

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

**“Síntese e Caracterização de Complexos de Eu (III) com Ligantes
Dicetona e Diferentes Fenantrolinas: Aplicações Antitumorais e
Interações com Biomoléculas”**

Josias da Silveira Rocha*

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

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

* bolsista CAPES

**São Carlos - SP
2025**

Rocha, Josias da Silveira

Síntese e Caracterização de Complexos de Eu (III) com Ligantes Diketona e Diferentes Fenantrolinas: Aplicações Antitumorais e Interações com Biomoléculas / Josias da Silveira Rocha -- 2025.
220f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Fillipe Vieira Rocha

Banca Examinadora: Fillipe Vieira Rocha, João Honorato de Araújo Neto, Renata Galvão de Lima, José Clayston Melo Pereira, Tiago Venâncio

Bibliografia

1. Química Inorgânica. 2. Complexos de Eu(III). 3. Câncer. I. Rocha, Josias da Silveira. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



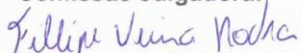
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

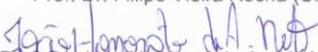
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

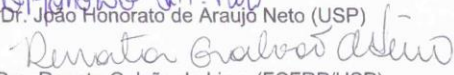
Folha de Aprovação

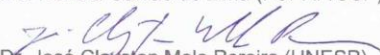
Defesa de Tese de Doutorado do candidato Josias da Silveira Rocha, realizada em 24/01/2025.

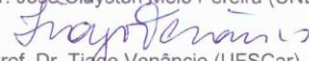
Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Felipe Vieira Rocha (UFSCar)


Prof. Dr. João Honorato de Araújo Neto (USP)


Profa. Dra. Renata Galvão de Lima (FCFRP/USP)


Prof. Dr. José Cláudio Melo Pereira (UNESP)


Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar)

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

“(...) Mas, veja bem, meu caro; não existe nada mais forte do que estes dois soldados: paciência e tempo.”

- Liev Tolstói, no livro “Guerra e Paz”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder sabedoria nos momentos adversos e pela dádiva de cada novo dia. Aos meus pais, Luzia Rocha e Carlos Rocha, expresso minha profunda gratidão pela criação repleta de amor e carinho. Sempre me apoiaram em todas as decisões e estiveram presentes nos momentos mais desafiadores, oferecendo força e conforto incondicional;

Ao grande Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha, minha profunda gratidão por sua contribuição inestimável à minha formação desde o mestrado. Sua orientação não apenas demonstrou que a academia é um espaço de respeito e aprendizado, mas também de amizade e colaboração. Sem dúvidas, a relação orientador-aluno que cultivamos foi fundamental para que eu me tornasse um pesquisador mais capacitado;

Minha gratidão ao grupo de pesquisa CCQM, que foi minha casa acadêmica ao longo desses seis anos repletos de aprendizado, companheirismo e amizade. Vocês mostraram que a academia pode ser um ambiente leve, de intensa dedicação e, ao mesmo tempo, um lugar onde se constroem memórias inesquecíveis. Esses anos certamente foram alguns dos melhores da minha vida. Um agradecimento especial ao meu grande amigo George, que esteve comigo em todas as etapas desde o mestrado, compartilhando desafios e conquistas. Aos doutorandos Tamara, Nádjia, Isabella, Josenilton e Victória, meu reconhecimento pelo apoio e pelas trocas ao longo da jornada. Aos ICs: Letícia, Maria Eduarda, Fernando, Yumi, Ana Júlia e Ana Beatriz. Também estendo minha gratidão àqueles que passaram por aqui e se tornaram grandes amigos, como o Dr. Mauro, Dr. Lucas e a Dra Gabriela. A todos vocês, meu muito obrigado por contribuírem tanto para minha formação e para tornar essa caminhada tão especial.

Minha gratidão também se estende aos meus amigos de moradia, Paulo e Bráulio, por todos os momentos de descontração, pelos conselhos e pela amizade inestimável;

Agradeço a todos os integrantes do laboratório LERCI pelo suporte e colaboração. Um agradecimento especial ao Dr. Marcos pelos ensaios de viscosidade e dicroísmo circular, e à Dra. Jocely pela realização dos ensaios de citometria de fluxo;

Ao Prof. Dr. João Honorato e o Dr. Pedro pelas difrações e refinamentos dos monocristais em parceria com o Prof. Dr. Javier Ellena;

A parceria de cálculos teóricos concedida pelo Prof. Dr. José Diogo e seu aluno Willyan Farias da Universidade Federal de Sergipe;

Agradeço ao doutorando Wladimir da Unesp – AQA, pelos ensaios fotofísicos dos complexos;

Ao Departamento de Química da UFSCar, especialmente ao Programa de Pós-Graduação e aos servidores Luciana Vizotto, Ariane, Cristina e Luciani;

Por fim agradeço aos órgãos de fomentos FAPESP, CNPQ, em especial a CAPES pela bolsa concedida.

Lista de tabelas

Tabela 1. Resumos das transições, intervalos, intensidades e quando essas transições devem ocorrer para complexos de Eu (III) luminescentes ¹⁰	12
Tabela 2. Reagentes e Solventes e suas respectivas procedências.....	28
Tabela 3. Deslocamentos químicos, números de hidrogênios e constantes de acoplamento para os ligantes aromáticos.	53
Tabela 4. Caracterizações físico-químicas dos complexos a base de Európio. ..	60
Tabela 5. Atribuições das principais bandas do infravermelho para os ligantes e complexos.....	67
Tabela 6. Comparação dos deslocamentos paramagnéticos versus diamagnéticos ($\Delta\delta$).	76
Tabela 7. Transições referentes aos ligantes e seus respectivos complexos, comprimentos de ondas (nm) por Absortividades Molares ε (L. cm ⁻¹ mol ⁻¹). Solvente: DMSO e concentrações de 1x10 ⁻⁵ M.....	81
Tabela 8. Dados fotofísicos para os complexos a base de Eu(III), como rendimento quântico global (Φ) e tempo de meia via τ (ms).....	84
Tabela 9. Parâmetros dos cristais, como distância (Å) e ângulos de ligações para os complexos Eu(DBM) ₃ NON, Eu(DBM) ₃ CN e do ligante livre DBM.	87
Tabela 10. Erro associado entre os poliedros de coordenação dos complexos e formas ideais de dodecaedro triangular e antiprisma quadrático obtidos através do programa SHAPE.	89

Tabela 11. Contribuição das transições eletrônicas envolvidas nas bandas mais importantes dos espectros de absorção eletrônica teóricos calculados com INDO/S-CIS. $\lambda \sim 300$ nm contribuição dos ligantes DBM e $\lambda \sim 250$ nm contribuição dos ligantes fenantrolinas.	91
Tabela 12. Energias S1 e T1 dos complexos estudados e suas respectivas RL obtidos através de cálculos INDO/S-CIS	95
Tabela 13. Parâmetros como Diâmetro hidrodinâmico (DH) e polidispersividade (PdI) para os complexos nos tempos de 0, 24 e 48 horas. Proporção PBS:complexos (99:1%).....	102
Tabela 14. Valores de IC ₅₀ para os ligantes e cisplatina em μ M frente a linhagens tumoral e não tumoral no período de 48 horas.	106
Tabela 15. Valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) obtidos para os complexos e cisplatina em μ M, frente a linhagens tumoral e não tumoral no período de 48 horas. Lipofilicidade em LogP.....	107
Tabela 16. Parâmetros experimentais para o sistema complexos-DNA para deslocamento do Hoechst 33258. Temperatura 37 °C.....	134
Tabela 17. Parâmetros de interações entre complexos e HSA. Stern-Volmer constante de supressão (KSv), constante de supressão biomolecular (Kq), constante de ligação (Kb), número de locais de ligações (n), valores de ΔG_0 , ΔH_0 e ΔS_0 para o sistema HSA-complexos em diferentes temperaturas.....	143

Lista de figuras

Figura 1. Processo de metástase aonde às células tumorais invadem a matriz extracelular, entram na corrente sanguínea, extravasam e invadem tecidos vizinhos ou a longas distâncias. Adaptado de Sergi ⁵	2
Figura 2. Complexos a base de Pt (II) aprovados para tratamentos contra o câncer. Destaca-se a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina aprovados no mundo inteiro. Nedaplatina (Japão), lobaplatina (China), heptaplatina (Coréia do Sul) e satraplatina (em testes clínicos) ^{7,8}	4
Figura 3. Complexos aprovados para testes clínicos como quimioterápicos, exceto o NAMI-A que não alcançou os resultados esperados.	6
Figura 4. Resumo dos mecanismos de transferências de energias entre ligantes e Eu (III) ^{11,12}	11
Figura 5. a) Complexo de európio (III) com ligantes do tipo dicetona e fenantrolina, ilustrando a capacidade de interagir com biomoléculas como o DNA, além de destacar as propriedades fluorescentes do complexo, que permitem sua utilização como sonda fluorescente.b) Complexos bimetálicos de európio (III) com ligantes terpiridinas e ácido tolfenâmico, que demonstram atividade fotodinâmica (PDT) contra células HeLa após exposição à luz de 365 nm por 1 hora. Além disso, esses complexos possuem a capacidade de atuar como sondas fluorescentes, proporcionando uma dupla funcionalidade terapêutica e diagnóstica. Adaptado de Dasari e colaboradores ^{11,12}	13

Figura 6. Mecanismo de ação do complexo Eu-Pt2, desenvolvido por Chandra e colabo-radores. Ativação do aqua complexo de platina no meio intracelular e ligação covalente ao DNA, internalização celular fora verificada via microscopia con-focal por fluorescência ¹⁵	14
Figura 7. Inibição do crescimento tumoral induzida por luz in vivo (a–c) e (d). efeito de RuEuL (com ou sem ativação por luz azul) na inibição do crescimento tumoral em camundongos xenotransplantados com células tumorais SW480. Quando os tumores atingiram um volume médio de 180 mm ³ , os camundongos foram randomizados em três grupos experimentais diferentes. Os camundongos receberam (i) solução salina a 0,9%, (ii) 40 µg do complexo RuEuL, ou (iii) 40 µg de RuEuL ativado por luz azul de 488 nm (RuEuL + hv) duas vezes por semana via injeção intratumoral. Três vezes por semana, os volumes tumorais foram medidos e calculados usando a fórmula (comprimento × largura ²)/2. No dia 21, os camundongos foram sacrificados e seus tumores foram coletados e pesados. (a) volume tumoral, (b) imagens representativas dos tumores e (c) peso dos tumores. (d) Imagem da ativação por luz azul de RuEuL e EuL (controle) ¹⁴	15
Figura 8. a) Desprotonação do equilíbrio ceto-enólico por meio de uma base do ligante 1,3-difenilpropano-diona (DBM) antes da coordenação. b) Forças de ligações M-L de diferentes β-dicetonas frente ao Eu (III) onde DBM = 1,3-difenilpropano-diona ou dibenzoilmetano; BFTA = 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona e TTA = 1-(2-tenoil)-3,3,3-trifluoroacetona. Adaptado de Nathalia e calaboradores ¹⁷	17

Figura 9. Exemplificando os três modos de interação possíveis para complexos metálicos com a biomolécula de DNA. a) Interações via Sulcos, b) Intercalação e c) Inserção. Adaptado de Zeglis e colaboradores ²⁷	19
Figura 10. Diferentes fenantrolinas com seus respectivos substituintes, onde: PH = 4,7-difenil-1,10-fenantrolinas, NON = [1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina, CN = pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila e BrF = 10-bromo-12- fluorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina.	21
Figura 11. Diferentes complexos com ligantes fenantronílicos. a e b) Complexos tri-coordenados de prata (I) com ligantes NON e CN e tiouréia como ligante auxiliar, c e d) Complexos octaédricos de rutênio (II) com ligantes planares bipyridinas, fenantrolinas e e NON e e) Complexos octaédricos de rutênio (II) com ligantes planares bipyridinas e CN ²⁹⁻³¹	22
Figura 12. Estrutura proposta para os complexos a base de Európio(III).	50
Figura 13. RMN de ¹ H para os ligantes, a) DBM (em Acetona-d ₆), b) PH (em CDCl ₃), c) NON (em DMSO-d ₆) e d) CN (DMSO-d ₆).	52
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (BrF). Solvente: CDCl ₃	54
Figura 15. Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do ligante BrF. Solvente: CDCl ₃ ...	55
Figura 16. Mapa de contorno HSQC ¹ H- ¹³ C do ligante BrF. Solvente: CDCl ₃ ..	56
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C para o ligante estendido derivado da fenantrolina (BrF). Solvente: CDCl ₃	57

Figura 18. Voltamogramas obtidos usando o GCE. a) Eu(DBM) ₃ PH. b) Eu(DBM) ₃ NON. c) Eu(DBM) ₃ CN.d) Eu(DBM) ₃ BrF. Concentração 0,01 M (TBAP 0,1 M). Velocidade de varredura de potencial (v) = 50 mV s ⁻¹	61
Figura 19. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo Eu(DBM) ₃ PH. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm ⁻¹	63
Figura 20. a) Esquema de substituição das águas coordenadas no precursor Eu(DBM) ₃ (H ₂ O) ₂ por ligantes fenantrolínicos. b) IV cortado na região acima de 3000 cm ⁻¹ para o ligante DBM e seu respectivo precursor.....	64
Figura 21. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo Eu(DBM) ₃ NON. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm ⁻¹	65
Figura 22. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo Eu(DBM) ₃ CN. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm ⁻¹	66
Figura 23. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo Eu(DBM) ₃ BrF. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm ⁻¹	67
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H para o complexo Eu(DBM) ₃ PH Solvente: Acetona-d ₆	69
Figura 25. Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H para o complexo Eu(DBM) ₃ PH. Solvente: Acetona-d ₆	70

Figura 26. Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. Solvente: Acetona- d_6	71
Figura 27. Região expandida para uma melhor visualização dos acoplamentos orto, meta e para dos ligantes complexados. Solvente: Acetona- d_6	72
Figura 28. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ Solvente: Acetona- d_6	73
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ Solvente: Acetona- d_6	74
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ Solvente: Acetona- d_6	75
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ Solvente: Acetona- d_6	76
Figura 32. Os diferentes níveis eletrônicos e suas possíveis transições em ligantes orgânicos ⁵⁹	77
Figura 33. Espectros de UV-Vis para os complexos em comparação com seus respectivos ligantes. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$; b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$; c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentrações $1 \times 10^{-5}\text{M}$ em DMSO.	78
Figura 34. Decolvoluções para os complexos. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$; b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$; c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Software MatLab.	80
Figura 35. Espectros de Absorbância (excitação 354-355 nm) e de Fluorescência dos complexos (emissão 613-616 nm). a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c)	

Eu(DBM) ₃ CN. d) Eu(DBM) ₃ BrF. Solvente: DMSO e concentração de 1x10 ⁻⁵ M.	82
Figura 36. Emissão dos complexos de Eu(III) no vermelho da transição hipersensível ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂ . Lâmpada UV Cole-Parmer 6W. Comprimento de excitação 365 nm.	83
Figura 37. Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos em a) Eu(DBM) ₃ NON e b) Eu(DBM) ₃ CN.	86
Figura 38. Estruturas tridimensionais dos complexos. a) Eu(DBM) ₃ PH. b) Eu(DBM) ₃ NON. c) Eu(DBM) ₃ CN. d) Eu(DBM) ₃ NON. E seus respectivos poliedros de coordenação otimizados com DFT utilizando o nível de teoria PBE1PBE/TZVP/MWB52/CPCM(DMSO).	88
Figura 39. Espectros de absorção eletrônica experimentais e teóricos calculados com os métodos DFT PBE1PBE/TZVP/MWB52/CPCM(DMSO) e semiempírico INDO/S-CIS. a) Eu(DBM) ₃ PH. b) Eu(DBM) ₃ NON. c) Eu(DBM) ₃ CN. d) Eu(DBM) ₃ BrF.	90
Figura 40. Orbitais moleculares mais relevantes no processo de absorção eletrônica calculados com o método INDO/S-CIS.	94
Figura 41. Diagramas de energia demonstrando em escala o processo de transferências de energias ligantes-Eu(III) dos complexos estudados. a) Eu(DBM) ₃ PH e Eu(DBM) ₃ NON. b) Eu(DBM) ₃ CN e Eu(DBM) ₃ BrF.	98

Figura 42. Estabilidades dos complexos em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48 horas. a) Eu(DBM) ₃ PH; b) Eu(DBM) ₃ NON; c) Eu(DBM) ₃ CN e d) Eu(DBM) ₃ BrF. Concentrações: 1x10 ⁻⁵ M.....	100
Figura 43. Estabilidades dos complexos em PBS nos tempos de 0, 24 e 48 horas. a) Eu(DBM) ₃ PH; b) Eu(DBM) ₃ NON; c) Eu(DBM) ₃ CN e d) Eu(DBM) ₃ BrF. Concentrações: 1x10 ⁻⁵ M.....	101
Figura 44. Análise via DLS para os complexos, intensidades relativas (%) por Diâmetros das partículas formadas. Em a) Eu(DBM) ₃ PH. b) Eu(DBM) ₃ NON. c) Eu(DBM) ₃ CN. d) Eu(DBM) ₃ BrF.	103
Figura 45. Estabilidades dos complexos em RPMI nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. a) Eu(DBM) ₃ PH; b) Eu(DBM) ₃ NON; c) Eu(DBM) ₃ CN e d) Eu(DBM) ₃ BrF. Concentrações: 1x10 ⁻⁵ M.....	104
Figura 46. Espectro de fluorescência para os complexos. a) Eu(DBM) ₃ PH, b) Eu(DBM) ₃ NON, c) Eu(DBM) ₃ CN e d) Eu(DBM) ₃ BrF. Em solventes como PBS e DMEM. Concentrações: 1x10 ⁻⁵ M. λ _{ex} = 353-355 nm.	105
Figura 47. Micrografias obtidas para a linhagem celular A2780cis nas concentrações de 2xIC ₅₀ , IC ₅₀ , 0,5xIC ₅₀ e 0,25xIC ₅₀ nos tempos de 0, 24 e 48 horas para o complexo Eu(DBM) ₃ BrF. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.	110
Figura 48. Ensaio morfológico para o composto Eu(DBM) ₃ BrF na linhagem celular A2780cis marcado com PI depois de 48 horas. Imagens obtidas com	

microscópio CELENA® S com zoom 4x. $\lambda_{exc} = 538 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 617 \text{ nm}$	112
Figura 49. Ensaio morfológico por fluorescência, células A2780cis tratadas com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ e marcadas com Green Plasma (verde) $\lambda_{exc} = 522 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ e DAPI (azul) $\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom 4x.....	113
Figura 50. a-b) Imagens clonogênicas das células A2780cis tratadas com os complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$, da direita para esquerda: controle; 0,25, 0,5 e 1x do IC_{50} . d-e) Gráfico de barras da distribuição do número de colônias em cada concentração.....	115
Figura 51. Histograma da distribuição de morte celular tratada com diferentes concentrações do composto $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ para linhagem celular A2780cis por 48 horas onde Q1 - necrose, Q2 – apoptose tardia, Q3 – células viáveis e Q4 - apoptose inicial. Gráficos de barras da porcentagem de células apoptóticas após tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ em diferentes concentrações nas células A2780cis por 48 horas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão dos experimentos em triplicata utilizando a ANOVA. Significância nos níveis de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$) usando ANOVA e teste Dunnet's.....	117
Figura 52. Distribuição do ciclo celular das células A2780cis após tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ por 48 horas. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por **** $p < 0,0001$	119

Figura 53. Distribuição do ciclo celular das células A2780cis após tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ por 48 h. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por * $p < 0,05$; ** e **** $p < 0,0001$.	121
Figura 54. Crescimento dos esferoides para a linhagem celular A2780cis e tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ variando-se tempo e concentração. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.	122
Figura 55. Crescimento dos esferoides para a linhagem celular A2780cis e tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ variando-se tempo e concentração. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.	123
Figura 56. Gráficos dos diâmetros dos esferoides pelo tempo de tratamento. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. c) cisplatina.	124
Figura 57. Marcações dos esferoides com DAPI e PI da linhagem celular A2780cis tratada com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ após de 144 horas.	125
Figura 58. Marcações dos esferoides com DAPI e PI da linhagem celular A2780cis tratada com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ após de 144 horas.	126
Figura 59. Interação com o DNA vis UV-Vis em concentrações fixas dos complexos e variações crescentes da concentração de ct-DNA. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentrações de 1×10^{-5} M em tampão Trisma.HCl.	128
Figura 60. Dicroísmo circular para os complexos. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentração do ct-DNA fixa em $100 \mu\text{M}$ e proporções molares $[\text{complexos}/\text{DNA}] = 0,00 - 0,50$.	130

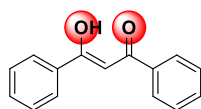
Figura 61. Viscosidade relativa do ct-DNA (100 μ M) na ausência e presença dos complexos e dos controles laranja de tiazol e cisplatina nas proporções molares [comple-xos/DNA] = 0,0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4. Soluções contém 20% de DMSO. * adaptado de Zhu et al. ⁹⁴ ** adaptado de Pages <i>et al.</i> ²⁷	131
Figura 62. a) Espectro de emissão do Hoechst 33258 na presença do ct-DNA e variações nas concentrações do complexo Eu(DBM) ₃ PH. λ_{ex} = 350nm e λ_{em} = 460 nm. b) Taxa de supressões de fluorescência (%) do corante na presença de diferentes concentrações dos respectivos complexos. c) Regressão polinomial do complexo Eu(DBM) ₃ PH e constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Ensaio realizado a 37 °C.	133
Figura 63. a) Gel de eletroforese no controle negativo somente plasmídeo pUC19 + DMSO + TBEx1 (MIX). Controle positivo: cisplatina + (MIX). Variações das concentrações dos complexos + MIX. b) Conformações que o plasmídeo pode assumir dependendo de possíveis interações.....	136
Figura 64. Gel de eletroforese para a diferentes isoformas das enzimas topoisomerasas na presença decrescente das concentrações dos complexos respectivamente. a) TOPOII α ; C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOII α + ATP. b) C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOI. c) C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOII β +ATP.	138
Figura 65. Espectro de fluorescência da HSA com aumento das concentrações dos complexos (5-30 μ M). a) Eu(DBM) ₃ PH. b) Eu(DBM) ₃ NON. c) Eu(DBM) ₃ CN. d) Eu(DBM) ₃ BrF. em 25 °C. λ_{ex} =280 nm e λ_{em} = 330 nm.....	141



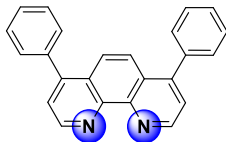
Lista de esquemas

Esquema 1. Design dos complexos, como as propriedades de cada fragmento e a importância de o centro metálico estar totalmente coordenada, afim de evitar supressões de fluorescência providas de moléculas desativadoras, como solventes.	25
Esquema 2. Síntese dos ligantes fenantrolinas modificados a partir dos precursores.	51
Esquema 3. Método <i>in-situ</i> das reações dos complexos de Eu(III) com ligantes DBM e diferentes fenantrolinas.	58
Esquema 4. Síntético dos complexos de Eu(III) com ligantes DBM e diferentes fenantrolinas.	59

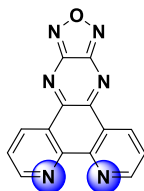
ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES



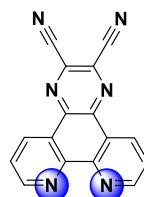
DBM
MM: 224,26 g/mol



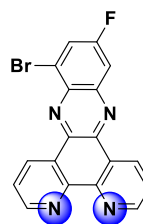
PH
MM: 332,41 g/mol



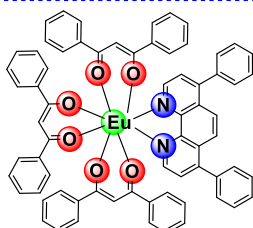
NON
MM: 274,24 g/mol



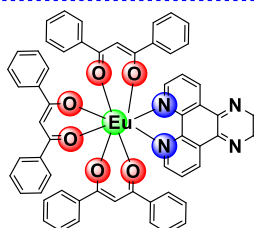
CN
MM: 282,27 g/mol



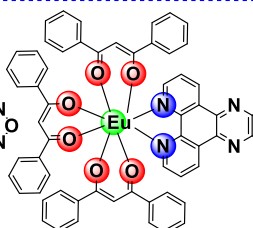
BrF
MM: 379,19 g/mol



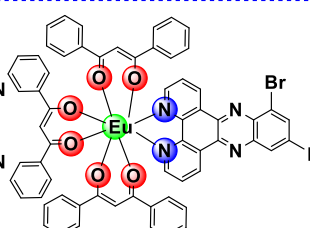
Eu(DBM)₃PH
MM: 1154,12 g/mol



Eu(DBM)₃NON
MM: 1095,96 g/mol



Eu(DBM)₃CN
MM: 1103,98 g/mol



Eu(DBM)₃BrF
MM: 1200,91 g/mol

RESUMO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE EU (III) COM LIGANTES DICETONA E DIFERENTES FENANTROLINAS: APLICAÇÕES ANTITUMORAIS E INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS. Nesta tese, foram sintetizados e caracterizados quatro complexos à base de Eu(III) com ligantes dibenzoilmetano (DBM) e diferentes fenantrolinas PH (4,7-difenil-1,10-fenantrolina); NON (*[1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina*); CN (*pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila*) e BrF (*10-bromo-12-fluorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina*). As caracterizações foram realizadas por meio de técnicas como difração de raios X, análise elementar (CHN), condutividade molar, susceptibilidade magnética e espectroscopia (UV-Vis, IV, RMN 1D e 2D, e fluorescência). A citotoxicidade dos ligantes e dos complexos foram avaliadas frente a linhagens celulares tumorais de pulmão (A549), próstata (DU-145), mama triplo negativa (MDA-MB-231) e ovário resistente à cisplatina (A2780cis), além de uma linhagem não tumoral de pulmão (MRC-5). Os complexos demonstraram elevada capacidade em afetar a viabilidade celular, equiparável ou superior à do fármaco padrão cisplatina. Dentre eles, destacaram-se os complexos Eu(DBM)₃PH e Eu(DBM)₃BrF, que apresentaram valores expressivos de IC₅₀ na linhagem A2780cis (0,850 µM e 3,57 µM, respectivamente) e índices de seletividade de 59,0 e 14,0, respectivamente. O mecanismo de morte celular para a linhagem A2780cis foi caracterizado como apoptótico, evidenciado por ensaios morfológicos, clonogênicos e de citometria de fluxo. Nos ensaios de citotoxicidade em modelos tridimensionais (3D), os complexos demonstraram capacidade de inibição do crescimento de esferoides tumorais. O complexo Eu(DBM)₃PH apresentou ação citostática, inibindo o crescimento celular já na menor concentração testada (0,78 µM). Por outro lado, o complexo Eu(DBM)₃BrF agiu de forma tanto dose como tempo dependente, inibindo o crescimento celular em 6,25 µM após 96 horas. Para investigar os possíveis alvos biomoleculares desses complexos,



foram realizados ensaios de interação com biomoléculas clássicas, como DNA e as enzimas Topoisomerasas. Em relação ao DNA, os complexos exibiram interação predominante no sulco menor, com destaque para o complexo Eu(DBM)₃PH, que apresentou capacidade de supressão de 84,4% do corante Hoechst 33258. Nos ensaios com a isoforma TOPOII α , todos os complexos, exceto Eu(DBM)₃CN, demonstraram atividade inibitória a 20 μ M. Além disso, a seletividade observada indicou que os complexos atuam como potenciais inibidores catalíticos da TOPOII, distinguindo-se de venenos da enzima, como a etoposídeo. Os complexos também demonstraram a capacidade de serem biologicamente transportados, apresentando constantes de ligação (K_b) intermediárias a fortes, na faixa de 10^5 a 10^6 , com a proteína sérica humana HSA. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial promissor dos complexos de Eu(III) com ligantes dicetonas e fenantrolinas no campo das aplicações antitumorais, evidenciando a seletividade e eficácia em modelos celulares tumorais.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF EU(III) COMPLEXES WITH B-DIKETONE LIGANDS AND DIFFERENT PHENANTHROLINES: ANTI-TUMOR APPLICATIONS AND INTERACTIONS WITH BIOMOLECULES.

In this work, four Eu(III)-based complexes were synthesized and characterized using the dibenzoylmethane (DBM) ligand and various phenanthrolines, PH (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline); NON ([1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pyrazino[2,3-f][1,10]phenanthroline); CN (pyrazino[2,3-f][1,10]phenanthroline-2,3-dicarbonitrile); and BrF (10-bromo-12-fluorodipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine). Characterization was performed using techniques such as X-ray diffraction, elemental analysis (CHN), molar conductivity, magnetic susceptibility, and spectroscopy (UV-Vis, IR, 1D and 2D NMR, and fluorescence). The cytotoxicity of the ligands and complexes was evaluated against tumor cell lines, including lung (A549), prostate (DU-145), triple-negative breast cancer (MDA-MB-231), and cisplatin-resistant ovarian cancer (A2780cis), as well as a non-tumor lung cell line (MRC-5). The complexes demonstrated high inhibitory activity, often comparable to or exceeding that of the standard drug cisplatin. Among the tested compounds, the Eu(DBM)₃PH and Eu(DBM)₃BrF complexes stood out, displaying remarkable IC₅₀ values of 0.850 μ M and 3.57 μ M, respectively, in the A2780cis cell line, with selectivity indices of 59.0 and 14.0, respectively. The mechanism of cell death in the A2780cis cell line was characterized as apoptotic, supported by morphological, clonogenic, and flow cytometry assays. In 3D cytotoxicity assays, the complexes demonstrated the ability to inhibit the growth of tumor spheroids. The Eu(DBM)₃PH complex showed cytostatic activity, preventing cellular growth even at the lowest tested concentration (0.78 μ M). Conversely, the Eu(DBM)₃BrF complex exhibited dose- and time-dependent behavior, inhibiting cell growth at 6.25 μ M after 96 hours. To investigate potential biomolecular targets, interaction studies were conducted with classical biomolecules such as DNA and



Topoisomerase enzymes. Regarding DNA, the complexes predominantly interacted with the minor groove, with Eu(DBM)₃PH achieving an 84.4% suppression of the Hoechst 33258 dye. In Topoisomerase II α (TOPOII α) inhibition assays, all complexes except Eu(DBM)₃CN showed inhibitory activity at 20 μ M. Moreover, the observed selectivity suggested that these complexes act as potential catalytic inhibitors of TOPOII, distinguishing themselves from enzyme poisons like etoposide. The complexes also demonstrated the ability to be biologically transported, showing intermediate to strong binding constants (K_b) in the range of 10^5 – 10^6 with human serum albumin (HSA). The obtained results in this thesis demonstrate the promising potential of Eu(III) complexes with diketone and phenanthroline ligands in the field of antitumor applications, highlighting their selectivity and efficacy in tumor cell models

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer e sua incidência.....	1
1.2. Metalofármacos como agentes antitumorais.....	3
1.3. Complexos de Eu (III), química e aplicações anticâncer.....	8
1.4. Planejamento estrutural, ligantes O'O'' e N'N''.....	16
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Solventes, Reagentes e Sínteses.....	28
3.2. Síntese dos ligantes	29
3.3. Síntese dos complexos	30
3.4. Métodos Instrumentais.....	32
3.4.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	32
3.4.2. Voltametria cíclica.....	32
3.4.3. Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível...	33
3.4.4. Análise via técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz	
(DLS)	33

3.4.5. Espectroscopia de Fluorescência	34
3.4.6. Rendimento Quântico Absoluto	34
3.4.7. Tempo de vida de Emissão (τ_{em})	35
3.4.8. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	35
3.4.9. Análise Elementar (CHN).....	35
3.4.10. Medidas de condutividade molar	35
3.4.11. Medidas de Susceptibilidade Magnética.....	36
3.4.12. Difração de Raios X de monocristal	37
3.4.13. Lipofilicidade (Coeficiente de partição log P).....	37
3.4.14. Estudos teóricos estruturais via TD-DFT e processos de transferências de energias	38
3.5. INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS	39
3.5.1. Interação com o ct-DNA via espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis).....	39
3.5.2. Interação com Albumina Soro Humano (HSA)	40
3.5.3. Ensaio de competição com Hoechst 33258	41
3.5.4. Interação com plasmídeo superenovelado (pUC19) via eletroforese	42
3.5.5. Inibição TOPO II α , II β e I β via eletroforese.....	42
3.5.6. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	43
3.5.7. Medidas de Viscosidade Relativa	43
3.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS	44
3.6.1. Linhagens celulares.....	44
3.6.2. Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT)	45

3.6.3.	Ensaio de sobrevivência clonogênica	45
3.6.4.	Ensaio de Morfologia celular campo claro e PI.....	46
3.6.5.	Ensaio de morfologia celular por fluorescência (Green plasma/DAPI)	46
3.6.6.	Ensaio ciclo celular	47
3.6.7.	Ensaio apoptose via citometria de fluxo	48
3.6.8.	Ensaio de cultura celular 3D	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1.	Sínteses e caracterizações dos ligantes	50
4.2.	Sínteses e caracterizações dos complexos	58
4.2.1.	Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV)	62
4.2.2.	Caracterizações via Ressonância Magnética dos Complexos	68
4.2.3.	Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV- Vis)	77
4.2.4.	Espectroscopia de Luminescência e dados Fotofísicos	82
4.2.5.	Descrição dos cristais obtidos por difração de raios X	85
4.2.6.	Cálculos teóricos, TD-DFT e energias de transferências L-M	88
4.2.7.	Estabilidade e verificação da emissão dos complexos em meio de cultura e tampão fosfato (PBS)	98

4.3. Análise da atividade citotóxica em modelos celulares 2D e 3D, e dos mecanismos de morte celular.....	105
4.4. Interações com biomoléculas por técnicas espectroscópicas, viscosidade e eletroforese.....	126
4.4.1. Ensaio de inibição das topoisomerases via eletroforese	136
4.4.2. Interação com a proteína albumina de sangue humano via fluorescência	140
5. Considerações Finais	145
6. CONCLUSÕES.....	149
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
8. APÊNDICE.....	162

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer e sua incidência

O câncer perfaz um conjunto de mais de cem doenças, que são caracterizadas por sua heterogeneidade, exibir diferentes origens e levar a diversos prognósticos. Essa problemática não é nova, as evidências mais antigas da doença foram encontradas em restos mortais de uma mulher egípcia de 4.200 anos, se tratando de uma doença tão antiga não é surpresa o surgimento de vários tratamentos ao decorrer da história^{1,2}.

Com a evolução da sociedade, observa-se que o câncer também se adaptou, e diversos fatores contribuem para os elevados índices de incidência e mortalidade a cada ano. Entre esses fatores, destacam-se a herança genética, mutações genéticas ou epigenéticas associadas à doença, além da idade, uma vez que as pessoas estão vivendo mais e, conseqüentemente, podem desenvolver a enfermidade. Fatores externos, como hábitos de vida, também desempenham um papel importante, incluindo o tabagismo, o abuso de álcool, dietas inadequadas e exposições naturais ou ocupacionais a um determinado ambiente².

O impacto do câncer em nível mundial em 2020 foi alarmante, com um total de 19,3 milhões de novos casos registrados, de acordo com o Global Cancer Observatory e a International Agency for Research on Cancer. Estima-se que um em cada cinco indivíduos desenvolverá a doença ao longo da vida. Os dez tipos de câncer mais comuns representam 60% do total de novos casos. Entre eles, destacam-se o câncer de mama feminino, com 11,7% (2,3 milhões), seguido pelo câncer de pulmão (11,4%, 2,2 milhões), câncer de cólon e reto (10%, 1,9 milhão), câncer de próstata (7,3%, 1,4 milhão) e câncer de pele não melanoma, com 6,2% (1,2 milhão). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, no triênio de 2023 a 2025, ocorrerão aproximadamente 704 mil novos casos.³

Mas o que explica a alta incidência e as mortes causadas pelo câncer a cada ano? A resposta está na característica marcante dessa doença: a "metástase". Trata-se da capacidade das células cancerosas de formar tumores secundários em tecidos ou órgãos adjacentes ou até mesmo a longas distâncias. Embora os mecanismos envolvidos na metástase ainda sejam pouco compreendidos, essa propriedade é frequentemente vista como uma das principais falhas das terapias anticâncer, contribuindo para as elevadas taxas de mortalidade, que ultrapassam 90% em alguns casos. O desenvolvimento da metástase envolve um processo complexo e ainda pouco compreendido. Onde células tumorais precisam deixar seu ambiente primário, circular pela corrente sanguínea, suportar a pressão dos vasos sanguíneos, adaptar-se a um novo sistema celular secundário (um processo chamado extravasamento) e, por fim, escapar da ação do sistema imunológico, para então se desenvolverem em um novo local.⁴ Fig 1.

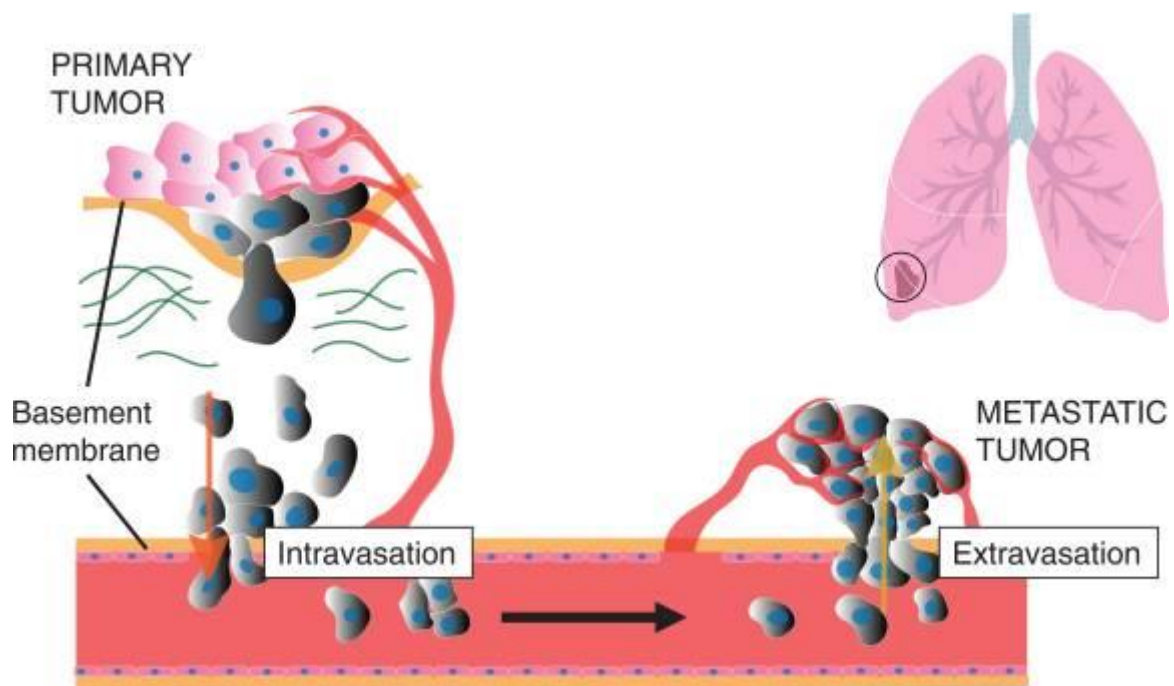


Figura 1. Processo de metástase aonde às células tumorais invadem a matriz extracelular, entram na corrente sanguínea, extravasam e invadem tecidos vizinhos ou a longas distâncias. Adaptado de Sergi⁵.

Com base nas informações apresentadas até o momento, a melhor forma de prevenir o desenvolvimento acentuado dessas células é por meio de diagnósticos rápidos e no investimento em pesquisa de novos fármacos e terapias eficazes no combate à proliferação tumoral. Nesse sentido, tem-se observado avanços significativos nos tratamentos para diferentes estágios da doença, incluindo cirurgia, radioterapia, imunoterapia, terapia hormonal, transplante de medula óssea e quimioterapia. Os tratamentos clássicos, como cirurgia, radioterapia e a administração de fármacos quimioterápicos, continuam a ser fundamentais na luta contra o câncer.

Dado o objetivo deste trabalho, dará se ênfase à quimioterapia, que envolve o desenvolvimento de compostos com atividade antitumoral. Um dos marcos que trouxe destaque à química inorgânica na oncologia foi a descoberta das propriedades anticancerígenas da cisplatina pelo Dr. Barnett Rosenberg em 1965. No entanto, a cisplatina só foi introduzida como agente quimioterápico em 1978. Desde então, tem sido amplamente utilizada no tratamento de diversas neoplasias malignas, incluindo cânceres de ovário, colo do útero, testículo, cabeça e pescoço, além de outros tumores sólidos⁵.

1.2. Metalofármacos como agentes antitumorais

Os metalofármacos têm sido utilizados há séculos, mas somente com os avanços recentes em metodologias e técnicas, tornou-se possível avaliar e caracterizar de forma mais precisa os possíveis mecanismos de ação desses compostos. A quimioterapia moderna teve início com a descoberta das propriedades do 3-amino-4-hidroxifenil-As^{III}, conhecido como Salvarsan, no tratamento da sífilis, e posteriormente com as propriedades antitumorais da cisplatina. Desde então, compostos à base de metais têm sido aplicados em um amplo espectro de terapias, incluindo agentes anticâncer, antimicrobianos e antivirais. No entanto, apenas

uma pequena parte desses compostos alcança sucesso em testes clínicos e posteriormente sua disponibilidade nas prateleiras⁶.

Uma das principais causas do insucesso nos tratamentos é a presença de efeitos colaterais severos aos pacientes. Por exemplo, a cisplatina apresenta diversos efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e hematológica, dentre outros, o que infelizmente reduz a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento⁵. Um dos maiores problemas da cisplatina é sua falta de especificidade, ou seja, ela age tanto em células tumorais quanto em células saudáveis. Para melhorar essas limitações, houve uma mudança no design dos complexos propostos, resultando no desenvolvimento dos complexos à base de Pt^{2+} , conhecidos como compostos de segunda geração. Fig 2.

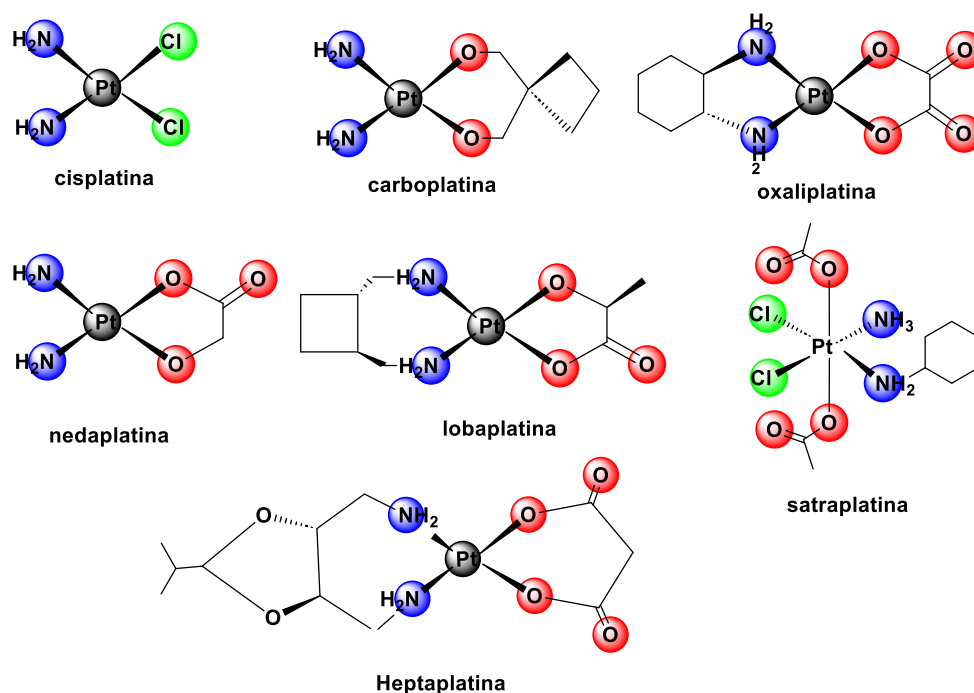


Figura 2. Complexos a base de Pt (II) aprovados para tratamentos contra o câncer. Destaca-se a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina aprovados no mundo inteiro. Nedaplatina (Japão), lobaplatina (China), heptaplatina (Coréia do Sul) e satraplatina (em testes clínicos)^{7,8}.

As mudanças estruturais buscavam diminuir a reatividade da cisplatina, propriedade contrastada na falta de especificidade celular. Resumidamente, o mecanismo de ação da cisplatina envolve a formação de uma espécie $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, que se liga covalentemente às bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA), especificamente nas bases guanina e adenina, formando adutos covalentes intra fita 1,2- ou 1,3-. Esses adutos DNA-Pt (II), resultam na interrupção da replicação do DNA e, conseqüentemente, na inibição da transcrição, parada do ciclo celular, tentativa de reparo do DNA e por fim, apoptose, que é a morte celular programada^{5,7}.

Todos esses processos têm origem em uma parte fundamental do complexo, os ligantes cloretos. No meio intracelular, que possui baixas concentrações de Cl^- , esses ligantes atuam como grupos abandonadores, resultando na formação de um aqua-complexo reativo. Com base nesse conceito, pesquisas sobre fármacos anticâncer à base de platina concentraram-se na substituição dos ligantes cloretos por outros menos lábeis, buscando modular a citotoxicidade associada à cisplatina (Fig. 2). Um exemplo é a carboplatina (aprovada em 1989), que incorpora um anel quelato do tipo dicarboxilato, proporcionando maior estabilidade ao complexo e exibindo menos toxicidade, além de reduzir efeitos colaterais como ototoxicidade (danos aos ouvidos) e nefrotoxicidade (danos aos rins)⁸.

Outro destaque é o complexo satraplatina, cuja vantagem é a administração oral, o que é mais conveniente para o paciente e reduz os custos do tratamento. O composto possui platina na forma Pt^{4+} , que, ao entrar na corrente sanguínea, é reduzida para Pt^{2+} por meio de proteínas redox, formando o complexo ativo. Atualmente, este fármaco está em fase de testes clínicos para diversos tipos de câncer^{7,8}.

No entanto, um dos grandes desafios enfrentados pelos metalofármacos à base de platina é a resistência intrínseca ou adquirida aos tratamentos. Estudos mostram que mesmo as terapias mais eficazes perdem sua eficácia ao longo do tratamento, o que torna imprescindível a pesquisa contínua sobre os

mecanismos de ação desses complexos. Nesse contexto, a terapia combinada, ou “coquetel”, que envolve a administração de dois ou mais medicamentos, tem se mostrado uma abordagem promissora. O efeito aditivo de diferentes agentes resulta em mecanismos de ação variados, como alvos biomoleculares e diferentes vias metabólicas⁷.

Além dos amplamente estudados complexos à base de platina, os complexos metálicos de rutênio também ganharam destaque na terapia anticâncer desde a década de 1990. Uma das principais vantagens dos complexos à base de rutênio é sua eficácia contra metástases, além de seu amplo espectro de ação contra diversos tipos de câncer. Entre os complexos de rutênio mais promissores ou já não mais, estão o NAMI-A, o KP1019 e o NKP-1339, sendo que apenas o último permanece em fases de testes clínicos nos EUA para o tratamento de câncer de pâncreas, gástrico e colorretal.². Fig 3.

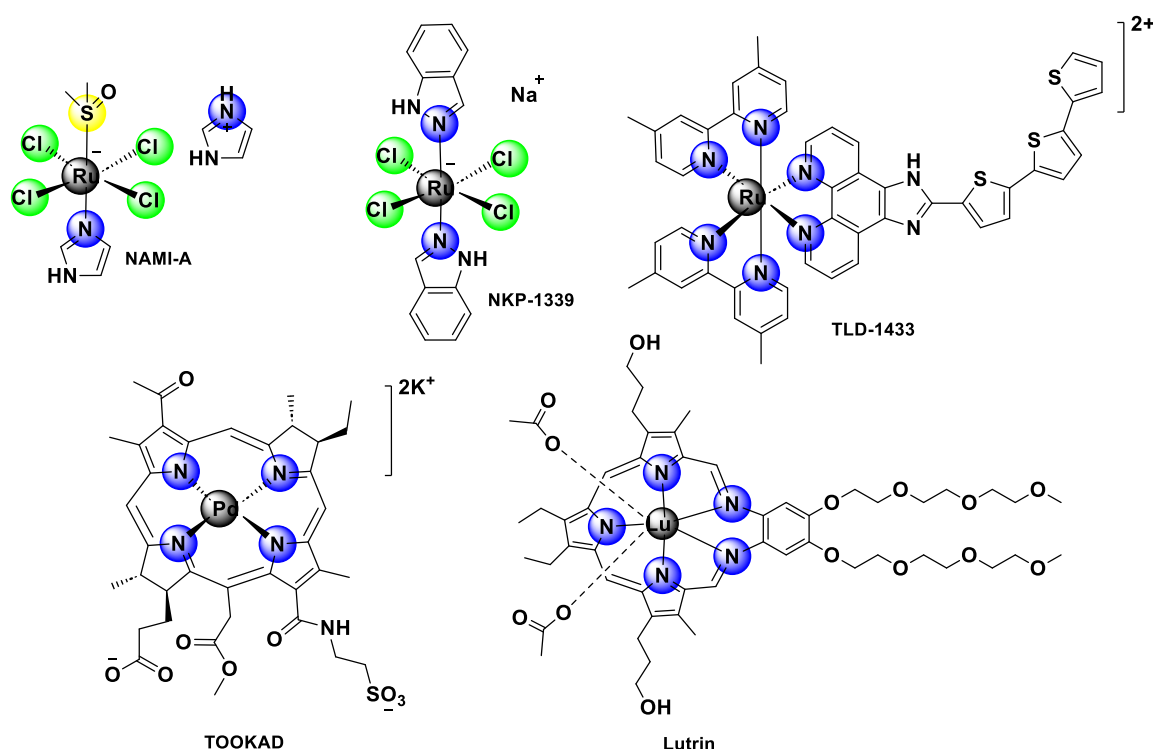


Figura 3. Complexos aprovados para testes clínicos como quimioterápicos, exceto o NAMI-A que não alcançou os resultados esperados.

Outra área que tem recebido bastante atenção nos últimos anos é a fototerapia, voltada para o desenvolvimento de espécies com propriedades fotossensibilizantes. Esses complexos são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS, Reactive Oxygen Species), que induzem a morte celular após serem ativados pela luz. A grande vantagem dessa terapia é o controle preciso sobre onde o fotossensibilizante atuará, pois, a luz é direcionada apenas ao tecido onde o tumor está se desenvolvendo. Isso resulta em uma significativa redução dos efeitos colaterais, uma vez que, normalmente, esses complexos não apresentam citotoxicidade sem a exposição à luz².

A Terapia Fotodinâmica (PDT do inglês photodynamic therapy) é um tratamento em duas etapas, no qual um agente fotossensibilizador (PS = photosensibilizer) é administrado de forma tópica ou intravenosa. Após algumas horas ou dias, a área a ser tratada é irradiada com luz de um comprimento de onda específico. Como a luz precisa penetrar em camadas mais profundas dos tecidos, a luz vermelha é geralmente a escolhida, o que torna essencial que as espécies fotossensibilizadoras tenham propriedades de absorção nessa faixa de luz. A luz atua como agente ativador da molécula fotossensível, que, em seu estado tripleto excitado, transfere energia para moléculas de oxigênio, gerando oxigênio singlete altamente reativo ($^1\text{O}_2$) nas células tumorais. Esse processo desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS = reactive oxygen species) em cascata, que reagem com componentes celulares, levando à vasoconstrição, agregação plaquetária, coagulação e, finalmente, à oclusão vascular do tumor⁷.

É importante destacar fotossensibilizadores promissores na área, como o TLD-1433, TOOKAD e o Lutrin (Fig. 3). O complexo mononuclear tris(polipiridil) de rutênio (II) demonstra um forte efeito dinâmico quando excitado a 530 nm, apresentando significativa atividade contra neoplasias de cólon e tumores cerebrais do tipo glioma em estudos *in vitro*. Em testes *in vivo*, utilizando modelos de camundongos tratados com células de carcinoma de cólon murino CT26.WT e TLD-1433, a fotossensibilização resultou em uma destruição tumoral

significativa, além de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais. O TLD-1433 se encontra em Fase II de testes clínicos para pacientes com câncer muscular de bexiga não invasivo².

Complexos à base de lantanídeos são amplamente aplicados na Terapia Fotodinâmica (PDT), pois a conversão intersistemas de seus estados tripleto são facilitadas pelo efeito do átomo pesado. Uma vasta gama de complexos com esses metais, associados a ligantes como porfirinas ou seus análogos, estão sendo desenvolvidas. Um exemplo é o complexo de lutécio com ligante do tipo texafirin (Lutrin), que atualmente se encontra na fase I de testes clínicos para o tratamento de câncer de próstata¹. Desses PS comentados até o momento somente o TO-OKAD se encontra aprovado em todos os testes e comercializado para o tratamento de câncer de próstata localizado, nos E.U.A., Israel e Europa (Fig 3). Por fim, para acompanhar em que fase de testes clínicos desses e outros metalofármacos, basta acessar a base de dados National Clinical Trials (<https://www.clinicaltrials.gov/>)⁶.

1.3. Complexos de Eu (III), química e aplicações anticâncer

Como já mencionado, os compostos terapêuticos à base de metais possuem características e vantagens únicas, oferecendo uma versatilidade estrutural e eletrônicas notáveis. Esses compostos apresentam uma ampla gama de estados de oxidação, geometrias de coordenação e a capacidade de modificar ligantes na esfera de coordenação. Os complexos metálicos muitas vezes atuam como pró-fármacos, ou seja, são ativados ao longo de seu percurso ou diretamente no local alvo. Essa ativação pode envolver a dissociação ou substituição de ligantes lábeis, como no caso da cisplatina, a abertura de anéis quelatos ou mudanças no estado de oxidação, tanto do metal quanto dos ligantes. Além disso, estímulos externos, como luz ou outros tipos de radiação, também podem ser utilizados para ativar seletivamente os metalofármacos no local desejado⁶.

Um dos grupos que atualmente veem recebendo notoriedade por apresentarem várias dessas vantagens são os dos lantanídeos, esses metais apresentam propriedades físico e químicas diferentes até mesmo dos metais de transições externa. Por exemplo, esses possuem excelentes estabilidades redox Ln (III) (Ln = Lantanídeos), que os tornam altamente adequados para aplicações celulares na presença de moléculas biológicas redutoras como ascorbatos e tióis, além disso possuem propriedades luminescentes únicas provindas de transições como transferência de carga $4f \leftrightarrow 5d$ e $f \leftrightarrow f$ ¹.

Não é de hoje que os lantanídeos têm papéis fundamentais em áreas como de diagnósticos e terapias. Os complexos a base de gadolínio, como ácido gadopentético, conhecido como Magnevist e o ácido gadotérico (Artirem), tem papéis fundamentais na área de ressonância magnética por imagem (MRI = magnetic resonance imaging). Outras formas como nanopartículas a base desses metais vem sendo promissores agentes de imagens para diferentes tipos de câncer. No entanto, as aplicações biomédicas desses tipos de compostos vão muito além de seu uso como agentes terapêuticos e de imagem de rotina contra o câncer¹.

Embora os metais da série compartilhem propriedades semelhantes, como raios atômicos e a formação de complexos isoestruturais e isoeletrônicos, o foco será dado ao íon Európio (III), escolhido para o desenvolvimento dos complexos abordados neste estudo e suas posteriores aplicações.

O íon trivalente de Európio (III) exibe uma fluorescência intensa na faixa do vermelho após excitação no UV-Vis. Essa fotoluminescência é potencializada quando o íon está coordenado a ligantes orgânicos, efeito conhecido como “antena”, que será discutido mais adiante. A luminescência do Eu (III) é amplamente estudada em várias áreas, como no desenvolvimento de matrizes poliméricas, vidros sol-gel, cristais líquidos e redes cristalinas metal-orgânicas (MOFs, metal-organic frameworks), entre outras⁹.

O íon Eu (III) possui 60 elétrons, dos quais 6 estão desemparelhados nos orbitais 4f. Esses orbitais estão em uma camada mais interna e são protegidos

pelos orbitais $5s^2$ e $5p^6$. Devido a essa maior proteção, as interações entre os orbitais do íon e dos ligantes têm um caráter altamente eletrostático, exercendo apenas mudanças conformacionais e deformações de densidades eletrônicas ao redor do metal que podem favorecer o relaxamento de transições proibidas. Por exemplo, enquanto a fluorescência dos complexos de metais de transição se manifesta em bandas largas devido à forte sobreposição covalente entre o metal e ligante, os complexos de európio exibem emissões finas e características, provenientes das transições radiativas entre estados de energia do próprio metal, como as transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$

Os mecanismos de transferência ou efeito “antena” entre ligante e metal ocorrem de três maneiras:

a) O estado excitado S_1 do ligante transfere energia não radiativa para um estado excitado de maior energia do metal ($|4\rangle$), que decai não radiativamente populando o estado emissor de menor energia ($|2\rangle$), e este, por sua vez, decai radiativamente para o estado fundamental;

b) Similar ao primeiro mecanismo, ocorre uma retro transferência para o estado tripleto do ligante (T_1), que então transfere energia para os estados $|3\rangle$ ou $|2\rangle$ do Eu (III), resultando no decaimento radiativo para o estado fundamental;

c) Há um decaimento não radiativo do estado S_1 para o estado T_1 no ligante via cruzamento intersistemas, que transfere a energia para os estados $|3\rangle$ ou $|2\rangle$, os quais, por fim, decaem radiativamente para o estado fundamental do íon metálico. Esse processo é o mais comum para o Eu (III) e caracterizado como efeito “antena”¹⁰. Fig 4.

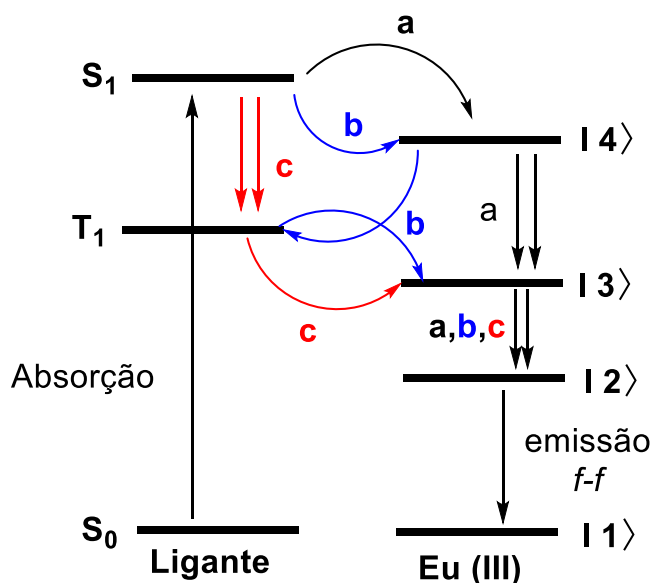


Figura 4. Resumo dos mecanismos de transferências de energias entre ligantes e Eu(III) ^{11,12}.

Em teoria são esperadas sete transições do tipo $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ onde J é referente ao número quântico angular total que indica a orientação do spin e o momento angular total. Os possíveis valores de J são $L + S$ (L = número quântico referente ao momento angular do orbital e S = número quântico de spin total), $L + S$, $L + S - 1$, $L + S - 2$, ..., $|L - S|$. Então para um termo 7F ($L = 3$ e $S = 3$) de menor multiplicidade para o Eu(III) só são possíveis os seguintes valores de $J = 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0$, a maioria dessas transições são regidas por dipolo elétrico induzido. A transição de dipolo elétrico ocorre como consequência da interação do íon de európio (III) com o ambiente ao seu redor, como os ligantes que tem a capacidade de distorcer a simetria e relaxar regras de paridades, como a de Laporte, quando as transições de mesma paridade, ou seja, $f-f$ são proibidas. Por fim um resumo dessas transições são dadas na tabela 1⁹.

Tabela 1. Resumos das transições, intervalos, intensidades e quando essas transições devem ocorrer para complexos de Eu (III) luminescentes¹⁰

Transição	Tipo de dipolo*	Intervalo (nm)	Intensidade**	Observações
$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	DE	570-585	mfr a for	Para simetrias do tipo C_n , C_{nv} , e C_s
$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	DM	585-600	for	Independente do ambiente simétrico
$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	DE	610-630	for a mfor	Hipersensível, dependente do ambiente
$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	DE	640-660	mfr a fr	Transição proibida.
$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	DE	680-710	m a for	Dependente do ambiente, mas não hipersensível
$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	DE	740-770	mfr	Transição proibida
$^5D_0 \rightarrow ^7F_6$	DE	810-840	mfr a m	Raramente medida e observada

* DE = dipolo elétrico magnético induzido; DM= transição por dipolo magnético.

** mfr = muito fraca; fr = fraca; m = média; for = forte e mfor = muito forte

Devido a essas propriedades, especialmente no que se refere à luminescência, os complexos de európio têm desempenhado um papel fundamental no diagnóstico e no combate ao câncer. Eles podem exibir propriedades teranósticas, ou seja, podem ser desenvolvidos como metalofármacos que são simultaneamente citotóxicos e atuam como sondas fluorescentes.

Com base nas propriedades do íon de európio (III), Dasari e colaboradores têm desenvolvido uma série de complexos com potenciais aplicações teranósticas. Um dos complexos estudados, que possui ligantes do tipo dpq (dipyrido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina) e 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona, apresentou dados fotofísicos ideais para uso como bio-sondas. Entre as principais características observadas estão o alto rendimento quântico, o longo tempo de meia-vida e a fotoestabilidade, permitindo a visualização da internalização do complexo tanto no citosol quanto no núcleo celular. Além disso, foi identificada uma interação do complexo com o DNA, incluindo intercalação nos sulcos e

parcial intercalação na dupla hélice pelos anéis do ligante planar dpq. (Fig. 5a)¹¹. Em outro estudo, focado em complexos bimetálicos de európio com ligantes terpiridinas e ácido tolfenâmico, o mesmo grupo de pesquisadores demonstraram a atividade anticâncer dos complexos através da terapia fotodinâmica (PDT), ao mesmo tempo em que exploraram a fluorescência característica do európio para estudar o modo de ação dos complexos. (Fig. 5b). Essas descobertas ressaltam o potencial desses complexos como agentes terapêuticos e diagnósticos na área oncológica¹².

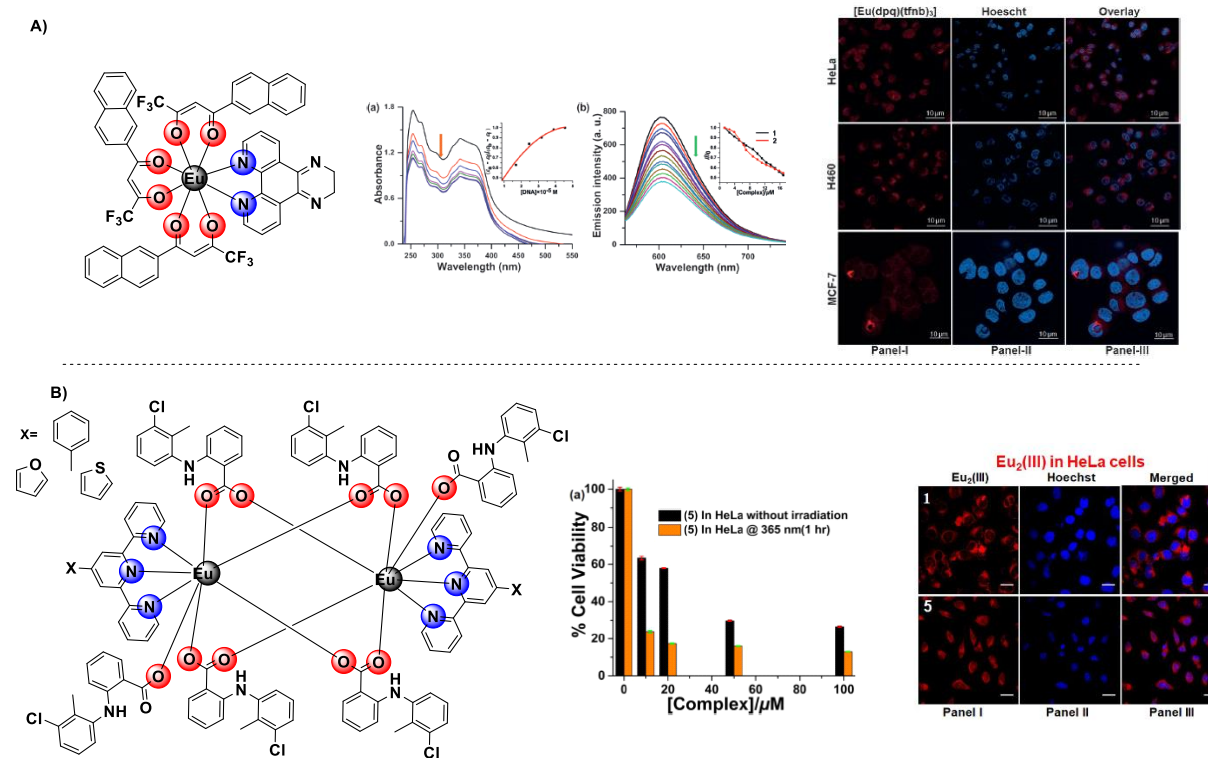


Figura 5. a) Complexo de európio (III) com ligantes do tipo dicetona e fenantroline, ilustrando a capacidade de interagir com biomoléculas como o DNA, além de destacar as propriedades fluorescentes do complexo, que permitem sua utilização como sonda fluorescente. b) Complexos bimetálicos de európio (III) com ligantes terpiridinas e ácido tolfenâmico, que demonstram atividade fotodinâmica (PDT) contra células HeLa após exposição à luz de 365 nm por 1 hora. Além disso, esses complexos possuem a capacidade de atuar como sondas fluorescentes,

proporcionando uma dupla funcionalidade terapêutica e diagnóstica. Adaptado de Dasari e colaboradores^{11,12}.

Devido à grande versatilidade estrutural que os complexos à base de európio oferecem, Chandra e colaboradores desenvolveram um sistema heterobimetalico, combinando a fluorescência do Eu(III) com a capacidade de formação de ligações covalentes dos complexos de platina, como o *cis*-PtCl₂(DMSO). Estudos iniciais demonstraram que esse complexo pode se ligar covalentemente ao DNA no meio intracelular. A internalização do complexo até o núcleo foi evidenciada pela fluorescência característica do európio, possibilitando o monitoramento de sua localização e interação com o DNA¹³. Fig 6.

