

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Desenvolvimento de potenciais metalofármacos para a terapia do cancro

Ana Cristina Eufrásio Poeta

Dissertação orientada por

Professora Susana Pina dos Santos e Doutora Ana Isabel Tomaz

Mestrado em Química
Especialização em Química

2015

Agradecimentos

São algumas as pessoas a quem gostaria de mostrar a minha gratidão, quer seja por terem contribuído de alguma forma para o decorrer deste trabalho, quer por estarem sempre presentes ao longo do meu percurso académico.

Em primeiro lugar gostava de agradecer às minhas orientadoras. Um enorme obrigada à Professora Doutora Susana Santos e a Doutora Ana Isabel Tomaz, pelo apoio, paciência, disponibilidade, orientação, estímulo e conhecimentos durante a realização desta tese.

À Professora Doutora Paula Robalo pela simpatia, disponibilidade e ajuda na realização da voltametria cíclica.

À Professora Doutora Fernanda Marques pela disponibilidade na realização dos estudos biológicos.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade, companheirismo e principalmente pelas sugestões. A todos eles, um muito obrigada por me terem recebido e ajudado de uma forma maravilhosa.

Aos meus amigos, em especial a Mariana, Pedro e Nuno, pela sua amizade e pelo conselho nos momentos bons e menos bons.

Aos meus pais, José Poeta e Fernanda Correia, o meu mais profundo obrigada por todos os vossos esforços e por me terem inculcido sempre o espírito de fazer tudo o melhor que saiba e a não desistir. No fundo, obrigada por todo o carinho, amor e confiança que têm depositado em mim.

Ao meu irmão e cunhada, Nelson Poeta e Bárbara Correia, obrigada pela cumplicidade, encorajamento e companheirismo prestado ao longo dos últimos anos.

Ao Filipe, obrigada por tudo e pelo que és!...

A TODOS, um muito OBRIGADA...

Ana Poeta

Resumo

O cancro é a segunda maior causa de morte nos países desenvolvidos, prevendo-se que o número de mortes devido a esta doença aumente 70% nas próximas duas décadas.

As terapias mais utilizadas para tratamento desta doença são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podendo também recorrer-se à imunoterapia e terapia hormonal. Os fármacos usados em quimioterapia podem ser divididos em vários grupos de acordo com a sua estrutura, modo de ação e a sua interação com outros fármacos. A cisplatina e os seus análogos tornaram-se os metalofármacos mais utilizados na terapia de diversos tipos de cancro, sendo usados sozinhos ou isolados em muitos regimes terapêuticas, independentemente da sua falta de selectividade, da limitação severa na dosagem devido a efeitos secundários agressivos e ao desenvolvimento de resistência ao tratamento.

A busca de novos metalofármacos tem como objetivo ultrapassar as desvantagens apontadas anteriormente, e simultaneamente desenvolver novos fármacos que tenham sucesso no tratamento de tumores resistentes aos compostos de cisplatina.

Neste trabalho descreve-se a síntese e caracterização de novos compostos orgânicos e inorgânicos, desenvolvidos com o objectivo contribuir para o desenvolvimento de novos agentes anti-tumorais pertencentes da família dos metalofármacos.

Foram sintetizados e caracterizados três compostos pertencentes à família das tiossemicarbazonas (HL^1 , HL^2 e HL^3), por condensação entre a **4-feniltiossemicarbazida** e os aldeídos heteroaromáticos indole-3-carboxaldeído, *N*-metilindole-3-carboxaldeído e 2-benzofurancarboxaldeído.

Por reação entre estas tiossemicarbazonas e *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂] na presença de triflato de prata, obtiveram-se três novos complexos de ruténio (II), complexos **1**, **2** e **3**, cuja estrutura, octaédrica, foi formulada como [Ru(bipy)₂(HL)][CF₃SO₃]₂ com o ligando coordenado na forma neutra ao ião ruténio pelo átomo de enxofre e pelo átomo de azoto imínico.

Por reação entre os tiossemicarbazonas HL^1 , HL^2 e HL^3 e CuCl₂, foram sintetizados três novos complexos de cobre, complexos **4**, **5** e **6**, tendo sido possível propor a formulação [Cu(HL)₂]Cl, para os complexos **4** e **5**, com o cobre no estado de oxidação (I) e a tiossemicarbazona coordenada na sua forma neutra (HL) pelo átomo de enxofre e pelo átomo de azoto imínico.

A caracterização de todos os compostos sintetizados, tiossemicarbazonas e complexos, foi feita recorrendo às técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C /APT, DEPT-135 e técnicas bidimensionais), ESI-MS, FTIR, espectroscopia de UV-Visível, análises elementares (% C, H, N) e adicionalmente, no caso dos complexos **1**, **2** e **3**, foi ainda estudado o comportamento redox dos compostos por voltametria cíclica.

Avaliou-se ainda a potencialidade das tiossemicarbazonas e dos complexos de Ru(II) sintetizados como agentes anti-tumorais, estudando a sua citotoxicidade em linhas de células tumorais da mama (MDA-MB-231) e do ovário (A2780). A tiossemicarbazona **HL**² e o complexo **2** apresentaram resultados muito prometedores de citotoxicidade às 72h de incubação com células A2780, com valores de IC_{50} de $4.5 \pm 1.7 \mu\text{M}$ e $0.15 \pm 0.04 \mu\text{M}$ respetivamente. Estes dois compostos revelaram-se também extremamente citotóxicos nas células altamente agressivas do cancro da mama triplo-negativo, MDAMB231, com valores de IC_{50} que ultrapassaram largamente o da cisplatina, $4.49 \pm 1.4 \mu\text{M}$ e $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$ respetivamente, na avaliação às 72h de incubação. Estes resultados indicam que esta família de compostos é promissora como potenciais agentes anti-tumorais.

