

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

Ana Luiza de Andrade Querino

**OURO NA TERAPIA ANTICÂNCER: compostos organometálicos com ligantes
ditiocarbamato e nanopartículas solúveis estabilizadas por carbeno *N*-heterocíclico**

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEx/DQ. 1.579

T. 722

Ana Luiza de Andrade Querino

OURO NA TERAPIA ANTICÂNCER: compostos organometálicos com ligantes ditiocarbamato e nanopartículas solúveis estabilizadas por carbeno *N*-heterocíclico

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências – Química.

Orientadora: Profa. Dra. Heveline Silva

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

Q4
2023
T

Querino, Ana Luiza de Andrade.
Ouro na terapia anticâncer [manuscrito] : compostos organometálicos com ligantes ditiocarbamato e nanopartículas solúveis estabilizadas por carbeno n-heterocíclico / Ana Luiza de Andrade Querino. 2023.
156 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Heveline Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 127-140.
Apêndice: f. 141-156.

1. Química inorgânica – Teses. 2. Ouro – Teses. 3. Química organometálica – Teses. 4. Nanopartículas – Teses. 5. Agentes antineoplásicos – Teses. 6. Carbenos (Compostos de metileno) – Teses. 7. Ligantes (Bioquímica) – Teses. I. Silva, Heveline, Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Ouro na Terapia Anticâncer: Compostos Organometálicos com Ligantes Ditiocarbamato e Nanopartículas Solúveis Estabilizadas por Carbeno N-heterocíclico"**

Ana Luiza de Andrade Querino

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Heveline Silva - Orientadora
UFMGProf. Roberto Santana da Silva
USP-Ribeirão PretoProfa. Amanda Porto Neves
UFRRJProfa. Heloisa de Oliveira Beraldo
UFMGProfa. Dayse Carvalho da Silva Martins
UFMG

Belo Horizonte, 24 de novembro de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Heveline Silva, Servidor(a)**, em 25/11/2023, às 08:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Roberto Santana da Silva, Usuário Externo**, em 27/11/2023, às 08:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Heloisa de Oliveira Beraldo, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2023, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Amanda Porto Neves, Usuária Externa**, em 28/11/2023, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Dayse Carvalho da Silva Martins, Professora do Magistério Superior**, em 23/01/2024, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador **2834288** e o código CRC **2012775B**.

*Dedico este trabalho a Penha, Carlinhos, Luiz
Fernando e Rafaela.*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Penha e Carlinhos, ao meu irmão Luiz Fernando e minha sobrinha Rafaela pelo amor que eu sempre senti onde quer que eu estivesse, pelo apoio incondicional na minha vida e por me darem esperança para continuar. Tudo foi possível com vocês.

À minha orientadora Profa. Heveline Silva, pela orientação durante a minha formação acadêmica, pelo apoio e confiança desde 2017. Considero uma sorte encontrar uma amiga na minha mentora.

À Profa. Angela Casini (TUM/Alemanha), inspiração para muitas, pela oportunidade maravilhosa de trabalhar no seu grupo de pesquisa durante o doutorado-sanduíche.

Aos membros e ex-membros do laboratório SibLab da UFMG: Toninho, Isabela, Thaiz, Katherine, Alice, Lara, Patrícia, Camila, pelas reuniões de grupo, pela confiança e pela oportunidade de fazer parte do trabalho de cada uma.

Aos membros e amigos do laboratório MedBioinorgChem na Universidade Técnica de Munique/Alemanha: Sophie, Guillermo, Denise, Darren, Tamara, Mihyun, Claudia, Julia, Ildikó, por todo o aprendizado e acolhimento durante o tempo em que estive no grupo.

Aos funcionários do DQ, Dra. Ivana do RMN, Mirra do HPLC, por todo o suporte técnico. Em especial às profissionais da limpeza, pela convivência diária, pela leveza e por serem inspiração.

Aos professores do DQ, em especial à Profa. Dayse e Profa. Heloísa: obrigada por aceitarem contribuir para a construção contínua do meu conhecimento.

Aos meus amigos da pós-graduação da UFMG: Ruth, Nathany e Mateus, pelas risadas e carinho incondicional, por estarem sempre perto de mim mesmo que longe fisicamente. Saibam, isso faz toda a diferença.

Aos amigos de “fora”: Jojo, Nathana, Joana, João, que fizeram parte de momentos felizes e tristes da minha vida, pessoas do bem, sempre prontas a me dar a mão quando precisei.

Danke an Hanna, dass sie mich bei diesem letzten Schritt unterstützt und mir Hoffnung für den nächsten gegeben hat.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado. À CAPES pela bolsa de doutorado-sanduíche na Alemanha no âmbito do programa CAPES-PrInt.

À UFMG, universidade pública, gratuita e de qualidade: orgulho de ser parte da sua história.

Caminhante, não há caminho. Se faz o caminho ao andar.

Resumo

A descoberta das propriedades medicinais dos compostos de ouro impulsionou o *design* e a síntese de novos metalo-fármacos para a terapia anticâncer. No presente trabalho procurou-se desenvolver complexos de ouro(0/I/III) com ligantes estratégicos que possam conferir maior estabilidade química, reatividade e seletividade ao composto final para efetiva interação com os alvos biológicos em ambiente fisiológico. Recentemente, a aplicação de nanotecnologia também tem se mostrado uma estratégia em nanomedicina para gerar sistemas de *drug-delivery*, diagnóstico por imagem ou mesmo em terapia, como no caso das nanopartículas de ouro (AuNPs). A estabilidade química limitada dos compostos à base de ouro em ambiente fisiológico tem sido um desafio na descoberta de novos medicamentos de ouro, mas a química organometálica pode superar esse problema. No primeiro capítulo, foram sintetizados novos complexos organo-ouro(III) (C1a – C4a) de estrutura $[(C^N)Au^{III}DTC]PF_6$, com o ligante C^N , 2-anilinopiridina, e ligantes ditiocarbamato (DTC = L1 – L4). Estes ligantes consistem em L1 ((*N*-(2,2-dimetoxietil)-*N*-(metil)-ditiocarbamato de sódio, **C1a**), L2 (1-piperidinaditiocarbamato de sódio, **C2a**), L3 (1-piperidina-4-oxo-ditiocarbamato de sódio, **C3a**) e L4 (1-pirrolidinoditiocarbamato de amônio, **C4a**). Além disso, foram obtidos os análogos de coordenação de ouro(III)-ditiocarbamato (C1b – C4b) de estrutura $[Au^{III}(DTC)Cl_2]$, como potenciais fármacos antitumorais. As duas séries de complexos de ouro(III), foram avaliadas quanto à citotoxicidade frente a linhagens de células de tumores de mama: MCF-7 e MDA-MB-231 e contra células saudáveis de mama, MCF10a. A partir dos resultados de IC_{50} , observa-se que os complexos sintetizados inibem o crescimento celular e, com destaque, o complexo **C3a** apresentou efeito antiproliferativo em concentração sub-micromolar contra células de MDA-MB-231 com seletividade moderada ($IC_{50} = 0,4 \mu M$, $IS = 2,0$). **C3a** e os compostos análogos foram escolhidos para estudos de estabilidade em solução e reatividade frente a biomoléculas, como *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) e albumina (BSA). O complexo organometálico **C3a** apresenta elevada estabilidade em solução PBS pH 7,4, enquanto o **C3b**, análogo de coordenação, parece sofrer reações de hidrólise. Os estudos de reatividade de **C3a** frente a NAC exploram uma potencial via de ação que implica na ligação covalente entre a fração organo-ouro(III) e o tiolato, sugerindo conversão para um aduto **C3a**/NAC. Interações similares para **C3b** e NAC não foram observados, revelando que o complexo não é reativo sob as mesmas condições. Ainda, **C3a** demonstrou uma maior capacidade de suprimir a fluorescência da BSA em experimentos que investigam a possibilidade de a proteína agir como um carreador do fármaco para os seus alvos biológicos. Os resultados revelam que a inclusão do ligante C^N para formação do composto organo-ouro(III) amplificou significativamente os efeitos de estabilidade e

reatividade dos complexos derivados de ouro(III)-ditiocarbamato quando comparados com seus análogos de coordenação; assim, contribuindo para demonstrar o grande potencial da química organometálica no desenvolvimento de novos metalo-fármacos para a quimioterapia do câncer. O segundo capítulo descreve a síntese de duas novas nanopartículas plasmônicas de ouro, estabilizadas por ligantes NHC: **NHC-COOEt@AuNPs** (em que NHC-COOEt: 1,3-dietil-5-propionil benzimidazol-2-ilideno) e **NHC-COOH@AuNPs** (em que NHC-COOH: 1,3-dietil-5-ácido carboxílico benzimidazol-2-ilideno). As AuNPs foram caracterizadas por espectroscopia no UV-vis, infravermelho, TEM e TGA, sendo possível identificar a banda de ressonância de plasmon de superfície localizadas em ambas as nanopartículas, que apresentam morfologia esférica e tamanho médio de 6 nm. A AuNP funcionalizada com um ácido carboxílico apresenta solubilidade em água, sendo possível caracterizá-la por RMN, potencial zeta e quanto à sua estabilidade em meios biológicos relevantes. Também pôde-se avaliar em meio aquoso preliminarmente o potencial catalítico das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** na reação de redução do 4-nitrofenol. As AuNPs são cataliticamente ativas para essa reação, apesar de mostrarem uma velocidade moderada de conversão do substrato. Ainda, resultados preliminares demonstram que, dada a presença do grupamento carboxilato em seu esqueleto, as nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** solúveis podem ser conjugadas com aminas primárias em reações de acoplamento amida. Espera-se, assim, contribuir para os estudos sobre a funcionalização de biomoléculas em nanopartículas de ouro, buscando novas estratégias terapêuticas para nanomateriais, e promovendo o avanço do desenvolvimento de plataformas versáteis para aplicações em nanotecnologia.

Palavras-chave: ouro; química organometálica; nanopartículas; agentes antineoplásicos.

Abstract

The discovery of the medicinal properties of gold compounds has driven the design and synthesis of new metallopharmaceuticals for anticancer therapy. The aim of this work was to develop gold(0/I/III) complexes with strategic ligands that can confer greater chemical stability, reactivity, and selectivity to the final compound for effective interaction with biological targets in a physiological environment. Recently, the application of nanotechnology has also proved to be a strategy in nanomedicine to generate drug-delivery systems, diagnostic imaging or even therapy, as demonstrated by gold nanoparticles (AuNPs). The limited chemical stability of gold-based compounds in physiological environments has been a challenge in the discovery of new gold drugs, but organometallic chemistry might overcome this problem. In the first chapter, new organo-gold(III) complexes (**C1a** - **C4a**) with the structure $[(C^N)Au^{III} DTC]PF_6$ were synthesized, with the C^N ligand, 2-anilinopyridine, and dithiocarbamate ligands (DTC = L1 - L4). These ligands consist of L1 ((sodium N-(2,2-dimethoxyethyl)-N-(methyl)- dithiocarbamate, **C1a**), L2 (sodium 1-piperidinedithiocarbamate, **C2a**), L3 (sodium 1-piperidine-4-oxo-dithiocarbamate, **C3a**) and L4 (ammonium 1-pyrrolidinedithiocarbamate, **C4a**). In addition, the gold(III)-dithiocarbamate coordination analogues (**C1b** - **C4b**) with the structure $[Au^{III}(DTC)Cl_2]$ were obtained as potential antitumor drugs. Both series of gold(III) complexes underwent evaluation for their cytotoxic effects on breast tumor cell lines, namely MCF-7 and MDA-MB-231, as well as on healthy breast cells, MCF10a. The IC_{50} results demonstrated that the synthesized complexes effectively inhibited cell growth. Notably, **C3a** exhibited a significant antiproliferative effect at sub-micromolar concentrations against MDA-MB-231 cells, displaying moderate selectivity ($IC_{50} = 0.4 \mu M$, $IS = 2.0$). **C3a**, as well as its analogous compounds, were selected for further stability studies in solution and reactivity assessments with biomolecules such as N-acetyl-L-cysteine (NAC) and albumin (BSA). The organometallic complex **C3a** has shown high stability in PBS pH 7.4, whereas **C3b**, its coordination analog, appeared to undergo hydrolysis reactions. Reactivity studies revealed that **C3a**, concerning NAC, explore a potential mode of action that involves covalent bonding between the organo-gold(III) fraction and the thiolate, suggesting conversion into a **C3a**/NAC adduct. In contrast, similar interactions were not observed for **C3b** and NAC, suggesting that the complex is not reactive under the same conditions. Furthermore, in experiments exploring the possibility of the albumin to act as a drug carrier to its biological targets, **C3a** has shown a greater ability to suppress the protein fluorescence. The results highlight that the insertion of the C^N ligand to form the organo-gold(III) compounds significantly enhances the stability and reactivity effects of the gold(III)-dithiocarbamate complexes when compared to their coordination analogs, thus

underscoring the great potential of organometallic chemistry in the development of novel metallo-drugs for cancer chemotherapy. The second chapter details the synthesis of two novel plasmonic gold nanoparticles, both stabilized by NHC ligands: **NHC-COOEt@AuNPs** (with NHC-COOEt representing 1,3-diethyl-5-propionyl benzimidazol-2-ylidene) and **NHC-COOH@AuNPs** (with NHC-COOH denoting 1,3-diethyl-5-carboxylic acid benzimidazol-2-ylidene). These AuNPs underwent comprehensive characterization using UV-vis, infrared, TEM, and TGA spectroscopy. These analyses revealed the presence of the surface plasmon resonance band in both nanoparticles, which exhibited a spherical morphology and an average size of 6 nm. The AuNP functionalized with carboxylic acid is water-soluble and was further characterized using NMR, zeta potential, and assessments of its stability in biologically relevant media. Additionally, the preliminary catalytic potential of **NHC-COOH@AuNPs** nanoparticles in the 4-nitrophenol reduction reaction in aqueous environments was evaluated. The results indicated that AuNPs exhibit catalytic activity for this reaction, albeit with a moderate rate of substrate conversion. Moreover, preliminary findings suggest that owing to the presence of the carboxylate group in their structure, soluble **NHC-COOH@AuNPs** nanoparticles can be linked with primary amines through amide coupling reactions. This promising discovery is expected to contribute to research in the functionalization of biomolecules within gold nanoparticles, thereby facilitating the exploration of novel therapeutic strategies involving nanomaterials and the advancement of versatile platforms for various nanotechnology applications.

Key words: gold; organometallic chemistry; nanoparticles; antineoplastic agents.

Lista de figuras

Figura 1 Representação estrutural de medicamentos usados no tratamento de câncer de mama.	25
Figura 2 Estrutura da cisplatina, fármaco inorgânico de Pt(II), referência no tratamento do câncer. -----	26
Figura 3 Estruturas de fármacos de Au(I) aprovados e utilizados clinicamente no tratamento de doenças reumáticas. -----	27
Figura 4 Acima: Visualização da estrutura cristalina do aduto formado entre o íon de Au(I) e a BSA, bem como dos aminoácidos presentes no sítio de interação. PDB ID: 6RJV.[37] Abaixo: Representação da reação que ocorre entre o complexo de Au(III)-ditiocarbamato e a proteína BSA. -----	28
Figura 5 Estruturas de complexos de Au(I) catiônicos com atividades anticâncer promissora. -	30
Figura 6 Estrutura de um complexo Au(I)-(NHC) ₂ com atividade citotóxica relevante. -----	30
Figura 7 Estrutura do complexo de organo-ouro(III) [Au(damp)Oac ₂].-----	31
Figura 8 Representação geral de complexos de ouro(III) ciclometalados com ligantes doadores de C,N (L = ligante auxiliar). -----	32
Figura 9 Representação estrutural de complexos ciclometalados de Au(III) que formam adutos estáveis com as ZF da PARP-1.-----	33
Figura 10 Representação de alguns modos de coordenação comuns aos ligantes ditiocarbamatos: (a) bidentado simétrico, (b) bidentado de baixa simetria e (c) monodentado.-----	33
Figura 11 Representação estrutural de complexos de Au(III)-ditiocarbamato e o composto AuL12. -----	34
Figura 12 Representação estrutural da série [Au ^{III} (C [^] N)(DTC)] ⁺ , sintetizada por Zhang e colaboradores como complexos de Au(III) promissores no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer.-----	36
Figura 13 Composto principal da série Au ^{III} (C [^] N)(DTC)] ⁺ presente no estudo desenvolvido por Mertens e colaboradores. -----	36
Figura 14 Representação estrutural do complexo ciclometalado C [^] N usado como precursor neste trabalho. -----	49
Figura 15 Esquema de síntese das séries de complexos de ouro(III)-ditiocarbamato sintetizadas. A partir dos ligantes L1 – L4 foram sintetizados os complexos organometálicos C1a – C4a e os complexos de coordenação C1b – C4b.-----	51
Figura 16 Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz) para o complexo C3a em DMSO-d ₆ . -----	53
Figura 17 Espectro de RMN de ¹³ C { ¹ H} (150 MHz) do complexo C3a em DMSO-d ₆ .-----	54

Figura 18 Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo C3a em DMSO- d_6 . -----	55
Figura 19 Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do complexo C1b e do ligante L1 em DMSO- d_6 . -----	56
Figura 20 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (150 MHz) do complexo C1b e do ligante L1 em DMSO- d_6 . -----	57
Figura 21 Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do complexo C3b e ligante L3 em DMSO- d_6 .--	58
Figura 22 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (150 MHz) do complexo C3b e ligante L3 em DMSO- d_6 . -----	59
Figura 23 Curvas concentração-resposta de viabilidade de células MDA-MB-231 expostas ao complexo C3a por 24 horas, 48 horas e 72 horas. -----	64
Figura 24 Espectros de UV-vis de C3a (50 μM , linha vermelha em 0 h e linha vermelha pontilhada em 24 h) e C3b (50 μM , linha verde em 0 h e linha verde pontilhada em 24 h) em PBS 1 \times (pH 7,4; 0,5% de DMSO). O ligante L3 também é mostrado (50 μM) para referência. -----	67
Figura 25 A) Representação das estruturas químicas propostas para as espécies presentes no estudo de interação de C3a com NAC, C3a, C3a:NAC e NAC (reduzida/oxidada). B) Espectros de RMN de ^1H do complexo C3a em DMSO- d_6 , na mistura DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20) e na presença de NAC em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20) nos tempos de 0 h e 24 h. O espectro da NAC isolada na mistura DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ é mostrado também para fins de comparação. -----	69
Figura 26 Representação da estrutura cristalina do aduto formado entre a proteína BSA e um complexo de ouro(III)-ditiocarbamato, com os resíduos Trp134, Trp212 (em rosa) e Cys34 destacados. O íon de Au(I) (esfera amarela) está ligado covalentemente ao resíduo Cys34. PDB ID: 6RJV.[37] -----	73
Figura 27 Espectros de fluorescência da BSA (10 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) na ausência e na presença de concentrações crescentes ($r = 0 - 2,0$) do complexo ciclometalado C3a (A) e do complexo de coordenação análogo C3b (B) em tampão PBS (pH 7,4; 0,5% de DMSO). -----	74
Figura 28 Atividades antiproliferativas (valores de IC_{50} , μM) do complexo C3a na linhagem MDA-MB-231 na ausência (C3a em células MDA-MB-231) e presença (C3a em células MDA-MB-231 + BSA) de concentrações plasmáticas da BSA após 72 h de incubação. Valores representados como a média \pm SD da quadruplicata de dois experimentos independentes ($n = 2$). -----	75
Figura 29 Taça de Lycurgus em exposição no Museu Britânico (Londres, Inglaterra) fotografada quando há reflexão da luz (esquerda) e quando há transmissão (direita). Reproduzido para fins não-comerciais com a permissão do Museu Britânico (The Lycurgus Cup© The Trustees of the British Museum). -----	80

Figura 30 Representação esquemática exemplificando a relação da escala de tamanho entre os nanomateriais e espécies na escala molecular, como átomos e moléculas, e materiais biológicos, como células e organelas. Adaptado de Foulkes, 2020.[117]-----	81
Figura 31 Representação esquemática de um plásmon localizado de superfície, ilustrando a origem da ressonância plasmônica causada pela interação dos elétrons na banda de condução com a radiação eletromagnética incidente.-----	83
Figura 32 Representação esquemática da morfologia diversa dos nanomateriais de ouro relatados.-----	84
Figura 33 Representação estrutural da nanopartícula de ouro PEGlada conjugada à oxaliplatina sintetizada por Brown e colaboradores.[130]-----	87
Figura 34 Representação estrutural de AuNPs estabilizadas por ligantes tióis e por ligantes carbeno N-heterocíclico.-----	88
Figura 35 Representação da estrutura eletrônica do estado fundamental singleto de um NHC do tipo imidazol-2-ilideno. Os orbitais eletrônicos estão representados, bem como os efeitos de estabilização da estrutura do NHC por doação de elétrons π (representado por setas vermelhas) e retirada de elétrons σ (representada pela seta verde).-----	89
Figura 36 Esquema geral da síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por ligantes NHC, NHC@AuNPs, por meio da abordagem bottom-up e top-down.-----	91
Figura 37 Esquema de síntese do ligante NHC utilizado neste trabalho a partir do ácido benzimidazol-5-carboxílico.-----	94
Figura 38 Esquema de reação para obtenção do complexo Au(I)-NHC. O complexo foi obtido por meio de uma reação de transmetalção usando o Ag_2O e o ligante NHC em diclorometano. ---	95
Figura 39 Representação esquemática de uma bolsa de diálise contendo as AuNPs e suas impurezas. A solução aquosa impura de AuNPs é colocada dentro da membrana de diálise que é selada com dois clips nas duas pontas. Essa bolsa é colocada dentro um béquer grande com água que fica sob agitação por alguns dias. Devido aos poros da membrana, as espécies moleculares deixam a bolsa em direção à água, funcionando como uma espécie de filtração da solução de AuNPs.-----	96
Figura 40 Formação das NHC-COOEt@AuNPs a partir do seu complexo de ouro(I) correspondente, em THF na presença de $\text{t-BuNH}_2\cdot\text{BH}_3$ por meio da abordagem bottom-up. À direita, observam-se as partículas escuras resultantes após a evaporação do solvente.-----	99
Figura 41 Formação das NHC-COOH@AuNPs solúveis a partir da hidrólise básica do éster presente na estrutura do ligante NHC. À direita, observa-se a solução aquosa contendo as nanopartículas solúveis.-----	100

Figura 42 Espectro UV-visível das NHC-COOEt@AuNPs em diclorometano, evidenciando a banda LSPR em 525 nm. -----	101
Figura 43 Espectro UV-visível das NHC-COOEt@AuNPs e NHC-COOH@AuNPs em diclorometano e água, respectivamente, evidenciando a banda LSPR próxima a 525 nm. -----	101
Figura 44 Espectro de RMN de ¹ H em D ₂ O das nanopartículas NHC-COOH@AuNPs após diálise e liofilização e atribuição dos sinais aos seus respectivos prótons. -----	103
Figura 45 Espectros de infravermelho (FTIR-ATR) das nanopartículas NHC-COOEt@AuNPs (linha vermelha) e NHC-COOH@AuNPs (linha azul). -----	104
Figura 46 Curva TG das nanopartículas NHC-COOH@AuNPs, com indicação dos percentuais de perda de massa nos diferentes eventos térmicos registrados, bem como as temperaturas em que esses eventos se iniciaram. -----	106
Figura 47 Imagem de MET representativa das NHC-COOEt@AuNPs e histograma de distribuição de tamanho de partícula: A AuNP apresentou um tamanho médio de $6,63 \pm 1,1$ nm. Barra de escala na imagem de MET: 50 nm. -----	107
Figura 48 Imagem de MET representativa das NHC-COOH@AuNPs e histograma de distribuição de tamanho de partícula: A AuNP apresentou um tamanho médio de $4,94 \pm 0,96$ nm. Barra de escala na imagem de MET: 50 nm. -----	108
Figura 49 Espectros UV-Vis de NHC-COOH@AuNPs em água MilliQ durante 24 h após a diálise. Os espectros foram registrados a cada 15 minutos durante a primeira hora e depois a cada 30 minutos até 15 horas. -----	109
Figura 50 Valores de potencial zeta médio obtidos das NHC-COOH@AuNPs em soluções aquosas ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) com diferentes valores de pH. O potencial zeta de cada solução foi medido em triplicata e o desvio padrão obtido também é ilustrado. -----	110
Figura 51 Espectros de absorção UV-Vis com foco na banda de LSPR de NHC-COOH@AuNPs em soluções aquosas $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ com diferentes valores de pH. -----	111
Figura 52 Espectros de absorção UV-Vis das NHC-COOH@AuNPs ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) na presença de NAC (2mM, pH 7,4) em PBS nos tempos de 0 h, 1h e 24h. -----	112
Figura 53. Esquema de reação da redução catalítica do substrato 4NP em fase aquosa, passando pelo intermediário 4NP ⁻ , gerando a amina correspondente 4AP como produto. As espécies associadas absorvem a luz UV-visível em comprimentos de onda variados facilitando as suas identificações. -----	114
Figura 54 Espectros do UV-visível obtidos a cada 30 segundos durante a reação de redução do 4NP catalisada pelas AuNPs (esquerda). À direita, tem-se o gráfico de evolução da intensidade de absorbância em 400 nm com relação ao tempo de reação avaliado. -----	116

Figura 55 Esquema representativo da reação de acoplamento amida entre as nanopartículas NHC-COOH@AuNPs e a amina fluorescente 7AMC, na presença de EDC/NHS em ambiente aquoso. -----	118
Figura 56 Espectro de fluorescência de emissão da amina 7AMC livre e na presença dos reagentes para o acoplamento amídico NHC-COOH@AuNPs/EDC/NHS imediatamente após o início da reação (0 h) e após deixar reagirem overnight. -----	119
Figura 57 Espectro de absorção no UV-visível das nanopartículas NHC-COOH@AuNPs submetidas à reação de conjugação com 7AMC (segundo-se o protocolo EDC/NHS) após 16 horas. -----	120
Figura 58 Espectro de fluorescência de emissão da amina 7AMC na ausência e na presença de concentrações crescentes da mistura ativada NHC-COOH@AuNPs/EDC/NHS. A seta indica que a emissão que ocorre próxima a 450 nm é suprimida com a titulação. -----	121
Figura 59 Espectro de emissão de fluorescência da amina 7AMC em H ₂ O (50 μM, linha azul) e da amina 7AMC em uma solução aquosa contendo os reagentes EDC/NHS (40 μM, linha preta). -----	122
Figura 60. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante L1 em DMSO-d ₆ . -----	141
Figura 61. Espectro de RMN de ¹³ C para o ligante L1 em DMSO-d ₆ . -----	141
Figura 62. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante L2 em DMSO-d ₆ . -----	142
Figura 63 Espectro de RMN de ¹³ C para o ligante L2 em DMSO-d ₆ . -----	142
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante L3 em DMSO-d ₆ . -----	143
Figura 65. Espectro de RMN de ¹³ C para o ligante L3 em DMSO-d ₆ . -----	143
Figura 66. Comparação do espectro de RMN de ¹ H para a 2-anilino piridina e o complexo [(C ^N)Au ^{III} Cl ₂] em DMSO-d ₆ . -----	144
Figura 67. Comparação do espectro de RMN de ¹³ C para a 2-anilino piridina e o complexo [(C ^N)Au ^{III} Cl ₂] em DMSO-d ₆ . -----	144
Figura 68 Espectros de massas por ESI ⁺ -MS dos complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato (C1a – C4a). -----	145
Figura 69. Espectros de massas por ESI ⁺ -MS dos complexos Au(III)-ditiocarbamato (C1b – C4b). -----	146
Figura 70. Espectro de RMN de ¹ H para o complexo C1a em DMSO-d ₆ . -----	147
Figura 71. Espectro de RMN de ¹³ C para o complexo C1a em DMSO-d ₆ . -----	147
Figura 72. Espectro de RMN de ¹ H para o complexo C2a em DMSO-d ₆ . -----	148
Figura 73. Espectro de RMN de ¹³ C para o complexo C2a em DMSO-d ₆ . -----	148
Figura 74. Espectro de RMN de ¹ H para o complexo C4a em DMSO-d ₆ . -----	149

Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C para o complexo C4a em DMSO- d_6 . -----	150
Figura 76 Mapa de contorno $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC do complexo C1b em DMSO- d_6 . -----	150
Figura 77 Estudo de estabilidade para o complexo C3a em DMSO- d_6 monitorado por espectros de RMN de ^1H . O complexo retém as características espectrais depois de 10 dias. -----	151
Figura 78 Estudo de estabilidade para o complexo C3b em DMSO- d_6 monitorado por espectros de RMN de ^1H . O complexo retém as características espectrais depois de 10 dias. -----	152
Figura 79 Espectros no UV-vis de C3a (50 μM) em PBS 1x (pH 7,4; 0,5% de DMSO) registrados em $t=0$ (traço vermelho-vinho) e 24 h (traço vermelho pontilhado). -----	153
Figura 80 Evolução dos espectros no UV-vis de C3b (50 μM ; 0,5% de DMSO) em PBS 1x (pH 7,4) durante 24 h. As setas indicam os desvios -----	153
Figura 81 Espectros de RMN de ^1H de C3b isolado em DMSO- d_6 , na mistura DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20) e na presença de quantidades equimolares de NAC em 0 h e 24 h. Para referência, o espectro de NAC isolado também é mostrado. Os sinais que são comuns ao complexo C3b livre e à mistura C3b:NAC estão marcados com *. -----	154
Figura 82 Espectros ESI $^+$ -MS de C3a:NAC após 24 horas de exposição. -----	154
Figura 83 Espectro de RMN de ^1H do composto intermediário para obtenção do ligante NHC e atribuições dos prótons da molécula e seus sinais. -----	155
Figura 84 Espectro de RMN de ^1H do ligante NHC e atribuições dos prótons e seus sinais. ---	155
Figura 85 Espectro de RMN de ^1H do complexo Au(I)-NHC e atribuições dos prótons e seus sinais. -----	156
Figura 86 Espectro de emissão da fluorescência da amina 7AMC (50 μM , H_2O) coletado em um período de 2 horas para se investigar efeitos de self-quenching. -----	156

Lista de tabelas

- Tabela 1 Resultados da análise elementar de C, H e N (%) dos complexos inéditos das séries $[(C^N)Au^{III}DTC]PF_6$ e $[Au^{III}(DTC)Cl_2]$ do ESI⁺-MS. Exp = experimental, Calc. = calculado, F.M. = fórmula molecular, M = massa molar.----- 52
- Tabela 2 Atividades antiproliferativas (valores de IC₅₀, μM) dos complexos $[(C^N)Au^{III}DTC]PF_6$ e de seus precursores, bem como dos compostos de coordenação $[Au^{III}(DTC)Cl_2]$, nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF10a após 72 h de incubação, avaliadas pelo ensaio do MTT. Valores representados como a média ± SD da quadruplicata de dois experimentos independentes (n = 2).----- 61
- Tabela 3 Atividades antiproliferativas (valores de IC₅₀, μM) do ligante L4 e dos complexos C3a e C3b na linhagem celular MDA-MB-231 após 24 h, 48 h e 72 h de incubação, avaliadas pelo ensaio do MTT. Valores representados como a média ± SD da quadruplicata de dois experimentos independentes (n = 2).----- 65

Lista de abreviaturas e símbolos

4NP	4-Nitrofenol
7AMC	7-Amino-4-cumarina
AuNP	Nanopartícula de ouro
BSA	Albumina do soro bovino, <i>Bovine Serum Albumin</i>
C ¹⁵ N	Ligante ciclometalado em C e N
CHN	Análise elementar de C, H e N
COOH	Ácido carboxílico
δ	Deslocamento Químico de RMN em ppm
DLCs	Cátions lipofílicos deslocalizados, <i>Delocalized Lipophilic Cations</i>
DLS	Dispersão dinâmica de luz, <i>Dynamic light scattering</i>
DTCs	Ligante ditiocarbamato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ε	Absortividade Molar (L.mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EPR	<i>Enhanced permeability and retention effect</i>
ER	Receptor de estrogênio, <i>Estrogen receptor</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FBS	Soro Fetal Bovino, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho
GSH	Glutationa
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano, <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR-ESI ⁺ -MS	Ionização por elétron spray de alta resolução, <i>High resolution electron Spray Ionization</i>
HSA	Albumina do soro humano, <i>Human Serum Albumine</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória a 50%
IS	Índice de seletividade

J	Constante de Acoplamento (Hz)
λ	Comprimento de Onda (nm)
LSPR	Banda de ressonância de plasmon de superfície localizada, <i>Surface plasmon resonance</i>
μ	Micro (10^{-6})
M	mol L ⁻¹
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MCF10a	Linhagem celular normal de glândula mamária
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MNPs	Nanopartículas metálicas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio
NAC	N-acetil- <i>L</i> -cisteína
NHC	Carbeno <i>N</i> -heterocíclico, <i>N-heterocyclic carbene</i>
NHS	N-hidroxissuccinimida
NP	Nanopartícula
PARP-1	Poli(ADP-ribose) polimerase-1, <i>Poly-ADP-ribose polymerase 1</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salino, <i>Phosphate-buffered Saline</i>
PDB ID	Banco de Dados de Proteínas, <i>Protein Data Bank</i>
PEG(<i>n</i>)	Polietilenoglicol
Phe	Fenilalanina
PR	Receptor de progesterona, <i>Progesterone receptor</i>
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RPMI 1640	Meio de cultura do Instituto Memorial Roswell Park, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rt	Temperatura ambiente
SD	Desvio-padrão, <i>Standard deviation</i>
TGA	Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo, <i>Triple-negative breast cancer</i>
Trp	Triptofano
TrxR	Tioredoxina redutase

Tyr

u.a.

UV-vis

Tirosina

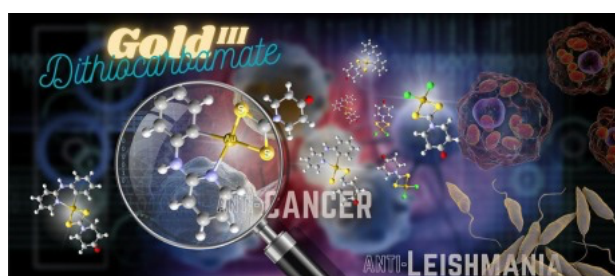
Unidade arbitrária

Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível

Sumário

CAPÍTULO 1	22
Complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato e compostos de coordenação análogos como potenciais agentes anticâncer	
1.1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	23
1.1.1 Câncer: a doença do século XXI	23
1.1.2 Morte celular programada: apoptose	25
1.1.3 Compostos de ouro para uso medicinal	26
1.1.4 Estratégias para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais de Au	29
1.2 OBJETIVOS	38
1.3 PARTE EXPERIMENTAL	39
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
1.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	76
CAPÍTULO 2	78
Nanopartículas de ouro solúveis estabilizadas por ligantes COOH-NHC: uma abordagem <i>bottom-up</i>	
2.1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	79
2.1.1 O universo nano e suas potencialidades	79
2.1.2 O que são os nanomateriais?	80
2.1.3 Nanomateriais de ouro e suas propriedades	82
2.1.4 Nanomateriais de ouro: a influência da forma e tamanho	84
2.1.5 Nanomateriais de ouro: aplicações em medicina	85
2.1.6 Estabilização da superfície de AuNPs	87
2.1.7 Métodos de obtenção de AuNPs:	90
2.2 OBJETIVOS	92
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	93
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
2.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	123
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICE	141

Capítulo 1 – Complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato e compostos de coordenação análogos como potenciais agentes anticâncer[‡]



[‡]Trabalho publicado na revista *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2023**.

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2023.112346

1.1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1.1 Câncer: a doença do século XXI

O câncer é um dos desafios de saúde pública mais urgentes em nível global, representando uma das principais causas de óbito e, conseqüentemente, constituindo um obstáculo significativo para o aumento da expectativa de vida. Em muitos países, o câncer ocupa o primeiro ou segundo lugar entre as causas de mortalidade prematura antes dos 70 anos no contexto de doenças não-transmissíveis.[1,2] A pandemia da COVID-19, doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, que acometeu o mundo todo em 2020 e foi a causadora de cerca de 7 milhões de mortes, dificultou ainda mais o acesso aos serviços de saúde e o diagnóstico/tratamento de câncer foram em consequência prejudicados. Ainda não se sabe a magnitude dos efeitos de subdiagnóstico e ausência de tratamento para o câncer no aumento da mortalidade devido à pandemia e este panorama deve ser atualizado nos próximos anos.[3–6]

“Câncer” é uma designação que engloba uma variedade de mais de 100 tipos distintos de doenças malignas que têm em comum a característica de apresentar crescimento anômalo das células. Essas células, que se proliferam de maneira acelerada, são caracterizadas por alterações nas suas funções fisiológicas, que levam ao crescimento anormal e descontrolado de órgãos e/ou tecidos, resultando na geração de tumores que podem se disseminar para áreas distantes do corpo.[7] O câncer está, muitas vezes, associado a irregularidades na replicação celular por fatores intrínsecos (como mutações genéticas e condições imunológicas) e/ou fatores externos (por exposição a fatores de risco, como luz ultravioleta, cigarros e substâncias carcinogênicas). Esses fatores causais podem aumentar a probabilidade de modificações malignas, agindo em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o processo de iniciação da doença. Esse processo pode ser lento e levar muitos anos para que a célula cancerosa se prolifere e origine um tumor visível.[8] As estatísticas mostram que no Brasil para o triênio 2023-2025 são esperados cerca de 704 mil novos casos de câncer. Entre mulheres, o tipo de câncer mais incidente é o câncer de mama. As estatísticas para 2023-2025 estimam cerca de 73 mil novos casos e a taxa de mortalidade por câncer de mama, ajustada pela população mundial, foi 11,84 óbitos/100.000 mulheres em 2020.[6] O diagnóstico precoce, em estágios iniciais da doença, é a principal estratégia para melhorar os resultados do tratamento.[7] Em outros estágios, o tratamento pode ser feito de forma local, com cirurgia e/ou radioterapia e, de forma sistêmica, com quimioterapia e hormonioterapia, sendo a escolha para o melhor tipo de tratamento dependente do estágio e progressão da doença e do tipo de tumor.

O câncer de mama é uma doença de natureza complexa e heterogênea, com distintos subtipos. A categorização dos subtipos do câncer de mama é realizada mediante avaliação imunohistoquímica, com base na expressão de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), bem como receptores do fator de crescimento epidérmico humano (HER2).[9] Um subtipo que merece grande atenção é o câncer de mama triplo negativo, também conhecido como TNBC (sigla do inglês *triple-negative breast cancer*), que se caracteriza pela ausência dos receptores de progesterona e estrogênio, além de não apresentar amplificação do fator de crescimento (ER-/EP-/HER2-).[10]

Os tumores de mama triplo negativos constituem aproximadamente 15 a 20% de todos os casos de câncer de mama e exibem um perfil altamente agressivo. Esse tipo de câncer é associado ao prognóstico mais desfavorável em comparação com outros subtipos, principalmente devido ao seu elevado potencial de disseminação metastática e às opções terapêuticas limitadas disponíveis. A incidência e a mortalidade relacionadas ao TNBC costumam ser altas não apenas entre as mulheres mais jovens, mas também desproporcionalmente entre as mulheres de origem africana e hispânica.[11–13]

Um fato importante que impulsiona a letalidade do TNBC é a sua "heterogeneidade molecular", descrita como "a falta de alterações recorrentes de fatores oncogênicos".[14] Enquanto pacientes com tumores do subtipo ER+ e/ou HER2+ podem se beneficiar de tratamentos direcionados, como Tamoxifeno e Trastuzumab, (Figura 1), respectivamente, ainda não existem abordagens direcionadas específicas para tumores TNBC.[15] Diferentemente da abordagem utilizada para tumores com superexpressão do HER2, o tratamento para o TNBC baseia-se principalmente em quimioterapia não específica, uma vez que, até recentemente, havia apenas um único tipo de terapia direcionada aprovada pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) em 2020. Essa terapia envolve conjugados de fármacos e anticorpos, como o Sacituzumabe govitecana (Trodelvy®), projetado para atacar a proteína Trop-2, presente em várias células cancerígenas de mama. Em muitos casos, terapias quimioterápicas que incorporam antraciclinas, taxanos e metalo-fármacos de platina são amplamente empregadas.[16] A estratégia quimioterápica atual tem como alvo o reparo do DNA (compostos de platina), a proteína p53 (taxanos) ou a proliferação celular (antraciclina).[14,17,18]

Infelizmente, a expectativa média de sobrevivência para mulheres com tumores triplo negativos metastáticos é inferior a um ano. Isso ocorre apesar da administração de tratamentos quimioterápicos intensivos e caros. Nesse contexto e no contexto do câncer de forma geral, a

investigação de novos fármacos quimioterápicos mais efetivos e seletivos para o tratamento de tumores permanece vital.

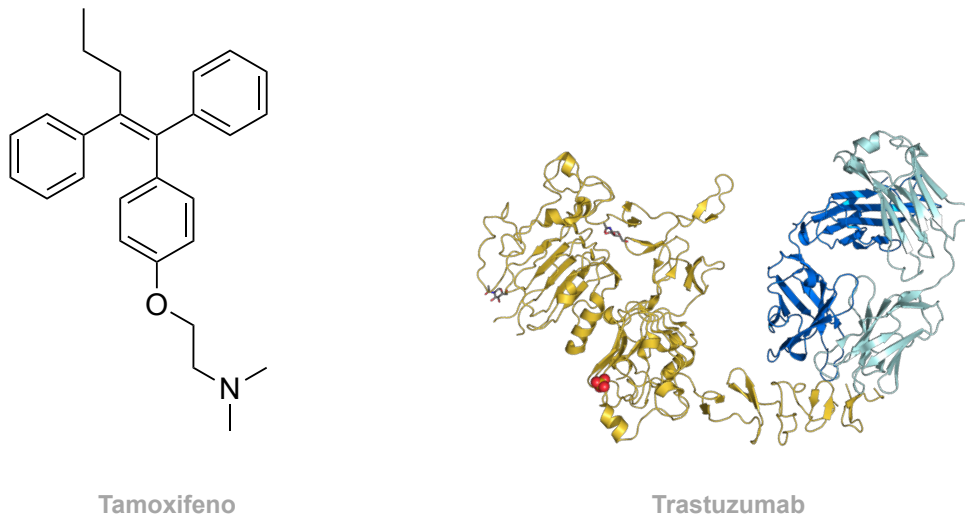


Figura 1 Representação estrutural de medicamentos usados no tratamento de câncer de mama.

Como mencionado, o fracasso de muitos tratamentos na quimioterapia do câncer geralmente resulta da falta de seletividade dos medicamentos em relação às células cancerígenas e em comparação aos tecidos não-tumorais. Isso se manifesta como uma baixa especificidade em relação ao tumor, a incapacidade de atingir e eliminar com precisão as metástases do câncer e a ocorrência de toxicidade sistêmica ou local devida à atividade fora do alvo. O advento da nanomedicina tem contribuído para o desenvolvimento de terapias inovadoras e essa pode ser uma alternativa promissora para lidar com as mencionadas limitações da quimioterapia, por exemplo com as nanopartículas de ouro, que tem propriedades teranósticas, ou seja, com possíveis aplicações terapêuticas e de diagnóstico por imagem.[19]

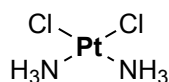
1.1.2 Morte celular programada: apoptose

Quando são detectadas anormalidades em uma célula (por exemplo, a célula não possui as organelas necessárias para o seu correto funcionamento ou o seu DNA encontra-se danificado de forma irreversível), um processo fisiológico normal é desencadeado induzindo sua própria morte. Esse processo é chamado de apoptose e atua na regulação do número de células no corpo. Existem duas vias de sinalização celular que induzem a apoptose: via extrínseca ou via intrínseca. A via extrínseca é desencadeada pela ativação extracelular de receptores de morte na superfície da célula, podendo ativar outras vias de sinalização, como em respostas inflamatórias. A via intrínseca (também conhecida como via mitocondrial) pode ser ativada dentro da célula, iniciada

intracelularmente como resposta a um DNA danificado, stress oxidativo e terapia anticâncer.[20,21]

1.1.3 Compostos de ouro para uso medicinal

Entre os agentes quimioterápicos anticâncer, pequenas moléculas orgânicas e biológicas predominam, mas o uso de fármacos baseados em metais de transição tem se mostrado muito eficaz. Como o exemplo mais bem-sucedido nesse contexto, tem-se a cisplatina – *cis*-diamindicloretoplatina(II), Figura 2 – e os quimioterápicos à base de platina que são usados para tratar vários tipos de câncer, como no caso do câncer de pulmão de pequenas células.[22,23] Entretanto, os complexos antitumorais de platina causam efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, neuropatia periférica, ototoxicidade, astenia e toxicidade hematológica, que limitam sua eficácia terapêutica. Além disso, o desenvolvimento da resistência celular à platina representa um problema central e resulta em um prognóstico ruim devido à falta de tratamentos alternativos.[24]



Cisplatina

Figura 2 Estrutura da cisplatina, fármaco inorgânico de Pt(II), referência no tratamento do câncer.

Compostos de ouro(0/I/III) têm demonstrado um potencial promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. O uso do ouro com fins medicinais remonta aos anos 2500 a.C. na China, associado à busca por longevidade. O ouro em pó era aplicado em feridas abertas e se dizia que removia toxinas associadas à varíola e úlceras da pele.[25] Com o desenvolvimento da água régia, tornou-se possível dissolver o ouro, tornando seu uso mais popular no período da alquimia e da medicina pré-moderna. As propriedades terapêuticas de um complexo chamado “*aurum vitae*”, contendo uma mistura de ouro, mercúrio e antimônio, desenvolvido no século XVII por Bartholomäus Kretschmar, puderam ser confirmadas recentemente por sua atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais.[26] No século XIX, usava-se uma mistura de ouro e cloreto de sódio, chamado “muriato de ouro e soda”, para tratar sífilis. Até a metade do século, essa mistura era prescrita como um fármaco secundário para tratar anemia, lúpus, alcoolismo, dentre outras doenças. Na era moderna figura o primeiro uso racional de um complexo de ouro na medicina atribuído a Robert Koch em ~1890, que observou que o complexo $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ possuía atividade bacteriostática contra “*tubercle bacillus*”, uma cepa de bactérias hoje conhecida como o agente causador da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Durante os

testes clínicos, no entanto, o complexo mostrou-se ineficaz e altamente tóxico, e o uso foi interrompido. Compostos contendo ouro(I)-tióis, como o aurotiomalato de sódio na Figura 3, se mostraram menos tóxicos e foram administrados em pacientes com tuberculose em 1925-1935, mas o uso decaiu quando observações sobre a toxicidade intensificaram-se, aliadas às poucas evidências de eficácia no tratamento.[27] Os tiolatos de ouro, mais tarde, foram estudados contra artrite reumatoide quando surgiu a (errônea) hipótese de que o “*tubercle bacillus*” causava a doença e que resultou na introdução clínica do aurotiomalato de sódio com administração injetável.[28,29] Nos anos 1980, um novo fármaco antirreumático de ouro(I), com a vantagem de ser administrado oralmente, foi apresentado. A auranofina (tetraacetil-β-D-tioglicosetrietilfosfinaouro(I)), Figura 3, aprovada para uso clínico em 1985, apresentou menor perfil de efeitos adversos, mas menor eficácia no tratamento de artrite reumatoide. No entanto, foi utilizada clinicamente por muitos anos para artrite psoriática e artrite reumatoide juvenil quando outros medicamentos da linha de frente, como metotrexato, falhavam no tratamento da artrite refratária.[30]

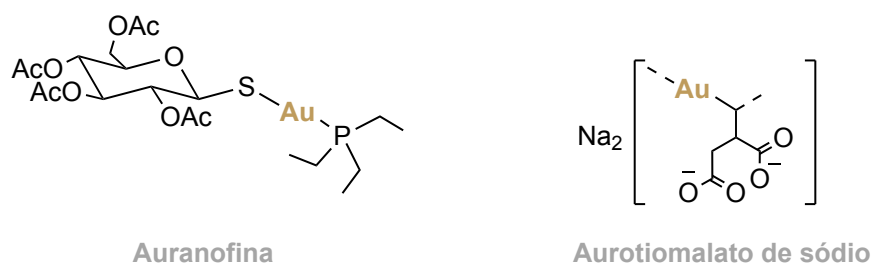


Figura 3 Estruturas de fármacos de Au(I) aprovados e utilizados clinicamente no tratamento de doenças reumáticas.

Embora a auranofina tenha sido desenvolvida inicialmente como um agente quimioterápico para o tratamento da artrite reumatoide, recentemente, foi demonstrado que ela apresenta uma gama diversificada de atividades biológicas clinicamente relevantes, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, antibacterianas, antitumorais e antidiabéticas.[31] Assim, um número crescente de estudos tem se concentrado no reposicionamento da auranofina como um novo candidato para o tratamento de uma ampla variedade de doenças e condições não relacionadas ao reumatismo, até mesmo mais recentemente como um agente inibidor do vírus da SARS-CoV-2.[32,33]

A investigação das potenciais atividades antitumorais de compostos de Au(I) foi iniciada a partir dos estudos de citotoxicidade *in vitro* da auranofina contra a linhagem de células HeLa (adenocarcinoma cervical) que demonstraram atividade antiproliferativa similar ou, em alguns casos, superior à atividade da cisplatina, fármaco inorgânico de referência no tratamento do

câncer.[34] A atividade *in vivo* dos compostos de Au(I), no entanto, demonstrou ser limitada a modelos de leucemia P388 em ratos, apenas.[35] Quando injetada, a auranofina sofre troca rápida de ligantes e se liga covalentemente ao resíduo de cisteína (Cys34) da albumina, a mais abundante proteína no plasma sanguíneo, diminuindo consideravelmente a concentração da espécie ativa e a taxa de uptake celular.[36] A primeira evidência estrutural da ligação covalente Cys34—ouro foi reportada recentemente por Messori e colaboradores, que cocristalizaram um complexo de Au(III) com um ligante ditiocarbamato e a proteína albumina do soro bovino, a BSA. Na estrutura (PDB ID: 6RJV), representada na Figura 4, observa-se que o íon Au(III) sofre redução e perde seus ligantes (dois íons brometo e o ligante ditiocarbamato), resultando no íon Au(I) ligado ao resíduo de Cys34. Em razão da baixa resolução da estrutura não foi possível identificar a identidade do segundo ligante, mas pode se pensar em água atuando como um ligante.[37]

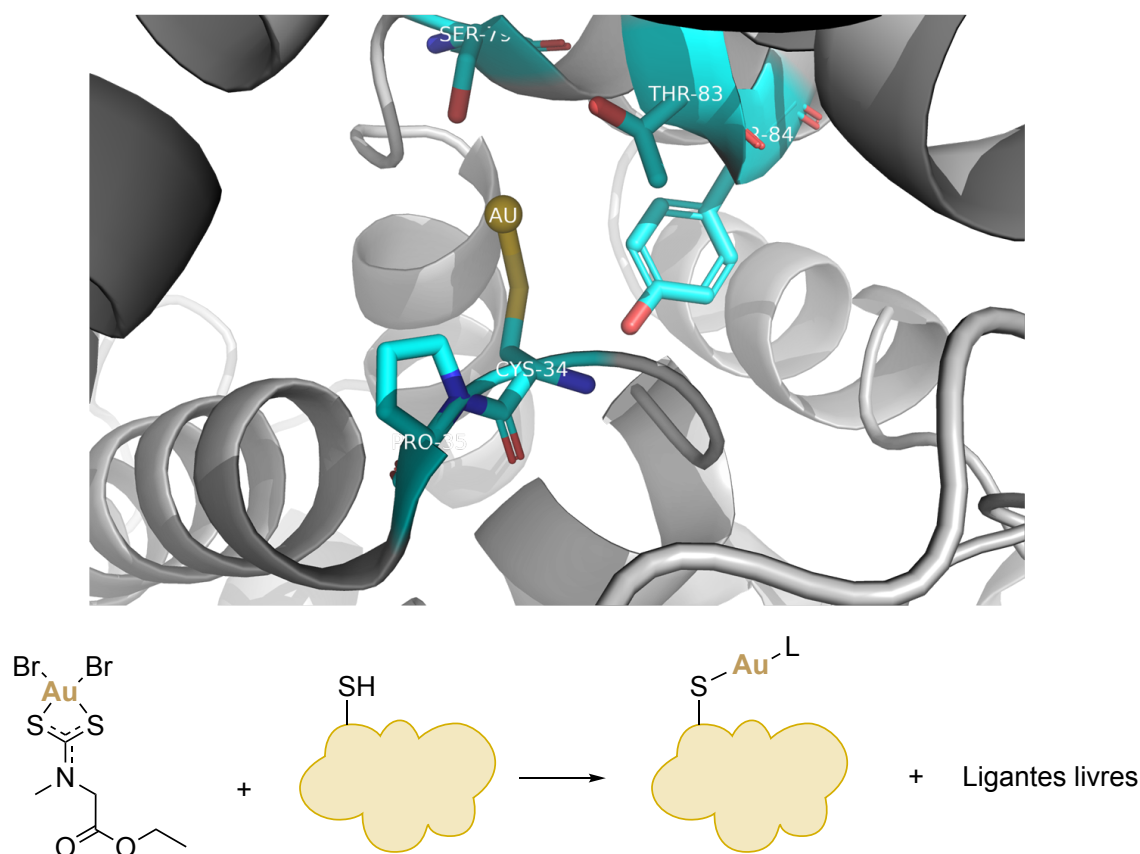


Figura 4 Acima: Visualização da estrutura cristalina do aduto formado entre o íon de Au(I) e a BSA, bem como dos aminoácidos presentes no sítio de interação. PDB ID: 6RJV.[37] Abaixo: Representação da reação que ocorre entre o complexo de Au(III)-ditiocarbamato e a proteína BSA.

