

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

**“ ESTUDOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS DE
COMPLEXOS DE COBRE: PROPRIEDADES
ESPECTROSCÓPICAS E ATIVIDADE BIOLÓGICA ”**

Herisson Faustino Santos de Oliveira

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE(A) EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador: Pror. Dr. Fillipe Vieira Rocha

bolsista (CNPQ)

**São Carlos – SP
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Herisson Faustino Santos de Oliveira, realizada em 28/07/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Rafael Gomes da Silveira (IFGoiano)

Profa. Dra. Clelia Mara de Paula Marques (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Dedicado a todas as crianças pretas e pobres que virão depois de mim.
Vocês conseguem. Vai ser difícil, mas não desistam.*

*“Mas iremos achar o tom
Um acorde com lindo som
E fazer com que fique bom
Outra vez o nosso cantar
E a gente vai ser feliz
Olha nós outra vez no ar
O show tem que continuar..
...Todo mundo que hoje diz
Acabou vai se admirar
Nosso amor vai continuar”*

Arlindo Cruz

AGRADECIMENTOS

À Deus que me trouxe até aqui de alguma forma.

À minha família principalmente à minha mãe e irmão por, bem... por tudo.

Ao Sr. José de Adonai Rocha, meu avô de coração que me incentivou em todos os passos da minha educação até o mestrado mas infelizmente não poderá me ver concluí-lo.

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

Ao Prof. Dr. Fillipe Rocha pela orientação, amizade, compreensão única e principalmente paciência.

À Dra. Inara de Aguiar pela co orientação e suporte em momentos de crise desde 2012.

Ao Prof. Dr. Alex Brown da Universidade de Alberta , Canadá pelo uso do seu cluster em algumas simulações computacionais.

Ao Prof. Dr. Rafael Silveira por ter me iniciado no meio da química computacional.

Ao Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Jr. e ao Dr. Renan Lira de Farias pelos experimentos de docking molecular.

Ao aluno de iniciação científica Eduardo Gonçalves que me acompanhou dia e noite desde o começo desse projeto. Um herói eu diria visto que eram raros os meus dias de bom humor.

Aos colegas do CCQM e LSCCI por todos os bons momentos de happy hour, “rolês” da química, e conversas profundas sobre ciência e a vida.

Aos grandes amigos do esporte universitário, da AIESEC no Brasil por manterem minha sanidade mental.

À todos os amigos que fiz nessa incrível cidade de São Carlos durante os melhores anos da minha vida.

Aos amigos da Stone, aos do Movimento Formô e ATM que hoje acreditam no meu trabalho.

Em especial à minha amiga Carolina Ronkoski pela figura 1.14.

À todas as pessoas pobres e pretas que venceram na vida contrariando a sociedade e me mostrando que eu também podia.

A todos que acreditaram.

Também aos “haters” que fizeram de tudo mas não conseguiram. Um beijo e tentem de novo.

E a VOCÊ. Que parou o que está fazendo para ler um trabalho escrito por mim em meio a felicidades e tristezas. Obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavra	Abreviatura
Ácido Desoxiribonucléico	DNA
Ressonância Magnética Nuclear	RMN
Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy	HSQC
Hexafluorofosfato de bis-aquo-Dipyrido[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxalina de Cu II	A1
Hexafluorofosfato de bis-aquo-6,7-dicyanodipyrido[2,2-d:2,3-f]quinoxalina de Cu II	A2
Hexafluorofosfato de 2,2 – Bipiridina - Dipyrido[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxalina de Cu II	B1
Hexafluorofosfato de 2,2 – Bipiridina - 6,7-dicyanodipyrido[2,2-d:2,3-f]quinoxalina de Cu II	B2
1,10 - Fenantrolina	PHEN
2,2 - Bipiridina	BIPY

Dipyrido[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxalina	L1
6,7-dicyanodipyrido[2,2-d:2,3-f]quinoxalina	L2
Topoisomerase II	TOPO II
Serun de Albumina Human	HSA
Serun de Albumina Bovina	BSA
Perclorato de tetrabutylamônio	PTBA
Calf Timus -DNA	CT-DNA
Dimetilsulfóxido	DMSO
Brometo de Etídio	BE

LISTA DE TABELAS

TABELA 6.1: Correção linear dos espectros teóricos do ligante L1 com 1,10-fenantrolina como referência.....	37
TABELA 6.2: Correção linear dos espectros teóricos do ligante L2 com 1,10-fenantrolina como referência.....	38
TABELA 6.3: Análise elementar dos complexos metálicos.....	50
TABELA 7.1 : Valores estruturais de comprimento e ângulo de ligação para o complexo A2 calculados em DFT B3LYP LANL2DZ comparados a dados experimentais cristalográficos.....	65
TABELA 7.2: Distribuição de carga nos átomos de Cobre nos complexos calculados em DFT B3LYP LANL2DZ.....	69
TABELA 8.1. Pontuação, tipo e total de contatos intermoleculares observados para os cálculos de ancoramento molecular.....	77
TABELA 9.1: Ordem das constantes de Stern Volmer obtidas pelo deslocamento de Brometo de Etídio em comparação com a literatura.....	79
TABELA 10.1: Resultados de IC ₅₀ (μmolL ⁻¹) obtidos em 24 horas de incubação em diferentes linhagens.....	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Desenvolvimento de um fármaco no brasil.....	2
FIGURA 1.2: Ciclo Celular.....	3
FIGURA 1.3: Mutações genéticas por troca de bases.....	4
FIGURA 1.4: Incidência de câncer no Brasil.....	5
FIGURA 1.5: Solvólise da cisplatina.....	6
FIGURA 1.6: Modos de interação da cisplatina com o DNA. (a) Ligação cruzada 1,2 - intrafita. (b) ligação cruzada 1,3 - intrafita. (c) ligação 1,2- interfitas.....	7
FIGURA 1.7: Estrutura dos complexos Cisplatina (a), Nami-A (b), KP1019 (c), KP1339 (d) e TLD1443 (e).....	8
FIGURA 1.8: Microscopia confocal do complexo $[Ru(phen)_2(ddpZr)]^{2+}$ na linhagem MCF-7. Enantiômero Λ à esquerda e enantiômero Δ à direita.....	9
FIGURA 1.9: Microscopia confocal do complexo (a-d) Ru-ER, (e-h) Ru-Arg8 and (i-l) Ru-NLS em células HeLa. Colunas 1 e 2 células aglomeradas e colunas 3 e 4 células isoladas.....	10
FIGURA 1.10: Estrutura esquemática dos complexos de Bisceglie ativos na linhagem U397.....	12
FIGURA 1.11: Estrutura dos ligantes e complexos planos de Zeglis, 2011.....	12
FIGURA 1.12: Posições dos complexos de Cu II minimizadas previstas por ancoragem molecular no sítio da ATPase.....	13
FIGURA 1.13: Difração de raio-x de um dos Complexos de Cu II de Lakshmipraba (a). Ancoragem molecular dessa mesma molécula ao DNA.....	14
FIGURA 1.14: Formação de nós durante a absorção eletrônica.....	15

FIGURA 1.15: Relação entre absorção e emissão de complexos inorgânicos para compostos orgânicos. Em tracejado, espectros de absorção e em linha cheia os complexos de emissão. Em azul o complexo $\text{Ru}(\text{dpp})_3\text{Cl}_2$ e em vermelho o composto orgânico Coumarina 6.....	17
FIGURA 1.16: Complexos polipiridínicos testados frente à linhagem MCF-7 de câncer de mama por Hussain.....	19
Figura 1.17 : Docking molecular do complexo 1 de Hussain interagindo com HSA.....	20
FIGURA 1.18: Planejamento dos complexos de Cobre.....	23
FIGURA 6.1: Mecanismo de reação da fenantrolina-5,6-diona.....	32
FIGURA 6.2: Espectro de RMN da fenantrolina-5,6-diona em CDCl_3 em 400 MHz.....	33
FIGURA 6.3: Reação de Substituição à carbonila da fenantrolina-5,6-diona em meio ácido.....	33
FIGURA 6.4: Espectro de IV em pastilha de KBr dos ligantes Fenantrolina-5,6-diona (vermelho) e ligante L1 (preto). O retângulo roxo assinala a banda 1690 cm^{-1} que desaparece após a reação.....	34
FIGURA 6.5: Espectro de RMN do ligante L1 em CDCl_3 à temperatura ambiente em 400MHz.....	34
FIGURA 6.6: Espectro de HSQC do ligante L1 em CDCl_3 à temperatura ambiente em 400 MHz.....	36
FIGURA 6.7: Espectro de RMN C^{13} do ligante L1 em CDCl_3 à temperatura ambiente em 400 MHz.....	38
FIGURA 6.8: Espectro de RMN C^{13} do ligante L2 em CDCl_3 à temperatura ambiente em 400 MHz.....	39
FIGURA 6.9: Espectro de absorção do ligante L2 em solução de Clorofórmio à temperatura ambiente.....	40

FIGURA 6.10: Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})_2]^{2+}$ calculada em DFT B3LYP LANL2DZ.....	41
FIGURA 6.11: Orbitais predominantes nas transições eletrônicas do complexo $[\text{Cu}(\text{L2})_2]^{2+}$ (a) e $[\text{Cu}(\text{L2})_2]^{1+}$ (b). Imagens obtidas pelo método NBO em DFT B3LYP LANL2DZ.....	43
FIGURA 6.12: Simulação do complexo A1 à esquerda e do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})]^{2+}$ à direita evidenciando a distância entre os ligantes.....	45
FIGURA 6.13: Espectro de absorção em solução aquosa do composto $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{Im})_2]^{2+}$	46
FIGURA 6.14 : Espectro de absorção em solução aquosa do complexo A1.....	47
FIGURA 6.15: Estrutura otimizada do Complexo B1 pelo método DFT B3LYP LANL2DZ mostrando torção de 7 graus no ligante bipyridínico.....	48
FIGURA 6.16: Esquema reacional dos complexos metálicos.....	49
FIGURA 6.17: Espectro de absorção experimental em água do complexo A1 em vermelho, em DFT B3LYP LANL2DZ em meio aquoso em preto e as forças de oscilador em vermelho com intensidades relativas.....	51
FIGURA 6.18: Espectro de absorção do complexo A2 em Clorofórmio à temperatura ambiente.....	52
FIGURA 6.19: Espectro de absorção (Vermelho) x espectro de emissão (Azul) excitado em 440 nm do complexo A2 em DMSO à temperatura ambiente.....	53
FIGURA 6.20: Espectro de absorção (Preto) x espectro de emissão (Vermelho) excitado em 420 nm do complexo A2 em DMSO à temperatura ambiente.....	53
FIGURA 6.21: Voltamogramas em Acetonitrila à temperatura ambiente dos compostos 1,10-fenantrolina (a) e 1,10-fenantrolina-5,6-diona(b).....	55
FIGURA 6.22: Voltamograma em Acetonitrila à temperatura ambiente do ligante L2.....	55

FIGURA 6.23: Voltamograma em Acetonitrila à temperatura ambiente dos complexo A1.....	56
FIGURA 6.24: Voltamograma em Acetonitrila à temperatura ambiente do Sulfato de Cobre II penta hidratado.....	57
FIGURA 6.25: Esquema reacional genérico de formação dos complexos B1 e B2.....	58
FIGURA 6.26: Espectro de infravermelho dos complexos A2 (preto) e B2 (vermelho) em pastilha de KBr à temperatura ambiente	59
FIGURA 6.27: Espectro de absorção do complexo B2 em Clorofórmio à temperatura ambiente.....	60
FIGURA 6.28: Espectro de absorção (preto) x emissão (vermelho) do complexo B2 em DMSO à temperatura ambiente	61
FIGURA 6.29: Voltametria cíclica do complexo B1 em Acetonitrila à temperatura ambiente.....	62
FIGURA 7.1: Espectros de IV teóricos calculados e experimental do complexo A2.....	63
FIGURA 7.2: Threshold Values obtidos na finalização do cálculo do complexo A2 em método DFT B3LYP LANL2DZ.....	64
FIGURA 7.3: Comparação entre espectros de absorção do complexo A2 teóricos em TD-DFT e experimental obtido em Clorofórmio à temperatura ambiente. Orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica de transferência de carga calculados em NBO.....	66
FIGURA 7.4: Comparação entre espectros de absorção do complexo B2 teóricos em TD-DFT e experimental obtido em Clorofórmio à temperatura ambiente.....	68
FIGURA 7.5: Orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica de transferência de carga do complexo B2 calculados em NBO.....	69
FIGURA 7.6: Diferença energética HOMO - LUMO entre os complexos A2 (à esquerda) e B2 (à direita) calculados em DFT B3LYP LANL2DZ.....	71

FIGURA 7.7: Densidades de Spin do estado fundamental dos complexos A2 e B2 calculados no vácuo em DFT B3LYP LANL2DZ.....	72
FIGURA 8.1: Pose de docking do ligante cocrystalizado (carbonos em magenta) e as nucleobases adjacentes (DA5, DA6, DT19 e DT20) do sítio de interação (carbonos em verde). Sobreposição de ambos os fragmentos aromáticos (teórico e experimental). DA e DT são deoxiadenosina e deoxitimidina, respectivamente.....	74
FIGURA 8.2: (A) e (B) são as poses de docking melhores pontuadas para A1 e A2, no bolsão hidrofóbico AA-TT, respectivamente. (C) orientações preferenciais dos ligantes, considerando as modificações no fragmento pirazínico.....	75
FIGURA 8.3: Poses de docking frente suas orientações relativas dos complexos A2 e B2 (A) e A1 e B1 (B) no sítio de ligação.....	76
FIGURA 8.4: (A) e (B) são as poses de docking melhores pontuadas para B1 e B2, no bolsão hidrofóbico AA-TT, respectivamente. (C) orientações preferenciais dos ligantes, considerando as modificações no fragmento pirazínico.....	76
FIGURA 8.5: Pontos de interação com DNA do complexo A2 (a) e B2 (b) calculados por docking molecular com águas omitidas.....	77
FIGURA 9.1: Equação de Stern-Volmer para o deslocamento do Brometo de Etídio para o complexo A2.....	78
FIGURA 9.2: Variação da intensidade de emissão do aduto CT-DNA + Brometo de Etídio com a adição do complexo A2.....	79

RESUMO

“ESTUDOS TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS DE COMPLEXOS DE COBRE: PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E ATIVIDADE BIOLÓGICA”

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. A comunidade científica está se mobilizando para estudar novos compostos com potencial citotóxico e que podem ser usados como sondas moleculares. No entanto, é importante destacar que, para cada 100 mil candidatos a medicamentos sintetizados, apenas um chega à fase clínica final. Um dos desafios da química medicinal é otimizar a taxa de sucesso, aumentando a eficiência do processo. Nesse contexto, os ligantes polipiridínicos agem como boas opções, uma vez que, quando coordenados a um centro metálico, seus complexos podem reunir características estruturais cruciais para promover seu uso como sondas biológicas, devido a bandas visíveis, resultantes de transferência de carga e a citotoxicidade dos agentes por intercalação com DNA. Neste trabalho, uma investigação teórica por DFT e TD-DFT de complexos de Cu II e Cu I foi realizada sobre suas propriedades estruturais e espectroscópicas. Os complexos polipiridínicos de Cu II foram sintetizados e caracterizados por UV-Vis, RMN, análise elementar, espectroscopia de fluorescência, condutividade e voltametria cíclica. Os dados mostraram faixas de absorção e emissão acima de 400 nm, com valores de rendimento quântico de emissões comparados com o padrão da literatura $[\text{Ru}(\text{Bipy})_3]^{2+}$. Os valores de IC_{50} para as linhagens celulares MDA-MB 231, MCF7 e PNT2 superam a citotoxicidade da cisplatina. O ensaio de deslocamento de brometo de etídio mostrou que todos os compostos interagem com a molécula de DNA e os estudos de ancoragem molecular demonstraram a capacidade dos compostos de atuarem como agentes intercalantes de DNA. Assim, o trabalho indicou o potencial dos complexos de Cu II como agentes biológicos ativos, ambos com alta citotoxicidade e propriedades luminescentes.

ABSTRACT

"THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES OF COPPER COMPLEXES: SPECTROSCOPIC PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY"

Cancer is the second leading cause of death in the world. The scientific community is mobilizing to study new compounds with cytotoxic potential and that can be used as molecular probes. However It is important to highlight that for every 100 thousand drug candidates synthesized, only one gets to the final clinical phase. One of the challenges of medicinal chemistry is to optimize the rate of success, increasing the efficiency of the process. In this context, polypyridic ligands act as good options, once when they are coordinated to a metallic center, their complexes can put together crucial structural features to promote their use as biological probes, due a visible bands, resulted of a charge transfer, and cytotoxic agents by intercalation with DNA. In this work, a theoretical investigation by DFT and TD-DFT of Cu II and Cu I complexes was carried out on their structural and spectroscopic properties. Cu II polypyridinics complexes were synthesized and characterized by UV-Vis, NMR, elemental analysis, fluorescence spectroscopy, conductivity and cyclic voltammetry. Data showed absorption and emission ranges above 400 nm, with quantum emission yield values compared to the literature standard $[\text{Ru}(\text{Bipy})_3]^{2+}$. The IC_{50} values towards MDA-MB 231, MCF7 and PNT2 cell lines surpass the cytotoxicity of cisplatin. Ethidium bromide displacement assay showed that all compounds interacted to the DNA molecule and the molecular docking studies demonstrated the capacity of the compounds to act as DNA intercalating agents. Thus, the

work indicated the potential of Cu II complexes as active biological agents, both with high cytotoxicity and luminescent properties.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	1
1.1.Química Medicinal.....	1
1.2.Câncer.....	2
1.3.Química Inorgânica no combate ao câncer	5
1.4.Fotoquímica de complexos inorgânicos.....	14
1.4.1.Rendimento Quântico.....	17
1.5.Química computacional.....	18
1.5.1.Cálculos estruturais.....;	21
2.Planejamento racional dos complexos.....	22
3.Objetivo Geral.....	24
3.1Objetivos Específicos.....	24
4.Procedimento Experimental.....	24
4.1.Síntese dos ligantes.....	24
4.1.1.Síntese da 1-10-fenantrolina-5-6-diona.....	24
4.1.2.Síntese do ligante Dipyrido[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxalina (L1).....	25
4.1.3.Síntese do ligante 6,7-dicyanodipyrido[2,2-d:2,3-f]quinoxalina (L2).....	25
4.2.Síntese dos complexos.....	26
4.2.1Síntese do complexo A1 [Cu(L1)(H ₂ O) ₂](PF ₆) ₂	26
4.2.2.Síntese do complexo A2 [Cu(L ₂)(H ₂ O) ₂](PF ₆) ₂	26

4.2.3 Síntese do complexo B1 [Cu(L1)(Bipy)](PF ₆) ₂	26
4.2.4 Síntese do complexo B2 [Cu(L2)(Bipy)](PF ₆) ₂	27
4.3 Espectroscopia na região Infravermelho.....	27
4.4 Espectroscopia de absorção e emissão na região do UV-Visível.....	27
4.5 Voltametria cíclica.....	28
4.6 RMN.....	28
4.7 Estudo de interação com o DNA utilizando Brometo de Etídio.....	29
4.8 Ensaio de viabilidade celular.....	29
5. Estudos teóricos.....	30
5.1 DFT e TD-DFT.....	30
5.2 Ancoragem Molecular.....	31
6. Resultados e discussão.....	32
6.1 Os ligantes.....	32
6.2 Complexos: Estudo do estado de oxidação, uma abordagem teórica.....	40
6.3 Caracterização dos Complexos.....	43
6.3.1 Síntese.....	43
6.3.2 Análise elementar.....	49
6.4 Caracterização dos complexos do tipo Aquo (A1 e A2).....	51
6.5 Complexos B1 e B2.....	57
7. Investigação teórica (Estrutura e Dados espectroscópicos).....	62
7.1 Complexo A2.....	63
7.2 Complexo B2.....	68
8. Ancoragem molecular.....	72

9.Deslocamento com brometo de etídio.....	77
10.Ensaio biológico.....	80
11.Considerações finais.....	83
12.Referências Bibliográficas.....	84
13. Apêndices	93

1. Introdução

1.1. Química Medicinal

Segundo a sociedade americana de química¹, química medicinal é definida como uma ciência interdisciplinar que trabalha para o aperfeiçoamento de novas drogas ou melhoria de seus processos. Do ponto de vista inorgânico, ela estuda dois focos principais: os metais na sua ocorrência natural em meio biológico e a interação de metais inseridos propositalmente como droga ou pró-drogas frente a um alvo biológico conhecido.

O uso de metais traz inúmeras vantagens em relação os compostos puramente orgânicos.² O próprio meio biológico já é constituído de inúmeros metais que funcionam como micronutrientes atuando como cofatores de enzimas, no transporte de elétrons e oxigênio.³ O uso de complexos inorgânicos permite uma ampla variedade de ligantes e de estruturas. Estes compostos podem ser utilizados como pró-drogas pela labilização de seus ligantes ou mudança no estado de oxidação.⁴

Basicamente a química medicinal hoje tem uma lógica de funcionamento simplificada que é ilustrada na Figura 1.1. Primeiro se escolhe uma problemática relevante ao estudo e investiga-se seu mecanismo de ação, é importante fixar um alvo biológico para melhor compreensão do sistema. Então, entra o planejamento racional, quando se propõe estruturas que possuem características que permitem um reconhecimento do alvo proposto na tentativa de solucionar a problemática.

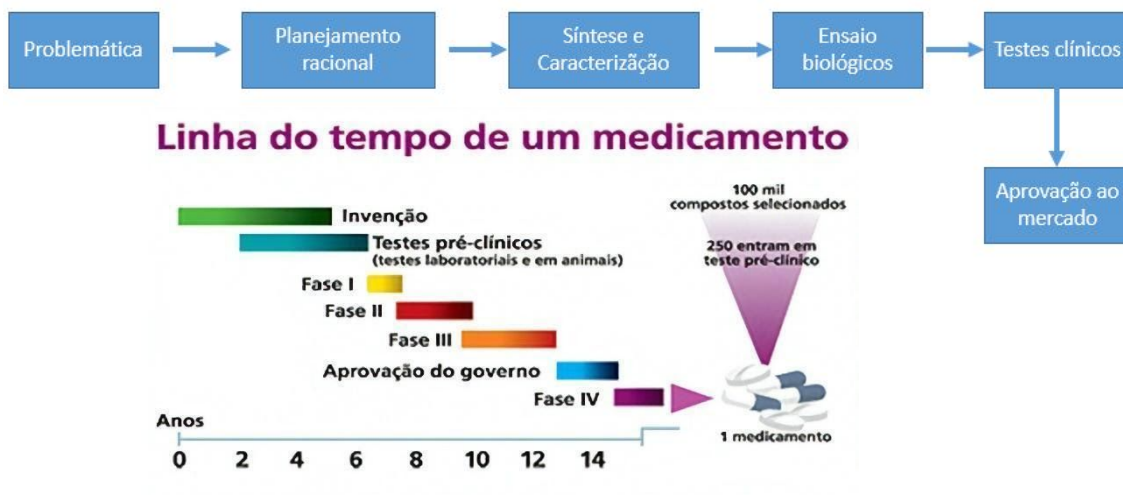


FIGURA 1.1: Desenvolvimento de um fármaco no Brasil⁵

De forma simplificada, após o planejamento racional, parte-se para a fase de síntese e caracterização das moléculas propostas e em seguida, realizam-se ensaios biológicos *in vitro*, ensaios *in vivo* e para os compostos bem sucedidos, testes clínicos.

No entanto, dentro de uma vasta gama de complexos a maioria das moléculas não avança além dos ensaios biológicos. No Brasil, um composto vai ao mercado a cada 100 mil sintetizados.⁵

1.2. Câncer

Nosso trabalho de química medicinal aborda a problemática do Câncer e como os complexos de coordenação podem ser usados no entendimento do combate a este conjunto de doenças. As diversas neoplasias são caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células mutantes. Normalmente o crescimento celular de uma célula saudável se dá em quatro etapas. G1, G2, S, quando há duplicação de material genético e preparação para a divisão, em seguida, termina na fase G0, quando apresenta pouca atividade

nuclear. Células cancerígenas normalmente não passam pela fase G₀ e continuam se multiplicando indiscriminadamente (Figura 1.2).⁶

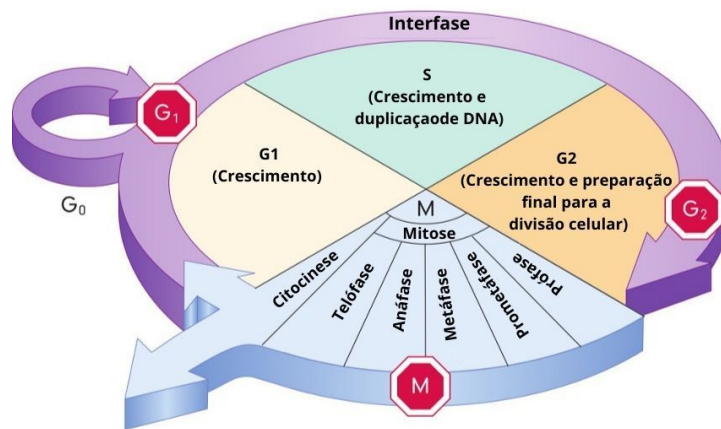


FIGURA 1.2: Ciclo Celular⁷

O grande problema é que estas células mutantes perderam a função original do tecido e por consequência o órgão começa a sofrer falência por falta de células que executam sua função corretamente.⁸ As mutações podem ocorrer por fatores externos como álcool, fumo e alimentação. Ou fatores internos geralmente genéticos. De maneira geral, ocorre uma inserção ou uma deleção de uma das bases nitrogenadas do DNA fazendo com que a sequência de proteínas codificadas seja completamente diferente do que deveria (Figura 1.3). Existem genes que são indutores de morte programada pela célula quando há alguma mutação genética nesse sentido.⁹ Estes genes sinalizam à célula sua autodestruição e evita que a mutação se propague.⁹⁻¹⁰ Estes genes podem também ser conhecidos como genes supressores de tumores. Um grande problema é quando este é o gene afetado pela mutação, quando isso acontece as células mutantes não entram mais em estado letárgico de multiplicação e são

reproduzidas indiscriminadamente, espalhando a mutação. O mais famoso desses genes é o P53, sabe-se que cerca de 50% das células tumorais tem alguma alteração nesse fragmento de DNA, em alguns tipos específicos de Câncer este índice sobe para 70%.¹⁰

	Seqüência normal	ACA	ATG	CAA	CGA	CAA			
		Thr	Met	Gln	Arg	Gln			
Troca de um par de bases	Sem a troca do aminoácido	ACG	ATG	CAA	CGA	CAA			
		Thr	Met	Gln	Arg	Gln			
	Com a troca do aminoácido	ATA	ATG	CAA	CGA	CAA			
	Ileu	Met	Gln	Arg	Gln				
	Mutação para um códon de término	ACA	ATG	TAA	CGA	CAA			
		Thr	Met						
Deleção/inserção de bases	Inserção de 1 base	ACA	GAT	GTA	ACG	ACA	A		
		Thr	Asp	Val	Thr	Thr			
	Perda de 1 base	ACA	ATC	AAC	GAC	AA			
		Thr	Ileu	Asn	Asp				
	Inserção de uma seqüência	ACA	ATG	AGG	GGG	CTA	CAA	CGA	CAA
		Thr	Met	Arg	Gly	Leu	Gln	Arg	Gln

FIGURA 1.3: Mutações genéticas por troca de bases¹¹

O Câncer é a segunda doença que mais mata no mundo. 8,2 milhões de pessoas morrem no mundo todos os anos em decorrência de câncer, só ficando atrás das doenças cardiovasculares. 14, 1 milhões de novos casos são registrados em todo mundo. Sendo assim, há uma grande mobilidade da comunidade científica em se estudar essa problemática de nível mundial. Os tipos de maior incidência no Brasil segundo o INCA são o de Próstata, mama e

de vias aéreas, como observado na Figura 1.4. O INCA ainda estima que serão 625 mil novos casos no triênio 2020-2022.¹²

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 1.4: Incidência de câncer no Brasil¹²

O tratamento do câncer hoje se dá de diversas formas, porém os mais comuns são cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A combinação de técnicas também é comum. Neste trabalho focaremos no uso dos quimioterápicos que são compostos químicos utilizados como forma de redução dos tumores ou até mesmo sua erradicação.

