

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Estudo de complexos metálicos de Ru^{II}, Ni^{II}, Pd^{II} e Pt^{II} com
ligantes aciltioureas: Atividade citotóxica e interação com
biomoléculas”**

Tamires Donizeth de Oliveira*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração:
QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador: Alzir Azevedo Batista

Coorientador: Eduardo E. Castellano

*** bolsista (CAPES)**

São Carlos - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tamires Donizeth de Oliveira, realizada em 20/12/2019:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
UFSCar

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra
UFSCar

Prof. Dr. Wilton Rogério Lustr
UNHARA

Prof. Dr. Flávio Vinícius Crizóstomo Kock
UFSCar

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva
USP

Dedicatória

Aos meus pais Cecília e Laércio, a
minha irmã Jéssica e ao meu esposo
Tiago, por sempre estarem comigo.
Em memória de meus avós Victor e
Francisca, que sempre me
incentivaram a buscar conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e me proteger.

Ao professor Alzir Azevedo Batista, pela orientação durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Eduardo Castellano e ao Msc. João Honorato pela resolução das estruturas cristalográficas.

Ao Msc. Gabriel Henrique Ribeiro pelo auxílio na realização dos ensaios de interação com biomoléculas.

A professora Márcia Regina Cominetti, pela disponibilização de seu espaço físico para realização de alguns ensaios biológicos e a Msc. Liany Johanna Luna Dulcey pelo experimento de apoptose.

A professora Ana Maria Plutín por me auxiliar na síntese dos ligantes, muito obrigada por toda a atenção, pela convivência e preocupação comigo.

A todos do grupo de pesquisa LERCI e aos agregados. Todos são grandes amigos que a vida me proporcionou, muito obrigada pelo companheirismo e amizade!

Ao pessoal do grupo LabMeeB. Muito obrigada pela amizade e ótima convivência.

A Angélica por ensinar o protocolo para o desenvolvimento dos experimentos de ciclo celular e apoptose e pela disposição em me auxiliar com minhas dúvidas.

A minha família, pelo apoio sempre constante, por serem sempre meu porto seguro, amo vocês!

Ao meu esposo Gelson, por ser meu companheiro em todos os momentos da minha vida, por me ajudar a ultrapassar os obstáculos, me incentivando sempre.

Ao corpo técnico e administrativo do Programa de Pós graduação em Química da UFSCar.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

INCA- Instituto Nacional do Câncer

WHO – World Health Organization

Bipy- 2,2'-bipiridina

Dppe - 1,2'-*bis*(difenilfosfina)etano

Dppb - 1,4'-*bis*(difenilfosfina)butano

Et₃N- Trietilamina

ATCC - *American Type Culture Collection*

MDA-MB-231- Adenocarcinoma de mama (triplo negativo)

MCF-7- Adenocarcinoma de mama

MCF-10A- Células não tumorais de mama humana

A549- Câncer de pulmão

MRC-5 – Células não tumorais de pulmão humano

IC₅₀- Concentração que Inibe 50% do crescimento celular

FBS- *Fetal Bovine Serum* (Soro fetal bovino)

DMEM- Meio de cultura Dulbecco Modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

RPMI- Meio de Cultura *Roswell Park Memorial Institute*

PBS- Tampão salino de fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

EGF- Receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

TNBC- Câncer de mama triplo negativo (*Triple Negative Breast Cancer*)

HSA- Human Serum Albumin (Albumina de Soro Humana)

CT-DNA- Ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro (*DeoxyriboNucleic Acid sodium salt from Calf Thymus*)

pBR322- DNA plasmidial

PTBA- Perclorato de tetrabutílamônio

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - Ressonância magnética nuclear de fósforo desacoplado do ^1H

IV- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

UV-vis- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

δ - Deslocamento químico nos espectros de RMN

ϵ - Absortividade molar

λ - Comprimento de onda

nm- Nanômetro

π - Ligação pi

μ - Micro (1×10^{-6})

J- Constante de acoplamento

Hz- Hertz

OC- *Open Circular* (circular)

L- *linear*

SC- *Supercoiled* (superenovelada)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condutividade molar e análise elementar dos complexos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L}_n)(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$	34
Tabela 2 – Bandas características na região do infravermelho dos ligantes aciltioureas e dos complexos (1-6).....	36
Tabela 3 - Principais distâncias interatômicas (Å) para os complexos 1-3 e 5-6.	43
Tabela 4- Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos 7-12.	45
Tabela 5 - Atribuição tentativa dos espectros de infravermelho dos complexos com fórmula geral $[\text{M}(\text{L}_n)(\text{dppe})]\text{BF}_4$ (7-12).....	47
Tabela 6- Valores de deslocamento químico e constante de acoplamento dos átomos de fósforo dos complexos (7-12).	48
Tabela 7- Principais ângulos e distâncias de ligação dos complexos.	54
Tabela 8- Valores de IC_{50} (μM) dos complexos (1-6) e ligantes (1-3).....	56
Tabela 9- Valores de IC_{50} em μM para os complexos (7-12).	66
Tabela 10- Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv} (M^{-1})), (K_{q} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)), constantes de ligação (K_{b} (M^{-1})), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔG (KJ mol^{-1}), ΔH (KJ mol^{-1}) e ΔS ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)) para os complexos com HAS em diferentes temperaturas.	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura dos compostos auranofina (1) e nipridde (2).....	1
Figura 2- Tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio de 2018-2019 separados por gênero. Fonte: INCA.....	2
Figura 3- Representação do processo de metástase.	3
Figura 4- Estrutura do fármaco cisplatina.	5
Figura 5- Estruturas dos complexos de platina (carboplatina e oxaliplatina) utilizados no tratamento do câncer, e de compostos de níquel(II) e paládio(II) com atividade frente à uma linhagem tumoral de pulmão.	6
Figura 6- Estruturas químicas dos complexo de rutênio KP418, KP1019, NKP-1339 e NAMI-A.	8
Figura 7- Estrutura básica dos ligantes aciltioureas.....	9
Figura 8- Modos de coordenação descritos para os ligantes aciltioureas.....	10
Figura 9- Complexos de Paládio(II) ⁴⁵ e Platina(II) ⁴⁶ sintetizados pelo grupo de pesquisa LERCI e seus valores de IC ₅₀ (µM) na linhagem tumoral de câncer de mama MDA-MB-231.	11
Figura 10- Complexos de rutênio contendo ligantes aciltiourea sintetizados pelo grupo LERCI e seus valores de IC ₅₀ (µM) na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.	12
Figura 11- Esquema de síntese dos complexos com fórmula geral [Ru(L _n)(bipy(P-P))PF ₆	33
Figura 12- Espectros na região do infravermelho do ligante 2 (em vermelho) e complexo 2 (em preto).	35
Figura 13 - Voltamograma cíclico em diclorometano do complexo 2.	37
Figura 14- Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} para os complexos 1-3 e do precursor [RuCl ₂ (bipy)(dppe)] em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.	38
Figura 15- Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} para os complexos 4-6 e do precursor [RuCl ₂ (bipy)(dppb)] em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.	38
Figura 16- Ampliação dos espectros de RMN de ¹ H dos complexos 2 e 5 em clorofórmio-d.....	39
Figura 17- Espectros de RMN de ¹³ C{ ¹ H} dos complexos 2 e 5 em clorofórmio-d.	41
Figura 18 – Estruturas cristalinas dos complexos 1-3 e 5-6. Para melhor visualização o contra íon PF ₆ ⁻ foi omitido.	42
Figura 19 - Esquema de síntese dos complexos com fórmula geral [M(L _n)(dppe)]BF ₄	44

Figura 20- Espectros na região do infravermelho do ligante 2 e dos complexos (8, 10 e 12).....	46
Figura 21- Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos 8, 10 e 12 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$	48
Figura 22- Espectros de RMN de ^{31}P do complexo 8 em $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$ nos tempos de 0, 24 e 48 horas.....	49
Figura 23- Ampliação dos espectros de RMN ^1H dos complexos 8, 10 e 12 em acetona- d_6	50
Figura 24- Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos 8, 10 e 12 em acetona- d_6	51
Figura 25- Estruturas cristalográficas dos complexos (7-12). O contra-íon BF_4^- foi omitido para melhor visualização.	53
Figura 26- Efeito dos complexos 3 (A) e 6 (B) na formação de colônias de células da linhagem MDA-MB-231.	57
Figura 27- Efeito do complexo 3 na morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações (μM).	58
Figura 28- Efeito do complexo 6 na morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações (μM).	59
Figura 29- Efeito dos complexos 3 (A) e 6 (B) em diferentes concentrações (μM) na migração celular da linhagem MDA-MB-231 a partir do ensaio de Wound Healing. Níveis de significância: $**p=0.0095$, $***p=0.0001$, $****p<0.0001$ utilizando ANOVA.....	60
Figura 30- Fases do Ciclo celular.....	61
Figura 31-Efeito dos complexos 3 e 6 na distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações). Significância: $**p=0.0095$, $***p=0.0001$, $****p<0.0001$ usando ANOVA.	63
Figura 32- - Efeito dos complexos 3 e 6 na indução de apoptose em células de câncer de mama (MDA-MB-231). Significância: $**p=0.0095$, $***p=0.0001$, $****p<0.0001$ usando ANOVA.....	65
Figura 33- Estrutura e citotoxicidade de complexos de Paládio(II) ⁴⁵ e Platina(II) ⁴⁶ com ligantes acilthioureias frente a linhagem tumoral de câncer de mama (MDA-MB-231).	67
Figura 34- Efeito da influência dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) em diferentes concentrações (μM) na formação de colônias de células da linhagem MDA-MB-231.	69
Figura 35- Efeito dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) na morfologia de células de câncer de mama (MDA_MB-231) em diferentes concentrações (μM).	70

Figura 36- Efeito dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) em diferentes concentrações (μM) na migração celular da linhagem MDA-MB-231 a partir do ensaio de Wound Healing. Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ utilizando ANOVA.	72
Figura 37- Influência dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) na distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações (μM). Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ utilizando ANOVA.....	74
Figura 38- Ilustração dos modos de interação com DNA. Fonte: modificado de Barra, 2015 ⁶⁹	76
Figura 39- Espectros na região do UV-Vis do complexo 2 após sucessivas adições de DNA (A) e tampão (B).	77
Figura 40- Efeito dos complexos (1-6) na viscosidade relativa do DNA.	78
Figura 41- Influência dos complexos na mobilidade eletroforética do DNA plasmidial (pBR322) em diferentes relações DNA/Complexo (A:0,05; B:0,1e C:0,3).	80
Figura 42- Espectro de Fluorescência do adulto Hoechst-DNA após a adição de diferentes concentrações do complexo 2.....	81
Figura 43- Estrutura da Albumina de soro humana (HSA). Fonte: Chuang & Otagiri, 2013 ⁷⁶	82
Figura 44- Influência dos complexos (7-12) na viscosidade relativa do DNA. .	88
Figura 45 - Espectros de Dicroísmo Circular com diferentes relações entre o DNA e os complexos 7 (A), 9 (B) e 11 (C).	89
Figura 46- Influência dos complexos 7 (A), 9 (B) e 11 (C) na intensidade de fluorescência do adulto Hoechst-DNA.	90

RESUMO**ESTUDO DE COMPLEXOS METÁLICOS DE Ru^{II}, Ni^{II}, Pd^{II} E Pt^{II} COM LIGANTES ACILTIOUREIAS: ATIVIDADE CITOTÓXICA E INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS**

Neste trabalho, duas séries de complexos fosfínicos contendo ligantes aciltioureas foram sintetizadas, caracterizadas e avaliadas com relação a atividade citotóxica. A primeira série foi composta por complexos metálicos de rutênio(II) com fórmula geral $[RuL_n(bipy)(P-P)]PF_6$, em que $L_n = N',N'$ -dimetil-N-benzoil-tiourea (L_1), N',N' -dimetil-N-tiofenil-tiourea (L_2) ou N',N' -dimetil-N-furoil-tiourea (L_3); bipy = 2,2'-bipiridina e P-P: 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) ou 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb) e a segunda série 2 complexos metálicos com fórmula geral $[ML_n(dppe)]BF_4$, em que $M = Ni^{II}, Pd^{II}$ ou Pt^{II} . Os complexos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN³¹P{¹H}, ¹H e ¹³C{¹H}, COSY, HMBC e HSQC), voltametria cíclica e difração de raios X. A avaliação da atividade citotóxica dos compostos foi realizada sobre linhagens tumorais e não tumorais de mama (MDA-MB-231(tumoral); MCF-7 (tumoral); MCF-10A (não tumoral)) e pulmão (A549 (tumoral); MRC-5 (não tumoral)). Os complexos da série 1 mostraram-se ativos para todas as linhagens tumorais avaliadas, enquanto os complexos da segunda série mostraram melhores resultados em linhagens tumorais de mama. Os complexos das séries 1 (complexos 3 e 6) e 2 (complexos 8, 10 e 12) quando avaliados na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 inibiram a formação de colônias, alteraram a morfologia e inibiram a migração celular a partir do ensaio de *Wound Healing*. Ainda, na mesma linhagem tumoral de mama, levaram a um acúmulo de células em Sub-G1 quando avaliada a influência no ciclo celular. Os complexos 3 e 6 induziram a morte celular via apoptose. Todos os complexos demonstraram interagir com DNA via sulco menor, e os complexos da série 1 apresentaram interação com a proteína HSA.

ABSTRACT**STUDY OF Ru^{II}, Ni^{II}, Pd^{II} AND Pt^{II} METAL COMPLEXES WITH ACYLTHIOUREA LIGANDS: CYTOTOXIC ACTIVITY AND BIOMOLECULES INTERACTION**

In this work, two series of phosphine complexes containing acylthiourea ligands were synthesized, characterized and evaluated of the cytotoxic activities. The first series of compounds was composed of complexes with the general formula [RuL_n(bipy)(P-P)]PF₆, where L_n = N', N'-dimethyl-N-benzoyl thiourea (L₁), N', N'-dimethyl-N-thiophenyl thiourea (L₂) or N', N'-dimethyl-N-furoyl thiourea (L₃); bipy = 2,2'-bipyridine and P-P: 1,2-bis (diphenylphosphine) ethane (dppe) or 1,4-bis (diphenylphosphine) butane (dppb) and the second series of complexes with the formula [ML_n(dppe)]BF₄, where M = Ni^{II}, Pd^{II} or Pt^{II}. The complexes were characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance (³¹P{¹H}, ¹H and ¹³C{¹H}, COSY, HMBC and HSQC), cyclic voltammetry and X-ray diffraction. The cytotoxic activity of the complexes against breast (MDA-MB-231 (tumor); MCF-7 (tumor); MCF-10A (non-tumor)) and lung (A549 (tumor); MRC-5 (non-tumor)) tumor and non tumor cell lines was performed by MTT assay. The first series of complexes showed activity and selectivity for all tumor lines evaluated, while the second series of complexes showed better results in breast tumor cell lines. The complexes of series 1 (3 and 6) and 2 (8, 10 and 12) when evaluated in the breast tumor line (MDA-MB-231) inhibited colony formation, altered morphology and inhibited cell migration from the *Wound Healing* assay. Still in the same breast tumor lineage, they led to an accumulation of cells in Sub-G1 phase on cell cycle analysis. The compounds 3 and 6 induced cell death by apoptosis. All complexes shown weak reversible interactions via minor groove of CT-DNA and the series 1 complexes interacted with the HSA protein.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1- Química Inorgânica Biológica	1
1.2-Câncer	2
1.3-Complexos Metálicos com Atividade Antitumoral	5
1.4-Aciltiureias	9
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	13
2.1- Objetivo Geral	13
2.2-Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1-Obtenção de Atmosfera Inerte	15
3.2-Solventes e Reagentes	15
3.3-Instrumentação	15
3.3.1-Análise Elementar	15
3.3.2-Conductividade Molar	15
3.3.3-Espectroscopia no Infravermelho	16
3.3.4-Espectroscopia no UV-Vis	16
3.3.5-Voltametria Cíclica	16
3.3.6-Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	16
3.3.7-Difração de Raios X	16
3.4-Sínteses	17
3.4.1-Síntese dos Ligantes	17
3.4.2-Síntese dos Complexos Precursores	17
3.4.2.1-Síntese do Complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$	17
3.4.2.2-Síntese do Complexo <i>cis</i> (Cl), <i>trans</i> (PPh ₃)- $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]$	18
3.4.2.3-Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppe})]$	18
3.4.2.4-Síntese do Complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})]$	18
3.4.2.5-Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$	19
3.4.2.6-Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{NiCl}_2(\text{dppe})]$	19

3.4.2.7-Síntese do Complexo <i>cis</i> -[PdCl ₂ (dppe)]	19
3.4.2.8-Síntese do Complexo <i>cis</i> -[PtCl ₂ (dppe)]	20
3.4.3-Síntese dos Complexos Metálicos	20
3.4.3.1-Síntese dos complexos com fórmula geral [RuL _n (bipy)(P-P)]PF ₆ (Série 1)	20
3.4.3.2-Síntese dos complexos com fórmula geral [ML _n (dppe)]BF ₄ (Série 2)	24
3.5-Ensaio Biológicos	27
3.5.1-Cultivo Celular	27
3.5.2-Ensaio de Viabilidade Celular	27
3.5.3-Ensaio de Morfologia Celular	28
3.5.4-Ensaio de formação de Colônias	28
3.5.5-Ensaio de Migração Celular- Wound Healing	29
3.5.6-Análise do Ciclo Celular	29
3.5.7-Apoptose	30
3.6- Estudo de Interação com Biomoléculas	31
3.6.1-Estudo de Interação com DNA-Titulação Espectrofotométrica	31
3.6.2-Estudo de Interação com DNA-Viscosidade	31
3.6.3-Estudo de Interação com DNA-Eletroforese em Gel	31
3.6.4-Estudo de Interação com DNA-Dicroísmo Circular	32
3.6.5-Estudo de Interação com DNA-Ensaio de Competitividade com Hoechst322	32
3.6.6-Estudo de Interação com HSA	32
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1-Síntese e Caracterização	33
4.1.1-Complexos com fórmula geral [Ru(L _n)(bipy)(P-P)]PF ₆ (Série 1)	33
4.1.2-Complexos com fórmula geral [M(L _n)(dppe)]BF ₄ (Série 2)	44
4.2-Ensaio Biológicos	55
4.2.1-Série 1	55
4.2.1.1-Ensaio de Citotoxicidade in vitro	55

4.2.1.2-Ensaio de Formação de Colônias	57
4.2.1.3-Ensaio de Morfologia Celular	58
4.2.1.4-Ensaio de Migração Celular – Wound Healing	59
4.2.1.5-Avaliação do Ciclo Celular	61
4.2.1.6-Apoptose	64
4.2.2-Série 2	66
4.2.2.1-Ensaio de Citotoxicidade in vitro	66
4.2.2.2-Ensaio de Formação de Colônias	68
4.2.2.3-Ensaio de Morfologia Celular	69
4.2.2.4-Ensaio de Migração Celular – <i>Wound Healing</i>	71
4.2.2.5-Avaliação do Ciclo Celular	73
4.3- Interação com Biomoléculas	75
4.3.1-Série 1	75
4.3.1.1-Interação com DNA	75
4.3.1.2-Interação com HSA	82
4.3.2-Série 2	87
4.3.2.1-Interação com DNA	87
CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES	91
REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	100

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1- Química Inorgânica Biológica

É de conhecimento que alguns metais apresentam essencialidade e que exercem papéis importantes em sistemas vivos, sendo na forma iônica que desempenham suas principais funções. Diversas biomoléculas presentes no organismo humano são constituídas por íons metálicos, como por exemplo a hemoglobina e a transferrina, enzimas de ferro que auxiliam no transporte de oxigênio^{1,2}.

O uso dos metais para fins biológicos não é algo recente, diferentes metais, tais como prata, ouro e cobre tem sido empregados neste sentido, desde as civilizações antigas. Atualmente, estudos acerca de complexos metálicos e suas propriedades biológicas são constantes na literatura, uma vez que os metais proporcionam características interessantes aos compostos formados, tais como diferentes estados de oxidação, e a capacidade de se ligar a moléculas orgânicas obtendo diferentes geometrias^{3,4}.

Desta forma, existem alguns compostos de coordenação em uso para tratamento de enfermidades como, por exemplo, os compostos auranofina e o nitroprussiato de sódio (Figura 1), utilizados no tratamento da artrite reumatoide e como vasodilatador, respectivamente^{5,6}.

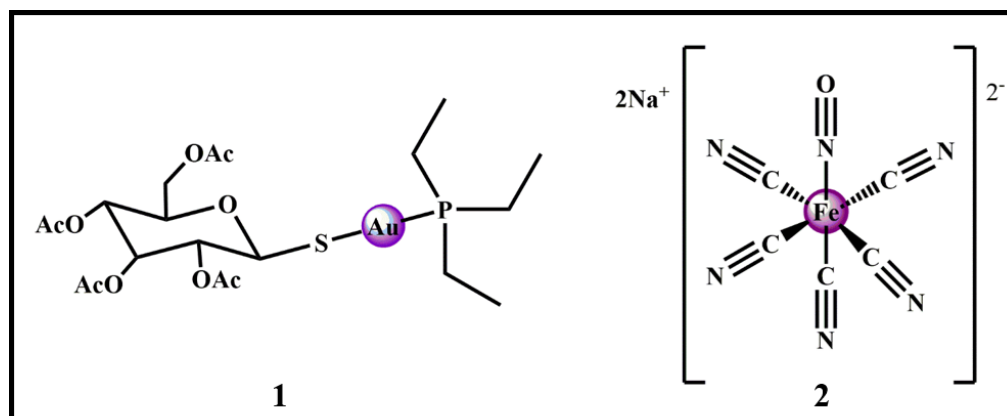


Figura 1-Estrutura dos compostos auranofina (1) e nitroprussiato de sódio (2).

1.2- Câncer

Atualmente o câncer é considerado a segunda principal causa de morte em nível mundial, de forma que dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) mostram que no ano de 2018 cerca de 9,6 milhões de mortes foram resultado desta enfermidade e estudos realizados pelo mesmo órgão estimam que globalmente haja um aumento no número de casos de cerca de 18,1 milhões no ano de 2018 para cerca de 29,5 milhões no ano de 2040^{7,8}.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer no ano de 2017, houve cerca de 115.057 mil óbitos em pessoas do sexo masculino e 103.583 mil no sexo feminino decorrentes dessa enfermidade. Estatísticas para o biênio 2018-2019 sugerem a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer para cada ano, sendo os mais incidentes o câncer de próstata e mama em mulheres (Figura 2)⁹.

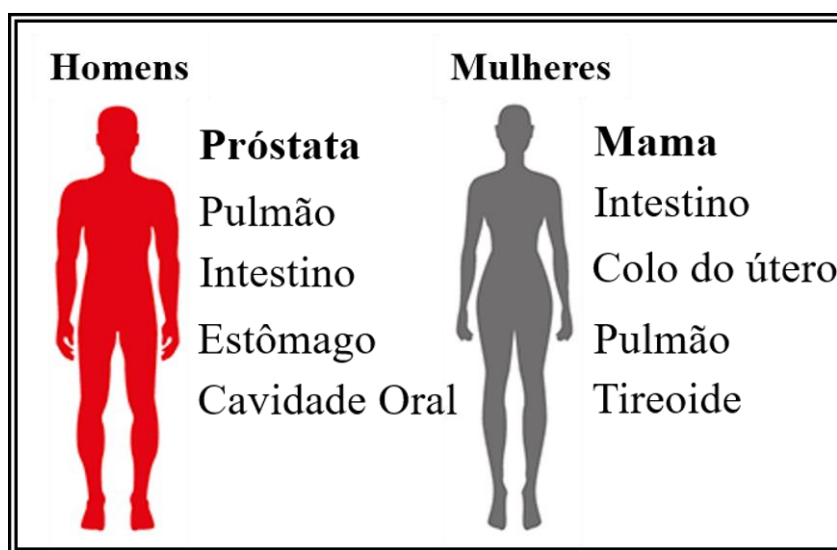


Figura 2- Tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio de 2018-2019 separados por gênero. Fonte: INCA.

Esses dados alarmantes se devem a grande complexidade desta enfermidade, uma vez que o câncer é um termo genérico utilizado para designar um grupo de mais de 100 doenças que podem atingir qualquer parte do corpo, e

apresentam como característica comum o crescimento celular descontrolado^{7,9}. Em geral as células cancerígenas apresentam problemas de regulação do ciclo celular, de forma que células com mutações, que normalmente seriam eliminadas, conseguem progredir e se proliferar¹⁰.

Após a formação do tumor, as células cancerosas, essas células podem migrar pela corrente sanguínea e invadir tecidos e órgãos, em um processo denominado metástase que é característico de tumores malignos e dificulta consideravelmente o tratamento, sendo a principal causa de morte em pacientes com câncer (Figura 3)¹¹.

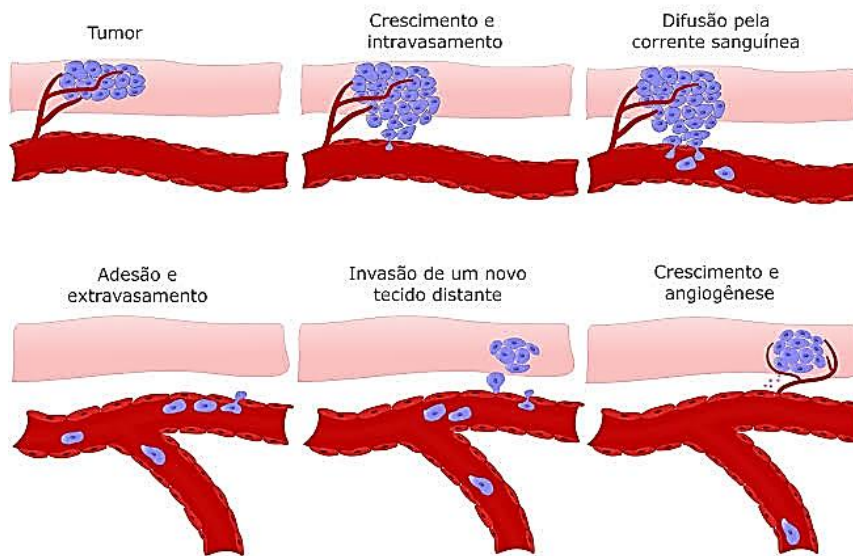


Figura 3- Representação do processo de metástase.

Diversos fatores podem ser causadores de câncer, sendo eles exógenos ou endógenos. Cerca de 80 à 90% dos casos de câncer são ocasionados por fatores externos, do próprio ambiente e estilo de vida do ser humano, podendo incluir o tabagismo, obesidade, consumo de álcool e exposição solar, enquanto apenas cerca de 10 à 20% estão relacionados a fatores internos, como mutações genéticas^{7,12}.

Alguns métodos podem ser empregados no tratamento do câncer, de forma que estudos neste sentido são bastante frequentes. Os principais procedimentos empregados com esse objetivo incluem procedimentos cirurgicos,

em que ocorre a retirada do tumor, sendo comum em tumores em fase inicial antecedendo a metástase; a quimioterapia, em que drogas são administradas para o tratamento do câncer; e a radioterapia que consiste na incidência de radiação ionizante com o intuito de destruir ou impedir a proliferação de células cancerígenas. No entanto, existem também possibilidades mais recentes como o transplante de medula óssea utilizado para tipos específicos de câncer, que afetam as células do sangue (leucemia e linfomas), que tem como fundamento a substituição da medula óssea do paciente; a imunoterapia que envolve a utilização de componentes do sistema imunológico, como por exemplo o uso de anticorpos; e a terapia alvo, que consiste na utilização de substâncias que agem em alvos moleculares específicos para bloquear o crescimento e a propagação de células cancerígenas. É importante ressaltar que os métodos expostos não são necessariamente utilizados individualmente, podendo haver a combinação de diferentes métodos¹²⁻¹⁴.

1.3- Complexos Metálicos com Atividade Antitumoral

Quando falamos de química bioinorgânica, principalmente em complexos metálicos como agentes antitumorais, é inevitável pensar no complexo *cis*-diaminodicloroplatina(II) (Figura 4), que teve suas propriedades antitumorais descobertas no ano de 1960 por Barnet Rosenberg, durante o estudo do crescimento de colônias de *Escherichia coli* em presença de campo elétrico, onde notou-se que alguns produtos da eletrólise de eletrodos contendo platina eram capazes de inibir a divisão celular nessa linhagem de bactérias. Após a identificação do complexo de platina(II) com responsável por essa atividade, o mesmo recebeu grande atenção tendo sua aprovação pela FDA no ano de 1978^{15,16}.

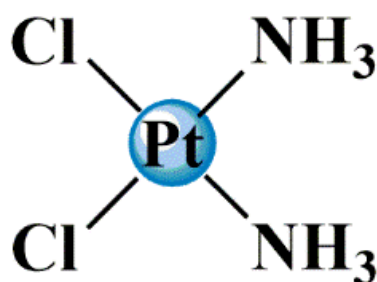


Figura 4- Estrutura do fármaco cisplatina.

Desde então até os dias atuais o fármaco cisplatina tem sido amplamente utilizado e apresentado grande eficiência no tratamento de diferentes tipos de câncer, como ovário, estômago, pulmão, próstata, entre outros. Estudos acerca do mecanismo de ação da cisplatina demonstram que o fármaco, administrado por via intravenosa, se mantém estável até sua entrada na célula, devido à alta concentração de íons cloreto presente no plasma sanguíneo (~100 mM) porém, após sua entrada via difusão no meio intracelular devido a menor concentração de íons cloreto (~4 mM), ocorrem sucessivas reações de hidrólise e a nova espécie se liga as bases do DNA, causando alterações em sua estrutura, influenciando no processo de proliferação e induzindo a morte celular^{17,18}.

Apesar do sucesso do cisplatina, alguns efeitos nocivos podem ser atribuídos ao fármaco, tais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e

resistência^{19,20}. Esses fatos impulsionaram os estudos acerca do desenvolvimento de novos complexos metálicos com atividade antitumoral. Novos complexos de platina seguiram sendo estudados e alguns deles mostraram-se promissores, como é o caso da carboplatina e da oxaliplatina, fármacos que também foram aprovados para uso em nível mundial (Figura 5)^{16,21}. Estudos empregando metais do grupo da platina (Pd(II) e Ni(II)) também foram e são desenvolvidos porém, até o momento, não obtiveram o mesmo sucesso, todavia, na literatura pode-se encontrar complexos com centros metálicos de Paládio(II) e Níquel(II) que apresentam boa atividade sobre linhagens tumorais, conforme demonstrado na Figura 5 que traz um exemplo de complexos de Paládio(II) e Níquel(II) com boa atividade sobre a linhagem tumoral de pulmão^{22,23}.

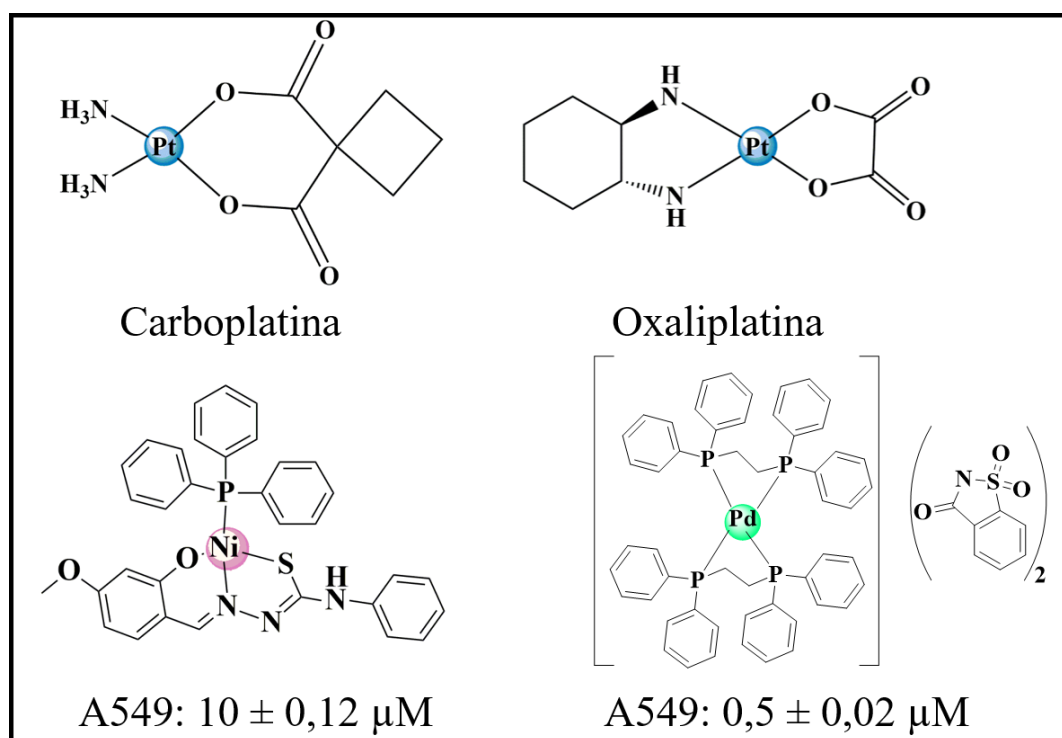


Figura 5- Estruturas dos complexos de platina (carboplatina e oxaliplatina) utilizados no tratamento do câncer, e de compostos de níquel(II) e paládio(II) com atividade frente à uma linhagem tumoral de pulmão.

Neste sentido, complexos contendo diferentes íons metálicos seguiram sendo estudados com relação a possível atividade antitumoral. Dentre muitos estudos, os complexos de rutênio (Ru) despertam grande interesse devido

as características do metal, que incluem o fato de apresentar geometria octaédrica diferindo da cisplatina e permitindo alocar um número maior de ligantes, a capacidade de alcançar diferentes estados de oxidação (Ru^{II} , Ru^{III} e Ru^{IV}) em fluídos biológicos, possibilitando a obtenção de pró-drogas ativadas através da redução do íon Ru^{III} , além da possível afinidade por biomoléculas com a transferrina, devido a sua similaridade com o ferro^{24,25}.

Na década de 80 Keppler e colaboradores descreveram um complexo de rutênio com fórmula *trans*- $[\text{RuCl}_4(\text{HIm})_2]$ (KP418) que apresentou atividade *in vivo* considerável em ratos, em um modelo de carcinoma colorretal, porém possuindo efeitos nocivos como perda de massa e mortalidade, no entanto inspirou a investigação de novos complexos com alterações estruturais. Neste sentido, anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa publicou os estudos do complexo análogo ao KP418 denominado KP1019, com fórmula estrutural *trans*- $[\text{RuCl}_4(\text{HInd})_2]$, onde o ligante imidazol é substituído por um ligante indazol. O complexo KP1019 apresentou bons resultados para o câncer de cólon, chegando a inibir cerca de 95% do volume do tumor em modelo animal, sem levar a morte, no entanto o desenvolvimento dos estudos clínicos da Fase I foram dificultados devido à baixa solubilidade do composto, o que levou a síntese de um novo análogo contendo o contra-íon Na^+ ($\text{Na}[\text{RuCl}_4(\text{HInd})_2]$) denominado NKP-1339, que aumentou a solubilidade em 30 vezes, permitindo a continuidade dos estudos clínicos que ainda encontram-se em desenvolvimento. A Figura 6 encontram-se apresenta as estruturas dos complexos mencionados^{26,27}.

O complexo NAMI-A ($[\text{H}_2\text{Im}][\text{trans-RuCl}_4(\text{dmsO-S})(\text{Him})]$) (Figura 6) teve seus estudos de atividade antitumoral relatados no ano de 1992. Os resultados demonstraram a eficiência do composto em reduzir a formação e o crescimento de metástases pulmonares, sendo avaliados em testes *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos animadores do complexo levaram o mesmo a entrar em ensaios clínicos, chegando a fase I/II, porém sendo posteriormente descontinuado após estudos em combinação com a gencitabina (composto utilizado como

quimioterápico) para o tratamento de câncer de pulmão, em que foram constatados considerável toxicidade do complexo de rutênio, além do melhor desempenho da gencitabina sozinha quando comparada a combinação com NAMI-A^{25,28,29}.

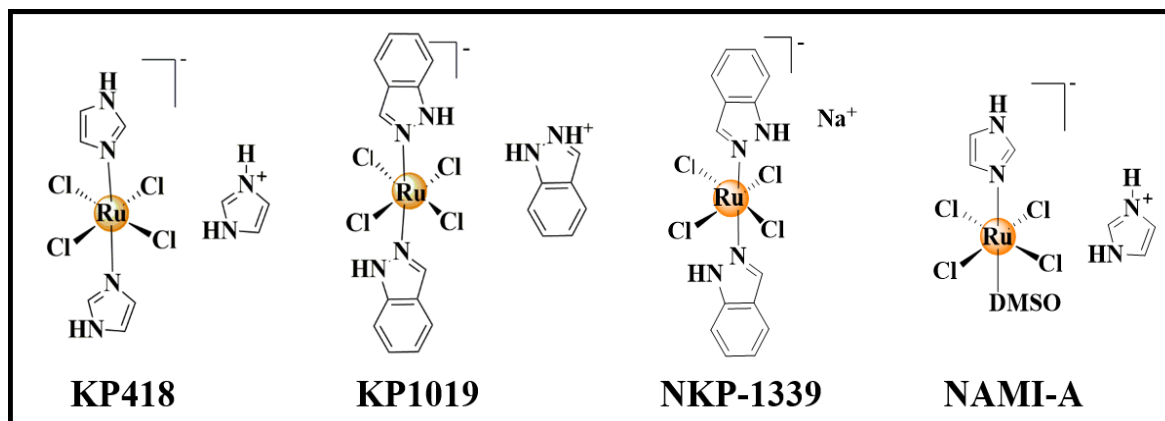


Figura 6- Estruturas químicas dos complexos de rutênio KP418, KP1019, NKP-1339 e NAMI-A.

O mecanismo de ação desses compostos relaciona-se a ativação dos mesmos no meio celular decorrente da redução $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$, e acredita-se que a interação com biomoléculas como albumina e transferrina auxilia no transporte dos complexos metálicos no organismo²⁷.

1.4- Aciltioureas

Na química bioinorgânica, além do centro metálico outro fator importante é a escolha dos ligantes dentre as inúmeras moléculas possíveis. As aciltioureas constituem uma classe de compostos descritas a muito tempo, desde a década de 80. São moléculas derivadas da tiourea, que apresenta estrutura semelhante a uréia, porém contendo um átomo de enxofre ao invés de oxigênio, no entanto, as aciltioureas apresentam um grupo acila, onde o grupo carbonila encontra-se ligado ao núcleo da tourea (Figura 7)³⁰.

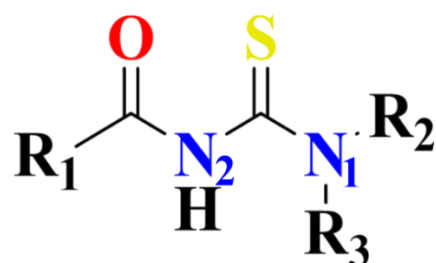


Figura 7- Estrutura básica dos ligantes aciltioureas.

Na literatura pode-se encontrar uma grande diversidade de aplicações para esta classe de compostos, que vão desde sua utilização em eletrodos de íon seletivo³¹ até aplicações que envolvem suas propriedades antifúngica³², bactericida³³ e antitumoral³⁴. Além disso, a probabilidade de alteração na estrutura dessas moléculas é grande, de forma que a mudança de seus grupos substituintes pode levar a um número elevado de novas estruturas, comumente encontram-se na literatura aciltioureas monossubstituídas e dissustituídas, que se diferenciam pelos grupos substituintes R₃ e R₄. Além da alteração de seus substituintes R, outra possibilidade é a alteração do átomo de enxofre por um átomo de selênio, dando origem as selenoureas, que recentemente vem sendo utilizadas na síntese de complexos metálicos³⁵⁻³⁷.

Além da sua variedade estrutural, do ponto de vista da química de coordenação estas moléculas se tornam muito interessantes devido a sua versatilidade, uma vez que apresentam diferentes pontos de ligação podendo se

coordenar a íons metálicos de diferentes maneiras, conforme elucidado na Figura 8³⁸. O modo de coordenação mais comum na literatura é o modo bidentado através dos átomos de oxigênio e enxofre³⁹, no entanto existem outras possibilidades descritas, sendo elas: monodentado (S)⁴⁰, bidentado (O, N1)⁴¹, bidentado (S, N2)⁴², bidentado (O, S) e monodentado (N1) (bimetálico)⁴³, e bidentado (O, S) sem que haja a desprotonação de N2⁴⁴.

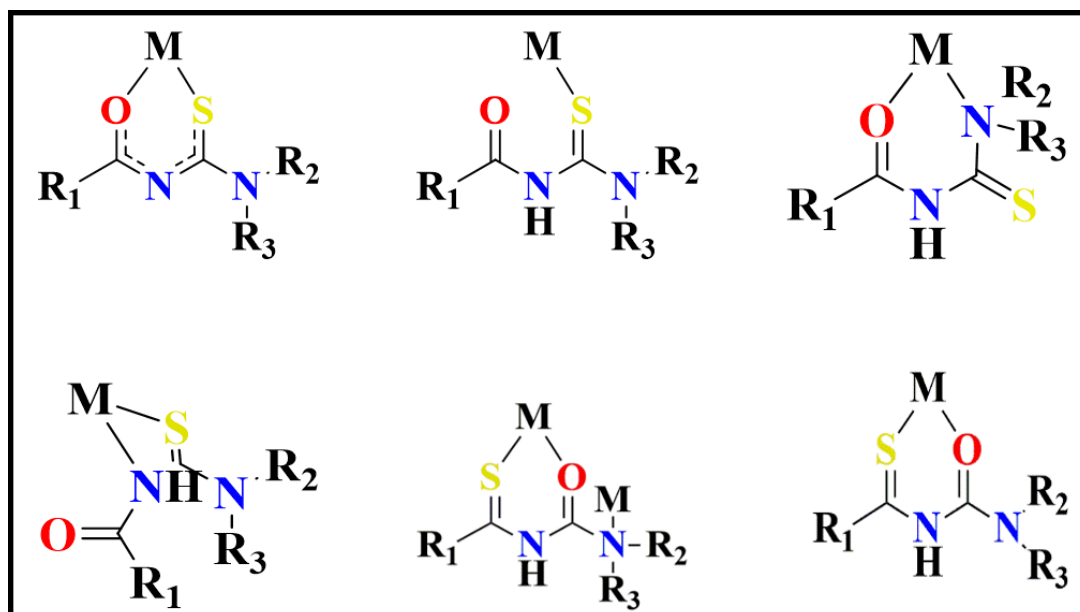


Figura 8- Modos de coordenação descritos para os ligantes aciltioureas³⁸⁻⁴⁴.

Essa riqueza estrutural e as possibilidades de aplicação dessas moléculas faz com que, apesar de serem conhecidas a muito tempo, ainda sejam atualmente muito estudadas. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa, Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos inorgânicos (LERCI) vem desenvolvendo trabalhos utilizando esta classe de ligantes na síntese de complexos com diferentes íons metálicos (Pd^{II}, Pt^{II} e Ru^{II}) desde o ano de 2014, investigando a aplicação dos compostos sobre diferentes linhagens tumorais, e a doenças como tuberculose e chagas.

Em um trabalho publicado pelo grupo no ano de 2014⁴⁵, em que complexos de paládio(II) foram avaliados em uma linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231), observou-se que os compostos contendo ligantes com substituintes R₂ e R₃ alifáticos apresentaram maior atividade quando avaliados na

linhagem tumoral, quando comparados a ligantes com substituintes aromáticos, conforme exposto na Figura 9. A mesma tendência foi observada anos mais tarde, em complexos de Pt^{II} publicados no ano de 2018 (Figura 9)⁴⁶.

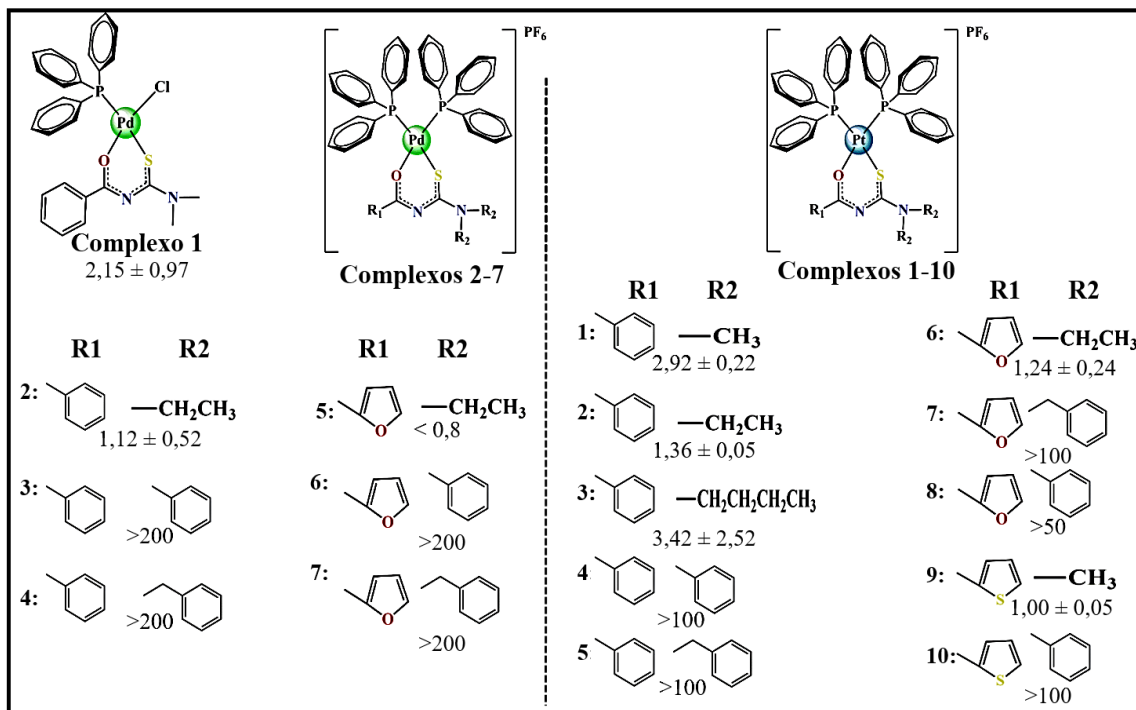


Figura 9- Complexos de Paládio(II)⁴⁵ e Platina(II)⁴⁶ sintetizados pelo grupo de pesquisa LERCI e seus valores de IC₅₀ (μM) na linhagem tumoral de câncer de mama MDA-MB-231.

Ainda no mesmo ano, complexos de rutênio(II), contendo esta mesma classe de ligantes foram estudados frente a uma linhagem tumoral de mama (MDA-MB-231) (Figura 10). Neste caso foi possível observar que os compostos que continham ligantes com grupos substituintes alifáticos menores apresentaram maior atividade quando comparados a um ligante contendo um grupo R₂ aromático com cadeia maior⁴⁷. Os resultados obtidos nestes trabalhos indicaram que a alteração dos grupos substituintes pode interferir na atividade citotóxica dos complexos metálicos contendo ligantes aciltioureas.

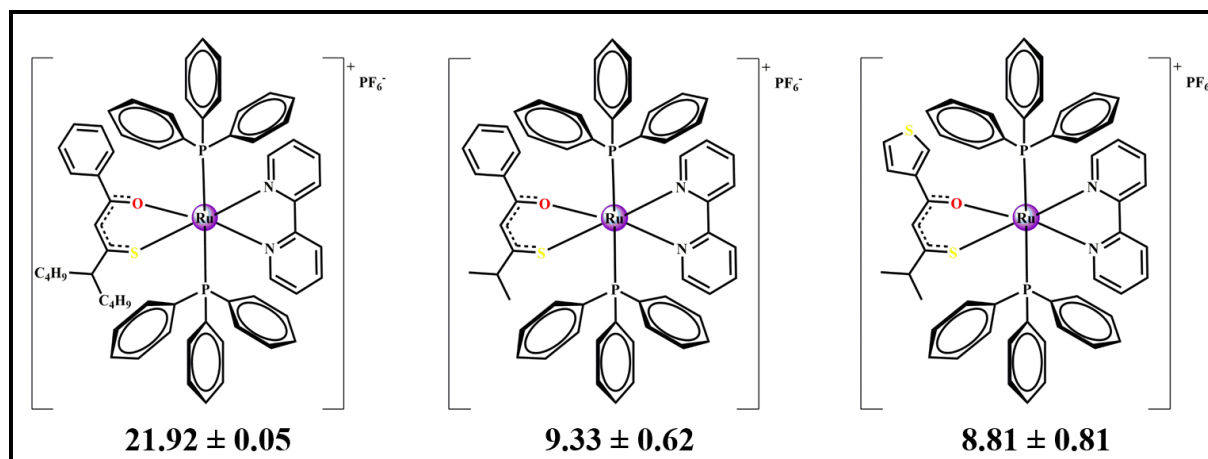


Figura 10- Complexos de rutênio contendo ligantes aciltiourea sintetizados pelo grupo LERCI e seus valores de IC₅₀ (μM) na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo a síntese de complexos metálicos contendo ligantes aciltioureas dissustituídas e o estudo de sua atividade citotóxica. Desta forma foi proposta a síntese de novos 11 complexos metálicos divididos em duas diferentes séries, onde a série 1 teve como objetivo a síntese de cinco complexos de rutênio contendo ligantes bipyridina, bifosfina (1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) ou 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb)) e aciltioureas (N',N'-dimetil-N-benzoil-tiourea, N',N'-dimetil-N-tiofenil-tiourea ou N',N'-dimetil-N-furoil-tiourea), variando-se as duas últimas classes de ligantes e avaliando a influência desta variação na atividade citotóxica; e a série 2 teve como finalidade a síntese de seis complexos contendo os ligantes 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) e aciltioureas (N',N'-dimetil-N-benzoil-tiourea ou N',N'-dimetil-N-tiofenil-tiourea) contendo diferentes íons metálicos (Ni^{II}, Pd^{II} e Pt^{II}) com o intuito de avaliar os efeitos na citotoxicidade.

2.2- Objetivos Específicos

De forma a cumprir o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Sintetizar os complexos precursores [RuCl₂(bipy)(dppe)], [RuCl₂(bipy)(dppb)], [NiCl₂(dppe)], [PdCl₂(dppe)] e [PtCl₂(dppe)].
- Sintetizar os complexos da série 1 com fórmula geral [RuL_n(bipy)(P-P)]PF₆, em que L_n: N',N'-dimetil-N-benzoil-tiourea, N',N'-dimetil-N-tiofenil-tiourea ou N',N'-dimetil-N-furoil-tiourea e P-P: 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) ou 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb).

-
-
- Sintetizar os complexos da série 2, com fórmula geral $[ML_n(dppe)]BF_4$, onde M: Ni^{II} , Pd^{II} ou Pt^{II} , e L_n : N',N'-dimetil-N-benzoil-tioureia ou N',N'-dimetil-N-tiofenil-tioureia.
 - Caracterizar os complexos sintetizados a partir de técnicas como análise elementar, condutividade molar, espectroscopias no infravermelho e UV-Vis, RMN de $^{31}P\{H\}$, 1H , e $^{13}C\{H\}$, voltametria cíclica e difração de raios x de monocristal.
 - Realizar o ensaio de viabilidade celular *in vitro* dos complexos frente às linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e pulmão (A549), e não tumorais MCF-10A (mama) e MRC-5 (pulmão).
 - Avaliar a capacidade dos complexos de alterar a morfologia e influenciar na migração celular e crescimento de colônias, bem como estudar a influência dos mesmos no ciclo celular e no mecanismo de morte na linhagem MDA-MB-231.
 - Realizar ensaios de interação com DNA a partir de técnicas como viscosidade, eletroforese em gel de agarose, ensaio competitivo com Hoechst33258 e dicroísmo circular, a fim de avaliá-lo como possível alvo para o mecanismo de ação.
 - Avaliar a capacidade dos complexos interagirem com a proteína HSA.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Obtenção de Atmosfera inerte

Todas as sínteses descritas neste trabalho foram realizadas utilizando atmosfera de argônio, obtida a partir da passagem de um fluxo do gás, proveniente da White Martins, por um sistema de colunas compostas por sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador do tipo BTS-R-3-11 (Fluka), mantido a 60°C.

3.2- Solventes e Reagentes

Todos os solventes utilizados foram submetidos a purificação prévia seguindo os métodos padrões. Os reagentes foram utilizados sem purificação prévia: RuCl₃.3H₂O (Sigma-Aldrich), C₄H₆NiO₄.4H₂O (Fluka), *t*-[PdCl₂(PPh₃)₂] (precmct), K₂[PtCl₄] (precmct), KPF₆ (Fluka), 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) (Strem Chemicals), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb) (Strem Chemicals), 2,2'-bipiridina (bipy) (Sigma-Aldrich), CT-DNA (Calf Thymus) (Sigma-Aldrich), Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), HSA (Human Serum Albumin) (Sigma-Aldrich) e MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromide) (Sigma-Aldrich), meio de cultura DMEM (Vitrocell), meio de cultura RPMI (Vitrocell).

3.3- Instrumentação

3.3.1- Análise Elementar

A determinação dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos complexos foi realizada no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, utilizando-se um analisador CHN modelo EA 1108 da FISON.

3.3.2- Condutividade Molar

Para a realização das medidas de condutividade molar foi empregado um condutivímetro Meter Lab., modelo CDM230, utilizando soluções dos complexos na concentração de 1x10⁻³ mol L⁻¹ em diclorometano.

3.3.3- Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro da marca Bomen-Michelson FT, modelo MB-102 na região de 4000-200 cm^{-1} , em pastilhas de KBr mantido previamente na estufa à 120°C.

3.3.4- Espectroscopia no UV-Vis

A coleta dos espectros de UV-Visível foi realizada em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452A. As medidas foram realizadas em diclorometano, utilizando cubetas de 1 cm de caminho óptico.

3.3.5- Voltametria Cíclica

Para a realização das medidas eletroquímicas dos complexos, utilizou-se um potenciostato/gauvanostato Electrochemical Analyzer, modelo BAS 100B. Os complexos foram solubilizados em uma solução de PTBA em diclorometano (0,1M). As medidas foram realizadas empregando-se uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos, tendo-se um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência, e eletrodos de trabalho e auxiliar de platina.

3.3.6- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY, HSQC, HMBC e DEPT 135 dos compostos foram obtidos em um equipamento BRUKER DRX 400 MHz sob supervisão do professor Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, no departamento de química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.7- Difração de Raios X

As medidas de difração de raios x de monocristal dos complexos sintetizados foram realizadas pelo Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano e pelo MSc. João Honorato de Araújo Neto no Laboratório de Cristalografia do Instituto

de Química da USP de São Carlos. Para a coleta dos dados utilizou-se difratômetros do tipo automático Enraf-Nonius Kappa-CCD e Apex II Duo, ambos utilizando radiação da linha $K\alpha$ do molibdênio (0,71070 Å). Os refinamentos foram realizados por métodos diretos utilizando o programa SHELXS 97.