Palavras-chaves

Cancro, agentes antitumorais, citotoxicidade, tiossemicarbazona, complexos de Ru^{II}, complexos de cobre

Abstract

Cancer is the second major cause of death in developed countries. It is expected that the number of deaths due to this disease increases by 70% over the next two decades.

The most common therapies for treatment of this disease are surgery, radiation and chemotherapy being hormone therapy and immunotherapy also used. Chemotherapeutic drugs can be divided into several groups according to their structure, mode of action and their interaction with other drugs. Cisplatin and its analogues have become the metallodrugs most used in the clinic for various types of cancer, being used alone or combined in many therapeutic regimens, irrespective of their lack of selectivity, strict limitations on dosage due to harsh side effects and development of resistance to treatment.

The search for new metallodrugs aims to overcome the disadvantages set out above, and simultaneously to develop new drugs that can be successfully used to treat cisplatin resistant tumors.

This work describes the synthesis and characterization of new organic and inorganic compounds, developed with the aim of finding new anti-cancer agents.

Three compounds belonging to the family of thiosemicarbazones (HL¹, HL² and HL³) were synthesized by condensation between 4-phenylthiosemicarbazide and heteroaromatic aldehydes, namely indole-3-carboxaldehyde, *N*-methylindole-3-carboxaldehyde and 2-benzofurancarboxaldehyde.

By reaction between these thiosemicarbazones and *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂] in the presence of silver triflate, three new octahedral complexes of ruthenium(II), complexes 1, 2 and 3, were obtained and formulated as [Ru(bipy)₂(HL)][CF₃SO₃]₂, with the ligand coordinated in neutral form to the ruthenium cation, through the sulfur and the imino nitrogen atoms.

By reaction between thiosemicarbazone HL¹, HL² and HL³ and CuCl₂ three new copper complexes, complex 4, 5 and 6, were synthesized. It was possible to formulate complexes 4 and 5 as [Cu(HL)₂]Cl, with copper in the oxidation state (I) and thiosemicarbazone coordinated in its neutral form (HL) through the sulfur and the imino nitrogen atoms.

The characterization of all synthesized compounds, thiosemicarbazones and complexes was done using spectroscopic techniques such as Nuclear Magnetic Resonance (¹H, ¹³C/APT, DEPT-135 and two-dimensional techniques), FTIR, UV-Visible, ESI-MS, Elemental Analysis (C, H, N, S)

and additionally, in the case of complexes 1, 2 and 3, their redox behavior was also studied by cyclic voltammetry.

The potential of thiosemicarbazones and Ru(II) complexes synthesized was evaluated as anti-tumor agents, studying their cytotoxicity in human tumor cell lines of breast cancer (MDA-MB-231) and ovarian cancer (A2780). The thiosemicarbazone HL² and the complex 2 showed very promising results, after a 72h incubation period, with IC₅₀ values of 4.5±1.7µM and 0.15±0.04µM, respectively, against A2780 cells. These two compounds proved to be also highly cytotoxic in the extremely aggressive cancer cell line (triple-negative breast) MDAMB231, with IC₅₀ values of 4.49±1.4µM e 0.11±0.02 µM (respectively), greatly exceeding that of cisplatin. These results indicate that this family of compounds is quite promising as potential antitumor agents.

Keywords

Cancer, anti-tumor agents, cytotoxicity, thiosemicarbazone, Ru(II) complexes, copper complexes

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Índice Geral.....	vi
Índice de Compostos.....	ix
Índices Figuras.....	xi
Índices de Esquemas.....	xiv
Índices de Tabelas.....	xv
Símbolos e Abreviaturas.....	xvii

Capítulo 1. Introdução

1.1. O Cancro: incidência na população Mundial.....	3
1.2. Terapias.....	5
1.3. Metalofármacos utilizados (actualmente) na terapia do cancro.....	6
1.4. Complexos de Ruténio.....	8
1.4.1. Complexos de ruténio em ensaios clínicos.....	8
1.4.2. Complexos Organometálicos de Ruténio.....	10
Complexos de Ruténio(II) com ligandos arenos.....	10
Complexos de ruténio(II) com ligandos ciclopentadienilos.....	13
1.4.3. Complexos inorgânicos de ruténio.....	15
Complexos de ruténio com ligandos polipiridínicos.....	15
1.5. Complexos de cobre.....	17
1.6. Ligandos orgânicos da família das tiossemicarbazona.....	17
Complexos de ruténio com co-ligandos tiossemicarbazona.....	19
Complexos de cobre com ligandos tiossemicarbazona.....	21
1.7. Enquadramento Geral.....	22

Capítulo 2. Síntese e caracterização de novos ligandos orgânicos do tipo aril-tiossemicarbazonas

2.1. Considerações Gerais.....	26
2.2. Análise e discussão de resultados.....	28
2.2.1. Ligando HL ¹	29
2.2.2. Ligando HL ²	32
2.2.3. Ligando HL ³	34
2.2.4. Ligando HL ⁴	36
2.2.5. Caracterização por espectroscopia de IV dos ligandos HL ¹ , HL ² e HL ³	37
2.2.6. Caracterização por espectroscopia de UV-vis dos ligandos HL ¹ , HL ² e HL ³	38