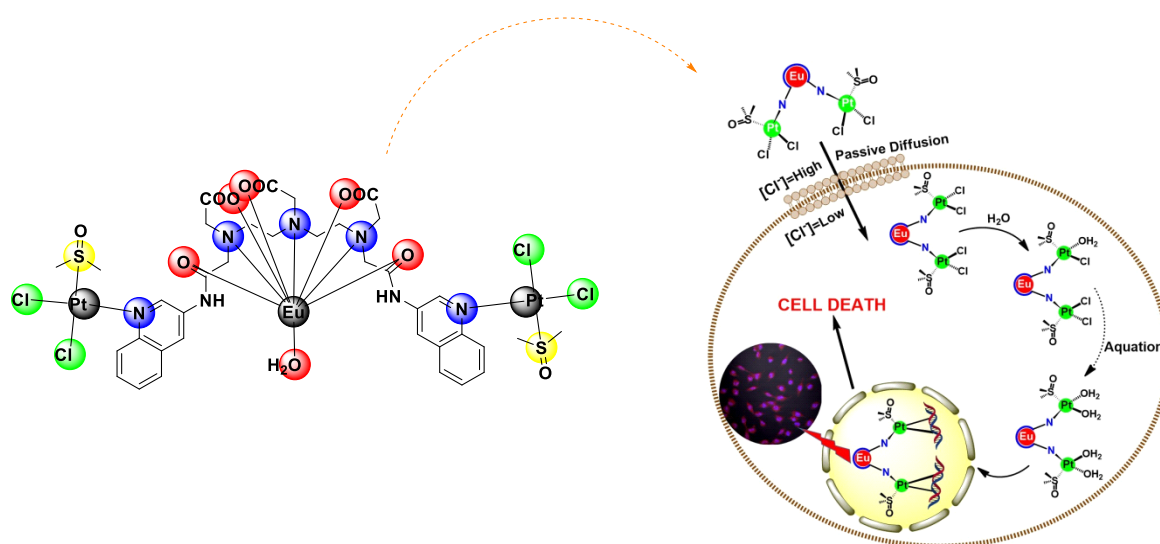


Figura 6. Mecanismo de ação do complexo Eu-Pt2, desenvolvido por Chandra e colaboradores. Ativação do aqua complexo de platina no meio intracelular e ligação covalente ao DNA, internalização celular fora verificada via microscopia con-focal por fluorescência¹⁵.

A capacidade de transporte do complexo à base de európio também foi investigada por Li e colaboradores, que desenvolveram um sistema de pró-fármaco fotoativado. Nesse caso, a parte responsável pela atividade anticâncer

deriva de um complexo de rutênio(II) constituído por ligantes bipyridinas, que, ao ser irradiado com luz de 488 nm, promove a quebra da ponte Eu-ciclono. É interessante observar que, no escuro ou sem exposição à luz, o complexo não apresenta citotoxicidade significativa. No entanto, quando exposto à luz, os valores de IC_{50} caem drasticamente de 277 para 32,5 μM na linhagem celular HeLa. Em testes *in vivo* em linhagem tumoral do tipo cólon (SW480) via xenotransplante em camundongos, o complexo, ao ser irradiado no comprimento de onda mencionado, mostrou uma redução significativa no volume tumoral em comparação ao composto não irradiado de 26,8% para 77,3%, respectivamente¹⁴. Fig 7.

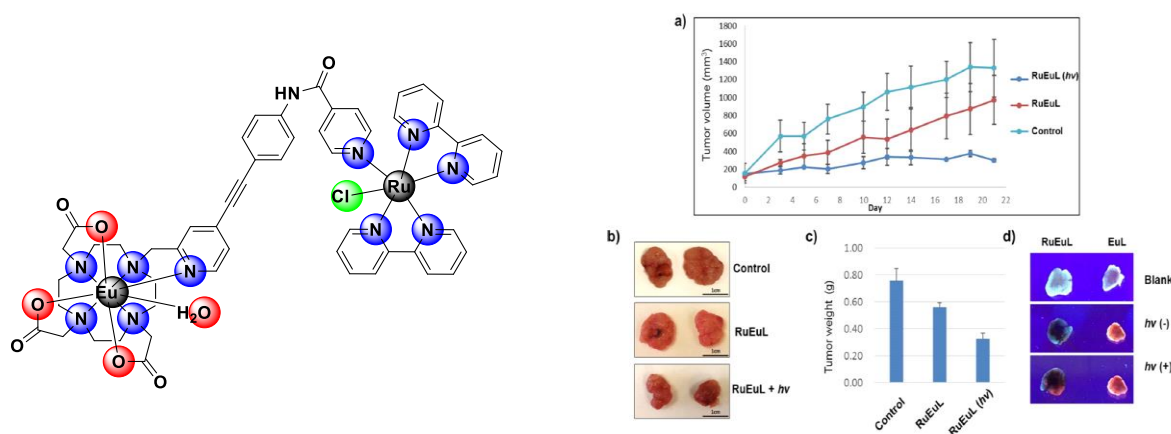


Figura 7. Inibição do crescimento tumoral induzida por luz *in vivo* (a–c) e (d). efeito de RuEuL (com ou sem ativação por luz azul) na inibição do crescimento tumoral em camundongos xenotransplantados com células tumorais SW480. Quando os tumores atingiram um volume médio de 180 mm³, os camundongos foram randomizados em três grupos experimentais diferentes. Os camundongos receberam (i) solução salina a 0,9%, (ii) 40 μg do complexo RuEuL, ou (iii) 40 μg de RuEuL ativado por luz azul de 488 nm (RuEuL + hv) duas vezes por semana via injeção intratumoral. Três vezes por semana, os volumes tumorais foram medidos e calculados usando a fórmula (comprimento $\times$ largura²)/2. No dia 21, os camundongos foram sacrificados e seus tumores foram coletados e pesados. (a) volume tumoral, (b) imagens representativas dos tumores e (c) peso dos tumores. (d) Imagem da ativação por luz azul de RuEuL e EuL (controle)¹⁴.

1.4. Planejamento estrutural, ligantes O'O" e N'N"

Diante do discutido até o momento, o design dos complexos abordados neste trabalho teve dois principais objetivos: desenvolver compostos com alta capacidade anticâncer e explorar suas propriedades de fluorescência no meio celular, permitindo uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação. Para isso, a escolha dos ligantes foi cuidadosamente planejada, levando em consideração possíveis efeitos sinérgicos que otimizem tanto a atividade terapêutica quanto o comportamento luminescente dos complexos no ambiente celular.

Como já mencionado, a química de coordenação do íon Eu(III) apresenta um forte caráter eletrostático, classificando-o como um ácido duro, de acordo com a teoria ácido-base de Pearson¹⁵. Dessa forma, a escolha dos ligantes auxiliares foi estrategicamente orientada para proteger a esfera de coordenação do íon, contra interações indesejadas, como a ligação com moléculas de água. Essas moléculas, que atuam como bases duras de Pearson através do átomo de oxigênio, são conhecidas por desativar a fluorescência via acoplamento vibracional. Assim, a proteção contra essas interações é essencial para preservar as propriedades luminescentes do complexo^{11,16}.

No caso dos complexos à base de lantanídeos, os ligantes do tipo β -dicetonas são amplamente utilizados, pois fornecem ligações altamente estáveis devido ao seu caráter aniônico após a desprotonação do equilíbrio ceto-enólico. Essa estabilidade é crucial para manter a integridade do complexo e garantir suas propriedades (Fig 8a).

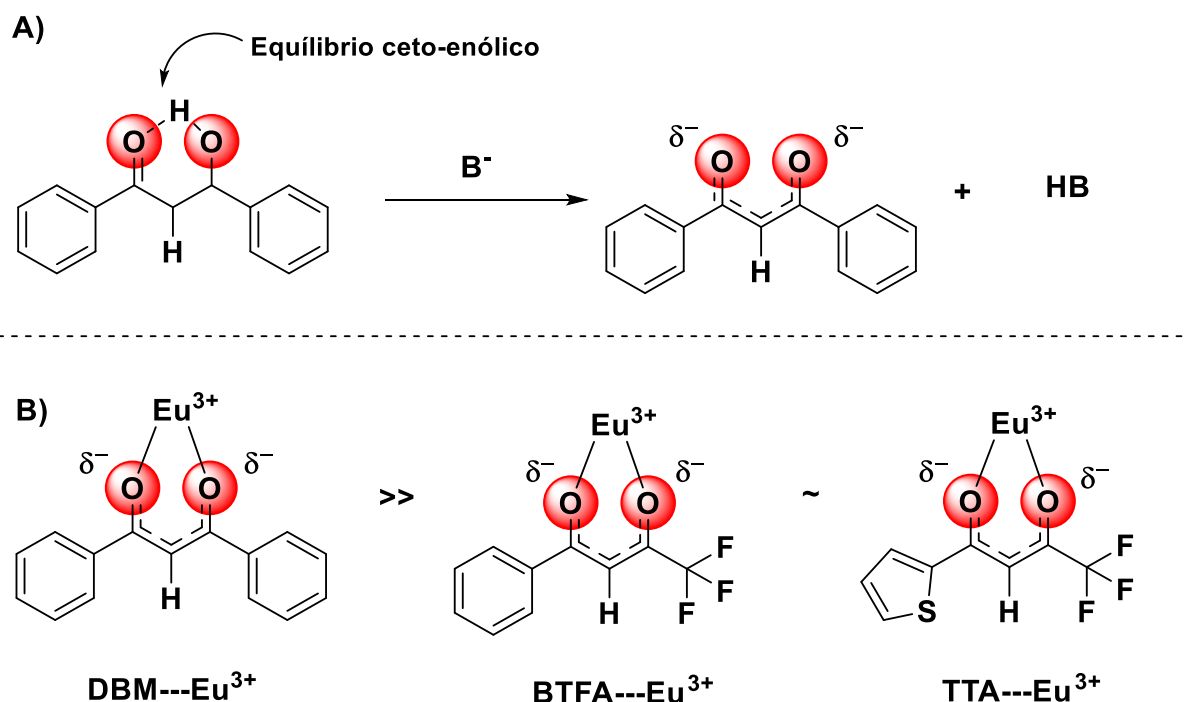


Figura 8. a) Desprotonação do equilíbrio ceto-enólico por meio de uma base do ligante 1,3-difenilpropano-diona (DBM) antes da coordenação. b) Forças de ligações M-L de diferentes β -dicetonas frente ao Eu (III) onde DBM = 1,3-difenilpropano-diona ou dibenzoilmetano; BTFA = 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona e TTA = 1-(2-tenoil)-3,3,3-trifluoroacetona. Adaptado de Nathalia e colaboradores¹⁷.

Os substituintes presentes nesses ligantes também influenciam significativamente na coordenação. Por exemplo, grupos retiradores de densidade eletrônica, como o flúor, tendem a formar ligações metal-ligante (M-L) mais fracas quando comparados a substituintes fenílicos. Isso ocorre porque há uma redução da densidade eletrônica no grupo carbonílico (C=O), diminuindo a capacidade de doação de elétrons do ligante para o metal e consequentemente a força de ligação¹⁷. Fig 8b.

Manter ligantes estáveis na esfera de coordenação dos lantanídeos é crucial, uma vez que a disponibilidade de íons de lantanídeos pode levar à competição com o cálcio [Ca (II)] em sistemas biológicos. Essa competição ocorre devido à notável similaridade entre esses íons em termos de raio iônico (85-106

pm do La ao Lu (III) e 86 pm para o cálcio) e ligações de caráter eletrostáticas, o que pode resultar em inibições do cálcio em diversas moléculas, proteínas, enzimas e processos celulares^{18,19}.

Outro papel fundamental desses ligantes, como as β -dicetonas, é promover a formação de complexos neutros na proporção 3:1 [β -dicetona/Eu(III)]. Essa característica é essencial para facilitar a difusão passiva dos compostos através de membranas celulares, já que complexos neutros apresentam maior lipofili- cidade em comparação com aqueles que possuem carga. A maior lipofilicidade permite que esses complexos interajam de forma mais eficaz com a bicamada li- pílica das membranas, o que pode aumentar a sua biodisponibilidade e facilitar sua internalização em células. Esse fator é particularmente importante no desen- volvimento de metalofármacos, onde a eficiência de transporte e absorção celular influencia diretamente na eficácia terapêutica²⁰.

A eficácia terapêutica está intrinsecamente associada à capacidade de um composto estabelecer interações específicas com biomoléculas envolvidas nos processos de replicação de células neoplásicas. Nesse contexto, o DNA (ácido desoxirribonucleico) destaca-se como uma biomolécula alvo de particular inte- resse, dado seu papel central na regulação e início dos processos de replicação celular. A interação direta com o DNA pode interferir em mecanismos de divisão celular, o que o torna uma via promissora para o desenvolvimento de novas estra- tégias terapêuticas, especialmente no tratamento de câncer.

Conforme discutido anteriormente, a cisplatina tem como principal alvo o DNA, e seu mecanismo de ação é mediado por ligações covalentes com as bases nitrogenadas (ver tópico 1.3). No entanto, células tumorais podem desen- volver resistência ao fármaco, seja de forma intrínseca ou ao longo do tratamento. Para superar essas resistências, uma abordagem eficaz envolve a exploração de diferentes tipos de interações com o DNA. Entre elas, a intercalação entre as fitas duplas da molécula de DNA também é alvo de bastante pesquisa, pois causa danos estruturais irreversíveis, como fortes torções angulares. Essas alterações

estruturais comprometem funções essenciais da molécula, como a transcrição, replicação e o reparo da dupla hélice, bloqueando assim a proliferação celular tumoral²¹⁻²³. Fig 9b.

Diante disso, um dos ligantes selecionados para compor a esfera de coordenação dos complexos estudados são os derivados da 1,10-fenantrolina. Esses ligantes possuem uma configuração estrutural altamente planar, com anéis aromáticos que facilitam a intercalação com o DNA, resultando na formação de adutos estáveis. A estabilidade dessas interações é atribuída à redução da energia resultante das transições entre os orbitais do intercalador e as bases nitrogenadas do DNA, um fenômeno favorecido pelos empilhamentos π - π entre as duas espécies moleculares²⁴.

Entre as interações não covalentes, além da metalintercalação, destacam-se as interações nos sulcos do DNA (Fig. 9a) e as metalinserções (Fig. 9c)²⁵.

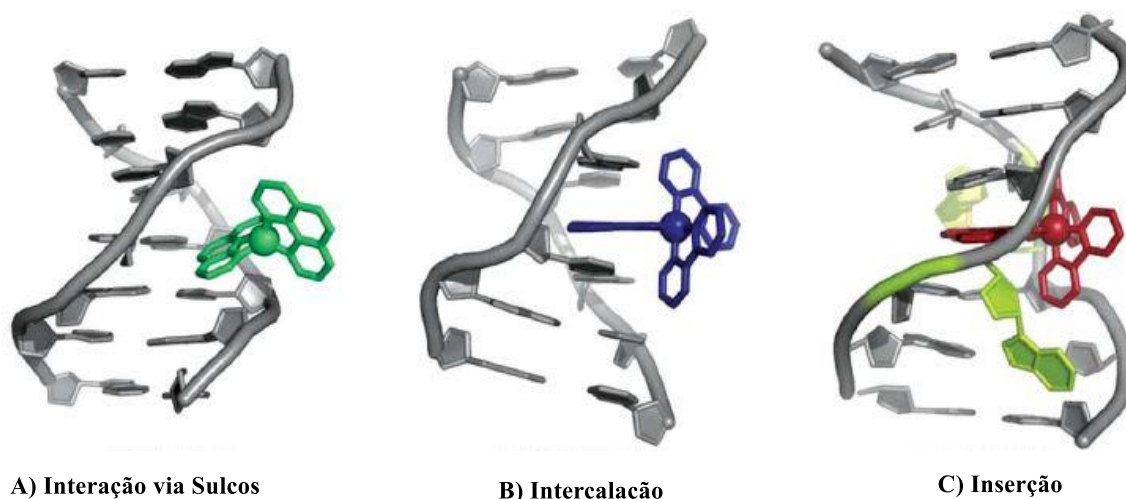


Figura 9. Exemplificando os três modos de interação possíveis para complexos metálicos com a biomolécula de DNA. a) Interações via Sulcos, b) Intercalação e c) Inserção. Adaptado de Zeglis e colaboradores²⁷.

A intercalação foi inicialmente postulada por Lerman, que sugeriu que uma molécula poderia interagir com a hélice do DNA, causando a separação

e o deslocamento de um par de bases²⁶. Embora Lerman estivesse se referindo a ligantes orgânicos, como as acridinas, o conceito pode ser facilmente aplicado aos complexos metálicos. Semelhante aos intercaladores, os insertores possuem um ligante aromático planar que se insere entre as bases do DNA. No entanto, enquanto os metalointercaladores desenrolam o DNA e inserem seu ligante planar entre dois pares de bases que permanecem intactos, os metaloinseriores deslocam as bases de um único par, com seu ligante planar, atuando como substituto no empilhamento π . Esse processo não provoca grandes alterações conformacionais na estrutura geral da biomolécula²⁵.

As interações nos sulcos do DNA, sejam maiores ou menores, são consideradas interações intermoleculares reversíveis e de natureza relativamente fraca, envolvendo forças eletrostáticas e de Van der Waals. Elas não induzem mudanças significativas na arquitetura do DNA, nem envolvem empilhamentos entre as bases. Contudo, a natureza dos ligantes auxiliares pode amplificar o efeito intercalador do complexo, uma vez que ocorre um efeito sinérgico entre a intercalação e as interações nos sulcos²⁷.

Além de suas propriedades relacionadas ao mecanismo de ação, as fenantrolinas desempenham papéis estruturais fundamentais, pois possuem a capacidade de estabilizar complexos por meio de ligações polidentadas. No que diz respeito à química de coordenação de compostos à base de európio, ligantes poli-aromáticos do tipo N'N'', podem atuar como excelentes cromóforos, funcionando como ligantes "antenas" que contribuem para o aumento da luminescência dos complexos. Os íons Eu(III) demonstram uma elevada afinidade por sítios de ligação que contêm nitrogênio como átomo doador. Embora o nitrogênio seja considerado uma base intermediária (dura/mole) no conceito de Pearson, trata-se de um átomo eletronegativo que apresenta grande facilidade para formar ligações fortes com íons do sexto período^{18,28}.

Nesse contexto, foram escolhidas fenantrolinas com diferentes substituintes, visando avaliar se esses grupos funcionais podem promover efeitos

sinérgicos tanto nas propriedades físico-químicas dos complexos estudados quanto em seus modos de ação frente a biomoléculas essenciais, diretamente envolvidas em processos de replicações celulares em células neoplásicas. Fig 10.

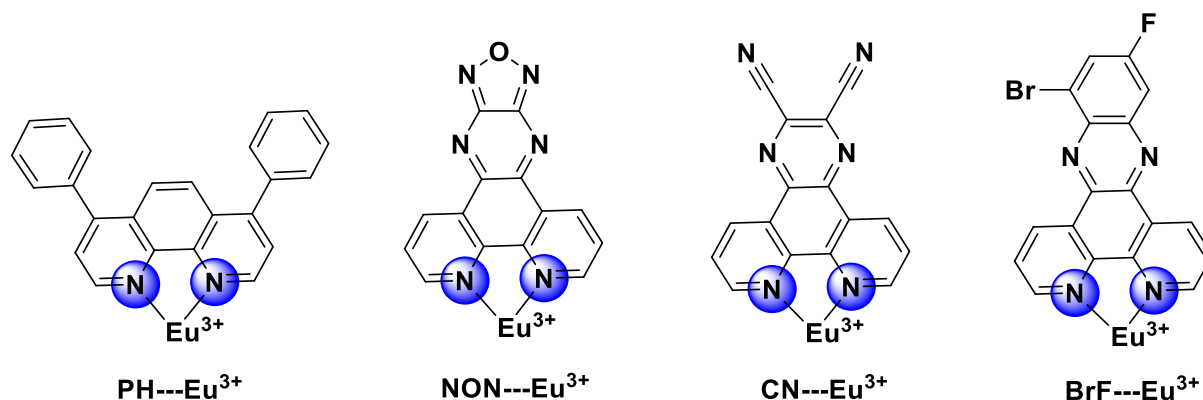


Figura 10. Diferentes fenantrolinas com seus respectivos substituintes, onde: PH = 4,7-difenil-1,10-fenantrolinas, NON = [1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina, CN = pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila e BrF = 10-bromo-12- fluorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina.

É importante destacar que alguns dos ligantes utilizados neste estudo foram selecionados com base em suas propriedades citotóxicas já conhecidas em diferentes linhagens celulares, seja como espécies livres ou quando coordenados a metais. A primeira evidência da citotoxicidade desses ligantes e seus respectivos complexos com prata (I) foi apresentada pelo grupo de Compostos de Coordenação na Química Medicinal (CCQM), liderado pelo Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha. Por exemplo, o ligante NON (Fig. 10) demonstrou altos valores de IC_{50} , com 0,53 μM em células de ovário resistentes à cisplatina (A2780cis) e 4,1 μM em células de próstata (DU-145), além de não exibir seletividade quando comparado com células não tumorais de pulmão (MRC-5), apresentando toxicidade elevada (IC_{50} = 0,59 μM). Após a complexação com prata (I) em um sistema tri-coordenado (Fig. 11), os dados de citotoxicidade mantiveram-se inalterados, sugerindo que o ligante atua de forma semelhante tanto na sua forma livre quanto coordenado.

Já para o ligante CN (Fig. 10 e 11), foi observado um aumento da citotoxicidade após a complexação com prata (I), embora, mais uma vez, a especificidade para células tumorais não tenha sido alcançada. Além disso, esses complexos não demonstraram interações significativas com o DNA, apresentando interações eletrostáticas intermediárias. Esse comportamento sugere que a mudança do centro metálico, visando disponibilizar novas geometrias de coordenação, pode ser uma estratégia interessante para melhorar a seletividade e a eficácia anticancerígena²⁹. Nesse sentido, a exploração das propriedades fotoluminescentes desses ligantes coordenados ao íon európio (III) abre novas possibilidades de estudo e aplicação, tanto no contexto terapêutico quanto em técnicas de diagnóstico.

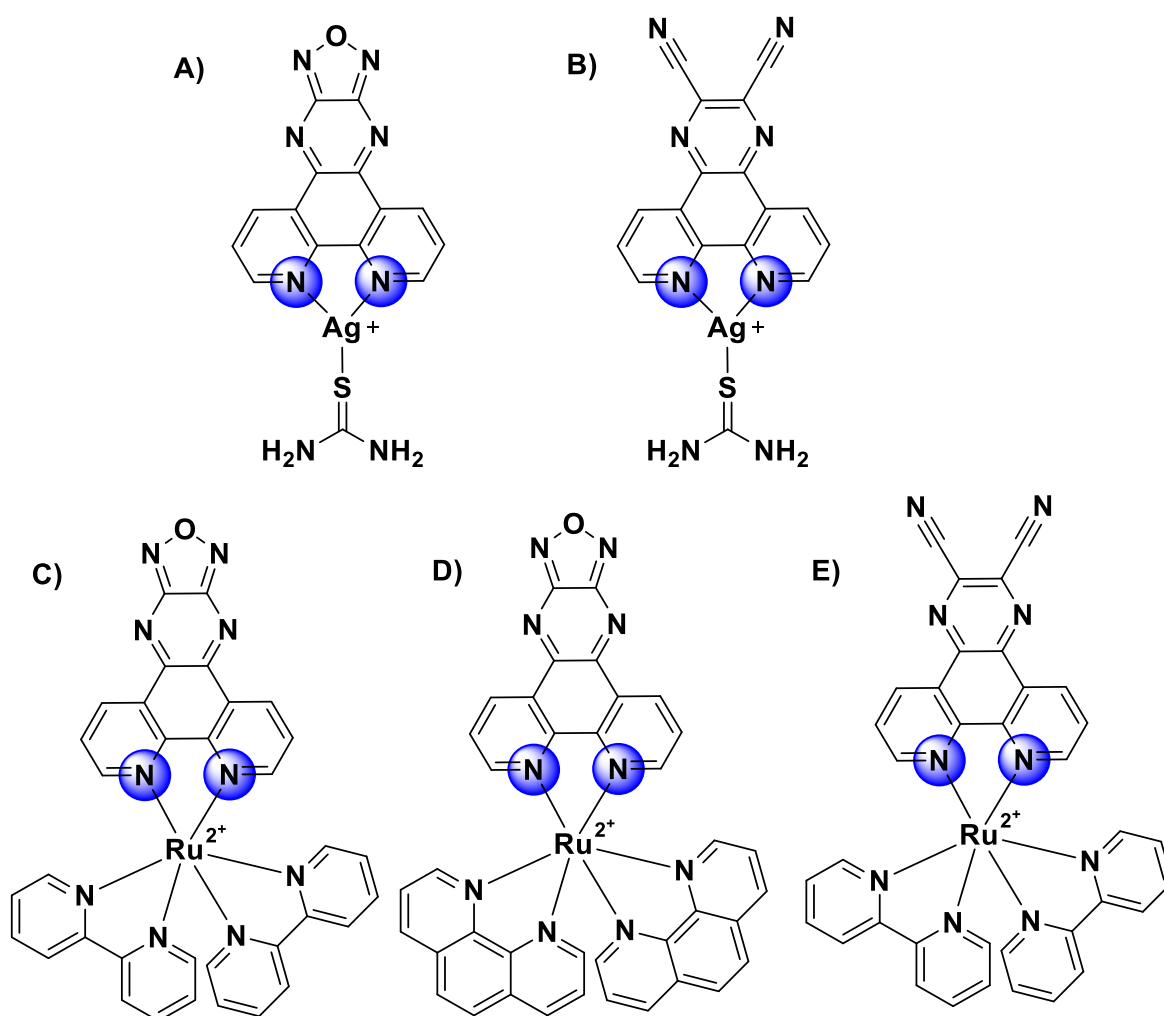


Figura 11. Diferentes complexos com ligantes fenantronílicos. a e b) Complexos tri-coordenados de prata (I) com ligantes NON e CN e tiouréia como ligante au-

xiliar, c e d) Complexos octaédricos de rutênio (II) com ligantes planares biperidinas, fenantrolinas e e NON e e) Complexos octaédricos de rutênio (II) com ligantes planares biperidinas e CN²⁹⁻³¹

Em dois estudos distintos, Peng, Chen e seus colaboradores investigaram a capacidade de ligantes estendidos, coordenados a complexos de rutênio (II), tanto do tipo bis(biperidínicos) (Fig. 11c e d) quanto bis(fenantrolínicos) (Fig. 11e), de interagir com biomoléculas como o DNA e a topoisomerase II α . Nessas pesquisas, demonstrou-se que os sistemas octaédricos formados, com todos os ligantes sendo planos, favoreceram a intercalação com o DNA, conforme indicado por testes de espectroscopia de absorção e fluorescência.

Além disso, o complexo contendo o ligante CN (Fig. 11e) exibiu uma atividade inibitória significativa sobre a enzima topoisomerase II α , com uma inibição observada em uma concentração de 30 μ M. Essa inibição é particularmente relevante, uma vez que as topoisomerases II α são enzimas superexpressas em células tumorais, desempenhando um papel crucial nos processos de replicação celular^{30,31}.

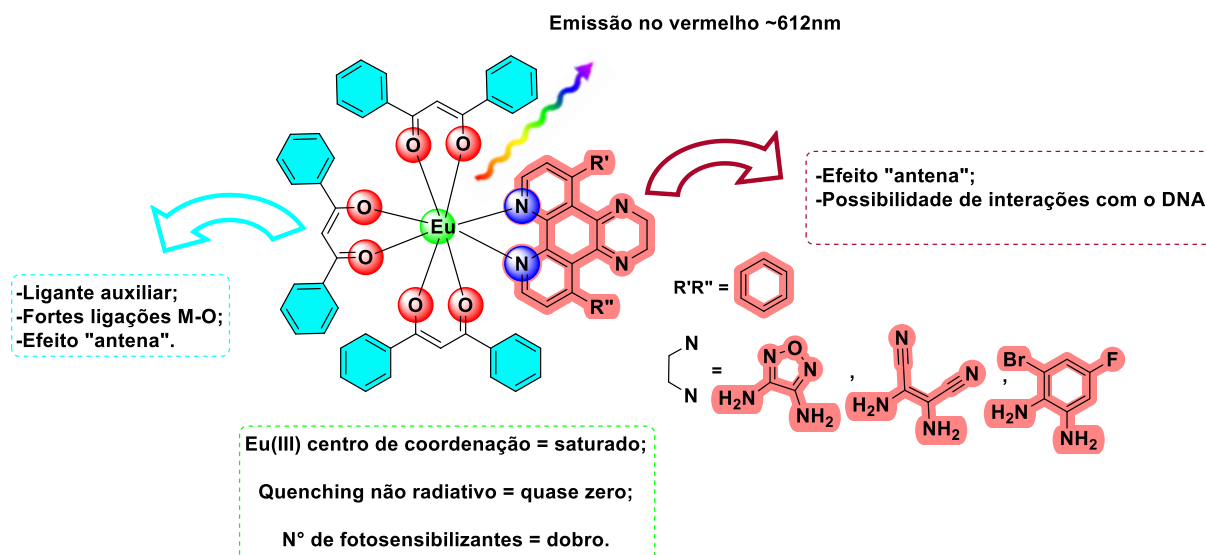
Face ao exposto, o presente trabalho buscou desenvolver complexos a base de Eu(III) com ligantes dicetona e variadas fenantrolinas, para aplicações tanto na área de diagnóstico, quanto de terapia, contra uma problemática que todo ano causa milhares de incidência e mortes como o câncer. O design dos complexos fora pensado para que cada espécie seja elas ligantes, substituintes ou íon, contribuíssem para uma estrutura final de maneira positiva, como a busca por seletividade entre células tumorais e não tumorais. Além disso tanto os dados de caracterizações, assim como estudos frente a biomoléculas clássicas como DNA, famílias de enzimas como topoisomerases II α , II β e I β visou entender os possíveis mecanismos de ações desses complexos dentro das células.

Consequentemente as interações complexo-arquiteturas celulares foram exploradas de maneira robusta, conseguindo identificar o tipo de morte

celular que os complexos causam vias técnicas como clonogênico, morfologias celulares em campo claro e por fluorescência, ensaios de apoptose e ciclo celular por técnicas como citometria de fluxo. Além disso os complexos mais promissores foram submetidos a testes frente a uma técnica promissora, recentemente implementada pelo grupo CCQM no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, que é o cultivo de células 3D.

Os modelos celulares 3D são interessantes pois recriam de forma mais fiel a estrutura tridimensional dos tecidos humanos. Isso permite que as células adotem morfologias e comportamentos mais próximos dos que ocorrem *in vivo*, incluindo interações célula-célula, além disso para modelos tumorais pode-se ter a simulação de propriedades relevantes da doença, tais como pH alterado, hipóxia, processos como invasão celular e metástase já que células tumorais 3D “imitam” barreiras mecânicas e bioquímicas que as células tumorais encontram ao invadir tecidos circundantes. Outra grande vantagem é a redução de modelos animais, pois oferecem uma plataforma mais representativa para testes iniciais de terapias e estudos de mecanismos de doenças, com maior relevância para humanos³².

Por fim um resumo estrutural dos compostos é exposto no Esquema 1 a seguir, bem como um resumo das propriedades de cada espécie que visam potencializar as propriedades finais dos complexos:



Esquema 1. Design dos complexos, como as propriedades de cada fragmento e a importância de o centro metálico estar totalmente coordenada, afim de evitar supressões de fluorescência providas de moléculas desativadoras, como solventes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O trabalho teve como propósito a obtenção de complexos heterolép-ticos de Eu(III), com ligantes dicetona e diferentes fenantrolinas, com proprieda-des luminescentes para uso no auxílio da compreensão do modo de ação e com elevadas propriedades citotóxicas visando superar ao menos uma das limitações observadas nos metalofármacos atualmente utilizados.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar quatro complexos neutros a base de Eu(III) do tipo $[Eu(DBM)_3(fen)]$, onde DBM = Dibenzoilmetano e fen, onde fen = PH (4,7-dife-nil-1,10-fenantrolina); NON (*[1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina*); CN (*pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarboni-trila*) e BrF (*10-bromo-12-fluorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina*);
- Caracterizar os complexos por diversas técnicas como UV-Vis, Infravermelho, Condutividade molar, Susceptibilidade magnética, Voltametria cí-clica, RMN tanto 1D quanto 2D, Fluorescência, Análise elementar e Difração de raios X de monocristal (quando possível a obtenção deles);
- Estudar a estabilidade estrutural dos complexos nos solventes utilizados nos ensaios, como DMSO, Tampão PBS e meio de cultura DMEM ou RPMI;
- Determinar a citotoxicidade dos complexos em células tumo-rais de pulmão, próstata, mama, e ovário e não tumoral de pulmão;

- Avaliar como os complexos atuam nas mudanças da morfologia celular tanto em 2D quanto 3D em campo claro e por fluorescência utilizando marcadores de núcleo e membrana, estudos de sobrevivência clonogênica e ciclo celular e consequentemente o mecanismo de morte celular;

- Realizar estudos frente a inibições de biomoléculas como o DNA e grupos de enzimas Topoisomerases, além de investigar a possibilidade desses complexos de serem carregados via HSA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Solventes, Reagentes e Sínteses

Todos os reagentes e solventes utilizados nas sínteses e caracterizações (Tabela 2), não passaram por tratamentos prévios.

Tabela 2. Reagentes e Solventes e suas respectivas procedências.

Reagente e Solvente	Procedência
Acetona	Synth
Brometo de Potássio	Sigma-Aldrich
Dietil éter	Supelco
Metanol P.A.	Synth
Etanol P.A.	Synth
Clorofórmio P.A.	Synth
Diclorometano P.A.	Synth
Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A.	Synth
Ácido Sulfúrico	Synth
Ácido Clorídrico	Synth
1-Octanol	Sigma-Aldrich
Clorofórmio- d_1	AcrosOrganics
DMSO- d_6	Sigma-Aldrich
Acetona- d_6	Sigma-Aldrich
Cloreto de Európio (III) hexahidratado	Sigma-Aldrich
Dibenzoilmetano	Sigma-Aldrich
4,7-Difenil-1,10-fenantrolina	GFS
3-Bromo-1,2-diamina-5-fluorobenzeno	Sigma-Aldrich
1,10-fenantrolina	NEON
3,4-Diaminofurazan	Sigma-Aldrich
Diaminomaleonitrila	TCI
Bicarbonato de Sódio	NEON
Agarose	KASVI

calf thymus DNA (ct-DNA)	Sigma-Aldrich
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich
Kit Topoisomerases	Inspiralis
HSA	Sigma-Aldrich
MTT	Sigma-Aldrich
pUC19 DNA	Thermoscientific

3.2. Síntese dos ligantes

Tanto o precursor fendiona (1,10-fenantrolina-5,6-diona), assim como o ligante NON ([1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina) e CN pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila] já se encontravam sintetizados, caracterizados e publicados²⁹. Desse modo a descrição para esses será resumida como se segue:

Síntese do ligante fendiona (1,10-fenentrolina-5,6-diona): **Rendimento:** 78 % (910,0 mg). **Cor:** Amarelo. ¹H RMN (400 MHz – CDCl₃-d₁) δ = 9,10 (dd, 2H), δ = 8,49 (dd, 2H), δ = 7,58 (dd, 2H).

Síntese do ligante NON ([1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina): **Rendimento:** 66% (174,0 mg). **Cor:** Amarelo. **UV-Vis (DMSO; 10⁻⁵ M):** 285-294 nm (π→π*); 352 nm (n→π*). **IV (KBr; ν/cm⁻¹):** ν = 3058-3016 (Ar-CH), ν = 1597-1597 (C=C/C=N), ν = 1443-1423 (C=N-O), β = 1025 (Ar-CH), γ = 608 (Ar-CH), γ = 457 (C=C) cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz – DMSO-d₆) δ = 9,49 (d, 2H), δ = 9,29 (d, 2H), δ = 8,07 (dd, 2H).

Síntese do ligante CN pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila]: **Rendimento:** 52% (137,0 mg); **Cor:** Marrom. . **UV-Vis (DMSO; 10⁻⁵ M):** 371 nm (n→π*), 353 nm (n→π*), 305 nm (π→π*). **IV (KBr; ν/cm⁻¹):** ν = 3111, 3068 (Ar-CH), ν = 1586, 1379 (C=C/C=N), ν = 2242 (CN_(nitrila)), γ = 741 (Ar-CH), γ =

437 (C=C) cm^{-1} . ^1H (400 MHz – CDCl_3) 9,46 (dd, 2H), 9,41 (dd, 2H), 7,80 (dd, 2H).

Síntese do ligante BrF (10-bromo-12-fluorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina):

Em um de balão de 100 mL foi adicionado cerca de 333,8 mg (0,1590 mmol) do precursor fendiona, o mesmo foi dissolvido em 50,00 mL de etanol a quente. Posteriormente 326,0 mg (0,1590 mmol) da diamina (3-Bromo-1,2-diamina-5-fluorobenzene) previamente dissolvida em pequena quantidade de etanol foi adicionada a solução gota a gota, a reação se tornou escura e em poucas horas um precipitado amarelo foi formado. A solução foi deixada sob refluxo durante 24 horas. Ao término o sólido foi isolado por filtração em pressão reduzida, lavado com etanol gelado. **Rendimento:** 66% (400,0 mg). **Cor:** Amarelo. **UV-Vis (DMSO; 10^{-5} M):** 370 - 390 nm ($n \rightarrow \pi^*$). **IV (KBr; v/cm^{-1}):** $\nu = 3035\text{-}2876$ (Ar-CH), $\nu = 1611\text{-}1476$ (C=C/C=N), $\nu = 1217$ (C-F), $\nu = 1073$ (C-Br), $\gamma = 733$ (Ar-CH) cm^{-1} . **^1H RMN (400 MHz – CDCl_3)** $\delta = 9,53$ (dd, 1H), $\delta = 9,44$ (dd, 1H), $\delta = 7,77$ (td, 2H), $\delta = 8,02$ (dd, 1H), $\delta = 7,85$ (dd, 1H), $\delta = 7,77$ (dt, 2H).

3.3. Síntese dos complexos

As sínteses dos complexos seguiram os seguintes procedimentos sintéticos, com pequenas adaptações da literatura^{33,34}:

Síntese do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{.PH}$: Em um balão de 50,00 mL foi adicionado 184,0 mg (0,08190 mmol) do ligante DBM (Dibenzoilmetano) em 10,00 mL de etanol, em seguida 200,0 μL de NH_4OH , deixou-se a solução em agitação até que todo cheiro de amônia se dispersasse. Então na solução, se adicionou cerca de 90,70 mg (0,0273 mmol) do ligante PH (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) e logo em seguida gota a gota, previamente dissolvido em etanol a quente o sal de $\text{EuCl}_3\text{.6H}_2\text{O}$ (100,0 mg, 0,0273 mmol) foi acrescentado. Assim que se iniciou a

adição do sal um precipitado branco foi formado, a solução então ficou sob refluxo durante 2 horas e posteriormente em temperatura ambiente até o dia posterior. O sólido foi isolado por filtração em pressão reduzida, lavado com etanol e água para tirar resquícios da base adicionada e do sal metálico. **Rendimento:** 92% (290,5 mg). **Cor:** Branco. μ_{eff} : 7,65 μ_B em 298 K. **Condutividade Molar (Λ_M) em DMSO em 298 K:** 2,83 $\text{Scm}^2 \text{mol}^{-1}$. **UV-Vis (DMSO; 10^{-5} M):** 355 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ do C=O (DBM)). **IV (KBr; ν/cm^{-1}):** $\nu = 3128\text{-}2944$ (Ar-CH), $\nu = 1577\text{-}1404$ (C=C/C=N), $\nu = 1593$ (C=O), $\gamma = 720$ (Ar-CH), $\nu = 514$ (Eu-O) cm^{-1} . **^1H RMN (400 MHz – Acetona- d_6)** $\delta = 13,42$ (s, 2H), $\delta = 10,27$ (s, 2H), $\delta = 9,48$ (s, 2H), $\delta = 9,27$ (s, 4H), $\delta = 8,45$ (s, 4H), $\delta = 8,17$ (s, 2H), $\delta = 6,92$ (s, 18H), $\delta = 6,40$ (s, 12H), $\delta = 3,23$ (s, 3H).

Síntese do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$: A síntese seguiu-se de maneira análoga ao item anterior (3.1.1.1.). 100,0 μL de NH_4OH em 118,0 mg (0,0525 mmol) de DBM. Posteriormente seguiu-se respectivamente 48,00 mg (0,0175 mmol) do NON e 64,10 mg (0,0175 mmol) de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. **Rendimento:** 78% (150,0 mg). **Cor:** Roxo. μ_{eff} : 7,18 μ_B em 298 K. **Condutividade Molar (Λ_M) em DMSO em 298 K:** 3,70 $\text{Scm}^2 \text{mol}^{-1}$. **UV-Vis (DMSO; 10^{-5} M):** 284-294 nm ($\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{NON})}$); 354 nm ($\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{DBM})} + n \rightarrow \pi^*_{(\text{NON})}$). **IV (KBr; ν/cm^{-1}):** $\nu = 3127\text{-}2934$ (Ar-CH), $\nu = 1567\text{-}1447$ (C=C/C=N), $\nu = 1596$ (C=O), $\nu = 1342$ (CNO), $\gamma = 752$ (Ar-CH), $\nu = 505$ (Eu-O), $\gamma = 455$ (Ar-C=C) cm^{-1} . **^1H RMN (400 MHz – Acetona- d_6)** $\delta = 12,66$ (s, 4H), $\delta = 9,97$ (s, 2H), $\delta = 6,82$ (s, 18H), $\delta = 6,03$ (s, 12H).

Síntese do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$: A síntese seguiu-se de maneira análoga ao item anterior (3.1.1.1.). 100,0 μL de NH_4OH em 144,0 mg (0,0642 mmol) de DBM, conseqüentemente o ligante CN (60,30 mg, 0,0214 mmol) e $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (78,4 mg, 0,0214 mmol). **Rendimento:** **Cor:** Amarelo μ_{eff} : 7,09 μ_B em 298 K. **Condutividade Molar (Λ_M) em DMSO em 298 K:** 3,02 $\text{Scm}^2 \text{mol}^{-1}$. **UV-Vis (DMSO; 10^{-5} M):** 266 nm ($\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{CN})}$); 355 nm ($\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{DBM})} + n \rightarrow \pi^*_{(\text{CN})}$). **IV**

(KBr; ν/cm^{-1}): $\nu = 3129\text{-}2947$ (Ar-CH), $\nu = 1552, 1519$ (C=C/C=N), $\nu = 1592$ (C=O), $\nu = 2238$ (CN_(nitrila)), $\gamma = 738$ (Ar-CH), $\gamma = 432$ (C=C), $\nu = 513$ (Eu-O) cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz – Acetona- d_6) $\delta = 12,63$ (s, 2H), $\delta = 12,48$ (s, 2H), $10,02$ (s, 2H), $\delta = 6,82$ (s, 18H), $\delta = 6,02$ (s, 12H) $\delta = 2,71$ (s, 3H).

Síntese do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\cdot\text{BrF}$: A síntese seguiu-se o mesmo procedimento do item anterior (3.1.1.1.). 200,0 μL de NH_4OH em 184,0 mg (0,0819 mmol) de DBM, BrF (103,0 mg, 0,0273 mmol) e (100,0 mg, 0,0273 mmol) de $\text{EuCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. **Rendimento:** 96 % (315,7mg). **Cor:** Amarelo claro. μ_{eff} : 7,31 μ_{B} em 298 K. **Condutividade Molar (Λ_{M}) em DMSO em 298 K:** 4,10 $\text{Scm}^2 \text{mol}^{-1}$. **UV-Vis (DMSO; 10^{-5} M):** 356 nm ($\pi \rightarrow \pi^*_{(\text{DBM})} + n \rightarrow \pi^*_{(\text{BrF})}$) 391 nm ($n \rightarrow \pi^*_{(\text{BrF})}$). **IV (KBr; ν/cm^{-1}):** $\nu = 3123\text{-}2944$ (Ar-CH), $\nu = 1577\text{-}1415$ (C=C/C=N), $\nu = 1593$ (C=O), $\gamma = 720$ (Ar-CH), $\nu = 519$ (Eu-O), $\gamma = 455$ (Ar-C=C) cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz – Acetona- d_6) $\delta = 12,48$ (s, 4H), $\delta = 9,29$ (s, 2H), $\delta = 8,98$ (s, 2H), $\delta = 6,69$ (s, 18H), $\delta = 6,07$ (s, 12H), $\delta = 2,87$ (s, 3H).

3.4. Métodos Instrumentais

3.4.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100, utilizou pastilhas de KBr (Brometo de potássio) como suporte. Usou o modo de 62 varreduras na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.4.2. Voltametria cíclica

Para os ensaios voltamétricos, uma célula eletroquímica de compartimento único com três eletrodos, sendo: de referência $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(3,0 \text{ mol L}^{-1})}$,

placa de platina ($0,25 \text{ cm}^2$) como auxiliar e, como eletrodo de trabalho, carbono vítreo ($\phi = 3,0 \text{ mm}$) – *Glassy Carbon Electrode* (GCE) foram empregados. Nas medidas ciclovoltagemétricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-204 (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), controlado pelo software NOVA 2.1.2. Inicialmente, foi registrado o perfil voltamétrico para o branco do eletrólito suporte perclorato de tetrabutilamônio (TBAP) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por ciclovoltagemetria (CV) na velocidade de varredura de potencial em 50 mV s^{-1} na janela de potencial compreendida entre $-1,2$ a $1,25 \text{ V}$. em seguida, todos os compostos utilizados também tiveram seu perfil voltamétrico registrado na mesma janela de potencial a uma concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. E por fim, foi realizado um estudo de velocidade de varredura de potencial na faixa de 20 a 100 mV s^{-1} para os complexos elaborados.

3.4.3. Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível

Os espectros foram obtidos com auxílio do espectrômetro SHIMADZU1650PC. Os espectros foram analisados a partir de soluções $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em DMSO. A região de varredura escolhida foi de 700 a 200 nm em caminho óptico de 1 cm em cubetas de quartzo. A técnica também foi usada para avaliar a estabilidade dos complexos em solução e em meio RPMI e PBS nos tempos de 0 , 24 , 48 e 72 horas.

3.4.4. Análise via técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As distribuições de tamanho das partículas por intensidade e os índices de polidispersividade para os complexos foram determinados via DLS, utilizando um equipamento Litesizer 500 – Anton Paar, com espalhamento angular de

90° à 25 °C e tempo de equilíbrio de 60 segundos. Soluções estoques dos complexos em DMSO, foram diluídos para 1×10^{-5} mol L⁻¹ em PBS e realizadas as análises nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

3.4.5. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC - lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928. Foram utilizadas cubetas de quartzo de quatro lados de caminho ótico 10 mm e volume 3,5 mL. Os espectros foram obtidos a partir de soluções $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ dos complexos em DMSO, PBS e DMEM.

3.4.6. Rendimento Quântico Absoluto

As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente utilizando o espectrômetro PLQY absoluto Quantaaurus-QY Plus UV/NIR (C13534-31, Hamamatsu) com uma lâmpada de xenon de 150 W como fonte de excitação e dois detectores (BT-CCD, 300-950 nm, e InGaAs, 900-1650 nm). Também foi utilizado um diodo de laser externo de 980 nm (FC-980 5 W, CNI Lasers) como fonte de excitação (emissão de conversão ascendente). A potência do laser foi ajustada entre 1,5 e 2,5 W (correspondente a 393,1-760,5 W/cm², considerando a área de iluminação no suporte da amostra, 0,0025 cm², de acordo com o fabricante). Foram efetuadas triplicadas para cada amostra. O método tem uma precisão de 10% em relação aos valores medidos. Uma descrição mais detalhada do método pode ser encontrada no trabalho de Borges e colaboradores³⁵.

3.4.7. Tempo de vida de Emissão (τ_{em})

Os espectros de fotoluminescência (PL) e as curvas de decaimento da emissão foram realizados a 25 °C num espectrofluorímetro Horiba-Jobin Yvon Fluorolog®-3 FL3-22, equipado com um fotomultiplicador Hamamatsu R928P. Para os espectros de excitação e emissão, foi utilizada uma lâmpada de arco curto de xenon contínuo de 450 W (UXL-450S-O, USHIO INC.) e, para as curvas de decaimento, uma lâmpada de arco curto de xenon de alta estabilidade de 0,15 J por flash (FX-1102, Excelitas Technologies)³⁶.

3.4.8. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Mapas de Contornos (COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C) foi utilizado um espectrômetro BRUKER Avance III - Nanobay 400MHz localizado no laboratório externo do Departamento de Química da UFSCar. Os solventes utilizados nas análises foram o DMSO- d_6 e CDCl_3 e Acetona- d_6 , na proporção 5 mg de amostra para 450 μL de solvente deuterado.

3.4.9. Análise Elementar (CHN)

As análises foram feitas no equipamento Fisions – EA1108 da CE instruments, sob responsabilidade da central analítica do Departamento de Química-UFSCar. O método empregado foi EA1108.

3.4.10. Medidas de condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram feitas no equipamento MARCONI modelo MA 521 pertencente ao grupo LABBES (Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biosensores, Eletroanalítica e Sensores.) do Departamento de Química-UFSCar. Foram preparadas soluções dos complexos nas concentrações de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO.

3.4.11. Medidas de Suscetibilidade Magnética

As medidas de momentos magnéticos efetivos (μ_{ef}) foram realizadas utilizando uma balança Johnson Matthey-AUTO MSB, onde se seguiu as etapas. Ajustou-se o capilar em 4,5 cm de altura, essa necessária para a medida no interior da balança em seguida pesou-se o capilar com e sem amostra, valor necessário para se abater na análise. A quantidade de amostra no tubo foi de cerca de 1,5 cm (15 mm). Tanto as medidas do peso da amostra no tubo, altura foram computados após tarar em uma calculadora acoplada ao equipamento. Por fim, o valor de suscetibilidade magnética por unidade de massa foi fornecido pela balança, posteriormente o momento magnético efetivo foi obtido como se segue na fórmula 1.

$$xm = xg.MM$$

$$\mu_{ef} = K(xm.T)^{\frac{1}{2}} = 2,84\sqrt{xm.T} \text{ Fórmula 1.}$$

Onde: xm = Suscetibilidade magnética molar; xg = Suscetibilidade magnética por unidade de massa; MM = Massa Molar; T = Temperatura em Kelvin; μ_{ef} = Momento magnético efetivo.

3.4.12. Difração de Raios X de monocristal

A difração de raios X foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Javier Alcides Ellena e Dr. Pedro Henrique de Oliveira Santiago (IFSC-USP) do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). As medidas de difração de raios X de monocristal dos complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$, foram executadas em um difratômetro Rigaku XtaLAB Synergy-S Dualflex equipado com um detector híbrido de contagem de fótons HyPix-6000HE, usando radiação de $\text{Mo-K}\alpha$ ($\lambda = 0.71073\text{\AA}$). Os cristais foram mantidos a 100 K durante a coleta de dados. O refinamento da cela unitária, a coleta e redução de dados e a correção da absorção foram realizados utilizando o programa CrysAlisPro. O método de faseamento intrínseco foi empregado para resolver as estruturas usando o programa de solução SHELXT-2018/2, enquanto o refinamento foi realizado usando métodos de mínimos quadrados no programa SHELXL-2019/2, ambos dentro do software Olex2³⁷⁻³⁹. Átomos não-hidrogenóides tiveram suas posições definidas a partir de análises subsequentes de mapas de diferenças de Fourier e refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogênio foram refinados isotropicamente, sendo localizados idealmente de acordo com a natureza química e hibridização dos átomos aos quais estão ligados.

Detalhes específicos sobre a coleta de dados e os parâmetros para o complexo são fornecidos, bem como distâncias e ângulos de ligações são expostos nas Tabelas A1-A6 em apêndice.

3.4.13. Lipofilicidade (Coeficiente de partição log P)

Inicialmente pegou-se 53 μL de uma solução $9,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em DMSO e adicionou em 5 mL de n-octanol, nova concentração foi de cerca $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente coletou-se 750 μL das soluções dos

complexos em n-octanol e misturou-se com 750 de água Milli-Q®, todas novas soluções de mistura foram feitas em triplicatas, as quais foram encubadas por 24 horas a 37 °C sob agitação a 200 rpm, utilizando o Termo-Shaker Agmaxx modelo AG100. Após incubação analisou-se as absorbâncias médias utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1650PC. Os valores das concentrações dos complexos em 1-octanol e água foram determinadas a partir da curva padrão previamente obtida das soluções estoques no referido solvente orgânico. A medida de lipofilicidade adotada é o log P, que é da fração entre a concentração de composto em n-octanol pela concentração em água, dada pela fórmula 2. Os espectros de absorbância e regressão linear se encontram em apêndice (Figs. A1-A4).

$$\log P = \log \frac{[nOc]}{[nH2O]}, \text{ onde } n = \text{mols} \text{ Fórmula 2}$$

3.4.14. Estudos teóricos estruturais via TD-DFT e processos de transferências de energias

Como apenas os complexos Eu(DBM)₃NON e Eu(DBM)₃CN têm estruturas cristalográficas e, visto que Eu(DBM)₃NON possui uma pequena desordem cristalográfica, os complexos foram montados a partir da estrutura cristalográfica de Eu(DBM)₃CN. Assim, as estruturas de Eu(DBM)₃NON, Eu(DBM)₃PH e Eu(DBM)₃BrF passaram por uma otimização geométrica com mecânica molecular (MM+) ⁴⁰ antes de serem utilizadas como entrada para os cálculos DFT executados no ORCA5.0.4⁴¹. O nível de teoria executado foi o funcional híbrido PBE1PBE com o conjunto de base TZVP para todos os átomos, exceto o európio, que foi tratado com o potencial efetivo de caroço (ECP) MWB52⁴², onde trata os 52 elétrons mais internos do európio como um potencial eletrostático. Além disso, o efeito implícito do solvente DMSO foi considerado através do CPCM⁴³.

A partir das estruturas DFT foram feitos os cálculos dos estados excitados com TD-DFT através dos funcionais híbridos CAM-B3LYP, B3LYP e PBE1PBE, todos com a base TZVP e ECP MWB52. Também foram executados cálculos com o efeito do solvente DMSO através do CPCM. Para os cálculos semiempíricos utilizou-se o método INDO/S-CIS^{44,45}. Todos os cálculos foram feitos com o ORCA5.0.4.

A análise dos dados obtidos foi feita através das ferramentas do programa LUMPAC⁴⁶ que também oferece o estudo teórico do processo de transferência de energia ligante-Eu(III) através das equações de taxa propostas por Malta^{47,48}.

3.5. INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS

3.5.1. Interação com o ct-DNA via espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis)

Dissolveu-se 5mg de ct-DNA (*Calf thymus*, timo de bezerro) em 5mL de tampão Trisma (pH = 7,4, solução aquosa de a 10^{-3} M de tris-HCl, 10^{-3} mol L⁻¹ de NaCl). A solução foi deixada na geladeira por um dia para facilitar a dissolução de DNA. Antes das análises, mediu-se a absorbância da solução estoque de ct-DNA para determinar sua concentração. A concentração foi calculada utilizando a absorvidade molar conhecida na literatura ($\epsilon = 6600$ L·mol⁻¹·cm⁻¹, $\lambda = 260$ nm) e aplicando a lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$). Após a determinação, a solução foi diluída para uma concentração final de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A constante de ligação (Kb) foi calculada aplicando-se a fórmula 3. Neste experimento, as concentrações dos complexos foram mantidas fixas em $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, onde variou-se as concentrações de DNA de $1,0 \times 10^{-6}$ - $2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, vale salientar que as adições de DNA foram feitas tanto na cubeta de trabalho quanto na do

branco para eliminar a absorbância da biomolécula. Por fim, as mudanças nas bandas foram monitoradas em $\lambda = \sim 355 \text{ nm}^{29}$.

$$\frac{[\text{DNA}]}{\epsilon A - \epsilon f} = \frac{[\text{DNA}]}{\epsilon b - \epsilon f} + \frac{1}{Kb (\epsilon b - \epsilon f)} \quad \text{Fórmula 3}$$

3.5.2. Interação com Albumina Soro Humano (HSA)

Inicialmente, uma solução estoque da HSA à $5,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada pela solubilização de 17,5 mg de HSA em 50 mL de tampão Trisma-HCl. A concentração da solução estoque da HSA foi determinada por UV-vis, empregando o valor da absorvidade molar da HSA em 280 nm ($35,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Posteriormente, alíquotas de 0 – 30 μL das soluções estoque dos complexos (concentração de 1 mmol L^{-1}) foram adicionadas em um microtubo de 2 mL, seguida pela adição de alíquotas de 0 – 50 μL dimetilsulfóxido. A soma dos volumes das alíquotas citadas perfaz um volume total de 50 μL . Posteriormente, nas soluções dos complexos foram adicionadas 950 μL da solução estoque de albumina ($5,25 \mu\text{mol L}^{-1}$). Portanto, foram preparadas soluções (1 mL) da proteína HSA com diferentes concentrações molares dos complexos em Trisma-HCl (5% DMSO), mantendo-se a concentração constante da albumina em 5 μM . As concentrações molares dos complexos foram 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 μM . A solução de HSA em tampão Trisma-HCl (5% DMSO) foi empregada como negativo controle. Soluções dos complexos em tampão Trisma-HCl (5% DMSO), nas maiores concentrações utilizadas (30 μM), foram empregadas para averiguar a ausência de emissão de fluorescência dos complexos. Imediatamente ao preparo das soluções HSA/completo, quatro alíquotas de 200 μL de cada solução foram adicionadas em quatro poços (200 μL /poço) de uma placa opaca de 96 poços. Desta maneira foram realizadas as quadruplicatas das medidas das soluções. Após o plaqueamento das soluções, os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na região de

300 a 700 nm, com o comprimento de excitação de 270 nm. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 298, 303 e 310 K. Os experimentos foram realizados no fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador empregando uma placa opaca de 96 poços⁴⁹.

3.5.3. Ensaio de competição com Hoechst 33258

Determinou-se a concentração do Hoechst 33258 e do DNA por UV-Vis. O cálculo da concentração do Hoechst foi realizado empregando o valor da absorbância e da absorvidade molar do Hoechst em 344nm ($\epsilon = 46000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) e do caminho óptico ($b = 1 \text{ cm}$), conforme a lei a Lambert-Beer. Posteriormente, preparou-se 10 mL de uma solução estoque DNA-Hoechst em Trisma-HCl com concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hoechst. Em diferentes microtubos de 1500 μL foram adicionadas alíquotas crescentes (5-40 μL) dos complexos em DMSO, o volume de DMSO foi completado até atingir 100 μL (10%). Em seguida, 900 μL da solução estoque DNA-Hoechst foram transferidos para cada microtubo perfazendo um volume total de 1000 μL . Em um dos microtubos adicionou-se apenas DMSO na ausência dos complexos e a solução estoque DNA-Hoechst. As soluções foram incubadas a 25°C por 30 min. Três alíquotas de 200 μL de cada microtubo foram transferidas para três poços de uma placa opaca de 96 poços, realizou-se então as medidas em triplicata. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador, a 25°C, realizando a excitação em 340nm e registrados na região de 370 a 700 nm⁴⁹.

3.5.4. Interação com plasmídeo superenovelado (pUC19) via eletroforese

Para os testes, primeiramente, dilui-se os complexos em três concentrações, sendo elas 20, 10 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, posteriormente em cada microtubo, 3 μL dessas soluções foram adicionadas a uma solução contendo 26,5 μL de água deionizada e 0,5 μL do plasmídeo pUC19, totalizando assim um volume final de ensaio de 30 μL . As soluções foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o tempo transcorrido as amostras foram retiradas do banho termostático e adicionou-se 15 μL de STEB (40 % de sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,5, 1 mM de EDTA, 0,5 mg mL^{-1} de azul de bromofenol), logo em seguida centrifugou-se (5000 rpm por 5 minutos), e 20 μL das amostras foram adicionadas nos respectivos poços do gel de agarose 1% (525 mg de agarose em 53 mL de TBE 1x). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 60 V durante 2 horas. Após esse período, o gel foi adicionado em solução corada de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™ EZ, a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad²⁹.

3.5.5. Inibição TOPO II α , II β e I β via eletroforese

O ensaio de inibição da enzima DNA-Topoisomerase II α foi realizado com o kit de relaxação do DNA fornecido pela Inspiralis Limited. No ensaio foi usado 0,5 μL de DNA (pBR322), 3 μL de tampão de ensaio (50 mM Tris.HCl (pH = 7.5) ;125 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT 100 $\mu\text{g/ml}$ albumin) e 1 μL (1,0 mM) de ATP para a preparação do mix. A solução de ensaio era composta por 4,5 μL de mix, 23 μL de água, 3,0 μL dos complexos e, por fim, 1 μL da topoII. Os complexos foram testados em diferentes concentrações (20, 10 e 1 μM). Para a realização do ensaio, as amostras foram mantidas incubadas a 37 °C por 45

minutos. Após este período foram adicionados 15 μ L de STEB (40% de sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,4, 1 mM de EDTA, 0,5 mg mL^{-1} de azul de bromo-fenol). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, a partir do sobrenadante, 20 μ L da fase aquosa foram adicionados no gel de agarose 1%, em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 7,2. A corrida eletroforética se procedeu em 60 V por 2h. A revelação do gel e o tratamento das imagens foram realizados da mesma forma descrita no item anterior (3.3.4.). O ensaio eletroforético com a enzima Topoisomerase II β e I β segue o mesmo protocolo descrito para Topoisomerase II α , a diferença está que não se tem a adição de ATP ao mix⁵⁰.

3.5.6. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As titulações de CD foram efetuadas com um espectro polarímetro JASCO J-815 a 25 °C. Foram preparadas soluções de ct-DNA (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl (pH 7,4) com diferentes razões molares [Complexo]/[ct-DNA] (0,05-0,5) foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Os espectros destas soluções foram registados de 230 a 500 nm utilizando uma cubeta de quartzo com um caminho ótico de 0,5 cm e uma velocidade de varrimento de 200 nm min^{-1} os espectros foram obtidos após 5 leituras para cada²⁹.

3.5.7. Medidas de Viscosidade Relativa

As medidas de viscosidade relativa foram efetuadas utilizando um viscosímetro de Ostwald, mantido por banho termostático a 25 °C. As amostras (4,0 mL) foram preparadas em tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo 20% de DMSO. A concentração de ct-DNA foi mantida constante a 100 μM e as concentrações dos complexos foram variadas, para obter diferentes razões molares, [Complexo]/[ct-DNA] (0,05-0,50). Os tempos de fluxo foram registados com um cronômetro digital, em quintuplicatas. Os valores da viscosidade específica (η/η_0)

1/3, foram traçados em função de [Complexo]/[ct-DNA], em que η e η_0 correspondem à viscosidade relativa do DNA na presença e na ausência dos complexos, respectivamente. A Fórmula 4, foi utilizada para calcular os valores da viscosidade relativa do DNA(η_0) a partir do tempo de fluxo da solução de DNA (t), corrigido pelo tempo de fluxo do tampão (t_0)⁴⁹.

$$\eta_0 = \frac{(t - t_0)}{t_0} \text{ Fórmula. 4}$$

3.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de IC₅₀ e testes como morfologias celulares, clonogênicos e linhagens 3D, foram realizados pelos alunos do CCQM: MSc. Tamara Teixeira e Dr. Dário Batista Fortaleza. Ensaios de apoptose e ciclo celular foram realizados pela Dra. Jocely Dutra no Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar, coordenado pela Prof. Dra. Márcia Cominetti.

3.6.1. Linhagens celulares

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens tumorais humanas de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC. HTB-26), tumoral de pulmão A549 (ATCC N. CCL-185), tumoral de próstata DU-145 (ATCC N. HTB-81), tumoral de ovário resistente a cisplatina A2780cis (ECACC No. 93112517) e a linhagem não tumoral de pulmão MRC-5 (ATCC N. CCL-171). As linhagens MDA-MB-231, A549, DU-145 e MRC-5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Vitrocell), suplementado com 10% de FBS, e as células MCF-7 e A2780cis foram cultivadas em meio RPMI (Roswell

Park Memorial Institute; Vitrocell), também contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37 °C.

3.6.2. Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT)

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, em 150 µL de meio suplementado. Após 24 horas de incubação (5% de CO₂ a 37 °C), as células foram tratadas com soluções estoque dos compostos em DMSO e em diferentes concentrações. As placas foram novamente mantidas na incubadora (5% de CO₂ a 37 °C) por 48 horas. Posteriormente, adicionaram-se 50 µL de uma solução de MTT (1 mg/mL) em cada poço, a qual foi mantida em incubação por 4 horas. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente removida e adicionaram-se 100 µL de isopropanol por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio do leitor de microplacas Epoch e os valores de IC₅₀ foram determinados utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0.2.

3.6.3. Ensaio de sobrevivência clonogênica

O ensaio de formação de colônias foi realizado para a linhagem celulares resistente a cisplatina A2780cis. As células foram semeadas em placas de 6 poços com uma densidade celular de 400 células/poço em 2 mL de meio de cultura suplementado com 10% FBS e mantidas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (Eu(DBM)₃PH e Eu(DBM)₃BrF = $0,25 \times \text{IC}_{50}$ µM, $0,50 \times \text{IC}_{50}$ µM e IC_{50} µM.) e incubadas por 48 horas. No controle, foi adicionado apenas

DMSO (0,5%) nas mesmas condições. Após esse período, o meio foi substituído por um meio fresco, sem qualquer complexo, e as placas foram incubadas por 10 dias. As células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e ácido acético (3:1) por 5 min, e coradas com 5% de cristal violeta por 30 min. O número de colônias formadas foi analisado usando o software ImageJ.

3.6.4. Ensaio de Morfologia celular campo claro e PI

A avaliação das alterações morfológicas foi realizada para os dois compostos escolhidos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$, na linhagem celular, A2780cis. As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de $1,5 \times 10^4$ célula/poço em 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% FBS e incubadas a 37 °C a 5% de CO_2 por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos em relação ao IC_{50} ($0,25 \times \text{IC}_{50}$ μM , $0,50 \times \text{IC}_{50}$ μM e IC_{50} μM .) as micrografias foram registradas em diferentes períodos (0, 24 e 48 horas) com o microscópio invertido (CELENA® S Logos Biosystems). Após 48 horas de tratamento, as células foram marcadas com PI (iodeto de propídeo) para observar a indicação de morte celular. Foram adicionados 200 μL de PI (300nM) em cada poço e incubou-se por 10 minutos; em seguida, as micrografias de fluorescência foram registradas no microscópio de fluorescência (CELENA® S Logos Biosystems).

3.6.5. Ensaio de morfologia celular por fluorescência (Green plasma/DAPI)

A análise morfológica por fluorescência com Green plasma e DAPI foi realizada apenas para os composto $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ na célula A2780cis. As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade

celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço em 150 μL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS, e incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 . Após isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações já descritas de cada composto e o controle com 0,5% de DMSO, e incubadas por 48 horas. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e as células foram fixadas com metanol (50 μL) por 5 minutos, o metanol foi removido e foram adicionados 50 μL da solução CellMask Green plasma membrane (solução de trabalho 1x) e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C). A seguir, o marcador foi removido e as células foram lavadas 2x com PBS (50 μL) cuidadosamente. Após lavar com PBS, foram adicionados 50 μL de DAPI (300 nM) e incubadas à temperatura ambiente por mais 10 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS 2x e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (CELENA® S Logos Biosystems) com os filtros adequados.