3.4- Sínteses

3.4.1- Síntese dos Ligantes

A síntese dos ligantes aciltioureas foi realizada seguindo uma metodologia previamente descrita na literatura⁴⁸. A uma solução do respectivo cloreto de acila em acetona seca (cloreto de benzoil, cloreto de tiofenil ou cloreto de furoil), adicionou-se gota-à-gota uma suspensão de tiocianato de potássio (KSCN) no mesmo solvente. Essa mistura foi mantida em agitação até o surgimento de um sólido de coloração branca (KCl), indicando a formação do isotiociano orgânico, e colocada em banho de gelo para a lenta adição de dimetilamina. A reação foi mantida em agitação por cerca 9 horas, até a obtenção do produto (o que foi observado por cromatografia de camada delgada). Após o tempo reacional adicionou-se água gelada para obtenção do sólido de interesse, que foi recristalizado em uma mistura acetona/água (50:50 v/v).

3.4.2- Síntese dos Complexos Precursores

3.4.2.1- Síntese do Complexo $[RuCl_2(PPh_3)_3]$

A síntese do complexo $[RuCl_2(PPh_3)_3]$ foi realizada segundo metodologia descrita por Stephenson&Wilkinson⁴⁹. Inicialmente adicionou-se 1,00 g (4,82 mmol) de $RuCl_3 \cdot nH_2O$ em metanol (250 mL) previamente desaerado, mantendo essa mistura em refluxo por 15 min em atmosfera de argônio. Após o arrefecimento da solução, adicionou-se 5,75 g (21,9 mmol) de trifenilfosfina (PPh_3) e manteve-se a reação em refluxo por 3h. Após o tempo reacional o sólido

marrom escuro formado foi separado por filtração, lavado com metanol e seco a vácuo. Rendimento: 90% (4,16 g).

3.4.2.2- Síntese do Complexo *cis* (Cl), *trans* (PPh₃)-[RuCl₂(PPh₃)₂(bipy)]

O complexo *cis, trans*-[RuCl₂(PPh₃)₂(bipy)] foi sintetizado partindo-se de 1,00 g (1,04 mmol) do complexo [RuCl₂(PPh₃)₃] que foi adicionado em diclorometano (50 mL) previamente desaerado juntamente com 0,18 g (1,15 mmol) do ligante 2,2'-bipiridina, conforme descrito na literatura⁵⁰. A reação foi mantida em agitação por 30 min, e posteriormente o volume foi reduzido para cerca de 2 mL e a precipitação do produto induzida com adição de éter etílico. O sólido foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 80% (0,71 g).

3.4.2.3- Síntese do Complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppe)]

Para a síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppe)] adicionou-se a um balão de duas bocas contendo tolueno desaerado 1,0 g (1,17 mmol) do complexo *cis, trans*-[RuCl₂(PPh₃)₂(bipy)] e 0,93 g (2,3 mmol) de dppe. A reação foi mantida em agitação e aquecimento por 48h. Após o tempo de reação o produto resultante foi filtrado, lavado com éter etílico e seco a vácuo. Rendimento: 89% (0,76 g).

3.4.2.4- Síntese do Complexo [RuCl₂(dppb)]₂(μ₂-dppb)

Para a realização da síntese desse complexo seguiu-se uma metodologia já descrita na literatura⁵¹, em que 1,00 g (1,04 mmol) do complexo [RuCl₂(PPh₃)₃] foi adicionado em um balão de duas bocas contendo hexano previamente desaerado (200 mL), seguindo-se da adição de 0,98 g (2,30 mmol) de 1,4bis-(difenilfosfina)butano (dppb). A reação foi então mantida em agitação, aquecimento e atmosfera a de argônio por 6 horas. O precipitado verde formado foi filtrado, lavado com hexano e seco sob vácuo. Rendimento = 95% (1,6 g).

3.4.2.5- Síntese do Complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)]

Em um balão de duas bocas contendo tolueno desaerado (250 mL) adicionou-se o complexo [RuCl₂(dppb)]₂(μ₂-dppb) (1,50 g - 0,92 mmol) e o ligante 2,2'-bipiridina (0,290 g - 1,85 mmol). O sistema foi mantido em agitação, refluxo e atmosfera inerte por 48 horas⁵². Após o tempo reacional, o precipitado vermelho formado foi filtrado em funil de placa sinterizada, lavado (tolueno e hexano) e seco à vácuo. Rendimento= 90% (0,62 g).

3.4.2.6- Síntese do Complexo *cis*-[NiCl₂(dppe)]

A síntese do complexo precursor *cis*-[NiCl₂(dppe)] foi realizada seguindo uma metodologia previamente descrita para um composto semelhante⁵³, onde o sal acetato de níquel(II) (C₄H₆NiO₄ · 4H₂O) (0,50 g - 2,00 mmol) foi solubilizado em 60 mL de metanol, seguido da adição do ligante dppe (0,88 g - 2,21 mmol). Após a mudança de coloração da reação, inicialmente verde, para alaranjado, adicionou-se 0,340 mL de HCl concentrado, levando a formação de um sólido da mesma cor. Rendimento: 82% (0,87 g).

3.4.2.7- Síntese do Complexo *cis*-[PdCl₂(dppe)]

Para a síntese do complexo *cis*-[PdCl₂(dppe)] partiu-se de uma solução do composto *trans*-[Pd(PPh₃)Cl₂] 1,85 mmol (1,30 g) em diclorometano (70 mL), adicionando-se 2mmol (0,80 g) do ligante dppe. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 24 horas sob atmosfera inerte. Após o tempo de reação, a solução foi concentrada, e induzida a precipitação com a adição de hexano⁵⁴. O sólido foi filtrado, lavado com hexano e éter e seco a vácuo. Rendimento: 95% (1,01 g).

3.4.2.8- Síntese do Complexo *cis*-[PtCl₂(dppe)]

A síntese do complexo precursor *cis*-[PtCl₂(dppe)] foi realizada adicionando-se o ligante dppe (1,85 mmol – 0,74 g) em metanol previamente desaerado (50 mL), e mantendo-se em refluxo até a total solubilização. Após o arrefecimento da solução, adicionou-se o sal K₂[PtCl₄] (1,81 mmol – 0,75 g) previamente solubilizado em diclorometano (120 mL) e manteve-se a reação em refluxo e atmosfera inerte por 24 horas^{54,55}. Após o tempo reacional, o volume foi reduzido, havendo o surgimento de um sólido, que foi solubilizado em DMF (20 mL), e recristalizado em éter dietílico. Rendimento: 82% (0,98 g).

3.4.3- Síntese dos Complexos Metálicos

3.4.3.1- Síntese dos complexos com fórmula geral [RuL_n(bipy)(P-P)]PF₆ (Série 1)

Para a síntese dos complexos de rutênio com fórmula geral [RuL_n(bipy)(P-P)]PF₆ (1-6) solubilizou-se o sal KPF₆ (0,150 mmol) em uma mistura diclorometano/metanol (40:30) (50 mL) seguida do ligante aciltiourea (*N*, *N*-dimetil-*N*'-benzoiltiourea (L₁), *N*, *N*-dimetil-*N*'-tiofeniltiourea (L₂) ou *N*, *N*-dimetil-*N*'-furoiltiourea(L₃)) (0,138 mmol (1-3); 0, 132 mmol (4-6)) e o respectivo precursor (*cis*-[RuCl₂(bipy)(dppe)] (0,138 mmol) ou *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)] (0,132 mmol)). A reação foi mantida em agitação e aquecimento por 10 horas. O composto foi precipitado a partir da redução do volume (cerca de 2 mL) e subsequente adição de água destilada. Os complexos foram lavados com água e hexano, e secos sob vácuo. Cristais adequados para difração de raios x foram obtidos por recristalização a partir de uma mistura de diclorometano/metanol. Esse procedimento geral pode ser observado na Figura 11. A síntese e caracterização do complexo 4 foram descritas anteriormente por Barolli e colaboradores⁵⁶.

[Ru(L₁)(bipy)(dppe)]PF₆ (**1**): sólido alaranjado, rendimento: 70% (0,098 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 9,43 (d, *J* 5,1 Hz, H5a bipy); 8,31 (d, *J* 5,5 Hz, 2H bipy, 2a, 5b); 7,88-7,76 (m, 4H, H3a, H4b bipy; Ph dppe); 7,61-7,59 (m, 2H, H6_{L1} e H10_{L1}); 7,53-7,44 (m, 2H, Ph_{meta} dppe); 7,39-7,28 (m, 7H, H4a e H2b bipy; 5H Ph dppe); 7,25-7,13 (m, 9H, H7_{L1}; H9_{L1}; H8_{L1}; 6H Ph dppe); 7,02-6,99 (m, 1H, Ph_{para} dppe); 6,92-6,88 (m, 2H, Ph_{meta} dppe); 6,61-6,57 (m, 2H, Ph_{orto} dppe); 6,34-6,31 (m, 1H, H3b bipy); 3,03 (s, 3H, CH₃L₁); 2,73 (s, 3H, CH₃L₁); 2,62-2,34 (m, 4H, CH₂ dppe). RMN ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 174,56 (C3 L₁); 170,12 (C4 L₁); 157,39 (C_{quaternário} bipy); 157,01 (C_{quaternário} bipy); 155,19 (C bipy) 150,78 (C5a bipy); 138,53-125,67 (C bipy; C Ph_{dppe}; C L₁); 124,43 (C3b bipy); 123,68 (C5b bipy); 123,34 (C2a bipy); 41,14 (CH₃ L₁); 40,20 (CH₃ L₁); 29,77-29,13 (CH₂ dppe); 25,31-25,08 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 69,97 (d); 67,3 (d); *J*_{P-P} = 19 Hz.

[Ru(L₂)(bipy)(dppe)]PF₆ (**2**): sólido alaranjado, rendimento: 54% (0,075g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 9,43 (d, *J* 5,3 Hz, 1H, H5a bipy); 8,35 (d, *J* 8,1 Hz, 1H, H2a bipy); 8,31 (d, *J* 8,0, 1H, H5b bipy); 7,94-7,91 (m, 1H, H3a bipy); 7,86-7,71(m, 3H, H4b bipy e 2H Ph dppe); 7,53-7,44 (m, 2H, Ph_{orto} dppe); 7,42-7,36 (m, 1H, H4a bipy); 7,36-7,28 (m, 5H, H2b bipy, 4H Ph dppe); 7,25-7,14 (m, 9H, 3H L₂ e 6H Ph dppe); 7,01-6,98 (m, 1H, Ph_{para} dppe); 6,92-6,87 (m, 3H, 2H Ph dppe); 6,63-6,58 (m, 2H, Ph_{orto} dppe); 6,32-6,29 (m, 1H, H3b bipy); 3,62-3,31 (m, 2H, CH₂ dppe); 2,97 (s, 3H, CH₃ L₂); 2,73 (s, 3H, CH₃ L₂); 2,62-2,34 (m, 2H, CH₂ dppe). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 174,12 (C3 L₂); 166,18 (C4 L₂); 157,48 (C_{quaternário} bipy); 155,89 (C bipy); 150,92 (C5a bipy); 144,96 (C_{quaternário} Ph dppe); 138,64 (C3a bipy); 138,15-127,81 (C bipy; C L₂; C Ph_{dppe}); 125,74 (C2a bipy); 124,32 (C_{orto} dppe); 123,64 (C5b bipy); 123,47 (C2a bipy); 41,03 (CH₃ L₂); 40,16 (CH₃ L₂); 29,70-29,99 (CH₂ dppe); 25,55-24,74

(CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 70,0 (d); 67,4 (d); *J*_{P-P} = 19 Hz.

[Ru(L₃)(bipy)(dppe)]PF₆ (**3**): sólido alaranjado, rendimento: 65% (0,090 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 9,42 (d, *J* 5,5 Hz, 1H, H5a bipy); 8,37 (d, *J* 8,1 Hz, 1H, H2a bipy); 8,29 (d, *J* 7,9 Hz, 1H, 5b bipy); 7,95-7,91 (m, 1H, H 3a bipy); 7,84-7,79 (m, 2H, Ph_{orto} dppe); 7,75-7,71 (m, 1H, H4b, bipy); 7,52-7,44 (m, 3H, 2H Ph_{orto} dppe e 1H Ph_{para} dppe); 7,42-7,36 (m, 1H, H4a bipy); 7,35-7,28 (m, 6H, 3H L₃ e 3H Ph dppe); 7,25-7,14 (m, 6H, Ph dppe); 7,00-6,97 (m, 1H, Ph_{para} dppe); 6,91-6,86 (m, 2H, Ph_{meta} dppe); 6,64-6,56 (m, 2H, Ph_{orto} dppe); 6,54 (dd, 1H, H2b bipy); 6,32-6,26 (m, 2H, H3b bipy; Ph_p dppe); 3,62-3,31 (m, 2H, CH₂ dppe); 2,98 (s, 3H, CH₃ L₃); 2,70 (s, 3H, CH₃ L₃); 2,62-2,34 (m, 2H, CH₂ dppe). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 174,24 (C3 L₃); 162,39 (C4 L₃); 157,21 (C_{quaternário} bipy); 155,66 (C Ph_{dppe}); 152,07 (C_{quaternário} bipy); 150,75 (C5a bipy); 144,46 (C Ph_{dppe}); 138,42 (C3a bipy); 137,64 (C4b bipy); 134,39-127,76 (C bipy; C L₃; Ph dppe); 125,65 (C4a bipy); 124,21-111,66 (C bipy; C Ph_{dppe}); 40,83 (CH₃ L₃); 39,94 (CH₃ L₃); 29,70-29,01 (CH₂ dppe); 25,28-24,87 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 70,0 (d); 67,4 (d); *J*_{P-P} = 19 Hz.

[Ru(L₂)(bipy)(dppb)]PF₆ (**5**): sólido alaranjado, rendimento: 80% (0,100 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 8,99 (m, 1H, H5a bipy); 8,54 (d, *J* 5.0 HZ, 1H, H5b bipy); 8,22-8,20 (m, 1H, H 2b bipy); 8,11-,8,08 (m, 1H, H3b bipy); 7,91-7,87 (m, 2H, Ph_{orto} dppb); 7,81-7,79 (m, 1H, H2a bipy); 7,72-7,58 (m, 2H, Ph_{orto} dppb); 7,48-7,11 (m, 15H, 10H Ph_{dppe}; 2H L₂); 7,07 (m, 1H, H4b bipy); 7,02-6,96 (m, 1H, L₂); 6,85-6,78 (m, 1H, Ph_{para} dppb); 6,74 (m, 2H, Ph_{meta} dppb); 6,34 (m, 2H, Ph_{orto} dppb); 3,29-3,16 (m, 1H, CH₂ dppb); 3,07 (s, 3H, CH₃ L₂); 2,95 (s, 4H, 1H CH₂ dppb e 3H CH₃ L₂); 2,53-2,33 (m, 3H, CH₂ dppb); 2,08-1,88 (m, 2H, CH₂ dppb);

1,44-1,29 (m, 1H, CH₂ dppb). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 173,78 (C3 L₂); 166,25 (C4 L₂); 158,54 (C1b_{quaternário} bipy); 157,80 (C5b bipy); 156,40 (C1a_{quaternário} bipy); 150,67 (C5a bipy); 144,78 (C_{quaternário} dppb); 140,45 (C_{quaternário} dppb); 138,73 (C3b bipy); 137,40 (C3a bipy); 137,23-127,52 (C bipy; C dppb; C L₂); 125,05 (C4a bipy); 124,79 (C4b bipy); 12,80 (C2b bipy); 122,60 (C2a bipy); 41,15 (CH₃ L₂); 40,25 (CH₃ L₂); 31,12-30,23 (CH₂ dppb); 28,90 (d, CH₂ dppb). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 43,1(d); 36,0 (d); *J*_{P-P} = 31 Hz.

[Ru(L₃)(bipy)(dppb)]PF₆ (**6**): sólido alaranjado, rendimento: 71% (0,096 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 8.99-8.91 (m, 1H, H5a bipy); 8,52 (d, 5,7 HZ, 1H, H5b bipy); 8,29-8,20 (m, 1H, H2b bipy); 8,15-8,08 (m, 1H, H3b bipy); 7,96-7,86 (m, 2H, Ph_{orto} dppb); 7,86-7,80 (m, 1H, H2a bipy); 7,70-7,60 (m, 2H, Ph_{orto} dppb); 7,56-7,49 (m, 1H, H3a bipy); 7,47-7,36 (m, 4H, 2HPh_{meta} dppb; 2HPh_{para} dppb); 7,33-7,27 (m, 2H, Ph_{meta} dppb); 7,25-7,11 (m, 7H, 2H Ph_{orto} dppb, 2H Ph_{meta} dppb, 1H Ph_{para} dppb, e 1H₆ L₃); 7,08-7,01 (m, 1H, H4b bipy); 6,95-6,87 (m, 2H, H4a bipy, and Ph_{para} dppb); 6,78-6,69 (m, 2H, Ph_{meta} dppb); 6,40-6,28 (m, 3H, 2H Ph_{orto} dppb, and 1H₈ L₃); 6,26-6,20 (m, 1H, H₇L₃); 3,30-3,17 (m, 1H, CH₂ dppb); 3,05-2,87 (m, 7H, 6H CH₃L₃, 1H CH₂ dppb); 2,45-2,36 (m, 2H, CH₂ dppb); 2,07-1,88 (m, 2H, CH₂ dppb); 1,34-1,24 (m, 2H, CH₂ dppb). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 174,07 (C3 L₃); 162,82 (C4 L₂); 158,60 (C1b_{quaternário} bipy); 157,73 (C5b bipy); 156,45 (C1a_{quaternário} bipy); 151,86 (C_{quaternário} L₃); 150,64 (C5a bipy); 144,56 (C6 L₃); 140,72 (C_{quaternário} dppb); 138,89 (C3b bipy); 137,37 (C3a bipy); 137,00 (C_{quaternário} dppb); 134,51 (C Ph_{orto} dppb); 133,83 (C Ph_{orto} dppb); 133,24 (C_{quaternário} dppb); 132,86 (C_{quaternário} dppb); 131,05-130,52 (C Ph dppb); 130,00 (C Ph_{orto} dppb); 128,87 (C Ph_{meta} dppb; C Ph_{para} dppb); 128,31-128,58 (C Ph dppb); 125,10 (C4a bipy); 124,78 (C4b bipy); 123,98 (C2b bipy); 122,66 (C2a bipy); 114,41 (C8 L₃); 111,77 (C7 L₃); 41,09 (CH₃ L₃); 40,23 (CH₃

L₃); 31,15 (CH₂ dppe); 29,35 (CH₂ dppe); 25,12 (CH₂ dppe); 22,70 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 43,4 (d); 36,1 (d); *J*_{P-P} = 31 Hz.

3.4.3.2- Síntese dos complexos com fórmula geral [ML_n(dppe)]BF₄ (Série 2)

A síntese dos complexos com fórmula geral [ML_n(dppe)]BF₄ (7-12) foi realizada solubilizando-se o ligante aciltiourea (L₁ (*N*, *N*-dimetil-*N*'-benzoiltiourea), ou L₂ (*N*, *N*-dimetil-*N*'-tiofeniltiourea)) (0,189 mmol M=Ni^{II}; 0,174 mmol M=Pd^{II}; 0,151 mmol M=Pt^{II}) em metanol (50 mL) seguido pela adição do respectivo precursor ([NiCl₂(dppe)] (0,189 mmol), [PdCl₂(dppe)] (0,174 mmol) ou [PtCl₂(dppe)] (0,151 mmol)), e o sal NaBF₄. Manteve-se a reação em aquecimento e agitação durante 3 horas. O volume da mistura reacional foi reduzido (2 mL) e a precipitação induzida pela adição de água destilada. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob vácuo.

[Ni(L₁)(dppe)]BF₄ (**7**): sólido amarelo, rendimento: 52% (0,075 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 7,89-7,77 (m, 8H, Ph_{orto} dppe); 7,64-7,61 (m, 4H, Ph_{para} dppe); 7,59-7,49 (m, 8H, Ph_{meta} dppe); 7,39-7,34 (m, 3H, L₁(H₆, H₁₀, H₈)); 7,10-7,07 (m, 2H, L₁(H₇, H₉)); 3,42 (s, 1H, L₁ CH₃); 3,18 (s, 1H, L₁ CH₃); 2,91-2,74 (m, 2H, CH₂ dppe); 2,68-2,50 (m, 2H, CH₂ dppe). RMN ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 172,42 (C₃ L₁); 171,16 (C₄ L₁); 136,10 (C₅ L₁); 133,64-133,27 (C_{orto} dppe); 132,93-132,60 (C_{para} dppe); 132,19 (L₁); 130,00-129,56 (C_{meta} dppe); 129,30 (L₁); 128,03 (L₁); 126,60-125,35 (C_{quaternário} dppe); 41,44 (L₁ CH₃); 40,52 (L₁ CH₃); 29,81-28,71 (CH₂ dppe); 23,87-23,43 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 60,9 (d); 56,2; (d) *J*_{P-P} = 67 Hz.

[Ni(L₂)(dppe)]BF₄ (**8**): sólido amarelo, rendimento: 68% (0,097 g). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 7,85-7,80 (m, 8H, Ph_{orto} dppe); 7,62-7,59 (m, 4H, Ph_{para} dppe); 7,56-

7,51(m, 8H, Ph_{meta} dppe); 7,34 (d, J 4,0 Hz, 1H, L_{2(H8)}); 6,81-6,78 (m, 2H, L_{1(H6,H7)}); 3,36 (s, 3H, L₁ CH₃); 3,15 (s, 3H, L₁ CH₃); 2,87-2,74 (m, 2H, CH₂ dppe); 2,60-2,47 (m, 2H, CH₂ dppe). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃, 298K): δ (ppm): 171,59 (C3 L₁); 166,95 (C4 L₁); 142,31 (C5 L₁); 133,64-132,96 (C_{orto} dppe); 132,57 (C_{para} dppe); 132,26 (C8 L₁); 131,89 (L₁); 129,97-129,55 (C_{meta} dppe); 127,98 (L₁); 126,73-125,23 (C_{quaternário} dppe); 41,28 (L₁ CH₃); 40,42 (L₁ CH₃); 29,81-28,86 (CH₂ dppe); 23,75-23,32 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 61,1 (d); 56,2 (d); $J_{P-P} = 67$ Hz.

[Pd(L₁)(dppe)]BF₄ (**9**): sólido branco, rendimento: 72% (0,100 g). RMN de ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): δ (ppm): 8,00-7,92 (m, 8H, Ph_{orto} dppe); 7,75-7,71 (m, 6H, 4H Ph_{para} dppe e 2H L_{1(H6 and H10)}); 7,67-7,62 (m, 8H, Ph_{meta} dppe); 7,48-7,44 (m, 1H, L_{1(H8)}); 7,28-7,24 (m, 2H, L_{1(H7 and H9)}); 3,47 (s, 3H, L₁ CH₃); 3,33 (s, 3H, L₁ CH₃); 3,31-3,14 (m, 2H, CH₂ dppe); 3,10-3,01 (m, 2H, CH₂ dppe, sinal sobreposto ao sinal do solvente). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, (CD₃)₂CO, 298K): δ (ppm): 172,58 (C3 L₁); 169,82 (C4 L₁); 136,84 (C5 L₁); 134,26-133,89 (C_{orto} dppe); 133,67-133,37 (C_{para} dppe); 132,57 (C8 L₁); 130,40-130,05 (C_{meta} dppe, C6 e C10 L₁); 128,64 (C7 e C9 L₁); 128,35-126,92 (C_{quaternário} dppe); 42,06 (L₁ CH₃); 40,76 (L₁ CH₃); 30,70-29,02 (CH₂ dppe sobreposto ao sinal do solvente); 22,29-24,86 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 64,6 (d); 58,6 (d); $J_{P-P} = 22$ Hz.

[Pd(L₂)(dppe)]BF₄ (**10**): sólido branco, rendimento: 80% (0,112 g). RMN de ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, integral, atribuição): δ (ppm): 8,01-7,92 (m, 8H, Ph_{orto} dppe); 7,75-7,69 (m, 4H, Ph_{para} dppe); 7,65-7,61 (m, 9H, Ph_{meta} dppe, H_{6(L2)}); 7,32 (d, J 2,9 Hz, 1H, L_{2(H8)}); 7,02 (dd, J 4,9 Hz, 3,8 Hz, 1H, L_{2(H7)}); 3,42 (s, 3H, L₂ CH₃); 3,30 (s, 4H, L₂ CH₃ e CH₂ dppe); 3,25-3,18 (m, 1H, CH₂ dppe); 3,05-2,99 (m, 1H, CH₂ dppe); 2,98-2,90 (m,

1H, CH₂ dppe). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, (CD₃)₂CO, 298K): δ (ppm): 171,97 (C₃ L₂); 166,15 (C₄ L₂); 143,14 (C₅ L₂); 134,55-134,04 (C_{orto} dppe); 133,95-133,32 (C_{para} dppe e C₆ L₂); 132,81 (C₈ L₂); 130,58-130,28 (C_{meta} dppe); 128,84 (C₇ L₂); 128,30-126,94 (C_{quaternário} dppe); 42,14 (CH₃ L₂); 40,91 (CH₃ L₂); 30,96-30,58 (CH₂ dppe sobreposto ao sinal do solvente); 25,09-24,66 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 64,6 (d); 57,9 (d); *J*_{P-P} = 22 Hz.

[Pt(L₁)(dppe)]BF₄ (**11**): sólido branco, rendimento: 52% (0,070 g). RMN de ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, integral, atribuição): δ (ppm): 8,01-7,89 (m, 8H, Ph_{orto} dppe); 7,75-7,69 (m, 4H, Ph_{para} dppe); 7,68-7,60 (m, 10H, 8H Ph_{meta} dppe; H₆ e H₁₀ L₁); 7,51-7,45 (m, 1H, H₈L₁); 7,28-7,22 (m, 2H, H₇ e H₉ L₁); 3,53 (s, 3H, CH₃L₁); 3,35 (s, 3H, CH₃L₁); 3,20-3,02 (m, 2H, CH₂L₁); 3,00-2,86 (m, 2H, CH₂L₁). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, (CD₃)₂CO, 298K): δ (ppm): 169,00 (C₄L₁); 168,30 (C₃L₁); 136,83 (C₅L₁); 134,69-134,38 (C_{orto} dppe); 133,87-133,66 (C_{para} dppe); 132,21 (C₈ L₁); 130,64-130,23 (C_{meta} dppe, C₆ e C₁₀ L₁); 129,11 (C₇ e C₉ L₁); 128,09-126,53 (C_{quaternário} dppe); 42,49 (CH₃L₁); 41,09 (CH₃L₁); 30,71-29,33 (CH₂ dppe sobreposto ao sinal do solvente); 26,41-26,05 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 48,8 (d); 35,9 (d); *J*_{P-P} = 9,0 Hz.

[Pt(L₂)(dppe)]BF₄ (**12**): sólido branco, rendimento: 60% (0,080 g). RMN de ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO, 298K) (multiplicidade, constante de acoplamento, integral, atribuição): δ (ppm): 8,01-7,91 (m, 8H, Ph_{orto} dppe); 7,72-7,66 (m, 5H, Ph_{para} dppe; H₆L₂); 7,66-7,59 (m, 8H, Ph_{meta} dppe); 7,28-7,25 (m, 1H, H₈L₂); 7,02-6,99 (m, 1H, H₇L₂); 3,45 (CH₃L₂); 3,30 (CH₃L₂); 3,16-3,03 (CH₂ dppe); 2,95-2,88 (CH₂ dppe). RMN de ¹³C (100 MHz, (CD₃)₂CO, 298K): δ (ppm): 167,42 (C₃L₂); 165,02 (C₄L₂); 142,65 (C₅L₂); 134,56-134,21 (C_{orto} dppe); 133,87-133,52 (C_{para} dppe; C₆L₂); 133,24 (C₈L₂); 130,54-130,19 (C_{meta} dppe); 129,07 (C₇L₂); 128,24-126,23 (C_{quaternário} dppe); 42,29 (CH₃L₂); 40,93 (CH₃L₂); 30,71-29,30 (CH₂ dppe)

sobreposto ao sinal do solvente); 25,97-25,55 (CH₂ dppe). RMN de ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): δ (ppm): 46,9 (d); 34,6 (d); *J*_{P-P} = 11 Hz.

3.5- Ensaios Biológicos

3.5.1- Cultivo Celular

A avaliação das propriedades biológicas dos complexos estudados foi realizada empregando, as linhagens tumorais humanas MDA-MB-231 (células de câncer de mama triplo negativo/ATCC No. HTB-26), MCF-7 (células de câncer de mama hormônio dependente/ATCC No. HTB-22) e A549 (células de câncer de pulmão/ ATCC No. CCL-185), e não tumorais humanas MCF-10A (linhagem não-tumoral de mama/ ATCC No. CRL-10317) e MRC-5 (linhagem não-tumoral de pulmão/ ATCC No. CCL-171). As linhagens MDA-MB-231, A549 e MRC-5 foram cultivadas utilizando-se o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Vitrocell), suplementado com 10% de FBS, enquanto a linhagem celular MCF-7 foi mantida em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*; Vitrocell), também contendo 10% de soro fetal bovino. Para o cultivo da linhagem não-tumoral de mama MCF-10A utilizou-se o meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12*; Gibco), contendo 5% de soro de calvalo, EGF (fator de crescimento epidermal humano) (20 μg mL⁻¹), hidrocortisona (0,5 μg mL⁻¹), insulina (10 μg mL⁻¹) e 1% de penicilina e estreptomicina. Para o cultivo de todas as linhagens, as células foram mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

3.5.2- Ensaio de Viabilidade Celular

A determinação da atividade citotóxica dos compostos na linhagens MDA-MB-231, MCF-7, A549, MCF-10A e MRC-5 foi realizada utilizando-se um método colorimétrico, se empregando o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que em células viáveis é reduzido à formazan, cristais de coloração violeta, que permitem sua quantificação⁵⁷.

Para a realização do ensaio, as células foram semeadas em uma placa de 96 poços ($1,5 \times 10^4$ células (150 μ L)/poço) e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂ para adesão celular. Após o tempo de incubação, foram adicionadas diferentes concentrações dos complexos em DMSO, de maneira que a porcentagem final de DMSO utilizada foi de 0,5%, e manteve-se a placa em estufa (37°C e 5% de CO₂) por 48 horas. Passado o tempo de incubação, adicionou-se 50 μ L de MTT (1mg/mL) por poço, mantendo-se novamente em estufa (37°C e 5% de CO₂) por 4 horas. Posteriormente, retirou-se o meio de cultura e solubilizou-se os cristais de formazan em isopropanol, realizando-se a leitura de absorbância (540 nm) em leitor de microplacas. Os valores de IC₅₀ foram determinados utilizando-se o *software* GraphPad Prism.

3.5.3- Ensaio de Morfologia Celular

Para a realização do ensaio de morfologia celular, com o intuito de avaliar a capacidade dos complexos causarem mudanças morfológicas nas células, utilizou-se a linhagem MDA-MB-231.

Foram plaqueadas $0,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços e mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, os complexos em diferentes concentrações foram adicionados e fotos foram registradas em diferentes intervalos de tempo (0h, 24h e 48h), utilizando-se um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS100) acoplado a uma câmera Motcam 1SP 1.3 MP.

3.5.4- Ensaio de formação de Colônias

Para avaliar a influência dos complexos na capacidade das roliferar e formar colônias, células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas (300 células/poço) em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas (37°C e 5% de CO₂), adicionando-se posteriormente os complexos em diferentes concentrações e mantendo-se em incubação nas mesmas condições por 48 horas. Após esse tempo,

o meio de cultura contendo os complexos foi retirado e substituído por um novo meio, e as placas mantidas novamente em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 10 dias. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado, os poços foram limpos com PBS e as células foram fixadas utilizando uma mistura metanol/ácido acético (3:1 v/v) por 15min. As células foram então coradas utilizando corante panótico da marca Newprov.

3.5.5- Ensaio de Wound Healing

A capacidade dos compostos de influenciar na migração celular foi avaliada em células da linhagem MDA-MB-231 utilizando-se o ensaio de *Wound Healing*. Foram plaqueadas 1,0x10⁵ células/poço em placas de 12 poços e mantidas em estufa por 24 horas até adquirir uma confluência celular próxima de 100%. Com o auxílio de uma ponteira de 1 mL realizou-se uma risca na monocamada de células aderidas nos poços. O meio de cultura foi retirado, os poços cuidadosamente lavados com PBS e um novo meio contendo os complexos em diferentes concentrações foi adicionado. Foram capturadas imagens nos tempos de 0, 24 e 48 horas utilizando microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS100) acoplado a uma câmera Motcam 1SP 1.3 MP. Os dados foram então analisados no *software* Image J.

3.5.6- Análise do Ciclo Celular

Para a realização da análise de ciclo celular células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 12 poços (0,4x10⁵ células/poço) e incubadas (37°C e 5% de CO₂) por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura contendo 10% de FBS foi substituído por meio contendo apenas 2% de soro fetal bovino (FBS), incubando-se novamente por 24 horas para a sincronização das células. Os compostos foram então adicionados em diferentes concentrações, e as placas mantidas em estufa por 48 horas. O meio foi então coletado, as células tripsinizadas e também coletadas e centrifugadas em 2500 rpm à 4°C por 5 min.

Após lavagem com PBS e nova centrifugação, as células foram então fixadas com etanol 70% por 24 horas à -20°C. Posteriormente houve a retirada do etanol a partir de centrifugação, e adição de uma mistura RNase/Iodeto de Propídio seguida de incubação em estufa (37°C e 5% de CO₂) por 30 min. As amostras foram então lidas em um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob supervisão da professora Márcia Regina Cominetti.

3.5.7- Apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado em células da linhagem MDA-MB-231 utilizando o kit PE Annexin V Apoptosis Detection (BD Biosciences). As células foram semeadas em placas de 24 poços (0,4x10⁵ células/poço) e mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Soluções dos complexos em diferentes concentrações foram adicionadas as células, que foram novamente encubadas por 48 horas. Após o tempo de tratamento o meio foi recolhido, para retirada das células desaderidas, centrifugado à 4°C e 2000 rpm, e após a lavagem com PBS as células foram suspendidas em tampão de ligação (1050 µL) e retornadas para a placa. As células foram então incubadas com Anexina V-PE (Ficoeritrina) e 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (2,5 µL/ poço) por 15 minutos a temperatura ambiente e ausência de luz. Após a incubação as células foram desaderidas com o auxílio de um *cell scraper*, centrifugadas e novamente suspendidas em tampão de ligação (200 µL). A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) supervisionado pela professora Márcia Regina Cominetti. A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, utilizando-se o *software* GrapPad Prism (versão 8.0).

3.6- Estudo de Interação com Biomoléculas

3.6.1- Estudo de Interação com DNA-Titulação Espectrofotométrica

Para a realização do experimento preparou-se uma solução de CT-DNA em tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) na concentração de 1 mM, determinada a partir da absorvidade molar da banda em 260 nm ($6600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{L}$). A titulação espectroscópica foi realizada utilizando-se duas cubetas de quartzo, uma contendo tampão Tris-HCl e DMSO (Branco), e outra contendo Tris-HCl e os complexos solubilizados em DMSO (10%). Sucessivas adições de CT-DNA (30 μL) foram realizadas, nas duas cubetas, registrando os espectros a cada adição. Foram também registrados espectros realizando sucessivas adições de tampão Tris-HCl ao invés de CT-DNA, com o intuito de avaliar se o decaimento da absorbância seria decorrente da interação com a biomolécula, ou efeito de diluição.

3.6.2- Estudo de Interação com DNA-Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas utilizando um viscosímetro de Oswald em um banho com temperatura de 25°C, empregando um cronômetro para a medida do tempo de escoamento. Foram utilizadas diferentes relações DNA/complexo em DMSO (10%), e os resultados foram expressos a partir de um gráfico $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$, em que η é a viscosidade relativa do CT-DNA na presença do complexo e η_0 na ausência do complexo.

3.6.3- Estudo de Interação com DNA-Eletroforese em Gel

Para a realização do experimento de eletroforese em gel, o DNA plasmidial (pBR322) (33 μM) foi incubado com diferentes concentrações (0-14,5 μM) dos complexos em DMSO (10%) a uma temperatura de 37°C por 18 horas. Após a incubação as amostras foram resolvidas em um gel com 1% de agarose em tampão TAE (0,45 M Tris-HCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM de EDTA, pH 7,4) em 100 V por 1,5 horas, utilizando-se uma cuba de eletroforese horizontal

(Bio-Rad). Após serem corados com brometo de etídio os géis foram revelados utilizando um aparelho ChemiDoc MP, Bio-Rad.

3.6.4- Estudo de Interação com DNA-Dicroísmo Circular

Foram preparadas soluções em diferentes relações complexo/DNA e mantidas a 37°C por 18 horas. As medidas foram realizadas numa janela de 200-400 nm em um equipamento Jasco J-720, utilizando uma cubeta circular de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

3.6.5- Estudo de Interação com DNA-Ensaio de Competitividade com Hoechst322

O ensaio competitivo com Hoechst33258 foi realizado empregando-se uma placa opaca de 96 poços. Para a realização do experimento foram preparadas soluções mantendo-se a concentração de Hoechst (6,0 µM) e DNA (125 µM) constantes, e variando a concentração dos complexos em DMSO (0-125 µM (Série 1)). Os espectros de fluorescência foram obtidos em um fluorímetro Synergy/H1-Biotek em um comprimento de excitação de 343 nm.

3.6.6- Estudo de Interação com HSA

O estudo de interação dos complexos com a biomolécula HSA (Albumina de Soro Humana) foi realizado a partir do monitoramento do decaimento da intensidade de fluorescência da biomolécula em 305 nm ($\lambda_{\text{excitação}}=270$ nm). Para a realização do experimento, preparou-se uma solução de HSA (5,0 µM) em tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl/ pH 7,4), que foi então titulada com diferentes concentrações dos complexos (2,5-25 µM para complexos 1-3 e 5,0-45 µM para complexos 4-6).

As medidas foram realizadas em triplicata, utilizando uma placa opaca de 96 poços em um Fluorímetro Synergy H1 BioTek nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Síntese e Caracterização

4.1.1- Complexos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L}_n)(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$ (Série 1)

A síntese dos complexos da série 1(1-6) com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L}_n)(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$ ($\text{L}_n = \text{N}$, *N,N*-dimetil-*N'*-benzoiltioureia (L_1), *N,N*-dimetil-*N'*-tiofeniltioureia (L_2) ou *N,N*-dimetil-*N'*-furoiltioureia (L_3); P-P= 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb)) foi realizada através da substituição dos ligantes cloreto presentes nos complexos precursores ($[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppe})]$ e $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$) pelos ligantes aciltioureia, conforme demonstrado na Figura 11.

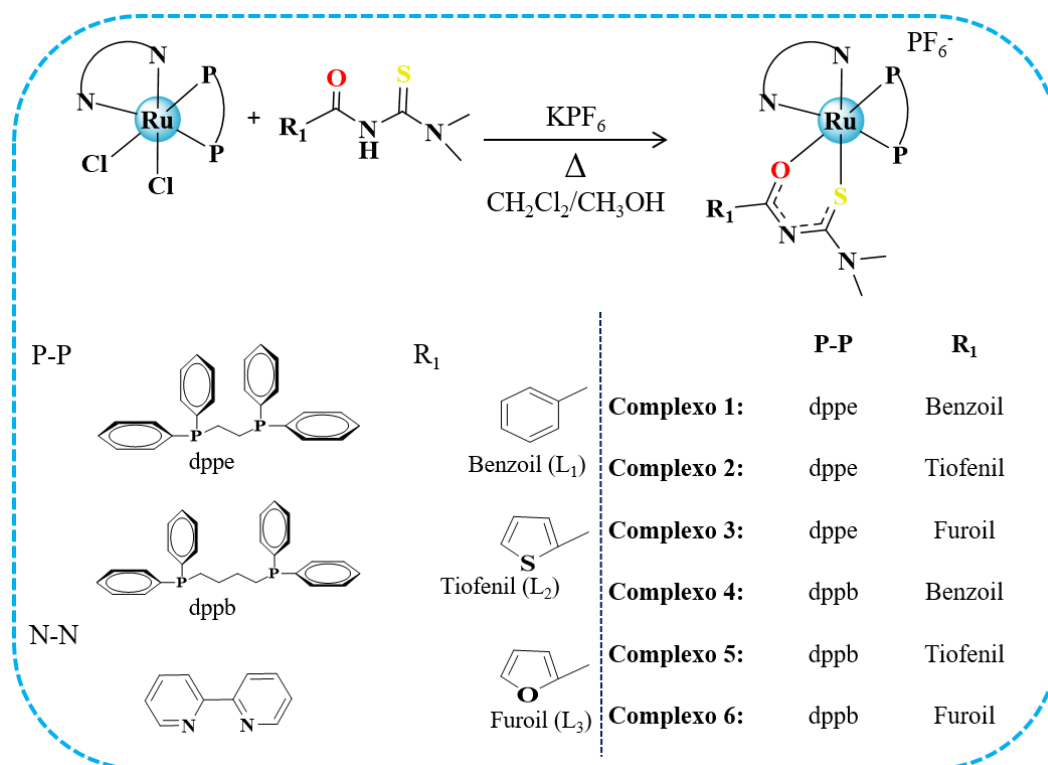


Figura 11- Esquema de síntese dos complexos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L}_n)(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$.

Todos os complexos sintetizados foram estáveis ao ar, apresentaram coloração alaranjada e foram solúveis em solventes como acetona, metanol, diclorometano, clorofórmio e DMSO.

As medidas de condutividade molar dos compostos mostraram que os mesmos são eletrólitos 1:1⁵⁸, indicando que os ligantes aciltioureias encontram-

se coordenados de forma desprotonada levando a formação de compostos catiônicos contendo o íon PF_6^- para o balanceamento de carga. Os dados de análise elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos complexos mostraram-se de acordo com as estruturas propostas, e assim como os valores de condutividade molar, encontram-se dispostos na Tabela 1.

Tabela 1- Condutividade molar e análise elementar dos complexos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L}_n)(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$.

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)	Condutividade ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
$[\text{Ru}(\text{L}_1)(\text{bipy})(\text{dppe})]\text{PF}_6$	53,85 (53,78)	4,42 (4,59)	5,46 (5,30)	3,12 (3,20)	65,3 (1:1)
$[\text{Ru}(\text{L}_2)(\text{bipy})(\text{dppe})]\text{PF}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50,33 (49,88)	4,32 (4,24)	5,34 (5,14)	6,11 (5,74)	63,4 (1:1)
$[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{bipy})(\text{dppe})]\text{PF}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	52,02 (51,76)	4,27 (4,19)	5,52 (5,37)	3,16 (2,99)	61,0 (1:1)
$[\text{Ru}(\text{L}_2)(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$	53,02 (53,42)	4,35 (4,35)	5,38 (5,43)	6,15 (5,39)	65,1 (1:1)
$[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$	52,03 (51,91)	4,65 (5,51)	5,38 (5,12)	3,02 (3,47)	61,5 (1:1)

Análise elementar: experimental (teórico); Condutividade molar em diclorometano (Faixa eletrólito 1:1: $12\text{-}77 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)⁵⁹.

Os espectros na região do infravermelho dos complexos apresentaram distinções quando comparados aos espectros dos ligantes livres (Figuras 12, A1 e A2). Inicialmente observa-se o desaparecimento da banda observada na região de 3200 cm^{-1} nos ligantes não coordenados, atribuída ao estiramento do grupo N-H, indicando a desprotonação dos mesmos após a coordenação. Outro fato importante é o deslocamento para menor número de onda observado nas bandas referente aos grupos C=O e C=S presentes nos ligantes livres, indicando que a coordenação ocorreu de maneira bidentada. Essas

alterações estão atreladas a desprotonação do grupo N-H dos ligantes que gera uma deslocalização eletrônica O-C-N-C-S, diminuindo o caráter de dupla ligação dos grupos C=O e C=S e levando a diminuição do número de onda.

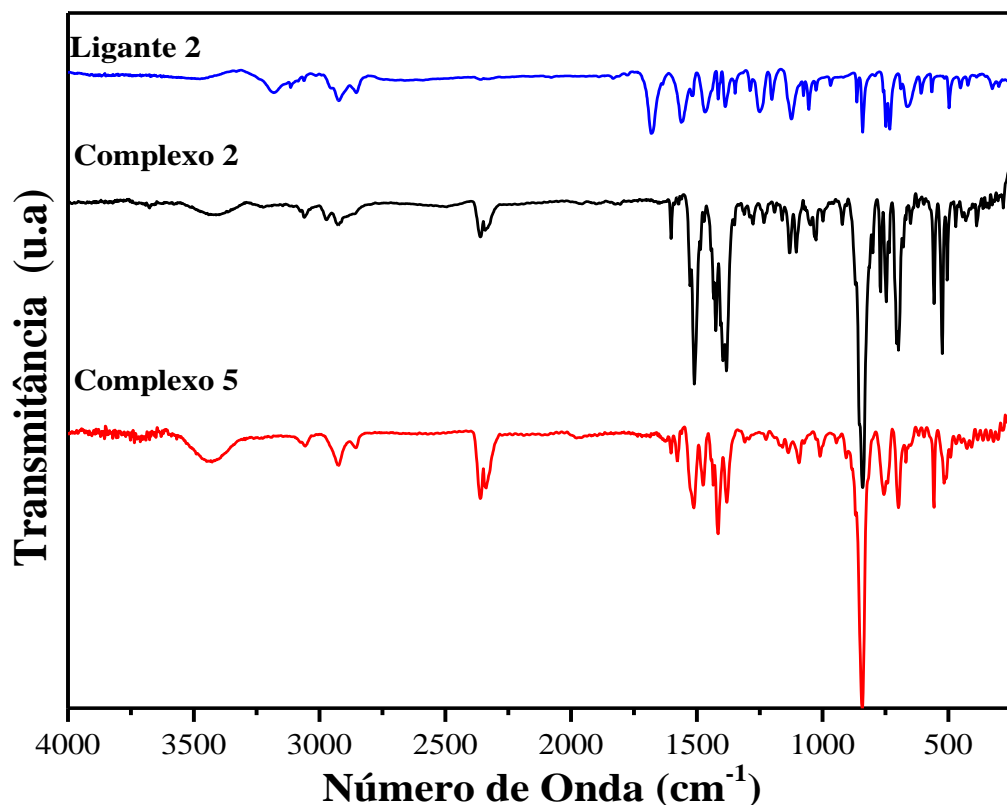


Figura 12- Espectros na região do infravermelho do ligante 2 (em vermelho) e complexo 2 (em preto).

Demais bandas características podem ser observadas nos espectros dos complexos, como a presença de uma banda intensa na região de 840 cm⁻¹ atribuída ao $\nu_{\text{P-F}}$ do contra íon PF_6^- , estando em concordância com os dados de condutividade molar obtidos, que indicaram eletrólitos 1:1. As bandas de baixa intensidade observadas na região de 525 e 503 cm⁻¹ foram atribuídas aos estiramentos $\nu_{\text{Ru-P}}^{60}$. A Tabela 2 apresenta as tentativas de atribuição dos espectros de infravermelho dos ligantes e complexos da série 1.

Tabela 2 – Bandas características na região do infravermelho dos ligantes aciltioureas e dos complexos (1-6).

	Ligantes			Complexos					
	L ₁	L ₂	L ₃	1	2	3	4	5	6
vN-H	3205	3183	3149	---	---	---	---	---	---
vC-H	2922	2924	2929	3058	3058	3058	3059	3059	3054
	2854	2854	2866	2926	2926	2926	2931	2927	2923
vC=O	1692	1680	1695	1508	1508	1528	1515	1509	1510
vC=S	1250	1254	1262	1230	1234	1223	1237	1225	1239
vP-F	---	---	---	840	839	840	841	844	842
δP-F	---	---	---	558	559	557	557	559	555
γC=S	718	733	767	701	705	699	700	700	700
vRu-P	---	---	---	526	525	527	517	514	516
				503	504	504	505	508	511

De forma a dar continuidade a caracterização estrutural dos compostos da série 1, foram obtidos os voltamogramas cíclicos dos complexos metálicos sintetizados (Figuras 13 e A4). Observou-se a presença de um processo quase reversível atribuído ao par redox Ru(II)/Ru(III) em todos os complexos. Todos os compostos apresentaram um aumento nos potenciais de oxidação quando comparados aos complexos precursores, o que está relacionado com a troca dos ligantes cloreto pelos ligantes aciltioureas, que apresentam maior caráter π -acceptor, causando maior estabilidade ao centro metálico. Observou-se que os complexos metálicos 1-3 contendo a bifosfina dppe apresentaram valores de potencial de pico anódico (E_{pa}) ligeiramente maiores quando comparados aos complexos contendo a bifosfina dppb (4-6), essa diferença pode estar relacionada aos valores de pK_a destes ligantes, onde a dppb apresenta menor acidez (pK_a= 4,72) quando comparada a dppe (pK_a= 3,86), aumentando a densidade

eletrônica no centro metálico e conseqüentemente diminuindo o potencial de oxidação^{61,62}.

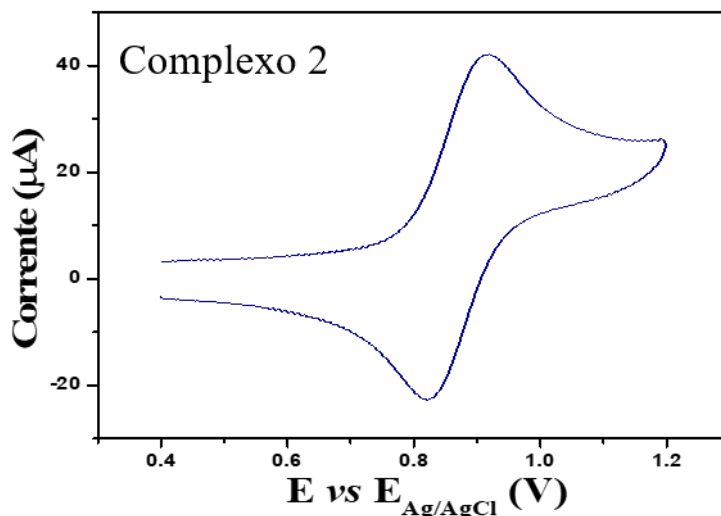


Figura 13 - Voltamograma cíclico em diclorometano do complexo 2.

A caracterização dos complexos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi realizada utilizando as técnicas de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY ^1H - ^1H , HSQC $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - ^1H e HMBQ $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - ^1H .

Os espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (Figuras 14 e 15) apresentaram um par de dupletos devido à não equivalência magnética dos átomos de fósforo dos ligantes bifosfínicos (dppe e dppb), com constantes de acoplamento de 19 Hz (complexos 1-3) e 31 Hz (complexos 4-6). Os valores de deslocamento químico após a coordenação dos ligantes aciltioureas foram alterados em relação aos complexos precursores, devido a troca dos ligantes cloreto pelos átomos de oxigênio e enxofre dos ligantes aciltioureas. Observa-se que em ambos os complexos um dos sinais sofre maior deslocamento com a coordenação, enquanto o outro sofre alterações menores, provavelmente por se manter *trans* ao átomo de nitrogênio do ligante 2,2'-bipiridina. O sinal presente na região de -144,5 confirma a presença do contra íon PF_6^- conforme observado na técnica de espectroscopia na região do infravermelho. A estabilidade dos complexos em DMSO e em uma mistura DMSO/DMEM foi avaliada por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, onde não foram observadas alterações entre o espectro inicial até o tempo de 48 horas.

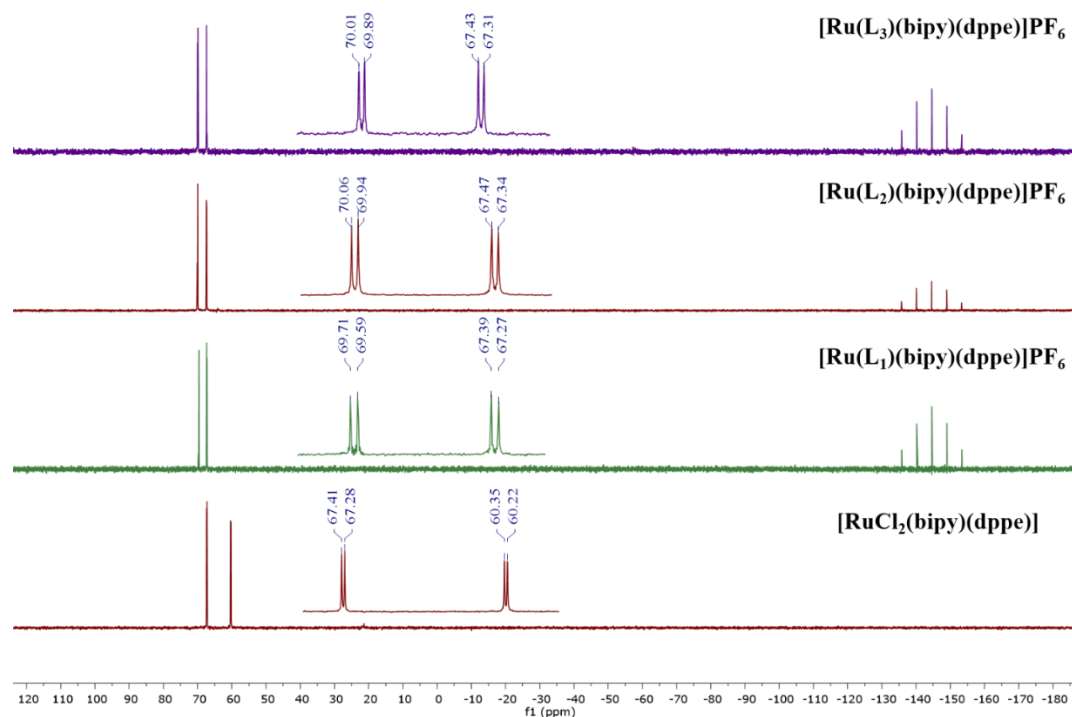


Figura 14- Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos 1-3 e do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppe})]$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

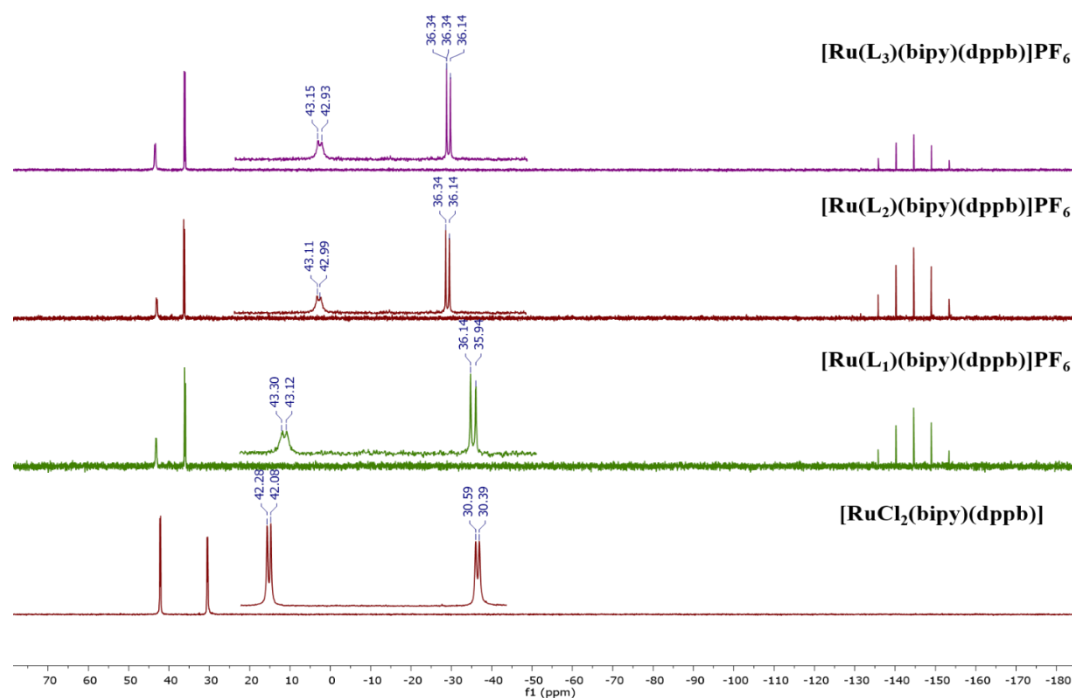


Figura 15- Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos 4-6 e do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

O RMN de hidrogênio dos compostos sintetizados mostraram-se coerentes com a estrutura proposta para os mesmos, a partir dos valores de integral obtidos. Em relação aos ligantes livres a primeira modificação observada foi a ausência do sinal atribuído ao grupo N-H, presente na região de 8,5 ppm, que é desprotonado em decorrência da coordenação, conforme já observado a partir da técnica de infravermelho. Na região de maior frequência dos espectros, pode-se observar os sinais atribuídos aos hidrogênios do ligante 2,2'-bipiridina, seguindo-se dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio presentes nos ligantes bifosfínicos e aciltioureas. Os hidrogênios alifáticos dos ligantes podem ser evidenciados na região de menor frequência do espectro. Na Figura 16 pode-se observar uma ampliação dos espectros de RMN ^1H dos complexos 2 e 5.