Capítulo 3. Síntese e Caracterização dos novos complexos de rutênio(II) com ligandos HL¹, HL² e HL³

3.1. Considerações Gerais.....	41
3.2. Análise e discussão de resultados.....	42
3.2.1. Caracterização por espectroscopia de RMN do precursor [<i>cis</i> -Ru(bipy) ₂ Cl ₂].....	42
3.2.2. Caracterização por espectroscopia de RMN e análise elementar dos complexos 1,2 e 3.....	44
3.2.3. Caracterização por espectroscopia de IV dos complexos 1,2 e 3.....	56
3.2.4. Caracterização por massa (ESI-MS) dos complexos 1,2 e 3.....	57
3.2.5. Caracterização por espectroscopia de UV-vis dos complexos 1,2 e 3.....	58
3.3. Estudos Electroquímicos por Voltametria Cíclica dos complexos 1,2 e 3.....	61
3.4. Estabilidade dos complexos 1,2 e 3.....	67

Capítulo 4. Síntese e Caracterização dos novos complexos de cobre com ligandos aril-tiossemicarbazonas HL¹, HL² e HL³

4.1. Considerações Gerais.....	72
4.2. Análise e discussão de resultados.....	72
4.2.1 Caracterização dos complexos de cobre por análise elementar, ESI-MS e espectroscopia de RMN.....	73
4.2.2. Caracterização por espectroscopia de IV dos complexos 4 e 5.....	80
4.2.3. Espectroscopia de UV-vis	81

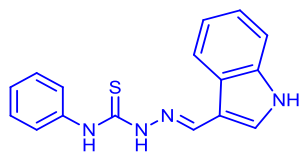
Capítulo 5. Estudos Biológicos

5. Estudos Biológicos.....	86
----------------------------	----

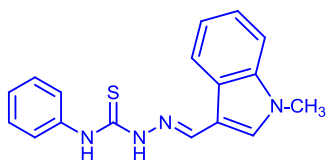
Capítulo 6. Descrição Experimental

6.1. Procedimentos Gerais.....	91
6.2. Métodos de caracterização.....	91
6.3. Síntese dos ligandos orgânicos.....	93
6.3.1. Procedimento geral de síntese.....	93
6.3.2. Ligando HL ¹	94
6.3.3. Ligando HL ²	95
6.3.4. Ligando HL ³	95
6.3.5. Tentativas de síntese do ligando HL ⁴	96
6.4. Síntese do precursor <i>cis</i> -bis(2,2'-bipiridina)dicloro rutênio(II) <i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂].....	97
6.5. Síntese dos complexos de Ru(II).....	98
6.5.1. Procedimento geral de síntese.....	98
6.5.2. Complexo 1.....	100
6.5.3. Complexo 2.....	101
6.5.4. Complexo3.....	102
6.6. Síntese dos complexos de cobre.....	102
6.6.1. Procedimento geral de síntese.....	103
6.6.2. Complexo 4.....	104
6.6.3. Complexo 5.....	104
6.7. Estudo de espectroscopia de Ultravioleta-Vísivel dos complexos (1)-(6) e estudo de estabilidade dos complexos (1)-(3).....	105
6.8. Estudo de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas.....	105
Capítulo 7. Conclusões e Pespectivas Futuras.....	109
Referências Bibliográficas.....	III
Anexos.....	X

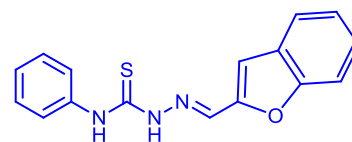
Índice de Compostos



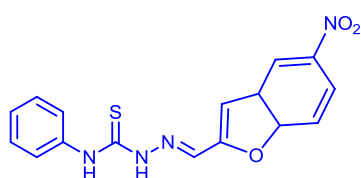
Ligando HL¹



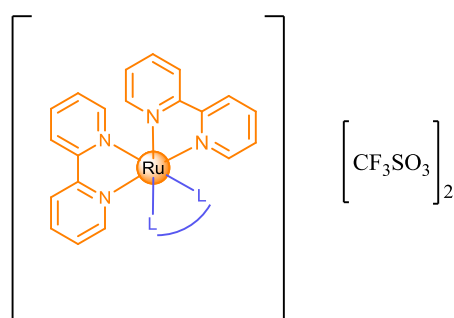
Ligando HL²



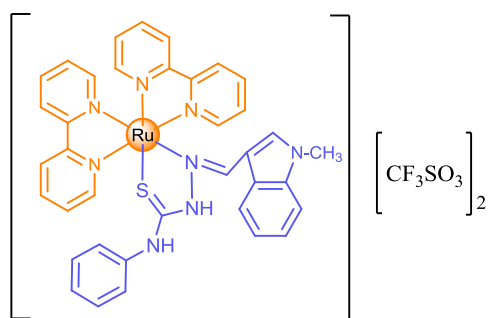
Ligando HL³



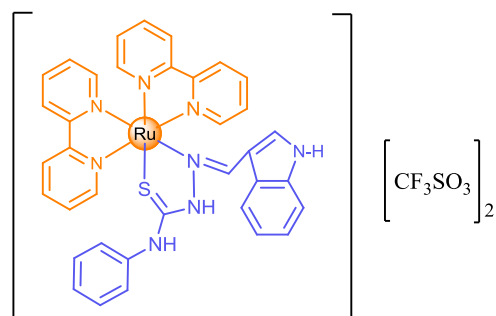
Ligando HL⁴



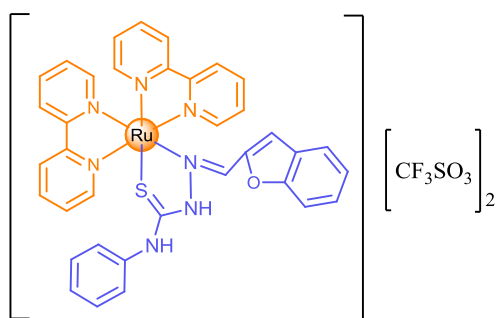
Precursor *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂]



