



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

CLÁUDIA NATÉRCIA ROCHA LIMA

Avaliação das propriedades fotoluminescentes e aplicações biológicas de derivados do complexo de ouro (I) fosfina/tiocarbamoil-pirazolina.

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Brasília, 2022.

CLÁUDIA NATÉRCIA ROCHA LIMA

Avaliação das propriedades fotoluminescentes e aplicações biológicas de derivados do complexo de ouro (I) fosfina/tiocarbamoil-pirazolina.

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2022.

Rocha Lima, Cláudia Natércia

Avaliação das propriedades fotoluminescentes e aplicações biológicas de derivados do complexo de ouro (I) fosfina/tiocarbamoil-pirazolina. / Cláudia Natércia Rocha Lima. _____

Brasília - DF, 2022.

XII, 51 f.: 29 cm.

Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular) _ Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília – DF, 2022

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

1. Compostos de ouro. 2. Moléculas bioativas. 3. Bioimagem celular. I. Avaliação das propriedades fotoluminescentes e aplicações biológicas de derivados do complexo de ouro (I) fosfina/tiocarbamoil-pirazolina II. Corrêa, José Raimundo. III. Universidade de Brasília.

CLÁUDIA NATÉRCIA ROCHA LIMA

Avaliação das propriedades fotoluminescentes e aplicações biológicas de derivados do complexo de ouro (I) fosfina/tiocarbamoil-pirazolina

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Correa (Presidente)

Profa.. Dra. Mariana Machado Hecht (Membro Titular)

Profa. Dra. Patricia Elaine de Almeida (Membro Titular)

Dr. Leo Kei Iwai (Membro Titular)

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo (Membro Suplente)

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Henrique (in memoriam) e Meire; e aos meus amados filhos, Caíel (in memoriam) e Maximus.

Creio nos milagres da ciência e na descoberta de uma profilaxia futura dos erros e violências do presente.

(Cora Coralina)

Trabalho realizado no Laboratório de Microscopia e Microanálises do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com o apoio financeiro das seguintes instituições:



Universidade de Brasília

Secretaria de
Educação



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Henrique** (*in memorian*) e **Meire**, meus primeiros professores, pelos ensinamentos que me deram suporte para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus familiares: **vovó Maria** e **vovô José** (*in memorian*); **tia Marlene** e **tia Neide**, pelo carinho e incentivo de sempre.

À **dona Dalva**, minha mãe preta, pela presença e apoio constantes.

Aos meus amados filhos, **Calel** (*in memorian*) e **Maximus**, por me darem o sentido e a motivação para seguir em frente.

Aos meus queridos amigos, que estiveram comigo tanto nos melhores quanto nos piores momentos, pela atenção, cuidado e acolhimento, que foram imprescindíveis nessa caminhada.

Ao meu namorado, **sapinho**, pela colaboração e apoio emocional.

Ao **Dr. Wesley**, pelo importante apoio psicológico.

Ao prezado **Prof. Dr. José Raimundo Corrêa**, pela orientação e oportunidade oferecidas, e pela paciência e cortesia a mim dispensadas ao longo do curso de doutorado.

Aos professores da Pós-graduação em Patologia Molecular por terem me fornecido embasamento teórico para a realização deste curso.

Ao secretário da Pós-graduação em Patologia Molecular, **Alessandro**, pela solicitude e prestatividade em seus atendimentos.

Aos colegas do Grupo Quimioterápicos e Sondas Fluorescentes do Laboratório de Microscopia e Microanálises do Instituto de Ciências Biológicas, pelo auxílio e troca de informações.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Minha mais sincera gratidão!

RESUMO

Na última década, o desenvolvimento de novos materiais de ouro para aplicações biológicas, como agentes anticâncer e antibacterianos tornou-se um promissor campo de investigação. Superar a resistência antimicrobiana e antitumoral e buscar novas metalodrogas com perfis farmacológicos distintos daqueles dos agentes quimioterápicos de platina constituem os principais desafios de hoje no campo da bioquímica medicinal. Nesse sentido, três novos compostos de Au(I) (**1**, **2** e **3**), mononucleares e altamente fotoluminescentes, baseados em materiais mistos de fosfina/tiocarbamoil-pirazolina, foram apresentados e caracterizados estruturalmente. Propriedades luminescentes e possíveis aplicações biológicas foram avaliadas. Trata-se de complexos catiônicos mononucleares do tipo $[\text{Ph}_3\text{PAu(L)}]\text{PF}_6$, com geometria de coordenação linear em torno de átomos Au(I). A investigação das propriedades fotofísicas mostrou uma intensa emissão azul-esverdeada quando os complexos foram excitados a 305 nm em solução. Essa emissão foi atribuída às transições eletrônicas mistas TCML + IL e TCLL, que ocorrem após a complexação do ligante. A caracterização dos compostos também incluiu experimentos de análises elementares e estudos de emissão/absorção. Adicionalmente, os compostos **1**, **2** e **3** e seus respectivos ligantes foram investigados como agentes antibacterianos contra cinco cepas de *Streptococcus aureus* (Gram-positivas) e uma cepa de *Escherichia coli* (Gram-negativa) com perfis distintos de resistência a antibióticos. A atividade citotóxica foi avaliada usando o método MTT contra as linhagens celulares de melanoma (B16F10), carcinoma mamário (4T1) e normais (BHK-21). Os compostos Au(I) mostraram-se mais ativos que seus respectivos precursores e ligantes livres. Testados como sondas para bioimagem celular, os complexos mostraram boa biodistribuição no citoplasma de MCF-7 e MDA-MB-231 (linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano).

Palavras-chave: Compostos de ouro, antibacteriano, antitumoral, microscopia confocal de varredura a laser, bioimagem.

ABSTRACT

In the last decade, the development of new gold materials for biological applications, such as anticancer and antibacterial agents, has become a promising field of investigation. Overcoming antimicrobial and antitumor resistance and searching for new metallodrugs with pharmacological profiles different from those of platinum chemotherapeutic agents constitute the main challenges of today in the area of medicinal biochemistry. Considering that, three new mononuclear and highly photoluminescent Au(I) compounds (**1**, **2** and **3**), based on mixed phosphine/thiocarbamoyl-pyrazoline materials, were identified and structurally characterized. Luminescent properties and possible biological applications were evaluated. They are mononuclear cationic complexes of the $[\text{Ph}_3\text{PAu(L)}]\text{PF}_6$ type, with linear coordination geometry around the Au(I) atoms. The investigation of the photophysical properties showed an intense blue-greenish emission when the complexes were excited at 305 nm in solution. This emission was attributed to the mixed electronic transitions TCML + IL and TCLL, which occur after ligand complexation. The characterization of the compounds also included elemental analysis experiments and emission/absorption studies. Additionally, compounds **1**, **2** and **3** and their respective ligands were investigated as antibacterial agents against five strains of *Streptococcus aureus* (Gram-positive) and one strain of *Escherichia coli* (Gram-negative) with distinct antibiotic resistance profiles. Cytotoxic activity was evaluated by the MTT method against melanoma (B16F10), mammary carcinoma (4T1) and normal (BHK-21) cell lines. Au(I) compounds were more active than their respective precursors and free ligands. Tested as probes for cell bioimaging, the complexes showed good biodistribution in the cytoplasm of MCF-7 and MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma cell lines). The photophysical properties, together with preliminary cell bioimaging assays, make these new materials suitable for application as biomarkers, both bioactive and luminescent, in bioimaging approaches.

Keywords: Gold compounds, antibacterial, antitumor, confocal laser scanning microscopy, bioimaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxas estimadas de incidência global dos diversos tipos de câncer em homens e mulheres, por 100.000, para 2020	03
Figura 2. Reações e funções da TrxR na célula.....	09
Figura 3. Fórmula estrutural da Auranofina, fármaco classificado pela OMS como um agente antirreumático.....	10
Figura 4. Fórmulas estruturais das Pirazolinas 1 (4,5-dihidro-3H-pirazol), 2 (4,5-dihidro-1H-pirazol) e 3 (2,3-dihydro-1H-pirazol)	23
Figura 5. Fórmula estrutural do grupo tiocarbamoil, RCSNH ₂	24
Figura 6. Fórmula estrutural da trifenilfosfina (PPh ₃).....	25
Figura 7. Esquema da síntese dos complexos.....	30
Figura 8. Estrutura cristalina do composto 1	31
Figura 9. Estrutura cristalina do composto 2	31
Figura 10. Estrutura cristalina do composto 3	32
Figura 11. Espectro de absorção dos complexos e seus respectivos ligantes medidos a 298 K ($\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$), em solução CH ₂ Cl ₂	33
Figura 12. Complexo 3 em solução de diclorometano ($1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$)	34
Figura 13. Espectro de emissão dos complexos e seus respectivos ligantes medidos a 298 K ($\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$), em solução CH ₂ Cl ₂	34
Figura 14. Espectros de excitação ($\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$) e emissão do complexo 1 medidos a 298 K, em solução CH ₂ Cl ₂	35
Figura 15. Espectros de excitação ($\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$) e emissão do complexo 2 medidos a 298 k, em solução CH ₂ Cl ₂	36
Figura 16. Espectros de excitação ($\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$) e emissão ($\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$) do complexo 3 medidos a 298 k, em solução CH ₂ Cl ₂	36
Figura 17. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MDA-MD231 coradas com complexos 1 , 2 e 3	38
Figura 18. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 coradas com 1	39
Figura 19. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 coradas com 2	40
Figura 20. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 coradas com 3	41
Figura 21. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de HUVEC (Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana) coradas com complexo 3	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência estimada de câncer no Brasil para 2020, conforme a localização primária do tumor, exceto pele não melanoma.	04
Tabela 2. Classificação das principais drogas aprovadas pela FDA para o tratamento do câncer e seus mecanismos de ação.	06
Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), em $\mu\text{g ml}^{-1}$, para os complexos 1 , 2 e 3 , e seus respectivos ligantes.	43
Tabela 4. Concentrações que inibem 50% da viabilidade de proliferação celular (IC_{50} , $\mu\text{M} \pm \text{SD}$).....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4T1	Células de carcinoma mamário
A2780	Linhagem celular de câncer de ovário
ACE2	Enzima de conversão de angiotensina II
AF	Auranofina
AgPen	Complexo de prata (I) contendo penicilina
ATCC 25922	Cepa derivada de <i>Escherichia coli</i>
ATCC 25923	Cepa derivada de <i>Staphylococcus aureus</i>
B16F10	Células de melanoma
BHK-21	Fibroblastos renais do bebê Hamster
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COVID-19	<i>Corona Virus Disease 2019</i>
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
CRISPR/Cas9	Conjunto de repetições palindrômicas regularmente espaçadas em associação com a nuclease Cas9, do inglês, <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) associated protein-9</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
G2/M	Ponto de verificação de danos ao DNA durante o ciclo celular
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HT29	Linhagem tumoral colorretal humana
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
MCF-7	Linhagem celular tumoral de mama
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MDA-MB-231	Linhagem celular tumoral de mama
MTT	Teste utilizado para determinação da viabilidade celular
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato;
NHC	Carbenos N-heterocíclicos
p53	Gene supressor tumoral
PBS	Tampão Salina-Fosfato modificado, do inglês, <i>Phosphate-buffered saline</i>

PdTC Complexo de paládio coordenado à tetraciclina, do inglês, *Pyrrolidine Dithiocarbamate*

PT-ACRAMTU{[PtCl(en)(ACRAMTU)](NO₃)₂, 2; ACRAMTU = 1-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea, 1, en = ethane-1,2-diamine}, composto híbrido com atividade antineoplásica

RNA..... Ácido Ribonucléico

RPMI 1640 Meio de cultura celular desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute

SARS-CoV-2Síndrome Respiratória Aguda, do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SFB Soro Fetal Bovino

SK-BR-3 .Linhagem celular tumoral de mama humana isolada pelo Centro de Câncer Memorial Sloan-Kettering

TCD4 Linfócitos T auxiliares CD4

TCILTransferência de Carga Intraligante

TCLLTransferência de Carga Ligante-Ligante

TCLMTransição de Carga Ligante-Metal

TCML + IL Transições Eletrônicas Mistas Metal-Ligante + Intraligante

TD-DFTTeoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo

TEF Transferência de Elétrons Fotoinduzida

TrxR Tiorredoxinas Redutases;

UV-vis..... Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Agentes quimioterápicos.....	2
1.2. Câncer	3
1.2.1. Quimioterapia no tratamento do câncer.....	5
1.3. Bactérias e antibióticos	7
1.3.1. <i>Histórico</i>	7
1.3.2. <i>Bactérias Gram positivas e Gram negativas</i>	8
1.4. Compostos de coordenação.....	9
1.4.1. Compostos de coordenação de ouro ou prata: agentes anticânceres	11
1.4.2. Compostos de coordenação de ouro e prata: agentes antimicrobianos	18
1.4.3. Compostos de coordenação de Au ou Ag: agentes de bioimagem celular	21
1.5. Ligantes Fostina/Tiocarbamoil-Pirazóis: características e propriedades	25
2. justificativa	29
3. Objetivo	30
3.1. Objetivos específicos	30
3.1.1. Apresentar e caracterizar os complexos 1, 2 e 3 quanto à estrutura molecular e à natureza fotoluminescente destes compostos;	30
3.1.2. Avaliar os complexos 1, 2 e 3 como agentes antibacterianos contra as cepas <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>E. coli</i> ATCC 25922, bem como, contra as cepas clínicas de <i>S. aureus</i> resistentes (clínica 1*, clínica 2*, clínica 3* e clínica 4*).	30
3.1.3. Determinar a citotoxicidade dos complexos 1, 2 e 3 em células tumorais das linhagens 4T1, B-16-F10 e da linhagem não tumoral BHK-21.	30
3.1.4. Analisar a captação e biodistribuição dos complexos 1, 2 e 3 em células tumorais;	30
3.1.5. Avaliar a aplicabilidade dos complexos 1, 2 e 3 como sondas para bioimagem celular.	30
4. materiais e métodos	31
4.1. Reagentes e equipamentos	31
4.2. Preparo dos compostos	31
4.3. Ensaio de bioimagem	32
4.4. Atividades biológicas.....	33
4.4.1. <i>Ensaio antibacterianos</i>	33
4.4.2. <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	35
4.5. Análises estatísticas	36
5. Resultados.....	37

5.1. Estrutura cristalina	37
.....	38
5.2. Absorção UV-vis	38
5.3. Estudos de fotoluminescência e bioimagem	39
5.4. Estudos antimicrobianos <i>in vitro</i>	48
5.5. Citotoxicidade	48
6. Discussão	50
7. Conclusão	53
8. bibliografia	54
9. ANEXOS	59
9.1. Anexo I: artigo científico	59
9.2. Anexo II: Informações suplementares	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agentes quimioterápicos

Agentes quimioterápicos são substâncias químicas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas ou neoplásicas em concentrações toleradas pelo hospedeiro. O conceito de quimioterápico abrange, principalmente, substâncias sintetizadas em laboratório que apresentam toxicidade considerada baixa para as células normais do hospedeiro e relativamente alta para o agente agressor (WALTER TAVARES, 2020).

O termo “quimioterapia” foi criado pelo biólogo alemão Paul Ehrlich, que foi pioneiro na investigação do uso de drogas para tratar doenças infecciosas. Considerado o pai da quimioterapia, foi o primeiro cientista a estudar modelos animais para examinar uma série de produtos químicos em relação a sua atividade potencial contra doenças. Documentos históricos sugerem que o uso bem-sucedido de combinações de arsênicos no tratamento da sífilis começou nos anos 1900, abrindo caminho para o desenvolvimento de drogas que viveram a ser empregadas para o tratamento do câncer (DEVITA; CHU, 2008).

O objetivo dos agentes quimioterápicos é inibir a proliferação de micro-organismos patogênicos ou de células neoplásicas, explorando diferentes níveis do funcionamento de moléculas pertencentes a maquinaria celular e seu microambiente. A diversidade da estrutura química dessas drogas lhes confere propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas variadas, devido aos seus diferentes mecanismos de ação. (AMJAD MT, 2020).

Considerando a importância da toxicidade seletiva, em micro-organismos, os principais alvos dos agentes quimioterápicos são: síntese da parede celular; interferência na integridade da membrana celular; interferência na síntese proteica; atividade antimetabólica, e, síntese e integridade de ácidos nucleicos. Já em células neoplásicas, os quimioterápicos tradicionais tem como alvo, principalmente, a síntese macromolecular, interferindo na síntese de DNA, RNA ou proteínas, além de atuarem inibindo o funcionamento apropriado de moléculas pré-formadas interferindo com etapas importantes da divisão celular, levando as células a morte (AMJAD MT, 2020; WALTER TAVARES, 2020).

1.2. Câncer

O câncer, também chamado de neoplasia maligna, é um amplo grupo de doenças que podem ocorrer em quase todos os tecidos ou órgãos do corpo humano, quando, inicialmente, células normais perdem o controle de sua proliferação. Este evento normalmente é seguido pela inativação dos processos de morte celular. Finalmente, determinadas populações destas células podem adquirir propriedades de células embrionárias, como capacidade migratória e síntese de metaloproteinasas (BOCK; TAIT, 2020; GIOVANNELLI *et al.*, 2019).

Esta última etapa caracteriza os tumores malignos, quando as células ultrapassam seus limites dentro do tecido, degradam membranas basais, colonizando espaços reservados a outros tipos celulares. Tais células degradam a matriz extracelular e migram para dentro de vasos sanguíneos e linfáticos, dispersando-se dentro do organismo e iniciando a colonização de regiões distantes do tumor primário. Uma vez instaladas em outros órgãos e tecidos, estas células originam novas lesões tumorais, denominadas metástases (ADJEI; HIDALGO, 2005; JIN *et al.*, 2019).

De acordo com o Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), uma plataforma da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), pertencente à Organização das Nações Unidas (ONU), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, tendo ocasionado, aproximadamente, 10 milhões de mortes em 2020. A maioria das mortes por câncer, se dá por sua propagação, no processo de metástase (WHO, 2021).

A demanda para tratamento do câncer cresce continuamente em todo o mundo, exercendo enorme pressão física, emocional e financeira nos indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde. Muitos sistemas de saúde em países em desenvolvimento não têm estrutura suficiente para administrar esse problema, e um grande número de pacientes com câncer em todo o mundo não tem acesso a diagnóstico e tratamento de qualidade em tempo hábil. Em países onde os sistemas de saúde são estruturados, as taxas de sobrevivência de muitos tipos de câncer estão melhorando graças à detecção precoce e acessível, ao tratamento de qualidade e aos cuidados de sobrevivência (WHO, 2021).

Em escala global, os tipos mais comuns da doença em homens, em ordem de incidência, são câncer de pulmão, de próstata, colorretal, de estômago e de fígado,

enquanto que, entre mulheres, os tipos mais frequentes são câncer de mama, colorretal, pulmonar, de colo do útero e de tireoide (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH IN CANCER, 2019) (Figura 1).

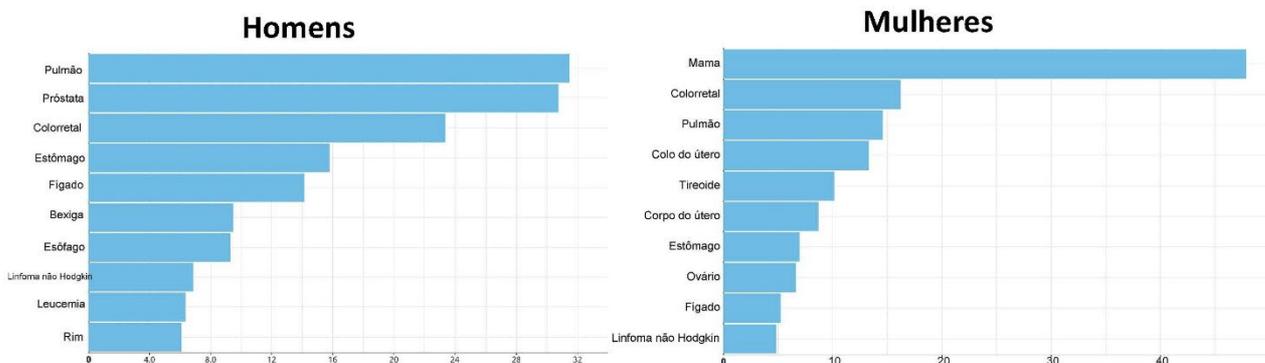


Figura 1. Taxas estimadas de incidência global dos diversos tipos de câncer em homens e mulheres, por 100.000, para 2020. (GLOBOCAN, 2020), adaptada).

Para o Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão pertencente ao Ministério da Saúde, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil, cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). O cálculo global corrigido para sub-registro, aponta a ocorrência de 685 mil novos casos (INCA, 2019; MATHERS; BERNARD; IBURG, 2004) (Tabela 1).

Além do mais, muitos pacientes apresentam recorrência da doença e requerem uma segunda linha de tratamento ou, em alguns casos, mais de duas. Dentro deste contexto, outra importante demanda do tratamento do câncer, é a necessidade de se reduzir os efeitos tóxicos das terapias convencionais (MALIK *et al.*, 2021).

Diante dos dados apresentados, esforços contínuos são feitos no sentido de se encontrar terapias inovadoras para uma variedade de tipos de câncer. Opções terapêuticas têm crescido exponencialmente ao longo do tempo, no entanto, o sucesso da terapia do câncer em todo o mundo só pode ser alcançado com o conhecimento aprofundado da biologia do tumor, de suas interações em seus microambientes e com o sistema imune. Tais condições contribuiriam ainda de forma muito significativa para a identificação de marcadores moleculares de circulação

precoces presentes em fases muito iniciais desta doença (HERTER-SPRIE; KUNG; WONG, 2013).

Tabela 1. Incidência estimada de câncer no Brasil para 2020, conforme a localização primária do tumor, exceto pele não melanoma. (INCA 2019, adaptada).

Localização Primária	Casos Novos	%			Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	65.840	29,2			Mama feminina	66.280	29,7
Cólon e Reto	20.540	9,1			Cólon e Reto	20.470	9,2
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9			Colo do útero	16.710	7,5
Estômago	13.360	5,9			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6
Cavidade Oral	11.200	5,0			Glândula Tireoide	11.950	5,4
Esôfago	8.690	3,9			Estômago	7.870	3,5
Bexiga	7.590	3,4			Ovário	6.650	3,0
Laringe	6.470	2,9			Corpo do útero	6.540	2,9
Leucemias	5.920	2,6			Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Sistema Nervoso Central	5.870	2,6			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	225.980	100,0			Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	223.110	100,0
Todas as Neoplasias	309.750				Todas as Neoplasias	316.280	

1.2.1. Quimioterapia no tratamento do câncer

Sabe-se que a progressão do câncer leva à formação de uma população heterogênea de células dentro do tumor com diferentes características moleculares. Essa heterogeneidade é marcada pela presença de populações clonais de células tumorais típicas e de populações de células tronco tumorais, com proliferação autossustentável, não responsividade a sinais de natureza antiproliferativa, evasão de apoptose, potencial irrestrito de replicação, vascularização sustentada e, para malignidade, invasão de tecido e metástase. A heterogeneidade é o fator que torna as células tumorais resistentes à administração de diversos esquemas de tratamentos, tornando crucial o desenvolvimento de novas terapias (DEVITA; CHU, 2008; MALIK *et al.*, 2021).

Recentemente surgiram muitas novas ideias e conceitos terapêuticos, como o uso de ferramentas de edição de genes por meio do sistema CRISPR / Cas9, capaz de corrigir mutações de DNA em células T humanas, entre outras diversas abordagens. Entretanto, as terapias tradicionais, a saber, quimioterapia, imunoterapia, terapia gênica e radioterapia ainda são a base para o tratamento do câncer, sendo

também imprescindível a busca por avanços nestes tratamentos (MALIK *et al.*, 2021; TIAN, X. *et al.*, 2019).

O objetivo da quimioterapia no contexto do câncer é inibir a proliferação celular, o que determina o crescimento do tumor, evitando, assim, a invasão em tecidos adjacentes e a consequente metástase. A inibição do crescimento do tumor pode ocorrer em vários níveis dentro da célula e em seu ambiente, a depender do alvo do quimioterápico. Quando a interferência na síntese ou função macromolecular é suficiente, levará à morte celular, seja pelo efeito direto do quimioterápico, seja pelo desencadeamento da apoptose (ADJEI; HIDALGO, 2005).

Os mecanismos celulares que promovem ou suprimem a proliferação e diferenciação celular são intrincados, envolvendo vários genes, receptores e diferentes vias de transdução de sinal. No entanto, as investigações em biologia de células tumorais levaram a uma visão significativa dos mecanismos de apoptose, angiogênese, metástase, vias de transdução de sinal, diferenciação e modulação de fatores de crescimento; conhecimentos imprescindíveis, que viabilizaram o desenvolvimento de diversos quimioterápicos (ADJEI; HIDALGO, 2005; AMJAD MT, 2020; BASKAR *et al.*, 2012) (Tabela 2).

A quimioterapia é frequentemente usada em conjunto com a radioterapia e a cirurgia. Quando administrada antes da cirurgia ou radioterapia é conhecida como quimioterapia neoadjuvante, para ajudar a diminuir o tamanho do tumor, enquanto que, a quimioterapia administrada após a cirurgia ou radioterapia é conhecida como quimioterapia adjuvante, que ajuda a matar as células cancerosas remanescentes (BASKAR *et al.*, 2012; INCIURA *et al.*, 2006).

Diversos estudos mostraram que a quimioterapia é muito mais eficaz quando uma combinação de vários medicamentos é usada, no lugar de um único medicamento. A quimioterapia combinada é uma escolha comum para produzir respostas eficazes e parece prevenir o desenvolvimento de clones resistentes. Embora promova citotoxicidade, tanto em células tumorais em repouso como em divisão, afeta também de forma significativa as células normais, sendo esta ação a responsável pelo grande número de efeitos adversos observados em pacientes em tratamento (DEVITA; CHU, 2008).

Tabela 2. Classificação das principais drogas aprovadas pela FDA para o tratamento do câncer e seus mecanismos de ação. (MALIK *et al.*, 2021, adaptada).

Classificação	Exemplos de fármacos	Alvo/ Mecanismo de ação
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida; Ifosfamida	Adicionam um grupo alquil à base guanina, evitando a formação da dupla hélice, promovendo a quebra das fitas
Antimetabólitos	Metotrexato; Gencitabina	Interferem em vias metabólicas pela inibição de reações enzimáticas
Inibidores mitóticos	Docetaxel; Vimblastina	Inibem mitose ou divisão celular
Antibióticos	Actinomicina, Bleomicina	Interferem com enzimas de replicação de DNA
Inibidores da topoisomerase	Topotecana; Etoposida	Bloqueiam a ação de topoisomerasas, interrompendo a replicação e reparo de DNA e a transcrição de RNA
Anticorpos	Trastuzumab; Cetuximab	Simulam o sistema imune para atacar células tumorais; Bloqueiam receptores celulares específicos
Inibidores de Transdução de sinal	Dasatinib; Imatinib	Inibem sinais celulares específicos
Moludadores epigenéticos	Vorinostat; Romidepsin	Inibem HDACs (Histonas Deacetilases)
Hormônios	Tamoxifeno; Anastrozole	Inibem vias relacionadas ao metabolismo de hormônios esteróides
Complexos de coordenação de Platina	Cisplatina; Carboplatina; Oxaliplatina	Inibem a síntese de DNA

1.3. Bactérias e antibióticos

1.3.1. Histórico

O homem e os micróbios partilham uma vida em comum que se perde na sombra do tempo, e, certamente, desde a pré-história, os micróbios provocam doença no homem. Entretanto, as causas dessas doenças só começaram a ser descobertas no século XIX, a partir de 1878, graças, sobretudo, aos trabalhos de Pasteur e Koch, e de seus contemporâneos, que demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades do homem e de outros animais (WALTER TAVARES, 2020).

A Segunda Guerra Mundial provocou um grande desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica de síntese, originando-se daí inúmeros novos quimioterápicos. Nesse mesmo período mundo assistiu ao surgimento de uma nova era no tratamento das infecções, com a introdução dos antibióticos na prática médica.

A descoberta da penicilina G, o primeiro antibiótico de utilidade clínica, ocorreu quando Alexander Fleming estudava culturas de *Staphylococcus aureus*, em 1928. Observou-se, na ocasião, que culturas dessa bactéria deixadas sobre uma bancada tinham se contaminado por um fungo do ar e que ao redor do fungo contaminante não existia crescimento do estafilococo. Fleming estudou o fenômeno observado, verificando que o fungo pertencia ao gênero *Penicillium*, atualmente denominado *P.*

chrysogenum, o qual elaborava uma substância que, difundindo-se no meio de cultura, exercia efeito antimicrobiano sobre a bactéria ali presente (FLEMING, 1946).

A era da antibioticoterapia estava, então, iniciada, envolvendo novos técnicos e cientistas, com novos métodos, equipamentos e materiais relacionados à química, à biologia e à farmacologia, e exigindo a montagem de novas estruturas de produção e comercialização da nova droga. O resultado final deste processo científico e tecnológico refletiu-se na mudança de expectativa de inúmeras doenças infecciosas, antes de difícil tratamento, apresentando agora melhor prognóstico, com elevado índice de cura e poucas sequelas (WEINSTEIN; BARZA, 1977). (Tabela 3).

Efeito dos Antibióticos no Índice de Letalidade de Algumas Infecções Comuns		
LETALIDADE (%)		
Doença	Era Pré-antibiótica	Era Pós-antibiótica
Pneumonia pneumocócica	20-85	cerca 5
Endocardite bacteriana subaguda	99	5
Meningite por <i>H. influenzae</i>	100	2-3
Meningite pneumocócica	100	8-10
Meningite meningocócica	20-90	1-5
Febre tifoide	8-10	1-2

Fonte: Weinstein L, Barza MJ. Am J Med Sci 1977;273:4-20.

1.3.2. Bactérias Gram positivas e Gram negativas

A forma das bactérias pode ser observada através de coloração de Gram que classifica as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas, ambos aproximadamente iguais em número e importância. A reação das bactérias à técnica de Gram expressa diferentes características, no que diz respeito à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (BROCHOT *et al.*, 2017).

A parede da célula Gram-negativa é constituída por múltiplas camadas diferentes, bastante complexas, que não retêm o corante quando submetidas a solventes nos quais o corante é solúvel, sendo descoloradas, e, quando acrescentado outro corante, adquirem nova coloração. Já a parede da célula Gram-positiva consiste

em uma única camada, que retém o corante aplicado, não adquirindo a coloração do segundo corante (SHAH, 1995).

O peptidoglicano é um heteropolissacarídeo ligado a péptideos presentes na parede celular de procariontes. É responsável pela morfologia das células e confere proteção ao citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e interno. É constituído por dois açúcares aminados, o ácido N-acetil glicosamina e o ácido N-acetil murâmico, e por um tetrapeptídeo, que está sempre ligado a um resíduo de ácido N-acetil murâmico (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS *et al* 2017).

Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular está composta por uma camada de peptidoglicano e três outras camadas, que a envolvem externamente; lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo. Nessas bactérias, a camada de peptidoglicano situa-se no espaço periplásmico, localizado entre a membrana citoplasmática (interna) e a membrana externa, onde também são encontradas enzimas hidrolíticas (fosfatases, nucleases, proteases e outras), que facilitam a nutrição bacteriana, a captação de açúcares e aminoácidos a partir do meio e a resistência a certos antibióticos (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS *et al* 2017).

Já nas bactérias Gram-positivas, a parede celular é mais espessa e rígida, consistindo em um único tipo de camada, composta, quase que completamente, por peptidoglicano. As múltiplas camadas de peptidoglicano das bactérias Gram-positivas constituem uma estrutura extremamente forte em tensão (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS *et al* 2017).

1.4. Compostos de coordenação

Os compostos de coordenação são formados por uma espécie central receptora de elétrons, que está ligada por covalência às outras espécies que compõem o composto, chamadas de ligantes, os quais, por sua vez, são doadores de elétrons. Geralmente a espécie central é um íon metálico, que confere características complexas a esses compostos, e neste caso, podem ser chamados de complexos metálicos (COELHO, 2015).

Os íons metálicos são essenciais para as funções biológicas. Alguns dos melhores exemplos conhecidos são o ferro (II), presente nas estruturas da hemoglobina e mioglobina, zinco (II), na enzima superóxido dismutase, cálcio, na formação óssea, sódio e potássio, nos processos homeostáticos, dentre muitos outros. Existem, também, muitos exemplos de íons metálicos e seus complexos que são usados como agentes farmacêuticos no diagnóstico ou mesmo no tratamento de uma grande variedade de doenças humanas (ABDOU *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012; ROCHA, D. P. *et al.*, 2011).

Os complexos metálicos mais proeminentes na medicina são as drogas anticâncer contendo platina. Esses agentes representam um dos grandes avanços no campo da química inorgânica medicinal. Três medicamentos à base de platina foram aprovados mundialmente para o tratamento do câncer em humanos, a saber, cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (Tabela 2 - seta). Apesar de terem sido introduzidos no mercado há quase 40 anos, os complexos de platina permanecem entre os quimioterápicos anticânceres mais amplamente utilizados, sendo empregados para o tratamento do câncer de cabeça, pescoço, pulmão, ovário e testículo (JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016; WALTER TAVARES, 2020).