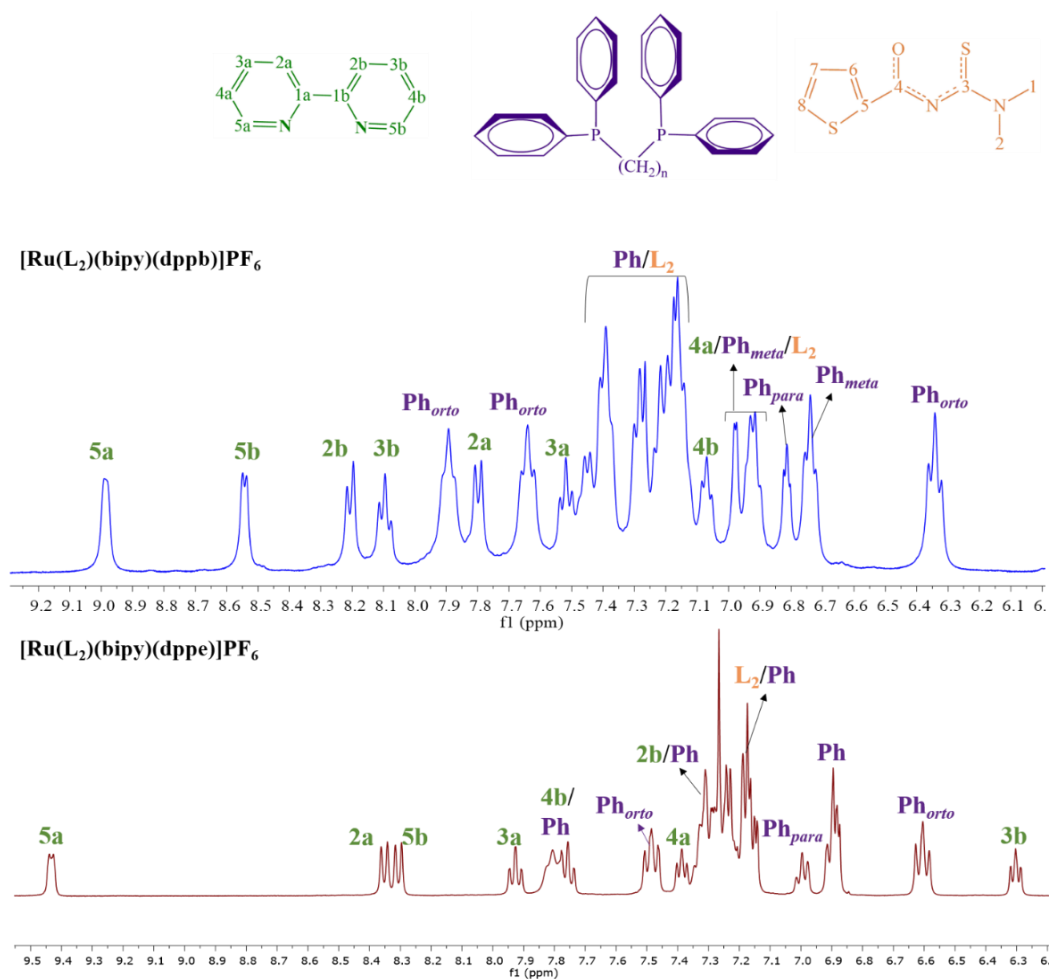


Figura 16- Ampliação dos espectros de RMN de ^1H dos complexos 2 e 5 em clorofórmio-d.

Os resultados obtidos no RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, da mesma maneira se mostram coerentes com as estruturas propostas. Os carbonos aromáticos encontram-se compreendidos na faixa de 140-120 ppm, enquanto a região alifática bastante limpa permite a observação dos carbonos atribuídos aos grupos $-\text{CH}_3$ dos ligantes aciltioureias e $-\text{CH}_2$ dos ligantes bifosfínicos. Um fato interessante observado nesses espectros quando comparados aos ligantes livres é o deslocamento observado nos átomos de carbono atribuídos aos grupos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{S}$, diretamente relacionamos a coordenação, onde nos complexos se observa uma aproximação destes sinais. Este efeito é observado em outros complexos metálicos contendo ligantes aciltioureias presentes na literatura com o mesmo modo de coordenação^{39,63,64}, e está relacionado a deslocalização eletrônica ocasionada a partir da desprotonação do ligante. A Figura 17 apresenta os espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos 2 e 5.

É importante ressaltar que todas as atribuições dos espectros de RMN ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram realizadas com o auxílio das técnicas bidimensionais, $\text{COSY}^1\text{H}-^1\text{H}$, $\text{HSQC}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}-^1\text{H}$ e $\text{HMBQ}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}-^1\text{H}$.

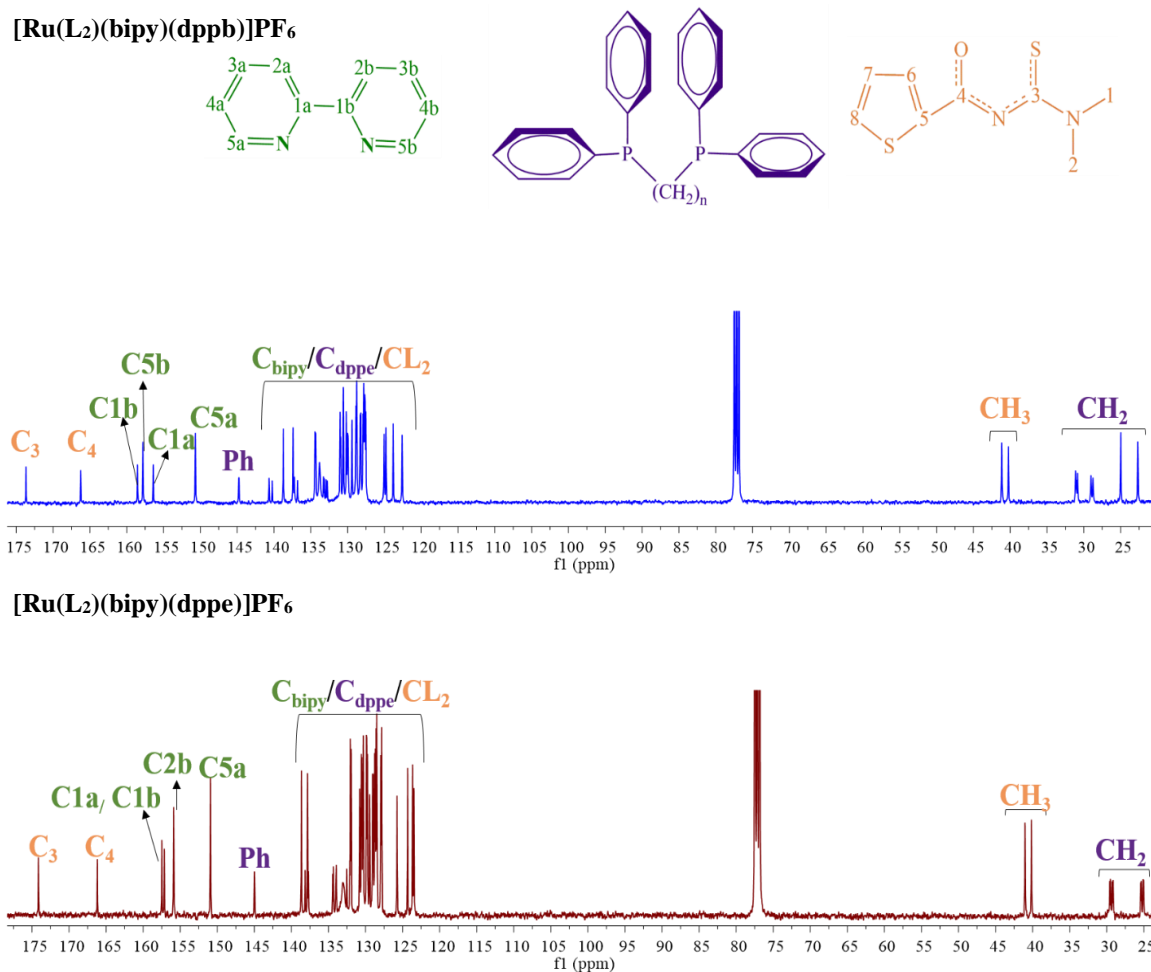


Figura 17- Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos 2 e 5 em clorofórmio-d.

Foram obtidas estruturas cristalinas para todos os complexos sintetizados, confirmando a presença dos ligantes bifosfínicos (dppe ou dppb), aciltioureas (L₁, L₂ ou L₃) e do ligante 2,2'-bipiridina, organizados em uma geometria octaédrica distorcida (Figura 18). Dados cristalográficos demonstraram que os complexos cristalizaram em um sistema monoclinico, em que os compostos 1-3 pertencem ao grupo espacial C2/c enquanto os compostos 5 e 6 pertencem ao grupo espacial P21/c. A coordenação dos ligantes aciltioureas a partir dos átomos de oxigênio e enxofre foi confirmada, e os átomos de fósforo dos ligantes bifosfínicos (dppe e dppb) foram encontrados *trans* aos átomos de oxigênio (P2 *trans* O1) dos ligantes aciltioureas e nitrogênio do ligante 2,2'-bipiridina (P1 *trans* N11). Foi possível observar alterações nos comprimentos das

ligações C-O e C-S, que após a coordenação se tornaram mais longas, diminuindo o caráter de dupla ligação, confirmando os resultados obtidos nas demais técnicas realizadas. Em decorrência da deslocalização eletrônica (O-C-N-C-S), após a coordenação observa-se uma diminuição no comprimento das ligações C1-N1 e C2-N2 em relação ao ligante aciltiourea não coordenado. Os comprimentos das ligações Ru-P, Ru-N, Ru-S e Ru-O podem ser observados na Tabela 3. Vale ressaltar que a estrutura cristalina do complexo 4 ($[\text{Ru}(\text{L}_1)(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$) já encontra-se descrita na literatura⁵⁶.

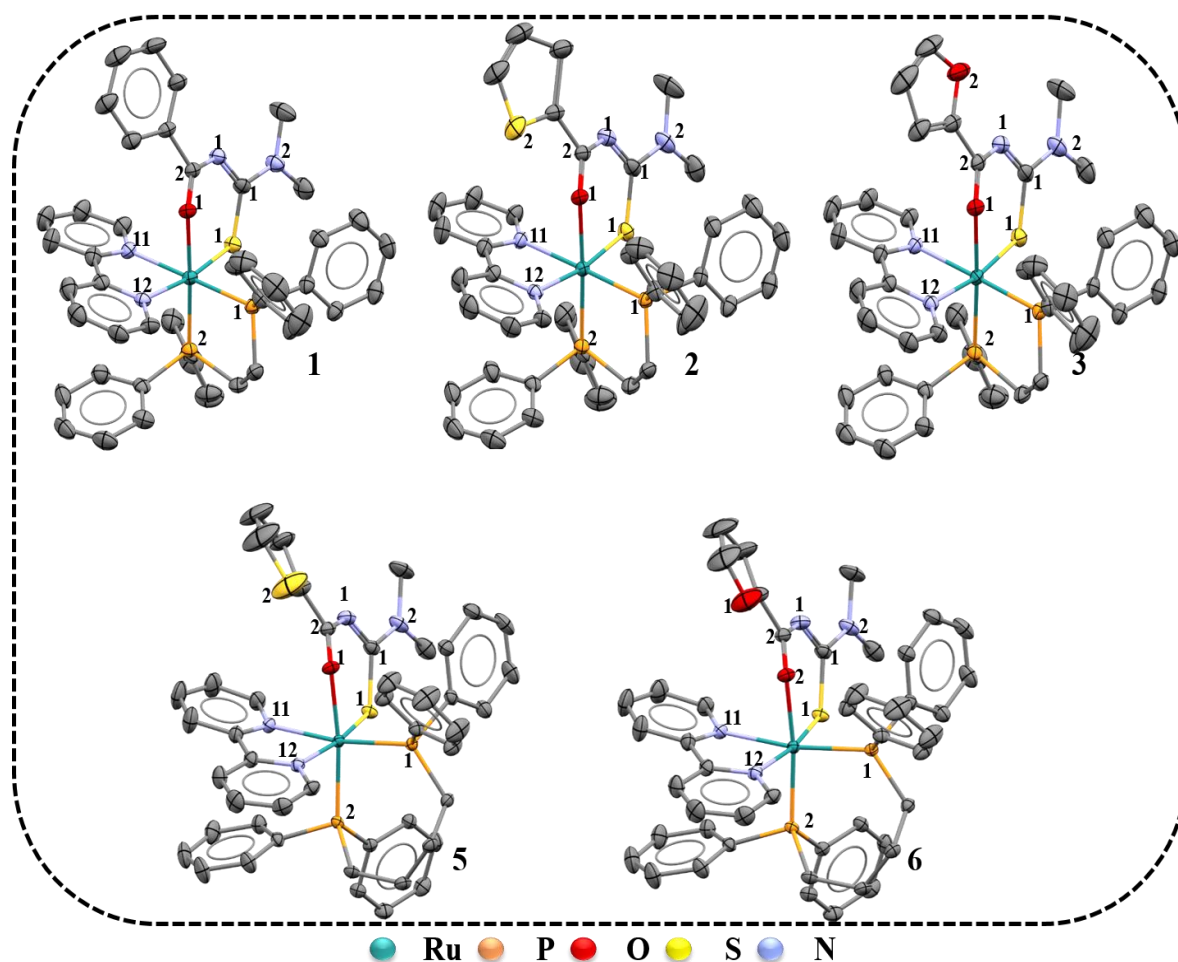


Figura 18 – Estruturas cristalinas dos complexos 1-3 e 5-6. Para melhor visualização o contra íon PF_6^- foi omitido.

Tabela 3 - Principais distâncias interatômicas (Å) para os complexos 1-3 e 5-6.

	1	2	3	5	6	L ₁	L ₂	L ₃
Ru-O(1)	2,126(3)	2,119(3)	2,124(2)	2,1231(19)	2,1174(17)	---	---	---
Ru-S(1)	2,338(11)	2,337(10)	2,3364(9)	2,3623(7)	2,3590(6)	---	---	---
Ru-N(11)	2,153(3)	2,146(3)	2,152(3)	2,128(2)	2,150(2)	---	---	---
Ru-N(12)	2,129(3)	2,127(3)	2,123(3)	2,149 (2)	2,129(2)	---	---	---
Ru-P(1)	2,2835(11)	2,2845(11)	2,2791(9)	2,3080(7)	2,3090(6)	---	---	---
Ru-P(2)	2,259(11)	2,260(10)	2,2579(9)	2,2985(7)	2,2986(6)	---	---	---
S(1)-C(1)	1,706(4)	1,719(4)	1,721(4)	1,734(3)	1,735(3)	1,6759(17)	1,6765(19)	1,6876(16)
O(1)-C(2)	1,263(5)	1,263(4)	1,260(4)	1,270(3)	1,271(3)	1,2133(19)	1,214(2)	1,2214(19)
N(1)-C(1)	1,352(5)	1,351(6)	1,348(4)	1,339(4)	1,338(3)	1,396(2)	1,404(2)	1,404(2)
N(1)-C(2)	1,321(5)	1,315(5)	1,320(4)	1,319(4)	1,315(4)	1,390(2)	1,394(2)	1,387(2)
C(6)-S(2)	---	1,600(8)	---	1,635(7)	---	---	1,692(2)	---
C(3)-S(2)	---	1,673(4)	---	1,666(4)	---	---	1,708(19)	---
C(6)-O(2)	---	---	1,376(6)	---	1,362(5)	---	---	1,365(2)
C(3)-O(2)	---	---	1,359(4)	---	1,362(4)	---	---	1,372(19)

4.1.2- Complexos com fórmula geral $[M(L_n)(dppe)]BF_4$ (Série 2)

Os complexos da série 2 com fórmula geral $[M(L_n)(dppe)]BF_4$, em que $M=Ni(II)$, $Pd(II)$ ou $Pt(II)$ e $L_n= N, N$ - dimetil- N' -benzoiltioureia (L_1) ou N, N - dimetil- N' -tiofeniltioureia (L_2) (7-12) foram sintetizados partindo dos respectivos complexos precursores ($[NiCl_2(dppe)]$, $[PdCl_2(dppe)]$ ou $[PtCl_2(dppe)]$) seguindo a rota sintética exposta na Figura 19. Os complexos sintetizados foram estáveis ao ar e solúveis em solventes como metanol, acetona e diclorometano.

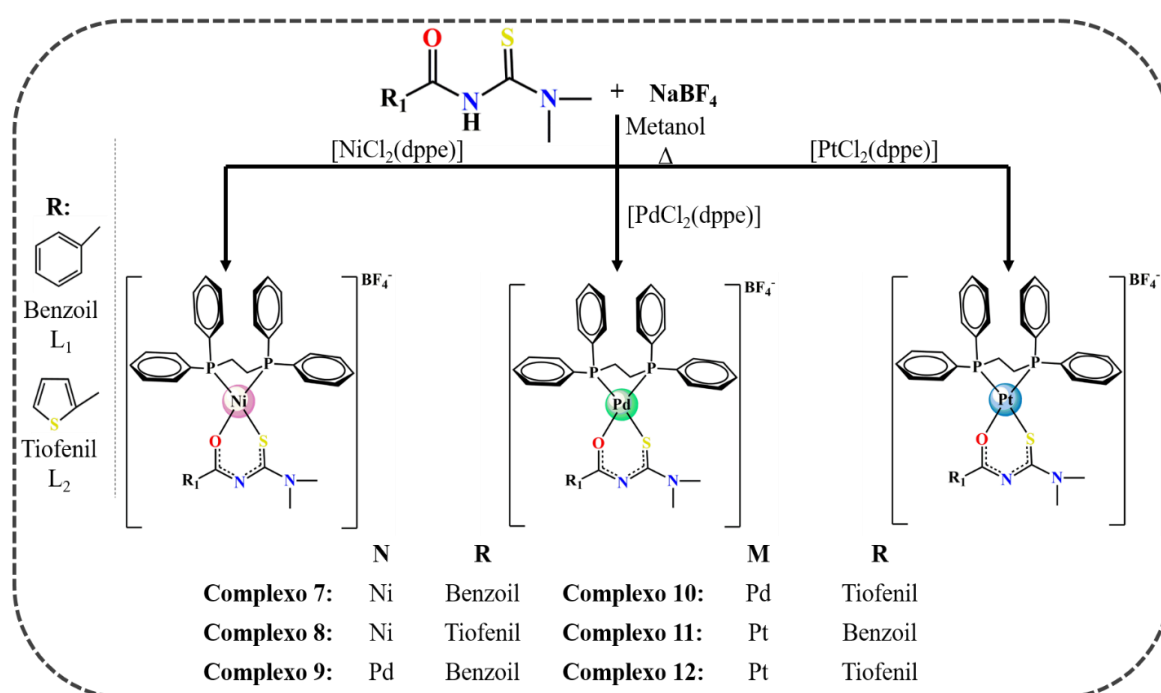


Figura 19 - Esquema de síntese dos complexos com fórmula geral $[M(L_n)(dppe)]BF_4$.

Os complexos foram inicialmente caracterizados a partir das técnicas de análise elementar e condutividade molar, os quais os dados encontram-se descritos na Tabela 4. As porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre encontradas experimentalmente estiveram de acordo com os valores teóricos, indicando a pureza dos compostos obtidos. Os valores de condutividade molar dos complexos em diclorometano indicaram que os mesmos são eletrólitos

1:1⁵⁸, indicando a presença do contra íon BF₄⁻ necessário para balancear a carga dos complexos catiônicos formados.

Tabela 4- Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos 7-12.

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)	Condutividade (S cm ² mol ⁻¹)
[NiL₁(dppe)]BF₄ · H₂O (7)	56,45 (56,21)	5,12 (4,85)	3,70 (3,64)	4,60 (4,17)	46,3
[NiL₂(dppe)]BF₄ (8)	54,36 (53,93)	4,13 (4,39)	3,79 (3,70)	8,31 (8,47)	50,0
[PdL₁(dppe)]BF₄ (9)	53,66 (54,12)	4,49 (4,42)	3,79 (3,51)	4,09 (4,01)	53,3
[PdL₂(dppe)]BF₄ (10)	50,39 (50,73)	4,33 (4,13)	3,74 (3,48)	8,11 (7,97)	56,2
[PtL₁(dppe)]BF₄ · 3H₂O (11)	46,14 (45,92)	4,04 (4,39)	3,22 (2,98)	3,81 (3,41)	49,9
[PtL₂(dppe)]BF₄ · H₂O (12)	45,00 (44,80)	3,99 (3,87)	3,47 (3,07)	7,79 (7,03)	62,6

Análise elementar: Experimental (Teórico). Condutividade molar em diclorometano (Faixa: 12-77 S cm² mol⁻¹)⁵⁹.

A caracterização por espectroscopia no infravermelho trouxe informações importantes acerca do modo de coordenação dos ligantes aciltioureas utilizados (Figuras 20 e A3). A ausência da banda intensa na região de 3200 cm⁻¹ (ligantes livres) indica a coordenação dos ligantes de maneira desprotonada. Em todos os complexos pode-se observar um deslocamento considerável para menor número de onda (cerca de 180 cm⁻¹) na banda atribuída ao grupo C=O, indicando a coordenação dos ligantes a partir do oxigênio carbonílico, fazendo com que haja uma diminuição no caráter de dupla ligação. A banda atribuída ao grupo C=S também sofreu um pequeno deslocamento após a coordenação aos respectivos íons metálicos. Os estiramentos νB-F característicos do contra íon BF₄⁻ foram observados sobrepostos em uma banda alargada na

região de 1190-998 cm^{-1} . Na região de menor número de onda dos espectros foi possível observar as bandas atribuídas aos estiramentos $\nu_{\text{M-P}}$. A Tabela 5 sumariza a atribuição tentativa dos espectros obtidos para os complexos metálicos sintetizados.

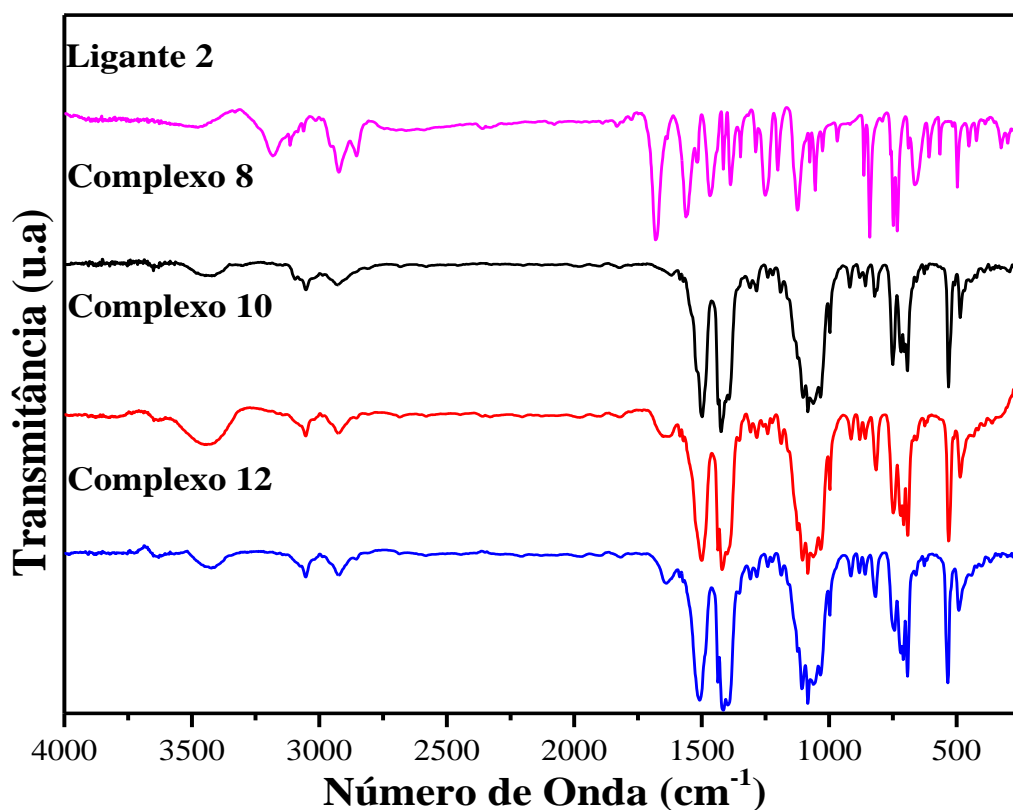


Figura 20- Espectros na região do infravermelho do ligante 2 e dos complexos (8, 10 e 12).

Tabela 5 - Atribuição tentativa dos espectros de infravermelho dos complexos com fórmula geral $[M(L_n)(dppe)]BF_4$ (7-12).

	Ligantes		Complexos					
	L ₁	L ₂	7	8	9	10	11	12
vN-H	3205	3183	---	---	---	---	---	---
vC-H	2922	2924	3053	3051	3051	3053	3056	3056
	2854	2854	2926	2930	2924	2924	2924	2924
vC=O	1692	1680	1504	1500	1504	1500	1512	1509
vC=S	1250	1254	1239	1242	1242	1240	1239	1239
vB-F	---	---	1190-	1190-	1187-	1189-	1190-	1190-
			996	998	998	996	997	997
	---	---						
γC=S	718	733	694	694	690	692	692	694
vM-P	---	---	532	531	531	531	535	534
			486	486	486	486	491	491

A caracterização dos complexos por espectroscopia de RMN foi realizada de maneira a auxiliar na elucidação estrutural dos mesmos. Foram obtidos espectros de RMN $^{31}P\{^1H\}$, 1H , $^{13}C\{^1H\}$, além de técnicas bidimensionais COSY 1H - 1H , HSQC e HMBC.

Os complexos precursores utilizados na síntese dos complexos (7-12) apresentam um singlete no espectro de RMN $^{31}P\{^1H\}$, devido a equivalência magnética dos átomos de fósforo da bifosfina dppe, que se encontram ambos *trans* a ligantes cloreto. Após a reação destes complexos com os ligantes aciltioureias utilizados nesta série de compostos, observa-se que a troca dos ligantes cloreto leva a obtenção de espectros contendo um conjunto de dupletos (Figuras 21 e A30), já que os átomos de fósforo passam a se diferenciar entre si. De maneira interessante, observa-se que as constantes de acoplamento entre os átomos de fósforo (J_{P-P}), as quais podem ser observadas na Tabela 6, se diferenciam com a mudança do íon metálico, onde os valores apresentam-se na seguinte ordem: 2J

$\text{Ni(II)} > {}^2J \text{ Pd(II)} > {}^2J \text{ Pt(II)}$, esta tendência já foi observada em outros complexos presentes na literatura⁶⁵, sugere-se que a densidade eletrônica dos átomos metálicos influencie nesta alteração.

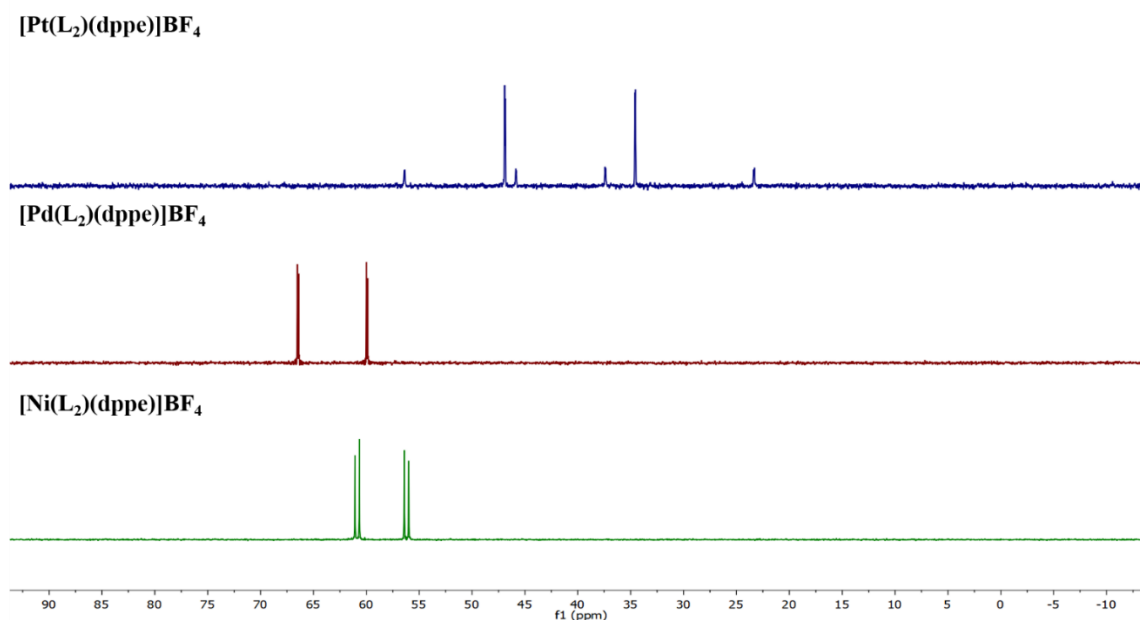


Figura 21- Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos 8, 10 e 12 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

Tabela 6- Valores de deslocamento químico e constante de acoplamento dos átomos de fósforo dos complexos (7-12).

	δ (ppm)	J_{P-P} (Hz)
Complexo 7	60,9 (d)/56,2 (d)	67
Complexo 8	61,1 (d)/56,2 (d)	67
Complexo 9	64,6 (d)/58,6 (d)	22
Complexo 10	64,6 (d)/57,9 (d)	22
Complexo 11	48,8 (d)/35,9 (d)	9,0
Complexo 12	46,9 (d)/34,6 (d)	11
[NiCl₂(dppe)]	57,5 (s)	---
[PdCl₂(dppe)]	64,7 (s)	---
[PtCl₂(dppe)]	41,6 (s)	---

O estudo de estabilidade dos complexos em DMSO e em uma mistura DMSO/DMEM foi realizado utilizando-se a técnica de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ no tempos 0h, 24h e 48h. Observou-se que os complexos contendo os íons metálicos Pd(II) e Pt(II) foram estáveis no tempo avaliado, enquanto os complexos contendo o íon metálico Ni(II) sofreram a labilização de uma parcela do ligante bifosfínico (Figura 22), tanto em DMSO quanto na mistura DMSO/DMEM, mostrando a menor estabilidade da ligação $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-P}$.

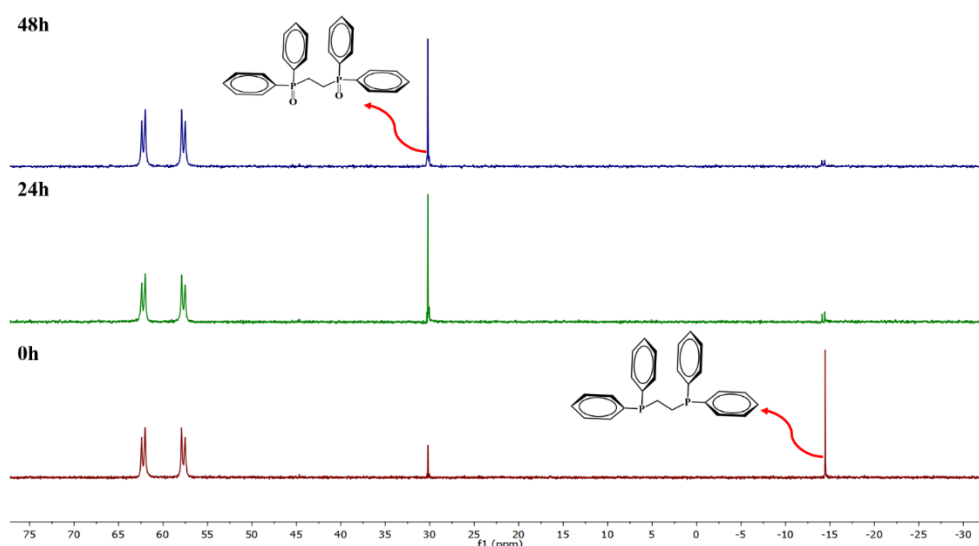


Figura 22- Espectros de RMN de ^{31}P do complexo 8 em DMSO/D₂O nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Na caracterização dos complexos por RMN ^1H foram obtidos espectros contendo valores de integral concordantes com a estrutura proposta. Os sinais atribuídos ao ligante bifosfínico dppe (orto, meta e para) foram observados em região de maior frequência, seguidos dos sinais atribuídos aos ligantes aciltioureias. A região alifática, apresenta os singletos atribuídos aos substituintes $-\text{CH}_3$ das aciltioureias, e os multipletos característicos dos grupos CH_2 do ligante dppe. É importante salientar a ausência do sinal atribuído ao grupo N-H nos ligantes livres, fato que indica a coordenação dos mesmos de maneira desprotonada, confirmando o já observado anteriormente nas demais técnicas

utilizadas. A Figura 23 apresenta os espectros de RMN ^1H dos complexos 8, 10 e 12 ampliados com a atribuição dos sinais.

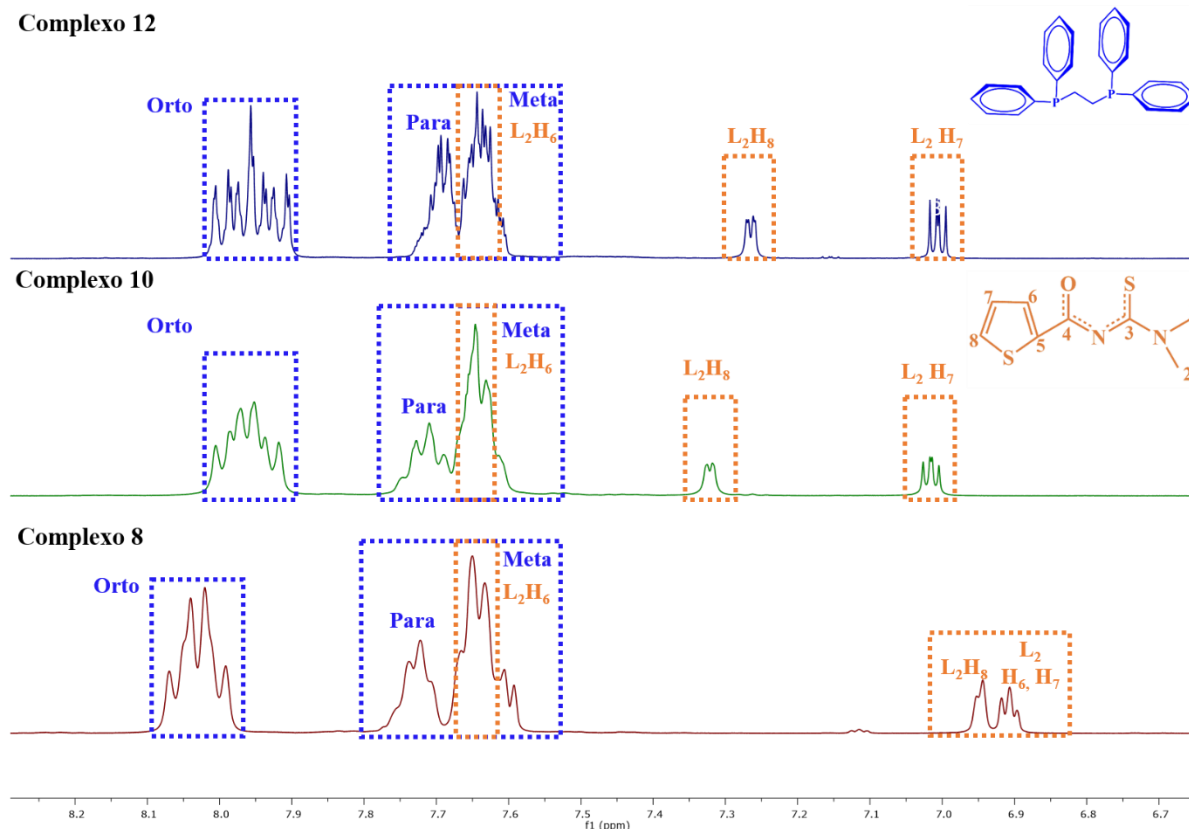


Figura 23- Ampliação dos espectros de RMN ^1H dos complexos 8, 10 e 12 em acetona- d_6 .

Como observado nos espectros de infravermelho (Figuras 20 e A3), e em demais trabalhos da literatura, a desprotonação dos ligantes a partir da coordenação de maneira bidentada, induz uma deslocalização eletrônica O-C-N-C-S, que pode ser evidenciada nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos^{42,63,66}. Ao comparar os espectros dos ligantes livres com os complexos metálicos sintetizados, observa-se um deslocamento nos sinais atribuídos aos grupos C=O e C=S, onde os mesmos são observados mais próximos após a coordenação, devido ao deslocamento do grupo C=O para a região maior frequência e do grupo C=S para menor frequência. Além disto, foram observados os sinais referentes ao ligante fosfínico, aos carbonos dos anéis dos ligantes

aciltioureas, assim como os carbonos dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ das aciltioureas e difenilfosfina dppe respectivamente. Na Figura 24 podem ser observados os espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos.

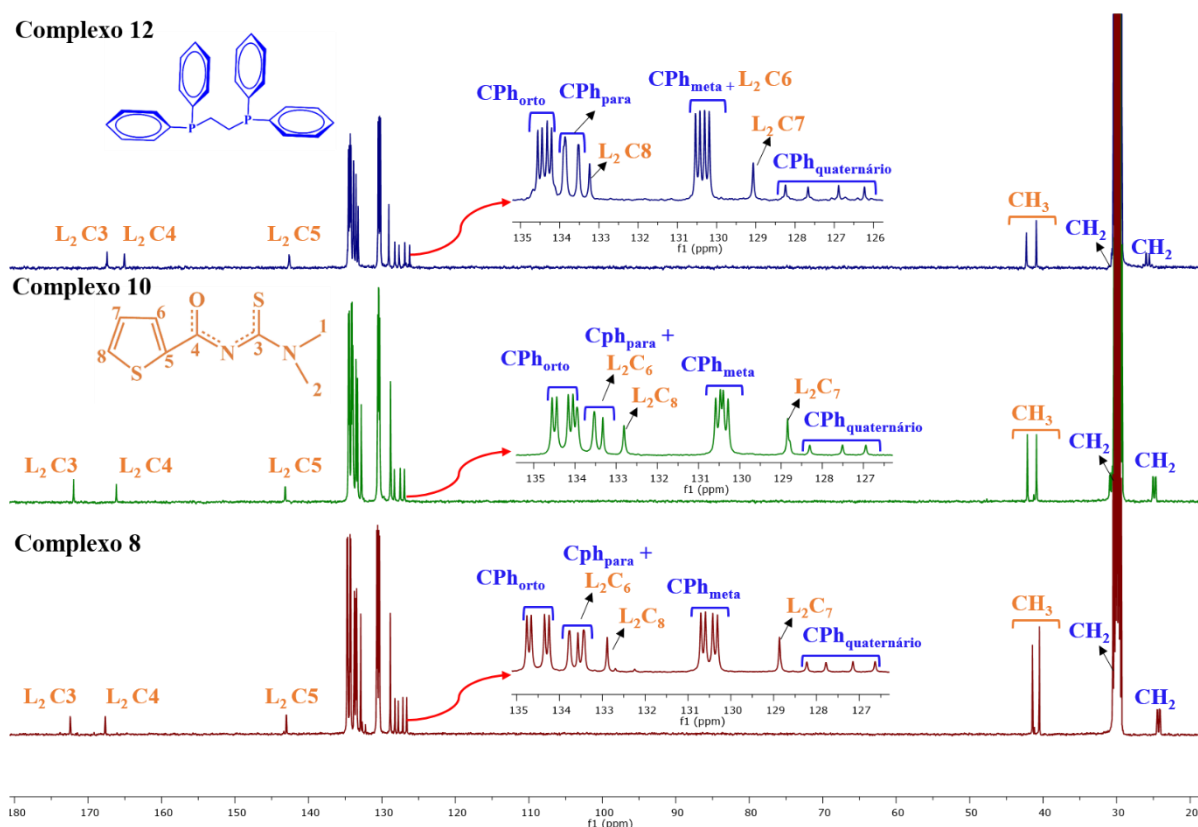


Figura 24- Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos 8, 10 e 12 em acetona- d_6 .

É importante ressaltar que todas as atribuições nos espectros de RMN ^1H e RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram realizadas com base nas técnicas bidimensionais Cosy $^1\text{H}-^1\text{H}$, HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$.

A partir da recristalização dos complexos em uma mistura diclorometano/metanol (1:1), foram obtidos cristais adequados para difração de raios x para os complexos estudados na série 2, no entanto, o complexo 9 não apresentou parâmetros cristalográficos adequados. Os compostos apresentaram uma geometria quadrado planar distorcida, contendo a bifosfina dppe coordenada de maneira bidentada, onde os átomos de fósforo encontraram-se *trans* aos átomos de oxigênio e enxofre dos grupos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{S}$ dos ligantes

aciltioureias (P1 *trans* O1 e P2 *trans* S1), assim como sugerido pelas demais técnicas de caracterização (Figura 25). A presença do contra-íon BF_4^- também pode ser confirmada a partir desta técnica.

Os complexos com centro metálico de Ni^{II} (7 e 8) cristalizaram em um sistema cristalino monoclinico com grupo espacial P2_1 , apresentando duas moléculas por célula unitária, enquanto os complexos de Pd^{II} e Pt^{II} (10, 11 e 12) cristalizaram em sistema cristalino monoclinico com grupo espacial P-1 e uma molécula por célula unitária. É importante ressaltar que apesar dos complexos 7 e 8 apresentaram duas moléculas por célula unitária, não existem grandes diferenças nas distâncias e ângulos de ligação entre estas.

Algumas alterações foram observadas a partir da coordenação dos ligantes aciltioureias aos íons metálicos. As ligações C-O e C-S diretamente relacionadas a coordenação, foram encontradas mais longas quando comparadas aos ligantes livres, e conseqüentemente foi observada uma diminuição nas ligações C-N, devido a deslocalização eletrônica induzida a partir da formação dos complexos metálicos. Estes dados encontram-se de acordo com os resultados obtidos nas técnicas de espectroscopia no infravermelho e RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$.

Apesar da alteração do íon metálico (Ni^{II} , Pd^{II} e Pt^{II}), as distâncias de ligação M-O, M-S, M-P1 e M-P2 encontradas foram bastante próximas, não havendo grandes alterações com a mudança do centro metálico, assim como os ângulos P1-M-P2, que se mantém bastante próximos independente do íon metálico utilizado. Contudo, ao avaliar os ângulos O1-M-P1, maiores valores são observados para os complexos de níquel em comparação aos complexos de paládio e platina. A Tabela 7 apresenta os principais ângulos e distância de ligação para os complexos.

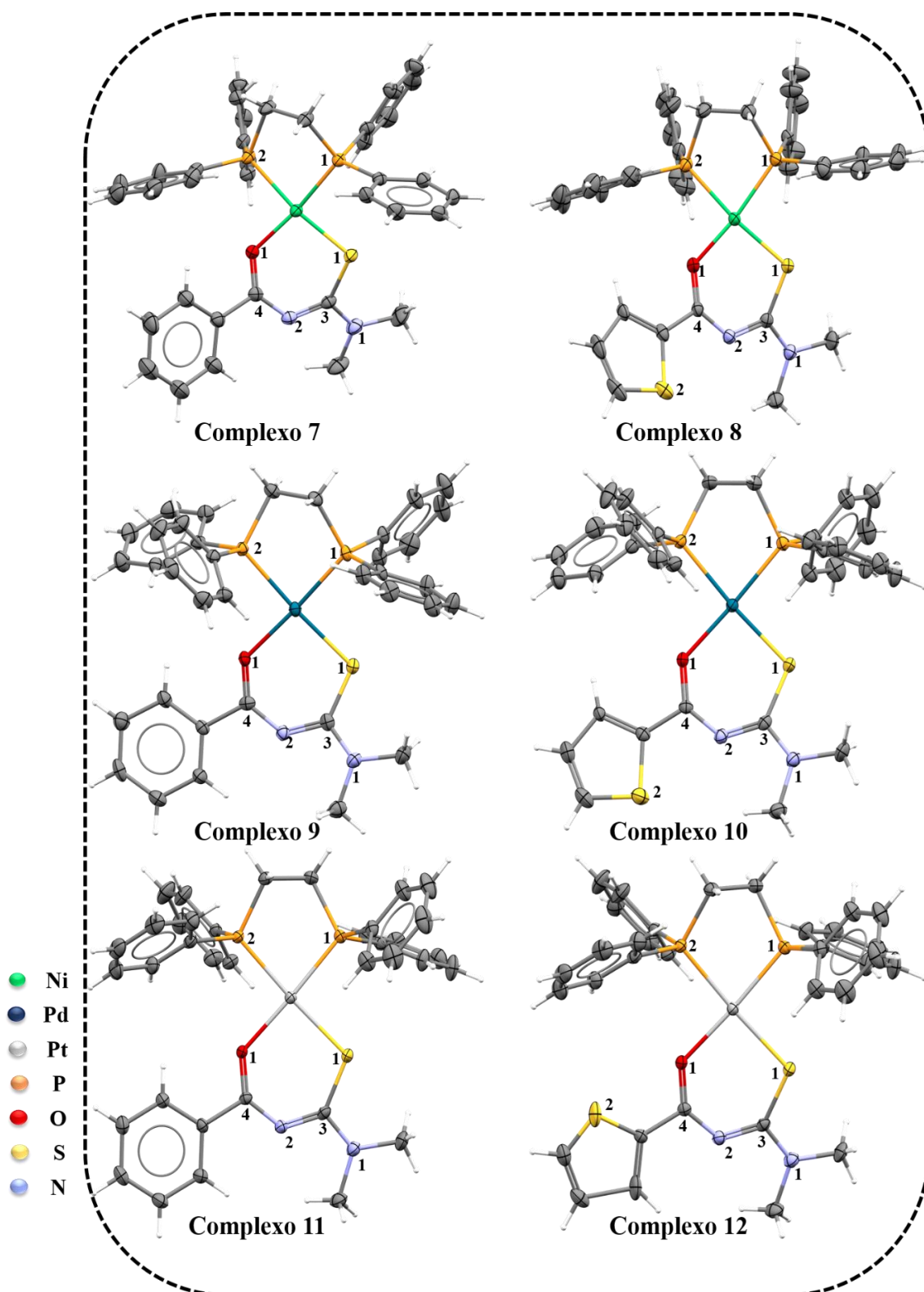


Figura 25- Estruturas cristalográficas dos complexos (7-12). O contra-íon BF_4^- foi omitido para melhor visualização.

Tabela 7- Principais ângulos e distâncias de ligação dos complexos.

	Distância de Ligação (Å)							
	Complexos						Ligantes	
	7	8	9	10	11	12	1	2
P1-M	2,155(2)	2,1465(13)	2,234(2)	2,2219(9)	2,2104(7)	2,2099(8)	---	---
P2-M	2,1997(18)	2,1852(13)	2,292(2)	2,2812(9)	2,2642(7)	2,2658(8)	---	---
O1-M	1,857(5)	1,864(3)	2,062(6)	2,056(2)	2,0580(18)	2,0624(19)	---	---
S1-M	2,1712(18)	2,1618(13)	2,316(2)	2,3100(9)	2,3024(7)	2,3056(8)	---	---
S(1)-C(3)	1,734(7)	1,722(5)	1,721(10)	1,728(4)	1,721(3)	1,727(3)	1,6759(17)	1,6765(19)
O(1)-C(4)	1,290(8)	1,267(6)	1,258(11)	1,259(4)	1,258(3)	1,266(3)	1,2133(19)	1,214(2)
N(2)-C(3)	1,349(8)	1,352(6)	1,347(12)	1,335(4)	1,331(4)	1,336(4)	1,396(2)	1,404(2)
N(1)-C(4)	1,306(8)	1,309(6)	1,330(12)	1,311(4)	1,307(3)	1,309(4)	1,390(2)	1,394(2)
	Ângulos (°)							
	Complexos						Ligantes	
	7	8	9	10	11	12	1	2
C4-N2-C3	125,0(6)	124,1(4)	128,6(9)	127,7(3)	128,0(3)	128,0(3)	123,76(14)	123,32(15)
O1-M-S1	97,42(15)	97,50(11)	92,12(18)	92,28(7)	91,95(5)	92,43(6)	---	---
P1-M-P2	83,91(7)	84,15(5)	84,49(9)	84,56(3)	85,50(3)	85,48(3)	---	---
O1-M-P1	172,15(15)	171,91(12)	175,48(19)	176,49(7)	176,17(6)	176,21(6)	---	---
S1-M-P2	168,90(7)	169,07(5)	175,93(9)	175,40(3)	176,57(3)	176,60(3)	---	---

4.2- Ensaios Biológicos

4.2.1- Série 1

4.2.1.1- Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

Após serem sintetizados e caracterizados, os complexos da série 1 foram avaliados em linhagens tumorais e não tumorais de mama (MDA-MB-231 (tumoral) e MCF-10A (não tumoral)) e pulmão (A549 (tumoral) e MRC-5 (não tumoral)). A determinação dos valores de IC₅₀ dos compostos foi realizada utilizando-se o ensaio com MTT, que consiste na redução deste no interior da mitocôndria em células viáveis, levando a formação de azul de formazan, que apresenta-se como cristais com coloração violeta, que podem ser quantificados a partir da espectroscopia de UV-Vis.

A Tabela 8 apresenta os valores de IC₅₀ obtidos para os complexos e os ligantes nas linhagens celulares avaliadas. Todos os compostos apresentaram boa atividade nas linhagens tumorais de mama e pulmão, com valores de IC₅₀ consideravelmente baixos, inclusive quando comparados ao fármaco cisplatina. Quando avaliados frente às linhagens não tumorais, pode-se observar que os complexos de rutênio apresentaram menor citotoxicidade, indicando que os mesmos apresentam maior seletividade para as linhagens tumorais de mama e pulmão.

Todos os ligantes aciltioureias utilizados, não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (>100 µM), de forma que os complexos foram mais eficientes que os ligantes não coordenados. De maneira geral todos os complexos apresentaram valores de IC₅₀ bastante semelhantes, indicando que as alterações estruturais realizadas nos ligantes aciltioureias (substituinte R₁), bem como a alteração na cadeia alifática do ligante fosfínico (dppe ou dppb), não foram capazes de causar grandes alterações na citotoxicidade dos complexos metálicos.

Tabela 8- Valores de IC₅₀ (μM) dos complexos (1-6) e ligantes (1-3).

	MDA-MB-231	MCF-10A	*IS ₁	A549	MRC-5	*IS ₂
1	0,21 ± 0,04	0,58 ± 0,09	2,7	0,25 ± 0,06	0,81 ± 0,09	3,2
2	0,13 ± 0,01	0,55 ± 0,13	4,4	0,15 ± 0,02	0,68 ± 0,05	4,4
3	0,13 ± 0,05	0,67 ± 0,14	5,0	0,25 ± 0,03	0,75 ± 0,03	3,0
4	0,13 ± 0,02	0,77 ± 0,13	5,9	0,23 ± 0,01	0,72 ± 0,02	3,1
5	0,12 ± 0,02	0,74 ± 0,03	6,2	0,23 ± 0,02	0,59 ± 0,05	2,5
6	0,11 ± 0,02	0,77 ± 0,08	6,9	0,25 ± 0,02	0,77 ± 0,08	3,1
L₁	>100	>100	---	>100	>100	---
L₂	>100	>100	---	>100	>100	---
L₃	>100	>100	---	>100	>100	---
Cisplatina	2,44 ± 0,20	23,9 ± 0,70	9,8	14,40 ± 1,40	29,09 ± 0,78	2,0

*IS₁ (Índice de Seletividade): MCF-10A/MDA-MB231; *IS₂ (Índice de Seletividade): MRC5/A549.

Apesar de os compostos terem apresentado bons resultados em ambas as linhagens tumorais avaliadas, foi observado um índice de seletividade ligeiramente melhor quando avaliados frente a linhagem tumoral de mama em (MDA-MB-231), o que nos levou a selecioná-la para dar seguimento aos demais ensaios biológicos. É importante salientar que a linhagem MDA-MB-231 é considerada uma linhagem de câncer de mama triplo negativa (TNBC), sendo por este motivo uma linhagem cancerígena muito agressiva e metastática. Desta forma a boa atividade apresentada pelos compostos nesta linhagem tumoral é promissora.

Para a realização dos demais ensaios, dois complexos desta série foram selecionados, sendo eles os complexos 3 e 6, contendo o mesmo substituinte R₁ nos ligantes aciltioureas e diferentes ligantes fosfínicos (dppe (**3**) e dppb (**6**)). Assim, os demais resultados biológicos apresentados serão referentes aos complexos selecionados.

4.2.1.2- Ensaio de Formação de Colônias

O ensaio de sobrevivência clonogênica consiste em avaliar a capacidade de uma célula sobreviver e formar colônias após o tratamento com os complexos metálicos de rutênio(II). Após 48h de tratamento das células com diferentes concentrações dos compostos, o meio de cultura foi retirado e a capacidade de sobrevivência foi avaliada por um período de 10 dias. Foi possível observar que os complexos foram capazes de diminuir a capacidade de formação de colônias das células da linhagem MDA-MB-231, de maneira que a diminuição foi mais evidenciada com o aumento da concentração, não sendo observadas colônias nas maiores concentrações avaliadas. Os resultados obtidos demonstram os efeitos citotóxicos dos complexos metálicos, e a dependência destes efeitos da concentração dos mesmos e podem ser evidenciados na Figura 26.