3.6.6. Ensaio ciclo celular

As células A2780cis foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 1×10^5 células/ poço. Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera de CO_2 , as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos ($\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$) por 48 h. Em seguida, as células foram coletadas, lavadas com PBS gelado e fixadas por 24 horas a -20°C em etanol a 70%. Após a fixação, as células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min a 4°C, res-suspensas em 250 μL de tampão PBS contendo RNase A (Sigma-Aldrich) 0,2 mg.mL^{-1} e com solução de fluorocromo hipotônico Iodeto de Propídeo (PI, Sigma-Aldrich) 1 mg.mL^{-1} e incubadas em gelo por 30 min para análise usando um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10000 eventos. A distribuição da fase do ciclo celular foi analisada usando o software FlowJo. O experimento foi realizado em triplicata. As células tratadas com 0,5% de DMSO foram o controle negativo.

3.6.7. Ensaio apoptose via citometria de fluxo

O ensaio de apoptose induzida pelo complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ na linhagem celular A2780cis foi realizado por citometria de fluxo usando um kit de detecção de apoptose *PE-Anexina V* (BD Biosciences). As células A2780cis foram semeadas em uma placa de 12 poços na densidade de 1×10^5 células/ poço e, após 24 h de incubação, foram expostas a diferentes concentrações do complexo ($0,5 \times \text{IC}_{50}$, IC_{50} , e $2 \times \text{IC}_{50}$) por 48 h. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram expostas aos marcadores *PE-Anexina V* (2,5 mL) e 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (2,5 mL) em 200 mL de tampão de ligação, por 15 min, em temperatura ambiente no escuro. Em seguida, as células foram coletadas com *scraper*, centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 4°C e ressuspensas em 400 mL de tampão de ligação para análise usando um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10.000 eventos, no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN). A fluorescência foi quantificada pelo software Cell Quest (BD Biosciences). As células tratadas com 0,5% de DMSO foram o controle negativo (CTRL).

3.6.8. Ensaio de cultura celular 3D

Para o experimento de cultura 3D, foi utilizado o Kit Bioprint de 96 poços da tecnologia de Cultura Celular 3D Magnética (m3D). Em uma garrafa de 25 cm², contendo a linhagem celular A2780, adicionou-se 150 µL de uma solução contendo nanopartículas (NanoShuttle – PL), para magnetizar as células. Após 24h, as células foram tripsinizadas, contadas para o ajuste da concentração das células, e em seguida semeadas em uma placa de cultura repelente de 96 poços (1500 células/poço). A placa de cultura foi colocada sob drives magnéticos a fim de que formassem esferoides através das forças magnéticas dos ímãs. A placa foi

armazenada em estufa (37°C - 5% CO₂) e a formação e crescimento dos esferoides foi sendo acompanhado por um microscópio CELENA® S Digital Imaging System (Logos Biosystems). Formados os esferoides, adicionou-se diferentes concentrações do complexo e acompanhou-se o efeito do composto sobre os esferoides por 6 dias. No sexto dia, adicionou-se os marcadores fluorescentes DAPI e PI para a análise de indicação de morte celular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Afim de facilitar a leitura, os complexos sintetizados serão tratados com siglas referentes aos ligantes, por exemplo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, onde DBM é referente aos ligantes dicetonas (Dibenzoilmetano) e PH, NON, CN, BrF perfaz os substituintes presentes nas fenantrolinas, como fenil, furazano, nitrila e bromo/flúor respectivamente (Fig 12). As seções ou tópicos serão separados em sínteses e caracterizações dos ligantes, complexos e posteriormente ensaios biológicos e por fim interações com biomoléculas.

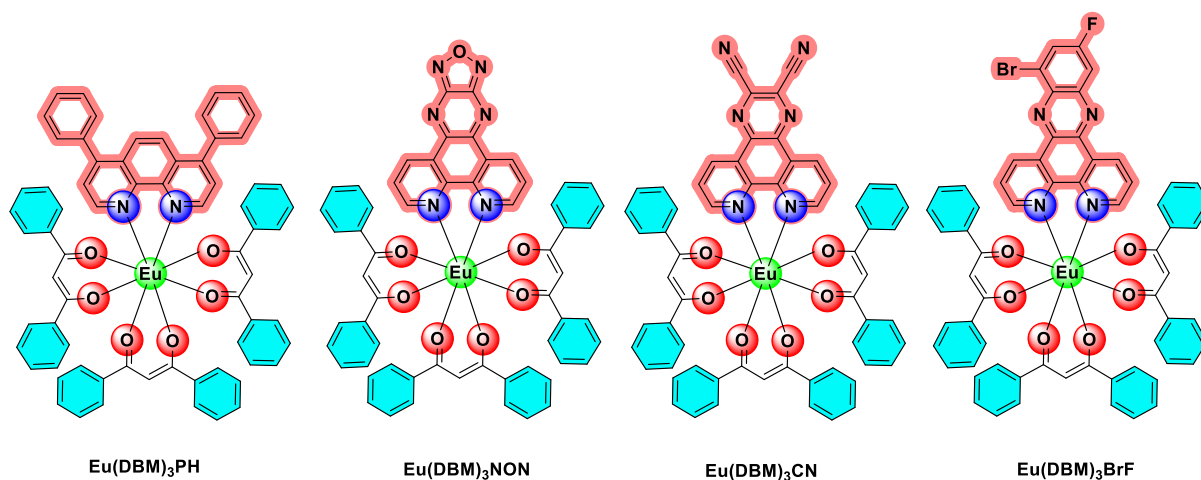
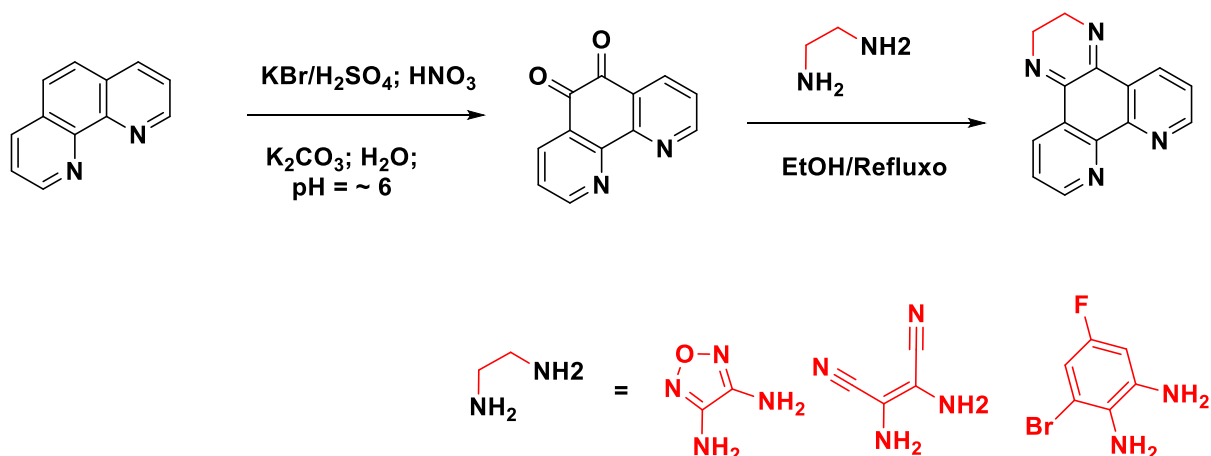


Figura 12. Estrutura proposta para os complexos a base de Európio(III).

4.1. Sínteses e caracterizações dos ligantes

Tanto o ligante DBM quanto o PH são ligantes comerciais e usou-se os espectros de RMN para verificar os sinais esperados e a presença de possíveis impurezas, os espectros desses ligantes se encontram em Anexo (Fig A6 e A7 respectivamente). Os ligantes fenentronílicos estendidos foram obtidos por sínteses adaptadas da literatura e já trabalhadas no grupo de pesquisa²⁹. Esquema 2.



Esquema 2. Síntese dos ligantes fenantrolinas modificados a partir dos precursores.

As sínteses dos ligantes fenantrolinas ocorrem a partir do precursor 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), esse sintetizado a partir da fenantrolina comercial na presença de solventes ácidos (ácido sulfúrico e nítrico). Posteriormente a formação das fenantrolinas modificadas se dá pelas reações de substituições em meio etanólico do respectivo precursor com as seguintes diaminas, 3,4-Diaminafurazano (NON), Diaminamaleonitrila (CN) e 3-Bromo-1,2-diamino-5-fluorobenzeno (BrF) (Esquema 2). Todas as reações formam precipitados ao final e os rendimentos foram apresentados na seção de metodologia.

Como são moléculas já relatadas na literatura, exceto o ligante BrF, nesta seção as caracterizações darão enfoque somente na ressonância magnética, com uma discussão mais aprofundada no ligante inédito (BrF).

Os ligantes simétricos NON e CN possuem três sinais esperados referentes a seis hidrogênios em ambientes químicos idênticos no RMN de ^1H , já o ligante PH além de possuir esses 3 sinais, tem-se a presença de sinais referentes aos anéis fenílicos nas posições 4 e 7 do anel (7,59 ppm) totalizando 10 hidrogênios. (Fig. 13b)

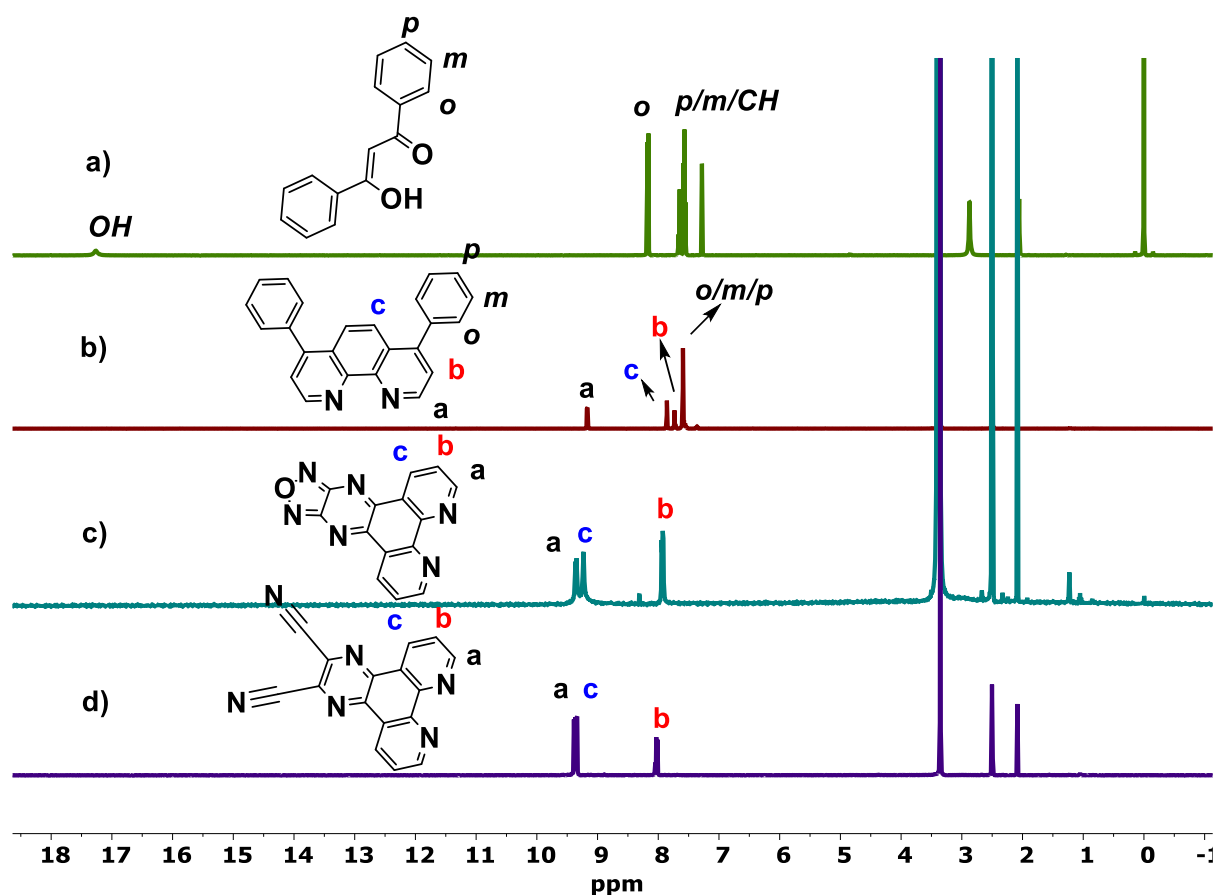


Figura 13. RMN de ^1H para os ligantes, a) DBM (em Acetona- d_6), b) PH (em CDCl_3), c) NON (em $\text{DMSO}-\text{d}_6$) e d) CN ($\text{DMSO}-\text{d}_6$).

O ligante dicetona (Fig 13a) apresenta quatro sinais, três desses são referentes as posições orto, meta e para com integração de 4:4:2 hidrogênios respectivamente, um sinal em 7,28 ppm referente ao hidrogênio CH próximos aos oxigênios e um outro sinal desblindado por conta do caráter ácido da ligação de hidrogênio intramolecular em 17,21 ppm. Ademais todos os deslocamentos químicos, constantes de acoplamentos e integrais para os ligantes são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Deslocamentos de prótons, números de hidrogênios e constantes de acoplamento para os ligantes aromáticos.

¹ H	Ligantes (δ ppm)				
	DBM (Acetona- <i>d</i> ₆)	PH (CDCl ₃)	NON (DMSO- <i>d</i> ₆)	CN (DMSO- <i>d</i> ₆)	BrF (CDCl ₃)
a/a'	-	9,24	9,36	9,39	9,53, 9,44
		(d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 2H)	(d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H)	(d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H)	(dd, <i>J</i> = 8,1, 1,6 Hz, 2H)
		7,59	7,80	8,04	7,77
b/b'	-	(d, <i>J</i> = 4,5 Hz, 2H)	(dd, <i>J</i> = 7,9, 8,1 Hz, 2H)	(dd, <i>J</i> = 8,2, 4,5 Hz, 2H)	(dt, <i>J</i> = 8,3, 4,7 Hz, 2H)
		7,86	9,24	9,35	9,26
c/c'	-	(s, 2H)	s, 2H)	(d, <i>J</i> = 4,4, 2H)	(td, <i>J</i> = 4,6, 1,7 Hz, 2H)
d	-	-	-	-	7,85
					(dd, <i>J</i> = 8,7, 2,6 Hz, 2H)
e	-	-	-	-	8,02
					(dd, <i>J</i> = 8,0, 2,6 Hz, 2H)
o	8,17 (dt, 4H)		-	-	-
m	7,57 (m, 4H)	7,60 (m, 10H)	-	-	-
p	7,64 (m, 2H)		-	-	-
OH	17,25 (s, 1H)	-	-	-	-
CH	7,28 (s, 1H)	-	-	-	-

o = orto; *m* = meta e *p* = para

O ligante fenantrônico (BrF) apresenta uma assimetria estrutural, então espera-se que os hidrogênios possam se desdobrar dependendo do ambiente que se encontram, a Figura 14, apresenta o espectro expandido na região de interesse o espectro total é demonstrado em anexo. Fig. A10.

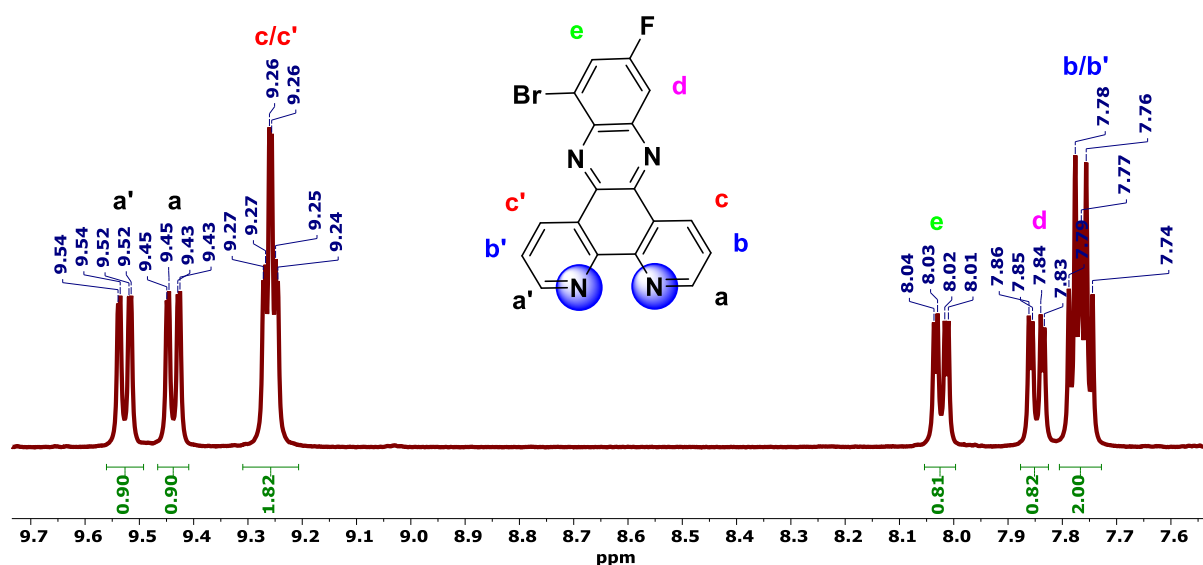


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H para o ligante estendido derivado da fenantrolina (BrF). Solvente: CDCl_3 .

O espectro apresenta seis sinais, para oito hidrogênios claramente expostos pelas integrais condizentes ao número de hidrogênios esperados, os prótons b/b' e c/c' aparecem separadamente, com integrais totalizando dois hidrogênios respectivamente, os outros sinais são separados pela parcela assimétrica existente na molécula. Os acoplamentos ^1H - ^1H (COSY do inglês Correlated Spectroscopy) (Fig. 15), serviu para elucidar principalmente os prótons a/a' que se separam.

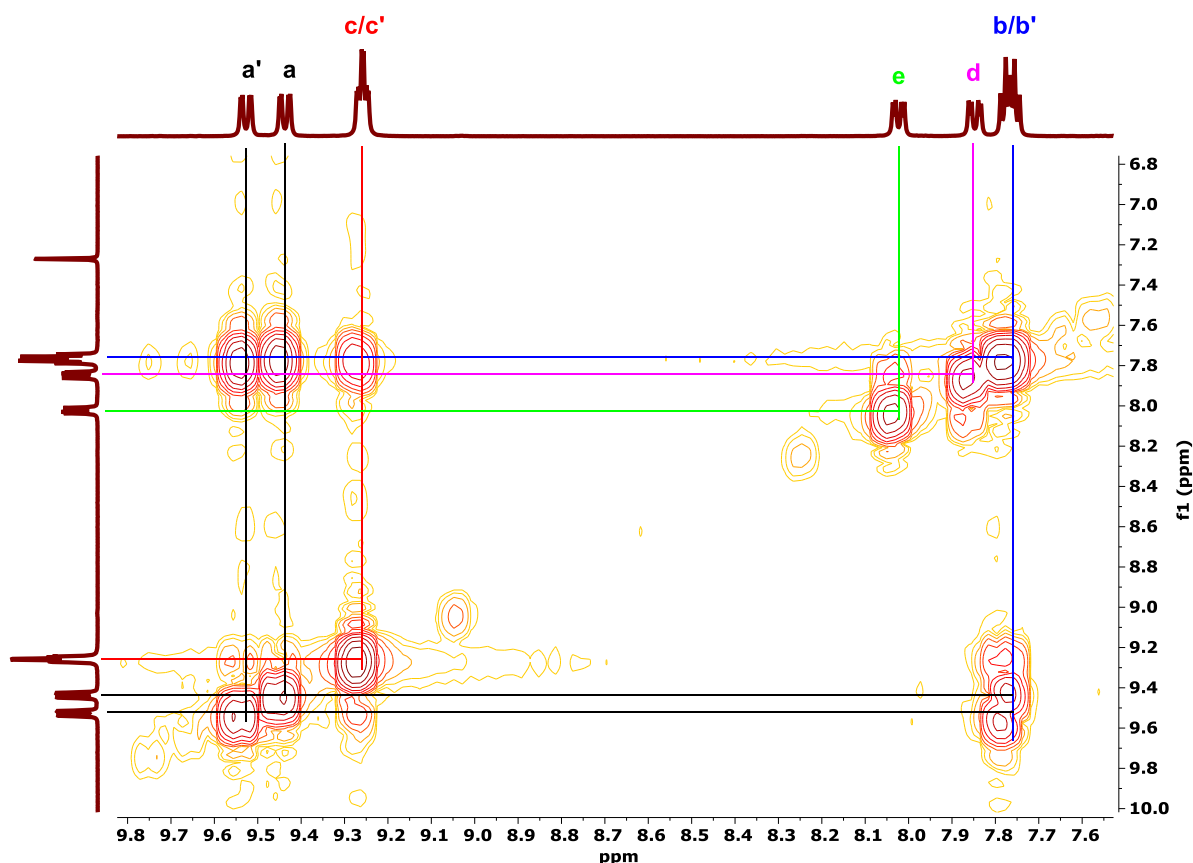


Figura 15. Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do ligante BrF. Solvente: CDCl_3 .

Também é possível verificar os acoplamentos a hidrogênios vizinhos, por exemplo os prótons b/b' se acoplam com os a/a' (linhas azuis e pretas, Fig.15), esse tipo de interação apresenta uma constante de acoplamento (3J) de 4,7 Hz e consequentemente com um outro $^3J = 8,3$ Hz entre b/b' e c/c', os acoplamentos a longa distância de quatro ligações a/a' e c/c', tem – se um $^4J = 1,6$ Hz, esse acoplamento é possível evidenciar pelo mapa de contorno mais fracos no COSY. Ademais os prótons provindos da parte diamina (He e Hd) apresentam multiplicidades de duplo dubleto referentes a acoplamentos a longa distância entre eles de 2,6 Hz, além disso, esses hidrogênios também acoplam com flúor (^{19}F , spin $\frac{1}{2}$) e consequentemente apresentam constantes $^4J = 8,7$ e 8,0 Hz, respectivamente. O mapa de contorno também fora utilizado para a caracterização entre carbonos ligados a hidrogênios a ligações correlatas ou vizinhos, HSQC (*Heteronuclear Single*

Quantum Coherence) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) respectivamente (Fig 16 e A11).

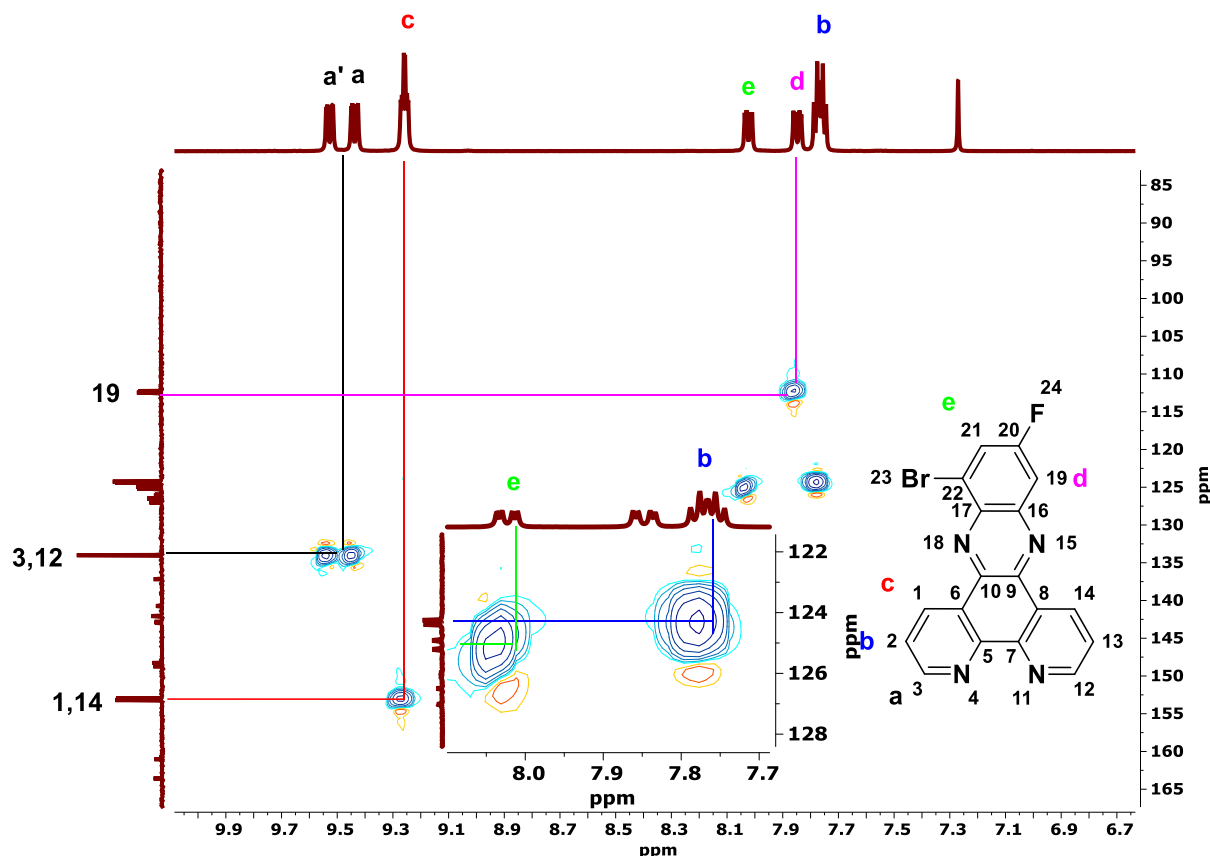


Figura 16. Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C do ligante BrF. Solvente: CDCl_3

A relações entre ^1H - ^{13}C ligados diretamente são mostrados na figura 16, acima, é interessante notar que a maioria dos sinais de carbono se apresentam como dubletos devido a assimetria da molécula e a possibilidade de acoplamento C-F para aqueles próximos a essa ligação, vide como já mencionado a alta abundância isotópica do ^{19}F . Para as caracterizações dos outros carbonos referentes ao ligante BrF fora utilizado HMBC (Fig. A11) que faz correlações dos hidrogênios com carbonos em até quatro ligações de distância, por ser uma molécula assimétrica, aromática e além de apresentar diferentes tipos de acoplamentos foi realizado uma tentativa na determinação de todos os carbonos, os mesmos são expostos como se segue na Figura 17.

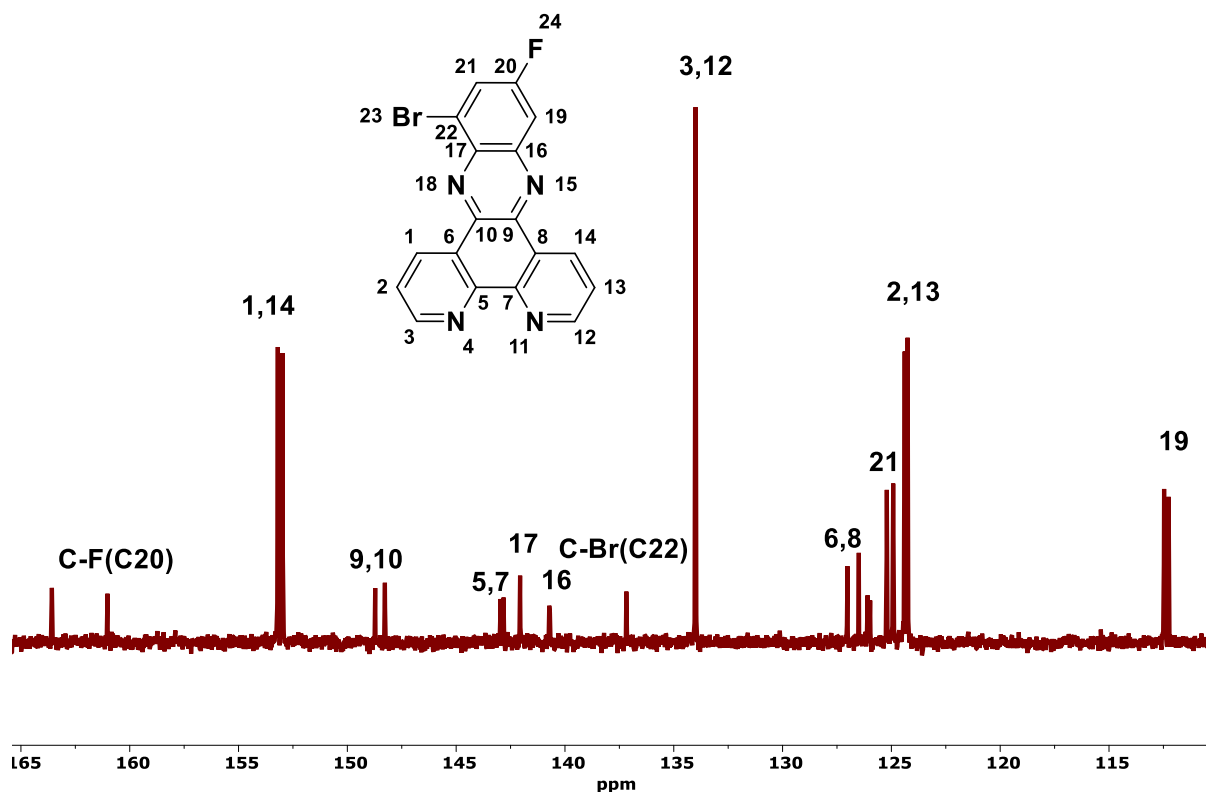


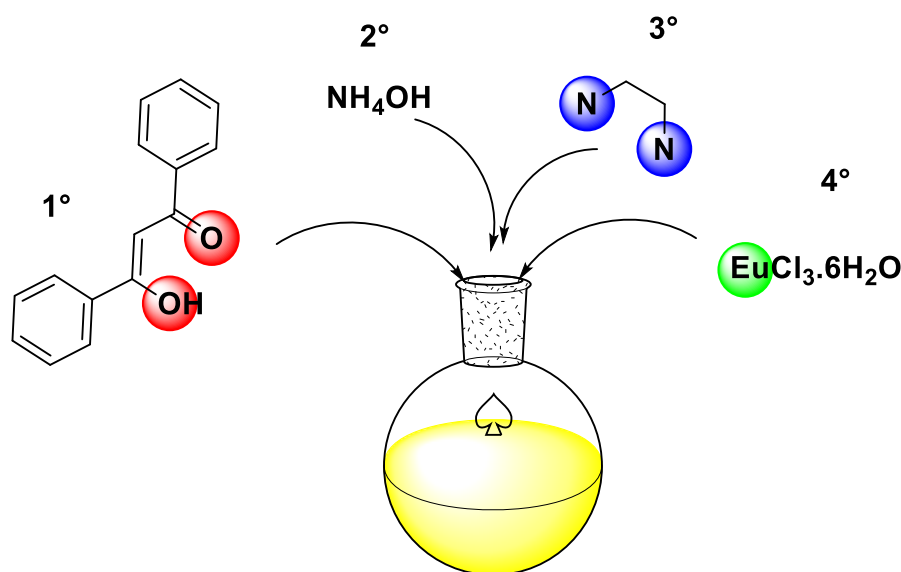
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante estendido derivado da fenantrolina (BrF). Solvente: CDCl_3 .

Os carbonos C19 e C21 foram caracterizados por estarem desdobrados devido a ligação carbono flúor vizinha, a posições *orto* em relação a ligação C-F apresentam constantes de acoplamentos $^2J = 21,1$ e $29,5$ Hz característicos em sistemas aromáticos, além do mais a ligação C-F *ipso* (C20 em $162,30$ ppm) apresenta $^1J = 256,9$ Hz⁵¹.

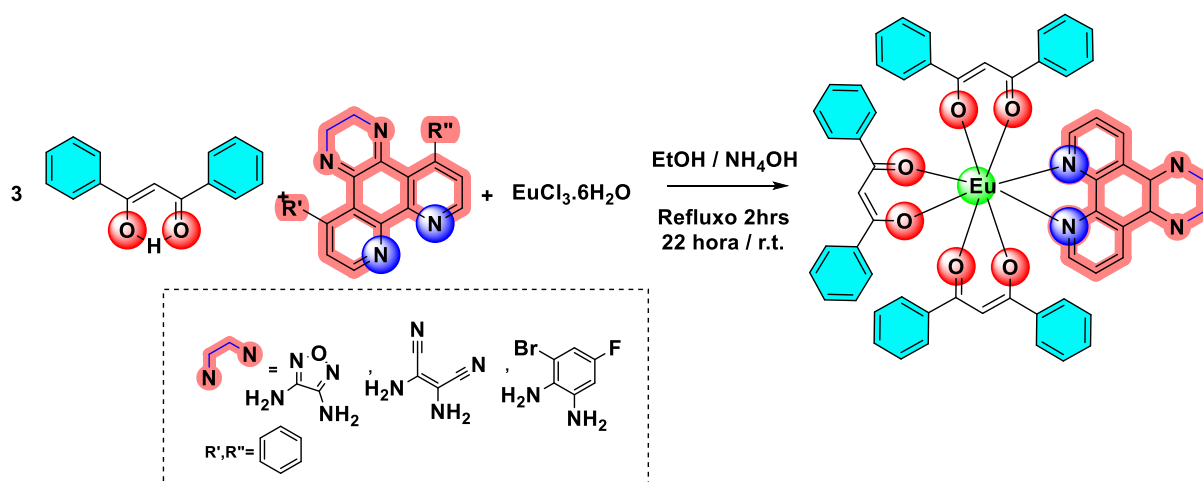
Por fim os outros dados de caracterizações como UV-Vis, Infravermelho, além de mais RMNs serão discutidos nos próximos tópicos juntamente com os complexos a fim de se comparar deslocamentos, sobreposições e forças de ligações na obtenção dos compostos desejados.

4.2. Sínteses e caracterizações dos complexos

As sínteses dos complexos ocorreram *in-situ* (Esquema 3 e 4): 1° e 2°: O ligante dicetona é colocado para reagir juntamente com uma base para que ocorra a desprotonação, afim de desfavorecer o equilíbrio ceto-enólico, isso favorece a reação quando se adiciona o sal de Eu(III). 3°: Posteriormente é adicionada as respectivas fenantrolinas. 4°: O sal metálico, que foi previamente dissolvido em etanol a quente e adicionado na reação, o que se observa é a formação em larga escala de precipitado. Por terem caráter eletroestáticos em termos de ligações, o grupo dos lantanídeos podem apresentar altos números de coordenações, como observados nas estruturas cristalográficas mais adiante, o que acaba favorecendo as reações do tipo *one-pot* (Fig. 37).



Esquema 3. Método *in-situ* das reações dos complexos de Eu(III) com ligantes DBM e diferentes fenantrolinas.



Esquema 4. Síntico dos complexos de Eu(III) com ligantes DBM e diferentes fenantrolinas.

Os complexos apresentam cores do amarelo ao roxo e rendimentos sintéticos consideráveis (Tabela 4). O sucesso na coordenação dos três ligantes DBM é evidenciada por meio da condutividade molar (solvente DMSO), todos os complexos apresentam-se na forma neutra devido as cargas 3+ do európio serem neutralizadas pelas cargas negativas pós desprotonação provindas das dicetonas, além disso a presença do íon de Európio no arcabouço molecular dos complexos é refletida nas medidas de susceptibilidade magnética que foram na faixa de 6,88-8,31 μ_B devido a 6 elétrons em orbitais *f* desemparelhados. Outro ponto importante é na obtenção dos complexos desejados na forma de pó, com valores de CNH condizentes entre os valores teóricos esperados com os experimentais (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterizações físico-químicas dos complexos a base de Európio.

Complexos	Rendimento %	C% exp (teórico)	H% exp (teórico)	N% exp (teórico)	μ_{eff}	Cor	($\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$)*
Eu(DBM) ₃ PH	92	72,04 (71,81)	4,61 (4,28)	2,82 (2,43)	6,88	Ama-relo claro	2,83
Eu(DBM) ₃ NON	78	64,96 (64,31)	4,12 (4,12)	8,16 (7,63)	8,18	Roxo	3,70
Eu(DBM) ₃ CN.H ₂ O	85	65,72 (65,30)	3,73 (3,68)	8,24 (7,49)	7,09	Ama-relo	3,02
Eu(DBM) ₃ BrF	96	63,03 (63,01)	4,91 (3,44)	5,88 (4,67)	8,31	Ama-relo claro	4,10

* Eletrólito em DMSO = $>35(\mu\text{Scm}^2\text{mol}^{-1})^{52}$.

Os estudos de voltametria cíclica foram realizados para comparações entre os processos irreversíveis e reversíveis dos ligantes e seus respectivos complexos. Os voltamogramas cíclicos do branco (0,1 mol L⁻¹ de TBAP), dos ligantes livres e do sal de Eu(III) estão apresentados no apêndice (Figs A27 e A28).

Os resultados indicam que, entre os ligantes avaliados, apenas a β -dicetona (DBM) e a fenantrolina com anel furazano (NON) exibem processos eletroquímicos significativos. O ligante DBM apresenta um processo irreversível de oxidação em 0,50 V, enquanto o ligante NON exibe um processo reversível com potenciais de oxidação (E_{Oxi}) e redução (E_{Red}) de -0,15 V e -0,21 V, respectivamente. Os demais ligantes não mostram mudanças significativas em relação ao branco, indicando comportamentos mais inertes.

Após a coordenação, observou-se um deslocamento do pico oxidativo do ligante DBM para valores mais elevados em todos os complexos: Eu(DBM)₃PH = 0,58 V; Eu(DBM)₃CN = 0,59 V; Eu(DBM)₃BrF = 0,58 V. O complexo Eu(DBM)₃NON apresenta um pico de oxidação do DBM em 0,52 V, além

de dois processos atribuídos ao ligante NON, com potenciais oxidativos e redutivos em -0,10 V e -0,15 V, respectivamente. A presença desses picos e seus deslocamentos confirmam a coordenação bem-sucedida do ligante ao íon metálico.

Adicionalmente, a estabilidade dos complexos foi corroborada pelas pequenas variações dos potenciais oxi-redutivos, mesmo diante de variações nas velocidades de varreduras 20-100 mV s^{-1} (Figs. A29-32).

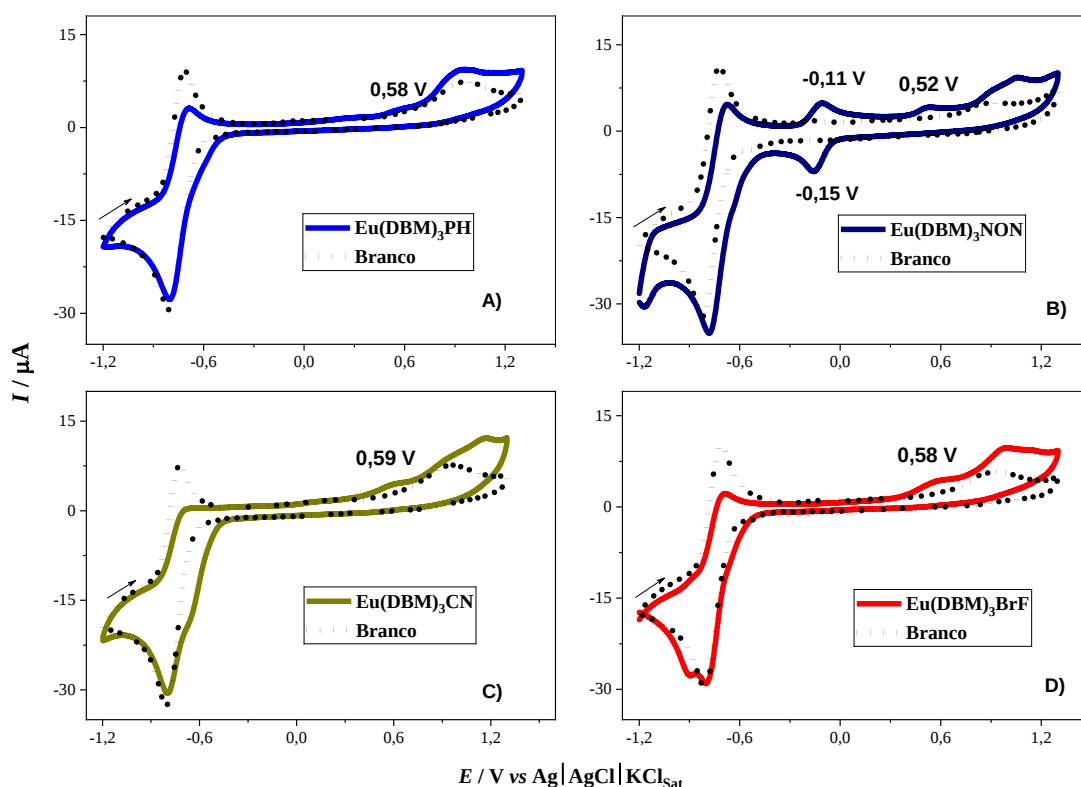


Figura 18. Voltamogramas obtidos usando o GCE. a) Eu(DBM)₃PH. b) Eu(DBM)₃NON. c) Eu(DBM)₃CN. d) Eu(DBM)₃BrF. Concentração 0,01 M (TBAP 0,1 M). Velocidade de varredura de potencial (v) = 50 mV s^{-1} .

4.2.1. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV)

A técnica na região do IV serviu para comparar os deslocamentos de bandas características dos ligantes com seus respectivos complexos por meio das vibrações de estiramentos e distorções angulares que grupos funcionais e ligações do tipo O-H, C-H, C-C, C=N, M-L etc. apresentam quando expostos a energia aplicada.

Uma das principais evidências da coordenação do ligante dicetona (DBM) aos complexos é o deslocamento observado na banda correspondente à ligação C=O. Em todos os complexos analisados, essa banda apresenta um deslocamento para menores energias (Figs. 19, 21, 22 e 23), o que é atribuído à forte interação eletrostática entre o íon Eu e o ligante. Essa interação enfraquece a ligação C=O, resultando em deslocamentos médios de 1610 cm^{-1} para uma faixa de aproximadamente $1596\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$. (Tabela 5). Destacando ainda nesse ligante, conta-se com aparecimento do estiramento $\nu\text{C-O}$ (hidroxila) em cerca $1416\text{-}1373\text{ cm}^{-1}$ pós coordenação. Para todos os complexos também foi possível observar o aparecimento do estiramento $\nu\text{Eu-O}$ (DBM) em regiões de menores energias (faixas de $514\text{-}506\text{ cm}^{-1}$) condizentes com complexos semelhantes na literatura^{11,53}.

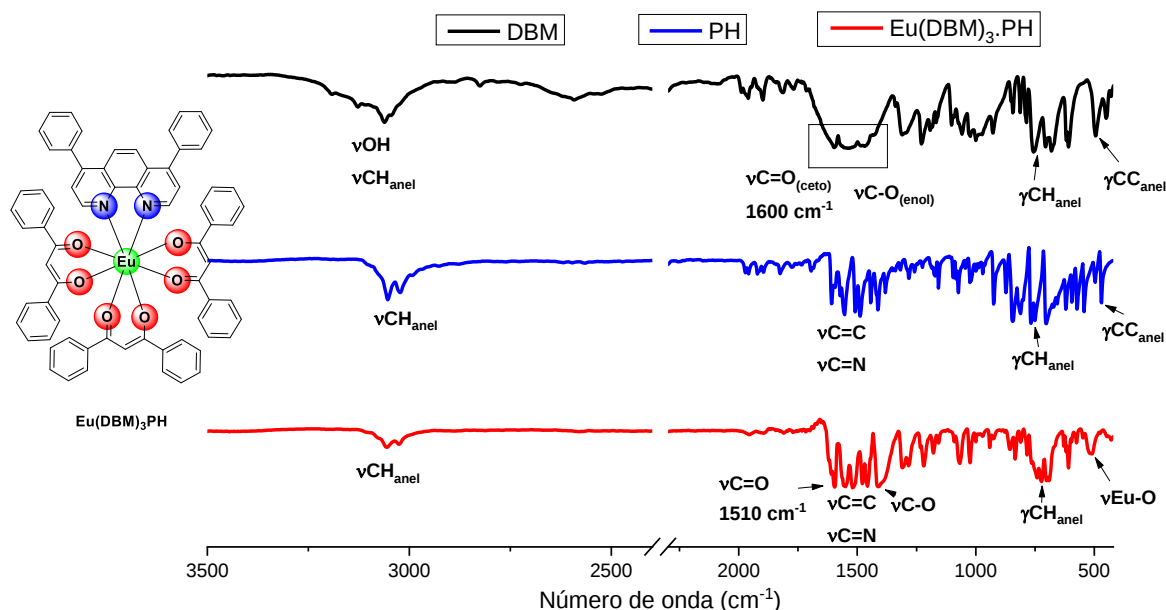


Figura 19. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm^{-1} .

Um aspecto crucial considerado no planejamento estrutural dos complexos é evidenciado pela análise em espectroscopia de infravermelho (IV). A ausência de ligantes, como moléculas de água, na esfera de coordenação é particularmente relevante devido ao impacto que esses ligantes têm na supressão da fluorescência. Nos espectros obtidos, observa-se a ausência de bandas de estiramento do tipo νOH e dos alargamentos característicos causados por ligações de hidrogênio. Esses efeitos, bastante evidentes no ligante DBM, conferem a ele um espectro alargado devido às interações de hidrogênio, mas estão ausentes nos complexos planejados, indicando a eficácia do design estrutural em evitar tais interferências. Para uma maior aprofundamento na discussão realizou-se a comparação do espectro do precursor $\text{Eu}(\text{DBM})_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ (que cota com a presença de duas moléculas de água em um complexo octa-coordenado) e como a relocação dos ligantes fenantrolínicos coordenadas no lugar do ligante aqua alteram os espectros de IV

eliminando a vibração característica de νOH (Fig 20a, 20b e A12). O estiramento νOH é presenciado na região de $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$.

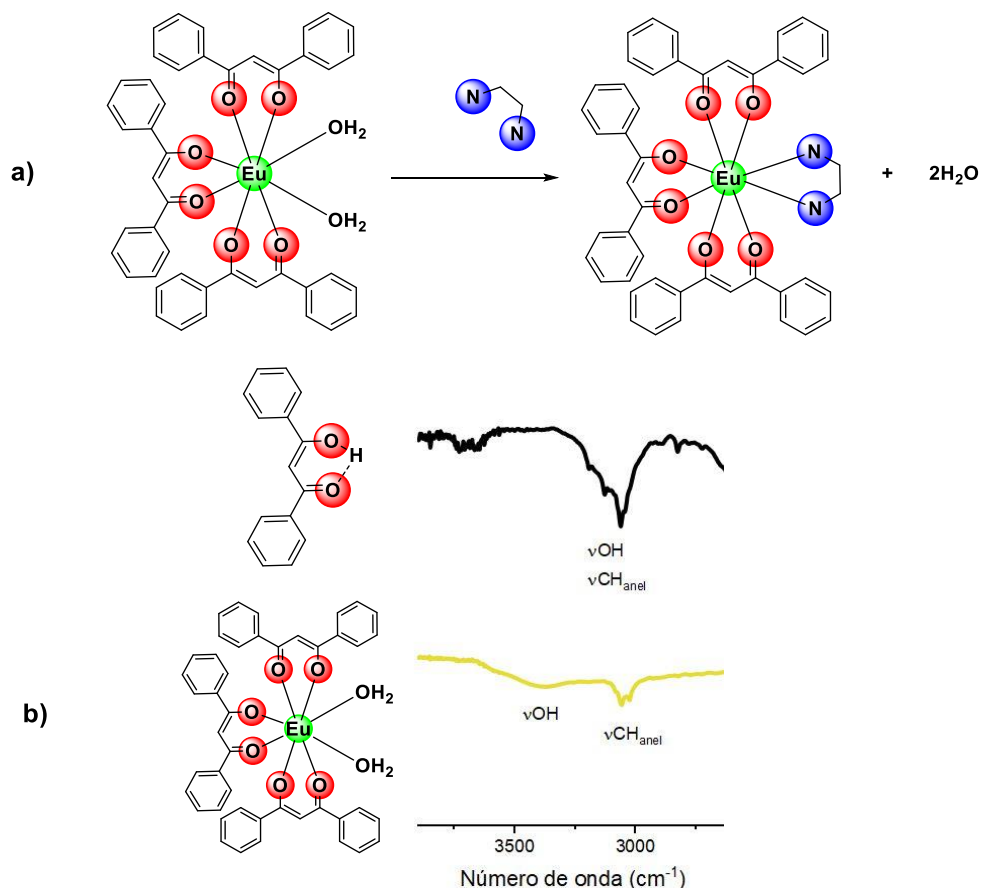


Figura 20. a) Esquema de substituição das águas coordenadas no precursor $\text{Eu}(\text{DBM})_3(\text{H}_2\text{O})_2$ por ligantes fenantrolínicos. b) IV cortado na região acima de 3000 cm^{-1} para o ligante DBM e seu respectivo precursor.

Outras mudanças nos espectros comparados aos ligantes livres estão no aparecimento do estiramento $\nu\text{C}=\text{N}$ nas regiões de $1576\text{-}1441\text{ cm}^{-1}$ provenientes dos ligantes fenantrolínicos já que outros tipos de estiramentos como νCH , $\nu\text{C}=\text{C}$ e γCH são provindos dos dois ligantes DBM e fenantrolinas presentes nas esferas de coordenações dos quatros diferentes complexos.

Para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3.\text{NON}$ (Fig 21), o ligante fenantrolina estendido apresenta o grupo funcional furazano (N-O-N), tal estiramento se apresenta em 1332 cm^{-1} , no ligante livre e 1312 cm^{-1} para o complexo^{29,55}.

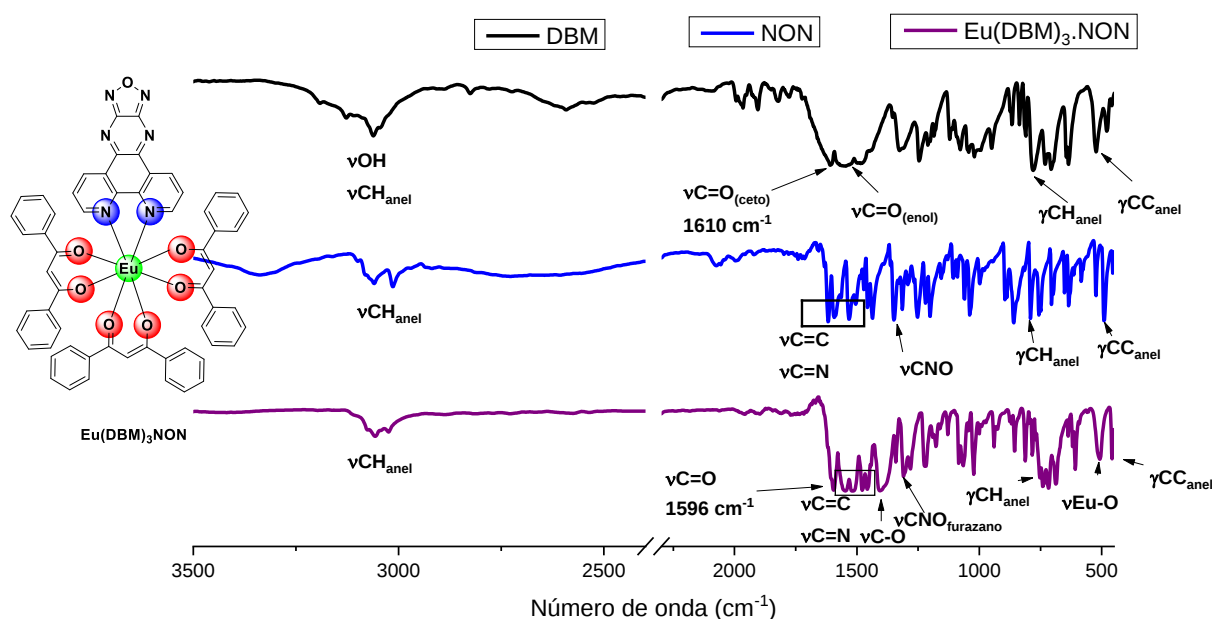


Figura 21. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm^{-1} .

O complexo com fenantrolina com grupos funcionais nitrilas $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ é um bom parâmetro ao se comparar a coordenação tanto da dicetona quanto do ligante CN (Fig. 22), isso porque a estiramento νCN aparece em regiões livres de outras vibrações providas das espécies coordenadas.

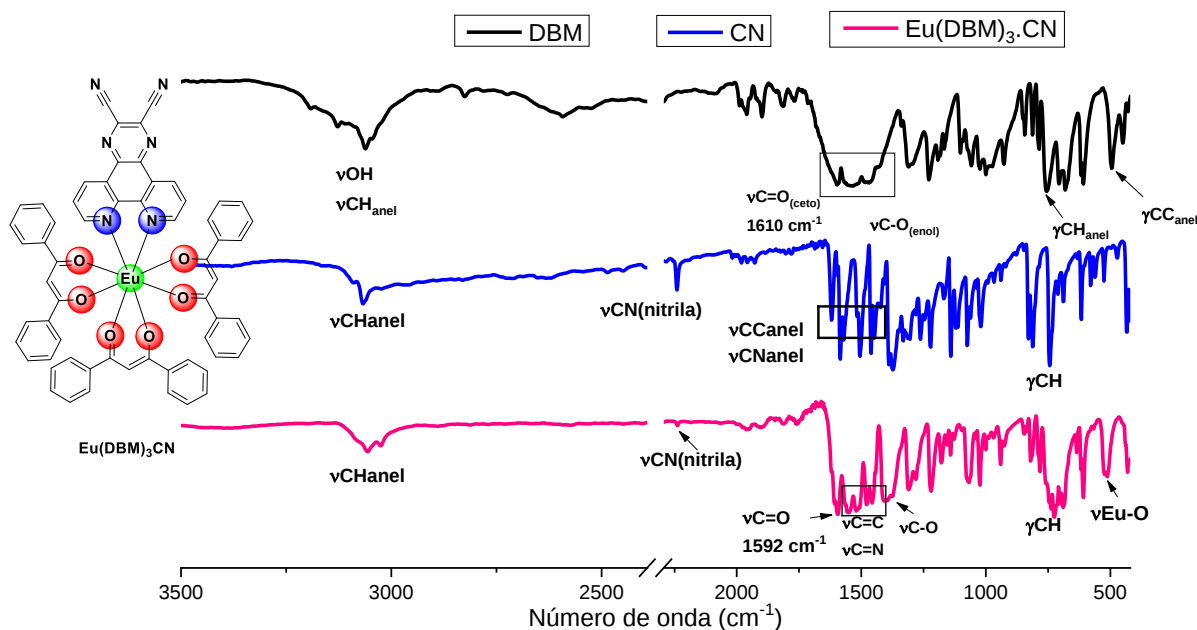


Figura 22. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de 4000-400 cm^{-1} .

Por exemplo, para o ligante livre o estiramento νCN se encontra em 2238 cm^{-1} ¹²⁹, já para o complexo com uma intensidade menor em 2237 cm^{-1} , não se observa grandes deslocamento, provavelmente por conta da distância de ligação entre o grupo nitrila das ligações próximas a coordenação ao metal. Consequentemente para o quarto complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ os estiramentos referentes ao anel halogenado podem ser difíceis de identificar, por aparecerem em regiões de menor frequências juntamente com outras bandas atribuídas a deformações dos anéis aparecem. Os estiramentos aril fluoreto e brometo apresentam estiramentos em 1071 cm^{-1} ($\nu\text{C-Br}$) e 1220 ($\nu\text{C-F}$) e para os ligantes e 1072 e 1023 cm^{-1} para os complexos respectivamente^{56,57}. Fig 23. Além disso, um resumo de todos os estiramentos discutidos está apresentado na Tabela 5.

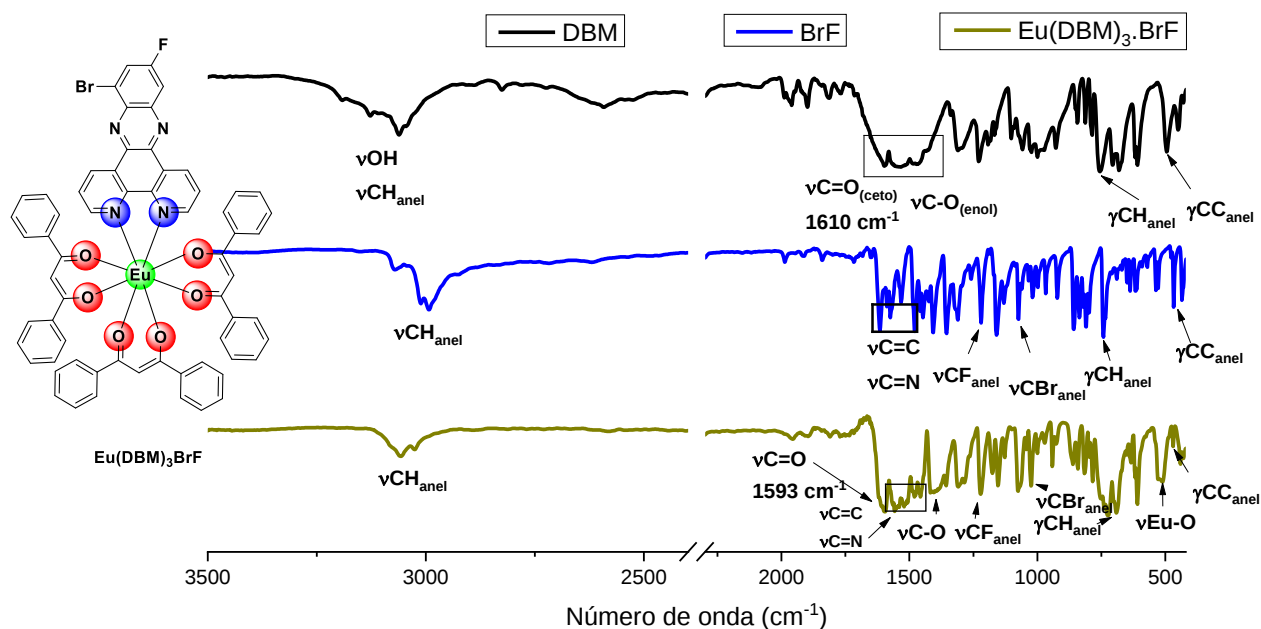


Figura 23. Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de $4000\text{--}40\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 5. Atribuições das principais bandas do infravermelho para os ligantes e complexos.

Atribuições	Ligantes/Complexos (cm^{-1})				
	DBM	EuPH	EuNON	EuCN	EuBrF
$\nu\text{CH}_{\text{anel}}$	-	3117- 2949/3112- 2984	3101- 2954/3124- 2966	3122- 2990/3118- 2990	3083- 2929/3121- 2965
νOH	3216- 2944	-	-	-	-
$\nu\text{CN}(\text{nitrila})$	-	-	-	2238/2237	-
$\nu\text{CC}/\text{CN}_{\text{anel}}$	enc	1612- 1461/1455- 1354	1616-1476/ 1579-1442	1618-1458/ 1567-1449	1616-1479/ 1567-1456
$\nu\text{CO}_{(\text{ceto})}$ - $\nu\text{CO}_{(\text{enol})}$	1600- 1468	-/1510-1413	-/1596-1406	-/1592-1398	-/1593-1410
νNON	-	-	1332/1312	-	-



vCF	-	-	-	-	1220/1219
vCBr	-	-	-	-	1072/1023
γCHanel	755	755/721	767/756	742/721	737/722
γCCanel	492	468/enc	463/456	enc/enc	465/468
vEuO	-	514	506	510	508

v= estiramento; γ= deformações fora do plano; enc= encorbertto.

4.2.2. Caracterizações via Ressonância Magnética dos Complexos

Apesar do paramagnetismo apresentados pelos complexos a base de Eu(III) devido aos seis elétrons desemparelhados $4f^6$, (vide a as susceptibilidades magnéticas mostradas na Tabela 4) a caracterização por RMN fora utilizada para demonstrar a obtenção dos complexos trabalhados. É interessante notar a perda de multiplicidade dos sinais dos ligantes quando esses coordenados, e os grandes deslocamentos que alguns prótons sofrem, esses efeitos são caracterizados pelas interações entre o momento nuclear magnético (spin) dos núcleos diamagnéticos (ligantes) com os elétrons f desemparelhados do íon, que também gera um campo magnético. Isso acarreta em uma interferência no ambiente como um todo, essas mudanças podem ser apresentadas por meio de interações dipolo-dipolo ou pela deslocalização dos elétrons do Eu(III)³³. Em sistemas semelhantes descritos na literatura as interações eletrostáticas (dipolo-dipolo) são mais evidentes já que os orbitais $4f$ são blindados por orbitais $5s$, $5p$ e devido a essas propriedades, aqueles hidrogênios próximos a ligação ao metal como os Ha e grupo Metino (C-H) sofrem os maiores efeitos paramagnéticos observados^{33,34,58}(Figs 24,29,30 e 31).

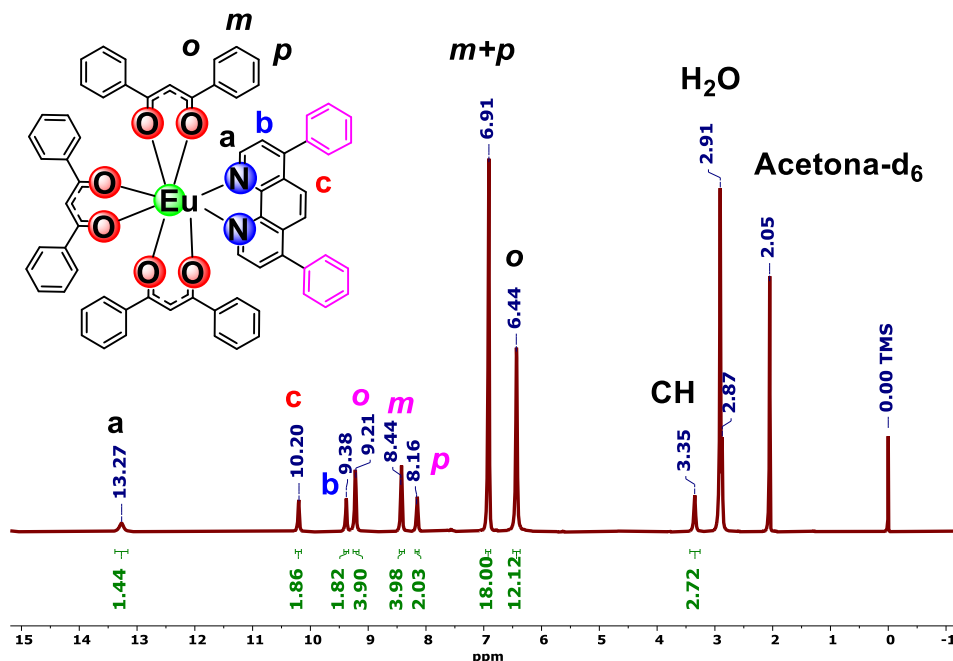


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ Solvente: Acetona- d_6 .

Como supracitado os efeitos de deslocamento são experimentados por todos os prótons, porém mais fortemente naqueles próximos as ligações ao metal. Consequentemente, vale ressaltar a pequena diferença comparativa da análise feita em diferentes solventes entre ligantes e complexos. Para o composto $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, observa que o hidrogênio de sigla Ha referente a fenantrolina sofre um grande deslocamento para regiões desblindadas de 4,03ppm, quando comparado com esse livre ($\text{H}\Delta\delta = \text{ppm}(\text{coordenado}) - \text{ppm}(\text{ligante livre})$). Já o hidrogênio C-H (DBM) experimenta um efeito contrário de blindagem, com um deslocamento de -3,93ppm. Pelas integrais constatou-se a coordenação do equivalente a três ligantes dicetonas, totalizando trinta prótons referentes 3DBM:Eu. Também pode-se perceber a grande separação nos hidrogênios, *orto*, *meta* e *para*, na parte do ligante fenantrolínico (PH), quando se comparado com o ligante livre (Figs 13 e A7), os efeitos paramagnéticos são mais pronunciáveis neste ligante, vide as integrais, principalmente do hidrogênio Ha que se encontram abaixo dos valores esperados.

O mapa de contorno (COSY) também foi realizado para complementar a caracterização do sistema. No entanto, foi possível aplicá-lo apenas ao complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, devido os efeitos paramagnéticos interferir mais fortemente nos demais complexos (Fig. 25).

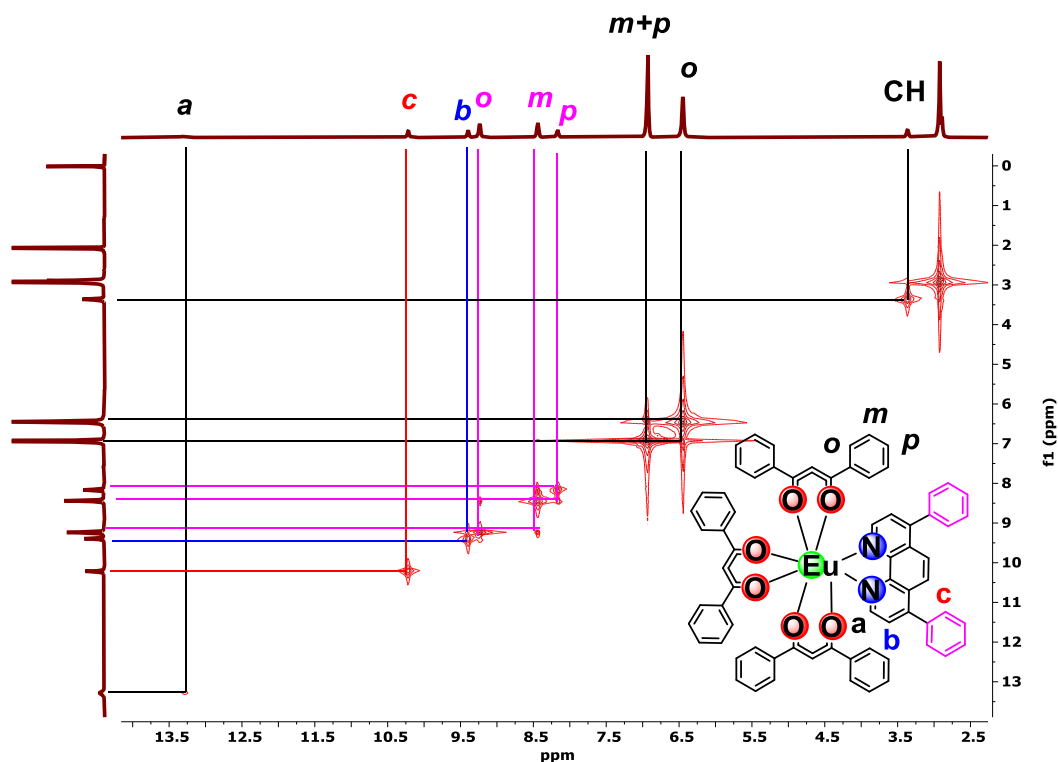


Figura 25. Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. Solvente: Acetona- d_6 .

Ao analisar a Figura 25 observa-se os acoplamentos entre si dos três sistemas de prótons distintos, por exemplo, sistemas *orto*, *meta* e *para* do ligante DBM. Assim como o sistema do anel fenílico (fenantrolina), com as integrais sendo 4:4:2 para os hidrogênios *orto*, *meta* e *para*, respectivamente, já o sistema de prótons, que fazem parte do conjunto de anéis característicos da fenantrolina, não apresentam esses tipos acoplamentos. Para a fenantrolina também foi possível caracterizar os carbonos vias mapas de contornos por meio do HSQC (^1H - ^{13}C) e HMBC (^1H - ^{13}C). Para uma melhor compreensão a estrutura do complexo foi apresentada de maneira simplificada já que os carbonos não se apresentam duplicados devido ao ambiente químico total do composto.