Embora os compostos à base de platina estejam bem estabelecidos na atual quimioterapia contra o câncer, o tratamento de doenças tumorais com esses agentes é maciçamente dificultado por graves efeitos adversos, os quais são relacionados à dose e incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade. Além disso, algumas linhagens tumorais são intrinsecamente resistentes a essas drogas, e mesmo as inicialmente sensíveis, podem passar por seleção de clones e se estabelecer populações resistentes ao tratamento (BARREIRO *et al.*, 2010; JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016; RYBAK, L. MUKHERJEA, D. JAJOO, 2009).

Com base em suas diferentes cinéticas, geometrias e reatividades em comparação com as drogas orgânicas não metálicas clássicas, os compostos metálicos podem oferecer um enorme espaço químico inexplorado em relação ao *design* e desenvolvimento de drogas modernas, que provavelmente foi subestimado pela pesquisa acadêmica e industrial de drogas (OTT, 2009).

Entretanto, nas últimas décadas, com o progresso no conhecimento dos mecanismos de funcionamento celular, o interesse em complexos de metais não-

platinados para quimioterapia tem crescido rapidamente. Superar a resistência antimicrobiana e antitumoral e buscar novas metalodrogas com perfis farmacológicos distintos daqueles dos agentes quimioterápicos de platina constituem os principais desafios de hoje no campo da bioquímica medicinal (OTT, 2009; WALTER TAVARES, 2020).

1.4.1. Compostos de coordenação de ouro ou prata: agentes anticânceres

O desenvolvimento de novos compostos de coordenação de ouro (Au) ou de prata (Ag) para aplicações biológicas, tais como, agentes anticânceres, antibacterianos, entre outras, tornou-se um campo de investigação bastante promissor (ABDOU *et al.*, 2009; BARREIRO *et al.*, 2010; CHAVES *et al.*, 2017; NOMIYA *et al.*, 2003; ORTEGO *et al.*, 2015; TAVARES, T. T. *et al.*, 2017).

Diversos desses compostos exibem propriedades citotóxicas para várias linhagens tumorais e também são eficazes contra linhagens resistentes à cisplatina. Essa eficácia parece estar relacionada à diversidade estrutural dos ligantes e seus complexos resultantes, que podem exibir uma infinidade de alvos (BARREIRO *et al.*, 2010; CHAVES *et al.*, 2017).

Particularmente, os complexos à base de ouro, em ambos os estados de oxidação, Au(I) e Au(III), têm atraído interesse crescente como potenciais agentes antitumorais e há evidências de que muitos deles atuam por mecanismos que envolvem as vias de morte celular mitocondrial. A mitocôndria tem um papel crucial na apoptose, o que faz dessas organelas um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas metalodrogas anticâncer (BARNARD; BERNERS-PRICE, 2007).

O mecanismo de ação dos complexos de Au ainda não é bem compreendido. Estudos sugerem que, ao contrário da cisplatina, o DNA não é o alvo primário. Neste caso, a citotoxicidade é mediada pela capacidade do composto de alterar a função mitocondrial e inibir a síntese de proteínas, interferindo nas interações DNA-proteína. Isso poderia ser parcialmente explicado pela maior afinidade do ouro para os ligantes contendo enxofre (tiolatos) e fósforo (fosfinas), e a menor afinidade por ligantes constituídos de nitrogênio e oxigênio (BARREIRO *et al.*, 2010; CHAVES *et al.*, 2017; OLIVEIRA, M. A. *et al.*, 2010).

Os complexos de ouro (I) estão entre os mais potentes inibidores conhecidos da tiorredoxina redutase (TrxR), qualidade atribuível à ligação de Au(I) ao resíduo de selenocisteína redox-ativo desta enzima. A TrxR converte a tiorredoxina a seu estado reduzido, em uma reação dependente de NADPH. As tiorredoxinas, por sua vez, atuam como doadores de elétrons, tanto para peroxidases, como para a ribonucleotídeo redutase (BARNARD; BERNERS-PRICE, 2007; CARLOS LIMA; RODRIGUEZ, 2012; HUANG; ZHONG, 2012).

Esse sistema é fundamental para o desempenho de várias funções biológicas, tais como, síntese de DNA, defesa contra o estresse oxidativo, apoptose e sinalização redox (Figura 2). Assim, a TrxR é um dos alvos específicos para o desenvolvimento de novas metalodrogas de coordenação Au(I) com atividade anticâncer (BARNARD; BERNERS-PRICE, 2007; CARLOS LIMA; RODRIGUEZ, 2012; HUANG; ZHONG, 2012).

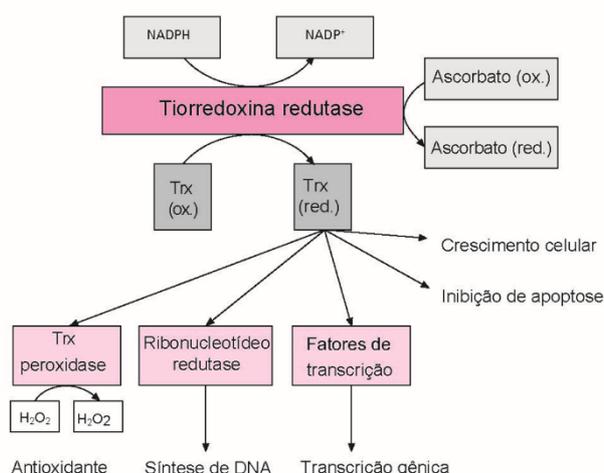


Figura 2. Reações e funções da TrxR na célula.

A TrxR utiliza NADPH para catalisar a conversão da Trx oxidada (ox.) em Trx reduzida (red.), e para reduzir as formas oxidadas de ascorbato em ascorbato reduzido. A Trx reduzida proporciona as seguintes reduções em seus respectivos alvos: (I) Trx peroxidase, que decompõe H₂O₂ em água; (II) ribonucleotídeo redutase, que reduz ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos para síntese de DNA e (III) fatores de transcrição, o que leva ao aumento da sua ligação ao DNA e à transcrição gênica alterada. Além disso, a Trx aumenta o crescimento celular e inibe a apoptose (HUANG; ZHONG, 2012, adaptada).

Além disso, o modo de ação desses compostos pode incluir: alteração do ciclo celular; geração de espécies reativas de oxigênio, que podem levar a danos mitocondriais e/ou no DNA; inibição de proteassoma; e inibição da topoisomerase IB, todos levando à apoptose (DELGADO *et al.*, 2020; MÁRMOL *et al.*, 2019; TAVARES, T. T. *et al.*, 2017).

A toxicidade relativamente baixa do ouro e sua labilidade permitem o consumo humano de medicamentos formados com esse elemento. Em 1985, o composto de fosfina de Au(I), conhecido como Auranofina (AF) (Figura 3) foi aprovado para o tratamento da artrite reumatoide. A AF substituiu o tratamento clínico com tiolatos injetáveis de Au(I) sendo usada amplamente por muitos anos, mostrando alguns efeitos secundários. Embora reações alérgicas, de causas desconhecidas, tenham limitado o uso no tratamento da artrite reumatoide, os medicamentos com ouro mostraram-se ativos para essa doença (ABDOU *et al.*, 2009; DELGADO *et al.*, 2020).

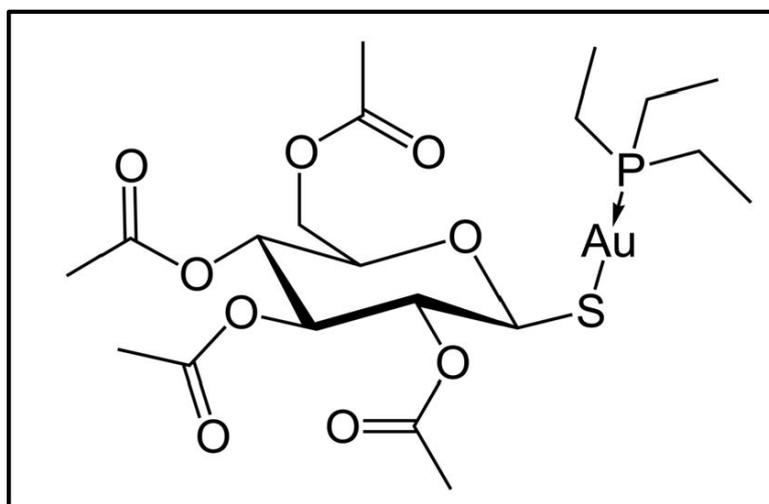


Figura 3. Fórmula estrutural da Auranofina, fármaco classificado pela OMS como um agente antirreumático.

Posteriormente, no entanto, a AF mostrou-se menos eficaz do que outras drogas antirreumáticas, tais como o metotrexato, o que levou a uma diminuição do seu uso clínico. Em meados dos anos 80, a AF mostrou-se um potente inibidor do crescimento de células tumorais *in vitro*, com atividade antitumoral *in vivo* limitada em modelos tumorais de camundongos (DELGADO *et al.*, 2020).

Duas classes distintas de complexos Au(I) contendo fosfina exibem propriedades antitumorais, os que apresentam geometria linear, de duas coordenadas, como a AF, e, os biquelatos tetraédricos, de quatro coordenadas. Estes últimos são cátions lipofílicos, que são estáveis na presença de tióis, além de exibirem substituintes aromáticos, que reduzem a probabilidade de reações colaterais oxidativas, em comparação às fosfinas substituídas com alquil (OTT, 2009).

Foi demonstrado que complexos tetraédricos catiônicos de Au(I) relacionados à fosfina não estão sujeitos a reações de troca de ligante tão prontamente quanto complexos de Au(I) lineares de duas coordenadas, sugerindo que essa atividade antitumoral pode resultar de propriedades lipofílicas catiônicas (BARNARD; BERNERS-PRICE, 2007).

Ambas as categorias parecem ter como alvo as mitocôndrias, por exemplo, a AF, que mostrou induzir a apoptose por meio da inibição seletiva da isoforma mitocondrial da TrxR. Porém, é provável que diferentes mecanismos estejam envolvidos, relacionados à propensão desses compostos a passar por reações de troca de ligante com ligantes biológicos (BARNARD; BERNERS-PRICE, 2007).

Outro grupamento, a naftalimida, foi utilizada com o objetivo de substituir o ligante de carboidrato da AF, supostamente mais relevante para a biodistribuição do composto do que para seus efeitos farmacodinâmicos. Au-Naftamilida apresentou efeitos promissores inibidores da proliferação celular, induziu apoptose e inibiu TrxR (GROVES *et al.*, 2019).

Como ligante bioativo, a porção naftalimida foi escolhida com base nos resultados pré-clínicos promissores da classe de drogas antitumorais das naftalimidias. Essa categoria de fármacos é caracterizada por conter um núcleo de naftalimida heterocíclico, capaz de se intercalar ao DNA, e uma cadeia lateral contendo um nitrogênio protonável, que permite um contato inicial com o esqueleto fosfato do DNA. Como muitos derivados da naftalimida exibem propriedades de fluorescência interessantes, esse ligante também pode fornecer uma bioimagem aprimorada dos compostos durante os exames *in vitro* e *in vivo*. (GROVES *et al.*, 2019; OTT *et al.*, 2009).

Complexos análogos ao medicamento AF contêm um ligante tiolato ligado ao Au(I) (Figura 3). Estudos de captação celular e biodistribuição demonstraram que a atividade antitumoral desses complexos é influenciada tanto pela natureza de seu ligante tiolato quanto por seu grupo fosfina. Já para complexos Au/ bis (difosfina), os mesmos estudos evidenciaram que a natureza das difosfinas afetaram claramente suas propriedades biológicas (CARLOS LIMA; RODRIGUEZ, 2012).

Além disso, verificou-se que a seletividade desses complexos para células cancerosas em relação às células normais pode ser modulada pelo ajuste de seu

equilíbrio lipofílico / hidrofílico por meio de *design* de ligante. Em geral, a atividade é reduzida quando a lipofilicidade também é reduzida, embora o átomo de metal também mostre afetar as propriedades biológicas dos complexos. Esses fatos foram observados em uma série de complexos Au contendo diferentes ligantes de fosfina (CARLOS LIMA; RODRIGUEZ, 2012).

As tiossemicarbazonas são mais uma classe de compostos conhecidos por suas propriedades químicas e biológicas, como atividade antitumoral. Sua capacidade de formar quelatos com metais tem grande importância em suas atividades biológicas. Sua síntese é muito simples, versátil e limpa, geralmente dando altos rendimentos, sendo, portanto, amplamente empregados como intermediários na síntese de outros compostos (TENÓRIO *et al.*, 2005).

A química de coordenação de tiossemicarbazonas tem atraído considerável interesse, tendo em vista sua capacidade variável de doação de elétrons, sua diversidade estrutural, bem como suas aplicações biológicas. Esses compostos podem se ligar a íons metálicos como ligantes bidentados (dois átomos doadores) ou tridentados (três átomos doadores), formando anéis quelatos de cinco membros, que conferem estabilidade ao composto (TAVARES, T. T. *et al.*, 2017).

Sabe-se, que as tiossemicarbazonas estão entre os inibidores mais potentes da atividade da ribonucleotídeo redutase, enzima que catalisa a síntese de DNA. Dessa forma, foi estabelecida uma forte correlação entre a atividade da ribonucleotídeo redutase e a atividade antitumoral (KOVALA-DEMERTZI *et al.*, 2003).

Complexos de ouro contendo o ligante tiossemicarbazona apresentam importante citotoxicidade e seletividade em células de câncer colorretal e impressionante capacidade de inibição da TrxR. Análises de modelagem molecular forneceram algumas percepções do modo de ligação entre tais complexos e a enzima TrxR, mostrando o bloqueio de aminoácidos implicados diretamente na catálise enzimática, o que sugere ser esta a causa da inibição da atividade desta enzima (TAVARES, T. T. *et al.*, 2017).

Sabe-se que ligantes derivados de acridina possuem atividade inibitória frente a enzimas reguladoras nucleares, como as topoisomerasas, além de exibirem uma forte interação com pares de bases do DNA. A tiouréia, por sua vez, é um versátil reagente em síntese orgânica. Vários complexos de ouro (I) com ligantes tiouréia são

inibidores de tirosina quinase, enquanto outros, são inibidores da tioredoxina redutase (GOUVEIA; MOURA, 2016; PÉREZ *et al.*, 2017).

Considerando o sucesso da chamada PT-ACRAMTU, um conjugado de platina-acridina-tiouréia direcionado a DNA, dois complexos análogos ouro-acridina-tiouréia foram sintetizados, a fim de se elucidar seus mecanismos de ação em linhagens celulares de câncer de ovário e de mama. Ambos os compostos mostraram citotoxicidade tanto para a linhagem celular de câncer de ovário, A2780, quanto para as linhagens celulares tumorais de mama MDA-MB-231, SK-BR-3 e MCF-7, exibindo valores de IC₅₀ na faixa submicromolar (PÉREZ *et al.*, 2017).

No mesmo estudo, foi demonstrado por métodos espectroscópicos e viscometria, que os complexos de ouro-acridina-tiouréia foram capazes de se intercalarem ao DNA, exibindo um efeito dependente da dose no desenrolamento do DNA mediado pela topoisomerase I, sugerindo assim, um mecanismo de ação dependente de DNA (PÉREZ *et al.*, 2017).

Um aspecto muito importante na concepção de complexos metálicos anticancerígenos é a sua estabilidade em condições fisiológicas, o que permite uma melhor entrega e transporte para as células tumorais. Por essa razão, fortes ligações ligante-metal são necessárias e, a este respeito, ligantes organometálicos, como carbenos *N*-heterocíclicos (NHCs), desempenham um papel fundamental (MORA; GIMENO; VISBAL, 2019).

Recentemente, complexos Au(I) contendo carbenos *N*-heterocíclicos, exibindo duas funções (antitumoral e antibacteriana), têm emergido como quimioterápicos com excelente potencial, com atividades anticâncer e antibacteriana superiores em relação à cisplatina e a antibióticos comerciais, respectivamente (MORA; GIMENO; VISBAL, 2019).

A família de complexos catiônicos lipofílicos Au(I) – NHC mostra uma seletividade particular para selenoproteínas mitocondriais, como TrxR. Curiosamente, esses complexos catiônicos induziram seletivamente a apoptose em células de câncer de mama altamente tumorigênicas, mas não em células normais. Esta toxicidade seletiva é o resultado de reações de troca de ligante em duas etapas com cisteína (Cys) e selenocisteína (Sec), devido à liberação dos ligantes NHCs após a incorporação na mitocôndria (MORA; GIMENO; VISBAL, 2019).

Outros materiais Au(I) com as misturas fosfina/indol ou fosfina/isatina, ambos luminescentes e bioativos, exibiram atividade citotóxica excepcional (10,11-0,28 μM) contra células leucêmicas resistentes a cisplatina da linhagem Jurkat-shBak, sugerindo um futuro promissor para esses agentes contra câncer (FERNÁNDEZ-MOREIRA *et al.*, 2019).

O Indol tornou-se um dos motivos estruturais mais privilegiados no processo de desenvolvimento de drogas e existe em um grande número de produtos ativos naturais e não naturais. Suas propriedades interessantes cobrem diversas áreas de pesquisa, além de produtos farmacêuticos. Muitos desses compostos já são drogas estabelecidas no mercado ou estão em ensaios clínicos. Portanto, o projeto de novas estruturas indol com propriedades atraentes ainda é um desafio ativo e o objetivo de esforços consideráveis por muitos grupos de pesquisa (FERNÁNDEZ-MOREIRA *et al.*, 2019).

Outra estrutura relacionada é o esqueleto de isatina que ganhou muita atenção de químicos orgânicos e medicinais, uma vez que este motivo também constitui o núcleo estrutural de um grande número de produtos naturais, bem como, de vários outros medicamentos candidatos. Junto com todo esse amplo espectro de propriedades biológicas, derivados de indol e isatina também desempenham um papel importante como compostos bioluminescentes (FERNÁNDEZ-MOREIRA *et al.*, 2019)

Em outra recente investigação, complexos mononucleares de prata (I), baseados em ligantes tiocarbamoil-pirazolina, foram sintetizados e caracterizados. A atividade antitumoral destes compostos foi examinada contra células de melanoma (B16F10) e células de carcinoma mamário (4T1). No entanto, apesar de serem menos tóxicos que a cisplatina, os complexos 1 e 2 mostraram-se mais seletivos para células BHK-21 normais (FAVARIN *et al.*, 2019).

Em resumo, os estudos dos complexos metálicos tendo como íon central ouro ou prata, bem como, de seus respectivos ligantes, evidenciam que propriedades como lipofilicidade, propensão a produzir reações de troca de ligante em meios biológicos e a natureza de compostos bioativos carregados ou não-carregados podem ser fatores importantes, definindo a atividade celular desses compostos (CARLOS LIMA; RODRIGUEZ, 2012; OTT, 2009).

1.4.2. Compostos de coordenação de ouro e prata: agentes antimicrobianos

Além da conhecida atividade anticâncer, vários derivados de ouro e prata apresentam atividade antibacteriana. A necessidade de superar a resistência antimicrobiana, tipicamente resultante do uso excessivo de antibióticos orgânicos tradicionais, que têm como alvo uma única molécula, tem sido o principal raciocínio para a prospecção de novos metalofármacos. Neste sentido, um grande número de compostos de metais de transição foi testado contra bactérias (FAVARIN *et al.*, 2019, 2020; NOMIYA *et al.*, 2003; ORTEGO *et al.*, 2015; SHAHINI *et al.*, 2018; VARNA *et al.*, 2018).

O uso de moléculas antibióticas bem estabelecidas como ligantes para a geração de compostos de coordenação é uma estratégia promissora para aumentar a atividade antibacteriana destes complexos. Por exemplo, a coordenação do paládio à tetraciclina melhora significativamente a atividade desse antibiótico em linhagens resistentes. O complexo de paládio coordenado à tetraciclina (PdTC) revelou-se ser dezesseis vezes mais potente do que a droga livre. Outro exemplo é o complexo de prata (I) contendo penicilina (AgPen), que mostrou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (COSTA *et al.*, 2012; ROCHA, D. P. *et al.*, 2011).

Historicamente, compostos de prata (I) apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana. O nitrato de prata vem sendo usado desde o século XVII para a prevenção da conjuntivite neonatal. Atualmente, o composto de prata mais comumente usado é a prata (I) sulfadiazina, que é amplamente utilizado na medicina para tratar e prevenir o desenvolvimento de infecções bacterianas em queimaduras na pele (WALTER TAVARES, 2020).

Recentemente, numerosos compostos de prata (I) foram sintetizados, os quais apresentaram atividade citotóxica contra bactérias Gram-positivas e negativas. Por exemplo, complexos de prata (I) com ligantes doadores de oxigênio foram estudados como possíveis agentes antibacterianos contra *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando valores promissores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) (FAVARIN *et al.*, 2019; PÉREZ *et al.*, 2017).

Outras classes de compostos de coordenação de prata com significativa atividade antibacteriana *in vitro* são baseadas em tioamida heterocíclica e ligantes

benzotiazol-2-tiona. A capacidade dessas ligas de coordenar centros metálicos de prata em modos monodentados ou em ponte resultou na síntese de um grande número de complexos bioativos (VARNA *et al.*, 2018).

Em mais um trabalho, compostos N-heterocíclicos de carbeno-prata(I) foram testados como agentes antibacterianos contra bactérias Gram-positivas e negativas e, também, como agentes antifúngicos, provando serem excelentes agentes inibidores da proliferação destes micro-organismos (SHAHINI *et al.*, 2018).

Favarin *et al.*, 2019, sintetizaram e caracterizaram a estrutura de complexos mononucleares de prata(I) baseados em ligantes tiocarbamoil-pirazolina. Estes compostos foram testados como agentes antibacterianos contra duas cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), e um painel de cepas clínicas de *S. aureus* com perfis distintos de resistência a antibióticos. Esses estudos demonstraram o potencial destes complexos para servirem como modelos de alternativas farmacêuticas viáveis aos atuais tratamentos de infecção bacteriana, com vistas a suplantarem a resistência a medicamentos.

Quanto aos modos de ação, os compostos de coordenação de prata podem atuar como metalofármacos, com vários mecanismos, por exemplo, distribuindo íons metálicos para prejudicar os processos de síntese da parede celular, ou, interagindo com o DNA bacteriano para interromper a transcrição. No entanto, os mecanismos de ação desses compostos também não foram completamente esclarecidos (FAVARIN *et al.*, 2019).

Especificamente, para o ouro (I), as pesquisas têm se concentrado principalmente em compostos com núcleo SAuP ou NAuP. Estudos têm mostrado bons resultados bactericidas ou bacteriostáticos para estes compostos, sendo alguns deles inibidores potentes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. A eficiência dessas atividades antimicrobianas foi fortemente relacionada à permutabilidade e à facilidade de reações de troca de ligantes (FAVARIN *et al.*, 2020; NOMIYA *et al.*, 2003; (OTT *et al.*, 2009).

Complexos de ouro ou prata com ligantes de aminofosfano foram sintetizados e testados contra as bactérias Gram-negativas *Salmonella enterica serovar typhimurium* e *Escherichia coli*, e, Gram-positivas, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Estes ligantes foram escolhidos porque a presença do grupo

amina permite uma fácil funcionalização, tornando possível a introdução de porções biológicas relevantes aos compostos. Alguns destes compostos exibiram poderosa atividade antibacteriana, principalmente contra os micro-organismos Gram-positivos, mostrando resultados comparáveis a antibióticos padrões, tais como, gentamicina e ampicilina (ORTEGO *et al.*, 2015).

Diversos estudos revelaram que complexos de Au ou Ag podem também ter atividade contra outros micro-organismos patogênicos. Esses compostos apresentaram ação antileishmania e antimalárica, atuando como intercalantes de DNA ou inibindo as enzimas específicas desses parasitas. Também, exibiram atividades antiparasitárias contra *Plasmodium*, *Schistosoma* e outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* (CHAVES *et al.*, 2017; ORTEGO *et al.*, 2015).

Complexos inorgânicos podem, ainda, exibir atividade biológica contra vírus, sendo uma possível alternativa a ser explorada para o desenvolvimento de novas terapias antivirais (GAVEGNANO *et al.*, 2019; KARGES; COHEN, 2021).

A capacidade da Aurofina de bloquear eventos relacionados à ativação imunológica contribui para uma melhor compreensão das ligações entre os eventos inflamatórios e a persistência do HIV. Recentemente, foi conduzido um ensaio utilizando-se a AF em humanos HIV-positivos, e nenhum evento adverso grave foi relatado durante esse estudo. Além disso, foi observado um declínio no total de células TCD4 algumas semanas após o início do tratamento. Esse estudo demonstrou que a AF pode ser tolerada com segurança em indivíduos HIV-positivos (GAVEGNANO *et al.*, 2019).

Atualmente, no contexto da pandemia de COVID-19, complexos metálicos Au foram investigados como possíveis agentes antivirais contra o vírus da síndrome respiratória aguda grave - coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (KARGES; COHEN, 2021; PAIVA, DE *et al.*, 2020).

Nas diferentes fases do ciclo de vida viral, várias enzimas são consideradas possíveis alvos terapêuticos. Complexos de Au funcionalizados com carbeno N-heterocíclico ou ligantes alquilil foram estudados como inibidores da enzima de conversão de angiotensina II (ACE2), uma metaloenzima dependente de Zn que está ligada às membranas de células encontradas nos pulmões, artérias, coração, rins e

intestinos. Como uma proteína transmembrana, a ACE2 foi identificada como um receptor de entrada celular para SARS-CoV-2 por meio das proteínas de espícula viral. Conseqüentemente, a inibição da interação de ACE2 com as proteínas espícula poderia potencialmente bloquear a entrada do vírus nas células hospedeiras (KARGES; COHEN, 2021).

A habilidade dos compostos Au(I) / Au(III) em inibir a união do domínio de ligação do receptor da proteína de espícula ao receptor ACE foi quantificada por meio de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA). Os resultados mostraram concentração inibitória média (IC₅₀) na faixa micro molar (IC₅₀ = 16,2–25,0 µM). Além disso, estes complexos metálicos também foram inibidores de protease tipo papaína (PLpro) de SARS-CoV-2, apresentando um possível mecanismo de ação multimodal (KARGES; COHEN, 2021).

1.4.3. Compostos de coordenação de Au ou Ag: agentes de bioimagem celular

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) é uma ferramenta eficiente para monitorar a captação e a biodistribuição de metalodrogas luminescentes no interior das células e de suas organelas. A criação de compostos de coordenação Au(I) com propriedades fotofísicas tornou-se um atrativo campo de investigação para o desenvolvimento de novas metalodrogas com dupla aplicação: como marcadores celulares e moléculas bioativas. Pode-se citar vários exemplos de trabalhos recentes que exploraram as características luminescentes de compostos de Au e seus ligantes. (FAVARIN *et al.*, 2020; GROVES *et al.*, 2019).

Propriedades interessantes de fluorescência de certos derivados da naftalimida foram descritas em uma ampla gama de relatórios. A intensidade de emissão de fluorescência foi considerada significativamente influenciada pelo ambiente químico em relação à polaridade do solvente, valor de pH ou presença de íons metálicos. Os efeitos descritos podem ser atribuídos a uma influência da polaridade do solvente na transferência de elétrons fotoinduzida (TEF) entre o nitrogênio da cadeia lateral e a fração naftalimida aromática. Em solventes com polaridade mais alta, a TEF pode ser prejudicada por causa da interação de moléculas do solvente com o par de elétrons livres do nitrogênio da cadeia lateral. No que se refere à interação da naftalimida com

íons metálicos, foi observado o aumento da intensidade do sinal, a depender da natureza do respectivo metal (OTT *et al.*, 2009).

A MCVL vem sendo aplicada para localizar a biodistribuição de complexos Au(I)/carbeno-naftamilida, fluorescentes e antitumorais, em células MCF-7. Quando esses complexos são excitados com feixes luminosos a 405 nm, ocorre emissão fluorescente na faixa do comprimento de onda do verde, principalmente na porção lisossomal dessas células. Ainda, estudos com a teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT) demonstraram que essa emissão está relacionada a transições de transferência de carga intraligantes. Assim, estas espécies de complexos Au mostraram excelente utilidade como agentes de imagem celular, incluindo aplicação em estudos por MCVL em células MCF-7 (GROVES *et al.*, 2019).

Estudos de biodistribuição celular monitorados por MCVL e espectroscopia de absorção atômica têm demonstrado que complexos de Au(I) contendo ligantes acridina-tiouréia ou naftalimida localizam-se no núcleo de células da linhagem tumoral de câncer de mama, MCF-7. A característica fortemente emissiva desses compostos foi importante para elucidar seu mecanismo de ação e indicar um possível vetor útil para facilitar o transporte de metais para o núcleo (OTT *et al.*, 2009; PÉREZ *et al.*, 2017).

A calcoplatina interrompe o ciclo celular na fase G2/M, induzindo significativamente ativação do *p53*, gene supressor tumoral, desencadeando vias apoptóticas à jusante. Um conjugado de ouro (I) contendo calcona apresentou fluorescência intrínseca e, graças a essa propriedade, foi possível localizar esse composto nas células da linhagem tumoral HT29 (câncer colorretal humano), por meio de microscopia confocal. O composto de Au(I) calcona foi localizado nas mitocôndrias, o que indicou uma aplicabilidade potencial no tratamento de cânceres nos quais a molécula P53 está ausente (GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

A fim de serem utilizados como marcadores emissivos, a exploração de novos derivados à base de ouro com ligantes indol e isatina também foi investigada. Esses complexos exibiram um perfil de emissão semelhante, em torno de 400 nm. Cálculos teóricos revelaram que a origem da emissão era dependente da natureza do heterocíclico. Os tempos de vida na faixa de centenas de nanossegundos indicaram a natureza da fluorescência dessas emissões. Neste caso, em particular, a despeito dos ensaios citotóxicos terem evidenciado um futuro promissor como um agente anticâncer, os dados relativos à bioimagem, como a excitação e emissão de alta

energia, bem como, os tempos de vida de fluorescência curtos, demonstraram que esses complexos não são considerados adequados para fins de imageamento celular (FERNÁNDEZ-MOREIRA *et al.*, 2019).

Para complexos cujo o centro metálico é a prata, pode-se citar outros trabalhos. Estudos de absorção celular monitorizados por espectroscopia de fluorescência confocal de complexos de prata contendo dietilbarbiturato revelaram que esses compostos são luminescentes e bioativos. Com estas propriedades foi possível demonstrar, por meio de testes de atividade anticâncer, que esses complexos podem acessar o citossol e o núcleo das células tumorais MCF-7, sugerindo que mitocôndria e DNA são os alvos biológicos (YILMAZ *et al.*, 2017).

Complexos de prata (I) com base nos ligantes difenilpiridina apresentando emissão azulada também foram testados para propriedades biológicas e fotofísicas. Os ligantes mencionados apresentaram boa atividade antimicrobiana e potencial promissor para a aplicação da MCVL em células tumorais HeLa, devido à alta fluorescência e rendimento quântico manifestado em solução (WANG, D.-H. *et al.*, 2017).

A investigação das propriedades fotofísicas de dois complexos mononucleares de prata (I) baseados em ligantes tiocarbamoil-pirazolina, revelou intensas emissões azul-esverdeadas, tanto em solução, como no estado sólido, quando excitados a 300 nm. Esta emissão foi atribuída às transições eletrônicas mistas, que ocorrem após à metalação do ligante. Características satisfatórias, incluindo tempos de vida de luminescência, nas faixas de nano e microssegundos, e a tonalidade azul-esverdeada das emissões destes compostos, os tornam interessantes para aplicação em bioimagem (FAVARIN *et al.*, 2019).

Outros centros metálicos, como cobre (I) e cádmio (II) também foram utilizados para produção de complexos metálicos. Favarin e *at al.* (2017) sintetizaram e caracterizaram dois complexos mononucleares heterolépticos de Cu(I) baseados em ligantes mistos de fosfina/tiocarbamoil-pirazolina. Para ambos os complexos, comportamento estrutural semelhante foi observado em torno dos átomos de Cu(I), que exibiram uma geometria de coordenação tetraédrica distorcida e comportamento monodentado dos ligantes tiocarbamoil-pirazolina.

Ainda, os dois complexos referidos acima exibiram notáveis propriedades fotofísicas, com emissão laranja-vermelha no estado sólido atribuída, principalmente, a transições eletrônicas, uma vez que seus ligantes correspondentes são pouco luminescentes quando excitados a 290 nm. A presença dessa transição eletrônica também foi apoiada por cálculos TD-DFT e pela comparação dos espectros de emissão do precursor Cu(I), que contém apenas ligantes fosfina, e o comportamento de emissão dos complexos. Assim, os compostos de coordenação de Cu(I) aqui relatados foram considerados propícios para aplicação em dispositivos luminescentes (FAVARIN *et al.*, 2017).