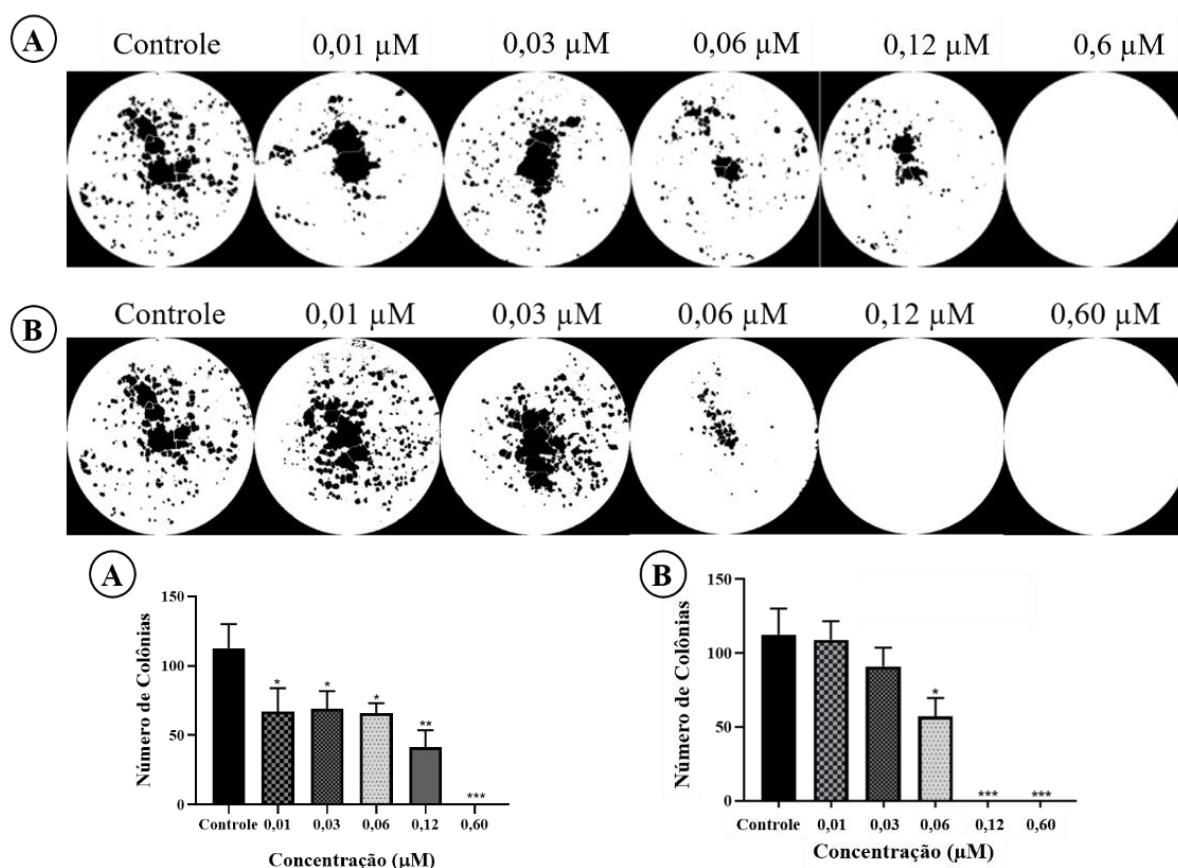


Figura 26- Efeito dos complexos 3 (A) e 6 (B) na formação de colônias de células da linhagem MDA-MB-231. Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$ utilizando ANOVA.

4.2.1.3- Ensaio de Morfologia Celular

Com o intuito de investigar as alterações morfológicas que os complexos 3 e 6 poderiam causar em células da linhagem tumoral MDA-MB-231, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos de rutênio (0,01, 0,06, 0,12, 0,60 e 1,2 μM), e imagens foram registradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas. As Figuras 27 e 28 apresentam os efeitos dos complexos 3 e 6 na linhagem tumoral de mama (MDA-MB-231) nos diferentes tempos e concentrações avaliados.

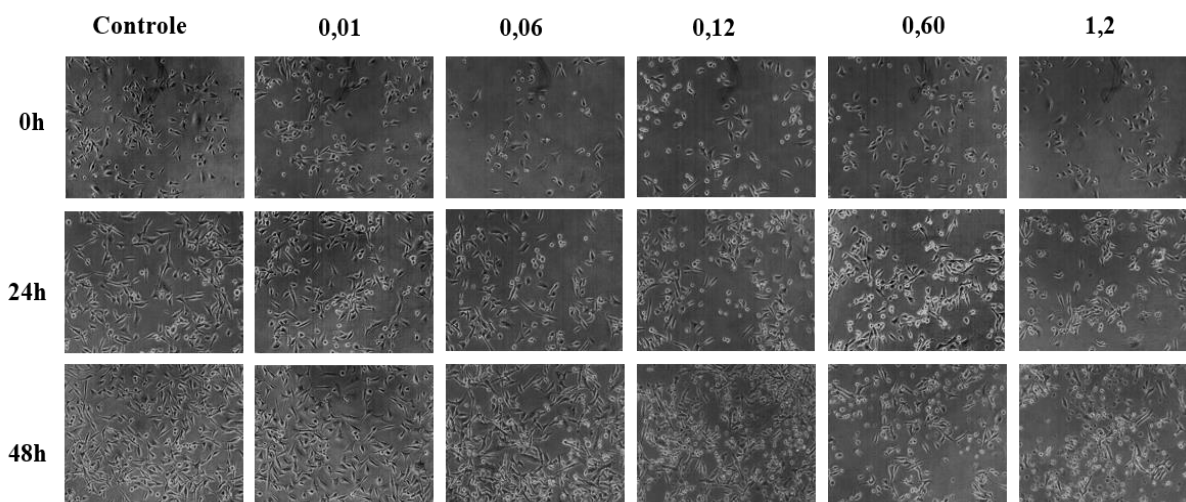


Figura 27- Efeito do complexo 3 na morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações (μM).

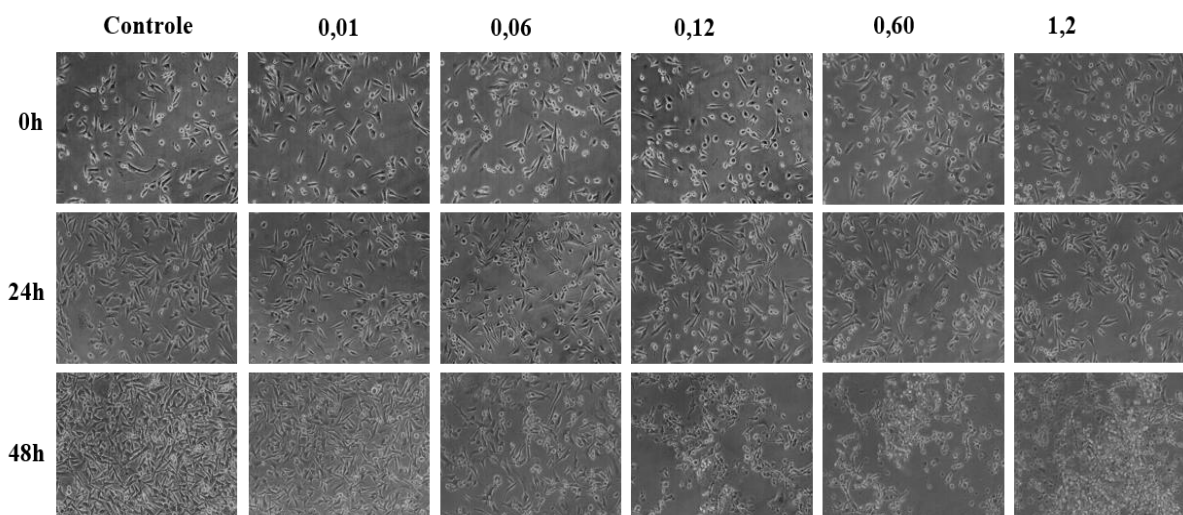


Figura 28- Efeito do complexo 6 na morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações (μM).

Pode-se observar que quando tratadas com os compostos a partir da concentração de $0,06 \mu\text{M}$ ocorre uma diminuição da confluência celular em comparação com o controle (DMSO 0,5%), na concentração do IC_{50} ($0,12 \mu\text{M}$), além da diminuição na confluência celular, podem ser observadas células em formato circular, com o aumento da concentração mais células em formato circular e desaderidas foram observadas, principalmente para o complexo 6, estes fatores são indícios de morte celular.

4.2.1.4- Ensaio de Migração Celular – Wound Healing

A capacidade dos complexos de inibir a migração celular em células tumorais de mama (MDA-MB-231) foi avaliada a partir do ensaio de *Wound Healing*, uma vez que a migração encontra-se presente no processo de metástase⁶⁷. Ao observar a influência dos compostos nos tempos avaliados (0, 24 e 48h), é possível notar que quando comparadas ao controle (0,5% DMSO), as células tratadas com os complexos 3 e 6 apresentaram diminuição na capacidade migratória, em todas as concentrações avaliadas ($0,01$, $0,03$ e $0,06 \mu\text{M}$), de forma que esta inibição foi superior com o aumento da concentração dos complexos de rutênio(II), tendo-se nas maiores concentrações uma inibição de cerca 60% do

fechamento da risca, comparativamente ao controle (Figura 29). É importante ressaltar que as concentrações dos compostos foram inferiores aos valores de IC_{50} .

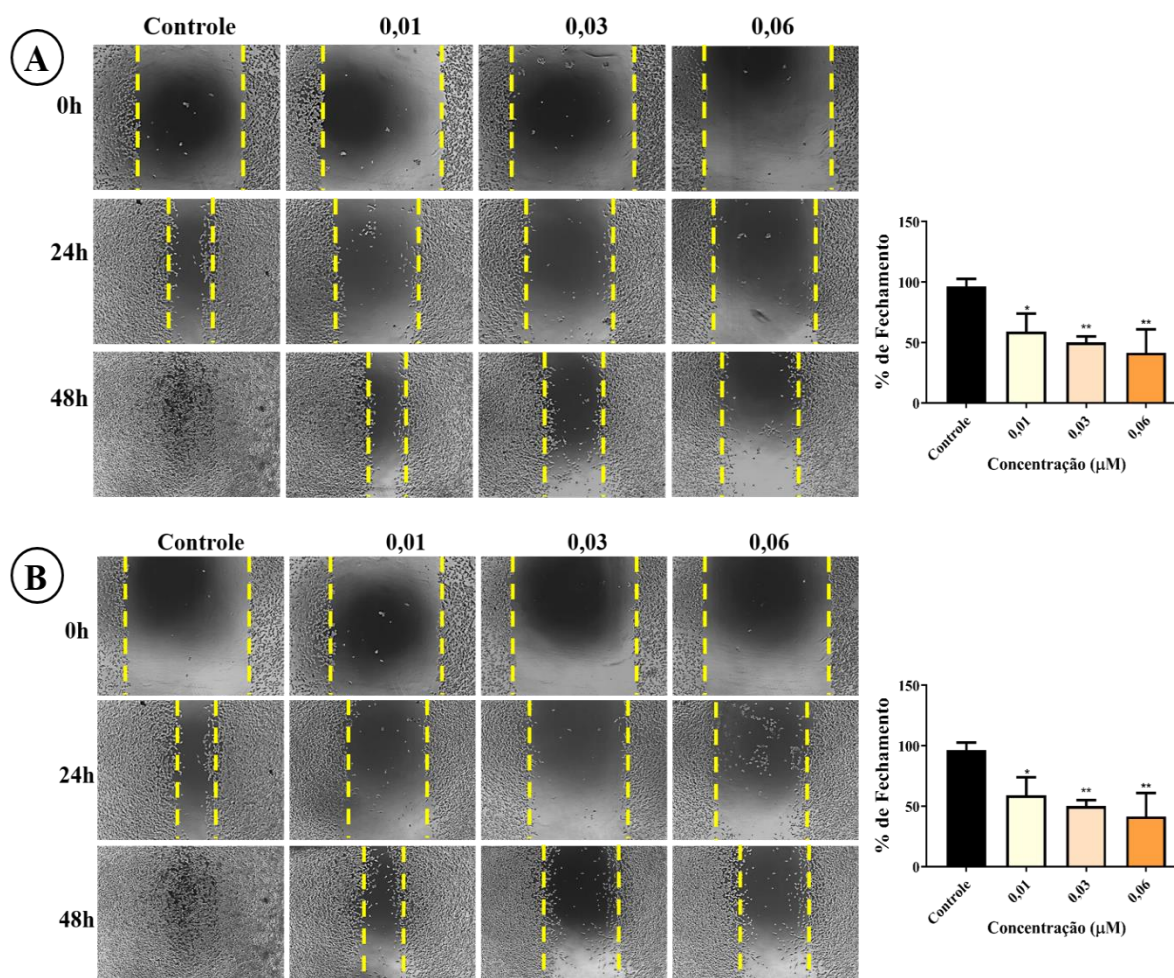


Figura 29- Efeito dos complexos 3 (A) e 6 (B) em diferentes concentrações (μM) na migração celular da linhagem MDA-MB-231 a partir do ensaio de *Wound Healing*. Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em \pm DS ($n=3$).

4.2.1.5- Avaliação do Ciclo Celular

O ciclo celular é uma sequência de eventos que levam as células a crescerem e se multiplicarem. Este processo se divide em 4 fases, denominadas G1, S, G2 e M representadas na Figura 30. Na fase G1 a célula se prepara para a síntese do DNA que será realizada na fase S, enquanto na fase G2, ocorre a preparação para a divisão celular ocorrida na fase M. As células podem também se encontrar em um estado de “dormência”, em uma fase conhecida como G0, não ocorrendo a proliferação. Durante o ciclo existem três pontos de checagem, que são mecanismos de controle e desenvolvimento celular, onde avalia-se se as células irão ou não progredir no ciclo, o que ocorrerá somente se as mesmas estiverem adequadas, como por exemplo não apresentando danos no DNA. Sabe-se que a falha destes pontos de checagem é uma característica de células cancerígenas¹⁰.

Dessa maneira diversos compostos estudados para o tratamento do câncer são avaliados com relação a sua capacidade de influenciar alguma fase do ciclo celular.

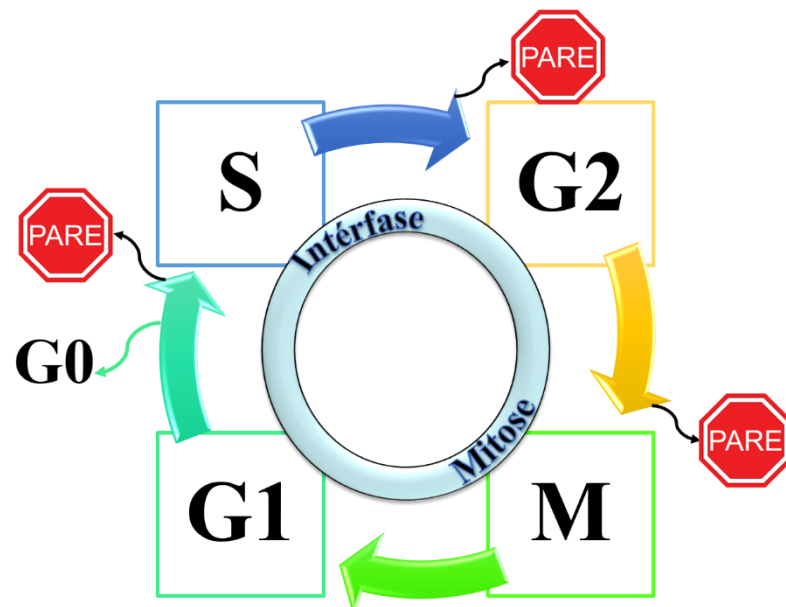


Figura 30- Fases do Ciclo celular. Fonte: Próprio autor.

A influência dos complexos de rutênio na distribuição no ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 foi avaliada a partir da técnica de citometria de fluxo. Na Figura 31 pode-se observar que quando comparadas ao controle, nas diferentes concentrações dos compostos ocorre um aumento de células em Sub-G1, de forma que nas maiores concentrações avaliadas esse aumento é mais considerável. Além dessas alterações pode-se notar também uma diminuição da população de células na fase G2, principalmente a partir da concentração de 0,6 μ M. O acúmulo de células em Sub-G1 pode ser um indício de que os compostos estão induzindo apoptose. Este mesmo comportamento já foi observado por outros complexos de rutênio, inclusive contendo ligantes aciltioureas^{42,68}.

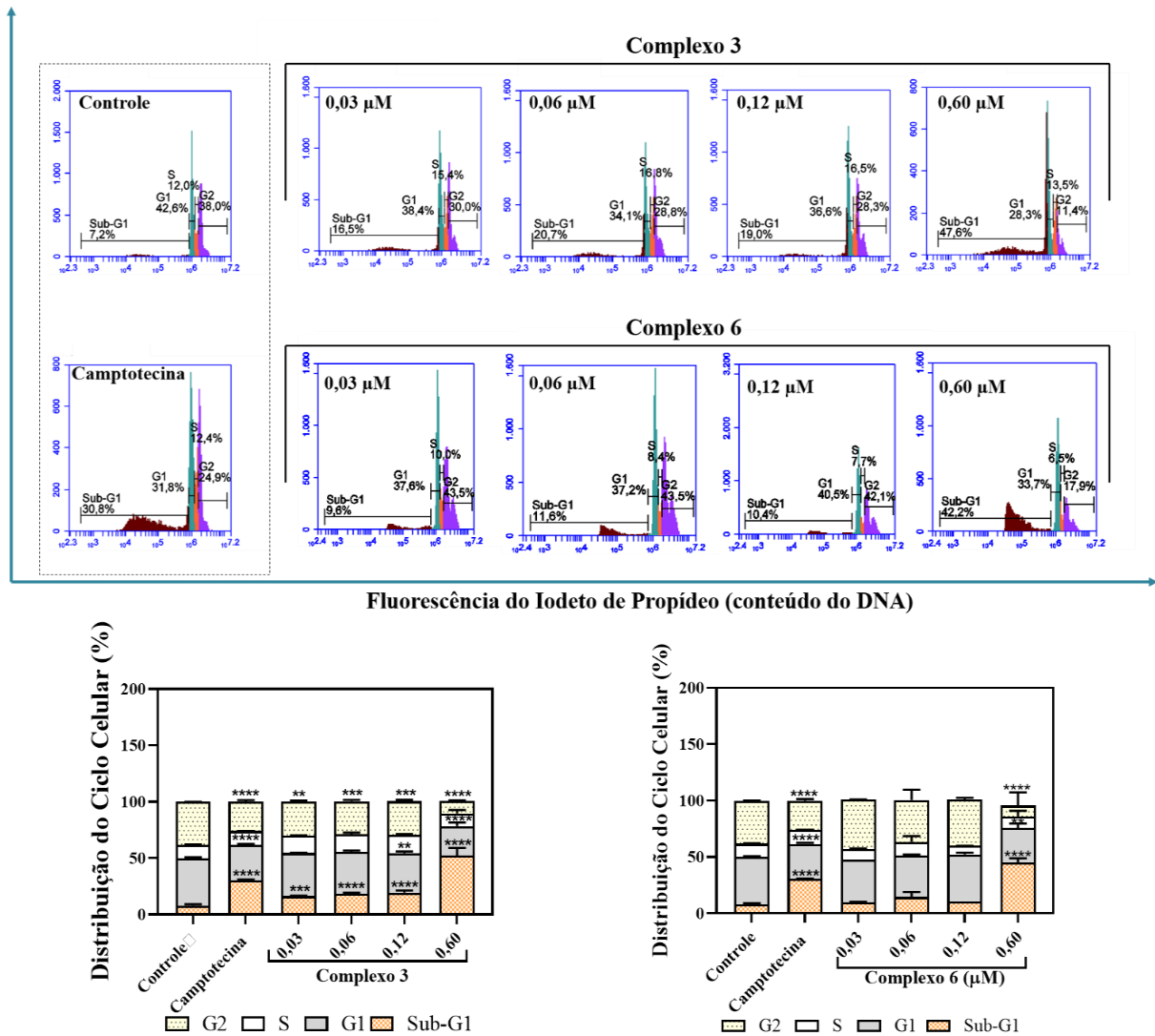


Figura 31-Efeito dos complexos 3 e 6 na distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações). Significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ usando ANOVA. Os dados foram expressos em \pm DS (n=3).

4.2.1.6- Apoptose

A morte celular pode ocorrer por diferentes mecanismos, dentre estes a apoptose e necrose estão entre os mais comuns. A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento, podendo também ocorrer como mecanismo de defesa a reações adversas, como quando células acabam sendo danificadas por doenças ou agentes nocivos. Este mecanismo de morte celular ocorre de maneira programada, e mudanças morfológicas ocorrem nas células apoptóticas, como o encolhimento e condensação, no entanto não ocorre exposição de seu conteúdo celular, não causando nenhuma resposta inflamatória prejudicial. A morte celular por necrose ocorre acidentalmente, desencadeada por traumas ou falta de nutrientes. Diferentemente da apoptose, as células em necrose sofrem um inchaço que leva ao extravasamento do conteúdo celular, causando danos inflamatórios.

Diante do exposto, espera-se que compostos estudados para o tratamento do câncer induzam a morte celular via apoptose, de forma a não causar respostas inflamatórias.

Os complexos 3 e 6 foram avaliados com relação ao mecanismo de morte celular induzido. O ensaio foi realizado por citometria de fluxo, utilizando-se o kit Anexina V-PE. Conforme observado na Figura 32, neste ensaio as células encontram-se divididas em diferentes quadrantes, em que no primeiro quadrante tem-se a população de células viáveis, enquanto os quadrantes 2 e 3 representam as células em apoptose inicial e tardia, respectivamente e o quarto quadrante as células em necrose.

Ao avaliar os resultados obtidos para os complexos de rutênio, pode-se observar que o tratamento com diferentes concentrações dos compostos ocasionou um aumento na população de células da linhagem MDA-MB-231 em apoptose quando comparadas ao controle (5,4% (apoptose inicial + apoptose tardia), tendo-se um aumento de 23,7, 35,3 e 73 % para o complexo 3 nas concentrações de 0,06, 0,12 e 0,6 μ M respectivamente. Para o complexo 6 nas

concentrações 0,03, 0,06, 0,12 e 0,6 μM observou-se uma porcentagem de 25,5, 29, 72,8 e 77,7% de células em apoptose, indicando que em ambos os compostos o efeito é dependente da concentração e demonstrando que os complexos induzem a morte celular por apoptose, conforme sugerido pelo experimento de ciclo celular.

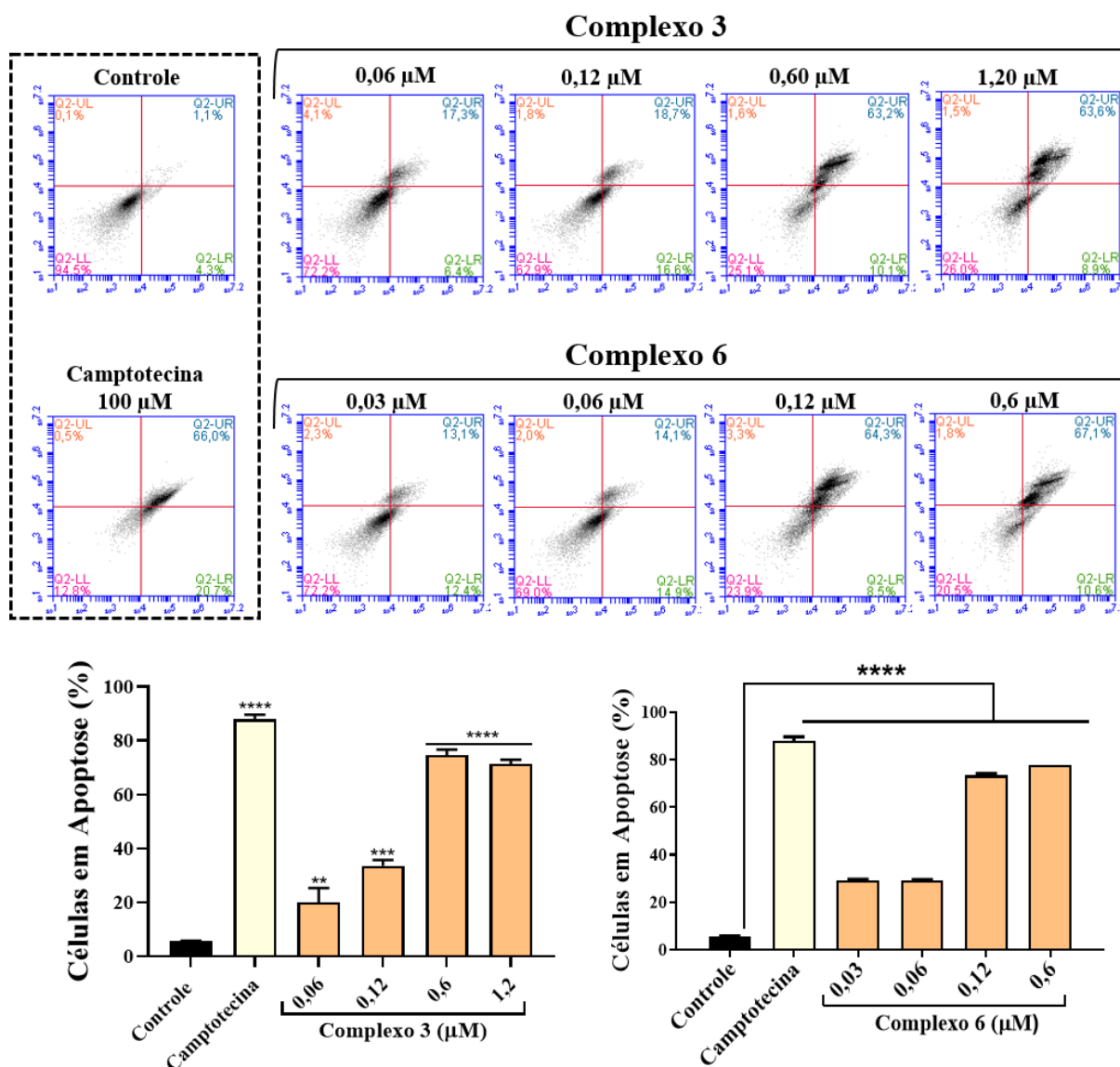


Figura 32- - Efeito dos complexos 3 e 6 na indução de apoptose em células de câncer de mama (MDA-MB-231). Significância: $**p=0.0095$, $***p=0.0001$, $****p<0.0001$ usando ANOVA. Os dados foram expressos em \pm DS (n=3).

4.2.2- Série 2

4.2.2.1- Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

Os complexos da série 2 após serem previamente sintetizados e caracterizados foram avaliados frente a linhagens tumorais e não tumorais de mama (MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A (não tumoral)) e pulmão (A549 e MRC-5 (não tumoral)). A Tabela 9 apresenta os valores de IC₅₀ obtidos em 48 horas para todos os complexos, ligantes e o fármaco cisplatina utilizado como padrão.

Tabela 9- Valores de IC₅₀ em μM para os complexos (7-12).

	MDA-MB- 231	MCF-7	MCF-10A	IS ¹	IS ²	A549	MRC-5	IS ³
7	0,28 ± 0,02	5,83 ± 0,13	4,57 ± 0,59	17	0,8	3,82 ± 0,11	2,79 ± 0,11	0,7
8	0,24 ± 0,02	5,41 ± 0,32	4,46 ± 0,46	18	0,8	4,66 ± 0,51	2,51 ± 0,25	0,5
9	5,39 ± 0,16	3,55 ± 0,39	7,17 ± 0,11	1,3	2,0	24,9 ± 1,03	4,19 ± 0,59	0,2
10	3,98 ± 0,80	3,51 ± 0,30	7,36 ± 0,15	1,8	2,1	21,3 ± 6,21	3,67 ± 0,13	0,2
11	4,62 ± 0,14	3,21 ± 0,23	6,14 ± 0,05	1,3	1,9	11,3 ± 1,19	3,31 ± 0,06	0,3
12	3,27 ± 0,12	3,75 ± 0,71	6,28 ± 0,41	1,9	1,7	15,0 ± 0,47	2,67 ± 0,27	0,2
P1	>50	>50	>50	--	--	>100	>50	--
P2	>50	>50	>50	--	--	>100	>100	--
P3	>50	>50	>50	--	--	>100	42,8 ± 4,45	--
CPT	2,44 ± 0,20	13,9 ± 2,02	23,9 ± 0,70	9,8		14,4 ± 1,40	29,1 ± 0,78	2,0

P1:[NiCl₂(dppe)]; P2:[PdCl₂(dppe)]; P3:[PtCl₂(dppe)]; CPT: Cisplatina. IS¹=MCF-10A/MDA-MB-231; IS²= MCF-10A/MCF-7; IS³= MRC-5/A549.

Quando avaliados nas linhagens celulares de pulmão, observou-se que os complexos apresentaram valores de IC₅₀ baixos, principalmente na linhagem não tumoral (MRC-5), onde todos os compostos apresentaram maior atividade comparativamente a linhagem tumoral (A549). No entanto, os compostos apresentaram melhor atividade nas linhagens tumorais de mama quando comparados à linhagem não tumoral, com exceção dos complexos de níquel(II) quando avaliados na linhagem tumoral MCF-7.

Dessa maneira, quando avaliamos a citotoxicidade dos complexos, observamos que quando realizadas alterações nos substituinte R_1 dos ligantes aciltioureias os valores de IC_{50} não apresentaram grandes distinções, assim como já observado nos complexos da série 1. No entanto, quando alteramos os íons metálicos (Níquel^{II}, Paládio^{II} e Platina^{II}), observamos, que em geral, os complexos de níquel(II) apresentaram valores mais baixos de IC_{50} , principalmente na linhagem tumoral MDA-MB-231. Coincidentemente os complexos de Ni^{II} apresentam menor estabilidade, ocorrendo a labilização de uma parcela do ligante fosfínico, o que possibilitaria a formação de novos compostos em meio de cultura, devido a presença do grande número de aminoácidos.

Quando comparamos os resultados obtidos neste trabalho com demais complexos de paládio^{II} e platina^{II} já descritos na literatura, pelo próprio grupo de pesquisa, observamos que os compostos contendo os mesmos ligantes aciltioureias, porém com um ligante fosfínico diferente (trifenilfosfina) (Figura 33)^{45,46} se mostraram mais citotóxicos, se tratando da linhagem MDA-MB-231, indicando que apesar da modificação do grupo R_1 não ocasionar grandes alterações na citotoxicidade, a mudança do ligante fosfínico pode influenciar os valores de IC_{50} .

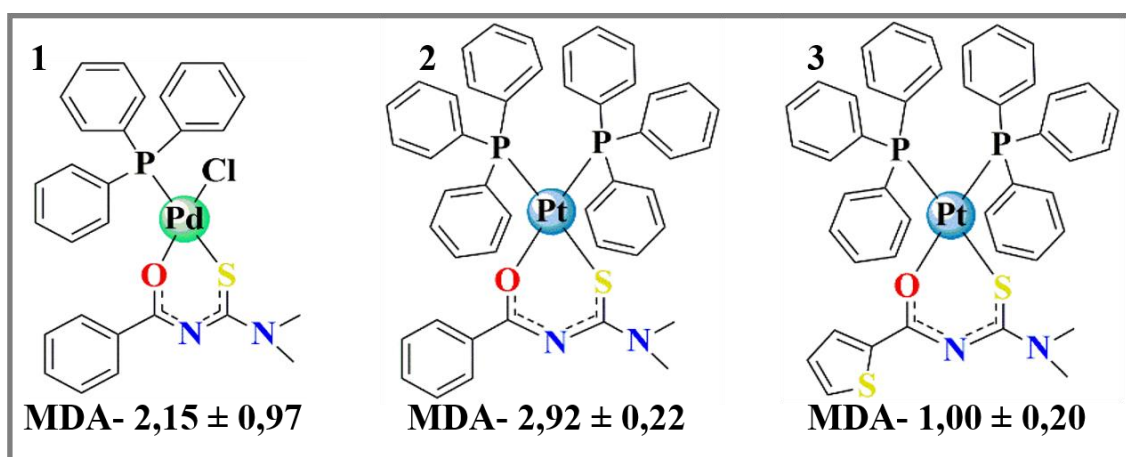


Figura 33- Estrutura e citotoxicidade de complexos de Paládio(II)⁴⁵ e Platina(II)⁴⁶ com ligantes aciltioureias frente a linhagem tumoral de câncer de mama (MDA-MB-231).

Levando em consideração os melhores resultados obtidos para os complexos quando avaliados na linhagem tumoral MDA-MB-231, principalmente para os complexos de níquel(II), optou-se por esta linhagem para dar continuidade aos ensaios biológicos. Desta forma 3 complexos foram selecionados para serem avaliados na linhagem de câncer de mama: complexo 8, complexo 10 e complexo 12.

4.2.2.2- Ensaio de Formação de Colônias

Os complexos 8, 10 e 12 (série 2) foram avaliados em relação a sua capacidade de influenciar na sobrevivência clonogênica de células da linhagem MDA-MB-231. Conforme observado na Figura 34 todos os compostos foram capazes de inibir a formação de colônias a partir da menor concentração avaliada, inibindo totalmente a formação de colônias nas concentrações superiores ao valor de IC_{50} . Foi possível observar que os complexos de Paládio(II) (10) e Platina(II) (12) apresentaram maior diminuição do número de colônias, quando comparados ao complexo de Níquel(II) (8), e que a inibição foi superior com o aumento da concentração. Os resultados obtidos confirmaram a atividade citotóxica dos complexos avaliados.

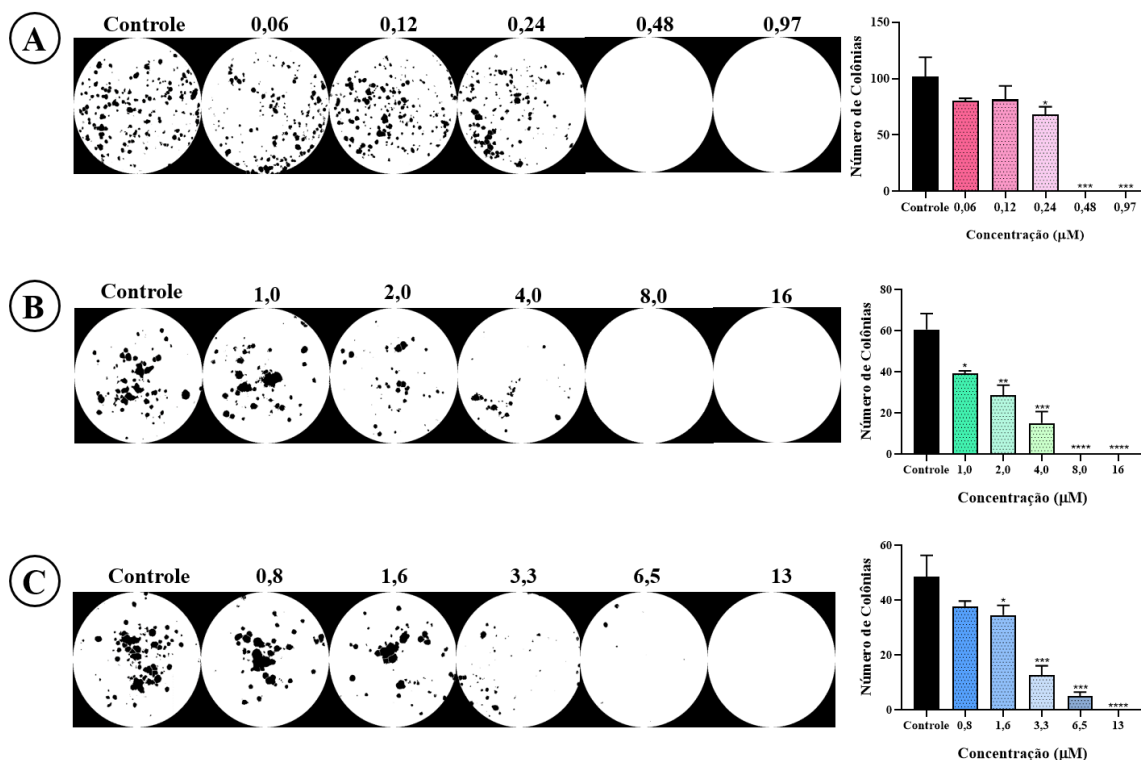


Figura 34- Efeito da influência dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) em diferentes concentrações (μM) na formação de colônias de células da linhagem MDA-MB-231. Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em \pm DS (n=3).

4.2.2.3- Ensaio de Morfologia Celular

A influência dos complexos 8, 10 e 12 na morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 foi analisada em diferentes concentrações (0,06, 0,12, 0,24, 0,48, 0,97 e 2,4 μM (8); 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16 e 32 μM (10); 0,8, 1,6, 3,3, 6,5, 13 e 26 μM (12)), registrando-se fotos nos tempos de 0, 24 e 48 horas. Conforme observado na Figura 35, quando comparados ao controle contendo DMSO (0,5%) os complexos apresentaram distinções, principalmente nas maiores concentrações avaliadas.

Inicialmente, nas menores concentrações (0,12 μM (8), 2,0 μM (10) e 1,6 μM (12)), observou-se uma menor confluência celular no tempo de 48 horas em relação ao controle, esse mesmo comportamento foi observado também nas concentrações do IC₅₀. Nas concentrações superiores ao IC₅₀ foi possível observar

células em formatos circulares, com diminuição da densidade celular e em alguns casos perda de aderência, principalmente nas maiores concentrações, sendo um indício de morte celular.

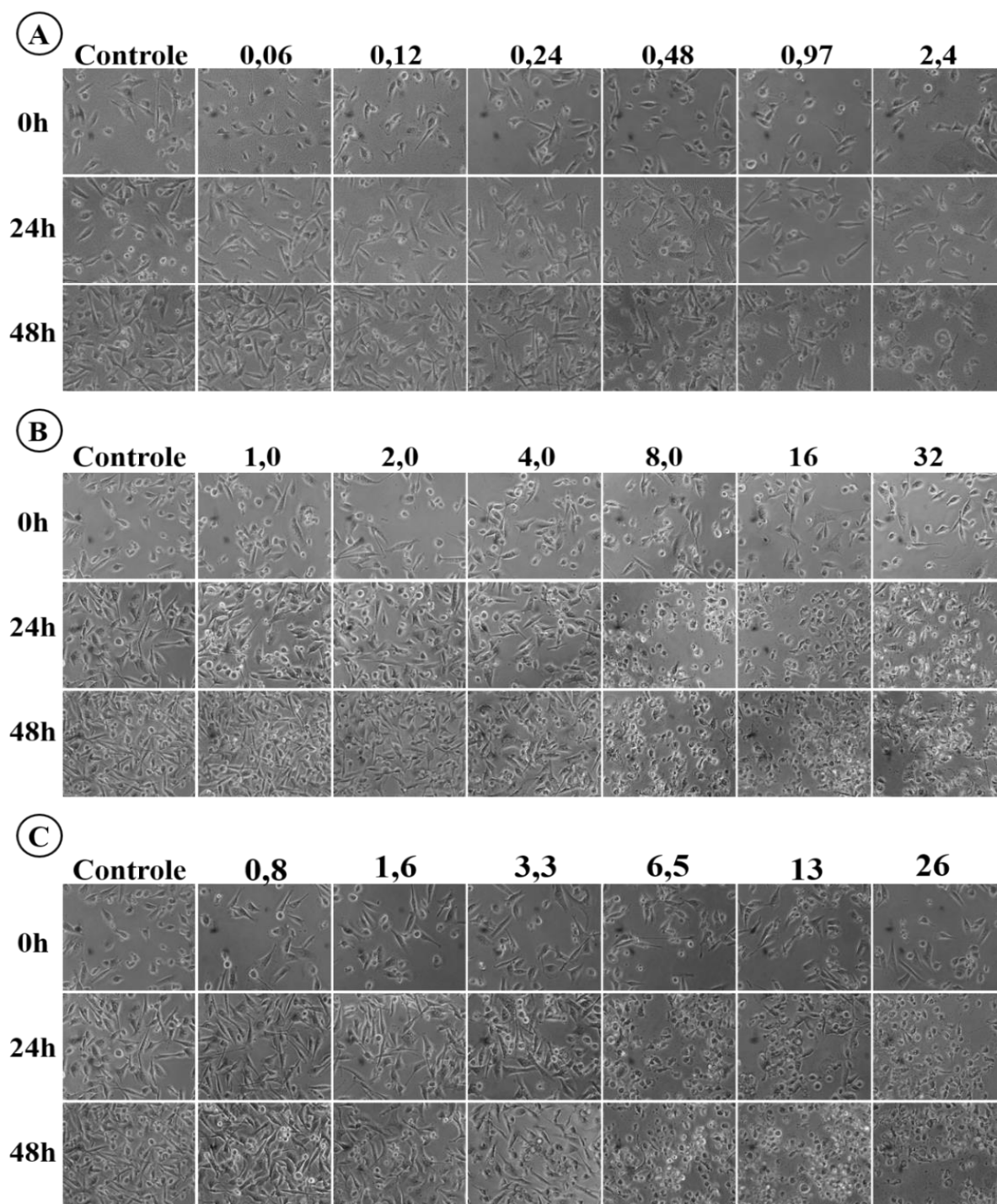


Figura 35- Efeito dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) na morfologia de células de câncer de mama (MDA_MB-231) em diferentes concentrações (μM).

4.2.2.4- Ensaio de Migração Celular – *Wound Healing*

Com o intuito de avaliar a capacidade dos compostos de inibir a migração celular, realizou-se o ensaio de *Wound Healing*, em que células da linhagem tumoral MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 12 poços, e após adquirirem uma confluência adequada, realizou-se uma risca na superfície contendo as células aderidas. O tratamento com diferentes concentrações dos complexos foi realizado, e o fechamento da risca foi acompanhado nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

A Figura 36 apresenta as imagens registradas nos diferentes tempos para os complexos 8, 10 e 12. Foi possível observar que já nas menores concentrações avaliadas os três compostos estudados foram capazes de inibir o fechamento da risca quando comparados ao controle (0,5% de DMSO), de forma que o complexo 8 apresentou uma inibição de 49, 3% na concentração de 0,06 μM , o complexo 10 inibiu 56, 5% do fechamento na concentração de 1,0 μM e o complexo 12 teve uma inibição de 56, 1% na concentração de 0,8 μM .

Com o aumento da concentração dos compostos foi possível observar uma maior inibição na migração celular, sendo mais pronunciado nos complexos de níquel(II) e paládio(II). Na concentração de 0,12 μM o complexo 8 inibiu cerca de 63, 3% da migração das células da linhagem MDA-MB-231, o complexo 10 teve uma inibição de 65,5 % na concentração de 2,0 μM , e o complexo 12 inibiu 59, 8% na maior concentração avaliada (1,6 μM). É interessante ressaltar que neste ensaio utilizou-se concentrações inferiores ao valor de IC_{50} .

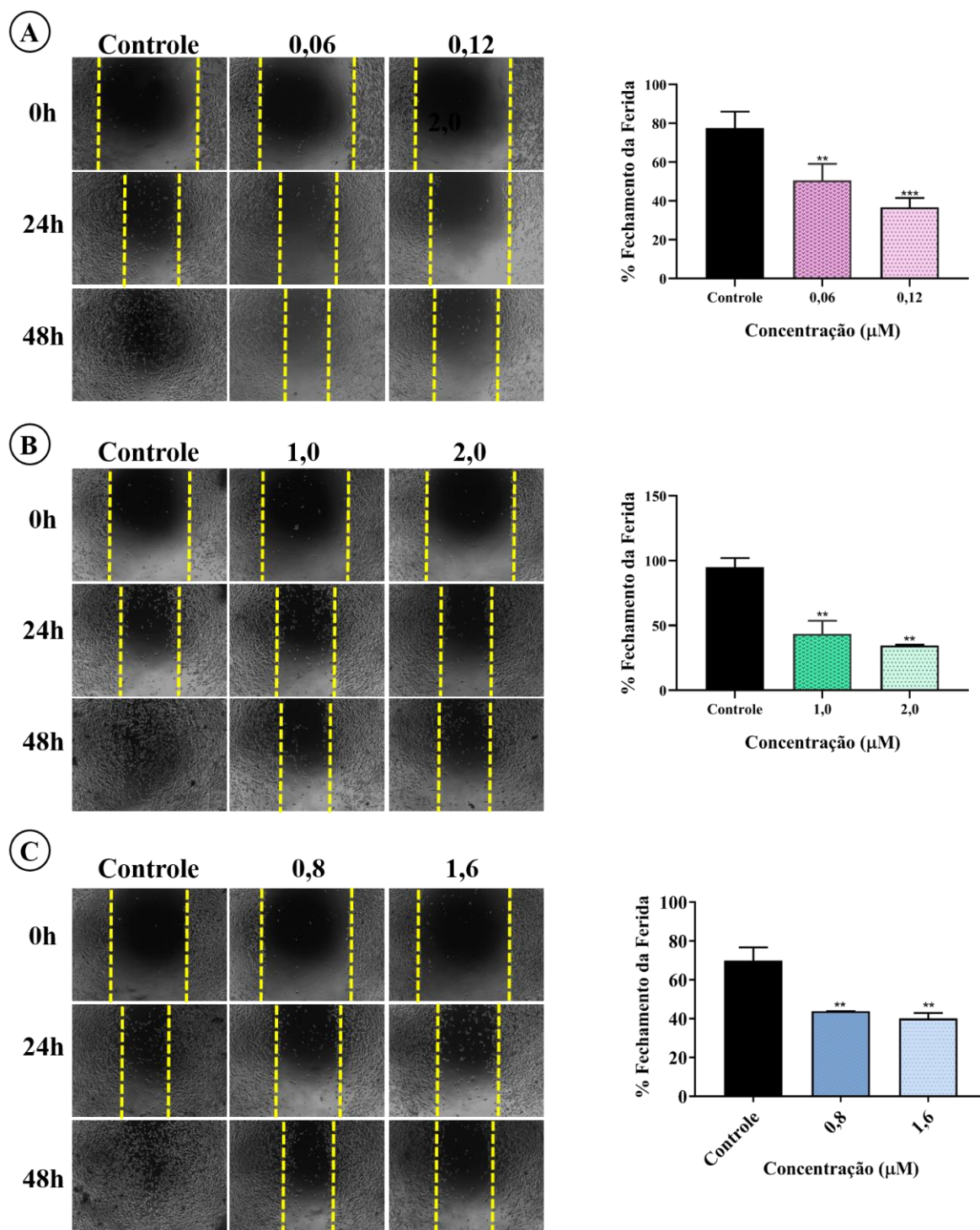


Figura 36- Efeito dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) em diferentes concentrações (μM) na migração celular da linhagem MDA-MB-231 a partir do ensaio de Wound Healing. Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em \pm DS (n=3).

4.2.2.5- Avaliação do Ciclo Celular

Conforme já comentado anteriormente, uma característica das células tumorais é apresentar defeitos nos pontos de checagem presentes em seu ciclo celular, processo pelo qual ocorre sua proliferação. Desta forma os complexos da série 2 (8, 10 e 12) foram avaliados com relação a sua influência no ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231, utilizando-se citometria de fluxo.

Os resultados obtidos após o tratamento com diferentes concentrações dos compostos por 48 horas são evidenciados na Figura 37, assim como os fármacos cisplatina e camptotecina utilizados como padrão. Foi possível observar que os complexos 8 e 10 nas menores concentrações utilizadas (0,06 e 0,12 μM para o complexo 8; 1,0 e 2,0 μM para o complexo 10), e nas concentrações do IC_{50} (0,24 μM (8) e 4,0 μM (10)) não apresentaram alterações significativas em nenhuma fase do ciclo celular nas células da linhagem de câncer de mama. No entanto, nas concentrações superiores ao IC_{50} (0,48 e 0,97 μM (8); 8,0 e 16 μM (10)) observou-se um acúmulo de células na fase Sub-G1, além de uma diminuição de células na fase G2. Todavia, o complexo 12 também induziu o acúmulo de células em Sub-G1 e a diminuição da população de células em G2, porém este efeito pode ser observado já na concentração do IC_{50} (3,3 μM), sendo acrescido com o aumento da concentração (6,5 e 13 μM).

A concentração de células em Sub-G1 pode ser observada em diferentes compostos na literatura, inclusive em um complexo de Ni(II) com ligante tiosemicarbazona⁶⁹, e pode ser um indicativo de que os compostos induzem a morte celular por apoptose.

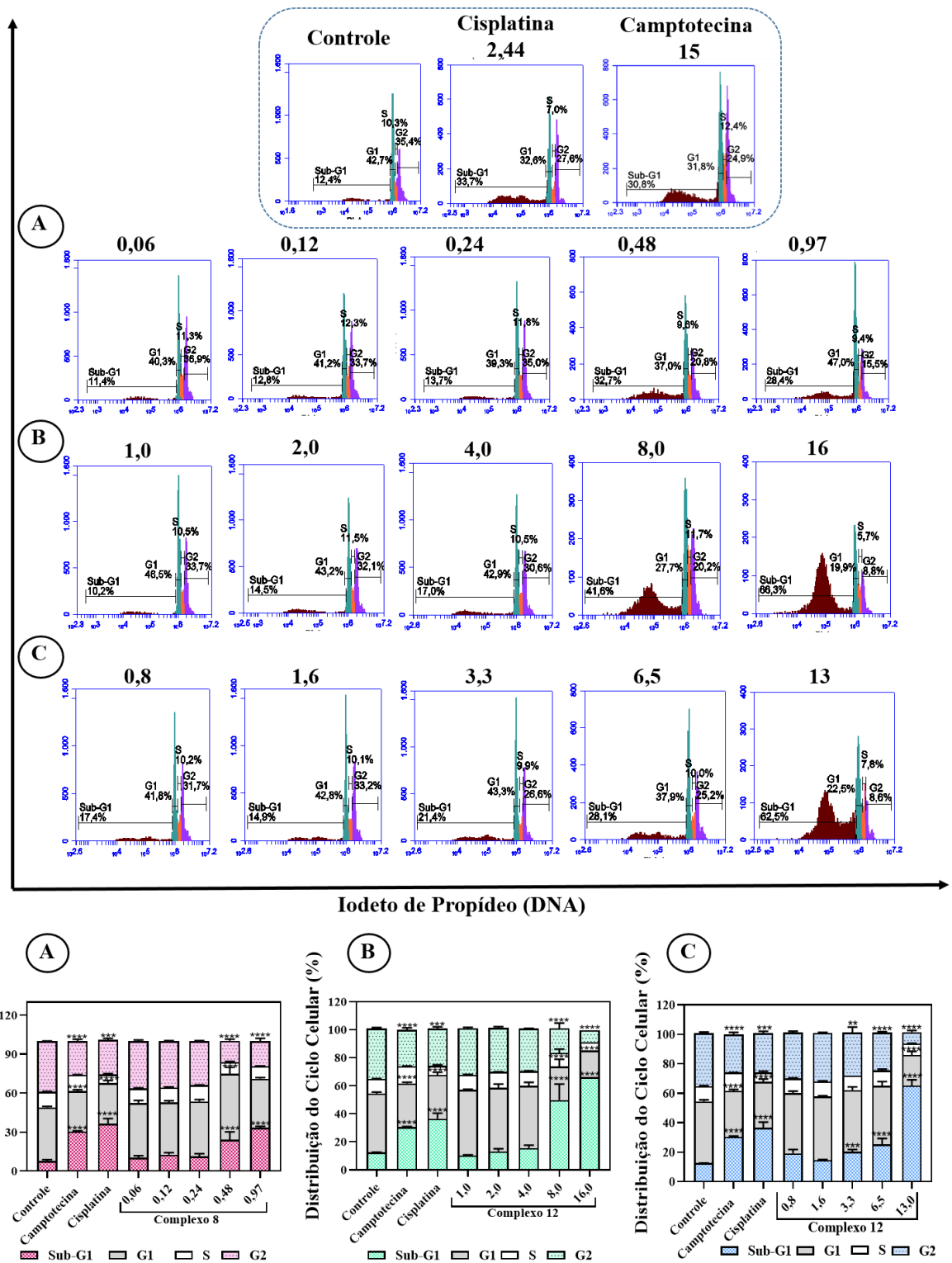


Figura 37- Influência dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) na distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 em diferentes concentrações (μM). Níveis de significância: ** $p=0.0095$, *** $p=0.0001$, **** $p<0.0001$ utilizando ANOVA. Os dados foram expressos em \pm DS (n=3).

4.3- Interação com Biomoléculas

4.3.1- Série 1

4.3.1.1- Interação com DNA

O estudo de interação de complexos metálicos com diferentes biomoléculas é constantemente realizado com o intuito de avaliar o mecanismo de ação destes compostos em linhagens tumorais. Neste sentido, o DNA é a biomolécula mais estudada, por ser o alvo de muitos medicamentos atualmente em uso clínico, ou em fase de desenvolvimento clínico. A interação com esta biomolécula pode ocorrer de maneira covalente ou não-covalente, conforme demonstrado na Figura 38.

Nas interações covalentes, o complexo se liga diretamente ao DNA através de suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato, sendo esta uma ligação irreversível. Um exemplo deste modo de interação é o fármaco cisplatina, que se liga covalentemente às bases nitrogenadas do DNA, mais precisamente no N7 de adenina e guanosina⁷⁰.

As interações não-covalentes podem acontecer através de intercalação, interações eletrostáticas ou interações nos sulcos do DNA. A intercalação consiste na inserção de uma molécula, em geral aromática e planar, aos pares de bases do DNA, um exemplo deste tipo de interação é o fármaco doxorrubicina, bastante utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. As interações eletrostáticas ocorrem entre complexos catiônicos com os grupos fosfato da biomolécula, que apresentam carga negativa, enquanto as interações pelos sulcos ocorrem com o alojamento dos complexos no sulco menor ou maior do DNA a partir de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, entre outras. É interessante ressaltar que essas interações podem coexistir, não necessariamente ocorrendo apenas um tipo de interação⁷¹.

Desta maneira a interação dos complexos de rutênio com CT-DNA e DNA plasmidial foi avaliada utilizando-se técnicas como titulação

espectrofotométrica, viscosidade, eletroforese e ensaio competitivo com Hoechst322.

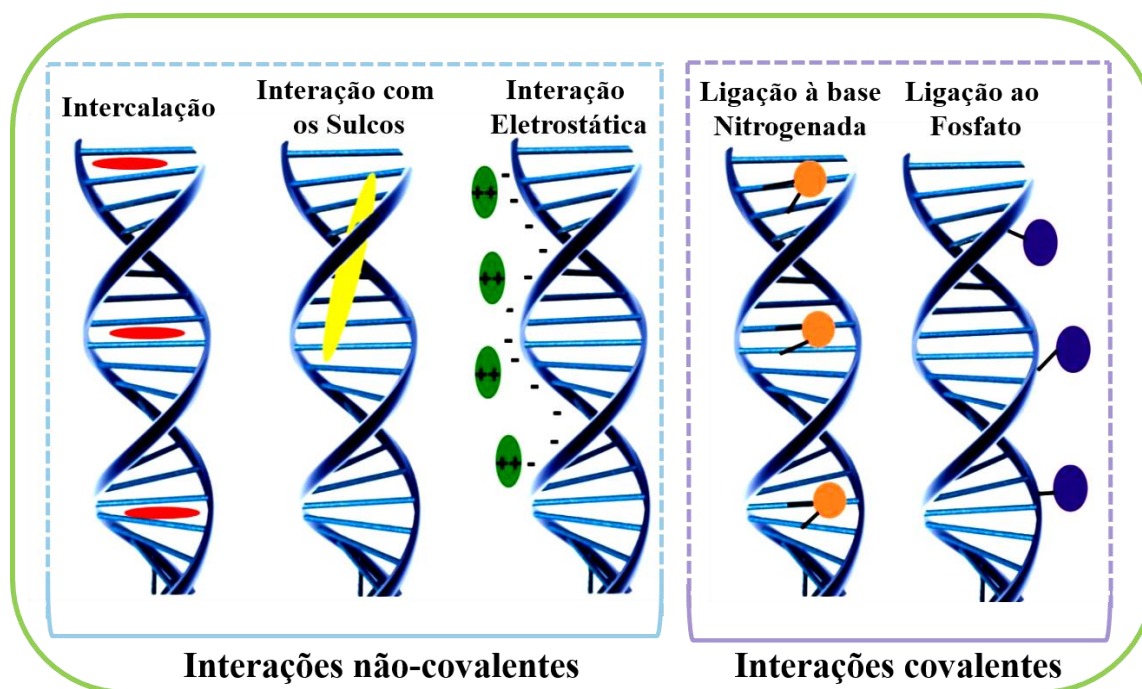


Figura 38- Ilustração dos modos de interação com DNA. Fonte: modificado de Barra, 2015⁷⁰.