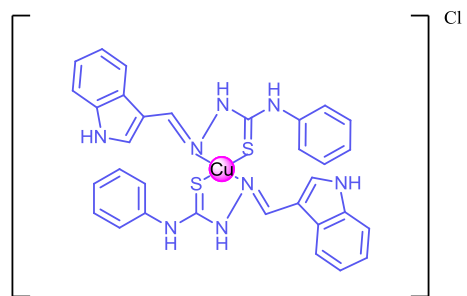
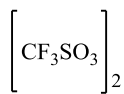
Complexo 1



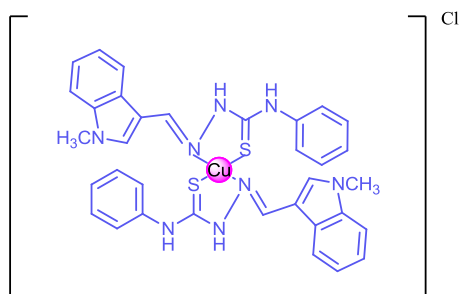
Complexo 2



Complexo 3



Complexo 4



Complexo 5

Índice de figuras

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1.1 – Esquema representativo de como as células cancerosas se multiplicam, sucessivamente originando um tumor. (Adaptado) ⁴	4
Figura 1.2 – Mortalidade por cancro: distribuição por sexos do número previsto de mortes na União Europeia em 2015 ⁸	4
Figura 1.3 – Fórmula estrutural dos metalofármacos de platina atualmente em uso clínico em quimioterapia.....	7
Figura 1.4 – Estruturas químicas dos agentes antitumorais NAMI-A e KP1019, os primeiros compostos de ruténio submetidos a ensaios clínicos.....	9
Figura 1.5 – Fórmula estrutural de complexos com o fragmento “Ru(η^6 -areno)” com atividade anti-tumoral.....	12
Figura 1.6 – Fórmula estrutural de complexos diméricos [Ru ₂ (<i>p</i> -cym) ₂ (R-TSC) ₂]X ₂ de ruténio(II) com ligandos do tipo tiossemicarbazona (R=H; CH ₃ ; CH ₂ CH ₃ ; CH ₆ CH ₅ e X= Cl; PF ₆).....	12
Figura 1.7 – Fórmula estrutural dos complexos [RuCp(bipy)(PPh ₃)] [CF ₃ SO ₃] (esquerda) e [RuCp(Me ₂ bipy)(PPh ₃)] [CF ₃ SO ₃] (direita).	14
Figura 1.8 – Estaurosporina (esquerda) e um exemplo do complexo organometálico inspirado na sua estrutura e desenvolvido por Meggers (direita).....	14
Figura 1.9 - Fórmulas de estruturas de alguns complexos polipiridínicos de ruténio: [Ru(II)(bipy)(terpy)]Cl, <i>cis</i> – [Ru(II)(bipy) ₂ Cl ₂] e <i>mer</i> – [Ru(II)Cl ₃ (terpy)].....	16
Figura 1.10 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas (R ¹ ,R ² ,R ³ ,R ⁴ ,R ⁵ : H, arilo ou alquilo).....	18
Figura 1.11 – Estrutura do heterocíclico-N ₃ -tiossemicarbazona e de derivado de tiossemicarbazona isatina- β	19
Figura 1.12 – Estrutura química do agente antitumoral inorgânico de ruténio [Ru(Cl) ₂ (PPh ₃) ₂ (Y-TSC)] (Y=Cl; NO ₂).....	20
Figura 1.13 – Estrutura do exemplo do complexo de ruténio ⁴⁸	21
Figura 1.14 - Exemplos de tiossemicarbazonas piridoxal e formiluracil.....	22
Figura 1.15 – Fórmula estrutural dos ligandos orgânicos que se propôs desenvolver.....	22

Capítulo 2- Síntese e caracterização dos novos ligandos orgânicos do tipo aril-tiossemicarbazonas

Figura 2.1 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas (R ₁ ,R ₂ ,R ₃ ,R ₄ ,R ₅ : H, arilo ou alquilo).....	26
--	----

Figura 2.2 - Confórmeros <i>syn</i> e <i>anti</i> existentes de tiossemicarbazonas.....	26
Figura 2.3 - Equilíbrio tautomérico estabelecido em solução entre as formas tiona e tiol de tiossemicarbazonas	27
Figura 2.4 – Estrutura do ligando HL ¹ e numeração dos respetivos protões e carbonos.....	29
Figura 2.5 – Correlações NOESY observadas para o ligando HL ¹	31
Figura 2.6 - Estrutura do ligando HL ² e numeração dos respetivos protões e carbonos.....	32
Figura 2.7 – Correlações NOESY observadas para o ligando HL ²	33
Figura 2.8 - Estrutura do ligando HL ³ e numeração dos respetivos protões e carbonos.....	34

Capítulo 3 – Síntese e caracterização dos novos complexos de Ru(II) com os ligandos HL¹, HL² e HL³

