação da região de interesse . (500 MHz, CDCl₃).

Tabela 6. Dados observados de RMN ^1H (500 MHz) do precursor H_2Salen e do ligante H_2Salam em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

 H_2Salen		 H_2Salam		
CH	δ_{H} (Observado)	δ_{H} (Literatura)*	δ_{H} (Observado)	δ_{H} (Literatura)*
2	8,39 (s)	8,44 (s)	-	-
5	6,96 (dd, $J_{\text{orto}}=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=1$ Hz)	6,96 (d, $J=8$ Hz)	6,86 (dd, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=1$ Hz)	6,77 (m)
6	7,32 (dt, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=2$ Hz)	7,32 (m)	7,20 (dt, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=2$ Hz)	7,08 (m)
7	6,88 (dt, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=1$ Hz)	6,89 (m)	6,81 (dt, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=1$ Hz)	6,77 (m)
8	7,25 (dd, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=2$ Hz)	7,32 (m)	7,00 (dd, $J=10$ Hz; $J_{\text{meta}}=2$ Hz)	7,08 (m)
CH_2				
1	3,97 (s)	3,97 (s)	2,86 (s)	2,76 (s)
2	-	-	4,01 (s)	3,86 (s)

*CARRADORI et al., 2013. (400 MHz) em CDCl_3

Nos espectros de infravermelho (IV) dos precursores com grupos naftóis, apresentados na **Figura 53**, são observadas bandas características de ambos os compostos sintetizados. Para o 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**) observou-se bandas de estiramento das ligações C-H dos anéis aromáticos em 3052 e 3001 cm^{-1} , enquanto que para o precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P₃**) essas bandas foram observadas em 3088 e 2980 cm^{-1} . Ambos os compostos apresentaram em seus espectros de infravermelho bandas de estiramentos simétricos e assimétricos de grupos metilenos em 2924 e 2872 cm^{-1} para o precursor α e 2971 e 2926 cm^{-1} para o precursor β . A presença de ligações duplas dos anéis aromáticos foi observada em ambos os espectros obtidos (1595, 1580, 1508 e 1394 cm^{-1} para o precursor α e 1721, 1607, 1556, 1506 e 1397 cm^{-1} para o precursor β). Também foram observadas bandas de deformações axiais assimétricas das ligações C–O–C em ambos os espectros. Essas bandas

confirmam a presença do anel epóxido e do grupo éter ligado diretamente ao anel naftol. Para o precursor α essas bandas foram observadas em 1240 ($\nu_{\text{C-O-C}_{\text{epóxido}}}$) e 1269 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}_{\text{aromático}}\text{-O-C}_{\text{alifático}}}$) e para o precursor β as bandas são observadas sobrepostas em 1278 cm^{-1} .

Os dados obtidos para ambos os espectros foram transcritos para a **Tabela 7** e comparados com resultados obtidos por LOPES em 2012.

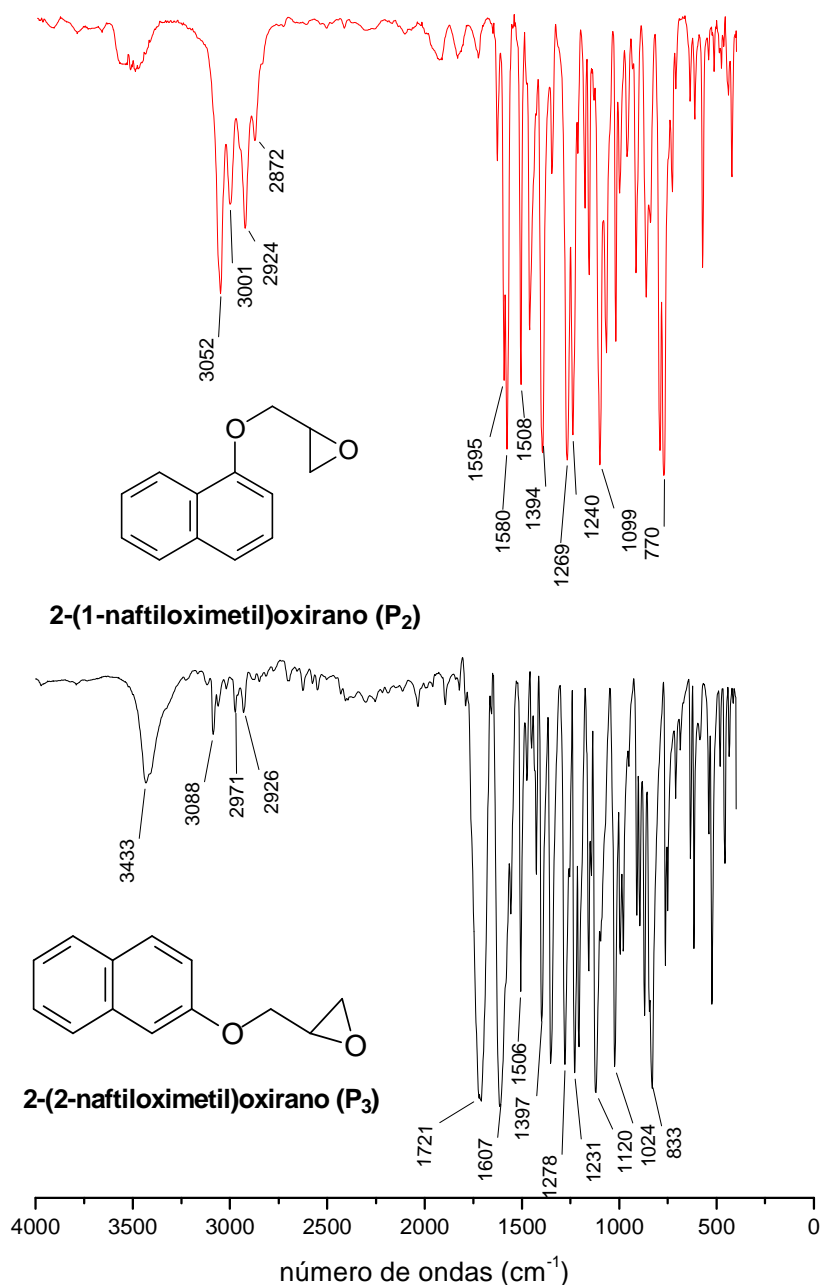


Figura 53. Espectros de Infravermelho dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano e 2-(2-naftiloximetil)oxirano.

Tabela 7. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**) e 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P₃**).

Atribuição	2-(1-naftiloximetil)oxirano (P₂) (cm ⁻¹)		2-(2-naftiloximetil)oxirano (P₃) (cm ⁻¹)	
	(Observado)	(Literatura)*	(Observado)	(Literatura)*
vCH _{aromático}	3052, 3001	3055, 3003	3088, 3080	3087
v _{as} CH ₂	2924	2926	2971	2974
v _s CH ₂	2872	2874	2926	2924
vC=C	1595, 1580, 1508, 1462, 1394	1595, 1579, 1508, 1462, 1396	1721, 1607, 1556, 1506, 1397	1729, 1609, 1508, 1398
vC-O-C _{epóxido}	1240	1240	1278	1278
vC _{arom.} -O-C _{alif.}	1269	1271	1278	1278

* LOPES, 2012.

O espectro de RMN ¹H para o precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**) (**Figura 54**) apresentou seis sinais na região dos hidrogênios aromáticos, os quais estão mais desblindados devido o efeito denominado de anisotropia magnética. Este efeito é resultante dos movimentos eletrônicos provocados pela ressonância nos anéis aromáticos. Nesta região foram observados dois multipletos (8,30-8,32 e 7,80-7,82 ppm), sendo o mais desblindado referente ao hidrogênio H-8 e o mais blindado correspondente ao hidrogênio H-5. Nesta mesma região foi possível confirmar a presença dos hidrogênios H-6 e H-7 por meio de um tripleto em 7,50 ppm. Ainda, observando esta região, foram observados dois dupletos (6,83 e 7,46 ppm) e um tripleto (7,37 ppm), os quais confirmam a presença dos hidrogênios H-2, H-4 e H-3. O mesmo espectro revelou a presença de cinco sinais na região alifática. Dentre estes, os mais desblindados (4,42 e 4,18 ppm) são referentes aos hidrogênios H-11. Este fato é devido a ligação do carbono C-11 ao grupo -OAr. Os hidrogênios presentes no anel epóxido foram confirmados pelos sinais em 3,49 – 3,54(*m*), 2,99 (*t*) e 2,87 – 2,88 (*m*). Os dados aqui discutidos são apresentados de forma comparativa na **Tabela 8**.

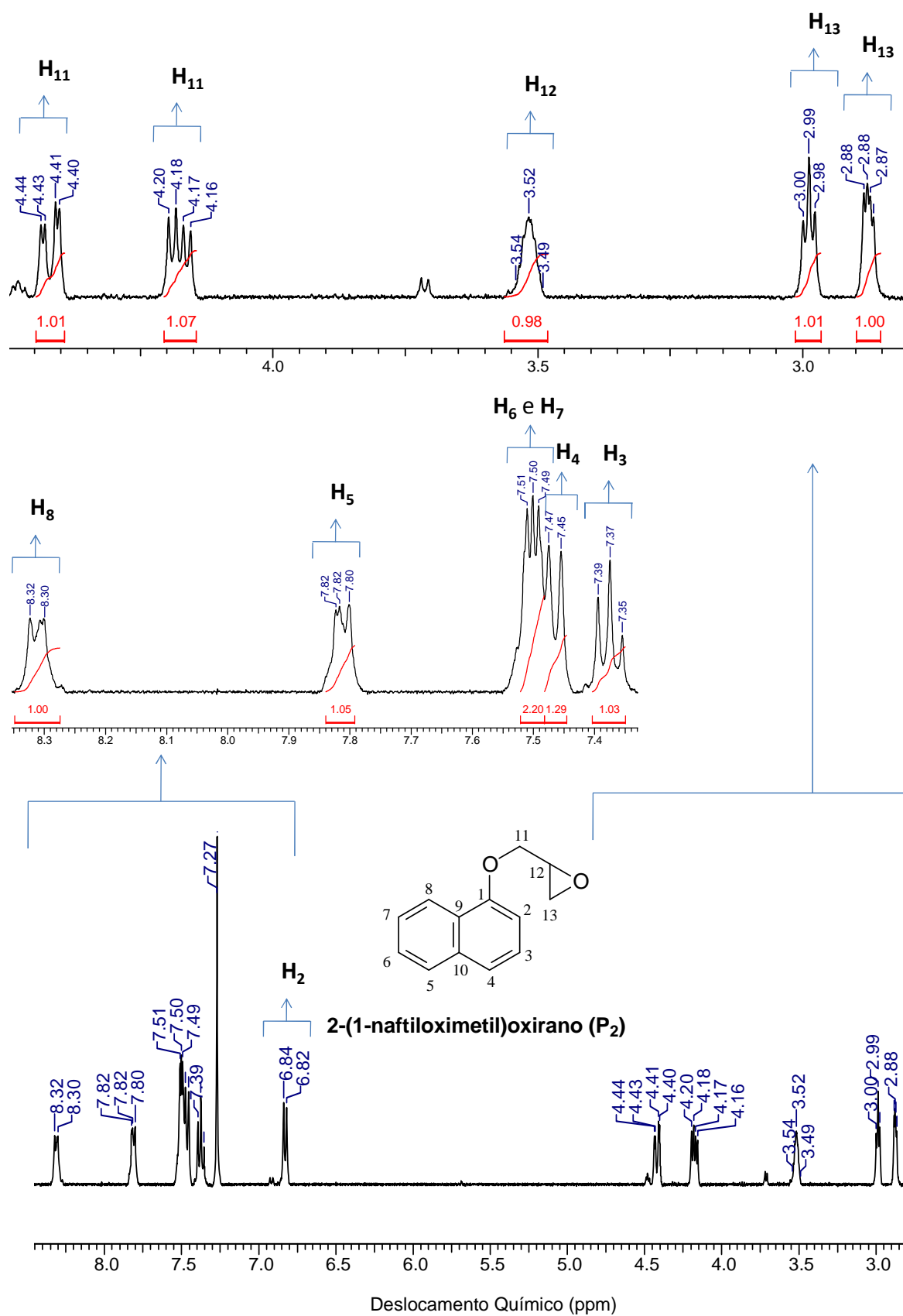


Figura 54. Espectro RMN ^1H do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P_2) com ampliações das regiões de interesse. (500 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN ^1H (**Figura 55**) para o precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P₃**) apresentou seis sinais na região dos hidrogênios aromáticos. Dentre estes, observou-se um simpleto em 7,16 ppm, referente ao hidrogênio H-1, esse sinal confirma a posição do grupamento epóxido no anel aromático, visto que o H-1 não apresenta vizinhos para acoplar. O único multiplete na região aromática corresponde à sobreposição de três hidrogênios (H-4, H-5 e H-8), enquanto que os dois tripletos observados são referentes aos hidrogênios H-6 e H-7 em 7,45 e 7,36 ppm, respectivamente. Foram observados acoplamentos com 7,5 Hz para esses dois tripletos indicando que os mesmos são átomos vizinhos. Em 7,19 ppm existe a presença de um duplo duplete, o qual corresponde a átomo H-3. Para este sinal foi possível determinar as constantes de acoplamento orto (J_{orto}) e meta (J_{meta}), sendo esses valores iguais a 9 e 2,5 Hz. Na região alifática foram observados cinco sinais, dos quais os mais desblindados em 4,36 e 4,10 ppm são referentes aos hidrogênios H-11 e os mais blindados referentes aos átomos H-13. Por fim, o último sinal observado é proveniente da presença do átomo de hidrogênio em H-12.

Os dados para ambos os precursores contendo a unidade naftol foram transcritos para a **Tabela 8** de forma comparativa com os valores descritos por LOPES em 2012.

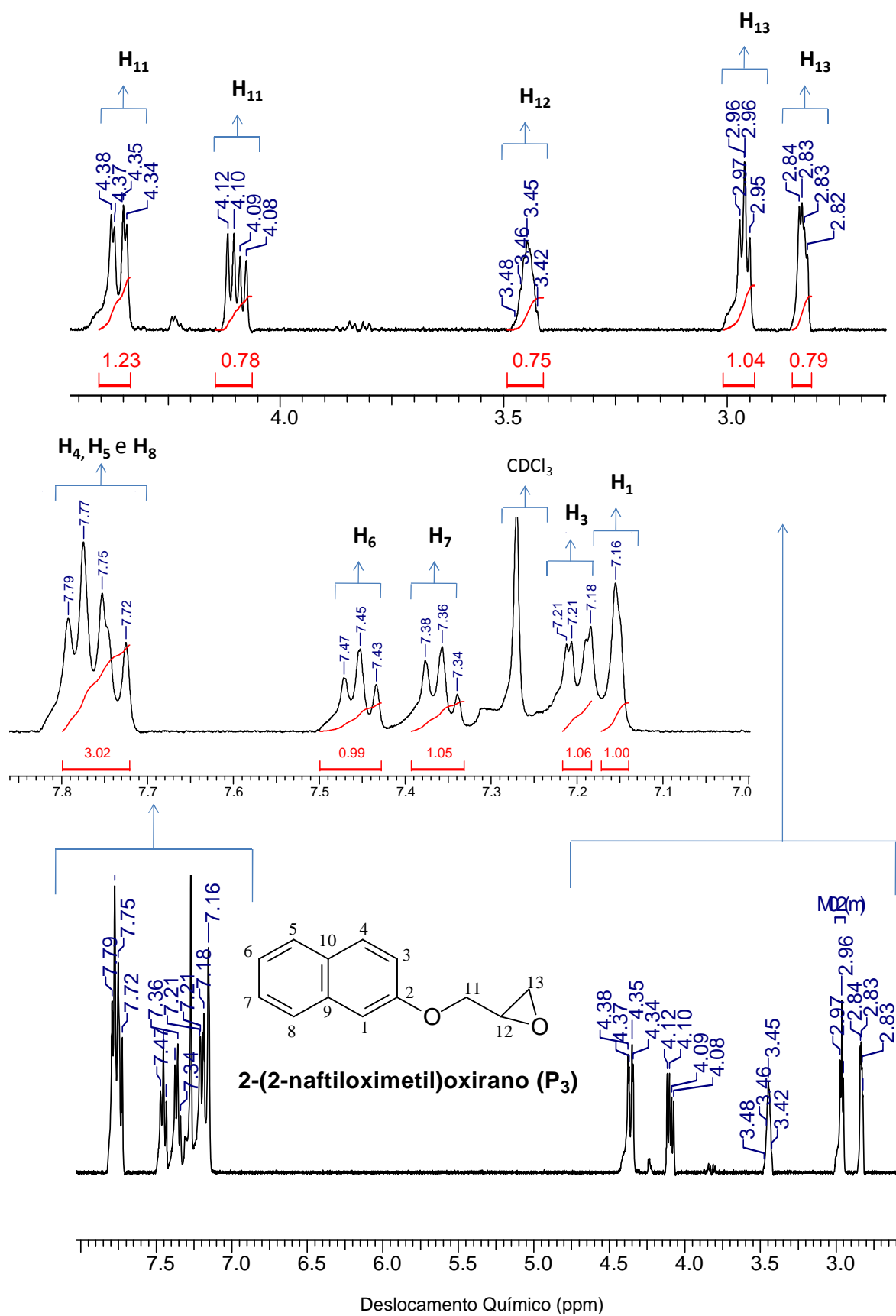


Figura 55. Espectro RMN ^1H do precursor 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P_3) com ampliações das regiões de interesse (500 MHz, CDCl_3).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) dos precursores 2-(1-naftiloximetil)oxirano (**P₂**) e 2-(2-naftiloximetil)oxirano (**P₃**) em CDCl_3 . Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.

	2-(1-naftiloximetil)oxirano (P₂)		2-(2-naftiloximetil)oxirano (P₃)	
	δ_{H} (Observado)	δ_{H} (Literatura)*	δ_{H} (Observado)	δ_{H} (Literatura)*
CH				
1	-	-	7,16 (s)	7,14 (d, $J=3,4$)
2	6,83 (d, $J=8$ Hz)	6,83 (d, $J=7,68$ Hz)	-	-
3	7,37 (t, $J=8$ Hz)	7,36 (t, $J=8,00$ Hz)	7,19 (dd, $J_{3-1}=2,5$ Hz; $J_{3-4}=9$ Hz)	7,19 (dd, $J_{3-1}=3,6$ Hz; $J_{3-4}=8,76$ Hz)
4	7,46 (d, $J=8$ Hz)	7,45 (d, $J=7,60$ Hz)	7,72 - 7,79 (m)	7,71 - 7,78 (m)
5	7,80-7,82 (m)	7,78 - 7,81 (m)	7,72 - 7,79 (m)	7,71 - 7,78 (m)
6	7,50 (t, $J=4$ Hz)	7,47 - 7,51 (m)	7,45 (t, $J=7,5$ Hz)	7,42 - 7,46 (m)
7	7,50 (t, $J=4$ Hz)	7,47 - 7,51 (m)	7,36 (t, $J=7,5$ Hz)	7,32 - 7,36 (m)
8	8,30-8,32 (m)	8,29 - 8,31 (m)	7,72 - 7,79 (m)	7,71 - 7,78 (m)
12	3,49-3,54 (m)	3,47 - 3,51 (m)	3,42 - 3,48 (m)	3,41 - 3,44 (m)
CH₂				
11	4,42 (dd, $J_{11-12}=3$ Hz; $J_{11a-11b}=11$ Hz)	4,39 (dd, $J_{11-12}=2,92$ Hz; $J_{11a-11b}=11,00$ Hz)	4,36 (dd, $J_{11-12}=3$ Hz; $J_{11a-11b}=11$ Hz)	4,35 (dd, $J_{11-12}=3,40$ Hz; $J_{11a-11b}=10,97$ Hz)
	4,18 (dd, $J_{11-12}=6$ Hz; $J_{11a-11b}=11$ Hz)	4,14 (dd, $J_{11-12}=5,52$ Hz; $J_{11a-11b}=11,00$ Hz)	4,10 (dd, $J_{11-12}=6$ Hz; $J_{11a-11b}=11$ Hz)	4,08 (dd, $J_{11-12}=5,12$ Hz; $J_{11a-11b}=10,76$ Hz)
13	2,99 (t, $J=4$ Hz)	2,96 (t, $J_{13a-11}=4,20$ Hz; $J_{13a-13b}=4,90$ Hz)	2,96 (t, $J=4,5$ Hz)	2,95 (t, $J_{13a-11}=4,16$ Hz; $J_{13a-13b}=4,88$ Hz)
	2,87 - 2,88 (m)	2,84 (dd, $J_{11-13b}=2,56$ Hz; $J_{13a-13b}=5,12$ Hz)	2,82 - 2,84 (m)	2,82 (dd, $J_{11-13b}=2,65$ Hz; $J_{13a-13b}=5,56$ Hz)

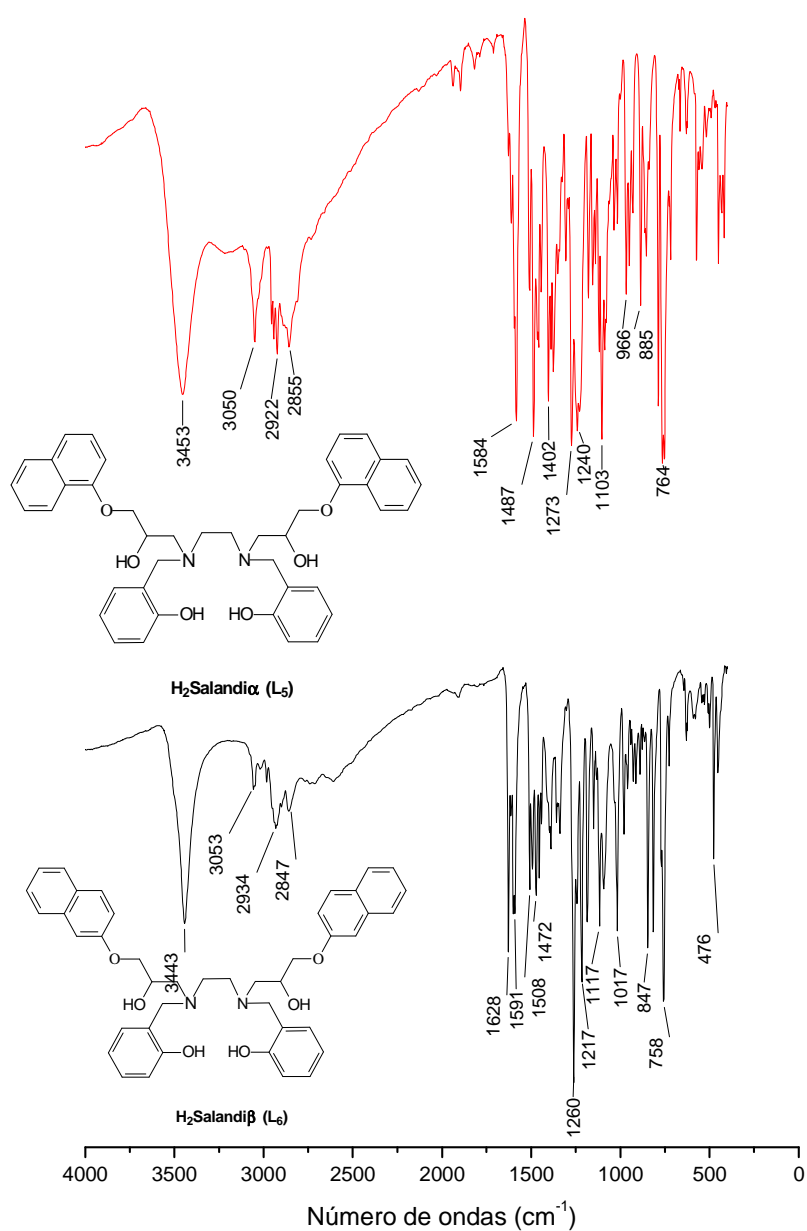
* LOPES, 2012.

Assim como para os ligantes contendo grupos amida, realizou-se a análise elementar de CHN para os ligantes $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ (**L₅**) e $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ (**L₆**). As porcentagens dos elementos avaliados são apresentadas na **Tabela 9**, sendo possível confirmar as proporções dos elementos presentes nos ligantes sintetizados, bem como prever as suas massas molares. Por meio desses dados, confirmou-se a presença de dois grupos naftóis ligados à molécula do ligante H_2Salam (**L₄**).

Tabela 9. Resultado das análises elementares para os ligantes H₂Salandi α e H₂Salandi β .

Ligante	C _{exp./} C _{calc.} (%)	H _{exp./} H _{calc.} (%)	N _{exp./} N _{calc.} (%)	Fórmula Molecular	MM (g.mol ⁻¹)
H ₂ Salandi α (L ₅)	74,65 / 74,98	6,56 / 6,59	4,20 / 4,16	C ₄₂ H ₄₄ N ₂ O ₆	672,82
H ₂ Salandi β (L ₆)	74,95 / 74,98	6,61 / 6,59	4,14 / 4,16	C ₄₂ H ₄₄ N ₂ O ₆	672,82

Em seguida, os ligantes derivados do H₂Salen contendo grupos naftóis foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros obtidos são apresentados de forma comparativa na **Figura 56**.

**Figura 56.** Espectro de Infravermelho dos ligantes H₂Salandi α e H₂Salandi β .

Os espectros apresentados na **Figura 56** são bastante semelhantes, visto que os ligantes também o são. Em ambos os espectros foram observadas bandas estreitas próximas de 3450 cm^{-1} . Esse fato indica que as hidroxilas não estão envolvidas em ligações de hidrogênio no estado sólido. Além desse sinal, os espectros de infravermelho mostraram bandas similares às apresentadas pelos precursores. Essas bandas incluem estiramento de ligações CH de aromáticos (aproximadamente 3050 cm^{-1}), estiramentos simétricos e assimétricos de grupos metilenos (CH_2) (aproximadamente 2850 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} , respectivamente) e estiramentos das ligações C=C de anéis aromáticos (entre 1400 e 1600 cm^{-1}). Os dados obtidos pelos espectros apresentados foram transcritos para a **Tabela 10**.

Tabela 10. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos compostos $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ e $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$.

Atribuição	$\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ (L_5) (cm^{-1})	$\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ (L_6) (cm^{-1})
νOH	3453	3443
$\nu\text{CH}_{\text{aromático}}$	3050	3053
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$	2943, 2922	2934
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	2855	2847
$\nu\text{C-N}$	1402	1472 1454
$\nu\text{C}_{\text{arom.}}-\text{O}$	1273	1260

Visando aprimorar a caracterização dos ligantes $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ (L_5) e $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ (L_6) foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) para ambos os compostos.

O espectro de RMN ^1H do ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ (L_5) (**Figura 57**) apresentou sinais para os onze hidrogênios aromáticos. Dentre esses sinais, sete são referentes aos hidrogênios aromáticos presentes nas estruturas dos grupos naftóis. No espectro de RMN ^1H do ligante verificou-se a presença de três dupletos provenientes do anel naftol em 6,84 ($J=8\text{ Hz}$); 7,83 e 8,09 ppm ($J=9\text{ Hz}$). O sinal mais blindado é referente ao hidrogênio H-2 com constante de acoplamento de 8 Hz, enquanto que os demais sinais apresentaram constante de acoplamento de 9 Hz e são atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8,

respectivamente. Nesta mesma região foram também observados dois tripletos oriundos dos hidrogênios dos grupos naftóis em 7,36 e 7,49 ppm. Esses sinais apresentaram constante de acoplamento de 8 Hz e correspondem aos núcleos dos átomos H-3 e H-7, respectivamente. Nesta mesma região foi observado um conjunto de sinais proveniente da sobreposição do tripleto referente ao hidrogênio H-6 (7,43 ppm) com o duplete correspondente ao núcleo do átomo H-4 (7,44 ppm).

Na região aromática também foram observados quatro sinais referentes aos hidrogênios do grupo fenol da unidade H₂Salam. Dentre estes verificou-se a presença de um duplete em 6,70 e um tripleto em 6,67 ppm, os quais estão relacionados com os núcleos dos hidrogênios H-17 e H-19, respectivamente. O conjunto de sinais entre 7,03 e 7,06 ppm corresponde a sobreposição do tripleto em 7,05 ppm (H-18) com o duplete em 7,04 ppm (H-20).

Além dos sinais citados, o espectro de RMN ¹H apresentou seis conjuntos de sinais entre 2 e 5 ppm, os quais concordam com a quantidade de hidrogênios alifáticos presente na molécula do ligante. O multiplete entre 4,11 e 4,15 ppm está relacionado com o núcleo do hidrogênio H-12, o qual acopla com hidrogênios vizinhos gerando um multiplete. Além deste, também observou-se outros multipletos entre 3,94 e 3,99 ppm, 3,66 e 3,75; 2,61 e 2,65 e entre 2,73 e 2,82, o quais estão de acordo com os átomos de hidrogênios H-11, H-14, H-13 e H-21.

No espectro de RMN ¹³C (**Figura 58**) observou-se vinte e um sinais, os quais estão de acordo com a quantidade de átomos de carbono presente na estrutura do ligante. Os sinais mais desblindados, em 154,48 e 157,15 ppm, são referentes aos carbonos C-1 e C-16, respectivamente. Esses sinais encontram-se nesta região devido ao forte efeito retirador de elétrons dos átomos de oxigênio ligados diretamente a esses átomos (PAVIA, et al., 2015). O espectro do ligante apresentou três sinais de ¹³C em 134,44; 125,40 e 123,95 ppm, os quais são referentes aos núcleos dos carbonos C-9, C-10 e C-15. Esses sinais, bem como os observados em 154,48 e 157,15 ppm não apresentaram correlações a curta distância com átomos de hidrogênio (**Figura 59 e 60**), sendo assim foi possível confirmar as atribuições realizadas.

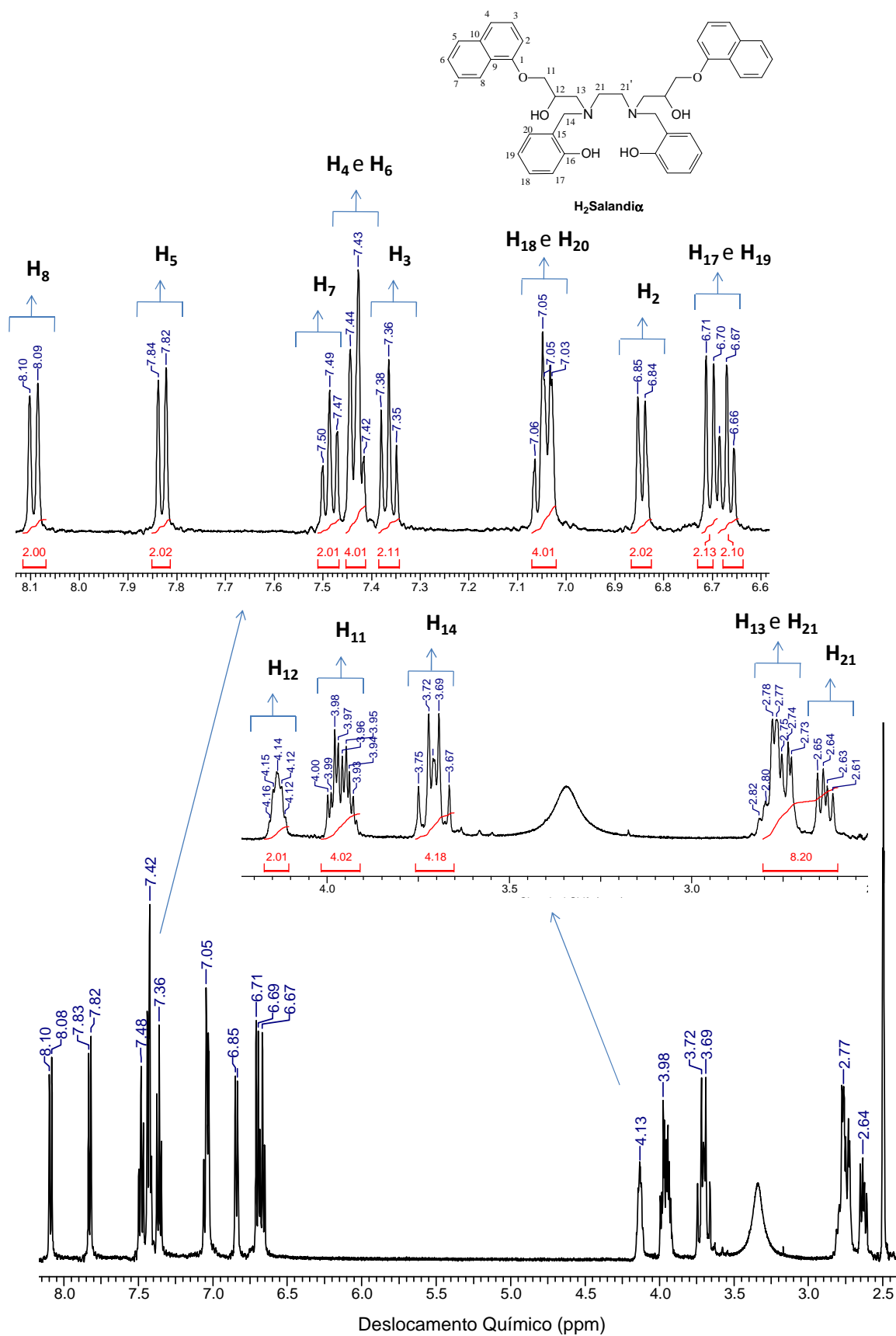


Figura 57. Espectro de RMN ¹H do ligante H₂Salandiα com ampliações das regiões de interesse (500 MHz, DMSO-D₆).

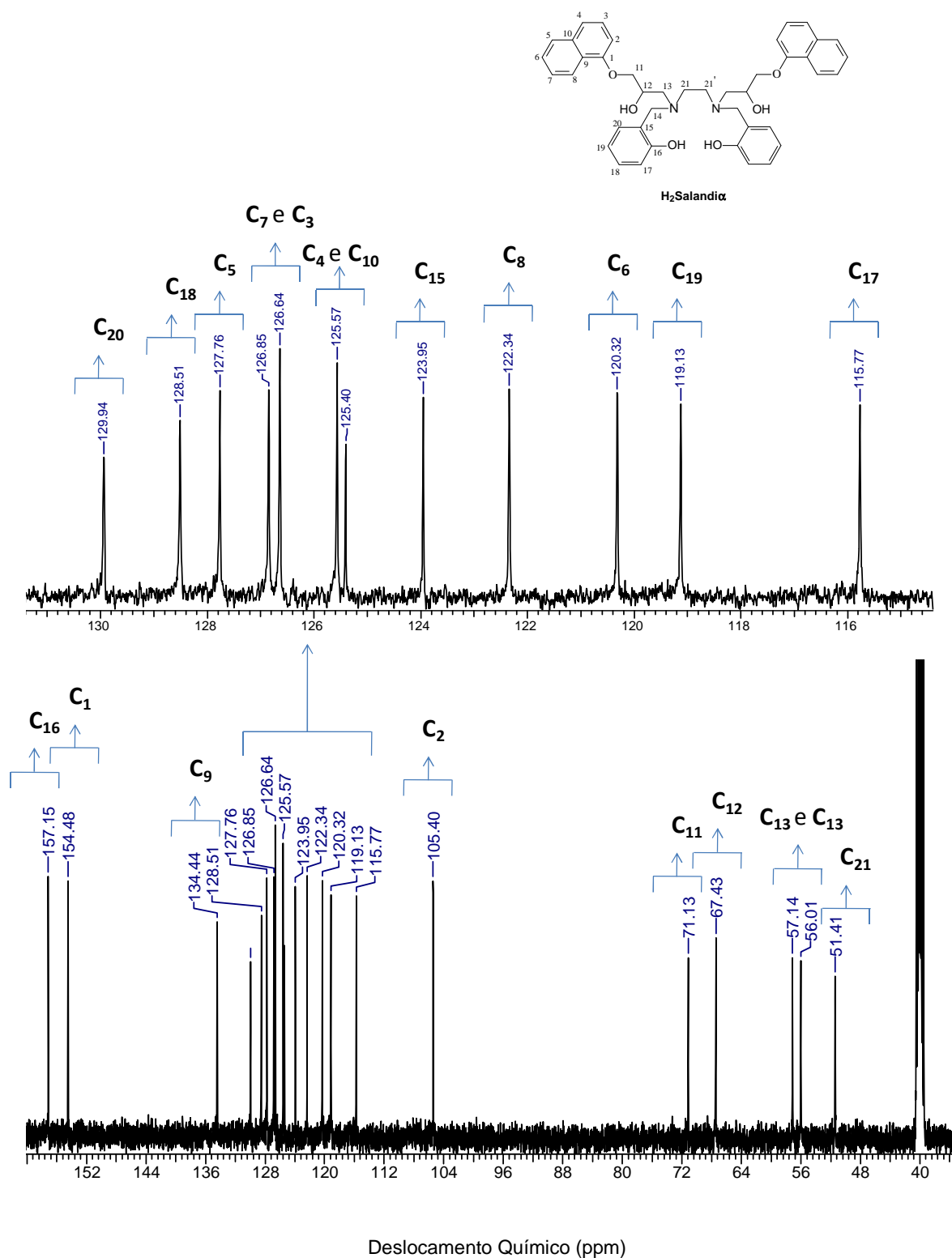


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C do ligante H₂Salandiα com ampliação da região de interesse (500 MHz, DMSO-D₆).

Na região aromática do espectro de RMN ^{13}C observaram-se sinais referentes aos onze grupos metínicos (CH) do ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$, em δ_{C} 105,40 (CH-2); 115,77 (CH-17); 119,94 (CH-20); 120,32 (CH-6); 122,34 (CH-8); 125,57 (CH-4); 126,04 (CH-3); 126,85 (CH-7); 127,76 (CH-5); 128,51 (CH-18); 129,94 (CH-20). Além desses sinais de carbono ^{13}C foram observados a presença de cinco sinais da região alifática, sendo um sinal referente ao grupo metínico (CH) em 67,43 ppm (CH-12) e os demais de grupos metilênicos (CH_2) em δ_{C} 51,41 (CH_2 -21); 56,01 (CH_2 -14); 57,14 (CH_2 -13) e 71,13 (CH_2 -11).

O espectro de HMQC (**Figura 59 e 60 e Tabela 11**) para o ligante indicou a presença de dezesseis correlações a curta distância entre os átomos de carbono e hidrogênio, confirmando as atribuições realizadas por meio dos espectros unidimensionais.

As ligações entre os grupos naftóis e a unidade H_2Salam podem ser comprovada através das correlações a longa distância $^3J_{\text{CH}}$ entre o carbono C-13 em 57,14 ppm com os hidrogênios 2H-11, 2H-14 e 2H-21. Esta ligação também pode ser confirmada pela correlação entre o carbono C-14, em 56,01 ppm, e os hidrogênios 2H-13, 2H-21 e 1H-20 e entre o carbono C-21, em 51,41 ppm, e os hidrogênios 2H-13 e 2H-14 (**Figura 61 e 62 e Tabela 11**).

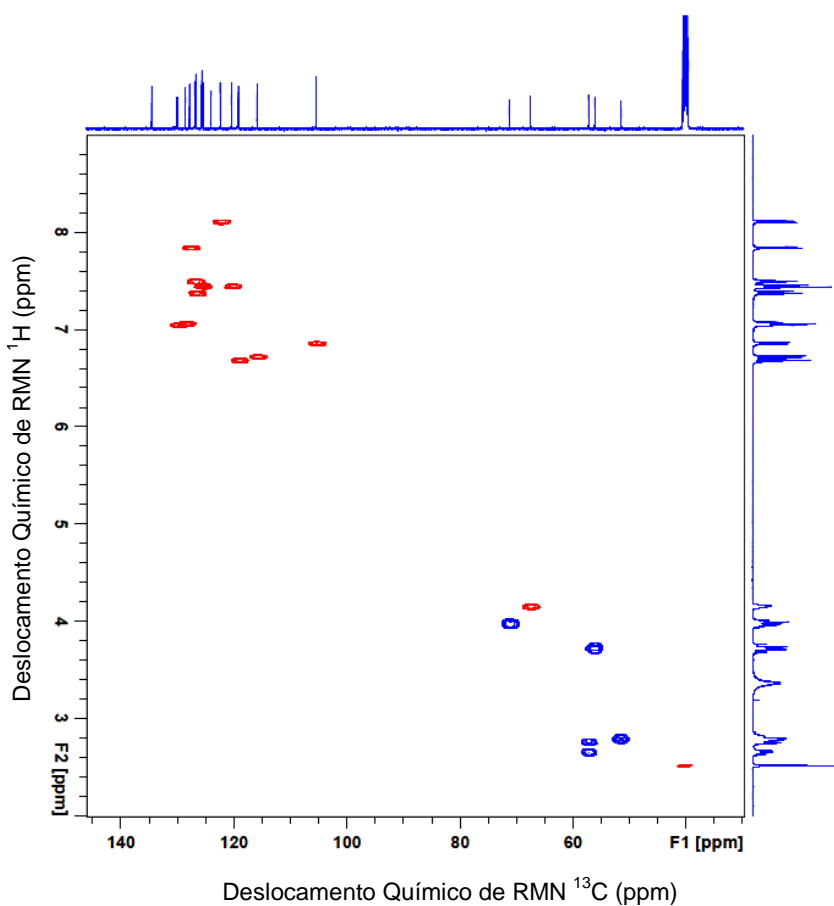


Figura 59. Espectro de HMQC do ligante H₂Salandix.

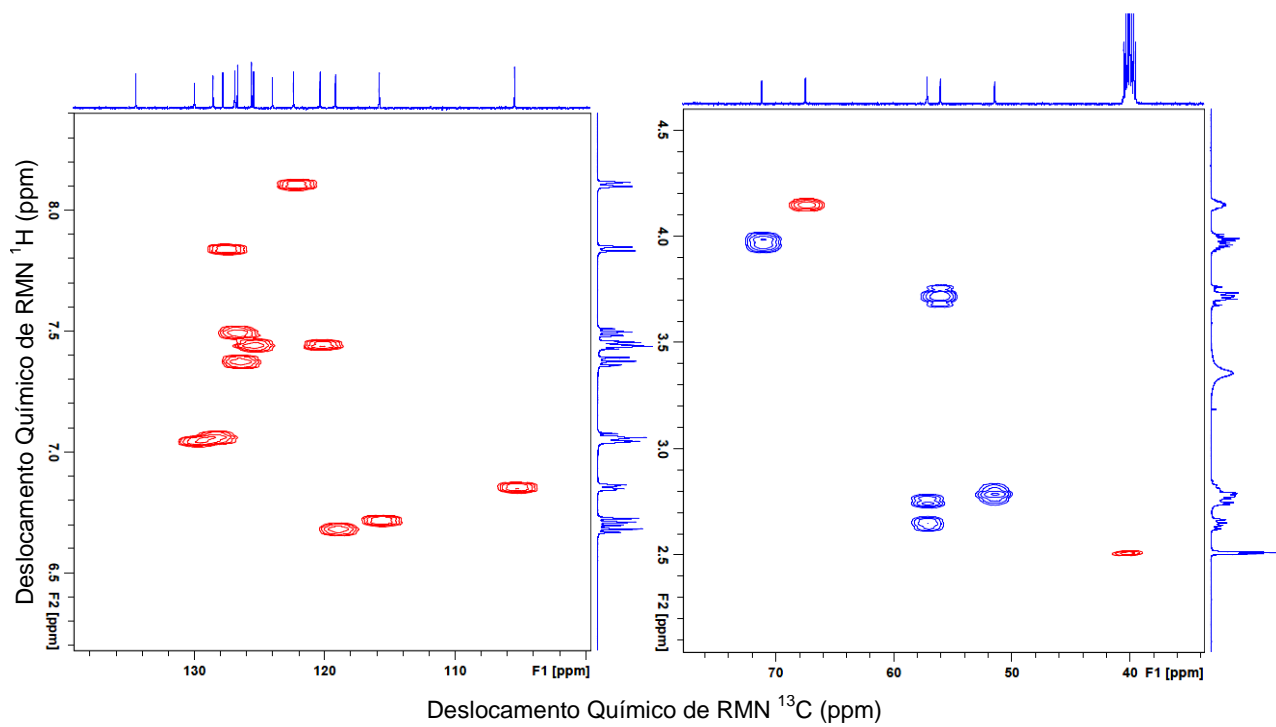


Figura 60. Ampliações do espectro de HMQC do ligante H₂Salandix.

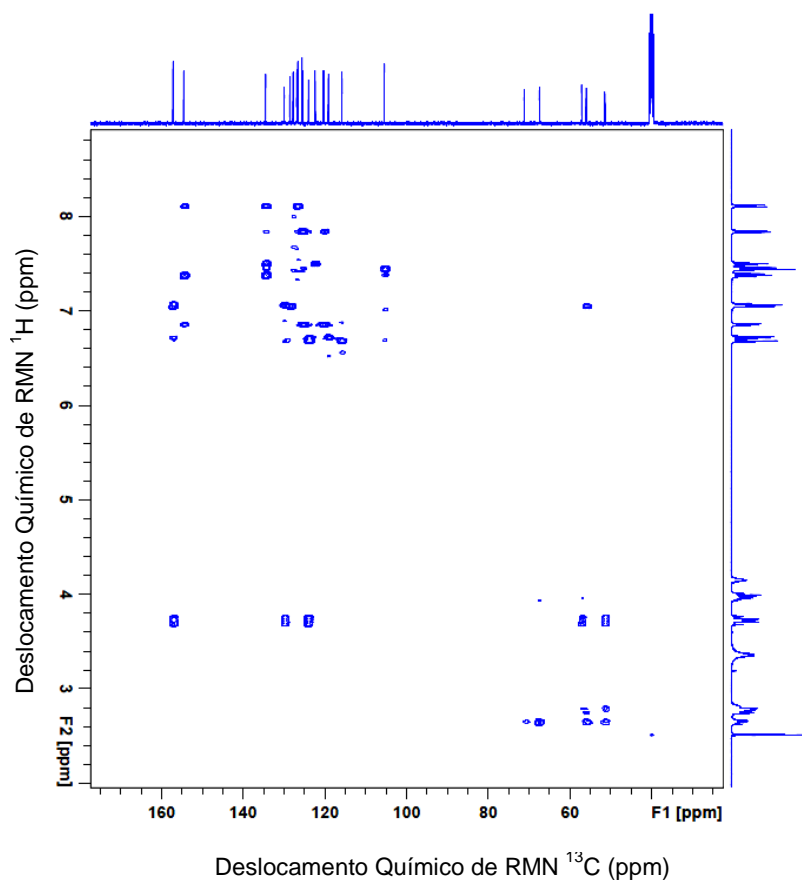


Figura 61. Espectro de HMBC do ligante $\text{H}_2\text{Salandix}$.