Rosa *at al.* (2018) sintetizaram e caracterizaram complexos baseados em ligantes tiocarbamoil-pirazolina, tendo como íon central o cádmio (II). Os complexos apresentaram comportamento estrutural semelhante ao redor do átomo de cádmio (II), com geometria de coordenação tetraédrica distorcida. Propriedades fotofísicas interessantes, como emissão azulada na faixa espectral (330-450 nm), atribuída principalmente a transições de carga, e, tempo de vida de fluorescência de nanosegundos (1,05 até 1,42 ns) foram observadas nestes compostos quando excitados em comprimento de onda de 300 nm.

Além do interesse em aprimorar a triagem de agentes cancerígenos, um esforço crescente também vem sendo feito na busca de detectores eficientes de pequenas biomoléculas que podem estar presentes em fluidos biológicos. A habilidade dos compostos de ouro (I) em interagir com eles mesmos, por meio de interações aurofílicas, e com outros íons de elementos pesados, produziu propriedades espectroscópicas que os tornam sensíveis a compostos orgânicos voláteis (COVs) e a outras interações moleculares (ABDOU *et al.*, 2009).

O monitoramento confiável de COVs tornou-se importante no controle ambiental e de segurança pública devido aos riscos potenciais à saúde que a exposição a essas substâncias oferece. Dessa forma, o desenvolvimento de sensores químicos estáveis e reversíveis baseados em vapocromismo ou vapoluminescência, que é a mudança dramática de cor ou luminescência de um material após a exposição a vapores de COVS, tornou-se um assunto de estudo intensivo nos últimos anos (ABDOU *et al.*, 2009).

Embora os ligantes de nitrogênio sejam muito importantes bioquimicamente, somente nos últimos anos a natureza da ligação do ouro (I) aos ligantes de nitrogênio foi estudada. A química do ouro (I) usando ligantes de nitrogênio pirazolato levou ao uso de outros ligantes de nitrogênio para formar complexos dinucleares, trinucleares cíclicos e tetranucleares de amidinato de ouro (I), com propriedades significativamente diferentes das espécies organometálicas e coordenadas de enxofre. As propriedades eletrônicas desses complexos foram estudadas em detalhes e é reconhecido que aceitar ligantes pode influenciar fortemente as propriedades associadas ao íon metálico. Aglomerados trinucleares e tetranucleares parecem particularmente interessantes, devido à forte basicidade dos centros de ouro (I) nestas moléculas. Como resultado, sua aplicabilidade como biossensores para orgânicos perigosos e/ou metabólitos parece razoável (ABDOU *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2008).

1.5. Ligantes Fostina/Tiocarbamoil-Pirazóis: características e propriedades

Derivados pirazolínicos suscitam cada vez mais atenção devido à sua rica e extensa coordenação química. Seus sistemas heterocíclicos exibem uma variedade de propriedades estruturais, catalíticas e luminescentes, tornando estes ligantes propícios para a construção de diversas estruturas moleculares. Sua composição básica é constituída por um anel heterocíclico aromático de cinco membros, com três átomos de carbono, e dois átomos de nitrogênio adjacentes nas posições 1 e 2 (FERLE *et al.*, 2013). (Figura 4).

O estudo do pirazol e seus derivados é indicado como uma área de pesquisa promissora e de grande aplicação. Evidencia-se que essa classe de compostos possui amplo espectro de importantes atividades biológicas e farmacêuticas, como atividades antimicrobiana, anti-hipertensiva, antitumoral, anti-inflamatória e antidepressiva. Verificou-se, ainda, que algumas dessas atividades podem estar presentes e também potencializadas com a inserção de átomos metálicos nestes tipos de ligantes em um centro metálico apropriado. Suas propriedades de emissão de luz tornaram-se objeto de pesquisa, embora menos exploradas do que sua bioatividade, mas às vezes associadas a isso (FAVARIN *et al.*, 2017, 2020; FERLE *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2018).

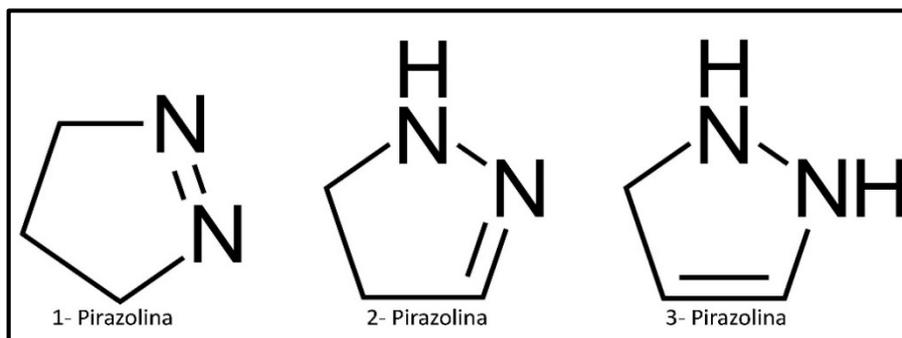


Figura 4. Fórmulas estruturais das Pirazolinas 1 (4,5-dihidro-3H-pirazol), 2 (4,5-dihidro-1H-pirazol) e 3 (2,3-dihidro-1H-pirazol).

O grupo funcional carbamoil é obtido ao substituir-se a hidroxila do ácido carbônico por um grupamento orgânico. Ligantes tiocarbamoil mostram uma grande versatilidade farmacológica. Entre as razões estruturais que explicariam esse amplo perfil estão o fato de serem, esses compostos, bons agentes quelantes, podendo coordenar-se a metais existentes nas estruturas de enzimas, inativando-as. Além disso, a estrutura dessas moléculas permite a modulação do seu caráter lipofílico, assim como, de suas interações com receptores biológicos, através da escolha dos substituintes da cadeia lateral (R) (BERALDO, 2004). (Figura 5).

Especificamente, quanto à relevância da presença do enxofre nesse ligante, acredita-se que a ligação Au-S seja responsável pela forte inibição observada da atividade enzimática. Isto porque estudos de várias estruturas de adutos de Au(I)-S-proteína usando cristalografia de raios X demonstraram que a maioria dessas estruturas apresentam interações entre as ligações Cys-S-Au-S-Cys e/ou Cys-S-Au-ligante no sítio ativo da enzima. Além do mais, os tiocompostos podem facilitar reações redox dentro do organismo (BERALDO, 2004; DELGADO *et al.*, 2020).

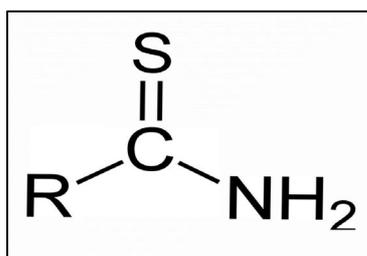


Figura 5. Fórmula estrutural do grupo tiocarbamoil, RCSNH₂.

O ligante trifenilfosfina, é um composto organofosforoso comum com a fórmula $P(C_6H_5)_3$ - frequentemente abreviado para PPh_3 (Figura 6). Um estudo comparando a citotoxicidade e a captação celular de complexos $Au(I)$ contendo fosfina revelou fortes efeitos antiproliferativos para complexos contendo, como ligante, trifenilfosfina, em oposição àqueles contendo *n*-alquil-fosfina. Isso poderia ser, em parte, atribuído a uma maior absorção deste composto nas células, correlacionando-se também com níveis mais elevados de ouro encontrados nos núcleos (SCHEFFLER; YOU; OTT, 2010)

Como resultado, pode-se afirmar que os valores de citotoxicidade, absorção celular e nuclear de vários complexos de ouro (I) fosfina indicaram uma influência ligeiramente positiva de substituintes maiores e mais lipofílicos, como fenil. Essa tendência geral correlaciona-se com a alta lipofilicidade de compostos aromáticos $Au(I)$ /trifenilfosfina, comparada com análogos não-aromáticos (SCHEFFLER; YOU; OTT, 2010).

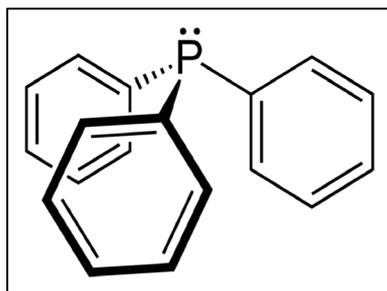


Figura 6. Fórmula estrutural da trifenilfosfina (PPh_3).

Complexos de ouro (I) baseados em ligantes tiocarbamoil-pirazolina foram sintetizados pela primeira vez em 2013 por Ferle e colaboradores. Neste estudo, as unidades catiônicas destes complexos apresentaram comportamento estrutural semelhante ao redor do átomo de $Au(I)$, exibindo uma geometria de duas coordenadas, com geometria de coordenação quase linear (FERLE *et al.*, 2013).

Favarin *at al.* (2019) sintetizaram e caracterizaram dois complexos mononucleares de prata (I) baseados em ligantes tiocarbamoil-pirazolina. Atividades biológicas e propriedades luminescentes favoráveis fazem dos complexos de prata (I) contendo ligantes tiocarbamoil-pirazolina moléculas atraentes para aplicação como agentes antibacterianos e biomarcadores luminescentes, em abordagens de bioimagem.

Em relação às características fotofísicas dos complexos acima mencionados, foi encontrada boa correlação entre os espectros de absorção e emissão. Eles emitem luminescência azulada no estado sólido à temperatura ambiente, quando excitados com feixes luminosa dentro da faixa do ultra violeta, a 320 nm, sendo exemplos representativos de compostos Au(I)/d10. A emissão azulada, que aparece em 415 nm para esses complexos catiônicos, foi atribuída às excitações de transição de carga ligante-metal (TCLM), decorrentes de orbitais à base de enxofre para o átomo de Au(I) (FERLE *et al.*, 2013).

Dado às notáveis características e propriedades destas classes de compostos, e, a fim de contribuir para o desenvolvimento de novos e promissores compostos, tanto bioativos como luminescentes, três novos complexos Au(I) mononucleares, altamente fotoluminescentes, baseados em materiais mistos de fosfina/tiocarbamoil-pirazolina são o objeto de estudo deste trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, pesquisadores vêm desenvolvendo novos compostos de coordenação luminescentes baseados em ligantes de fosfina ou pirazolina 1,3,5-substituída, e coordenados com metais de transição d^{10} (Cu^I, Au^I, Cd^{II}), para aplicações inovadoras em química de materiais (FAVARIN *et al.*, 2017; FERLE *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2018).

Considerando as propriedades luminescentes verificadas em pesquisas anteriores e as características peculiares dos ligantes tiocarbamoil-pirazolina, e, levando em conta a capacidade desses grupamentos de se coordenarem em átomos metálicos; além do seu uso potencial como agentes antitumorais e antibacterianos, estes ligantes podem ser utilizados para o projeto de complexos com diversos outros centros metálicos, para a investigação de aplicações biológicas e de bioimageamento (FAVARIN *et al.*, 2017, 2019, 2020; ROSA *et al.*, 2018).

Na busca por um centro metálico capaz de se coordenar com esses ligantes, optou-se, no presente trabalho, por utilizar o $Au(I)$, devido a suas propriedades favoráveis na formação de complexos. A interação entre $Au(I)$ e ligantes baseados em um núcleo pirazoliníco pode potencializar as propriedades já existentes nessas moléculas, bem como promover o surgimento de novos compostos.

3. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo apresentar e caracterizar três novos compostos de ouro (I) mononucleares, altamente fotoluminescentes, baseados em materiais mistos de fosfina/tiocarbamoil-pirazolina.

3.1. Objetivos específicos

- 3.1.1. Apresentar e caracterizar os complexos **1**, **2** e **3** quanto à estrutura molecular e à natureza fotoluminescente destes compostos;
- 3.1.2. Avaliar os complexos **1**, **2** e **3** como agentes antibacterianos contra as cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, bem como, contra as cepas clínicas de *S. aureus* resistentes (clínica 1*, clínica 2*, clínica 3* e clínica 4*).
- 3.1.3. Determinar a citotoxicidade dos complexos **1**, **2** e **3** em células tumorais das linhagens 4T1, B-16-F10 e da linhagem não tumoral BHK-21.
- 3.1.4. Analisar a captação e biodistribuição dos complexos **1**, **2** e **3** em células tumorais;
- 3.1.5. Avaliar a aplicabilidade dos complexos **1**, **2** e **3** como sondas para bioimagem celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e equipamentos

Os solventes (AR grade) foram obtidos comercialmente e utilizados na síntese, sem purificação adicional. Os materiais de partida para a síntese de Ph_3PAuCl e seus ligantes L1 (1-tiocarbamoil-5-(4-metilfenil)-3-fenil-4,5-di-hidro-1*H*pirazol), L2 (1-tiocarbamoil-3,5-difenil-4,5-di-hidro-1*H*pirazol), e L3 (1-tiocarbamoil-5-(4-metoxifenil)-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol) foram preparados de acordo com a metodologia publicada (BAENZIGER; BENNETI; SOBOROFF, 1976; PIZZUTI *et al.*, 2009). Em resumo, o composto cloro(trifenilfosfina)ouro(I), Ph_3PAuCl , foi preparado pela reação de trifenilfosfina com ácido cloroáurico, em etanol. Os ligantes L1, L2 e L3 foram sintetizados via condensação de calconas com tiossemicarbazida, em etanol e hidróxido de potássio. Esses produtos foram isolados com bons rendimentos após curtos tempos de reação.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), utilizados na identificação e caracterização estrutural dos grupamentos químicos dos compostos sintetizados, foram adquiridos em um espectrofotômetro Jasco-4100, usando-se pastilhas de brometo de potássio.

Os solventes usados nos experimentos de UV-vis e fluorescência foram adquiridos da Aldrich. Os experimentos UV-vis foram conduzidos em um espectrofotômetro PerkinElmer Lambda 650 (200–800 nm), usando-se cubetas de quartzo. Os espectros de emissão em solução foram obtidos em um fluorímetro Varian Cary Eclipse, pela excitação das amostras a 305 nm e coleta das emissões na faixa de 320-550 nm.

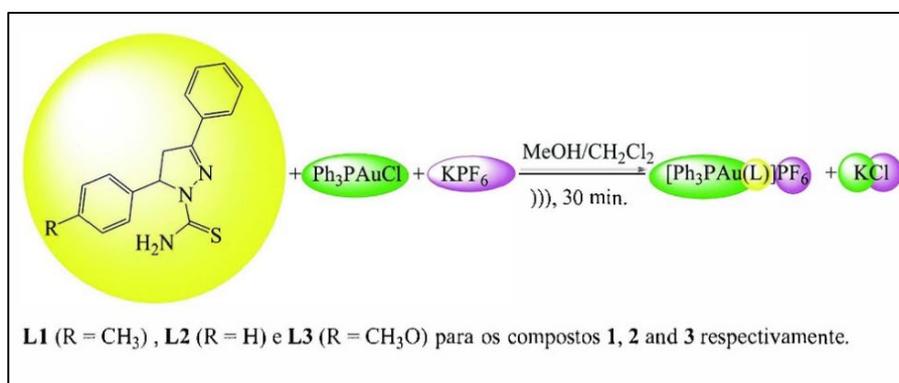
4.2. Preparo dos compostos

Os compostos investigados neste trabalho foram preparados e cedidos pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Um mesmo processo foi aplicado para preparar os compostos **1**, **2** e **3**, utilizando seus respectivos ligantes (L1, L2 e L3). Por exemplo, para o composto (**1**) [$\text{Ph}_3\text{PAu(L1)}$] PF_6 ., em um procedimento único, 1 mmol (0,0494 g) de precursor de ouro (Ph_3PAuCl), 1 mmol (0,0184 g) de KPF_6 e 1 mmol (0,0295 g) de ligante (L1) foram

adicionados a um frasco de 20 mL contendo 6 mL de solventes de mistura (1:1, v:v) de MeOH/CH₂Cl₂. Este sistema foi sonificado por 30 min, o que aumentou sua temperatura para 35 °C. A solução resultante incolor foi filtrada e, após três dias, cristais incolores foram isolados da solução mãe.

A síntese sonoquímica dos complexos **1**, **2** e **3** foi realizada, com bons rendimentos (59–64,5%), usando-se uma sonda microtip conectada a um processador ultrassônico *Sonics Vibra-cell* de 500 W, operando em potência máxima de 20 kHz, de acordo com os métodos publicados por Favarin *et al.* (FAVARIN *et al.*, 2019). O esquema 1 exhibe reação de síntese dos complexos **1**, **2** e **3**.



Esquema 1. Síntese dos complexos.

4.3. Ensaios de bioimagem

Os ensaios de bioimagem foram realizados utilizando-se duas linhagens celulares de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MD231 e MCF7) e uma linhagem celular não tumoral de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Essas linhagens celulares foram adquiridas no banco de células do Laboratório de Microscopia e Microanálises do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

As células foram cultivadas em meio Leibovitz L15 a 37°C na ausência de CO₂, para MDA-MB-231; *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) a 37°C com 5% de CO₂, para MCF-7; e RPMI 1640 a 37 °C e 5% de CO₂, para HUVEC. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e 25 µg/ml de gentamicina.

As células foram semeadas em lamínulas circulares de 13 mm, no fundo de uma placa de 24 poços e deixadas para aderir durante a noite. Após, as lamínulas foram lavadas três vezes com meio livre de soro para a remoção de células não aderentes. Depois de alcançar confluência, as células foram separadas em duas amostras (vivas e fixadas).

As amostras vivas foram incubadas por 30 min com um dos compostos em solução (10 mM) a 37 °C, lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente, fixadas em formaldeído 3,7% por 30 min, e lavadas novamente três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas de vidro usando *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras fixadas foram primeiro lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4), fixadas em formaldeído 3,7% por 30 min, lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente, e incubadas com um dos compostos em solução (10 mM) à temperatura ambiente por 30 min. Após, elas foram lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e, em seguida, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, usando *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras para controles negativos foram incubadas em 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO, a solução diluente) e examinadas sob 405 nm de excitação a laser em um microscópio confocal Leica TCS SP5. As imagens de fluorescência foram adquiridas em 400-480 nm (azul) e intervalos de 500–580 nm (verde). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, com três repetições para cada condição experimental.

4.4. Atividades biológicas

4.4.1. Ensaios antibacterianos

Os ensaios antibacterianos foram realizados em *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, e, em cepas clínicas de *S. aureus* resistentes à: *clindamicina*, *eritromicina* e *penicilina G* (clínica 1*); *oxacilina* e *penicilina G* (clínica 2*); *penicilina G* (clínica 3*); e *clindamicina* e *eritromicina* (clínica 4*). Todas as cepas clínicas foram

fornecidas pelo Centro de Análises Clínicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Hospital de Universitário (Campo Grande, Brasil). Os reagentes e meios utilizados para ensaios antibacterianos foram adquiridos da Sigma Aldrich.

A determinação de valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foi feita de acordo com Favarin *et al.* (FAVARIN *et al.*, 2019). Em resumo, para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram distribuídos 100 μ L de meio Mueller-Hinton em placas de 96 poços. Foram preparadas soluções estoque à concentração 3 mg/mL, para os ligantes, ou 2 mg/mL, para os complexos. Foram realizadas diluições seriadas até atingir uma concentração final dentro dos intervalos de 11,7-1500 μ g/mL, para os ligantes, ou 1–1000 μ g/mL, para os complexos, com um volume final de 100 μ L, cada. Para a gentamicina, as concentrações finais variaram de 60 a 0,5 μ g/ml.

Os inóculos consistiam em uma cultura bacteriana de cada cepa, diluída em solução salina estéril (0,45%) até uma concentração de, aproximadamente, 10⁸ UFC/mL, e cultivada *overnight*, em ágar Mueller-Hinton. Esta solução foi diluída (1:10) em solução salina (0,45%), e 5 μ L foram adicionados a cada poço contendo as amostras teste. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e as placas de microdiluição foram incubadas a 36°C por 18 h.

Posteriormente, 20 μ L de uma solução aquosa (0,5%) de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) foram adicionados a cada poço e as bandejas foram novamente incubadas a 36°C, por 2 h. Nos poços onde o crescimento bacteriano ocorreu, o TTC mudou de incolor para vermelho. A CIM foi definida como a concentração mais baixa de cada substância na qual não ocorreu mudança de cor, e foi expressa em μ g/mL. Como controle positivo foi utilizado gentamicina.

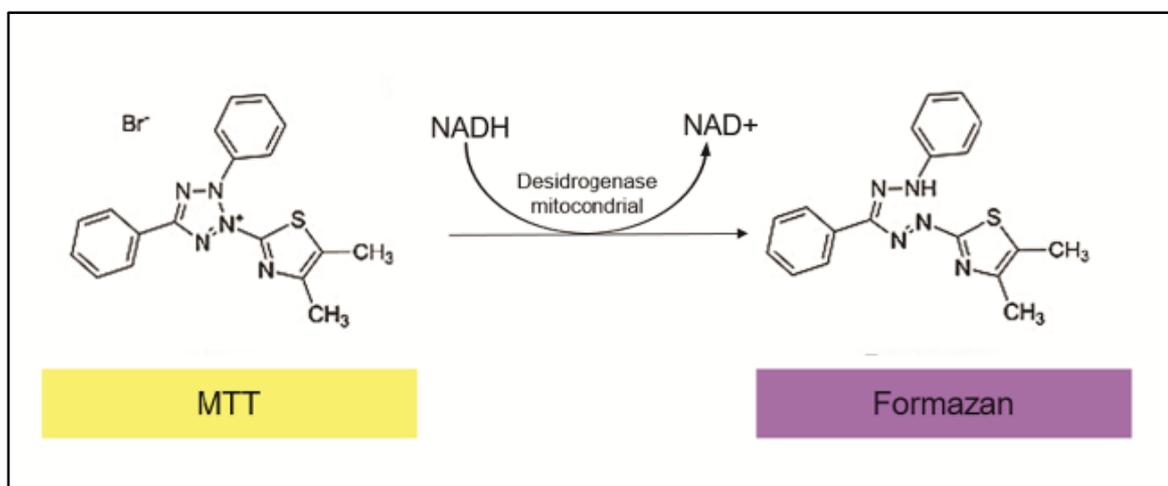
A determinação das concentrações bactericidas mínimas (CBM) foi realizada com base na subcultura de inóculos bacterianos da placa CIM, em meio nutriente ágar. De cada um dos poços que não apresentavam crescimento visível, amostras foram retiradas, semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton e, posteriormente, incubadas a 37°C, por 24 horas. Para cada composto, a CBM foi derivada da primeira concentração em que nenhuma cultura foi observada em Ágar Mueller-Hinton.

4.4.2. Ensaios de viabilidade celular

A atividade citotóxica foi investigada contra duas linhagens de células tumorais (4T1, carcinoma mamário murino; B-16-F10, melanoma murino) e uma linhagem celular não tumoral (BHK-21, rim de hamster). As células foram propagadas em meio de cultura RPMI 1640 a pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino, Hepes (4,0 mmol L⁻¹), NaHCO₃ (14,0 mmol L⁻¹), ampicilina (0,27 mmol L⁻¹) e estreptomicina (0,06 mmol L⁻¹). As células foram colhidas usando tripsina-EDTA, e, segundo às recomendações do fabricante, semeadas em placas de 96 poços (100 µL por poço) a uma densidade de 1 X 10³ de células viáveis por poço. Em seguida, foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂, por 24 h.

As soluções estoque em DMSO, utilizadas para este experimento, foram diluídas em série, em meio de cultura celular (<1% DMSO). Após exposição à cada complexo e seus respectivos ligantes, a 37 °C, com de 5% de CO₂, por 72 h, as células foram incubadas com (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) (MTT, 0,01 mol L⁻¹ em solução aquosa, 10 µL por poço), no escuro, a 37 °C, com 5% de CO₂, por 4 h.

Em seguida, esta solução foi retirada e adicionou-se 100 µl de DMSO à cada um dos poços, para a dissolução dos cristais de formazan. A metabolização do MTT por células viáveis resulta em um complexo violeta que, solubilizado em DMSO, é quantificável por colorimetria (absorvância de 570 nm) (MOSMANN T, 1983). O esquema 1 mostra a reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água).



Esquema 2. Reação de redução do MTT a formazan.

As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). Os controles negativos (100% de viabilidade) consistiram de células expostas ao meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. A cisplatina foi usada como controle positivo contra todas as linhagens celulares.

O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada composto ou ligante utilizado e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de inibição foi determinada comparando a densidade celular das células tratadas com as células controle no mesmo período de incubação [porcentagem de inibição = $(1 - \text{densidade da célula do grupo tratado}) / \text{densidade da célula do grupo controle}$].

Os dados brutos foram normalizados para as células controle não tratadas e relacionados com a atividade metabólica das células viáveis tratadas. Valores IC_{50} - concentrações que inibem 50% da viabilidade de proliferação celular - (Tabela 4) foram calculados aplicando-se quatro regressões não lineares paramétricas e empregando-se o programa *GraphPad Prisme 5.0*.

4.5. Análises estatísticas

Os dados das análises quantitativas foram submetidos ao teste t de Student para amostras não pareadas (entre dois grupos) ou à análise de variância simples (ANOVA) (entre três ou mais grupos). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o Software GraphPad Prism e os resultados foram expressos como Média \pm SEM. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Estrutura cristalina

Os três complexos analisados no presente estudo diferem, em sua estrutura, no substituinte ligado à posição 5 (seta vermelha) no anel de pirazolina (4-metilfenil para **1**, fenil para **2**, 4-metoxifenilo para **3**) (Figura 7, 8 e 9). Os compostos **1**, **2** e **3** são complexos catiônicos $[\text{Ph}_3\text{PAu(L)}]\text{PF}_6$, nos quais as estruturas componentes têm ligantes monodentados coordenados com o centro Au(I) através do átomo de enxofre no tiocarbamoil do ligante (motivo C=S). O átomo Au(I) tem geometria de coordenação quase linear com ângulos de ligação (P–Au–S) variando de $169,63(4)^\circ$ a $170,64(4)^\circ$.

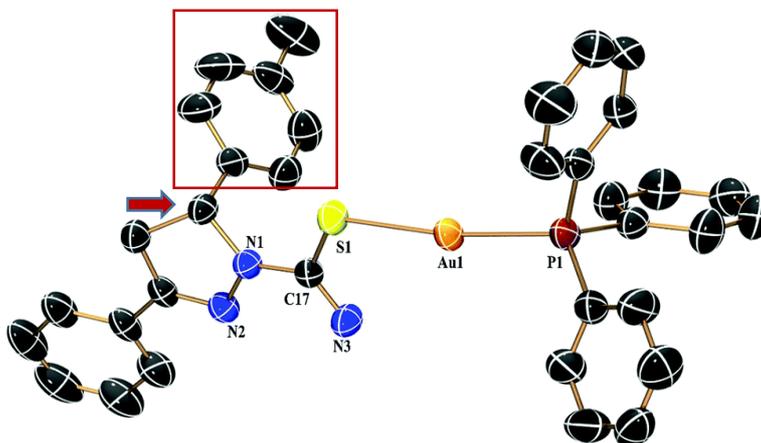


Figura 7. Estrutura cristalina do composto 1. Átomos de hidrogênio, ânion PF_6 e solvente metanol omitidos, para maior clareza. Posição 5 no anel de pirazolina indicada pela seta vermelha; substituinte ligado à posição 5 destacado no retângulo.

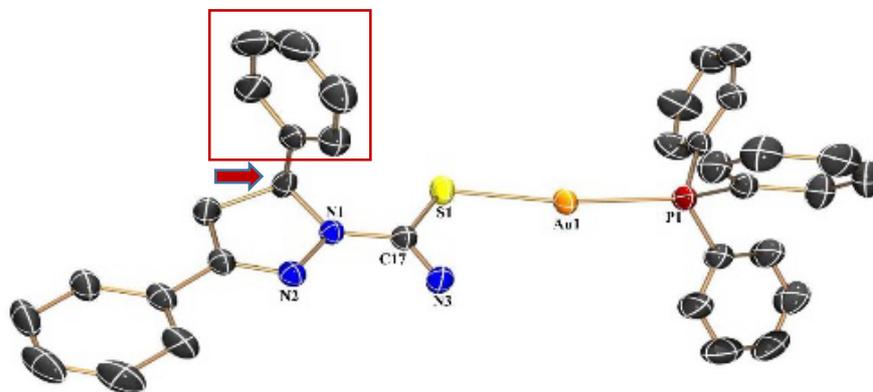


Figura 8. Estrutura cristalina do composto 2. Átomos de hidrogênio, ânion PF_6 e solvente metanol omitidos, para maior clareza. Posição 5 no anel de pirazolina indicada pela seta vermelha; substituinte ligado à posição 5 destacado no retângulo.

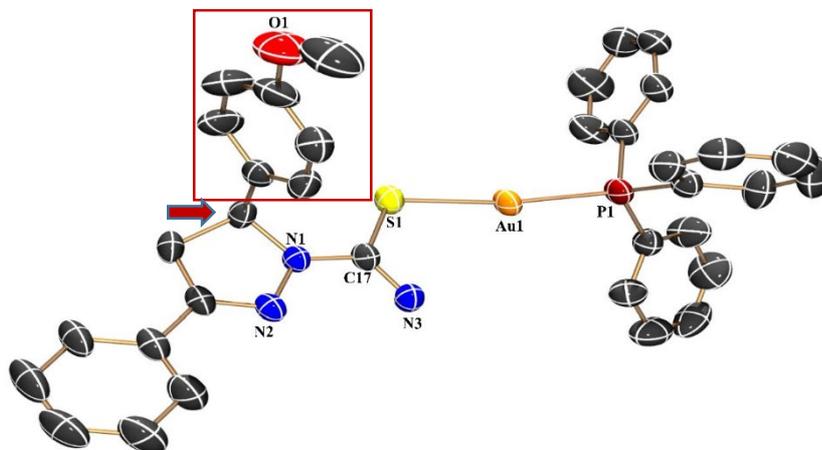


Figura 9. Estrutura cristalina do composto 3. Átomos de hidrogênio, ânion PF_6^- e solvente metanol omitidos, para maior clareza. Posição 5 no anel de pirazolina indicada pela seta vermelha; substituinte ligado à posição 5 destacado no retângulo; átomo de oxigênio, em vermelho.

5.2. Absorção UV-vis

A figura 10 mostra o espectro UV-visível dos complexos. Observa-se que os complexos e ligantes livres exibiram duas bandas de absorção centradas a 325 e 240nm. Um efeito hiperacrômico foi notado nos espectros de absorção dos complexos, após a metalação de ligantes por átomos Au(I).

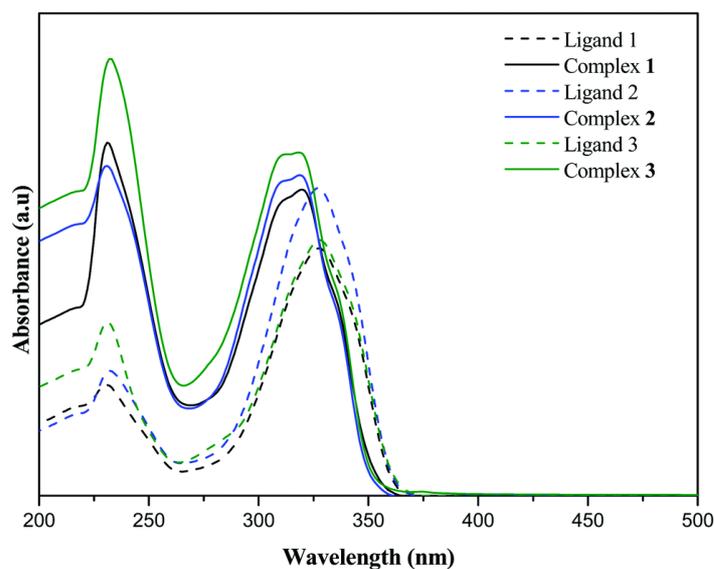


Figura 10. Espectro de absorção dos complexos e seus respectivos ligantes medidos a 298 K ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$), em solução CH_2Cl_2 .

5.3. Estudos de fotoluminescência e bioimagem

Para estudos de fotoluminescência e bioimagem e tendo como motivação os diversos trabalhos anteriormente citados, buscou-se focar as características de emissão que as moléculas, objeto do presente estudo, exibiam em solução. Além disso, investigou-se a viabilidade de usar esses novos compostos como sondas luminescentes em aplicações de bioimagem celular.

Os experimentos revelaram que, expostos em solução à radiação de 306 nm, os complexos emitiram luz azul esverdeada, cobrindo a faixa de 330-520 nm, claramente visível a olho nu (Figura 11). Dessa forma, com base nesse comportamento e nos perfis de absorção UV-vis, foi selecionado, como comprimento de onda de excitação, $\lambda_{ex}=305$ nm, para experimentos de fotoluminescência. A Figura 12 mostra os espectros de emissão dos complexos e seus respectivos ligantes em solução de diclorometano.

Os espectros de excitação adquiridos para os complexos **1**, **2** e **3** (Figura 13,14 e 15, respectivamente) se assemelham aos obtidos em experimentos UV-vis para os mesmos complexos.