Via HSQC (Fig. 26), foi possível identificar todos os carbonos diretamente ligados aos seus respectivos prótons, exceto o próton Ha referente ao ligante PH devido à proximidade ao centro paramagnético, na Figura 27, é apresentada a região expandida para uma melhor visualização dos sinais, as intensidades dos sinais corroboram com suas respectivas quantidades de carbonos, por exemplo, o sinal em 124,78 ppm é condizente a todos carbonos da parte da dicetona nas posições *orto*, *meta* e *para*, enquanto que os carbonos em 131,29 ppm somente são atribuídos aqueles nas posições *meta* e *para*. Também foi possível notar que o carbono C34 acompanha a blindagem experimentada pelo próton metino (C-H).

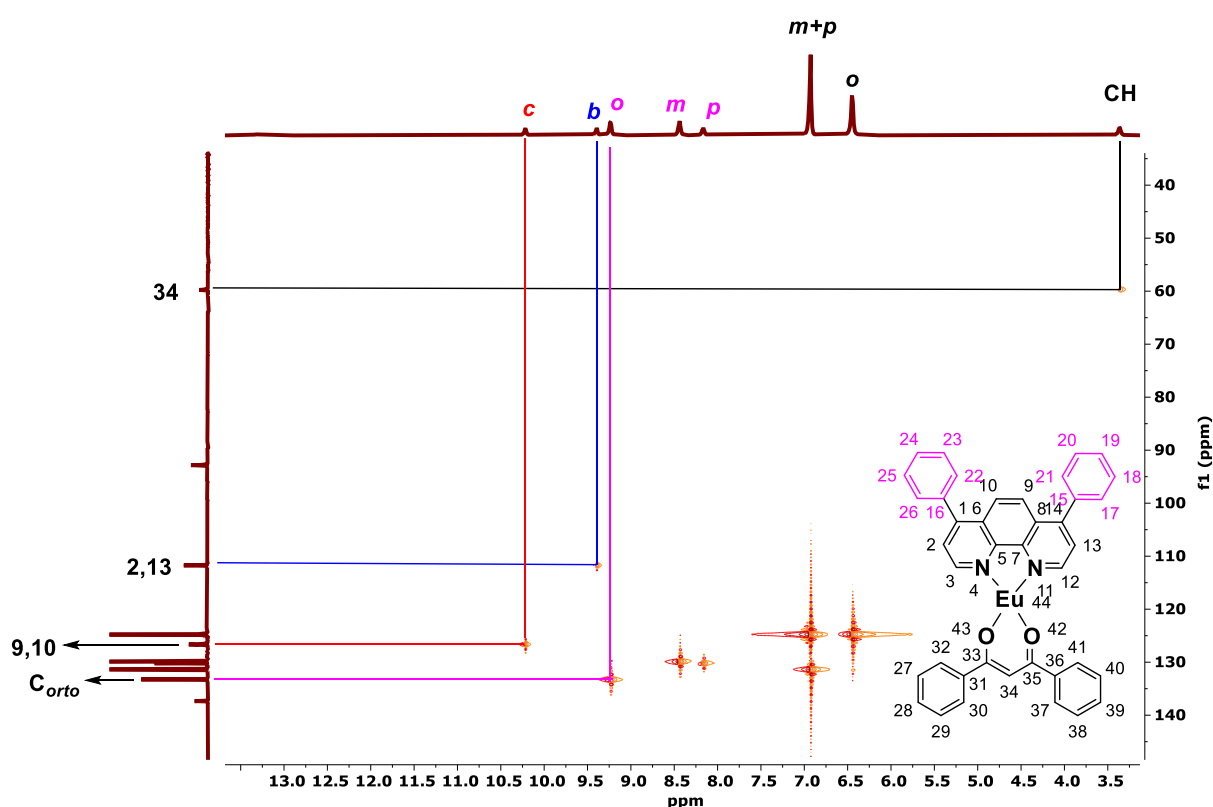


Figura 26. Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. Solvente: Acetona- d_6 .

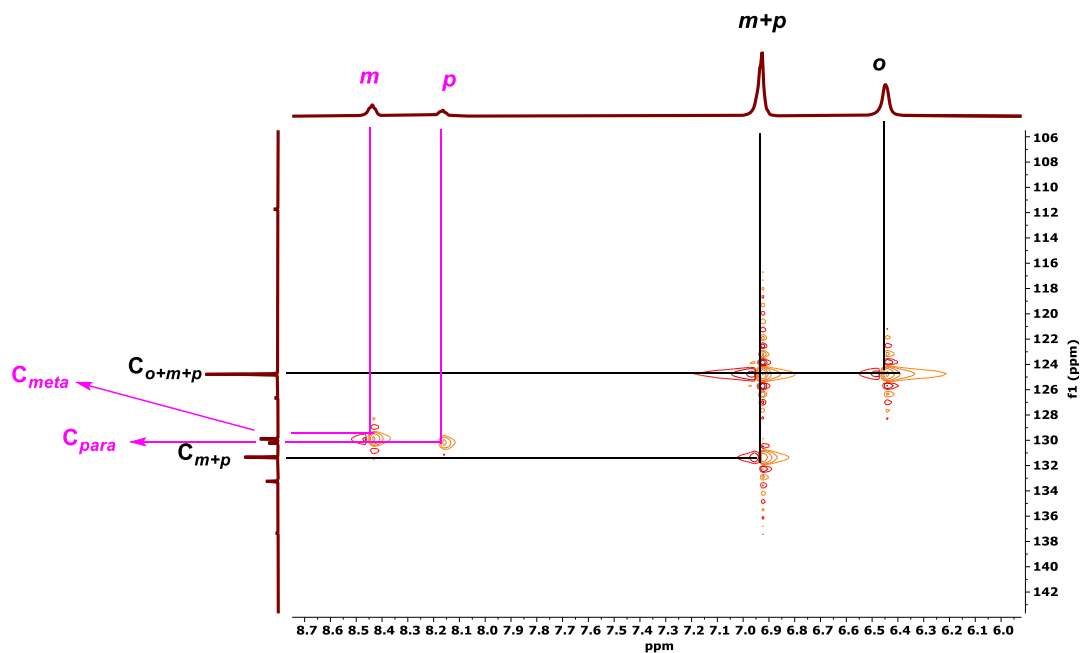


Figura 27. Região expandida para uma melhor visualização dos acoplamentos orto, meta e para dos ligantes complexados. Solvente: Acetona- d_6 .

Consequentemente a caracterização dos carbonos faltantes fora realizada com auxílio da técnica HMBC (^1H - ^{13}C), Figura. A13, e os carbonos totais via espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ na Figura 28 a seguir:

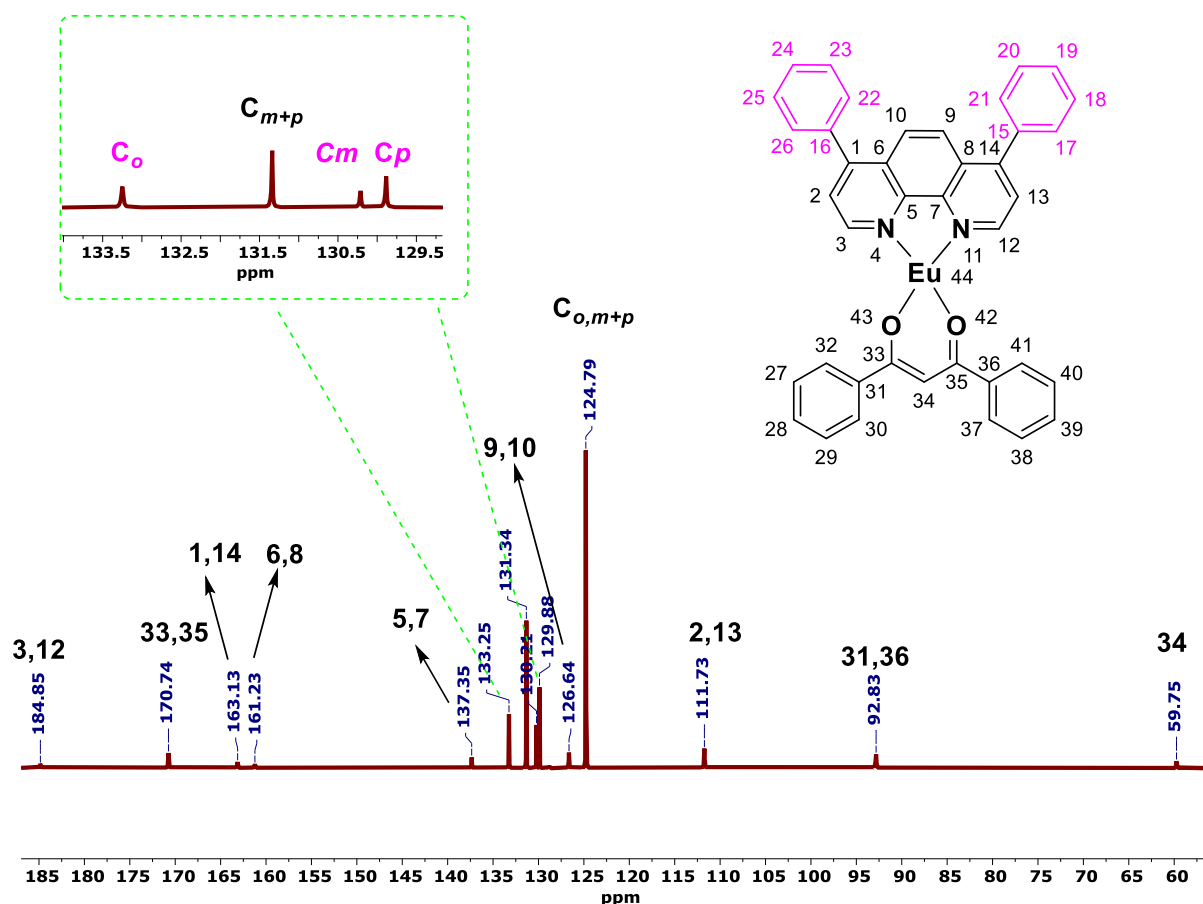


Figura 28. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ Solvente: Acetona- d_6

Por não exibirem acoplamentos com nenhuma das espécies os carbonos C3,12 foram caracterizados apresentando as maiores desblindagens (184,85 ppm) acompanhando os mesmos efeitos apresentados pelos seus prótons Ha'/a'' . Os carbonos diretamente ligados aos oxigênios C33,35, foram caracterizados devido aos acoplamentos a longa distância com o hidrogênio C-H, nesse caso observa-se que o efeito paramagnético rege os efeitos de deslocamentos, já que em teoria espera-se que carbono diretamente ligado a oxigênio do tipo cetona ($\text{C}=\text{O}$) apresente os maiores deslocamentos que os carbonos 3,12⁵⁹.

Para os complexos com as fenantrolinas estendidas (Figs 29-31), percebe-se que os prótons referentes aos anéis planares sofrem grandes deslocamentos para regiões mais desblindadas, porém isso ocorre de maneira conjunta respeitando as respectivas ordens dos respectivos ligantes livres. A parte referente a

dicetona também experimenta efeitos contrários de blindagem, vale destacar os deslocamentos próximos apresentados para os complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ de cerca 6,82 e 6,04 ppm para a parte *orto*, *meta* e *para* (DBM) assim como do C-H (~2,69 e 2,71 ppm respectivamente).

Referente ao complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ (Fig 31) são expostos os mesmos efeitos, mas dando mais ênfase na grande perda de multiplicidade e intensidade nos sinais provindos do ligante BrF, mas por meio das integrais observou-se a presença dos oito prótons esperados, referentes aos hidrogênios do ligante planar assimétrico, e no sistema geral a proporção foi de 1:1:3 onde BrF:Eu:DBM.

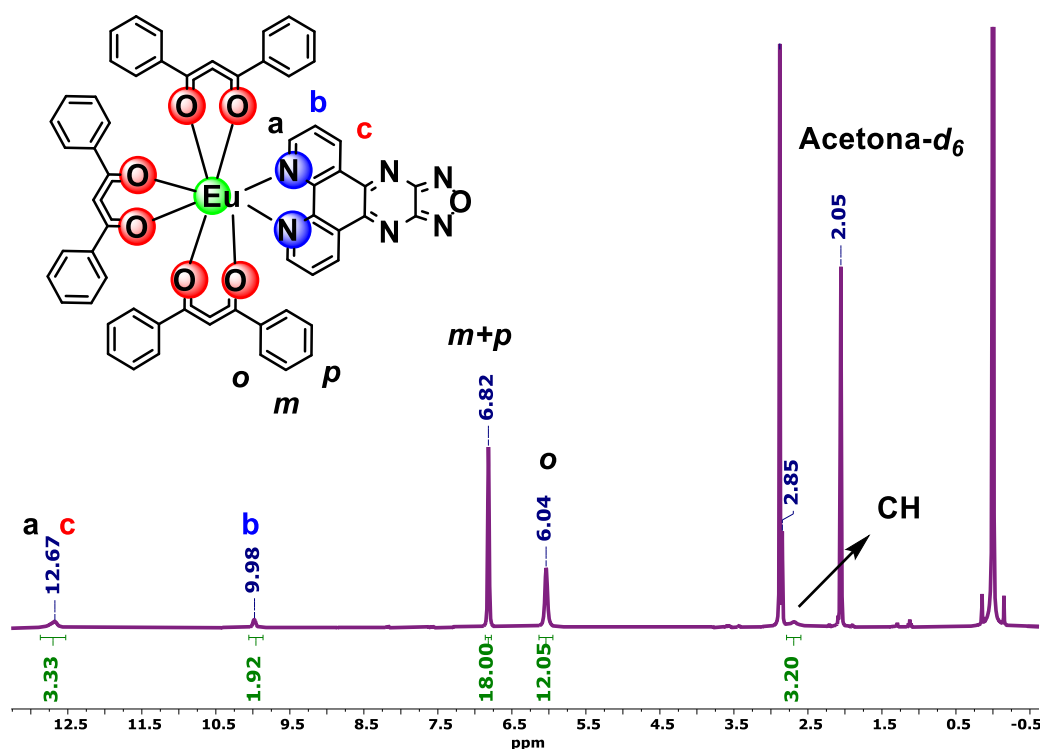


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ Solvente: Acetona- d_6 .

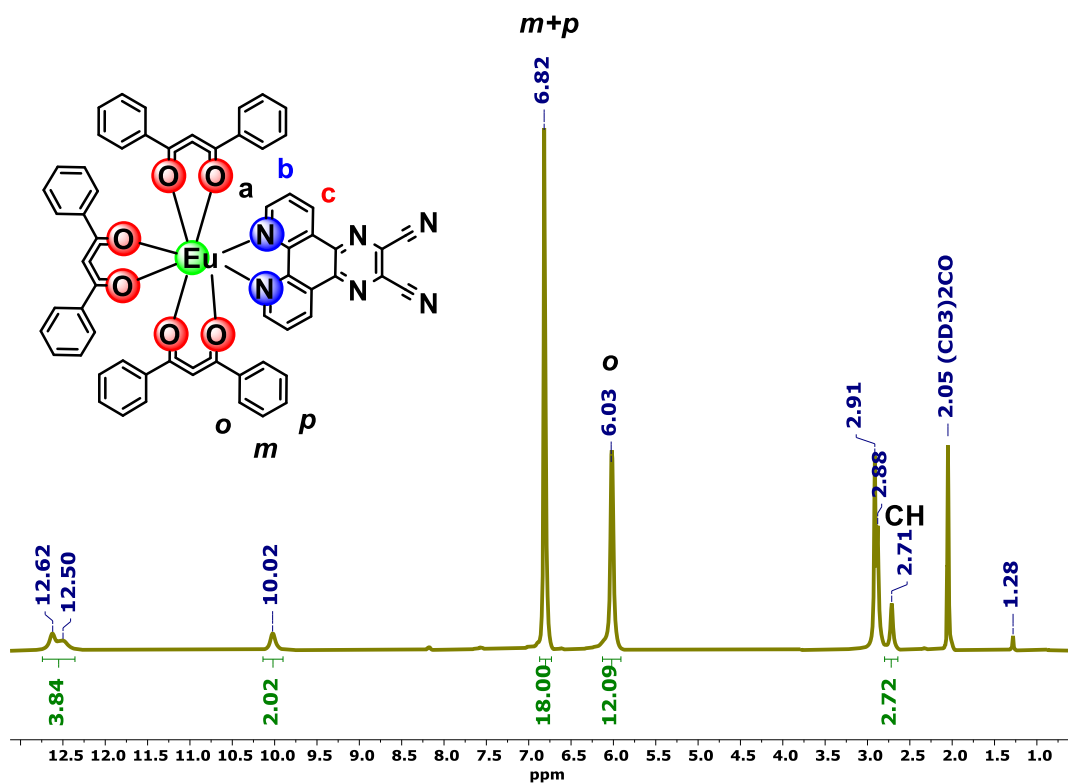


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ Solvente: Acetona- d_6 .

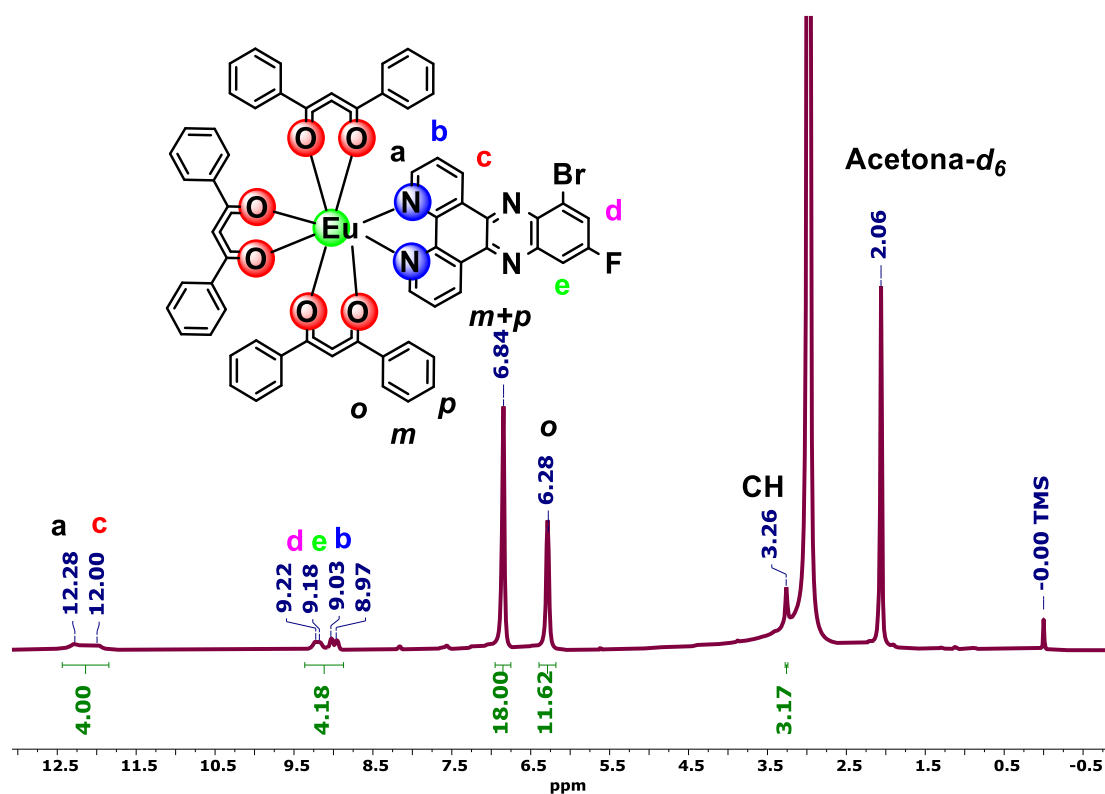


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ Solvente: Acetona- d_6 .

De maneira geral é interessante notar que o efeito paramagnético apresentado na técnica serviu para confirmar a obtenção dos complexos, apesar dos sinais se apresentarem alargados foi possível determinar as integrais esperadas para os ligantes presentes no arcabouço molecular do metal, além disso foi importante notar a natureza das ligações de caráter predominantemente eletrostáticos entre metal e ligantes.

Por fim, um resumo dos deslocamentos paramagnéticos (os deslocamentos dos ligantes podem ser encontrados na Tabela. 5) de alguns prótons pós coordenação são expostos na Tabela. 6 a seguir, onde é notável, que de maneira geral os efeitos são bastante parecidos, quando se compara a série de complexos devido suas similaridades isoeletrônicas e isoestruturais.

Tabela 6. Comparação dos deslocamentos paramagnéticos versus diamagnéticos ($\Delta\delta$).

Compostos	Deslocamentos paramagnéticos $\text{H}\Delta\delta^*$ em ppm					
	Ha	Hb	Hc	Hd	He	CH(DBM)
$\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$	4,02	1,79	2,34	-	-	-3,93
$\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$	enc**	2,05	3,44	-	-	-4,59
$\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$	3,24	1,99	3,16	-	-	-4,57
$\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$	2,75	1,26	2,73	1,33	1,20	-4,02

* $\text{H}\Delta\delta = \text{ppm}(\text{coordenado}) - \text{ppm}(\text{ligante livre})$, deslocamento dos ligante livres pode ser encontrado na tabela 5.

** Região encoberta

4.2.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Diferentemente da técnica de IV, na qual uma energia é aplicada para causar vibrações nas moléculas, no UV-Vis utiliza-se uma energia de frequência mais alta, capaz de promover elétrons de níveis energéticos mais baixos (estado fundamental) para níveis energéticos mais altos (estado excitado) em átomos, moléculas ou complexos. Geralmente as prováveis transições, resumidamente, ocorrem nos orbitais preenchidos de mais altas energias (HOMOS), para orbitais vacantes de mais baixas energias (LUMOS)⁵⁷.

Se tratando dos sistemas aqui trabalhados os ligantes orgânicos possuem transições de caráter σ e π (estados fundamentais) para estados excitados σ^* e π^* (*=antiligante). Fig 32.

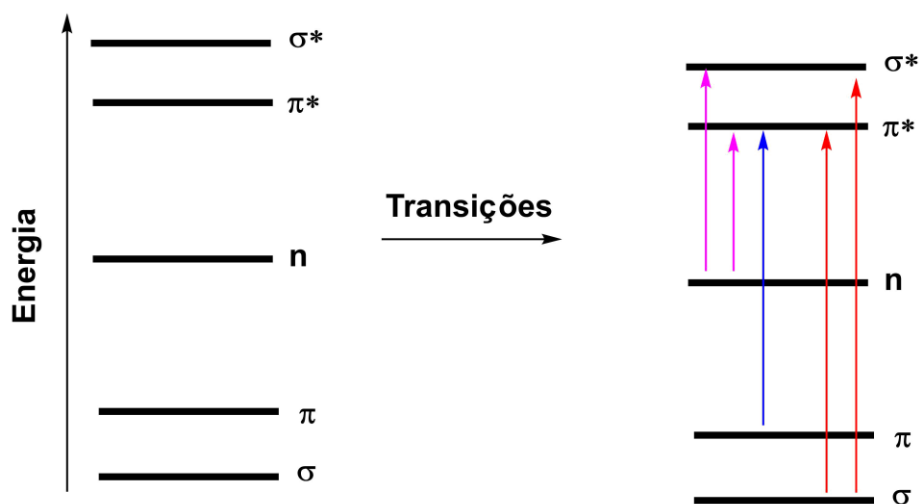


Figura 32. Os diferentes níveis eletrônicos e suas possíveis transições em ligantes orgânicos⁵⁹.

Diante disso essas transições podem ser analisadas devido absorbância em comprimentos de ondas específicos via técnica de ultravioleta visível. Por

exemplo os complexos aqui trabalhados (Fig 33), apresentam bandas de absorções nas faixas de 260 a 400 nm.

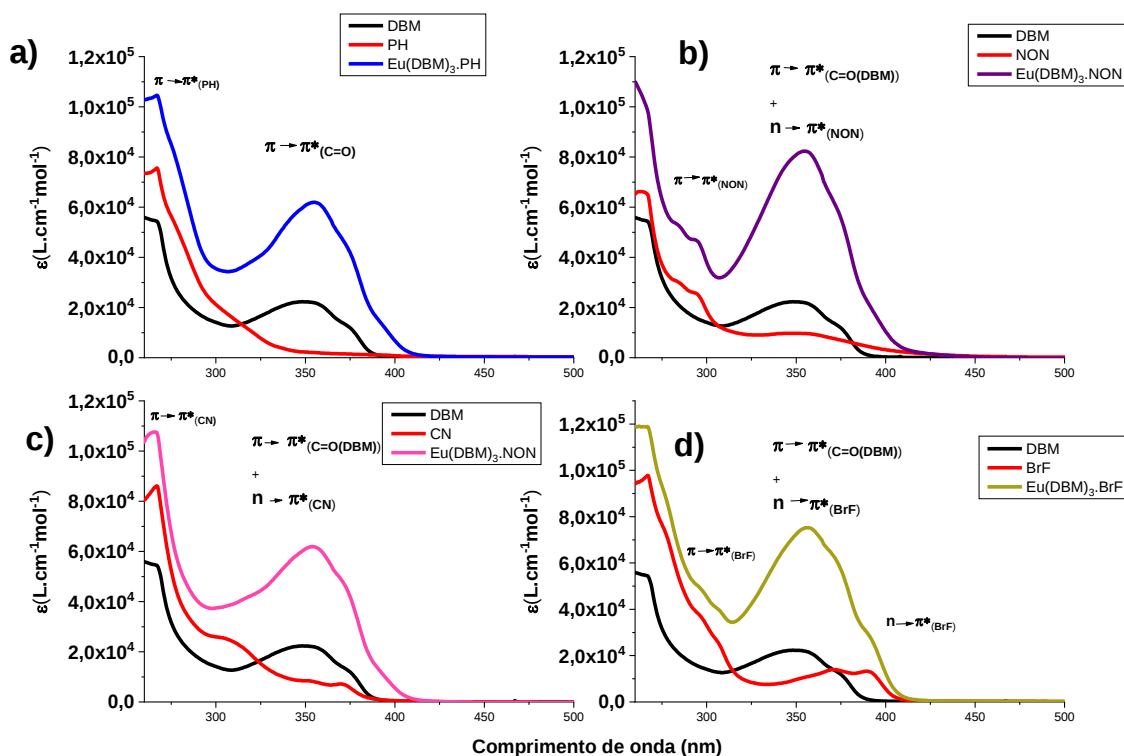


Figura 33. Espectros de UV-Vis para os complexos em comparação com seus respectivos ligantes. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$; b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$; c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentrações $1 \times 10^{-5} \text{M}$ em DMSO.

O ligante Dibenzoilmetano (DBM), apresenta duas transições do tipo $\pi-\pi^*$, uma referente as transições presentes nos anéis aromáticos em 266 nm, tais bandas são mais difíceis de visualizar devido a absorção do solvente ($\text{DMSO} \pm 260 \text{ nm}^{57}$), outra transição de mesmo caráter pode ser vista em 350 nm, que são provindas da transição carbonila $\text{C}=\text{O}^{60}$. Já os ligantes fenantrolinas variam de acordo com os substituintes, por exemplo o ligante PH, por apresentar somente ligações aromáticas tem suas transições em maiores energias (menores

comprimentos de ondas). Ao decorrer da série dos complexos, os ligantes com substituintes NON (furazano), CN (nitrila) e BrF (Halogênios) possuem bandas entre 300 a 400 nm devido as possíveis transições de elétrons não ligantes, essas do tipo $n-\pi^*$, que são de menores energias²⁹.

Quando essas transições são comparadas aos respectivos complexos, nota-se que todas transições referentes aos ligantes coordenados ao arcabouço molecular do metal se encontram presentes, o que ocorre é um grande aumento nas intensidades (um efeito hipercrômico), isso é esperado por conta da proporção 3:1 entre ligante DBM e Európio, além disso as bandas dos respectivos ligantes derivados da fenantrolina podem atuar nessas somas de absorbâncias justamente por estarem sobrepostas em regiões de mesma transições do ligante dicetona ($C=O$).

Para uma melhor visualização das transições foram feitas as deconvoluções para todos os complexos (Fig 34). Pode-se observar que as maiores contribuições em termos de transições provêm do ligante DBM. Isso ocorre quando uma banda experimental alargada é compatível com quatro transições de caráter $\pi-\pi^*$, conforme indicado pelos dados teóricos, vide o complexo $Eu(DBM)_3PH$ que não apresenta contribuição do ligante fenantronílico nessa região (Fig. 34a). As contribuições dos ligantes planares são melhores visualizadas para os complexos $Eu(DBM)_3NON$ e $Eu(DBM)_3BrF$ (Fig. 34b e d), quando foi possível identificar as transições de caráter $\pi-\pi^*$ em cerca de 300 nm, bem como a transição $n-\pi^*$ em aproximadamente 400 nm provindas de pares de elétrons não ligados dos grupos halogenado bromo e flúor.

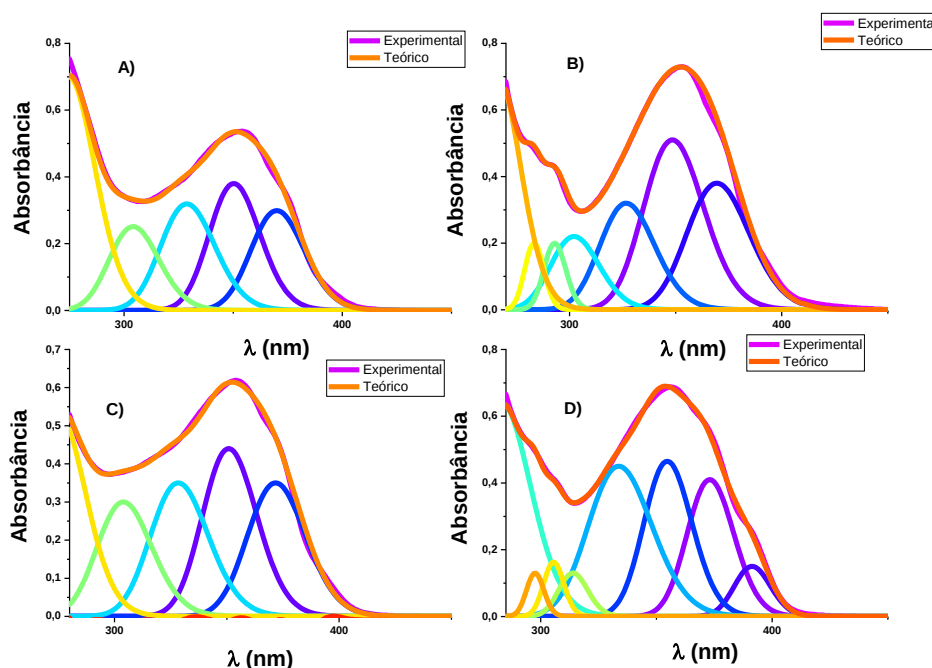


Figura 34. Decovoluções para os complexos. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$; b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$; c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Software MatLab.

Os íons lantanídeos possuem características espectroscópicas incomuns, por exemplo, as transições do tipo $f-f$ são proibidas pela regra de Laporte (transferências de mesmas paridades são proibidas¹⁵) o que acarreta em absorvidades molares baixas ($\epsilon < 1 \text{ M}^{-1}$), além do mais a proteção experimentada pelos orbitais $4f$, geram acoplamentos poucos evidentes com os orbitais dos ligantes, o que reflete em pequenos deslocamentos em relação aos ligantes livres e como consequências as transições de cargas ligante metal (TCLM) podem ser quase não evidenciadas ou sobrepostas por transições inteiramente dos ligantes, como observado nos espectros acima⁹. Porém os ligantes cromóforos utilizados neste trabalho têm papéis fundamentais nas propriedades espectroscópicas quando se trata das emissões na região de $\sim 600 \text{ nm}$, as quais serão discutidas mais a fundo na próxima sessão. Por fim a natureza das transições até aqui discutidas são exemplificadas na tabela 7 abaixo, juntamente com suas absorvidades molares (ϵ).

Tabela 7. Transições referentes aos ligantes e seus respectivos complexos, comprimentos de ondas (nm) por Absortividades Molares ϵ (L. $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$). Solvente: DMSO e concentrações de $1 \times 10^{-5}\text{M}$.

Ligantes	Transição	(Comprimento de onda nm) ϵ (L. $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
DBM	$\pi \rightarrow \pi^*$	(267) 54.000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(350) 22.000
PH	$\pi \rightarrow \pi^*$	(267) 75.000
NON	$\pi \rightarrow \pi^*$	(285) 30.000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(294) 26.000
	$n \rightarrow \pi^*$	(354) 9.800
CN	$\pi \rightarrow \pi^*$	(271) 87000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(307) 24.800
	$n \rightarrow \pi^*$	(354) 8.200
	$n \rightarrow \pi^*$	(370) 7.100
BrF	$\pi \rightarrow \pi^*$	(296) 37.600
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(306) 26.200
	$n \rightarrow \pi^*$	(371) 13.800
	$n \rightarrow \pi^*$	(390) 13.200
Complexos	Transição	(Comprimento de onda nm) ϵ (L. $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
Eu(DBM) ₃ PH	$\pi \rightarrow \pi^*$	(267) 100.000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(355) 62.000
Eu(DBM) ₃ NON	$\pi \rightarrow \pi^*$	(284) 53.000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(295) 46.700
	$\pi \rightarrow \pi^* +$	(355) 82.000
	$n \rightarrow \pi^*$	
Eu(DBM) ₃ CN	$\pi \rightarrow \pi^*$	(266) 107.500
	$\pi \rightarrow \pi^* +$	(354) 61.900
	$n \rightarrow \pi^*$	
Eu(DBM) ₃ BrF	$\pi \rightarrow \pi^*$	(296) 49.500
	$\pi \rightarrow \pi^*$	(306) 40.600

$\pi \rightarrow \pi^*$	(357) 75.200
$n \rightarrow \pi^*$	(391) 28.500

4.2.4. Espectroscopia de Luminescência e dados Fotofísicos

Os complexos de Eu(III) exibem uma intensa emissão no vermelho (613-616 nm), após a excitação de bandas provindas dos ligantes no UV-Vis (Fig 35). Para uma melhor visualização das transições via fluorescência, os espectros também são expostas separadamente em apêndice (Figs A14-17).

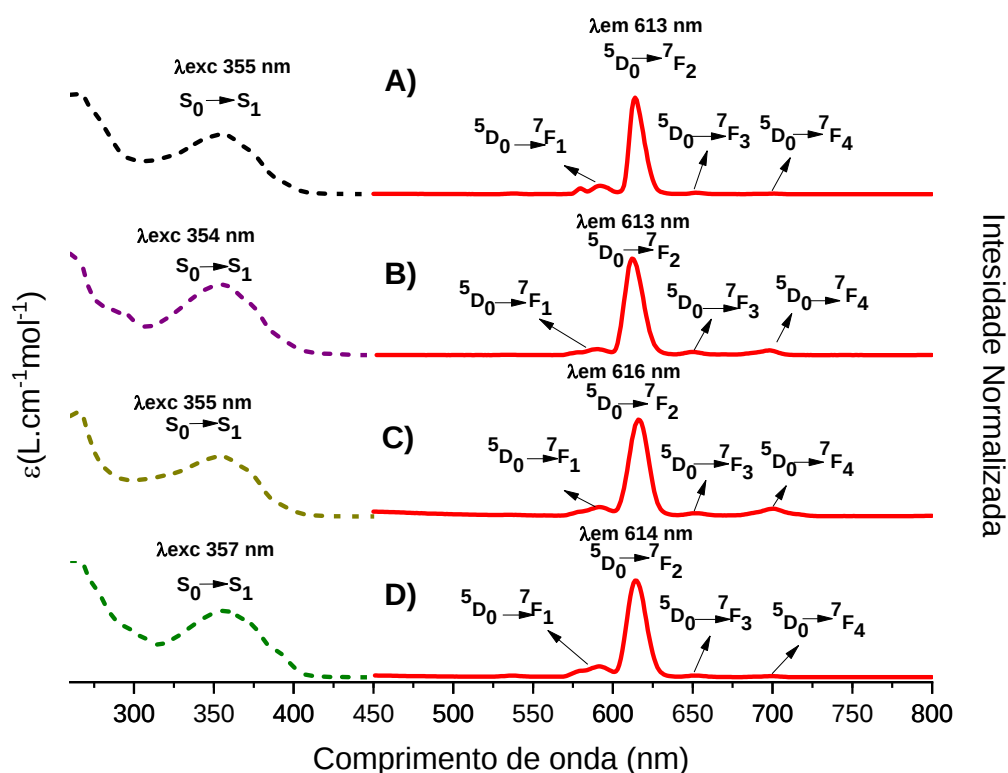


Figura 35. Espectros de Absorbância (excitação 354-355 nm) e de Fluorescência dos complexos (emissão 613-616 nm). a) Eu(DBM)₃PH. b) Eu(DBM)₃NON. c) Eu(DBM)₃CN. d) Eu(DBM)₃BrF. Solvente: DMSO e concentração de 1×10^{-5} M.

Os espectros de luminescência dos complexos fornecem informações significativamente mais detalhadas do que os espectros de absorção. Isso ocorre

porque, nesses compostos, a absorção é predominantemente influenciada pelos ligantes, que desempenham o papel de antenas. Esses ligantes captam a energia e a transferem posteriormente para os estados excitados de menor energia do Eu(III). Esse processo culmina em um decaimento radiativo, resultando na emissão de fluorescência. Nos complexos estudados, essa emissão é caracterizada pelas transições típicas do Eu(III) do tipo $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ (onde $J=1-4$). A emissão vermelha intensa (Fig. 35 e 36), característica dos complexos de Eu(III), é atribuída principalmente à transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, cuja intensidade e posição são fortemente influenciadas pela simetria local ao redor do íon e pela natureza dos ligantes⁹. As transições do tipo 7F_5 e 7F_6 não foram observadas pois estão fora das faixas detectáveis pelo equipamento utilizado, esse comportamento ocorre devido a regra de Landé onde “o espaçamento entre os níveis de energia aumenta com o valor de J ”, ou seja, quanto maior esse valor, mais separado ele estará dos níveis vizinhos e possivelmente essas transições se encontram no infravermelho⁹. Os dados fotofísicos dos complexos estão apresentados na Tabela 8.

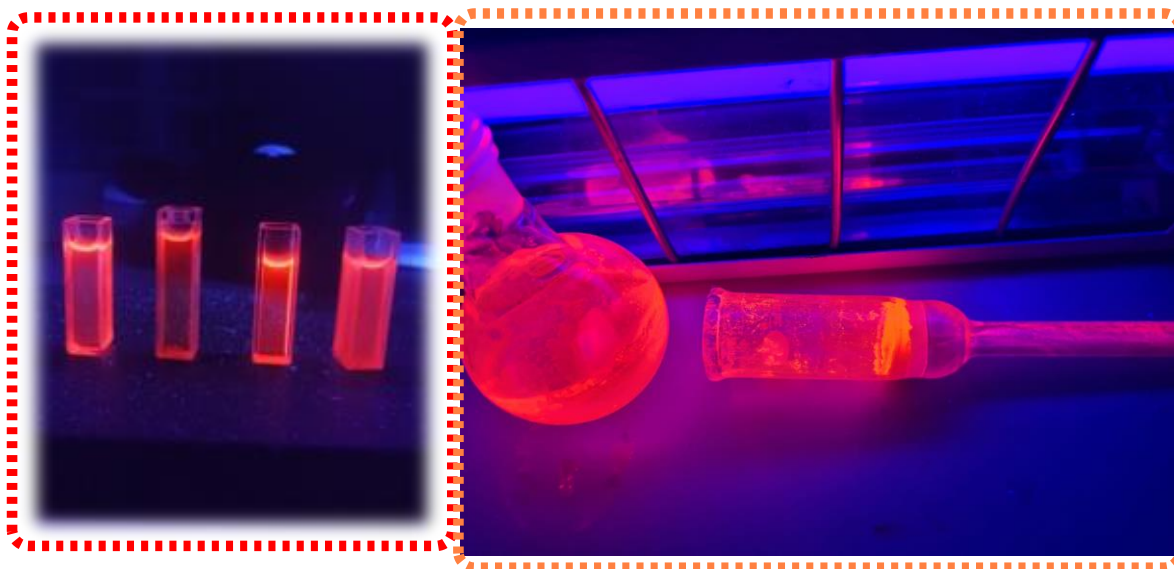


Figura 36. Emissão dos complexos de Eu(III) no vermelho da transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$. Lâmpada UV Cole-Parmer 6W. Comprimento de excitação 365 nm.

Tabela 8. Dados fotofísicos para os complexos a base de Eu(III), como rendimento quântico global (Φ) e tempo de meia vida τ (ms).

COMPLEXOS	Comprimento de onda de excitação – emissão (nm)	Φ_{global} %	Tempo de meia vida τ [ms]
Eu(DBM) ₃ PH	353,84 – 612,40	12,2	0,136 $\pm$ 0,00228
Eu(DBM) ₃ NON	353,84 – 613,14	1,6	0,129 $\pm$ 0,00277
Eu(DBM) ₃ CN	353,84 – 612,40	3,5	0,129 $\pm$ 0,00324
Eu(DBM) ₃ BrF	353,84 – 613,14	1,5	0,123 $\pm$ 0,00283

Observa-se que os tempos de meia-vida para todos os complexos apresentam pequenas variações, de 0,136 a 0,123 ms, o que pode ser atribuído às similaridades estruturais entre os compostos.

O rendimento quântico apresenta um padrão semelhante, com destaque para o complexo Eu(DBM)₃PH, que se sobressai em relação aos demais devido ao seu tempo de meia-vida prolongado e rendimento quântico de 12,2%. Embora o rendimento quântico seja relativamente elevado em comparação com outros complexos da série, ainda é considerado baixo frente a valores reportados na literatura para sistemas similares. Por exemplo, Dasari e colaboradores, ao estudarem complexos de Eu(III) com ligantes fenantrolínicos estendidos, como dipiridoquinoxalina e dipiridofenazina, relataram rendimentos de aproximadamente 30% em DMF. Em um outro estudo, o mesmo grupo obteve um rendimento quântico de ~20% ao incorporar β -dicetonas do tipo 4,4,4-trifluoro-1-(2-naftil)-1,3-butanodiona e dipiridoquinoxalina. Similarmente, Abbas e colaboradores alcançaram rendimentos de 24-36% para complexos de Eu(III) com ligantes terpiridínicos variados^{11,61,62}.

É importante ressaltar que neste trabalho todas as análises foram realizadas sob condições experimentais brandas, sem controle rigoroso de atmosfera e utilizando solventes sem tratamento prévio. Essas condições podem contribuir para a perda de energia do sistema complexo para a vizinhança. A opção por essas condições teve como objetivo investigar previamente a capacidade desses complexos de emitirem fluorescência em ambientes celulares. Como será discutido mais adiante, em ensaios realizados em meio de cultura e tampão fosfato, os

compostos demonstraram fluorescência, sugerindo um potencial promissor como sondas luminescentes para aplicações em ambientes intracelulares.

A análise estrutural dos complexos, aliada a cálculos teóricos, revelou que os ligantes desempenham um papel relevante nas transferências de energia. Observou-se, por exemplo, que as distâncias energéticas entre os estados tripleto (T_1) dos centros doadores (ligantes) e o receptor (íon central) encontram-se entre 5 e 6 Å, enquanto valores ideais ficam abaixo de 5 Å. Além disso, as diferenças energéticas entre os estados T_1 e o nível emissor 5D_0 do európio também impactam nas propriedades espectroscópicas dos complexos. Destacando que apenas o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ apresenta-se dentro da faixa energética ideal, refletindo-se em seu maior rendimento quântico e melhor eficiência luminescente em comparação aos demais. Para mais detalhes sobre as discussões teóricas, consulte a vide a seção 4.2.6.

4.2.5. Descrição dos cristais obtidos por difração de raios X

As estruturas propostas foram confirmadas via difração de raios X para os complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$.

O sistema para obtenção dos monocristais fora realizado por meio de difusão de solventes imiscíveis entre si, por exemplo, utilizou a acetona para solubilizar os complexos em um tubo de RMN e em seguida lentamente adicionou-se hexano para formar duas fases, para facilitar uma difusão mais lenta, o sistema foi levado para geladeira e em alguns dias notou-se o aparecimento de cristais aptos a serem difratados. O complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ é pertence ao grupo cristalino do tipo ortorrômbico com disposição espacial igual a $P2_12_12_1$, já o complexo que se diferencia pela fenantrolina do tipo CN é classificado como um sistema triclinico do grupo espacial P-1.

De maneira geral, as estruturas apresentam o íon de európio com oito pontos de coordenação, com três ligantes DBM e as respectivas fenantrolinas compondo a esfera de coordenação (Fig. 37a e b).

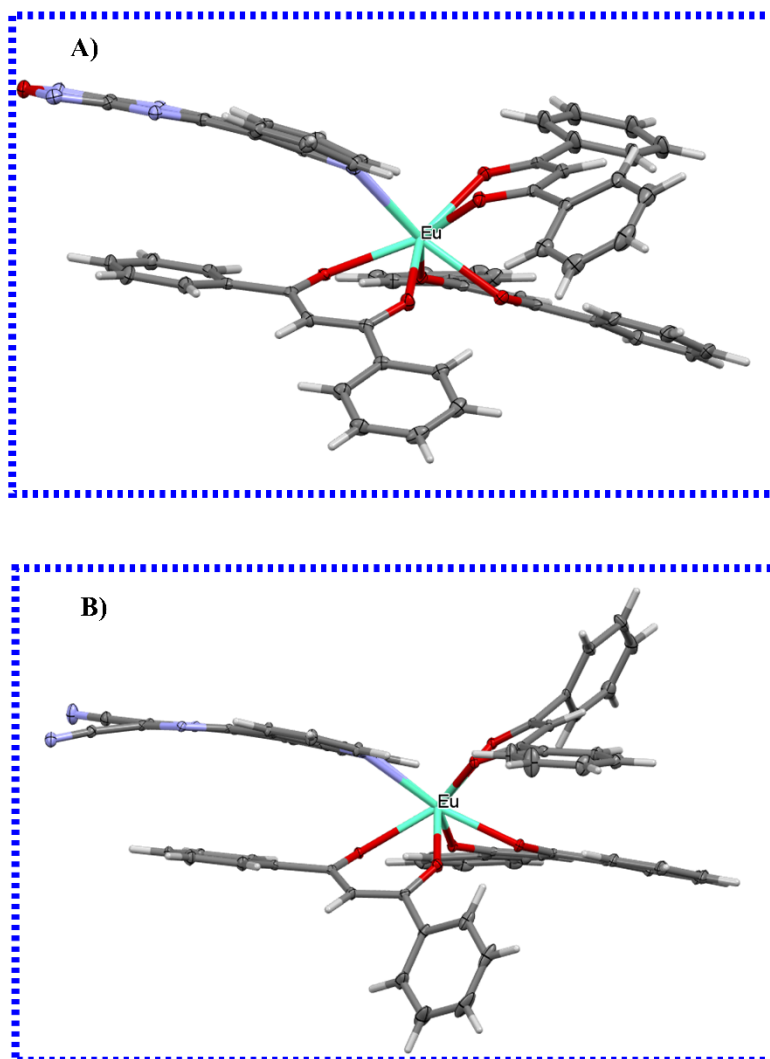


Figura 37. Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos em a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ e b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$.

Como previsto o íon de $\text{Eu}(\text{III})$ se encontra saturado em termos de número de coordenação e livre de moléculas de água, além disso a presença de ligantes volumosos podem dificultar a interações ou até mesmo a disponibilidade

de ligações com ligantes aqua, como já discutido, interações com moléculas desativadoras de fluorescência podem limitar a emissão do sistema.

Em termos de distâncias de ligação, os ligantes O'O'' apresentam uma ligação mais forte com o íon Eu(III) em comparação aos ligantes N'N'', como esperado, devido à maior afinidade do europium (Eu) por oxigênios. As distâncias médias Eu-O e Eu-N são, respectivamente, de 2,300 Å e 2,600 Å (Tabela. 9).

Por fim um resumo das distâncias e ângulos de ligações entre Eu-Ligantes são resumidos na tabela 9, as interações gerais para todos os átomos são expostos em apêndice bem como a célula unitária dos complexos.

Tabela 9. Parâmetros dos cristais, como distância (Å) e ângulos de ligações para os complexos Eu(DBM)₃NON, Eu(DBM)₃CN e do ligante livre DBM.

Átomos	Distâncias de ligações Å	
	Eu(DBM) ₃ NON	Eu(DBM) ₃ CN
Eu-N1	2,610	2,628
Eu-N2	2,611	2,630
Eu-O1	2,374	2,326
Eu-O2	2,349	2,347
Eu-O3	2,339	2,380
Eu-O4	2,346	2,353
Eu-O5	2,370	2,391
Eu-O6	2,332	2,332
DBM*		
O1-C5	1,277	
O2-C7	1,302	
Ângulos°		
O1-Eu-O2	71,57	71,07
O3-Eu-O4	72,16	71,96
O5-Eu-O6	72,70	73,38
N1-Eu-N2	62,06	61,74

*D.E.Williams, Acta Crystallographica, 1966, 21, 340⁶⁴

4.2.6. Cálculos teóricos, TD-DFT e energias de transferências L-M

As estruturas tridimensionais de cada complexo foram otimizadas com o nível de teoria DFT PBE1PBE/TZVP/MWB52/CPCM(DMSO) e estão dispostas na Figura. 38. Utilizando o programa SHAPE ⁶⁵, verificou-se que as formas que mais se assemelham aos poliedros de coordenação dos complexos são dodecaedro triangular (grupo pontual D_{2d}) para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ e anti-prisma quadrático (grupo pontual D_{4d}) para $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ (Tabela 10). De maneira geral, os poliedros apresentam bastante semelhança (Fig. 38). Isso está diretamente correlacionado à semelhança isoestruturais dos complexos.

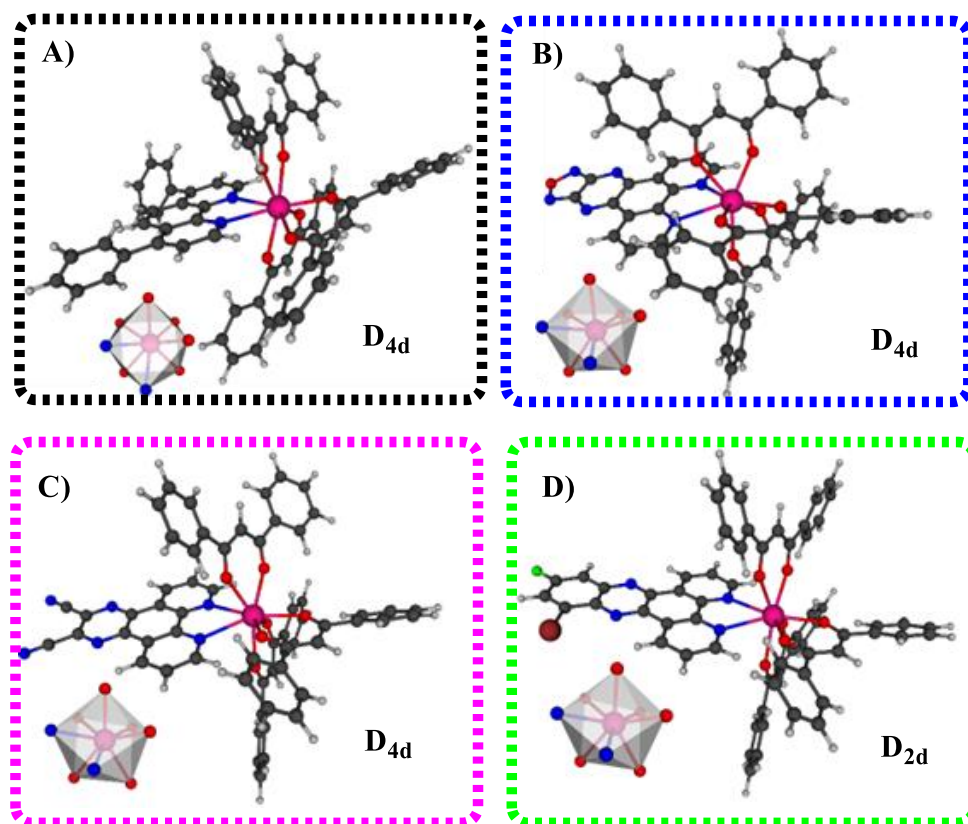


Figura 38. Estruturas tridimensionais dos complexos. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. E seus respectivos

poliedros de coordenação otimizados com DFT utilizando o nível de teoria PBE1PBE/TZVP/MWB52/CPCM(DMSO).

Tabela 10. Erro associado entre os poliedros de coordenação dos complexos e formas ideais de dodecaedro triangular e antiprisma quadrático obtidos através do programa SHAPE.

Complexos	Dodecaedro triangular	Antiprisma quadrático
Eu(DBM) ₃ PH	1,363	1,194
Eu(DBM) ₃ NON	1,902	0,867
Eu(DBM) ₃ CN	1,350	1,237
Eu(DBM) ₃ BrF	0,809	1,898

Nos cálculos dos estados excitados, a seleção do método baseou-se na precisão na determinação do espectro de absorção teórico. Assim, os métodos INDO/S-CIS e PBE1PBE com efeito de solvente apresentaram os resultados mais acurados (Fig. 39). No entanto, entre os dois, o método INDO/S-CIS demonstrou maior concordância com os dados experimentais, permitindo uma descrição mais fiel das transições eletrônicas observadas. Dado seu desempenho superior, optou-se por utilizar os dados obtidos pelo método semiempírico INDO/S-CIS para as análises subsequentes do estudo

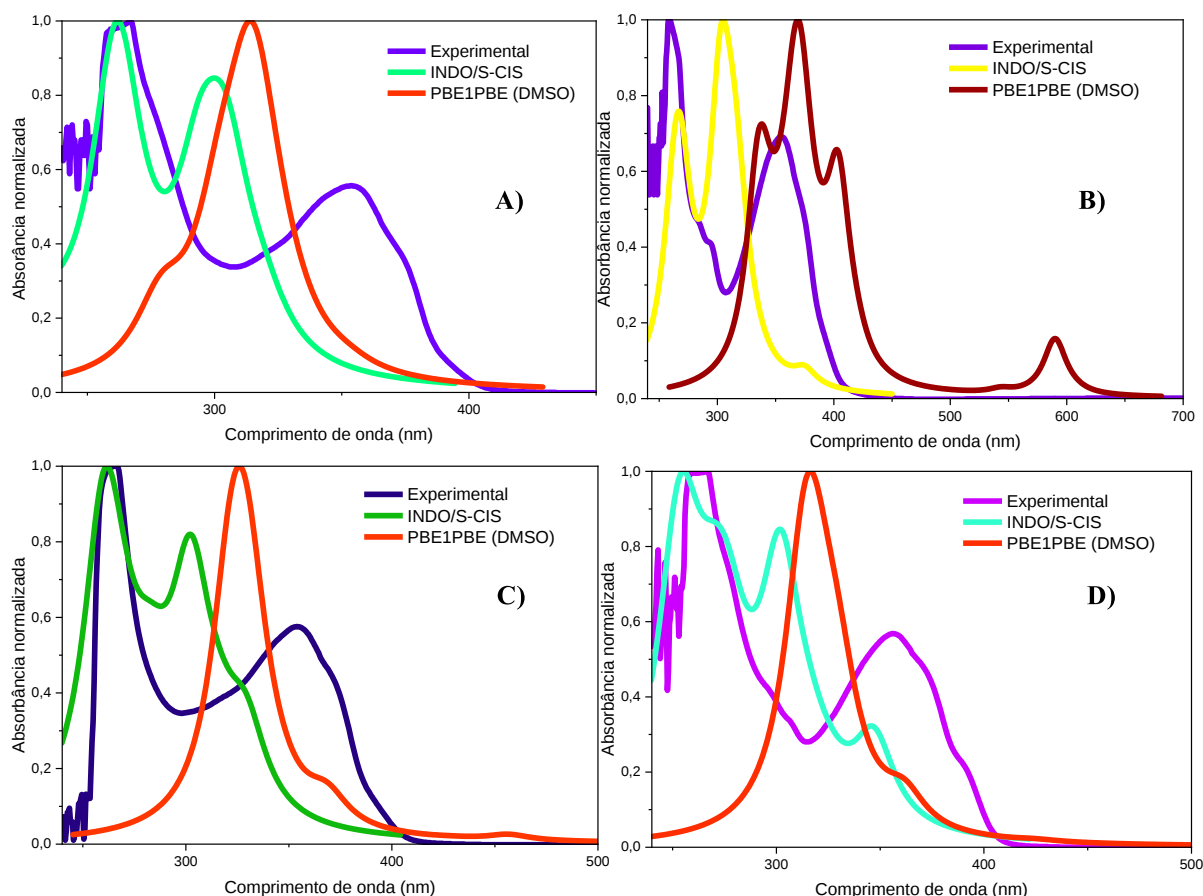


Figura 39. Espectros de absorção eletrônica experimentais e teóricos calculados com os métodos DFT PBE1PBE/TZVP/MWB52/CPCM(DMSO) e semiempírico INDO/S-CIS. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$.

A análise dos dados apresentados na Tabela 11, permitiu identificar o caráter das transições eletrônicas mais relevantes para as bandas observadas no espectro de absorção teórico de cada complexo, com base nos cálculos de estados excitados utilizando o método semiempírico INDO/S-CIS. O complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ apresentou um número maior de transições em relação aos demais, atribuídas aos diferentes quelatos que compõem a esfera de coordenação. As maiores contribuições dos ligantes também foram confirmadas por cálculos de deconvolução (Fig. 34).

Para todos os complexos, observou-se a ocorrência de transições eletrônicas na faixa de 302-304 nm. Essas transições estão associadas aos orbitais

localizados nas β -dicetonas, conforme esperado, dado o predomínio dessas ligantes na esfera de coordenação. Essa característica indica uma contribuição expressiva do ligante DBM nas propriedades espectroscópicas dos complexos, reforçando sua relevância no perfil de absorção.

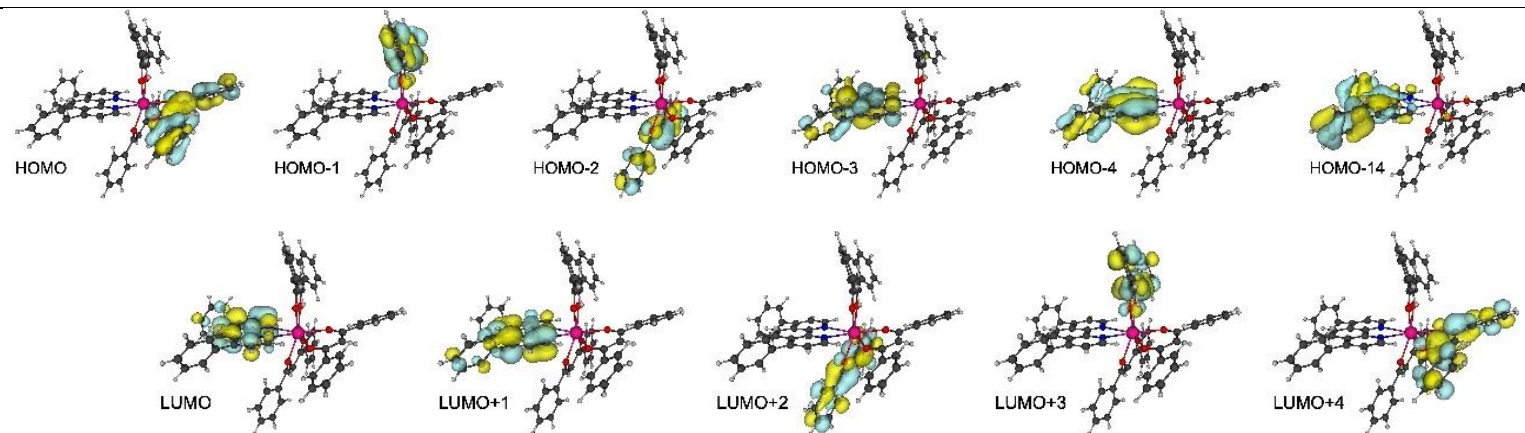
Para os menores comprimentos de onda os ligantes fenantrolínicos desempenham um maior papel na contribuição das transições, devido as transições π - π^* mais energéticas. Uma maneira de visualizar os ligantes envolvidos nessas transições é através da Figura 40, onde traz os orbitais presentes na Tabela 11 renderizados.

Tabela 11. Contribuição das transições eletrônicas envolvidas nas bandas mais importantes dos espectros de absorção eletrônica teóricos calculados com INDO/S-CIS. $\lambda \sim 300$ nm contribuição dos ligantes DBM e $\lambda \sim 250$ nm contribuição dos ligantes fenantrolinas.

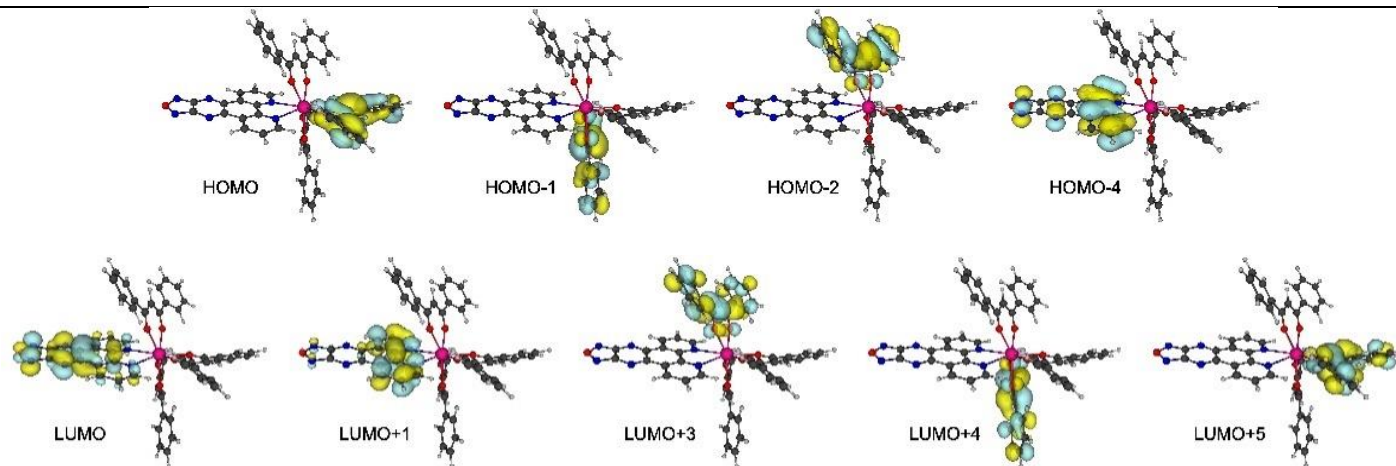
Complexos	(nm)	Força de oscilador	Maior contribuição	Total %
Eu(DBM) ₃ PH	319,6	0.1765	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+3 (72,48%) HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO+2 (13,74%) HOMO $\rightarrow$ LUMO+4 (44,83%)	86,22%
	304,6	1.0997	HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO+2 (23,82%) HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+3 (11,18%) HOMO-3 $\rightarrow$ LUMO+1 (9,94%) HOMO-3 $\rightarrow$ LUMO+1 (38,38%)	89,77%
	294,4	0.9581	HOMO-3 $\rightarrow$ LUMO (28,11%) HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO (10,35%) HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO+1 (6,25%) HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO (25,42%) HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO (19,52%)	93,09%
	261,6	1.2386	HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO+1 (11,90%) HOMO-14 $\rightarrow$ LUMO (8,52%) HOMO-14 $\rightarrow$ LUMO+1 (6,02%)	71,38%
	375,0	0.0939	HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO (96,19%) HOMO $\rightarrow$ LUMO+5 (51,25%)	96,19%
Eu(DBM) ₃ NON	303,2	1.6095	HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+4 (22,61%) HOMO-2 $\rightarrow$ LUMO+3 (16,39%)	90,25%
	267,6	0.9552	HOMO-4 $\rightarrow$ LUMO+1 (81,13%)	81,13%
Eu(DBM) ₃ CN	329,2	0.5382	HOMO-3 $\rightarrow$ LUMO (90,50%) HOMO-5 $\rightarrow$ LUMO+1 (6,44%)	96,94%
	302,4	1.5324	HOMO $\rightarrow$ LUMO+5 (43,67%)	90,42

Eu(DBM) ₃ BrF	260,2	1.8688	HOMO-2 → LUMO+3 (27,86%)	76,76%
			HOMO-1 → LUMO+4 (18,89%)	
			HOMO-8 → LUMO+2 (52,95%)	
			HOMO-3 → LUMO+1 (16,61%)	
			HOMO-9 → LUMO+2 (7,20%)	
	347,0	0.5649	HOMO-3 → LUMO (74,30%)	88,31%
			HOMO-4 → LUMO (14,01%)	
			HOMO → LUMO+5 (43,15%)	
	302,1	1.5973	HOMO-1 → LUMO+4 (16,42%)	88,95%
			HOMO-2 → LUMO+3 (14,31%)	
			HOMO-2 → LUMO+4 (8,05%)	
			HOMO-1 → LUMO+3 (7,02%)	
	275,5	0.6957	HOMO-4 → LUMO+1 (47,85%)	84,40%
			HOMO-3 → LUMO+2 (31,24%)	
			HOMO-17 → LUMO (5,31%)	
			HOMO-3 → LUMO+2 (29,50%)	
	252,1	0.9687	HOMO-4 → LUMO+1 (13,66%)	77,26%
			HOMO-19 → LUMO+4 (13,48%)	
			HOMO-4 → LUMO+2 (11,51%)	
			HOMO-3 → LUMO+1 (9,11%)	

Eu(DBM)₃PH



Eu(DBM)₃NO
N



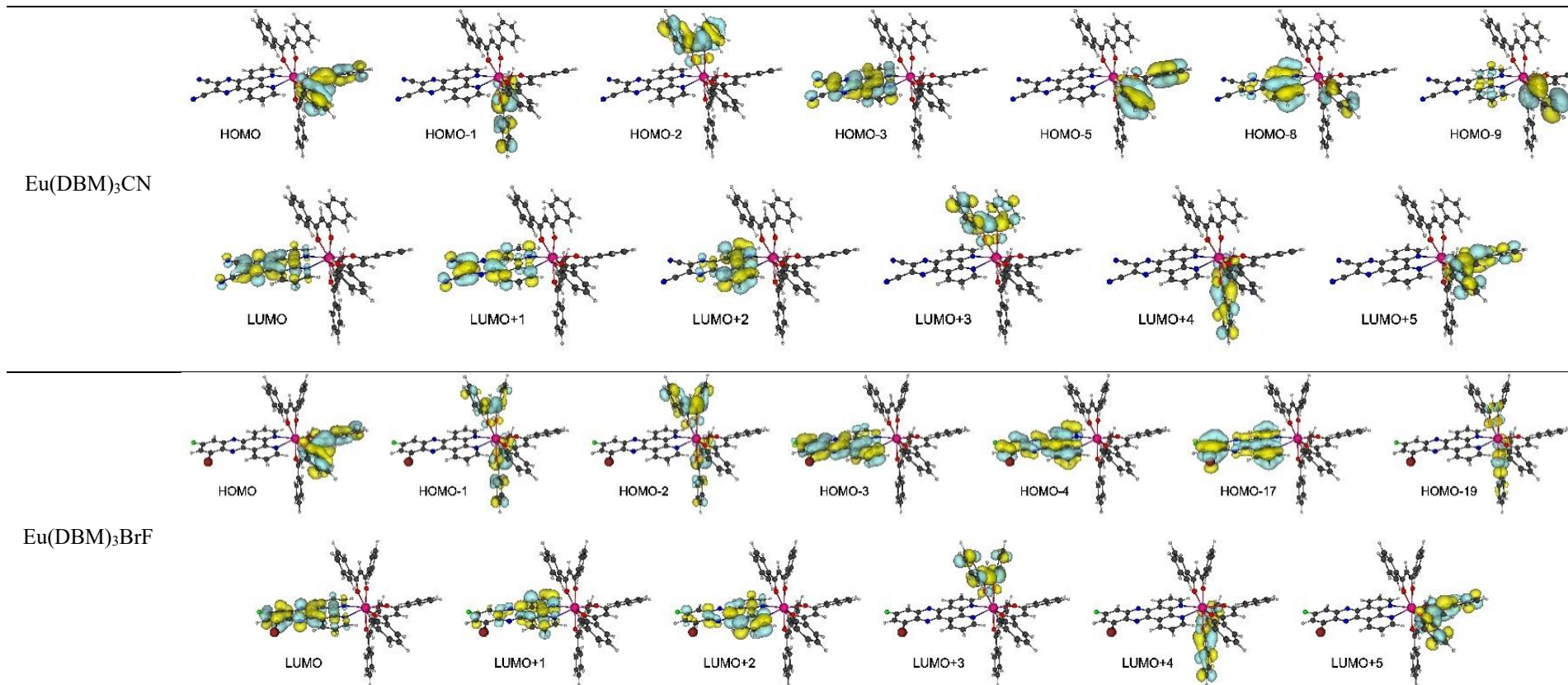


Figura 40. Orbitais moleculares mais relevantes no processo de absorção eletrônica calculados com o método INDO/S-CIS.