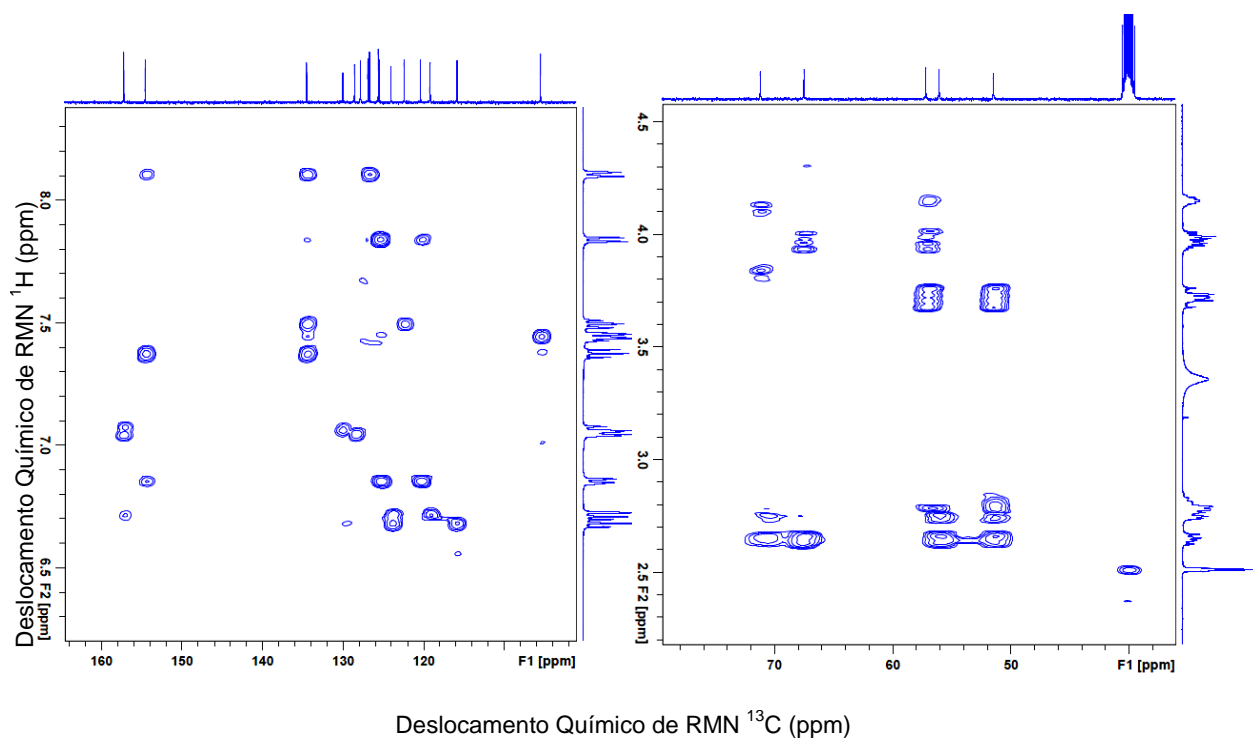


Figura 62. Ampliações do espectro de HMBC do ligante $\text{H}_2\text{Salandix}$.

Assim como para o ligante H₂Salandi α (L₅), o espectro de RMN ¹H do ligante H₂Salandi β (L₆) (**Figura 63**) apresentou sinais para os onze hidrogênios aromáticos, dois quais sete são referentes aos hidrogênios aromáticos presentes nos grupos naftóis e quatro são oriundos dos hidrogênios dos anéis fenólicos. A unidade naftol resultou na formação de dois dupletos em 7,09 (H-3) e 7,21 ppm (H-1), dois tripletos em 7,33 (H-6) e 7,44 ppm (H-7) e um multiplete entre 7,75 e 7,81 ppm (H-4; H-5 e H-8). As unidades fenólicas resultaram na formação de um duplete em 6,71 (H-17) e dois tripletos em 6,68 ppm (H-19) e 7,05 (H-18 e H-20). Além dos hidrogênios aromáticos também se verificou a presença de sinais referentes a hidrogênios alifáticos em 2,56-2,70 (H-13); 2,72 (H-21); 3,70 (H-14); 3,88-3,98 (H-11) e 4,04-4,08 (H-12).

O espectro de RMN ¹³C (**Figura 64**) apresentou sinais referentes a vinte e um átomos de carbonos para o ligante H₂Salandi β , sendo quatro sinais para grupos metilênicos (CH₂) em δ_c 51,18 (CH₂-21); 55,98 (CH₂-14); 57,28 (CH₂-13) e 71,16 (CH₂-11), doze sinais para grupos metínicos (CH) em δ_c 67,18 (CH-12); 107,05 (CH-1); 115,76 (CH-17); 119,14 (CH-19); 119,23 (CH-3); 124,33 (CH-6); 126,81 (CH-7); 127,12 (CH-8); 127,95 (CH-5); 128,53 (CH-20); 129,66 (CH-4) e 129,98 (CH-18) e cinco sinais para átomos de carbono quaternário em δ_c 123,99 (C-15); 128,91 (C-10); 134,71 (C-9); 156,94 (C-2) e 157,09 (C-16).

O espectro de HMQC (**Figura 65 e 66 e Tabela 11**) para o ligante indicou a presença de dezesseis correlações a curta distância entre os átomos de carbono e hidrogênio, confirmando as atribuições realizadas por meio dos espectros unidimensionais. As atribuições realizadas para os átomos de carbono e hidrogênio foram confirmadas por meio das correlações a longa distância ^{2,3}J_{CH}, sendo estas observadas no espectro de HMBC (**Figuras 67 e 68 e Tabela 11**).

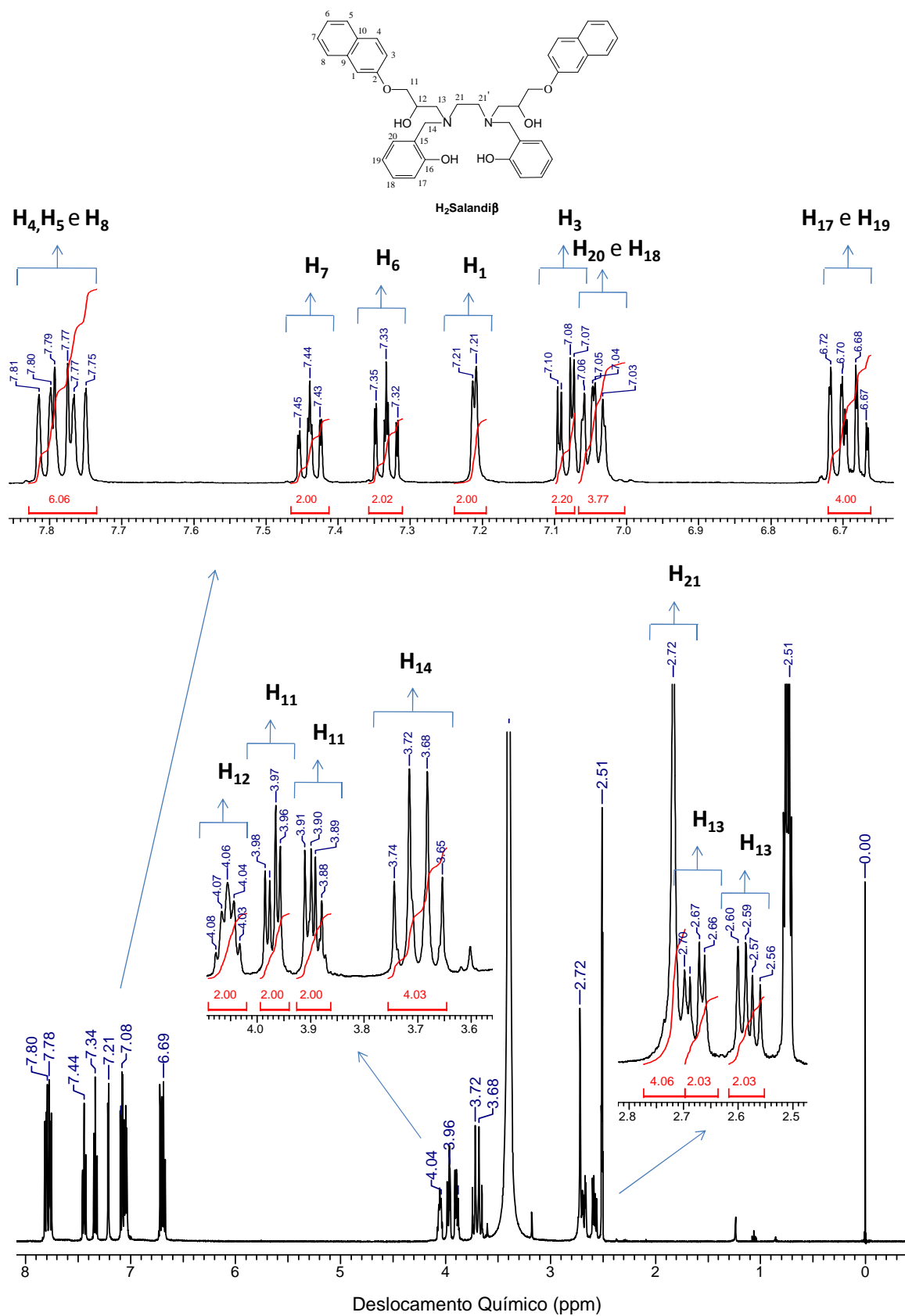


Figura 63. Espectro de RMN 1H do ligante $H_2Salandi\beta$ com ampliações das regiões de interesse (500 MHz, DMSO- D_6).

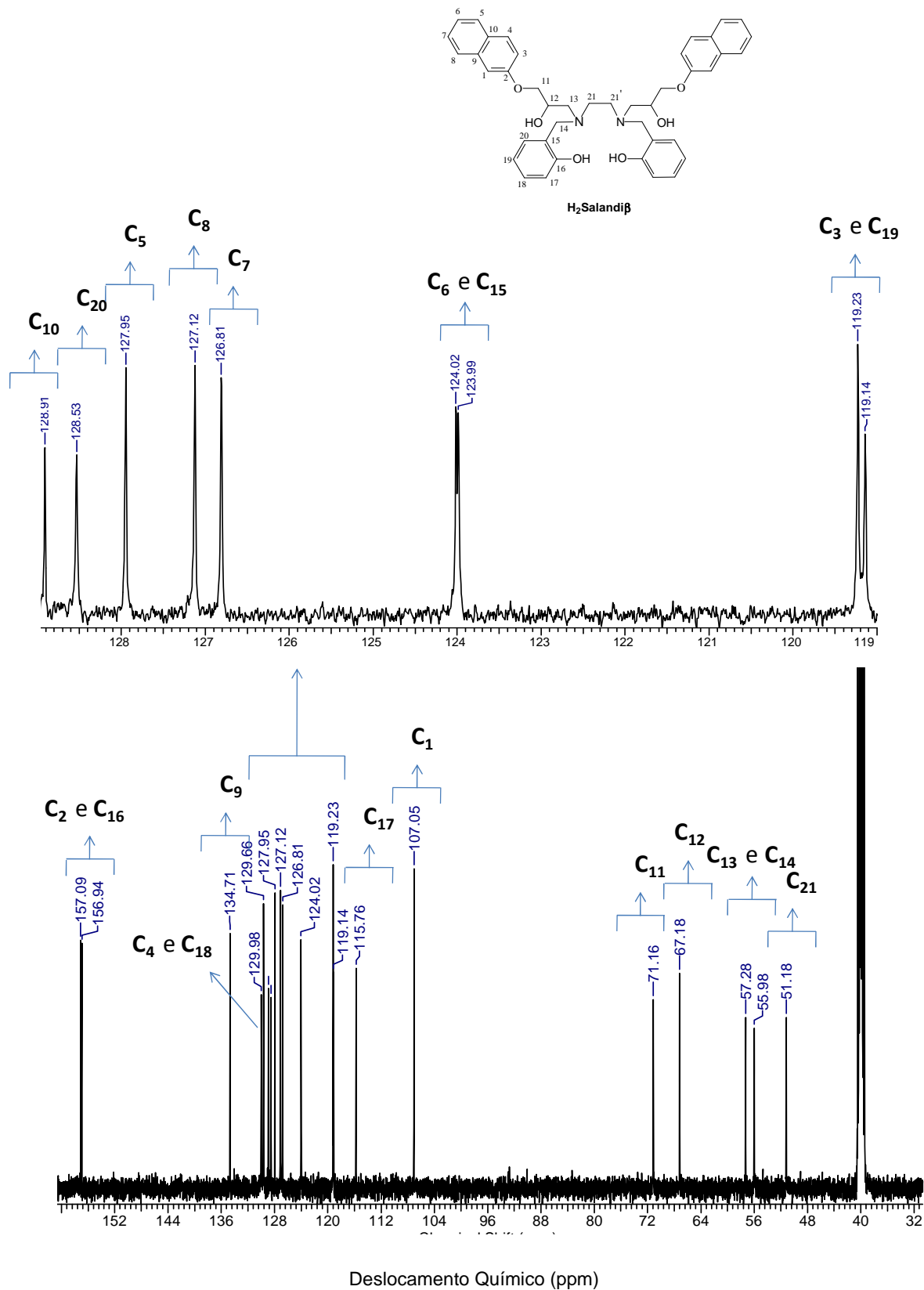


Figura 64. Espectro de RMN ¹³C do ligante H₂Salandiβ com ampliação da região de interesse (500 MHz, DMSO-D₆).

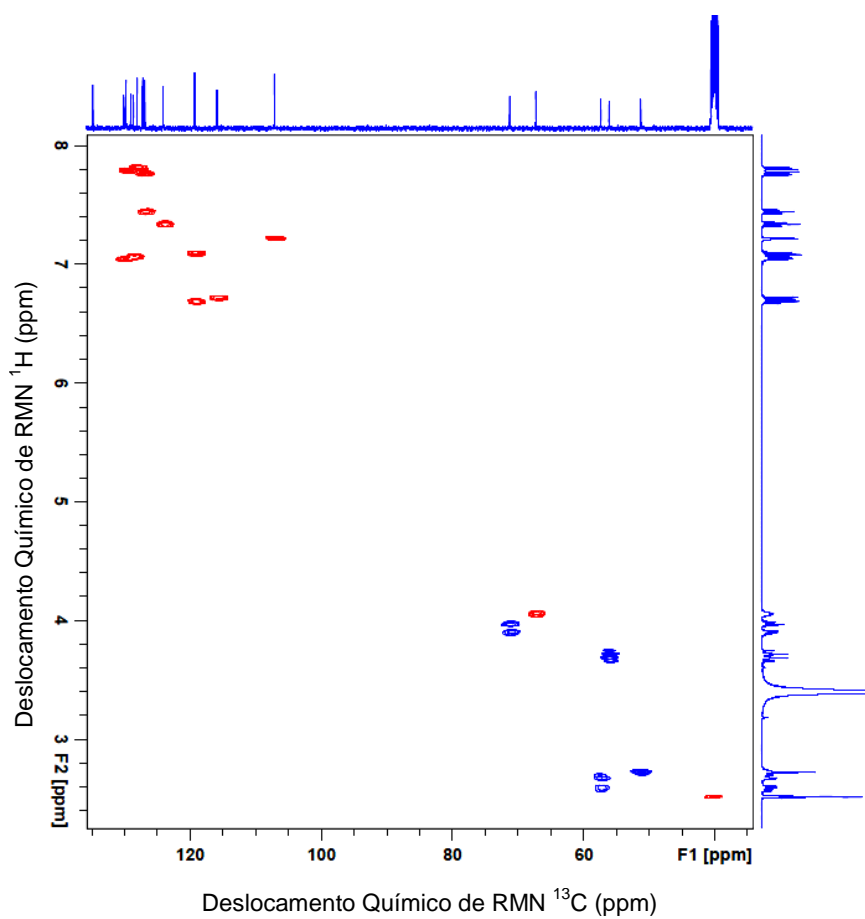


Figura 65. Espectro de HMQC do ligante H₂Salandiβ.

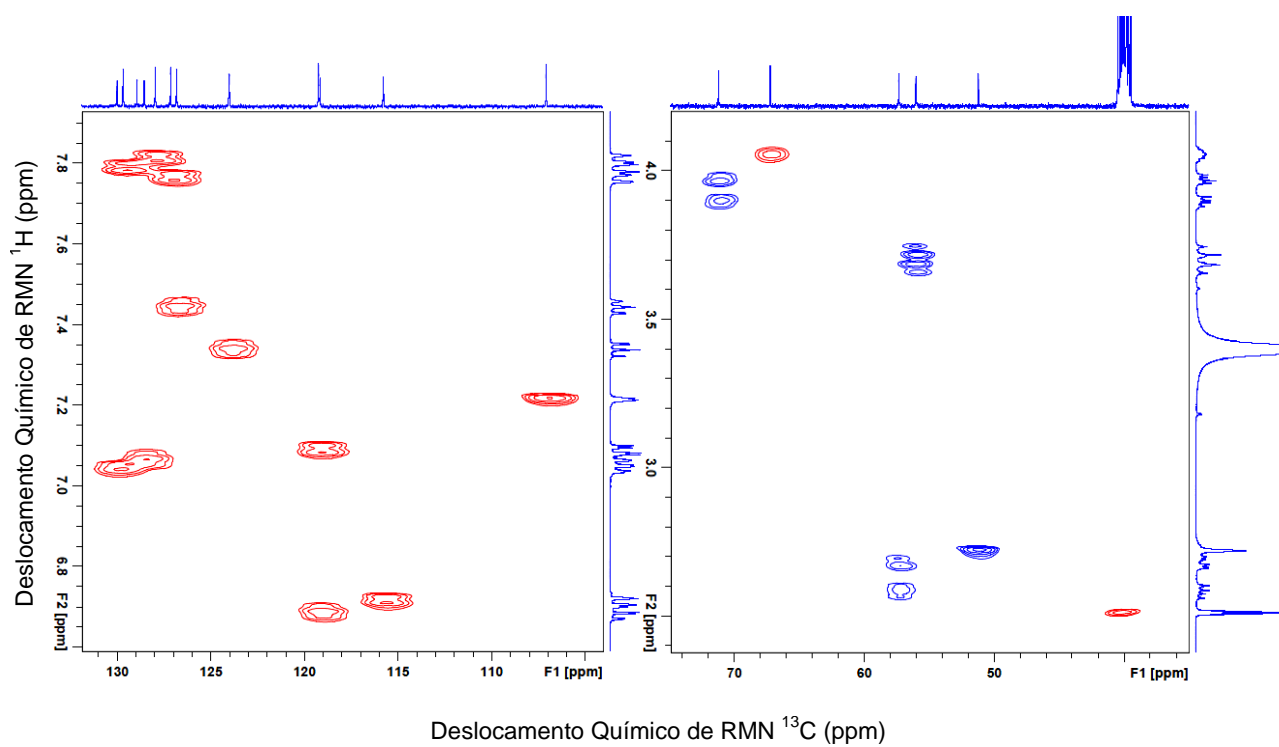


Figura 66. Ampliações do espectro de HMQC do ligante H₂Salandiβ.

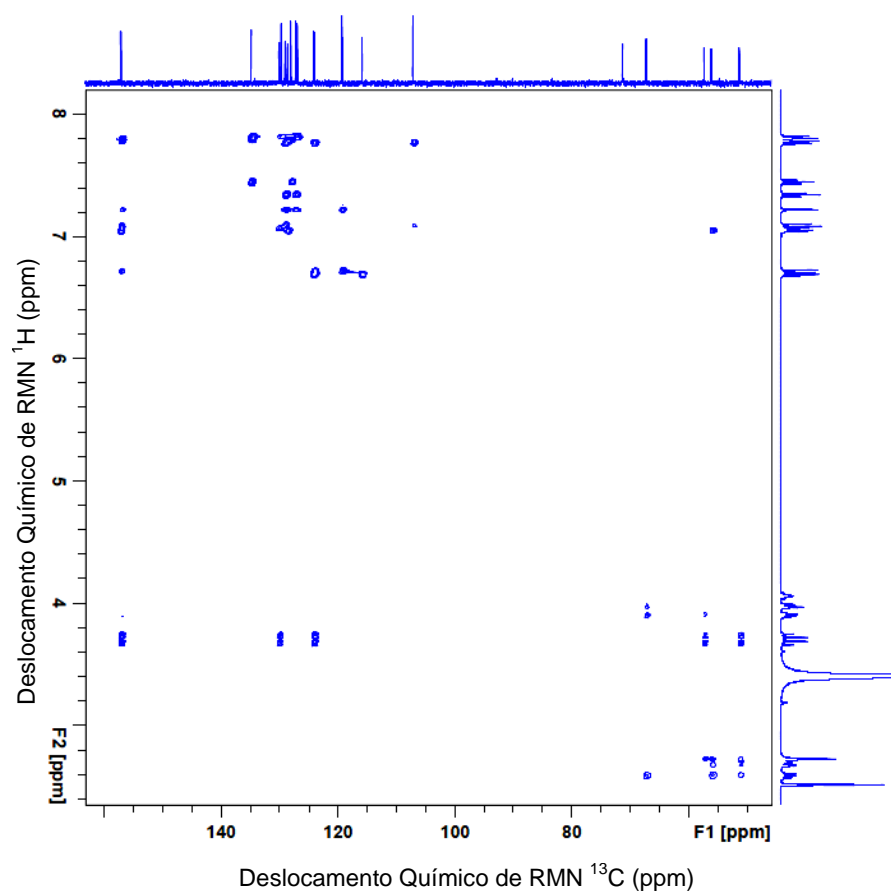


Figura 67. Espectro de HMBC do ligante H₂Salandiβ.

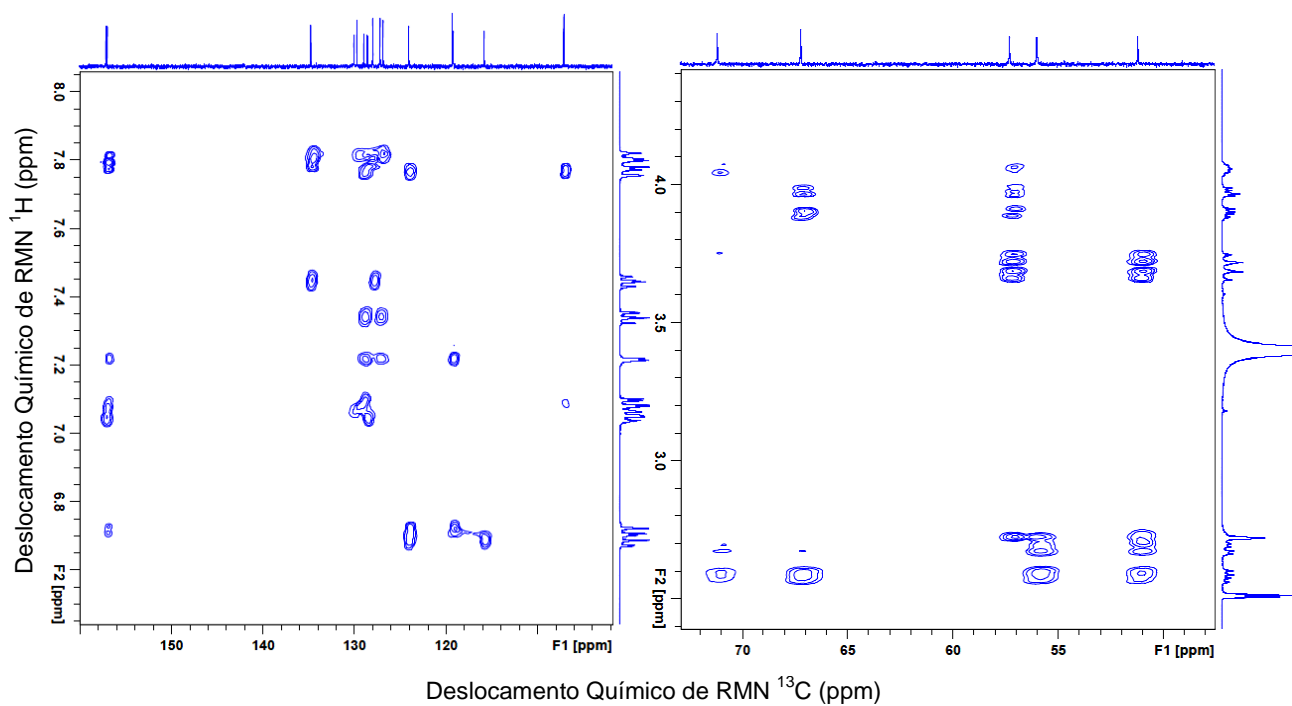
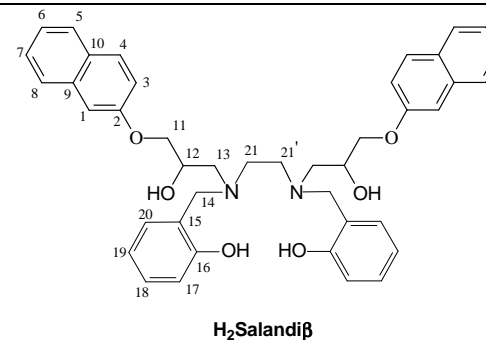
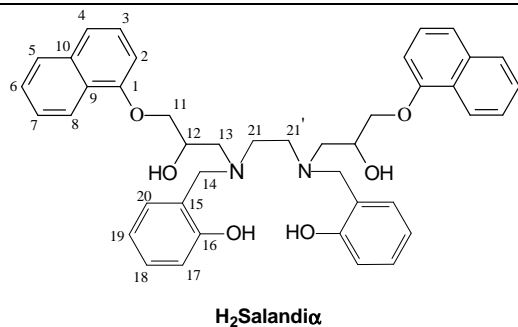


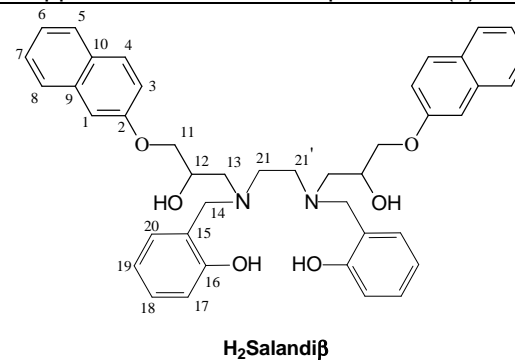
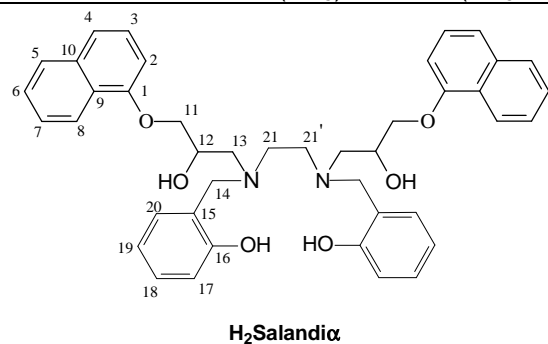
Figura 68. Ampliações do espectro de HMBC do ligante H₂Salandiβ.

Tabela 11. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) para os ligantes $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ (DMSO- D_6) e $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ (DMSO- D_6), incluindo resultados obtidos por correlações bidimensionais 2D HMQC ($^1J_{\text{HC}}$) e HMBC ($^nJ_{\text{HC}}$ n = 2 e 3). Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz.



	HMQC			HMBC		HMQC			HMBC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$		
C										
1	154,48	-	1H-2	2H-11, 1H-8, 1H-3	-	-	-	-		
2	-	-	-	-	156,94	-	1H-1, 1H-3	1H-4, 2H-11		
9	134,44	-	1H-8	1H-7	134,71	-	1H-1, 1H-8	1H-4, 1H-5, 1H-7		
10	125,40	-	1H-4, 1H-5	-	128,91	-	1H-4, 1H-5	1H-1, 1H-6, 1H-8		
15	123,95	-	-	1H-19, 1H-17	123,99	-	2H-14, 1H-20	1H-19		
16	157,15	-	1H-17	2H-14, 1H-18, 1H-20	157,09	-	1H-17	2H-14, 1H-18, 1H-20		
CH										
1	-	-	-	-	107,05	7,21 (<i>d</i> , $J=2$ Hz)	-	1H-3, 1H-11		
2	105,40	6,84 (<i>d</i> , $J=8$ Hz)	1H-3	1H-4						
3	126,64	7,36 (<i>t</i> , $J=8$ Hz)	1H-4	-	119,23	7,09 (<i>dd</i> , $J=7,5; 2$ Hz)	1H-4	1H-1		
4	125,57	7,43 (<i>d</i> , $J=9$ Hz)	-	1H-2, 1H-5	129,66	7,80 (<i>m</i>)	1H-3	1H-5		
5	127,76	7,83 (<i>d</i> , $J=9$ Hz)	-	1H-4	127,95	7,79 (<i>m</i>)	1H-6	1H-4, 1H-7		
6	120,32	7,42 (<i>t</i> , $J=8$ Hz)	1H-5	-	124,33	7,33 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz)	1H-5, 1H-7	1H-8		

Tabela 11. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz) para os ligantes $\text{H}_2\text{Salandi}\alpha$ (DMSO- D_6) e $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ (DMSO- D_6), incluindo resultados obtidos por correlações bidimensionais 2D HMQC ($^1J_{\text{HC}}$) e HMBC ($^nJ_{\text{HC}}$ n = 2 e 3). Deslocamento químico (δ) em ppm e constante de acoplamento (J) em Hz(Continuação).



	HMQC				HMBC			
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$
CH								
7	126,85	7,48 (<i>t</i> , $J=8$ Hz)	1H-8	-	126,81	7,44 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz)	1H-6, 1H-8	1H-5
8	122,34	8,09 (<i>d</i> , $J=9$ Hz)	1H-7	-	127,12	7,76 (<i>m</i>)	1H-7	1H-1, 1H-6
12	67,43	4,11-4,15 (<i>m</i>)	2H-11, 2H-13	-	67,18	4,04-4,08 (<i>m</i>)	2H-11, 2H-13	
17	115,77	6,70 (<i>d</i> , $J=9$ Hz)	-	1H-19	115,76	6,71 (<i>d</i> , $J=7$ Hz)	1H-18	1H-19
18	128,51	7,05 (<i>t</i> , $J=9$ Hz)	-	1H-20	129,98	7,05 (<i>t</i> , $J=7$ Hz)	1H-19	1H-20
19	119,13	6,67 (<i>t</i> , $J=9$ Hz)	-	1H-17	119,14	6,68 (<i>t</i> , $J=7$ Hz)	-	1H-17
20	129,94	7,04 (<i>d</i> , $J=9$ Hz)	-	1H-18	128,53	7,09 (<i>d</i> , $J=7$ Hz)	-	1H-18
CH₂								
11	71,13	3,94 – 3,99 (<i>m</i>)	1H-12	2H-13	71,16	3,88-3,98 (<i>m</i>)	1H-12	2H-13
13	57,14	2,61-2,65 (<i>m</i>) 2,72-2,75 (<i>m</i>)	1H-12	2H-11, 2H-14, 2H-21	57,28	2,56-2,60 (<i>m</i>) 2,66-2,70 (<i>m</i>)	1H-12	2H-11, 2H-14, 2H-21
14	56,01	3,66 – 3,99 (<i>m</i>)	-	2H-13, 2H-21, 1H-20	55,98	3,70 (<i>dt</i> , $J=15$ Hz)		
21	51,41	2,77-2,81 (<i>m</i>)	2H-21'	2H-13, 2H-14	51,18	2,72 (<i>s</i>)	2H-21'	2H-13, 2H-14

Além das caracterizações apresentadas anteriormente utilizou-se a análise de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) em meio ácido para os novos ligantes H₂Salandi α (**Figura 69**) e H₂Salandi β (**Figura 70**). Os sinais observados estão de acordo com as estruturas propostas para ambos os ligantes, sendo observado o íon molecular em 337 *m/z*. Os perfis de fragmentação entre os dois ligantes apresentaram resultados bem próximos, sendo observada a presença de quatro sinais mais abundantes com valores de *m/z* de aproximadamente 107; 337; 567 e 673 (**Figura 71**). Além desses também foi observado a presença dos íons com valores de *m/z* de 244; 461 e 473 em solução ácida após ionização (**Figura 71**). As ampliações dos sinais apresentados nos perfis de fragmentação dos dois ligantes, bem como seus respectivos perfis isotópicos, são apresentados em anexo (**Anexos 1 a 7**).

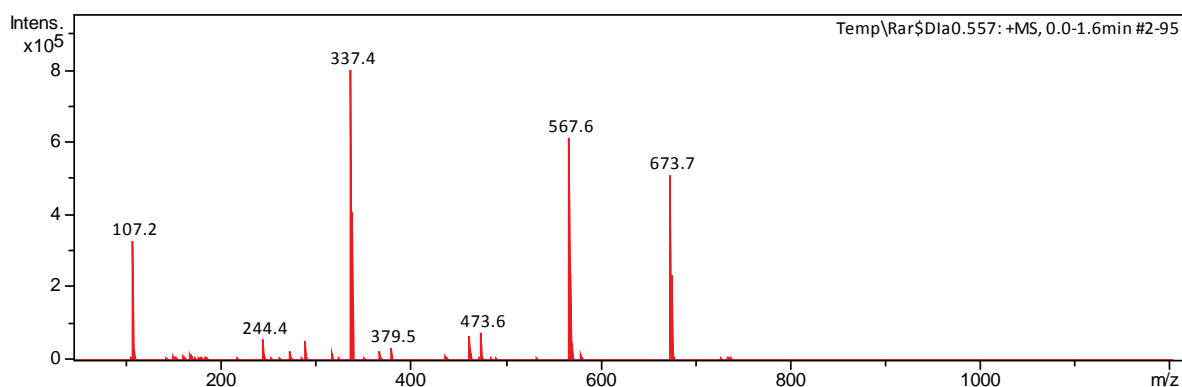


Figura 69. Análise de Espectrometria de Massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) para o ligante H₂Salandi α .

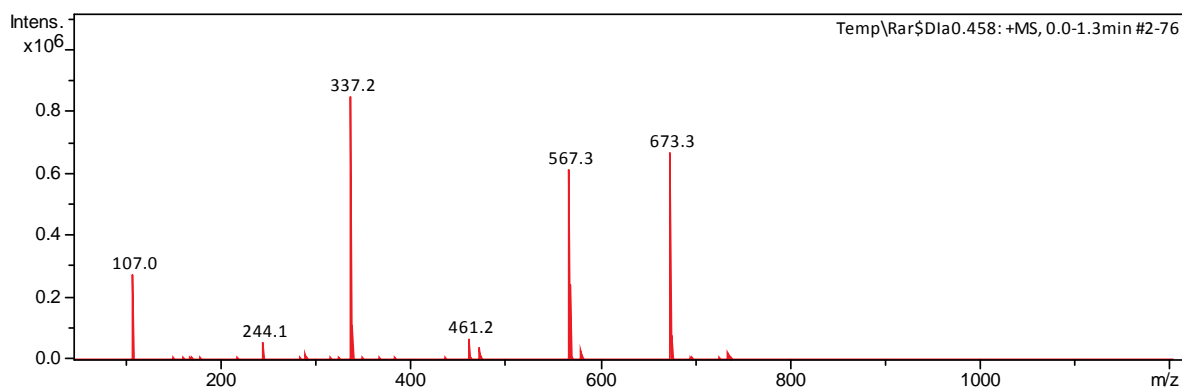


Figura 70. Análise de Espectrometria de Massas com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) para o ligante H₂Salandi β .

Na **Figura 71** é apresentada uma proposta para a fragmentação do ligante H₂Salandi β , sendo omitida a proposta para o ligante H₂Salandi α , devido à similaridade entre as propostas, sendo a única diferença a posição do anel naftaleno.

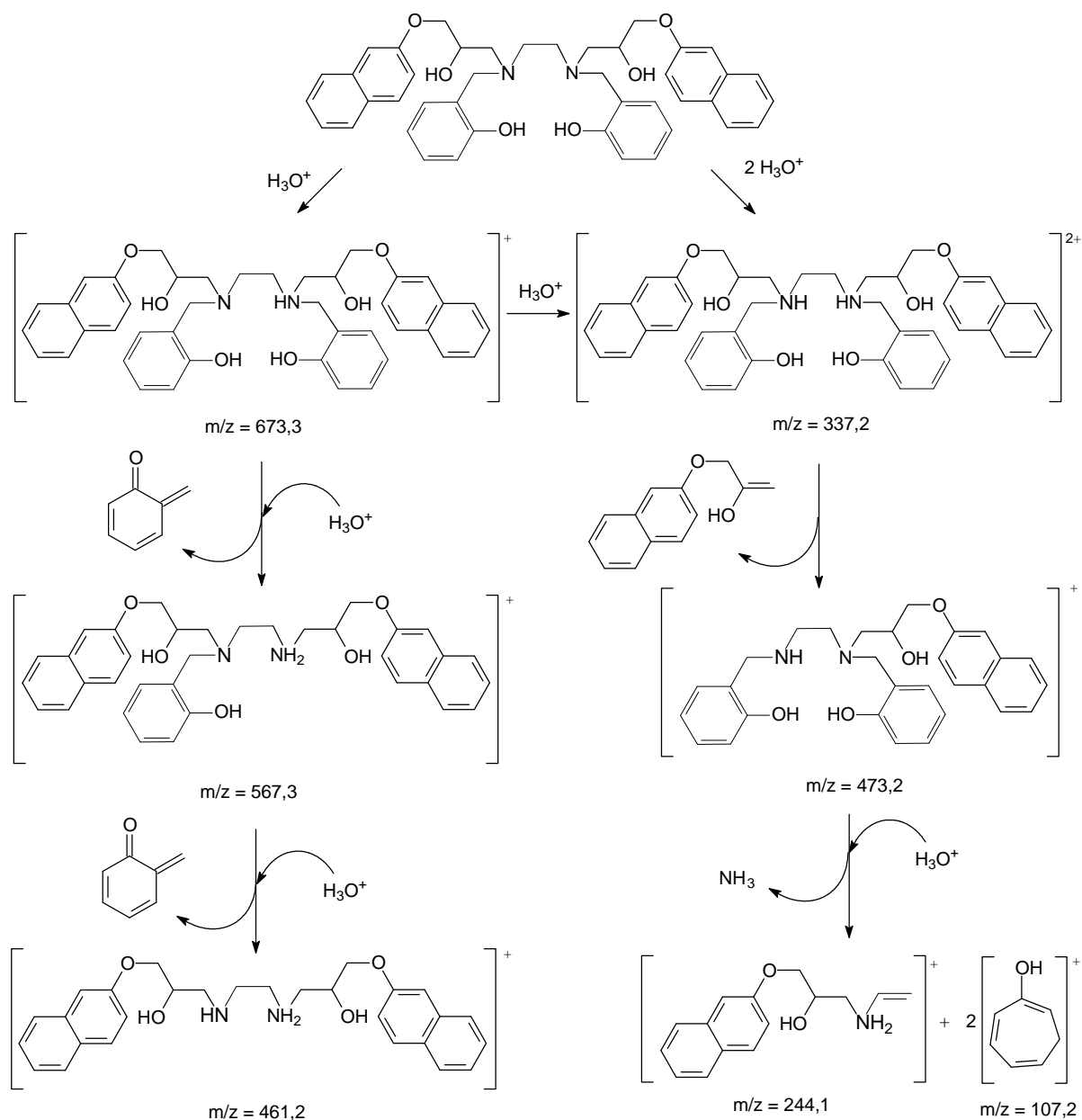


Figura 71. Proposta de fragmentação do ligante H₂Salandi β após ionização em meio ácido por espectrometria de ionização por eletrospray (ESI-MS).

5.5. Sínteses dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida

As reações entre quantidades equimolares dos ligantes contendo grupos amida e o cloreto de cobre (II) resultaram na formação de sólidos com coloração azul. As estruturas propostas para os complexos são apresentados na **Figura 72**, sendo possível observar a formação de compostos de coordenação mononucleares com uma unidade do ligante e um átomo de cobre (II).

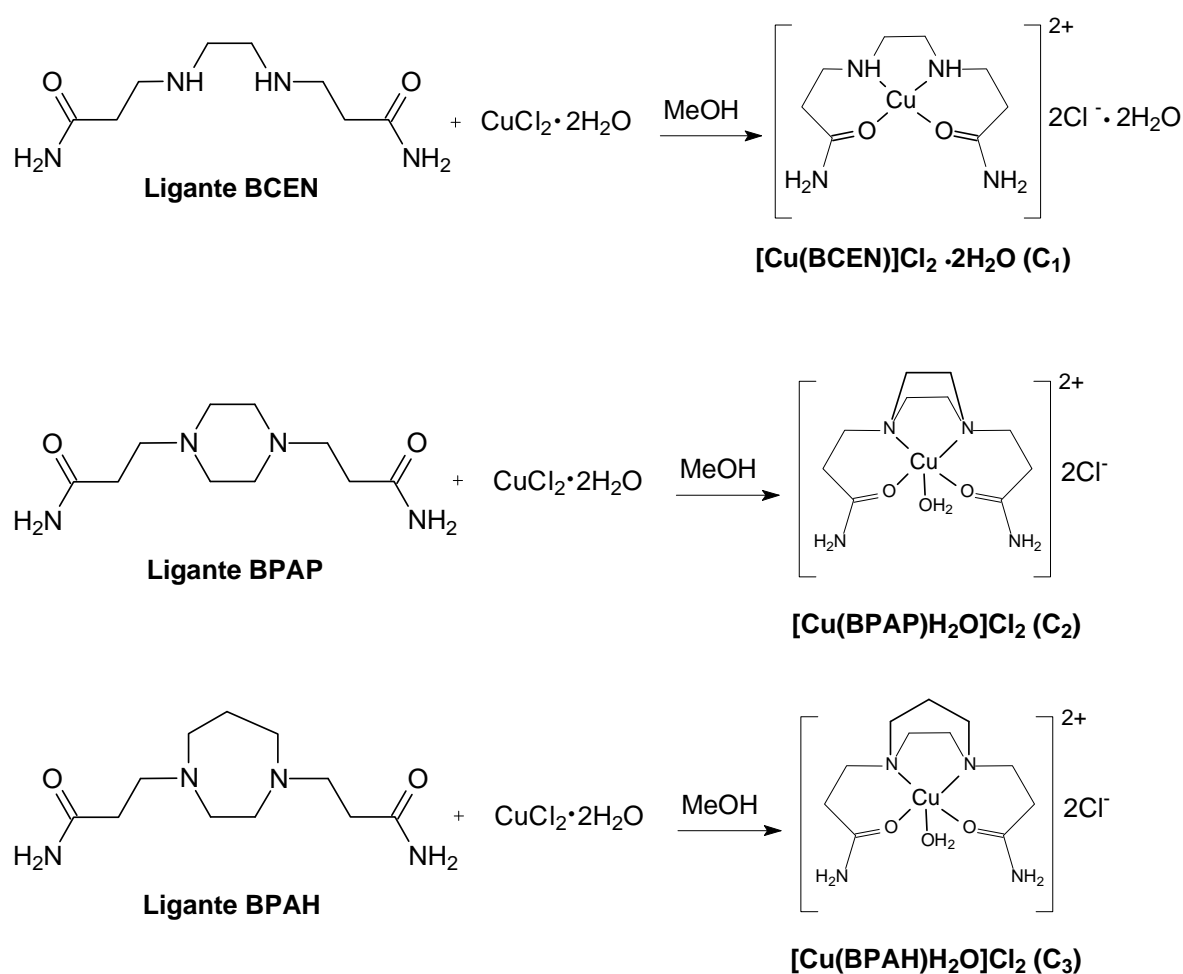


Figura 72. Esquema de sínteses dos complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.

Como os ligantes são tetradentados, foi possível prever que as coordenações ocorrem entre os centros metálicos e os átomos mais nucleofílicos dos ligantes, sendo estes os nitrogênios das aminas e os oxigênios das funções

amida. Em seguida, foram utilizadas diferentes técnicas instrumentais visando confirmar as estruturas dos compostos sintetizados.

5.6. Caracterizações dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.

Os dados da análise elementar (**Tabela 12**) para os complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida são condizentes com compostos de coordenação contendo um íon cobre, uma molécula do ligante, dois íons cloreto e diferentes proporções de moléculas de água. Para o complexo **C₁** a análise elementar indicou a presença de duas moléculas de água, enquanto que os complexos com unidades diazocíclicas (**C₂** e **C₃**) apresentaram apenas uma única molécula de água em sua composição.

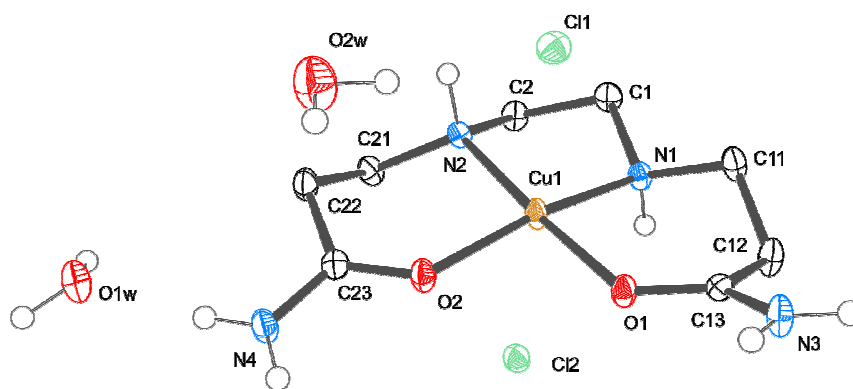
Tabela 12. Resultado da análise elementar para os ligantes contendo grupos amida.

Complexos	C _{exp.} /C _{calc.} (%)	H _{exp.} /H _{calc.} (%)	N _{exp.} /N _{calc.} (%)	Fórmula Molecular	MM (g.mol ⁻¹)
C₁	25,46 / 25,79	5,78 / 5,95	14,82 / 15,03	C ₈ H ₂₂ Cl ₂ CuN ₄ O ₄	372,74
C₂	31,86 / 31,54	5,86 / 5,82	14,83 / 14,71	C ₁₀ H ₂₂ Cl ₂ CuN ₄ O ₃	380,76
C₃	33,81 / 33,47	6,32 / 6,13	14,50 / 14,19	C ₁₁ H ₂₄ Cl ₂ CuN ₄ O ₃	394,79

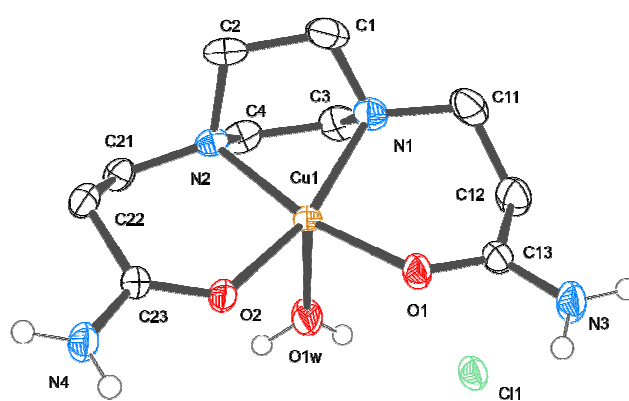
Para os três compostos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida foram obtidos monocristais, tendo sido possível a resolução de suas estruturas moleculares por difratometria de raios X (**Figura 73**), as quais apresentaram os parâmetros cristalográficos descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13. Parâmetros cristalográficos para os complexos de cobre com grupo amida.