Figura 11. Complexo 3 em solução de diclorometano ($1,0 \times 10^{-5}$ M). À esquerda: sob luz natural; à direita: a 306 nm (UV). Os complexos **1** e **2** exibiram comportamento semelhante.

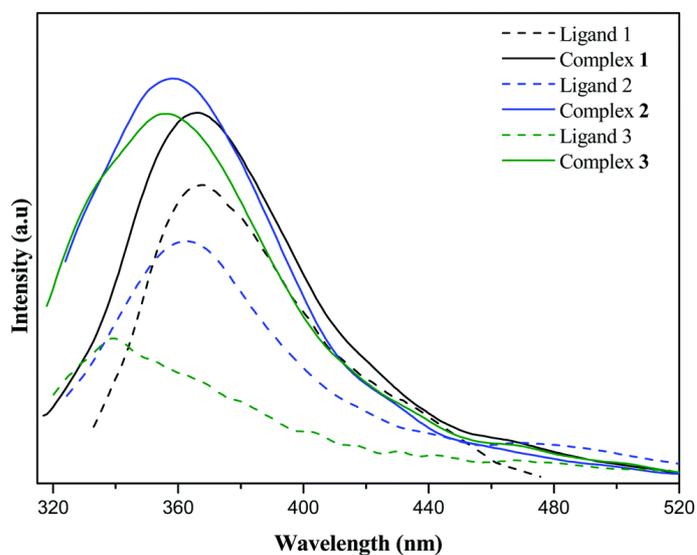


Figura 12. Espectro de emissão dos complexos e seus respectivos ligantes medidos a 298 K ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$), em solução CH_2Cl_2 .

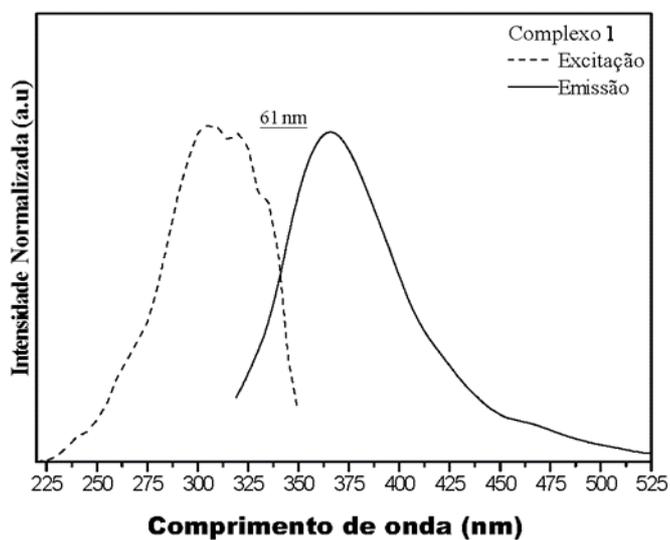


Figura 13. Espectros de excitação ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$) e emissão do complexo 1 medidos a 298 K, em solução CH_2Cl_2 . Dados normalizados por comparação (complexos 2 e 3 exibem comportamento similar).

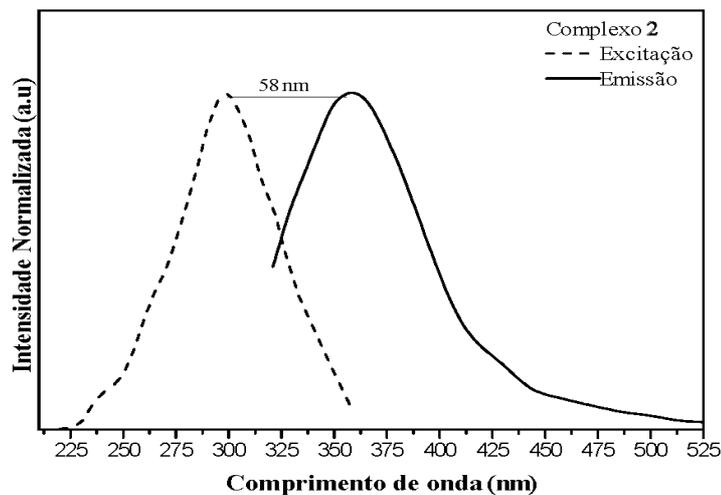


Figura 14. Espectros de excitação ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$) e emissão do complexo 2 medidos a 298 k, em solução CH_2Cl_2 . Dados normalizados por comparação (complexos 1 e 3 exibem comportamento similar).

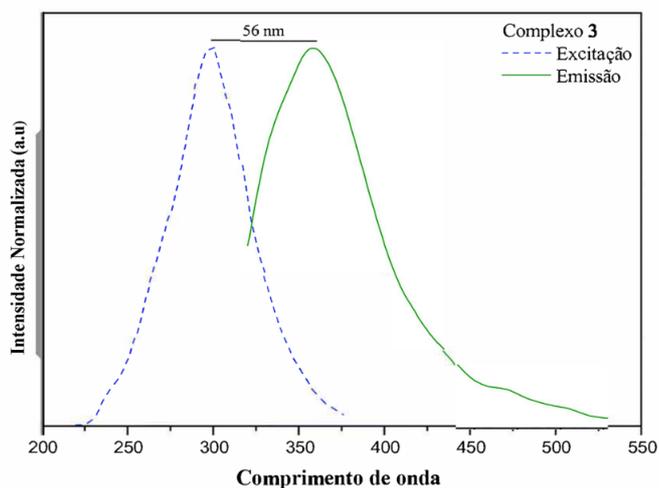


Figura 15. Espectros de excitação ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$) e emissão ($\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$) do complexo 3 medidos a 298 k, em solução CH_2Cl_2 . Dados normalizados por comparação (complexos 1 e 2 exibem comportamento similar).

Considerando a luminescência aumentada exibida pelos materiais mistos de fosfina/tiocarbamoil-pirazolina-Au(I) em comparação com os ligantes livres, decidiu-se aplicar esses complexos como sondas, em ensaios de bioimagem celular, usando técnicas de MCVL. As Figuras 16 a 20 mostram as imagens captadas por MCVL de células tumorais de mama (MDA-MD231, MCF-7) e células normais do tipo HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*), incubadas com cada complexo.

Os complexos **1**, **2** e **3** forneceram boas imagens em MCVL mostrando internalização celular razoável, com biodistribuição uniforme no citoplasma das células MDA-MD231 e MCF-7, utilizadas como modelos no estudo de bioimagem (Fig. 16 a 19). Não foram observados focos brilhantes concentrados no citoplasma ou núcleo celular, sugerindo que estes compostos não apresentam uma biodistribuição preferencial em organelas.

A fim de comparar os perfis de biodistribuição e captação celular apresentados pelos complexos de ouro, objetos deste estudo, em células tumorais e normais, realizou-se um experimento modelo, utilizando células normais do tipo HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). A Figura 20 mostra as imagens de MCVL de células HUVEC incubadas com complexo **3**.

Como esperado, a absorção celular e a biodistribuição observadas nos experimentos com células normais (HUVEC) são semelhantes às observadas em células tumorais MDA-MD231 e MCF-7. Assim como nas células tumorais, nas células não-tumorais HUVEC nota-se uma internalização celular, com biodistribuição uniforme no citoplasma, e também não foram observados focos brilhantes concentrados no citoplasma ou núcleo celular.

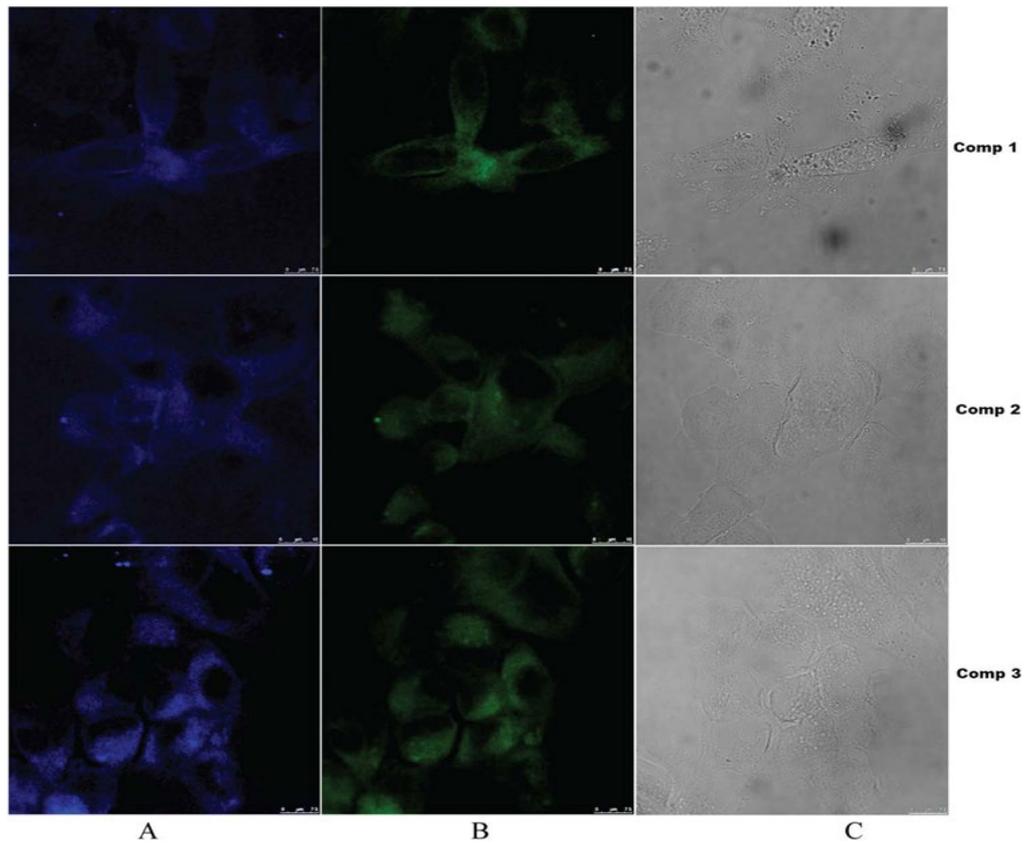


Figura 16. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MDA-MD231 coradas com complexos 1, 2 e 3. Células incubadas com fluoróforo 10 μ M: (A) bioimagem celular sob λ_{ex} = 305 nm; (B) bioimagem celular sob λ_{ex} = 405 nm; (C) em branco. Barra de escala de referência = 75 μ m.

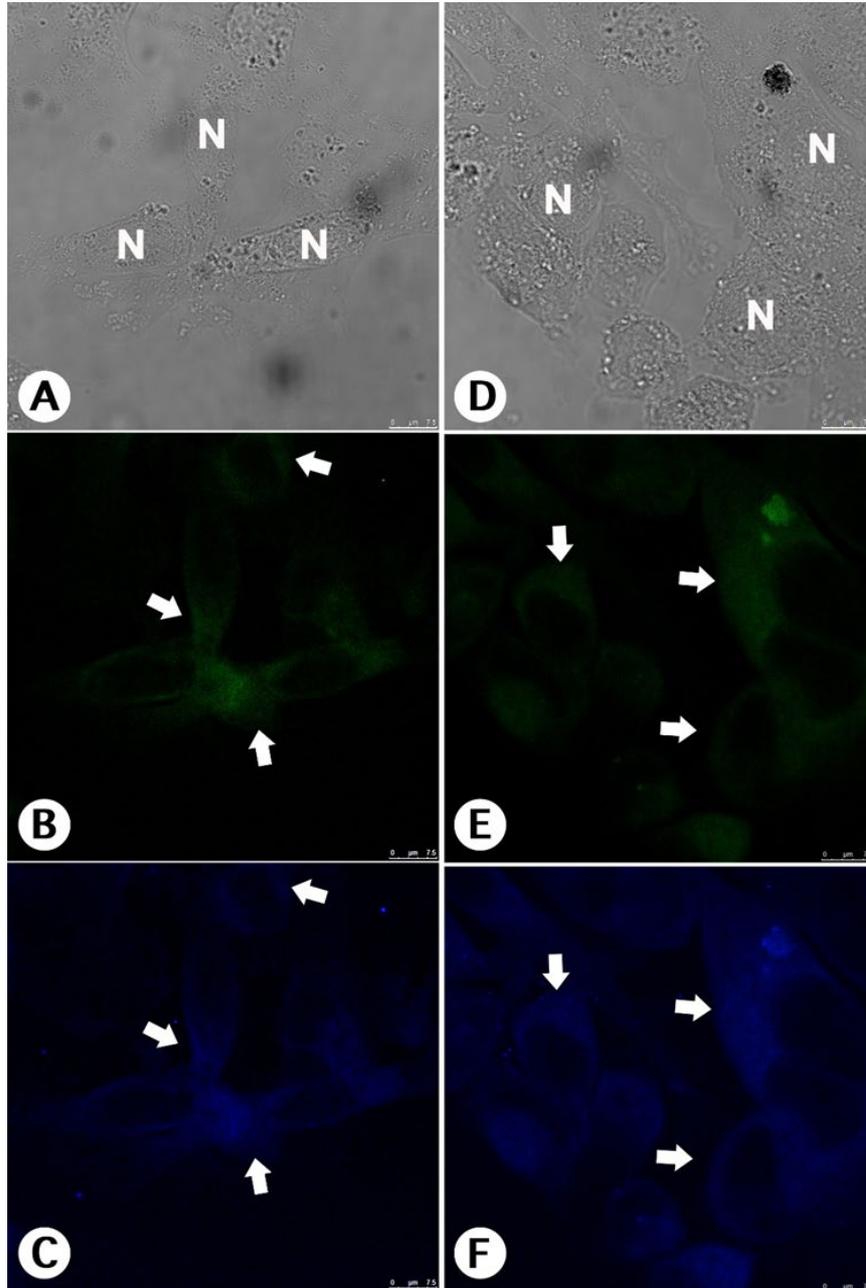


Figura 17. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 coradas com 1. Imagens A, B e C células vivas, imagens D, E e F células fixadas. O complexo 1 tem dupla emissão de fluorescência, verde ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) mostrado nas imagens B e E e azul ($\lambda_{exc} = 305 \text{ nm}$) mostrado nas imagens C e F. A fluorescência foi distribuída no citoplasma das células (seta branca). Os núcleos das células não foram corados por este composto e aparecem como vazios pretos nas células. As imagens A e D mostram a morfologia das células normais por

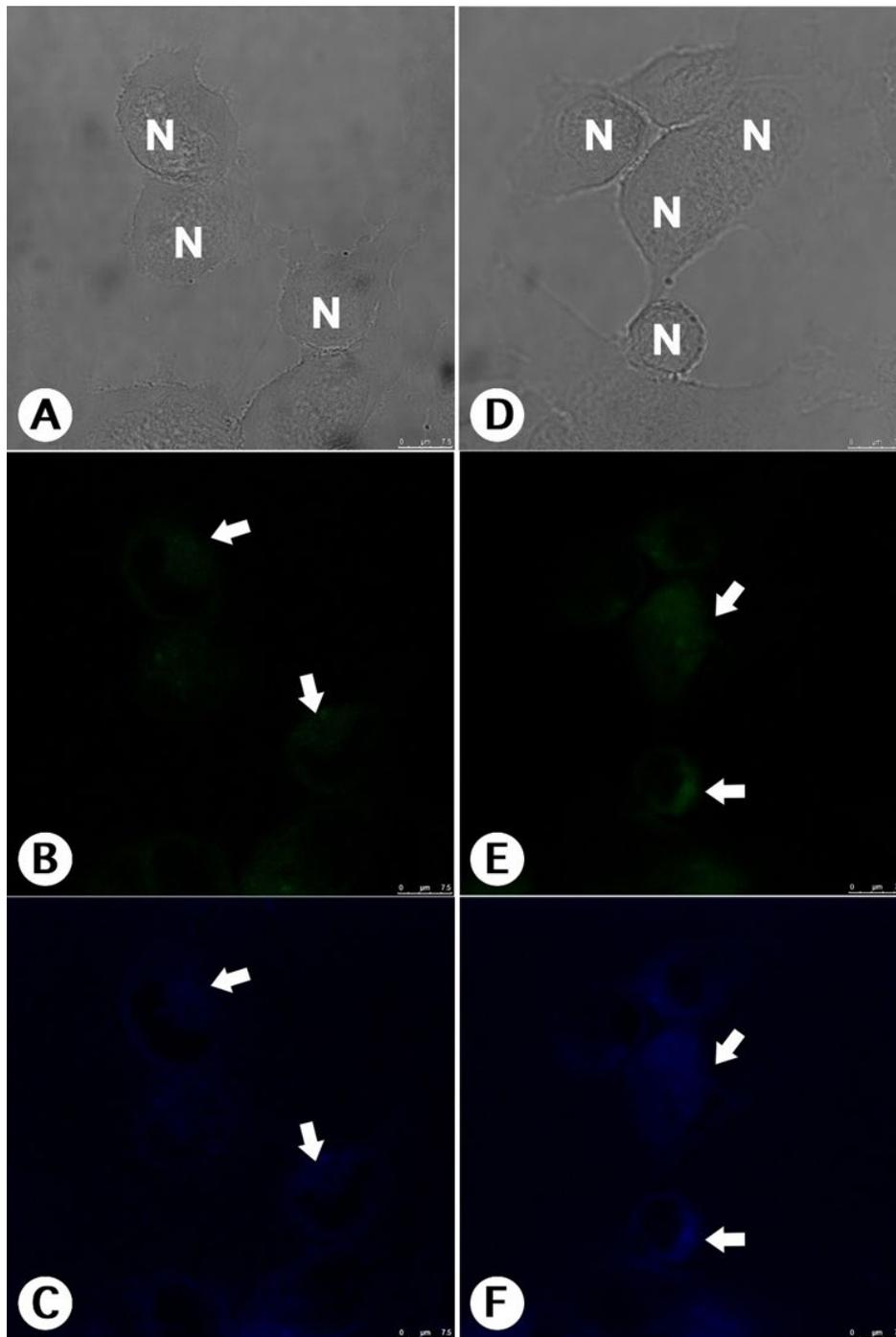


Figura 18. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 coradas com 2. Imagens A, B e C, células vivas, imagens D, E e F, células fixadas. O complexo **2** apresenta emissão de fluorescência dupla, verde ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$), mostrado nas imagens B e E e azul ($\lambda_{exc} = 305 \text{ nm}$), mostrado nas imagens C e F. A fluorescência foi distribuída no citoplasma das células (seta branca). O sinal fluorescente foi menos intenso do que os observados em células coradas com **3**. Os núcleos das células não foram corados por este composto e que aparecem como vazios pretos nas células. As imagens A e D mostram a morfologia das células normais por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência = $75 \mu\text{m}$.

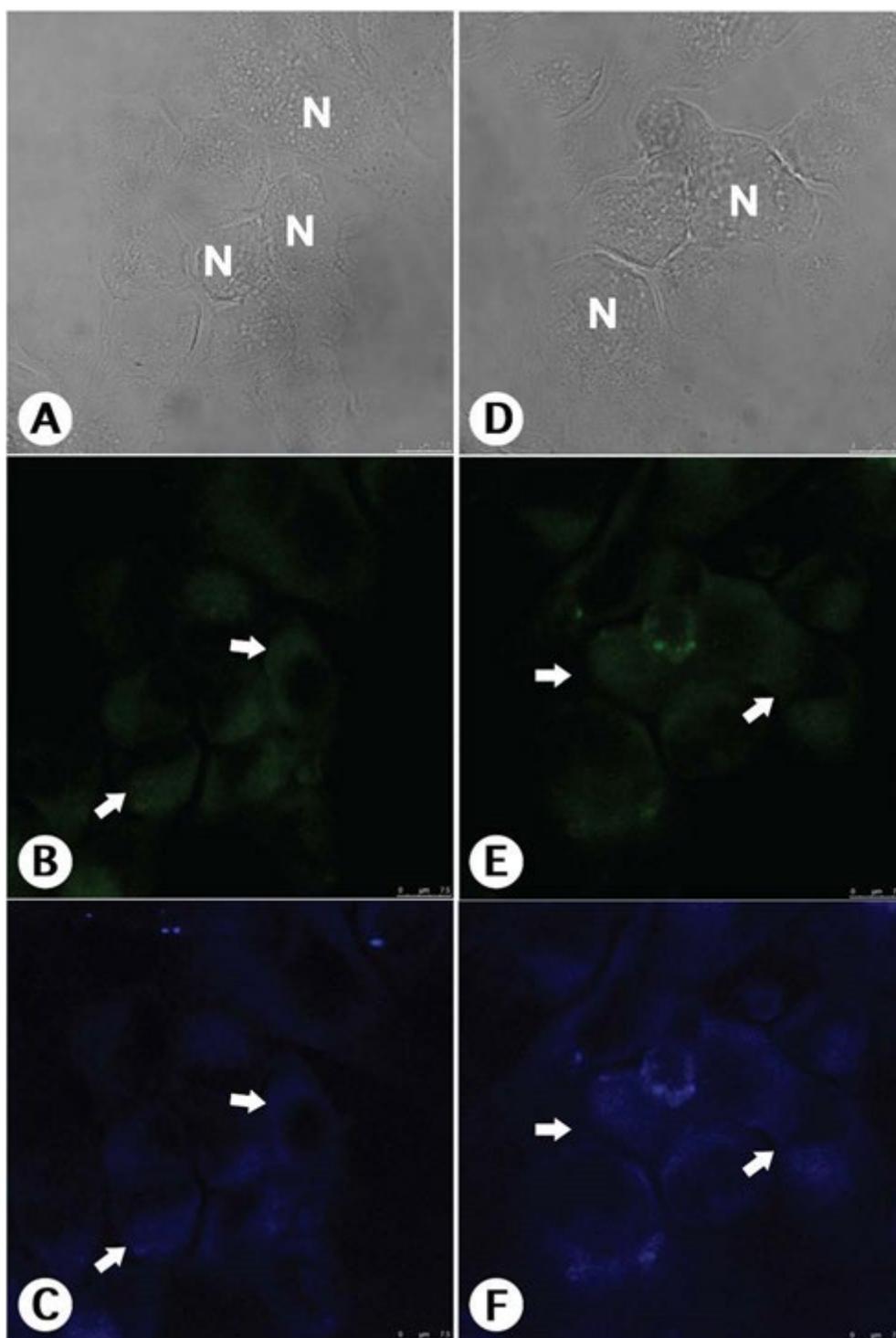


Figura 19. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 coradas com 3. Imagens (A)–(C) células vivas, imagens (D)–(F) células fixadas. O complexo 3 apresentou dupla emissão de fluorescência, verde ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) mostrado nas imagens B e E e azul ($\lambda_{exc} = 305 \text{ nm}$) mostrado nas imagens (C) e (F). A fluorescência foi distribuída no citoplasma das células (seta branca). Este complexo não corou os núcleos das células, que aparecem como vazios pretos nas células. As imagens (A) e (D) mostram a morfologia das células normais por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência = $75 \mu\text{m}$.

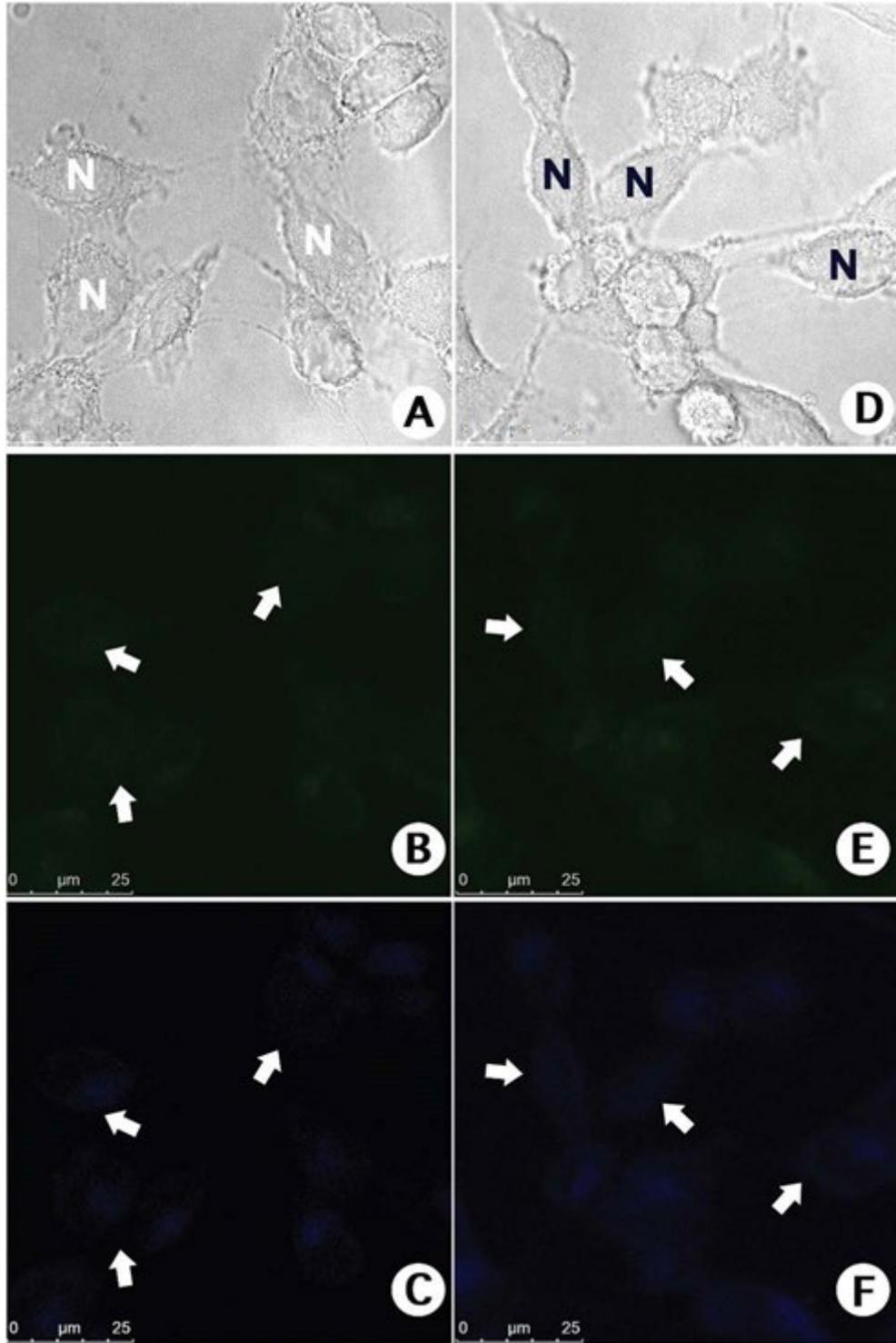


Figura 20. Imagens de microscopia de fluorescência confocal de HUVEC (Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana) coradas com complexo 3. Imagens (A)–(C) células vivas, imagens (D)–(F) células fixadas. O complexo 3 apresentou dupla emissão de fluorescência, verde ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) nas imagens (B) e (E) e azul ($\lambda_{exc} = 305 \text{ nm}$) nas imagens (C) e (F). A fluorescência foi distribuída para o citoplasma das células (seta branca). Os núcleos das células não foram corados por este composto e aparecem como vazios pretos nas células. As imagens (A) e (D) mostram a morfologia das células normais por microscopia de contraste de fase. Barra de escala de referência = 25 μm . (Comportamento semelhante foi observado para os complexos 1 e 2.)

5.4. Estudos antimicrobianos *in vitro*

Todos os ligantes orgânicos e compostos à base de ouro foram testados quanto ao efeito antibacteriano em bactérias Gram-positivas (cinco cepas de *S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*), usando o método de microdiluição em meio de cultura. Os resultados foram expressos em valores de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) (Tabela 4).

O THTAuCl é um composto lábil de ouro que, em solução de DMSO, promove a formação de um complexo de ouro com o solvente, que, por sua vez, é equivalente a um sal de ouro. Essa substância foi escolhida, devido a sua melhor solubilidade em meio de cultura, para comparar, assim como os ligantes, a atividade de ouro sozinha em relação aos complexos.

Ensaio complementares envolvendo a determinação de CBM mostraram que os complexos também são bactericidas, exceto para **2** e **3**, quando testados contra a cepa clínica 2*, bem como, para **1**, quando testado contra a cepa clínica 3*.

Tabela 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), em $\mu\text{g ml}^{-1}$, para os complexos 1, 2 e 3, e seus respectivos ligantes.

Composto	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>S. aureus</i> (clinical 1*)		<i>S. aureus</i> (clinical 2*)		<i>S. aureus</i> (clinical 3*)		<i>S. aureus</i> (clinical 4*)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922) CIM
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
Ligante 1	375	–	125	–	250	–	125	–	125	–	>500
Ligante 2	375	–	125	–	250	–	125	–	125	–	>500
Ligante 3	375	–	125	–	250	–	125	–	125	–	>500
Complexo 1	3.9	7.8	3.9	3.9	3.9	15.6	1.95	>7.8	7.8	7.8	>500
Complexo 2	3.9	7.8	0.97	1.95	0.97	>3.9	1.95	1.95	1.95	1.95	>500
Complexo 3	3.9	7.8	7.8	7.8	3.9	>15.6	1.95	3.9	3.9	3.9	>500
THTAuCl	31.25	125	15.6	31.25	7.8	>31.25	15.6	31.25	31.25	15.6	>500
Gentamicina	0.9	–	3.75	–	3.75	–	3.75	–	1.8	–	3.75

1*: cepa resistente a clindamicina, eritromicina e penicilina G. 2*: cepa resistente a oxacilina e penicilina G. 3*: cepa resistente a penicilina G. 4*: cepa resistente a clindamicina e eritromicina.

5.5. Citotoxicidade

Os ligantes orgânicos e compostos à base de ouro foram testados contra células tumorais e não tumorais para avaliação de citotoxicidade e índices de

seletividade. Várias concentrações foram empregadas para obter valores de IC₅₀ (Tabela 5), após 72 h de exposição.

Tabela 5. Concentrações que inibem 50% da viabilidade de proliferação celular (IC₅₀, μM ± SD).

Composto	Células tumorais				Células não tumorais BHK-21
	B16-F10	SI	4T1	SI	
Ligante 1	>100	nd	>100	nd	>100
Ligante 2	>100	nd	>100	nd	>100
Ligante 3	>100	nd	>100	nd	>100
Complexo 1	16.3 ± 1.0	0.5	54.4 ± 4.6	0.1	9.4 ± 0.6
Complexo 2	13.3 ± 0.7	0.7	48.4 ± 1.7	0.1	9.5 ± 0.1
Complexo 3	1.3 ± 0.1	3.7	4.4 ± 0.5	1.1	4.9 ± 0.4
Ph₃PAuCl	5.7 ± 0.7	1.4	10.6 ± 1.3	0.7	8.0 ± 0.6
Cisplatina	6.0 ± 1.0	3.0	5.0 ± 1.7	3.6	18.4 ± 1.9

SD: desvio padrão (triplicata de dois experimentos independentes).

SI: Índice de seletividade = IC₅₀ (μM) para células não tumorais / IC₅₀ (μM) para células tumorais.

nd: não determinado.

6. DISCUSSÃO

Os três compostos produzidos são espécies isoestruturais, ou seja, são similares em suas estruturas cristalográficas. Assim, as principais características destas moléculas serão discutidas em conjunto. Os comprimentos de ligação e ângulos mais relevantes nestas estruturas estão de acordo com compostos semelhantes, relatados em outros trabalhos (TZENG *et al.*, 2004).

Os complexos mononucleares Au(I)/fosfina geralmente exibem forte absorção na faixa UV-vis, em solução. Em estudos pioneiros, essas absorções foram relacionadas a ligações intraligantes (IL) e a transições eletrônicas de transferência de carga de metal para ligante (TCML) (KING *et al.*, 1992).

Neste trabalho, as bandas de absorção dos ligantes foram são, provavelmente, atribuídas a transições de transferência de carga intraligante (TCIL), envolvendo a porção tiocarbamoil (C=S) conjugada com o anel pirazolina; e a transições eletrônicas pertencentes aos anéis aromáticos dos ligantes (KING *et al.*, 1992).

Recentemente, complexos luminescentes Au(I)/tris[2-(2-piridil)etil]fosfina, que emitem cores ajustáveis, bem como compostos bioativos Au(I)/bis(difenilfosfina), ambos com aplicação em bioimagem, foram sintetizados e caracterizados estruturalmente. Apesar da síntese bem-sucedida desses complexos de Au(I) luminescentes, contendo fosfinas como ligantes, e apresentando propriedades fotofísicas, este campo de investigação, certamente, pode se beneficiar de avanços na descoberta de novas metalodrogas luminescentes (BARANOV *et al.*, 2019; FAVARIN *et al.*, 2017).

Os ligantes orgânicos livres, apresentados neste trabalho, mostraram-se menos luminescentes em solução do que seus respectivos complexos. Acredita-se que o aumento da luminescência dos complexos pode estar relacionado com a presença de novas transições eletrônicas mistas, como TCML + IL e TCLL, que aparecem após a metalação do ligante pelo o átomo metálico Au(I) (KING *et al.*, 1992).

Os espectros de excitação e emissão para **1**, **2** e **3** são imagens especulares mútuas quase exatas, sugerindo que os processos de emissão e excitação são relacionados aos mesmos níveis de energia (LAKOWICZ, 2010).