Inicialmente realizou-se o experimento de titulação espectrofotométrica dos complexos, realizando-se sucessivas adições de uma solução de CT-DNA a soluções dos complexos, com intuito de avaliar as alterações nos espectros de UV-Vis. Para comparação, o mesmo foi realizado adicionando-se tampão trizma ao invés de DNA (Figuras 39 e A63). Ao observar os resultados obtidos, notou-se que o decaimento das bandas com a adição da biomolécula foi similar ao decaimento com a adição de tampão, de forma que este efeito foi atribuído a diluição e não a interação dos compostos com a biomolécula, indicando que as interações envolvidas seriam fracas e não permitindo calcular uma constante de interação. Dessa maneira outros experimentos foram realizados com o intuito de obter informações acerca do tipo de interação dos complexos com DNA.

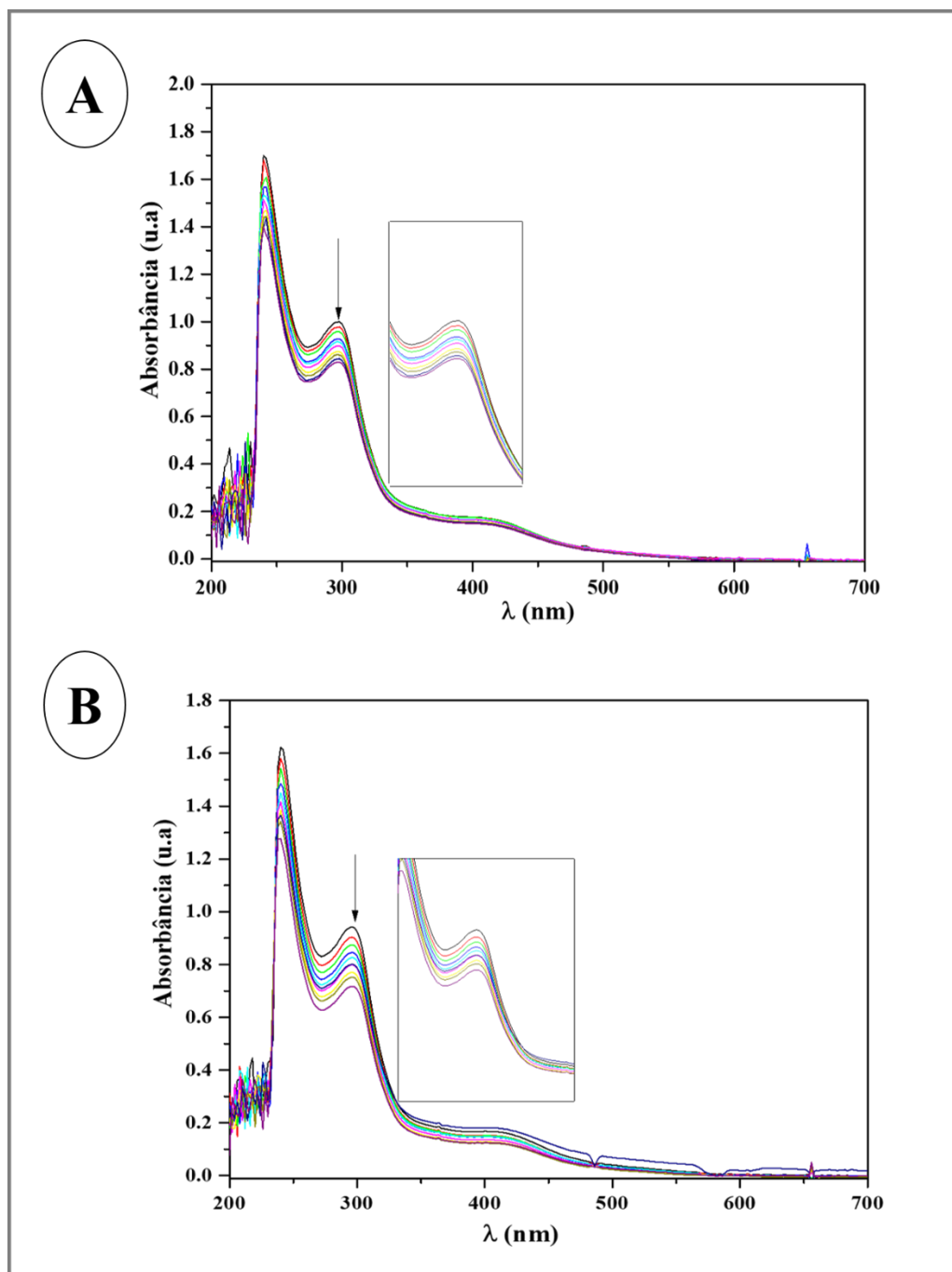


Figura 39- Espectros na região do UV-Vis do complexo 2 após sucessivas adições de DNA (A) e tampão Trizma (B).

No experimento de viscosidade, avaliou-se a influência de diferentes concentrações dos complexos na viscosidade do CT-DNA. Neste experimento podem-se diferenciar alguns modos de interação, de maneira que compostos que interagem covalentemente com o DNA levam a uma distorção na dupla hélice, reduzindo o comprimento da molécula de DNA e fazendo com que haja um

decréscimo na viscosidade; compostos intercaladores fazem com que ocorra o alongamento e desenrolamento da dupla hélice, o que proporciona um aumento na viscosidade do DNA; e moléculas que interagem nos sulcos ou de maneira eletrostática não promovem alterações significativas na viscosidade do DNA, já que não influenciam o comprimento da molécula⁷⁰.

Para a realização deste experimento, utilizou-se o composto laranja de tiazol como padrão, devido a sua capacidade de interagir com a CT-DNA via intercalação. Na Figura 40 encontram-se presentes os resultados obtidos para o padrão, bem como para os complexos da série 1, expressos em uma relação $(\eta/\eta^0)^{1/3}$ (viscosidade específica do DNA na presença (η) e ausência dos compostos(η^0)) *versus* [complexo]/[DNA] (razão entre a concentração de composto e DNA). Foi possível observar um aumento da viscosidade do DNA com o aumento da concentração do padrão utilizado, confirmando o seu perfil intercalador, enquanto o aumento da concentração dos complexos não ocasionou alterações significativas, um indicativo de interações eletrostática ou nos sulcos do DNA.

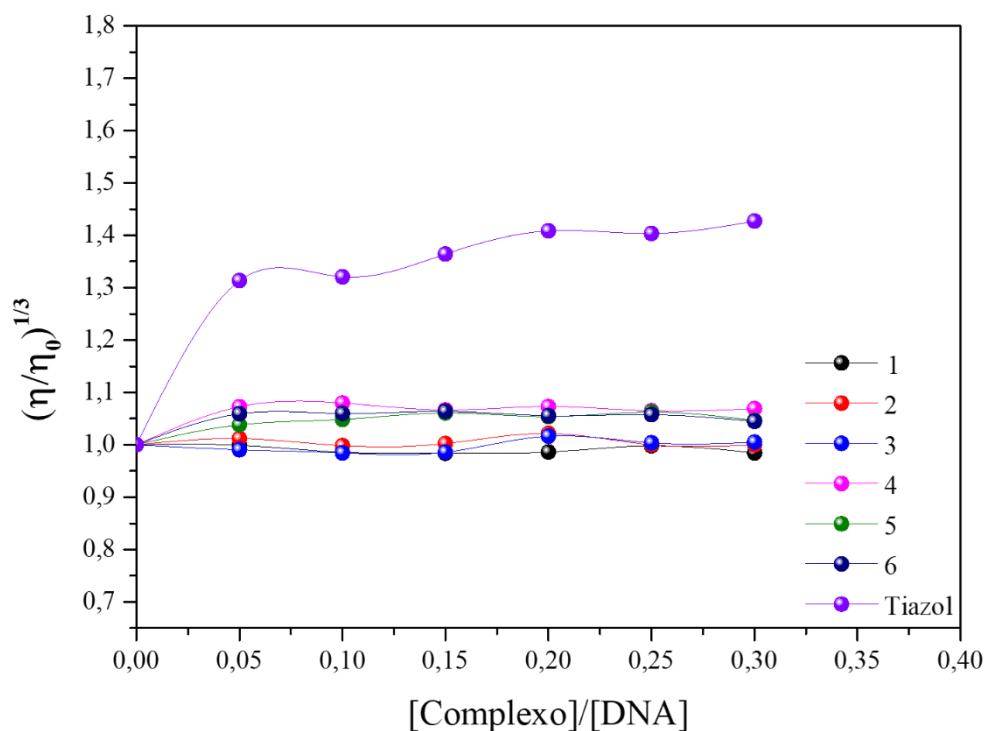


Figura 40- Efeito dos complexos (1-6) na viscosidade relativa do DNA.

A capacidade dos compostos interagirem com DNA foi avaliada também pelo ensaio de mobilidade eletroforética em gel de agarose. Neste caso emprega-se o DNA plasmidial, que apresenta três principais formas, sendo elas: superenovelada (*supercoiled-SC*), que é a forma mais compacta do DNA, apresentando maior mobilidade, por migrar com maior velocidade pelo gel; circular (*open circular-OC*), uma forma mais volumosa, que tem como consequência uma menor velocidade de migração; e a forma linear (L), que apresenta-se como intermediária entre as formas SC e OC. Alterações na mobilidade destas bandas na presença de complexos metálicos pode ser um indício de interação com a biomolécula⁷².

Na Figura 41 pode-se observar a imagem do gel de agarose obtido para os complexos (1-6), onde nas maiores concentrações ocorre uma diminuição na intensidade de todas as bandas, havendo em alguns casos o desaparecimento das mesmas. Este comportamento pode ser ocasionado por diferentes motivos, como a fragmentação do DNA, ocasionada por fortes interações, o deslocamento do brometo de etídio que encontra-se intercalado a biomolécula ou, em alguns casos por complexos que interagem nos sulcos do DNA, que causam distorções na estrutura da biomolécula, dificultando a entrada, ou expulsando o brometo de etídio^{42,72}. Uma vez que os demais experimentos sugeriram que o modo de interação dos complexos não seria via intercalação ou covalente, sugeriu-se que os mesmos estariam interagindo nos sulcos do DNA.

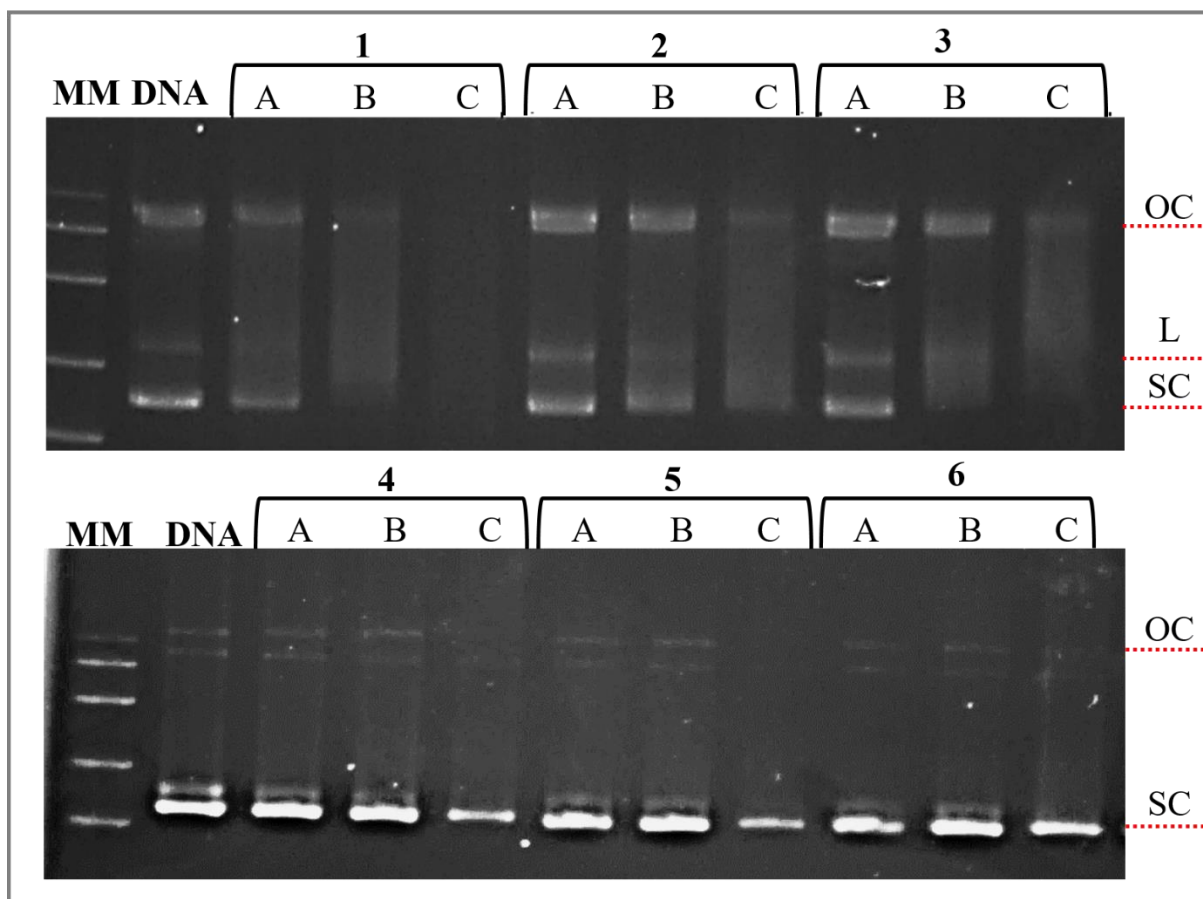


Figura 41- Influência dos complexos na mobilidade eletroforética do DNA plasmidial (pBR322) em diferentes relações DNA/Complexo (A:0,05; B:0,1e C:0,3).

Uma vez que os experimentos realizados indicaram que os compostos estariam interagindo nos sulcos do DNA, optou-se por realizar um ensaio competitivo com Hoeschst 33258. Este composto possui a capacidade de interagir no sulco menor do DNA, e a partir desta interação leva a formação de um aduto fluorescente. Dessa maneira, compostos que interagem no sulco menor são capazes de deslocar o Hoeschst 33258 levando a uma diminuição na intensidade de fluorescência⁷³⁻⁷⁵. Nas Figuras 42 e A64 pode-se observar os espectros obtidos após a adição de diferentes concentrações dos compostos, onde com o aumento da concentração ocorre a diminuição da intensidade de fluorescência, indicando que os compostos são capazes de deslocar o Hoeschst

33258 e sugerindo que a interação dos mesmos com o DNA ocorre via sulco menor.

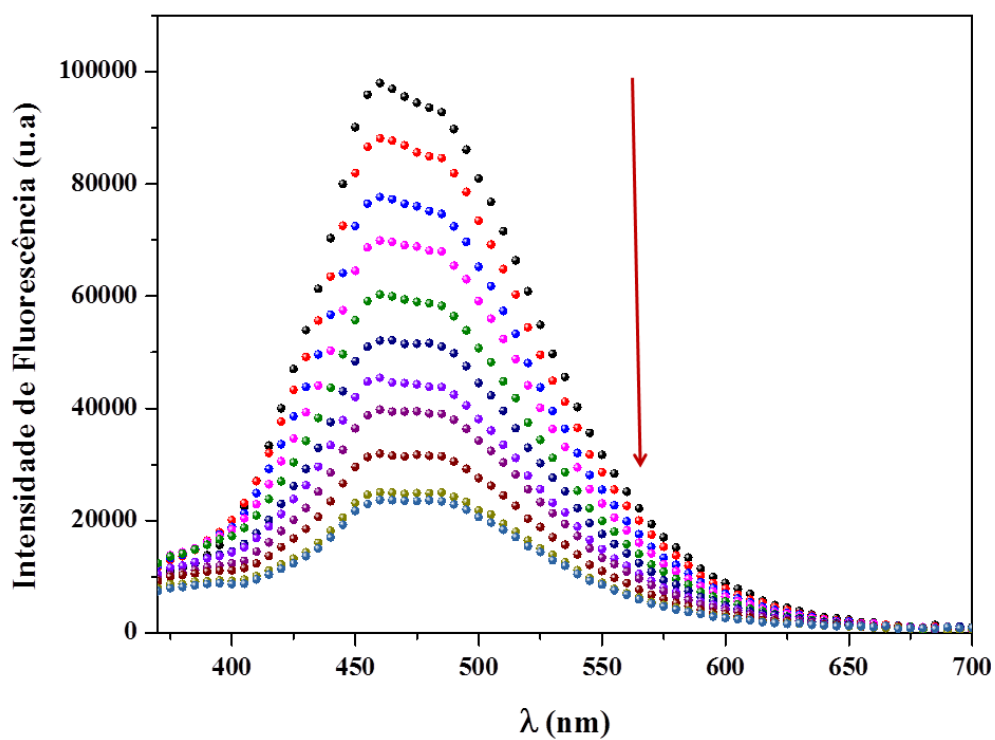


Figura 42- Espectro de Fluorescência do adulto Hoechst-DNA após a adição de diferentes concentrações do complexo 2.

4.3.1.2- Interação com HSA

A Albumina de soro humana (HSA) (Figura 43) é uma das principais proteínas do plasma sanguíneo, apresentando diversas funções fisiológicas, tais como a contribuição para a pressão sanguínea osmótica e o auxílio no transporte, distribuição e metabolismo de diversos ligantes, que compreendem uma grande variedade de moléculas, incluindo medicamentos. Essa proteína é composta por 585 resíduos de aminoácidos, apresentando 17 grupos de tirosina e um resíduo de triptofano localizado no subdomínio IIA⁷⁶.

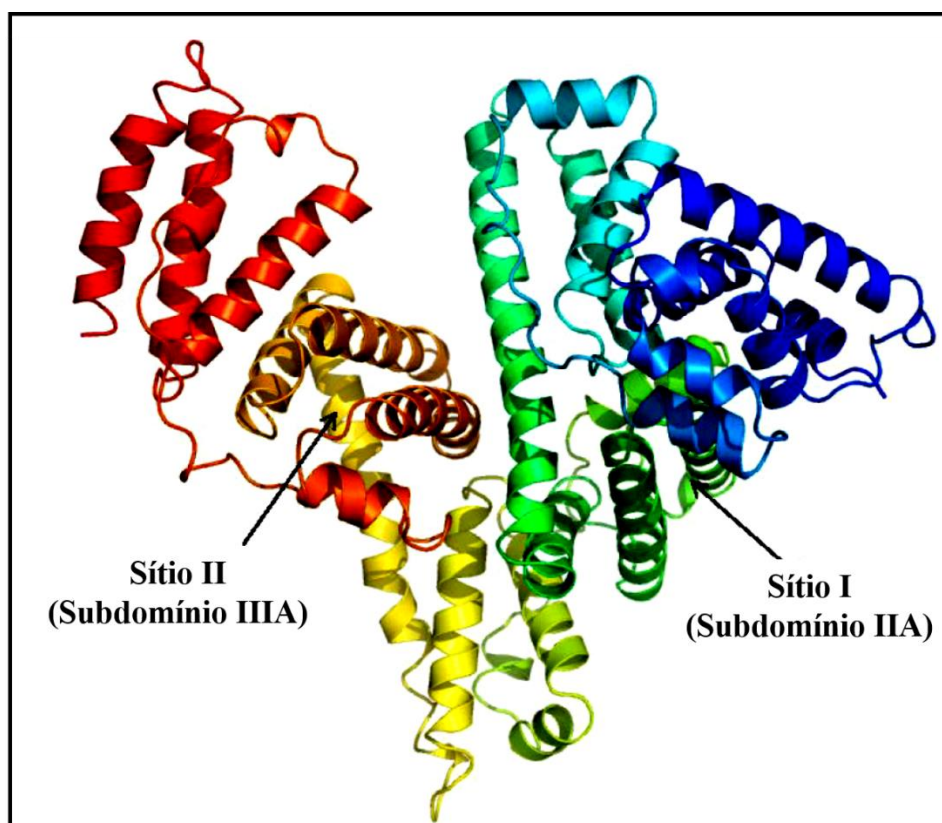


Figura 43- Estrutura da albumina de soro humana (HSA). Fonte: Chuang & Otagiri, 2013⁷⁷.

Uma vez que esta biomolécula atua como transportadora de fármacos, é interessante avaliar a capacidade dos complexos metálicos

interagirem com a proteína. Dessa maneira os estudos de interação dos complexos da série 1 com a biomolécula foram realizados.

A técnica de espectroscopia de fluorescência é bastante utilizada para avaliação da interação de compostos com a HSA. Uma vez que a proteína apresenta fluorescência, decorrente principalmente do resíduo de triptofano presente em sua estrutura, compostos que interagem com a biomolécula levam a um decaimento na intensidade de fluorescência da proteína. Quando avaliados em diferentes concentrações, os complexos da série 1 foram capazes de diminuir a intensidade de fluorescência da HSA, indicando que os mesmos interagem com a biomolécula. Uma análise quantitativa da supressão pode ser realizada a partir da equação de Stern-Volmer^{78,79}:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q t_0 [Q]$$

Em que, F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do complexo e F a intensidade de fluorescência na presença do complexo; $[Q]$ é a concentração do complexo; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer; K_q é a constante de velocidade de supressão biomolecular e t_0 o tempo de meia vida.

Na Tabela 10 estão presentes os valores de K_{SV} (obtido a partir de um gráfico F_0/F versus $[Q]$) e K_q (obtido a partir da razão entre K_{SV} e t_0).

Tabela 10- Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv} (M^{-1})), (K_q ($M^{-1} s^{-1}$)), constantes de ligação (K_b (M^{-1})), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔG ($KJ mol^{-1}$), ΔH ($KJ mol^{-1}$) e ΔS ($J mol^{-1} K^{-1}$)) para os complexos com HAS em diferentes temperaturas.

	T(K)	$K_{sv}(10^4)$	$K_q (10^{12})$	K_b	n	ΔG	ΔH	ΔS
1	298	$4,66 \pm 0,12$	9,32	$5,93 \pm (0,14) \cdot 10^4$	$1,08 \pm 0,08$	-27,2	184,6	710,7
	303	$4,27 \pm 0,11$	8,53	$1,01 \pm (0,23) \cdot 10^5$	$1,08 \pm 0,02$	-29,0		
	310	$4,38 \pm 0,12$	8,77	$1,06 \pm (0,34) \cdot 10^6$	$1,30 \pm 0,04$	-35,8		
2	298	$4,90 \pm 0,28$	9,81	$3,89 \pm (0,62) \cdot 10^5$	$1,12 \pm 0,09$	-31,9	79,2	373,8
	303	$4,52 \pm 0,21$	9,05	$1,11 \pm (0,25) \cdot 10^6$	$1,30 \pm 0,03$	-35,1		
	310	$4,37 \pm 0,13$	8,74	$1,34 \pm (0,72) \cdot 10^6$	$1,31 \pm 0,07$	-35,4		
3	298	$2,69 \pm 1,29$	5,37	$2,58 \pm (0,17) \cdot 10^4$	$0,97 \pm 0,04$	-25,2	311,0	1127,9
	303	$2,56 \pm 0,11$	5,12	$8,13 \pm (0,17) \cdot 10^5$	$1,30 \pm 0,02$	-34,3		
	310	$2,45 \pm 0,10$	4,89	$3,32 \pm (0,40) \cdot 10^6$	$1,47 \pm 0,03$	-38,7		
4	298	$3,10 \pm 0,09$	6,20	$1,99 \pm (0,29) \cdot 10^4$	$1,01 \pm 0,03$	-24,5		
	303	$3,05 \pm 0,08$	6,09	$6,25 \pm (0,19) \cdot 10^4$	$1,08 \pm 0,02$	-27,8	197,4	744,8
	310	$3,14 \pm 0,12$	6,29	$4,35 \pm (0,14) \cdot 10^5$	$1,24 \pm 0,03$	-33,5		
5	298	$3,68 \pm 0,06$	7,37	$5,29 \pm (0,16) \cdot 10^4$	$1,06 \pm 0,03$	-27,0		
	303	$3,54 \pm 0,13$	7,08	$1,42 \pm (0,11) \cdot 10^5$	$1,14 \pm 0,01$	-29,9	175,9	680,7
	310	$3,34 \pm 0,22$	6,69	$8,26 \pm (0,31) \cdot 10^5$	$1,28 \pm 0,06$	-35,1		
6	298	$3,89 \pm 0,16$	7,78	$2,96 \pm (0,51) \cdot 10^5$	$1,23 \pm 0,03$	-31,2		
	303	$3,27 \pm 0,15$	6,54	$1,06 \pm (0,34) \cdot 10^6$	$1,34 \pm 0,03$	-35,0	189,4	740,4
	310	$3,39 \pm 0,12$	6,77	$5,71 \pm (0,46) \cdot 10^6$	$1,59 \pm 0,11$	-40,1		

Ao avaliar os valores de K_{SV} obtidos para os complexos em diferentes temperaturas foi possível observar que o aumento da temperatura proporcionou uma ligeira diminuição nos valores da constante K_{SV} , indicando que a supressão da fluorescência ocorre a partir de um mecanismo estático, além disso os valores de constante de velocidade de supressão biomolecular (K_q) obtidos foram na ordem de $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, superior ao valor máximo possível para o mecanismo dinâmico ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁷⁸.

Para a obtenção da constante de ligação entre os complexos e a HSA (K_b), empregou-se a equação:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

Em que, K_b é a constante de ligação entre o supressor e a HSA e n é o número de sítios de ligação por molécula de HSA. Estes valores foram obtidos por meio de um gráfico $\log (F_0 - F)/F$ versus $\log [Q]$, onde K_b é o coeficiente linear e n o coeficiente angular.

Os complexos apresentaram valores de K_b variando na ordem de 10^4 - 10^6 M^{-1} , semelhantes a outros complexos contendo ligantes aciltioureas. Além disso, os valores de constante de ligação foram superiores com o aumento da temperatura indicando a maior estabilidade do adulto complexo-HSA. Os valores de n encontrados foram próximos de 1 indicando que os compostos apresentam um ponto de ligação.

A determinação dos parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) foi realizada com o intuito de obter mais informações acerca do tipo de interação, para isso utilizou-se as seguintes equações:

$$\ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} = \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \frac{\Delta H^\circ}{R}$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Onde, K_{b1} e K_{b2} são as constantes de ligação nas diferentes temperaturas (T_1 e T_2); R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); ΔS° é a variação de entropia; ΔH° é a variação de entalpia e ΔG° é a energia de Gibbs. Os parâmetros termodinâmicos podem trazer informações sobre os tipos de interação entre o complexo e a HSA, de forma que: valores positivos para ΔH° e ΔS° indicam interações hidrofóbicas entre os complexos e a HSA; valores negativos para ΔH° e ΔS° correspondem às forças de van der Waals; valores negativos de ΔH° e positivos ΔS° indicam interação eletrostática⁸⁰.

Ao analisar os valores de ΔG° , ΔH° e ΔS° dos complexos, presentes na Tabela 10, pode-se observar que os valores negativos de ΔG° indicam que a ligação é espontânea, e os valores de ΔH° e ΔS° positivos indicam interações hidrofóbicas envolvidas.

4.3.2- Série 2

4.3.2.1- Interação com DNA

Assim como para série 1 os complexos da série 2 também foram avaliados com relação a sua capacidade de interagir com DNA, devido ao fato de a biomolécula ser o alvo de diversos fármacos, conforme já exposto anteriormente. Inicialmente realizou-se o ensaio de viscosidade, com o intuito de avaliar se os compostos em diferentes concentrações seriam capazes de influenciar na viscosidade do DNA, podendo distinguir os modos de interação covalente, intercalação e interações eletrostáticas ou nos sulcos do DNA.

Na Figura 44 estão expostos os resultados obtidos para o estudo de interação dos complexos de 7-12, expressos em uma relação $(\eta/\eta^0)^{1/3}$ versus [complexo]/[DNA] (razão entre a concentração do complexo e DNA), em que η é viscosidade específica do DNA na presença (η) e ausência dos compostos (η^0).

Neste ensaio dois padrões foram utilizados: o laranja de tiazol, conhecido por sua capacidade de interagir com a biomolécula via intercalação, levando a um aumento na viscosidade do DNA, conforme observado na Figura 44; e o fármaco cisplatina, que interage covalentemente com o DNA, fazendo com ocorra uma diminuição na viscosidade, assim como observado nos resultados obtidos. No entanto, quando observamos os resultados obtidos para os complexos da série 2, nota-se que, mesmo com o aumento da concentração, os compostos não foram capazes de alterar a viscosidade do DNA, indicando que o modo de interação dos complexos metálicos seria de maneira eletrostática ou nos sulcos do DNA.

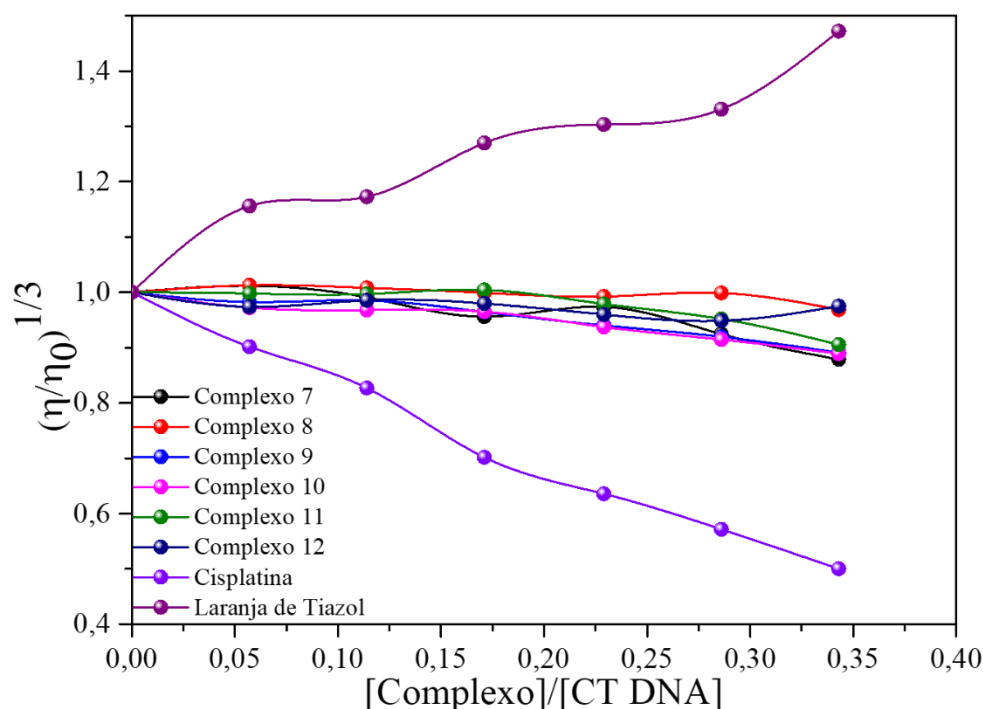


Figura 44- Influência dos complexos (7-12) na viscosidade relativa do DNA.

De forma a dar continuidade aos estudos de interação com a biomolécula, novos ensaios empregando técnicas diferentes foram realizados. A técnica de dicroísmo circular é bastante utilizada em se tratando do estudo de interação com DNA, apresentando boa sensibilidade na detecção de mudanças na estrutura secundária da biomolécula. A forma B do DNA apresenta em seu espectro DC duas bandas, sendo elas uma banda positiva em 275 nm, referente ao empilhamento das bases e uma banda negativa em 245 nm, atribuída ao giro para direita. Complexos que tenham a capacidade de interagir com o DNA podem causar alterações em seu espectro de dicroísmo circular. Compostos intercaladores em geral levam a um aumento na intensidade de ambas as bandas da biomolécula, enquanto a interação no sulco menor pode levar a diminuição da banda atribuída a elipticidade⁷².

As Figuras 45 e A66 apresenta os espectros DC do CT-DNA após incubação na presença e ausência dos complexos (7-12) à 37C por 18 horas. Foi possível observar que com o aumento da concentração dos complexos teve-se uma ligeira diminuição na banda positiva do DNA, atribuída ao empilhamento dos

pares de base, e uma diminuição mais evidente na elipticidade do DNA. Foi possível notar também que este efeito foi mais pronunciado nos complexos de Paládio(II) e Platina(II) quando comparados aos complexos de Níquel(II). A partir dos resultados obtidos, juntamente com as informações resultantes do ensaio de viscosidade, sugeriu-se que a interação dos compostos com o DNA seria via sulco menor.

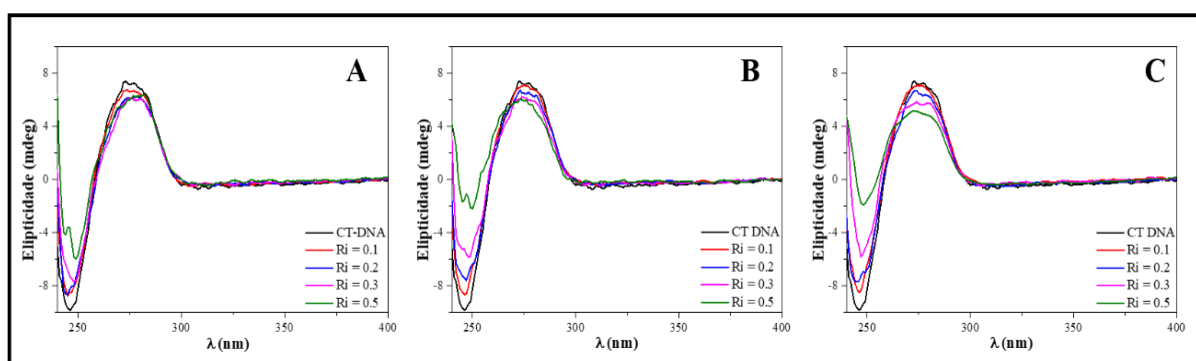


Figura 45 - Espectros de Dicroísmo Circular com diferentes relações entre o DNA e os complexos 7 (A), 9 (B) e 11 (C).

Uma vez que as técnicas realizadas levaram a sugerir a interação dos complexos no sulco menor do DNA, realizou-se o ensaio competitivo com Hoechst, com o intuito de avaliar se os mesmos seriam capazes de deslocar o corante, conhecido por se ligar ao sulco menor do DNA e promover uma diminuição na intensidade de fluorescência decorrente do adulto Hoechst-DNA.

Conforme apresentado nas Figuras 46 e A67, todos os complexos da série 2 levaram a uma diminuição na intensidade de fluorescência do adulto Hoechst-DNA, de maneira que esta supressão foi maior com o aumento da concentração dos compostos. Os resultados demonstram a capacidade dos complexos em deslocar o marcador fluorescente, indicando que os mesmos interagem no sulco menor do DNA, o que se encontra em concordância com as demais técnicas realizadas.

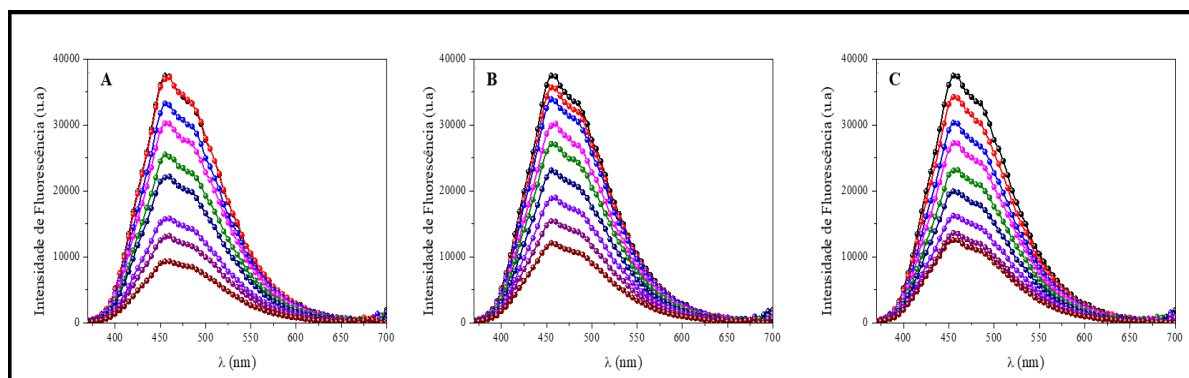


Figura 46- Influência dos complexos 7 (A), 9 (B) e 11 (C) na intensidade de fluorescência do adulto Hoechst-DNA.

CAPÍTULO 5- CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados 11 novos complexos fosfínicos contendo ligantes aciltioureas dissustituídas, divididos em duas séries. A primeira série (série 1), foi composta por 6 complexos de rutênio(II) (5 inéditos e 1 previamente descrito na literatura) com fórmula geral $[\text{RuL}_n(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$, em que $L_n =$: N',N'-dimetil-N-benzoil-tiourea (L_1), N',N'-dimetil-N-tiofenil-tiourea (L_2) ou N',N'-dimetil-N-furoil-tiourea (L_3); bipy = 2,2'-bipiridina e P-P: 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) ou 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb) e a série 2 por 6 complexos isoestruturais com fórmula geral $[\text{ML}_n(\text{dppe})]\text{BF}_4$, em que $M = \text{Ni}^{\text{II}}$, Pd^{II} ou Pt^{II} .

Os complexos foram caracterizados a partir de técnicas como condutividade molar, análise elementar de CHNS, espectroscopia no infravermelho, análises de Ressonância Magnética Nuclear ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H e $\text{RMN}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$), voltametria cíclica (complexos da série 1) e difração de raios X.

Nas duas séries sintetizadas os ligantes aciltioureas se coordenaram de maneira bidentada a partir dos átomos de oxigênio e enxofre, modo de coordenação mais comum segundo a literatura. Esse fato foi evidenciado a partir das técnicas de caracterização.

Os complexos da série 1 foram avaliados frente a linhagens tumorais e não tumorais de mama (MDA-MB-231(tumoral); MCF-10A (não tumoral)) e pulmão (A549 (tumoral); MRC-5 (não tumoral)) apresentando boa atividade e seletividade frente às linhagens tumorais. As alterações estruturais nos ligantes aciltioureas (R_1) e dos ligantes bifosfínicos (dppe e dppb) não levou a grandes alterações nos valores de IC_{50} .

Os complexos da série 2 foram avaliados em linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e pulmão (A549) e não tumorais dos mesmos tecidos (MCF-10A (mama) e MRC-5 (pulmão)), apresentando maior atividade na linhagem não tumoral, quando avaliados nas linhagens celulares de pulmão, e sendo mais ativos nas linhagens tumorais quando avaliados nas linhagens

celulares de mama. Assim como nos complexos da série 1 a alteração do grupo R_1 nos ligantes aciltioureas não promoveu grandes alterações na citotoxicidade dos complexos, porém a alteração íon metálico teve influência, de maneira que os complexos de níquel(II) apresentaram maior atividade.

Os complexos das séries 1 (3 e 6) e 2 (8, 10 e 12) foram capazes de inibir a formação de colônias e alterar a morfologia de células da linhagem MDA- MB-231 principalmente nas maiores concentrações, e inibiram a migração celular em células da mesma linhagem em todas as concentrações avaliadas pelo ensaio de *Wound Healing*. Quando avaliados no ensaio de ciclo celular, todos induziram o acúmulo de células na fase Sub-G1, principalmente nas concentrações superiores ao IC_{50} , indicando que os mesmos estariam induzindo a morte celular. Os complexos da Série 1 (3 e 6) induziram a morte celular por apoptose no ensaio com Anexina V, de maneira dependente da concentração.

Todos os complexos, quando avaliados em relação a interação com CT-DNA, levaram a sugerir a interação no sulco menor do DNA, e os complexos da série 1 mostraram interação com a biomolécula HSA, apresentando constantes de ligação na ordem de 10^4 - 10^6 , assim como demais complexos contendo ligantes aciltioureas.

REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. REEDIJK, J. “Bioinorganic chemistry” . IN: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. Elsevier Inc. 2013, p. 1-3.
2. MJOS, K. D. & ORVIG, C. “Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry”. Chem. Rev., **114**: 4540, 2014.
3. THOMPSON, K. H. & ORVIG, C. “Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design”. Dalt. Trans., 2006 (6): 761, 2006.
4. SCHWIETERT, C. W. & MCCUE, J. P. “Coordination compounds in medicinal chemistry”. Coord. Chem. Rev., 184 (1): 67, 1999.
5. RODER, C. & THOMSON, M. J. “Auranofin: Repurposing an old drug for a golden new age”. Drugs R. D., 15 (1): 13, 2015.
6. HOTTINGER, D. G.; BEEBE, D. S.; KOZHIMANNIL, T.; PRIELIPP, R. C.; & BELANI, K. G. “Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review”. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol., 30 (4): 462, 2014.
7. “World Health Organization (WHO)”. Cancer Fact Sheet 2014. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acessado em 20/10/2019.
8. “World Health Organization”. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. Acessado em 20/10/2019.
9. “Instituto Nacional do Câncer”. <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acessado em 20/10/2019.
10. FOSTER, I. “Cancer: A cell cycle defect”. Radiography., 14 (2): 144, 2008.
11. BODENSTINE, T. M. & WELCH, D. R. “Metastasis suppressors and the tumor microenvironment”. Cancer Microenviron., 1 (1): 1, 2008.
12. “Instituto Nacional do Câncer” . <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>. Acessado em 20/10/2019.
13. “World Health organization” . https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acessado em 20/10/2019.
14. PARDOLL, D. M. “The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy”. Nat. Rev. Cancer., 12 (4): 252, 2012.
15. WILSON, J. J. & LIPPARD, S. J. “Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes”. Chem. Rev., 114 (8): 4470, 2014.
16. DASARI, S. & TCHOUNWOU, P. B. “Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action”. Eur. J. Pharmacol., **740**: 364, 2014.
17. NEVES, A. P. & VARGAS, M. D. “Platinum(II) complexes in cancer therapy”. Rev. Virtual Química., 3 (3): 196, 2014.
18. JUNG, Y. & LIPPARD, S. J. “Direct cellular responses to platinum-induced dna damage”. Chem. Rev., 107 (5): 1388, 2007.
19. KELLAND, L. “The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy”.

- Nat. Rev. Cancer., 7 (8): 573, 2007.
20. MANOHAR, S. & LEUNG, N. "Cisplatin nephrotoxicity: A review of the literature". *J. Nephrol.*, 31 (1): 15, 2018.
 21. CAIRES, A. C. F. "Recent advances involving palladium(II) complexes for the cancer therapy". *Anticancer Agents Med. Chem.*, 7 (5): 484, 2008.
 22. ICSEL, C.; YILMAZ, V. T.; AYGUN, M.; CEVATEMRE, B.; ALPER, P. & ULUKAYA, E. "Palladium(II) and platinum(II) saccharinate complexes with bis(diphenylphosphino)methane/ethane: Synthesis, S-phase arrest and ROS-mediated apoptosis in human colon cancer cells". *Dalt. Trans.*, 47 (33): 11397, 2018.
 23. UMADEVI, C.; KALAIVANI, P.; PUSCHMANN, H.; MURUGAN, S.; MOHAN, P. S. & PRABHAKARAN, R. "Substitutional impact on biological activity of new water soluble Ni(II) complexes: Preparation, spectral characterization, X-ray crystallography, DNA/protein binding, antibacterial activity and in vitro cytotoxicity". *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 167 (II): 45, 2017.
 24. CLARKE, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord. Chem. Rev.*, **236**: 209, 2003.
 25. LEIJEN, S.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN WERKHOVEN, E.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J. H. & SCHELLENS, J. H. M. "Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy". *Invest. New Drugs.*, 33 (1): 201, 2015.
 26. TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W. & KEPPLER, B. K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application". *Chem. Sci.*, 5 (8): 2925, 2014.
 27. MEIER-MENCHES, S. M.; GERNER, C.; BERGER, W.; HARTINGER, C. G. & KEPPLER, B. K. "Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents-towards clinical development". *Chem. Soc. Rev.*, 47 (3): 909, 2018.
 28. ALESSIO, E. & MESSORI, L. "NAMMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: A case story in medicinal inorganic chemistry". *Molecules.*, 24 (10): 1995, 2019.
 29. ALESSIO, E. "Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: A personal perspective". *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017 (12): 1549, 2017.
 30. SAEED, A.; FLÖRKE, U. & ERBEN, M. F. "A review on the chemistry, coordination, structure and biological properties of 1-(acyl/aroyl)-3-(substituted) thioureas". *J. Sulfur Chem.*, 35 (3): 318, 2014.
 31. OTAZO-SÁNCHEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, L.; ESTÉVEZ-HERNÁNDEZ, O.; ROJAS-LIMA, S.; & ALONSO-CHAMARRO, J. "Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes". *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2 (11): 2211, 2001.

32. TAHIR, S.; BADSHAH, A.; HUSSAIN, R. A.; TAHIR, M. N.; TABASSUM, S.; PATUJO, J. A. & RAUF, M. K. "DNA-binding studies and biological activities of new nitrosubstituted acyl thioureas". *J. Mol. Struct.*, **1099**: 215, 2015.
33. SAEED, A.; SHAHEEN, U.; HAMEED, A. & NAQVI, S. Z. H. "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some new 1-(fluorobenzoyl)-3-(fluorophenyl)thioureas". *J. Fluor. Chem.* 130 (11): 1028, 2009.
34. KOCA, İ.; ÖZGÜR, A.; COSKUN, K. A. & TUTAR, Y. "Synthesis and anticancer activity of acyl thioureas bearing pyrazole moiety". *Bioorganic Med. Chem.*, 21 (13): 3859, 2013.
35. MOLTER, A.; KATHREIN, S.; KIRCHER, B. & MOHR, F. "Anti-tumour active gold(I), palladium(II) and ruthenium(II) complexes with thio- and selenoureato ligands: A comparative study". *Dalt. Trans.*, 47 (14): 5055, 2018.
36. KUCHAR, J.; RUST, J.; LEHMANN, C. W. & MOHR, F. "Copper(I) complexes with anionic acylthio- or acylselenourea ligands and N-heterocyclic carbenes or phosphanes". *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2018 (48): 5215, 2018.
37. KUCHAR, J.; RUST, J.; LEHMANN, C. W.; & MOHR, F. "Acylseleno- and acylthiourea complexes of gold(I) N-heterocyclic carbenes". *New J. Chem.*, 43 (27): 10750, 2019.
38. SHEEBA, M. M.; TAMIZH, M. M.; FARRUGIA, L. J.; ENDO, A. & KARVEMBU, R. "Chiral (η^6 -p-cymene)ruthenium(II) complexes containing monodentate acylthiourea ligands for efficient asymmetric transfer hydrogenation of ketones". *Organometallics.*, 33 (2): 540, 2014.
39. YASEEN, S.; RAUF, M. K.; ZAIB, S.; BADSHAH, A.; TAHIR, M. N.; ALI, M. I.; IMTIAZ-UD-DIN; SHAHID, M. & IQBAL, J. "Synthesis, characterization and urease inhibition, in vitro anticancer and antileishmanial studies of Co(III) complexes with N,N,N'-trisubstituted acylthioureas". *Inorganica Chim. Acta.* **443**: 69, 2016.
40. COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTÍN, A. M.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R. & BATISTA, A. A. "Half sandwich Ru(II)-acylthiourea complexes: DNA/HSA-binding, anti-migration and cell death in a human breast tumor cell line". *Dalt. Trans.*, 46 (38): 12865, 2017.
41. CHE, D.-J.; LI, G.; YAO, X.-L.; WU, Q.-J.; WANG, W.-L. & ZHU, Y. "Photochemical generation of a novel (O, N', N'') coordinated iron(II) complex [Fe(FT-py)₂] from a ferrocenoyl-functionalized thiourea ligand: N-ferrocenylcarbonyl-N'-(2-pyridyl)thiourea (HFT-py): crystal and molecular structures of HFT-py and [Fe(FT-py)]". *J. Organomet. Chem.*, 584 (1): 190, 1999.
42. CUNHA, B. N.; COLINA-VEGAS, L.; PLUTÍN, A. M.; SILVEIRA, R. G.; HONORATO, J.; OLIVEIRA, K. M.; COMINETTI, M. R.; FERREIRA, A. G. CASTELLANO, E. E. & BATISTA, A. A. "Hydrolysis reaction

- promotes changes in coordination mode of Ru(II)/acylthiourea organometallic complexes with cytotoxicity against human lung tumor cell lines". *J. Inorg. Biochem.*; **186**: 147, 2018.
43. NGUYEN, H. H. & ABRAM, U. "N-Picolyl-N'-benzoylthiourea, H₂picbtu - A new ligand with a remarkable coordination mode. Synthesis and structures of H₂picbtu and its tetrameric oxorhenium(V) complex". *Inorg. Chem. Commun.*, 11 (12): 1478, 2008.
 44. ABRAM, U.; ABRAM, S.; ALBERTO, R. & SCHIBLI, R. "Ligand exchange reactions starting from [Re(CO)₃Br₃]²⁻. Synthesis, characterization and structures of rhenium(I) tricarbonyl complexes with thiourea and thiourea derivatives". *Inorganica Chim. Acta.*, 248 (2): 193, 1996.
 45. PLUTÍN, A. M.; MOCELO, R.; ALVAREZ, A.; RAMOS, R.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; GRAMINHA, A. E.; FERREIRA, A. G. & BATISTA, A. A. "On the cytotoxic activity of Pd(II) complexes of N,N-disubstituted-N'-acyl thioureas". *J. Inorg. Biochem.*, **134**: 76, 2014.
 46. PLUTÍN, A. M.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; RAMOS, R.; SÁNCHEZ, O. C.; CASTELLANO, E. E.; DA SILVA, M. M.; VILLARREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; PAVAN, F. R. & BATISTA, A. A. "Structure/activity of Pt^{II}/N,N-disubstituted-N'-acylthiourea complexes: Anti-Tumor and Anti-Mycobacterium tuberculosis activities". *J. Brazilian Chem. Soc.*, 29 (6): 1256, 2018.
 47. BECCENERI, A. B.; POPOLIN, C. P.; PLUTIN, A. M.; MAISTRO, E. L.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A. & COMINETTI, M. R. "The trans-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-N'-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)]PF₆ complex has pro-apoptotic effects on triple negative breast cancer cells and presents low toxicity in vivo". *J. Inorg. Biochem.*, 186 (March): 70, 2018.
 48. RAMOS, R.; STEVENS, A. M. P.; DE OLIVEIRA, T. D.; BATISTA, A. A.; CASTELLANO, E. E.; DUQUE, J.; SORIA, D. B.; FANTONI, A. C.; CORRÊA, R. S. & ERBEN, M. F. "Understanding the conformational changes and molecular structure of fuoyl thioureas upon substitution". *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **176**: 8, 2017.
 49. STEPHENSON, T. A. & WILKINSON, G. "New complexes of ruthenium(II) and (III) with triphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands". *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 28 (III): 945, 1966.
 50. BATISTA, A. A.; SANTIAGO, M. O.; DONNICI, C. L.; MOREIRA, I. S.; HEALY, P. C.; BERNERS-PRICE, S. J.; QUEIROZ, S. L. "Electrochemical and spectroscopic studies on RuCl₂(PPh₃)₂(N)₂ and RuCl₂(PPh₃)₂(N-N) complexes (N= pyridine derivatives and N-N= phenanthroline or bipyridine derivatives). X-ray structure of RuCl₂(PPh₃)₂(phen)". *Polyhedron.*, 20 (17): 2123, 2001.
 51. BRESSAN, M. & RIGO, P. "Five-Coordinate complexes of ruthenium(II)

- with di(tertiary phosphines)". *Inorg. Chem.*, 14 (9): 2286, 1975.
52. QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A.; OLIVA, G.; GAMBARDELLA, M. T. P.; SANTOS, R. H. A.; MACFARLANE, K. S.; RETTIG, S. J.; JAMES, B. R. "The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylened". *Inorganica Chim. Acta.* 267 (2): 209, 1998.
53. ANGULO, I. M.; BOUWMAN, E.; VAN GORKUM, R.; LOK, S. M.; LUTZ, M. & SPEK, A. L. "New nickel-containing homogeneous hydrogenation catalysts structures of [Ni(o-MeO-dpppol)Cl₂] and [Ni(dcpe)Cl₂]"'. *J. Mol. Catal. A Chem.*, 202 (1-2): 97, 2003.
54. PEÑA, W. J. V. "Complexos fosfínicos de platina(II) e paládio(II): atividade farmacológica e interação com o DNA e com a Ferritoporfirina". 2017. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2017. Tese de doutorado, 189 p.
55. DOPKE, N. C. & OEMKE, H. E. "The microwave synthesis of platinum(II) phosphine complexes". *Inorganica Chim. Acta.*, 376 (1): 638, 2011.
56. BAROLLI, J. P.; MAIA, P. I. S.; COLINA-VEGAS, L.; MOREIRA, J.; PLUTIN, A. M.; MOCELO, R.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. & BATISTA, A. A. "Heteroleptic tris-chelate ruthenium(II) complexes of N, N'-disubstituted- N'-acylthioureas: Synthesis, structural studies, cytotoxic activity and confocal microscopy studies". *Polyhedron.*, **126**: 33, 2017.
57. MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Methods.*, 65 (1-2): 55, 1983.
58. GEARY, W. J. "The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds". *Coord. Chem. Rev.*, **7**: 81, 1971.
59. GARCIA VELHO, R. "Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico". 2006. Programa Pós-Graduação em Química - UFSCar, 170 p., 2006.
60. NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 6a edição. (Inter-Science EW, ed.). New York: WILEY. 2009.
61. SOWA, J. R. & ANGELICI, R. J. "Bidentate phosphine basicities as determined by enthalpies of protonation". *Inorg. Chem.*, 30 (18): 3534, 1991.
62. BERNERS-PRICE, S. J.; NORMAN, R. E. & SADLER, P. J. "The autoxidation and proton dissociation constants of tertiary diphosphines: relevance to biological activity". *J. Inorg. Biochem.*, 31 (3): 197, 1987.
63. CORREA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; DELOLO, F. G.; ALVAREZ, A.;

- MOCELO, R.; PLUTIN, A. M.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E. & BATISTA, A. A. "Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'-(disubstituted)thiourea ligands: Synthesis, characterization, BSA- and DNA-binding studies of new cytotoxic agents against lung and prostate tumour cells". *J. Inorg. Biochem.*, 150 (II): 63, 2015.
64. MAUTJANA, A. N.; MILLER, J. D. S.; GIE, A.; BOURNE, S. A. & KOCH, K. R. "Tailoring hydrophilic N,N-dialkyl-N'-acylthioureas suitable for Pt(II), Pd(II) and Rh(III) chloride pre-concentration from acid aqueous solutions, and their complex separation by reversed-phase HPLC". *Dalt. Trans.*, 2003 (10): 1952, 2003.
65. KENNEDY, J. D. & STAVES, J. "NMR Studies on Halogeno-cis-bis(phosphine)-nido-pentaboranyl Derivatives of Nickel, Palladium, and Platinum". *Zeitschrift für Naturforsch.*, 34 (6): 808, 1979.
66. SAEED, S.; RASHID, N.; ALI, M.; HUSSAIN, R. & JONES, P. "Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and pharmacological properties of some thiophene-thiourea core derivatives". *Eur. J. Chem.*, 1 (3): 221, 2010.
67. CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nat. Rev. Cancer.*, 2 (8): 563, 2002.
68. COLINA-VEGAS, L.; OLIVEIRA, K.; CUNHA, B.; COMINETTI, M.; NAVARRO, M. & AZEVEDO BATISTA, A. "Anti-Proliferative and Anti-Migration Activity of Arene–Ruthenium(II) Complexes with Azole Therapeutic Agents". *Inorganics.*, 6 (4): 132, 2018.
69. BALACHANDRAN, C.; HARIBABU, J.; JEYALAKSHMI, K.; BHUVANESH, N. S. P.; KARVEMBU, R.; EMI, N. & AWALE, S. "Nickel(II) bis(isatin thiosemicarbazone) complexes induced apoptosis through mitochondrial signaling pathway and G0/G1 cell cycle arrest in IM-9 cells". *J. Inorg. Biochem.* **182**: 208, 2018.
70. BARRA, C. V.; & NETTO, A. V. G. "Artigo Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: Um enfoque nos metalintercaladores". *Rev. Virtual Química.*, 7 (6): 1998, 2015.
71. SIRAJUDDIN, M.; ALI, S. & BADSHAH, A. "Drug – DNA interactions and their study by UV – Visible , fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry". *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 124 (2013): 1, 2013.
72. KELLETT, A.; MOLPHY, Z.; SLATOR, C.; MCKEE, V. & FARRELL, N. P. "Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions". *Chem. Soc. Rev.*, 48 (II): 971, 2019.
73. WIEDERHOLT, K.; RAJUR, S. B.; JR., J. G.; O'DONNELL, M. J. & MCLAUGHLIN, L. W. "DNA-tethered Hoechst groove-binding agents: Duplex stabilization and fluorescence characteristics". *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (30): 7055, 1996.
74. KASHANIAN, S. & ZEIDALI, S. H. "DNA Binding Studies of Tartrazine Food Additive". *DNA Cell Biol.*, 30 (7): 499, 2011.