Complexos de Au(III) se mostraram atrativos na Química Medicinal, sobretudo na quimioterapia do câncer. Centros de Au(III) são conhecidos por originar complexos em geometria

quadrática-plana com propriedades isoeletrônicas (orbital de valência d^8) e isoestruturais em relação aos compostos de Pt(II), como a cisplatina, podendo exibir mecanismos de ação semelhantes. O centro de Au(III) atua como um ácido de Lewis duro, ligando-se preferencialmente aos pares de elétrons livres de hetero-átomos, como N, O, S, entre outros.[38]

Um dos principais motivos que impedem a atual aprovação de compostos de Au(I) e Au(III) para a clínica do tratamento do câncer é a solubilidade limitada e a estabilidade química no meio fisiológico, responsável não apenas pela redução da atividade citotóxica, mas também pelo acúmulo indesejável do metal em órgãos vitais.[39,40] Embora, em alguns casos, a chamada especiação de Au(I)/Au(III) seja responsável por sua bioatividade e sua alta citotoxicidade *in vitro*, na maioria dos casos, esse fenômeno não apenas resulta em troca rápida de ligantes com nucleófilos biológicos, como é o caso da auranofina, mas também na redução do centro de Au(III) para Au(I) ou Au(0) sob condições fisiológicas devido ao seu alto potencial redox, resultando em perda da atividade e possíveis efeitos adversos, devidos à liberação dos ligantes ou do metal livre em meio fisiológico.[40,41]

1.1.4 Estratégias para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais de Au

Uma grande preocupação em relação aos potenciais fármacos de ouro é a baixa estabilidade quando submetidos a condições fisiológicas. A auranofina, por exemplo, é um complexo de Au(I), de geometria linear que tem o ligante tetraacetiltioglicose rapidamente substituído por tióis presentes no meio celular *in vivo*, enquanto o ligante trietilfosfina pode ser removido lentamente e oxidado ao seu óxido de fosfina (Et_3PO).[42]

Nesse sentido, compostos tetraédricos de Au(I) com ligantes difosfina, gerando sistemas quelatos mais estáveis (Figura 5), foram desenvolvidos por Berners-Price e colaboradores como uma tentativa de mitigar essa tendência conhecida de complexos lineares de Au(I) sofrerem reações de substituição em meio fisiológico. Embora esses complexos catiônicos tenham avançado até estudos pré-clínicos, eles foram descartados devido às suas altas toxicidades.[43] O tipo de complexo mostrado na Figura 5 é parte ainda de uma outra abordagem: o desenvolvimento de uma classe de compostos catiônicos chamada cátions lipofílicos deslocalizados (DLCs, do inglês *delocalized lipophilic cations*). Os DLCs caracterizam-se por seus elevados coeficientes de partição, com o objetivo de aumentar a lipofilicidade e a absorção pela membrana lipídica celular, e pela sua carga positiva deslocalizada, que favorecem o seu direcionamento às espécies carregadas negativamente dentro das células.[44,45] As mitocôndrias de células cancerosas apresentam elevado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), uma vez que essas células

necessitam de maior quantidade de energia para sustentar suas taxas mais rápidas de crescimento e proliferação, levando à maior produção de ATP, que gera um potencial negativo sobressalente. Assim, os DLCs acumulam-se seletivamente na mitocôndria de células cancerosas devido à diferença de $\Delta\psi_m$ em relação às células saudáveis, consumando a mitocôndria como possível alvo biomolecular.[46]

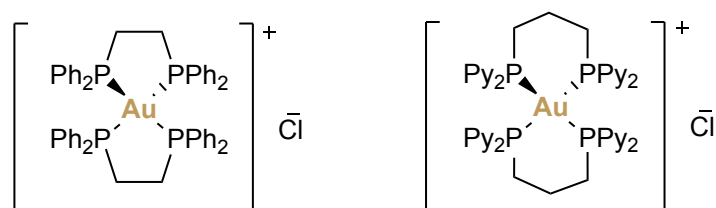


Figura 5 Estruturas de complexos de Au(I) catiônicos com atividades anticâncer promissora.

Nos últimos anos, a química de complexos contendo ligantes carbeno *N*-heterocíclicos (NHC), principalmente de Au(I), experimenta seu auge. NHCs são ligantes neutros σ -doadores, assim como as fosfinas, com a vantagem de serem mais propensos a modificações estruturais e eletrônicas por métodos sintéticos convencionais para modular suas características finais, como por exemplo aumento da lipofilicidade.[47] Os DLCs reportados por Berners-Price e colaboradores contendo Au(I)-biscarbeno, como o da Figura 6, foram pensados cuidadosamente considerando seu caráter lipofílico e demonstraram ser mais seletivos que os complexos de Au(I) com ligantes bisfosfina (Figura 5). Como reportado, os grupos ligados aos átomos de nitrogênio do heterociclo NHC foram modificados para ajustar o caráter lipofílico dos complexos e se observou uma relação direta entre a lipofilicidade e a atividade anti-mitocondrial.[48,49] O balanço hidrofílico/lipofílico de compostos bioativos deve ser considerado, sendo que geralmente é observado que compostos mais lipofílicos são mais citotóxicos, mas, também, menos seletivos.[27]

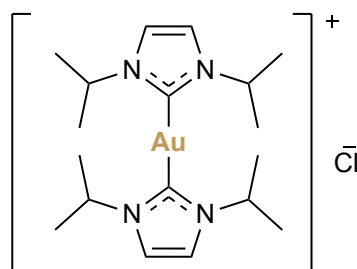


Figura 6 Estrutura de um complexo Au(I)-(NHC)₂ com atividade citotóxica relevante.

No caso dos complexos de Au(III), que são mais propensos a reações secundárias em condições fisiológicas, algumas estratégias podem ser empregadas para melhor estabilizar o seu

alto estado de oxidação. Essas estratégias fazem uso de ligantes menos lábeis, com melhor caráter σ -doador como nas abordagens organometálicas ou por ligantes sulfurados, e multidentados para formação de sistemas quelatos mais estáveis.[45,50,51]

Nesse sentido, um dos primeiros exemplos foram os complexos do tipo $[\text{Au}(\text{damp})\text{X}_2]$ (em que $\text{damp} = 2\text{-}[(\text{dimetilamino})\text{metil}]\text{fenil}$ e $\text{X} = \text{cloreto, tiocianato ou acetato}$) reportados por Parish e colaboradores. Esses são bons representantes dos compostos organometálicos de ouro(III) ciclometalados em $\text{C}^{\wedge}\text{N}$, como o complexo da Figura 7. Foi observado que os complexos são estáveis na presença de agentes redutores e apresentaram atividade *in vivo* similar à cisplatina contra xenoenxertos de carcinoma humano. Alguns compostos desta série inibem as cisteíno-proteases catepsina B e K, com valores de IC_{50} em faixas submicromolar (0,6 – 1,36 μM e 1,3 – 3,3 μM , respectivamente) e são potentes inibidores da enzima tiorredoxina-redutase (TrxR).[52–54] A descoberta das propriedades antitumorais dessa classe de complexos ciclometalados levou ao renascimento do interesse em complexos de ouro(III) como possíveis agentes anticâncer.

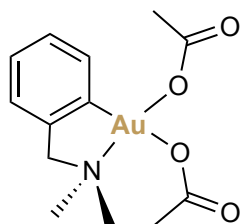


Figura 7 Estrutura do complexo de organo-ouro(III) $[\text{Au}(\text{damp})\text{Oac}_2]$.

A reação de ciclometalação é a ativação de uma ligação C—H de moléculas contendo grupos doadores (N, O, P, S e Se) mediada por um metal de transição. A reação leva à formação de um ciclo (chamado metalacilo) contendo uma ligação entre o átomo doador e o metal (M—X) e uma ligação covalente M—C que no caso do ouro (Au—C) forma o que chamamos de organo-ouro.[55] Os complexos ciclometalados são geralmente caracterizados pela estabilidade redox e termodinâmica: estudos com complexos organo-ouro revelam que a simples presença de um ligante C-desprotonado (C^-) é suficiente para estabilizar o íon Au(III) contra redução em condições fisiológicas.[39] Além disso, as propriedades estéricas e eletrônicas podem ser facilmente ajustadas pela modificação estrutural dos ligantes aniônicos ciclometalados ou ligantes auxiliares para obter compostos com caráter lipofílico aprimorado e/ou favorecer propriedades bioquímicas desejadas.

Em geral, a introdução de um número cada vez maior de ligações Au—C torna os compostos mais lipofílicos e, portanto, facilita o *uptake* celular. Entretanto, a capacidade de

interagir com grupos tióis ou grupos de selenol das proteínas pode ser reduzida, de forma que um equilíbrio deve ser levado em consideração. Uma variedade de complexos de ouro(III) ciclometalados com ligantes doadores de nitrogênio foram sintetizados até o momento, apresentando ligantes doadores de nitrogênio bidentados C,N- e tridentado N,C,N-, C,N,N-, e C,N,C-, Figura 8, gerando anéis C,N de cinco ou seis membros. Estudos recentes mostram que complexos ciclometalados de Au(III) agem simultaneamente coordenando-se ao DNA e como inibidores da TrxR.[56,57]

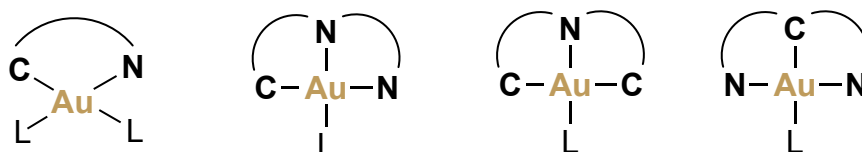


Figura 8 Representação geral de complexos de ouro(III) ciclometalados com ligantes doadores de C,N (L = ligante auxiliar).

Os complexos ciclometalados de Au(III) também têm sido reportados como inibidores das proteínas *zinc finger* (ZF), a maior família de fatores de transcrição no genoma humano. ZFs são motivos estruturais de proteínas que funcionam como domínios de reconhecimento para DNA, RNA e outras proteínas.[58] As proteínas ZFs são alvos interessantes para o tratamento do câncer, pois estão envolvidas na transcrição, tradução e reparo do DNA. Assim, muitas proteínas ZF estão associadas à progressão do câncer, embora os mecanismos exatos sejam objeto de pesquisa atualmente.[59]

As poli(adenosina difosfato ribose)-polimerases (PARPs), frequentemente referidas como “os anjos da guarda do DNA”, são alvos de grande interesse no contexto do tratamento do câncer. Isso se deve ao fato de que a sobrevivência de muitos tumores depende do reparo de DNA mediado pelas enzimas PARPs. Além do sítio catalítico ativo da PARP-1, que pode ser explorado como alvo farmacológico, a enzima possui dois domínios ZF que se ligam ao DNA, podendo ser alvos biológicos de metalo-fármacos, permitindo uma inibição indireta da função da proteína.[59] Os metalo-fármacos têm a capacidade de remover os íons Zn(II) e provocar modificações estruturais nos domínios ZF, resultando na interrupção ou inibição de sua função. O deslocamento do íon Zn(II) dos domínios ZF por espécies de ouro Au(I) ou Au(III) gera estruturas chamadas de *gold fingers*. [60] Essa substituição de um centro tetraédrico de Zn(II) por Au(I/III) tem como consequência a modificação da estrutura. A redução facilitada do Au(III) para Au(I) em condições fisiológicas frequentemente leva à formação de adutos Au(I)-proteínas ZF.

Um estudo recente demonstrou os aspectos estruturais de compostos de Au(III) tendo a PARP-1 como alvo, mostrando que complexos de Au(III) ciclometalados C[^]N (Figura 9), C[^]N[^]C e quelatos N[^]N apresentam uma forte afinidade por proteínas ZF da enzima PARP-1, evitando a redução do Au(III) a Au(I). Essa maior estabilidade dos adutos ciclometalados de Au(III) favorece o direcionamento específico à PARP-ZF, sugerindo a ciclometalação como uma estratégia para obter seletividade.[61]

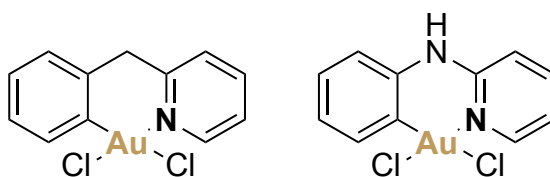


Figura 9 Representação estrutural de complexos ciclometalados de Au(III) que formam adutos estáveis com as ZF da PARP-1.

Outros ligantes multidentados eficientes na estabilização do ouro(III) são os ligantes ditiocarbamato, que se coordenam aos metais geralmente de modo S[^]S bidentado.[62] Os ditiocarbamatos (DTCs) são compostos organossulfurados produtos da reação entre uma amina secundária, preferencialmente em meio básico, e o dissulfeto de carbono, que se caracterizam pela presença do grupo –NCSS⁻, extensivamente investigados na literatura por comprovadas atividades biológicas interessantes.[63,64]

Como ligantes, os DTCs apresentam modos de complexação diversos, como representados na Figura 10, ligando-se ao íon metálico pelos átomos de enxofre, com vasto potencial de aplicação em química de coordenação, podendo estabilizar cátions metálicos nos mais variados estados de oxidação e geometrias.[64,65]

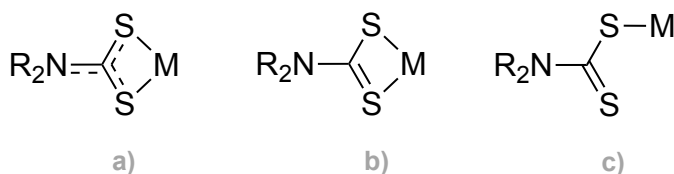


Figura 10 Representação de alguns modos de coordenação comuns aos ligantes ditiocarbamatos: (a) bidentado simétrico, (b) bidentado de baixa simetria e (c) monodentado.

Os ligantes DTCs ligam-se aos cátions metálicos principalmente em modo de coordenação bidentado simétrico (a) ou monodentado (c). Complexos com ligantes ditiocarbamato em coordenação monodentada geralmente são formados quando os ligantes do centro metálico são volumosos ou quando é favorecida uma geometria de coordenação linear, como no caso de complexos de Au(I).[63,66]

Na literatura, observamos que complexos derivados do Au(III)-ditiocarbamato têm demonstrado propriedades citotóxicas relevantes, muitas vezes com maior efeito citotóxico *in vitro* do que a cisplatina, e capazes de superar a resistência intrínseca ou adquirida ao fármaco inorgânico de referência. Muitos artigos de revisão se dedicaram a abordar esse tema.[62,66–69] Interessantemente, ligantes DTC podem ser utilizados em combinação com íons metálicos de interesse farmacológico para prevenir efeitos adversos tóxicos (como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, por exemplo). Em complexos com geometria quadrática, essa estratégia é baseada no forte efeito *trans* influenciador dos átomos de enxofre no grupo –NCSS bidentado que torna a coordenação *trans* de grupos tióis presentes em meio celular menos favorável, potencialmente impedindo a interação entre o centro metálico e proteínas tioladas, e diminuindo prováveis efeitos tóxicos resultantes dessas interações.[70] Motivado pelo potencial dos ditiocarbamatos como inibidores da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, o grupo liderado por Fregona sintetizou uma série de ditiocarbamatos de Au(III) como promissores agentes antitumorais (alguns exemplos na Figura 11).[71] A capacidade quelante exibida por esses ligantes impede a sua substituição não específica em meio biológico, resultando na manutenção da atividade e na amplificação da citotoxicidade efetiva. Nesse sentido, um dos exemplos mais promissores é o complexo denominado AuL12, que demonstrou alta citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e toxicidade sistêmica reduzida comparado à cisplatina.[71,72] O mecanismo de interação desse complexo com a albumina foi mencionado anteriormente (Figura 4).

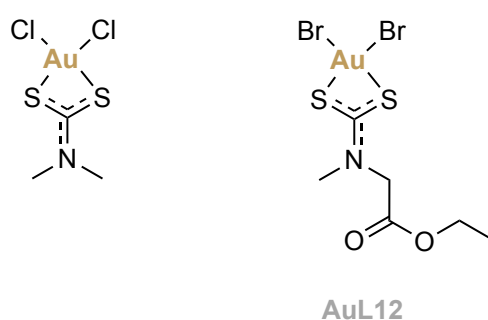


Figura 11 Representação estrutural de complexos de Au(III)-ditiocarbamato e o composto AuL12.

Estudos para elucidar o mecanismo de ação citotóxica de AuL12 demonstraram que as proteassomas podem ser o alvo primário do complexo Au(III)-ditiocarbamato e, em combinação com a inibição do sistema TrxR, leva à superprodução intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando morte celular por vias apoptóticas.[34,73] Uma das grandes desvantagens do AuL12 e outros compostos análogos é a baixa solubilidade, resultando em baixa

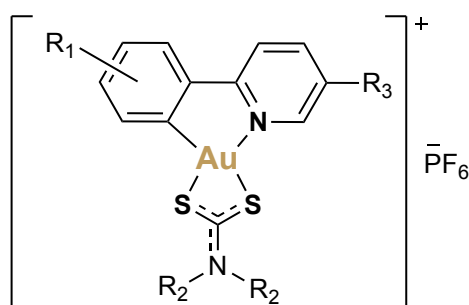
biodisponibilidade e especiação em condições fisiológicas. Assim, formulações com ciclodextrina, por exemplo, podem ser usadas para atenuar este problema.[74,75]

Ainda dentro deste contexto, convém destacar que nos últimos anos uma variedade de complexos organometálicos C^N de Au(III) e ditiocarbamato S^S como ligantes auxiliares foram sintetizados com o objetivo de finalmente encontrar um novo candidato inorgânico para a terapia anticâncer. Fazendo uso das já mencionadas propriedades quimioprotetoras dos ligantes ditiocarbamato e da estabilização do centro de Au(III) por ciclometalação, variações na estrutura molecular dos esqueletos C^N e/ou S^S podem ainda influenciar suas propriedades químicas, reatividade e interações biológicas, podendo afetar a afinidade por alvos específicos, a estabilidade e a solubilidade do composto final.[68,76–78]

Assim, compostos derivados de fórmula [Au^{III}(C^N)(DTC)]⁺ frequentemente demonstram grande estabilidade em condições fisiológicas e mesmo na presença de biomoléculas redutoras, como a glutationa (GSH).[79]

Contel e colaboradores relataram, em 2009, os complexos catiônicos organo-ouro(III) com ligantes ditiocarbamato e ligante C^N-iminofosforado, solúveis em água ou estáveis em meio aquoso, com atividade citotóxica decorrente da interação com o citocromo-c e com a TrxR e da indução de apoptose e/ou necrose em células tumorais.[80]

Zhang e colaboradores, por sua vez, sintetizaram uma série de complexos de [Au^{III}(C^N)(DTC)]⁺ derivados da 2-fenilpiridina, variando-se os substituintes nos ligantes ditiocarbamato e ao ligante ciclometalado (Figura 12). Assim, a proposta era de que o complexo final apresentasse características aprimoradas resultantes da modificação do efeito estérico e/ou lipofílico do ligante 2-fenilpiridina para otimização da especificidade biológica, bem como de um efeito de citotoxicidade seletiva decorrente da modificação no ligante ditiocarbamato. Os complexos apresentaram elevada citotoxicidade em linhagens tumorais de câncer de mama, especialmente na linhagem MCF-7, com valores de IC₅₀ em uma faixa de 0,070 a 6,3 μM, e elevada seletividade.[78]



- 1: R₁ = 4-*n*-butil; R₂ = etil; R₃ = H
- 2: R₁ = H; R₂ = etil; R₃ = H
- 3: R₁ = 3-*n*-butil; R₂ = etil; R₃ = H
- 4: R₁ = 4-*n*-butoxi; R₂ = etil; R₃ = H
- 5: R₁ = 4-trifluorometil; R₂ = etil; R₃ = H
- 6: R₁ = 4-*n*-butil; R₂ = *n*-butil; R₃ = H
- 7: R₁ = H; R₂ = *n*-butil; R₃ = H
- 8: R₁ = H; R₂ = etil; R₃ = *n*-butil

Figura 12 Representação estrutural da série $[Au^{III}(C^N)(DTC)]^+$, sintetizada por Zhang e colaboradores como complexos de Au(III) promissores no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer.[78]

Mais recentemente, Mertens e colaboradores, demonstraram o aumento da atividade dos derivados DTC modificando a estrutura do ligante C^N e o tamanho do anel ciclometalado. A série $[Au^{III}(C^N)(DTC)]^+$ sintetizada, contendo um anel ciclometalado de 6 membros, foi também avaliada contra células tumorais de mama, demonstrando elevada citotoxicidade e inibição seletiva da atividade respiratória mitocondrial. O composto principal deste trabalho (Figura 13) apresentou IC₅₀ de 0,773 μM contra a linhagem de câncer de mama TNBC, MDA-MB-231, e estudos mais sofisticados de transcriptômica revelaram interferências nos processos relacionados à fosforilação oxidativa, ciclo celular e fissão mitocondrial.[57]

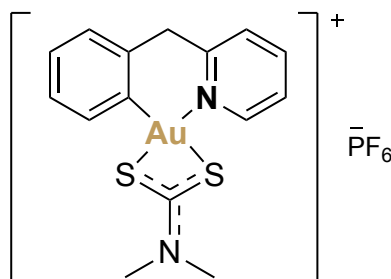


Figura 13 Composto principal da série $[Au^{III}(C^N)(DTC)]^+$ presente no estudo desenvolvido por Mertens e colaboradores.

Com base no mencionado, a avaliação da atividade antiproliferativa de novos compostos de ouro(III) com ligantes ditiocarbamato, sejam eles compostos organometálicos ou de coordenação, pode contribuir de forma valiosa para a construção da biblioteca dessas classes de potenciais metalo-fármacos. Além disso, pode-se contribuir para a compreensão dos benefícios de

compostos organometálicos ou de coordenação como antitumorais para que eles possam finalmente encontrar seu caminho para a clínica do tratamento anticâncer.

1.2 OBJETIVOS

Fundamentado pelos aspectos introdutórios apresentados, esse capítulo tem como principal objetivo apresentar o desenvolvimento de novos complexos organo-ouro(III) ciclometalados (C^N) com ligantes derivados do ditiocarbamato, bem como seus compostos de coordenação análogos e investigar suas propriedades antitumorais.

1.2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho, descrito nesse capítulo, compreenderam:

- i. A síntese e a caracterização de novos complexos organo-ouro(III) que incorporam um ligante aril-piridina ciclometalado para promover maior estabilidade dos complexos e ligantes ditiocarbamatos de diferentes grupamentos R alquil;
- ii. A investigação da atividade citotóxica dos complexos organo-ouro(III) e ligantes, bem como dos complexos precursores, frente às linhagens de células tumorais de mama humana, MDA-MB-231 e MCF-7;
- iii. A avaliação dos índices de seletividade dos compostos utilizando-se um comparativo entre as células tumorais e as linhagens de células normais MCF10a;
- iv. A investigação da estabilidade química dos compostos mais ativos em solução (DMSO e sob condições fisiológicas);
- v. Estudos das prováveis interações *in vitro* dos complexos e biomoléculas (N-acetil-L-cisteína e albumina) por diferentes técnicas espectroscópicas, como forma de investigar do mecanismo de ação.

1.3 PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos de fontes comerciais com padrão de pureza analítico e usados como recebidos.

1.3.2 Medidas físicas

As análises elementares de CHN% foi realizada em um equipamento Analisador Elementar CHNS/O Perkin Elmer 2400 Série II, disponível na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As medidas de absorção eletrônica molecular na região do UV-visível (UV-vis) foram realizadas em equipamento Shimadzu modelo UV-2600 com cubetas de quartzo e caminho óptico de 1 cm. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico como absorbância (u.a.) vs comprimento de onda (λ , nm) utilizando o *software* GraphPad Prism 9. As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Cary Eclipse.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para os núcleos de ^1H (600 MHz), ^{13}C (150 MHz) e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (242 MHz) foram obtidos no espectrômetro multinuclear BRUKER Avance III HD 600, equipamento disponível na plataforma multiusuário no Departamento de Química da UFMG, e o sinal residual do dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), adquirido da *Cambridge Isotope Laboratories*, em 2,50 ppm foi utilizado como referência interna. O *software* MestReNova foi utilizado para visualizar os espectros e gerar suas figuras.

Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro Q-Exactive da Thermo-Scientific com ionização por spray de elétrons em modo positivo (ESI^+ MS), visualizados e analisados no *software* Xcalibur 4.2 (Thermo). As análises foram realizadas no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - CRTI da Universidade Federal de Goiás.

1.3.3 Síntese e caracterização dos compostos

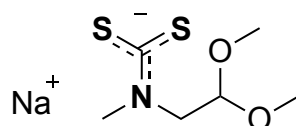
1.3.3.1 Complexos precursores de Au(III)

O precursor $[(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$ foi obtido baseando-se em metodologia descrita na literatura.[81] Em 5,0 mL de etanol foram adicionados 0,510 g (3 mmol) de 2-anilinopiridina e a mistura foi deixada sob agitação até completa solubilização. Então, uma solução etanólica de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,394 g, 1 mmol, 5,0 mL) foi adicionada gota-a-gota. Essa solução foi mantida em agitação magnética e protegida da luz por 24 h. O precipitado amarelado resultante foi filtrado em funil de Büchner, lavado com água, hexano e seco sob pressão reduzida. O complexo obtido é solúvel em DMSO, acetonitrila e parcialmente solúvel em acetona.

$[(C^{\wedge}N)Au^{III}Cl_2]$ – Rendimento: 83%. **RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz):** δ 10,71 (s, 1H, NH), 8,80 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, H6'), 7,96 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4'), 7,55 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H3), 7,40 (d, $J = 8,4$ Hz 1H, H3'), 7,25 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H5), 7,13 – 7,09 (m, 2H, H6 e H5'), 7,01 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H4) ppm. **RMN $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz):** δ 148,71 (C2'), 148,59 (C6'), 141,92 (C4'), 133,79 (C1), 132,07 (C3), 129,13 (C5), 123,48 (C4), 122,29 (C2), 117,34 (C6), 115,98 (C5'), 114,97 (C3') ppm. **Análise elementar** calculada para $C_{11}H_9AuCl_2N_2$ (437,08 g mol $^{-1}$): C, 30,23; H, 2,08; N, 6,41. Experimental: C, 30,39; H, 1,71; N, 6,40. **ESI $^+$ MS (m/z):** 458,96877, $[C_{11}H_9AuCl_2N_2-Na]^+$ (calc. 458,97005).

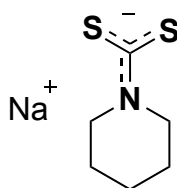
1.3.3.2 Ligantes ditiocarbamatos (DTCs)

Os ligantes DTCs L1 - L3 foram obtidos por procedimentos previamente reportados na literatura.[82] Em banho de gelo (0 – 4°C), a amina correspondente (1 eq) é deixada sob agitação em solução etanólica. Adiciona-se, então, NaOH aquoso (1 eq) e, por fim, CS $_2$ (2 eq) gota-a-gota, deixando o sistema em agitação magnética por 2 horas. Os ligantes L1 – L3 precipitam no meio reacional, em repouso na geladeira ou favorece-se a precipitação com adição de éter dietílico. Posteriormente, os produtos foram isolados por filtração simples, lavados com éter dietílico e secos sob pressão reduzida.



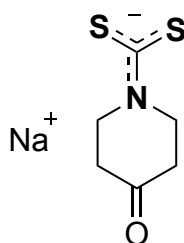
Para o L1, a amina utilizada foi a *N*-(2,2-dimetoxietil)-*N*-metiletilamina.

L1 – *N*-(2,2-dimetoxietil)-*N*-(metil)-ditiocarbamato de sódio. Rendimento: 80%. **RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz):** δ 4,73 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, Hc), 4,08 (d, $J = 5,3$ Hz, 2H, Hb), 3,38 (s, 3H, Ha), 3,28 (s, 6H, Hd) ppm. **RMN $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz):** δ 214,85 (N-CS $_2$), 103,07 (Cc), 56,41 (Cb), 53,90 (Cd), 43,45 (Ca) ppm. **Ponto de fusão:** 83,9 – 85,2 °C.



Para o L2, a amina utilizada foi a Piperidina.

L2 – 1-piperidinaditiocarbamato de sódio. Rendimento: 80%. **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz):** δ 4,31 – 4,20 (m, 4H, Ha), 1,54 (m, 2H, Hc), 1,40 (m, 4H, Hb) ppm. **RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz):** δ 212,46 (N-CS₂), 50,29 (Ca), 25,80 (Cb), 24,42 (Cc) ppm. **Ponto de fusão:** 250 °C (decomposição).



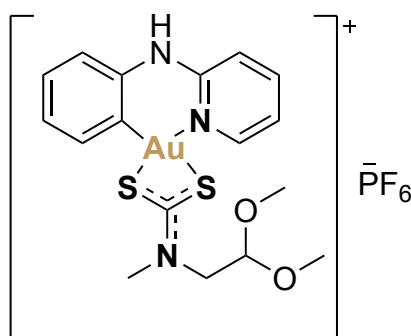
Para o L3, a amina utilizada foi a 4-Piperidona monoidratada.

L3 – 1-piperidina-4-oxo-ditiocarbamato de sódio. Rendimento: 82%. **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz):** δ 4,54 (t, $J = 6,1$ Hz, 4H, Ha), 2,32 (t, $J = 6,1$ Hz, 4H, Hb) ppm. **RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz):** δ 215,01 (N-CS₂), 208,82 (C=O), 47,93 (Ca), 40,51 (Cb) ppm. **Ponto de fusão:** 210 °C (decomposição).

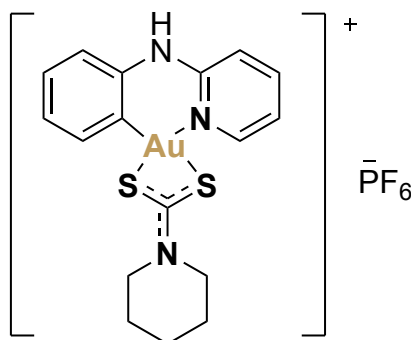
O ligante **L4** (1-pirrolidinoditiocarbamato de amônio) foi obtido comercialmente, como mencionado.

1.3.3.3 Complexos do tipo [(C^N)Au^{III}DTC]PF₆

Os complexos do tipo [(C^N)Au^{III}DTC]PF₆ foram sintetizados com base em metodologia descrita na literatura.[57]. Assim, os ligantes DTCs (0,1 mmol) foram solubilizados em 5,0 mL de MeOH e adicionados gota-a-gota a uma suspensão equimolar do precursor metálico [(C^N)Au^{III}Cl₂] em 5,0 mL de MeOH. O sistema foi deixado sob agitação magnética por 18 h e decorrido esse tempo, a solução metanólica encontrava-se sem sólidos em suspensão. Posteriormente, uma solução aquosa saturada de KPF₆ foi adicionada ao meio reacional para formar os complexos **C1a** – **C4a**, sob a forma de sólidos de cor bege, que foram filtrados sob pressão reduzida e lavados com água e hexano.

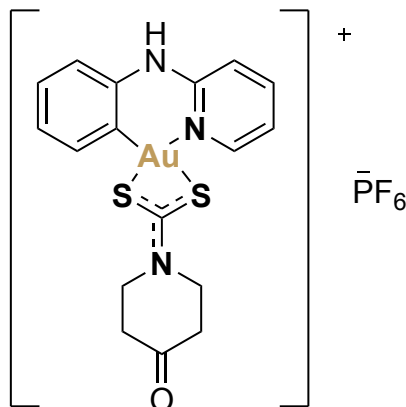


C1a – $[(C^{\wedge}N)Au^{III}(L1)]PF_6$. Rendimento: 65%. **RMN 1H (DMSO- d_6 , 600 MHz):** δ 10,95 (s, 1H, NH), 8,35 (s, 1H, H6'), 8,03 (s, 1H, H4'), 7,51 (s, 1H, H3'), 7,43 (s, 1H, H5), 7,34 (s, 1H, H6), 7,27 (s, 1H, H3), 7,06 (m, 2H, H4 e H5'), 4,81 (s, 1H, Hc), 4,01 (s, 2H, Hb), 3,54 (d, $J = 18,7$ Hz, 3H, Ha), 3,40 (s, 6H, Hd) ppm. **RMN $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz):** δ 194,77 (N-CS₂), 194,67 (N-C'S₂), 147,65 e 147,55 (C6'), 146,68 (C2'), 141,11 (C4'), 131,95 e 131,87 (C1), 130,51 e 130,43 (C3), 129,74 (C5), 123,81 (C4), 122,54 e 122,36 (C2), 118,00 (C6), 116,65 e 116,62 (C5'), 116,24 (C3'), 100,88 e 100,62 (Cc), 55,96 e 54,47 (Cb), 55,03 e 54,79 (Cd), 41,22 e 40,32 (Ca) ppm. **RMN $^{31}P\{^1H\}$ (DMSO- d_6 , 242 MHz):** -141,06 ppm (septeto, $J = 10,5$ Hz, PF₆). **Análise elementar** calculada para C₁₇H₂₁AuF₆N₃O₂PS₂ (705,42 g mol⁻¹): C, 28,95; H, 3,00; N, 5,96. Experimental: C, 28,32; H, 2,94; N, 5,84. **RP-HPLC:** R_f = 17,27 min. **ESI⁺ MS (m/z):** 560,07575, [C₁₇H₂₁AuN₃O₂S₂]⁺ (calc. 560,07407).

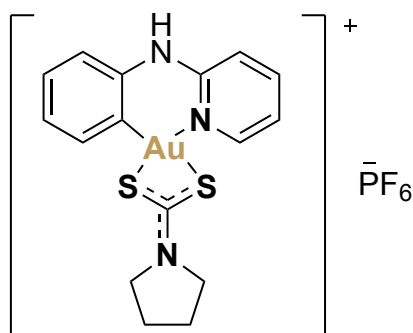


C2a – $[(C^{\wedge}N)Au^{III}(L2)]PF_6$. Rendimento: 54%. **RMN 1H (DMSO- d_6 , 600 MHz):** δ 10,94 (s, 1H, NH), 8,35 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H6'), 8,03 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H4'), 7,51 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H3'), 7,43 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H5), 7,34 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H6), 7,28 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H3), 7,06 (m, 2H, H4 e H5'), 3,98 (m, 4H, Ha+a'), 1,77 (m, 4H, Hb+c) ppm. **RMN $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz):** δ 189,27 (N-CS₂), 147,45 (C6'), 146,72 (C2'), 141,07 (C4'), 131,93 (C1), 130,44 (C3), 129,67 (C5), 123,75 (C4), 122,66 (C2), 117,99 (C6), 116,60 (C5'), 116,24 (C3'), 52,09 e 50,44 (Ca+a'), 25,52 e 25,59 (Cb+b'), 23,28 (Cc) ppm. **$^{31}P\{^1H\}$ (DMSO- d_6 , 242 MHz):** -132,72 ppm (septeto, $J = 10,5$ Hz, PF₆). **Análise elementar** calculada para C₁₇H₁₉AuF₆N₃PS₂ (671,41 g mol⁻¹):

¹): C, 30,41; H, 2,85; N, 6,26. Experimental: C, 30,10; H, 2,79; N, 6,04. **RP-HPLC**: $R_f = 19,91$ min. **ESI⁺ MS (m/z)**: 526,06963, $[C_{17}H_{19}AuN_3S_2]^+$ (calc. 526,06859).



C3a – $[(C^{\wedge}N)Au^{III}(L3)]PF_6$. Rendimento: 64%. **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz)**: δ 10,97 (s, 1H, NH), 8,37 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, H6'), 8,04 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H4'), 7,52 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H3'), 7,45 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, H5), 7,34 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H6), 7,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H3), 7,08 (m, 2H, H4 e H5'), 4,32 – 4,29 (m, 4H, Ha+a'), 2,81 – 2,73 (m, 4H, Hb+b') ppm. **RMN ¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆, 150 MHz)**: δ 205,06 (CO), 191,97 (N-CS₂), 147,53 (C6'), 146,68 (C2'), 141,17 (C4'), 131,90 (C1), 130,41 (C3), 129,82 (C5), 123,85 (C4), 122,50 (C2), 118,10 (C6), 116,71 (C5'), 116,32 (C3'), 47,27 e 46,12 (Ca+a'), 37,84 e 37,77 (Cb+b') ppm. **³¹P{¹H} (DMSO-*d*₆, 242 MHz)**: -132,73 ppm (septeto, $J = 10,5$ Hz, PF₆). **Análise elementar** calculada para C₁₇H₁₇AuF₆N₃OPS₂ (685,39 g mol⁻¹): C, 29,79; H, 2,50; N, 6,13. Experimental: C, 24,81; H, 2,30; N, 5,60. **RP-HPLC**: $R_f = 14,10$ min. **ESI⁺ MS (m/z)**: 572,07561, $[C_{17}H_{17}AuN_3OS_2(CH_3OH)]^+$ (calc. 572,07407).

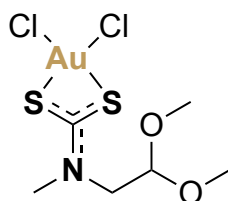


C4a – $[(C^{\wedge}N)Au^{III}(L4)]PF_6$. Rendimento: 53%. **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz)**: δ 10,95 (s, 1H, NH), 8,32 (s, 1H, H6'), 8,03 (s, 1H, H4'), 7,51 (s, 1H, H3'), 7,43 (s, 1H, H5), 7,34 (s, 1H, H6), 7,25 (s, 1H, H3), 7,06 (m, 2H, H4 e H5'), 3,93 (d, $J = 33,7$ Hz, 4H, Ha+a'), 2,11 (s, 4H, Hb+b') ppm. **RMN ¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆, 150 MHz)**: δ 186,50 (N-CS₂), 147,45 (C6'), 146,61 (C2'), 141,11 (C4'), 131,80 (C1), 130,38 (C3), 129,74 (C5), 123,79 (C4), 122,57 (C2), 118,06 (C6),

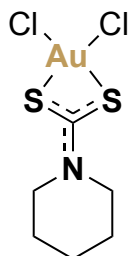
116,64 (C5'), 116,28 (C3'), 52,17 e 51,72 (Ca+a'), 24,05 e 23,74 (Cb+b') ppm. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO-*d*₆, 242 MHz): -141,05 ppm (septeto, $J = 10,5$ Hz, PF₆). **Análise elementar** calculada para C₁₆H₁₇AuF₆N₃PS₂ (657,38 g mol⁻¹): C, 29,23; H, 2,61; N, 6,39. Experimental: C, 28,44; H, 2,54; N, 6,23. **RP-HPLC**: R_f = 18,04 min. **ESI⁺ MS (m/z)**: 512,05440, [C₁₆H₁₇AuN₃S₂]⁺ (calc. 512,05294).

1.3.3.4 Complexos do tipo [Au^{III}(DTC)Cl₂]

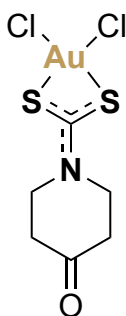
Os complexos de tipo [Au^{III}(DTC)Cl₂] foram obtidos conforme procedimento descrito na literatura.[83] Os compostos **C2b**[83] e **C4b**[84] foram publicados anteriormente. Assim, os ligantes DTCs (0,1 mmol) foram solubilizados em 1,0 mL de H₂O e adicionados gota-a-gota à uma solução equimolar do precursor metálico HAuCl₄.3H₂O (0,1 mmol) em 2,0 mL de H₂O. O sistema foi deixado sob agitação magnética por 2 h. Por fim, os sólidos amarelos resultantes foram filtrados e lavados com H₂O.



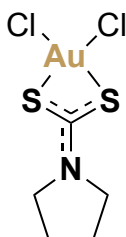
C1b – [Au^{III}(L1)Cl₂]. Rendimento: 60%. **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz)**: δ 4,73 (t, $J = 4,6$ Hz, 1H, Hc), 3,88 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H, Hb), 3,43 (s, 3H, Ha), 3,37 (s, 6H, Hd) ppm. **RMN ¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆, 150 MHz)**: δ 190,28 (N-CS₂), 100,71 (Cc), 55,11 (Cb), 54,57 (Cd), 39,74 (Ca) ppm. **Análise elementar** calculada para C₆H₁₂AuCl₂NO₂S₂ (462,15 g mol⁻¹): C, 15,59; H, 2,62; N, 3,03. Experimental: C, 15,86; H, 2,45; N, 3,03. **ESI⁺ MS (m/z)**: 483,92421, [M–Na]⁺ (calc. 483,92497).



C2b – [Au^{III}(L2)Cl₂]. Rendimento: 66%. **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz)**: δ 3,81 (m, 4H, Ha), 1,72 (m, 6H, Hb,c) ppm. **RMN ¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆, 150 MHz)**: 50,66 e 50,35 (Ca+a'), 25,17 e 24,95 (Cb+b'), 23,46 (Cc) ppm. **ESI⁺MS (m/z)**: 449.91860, [M–Na]⁺ (calc. 449.91949).



C3b – [Au^{III}(L3)Cl₂]. Rendimento: 66%. **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz):** δ 4,17 (t, *J* = 6,4 Hz, 4H, Ha), 2,74 (t, *J* = 6,4 Hz, 4H, Hb) ppm. **RMN ¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆, 150 MHz):** δ 205,11 (CO), 194,43 (N-CS₂), 45,73 (Ca), 37,57 (Cb) ppm. **Análise elementar** calculada para C₆H₈AuCl₂NOS₂ (442,12 g mol⁻¹): C, 16,30; H, 1,82; N, 3,17. Experimental: C, 14,20; H, 1,72; N, 2,78. **ESI⁺ MS (*m/z*):** 463,89799, [M–Na]⁺ (calc. 463,89876).



C4b – [Au^{III}(L4)Cl₂]. Rendimento: 70%. **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz):** δ 3,83 (s, 4H, Ha), 2,06 (m, 4H, Hb) ppm. **ESI⁺ MS (*m/z*):** 435,90303, [M–Na]⁺ (calc. 435,90384).

1.3.4 Estudos de estabilidade e reatividade

A estabilidade dos compostos **C3a** e **C3b** foi avaliada por meio de análises por RMN de ¹H em DMSO-*d*₆ e na mistura de solventes DMSO-*d*₆ e D₂O (em uma proporção de 80:20). Os complexos também foram investigados quanto às suas estabilidades em tampão PBS 1x em pH = 7,4 por espectroscopia de absorção na região do UV-vis.

1.3.5 Ensaios de estabilidade em DMSO

No RMN, cerca de 10 mg dos complexos foram completamente dissolvidos em cerca de 400 μL de DMSO-*d*₆ e o espectro de ¹H foi coletado ao longo de 10 dias. O *software* MestreNova foi usado para gerar os espectros.

1.3.6 Ensaios de estabilidade em PBS

Para investigar a estabilidade dos complexos **C3a** e **C3b** em tampão, foram preparadas soluções-estoque em DMSO em uma concentração de 10.000 μM antes das suas diluições em PBS

1x (pH 7,4) até a diluição de 50 μM . Então, o espectro UV-vis foi registrado a cada 2 minutos por 24 h. Para gerar as figuras representativas dos espectros UV-vis, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 9 com os dados referentes ao tempo de 0 h e 24 h para melhor visualização do efeito.

1.3.7 Ensaios de estabilidade em DMSO- d_6 /D₂O

Foram conduzidos testes de estabilidade por RMN ao longo do tempo para **C3a** ciclometalado e para o composto de coordenação **C3b**, em uma mistura de DMSO- d_6 e D₂O (80:20). Para isso, quantidades aproximadas de cerca de 3 mg de cada complexo de ouro(III) foram dissolvidas em 0,5 mL DMSO- d_6 /D₂O (80:20). Então, os espectros de RMN de ¹H de **C3a** e **C3b** foram registrados imediatamente após a mistura e 1, 6, 12 e 24 horas após a dissolução.

1.3.8 Ensaios de reatividade com NAC

Os estudos de reatividade dos complexos **C3a** e **C3b** frente à *N*-acetil-cisteína foram realizados similarmente na mesma mistura de solventes. Assim, uma quantidade equimolar de NAC foi adicionada à solução de DMSO- d_6 /D₂O (80:20) contendo os complexos e os espectros de RMN de ¹H foram registrados nos mesmos intervalos de tempo (1, 6, 12 e 24 horas após a dissolução). Após 24 horas, cada mistura foi analisada por HR-ESI-MS no modo positivo, utilizando MeCN como solvente. O *software* MestreNova foi usado para gerar os espectros de RMN, enquanto o *software* FreeStyle foi usado para gerar os espectros de massas.

1.3.9 Ensaios de interação com proteínas de transporte: BSA

Os complexos **C3a** e **C3b** também foram testados quanto à sua capacidade de se ligar à albumina, investigando suas capacidades em inibir a fluorescência intrínseca da proteína. Os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro Varian Cary-Eclipse, com excitação das amostras no comprimento de onda de 280 nm, leitura de emissão de fluorescência na faixa de 300 – 500 nm e temperatura igual a 25 °C. Para a obtenção dos espectros, uma solução-estoque de BSA (0,45 mM) em tampão PBS 1x (pH = 7,4) foi diluída até uma concentração final de 10 μM . Alíquotas de 0,5 μL de soluções-estoque (0,01 M) dos complexos de ouro, em DMSO, foram adicionadas obtendo-se uma faixa de $r = 0 - 2,0$, onde r representa a razão da concentração do complexo e da proteína, $= \frac{[\text{complexo}]}{[\text{BSA}]}$. A porcentagem de DMSO não ultrapassou 1%, para garantir a integridade estrutural da proteína.

Para determinar a magnitude da interação entre a albumina e os complexos, utilizamos a equação de Stern-Volmer[85]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

Na equação, I_0 e I correspondem, respectivamente, às intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença de concentrações crescentes, $[Q]$, é a concentração do complexo supressor da emissão (ou “*quencher*”). A constante K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, coeficiente angular obtido da regressão linear de I_0/I vs $[Q]$ e considerada a constante de supressão dinâmica da fluorescência.

A constante K_{sv} pode ser reescrita como:

$$k_q = K_{sv}/\tau_0$$

em que k_q é a constante de velocidade de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida da fluorescência do fluoróforo excitado ($\tau_0 = 1 \times 10^{-8}$ s).

A extensão da força de interação entre a albumina e o complexo supressor é definida com a constante de ligação K_b , bem como n corresponde ao número de sítios ocupados na estrutura da proteína para esta interação. Esses parâmetros são obtidos utilizando-se a equação de Scatchard:[86]

$$\log \frac{I_0 - I}{I} = \log K_b + n \log [Q]$$

Os valores de fluorescência obtidos durante a titulação espectrofluorimétrica foram corrigidos devido ao efeito de filtro interno, que emerge da absorção nos comprimentos de onda de emissão (340 nm) e excitação (280 nm) pelos complexos usados durante as titulações, segundo a equação:

$$I_{corr} = I_{obs} \times 10^{\frac{A_{emissão} + A_{excitação}}{2}}$$

I_{corr} e I_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigida e observada, respectivamente, e $A_{emissão}$ e $A_{excitação}$ são os valores de absorbância nos comprimentos de onda mencionados.

1.3.10 Estudos de viabilidade celular e determinação do IC₅₀

A avaliação do efeito dos complexos de Au(III) e ligantes DTCs sobre a viabilidade celular foi realizada pelo ensaio do MTT, um ensaio colorimétrico baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, MTT, amplamente utilizado para a medição de proliferação celular. Em razão de seus grupos lipofílicos e por ser uma molécula positivamente carregada, o MTT, que possui cor amarelada e solubilidade moderada em água, atravessa a membrana mitocondrial das células viáveis, sendo reduzido em meio intracelular para formar cristais de cor violeta de formazan (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan), insolúveis em água mas solúveis em DMSO, dentre outros solventes.[87]

A absorbância da solução resultante da dissolução do formazan em DMSO está relacionada ao número de células vivas, segundo a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}}}{\text{Abs}} \times 100\% \quad (5)$$

Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram distribuídas em placas de 96 poços em densidades que variaram conforme a linhagem celular (entre $0,7 - 1,2 \times 10^3$ células/poço) e incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após aderência, as células foram tratadas por 72 horas com concentrações decrescentes de cada composto a ser testado (50,0 – 0,02 μM). As soluções dos compostos foram preparadas em DMSO e diluídas em meio de cultura, sendo que a concentração máxima de DMSO não excedeu 1% v/v. Cumprido o tempo de exposição, 20 μL de uma solução aquosa de MTT a 2,5 mg mL⁻¹ são adicionados aos poços das placas, que foram mantidas por 4 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Por fim, retira-se o meio sobrenadante e o produto de redução do MTT é solubilizado em DMSO. Em um leitor de microplacas, as absorbâncias das soluções em cada poço são adquiridas em $\lambda = 570$ nm. A partir dessas absorbâncias, obtém-se as viabilidades celulares em cada concentração e são construídas as curvas concentração-resposta, necessárias para aquisição do valor da concentração inibitória a 50% da viabilidade celular (IC₅₀, μM), ou seja, a concentração do complexo que produz um efeito inibitório do crescimento celular de 50% da inibição máxima possível. Os dados obtidos foram normalizados considerando-se a viabilidade celular do controle negativo (sem adição dos compostos testados) como 100% utilizando o *software* GraphPad Prism 9.

Nesse trabalho, foram avaliadas as linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231, que possui um fenótipo triplo-negativo altamente metastática, e a linhagem de adenocarcinoma mamário estrógeno-dependente humano MCF-7. As células não-tumorais de mama, MCF10a, foram utilizadas para se calcular a seletividade dos compostos testados frente às células tumorais.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Síntese dos ligantes ditiocarbamato (DTCs)

Os ligantes organossulfurados utilizados neste trabalho (L1 – L3) foram sintetizados de acordo com metodologias descritas na literatura[82] e a caracterização foi realizada por RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em $\text{DMSO-}d_6$ e por medidas de seus pontos de fusão. O ligante L4 foi obtido comercialmente e usado sem quaisquer purificações prévias. As análises espectrais confirmam a obtenção dos ligantes DTC, de coloração branca ou levemente bege, solúveis em solventes como DMSO , H_2O e MeOH . Os espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos ligantes apresentam sinais de átomos de hidrogênio e carbono característicos dos compostos obtidos. As atribuições estão descritas no **Material Suplementar** (Figura 60 – Figura 65).

1.4.2 Síntese dos complexos $[(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Au}^{\text{III}}\text{DTC}]\text{PF}_6$ e $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{DTC})\text{Cl}_2]$

Inicialmente, o complexo precursor ciclometalado $[(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$ (cuja estrutura está representada na Figura 14) foi obtido a partir da 2-anilino piridina ($\text{C}^{\wedge}\text{N}$) e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, baseando-se em procedimentos reportados na literatura[81] por meio de uma reação de ciclometalação. A escolha do ligante $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ deu-se com base nas propriedades exibidas por sistemas heterocíclicos derivados, com atividades antiproliferativas já reportadas nas linhagens de B16F10 (melanoma murino metastático) e A549 (adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas), e frente às células de carcinoma colorretal em compostos de coordenação de $\text{Au}(\text{I})$ e $\text{Ag}(\text{I})$. [88–90] Além disso, como mencionado, a estabilidade fornecida ao centro de $\text{Au}(\text{III})$ pela formação de um complexo ciclometalado é amplamente relatada na literatura.[77]

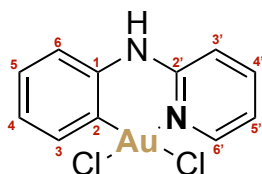


Figura 14 Representação estrutural do complexo ciclometalado $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ usado como precursor neste trabalho.

O complexo ciclometalado precursor $[(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$ foi caracterizado por RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para que fosse feita a correta atribuição dos sinais de hidrogênio e carbono em sua estrutura (**Material Suplementar**, Figura 66 – Figura 67), baseando-se na literatura [81] e nos efeitos eletrônicos decorrentes da presença do centro de ouro(III), bem como nas multiplicidades dos sinais obtidos. O espectro de RMN de ^1H apresenta apenas oito sinais de ressonância de prótons aromáticos bem definidas indicando a remoção de um próton do anel anilínico, e destaca-se o deslocamento do $\text{H}6'$ para campos mais baixos após a coordenação com $\text{Au}(\text{III})$ em comparação com o espectro da 2-anilino piridina livre. O $\text{H}6'$, que já se destacava no ligante livre

como o mais desblindado dos hidrogênios aromáticos por ser vizinho ao nitrogênio piridínico e, por estar na posição *meta* do anel com menor densidade de carga, apresenta uma desblindagem significativa ($\Delta\delta = 0,66$ ppm), provavelmente devida ao efeito indutivo da presença do íon metálico coordenado e da proximidade do ligante eletronegativo cloreto. Esse deslocamento está de acordo com o relatado para outros complexos análogos e é usualmente observado quando um ligante cloreto está nas proximidades do anel piridínico.[81] O NH, no entanto, é o próton que apresenta o maior deslocamento para frequências mais altas ($\Delta\delta = 1,72$ ppm). Também observamos nos espectros de RMN um maior número de ressonâncias referentes aos hidrogênios e carbonos da estrutura, devido à quebra de simetria do anel anilínico após a perda do próton e coordenação de **C1a** ao centro de Au(III).

A reação dos ligantes L1 – L4 com o complexo precursor $[(C^{\wedge}N)Au^{III}Cl_2]$, em MeOH, seguida da adição de uma solução aquosa saturada de KPF_6 , gerou os complexos **C1a** – **C4a** de fórmula molecular $[(C^{\wedge}N)Au^{III}DTC]PF_6$ com rendimentos na faixa de 50% – 65%. (Figura 15). A síntese foi realizada com base em metodologia descrita na literatura [57] e é descrita na **Parte Experimental**.