Neste estudo, a modelagem da transferência de energia entre ligantes e metal (L-M) foi realizada sob uma abordagem teórica. Inicialmente, foram identificados os níveis de energia singlete e tripleto de menor energia (S1 e T1, respectivamente) e as distâncias entre o centro doador de energia (R_L) nos ligantes e o centro aceitador de energia, Eu(III).

A compreensão dessas trocas de energia é essencial para a modelagem, pois fornece informações fundamentais para o cálculo das taxas de transferência de energia entre ligantes e metal. Isso possibilita a avaliação da favorabilidade da população energética do íon, indicando se há uma transferência eficiente para o Eu(III). Os dados resultantes, obtidos com o uso do software LUMPAC, são apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Energias S1 e T1 dos complexos estudados e suas respectivas R_L obtidos através de cálculos INDO/S-CIS

Complexos	Comprimento de onda (nm)	S ₁		T ₁	
		R_L (Å)	Energia (cm ⁻¹)	R_L (Å)	Energia (cm ⁻¹)
Eu(DBM) ₃ PH	319,6	4,5574	31292,40	5,2712	20710,10
Eu(DBM) ₃ NON	375,0	6,9399	26665,70	5,6000	19693,70
Eu(DBM) ₃ CN	329,2	6,7129	30377,00	6,5848	22263,20
Eu(DBM) ₃ BrF	347,0	6,1471	28820,10	6,2106	20274,50

Quanto maior a distância R_L em um complexo, menor tende a ser a eficiência da transferência de energia entre ligante e metal, uma vez que o aumento dessa distância favorece perdas energéticas ao longo do trajeto. Nos complexos Eu(DBM)₃PH, Eu(DBM)₃NON, Eu(DBM)₃CN e Eu(DBM)₃BrF, os valores de R_L obtidos são maiores do que os observados em sistemas luminescentes semelhantes já investigados teoricamente, os quais tipicamente apresentam valores médios abaixo de 5 Å⁶⁶⁻⁶⁸. Esse cenário sugere que os complexos estão sujeitos a grandes perdas de energia durante o processo de transferência do ligante para o metal, impactando negativamente a eficiência da população do estado excitado do íon Eu(III) e reduzindo o rendimento quântico. Esse efeito é claramente

corroborado pelos rendimentos quânticos experimentais observados para os complexos (Tabela 8).

Entre os complexos analisados, o $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ apresentou os menores valores de R_L (Tabela 12), fato que pode ser atribuído à excitação dos estados de menor energia ocorrer predominantemente nos ligantes β -dicetonatos. Esse encurtamento na distância de transferência indica que a energia percorre um caminho mais curto entre o ligante e o centro metálico, o que favorece uma maior eficiência no processo de transferência de energia. Assim, o complexo potencialmente apresenta um melhor desempenho luminescente experimentalmente em relação aos demais complexos devido a uma menor perda de energia durante a transferência.

De acordo com a regra de Latva, para que a transferência de energia entre o ligante e o íon lantanídeo ocorra de forma eficiente, o nível tripleto (T_1) dos ligantes deve estar entre 2500 e 4000 cm^{-1} acima do nível emissor do íon $\text{Eu}(\text{III})$ ⁶⁹. Para o íon $\text{Eu}(\text{III})$, cujo nível emissor $^5\text{D}_0$ encontra-se a 17293 cm^{-1} , os valores de T_1 ideais dos ligantes estariam entre 19793 e 21293 cm^{-1} . Entre os complexos estudados, apenas $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ apresentam níveis T_1 dentro desse intervalo (20710,10 e 20274,50 cm^{-1} respectivamente), sugerindo uma maior adequação para a transferência eficiente de energia nesses compostos. O complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ (19693,70 cm^{-1}), apesar de não estar exatamente dentro do intervalo ideal, exibe valores próximos, sugerindo uma possível eficiência energética ligeiramente inferior.

Para o cálculo das taxas de transferência de energia, considerou-se os níveis S_1 e T_1 dos complexos e os níveis aceitadores do $\text{Eu}(\text{III})$: $^5\text{D}_0$, $^5\text{D}_1$, $^5\text{D}_2$, $^5\text{D}_3$, $^5\text{D}_4$, $^5\text{L}_6$, $^5\text{L}_7$, $^5\text{G}_2$, $^5\text{G}_3$, $^5\text{G}_5$ e $^5\text{G}_6$ excitados a partir dos estados fundamentais $^7\text{F}_0$ ou $^7\text{F}_1$. Os valores obtidos estão na tabela A7.

Ao analisar os canais de transferência de energia entre os níveis T_1 dos ligantes e o nível emissor $^5\text{D}_0$ do íon $\text{Eu}(\text{III})$, o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ se destaca por apresentar maiores taxas de transferência de energia (W_{ET}) em

comparação aos demais complexos. Embora este complexo não apresente as menores taxas de retrotransferência de energia (W_{BT}), todos os valores de W_{BT} são exponencialmente inferiores aos de W_{ET} . Esse fator é relevante, pois minimiza as perdas de eficiência luminescente do íon Eu(III) devido a retrotransferências para os ligantes orgânicos.

Esses dados sugerem que o complexo Eu(DBM)₃PH possui uma maior população no nível 5D_0 , tornando-o o candidato mais promissor em termos de luminescência. Em contrapartida, o complexo Eu(DBM)₃CN exibe as menores taxas de W_{ET} e W_{BT} , o que está associado à sua maior energia do estado T_1 em comparação aos outros complexos (vide Tabela 12), resultando em uma menor interação entre os níveis devido à maior distância energética entre o nível aceitador (5D_0) e o doador (T_1). O comportamento oposto é observado para o complexo Eu(DBM)₃NON, que possui a menor energia T_1 e, conseqüentemente, uma interação mais intensa entre os níveis T_1 e 5D_0 , refletida em valores mais elevados de W_{BT} . Assim, o fato de Eu(DBM)₃NON não exibir as maiores taxas de W_{ET} sugere que isso possa estar relacionado à sua maior distância RL entre o estado T_1 e o íon Eu(III).

Uma abordagem prática para ilustrar o processo de transferência de energia é por meio dos diagramas de energia de Jablonski (Fig. 41). Esses diagramas permitem visualizar em escala os diferentes níveis de energia envolvidos, facilitando a compreensão dos valores obtidos para as taxas de transferência de energia. Essa representação visual possibilita identificar com clareza as etapas de excitação, relaxamento e retrotransferência de energia, destacando os níveis mais relevantes na dinâmica energética dos complexos analisados.

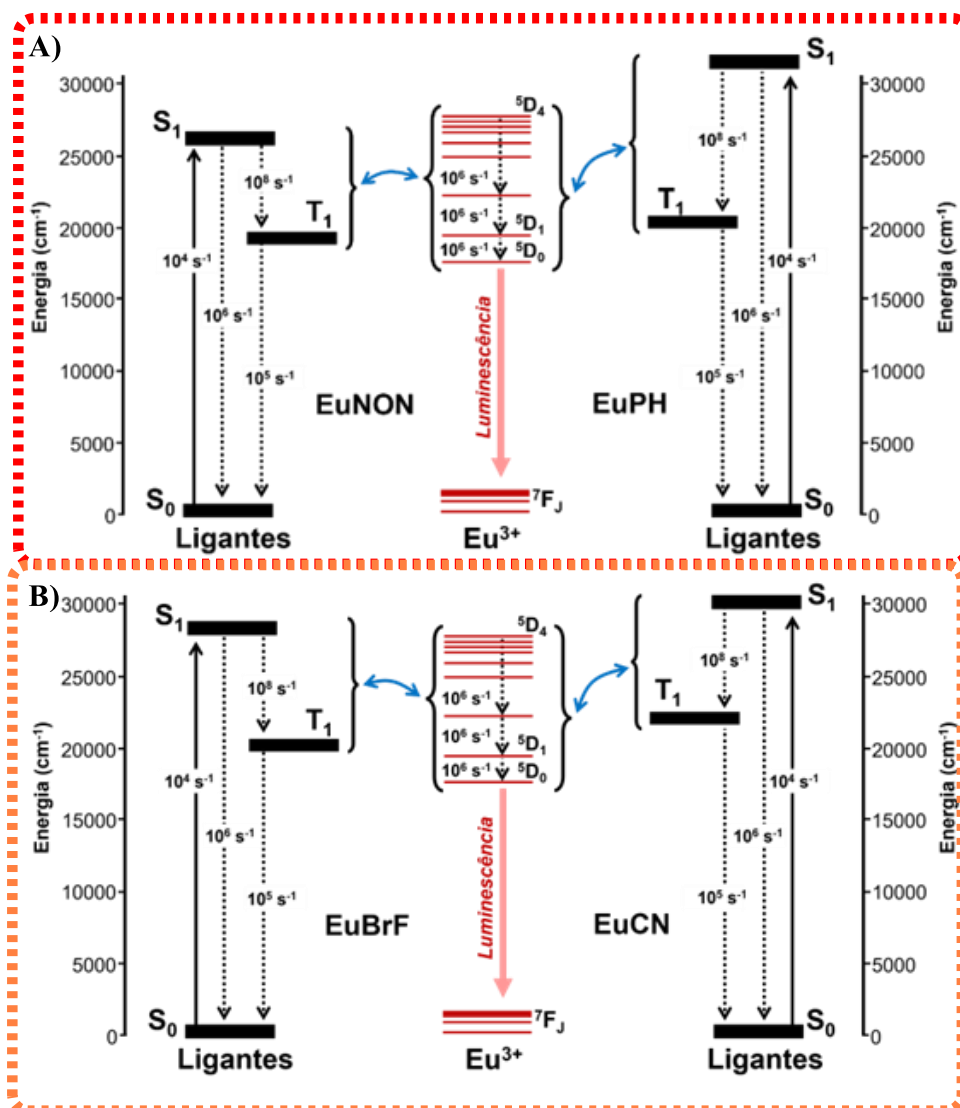


Figura 41. Diagramas de energia demonstrando em escala o processo de transferências de energias ligantes-Eu(III) dos complexos estudados. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$.

4.2.7. Estabilidade e verificação da emissão dos complexos em meio de cultura e tampão fosfato (PBS)

Antes de realizar ensaios biológicos com linhagens celulares ou avaliar interações com biomoléculas, é fundamental investigar a estabilidade dos compostos nos solventes utilizados nesses experimentos. Isso se deve às condições distintas apresentadas por esses meios, em comparação com solventes como

DMSO ou acetona, comumente usados nos testes de caracterização inicial. Por exemplo, o tampão fosfato (PBS), é amplamente empregado em experimentos biológicos, contém uma alta concentração de fosfato em sua forma aniônica e água, espécies que possuem forte afinidade pelo íon európio (III).

Além disso, meios de cultura como DMEM ou RPMI, são frequentemente usados no cultivo celular, esses apresentam diversas classes de aminoácidos e piruvato de sódio, entre outros componentes. Esses compostos, quando presentes em altas concentrações, podem competir com os ligantes coordenados ao íon metálico, promovendo a substituição desses ligantes e, consequentemente, inativando tanto as propriedades espectroscópicas quanto as propriedades bioativas dos complexos. Assim, a avaliação prévia da estabilidade em diferentes meios biológicos é essencial para entender como os compostos se comportam no meio extra e intracelular.

Primeiramente, foram realizados estudos de estabilidade em DMSO por meio da espectroscopia na região do UV-Vis, uma técnica altamente sensível a mudanças conformacionais ou interações entre soluto e solvente. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como solvente para dissolver os complexos antes dos ensaios celulares (Fig. 42a-d). Observou-se que os complexos mantêm sua estabilidade nos intervalos de 0, 24 e 48 horas. Esses intervalos são relevantes, pois indicam o período necessário de incubação dos complexos durante os ensaios celulares, garantindo que suas propriedades não se alterem ao longo do tempo

como

observado.

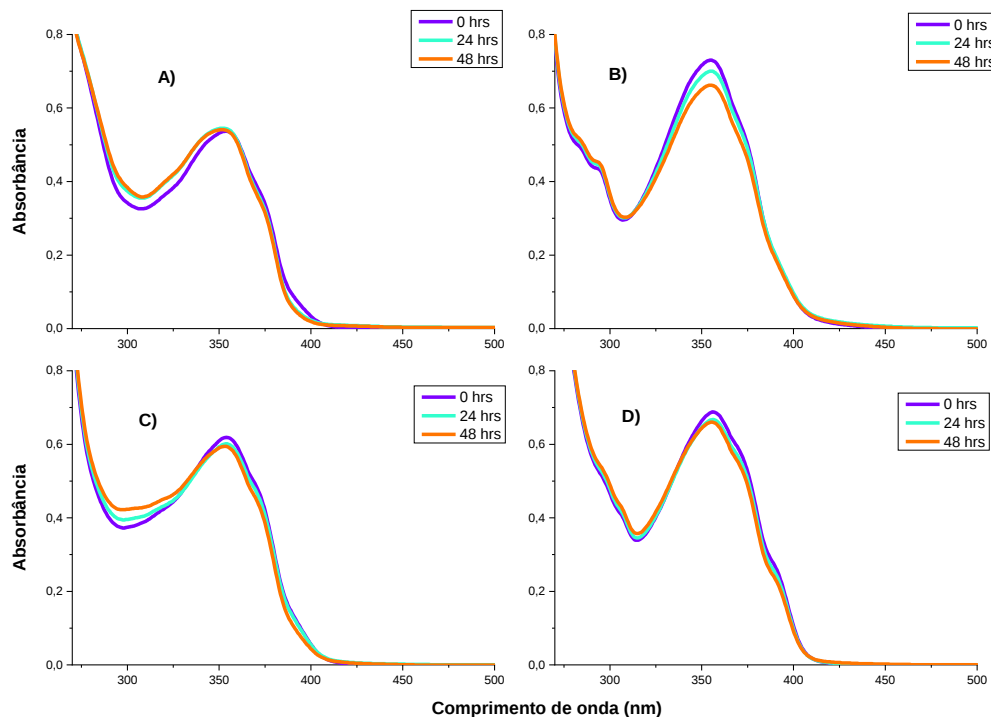


Figura 42. Estabilidades dos complexos em DMSO nos tempos de 0, 24 e 48 horas. a) Eu(DBM)₃PH; b) Eu(DBM)₃NON; c) Eu(DBM)₃CN e d) Eu(DBM)₃BrF. Concentrações: 1×10^{-5} M.

Consequentemente, as soluções dos complexos em DMSO foram utilizadas para a mesma análise em PBS, com uma relação v/v de 50 μ L/5000 μ L (complexos/PBS, respectivamente). Conforme observado na Figura 43a-d, houve uma diminuição gradual nas bandas dos compostos, sugerindo a possível precipitação dos complexos ao longo do tempo. Esse comportamento é reforçado pelo fato de que as bandas não apresentaram deslocamentos, o que poderia indicar instabilidade devido à formação de novas espécies.

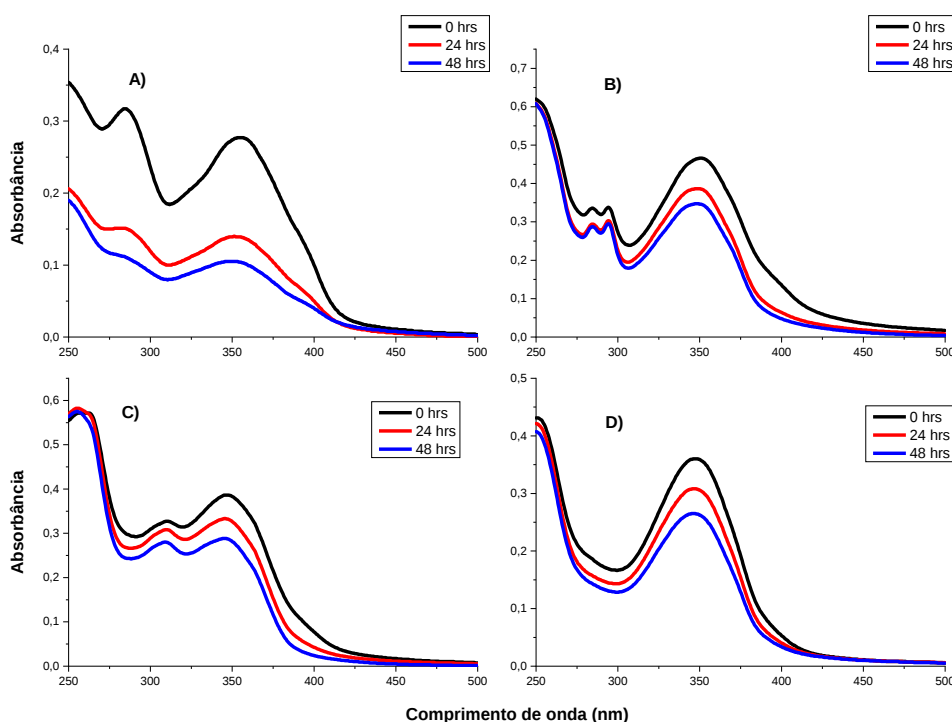


Figura 43. Estabilidades dos complexos em PBS nos tempos de 0, 24 e 48 horas. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$; b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$; c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentrações: 1×10^{-5} M.

A formação de agregados foi confirmada por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering - DLS) (Fig. 44a-d). Essa técnica permite relacionar o movimento Browniano das partículas em suspensão com seu tamanho hidrodinâmico, proporcionando uma estimativa precisa do diâmetro médio das partículas e da distribuição de tamanhos.

Ao analisar as soluções em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas) em tampão PBS, nas mesmas condições experimentais utilizadas no UV-Vis, observou-se um aumento nos diâmetros hidrodinâmicos das partículas, o que indica a formação de agregados (Tabela 13). Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento das interações eletrostáticas, como as ligações de hidrogênio, que são intensificadas pelo uso de PBS, um solvente de alta força iônica. A alta concentração de íons no PBS aumenta a solvatação dos complexos, promovendo a

agregação entre as partículas devido à diminuição da repulsão entre elas e ao aumento das interações atrativas^{70,71}.

Os valores de índice de polidispersividade (PdI), que mede a largura da distribuição de tamanhos das partículas, variaram entre 0,16 e 0,39, valores que se situam dentro da faixa de 0 (sistemas altamente homogêneos) a 1 (sistemas altamente heterogêneos). Isso indica que a distribuição de tamanhos dos agregados formados é relativamente homogênea, caracterizando um padrão de agregação mais uniforme⁷².

Tabela 13. Parâmetros como Diâmetro hidrodinâmico (DH) e polidispersividade (PdI) para os complexos nos tempos de 0, 24 e 48 horas. Proporção PBS:complexos (99:1%).

Parâmetros	Eu(DBM)₃PH (0, 24 e 48 hrs)	Eu(DBM)₃NON (0, 24 e 48 hrs)	Eu(DBM)₃CN (0, 24 e 48 hrs)	Eu(DBM)₃BrF (0, 24 e 48 hrs)
DH (nm)	2677, 3085 e 4351	1408, 1754 e 1371	1276, 1863 e 3206	2189, 2511 e 2038
PdI/100%	0,23, 0,37 e 0,22	0,16, 0,25 e 0,39	0,01, 0,23 e 0,29	0,21, 0,29 e 0,32

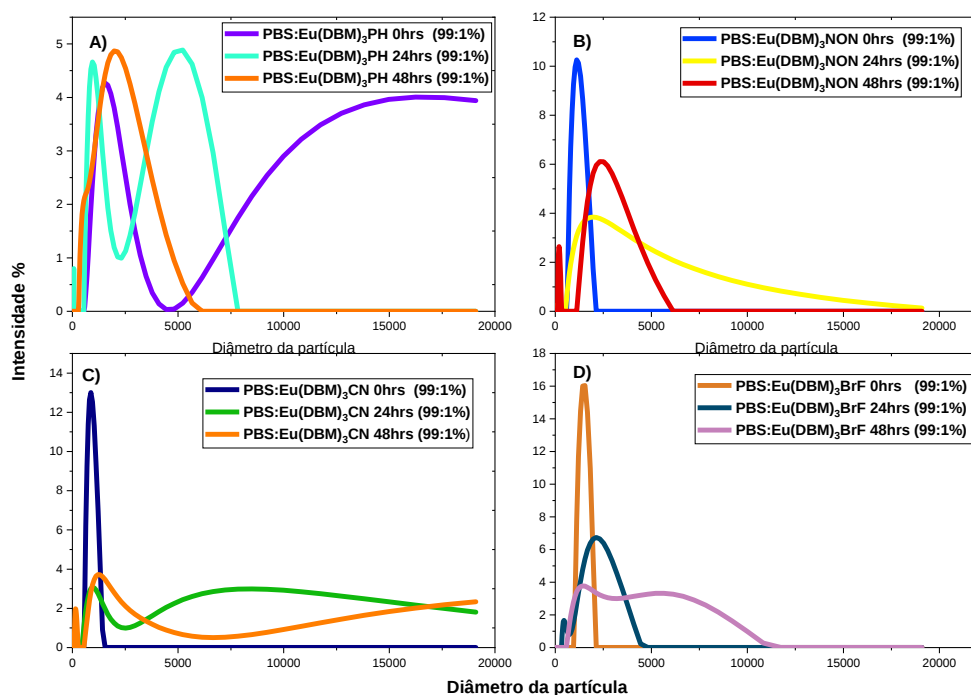


Figura 44. Análise via DLS para os complexos, intensidades relativas (%) por Diâmetros das partículas formadas. Em a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$.

As interações e possíveis mudanças conformacionais dos complexos foram observadas nos testes de estabilidade realizados com o meio de cultura RPMI (Fig. 45a-d). Entre 0 e 24 horas, nota-se um aumento nas intensidades das bandas, além da presença de pontos isobésticos, o que sugere mudanças conformacionais e a formação de novas espécies. Vale destacar que a possibilidade de interações eletrostáticas ou a coordenação com alguma espécie presente no meio ao centro metálico não pode ser descartada, dado que os íons de európio (III) possuem grande capacidade de acomodar diferentes disposições estruturais. No entanto não se observa grandes deslocamentos nas bandas próximas de 350 nm, proveniente dos ligantes, indicando que a permanência desses, na esfera coordenação.

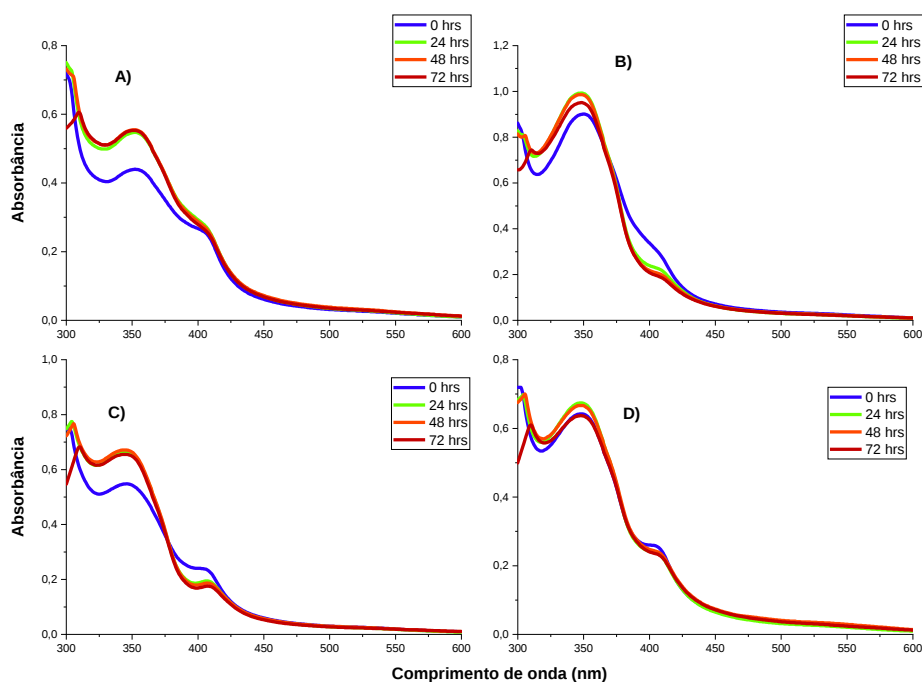


Figura 45. Estabilidades dos complexos em RPMI nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$; b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$; c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentrações: 1×10^{-5} M.

Os compostos também foram analisados por fluorescência, tanto em PBS quanto em RPMI (Fig. 46a-d), em uma análise qualitativa para avaliar a possibilidade de apresentarem luminescência em meio intracelular, visando possíveis aplicações como sondas fluorescentes. Observou-se que três dos complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ (Fig. 46a,c e d), exibem a emissão característica do európio em torno de 612 nm, exceto o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ (Fig. 46b), cuja fluorescência foi completamente suprimida. Vale destacar que as análises foram conduzidas em condições brandas, sem tratamentos prévios dos solventes aplicados. Mesmo com essas condições, os complexos mantiveram suas emissões, com destaque para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, que apresentou a banda característica com alta intensidade e sem alargamento, indicando uma estabilidade luminescente favorável, isso indica a possibilidade desses complexos atuarem como possíveis sondas bioluminescentes.

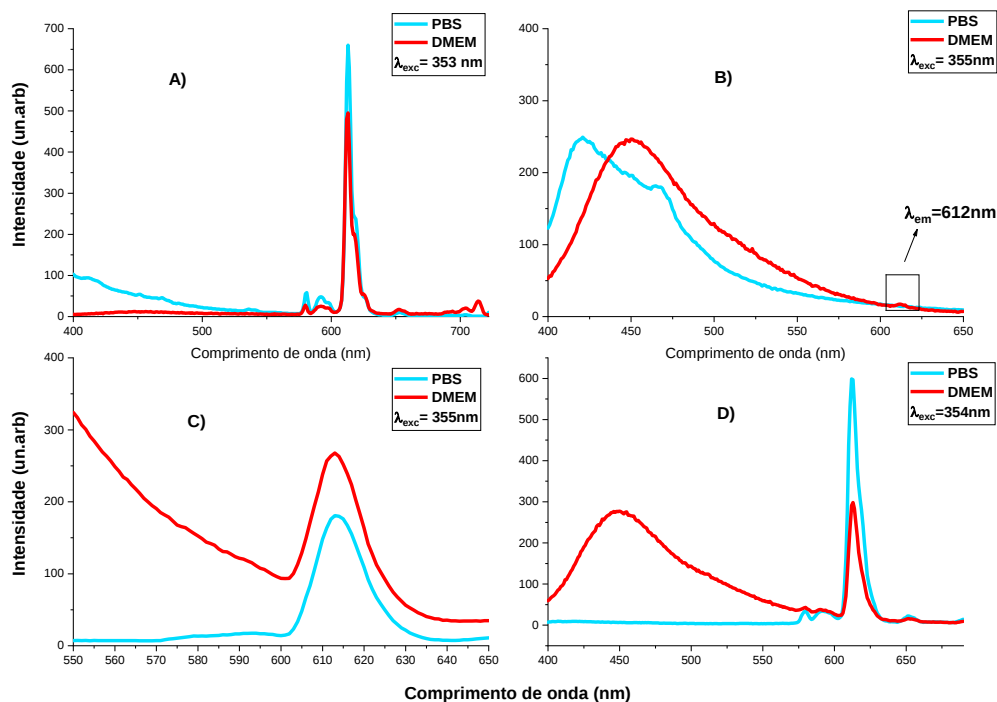


Figura 46. Espectro de fluorescência para os complexos. a) Eu(DBM)₃PH, b) Eu(DBM)₃NON, c) Eu(DBM)₃CN e d) Eu(DBM)₃BrF. Em solventes como PBS e DMEM. Concentrações: 1×10^{-5} M. $\lambda_{ex} = 353$ -355 nm.

4.3. Análise da atividade citotóxica em modelos celulares 2D e 3D, e dos mecanismos de morte celular

Os ensaios citotóxicos e antiproliferativos dos complexos foram realizados utilizando o método colorimétrico MTT, uma técnica amplamente empregada para avaliar a viabilidade celular. Neste método, o sal de tetrazólio (MTT = brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é reduzido por enzimas mitocondriais ativas presentes em células viáveis, resultando na formação de cristais de formazana de coloração púrpura. A intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas e viáveis,

sendo quantificada por espectrofotometria e os dados expressos em tabelas de IC₅₀ (concentração de inibição de 50% da viabilidade celular)⁷³.

As linhagens celulares tumorais empregadas nos ensaios foram selecionadas por sua relevância epidemiológica global, incluindo A549 (câncer de pulmão), DU-145 (câncer de próstata), MDA-MB-231 (câncer de mama triplo negativo) e A2780cis (câncer de ovário resistente à cisplatina). Adicionalmente, uma linhagem não tumoral de pulmão (MRC-5) foi utilizada como controle, permitindo a avaliação da seletividade dos complexos em relação a células não tumorais.

Todos os resultados obtidos foram comparados ao fármaco padrão cisplatina, que atuou como controle positivo nos experimentos, possibilitando a validação dos efeitos citotóxicos e seletividade dos complexos investigados.

A Tabela 14 a seguir apresenta os valores de IC₅₀ obtidos para os ligantes livres. Nota-se que os ligantes PH e NON exibem valores baixos de IC₅₀, ou seja, indica uma alta citotoxicidade, com uma baixa quantidade de células viáveis em comparação à cisplatina. No entanto, é importante destacar que esses ligantes não demonstram seletividade, apresentando também baixos valores de IC₅₀ em células não tumorais (MRC-5). Como discutido, a especificidade é fundamental para minimizar efeitos colaterais, uma vez que a toxicidade em células saudáveis pode levar a complicações indesejáveis durante o tratamento.

Tabela 14. Valores de IC₅₀ para os ligantes e cisplatina em µM frente a linhagens tumoral e não tumoral no período de 48 horas.

LIGANTES	MRC-5	A549	DU-145	MDA-MB-231	A2780cis
DBM	18,8 ± 0,44	>100	26,7 ± 0,25	>50,0	>50,0
PH	1,38 ± 0,17	2,01 ± 0,22	1,92 ± 0,12	0,240 ± 0,09	2,61 ± 0,20
NON	0,370 ± 0,02	0,210 ± 0,04	0,140 ± 0,01	0,130 ± 0,01	0,150 ± 0,03
CN	6,87 ± 0,63	>50	29,9 ± 1,30	0,750 ± 0,11	1,66 ± 0,44
BRF	> 50,0	>50,0	>50,0	>50,0	>50,0
Cisplatina	12,5 ± 0,15	14,4 ± 1,40	2,30 ± 0,40	10,2 ± 0,20*	25,6 ± 0,29

Os efeitos sinérgicos entre os ligantes e o íon Eu(III) nos complexos influenciam as propriedades citotóxicas de forma significativa em alguns dos complexos.

Por exemplo, o complexo Eu(DBM)₃NON (Tabela 15) mantém a citotoxicidade já observada no ligante livre NON, apresentando baixos valores de IC₅₀, com variações mínimas. É interessante ressaltar que a alta capacidade citotóxica dessa espécie se mostra independente do ambiente de coordenação. Isso é evidenciado também em estudos realizados com complexos de prata (I) pelo grupo de pesquisa, nos quais o ligante NON exibiu valores de IC₅₀ igualmente baixos, variando entre 0,29 e 0,55 µM, sem apresentar seletividade entre células tumorais e não tumorais²⁹.

Tabela 15. Valores de IC₅₀ e índice de seletividade (IS) obtidos para os complexos e cisplatina em µM, frente a linhagens tumoral e não tumoral no período de 48 horas. Lipofilicidade em LogP.

COMPLEXOS	MRC-5	A549	DU-145	A2780cis	MDA-MB-231	IS*	IS**	Log P
Eu(DBM)₃PH	>50,0	>50,0	>50,0	0,850 ± 0,11	0,870 ± 0,07	59,0	57,5	0,52
Eu(DBM)₃NON	0,200 ± 0,01	0,380 ± 0,07	0,21 ± 0,01	0,160 ± 0,03	0,140 ± 0,03	1,20	1,43	0,51
Eu(DBM)₃CN	18,5 ± 1,16	25,6 ± 1,62	6,17 ± 0,57	6,86 ± 0,21	3,08 ± 0,73	2,70	6,01	0,87
Eu(DBM)₃BrF	>50,0	>50,0	>50,0	3,57 ± 0,15	>50	14,0	-	0,90
Cisplatina	12,5 ± 0,15	14,4 ± 1,40	2,30 ± 0,4	25,6 ± 0,29	10,2 ± 0,20 ⁷⁴	0,490	1,22	-2,5

IS* : (MRC-5/A2780cis); IS** : (MRC-5/MDA-MB-231)

Para os demais complexos, algumas observações específicas são relevantes:

- Eu(DBM)₃CN: apresentou valores de IC₅₀ comparáveis aos do fármaco padrão, exceto para a linhagem triplo negativa MDA-

MB-231, com um valor de 3,08 μM , uma diferença de 3,31 μM em relação à cisplatina. Vale ressaltar a seletividade do complexo, que foi de 6,01 μM .

- $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$: demonstrou alta seletividade tanto para a linhagem MDA-MB-231 quanto para A2780cis, com valores de IS igual 59,0 e 57,5, respectivamente. Esse efeito contrasta com a atividade citotóxica do ligante PH livre, que apresentou baixos valores de IC_{50} para todas as linhagens, além de falta de seletividade.
- Tanto o ligante DBM quanto BrF, quando livres, apresentaram altos valores de IC_{50} , com destaque para a inatividade da fenantrolina em todas as linhagens testadas ($>50 \mu\text{M}$). No entanto, ao serem coordenados ao európio, observou-se um aumento expressivo na citotoxicidade, especialmente contra a linhagem de ovário resistente à cisplatina (A2780cis), acompanhada de alta seletividade de 14 μM .
- Todos os complexos apresentaram lipofilicidades (Log P) positivos e próximos entre si, evidenciando a possibilidade desses de adentrarem nas células por meio das membranas fosfolipídicas²⁰.

Outras observações merecem destaque: i) A diferença significativa nos índices de seletividade dos complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ em comparação com o fármaco padrão, especialmente nas células tumorais altamente incidentes, como a MDA-MB-231 (triplo negativa em estágio agressivo) e a A2780cis (resistente à cisplatina); ii) A resistência intrínseca ou adquirida à cisplatina, aliada à sua falta de seletividade, representa um grande desafio. Os complexos estudados mostram potencial ao atuar por um mecanismo alternativo ao da ligação covalente ao DNA típica da cisplatina, demonstrando eficácia

significativa contra linhagens resistentes ao fármaco. Explorar novos mecanismos de ação é crucial para tratar células resistentes e desenvolver quimioterápicos inovadores. Tendo em vista os resultados obtidos os dois complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ foram selecionados para seguimento nos próximos testes, utilizando a linhagem celular A2780cis, por ter um maior apelo científico por suas propriedades de resistência.

Para analisar as alterações morfológicas promovidas pelos complexos na linhagem celular A2780cis, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. As micrografias foram coletadas em 0, 24 e 48 horas (Fig. 47 e A20). Para a discussão, optou-se por utilizar o complexo de fenantrolina BrF, uma vez que ambos os compostos apresentam propriedades semelhantes nos ensaios realizados. As análises morfológicas do composto $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ encontram-se no apêndice (Fig. A20)).

No controle, observa-se um aumento progressivo na densidade celular de 0 a 48 horas. Contudo, nas células tratadas com os complexos, na concentração de metade do IC_{50} ($0,5 \times \text{IC}_{50}$) já é possível observar mudanças morfológicas visíveis após 48 horas, como a redução da densidade celular e o aparecimento de células com morfologia esférica. Esse efeito é ainda mais pronunciado na concentração do IC_{50} , quando a linhagem celular perde seu padrão de membrana alongado, apresentando, em vez disso, detritos celulares, perda de adesão e um aumento de células com padrão esférico. Essas características esféricas estão associadas a morte celular por apoptose, dado que a necrose normalmente causa aumento celular e ruptura da membrana, expondo o conteúdo intracelular ao ambiente externo^{75,76}.

Esses resultados indicam que os complexos atuam de maneira tanto dose, como tempo dependentes, tornando-se mais agressivos para as células tumorais conforme aumentam a concentração e o tempo de exposição.

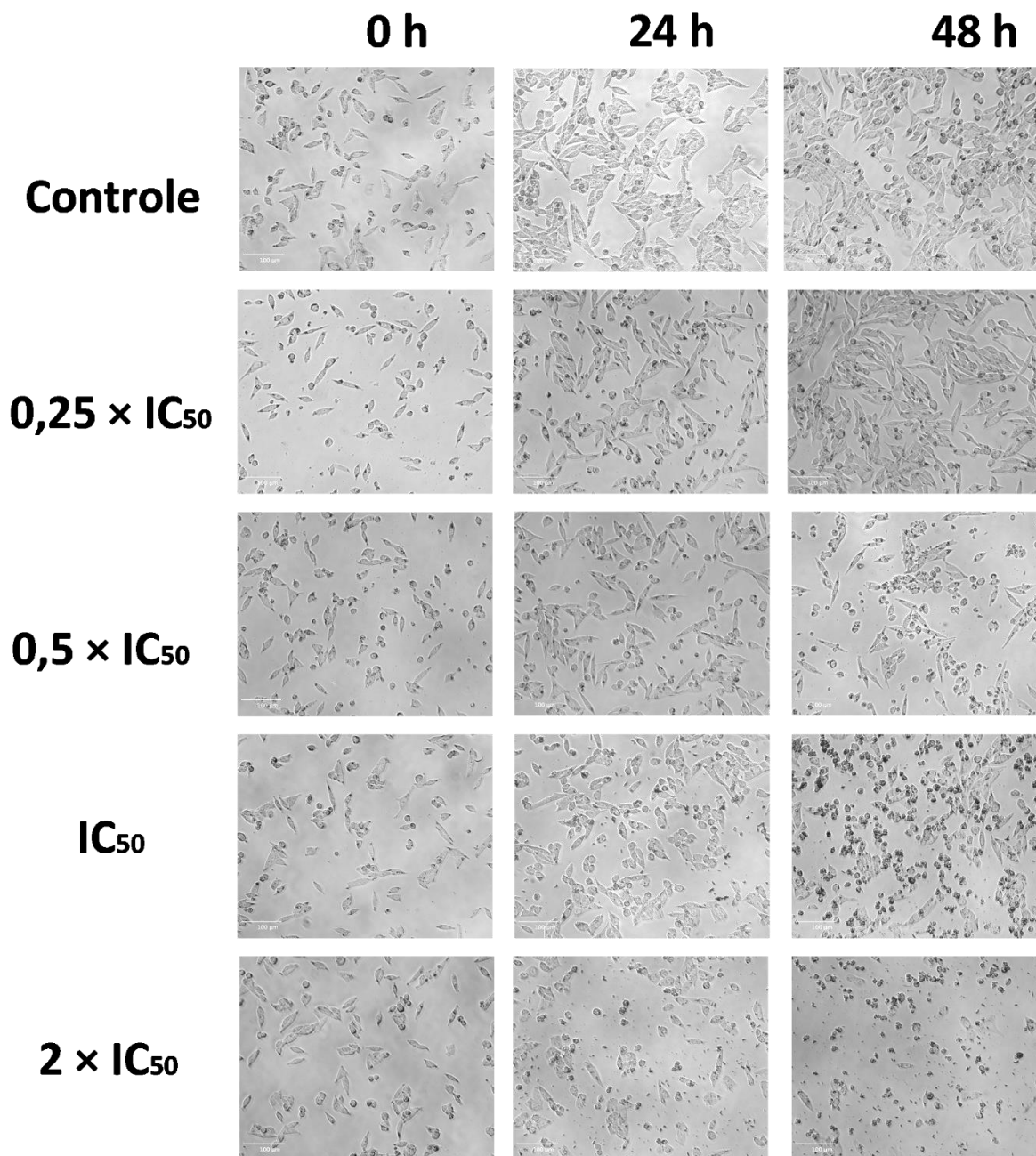


Figura 47. Micrografias obtidas para a linhagem celular A2780cis nas concentrações de $2 \times IC_{50}$, IC_{50} , $0,5 \times IC_{50}$ e $0,25 \times IC_{50}$ nos tempos de 0, 24 e 48 horas para o complexo $Eu(DBM)_3BrF$. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.

Para aprofundar a compreensão sobre os eventos iniciais do processo de morte celular, as células foram tratadas e marcadas com iodeto de propídeo (PI) após 48 horas de exposição. O PI é um marcador fluorescente que se intercala

especificamente com o DNA, emitindo fluorescência vermelha ao se ligar. Essa interação ocorre apenas em células com membranas comprometidas ou desorganizadas, permitindo a identificação precisa de células mortas ou em estágios avançados de danos à membrana plasmática.⁷⁷

Observou-se marcação em células tratadas com $0,5 \times \text{IC}_{50}$, onde algumas exibiram fluorescência vermelha, indicando a ocorrência de morte celular. Esse efeito tornou-se progressivamente mais intenso à medida que a concentração do composto aumentou, alcançando seu pico em tratamentos com o dobro do IC_{50} , evidenciando uma relação dose-dependente na indução de morte celular. (Figs 48 e A21).

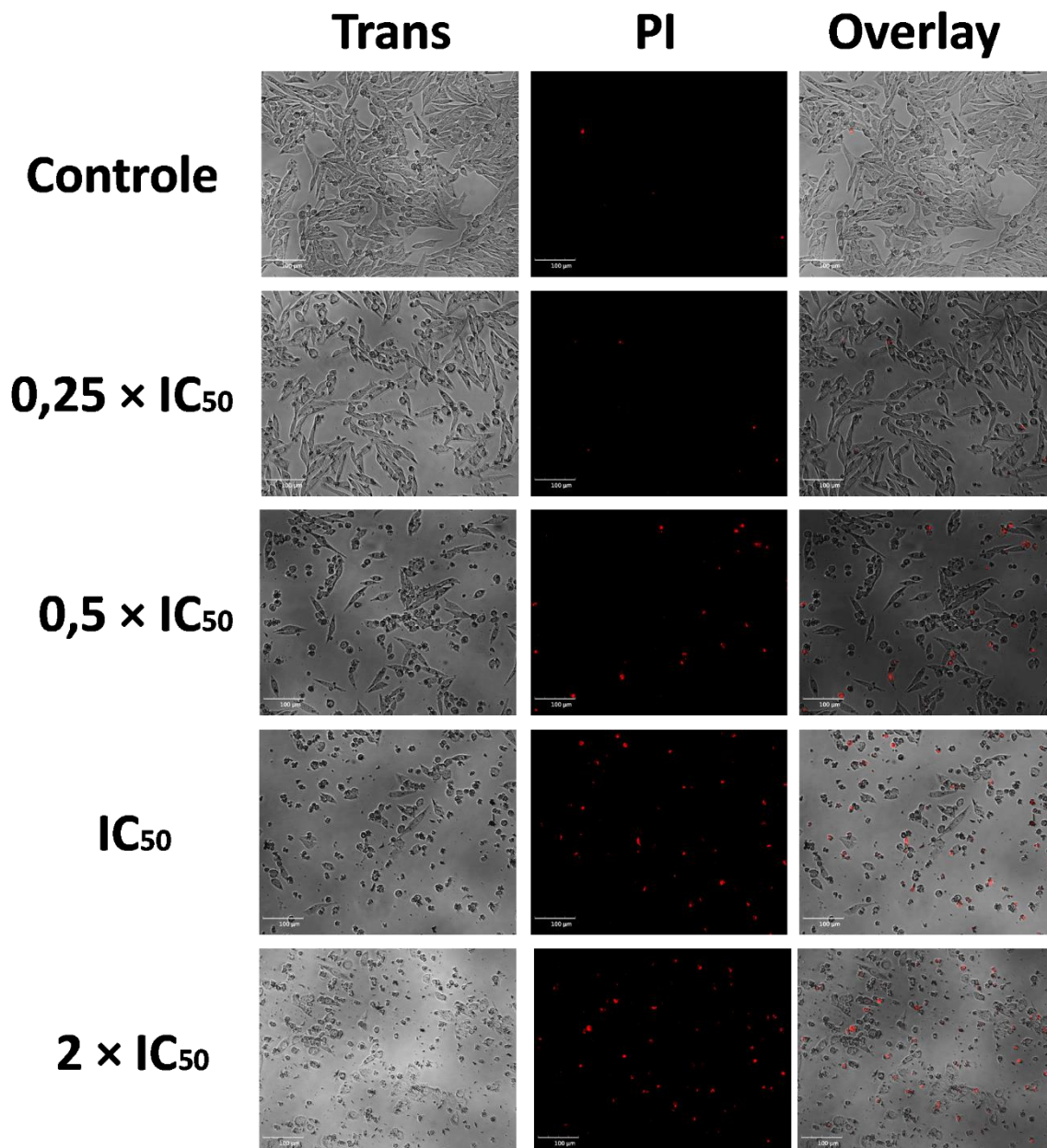


Figura 48. Ensaio morfológico para o composto $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ na linhagem celular A2780cis marcado com PI depois de 48 horas. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom 4x. $\lambda_{\text{exc}} = 538 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{de em}} = 617 \text{ nm}$.

Para aprofundar a análise das alterações morfológicas causadas pelo complexo, foram realizadas marcações fluorescentes do núcleo e da membrana celular com DAPI e Green Plasma (CellMask™), respectivamente (Figura 49). O DAPI atua como um marcador nuclear, intercalando-se preferencialmente nas bases adenina e timina e emitindo fluorescência azul. O Green Plasma é uma

molécula anfipática, com uma porção lipofílica que facilita a interação com a membrana celular e uma porção que se ancora nela, emitindo fluorescência verde⁷⁸.

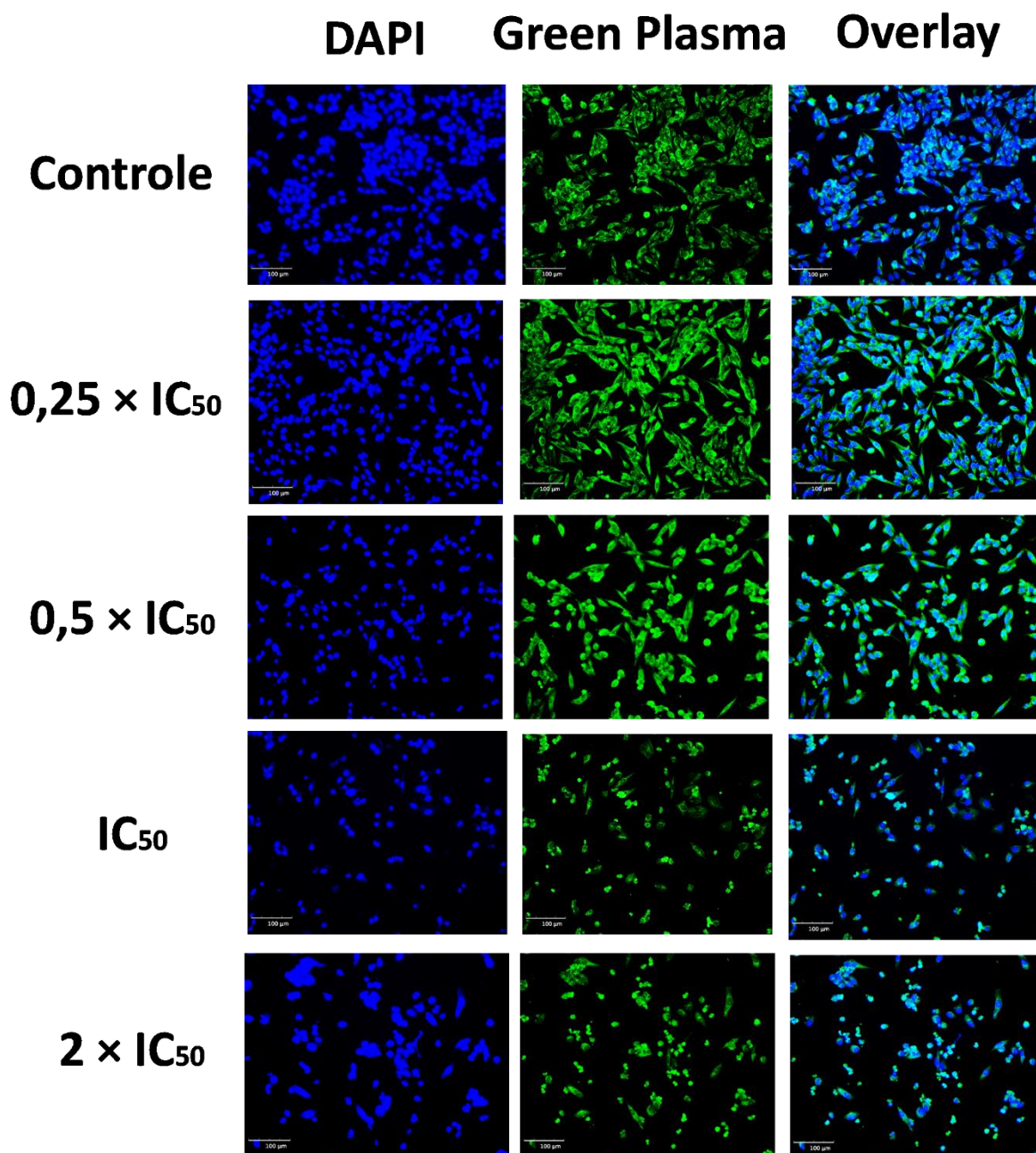


Figura 49. Ensaio morfológico por fluorescência, células A2780cis tratadas com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ e marcadas com Green Plasma (verde) $\lambda_{\text{exc}} = 522 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ e DAPI (azul) $\lambda_{\text{exc}} = 358 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom 4x

Observou-se uma redução na marcação dos núcleos pelo DAPI a partir de $0,25 \times IC_{50}$, possivelmente indicando fragmentação do DNA à medida que a concentração do complexo aumenta. Alterações também foram notadas na membrana, que passou a apresentar estruturas esféricas, sugerindo empacotamento.

Esses resultados sugerem que o complexo pode agir em múltiplas regiões celulares, facilitado por suas propriedades lipofílicas (Tabela 15), indicando morte celular. Embora a análise morfológica isolada não permita concluir definitivamente o mecanismo apoptótico, ela indica que os complexos têm um impacto significativo na arquitetura celular.

Efeitos semelhantes foram observados nos ensaios de sobrevivência clonogênica com células A2780cis (Fig. 50a-d). No controle, a capacidade proliferativa das células é evidente, com formação de colônias. Contudo, após o tratamento com os complexos, observa-se uma diminuição significativa na formação de colônias a partir de metade do IC_{50} , com uma redução de aproximadamente 50% na capacidade clonogênica em comparação ao controle da esquerda para a direita. Quando tratadas na concentração equivalente ao IC_{50} , ocorre uma perda completa da capacidade de clonogenicidade das células (gráficos de barras), reforçando a eficácia dos compostos em interferir nos mecanismos de replicação celular em células cancerosas.

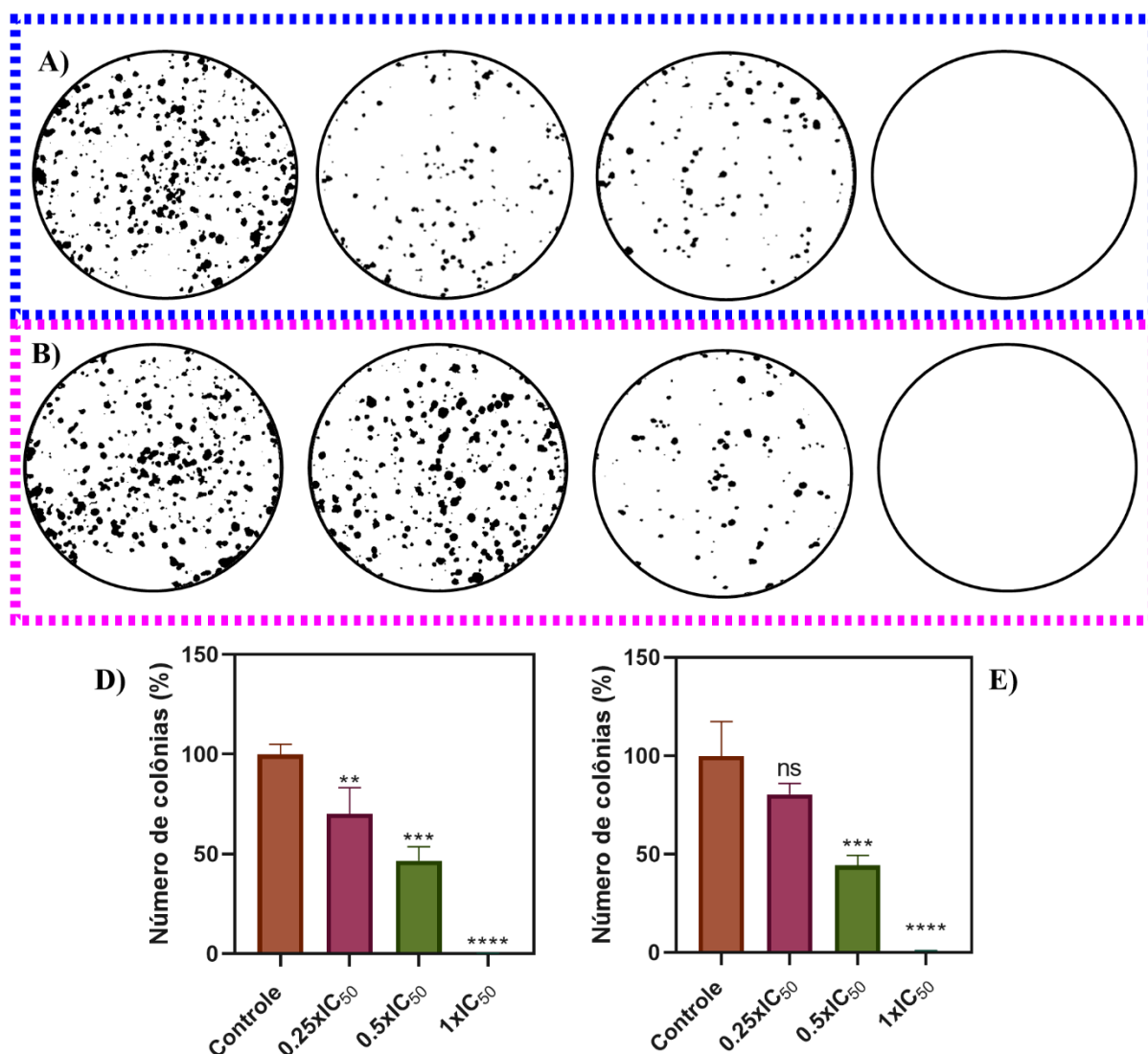


Figura 50. a-b) Imagens clonogênicas das células A2780cis tratadas com os complexos Eu(DBM)₃PH e Eu(DBM)₃BrF, da direita para esquerda: controle; 0,25, 0,5 e 1x do IC₅₀. d-e) Gráfico de barras da distribuição do número de colônias em cada concentração.

Diante do exposto até o momento, visto a capacidade dos complexos de alterarem o ambiente celular seja eles na morfologia bem como na inibição das células em formarem colônias. Realizou-se o ensaio de apoptose celular via citometria de fluxo. Trata-se de uma técnica robusta para identificar o mecanismo de morte que os complexos estão desempenhando, seja eles por apoptose ou necrose.

O kit utilizado no experimento foi o Anexina V-PE, resumidamente, Anexina V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina, um fosfolípido que normalmente está dentro da membrana celular em células saudáveis. No início da apoptose (morte celular programada), o fosfolípido migra para a parte externa da membrana já que a mesma se encontra comprometida. Esse processo permite a detecção da morte celular⁷⁷.

Os dados obtidos para o complexo Eu(DBM)₃PH após 48 horas de tratamento (Fig. 51) indicam que este composto induz apoptose de maneira dependente da concentração. No histograma, observa-se que, no controle, a maioria das células encontra-se no quadrante Q3, indicando viabilidade celular. Com o tratamento, ocorre uma transição para o quadrante Q2, característico da apoptose tardia. Na concentração equivalente ao IC₅₀, 66,5% das células estão em apoptose; esse percentual aumenta para 88,0% ao dobrar a concentração do composto.

Na apoptose tardia, a integridade da membrana celular está comprometida: além da exposição da fosfatidilserina, a membrana permite a entrada de corantes como o 7-AAD, que se ligam ao DNA, possibilitando a distinção entre células saudáveis e em apoptose⁷⁷.

Esses dados corroboram com os resultados dos ensaios clonogênicos e morfológicos, demonstrando que os complexos induzem apoptose nas células, evidenciando um mecanismo de ação antitumoral. Observa-se que o potencial antiproliferativo e antitumoral dos complexos aumenta conforme a concentração e o tempo de exposição. Além disso, destaca-se que a indução de morte celular por apoptose é preferida em terapias com quimioterápicos, pois, ao contrário da necrose, a apoptose não provoca inflamação ou danos aos tecidos adjacentes, reduzindo o risco de efeitos colaterais indesejados.

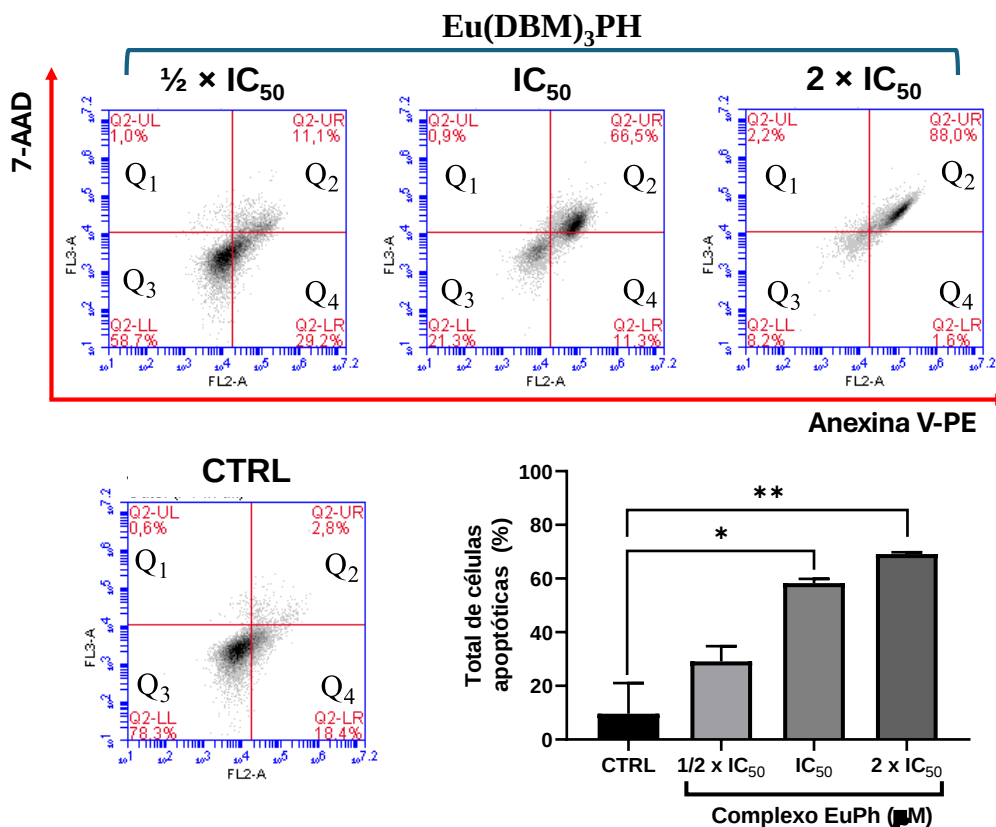


Figura 51. Histograma da distribuição de morte celular tratada com diferentes concentrações do composto Eu(DBM)₃PH para linhagem celular A2780cis por 48 horas onde Q1 - necrose, Q2 – apoptose tardia, Q3 – células viáveis e Q4 - apoptose inicial. Gráficos de barras da porcentagem de células apoptóticas após tratamento com o complexo Eu(DBM)₃PH em diferentes concentrações nas células A2780cis por 48 horas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão dos experimentos em triplicata utilizando a ANOVA. Significância nos níveis de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$) usando ANOVA e teste Dunnett's.

Compreender em qual etapa do processo de divisão celular os compostos estão agindo é crucial para estabelecer conexões entre mecanismos de ação e suas respectivas atividades biológicas. A divisão celular, essencial para o crescimento, desenvolvimento e reparo dos organismos multicelulares, ocorre em duas fases principais: a interfase e a fase mitótica. Neste caso, será dada ênfase à

interfase, pois é nela que a célula se prepara para a divisão. Durante a interfase, a célula se prepara para a divisão e passa por três subfases:

- G0/G1: A célula cresce e sintetiza proteínas essenciais, além de verificar condições ideais para a divisão. Este é um ponto de controle importante para evitar erros;
- S: Ocorre a replicação do DNA, duplicando o material genético;
- G2: A célula continua a crescer e produz proteínas específicas para a fase de divisão. Verificações finais garantem que o DNA foi replicado corretamente.

Nas subfases G0/G₁, as células podem entrar em estados de quiescência, onde não ocorrem atividades relacionadas à replicação, também referidos como fase SubG₁. Uma diferença crucial entre células saudáveis e tumorais está nos pontos de checagem do ciclo celular. Em células normais, esses pontos atuam verificando a presença de danos celulares como em organelas ou no DNA antes de permitir o avanço para as fases subsequentes do ciclo. Em contraste, células tumorais frequentemente apresentam mutações que comprometem esses pontos de checagem, permitindo que continuem em reprodução constante e levando a uma divisão celular descontrolada^{79,80}.

Nas figuras 52 e 53, pode se observar os resultados obtidos para o ensaio de ciclo celular na linhagem celular A2780cis.

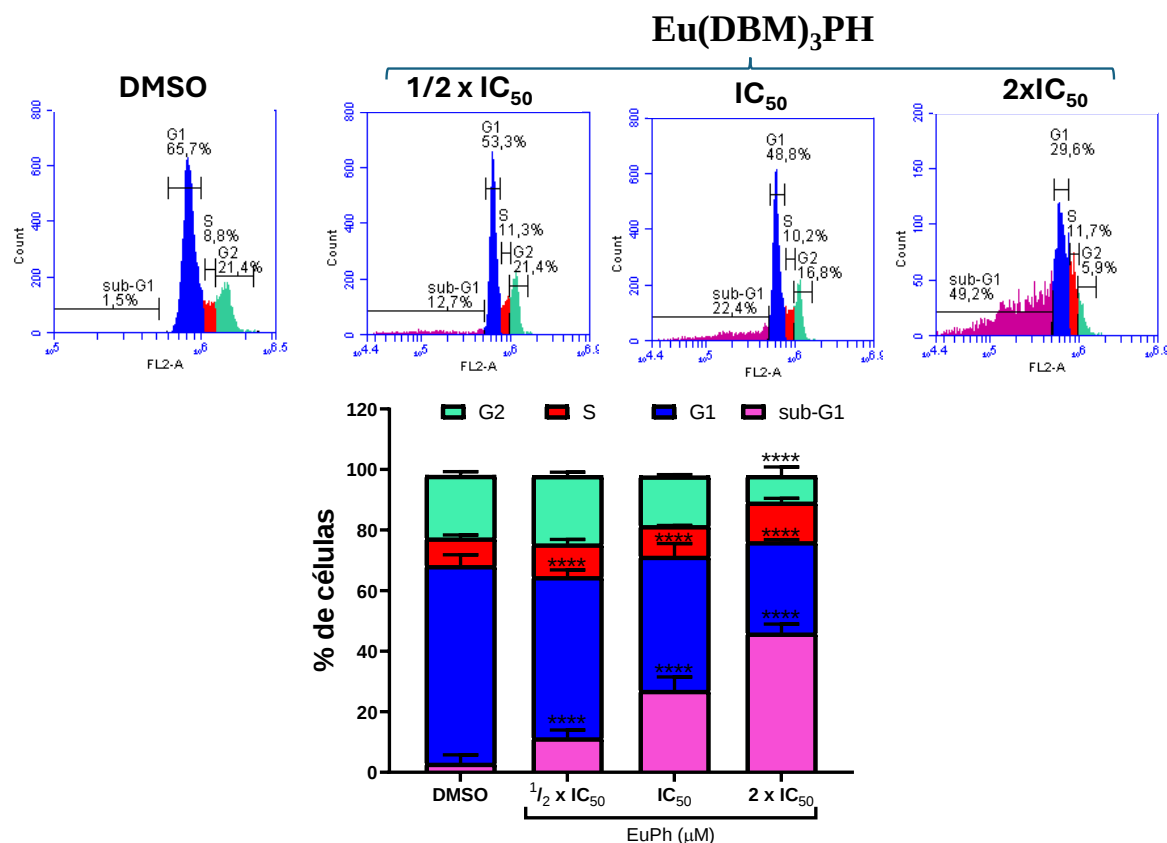


Figura 52. Distribuição do ciclo celular das células A2780cis após tratamento com o complexo Eu(DBM)₃PH por 48 horas. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por **** $p < 0,0001$.

Os compostos estudados apresentam mecanismos de ação semelhantes. Observa-se que, no controle, a maioria das células encontra-se nas fases G1 e G2 do ciclo celular. Após o tratamento com os complexos Eu(DBM)₃PH e Eu(DBM)₃BrF (Figs. 52 e 53), há um aumento na proporção de células na fase SubG1, de modo dependente da concentração (0,85 e 3,57 μM, correspondentes ao IC₅₀ dos complexos), atingindo 22,4% e 13,8%, respectivamente. A fase SubG1 é caracterizada por células com conteúdo de DNA inferior ao normal, indicando fragmentação do DNA — um marcador típico de células em apoptose, o que está de acordo com os ensaios realizados, apontando para um mecanismo apoptótico induzido pelos complexos⁸¹.