-
75. PANSARE, A. V.; KULAL, D. K.; SHEDGE, A. A. & PATIL, V. R. "HsDNA groove binding, photocatalytic activity, and in vitro breast and colon cancer cell reducing function of greener SeNPs". *Dalt. Trans.*, 45 (30): 12144, 2016.
 76. NAVEENRAJ, S. & ANANDAN, S. "Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs". *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 14 : 53, 2013.
 77. CHUANG, V. T. G. & OTAGIRI, M. "Photoaffinity labeling of plasma proteins". *Molecules.* 18 (11): 13831, 2013.
 78. LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edit. New York: Springer. 2009.
 79. SUN, J.; HUANG, Y.; ZHENG, C.; ZHOU, Y.; LIU, Y. & LIU, J. "Ruthenium (II) Complexes Interact with Human Serum Albumin and Induce Apoptosis of Tumor Cells". *Biol. Trace Elem. Res.*, 163 (1-2): 266, 2015.
 80. ROSS, P. D. & SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability". *Biochemistry.* **20**: 3096, 1981.

APÊNDICE

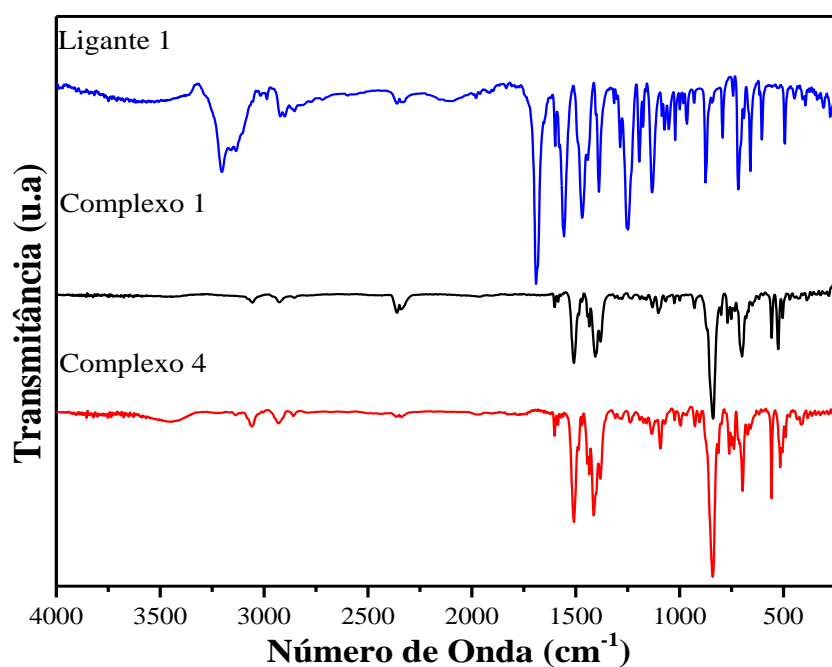


Figura A 1- Espectros na região do infravermelho dos complexos (1 e 4) e do ligante 1.

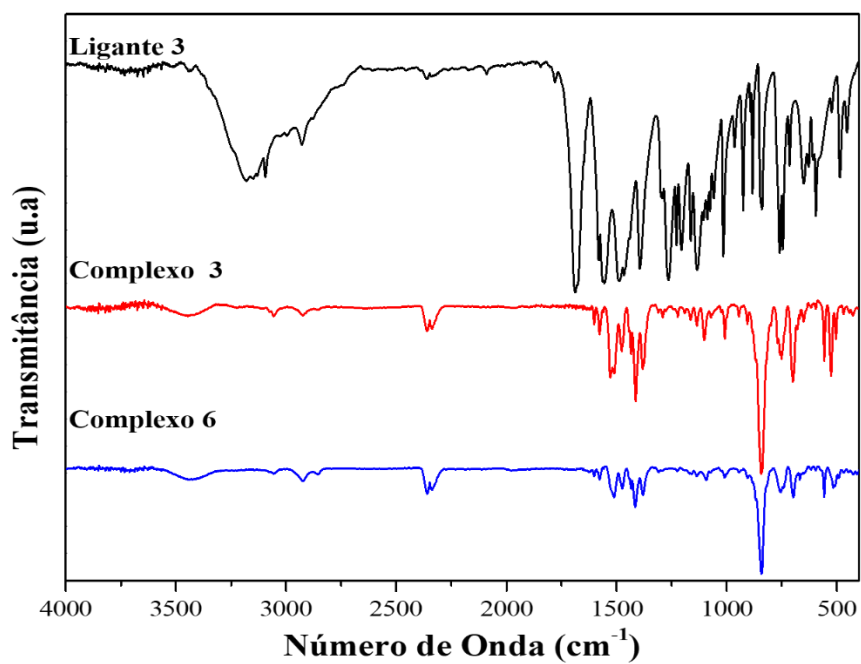


Figura A 2- Espectros na região do infravermelho dos complexos (3 e 6) e do ligante 3.

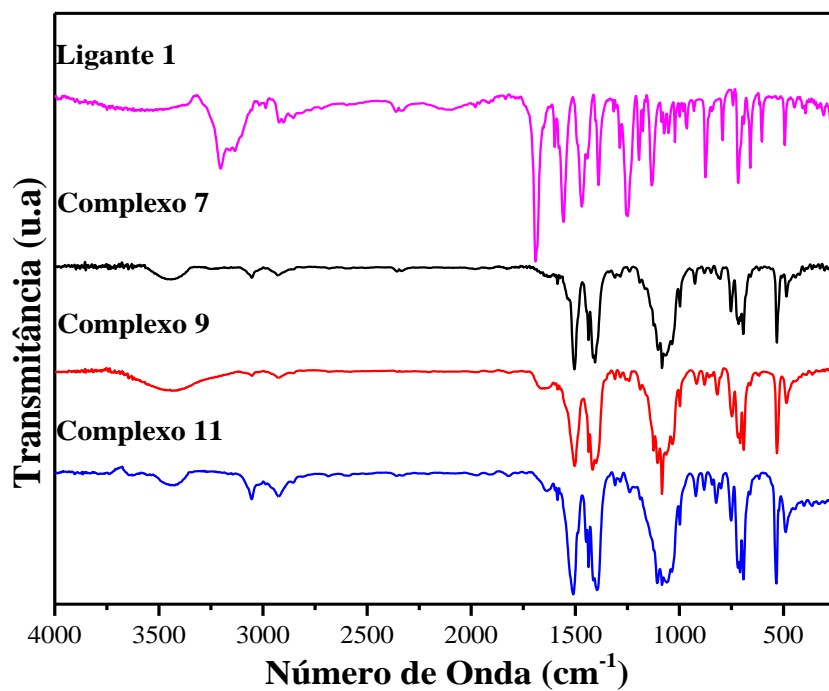


Figura A 3- Espectros na região do infravermelho dos complexos (7, 9 e 11) e do ligante 1.

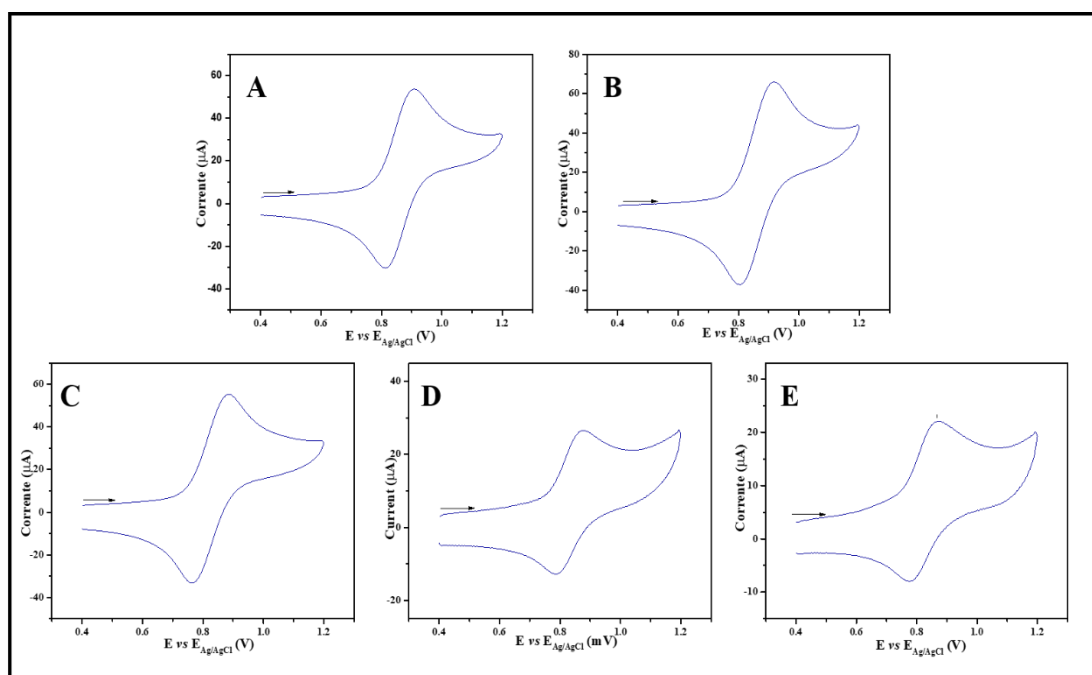


Figura A 4- Voltamogramas cíclicos dos complexos 1 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) e 6 (E) em diclorometano.

Tabela A 1-Valores de E_{pa} e $E_{1/2}$ dos complexos da série 1.

	E_{pa} (mV)	$E_{1/2}$ (mV)
Complexo 1	906	860
Complexo 2	916	868
Complexo 3	918	861
Complexo 5	874	830
Complexo 6	866	821

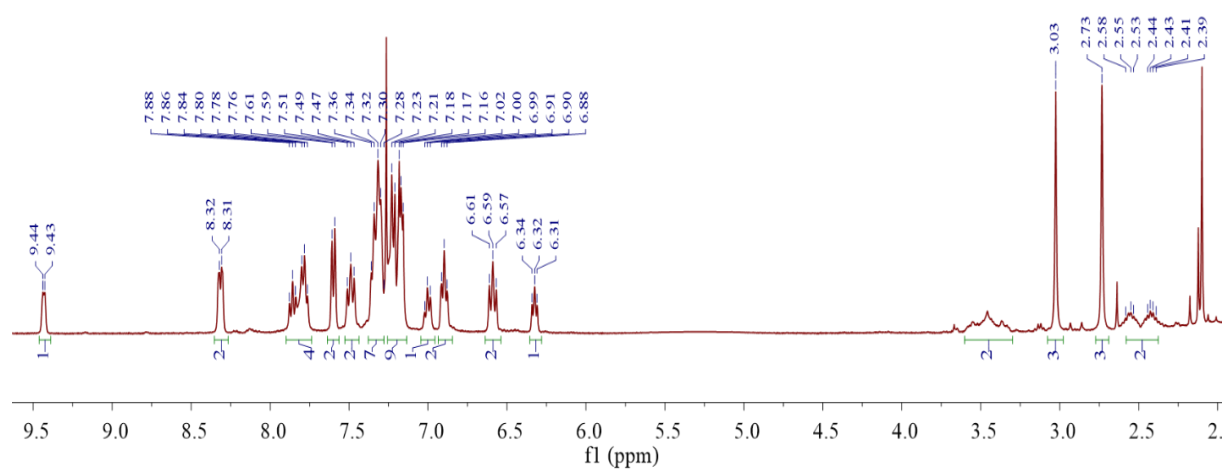


Figura A 5- Espectro de RMN de 1H do complexo 1 em clorofórmio-d.

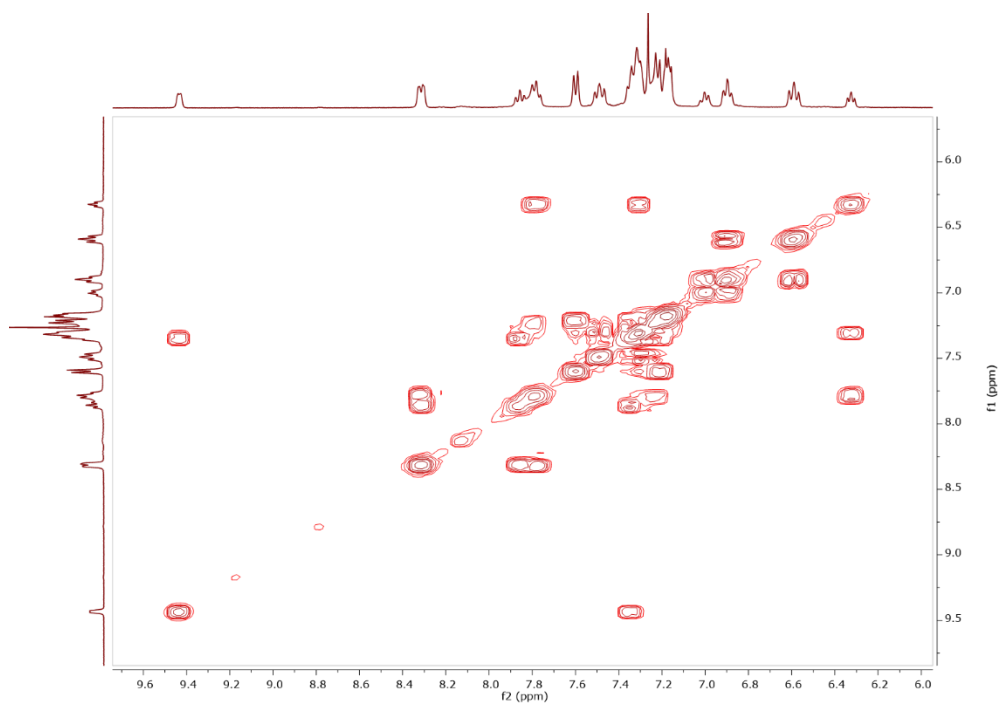


Figura A 6- Espectro de RMN -COSY do complexo 1 em clorofórmio-d.

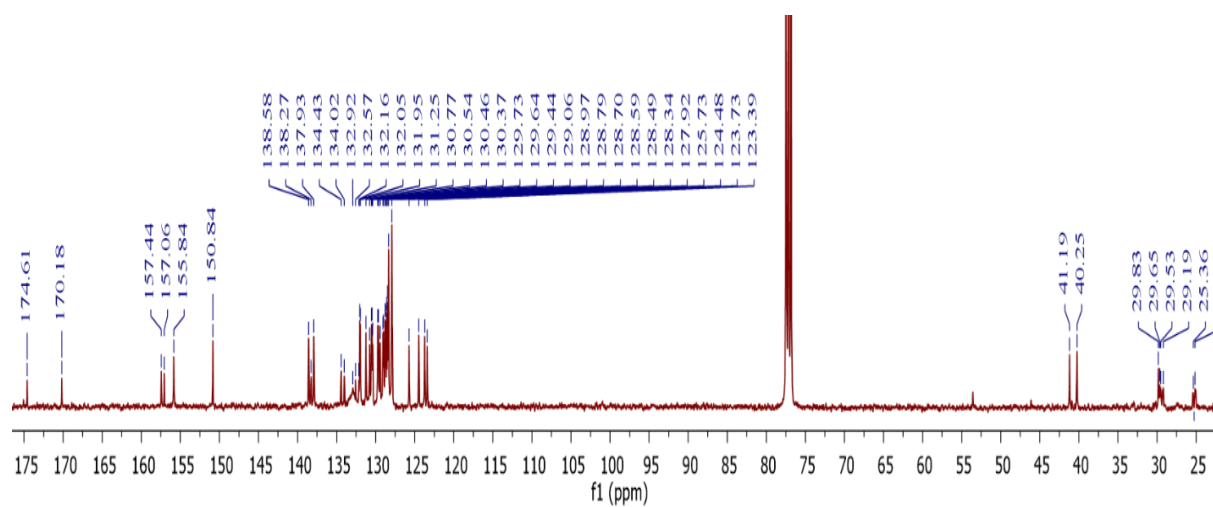


Figura A 7- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 1 em clorofórmio-d.

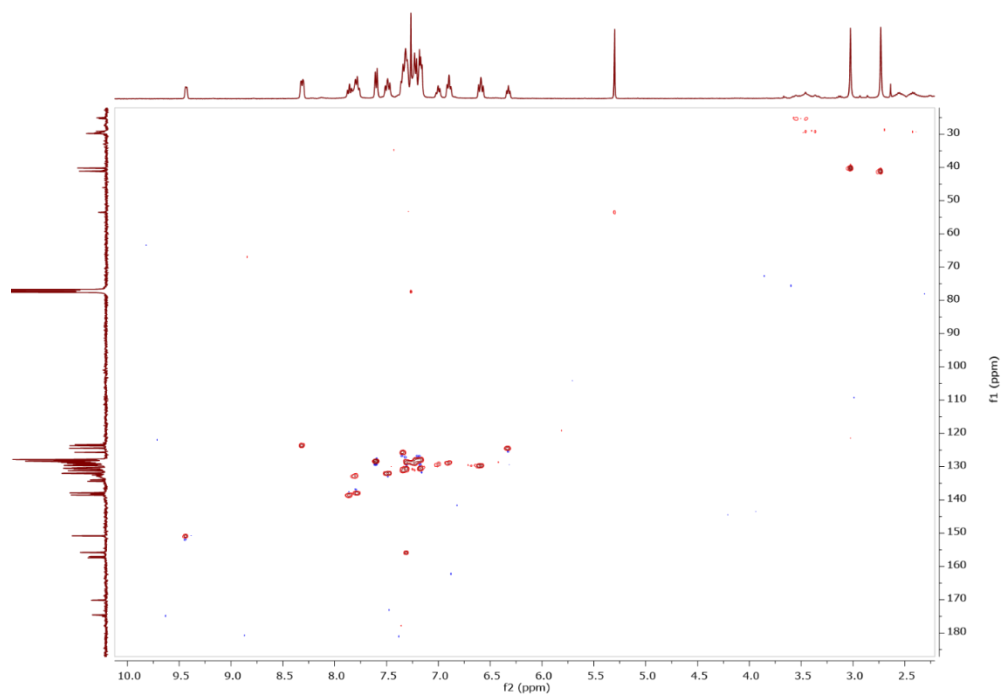


Figura A 8- Espectro de RMN -HSQC do complexo 1 em clorofórmio-d.

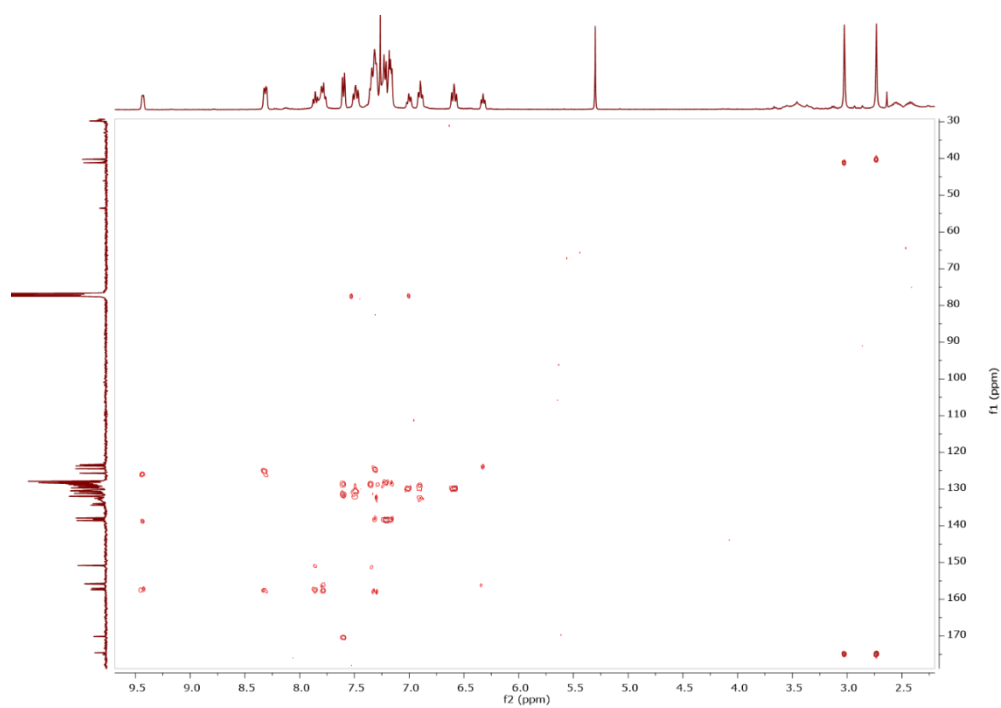


Figura A 9- Espectro de RMN -HMBC do complexo 1 em clorofórmio-d.

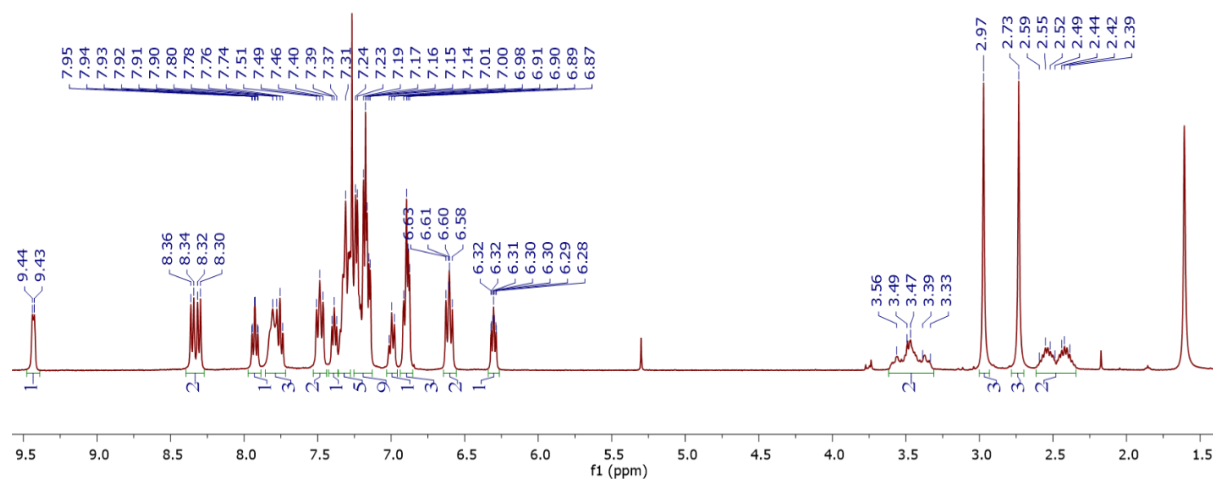


Figura A 10- Espectro de RMN ¹H do complexo 2 em clorofórmio-d.

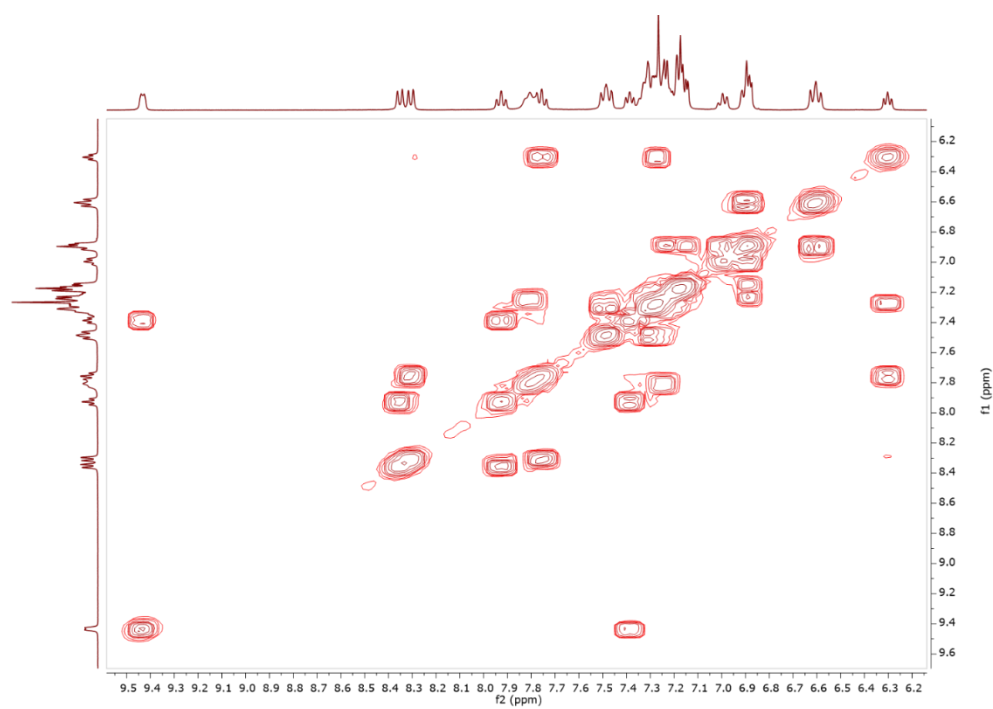


Figura A 11- Espectro de RMN-COSY do complexo 2 em clorofórmio-d.

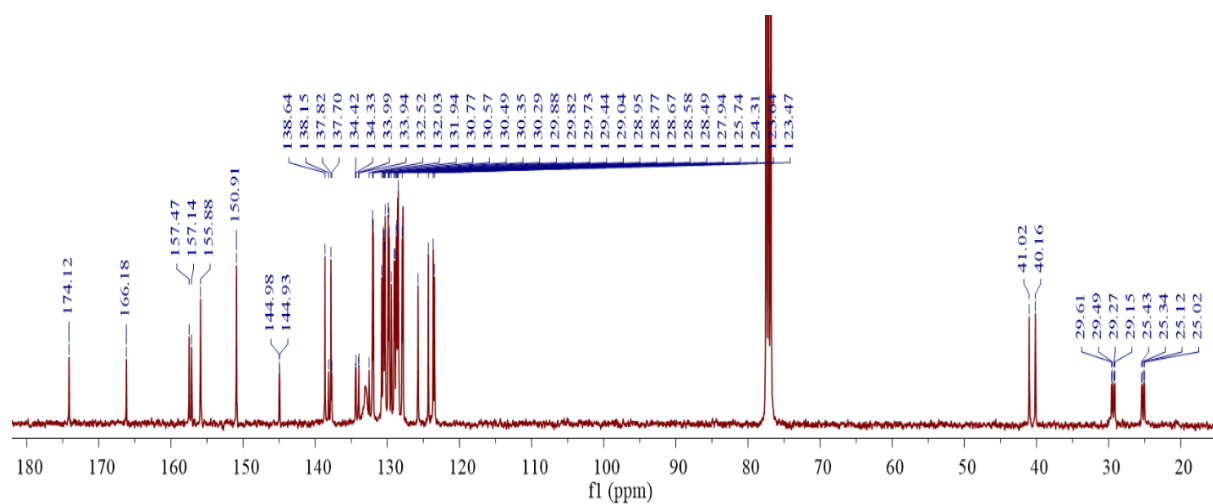


Figura A 12- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 2 em clorofórmio-d.

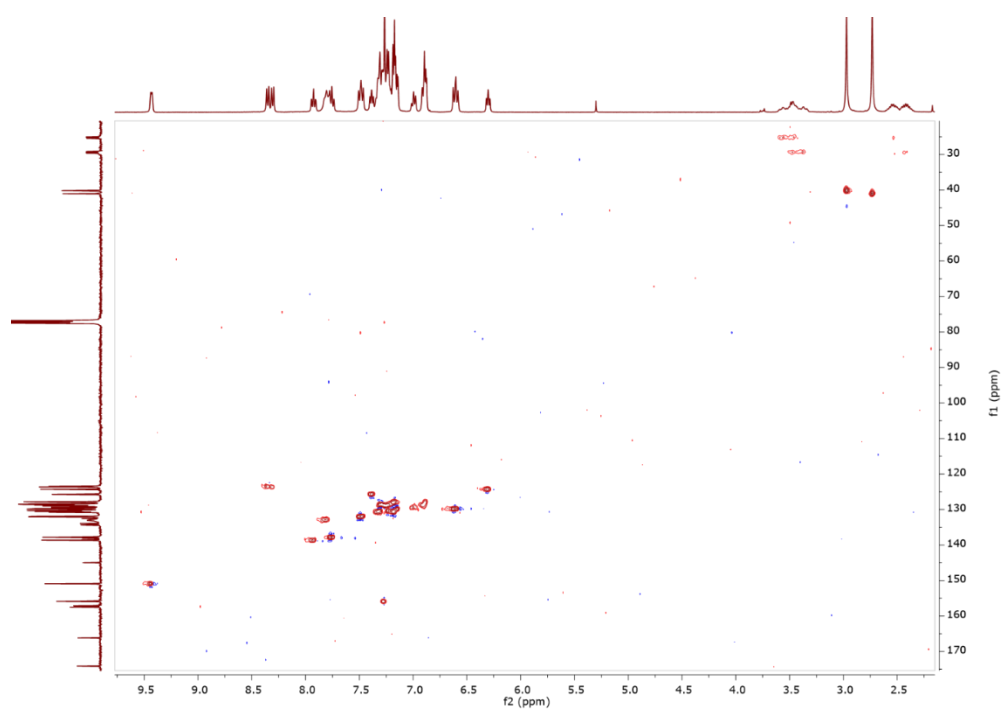


Figura A 13- Espectro de RMN-HSQC do complexo 2 em clorofórmio-d.

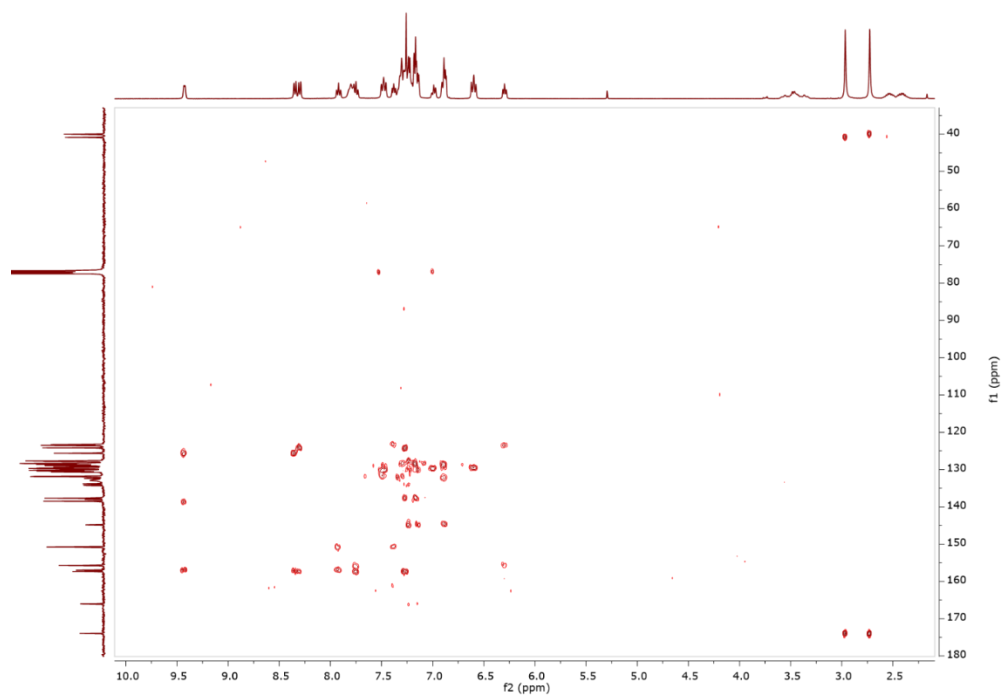


Figura A 14- Espectro de RMN-HMBC do complexo 2 em clorofórmio-d.

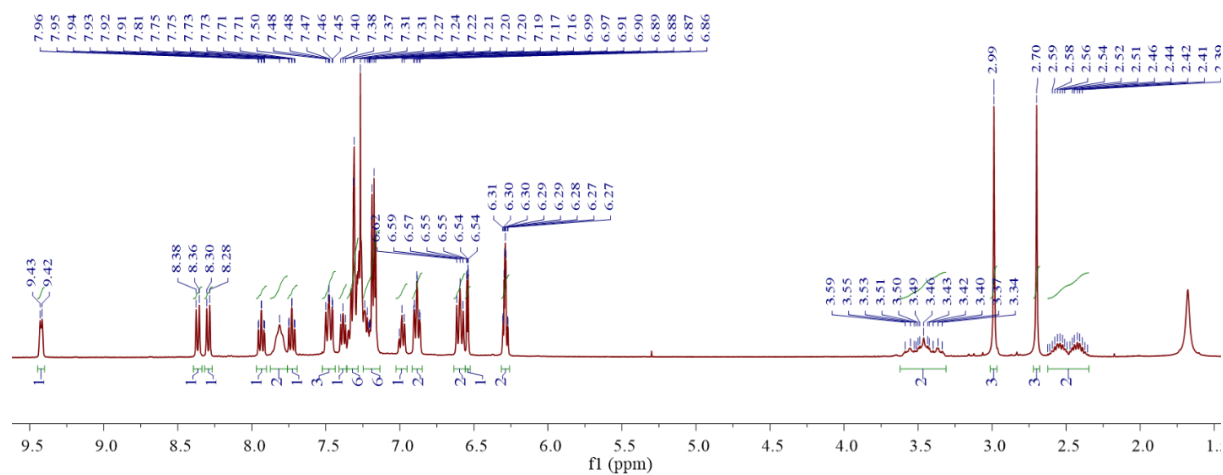


Figura A 15- Espectro de RMN 1H do complexo 3 em clorofórmio-d.

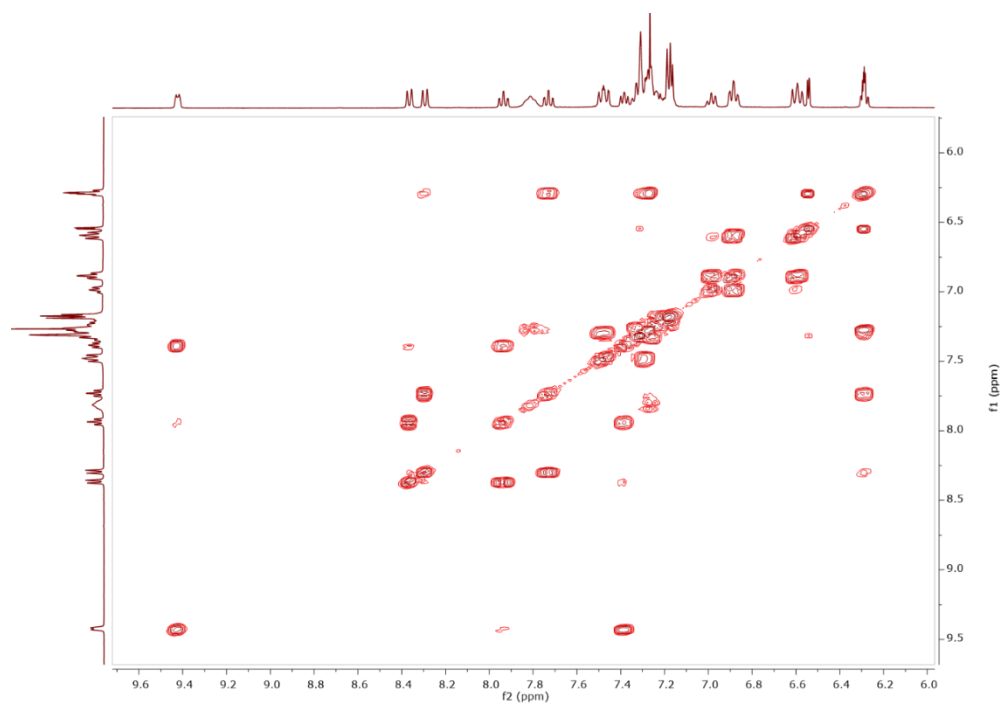


Figura A 16- Espectro de RMN-COSY do complexo 3 em clorofórmio-d.

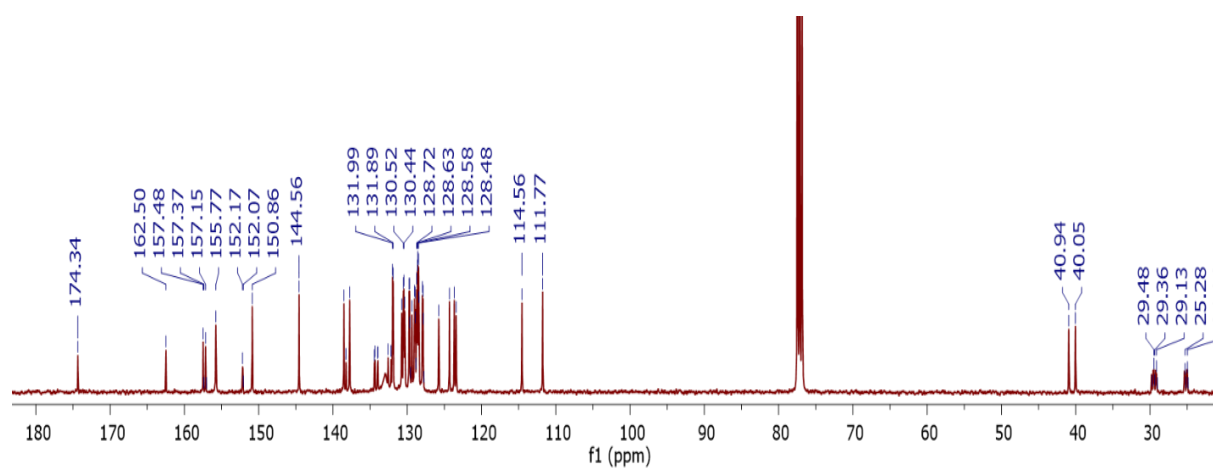


Figura A 17- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 3 em clorofórmio-d.

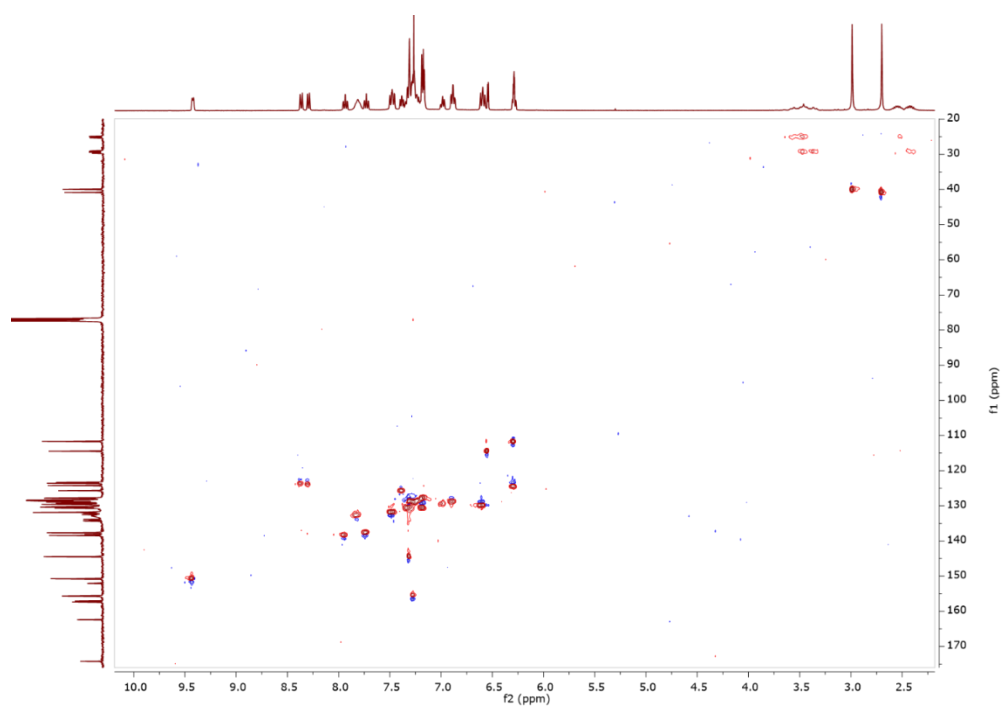


Figura A 18- Espectro de RMN-HSQC do complexo 3 em clorofórmio-d

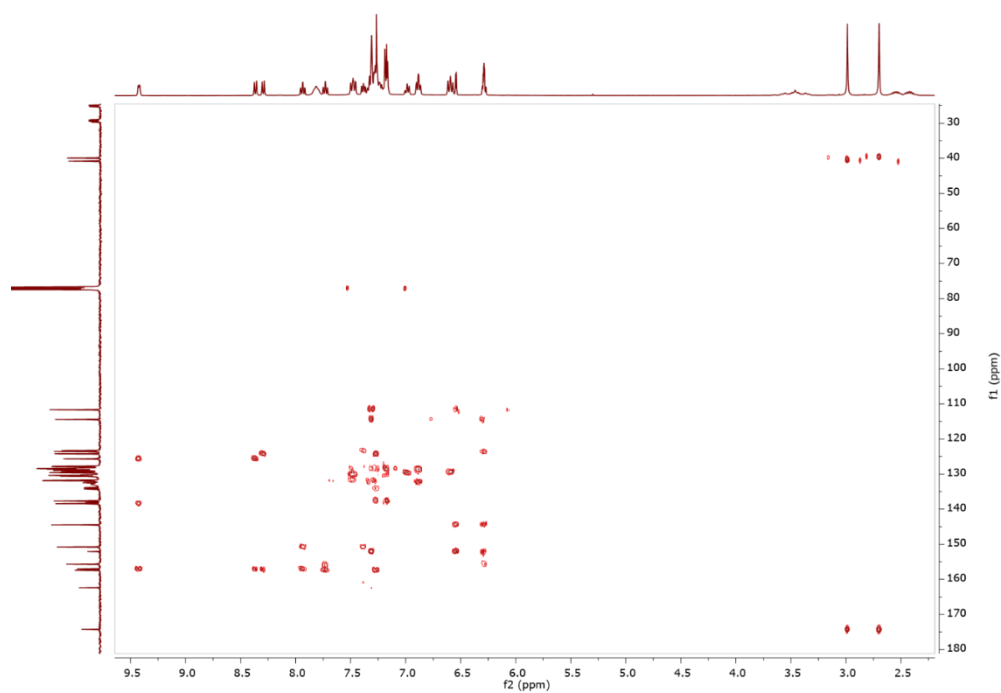


Figura A 19- Espectro de RMN-HSQC do complexo 3 em clorofórmio-d.

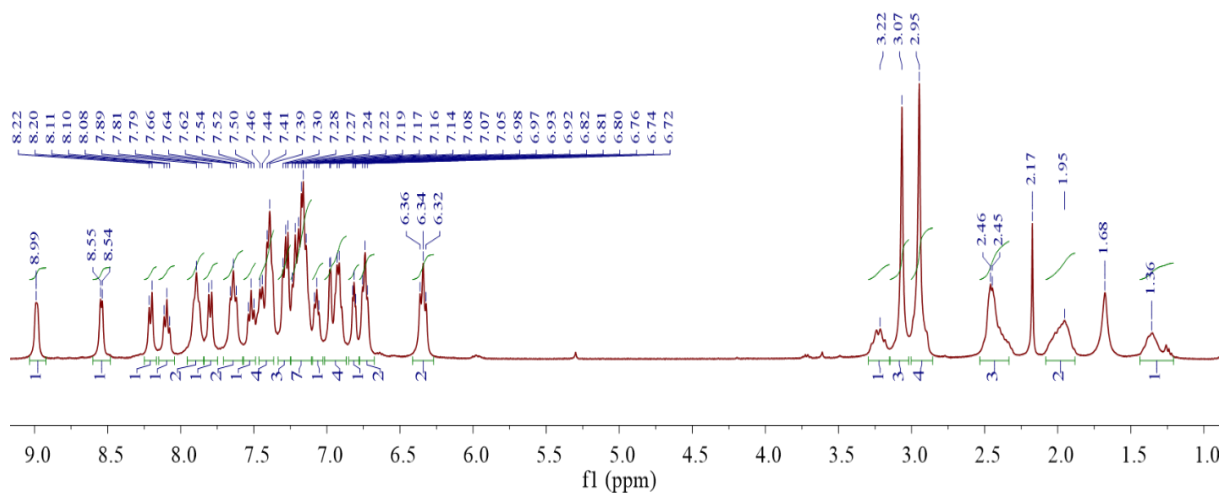


Figura A 20- Espectro de RMN ^1H do complexo 5 em clorofórmio-d.

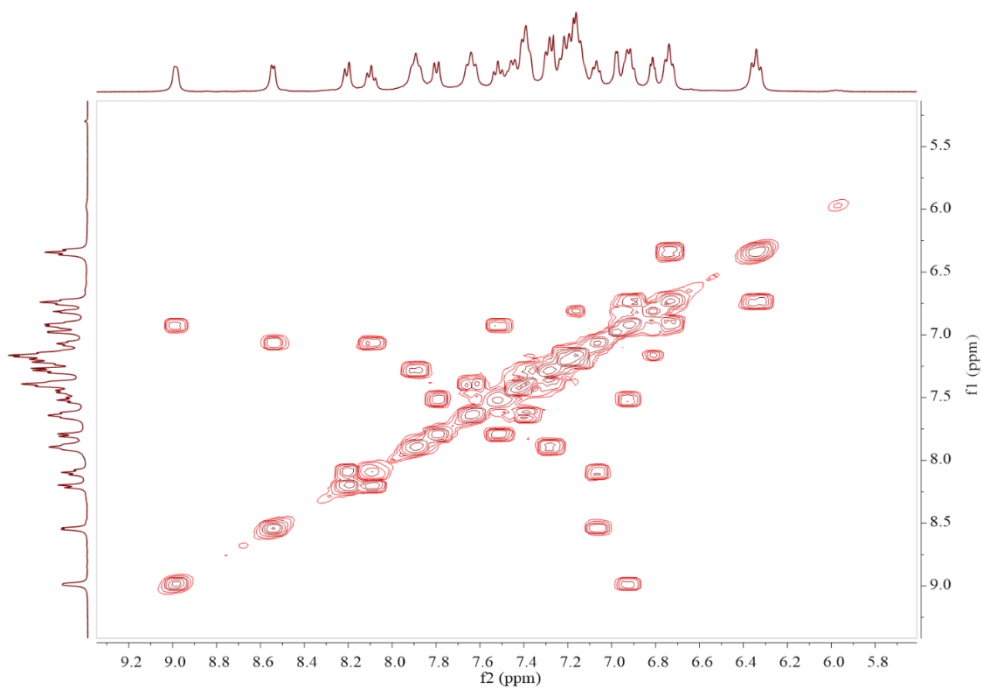


Figura A 21- Espectro de RMN-COSY do complexo 5 em clorofórmio-d.

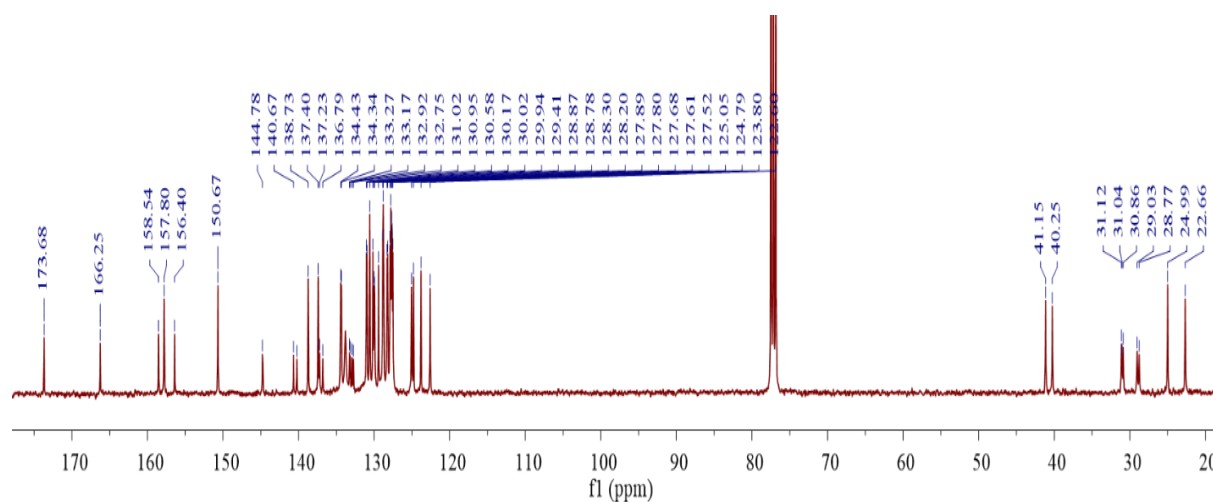


Figura A 22- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 5 em clorofórmio-d.

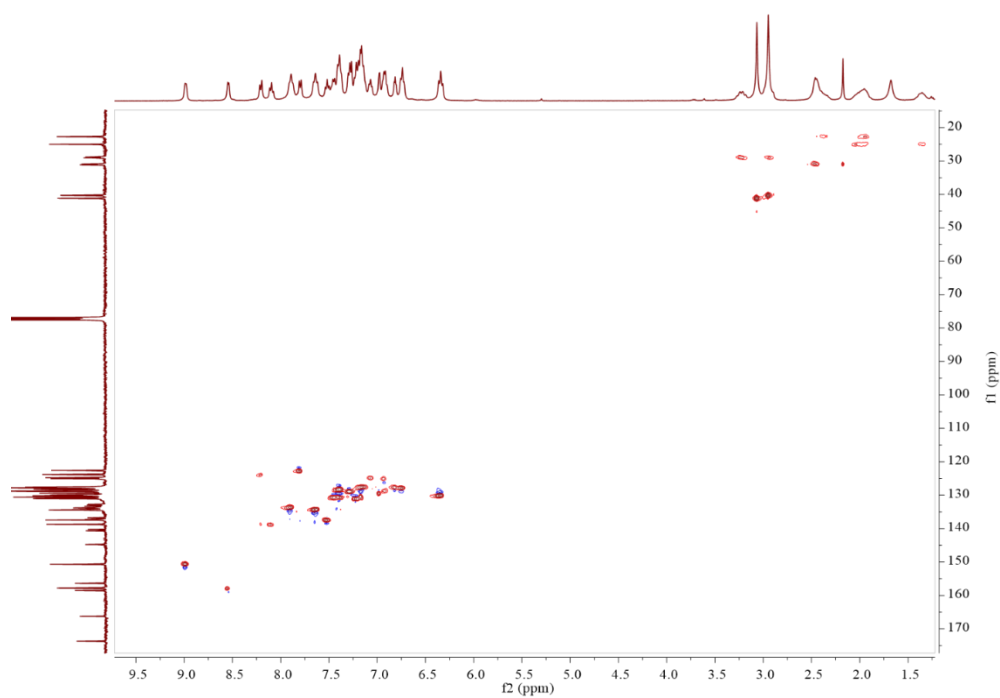


Figura A 23- Espectro de RMN-HSQC do complexo 5 em clorofórmio-d.

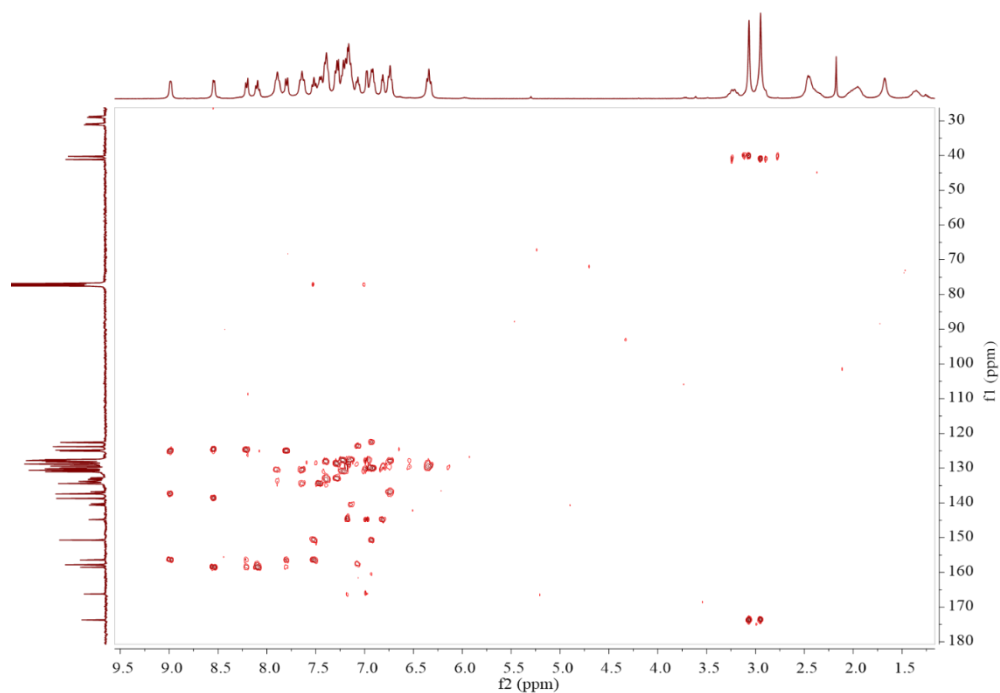


Figura A 24- Espectro de RMN-HMBC do complexo 5 em clorofórmio-d.