Propõe-se que as estruturas de **C1a** – **C4a** compreendem à fração ciclometalada $(C^{\wedge}N)-Au(III)$ derivada do complexo precursor e a substituição dos ligantes cloreto na esfera de coordenação do íon metálico por um ligante ditiocarbamato coordenado de forma bidentada resultando em complexos carregados positivamente (tendo o ânion hexafluorofosfato PF_6^- como contra-íon).

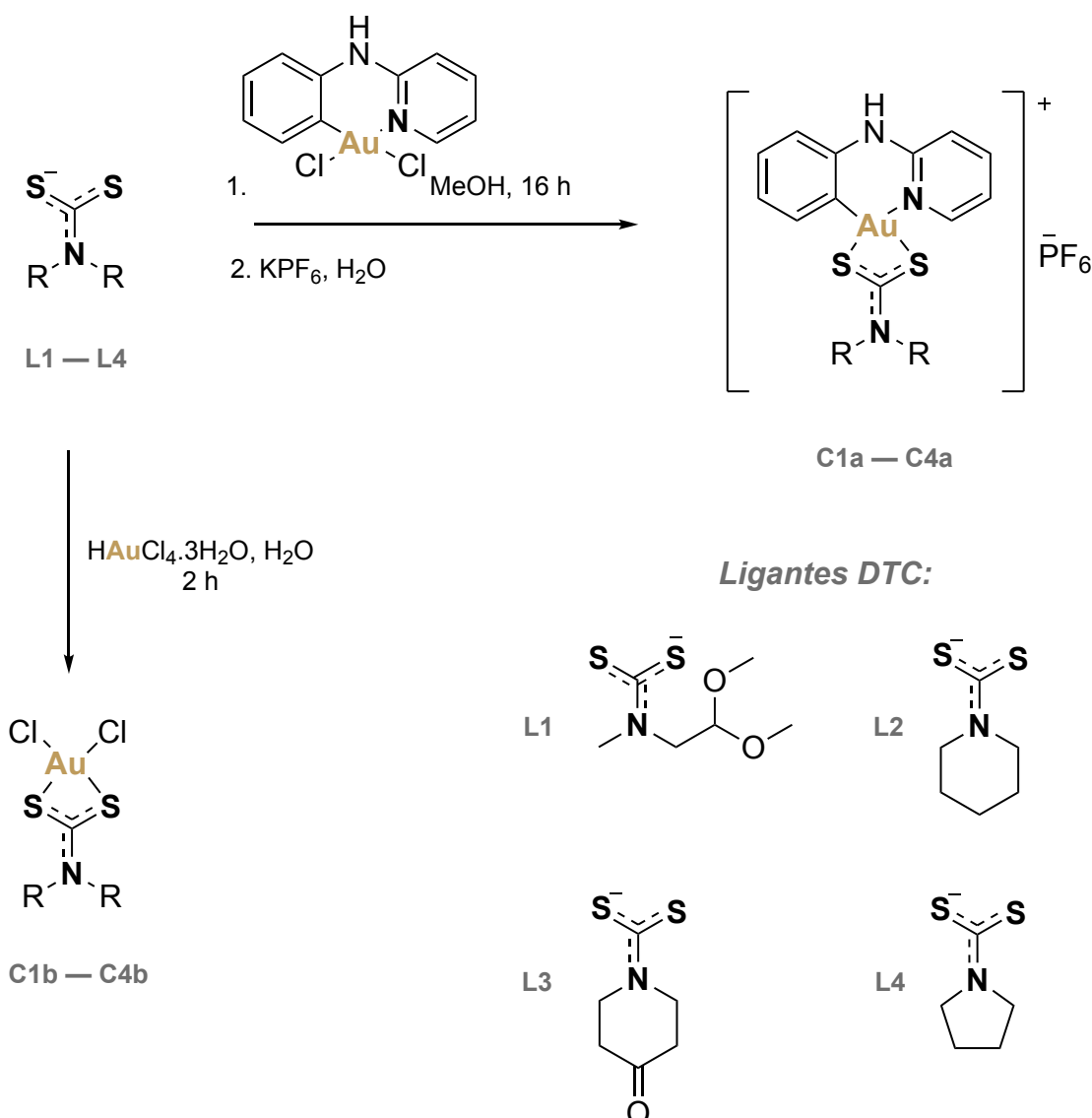


Figura 15 Esquema de síntese das séries de complexos de ouro(III)-ditiocarbamato. A partir dos ligantes L1 – L4 foram sintetizados os complexos organometálicos C1a – C4a e os complexos de coordenação C1b – C4b.

Para se avaliar os efeitos estruturais e biológicos da porção organo-ouro(III) em complexos contendo ligantes DTCs foram sintetizados, também, os complexos Au(III)–ditiocarbamato análogos (Figura 15). Os complexos do tipo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{DTC})\text{Cl}_2]$ foram obtidos por meio da mistura de soluções aquosas equimolares dos ligantes ditiocarbamato e o sal $\text{H[AuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, em meio aquoso, em uma reação de substituição de dois ligantes cloreto da esfera de coordenação do Au(III) por um ligante ditiocarbamato coordenado de modo bidentado. Os compostos C2b[83] e C4b[84] foram publicados anteriormente.

1.4.3 Análise Elementar de C, H e N e Espectrometria de Massas ESI⁺-MS

Os complexos [(C[^]N)Au^{III}DTC]PF₆ e [Au^{III}(DTC)Cl₂] foram obtidos como sólidos amorfos de coloração bege, apresentando estabilidade ao ar e solubilidade em solventes como DMSO, DMF e MeCN. Os resultados experimentais da composição elementar para carbono, hidrogênio e nitrogênio (%) corroboram as fórmulas mínimas propostas para as estruturas dos complexos, assim como adequados graus de pureza, como mostrado na Tabela 1. Também foram realizados experimentos para determinação dos picos do íon molecular dos complexos inéditos por espectrometria de massas com ionização por elétrons-spray em modo positivo (ESI⁺MS), também apresentados na Tabela 1 (os espectros podem ser visualizados na Figura 68 e Figura 69, **Material Suplementar**).

Tabela 1 Resultados da análise elementar de C, H e N (%) dos complexos inéditos das séries [(C[^]N)Au^{III}DTC]PF₆ e [Au^{III}(DTC)Cl₂] do ESI⁺-MS. Exp = experimental, Calc. = calculado, F.M. = fórmula molecular, M = massa molar.

Complexo	%C	%H	%N	[M] ⁺ (Calc.) (m/z)	F.M.	M (g mol ⁻¹)
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)			
C1a	28,32 (28,95)	2,94 (3,00)	5,84 (5,96)	560,07575 (560,07407) ^a	C ₁₇ H ₂₁ AuF ₆ N ₃ O ₂ PS ₂	705,42
C2a	30,10 (30,41)	2,79 (2,85)	6,04 (6,26)	526,06963 (526,06859) ^a	C ₁₇ H ₁₉ AuF ₆ N ₃ PS ₂	671,41
C3a	30,27 (29,79)	2,54 (2,50)	6,08 (6,13)	572,07561 (572,07407) ^b	C ₁₇ H ₁₇ AuF ₆ N ₃ OPS ₂	685,39
C4a	28,44 (29,23)	2,54 (2,61)	6,23 (6,39)	512,05440 (512,05294) ^a	C ₁₆ H ₁₇ AuF ₆ N ₃ PS ₂	657,38
C1b	15,86 (15,59)	2,45 (2,62)	3,03 (3,03)	483,92421 (483,92497) ^c	C ₆ H ₁₂ AuCl ₂ NO ₂ S ₂	462,15
C3b	14,40 (16,30)	1,91 (1,82)	2,79 (3,17)	463,89799 (463,89876) ^c	C ₆ H ₈ AuCl ₂ NOS ₂	442,12

^a [M]⁺ corresponde aos picos dos cátions [(C[^]N)Au^{III}DTC]⁺ dos complexos **C1a**, **C2a** e **C4a**.

^b [M]⁺ corresponde ao pico do cátion [(C[^]N)Au^{III}(L3)+MeOH]⁺.

^c [M]⁺ corresponde ao pico do íon molecular [M+Na]⁺.

1.4.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C{¹H} e ³¹P{¹H}

A caracterização por RMN dos compostos foi realizada com o objetivo de se verificar o sucesso reacional de todas as etapas, desde a obtenção dos ligantes e precursores organo-ouro(III) até a obtenção dos complexos biologicamente relevantes organo-ouro(III)-ditiocarbamato, confirmando a coordenação das frações DTC ao centro de Au(III) por variações nos deslocamentos químicos de sinais característicos dos núcleos de hidrogênio, carbono e fósforo. Considerando-se a similaridade estrutural dos complexos do tipo [(C[^]N)Au^{III}DTC]PF₆, são discutidos a seguir os espectros obtidos para o complexo **C3a**, enquanto os espectros de ¹H e ¹³C{¹H} dos outros complexos, bem como suas atribuições, são detalhados no **Material Suplementar** (Figura 70 – Figura 75).

O espectro de RMN de ^1H do complexo **C3a** (Figura 16) apresenta os sinais referentes ao ligante L3 e ao ligante C \wedge N, em concordância com a estrutura proposta.

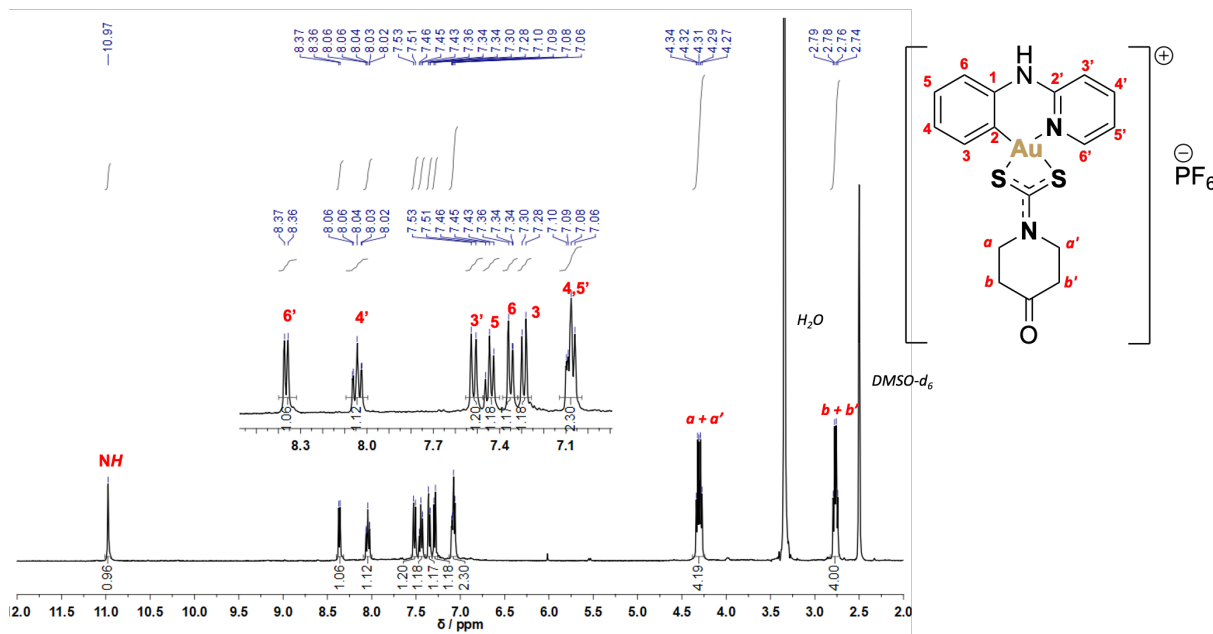


Figura 16 Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) para o complexo **C3a** em $\text{DMSO-}d_6$.

O sinal centrado em 2,77 ppm com integração de 4H pode ser atribuído aos hidrogênios **Hb** e **Hb'** dos grupos metilênicos vizinhos à carbonila no ligante L3. Em 4,31 ppm, atribui-se ao sinal dos hidrogênios **Ha** e **Ha'** vizinhos ao nitrogênio do grupo ditiocarbamato. Essa proposta de atribuição dos sinais aos prótons do ligante L3 é baseada nos efeitos eletrônicos que decaem sobre os hidrogênios vizinhos ao fragmento $-\text{NCSS}$, resultando na diminuição da densidade eletrônica ao redor dos prótons **Ha+a'** e uma menor blindagem. Com relação à fração ciclometalada, os sinais dos hidrogênios **H4** e **H5'** do ligante C \wedge N são atribuídos ao multipletto entre 7,10 e 7,06 ppm na região de aromáticos com integração próxima a 2. Os hidrogênios **H3** e **H6** ressonam em 7,28 e 7,34 ppm, respectivamente, como dupletos. Em 7,45 ppm, tem-se o **H5** como um tripleto e em 7,52 ppm, o sinal de **H3'**. Em região mais desblindada dos aromáticos, temos a ressonância dos hidrogênios **H4'** (tripleto em 8,04 ppm) e **H6'** (dupletto em 8,36 ppm). O próton vizinho ao nitrogênio coordenado ao Au(III) apresenta um efeito maior de blindagem, comparando-se com o complexo precursor $[(\text{C}\wedge\text{N})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$ ($\Delta\delta \approx 0,50$ ppm), evidenciando que o grupo ciclometalado (C \wedge N)–Au(III) sofre alterações eletrônicas com a coordenação do ligante DTC. Essas observações sugerem que o efeito eletrônico do íon de ouro nos ligantes da esfera de coordenação pode ser maior no ligante DTC. O sinal em 10,97 ppm é atribuído ao próton do grupo **NH**, levemente mais desblindado ($\Delta\delta = 0,26$ ppm) do que o observado para o complexo precursor $[(\text{C}\wedge\text{N})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$.

No espectro de RMN para os núcleos de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **C3a** (Figura 17) observam-se variações discretas nos deslocamentos químicos dos carbonos do ligante DTC, com exceção do carbono $-\text{CS}_2$, que ressona em ~ 192 ppm, enquanto no ligante livre L3 seu sinal é observado em 215 ppm, de acordo com o que é reportado na literatura para compostos similares.[71] Essa variação de $\Delta\delta \approx 23,0$ ppm, resultante da blindagem do átomo de carbono $-\text{CS}_2$, correlaciona-se bem com a proposta de uma maior densidade eletrônica no fragmento $-\text{NCSS}$ e um aumento do caráter de dupla ligação carbono-nitrogênio.[91]

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para todos os complexos confirmam a presença do contra-íon hexafluorofosfato (PF_6^-), como representado para o complexo **C3a** na Figura 18, que apresenta o sinal de fósforo desdobrado como um septeto observado na região de -140 ppm devido aos acoplamentos com os núcleos de flúor com $I = \frac{1}{2}$.

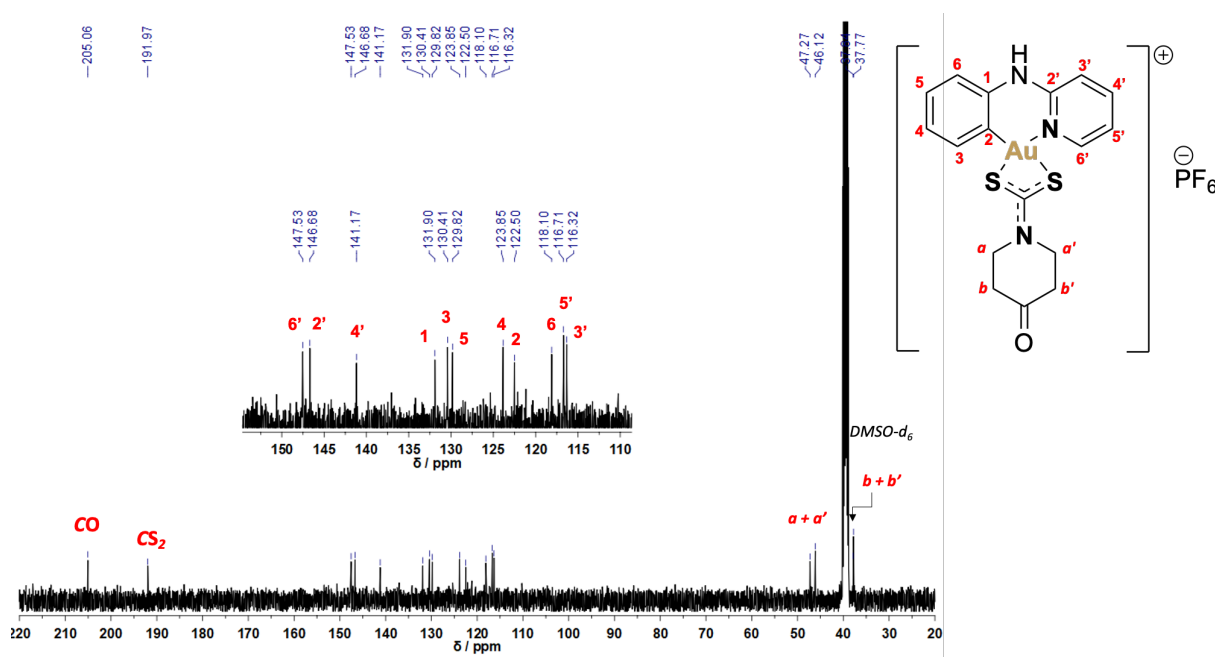


Figura 17 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (150 MHz) do complexo **C3a** em DMSO-d_6 .

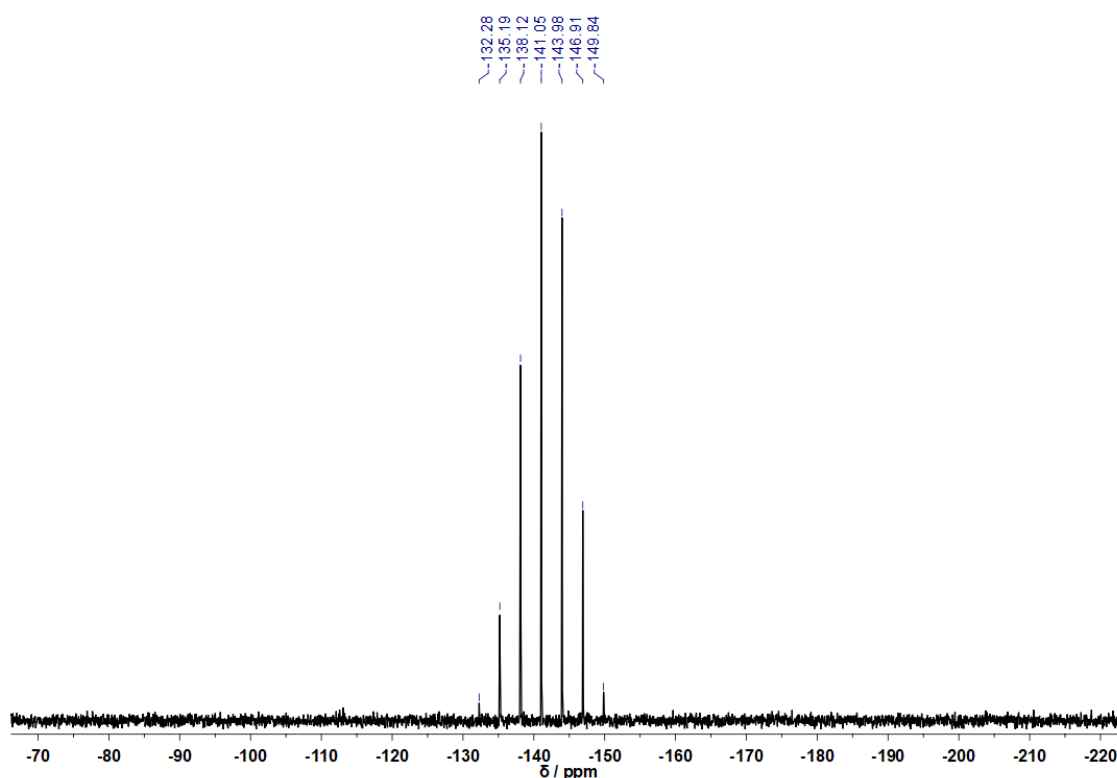


Figura 18 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo **C3a** em $\text{DMSO-}d_6$.

Os complexos do tipo $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{DTC})\text{Cl}_2]$ foram caracterizados, também, por RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em soluções de $\text{DMSO-}d_6$. Aqui, destacam-se os espectros de RMN referentes aos complexos **C1b** e **C3b**, inéditos e também caracterizados por $\text{ESI}^+\text{-MS}$ e CHN , conforme previamente apresentado.

Para o complexo **C1b**, resultante da reação entre o ligante **L1** e o $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, fica evidente a formação do produto proposto, comparando-se o espectro de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ com os espectros do ligante ditiocarbamato livre (Figura 19). No espectro de RMN de ^1H do complexo, o sinal do **Hc** (um tripleto em 4,73 ppm com integração próxima a 1) não sofre variações no deslocamento químico em comparação ao ligante livre, dando indícios de que esse próton não é fortemente influenciado eletronicamente pela presença do metal. No entanto, os hidrogênios metilênicos **Hb** são blindados e ressonam em um duplete com integração igual a 2 em 3,88 ppm ($\Delta\delta \approx 0,20$ ppm em comparação ao **L1**). Já os hidrogênios do grupo metila **Ha** sofrem um efeito de desblindagem discreto. Através do mapa de correlação bidimensional HSQC (do inglês *heteronuclear single quantum coherence*), foi identificado que o sinal referente aos hidrogênios

Hd é encoberto pelo sinal da água presente no solvente deuterado utilizado, com $\delta = 3,37$ ppm (Figura 76).

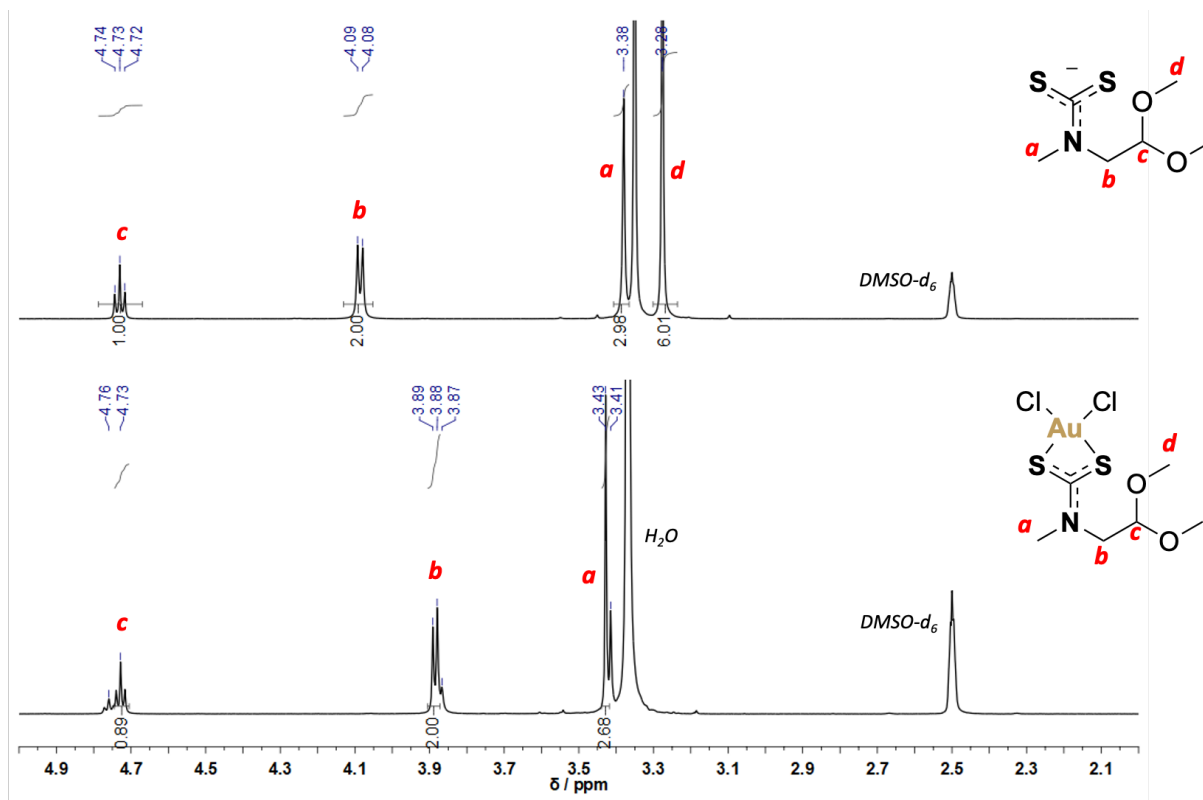


Figura 19 Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do complexo **C1b** e do ligante **L1** em $\text{DMSO-}d_6$.

Na Figura 20, tem-se os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **C1b** e do ligante **L1**. Para os experimentos referentes ao núcleo de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ das amostras é observado um efeito semelhante ao observado no experimento de ^1H . O sinal referente ao carbono **Ca** do complexo é encoberto pelo sinal de RMN do $\text{DMSO-}d_6$, sendo possível visualizar a correlação entre os sinais de **Ha** e **Ca** no experimento bidimensional $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC (Figura 76). Assim, **Ca** tem $\delta = 39,46$ ppm no complexo, com $\Delta\delta \approx 4,0$ ppm para campo mais alto em comparação ao ligante livre. Os carbonos **Cb** e **Cd** são fracamente influenciados pela coordenação ao centro metálico e seus sinais são encontrados próximos aos deslocamentos químicos originais. O sinal do carbono **Cc** é observado em 100,71 ppm e apresenta um discreto efeito de blindagem ($\Delta\delta \approx 3,0$ ppm). Como esperado, o carbono ditiocarbâmico $-\text{CS}_2$ é fortemente influenciado pela coordenação ao Au(III) . No ligante livre, o sinal desse carbono é observado em $\delta = 190,28$ ppm, enquanto no complexo **C1b** o sinal é observado em $\delta = 190,28$ ppm. Como comentado anteriormente, essa considerável variação de $\Delta\delta \approx 25,0$ pp é resultado da blindagem do átomo de carbono $-\text{CS}_2$ e, corrobora bem a proposta de uma maior densidade eletrônica no fragmento $-\text{NCSS}$ e um aumento do caráter de dupla ligação

carbono-nitrogênio, uma vez que o ligante não se encontra mais em seu estado aniônico. Ainda pode-se observar que o sinal do $-\text{CS}_2$ no complexo **C1b** é mais blindado que o sinal do complexo organo-ouro(III)-ditiocarbamato análogo (**C1a**, Figura 71). No espectro do complexo **C1a**, o sinal $-\text{CS}_2$ é encontrado em ~ 194 ppm, demonstrando que a porção organo-ouro(III) deve influenciar na indução da densidade eletrônica na direção do ligante $\text{C}^{\wedge}\text{N}$.

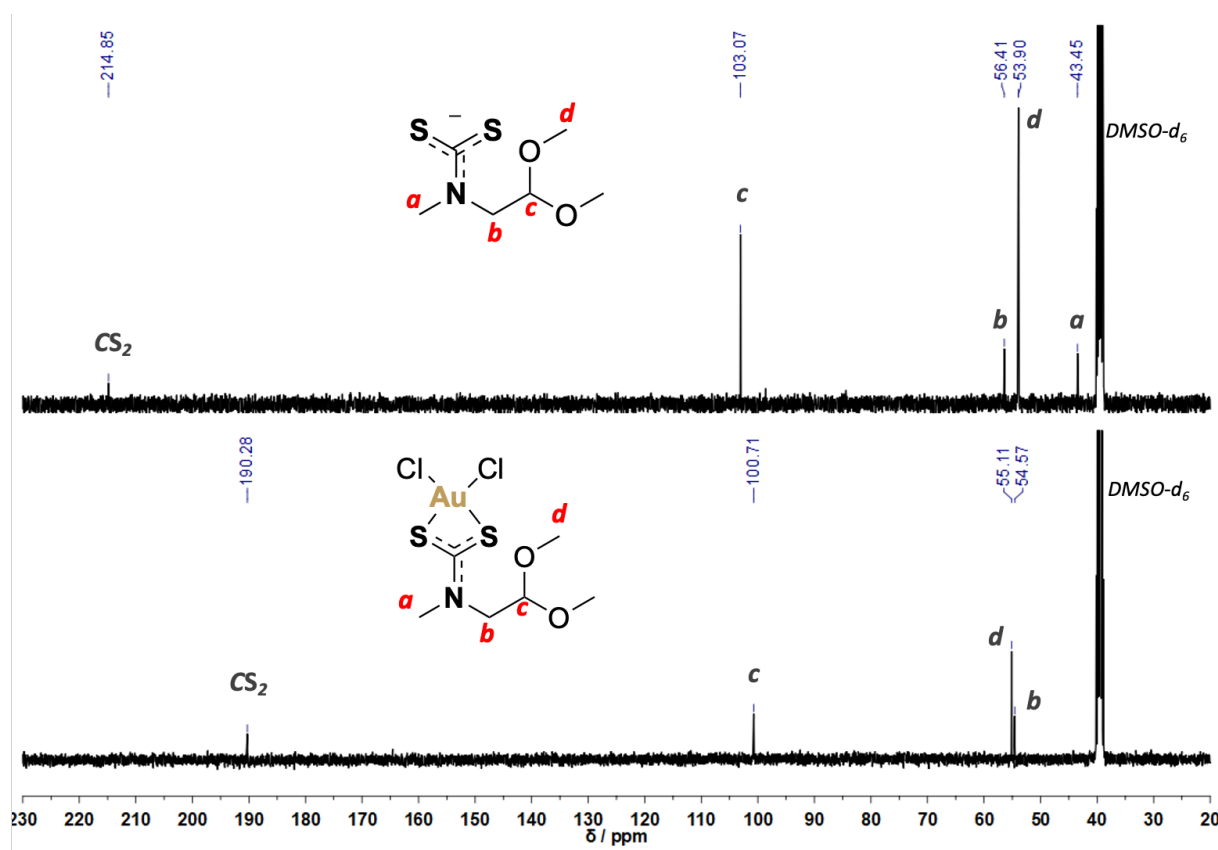


Figura 20 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (150 MHz) do complexo **C1b** e do ligante **L1** em DMSO-d_6 .

Para o complexo **C3b**, resultante da reação entre o ligante ditiocarbamato L3 e o sal de Au(III), os espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em $\text{DMSO-}d_6$ são demonstrados na Figura 21 e Figura 22. De forma análoga ao observado para o ligante ditiocarbamato livre L3, no espectro de ^1H do complexo são observadas ressonâncias dos prótons metilênicos equivalentes **Ha** e **Hb**, que se desdobram como tripletos com integração igual a 2. O **Ha**, mais próximo ao centro de coordenação do íon metálico Au(III), é blindado comparando-se com o mesmo próton no ligante L3, mudando de um sinal tripleto centrado em 4,54 ppm para 4,17 ppm ($\Delta\delta = 0,37$ ppm), podendo-se supor uma maior densidade de carga nessas posições do complexo em solução. Por outro lado, de forma quase proporcional, o sinal dos prótons **Hb** apresentam um deslocamento químico maior em comparação ao ligante, de 2,32 ppm para 2,74 ppm ($\Delta\delta = 0,42$ ppm). Essas observações corroboram a presença do centro metálico de Au(III) coordenado ao ligante organosulfurado e sua influência eletrônica sobre os prótons do ligante.

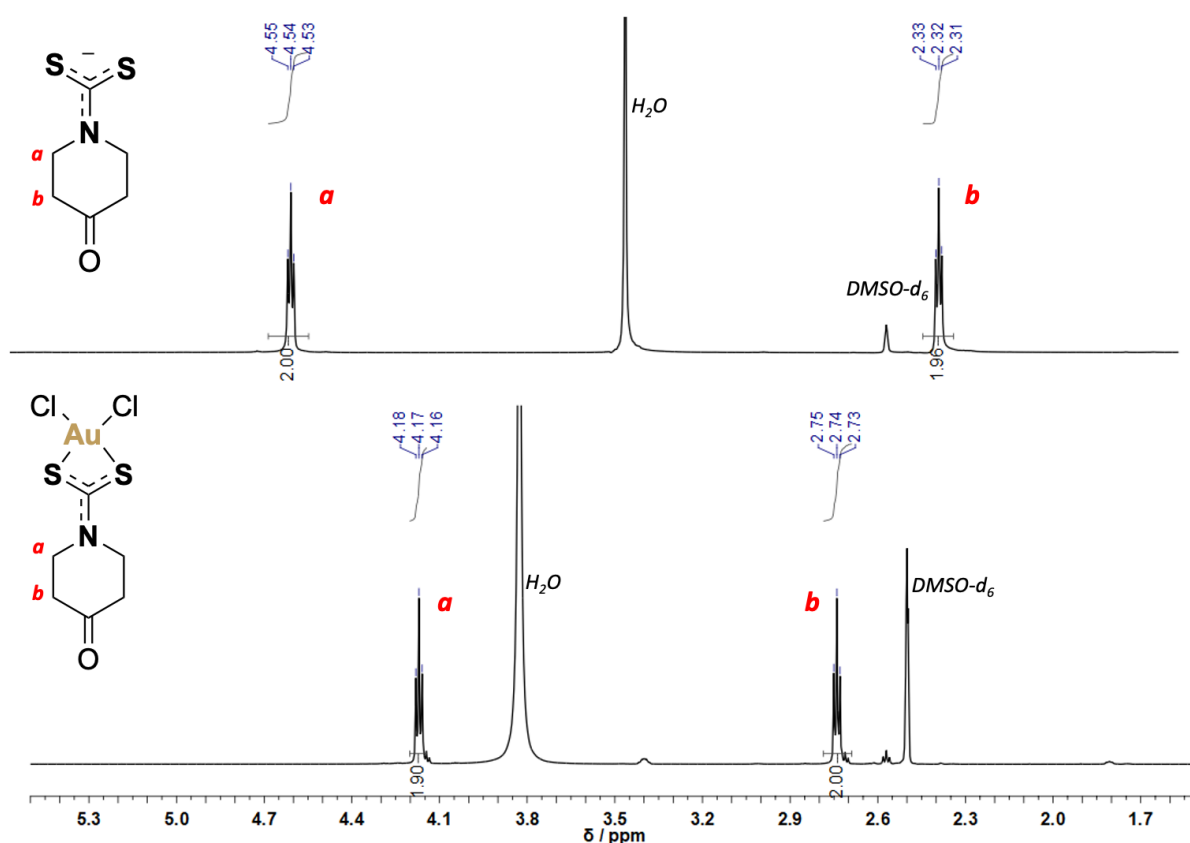


Figura 21 Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do complexo **C3b** e ligante L3 em $\text{DMSO-}d_6$.

Na Figura 22 tem-se os espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **C3b** e do ligante L3. Como esperado, os dois sinais referentes aos carbonos metilênicos do ligante L4 são observados no espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo. Analogamente ao que ocorre no espectro de ^1H , o sinal do **Ca**,

mais próximo ao grupo —NCSS , sofre um efeito de blindagem em comparação ao espectro do ligante livre, de 47,93 ppm para 45,73 ppm ($\Delta\delta = 2,2$ ppm). O **Cb** tem seu sinal deslocado para menores deslocamentos químicos, diferente do que é observado para seus prótons, em 37,57 ppm (sendo que em L3 o sinal é observado em 40,51 ppm, $\Delta\delta \approx 3,0$ ppm). Nas regiões de campo mais baixo, são esperados os sinais de carbonos insaturados do grupo carbonila e ditiocarbâmico. Observa-se que a carbonila tem seu sinal em 205,11 ppm, levemente blindado com relação ao observado para o ligante L3 livre. Novamente, o carbono ditiocarbâmico —CS_2 é fortemente influenciado pela coordenação ao Au(III) na estrutura do **C3b**, sendo observado em 194,43 ppm, com cerca de $\Delta\delta \approx 20$ ppm, uma vez que o L3 apresenta esse sinal em 215,01 ppm. Comparando-se com o complexo organo-ouro(III)-ditiocarbamato análogo (**C3a**, Figura 16), o carbono do —CS_2 no complexo **C3a** é levemente mais blindado em 191,97 ppm.

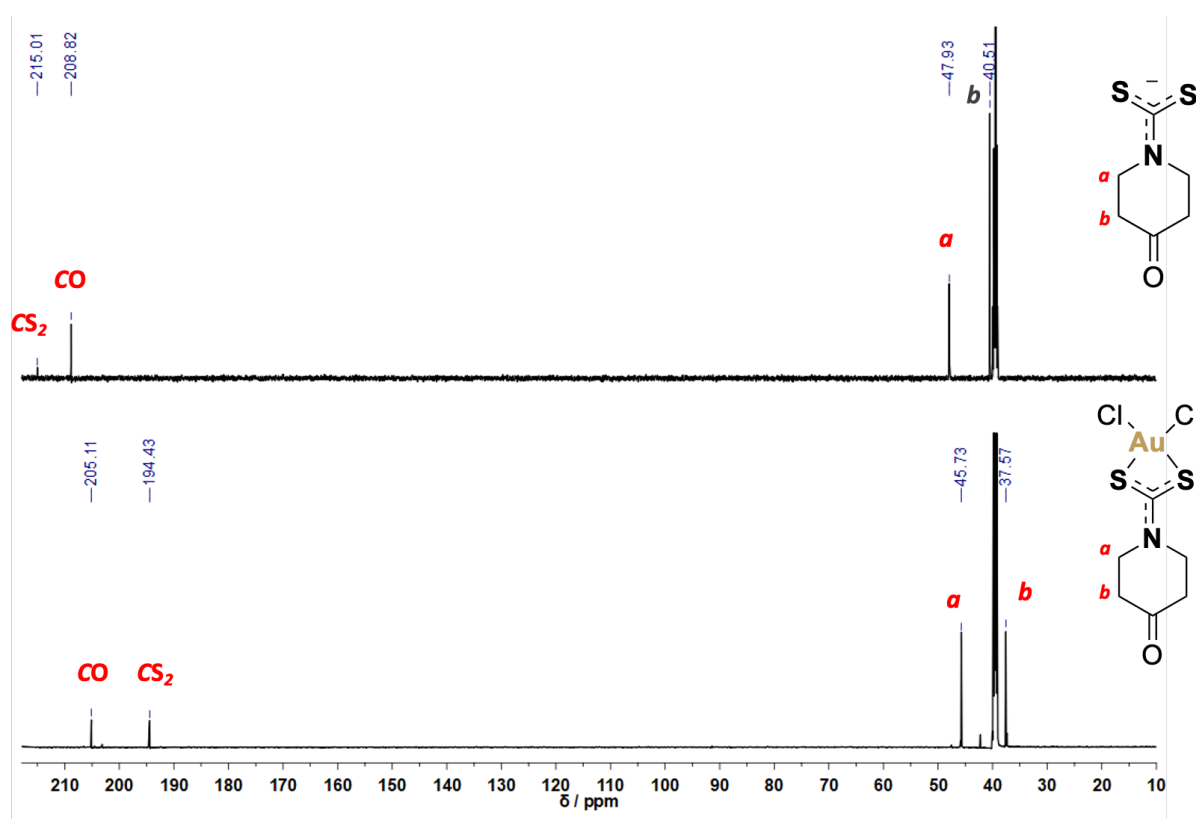


Figura 22 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (150 MHz) do complexo **C3b** e ligante L3 em $\text{DMSO-}d_6$.

1.4.5 Atividade antiproliferativa frente a linhagens tumorais

Com o objetivo de se entender o potencial biológico dos complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato e seus análogos de coordenação, foram realizados estudos de viabilidade celular em linhagens tumorais humanas após exposição aos complexos por 72h, além da determinação do IC_{50} dos compostos em cada linhagem por meio do ensaio colorimétrico do MTT. O parâmetro IC_{50} refere-se à concentração necessária para inibir o crescimento da população de células pela metade. Assim, quanto mais baixo for o valor de IC_{50} , mais eficaz é o potencial fármaco utilizado, o que significa que a dose necessária para mostrar o efeito inibidor é menor. Os valores de IC_{50} foram calculados a partir da curva sigmoidal concentração-resposta.

Neste trabalho, as culturas de células tumorais humanas, MCF-7 e MDA-MB-231, foram tratadas na presença de concentrações crescentes dos compostos dissolvidos em meio de cultura com 1% v/v em DMSO por 72 horas. As células de câncer de mama escolhidas apresentam variações nas expressões dos receptores de hormônios, como estrogênio (ER)/progesterona (PR) e o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Enquanto as células MCF-7 são dependentes de hormônio (ER+/PR+), as células MDA-MB-231 são um modelo agressivo e independente, pois não possuem os três tipos de receptores e, por isso, são conhecidas como triplo-negativas (ER-/PR-/HER2-).[10] Para se definir efeitos de seletividade dos compostos, a linhagem de células normais MCF10a foi utilizada nas mesmas condições. Os ensaios de viabilidade celular também foram realizados com o metalo-fármaco cisplatina nas mesmas condições experimentais, como um composto de referência.

Na Tabela 2, tem-se os valores de IC_{50} (μM) obtidos nos experimentos realizados com as linhagens tumorais, demonstrando que os compostos apresentam atividade citotóxica *in vitro* expressiva, capazes de inibir o crescimento celular dentro da faixa de concentração avaliada.

Tabela 2 Atividades antiproliferativas (valores de IC_{50} , μM) dos complexos $[(C^{\wedge}N)Au^{III}DTC]PF_6$ e de seus precursores, bem como dos compostos de coordenação $[Au^{III}(DTC)Cl_2]$, nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e MCF10a após 72 h de incubação, avaliadas pelo ensaio do MTT. Valores representados como a média \pm SD da quadruplicata de dois experimentos independentes ($n = 2$).

Composto	Células tumorais			Célula normal	
	IC_{50} ($\mu M \pm SD$)			IC_{50} ($\mu M \pm SD$)	
	MCF-7	IS*	MDA-MB-231	IS	MCF10a
L1	3,0 \pm 0,6	1,2	2,9 \pm 0,1	1,3	3,7 \pm 0,1
L2	8,8 \pm 0,6	0,1	3,9 \pm 0,1	0,2	1,0 \pm 0,3
L3	5,2 \pm 0,3	0,8	3,40 \pm 0,03	1,1	4,1 \pm 0,1
L4	4,2 \pm 1,1	0,3	3,7 \pm 0,4	0,3	1,3 \pm 0,2
C1a	1,2 \pm 0,5	0,6	1,3 \pm 0,5	0,5	0,7 \pm 0,1
C2a	0,7 \pm 0,2	0,3	0,6 \pm 0,2	0,3	0,2 \pm 0,1
C3a	3,2 \pm 1,5	0,2	0,4 \pm 0,1	2,0	0,8 \pm 0,2
C4a	1,5 \pm 0,3	1,0	1,60 \pm 0,02	0,9	1,5 \pm 1,3
C1b	1,7 \pm 0,1	0,3	1,3 \pm 0,6	0,4	0,6 \pm 0,1
C2b	0,6 \pm 0,01	0,5	0,7 \pm 0,1	0,4	0,3 \pm 0,1
C3b	3,9 \pm 0,1	0,5	2,3 \pm 0,1	0,9	2,1 \pm 0,2
C4b	0,9 \pm 0,1	0,6	1,7 \pm 0,1	0,3	0,6 \pm 0,1
$[(C^{\wedge}N)Au^{III}Cl_2]$	15,6 \pm 4,4	1,0	19,3 \pm 2,0	0,8	15,4 \pm 1,2
Cisplatina	2,6 \pm 0,2	1,0	2,9 \pm 0,1	0,9	2,7 \pm 0,7

*O índice de seletividade (IS) é calculado pela equação: IC_{50} (célula saudável, μM)/ IC_{50} (célula tumoral, μM).

De modo geral, os ligantes ditiocarbamato L1 – L4 apresentaram efeitos citotóxicos significativos contra as linhagens celulares tumorais. Esses resultados são esperados, uma vez que essa classe compostos é extensivamente investigada na literatura por seu potencial farmacológico.[92] No entanto, a coordenação dos ligantes DTCs ao centro metálico organo-ouro(III) levou a aumentos consideráveis das atividades antiproliferativas nas linhagens avaliadas. A avaliação dos dados permitiu constatar que o complexo precursor neutro $[(C^{\wedge}N)Au^{III}Cl_2]$, apesar de conter dois ligantes lábeis na sua estrutura de forma similar à cisplatina, apresentou o maior valor de IC_{50} nas células avaliadas, juntamente com baixa seletividade para as células tumorais. Essa observação demonstra que o complexo de Au(III) contendo dois ligantes cloreto lábeis, não

apresenta um potencial farmacológico comparável ao fármaco inorgânico de referência, nem mesmo deve apresentar um mecanismo de ação similar.

Entretanto, a substituição dos ligantes cloretos pelos ligantes DTC resultou em um aumento significativo da citotoxicidade do complexo precursor ciclometalado (entre 5 e 50 vezes) em ambas as linhagens celulares de câncer de mama. Embora a investigação aprofundada dos modos de ação deva ser abordada em estudos futuros, pode-se levantar a hipótese de que esse efeito pode ser devido ao caráter lipofílico dos complexos (**C1a** – **C4a**) em comparação aos ligantes livres ou ao complexo precursor, que pode promover rotas alternativas para a entrada na célula e a atividade biológica. De fato, o ditiocarbamato derivado da piperidina (L2) parece ser benéfico em ambas as séries, já que **C2a** e **C2b** são bastante ativos contra MCF-7 e MDA-MB-231, embora a seletividade em relação às células cancerosas não tenha sido observada. Uma hipótese, neste caso, pode ser associada ao caráter lipofílico do complexo final: uma maior lipofilicidade pode favorecer a *uptake* celular, mas a seletividade pode não ser atingida em suas interações com células ou alvos específicos. Isso pode estar ocorrendo devido à maior probabilidade de interação com membranas celulares em geral, não apenas com a membrana da célula-alvo, levando a efeitos tóxicos não-seletivos.

Os complexos derivados do ligante L4, **C4a** e **C4b**, se mostraram ativos nas duas linhagens tumorais de mama, com atividade similar sobre as células TNBC. Para a linhagem MCF-7, no entanto, observa-se um maior efeito do complexo de coordenação **C4b**.

Nos estudos de atividade antiproliferativa, o composto **C3a**, derivado da piperidona, é o composto mais ativo contra as células MDA-MB-231 ($IC_{50} = 0,4 \mu M$), mostrando modesta seletividade ($IS = 2$) frente a linhagem tumoral. Comparativamente, a atividade antiproliferativa obtida para o composto ciclometalado **C3a** é cerca de 7 vezes maior do que o obtido para a cisplatina na linhagem MDA-MB-231, enquanto que o metalo-fármaco de Pt(II) apresenta um IS também menor ($IS = 0,9$).

C3a demonstrou, ainda, cerca de nove vezes mais seletividade para as células triplo-negativas em comparação com as células MCF-7 ($IC_{50} = 3,2 \mu M$). Assim, com relação ao potencial citotóxico do complexo **C3a** na linhagem triplo-negativa, o resultado aqui obtido de $IC_{50} = 0,4 \mu M$ é mais favorável do que foi observado anteriormente para compostos organo-ouro(III) análogos na mesma linhagem, como no trabalho de Mertens e colaboradores ($IC_{50} = 0,5 - 0,7 \mu M$).^[57] Isso demonstra que a atividade citotóxica pode ser favorecida com variações na estrutura química de ambos os ligantes ditiocarbamato e/ou C^N, a partir de grupos funcionais que alteram a lipofilicidade do composto final ou favoreçam certos tipos de interações intermoleculares.

Sem a fração organometálica, para compostos da série **C1b** – **C4b**, a atividade antiproliferativa aqui observada foi, de modo geral, melhor do que a dos ligantes livres correspondentes, contudo, isso foi acompanhado de uma seletividade reduzida. O composto de coordenação, **C3b**, demonstrou uma atividade pelo menos cinco vezes menor contra as células MDA-MB-231 quando comparado ao análogo **C3a** ciclometalado e atividade antiproliferativa comparável ao observado para células normais. O ligante L3 apresenta um desempenho inferior aos complexos correspondentes, evidenciando a importância da presença do centro de Au(III) para os efeitos antiproliferativos da série de compostos avaliada.

Esses resultados estão alinhados com estudos sobre compostos de coordenação e/ou compostos organometálicos como potenciais agentes quimioterápicos para uma variedade de tipos de câncer, incluindo câncer de mama triplo negativo, uma vez que essas pequenas moléculas têm grande potencial com ação multimodal para tratamento isolado ou terapia combinada.[18]

Como o complexo ciclometalado **C3a** apresentou alta citotoxicidade contra células MDA-MB-231 e um moderado índice de seletividade, ele foi escolhido como o composto principal deste estudo, juntamente com o análogo de coordenação **C3b** e o ligante **L3**, para investigar mais profundamente aspectos de sua estabilidade química em solução, reatividade em relação a moléculas ricas em tióis e ter um melhor entendimento de suas interações sob condições fisiológicas.

Portanto, o efeito antiproliferativo dos derivados do ligante **L3** sobre a linhagem MDA-MB-231 também foi estimado variando-se os tempos de exposição a fim de esclarecer se seus efeitos citotóxicos são dependentes deste fator. Na Figura 23, tem-se as curvas concentração-resposta do complexo ciclometalado **C3a** obtidas pelo ensaio do MTT após 24 h, 48 h e 72 h de exposição. Ainda, com os dados da Tabela 3, observa-se que já nas primeiras 24 h o complexo **C3a** exerce atividade antiproliferativa apreciável contra as células tumorais de MDA-MB-231. Assim, o complexo apresenta atividade citotóxica dependente do tempo de exposição, uma vez que as concentrações inibitórias diminuem significativamente após 48h e 72 h. Esse efeito pode ser atribuído ao aumento gradual da concentração intracelular de **C3a**, à sua acumulação em compartimentos celulares específicos ao longo do tempo ou possivelmente devido ao desencadeamento de respostas celulares, de forma que esse efeito não foi observado para o ligante ditiocarbamato e o complexo **C3b**.

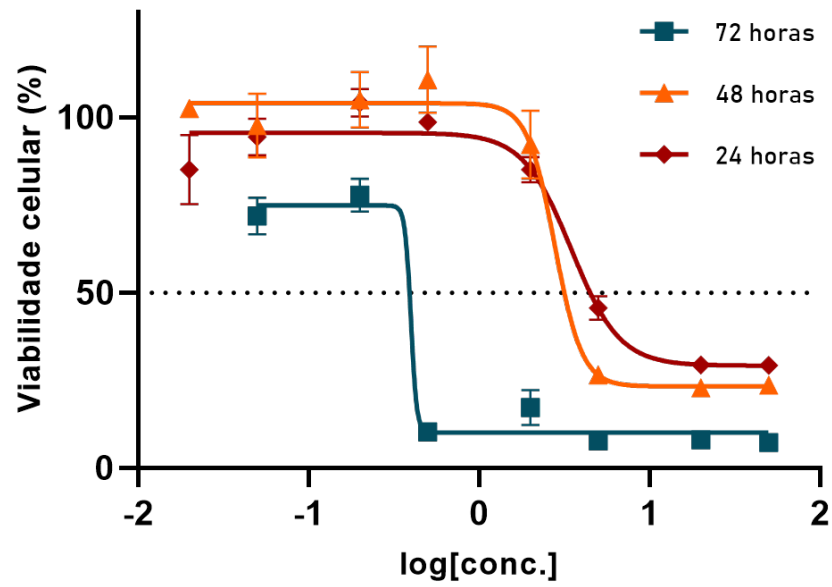


Figura 23 Curvas concentração-resposta de viabilidade de células MDA-MB-231 expostas ao complexo C3a por 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Tabela 3 Atividades antiproliferativas (valores de IC_{50} , μM) do ligante L4 e dos complexos C3a e C3b na linhagem celular MDA-MB-231 após 24 h, 48 h e 72 h de incubação, avaliadas pelo ensaio do MTT. Valores representados como a média \pm SD da quadruplicata de dois experimentos independentes ($n = 2$).

Compostos	IC_{50} (μM)		
	24 h	48 h	72 h
L3	6,6 \pm 0,3	5,3 \pm 0,3	3,4 \pm 0,1
C3a	3,5 \pm 0,1	2,7 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1
C3b	3,01 \pm 0,60	3,9 \pm 0,9	2,3 \pm 0,1

1.4.6 Estudos de estabilidade e reatividade com biomoléculas ricas em tióis

1.4.6.1 Estudos de estabilidade em DMSO- d_6

Devido à solubilidade limitada em outros solventes, os experimentos de RMN para os complexos foram realizados em solução de DMSO- d_6 . Por ser um solvente coordenante e empregado em muitos outros experimentos neste trabalho, a estabilidade dos complexos C3a e C3b em DMSO foi avaliada por RMN de 1H após 10 dias. Observa-se que os complexos C3a e C3b retêm suas características espectrais pelo menos durante esse período, o que pode indicar a estabilidade dos complexos e de suas ligações neste solvente, Figura 77 e Figura 78, não ocorrendo troca de ligantes na esfera de coordenação do Au(III).

1.4.6.2 Estudos de estabilidade em solução

Para garantir que os efeitos citotóxicos observados para C3a e C3b resultam de suas características estruturais, e não da liberação dos ligantes ditiocarbamato em condições fisiológicas e consequente decomposição química, a estabilidade dos complexos de Au(III) em ambiente aquoso foi avaliada. Para isso, os complexos foram totalmente solubilizados em DMSO, em uma solução-estoque de concentração de 0,01 M e posteriormente diluídos em tampão PBS 1 \times (pH 7,4) até atingir uma concentração de 50 μM , de forma que fosse possível a visualização das bandas referentes aos compostos no espectro de UV-visível. Então, monitoraram-se as bandas de absorvância na região UV-Visível dos compostos C3a e C3b em tampão à temperatura ambiente, na faixa de 200 e 800 nm, em intervalos regulares durante 24 horas. Esse experimento permite monitorar possíveis transformações estruturais dos complexos de ouro que podem ocorrer na presença de um sistema aquoso, como hidrólise, redução para Au(I) ou Au 0 , precipitação e/ou formação de ouro elementar.