1.3. Química Inorgânica no combate ao câncer

O alvo biológico mais estudado quando se fala de Câncer é o DNA. Responsável por toda informação genética, que se traduz em proteínas e enzimas que geram todas as funções no organismo. O estudo de quimioterápicos inorgânicos iniciou-se na década de 60, com o sucesso da *cis*-diaminocloroplatina (II), a Cisplatina.¹³⁻¹⁴

Ainda hoje o composto é um dos fármacos mais utilizados no tratamento da doença com índice de mais de 90% de cura de tumores de testículos.¹³ A sua aprovação para uso mundial em 1978, para câncer de testículo

e ovário, abriram precedentes para que novos fármacos a partir de compostos metálicos começassem a ser estudados.

Apesar do sucesso e amplo uso da cisplatina, ela ainda apresenta algumas limitações como efeitos colaterais e resistência de alguns tipos de células,¹⁵⁻¹⁷ além disso, ocorre um grande problema de biodisponibilidade uma vez que apenas 5% das moléculas no organismo chegam realmente ao meio intracelular.¹⁶ Sendo assim, começou uma busca por novos fármacos inorgânicos capazes de suprir estas problemáticas. Neste contexto, surgem as drogas a base de platina de segunda geração, carboplatina e oxaliplatina.¹⁸⁻¹⁹

O mecanismo de ação da cisplatina no organismo se dá através da labilização dos ligantes cloridos como mostra a Figura 1.5. A molécula de cisplatina é originalmente neutra o que facilita o transporte na membrana, quando a molécula passa ao meio intracelular onde a concentração de cloreto é 25 vezes menor do que no meio extracelular o ciclo começa com a labilização. Os aquo complexos formados são mais reativos e na presença do DNA se ligam as bases nitrogenadas o que acarreta em uma deformação de sua estrutura, iniciando o processo de apoptose celular.²⁰

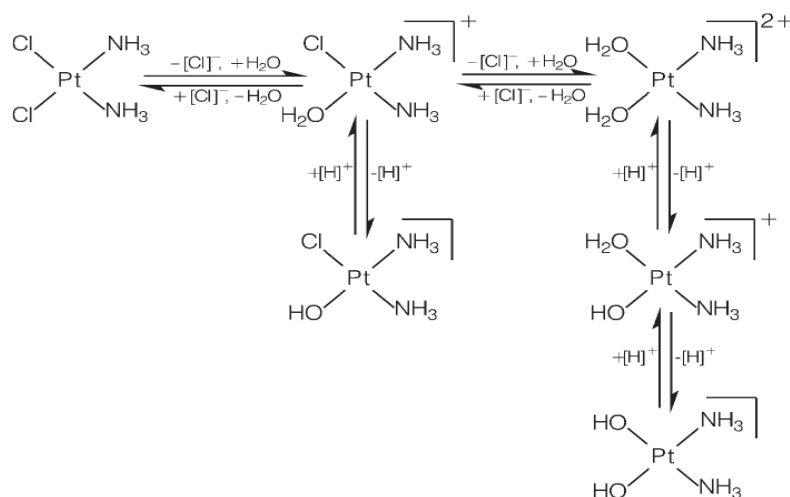


FIGURA 1.5: Solvólise da cisplatina²¹

A cisplatina pode se ligar de diferentes formas ao DNA. As formas mais comuns são ligações covalentes nas bases nitrogenadas do DNA nas formas 1,2 [Figura 1.6 (a)] e 1,3 intrafita entre Guaninas [Figura 1.6 (b)] e a ligação cruzada interfítas entre Guaninas [Figura 1.6 (c)], sendo a primeira forma citada a principal responsável pela citotoxicidade do composto.

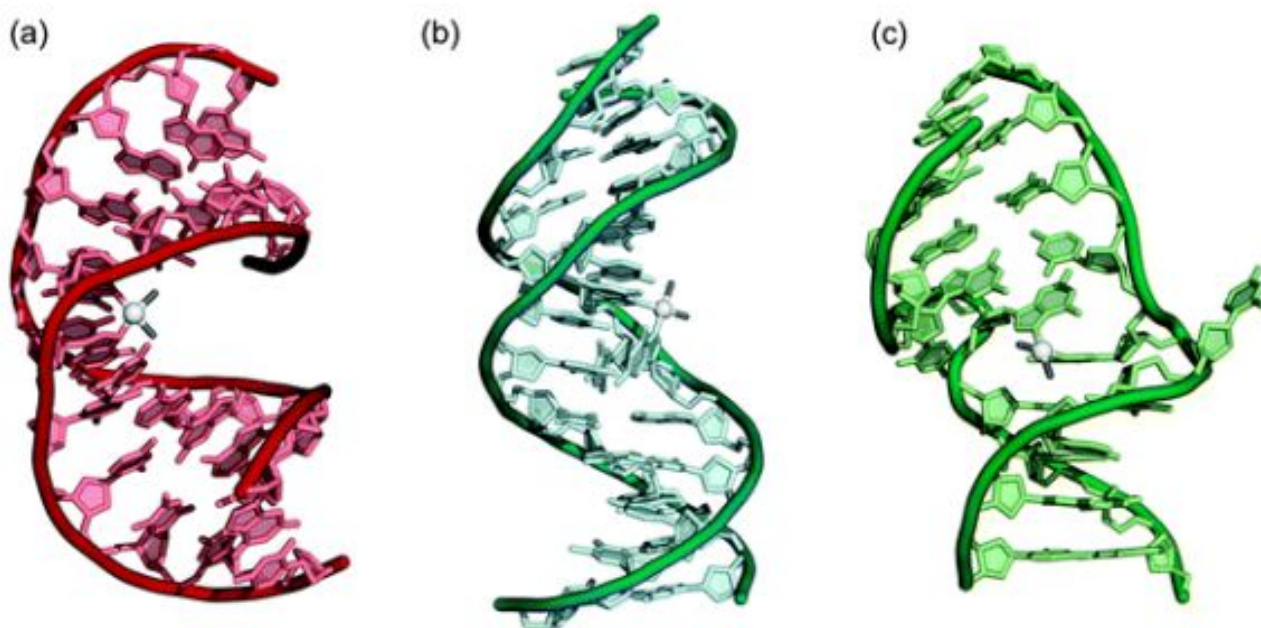


FIGURA 1.6: Modos de interação da cisplatina com o DNA. (a) Ligação cruzada 1,2 - intrafita. (b) ligação cruzada 1,3 - intrafita. (c) ligação 1,2-interfítas.²²

Dada então a potencialidade dos complexos inorgânicos como agentes citotóxicos e as limitações dos compostos de platina se buscam outros metais que possam atuar como novos candidatos à fármacos. Dentre eles são muito comuns os complexos de Ru II, e Cu II.

Os complexos de Rutênio II são amplamente estudados pela sua versatilidade de possíveis ligantes, bem como suas propriedades fotoquímicas e

fotofísicas. Sua configuração d^6 faz com que ele seja um complexo muito estável e com grande versatilidade de números de oxidação além de mimetizar o ferro, quanto a ligações com enzimas carreadoras como a transferrina.

A Figura 1.7 mostra alguns complexos de rutênio estudados, dentre eles destacam-se os compostos NAMI-A e KP1019, que chegaram aos testes clínicos. Neste caso, os compostos são utilizados como pró-drogas, sua estrutura ativa ocorre, somente, após sua redução no meio biológico. Fatores como pH mais ácido acabam favorecendo com que esta redução ocorra principalmente no tecido tumoral em detrimento do saudável.²³⁻²⁵ É conhecido que os compostos de Rutênio podem atuar em diversos alvos biológicos, principalmente nas mitocôndrias, o que faz com que o estudo do mecanismo de ação seja um pouco mais lento.

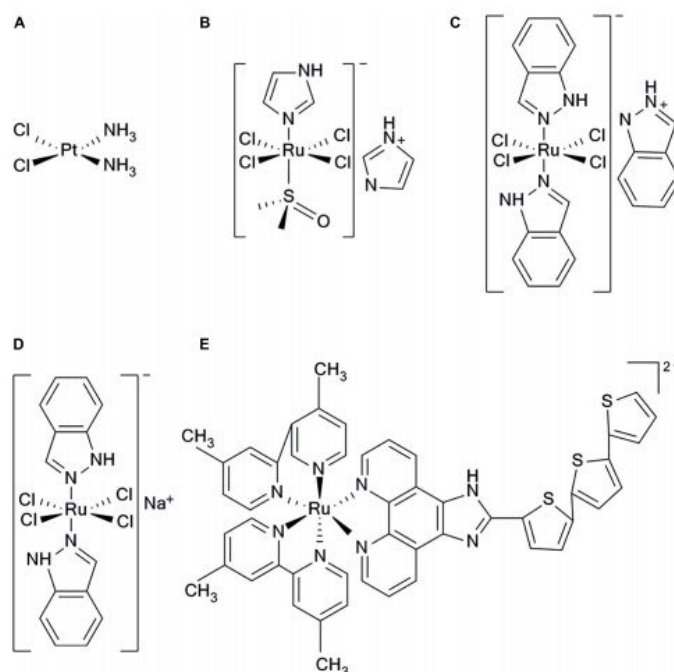


FIGURA 1.7: Estrutura dos complexos Cisplatina (a), Nami-A (b), KP1019 (c), KP1339 (d) e TLD1443 (e).²⁵

Auxiliando o estudo dos mecanismos de ação dos complexos de Rutênio é altamente desejável que estes complexos apresentem propriedades luminescentes/fluorescentes, para que possam ser acompanhados no meio biológico. No trabalho realizado por Svensson e colaboradores foi possível observar a diferença nas intensidades de emissão dos enantiômeros Λ e Δ do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ddpzR})]^{2+}$. A Figura 1.8 mostra que no citoplasma ambos os isômeros têm intensidade de emissão parecidos, porém, o isômero Λ mostra uma maior intensidade no núcleo e menor intensidade no nucléolo, o que acontece de maneira inversa na forma Δ , mostrando possíveis diferentes formas de ação para cada isômero. Anteriormente a citotoxicidade desses compostos foi analisada frente a linhagem MCF-7 com citotoxicidade de $11\mu\text{M}$. Os mesmos estudos apontam um alto potencial intercalador como o principal ponto a ser considerado na toxicidade dos complexos. Sendo assim, esse trabalho como outros gera um histórico de complexos de metais de transição sensíveis ao meio biológico onde se encontram, cuja sensibilidade resulta em uma mudança de comportamento espectroscópico visível.

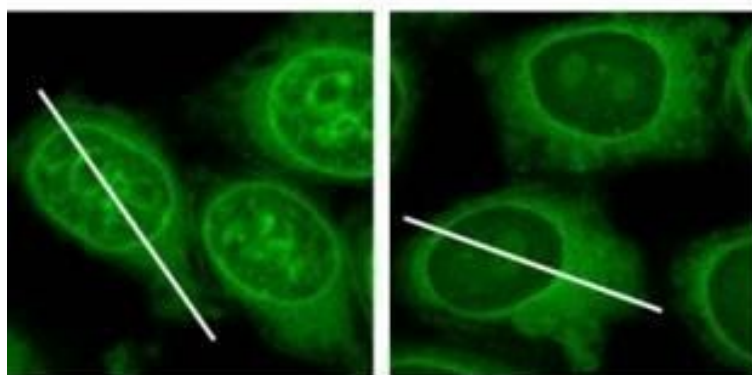


FIGURA 1.8 : Microscopia confocal do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ddpzR})]^{2+}$ na linhagem MCF-7. Enantiômero Λ à esquerda e enantiômero Δ à direita²⁶

Em 2016, Byrne e colaboradores publicaram um trabalho, utilizando complexos polipiridínicos de Rutênio II como sondas de DNA. (figura 1.9) Os resultados mostram um aumento significativo na intensidade de emissão do complexo quando excitado na banda de transferência de carga, o que mostra o quanto estes complexos são promissores como sondas biológicas. Estes complexos apresentaram valores de rendimento quântico de emissão da ordem de 0,067, comparáveis ao padrão rutênio trisbipy de 0,040 e tempos de vida de emissão de 579 ns. Foi observado que o complexo 1 após 2 horas se distribui igualmente pelo citoplasma, porém, em 4 horas foi observado uma maior concentração no retículo endoplasmático (figura 1.9, imagens a-d). Para o complexo 2, foi observada mesmo em 24 horas uma distribuição uniforme indicando um mecanismo em mais de uma organela e para o complexo 3, foi observado que após 24 horas ocorre uma maior acumulação no núcleo indicando que a interação com o DNA é a responsável pela citotoxicidade do complexo. (Figura 1.9, imagens i-l)

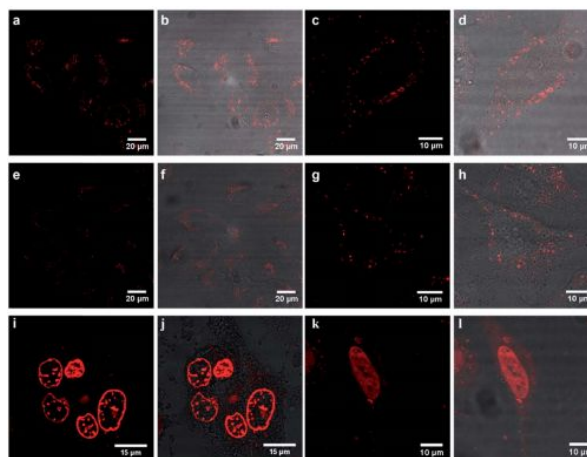


FIGURA 1.9: Microscopia confocal do complexo (a-d) Ru-ER, (e-h) Ru-Arg8 and (i-l) Ru-NLS em células HeLa. Colunas 1 e 2 células aglomeradas e colunas 3 e 4 células isoladas.²⁷

Dado o amplo estudo de complexos de Rutênio hoje se buscam outros metais mais viáveis e com outras geometrias possíveis mas que também tenham potencial citotóxico e com propriedades luminescentes que propiciem os estudos de bioacumulação e facilitam assim o entendimento de mecanismos de ação.

O cobre surge como uma alternativa aos complexos de rutênio, além de apresentarem propriedades que os caracteriza como possíveis sondas biológicas,²⁸ é um metal essencial no meio biológico. No organismo, existem diversas enzimas de cobre que são responsáveis pelo transporte de oxigênio, e de elétrons,²⁹⁻³⁰ dado sua possibilidade de mudança de número de oxidação. Um homem adulto possui em média cerca de 140 mg de cobre no organismo o que faz este metal essencial para a vida.

O cobre com configuração $3d^{10} 4s^1$ se apresenta mais facilmente nos estados de oxidação 0, 1 e 2, sendo que o estado 1 apenas é possível em sistemas retiradores de elétrons. Quando em estado de oxidação 2 o íon cobre pode assumir geometria quadrática plana ou tetraédrica, dependendo do tipo de ligante. Mais uma vez pela configuração d^9 , rica em elétrons, o metal tem preferência por ligantes π receptores que o estabilizam, como fosfinas, nitrilas ou ligantes polipiridínicos.

Bisceglie e colaboradores sintetizaram uma série de complexos de cobre e níquel ligados a tiossemicarbazonas e observaram que os compostos de cobre foram mais que 100 vezes mais ativos que os ligantes livres contra a linhagem U937. Um fator que pode ser diferencial nesta observação é a estrutura dos complexos, quando os compostos a base de cobre se mostraram quadráticos planos, enquanto que nos análogos de níquel a geometria foi octaédrica (Figura 1.10).

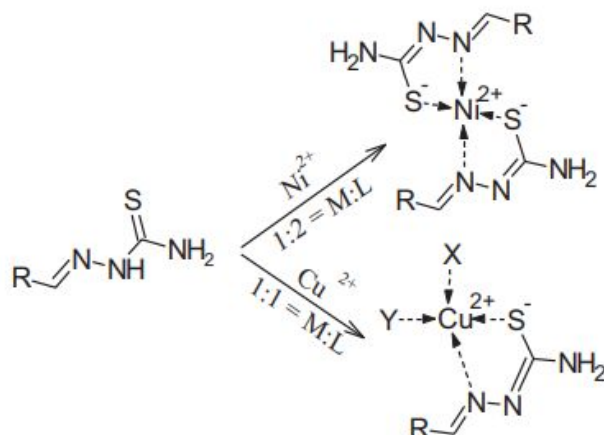


FIGURA 1.10: Estrutura esquemática dos complexos de Bisceglie ativos na linhagem U397³¹

Em, 2011 Zeglis (Figura 1.11) e colaboradores sintetizaram uma série de complexos de cobre com ligantes bidentados e sugeriram que a maior atividade citotóxica dos complexos em relação aos ligantes se dava pela planaridade que a estrutura conferida aos complexos pelo centro metálico de Cu II, fazendo com que este centro seja promissor com agente citotóxico.

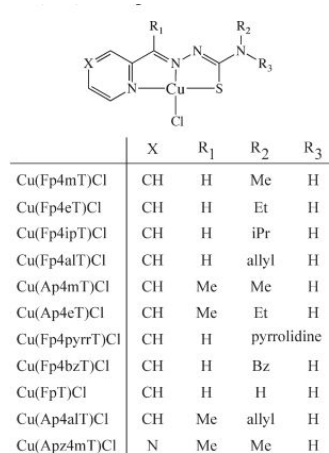


FIGURA 1.11: Estrutura dos ligantes e complexos planos de Zeglis, 2011³²

Essa sugestão foi corroborada por Bisceglie em 2015 que mostrou que, frente à linhagem U397 apenas os complexos de Cu II se mostraram ativos

enquanto comparados aos análogos de níquel. O estudo de interação enzimática logo mostrou que apenas os complexos de Cu II interagiam com a enzima TOPO II, responsável pela replicação celular. Ao verificar os resultados da ancoragem molecular (Figura 1.12), sugeriu-se que a planaridade dos compostos de cobre facilitava a interação com a biomolécula o que justificava sua citotoxicidade reafirmando a teoria de Zeglis.

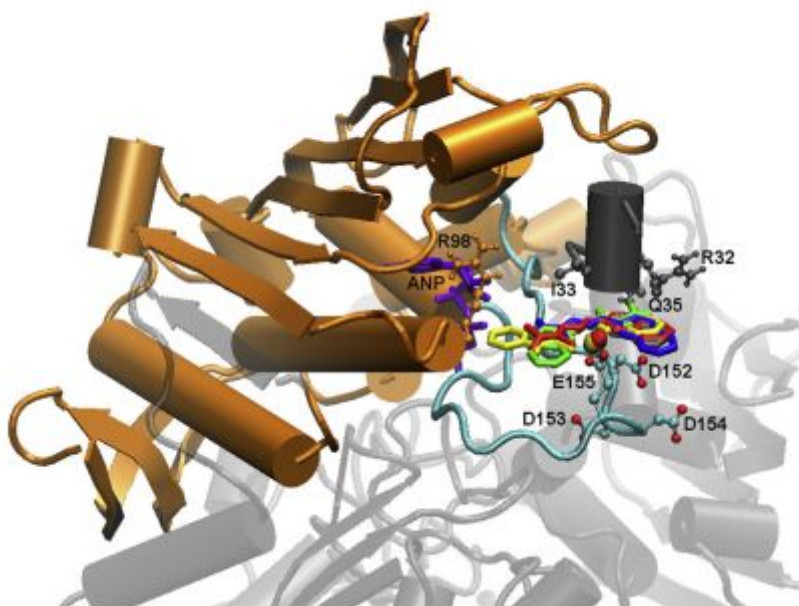


FIGURA 1.12: Posições dos complexos de Cu II minimizadas previstas por ancoragem molecular no sítio da ATPase.³³

No que diz respeito a outras biomoléculas, Lakshmipraba e colaboradores também demonstraram a importância da geometria quadrática plana em complexos derivados de fenantrolina interagindo com o DNA. O trabalho mostra que os complexos de cobre (Figura 1.13) interagem de maneira parcialmente intercalativa no sulco menor do DNA com constante na ordem de 10^4 . Os experimentos de dicroísmo circular mostram que provavelmente oriundos da fenantrolina interagem com as bases nitrogenadas do DNA por

interações π , mostrando o grande potencial destes complexos como candidatos a agentes citotóxicos³⁴.

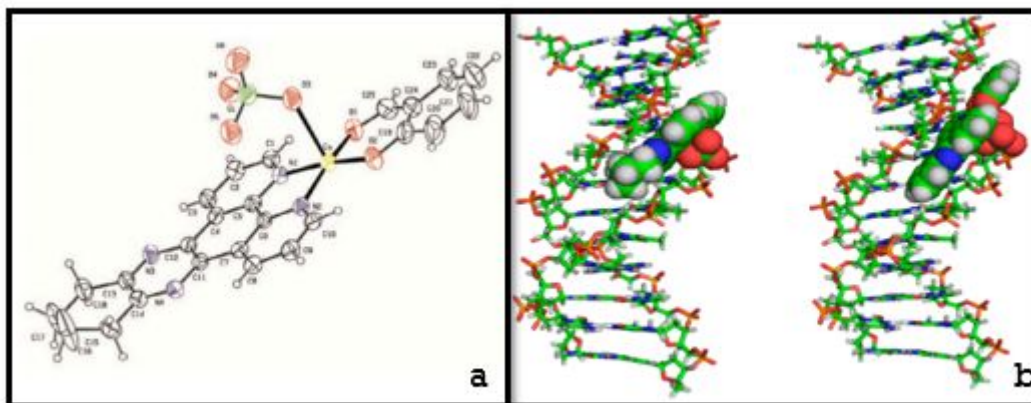


FIGURA 1.13: Difração de raio-x de um dos Complexos de Cu II de LakshmiPraba (a). Ancoragem molecular dessa mesma molécula ao DNA.³⁴

1.4. Fotoquímica de complexos inorgânicos

Complexos com propriedades fluorescentes são de grande interesse em estudos biológicos, uma vez que permitem uma maior compreensão da ação dos complexos no organismo. Para um planejamento estrutural adequado, é necessário o conhecimento do processo de absorção e emissão de luz visível. Segundo Turro³⁵ e colaboradores, uma molécula absorve energia atingindo um estado excitado quando ocorre uma ressonância entre a densidade eletrônica e a frequência da luz incidida. Neste momento ocorre a formação de um nó e há a absorção eletrônica (Figura 1.14).

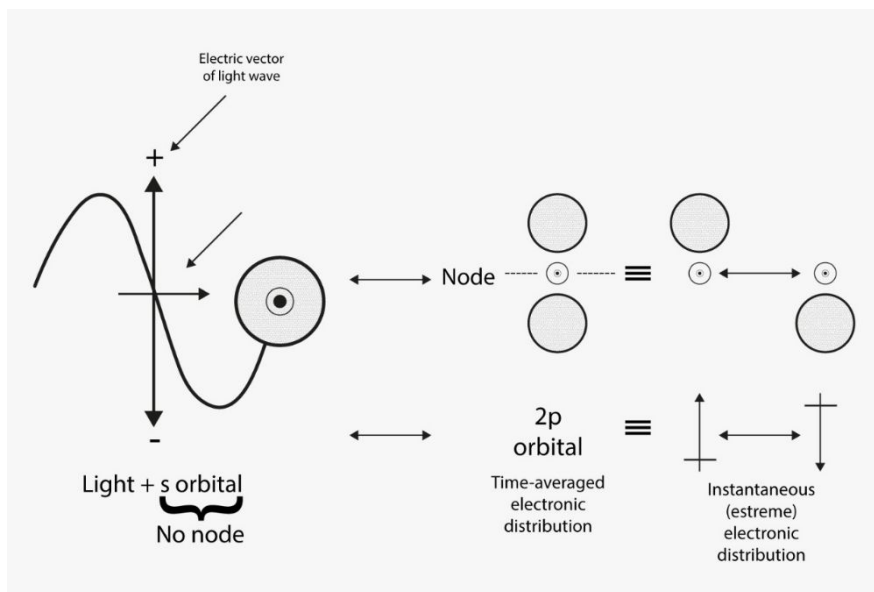


FIGURA 1.14: Formação de nós durante a absorção eletrônica³⁵.

Pelo princípio de Franck Kondon³⁵ toda transição eletrônica ocorre no sentido vertical, uma vez que o núcleo é mais pesado que os elétrons. Sendo assim, no momento da transição eletrônica não há mudança nas coordenadas nucleares do sistema. Da mesma forma, a transição ocorre num período de 10^{-15} s, tempo insuficiente para que o momento de rotação do elétron se inverta. Dadas essas informações temos como resumo o que uma transição eletrônica precisa para acontecer: Ressonância da frequência com o estado fundamental, mudança orbital e conservação de spin. Qualquer transição fora destas condições se torna uma transição proibida. Essa permissividade pode ser observada através do valor de absorvidade molar (ϵ) calculado pela equação de Lambert-Beer.

O processo de emissão ocorre de maneira inversa, porém não necessariamente de forma vertical. Em compostos puramente orgânicos é comum que haja pouca dissipação de energia por vibração e o estado populado seja exatamente o estado emissivo. Para complexos de metais de transição, a partir do momento em que há a absorção ocorre uma mudança de estado com

inversão de spin, uma vez que o complexo acaba ganhando mais graus de liberdade e geralmente, este é o estado responsável pela emissão, quando ocorre. Se o complexo não apresenta uma estrutura rígida, ele acaba perdendo energia apenas por radiação infravermelha, oriunda dos movimentos das ligações químicas.

No entanto, este processo de inversão de spin no estado excitado, promove uma vantagem aos compostos de coordenação, uma maior diferença entre o comprimento de onda de absorção e emissão, chamado de deslocamento de Stokes. Esta distância permite que os dois processos ocorram de maneira independente sem interferência da luz emitida pela luz absorvida, como acontece nos compostos orgânicos onde ocorrem processos de reabsorção. A Figura 1.15 mostra os exemplos da Courmarina 6 e de um complexo de metal de transição. Repare na grande sobreposição entre os espectros de absorção e emissão. Essa sobreposição pode causar uma supressão de luminescência por reabsorção bem como processos paralelos indesejados. Quando olhamos o complexo de metal de transição observamos que ao se iniciar a banda de emissão, a banda de absorção está quase zerada o que garante um isolamento dos dois processos e o estudo em separado de cada um.