A diferença na atuação dos compostos sobre a parada do ciclo celular é observada na fase S. O complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ mantém a porcentagem de células nesta fase em aproximadamente 11%, enquanto o $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ apresenta uma diminuição progressiva à medida que a concentração aumenta. Isso sugere que o $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ possa parar mais efetivamente o ciclo na fase S, uma vez que a porcentagem relativa (concentração excluindo a fase subG1 de células na fase S vai aumentando na medida que a concentração do compostos aumenta. Uma hipótese levantada para justificar esse fato é a capacidade de inibição das enzimas topoisomerases, como será abordado nos ensaios de interação com biomoléculas (Seção 4.4). As topoisomerases desempenham um papel essencial na replicação do DNA, aliviando o estresse gerado pelo superenovelamento da hélice durante a síntese. Por essa função crucial, essas enzimas são alvos de diversos agentes quimioterápicos, que buscam interromper a replicação em células tumorais, inibindo assim a proliferação descontrolada^{82,83}.

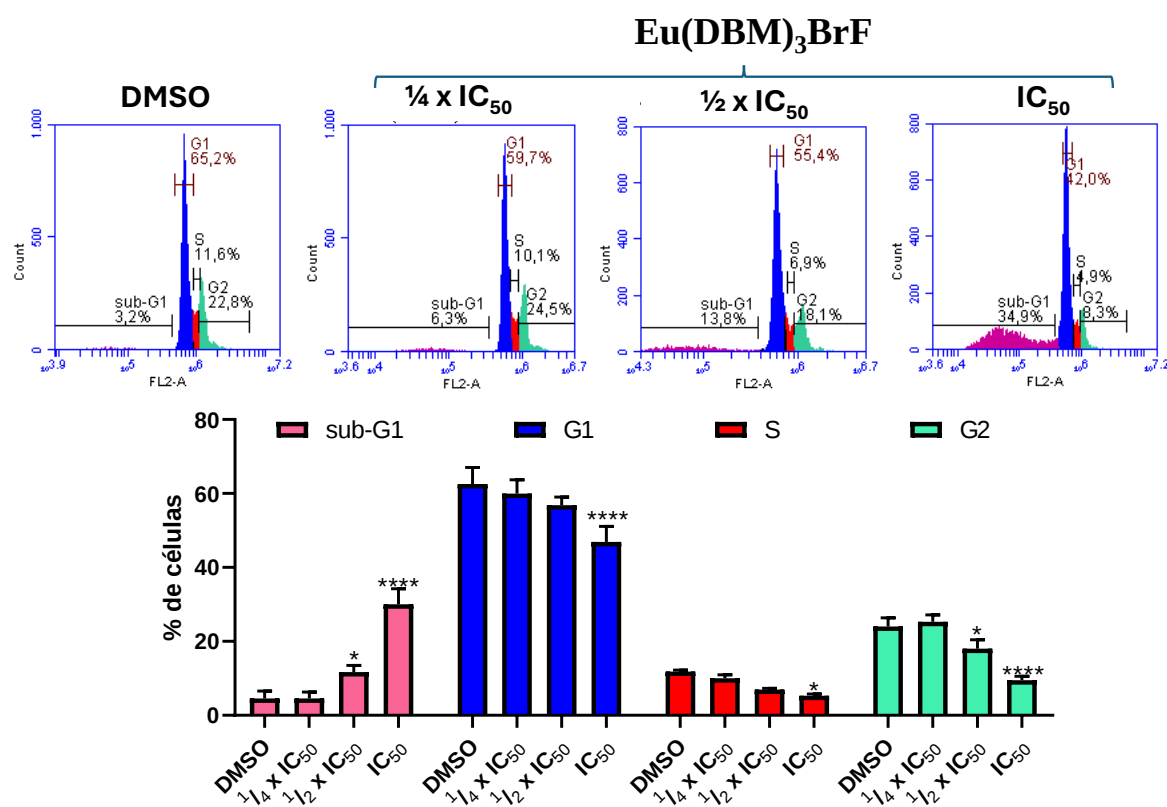


Figura 53. Distribuição do ciclo celular das células A2780cis após tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ por 48 h. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por * $p < 0,05$; ** e **** $p < 0,0001$.

Os ensaios morfológicos em culturas de células em 3D oferecem várias vantagens em relação aos sistemas bidimensionais (2D), principalmente na pesquisa biomédica e no desenvolvimento de fármacos. Em culturas 3D, as células apresentam uma organização e interação mais próximas das encontradas em tecidos e tumores *in vivo*, promovendo uma arquitetura celular que mantém o gradiente de oxigênio; nutrientes; pH; fatores de crescimento; também se nota a presença de morte tanto por apoptose quanto por necrose. Isso permite uma análise mais realista da resposta celular, além de melhor simular o microambiente tumoral. Outras vantagens incluem a formação de junções celulares e o aumento da resistência a fármacos, características comuns em tumores reais, mas não tão expressivas em culturas 2D^{32,84–86}.

O crescimento e análise dos esferoides foram realizados em até 144 horas (6 dias) e expostos como se segue (Figs 54 e 55): Observou-se no grupo controle o crescimento contínuo dos esferoides ao longo de 144 horas, evidenciando um aglomerado celular progressivo. Na primeira concentração testada do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ ($0,78 \mu\text{M}$), próxima ao valor de IC_{50} determinado em ensaios 2D, os esferoides tumorais demonstraram ausência de crescimento até o final do tratamento.

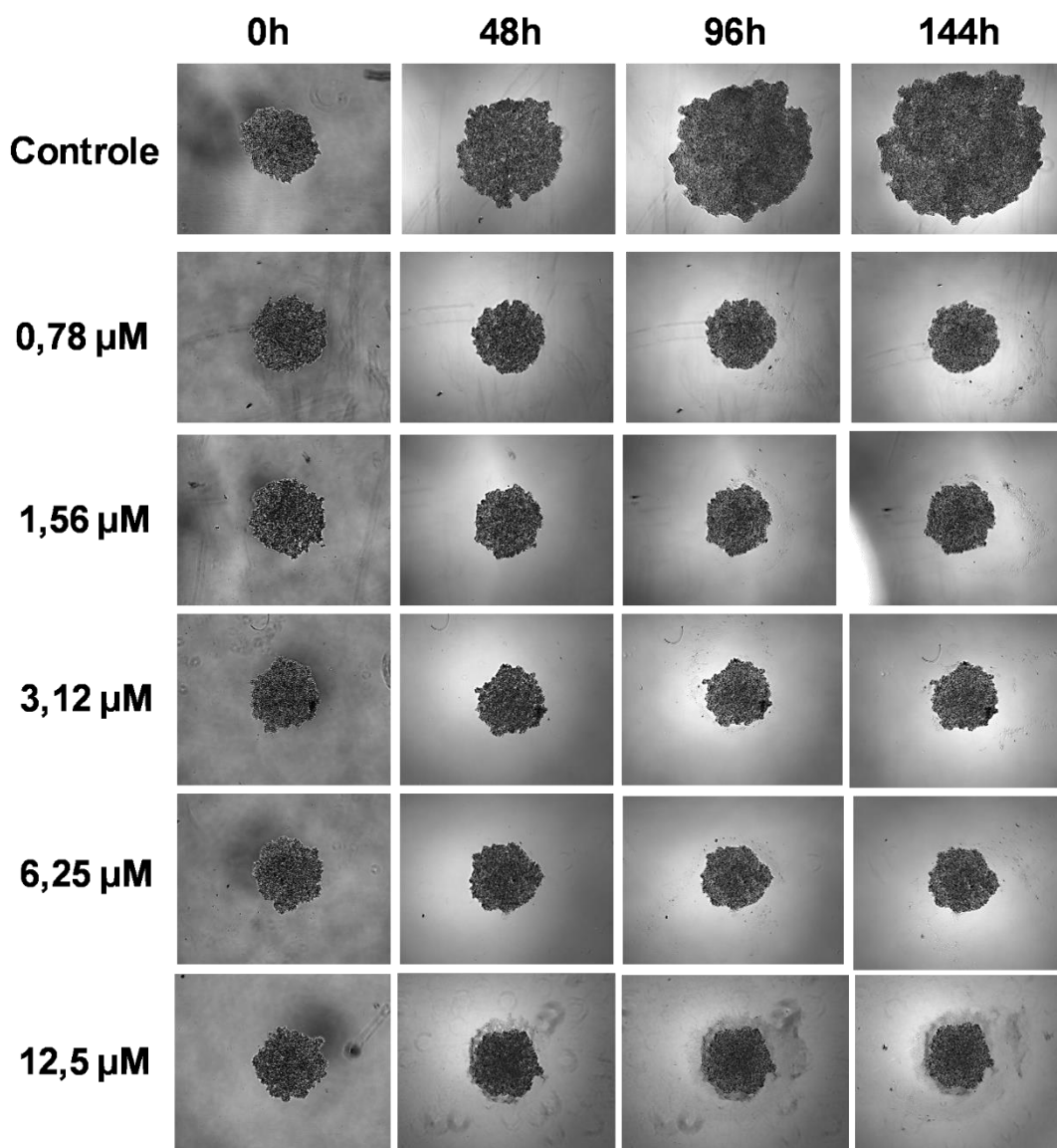


Figura 54. Crescimento dos esferoides para a linhagem celular A2780cis e tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ variando-se tempo e concentração. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.

O composto $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ (Fig. 55), apresenta um comportamento ligeiramente diferente. Nas concentrações iniciais, até $3,12 \mu\text{M}$, não se observa inibição do crescimento dos esferoides celulares. O efeito do tratamento torna-se perceptível apenas em concentrações superiores, com $6,24 \mu\text{M}$, e após 96 horas, quando é possível notar uma redução no tamanho dos esferoides, seguida por uma estabilização de seu crescimento até o final do período de tratamento, caracterizando esse complexo dose e tempo dependente.

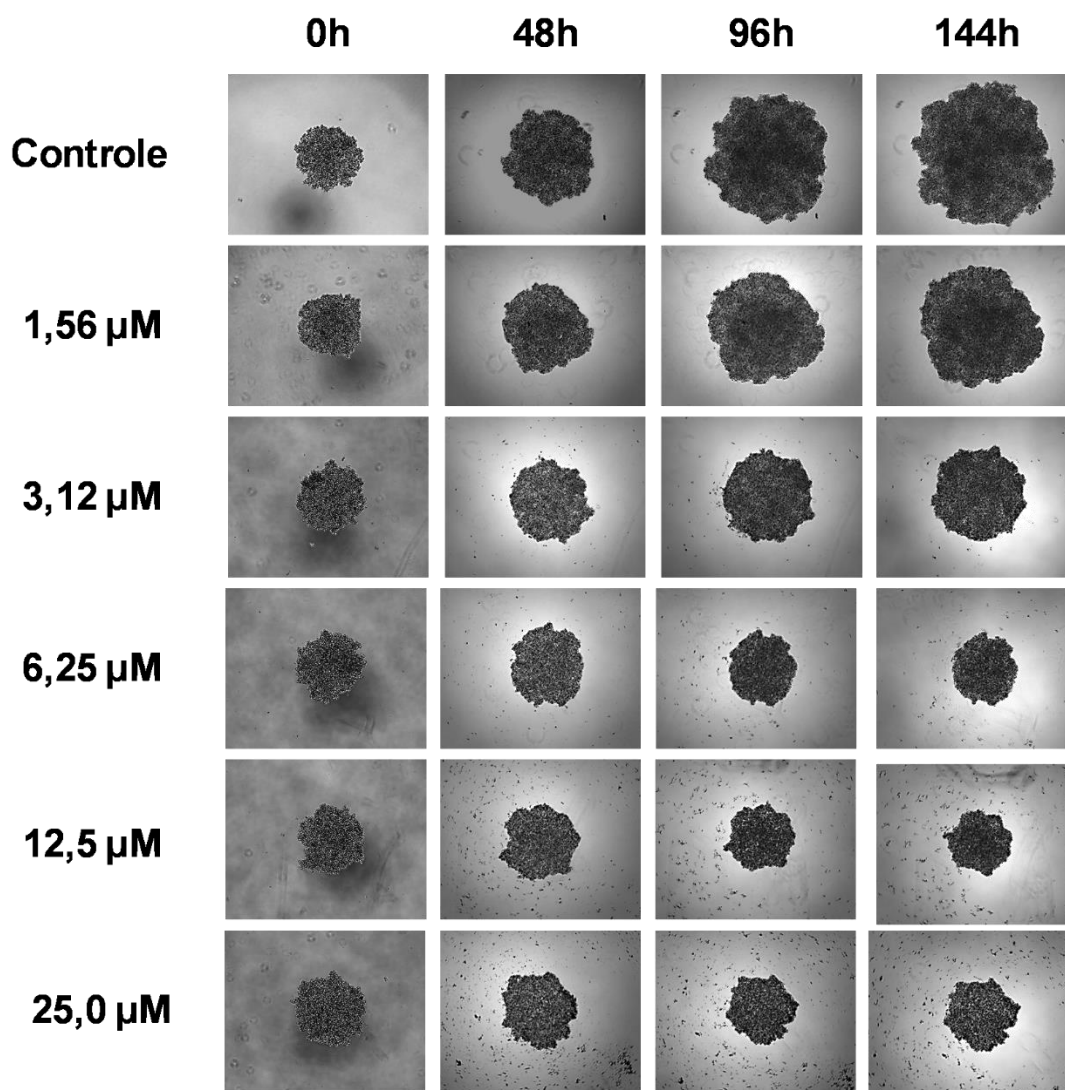


Figura 55. Crescimento dos esferoides para a linhagem celular A2780cis e tratamento com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ variando-se tempo e concentração. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S.

Esses efeitos são mais facilmente visualizados nos gráficos de diâmetro dos esferoides ao longo do tempo (Figs 56a-c). Em comparação com o fármaco padrão cisplatina, observa-se que este composto começa a exibir efeitos citotóxicos na linhagem tumoral somente a partir do oitavo dia, com uma concentração de $6,3 \mu\text{M}$. Em contraste, os complexos aqui discutidos demonstram eficácia em concentrações iguais ou menores, e com um tempo de tratamento significativamente reduzido, indicando uma potencial vantagem terapêutica em termos de dose e duração da exposição.

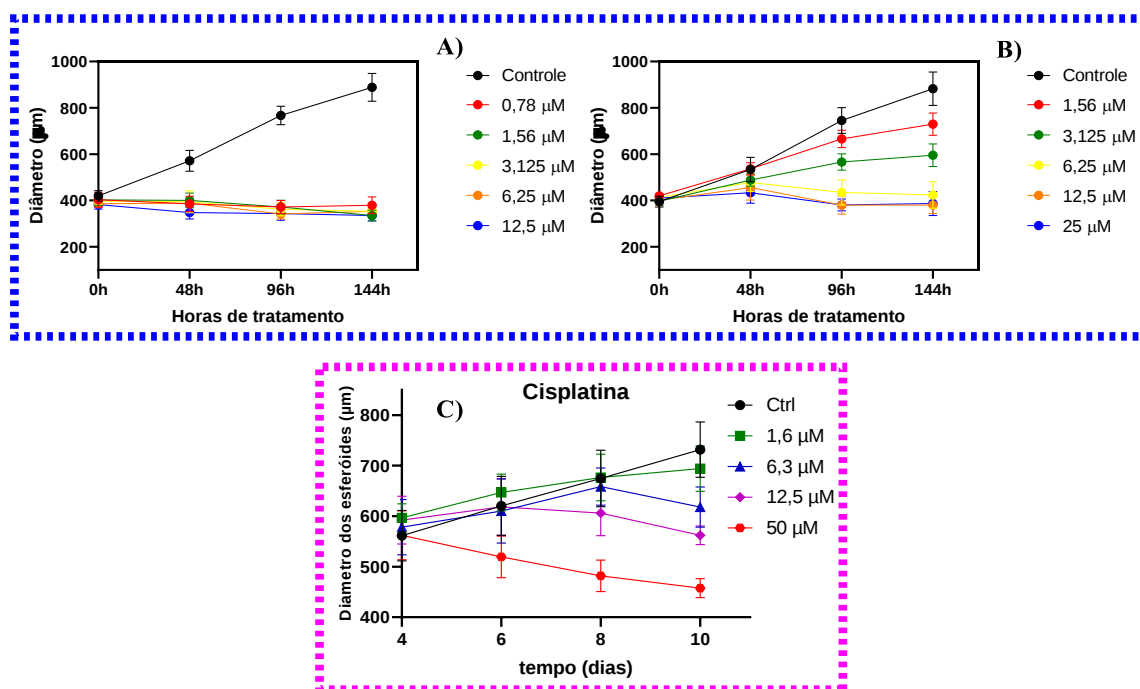


Figura 56. Gráficos dos diâmetros dos esferoides pelo tempo de tratamento. a) Eu(DBM)₃PH. b) Eu(DBM)₃BrF. c) cisplatina.

Após 144 horas, os esferoides foram marcados com as biossondas DAPI e iodeto de propídeo (PI) (Figs. 57 e 58). Observa-se, em comparação ao controle, um aumento na fluorescência vermelha do PI, o que indica um maior número de células mortas já nas primeiras concentrações dos complexos, que consequentemente não apresentam variações até as concentrações finais. O modelo 3D revela que os complexos atuam de maneira homogênea em toda a estrutura do esferoide, sugerindo uma internalização eficaz dos compostos no microambiente tumoral.

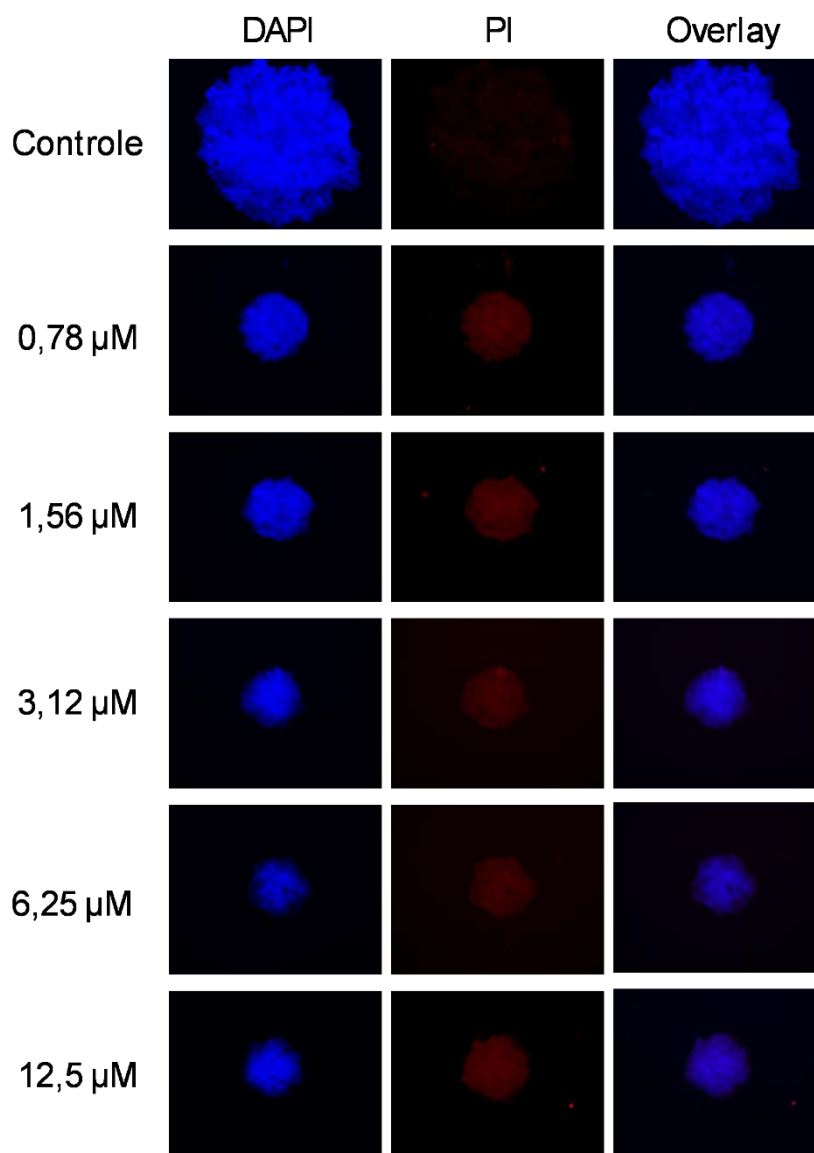


Figura 57. Marcações dos esferoides com DAPI e PI da linhagem celular A2780cis tratada com o complexo Eu(DBM)₃PH após de 144 horas.

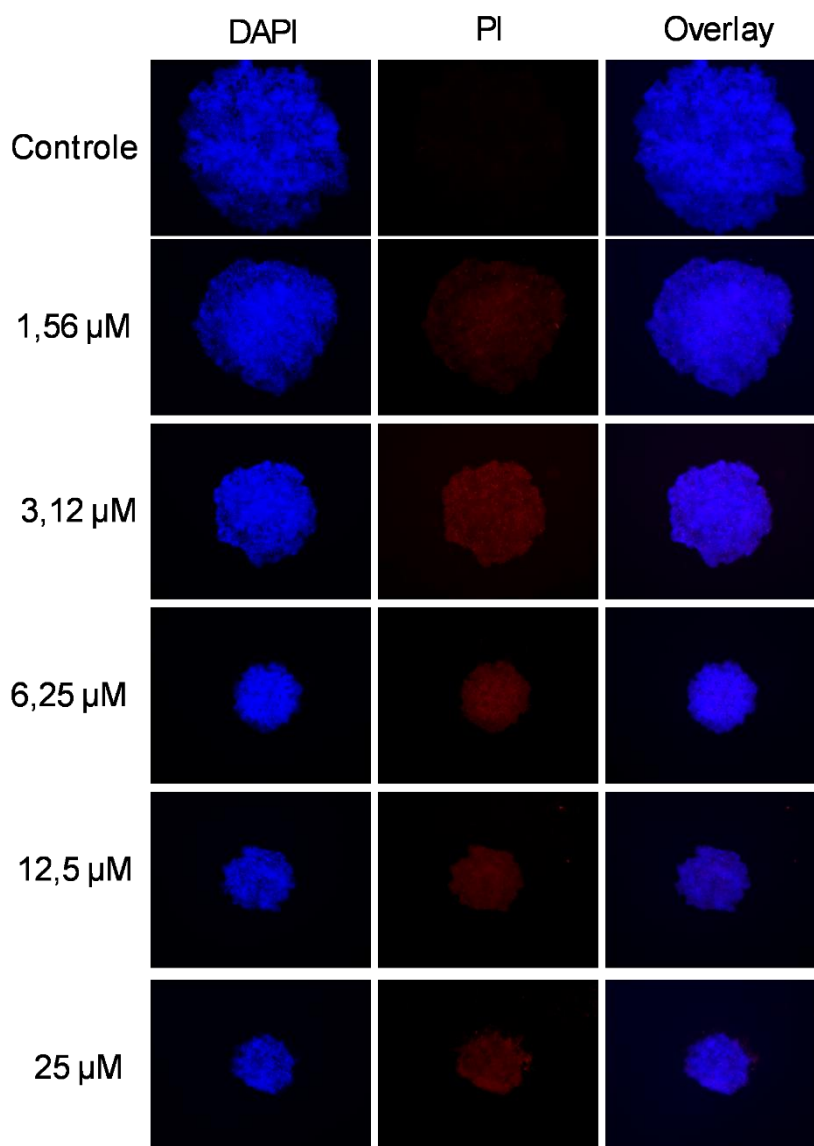


Figura 58. Marcações dos esferoides com DAPI e PI da linhagem celular A2780cis tratada com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ após de 144 horas.

4.4. Interações com biomoléculas por técnicas espectroscópicas, viscosidade e eletroforese

Na seção anterior, foi evidenciado que os complexos estudados possuem propriedades antitumorais marcantes, com ambos os compostos de destaque mostrando efeitos pronunciados sobre as morfologias celulares da linhagem A2780cis. Essa linhagem, conhecida por sua resistência à cisplatina, respondeu

aos complexos através de mecanismos de morte celular por vias apoptóticas, indicando um modo de ação distinto do fármaco padrão como menor tempo de ação e menores concentrações nos testes 3D. Nesta seção, será dada ênfase à tentativa de identificar possíveis alvos moleculares desses compostos, com foco em dois candidatos intuitivos: o DNA e as enzimas topoisomerases. Esses alvos foram selecionados devido à sua participação essencial na replicação celular, sendo que suas interações e inibições são cruciais para suprimir o crescimento celular e, assim, induzir a morte das células tumorais via apoptose.

As técnicas espectroscópicas têm ampla aplicação em estudos de interações com o DNA, devido à sua sensibilidade a mudanças conformacionais, refletidas em bandas características tanto da biomolécula quanto das interações entre compostos-DNA. Além disso, essas técnicas oferecem resultados rápidos e de baixo custo, tornando-se ferramentas ideais para a análise de interações moleculares⁸⁷.

A primeira técnica utilizada foi a espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). Dada a presença de bandas ativas nos complexos, foi possível monitorar as variações nessas bandas em função das diferentes concentrações de DNA. Um resumo das interações observadas está apresentado na Figura 59a-d, a seguir.

Se observa que com incrementos nas concentrações do ct-DNA ocorre pequenos efeitos hipocrômicos, ou seja, diminuição das intensidades das bandas dos complexos situadas em cerca 350 nm, além de pontos isosbéticos evidenciando a ocorrência de mudanças conformacionais entre complexos e o DNA. Porém todos esses efeitos totais não caracterizam que os complexos estejam agindo como intercaladores por essa técnica, já que efeitos mais pronunciáveis seriam identificados, como maiores hipercromismo devido às fortes interações π para π^* (composto-DNA) serem limitadas, pois esses orbitais π já estão preenchidos por elétrons e consequentemente diminui-se a probabilidade dessas transições ocorrerem, além de deslocamento dessas bandas para o vermelho

(batocromismo) provinda de uma estabilidade adquirida, após a intercalação, provocando uma diminuição na energia necessária para as transições π ⁸⁸.

As constantes de ligações ou K_b foram na ordem de 10^5 M^{-1} e podem ser consultadas em apêndice junto com as retas de regressão linear para cada composto, isso indica que as interações que estejam ocorrendo entre as espécies são na ordem intermediária de força ligação, podendo ser elas tanto eletrostáticas quanto interações nos sulcos do DNA.

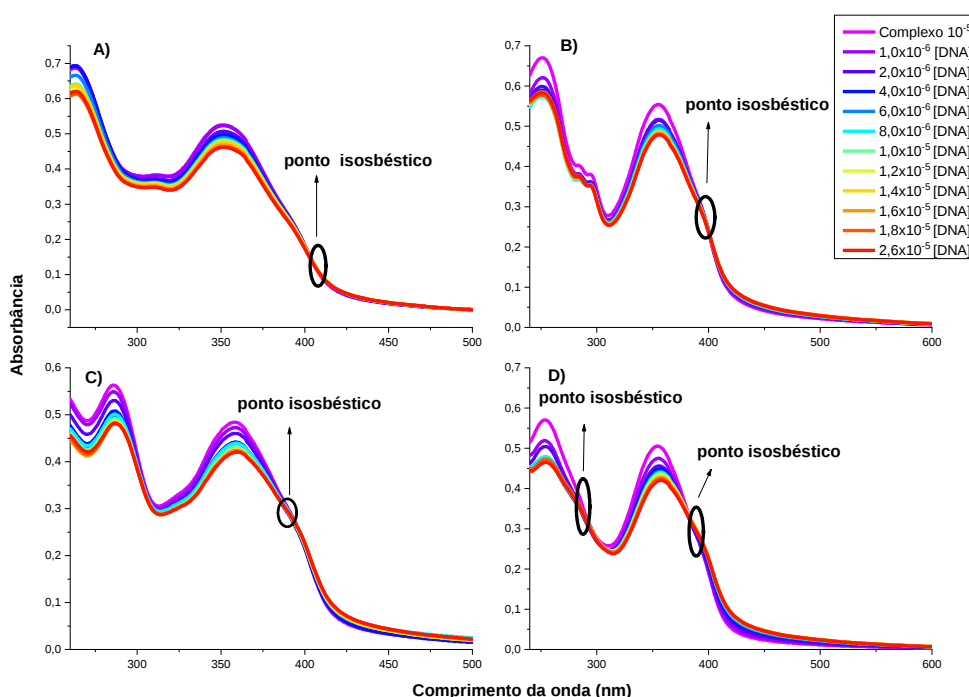


Figura 59. Interação com o DNA vis UV-Vis em concentrações fixas dos complexos e variações crescentes da concentração de ct-DNA. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentrações de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ em tampão Trisma.HCl.

O Dicroísmo Circular (CD) foi utilizado neste estudo devido à sua alta sensibilidade às mudanças conformacionais nas bases do DNA. O espectro característico dessa biomolécula varia conforme a conformação que adota, sendo

as formas B, A e Z as conformações mais comuns para as duplas hélices, com a forma B-DNA predominante em condições fisiológicas. No espectro de CD, o DNA na conformação B apresenta duas bandas características: uma banda negativa em aproximadamente 245 nm, relacionada à elipticidade estrutural da dupla hélice, e uma banda positiva por volta de 275 nm, associada ao empilhamento das bases nitrogenadas⁸⁷.

Na Figura 60a-d, não se observa alterações significativas nas bandas características das conformações do DNA em função das diferentes concentrações dos complexos. O que sugere que as interações estabelecidas são, de fato, provindas de interações eletrostáticas ou via sulcos do DNA. Caso houvesse interações mais efetivas, como a intercalação ou ligações covalentes, essas seriam evidenciadas por torções conformacionais, refletidas em deslocamentos das bandas e alterações nas intensidades das duas bandas principais associadas à conformação B-DNA nos espectros. Esses resultados reforçam a hipótese de que os complexos não induzem modificações estruturais significativas no DNA, mantendo-se em interações mais superficiais e de baixa afinidade⁸⁹.

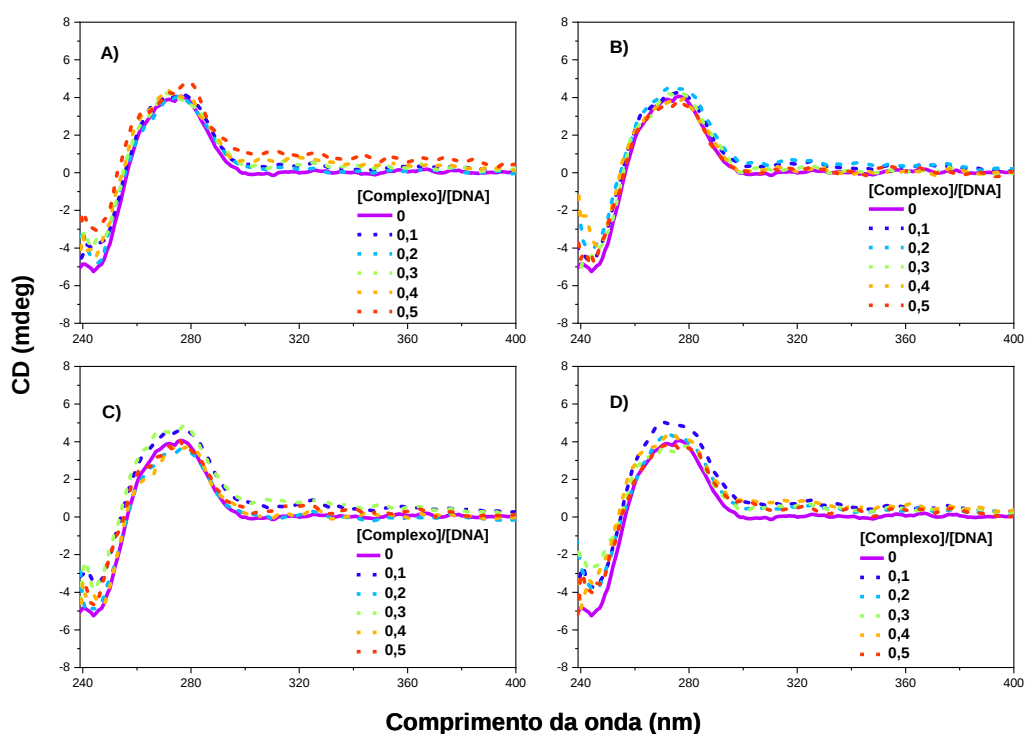


Figura 60. Dicroísmo circular para os complexos. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. c) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. d) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$. Concentração do ct-DNA fixa em $100\ \mu\text{M}$ e proporções molares $[\text{complexos}/\text{DNA}] = 0,00 - 0,50$.

Outro ensaio empregado para investigar o tipo de interação entre os complexos e o DNA foi a determinação da viscosidade relativa de soluções contendo o DNA e os complexos. Combinada com UV-vis e dicroísmo circular, essa medida fornece informações robustas para descartar ou confirmar a ocorrência de interações covalentes ou de intercalação. A viscosimetria é reconhecida por sua baixa ambiguidade, permitindo inferir com maior precisão se há intercalação ou ligação covalente. Complexos que se intercalam no DNA tendem a causar um aumento na viscosidade da solução, uma vez que provocam mudanças conformacionais, resultando em DNA circular e menos flexível. Em contraste, interações covalentes tendem a linearizar o DNA, diminuindo a viscosidade^{90,91}. Essas observações foram confirmadas com o uso de controles, como o laranja de tiazol,

um intercalador clássico, e a cisplatina, que forma ligações covalentes, ambos representados na Figura 61. Os resultados expostos corroboram com a ausência de ligação covalente ou de intercalação significativa, já que os complexos estão no limítrofe não ocasionando mudanças visíveis na estrutura secundária do ct-DNA.

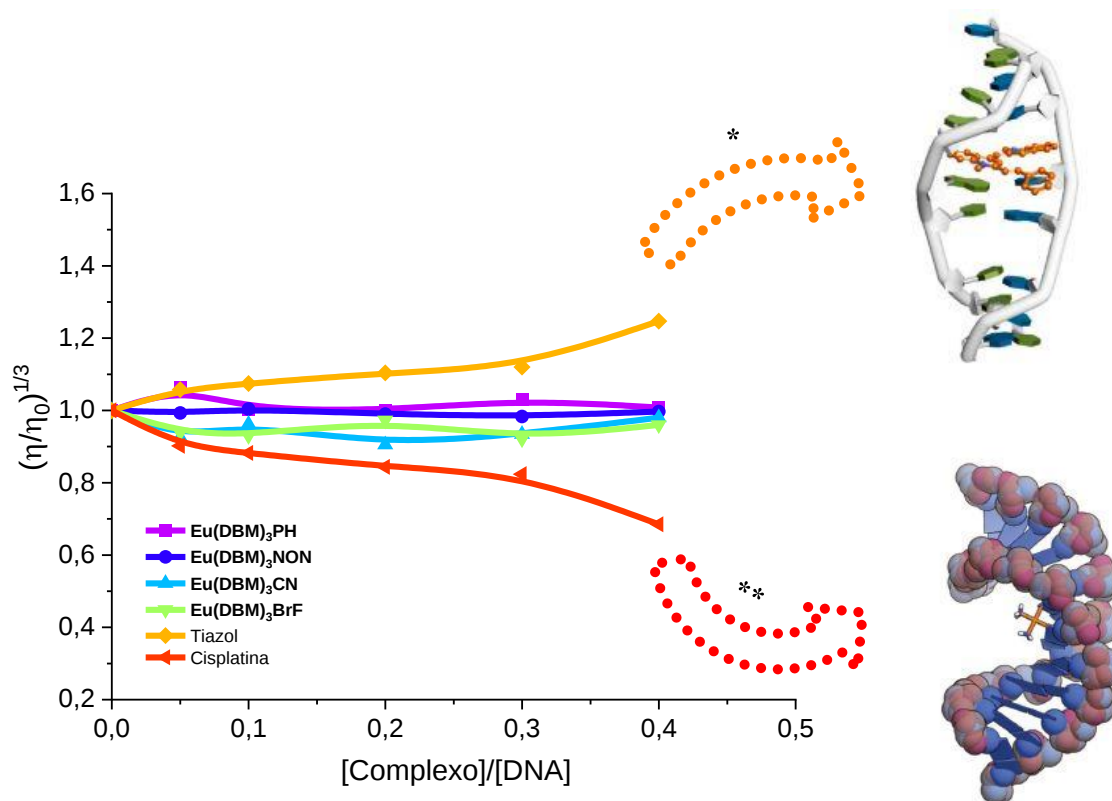


Figura 61. Viscosidade relativa do ct-DNA (100 μ M) na ausência e presença dos complexos e dos controles laranja de tiazol e cisplatina nas proporções molares [complexos/DNA] = 0,0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4. Soluções contém 20% de DMSO. * adaptado de Zhu et al.⁹⁴ ** adaptado de Pages *et al.*²⁷

Para aprofundar a análise e excluindo as possibilidades de intercalação e ligação covalente às bases do DNA, foram realizados estudos adicionais de competição utilizando o corante Hoechst 33258. Este corante é amplamente conhecido por sua afinidade pelo sulco menor do DNA, quando, ao se ligar, pode aumentar sua fluorescência em até trinta vezes na região de 460 nm. Esse aumento ocorre devido à supressão do relaxamento rotacional e à redução da hidratação na

ligação ao DNA, o que estabiliza a emissão fluorescente do complexo Hoechst-DNA⁹².

Se os complexos em estudo tiverem afinidade pelo sulco menor do DNA, espera-se que eles desloquem o Hoechst, causando uma redução na fluorescência. Portanto, a supressão da fluorescência é um indicativo de interações dos complexos ao sulco menor do DNA, sugerindo uma possível interação neste sítio específico.

O ensaio de competição realizado (Figs. 62a-c) mostrou que a adição gradual dos complexos provoca uma expressiva supressão da fluorescência do corante Hoechst. No gráfico de porcentagem de supressão (Fig. 62b), observa-se que os complexos contendo fenantrolinas estendida exibem uma taxa de supressão próxima a 50%, enquanto o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ alcança uma taxa de 84% (Tabela 16). Esses resultados indicam uma afinidade considerável desses complexos pelo sulco menor do DNA^{93,94}.

Além disso, o grande deslocamento de Stokes característico dos complexos de európio se mostra vantajoso em ensaios envolvendo biomoléculas fluorescentes, minimizando sobreposições entre bandas de emissão. Na Figura 62a, é claramente visível a separação entre a emissão do corante (cerca de 450 nm) e a emissão característica do európio (~612 nm), independentemente das variações de concentração dos complexos. Isso facilita a interpretação dos dados e destaca a utilidade dos complexos de európio em estudos de interação com biomoléculas fluorescentes.

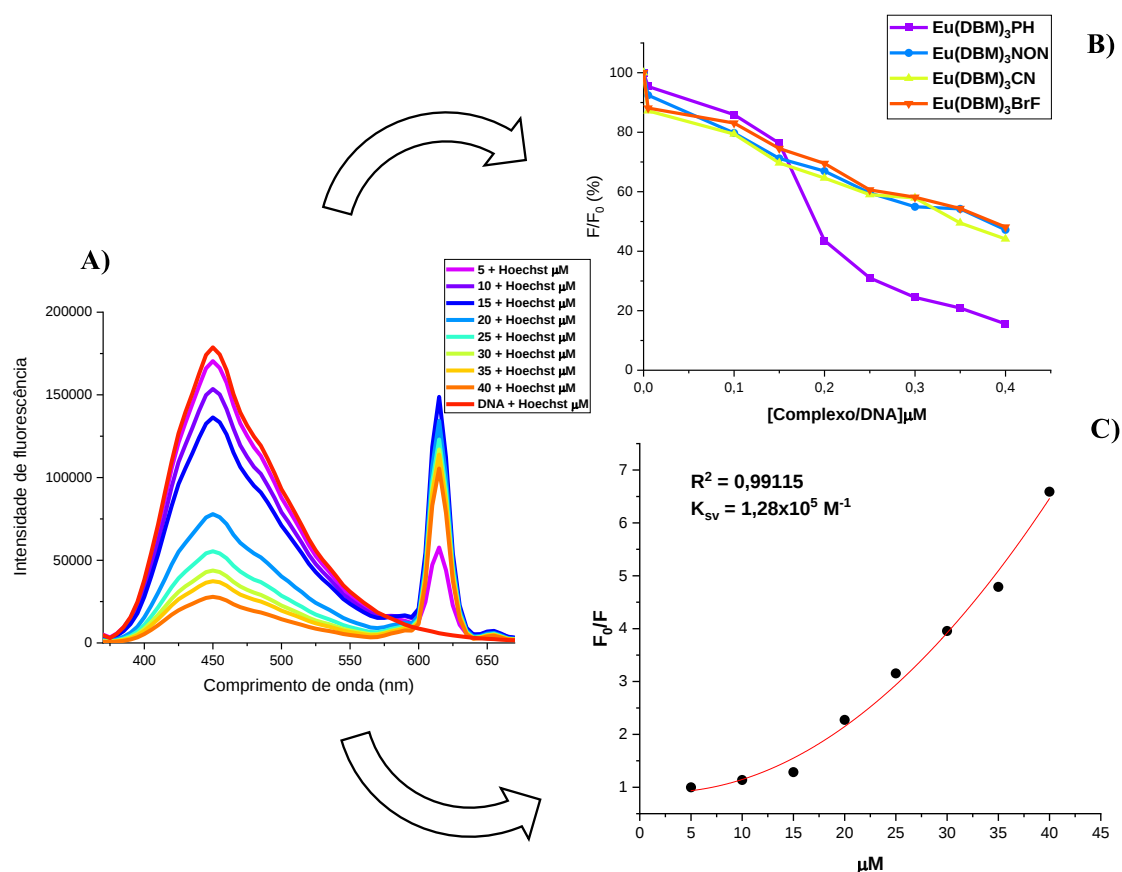


Figura 62. a) Espectro de emissão do Hoechst 33258 na presença do ct-DNA e variações nas concentrações do complexo Eu(DBM)₃PH. $\lambda_{ex} = 350\text{nm}$ e $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$. b) Taxa de supressões de fluorescência (%) do corante na presença de diferentes concentrações dos respectivos complexos. c) Regressão polinomial do complexo Eu(DBM)₃PH e constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Ensaios realizados a 37 °C.

As constantes de supressão de fluorescência (K_{sv}) estão alinhadas com as taxas de supressão observadas, apresentando valores intermediários em torno de 10^4 mol. L^{-1} para os complexos com ligantes fenantrolínicos NON, CN e BrF, e demonstrando uma maior afinidade do complexo Eu(DBM)₃PH pelo sulco menor, com uma constante de $1,28 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 16). Acredita-se que essa preferência possa ser atribuída às diferenças estruturais do Eu(DBM)₃ PH, que possui maior número de anéis aromáticos, com liberdade torsional que parece favorecer interações eletrostáticas por forças de Van der Waals no sulco menor do

DNA⁸⁸, além disso a somatória pela afinidade pelo sulco além da inibição da TO-POII α pode ser o reflexo da maior atuação desse complexo pela fase S do ciclo celular.

É relevante destacar que vários medicamentos já aprovados para o tratamento de doenças, como fármacos anticâncer, antivirais e antibacterianos, são conhecidos por interagir com o DNA por meio do sulco menor. Exemplos incluem cloroquina, netropsina, distamicina e o próprio Hoechst, entre outros, que utilizam essa via de interação seletiva para modular a função celular.⁸⁸

Tabela 16. Parâmetros experimentais para o sistema complexos-DNA para deslocamento do Hoechst 33258. Temperatura 37 °C.

Complexos	K _{SV} (10 ⁵) M ⁻¹	Supressões (%)
Eu(DBM) ₃ PH	1,28	84,4
Eu(DBM) ₃ NON	0,288	52,7
Eu(DBM) ₃ CN	0,246	55,9
Eu(DBM) ₃ BrF	0,256	51,6

A técnica de eletroforese baseia-se na migração de moléculas carregadas através de um gel, que separa as moléculas conforme seus tamanhos e conformações. Sendo o DNA uma molécula polianiónica, sua movimentação ocorre em direção ao polo positivo sob campo elétrico, e sua migração é modulada por conformações que podem ser alteradas ao interagir fortemente com outras moléculas. Assim, a eletroforese permite observar variações conformacionais diretas, como aquelas causadas por ligações intercalativas ou covalentes⁹⁵.

A Figura 63b, ilustra as diferentes conformações assumidas pelo plasmídeo em resposta à interação com moléculas. Em sua forma nativa, o DNA plasmidial exhibe predominantemente uma conformação superenovelada, que é mantida na ausência de interações com outras espécies. Na presença de compostos intercalantes, o DNA tende a adotar uma conformação circular, indicativa de interações fortes. Já a conformação linear, que surge em casos de ligações

covalentes, está associada a eventos de clivagem da estrutura^{29,96}. Na Figura 63a, observa-se que a cisplatina (C^{+}), ao ser aplicada em uma concentração de 5 μM , induz a conversão do DNA para a forma linear.

Os compostos, em concentrações decrescentes, não demonstram capacidade de induzir alterações conformacionais no plasmídeo. Essa observação é confirmada pela comparação com o controle negativo, no qual a conformação superenovelada permanece predominante. A estabilidade estrutural do plasmídeo na presença dos complexos indica uma baixa propensão desses compostos para promover interações fortes, como intercalantes ou ligações covalentes, que causariam mudanças perceptíveis na conformação do DNA, o que corrobora com os demais resultados de interação com DNA discutidos anteriormente. Adicionalmente, compreender como os complexos afetam a mobilidade eletroforética do DNA é de suma importância para que se possa fazer uma interpretação mais acertiva nos ensaios de inibição do relaxamento estrutural do DNA causados pelas enzimas topoisomerasas, os quais serão discutidos a seguir.

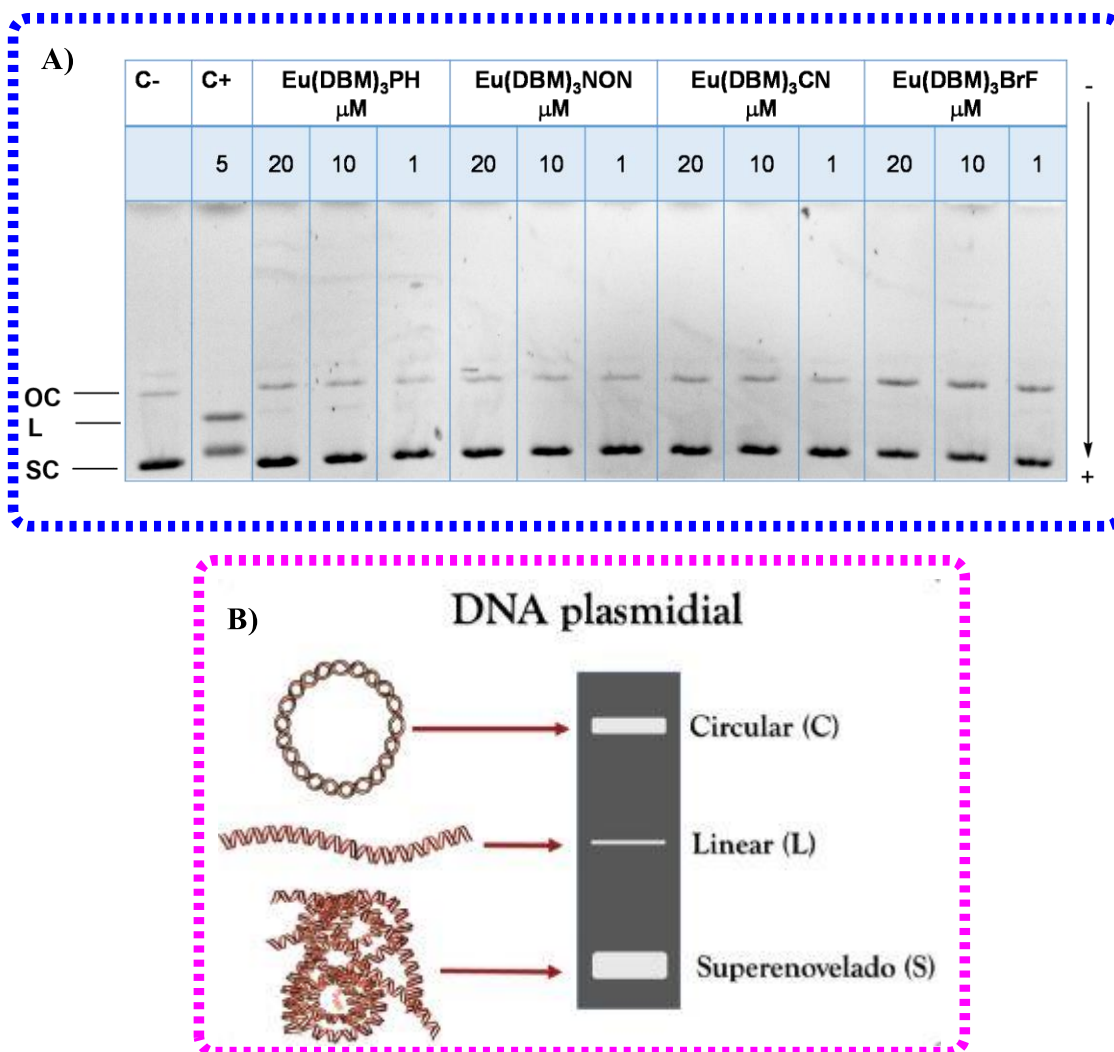


Figura 63. a) Gel de eletroforese no controle negativo somente plasmídeo pUC19 + DMSO + TBEx1 (MIX). Controle positivo: cisplatina + (MIX). Variações das concentrações dos complexos + MIX. b) Conformações que o plasmídeo pode assumir dependendo de possíveis interações.

4.4.1. Ensaio de inibição das topoisomerases via eletroforese

Topoisomerases tipo I e tipo II desempenham papéis fundamentais na manutenção do DNA e são alvos promissores para a terapia anticâncer devido à sua função em processos celulares. Essas enzimas facilitam o desenrolamento do DNA durante a replicação e transcrição ao romper e religar fitas de DNA, alterando a topologia da molécula. A inibição das topoisomerases interrompe a

replicação, resultando em quebras de DNA irreparáveis que levam à apoptose. A distinção entre topoisomerasas tipo I e II está nos mecanismos de ação: a tipo I atua em uma única fita de DNA e altera o número de ligações em unidades ímpares, enquanto a tipo II atua em fitas duplas, mudando o número de ligações em unidades pares. Os agentes terapêuticos que visam inibir essas enzimas estabilizam complexos que promovem danos no DNA, sendo essa a base para a eficácia terapêutica no tratamento de cânceres e outras doenças^{83,97}.

Na Figura 64a-c, se encontra os ensaios realizados com as diferentes formas da topoisomerase, esses que estão presente em partes do ciclo celular de diferentes maneiras. Por exemplo as TOPOII α (Fig.64a): é altamente expressa em células tumorais e tem papel fundamental durante a replicação do DNA e requer o uso de ATP. Esta enzima causa uma quebra temporária na fita dupla no DNA, através da qual passa uma segunda hélice de DNA, alterando o superenovelamento e permitindo o desenrolamento do DNA. A TOPOI β (Fig. 64b): desempenha um papel na remoção de superenovelamentos do DNA durante a transcrição e replicação. Diferentemente da II α , a topoisomerase I atua clivando apenas uma das fitas do DNA e não requer ATP para sua atividade. A TOPOII β (Fig. 64c): é expressa em níveis mais baixos em células proliferativas e em altos níveis em células diferenciadas e em tecidos específicos, como o cérebro. Ela desempenha um papel na manutenção do DNA em células não proliferativas, na regulação de genes específicos e na reparação de danos ao DNA^{98,99}. Dessa forma, é desejável que o composto atue de forma seletiva entre as isoformas α e β , da topoisomerase do tipo II.

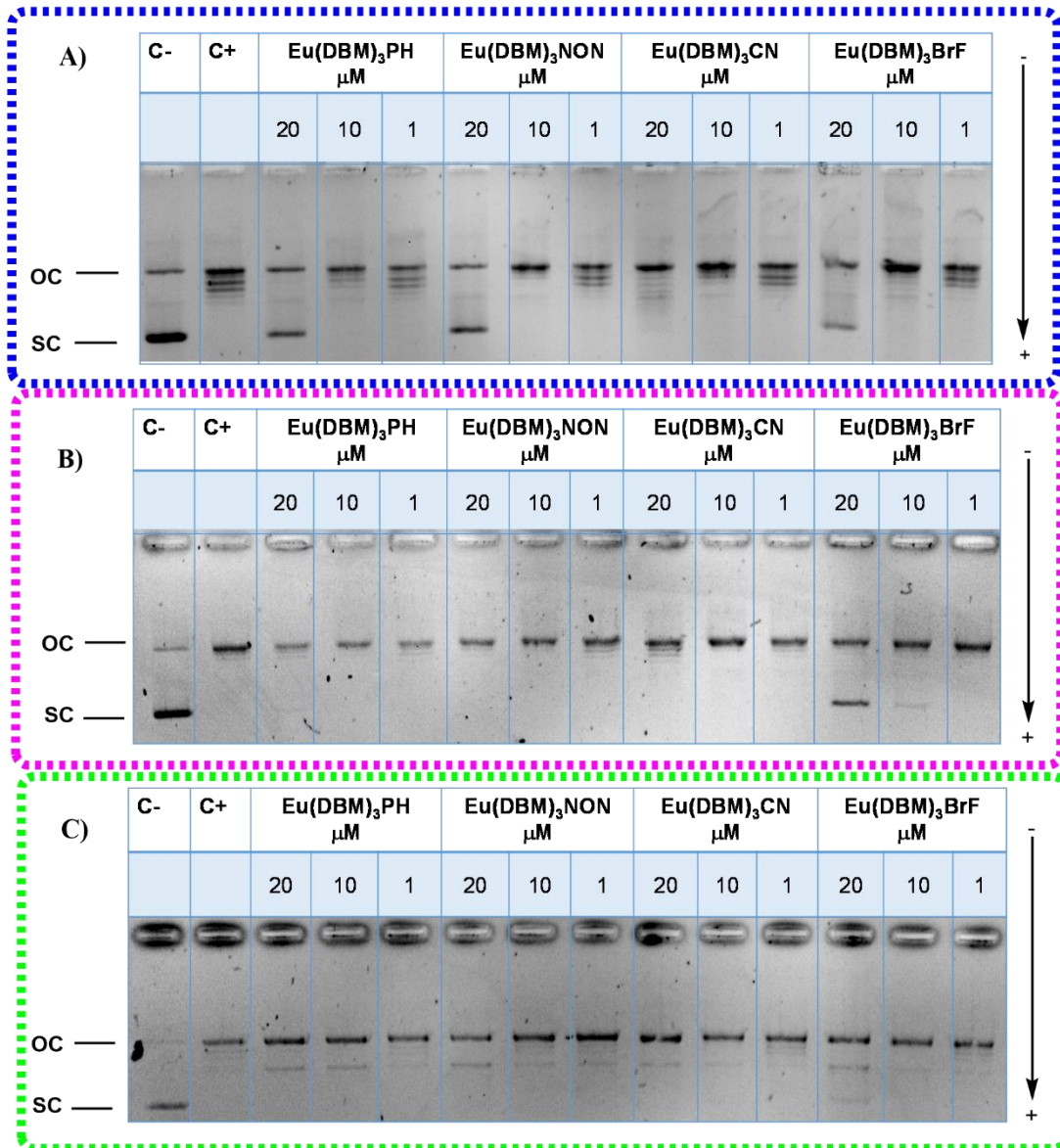


Figura 64. Gel de eletroforese para a diferentes isoformas das enzimas topoisomerases na presença decrescente das concentrações dos complexos respectivamente. a) TOPOII α ; C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOII α + ATP. b) C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOI. c) C- = DNA; C+ = DNA+ TOPOII β +ATP.

- No ensaio, dois controles foram aplicados: o controle negativo (C-), que consistiu apenas no plasmídeo pBR322, permitindo observar sua migração na forma predominante, a superenovelada. Nos controles positivos, foram adicionadas as respectivas topoisomerases, para avaliar suas atividades inibitórias frente ao DNA, gerando uma conformação circular devido à clivagem do DNA

causada pelas enzimas. Nas condições experimentais, as seguintes observações foram feitas: Na figura 64a, somente o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$ não foi capaz de inibir a atividade da $\text{TOPOII}\alpha$, os demais complexos mostram uma inibição em $20\ \mu\text{M}$, vide que as bandas do DNA superenovelado se encontra presente;

- Frente a $\text{TOPOII}\beta$ (Fig. 64b), a inibição é apresentada somente pelo complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$;
- Os complexos não exibem inibição da $\text{TOPOII}\beta$ (Fig. 64c), esse padrão de atividade é de suma importância, já que as topoisomerase $\text{II}\beta$ também são expressas em células não tumorais, o que caracteriza esses complexos como inibidores catalíticos e não venenos da TOPOII ¹⁰⁰.

Inibidores catalíticos e venenos de topoisomerasas são dois tipos distintos de agentes com funções cruciais nas terapias anticâncer, devido à maneira como interagem com a enzima e afetam o DNA. Os venenos estabilizam o complexo DNA-topoisomerase durante o processo de religação das quebras de fita, resultando em quebras irreversíveis que podem levar à morte celular. Essas quebras não religadas, por sua vez, podem induzir mutações e rearranjos cromossômicos, aumentando o risco de desenvolvimento de tumores secundários. Em contraste, os inibidores catalíticos bloqueiam etapas específicas da atividade enzimática sem gerar quebras de DNA, impedindo, por exemplo, a ligação da topoisomerase ao DNA, o que lhes confere um perfil menos mutagênico^{98,101}.

Os complexos aqui investigados apresentam taxas de inibição da topoisomerase menores que o fármaco padrão etoposídeo (classificado como um veneno da TOPOII e amplamente utilizado em terapias anticâncer), que exibe uma taxa de inibição em torno de $35\ \mu\text{M}$. Em ensaios citotóxicos frente a linhagem A2780cis, por exemplo, etoposídeo apresentou IC_{50} de $1,7\ \mu\text{M}$, um valor próximo aos complexos sintetizados neste estudo^{102,103}.

Outro ponto relevante é que a inibição da $\text{TOPO II}\alpha$ pelos complexos pode contribuir para os efeitos anticâncer observados, o que pode estar relacionado à discreta variação do ciclo celular na fase S, associada à síntese e replicação

do DNA, quando tratadas com o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ (Fig. 52). Esses resultados indicam que os complexos podem atuar em múltiplos alvos biológicos, sugerindo a necessidade de investigações adicionais para esclarecer com maior precisão os mecanismos envolvidos na indução de apoptose em células tumorais.

4.4.2. Interação com a proteína albumina de sangue humano via fluorescência

A albumina de sangue humano (HSA) é uma proteína abundante no plasma sanguíneo e liga-se a uma gama de medicamentos ou ligantes endógenos. A HSA desempenha um papel fundamental nos processos fisiológicos e de transporte, como regulação da pressão osmótica, transportando ácido graxos, hormônios, ácidos biliares, aminoácidos, metais e metabolitos tóxicos. Além disso, a proteína tem a propriedade de potencializar a farmacocinética e dinâmica de fármacos, diminuir efeitos colaterais e aumentar a disposição do medicamento no alvo de interesse. No entanto, fármacos que tenham alta afinidade pela HSA necessitam de doses mais altas para atingir uma concentração efetiva, já que esses precisam estar biodisponíveis para o alvo terapêutico. Portanto os estudos de interações HSA-fármacos é um fator essencial para iniciar a compreensão sobre a biodisponibilidade dos potenciais fármacos¹⁰⁴.

A HSA é uma proteína globular de cadeia polipeptídica simples constituída por 583 resíduos de aminoácidos. A fluorescência intrínseca da proteína é provinda do resíduo triptofano que é altamente sensível ao ambiente local. As alterações nos espectros de emissão do triptofano (HSA) geralmente ocorrem em resposta a transições conformacionais, ligação de substrato ou desnaturação. Nesse contexto, ensaios de interação que acarretam na supressão de fluorescência da HSA é um método útil para se estudar os modos de ligação proteína-complexos^{49,104}.

Os resultados apresentados na Figura 65a-d, mostra uma supressão da fluorescência da HSA em 330 nm com o aumento nas concentrações dos complexos (até 30 μ M), as taxas se aproximam de 80% de supressão da intensidade de fluorescência encontrada para a HSA livre, sugerindo mudanças conformacionais nos resíduos de triptofano.

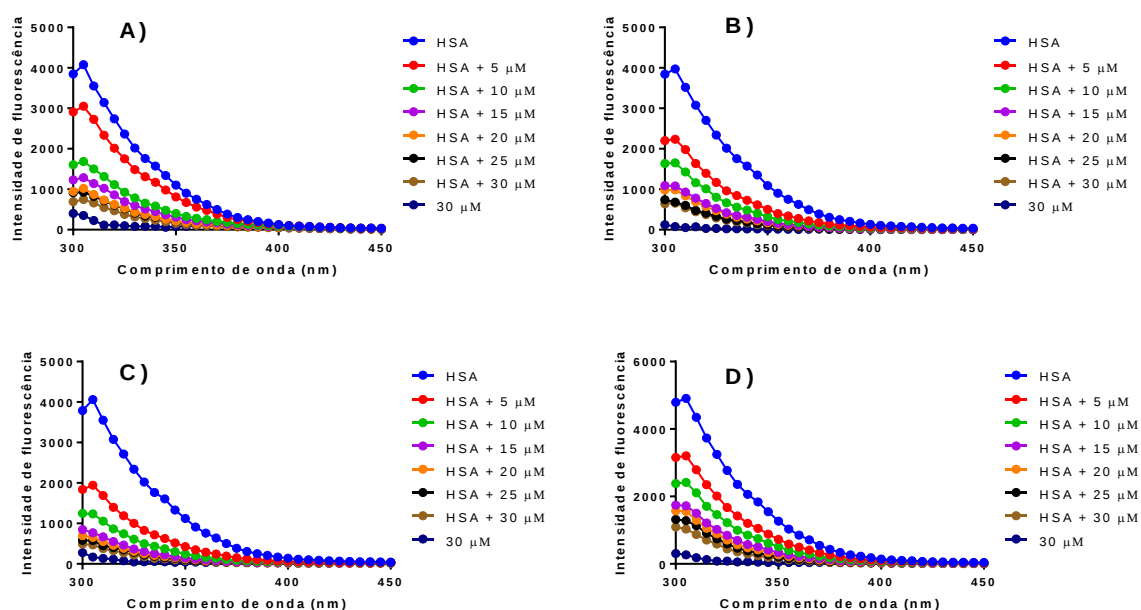


Figura 65. Espectro de fluorescência da HSA com aumento das concentrações dos complexos (5-30 μ M). a) Eu(DBM)₃PH. b) Eu(DBM)₃NON. c) Eu(DBM)₃CN. d) Eu(DBM)₃BrF. em 25 °C. λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 330 nm.

A interação de agentes supressores com a albumina sérica humana (HSA) pode ocorrer por dois mecanismos principais: supressão estática ou dinâmica, conforme indicado pelos parâmetros apresentados na Tabela 17. Observa-se, por exemplo, que a constante de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) diminui com o aumento da temperatura, o que sugere um mecanismo de supressão estática.

Na supressão estática, ocorre a formação de um complexo estável entre o fluoróforo (HSA) e o supressor (HSA-complexo) no estado fundamental, o que suprime a emissão de fluorescência apenas quando HSA está ligada ao

supressor. Assim, a emissão observada provém exclusivamente da HSA não complexada. Como a estabilidade do complexo HSA-supressor tende a diminuir com o aumento da temperatura, há uma consequente redução na supressão de fluorescência, refletida na queda de K_{SV} ^{49,89}. O valor da constante de supressão biomolecular também (K_q) corrobora com o mecanismo estático, apresentando valores abaixo de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, os quais são tidos como mecanismos de supressão dinâmica em biopolímeros¹⁰⁵.

Tabela 17. Parâmetros de interações entre complexos e HSA. Stern-Volmer constante de supressão (KSv), constante de supressão biomolecular (Kq), constante de ligação (Kb), número de locais de ligações (n), valores de ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 para o sistema HSA-complexos em diferentes temperaturas

Complexos	T(K)	Ksv ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	Kq ($\times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Kb ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	n	$\Delta H \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S \text{ (J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}\text{)}$	$\Delta G \text{ (J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}\text{)}$
Eu(DBM) ₃ PH	298	15,7 $\pm$ 1,2	2,61	95,19 $\pm$ 0,0001	1,4	0,97	135,34	-39,834 $\pm$ 5,383
	303	14,7 $\pm$ 0,49	2,46	58,18 $\pm$ 0,0001	1,4			-39,261 $\pm$ 5,326
	310	14,4 $\pm$ 0,25	2,40	92,23 $\pm$ 0,0001	1,4			-41,356 $\pm$ 5,665
Eu(DBM) ₃ NON	298	1,91 $\pm$ 2,2	3,19	4,694 $\pm$ 0,0001	1,1	19,73	174,45	-32,373 $\pm$ 5,239
	303	1,80 $\pm$ 2,0	2,99	4,827 $\pm$ 0,0001	1,1			-32,987 $\pm$ 5,218
	310	1,68 $\pm$ 0,40	2,81	6,325 $\pm$ 0,0001	1,1			-34,445 $\pm$ 5,875
Eu(DBM) ₃ CN	298	2,62 $\pm$ 1,5	4,36	6,897 $\pm$ 0,0001	1,1	-15,10	62,67	-33,327 $\pm$ 5,370
	303	2,61 $\pm$ 4,5	4,35	10,37 $\pm$ 0,0001	1,1			-34,915 $\pm$ 5,579
	310	2,36 $\pm$ 3,6	3,94	5,715 $\pm$ 0,0001	1,1			-34,184 $\pm$ 5,512
Eu(DBM) ₃ BrF	298	1,26 $\pm$ 0,99	2,10	2,467 $\pm$ 0,0001	1,1	16,07	156,83	-30,778 $\pm$ 5,399
	303	1,19 $\pm$ 0,68	1,98	2,494 $\pm$ 0,0001	1,1			-31,322 $\pm$ 5,473
	310	1,18 $\pm$ 0,52	1,98	3,141 $\pm$ 0,0001	1,1			-32,640 $\pm$ 5,656

Os complexos demonstraram constantes de ligação (K_b) intermediárias a fortes com a albumina sérica humana (HSA), variando na ordem de 10^5 – 10^6 M^{-1} (Tabela 17), o que sugere uma formação estável de adutos HSA-complexo com estequiometria 1:1 (n). A estabilidade dessas interações é reforçada pelos valores termodinâmicos negativos de ΔG , indicando que o processo de ligação ocorre de forma espontânea para todos os complexos, independentemente do aumento de temperatura.

Esses resultados sugerem que os complexos possuem afinidades moderadas a altas com a HSA, o que favorece a viabilidade dos compostos em sistemas biológicos ao facilitar seu transporte e melhorar sua solubilidade no sangue. Contudo, a elevada estabilidade da ligação com a HSA pode reduzir a biodisponibilidade dos complexos no tecido-alvo, requerendo, potencialmente, o uso de doses mais elevadas para atingir níveis terapêuticos.