Esse padrão de excitação/emissão também sustenta a interpretação dos experimentos de absorção UV-vis, em que ocorreu absorbância a 325 nm para todos os três complexos, atribuída principalmente às transições eletrônicas mistas TCML + IL e TCLL. Foi relatado que o uso de fosfinas aromáticas como ligantes auxiliares coordenados a Au(I) melhora o desempenho luminescente de complexos Au(I)/tionaftalimida, tornando essas moléculas aplicáveis à bioimagem celular (LANGDON-JONES; POPE, 2014).

Não foram observados focos brilhantes concentrados no citoplasma ou núcleo celular, sugerindo, assim, que os referidos complexos não apresentam uma biodistribuição preferencial em organelas.

Até agora, apenas um número limitado de materiais de ouro incorporando ligantes fluorescentes foi aplicado à bioimagem celular, uma vez que condições ideais são necessárias para a investigação por MCVL (LANGDON-JONES; POPE, 2014). Em geral, os estudos preliminares de bioimagem celular aqui apresentados, juntamente com as propriedades luminescentes observadas, qualificam nossos complexos como promissoras sondas celulares luminescentes baseadas em materiais compostos por trifenilfosfina/pirazolina de centro metálico ouro(I).

Os três complexos exibiram uma atividade antibacteriana potente e significativa, com CIMs na faixa de 0,97–7,8 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Essa bioatividade observada foi notável, visto que, alguns complexos demonstraram ser de 16 a 258 vezes mais ativos do que os seus respectivos ligantes livres. Os compostos mostraram-se igualmente ativos contra a cepa padrão, *S. Aureus*, e a cepa clínica 3*, enquanto que, o complexo **2** provou ser o mais ativo contra as outras cepas resistentes.

Notavelmente, os complexos **1** e **3** foram seletivos para bactérias Gram-positivas, concordando com dados publicados sobre complexos Au(I) contendo ligantes do tipo fosfina (ALMEIDA, A. M. *et al.*, 2017; FILLAT *et al.*, 2011; GLIŠIĆ; DJURAN, 2014; MARQUES, L. L. *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que a parede celular de bactérias Gram-negativas é mais complexa e sofisticada que de Gram-positivas, assim, as diferenças nas bioatividades envolvendo essas duas classes bacterianas podem estar relacionadas às diferentes características estruturais das paredes celulares desses microrganismos (FILLAT *et al.*, 2011; MARQUES, L. L. *et al.*, 2007).

Os três complexos foram mais ativos que seus respectivos ligantes, mostrando um efeito sinérgico entre metal e ligante sobre a atividade biológica. Investigações anteriores desses ligantes, usando prata como átomo de metal, mostraram que a complexação aumentou a citotoxicidade, embora não o suficiente para superar a cisplatina (FAVARIN et al., 2019).

O presente estudo revelou que as células de melanoma B16-F10 são mais sensíveis aos complexos de ouro do que as células de adenocarcinoma 4T1. Em comparação com a cisplatina, **3** mostrou-se cinco vezes mais ativa contra células B16-F10, com índice de seletividade comparável.

Em relação ao substituinte R (Esquema 1), o complexo contendo a porção metoxi (**3**) foi, pelo menos, 10 vezes mais ativo do que **1** e **2**, contra ambas as linhagens de células tumorais. Este achado destaca o importante papel desempenhado pela estrutura do ligante, visto que, o complexo precursor de ouro (Ph₃PAuCl) também é citotóxico. Dessa forma, a presença de ligantes de tiocarbamoil-pirazolina em vez de cloreto, em complexos de fosfina Au(I) com um grupo doador de elétrons específico (-OCH₃), também desempenha um papel na citotoxicidade dos compostos.

Além disso, a estrutura molecular é importante no mecanismo de ação de complexos metálicos que apresentam atividade através de interações com alvos específicos. É bem relatado na literatura que alguns substituintes podem conduzir a molécula para uma bolsa hidrofílica ou hidrofóbica em uma proteína, enzima ou outro alvo, conforme descrito anteriormente para complexos de ouro e tioredoxina redutase (GARCIA et al., 2016; MA et al., 2019).

As estruturas cristalinas destas moléculas sugerem conformações muito semelhantes, mas biointerações ocorrem em ambiente fisiológico (solução aquosa) e podem gerar diferenças conformacionais, levando a diferentes interações (MA et al., 2019).

Os resultados aqui apresentados sugerem que a estrutura do ligante está favorecendo a interação metal-alvo, uma vez que o ligante não é consideravelmente citotóxico sozinho. Outras investigações biológicas explorando, como ferramenta, a luminescência dos complexos de ouro **1**, **2** e **3** podem fornecer maiores esclarecimentos sobre seus mecanismos de ação.

7. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, pesquisadores vêm desenvolvendo novos compostos de coordenação luminescentes baseados em ligantes de fosfina ou pirazolina 1,3,5-substituída, e coordenados com metais de transição d10 (CuI, AuI, CdII), para aplicações inovadoras em química de materiais. Neste trabalho três novos compostos Au(I), identificados como **1**, **2** e **3**, foram sintetizados com sucesso, via síntese sonoquímica. Em seguida, estes compostos foram caracterizados, exibindo uma luminescência azul-esverdeada brilhante, quando excitados a $\lambda_{exc} = 305$ nm, em solução. Este comportamento luminescente foi atribuído, principalmente, às transições eletrônicas mistas TCML + IL e TCLL, que ocorrem após a complexação do ligante, conforme indicado por cálculos de DFT. Ensaios antibacterianos revelaram a potencial aplicabilidade dos complexos como alternativas farmacêuticas para o tratamento de infecções, visando contornar a resistência a medicamentos antibióticos. Ensaios de citotoxicidade mostraram que os compostos à base de ouro são ativos contra células tumorais, embora os ligantes tenham se mostrado inativos. O composto **3**, que contém um substituinte metoxi, mostrou-se seletivo e mais ativo que a cisplatina. Por fim, conforme demonstrado pelas imagens de MCVL, os complexos apresentaram boa internalização celular, com biodistribuição uniforme no citoplasma das células tumorais MDA-MD231 e MCF-7. As propriedades fotofísicas, juntamente com ensaios preliminares de bioimagem celular, tornam esses novos materiais propícios para a aplicação como biomarcadores, tanto bioativos como luminescentes, em abordagens de bioimagem.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABDOU, H. E. *et al.* Structures and properties of gold(I) complexes of interest in biochemical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, 2009. v. 253, n. 11–12, p. 1661–1669.
- ADJEI, A. A.; HIDALGO, M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, 2005. v. 23, n. 23, p. 5386–5403.
- ALMEIDA, A. M. DE *et al.* Lipophilic gold(I) complexes with 1,3,4-oxadiazol-2-thione or 1,3-thiazolidine-2-thione moieties: synthesis and their cytotoxic and antimicrobial activities. **BioMetals**, 2017. v. 30, n. 6, p. 841–857.
- AMJAD MT, K. A. **Cancer Chemotherapy**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- BAENZIGER, N. C.; BENNETI, W. E.; SOBOROFF, D. M. Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. **Acta Crystallogr.**, 1976. v. 32, p. 962–963.
- BARANOV, A. Y. *et al.* Silver(I) and gold(I) complexes with tris[2-(2-pyridyl)ethyl]phosphine. **Inorganica Chimica Acta**, 2019. v. 494, n. May, p. 78–83. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.05.015>>.
- BARNARD, P. J.; BERNERS-PRICE, S. J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, 2007. v. 251, n. 13- 14 SPEC. ISS., p. 1889–1902.
- BARREIRO, E. *et al.* Dinuclear triphenylphosphinegold(I) sulfanylcarboxylates: Synthesis, structure and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2010. v. 104, n. 5, p. 551–559. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.01.006>>.
- BASKAR, R. *et al.* Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, 2012. v. 9, n. 3, p. 193–199.
- BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, 2004. v. 27, n. 3, p. 461–471.
- BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. **Mitochondria as multifaceted regulators of cell death**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>>.
- CARLOS LIMA, J.; RODRIGUEZ, L. Phosphine-Gold(I) Compounds as Anticancer Agents: General Description and Mechanisms of Action. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 2012. v. 11, n. 10, p. 921–928.
- CHAVES, J. D. S. *et al.* Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 127, p. 727–739.
- COELHO, A. **Química Química Inorgânica II**. 1ª ed. Fortaleza - Ceará: EdUECE, 2015.
- COSTA, G. S. M. *et al.* Silver(I) and gold(I) complexes with penicillamine: Synthesis, spectroscopic

characterization and biological studies. **Polyhedron**, 2012. v. 34, n. 1, p. 210–214. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2012.01.002>>.

DELGADO, G. *et al.* COMPOSTOS QUIMIOTERÁPICOS DE OURO: UMA VISÃO GERAL DOS COMPLEXOS ANTICÂNCER DE Au(I/III) EM RELAÇÃO À ESTRUTURA DO LIGANTE. **Química Nova**, 2020. v. 43, n. 8, p. 1104–1124.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, 2008. v. 68, n. 21, p. 8643–8653.

FAVARIN, L. R. V. *et al.* Synthesis and structural characterization of new heteroleptic copper(I) complexes based on mixed phosphine/thiocarbamoyl-pyrazoline ligands. **Polyhedron**, 2017. v. 121, p. 185–190. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2016.10.003>>.

_____ *et al.* Sonochemical synthesis of highly luminescent silver complexes: Photophysical properties and preliminary in vitro antitumor and antibacterial assays. **Inorganica Chimica Acta**, 2019. v. 492, n. April, p. 235–242. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.04.043>>.

_____ *et al.* Harvesting greenish blue luminescence in gold(i) complexes and their application as promising bioactive molecules and cellular bioimaging agents. **New Journal of Chemistry**, 2020. v. 44, n. 17, p. 6862–6871.

FERLE, A. *et al.* The first gold(I) complexes based on thiocarbamoyl-pyrazoline ligands: Synthesis, structural characterization and photophysical properties. **Polyhedron**, 2013. v. 63, p. 9–14. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2013.07.007>>.

FERNÁNDEZ-MOREIRA, V. *et al.* Bioactive and luminescent indole and isatin based gold(i) derivatives. **Dalton Transactions**, 2019. v. 48, n. 9, p. 3098–3108.

FILLAT, M. F. *et al.* Synthesis, structure and bactericide activity of (aminophosphane)gold(I) thiolate complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2011. n. 9, p. 1487–1495.

GARCIA, A. *et al.* Novel antitumor adamantane-azole gold(I) complexes as potential inhibitors of thioredoxin reductase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2016. v. 21, n. 2, p. 275–292.

GAVEGNANO, C. *et al.* Crossroads of Cancer and HIV-1 : Pathways to a Cure for HIV. 2019. v. 10, n. October, p. 1–8.

GIOVANNELLI, P. *et al.* Breast cancer stem cells: The role of sex steroid receptors. **World Journal of Stem Cells**, 2019. v. 11, n. 9, p. 594–603.

GLIŠIĆ, B.; DJURAN, M. I. Gold complexes as antimicrobial agents: An overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. **Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions**, 2014. v. 43, n. 16, p. 5950–5969.

GLOBOCAN. CANCER TODAY. **World Health Organization**, 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

GONZÁLEZ, J. J. *et al.* Luminescent Gold(I) Complexes of 1-Pyridyl-3-anthracenylchalcone Inducing Apoptosis in Colon Carcinoma Cells and Antivascular Effects. **Inorganic Chemistry**, 2019. v. 58, n. 19, p. 12954–12963.

GOUVEIA, R. G.; MOURA, R. O. De. Derivados de acridina como intercaladores de dna: uma revisão. **Congresso Brasileiro De Ciencias Da Saude**, 2016. n. 83.

GROVES, L. M. *et al.* Fluorescent functionalised naphthalimides and their Au(i)-NHC complexes for potential use in cellular bioimaging. **Dalton Transactions**, 2019. v. 48, n. 5, p. 1599–1612.

HERTER-SPRIE, G. S.; KUNG, A. L.; WONG, K. K. New cast for a new era: Preclinical cancer drug

development revisited. **Journal of Clinical Investigation**, 2013. v. 123, n. 9, p. 3636–3645.

HUANG, J.; ZHONG, L. Thioredoxin reductase. **Advanced Topics in Science and Technology in China**, 2012. v. 8, p. 41–64.

INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa>>.

INCIURA, A. *et al.* Comparison of adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in the management of advanced ovarian cancer: A retrospective study of 574 patients. **BMC Cancer**, 2006. v. 6, p. 1–7.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH IN CANCER. Global cancer observatory. **Malaysia Cancer Statistics**, 2019. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

JIN, K. T. *et al.* **Current progress in the clinical use of circulating tumor cells as prognostic biomarkers. Cancer Cytopathology.**

JOHNSTONE, T.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. **Chem Rev.**, 2016. v. 5, p. 3436–3486.

KARGES, J.; COHEN, S. M. Metal Complexes as Antiviral Agents for SARS-CoV-2. **ChemBioChem**, 2021. v. 22, n. 16, p. 2600–2607.

KING, C. *et al.* Luminescent Mononuclear Gold(I) Phosphines. **Inorganic Chemistry**, 1992. v. 31, n. 15, p. 3236–3238.

KOVALA-DEMERTZI, D. *et al.* Platinum(II) and palladium(II) complexes with 2-acetyl pyridine 4N-ethyl thiosemicarbazone able to overcome the cis-platin resistance. Structure, antibacterial activity and DNA strand breakage. **BioMetals**, 2003. v. 16, n. 3, p. 411–418.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3^a ed. New York: Springer International Publishing, 2010.

LANGDON-JONES, E. E.; POPE, S. J. A. Recent developments in gold(I) coordination chemistry: Luminescence properties and bioimaging opportunities. **Chemical Communications**, 2014. v. 50, n. 72, p. 10343–10354.

MA, W. *et al.* Rhodamine-modified fluorescent half-sandwich iridium and ruthenium complexes: Potential application as bioimaging and anticancer agents. **Dalton Transactions**, 2019. v. 48, n. 15, p. 4788–4793.

MALIK, D. *et al.* Futuristic approach to cancer treatment. **Gene**, 2021. v. 805, n. April, p. 145906. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145906>>.

MÁRMOL, I. *et al.* Alkynyl Gold(I) complexes derived from 3-hydroxyflavones as multi-targeted drugs against colon cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 183.

MARQUES, L. L. *et al.* New gold(I) and silver(I) complexes of sulfamethoxazole: Synthesis, X-ray structural characterization and microbiological activities of triphenylphosphine(sulfamethoxazolato-N2)gold(I) and (sulfamethoxazolato)silver(I). **Inorganic Chemistry Communications**, 2007. v. 10, p. 1083–1087.

MATHERS, C.; BERNARD, C.; IBURG, K. Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. **Global Programme on Evidence for Health Policy Discussion**, 2004. v. 2003, n. 54, p. 1–116. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/healthinfo/paper54.pdf>>.

MORA, M.; GIMENO, M. C.; VISBAL, R. Recent advances in gold-NHC complexes with biological properties. **Chemical Society Reviews**, 2019. v. 48, n. 2, p. 447–462.

- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 1983. v. 65, p. 55–63.
- NOMIYA, K. *et al.* Ligand-exchangeability of 2-coordinate phosphinegold(I) complexes with AuSP and AuNP cores showing selective antimicrobial activities against Gram-positive bacteria. Crystal structures of [Au(2-Hmpa)(PPh₃)] and [Au(6-Hmna)(PPh₃)] (2-H₂mpa=2-mercaptopropio. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2003. v. 95, n. 2–3, p. 208–220.
- OLIVEIRA, M. A. *et al.* Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. **Biochemistry**, 2010. v. 49, n. 15, p. 3317–3326.
- ORTEGO, L. *et al.* (Aminophosphane)gold(I) and silver(I) complexes as antibacterial agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2015. v. 146, p. 19–27. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.007>>.
- OTT, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, 2009. v. 253, n. 11–12, p. 1670–1681.
- _____ *et al.* A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2009. v. 52, n. 3, p. 763–770.
- PAIVA, R. E. F. DE *et al.* What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks. **Dalton Transactions**, 2020. v. 49, n. 45, p. 16004–16033.
- PÉREZ, S. A. *et al.* New Acridine Thiourea Gold(I) Anticancer Agents: Targeting the Nucleus and Inhibiting Vasculogenic Mimicry. **ACS Chemical Biology**, 2017. v. 12, n. 6, p. 1524–1537.
- PIZZUTI, L. *et al.* Environmentally friendly sonocatalysis promoted preparation of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2009. v. 16, n. 6, p. 728–731. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.005>>.
- ROCHA, D. P. *et al.* Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, 2011. v. 34, n. 1, p. 111–118.
- ROSA, P. P. *et al.* Synthesis, crystalline structures and photophysical properties of new cadmium iodide complexes with thiocarbamoyl-pyrazoline ligands. **Inorganica Chimica Acta**, 2018. v. 483, n. August, p. 293–298.
- RYBAK, L. MUKHERJEA, D. JAJOO, S. Et Al. Cisplatin Ototoxicity and Protection: Clinical and Experimental Studies. **Tohoku J Exp Med.**, 2009. v. 219, p. 177–186.
- SCHEFFLER, H.; YOU, Y.; OTT, I. Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes. **Polyhedron**, 2010. v. 29, n. 1, p. 66–69. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2009.06.007>>.
- SHAHINI, C. R. *et al.* Benzoxazole and dioxolane substituted benzimidazole-based N-heterocyclic carbene–silver(I) complexes: Synthesis, structural characterization and in vitro antimicrobial activity. **Journal of Organometallic Chemistry**, 2018. v. 868, p. 1–13. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.04.039>>.
- TAVARES, T. T. *et al.* Gold(I) complexes with aryl-thiosemicarbazones: Molecular modeling, synthesis, cytotoxicity and TrxR inhibition. **Polyhedron**, 2017. v. 132, p. 95–104. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2017.05.004>>.
- TENÓRIO, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância

biológica. **Química Nova**, 2005. v. 28, n. 6, p. 1030–1037.

TIAN, X. *et al.* CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. **npj Precision Oncology**, 2019. v. 3, n. 1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41698-019-0080-7>>.

TZENG, B. C. *et al.* Photophysical properties, electronic and crystal structures of luminescent diphosphine digold(I)-pyridine-2-thiolate complexes. **Inorganica Chimica Acta**, 2004. v. 357, n. 5, p. 1405–1410.

VARNA, D. *et al.* Heterocyclic thioamide/phosphine mixed-ligand silver(I) complexes: Synthesis, molecular structures, DNA-binding properties and antibacterial activity. **Polyhedron**, 2018. v. 151, p. 131–140. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.05.020>>.

VIEIRA, A. *et al.* Revisão. 2008. v. 31, n. 5, p. 1208–1217.

WALTER TAVARES. **ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS PARA O CLÍNICO**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2020.

WANG, D.-H. *et al.* Silver(I) Complexes of Diphenylpyridines: Crystal Structures, Luminescence Studies, Theoretical Insights, and Biological Activities. **ChemPlusChem**, 2017. v. 82, n. 2, p. 323–332.

WHO. Câncer. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>.

YILMAZ, V. T. *et al.* Structures and biochemical evaluation of silver(I) 5,5-diethylbarbiturate complexes with bis(diphenylphosphino)alkanes as potential antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. v. 139, p. 901–916. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.062>>.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I: artículo científico

ARTIGO CIENTÍFICO:

**Harvesting greenish blue luminescence in gold(I)
complexes and their application as promising
bioactive molecules and cellular bioimaging agents**



Cite this: *New J. Chem.*, 2020, **44**, 6862

Harvesting greenish blue luminescence in gold(I) complexes and their application as promising bioactive molecules and cellular bioimaging agents†

Lis R. V. Favarin,^a G. B. Laranjeira,^a Cristiane F. A. Teixeira,^a Heveline Silva,^b A. C. Micheletti,^a Lucas Pizzuti,^a Amilcar Machulek Júnior,^a Anderson R. L. Caires,^a Victor M. Deflon,^c Rafaela B. P. Pesci,^d C. N. Lima Rocha,^e J. R. Correa,^e L. M. C. Pinto^a and Gleison Antônio Casagrande^a*

Three novel highly photoluminescent mononuclear Au^I compounds (**1**, **2**, and **3**) based on mixed phosphine/thiocarbamoyl-pyrazoline materials were synthesized at good yields using a sonochemical method and then structurally characterized. X-ray diffraction studies revealed the compounds to be mononuclear cationic complexes of the [Ph₃PAu(L)]PF₆ type with linear coordination geometry around Au^I atoms. Investigation of photophysical properties showed an intense greenish blue emission when the complexes were excited at 305 nm in solution. The emission was attributed to mixed MLCT + IL and LLCT electronic transitions taking place after ligand complexation, as shown by DFT calculations. Full characterization of the compounds also comprised ¹H and ¹³C NMR experiments, elemental analyses, infrared spectroscopy, and absorption–emission studies. Additionally, compounds **1**, **2**, and **3** and respective ligands were investigated as antibacterial agents against five *Streptococcus aureus* strains (Gram-positive) and one *Escherichia coli* strain (Gram-negative) with distinct antibiotic-resistance profiles. Cytotoxic activity was assessed using the MTT method against B16F10 melanoma, 4T1 mammary carcinoma, and normal BHK-21 baby hamster kidney cell lines. The synthesized Au^I compounds proved more active than the respective precursors and free ligands. Tested as probes for cellular bioimaging, the complexes showed good biodistribution in the cytoplasm of MCF-7 and MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma cell lines).

Received 17th March 2020,
Accepted 2nd April 2020

DOI: 10.1039/d0nj01339k

rsc.li/njc

1. Introduction

In the past few decades, the development of novel gold and silver coordination compounds for biological application as anticancer and antibacterial agents has become a promising field of investigation.^{1–6} Overcoming antimicrobial and antitumor resistance and seeking new metallodrugs with pharmacological profiles distinct from those of platinum chemotherapeutic agents constitute today's primary challenges in the medicinal chemistry field.⁷ Using well-known antibiotic molecules as ligands for the generation of Au^I coordination compounds is a promising strategy to enhance the antibacterial activity of penicillamine/Au^I complexes against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.⁸ Aminophosphane/Au^I complexes have been employed against Gram-negative *Salmonella enterica* and *E. coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus*, showing antibacterial activity comparable to standard antibiotics such as gentamicin and ampicillin.¹ Recently, N-heterocyclic carbene/Au^I complexes exhibiting dual function (antitumor and antibacterial) have emerged as excellent-

^a Grupo de Pesquisa em Síntese e Caracterização Molecular de Mato Grosso do Sul, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Laboratório 2), Av. Senador Filinto Muller, 1555, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil.

E-mail: gleisoncasag@gmail.com, gleison.casagrande@ufms.br;

Fax: +55 67 3345 7190; Tel: +55 67 3345 3595

^b Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

^c Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense, 400, São Carlos, SP 13566-590, Brazil

^d Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^e Laboratório de Microscopia e Microanálises, Grupo Quimioterápicos e Sondas Fluorescentes, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Av. L3 Norte, s.n., Campus Darcy Ribeiro, Brasília, DF 70910-900, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1959700 (1), 1959701 (2), and 1959702 (3). For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0nj01339k

potential chemotherapeutics, with superior anticancer and antibacterial activities, relative to cisplatin and commercial antibiotics, respectively.⁹ Mitochondria play a crucial role in the regulation of apoptosis (programmed cell death), which makes these organelles an attractive target for the discovery of new anticancer metallodrugs. Thioredoxin reductase appears to be one of the specific targets for Au^I coordination metallodrugs with anticancer activity,^{10,11} and cellular biodistribution studies monitored by confocal fluorescence microscopy (CFM) and atomic absorption spectroscopy have shown that Au^I complexes containing acridine–thiourea or naphthalimide ligands locate into the cell nucleus, suggesting a DNA-dependent mechanism of action.^{12,13} Properties such as lipophilicity, propensity to undergo ligand exchange reactions in biological media, and a charged or uncharged bioactive compounds nature may be important factors defining cell activity.^{11–13} CFM is a useful tool to monitor cellular uptake and biodistribution of luminescent metallodrugs into the organelles. Designing luminescent, bioactive Au^I coordination compounds has become an attractive field of investigation for the development of novel metallodrugs having a dual application: as cellular markers and bioactive molecules. CFM has recently been applied to track the biodistribution of fluorescent and antitumor carbene–naphthalimide/Au^I complexes in MCF-7 tumor cells. Green light, mostly at the lysosomal portion of MCF-7 cells, is emitted when these complexes are excited at 405 nm. (Time-dependent density-functional theory (TD-DFT) studies demonstrated that this emission is related to intraligand charge-transfer (ILCT) transitions.¹⁴) Bioactive, luminescent, mixed phosphine/indole or phosphine/isatin Au^I materials have exhibited outstanding cytotoxic activity (10.11–0.28 μM) against leukemia and cisplatin-resistant Jurkat-shBak cells, hinting at a promising future as anticancer agents.¹⁵ A study comparing the cytotoxicity and cellular uptake of phosphine/Au^I complexes revealed stronger antiproliferative effects for complexes containing triphenylphosphine, as opposed to *n*-alkyl-phosphine, as a ligand. This general trend correlates with the higher lipophilicity of aromatic triphenylphosphine/Au^I compounds, compared with non-aromatic analogues.¹⁶ In recent years, our research group has been developing novel luminescent coordination compounds based on phosphine or 1,3,5-substituted pyrazoline ligands with closed-shell d¹⁰ transition metals (Cu^I, Au^I, Cd^{II}) for innovative applications in materials chemistry.^{17–19} Given the remarkable luminescence properties of this class of molecules, and in order to contribute to the development of new promising luminescent and bioactive compounds, this article reports the synthesis, structural characterization, TD-DFT calculations, biologic assaying, and bioimaging investigation of three new, highly luminescent Au^I materials based on mixed triphenylphosphine/1,3,5-substituted pyrazoline ligands.

2. Experimental

2.1. Chemicals, measurements, calculations, and biological activities

Solvents (AR grade) were obtained commercially and used in the synthesis without further purification. Ph₃PAuCl and ligands

L1 (1-thiocarbamoyl-5-(4-methylphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole), L2 (1-thiocarbamoyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole), and L3 (1-thiocarbamoyl-5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole), the starting materials, were prepared according to published methods.^{20,21} Solvents (spectroscopic grade) used in the UV-vis and fluorescence experiments were purchased from Aldrich. ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C NMR (75 MHz) spectra were acquired on a Bruker Avance DPX-300 spectrometer using CDCl₃ as the deuterated solvent, and recorded as ppm relative to the internal tetramethylsilane standard. Elemental analyses (CHN) were performed on a PerkinElmer 2400 instrument. FT-IR spectra were acquired on a Jasco-4100 spectrophotometer using KBr pellets. UV-vis experiments were conducted on a PerkinElmer Lambda 650 spectrophotometer (200–800 nm), using quartz cuvettes. The emission spectra in solution were obtained on a Varian Cary Eclipse fluorimeter by exciting the samples at 305 nm and collecting emissions in the 320–550 nm range. Melting points, determined on an Instruterm DF-3600 apparatus, are reported uncorrected.

For the bioimaging assay, the cells were seeded on 13 mm round glass coverslips at the bottom of a 24-well plate, allowed to adhere overnight, and washed three times with serum-free medium for removal of non-adherent cells. After reaching confluence, the cells were separated into two samples (live and fixed). Live samples were incubated for 30 min with one of the compounds in solution (10 μM) at 37 °C, washed three times with PBS 1× (pH 7.4) at room temperature, fixed in 3.7% formaldehyde for 30 min, and washed again three times in PBS 1× (pH 7.4) at room temperature. The coverslips were then mounted over glass slides using ProLong Gold Antifade (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The fixed samples were first washed three times in PBS 1× (pH 7.4), fixed in 3.7% formaldehyde for 30 min, washed three times in PBS 1× (pH 7.4) at room temperature, and incubated with one of the compounds in solution (10 μM) at room temperature for 30 min. Finally, they were washed three times in PBS 1× (pH 7.4) at room temperature and the coverslips were then mounted over glass slides using ProLong Gold Antifade (Invitrogen) as per manufacturer's instructions. The samples for negative controls were incubated in 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO, the diluent solution) and examined under 405 nm laser excitation on a Leica TCS SP5 confocal microscope. The fluorescence images were acquired in the 400–480 nm (blue) and 500–580 nm (green) ranges. All assays were performed in triplicate, with three repetitions for each experimental condition.

X-ray data were collected using a Bruker APEX II CCD area-detector diffractometer with graphite-monochromatized Mo-Kα radiation. The crystal structures of complexes were solved using a ShelX package.²² All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters, and the hydrogen atoms were included at their theoretically ideal positions. (More detailed information about structure elucidation is given in Table S1, ESI.†) Density-functional theory (DFT) calculations were performed with the B3LYP functional,^{23,24} the SDD for Au, and the 6-31G* basis set for C, N, S, P, F, O, Cl, and H, implemented using a Gaussian09 software package.²⁵ Atomic coordinates,

determined for individual molecular structures by X-ray crystallographic analysis, were used for DFT calculations. Vertical excitation energies were calculated using time-dependent DFT (TD-DFT). MO diagrams were reproduced using Avogadro (version 1.2.0).²⁶ Antibacterial assays were performed on *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and four *S. aureus* clinical strains (clindamycin-, erythromycin-, and penicillin G-resistant; oxacillin- and penicillin G-resistant; penicillin G-resistant; and clindamycin- and erythromycin-resistant). Clinical strains were provided by the Center for Clinical Analysis of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Teaching Hospital (Campo Grande, Brazil). All reagents and media for the antibacterial assays were purchased from Sigma Aldrich. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values was performed as per Favarin *et al.*⁵ Gentamicin was the positive control. Cytotoxic activity was investigated against two tumor cell lines (4T1: mouse metastatic mammary adenocarcinoma; B16-F10: mouse metastatic skin melanoma) and one non-tumor cell line (BHK-21: baby hamster kidney). The cells were propagated in RPMI 1640 culture medium at pH 7.4, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), Hepes (4.0 mmol L⁻¹), NaHCO₃ (14.0 mmol L⁻¹), ampicillin (0.27 mmol L⁻¹), and streptomycin (0.06 mmol L⁻¹). The cells were harvested using trypsin-EDTA, seeded in 96-well plates (100 μL per well) at a density of 1 × 10³ viable cells per well, and incubated at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. Stock DMSO solutions of the test substances were serially diluted in cell culture medium (<1% DMSO). After drug exposure at 37 °C under 5% CO₂ for 72 h, the cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.01 mol L⁻¹ in water solution, 10 μL per well) at 37 °C under 5% CO₂ for 4 h. MTT metabolization by viable cells results in a violet complex that, solubilized in 100 μL of DMSO, is quantifiable by colorimetry (570 nm absorbance).²⁷ Negative controls (100% viability) consisted of cells exposed to RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. Cisplatin was used as the positive control against all cell lines. Raw data were normalized to the untreated control cells and set into relation with the metabolic activity of the viable treated cells. IC₅₀ values—the concentrations inhibiting 50% of cell growth viability—(Table 3) were calculated using four parametric nonlinear regressions employing GraphPad Prism 5.0 software.

2.2. Preparation of compounds

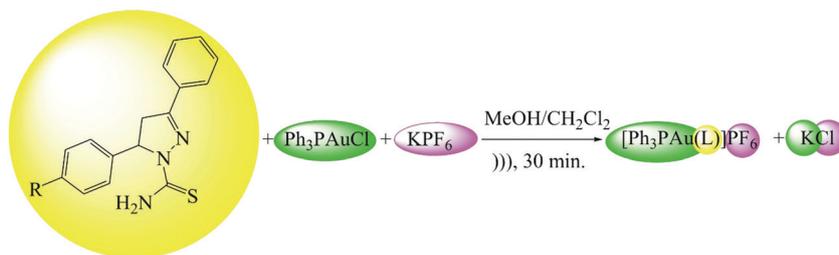
Sonochemical synthesis of complexes **1**, **2**, and **3** was performed using a microtip probe connected to a 500 W Sonics Vibra-cell ultrasonic processor operating at 20 kHz maximum power output, employing methods published by our research group.⁵ Scheme 1 displays the synthesis of complexes **1**, **2**, and **3**.

Compound (1) [Ph₃PAu(L1)]PF₆. In a one-pot procedure, 1 mmol (0.0494 g) of gold precursor (Ph₃PAuCl), 1 mmol (0.0184 g) of KPF₆, and 1 mmol (0.0295 g) of ligand (L1) were added to a 20 mL vial containing 6 mL of mixture solvents (1:1, v:v) of MeOH/CH₂Cl₂. The system was sonicated for 30 min, which increased its temperature to 35 °C. The resulting colorless solution was filtered off and, after three days, prismatic colorless crystals were isolated from the mother solution.

The same procedure was applied to prepare compounds **2** and **3**, using the respective L2 and L3 ligands.