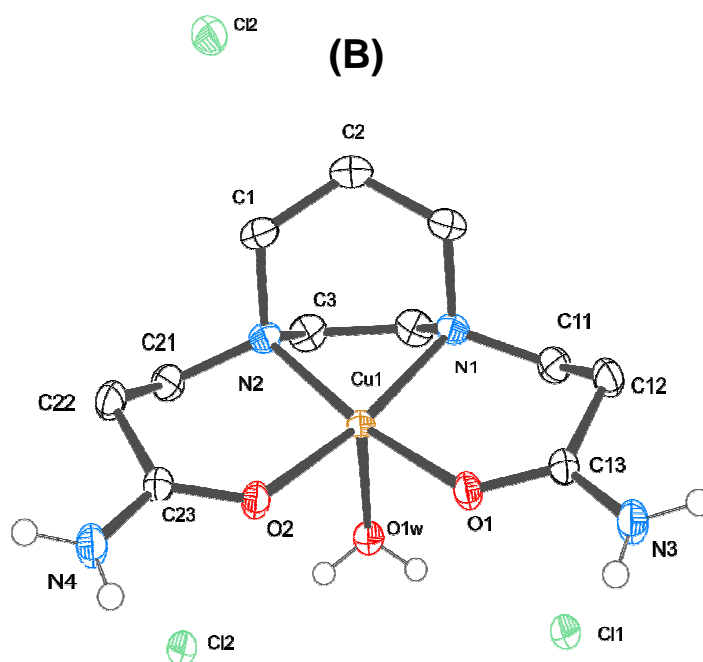
	[Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O	[Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂	[Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂
Fórmula empírica	C ₈ H ₂₂ Cl ₂ CuN ₄ O ₄	C ₁₀ H ₂₂ Cl ₂ CuN ₄ O ₃	C ₁₁ H ₂₄ Cl ₂ CuN ₄ O ₃
Massa molecular	372,74	380,76	394,78
Temperatura (K)	150(2)	190(2)	173(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico	Ortorrômbico
Grupo espacial	P-1	P 2 ₁ /c	P n m a
Parâmetros de cela	a = 8,1007(14) Å α = 82,599(12) ^o b = 8,732(2) Å β = 71,669(10) ^o c = 12,1424(19) Å γ = 69,314(12) ^o	a = 18,5630(5) Å α = 90 ^o b = 7,0046(2) Å β = 92,705(2) ^o c = 12,2318(4) Å γ = 90 ^o	a = 12,1568(4) Å α = 90 ^o b = 18,0374(6) Å β = 90 ^o c = 7,3743(2) Å γ = 90 ^o
Volume (Å ³)	762,6(3)	1588,68(8)	1617,02(9)
Z	2	4	4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,623	1,592	1,622
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	1,797	1,722	1,695
F(000)	386,0	788	820
Dimensões do cristal (mm ³)	0,47 × 0,31 × 0,15	0,27 × 0,10 × 0,03	0,22 × 0,16 × 0,10
Intervalo de θ na coleta	2,49 a 25,24	2,20 a 30,00	2,26 a 35,06
Intervalo hkl na coleta	-9 ≤ h ≤ 9, -10 ≤ k ≤ 10, -14 ≤ l ≤ 14	-26 ≤ h ≤ 26, -9 ≤ k ≤ 9, -17 ≤ l ≤ 17	-19 ≤ h ≤ 19, -29 ≤ k ≤ 29, -11 ≤ l ≤ 11
Reflexões coletadas	8058	29735	29317
Reflexões independentes	2864 [R _{int} = 0,0255]	4618 [R _{int} = 0,0275]	3660 [R _{int} = 0,0198]
Fatores de transmissão max. e mín.	0,745 e 0,591	0,950 e 0,654	0,8488 e 0,7067
Método de refinamento	Matriz completa em F ²	Matriz completa em F ²	Matriz completa em F ²
Dados/Parâmetros	2864/0/178	4618 / 0 / 181	3660 / 0 / 100
Índices finais R[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0274 wR ₂ = 0,0817	R ₁ = 0,0487 wR ₂ = 0,1049	R ₁ = 0,0260 wR ₂ = 0,0737
Índices R (todos os dados)	R ₁ = 0,0326 wR ₂ = 0,0852	R ₁ = 0,0587 wR ₂ = 0,1082	R ₁ = 0,0288 wR ₂ = 0,0755
Picos max. e mín.	0,38 e -0,46	0,998 e -0,664	0,898 e -0,269



(A)



(B)



(C)

Figura 73. Estruturas moleculares resolvidas por difração de raios X dos complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida. **[A]** $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, **[B]** $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e **[C]** $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

Todas as estruturas obtidas foram condizentes com os resultados indicados pela análise elementar CHN, confirmando a presença de um átomo de cobre, uma molécula de ligante e dois íons cloretos para cada um dos compostos de coordenação. Para o composto $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, foram identificadas duas moléculas de água de hidratação, enquanto que para os demais complexos de cobre com ligantes contendo grupos amida observou-se a presença de uma molécula de água coordenada.

Uma estrutura molecular obtida por difração de raios X para o composto de cobre com ligante BCEN foi apresentada por CHAO e colaboradores em 2008, no entanto a análise por difração de raios X de monocristal apresentado neste trabalho indicou que as estruturas moleculares não são as mesmas. Embora o modo de coordenação do ligante BCEN seja muito semelhante, uma diferença significativa é observada em relação à neutralização do complexo. Esse fato é resultante da diferença de 0,1 Å na distância entre o centro de cobre e o íon cloreto quando comparado com o complexo anteriormente relatado. Sendo assim, considera-se que a interação de Cu-Cl em $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é iônica, enquanto CHAO sugeriu uma interação covalente. A estrutura molecular de um complexo de cobre obtida com perclorato de cobre (II) foi também reportada anteriormente (HAY, et al, 1997). Neste composto o íon de cobre (II) apresentou uma geometria quadrática plana e os ânions percloratos mostraram uma fraca interação com o centro metálico. Além dessas diferenças, também verificou-se que o grupo espacial apresentado pelo complexo com íons cloretos descrito na literatura foi monoclinico ($P2_{1/n}$), enquanto que o complexo sintetizado neste trabalho apresentou uma geometria triclinica (P-1).

Enquanto o complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentou uma geometria quadrática plana, os complexos de cobre sintetizados com os ligantes contendo as diaminas cíclicas mostraram uma geometria piramidal quadrática. Sendo suas estruturas descritas pela primeira vez neste trabalho.

O complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentou um conjunto de coordenação N_2O_2 , enquanto os complexos $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ mostram um ambiente N_2O_3 , sendo esta mudança resultado da presença das moléculas de H_2O na posição axial nos complexos $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. Pode-se observar na **Tabela 14** que os complexos com geometria piramidal

quadrática possuem uma ligação em posição axial mais longa e quatro ligações mais curtas no plano equatorial. Esta distorção tetragonal é uma consequência da configuração d^9 , resultando em uma distorção *Jahn-Teller*, com alongamento do eixo z. Esse efeito se caracteriza pela quebra da degenerescência dos orbitais d , levando a distorções na geometria do complexo.

Os ligantes BPAP e BPAH mostraram o mesmo modo de coordenação do ligante BCEN, visto que as médias dos comprimentos de ligação são semelhantes para os três complexos sintetizados [1,976 Å (BCEN) vs. 1,996 Å (BPAP) vs. 1,984 (BPAH)]. Esse fato indica que a mudança da unidade etilenodiamina para as unidades piperazina e homopiperazina não possui influência significativa sobre as distâncias das ligações observadas. Por outro lado, a unidade piperazina induz uma diminuição significativa no ângulo de ligação N-Cu-N [74,43(11)°] quando comparada com a unidade etilenodiamina [85,31(8)°]. Este efeito é resultante da menor flexibilidade da unidade piperazina, quando comparada as demais unidades centrais, resultando ainda, no aumento do ângulo entre os átomos de O-Cu-O do complexo [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂ [91,88(9)°].

Os valores do parâmetro τ para os complexos indicam que [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O e [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂ não são simétricos, enquanto o complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ mostra um plano de simetria, sendo este formado pelos átomos de O1W-Cu1-C2.

Tabela 14. Distâncias de ligação [Å] e ângulos [°] selecionados para os complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.

	[Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O	[Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂	[Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂
Cu(1)-O(1)	1,9631(15)	1,942(2)	1,9640(7)
Cu(1)-O(2)	2,0063(16)	1,955(2)	1,9640(7)
Cu(1)-N(1)	2,0121(19)	2,010(3)	2,0057(9)
Cu(1)-N(2)	2,0037(19)	1,997(3)	2,0057(8)
Cu(1)-O(1W)	-	2,218(2)	2,2469(12)
O(1)-Cu(1)-O(2)	87,09(7)	91,88(9)	87,54(4)
O(1)-Cu(1)-N(2)	168,50(8)	167,28(11)	168,66(4)
O(2)-Cu(1)-N(2)	94,26(7)	95,51(10)	94,73(3)
O(1)-Cu(1)-N(1)	94,25(7)	95,60(10)	94,73(3)
O(2)-Cu(1)-N(1)	175,39(7)	161,73(11)	168,66(4)
N(2)-Cu(1)-N(1)	85,31(8)	74,43(11)	80,94(5)
O(1)-Cu(1)-O(1W)	-	93,86(10)	96,09(3)
O(2)-Cu(1)-O(1W)	-	91,62(10)	96,09(3)
N(2)-Cu(1)-O(1W)	-	96,27(10)	94,71(4)
N(1)-Cu(1)-O(1W)	-	104,44(11)	94,71(4)

Devido à presença dos grupos amida, das moléculas de água e dos íons cloretos na composição química dos complexos, verificou-se por difração de raios X a presença de várias ligações de hidrogênio entre as unidades terminais $-NH_2$ e moléculas de água e íons cloreto, resultando em diferentes arranjos tridimensionais (**Figura 74**).

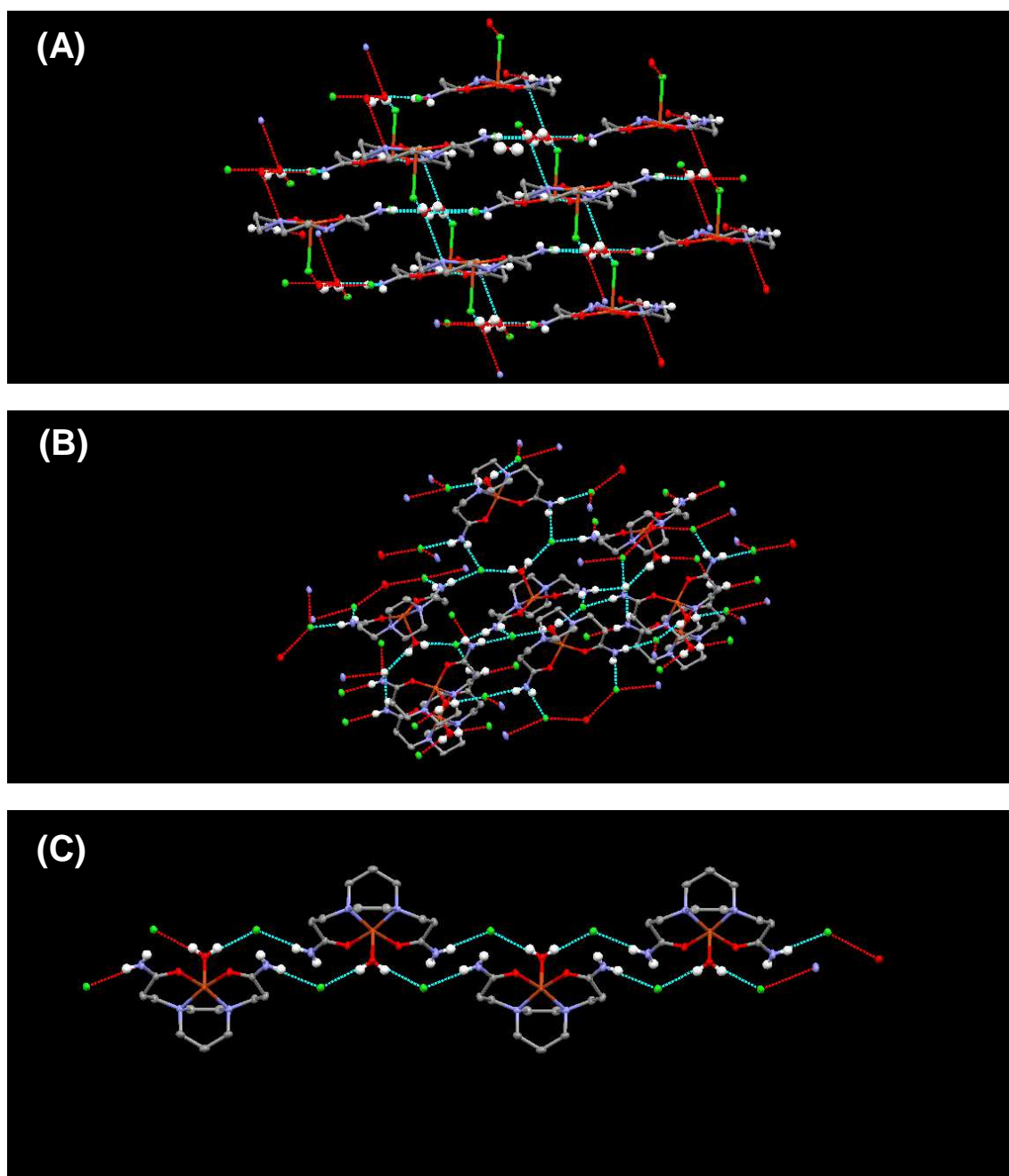


Figura 74. Empacotamentos dos complexos contendo grupos amida obtidos por difração de raios X. **[A]** $[Cu(BCEN)Cl_2 \cdot 2H_2O]$, **[B]** $[Cu(BPAP)H_2O]Cl_2$ e **[C]** $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$.

Além da resolução das estruturas por difratometria de raios X e análise de suas composições elementares, foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho para os complexos de cobre (II). No espectro de infravermelho do complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 75**) são observadas as bandas características do ligante BCEN. Dentre elas, as bandas em 3295 e 3154 cm^{-1} correspondem ao estiramento axial das ligações N-H das amidas primárias. A diminuição do número de onda da banda referente às ligações C=O do ligante para o complexo indica a coordenação do ligante BCEN pelos átomos de oxigênio da carbonila. Essa redução de 1693 cm^{-1} para 1653 cm^{-1} é proveniente do enfraquecimento das ligações C=O após a coordenação com o átomo de cobre (**Tabela 15**). Também se observou uma redução significativa para o estiramento axial da ligação N-H da amina secundária, sendo esta redução de 114 cm^{-1} (3268 para 3154 cm^{-1}), a qual indica a coordenação dos átomos de nitrogênio das aminas com o centro de cobre (II). Porém, assim como observou-se no espectro de infravermelho do ligante (**Figura 37**) as bandas referentes as aminas e amidas foram sobrepostas em 3154 cm^{-1} . O empacotamento dos complexos verificado por difração de raios X indica a formação de ligações de hidrogênio envolvendo os grupos $-\text{NH}_2$. Esse fato é comprovado pela diminuição dos números de onda das bandas referentes às deformações angulares dos grupos $-\text{NH}_2$ ($\nu_{\text{angular}}\text{NH}_2$) e às deformações angulares fora do plano de ligações NH ($\nu_{\text{angular}}\text{NH}_{\text{fora do plano}}$) apresentadas na **Tabela 15**.

De modo similar ao apresentado anteriormente, os espectros de infravermelho dos complexos $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**Figura 75**) indicaram bandas características de seus respectivos ligantes. Das quais, as bandas entre 3330 e 3000 cm^{-1} indicam a presença das ligações N-H das amidas primárias. A diminuição do número de onda das bandas referentes aos estiramentos das ligações C=O dos ligantes em relação aos complexos confirma a coordenação das moléculas de BPAP e BPAH pelos átomos de oxigênio da carbonila (**Tabela 15**). Também foram observadas alterações nos números de onda referentes às deformações angulares dos grupos $-\text{NH}_2$ ($\nu_{\text{angular}}\text{NH}_2$) e às deformações angulares fora do plano de ligações NH ($\nu_{\text{angular}}\text{NH}_{\text{fora do plano}}$) confirmando o aumento das ligações de hidrogênio nas estruturas dos complexos.

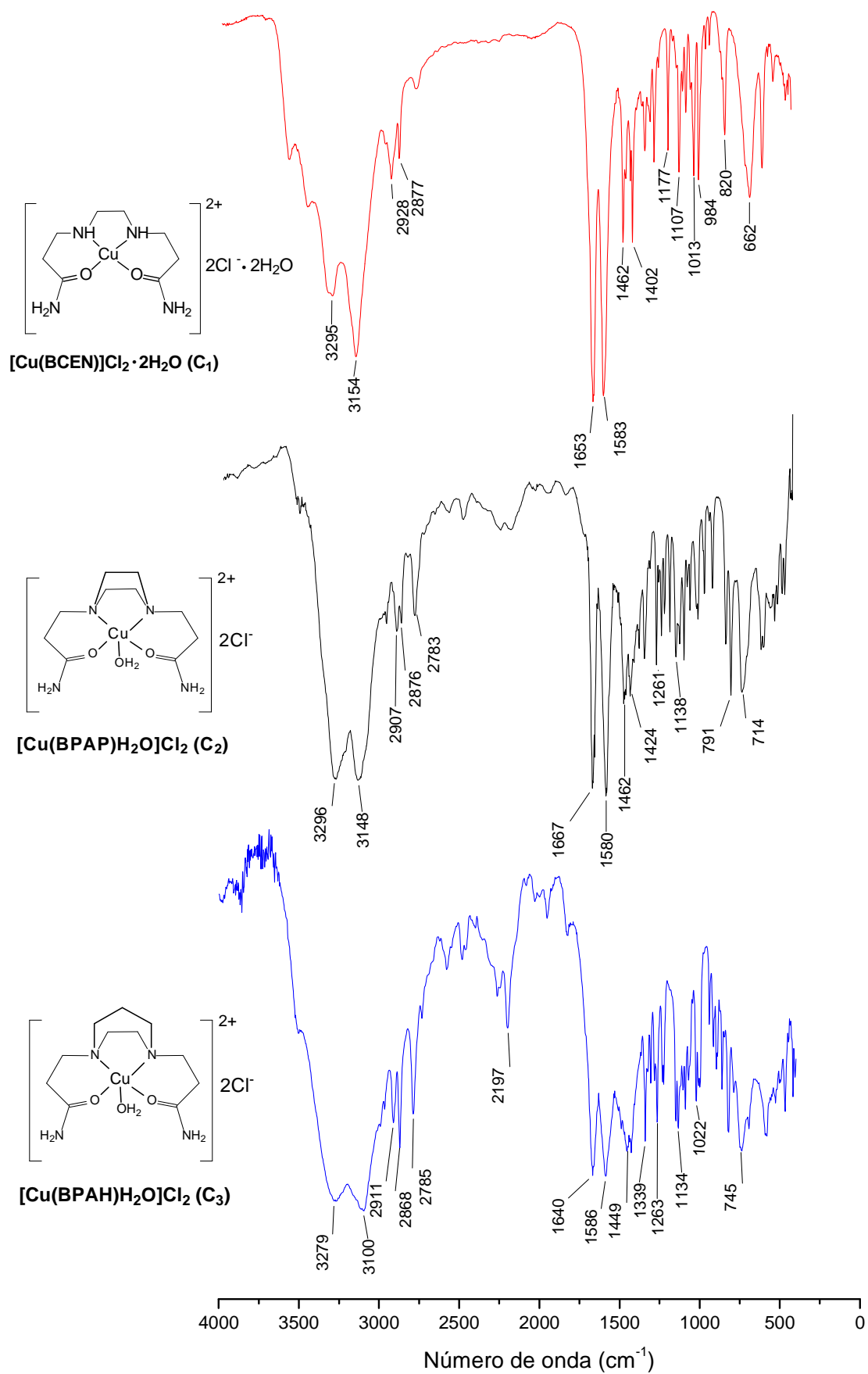


Figura 75. Espectros de infravermelho dos complexos de cobre com ligantes contendo grupos amida.

Tabela 15. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos ligantes contendo grupos amida e seus respectivos complexos de cobre (II).

Ligantes		Complexos
Atribuição	BCEN (cm ⁻¹)	[Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O
vNH _{amina}	3268	3154
vNH _{amida}	3077 e 3268	3154 e 3295
vC=O	1694	1653
V _{angular} NH ₂	1663	1583
vC-N	1402 e 1449	1402 e 1462
vC-H	2962, 2861 e 2841	2928 e 2877
V _{angular} NH _{fora do plano}	735	662
Atribuição	BPAP (cm ⁻¹)	[Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂
vNH _{amida}	3383, 3293, 3210 e 3077	3296 e 3148
vC=O	1686 e 1655	1667
V _{angular} NH ₂	1622	1580
vC-N	1443 e 1446	1462 e 1424
vC-H	2974, 2942, 2901, 2828 e 2798	2907, 2876 e 2783
V _{angular} NH _{fora do plano}	733	714
Atribuição	BPAH (cm ⁻¹)	[Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂
vNH _{amida}	3279 e 3152	3279 e 3100
vC=O	1667	1640
V _{angular} NH ₂	1667	1586
vC-N	1416	1449
vC-H	2930 a 2852	2911, 2868 e 2786
V _{angular} NH _{fora do plano}	787	745

Os dados anteriormente descritos foram utilizados para caracterizar os complexos [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O, [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂ e [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ em estado sólido. No entanto, torna-se de grande valia avaliar as estruturas dos compostos de coordenação sintetizados em solução, principalmente nos meios empregados nos testes biológicos, visto que uma leve alteração na estrutura dos compostos pode influenciar drasticamente as propriedades biológicas destes. Com este fim, foram

utilizadas as análises de espectroscopia na região do UV-Vis, voltametria cíclica, condutividade molar, espectrometria de massas por ionização do tipo *eletrospray* (ESI-EM) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Os dados de absorção na região do UV-Vis para os complexos de cobre (II) contendo grupos amida e para o cloreto de cobre (II) foram coletados em água e em DMSO (**Figuras 76 a 79**), sendo estes apresentados na **Tabela 16**. Os complexos exibiram apenas uma única transição na região do visível, cujos valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) são típicos de transições *d-d*. É possível verificar que nos complexos $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$, o máximo de absorção é quase independente do solvente empregado. No entanto, o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ mostra um comportamento distinto. Na solução de DMSO, a transição ocorre à menor energia (781 nm) quando comparado com a transição observada em solução aquosa (639 nm), o que indica geometrias de coordenação distintas ou ambientes diferentes em torno do centro do cobre (II) nos solventes analisados.

Tabela 16. Dados de espectroscopia na região do UV-Vis para os complexos $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$, $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ e $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em água e DMSO.

Compostos	$\lambda(\text{nm}) / \epsilon (\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$			
	DMSO		H ₂ O	
	λ	ϵ	λ	ϵ
$[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	655	100	652	112
$[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$	781	162	639	238
$[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$	643	160	630	143
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	937	960	813	136

Por outro lado, é possível afirmar que em água o modo de coordenação dos três complexos é semelhante. O máximo de absorção em água está na região típica de complexos de cobre com geometria pseudo-octaédrica (550-700 nm) contendo ambiente coordenação N_2O_2 no plano equatorial e moléculas de água no eixo axial. Os compostos com geometria quadrática plana normalmente absorvem em comprimento de onda menor do que os observados para as espécies pseudo-octaédrica (TABBI, et al., 2013). Portanto, é possível afirmar que em solução aquosa os complexos apresentaram geometria pseudo-octaédrica, com duas moléculas de água coordenadas no eixo z. Por outro lado, em solução de DMSO, propõe-se que o

complexo $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ exibe uma geometria com cinco átomos coordenados ao centro metálico, enquanto os demais complexos apresentam seis.

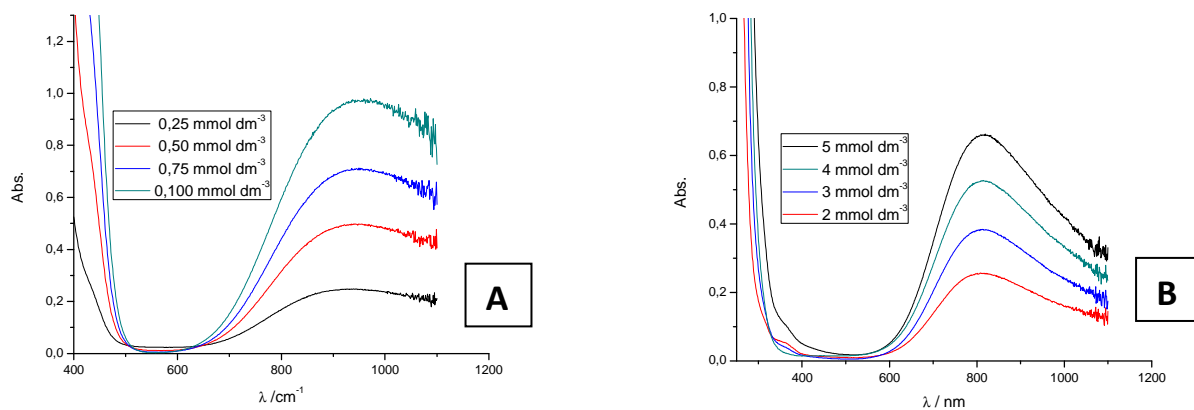


Figura 76. Espectro eletrônico do $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em DMSO [A] e em água [B].

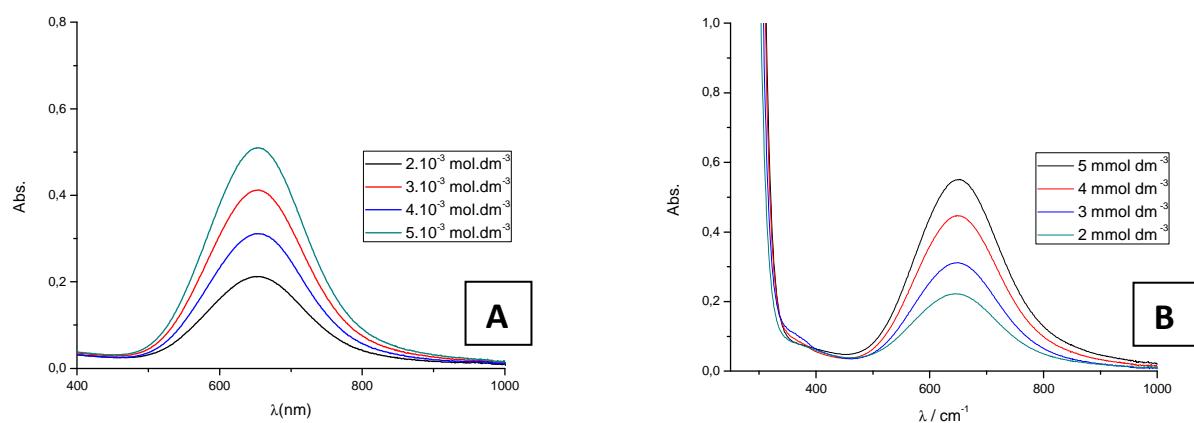


Figura 77. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em DMSO [A] e em água [B].

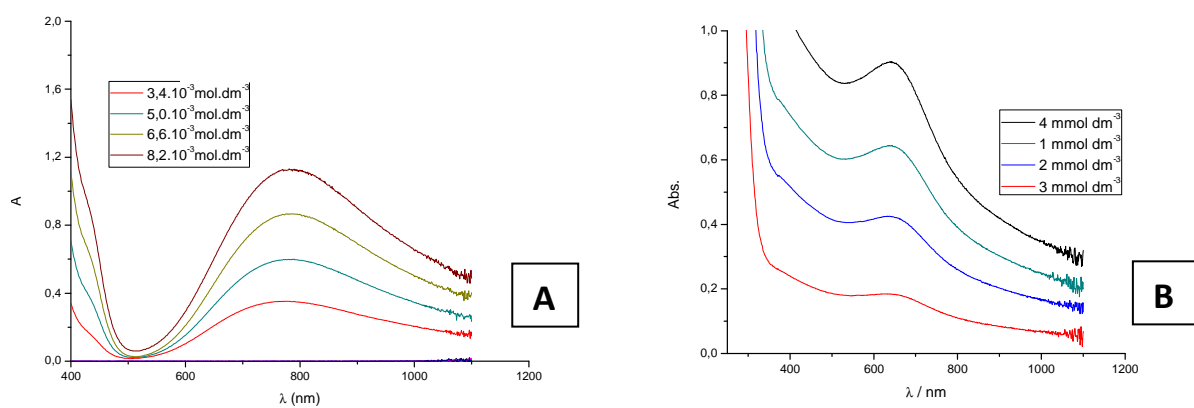


Figura 78. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ em DMSO [A] e em água [B].

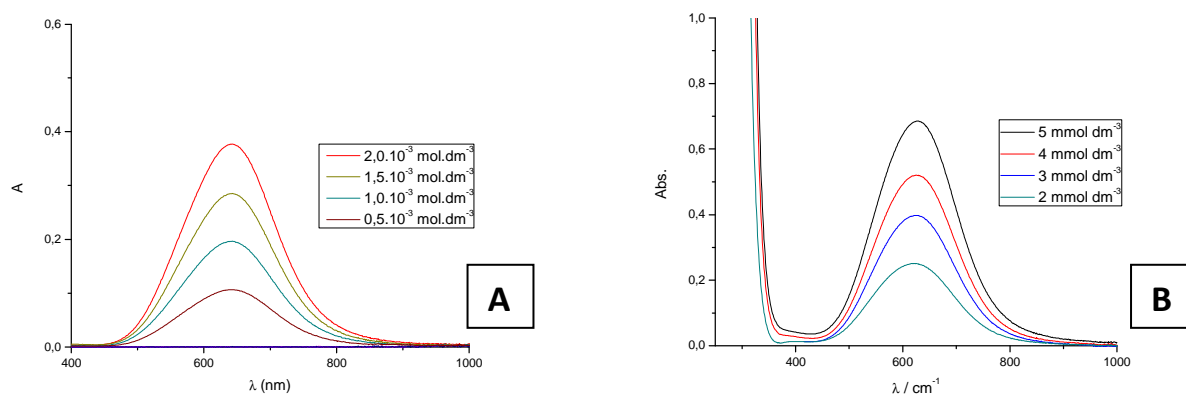


Figura 79. Espectro eletrônico do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ em DMSO [A] e em água [B].

Prenești e colaboradores propuseram a equação ($\lambda_{\text{max}} = 10^3 / \sum_{i=1}^n n_i \bar{v}_i$) para estimar o λ_{max} apresentado por complexos de cobre com diferentes átomos doadores no plano equatorial e uma molécula de água na posição axial, na referida equação n é igual ao número de grupos doadores na posição equatorial ($4 \geq n \geq 1$) e \bar{v}_i representa a contribuição individual de cada grupo para o campo ligante do complexo (PRENEȘTI, et al., 1999). Considerando esta equação, o λ_{max} apresentado pelos complexos seria 622 nm, o que é próximo dos dados observados para complexos em solução aquosa. A pequena diferença observada pode ser atribuída ao efeito dos ângulos de ligação do plano equatorial e à proximidade de moléculas de água que interagem no eixo axial com o centro de cobre.

As medidas condutimétricas para os compostos de cobre (II) foram realizadas em DMSO com concentração de composto de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$. Os valores observados são apresentados na **Tabela 17**. Por meio desses dados verificou-se que as condutividades molares dos compostos de coordenação são relativamente próximas, indicando que todos os complexos em DMSO são eletrólitos do tipo 1:2 (GEARY, 1971). Estes resultados estão de acordo com o esperado, visto que em estado sólido os cloretos não estão coordenados aos centros metálicos, sendo assim dificilmente essa coordenação ocorreria em DMSO.

Tabela 17. Resultados da análise de condutividade molar dos compostos de cobre (II) com ligantes contendo amida.

Condutividade molar (Λ_M) / ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)		
[Cu(BCEN)]Cl ₂ •2H ₂ O	[Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂	[Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂
122	137	161

Estudos das propriedades redox dos complexos foram realizados pela técnica de voltametria cíclica. Os resultados obtidos indicaram que os complexos [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O e [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ apresentam comportamentos redox similares, sendo estes considerados processos irreversíveis. Estes complexos apresentaram, respectivamente, processos catódicos em -1,093 e -1,065V vs Fc/Fc⁺ e processos anódicos em -0,115 e -0,073 V vs. Fc/Fc⁺. Por outro lado o complexo [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂ apresentou um par redox *quasi*-reversível com potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de -0,220 V vs. Fc/Fc⁺ (**Figura 80**).

Os dados eletroquímicos, assim como os observados pela análise de UV-Vis, sugerem que os complexos [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O e [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ têm ambiente de coordenação semelhantes em DMSO, diferindo do complexo [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂. Complexos de cobre (II) coordenados por grupos N₂O₂ mostram um potencial redox muito negativo quando exibem uma geometria pseudo-octaédrica (TABBIA, et al., 2013), como os potenciais observados para os complexos [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O e [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂. Por outro lado, a variação do potencial para um valor menos negativo leva a indicação de uma geometria piramidal de base quadrada, como observado para o complexo [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂. Além deste fato, a presença dos processos redox irreversíveis para os complexos [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O e [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ indica que ocorre mudança no número de coordenação em torno do átomo central, induzido pelo processo redox.

Portanto, é possível sugerir que o ligante BPAP mostra um maior impedimento espacial do que os ligantes BCEN e BPAH, permitindo a coordenação de apenas uma molécula de DMSO com o centro de cobre (II), enquanto que na presença dos ligantes BCEN e BPAH, duas moléculas de DMSO podem interagir com o centro metálico.

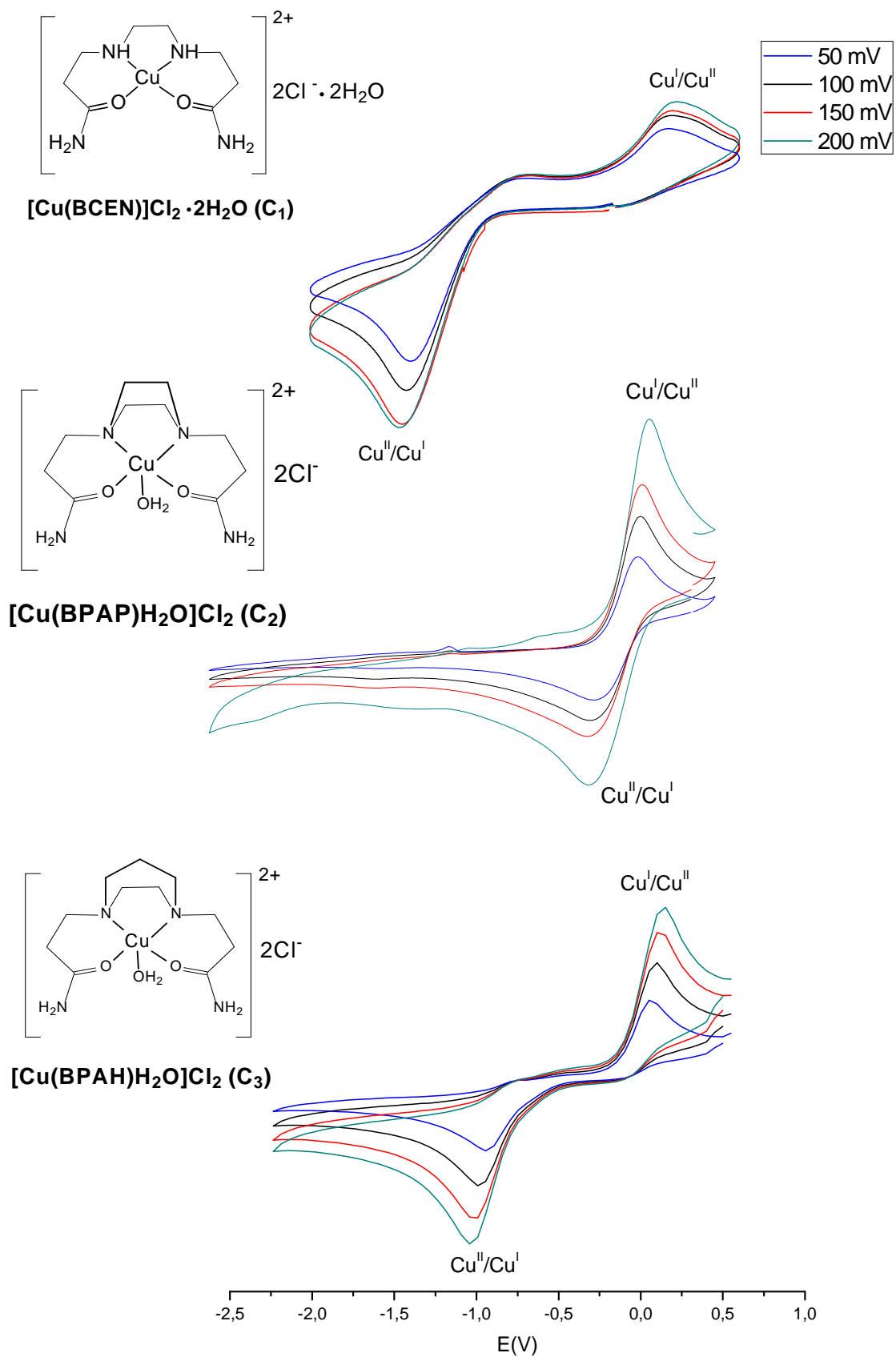


Figura 80. Voltamogramas cíclicos dos complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida.

A análise de espectrometria de massas com ionização por *eletrisplay* (ESI-MS) foi utilizada para a caracterização dos compostos de cobre com ligantes contendo grupos amida em uma mistura de água e metanol (1:1). O espectro de massas para o complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 81**) apresentou nove grupos de sinais com diferentes razões carga/massa, dentre estes destacam-se os sinais 101,1; 132,5; 181,0; 264,1 e 300 m/z . O pico base é observado em m/z 132,5 e refere-se ao cátion divalente que contém uma unidade do ligante e um átomo de cobre (II), $[\text{Cu}(\text{BCEN})]^{2+}$. Os demais sinais analisados apresentaram perfis isotópicos característicos de íons monovalentes, com destaque para o sinal m/z 300, o qual é referente ao cátion do complexo com um átomo de cloro coordenado $[\text{Cu}(\text{BCEN})\text{Cl}]^+$. Todos os sinais apresentados estão de acordo com os perfis isotópicos dos íons apresentados, confirmando as propostas realizadas para os íons mais abundantes (**Anexos 8 a 12**).

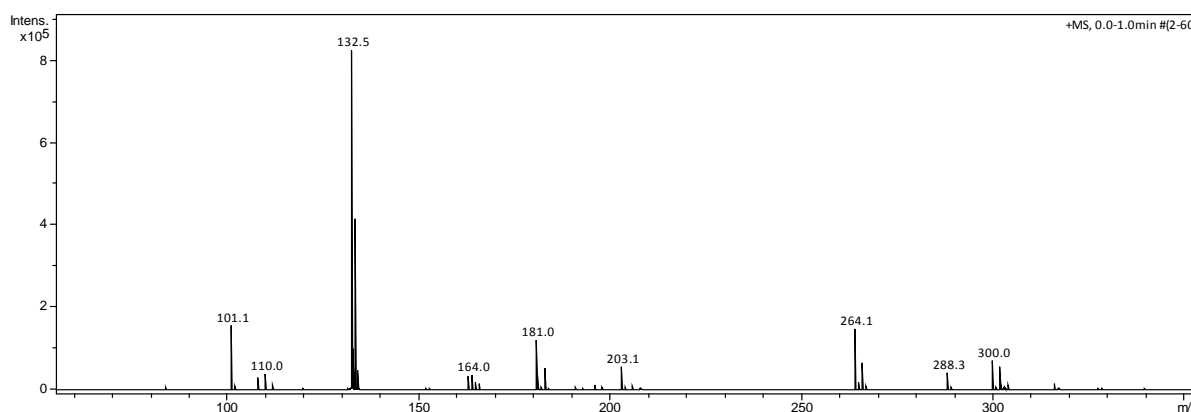


Figura 81. Resultados de ESI(+)-MS para o complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

As análises de ESI(+)-MS/MS para os principais sinais confirmaram as propostas realizadas anteriormente, visto que os sinais gerados integram as estruturas dos íons analisados. O sinal m/z 300 gerou sinais em m/z 264,1 e 132,5. A mesma análise para o sinal m/z 264,1 resultou em íons com relação carga/massa de 132,5; 181,0 e 206,0, dos quais os dois primeiros são observados no espectro do complexo, enquanto o terceiro foi observado pela primeira vez. Por fim, a análise de ESI(+)-MS/MS para o sinal com m/z de 132,5 resultou na formação de vários fragmentos, dos quais os mais abundantes são observados no espectro do complexo, sendo estes os sinais 101 e 181 m/z (**Anexos 13 a 17**).

No espectro de ESI(+)-MS do composto $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**Figura 82**) foram identificadas cinco espécies catiônicas (m/z 326, 390, 753, 817 e 881). O sinal m/z de 326 corresponde ao cátion mononuclear $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{Cl}]^+$. Esse cátion é formado a partir da substituição da molécula de água por um íon cloreto no sítio de coordenação. O sinal m/z 390 corresponde ao íon $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{Cl}]^+$ com duas moléculas de metanol, gerando o íon $[\text{Cu}(\text{BPAP})(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{Cl}]^+$. Os sinais em m/z 753 e 817 são correspondentes às espécies binucleares identificadas como: $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{Cl}_3]^+$ e $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_3\text{Cl}_3]^+$, respectivamente. Acredita-se que o sinal observado em m/z 881 é correspondente a sobreposição dos sinais referentes aos íons $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_6\text{Cl}_3]^+$ e $[\text{Cu}_4(\text{BPAP})_4(\text{CH}_3\text{OH})_{12}\text{Cl}_6]^{2+}$. As propostas para estas espécies foram confirmadas através das análises dos perfis isotópicos obtidos, os quais encontram-se em anexo (**Anexos 18 a 22**). A análise de ESI(+)-MS/MS do íon com m/z 817 indicou a formação dos sinais com m/z 326 e 390, ambos previamente mencionados (**Anexo 23**).

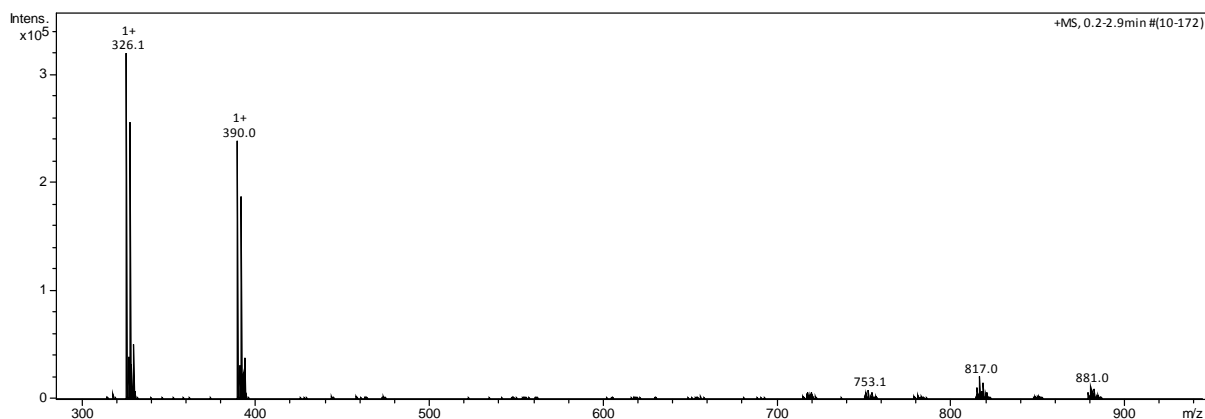


Figura 82. Resultados de ESI(+)-MS para o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

No espectro de ESI(+)-MS do composto $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ (**Figura 83**) foi identificada uma única espécie catiônica com m/z de 340. Este sinal corresponde ao cátion mononuclear $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{Cl}]^+$, o qual é formado a partir da mudança de uma molécula de água por íon cloreto no sítio de coordenação. Assim como para os sinais observados nos espectros dos compostos anteriores, a proposta para esta espécie foi confirmada através da análise do seu perfil isotópico (**Anexo 24**).

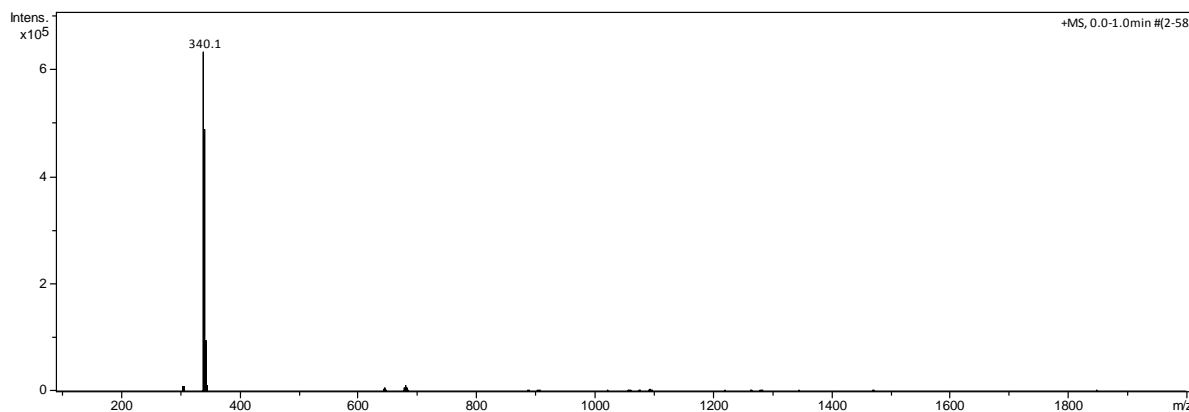


Figura 83. Resultados de ESI(+)-MS para o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

Os dados de ESI(+)-MS para o composto $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ indicam que este apresenta maior estabilidade do que os demais compostos de cobre (II), visto que em mesmas condições não foram observadas fragmentações do íon molecular. Este fato é de extrema importância para futuros estudos biológicos, pois a degradação de um composto nos sistemas teste pode reduzir a atividade deste.

Os complexos de cobre (II) contendo ligantes com grupos amida também foram estudados por ressonância paramagnética eletrônica. Os espectros de RPE e os dados obtidos na simulação dos espectros, para os complexos de cobre (II) com ligantes contendo grupos amida, são apresentados na **Figura 84** e na **Tabela 18**. Os dados obtidos indicaram um sinal típico de cobre (II) em ambiente axial simétrico com configuração eletrônica $3d^9$ e spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$. Foram observadas componentes hiperfinas paralelas e perpendiculares, resultantes da interação entre o momento magnético e o momento eletrônico do íon paramagnético (WILLIAMS, et al., 2003).

De acordo com a **Tabela 18** verifica-se que os valores de g_{\parallel} estão na faixa que indica interações covalente entre o átomo central e os átomos coordenantes presentes nas estruturas dos ligantes. De acordo com a literatura, valores de g_{\parallel} superiores a 2,3 indicam uma natureza mais iônica, enquanto valores inferiores indicam ambientes de ligação mais covalentes (KIVELSON e NIEMAN, 1961).

Os resultados da simulação indicaram que os complexos de cobre com grupo amida tornam-se hexacoordenados em solução de DMSO. Esse fato é explicado pela observação de que $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ e $A_{\parallel} > A_{\perp}$, correspondendo a íons Cu (II) localizados em centros octaédricos distorcidos (D_{4h}) alongados ao longo do

eixo z, devido ao efeito *Jahn-Teller*, sendo o seu estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ (${}^2B_{1g}$) (KALFAOGLU e KARABUTUT, 2011). Desta forma, em solução de DMSO, propõe-se que este se coordene ao metal. Acredita-se que a similaridade entre os espectros é resultado das análises serem realizadas em solução de DMSO congeladas em nitrogênio líquido, não sendo identificadas as diferenças estruturais apresentadas pelas técnicas de espectroscopia eletrônica e voltametria cíclica.