Os espectros de absorção no UV-visível para os complexos de **C3a** e **C3b** são mostrados na Figura 24. O ligante DTC comum aos complexos, L3, também foi registrado para fins de comparação. Ambos os espectros, tanto do complexo ciclometalado **C3a** e do análogo de coordenação **C3b**, mostram uma banda de absorção intensa próxima a 260 nm devido a transições intraligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ permitidas por spin de orbitais localizados no C^N e no ligante DTC. As transições observadas para **C3a** em torno de 295 nm e 308 nm para **C3b**, podem ser atribuídas à transferência de carga ligante-metal, originada do ligante DTC para o centro metálico eletrofílico Au(III). Adicionalmente, para **C3a**, nota-se uma banda de baixa intensidade em torno de 334 nm, possivelmente relacionada a transições metal-ligante.[57]

Observa-se que, pelo menos durante o período 24 horas, o complexo ciclometalado **C3a** apresentou estabilidade considerável em condições fisiológicas, exibindo variações espectrais mínimas ao longo do tempo (Figura 79). Em contrapartida, para **C3b** durante 24 horas (Figura 80), é observado um efeito hipocrômico e levemente batocrômico para a transição de 260 nm, bem como um efeito hiperocrômico para a transição de 308 nm, que pode ser associado à formação de ligação Au(III)-OH₂, levando a um aumento da solubilidade em água e, conseqüentemente, um aumento da intensidade de absorção. Para **C3a** e **C3b**, no entanto, não foram detectados sinais de liberação do ligante DTC na região UV-Vis indicando a estabilidade dos complexos de ouro(III)-DTC em solução, não foi observada nenhuma deposição de ouro elementar. Não se observou sinais de precipitação uma vez que a solução continuava límpida e sem alterações de cor e/ou turbidez após o experimento.

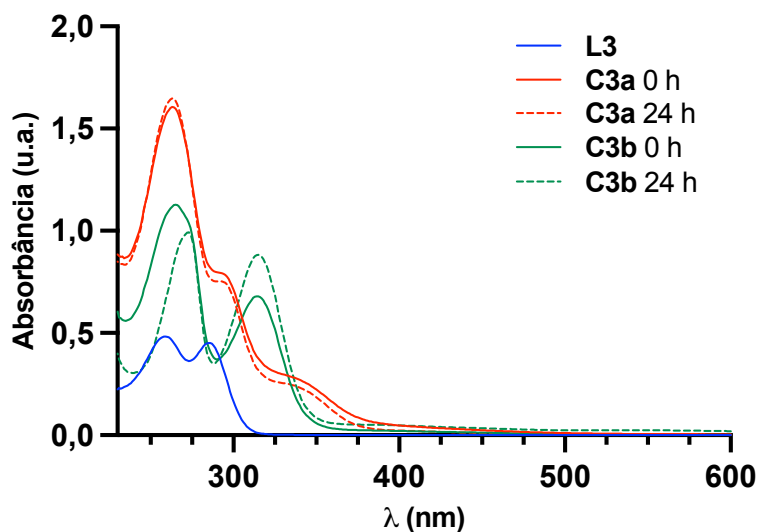


Figura 24 Espectros de UV-vis de **C3a** ($50 \mu\text{M}$, linha vermelha em 0 h e linha vermelha pontilhada em 24 h) e **C3b** ($50 \mu\text{M}$, linha verde em 0 h e linha verde pontilhada em 24 h) em PBS $1\times$ (pH 7,4; 0,5% de DMSO). O ligante **L3** também é mostrado ($50 \mu\text{M}$) para referência.

1.4.6.3 Estudos de reatividade com NAC

Em sistemas biológicos, moléculas como a glutatona e a albumina estão presentes em concentrações significantes e, é amplamente documentada na literatura a interação de complexos de ouro com essas biomoléculas. Essa atração ocorre devido à afinidade dos tióis pelo ouro, bem como à capacidade dos complexos de metais de transição do terceiro período em atuar como ácidos de Lewis, demonstrando afinidade por bases macias e nucleófilos. Estudos abordando a reatividade entre complexos de ouro (III) e modelos de tióis são valiosos para compreender a propensão dos metalo-fármacos a reações colaterais na presença de moléculas contendo grupos tiolados. Além disso, essas investigações podem proporcionar percepções sobre possíveis mecanismos de ação, uma vez que proteínas contendo tióis são identificadas como potenciais alvos biológicos para metalo-fármacos. Esse conjunto de proteínas inclui cisteíno-proteases, *Zinc-fingers*, tioredoxina-redutases e aquaporinas.[93–95]

Para investigar a reatividade dos compostos frente a moléculas nucleofílicas biológicas, conduziu-se um estudo de estabilidade por RMN de ^1H ao longo de 24 horas em temperatura ambiente. O objetivo foi monitorar a interação entre o complexo ciclometalado, **C3a**, e uma quantidade equimolar de N-acetil-L-cisteína (NAC) em uma mistura de DMSO- d_6 /D $_2$ O (80:20). Também realizou-se a mesma reação com o análogo do complexo de coordenação, **C3b**.

Para isso, foi necessário inicialmente conhecer a estabilidade dos complexos **C3a** e **C3b** na mistura DMSO- d_6 /D $_2$ O (80:20). Após solubilizar cerca de 3 mg dos complexos na mistura,

coletaram-se espectros de RMN de ^1H das amostras em intervalos regulares (Figura 25 e Figura 81, para **C3a** e **C3b**, respectivamente). Após 24 horas, observaram-se mudanças espectrais no RMN de ^1H para **C3a** e **C3b** que podem estar relacionadas a processos de hidrólise parcial. No caso do **C3a** em $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20), Figura 25, a presença de sinais adicionais relacionados ao ligante ditiocarbamato indica assimetria no complexo e, portanto, possivelmente descoordenação do nitrogênio piridínico do ligante $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ e coordenação de uma molécula de água. Quanto ao complexo **C3b** (Figura 81), é razoável supor que a água favoreça a maior labilidade de um dos ligantes cloreto, conforme sugerido pelos estudos de estabilidade por UV-vis. Em ambos os casos, não foram observados indícios de alteração de cor, precipitação indesejada ou formação de ouro elementar.

Quando **C3a** foi submetido ao tratamento com NAC em $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20), conforme ilustrado na Figura 25, percebe-se já no tempo de 0 h, mudanças nas ressonâncias de prótons relacionados à parte ciclometalada do complexo de ouro(III), ao compararmos o espectro com aquele obtido na ausência de NAC. As observações sugerem a conversão do complexo ciclometalado para uma nova espécie que é formada em uma proporção de 1:1 entre **C3a** e NAC, como representado na Figura 25. Mais especificamente, o espectro revelou na fração $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ um efeito de blindagem de todos os prótons aromáticos e um deslocamento significativo do sinal atribuído ao próton $\text{H6}'$ para regiões de campo mais alto, o que sugere a descoordenação do átomo de nitrogênio do ligante ciclometalado do ouro (Figura 25).

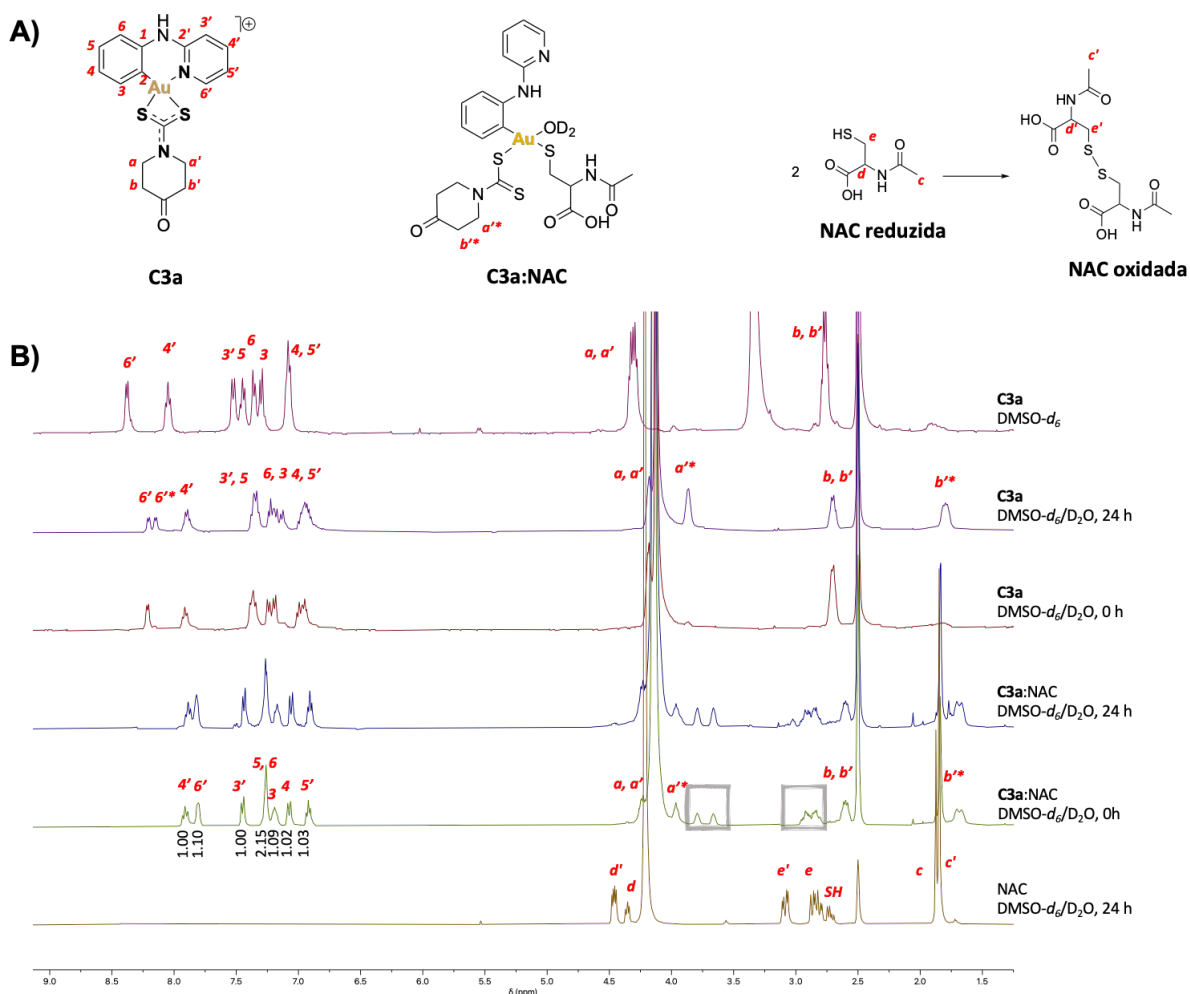


Figura 25 A) Representação das estruturas químicas propostas para as espécies presentes no estudo de interação de **C3a** com NAC, **C3a**, **C3a:NAC** e NAC (reduzida/oxidada). B) Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) do complexo **C3a** em DMSO- d_6 , na mistura DMSO- d_6 /D $_2$ O (80:20) e na presença de NAC em DMSO- d_6 /D $_2$ O (80:20) nos tempos de 0 h e 24 h. O espectro da NAC isolada na mistura DMSO- d_6 /D $_2$ O é mostrado também para fins de comparação.

Na região de baixa frequência dos espectros, os sinais correspondentes à NAC apresentaram também mudanças imediatas ao ser adicionado ao **C3a**. O desaparecimento dos sinais relacionados à NAC simultâneo ao surgimento de novos sinais em uma região próxima do espectro, confirma a reação de **C3a** com a molécula-modelo. Nota-se também a formação de novos sinais relacionados ao ligante L3 da esfera de coordenação de **C3a**, denominados a'' e b'' no espectro da Figura 25, sugerindo que a espécie resultante é de baixa simetria. Ainda, o perfil do espectro de RMN de ^1H da mistura **C3a** e NAC é consistente ao longo dos diferentes intervalos de tempo avaliado, sugerindo que a reação entre as espécies ocorre imediatamente e o produto formado permanece estável em solução.

Importante ressaltar que este resultado difere do que foi relatado para os complexos de ouro(III) ciclometalados derivados da fenilpiridina e do DTC de cinco membros reportados

por Williams e colaboradores, que demonstraram serem complexos não-reativos frente à NAC.[56] Entretanto, é importante mencionar que pequenas discrepâncias nas condições experimentais podem ter influenciado esses resultados. Adicionalmente, deve-se considerar que os complexos de ouro(III), com seis membros na parte ciclometalada C^N, como os aqui examinados, exibem normalmente reatividade distinta quando comparados aos seus análogos de cinco membros, como previamente relatado por Wenzel e colaboradores. Em seus estudos, apenas os complexos de ouro(III) de seis membros foram capazes de realizar reações de arilação da cisteína.[94]

Para confirmar a natureza do aduto formado, a mistura de reação **C3a**:NAC foi analisada por HR-ESI-MS. O espectro (Figura 82, **Material Suplementar**) mostra o pico do composto organometálico **C3a** e sugere um pico monocarregado adicional, que corrobora a formação de uma nova espécie com um pico de massa 721,1462 m/z, que pode ser atribuída à espécie [(C^N)ouro(III)-L3-NAC-OH₂]-H⁺ (como demonstrado na Figura 25).

O estudo da reação entre o complexo de coordenação **C3b** e a NAC sob as mesmas condições, no entanto, resultou em observações diferentes. Para o complexo **C3b** na presença de NAC, o espectro de RMN de ¹H não evidencia mudanças relacionadas às ressonâncias de prótons do ligante ditiocarbamato L3 (Figura 81). Comparando-se com o espectro de RMN do complexo isolado em DMSO-d₆/D₂O (80:20), que sugere a possibilidade de hidrólise parcial nessas condições, nenhuma mudança significativa é observada e o espectro de **C3b**:NAC é consistente ao longo do tempo de 24 h. No que diz respeito aos sinais relacionados aos prótons da NAC, é evidente que o sinal correspondente ao hidrogênio Hd da espécie NAC reduzida é mínimo nos espectros da mistura **C3b**:NAC, sendo visível somente no tempo de 0 h. Além disso, nos espectros de **C3b**:NAC não foi possível identificar o sinal do SH (multiplete em 2,75 ppm), o que está em conformidade com a proposta de predominância da forma oxidada da NAC.

Dessa forma, é razoável propor que, nas condições testadas, o complexo **C3b** não reage com a NAC, uma vez que apenas a forma oxidada da NAC é observada nos espectros de RMN de ¹H. Essa conclusão é respaldada pelos estudos anteriores com o complexo de ouro(III)-ditiocarbamato AuL12 (Figura 11) quanto à reatividade frente a tióis-modelo por meio de espectroscopia de RMN, conforme relatado por Boscutti e colaboradores.[96] Seus resultados corroboram as nossas observações quanto à ausência de reatividade apresentada por complexos de ouro(III)-DTC na presença de NAC. Vale ressaltar que, na presente investigação, não foram observadas mudanças de coloração ou indícios de precipitação (diferente do observado no estudo conduzido por Boscutti e colaboradores[96]), e os espectros de RMN de **C3b** permaneceram

inalterados durante o período em que o NAC estava presente. Tais constatações, portanto, indicam uma maior estabilidade química de **C3b** em comparação ao AuL12, destacando que o *design* do ligante pode desempenhar um papel relevante na modulação da reatividade dos complexos de ouro(III)-DTC.

1.4.6.4 Estudos de reatividade com albumina

A albumina do soro humano (HSA) é a proteína solúvel mais abundante no plasma humano, presente em concentrações de 30 – 50 g L⁻¹, o que representa cerca de 60% do conteúdo total das proteínas plasmáticas. No organismo, atua em funções biológicas diversas como no armazenamento, transporte, metabolização e excreção de uma ampla gama de ligantes exógenos e/ou endógenos, como nutrientes, hormônios e fármacos. A habilidade intrínseca da albumina em carrear compostos através da circulação e de se ligar reversivelmente com uma variedade de ligantes, mesmo moléculas como ácidos graxos e outros relativamente insolúveis, faz dela uma plataforma ideal para o transporte e distribuição de compostos hidrofóbicos.[97] A afinidade de ligação de qualquer substância biorrelevante com a albumina afeta significativamente suas propriedades farmacocinéticas, ou seja, seus processos de absorção, distribuição, metabolismo/biotransformação e excreção. Além disso, a afinidade de ligação também determina a biodisponibilidade de um potencial fármaco. Caso a afinidade seja baixa, a etapa de absorção da farmacocinética é desfavorecida. Caso a afinidade seja alta, a etapa de absorção é favorecida, porém, a biodistribuição para os tecidos será limitada devido à estabilidade do aduto formado, afetando, também, a sua farmacocinética.[98]

Do ponto de vista estrutural, a HSA é uma proteína de cadeia única de peso molecular de 66,5 kDa e 585 resíduos de aminoácidos, com uma estrutura secundária organizada em ~67% de α -hélice e a estrutura terciária em formato de coração. A albumina do soro bovino (BSA) é bastante utilizada como modelo biomimético por sua disponibilidade, baixo custo e semelhança estrutural com a HSA. A proteína bovina apresenta 80% de homologia estrutural e 76% de similaridade na estrutura terciária comparando-se à variável humana, com 582 resíduos de aminoácidos e 35 resíduos de cisteína (17 pontes dissulfeto), o que confere uma forte estabilidade para a BSA. Sua estrutura secundária é organizada em 67% de α -hélice e o ponto isoelétrico (PI) da BSA está em torno de 4,70 – 5,60, o que sugere que em condições fisiológicas a proteína possui mais cargas negativas.[97] Essa característica pode atrair pequenas moléculas carregadas positivamente e favorecer a formação de um aduto estável.

A estrutura das albuminas é dividida em três grandes domínios estruturalmente similares, chamados I, II e III. Cada domínio possui dois subdomínios denominados A e B. As principais regiões responsáveis pela ligação de moléculas endógenas ou exógenas localizam-se nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIA, conhecidos como sítios I e II de Sudlow. A afinidade de ligação no sítio I é favorecida, principalmente, por interações hidrofóbicas. No sítio II, observa-se uma combinação de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Na estrutura da BSA, os subdomínios IIA e IB contém, cada um, um resíduo de triptofano (Trp212 e Trp134, respectivamente), sendo o segundo próximo à região em que se encontra o único resíduo de cisteína livre (Cys34) na estrutura da albumina como mostrado na Figura 26.[99,100]

Como frequentemente abordado na literatura, muitos compostos terapêuticos, incluindo complexos de ouro (I/III), interagem com a albumina por meio do Cys34 exposto na superfície, o único resíduo de cisteína na estrutura proteica que não está envolvido em ligações dissulfeto.

Considerando que a albumina é um importante carreador de moléculas exógenas na corrente sanguínea, alguns estudos têm explorado a proteína para a liberação controlada de fármacos que apresentam lipofilicidade elevada e não têm acesso facilitado aos tecidos cancerosos através do plasma sanguíneo.[101,102] A conjugação de medicamentos à albumina representa atualmente uma estratégia terapêutica para encapsular medicamentos, sendo exemplificada pela primeira formulação aprovada pelo FDA que utiliza tecnologia de nanopartículas ligadas à proteína com paclitaxel (Abraxane®), clinicamente utilizado no tratamento do câncer de mama metastático para contornar a toxicidade associada ao fármaco.[103]

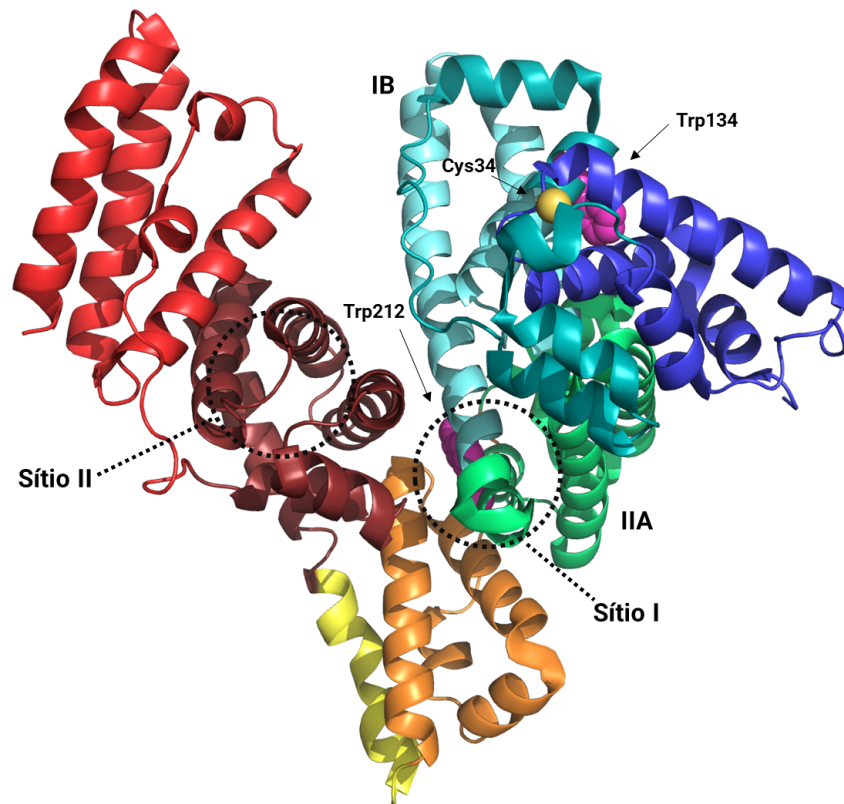


Figura 26 Representação da estrutura cristalina do aduto formado entre a proteína BSA e um complexo de ouro(III)-ditiocarbamato, com os resíduos Trp134, Trp212 (em rosa) e Cys34 destacados. O íon de Au(I) (esfera amarela) está ligado covalentemente ao resíduo Cys34. PDB ID: 6RJV.[37]

As albuminas, quando excitadas em 280 nm, apresentam fluorescência intrínseca com máximo de emissão na região de 350 nm que pode ser atribuída à combinação da fluorescência dos resíduos de L-aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) presentes nas cadeias proteicas. Na estrutura da BSA, a emissão dos resíduos de triptofano (Trp134 e Trp212) é a mais significativa, em razão da natureza química do ambiente ao redor desses grupos.[97]

Assim, para verificar se os complexos de ouro(III), **C3a** e **C3b**, interagem com a albumina para que possam ser biodistribuídos quando em meio fisiológico e identificar a força dessa potencial ligação, estudos de interação com a BSA foram realizados por monitoramento da fluorescência intrínseca da proteína na ausência e na presença de concentrações crescentes dos compostos selecionados.

Em pH fisiológico, a adição de alíquotas da solução-estoque dos complexos **C3a** e **C3b** resultou na diminuição da intensidade da banda centrada em 350 nm da proteína, como se vê na Figura 27. A supressão da fluorescência intrínseca da albumina pode ser atribuída a alterações nos

microambientes proteicos ao redor dos resíduos de aminoácidos fluorescentes induzidas pela presença dos complexos. Esse resultado sugere que ambos os complexos devem interagir nos subdomínios IIA e/ou IB, que contém os resíduos fluorescentes na estrutura da proteína. Ainda, o centro de ouro(III) pode interagir com o resíduo de cisteína livre da albumina, enquanto a fração orgânica dos complexos pode apresentar afinidade por outros sítios proteicos.

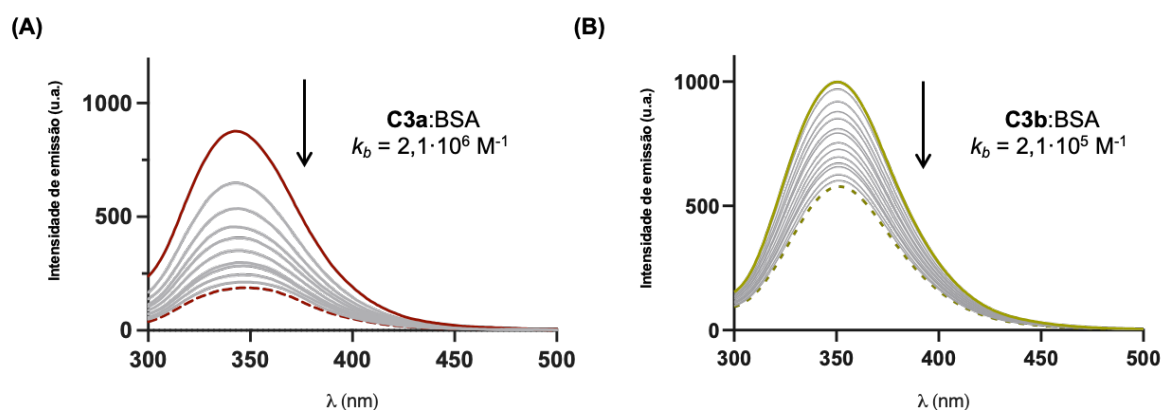


Figura 27 Espectros de fluorescência da BSA ($10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) na ausência e na presença de concentrações crescentes ($r = 0 - 2,0$) do complexo ciclometalado **C3a** (A) e do complexo de coordenação análogo **C3b** (B) em tampão PBS (pH 7,4; 0,5% de DMSO).

Nos estudos de interação com a BSA, os complexos **C3a** e **C3b**, sob as mesmas condições, apresentaram diferentes capacidades de supressão da fluorescência. Isto é, **C3a** foi capaz de suprimir cerca de 70% da fluorescência da proteína, enquanto o complexo **C3b** induziu a supressão de 45%. Esses resultados podem ser expressos nas constantes de ligação (k_b) obtidas: para **C3a**, $k_b = 2,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ e para **C3b**, $k_b = 2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, calculadas com a equação de Scatchard. Esse grau de interação é um parâmetro relevante no desenvolvimento de novos fármacos e pode ajudar a definir se um composto bioativo poderia ser carregado pela albumina na corrente sanguínea e quão facilmente seria liberado para o alvo biológico. Nesse caso, os resultados sugerem que **C3a** é mais reativo e apresenta mais afinidade com a albumina do que o seu análogo de coordenação. Dado o ponto isoelétrico da albumina, e sob as condições em que os estudos de interação foram realizados, pode-se supor que o complexo de carga positiva **C3a** apresenta maior afinidade pela proteína que apresenta em pH fisiológico uma resultante de cargas negativas. Essa característica pode favorecer a formação de adutos estabilizados por interações eletrostáticas, de forma que **C3a** apresenta, nesse sentido, uma clara vantagem com relação à **C3b**.

Sabe-se que biomoléculas ricas em tióis na corrente sanguínea não podem desativar completamente metalo-fármacos, para que esses fármacos atuem e estejam aptos a executar seus

mecanismos de bioação. Portanto, estudos farmacocinéticos são uma etapa fundamental do desenvolvimento de novos medicamentos para avaliar a consistência da atividade quimioterapêutica e garantir a sua eficácia clínica ideal nas condições plasmáticas. Assim, para investigar uma provável conjugação do complexo organo-ouro(III) bioativo **C3a** com a albumina e verificar a biodisponibilidade do potencial fármaco na presença da proteína, foi realizado o ensaio de viabilidade celular de células MDA-MB-231 com meio de cultura suplementado com concentrações plasmáticas da BSA (40 mg mL^{-1}).[104]

No ensaio de atividade citotóxica frente a células MDA-MB-231 e na presença de concentrações plasmáticas da albumina, observamos uma diminuição significativa da atividade antiproliferativa de **C3a** (Figura 28). Na ausência de albumina, como mencionado, o IC_{50} do complexo organometálico é de $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ na linhagem celular TNBC. Ao se realizar o ensaio do MTT em células MDA-MB-231 e meio de cultura contendo concentrações plasmáticas de albumina, o IC_{50} do complexo **C3a** passa a ser $9,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$. Entretanto, mesmo sob essas condições, e com a esperada interferência para compostos catiônicos, o complexo **C3a** permanece suficientemente ativo, de forma que o complexo organo-ouro(III) pode ser considerado um bom candidato para a quimioterapia anticâncer.

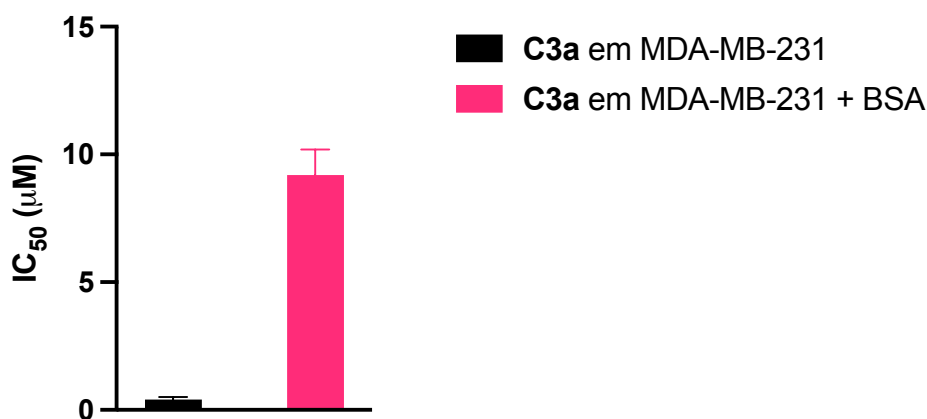


Figura 28 Atividades antiproliferativas (valores de IC_{50} , μM) do complexo **C3a** na linhagem MDA-MB-231 na ausência (**C3a** em células MDA-MB-231) e presença (**C3a** em células MDA-MB-231 + BSA) de concentrações plasmáticas da BSA após 72 h de incubação. Valores representados como a média \pm SD da quadruplicata de dois experimentos independentes ($n = 2$).

1.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em resumo, foram relatados neste trabalho quatro novos complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato inéditos com os ligantes 2-anilinopiridina e derivados do ditiocarbamato de fórmula geral $[(C^N)Au^{III}DTC]PF_6$ (**C1a** – **C4a**), propostos como potenciais novos agentes antitumorais para quimioterapia do câncer. Na síntese, o precursor $[(C^N)Au^{III}Cl_2]$, contendo uma fração organo-ouro(III) ciclometalada, foi utilizado em uma reação em que os ligantes cloreto são substituídos por um ligante DTC, que se coordena de forma bidentada. Os complexos de coordenação correspondentes ouro(III)-ditiocarbamato, $[Au^{III}(DTC)Cl_2]$, também foram apresentados, e dois deles são relatados aqui pela primeira vez (**C1b** e **C3b**).

Todos os compostos obtidos foram avaliados quanto às suas atividades citotóxicas em linhagens celulares humanas de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7). Os complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato apresentaram atividades citotóxicas significativas. Todos os compostos inibiram a viabilidade das células tumorais de maneira concentração-dependente, podendo-se obter o IC_{50} a partir das curvas concentração-resposta. O composto **C3a** foi destaque na linhagem MDA-MB-231 por sua atividade antiproliferativa na faixa de concentração submicromolar ($IC_{50} = 0,4 \pm 0,1 \mu M$), apresentando certa seletividade ($IS = 2,0$) em relação às células tumorais, e, por isso, foi selecionado para estudos preliminares quanto ao seu mecanismo de ação, juntamente com seus análogos **C3b** e L3.

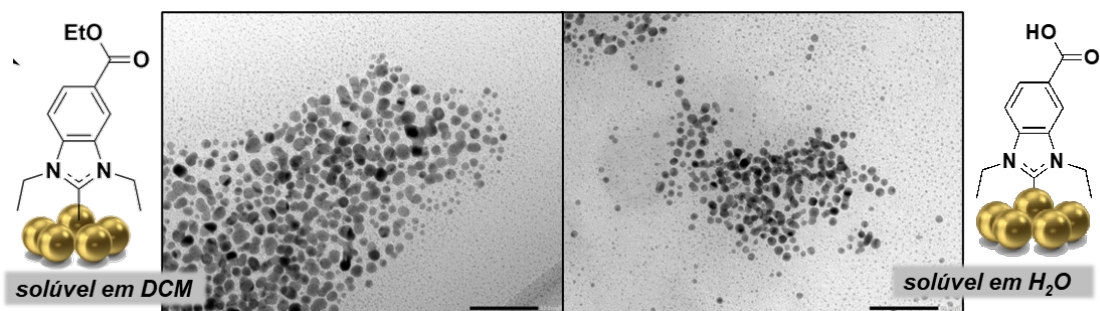
Em estudos de estabilidade em solução (em DMSO e PBS, pH 7,4), o complexo organometálico **C3a** mostrou-se estável quimicamente pelo período avaliado, sem reações de troca de ligante que pudesse descaracterizá-lo ou possíveis reações de oxirredução e precipitação. O complexo de coordenação análogo, **C3b**, no entanto, parece sofrer hidrólise. Os estudos de reatividade na presença de NAC também demonstram as diferenças potenciais entre esses complexos: **C3a** parece interagir com tióis em uma maior extensão do que **C3b**, uma vez que o complexo de coordenação parece não ser reativo frente à molécula-modelo, enquanto a interação com o complexo organometálico parece gerar um aduto, identificado por HR-ESI-MS, em proporção de 1:1 de **C3a**/NAC. De forma similar, o complexo **C3a** suprime a fluorescência intrínseca da albumina mais efetivamente do que **C3b**, podendo se supor uma melhor interação entre a biomolécula e o complexo organometálico, em prováveis mecanismos de transporte e biodistribuição quando em meios fisiológicos.

De modo geral, os estudos evidenciaram que os complexos organometálicos ouro(III)-ditiocarbamato podem ser vantajosos em relação aos análogos de coordenação como candidatos a agentes antitumorais em linhagens de câncer de mama, especialmente por sua estabilidade em

condições fisiológicas e atividade antiproliferativa. Além disso, com relação à interação com a albumina, um fator crítico no transporte de fármacos pela corrente sanguínea, algumas características intrínsecas ao composto organometálico (como carga líquida, caráter lipofílico, estabilidade química) podem ser relevantes para se obter ligação reversível e biodistribuição ideal. Estudos mais aprofundados quanto aos mecanismos de ação dos complexos de ouro(III)-ditiocarbamato devem ser conduzidos na presença de alvos biológicos que atuam significativamente na evolução do câncer, como a enzima tioredoxina-redutase e aquaporinas. Os resultados apresentados trazem contribuições importantes para a literatura quanto às vantagens dos complexos organometálicos de ouro em relação aos análogos de coordenação e podem contribuir para o desenvolvimento de compostos de ouro como protótipos de metalo-fármacos.

Capítulo 2 – Nanopartículas de ouro solúveis estabilizadas por ligantes COOH-NHC: uma abordagem *bottom-up*

Parte do trabalho desenvolvido na Universidade Técnica de Munique (TUM), Alemanha, no período de julho/22 – junho/23 sob orientação da Dra. Angela Casini.



2.1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1.1 O universo nano e suas potencialidades

O prêmio Nobel de Química de 2023 reconheceu o trio M. G. Bawendi, L. E. Brus e A. I. Ekimov por seus trabalhos na área de nanotecnologia, especificamente pela descoberta e síntese dos pontos quânticos, partículas tão pequenas que seu tamanho determina suas propriedades.[105]

O termo “nanotecnologia” está relacionado ao *design* e aplicação de componentes que ocorrem em escala nanométrica abrangendo o estudo das propriedades estruturais de nanoestruturas em nível molecular e submolecular, juntamente com seus atributos elétricos, ópticos e magnéticos. Assim, atualmente, a nanotecnologia é uma área ampla e interdisciplinar que envolve engenharia, biomedicina, química e física. Dentre as várias áreas onde a nanotecnologia tem sido utilizada podemos destacar a nanoeletrônica, bionanotecnologia, nanomedicina, entre outras. As aplicações variam desde sistemas de nanoencapsulamento de fármacos até a síntese de materiais biodegradáveis, antichamas e antimicrobianos.[106-108]

Nas últimas décadas, nanomateriais tem atraído bastante atenção e são agora reconhecidos como uma das “maravilhas” da medicina contemporânea.[109] A aplicação moderna das nanopartículas metálicas (NPs) envolve detecção e imagem, liberação controlada de fármacos e quimioterapia do câncer.[110-113] Historicamente, no entanto, as nanopartículas de ouro (AuNPs), por exemplo, já eram conhecidas e utilizadas como utensílios domésticos há mais de 2.000 anos.[114,115] No uso mais famoso de nanomateriais, a taça de Lycurgus, proveniente dos tempos romanos com cerca de 1.600 anos de idade é um bom exemplo, Figura 29. A peça foi utilizada para fins decorativos naquele tempo por causa de suas cores múltiplas: verde quando a luz é refletida e vermelha quando a luz é transmitida através dela. O dicroísmo observado deve-se às nanopartículas de Ag-Au e eficientes capacidades de espalhamento e absorção da luz, que resultam em cores distintas e propriedades distintas das apresentadas pelo material *bulk* correspondente.[114]



Figura 29 Taça de Lycurgus em exposição no Museu Britânico (Londres, Inglaterra) fotografada quando há reflexão da luz (esquerda) e quando há transmissão (direita). Reproduzido para fins não-comerciais com a permissão do Museu Britânico (The Lycurgus Cup© The Trustees of the British Museum).

2.1.2 O que são os nanomateriais?

Os átomos são os blocos de construção fundamentais da matéria e têm tamanhos da ordem de 1 angstrom (0,1 nanômetros, nm). Materiais em uma escala macroscópica, perceptível a olho nu, são chamados de “*bulk*” e podem variar de milímetros a quilômetros, dependendo do contexto. Nanomateriais são materiais que possuem propriedades e estruturas em escala nanométrica, ou seja, em uma dimensão que varia entre 1 e 100 nm, e que exibem características distintas das observadas no mesmo material em uma escala macroscópica devido a efeitos quânticos e à relação área de superfície/volume.[116] Materiais em escala nanométrica são particularmente intrigantes em contextos biológicos, uma vez que a maioria das biomoléculas e estruturas celulares compartilha uma faixa de tamanho semelhante, o que facilita sua integração nesses ambientes.[117] A Figura 30 ilustra de forma detalhada a comparação de tamanhos entre algumas biomoléculas e nanomateriais.

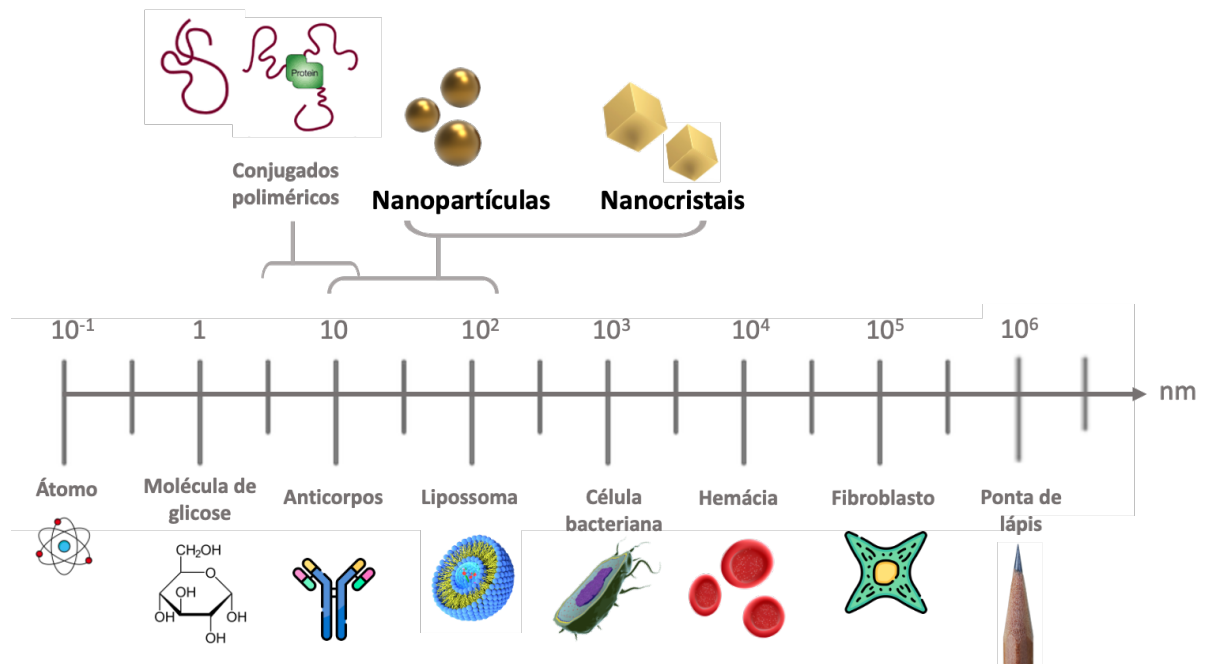


Figura 30 Representação esquemática exemplificando a relação da escala de tamanho entre os nanomateriais e espécies na escala molecular, como átomos e moléculas, e materiais biológicos, como células e organelas. Adaptado de Foulkes, 2020.[117]

Atualmente, uma variedade de nanomateriais está disponível, com muitos deles baseados em partículas metálicas, polímeros, óxidos ou na exploração de materiais de carbono, como nanotubos de carbono, grafeno e fulerenos.[116]

Apesar da cautela exercida pelas agências reguladoras encarregadas do controle de nanomateriais, como a EMA (do inglês *European Medicines Agency*) e o FDA, algumas nanoestruturas à base de lipossomos e metais já receberam aprovação para uso em aplicações médicas e biomédicas, chamados atualmente de nanomedicamentos. Dentre as nanopartículas metálicas já aprovadas pelo FDA, tem-se, por exemplo, uma nanopartícula de óxido de ferro (Diafer) usada para a reposição de ferro em indivíduos com anemia, e a chamada “Hensify,” uma nanopartícula metálica composta de óxido de háfnio usada em combinação com a radioterapia, uma vez que quando aplicada localmente em tumores sólidos, amplifica a dose de radiação nas células cancerígenas-alvo, enquanto minimizam o impacto nas células saudáveis adjacentes.[117]

Com o sucesso emergente dos nanomateriais e nanomedicamentos no cenário clínico, torna-se fundamental que as diretrizes regulatórias quanto aos processos de fabricação e escalonamento, caracterização físico-química, efeito terapêutico e toxicologia sejam atualizadas para contemplar essa nova classe de compostos na nanomedicina.

2.1.3 Nanomateriais de ouro e suas propriedades

O ouro é um metal precioso conhecido por seu brilho e característica cor dourada. Atualmente, a produção mundial de ouro é destinada principalmente para três finalidades: cerca de 50% são utilizados na fabricação de joias, aproximadamente 40% são investidos como reserva de valor, e os restantes 10% têm diversos usos industriais. Essa distribuição de uso no mercado está em grande parte relacionada à extrema escassez do ouro na crosta terrestre, que está presente em apenas 5 partes por bilhão (ppb). Essa relativa falta de abundância torna o ouro um dos metais mais valiosos do mundo, o que explica sua ampla aceitação como moeda desde tempos antigos.[118]

A longa tradição de uso do ouro na indústria de joias pode ser atribuída à sua impressionante e duradoura aparência metálica, bem como à sua relativa raridade e valor intrínseco. Sua maleabilidade também é notável, permitindo que o ouro seja facilmente moldado em diversas formas, e até mesmo a habilidade de ser martelado em folhas extremamente finas ou esticado em fios delicados. Mesmo ourives antigos eram capazes de martelar o ouro em folhas com uma espessura de até 500 átomos (cerca de 144 nanômetros). Essas folhas extremamente finas desempenharam um papel importante no avanço da ciência moderna, fornecendo o principal componente (folha de ouro bombardeada por partículas α) para o famoso experimento de espalhamento de Rutherford, que desempenhou um papel fundamental no estabelecimento do modelo atômico nuclear.[118]

Recentemente, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm se destacado na nanobiotecnologia devido à sua alta biocompatibilidade e estabilidade química, às suas propriedades ópticas excepcionais e alta concentração de elétrons, tornando-se referência na pesquisa em sistemas biológicos. AuNPs são amplamente exploradas em diversas áreas, incluindo catálise, energia e medicina, devido às vantagens físico-químicas que superam sua forma em maior escala. O ouro, conhecido por sua inércia química, adquire propriedades singulares em escala nanométrica, sendo especialmente atraente para aplicações biomédicas. Sua forma e tamanho podem ser precisamente ajustados para otimizar interações com moléculas, células e tecidos, permitindo a criação de sistemas nanométricos altamente eficazes e seletivos.[118,119]

As propriedades ópticas de nanopartículas metálicas, como Au e Ag, surgem da interação da luz com tais nanoestruturas de dimensões menores que o comprimento de onda da radiação incidente. Assim, quando uma AuNP é exposta a uma onda monocromática plana, gera-se uma separação de cargas na superfície metálica, que apresenta uma forte força restauradora, originando uma oscilação coordenada dos elétrons na banda de condução (Figura 31).[118] Essa oscilação

coletiva induzida na nuvem eletrônica do metal excitada pela radiação é conhecida como ressonância plasmônica localizada de superfície (LSPR, do inglês *localized surface plasmon resonance*), resultando na geração de campos eletromagnéticos intensificados na superfície da partícula.[115]

As dispersões coloidais compostas por AuNPs diferenciam-se das demais em virtude desta propriedade óptica, que resulta na cor (geralmente as dispersões são vermelho-vinho) e possui intensa absorção e espalhamento da luz na região visível do espectro eletromagnético.[115]

Assim, a LSPR deriva de uma forte interação da AuNP com a luz incidente, que resulta em amplificação do espalhamento e absorção da luz pela nanopartícula de ouro. Tanto o espalhamento quanto a absorção de luz pelas nanopartículas são amplificados, permitindo que as AuNPs tenham grande relevância em aplicações biomédicas e sirvam de sondas intensas para imunoenaios[120], como sensores[121] e em espectroscopia melhorada de superfície[115].

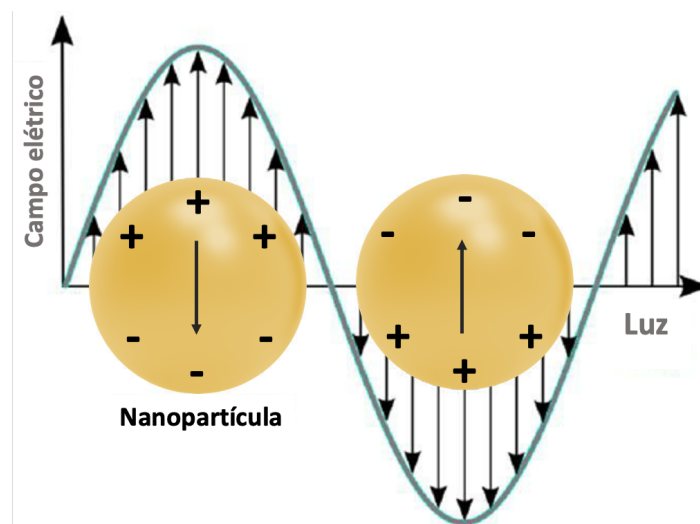


Figura 31 Representação esquemática de um plásmon localizado de superfície, ilustrando a origem da ressonância plasmônica causada pela interação dos elétrons na banda de condução com a radiação eletromagnética incidente.

As propriedades da banda de LSPR (por exemplo, a posição da banda e a razão entre espalhamento e absorção) de uma nanoestrutura de ouro são determinadas por vários parâmetros, inclusive o tamanho, a forma, a estrutura e a morfologia, bem como o ambiente que circunda a superfície da nanoestrutura.[115]

A frequência em que é observada a banda LSPR é uma importante característica das AuNPs, que pode ser detectada por meio de espectroscopia na região do UV-Visível e apresenta comprimentos de onda (λ) na faixa de 510 e 560 nm para nanopartículas de ouro esféricas com diâmetro entre 10 e 100 nm.[115,122] Além disso, a ligação e proximidade de moléculas de superfície das nanopartículas podem modificar o comprimento de onda de absorção demonstrando

alterações na largura e definição das bandas formadas, *i.e.*, o alargamento e deslocamento da banda de LSPR para maiores comprimentos de onda (para a região do vermelho), acompanhado de alterações na cor da solução contendo a AuNP para tons mais azulados pode ser indicativo de agregação e/ou decomposição das nanopartículas.[115]

2.1.4 Nanomateriais de ouro: a influência da forma e tamanho

O controle preciso do tamanho e morfologia de partículas na escala nanométrica é um assunto amplo e intrigante, principalmente devido às notáveis alterações que pequenas variações no tamanho e na forma de nanopartículas podem causar nas suas propriedades ópticas, eletrônicas e químicas. Ou seja, as propriedades finais das AuNPs dependem intimamente da sua morfologia e do seu tamanho.

A morfologia das AuNPs refere-se à sua forma ou geometria e, nesse sentido, as nanopartículas de ouro podem ser sintetizadas em formas variadas, incluindo a geometria esférica ou *quasi*-esférica, em formato de gaiolas como nas estruturas chamadas de *nanocage*, alongadas como os *nanorods*, ocas como nas *nanoshells*, dentre outras. (Figura 32) As AuNPs sintetizadas pela redução do ouro em fase aquosa tendem a ter morfologia de *quasi*-esfera, pois essa forma apresenta a menor área de superfície em comparação com outras morfologias.



Figura 32 Representação esquemática da morfologia diversa dos nanomateriais de ouro relatados.

Nanopartículas de ouro alongadas, como os *nanorods*, são formadas apresentando anisotropia de forma, gerando duas bandas plasmônicas diferentes relacionadas às oscilações transversais e longitudinais dos elétrons (na faixa de 500 nm e 700 – 1000 nm, respectivamente).[122] A banda na região do infravermelho próximo, em que a absorção do tecido é mínima conforme prevê a janela terapêutica, é muito útil para possíveis aplicações *in vivo*.[113]

Dentre as aplicações, a catálise é também um ponto central para os nanomateriais de ouro. As AuNPs mostram-se versáteis sendo capazes de catalisar uma variedade de reações, como hidrogenação seletiva, oxidação de CO, epoxidação propilênica, dentre outras.[123,124] Muitas vezes, a eficácia da catálise está associada ao tamanho médio e morfologia das nanopartículas. O aumento do número de sítios de coordenação em nanopartículas menores pode ser uma razão para

esse comportamento. Em geral, as NPs apresentam maior razão superfície/volume em comparação com seus materiais correspondentes na forma *bulk*. Em 1987, Haruta e colaboradores descobriram que a oxidação de CO para CO₂ pelo O₂ é muito mais eficiente na presença de AuNPs menores que 5 nm.[125] Assim, embora o universo dos nanomateriais em nanomedicina e nanotecnologia abranja partículas na faixa de 1 a 100 nm, a descoberta de Haruta redirecionou a pesquisa de nanocatálise às menores nanopartículas.

2.1.5 Nanomateriais de ouro: aplicações em medicina

Na área da medicina, as nanopartículas de ouro têm sido objeto de intenso estudo nos últimos anos, desempenhando um papel fundamental no avanço da pesquisa em nanotecnologia sobre novas abordagens terapêuticas e métodos de diagnóstico voltados para o tratamento e detecção do câncer.[126] As AuNPs plasmônicas são avaliadas principalmente como agentes em terapia fototérmica, agentes de contraste para exames de imagem, veículos para transporte de medicamentos e material genético em sistemas biológicos, bem como na sensibilização à radioterapia ou como agentes em imageamento fotoacústico.[127]

Assim, as AuNPs apresentam propriedades teranósticas, oriundas das suas capacidades terapêuticas e diagnósticas intrínsecas.

As nanopartículas de ouro apresentam ainda uma vantagem devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (*enhanced permeability and retention*, EPR) dos tumores, que contribui para os benefícios de nanoestruturas nos tratamentos de tumores sólidos. O efeito EPR surge das características peculiares dos vasos sanguíneos que alimentam os tumores. Objetivando uma rápida divisão e proliferação, esses vasos em tecidos tumorais são frequentemente mais permeáveis do que os vasos sanguíneos em tecidos saudáveis, permitindo que moléculas e nanopartículas menores extravasem mais facilmente para o interior do tecido, enquanto a drenagem linfática prejudicada nos tumores sólidos contribui para a retenção local dessas partículas.[128] Assim, a sinergia entre esses fatores garante que as AuNPs possam se acumular preferencial e seletivamente nos tumores de forma passiva, podendo atuar com as já mencionadas propriedades teranósticas. No entanto, o surgimento recente de evidências sugerindo que os mecanismos de transporte ativo também são significativos podem contestar essa teoria do efeito EPR.[129]

O estudo *in vivo* pioneiro com nanopartículas de ouro foi conduzido por Herold e colaboradores em 2009, que relataram pela primeira vez que microesferas de ouro tinham a capacidade de amplificar a dose de radiação aplicada a tumores usando raios-X. Nesse trabalho,

nanopartículas de ouro de tamanho próximo a 1,9 nm foram injetadas em modelos de câncer de mama em camundongos, onde se observou que o volume do tumor foi reduzido de forma dramática e que a taxa de sobrevivência de 1 ano foi aumentada, mesmo após apenas 2 minutos de irradiação.[129]

Foi demonstrado que metalo-fármacos derivados de platina(II/IV) podem ser conjugados à superfície de nanopartículas de ouro resultando no aumento da absorção e efeito citotóxico, como no exemplo de AuNPs e oxaliplatina de Brown e colaboradores.[130]

A oxaliplatina é um fármaco antitumoral, classificada como um agente alquilante de platina pertencente à mesma classe de compostos que a cisplatina (Figura 2). A oxaliplatina é conhecida por sua eficácia no tratamento de diversos tipos de câncer, como no tratamento de câncer de pâncreas, estômago e colorretal metastático em combinação com o 5-fluorouracil e leucovorin. A atuação dos metalo-fármacos derivados da platina em quimioterapia é muitas vezes limitada, uma vez que os efeitos adversos associados ao tratamento são significativos, bem como a capacidade dos tumores em desenvolver resistência celular. Estratégias para mitigar esses efeitos permeiam o uso de sistemas de *drug-delivery*, ou seja, veículos de liberação de fármacos capazes de atingir os cânceres de forma passiva ou ativa, como no encapsulamento dos medicamentos em nanocarreadores para promover a absorção e a liberação das substâncias em meio biológico.[131] No trabalho de Brown e colaboradores, foi demonstrada a conjugação da oxaliplatina à superfície de AuNPs funcionalizadas com uma monocamada de PEG-tiolada com um grupo carboxilato (Figura 33), em que PEG é o polietilenoglicol, para conferir maior solubilidade às partículas finais. As nanopartículas de ouro funcionalizadas com a oxaliplatina foram avaliadas quanto à citotoxicidade, à absorção do fármaco e à localização em linhagens celulares tumorais diversas, como na A549, de câncer epitelial de pulmão. A citotoxicidade das nanopartículas conjugadas AuNPs/oxaliplatina apresentou um aumento de cerca de 6 vezes em comparação com o metalo-fármaco antitumoral isolado e imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostraram o acúmulo intracelular do nanoconjugado e a capacidade de penetração do núcleo celular, o que não ocorre para AuNPs não-funcionalizadas. Ainda, o tamanho médio de partícula das AuNPs isoladas (~31 nm), contrasta com o tamanho de cerca de 176 nm do conjugado AuNPs/oxaliplatina, revelando um aumento substancial que não permite que as NPs sejam facilmente excretadas por sistemas biológicos.