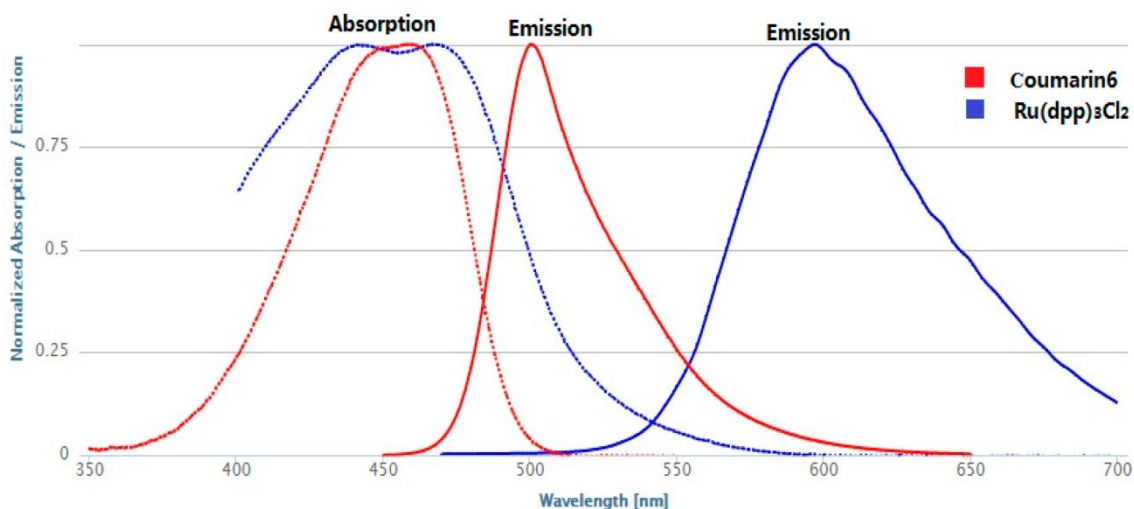


FIGURA 1.15: Relação entre absorção e emissão de complexos inorgânicos para compostos orgânicos. Em tracejado, espectros de absorção e em linha cheia os complexos de emissão. Em azul o complexo $\text{Ru(dpp)}_3\text{Cl}_2$ e em vermelho o composto orgânico Coumarina 6³⁶.

1.4.1. Rendimento quântico

Neste sentido, para que um complexo seja apto para ser usado como uma possível sonda fluorescente se deseja um alto rendimento quântico de emissão, que é definido como a relação entre moléculas que atingem o estado excitado e pelas moléculas que realmente emitem.

$$\phi = \frac{\text{número de moléculas que atingem o estado excitado}}{\text{número de fótons emitidos}}$$

Em moléculas orgânicas rígidas como o pireno, antraceno ou perileno este número se aproxima muito de 1, pois os sistemas aromáticos

conjugados conferem pouca vibração ao sistema, fazendo com que as perdas energéticas por processos não radiativos sejam suprimidas em detrimento dos processos radiativos.³⁵

Já em complexos com maior mobilidade se esperam rendimentos quânticos bem menores uma vez que a molécula está mais propícia a perdas vibracionais. Importante ressaltar que o rendimento quântico também depende da temperatura e solvente que influenciam diretamente nas condições vibracionais.

Como exemplos temos os complexos quadráticos planos de Exposito et al , em 2015³⁷. Foram sintetizados 9 complexos com um ligante derivado do perileno e analisados seus rendimentos quânticos de emissão. Apenas na substituição do perileno o ligante foi de um rendimento de 0,93 para 0,13 e quando complexado esse valor passou a 0,0004. Mostrando realmente a capacidade de supressão de luminescência em prol do grau vibracional das moléculas.

1.5. Química computacional

A fim de se aperfeiçoar o processo de planejamento, síntese e caracterização de possíveis compostos biologicamente ativos, uma das vertentes da química computacional, propõe-se compreender os modos de interação de complexos e moléculas orgânicas no meio biológico.³⁸ Uma das técnicas para tal é a de modelagem molecular que consiste na previsão estrutural de um fragmento ligante-receptor sendo esse ligante um composto orgânico ou um complexo de metal de transição.³⁸

Geralmente um dos métodos utilizados para a determinação da estrutura de um aduto formado por molécula bioativa e macrobiomolécula pode ser feito por cristalografia de Raios-X,³⁹ porém ainda ocorre a limitação do

método a se obter fases puramente cristalinas para a análise, o que não é algo trivial experimentalmente. Outro ponto é que não se garante que a conformação cristalizada será a mais estável quando em solução.

Sendo assim a modelagem molecular trabalha com ferramentas de construção e análise de sistemas complexos por meio computacional. Basicamente a técnica parte de uma estrutura de um receptor conhecida experimentalmente e se ajusta o candidato a fármaco neste sítio.³⁹⁻⁴⁰ E através de cálculos de interação se podem comparar os dados experimentais e teóricos e assim concluir sobre uma possível interação com o sistema em estudo.

Em 2019, Hussain e colaboradores⁴¹ reportaram complexos de polipiridínicos de Cu(II) com citotoxicidade de 100, 50 e 10 μM para os complexos 1,2 e 3, respectivamente, frente à linhagem de câncer de mama MCF-7 (Figura 1.16). Para se compreender os modos de ligação destes complexos com as proteínas HSA e BSA, foram conduzidos os estudos de modelagem molecular nos dois sítios possíveis de interação destas macromoléculas.

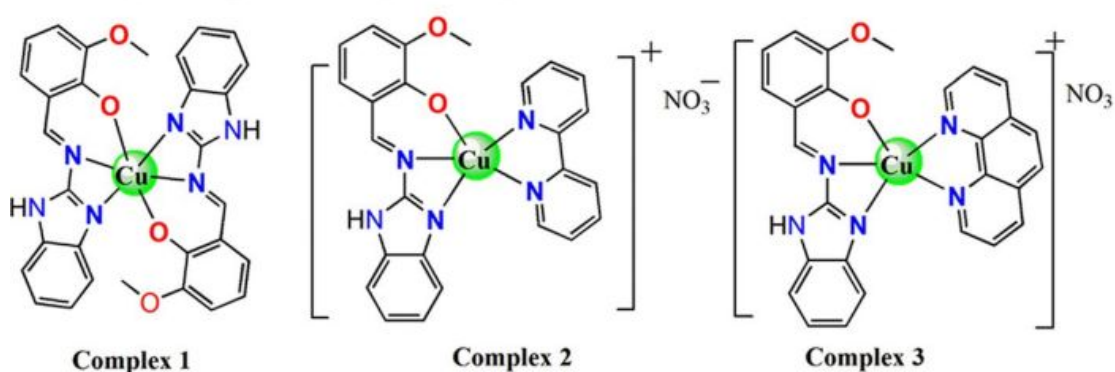


FIGURA 1.16: Complexos polipiridínicos testados frente à linhagem MCF-7 de câncer de mama por Hussain.⁴¹

O estudo mostrou que todos os compostos se ligam no sítio hidrofóbico do HSA interagindo com o aminoácido Triptofano 214 com boa interação hidrofóbica. Uma das razões a qual se atribuiu a melhor interação foi à presença dos ligantes polipiridínicos na estrutura. Estes ligantes bidentados ao travar a estrutura com ligantes rígidos permitem maior interação com os aminoácidos. Os ligantes Bipyridina e fenantrolina interagem diretamente com os aminoácidos do HSA segundo o estudo de ancoragem molecular, sugerindo que esta interação dos anéis aromáticos seja um dos fatores predominantes para a citotoxicidade do composto.⁴¹

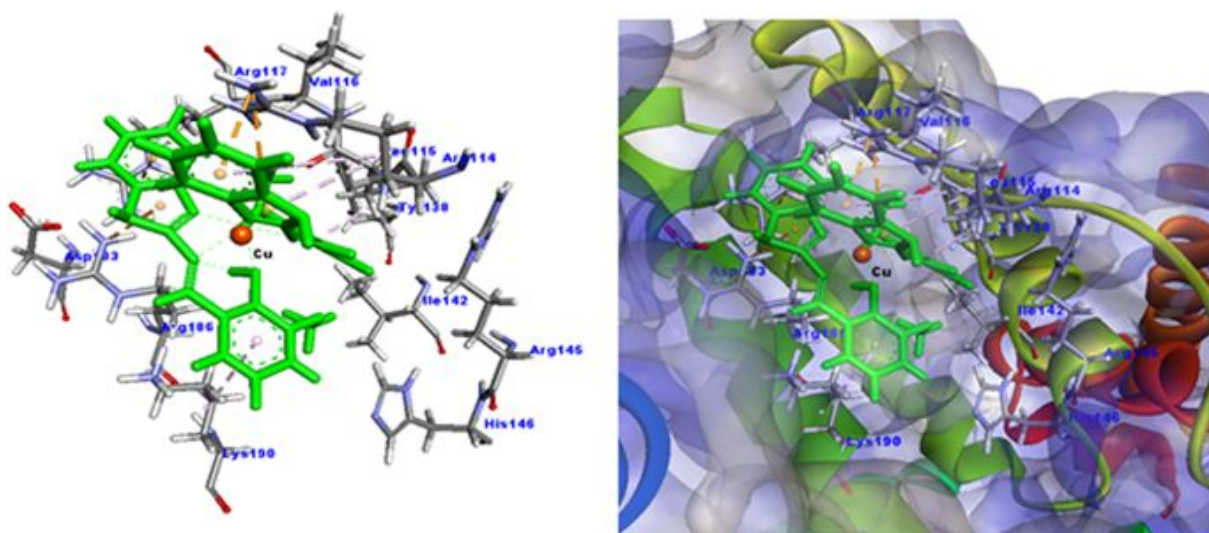


Figura 1.17 : Docking molecular do complexo 1 de Hussain interagindo com HSA⁴¹

Um ponto importante do exemplo acima é que só foi possível o estudo de interação por modelagem molecular por haver uma estrutura cristalina do complexo em questão. Sendo assim, para o caso quando não há estrutura cristalina conhecida, a química computacional lança mão de outra ferramenta, cálculos estruturais.

1.5.1. Cálculos estruturais

Os cálculos estruturais que utilizam métodos quânticos são divididos em três grandes grupos: métodos *Ab initio*, o cálculo de baseia apenas em constantes fundamentais como a de Planck, velocidade da luz e carga do elétron. Neste modelo, todas as equações são resolvidas com algumas aproximações. Um exemplo é a aproximação de Born-Oppenheimer que separa a função nuclear da eletrônica os calculando separadamente para cada átomo, uma vez que o movimento do núcleo é muito mais lento que o do elétron. Sendo assim, esta aproximação funciona bem para átomos muito massivos, porém não muito boa em átomos mais leves. A grande limitação deste método é o custo computacional de se calcular uma função nuclear e uma função eletrônica para cada partícula usando apenas constantes fundamentais.⁴²

Outra opção é o método semi-empírico, que usam menos aproximações, porém partem de dados experimentais conhecidos para executar o cálculo, ou até mesmo podem ser usados no lugar de dados experimentais, parâmetros calculados pelo método *Ab initio*. Uma simplificação e limitação empregada é a consideração apenas dos elétrons de valência e o uso apenas das funções de base *s* e *p*. Os elétrons de camadas mais internas são descontados por um fator de blindagem orbital levando em consideração a repulsão entre os elétrons de camadas mais internas. Ao contrário do cálculo *Ab initio* quando os erros geralmente são sistemáticos e previsíveis, no método semi-empírico, os erros são mais aleatórios e dependem dos parâmetros utilizados bem como dos dados experimentais que se utilizam no cálculo.

Para átomos mais pesados contendo orbitais *d* e *f* é recomendável a realização de cálculos da teoria do funcional da densidade (DFT). Diferente dos métodos semi-empírico e *ab initio*, quando se calcula a função de onda para cada

elétron o que torna o custo computacional muito grande em sistemas complexos, no método DFT se utiliza apenas uma única função densidade eletrônica $\rho(N)$, onde N é o número de elétrons do sistema. Se antes para cada elétron se tinham coordenadas x, y e z , agora existem apenas três coordenadas consideradas no cálculo (x, y e z da função densidade).

2. Planejamento dos complexos

Tendo em vista o exposto acima, quando pensamos em um complexo metálico bioativo que possa ser também promissor como sonda biomolecular leva-se em consideração dois fatores: as propriedades espectroscópicas e citotoxicidade do complexo.

O íon Cu II foi escolhido por ser um metal além de economicamente vantajoso, de geometria plana e com configuração eletrônica d^9 o que permite transferências de carga no visível quando combinados com o ligante apropriado. Além disso, os compostos contendo o íon Cu II , já são conhecidos na literatura como promissores agentes quimioterápicos, tanto quando se considera a citotoxicidade, quanto sua utilização como sonda.⁴³⁻⁴⁵

Quando pensamos no ligante, ligantes rígidos e aromáticos se mostraram promissores no meio biológico. Dentre estes, os ligantes polipiridínicos como imidazol e fenantrolina já vem sendo amplamente estudados por conferir rigidez e estabilidade termodinâmica ao composto quando coordenados de maneira bidentada, o que auxilia nas interações hidrofóbicas no meio biológico. Sua estrutura com orbitais do tipo π^* vazios permitem, quando combinados com átomos ricos em elétrons d , que realizem movimentações eletrônicas dentro do visível.⁴⁶ Esse comprimento de onda de excitação dentro do visível infere uma excitação menos energética, o que para uma possível aplicação como sonda biológica garantiria que o organismo não

sofra alterações devido à radiações de alta energia, como ultravioleta, por exemplo. A maioria das biomoléculas também absorve na região ultravioleta, o que não garantiria uma preferência na excitação exclusiva da molécula sintetizada.

A fim de se estender a conjugação dos elétrons do ligante deixando os orbitais vazios mais acessíveis, e assim, trazendo a energia da transferência de carga para regiões menos energéticas, visível, realizou-se alterações pontuais na estrutura da fenantrolina através da inserção de sistemas conjugados simples, favorecendo as propriedades espectroscópicas sem prejudicar a solubilidade em água destes complexos. A fenantrolina já é estudada em diversos compostos com resultados promissores em complexos que são tanto citotóxicos quanto fluorescentes.⁴⁶⁻⁴⁸ Face o exposto, planejou-se complexos contendo o centro metálico de Cu II com ligantes derivados da fenantrolina e imidazol (Figura 1.18).

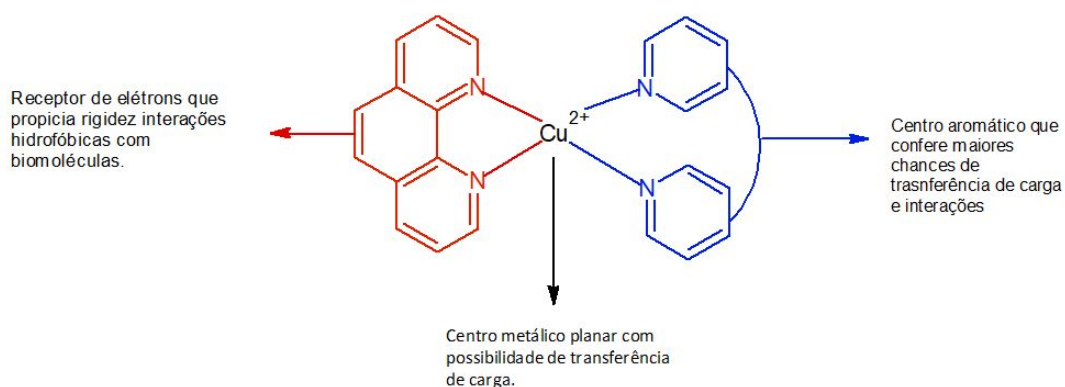


FIGURA 1.18: Planejamento racional dos complexos de Cobre

3. Objetivo Geral

Estudar experimental e teoricamente as propriedades espectroscópicas e estruturais de complexos de Cu II como possíveis complexos citotóxicos e sondas biológicas.

3.1. Objetivos Específicos

- 1- Sintetizar e caracterizar os ligantes e complexos de cobre
- 2- Calcular suas estruturas teóricas por DFT
- 3- Estudar suas propriedades espectroscópicas por TD - DFT
- 4- Realizar estudos de interação com DNA por ancoragem molecular
- 5- Realizar estudos de interação experimentais dos compostos com o DNA
- 6- Realizar ensaios de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares

4. Procedimento Experimental

4.1. Síntese dos ligantes

4.1.1. Síntese da 1-10-fenantrolina-5-6-diona

Em um balão de 250 mL, em banho de gelo 0°C, foram adicionados 1g de 1-10 fenantrolina e 5g de KBr sólido. A esta mistura foram gotejados 60 mL de uma solução de sulfonítrica, previamente preparada, também em banho de gelo, a partir da mistura de 40 mL de H₂SO₄ e 20 mL de HNO₃. A mistura foi colocada sob agitação e a reação foi mantida em refluxo até o desaparecimento do gás vermelho formado, Br₂ em aproximadamente 2 horas.

A solução foi neutralizada com solução saturada de Na₂CO₃ e filtrada. A solução amarela foi extraída 3 vezes com 50 mL de CHCl₃. A fase

orgânica foi evaporada completamente, resultando em um sólido amorfo amarelo (rendimento 65%).⁴⁶

4.1.2. Síntese do ligante Dipyrído[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxalina (L1)

Em um balão de 250 mL foram adicionados 300 mg de 1-10-fenantrolina-5-6-diona solubilizados em 50 mL de etanol. A esta solução foi adicionado 1 mL de HCl 30 % sob agitação. Logo em seguida, foram adicionados 143 mg de 3,4-diaminofurazano solubilizados em 50 mL de etanol. A solução foi refluxada por 8 horas, neutralizada e teve seu volume reduzido. A precipitação foi forçada em banho de gelo e o sólido amarelo foi filtrado e seco à vácuo. (rendimento de 50%).⁴⁷

4.1.3. Síntese do ligante 6,7-dicyanodipyrído[2,2-d:2,3-f]quinoxalina (L2)

Em um balão de 250 mL foram adicionados 300 mg de 1-10-fenantrolina-5-6-diona e solubilizados em 50 mL de etanol. Após isso foram adicionados 155 mg de 3,4-diaminofurazano solubilizados em 50 mL de etanol. A solução foi refluxada por 8 horas, neutralizada e teve seu volume reduzido. A precipitação foi forçada em banho de gelo e o sólido amarelo foi filtrado e seco à vácuo. (rendimento de 47%).⁴⁷

4.2. Síntese dos complexos

4.2.1. Síntese do complexo A1 $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{PF}_6)_2$

Em um balão de 250 mL foram adicionados 100 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solubilizados em 50 mL de água. A esta solução foi gotejada uma suspensão feita a partir de 110 mg do ligante 1 e 50 mL de etanol. A solução foi refluxada por 24 horas, à 90 °C. Após este período, o volume reduzido. Em seguida, a precipitação foi forçada em banho de gelo. O sólido verde foi filtrado e recristalizado em água quente, com excesso de NH_4PF_6 . O composto foi lavado com água à temperatura ambiente e seco à vácuo (rendimento de 60%).

4.2.2. Síntese do complexo A2 $[\text{Cu}(\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})_2](\text{PF}_6)_2$

Em um balão de 250 mL foram adicionados 100 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e solubilizados em 50 mL de água. A esta solução foi gotejada uma suspensão feita a partir de 113,05 mg do ligante 2 e 50 mL de etanol. A solução foi refluxada por 24 horas, à 90 °C. Após o volume ter sido reduzido, a precipitação foi forçada em banho de gelo, observou-se a formação de um sólido verde, que foi filtrado. O composto foi solubilizado em água quente e cristalizado, com excesso de NH_4PF_6 . O sólido verde foi lavado com água à temperatura ambiente e seco à vácuo (rendimento médio 60%).

4.2.3. Síntese do complexo B1 $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{Bipy})](\text{PF}_6)_2$

Em um balão de 100 mL foram adicionados 100 mg do complexo A1 solubilizados em 50 mL de acetona. A esta solução foram adicionados 25 mg

de 2,2 Bipy. Após o volume ter sido reduzido, a precipitação foi forçada em banho de gelo, observou-se a formação de um sólido marrom, que foi filtrado, lavado com etanol gelado e seco à vácuo. (rendimento médio 50%).

4.2.4. Síntese do complexo B2 [Cu(L2)(Bipy)](PF₆)₂

Em um balão de 100 mL foram adicionados 100 mg do complexo A2 e solubilizados em 50 mL de acetona. À essa solução foram adicionados 25 mg de 2,2 Bipy. Após o volume ter sido reduzido, a precipitação foi forçada em banho de gelo, observou-se a formação de um sólido marrom, que foi filtrado, lavado com etanol gelado e seco à vácuo. (rendimento médio 50.7%).

4.3. Espectroscopia na região Infravermelho

Os espectros foram obtidos em pastilha de CsI de maneira qualitativa, com branco previamente coletado em pastilha de CsI. Os resultados foram coletados em varreduras de 42 scans no espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100.

4.4. Espectroscopia de absorção e emissão na região do UV-Visível

Os espectros foram obtidos em solução de DMSO à temperatura ambiente com velocidade média de varredura e amplitude de 200 a 900 nm em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. As medidas foram feitas com absorbância na banda de interesse próximo de 1, respeitando a Lei de Beer. Os espectros de emissão foram obtidos a partir de soluções a 0,1 de absorbância nas

bandas de interesse. Os rendimentos quânticos foram calculados por comparação frente ao padrão $[\text{Ru}(\text{Bipy})_3]^{2+}$ através da equação 1.

$$\Phi_{\text{amostra}} = \Phi_{\text{padrão}} \left(\frac{I_{\text{amostra}}}{A_{\text{amostra}}} \right) \left(\frac{A_{\text{padrão}}}{I_{\text{padrão}}} \right) \left(\frac{\eta_{\text{amostra}}}{\eta_{\text{padrão}}} \right)^2$$

Equação 1: Rendimento quântico^{35,37}

$\Phi_{\text{padrão}}$ = rendimento quântico da molécula $[\text{Ru}(\text{Bipy})_3]^{2+}$

I = área do gráfico de intensidade de emissão da amostra e do padrão

A = absorção da amostra e do padrão no comprimento de excitação

η = índice de refração do solvente

4.5. Voltametria cíclica

Os estudos eletroquímicos foram conduzidos em uma cela de 3 eletrodos em 10 mL de acetonitrila desaerada com gás Argônio em um potenciostato AUTOLAB PGSTAT101. O eletrodo de trabalho e contra-eletrodo utilizados foram de disco de platina, e o eletrodo de referência foi um fio de prata. Os voltamogramas foram obtidos em diferentes sentidos e velocidades a depender do sistema. A concentração de composto utilizada foi de 10^{-3}M para as espécies analisadas e 0,1 M para o eletrólito suporte (PTBA).

4.6. RMN

Para os ligantes, foram obtidos os espectros de RMN unidimensionais de ^1H e ^{13}C e bidimensionais de COSY H-H e HSQC, em DMSO - d^6 ou clorofórmio deuterados. Para os complexos não foi possível a obtenção dos espectros de RMN devido a sua natureza paramagnética. Todos os

experimentos foram conduzidos em um equipamento de 400mHz, BRUKER ARX 9,4T .

4.7. Estudo de interação com o DNA utilizando Brometo de Etídio

Uma solução de Brometo de etídio foi misturada a uma solução de CT- DNA de modo que a concentração final de cada espécie em solução fosse de 50 μM . Esta solução foi titulada com o complexo de interesse em concentrações que vão de 0 a 50 μM . O resultado desta titulação foi monitorado pelo decrescimento da intensidade da curva de emissão do aduto BE + DNA em função da adição de complexo. Para correção da linha de base foi utilizado o branco (solvente).⁴⁸

4.8. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares: MDA-MB-231(câncer de mama), A549 (câncer de pulmão) e MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino) dentro de garrafas de plástico (Corning) armazenadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

A contagem das células foi realizada utilizando o corante Azul de Tripiano em uma câmara de Neubauer no Microscópio Nikon Eclipse TS100. Após a contagem da suspensão, foram adicionadas à placas de 96 poços alíquotas com 150 μL contendo $1,5 \times 10^4$ células mL^{-1} . As placas foram mantidas por 24 h na estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 μL de uma solução de DMSO contendo o ligante ou os complexos. As concentrações finais dos compostos nos poços foram de $8,00 \times 10^{-1}$; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00;

50,00; 100,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; para os compostos mais ativos as concentrações precisaram ser ajustadas para: $2,00\times 10^{-1}$; $3,90\times 10^{-1}$; $7,80\times 10^{-1}$; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48 h.⁴⁹⁻⁵¹

Após a incubação das microplacas foi adicionado a cada poço 50 μL de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolio) ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubada novamente na estufa por 4h. Por fim, se retirou a solução de cada poço e adicionou-se 100 μL de DMSO, em seguida foram realizadas as medidas de absorbância em cada poço com o leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 2010 e GraphPadPrism 5.01.

5. Estudos teóricos

5.1. DFT e TD-DFT

Inicialmente as estruturas dos complexos foram otimizadas utilizando o método DFT com funcionais B3LYP nas bases LANL2DZ e CCPVDZ, para se averiguar qual gerariam melhores resultados. Frente aos dados obtidos, foi escolhida a base CCPVDZ para a continuação dos estudos. As estruturas foram otimizadas, novamente, com os funcionais CAM-B3LYP e M062X. A partir das estruturas otimizadas, foram calculados pelo método TD-DFT os espectros de absorção teóricos das moléculas. As análises populacionais foram feitas através do cálculo de energia no estado fundamental das estruturas otimizadas, utilizando as keywords pop=full, nbo iop (3/33=1). As análises populacionais foram feitas utilizando o software GaussSum. Os espectros de RMN dos ligantes foram simulados pelo método DFT (GIAO). Os sinais foram corrigidos frente a prótons calculados do ligante 1-10, fenantrolina,

utilizado como padrão. Todos os cálculos foram efetuados em fase gasosa e em modelo IEFPCM de solvente, em DMSO.

5.2. Ancoragem Molecular

O arquivo contendo as coordenadas tridimensionais da biomolécula alvo foi obtido do *Protein Data Bank*, PDB ID: 1G3X⁵², a qual obteve sua estrutura resolvida pela técnica de difração por raios X e resolução igual a 2,7 X. Antes do cálculo de ancoramento molecular, os átomos de hidrogênio da biomolécula foram adicionados automaticamente considerando os estados de protonação em pH = 7,4. Em seguida, todas as águas e o ligante co-cristalizado (acridina – 9 – carbaldeído, 9AC) foram extraídos. Cálculos de redocking foram realizados em 50 “runs” para a função de pontuação ChemPLP⁵³ em modelo rígido, disponíveis no software GOLD (v 5.7)⁵⁴⁻⁵⁵. Utilizando-se o coligante 9AC como referência, o raio escolhido para o modelo foi de 10X. Posteriormente, como no redocking, os complexos de Cu(II) foram docados. As poses contendo maiores pontuações foram extraídas como solução e os resultados foram interpretados através das plataformas gráficas Pymol⁵⁶ e DSV (v 17.2.0)⁵⁷.