Uma razão entre $g_{//}$ e $A_{//}$ entre 105 e 135 cm indica que os átomos que compõem o plano equatorial formam uma unidade plana quase perfeita (FAGGI, et al., 2015 e TERRA, 2016). Os valores obtidos destas razões para os complexos de cobre (II) são apresentados na **Tabela 18** e indicam que, em solução de DMSO a 100 K todos os complexos de cobre com grupos amida apresentam o plano equatorial sem distorções tetraédricas.

Tabela 18. Dados da simulação dos espectros de RPE para os compostos de cobre com ligantes contendo amida.

	g_{\perp}	$g_{//}$	A_{\perp} (MHz)	$A_{//}$ (MHz)	$A_{//}$ (cm^{-1})	$g_{//}/A_{//}$ (cm)
C₁	$2,058 \pm 0,003$	$2,268 \pm 0,001$	60 ± 10	565 ± 5	0,0188	120
C₂	$2,054 \pm 0,001$	$2,248 \pm 0,001$	60 ± 5	555 ± 2	0,0185	122
C₃	$2,0535 \pm 0,0002$	$2,246 \pm 0,001$	70 ± 5	565 ± 2	0,0188	119

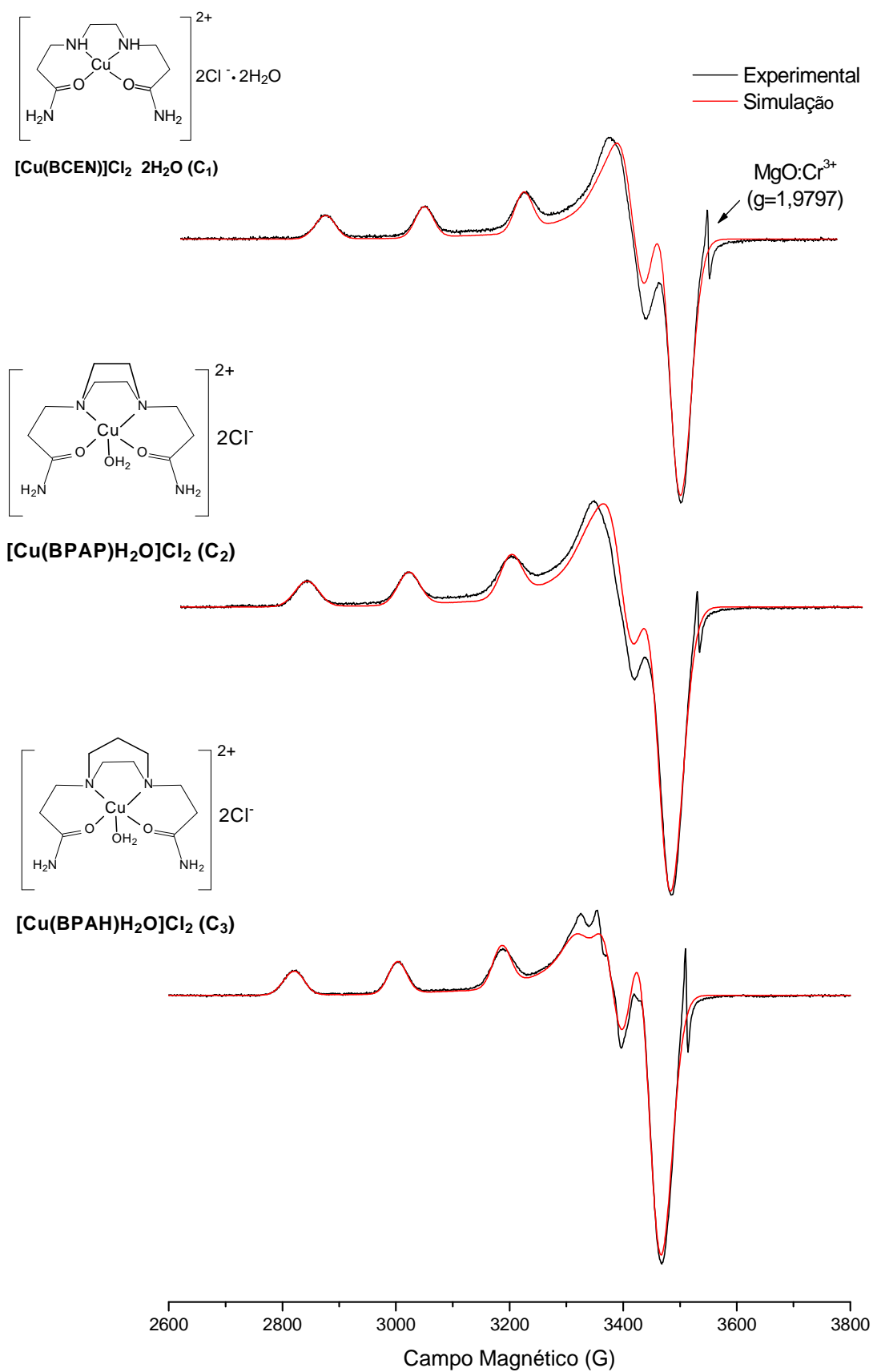


Figura 84. Espectros de ressonância paramagnética eletrônica para os complexos de cobre (II) com ligantes com grupos amida em solução de DMSO, a 100 K, sendo linha preta para espectros experimentais e linha vermelha para espectros simulados. O MgO:Cr (III) (g= 1,9797) foi utilizado como sinal de referência.

5.7. Sínteses dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes derivados do H₂Salen

Inicialmente realizou-se as reações entre três ligantes derivados do H₂Salen [H₂Salam (L₄), H₂Salandiα (L₅) e H₂Salandiβ (L₆)] com quantidades equimolares do sal de cobre (II). No entanto, verificou-se por análise elementar de CHN que as sínteses com os ligantes contendo o grupo naftol resultavam em complexos binucleares. Sendo assim, preferiu-se alterar a estequiometria entre o ligante e o metal para 1:2, como apresentado na metodologia descrita anteriormente. Acredita-se que este fato está associado a dois fatores, sendo o primeiro devido à presença de mais dois grupamentos nucleofílicos (-OH) comparado ao ligante H₂Salam, além da inserção de dois grupos volumosos (naftóis), para cada molécula de H₂Salam. Esses grupos resultam em um aumento do efeito estérico, levando à formação de complexos binucleares. As estruturas propostas para os complexos são apresentadas na **Figura 85**.

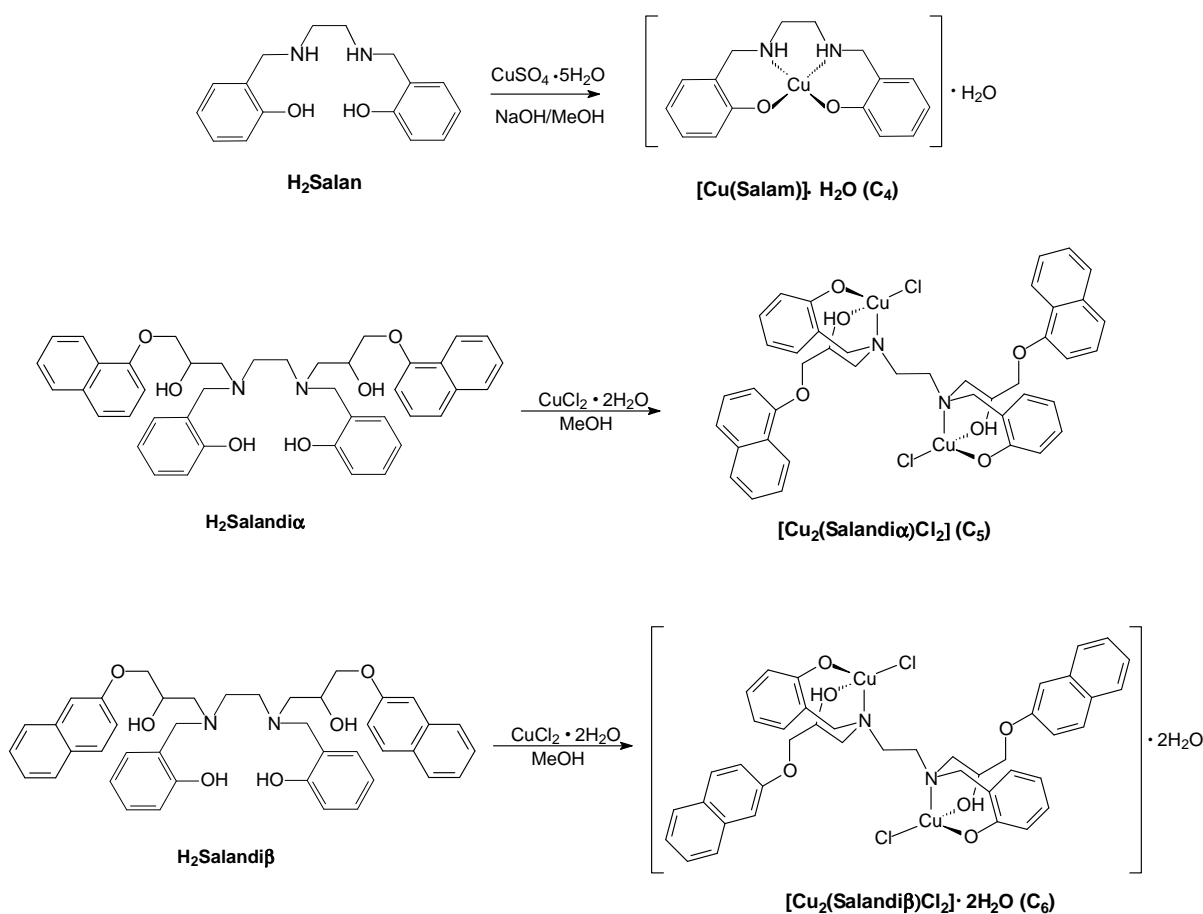


Figura 85. Esquema de sínteses dos complexos de cobre (II) com ligantes derivados do H₂Salen.

5.8. Caracterizações dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes derivados do H₂Salen

Os dados das análises elementares para os complexos de cobre com ligantes derivados do H₂Salen são apresentados na **Tabela 19**, os quais são condizentes com as estruturas de coordenação apresentadas acima. Essa análise indicou que o complexo formado pelo ligante H₂Salam apresenta uma unidade do ligante, um centro metálico de cobre e uma molécula de água de hidratação, sendo estes dados confluentes com os obtidos por Aidym e colaboradores em 2011. Para os compostos de coordenação com grupos naftóis sugere-se a presença de dois centros metálicos de cobre e uma molécula de ligante e dois átomos de cloro para cada composto de coordenação. No caso do complexo com ligante H₂Salandiβ também sugere-se a presença de duas moléculas de água como solventes de hidratação.

Tabela 19. Resultado da análise elementar para os complexos de cobre (II) derivados do H₂Salen.

Complexos	C _{exp.} /C _{calc.} (%)	H _{exp.} /H _{calc.} (%)	N _{exp.} /N _{calc.} (%)	Fórmula Molecular	MM (g.mol ⁻¹)
C₄	54,47 / 54,61	5,78 / 5,73	8,01 / 7,96	C ₁₆ H ₂₀ CuN ₂ O ₃	351,89
C₅	59,08 / 58,79	5,63 / 5,38	3,41 / 3,12	C ₄₄ H ₄₈ Cl ₂ Cu ₂ N ₂ O ₆	898,87
C₆	56,64 / 56,53	5,40 / 5,61	3,24 / 3,00	C ₄₄ H ₅₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₂ O ₈	934,90

Com base nos dados das análises elementares de CHN foi possível determinar as fórmulas moleculares para os complexos **C₄**, **C₅** e **C₆** conforme apresentadas na tabela anterior.

Além da determinação da composição elementar de CHN dos compostos de coordenação de cobre (II) derivados do H₂Salen, também foram obtidos dados de espectroscopia de infravermelho para os três compostos, os quais são apresentados na **Figura 86** e comparados com os dados de espectroscopia na região do IV obtidos para os ligantes (**Tabela 20**).

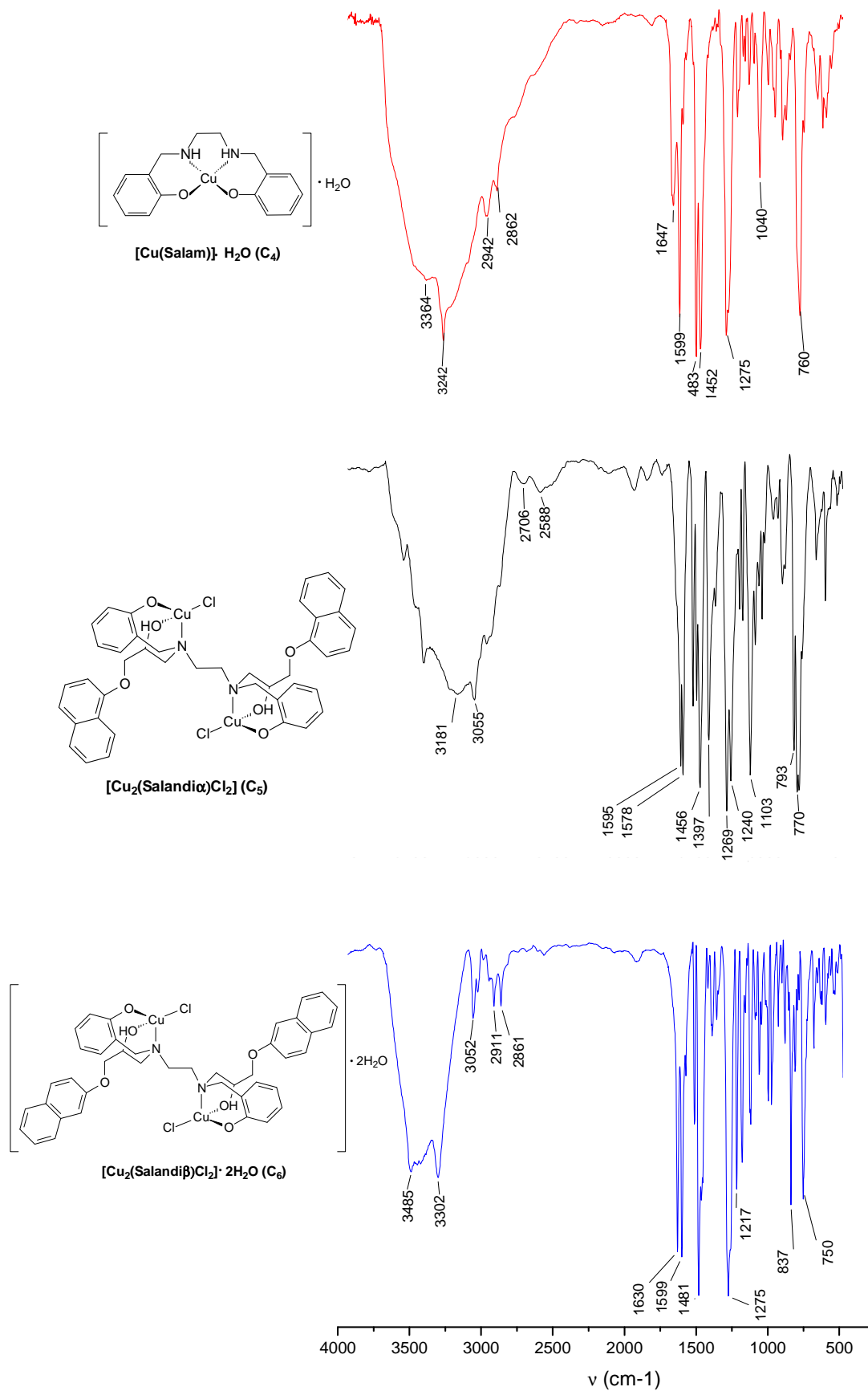


Figura 86. Espectros de infravermelho dos complexos de cobre (II) com ligantes derivados do H₂Salen.

Tabela 20. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho dos ligantes derivados do H₂Salen e seus respectivos complexos de cobre (II).

Ligantes		Complexos
Atribuição	H ₂ Salam (cm ⁻¹)	[CuSalam]•H ₂ O
vOH	2500-3500	2500-3500
vNH	3422	3242
vCH _{aromático}	3043	*
v _{as} CH ₂	2966	2942
v _s CH ₂	2887, 2854	2862
vC-N	1485	1483
Atribuição	H ₂ Salandiα (cm ⁻¹)	[Cu ₂ SalandiαCl ₂] (cm ⁻¹)
vOH	3454	3000-3500
vCH _{aromático}	3049	*
v _{as} CH ₂	2943, 2926	*
v _s CH ₂	2881, 2854	2706
vC-N	1460	1456
vC _{arom.} -O-C _{alif.}	1273	1269
Atribuição	H ₂ Salandiβ (cm ⁻¹)	[Cu ₂ Salandiβ(H ₂ O) ₂ Cl ₂] (cm ⁻¹)
vOH	3445	3050-3500
vCH _{aromático}	3059	3052
v _{as} CH ₂	2935	2911
v _s CH ₂	2856	2861
vC-N	1473	1481
vC _{arom.} -O-C _{alif.}	1259	1275

* Sinal sobreposto pela região de vOH

Nos espectros de infravermelho dos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes derivados do H₂Salen (**Figura 86**) são observadas bandas características de seus respectivos ligantes. No entanto observa-se a intensificação de uma banda alargada na região entre 3000 e 3500 cm⁻¹, a qual corresponde ao estiramento axial das ligações O-H de moléculas de água e/ou grupos O-H das funções alcoóis presentes nos complexos com grupos naftóis. Para os complexos **C**₄ e **C**₅ os estiramentos próximos de 3000 cm⁻¹ foram sobrepostos pelas bandas fortes correspondentes ao estiramento das ligações O-H. Além desta diferença, também se observou uma redução no número de onda dos estiramentos referentes às ligações

N-H para o complexo $[\text{CuSalam}]\cdot\text{H}_2\text{O}$. Essa diminuição indica a coordenação dos ligantes pelos átomos de nitrogênio do grupo amina, resultando no enfraquecimento das ligações N-H após a coordenação com o átomo de cobre (**Tabela 20**).

Os estudos de absorção na região do UV-Vis foram realizados para os novos complexos de cobre (II) derivados da H_2Salen . Estes ensaios foram realizados exclusivamente em DMSO espectroscópico, visto que estes complexos não apresentam boa solubilidade em água.

Os espectros eletrônicos para os complexos $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 87**) apresentaram uma única banda assimétrica em 701 nm ($\epsilon = 143 \text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e 720 nm ($\epsilon = 110 \text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), respectivamente. Devido aos baixos valores de absorvidade molar observados, estas bandas são atribuídas às transições *d-d*. Os valores de comprimento de onda observados em ambos os casos, indicam uma geometria piramidal quadrática para os centros de cobre (II) de ambos os complexos, sendo resultado de coordenações de moléculas de DMSO para formar essa geometria.

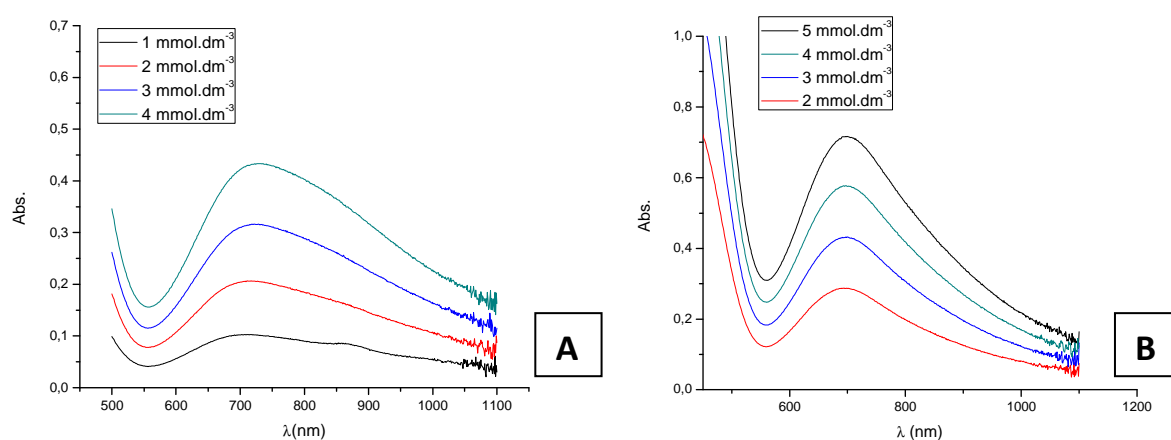


Figura 87. Espectro eletrônico para os compostos de coordenação derivados do H_2Salen com grupos naftóis em DMSO, $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ [A] e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [B].

As medidas condutimétricas para os compostos $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram realizadas em DMSO espectroscópico com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, obtendo-se $24,35 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o complexo com o ligante com o grupo naftol na posição alfa e $36,07 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para o complexo com ligante na posição beta. O baixo valor de condutividade indica a ausência de contra-

íons em ambos os complexos de cobre (II) indicando que os íons cloretos estão coordenados aos centros metálicos.

Os voltamogramas cíclicos para os complexos $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 88**) apresentam dois pares redox *quasi-reversíveis*, confirmando a presença de dois centros de cobre (II).

No voltamograma para o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ são observados dois picos catódicos referentes aos pares redox Cu(II)/Cu(I) em $-0,445 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e $-1,269 \text{ V vs Fc/Fc}^+$. Os processos anódicos referentes às oxidações dos átomos de Cu(I) gerados são observados em $-0,283 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e $-1,191 \text{ V vs Fc/Fc}^+$. As diferenças entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p) para os processos são de $0,162 \text{ V}$ e $0,078 \text{ V}$ e os potenciais de meia onda são iguais a $-0,362 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e $-1,230 \text{ V vs Fc/Fc}^+$, respectivamente.

Para o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ observa-se dois picos catódicos em $-0,432 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e $-1,218 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e dois picos anódicos em $-0,186 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e $-1,048 \text{ V vs Fc/Fc}^+$, os quais são referentes aos mesmos processos do composto de coordenação anterior. Por meio destes dados determinou-se as diferenças entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p) para o referido composto, sendo obtido valores de $0,246 \text{ V}$ e $0,170 \text{ V}$. Os potenciais de meia onda apresentados pelo composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ são iguais a $-0,309 \text{ V vs Fc/Fc}^+$ e $-1,133 \text{ V vs Fc/Fc}^+$.

Ambos os complexos tiveram seus potenciais de oxidação e redução determinados em relação ao par redox padrão (Fc/Fc^+ $0,400 \text{ V vs EPH}$), obtido separadamente em mesmas condições. Além disso, verificou-se que as análises voltamétricas são bastante similares entre os dois compostos, indicando que ambos apresentam ambientes de coordenação semelhantes em solução.

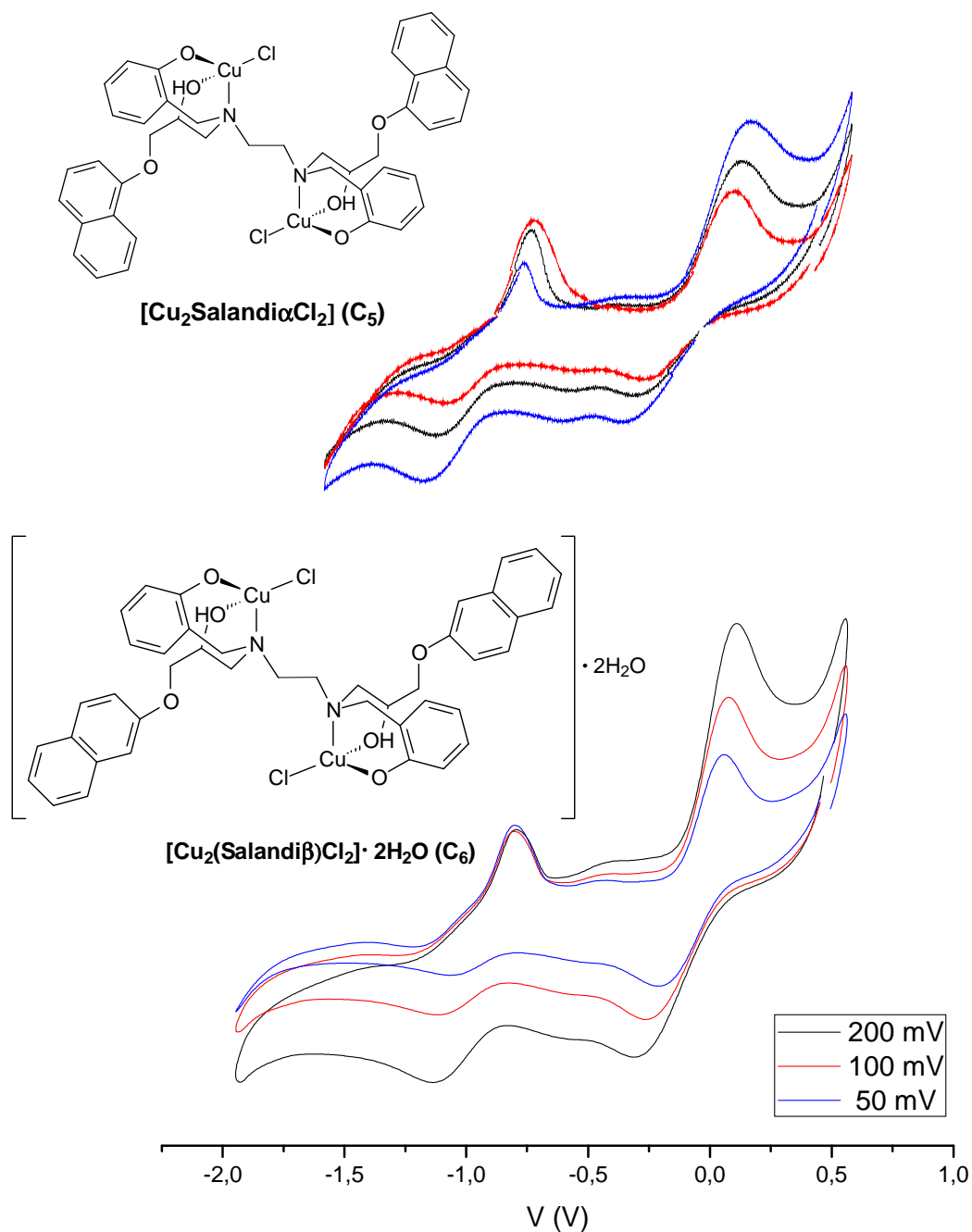


Figura 88. Voltamogramas cíclicos para os compostos de coordenação [Cu₂(Salandiα)Cl₂] e [Cu₂(Salandiβ)Cl₂]·2H₂O.

Assim como para os complexos de cobre (II) com grupamento amida, a análise de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (ESI/MS) foi utilizada para verificar o perfil de fragmentação dos compostos sintetizados em uma mistura de água e metanol (1:1). O espectro de massas para o complexo neutro [Cu₂(Salandiα)Cl₂] (**Figura 89**) apresentou seis grupos de sinais com diferentes

razões carga/massa, no entanto nenhum dos sinais observados é correspondente ao íon molecular, o que é resultado da ausência de contra-íons na estrutura geral do complexo. Dentre estes, destacam-se os sinais com m/z de 288,3; 336,2; 499,1; 673,3 e 734,2. O íon mais abundante ($m/z = 734,2$) é referente ao cátion monovalente contendo uma unidade do ligante desprotonado ($\text{HSalandi}\alpha^-$) e um íon cobre (II), o íon com sinal em m/z 673,3 corresponde a uma unidade do ligante protonada ($\text{H}_3\text{Salandi}\alpha^+$) e o íon com sinal em m/z 367,6 é referente ao cátion divalente contendo uma unidade do ligante neutro com um centro metálico de cobre (II) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{Salandi}\alpha)]^{2+}$. Os sinais em m/z 499,1 e 336,2 são correspondentes a fragmentos do complexo e do ligante, respectivamente, sendo estes caracterizados como $[\text{CuC}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_2]^+$ para o sinal em 499,1 e $(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N})^+$ para o sinal em 336,2 (**Anexos 25 a 29**). A análise de ESI-MS/MS para o sinal mais abundante ($m/z = 734,2$) não resultou na formação de nenhum outro sinal, conforme pode ser observado no **Anexo 30**.

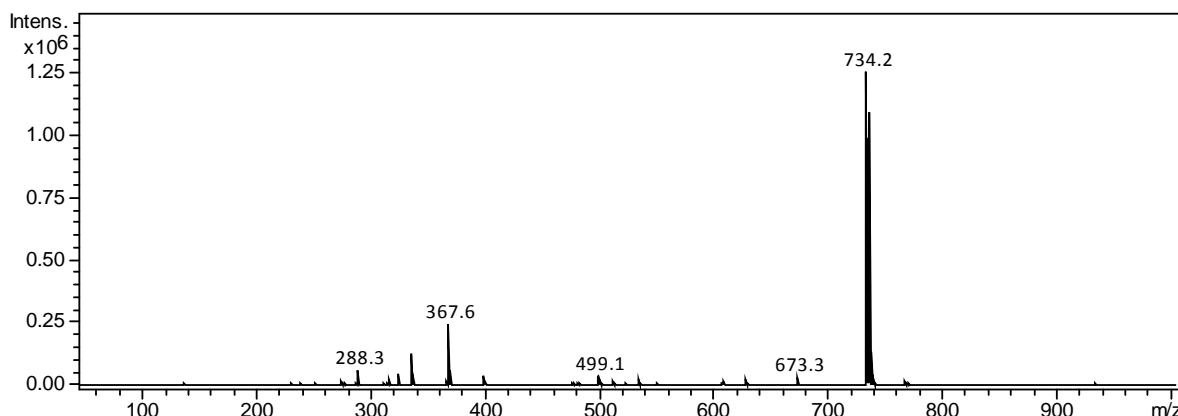


Figura 89. ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$.

O espectro de ESI-(+)-MS do composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 90**) foi bastante similar ao espectro apresentado para o composto $[\text{Cu}_2\text{Salandi}\alpha\text{Cl}_2]$, porém verificou-se uma maior abundância de fragmentos no espectro do composto contendo o grupo β -naftol. Como as análises foram realizadas em mesmas condições, acredita-se que o $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ apresenta maior estabilidade comparada ao complexo com ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$.

No espectro de ESI-(+)-MS do composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram identificadas seis espécies catiônicas (m/z 336,2; 367,6; 399,1; 567,3; 673,3 e

734,2), sendo a mais abundante a que apresentou um sinal com m/z 734,2, o qual correspondente ao cátion mononuclear $[\text{Cu}(\text{HSalandi}\beta)]^+$. Esse cátion é formado a partir da quebra de parte da molécula binuclear com perda de um átomo de cobre (II) e dois íons cloretos. Assim como para o complexo anterior não observou-se a formação do íon molecular, visto que o complexo é uma espécie neutra. O sinal em m/z 673,3 corresponde ao ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ protonado, enquanto que o sinal em m/z 367,6 é referente ao íon $[\text{CuH}_2\text{Salandi}\beta]^{2+}$, indicando a presença de um íon cobre (II) coordenado a uma molécula do ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$. Os demais íons observados são referentes à fragmentação do ligante, resultando nos íons monovalentes, $[\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5]^+$ em m/z 567,3 e $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_3]^+$ em m/z 336,2. Além destes, verificou-se a presença de um sinal referente ao complexo de cobre coordenado a uma fragmentação do ligante com m/z 399,1, sendo este referente ao íon $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N})]^+$. As ampliações dos sinais indicados acima e seus perfis isotópicos simulados são apresentados de forma comparativa em anexo (**Anexos 31 a 36**).

A análise de ESI-MS/MS para o sinal mais abundante ($m/z = 734,2$) resultou na formação de um pico com m/z 673,3, o qual corresponde à molécula do ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ protonada, conforme pode ser observado no **Anexo 37**.

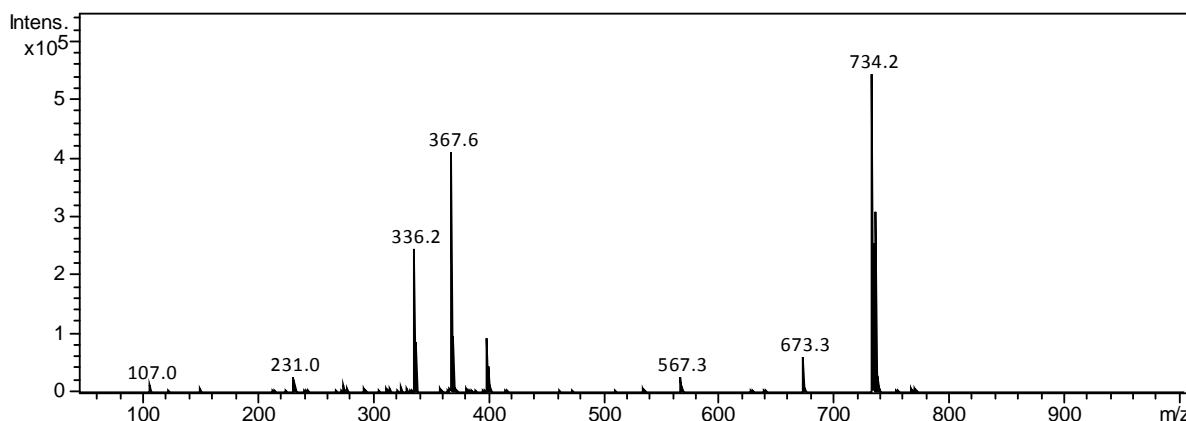


Figura 90. ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Os espectros de RPE e os dados obtidos na simulação dos espectros, para os complexos de cobre (II) com grupos naftóis são apresentados na **Figura 91** e na **Tabela 21**, respectivamente. Assim como para os complexos de cobre anteriores, os dados indicaram um sinal típico de cobre (II) em ambiente axial simétrico com configuração eletrônica $3d^9$ e spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$.

Tabela 21. Dados da simulação dos espectros de RPE para os compostos de cobre (II) com ligantes contendo grupos naftóis.

	Int.	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\perp} (MHz)	A_{\parallel} (MHz)	A_{\parallel} (cm^{-1})	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (cm)
C₅	1	$2,06 \pm 0,05$	$2,420 \pm 0,001$	70 ± 10	410 ± 10	0,0136	178
	18	$2,067 \pm 0,005$	$2,29 \pm 0,01$	35 ± 5	475 ± 5	0,0158	145
C₆	-	$2,083 \pm 0,003$	$2,425 \pm 0,002$	20 ± 10	390 ± 10	0,0130	187

Para o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ (**C₅**) houve a necessidade de realizar uma combinação de duas simulações com diferentes intensidades para que os resultados simulados e experimentais sejam os mais próximos possíveis.

De acordo com a tabela anterior verifica-se que o valor de g_{\parallel} para o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é superior a 2,3 indicando uma interação covalente entre o átomo de cobre e os átomos coordenantes mais fraca do que para o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$.

Os resultados da simulação indicaram que os complexos de cobre (II) com grupos naftóis tornam-se hexacoordenados em solução de DMSO. Esse fato é explicado devido $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ e $A_{\parallel} > A_{\perp}$, correspondendo a íons Cu (II) localizados em centros octaédricos com eixo z alongado devido ao efeito *Jahn-Teller* (D_{4h}), sendo o seu estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ (${}^2B_{1g}$) (KALFAOGLU e KARABUTUT, 2011).

Por meio da análise de RPE foi possível confirmar que os átomos de cobre (II) estão a uma distância maior do que duas ligações. Esse fato se reflete na aparência do espectro, a qual é típica de espécies mononucleares de cobre (II).

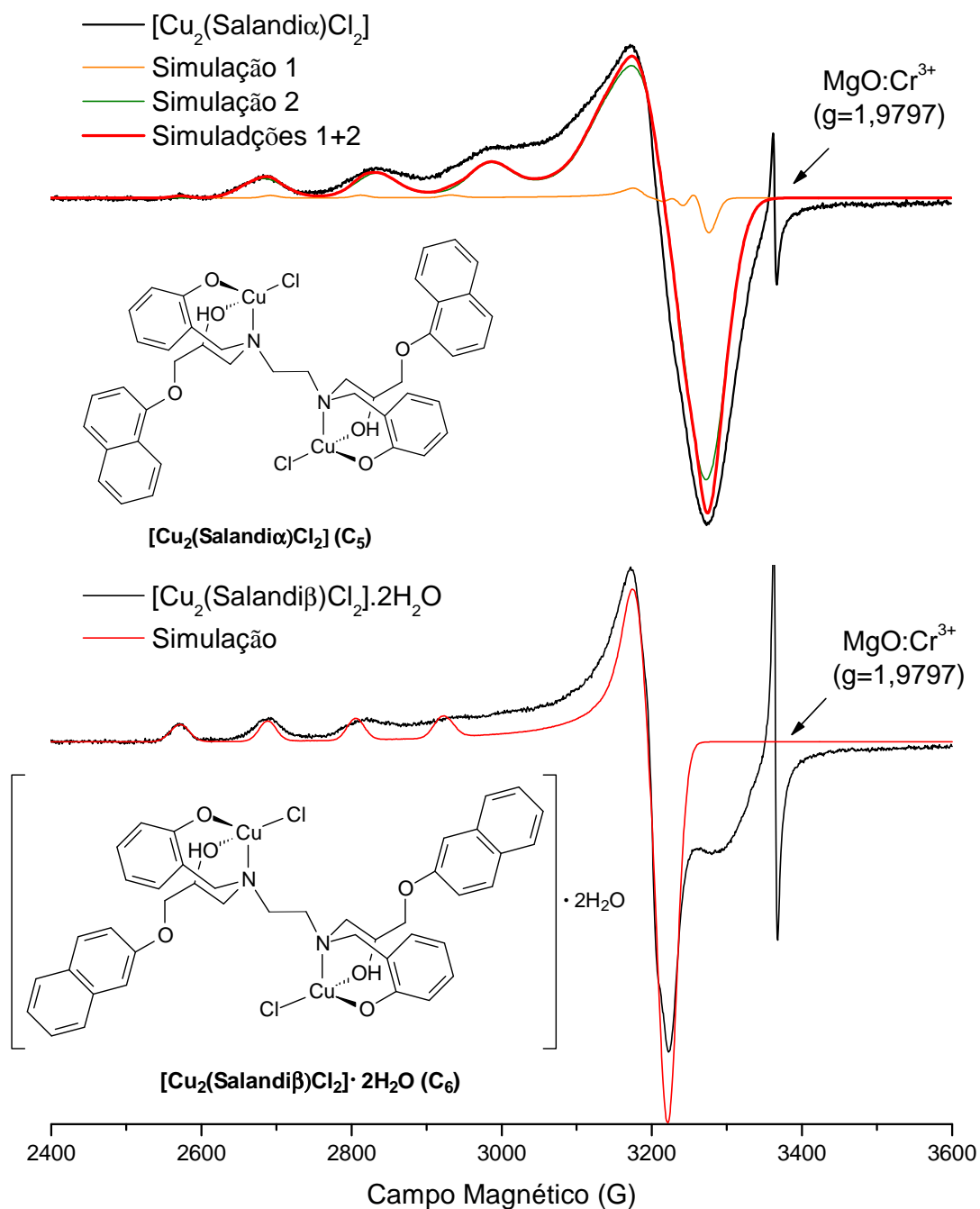


Figura 91. Espectros de ressonância paramagnética eletrônica para os complexos de cobre(II) com ligantes com grupo naftóis em solução de DMSO, a 100 K, sendo linha preta para espectros experimentais e linha vermelha para espectros simulados. O MgO:Cr (III) ($g = 1,9797$) foi utilizado como sinal de referência.

5.9. Avaliação da atividade antitumoral de compostos

5.9.1. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltretazólio)

Um dos métodos mais utilizados na verificação da viabilidade celular é o da metabolização do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltretazólio). O ensaio consiste na redução do MTT, um composto de coloração amarela, por uma enzima presente em células viáveis denominada de *succinato desidrogenase mitocondrial*, a um composto de cor púrpura característica conhecido como formazan. A mudança de cor permite a quantificação por espectrofotometria em 570 nm, gerando resultados que são proporcionais às células com metabolismo ativo (LOPES, 2012).

O teste com MTT tem por objetivo a avaliação do efeito citotóxico dos compostos. Sendo que, apenas os compostos com capacidade de reduzir de forma significativa a viabilidade de células tumorais apresentam potencial terapêutico. Dessa forma, ensaios desse tipo, que permitem uma seleção de compostos mais promissores, são efetuados inicialmente para descoberta de novos fármacos.

Neste trabalho, que visa testes iniciais quanto à atividade antitumoral de compostos de cobre (II) com diferentes ligantes *N,O*-doadores, foram selecionadas cinco linhagens tumorais, sendo três delas linhagens provenientes de células sanguíneas (MOLT-4, U937, THP-1) e duas de tumores sólidos (H460 e COLO 205). Além destas, os testes foram realizados para uma linhagem normal de células do sangue periférico (PBMC) a fim de verificar a citotoxicidade dos compostos mais ativos contra uma linhagem de células normais.

Com intuito de se obter uma comparação mais efetiva, os resultados das análises de viabilidade celular pelo método de metabolização do MTT foram convertidos em índice de citotoxicidade a 50 % (IC_{50}), ou seja, foi calculada a concentração mínima capaz de danificar e/ou causar morte celular de 50 % das células em cada análise, sendo estes apresentados na **Tabela 22**.

Tabela 22. Resultados de IC₅₀ dos ligantes, complexos de cobre (II), CuCl₂•2H₂O e Cisplatina frente às linhagens de células PBMC, H460, MOLT-4, U937, THP-1 e COLO 205 em 36 h de tratamento.

	IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)					
	H460	MOLT-04	U937	THP-1	COLO205	PBMC
Cisplatina	200 ± 1	21 ± 1	16 ± 1	12 ± 1	37 ± 1	38 ± 1*
CuCl ₂ •2H ₂ O	> 200	>200	>200	>200	>200	-
Ligante BCEN	> 200	>200	>200	>200	>200	-
Ligante BPAP	> 200	>200	>200	>200	>200	-
Ligante BPAH	> 200	>200	>200	>200	>200	-
Ligante H ₂ Salam	> 200	>200	>200	>200	>200	-
Ligante H ₂ Salandiβ	> 200	>200	>200	>200	>200	-
Ligante H ₂ Salandiα	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	-
[Cu(BCEN)]Cl ₂ •H ₂ O	100 ± 2	> 200	184 ± 2	> 200	98 ± 2	> 200
[Cu(BPAP)H ₂ O]Cl ₂	71 ± 2	> 200	> 200	> 200	93 ± 2	> 200
[Cu(BPAH)H ₂ O]Cl ₂	58 ± 2	> 200	> 200	> 200	79 ± 2	> 200
[Cu(Salam)]•H ₂ O	78 ± 2	> 200	> 200	> 200	57 ± 2	26 ± 2
[Cu ₂ SalandiαCl ₂]	42 ± 2	7 ± 1	10 ± 1	13 ± 1	38 ± 1	11 ± 2
[Cu ₂ Salandiβ(OH) ₂ Cl ₂]	31 ± 2	5 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	33 ± 2	16 ± 2

* MORCELLI, et al., 2016b.

Os resultados de IC₅₀ apresentados acima indicam que todos os ligantes, bem como o sal de cobre utilizado (CuCl₂•2H₂O) não apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens de células cancerígenas utilizadas até uma concentração de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. No entanto, a complexação destes ligantes ao cobre (II) resultou em compostos que promovem a redução da viabilidade celular de pelo menos duas das linhagens tumorais testadas para cada complexo. Esse fato indica que as reações de complexação são fundamentais para potencializar a atividade antitumoral do centro metálico e dos ligantes utilizados.

Verificou-se que os compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo amida foram ativos somente para as linhagens de tumores sólidos (H460 e COLO 205). Foi observado durante os testes que estas linhagens perdem sua capacidade de aderência quando tratadas com os supracitados compostos de coordenação. Desta forma, a atividade antitumoral desses compostos pode estar associada aos mecanismos de aderência destas células. Este mesmo grupo de

compostos não apresentou redução da viabilidade celular das células normais do sangue periférico (PBMC). Esses fatos associados aos valores de IC_{50} para as células tumorais do tipo H460, que são inferiores ao resultado apresentado pela cisplatina, corroboram para a realização de um estudo mais aprofundado do tipo de morte celular, especialmente para o composto com ligante BPAH, o qual apresentou o menor valor de IC_{50} , dentre os compostos de cobre (II) contendo grupos amida testados, apresentando um valor de IC_{50} de $(58 \pm 2) \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Comparando os resultados obtidos com os compostos $[\text{Cu}(\text{Salam})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\alpha)\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, verifica-se que a inserção dos grupos naftóis, tanto na posição alfa quanto na posição beta, diminui a viabilidade celular das linhagens analisadas, inclusive para a linhagem de células normais (PBMC). No entanto, verificou-se que a redução da viabilidade celular após o tratamento dos compostos com grupos naftóis foi mais pronunciada para as células tumorais do que para as células normais, sendo assim, a presença de grupos naftóis pode ser considerado um avanço para o aumento da atividade antitumoral de compostos de coordenação. Tal observação está em acordo com os resultados relatados anteriormente por Fernandes e colaboradores.

Dentre os compostos de coordenação derivados do H_2Salen , o que se destacou foi o $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ principalmente para as linhagens tumorais não aderentes (MOLT-04, U937 e THP-1), apresentando valores de IC_{50} inferiores a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Além desse fato, o tratamento das células de PBMC com este composto apresentou um valor de IC_{50} superior ao obtido pelo tratamento dessa mesma linhagem com o complexo $[\text{Cu}_2\text{Salandi}\alpha\text{Cl}_2]$. Por estes motivos selecionou-se o complexo $[\text{Cu}_2\text{Salandi}\beta(\text{OH})_2\text{Cl}_2]$ e as linhagens tumorais MOLT-04 e U937 para prosseguir na avaliação do tipo de morte celular.

5.9.2. Avaliação da externalização de fosfatidilserina (marcação com anexina V e iodeto de propídio) para a linhagem H460 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$

Os resultados apresentados acima indicaram que o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ possui atividade citotóxica expressiva frente à linhagem H460.

Os resultados indicaram que o complexo de cobre é mais ativo do que o próprio medicamento controle para linhagem de pulmão (cisplatina), sendo uma linhagem resistente ao tratamento com a medicação. Esse fato, somado a alta solubilidade do complexo em água e a baixa citotoxicidade para as células normais do sangue periférico (PBMC) indicaram que estudos mais avançados devem ser realizados para determinar o mecanismo de morte celular observado.

Para determinação do tipo de morte celular, utilizou-se a técnica de marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP). Os resultados observados são apresentados na **Figura 92** para as células de H460 quando tratadas com concentrações equivalentes a uma e duas vezes o valor do IC_{50} e com $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. Nos gráficos, o quadrante inferior esquerdo indica a presença de células que não foram marcadas por anexina V nem por iodeto de propídio, portanto essas células são consideradas células viáveis. O quadrante inferior direito indica células somente marcadas com anexina V, portanto células que apresentaram morte celular por apoptose. Em contrapartida, o quadrante superior esquerdo indica as células que foram marcadas somente com iodeto de propídio, relacionadas à morte celular por necrose. A existência de dupla marcação no quadrante superior direito indica a morte celular por apoptose “tardia”. Essa marcação é observada devido à ausência de fagócitos *in vitro*, levando à degradação da membrana celular dos corpos apoptóticos e resultando na marcação com iodeto de propídio.