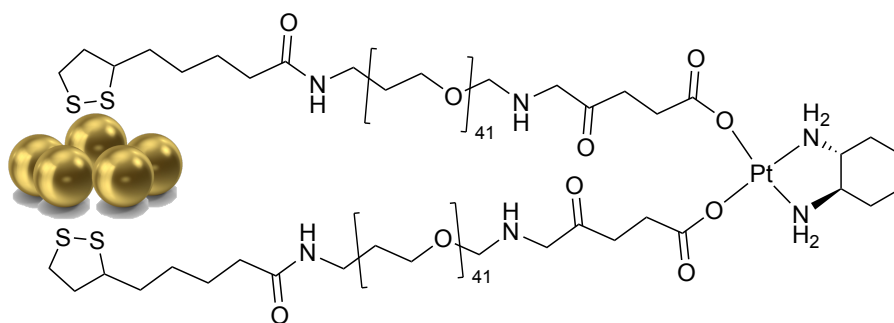


Figura 33 Representação estrutural da nanopartícula de ouro PEGlada conjugada à oxaliplatina sintetizada por Brown e colaboradores.[130]

Nesse sentido, o trabalho de Lippard e colaboradores também demonstrou a habilidade de conjugação de metalo-fármacos de Pt(IV) sobre a superfície de AuNPs, por meio de reações de acoplamento amida. Nas células tumorais A549, a nanopartícula resultante apresentou IC_{50} de 0,9 μ M, enquanto a cisplatina apresenta IC_{50} de 11 μ M, demonstrando a habilidade antiproliferativa muito superior do conjugado de AuNPs-Pt(IV) sobre esse tipo de célula tumoral.[132]

Mais recentemente, foi demonstrado que a auranofina, fármaco de ouro(I) referência no tratamento da artrite reumatoide (Figura 3), foi bioconjugada à superfície de um nanocarreador de ferritina para facilitar o transporte do metalo-fármaco e modular suas propriedades finais de biodistribuição. Esse nanoconjugado, em que a auranofina liga-se seletivamente aos aminoácidos Cys90 e Cys102, demonstrou ser mais citotóxico ($IC_{50} = 0,26 \mu$ M) que o metalo-fármaco livre de ouro(I) ($IC_{50} = 0,80 \mu$ M) em linhagens celulares resistentes à ação antitumoral da cisplatina (A2780cis), um resultado promissor para aplicações terapêuticas.[133]

2.1.6 Estabilização da superfície de AuNPs

Devido à sua elevada energia de superfície, nanopartículas de ouro podem demonstrar certa instabilidade. Isso ocorre porque as interações de van der Waals entre o núcleo metálico das AuNPs e suas altas energias de superfície podem resultar em processos de agregação irreversíveis. Assim, para garantir estabilidade físico-química, prevenindo agregação indesejada e garantindo o controle favorável do tamanho dessas partículas, deve-se introduzir ligantes adequados, chamados comumente de agentes estabilizadores.[134]

Ao longo dos anos, para aprimorar a estabilidade das AuNPs e ajustar suas propriedades de superfície, uma grande variedade de ligantes foi relatada na literatura. A estabilidade coloidal é obtida por meio de uma combinação de repulsão eletrostática e isolamento estérico proporcionados por esses agentes estabilizadores. Dentre esses ligantes, os mais comuns são os ligantes organossulfurados, incluindo tióis e sulfetos (Figura 34), devido à sua natureza aurofílica

e alta afinidade pela superfície “macia” das nanopartículas de ouro, além de estabilizadores estéricos e eletrostáticos (por exemplo, o PVA, álcool polivinílico e citrato).[134,135] Apesar de inúmeros exemplos na literatura, esses estabilizadores contendo enxofre nem sempre são ideais devido à falta de estabilidade oxidativa e térmica da ligação Au-S, bem como às dificuldades de derivatização que impedem a funcionalização adicional das AuNPs. Assim, os pesquisadores começaram a investigar diferentes ligantes estabilizadores, incluindo os carbenos *N*-heterocíclicos (Figura 34).[135]

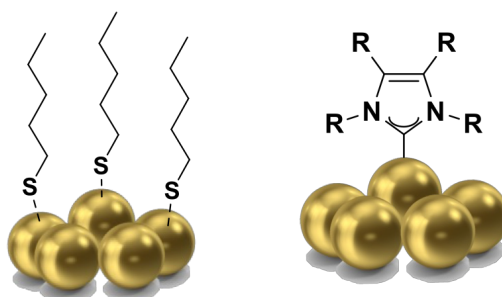


Figura 34 Representação estrutural de AuNPs estabilizadas por ligantes tióis e por ligantes carbeno *N*-heterocíclico.

Os ligantes carbeno *N*-heterocíclicos, ou NHC, são ligantes orgânicos neutros, usados em química de coordenação e catálise. Esses ligantes contêm um anel de carbono, geralmente um anel de cinco membros com átomos de nitrogênio adjacentes. O átomo de carbono nesse anel tem dois pares de elétrons livres, o que o torna altamente nucleofílico, permitindo a formação de ligações covalentes com íons metálicos como doadores de pares de elétrons. A presença de átomos de nitrogênio, que atuam como retiradores de elétrons σ e doadores de elétrons π , nas proximidades do carbeno, resulta na estabilização da estrutura do ligante NHC. Isso ocorre por meio da redução da energia do orbital σ ocupado e do aumento da densidade de elétrons no orbital p vazio. Além disso, a estrutura cíclica do NHC proporciona estabilidade adicional ao estado do carbeno hibridizado sp^2 singlete (Figura 35).[135]

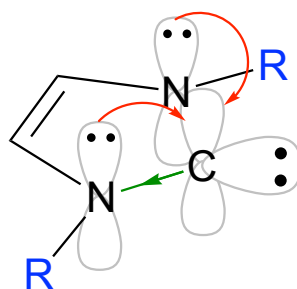


Figura 35 Representação da estrutura eletrônica do estado fundamental singlete de um NHC do tipo imidazol-2-ilideno. Os orbitais eletrônicos estão representados, bem como os efeitos de estabilização da estrutura do NHC por doação de elétrons π (representado por setas vermelhas) e retirada de elétrons σ (representada pela seta verde).

Os ligantes NHCs neutros e ricos em elétrons estabelecem ligações covalentes fortes com superfícies metálicas, desempenhando um papel fundamental na estabilização de nanopartículas metálicas. Essa estabilização é essencial para preservar as propriedades dependentes do tamanho das NPs. Embora as espécies elementares mono/oligo-atômicas estabilizadas por NHC tenham sido relatadas em 1994, a primeira evidência de interações entre NHCs e NPs metálicas surgiu em 2005 e 2007. Desde então, uma variedade de NPs metálicas funcionalizadas com NHC (NHC@MNPs), incluindo as AuNPs, tem sido sintetizada com sucesso.[134,135]

Além da estabilização eletrônica mencionada, ligantes NHC são interessantes, uma vez que é possível projetar estruturas com variados grupos funcionais, possibilitando a funcionalização direcionada e diversificada da superfície de nanopartículas para aplicações específicas, como catálise e nanomedicina.[136] Por exemplo, é possível introduzir grupos que favoreçam a bioconjugação a moléculas biológicas, como proteínas ou anticorpos, ou grupos que aumentem a solubilidade e/ou estabilidade coloidal em sistemas fisiológicos, bem como para modulação da lipofilicidade.

Para que as AuNPs possam ser aplicadas na área biomédica, é essencial que sejam solúveis em água e mantenham alta estabilidade. Esta última característica frequentemente representa um desafio, especialmente quando em contato com compostos biologicamente relevantes, como a glutathione (GSH), dada a elevada afinidade dos átomos de ouro por moléculas tioladas. O primeiro exemplo de NHC@AuNPs solúveis foi apresentado por MacLeod e colaboradores em 2015. Essas NHC@AuNPs, que foram revestidas com polietilenoglicol (“PEGladas”) para garantir solubilidade, foram sintetizadas por meio da abordagem *bottom-up* e demonstraram manter estabilidade em várias condições biológicas relevantes, incluindo na presença de GSH.[137]

No mesmo ano, Glorius e colaboradores sintetizaram nanopartículas de ouro e paládio com ligantes NHC carregados negativamente (ligantes sulfonados ou carboxilatos) por meio da abordagem *top-down*, demonstrando meses de elevada estabilidade em solução aquosa com pH

>4. Ainda, foi demonstrada a reversibilidade da agregação induzida variando-se o pH do meio contendo NHC@AuNPs carboxilada, evidenciando o conceito de estabilização eletrostática das nanopartículas.[138]

Um dos poucos exemplos de nanopartículas de ouro funcionalizadas com NHC e solúveis em água para aplicações biomédicas foi descrito em um estudo conduzido por Crudden e colaboradores em 2017. Nesse estudo, eles sintetizaram nanopartículas de ouro funcionalizadas com grupos carboxilatos incorporados na estrutura do NHC. Essas nanopartículas tinham um tamanho médio de partícula de $4,2 \pm 0,7$ nm e mostraram uma estabilidade moderada em condições biologicamente relevantes, incluindo uma solução 2 mM de glutatona. Além disso, as AuNPs sintetizadas demonstraram potencial como possíveis sondas para aplicações de imageamento fotoacústico.[139]

2.1.7 Métodos de obtenção de AuNPs:

Até o momento, uma das aplicações mais comuns dos ligantes carbenos *N*-heterocíclicos em ciência dos materiais é a estabilização de nanopartículas e superfícies metálicas devido à forte ligação NHC-metal. Como mencionado, as nanopartículas de ouro estabilizadas por ligantes NHC (NHC@AuNPs) podem ser sintetizadas principalmente por meio de duas abordagens principais, conhecidas como abordagens *bottom-up* e *top-down* (Figura 36).

Na abordagem *top-down*, o precursor imidazólio desprotonado, geralmente formado *in situ*, é adicionado às nanopartículas de ouro que possuem um ligante estabilizador mais fraco (como ligantes tiolados). Esse ligante mais fraco é posteriormente substituído por meio de uma troca de ligante na superfície da nanopartícula (conforme ilustrado na Figura 36). Dessa forma, é possível que propriedades inerentes às AuNPs precursoras, como tamanho médio e forma, sejam mantidas nas AuNPs finais.[135]

Por outro lado, na abordagem *bottom-up* ocorre a redução direta de complexos de ouro(I)-NHC previamente formados (usando agentes redutores, como NaBH_4 ou $t\text{-BuNH}_2\cdot\text{BH}_3$), sendo que as partículas crescem gradualmente à medida que mais átomos de ouro agregam-se. Agentes redutores fortes, como o NaBH_4 , produzem NPs menores ($\sim 1\text{-}4$ nm), enquanto agentes redutores mais moderados, como $t\text{-BuNH}_2\cdot\text{BH}_3$, geram NPs um pouco maiores ($\sim 5\text{-}6$ nm).[135,136]

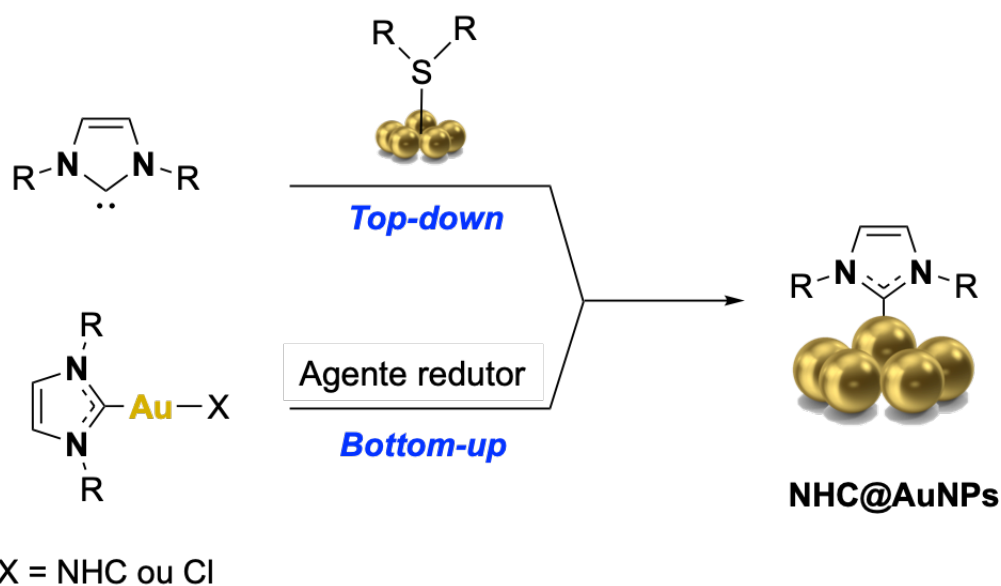


Figura 36 Esquema geral da síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por ligantes NHC, NHC@AuNPs, por meio da abordagem bottom-up e top-down.

Assim, com base no supramencionado, observa-se que síntese de nanopartículas de ouro solúveis em água e estabilizadas por ligantes NHC é um assunto relativamente novo, com grandes potenciais de aplicações em catálise e medicina. Até o momento, não há relatos do uso de NHC@AuNPs para catálise em células vivas, nas chamadas reações bio-ortogonais, para fins terapêuticos ou outras aplicações biomédicas. Portanto, com este trabalho visa-se contribuir para a investigação de novas NHC@AuNPs solúveis e dispersíveis em água para catalisar reações em ambientes aquosos, visando possíveis aplicações futuras em transformações bio-ortogonais em células.

2.2 OBJETIVOS

Fundamentado pelos aspectos introdutórios apresentados, o trabalho descrito nesse capítulo tem como principal objetivo contribuir para a área de nanobiotecnologia com a obtenção de novas nanopartículas de ouro plasmônicas funcionalizáveis derivadas de ligantes NHC para aplicações em catálise e em reações de bioconjugação em meio aquoso.

2.2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho apresentado no presente capítulo compreenderam:

- i. A síntese de AuNPs coloidais que incorporam ligantes NHC com um grupo carboxilato funcionalizável por meio da abordagem *bottom-up*;
- ii. A caracterização espectroscópica e físico-química das nanopartículas obtidas por técnicas como espectroscopia de UV-vis, RMN e infravermelho, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de transmissão;
- iii. A investigação da estabilidade química da AuNP em água, PBS e na presença de moléculas biologicamente relevantes por meio de técnicas como UV-vis e potencial zeta;
- iv. A avaliação do potencial catalítico da AuNP na reação-modelo de redução do 4-nitrofenol;
- v. A investigação prévia da capacidade de acoplamento amida da AuNP solúvel na presença de uma amina fluorescente.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes de partida utilizados neste trabalho foram obtidos de fontes comerciais com padrão de pureza analítico e usados como recebidos.

2.3.2 Instrumentação

As medidas de absorção eletrônica molecular na região do UV-visível (UV-vis) foram realizadas em equipamento Shimadzu modelo UV-2600 com cubetas de quartzo e caminho óptico de 1 cm. A agitação foi fornecida por um agitador magnético externo. As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Cary Eclipse. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico como absorvância (u.a.) vs comprimento de onda (λ , nm) utilizando o *software* GraphPad Prism 9.

Os espectros de RMN de ^1H (400 MHz) foram obtidos no espectrômetro multinuclear Bruker AV400 UltraShield, equipamento disponível na plataforma multiusuário na Universidade Técnica de Munique (TUM, Alemanha) e os sinais residuais do clorofórmio (CDCl_3) e óxido de deutério (D_2O), adquiridos da Merck, foram utilizados como referência interna. O *software* MestReNova foi utilizado para visualizar os espectros e gerar suas figuras.

Os espectros de infravermelho foram obtidos de um equipamento Elmer Perkin Frontier FT-IR e visualizados no *software* GraphPad Prism 9.

As análises térmicas (TGA) foram realizadas com um equipamento TG Q5000 da TA Instruments. Para isso, cerca de 2 mg de amostra foram aquecidos da temperatura ambiente até 800 °C, sob uma razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} e atmosfera de argônio com fluxo de 25 mL min^{-1} .

O potencial zeta foi obtido, a partir de soluções aquosas, em um Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi medida no JEOL 100 CX na Universidade Técnica de Munique (TUM, Alemanha). Antes da medição, amostras suspensas em clorofórmio ou água foram depositadas em uma grade de cobre/carbono, de poros de 200 mesh. As medidas foram feitas após as grades serem secadas por 12 h. As micrografias foram analisadas usando o *software* Image J.

2.3.3 Síntese do ligante NHC

O ligante NHC foi sintetizado conforme procedimento publicado na literatura [140] e o esquema de síntese está representado na Figura 37.

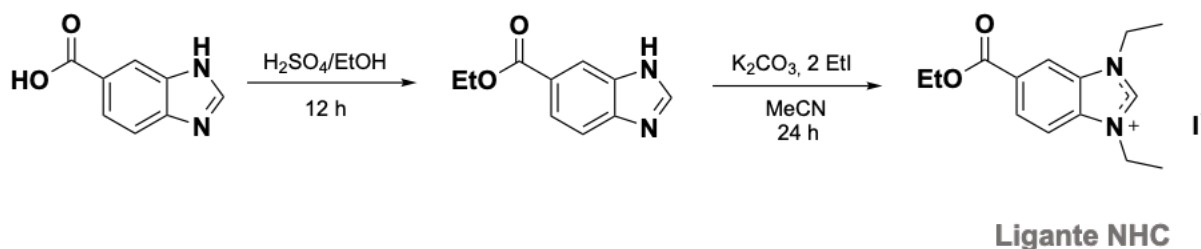


Figura 37 Esquema de síntese do ligante NHC utilizado neste trabalho a partir do ácido benzimidazol-5-carboxílico.

Inicialmente, o ácido benzimidazol-5-carboxílico (650 mg, 4,009 mmol) foi suspenso em etanol absoluto (EtOH, 10 mL). Em seguida, ácido sulfúrico conc. (H_2SO_4 , 0,25 mL, catalítico) foi adicionado à solução, que foi agitada sob refluxo por 26 horas. A reação foi vertida sobre gelo/água (aproximadamente 50 mL), tornada alcalina com solução de hidróxido de sódio (NaOH, 5 M, pH 12) e extraída com acetato de etila (3×50 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida para obter o produto. Rendimento: 59%. Esse composto intermediário purificado foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 83) e utilizado na etapa seguinte para a síntese do ligante NHC.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 10,65 (s, 1H, NH), 8,43 (s, 1H, Ha), 8,29 (s, 1H, Hb), 8,01 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Hc) 7,67 (d, $J = 8,7$ Hz 1H, Hd), 4,39 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, He), 1,39 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, Hf) ppm.

Então, preparou-se o sal de iodeto de benzimidazólio, o ligante NHC, a partir do composto intermediário obtido na etapa anterior (Figura 37). Logo, o intermediário benzimidazol (400 mg, 1 eq.) e carbonato de potássio (K_2CO_3 , 291 mg, 1 eq.) foram adicionados em acetonitrila (MeCN, 15 mL), junto de iodeto de etila (EtI, 5 eq.) e a mistura de reação foi agitada magneticamente sob refluxo por 24 horas. Em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi suspenso em diclorometano (20 mL) e a solução foi filtrada. O solvente foi removido e o resíduo foi lavado três vezes com 100 mL de tetrahydrofurano/n-hexano (2/5). Rendimento: 70%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 11,24 (s, 1H, Ha), 8,40 (s, 1H, Hb), 8,33 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, Hc) 7,82 (d, $J = 8,7$ Hz 1H, Hd), 4,73 (m, 4H, H2 e H2'), 4,46 (m, $J = 7,1$ Hz, 2H, He), 1,79 (m, 6H, H1 e H1') 1,44 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, Hf) ppm.

2.3.4 Síntese do complexo monocarbeno Au(I)-NHC

O complexo Au(I)-NHC foi sintetizado conforme procedimento publicado na literatura [140] e o esquema de síntese está representado na Figura 38.



Figura 38 Esquema de reação para obtenção do complexo **Au(I)-NHC**. O complexo foi obtido por meio de uma reação de transmetalização usando o Ag_2O e o ligante NHC em diclorometano.

O sal de iodeto de benzimidazólio (ligante NHC) foi usado para sintetizar o complexo **Au(I)-NHC**, dissolvendo-se o ligante NHC (1 eq) e Ag_2O (0,6 eq.) em diclorometano (DCM, 20 mL) e deixando o sistema sob agitação *overnight* em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), protegidos da luz. O precursor de ouro, $[\text{Au}(\text{SMe}_2)\text{Cl}]$ (1,1 eq., SMe_2 = dimetilsulfeto) foi, então, adicionado e a mistura seguiu sob agitação magnética por 60 h. Por fim, a reação foi filtrada em celite e o solvente do filtrado foi todo removido sob pressão reduzida. O resíduo foi lavado com THF/*n*-hexano (2:5, 3 vezes) e por várias vezes com éter dietílico, até que o solvente estivesse incolor. O produto laranja-claro obtido foi seco sob pressão reduzida. Rendimento: 60%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8,19 (s, 1H, Hb), 8,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Hc) 7,52 (d, $J = 8,6$ Hz 1H, Hd), 4,58 (m, 4H, H2 e H2'), 4,44 (m, $J = 7,3$ Hz, 2H, He), 1,55 (m, 6H, H1 e H1') 1,44 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, Hf) ppm.

2.3.5 Síntese de NHC-COOEt@AuNPs por meio da abordagem *bottom-up*

O complexo **Au(I)-NHC** (1 eq.) foi dissolvido em 2 mL de THF e deixado sob agitação vigorosa à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e protegido da luz. Uma solução de *t*-BuNH₂.BH₃ (3,6 eq.) em 1 mL de THF foi preparada e então adicionada à solução do complexo de ouro sob agitação magnética. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por 16 horas, resultando em uma solução marrom. Em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida, resultando na formação das AuNPs como um sólido preto. Este sólido foi dissolvido em diclorometano e filtrado através de algodão para remover quaisquer partículas insolúveis. O filtrado foi submetido à remoção completa do solvente e, finalmente, seco sob pressão reduzida.

2.3.6 Síntese de NHC-COOH@AuNPs por hidrólise de NHC-COOEt@AuNPs

As nanopartículas de NHC-COOEt@AuNPs (20 mg) foram suspensas em 5 mL de EtOH e deixadas sob agitação magnética vigorosa à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Separadamente, 5 mg de NaOH foram dissolvidos em 5 mL de água e adicionados à suspensão de nanopartículas. A mistura reacional foi, então, aquecida a 90 °C e agitada por 1 hora. Após resfriar até temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), o etanol foi removido sob pressão reduzida e partículas insolúveis presentes na fase aquosa foram removidas por filtração através de algodão. As nanopartículas de NHC-COOH@AuNPs, dissolvidas em água, foram purificadas por diálise (Figura 39) por 48 h usando uma membrana de diálise de celulose tratada (Sigma-Aldrich, D9652) com um corte de peso molecular de 14 kDa. Rendimento: 75%.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ 7,98 (s, H_b), 7,76 (d, H_c), 7,76 (d, H_d), 4,58 e 4,52 (m, H₂ e H₂'), 1,52 (m, H₁ e H₁') ppm.

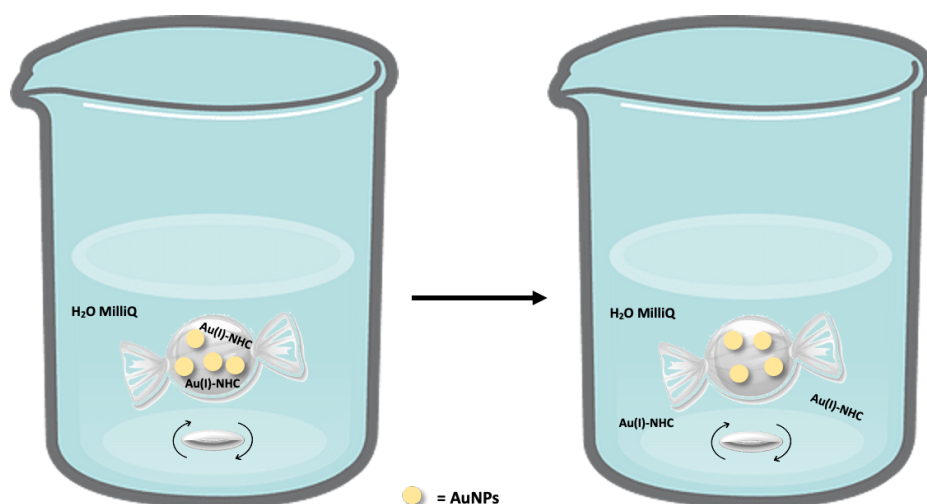


Figura 39 Representação esquemática de uma bolsa de diálise contendo as AuNPs e suas impurezas. A solução aquosa impura de AuNPs é colocada dentro da membrana de diálise que é selada com dois clips nas duas pontas. Essa bolsa é colocada dentro um béquer grande com água que fica sob agitação por alguns dias. Devido aos poros da membrana, as espécies moleculares deixam a bolsa em direção à água, funcionando como uma espécie de filtração da solução de AuNPs.

2.3.7 Reação de redução catalítica do 4-nitrofenol

O experimento foi realizado em triplicata, com uma massa de 0,2 mg de NHC-COOH@AuNPs. 100 µL de uma solução aquosa de 4-nitrofenol (3 mM) foram adicionados a uma cubeta contendo as AuNPs e 1,9 mL de água MilliQ. 1 mL de uma solução aquosa de NaBH₄ (30 mM) foi rapidamente adicionado à cubeta enquanto se iniciava a análise. A concentração total

de 4-nitrofenol e NaBH_4 na cubeta foi de 0,1 mM e 10 mM, respectivamente. As reações de redução do 4-nitrofenol foram monitoradas por espectroscopia de absorção no espectrofotômetro UV-Vis, em uma faixa de 700 – 230 nm e taxa de varredura de 600 nm min^{-1} . O espectrofotômetro de UV-vis foi configurado para registrar um espectro a cada 30 segundos durante 360 minutos, mas foi interrompido quando a intensidade de absorção da banda de 400 nm permaneceu constante durante as análises.

A constante de reação (k) foi calculada traçando o logaritmo natural da mudança na concentração [C] do 4NP ao longo do tempo (t), com base na concentração inicial do 4NP $[C_0]$, considerando a absorbância em 400 nm.

$$\ln [C] = -kt + \ln [C_0]$$

2.3.8 Reação de acoplamento das nanopartículas NHC-COOH@AuNPs com 7-amino-4-metil-cumarina

A conjugação foi realizada mediante a otimização de um método, utilizando-se o protocolo EDC/NHS, com base em metodologias descritas na literatura.[141]

Assim, 200 μL de uma solução aquosa 1 mg mL^{-1} das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** foram ativadas durante 5 minutos por 5 μL de uma solução aquosa 0,2 M de EDC e 10 μL de uma solução aquosa 0,2 M de NHS (as concentrações dos reagentes acopladores estavam com a razão molar EDC/NHS de 1:2). Separadamente, 10 μL de uma solução-estoque 0,01 M da amina fluorescente 7AMC, em DMF, foram deixados para agitar em 1,7 mL de H_2O . A solução ativada das nanopartículas (10 μL) foram tituladas com a solução da amina, enquanto registrava-se o espectro de fluorescência da 7AMC ($\lambda_{\text{excitação}}$: 340 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 450 nm).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Síntese do complexo Au(I)-NHC

O ligante imidazol e o complexo **Au(I)-NHC** foram sintetizados seguindo a rota descrita por Ott e colaboradores.[140] Inicialmente, para a obtenção do ligante (Figura 2.9) foi realizada uma reação de proteção do grupo –COOH no ácido 1H-benzimidazol-5-carboxílico com etanol em meio ácido. Em seguida, o sal benzimidazólico, denominado **ligante NHC**, foi formado *via* alquilação do respectivo benzimidazol com iodoetano em acetonitrila.

Posteriormente, o complexo NHC de ouro(I), **Au(I)-NHC**, foi sintetizado em diclorometano em uma reação de duas etapas por meio de uma etapa de transmetalção com o óxido de prata. A transmetalção é tradicionalmente definida como uma troca de metais entre um composto organometálico e um metal ou um composto organometálico diferente, particularmente útil em Química Supramolecular e na obtenção de complexos de ouro(I)-NHC. Nesse caso, o complexo de prata intermediário, Ag(I)-NHC, não foi isolado e foi reagido por 60 horas com o precursor de ouro(I), Au(SMe₂)Cl, para obtenção do complexo de ouro(I)-NHC (Figura 2.10).

Todos os precursores sintetizados relatados na literatura foram caracterizados por RMN de ¹H em CDCl₃ e a análise dos espectros está de acordo com as estruturas químicas propostas e com as atribuições de prótons reportadas anteriormente [140] (**Material Suplementar**, Figura 83 – Figura 85). A conversão do sal de benzimidazólio (ligante NHC) em complexo de ouro(I), **Au(I)-NHC**, foi corroborada com a análise de RMN de ¹H pela ausência do sinal de **Ha** no espectro do produto (Figura 85). O precursor sem metal exibe um sinal para esse hidrogênio na faixa de 11,2 ppm (Figura 84).

2.4.2 Síntese de NHC@AuNPs: uma abordagem *bottom-up*

A abordagem sintética escolhida para obtenção das nanopartículas de ouro solúveis (NHC@AuNPs) foi o método “*bottom-up*”, inspirado pelo trabalho de Young e colaboradores[142], em que as AuNPs são obtidas por meio de reação de redução de um complexo de ouro(I) mantendo-se os ligantes NHC coordenados.

Inicialmente, o complexo **Au(I)-NHC** foi dissolvido em THF e deixado sob agitação protegido da luz. Para a formação das nanopartículas por meio da redução dos centros de ouro(I) para ouro(0), o agente redutor escolhido foi o *t*-BuNH₂.BH₃, de caráter redutor moderado, uma vez que agentes redutores mais fortes podem gerar AuNPs muito pequenas. A mistura de reação foi deixada sob agitação por 24 h para garantir total redução e uma distribuição de tamanho uniforme, como descrito por Crudden e colaboradores[139], que observaram que o tempo de

reação mais longo pode gerar AuNPs ligeiramente maiores com uma estreita distribuição de tamanho de partícula.

A adição do agente redutor levou imediatamente à observação de uma mudança de cor da solução, inicialmente amarela (relativo ao complexo de ouro(I)) para marrom até vermelho-tinto, característica de nanopartículas de ouro. As nanopartículas de ouro(I), **NHC-COOEt@AuNPs**, foram obtidas como sólidos pretos, que apresentam caráter hidrofóbico e são solúveis em solventes como diclorometano e etanol. O esquema de síntese para formação das **NHC-COOEt@AuNPs** encontra-se na Figura 40, bem como a foto do balão reacional após evaporação do solvente, resultando nas nanopartículas escuras.

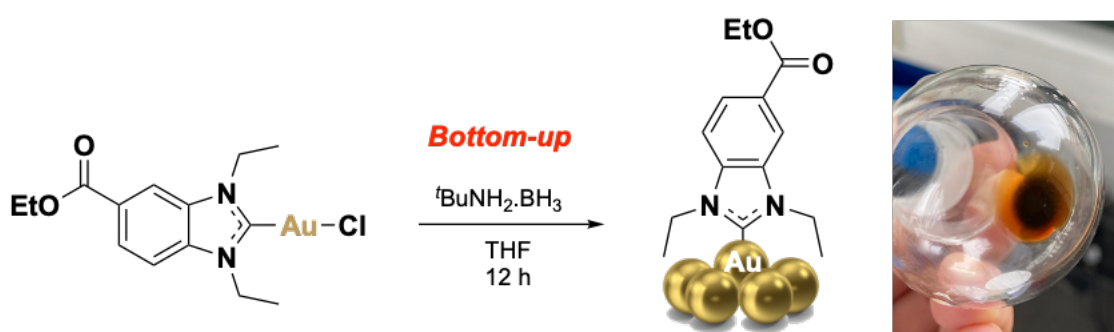


Figura 40 Formação das **NHC-COOEt@AuNPs** a partir do seu complexo de ouro(I) correspondente, em THF na presença de $t\text{-BuNH}_2 \cdot \text{BH}_3$ por meio da abordagem bottom-up. À direita, observam-se as partículas escuras resultantes após a evaporação do solvente.

Para obtenção de **NHC-COOH@AuNPs** solúveis em água foi necessário promover a hidrólise básica do éster presente na estrutura das nanopartículas **NHC-COOEt@AuNPs** reestabelecendo o grupo carboxilato do ligante NHC. As AuNPs foram purificadas por meio de diálise contra água MilliQ para remoção de possíveis espécies que não reagiram.

Na Figura 41, tem-se o esquema de síntese para obtenção das **NHC-COOH@AuNPs**, bem como a foto da solução aquosa resultante de cor vermelho-vinho.

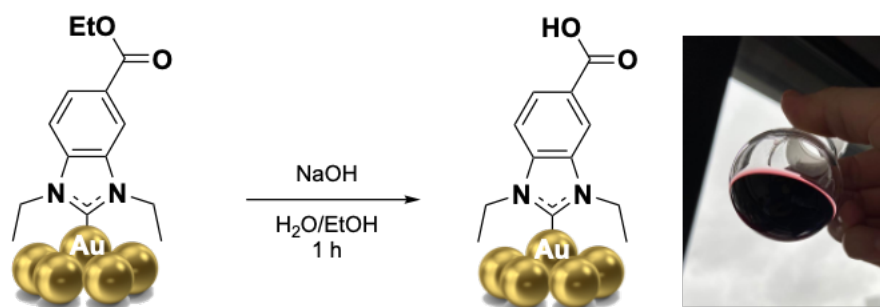


Figura 41 Formação das **NHC-COOH@AuNPs** solúveis a partir da hidrólise básica do éster presente na estrutura do ligante NHC. À direita, observa-se a solução aquosa contendo as nanopartículas solúveis.

Depois disso, as nanopartículas de ouro **NHC-COOH@AuNPs** solúveis resultantes foram liofilizadas para gerar sólidos escuros que podem ser redispersos em água para serem analisadas por UV-vis, RMN, TG, MET e potencial zeta. O potencial das **NHC-COOH@AuNPs** como catalisadores em reações-modelo foi avaliado. Além disso, como prova de conceito, a capacidade de acoplamento com aminas para formação de ligação amida também foi avaliada.

2.4.3 Espectroscopia no UV-visível

A formação de AuNPs estabilizadas por ligantes NHC por meio da abordagem BU foi confirmada por espectroscopia UV-vis. As **NHC-COOEt@AuNPs** exibem uma banda nítida de ressonância plasmônica de superfície centrada em 525 nm em diclorometano (Figura 42), com um comprimento de onda típico para AuNPs com um tamanho médio de partícula entre 2-5 nm. A largura de banda indica, ainda, a monodispersividade das AuNPs sintetizadas. Na região do UV ainda é possível observar as bandas associadas às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ relacionadas ao anel benzimidazol, em 234 nm e 298 nm, respectivamente, confirmando a presença da fração orgânica na estrutura das AuNPs.

As transições eletrônicas observadas na região do UV podem ainda ser atribuídas ao complexo de ouro(I), **Au(I)-NHC**, uma vez que não foi possível purificar as nanopartículas de caráter hidrofóbico por diálise. A banda próxima a 366 nm pode ser atribuída às transições de transferência de carga metal-ligante do complexo de ouro(I).

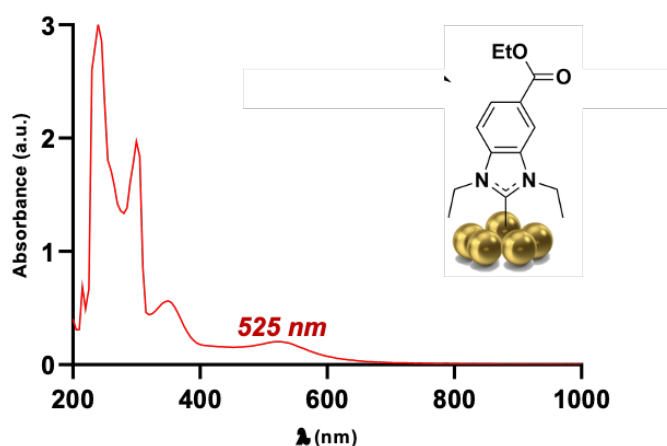


Figura 42 Espectro UV-visível das $NHC-COOEt@AuNPs$ em diclorometano, evidenciando a banda LSPR em 525 nm.

A dissolução das nanopartículas $NHC-COOH@AuNPs$ em água produz uma solução típica de cor vermelho-vinho. Após a reação de hidrólise, a banda de ressonância plasmônica permanece visível e próxima de 525 nm, no entanto, deve-se considerar que os solventes utilizados nas análises de UV-vis para as duas nanopartículas são diferentes e podem influenciar na absorção. Na região das transições eletrônicas referente à fração orgânica da superfície das nanopartículas, são observadas as transições $\pi-\pi^*$ (em 230 nm) e $n-\pi^*$ (em 302 nm) associadas ao grupo carboxílico e aromático. Devido à purificação via diálise, qualquer resquício de complexo Au(I)-NHC foi removido e, portanto, a banda em 366 não está presente (Figura 43).

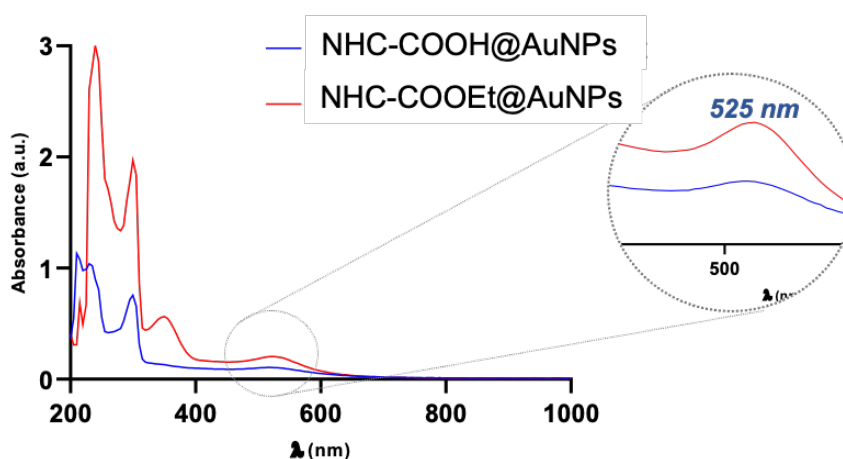


Figura 43 Espectro UV-visível das $NHC-COOEt@AuNPs$ e $NHC-COOH@AuNPs$ em diclorometano e água, respectivamente, evidenciando a banda LSPR próxima a 525 nm.

2.4.4 Espectroscopia de RMN de ^1H

Para nanopartículas de ouro solúveis, a espectroscopia de RMN é uma ferramenta importante para avaliar a camada orgânica qualitativa ou quantitativamente, e fornece informações valiosas sobre a pureza, a densidade do ligante, além de compreender os efeitos eletrônicos do ouro em relação aos ligantes estabilizadores.[143] A espectroscopia de RMN ainda apresenta vantagens no que tange a preservação da amostra, uma vez que é um método não-destrutivo, ao contrário de outras técnicas usadas na caracterização de nanopartículas, como espectrometria de massas. No entanto, a análise de RMN é definitivamente favorecida para nanopartículas menores, de forma que a simples possibilidade de realização da análise já é indicativa do tamanho das AuNPs.[144]

Assim, após diálise e liofilização, o espectro de RMN de ^1H foi registrado para as nanopartículas de **NHC-COOH@AuNPs** em D_2O (Figura 44). Devido à insolubilidade em água dos compostos precursores (**Au(I)-NHC** e **NHC-COOEt@AuNPs**), não foi possível comparar diretamente os espectros de RMN. Na verdade, a solubilidade das **NHC-COOH@AuNPs** em meio aquoso é uma forte evidência da presença do grupo carboxilato na superfície da nanopartícula de Au.

Na região de prótons aromáticos do espectro de RMN de ^1H observam-se as ressonâncias de próton do grupo benzimidazol em 7,98 (singlete, **Hc**), 7,76 (duplete, **Hb**) e 7,37 ppm (duplete, **Ha**). Ainda, nenhum sinal evidente do ligante imidazólico livre foi fortemente detectável na amostra **NHC-COOH@AuNPs**, conforme indicado pela ausência de um sinal mais desblindado próximo a ~ 9 ppm no espectro de ^1H . Dois sinais alargados em 4,58 e 4,42 ppm podem ser atribuídos às ressonâncias dos hidrogênios metilênicos vizinhos ao nitrogênio do ligante NHC, **H2** e **H2'**. Similarmente, os sinais dos grupos metila, **H1** e **H1'**, são observados próximo a 1,50 ppm.

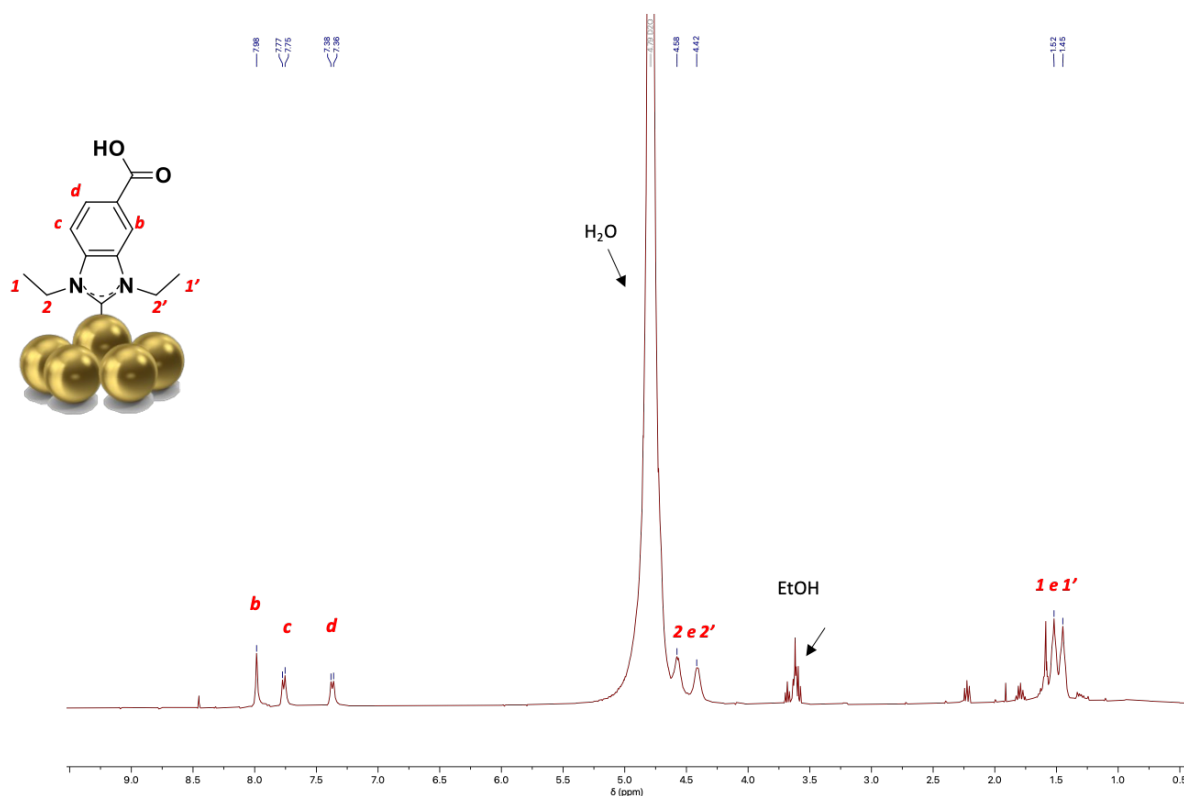


Figura 44 Espectro de RMN de ^1H em D_2O das nanopartículas NHC-COOH@AuNPs após diálise e liofilização e atribuição dos sinais aos seus respectivos prótons.

2.4.5 Espectroscopia de infravermelho

A estrutura química da camada orgânica que envolve o núcleo das nanopartículas de ouro pode ser analisada por meio de espectroscopia de infravermelho, com base nas características vibracionais específicas de grupos funcionais dos ligantes. Assim, a espectroscopia de infravermelho é uma ferramenta útil para realizar uma avaliação qualitativa da fração orgânica que envolve as AuNPs, sendo também aplicável para monitorar a modificação da superfície da nanopartícula ou a troca de ligantes. Além disso, alterações nas bandas características de grupos funcionais adsorvidos na superfície das NPs podem ser utilizadas para descrever o tipo e a orientação da interação entre o núcleo e o ligante orgânico.

Neste trabalho, FTIR-ATR foi utilizado para corroborar os dados de RMN de ^1H e UV-vis quanto à ausência dos precursores imidazólicos na superfície das NPs, bem como verificar o sucesso da reação de hidrólise do éster para gerar as nanopartículas solúveis. O acessório de reflexão total atenuada (ATR) foi selecionado em razão da possibilidade de colocar a amostra no cristal ATR sem qualquer pré-tratamento ou preparo de amostras que possam influenciar no espectro final obtido.

Uma comparação qualitativa dos espectros de IR foi feita entre as nanopartículas **NHC-COOEt@AuNPs** e **NHC-COOH@AuNPs** (Figura 45). Um espectro de fundo foi coletado antes da análise de cada amostra e cada espectro foi registrado a partir de 32 varreduras. A confirmação da presença de moléculas orgânicas ancoradas na superfície das nanopartículas foi estabelecida devido à detecção de bandas de vibração na faixa correspondente aos grupos C-H, que se estende por volta de 2900 cm^{-1} para os ligantes NHC. A espectroscopia de infravermelho sugere a substituição das moléculas estabilizadoras de NHC com um grupo éster pelo análogo ácido carboxílico. Para as **NHC-COOEt@AuNPs**, a banda da carbonila é observada em 1705 cm^{-1} , enquanto para **NHC-COOH@AuNPs** a absorção é próxima de 1640 cm^{-1} . Além disso, a banda da carbonila do éster é mais nítida e aguda, como observado no espectro para as **NHC-COOEt@AuNPs**, enquanto a banda de ácido carboxílico é mais alargada.

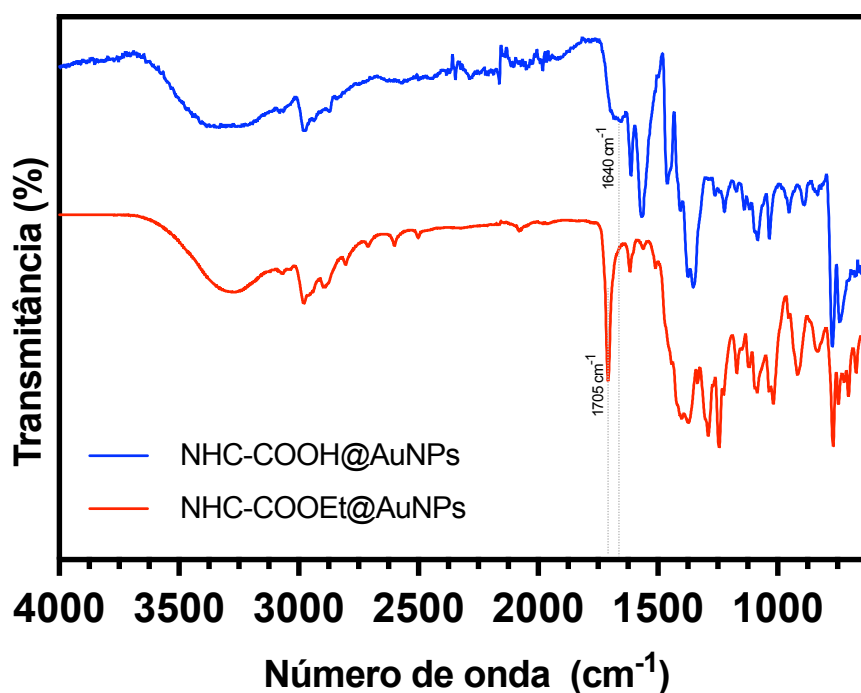


Figura 45 Espectros de infravermelho (FTIR-ATR) das nanopartículas **NHC-COOEt@AuNPs** (linha vermelha) e **NHC-COOH@AuNPs** (linha azul).

2.4.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para se entender o comportamento termoquímico das **NHC-COOH@AuNPs**, estimar o grau de funcionalização do ligante NHC na sua superfície, bem como conhecer o teor de ouro na amostra.

O fundamento principal da TGA é que a mudança de massa de uma amostra pode ser estudada sob condições programadas de temperatura. Essa análise envolve o aquecimento de uma amostra de massa conhecida e o monitoramento da queda percentual na massa à medida que a amostra se decompõe. Compostos voláteis, água adsorvida e solventes presentes na amostra se perdem primeiro abaixo de 150 °C, enquanto a água ligada e os materiais orgânicos de baixo peso molecular são perdidos entre 150 °C e 250 °C. Acima de 250 °C, outros materiais orgânicos se decompõem, restando, no caso de nanopartículas metálicas, o metal como resíduo.[145]

A curva termogravimétrica das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** encontra-se na Figura 46. A medida foi registrada sob atmosfera de argônio com fluxo de 25 mL min⁻¹ e as amostras foram aquecidas com uma taxa de 10 °C min⁻¹ de 30 a 800 °C.

A curva se inicia com a perda de massa de 9,5% em um evento contínuo que ocorre até a temperatura próxima de 120 °C, sugerindo a possível liberação de solvente residual ou voláteis adsorvidos na superfície das nanopartículas. Em seguida, tem-se um segundo evento em um intervalo relativamente curto de temperatura, que se inicia na temperatura de 120 °C até 180 °C, e resultou na perda de 16,5% de massa da amostra, provavelmente iniciando a degradação dos ligantes NHC. Por fim, um terceiro evento mais longo resultou na perda de 13% em massa da amostra, atribuído à remoção dos ligantes da superfície das nanopartículas de ouro. Assim, a partir de 492 °C tem-se uma certa estabilidade térmica da amostra que resulta em 61% de resíduo, que se refere ao ouro total na amostra e conseqüentemente cerca de 39% em massa de funcionalização na superfície das nanopartículas. O resultado obtido de 39% de funcionalização está de acordo com a proporção relatada para outros sistemas **NHC@AuNPs**[142,146,147], evidenciando que a retenção do ligante NHC na superfície da AuNP é comumente observada para colóides obtidos por meio da abordagem *bottom-up*.

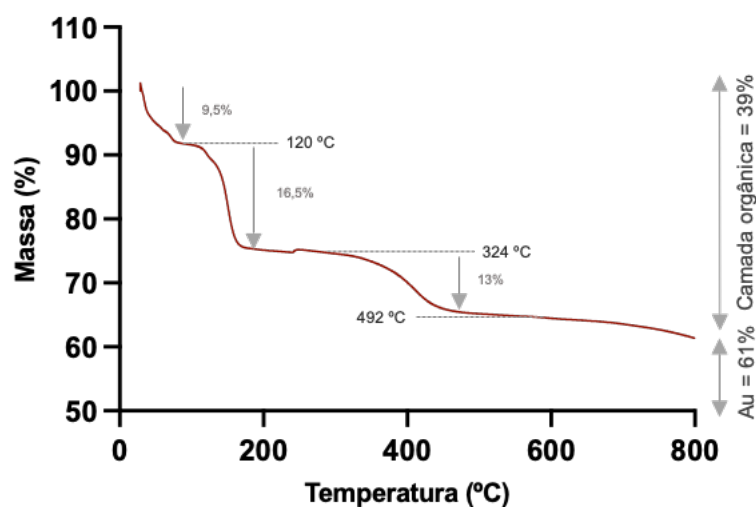


Figura 46 Curva TG das nanopartículas $NHC-COOH@AuNPs$, com indicação dos percentuais de perda de massa nos diferentes eventos térmicos registrados, bem como as temperaturas em que esses eventos se iniciaram.