Figura 3.1 - Estrutura proposta para o complexo [Ru(bipy) ₂ (HL ¹)] [CF ₃ SO ₃] (complexo 1).....	45
Figura 3.2 – Espectro de NMR 1H em DMSO para Complexo 1 , HL ¹ e <i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	46
Figura 3.3 - Estrutura proposta para o complexo [Ru(bipy) ₂ (HL ²)] [CF ₃ SO ₃] (complexo 2).....	49
Figura 3.4 – Espectro de NMR 1H em DMSO para complexo 2 , ligando HL ² e <i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	49
Figura 3.5 - Estrutura proposta para o complexo [Ru(bipy) ₂ (HL ³)] [CF ₃ SO ₃] (complexo 3).....	52
Figura 3.6 – Espectro de NMR ¹ H em DMSO para Complexo 3 , ligando HL ³ e <i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	53
Figura 3.7 - Formação da espécie monopositiva durante o processo de ionização do complexo 1	58
Figura 3.8 – Espetro eletrónico ligando HL ¹ (C _{ligando HL¹} =1,42x10 ⁻⁵ M), precursor <i>cis</i> -Ru(bipy) ₂ Cl ₂ (C _{precursor} =2,02x10 ⁻⁵ M) e complexo 1 (C _{complexo 1} =8,70x10 ⁻⁶ M), em DMSO.....	60
Figura 3.9 – Espetro eletrónico ligando HL ² (C _{ligando HL²} =1,44x10 ⁻⁵ M), precursor <i>cis</i> -Ru(bipy) ₂ Cl ₂ (C _{precursor} =2,02x10 ⁻⁵ M) e complexo 2 (C _{complexo 2} =9,55x10 ⁻⁶ M), em DMSO.....	61
Figura 3.10 – Espetro eletrónico ligando HL ³ (C _{ligando HL³} =1,42x10 ⁻⁵ M), precursor <i>cis</i> -Ru(bipy) ₂ Cl ₂ (C _{precursor} =2,02x10 ⁻⁵ M) e complexo 3 (C _{complexo 3} =6,70x10 ⁻⁶ M), em DMSO.	61
Figura 3.11 – Voltamograma cíclico do ligando HL ¹ em ACN (ν = 200 mV.s ⁻¹).....	63
Figura 3.12 - Voltamograma cíclico do ligando HL ² em DCM (ν = 200 mV.s ⁻¹).....	63
Figura 3.13 - Voltamograma cíclico do ligando HL ³ em ACN (ν = 200 mV.s ⁻¹).....	63
Figura 3.14 - Voltamograma cíclico do complexo [Ru(bipy) ₂ Cl ₂] em ACN (ν = 200 mV.s ⁻¹); a azul processo redox quase-reversível observado na zona -0,5V a 1V e atribuído ao centro de ruténio.....	64

Figura 3.15 - Voltamograma cíclico do complexo 1 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN ($v = 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), evidenciando o processo a vermelho associado ao centro metálico e o processo azul associado às bipyridinas.....	65
Figura 3.16 - Voltamograma cíclico do complexo 1 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN a diferentes velocidades de varrimento na zona de potencial -0.4V a 0.8V; (1) pico de adsorção, (2) processo redox atribuído ao centro metálico Ru(II)/Ru(III).....	65
Figura 3.17 – Voltamograma cíclico do complexo 1 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN na zona de potenciais negativos, evidenciando os redox quasi-reversíveis a processos atribuídos aos ligandos negativos, evidenciando os redox quasi-reversíveis processos atribuídos aos ligandos bipyridina coordenados.....	66
Figura 3.18 - Voltamograma do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN ($v= 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$); processo a azul associado a oxidação Ru(II)/Ru(III).....	65
Figura 3.19 - Voltamograma do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DCM ($v= 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$); processo a tracejado é o processo correspondente ao centro metálico.....	67
Figura 3.20 – Espectro de estabilidade do complexo 1 , ($C_{\text{complexo 1}}=2,00\text{E}^{-5}$).....	68
Figura 3.21 – Espectro de estabilidade do complexo 2 , ($C_{\text{complexo 2}}=3,60\text{E}^{-5}$).....	68
Figura 3.22 – Espectro de estabilidade do complexo 3 , ($C_{\text{complexo 3}}=2,00\text{E}^{-5}$).....	69

Capítulo 4 – Síntese e caracterização dos complexos de cobre com os ligandos aril-tiossemicarbazonas HL¹, HL² e HL³

Figura 4.1 - Estrutura proposta para o complexo 4 $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ e numeração dos respectivos prótons e carbonos.....	74
Figura 4.2 – Espectro de NMR ¹ H em DMSO para complexo 4 e o respectivo ligando HL ¹	75
Figura 4.3 - Estrutura proposta para o complexo 5 $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2\text{Cl}]$ e numeração dos respectivos prótons e carbonos.....	77
Figura 4.4 – Espectro de NMR ¹ H para complexo 5 e HL ² em DMSO- <i>d</i> ₆	78
Figura 4.5 – Espetro eletrónico do complexo $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^1)_2]$ em dimetilsulfóxido e dimetilformamida.....	82
Figura 4.6 – Espetro eletrónico do complexo $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^2)_2]$ em dimetilsulfóxido e dimetilformamida.....	82
Figura 4.7 – Espetro eletrónico do ligando HL ¹ e complexo 4 em DMSO.....	83
Figura 4.8 – Espetro eletrónico do ligando HL ² e complexo 5 em DMSO.....	83

Índice de esquemas

Capítulo 2- Síntese e caracterização de novos ligandos orgânicos do tipo aril-tiossemicarbazonas