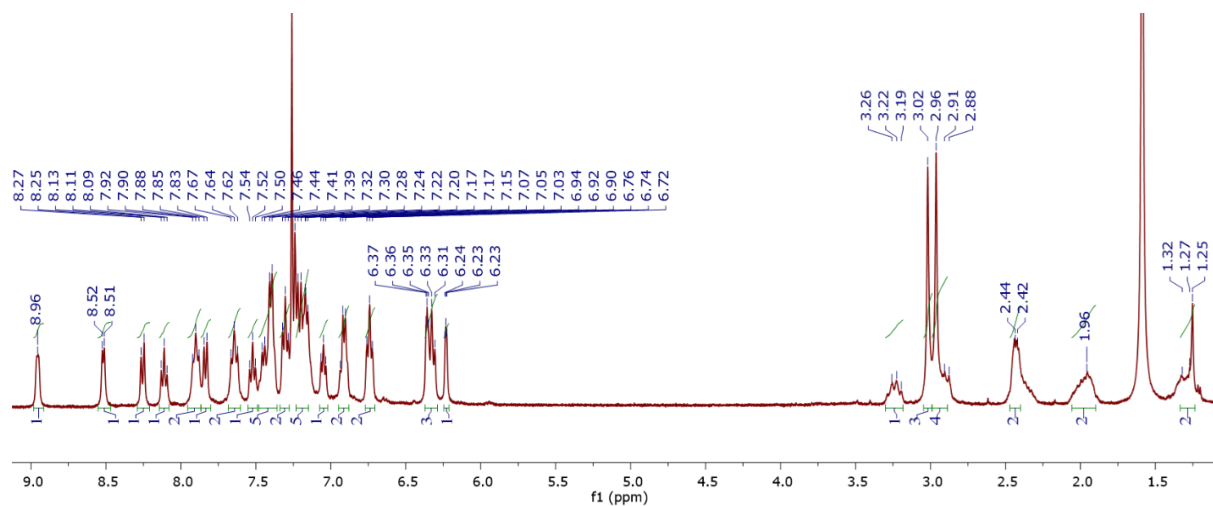


Figura A 25-Espectro de RMN 1H do complexo 6 em clorofórmio-d.

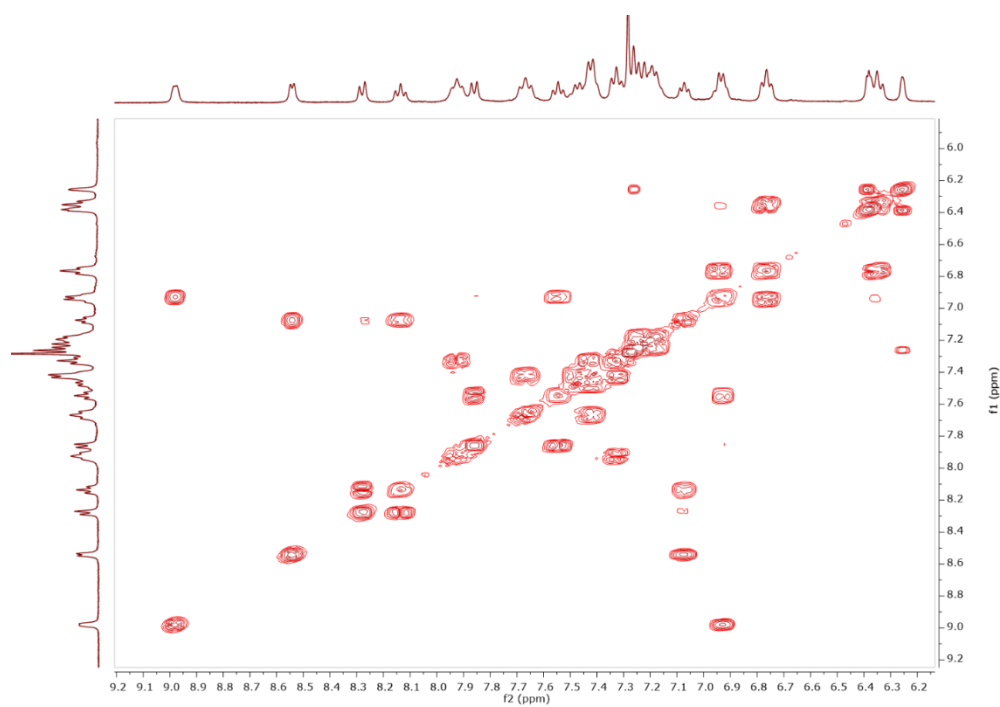


Figura A 26-Espectro de RMN-COSY do complexo 6 em clorofórmio-d.

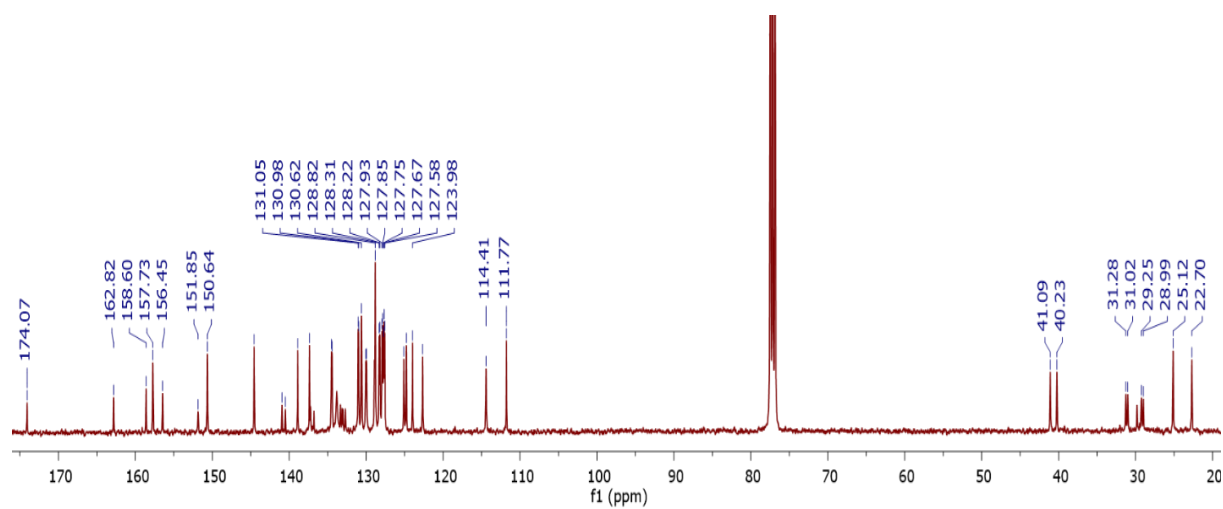


Figura A 27-Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 6 em clorofórmio-d.

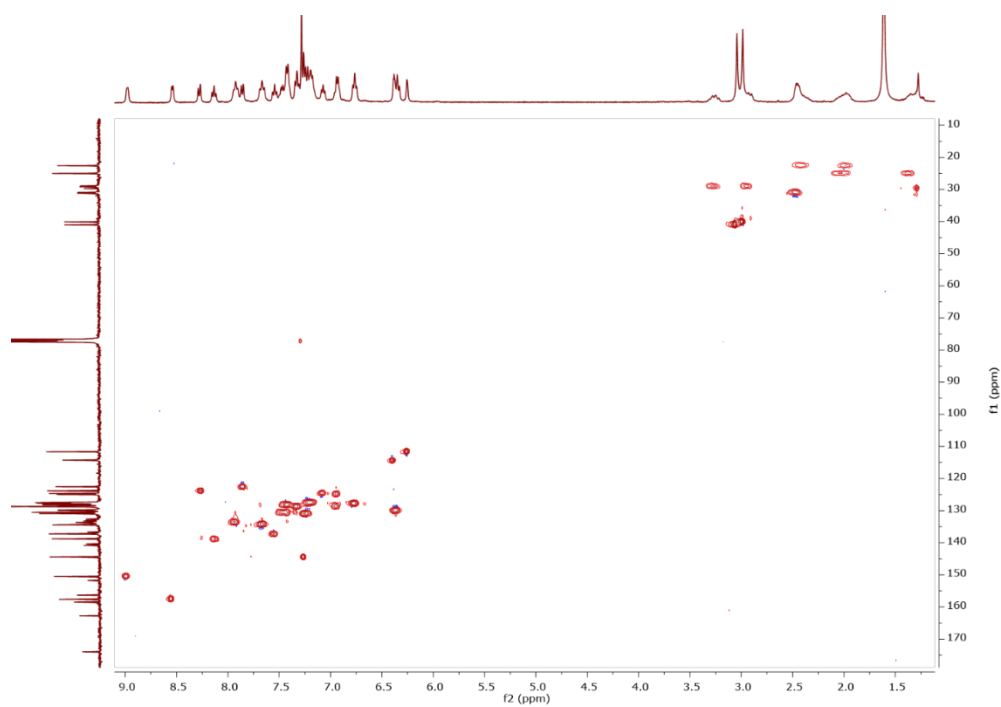


Figura A 28-Espectro de RMN-HSQC do complexo 6 em clorofórmio-d.

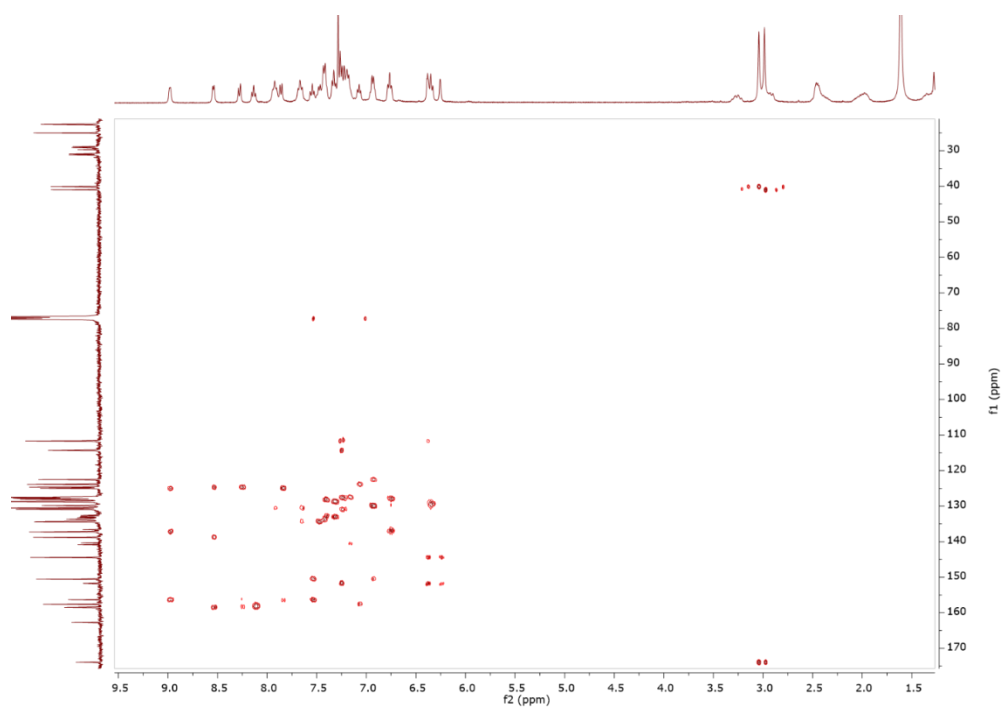


Figura A 29-Espectro de RMN-HMBC do complexo 6 em clorofórmio-d.

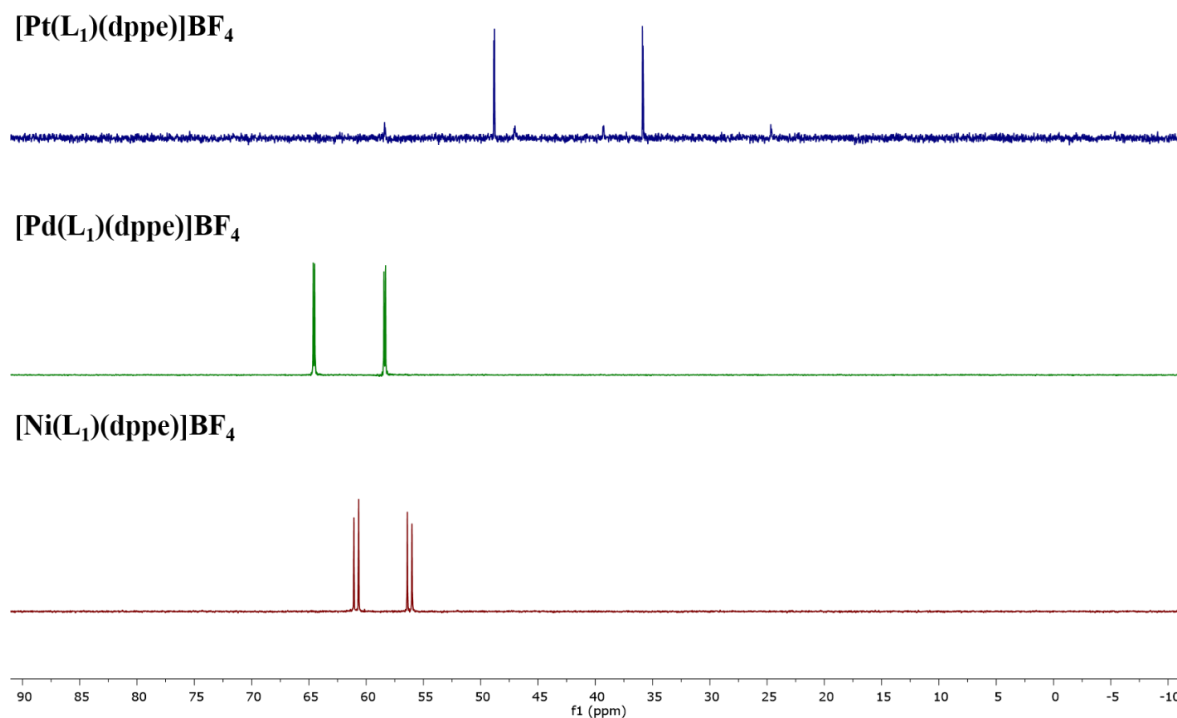


Figura A 30- Espectro de RMN ³¹P{¹H} dos complexos 7, 9 e 11 em CH₂Cl₂/D₂O.

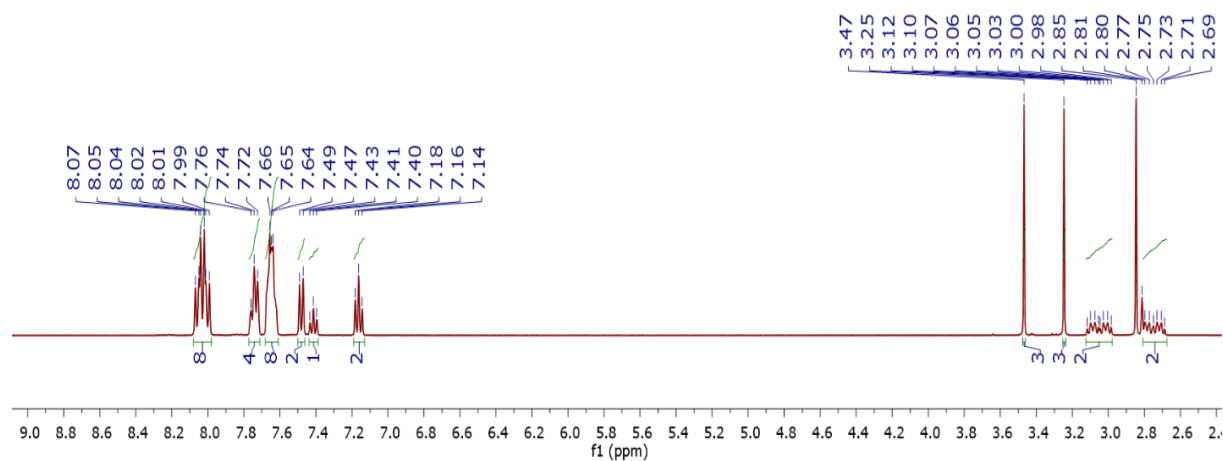


Figura A 31-Espectro de RMN ¹H do complexo 7 em acetona-d₆.

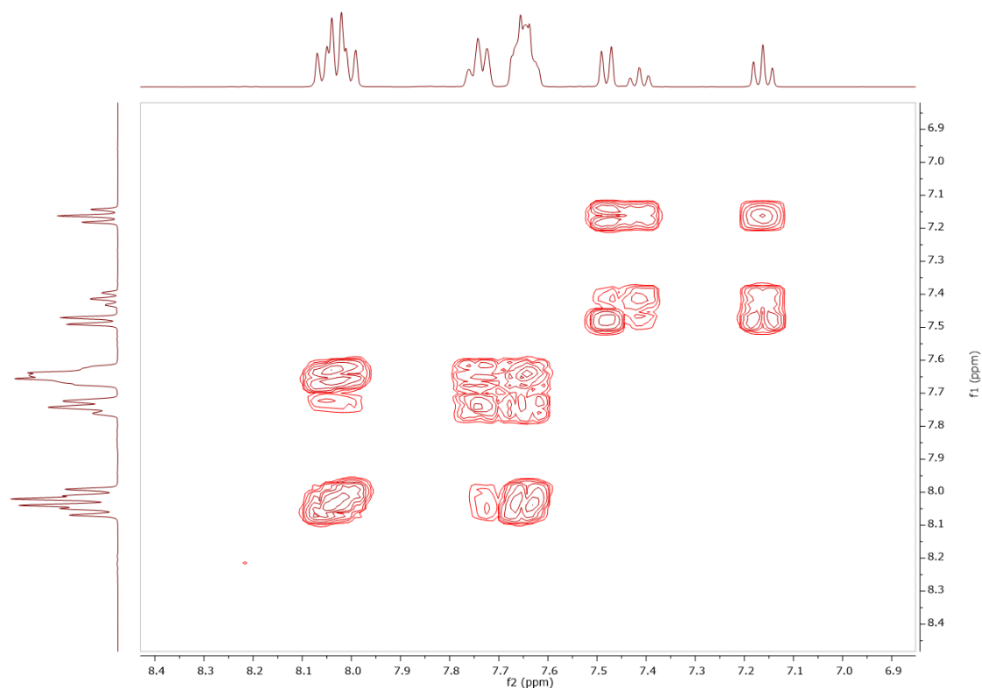


Figura A 32-Espectro de RMN-COSY do complexo 7 em acetona-d₆.

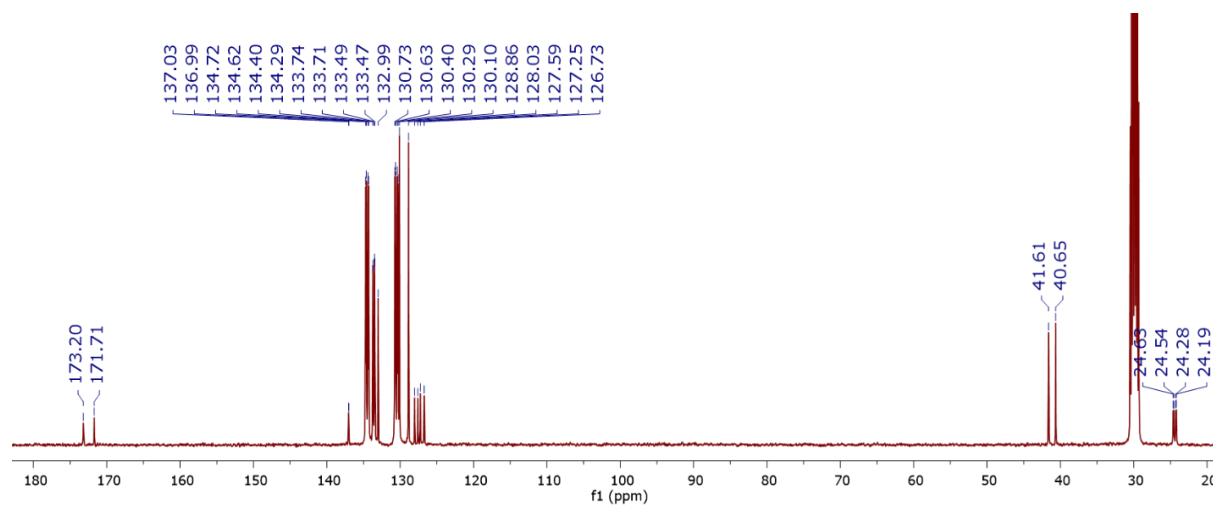


Figura A 33-Espectro de RMN ¹³C{¹H} do complexo 7 em acetona-d₆.

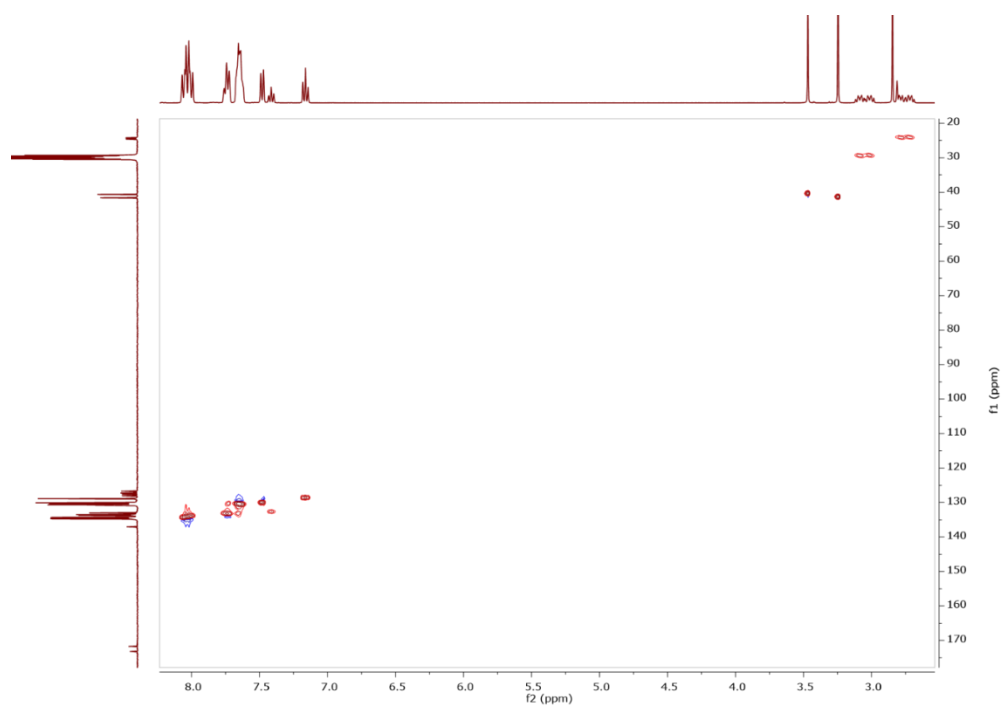


Figura A 34-Espectro de RMN-HSQC do complexo 7 em acetona-d6.

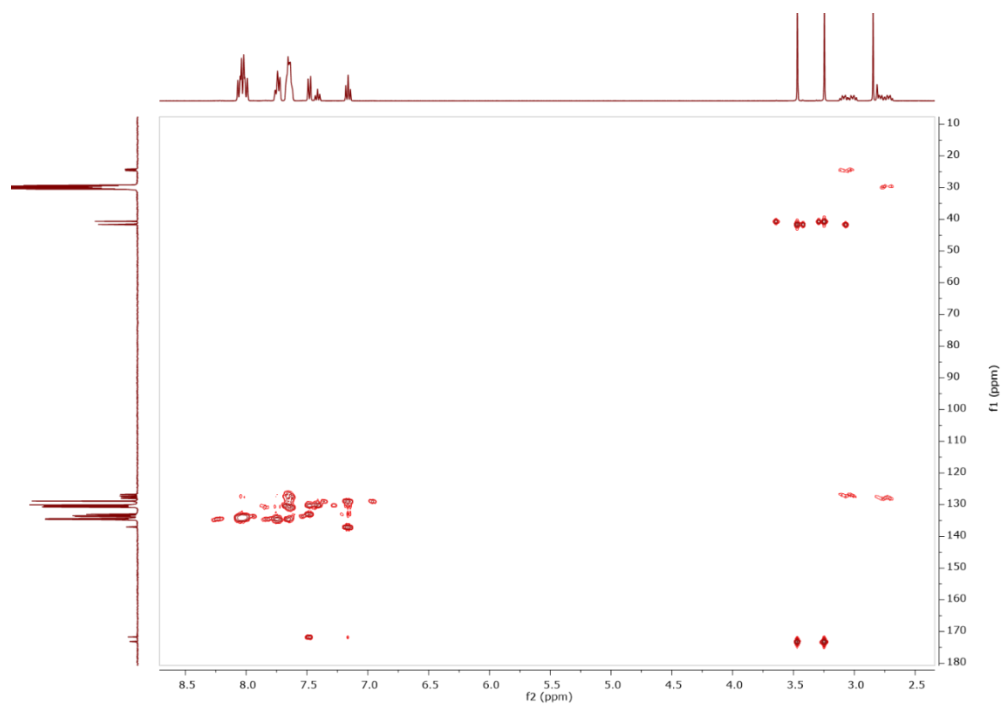


Figura A 35- Espectro de RMN-HMBC do complexo 7 em acetona-d6.

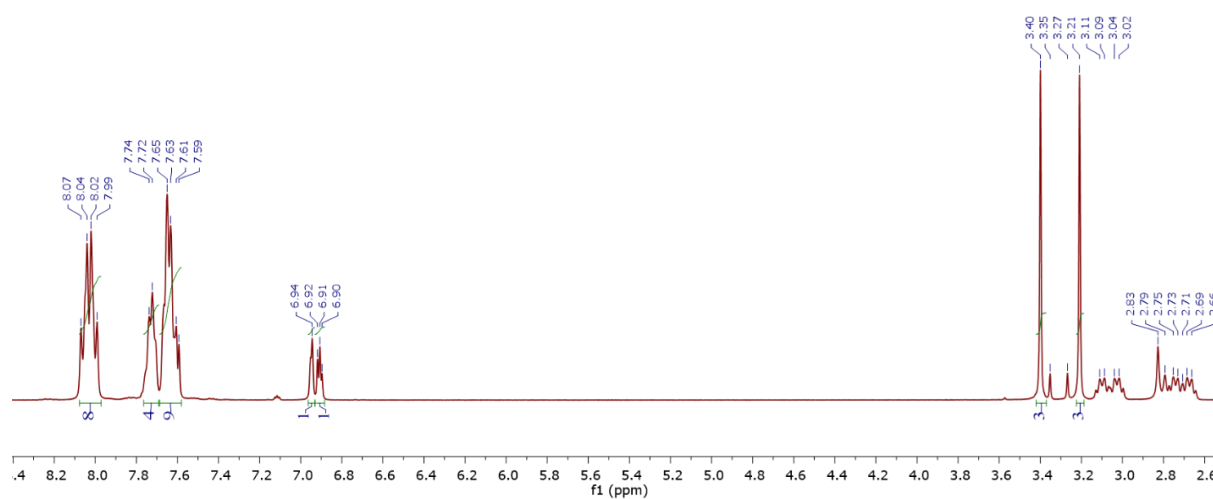


Figura A 36- Espectro de RMN ¹H do complexo 8 em acetona-d₆.

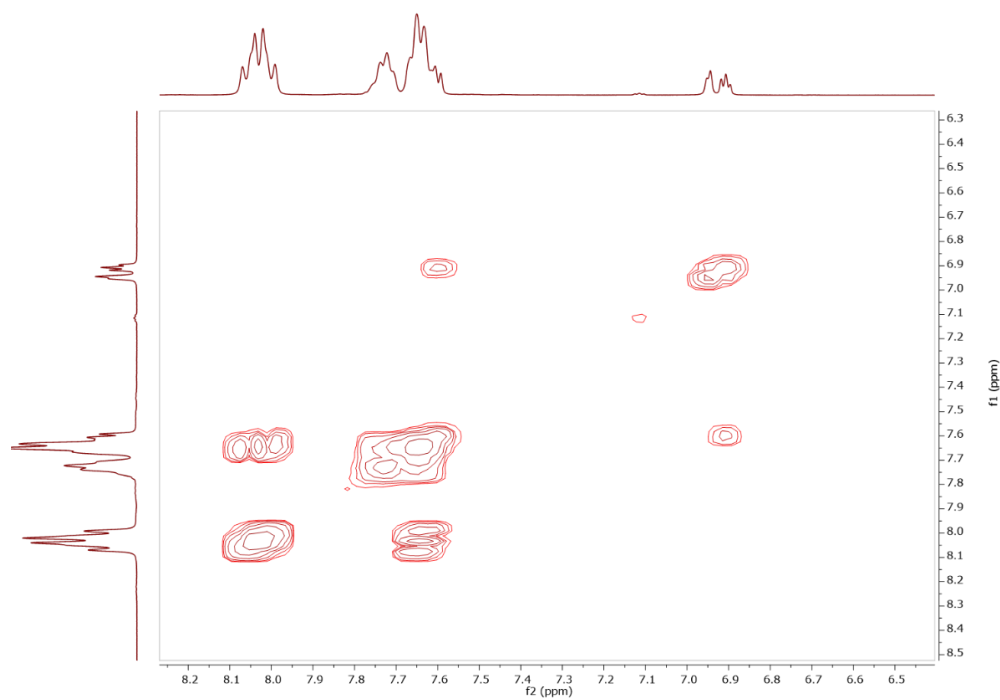


Figura A 37- Espectro de RMN-COSY do complexo 8 em acetona-d₆.

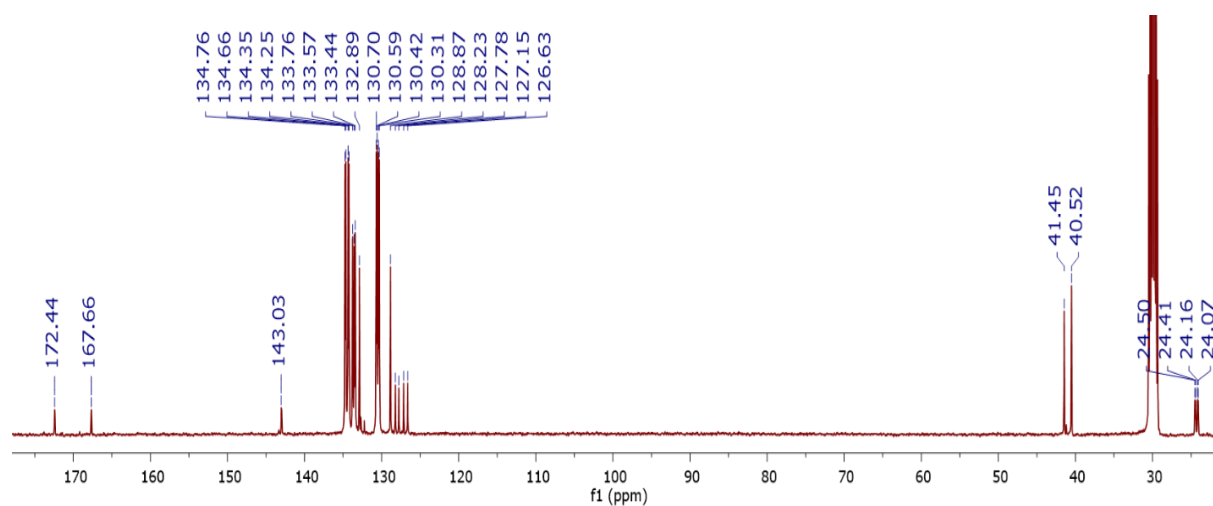


Figura A 38-Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 8 em acetona-d6.

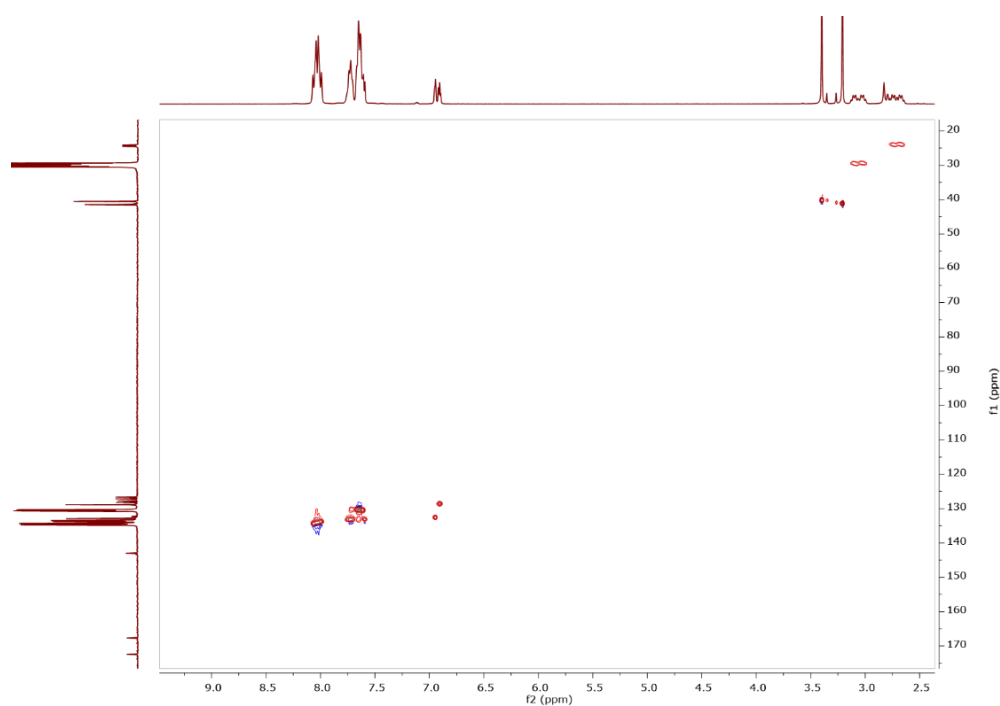


Figura A 39- Espectro de RMN-HSQC do complexo 8 em acetona-d6.

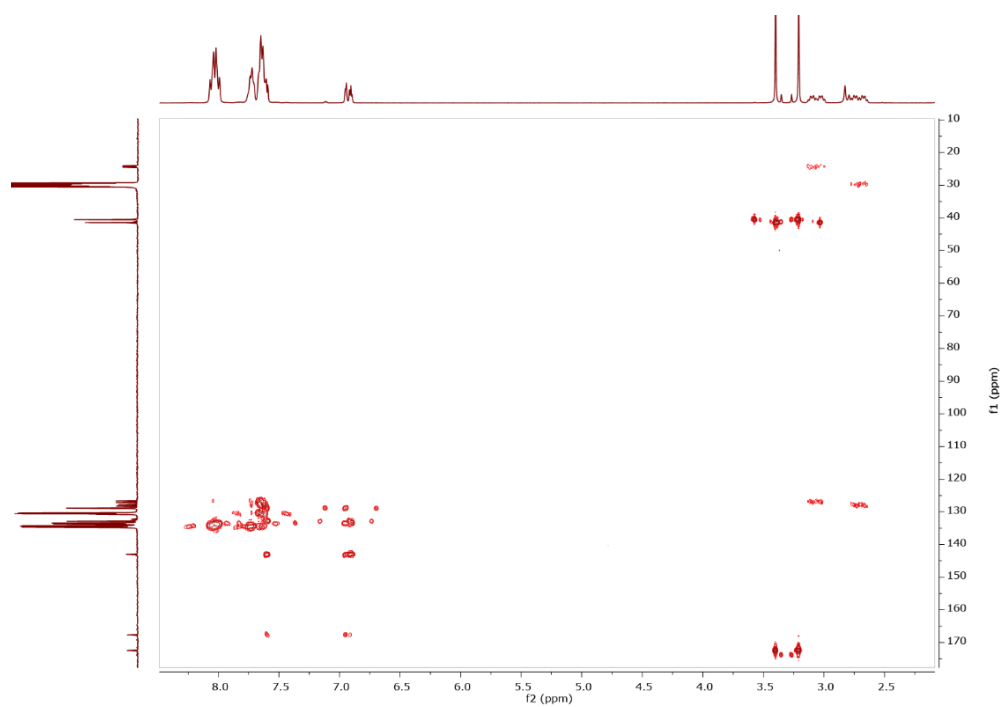


Figura A 40-Espectro de RMN-HMBC do complexo 8 em acetona-d6.

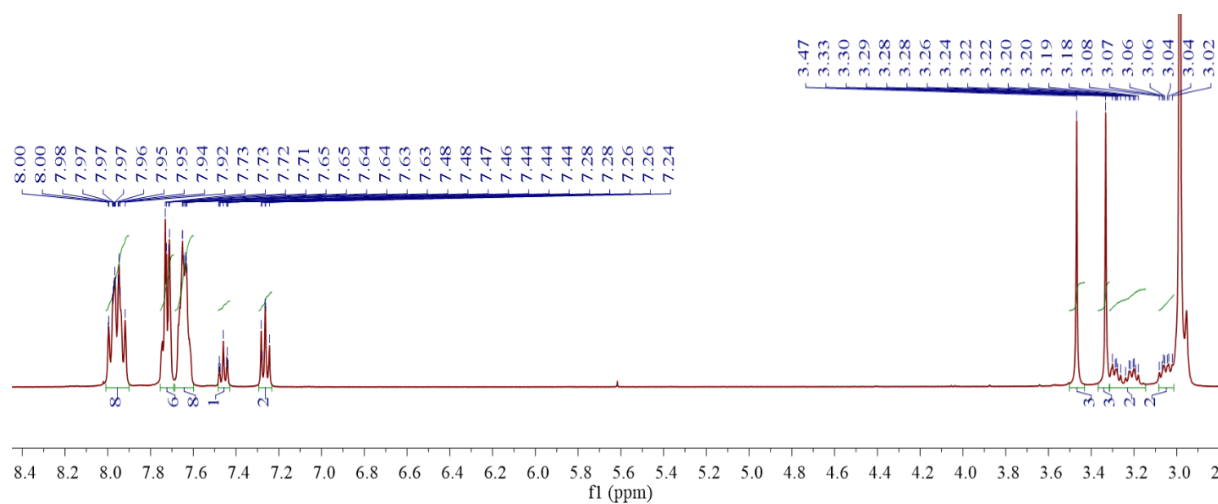


Figura A 41-Espectro de RMN ^1H do complexo 9 em acetona-d6.

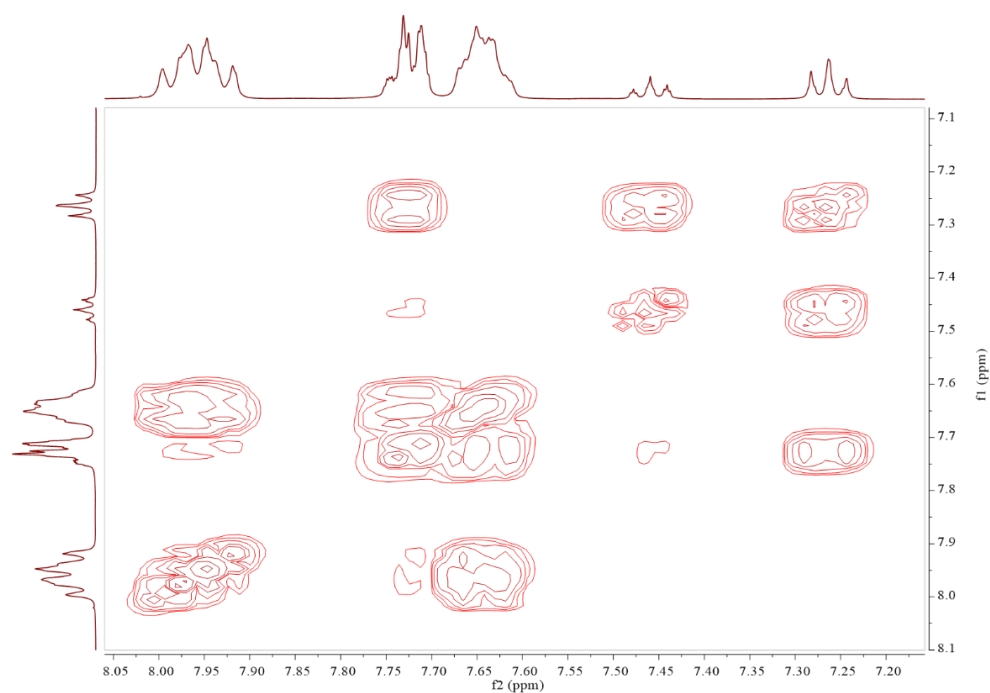


Figura A 42-Espectro de RMN-COSY do complexo 9 em acetona-d6.

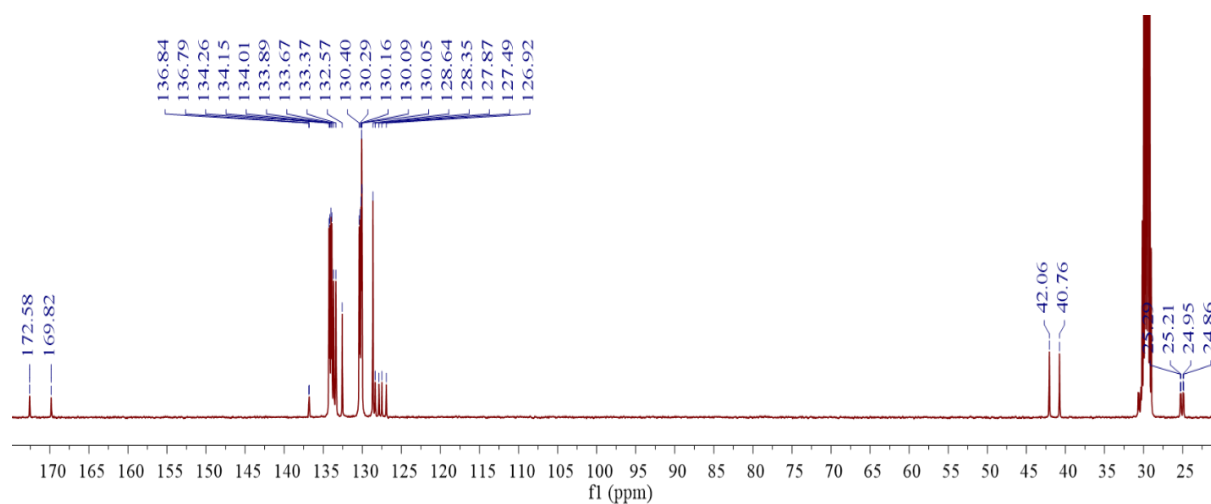


Figura A 43-Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 9 em acetona-d6.

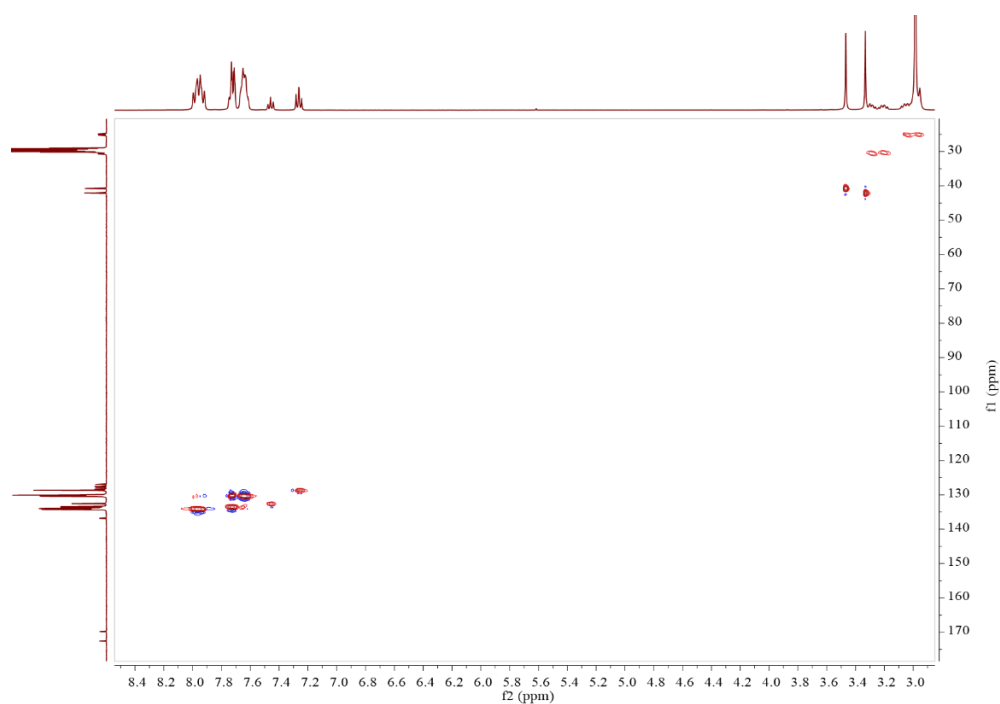


Figura A 44-Espectro de RMN-HSQC do complexo 9 em acetona-d6.

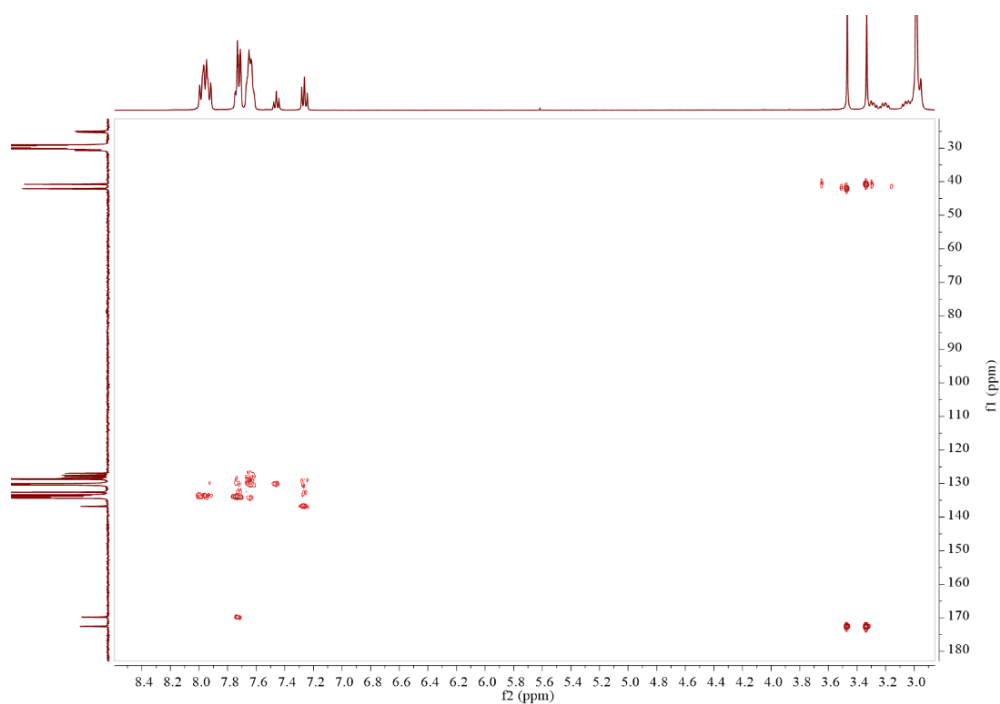


Figura A 45-Espectro de RMN-HMBC do complexo 9 em acetona-d6.

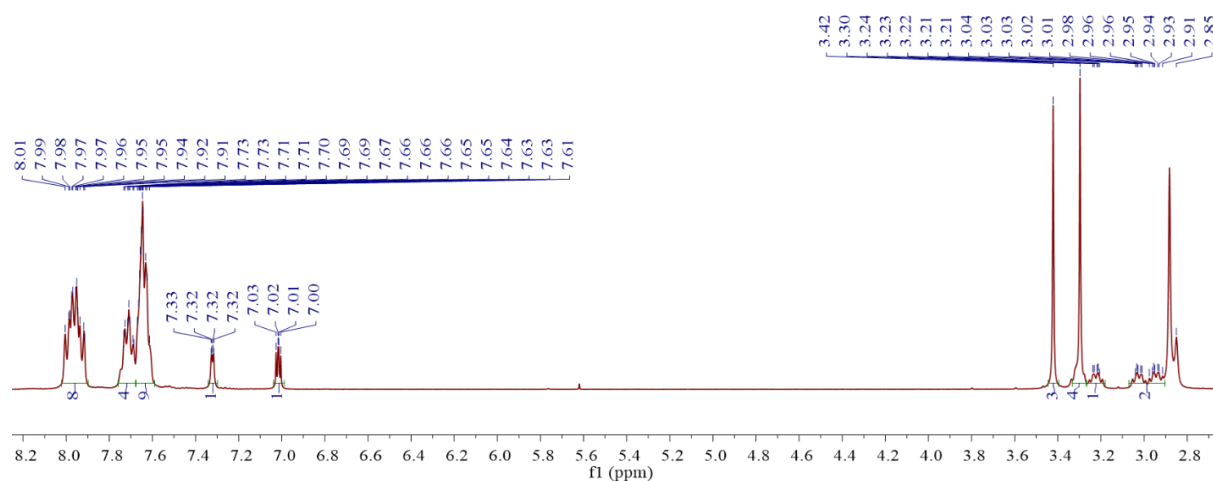


Figura A 46-Espectro de RMN ¹H do complexo 10 em acetona-d₆.

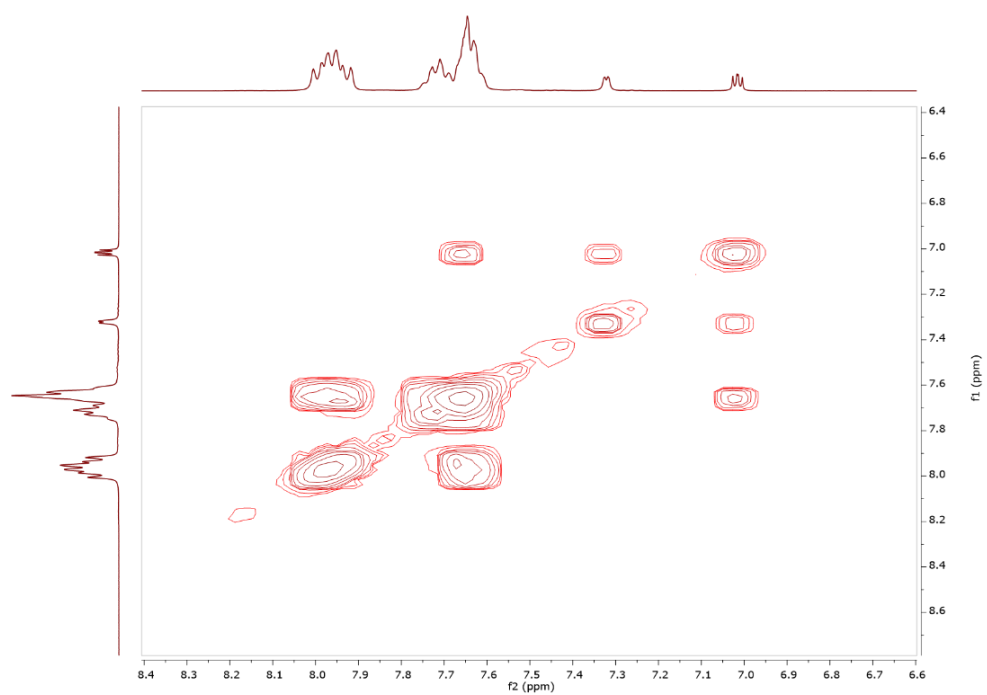


Figura A 47-Espectro de RMN-COSY do complexo 10 em acetona-d₆.

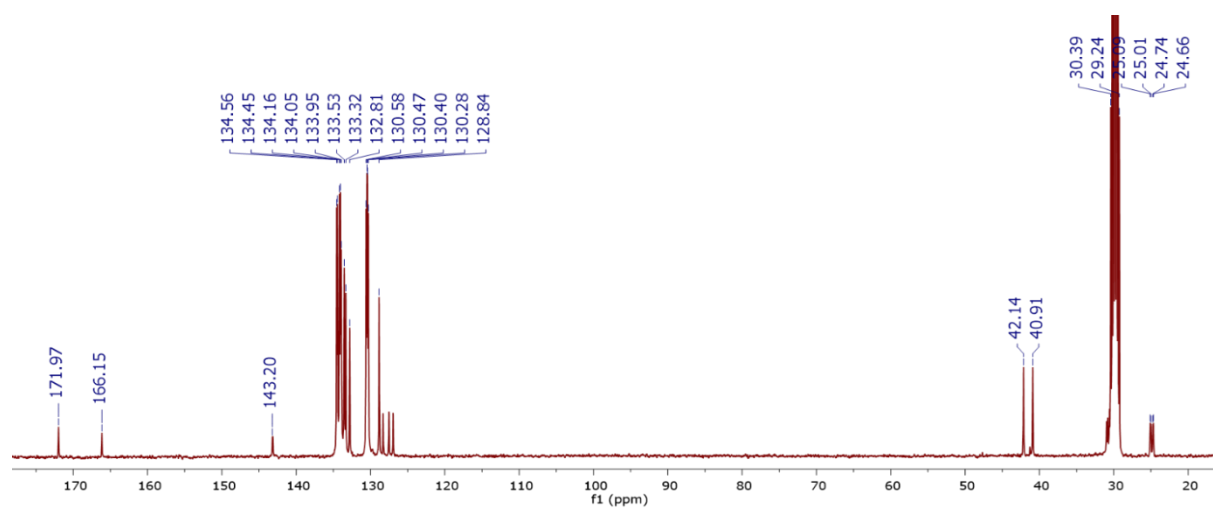


Figura A 48-Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 10 em acetona- d_6 .

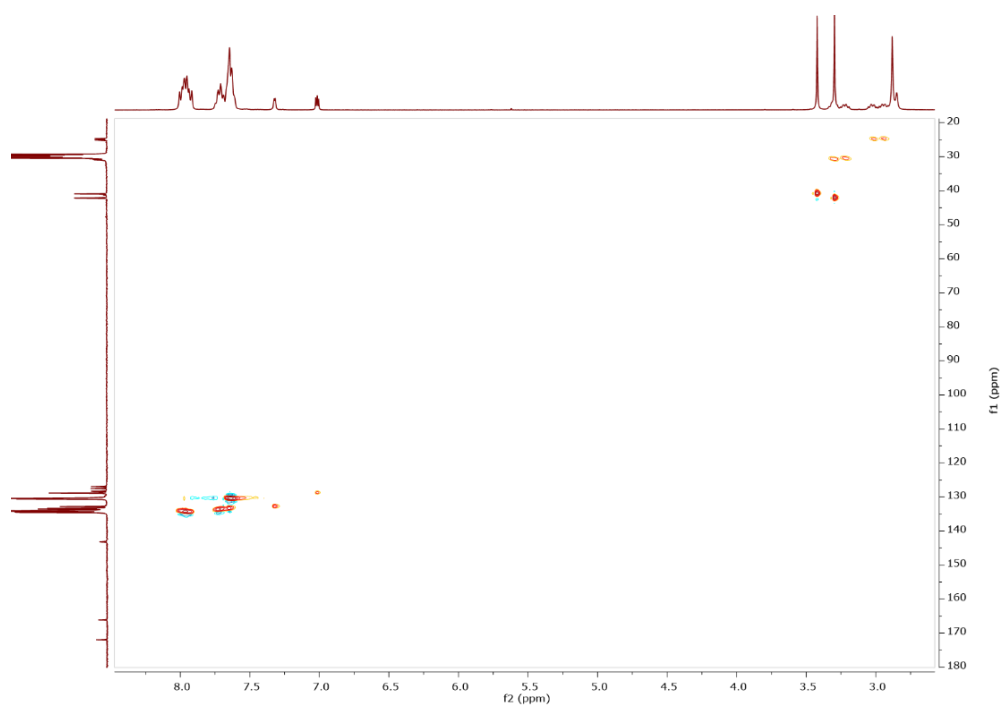


Figura A 49-Espectro de RMN-HSQC do complexo 10 em acetona- d_6 .