6. Resultados e discussão

6.1. Os ligantes

A reação de formação do ligante fenantrolina-5,6-diona seguiu o mecanismo da Figura 6.1, já conhecido na literatura.

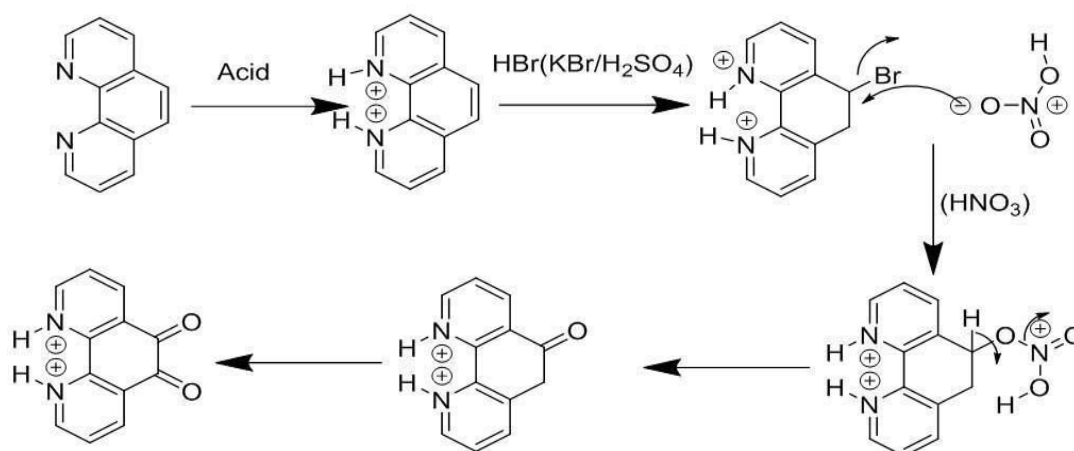


FIGURA 6.1: Mecanismo de reação da fenantrolina -5,6-diona.⁵⁸

Como o ligante já é bem descrito na literatura, sua estrutura foi confirmada pelo espectro na região do infravermelho. Além das bandas relacionadas ao sistema fenantrolínico, foi possível observar a banda característica do estiramento CO em 1690 cm⁻¹.⁵⁹ Além disso, o espectro de RMN de H¹, mostra os 3 sinais referentes aos prótons a, b e c (Figura 6.2) da fenantrolina em 9.11, 8.50 e 7.58, respectivamente, deslocados em relação à fenantrolina livre. Adicionalmente, percebe-se o desaparecimento de um sinal de dois H da fenantrolina livre em 8.22 ppm.⁶⁰

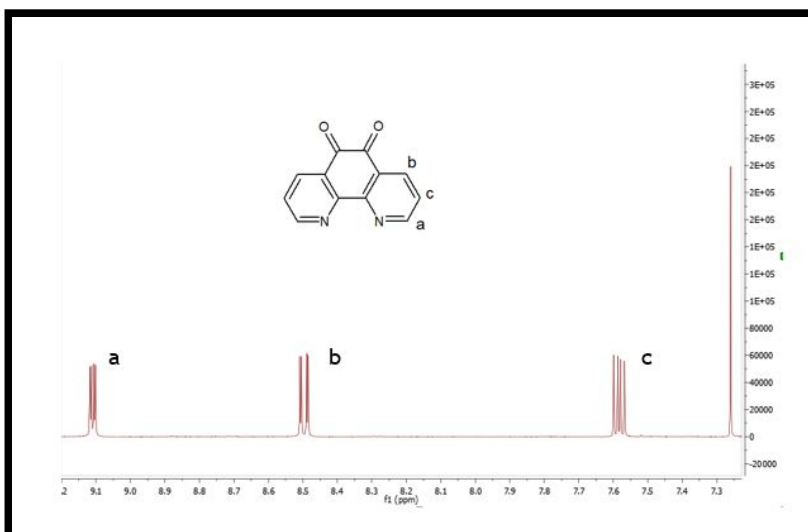


FIGURA 6.2: Espectro de RMN da fenantrolina-5,6-diona em CDCl_3 em 400 MHz.

Nos ligantes 1 e 2, observa-se no espectro de infravermelho o desaparecimento da banda em 3300 cm^{-1} referente ao grupo NH_2 da diamina e o desaparecimento da banda em 1690 cm^{-1} atribuída ao grupo carbonil do ligante fendiona, assinalada em roxo na Figura 6.4. Sendo assim, sugere-se que houve a substituição das carbonilas pelos nitrogênios da diamina conforme esquematizado na Figura 6.3.

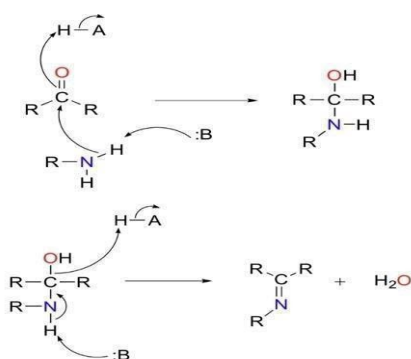


FIGURA 6.3: Reação de Substituição à carbonila da fenantrolina-5,6-diona em meio ácido.⁵⁸

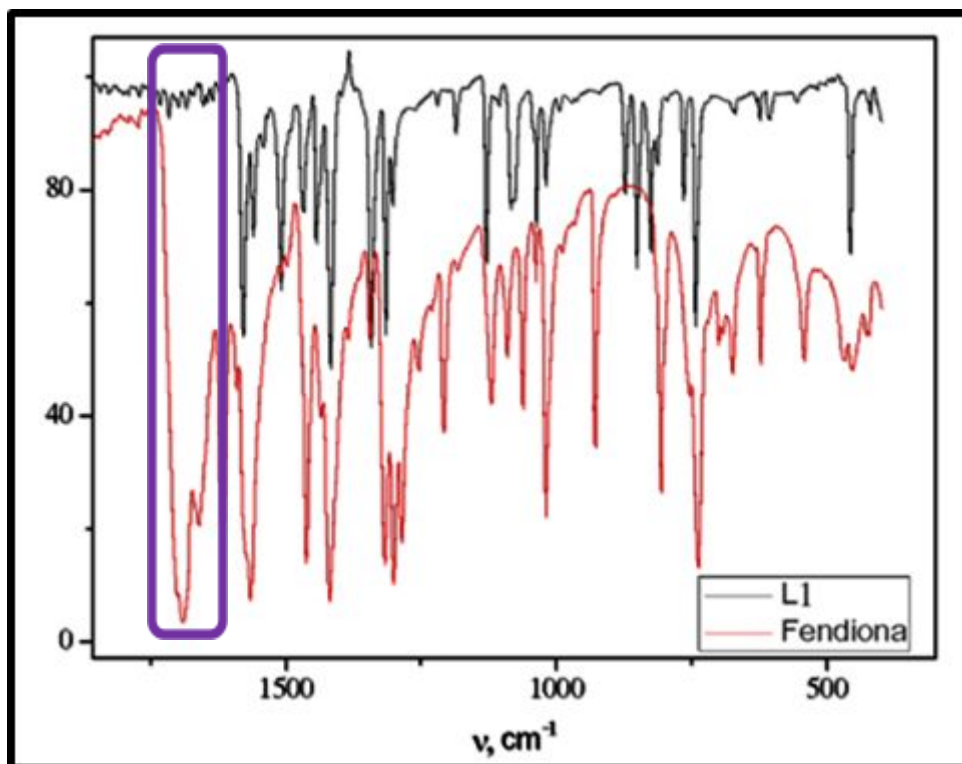


FIGURA 6.4: Espectro de IV em pastilha de KBr dos ligantes Fenantrolina-5,6-diona (vermelho) e ligante L1 (preto). O retângulo roxo assinala a banda 1690 cm^{-1} que desaparece após a reação.

Os espectros de RMN H^1 do ligante L1 mostram os três sinais na região de aromáticos atribuídos aos 6 prótons que são equivalentes. Todos os sinais se apresentaram como duplos dubletos, uma vez que cada próton sente a interação dos outros dois prótons no mesmo sistema aromático, ocasionado o desdobramento do sinal. Através das constantes de acoplamento, se pode observar que o próton *a* possui maior interação com o próton *c*, e uma menor interação com o próton *b*. O que significa que o próton *a* está em posição orto ao próton *c* e em meta em relação ao próton *b*. Inicialmente, atribui-se o próton mais desprotegido, o qual está ligado ao carbono adjacente ao nitrogênio, próton *a* como o orto ao nitrogênio da fenantrolina e a partir daí se fez a atribuição dos outros sinais conforme a Figura 6.5.

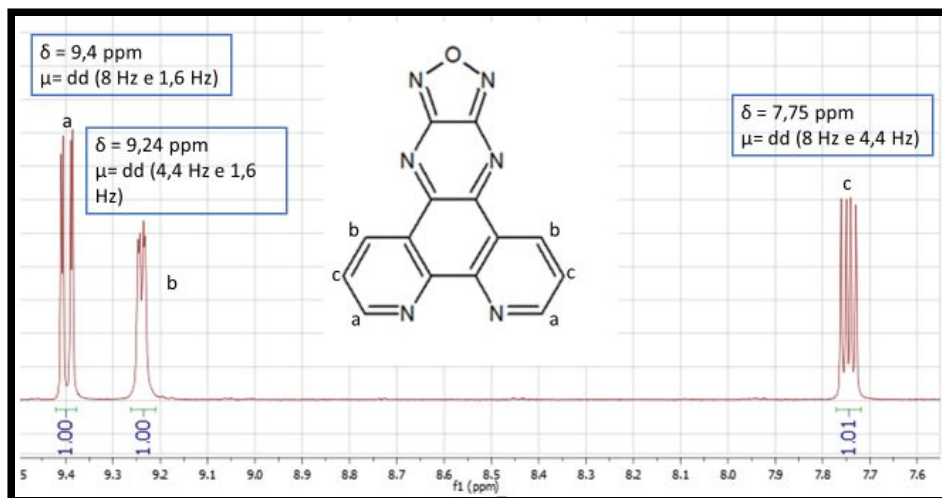


FIGURA 6.5: Espectro de RMN do ligante L1 em CDCl_3 à temperatura ambiente em 400MHz.

O espectro de carbono para este mesmo ligante L1 (Figura 6.7) mostra 7 carbonos referentes aos 14 carbonos simétricos da molécula, dois a dois. Os carbonos hidrogenados foram atribuídos com o auxílio da técnica de HSQC (Figura 6.6). Nesta técnica se observou os hidrogênios a, b e c ligados diretamente aos carbonos de deslocamento químico 155, 125, e 75 ppm, respectivamente. Os cruzamentos entre Hidrogênio **a** e Carbono em 155 ppm se assinala em azul, o Hidrogênio **b** ao carbono em 135 ppm em laranja e o cruzamento do Hidrogênio **c** em verde.

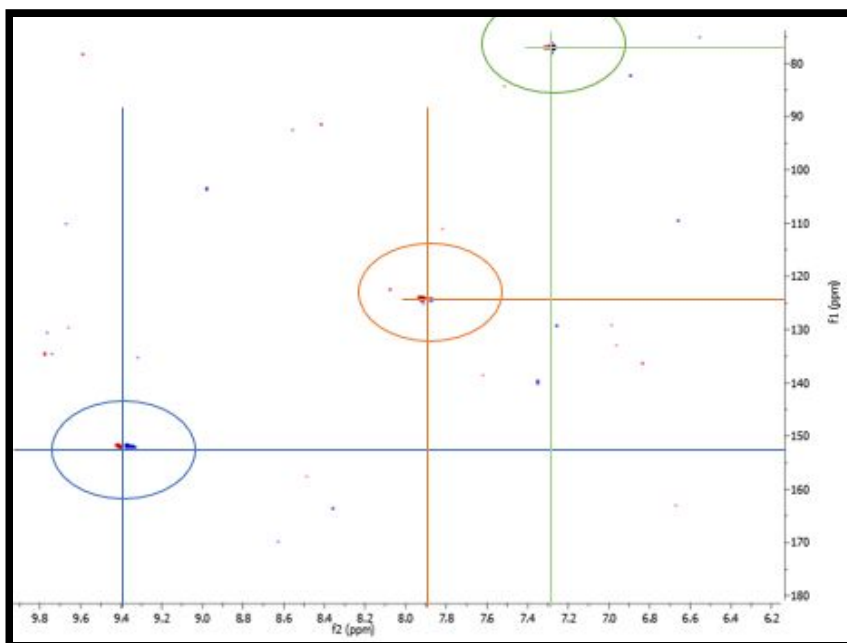


FIGURA 6.6: Espectro de HSQC do ligante L1 em CDCl_3 à temperatura ambiente em 400 MHz

A atribuição dos outros carbonos do ligante L1 se mostra duvidosa até mesmo na literatura. Pelos efeitos de ressonância da molécula não é trivial atribuir os carbonos não hidrogenados.⁵⁹ Sendo assim, fez-se uso de métodos computacionais para a simulação dos espectros de RMN da molécula. Para se corrigir os espectros obtidos, foram otimizadas as estruturas das moléculas 1,10-fenantrolina e a de 3,4-diaminofurazano, pela mesma metodologia, e calculados seus espectros de RMN. Uma vez feito isso, foi calculado o erro do resultado do cálculo em relação ao experimental já conhecido na literatura. E esse erro obtido em cada próton foi aplicado na molécula de ligante calculada.

Exemplificando:

O carbono 1 do ligante 1,10 – fenantrolina apresenta um sinal em 150,12 ppm. O resultado do cálculo deste carbono foi de 158,698 ppm. Sendo assim, o método apresenta uma discrepância de 8,578 a mais do que o valor real. Então, para o cálculo do ligante 1. em que o resultado do deslocamento químico

do carbono 1 foi de 164,675, aplicou-se o mesmo erro do padrão fenantrolina, 8,578, e se chegou ao resultado corrigido de 156 ppm, muito mais próximo do resultado experimental, 155 ppm. Este método foi utilizado para todos os carbonos, obtendo-se os seguintes resultados.⁶⁰

TABELA 6.1: Correção linear dos espectros teóricos do ligante L1 com 1,10-fenantrolina como referência.

Phen			C	Ligante 1		
Teo	Exp	Erro		Teo	Teo ref	Exp
158,69	150,12	8,578	1	164,67	156,09	151,80
156,27	146,10	10,17	6	160,63	150,46	150,31
142,07	135,81	6,26	7	158,09	151,83	150,10
135,83	128,46	7,37	5	142,74	135,37	135,74
134,02	126,35	7,67	4	132,78	125,10	126,54
128,43	122,90	5,53	3	130,67	125,13	125,21

Então, a partir dos resultados teóricos foi possível a atribuição de todos os carbonos, como mostrado na Figura 6.7. O mesmo processo foi realizado para o ligante 2, chegando-se às atribuições da figura 6.8.

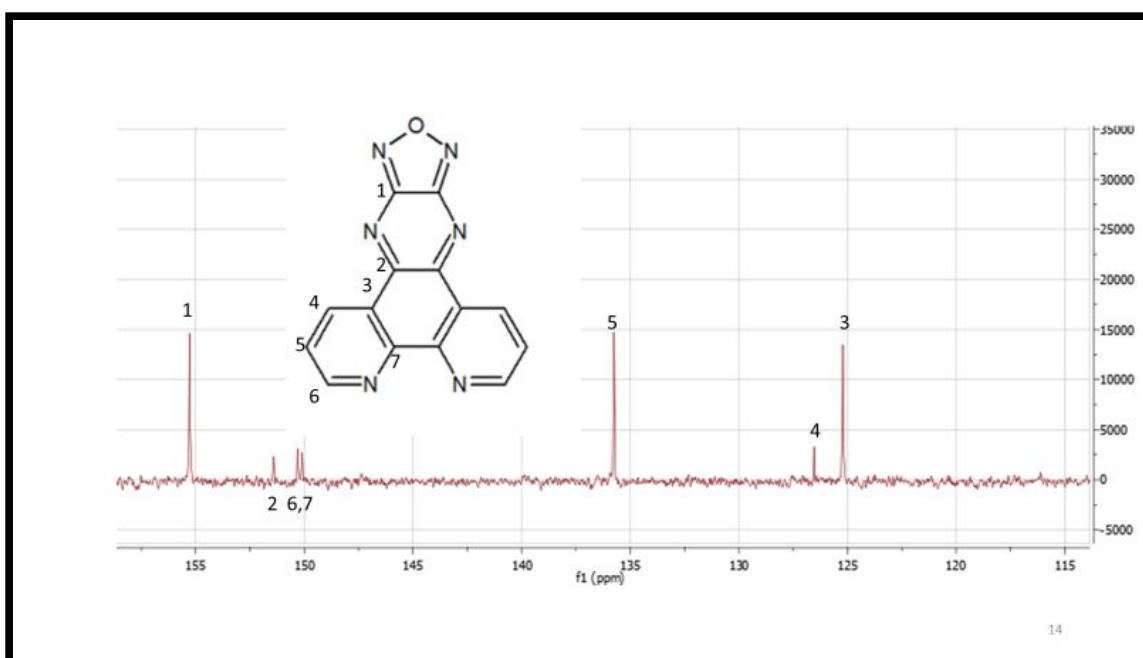


FIGURA 6.7: Espectro de RMN C^{13} do ligante L1 em $CDCl_3$ à temperatura ambiente em 400 MHz

TABELA 6.2: Correção linear dos espectros teóricos do ligante L2 com 1,10-fenantrolina como referência.

Phen			C	Ligante 2		
Teo	Exp	Erro		Teo	Teo ref	Exp
158,69	150,12	8,57	1	163,91	155,33	155,04
156,27	146,10	10,17	2	158,62	148,45	148,86
142,07	135,81	6,26	6	149,43	143,17	141,96
135,83	128,46	7,37	3	138,94	131,57	134,73
134,02	126,35	7,67	4	130,66	122,98	125,13
128,43	122,90	5,53	2	130,32	124,78	124,83

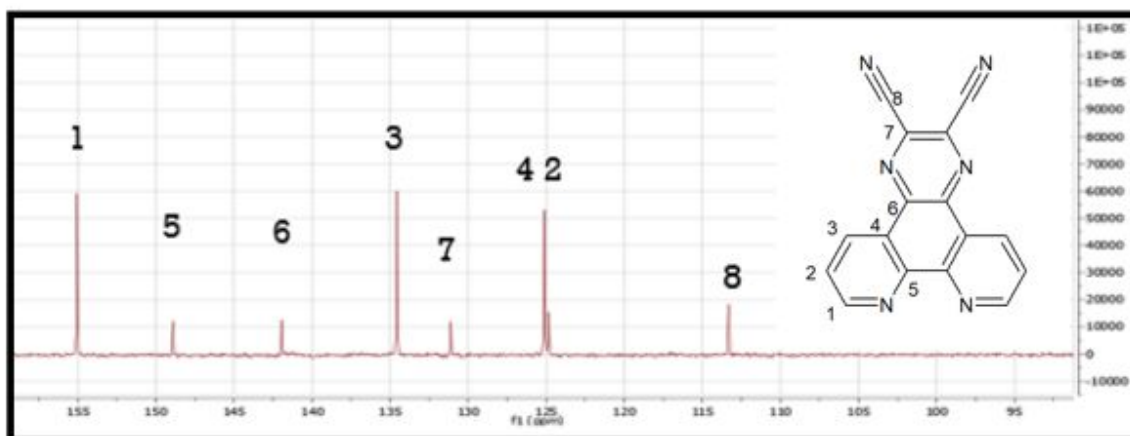


FIGURA 6.8: Espectro de RMN C^{13} do ligante L2 em $CDCl_3$ à temperatura ambiente em 400 MHz

Os espectros de absorção na região do UV-Vis (Figura 6.9) mostraram bandas na região de 360 nm característicos de transições intraligante $\pi-\pi^*$ da fenantrolina. Os valores de absorvidade molar em torno de 100.000 $Lmol^{-1}cm^{-1}$ mostraram que as bandas são muito permitidas o que é característico deste tipo de transição, uma vez que é gerado um nó no momento da transição eletrônica.³⁵

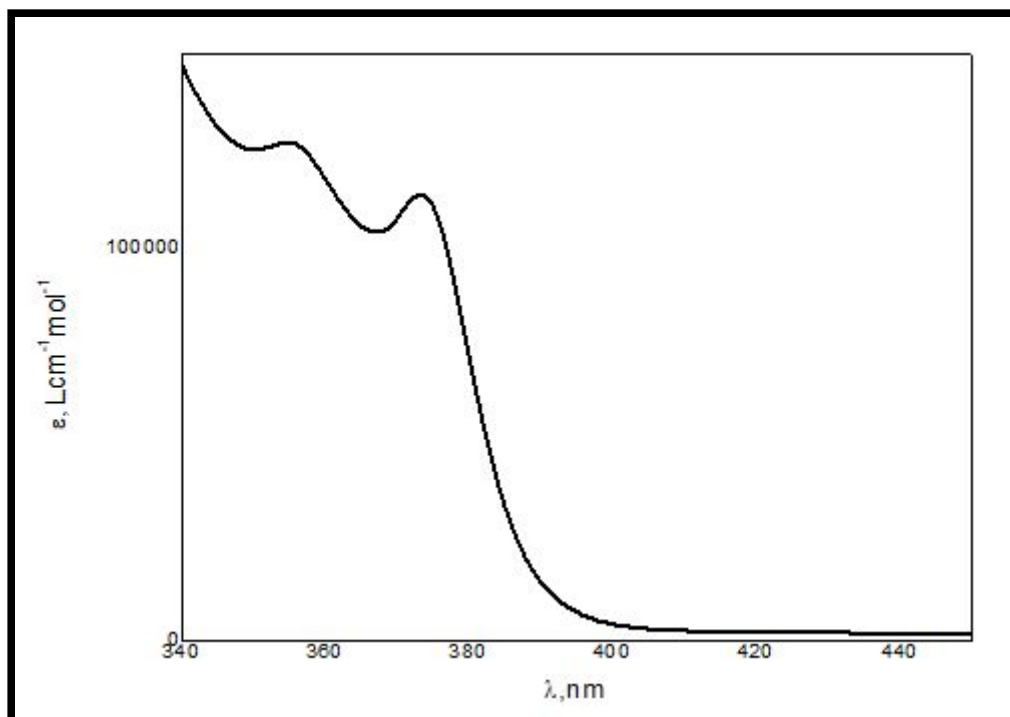


FIGURA 6.9: Espectro de absorção do ligante L2 em solução de Clorofórmio à temperatura ambiente.

6.2. Complexos: Estudo do estado de oxidação, uma abordagem teórica

No desenvolver do trabalho, a primeira pergunta a ser respondida era qual o estado de oxidação do íon cobre usar para melhores resultados. Sendo melhores resultados, neste caso, a formação de uma estrutura com maior estabilidade termodinâmica, com maior planaridade e que pudesse apresentar propriedades espectroscópicas mais apropriadas para seu uso como uma possível sonda. Desta forma, recorreu-se aos cálculos estruturais de complexos de cobre I e cobre II contendo o ligante L1, derivado da fenantrolina (Figura 6.10)

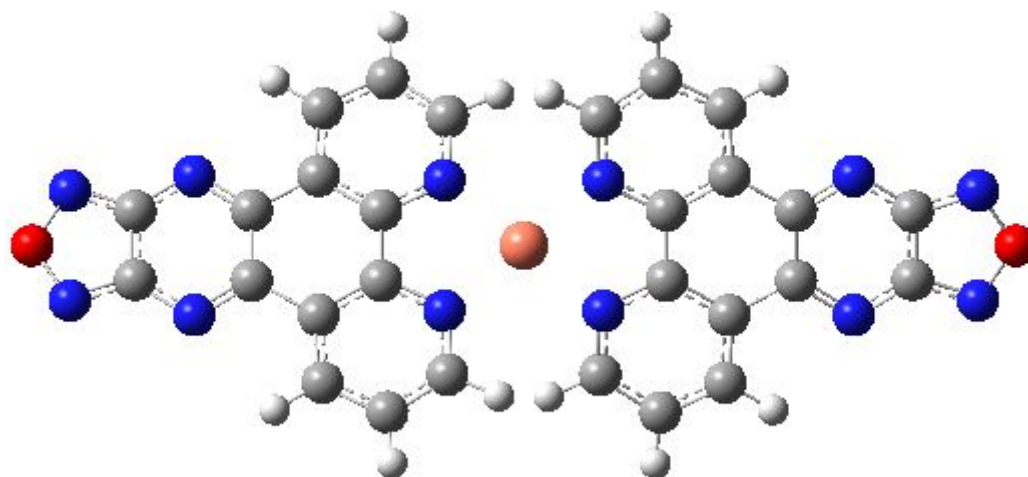


FIGURA 6.10: Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{L}1)_2]^{2+}$ calculada em DFT B3LYP LANL2DZ.

Para o complexo com estado de oxidação I, foi observado ângulo entre os planos dos ligantes de 83 graus enquanto que para o complexo de estado de oxidação II foi encontrado um ângulo de 39 graus mostrando como esperado que o estado de oxidação II teria uma maior planaridade.

Isto ocorre porque o íon Cu I é um íon d^{10} que para acomodar quatro ligantes em sua esfera, fará uma hibridização sp^3 com seus orbitais 4s e 4p vazios, adotando assim uma geometria tetraédrica. Para o íon Cu II a configuração é d^9 o que faz com que esse íon hibridize uma forma dsp^2 formando um quadrado planar.

No que diz respeito aos espectros de absorção da molécula, ambas apresentaram bandas no visível, porém o complexo de Cu II apresentou uma banda mais ao visível quando comparado ao análogo de Cu I (Figura 6.11). Os cálculos dos orbitais mostraram que ambos os complexos possuem bandas de

transferência de carga, porém no Cu I esta banda é caracterizada com uma transição do metal para o ligante enquanto que no íon Cu II ocorre uma transferência do ligante para o metal. O íon Cu I de configuração d^{10} , com camada fechada, possui uma maior tendência em optar por doar sua densidade eletrônica no estado excitado. Em contrapartida, o íon Cu II possui uma maior deficiência eletrônica, pela sua configuração d^9 quando comparado ao íon d^{10} , sendo esperado que no estado excitado ele tenha uma tendência a receber densidade eletrônica dos seus ligantes.

Cabe ressaltar que no estado fundamental, ambos os íons são deficientes de elétrons e recebem densidade eletrônica de seus ligantes em uma reação ácido-base de Lewis. O que é levado em consideração no estudo do espectro de UV-Vis é o comportamento no estado excitado da molécula.

Os estudos de NBO mostram a composição orbitalar dos orbitais de saída e de chegada envolvidos na transição eletrônica, Figura 6.11, onde pode-se observar claramente a diferente movimentação de densidade eletrônica no estado excitado dos complexos. Então, dada as propriedades espectroscópicas, mas principalmente, considerando as propriedades estruturais desejadas, optou-se por seguirmos os estudos com os complexos de número de oxidação II.