Compound (1) [Ph₃PAu(L1)]PF₆·MeOH. Colorless, air-stable crystalline substance (yield: 64.5% of crystals based on the gold precursor used); m.p. 140–142 °C; FW = 931.64, C₃₆H₃₆AuF₆N₃O₂S; calcd (%) C 46.40, H 3.89, N 4.51; found (%) C 46.51, H 3.91, N 4.54. IR (KBr, ν(cm⁻¹)): 3586–3190 [ν(N–H)], 3058 [ν(C–H)_{Ar}], 1591 [ν(C=N)], 1532 [ν(C=C)], 1396 [ν(C=S)], 841 [ν(P–F)].^{28,29} ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.82–7.79 (m, 2H, Ar), 7.76 (bs, 1H, NH), 7.55–7.44 (m, 18H, Ar), 7.26–7.07 (m, 5H, Ar + NH), 5.75 (dd, *J* = 11.0, 3.5 Hz, 1H, H_X), 3.99 (dd, *J* = 18.0, 11.0 Hz, 1H, H_B), 3.31 (dd, *J* = 18.0, 3.6 Hz, 1H, H_A), 2.31 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.3, 165.4, 161.3, 137.7 (d, JC-P = 96.8 Hz), 134.2 (d, JC-P = 12.9 Hz), 132.6, 132.3, 130.0, 130.0 (d, JC-P = 13.9 Hz), 129.3, 129.2, 128.0, 127.2, 125.5, 64.4, 44.4, 21.3.

Compound (2) [Ph₃PAu(L2)]PF₆·MeOH. Colorless, air-stable crystalline substance (yield: 62.5% of crystals based on the gold precursor used); m.p. 145–147 °C; FW = 917.62, C₃₅H₃₄AuF₆N₃O₂S; calcd (%) C 45.80, H 3.73, N 4.58; found (%) C 46.01, H 3.75, N 4.60. IR (KBr, ν(cm⁻¹)): 3580–3414 [ν(N–H)], 3055 [ν(C–H)_{Ar}], 1593 [ν(C=N)], 1531 [ν(C=C)], 1396 [ν(C=S)], 837 [ν(P–F)].^{28,29} ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80–7.78 (m, 2H, Ar), 7.74 (bs, 1H, NH), 7.58–7.41 (m, 18H, Ar), 7.35–7.26 (m, 3H, Ar), 7.18–7.16 (m, 2H, Ar), 7.04 (bs, 1H, NH), 5.77 (dd, *J* = 11.0, 3.6 Hz, 1H, H_X), 4.02 (dd, *J* = 18.2, 11.0 Hz, 1H, H_B), 3.31 (dd, *J* = 18.1, 3.4 Hz, 1H, H_A). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.3, 161.4, 140.0, 134.3, 134.1, 132.6, 132.4, 129.9, 129.8, 129.5, 129.2, 128.6, 128.1, 125.6, 64.7, 44.4.



L1 (R = CH₃), L2 (R = H) and L3 (R = CH₃O) for compounds **1**, **2** and **3** respectively.

Scheme 1 Synthesis of complexes.

Compound (3) [Ph₃PAu(L3)]PF₆·MeOH. Colorless, air-stable crystalline substance (yield: 59.00% of crystals based on the gold precursor used); m.p. 135–137 °C; FW = 947.70, C₃₆H₃₆AuF₆N₃O₂P₂S; calcd (%) C 45.71, H 3.87, N 4.54; found (%) C 45.73, H 3.91, N 4.56. IR (KBr, $\nu(\text{cm}^{-1})$): 3580–3414 [$\nu(\text{N-H})$], 3061 [$\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$], 1593 [$\nu(\text{C=N})$], 1533 [$\nu(\text{C=C})$], 1397 [$\nu(\text{C=S})$], 841 [$\nu(\text{P-F})$].^{28,29} ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80–7.77 (m, 2H, Ar), 7.71 (bs, 1H, NH), 7.56–7.40 (m, 18H, Ar), 7.10–7.08 (m, 2H, Ar), 6.98 (bs, 1H, NH), 6.84–6.81 (m, 2H, Ar), 5.71 (dd, $J = 11.0, 3.6$ Hz, 1H, H_X), 3.97 (dd, $J = 18.2, 11.0$ Hz, 1H, H_B), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.28 (dd, $J = 18.2, 3.6$ Hz, 1H, H_A). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 161.6, 159.7, 134.3, 134.1, 132.6, 132.3, 132.1, 129.9, 129.7, 129.2, 128.0, 127.0, 114.7, 64.3, 55.4, 44.4.

3. Results and discussion

3.1. Crystal structure

Since both Au^I compounds prepared have the same isostructural crystallographic structure (monoclinic *P21/n* space group), the principal structural features of both molecules will be discussed together. Fig. 1 shows the crystalline structure of complex 1. (See Fig. S1 and S2 (ESI[†]) for complexes 2 and 3, respectively.)

The complexes differ in the substituent bonded at the 5-position on the pyrazoline ring (4-methylphenyl for 1, phenyl for 2, 4-methoxyphenyl for 3). Complexes 1, 2, and 3 are cationic complexes of the [Ph₃PAu(L)]PF₆ type, in which both component structures have monodentate ligands coordinated with the Au^I center through the sulfur atom in the ligand's thiocarbonyl (C=S) moiety. The Au^I atom has an almost linear coordination geometry with bond angles (P–Au–S) ranging from 169.63(4)° to 170.64(4)° (Table S2, ESI[†]). The most relevant bond lengths and angles in both structures are in agreement with similar compounds reported elsewhere.³⁰ (More detailed information about bond angles and distances is given in Table S2, ESI[†])

3.2. UV-vis absorption and TD-DFT calculations

Mononuclear Au^I/phosphine complexes often exhibit strong absorption in the UV-vis range in solution. In pioneering

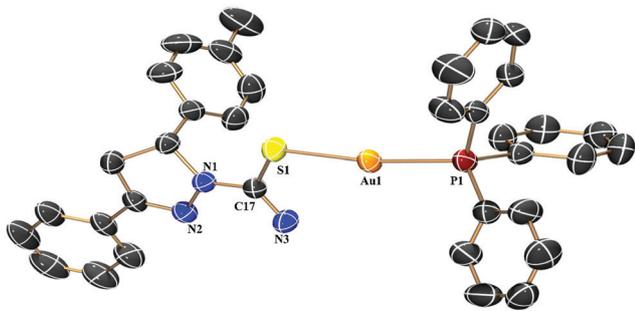


Fig. 1 Crystalline structure of 1. Hydrogen atoms, PF₆ anion, and methanol solvate omitted for clarity. Thermal ellipsoids drawn at a 50% probability level.

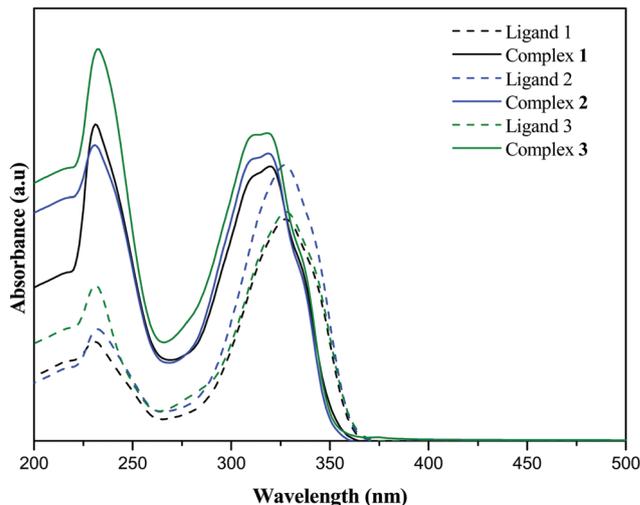


Fig. 2 Absorption spectra of complexes and respective ligands measured at 298 K in CH₂Cl₂ solution ($\approx 1.0 \times 10^{-5}$ M).

studies by Fackler *et al.*, these absorptions were related to intraligand (IL) $\pi \rightarrow \pi^*$ and metal-to-ligand charge-transfer (MLCT) electronic transitions.³¹ Encouraged by these studies, and in order to minimize the solvent effect on the structural and electronic properties of the complexes, we chose to acquire the electronic spectra of these compounds in dilute solutions ($\approx 1.0 \times 10^{-5}$ M) of CH₂Cl₂ as a non-coordinating solvent. Because the complexes are structurally similar (general formula [Ph₃PAu(L)]PF₆), TD-DFT calculations were performed for complex 3 to elucidate the origin of the electronic transitions involved in absorption. Fig. 2 shows the UV-vis spectra of the complexes. Fig. 3 depicts natural transition orbitals (NTOs) obtained from DFT calculations.

Table 1 shows energy levels calculated, oscillator strength values, and orbital transition data for selected lower-lying transitions, additionally reporting the principal assignments involved in NTOs.

As seen in Fig. 2, the complexes and free ligands exhibited two absorption bands centered at *ca.* 325 and 240 nm. The absorption bands of ligands were attributed to intraligand charge-transfer (ILCT) transitions of the $n \rightarrow \pi^*$ type involving a thiocarbonyl (C=S) moiety conjugated with the pyrazoline ring, and $\pi \rightarrow \pi^*$ electronic transitions belonging to the ligands' aromatic rings.¹⁸ A hyperchromic effect was observed in the absorption spectra of the complexes after metalation of ligands to Au^I atoms. In light of the DFT results, this hyperchromic effect was related to the emergence of new electronic transitions taking place after coordination of ligands to Au^I atoms. Therefore, the strong absorption bands centered at *ca.* 325 nm in the spectra of the complexes might be related to HOMO \rightarrow LUMO and HOMO–1 \rightarrow LUMO electronic transitions of the MLCT + IL type mixed with HOMO \rightarrow L+1, L+2, L+3 ligand-to-ligand charge-transfer (LLCT) electronic transitions. TD-DFT calculations were also performed to investigate whether the experimental UV-vis profiles fitted theoretical predictions. In the UV-vis spectrum calculated for complex 3

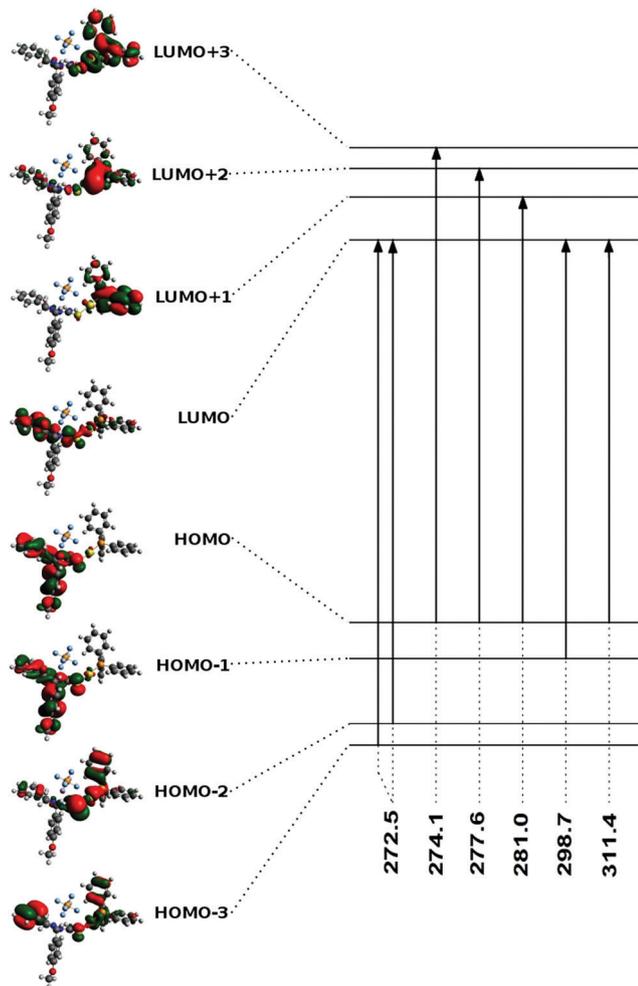


Fig. 3 Frontier orbitals of complex **3**, according to DFT calculations. Emphasis is on natural transition orbitals. DFT calculations were based on molecular structure (bond lengths and angles) determined by X-ray analysis.

Table 1 Energy levels calculated, oscillator strengths (f), and orbital transition analyses for selected lower-lying transitions

State	λ (nm)	f	Contribution	Description
S1	311.4	0.2781	H \rightarrow L (94%)	LMCT + IL
S2	298.7	0.4706	H-1 \rightarrow L (91%)	LMCT + IL
S3	281.0	0.0017	H \rightarrow L+1 (92%)	LLCT
S4	277.6	0.0432	H \rightarrow L+2 (81%)	LLCT
S5	274.1	0.0285	H \rightarrow L+3 (77%)	LLCT
S6	272.5	0.0051	H-2 \rightarrow L (40%)	IL
			H-3 \rightarrow L (38%)	IL

(Fig. S3, ESI[†]), the band centered at *ca.* 325 nm exhibits a good fit with the experimentally obtained spectrum.

3.3. Photoluminescence and cellular bioimaging studies

Despite the successful synthesis of luminescent Au^I complexes containing phosphines as ligands, featuring interesting structural and photophysical properties, this field of investigation can benefit from breakthroughs in the discovery of novel

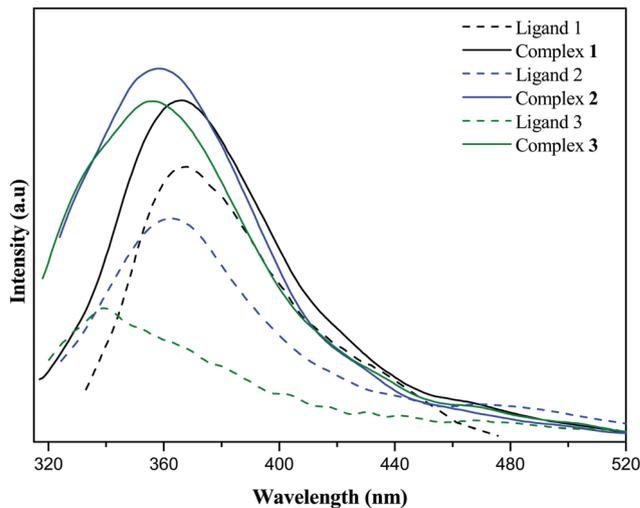


Fig. 4 Emission spectra of complexes and respective ligands measured in CH₂Cl₂ solution ($\approx 1.0 \times 10^{-5}$ M) at 298 K ($\lambda_{\text{ex}} = 305$ nm).

luminescent metallodrugs. Recently, luminescent Au^I/tris[2-(2-pyridyl)ethyl]phosphine complexes emitting tunable colors, as well as bioactive Au^I/bis(diphenylphosphine) compounds with bioimaging application, have been synthesized and structurally characterized.^{18,32} Motivated by these studies, our attention was drawn to the emission features that our molecules exhibited in solution. Additionally, we investigated the feasibility of using these new compounds as luminescent probes in cellular bioimaging applications. Our experiments revealed that, exposed in solution to 306 nm radiation, the complexes emitted greenish blue light covering the 330–520 nm range, clearly visible to the naked eye (Fig. S4, ESI[†]). Based on this behavior and the UV-vis absorption profiles, we selected $\lambda_{\text{ex}} = 305$ nm as the excitation wavelength for photoluminescence experiments. Fig. 4 shows the emission spectra of the complexes and respective ligands in dichloromethane solution.

The free organic ligands, however, proved less luminescent in solution than the respective complexes. We believe that the enhanced luminescence of complexes may be related to the presence of new electronic transitions such as mixed MLCT + IL and LLCT appearing after ligand metalation to the Au^I metallic atom (in agreement with DFT calculations). Furthermore, the excitation spectra acquired for complex **3** (Fig. 5) closely resembles that obtained in UV-vis experiments for the same complex. Also, the excitation and emission spectra for **3** are nearly exact mutual mirror images, suggesting that emission and excitation processes are related to the same energy levels.³³

This feature also supports our interpretation of the UV-vis absorption experiments, where the absorption shoulder at *ca.* 325 nm, for all three complexes, was primarily assigned to mixed MLCT + IL and LLCT electronic transitions. Use of aromatic phosphines working as ancillary ligands coordinated to Au^I has been reported as improving the luminescent performance of Au^I/thionaphthalimide complexes, rendering these molecules applicable to cellular bioimaging.³⁴ Considering the enhanced luminescence exhibited by our phosphine/thiocarbamoyl-pyrazoline-Au^I

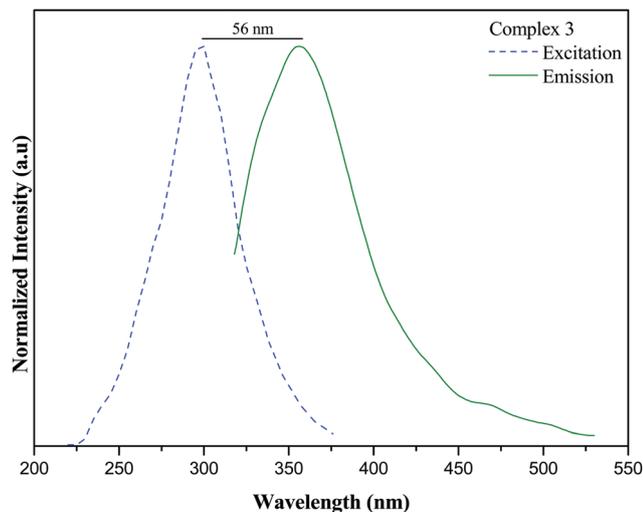


Fig. 5 Excitation ($\lambda_{em} = 360$ nm) and emission ($\lambda_{ex} = 305$ nm) spectra measured at 298 K in CH_2Cl_2 solution ($\approx 1.0 \times 10^{-5}$ M). Data are normalized for comparison. (Complexes **1** and **2** exhibited similar behavior. See Fig. S5 and S6, ESI.†)

mixed materials in comparison with the free ligands, we decided to apply these complexes as probes in cellular bioimaging assays

using CFM techniques. Fig. 6 and 7 shows the CFM images of MDA-MD231 and MCF-7 cells incubated with each complex (Fig. S7 and S8 show additional images, ESI†).

As yet, only a limited number of gold materials incorporating fluorescent ligands have been applied to cellular bioimaging, given that optimal conditions are required for CFM investigation.³⁴ Our compounds **1**, **2**, and **3**, however, provided good CFM images showing reasonable cellular internalization, with uniform biodistribution in the cytoplasm of MDA-MD231 and MCF-7 cells, which were used as models in the bioimaging study (Fig. 6 and 7). No concentrated bright foci were observed in the cytoplasm or cellular nucleus, suggesting for instance that our complexes do not present a preferential organelle biodistribution. In order to compare the biodistribution and cellular uptake profiles presented by the prepared gold complexes in tumoral and normal cells, we performed a model experiment using normal cells of the type HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Fig. 8 shows the CFM images of HUVEC cells incubated with complex **3**.

As expected, the cellular uptake and biodistribution observed in the experiments with normal cells (HUVEC) are similar to that observed in tumoral MDA-MD231 and MCF-7 cells. In normal cells HUVEC we also observed a cellular

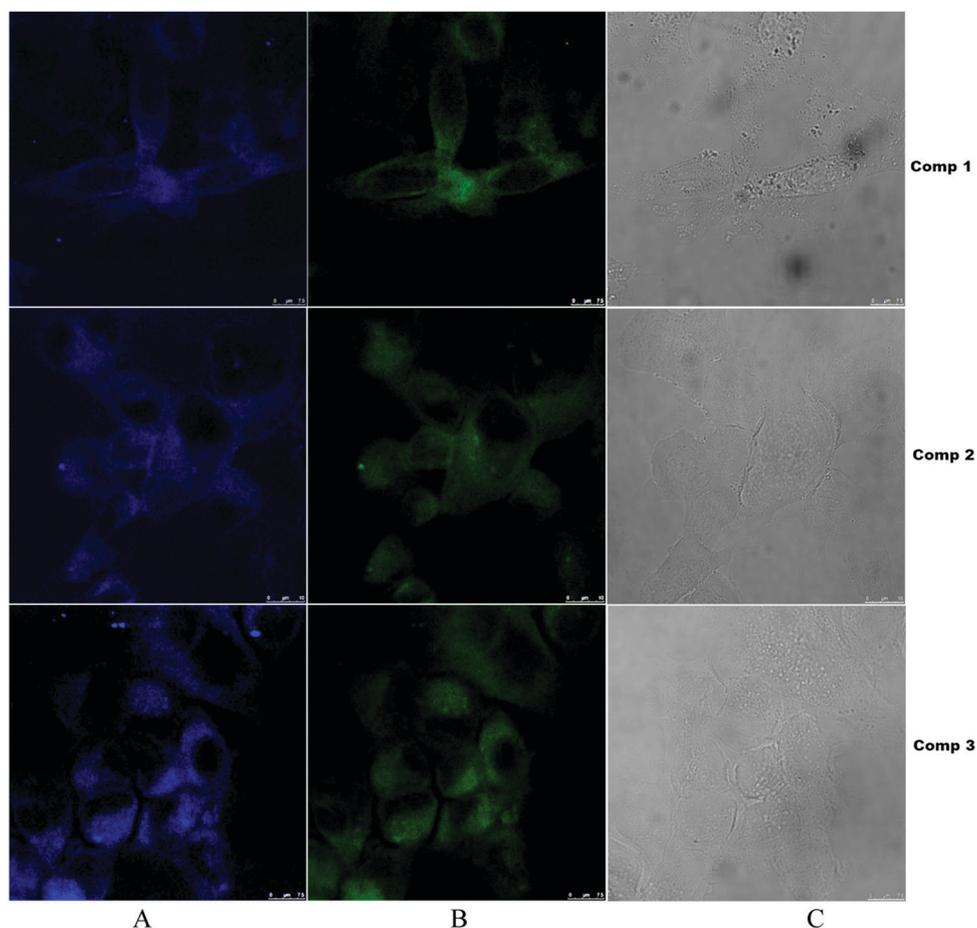


Fig. 6 Confocal fluorescence microscopy images of MDA-MD231 cells stained with complexes **1**, **2**, and **3**. Cells incubated with $10 \mu\text{M}$ fluorophore: (A) cellular bioimaging under $\lambda_{ex} = 305$ nm; (B) cellular bioimaging under $\lambda_{ex} = 405$ nm; (C) blank. Reference scale bar = $75 \mu\text{m}$.

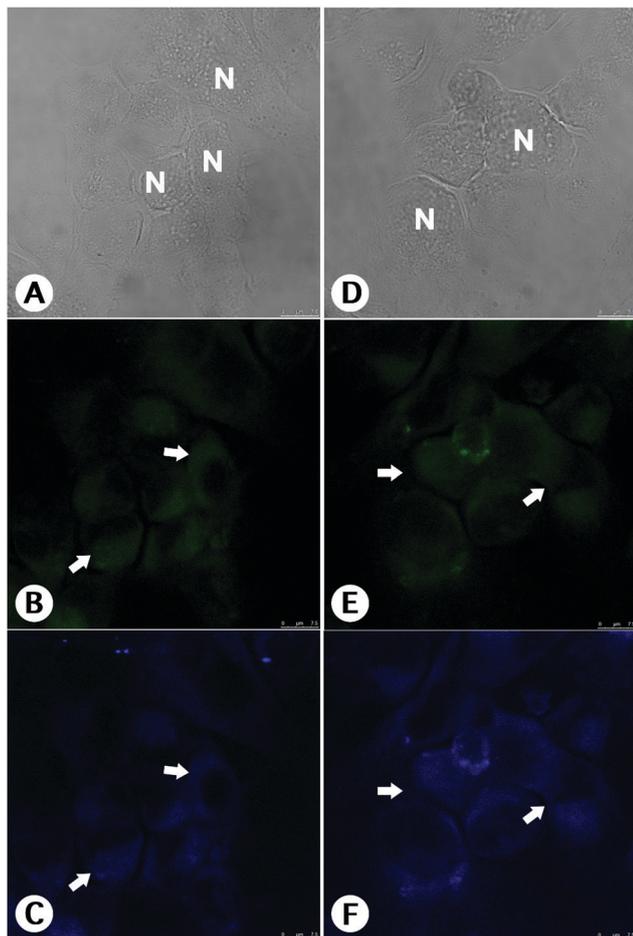


Fig. 7 Confocal fluorescence microscopy images of MCF-7 cells stained with **3**. Images (A)–(C) live cells, images (D)–(F) fixed cells. The complex **3** presented dual fluorescence emission, green ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$) showed in images B and E and blue ($\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$) showed in images (C) and (F). The fluorescence was distributed into the cells cytoplasm (white arrow). This complex did not stain the cells nuclei, which are showed as black voids in the cells. Images (A) and (D) show the normal cells morphology by phase contrast microscopy. Reference scale bar = $75 \mu\text{m}$.

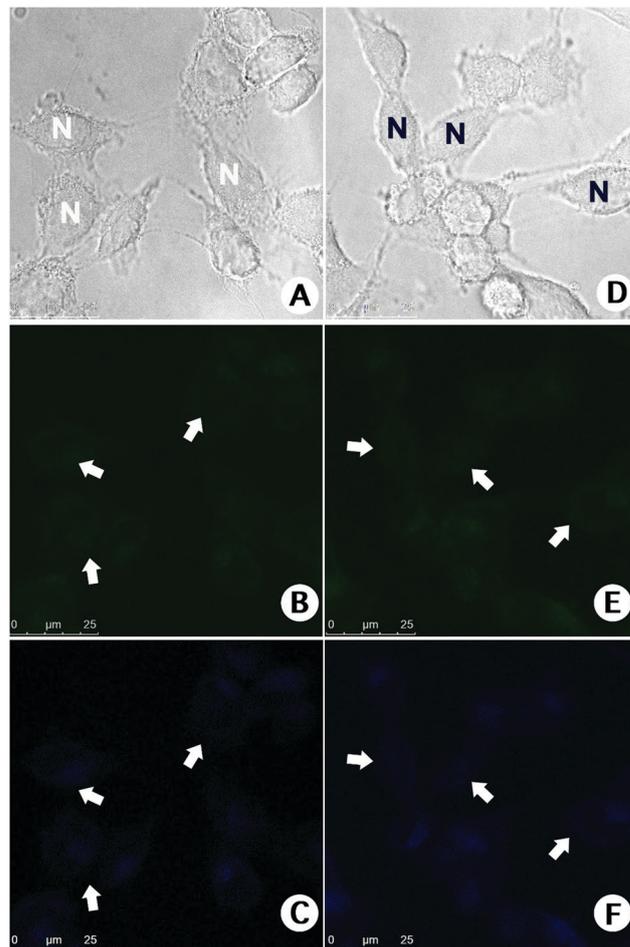


Fig. 8 Confocal fluorescence microscopy images of HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) stained with complex **3**. Images (A)–(C) live cells, images (D)–(F) fixed cells. Complex **3** presented dual fluorescence emission, green ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$) showed in images (B) and (E) and blue ($\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$) showed in images (C) and (F). The fluorescence was distributed to the cells cytoplasm (white arrow). The cells nuclei were not stained by this compound, which are showed as black voids in the cells. Images (A) and (D) show the normal cells morphology by phase contrast microscopy. Reference scale bar = $25 \mu\text{m}$. (Similar behavior it was observed by the complexes **1** and **2**.)

internalization, with uniform biodistribution in the cytoplasm and no concentrated bright foci were also observed in the cytoplasm or cellular nucleus, suggesting again in this case that our complexes do not present a preferential organelle biodistribution. Overall, these preliminary cellular bioimaging studies, together with luminescent properties, qualify our complexes as promising luminescent cellular probes based on gold(i) triphenylphosphine/pyrazoline materials.

3.4. Antimicrobial *in vitro* studies

All organic ligands and gold based compounds were assayed for antibacterial effect on Gram-positive (five *S. aureus* strains) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria, using the broth microdilution method. The results were expressed as MIC and MBC values (Table 2).

The complexes exhibited a potent and significant antibacterial activity, with MICs in the $0.97\text{--}7.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ range.

However, noteworthy differences were observed, with complexes proving 16 to 258 times more active than free ligands. All three complexes proved equally active against *S. aureus* standard strain and clinical strain 3*, while complex **2** proved the most active against the other resistant strains. THTAuCl is a labile gold compound, which in a DMSO solution would promote the formation of a gold complex with the solvent, which in turn would be equivalent to the use of a gold salt, however it was chosen due to its better solubility in the assay medium. It was also evaluated to compare, as well as the ligands, the gold activity alone in relation to the complexes and, once again, the complexes were more active, showing the synergistic effect between metal and ligand on the biological activity.

Notably, complexes **1** and **3** were selective for Gram-positive bacteria, in agreement with published data on Au^I complexes

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for complexes **1**, **2**, and **3** and respective ligands

Compound	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>S. aureus</i> (clinical 1*)		<i>S. aureus</i> (clinical 2*)		<i>S. aureus</i> (clinical 3*)		<i>S. aureus</i> (clinical 4*)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
Ligand 1	375	—	125	—	250	—	125	—	125	—	> 500
Ligand 2	375	—	125	—	250	—	125	—	125	—	> 500
Ligand 3	375	—	125	—	250	—	125	—	125	—	> 500
Complex 1	3.9	7.8	3.9	3.9	3.9	15.6	1.95	>7.8	7.8	7.8	> 500
Complex 2	3.9	7.8	0.97	1.95	0.97	>3.9	1.95	1.95	1.95	1.95	> 500
Complex 3	3.9	7.8	7.8	7.8	3.9	>15.6	1.95	3.9	3.9	3.9	> 500
THTAuCl	31.25	125	15.6	31.25	7.8	>31.25	15.6	31.25	31.25	15.6	> 500
Gentamicin	0.9	—	3.75	—	3.75	—	3.75	—	1.8	—	3.75

1*: clindamycin-, erythromycin- and penicillin G-resistant strain. 2*: oxacillin- and penicillin G-resistant strain. 3*: penicillin G-resistant strain. 4*: clindamycin- and erythromycin-resistant strain.

containing phosphine-type ligands.^{35–38} It is worth mentioning that the cell wall of Gram-negative bacteria is more complex and sophisticated than Gram-positive ones, in this sense, the differences in the bioactivities involving these two bacterial classes may be related to the different structural features of the cell walls of these microorganisms.^{37,38} Complementary assays involving MBC determination showed the complexes to be also bactericidal, except for **2** and **3** when tested against clinical strain **2***, as well as for **1** tested against clinical strain **3***.

3.5. Cytotoxicity

Organic ligands and gold based compounds were tested against tumor and non-tumor cells for evaluation of cytotoxicity and selectivity indices. Various concentrations were employed to obtain IC_{50} values (Table 3) after 72 h exposure.

Previous investigation of these ligands using silver as the metal atom showed that complexation increased cytotoxicity, although not sufficiently to outperform cisplatin.⁵ The present study revealed B16-F10 melanoma cells to be more sensitive to gold complexes than 4T1 adenocarcinoma cells. Compared with cisplatin, **3** proved five times more active against B16-F10 cells and the selectivity index steel comparable to cisplatin. Relative to substituent R (Scheme 1), the complex containing a methoxy moiety (**3**) was at least 10 times more active than **1** and **2** against both tumor cell lines. This finding highlights the important role played by ligand structure when the precursor

gold complex (Ph_3PAuCl) is also cytotoxic. The presence of thiocarbamoyl-pyrazoline ligands instead of chloride in phosphine Au^{I} complexes with a specific electron donor group ($-\text{OCH}_3$) also plays a role in cytotoxicity. The molecular structure is important in the mechanism of action of metal complexes that show activity through interactions with specific targets. It is well reported in the literature that some substituents can drive the molecule to a hydrophilic or hydrophobic pocket in a protein, enzyme, or other target as previously described for gold complexes and thioredoxin reductase.³⁹ The crystal structures suggest very similar conformations but bio-interactions occur in physiological environment (aqueous solution) and it can generate conformational differences leading to different interactions. These results suggest the ligand structure is favoring the metal-target interaction once the ligand is not active by itself. Further investigations and exploration of the luminescence of the gold compounds as a tool⁴⁰ can clarify this hypothesis about mechanism of action.

4. Conclusion

We successfully synthesized three novel Au^{I} compounds *via* sonochemical synthesis, with good yields (59–64.5%). Compounds **1**, **2**, and **3** were fully characterized and exhibited bright greenish blue luminescence when excited at $\lambda_{\text{ex}} = 305$ nm in solution. This luminescent behavior was primarily attributed to mixed MLCT + IL and LLCT electronic transitions taking place after ligand complexation, as shown by DFT calculations. Antibacterial assays revealed the potential applicability of the complexes as pharmaceutical alternatives to treat bacterial infection, with a view to circumventing drug resistance. Cytotoxicity assays showed the gold based compounds to be active against tumor cells, even though ligands proved inactive. Compound **3**, which contains a methoxy substituent, proved selective and more active than cisplatin. Finally, as demonstrated by CFM images, the complexes exhibited good cellular internalization, with uniform biodistribution in the cytoplasm of MDA-MD231 and MCF-7 cells. The photophysical properties, along with preliminary cellular bioimaging assays, make these novel materials attractive for application as bioactive and luminescent biomarkers in bioimaging approaches.