Analisando o gráfico de Anexina V/IP para o controle verifica-se uma porcentagem de 92,13 % de células vivas, o que mostra que as células foram cultivadas de forma adequada (**Figura 92 A**).

Para o ensaio realizado após 30 h de incubação e utilizando uma concentração equivalente a IC_{50} , verificou-se 28,43 % de morte celular por apoptose (**Figura 92 D**), enquanto que o tratamento com $2 \times IC_{50}$ levou a uma porcentagem de morte por apoptose de 87,37 % (**Figura 92 E**). Já o tratamento com $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ gerou 93,37 % de morte celular por apoptose (**Figura 92 F**). Os dados observados para o complexo de cobre (II) indicam que o mesmo possui maior atividade comparada com a cisplatina, a qual gerou 39,06 % de apoptose quando as células foram tratadas com uma concentração equivalente a

uma vez o IC₅₀ (**Figura 92 B**) e 76,67 % quando as células da mesma linhagem foram tratadas com uma concentração igual a duas vezes a IC₅₀ (**Figura 92 C**).

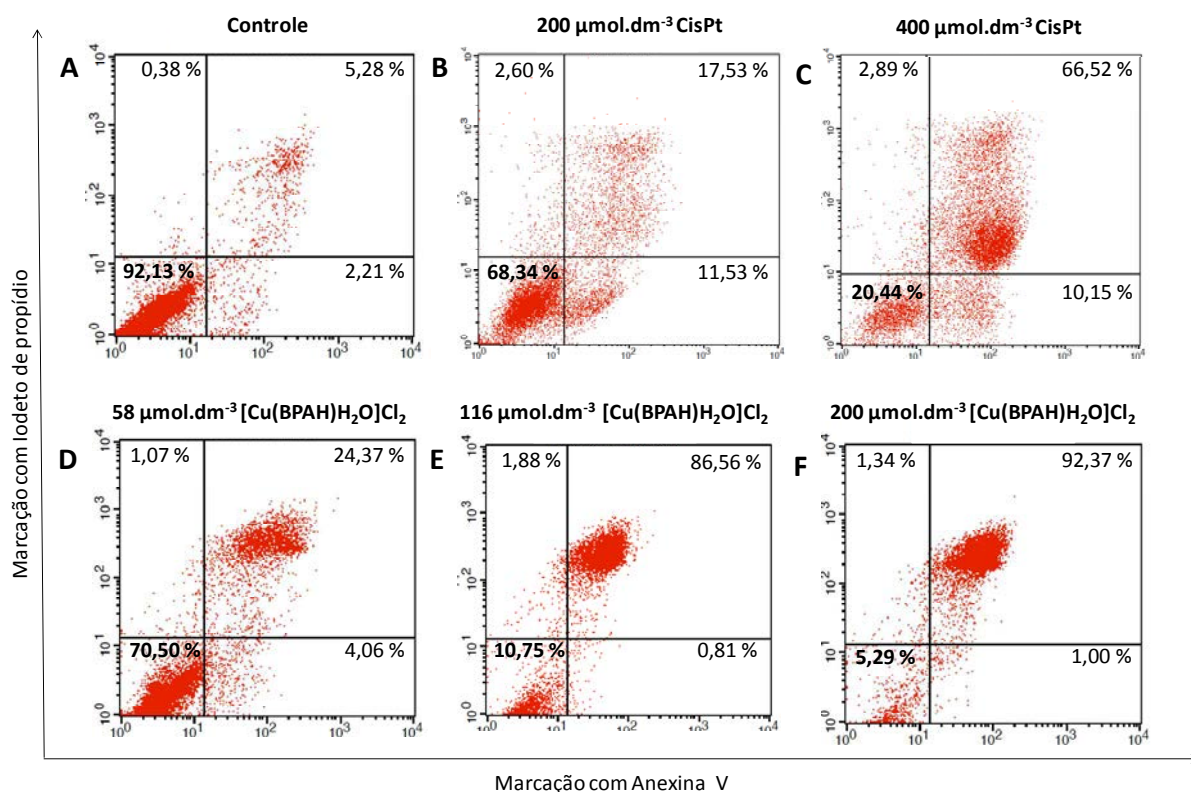


Figura 92. Marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) para as células de H460 incubadas por 30 h. **[A]** (controle); **[B]** Utilizando uma vez a IC₅₀ da Cisplatina; **[C]** Utilizando duas vezes a IC₅₀ da Cisplatina; **[D]** Utilizando uma vez a IC₅₀ do complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂; **[E]** Utilizando duas vezes a IC₅₀ do complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ e **[F]** Utilizando 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂.

5.9.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial para a linhagem de H460 quando tratada com o complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂

Além do ensaio de anexina, foi realizado o método de marcação com o corante de JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), o qual indica alterações no potencial da membrana celular, função que está diretamente ligada à cadeia respiratória celular da linhagem de células analisada. Quando existe perda da função mitocondrial as células iniciam o processo de morte celular por apoptose (GILLIAN, *et al.*, 2005).

A técnica se baseia na diferença de concentração do corante JC-1. Quando a concentração do mesmo se torna elevada na matriz mitocondrial há formação de agregados que fluorescem na região do vermelho. Em células onde ocorreu o

colapso do potencial de membrana mitocondrial não ocorre à formação de agregados de JC-1 e as células apresentam citoplasma com fluorescência verde (SMILEY, et al., 1991).

Na **Figura 93** é possível observar os resultados para as células H460 tratadas com concentração equivalente a uma e duas vezes o valor do IC_{50} do complexo $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$ e da Cisplatina, além de uma concentração de $200 \mu mol.dm^{-3}$ do complexo $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$.

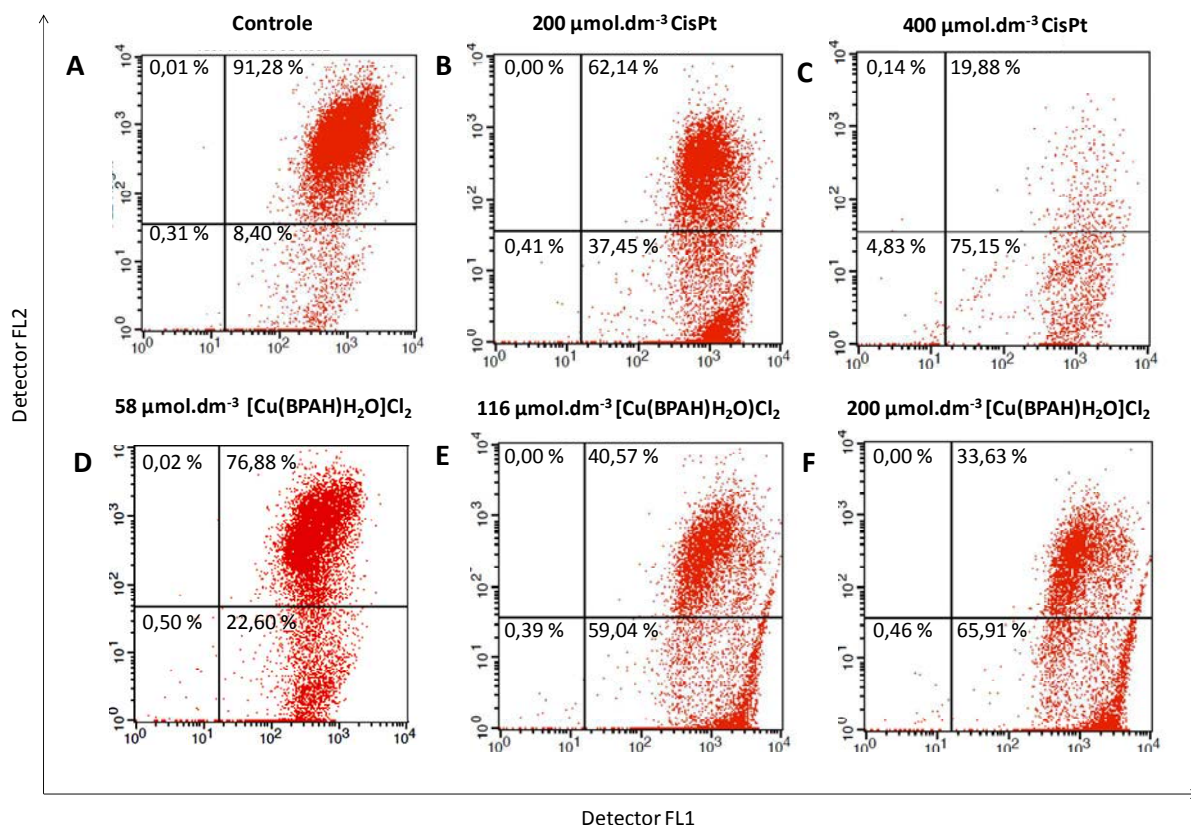


Figura 93. Análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de H460 submetida a incubação de 30 horas com os compostos de coordenação $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$ e Cisplatina. **[A]** controle; **[B]** Utilizando uma vez a IC_{50} da Cisplatina; **[C]** Utilizando duas vezes a IC_{50} da Cisplatina; **[D]** Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$; **[E]** Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$ e **[F]** Utilizando $200 \mu mol.dm^{-3}$ do complexo $[Cu(BPAH)H_2O]Cl_2$.

Para o ensaio a uma concentração de uma vez o valor de IC_{50} verificou-se 22,60 % de perda do potencial da membrana mitocondrial das células da linhagem analisada (**Figura 93 D**), enquanto isso observou-se uma perda de 59,04 % do potencial das membranas das células tumorais de H460, quando estas foram tratadas com duas vezes o valor de IC_{50} . (**Figura 93 E**). Para o tratamento com $200 \mu mol.dm^{-3}$

$\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ observou-se 65,91 % de redução do potencial mitocondrial (**Figura 93 F**), mostrando que a atuação do composto não está totalmente relacionada a atividade das mitocôndrias, visto que existe uma maior porcentagem de células em apoptose do que células com mitocôndrias danificadas. Os dados observados para o complexo de cobre (II) indicam que o mesmo possui menor redução das atividades das mitocôndrias comparada com a cisplatina. A qual gerou 37,45 % de alteração do potencial de membrana das mitocôndrias quando as células foram tratadas com uma concentração igual ao valor do IC_{50} (**Figura 93 B**) e 75,15 % quando as células da mesma linhagem foram tratadas com dois IC_{50} (**Figura 93 C**), sendo observado que os valores estão bem próximos dos dados apresentados pela técnica de anexina V/IP.

5.9.4. Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo para a linhagem de H460 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$

A análise do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo quantifica o conteúdo de DNA em cada uma das fases desse ciclo. Este fato é proveniente das diferentes quantidades de DNA em cada uma das etapas da divisão celular por mitose. Em um primeiro momento, as células apresentam determinada quantidade de DNA e encontram-se na fase *G1* (crescimento 1). Em seguida, a mesma sofre alterações em sua quantidade de DNA passando para a fase *S* (síntese). Após o término desta fase, todo o DNA encontra-se duplicado, levando ao início da fase *G2* (crescimento 2), que ao findar leva a fase *M* (mitose). A técnica de avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo é baseada na intercalação do iodeto de propídio com o DNA após rompimento das membranas celular e nuclear, formando aglomerados que fluorescem na região do vermelho, sendo então detectados por citometria de fluxo. Nos estágios mais tardios da apoptose, o conteúdo de DNA é clivado originando fragmentos, os quais são quantificados e aparecem em região do histograma denominada de Sub-G1 (NUNES, 2001 e GONG, et al., 1994).

Para avaliar o mecanismo de morte celular, provocado pela atuação do composto $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ para as células tumorais do tipo H460, foi realizada a análise de marcação com iodeto de propídio (IP) após extravasamento do material genético da célula. Os resultados são apresentados na **Figura 94**.

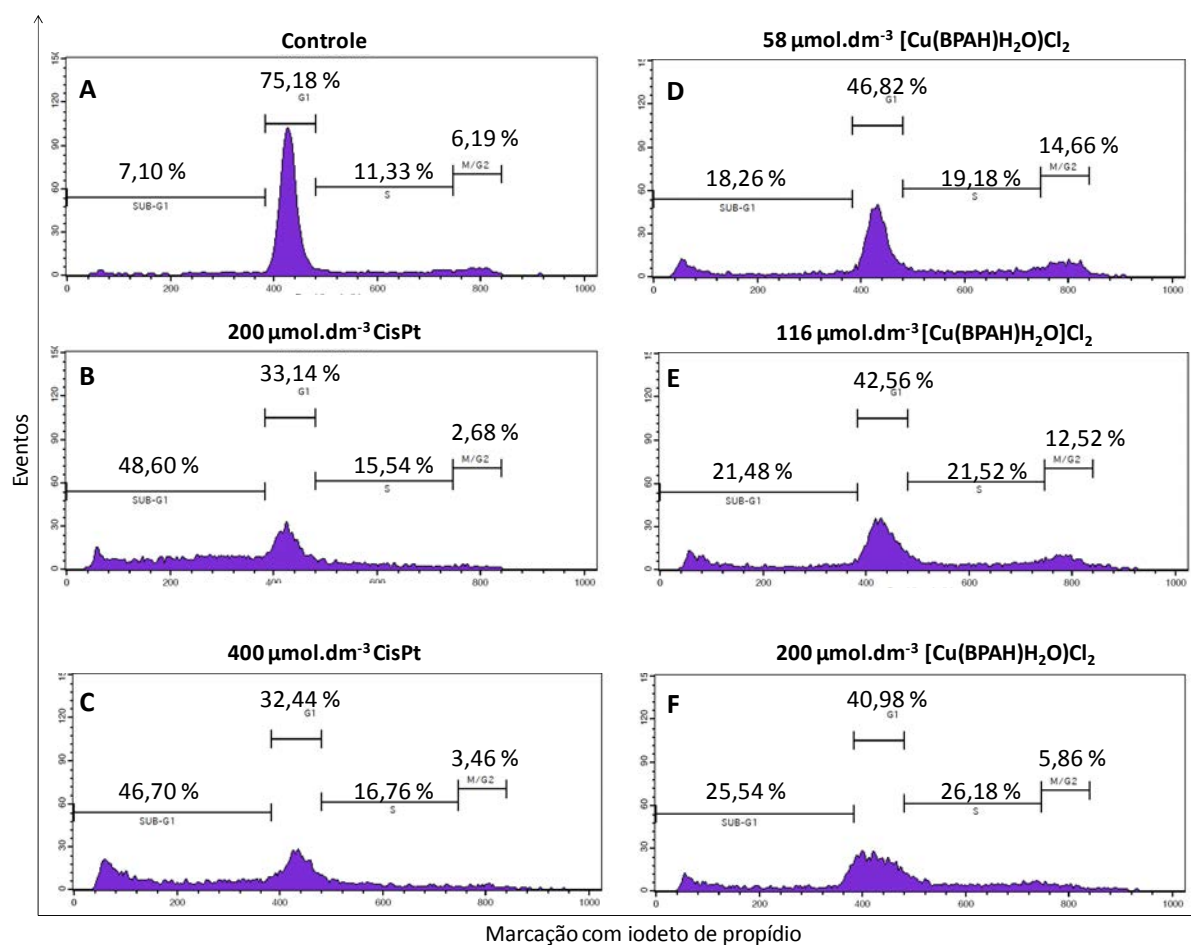


Figura 94. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linhagem de H460 submetida a incubação de 30 horas com os compostos de coordenação [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ e Cisplatina. **[A]** Controle; **[B]** Utilizando uma vez a IC₅₀ da Cisplatina; **[C]** Utilizando duas vezes a IC₅₀ da Cisplatina; **[D]** Utilizando uma vez a IC₅₀ do complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂; **[E]** Utilizando duas vezes a IC₅₀ do complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂ e **[F]** Utilizando 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂.

A análise do ciclo celular indicou que tanto a cisplatina, quanto o [Cu(BPAH)H₂O]Cl₂, levam a uma redução das células em G1, sendo a cisplatina mais efetiva do que o complexo de cobre (II). Por meio destes dados verifica-se que o tratamento com 200 e 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de Cisplatina resulta em quantidades muito similares de DNA na região do Sub-G1 (48,60 % e 46,70 %, respectivamente) (**Figura 94 B e C**). Neste experimento verificou-se uma porcentagem de 25,54 % de células em Sub-G1 para o complexo de cobre (II) contra os 48,60 % de células em Sub-G1 para a cisplatina, ambos na concentração de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (**Figura 94 B e F**). Também observou-se que o aumento da concentração de um para dois IC₅₀ não afeta significativamente a quantidade de células em Sub-G1 (**Figura 94 D e E**).

5.9.5. Avaliação da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a linhagem de H460 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada neste trabalho para averiguar as alterações morfológicas apresentadas pelas células tumorais de H460 quando tratadas com diferentes concentrações (58 , 116 e $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) do composto de coordenação de cobre (II) contendo o ligante BPAH e incubadas por 4 e 8 h. Após esse período as células tratadas e o controle de H460 foram processados e observados em microscópio eletrônico de transmissão, sendo obtidas as imagens apresentadas na **Figura 95**, **96** e **97**.

As microscopias de uma célula de carcinoma de pulmão H460 antes do tratamento são apresentadas na **Figura 95** sendo possível observar a morfologia da célula desta linhagem. Por meio dessas imagens será possível realizar comparações com as microscopias após o tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$.

Controle (H460)

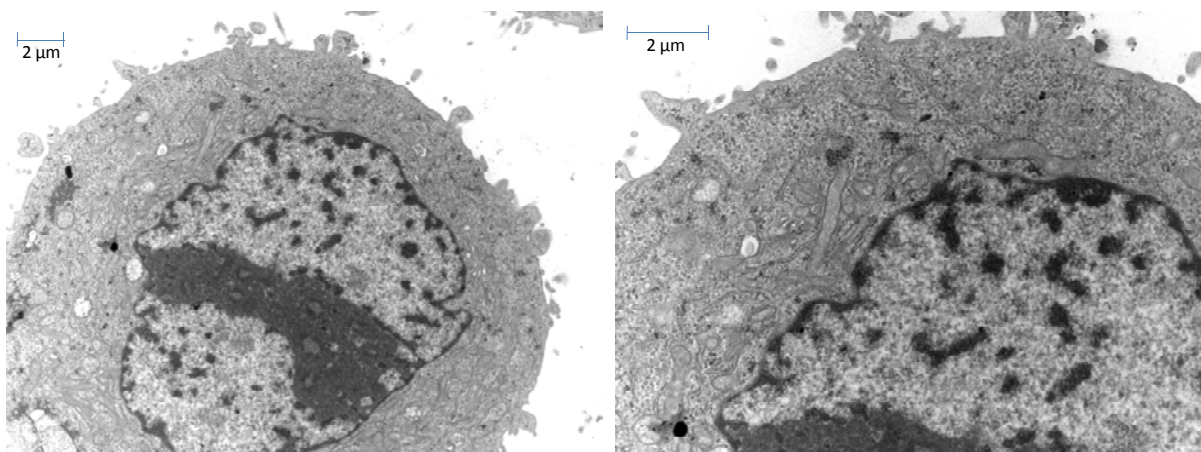
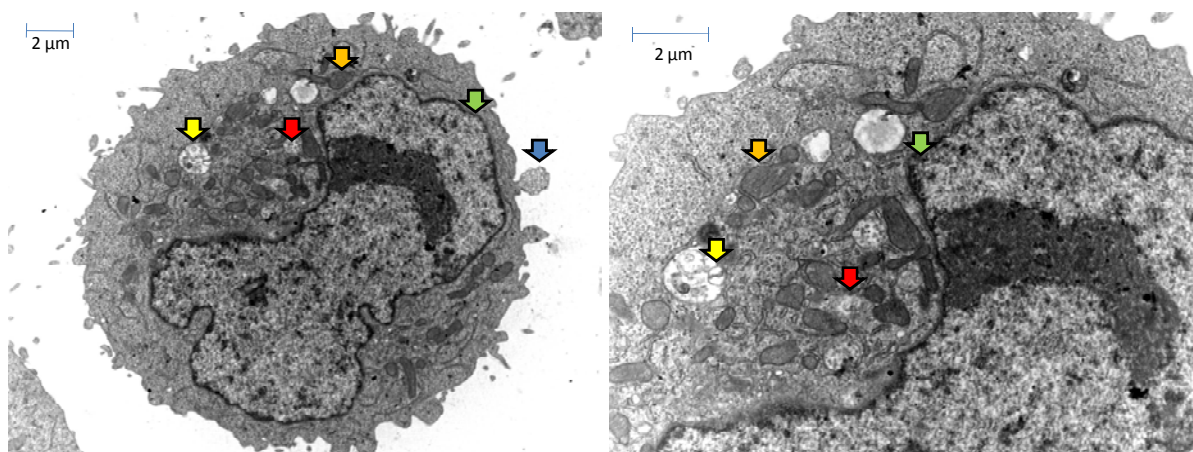
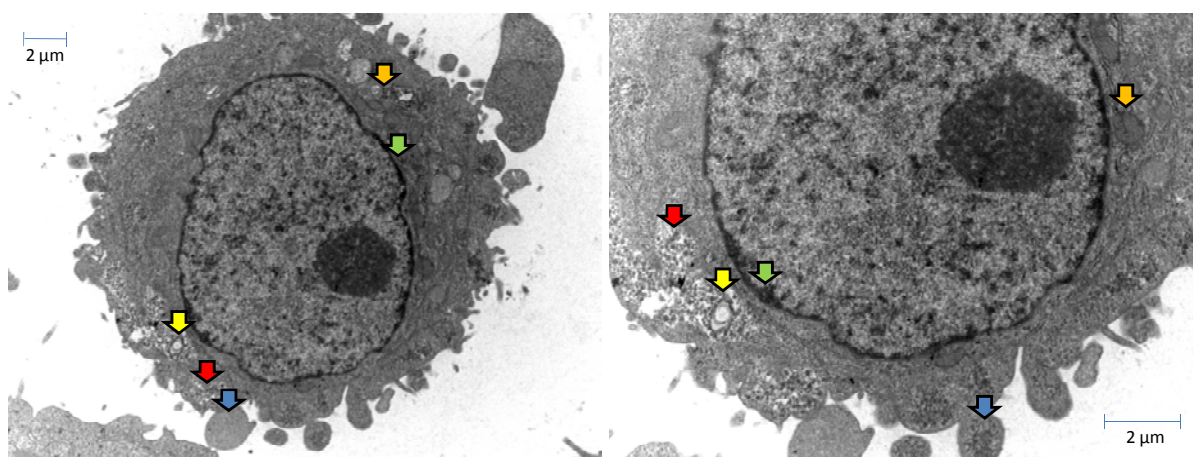


Figura 95. Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem de carcinoma de pulmão H460 (Células controle).

A) Tratamento das células de H460 com $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ - 4 h



B) Tratamento das células de H460 com $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ - 8 h



C) Tratamento das células de H460 com $116 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ - 4 h

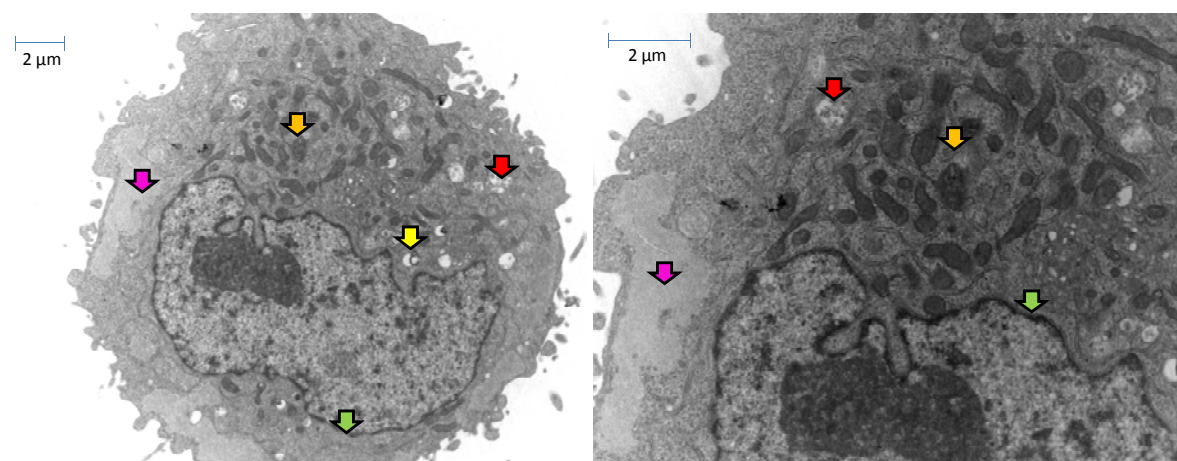
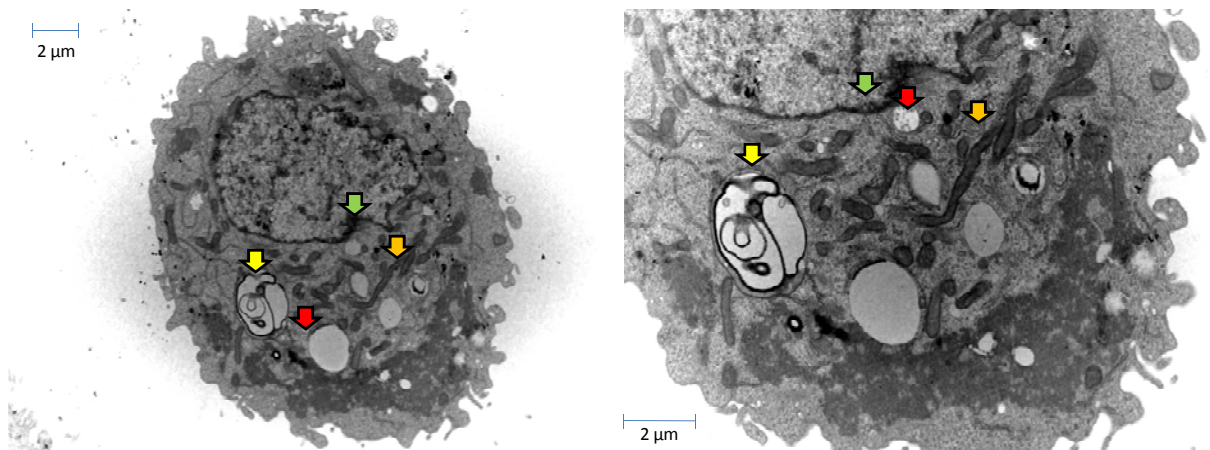
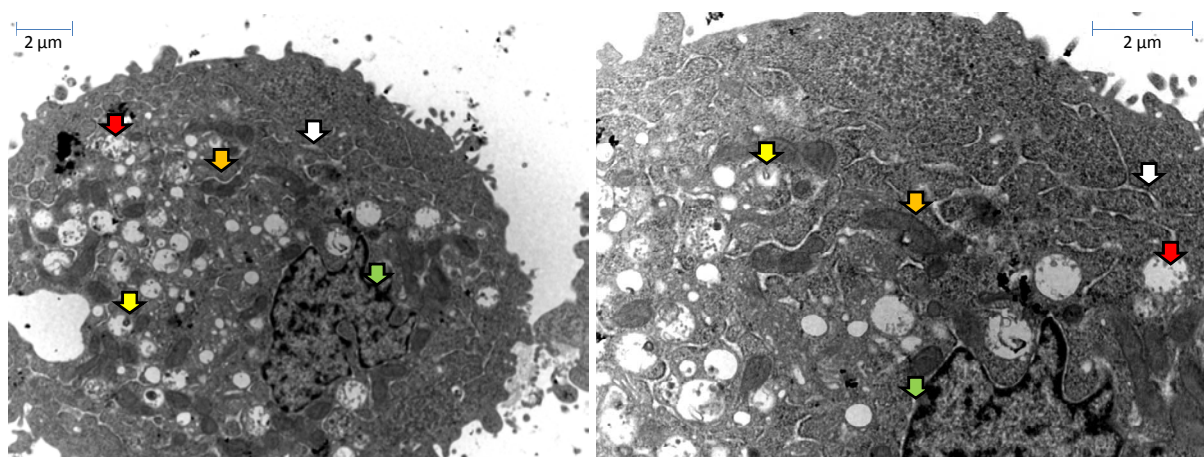


Figura 96. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de carcinoma de pulmão H460 incubadas com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. **[A]** Na concentração de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 4 horas; **[B]** Na concentração de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 8 horas e **[C]** Na concentração de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 4 horas.

A) Tratamento das células de H460 com $116 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ - 8 h



B) Tratamento das células de H460 com $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ - 4 h



C) Tratamento das células de H460 com $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ - 8 h

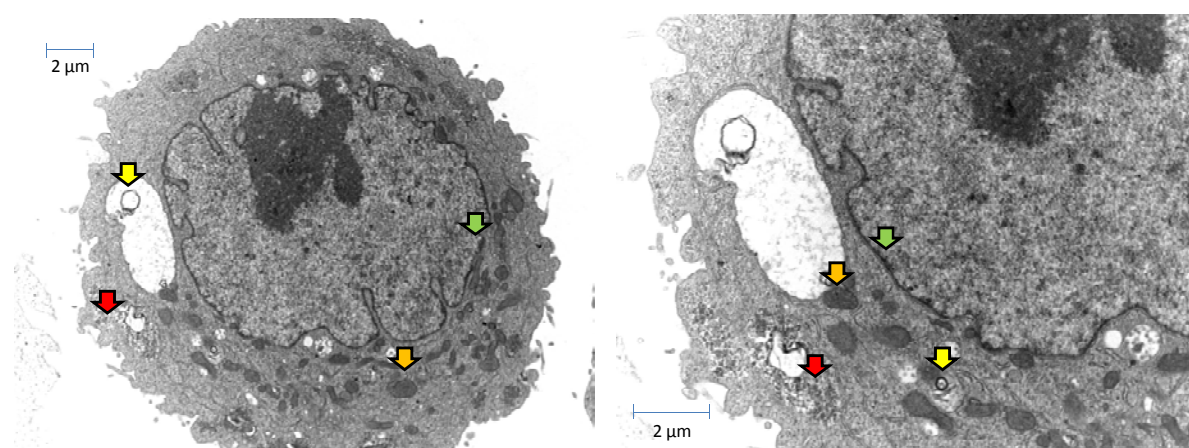


Figura 97. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de carcinoma de pulmão H460 incubadas com o complexo $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. **[A]** Na concentração de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 8 horas; **[B]** Na concentração de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 4 horas e **[C]** Na concentração de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ por 8 horas.

As microscopias eletrônicas de transmissão apresentadas acima revelaram diferentes alterações morfológicas nas células de H460 após tratamento com o composto de coordenação $[\text{Cu}(\text{BPAH})\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$. Em todos os casos observou-se processos de condensação de cromatina na periferia nuclear (setas verdes), sendo esta um indicativo de morte celular por apoptose. Em todos os tratamentos também se observou alterações nas estruturas das mitocôndrias, tais como inchamento e alargamento destas organelas (setas laranjas). Estas alterações são coerentes com os dados de JC-1 apresentados anteriormente, indicando que a mitocôndria participa do processo de morte celular por apoptose. Nas microscopias foram observados processos de esvaziamento de diferentes organelas (setas vermelhas), além de algumas destas realizarem processos de engolfamento (setas amarelas). Em alguns casos, também verificou-se a presença de corpos apoptóticos agregados as membranas celulares (setas azuis), principalmente nas análises realizadas após incubação por 8 h. Em concentrações mais elevadas ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) verificou-se um leve alargamento nas estruturas dos retículos endoplasmáticos (setas brancas). Por fim, também observou-se a redução de alguns estoques de glicogênio (setas rosas), provavelmente devido a um aumento do metabolismo celular, o qual visa uma recuperação das organelas danificadas.

5.9.6. Avaliação da externalização de fosfatidilserina (marcação com anexina V e iodeto de propídio) para as linhagens de MOLT-04 e U937 quando tratadas com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Por meio dos resultados obtidos pela metabolização do MTT após tratamento com diferentes compostos derivados do H_2Salen verificou-se que o composto de cobre (II) com ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ foi o mais ativo da série analisada, apresentando resultados significativos para todas as linhagens testadas. Dentre estas destacam-se os resultados apresentados para as linhagens não aderentes de MOLT-04 e U937, apresentando valores de IC_{50} de 5 e 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, respectivamente.

O ensaio de externalização de fosfatidilserina para a linhagem de MOLT-04 quando tratada com 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($1\times\text{IC}_{50}$) do composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ após 24 h de incubação resultou em somente 12,82 % de morte celular por

apoptose, enquanto que após tratamento com $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($2\times\text{IC}_{50}$) em mesmo período de incubação resultou em 58,20 % de morte celular por apoptose (**Figura 98**). Este resultado é bastante promissor visto que o mesmo ensaio com $42,8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($2\times\text{IC}_{50}$) de Cisplatina resultou em somente 40,61 % de morte celular por apoptose (BULL, 2016).

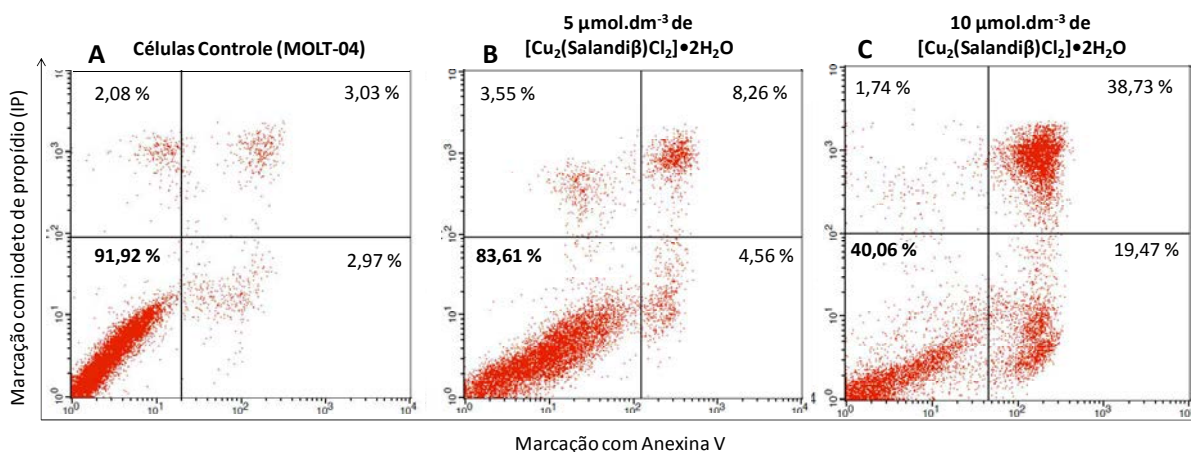


Figura 98. Marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) para as células de MOLT-04 incubadas por 24 h. **[A]** células controle; **[B]** Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e **[C]** Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

O ensaio apresentado anteriormente também foi realizado para a linhagem leucêmica de U937, o qual resultou em um aumento da morte celular por apoptose quando as células foram tratadas com 8 ($1\times\text{IC}_{50}$) e $16 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ($2\times\text{IC}_{50}$), obtendo-se, respectivamente, 67,49 e 90,36 % de morte celular por apoptose (**Figura 99**). Esse resultado é ainda mais promissor, visto que Bull em 2016 verificou que o tratamento com $32,4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de Cisplatina resulta em somente 22,59 % de morte celular por apoptose, enquanto que $16 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do composto testado resultou em 90,36 % de morte celular por apoptose, ambos os ensaios em 24 h.

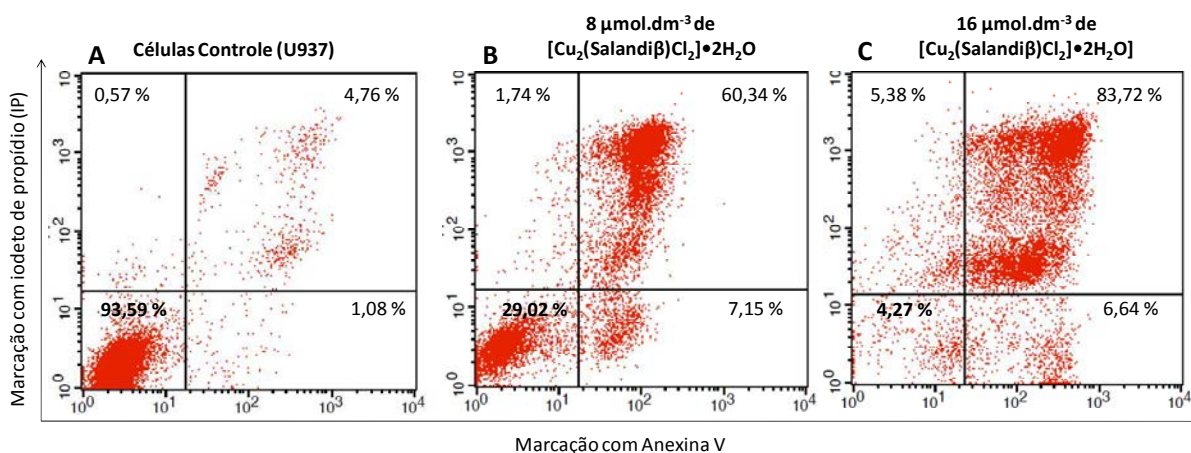


Figura 99. Marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) para as células de U937 incubadas por 24 h. **[A]** Células controle; **[B]** Utilizando uma vez a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e **[C]** Utilizando duas vezes a IC_{50} do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

5.9.7. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Por meio dos dados apresentados acima observou-se que as células de U937 apresentam maior porcentagem de morte celular por apoptose quando estes foram comparados aos resultados apresentados para a linhagem MOLT-04. Sendo assim, somente a linhagem U937 foi selecionada para realização dos demais ensaios biológicos.

Os dados de marcação com JC-1 indicaram que o composto de cobre (II) com ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ possui alta influência na cadeia respiradora de elétrons, alterando significativamente o potencial de membrana das mitocôndrias. Na **Figura 100** verifica-se que o aumento na concentração do complexo resulta numa elevada perda das propriedades dessas organelas, resultando em 91,14 % de inatividade quando utiliza-se $8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ e 96,09 % quando utiliza-se $16 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ após 24 horas de incubação.

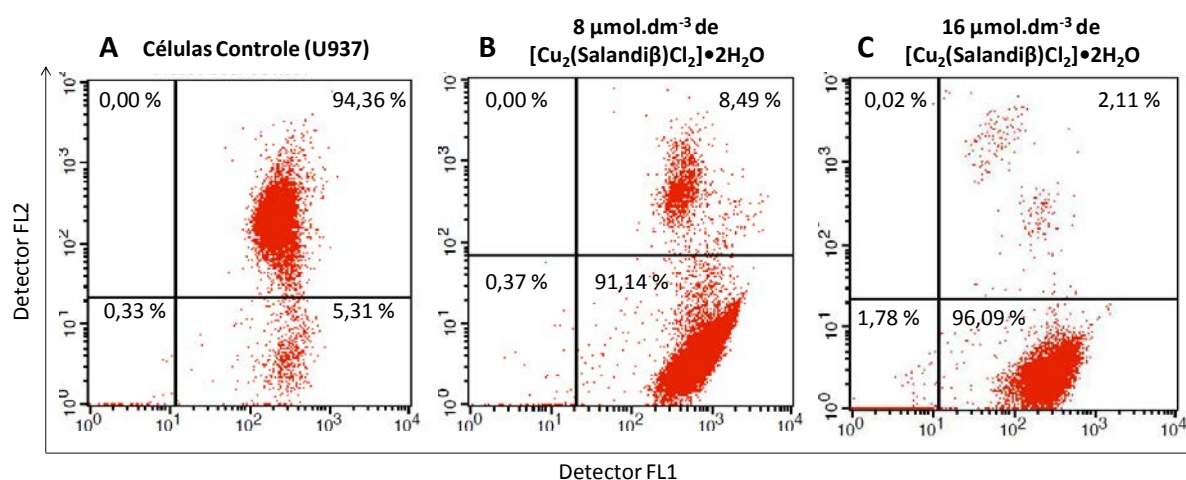


Figura 100. Análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de U937 submetida a incubação de 24 horas com os compostos de coordenação para o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. **[A]** Células controle; **[B]** Utilizando uma vez a IC_{50} de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e **[C]** Utilizando duas vezes a IC_{50} de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

5.9.8. Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Em seguida, utilizando o mesmo tempo de incubação verificou-se a influência do composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no funcionamento do ciclo celular das células do tipo U937. Por meio deste ensaio verificou-se que o aumento da concentração de composto de 8 para 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ resulta em um aumento da porcentagem de fragmentos de DNA, sendo observado valores de 13,36 % e 69,30 %, respectivamente (**Figura 101**). As porcentagens de eventos em Sub-G1 quando as células de U937 foram tratadas com o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ são superiores a porcentagem apresentada pelas células controle (3,50 %). Além desses dados é importante destacar a ação da cisplatina, a qual foi analisada por Borges em sua tese de doutorado (2013). O autor utilizou a mesma metodologia para avaliar o medicamento controle com uma concentração de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Os resultados obtidos por Borges indicaram um valor de 99,1 % de eventos em Sub-G1, mostrando uma alteração significativa na estrutura do DNA (BORGES, 2013).

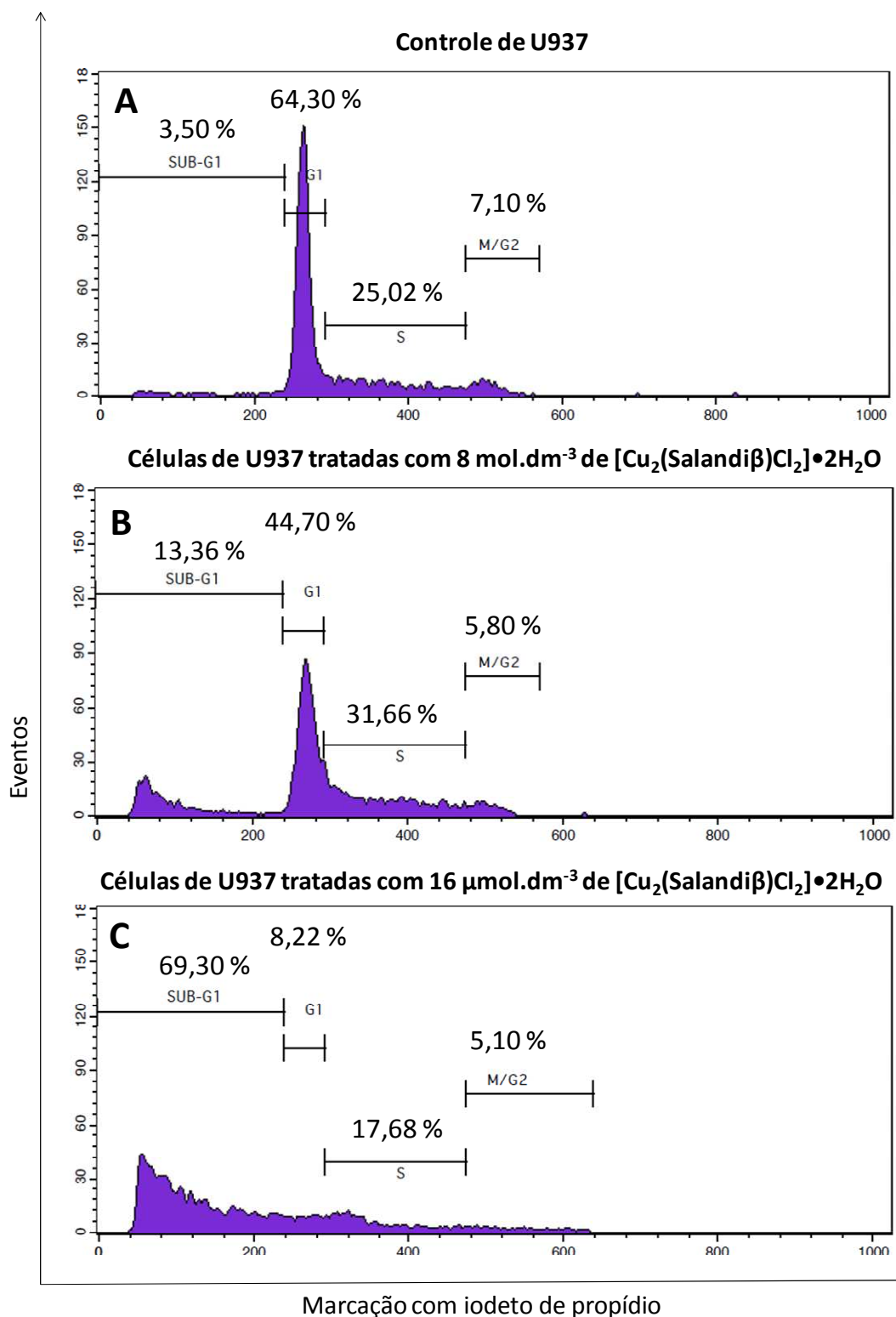
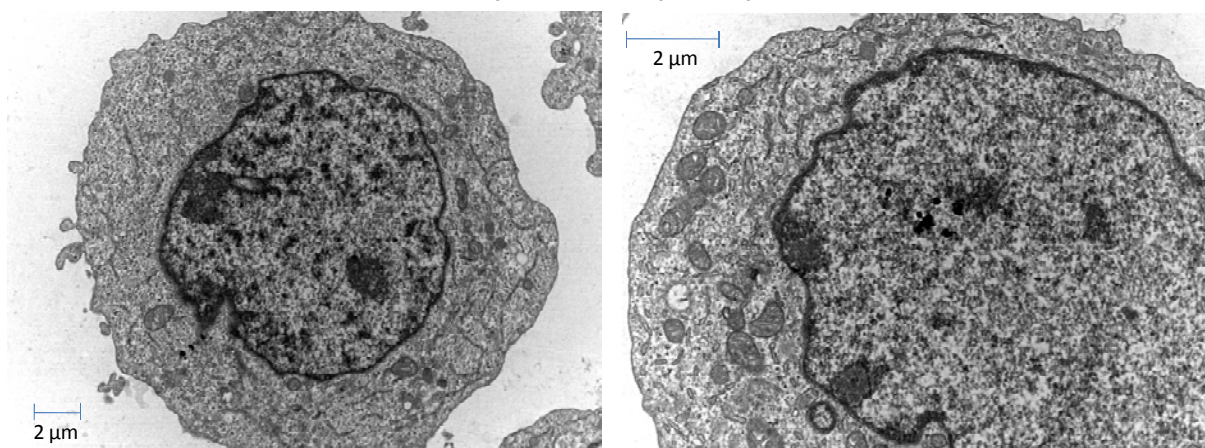


Figura 101. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, para a linhagem de U937 submetida a incubação de 24 horas com os compostos de coordenação [Cu₂(Salandiβ)Cl₂]•2H₂O. **[A]** Células controle; **[B]** Utilizando uma vez a IC₅₀ de [Cu₂(Salandiβ)Cl₂]•2H₂O e **[C]** Utilizando duas vezes a IC₅₀ de [Cu₂(Salandiβ)Cl₂]•2H₂O.