2.4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As técnicas de microscopia eletrônica ganharam ampla aplicação para visualizar as AuNPs devido à sua resolução intrínseca em escala subnanométrica. A microscopia eletrônica de varredura, conhecida como MEV, fornece imagem da superfície (ou quase superfície) de uma amostra. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica avançada de microscopia que utiliza feixes de elétrons, em vez de luz visível, para obter imagens e informações detalhadas sobre amostras em escala nanométrica. A MET é uma técnica básica usada para a caracterização de nanopartículas metálicas, especialmente aquelas usadas para catálise, já que o desempenho das nanopartículas pode, em última análise, estar ligado ao seu tamanho e forma.[143] Ainda, a MET pode ser usado para medir cada tamanho de partícula diretamente, permitindo que o tamanho médio e a distribuição do tamanho da partícula sejam derivados da imagem obtida. A camada orgânica que envolve uma nanopartícula geralmente não é diretamente visível, uma vez que a sua espessura é muito pequena na escala nanométrica. As imagens de MET, portanto, fornecem a dimensão do núcleo de ouro, ou seja, da agregação metálica decorrente da formação de nanopartículas.

Por meio da MET, foi possível obter imagens de alta resolução de ambas as nanopartículas de ouro sintetizadas, destacando sua forma esférica uniforme e proporcionando uma visualização precisa do tamanho e da distribuição das partículas para determinar o tamanho médio de partícula.

Para isso, uma gota de uma suspensão saturada de $NHC-COOEt@AuNPs$ em diclorometano foi gotejada sobre uma grade de cobre revestida de carbono e deixada para evaporar

naturalmente antes da análise de MET. Na Figura 47 tem-se uma imagem de MET representativa das nanopartículas **NHC-COOEt@AuNPs**. A análise da distribuição do tamanho de cerca de 200 partículas revelou que as AuNPs têm cerca de $6,63 \pm 1,1$ nm de diâmetro, como observado no histograma de tamanhos obtido e demonstrado na Figura 47.

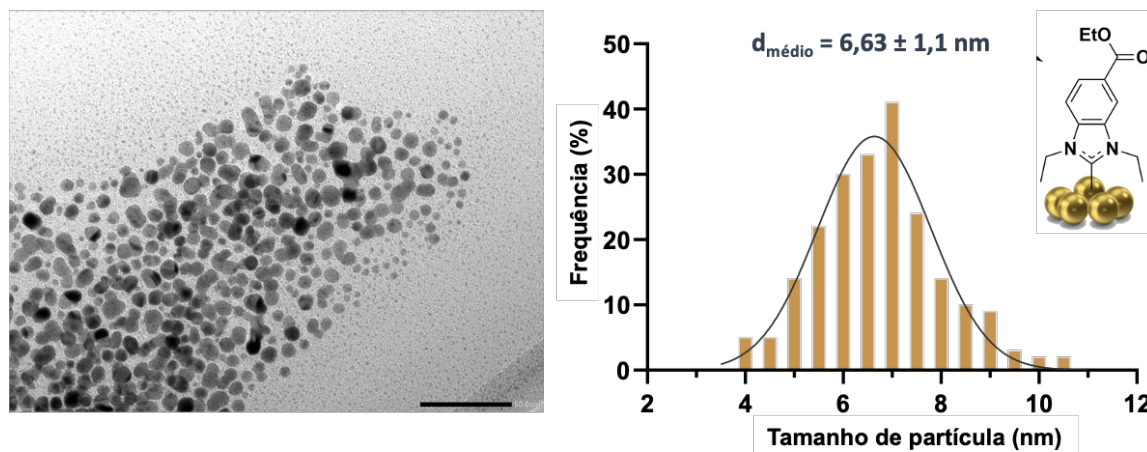


Figura 47 Imagem de MET representativa das **NHC-COOEt@AuNPs** e histograma de distribuição de tamanho de partícula: A AuNP apresentou um tamanho médio de $6,63 \pm 1,1$ nm. Barra de escala na imagem de MET: 50 nm.

Para as nanopartículas solúveis, uma gota de uma suspensão aquosa saturada de **NHC-COOH@AuNPs** foi gotejada sobre uma grade de cobre revestida de carbono e deixada para evaporar naturalmente antes da análise de MET. A análise da distribuição do tamanho de cerca de 400 partículas revelou que as **NHC-COOH@AuNPs** têm cerca de $4,94 \pm 0,96$ nm de diâmetro, como observado no histograma de tamanhos obtido e demonstrado na Figura 48.

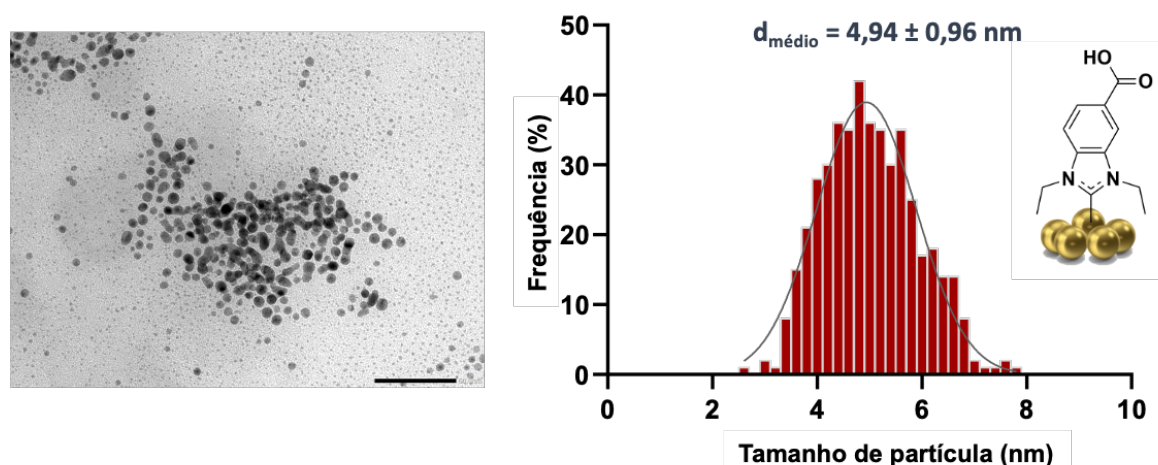


Figura 48 Imagem de MET representativa das **NHC-COOH@AuNPs** e histograma de distribuição de tamanho de partícula: A AuNP apresentou um tamanho médio de $4,94 \pm 0,96$ nm. Barra de escala na imagem de MET: 50 nm.

Em geral, a análise de MET destaca claramente o tamanho pequeno das AuNPs, que nesse caso, poderia também ser previsto a partir do λ_{max} da banda LSPR de ambas as nanopartículas obtidas. Os seus tamanhos médios obtidos estão de acordo com o que tem sido relatado na literatura para AuNPs similares, obtidas também por meio da abordagem *bottom-up*. [142,146,147]

2.4.8 Estudos de estabilidade em solução

2.4.8.1 Estabilidade em água

Ao se avaliar a estabilidade de nanopartículas de ouro solúveis, as investigações do perfil UV-vis ao longo do tempo podem ser úteis para obter informações sobre os processos de agregação que podem ocorrer em solução e/ou para verificar se o ligante NHC dissocia-se da superfície da nanopartícula ao longo do tempo. A estabilidade em condições fisiológicas também é crucial para considerar as AuNPs como possíveis agentes em aplicações biomédicas.

Assim, uma quantidade suficiente de **NHC-COOH@AuNPs** para atingir uma absorbância da banda SPR de aproximadamente 0,5 no UV-vis foi dissolvida em água MilliQ e os espectros de UV-vis foram registrados entre 200-1000 nm ao longo do tempo. Dentro do tempo máximo registrado de 24 horas, não foram observadas alterações significativas na amostra, de forma que na solução analisada não foi possível detectar a olho nu sinais de agregação das nanopartículas, como sinais de precipitação ou mudança de cor. Além disso, nos espectros obtidos, a intensidade da banda LSPR das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** ou das bandas associadas à fração orgânica é essencialmente a mesma durante a análise, revelando a alta estabilidade das nanopartículas e dos ligantes ancorados à superfície nessas condições.

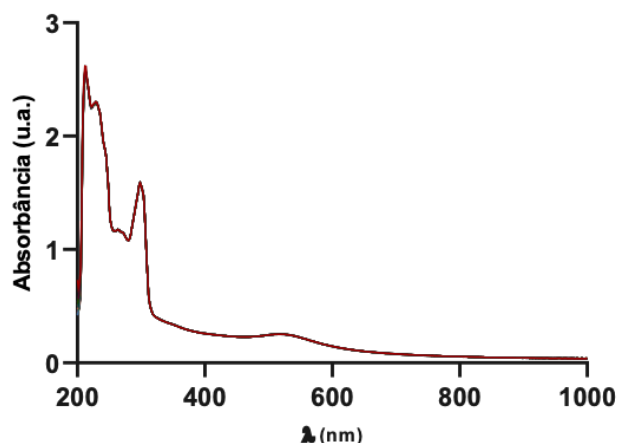


Figura 49 Espectros UV-Vis de **NHC-COOH@AuNPs** em água MilliQ durante 24 h após a diálise. Os espectros foram registrados a cada 15 minutos durante a primeira hora e depois a cada 30 minutos até 15 horas.

2.4.8.2 Estabilidade em função do pH

Nanopartículas de ouro que mantêm sua estabilidade em soluções com diferentes níveis de acidez e em meios biológicos são cruciais para diversas aplicações nos campos da biomedicina, diagnóstico, pesquisa e processos industriais. Uma vez que os sistemas biológicos podem apresentar níveis variados de pH, as AuNPs estáveis em relação ao pH garantem que essas aplicações funcionem de maneira confiável sob diferentes condições fisiológicas.

No caso das **NHC-COOH@AuNPs** sintetizadas, o grupo -COOH pode ainda ser um grupo que responde aos diferentes valores de pH do meio, uma vez que pode ser protonado e desprotonado conforme necessário. A dissociação desse grupo proporciona estabilização eletrostática e pode, portanto, alterar características finais das nanopartículas, como a solubilidade ou a capacidade de dispersão das AuNPs em água. Assim, a investigação da carga superficial de nanomateriais desempenha um papel fundamental na explicação da estabilidade coloidal e na prevenção da aglomeração desses materiais. Na prática, essa carga é frequentemente avaliada por meio da medida do potencial zeta, expresso em milivolts (mV).

A estabilidade coloidal das AuNPs funcionalizadas com os ligantes NHC-COOH, **NHC-COOH@AuNPs**, foi confirmada por meio da medida do potencial zeta de diferentes soluções contendo aproximadamente a mesma massa de nanopartículas ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) em uma faixa de pH de 1 – 13, a fim de estimar a carga sobre a superfície orgânica do metal sob essas condições. As mesmas soluções empregadas nas medidas de potencial zeta, também puderam ser analisadas por espectroscopia no UV-vis, uma vez que a observação do máximo de absorção da banda de LSPR também pode ser útil na identificação de fenômenos de agregação decorrentes da desestabilização das nanopartículas a depender do meio empregado, nesse caso, a depender do pH do meio.

Para estudar a função da estabilização eletrostática, foi realizada a medida do potencial zeta das **NHC-COOH@AuNPs** em solução aquosa e foi observado um potencial zeta próximo a -25 mV em água MilliQ. Esse potencial zeta negativo é consistente com a presença de um carboxilato desprotonado do ligante NHC na superfície das nanopartículas. Em termos gerais, as nanopartículas com um potencial zeta acima de 25 mV ou abaixo de -25 mV têm sido descritas como estáveis, devido à presença de repulsão eletrostática adequada para mantê-las em suspensão de maneira constante.[142]

A análise do potencial zeta em diferentes valores de pH revelou que as nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** apresentam carga negativa sobre a superfície em pH entre 3 e 13. Em meio ácido (pH = 1 e pH = 2), no entanto, o potencial zeta aumenta para cerca de +25 mV. Assim, pode ser considerado que o ponto isoelétrico das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** está próximo de 2,5, ou seja, o pH em que ocorre o equilíbrio de cargas negativas e positivas na superfície das nanopartículas. Essas observações confirmam a hipótese de que os ligantes NHC continuam ligados à superfície das nanopartículas e que a hidrólise foi eficiente na formação do grupo ácido carboxílico.

Essa tendência de variação do potencial de superfície em função do pH foi observada também para nanopartículas similares, como no trabalho já mencionado de Young e colaboradores.[142]

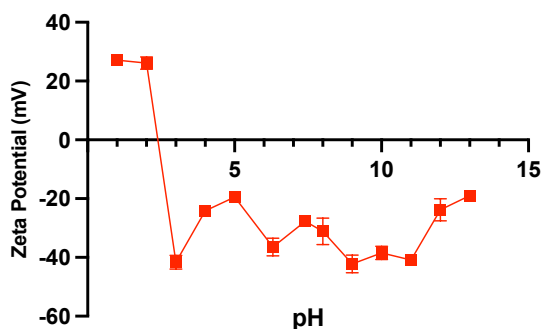


Figura 50 Valores de potencial zeta médio obtidos das **NHC-COOH@AuNPs** em soluções aquosas ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) com diferentes valores de pH. O potencial zeta de cada solução foi medido em triplicata e o desvio padrão obtido também é ilustrado.

Para o espectro de absorção na região do UV-vis das soluções de **NHC-COOH@AuNPs** em diferentes valores de pH, para além de pequenos desvios observados, pode se verificar também que não houve agregação, uma vez que os espectros não foram ampliados em comprimentos de onda próximos à região de 600 – 700 nm, indicando elevada estabilidade da banda LSPR, e consequentemente das nanopartículas, nas diferentes condições. Em meio ácido, pH 1—2, é

observado que eventualmente as nanopartículas precipitam, mas podem ser redispersas ao se basificar o meio novamente.

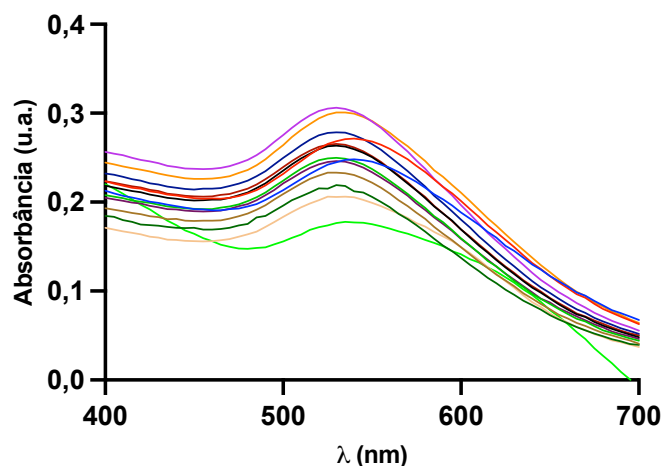


Figura 51 Espectros de absorção UV-Vis com foco na banda de LSPR de *NHC-COOH@AuNPs* em soluções aquosas $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ com diferentes valores de pH.

2.4.8.3 Estabilidade na presença de modelos de tiol

Em sistemas biológicos, moléculas como a glutatona e a albumina estão presentes em concentrações significativas e a interação de compostos de ouro com essas biomoléculas é bem estabelecida na literatura.[50] Como já mencionado, essas interações podem ser explicadas pela natureza aurofílica dos tióis e pelo fato de que os centros metálicos de ouro geralmente atuam como centros de ácido π -Lewis com afinidade por bases macias e nucleófilos. AuNPs geralmente têm uma afinidade especial por tióis devido à forte interação entre os átomos de enxofre nos grupos tiol (-SH) e a superfície do ouro. Razão pela qual as AuNPs são frequentemente usadas em aplicações que envolvem moléculas de tiol, como na funcionalização de superfícies ou na detecção de biomoléculas. No entanto, moléculas como a glutatona já demonstraram causar a degradação de nanopartículas de ouro.[142] Estudos sobre a reatividade entre AuNPs e moléculas-modelo podem ser úteis para entender a suscetibilidade das nanopartículas a sofrer reações colaterais na presença de moléculas tioladas. Além disso, pode-se entender mais sobre a estabilidade da ligação organometálica que ocorre entre a superfície da nanopartícula e os ligantes NHC.

Assim, um estudo de estabilidade foi realizado para avaliar a biocompatibilidade e a estabilidade das AuNPs em condições tamponadas (solução tampão de fosfato PBS, pH 7,4) na presença de *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) em concentrações plasmáticas de substâncias tioladas, como a glutatona.

Depois de expor as *NHC-COOH@AuNPs* a 2 mM de NAC, os espectros de UV-vis foram coletados ao longo do tempo, com intervalos entre 1 h e 24 h. Observa-se nos espectros (Figura

52) que mínimas variações na intensidade de absorção da banda LSPR são registrados, permanecendo a banda plasmônica essencialmente inalterada. Na região do UV, as intensidades de absorção relacionadas às transições no ligante NHC também são fracamente alteradas, sem quaisquer deslocamentos hipso- ou batocrômico. Essas observações confirmam a alta estabilidade das **NHC-COOH@AuNPs** em relação à agregação ou decomposição das nanopartículas na presença de NAC, podendo-se supor integridade estrutural mesmo na presença de moléculas tioladas.

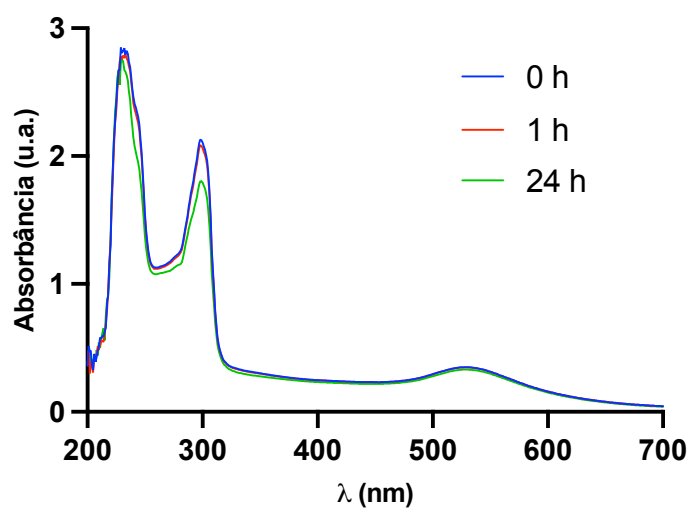


Figura 52 Espectros de absorção UV-Vis das **NHC-COOH@AuNPs** ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) na presença de NAC (2 mM , pH 7,4) em PBS nos tempos de 0 h, 1h e 24h.

2.4.9 Redução catalítica do 4-nitrofenol por nanopartículas NHC-COOH@AuNPs

Nanopartículas de ouro são consideradas excelentes catalisadores em uma variedade de reações químicas, graças a várias propriedades únicas que as tornam ideais para a catálise. As AuNPs possuem uma excelente área superficial devido ao tamanho nanométrico; essa relação superfície/volume ampliada aumenta a eficiência da catálise, permitindo que uma pequena quantidade de AuNPs realize um grande número de reações. Ainda, as propriedades eletrônicas das AuNPs são influenciadas pelo tamanho, podendo permitir a ativação de reações a temperaturas mais baixas e a catálise de reações que podem não ocorrer em partículas de tamanho maior.[123,124,148] Outras vantagens permeiam a versatilidade das AuNPs, especialmente aquelas estabilizadas por ligantes NHC, que podem ser funcionalizadas para permitir a adaptação de suas propriedades finais em diferentes reações, bem como a estabilidade das nanopartículas de ouro.[135]

A catálise emergiu de maneira significativa no campo da química inorgânica medicinal, representando uma ferramenta para gerar novos candidatos a fármacos e mitigar as limitações associadas aos metalo-fármacos convencionais.[149–151] Idealmente, os metalo-fármacos catalíticos demonstram especificidade, estabilidade em ambientes biológicos e minimizam a toxicidade, enquanto ainda mantêm uma atividade catalítica relevante. Essa atividade catalítica pode ser descrita como a capacidade de ativar uma pró-droga ou um fluoróforo, ou de modificar componentes ou processos celulares. Após a transformação catalítica, o catalisador permanece inalterado, permitindo sua reação com uma nova molécula alvo, gerando assim um efeito de amplificação. Essa amplificação resultaria, portanto, na redução da dose necessária de metalo-fármacos. Ainda, existe o potencial para reduzir ou eliminar os efeitos adversos, uma vez que o metalo-fármaco catalítico em si não é tóxico e afeta exclusivamente a molécula alvo desejada de forma específica.[149] Em reações bio-ortogonais, os catalisadores derivados de metais não-tóxicos, como o ouro, são particularmente interessantes para aplicações terapêuticas, dadas as já mencionadas inúmeras vantagens associadas às AuNPs, como boa biocompatibilidade, capacidade de agir como uma plataforma de *drug-delivery* e propriedades teranósticas.[149]

Nesse trabalho, como a alta estabilidade das nanopartículas foi demonstrada em condições aquosas, em diferentes valores de pH e na presença de tióis, as **NHC-COOH@AuNPs** puderam ser avaliadas como potenciais catalisadores em reações que ocorrem em meio aquoso. Assim, o desempenho catalítico das **NHC-COOH@AuNPs** foi investigado na redução de 4-nitrofenol a 4-aminofenol na presença de um agente redutor. Os nitrofenóis são compostos orgânicos, contendo grupos nitro, considerados grandes poluentes aquáticos, gerados por fontes agrícolas e

industriais.[152] A redução do 4-nitrofenol (4NP) utilizando NaBH_4 como agente redutor é amplamente reconhecida como um dos métodos mais populares para a redução de compostos nitro. Isso se deve ao fato de que, com base no potencial eletroquímico padrão do 4-nitrofenol, o processo de redução é termodinamicamente favorável. No entanto, a cinética da reação é desfavorável devido à repulsão entre íons negativos, como 4NP^- e BH_4^- . Portanto, é crucial a presença de um catalisador para acelerar a reação. O catalisador desempenha um papel fundamental na redução eficiente do 4-nitrofenol, facilitando a transferência de elétrons e diminuindo a barreira energética. A reação química resultante da redução catalítica do 4-nitrofenol é muito popular e amplamente estudada na avaliação do desempenho catalítico das AuNPs. Nessa reação, que ocorre em meio aquoso a temperatura ambiente, o 4-nitrofenol é convertido ao 4-aminofenol (com um grupo amino $-\text{NH}_2$) na presença de um agente redutor, geralmente o borohidreto de sódio (NaBH_4), e as AuNPs podem atuar como catalisadoras nesse processo (Figura 53).[153] Como reportado anteriormente, a redução de 4NP sem catalisador mostra conversão $<20\%$ mesmo após 142 minutos, indicando uma reação lenta.[154] A reação de 4-nitrofenol (4NP) pode ser monitorada por espectroscopia UV-Vis em função do tempo de reação. Isso se deve à redução da banda em torno de 400 nm, correspondente ao 4NP^- , e ao aumento simultâneo da intensidade de absorbância da banda em torno de 315 nm, correspondente ao 4-aminofenol (4AP). Normalmente, a presença das AuNPs como catalisadoras diminui a energia de ativação da reação, tornando-a eficiente e seletiva.

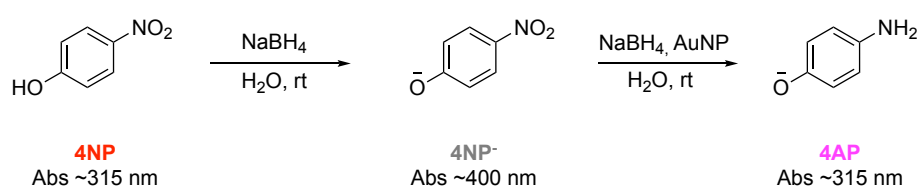


Figura 53. Esquema de reação da redução catalítica do substrato 4NP em fase aquosa, passando pelo intermediário 4NP^- , gerando a amina correspondente 4AP como produto. As espécies associadas absorvem a luz UV-visível em comprimentos de onda variados facilitando as suas identificações.

Além disso, sob essas condições experimentais, observou-se que o único produto gerado é o 4-aminofenol. O mecanismo preciso desta reação ainda não foi completamente elucidado; no entanto, um mecanismo proposto foi descrito por de Oliveira e colaboradores.[155] De acordo com a proposta, a etapa limitante da taxa na redução do 4-nitrofenol envolve a clivagem da ligação B-H do NaBH_4 para ativar os hidretos na superfície das AuNPs. Esses hidretos ativados são subsequentemente transferidos para o grupo nitro, resultando na sua redução para aminofenol em um processo de três etapas. É importante destacar que um excesso de NaBH_4 é fundamental nessa reação, pois uma quantidade significativa de hidretos ativados é liberada da superfície das

nanopartículas na forma de gás hidrogênio (H_2). Além disso, o uso de um excesso de $NaBH_4$ em relação ao 4-nitrofenol garante que a concentração de borohidreto permaneça essencialmente constante durante a reação e permite que essa reação seja tratada como pseudo-primeira ordem, facilitando a determinação da constante por meio de uma equação de primeira ordem.

O protocolo experimental para a reação catalisada foi baseado em procedimentos relatados na literatura.[156] A reação foi conduzida em três repetições e, em todos os casos, não foi alcançada uma conversão completa do 4NP. Isso pode ter ocorrido porque o $NaBH_4$ foi completamente consumido ou hidrolisado antes que todo o 4NP pudesse reagir. Esse fenômeno pode ser reconhecido pela estabilização da banda de absorção próxima a 400 nm.

Com base em curva de calibração obtida para o 4NP, utilizando-se a absorbância da banda em 400 nm para soluções de diferentes concentrações, e utilizando-se a equação de Lambert-Beer, o coeficiente de absorvidade molar foi obtido como sendo $17.239,32 M^{-1} cm^{-1}$.

O estudo cinético no UV-Vis da atuação catalítica das **NHC-COOH@AuNPs** na redução do 4NP está representado na Figura 54. Observa-se no espectro a banda de absorção característica do 4NP em 400 nm, bem como as bandas associadas às nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** em 525 nm (banda LSPR) e na região do UV (transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ no ligante NHC). A seta na figura aponta para a diminuição da intensidade de absorbância do substrato 4NP no decorrer da reação de redução para formação do produto 4AP, indicando que a nanopartícula é cataliticamente ativa. Assim, de acordo com a equação mencionada, pode-se calcular a constante de reação na presença das **NHC-COOH@AuNPs** e a constante foi $k = 0,13 \pm 0,01 min^{-1}$. Também fica claro no espectro UV-vis e no gráfico de evolução da absorbância da Figura 54 que a concentração de 4NP começou a se estabilizar após 7 minutos. As nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** exibem uma eficiência catalítica moderada, alcançando aproximadamente 75% de conversão do substrato em apenas 8 minutos.

Em 2022, Casini e colaboradores sintetizaram nanopartículas de ouro solúveis com ligantes NHC sulfonados, sendo que os seus potenciais catalíticos de conversão do 4NP foram avaliados.[156] Nesse trabalho, a AuNP apresentou alta eficiência catalítica, com a conversão do substrato atingindo 81% após apenas 1,5 minutos de reação, com uma constante de conversão de $1,4 min^{-1}$ (sob as mesmas condições experimentais desta tese), ou seja, cerca de 10 vezes maior que as **NHC-COOH@AuNPs**. Outros catalisadores derivados de nanopartículas de ouro foram avaliados variando-se suas concentrações, sendo observado em alguns casos a atividade catalítica dependente da concentração, como no interessante trabalho de Shen e colaboradores[157], que

obtiveram AuNPs cataliticamente ativas por métodos biogênicos e observaram quase total consumo do substrato 4NP em até 120 segundos de reação.

Esses resultados demonstram preliminarmente que as nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** têm potencial como catalisadores em reações de redução. A fim de diminuir esse tempo para a conversão completa do substrato e otimizar ainda mais o potencial catalítico das nanopartículas, pode se investir em outros agentes redutores na metodologia *bottom-up* de formação das AuNPs que gerem partículas ainda menores, proporcionando uma relação área de superfície/volume mais favorável ou mesmo alterações na morfologia final da nanopartícula.

Para melhor entender o perfil catalítico das nanopartículas, no entanto, o teor de ouro de cada amostra deverá ser determinado por técnicas como ICP-MS e XPS para se investigar a porcentagem de Au(I)/Au(0).

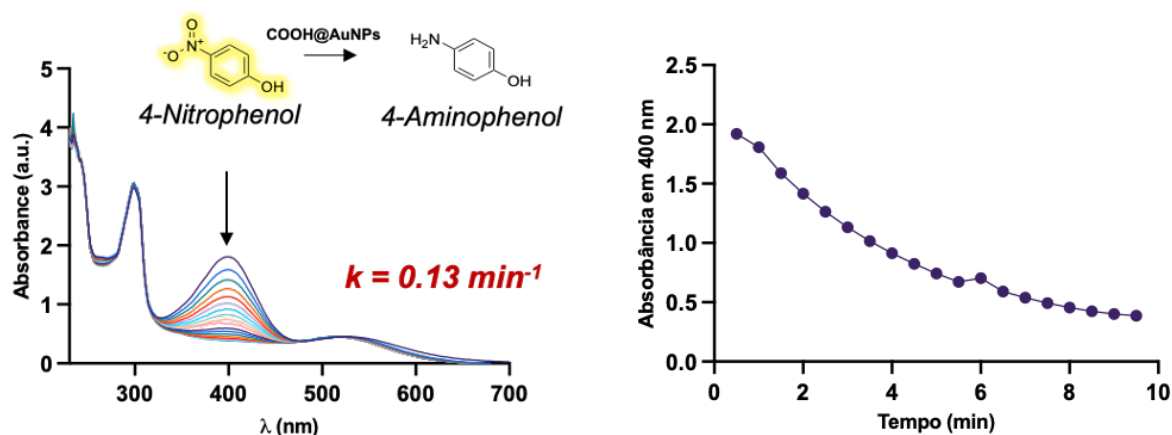


Figura 54 Espectros do UV-visível obtidos a cada 30 segundos durante a reação de redução do 4NP catalisada pelas AuNPs (esquerda). À direita, tem-se o gráfico de evolução da intensidade de absorbância em 400 nm com relação ao tempo de reação avaliado.

Ainda na Figura 54, observa-se que as bandas de transição do UV-vis associadas às nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** permanecem virtualmente inalteradas durante a catálise: a banda LSPR não tem seu comprimento de onda máximo deslocado e a intensidade de absorção permanece constante, enquanto as bandas na região do UV do ligante NHC também não sofrem variações significativas. Essas observações sugerem que, apesar de uma constante de reação relativamente baixa, as nanopartículas catalisam a redução do 4NP conservando sua estrutura química e não sofrem de fenômenos de agregação ou precipitação.

2.4.10 Conjugação de AuNPs em reações de acoplamento amídico

Nos últimos anos, as nanopartículas de ouro também emergiram como promissoras plataformas de *drug-delivery* devido às suas propriedades intrínsecas já mencionadas. Uma das principais vantagens das nanopartículas nesse sentido é a possibilidade de controlar seu tamanho e forma durante a síntese, permitindo um *design* direcionado para atender às necessidades específicas de uma aplicação otimizando a eficiência terapêutica.[69,158]

Outra vantagem é que as nanopartículas de ouro são altamente estáveis e biocompatíveis, tornando-as adequadas para uso em sistemas biológicos. Sua superfície pode ser modificada com a conjugação de proteínas, anticorpos ou mesmo pequenas moléculas terapêuticas possibilitando o direcionamento específico das nanopartículas para células ou tecidos-alvo. Essa estratégia pode reduzir a toxicidade em células saudáveis e aumentar a eficácia da terapia.[159]

Ainda, considerando que as nanopartículas de ouro podem atuar como agentes em terapia fototérmica ou como agentes de contraste para imagem médica, a pesquisa também se concentra em abordagens de terapias combinadas com esse tipo de nanomaterial.[119]

A conjugação de nanopartículas de ouro com biomoléculas resulta, então, na criação de materiais híbridos que possibilitam a interação das nanopartículas metálicas com sistemas biológicos.[160,161] Atualmente, existem quatro principais estratégias para a bioconjugação:

- i) Adsorção (incluindo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals);
- ii) Quimissorção, por exemplo, usando grupos tiol;
- iii) Acoplamento covalente, explorando grupos funcionais presentes tanto nas partículas quanto nas biomoléculas;
- iv) Ligação não-covalente, baseada na afinidade entre sistemas receptor-ligante.

A adsorção física é o método mais simples e amplamente utilizado, mas geralmente resulta em orientação aleatória de moléculas conjugadas, levando a uma reprodutibilidade limitada. A conjugação mais estável de moléculas na superfície de AuNPs, com melhor reprodutibilidade, é alcançada por meio de ligação covalente.[162]

Grupos carboxílicos disponíveis podem reagir com aminas primárias por meio de uma reação de condensação para produzir ligações amídicas, então, como prova de conceito, é descrita a conjugação de aminas de interesse para reação de acoplamento amida no grupo ácido carboxílico da superfície das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs**.

A 7-amino-4-metilcumarina (7AMC) faz parte de um conjunto de cumarinas, com mais de 1.300 representantes identificadas na natureza, principalmente em plantas verdes. Essas cumarinas são reconhecidas por sua capacidade de atuar como eliminadoras de radicais livres, bem como por

suas propriedades anticâncer, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiproliferativas, antibacterianas, anti-HIV e antifúngicas.[163]

A 7AMC (Figura 55) é um composto que exibe fluorescência, com uma excitação máxima em 341 nm e uma emissão máxima em 441 nm. A classe de compostos a qual pertence a 7AMC é usada comumente como marcadores fluorescentes de peptídeos, ferramentas versáteis para a detecção e localização de atividades de enzimas proteolíticas.[164]

O acoplamento das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs**, contendo o grupo -COOH, e a 7AMC, molécula biorelevante contendo o grupamento amina, pode amplificar as propriedades biológicas do derivado cumarina, bem como oferecer uma plataforma de *drug-delivery* para a molécula que é inerentemente hidrofóbica. Além disso, o acoplamento que forma o grupo amida pode ocasionar a supressão da fluorescência, oferecendo um meio prático e rápido de se verificar o sucesso da reação, como demonstrado no trabalho de Žamojć e colaboradores.[165]

O esquema de reação de formação do grupo amida é representado na Figura 55.

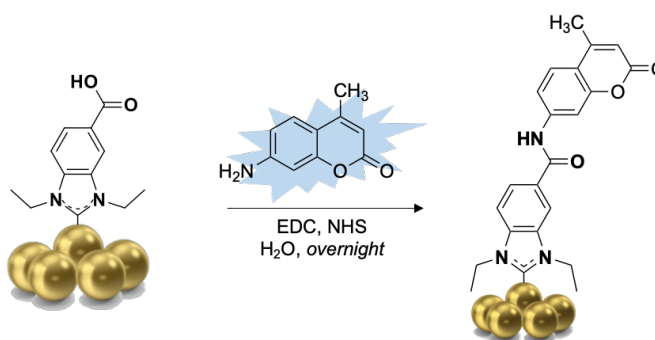


Figura 55 Esquema representativo da reação de acoplamento amida entre as nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** e a amina fluorescente 7AMC, na presença de EDC/NHS em ambiente aquoso.

A estratégia adotada neste trabalho envolveu o estudo do acoplamento covalente da amina 7AMC na superfície das AuNPs, utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e o grupo intermediário estabilizador *N*-hidroxissuccinimida (NHS), amplamente conhecidos como o protocolo EDC/NHS para reações de acoplamento com biomoléculas. Em resumo, o EDC/NHS foi usado para ativar o grupo funcional -COOH das nanopartículas, o que facilita a reação posterior com o grupamento amina. O mecanismo de acoplamento empregando-se os agentes acopladores EDC/NHS é bem discutido na literatura e já foi utilizado para o acoplamento de metalo-fármacos de Pt(IV) e nanopartículas de ouro por Lippard e colaboradores.[132] O mecanismo de ativação inicial envolve a incorporação de um grupo OH do ácido carboxílico a uma das ligações duplas do reagente carbodiimida, levando à formação do intermediário instável *O*-aciluréia, chamado também de ácido carboxílico “ativado”. Esse intermediário pode, ainda, ser

hidrolisado restaurando o ácido carboxílico inicial. E, embora esse intermediário possa reagir diretamente com uma amina primária, essa reação apresenta algumas limitações, incluindo cinética de reação lenta, suscetibilidade à hidrólise e possibilidade de rearranjo para uma *N*-acilureia não reativa. O NHS é introduzido justamente para aumentar a eficácia da ativação inicial, aumentando a estabilidade dos intermediários e gerando um éster ativo que se mostra um melhor grupo abandonador.

O procedimento experimental foi baseado em metodologia descrita para o acoplamento amídico de nanopartículas de ouro estabilizadas por ligantes tióis com peptídeos, descrito por Bartczak e colaboradores.[141] Devido à natureza hidrofílica das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** e demais reagentes, a cumarina fluorescente foi preparada como uma solução-estoque em DMF. Para minimizar efeitos de *self-quenching*, a concentração da amina 7AMC foi mantida constante (50 μ M). No espectrofluorímetro, utilizando um comprimento de onda de excitação de 340 nm, o espectro da amina 7AMC isolada foi registrado, onde observa-se a emissão de fluorescência próxima de 450 nm. Após a adição da mistura ativada **NHC-COOH@AuNPs/EDC/NHS** à amina, a supressão parcial da fluorescência foi imediatamente observada (tempo 0 h), indicando que o produto resultante do acoplamento amídico não é fortemente luminescente. Deixando-se a mistura reagir por mais 16 horas, é observado que a supressão da fluorescência continua e atinge seu máximo sob essas condições (Figura 56).

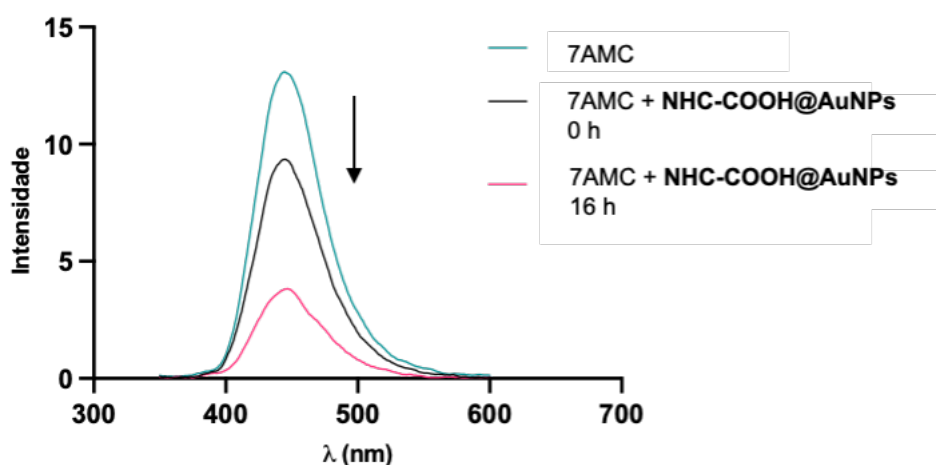


Figura 56 Espectro de fluorescência de emissão da amina 7AMC livre e na presença dos reagentes para o acoplamento amídico **NHC-COOH@AuNPs/EDC/NHS** imediatamente após o início da reação (0 h) e após deixar reagirem overnight.

O espectro UV-visível da reação após 16 h encontra-se na Figura 57. No espectro, as bandas associadas à amina 7AMC são observadas. Em 334 nm, tem-se a banda característica dessa

classe de compostos, responsável por seu forte perfil luminescente e, em 230 nm, a banda decorrente das transições associadas ao sistema π . Já em 296 nm, a absorção pode ser relacionada ao anel benzimidazol presente na fração orgânica das **NHC-COOH@AuNPs**, com um leve desvio hipsocrômico com relação à nanopartícula isolada. A banda LSPR tem uma intensidade baixa, no entanto, dentro do esperado para a concentração da solução e próxima da intensidade inicial (DO = 0,3). Não foram observados a olho nu ou no espectro de absorção sinais de agregação, degradação ou mesmo precipitação das nanopartículas no meio reacional, confirmando ao menos um certo grau de estabilidade nas condições empregadas.

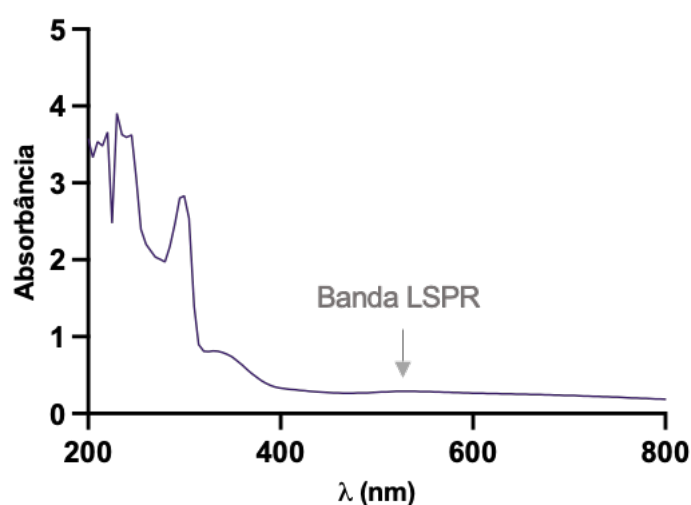


Figura 57 Espectro de absorção no UV-visível das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** submetidas à reação de conjugação com 7AMC (segundo-se o protocolo EDC/NHS) após 16 horas.

A intensidade da fluorescência foi avaliada em uma solução de 7AMC (50 μM) em duas condições: primeiro, na ausência da mistura ativada **NHC-COOH@AuNPs/EDC/NHS** e, em seguida, na presença de diferentes concentrações do supressor, variando a concentração de 0,00 mg mL^{-1} a 0,16 mg mL^{-1} . Após cada adição, a solução foi agitada suavemente para garantir uma distribuição uniforme e a intensidade da fluorescência foi registrada. A Figura 58 contém o resultado do experimento, com o espectro de fluorescência de emissão (esquerda) e a relação da intensidade de emissão em 450 nm com a concentração de nanopartículas (direita). Observa-se que a mistura ativada **NHC-COOH@AuNPs/EDC/NHS** suprime eficientemente a fluorescência da amina nas condições empregadas. Ainda, a intensidade da fluorescência de emissão da amina 7AMC decresce aproximadamente linearmente até a concentração de 0,05 mg mL^{-1} .

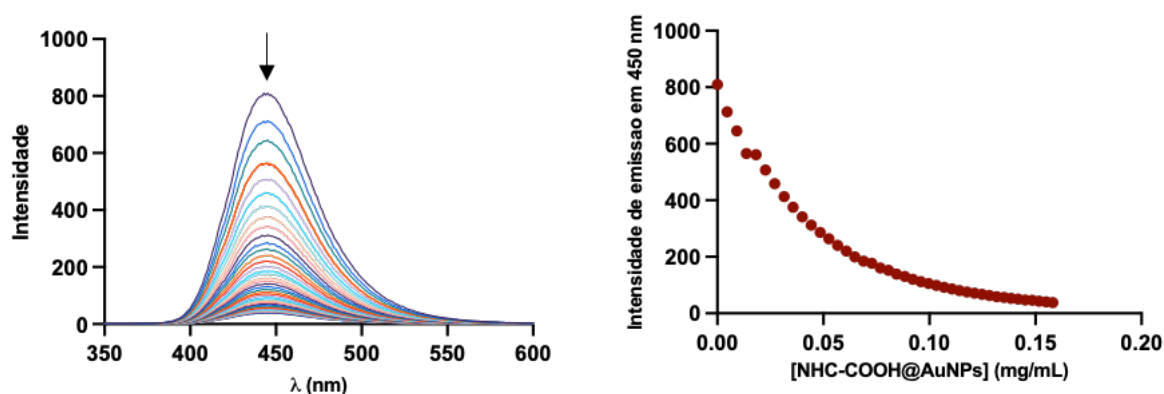


Figura 58 Espectro de fluorescência de emissão da amina 7AMC na ausência e na presença de concentrações crescentes da mistura ativada **NHC-COOH@AuNPs**/EDC/NHS. A seta indica que a emissão que ocorre próxima a 450 nm é suprimida com a titulação.

Ainda, como mencionado, deve-se considerar a possibilidade de auto-extinção da fluorescência ou *self-quenching*, um fenômeno que ocorre quando as moléculas de fluoróforos estão muito próximas umas das outras, a ponto de as interações entre elas reduzirem a intensidade ou até mesmo extinguirem a fluorescência emitida. Para investigar esse fenômeno, a amina 7AMC foi preparada na mesma concentração do experimento de titulação e o seu espectro foi registrado periodicamente em um intervalo total de 2h. Nenhum efeito significativo de *self-quenching* foi observado, demonstrando que a concentração da amina 7AMC foi adequado (Figura 86).

Para demonstrar que a supressão da fluorescência da amina 7AMC não é decorrente de efeitos de diluição durante a titulação da solução contendo a mistura ativada **NHC-COOH@AuNPs**/EDC/NHS, o espectro de fluorescência foi registrado na ausência das nanopartículas e na presença dos reagentes acopladores usados neste trabalho e, adicionando-se solvente suficiente para garantir a mesma diluição resultante com o fim da titulação. Observa-se na Figura 59 que o efeito da diluição e/ou da presença dos reagentes acopladores EDC/NHS na intensidade de emissão da amina 7AMC é mínimo, evidenciando que o mecanismo de supressão da fluorescência está associado à presença das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs**.

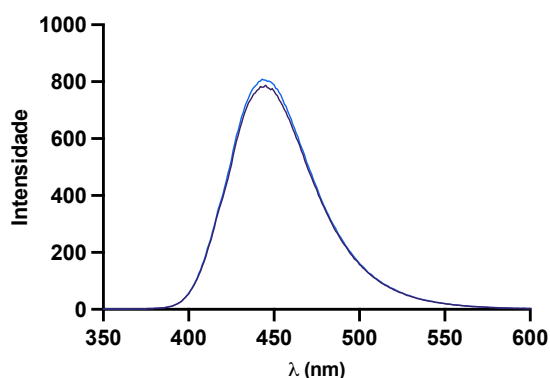


Figura 59 Espectro de emissão de fluorescência da amina 7AMC em H_2O ($50 \mu M$, linha azul) e da amina 7AMC em uma solução aquosa contendo os reagentes EDC/NHS ($40 \mu M$, linha preta).

Os experimentos-controle realizados mostram-se importantes para entender se os efeitos de supressão da fluorescência observados podem ser atribuídos à interação efetiva entre a amina fluorescente 7AMC e as nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs**, podendo-se supor que o acoplamento amídico ocorre, restando-se investigar a reversibilidade desta interação. Dessa forma, tem-se evidências de que as **NHC-COOH@AuNPs** são potenciais plataformas de (bio)conjugação em reações de acoplamento para formação de grupo amida.

2.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse capítulo, descreveu-se a síntese e estudos preliminares para aplicação em catálise e conjugação de novas nanopartículas de ouro com grupos carboxilatos a partir de ligantes NHC funcionalizados. Os experimentos realizados confirmaram a eficácia da síntese das nanopartículas **NHC-COOEt@AuNPs** funcionalizadas com um grupo éster por meio da abordagem *bottom-up*, seguida da hidrólise para gerar as nanopartículas carboxiladas análogas **NHC-COOH@AuNPs**. A caracterização das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** envolveu técnicas como espectroscopias de RMN de ^1H , UV-vis e infravermelho, potencial zeta, análise termogravimétrica e TEM, evidenciando a composição química, morfologia e estabilidade térmica das amostras produzidas. As nanopartículas de ouro têm cerca de 6 nm, morfologia esférica e apresentam a banda plasmônica em 525 nm.

Os grupos carboxilatos conferem às nanopartículas solubilidade ou dispersibilidade em água, o que é particularmente interessante pois abre novas possibilidades de aplicação em sistemas aquosos, em potenciais aplicações terapêuticas, ambientais ou de interesse biotecnológico. Assim, as **NHC-COOH@AuNPs** foram avaliadas quanto às suas estabilidades coloidais no UV-vis em água por intervalos regulares de tempo de até 24 horas. As AuNPs mostraram-se particularmente estáveis em água, não sendo observados efeitos de agregação ou precipitação. Ainda, as **NHC-COOH@AuNPs** foram avaliadas em uma grande faixa de pH e variações mínimas quanto à banda LSPR foram registradas. Em meio ácido, como esperado, as nanopartículas apresentam menor estabilização eletrostática decorrente da protonação do ácido carboxílico e podem ocorrer fenômenos de agregação.

A estabilidade das nanopartículas **NHC-COOH@AuNPs** em meios biologicamente relevantes (PBS e NAC) também foi demonstrada, bem como resultados preliminares de reações de acoplamento amídico na superfície das nanopartículas. Esses estudos apontam para a possibilidade de se utilizar as nanopartículas em sistemas biológicos e promover reações de bioconjugação, permitindo o desenvolvimento de novos nanofármacos como sistemas de liberação controlada.

Ainda, o potencial catalítico das **NHC-COOH@AuNPs** foi demonstrado na reação de redução do 4-nitrofenol em meio aquoso, sendo que as nanopartículas mostraram-se cataliticamente ativas. Essas observações dão suporte para pesquisas futuras envolvendo a investigação do desempenho catalítico das **NHC@AuNPs** em reações mais relevantes do ponto de vista biológico, como em reações bio-ortogonais para realização de catálise dentro das células.

Apesar dos resultados preliminares positivos obtidos neste trabalho, ainda existem desafios a serem superados, como a compreensão mais detalhada da composição das nanopartículas a fim de se investigar o teor de Au(I) e Au(0) na amostra, bem como a relação ligantes NHC/Au e entender o grau de funcionalização da superfície das AuNPs. Esses estudos encontram-se em andamento utilizando-se técnicas de ICP-MS e XPS.

Além disso, a toxicidade *in vitro* das nanopartículas de ouro **NHC-COOH@AuNPs** deve ser determinada em linhagens tumorais e não-tumorais. Assim, pode-se investigar a possibilidade dessas nanopartículas atuarem como uma nova plataforma teranóstica, com possíveis aplicações terapêuticas e de diagnóstico por imagem, como na determinação de seus potenciais como agentes antitumorais com foco na terapia fototérmica e como agentes de contraste em imageamento fotoacústico.

Em termos gerais, este trabalho contribui para o entendimento das nanopartículas de ouro solúveis com ligantes NHC e de elevada estabilidade, abrindo novas perspectivas para suas aplicações em catálise e como plataforma para a conjugação de moléculas, com potencial para impactar significativamente áreas como a medicina e a nanotecnologia.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer, uma designação dada para um conjunto de mais de 100 doenças, é considerado a doença do século XXI. Mais de 10 milhões de pessoas morrem anualmente no mundo todo em decorrência do câncer e suas complicações. Compostos de ouro são uma classe de metalo-fármacos com grande potencial como agentes bioativos, especialmente no diagnóstico e na quimioterapia do câncer. A pesquisa atual dessa classe de compostos concentra-se principalmente na concepção de fármacos moleculares com atividades farmacológicas superiores, incluindo estratégias de direcionamento, além de visar melhorar as propriedades físico-químicas, como estabilidade química e solubilidade em ambientes fisiológicos. Adicionalmente, a capacidade de modificar a superfície de nanomateriais, como as nanopartículas de ouro, com diversos compostos funcionais e direcionados, bem como suas propriedades teranósticas únicas, amplia consideravelmente seu potencial para aplicações em nanomedicina para tratamento de câncer. Desta forma, no presente procurou-se desenvolver compostos de ouro de interesse farmacológico para contribuir para a biblioteca de compostos moleculares e nanomateriais. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: i) o desenvolvimento de novos complexos organometálicos de ouro(III) com ligantes ditiocarbamato e ii) o desenvolvimento de nanopartículas de ouro com ligantes NHC solúveis em ambientes aquosos e biocompatíveis.

Os compostos organometálicos de ouro(III) com ligantes ditiocarbamato sintetizados foram avaliados quanto ao potencial antiproliferativo contra linhagens de células de tumores de mama humana, MCF-7 e MDA-MB-231, e quanto às interações com biomoléculas relevantes. Constataram-se a alta estabilidade química dos compostos e uma atividade antiproliferativa significativa contra linhagens de células tumorais de mama humana, bem como um modo de ação que pode estar associado à interação com moléculas tioladas do meio fisiológico.

Nanopartículas de ouro (AuNP) com ligantes NHC, tamanho médio entre 5 – 6 nm, banda plasmônica próxima a 525 nm e com potencial para serem utilizadas como agentes em terapia fototérmica, foram preparadas. A AuNP solúvel em água demonstrou estabilidade química em meio aquoso, em uma grande faixa de pH e na presença de biomoléculas relevantes. Seu uso como catalisador também foi preliminarmente avaliado, bem como em reações de conjugação amídica, demonstrando o potencial dessa AuNP em atuar em reações de catálise em células vivas, como por exemplo em reações bio-ortogonais.

Apesar de nenhum composto de ouro ser atualmente usado em tratamento padrão para o câncer, os temas abordados demonstram a versatilidade desse metal em atuar como composto bioativo em medicina, assim como em sistemas catalíticos, podendo contribuir para o

desenvolvimento da biblioteca de metalo-fármacos que serão usados no diagnóstico e tratamento do câncer e em Química Medicinal.