Além disso, é importante observar que a HSA desempenha um papel relevante no transporte de nutrientes para células cancerosas, que, em comparação com células saudáveis, apresentam uma demanda nutricional elevada devido a suas taxas de proliferação mais rápidas. Além disso os complexos aqui trabalhados apresentam constantes de ligações dentro da janela de fármacos já aprovados para diversos tipos de doenças como BI-2536 ($K_b = 3,78 \times 10^6$), varfarina ($K_b = 6,17 \times 10^4$), tenofovir ($K_b = 5,70 \times 10^4$), dexametasona ($K_b = 7,10 \times 10^3$) e furose-mida ($K_b = 1,99 \times 10^5$)^{89,104}.

5. Considerações Finais

Com base em todas as discussões apresentadas, algumas considerações importantes podem ser traçadas sobre o trabalho realizado, assim como novas perspectivas para futuras investigações.

Foram sintetizados quatro complexos heteroléticos baseados no Eu(III) como centro de coordenação, utilizando três ligantes β -dicetonas (DBM) e variando-se as fenantrolinas. O planejamento estrutural foi elaborado de forma a explorar as diferentes possibilidades estruturais e espectroscópicas do íon Eu(III). Para isso, foi adotado um número de coordenação (NC) = 8, garantindo que o íon metálico estivesse totalmente saturado em termos de coordenação. Essa estratégia foi essencial para evitar a coordenação de espécies indesejáveis, como moléculas de água, que são conhecidas por desativar a fluorescência.

A formação dos complexos foi confirmada por uma série de técnicas analíticas e espectroscópicas que demonstraram a eficácia das sínteses realizadas:

- Por meio de técnicas espectroscópicas, como o Ultravioleta-Visível (UV-Vis), foi possível identificar as bandas características dos ligantes nos complexos sintetizados. Essa técnica também foi empregada para avaliar a estabilidade dos complexos em diferentes meios, como DMSO, tampão fosfato (PBS) e meio de cultura (RPMI). Os resultados indicaram que os complexos apresentaram boa estabilidade em DMSO. No entanto, em PBS, foi observado um padrão de agregação, que foi confirmado por meio de análises de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). No meio de cultura RPMI, as análises mostraram um aumento das bandas de absorção ao longo de 0 a 24 horas, o que pode ser atribuído a interações intermoleculares, mesmo com o centro metálico saturado em termos de coordenação. Essas observações sugerem que os complexos mantêm sua integridade em diferentes condições, mas podem sofrer alterações estruturais dependendo do ambiente;

-A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) evidenciou os efeitos paramagnéticos inerentes ao íon central de európio(III). Esses efeitos foram observados através do alargamento dos sinais no espectro e dos deslocamentos químicos significativos dos prótons próximos às ligações com o íon metálico. Esses deslocamentos refletem a interação eletrostática característica proporcionada pelos lantanídeos, demonstrando a influência do ambiente paramagnético na proximidade do núcleo metálico sobre os ligantes coordenados. Essas observações reforçam a formação e a estrutura dos complexos sintetizados;

- Uma das técnicas de caracterização mais robustas empregadas foi a difração de raios X, que permitiu a elucidação da disposição estrutural de dois dos complexos sintetizados: $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. Ambos os complexos apresentam estequiometria 1:1:3 (fen:Eu³⁺:DBM), evidenciando estruturas livres de moléculas de água coordenadas. Essa ausência foi corroborada pela análise espectroscópica no infravermelho, que não identificou o estiramento característico da banda νOH em nenhum dos complexos;

- Os complexos apresentaram luminescência característica do íon Eu(III), destacando-se a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, que é responsável pela emissão de luz no espectro visível. Essa propriedade espectroscópica foi amplificada pela coordenação dos ligantes cromóforos, que atuam como "antenas" eficientes na transferência de energia. Os dados fotofísicos, como rendimentos quânticos e tempos de meia-vida, apresentaram valores intermediários quando comparados a sistemas semelhantes descritos na literatura. No entanto, esses resultados foram obtidos sob condições experimentais brandas, sem tratamentos prévios dos solventes. Ademais, os resultados qualitativos de fluorescência em soluções de PBS e meio de cultura (RPMI) confirmaram que os complexos mantêm sua capacidade de emissão luminescente mesmo em ambientes mais desafiadores, como o intracelular;

- Os cálculos teóricos realizados via TD-DFT foram essenciais para correlacionar os dados teóricos e experimentais, além de identificar os orbitais

moleculares mais relevantes nas transições ligante-metal (L-M). Esses cálculos também permitiram avaliar a eficiência da transferência de energia entre os estados tripleto (T_1) dos ligantes e o nível emissor 5D_0 do íon Eu(III). Observou-se que apenas o complexo Eu(DBM)₃PH apresentou distâncias energéticas dentro da faixa ideal para uma transferência eficiente de energia, justificando seus dados espectroscópicos superiores em termos de emissão luminescente, destacando-se em relação aos demais complexos.

Nos ensaios biológicos, os complexos apresentaram valores de IC_{50} comparáveis ou inferiores ao do fármaco padrão, evidenciando seu potencial antitumoral. Dentre os compostos estudados, três complexos merecem destaque pelas distintas estratégias de ação observadas.

O complexo Eu(DBM)₃NON apresentou altos níveis de inibição do crescimento celular, tanto em células saudáveis quanto em células tumorais, indicando uma baixa seletividade. Essa característica é atribuída ao ligante NON, que apresenta uma elevada citotoxicidade intrínseca. Notavelmente, os resultados deste estudo confirmaram que a atividade citotóxica do ligante NON permanece consistente independentemente do ambiente químico em que está inserido, seja em coordenação tetraédrica, octaédrica ou em geometria antiprisma quadrada (NON-Eu (III)). Por outro lado, os complexos Eu(DBM)₃PH e Eu(DBM)₃BrF destacaram-se pelos elevados índices de seletividade, particularmente contra células tumorais altamente agressivas ou resistentes, como a linhagem celular MDA-MB-231, um tipo de câncer de mama triplo negativo conhecido por sua agressividade, e a A2780cis, de câncer de ovário, caracterizadas pela resistência ao tratamento padrão com cisplatina:

- O complexo Eu(DBM)₃PH frente as duas linhagens citadas acima apresentou seletividades de 57,5 (MDA-MB-231) com $IC_{50} = 0,870 \mu M$, 59,0 (A2780cis e $IC_{50} = 0,850$) uma diferença de escalar de cerca de 11 a 30 μM em relação a atividade da cisplatina. Já o complexo Eu(DBM)₃BrF apresentou atividade somente frente a linhagem de ovário resistente ($IC_{50} = 3,57 \mu M$ e $IS = 14,0$);

- Devido às suas destacadas atividades citotóxicas, os complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$ foram selecionados para a realização de testes biológicos adicionais frente a linhagem celular A2780cis. Os ensaios morfológicos e clonogênicos revelaram que ambos os complexos possuem a capacidade de alterar a arquitetura celular e inviabilizar o crescimento de colônias já em concentrações correspondentes a 0,5 do valor de IC_{50} . Esses resultados indicam a eficácia dos compostos em interferir no comportamento celular mesmo em doses reduzidas;

- Além disso, o mecanismo de morte celular induzido pelos complexos foi caracterizado como apoptose, conforme demonstrado por análises de citometria de fluxo. Essas descobertas sugerem que os compostos podem desencadear vias de morte celular programada, um mecanismo preferível em terapias anticâncer;

- Nos ensaios tridimensionais (3D) realizados com a linhagem celular A2780cis, os complexos $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ e $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ demonstraram mecanismos de ação distintos. O complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$ apresentou uma notável atividade citostática, impedindo significativamente o crescimento das células tumorais já na menor concentração testada ($0,78 \mu\text{M}$). Esse comportamento é particularmente relevante, pois sugere que o complexo pode atuar na contenção do tumor. Por outro lado, o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$ exibiu uma resposta dependente tanto do tempo quanto da concentração. Observou-se uma inviabilização progressiva dos esferoides tumorais ao longo de 96 horas, com a eficácia aumentando proporcionalmente à elevação da concentração do composto. Esses resultados evidenciam o potencial diferenciado de cada complexo para abordagens terapêuticas específicas no tratamento de tumores resistentes.

Após a realização dos ensaios biológicos, os complexos foram submetidos a estudos frente a biomoléculas clássicas, como DNA e enzimas Topoisomerasas, que desempenham papéis cruciais nos processos de replicação celular. Esses ensaios foram conduzidos com o objetivo de elucidar potenciais

mecanismos de ação dos compostos, fornecendo informações fundamentais sobre suas interações moleculares e possíveis alvos biológicos:

- De maneira geral, os complexos não demonstraram interações intercalativas com o DNA, mas sim uma afinidade preferencial pelo sulco menor da biomolécula. Essa conclusão foi corroborada por ensaios de competição com o corante Hoechst 33258, nos quais os complexos exibiram constantes de extinção de fluorescência (K_{sv}) na ordem de 10^4 a 10^5 . Além disso, apresentaram elevadas taxas de supressão da fluorescência do corante, com destaque para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$, que atingiu uma supressão de 84%. Esses resultados indicam uma interação significativa dos complexos por esse arcabouço molecular do DNA;

- Os ensaios realizados frente às Topoisomerases indicaram que os complexos atuam como inibidores catalíticos da enzima, demonstrando seletividade e diferenciando-se de venenos da TOPOII, que estão associados ao risco de indução de tumores secundários. Todos os complexos, com exceção do $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$, foram capazes de inibir a atividade da TOPOII α em concentrações de 20 μM , valores inferiores ao do fármaco padrão etoposídeo, que, por sua vez, é classificado como um veneno da TOPOII. Esses resultados destacam o potencial terapêutico dos complexos como agentes antitumorais com mecanismos de ação menos agressivos.

6. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que os compostos de Európio(III) demonstraram potencial como agentes anticâncer, destacando-se por sua elevada interferência na viabilidade celular de linhagens resistentes ao fármaco padrão, cisplatina. Esses compostos apresentam uma combinação de propriedades promissoras: capacidade de induzir apoptose em células resistentes, inibição da enzima TOPO II α , um importante alvo molecular envolvido na regulação da topologia do DNA, e afinidade para serem transportados pela albumina sérica humana (HSA).

Essa última característica é especialmente relevante, pois pode melhorar a biodistribuição e a seletividade do composto, maximizando sua eficácia terapêutica e minimizando efeitos adversos. Esses resultados reforçam o potencial desses complexos no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer.

Conclui-se que as arquiteturas estruturais dos complexos à base de európio avaliados neste trabalho apresentam propriedades químicas e biológicas promissoras. A alta seletividade observada em células de difícil tratamento evidencia o alcance dos principais objetivos propostos. Contudo, como perspectiva futura, sugere-se a exploração detalhada das propriedades luminescentes desses compostos em ambientes celulares, com o intuito de compreender os mecanismos de internalização e identificar de forma mais precisa os possíveis alvos moleculares desses complexos, uma vez que as biomoléculas clássicas não se configuraram como os principais alvos.

Além disso, os resultados obtidos incentivam a continuidade dos estudos nesse campo, com foco em possíveis modificações estruturais nos ligantes auxiliares, como a redução do tamanho dos grupos aromáticos do ligante DBM, substituindo-os por grupos menores, como $-CH_3$. Tais alterações podem aumentar a eficiência de interação com os alvos como o DNA, potencializando as propriedades intercalativas das fenantrolinas estendidas. Essas estratégias abrem novas possibilidades para o desenvolvimento de sistemas ainda mais eficazes no contexto químico-biológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teo, R. D., Termini, J. & Gray, H. B. Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. *J. Med. Chem.* **59**, 6012–6024 (2016).
2. Simpson, P. V., Desai, N. M., Casari, I., Massi, M. & Falasca, M. Metal-based antitumor compounds: Beyond cisplatin. *Future Med. Chem.* **11**, 119–135 (2019).
3. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer, B. *Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. 2022* (2022).
4. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, (2020).
5. Qi, L. *et al.* Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1469–1486 (2019).
6. Anthony, E. J. *et al.* Metallodrugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development. *Chem. Sci.* **11**, 12888–12917 (2020).
7. Mjos, K. D. & Orvig, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem. Rev.* **114**, 4540–4563 (2014).
8. Lazarević, T., Rilak, A. & Bugarčić, Ž. D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **142**, 8–31 (2017).
9. Binnemans, K. Interpretation of europium(III) spectra. *Coord. Chem. Rev.* **295**, 1–45 (2015).
10. Souza, E. R. & Sigoli, F. A. Princípios fundamentais e modelos de transferência de energia inter e intramolecular. *Quim. Nova* **35**, 1841–1847 (2012).
11. Dasari, S., Singh, S., Sivakumar, S. & Patra, A. K. Dual-Sensitized Luminescent Europium(III) and Terbium(III) Complexes as Bioimaging

- and Light-Responsive Therapeutic Agents. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 17387–17396 (2016).
12. Dasari, S. *et al.* Bimetallic Europium and Terbium Complexes Containing Substituted Terpyridines and the NSAID Drug Tolfenamic Acid: Structural Differences, Luminescence Properties, and Theranostic Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, 2998–3009 (2020).
 13. Chandra, A., Singh, K., Singh, S., Sivakumar, S. & Patra, A. K. A luminescent europium(III)-platinum(II) heterometallic complex as a theranostic agent: A proof-of-concept study. *Dalt. Trans.* **45**, 494–497 (2016).
 14. Li, H. *et al.* A Smart Europium-Ruthenium Complex as Anticancer Prodrug: Controllable Drug Release and Real-Time Monitoring under Different Light Excitations. *J. Med. Chem.* **60**, 8923–8932 (2017).
 15. Gary L. Miessler, Paul J. Fischer, D. A. T. *Química Inorgânica*. (2014).
 16. SILVA, V. A. M. DA. LANTANÍDEOS COM LIGANTES CROMÓFOROS E β -DICETONATOS COM POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOLÓGICAS E CATALÍTICAS LANTANÍDEOS COM LIGANTES CROMÓFOROS E β -DICETONATOS COM POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOLÓGICAS. 102 (2020).
 17. Lima, N. B. D., Silva, A. I. S., Santos, V. F. C., Gonçalves, S. M. C. & Simas, A. M. Europium complexes: choice of efficient synthetic routes from RM1 thermodynamic quantities as figures of merit. *RSC Adv.* **7**, 20811–20823 (2017).
 18. Martins, T. S. & Isolani, P. C. Terras raras: Aplicações industriais e biológicas. *Quim. Nova* **28**, 111–117 (2005).
 19. Hirano, S. & Suzuki, K. T. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ. Health Perspect.* **104**, 85–95 (1996).
 20. Rama, A. C. R., Veiga, F., Figueiredo, I. V., Sousa, A. & Caramona, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil-beta-

- ciclodextrina: estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **42**, 73–94 (2006).
21. Liu, H. K. & Sadler, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. *Acc. Chem. Res.* **44**, 349–359 (2011).
 22. Neidle, S. & Abraham, Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acid. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **17**, 73–121 (1984).
 23. Keck, M. V. & Lippard, S. J. Unwinding of Supercoiled DNA by Platinum-Ethidium and Related Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3386–3390 (1992).
 24. Kellett, A., Molphy, Z., Slator, C., McKee, V. & Farrell, N. P. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug–DNA interactions. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 971–988 (2019).
 25. Zeglis, B. M., Pierre, V. C. & Barton, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chem. Commun.* **7345**, 4565–4579 (2007).
 26. Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* **3**, 18–30 (1961).
 27. Pages, B. J., Ang, D. L., Wright, E. P. & Aldrich-Wright, J. R. Metal complex interactions with DNA. *Dalt. Trans.* **44**, 3505–3526 (2015).
 28. Sinha, S., Jørgensen, C. & Pappalardo, R. Fluorescence Spectra of Europium (III) Phthalate and Naphthalate and of Samarium (III), Europium (III), Terbium (III) and D y s p r o s i u m (III) Dipyridyl C o m p l e x e s. *Zeitschrift für Naturforsch.* **19**, (1963).
 29. Rocha, J. S. *et al.* Synthesis and characterization of silver(I) complexes bearing phenanthroline derivatives as ligands: Cytotoxicity and DNA interaction evaluation. *Inorg. Chem. Commun.* **131**, (2021).
 30. Chen, X. *et al.* Effects of intercalative ligands on the DNA binding, DNA topoisomerase II and DNA transcription inhibition of polypyridyl ruthenium(II) complexes. *Inorganica Chim. Acta* **378**, 140–147 (2011).

31. Peng, 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. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **74**, 896–901 (2009).
32. Breslin, S. & O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* **18**, 240–249 (2013).
33. Ahmed, Z. & Iftikhar, K. Solution studies of lanthanide (III) complexes based on 1,1,1,5,5,5-hexafluoro-2,4-pentanedione and 1,10-phenanthroline Part-I: Synthesis, ¹H NMR, 4f-4f absorption and photoluminescence. *Inorganica Chim. Acta* **363**, 2606–2615 (2010).
34. Ahmed, Z. & Iftikhar, K. Synthesis, luminescence and NMR studies of lanthanide (III) complexes with hexafluoroacetylacetone and phenanthroline. Part II. *Inorganica Chim. Acta* **392**, 165–176 (2012).
35. Borges, F. H. *et al.* Luminescent thermometry based on Er³⁺/Yb³⁺ co-doped yttrium niobate with high NIR emission and NIR-to-visible upconversion quantum yields. *J. Lumin.* **248**, (2022).
36. de Freitas, B. D. *et al.* Green host urethanesil based on castor oil doped with Eu³⁺ complex. *Opt. Mater. (Amst)*. **138**, 113706 (2023).
37. Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K. & Puschmann, H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 339–341 (2009).
38. Sheldrick, G. M. SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **71**, 3–8 (2015).
39. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **71**, 3–8 (2015).
40. Hocquet, A. & Langg rd, M. An evaluation of the MM+ force field. *J. Mol. Model.* **4**, 94–112 (1998).
41. Neese, F. Software update: The ORCA program system—Version 5.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* vol. 12

- (2022).
42. Dolg, M., Stoll, H. & Preuss, H. Energy-adjusted ab initio pseudopotentials for the rare earth elements. *J. Chem. Phys.* **90**, 1730–1734 (1989).
 43. Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G. & Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.* **24**, 669–681 (2003).
 44. Ridley, J. E. & Zerner, M. C. Triplet states via intermediate neglect of differential overlap: Benzene, pyridine and the diazines. *Theor. Chim. Acta* **42**, 223–236 (1976).
 45. Zerner, M. C., Loew, G. H., Kirchner, R. F. & Mueller-Westerhoff, U. T. An Intermediate Neglect of Differential Overlap Technique for Spectroscopy of Transition-Metal Complexes. Ferrocene. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 589–599 (1980).
 46. Dutra, J. D. L., Bispo, T. D. & Freire, R. O. LUMPAC lanthanide luminescence software: Efficient and user friendly. *J. Comput. Chem.* **35**, 772–775 (2014).
 47. Malta, O. L. Ligand - Rare-earth ion energy transfer in coordination compounds. A theoretical approach. *J. Lumin.* **71**, 229–236 (1997).
 48. Silva, F. R. G. E. & Malta, O. L. Calculation of the ligand-lanthanide ion energy transfer rate in coordination compounds: Contributions of exchange interactions. *J. Alloys Compd.* **250**, 427–430 (1997).
 49. Ribeiro, G. H. *et al.* Ruthenium(II) phosphine/mercapto complexes: Their in vitro cytotoxicity evaluation and actions as inhibitors of topoisomerase and proteasome acting as possible triggers of cell death induction. *Inorg. Chem.* **59**, 15004–15018 (2020).
 50. Lima, M. A. *et al.* Palladium(II) complexes bearing thiosemicarbazone and phosphines as inhibitors of DNA-Topoisomerase II enzyme: Synthesis, characterizations and biological studies. *Inorg. Chem. Commun.* **112**, 107708 (2020).

51. Branco, F. S. C. *et al.* Nuclear magnetic resonance of organofluorine compounds: A challenge in the teaching of spectroscopy. *Quim. Nova* **38**, 1237–1246 (2015).
52. Geary, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* (1971) doi:10.1016/S0010-8545(00)80009-0.
53. Bala, M., Kumar, S., Taxak, V. B., Boora, P. & Khatkar, S. P. Synthesis, photoluminescent features and intramolecular energy transfer mechanism of europium (III) complexes with fluorinate β -diketone ligand and auxiliary ligands. *J. Fluor. Chem.* **178**, 6–13 (2015).
54. Hasan, N. & Iftikhar, K. Synthesis, crystal structure and photoluminescence studies of [Eu(dbm)₃(impy)] and its polymer-based hybrid film. *New J. Chem.* **43**, 2479–2489 (2019).
55. Talawar, M. B., Sivabalan, R., Senthilkumar, N., Prabhu, G. & Asthana, S. N. Synthesis, characterization and thermal studies on furazan- and tetrazine-based high energy materials. *J. Hazard. Mater.* **113**, 11–25 (2004).
56. Robert M. Silverstein, F. X. W. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. (1997).
57. Lampman, P., Vyvyan, K., Pavia, D. L. & Kriz, G. S. *Spectroscopy 4th Ed.* (1973).
58. Khan, A. A., Saxena, A. K. & Iftikhar, K. Mixed-ligand lanthanide complexes - X. Interaction of trivalent lanthanides with 1,10-phenanthroline and thiocyanate in alcohol. *Polyhedron* **16**, 4143–4151 (1997).
59. Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G. & Vyvyan, J. Introdução à espectroscopia. *Cengage Learn*. (2012) doi:10.1590/S0100-40422007000700048.
60. Ruan, L., Gao, X., Zhao, J., Xu, C. & Liang, D. Preparation and characteristics of Eu(DBM)₃phen: Synthesis, single-crystal structure and spectroscopic analysis. *J. Mol. Struct.* **1149**, 265–272 (2017).
61. Dasari, S. & Patra, A. K. Luminescent europium and terbium complexes of

- dipyridoquinoxaline and dipyrrophenazine ligands as photosensitizing antennae: Structures and biological perspectives. *Dalt. Trans.* **44**, 19844–19855 (2015).
62. Abbas, Z. *et al.* Luminescent europium(iii) and terbium(iii) complexes of β -diketonate and substituted terpyridine ligands: Synthesis, crystal structures and elucidation of energy transfer pathways. *New J. Chem.* **43**, 15139–15152 (2019).
 63. Zhang, S., Turnbull, G. A. & Samuel, I. D. W. Highly efficient solution-processable europium-complex based organic light-emitting diodes. *Org. Electron.* **13**, 3091–3096 (2012).
 64. Williams, D. E. Crystal structure of dibenzoylmethane. *Acta Crystallogr.* **21**, 340–349 (1966).
 65. Pinsky, M., Dryzun, C., Casanova, D., Alemany, P. & Avnir, D. Analytical methods for calculating continuous symmetry measures and the chirality measure. *J. Comput. Chem.* **29**, 2712–2721 (2008).
 66. Ilmi, R. *et al.* Single component white-OLEDs derived from tris(β -diketonato) europium(iii) complexes bearing the large bite angle N²-(4-thiazolyl)benzimidazole ligand. *Dalt. Trans.* **51**, 14228–14242 (2022).
 67. Al-Busaidi, I. J. *et al.* Utilization of a Pt(ii) di-yne chromophore incorporating a 2,2'-bipyridine-5,5'-diyl spacer as a chelate to synthesize a green and red emitting d-f-d heterotrinnuclear complex. *Dalt. Trans.* **50**, 1465–1477 (2021).
 68. Al-Busaidi, I. J. *et al.* Synthesis and photophysical properties of ternary β -diketonate europium(III) complexes incorporating bipyridine and its derivatives. *Dye. Pigment.* **197**, (2022).
 69. Latva, M. *et al.* Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield. *J. Lumin.* **75**, 149–169 (1997).
 70. Vinck, R. *et al.* Red-Absorbing Ru(II) Polypyridyl Complexes with Biotin

- Targeting Spontaneously Assemble into Nanoparticles in Biological Media. *Inorg. Chem.* **61**, 13576–13585 (2022).
71. Soliman, N., Sol, V., Ouk, T. S., Thomas, C. M. & Gasser, G. Encapsulation of a ru(II) polypyridyl complex into polylactide nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *Pharmaceutics* **12**, 1–10 (2020).
 72. Kumar, A. & Dixit, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. *Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic Acids* 44–58 (2017) doi:10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1.
 73. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 74. Graminha, A. E. *et al.* A novel ruthenium(ii) gallic acid complex disrupts the actin cytoskeleton and inhibits migration, invasion and adhesion of triple negative breast tumor cells. *Dalt. Trans.* **50**, 323–335 (2021).
 75. Rello, S. *et al.* Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **10**, 201–208 (2005).
 76. Koester, S. K. & Bolton, W. E. Differentiation and assessment of cell death. *Clin. Chem. Lab. Med.* **37**, 311–317 (1999).
 77. Banfalvi, G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* **22**, 306–323 (2017).
 78. Matejka, N., Amarlou, A., Neubauer, J., Rudigkeit, S. & Reindl, J. High-Resolution Microscopic Characterization of Tunneling Nanotubes in Living U87 MG and LN229 Glioblastoma Cells. *Cells* **13**, (2024).
 79. Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* **35**, 461–478 (1998).
 80. Matthews, H. K., Bertoli, C. & de Bruin, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 74–88 (2022).
 81. de Oliveira, T. D. *et al.* Cytotoxicity of ruthenium-N,N-disubstituted-N'-acylthioureas complexes. *Mater. Sci. Eng. C* **115**, 111106 (2020).
 82. Vann, K. R., Oviatt, A. A. & Osheroff, N. Topoisomerase II Poisons:

- Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors. *Biochemistry* **60**, 1630–1641 (2021).
83. Gaikwad, M., Konkimalla, V. B. & Salunke-Gawali, S. Metal complexes as topoisomerase inhibitors. *Inorganica Chim. Acta* **542**, (2022).
 84. Yamada, K. M. & Cukierman, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell* **130**, 601–610 (2007).
 85. Anton, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 5517–5527 (2015).
 86. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 207–218 (2014).
 87. Rehman, S. U., Sarwar, T., Husain, M. A., Ishqi, H. M. & Tabish, M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **576**, 49–60 (2015).
 88. Sirajuddin, M., Ali, S. & Badshah, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **124**, 1–19 (2013).
 89. Villarreal, W. *et al.* Copper(I)-Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. *Inorg. Chem.* **56**, 3781–3793 (2017).
 90. Biver, T., García, B., Leal, J. M., Secco, F. & Turriani, E. Left-handed DNA: Intercalation of the cyanine thiazole orange and structural changes. A kinetic and thermodynamic approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 13309–13317 (2010).
 91. Wei, Y. & Guo, L. H. Binding interaction between polycyclic aromatic compounds and DNA by fluorescence displacement method. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 940–945 (2009).
 92. Bucevičius, J., Lukinavičius, G. & Gerasimaite, R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors* **6**, (2018).

93. Cunha, B. N. *et al.* Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation. *Inorg. Chem.* **59**, 5072–5085 (2020).
94. Colina-Vegas, L. *et al.* Anti-proliferative and anti-migration activity of arene-ruthenium(II) complexes with azole therapeutic agents. *Inorganics* **6**, (2018).
95. Brammer, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. *Doc. line Embrapa* **06**, 1–8 (2001).
96. Honorato, J. *et al.* Esterification of the free carboxylic group from the lutidinic acid ligand as a tool to improve the cytotoxicity of Ru(ii) complexes. *Inorg. Chem. Front.* **6**, 376–390 (2019).
97. Jiang, X. *et al.* Inhibition of Topoisomerases by Metal Thiosemicarbazone Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
98. Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S. Y. N. & Nitiss, J. L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 703–721 (2016).
99. McClendon, A. K. & Osheroff, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **623**, 83–97 (2007).
100. Franco, M. A. *et al.* Antitumor Activity of New Pd(II) Complexes with Ligands Derived from O-Vanillin Acting as Topoisomerase I and II Inhibitors. *ChemistrySelect* **9**, (2024).
101. Deweese, J. E. & Osheroff, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* **37**, 738–748 (2009).
102. Rocha, F. V. *et al.* Cationic Pd(II) complexes acting as topoisomerase II inhibitors: Synthesis, characterization, DNA interaction and cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* **159**, 165–168 (2016).
103. Sima, N. *et al.* Small Molecules Identified from a Quantitative Drug Combinational Screen Resensitize Cisplatin's Response in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. *Transl. Oncol.* **11**, 1053–1064 (2018).

104. Fernández-Sainz, J. *et al.* Binding of the anticancer drug BI-2536 to human serum albumin. A spectroscopic and theoretical study. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **172**, 77–87 (2017).
105. Zhao, X., Liu, R., Chi, Z., Teng, Y. & Qin, P. New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. *J. Phys. Chem. B* **114**, 5625–5631 (2010).

8. APÊNDICE

Tabela A1. Dados de Difração de raios X de monocristal para o complexo Eu(DBM)₃NON.

Empirical formula	C ₅₉ H ₃₉ EuN ₆ O ₇
Formula weight	1095.92
Temperature/K	99.99(10)
Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	9.2696(2)
b/Å	21.3969(4)
c/Å	24.1104(5)
$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	90
$\gamma/^\circ$	90
Volume/Å ³	4782.07(17)
Z	4
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.522
μ/mm^{-1}	1.376
F(000)	2216.0
Crystal size/mm ³	0.475 × 0.072 × 0.068
Radiation	Mo K α (λ = 0.71073)
2 Θ range for data collection/ $^\circ$	4.708 to 54.206
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -27 ≤ k ≤ 27, -30 ≤ l ≤ 29
Reflections collected	34014
Independent reflections	10416 [R _{int} = 0.0384, R _{sigma} = 0.0420]
Data/restraints/parameters	10416/83/631
Goodness-of-fit on F ²	1.083
Final R indexes [I ≥ 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0284, wR ₂ = 0.0651
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0327, wR ₂ = 0.0718
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.56/-0.47
Flack parameter	-0.017(5)

Tabela A2. Distâncias de ligações para o complexo Eu(DBM)₃NON.

Átomos		Distância (Å)	Átomos		Distância (Å)
Eu1	O1	2.374(3)	C19	C20	1.400(7)
Eu1	O2	2.349(3)	C19	C24	1.388(7)
Eu1	O3	2.339(3)	C20	C21	1.396(7)
Eu1	O4	2.346(3)	C21	C22	1.382(8)
Eu1	O5	2.370(3)	C22	C23	1.389(8)
Eu1	O6	2.332(3)	C23	C24	1.388(6)
Eu1	N1	2.610(4)	C25	C26	1.399(6)
Eu1	N2	2.611(4)	C25	C30	1.398(7)
Eu1	C33	3.268(4)	C26	C27	1.380(7)
O1	C1	1.267(5)	C27	C28	1.375(8)
O2	C3	1.271(5)	C28	C29	1.375(8)
O3	C16	1.271(5)	C29	C30	1.384(7)
O4	C18	1.285(6)	C31	C32	1.404(6)
O5	C31	1.272(5)	C31	C40	1.523(6)
O6	C33	1.266(5)	C32	C33	1.403(6)
O7	N5	1.387(5)	C33	C34	1.489(6)
O7	N6	1.373(5)	C34	C35	1.395(6)
N1	C60	1.334(6)	C34	C39	1.387(7)
N1	C61	1.347(6)	C35	C36	1.390(8)
N2	C51	1.329(5)	C36	C37	1.368(9)
N2	C62	1.360(6)	C37	C38	1.384(9)
N3	C56	1.321(5)	C38	C39	1.395(8)
N3	C63	1.359(6)	C40	C45	1.3900
N4	C55	1.306(6)	C40	C41	1.3900
N4	C64	1.361(6)	C40	C46	1.317(10)
N5	C63	1.320(6)	C40	C50	1.454(9)
N6	C64	1.322(6)	C45	C44	1.3900
C1	C2	1.394(6)	C44	C43	1.3900
C1	C10	1.508(6)	C43	C42	1.3900
C2	C3	1.402(6)	C42	C41	1.3900
C3	C4	1.494(6)	C46	C47	1.382(10)
C4	C5	1.398(6)	C47	C48	1.439(11)
C4	C9	1.397(7)	C48	C49	1.338(11)
C5	C6	1.379(7)	C49	C50	1.377(10)
C6	C7	1.377(8)	C51	C52	1.395(7)

C7	C8	1.372(7)	C52	C53	1.365(7)
C8	C9	1.386(7)	C53	C54	1.408(5)
C10	C11	1.397(7)	C54	C55	1.459(6)
C10	C15	1.392(7)	C54	C62	1.392(6)
C11	C12	1.391(7)	C55	C56	1.480(6)
C12	C13	1.395(7)	C56	C57	1.454(6)
C13	C14	1.371(7)	C57	C58	1.398(6)
C14	C15	1.393(7)	C57	C61	1.397(6)
C16	C17	1.408(6)	C58	C59	1.377(7)
C16	C25	1.496(7)	C59	C60	1.392(7)
C17	C18	1.401(7)	C61	C62	1.473(6)
C18	C19	1.492(6)	C63	C64	1.412(6)

Tabela A3. Ângulos de ligações para o complexo Eu(DBM)₃NON.

Ligações			Ângulos °	Ligações			Ângulos
O1	Eu1	N1	71.57(11)	C17	C18	C19	120.0(4)
O1	Eu1	N2	71.00(11)	C20	C19	C18	122.5(4)
O1	Eu1	C33	151.61(10)	C24	C19	C18	119.0(4)
O2	Eu1	O1	71.14(10)	C24	C19	C20	118.5(4)
O2	Eu1	O5	145.16(10)	C21	C20	C19	120.4(5)
O2	Eu1	N1	136.98(11)	C22	C21	C20	120.3(5)
O2	Eu1	N2	85.95(11)	C21	C22	C23	119.6(5)
O2	Eu1	C33	86.40(10)	C24	C23	C22	120.1(5)
O3	Eu1	O1	123.04(11)	C19	C24	C23	121.0(5)
O3	Eu1	O2	78.23(11)	C26	C25	C16	118.0(4)
O3	Eu1	O4	72.16(11)	C30	C25	C16	123.7(4)
O3	Eu1	O5	79.85(12)	C30	C25	C26	118.3(4)
O3	Eu1	N1	141.80(11)	C27	C26	C25	120.4(5)
O3	Eu1	N2	152.53(10)	C28	C27	C26	120.5(5)
O3	Eu1	C33	66.13(11)	C29	C28	C27	120.3(5)
O4	Eu1	O1	81.11(10)	C28	C29	C30	120.0(5)
O4	Eu1	O2	117.53(11)	C29	C30	C25	120.7(5)
O4	Eu1	O5	80.31(10)	O5	C31	C32	124.7(4)
O4	Eu1	N1	76.47(11)	O5	C31	C40	115.5(4)
O4	Eu1	N2	135.30(11)	C32	C31	C40	119.7(4)
O4	Eu1	C33	125.77(11)	C33	C32	C31	124.3(4)

O5	Eu1	O1	143.61(10)	O6	C33	Eu1	34.21(19)
O5	Eu1	N1	73.80(11)	O6	C33	C32	124.6(4)
O5	Eu1	N2	102.04(12)	O6	C33	C34	115.7(4)
O5	Eu1	C33	59.93(10)	C32	C33	Eu1	96.0(3)
O6	Eu1	O1	134.50(10)	C32	C33	C34	119.6(4)
O6	Eu1	O2	76.82(10)	C34	C33	Eu1	137.8(3)
O6	Eu1	O3	79.20(11)	C35	C34	C33	123.6(4)
O6	Eu1	O4	143.52(11)	C39	C34	C33	117.6(4)
O6	Eu1	O5	72.70(10)	C39	C34	C35	118.7(5)
O6	Eu1	N1	117.31(11)	C36	C35	C34	120.5(6)
O6	Eu1	N2	75.39(11)	C37	C36	C35	119.9(6)
O6	Eu1	C33	17.77(11)	C36	C37	C38	120.8(5)
N1	Eu1	N2	62.06(11)	C37	C38	C39	119.3(6)
N1	Eu1	C33	119.64(11)	C34	C39	C38	120.7(5)
N2	Eu1	C33	90.81(11)	C45	C40	C31	121.6(4)
C1	O1	Eu1	132.8(3)	C45	C40	C41	120.0
C3	O2	Eu1	137.6(3)	C41	C40	C31	116.8(4)
C16	O3	Eu1	130.2(3)	C46	C40	C31	121.1(5)
C18	O4	Eu1	128.8(3)	C46	C40	C50	122.0(6)
C31	O5	Eu1	129.4(3)	C50	C40	C31	116.6(5)
C33	O6	Eu1	128.0(3)	C44	C45	C40	120.0
N6	O7	N5	113.8(3)	C45	C44	C43	120.0
C60	N1	Eu1	122.6(3)	C42	C43	C44	120.0
C60	N1	C61	117.5(4)	C41	C42	C43	120.0
C61	N1	Eu1	116.5(3)	C42	C41	C40	120.0
C51	N2	Eu1	122.6(3)	C40	C46	C47	120.3(7)
C51	N2	C62	117.9(4)	C46	C47	C48	118.1(8)
C62	N2	Eu1	115.8(3)	C49	C48	C47	120.7(7)
C56	N3	C63	112.9(4)	C48	C49	C50	121.5(7)
C55	N4	C64	113.4(4)	C49	C50	C40	116.7(7)
C63	N5	O7	103.1(4)	N2	C51	C52	123.0(4)
C64	N6	O7	103.3(4)	C53	C52	C51	119.2(4)
O1	C1	C2	124.6(4)	C52	C53	C54	119.2(5)
O1	C1	C10	115.6(4)	C53	C54	C55	121.7(4)
C2	C1	C10	119.8(4)	C62	C54	C53	118.0(4)
C1	C2	C3	123.9(4)	C62	C54	C55	120.4(4)

O2	C3	C2	123.3(4)	N4	C55	C54	118.1(4)
O2	C3	C4	115.9(4)	N4	C55	C56	123.4(4)
C2	C3	C4	120.8(4)	C54	C55	C56	118.5(4)
C5	C4	C3	124.0(4)	N3	C56	C55	123.0(4)
C9	C4	C3	118.5(4)	N3	C56	C57	117.9(4)
C9	C4	C5	117.5(4)	C57	C56	C55	119.0(4)
C6	C5	C4	120.8(5)	C58	C57	C56	121.7(4)
C7	C6	C5	120.7(5)	C61	C57	C56	120.5(4)
C8	C7	C6	119.7(5)	C61	C57	C58	117.8(4)
C7	C8	C9	120.1(5)	C59	C58	C57	119.2(4)
C8	C9	C4	121.2(4)	C58	C59	C60	118.9(4)
C11	C10	C1	118.7(4)	N1	C60	C59	123.3(5)
C15	C10	C1	123.2(4)	N1	C61	C57	123.3(4)
C15	C10	C11	118.1(4)	N1	C61	C62	116.8(4)
C12	C11	C10	121.2(5)	C57	C61	C62	119.9(4)
C11	C12	C13	119.5(5)	N2	C62	C54	122.5(4)
C14	C13	C12	119.7(5)	N2	C62	C61	116.8(4)
C13	C14	C15	120.7(5)	C54	C62	C61	120.7(4)
C10	C15	C14	120.7(5)	N3	C63	C64	123.9(4)
O3	C16	C17	123.8(4)	N5	C63	N3	126.2(4)
O3	C16	C25	116.7(4)	N5	C63	C64	109.9(4)
C17	C16	C25	119.5(4)	N4	C64	C63	123.4(4)
C18	C17	C16	124.5(4)	N6	C64	N4	126.6(4)
O4	C18	C17	123.9(4)	N6	C64	C63	110.0(4)
O4	C18	C19	116.0(4)				

Tabela A4. Dados de Difração de raios X de monocristal para o complexo Eu(DBM)₃CN.

Empirical formula	C ₆₁ H ₃₉ EuN ₆ O ₆
Formula weight	1103.94
Temperature/K	100(2)
Crystal system	triclinic
Space group	P-1

a/Å	9.31410(10)
b/Å	12.1622(2)
c/Å	22.8939(3)
$\alpha/^\circ$	81.1250(10)
$\beta/^\circ$	85.6880(10)
$\gamma/^\circ$	73.3260(10)
Volume/Å ³	2453.32(6)
Z	2
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.494
μ/mm^{-1}	1.340
F(000)	1116.0
Crystal size/mm ³	? × ? × ?
Radiation	MoK α ($\lambda = 0.71073$)
2 Θ range for data collection/ $^\circ$	5.466 to 51.364
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -14 ≤ k ≤ 14, -27 ≤ l ≤ 27
Reflections collected	57293
Independent reflections	9305 [R _{int} = 0.0410, R _{sigma} = 0.0251]
Data/restraints/parameters	9305/0/667
Goodness-of-fit on F ²	1.072
Final R indexes [I ≥ 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0191, wR ₂ = 0.0453
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0224, wR ₂ = 0.0460

Tabela A5. Distâncias de ligações para o complexo Eu(DBM)₃CN.

Átomos		Distâncias (Å)	Átomos		Distâncias (Å)
Eu1	O1	2.3251(12)	C37	C36	1.394(3)
Eu1	O6	2.3258(11)	C37	C32	1.395(3)
Eu1	O2	2.3472(12)	C32	C33	1.388(3)
Eu1	O4	2.3527(12)	N5	C15	1.144(3)
Eu1	O3	2.3804(11)	C1	C2	1.401(3)
Eu1	O5	2.3914(12)	C27	C28	1.387(3)
Eu1	N1	2.6285(14)	C3	C2	1.375(3)
Eu1	N2	2.6305(14)	C54	C55	1.402(3)
O2	C25	1.261(2)	C54	C53	1.403(2)
O3	C38	1.276(2)	C14	C15	1.453(2)
O1	C23	1.281(2)	C30	C29	1.381(3)

O6	C55	1.271(2)	C22	C21	1.398(3)
O5	C53	1.269(2)	C22	C17	1.399(3)
O4	C40	1.266(2)	C55	C56	1.497(2)
N2	C10	1.326(2)	C39	C40	1.403(3)
N2	C6	1.357(2)	C53	C52	1.503(2)
N1	C1	1.328(2)	C33	C34	1.385(3)
N1	C5	1.353(2)	C40	C41	1.494(3)
N4	C13	1.331(2)	C41	C46	1.388(3)
N4	C12	1.339(2)	C41	C42	1.388(3)
N3	C14	1.328(2)	C36	C35	1.388(3)
N3	C11	1.342(2)	C56	C61	1.386(3)
C6	C7	1.400(2)	C56	C57	1.391(3)
C6	C5	1.461(2)	C17	C18	1.385(3)
C5	C4	1.404(2)	C57	C58	1.392(3)
C7	C8	1.400(3)	C46	C45	1.397(3)
C7	C12	1.455(2)	C52	C47	1.387(3)
C4	C3	1.399(2)	C52	C51	1.396(3)
C4	C11	1.451(2)	C29	C28	1.380(3)
C12	C11	1.417(2)	C21	C20	1.389(3)
C10	C9	1.396(3)	C47	C48	1.390(3)
C8	C9	1.375(3)	C35	C34	1.383(3)
N6	C16	1.145(2)	C18	C19	1.382(3)
C26	C31	1.392(3)	C48	C49	1.386(3)
C26	C27	1.397(3)	C51	C50	1.387(3)
C26	C25	1.505(2)	C58	C59	1.370(3)
C25	C24	1.414(3)	C20	C19	1.378(3)
C38	C39	1.400(2)	C49	C50	1.378(3)
C38	C37	1.499(2)	C42	C43	1.386(3)
C24	C23	1.400(3)	C59	C60	1.383(3)
C23	C22	1.500(2)	C45	C44	1.377(4)
C13	C14	1.402(3)	C61	C60	1.382(3)
C13	C16	1.452(3)	C43	C44	1.363(4)
C31	C30	1.389(3)			

Tabela A6. Ângulos de ligações para o complexo Eu(DBM)₃CN.

Átomos			Ângulos°	Átomos			Ângulos°
O1	Eu1	O6	145.22(4)	O1	C23	C24	124.11(16)
O1	Eu1	O2	71.07(4)	O1	C23	C22	115.22(16)
O6	Eu1	O2	80.31(4)	C24	C23	C22	120.66(16)
O1	Eu1	O4	112.93(4)	N4	C13	C14	121.93(16)
O6	Eu1	O4	75.82(4)	N4	C13	C16	117.36(16)
O2	Eu1	O4	73.49(4)	C14	C13	C16	120.44(15)
O1	Eu1	O3	84.07(4)	C8	C9	C10	118.86(17)
O6	Eu1	O3	129.40(4)	C30	C31	C26	120.50(19)
O2	Eu1	O3	124.34(4)	C36	C37	C32	119.09(17)
O4	Eu1	O3	71.96(4)	C36	C37	C38	121.30(16)
O1	Eu1	O5	80.86(4)	C32	C37	C38	119.56(16)
O6	Eu1	O5	73.38(4)	C33	C32	C37	120.03(17)
O2	Eu1	O5	76.36(4)	N6	C16	C13	174.83(19)
O4	Eu1	O5	139.79(4)	N1	C1	C2	123.54(17)
O3	Eu1	O5	148.23(4)	C28	C27	C26	120.4(2)
O1	Eu1	N1	77.12(4)	C2	C3	C4	118.83(16)
O6	Eu1	N1	118.00(4)	C55	C54	C53	124.37(16)
O2	Eu1	N1	141.11(4)	N3	C14	C13	122.17(16)
O4	Eu1	N1	141.50(4)	N3	C14	C15	116.20(16)
O3	Eu1	N1	72.40(4)	C13	C14	C15	121.63(16)
O5	Eu1	N1	77.04(4)	C3	C2	C1	118.81(17)
O1	Eu1	N2	135.72(4)	C29	C30	C31	120.2(2)
O6	Eu1	N2	74.21(4)	C21	C22	C17	118.33(17)
O2	Eu1	N2	153.19(4)	C21	C22	C23	123.66(17)
O4	Eu1	N2	92.05(5)	C17	C22	C23	118.02(17)
O3	Eu1	N2	69.15(4)	O6	C55	C54	123.86(16)
O5	Eu1	N2	103.64(4)	O6	C55	C56	116.08(16)
N1	Eu1	N2	61.74(4)	C54	C55	C56	120.06(15)
C25	O2	Eu1	133.85(11)	C38	C39	C40	122.84(16)
C38	O3	Eu1	129.39(10)	O5	C53	C54	126.28(16)
C23	O1	Eu1	132.44(11)	O5	C53	C52	116.86(15)
C55	O6	Eu1	128.37(11)	C54	C53	C52	116.84(15)
C53	O5	Eu1	129.10(11)	C34	C33	C32	120.36(17)
C40	O4	Eu1	135.56(11)	O4	C40	C39	124.47(16)
C10	N2	C6	117.61(15)	O4	C40	C41	116.29(16)

C10	N2	Eu1	121.10(11)	C39	C40	C41	119.23(16)
C6	N2	Eu1	117.51(11)	C46	C41	C42	119.53(19)
C1	N1	C5	117.80(15)	C46	C41	C40	119.92(19)
C1	N1	Eu1	121.20(11)	C42	C41	C40	120.29(18)
C5	N1	Eu1	117.26(11)	C35	C36	C37	120.57(18)
C13	N4	C12	116.42(15)	C61	C56	C57	118.65(17)
C14	N3	C11	116.50(15)	C61	C56	C55	118.99(17)
N2	C6	C7	122.41(16)	C57	C56	C55	122.28(17)
N2	C6	C5	116.88(15)	N5	C15	C14	178.5(2)
C7	C6	C5	120.70(15)	C18	C17	C22	120.9(2)
N1	C5	C4	122.45(16)	C56	C57	C58	120.58(19)
N1	C5	C6	117.46(15)	C41	C46	C45	119.3(2)
C4	C5	C6	120.09(15)	C47	C52	C51	119.40(18)
C6	C7	C8	118.56(15)	C47	C52	C53	119.99(16)
C6	C7	C12	119.29(16)	C51	C52	C53	120.61(17)
C8	C7	C12	122.08(16)	C28	C29	C30	119.82(19)
C3	C4	C5	118.53(16)	C20	C21	C22	120.4(2)
C3	C4	C11	122.28(15)	C52	C47	C48	120.09(19)
C5	C4	C11	119.16(16)	C29	C28	C27	120.4(2)
N4	C12	C11	121.58(15)	C34	C35	C36	119.90(19)
N4	C12	C7	118.56(16)	C35	C34	C33	120.03(17)
C11	C12	C7	119.70(15)	C19	C18	C17	120.0(2)
N2	C10	C9	123.73(16)	C49	C48	C47	120.0(2)
C9	C8	C7	118.77(17)	C50	C51	C52	120.3(2)
N3	C11	C12	121.19(16)	C59	C58	C57	120.02(19)
N3	C11	C4	118.05(16)	C19	C20	C21	120.4(2)
C12	C11	C4	120.72(15)	C50	C49	C48	120.24(19)
C31	C26	C27	118.68(17)	C20	C19	C18	120.05(19)
C31	C26	C25	117.42(17)	C43	C42	C41	120.0(2)
C27	C26	C25	123.90(17)	C58	C59	C60	119.87(19)
O2	C25	C24	123.44(16)	C44	C45	C46	120.6(2)
O2	C25	C26	115.64(16)	C49	C50	C51	120.0(2)
C24	C25	C26	120.91(16)	C60	C61	C56	120.6(2)
O3	C38	C39	123.99(16)	C44	C43	C42	120.8(3)
O3	C38	C37	117.13(15)	C61	C60	C59	120.3(2)
C39	C38	C37	118.86(15)	C43	C44	C45	119.7(2)

C23	C24	C25	123.21(16)
-----	-----	-----	------------

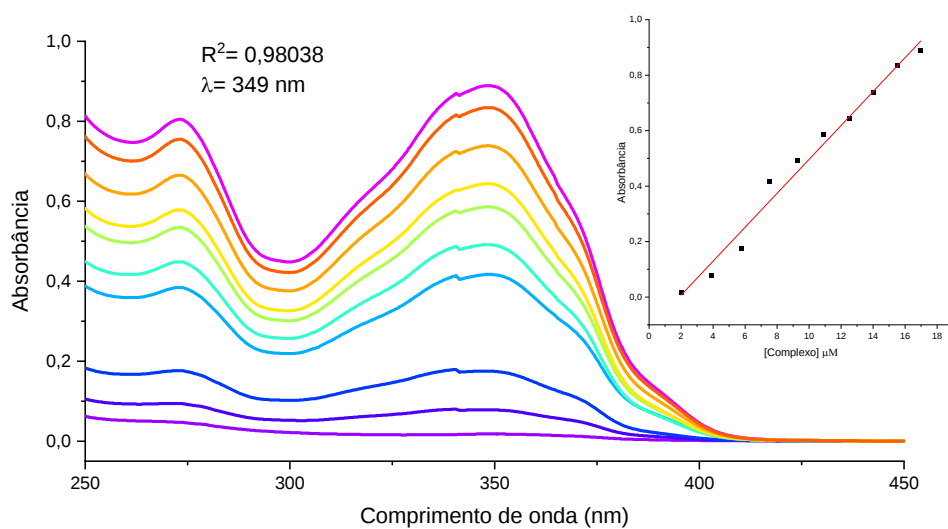


Figura A1. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$.

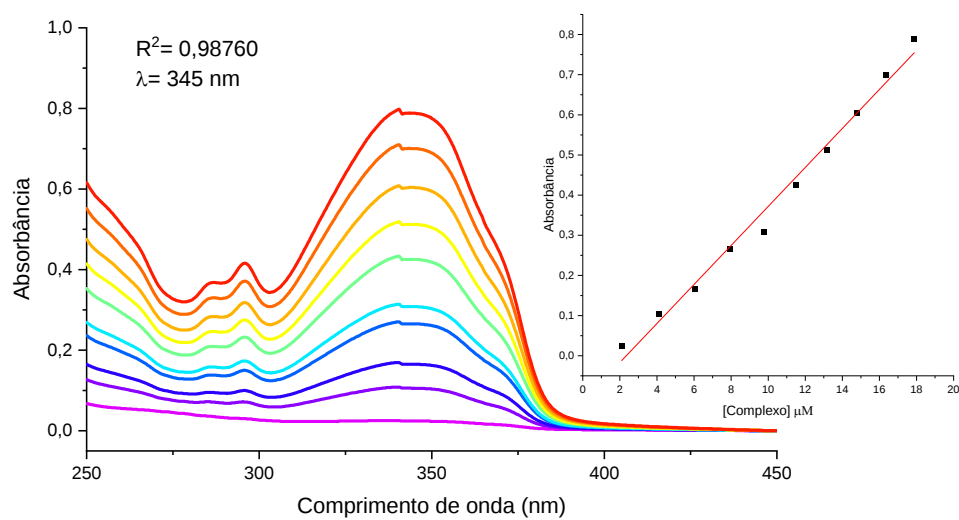


Figura A2. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$.

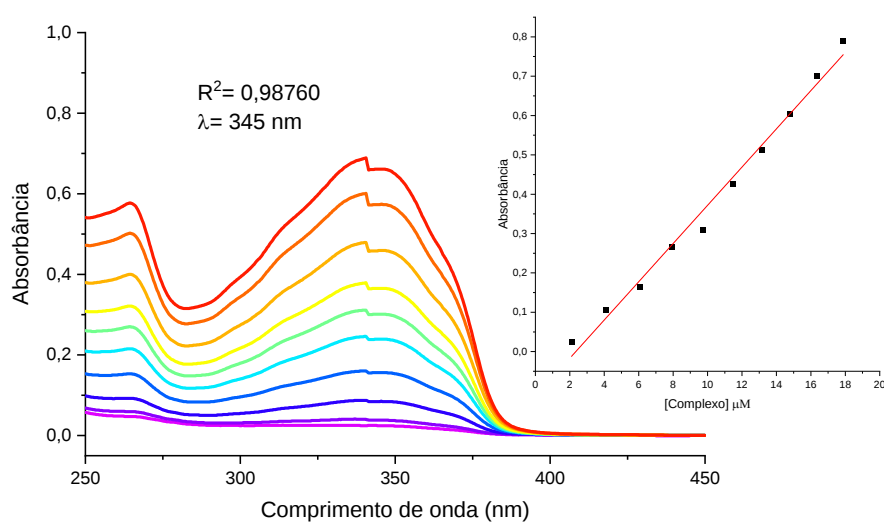


Figura A3. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$.

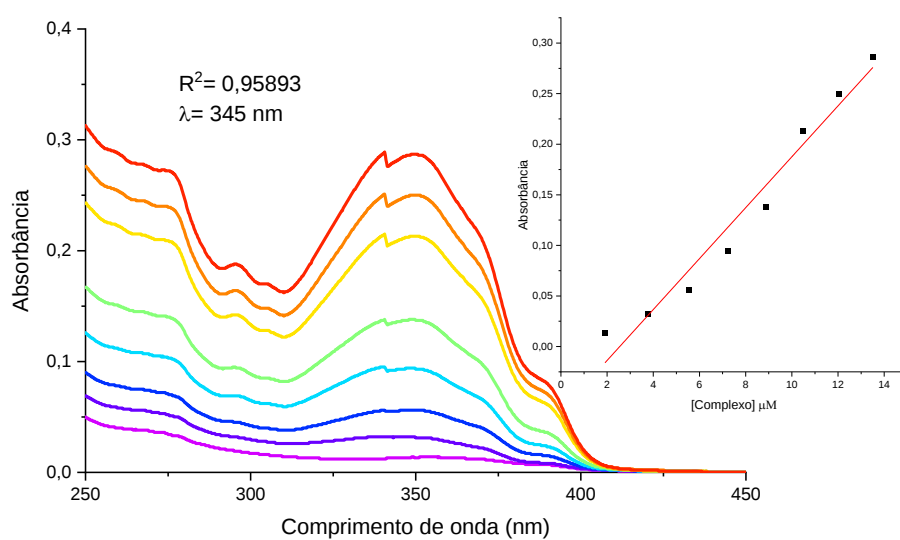


Figura A4. Espectros e regressão linear para o teste de lipofilicidade do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$.

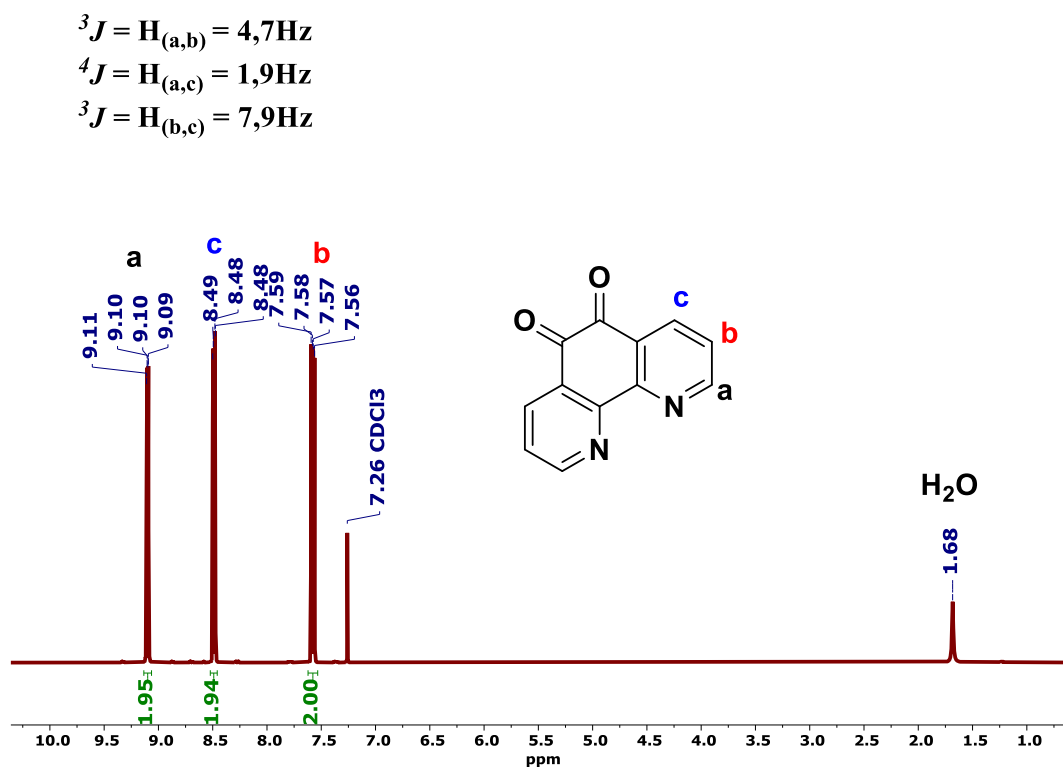


Figura A5. Espectro de RMN de ^1H para o ligante 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona). Solvente: CDCl_3 .

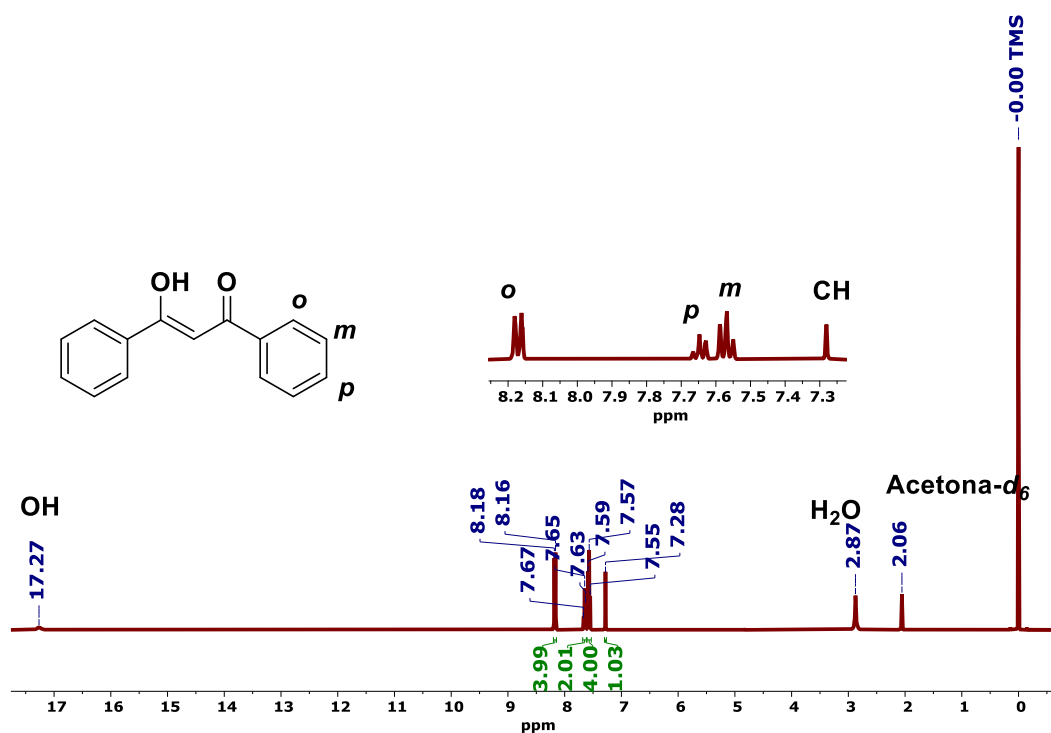


Figura A6. Espectro de RMN de ^1H para o ligante Dibenzoylmetano (DBM). Solvente: Acetona- d_6 .

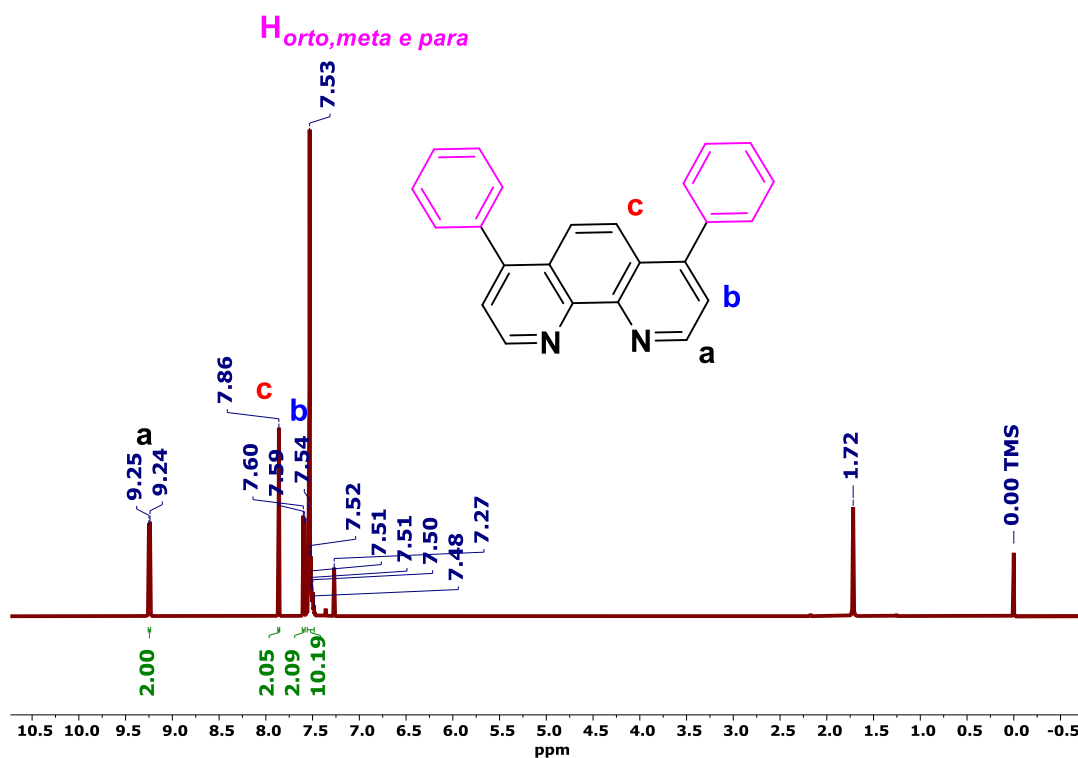


Figura A7. Espectro de RMN de ^1H para o ligante PH (4,7-difenil-1,10-fenantrolina). Solvente: CDCl_3 .

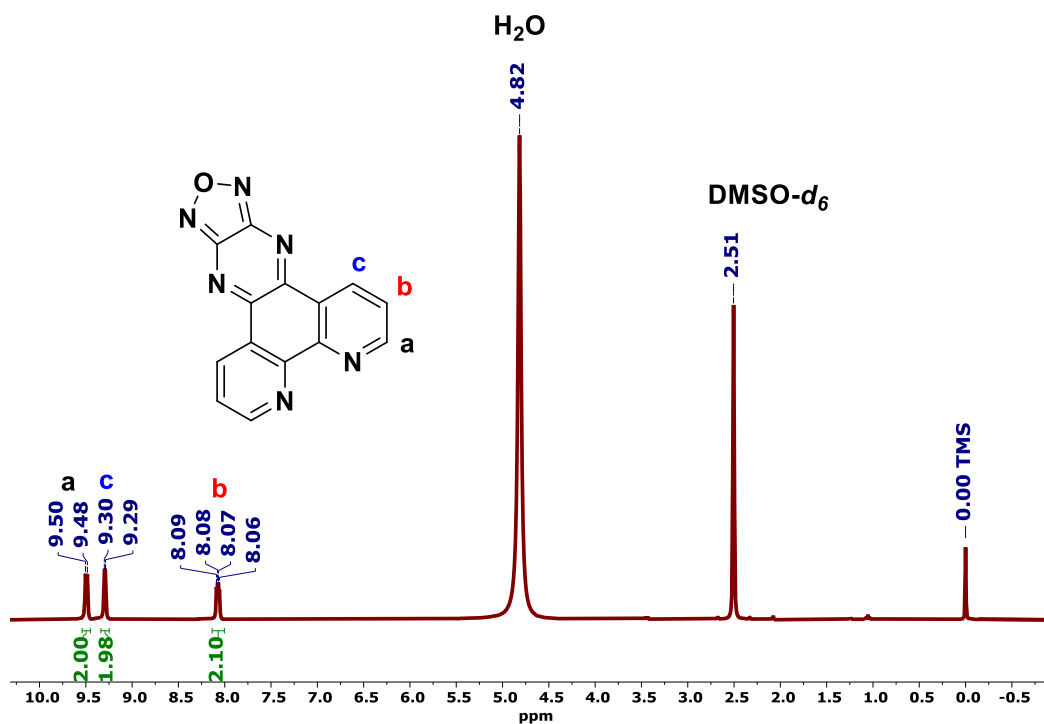


Figura A8. Espectro de RMN de ^1H para o ligante NON ([1,2,5]oxadiazolo[3',4':5,6]pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina). Solvente: DMSO- d_6 .