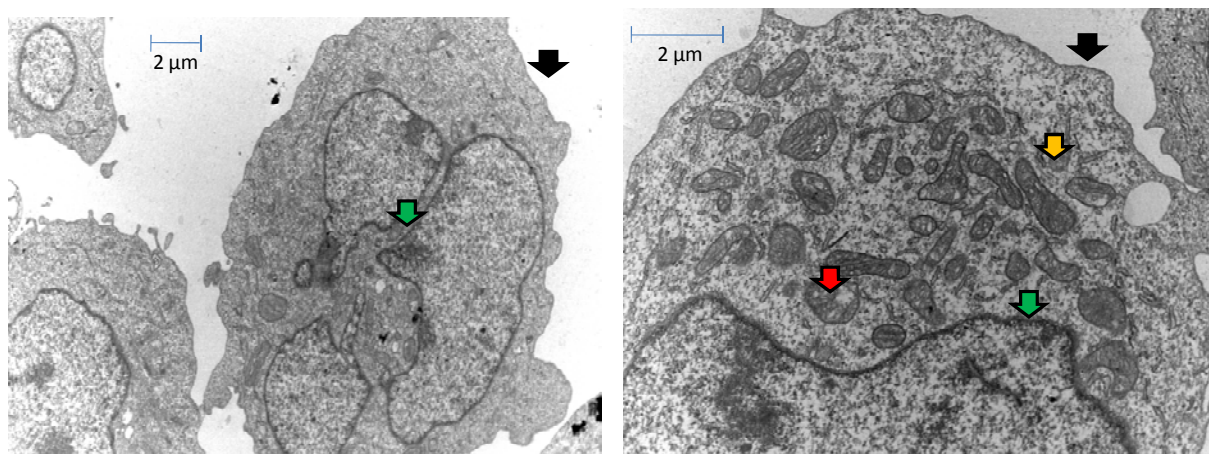
5.9.9. Avaliação da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Os dados de marcação com anexina V e IP, somados aos dados de JC-1 estão de acordo com os resultados apresentados pela análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Com intuito de observar os principais indícios de atuação do composto, as células U937 foram tratadas com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nos tempos de 4 e 8 h nas concentrações de $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$ ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) e 1IC_{50} ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Os resultados obtidos são apresentados nas **Figuras 102 e 103**, nas quais as setas destacadas em verde indicam a condensação do DNA observada desde o início do tratamento com o composto. As setas laranjas indicam alterações mitocondriais, levando a formação de vacúolos, confirmando o dado observado pela marcação com JC-1. As setas vermelhas indicam o aumento da vacuolização das células testadas, sendo um estágio avançado das alterações mitocondriais. Nas micrografias de transmissão também são observados processos de engolfamento de organelas, as quais são apresentadas pelas setas em amarelo, além de alterações nos retículos endoplasmáticos, indicadas pelas setas brancas. Por fim, as setas em preto indicam a perda das microvilosidades das membranas celulares, no entanto é necessário um estudo mais aprofundado por microscopia eletrônica de varredura para confirmar essa alteração.

A) Controle (U937)



B) Tratamento das células de U937 com $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 4 h



C) Tratamento das células de U937 com $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 8 h

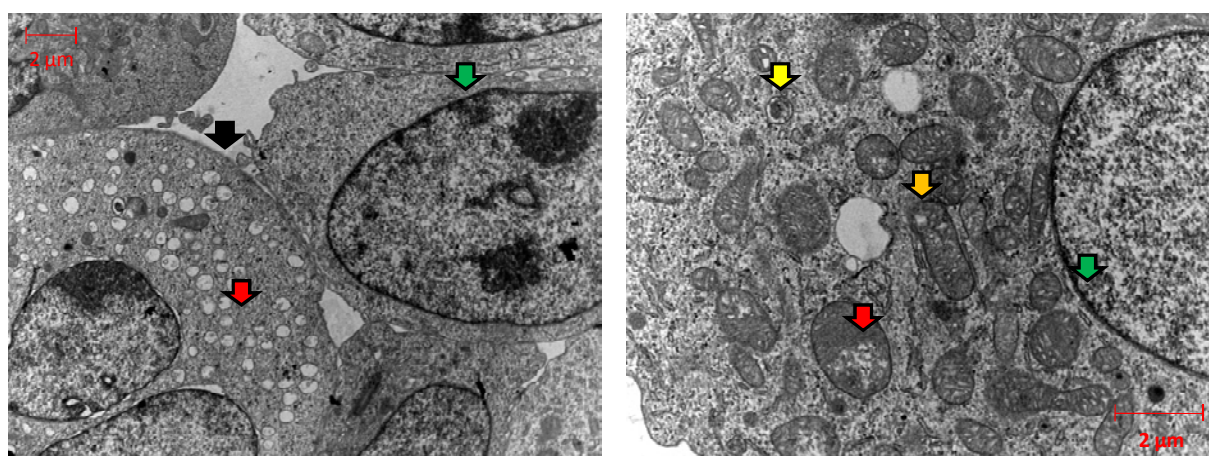
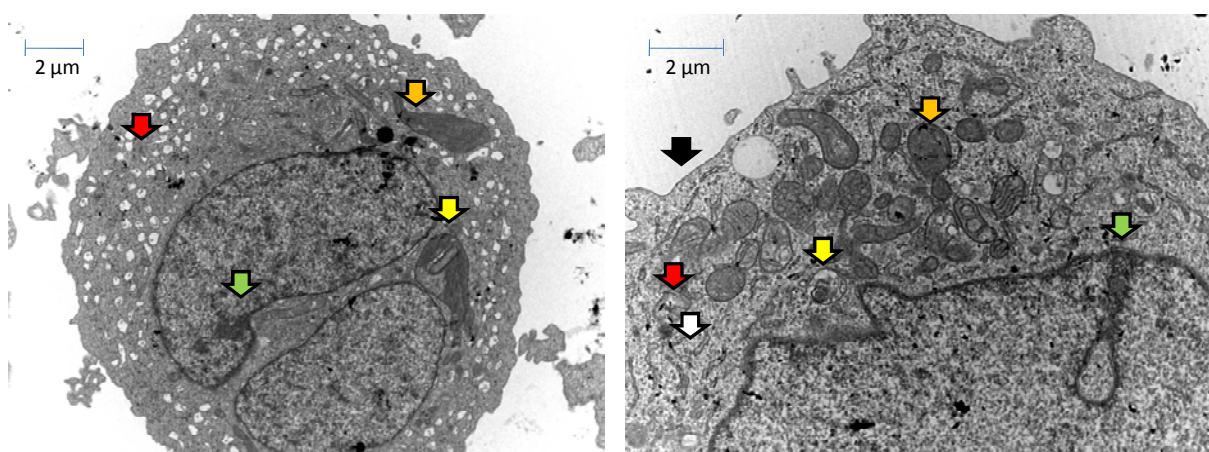


Figura 102. Micrografias eletrônicas de transmissão das células de U937 tratadas com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nos tempos de 4 e 8 h nas concentração de $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$. **[A]** Células controle; **[B]** Utilizando metade da IC_{50} de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ após 4 h de tratamento e **[C]** Utilizando metade da IC_{50} de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ após 8 h de tratamento.

A) Tratamento das células de U937 com $8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 4 h



B) Tratamento das células de U937 com $8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 8 h

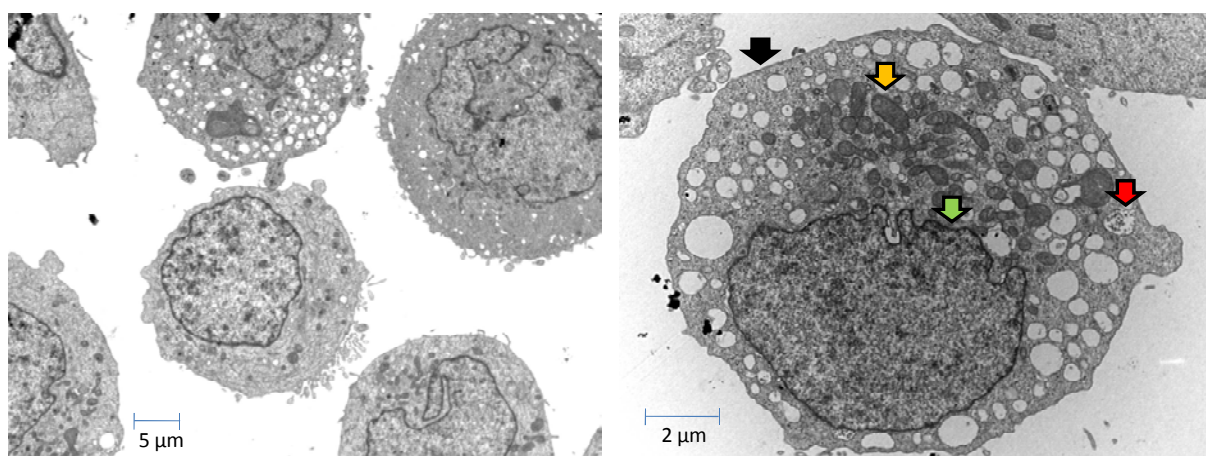


Figura 103. Micrografias eletrônicas de transmissão das células de U937 tratadas com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nos tempos de 4 e 8 h nas concentração de $1 \times \text{IC}_{50}$. **[A]** Após 4 h de tratamento e **[B]** Após 8 h de tratamento.

5.9.10. Avaliação da ativação das caspases 3, 6, 8, 9, 12 para a linhagem de U937 quando tratada com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Os resultados apresentados acima indicam que o tipo de morte celular predominante para as células U937 quando tratadas com o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é a apoptose. Esse tipo de morte celular apresenta-se por duas vias, denominadas de intrínseca e extrínseca. A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte celular presentes na membrana da célula. Em seguida ocorre a ativação da procaspase 8, sendo esta considerada uma caspase iniciadora de via extrínseca. Em contrapartida a via intrínseca é iniciada por alterações em organelas, tais como a mitocôndria ou o retículo endoplasmático.

Quando ocorre alterações mitocondriais a procaspase 9 é ativada e quando as alterações são no retículo endoplasmático ativa-se a procaspase 12, sendo ambas consideradas caspases iniciadoras de via intrínseca de morte celular por apoptose. Antes de iniciar o processo de morte celular por apoptose, as caspases iniciadoras ativam outras caspases, denominadas de efetoras, sendo estas responsáveis pelo início do processo de morte celular por apoptose.

Neste trabalho foram realizadas a avaliação das caspases 3, 6, 8 e 9 por marcadores específicos, seguida da leitura em um espectrofotômetro em 405 nm. Os resultados são apresentados na **Figura 104**, sendo observado que ocorreu ativação de todas as caspases avaliadas nas 3 primeiras horas, indicando que ambas as vias de morte celular por apoptose foram ativadas. Além disso, verificou-se que o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ provoca morte celular por apoptose nas primeiras horas de atuação, sendo um aspecto extremamente importante para a implementação do mesmo como um possível metalofármaco, visto que resultados apresentados por Borges em 2013 indicam que a Cisplatina possui ápice de ativação das caspases somente após 12 h de tratamento.

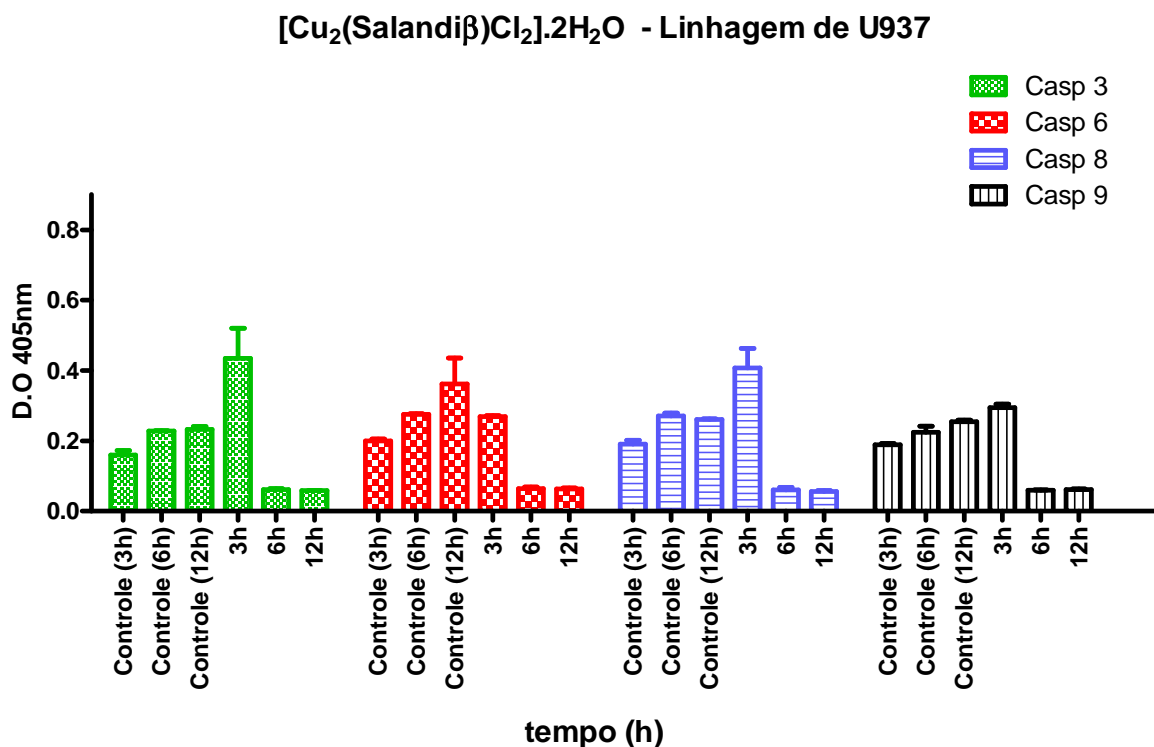


Figura 104. Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 em células de U937 após incubação com o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 3, 6 e 12 h.

Além das caspases analisadas anteriormente, também foi possível a avaliação da ativação da caspase 12, sendo este ensaio realizado por citometria de fluxo, utilizando marcador específico. Após tratamento com $8 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 24 h de incubação, verificou-se que ocorreu uma ativação significativa da caspase 12, sendo obtido um valor de 97,79 % de ativação desta proteína (**Figura 105**).

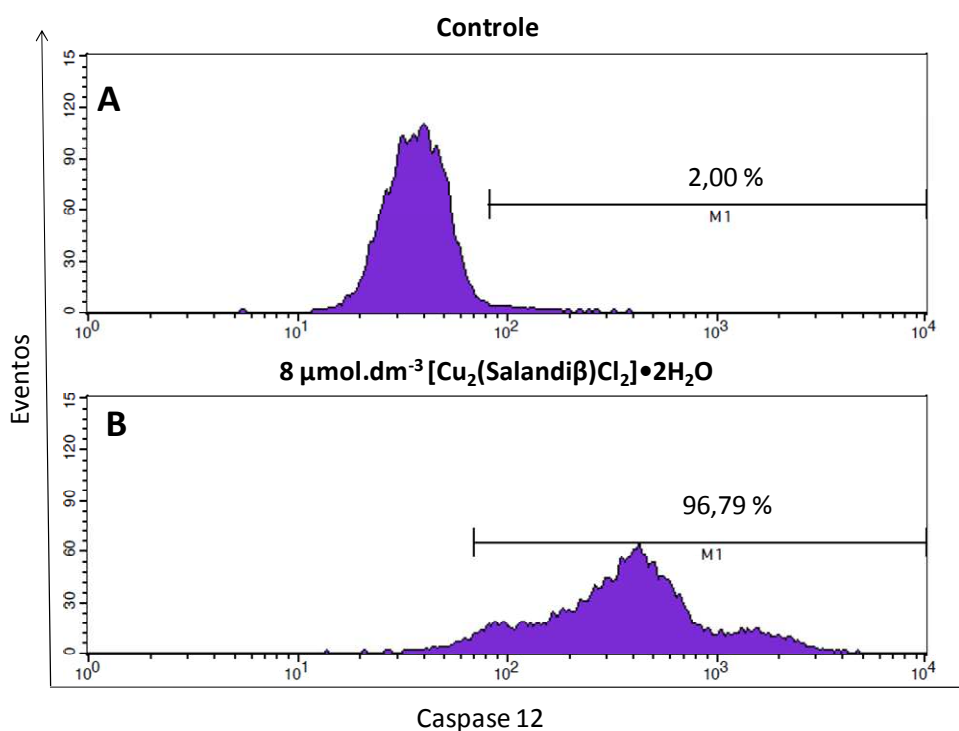


Figura 105. Avaliação da atividade da caspase 12 em células de U937 após incubação com o composto $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 24 h.

Os resultados apresentados para a elucidação do mecanismo de morte celular para ambos os compostos avaliados são bastante promissores, visto que ambos apresentaram indicações de morte celular por apoptose mais pronunciadas que o medicamento controle (cisplatina) utilizado para esses tipos de tumores. Sendo assim, estudos *in vivo* estão entre as perspectivas de continuação desse trabalho.

6. CONCLUSÕES

Diante do levantamento bibliográfico realizado e dos dados apresentados verifica-se que compostos de coordenação apresentam atividades antitumorais significativas, com destaque para os compostos de platina. No entanto, a síntese, caracterização e avaliação antitumoral de novos compostos de coordenação com diferentes centros metálicos vem se desenvolvendo nos últimos anos, principalmente para compostos com centro de cobre (II), os quais mostram-se bastante ativos. Estes compostos podem ser uma alternativa para o tratamento de diferentes tumores, visto que alguns destes apresentam resistência ao tratamento com os fármacos comercializados atualmente.

Tendo em vista o que foi apresentado neste trabalho, concluiu-se que as metodologias empregadas nas sínteses dos ligantes e dos compostos de coordenação de cobre (II) foram adequadas. Além desse fato, as diferentes análises instrumentais utilizadas na caracterização dos ligantes e dos complexos mostram-se imprescindíveis para propor estruturas para os compostos sintetizados. Por meio das técnicas de CHN, IV e RMN, foi possível confirmar as sínteses de seis ligantes orgânicos simétricos com uma unidade central diamínica. A inserção de grupos planares em uma das unidades centrais dos ligantes foi realizada visando potencializar a atividade antitumoral dos compostos de coordenação sintetizados. Com o auxílio de diferentes técnicas instrumentais, também foi possível verificar que os compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes contendo amida foram mononucleares com apenas uma unidade do ligante orgânico para cada centro metálico. Enquanto os compostos de coordenação com ligantes contendo grupos naftóis resultaram na formação de compostos binucleares com apenas um único ligante orgânico em sua estrutura.

Os testes de viabilidade celular com diferentes linhagens tumorais (H460, MOLT-04, U937, THP-1 e Colo-205) para os compostos de coordenação avaliados mostraram, em alguns casos, atividades expressivas, com valores de IC_{50} inferiores aos apresentados pela cisplatina, o que demonstra a efetividade dos compostos *N,O*-doadores coordenados ao cobre (II). Dentre os compostos de coordenação contendo grupo amida destaca-se o complexo de cobre com ligante BPAH, o qual apresentou um valor de IC_{50} de $58 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ para uma linhagem de pulmão

resistente à cisplatina (H460). Esse resultado torna-se ainda mais promissor, visto que as células normais do sangue periférico (PBMC) apresentaram-se viáveis mesmo após o tratamento com $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do referido complexo. Além disso, a não redução na viabilidade celular das células não aderentes até uma concentração de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, indica que este complexo possui uma especificidade para tumores sólidos.

Dentre os compostos de coordenação com ligantes contendo grupos planares, pode-se destacar o complexo com ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$, o qual apresentou valores de IC_{50} inferiores a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ para células não aderentes. No entanto, a análise do tipo de morte celular para as linhagens mais sensíveis ao tratamento com o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Salandi}\beta)\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ indicou que as células MOLT-04 perdem sua viabilidade após 36 h de tratamento, enquanto que as células U937 apresentam alto número de mortes celulares.

Com intuito de verificar o tipo de mecanismo de morte celular empregado para os dois complexos mais ativos frente às duas linhagens cancerígenas testadas (H460 e U937) empregou-se diferentes metodologias, sendo observado que ambos os compostos atuam por um mecanismo apoptótico. Além disso, concluiu-se que o complexo com ligante BPAH provavelmente atua nas proteínas de aderência das células tumorais, enquanto que o complexo com ligante $\text{H}_2\text{Salandi}\beta$ provoca a morte celular por ambas as vias apoptóticas (intrínseca e extrínseca).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANS, M. N.; ASHTON, N. W.; PAQUET, N. BYRNE, K. O. e RICHARD, D. Mechanisms of Cisplatin Resistance: DNA Repair and Cellular Implications. ***Advances in Drug Resistance research***, 2014;

AIDYN, A.; MEDZHIDOV, A. A.; FATULLAEVA, P. A.; TASHCHIOGLU, S; YALCHIN, B. e SAIYN, S. Oxidative Dehydrogenation in Complexes of Transition Metals (Cu(II), Co(II), Ni(II) with *N,N'*-di(2-Hydroxybenzyl)diamines. ***Russian Journal of Coordination Chemistry***, 27(7): 521-527, 2001;

ALBERTS, B., JOHNSON, A., RAFF, L., WALTER, RL. ***Biologia Molecular da Célula***. Porto Alegre: Artmed, 5 ed., 1268, 2010;

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T .P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. ***Química Nova***, 28: 118-129, 2005;

ANSARI, K. I.; KASIRI, S. GRANT, J. D.; MANDAL, S. S. Fe(III)-Salen and Salphen Complexes Induce Caspase Activation and Apoptosis in Human Cells. ***Journal Biomolecular Screening***,16(1): 26-35, 2011;

AZUARA, L. R.; BRAVO-GÓMEZ. Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. ***Current Medicinal Chemistry***,17: 3606-3615, 2010;

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards 49 new targets. ***Chemical Communications***, 49: 5106-5131, 2013;

BASSETT, E. A.; WANG, W.; RASTINEJAD, F. e EL-DEIRY, W. S. Structural and functional basis for therapeutic modulation of p53 signaling. ***Clinical Cancer Research***, 14: 6376–6386, 2008;

BEREZUK, M. E.; PAESANO, A. J.; CARVALHO, N. M. F.; HORN, A. J.; ARROYO, P. A.; CARDOSO-FILHO, L. Theoretical and Empirical Studies on the Catalytic Partial Oxidation of Methane Promoted by FeY and Fe(piperazine)Y complexes (Y = y-zeolite). ***International Journal of Chemical Reactor Engineering***, 9: 1-29, 2011;

BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. ***Dalton Transactions***, 13: 1267-1272, 2007;

BERGHE, T. V.; CROOTJANS, S.; GOOSSENS, V.; DONDELINGER, Y.; KRYSKO, D. V.; TAKAHASHI, N. e VANDENABEELE, P. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods**, 61:117–129, 2013;

BOUCHET, B.P.; DE FROMENTEL, C.C.; PUISIEUX, A. e GALMARINI, C.M. p53 as a target for anti-cancer drug development. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 58:190-207, 2006;

BOULIKAS, T. PANTOS, A. BELLIS, E. CHRISTOFIS,P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. **Cancer Therapy**, 5: 537-583, 2007;

BORGES, F. V. Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de complexos de cobre e zinco frente a células leucêmicas e melanômicas. Tese (Doutorado), Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

BULL, E. S., Síntese, caracterização e avaliação das atividades de nucleases e antitumoral de compostos de coordenação de cobre. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008;

BULL, E. S., Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de compostos de coordenação de cobre(II) e gálio (III). Tese (Doutorado), Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2016;

BURGER, H.; NOOTER, K.; BOERSMA, A.W.M.; KORTLAND, C.J. e STOTER, G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. **International Journal of Cancer**, 73: 592–599, 1997;

BURGER, H.; LOOS, W.J.; EECHOUTE, K.; VERWEIJ, J.; MATHIJSSSEN, R.H.J.; WIEMER, E.A.C. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. **Drug Resistance**, 14: 22–34, 2011;

CARRADORRI, S.; MONTE, C.; D'ASCENZIO, M. SECCI., D.; CELIK, G.; CERUSO, M.;VULLO, D.; SCOZZAFAVA, A. e SUPURAN, C. T. Salen and tetrahydrosalen derivates act as effective inhibitors of the tumor-associated carbionic anhydrase XII – A new scaffold for designing isoform-selective inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**., 23: 6759-6763, 2013;

CASCIATO, D. A. Manual de Oncologia Clínica. 1º ed. São Paulo, Novo Conceito, 2008;

CASINI, A.; HARTINGER, C.; GABBIANI, C.; MINI, E.; DYSON, P.J.; KEPPLER, B.K.; MESSORI, L. Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol.102, 564–575, 2008;

CHRESTA, C. M. e HICKMAN, J. A. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax: Bcl-2 ratio. *Cancer Research*, 56(8):1834–1841, 1996;

CHU, E. e SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do Câncer. In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B. e TREVOR, A. J. (Org.). Farmacologia Básica e Clínica. Tradução de Ademar Valadares Fonseca, Geraldo Serra, José Eduardo Ferreira de Figueiredo e Patrícia Lydie Voeux. Porto Alegre: Artmed, 12ª Ed., p. 949 – 975, 2014;

CONLY, L. R. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Research*. 19, 291-306, 2011;

CONNOR, M. O.; KELLETT, A.; MCCANN, M. ROSAIR, G.; MCNAMARA, M.; HOWE, M.; CREAVENT, B. S.; MCCLEAN, S.; KIA, A. F. A.; SHEA, D. E. e DEVEREUX, M. Copper(II) Complexes of Salicylic Acid Combining Superoxide Dismutase Mimetic Properties with DNA Binding and Cleaving Capabilities Display Promising Chemotherapeutic Potential with Fast Acting in Vitro Cytotoxicity against Cisplatin Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55: 1957–1968, 2012;

COSETA, B, JAN, M. S., ROBERTUS, A. M. B. Controlo f cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14: 518-528, 2013;

CULLEN, K. J.; YANG, Z. ; SCHUMAKER, L. e GUO, Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39: 43–50, 2007;

DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E. M.; GLEASON, C. E.; PATEL, D. N.; BAUER, A. J.; CANTLEY, A. M.; YANG, W. S.; MORRISON, B. e STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Na Iron-Dependent Formo Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 963-965, 2012;

ELMORE, S. Apoptosis: A Review pf programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516, 2007;

FAGG, E.; GAVARA, R.; BOLTE, M. FAJARÍ, L.; JULIÁ, L.; RODRÍGUEZ, L. e ALFONSO, I. Copper(II) complexes of macrocyclic and open-chain pseudopeptidic ligands: synthesis, characterization and interaction with dicarboxylates. ***Dalton Transitions***, 44: 12700-12710, 2015;

FARRELL, N. Biomedical uses and applications of Inorganic Chemistry. An overview. ***Coordination Chemistry Reviews***, 232: 1-4, 2003;

FERNANDES, C.; HORN, A. Jr.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; ASSIS, V.M.; ROCHA, M. R.; MATHIAS, L. S.; BULL, E. S.; BORTOLUZZI, A. J.; GUIMARÃES, E. V.; ALMEIDA, J. C.; RUSSELL, D. H. Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. ***Journal Inorganic Biochemistry***, 104, 1214-1223, 2010;

FERNANDES, C.; HORN JR, A.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; KANASHIRO, M. M.; ROCHA, M. R.; MOREIRA, R. O.; MORCELLI, S. R.; LOPES, B. F.; MATHIAS, L. S.; BORGES, F. V.; BORGES, L. J. H.; FREITAS, W. R.; VISENTIN, L. C.; ALMEIDA, J. C. A., SCHENK, G. Synthesis, characterization, antibacterial and activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N₃ or N₂O donor groups. ***Inorganica Chimica Acta***, 416:35-48, 2014;

FERNANDES, C.; HORN JR, A.; LOPES, B. F.; BULL, E. S.; AZEREDO, N. F. B.; KANASHIRO, M. M.; BORGES, F. V.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; PIRES, A.; FRANCO, R. W. A.; ALMEIDA, J. C. A.; MACIEL, L. L. F.; RESENDE, J. A. L. C.; SCHENK, G. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. ***Journal of Inorganic Biochemistry***, 153: 68-87, 2015;

FISCHER, U. E SCHULZE-OSTHOFF, K. New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. ***Pharmacological Reviews***, 57:187-215, 2005;

FLOREA, A. BUSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. ***Canceres***, 3:1351-1371, 2011;

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. ***Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola***, 6:13-18, 2005;

FREITAS, W. R. Efeitos antineoplásicos induzidos in vitro por isoquinolino quinonas sintéticas em linhagens de células tumorais humanas. Dissertação (Mestrado), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2011;

GALLUZZI, L.; KEPP, O. E KROEMER, G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. ***Molecular Cell Biology***, 13: 780-788, 2012;

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; et al; Kroemer, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. ***Cell Death and Differentiation***, 1-16, 2014;

GUERRA, W. RODRIGUES, M. A. RUGGIERO, R. Compostos Inorgânicos como fármacos. ***Sociedade Portuguesa de Química (SPQ)***, 115: 25-30, 2009;

GALLAGHER, W.M.; CAIRNEY, M.; SCHOTT B.; RONINSON, I.B.; BROWN, R. Identification of p53 genetic suppressor elements which confer resistance to cisplatin. ***Oncogene***. 14: 185-193, 1997;

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. ***Coordination Chemistry Review***, v. 7, p. 81-122, 9 1971;

GILLIAN L.; EVANS G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. ***Theriogenology***, 63: 445-457, 2005;

GRAF, N., LIPPARD, S.J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 64(11): 993–1004, 2012;

GRANVILLE, D. e GOTTLIEB, R. A. Mitochondria: Regulators of Cell Death and Survival. The ***Scientific World Journal***, 2, 1569–1578, 2002;

GRECG, R. S.; MOLEPO, J. M.; MONPETIT, V. J.; MIKAEL, N. Z.; REDMOND, D.; GADIA M. e STEWART, D. J. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. ***Journal of Clinical Oncology***, 10(5): 795-803, 1992;

GRIVICICH, I.; REGNER, A. e ROCHA, A, B. Morte Celular por Apoptose. ***Revista Brasileira de Cancerologia***, 53(3): 335-343, 2007;

GUTSCHNER, T. e DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. ***RNA Biology***, 9(6):703-719, 2012;

HAHN, W.C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. ***Natural Reviews Cancer***, 2:331-341;

HALL, M.D.; OKABE, M.; SHEN, D.W.; LIANG, X.J. e GOTTESMAN, M.M. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. **Review Pharmacology Toxicology**, 48: 495–535, 2008;

HARTWELL, L. H. e WENERT, T.A. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. **Science**, 3; 246: 629-634, 1989;

HAUPT, Y. MAYA, R. KAZAZ, A. OREN, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, 387: 296-299, 1997;

HAY, R. W.; GOVAN, N.; PEROTTI, A.; CARUGO, O. Copper(II), nickel(II) and palladium(II) complexes of the di-amide ligand N,N'-bis(2-carbamoyl)ethylenediamine (H2L) and the crystal structure of the carbonyl-oxygen-bonded copper(II) complex [Cu(H2L)](ClO4)2. **Transition Metals Chemistry**, 22: 389-394, 1997;

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407: 770-776, 2000;

HORN JR., A., FERNANDES, C., PARRILHA, G. L., KANASHIRO, M. M., BORGES, F. V., MELO, E. J. T., SCHENK, G., TERENZI, H, PICH, C. T. Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 128: 38-47, 2013;

HOWELL, S.B.; SAFAEI, R.; LARSON, C.A. e SAILOR, M.J. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. **Molecular Pharmacology**, 77: 887–894, 2010;

IARC - International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Statistics: All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Incidence and Mortality Worldwide in 2008. 2013. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>>, Acesso em: 25/07/2013;

IKARI, A.; NAGATANI, Y.; TSUKIMOTO, M.; HARADA, H.; MIWA, M. e TAKAGI, K. Sodium-dependent glucose transporter reduces peroxynitrite and cell injury caused by cisplatin in renal tubular epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1717, 109–117, 2005;

INCA - ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2. ed. rev. e atual, Rio de Janeiro: INCA, 2012;

INCA. Fisiopatologia do câncer, capítulo 2. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>>. Acesso em: 26/11/2013, 2006;

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Incidência de câncer no Brasil, 2013. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>>, Acesso em: 25/10/2014;

INCA – Estimativa 2014-2017: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, 2016;

JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G. e KEPLER, B. K. Antitumor metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Transactions*, 14(2):183-94, 2007;

JUNG, Y e LIPPARD, S. J. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chemical Reviews*, 107(5): 1387-1407, 2007;

KALFAOGLU, E.; KARABUTUT, B. Theoretical investigation of EPR and molecular orbital coefficient parameters for $[\text{Cu}(\text{hsm})_2(\text{sac})_2]$ complex. *Chemical Physics Letters*, 505: 154-156, 2011;

KANDUC, D.; MITTELMAN, A.; SERPICO, R.; SINIGAGLIA, E.; SINHA, A. A.; NATALE, C.; SANTACROCE, S. SIMONE, S., BUCCI, R. FARBER, E. Cell Death: Apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, 21: 165-170, 2012;

KAPITZA, S.; PONGRATZ, M.; JAKUPEC, M. A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; LACKINGER, L.; KEPLER, B. K. e MARIAN, B. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(2): 101–110, 2004;

KARTALOU, M. e ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research*, 478: 23–43, 2001;

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer. Nature Reviews Cancer*, 7: 573-584, 2008;

KELLETT, A.; CONNOR, M. O.; MCCANN, M.; HOWE, A.; CASEY, A.; MCCARRON P.; KAVANAGH, K.; MCNAMARA, M.; KENNEDY, S.; MAY, D. D.; SKELL, P.

S.; SHEA, D. O. e DEVEREUX, M. Water-soluble bis(1,10-phenanthroline) octanedioate Cu^{2+} and Mn^{2+} complexes with unprecedented nano and picomolar in vitro cytotoxicity: promising leads for chemotherapeutic drug development. **MedChemComm**, 2: 579-584, 2011;

KELLETT, A.; HOWE, O.; CONNOR, M. O.; MCCANN, M.; CREAVER, B.; MCCLEAN, S.; FOLTYN-ARFA, K. A.; CASEY, A. e DEVEREUX, M. Radical Induced DNA Damage by Cytotoxic Square-Planar Copper(II) Complexes Incorporating o-Phthalate and 1,10-Phenanthroline or 2,2'-Dipyridyl. **Free Radical Biology And Medicine**, 53(3): 564-576, 2012;

KÖPF-MAIER, P. Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 47, 1–16, 1994;

KIVELSON, K.; NIEMAN, R. ESR studies on the bonding in copper complexes. **The Journal of Chemical Physics**, 35: 149-155, 1961;

KUMAR, V; COTRAN, RS; ROBBINS, SL. Patologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 Ed., 2000;

KUMAR, V. ABBAS, A.K., FAUSTO, N. Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease. *Philadelphia. Elsevier Saunders*, 7. Ed. 2005.

LAKOMSKA, I.; FANDZLOCH, M.; MUZIOL, T.; LIS, T. e JEZIERSKA, J. Synthesis, characterization and antitumor properties of two highly cytotoxic ruthenium (III) complexes with bulky triazolopyrimidine ligands. **Dalton Transactions**, 17: 6219-6226, 2013;

LIU, J.; ZHANG, C., HU, W. e FENG, Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. **Cancer Letters**, 356(2): 197–203, 2014;

LODISH, L., BERK, A., MATSUDARIA, P., KAISER, C.A., KRIEGER, M., SCOTT, M.P., ZIPURISKY, L., DARNELL, J. *Molecular Cell Biology*. Artmed, 5 Ed., 973, 2005;

LOPES, B. F. Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Antiproliferativa de Compostos Orgânicos e de Coordenação de Cobre: Influência do Naftol e da Cumarina na Atividade Biológica. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

MACHADO, A.E.D. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, 23, 237-243, 2000;

MANDIC, A.; HANSSON, J.; LINDER, S. e SHOSHAN, M.C. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling, **The Journal of Biological Chemistry**, 278: 9100–9106, 2003;

MAPARA, M. Y. e SYKES, M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. **Journal of Clinical Oncology**, 22(6):1136-1151, 2004;

MARINE, J. C. e LOZANO, G. Mdm2-media mediated ubiquitylation: p53 and beyond. **Cell Death Differ**, 17(1), 93-102, 2010;

MATTOS, M. C. e MARZORATI, L. Aspectos Mecanísticos da Adição de Michael. **Química Nova**, 22 (5): 710-714, 1999;

MILLER, R. P.; TADAGAVADI, R. K.; RAMESH, G. e REEVES, W. B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. **Toxins**, 2, 2490-2518, 2010;

MOMAND, J.; ZAMBETTI, G. P.; OLSON, D. C.; GEORGE, D. e LEVINE, A. J. The *mdm-2* Oncogene Product Forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-Mediated trans-activation. **Cell**, 69, 1237-1245, 1992;

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, 69(6): 286–295, 2011;

MORCELLI, S. R.; BULL, E. S.; TERRA, W. S.; MOREIRA, R. O.; BORGES, F. V. KANASHIRO, M. M.; BORTOLUZZI, A. J. MACIEL, L. L. F.; ALMEIDA, J. C. HORN, A. JR. e FERNANDES, C. Synthesis, characterization and antitumoral activity of new cobalt(II)complexes: Effect of the ligand isomerism on the biological activity of the complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 161: 73-82, 2016a;

MORCELLI, S. R.; KANASHIRO, M. M.; CANDELA, D. R. S.; ALZAMORA, M. , A. JR. e FERNANDES, C. Synthesis, characterization and antitumoral activity of new di-iron (III) complexes containing naphthyl groups: Effect of the isomerism on the biological activity. **Inorganic Chemistry communications**, 67: 22-24, 2016b;

MORGAN, D. O. Principles of CDK regulation. **Nature**, 374: 131-134, 1995;

MUHAMMAD, N. e GUO, Z. Based anticancer chemotherapeutic agents. **Chemical Biology**, 19: 144-153, 2014;

MURRAY, A. W. e KIRSCHER, M. W. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 25; 339: 275-280, 1989;

ORVIG, C. e ABRAMS, M. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. **Chemical Reviews**. Vol. 99 (9): 2201-2204, 1999;

PAVIA, D.; LAMPMAN, G. M.; KRIS, G. e VYVYAN, J. R. Introdução a Espectroscopia. 2ª Ed. São Paulo, Cengage Learning, 2015;

PERES, L. A. B. e CUNHA, A. D. J. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. **Journal Brasileiro de Nefrotoxicidade**, 35(4):332-340, 2013;

PICCIOLI, F.; SABATINI, S.; MESSORI, L.; ORIOLI, P.; HARTINGER, C.G. e KEPPLER, B.K. A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl₄(Ind)₂] and serum proteins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 98(6): 1135–1142, 2004;

PRENESTI, E.; DANIELE, P.G; PRENCIPE, M. e OSTACOLI G. Spectrum – Structure correlation for visible absorption spectra of copper(II) complexes in aqueous solution. **Polyhedron**, 18 3233-3241, 1999;

ROSAS, M. S. L. et al. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química** (UFF), Niterói, 5(2): 243-265, 2013;

SALMONM, S.E., *Farmacología Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998;

SILVA, G. B E VARGAS, M. D. Complexos de Pt⁴⁺: Estratégia Molecular no Combate ao Câncer. **Revista Virtual de Química**, 4(2), 102-117, 2012;

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. e KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª ed. LTC, Rio de Janeiro, 2012;

SHERR, C. J. Cancer Cell Cycles. **Science**, 274: 1672-1677, 1996;

SHERR, C. J. e ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes and Development**, 13(12):1501-1512, 1999;

SMILEY, S. T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C. LIN., M.; CHEN, A. SMITH, T. W.; STEELE, S. D. JR. e CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America.**, 88(9):3671-3675, 1991;

SPRECKELMEYER, S.; ORVIG, C. E CASINI, A. Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metalloodrugs: An Overview beyond Cisplatin. **Molecules**, 19: 15584-15610, 2014;

STEWART, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 63: 12–31, 2007;

TABBIA, G., GIUFFRIDAA, A., BONOMO, R.P. Determination of formal redox potentials in aqueous solution of copper(II) complexes with ligands having nitrogen and oxygen donor atoms and comparison with their EPR and UV-Vis spectral features. **Journal Inorganic Biochemistry**, 128: 137-145, 2013;

TAN, C. P.; LU, Y. T.; JI, L. N.; MAO, Z. W. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics**, 6: 978-26995, 2014;

TANIDA, S.; MIZOSHITA, T.; OZEKI, K.; TSUKAMOTO, H.; KAMIYA, T.; KATAOKA, H., SAKAMURO, D. e JOH, T. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. **International Journal of Surgical Oncology**, 22:1-8, 2012;

TAO, C. PETER, A. S., FIONA, K. M., NICOLA, J. C. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. **Drug Discovery Today**, 17: 194-202, 2012;

TERRA, W. S.; FERREIRA, S. S.; COSTA, R. O.; MENDES, L. L. FRANCO, R. W. A.; BORTTOLUZZI, A. J.; RESENDE, J. A. L. C.; FERNANDES, C. e HORN, Jr. A. Evaluating the influence of the diamine unit (ethylenediamine, piperazine and homopiperazine) on the molecular structure, physical chemical properties and superoxide dismutase activity of copper complexes. **Inorganica Chimica Acta**, 450: 353-363, 2016;

TOMASETTI, C. VOGELSTEIN, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem divisions. **Science**, 2; 347: 78-81, 2015;

WANG, D. e LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Review Drug Discovery**, 4: 307–320, 2005;

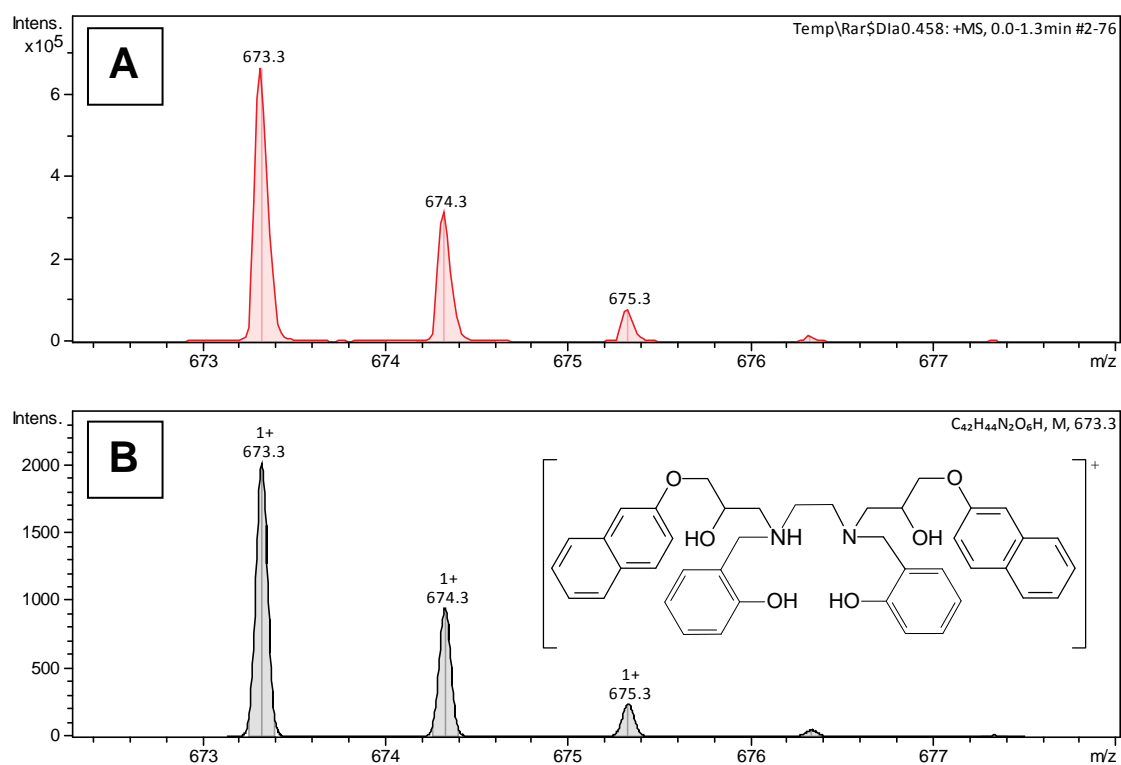
WANG, X.; LI, H.; DU, X.; HARRIS, J.; GUOC, J. e SUN, H. Activation of carboplatin and nedaplatin by the N-terminus of human copper transporter 1 (hCTR1). **Chemical Science**. 3, 3206-3215, 2012;

WHO, World Health Organization. Cancer. Publicação on line disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>, Acesso em: 25/10/2015;

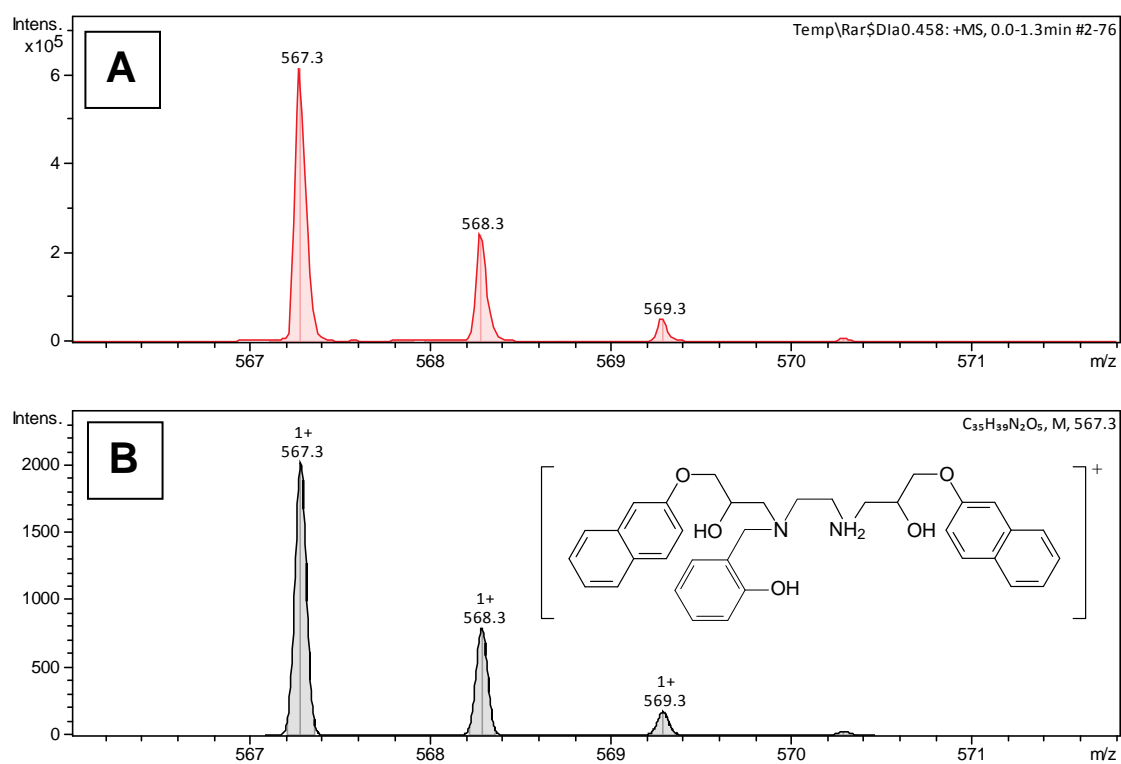
WILLIAMS, C. J.; MORRIS, H.; SVOREC, J.; VALKOVA, M.; VALKO, M.; MONCOL, J.; MAZUR, M.; VALACH, F.; MELNIK, M. A study of copper(II) carboxylato complexes with the biological ligands nicotinamide and papaverine. **Journal of Molecular Structure**. v. 659,53-60, 2003;

ZOCOLI, R.; REICHOW, S. L. e ZOCOLI, A. M. F. Emissões otoacústicas x Cisplatina: detecção precoce da ototoxicidade em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 69: 222-225, 2003.