Esquema 2.1 - Mecanismo reacional geral da síntese de tiossemicarbazonas.....27

Esquema 2.2 - Esquema geral de síntese das tiossemicarbazonas obtidas neste trabalho.....28

Esquema 2.3 –Esquemas das sínteses realizadas para o ligando HL⁴36

Capítulo 3 – Síntese e caracterização dos novos complexos de Rutênio(II) com ligandos HL¹, HL² e HL³

Esquema 3.1- Esquema de síntese do composto de partida *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].....42

Esquema 3.2 - Síntese geral dos complexos **1,2** e **3** (L=Ligando HL¹, HL² e HL³), isolados com o contra-íon triflato.....42

Capítulo 4 – Síntese e caracterização dos complexos de cobre com os ligandos aril-tiossemicarbazonas HL¹, HL² e HL³

Esquema 4.1 - Síntese geral dos complexos **4,5** e **6**72

Capítulo 6 – Descrição Experimental

Esquema 6.1 - Esquema geral da síntese dos ligandos.....93

Esquema 6.2 - Esquema de síntese do precursor *cis*-[(bipy)₂RuCl₂].....98

Esquema 6.3 - Esquema geral da síntese dos complexos de rutênio (L=HL¹, HL², HL³).....99

Esquema 6.4 - Esquema geral da síntese dos complexos de cobre (L=HL¹, HL², HL³).....103

Índice de Tabelas

Capítulo 2- Síntese e caracterização de novos ligandos orgânicos do tipo aril-tiossemicarbazonas

Tabela 2.1 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para a o ligando HL ¹ em DMSO- <i>d</i> ₆	30
Tabela 2.2 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o ligando HL ¹ em DMSO- <i>d</i> ₆	30
Tabela 2.3 – Resultados de análise elementar para o ligando HL ¹	32
Tabela 2.4 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o ligando HL ² em DMSO- <i>d</i> ₆	33
Tabela 2.5 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o ligando HL ² em DMSO- <i>d</i> ₆	33
Tabela 2.6 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o ligando HL ²	34
Tabela 2.7 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o ligando HL ³ em DMSO- <i>d</i> ₆	35
Tabela 2.8 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o ligando HL ³ em DMSO- <i>d</i> ₆	35
Tabela 2.9 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o ligando HL ³	36
Tabela 2.10 - Dados espectroscópicos de IV para os ligandos HL ¹ , HL ² e HL ³	37
Tabela 2.11 - Dados obtidos dos espectros electrónicos de UV-vis relativos aos ligandos HL ¹ , HL ² e HL ³	38

Capítulo 3 – Síntese e caracterização dos novos complexos de ruténio(II) com os ligandos HL¹, HL² e HL³

Tabela 3.1 - Resultados de RMN ^1H 1D e COSY para o composto de partida <i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	43
Tabela 3.2 - Resultados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o composto de partida <i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂] em DMSO- <i>d</i> ₆	43
Tabela 3.3 - Resultados de RMN ^1H 1D e COSY obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ para o complexo 1 [Ru(bipy) ₂ (HL ¹)] [CF ₃ SO ₃] ₂	46
Tabela 3.4 - Resultados de RMN ^{13}C 1D e 2D obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ para o complexo 1 [Ru(bipy) ₂ (HL ¹)] [CF ₃ SO ₃] ₂ em DMSO- <i>d</i> ₆	47
Tabela 3.5 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo 1.....	48

Tabela 3.6 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo 2 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ em $\text{DMSO-}d_6$	50
Tabela 3.7 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo 2 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ em $\text{DMSO-}d_6$	51
Tabela 3.8 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo 2	52
Tabela 3.9 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo 3 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ em $\text{DMSO-}d_6$	53
Tabela 3.10 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo 3 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ em $\text{DMSO-}d_6$	54
Tabela 3.11 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo 3	55
Tabela 3.12 – Dados espectroscópicos de IV dos complexos 1, 2 e 3	56
Tabela 3.13 – Dados espectroscópicos de UV-Vis dos complexos 1, 2 e 3 (Sh =Ombro).....	59
Tabela 3.14 – Dados electroquímicos dos ligandos HL¹, HL², HL³ , do precursor <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ e complexo 1 , complexo 2 e complexo 3	62

Capítulo 4 – Síntese e caracterização dos complexos de cobre com os ligandos aril-tiossemicarbazonas **HL¹, HL² e HL³**

Tabela 4.1 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo 4	73
Tabela 4.2 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo 4 $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$	74
Tabela 4.3 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo 4 $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$	75
Tabela 4.4 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo 5	77
Tabela 4.5 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo 5 $[\text{Cu}(\text{HL}^2)\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$	77
Tabela 4.6 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo 5 $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$	78
Tabela 4.7 – Dados espectroscópicos de IV dos complexos 4 e 5	80
Tabela 4.8 – Dados espectroscópicos de UV-Vis do complexo 4 e complexo 5	81

Capítulo 5 – Estudos Biológicos

Tabela 5.1 – Valores de IC₅₀ (μM ± desvio padrão) obtidos para os Ligandos HL¹, HL² e HL³, complexos (1),(2) e (3) e fármaco de referência para a linha celular A2780 (após 72h e 24h) e MDAMB231 (após 72h), a 37°C.....87

Capítulo 6 – Descrição Experimental

Tabela 6.1 - Condições reacionais para a síntese dos compostos tiossemicarbazona.....94