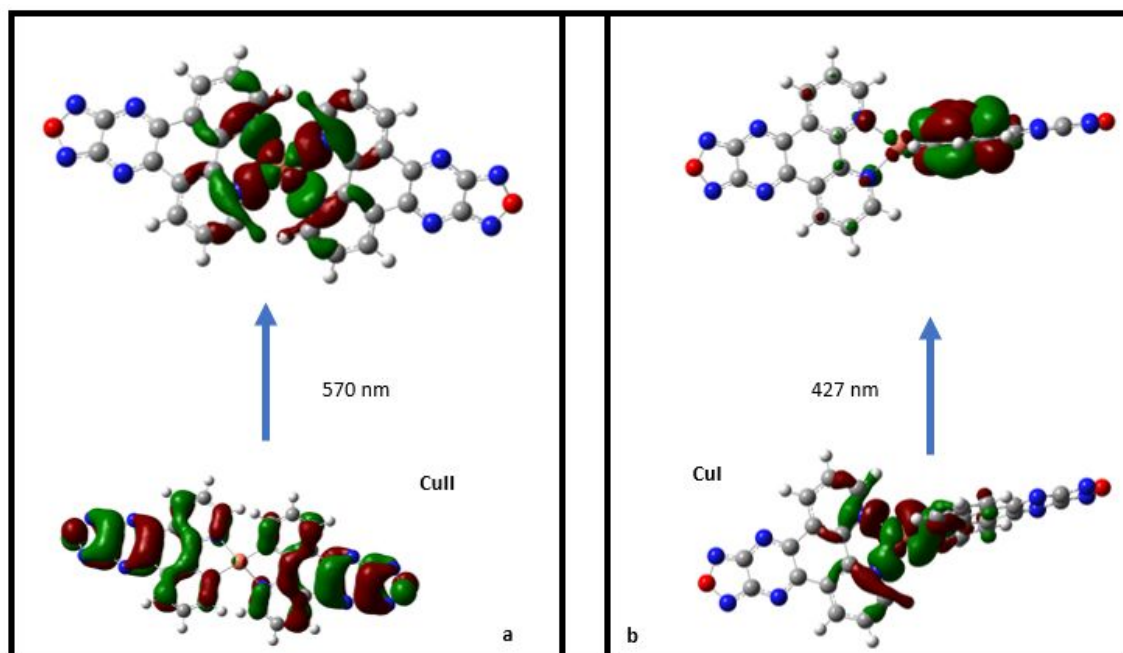


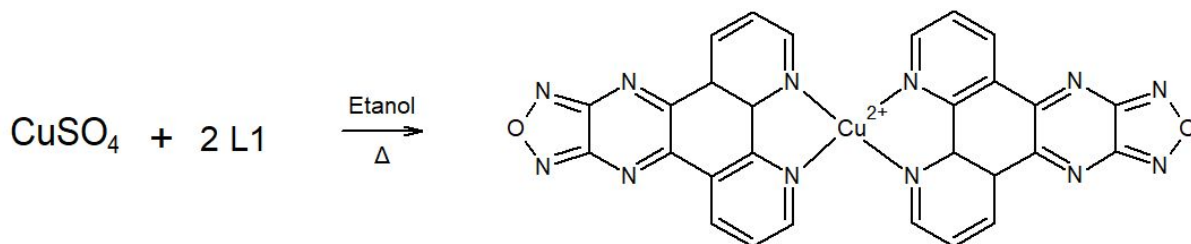
FIGURA 6.11: Orbitais predominantes nas transições eletrônicas do complexo $[\text{Cu}(\text{L}2)_2]^{2+}$ (a) e $[\text{Cu}(\text{L}2)_2]^{1+}$ (b). Imagens obtidas pelo método NBO em DFT B3LYP LANL2DZ.

6.3. Caracterização dos Complexos:

6.3.1 Síntese

Inicialmente, a partir da reação entre o sal de cobre e os ligantes (esquema 1) visava-se a inserção de duas moléculas de fenantrolina substituída no arcabouço molecular. Os produtos resultantes variaram em cor entre, verde e marrom, e se mostraram parcialmente solúveis em água. Ao se comparar os resultados de análise elementar foi observado um grande desvio do esperado para os complexos bisquelatos. Ao serem analisadas as possibilidades, criou-se a

hipótese da formação de um possível aquo-complexo, e que a segunda fenantrolina não estivesse coordenada ao centro metálico.



Esquema 6.11: Síntese do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})]^{2+}$

Neste sentido, a síntese foi refeita mudando-se a razão entre os reagentes, com um equivalente dos ligantes. Os sólidos formados apresentaram as mesmas cores e rendimentos próximos aos encontrados a partir da primeira síntese. Estas observações reforçaram a hipótese de formação de aquo-complexos. Os valores obtidos através da análise elementar estão condizentes com esta proposta estequiométrica (Tabela 6.3).

Ao buscar uma solução para este caso, recorreremos ao cálculo estrutural DFT para as moléculas propostas, e se observou que o complexo contendo dois equivalentes de ligante, possuía uma distância entre os planos formados Cu-Ligante de 0,84 angstroms, enquanto que o aquo-complexo, esta distância foi de apenas 0,58 angstroms (Figura 6.12). Essa maior distância que o complexo bisquelato apresenta é decorrente do efeito estérico entre eles, no entanto esta torção de 3 graus, desvio da planaridade em um sistema rígido, pode conferir uma tensão, forte o suficiente, para que o complexo não seja formado experimentalmente. Esta perda de planaridade da fenantrolina não só é inviável do ponto de vista estrutural, pela rigidez do complexo, como energeticamente poderia alterar a aromaticidade do ligante, uma vez que ele perderia a

planaridade no processo. Esta tensão não existe no caso do aquo-complexo, pela natureza do ligante, e conseqüentemente, observa-se um desvio de apenas 0,85 graus na planaridade.

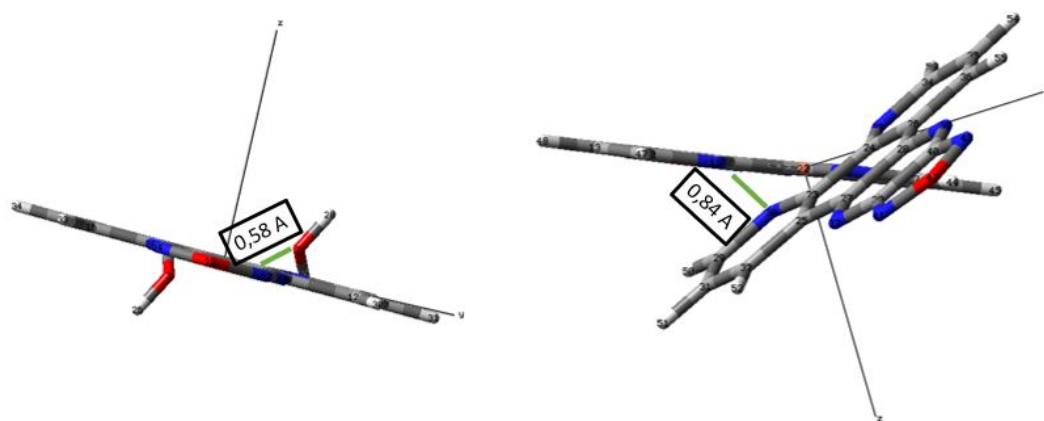
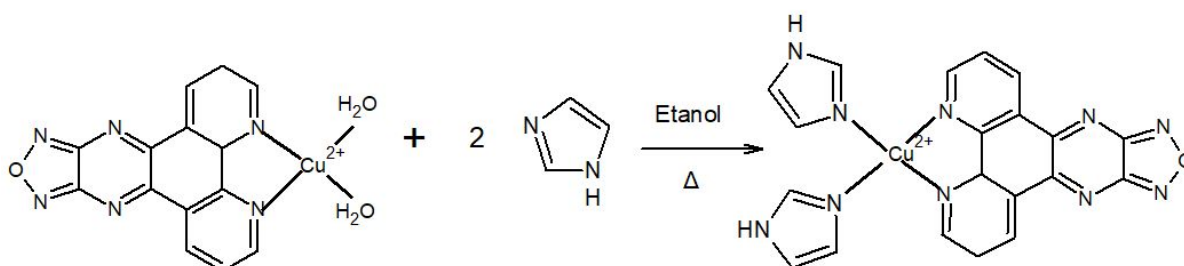


FIGURA 6.12: Simulação do complexo A1 à esquerda e do complexo $[\text{Cu}(\text{L1})]^{2+}$ à direita evidenciando a distância entre os ligantes.

Apesar da obtenção de aquo-complexos não ter sido planejada, estas estruturas foram mantidas neste estudo, uma vez que podem conferir interações múltiplas com a molécula do DNA, tais como: intercalação e ligação covalente. No entanto, do ponto de vista espectroscópico, a inserção de outro ligante piridínico se mostra interessante. Desta forma, foram realizadas sínteses de substituição das moléculas de água pelo ligante imidazol.



Esquema 6.2: Síntese do complexo $[Cu(L1)(ImH)_2]^{2+}$

Quando este complexo reage com dois equivalentes de imidazol ocorre a formação de um complexo verde escuro atribuído ao complexo $[Cu(L1)(Im)_2]^{2+}$. Em seu espectro na região do UV-Vis pode-se observar uma banda característica em 550 nm (figura 6.13), porém, ao se realizar a medida em presença de água à temperatura ambiente se observa um consumo da banda em 550 nm, quando o espectro resultante passa a ser o espectro do aquo-complexo. Sendo assim, atribuiu-se a este fenômeno, uma labilização dos ligantes imidazólicos por moléculas água, o que é comumente relatado na literatura⁵⁹. Uma vez que foi observada a degradação do complexo e meio aquoso, uma medida de absorvidade neste meio seria inviável, por isso o espectro de absorção só foi possível de ser apresentado e absorção.

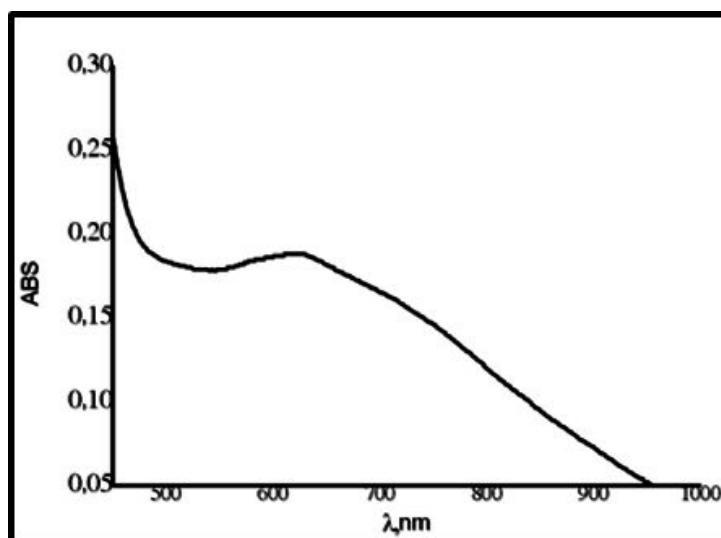


FIGURA 6.13: Espectro de absorção em solução aquosa do composto $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{Im})_2]^{2+}$

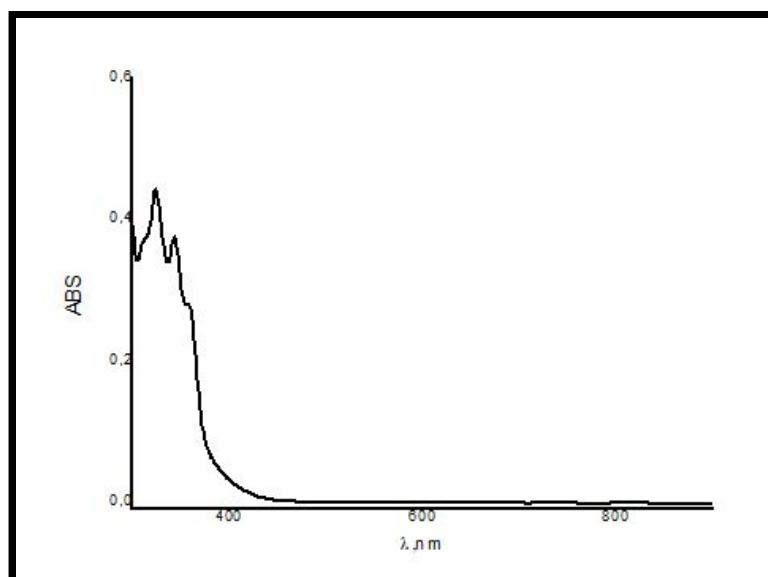


FIGURA 6.14 : Espectro de absorção em água do complexo A1.

Uma vez que a reação com imidazol nos levou a um sistema lábil, retornou-se a idéia de formação de complexos bisquelatos, mas que o co-ligante pudesse apresentar uma maior torção que a fenantrolina. Desta forma, escolheu a

molécula de bipyridina como co-ligante, por apresentar maior possibilidade de torção e poder se coordenar de forma bidentada. Diante destas observações, novos cálculos teóricos de otimização de estrutura foram realizados. Os dados mostraram que para essa nova molécula, com a bipyridina, as distâncias entre os planos dos ligantes seriam de 40 graus, e a torção entre os imidazóis, que podem girar em torno da ligação simples, foi verificada ser de 7 graus (Figura 6.15), devido a esta maior flexibilidade do ligante, a reação poderia ser mais viável.

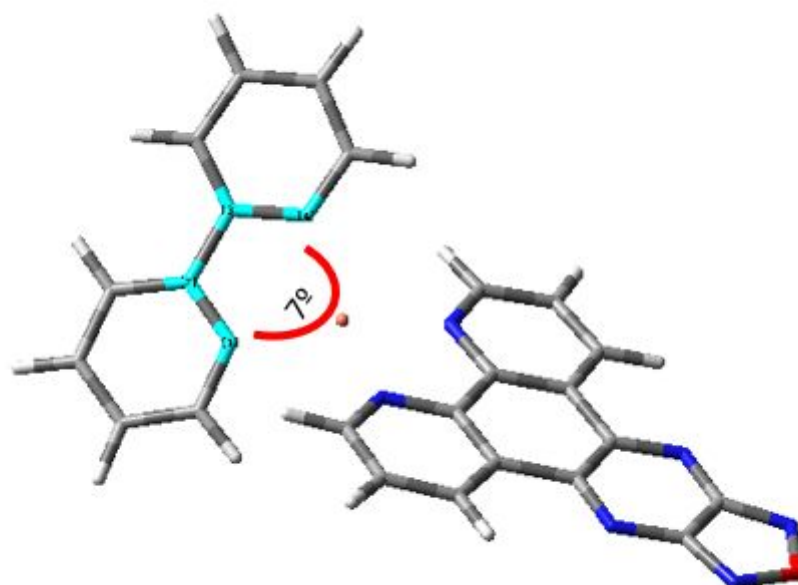


FIGURA 6.15: Estrutura otimizada do Complexo B1 pelo método DFT B3LYP LANL2DZ mostrando torção de 7 graus no ligante bipyridínico.

Pelas razões supracitadas, o estudo se desenvolveu com os aquo-complexos (A1 e A2) e seus respectivos análogos, contendo a bipyridina (B1 e B2) (Figura 6.16).

Os complexos foram sintetizados conforme o esquema reacional abaixo. Uma vez que o centro metálico possui configuração d^9 , a conformação esperada do complexo formado seria quadrática plana. Para esse tipo de complexo ocorre prioritariamente um mecanismo associativo de substituição com a formação de um complexo pentacoordenado, no estado de transição, com a subsequente saída das moléculas de água, coordenadas ao centro metálico. Esta associação é coerente tanto na inserção da fenantrolina substituída quanto na inserção da bipyridina, uma vez que os ligantes agora são ligantes pequenos que propiciam baixo impedimento estérico.

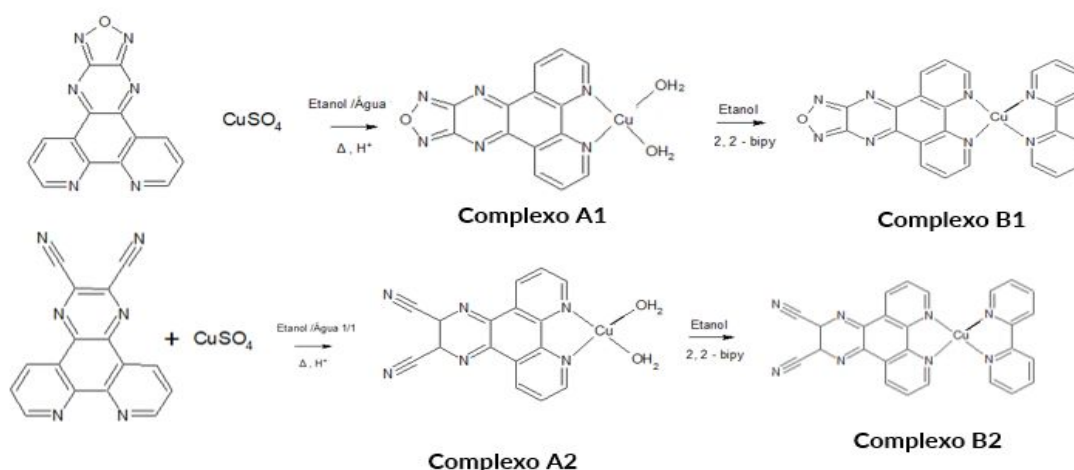


FIGURA 6.16: Esquema reacional dos complexos metálicos

6.3.2. Análise elementar

A tabela 3 mostra os resultados de análise elementar para os complexos. Para os complexos com Bipy (B1 e B2) foi adicionada uma molécula de acetona de cristalização para resultados mais coerentes. Conforme

esperado, as fórmulas mínimas dos compostos indicam a obtenção dos complexos de interesse.

TABELA 6.3: Análise elementar dos complexos metálicos

Complexo	Fórmula mínima	%C (T/E)	%N (T/E)	%H (T/E)
A1	$C_{14}H_{10}CuF_{12}N_6O_3P_2$	25,33/24,50	12,66/12,09	1,52/1,70
A2	$C_{16}H_{12}CuF_{12}N_6O_2P_2$	28,61/27,73	12,51/11,45	1,50/1,83
B1	$C_{27}H_{20}CuF_{12}N_8O_2P_2$	38,52/37,92	13,31/13,10	2,39/2,50
B2	$C_{29}H_{22}CuF_{12}N_8OP_2$	40,88/40,35	13,15/12,77	2,60/3,02

6.4. Caracterização dos complexos do tipo Aquo (A1 e A2)

Os resultados de condutividade para os compostos foram de 235 e 248 $Scm^{-2}mol^{-1}$ para os complexos A1 e A2, respectivamente. Estes resultados são coerentes com eletrólitos 2:1 uma vez que o contra íon PF_6^- é monovalente, o que também é coerente com o estado de oxidação do íon cobre II esperado nestas condições.

O espectro de UV-Vis do composto A1 apresentou uma banda similar a do ligante, porém levemente deslocada para uma região de maior comprimento de onda. Esta região acaba sendo uma região muito energética para uma excitação de complexo com aplicação biológica, uma vez que se procura um composto com máximos de absorção mais deslocados para a região do visível, desta forma, a excitação não atinge um nível energético capaz de causar alterações celulares. Foi observada uma diminuição da absorvidade

molar do composto, o que realmente indica a coordenação, apesar do pouco deslocamento quando comparado ao ligante livre.

Os resultados de DFT (Figura 6.17) mostram resultados coerentes com o experimental, o que mais uma vez, nos indica a obtenção do composto. Segundo os estudos de NBO, a banda nessa região deixa de ser uma banda intraligante e agora passa a ser uma banda de transferência de carga Ligante-Metal.

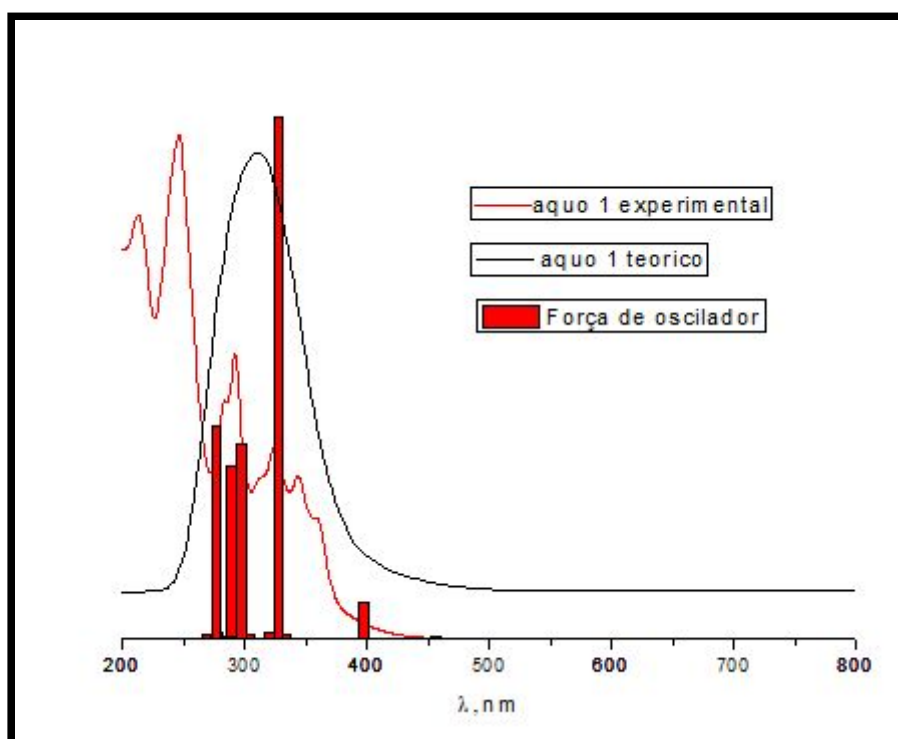


FIGURA 6.17: Espectro de absorção experimental em água do complexo A1 em vermelho, em DFT B3LYP LANL2DZ em meio aquoso em preto e as forças de oscilador em vermelho com intensidades relativas.

Já no complexo A2 observa-se uma banda intensa em 290 nm referente ao ligante L2 coordenado. Outra banda composta por dois picos é observada, um em 420 e outro em 440 nm, de absortividades próximas de 2400

$\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$. Este valor de absortividade, nesta região, pode ser atribuído a transferências de carga entre estados dubletos, uma vez que transição com inversão de Spin não são permitidas. Não foi possível observar bandas de menor absortividade atribuídas às bandas centradas no metal, sendo assim, sugere-se que a coordenação do ligante L2 aumenta a energia de campo ligante levando a banda MC que comumente se observa em 500 nm para a região de 420 nm, portanto, encoberta pela banda de maior intensidade na mesma região (Figura 6.18).

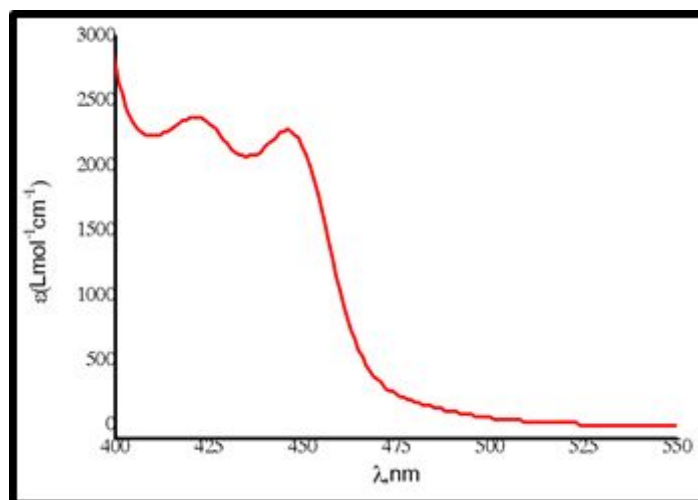


FIGURA 6.18: Espectro de absorção do complexo A2 em Clorofórmio à temperatura ambiente.

O complexo A1 quando excitado na banda de transferência de carga não apresentou emissão na presença de oxigênio, porém para o complexo A2, os estudos dos espectros de emissão mostraram que quando excitado na banda de transferência de carga ele é capaz de emitir luz visível na presença de oxigênio. Quando o complexo é excitado na banda de 440 nm observa-se a formação de um ombro na emissão (Figura 6.19), porém quando o complexo é excitado em 420 nm, se observa uma banda larga com máximo em 475 nm (Figura 6.20). Sendo assim, infere-se que apesar de na absorção serem populados dois estados

dubletos, apenas um destes estados (o correspondente à banda em 420 nm) é um estado emissivo, enquanto, o outro estado perde sua energia por movimentos vibracionais ou teve sua luminescência suprimida pela presença de oxigênio.

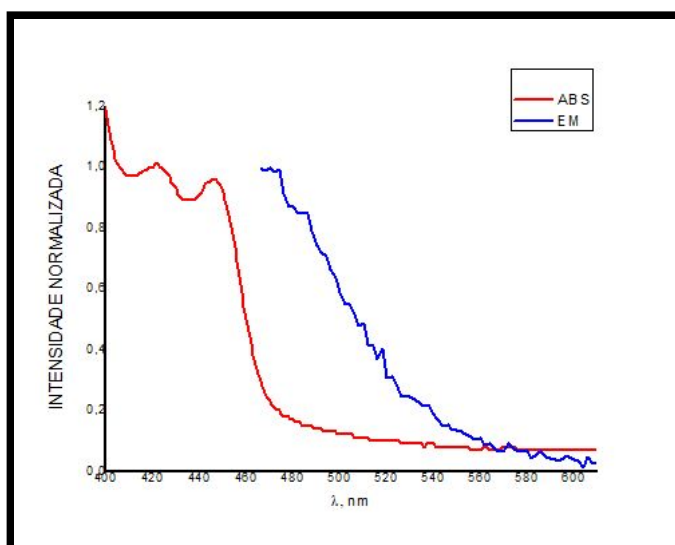


FIGURA 6.19: Espectro de absorção (Vermelho) x espectro de emissão (Azul) excitado em 440 nm do complexo A2 em DMSO à temperatura ambiente.

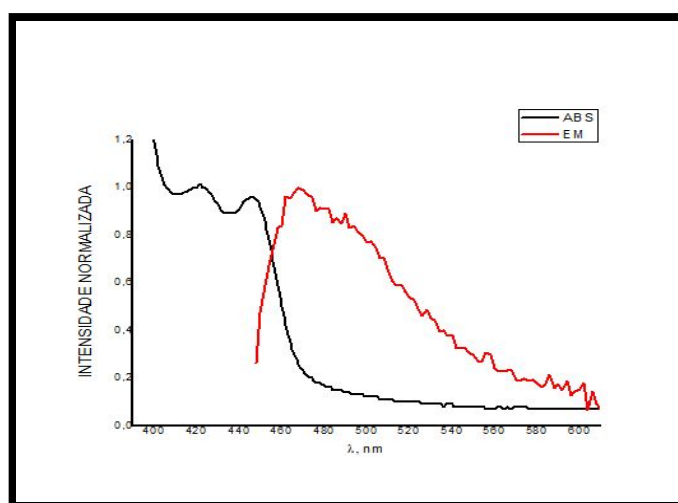


FIGURA 6.20: Espectro de absorção (Preto) x espectro de emissão (Vermelho) excitado em 420 nm do complexo A2 em DMSO à temperatura ambiente.