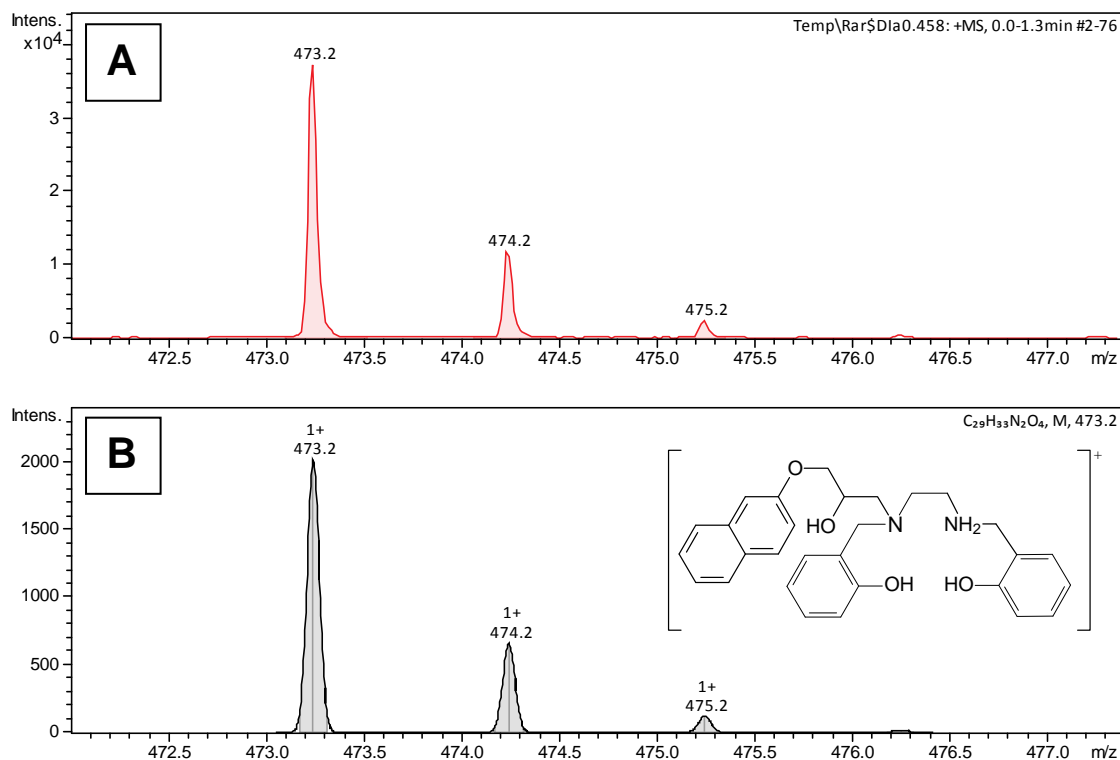
ANEXOS



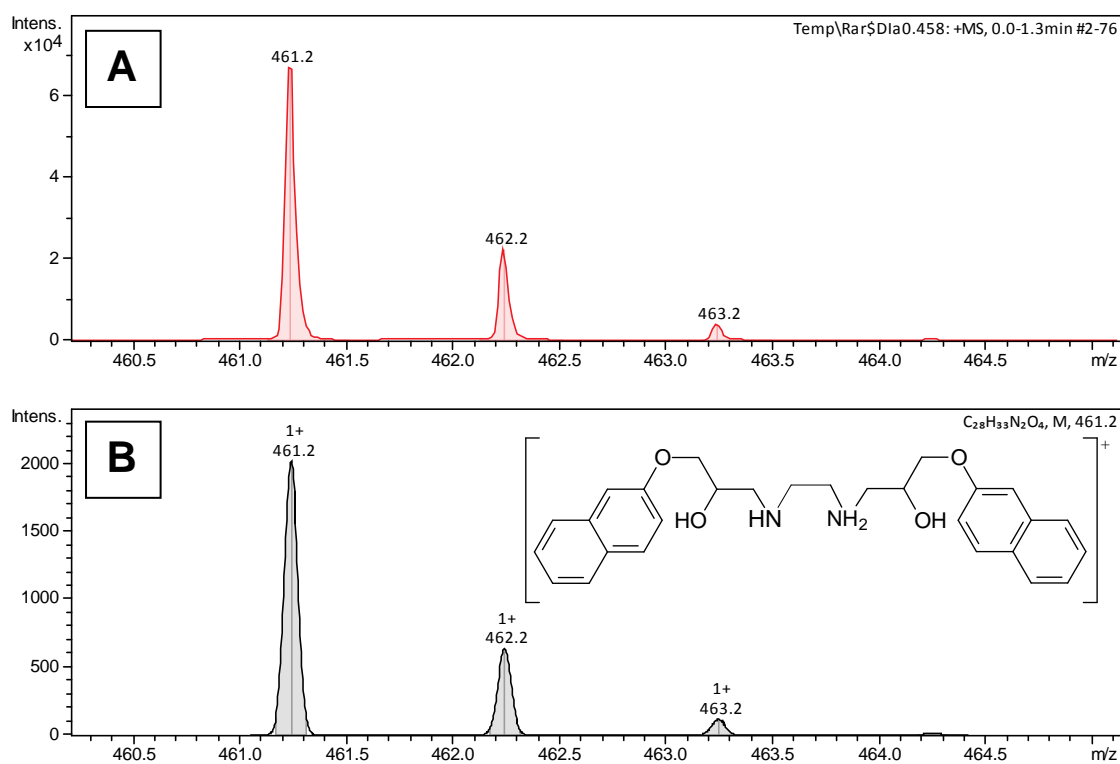
Anexo 1. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{42}H_{45}N_2O_6)^+$ com sua proposta estrutural.



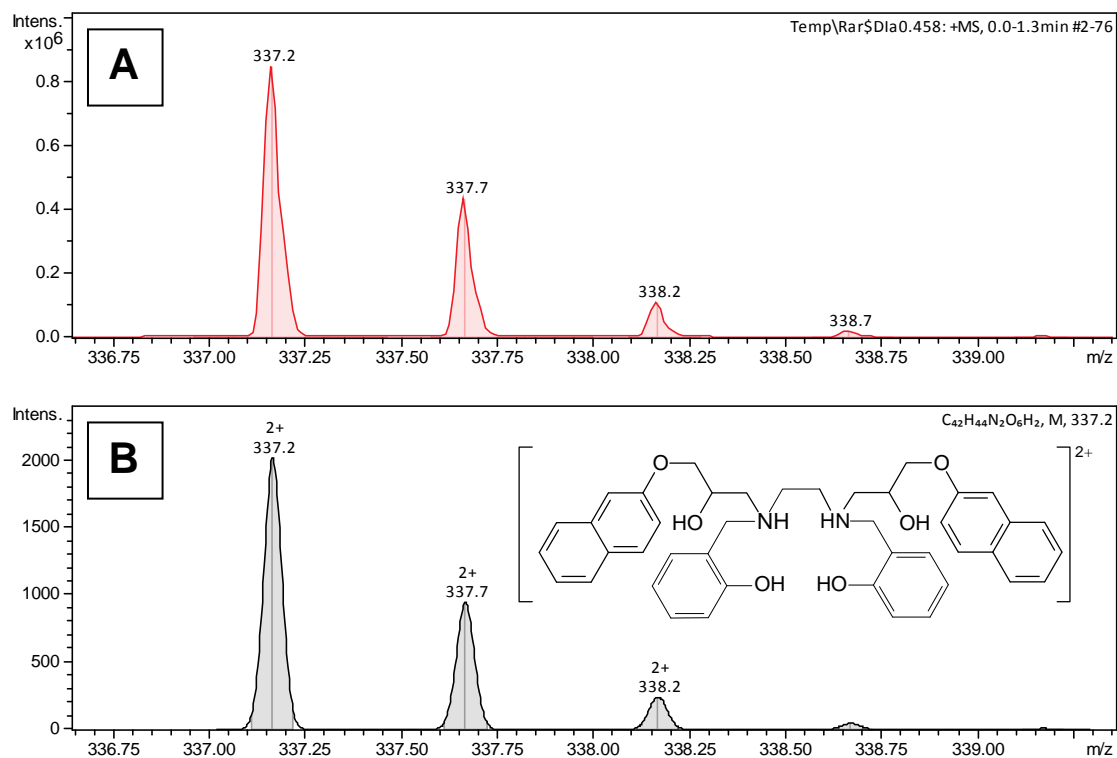
Anexo 2. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{35}H_{39}N_2O_5)^+$ com sua proposta estrutural.



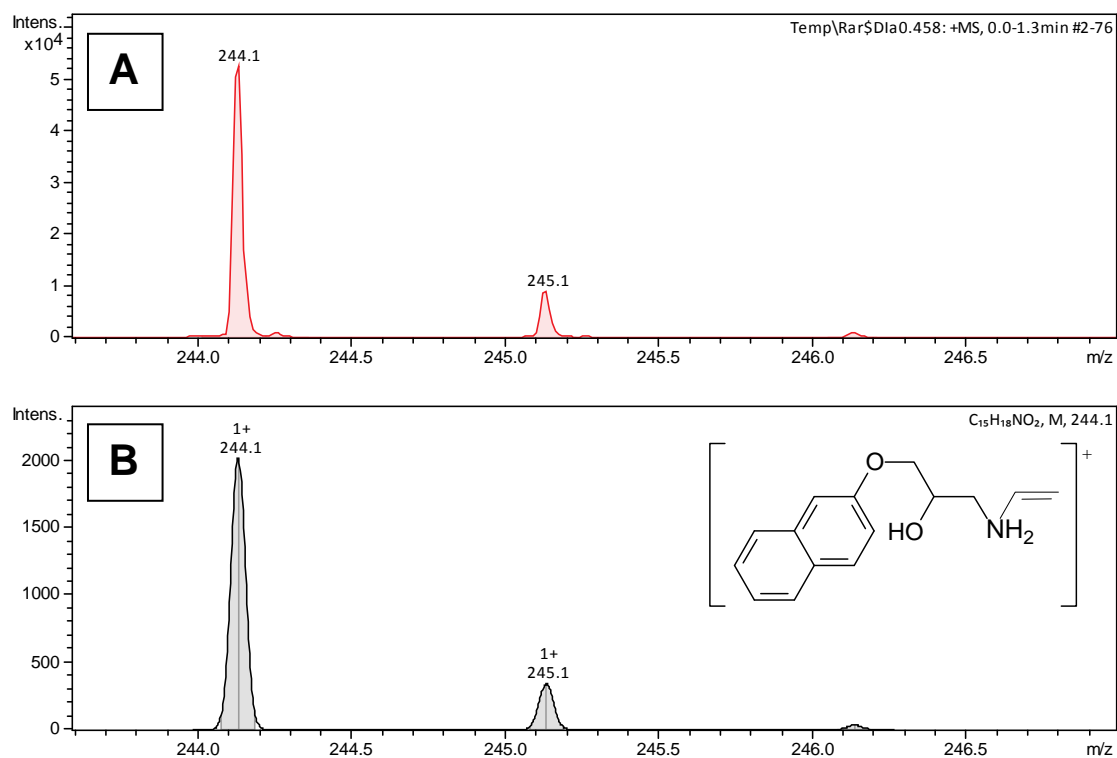
Anexo 3. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{29}H_{33}N_2O_4)^+$ com sua proposta estrutural.



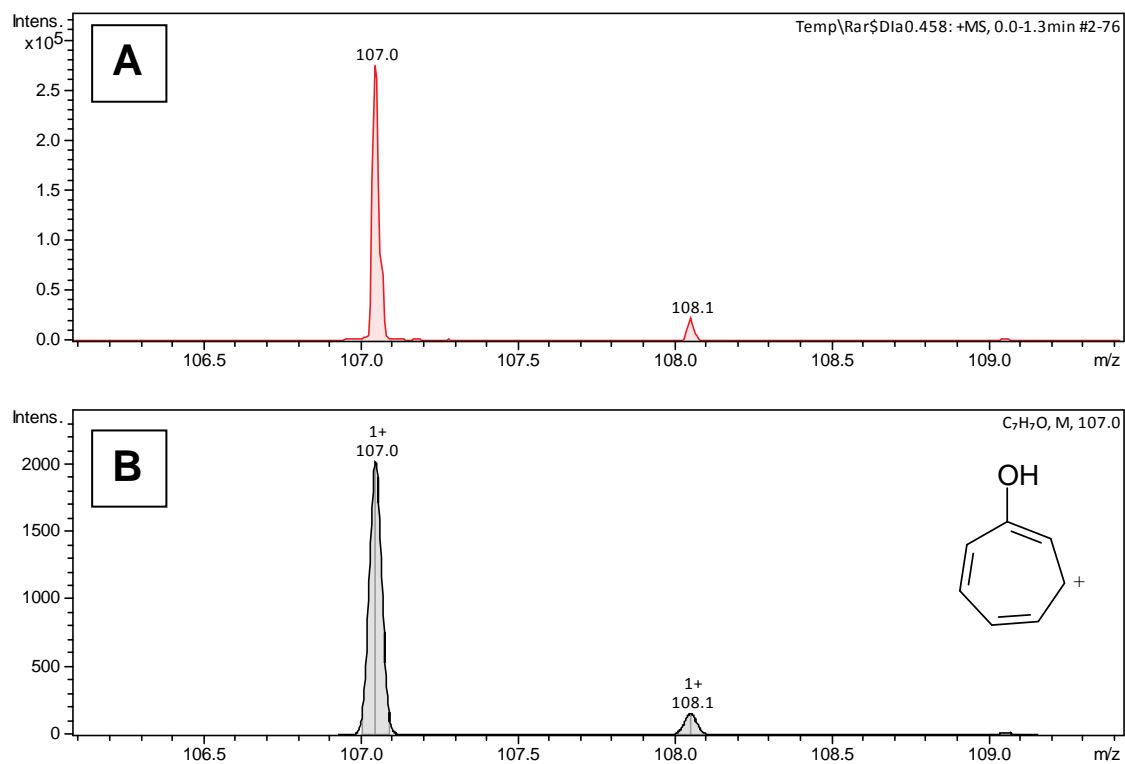
Anexo 4. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{28}H_{33}N_2O_4)^+$ com sua proposta estrutural.



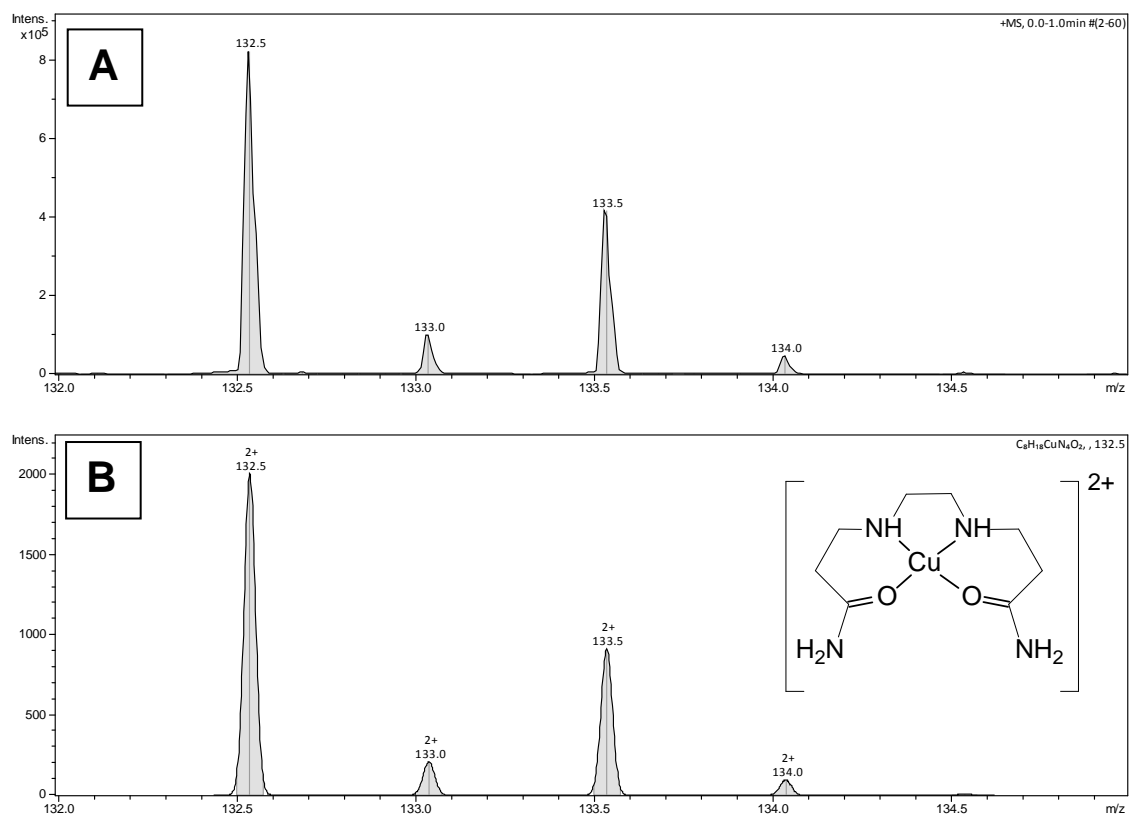
Anexo 5. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{22}H_{46}N_2O_6)^{2+}$ com sua proposta estrutural.



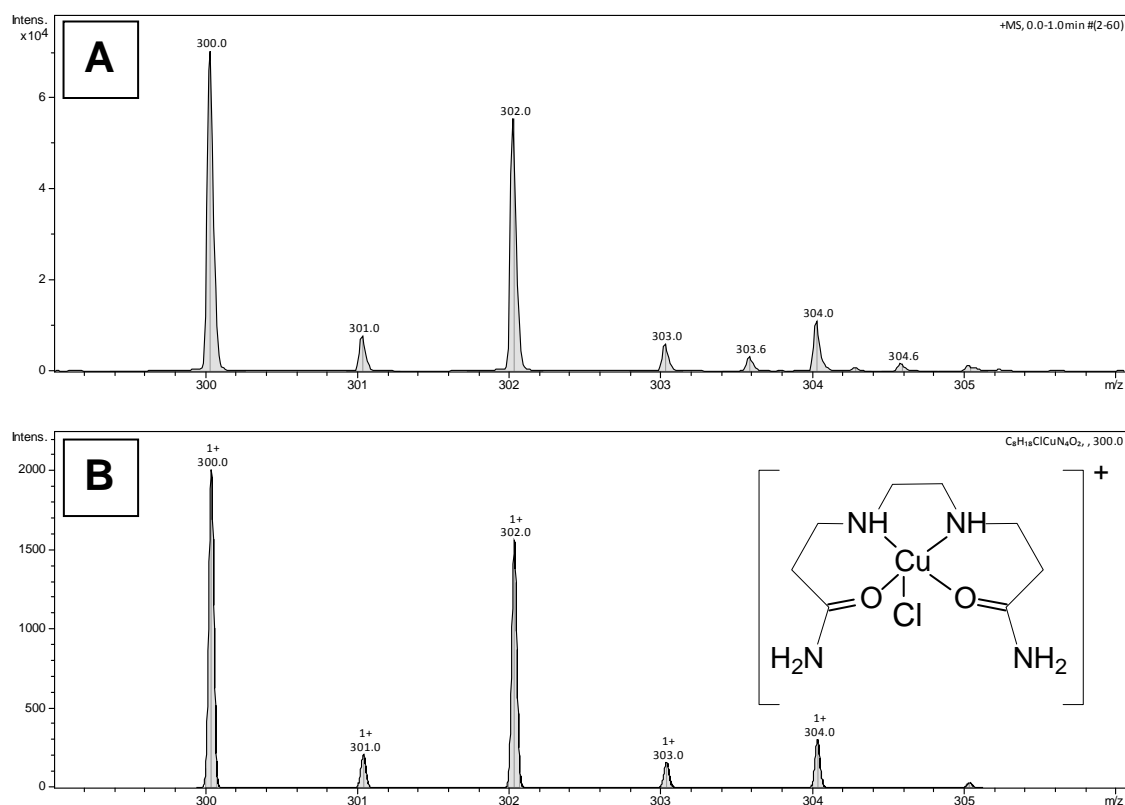
Anexo 6. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{15}H_{18}NO_2)^+$ com sua proposta estrutural.



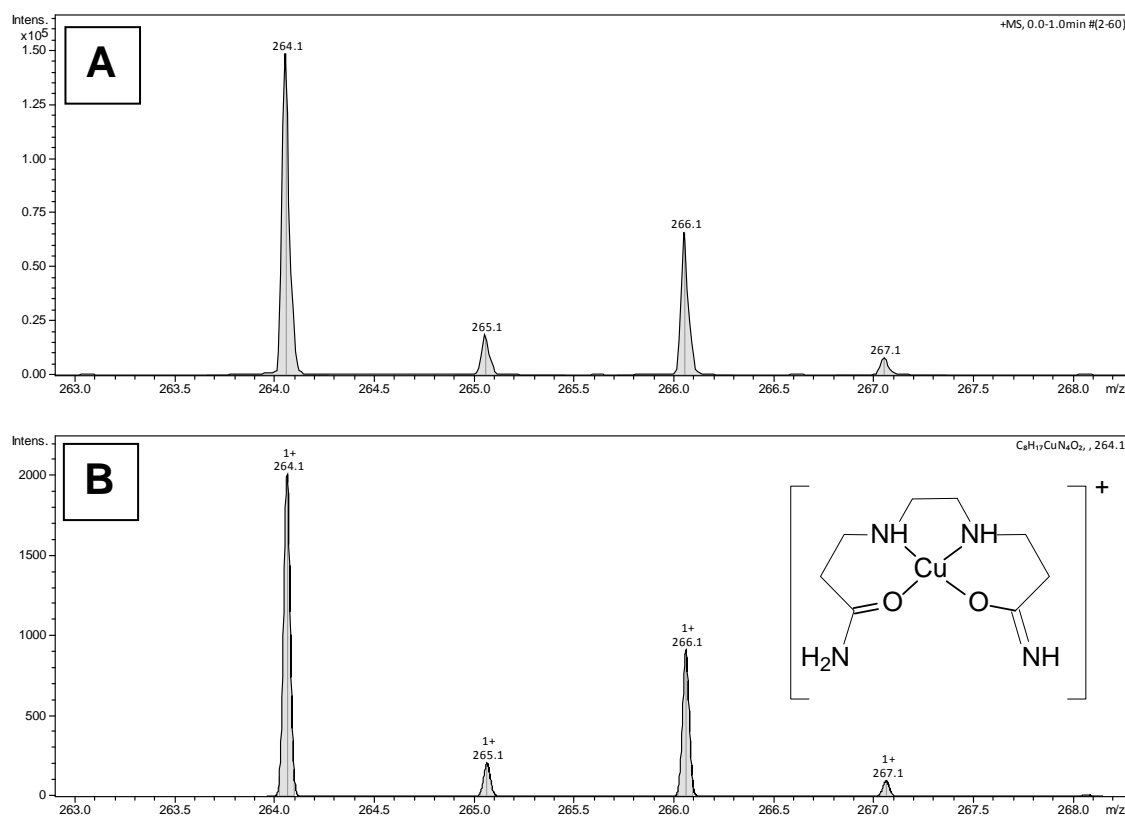
Anexo 7. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_7H_7O)^+$ com sua proposta estrutural.



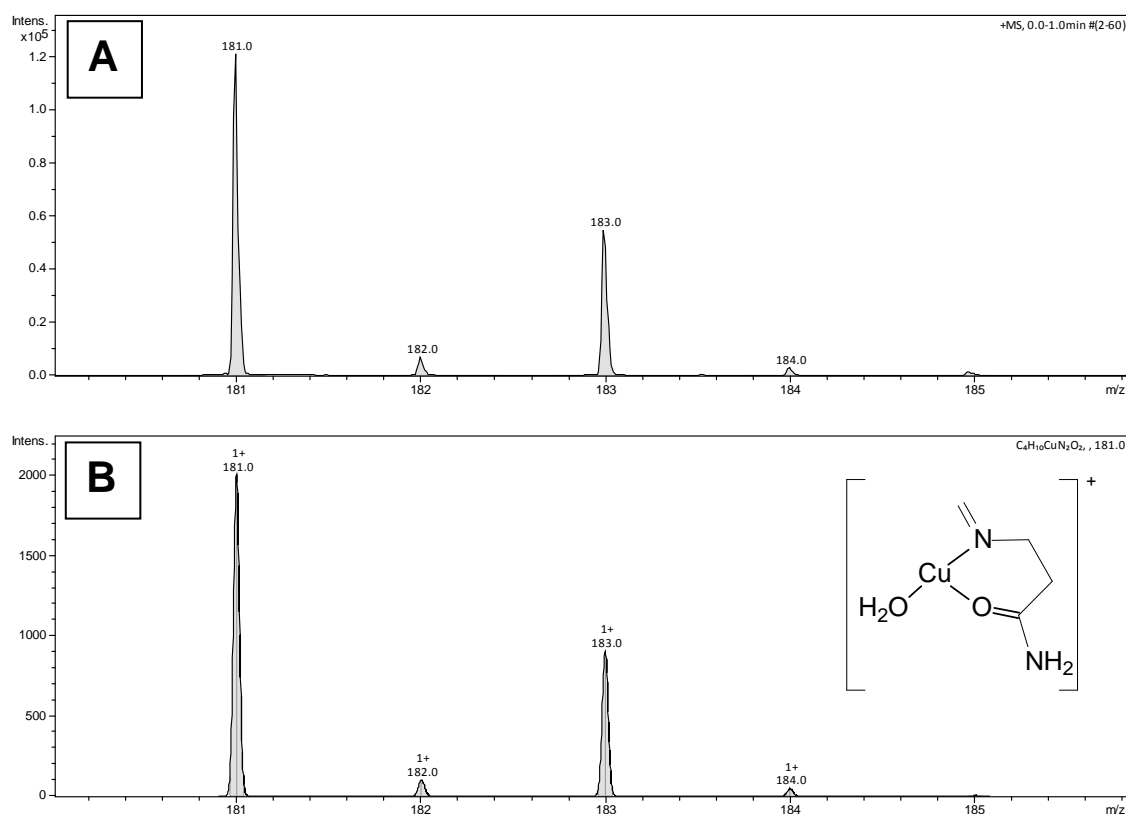
Anexo 8. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[Cu(BCEN)]^{2+}$ com sua proposta estrutural.



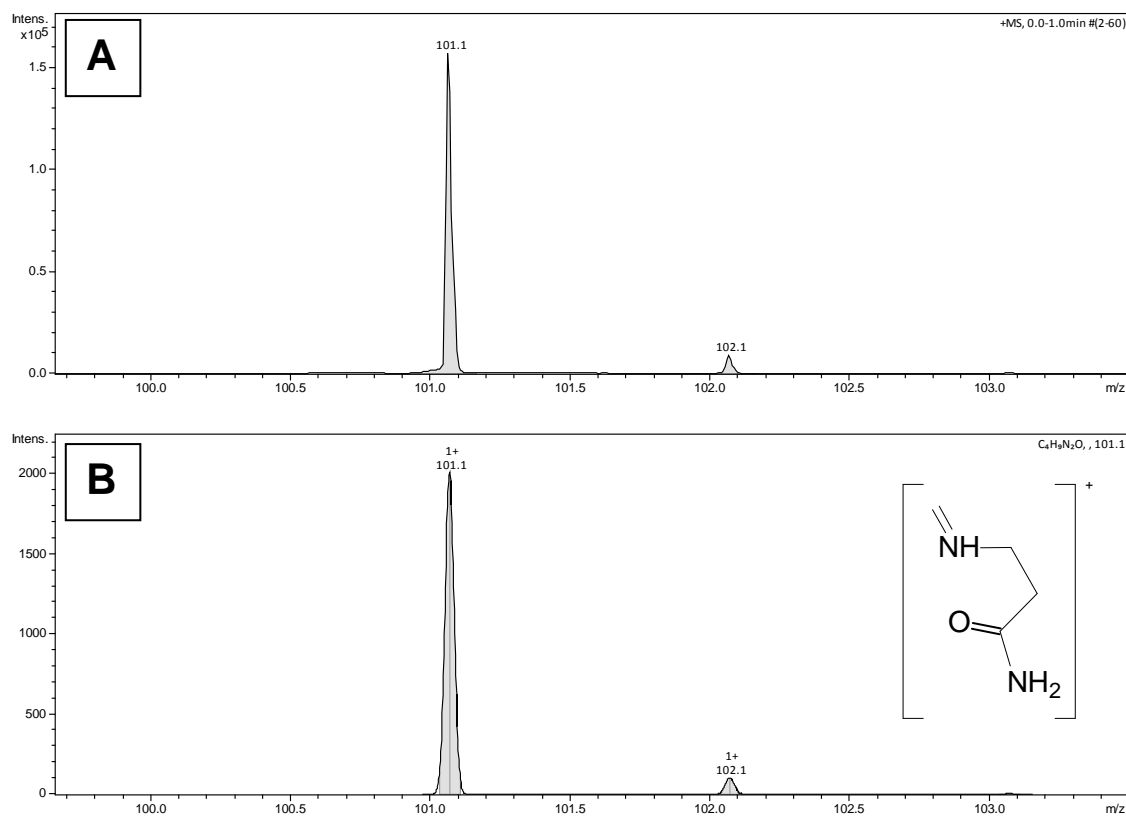
Anexo 9. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{BCEN})\text{Cl}]^+$ com sua proposta estrutural.



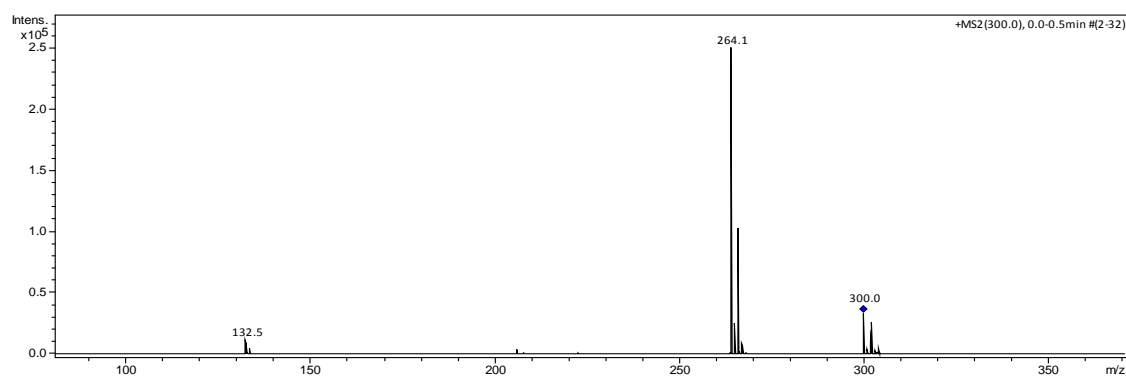
Anexo 10. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2)]^+$ com sua proposta estrutural.



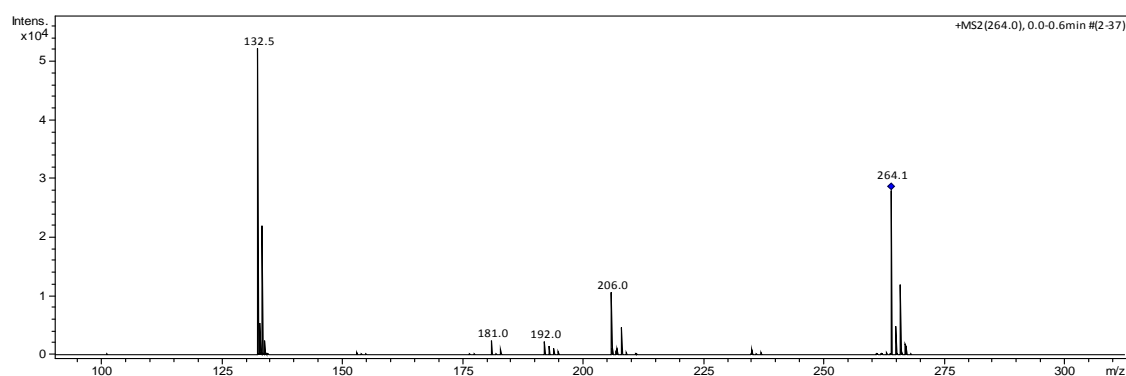
Anexo 11. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2)]^+$ com sua proposta estrutural.



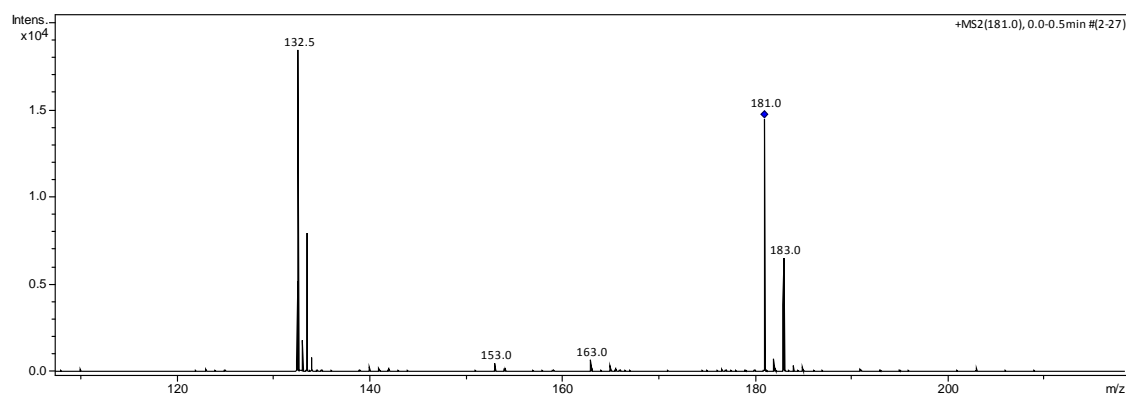
Anexo 12. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_2\text{O})^+$ com sua proposta estrutural.



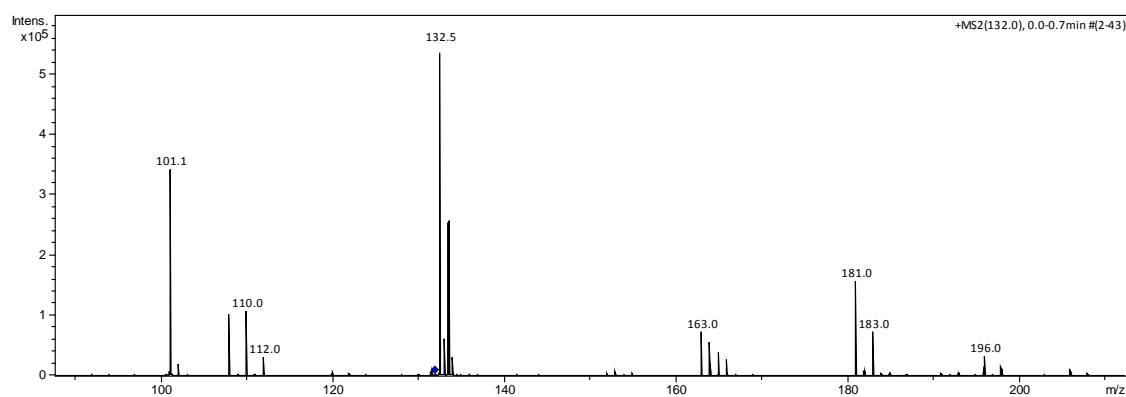
Anexo 13. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 300 para o complexo [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O.



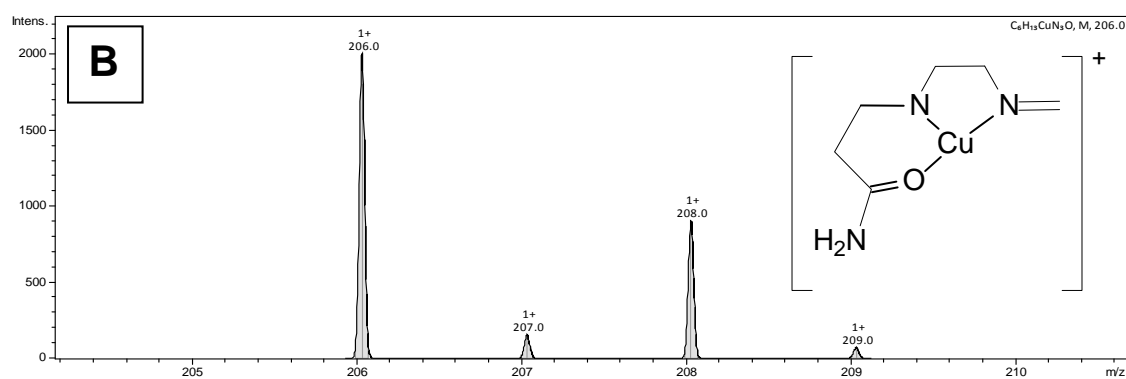
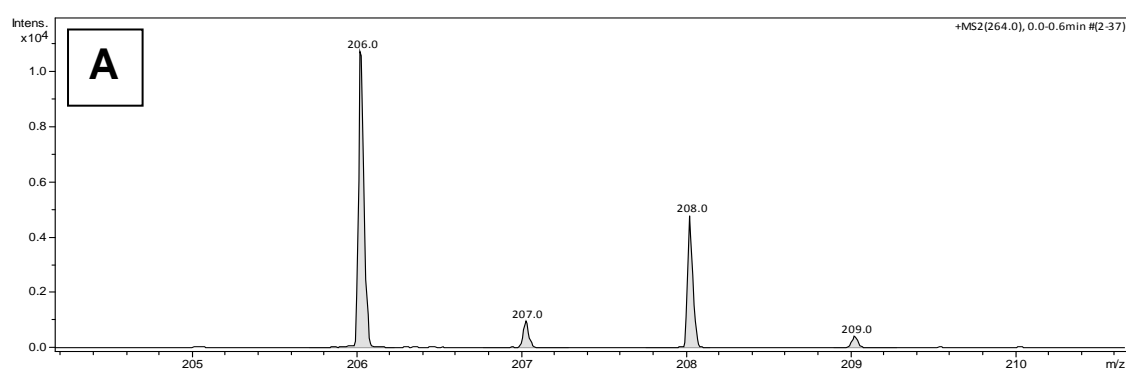
Anexo 14. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 264 para o complexo [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O.



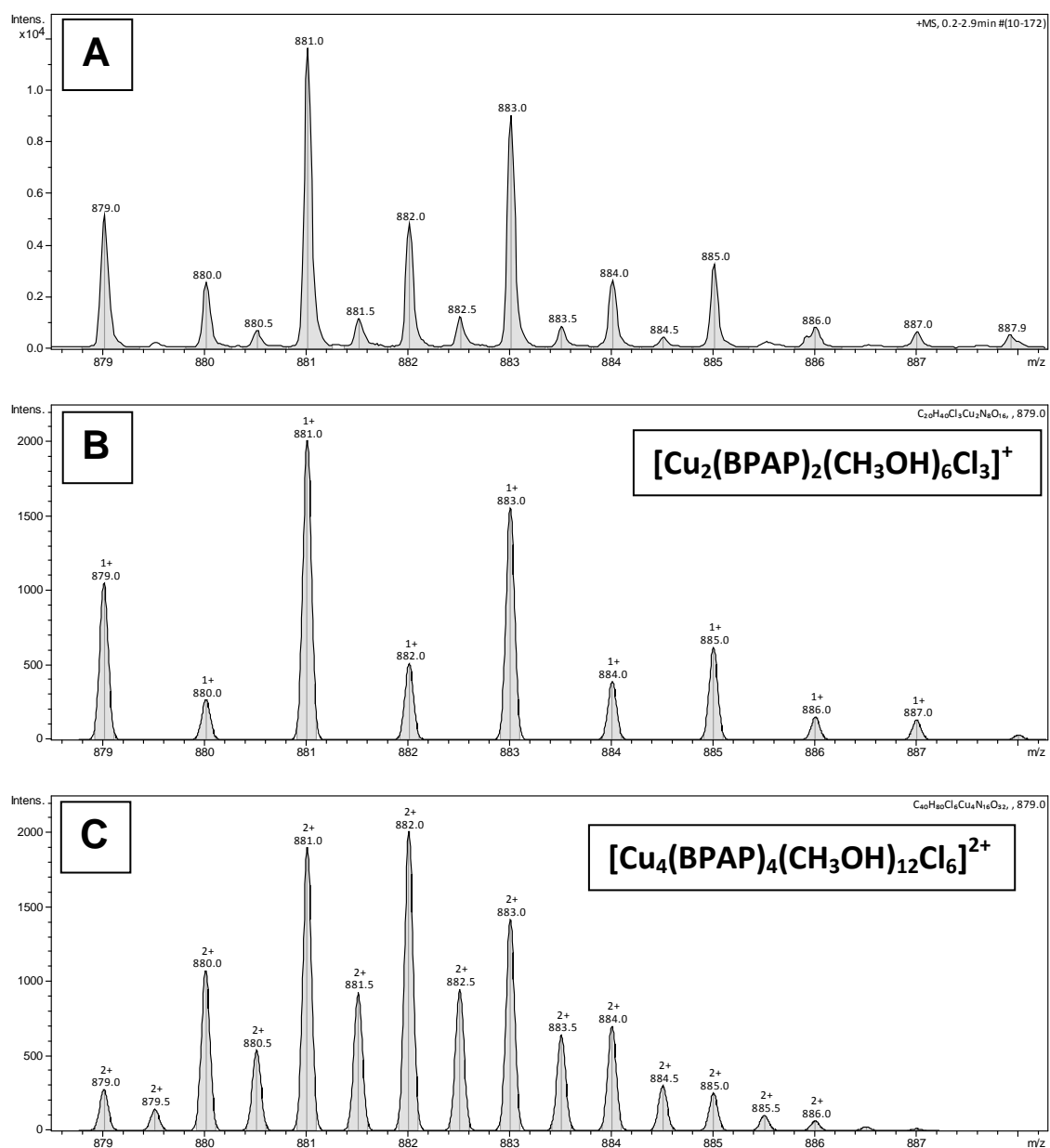
Anexo 15. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 181 para o complexo [Cu(BCEN)]Cl₂•2H₂O.



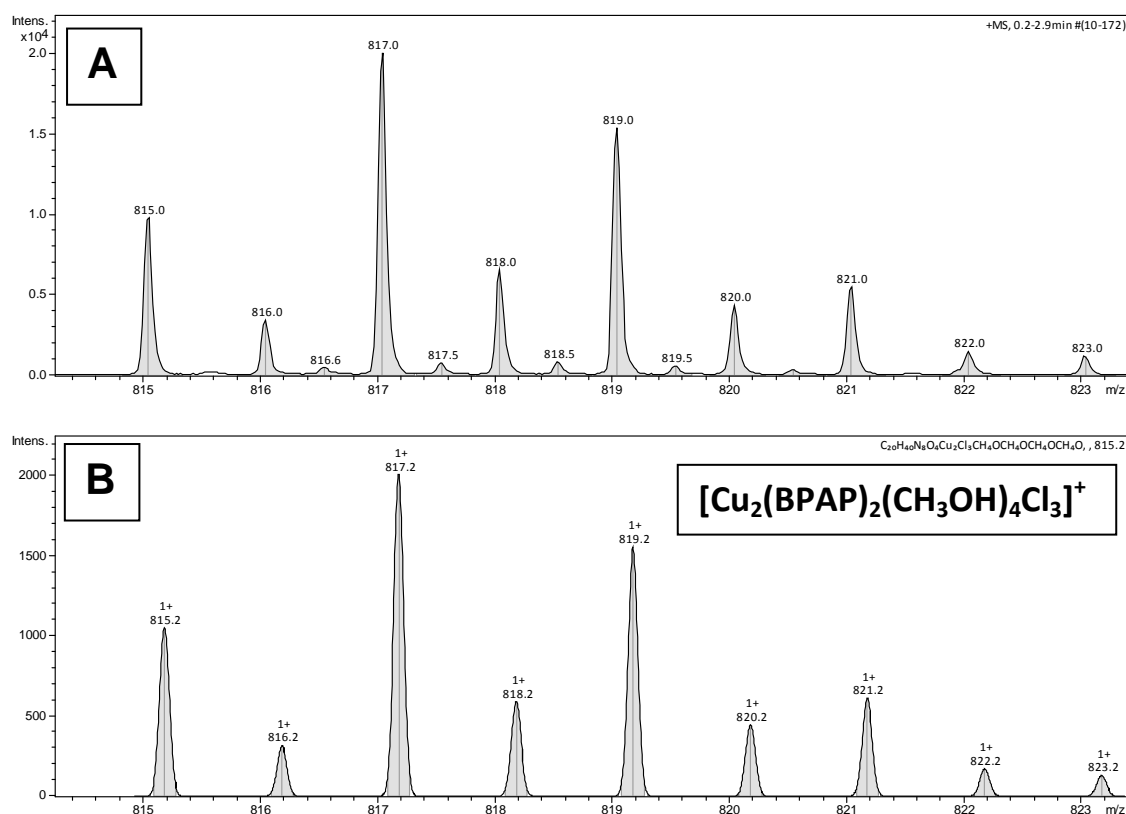
Anexo 16. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 132,5 para o complexo $[\text{Cu}(\text{BCEN})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.



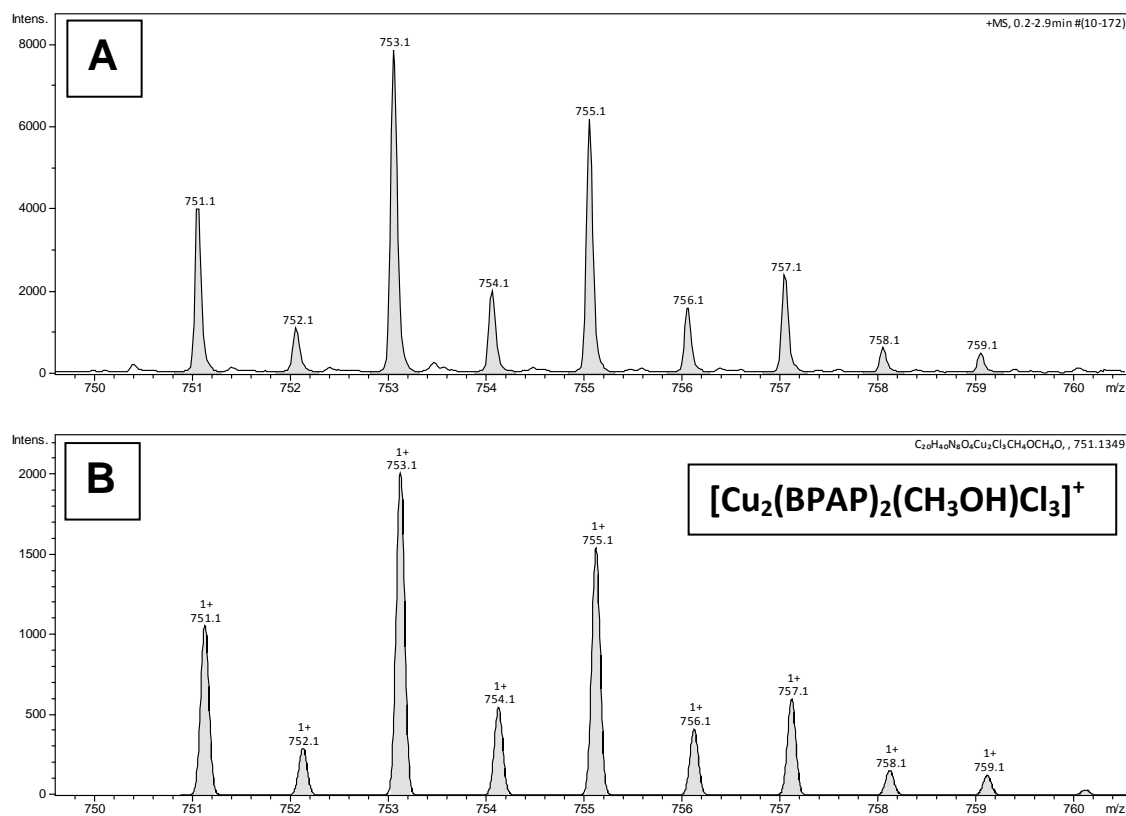
Anexo 17. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O})^+$ com sua proposta estrutural.