Tabela 6.2 - Condições reacionais para a síntese dos complexos de rutênio.....99

Tabela 6.3 - Condições reacionais para a síntese dos complexos de cobre.....103

Símbolos e Abreviaturas

3-AB -3-Aminobenzamida

A2780 - Linha celular do carcinoma humano do ovário

A2780cisR – Linha celular do carcinoma humano do ovário resistente à cisplatina

Abs - Absorvância

ACN - Acetonitrilo

AE - Análise Elementar

bipy - 2,2' - bipyridina

BEL-7404 - Linha celular do cancro de fígado

CDDP - Cisplatina

CEM55 - linhagens de leucemia

Cis - Cisplatina

COSY – Espectroscopia de Correlação (**CO**rrelation **S**pectroscop**Y**)

Cp - Ciclopentadienilo

Cu - Cobre

CV - Cyclic Voltametry (voltametria cíclica)

cym - Cimeno

d – Duplete (RMN)

DCM - Diclorometano

DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF - Dimetilformamida

DMSO - Dimetisulfóxido

DNA - Desoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

en – Etilenodiamina

ESI-MS - Espectrometria de **M**assa com Ionização de **E**lectro-**S**pray

Et - Etilo

Et al. - et alii (e outros)

EtOH - etanol

ETDT- éter dietílico

FDA - Food and Drug Administration

FTIR - Infravermelho por transformada de Fourier (**F**ourier **T**ransform **I**nfra**R**ed)

GSK -3 - Inibidor

HCT 116 - Linha celular do carcinoma colo-rectal

HEK-293T - Linha celular do carcinoma colo-rectal

HEX - Hexano

HMBC - Heteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation

HMQC - Heteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence

HT-29 - Linha celular do carcinoma colo-retal

IC₅₀ - concentração do citostático que inibe a proliferação celular em 50%

IV - Infravermelho

i.v - intravenosa

K562 - linhagens de leucemia humana

KB-V1 - Linha celular P-glicoproteína

KP1019 - *trans*-[tetraclorobis(1H-indazole)rutenato^{III} de indazólio

L→M - Transferência eletrónica ligando→metal

m - multiplete (RMN)

M - Molar (moles por litro)

MCF7 - Linha celular do cancro da mama

MDAMB231 - Linha celular do cancro da mama

Me₂bipy - 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina

mL - Mililitro

m/Z - razão massa/carga

M→L - Transferência eletrónica metal→ligando

MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NAMI-A - *trans*-imidazoledimetilsulfóxidotetraclororutenato^{III} de imidazólio

NOESY - Nuclear Overhauser effect spectroscopy

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARP - Poli-(ADP-ribose)-polimerase

PC3 - Linha celular do cancro da próstata

PDTC - Complexo de cobre(II) com o ligando pirrolidina ditiocarbamato

Ph – Fenilo

phen - Diimina 1,10-fenantrolina

PIM-1 - Cinase Proteica

PPh₃ - Trifenilfosfano

ppm - Partes por milhão

Pt – Platina

PTA - 1,3,5-triaza-7-fosfoadamanteno

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de próton

s - Singleto (RMN)

SGC-7901 - Linha celular do cancro gástrico humano

t – Tripleto (RMN)

terpy - 2,2': 6',2'' – terpiridina

TMS - Tetrametilsilano

TSC - Ligando tiossemicarnazona

UV-Vis - Espectroscopia de Ultravioleta e Visível

U937 - Linhagens de leucemia humana

WHO - World Health Organization

FDA - Food and Drug Administration

RAPTA – Classe de compostos de ruténio(II) com o ligando pta e um ligando η^6 -areno

RNA - Ácido ribonucleico

Ru - Ruténio

δ /ppm – Desvio químicos em partes por milhão

ϵ - Coeficiente de absorvidade molar (UV-Vis)

λ - Comprimento de onda

ν - Frequência máxima de absorção em IV

°C - Graus Celsius

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Introdução

1.1.0 Cancro: incidência na população Mundial

O corpo humano é constituído por triliões de células, que normalmente crescem e se dividem para formar outras células necessárias ao organismo. Quando essas células envelhecem ou ficam danificadas, morrem e são substituídas por novas células, formando-se assim um ciclo celular.¹ Este equilíbrio pode ser perturbado. Ao se formarem novas células, sem que o organismo necessite e, ao mesmo tempo, se as células velhas não morrerem, originam-se tumores, que podem ser benignos ou malignos.²

Nos tumores benignos as células não se disseminam para os tecidos envolventes (ou para outras partes do organismo).²

Nos tumores malignos as células podem invadir e danificar os tecidos e órgãos circundantes, e, por vezes, libertar-se do tumor primário e entrar na corrente sanguínea ou no sistema linfático, formando novos tumores noutros órgãos (processo que se designa por metastização) (figura 1.1).² Assim, cancro é o nome genérico dado a um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais e pela sua rápida propagação, sendo uma doença que tem origem em alterações genéticas que controlam a forma como as células crescem e se dividem, alterando os processos normais do ciclo celular. Estas alterações podem ser hereditárias ou de origem ambiental (provocadas por exemplo, por exposição a substâncias, como os produtos químicos do tabaco, ou radiação, como os raios ultravioleta do sol).^{1,3}

Um cancro pode desenvolver-se em praticamente qualquer parte do corpo, consoante o tipo de células/tecidos envolvido nesse processo, e cada tipo de cancro é nomeado de acordo com o órgão em que se manifesta.²