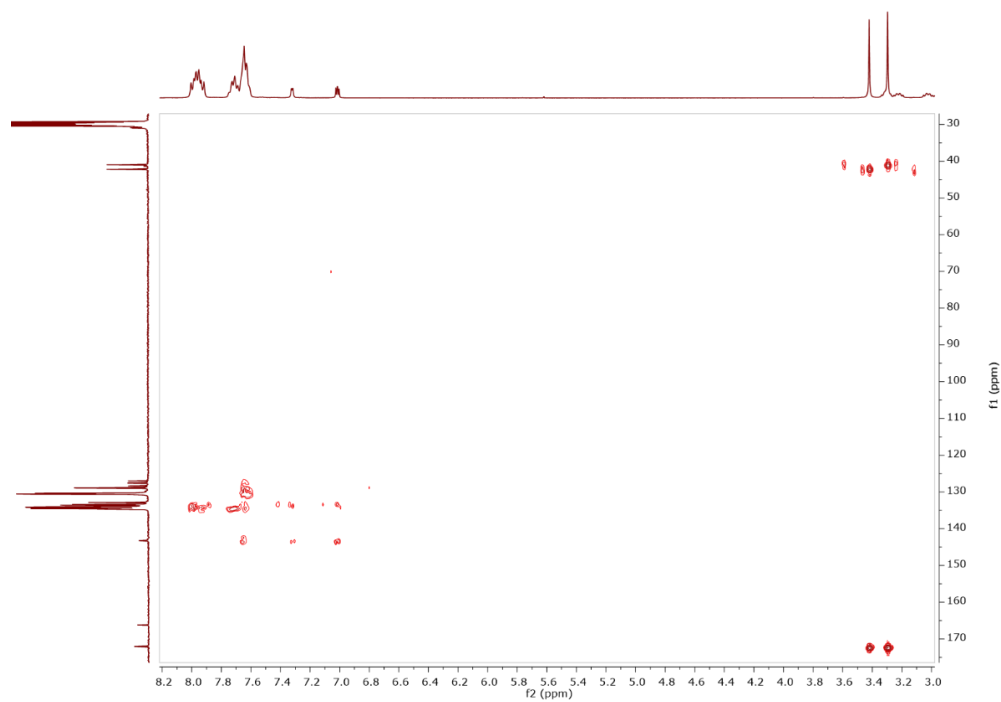


Figura A 50-Espectro de RMN-HMBC do complexo 10 em acetona-d6.

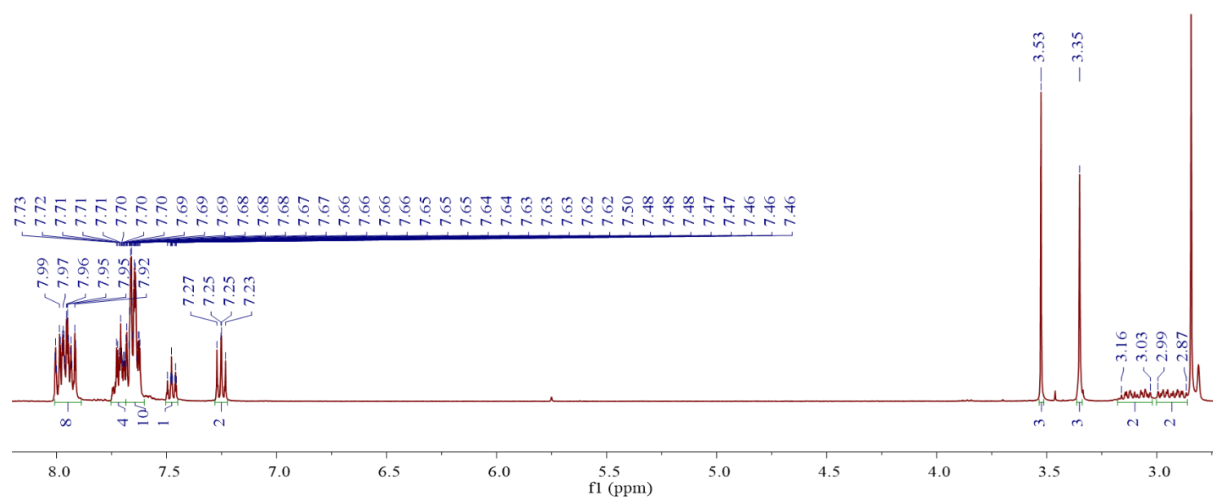


Figura A 51-Espectro de RMN ^1H do complexo 11 em acetona-d6.

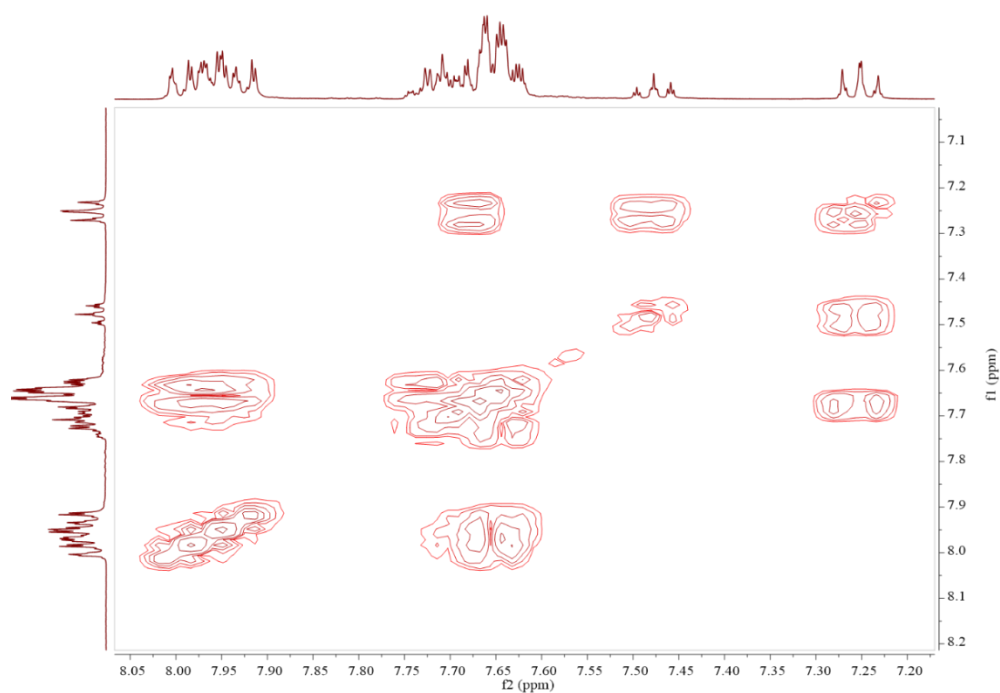


Figura A 52-Espectro de RMN-COSY do complexo 11 em acetona-d6.

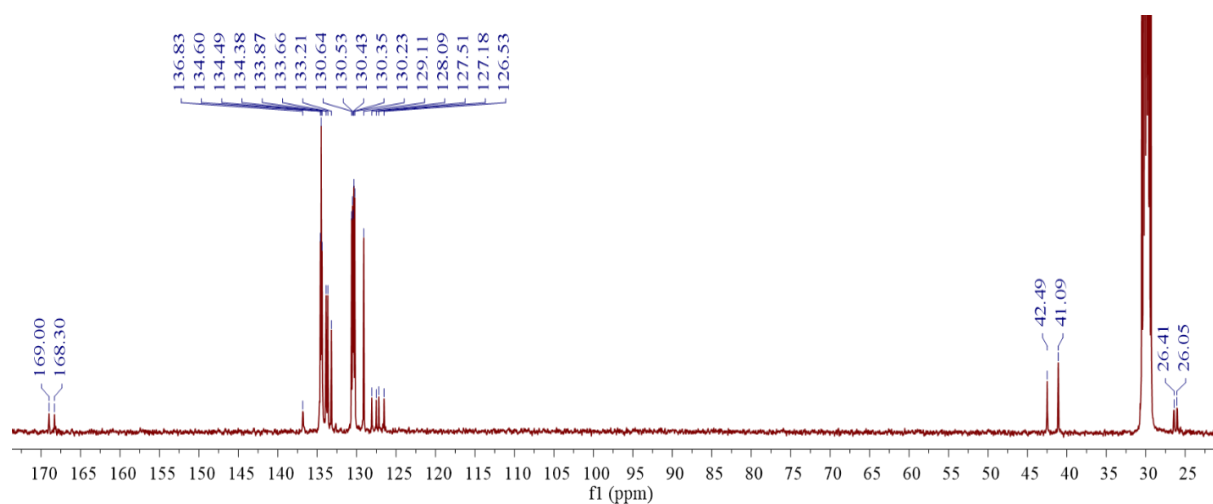


Figura A 53-Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 11 em acetona-d6.

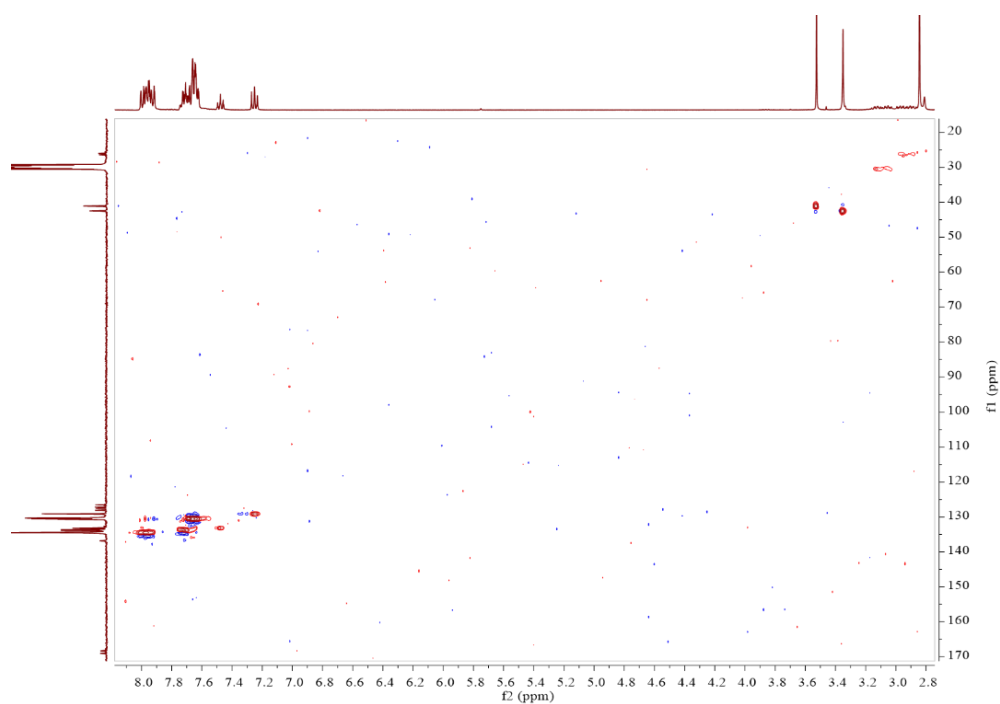


Figura A 54-Espectro de RMN-HSQC do complexo 11 em acetona-d6.

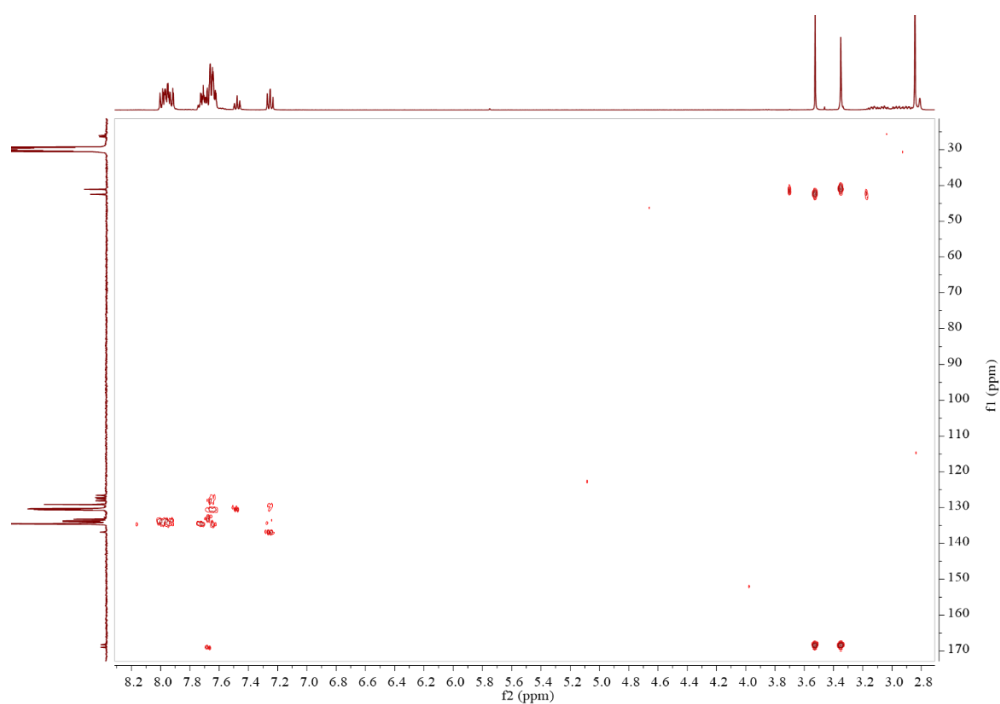


Figura A 55-Espectro de RMN-HMBC do complexo 11 em acetona-d6.

Complexo 12

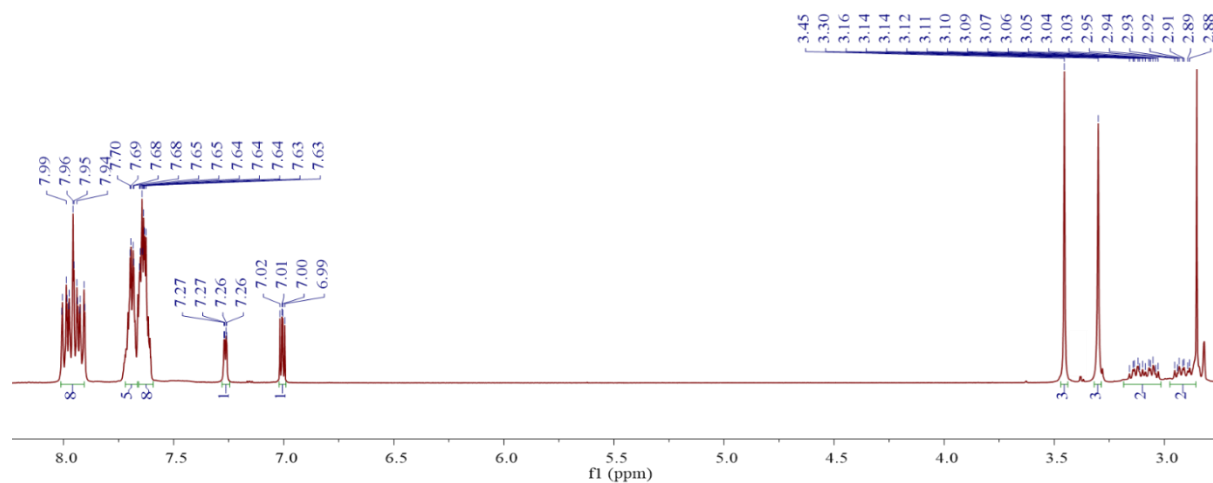


Figura A 56-Espectro de RMN ¹H do complexo 12 em acetona-d6.

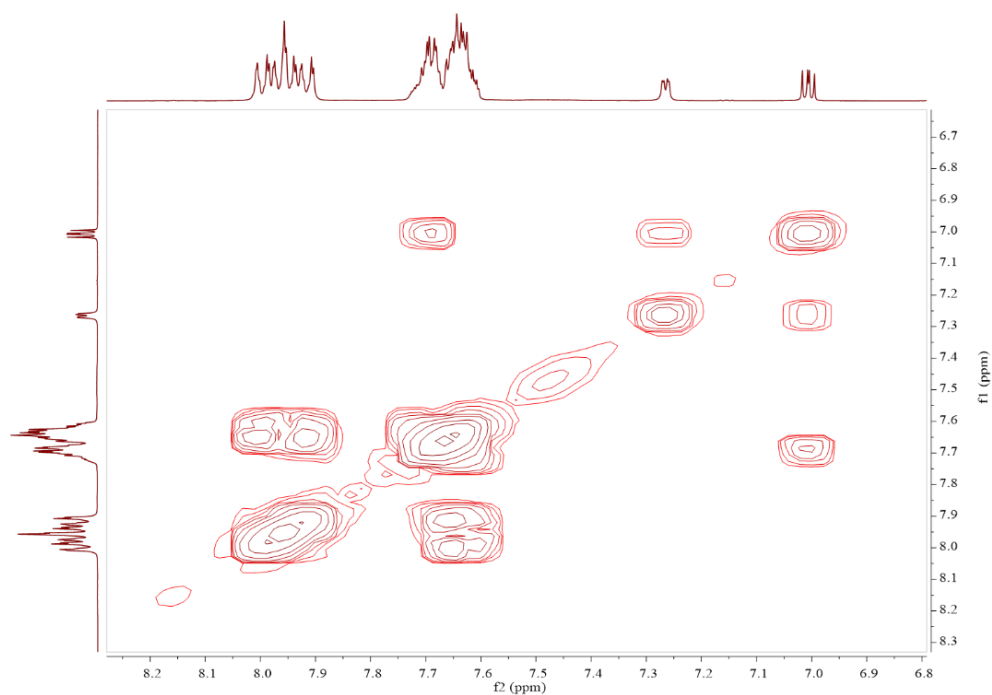


Figura A 57-Espectro de RMN-COSY do complexo 12 em acetona-d6.

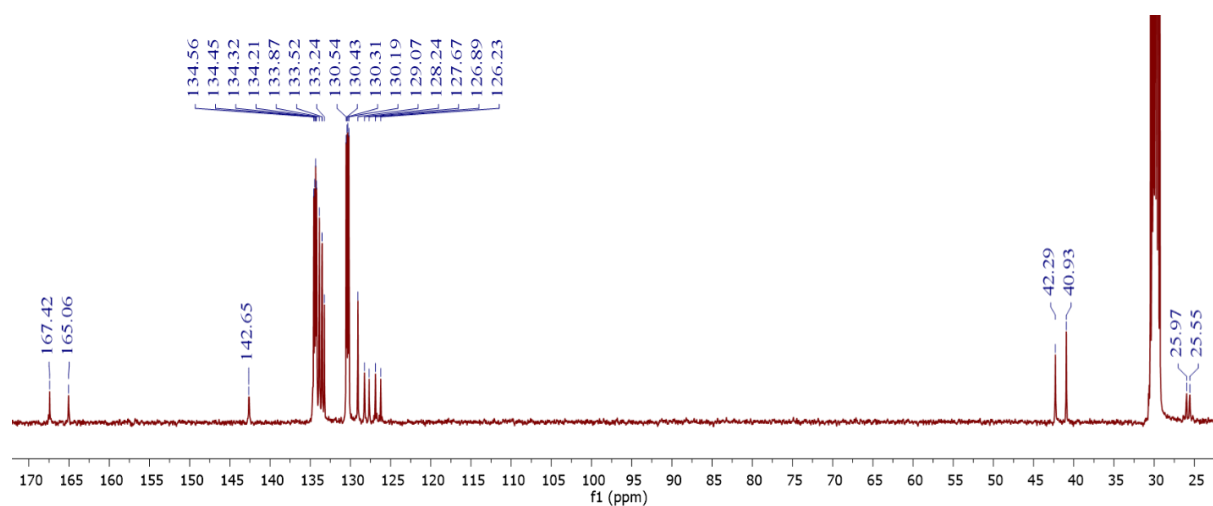


Figura A 58-Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo 12 em acetona-d₆.

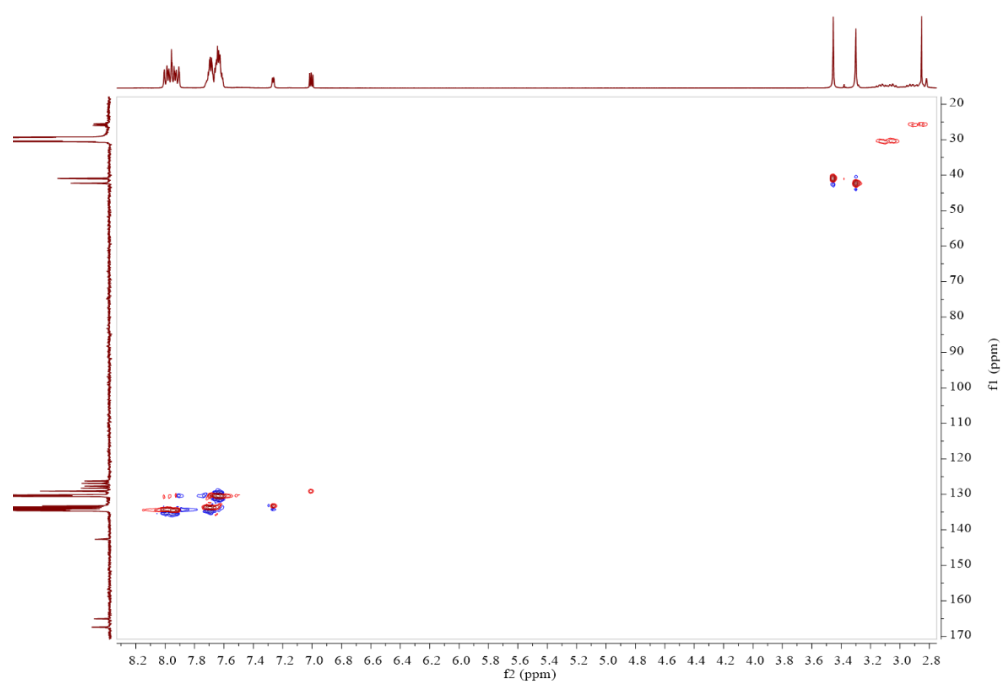


Figura A 59-Espectro de RMN-HSQC do complexo 12 em acetona-d₆.

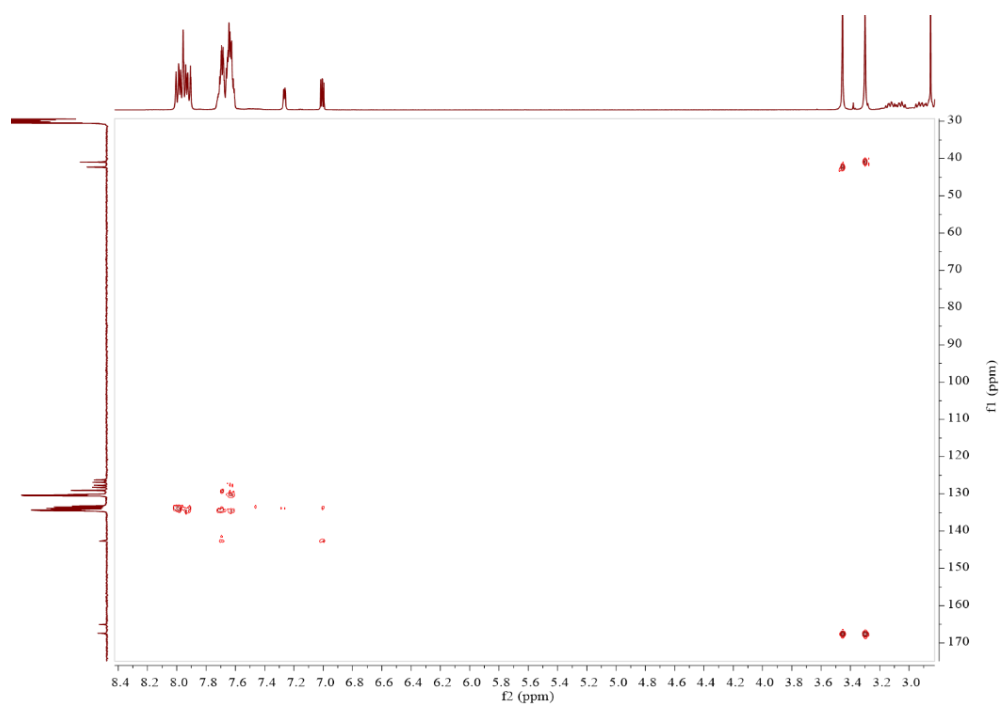


Figura A 60-Espectro de RMN-HMBC do complexo 12 em acetona-d₆.

Tabela A 2- Dados cristalográficos dos complexos 1, 2, 3, 5 e 6.

	1	2	3	5	6
Empirical formula	C ₄₆ H ₄₃ F ₆ N ₄ OP ₃ RuS	C ₄₄ H ₄₁ F ₆ N ₄ OP ₃ RuS ₂	C ₄₄ H ₄₁ F ₆ N ₄ O ₂ P ₃ RuS	C ₄₆ H ₄₅ F ₆ N ₄ OP ₃ RuS ₂	C ₄₆ H ₄₅ F ₆ N ₄ O ₂ P ₃ RuS
Formula weight	1007.88	1013.91	997.85	1041.96	1025.90
Temperature	296(2) K	296(2) K	296(2) K	296(2) K	296(2) K
Wavelength	0.71073 Å	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	C 2/c	C 2/c	C 2/c	P 21/c	P 21/c
Unit cell dimensions					
a (Å)	16.4670(5)	16.5280(10)	16.3281(3)	12.1968(9)	12.2626(5)
b (Å)	13.5392(4)	13.4530(9)	13.5748(2)	27.594(2)	27.3981(11)
c (Å)	40.8079(12)	40.819(3)	40.4256(6)	14.6276(11)	14.5631(6)
α (°)	90	90	90	90	90
β (°)	97.239(2)	97.5010(10)	98.1820(10)	109.522(2)	110.148(2)
γ (°)	90	90°	90	90	90
Volume (Å³)	9025.6(5)	8998.4(10)	8869.2(2)	4640.0(6)	4593.4(3)
Z	8	8	8	4	4
Density calculated (Mg/m³)	1.483	1.497	1.495	1.492	1.483
Absorption coefficient (mm⁻¹)	0.565	0.612	0.576	0.596	0.558
F(000)	4112	4128	4064	2128	2096
Crystal size (mm³)	0.101 x 0.092 x 0.088	0.134 x 0.122 x 0.111		0.133 x 0.122 x 0.113	0.153 x 0.124 x 0.111
Theta range for data collection (°)	1.006 to 25.209	1.006 to 25.995	1.959 to 26.000	1.476 to 25.999	1.486 to 25.999
Index ranges	-19<=h<=16, - 16<=k<=13, - 41<=l<=48	-20<=h<=9, - 16<=k<=15, - 49<=l<=50	-17<=h<=20, -16<=k<=14, -49<=l<=46	-15<=h<=15, -33<=k<=34, -18<=l<=18	-15 ≤ h ≤ 15, -27 ≤ k ≤ 33, -16 ≤ l ≤ 17
Reflections collected	29909	35213	32974	73575	34045
Independent reflections	7949 [R(int) = 0.0452]	8754 [R(int) = 0.0327]	8683 [R(int) = 0.0331]	9114 [R(int) = 0.0319]	9011 [R(int) = 0.0315]
Completeness to theta = 25.242°	97.3 %	99.3 %	100.0 %	100.0 %	100.0 %
Absorption correction	None	None	None	None	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	7949 / 0 / 499	8754 / 0 / 490	8683 / 0 / 490	9114 / 0 / 571	9011 / 0 / 570
Goodness-of-fit on F²	1.143	1.203	1.110	1.169	0.983
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0501, wR2 = 0.1094	R1 = 0.0506, wR2 = 0.1288	R1 = 0.0440, wR2 = 0.0941	R1 = 0.0366, wR2 = 0.0856	R1 = 0.0346, wR2 = 0.0874
R indices (all data)	R1 = 0.0666, wR2 = 0.1210	R1 = 0.0572, wR2 = 0.1360	R1 = 0.0557, wR2 = 0.0985	R1 = 0.0422, wR2 = 0.0908	R1 = 0.0402, wR2 = 0.0930
Extinction coefficient	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Largest diff. peak and hole	0.387 and -0.502 e.Å ⁻³	1.418 and -0.774 e.Å ⁻³	1.069 and -0.477 e.Å ⁻³	0.668 and -0.662 e.Å ⁻³	0.624 and -0.502 e.Å ⁻³

Tabela A 3- Dados cristalográficos dos complexos 7, 8, 10, 11 e 12.

	7	8	10	11	12
Empirical formula	C ₃₆ H ₃₅ BF ₄ N ₂ NiOP ₂ S	C ₃₄ H ₃₃ BF ₄ N ₂ NiOP ₂ S ₂	C ₃₄ H ₃₃ BF ₄ N ₂ OP ₂ PdS ₂	C ₃₆ H ₃₅ N ₂ OP ₂ PtS	C ₃₄ H ₃₃ N ₂ OP ₂ PtS ₂
Formula weight	751.18	757.20	804.89	800.75	806.77
Temperature	293(2)	298.0	293(2)	293(2)	293(2)
Crystal system	monoclinic	monoclinic	triclinic	triclinic	triclinic
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P-1	P-1	P-1
a (Å)	11.5060(3)	11.5120(5)	9.2655(7)	9.2660(3)	9.2558(3)
b (Å)	16.6710(6)	16.6557(7)	13.5452(7)	13.6570(4)	13.5668(4)
c (Å)	18.4810(6)	18.2709(8)	15.6868(8)	15.6013(4)	15.6517(4)
α (°)	90	90	87.565(4)	92.377(2)	87.603(2)
β (°)	90.507(2)	90.527(4)	89.158(5)	90.077(2)	89.207(2)
γ (°)	90	90	78.284(5)	101.218(3)	78.498(2)
Volume (Å³)	3544.8(2)	3503.1(3)	1925.9(2)	1934.80(10)	1924.22(10)
Z	4	4	2	2	2
Density calculated (Mg/m³)	1.408	1.436	1.388	1.374	1.392
Absorption coefficient (mm⁻¹)	0.750	0.816	0.721	3.789	3.863
F(000)	1552.0	1560.0	816.0	794.0	798.0
Crystal size (mm³)	0.543 × 0.221 × 0.122	0.14 × 0.13 × 0.1	0.646 × 0.168 × 0.103	0.481 × 0.305 × 0.195	0.348 × 0.26 × 0.11
Theta range for data collection (°)	5.362 to 51.5	5.086 to 52.742	5.174 to 54.204	5.166 to 54.206	5.18 to 54.206
Index ranges	-14 ≤ h ≤ 13, -20 ≤ k ≤ 19, -22 ≤ l ≤ 20	-14 ≤ h ≤ 14, -19 ≤ k ≤ 20, -22 ≤ l ≤ 19	-11 ≤ h ≤ 11, -17 ≤ k ≤ 17, -20 ≤ l ≤ 20	-11 ≤ h ≤ 11, -17 ≤ k ≤ 17, -19 ≤ l ≤ 19	-11 ≤ h ≤ 11, -17 ≤ k ≤ 17, -20 ≤ l ≤ 20
Reflections collected	25217	23115	25073	42893	42763
Independent reflections	12785 [R _{int} = 0.0486, R _{sigma} = 0.0538]	13150 [R _{int} = 0.0215, R _{sigma} = 0.0350]	8476 [R _{int} = 0.0327, R _{sigma} = 0.0362]	8514 [R _{int} = 0.0469, R _{sigma} = 0.0306]	8469 [R _{int} = 0.0440, R _{sigma} = 0.0294]
Data / restraints / parameters	12785/1/869	13150/89/887	8476/68/426	8514/0/39	8469/0/387
Goodness-of-fit on F²	1.052	1.032	1.065	1.047	1.048
Final R indices [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0496, wR ₂ = 0.1266	R ₁ = 0.0378, wR ₂ = 0.0946	R ₁ = 0.0444, wR ₂ = 0.1112	R ₁ = 0.0229, wR ₂ = 0.0510	R ₁ = 0.0241, wR ₂ = 0.0572
R indices (all data)	R ₁ = 0.0629, wR ₂ = 0.1393	R ₁ = 0.0479, wR ₂ = 0.1025	R ₁ = 0.0587, wR ₂ = 0.1237	R ₁ = 0.0291, wR ₂ = 0.0540	R ₁ = 0.0307, wR ₂ = 0.0606
Largest diff. peak and hole	0.46/-0.75 e Å ⁻³	0.40/-0.41 e Å ⁻³	0.77/-0.53 e Å ⁻³	0.69/-0.89 e Å ⁻³	1.11/-0.75 e Å ⁻³

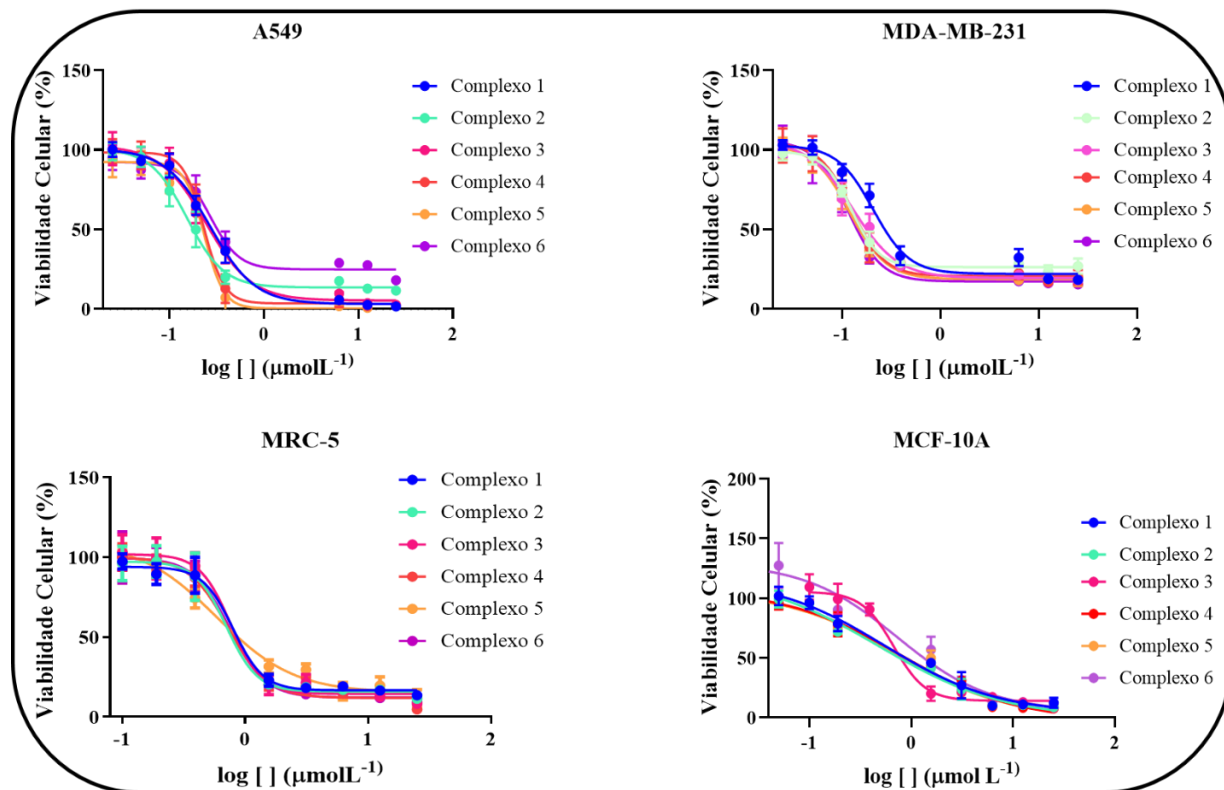


Figura A 61-Gráficos de viabilidade celular dos complexos 1-6 nas linhagens tumorais e não tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-10A) e pulmão (A549 e MRC-5).

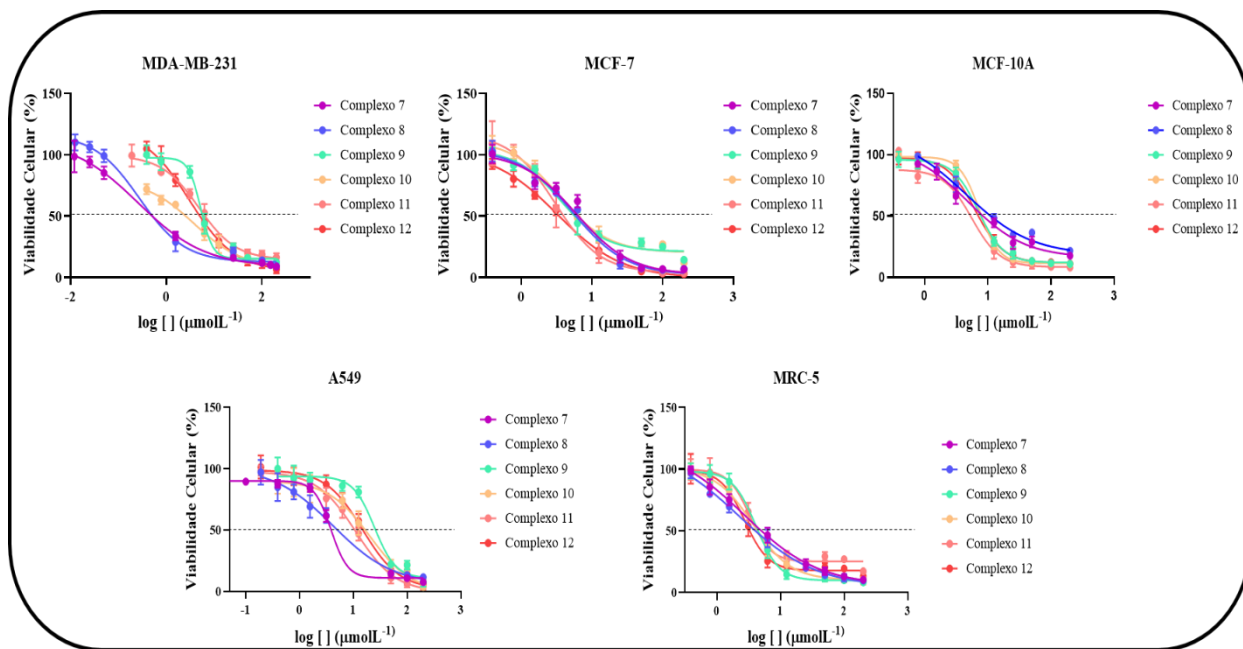


Figura A 62-Gráficos de viabilidade celular dos complexos 1-6 nas linhagens tumorais e não tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A) e pulmão (A549 e MRC-5).

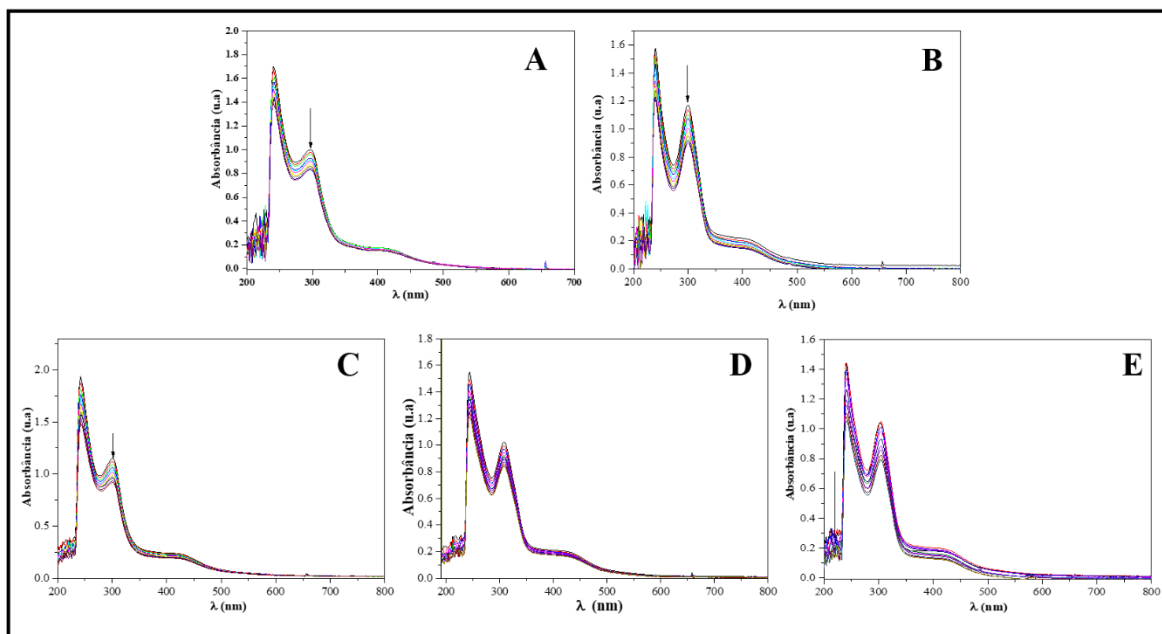


Figura A 63- Espectros na região do UV-Vis dos complexos 1 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) e 6 (E) após sucessivas adições de DNA.

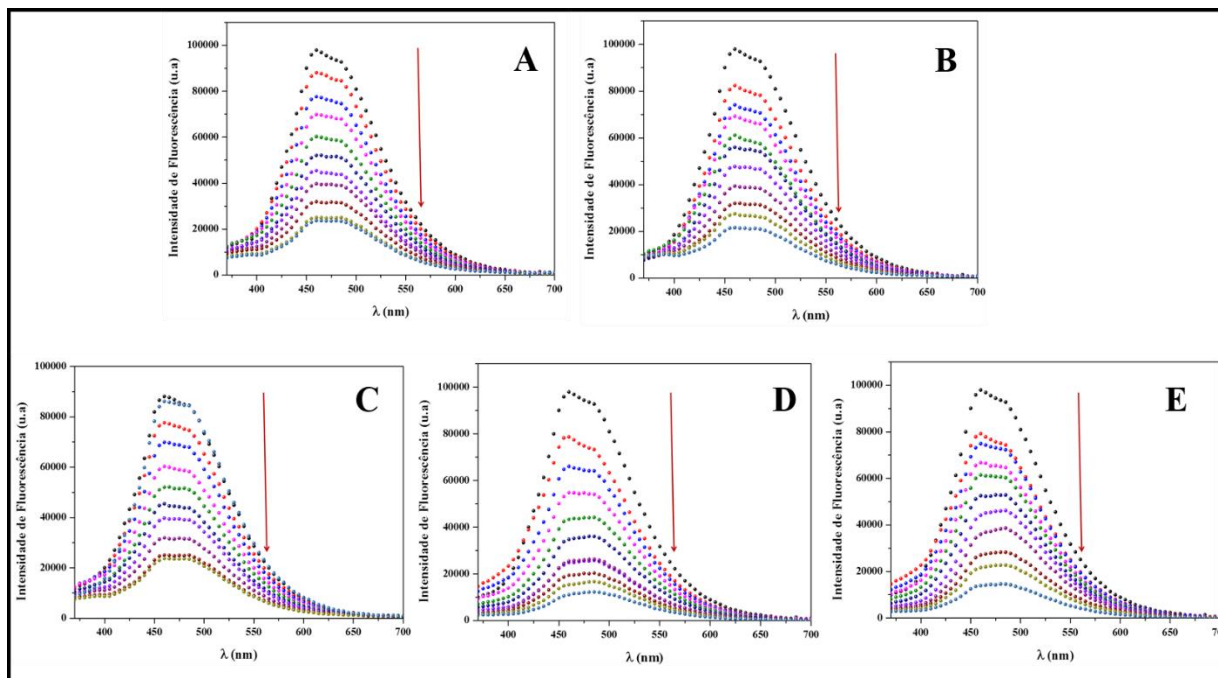


Figura A 64- Espectro de Fluorescência do adulto Hoechst-DNA após a adição de diferentes concentrações dos complexos 1 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) e 6 (E).

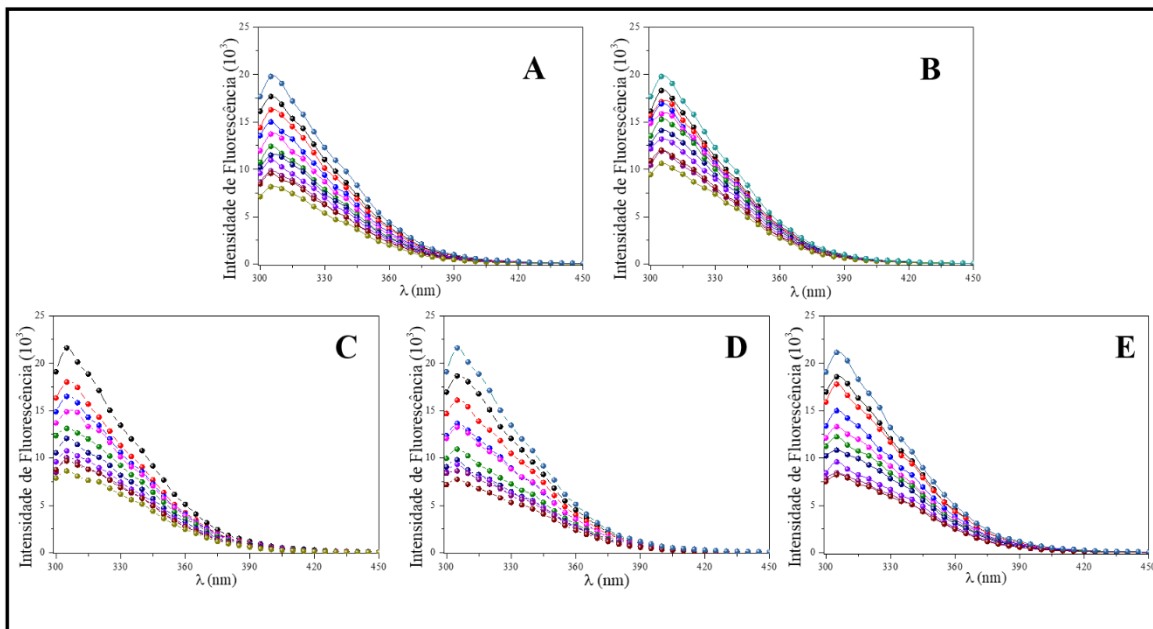


Figura A 65- Espectros de supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações dos complexos 1 (A), 3(B), 4 (C), 5(D) e 6 (D).

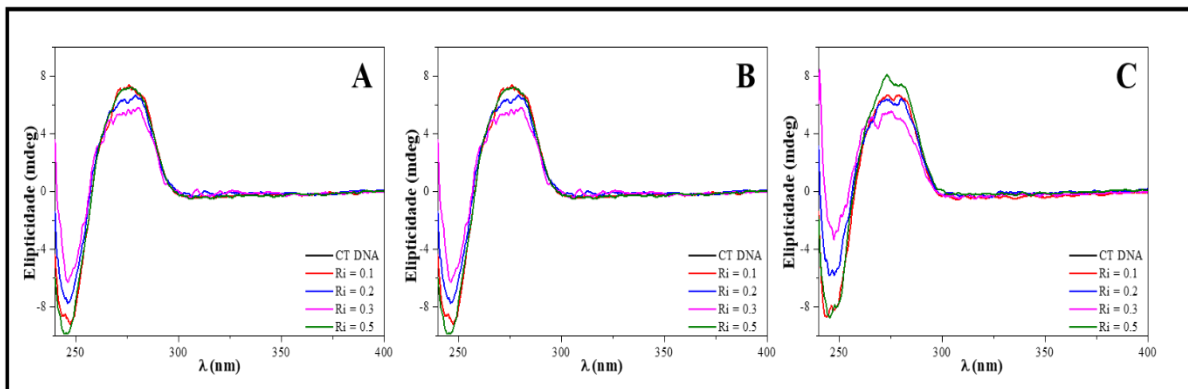


Figura A 66- Espectros de Dicroísmo Circular com diferentes relações entre o DNA e os complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C).

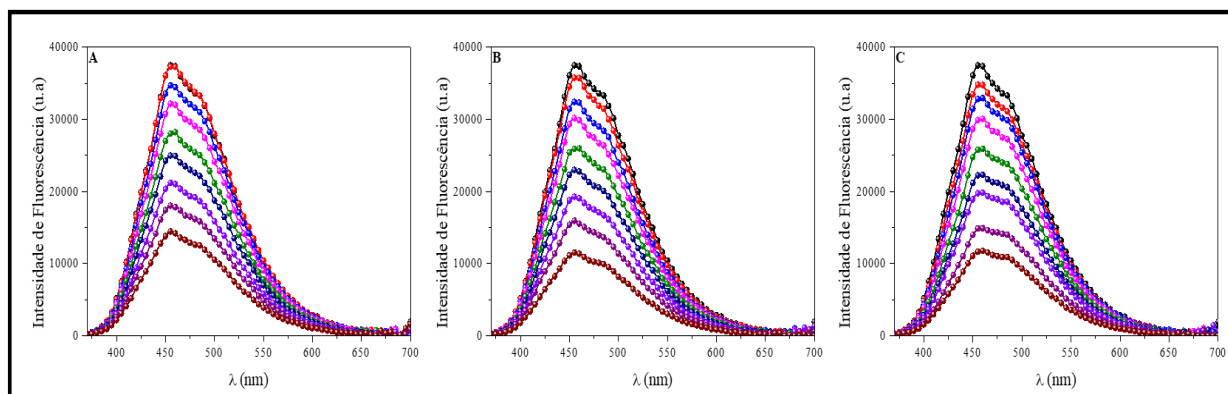
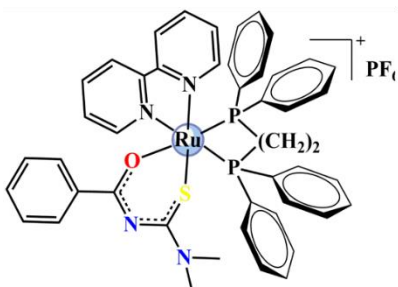
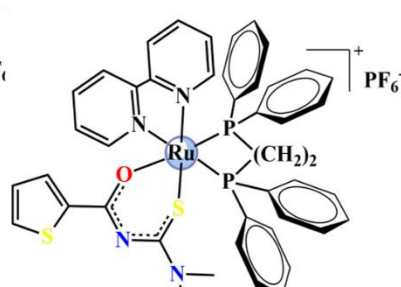


Figura A 67-Influência dos complexos 8 (A), 10 (B) e 12 (C) na intensidade de fluorescência do adulto Hoechst-DNA.

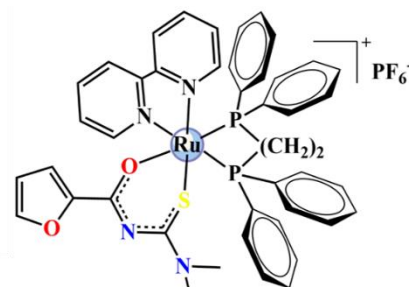
Série 1



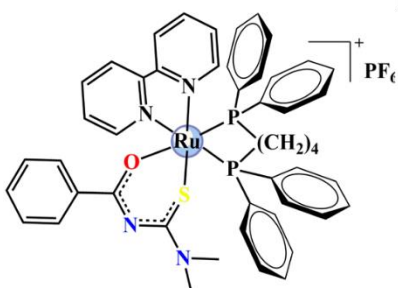
Complexo 1



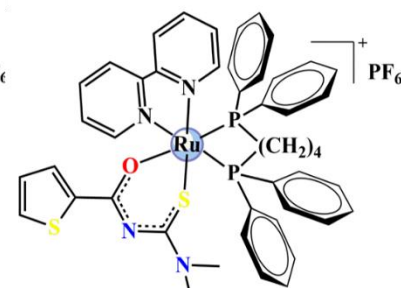
Complexo 2



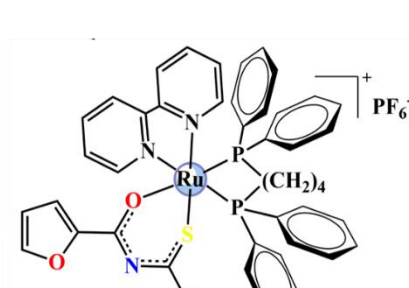
Complexo 3



Complexo 4

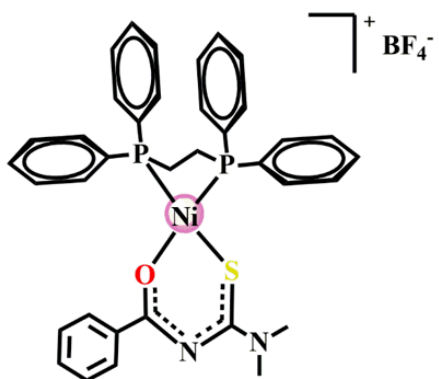


Complexo 5

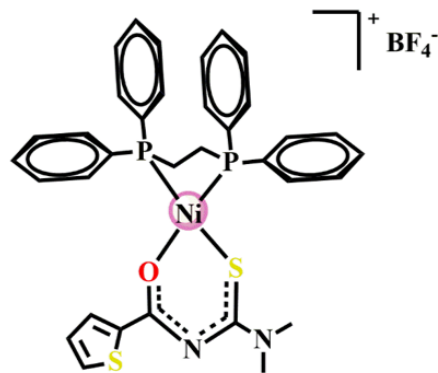


Complexo 6

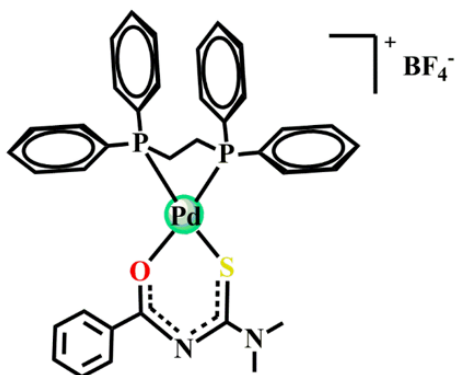
Série 2



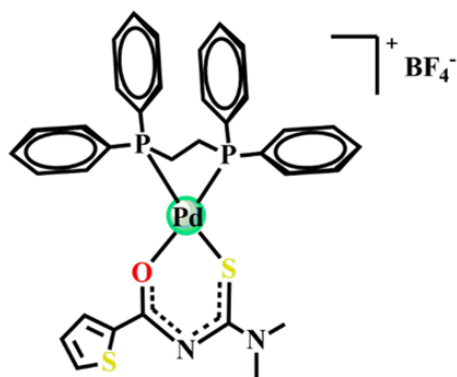
Complexo 7



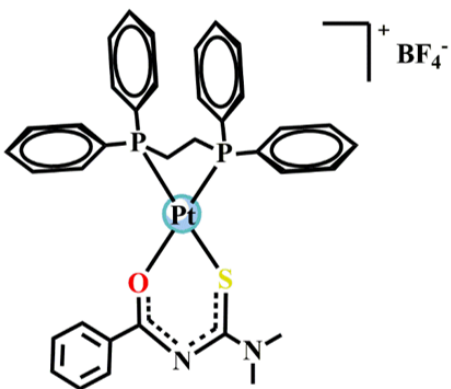
Complexo 8



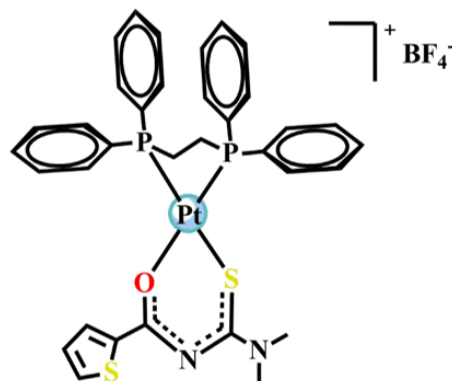
Complexo 9



Complexo 10



Complexo 11



Complexo 12