Quando calculado o rendimento quântico de emissão temos um resultado de 0,031, que quando comparado ao valor de 0,040 do padrão $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$, em oxigênio, mostra que conseguimos obter um complexo de cobre emissivo, e potencial emissivo próximo do principal padrão inorgânico da literatura. O fato de o complexo ter sido emissivo tanto quanto o padrão, no meio oxigenado, mostra que este composto é promissor para estudos biológicos de acumulação por microscopia confocal.

Outro fator importante foi o deslocamento de Stokes observado da ordem de $1,81 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ (55 nm). Este bom valor indica que em experimentos biológicos ou espectroscópicos não haverá interferências na emissão observada por processos de reabsorção de luz, o que é comum em compostos puramente orgânicos.

Estudos eletroquímicos por voltametria cíclica mostraram que para os dois ligantes foram observados potenciais de redução padrão da fenantrolina, abaixo de -0,6 volt, porém deslocados. Gayathri, em 2014⁶¹ já descreveu a formação de novas fenantrolinas por meios eletroquímicos, aos quais ao substituir a 1,10 fenantrolina ocorre a formação de um potencial abaixo de zero como o observado (Figura 6.21). Uma vez que os ligantes propostos possuem maior conjugação de elétrons π , os potenciais oxidação dos ligantes L1 e L2 aparecem em valores mais negativos. Nenhum dos potenciais dos ligantes foi coincidente com os potenciais metálicos (Figura 6.22) e não houve uma diferença significativa de potencial quando se muda o substituinte da fenantrolina.

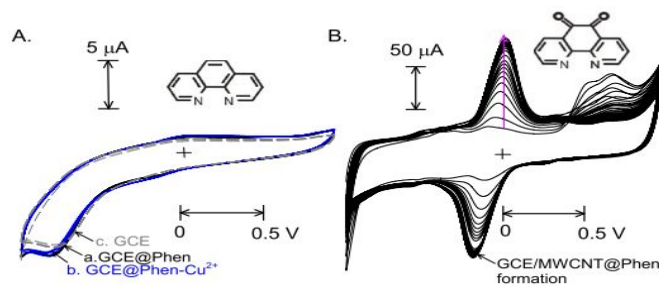


FIGURA 6.21: Voltamogramas em Acetonitrila à temperatura ambiente dos compostos 1,10-fenantrolina (a) e 1,10- fenantrolina-5,6-diona(b).⁶¹

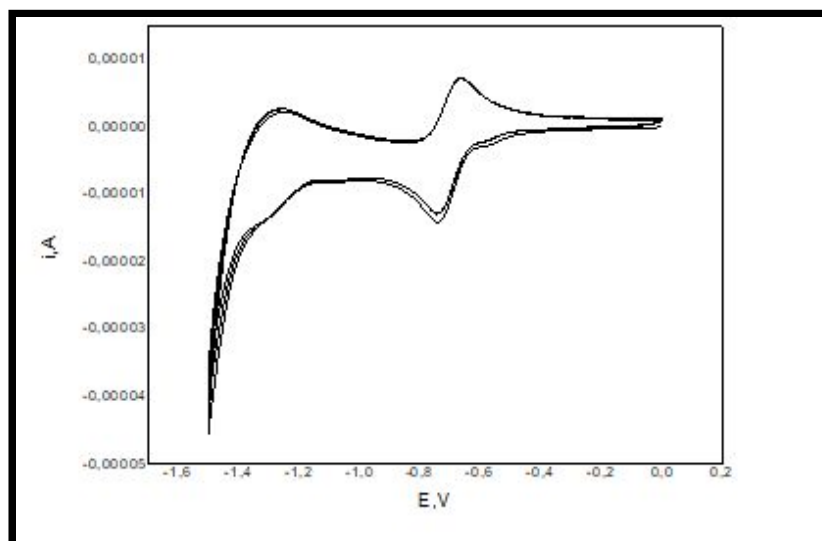


FIGURA 6.22: Voltamograma em Acetonitrila à temperatura ambiente do ligante L2.

A voltametria cíclica mostrou um par redox 0,35 / 0,1 volts para o complexo A1 e 0,25 / 0,05 volts para o complexo A2, atribuídos a potenciais CuI-CuII.⁶¹ Sendo assim, para complexo oriundo do L2 se observa maior energia necessária na oxidação do centro metálico, sendo um indício que este ligante é

mais ácido que o derivado do furazano (L1). Os potenciais para ambos os compostos foram semi-reversíveis, do ponto de vista termodinâmico, e a semelhança entre as intensidades de corrente indicam um processo cinético com constante da mesma ordem de grandeza.

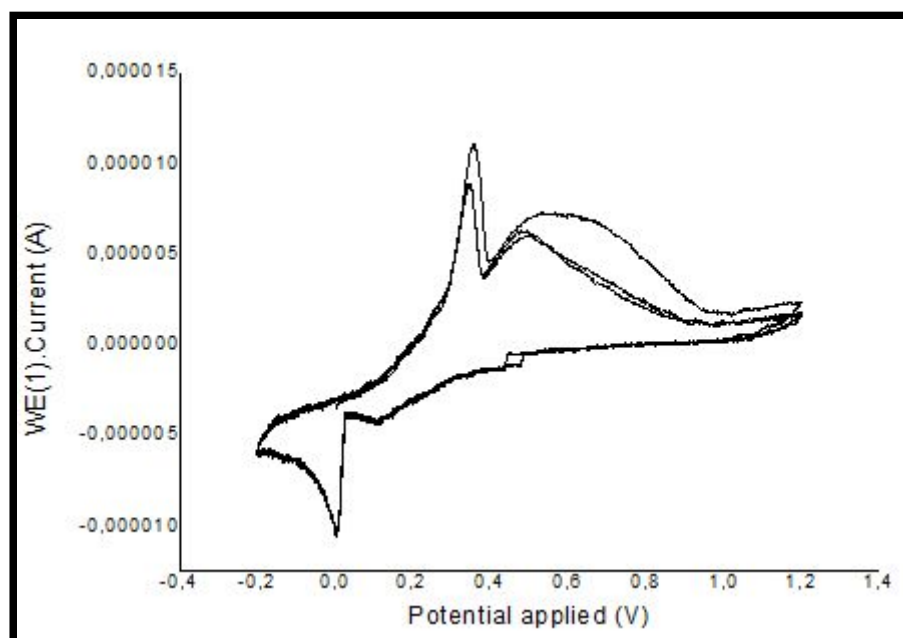


FIGURA 6.23: Voltamograma em Acetonitrila à temperatura ambiente dos complexo A1.

Quando comparados aos potenciais do sulfato de cobre nas mesmas condições, observamos um potencial e 0,6V de oxidação (Figura 6.24), o que nos leva a crer que de alguma maneira o ligante fenantrolina atua como bom doador de densidade eletrônica ao centro metálico, uma vez que a diminuição do potencial de oxidação do metal indica uma maior facilidade de retirada do elétron, indicando assim que o Cu (II) está recebendo densidade eletrônica do ligante.

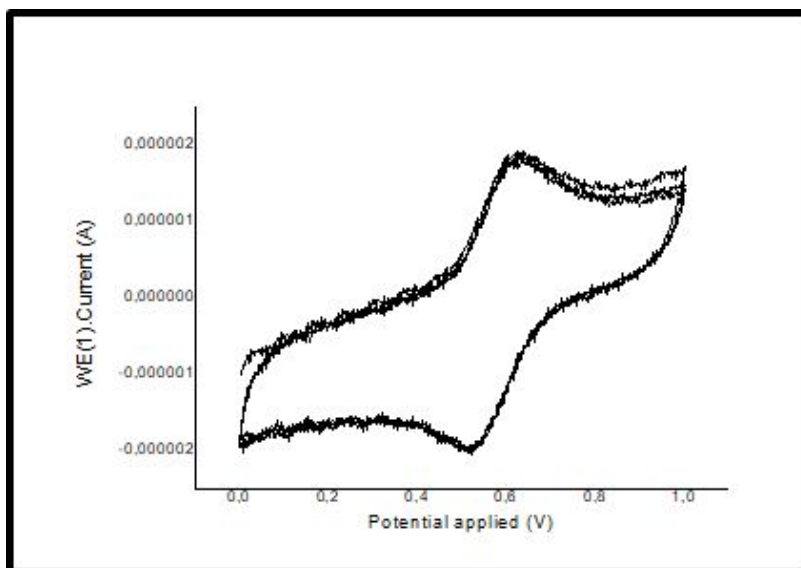


FIGURA 6.24: Voltamograma em Acetonitrila à temperatura ambiente do Sulfato de Cobre II penta hidratado.

6.5. Complexos B1 e B2

Os complexos foram obtidos pelo esquema reacional da Figura 6.25. O ligante bipyridina tem como característica ser um ácido π . Sendo assim, para centros metálicos ricos em elétrons como o Cu (II) pode ocorrer retrodoação, efeito em que a densidade eletrônica π do metal pode ser deslocada em direção dos orbitais π antiligantes vazios da Bipy, abaixando a energia do sistema. A presença de dois pares de elétron não ligantes na molécula de água ocasiona uma repulsão frente aos orbitais d do centro metálico, também rico em elétrons, fazendo com que a água seja um ligante fraco quando comparado à Bipy, para este caso. Então, a reação de substituição de duas moléculas de água por uma bipy é termodinamicamente favorável no que tange a energia de ligação, gerando o aumento da entropia do sistema, acarretada pelo efeito quelato. Além disso, o fato de a Bipy ser um ligante que se coordena de maneira

bidentada restringindo a mobilidade do centro metálico pode auxiliar as propriedades luminescentes.

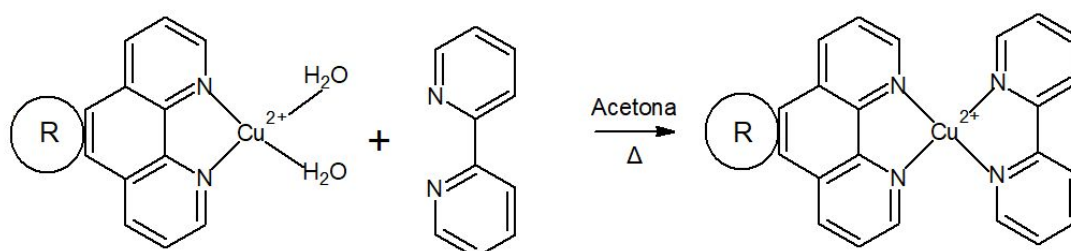


FIGURA 6.25: Esquema reacional genérico de formação dos complexos B1 e B2.

Os ensaios de condutividade mostram valores de 146 e 177 $\text{Scm}^{-2}\text{mol}^{-1}$ que são menores do que os aquo complexos correspondentes. Isto provavelmente ocorre devido ao maior peso molecular e, conseqüentemente, menor mobilidade no meio. Ainda assim, conforme esperado, estes valores indicam eletrólitos 1:2 de acordo com as estruturas propostas.⁶²

Com a adição da Bipy, a única diferença notável ao espectro de infravermelho foi a intensificação e a adição de novas bandas na região aromática, acarretada pelo novo grupo inserido. Como esperado, há também uma banda em 840 cm^{-1} atribuída aos estiramentos do grupo hexafluorofosfato, utilizado como contraíon.

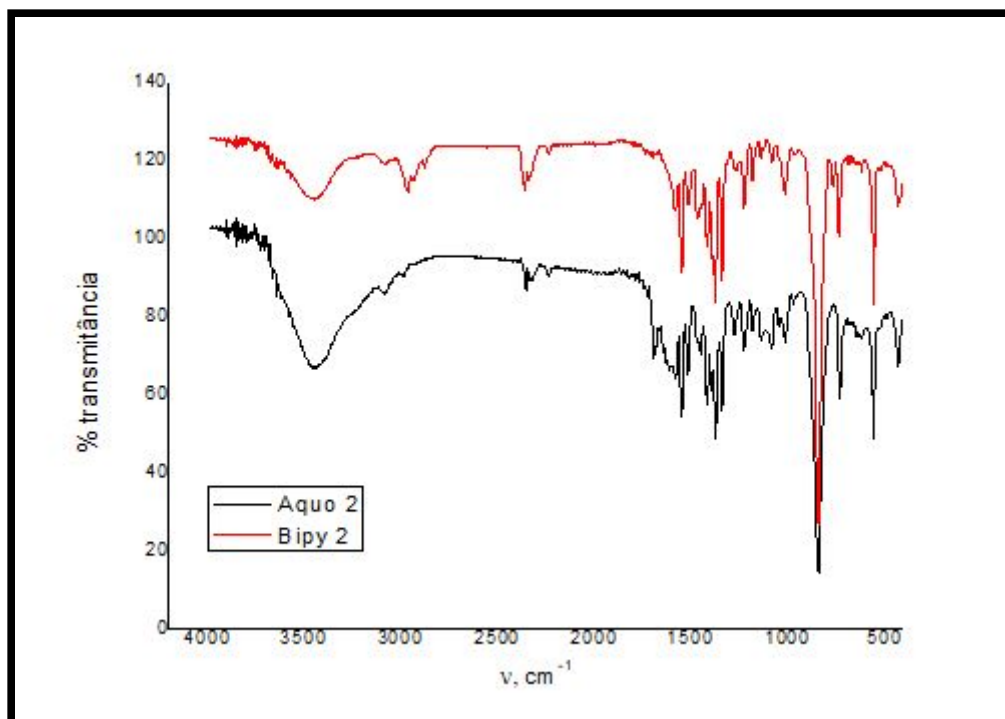


FIGURA 6.26: Espectro de infravermelho dos complexos A2 (preto) e B2 (vermelho) em pastilha de KBr à temperatura ambiente .

O espectro de absorção na região do UV-Vis apresenta, além das bandas dos ligantes em 290 nm, uma banda larga em 450 nm (Figura 6.27) atribuída à transferência de carga. Em relação aos aquos complexos, se observou um deslocamento batocrômico, o que indica que a inserção da Bipy no complexo aumentou a interação entre os orbitais do metal e dos ligantes, fazendo com que a energia da transição eletrônica diminuísse, ocasionando o deslocamento para o vermelho. Um deslocamento ao vermelho mostra que com o aumento da aromaticidade do sistema ele pode ser cada vez mais promissor na obtenção de sondas para aplicação biológica, devido sua excitação ocorrer em regiões menos energéticas.

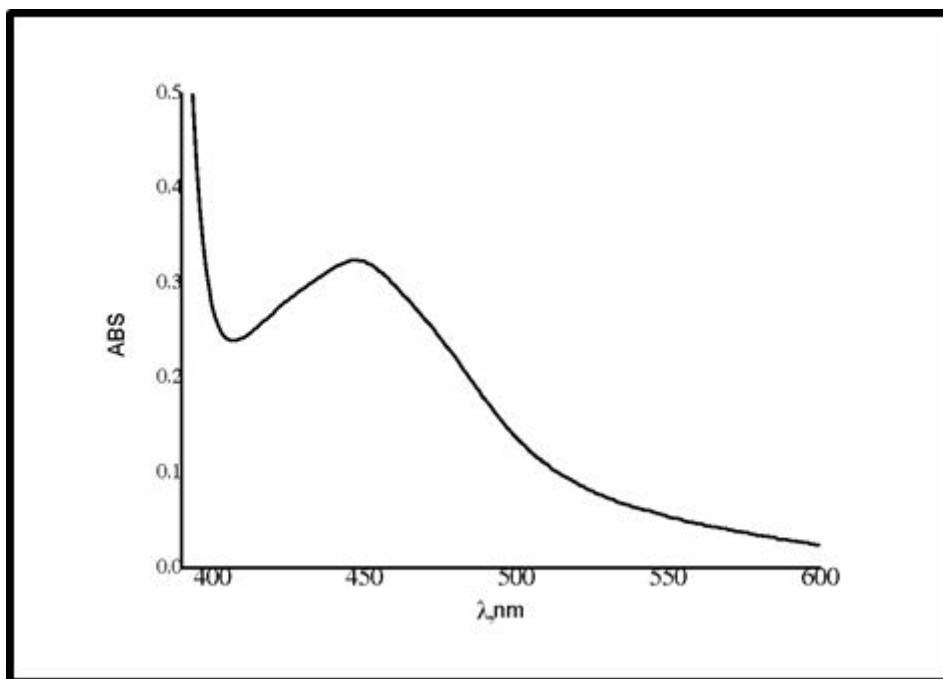


FIGURA 6.27: Espectro de absorção do complexo B2 em Clorofórmio à temperatura ambiente .

Mesmo com a inserção da Bipyridina só foi possível observar luminescência no complexo B2, o que nos leva a crer que o ligante L2 é o principal contribuinte para o estado emissivo do composto.

O rendimento quântico calculado para B2 foi de 0,035, o que mostra que a bipyridina deixa o complexo mais emissivo que o seu análogo aquo. Isso provavelmente ocorre devido a maior rigidez do sistema, impedindo a perda energética por vibração. Foi observado para este composto um deslocamento de Stokes de $1,33 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ (75 nm), o que indica uma separação adequada entre energia absorvida e emitida, não sendo estudos futuros comprometidos por processos de reabsorção.

O experimento de emissão foi inicialmente conduzido em clorofórmio, ao se observar o espectro, se via uma banda larga com pouca

definição. A fim de se conseguir uma maior definição do espectro, foi realizado o mesmo experimento em DMSO. Como resultado, a banda antes larga e mal definida em clorofórmio se apresentou como uma banda desdobrada (Figura 6.27). Assim como no complexo A2, ao se excitar na banda de maior comprimento de onda, se obtinha um ombro como resposta no espectro de emissão, e ao se excitar na banda de transferência de carga, ligeiramente mais à esquerda, foi possível verificar a formação de uma banda de emissão completa.

Quando comparamos os resultados do B2 com o complexo A2, observam-se características semelhantes de absorção, os quais apresentam duas bandas de absorção, porém, apenas uma é responsável pelo estado emissivo. A adição da bipyridina contribui para o abaixamento da diferença de energia, uma vez que as bandas são deslocadas para comprimentos de onda maiores e promove um maior deslocamento de Stokes. Uma vez que compostos A1 e B1 não apresenta nenhuma emissão, assume-se que a interação entre o centro metálico e o ligante L2 é a responsável pelo estado emissivo.

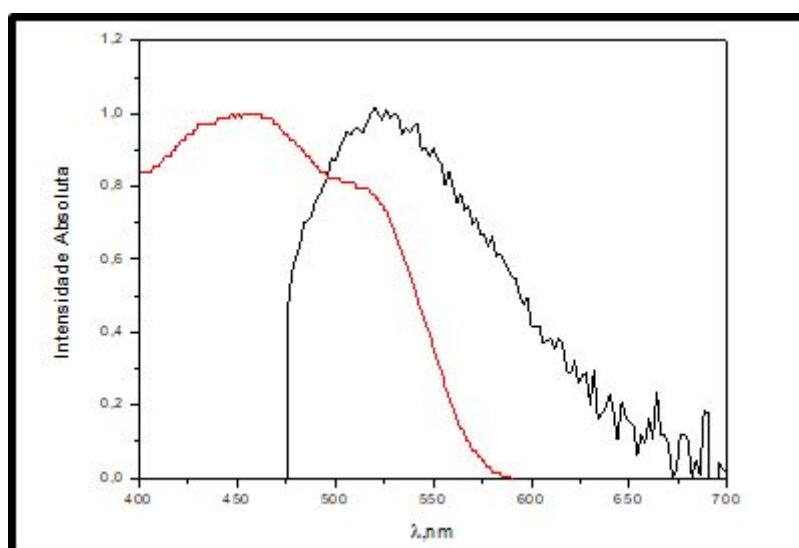


FIGURA 6.28: Espectro de absorção (preto) x emissão (vermelho) do complexo B2 em DMSO à temperatura ambiente

O voltamograma do complexo B1 e B2 (Figura 6.28) mostram um potencial Redox em 0,27 V e 0,20 V, respectivamente, ambos semi-reversíveis. Em comparação com os aquo-complexos, observa-se uma redução no potencial de oxidação, indicando que a presença da Bipy, promove uma melhor combinação entre seus orbitais com os do metal, o que justificaria não só o metal estar mais rico em elétrons, reduzindo seu potencial redox, como o deslocamento batocrômico no espectro de UV-Vis.

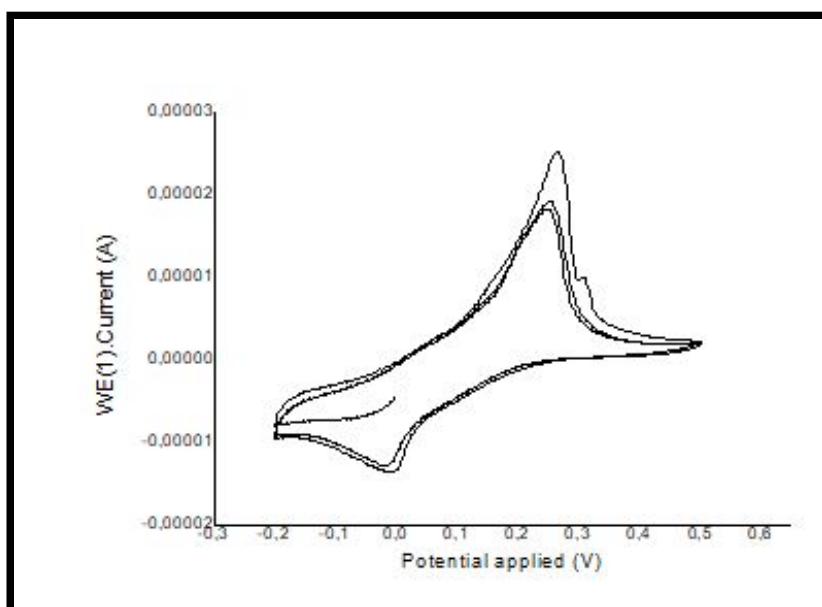


FIGURA 6.29: Voltametria cíclica do complexo B1 em Acetonitrila à temperatura ambiente

7. Investigação teórica (Estrutura e Dados espectroscópicos)

Frente aos resultados experimentais obtidos, a secção a seguir foi descrita apenas para os complexos contendo o L2, mas toda a abordagem também foi realizada para os complexos A1 e B1.

7.1. Complexo A2

A figura 7.1 mostra todos os espectros de IV calculados corrigidos frente ao experimental. Os espectros foram normalizados pela banda experimental da nitrila. Foi observado que o espectro com menor desvio do experimental foi o obtido pela combinação de funcional B3LYP com base CCPVDZ.

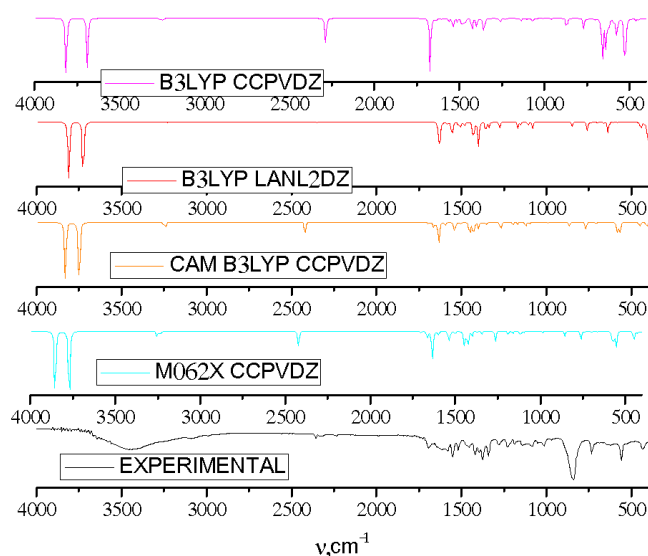


FIGURA 7.1: Espectros de IV teóricos calculados e experimental do complexo A2.

Quando se comparam os espectros se observa uma presença de mais bandas no espectro experimental que no teórico, oriundas das interações intermoleculares, e interações com o meio da pastilha, uma vez que o cálculo é realizado em fase gasosa. Um ponto discrepante é a banda em 850 cm^{-1} , oriunda do íon PF_6^- , que não aparece nos espectros teóricos, uma vez que o cálculo considera apenas a estrutura do cátion. A boa sobreposição entre os espectros mostra que o método foi capaz de prever bem as distâncias de ligação e forças

de oscilador.⁴² A ausência de frequências negativas indica um bom grau de convergência do método.

A Figura 7.2 mostra os threshold values para os parâmetros de convergência em B3LYP /CCPVDZ. Estes valores são parâmetros de convergência necessários para que o cálculo seja realizado com sucesso. Um valor X de Threshold diz o valor mínimo para todos os parâmetros do cálculo para que ele seja considerado confiável. Como observado, no ponto de convergência, todos os valores foram bem abaixo do setado pelo método como aceitáveis para um cálculo convergente. Estes valores foram verificados para todos os cálculos efetuados independente do método.⁴²

Item	Value	Threshold	Converged?
Maximum Force	0.000023	0.000450	YES
RMS Force	0.000004	0.000300	YES
Maximum Displacement	0.000729	0.001800	YES
RMS Displacement	0.000144	0.001200	YES
Predicted change in Energy=-2.674384D-08			
Optimization completed.			

FIGURA 7.2: Threshold Values obtidos na finalização do cálculo do complexo A2 em método DFT B3LYP LANL2DZ.

Quando comparamos os dados estruturais com resultados experimentais de estruturas cristalinas de complexos similares na literatura⁴², nota-se a coerência tanto entre os ângulos de ligação, quanto em relação às distâncias entre os átomos (tabela 7.1). Demonstrando a eficiência do método empregado. Estas constatações são muito importantes para os estudos de ancoragem molecular, uma vez que sem a estrutura cristalina dos complexos é

necessário validar, de todas as formas possíveis, que a estrutura teórica é o mais próxima do que seria a experimental.

TABELA 7.1 : Valores estruturais de comprimento e ângulo de ligação para o complexo A2 calculados em DFT B3LYP LANL2DZ comparados a dados experimentais cristalográficos⁴²

	N – Cu (Å°)	O – Cu (Å°)	α N – Cu – N
Vácuo	2,00	2,01	83,9
DMSO	1,99	1,99	82,2
Referência	1,96	1,96	79

Ao se comparar os resultados teóricos das propriedades espectroscópicas na região do UV-Vis (TD-DFT) observamos que o método que mais responde às propriedades espectroscópicas encontradas experimentalmente é o método B3LYP com funcional CCPVDZ, que consegue prever tanto as bandas do ligante, quanto as bandas de absorção do complexo.

Quando ocorre uma transição eletrônica, ocorre uma movimentação em toda a densidade eletrônica da molécula, e como consequência disso, é comum observarmos mais de uma transição contribuinte em uma banda. Isto porque, este novo arranjo da densidade eletrônica envolve vários orbitais. Apesar disso, é comum observarmos uma transição como a principal responsável sobre o fenômeno, o que pode ser mensurado através da

contribuição relativa de cada transição para aquele estado espectroscópico, e assim analisaremos todos os cálculos de TD-DFT.