Table 3 Concentrations inhibiting 50% of cell growth viability (IC_{50} , $\mu\text{M} \pm \text{SD}$)

Compound	Tumor cells				Non-tumor BHK-21 cells
	B16-F10	SI	4T1	SI	
Ligand 1	>100	nd	>100	nd	>100
Ligand 2	>100	nd	>100	nd	>100
Ligand 3	>100	nd	>100	nd	>100
Complex 1	16.3 \pm 1.0	0.5	54.4 \pm 4.6	0.1	9.4 \pm 0.6
Complex 2	13.3 \pm 0.7	0.7	48.4 \pm 1.7	0.1	9.5 \pm 0.1
Complex 3	1.3 \pm 0.1	3.7	4.4 \pm 0.5	1.1	4.9 \pm 0.4
Ph_3PAuCl	5.7 \pm 0.7	1.4	10.6 \pm 1.3	0.7	8.0 \pm 0.6
Cisplatin	6.0 \pm 1.0	3.0	5.0 \pm 1.7	3.6	18.4 \pm 1.9

SD: standard deviation (triplicate of two independent experiments). SI: selectivity index = IC_{50} (μM) for non-tumor cells/ IC_{50} (μM) for tumor cells. nd: not determined.

Specific contributions of each co-author

Lis R. V. Favarin performed the synthesis of compounds; G. B. Laranjeira and Cristiane F. A. Teixeira have performed the spectroscopic characterization. H. Silva and A. C. Micheletti performed antitumor and antibacterial experiments respectively. L. Pizzuti, and A. M. Júnior performed and gathered NMR results. A. R. L. Caires performed luminescence experiments, V. M. Deflon and Rafaela B. P. Pesci performed X-ray experiments. C. N. L. Rocha and J. R. Correa performed the bioimaging experiments and L. M. C. Pinto performed TD-DFT calculations. G. A. Casagrande material organization and wrote paper.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Brazilian research agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (302532/2017) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, finance code 001). L. R. V. F.; G. B. L., and C. F. A. T. also thank these agencies for the grants awarded and FAPESP (Grant 2009/54011-8).

References

- 1 L. Ortego, J. Gonzalo-Asensio, A. Laguna, M. D. Villacampa and M. C. Gimeno, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **146**, 19–27.
- 2 E. Barreiro, J. S. Casas, M. D. Couce, A. Sánchez, A. Sánchez-González, J. Sordo, J. M. Varela and E. M. V. López, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 551–559.
- 3 K. Nomiya, S. Yamamoto, R. Noguchi, H. Yokoyama, N. C. Kasuga, K. Ohyama and C. Kato, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **95**, 208–220.
- 4 J. D. S. Chaves, L. G. Tunes, C. H. J. Franco, T. H. Francisco, C. C. Corrêa, S. M. F. Murta, R. L. Monte-Neto, H. Silva, A. P. S. Fontes and M. V. Almeida, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **127**, 727–739.
- 5 L. R. V. Favarin, L. B. Oliveira, H. Silva, A. C. Micheletti, L. Pizzuti, A. Machulek Júnior, A. R. L. Caires, D. F. Back, S. M. Lima, L. H. C. Andrade, L. F. B. Duarte, L. M. C. Pinto and G. A. Casagrande, *Inorg. Chim. Acta*, 2019, **492**, 235–242.
- 6 H. E. Abdou, A. A. Mohamed, J. P. F. Júnior, A. Burini, R. Galassi, J. M. López-de-Luzuriaga and M. E. Olmos, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1661–1669.
- 7 I. Ott, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1670–1681.
- 8 G. S. M. Costa, P. P. Corbi, C. Abbenhausen, A. L. B. Formiga, W. R. Lustrí and A. Cuín, *Polyhedron*, 2012, **34**, 210–214.
- 9 M. Mora, M. C. Gimeno and R. Visbal, *Chem. Soc. Rev.*, 2019, **48**, 447–462.
- 10 P. J. Barnard and S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1889–1902.
- 11 J. C. Lima and L. Rodríguez, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2011, **11**, 921–928.
- 12 S. A. Pérez, C. de Haro, C. Vicente, A. Donaire, A. Zamora, J. Zajac, H. Kostrhunova, V. Brabec, D. Bautista and J. Ruiz, *ACS Chem. Biol.*, 2017, **12**, 1524–1537.
- 13 I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D. H. W. Vlecken, I. J. Marques, D. Kubutat, J. Will, W. S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop and C. P. Bagowski, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 763–770.
- 14 L. M. Groves, C. F. Williams, A. J. Hayes, B. D. Ward, M. D. Isaacs, N. O. Symonds, D. Lloyd, P. N. Horton, S. J. Coles and S. M. Pope, *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 1599–1612.
- 15 V. Fernández-Moreira, C. Val-Campillo, I. Ospino, R. P. Herrera, I. Marzo, A. Laguna and M. C. Gimeno, *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 3098–3108.
- 16 H. Scheffler, Y. You and I. Ott, *Polyhedron*, 2010, **29**, 66–69.
- 17 A. Ferle, D. F. Back, L. Pizzuti, S. D. Inglez, A. R. L. Caires, E. S. Lang, A. F. C. Flores, A. M. Junior, V. M. Deflon and G. A. Casagrande, *Polyhedron*, 2013, **63**, 9–14.
- 18 L. R. V. Favarin, P. P. Rosa, L. Pizzuti, A. M. Junior, A. R. L. Caires, L. S. Bezerra, L. M. C. Pinto, G. Maia, C. C. Gato, D. F. Back, A. Anjos and G. A. Casagrande, *Polyhedron*, 2017, **121**, 185–190.
- 19 P. P. Rosa, G. B. Laranjeira, L. R. V. Favarin, L. Pizzuti, A. M. Júnior, L. M. C. Pinto, C. C. Gato, A. R. L. Caires, C. G. Oliveira, V. M. Deflon and G. A. Casagrande, *Inorg. Chim. Acta*, 2018, **483**, 293–298.
- 20 N. C. Baenziger, W. E. Benneti and D. M. Soboroff, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, 1976, **32**, 962–963.
- 21 L. Pizzuti, L. A. Piovesan, A. F. C. Flores, F. H. Quina and C. M. P. Pereira, *Ultrason. Sonochem.*, 2009, **16**, 728.
- 22 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 2008, **64**, 112.
- 23 C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1988, **37**, 785.
- 24 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- 25 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas,

- J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
- 26 M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek and G. R. Hutchison, *J. Cheminf.*, 2012, **4**, 17.
- 27 T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55–63.
- 28 D. Nemcsok, A. Kovács, K. M. Szécsényi and V. M. Leovac, *Chem. Phys.*, 2006, **328**, 85.
- 29 K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 6th edn, John Wiley & Sons Inc., 2009.
- 30 B. Tzeng, J. Liao, G. Lee and S. Peng, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 1405–1410.
- 31 C. King, M. N. I. Khan, R. J. Staples and J. P. Fackler, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3236–3238.
- 32 A. Y. Baranov, M. I. Rakhmanova, D. G. Samsonenko, S. F. Malysheva, N. A. Belogorlova, I. Y. Bagryanskaya, V. P. Fedin and A. V. Artem'ev, *Inorg. Chim. Acta*, 2019, **494**, 78–83.
- 33 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edn, Springer, 2010.
- 34 E. E. Langdon-Jones and S. J. A. Pope, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 10343–10354.
- 35 A. M. de Almeida, B. A. de Oliveira, P. P. de Castro, C. C. de Mendonça, R. A. Furtado, H. D. Nicolella, H. Silva and M. V. de Almeida, *Biometals*, 2017, **30**, 841–847.
- 36 B. Đ. Glišić and M. I. Djuran, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 5950–5969.
- 37 L. L. Marques, G. M. de Oliveira, E. S. Lang, M. M. A. de Campos and L. R. S. Gris, *Inorg. Chem. Commun.*, 2007, **10**, 1083–1087.
- 38 M. F. Fillat, M. C. Gimeno, A. Laguna, E. Latorre, L. Ortego and M. D. Villacampa, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 1487–1495.
- 39 A. Garcia, R. C. Machado, R. M. Grazul, M. T. Lopes, C. C. Corrêa, H. F. Dos Santos, M. V. de Almeida and H. Silva, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2016, **21**, 275–292.
- 40 W. Ma, L. Guo, Z. Tian, S. Zhang, X. He, J. Li, Y. Yang and Z. Liu, *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 4788–4793.

9.2. Anexo II: Informações suplementares

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES PARA:

Harvesting greenish blue luminescence in gold(I) complexes and their application as promising bioactive molecules and cellular bioimaging agents

Supporting information for:

Harvesting greenish blue luminescence in Gold(I) complexes and their application as promising bioactive molecules and cellular bioimaging agents.

Lis R. V. Favarin^[a], G. B. Laranjeira^[a], Cristiane F. A. Teixeira^[a], Heveline Silva^[b], A. C. Micheletti^[a], Lucas Pizzuti^[a], Amilcar Machulek Júnior^[a], Anderson R. L. Caires^[a], Victor M. Deflon^[c], Rafaela B. P. Pesci^[e], C. N. Lima Rocha^[d], J. R. Correa^[d], L. M. C. Pinto^[a], and Gleison Antônio Casagrande*^[a]

[a] Grupo de Pesquisa em Síntese e Caracterização Molecular de Mato Grosso do Sul, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Laboratório 2); Av. Senador Filinto Muller, 1555, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil.

[b] Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

[c] Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo; Av. Trabalhador São-Carlense, 400, São Carlos, SP 13566-590, Brazil.

[d] Laboratório de Microscopia e Microanálises, Grupo Quimioterápicos e Sondas Fluorescentes, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; Av. L3 Norte, s.n., Campus Darcy Ribeiro, Brasília, DF 70910-900, Brazil.

[e] Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 58051-900 João Pessoa – PB, Brazil.

*Corresponding author. Tel. +55 67 3345 3595; fax +55 67 3345 7190; e-mail addresses: gleisoncasag@gmail.com, gleison.casagrande@ufms.br

Table S1. Crystal data and structure refinement for complexes **1**, **2** and **3**

Compound	1	2	3
Empirical formula	C ₃₆ H ₃₆ AuF ₆ N ₃ OP ₂ S	C ₃₅ H ₃₄ AuF ₆ N ₃ OP ₂ S	C ₃₆ H ₃₆ AuO ₂ N ₃ SP ₂ F ₆
Formula weight	931.64	917.62	947.70
Temperature (K)	296(2)	296(2)	296(2)
Radiation, λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic (<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>)	Monoclinic (<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>)	Monoclinic (<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>)
Unit cell dimensions			
<i>a</i> (Å)	15.6260(6)	15.5446(3)	15.730(4)
<i>b</i> (Å)	15.1781(6)	14.8994(3)	14.896(5)
<i>c</i> (Å)	16.3393(6)	16.1594(4)	16.543(5)
α (°)	90.000(0)	90.000(0)	90.000(0)
β (°)	104.658(2)	105.9130(10)	105.515(10)
γ (°)	90.000(0)	90.000(0)	90.000(0)
Volume (Å ³)	3749.1(2)	3599.18(13)	3734.8(19)
<i>Z</i> / density calculated (g cm ⁻³)	4/1.651	4/1.693	4/1.402
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	4.128	4.298	4.087
<i>F</i> (000)	1840	1808	1528
Crystal size (mm)	0.41 × 0.18 × 0.18	0.82 × 0.56 × 0.28	0.22 × 0.22 × 0.14
Range for data collection, θ (°)	1.86 to 26.42	1.61 to 26.41	2.495 to 30.176
Index ranges	-19 ≤ <i>h</i> ≤ 19 -18 ≤ <i>k</i> ≤ 18 -20 ≤ <i>l</i> ≤ 20	-16 ≤ <i>h</i> ≤ 19 -15 ≤ <i>k</i> ≤ 18 -16 ≤ <i>l</i> ≤ 20	-22 ≤ <i>h</i> ≤ 22 -20 ≤ <i>k</i> ≤ 20 -22 ≤ <i>l</i> ≤ 23
Reflections collected	28644	27388	53312
Independent reflections	7690[R(int) = 0.0244]	7382[R(int) = 0.0364]	10998[R(int) = 0.0408]
Completeness to θ_{\max}	99.7%	99.9%	99.7%
Absorption correction	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan
Data/restraints/parameters	7690 / 0 / 518	7382 / 36 / 444	10998 / 0 / 460
Goodness-of-fit, <i>F</i> ²	1.019	1.027	1.032
Final <i>R</i> indices (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	<i>R</i> ₁ = 0.0254 w <i>R</i> ₂ = 0.0670	<i>R</i> ₁ = 0.0302 w <i>R</i> ₂ = 0.0720	<i>R</i> ₁ = 0.0405 w <i>R</i> ₂ = 0.0980
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0333 w <i>R</i> ₂ = 0.0718	<i>R</i> ₁ = 0.0391 w <i>R</i> ₂ = 0.0756	<i>R</i> ₁ = 0.0732 w <i>R</i> ₂ = 0.1122
Largest peak-and-hole difference (e Å ⁻³)	1.192 and -0.694	0.921 and -0.875	1.021 and -0.644

$$*R_1 = |F_0 - F_c| / |F_0|; wR_2 = [w(F_0^2 - F_c^2)^2 / (wF_0^2)]^{-1/2}$$

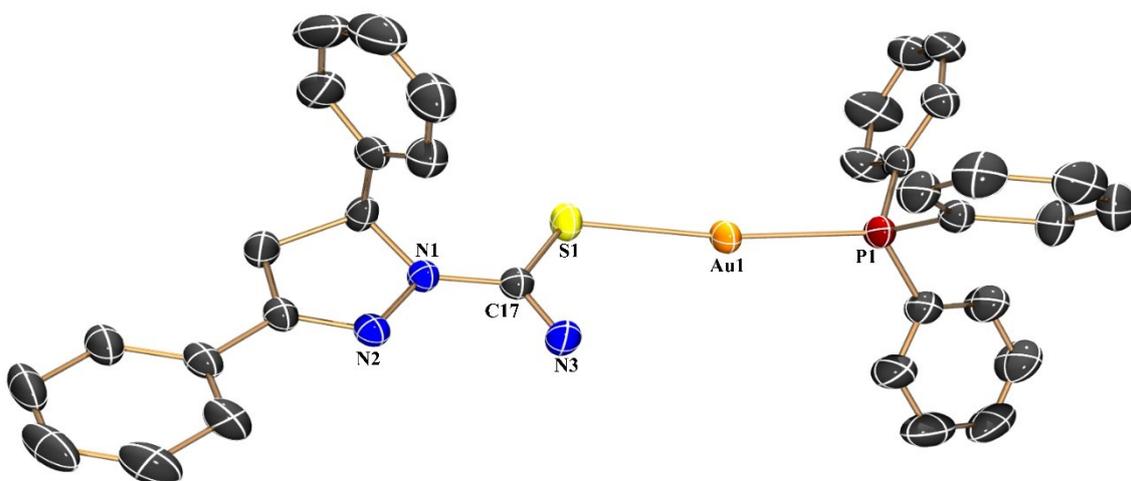


Figure S1. Crystalline structure of **2**. Hydrogen atoms, PF_6 anion, and methanol solvate omitted for clarity. Thermal ellipsoids drawn at a 50% probability level.

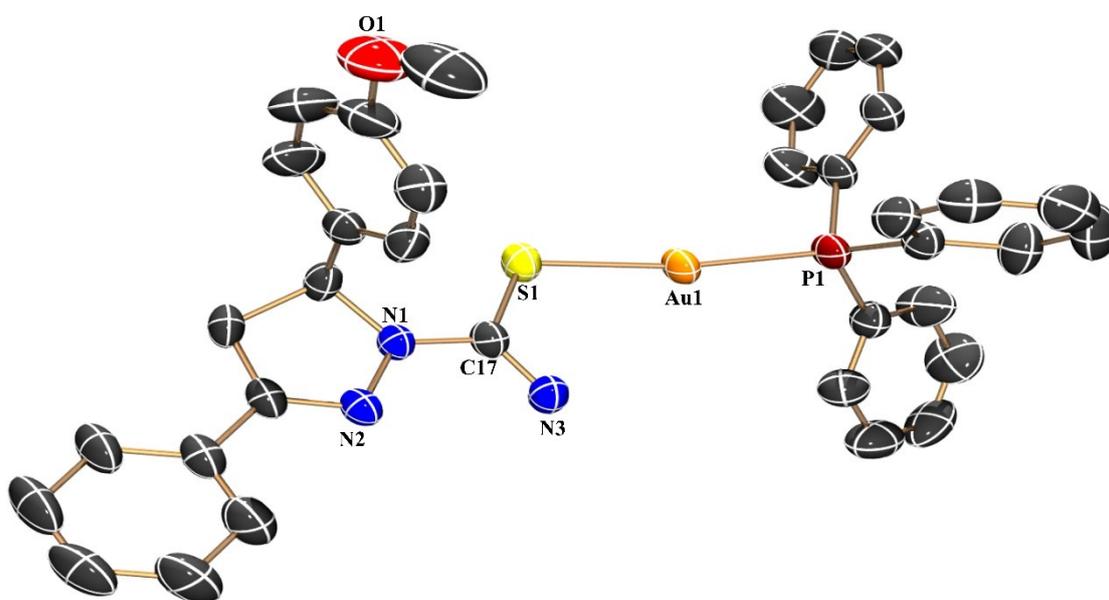


Figure S2. Crystalline structure of **3**. Hydrogen atoms, PF_6 anion, and methanol solvate omitted for clarity. Thermal ellipsoids drawn at a 50% probability level.

Table S2. Selected bond distances (Å) and bond angles (°) for complexes **1**, **2** and **3**.

	Complex 1	Complex 2	Complex 3
Distances (Å)			
P(1)-Au(1)	2.2729(8)	2.2680(9)	2.2600(12)
S(1)-Au(1)	2.3053(8)	2.3018(9)	2.2950(12)
C(17)-S(1)	1.724(3)	1.719(4)	1.721(4)
C(17)-(N1)	1.331(4)	1.329(4)	1.326(5)
C(17)-N(3)	1.309(4)	1.314(5)	1.303(5)
N(1)-N(2)	1.410(3)	1.409(4)	1.406(4)
Angles (°)			
P(1)-Au(1)-S(1)	169.83(3)	169.63(4)	170.64(4)

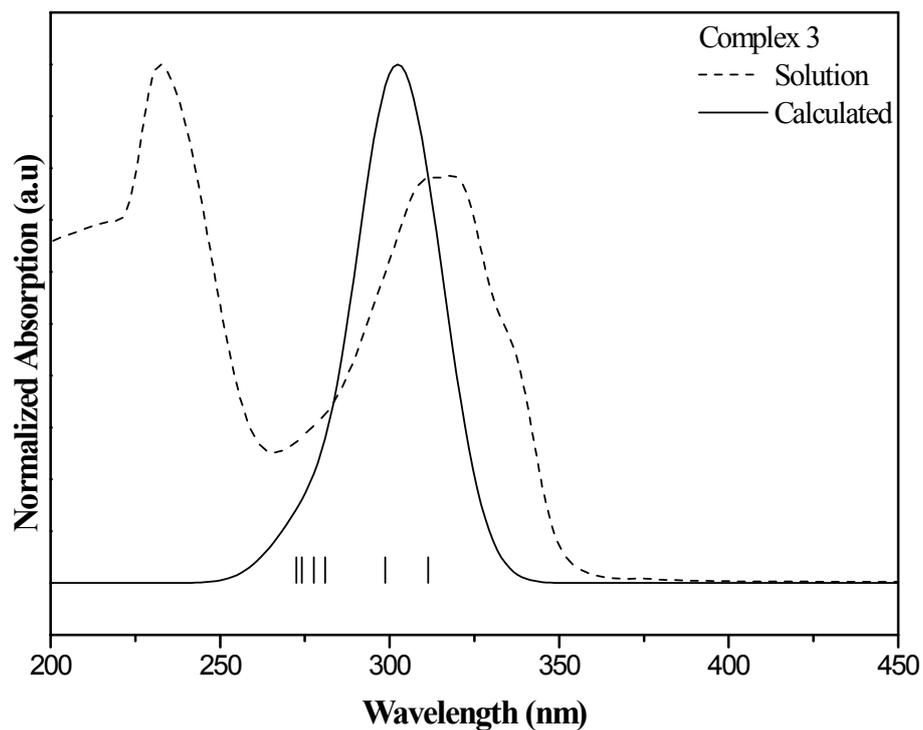


Figure S3. Experimental (solid line) and calculated (dashed line) absorption spectra of complex **3**.

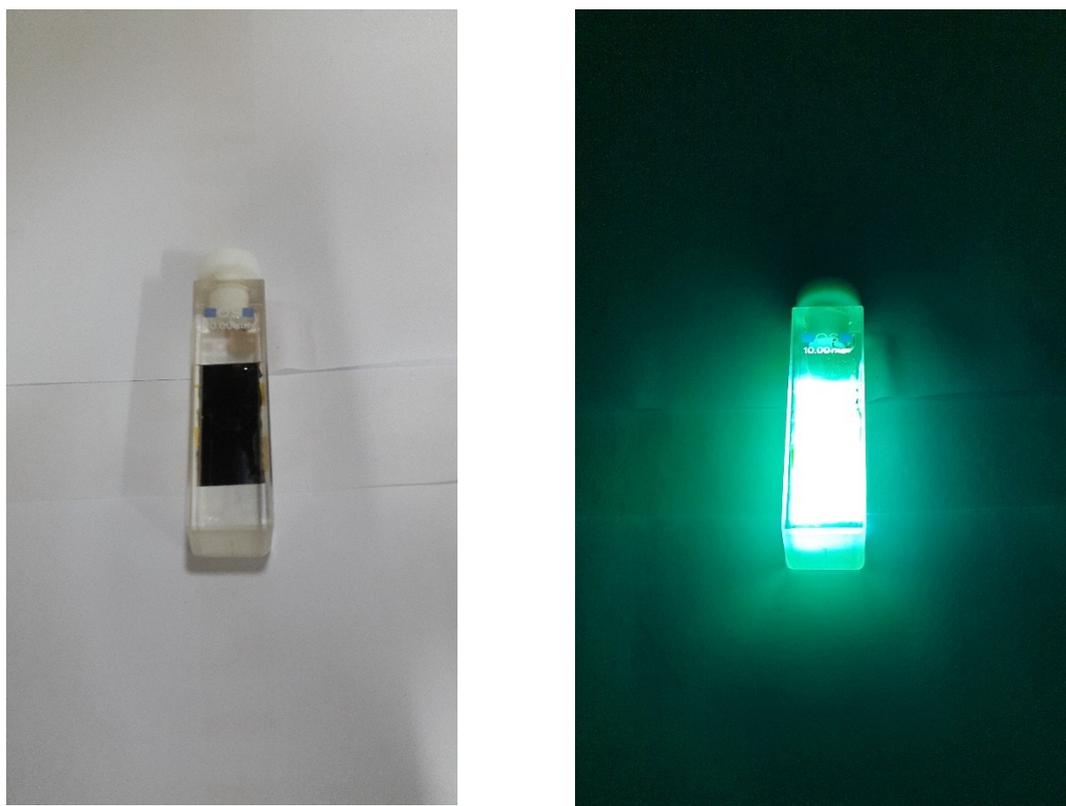


Figure S4. Dichloromethane solution (1.0×10^{-5} M) of complex **3**. Left: under natural light; right: with 306 nm (UV) passing through solution. Complexes **1** and **2** exhibited similar behavior.

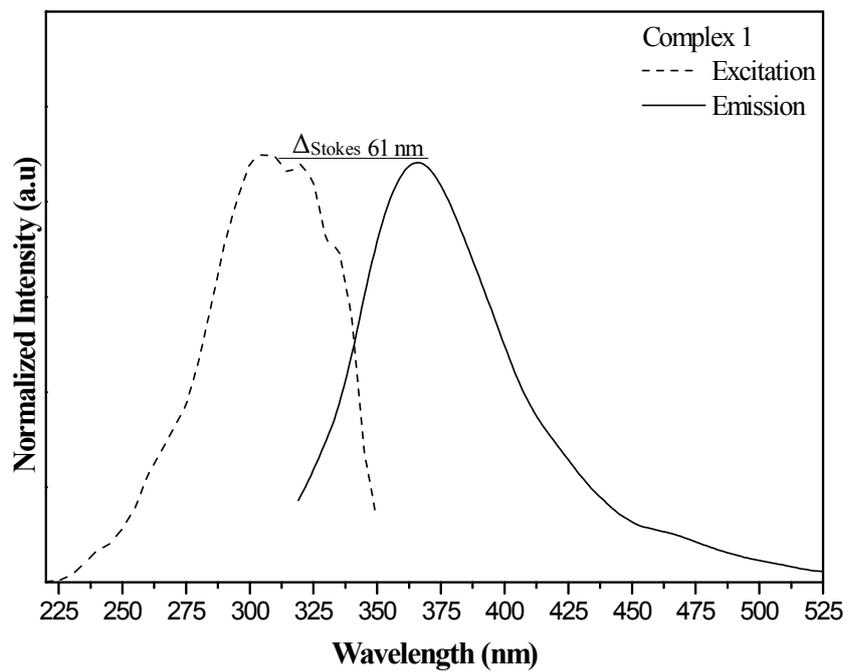


Figure S5. Excitation and emission spectra of complex **1** measured in CH_2Cl_2 solution ($\approx 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) at 298 K ($\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$).

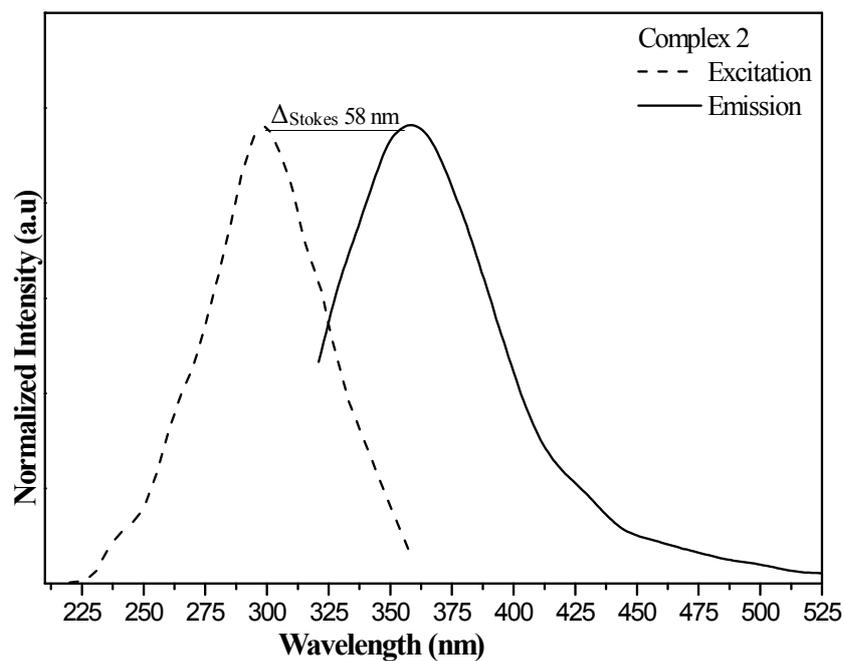


Figure S6. Excitation and emission spectra of complex **2** measured in CH_2Cl_2 solution ($\approx 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) at 298 K ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$).

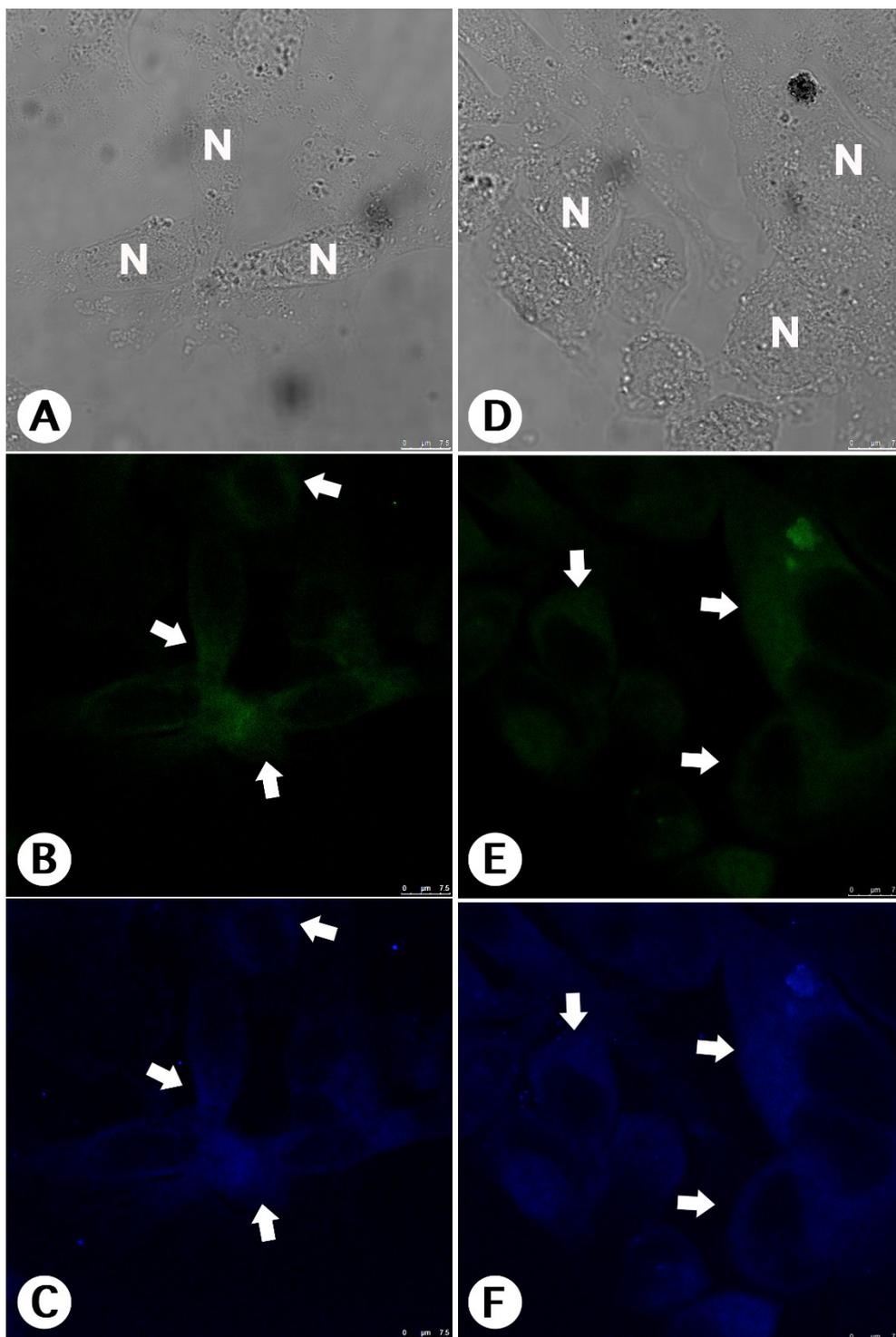


Figure S7. Confocal fluorescence microscopy images of MCF-7 cells stained with **1**. Images A, B and C live cells, images D, E and F fixed cells. The complex **1** has dual fluorescence emission, green ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$) shown in images B and E and blue ($\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$) shown in images C and F. The fluorescence was distributed into the cells cytoplasm (white arrow). The cells nuclei were not stained by this compound, which are shown as black voids in the cells. Images A and D show the normal cells morphology by phase contrast microscopy. Reference scale bar = $75 \mu\text{m}$.