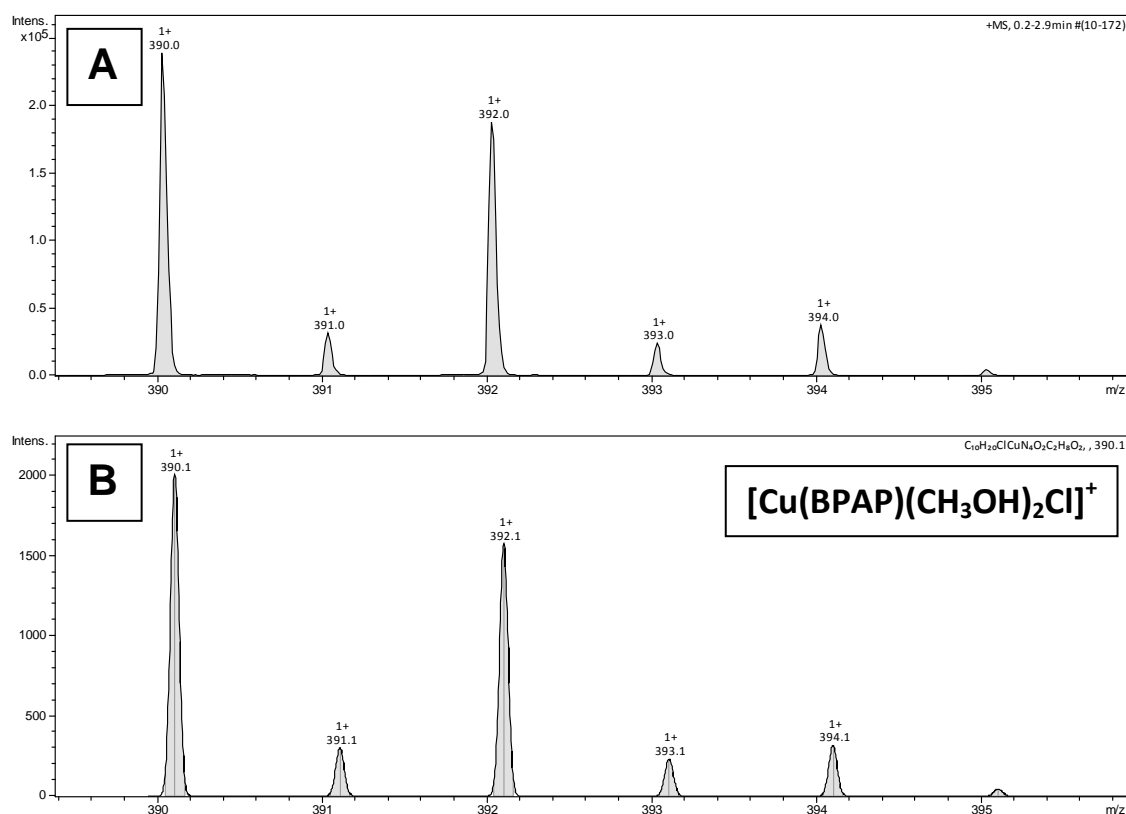
Anexo 18. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_6\text{Cl}_3]^+$ e **[C]** para a espécie $[\text{Cu}_4(\text{BPAP})_4(\text{CH}_3\text{OH})_{12}\text{Cl}_6]^{2+}$.



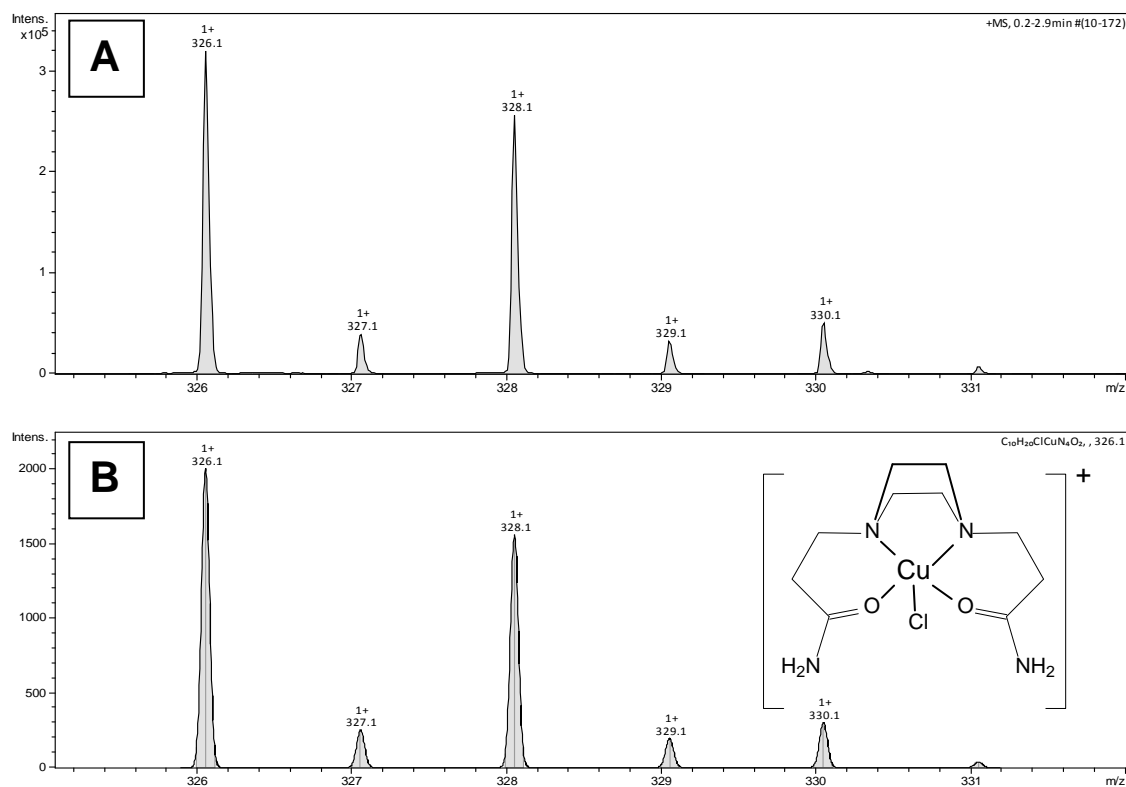
Anexo 19. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})_4\text{Cl}_3]^+$.



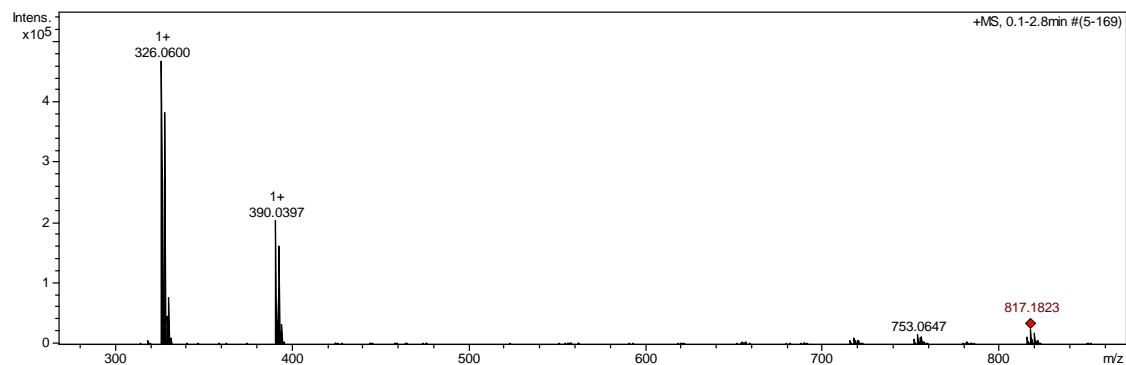
Anexo 20. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}_2(\text{BPAP})_2(\text{CH}_3\text{OH})\text{Cl}_3]^+$.



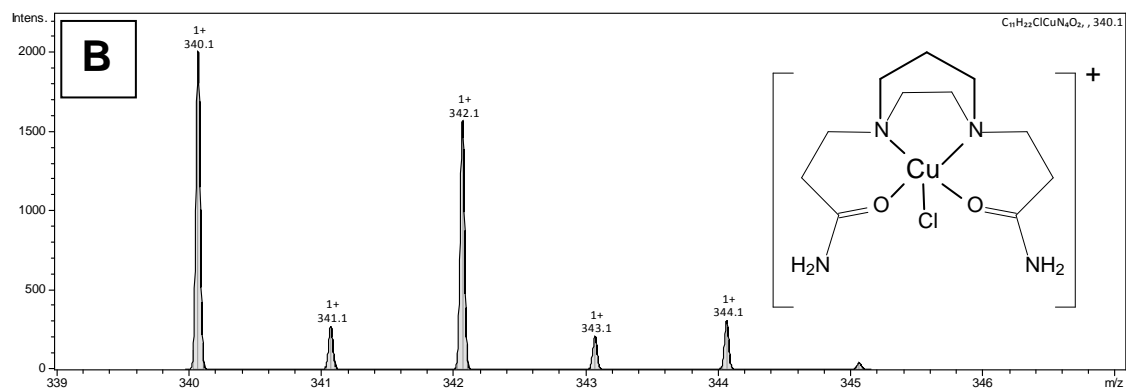
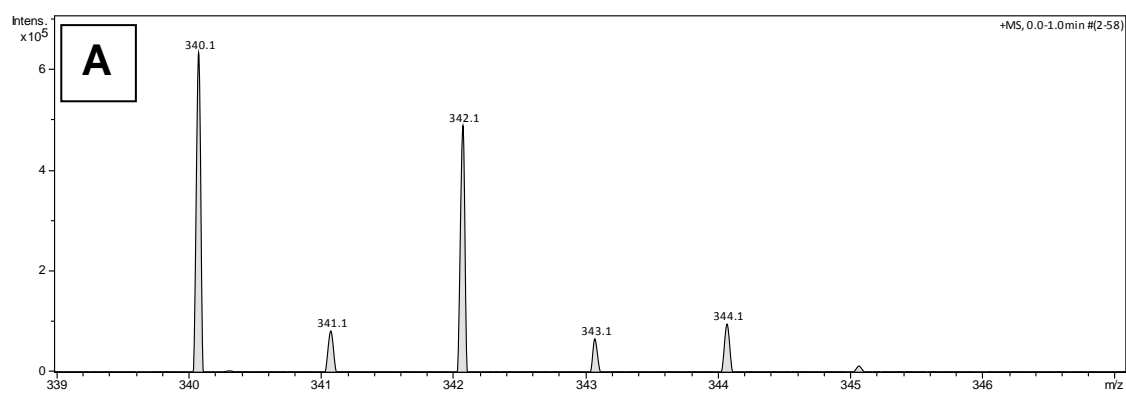
Anexo 21. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{BPAP})(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{Cl}]^+$.



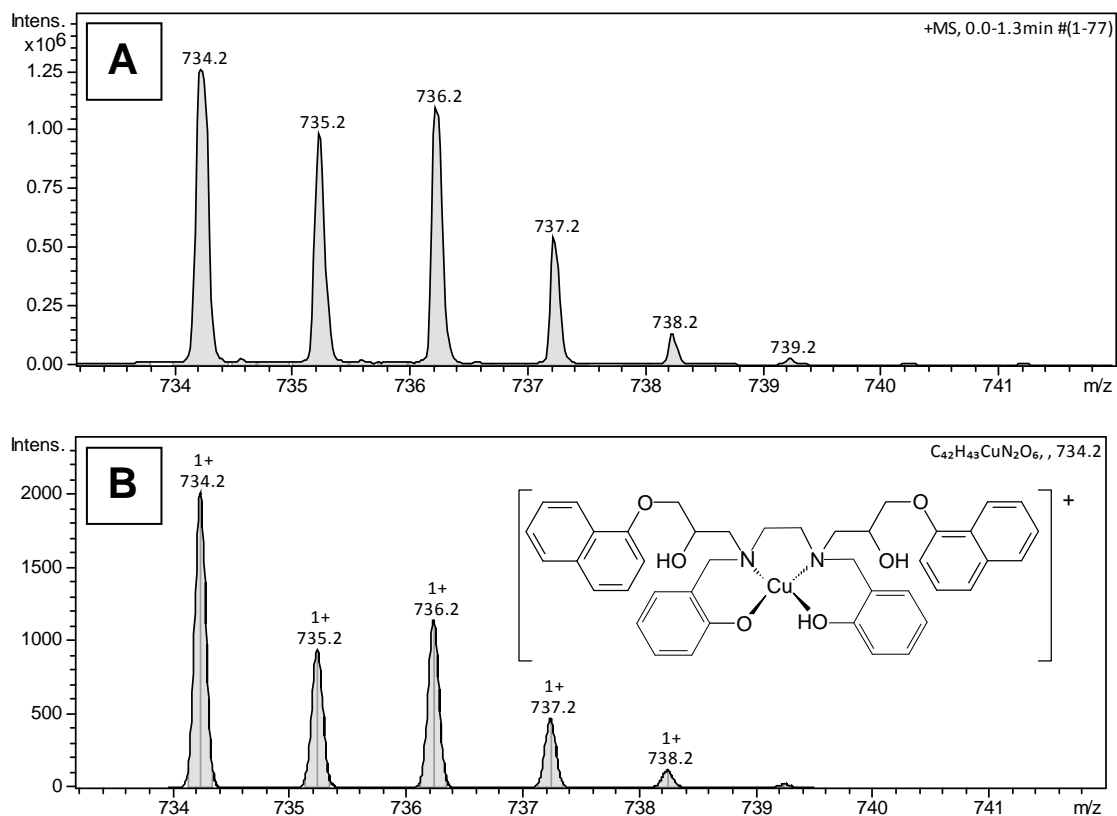
Anexo 22. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{BPAP})\text{Cl}]^+$ com sua proposta estrutural.



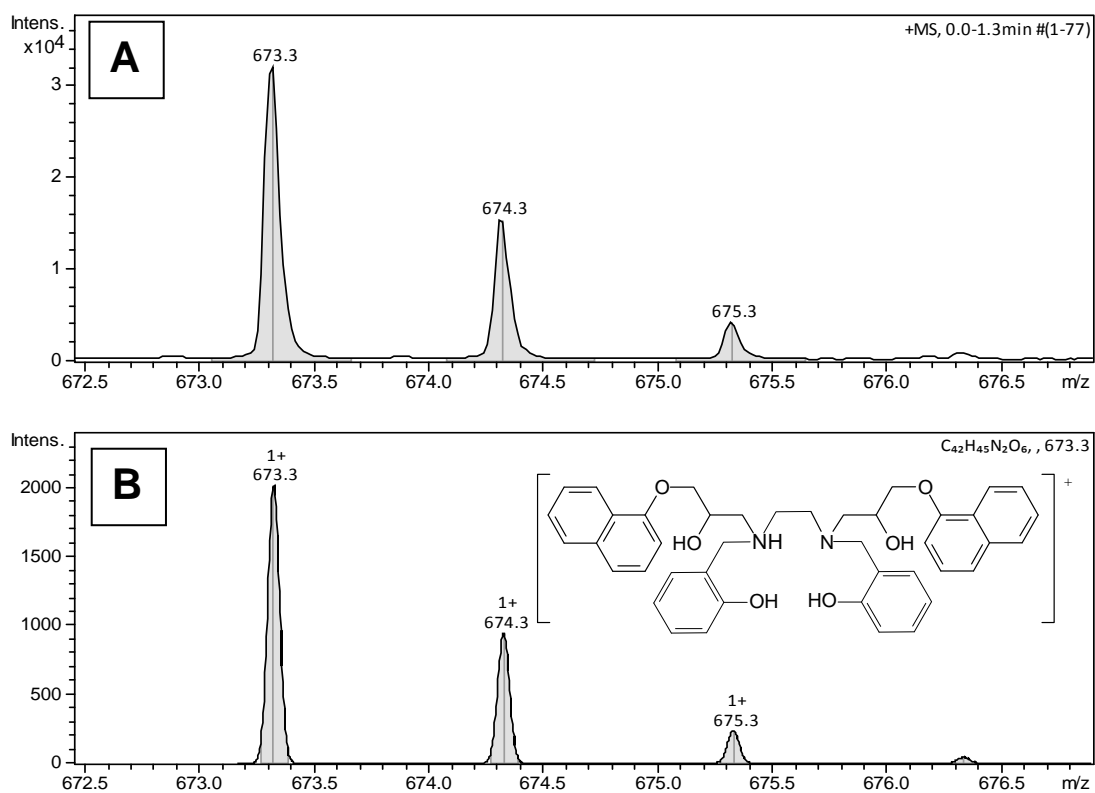
Anexo 23. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 817 para o complexo [Cu(BPAP)H₂O]Cl₂.



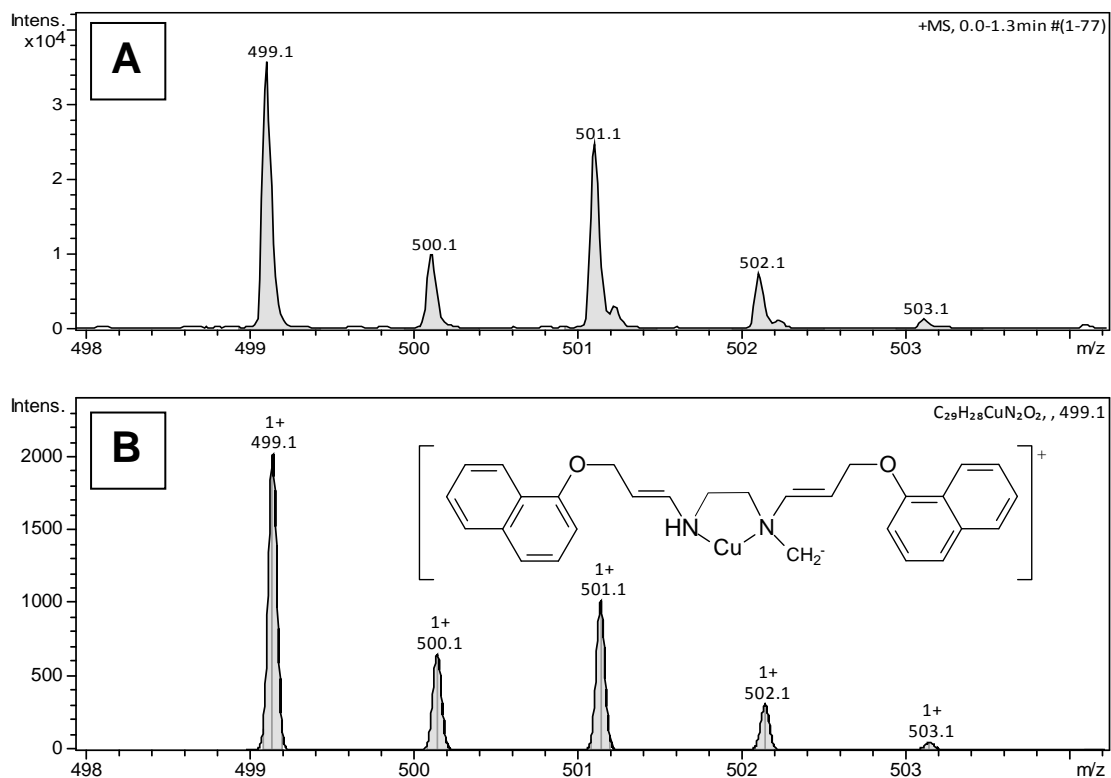
Anexo 24. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie [Cu(BPAH)Cl]⁺ com sua proposta estrutural.



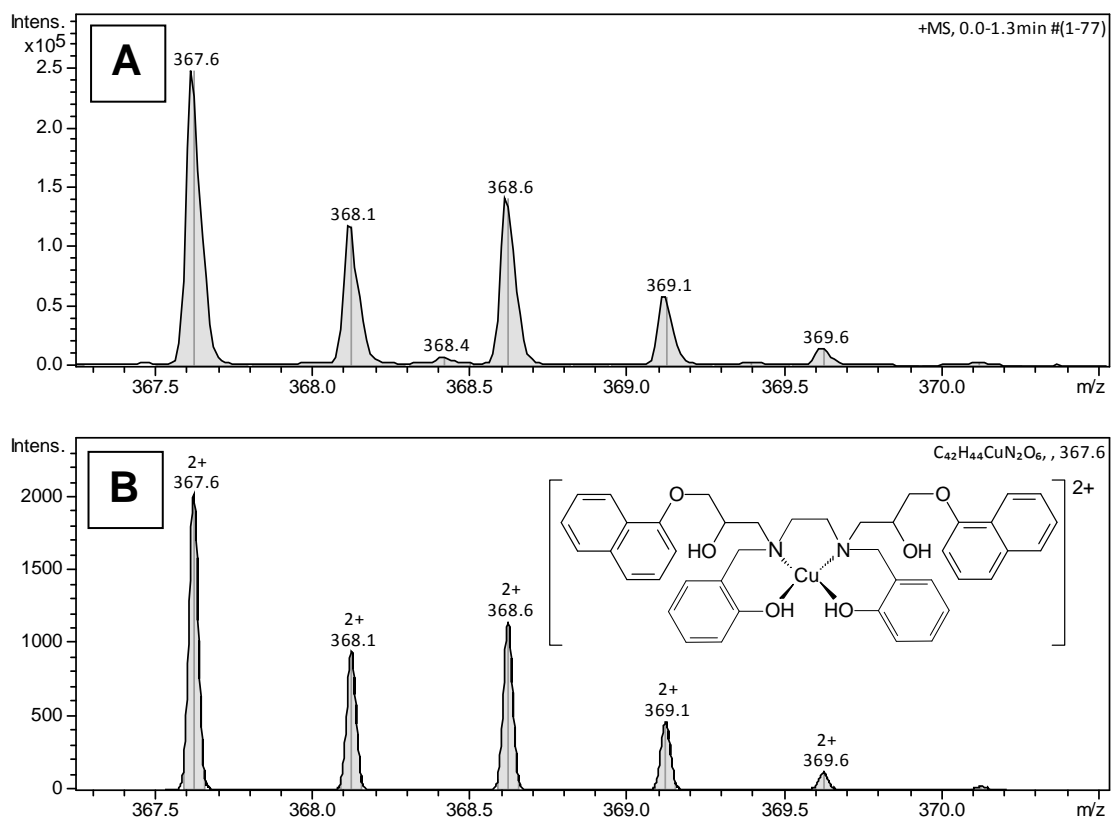
Anexo 25. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{CuHSalandi}\alpha]^+$ com sua proposta estrutural.



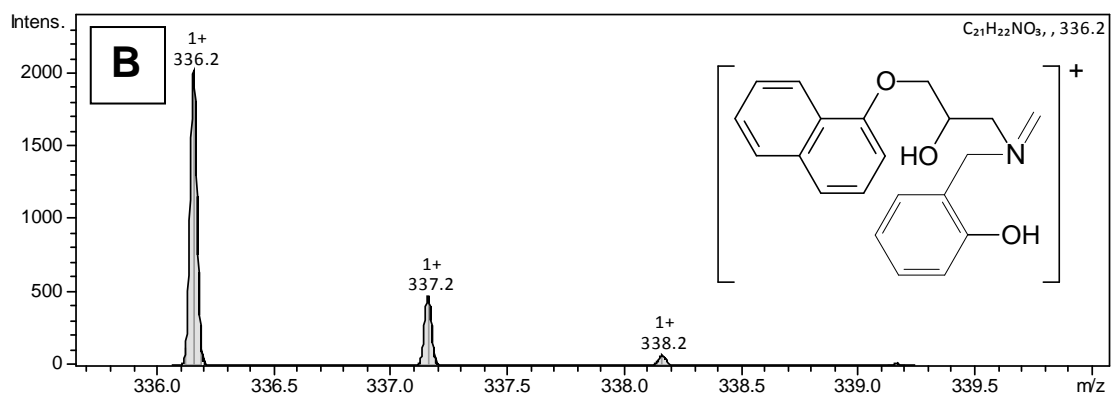
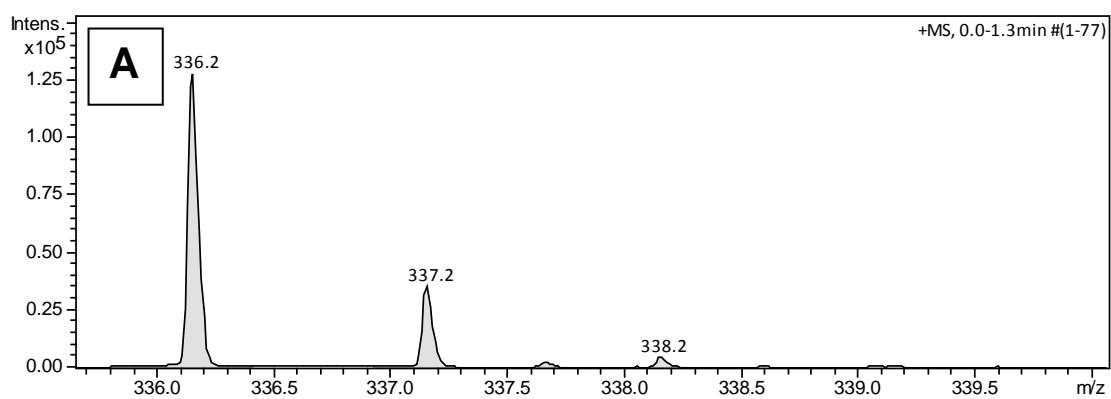
Anexo 26. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[\text{H}_3\text{Salandi}\alpha]^+$ com sua proposta estrutural.



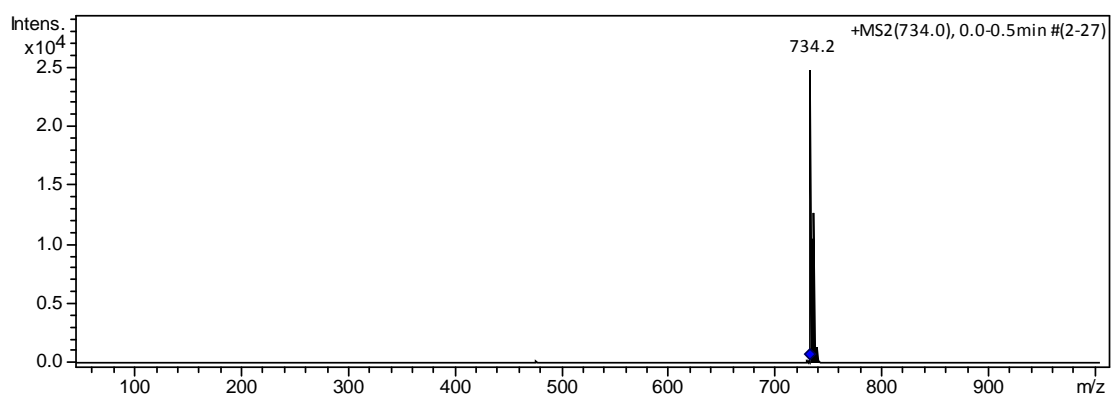
Anexo 27. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[Cu(C_{29}H_{28}O_2N_2)]^+$ com sua proposta estrutural.



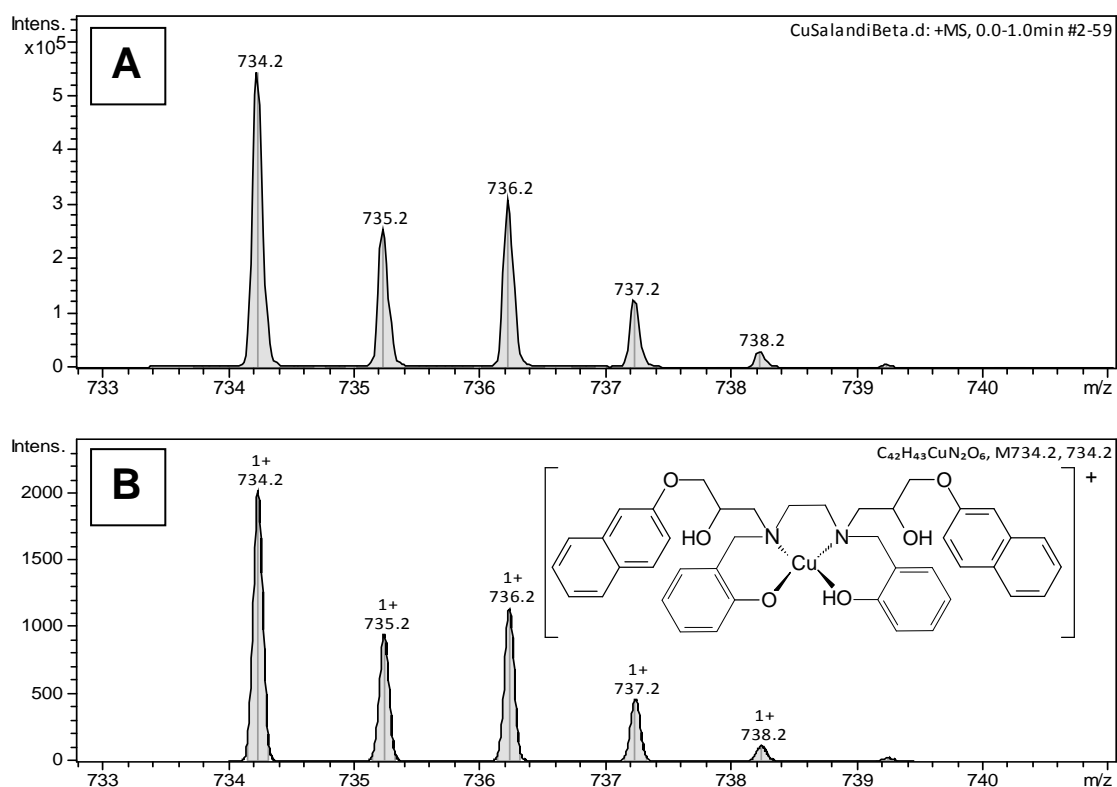
Anexo 28. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[CuH_2Salandio\alpha]^+$ com sua proposta estrutural.



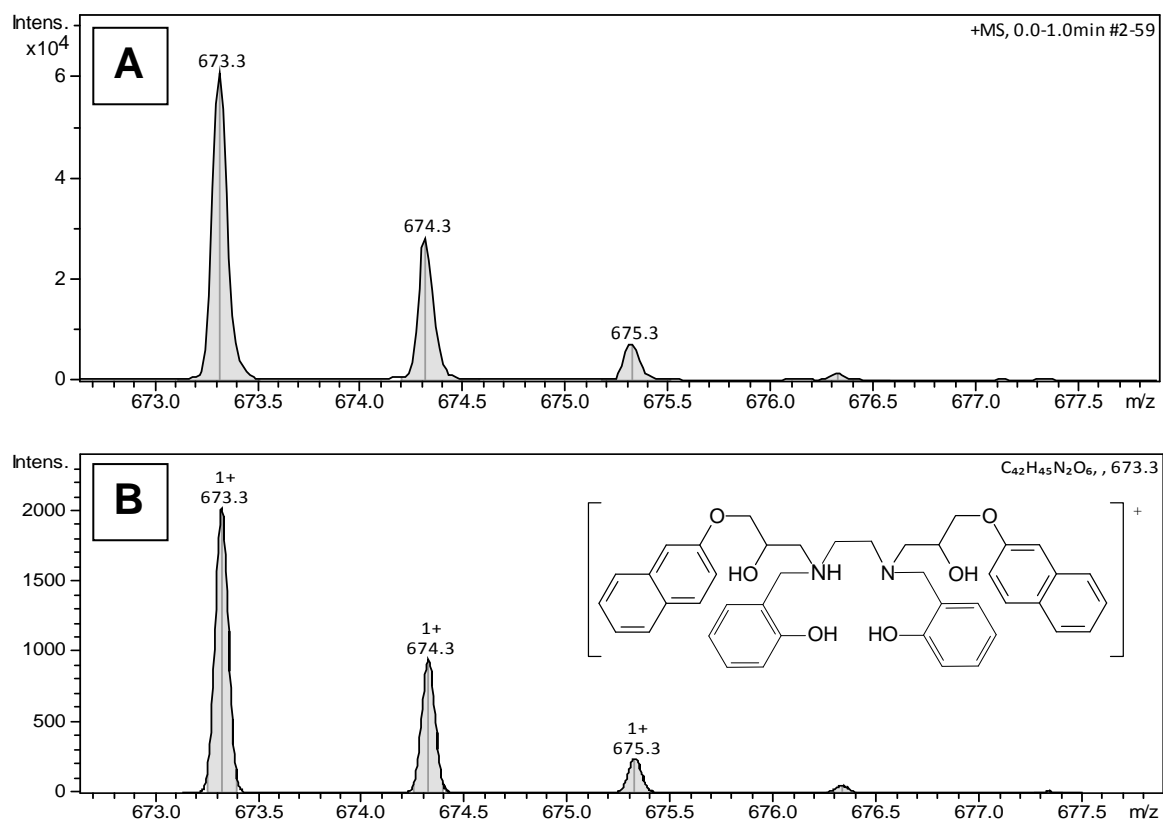
Anexo 29. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(C_{21}H_{22}O_3N)^+$ com sua proposta estrutural.



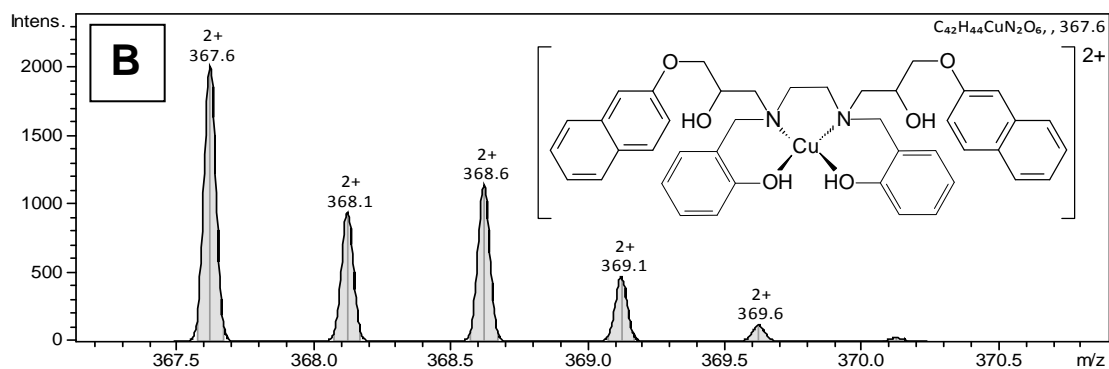
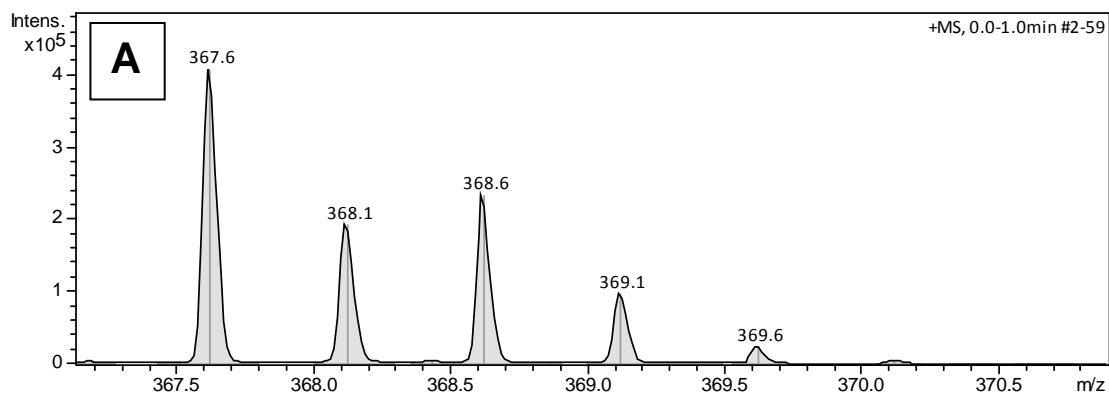
Anexo 30. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 734 para o complexo $[CuSalandi\alpha Cl_2]$.



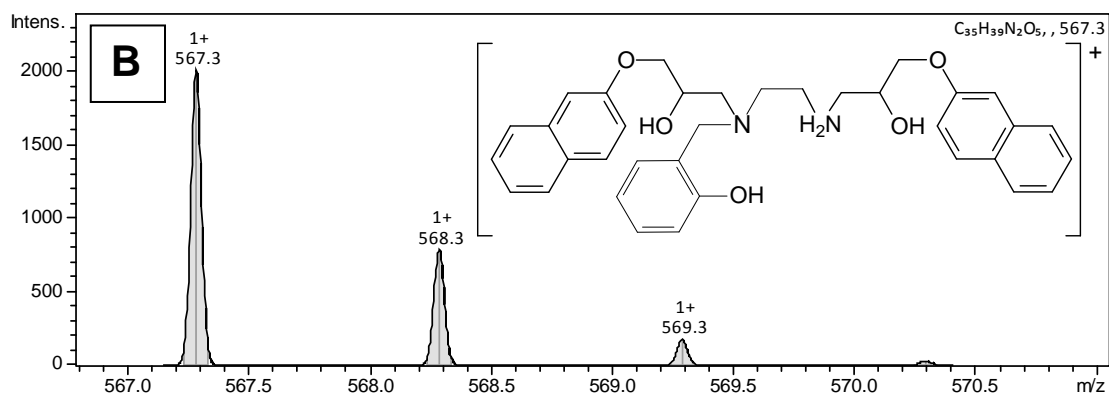
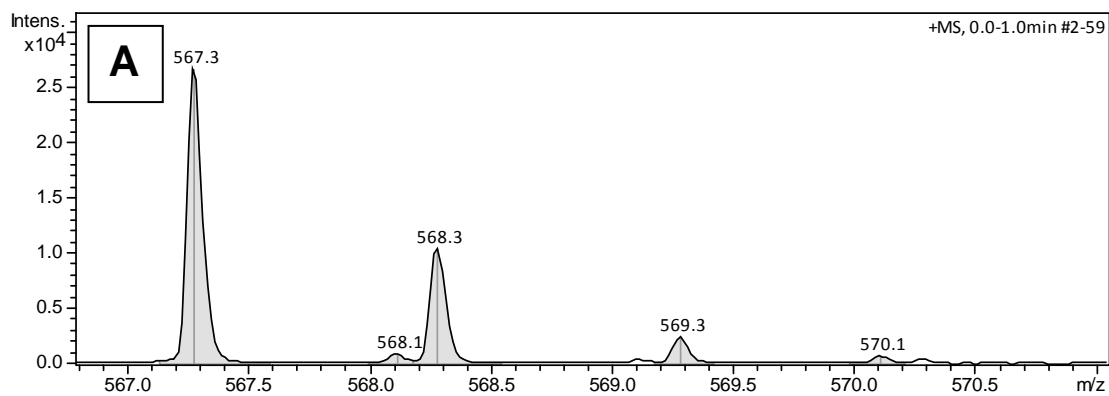
Anexo 31. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[CuHSalandi\beta]^+$ com sua proposta estrutural.



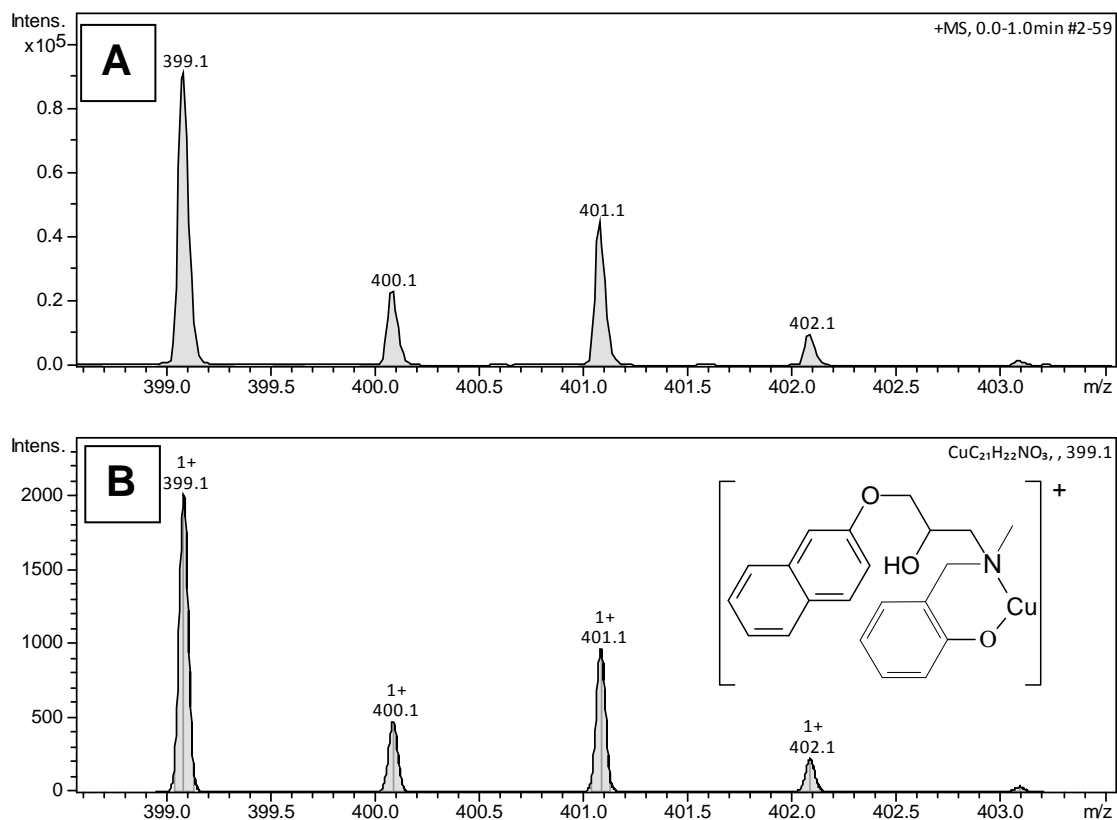
Anexo 32. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(H_3Salandi\beta)^+$ com sua proposta estrutural.



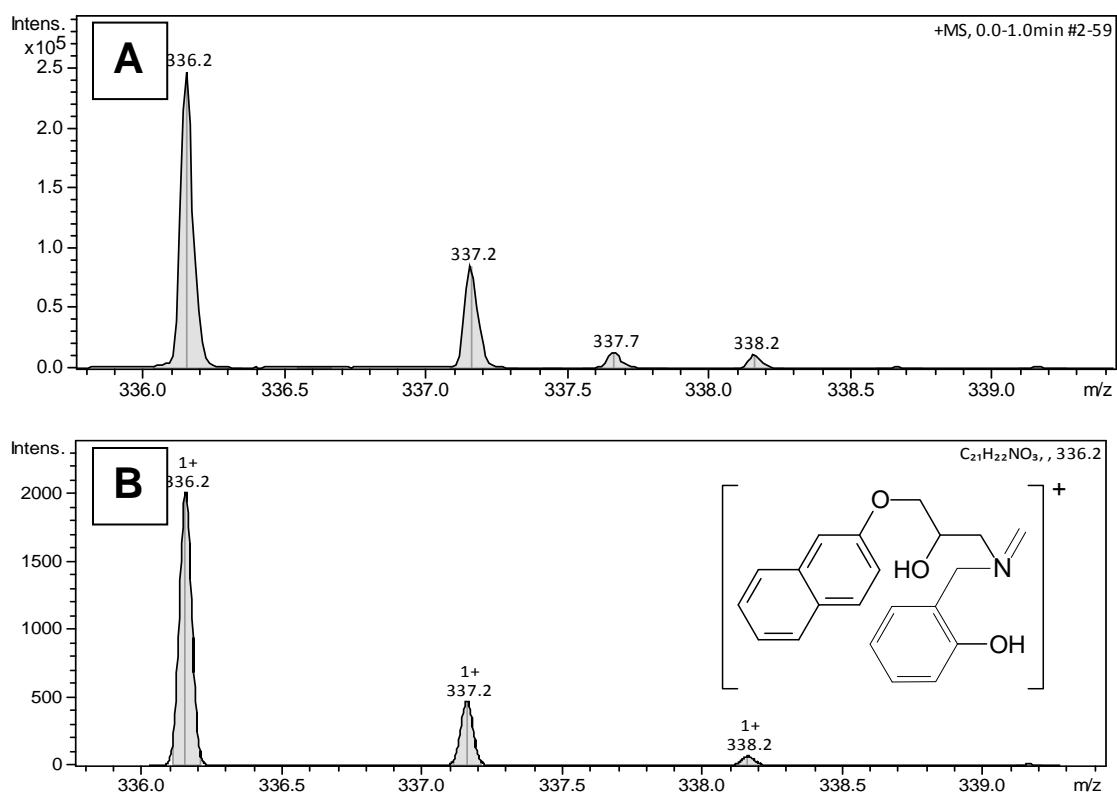
Anexo 33. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{Salandi}\beta)]^{2+}$ com sua proposta estrutural.



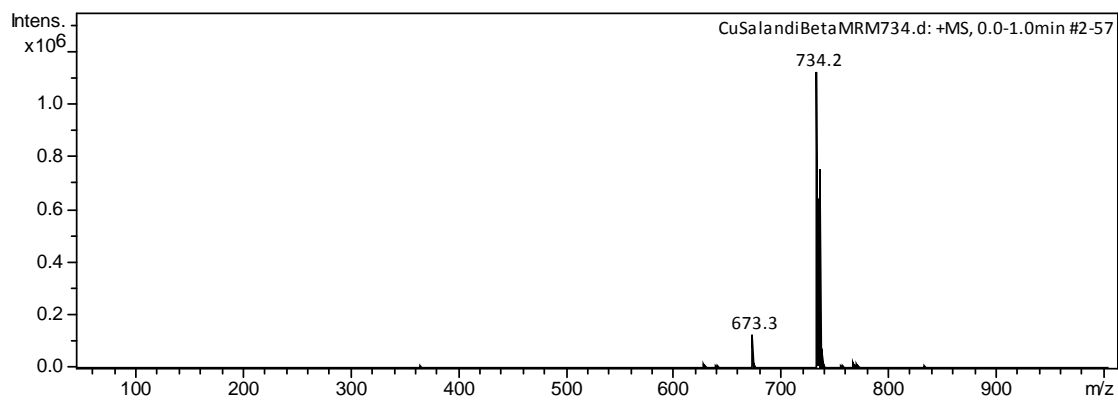
Anexo 34. Perfil isotópico experimental [A] e teórico [B] calculado para a espécie $(\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5)^+$ com sua proposta estrutural.



Anexo 35. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $[Cu(C_{21}H_{22}NO_2)]^+$ com sua proposta estrutural.



Anexo 36. Perfil isotópico experimental **[A]** e teórico **[B]** calculado para a espécie $(C_{21}H_{22}NO_2)^+$ com sua proposta estrutural.



Anexo 37. ESI(+)-MS/MS do sinal com m/z de 734 para o complexo [CuSalandi β Cl₂].