REFERÊNCIAS

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. **2021**;71:7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>.
- [2] Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **2016**;25(1):16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>.
- [3] Msemburi W, Karlinsky A, Knutson V, Aleshin-Guendel S, Chatterji S, Wakefield J. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. *Nature*. **2023**;613:130–137. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05522-2>.
- [4] Chhikara BS, Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*. **2023**;10(1):451–451. (acessado em 24 de agosto de 2023). <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>.
- [5] Tachibana BMT, Ribeiro RLM, Federicci ÉEF, Feres R, Lupinacci FAS, Yonekura I, Racy ACS. The delay of breast cancer diagnosis during the COVID-19 pandemic in São Paulo, Brazil. *Einstein (Sao Paulo)*. **2021**;19:eAO6721. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021AO6721.
- [6] Santos MO, Lima FCdS, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LMd, Cancela MC. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **2023**;69(1):e-213700. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>.
- [7] Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*. **2017**;4(4):127-129 <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.
- [8] Lewandowska A, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer – review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. **2019**;26(1):1–7. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>.
- [9] Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*. **2015**;72:333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>.
- [10] Liao M, Zhang J, Wang G, Wang L, Liu J, Ouyang L, Liu B. Small-Molecule Drug Discovery in Triple Negative Breast Cancer: Current Situation and Future Directions. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2021**;64(5):2382–2418. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01180>.
- [11] Gonçalves H, Guerra MR, Duarte Cintra JR, Fayer VA, Brum IV, Bustamante Teixeira MT. Survival Study of Triple-Negative and Non-Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. **2018**;12. <https://doi.org/10.1177/1179554918790563>.
- [12] Sineshaw HM, Gaudet M, Ward EM, Flanders WD, Desantis C, Lin CC, Jemal A. Association of race/ethnicity, socioeconomic status, and breast cancer subtypes in the National Cancer Data Base (2010-2011). *Breast Cancer Research and Treatment*. **2014**;145:753–763. <https://doi.org/10.1007/S10549-014-2976-9>.
- [13] Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez D, Blake-Cerda M, Arce C, Motola-Kuba D, Villarreal-Garza C, González-Angulo AM, Bargalló E, Aguilar JL, Mohar A, Arrieta Ó.

- Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer*. **2011**;117:3658–3669. <https://doi.org/10.1002/CNCR.25961>.
- [14] Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. **2016**;11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157368>.
- [15] Wu Q, Sharma D. Autophagy and Breast Cancer: Connected in Growth, Progression, and Therapy. *Cells*. **2023**;12:1156. <https://doi.org/10.3390/cells12081156>.
- [16] Vojtek M, Marques MPM, Ferreira IMPLO, Mota-Filipe H, Diniz C. Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer. *Drug Discovery Today*. **2019**;24(4):1044–1058. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2019.02.012>.
- [17] Nayeem N, Contel M. Exploring the Potential of Metallodrugs as Chemotherapeutics for Triple Negative Breast Cancer. *Chemistry - A European Journal*. **2021**;27:8891–8917. <https://doi.org/10.1002/chem.202100438>.
- [18] Kumari L, Mishra L, Patel P, Sharma N, Das Gupta G, Das Kurmi B. Emerging targeted therapeutic strategies for the treatment of triple-negative breast cancer. *Journal of Drug Targeting*. **2023**;31(9):889–907. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2023.2245579>.
- [19] Entezari M, Yousef Abad GG, Sedghi B, Ettehadi R, Asadi S, Beiranvand R, Haratian N, Karimian SS, Jebali A, Khorrami R, Zandieh MA, Saebfar H, Hushmandi K, Salimimoghdam S, Rashidi M, Taheriazam A, Hashemi M, Ertas YN. Gold nanostructure-mediated delivery of anticancer agents: Biomedical applications, reversing drug resistance, and stimuli-responsive nanocarriers. *Environmental Research*. **2023**;225:115673. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.115673>.
- [20] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. **2006**;25:4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>.
- [21] Kaufmann SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*. **2003**;22:7414–7430. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206945>.
- [22] Rosenberg B. Platinum Complexes for the Treatment of Cancer. *Interdisciplinary Science Reviews*. **2013**;3(2):134–147. <https://doi.org/10.1179/030801878791926119>.
- [23] Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. **2021**;21:37–50. <https://doi.org/10.1038/S41568-020-00308-Y>.
- [24] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. **2007**;7:573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- [25] Huaizhi Z, Yuantao N. China's ancient gold drugs. *Gold Bulletin*. **2001**;34:24–29. <https://doi.org/10.1007/BF03214805>.

- [26] Rubbiani R, Wahrig B, Ott I. Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **2014**;19:961–965. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1135-4>.
- [27] Berners-Price SJ, Filipovska A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics*. **2011**;3(9):863–873. <https://doi.org/10.1039/C1MT00062D>.
- [28] Higby GJ. Gold in medicine. *Gold Bulletin*. **1982**;15:130–140. <https://doi.org/10.1007/BF03214618>.
- [29] Allardyce CS, Dyson PJ. Metal-based drugs that break the rules. *Dalton Transactions*. **2016**;45:3201–3209. <https://doi.org/10.1039/C5DT03919C>.
- [30] Delgado G, Condé C, Santos H, Navarro M. Compostos quimioterápicos de ouro: uma visão geral dos complexos anticâncer de Au(I/III) em relação à estrutura do ligante. *Química Nova*. **2020**;43(8):1104–1124 <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170566>.
- [31] Shen S, Shen J, Luo Z, Wang F, Min J. Molecular mechanisms and clinical implications of the gold drug auranofin. *Coordination Chemistry Reviews*. **2023**;493:215323. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215323>.
- [32] Rothan HA, Stone S, Natekar J, Kumari P, Arora K, Kumar M. The FDA-approved gold drug auranofin inhibits novel coronavirus (SARS-COV-2) replication and attenuates inflammation in human cells. *Virology*. **2020**;547:7–11. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2020.05.002>.
- [33] Biji A, Khatun O, Swaraj S, Narayan R, Rajmani RS, Sardar R, Satish D, Mehta S, Bindhu H, Jeevan M, Saini DK, Singh A, Gupta D, Tripathi S. Identification of COVID-19 prognostic markers and therapeutic targets through meta-analysis and validation of Omics data from nasopharyngeal samples. *eBioMedicine*. **2021**;70:103525. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103525>.
- [34] Casini A, Messori L. Molecular Mechanisms and Proposed Targets for Selected Anticancer Gold Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2011**;11(21):2647–2660. <https://doi.org/10.2174/156802611798040732>.
- [35] Milacic V, Fregona D, Dou QP. Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs. *Histology and Histopathology*. **2008**;23:101–108. <https://doi.org/10.14670/HH-23.101>.
- [36] Yeo CI, Ooi KK, Tiekink ERT. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules*. **2018**;23:1410. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061410>.
- [37] Pratesi A, Cirri D, Fregona D, Ferraro G, Giorgio A, Merlino A, Messori L. Structural Characterization of a Gold/Serum Albumin Complex. *Inorganic Chemistry*. **2019**;58:10616–10619. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01900>.
- [38] Giorgio A, Merlino A. Gold metalation of proteins: Structural studies. *Coordination Chemistry Reviews*. **2020**;407:213175. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2019.213175>.

- [39] Zou T, Lum CT, Lok CN, Zhang JJ, Che CM. Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chemical Society Reviews*. **2015**;44:8786–8801. <https://doi.org/10.1039/C5CS00132C>.
- [40] Sánchez Delgado GY, do C. Ferreira FH, Paschoal DFS, Dos Santos HF. The role of tridentate ligands on the redox stability of anticancer gold(III) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2022**;236:111970. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2022.111970>.
- [41] Glišić BD, Rajkovic S, Stanic ZD, Djuran MI. A spectroscopic and electrochemical investigation of the oxidation pathway of glycyl-D,L-methionine and its N-acetyl derivative induced by gold(III). *Gold Bulletin*. **2011**;44:91–98. <https://doi.org/10.1007/s13404-011-0014-9>
- [42] Shaw CF. Gold-Based Therapeutic Agents. *Chemical Reviews*. **1999**;99(9):2589–2600. <https://doi.org/10.1021/CR980431O>.
- [43] Berners-Price SJ, Sadler PJ. Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity. *Bioinorganic Chemistry. Structure and Bonding*. Springer, Berlin, Heidelberg, **1988**;70:27–102. https://doi.org/10.1007/3-540-50130-4_2.
- [44] Modica-Napolitano JS, Aprile JR. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**;49:63–70. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00125-9).
- [45] Filomeni G, Piccirillo S, Graziani I, Cardaci S, Da Costa Ferreira AM, Rotilio G, Ciriolo MR. The isatin-Schiff base copper(II) complex Cu(II) acts as delocalized lipophilic cation, yields widespread mitochondrial oxidative damage and induces AMP-activated protein kinase-dependent apoptosis. *Carcinogenesis*. **2009**;30(7):1115–1124. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGP105>.
- [46] Qian K, Chen H, Qu C, Qi J, Du B, Ko T, Xiang Z, Kandawa-Schulz M, Wang Y, Cheng Z. Mitochondria-targeted delocalized lipophilic cation complexed with human serum albumin for tumor cell imaging and treatment. *Nanomedicine*. **2020**;23:102087. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102087>.
- [47] Ott I. Medicinal Chemistry of Metal N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complexes. *Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells*. Elsevier, **2017**:147–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803814-7.00005-8>.
- [48] Baker MV, Barnard PJ, Berners-Price SJ, Brayshaw SK, Hickey JL, Skelton BW, White AH. Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure and anti-mitochondrial activity. *Dalton Transactions*. **2006**:3708–3715. <https://doi.org/10.1039/B602560A>.
- [49] Hickey JL, Ruhayel RA, Barnard PJ, Baker MV, Berners-Price SJ, Filipovska A. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *Journal of the American Chemical Society*. **2008**;130:12570–12571. <https://doi.org/10.1021/ja804027j>.

- [50] Da Silva Maia PI, Deflon VM, Abram U. Gold(III) complexes in medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*. **2014**;6:1515–1536. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.87>.
- [51] Radisavljević S, Petrović B. Gold(III) Complexes: An Overview on Their Kinetics, Interactions With DNA/BSA, Cytotoxic Activity, and Computational Calculations. *Frontiers in Chemistry*. **2020**;8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00379>.
- [52] Engman L, McNaughton M, Gajewska M, Kumar S, Birmingham A, Powis G. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold(III) compounds. *Anticancer Drugs*. **2006**;17(5):539–544. <https://doi.org/10.1097/00001813-200606000-00007>.
- [53] Fricker SP, Mosi RM, Cameron BR, Baird I, Zhu Y, Anastassov V, Cox J, Doyle PS, Hansell E, Lau G, Langille J, Olsen M, Qin L, Skerlj R, Wong RSY, Santucci Z, McKerrow JH. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2008**;102(10):1839–1845. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.05.010>.
- [54] Parish RV, Mack J, Hargreaves L, Wright JP, Buckley RG, Elsome AM, Fricker SP, Theobald BRC. Chemical and biological reactions of diacetato[2-(dimethylaminomethyl)-phenyl]gold(III), [Au(O₂CMe)₂(dmamp)]. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. **1996**;69–74. <https://doi.org/10.1039/DT9960000069>.
- [55] Omae I. Five-membered ring products as universal reagents. *Cyclometalation reactions*. Springer, Tokyo. **2014**;1–208. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-54604-7>.
- [56] Williams MRM, Bertrand B, Hughes DL, Waller ZAE, Schmidt C, Ott I, O'Connell M, Searcey M, Bochmann M. Cyclometallated Au(III) dithiocarbamate complexes: synthesis, anticancer evaluation, and mechanistic studies. *Metallomics*. **2018**;10:1655–1666. <https://doi.org/10.1039/c8mt00225h>.
- [57] Mertens RT, Parkin S, Awuah SG. Cancer cell-selective modulation of mitochondrial respiration and metabolism by potent organogold(III) dithiocarbamates. *Chemical Science*. **2020**;11:10465–10482. <https://doi.org/10.1039/d0sc03628e>.
- [58] Abbehausen C. Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds-an update. *Metallomics*. **2019**;11:15–28. <https://doi.org/10.1039/c8mt00262b>.
- [59] Gabbiani C, Messori L. Protein Targets for Anticancer Gold Compounds: Mechanistic Inferences. *Anticancer Agents in Medical Chemistry*. **2012**;11(10):929–939. <https://doi.org/10.2174/187152011797927607>.
- [60] Abbehausen C, De Paiva REF, Bjornsson R, Gomes SQ, Du Z, Corbi PP, Lima FA, Farrell N. X-ray Absorption Spectroscopy Combined with Time-Dependent Density Functional Theory Elucidates Differential Substitution Pathways of Au(I) and Au(III) with Zinc Fingers. *Inorganic Chemistry*. **2018**;57:218–230. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02406>.
- [61] Wenzel MN, Meier-Menches SM, Williams TL, Rämisch E, Barone G, Casini A. Selective targeting of PARP-1 zinc finger recognition domains with Au(III) organometallics. *Chemical Communications*. **2018**;54:611–614. <https://doi.org/10.1039/c7cc08406d>.

- [62] Ronconi L, Nardon C, Boscutti G, Fregona D. Gold(III)-Dithiocarbamate Anticancer Therapeutics: Learning from the Past, Moving to the Future. *Advances in Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. **2013**;2:130–172. <https://doi.org/10.2174/9781608054961113020006>.
- [63] Adokoh CK. Therapeutic potential of dithiocarbamate supported gold compounds. *RSC Advances*. **2020**;10:2975–2988. <https://doi.org/10.1039/c9ra09682e>.
- [64] Menezes D, Lima G. Aspectos gerais da química dos ditiocarbamatos e de seus complexos metálicos e interações dessas espécies químicas com importantes enzimas – uma breve revisão. *Química Nova*. **2021**;44. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170755>.
- [65] Kaul L, Süß R, Zannettino A, Richter K. The revival of dithiocarbamates: from pesticides to innovative medical treatments. *iScience*. **2021**;24:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102092>.
- [66] Hogarth G. Metal-dithiocarbamate complexes: chemistry and biological activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2012**;12:1202–1215. <https://doi.org/10.2174/138955712802762095>.
- [67] Ronconi L, Marzano C, Zanella P, Corsini M, Miolo G, Maccà C, Trevisan A, Fregona D. Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: Solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**;49:1648–1657. <https://doi.org/10.1021/jm0509288>.
- [68] Bertrand B, Williams MRM, Bochmann M. Gold(III) Complexes for Antitumor Applications: An Overview. *Chemistry – A European Journal*. **2018**;24:11840–11851. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201800981>.
- [69] Moreno-Alcántar G, Picchetti P, Casini A. Gold Complexes in Anticancer Therapy: From New Design Principles to Particle-Based Delivery Systems. *Angewandte Chemie International Edition*. **2023**;62: e202218000. <https://doi.org/10.1002/anie.202218000>.
- [70] Ronconi L, Aldinucci D, Dou QP, Fregona D. Latest Insights into the Anticancer Activity of Gold(III)-Dithiocarbamate Complexes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **2010**;10(4):283–292. <http://dx.doi.org/10.2174/187152010791162298>.
- [71] Ronconi L, Giovagnini L, Marzano C, Bettio F, Graziani R, Pilloni G, Fregona D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: Design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorganic Chemistry*. **2005**;44:1867–1881. <https://doi.org/10.1021/ic048260v>.
- [72] Ronconi L, Fregona D. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton Transactions*. **2009**:10670–10680. <https://doi.org/10.1039/B913597A>.
- [73] Cattaruzza L, Fregona D, Mongiat M, Ronconi L, Fassina A, Colombatti A, Aldinucci D. Antitumor activity of gold(III)-dithiocarbamate derivatives on prostate cancer cells and xenografts. *International Journal of Cancer*. **2011**;128:206–215. <https://doi.org/10.1002/IJC.25311>.

- [74] Tomasello MF, Nardon C, Lanza V, Di Natale G, Pettenuzzo N, Salmaso S, Milardi D, Caliceti P, Pappalardo G, Fregona D. New comprehensive studies of a gold(III) Dithiocarbamate complex with proven anticancer properties: Aqueous dissolution with cyclodextrins, pharmacokinetics and upstream inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**;138:115–127. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.06.013>.
- [75] Ringhieri P, Iannitti R, Nardon C, Palumbo R, Fregona D, Morelli G, Accardo A. Target selective micelles for bombesin receptors incorporating Au(III)-dithiocarbamate complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. **2014**;473:194–202. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2014.07.014>.
- [76] Henderson W. The Chemistry of Cyclometallated Gold(III) Complexes with C,N-Donor Ligands. *Advances in Organometallic Chemistry*. **2006**;54:207–265. [https://doi.org/10.1016/S0065-3055\(05\)54005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3055(05)54005-X).
- [77] Bertrand B, Casini A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Transactions*. **2014**;43:4209–4219. <https://doi.org/10.1039/C3DT52524D>.
- [78] Zhang J-J, Ng K-M, Lok CN, Sun RW-Y, Che C-M. Deubiquitinases as potential anti-cancer targets for gold(III) complexes. *Chemical Communications*. **2013**;49:5153. <https://doi.org/10.1039/c3cc41766b>.
- [79] Abás E, Aguirre-Ramírez D, Laguna M, Grasa L. Selective Anticancer and Antimicrobial Metallo-drugs Based on Gold(III) Dithiocarbamate Complexes. *Biomedicines*. **2021**;9:1775. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121775>.
- [80] Shaik N, Martínez A, Augustin I, Giovinazzo H, Varela-Ramírez A, Sanaú M, Aguilera RJ, Contel M. Synthesis of Apoptosis-Inducing Iminophosphorane Organogold(III) Complexes and Study of Their Interactions with Biomolecular Targets. *Inorganic Chemistry*. **2009**;48:1577–1587. <https://doi.org/10.1021/ic801925k>.
- [81] Fuchita Y, Ieda H, Kayama A, Kinoshita-Nagaoka J, Kawano H, Kameda S, Mikuriya M. Cycloauration of 2-substituted pyridine derivatives. Synthesis, structure and reactivity of six-membered cycloaurated complexes of 2-anilino-, 2-phenoxy- and 2-(phenylsulfanyl)-pyridine. *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*. **1998**;4095–4100. <https://doi.org/10.1039/a807108j>.
- [82] Ferreira IP, De Lima GM, Paniago EB, Pinheiro CB, Wardell JL, Wardell SMSV. Study of metal dithiocarbamate complexes, Part V. Metal complexes of [S2CN(CH2CH(OMe)2)]: A standard dimeric zinc dithiocarbamate structural motive, a rare cadmium dithiocarbamate coordination polymer, and a hydrated sodium dithiocarbamate complex, with a [Na2O2] core and chain. *Inorganica Chimica Acta*. **2016**;441:137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.11.011>.
- [83] Shi Y, Chu W, Wang Y, Wang S, Du J, Zhang J, Li S, Zhou G, Qin X, Zhang C. Synthesis, characterization and cytotoxicity of the Au(III) complexes with cyclic amine-based dithiocarbamate ligands. *Inorganic Chemistry Communications*. **2013**;30:178–181. <https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2013.02.010>.

[84] Sun RWY, Zhang M, Li D, Li M, Wong AST. Enhanced anti-cancer activities of a gold(III) pyrrolidinedithiocarbamate complex incorporated in a biodegradable metal-organic framework. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2016**;163:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.020>.

[85] Mote US, Bhattar SL, Patil SR, Kolekar GB. Interaction between felodipine and bovine serum albumin: fluorescence quenching study. *Luminescence*. **2010**;25:1–8. <https://doi.org/10.1002/bio.1130>.

[86] Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC, Tao WH, Tang SH. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Luminescence*. **2007**;126(1):211–218. <https://doi.org/10.1016/J.JLUMIN.2006.06.013>.

[87] Stoddart MJ. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, **2011**. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>.

[88] Li DD, Fang F, Li JR, Du QR, Sun J, Bin Gong H, Zhu HL. Discovery of 6-substituted 4-anilinoquinazolines with dioxygenated rings as novel EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2012**;22:5870–5875. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2012.07.079>.

[89] Zhang D, Yan Y, Jin G, Liu B, Ma X, Han D, Jia X. Synthesis and antitumor evaluation of novel 4-anilino-7,8-dihydropyrido[4,3-d]pyrimidine-6(5H)-carboxylate derivatives as potential EGFR inhibitors. *Archiv der Pharmazie*. **2018**;351:e1800110. <https://doi.org/10.1002/ARDP.201800110>.

[90] Mármol I, Montanel-Perez S, Royo JC, Gimeno MC, Villacampa MD, Rodríguez-Yoldi MJ, Cerrada E. Gold(I) and Silver(I) Complexes with 2-Anilinopyridine-Based Heterocycles as Multitarget Drugs against Colon Cancer. *Inorganic Chemistry*. **2020**;59:17732–17745. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02922>.

[91] Gaal HLMV, Diesveld JW, Pijpers FW, Linden JGMDV. ¹³C NMR Spectra of Dithiocarbamates. Chemical Shifts, Carbon-Nitrogen Stretching Vibration Frequencies, and π Bonding in the NCS₂ Fragment. *Inorganic Chemistry*. **1979**;18:3251–3260. <https://doi.org/10.1021/ic50201a062>.

[92] Jiao Y, Hannafon BN, Ding W-Q. Disulfiram's Anticancer Activity: Evidence and Mechanisms. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. **2016**;16:1378–1384. <https://doi.org/10.2174/1871520615666160504095040>.

[93] Tavares TT, Azevedo GC, Garcia A, Carpanez AG, Lewer PM, Paschoal D, Müller BL, Dos Santos HF, Matos RC, Silva H, Grazul RM, Fontes APS. Gold(I) complexes with arylthiosemicarbazones: Molecular modeling, synthesis, cytotoxicity and TrxR inhibition. *Polyhedron*. **2017**;132:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.05.004>.

[94] Wenzel MN, Bonsignore R, Thomas SR, Bourissou D, Barone G, Casini A. Cyclometalated Au^{III} Complexes for Cysteine Arylation in Zinc Finger Protein Domains: towards Controlled Reductive Elimination. *Chemistry – A European Journal*. **2019**;25:7628–7634. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201901535>.

- [95] de Almeida A, Mósca AF, Wragg D, Wenzel M, Kavanagh P, Barone G, Leoni S, Casini A. The mechanism of aquaporin inhibition by gold compounds elucidated by biophysical and computational methods. *Chemical Communications*. **2017**;53:3830–3833. <https://doi.org/10.1039/C7CC00318H>.
- [96] Boscutti G, Marchiò L, Ronconi L, Fregona D. Insights into the Reactivity of Gold-Dithiocarbamate Anticancer Agents toward Model Biomolecules by Using Multinuclear NMR Spectroscopy. *Chemistry - A European Journal*. **2013**;19:13428–13436. <https://doi.org/10.1002/chem.201302550>.
- [97] Naveenraj S, Anandan S. Binding of serum albumins with bioactive substances - Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. **2013**;14:53–71. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEMREV.2012.09.001>.
- [98] Yu L, Hua Z, Luo X, Zhao T, Liu Y. Systematic interaction of plasma albumin with the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. **2022**;1877:188655. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188655>.
- [99] Knudsen Sand KM, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, Andersen JT. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: Opportunities for design of albumin-based therapeutics. *Frontiers in Immunology*. **2015**. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00682>.
- [100] Moreira MB, Franciscato DS, Toledo KCF, De Souza JRB, Nakatani HS, De Souza VR. Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. *Química Nova*. **2015**;38:227–232. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140315>.
- [101] Qian K, Chen H, Qu C, Qi J, Du B, Ko T, Xiang Z, Kandawa-Schulz M, Wang Y, Cheng Z. Mitochondria-targeted delocalized lipophilic cation complexed with human serum albumin for tumor cell imaging and treatment. *Nanomedicine*. **2020**;23:102087. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2019.102087>.
- [102] Gradishar WJ. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*. **2006**;7:1041–1053. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.8.1041>.
- [103] Miele E, Spinelli GP, Miele E, Tomao F, Tomao S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*. **2009**;4:99. <https://doi.org/10.2147/IJN.S3061>.
- [104] Querino AL de A, Enes KB, Chaves OA, Dittz D, Couri MRC, Diniz R, Silva H. Modified pyrazole platinum(II) complex can circumvent albumin and glutathione: Synthesis, structure, and cytotoxic activity. *Bioorganic Chemistry*. **2020**;100:103936. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103936>.
- [105] Nobel Prize in Chemistry 2023. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. (acessado em 16 de outubro de 2023). <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2023/press-release/>.
- [106] Malik S, Muhammad K, Waheed Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules*. **2023**;28:661. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28020661>.

- [107] Kumar R, Kumar M, Luthra G. Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*. **2023**. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.12.172>.
- [108] Singh H, Kaur K. Role of nanotechnology in research fields: Medical sciences, military & tribology - A review on recent advancements, grand challenges, and perspectives. *Materials Today: Proceedings*. **2023** <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.02.061>.
- [109] Shreyash N, Bajpai S, Khan MA, Vijay Y, Tiwary SK, Sonker M. Green Synthesis of Nanoparticles and Their Biomedical Applications: A Review. *ACS Applied Nano Materials*. **2021**;4:11428–11457. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.1C02946>.
- [110] Nirmala MJ, Kizhuveetil U, Johnson A, G B, Nagarajan R, Muthuvijayan V. Cancer nanomedicine: a review of nano-therapeutics and challenges ahead. *RSC Advances*. **2023**;13:8606–8629. <https://doi.org/10.1039/D2RA07863E>.
- [111] Giri PM, Banerjee A, Layek B. A Recent Review on Cancer Nanomedicine. *Cancers*. **2023**;15:2256. <https://doi.org/10.3390/cancers15082256>.
- [112] Ion D, Niculescu A-G, Păduraru DN, Andronic O, Muşat F, Grumezescu AM, Bolocan A. An Up-to-Date Review of Natural Nanoparticles for Cancer Management. *Pharmaceutics*. **2021**;14:18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010018>.
- [113] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies, and toxicity. *Chemical Society Reviews*. **2009**;38:1759. <https://doi.org/10.1039/b806051g>.
- [114] Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*. **2008**;40:270–277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>
- [115] Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Maragò OM, Iatì MA. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **2017**;29. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- [116] Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications, and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. **2019**;12:908–931. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.05.011>.
- [117] Foulkes R, Man E, Thind J, Yeung S, Joy A, Hoskins C. The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives. *Biomaterials Science*. **2020**;8:4653–4664. <https://doi.org/10.1039/D0BM00558D>.
- [118] Yang X, Yang M, Pang B, Vara M, Xia Y. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews*. **2015**;115:10410–10488. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00193>
- [119] Giljohann, D, Seferos, D, Daniel, W, Massich, M, Patel, P e Mirkin, C. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**;49: 3280-3294. <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>.
- [120] Zhang M, Guo X. Gold/platinum bimetallic nanomaterials for immunoassay and immunosensing. *Coordination Chemistry Reviews*. **2022**;465:214578. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2022.214578>.

- [121] Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*. **2012**;112:2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.
- [122] Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*. **2006**;6:662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>.
- [123] Corma A, Garcia H. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. *Chemical Society Reviews*. **2008**;37:2096–2126. <https://doi.org/10.1039/B707314N>.
- [124] Grisel R, Weststrate KJ, Gluhoi A, Nieuwenhuys BE. Catalysis by gold nanoparticles. *Gold Bulletin*. **2002**;35:39–45. <https://doi.org/10.1007/BF03214836>.
- [125] Ishida T, Taketoshi A, Haruta M. Gold Nanoparticles for Oxidation Reactions: Critical Role of Supports and Au Particle Size. *Topics in Organometallic Chemistry*. Springer. **2020**;66:1–48. https://doi.org/10.1007/3418_2020_42.
- [126] Aminolroayaei F, Shahbazi-Gahrouei D, Shahbazi-Gahrouei S, Rasouli N. Recent nanotheranostics applications for cancer therapy and diagnosis: A review. *IET Nanobiotechnology*. **2021**;15:247–346 <https://doi.org/10.1049/nbt2.12021>.
- [127] Khorasani A, Shahbazi-Gahrouei D, Safari A. Recent Metal Nanotheranostics for Cancer Diagnosis and Therapy: A Review. *Diagnostics*. **2023**;13:833. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13050833>.
- [128] Kalyane D, Raval N, Maheshwari R, Tambe V, Kalia K, Tekade RK. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. *Materials Science and Engineering: C*. **2019**;98:1252–1276. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.01.066>.
- [129] Sindhvani S, Syed AM, Ngai J, Kingston BR, Maiorino L, Rothschild J, MacMillan P, Zhang Y, Rajesh NU, Hoang T, Wu JLY, Wilhelm S, Zilman A, Gadde S, Sulaiman A, Ouyang B, Lin Z, Wang L, Egeblad M, Chan WCW. The entry of nanoparticles into solid tumors. *Nature Materials*. **2020**;19:566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- [130] Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, Flint DJ, Plumb JA, Graham D, Wheate NJ. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society*. **2010**;132:4678–4684. <https://doi.org/10.1021/JA908117A>.
- [131] Browning RJ, Reardon PJT, Parhizkar M, Pedley RB, Edirisinghe M, Knowles JC, Stride E. Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano*. **2017**;11: 8560–8578. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.7B04092>.
- [132] Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. *Journal of the American Chemical Society*. **2009**;131:14652–14653. <https://doi.org/10.1021/JA9071282>.
- [133] Cosottini L, Massai L, Ghini V, Zineddu S, Geri A, Mannelli M, Ciambellotti S, Severi M, Gamberi T, Messori L, Turano P. Bioconjugation of the gold drug auranofin to human ferritin

yields a potent cytotoxin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **2023**;87:104822. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2023.104822>.

[134] Engel S, Fritz EC, Ravoo BJ. New trends in the functionalization of metallic gold: from organosulfur ligands to N-heterocyclic carbenes. *Chemical Society Reviews*. **2017**;46:2057–2075. <https://doi.org/10.1039/C7CS00023E>.

[135] Thomas SR, Casini A. N-Heterocyclic carbenes as “smart” gold nanoparticle stabilizers: State-of-the art and perspectives for biomedical applications. *Journal of Organometallic Chemistry*. **2021**;938:121743 <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2021.121743>.

[136] Kaur G, Thimes RL, Camden JP, Jenkins DM. Fundamentals and applications of N-heterocyclic carbene functionalized gold surfaces and nanoparticles. *Chemical Communications*. **2022**;58:13188–13197. <https://doi.org/10.1039/D2CC05183D>.

[137] MacLeod MJ, Johnson JA. PEGylated N-Heterocyclic Carbene Anchors Designed to Stabilize Gold Nanoparticles in Biologically Relevant Media. *Journal of the American Chemical Society*. **2015**;137:7974–7977. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b02452>.

[138] Ferry A, Schaepe K, Tegeder P, Richter C, Chepiga KM, Ravoo BJ, Glorius F. Negatively Charged N-Heterocyclic Carbene-Stabilized Pd and Au Nanoparticles and Efficient Catalysis in Water. *ACS Catalysis*. **2015**;5:5414–5420. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b01160>.

[139] Salorinne K, Man RWY, Li CH, Taki M, Nambo M, Crudden CM. Water-Soluble N-Heterocyclic Carbene-Protected Gold Nanoparticles: Size-Controlled Synthesis, Stability, and Optical Properties. *Angewandte Chemie*. **2017**;129:6294–6298. <https://doi.org/10.1002/ange.201701605>.

[140] Büssing R, Karge B, Lippmann P, Jones PG, Brönstrup M, Ott I. Gold(I) and Gold(III) N-Heterocyclic Carbene Complexes as Antibacterial Agents and Inhibitors of Bacterial Thioredoxin Reductase. *ChemMedChem*. **2021**;16:3402–3409. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100381>.

[141] Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*. **2011**;27:10119–10123. <https://doi.org/10.1021/la2022177>.

[142] Young AJ, Eisen C, Rubio GM, Chin JM, Reithofer MR. pH responsive histidin-2-ylidene stabilized gold nanoparticles. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2019**;199:110707. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110707>.

[143] Ong Q, Luo Z, Stellacci F. Characterization of Ligand Shell for Mixed-Ligand Coated Gold Nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*. **2017**;50:1911–1919. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00165>.

[144] Greskovich KM, Powderly KM, Kincanon MM, Forney NB, Jalomo CA, Wo A, Murphy CJ. The Landscape of Gold Nanocrystal Surface Chemistry. *Accounts of Chemical Research*. **2023**;56:4316–4327. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00109>.

[145] Saadatkah N, Carillo Garcia A, Ackermann S, Leclerc P, Latifi M, Samih S, Patience GS, Chaouki J. Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA.

The Canadian Journal of Chemical Engineering. **2020**;98:34–43.

<https://doi.org/10.1002/CJCE.23673>.

[146] Narouz MR, Li CH, Nazemi A, Crudden CM. Amphiphilic N-Heterocyclic Carbene-Stabilized Gold Nanoparticles and Their Self-Assembly in Polar Solvents. *Langmuir*. **2017**;33:14211–14219. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02248>.

[147] Young AJ, Sauer M, Rubio GM, Sato A, Foelske A, Serpell CJ, Chin JM, Reithofer MR. One-step synthesis and XPS investigations of chiral NHC–Au(0)/Au(I) nanoparticles. *Nanoscale*. **2019**;11:8327–8333. <https://doi.org/10.1039/C9NR00905A>.

[148] Saha R, Mondal B, Mukherjee PS. Molecular Cavity for Catalysis and Formation of Metal Nanoparticles for Use in Catalysis. *Chemical Reviews*. **2022**;122(14):12244–12307. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00811>.

[149] Soldevila-Barreda JJ, Metzler-Nolte N. Intracellular catalysis with selected metal complexes and metallic nanoparticles: Advances toward the development of catalytic metallodrugs. *Chemical Reviews*. **2019**;119:829–869. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00493>.

[150] Alonso-de Castro S, Terenzi A, Gurruchaga-Pereda J, Salassa L. Catalysis Concepts in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chemistry – A European Journal*. **2019**;25:6651–6660. <https://doi.org/10.1002/chem.201806341>.

[151] Liu Y, Bai Y. Design and Engineering of Metal Catalysts for Bio-orthogonal Catalysis in Living Systems. *ACS Applied Bio Materials*. **2020**;3:4717–4746. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00581>.

[152] Zhao P, Feng X, Huang D, Yang G, Astruc D. Basic concepts and recent advances in nitrophenol reduction by gold- and other transition metal nanoparticles. *Coordination Chemistry Reviews*. **2015**;287:114–136. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2015.01.002>.

[153] Rodriguez Y, Mejía M, Kumar N, Bogireddy R. Reduction of 4-nitrophenol using green-fabricated metal nanoparticles. *RSC Advances*. **2022**;12:18661–18675. <https://doi.org/10.1039/D2RA02663E>.

[154] Kassem AA, Abdelhamid HN, Fouad DM, Ibrahim SA. Catalytic reduction of 4-nitrophenol using copper terephthalate frameworks and CuO@C composite. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **2021**;9:104401. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2020.104401>.

[155] de Oliveira FM, de Araújo Nascimento LRB, Calado CMS, Meneghetti MR, da Silva MGA. Aqueous-Phase Catalytic Chemical Reduction of p-Nitrophenol Employing Soluble Gold Nanoparticles with Different Shapes. *Catalysts*. **2016**;6:215. <https://doi.org/10.3390/CATAL6120215>.

[156] Thomas S, Yang W, Morgan DJ, Davies T, Li JJ, Fischer R, Huang J, Dimitratos N, Casini A. Bottom-up Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles Stabilized by N-heterocyclic Carbenes: From Structural Characterization to Applications. *Chemistry – A European Journal*. **2022**;28:e2022015. <https://doi.org/10.1002/chem.202201575>.

- [157] Shen W, Qu Y, Pei X, Li S, You S, Wang J, Zhang Z, Zhou J. Catalytic reduction of 4-nitrophenol using gold nanoparticles biosynthesized by cell-free extracts of *Aspergillus* sp. WL-Au. *Journal of Hazardous Materials*. **2017**;321:299–306. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.07.051>.
- [158] Dreaden EC, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeutic Delivery*. **2012**;3:457–478. <https://doi.org/10.4155/TDE.12.21>.
- [159] Kumari V, Vishwas S, Kumar R, Kakoty V, Khursheed R, Babu MR, Harish V, Mittal N, Singh PK, Alharthi NS, Hakami MA, Aba Alkhayl FF, Gupta G, De Rubis G, Paudel KR, Singh M, Zandi M, Oliver BG, Dua K, Singh SK. An overview of biomedical applications for gold nanoparticles against lung cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **2023**;86:104729. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104729>.
- [160] Riley RS, Day ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. **2017**;9:e1449. <https://doi.org/10.1002/WNAN.1449>.
- [161] Kairdolf BA, Qian X, Nie S. Bioconjugated nanoparticles for biosensing, in vivo imaging, and medical diagnostics. *Analytical Chemistry*. **2017**;89:1015–1031. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04873>.
- [162] Kairdolf BA, Mancini MC, Smith AM, Nie S. Minimizing nonspecific cellular binding of quantum dots with hydroxyl-derivatized surface coatings. *Analytical Chemistry*. **2008**;80:3029–3034. <https://doi.org/10.1021/AC800068Q>.
- [163] Pereira TM, Franco DP, Vitorio F, Kummerle AE. Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2018**;18:124–148. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180329115523>.
- [164] Kim E, Park S, Yang H. One label-based fluorescence detection of a protease that cleaves the peptide bond between two specific amino acids. *Analytical Methods*. **2017**;9:3049–3054. <https://doi.org/10.1039/C7AY00347A>.
- [165] Źamojć K, Wiczek W, Zaborowski B, Jacewicz D, Chmurzyński L. Fluorescence quenching of 7-amino-4-methylcoumarin by different TEMPO derivatives. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2015**;136:1875–1880. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.102>.

APÊNDICE

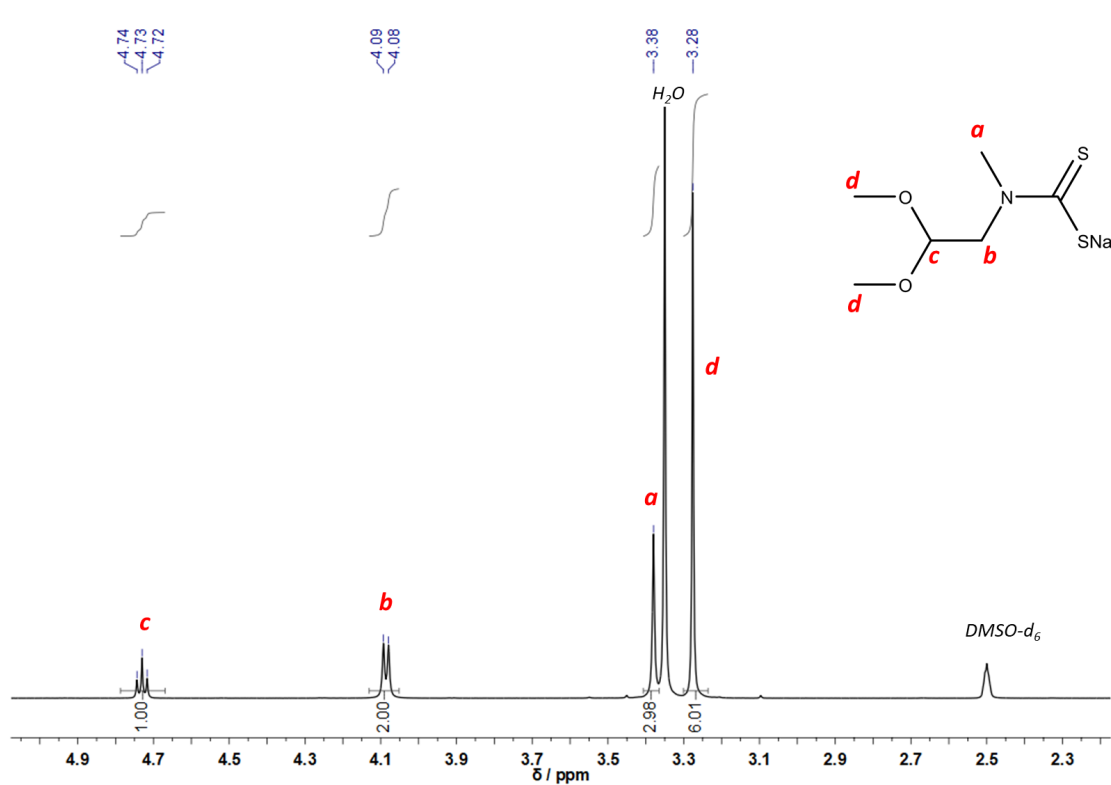


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) para o ligante L1 em DMSO- d_6 .

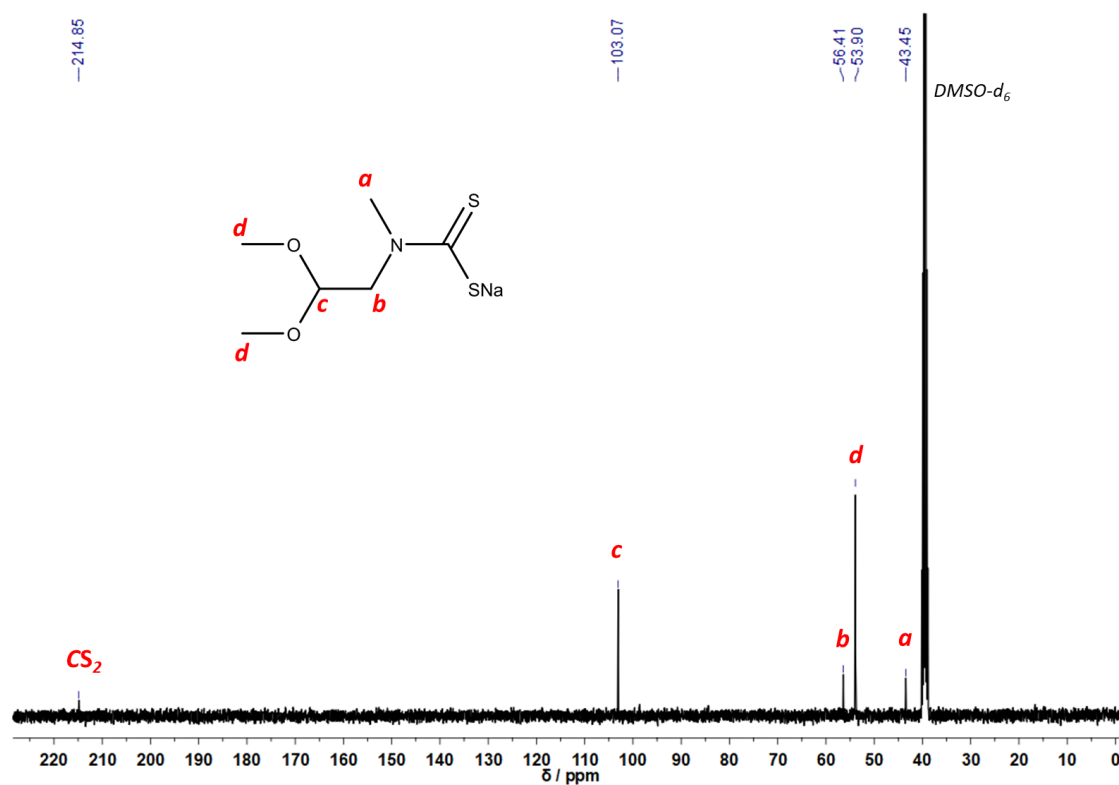


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) para o ligante L1 em DMSO- d_6 .

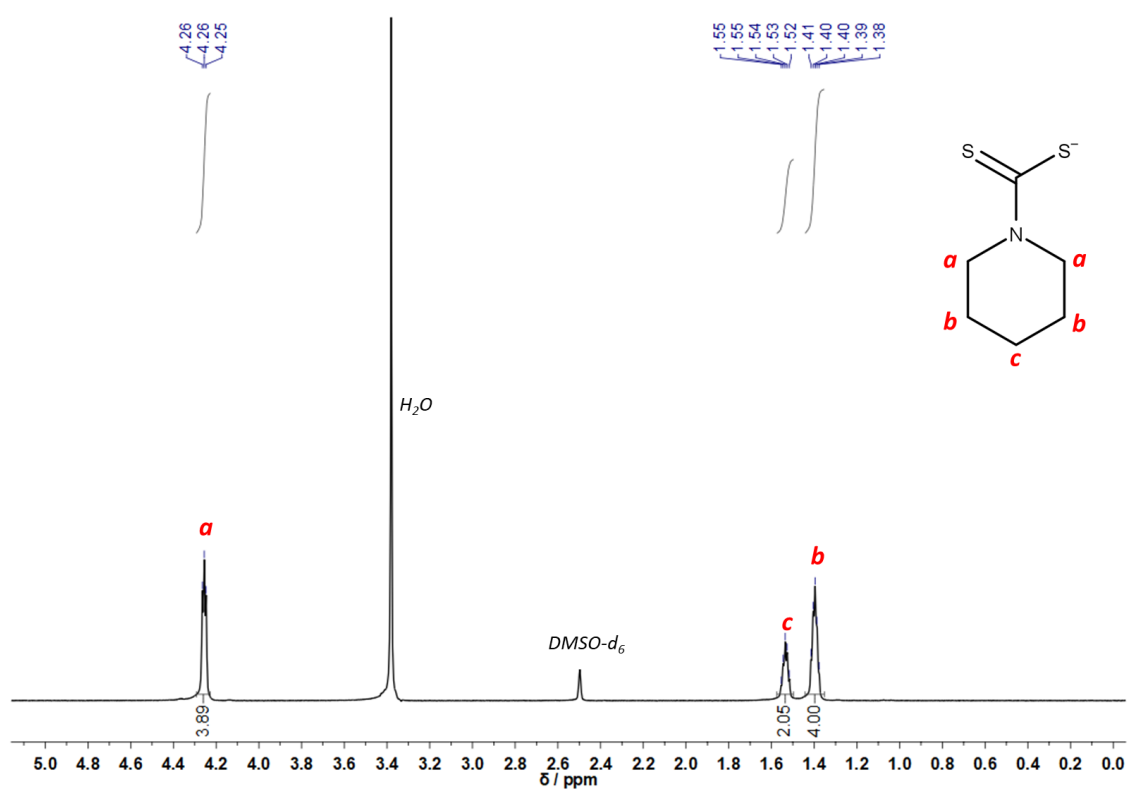


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) para o ligante L2 em $\text{DMSO-}d_6$.

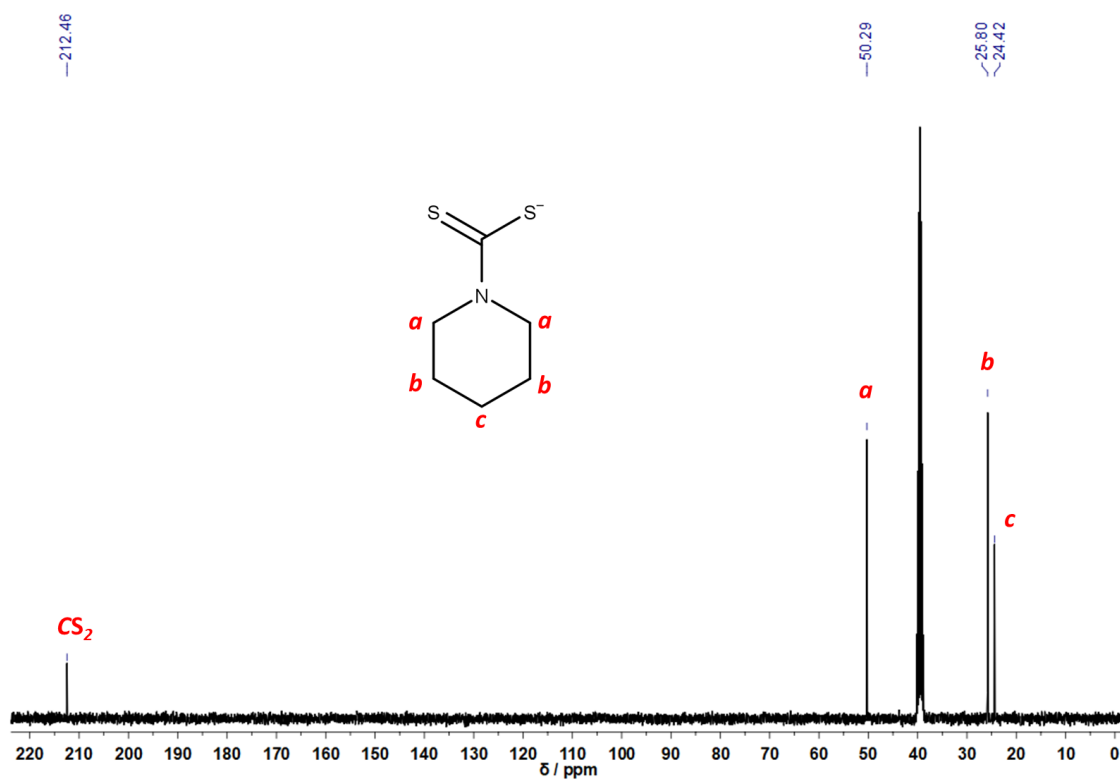


Figura 63 Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) para o ligante L2 em $\text{DMSO-}d_6$.

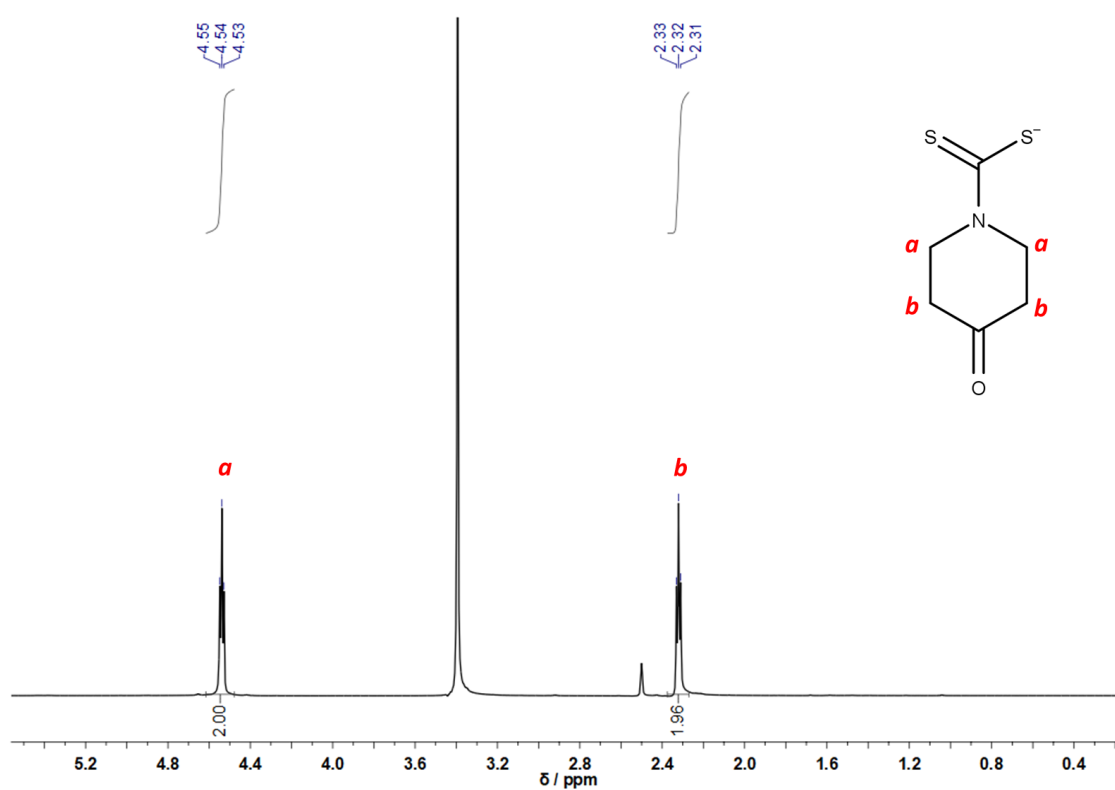


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (100 MHz) para o ligante L3 em $\text{DMSO-}d_6$.

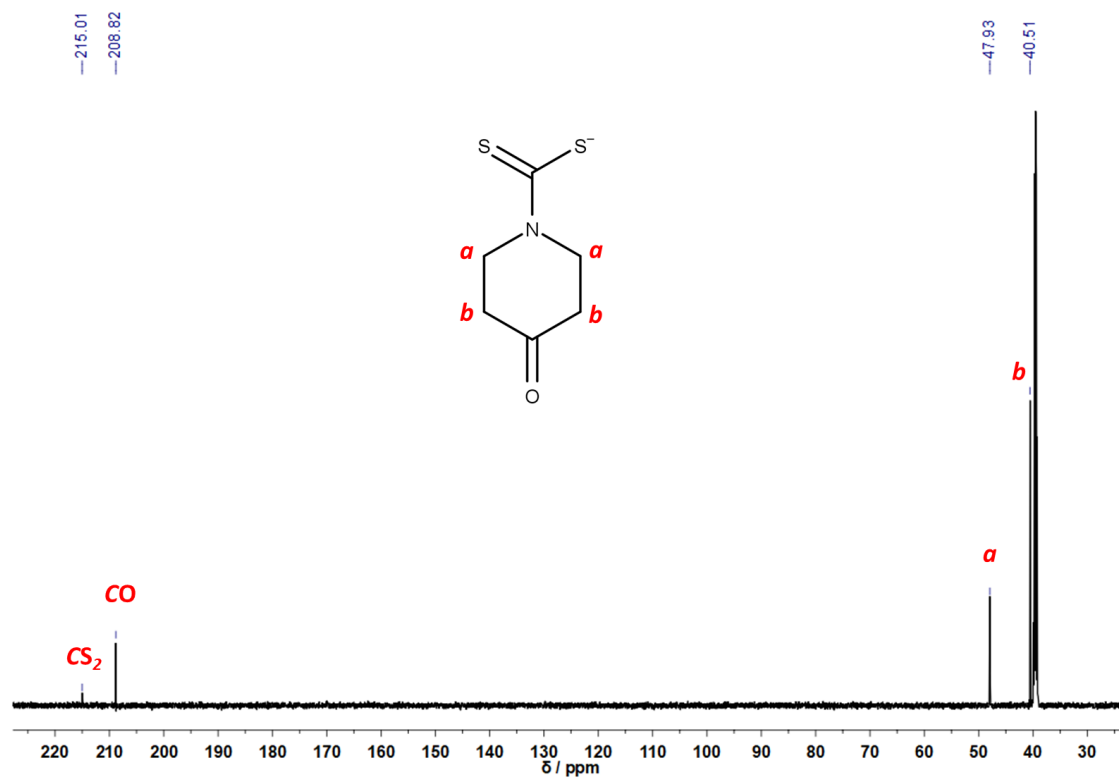


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) para o ligante L3 em $\text{DMSO-}d_6$.