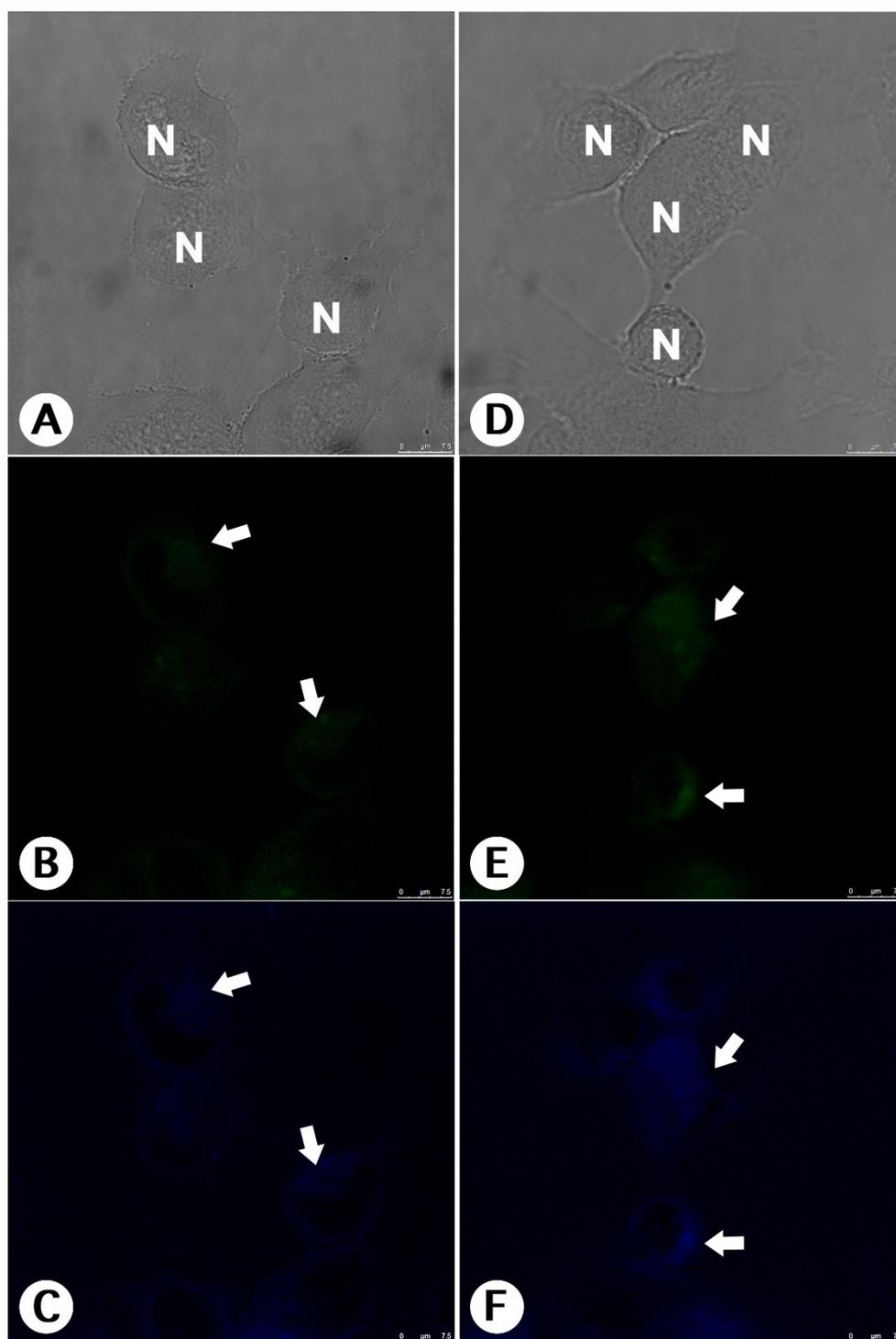


Figure S8. Confocal fluorescence microscopy images of MCF-7 cells stained with **2**. Images A, B and C live cells, images D, E and F fixed cells. The complex **2** presented dual fluorescence emission, green ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$) showed in images B and E and blue ($\lambda_{exc} = 305 \text{ nm}$) showed in images C and F. The fluorescence was distributed into the cells cytoplasm (white arrow). The fluorescent signal was less intense to those observed in cell stained with **2**. The cells nuclei were not stained by this compound, which are showed as black voids in the cells. Images A and D show the normal cells morphology by phase contrast microscopy. Reference scale bar = $75 \mu\text{m}$.

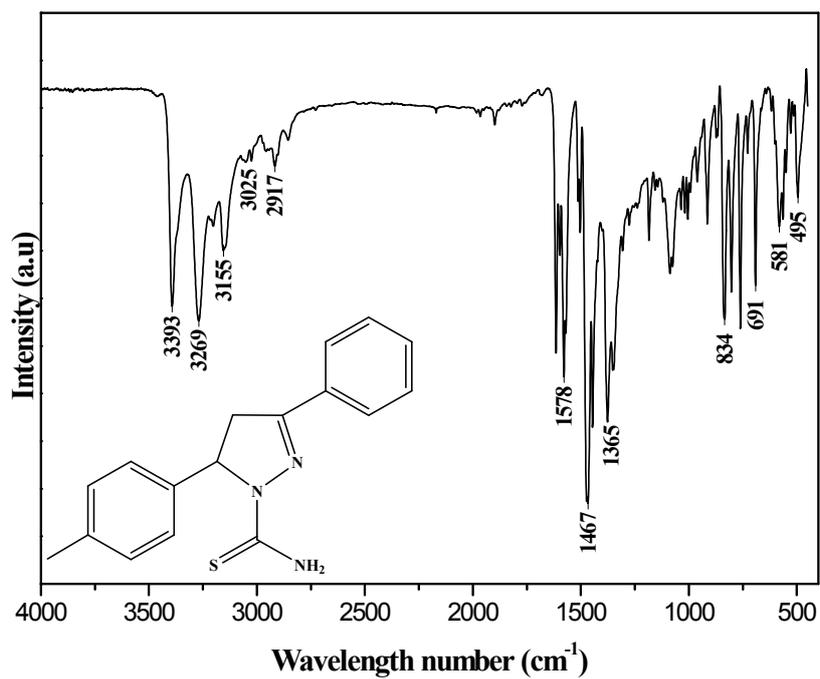


Figure S9. Infrared spectrum of ligand 1.

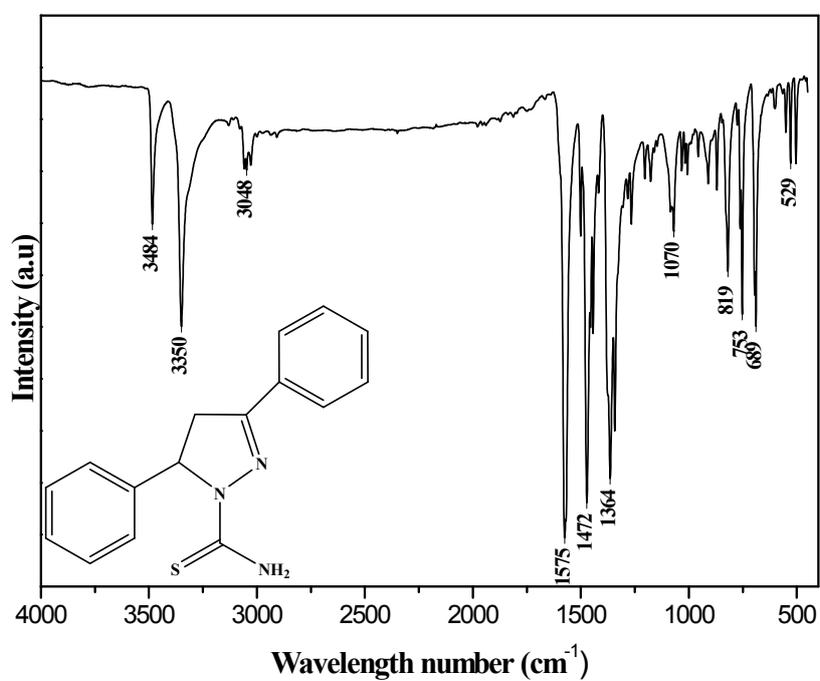


Figure S10. Infrared spectrum of ligand 2.

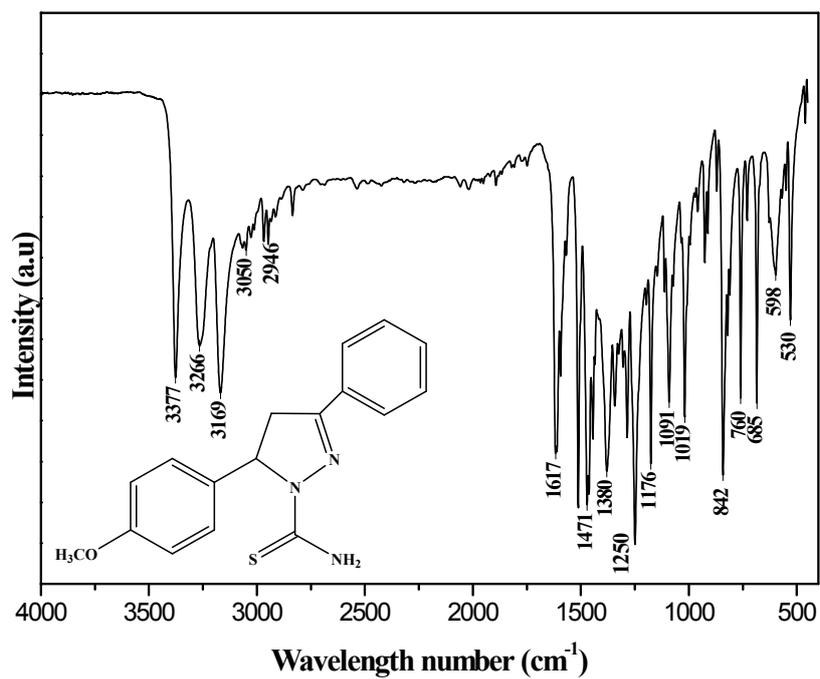


Figure S11. Infrared spectrum of ligand 3.

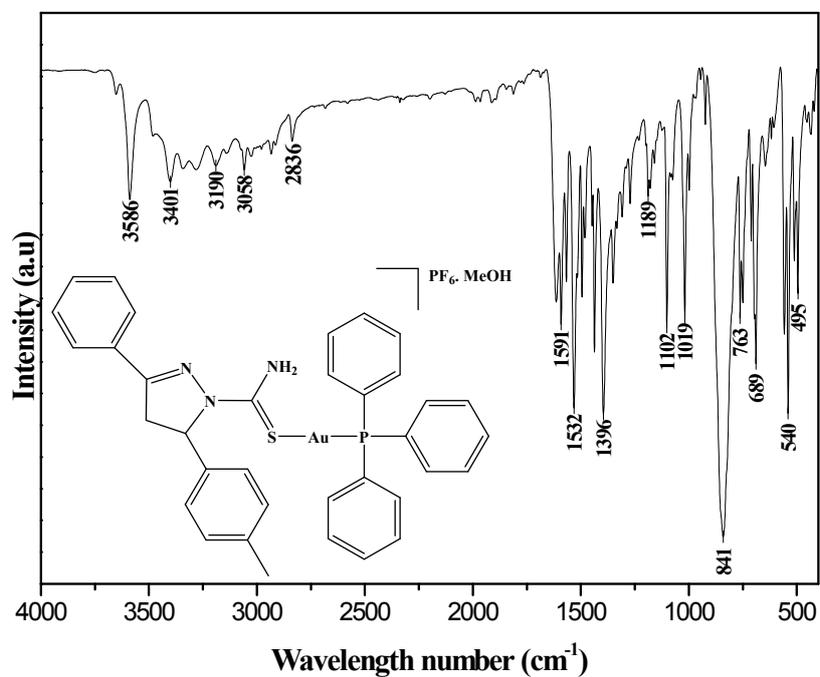


Figure S12. Infrared spectrum of complex 1.

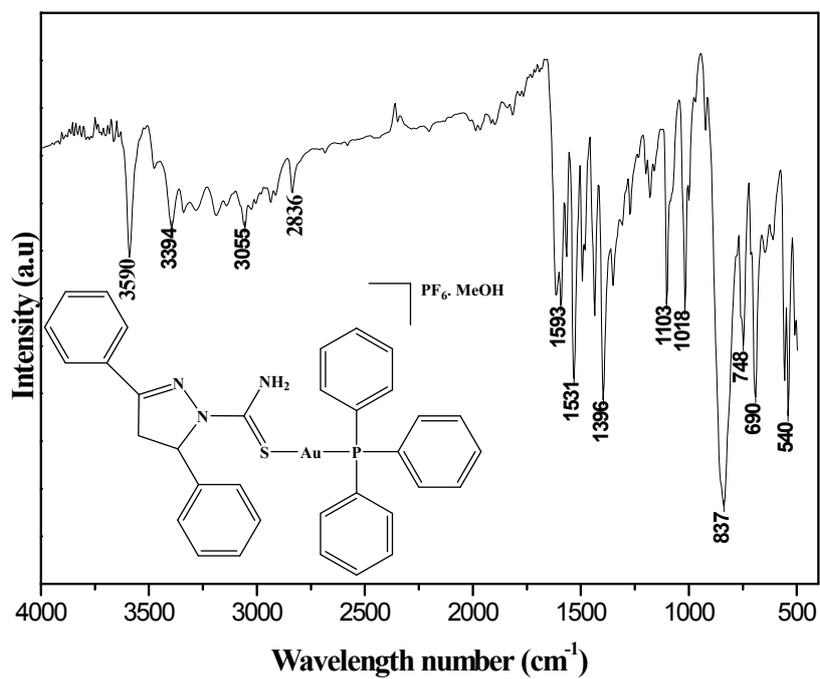


Figure S13. Infrared spectrum of complex 2.

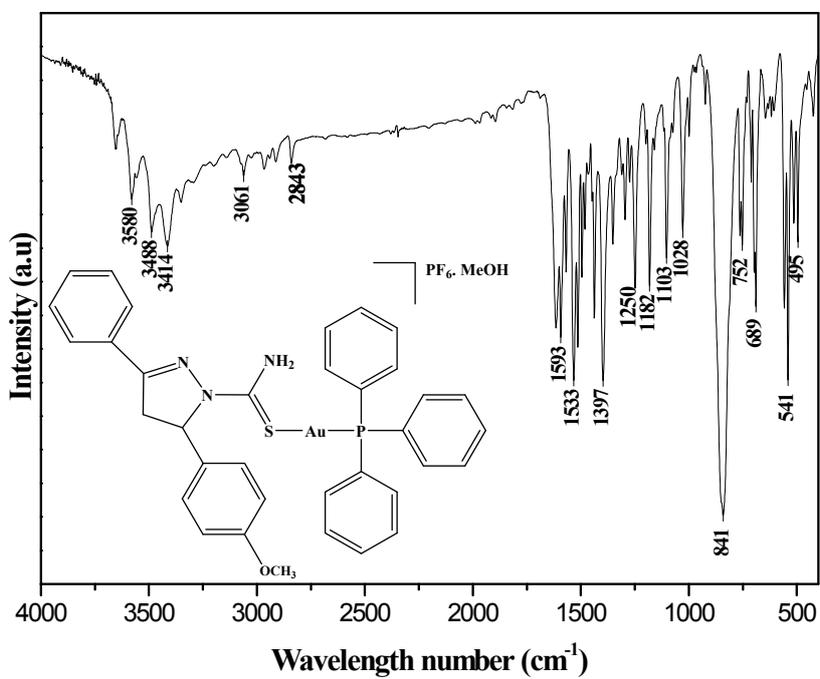
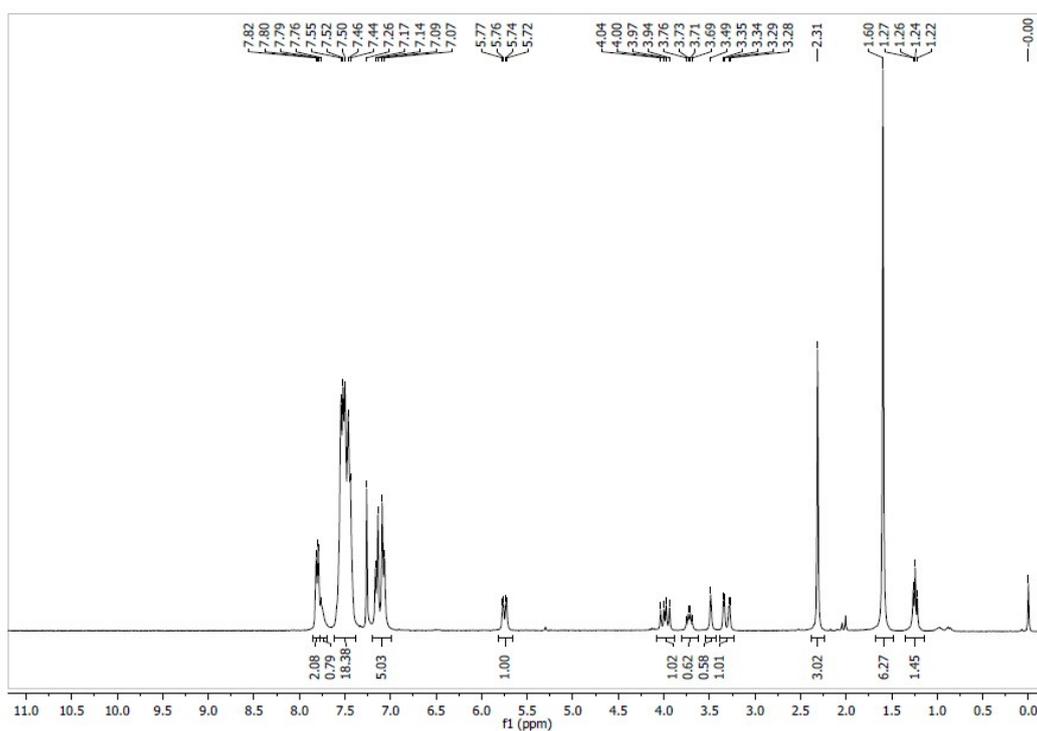


Figure S14. Infrared spectrum of complex 3.

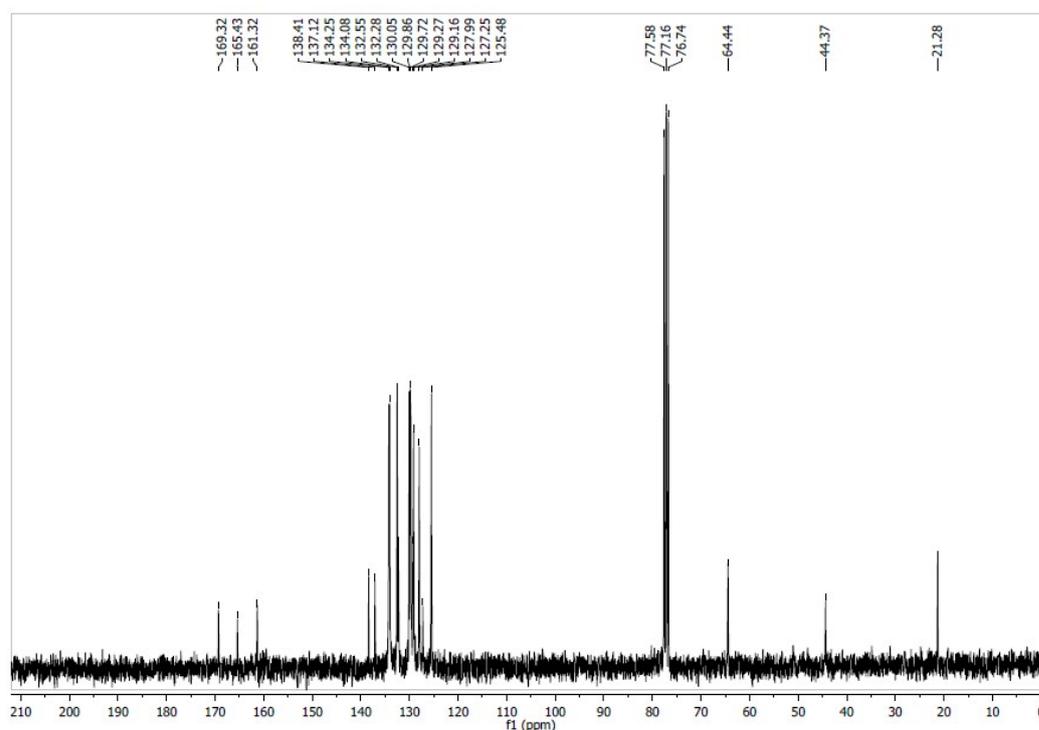
Table S3. Modes and vibrational frequencies of the precursor, ligands and complexes.

	Vibrational frequency (cm ⁻¹)						
	[Ph ₃ PAuCl]	Ligand	Ligand	Ligand	Complex	Complex	Complex
		1	2	3	1	2	3
$\nu(\text{N-H})$	–	3393-3155	3484-3350	3337-3169	3586-3190	3580-3414	3580-3414
$\nu(\text{C-H})_{\text{Ar}}$	3062	3025	3048	3050	3058	3055	3061
$\nu(\text{C-H})$	–	2917	NO	2956	2836	2836	2843
$\nu(\text{C=C})_{\text{Ar}}$	1480-1384	1467	1472	1471	1532	1531	1533
$\nu(\text{C=N})$	–	1578	1575	1617	1591	1593	1593
$\nu(\text{C=S})$	–	1365	1364	1380	1396	1396	1397
$\delta(\text{C-H})$	990-750	990-750	990-750	990-750	990-760	990-760	990-760
$\nu(\text{P-F})$	–	–	–	–	841	837	841
$\nu(\text{C-P})$	1098	–	–	–	1102	1103	1103
$\delta(\text{C-H})_{\text{Ar}}$	748	691	689	685	689	690	689
$\nu(\text{C-O-CH}_3)$	–	–	–	1250	–	–	1250
$\nu(\text{O-H})$	–	–	–	–	3586	3590	3580

NO: not observed.

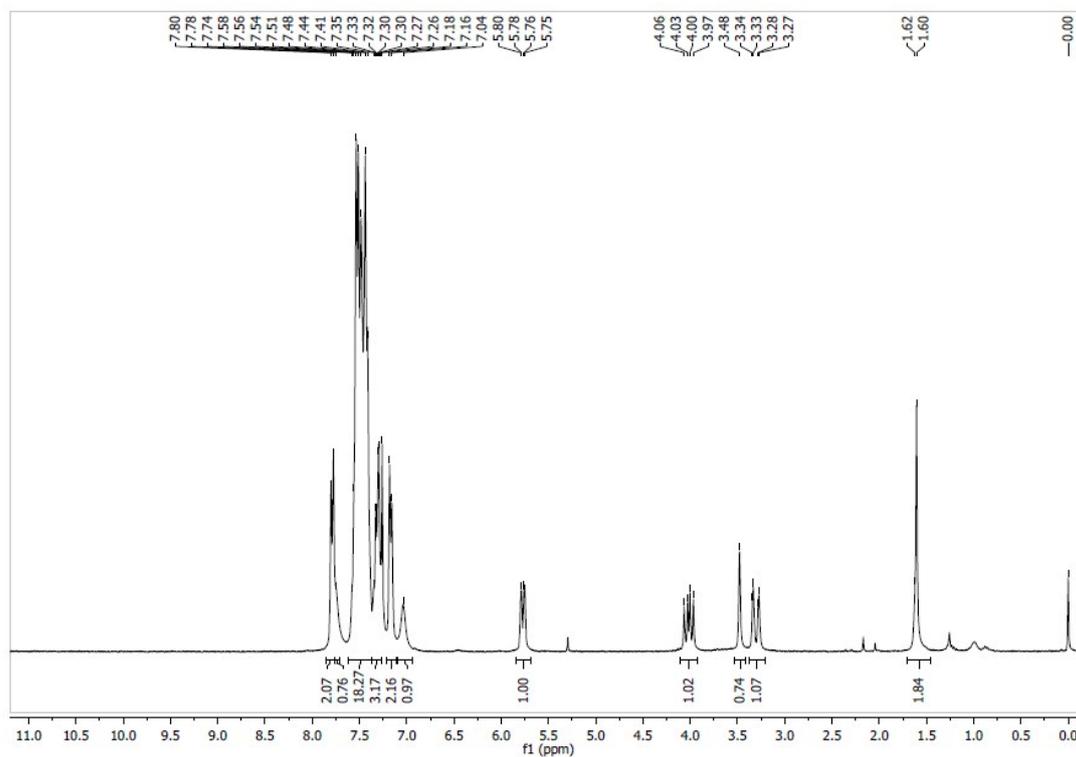


Complex **1**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82-7.79 (m, 2H, Ar), 7.76 (bs, 1H, NH), 7.55-7.44 (m, 18H, Ar), 7.26-7.07 (m, 5H, Ar + NH), 5.75 (dd, $J = 11.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J = 18.0, 11.0$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 18.0, 3.6$ Hz, 1H). 2.31 (s, 3H, CH_3).

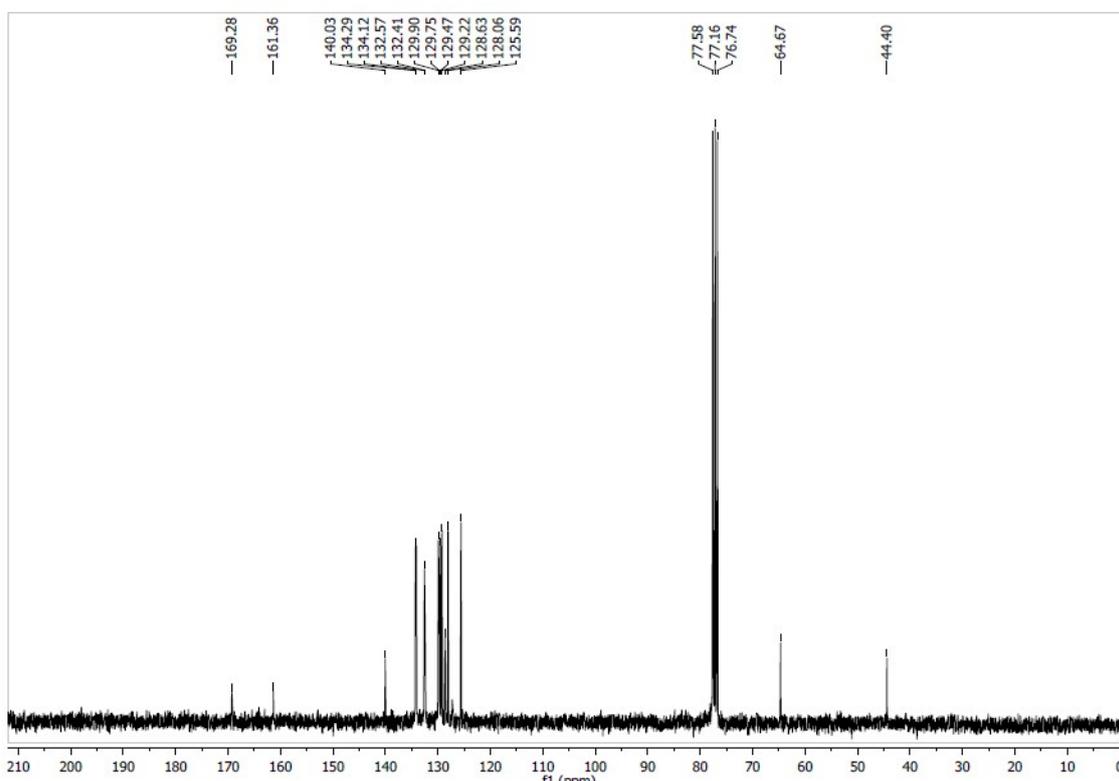


Complex **1**. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.3, 165.4, 161.3, 137.7 (d, $\text{JC-P} = 96.8$ Hz), 134.2 (d, $\text{JC-P} = 12.9$ Hz), 132.6, 132.3, 130.0, 130.0 (d, $\text{JC-P} = 13.9$ Hz), 129.3, 129.2, 128.0, 127.2, 125.5,

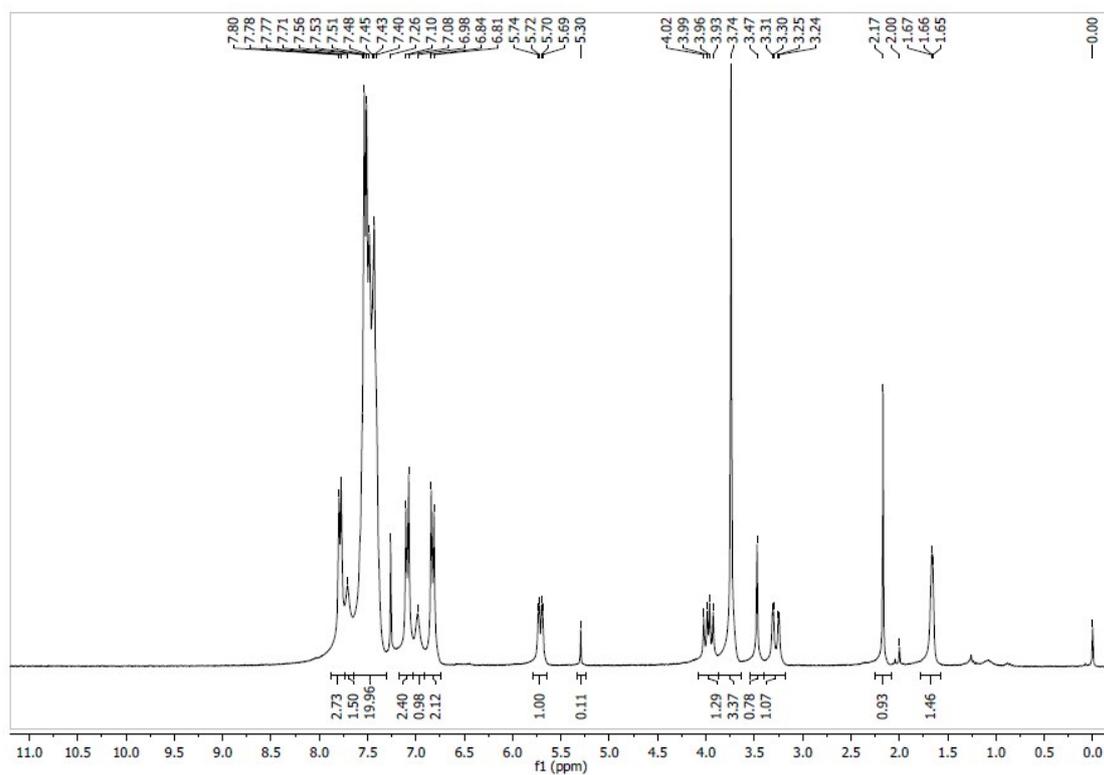
64.4, 44.4, 21.3.



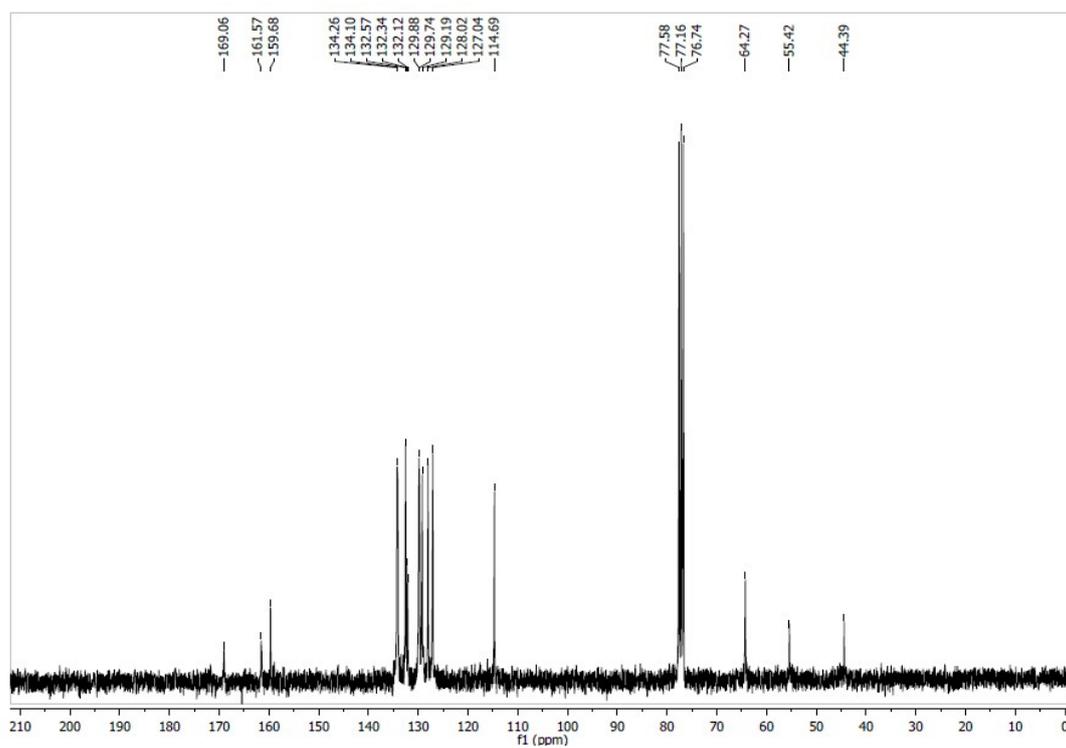
Complex **2**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.80-7.78 (m, 2H, Ar), 7.74 (bs, 1H, NH), 7.58-7.41 (m, 18H, Ar), 7.35-7.26 (m, 3H, Ar), 7.18-7.16 (m, 2H, Ar), 7.04 (bs, 1H, NH), 5.77 (dd, $J = 11.0, 3.6$ Hz), 4.02 (dd, $J = 18.2, 11.0$ Hz), 3.31 (dd, $J = 18.1, 3.4$ Hz).



Complex **2**. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.3, 161.4, 140.0, 134.3, 134.1, 132.6, 132.4, 129.9, 129.8, 129.5, 129.2, 128.6, 128.1, 125.6, 64.7, 44.4.



Complex **3**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.80-7.77 (m, 2H, Ar), 7.71 (bs, 1H, NH), 7.56-7.40 (m, 18H, Ar), 7.10-7.08 (m, 2H, Ar), 6.98 (bs, 1H, NH), 6.84-6.81 (m, 2H, Ar), 5.71 (dd, $J = 11.0, 3.6$ Hz, 1H), 3.97 (dd, $J = 18.2, 11.0$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.28 (dd, $J = 18.2, 3.6$ Hz, 1H).



Complex **3**. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.1, 161.6, 159.7, 134.3, 134.1, 132.6, 132.3, 132.1, 129.9, 129.7, 129.2, 128.0, 127.0, 114.7, 64.3, 55.4, 44.4.