O resultado experimental já mostrava que a banda em 420 nm era oriunda de uma transferência de carga, porém, ao se calcular os orbitais envolvidos nas ligações químicas pode-se observar uma transição vertical envolvendo os orbitais beta do complexo (figura 7.3), sendo o orbital de partida possuindo 100% de contribuição do L2 e o orbital de destino, possuindo uma contribuição de 20% dos orbitais do íon metálico, caracterizando a banda como uma transferência de carga do ligante para o metal.

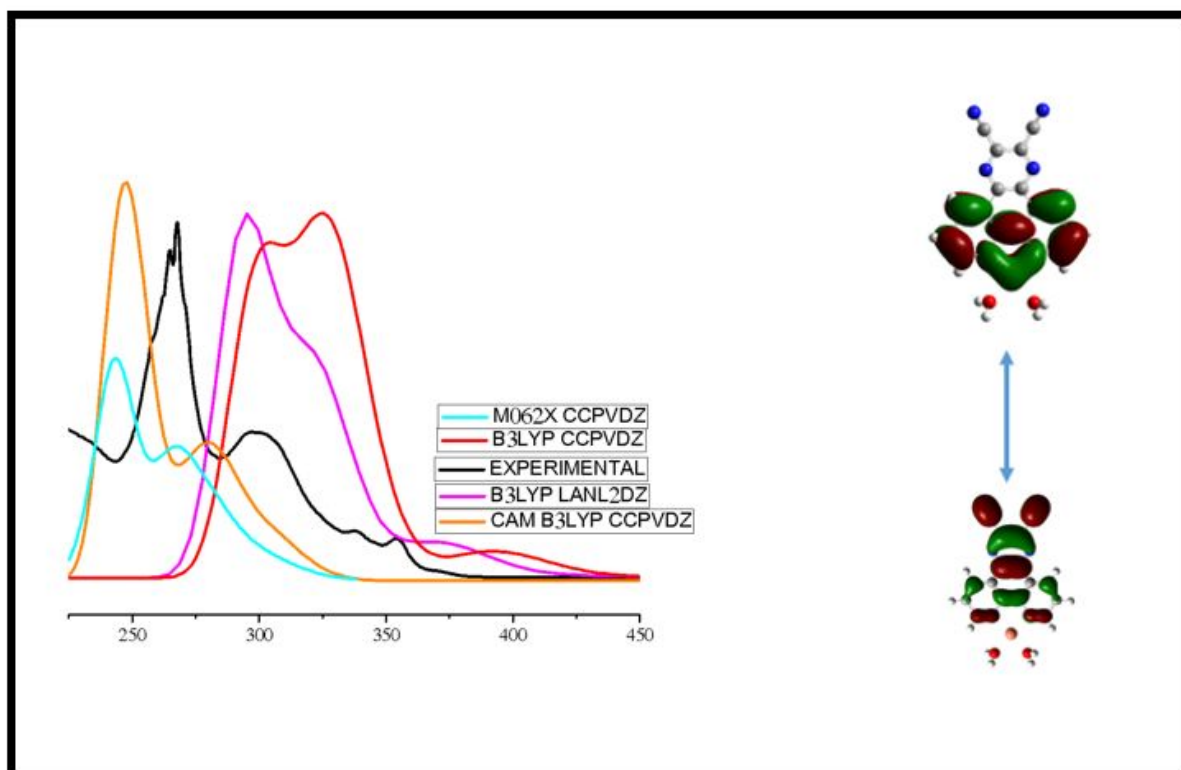


FIGURA 7.3: Comparação entre espectros de absorção do complexo A2 teóricos em TD-DFT e experimental obtido em Clorofórmio à temperatura ambiente. Orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica de transferência de carga calculados em NBO.

Quando observamos os resultados para o complexo B2 (Figura 7.4), nota-se que o método que melhor respondeu aos resultados experimentais foi B3LYP com funcional LANL2DZ. Tanto para os complexos do tipo A, quanto para os complexos do tipo B, aos funcionais mais pesados não conseguiram prever as bandas no visível. Ainda não foi possível determinar o motivo para tal.

No complexo B2, foi observado que a principal contribuição para a transição em 450 nm é a transferência de densidade eletrônica de um orbital 95% Bipy, para um orbital 60% cobre (Figura 7.5), caracterizando a transição como uma transferência de carga do ligante para o metal.

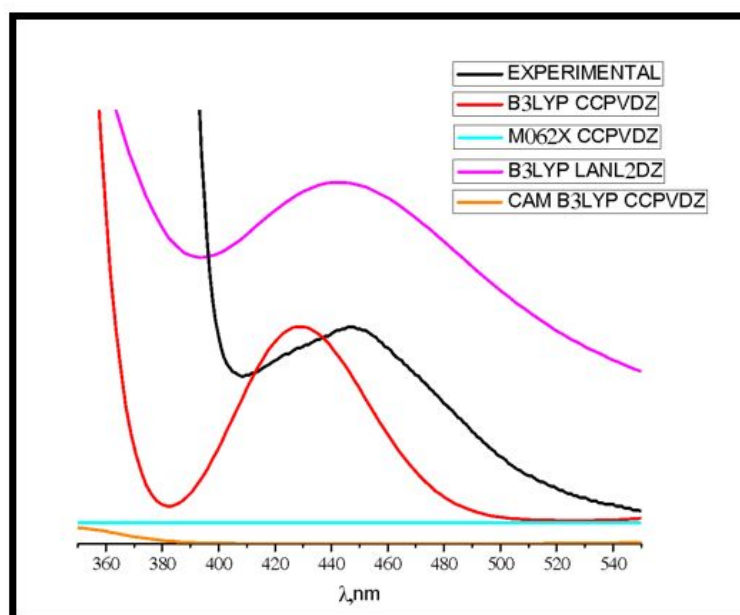


FIGURA 7.4: Comparação entre espectros de absorção do complexo B2 teóricos em TD-DFT e experimental obtido em Clorofórmio à temperatura ambiente.

7.2. Complexo B2

Quando se compara os dados para os compostos A2 e B2, destacam-se dois pontos: primeiro, ao inserir a Bipy na estrutura, a transferência de carga requer menor energia para ocorrer; segundo, a contribuição desta banda passa a ser prioritariamente da Bipy, mesmo com a presença da fenantrolina, indicando que os orbitais da Bipy estão mais próximos em energia dos orbitais metálicos, do que os orbitais do ligante fenantrolínico. Este fato sugere a ocorrência de uma maior mistura entre os orbitais da Bipy com o cobre, o que poderia justificar a maior concentração da densidade eletrônica no centro metálico observado na técnica de voltametria. Possivelmente, esta maior interação orbitalar confere um acúmulo de densidade eletrônica no centro metálico, abaixando o seu potencial de oxidação em 0.07V.

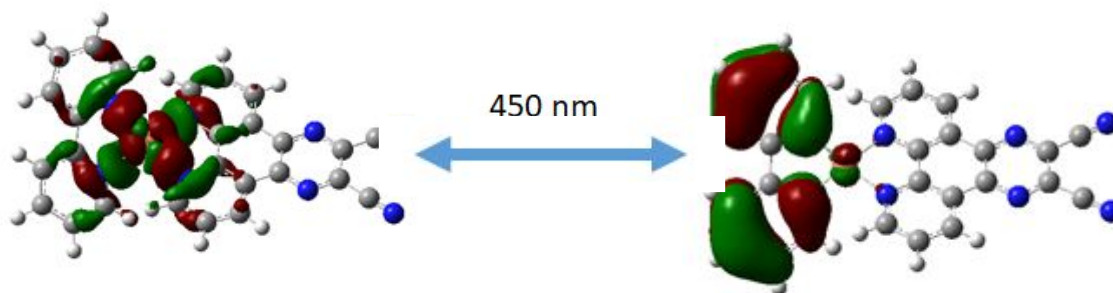


FIGURA 7.5: Orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica de transferência de carga do complexo B2 calculados em NBO.

Corroborando com o explicitado acima, analisando-se as cargas de Mulliken calculadas sobre o centro metálico, percebe-se uma diminuição da carga positiva no cobre, quando se muda do aquo-complexo, para o complexo

contendo bipyridina, assumindo valores de 0,858 e 0,586, respectivamente. Uma redução em 32% na carga positiva do centro metálico. Para reforçar esta hipótese, as cargas oriundas dos cálculos por NBO também foram analisadas, uma vez que as cargas de Mulliken consideram apenas as interações eletrostáticas entre os átomos e neste caso temos grande contribuição de efeitos covalentes como a retrodoação.

A técnica de NBO considera não só as contribuições eletrostáticas como também as contribuições covalentes, o que torna o método mais adequado para este caso. Quando observamos o valor das cargas sobre o centro metálico calculadas, percebe-se que a inserção da Bipy faz com que haja uma diminuição da carga positiva sobre o íon de cobre 1.065 para 0.979, uma redução de 8%. Apesar de esta diminuição ter sido menos acentuada do que nas cargas de Mulliken, verifica-se que a mesma tendência foi observada.

TABELA 7.2: Distribuição de carga nos átomos de Cobre nos complexos calculados em DFT B3LYP LANL2DZ

	A1	A2	B1	B2
Mulliken	0,858	0,858	0,586	0,586
NBO	1,154	1,154	1,060	1,060

Quando analisamos o GAP HOMO-LUMO (Figura 7.6) dos dois grupos de moléculas, A2 e B2, observa-se que o GAP calculado em B3LYP-CCPVDZ em A2 é de 3.62eV, e para B2 é de 3.90eV, o que mostra que a inserção da Bipy diminui a energia dos orbitais preenchidos da molécula em relação aos orbitais antiligantes vazios, indicando uma maior estabilidade termodinâmica, como já conhecido pela literatura. Esta diferença energética é o equivalente a 29 KJ/mol. Vale a pena ressaltar, que a literatura reporta que diferenças a partir de 0,1 eV, entre o GAP HOMO-LUMO, indicam diferenças significativas na estabilidade termodinâmica de compostos.⁴²

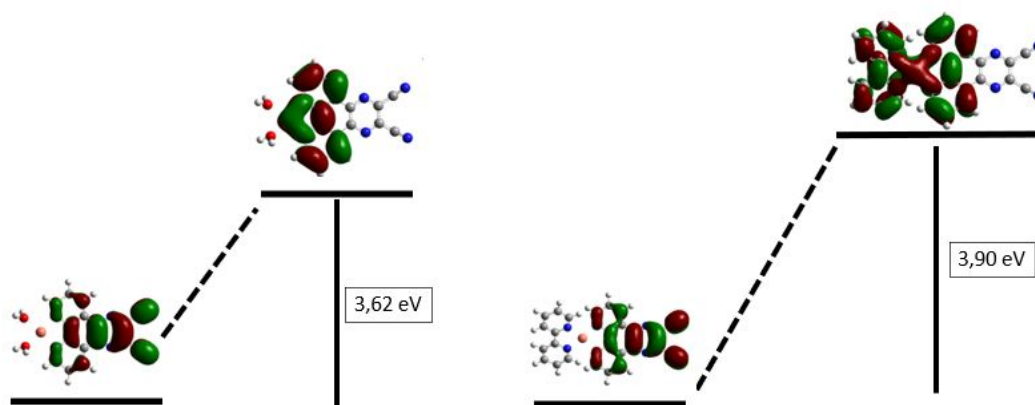


FIGURA 7.6: Diferença energética HOMO - LUMO entre os complexos A2 (à esquerda) e B2 (à direita) calculados em DFT B3LYP LANL2DZ.

Quando observamos, porém, o comportamento dos orbitais HOMO, entre as duas moléculas nota-se que apesar da maior diferença de energia HOMO-LUMO vir do composto B2, este tem sua energia de HOMO maior que a do complexo A2. Sendo a energia de -13,21 eV para A2, e de -12,73 para B2. Sendo assim, se observa que apesar da maior estabilidade termodinâmica do

complexo tipo B, ocorre uma desestabilização dos seus orbitais com a inserção da Bipy.

Observando o mapa de densidade de Spin destas moléculas no estado fundamental (figura 7.7), foi capaz de analisar como está distribuída a densidade de carga na molécula, neste estado, e tem-se que a contribuição predominante para o complexo A2, em termos de distribuição é de uma densidade eletrônica sigma, enquanto que para o complexo B2, a maior contribuição é de uma densidade π , conforme observamos na figura 7.7.

Estes resultados apontam que a contribuição sigma é mais estável que a contribuição π , acarretando em uma estabilização de todos os orbitais da molécula A2 em relação à molécula B2. Uma conclusão coerente, quando consideramos que ao coordenar a Bipy na estrutura molecular, insere-se também uma grande densidade eletrônica π na molécula, ocasionando este maior caráter no estado fundamental. Elegendo o composto B2 como um promissor candidato a sonda molecular, bem como um intercalador da biomolécula de DNA.

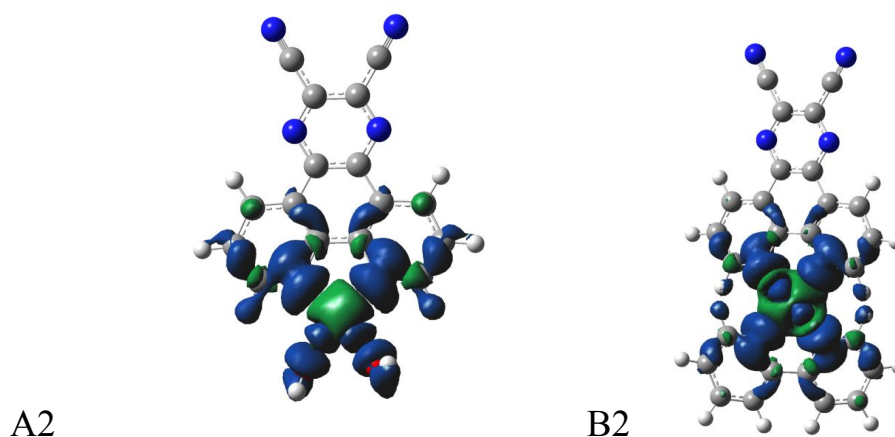


FIGURA 7.7: Densidades de Spin do estado fundamental dos complexos A2 e B2 calculados no vácuo em DFT B3LYP LANL2DZ.

8. Ancoragem molecular

Os modelos de modelagem molecular abordados neste trabalho são os baseados na mecânica clássica, que considera os átomos como esferas duras ligados por uma mola. A energia resultante deste sistema será o balanço entre as energias de repulsão dos átomos entre si e de parâmetros que consideram as posições de equilíbrio destes átomos, e a constante da mola das ligações química geralmente é obtida de parâmetros espectroscópicos. Uma vantagem deste tipo de modelagem é a velocidade de análise, uma vez que estes sistemas geralmente são muito complexos de serem avaliados por outros métodos, fazendo com que a modelagem molecular por mecânica clássica tenha menos recurso computacional exigido.

Particularmente, a intercalação é o modo de ligação mais comum entre os metalofármacos antineoplásicos que contenham ligantes policíclicos aromáticos⁶⁴⁻⁶⁶. Nesse contexto, define-se intercalação como a inserção de compostos geometricamente planos entre duas nucleobases adjacentes por forças intermoleculares de empilhamento π .

Através da técnica de ancoramento molecular, avaliou-se os parâmetros geométricos e complementaridade entre as estruturas dos complexos de Cu(II) (A1, A2, B1 e B2) com o fragmento de DNA d(CGCGAATTCGCG)₂⁵². Esta estrutura cristalina do DNA, forma B, possui como intercalante referência o fragmento aromático acridina-9-carbaldeído (9AC). Assim, para validar a metodologia computacional empregada, foi utilizada a abordagem de redocagem (redocking)⁶⁷. O ligante nativo foi extraído do sítio de interação, e se calculou a orientação original do ligante. Como solução, espera-se que o valor de desvio médio quadrático (RMSD) entre as coordenadas atômicas experimentais e do modelo seja inferior a 2,0 Å, Figura 8.1.

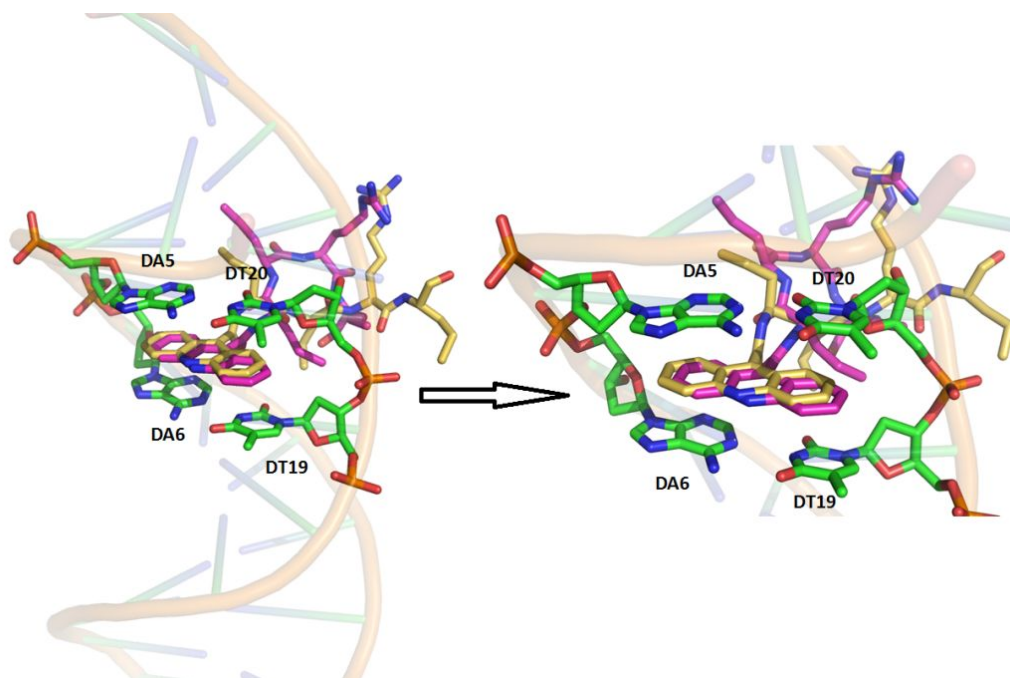


FIGURA 8.1: Pose de docking do ligante cocristalizado (carbonos em magenta) e as nucleobases adjacentes (DA5, DA6, DT19 e DT20) do sítio de interação (carbonos em verde). Sobreposição de ambos os fragmentos aromáticos (teórico e experimental). DA e DT são deoxiadenosina e deoxitimidina, respectivamente.

A figura 8.1 apresenta o modo de ligação por intercalação no qual se encontra o fragmento policíclico aromático 9AC cocristalizado (carbonos em amarelo) e o modelo computacional sobreposto (carbonos em magenta). O valor de RMSD foi de 0,6628 Å, sugerindo boa concordância entre os dados experimentais e computacionais. Em sequência, avaliou-se os parâmetros geométricos para complexos de Cu(II) contendo os ligantes derivados da dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina no bolsão hidrofóbico AA-TT, (Figuras 8.2 e 8.4).

Pode ser inferido, a partir dos dados de docking, que entre os compostos A1 e A2 as presenças dos substituintes nitrilas no fragmento pirazínico promovem variação na orientação do ligante no sítio de ligação.

Como resultado, o reconhecimento molecular via empilhamento $\pi - \pi$ ($X_{vdW} \leq 3,4 \text{ \AA}$)⁶⁸ para o composto A2 é mais significativo no bolsão hidrofóbico que A1, Figura 53 A-C.

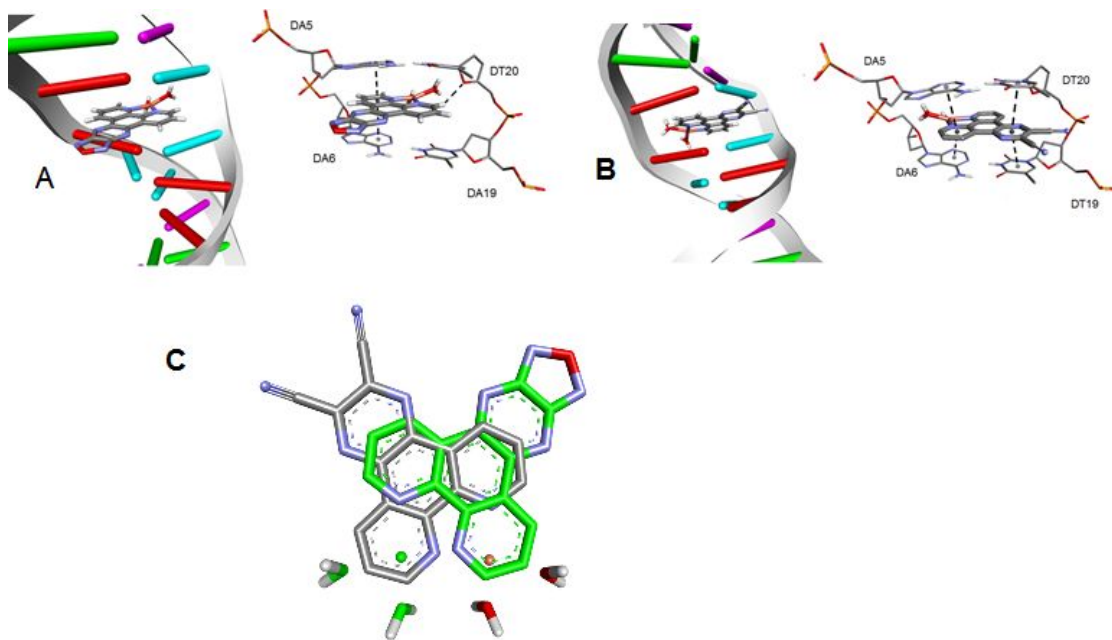


FIGURA 8.2: (A) e (B) são as poses de docking melhores pontuadas para A1 e A2, no bolsão hidrofóbico AA-TT, respectivamente. (C) orientações preferenciais dos ligantes, considerando as modificações no fragmento pirazínico.

De maneira oposta, as substituições sobre o fragmento pirazínico não promoveram variações significativas entre as orientações dos compostos B1 e B2 no sítio de ligação. Contudo, a substituição dos ligantes lábeis pela 2,2'-bipiridina aumentou o volume estérico em torno do ambiente de coordenação do metal. Dessa forma, observa-se a diminuição de preferência da interação por intercalação em relação aos aquo-complexos (Figura 8.4).

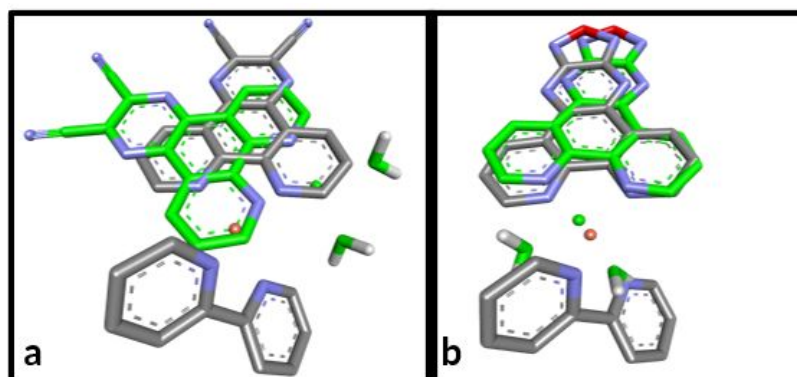


FIGURA 8.3: Poses de docking frente suas orientações relativas dos complexos A2 e B2 (A) e A1 e B1 (B) no sítio de ligação.

É importante destacar que a partir da hibridização sp^2 dos grupos C-H da 2,2'-bipiridina, observa-se a formação de ligações de hidrogênio não clássicas (C-H...O) com o átomos de O-aceitadores das riboses proximais (como critério, X_{vdw} entre H e O $\leq 2,72 X$)⁶⁸, (figura 8.4 e 8.5).

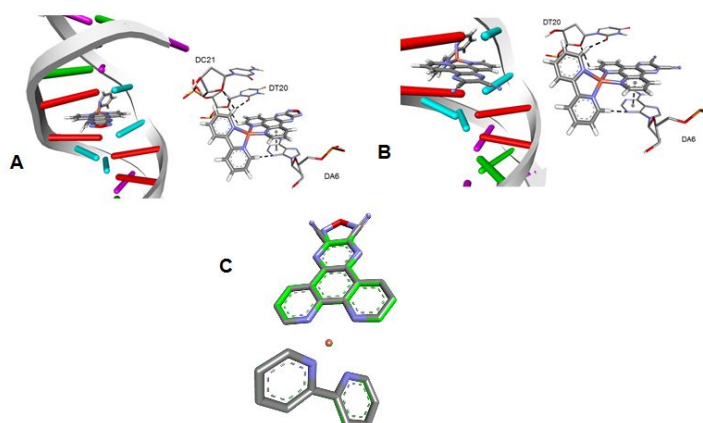


FIGURA 8.4: (A) e (B) são as poses de docking melhores pontuadas para B1 e B2, no bolsão hidrofóbico AA-TT, respectivamente. (C) orientações preferenciais dos ligantes, considerando as modificações no fragmento pirazínico.

Assim sendo, de acordo com os melhores valores de pontuação para as poses de docking (Tabela 8.1), pode-se deduzir que tanto as presenças dos substituintes nitrilas, como o ligante bipyridinico apresentam influência direta na afinidade destes compostos pela biomolécula de DNA. Além disso, observa-se para os compostos em questão que o número ótimo de contatos intermoleculares frente ao DNA foi equivalente a quatro.

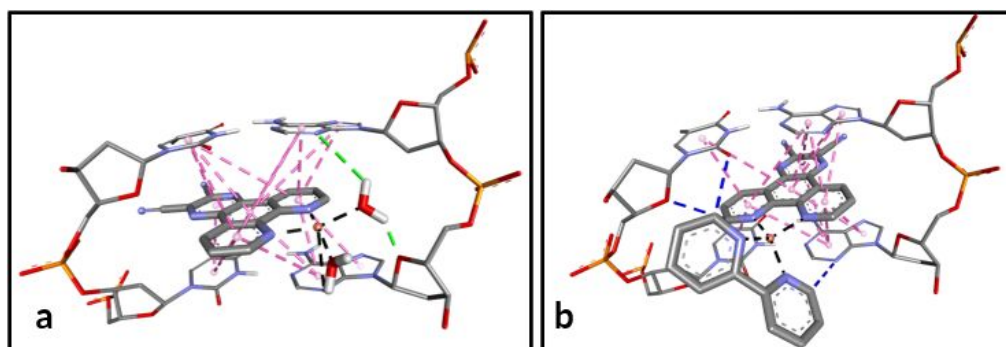


FIGURA 8.5: Pontos de interação com DNA do complexo A2 (a) e B2 (b) calculados por docking molecular com águas omitidas.

TABELA 8.1. Pontuação, tipo e total de contatos intermoleculares observados para os cálculos de ancoramento molecular.