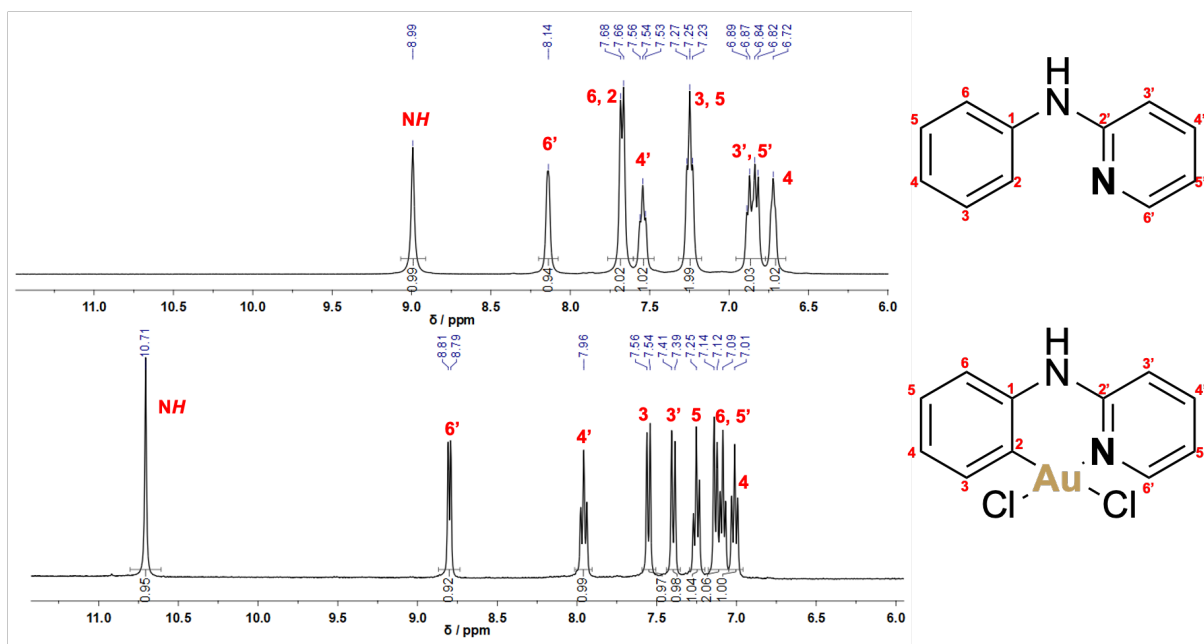


Figura 66. Comparação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) para a 2-anilino-3-piridina e o complexo $[(\text{C}^{\text{N}})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

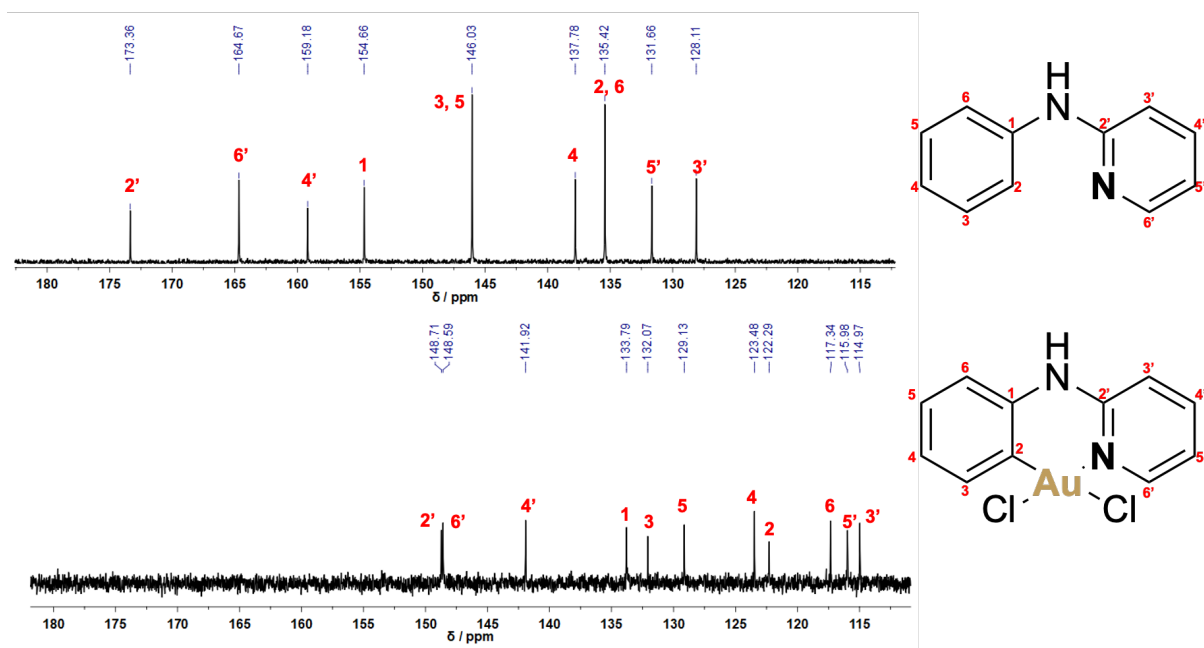


Figura 67. Comparação do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) para a 2-anilino-3-piridina e o complexo $[(\text{C}^{\text{N}})\text{Au}^{\text{III}}\text{Cl}_2]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

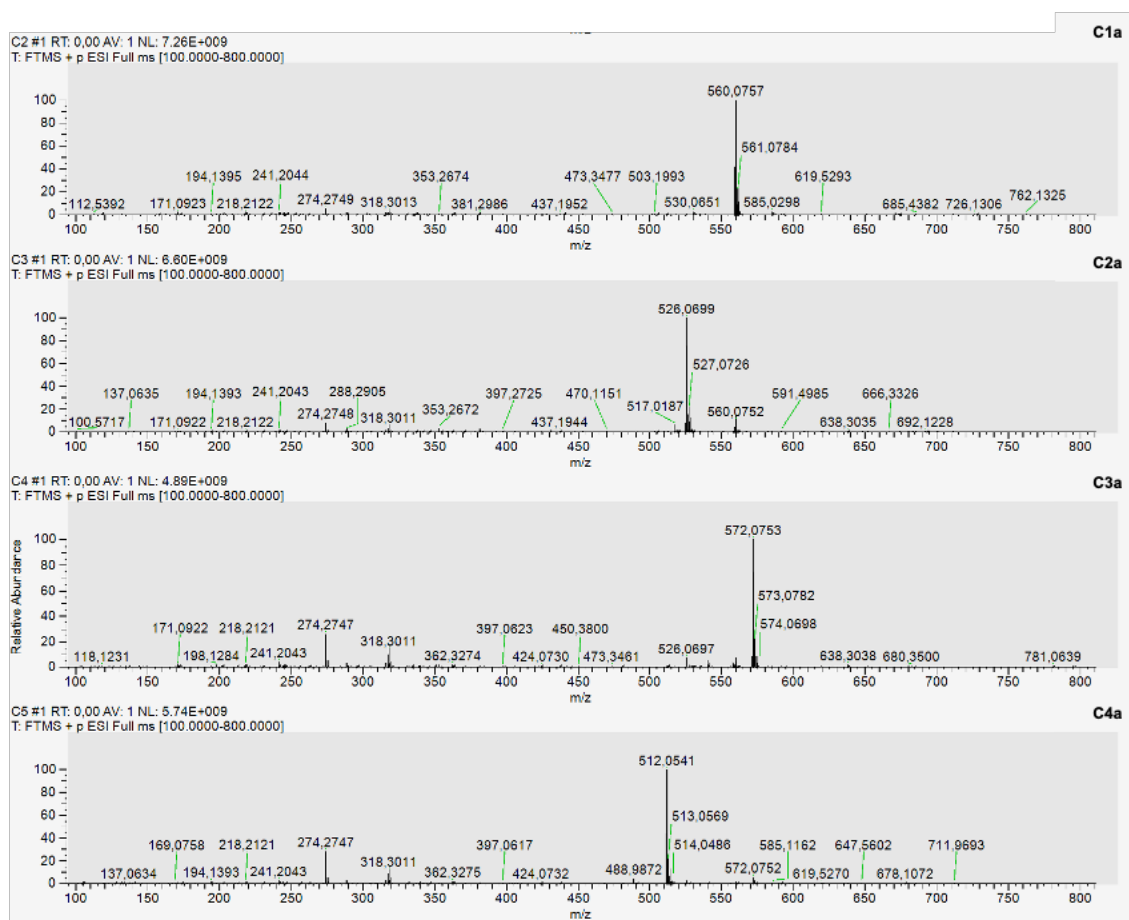


Figura 68 Espectros de massas por ESI⁺-MS dos complexos organo-ouro(III)-ditiocarbamato (C1a – C4a).

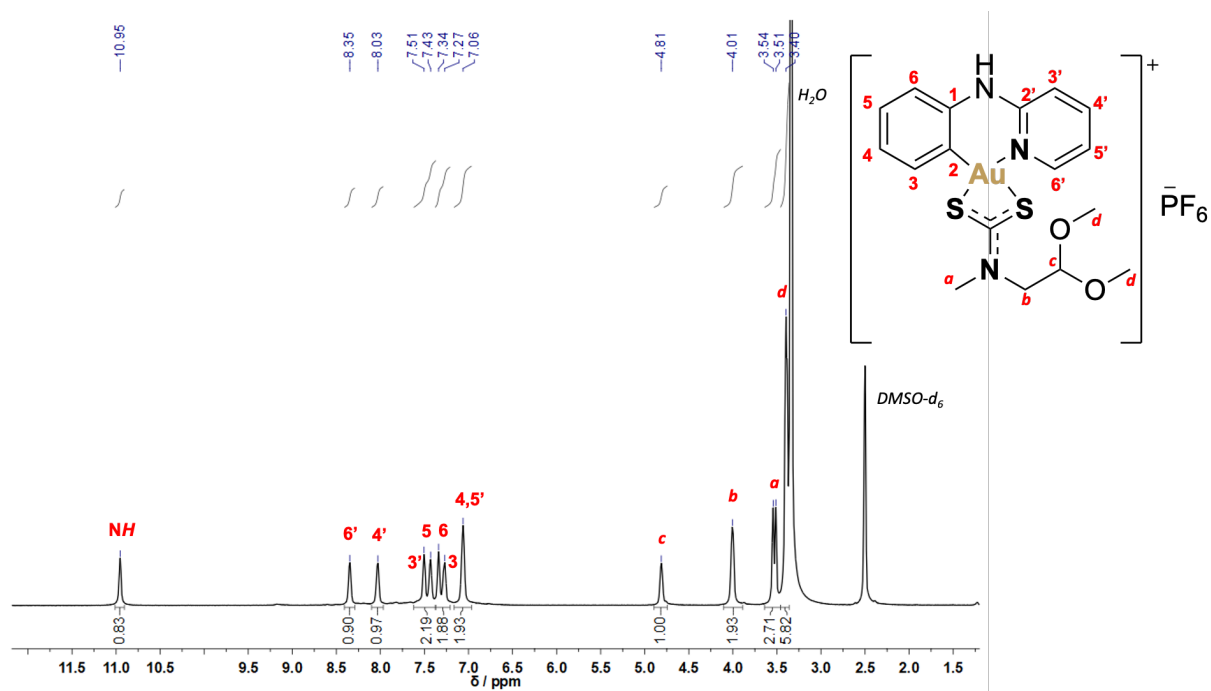


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) para o complexo **C1a** em DMSO-d_6 .

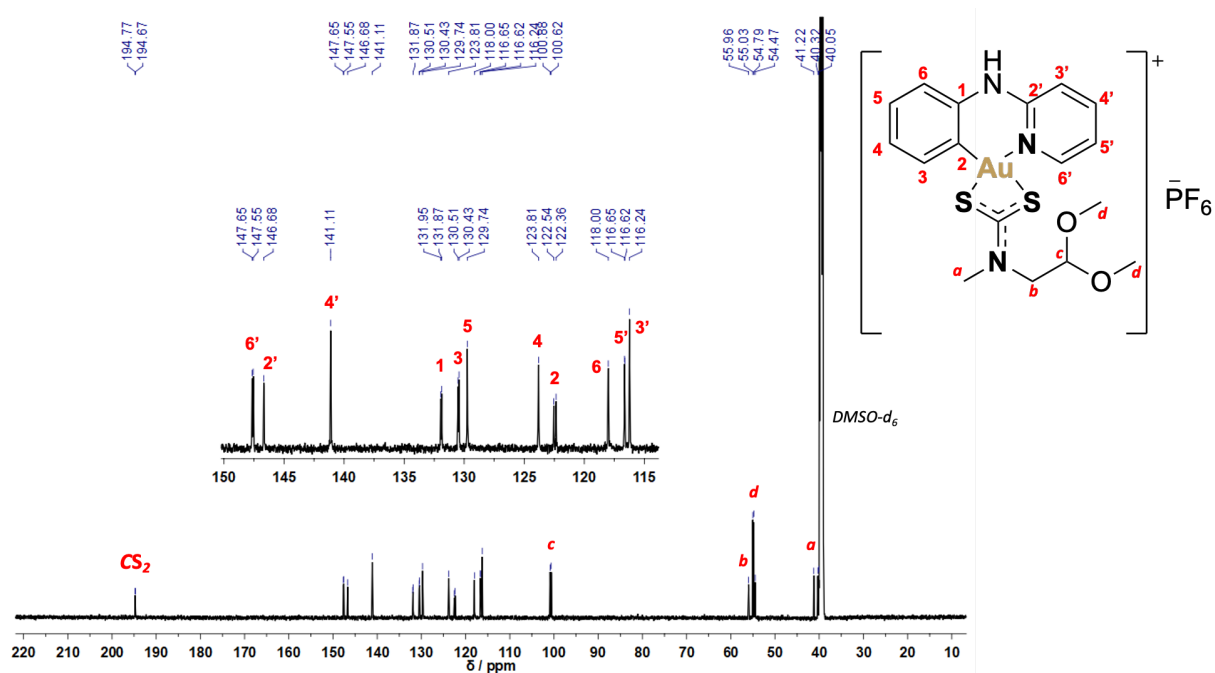


Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) para o complexo **C1a** em DMSO-d_6 .

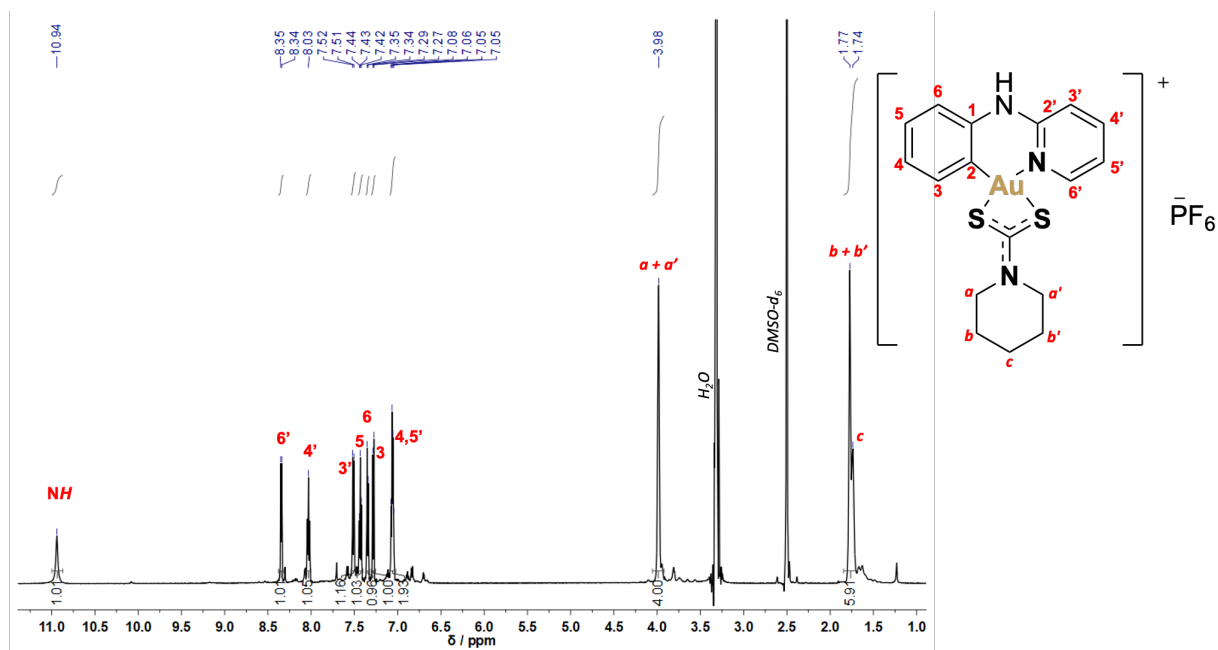


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) para o complexo **C2a** em DMSO-d_6 .

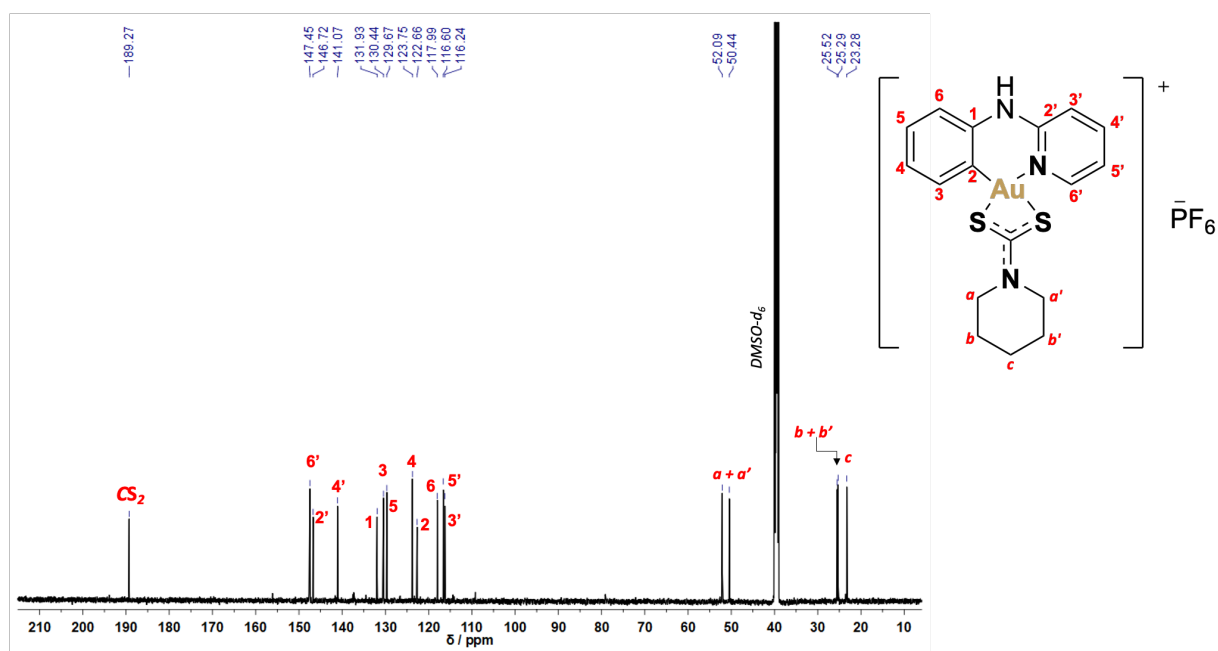


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) para o complexo **C2a** em DMSO-d_6 .

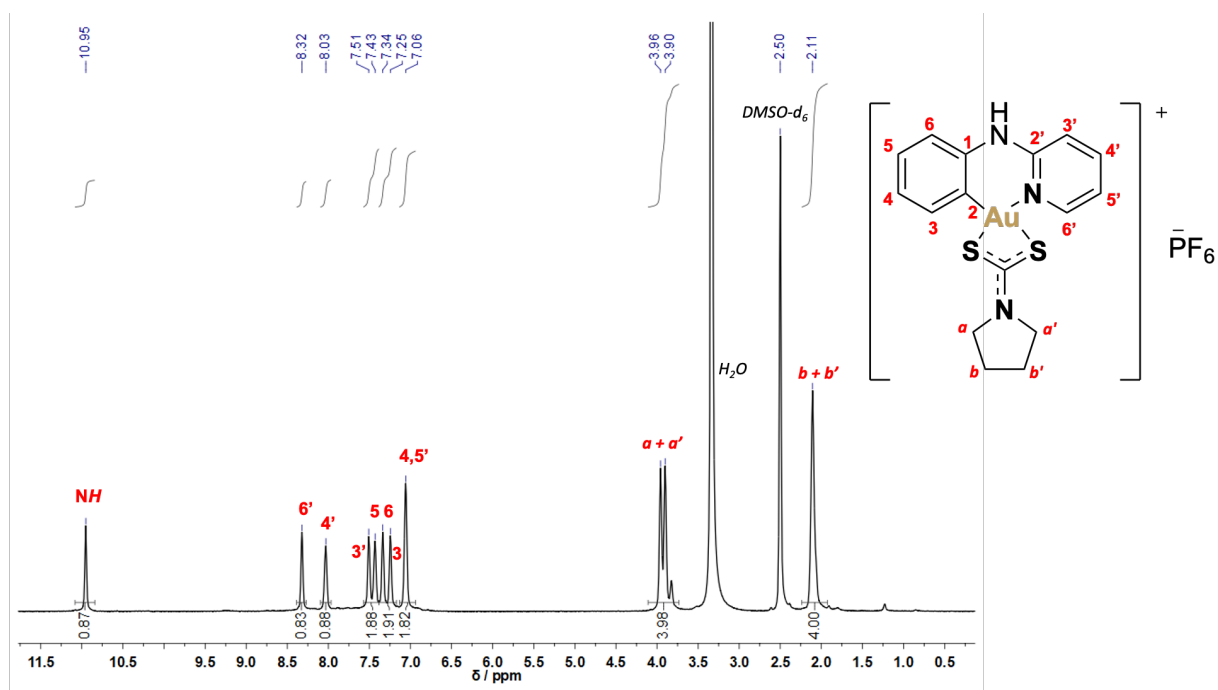


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) para o complexo **C4a** em DMSO-d_6 .

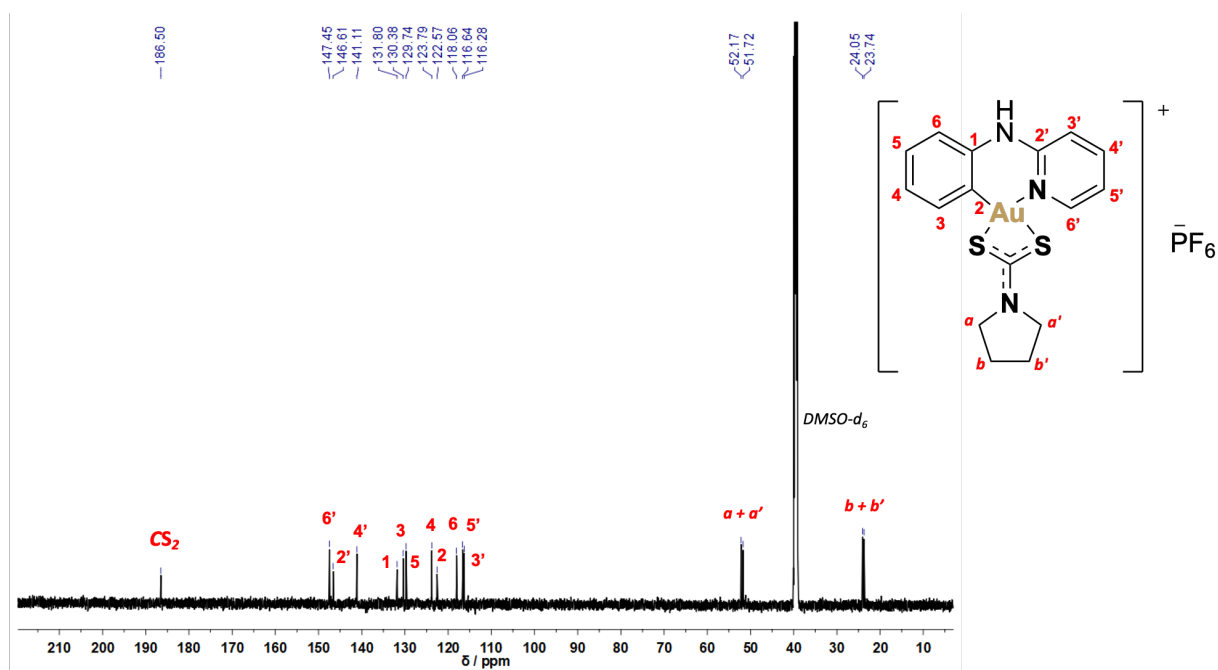


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz) para o complexo **C4a** em $\text{DMSO-}d_6$.

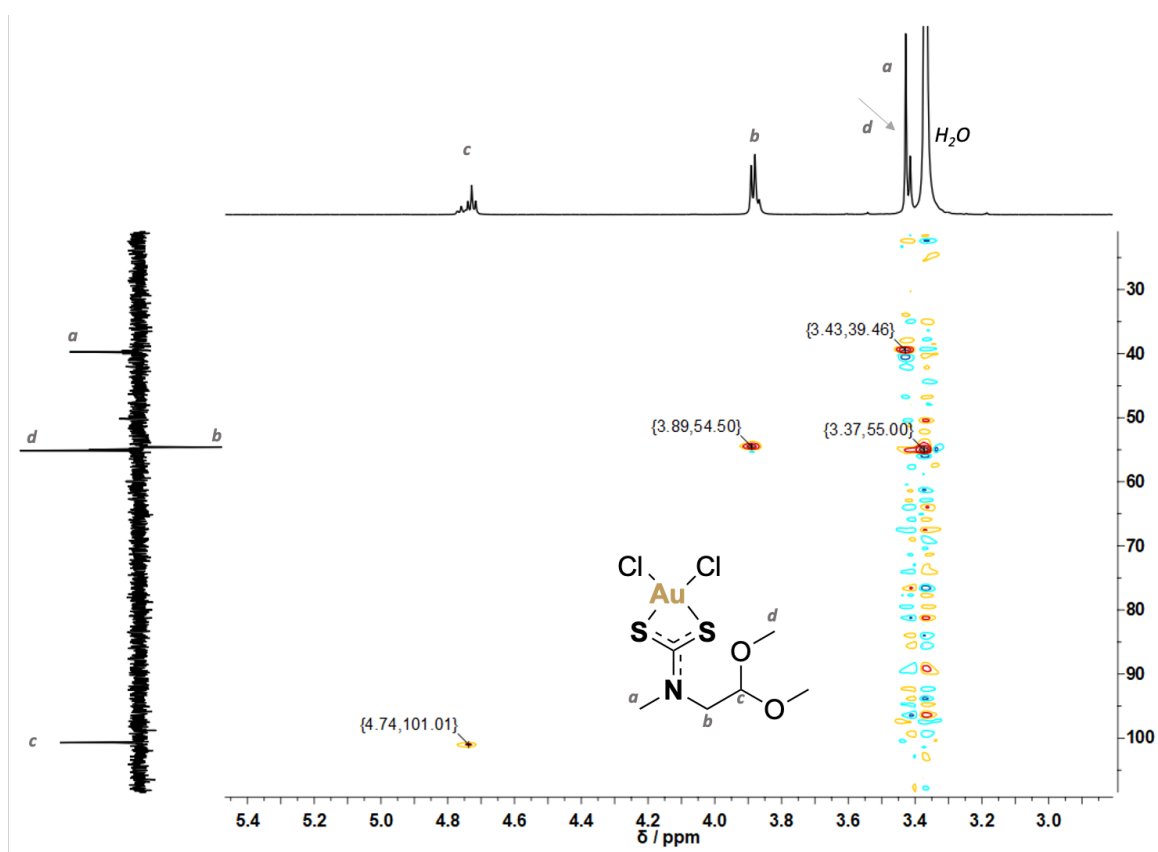


Figura 76 Mapa de contorno ^1H - ^{13}C HMQC do complexo **C1b** em $\text{DMSO-}d_6$.

Estudos de estabilidade em solução

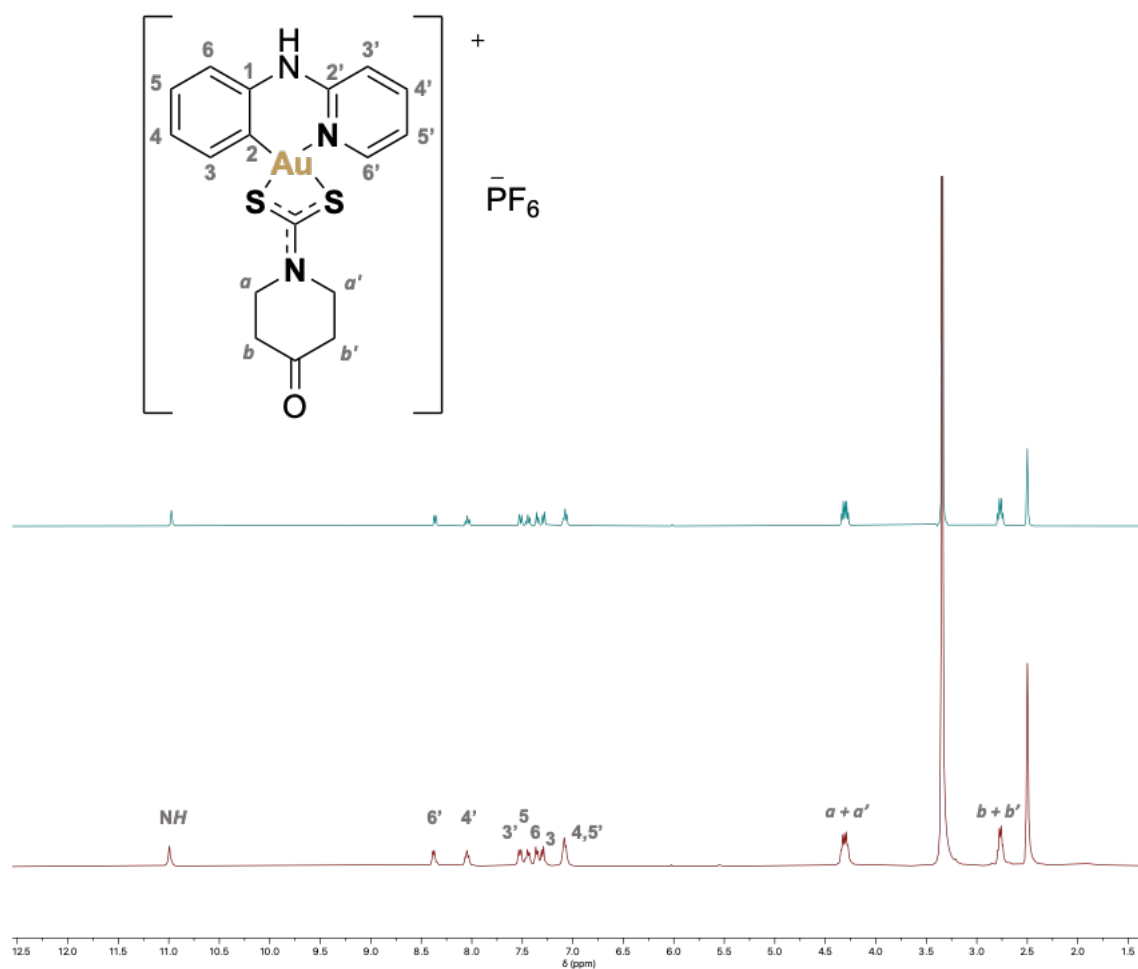


Figura 77 Estudo de estabilidade para o complexo **C3a** em $\text{DMSO-}d_6$ monitorado por espectros de RMN de ^1H (400 MHz). O complexo retém as características espectrais depois de 10 dias.

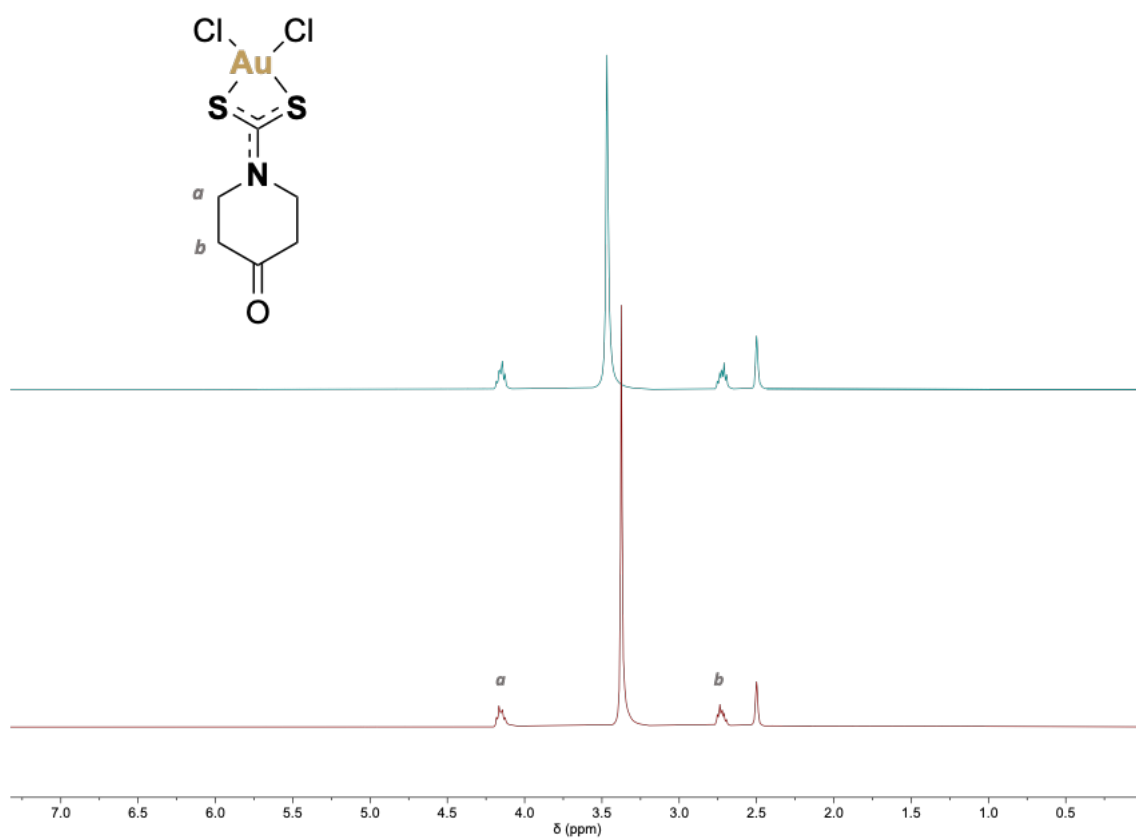


Figura 78 Estudo de estabilidade para o complexo **C3b** em DMSO-d_6 monitorado por espectros de RMN de ^1H (400 MHz). O complexo retém as características espectrais depois de 10 dias.

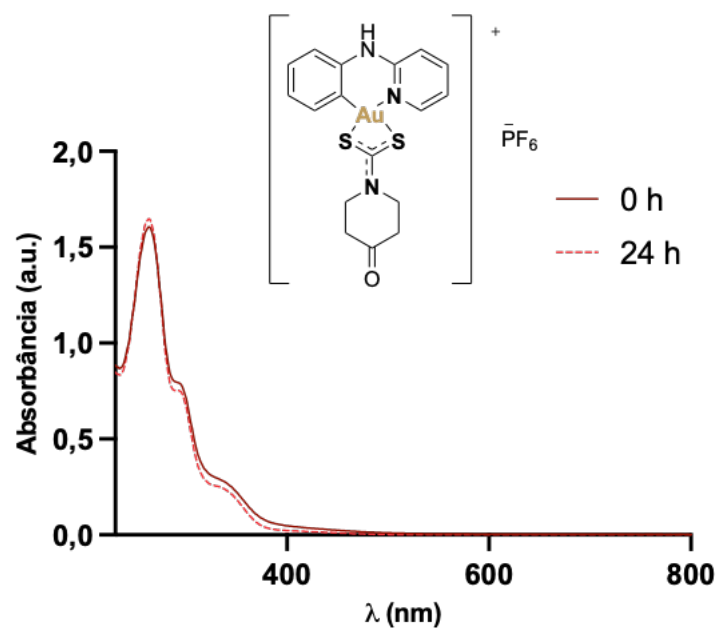


Figura 79 Espectros no UV-vis de **C3a** (50 μM) em PBS 1x (pH 7,4; 0,5% de DMSO) registrados em $t = 0$ (traço vermelho-vinho) e 24 h (traço vermelho pontilhado).

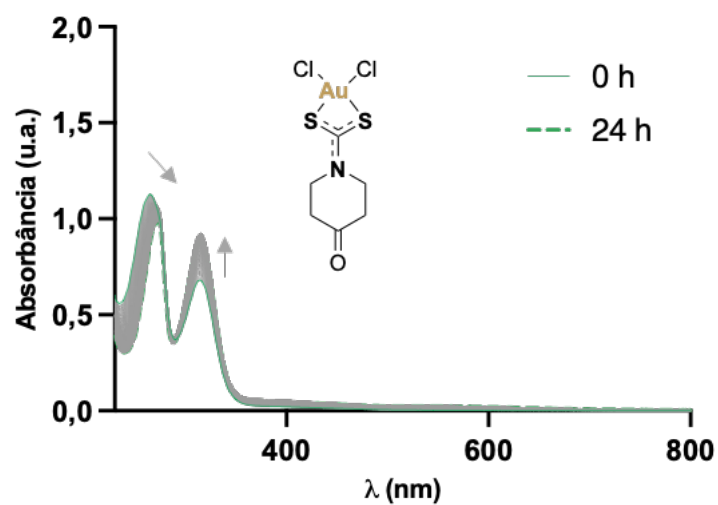


Figura 80 Evolução dos espectros no UV-vis de **C3b** (50 μM ; 0,5% de DMSO) em PBS 1x (pH 7,4) durante 24 h. As setas indicam os desvios

Estudos de reatividade com NAC

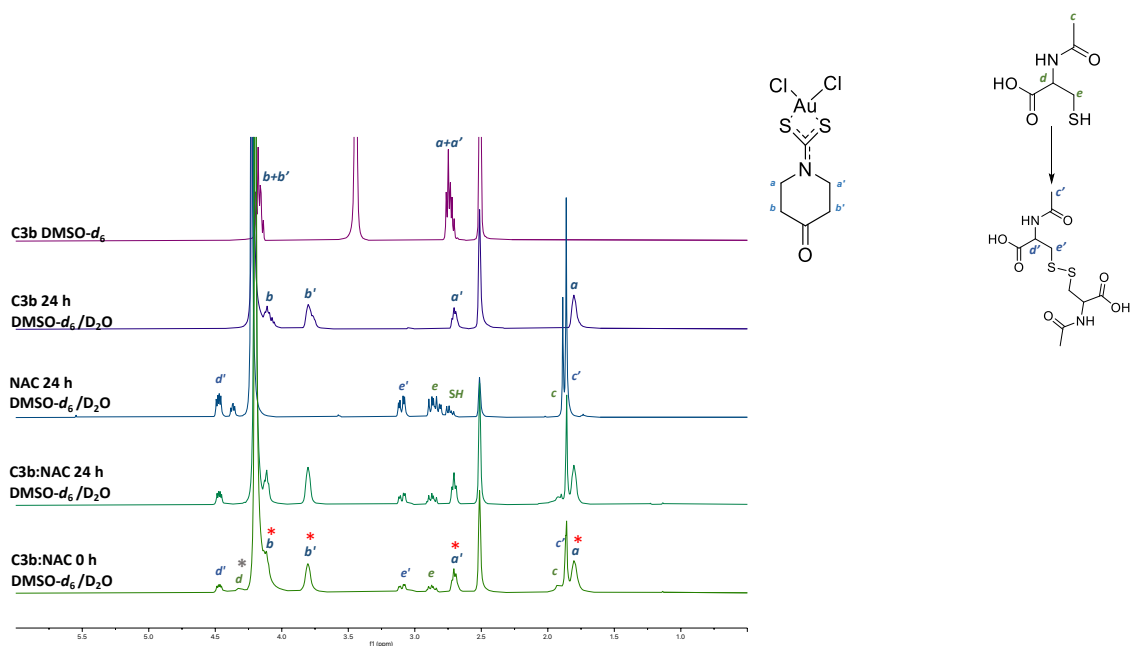


Figura 81 Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) de **C3b** isolado em $\text{DMSO-}d_6$, na mistura $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (80:20) e na presença de quantidades equimolares de NAC em 0 h e 24 h. Para referência, o espectro de NAC isolado também é mostrado. Os sinais que são comuns ao complexo **C3b** livre e à mistura **C3b:NAC** estão marcados com *.

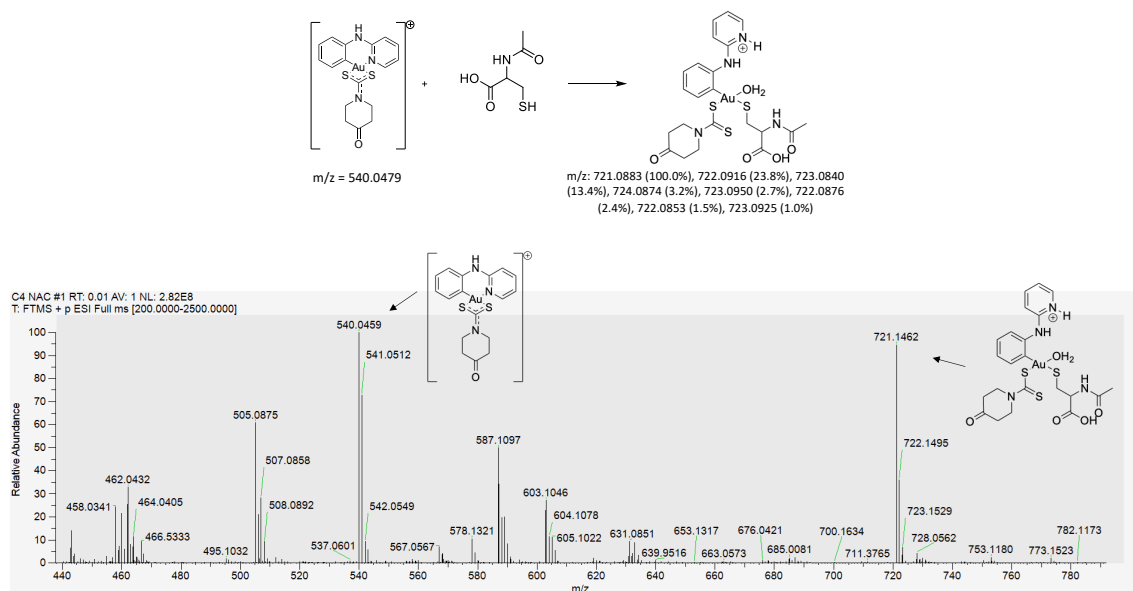


Figura 82 Espectros $\text{ESI}^+\text{-MS}$ de **C3a:NAC** após 24 horas de exposição.

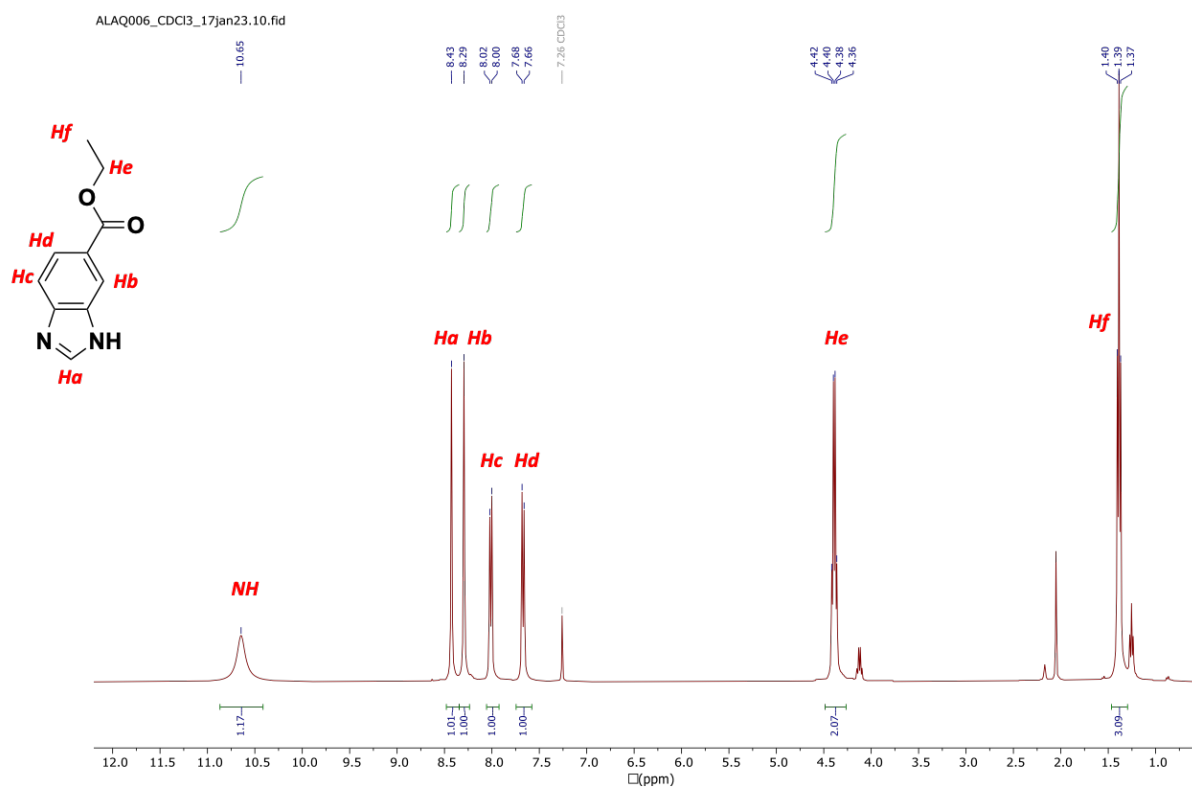


Figura 83 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do composto intermediário para obtenção do ligante NHC e atribuições dos prótons da molécula e seus sinais.

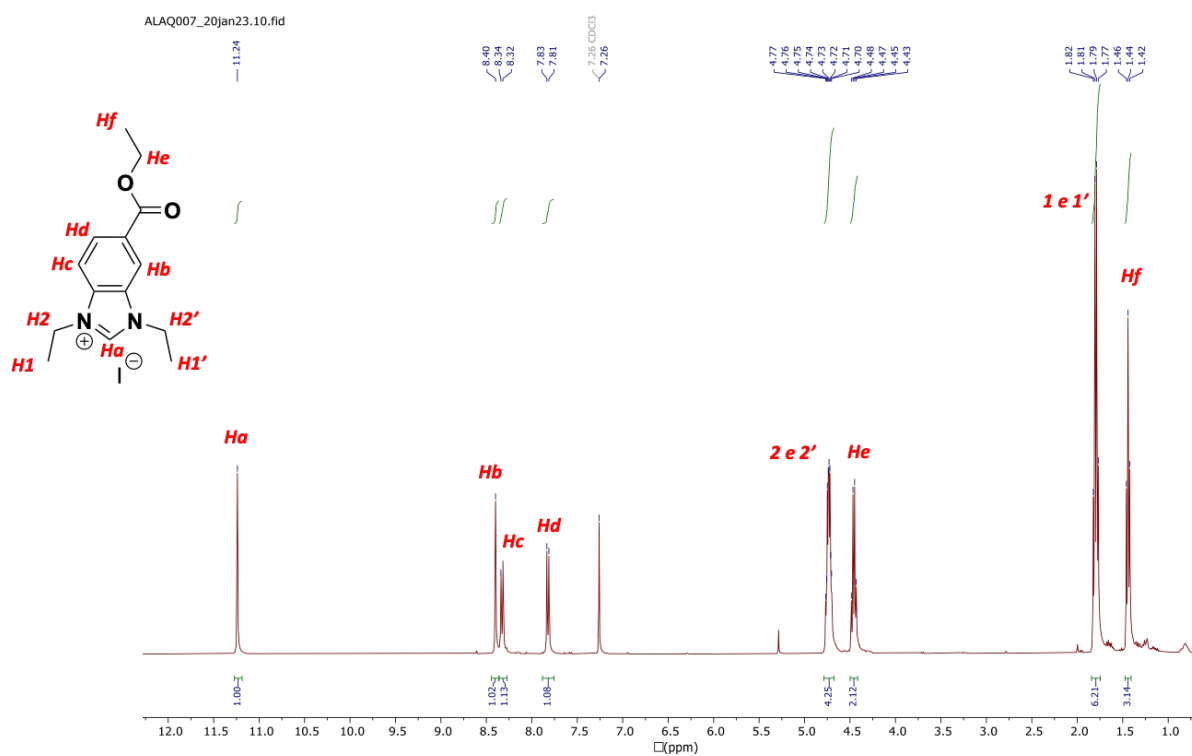


Figura 84 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do ligante NHC e atribuições dos prótons e seus sinais.

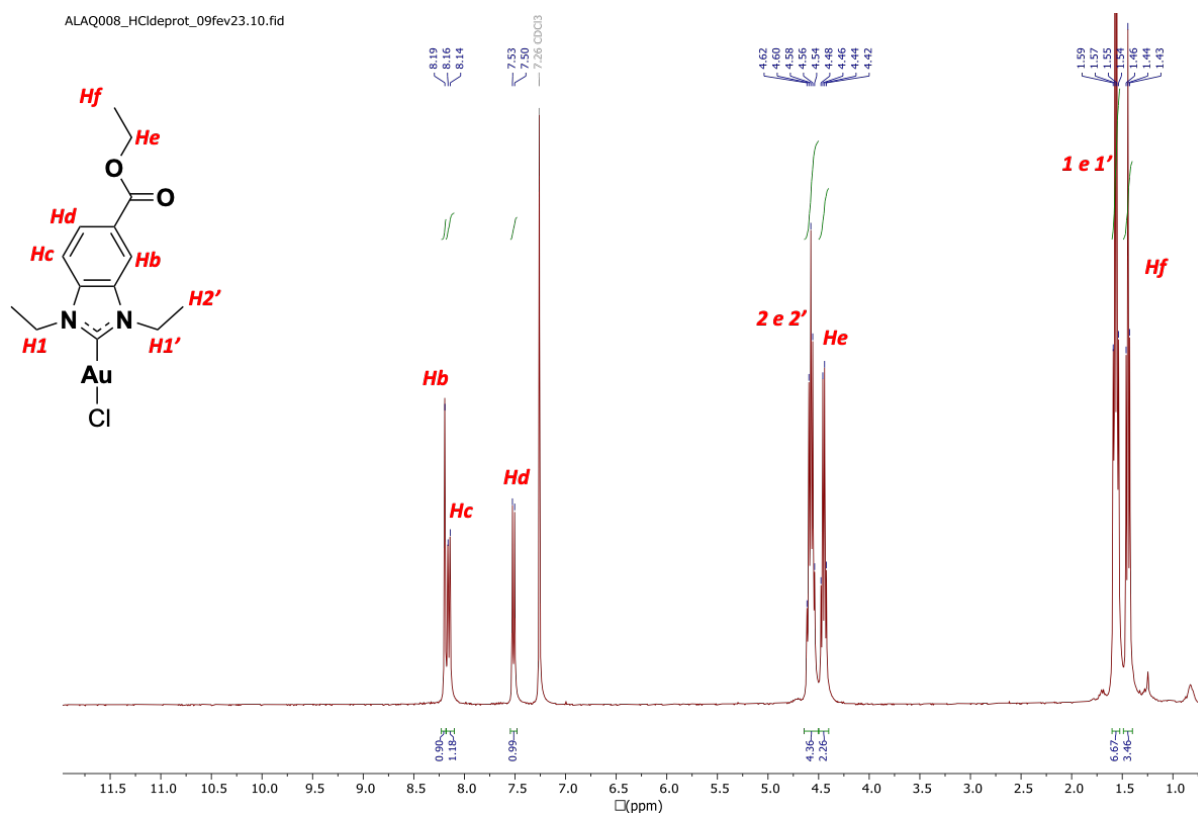


Figura 85 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do complexo Au(I) -NHC e atribuições dos prótons e seus sinais.

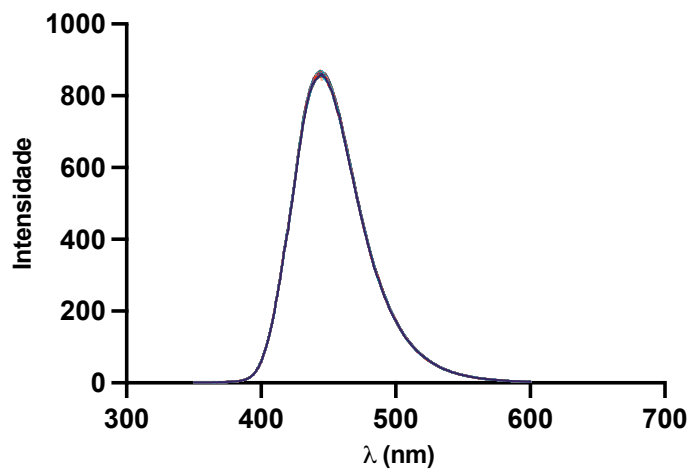


Figura 86 Espectro de emissão da fluorescência da amina 7AMC (50 μM , H_2O) coletado em um período de 2 horas para se investigar efeitos de self-quenching.