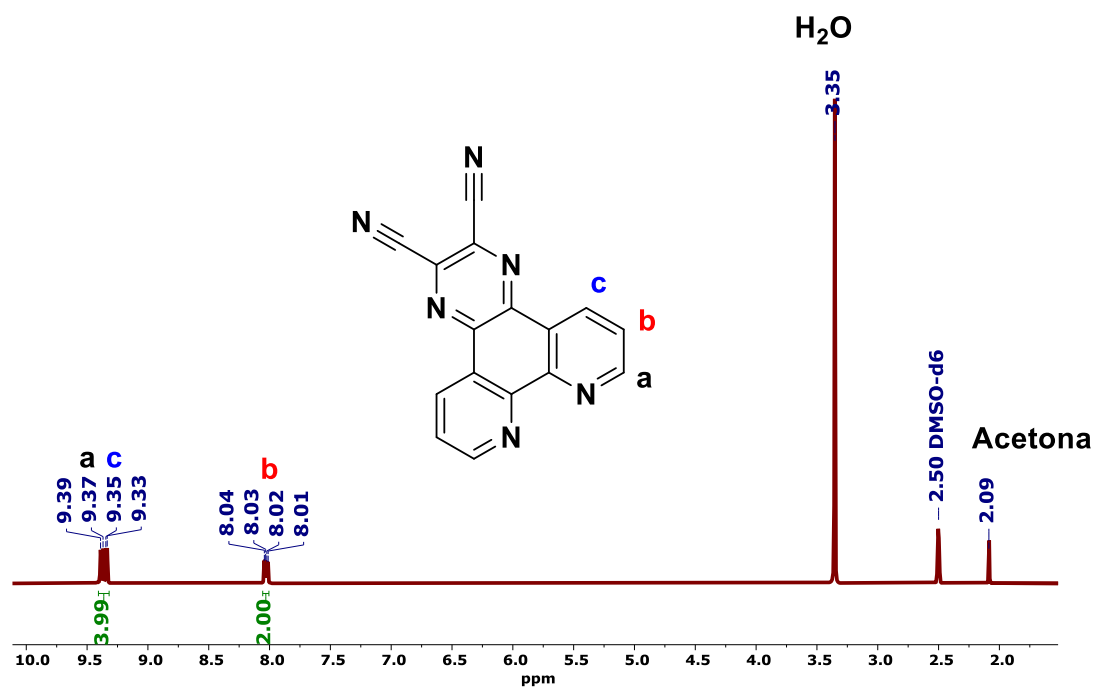


Figura A9. Espectro de RMN de ^1H para o ligante CN pirazina[2,3-f][1,10]fenantrolina-2,3-dicarbonitrila]. Solvente: DMSO- d_6 .

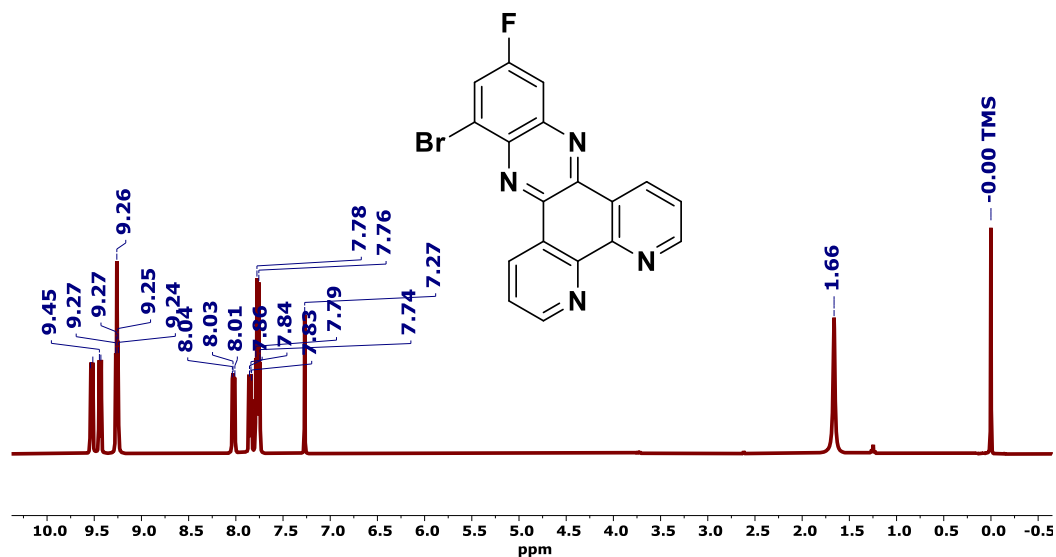


Figura A10. Espectro de RMN de ^1H para o ligante BrF (10-bromo-12-fluorodipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina). Solvente: CDCl_3 .

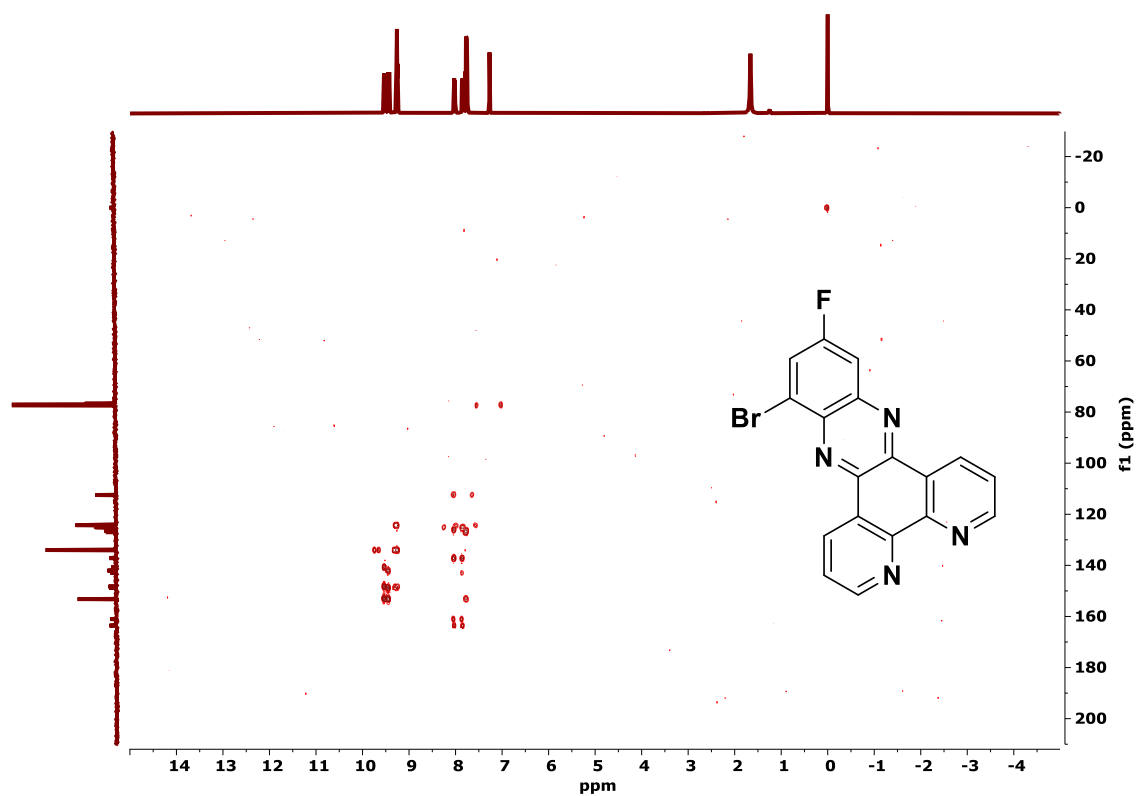


Figura A11. Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C do ligante BrF. Solvente: CDCl_3 .

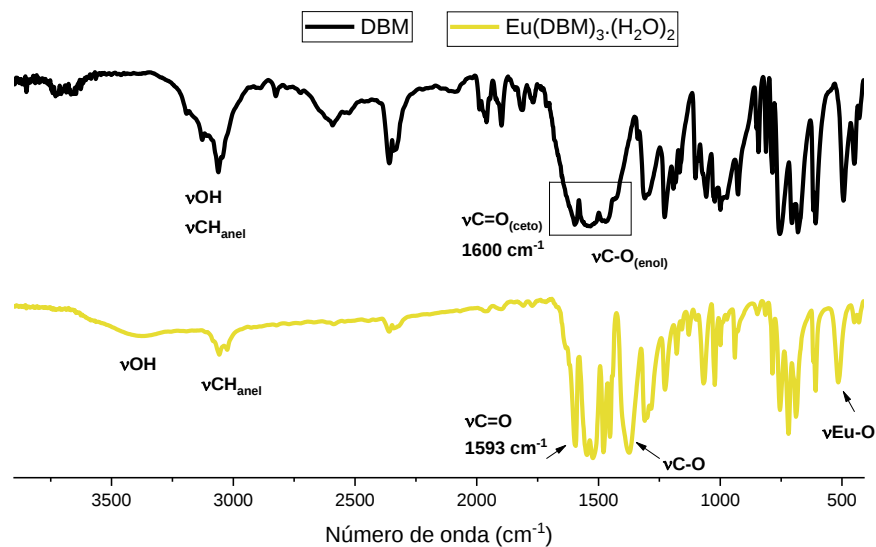


Figura A12. Espectro vibracional na região do infravermelho ligante DBM (cima) e do precursor $\text{Eu}(\text{DBM})_3(\text{H}_2\text{O})_2$ (baixo). Obtidos em pastilhas de KBr com faixa de leitura de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

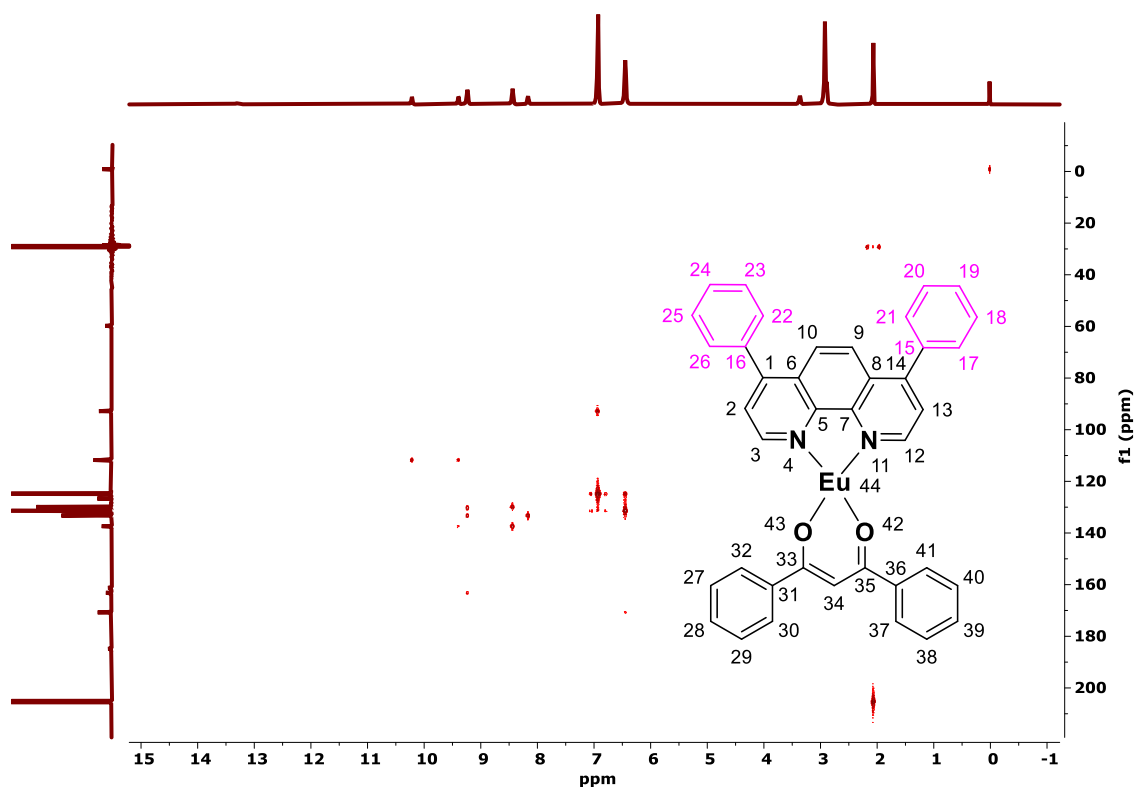


Figura A13. Mapa de contorno HMBC $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. Solvente: Acetona- d_6 .

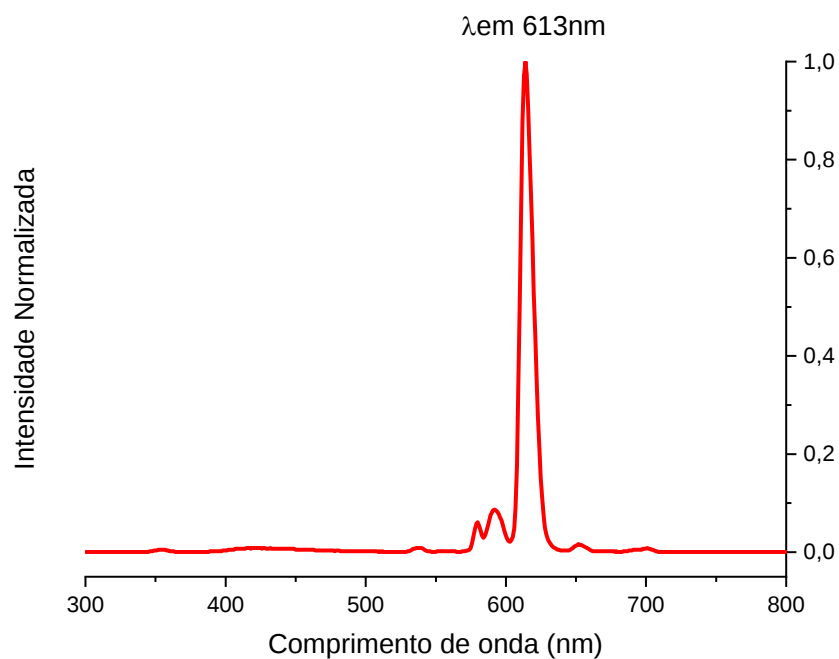


Figura A14. Espectro de luminescência para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. Comprimento de onda de excitação 355 nm. Solvente DMSO e concentração $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

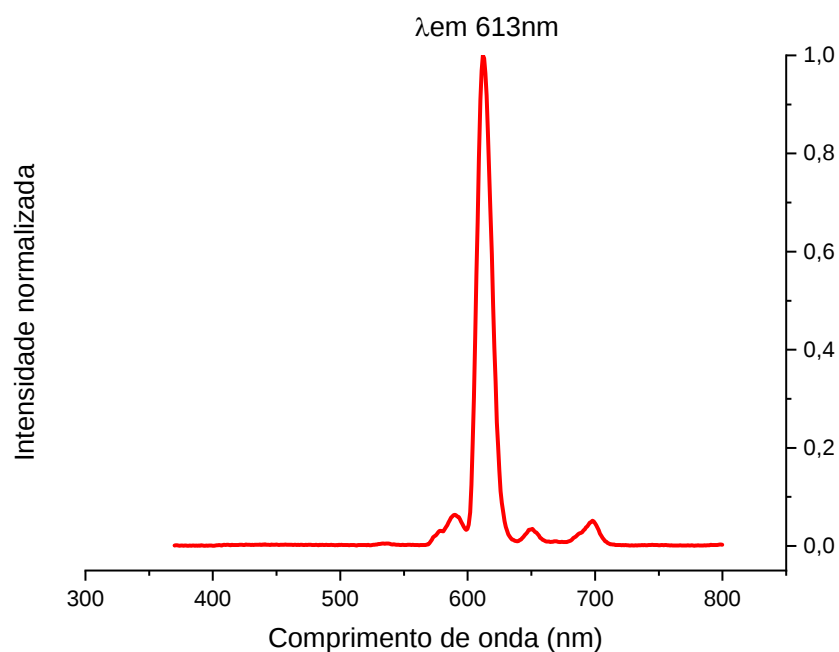


Figura A15. Espectro de luminescência para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$. Comprimento de onda de excitação 354 nm. Solvente DMSO e concentração $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

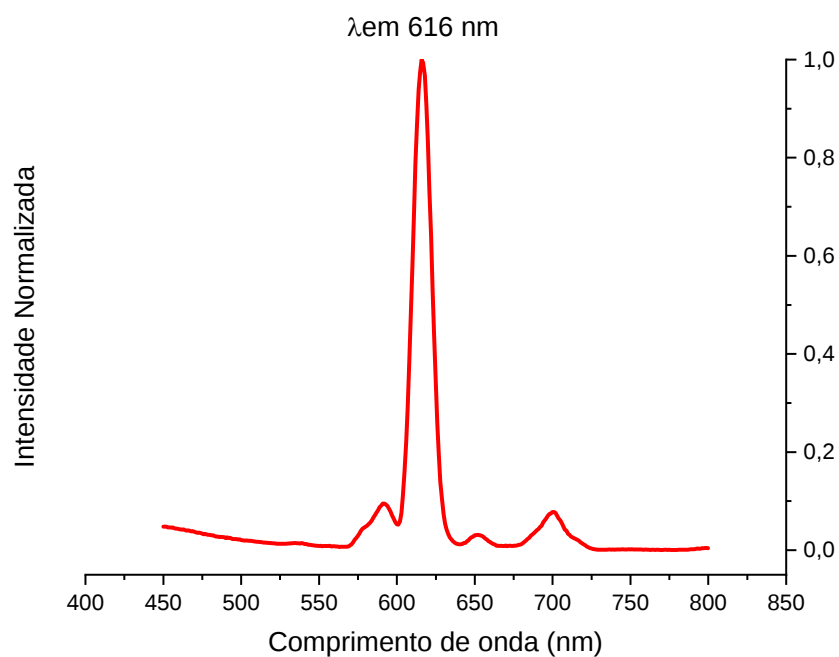


Figura A16. Espectro de luminescência para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. Comprimento de onda de excitação 355 nm. Solvente DMSO e concentração $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

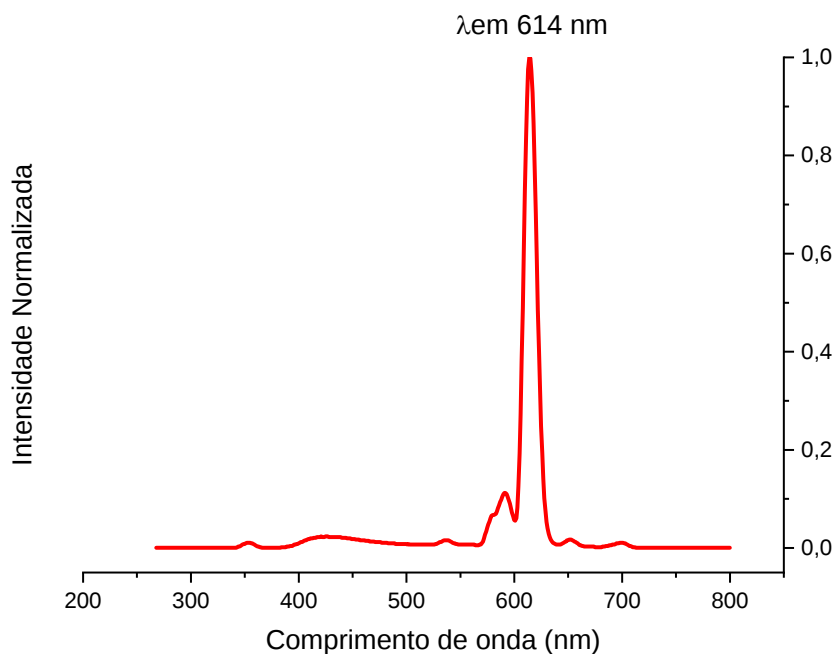


Figura A17. Espectro de luminescência para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$. Comprimento de onda de excitação 357 nm. Solvente DMSO e concentração $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

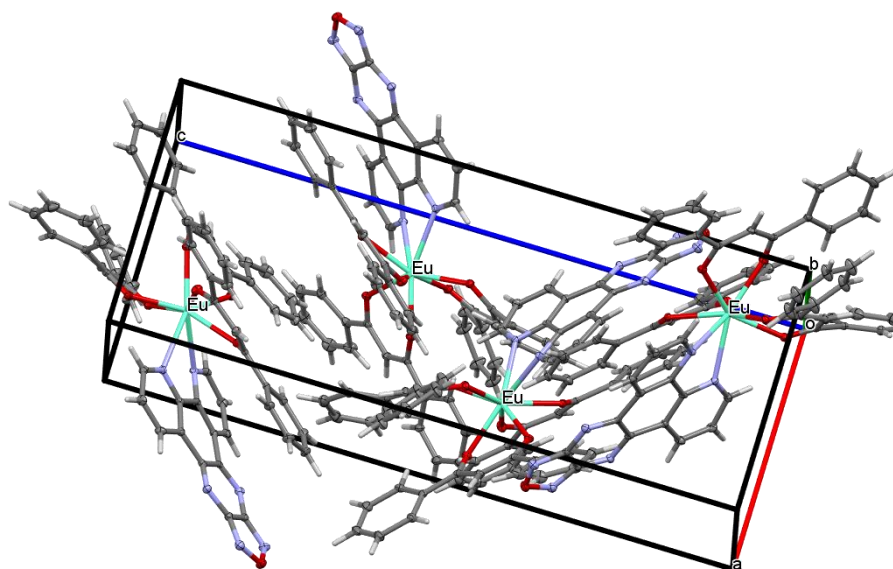


Figura A18. Representação da célula unitária para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$

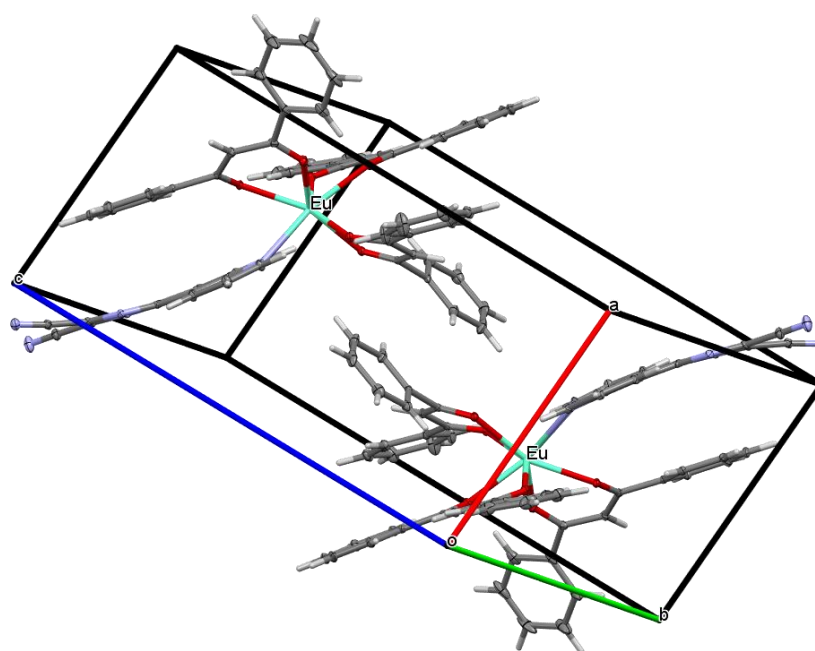


Figura A19. Representação da célula unitária para o complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$

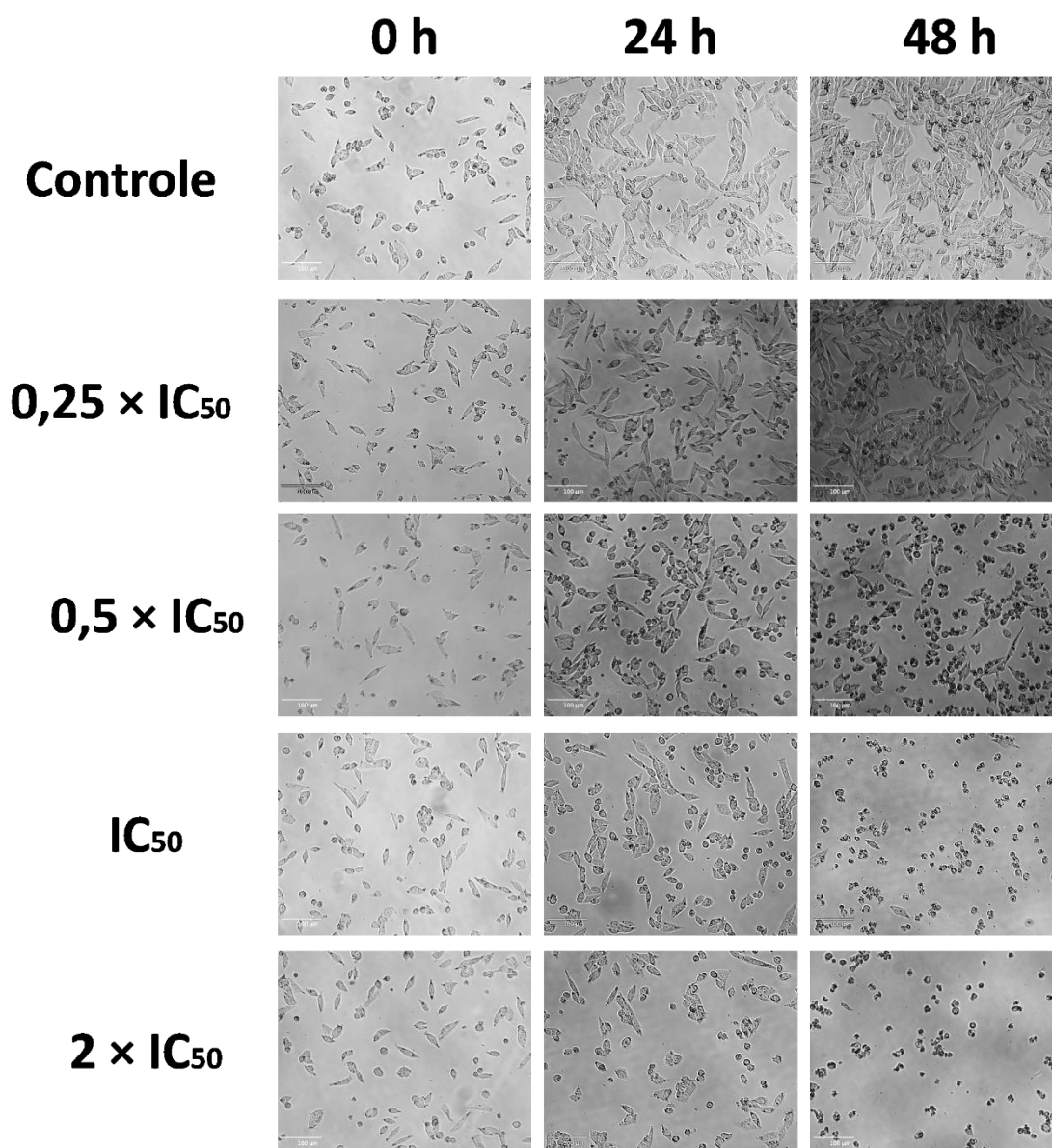


Figura A20. Micrografias obtidas para a linhagem celular A2780cis nas concentrações de $2 \times IC_{50}$, IC_{50} , $0,5 \times IC_{50}$ e $0,25 \times IC_{50}$ nos tempos de 0, 24 e 48 horas para o complexo $Eu(DBM)_3PH$. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.

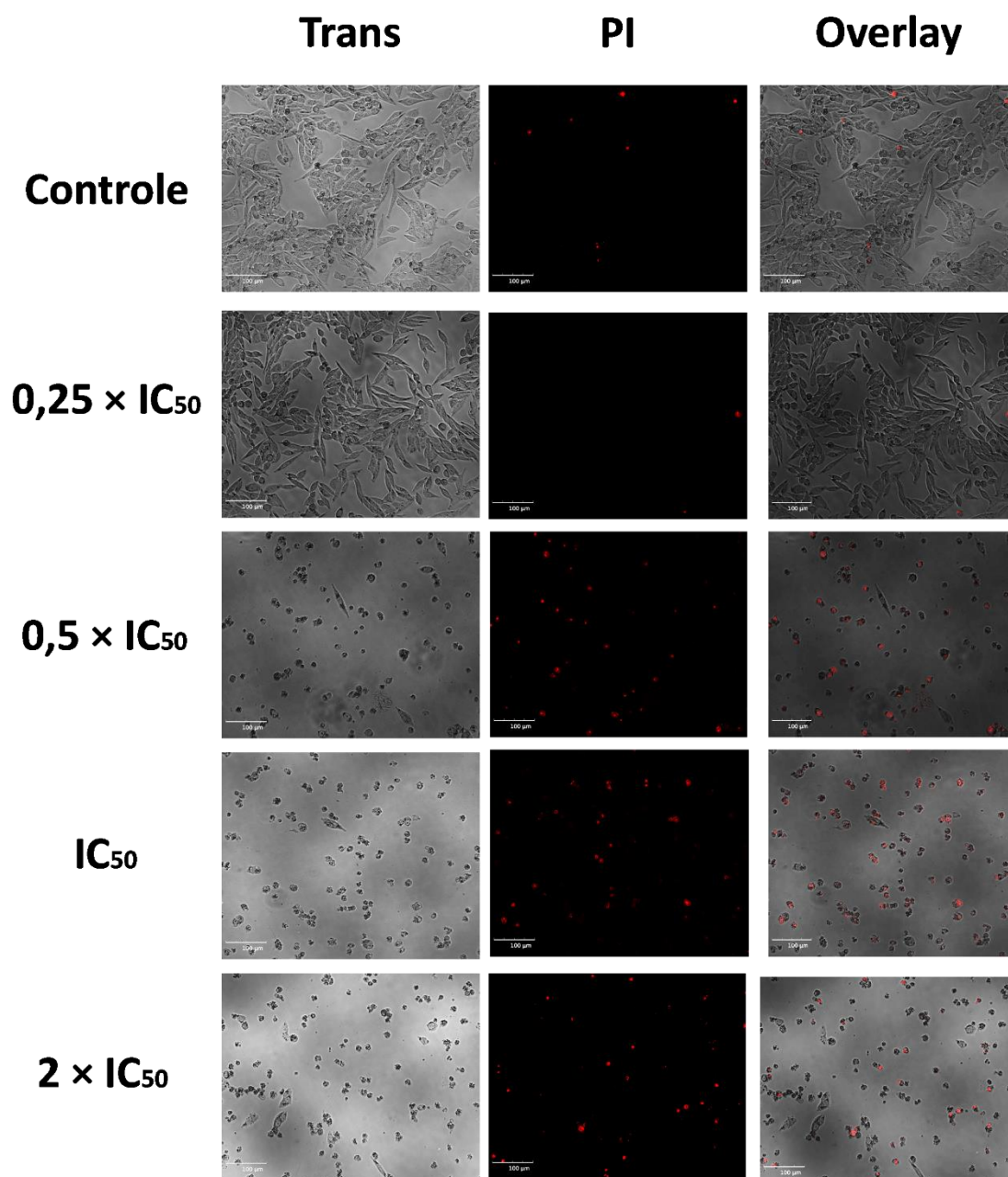


Figura A21. Ensaio morfológico para o composto $Eu(DBM)_3PH$ na linhagem celular A2780cis marcado com PI depois de 48 horas. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x. $\lambda_{exc} = 538 \text{ nm}$ e $\lambda_{de\ em} = 617 \text{ nm}$.

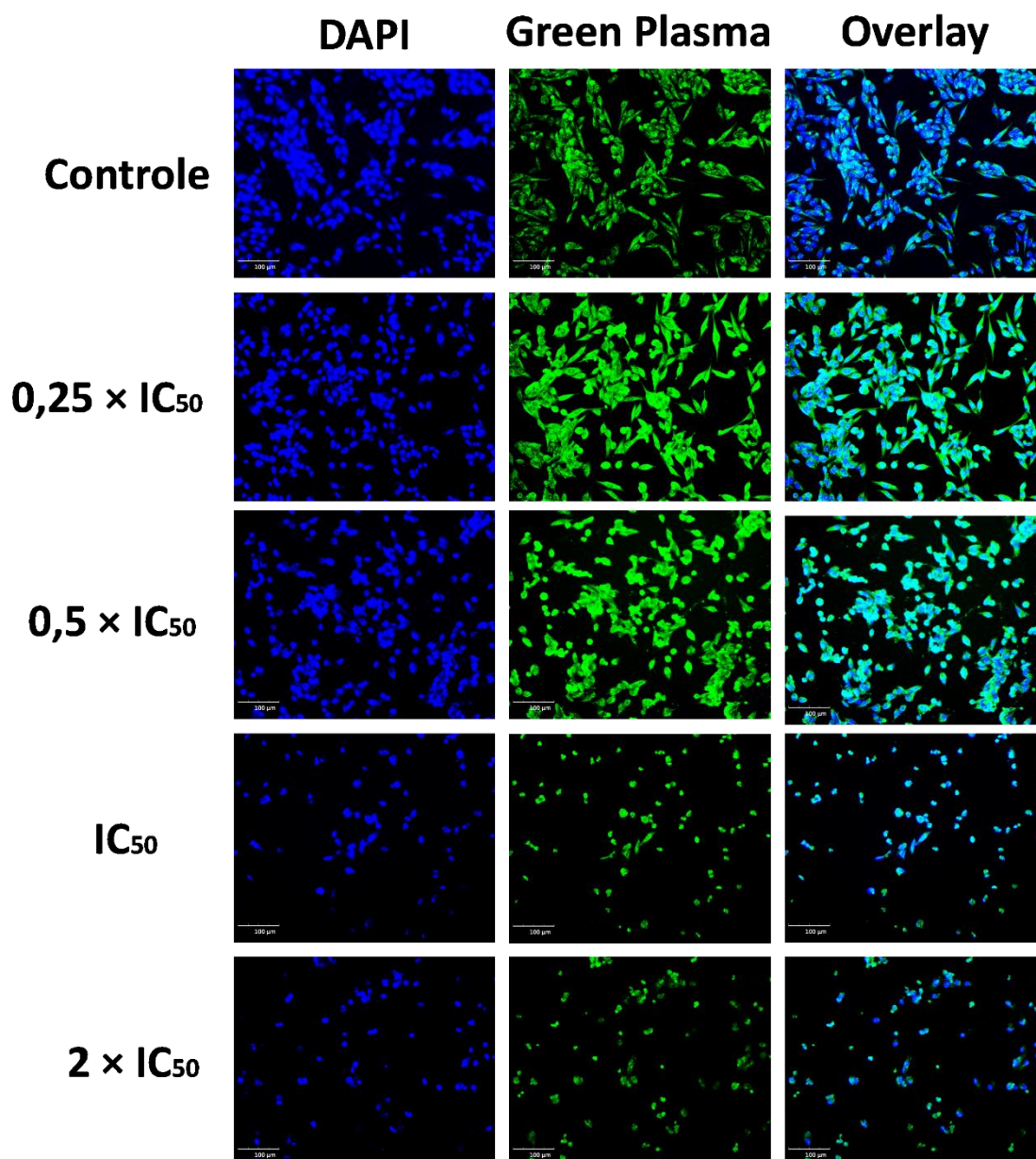


Figura A22. Ensaio morfológico por fluorescência, células A2780cís tratadas com o complexo $Eu(DBM)_3PH$ e marcadas com Green Plasma (verde) $\lambda_{exc} = 522 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ e DAPI (azul) $\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.

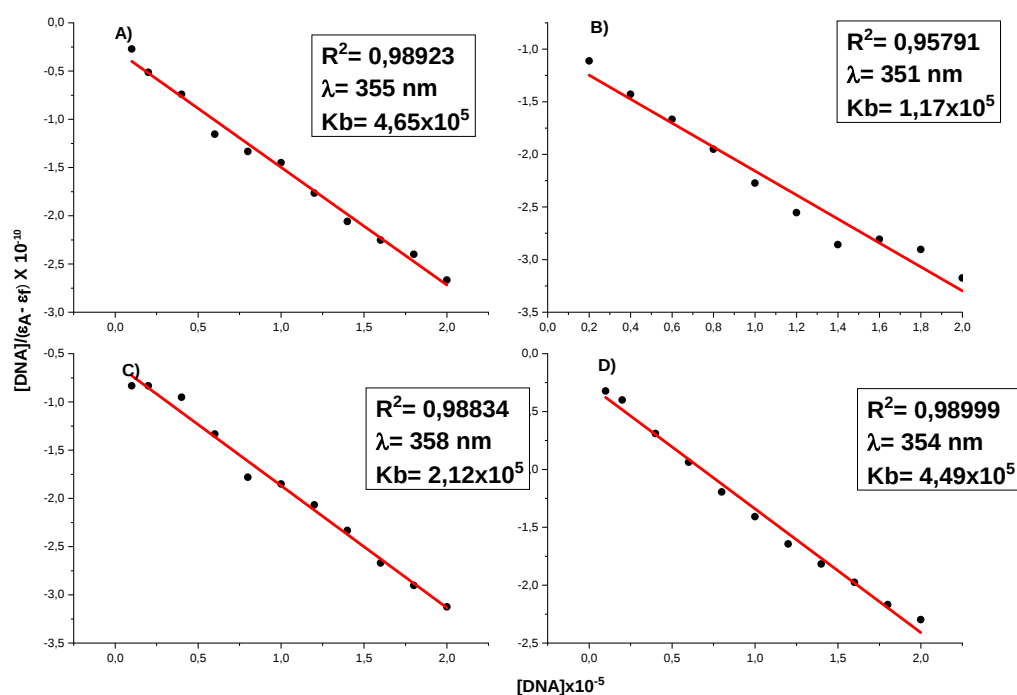


Figura A23. Regressão linear, respectivos comprimentos de onda e valor da constante de ligação K_b para os complexos. a) Eu(DBM)₃NON. b) Eu(DBM)₃CN. c) Eu(DBM)₃PH. d) Eu(DBM)₃BrF.

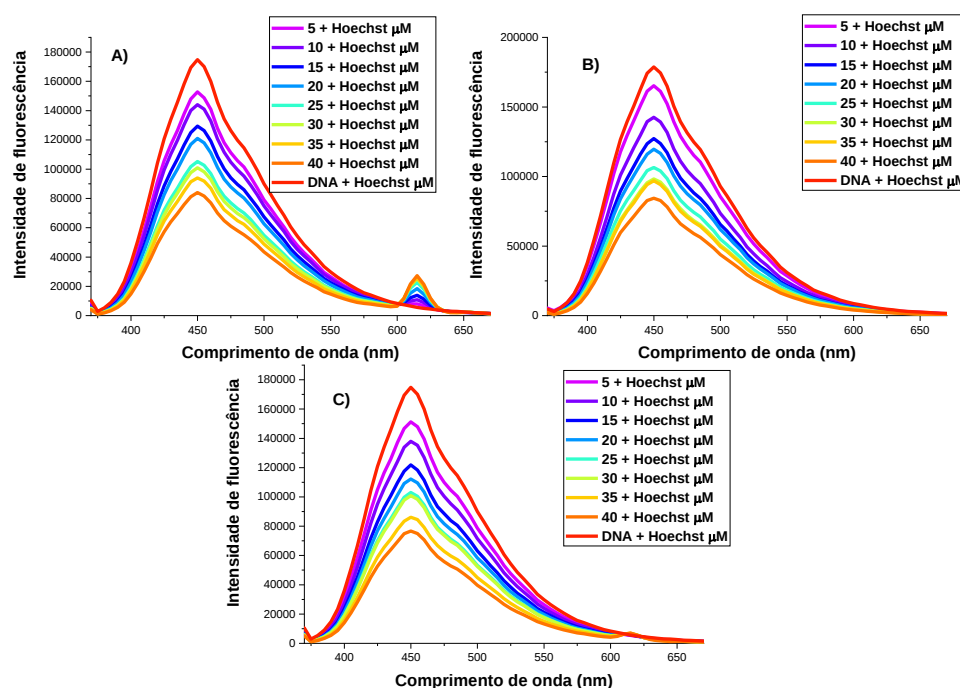


Figura A24. Espectro de emissão do Hoechst 33258 na presença do ct-DNA e variações nas concentrações do complexo. a) Eu(DBM)₃BrF. b) Eu(DBM)₃NON. c) Eu(DBM)₃CN. $\lambda_{\text{ex}} = 350\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460\text{nm}$.

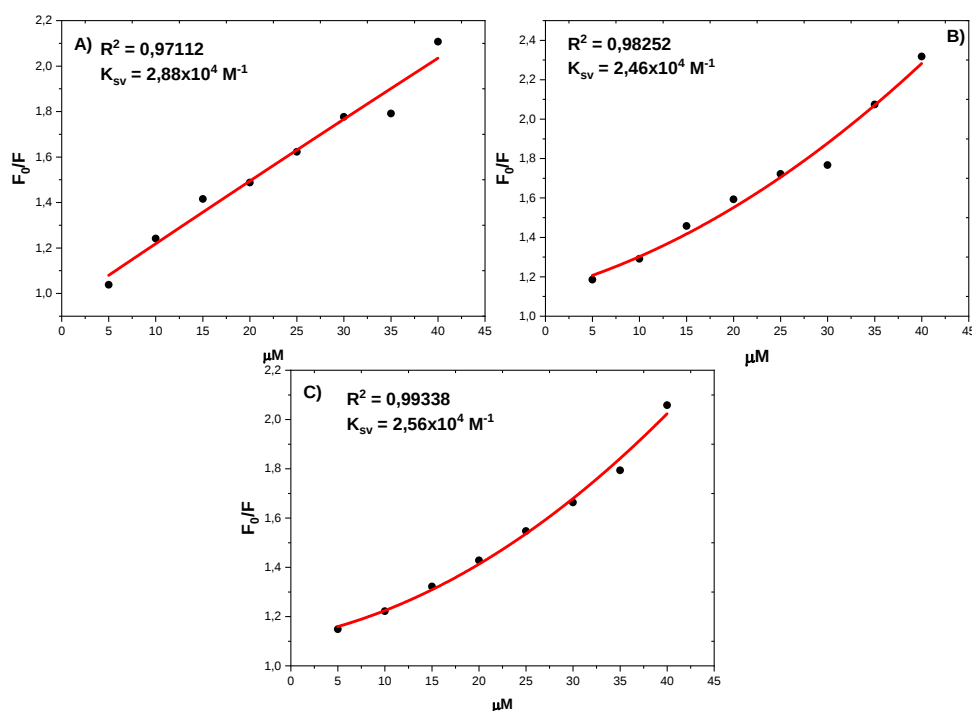


Figura A25. Regressão polinomial dos complexos. a) Eu(DBM)₃NON. b) Eu(DBM)₃CN. c) Eu(DBM)₃BrF. Constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Ensaios realizados a 37 °C.

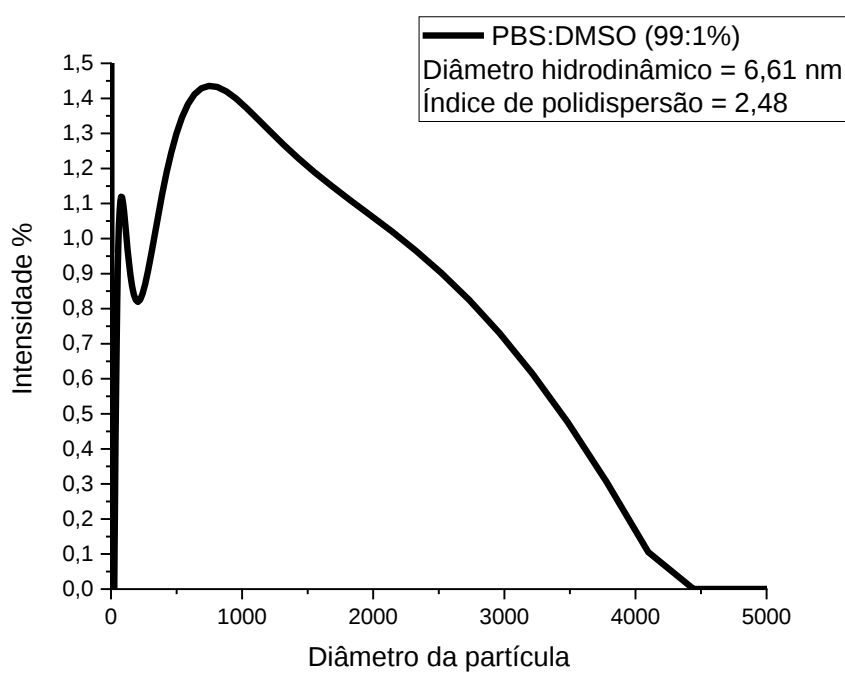


Figura A26. Análise via DLS para o solvente PBS:DMSO como branco, intensidades relativas (%) por Diâmetros das partículas formadas.

Tabela A7. Taxas de transferência (W_{ET}) e retrotransferência (W_{BT}) de energia entre diversos canais envolvendo os níveis S_1 e T_1 dos complexos e os níveis aceitadores do Eu^{3+} .

Do-ador	Aceita-dor	Eu(DBM) ₃ BrF		Eu(DBM) ₃ CN		Eu(DBM) ₃ NON		Eu(DBM) ₃ PH	
		W_{ET}	W_{BT}	W_{ET}	W_{BT}	W_{ET}	W_{BT}	W_{ET}	W_{BT}
S_1	$^7F_0 \rightarrow$	2.43	$\times$ 2.38	$\times$ 9.72	$\times$ 5.44	$\times$ 1.77	$\times$ 5.31	$\times$ 4.23	$\times$ 2.93
	5D_0	10^1	10^{-23}	10^{-1}	10^{-28}	10^2	10^{-18}	10^0	10^{-29}
	$^7F_0 \rightarrow$	3.04	$\times$ 1.22	$\times$ 1.33	$\times$ 3.04	$\times$ 9.65	$\times$ 1.19	$\times$ 2.41	$\times$ 6.84
	5D_1	10^3	10^{-17}	10^2	10^{-22}	10^3	10^{-12}	10^3	10^{-23}
	$^7F_0 \rightarrow$	8.80	$\times$ 4.62	$\times$ 2.07	$\times$ 6.20	$\times$ 7.65	$\times$ 1.23	$\times$ 1.04	$\times$ 3.88
	5L_6	10^4	10^{-3}	10^4	10^{-7}	10^4	10^{-2}	10^5	10^{-8}
	$^7F_0 \rightarrow$	3.58	$\times$ 1.76	$\times$ 1.13	$\times$ 3.17	$\times$ 2.08	$\times$ 3.15	$\times$ 6.74	$\times$ 2.35
	5G_6	10^4	10^0	10^4	10^{-4}	10^4	10^4	10^4	10^{-5}
	$^7F_0 \rightarrow$	1.08	$\times$ 2.90	$\times$ 3.89	$\times$ 5.99	$\times$ 4.99	$\times$ 4.12	$\times$ 6.97	$\times$ 1.33
	5D_4	10^4	10^1	10^3	10^{-3}	10^3	10^5	10^4	10^{-3}
	$^7F_1 \rightarrow$	1.01	$\times$ 1.65	$\times$ 2.86	$\times$ 2.69	$\times$ 5.79	$\times$ 2.92	$\times$ 4.02	$\times$ 4.69
	5D_0	10^3	10^{-22}	10^1	10^{-27}	10^3	10^{-17}	10^2	10^{-28}
	$^7F_1 \rightarrow$	9.07	$\times$ 6.10	$\times$ 4.79	$\times$ 1.84	$\times$ 4.49	$\times$ 9.27	$\times$ 2.46	$\times$ 1.17
	5D_1	10^3	10^{-18}	10^2	10^{-22}	10^4	10^{-13}	10^3	10^{-23}
	$^7F_1 \rightarrow$	1.73	$\times$ 1.52	$\times$ 1.16	$\times$ 5.81	$\times$ 3.04	$\times$ 8.20	$\times$ 2.69	$\times$ 1.67
	5D_2	10^3	10^{-13}	10^2	10^{-18}	10^3	10^{-9}	10^3	10^{-18}
	$^7F_1 \rightarrow$	1.20	$\times$ 1.01	$\times$ 1.88	$\times$ 9.06	$\times$ 1.32	$\times$ 3.41	$\times$ 1.84	$\times$ 1.10
	5D_3	10^5	10^{-5}	10^4	10^{-10}	10^5	10^{-1}	10^5	10^{-10}
	$^7F_1 \rightarrow$	2.25	$\times$ 1.99	$\times$ 4.91	$\times$ 2.47	$\times$ 2.18	$\times$ 5.89	$\times$ 2.36	$\times$ 1.48
	5L_6	10^4	10^{-4}	10^3	10^{-8}	10^4	10^0	10^4	10^{-9}
	$^7F_1 \rightarrow$	6.12	$\times$ 7.61	$\times$ 1.64	$\times$ 1.17	$\times$ 4.41	$\times$ 1.69	$\times$ 8.97	$\times$ 7.91
	5L_7	10^4	10^{-2}	10^4	10^{-5}	10^4	10^3	10^4	10^{-7}
	$^7F_1 \rightarrow$	1.43	$\times$ 2.10	$\times$ 2.60	$\times$ 2.19	$\times$ 6.27	$\times$ 2.83	$\times$ 1.09	$\times$ 1.14
	5G_2	10^5	10^{-1}	10^4	10^{-5}	10^4	10^3	10^6	10^{-5}
	$^7F_1 \rightarrow$	1.83	$\times$ 8.12	$\times$ 4.58	$\times$ 1.16	$\times$ 1.06	$\times$ 1.45	$\times$ 5.89	$\times$ 1.85
	5G_3	10^5	10^{-1}	10^4	10^{-4}	10^5	10^4	10^5	10^{-5}
	$^7F_1 \rightarrow$	1.79	$\times$ 1.48	$\times$ 5.21	$\times$ 2.46	$\times$ 1.15	$\times$ 2.93	$\times$ 2.98	$\times$ 1.75
	5G_6	10^4	10^{-1}	10^3	10^{-5}	10^4	10^3	10^4	10^{-6}
	$^7F_1 \rightarrow$	5.27	$\times$ 4.59	$\times$ 1.54	$\times$ 7.67	$\times$ 3.39	$\times$ 9.07	$\times$ 9.15	$\times$ 5.66
	5G_5	10^4	10^{-1}	10^4	10^{-5}	10^4	10^3	10^4	10^{-6}
T_1	$^7F_0 \rightarrow$	2.55	$\times$ 1.57	$\times$ 5.65	$\times$ 2.51	$\times$ 7.15	$\times$ 7.15	$\times$ 7.87	$\times$ 6.01
	5D_0	10^{-1}	10^{-7}	10^{-2}	10^{-12}	10^{-1}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-8}
	$^7F_0 \rightarrow$	1.33	$\times$ 3.35	$\times$ 3.88	$\times$ 7.05	$\times$ 4.57	$\times$ 1.87	$\times$ 7.82	$\times$ 2.44
	5D_1	10^6	10^3	10^5	10^{-2}	10^6	10^5	10^6	10^3
	$^7F_0 \rightarrow$	1.15	$\times$ 3.81	$\times$ 2.23	$\times$ 5.32	$\times$ 1.30	$\times$ 6.95	$\times$ 3.69	$\times$ 1.51
	5L_6	10^{-1}	10^9	10^{-1}	10^5	10^{-1}	10^{10}	10^{-1}	10^9
	$^7F_0 \rightarrow$	9.47	$\times$ 2.94	$\times$ 2.66	$\times$ 5.95	$\times$ 9.56	$\times$ 4.81	$\times$ 3.29	$\times$ 1.26
	5G_6	10^{-3}	10^{11}	10^{-2}	10^7	10^{-3}	10^{12}	10^{-2}	10^{11}
	$^7F_0 \rightarrow$	1.10	$\times$ 1.86	$\times$ 3.86	$\times$ 4.72	$\times$ 1.46	$\times$ 4.02	$\times$ 6.55	$\times$ 1.37
	5D_4	10^{-3}	10^{12}	10^{-3}	10^8	10^{-3}	10^{13}	10^{-3}	10^{12}
	$^7F_1 \rightarrow$	4.66	$\times$ 4.83	$\times$ 7.86	$\times$ 5.87	$\times$ 1.88	$\times$ 3.16	$\times$ 2.43	$\times$ 3.12
	5D_0	10^6	10^{-1}	10^5	10^{-6}	10^7	10^1	10^7	10^{-1}

${}^7F_1 \rightarrow$	6.78	$\times$	2.87	$\times$	1.81	$\times$	5.52	$\times$	2.38	$\times$	1.63	$\times$	3.86	$\times$	2.02	$\times$
5D_1	10^2		10^{-1}		10^2		10^{-6}		10^3		10^1		10^3		10^{-1}	
${}^7F_1 \rightarrow$	7.29	$\times$	4.03	$\times$	3.67	$\times$	1.46	$\times$	2.14	$\times$	1.91	$\times$	4.84	$\times$	3.31	$\times$
5D_2	10^4		10^6		10^4		10^2		10^5		10^8		10^5		10^6	
${}^7F_1 \rightarrow$	6.92	$\times$	3.67	$\times$	8.82	$\times$	3.37	$\times$	1.17	$\times$	1.00	$\times$	3.14	$\times$	2.06	$\times$
5D_3	10^{-1}		10^7		10^{-1}		10^3		10^0		10^9		10^0		10^7	
${}^7F_1 \rightarrow$	4.48	$\times$	2.49	$\times$	7.87	$\times$	3.15	$\times$	5.19	$\times$	4.67	$\times$	1.40	$\times$	9.65	$\times$
5L_6	10^{-2}		10^8		10^{-2}		10^4		10^{-2}		10^9		10^{-1}		10^7	
${}^7F_1 \rightarrow$	3.82	$\times$	3.00	$\times$	8.79	$\times$	4.97	$\times$	4.09	$\times$	5.20	$\times$	1.27	$\times$	1.23	$\times$
5L_7	10^{-2}		10^{10}		10^{-2}		10^6		10^{-2}		10^{11}		10^{-1}		10^{10}	
${}^7F_1 \rightarrow$	2.44	$\times$	2.27	$\times$	4.43	$\times$	2.96	$\times$	4.93	$\times$	7.41	$\times$	2.15	$\times$	2.46	$\times$
5G_2	10^4		10^{16}		10^4		10^{12}		10^4		10^{17}		10^5		10^{16}	
${}^7F_1 \rightarrow$	8.33	$\times$	2.32	$\times$	1.92	$\times$	3.86	$\times$	1.18	$\times$	5.35	$\times$	4.30	$\times$	1.49	$\times$
5G_3	10^{-2}		10^{11}		10^{-1}		10^7		10^{-1}		10^{12}		10^{-1}		10^{11}	
${}^7F_1 \rightarrow$	7.18	$\times$	3.74	$\times$	1.83	$\times$	6.87	$\times$	7.46	$\times$	6.29	$\times$	2.44	$\times$	1.57	$\times$
5G_6	10^{-3}		10^{10}		10^{-2}		10^6		10^{-3}		10^{11}		10^{-2}		10^{10}	
${}^7F_1 \rightarrow$	2.09	$\times$	1.15	$\times$	5.34	$\times$	2.11	$\times$	2.19	$\times$	1.95	$\times$	7.20	$\times$	4.90	$\times$
5G_5	10^{-2}		10^{11}		10^{-2}		10^7		10^{-2}		10^{12}		10^{-2}		10^{10}	

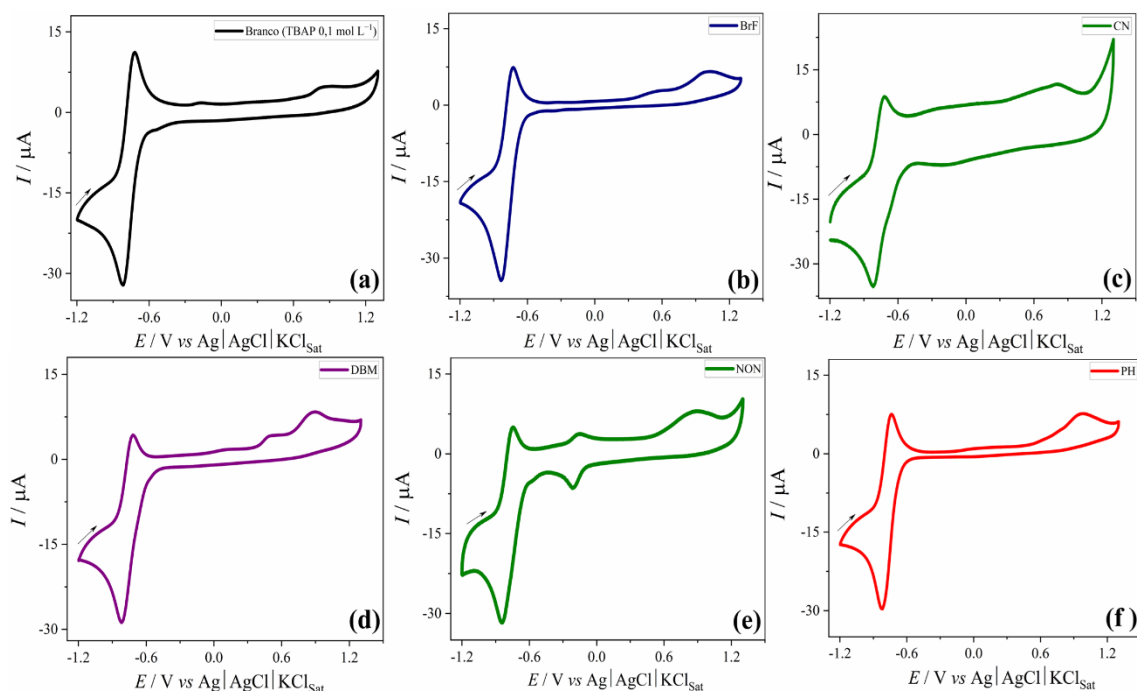


Figura A27. Voltamogramas obtidos usando o GCE. Em (a) branco (TBAP 0,1 mol L⁻¹), (b) BrF, (c) CN, (d) DBM, (e) NON e (f) PH ligantes a 1,0 mmol L⁻¹ (TBAP 0,1 M). Velocidade de varredura de potencial (v) = 50 mV s⁻¹.

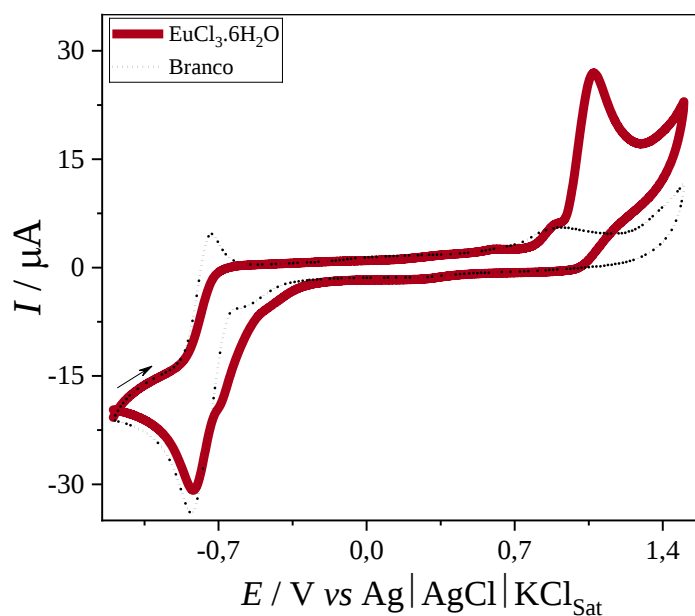


Figura A28. Voltamograma obtido em GCE com sobreposições do branco TBAP 0,1 M e do sal de Eu (III) 0,01 M.

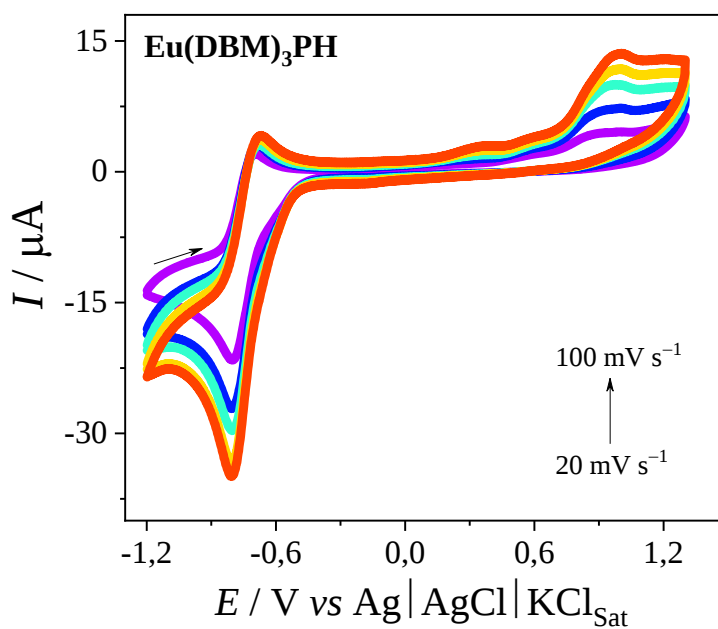


Figura A29. Voltamograma com velocidade de varreduras 20-100 mV s^{-1} do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$.

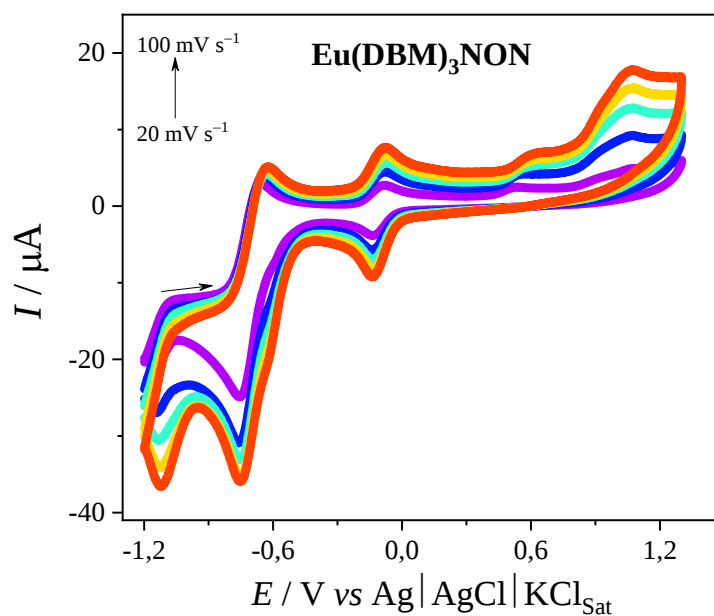


Figura A30. Voltamograma com velocidade de varreduras 20-100 mV s^{-1} do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{NON}$.

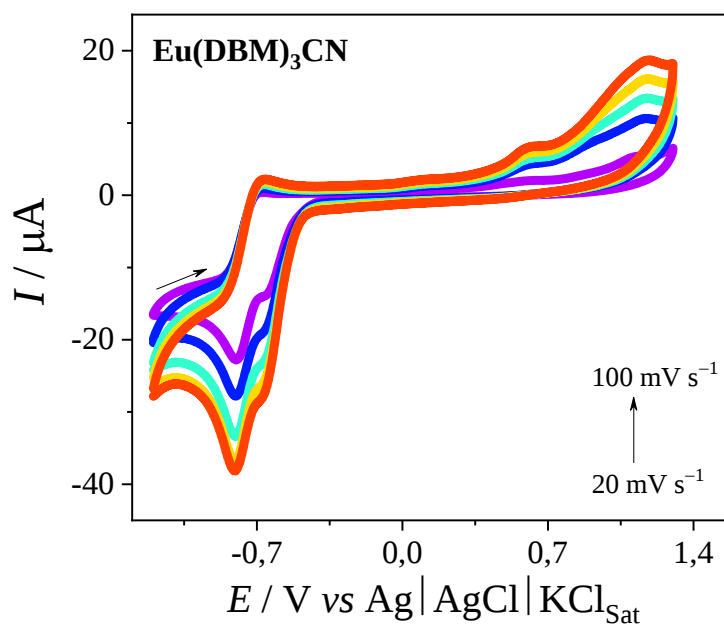


Figura A31. Voltamograma com velocidade de varreduras 20-100 mV s^{-1} do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{CN}$.

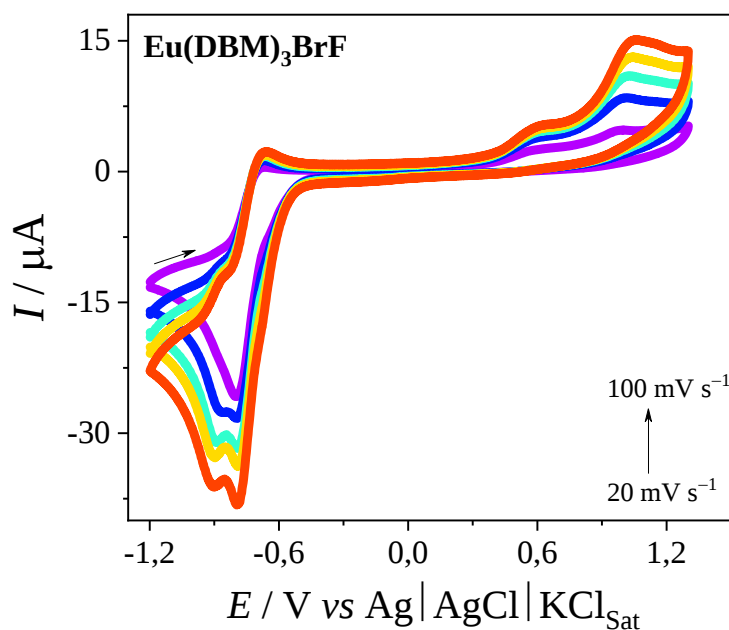


Figura A32. Voltamograma com velocidade de varreduras 20-100 mV s^{-1} do complexo $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{BrF}$.

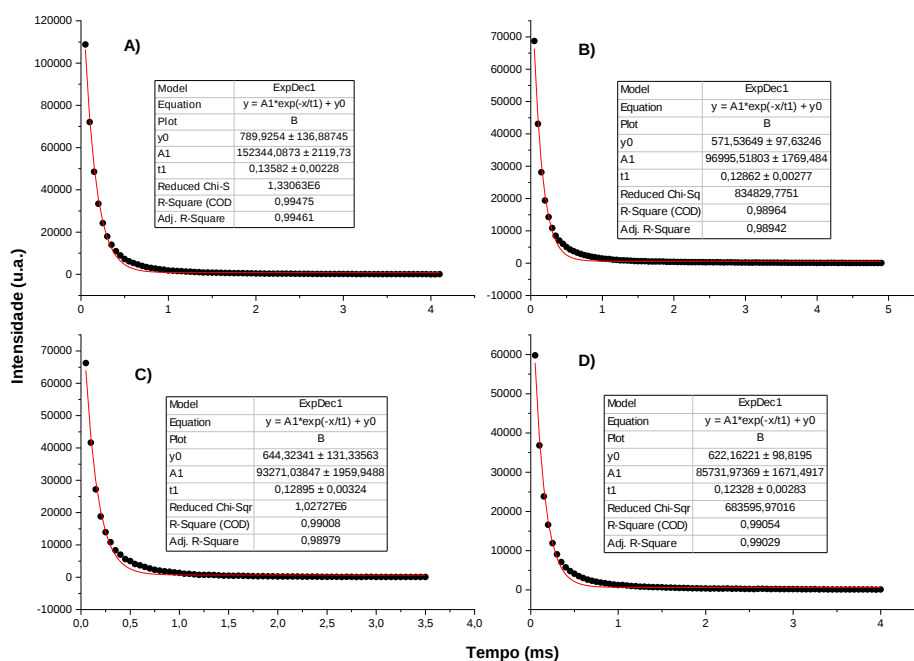


Figura A33. Perfil de decaimento do estado $^5\text{D}_0$ e medida do tempo de meia vida em aproximadamente 614 nm para os complexos de $\text{Eu}(\text{III})$. a) $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{PH}$. b)



Eu(DBM)₃NON. c) Eu(DBM)₃CN. d) Eu(DBM)₃BrF. $\lambda_{\text{exc}} = \sim 353 \text{ nm}$, [complexos] = $1 \times 10^{-5} \text{ M}$.