	Pontuação	$sp^2C-H...O$	$\pi - \pi$	Total de contatos
A1	70,75	1	2	3
A2	77,85	0	4	4
B1	75,68	4	1	5
B3	77,61	3	1	4

9. Deslocamento com brometo de etídio

Uma das técnicas para se investigar a interação de complexos com a biomolécula de DNA é o ensaio de deslocamento de brometo de etídio. As Figuras 9.1 e 9.2 demonstram as alterações ocorridas no padrão (DNA-brometo de etídio) em decorrência da inserção dos complexos na solução. O comportamento linear da curva indica uma boa confiabilidade no método.⁴⁸

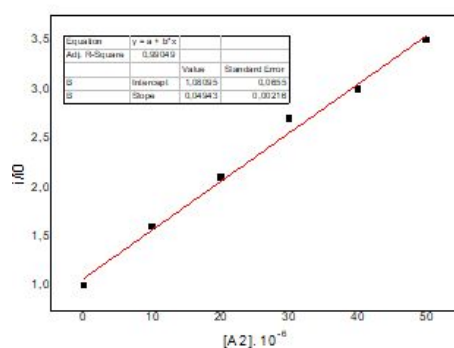


FIGURA 9.1: Equação de Stern-Volmer para o deslocamento do Brometo de Etídio para o complexo A2.

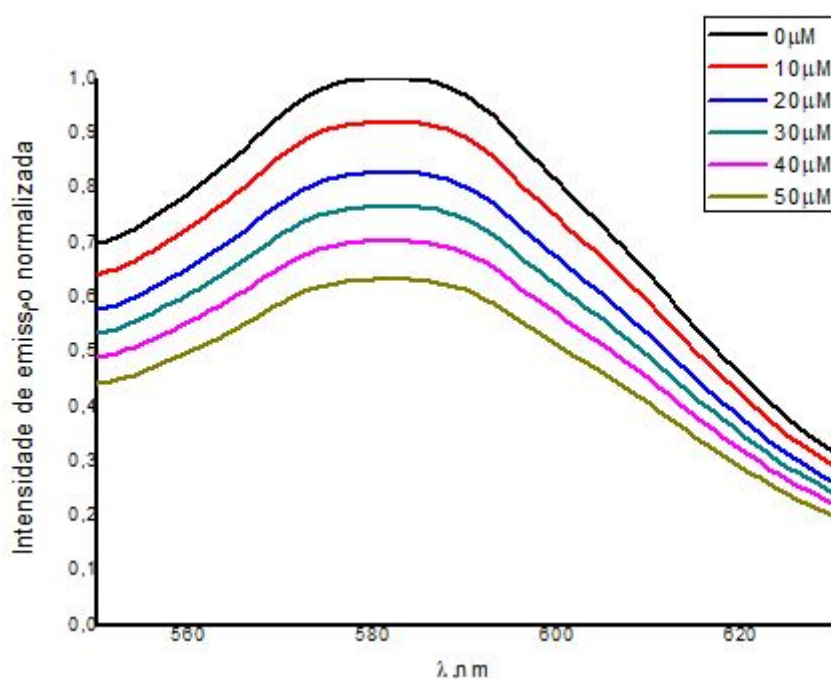


FIGURA 9.2: Variação da intensidade de emissão do aduto CT-DNA + Brometo de Etídio com a adição do complexo A2.

Através da equação de Stern-Volmer clássica foi possível extrair as constantes de interação de todos os compostos testados, demonstrados na tabela 9.1. Comparando os dados obtidos com resultados da literatura, observa-se que os aquo-complexos apresentam valores de constantes de interações na ordem de grandeza de padrões covalentes, como o verde de metila. Em contrapartida, os complexos B1 e B2 apresentam constantes da ordem de grandeza da Acridina, padrão intercalador.

TABELA 9.1: Ordem das constantes de Stern Volmer obtidas pelo deslocamento de Brometo de Etídio em comparação com a literatura.⁴⁸

	K	Tipo de interação
Acridina	$1,5 \cdot 10^6$	Intercalação
B1	$3,7 \cdot 10^6$	
B2	$4,3 \cdot 10^6$	
Verde de Metila	$1,04 \cdot 10^7$	Covalente
A1	$2,6 \cdot 10^7$	
A2	$1,4 \cdot 10^7$	

Sendo assim, os dados experimentais corroboram com os dados de ancoragem molecular, quando os aquo-complexos expressam uma maior capacidade de interação com o DNA, e provavelmente possuem uma componente covalente mais forte do que o composto com a Bipy. De qualquer maneira, o estudo mostrou uma interação do complexo com o DNA capaz de suprimir a luminescência do aduto, seja pelo deslocamento do Brometo de Etídio ou pela mudança na conformação da biomolécula pós interação com o complexo.

A titulação inversa também foi uma opção para teste. Neste caso foi feita uma tentativa de medir a emissão do complexo e verificar a sua variação conforme adicionava-se CT-DNA. Porém na concentração mínima de 10 micromolar de DNA havia uma supressão quase total da luminescência do composto. Este fato nos mostrou que tanto o composto é capaz de interagir com o DNA quanto essa interação é capaz de suprimir a luminescência do composto

fazendo com que estes complexos sejam bons candidatos para uma sonda molecular de DNA on-off.

10. Ensaio biológicos

Para se averiguar se as fortes interações com o DNA são capazes conferir citotoxicidade aos compostos, ensaios de viabilidade celular foram executados frente a 4 linhagens celulares (Tabela 10.1).

Foi observado que os ligantes livres possuem IC_{50} maior que 20 micromolar para a linhagem MDA MB 231, no entanto, se mostraram ativos frente às demais linhagens apresentando valores de IC_{50} bem expressivos, demonstrando que por si só podem afetar a viabilidade celular, destaca-se o L1 como sendo o mais ativo.

Todos os complexos apresentaram reduções significativas, mais de dez vezes, na citotoxicidade quando comparado aos seus respectivos ligantes. Indicando uma ação sinérgica entre os compostos orgânicos, já biologicamente ativos, e os centros metálicos. Vale destacar que os complexos do L1 se mostraram mais ativos que os complexos contendo o L2, seguindo o que foi observado para os ligantes livres, por exemplo: na linhagem DU-145 os complexos oriundos do ligante L1 se mostraram pelo menos 6 vezes mais ativos dos que os complexos do ligante L2; na linhagem MCF-7 essa diferença chega a dez vezes. Outro destaque, refere-se a alta atividade dos complexos frente a linhagem MDA-MB-231, uma vez que os ligantes foram inativos frente essa linhagem, indicando que a coordenação alterou o modo de ação frente a esta linhagem. Pelos resultados obtidos, acredita-se que os compostos agem indistintamente frente as diferentes linhagens celulares, apresentando valores similares para todas elas, inclusive para linhagem não-tumoral, PNT2.

No entanto, ressalta-se a elevada citotoxicidade dos complexos, superando a cisplatina, compostos padrão, em todos os casos. Validando o sistema como promissor na obtenção de complexos biologicamente ativos.

Uma vez que o experimento de deslocamento do Brometo de Etídio indica uma interação forte com o DNA, sugere-se que além da capacidade de interações hidrofóbicas, a capacidade de interações covalentes com a biomolécula de DNA seja um fator importante para a citotoxicidade. Além disso, concluímos que o ligante pirazínico é mais determinante do que o bipyridínico para a ação neste caso.

Sugere-se então, que o centro metálico, nos complexos aquo, faça uma ligação de caráter covalente com uma das bases do DNA, adicionalmente, os ligantes fenantrolínicos se intercalam de forma efetiva entre as bases nitrogenadas, justificando ambos os valores de IC_{50} . Esta hipótese se mostra mais coerente diante dos resultados apresentados. No entanto, mais ensaios frente a molécula de DNA deverão ser realizados para comprovar estes tipos de interações.

TABELA 10.1: Resultados de IC_{50} (μmolL^{-1}) obtidos em 24 horas de incubação em diferentes linhagens em comparação com a cisplatina⁶⁹⁻⁷⁰

	Linhagem			
	MDA MB 231	DU 145	MCF 7	PNT 2
L1	>20	$3,12 \pm 0,06$	$1,44 \pm 0,15$	$1,59 \pm 0,06$
L2	>20	$5,83 \pm 0,26$	$23,26 \pm 0,85$	$8,67 \pm 0,10$

A 1	$0,24 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,06$
A 2	$3,05 \pm 0,19$	$2,36 \pm 0,05$	$4,52 \pm 0,37$	$9,15 \pm 0,54$
B 1	<0,8	$0,37 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,01$	$2,01 \pm 0,05$
B 2	$3,62 \pm 0,10$	$3,66 \pm 0,91$	$4,33 \pm 0,15$	$5,51 \pm 0,34$
Cisplatina	$67,0 \pm 1,06$	$15,0 \pm 1,40$	$19,90 \pm 4,20$	$11,74 \pm 1,20$

11. Considerações finais

Os quatro complexos propostos foram sintetizados com sucesso. Os estudos mostram que os compostos do ligante 2 são promissores como sondas biológicas on-off sensíveis ao DNA com luminescência e absorção na região do visível, enquanto que os compostos do ligante 1 obtiveram melhores resultados citotóxicos. Os estudos de interação (teórico e experimental) sugerem uma interação de moderada a forte destes compostos com o DNA sendo os

compostos aquo complexos de interação mais forte. Não se encontrou uma relação clara entre a interação com DNA e citotoxicidade destes compostos, indicando a necessidade de uma análise mais profunda sobre o modo de atuação na molécula de DNA, podendo co-existir mais de uma forma de interação/ligação. Os estudos de DFT mostraram que o melhor método para se extrair as propriedades espectroscópicas é o de funcional B3LYP com base CCPVDZ pelo menos com esse número de estados calculados. Estes estudos mostraram quem em número de oxidação I os compostos tendem à geometria tetraédrica enquanto que em NOX II tendem à geometria quadrática plana. Essa planaridade leva a uma boa interação com o bolsão hidrofóbico do DNA com 3 a 5 pontos de contatos mais fortes com as zonas hidrofóbicas. Ao mesmo tempo o NOX dois propicia transferência de carga do ligante para o metal com bom deslocamento de Stokes e boa absorvidade molar. Além disso os complexos se mostraram nas linhagens testadas mais citotóxicos do que o padrão Cisplatina nos levando a crer que os complexos de Cu II podem ser estudados como sondas biológicas e como agentes citotóxicos.

12. Referências Bibliográficas

1. American Chemical Society. Medicinal Chemistry. Disponível em <https://www.acs.org/content/acs/en/careers/college-to-career/chemistry-careers/medicinal-chemistry.html> , acessado em 30 de junho de 2020.

2. Sodhi, R. K.; Paul, S.; Metal Complexes in Medicine “An Overview and Update from Drug Design Perspective”. *Canc Therapy & Oncol Int J.* ; 14(2), 2019.
3. Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. “Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology”. *Chem. Rev.*; 96, 2239-2314,1996.
4. Rijt, S. H. V.; Sadler, P. J. “Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs”. *Drug Discov. Today.*;14, 1089-1097, 2009
5. Pfizer. “Avaliação clínica de fármacos e agências regulatórias”. Disponível em <https://www.pfizer.com.br/sobre-a-pfizer/industria-farmaceutica> , acessado em 30 de junho de 2020.
6. Wilkins, L. W. “Anti-Cancer Drugs: An International Journal on Anti-Cancer Agents”. *Pharm. Pharmacy*, 11, 127, 2012.
7. Biologianet. “Ciclo celular: O que é, etapas, controle, resumo”. Disponível em <https://www.biologianet.com/biologia-celular/ciclo-celular.htm> , acessado em 30 de junho de 2020.
8. INCA. “O que é câncer”. Disponível em <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer> , acessado em 30 de junho de 2020.
9. Jackson, A. L.; Loeb, L. A. “The contribution of endogenous sources of DNA damage to multiple mutations in cancer”. *Mutat Res*, 477, 7-21, 2001.
10. Pinho, M. S. L.; “Expressão das proteínas p53 e Cox-2 em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente”. *Rev. Bras. Colo-Proctol*, 20, 258-260, 2000.
11. Sala bioquímica . Adaptado. Disponível em <http://salabioquimica.blogspot.com/2014/05/bases-bioquimicas-da-hereditarieda-de.html> , acesso em 30 de junho de 2020.

12. INCA, “Estimativa|2020”
<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>, acessado em 19 de outubro de 2020.
13. Rosenberg, B.; van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, H.V.; *Nature*, 222, 385. 1969
14. Rosenberg, B.; van Camp, L.; *Cancer Res.* 1970, 30, 1799
15. Barra, C. V.; Netto, A. V. G. “Interações Entre Complexos Antitumorais e o DNA e Suas Ferramentas de Análise: Um Enfoque Nos Metalintercaladores”, *Revista Virtual de Química* 2015, 7 (6), 1998.
16. Jahromi, E. Z.; Divsalar, A.; Saboury, A. A.; Khaleghizadeh, S.; MansouriTorshizi, H.; Kostova, I. “Palladium Complexes: New Candidates for AntiCancer Drugs”. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2016, 13 (5), 967.
17. Liscovitch, M.; Yaakov, L. “Cancer Multidrug Resistance : A Review of Recent Drug Discovery Research”, *IDrugs: the investigational Drugs Journal*, 5 (4), 2002
18. Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. “The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials”. *Dalton Trans.*, 39, 8113-8127, 2010.
19. Harrap, K.R. ; “Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative.” *Cancer Treat Rev.*, 12, 21-33, 1985.
20. Sadler, P. J. “Metals in Medicine: Design and mechanism of action”. *Adv. Inorg. Chem.*, 36, 1-48, 1991
21. Fontes, A., P., S.; César, E., T.; Beraldo, H.; “A química inorgânica na terapia do câncer”. *Quím. Nova na escola*, 6, 13-18, 2015
22. Todd, R. C.; Lippard, S. J. “Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds”. *Metallomics*, 1, 280-291, 2009.

23. Sava, G.; Alessio, E.; Bergamo, A.; Mestroni, G. “ Sulfoxide Ruthenium Complexes: Non toxic Tools for the Selective treatment of Solid Tumor Metastases”. *Metallopharmaceuticals I - Topics in Biological Inorganic Chemistry*, 1, 143-169, 1999.
24. Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K. “from bench to bedside-preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans - [tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 o FFC14A)”. *J. Inorg. Biochem.*, 100, 891-904, 2006.
25. Lin K., Zhao Z-Z., Bo H-B., Hao X-J. and Wang J-Q. “Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy”. *Front. Pharmacol.* 9,1323, 2018.
26. Svensson F. R.; Abrahamsson, M.; Stomberg, N.; Ewing, A. G.; Lincoln, P.; “Ruthenium(II) Complex Enantiomers as Cellular Probes for Diastereomeric Interactions in Confocal and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy” *J Phys. Chem. Lett.*, 2(5), 397-401, 2011.
27. Byrne, A.; Burke, C. S.; Keyes, T. E., “Precision Targeted Ruthenium (II) Luminophores; Highly Effective Probes for Cell Imaging by Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy”. *Chem. Sci.* ,7, 6551-6562, 2016
28. Nitsch, J.; Kleeberg, C.; Frohlich, R.; Steffen, A.; “Luminescent copper I halide and pseudohalide phenanthroline complexes revisited: Simple structures, complicated state Behavior.” *Dalton Trans*, 44, 2015.
29. Haas, K. L.; Franz, K. J.; “Application of Metal Coordination Chemistry to Explore and Manipulate Cell Biology,” *National Institute of health, Chem rev*, 109, 10, 4921-4960, 2009.

30. Festa, R. A.; Thiele, D. J.; "Copper: An essential metal in biology". *Current Bio*, 21, 877-883, 2011.
31. Bisceglie F.; Pinelli S.; Alinovi R.; et al. "Cinnamaldehyde and cuminaldehyde thiosemicarbazones and their copper(II) and nickel(II) complexes: a study to understand their biological activity". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014.
32. Zeglis, B. M. et al. "Role of Metalation in the Topoisomerase IIa Inhibition and Antiproliferation Activity of a Series of π -Heterocyclic-N 4-Substituted Thiosemicarbazones and Their Cu (II) Complexes". *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 2391, 2011.
33. Bisceglie, F.; Musiari, A.; Pinelli, S.; Alinovi, R.; Menozzi, I.; Polverini, E.; Tarasconi, P.; Tavone, M.; Pelosi, G. "Quinoline-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazones and Their Cu(II) and Ni(II) Complexes as Topoisomerase IIa Inhibitors". *J. Inorg. Biochem.*, 152, 10 2015
34. Lakshmipraba, J.; Arunachalam, S.; Vijay, R.; Venuvanalingam, P.; "Synthesis, DNA binding and docking studies of copper(II) complexes containing modified phenanthroline ligands". *Journal of Coordination Chemistry*, 68(8), 1-24, 2015.
35. Turro N. J. "Modern molecular photochemistry", 3, 2012.
36. Jiang, Z.; Yu, X.; Zhai, S.; Hao Y. "Ratiometric Dissolved Oxygen Sensors Based on Ruthenium Complex Doped with Silver Nanoparticles". *sensors*, 17, 548, 2017.
37. Expósito, J. E.; Álvarez-Paino, M.; Aullón, G.; Miguel, J. A. Espinet, P. "Higher fluorescence in platinum (IV) orthometallated complexes of perylene

imine compared with their platinum (II) or paladium (II) analogues” . Dalton Trans., 44, 16164-16176, 2015.

38. Malinina L.; Soler-López M.; Aymamí J.; Subirana J.A. “Intercalation of an acridine-peptide drug in an AA/TT base step in the crystal structure of [d(CGCGAATTCGCG)](2) with six duplexes and seven Mg(2+) ions in the asymmetric unit.” Biochemistry 41(30), 9341-9348, 2002.

39. Chen Y-C. Beware of docking!”. Trends in Pharmacological Sciences , 36(2),78-95, 2015.

40. Waszkowycz, B. “Towards improving compound selection in structure-based virtual screening” Drug Discovery Today , 13(5–6), 219-226, 2008.

41. Hussain,, A.; FahadAlAjmi, M.; Rehman, T.; Amir, S., Husain F. M. , Alsalmeh A.; et.al. “Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal antiinflammatory agents: In vitro and in vivo studies”, nature, 9, 5237, 2019.

42. Foresman, J. B.; Frisch, E. “Exploring chemistry with electronic structure methods”, 2nd edition,

43. Friedman, A. E.; Chambron, J. C.; Sauvage, J. P.; Turro, N. J.; Barton, J. K. “A molecular light switch for DNA : [Ru(bpy)₂(dppz)]²⁺”. J. Am. Chem. Soc., 112, 4960, 1990.

44. Cardoso, C. R, Et al. “Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono and bi dentate histamine ligand”. Dalton Trans., 41m 6726-6734, 2012.

45. Narasimhan, B.; Sharma, D.; Kumar, P. "Biological importance of imidazole nucleus in the new millenium". *Med Chem Res*, 20, 1119-1140, 2011.
46. Sergeeva, N. N.; Donnier-Marechal, M.; Vaz, G. M.; Davies, A. M.; Senge, M. O. "Stability and spectral properties of europium and zinc phenanthroline complexes as luminescent probes in high content cell-imaging analysis". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1589–1595,2011.
47. Penga, B., et. Al "Synthesis, characterization and DNA-binding studies of ruthenium(II) mixed-ligand complexes containing dipyrido[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]quinoxaline". *Spectrochimica Acta Part A*, 74, 896–901, 2009
48. Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Castiñeiras, A.; Lloret, F. "A Unique Discrete Tetranuclear Cu'–Cu(N-N)2Cu–Cu' Copper(II) Complex, Built from a μ_3 -1,2,4-Triazolato- μ -carboxylato Ligand, as an Effective DNA Cleavage Agent" *Inorg. Chem.*, 51, 9809–9819, 2012
49. Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Morel, L.; Gautier, A.; Garrido, S. S.; Mauro, A. E.; Frem, R. C. G.; Netto, A. V. G. "DNA Binding, Topoisomerase Inhibition and Cytotoxicity of Palladium(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Thioureas". *Inorganica Chim. Acta*, 446, 54, 2016.
50. Popolin, C. P.; Reis, J. P. B.; Becceneri, A. B.; Graminha, A. E.; Almeida, M. A. P.; Corrêa, R. S.; Colina-Vegas, L. A.; Ellena, J.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. "Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple 64 Negative Breast Cancer Cells." *PLoS One*, 12 (9), 2017.

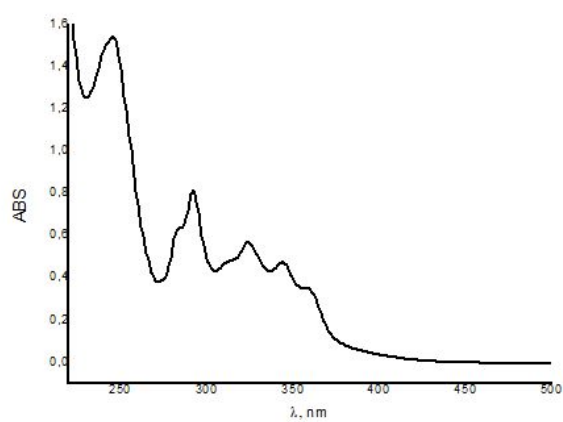
51. Colina-Vegas, L.; Lucena Dutra, J.; Villarreal, W.; Neto, J. H. de A.; Cominetti, M. R.; Pavan, F.; Navarro, M.; Batista, A. A. "Ru (II)/ Clotrimazole / Diphenylphosphine / Bipyridine Complexes : Interaction with DNA , BSA and Biological Potencial against Tumor Cell Lines and Mycobacterium..." J. Inorg. Biochem., 162 (September), 135, 2016.
52. Malinina L.; Soler-López M.; Aymamí J.; Subirana J.A. "Intercalation of an acridine-peptide drug in an AA/TT base step in the crystal structure of [d(CGCGAATTCGCG)](2) with six duplexes and seven Mg(2+) ions in the asymmetric unit." Biochemistry 41(30), 9341-9348, 2002.
53. Waszkowycz B: Towards improving compound selection in structure-based virtual screening. Drug Discovery Today, 13(5–6):219-226, 2008.
54. Chen Y-C: Beware of docking! Trends in Pharmacological Sciences, 36(2):78-95, 2015.
55. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J: Software for molecular docking: a review. Biophysical Reviews, 9(2):91-102, 2017
56. DeLano WL: The PyMOL Molecular Graphics System. In., PyMOL v 1.7.4.4 edn. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific; 2002.
57. Kemmish H, Fasnacht M, Yan L: Fully automated antibody structure prediction using BIOVIA tools: Validation study. PLoS ONE, 12(5):e0177923, 2017
58. Antkowiak, W.Z.; Sobczak, A. "Solvent effect on the reactivity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione towards diazomethane". Tetrahedron, 57(14), 2799-2805

59. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 3 ed.; Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A, 1979.
60. Frisch, M. J.; et. Al , “GAUSSIAN 09, Revision B.01”. 2010.
61. Gayathri, P.; & Senthil, A. K.; “Electrochemical Behavior of the 1,10-Phenanthroline Ligand on a Multiwalled Carbon Nanotube Surface and Its Relevant Electrochemistry for Selective Recognition of Copper Ion and Hydrogen Peroxide Sensing”. *Langmuir*, 30(34), 10513–10521, 2014
62. Garcia Velho, R. *Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico*. Programa de PósGraduação em Química - UF , 170,2006.
63. Molbase. 1-10-phenanthroline. Disponível em “molbase.com/en/hnmr_5144-89-8-moldata-32776.html”. Acesso em 30 de junho de 2020.
64. Caires AC: Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 7(5):484-491,2007.
65. Tariq M, Sirajuddin M, Ali S, Khalid N, Tahir MN, Khan H, Ansari TM: Pharmacological investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses of newly synthesized potentially bioactive organotin(IV) carboxylates. *J Photochem Photobiol B*, 158:174-183, 2016.
66. Mahata T, Chakraborty J, Kanungo A, Patra D, Basu G, Dutta S: Intercalator-Induced DNA Superstructure Formation: Doxorubicin and a Synthetic Quinoxaline Derivative. *Biochemistry*, 57(38):5557-5563,2018.
67. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ: AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16):2785-2791,2009.

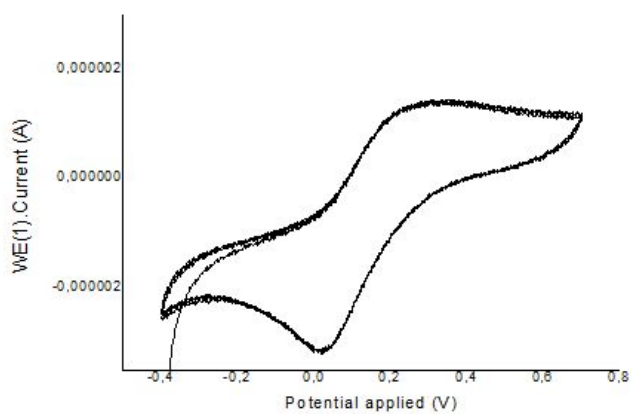
68. Rowland RS, Taylor R: Intermolecular Nonbonded Contact Distances in Organic Crystal Structures: Comparison with Distances Expected from van der Waals Radii. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(18):7384-7391,1996.
69. Shavsavar, F.; Bozorgmehr, M.; Mirzadegan, E.; Abedi,A.; Lighvan, Z. M.; Safari,N.; Amani, V.; Zarnani, A-H. “A Novel Platinum-based Compound with Preferential Cytotoxic Activity against a Panel of Cancer Cell Lines”. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16,3,2016.
70. Lima, M. A.; Costa, V. A.; Franco, M. A.;de Oliveira, G. P.; Deflon, V. M.; Rocha, F. V. “Palladium(II) complexes bearing thiosemicarbazone and phosphines as inhibitors of DNA-Topoisomerase II enzyme: Synthesis, characterizations and biological studies” . *Ino. Chem. Com.*,112,107708,2020

13. Apêndices

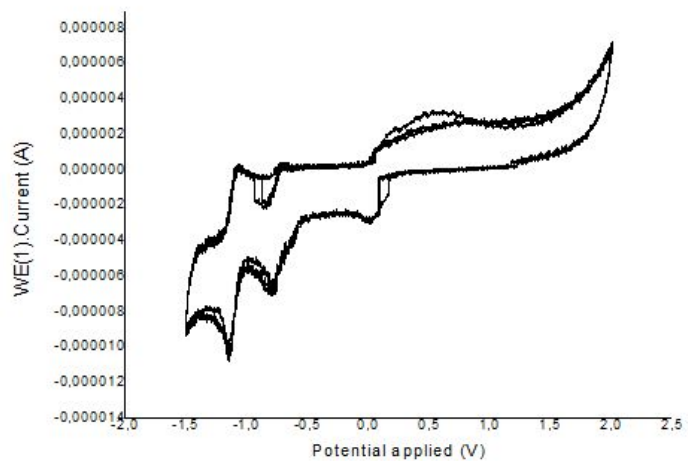
13.1. Espectro de absorção do ligante L1 em água.



13.2. Voltametria cíclica do complexo A2 em Acetonitrila



13.3. Voltametria cíclica do complexo B2 em Acetonitrila



13.4. Voltametria cíclica do ligante L1 em Acetonitrila