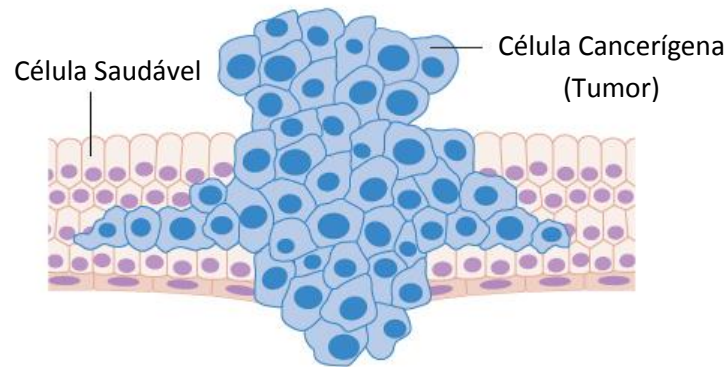


Figura 1.1 – Esquema representativo de como as células cancerosas se multiplicam, sucessivamente originando um tumor. (Adaptado)⁴

O cancro tem um impacto social considerável. É considerado a segunda maior causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a terceira doença líder em mortalidade nos países em desenvolvimento,⁵ tendo sido a causa de 8,2 milhões de mortes em 2012 por todo o mundo, de acordo com o relatório *Globocan 2012* e da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁶. Também segundo a OMS, a estimativa de óbitos devidos a cancro é de 13,1 milhões no mundo para 2030.³

As previsões para 2015 de mortalidade associada ao cancro a nível mundial são proporcionalmente maiores no sexo masculino do que no sexo feminino (13% e 10%, respectivamente).⁷ Os tipos de cancro diagnosticados mais frequentemente diferem entre homens e mulheres, sendo que para os homens os mais frequentes são os cancros do pulmão, intestino (cólon e reto) e próstata e para as mulheres os cancros da mama, pulmão e intestino (cólon e reto) – figura 1.2.

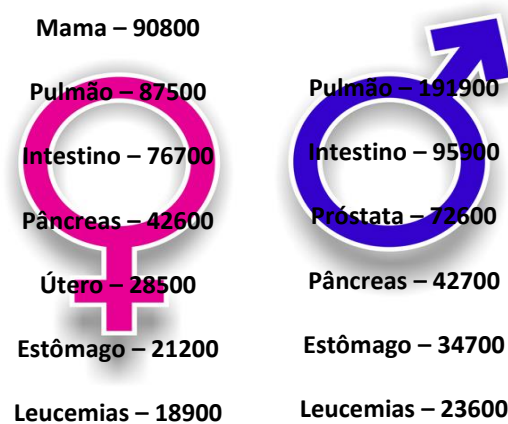


Figura 1.2 – Mortalidade por cancro: distribuição por sexos do número previsto de mortes na União Europeia em 2015⁸.

Embora as estimativas mostrem um crescente aumento da incidência destas doenças em ambos os sexos (em parte como consequência do aumento da população e do seu envelhecimento), a taxa de mortalidade por cancro tem vindo a diminuir, entre as mulheres desde 1970 e entre os homens desde 1985. Este aumento na taxa de sobrevivência é devido a melhores tratamentos, particularmente graças ao desenvolvimento de fármacos anticancerígenos mais eficientes.⁵

Apesar de se desconhecer muitos dos mecanismos do desenvolvimento desta doença, muitos foram os progressos já feitos no sentido de prolongar o tempo e a qualidade de vida dos pacientes. No entanto existem tipos de cancro para os quais não há ainda tratamento eficiente, em que muitas das opções terapêuticas existentes são acompanhadas por efeitos secundários extremamente debilitantes. A investigação nesta área é importante, urgente e crucial para encontrar agentes terapêuticos mais eficientes e mais selectivos.

1.2.Terapias

Os tipos de tratamento do cancro atualmente existentes são vários e o critério de seleção da terapia a aplicar varia consoante o tipo de neoplasia em causa. As terapias mais utilizadas são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podendo também recorrer-se à imunoterapia e terapia hormonal.

A cirurgia é utilizada em casos em que a massa de células anormais é bem definida e delimitada (caso em que o tumor ainda não se encontra espalhado pelo organismo, não metastizou, estando numa fase inicial), podendo todavia ser difícil distinguir o tecido saudável do não saudável.⁴ Outra opção de tratamento é a radioterapia, no qual a radiação utilizada consegue interatuar com as células de rápido crescimento visto que as células tumorais têm um défice em genes reparadores do DNA, ficando mais vulneráveis a uma gama de radiação mais intensa.⁴ Existem vários tipos de radiação: a radiação externa (provém de uma máquina emissora); radiação interna (provém de material radioactivo que é implantado no doente – radiação por implante ou braquiterapia) e radiação sistémica (se tem origem em isótopos radioactivos administrados ao doente, sendo o material absorvido pelas células malignas).⁹ A imunoterapia ou terapia biológica baseia-se na capacidade natural do nosso organismo para combater o cancro através do sistema imunitário, ajudando a reparar, estimular ou elevar as respostas imunes do organismo.¹⁰ Os principais tipos de imunoterapia atualmente utilizados incluem:^{11,12} anticorpos monoclonais, no qual se visa acoplar estes anticorpos às células

cancerígenas, impedindo o seu crescimento; vacinas que ao serem introduzidas no organismo, iniciam uma resposta imune contra determinados agentes; e imunoterapias não específicas, que procuram melhorar as funções do sistema imunitário. Estes tratamentos são, em geral, introduzidos por via intravenosa para que os fármacos usados possam circular através da corrente sanguínea, de forma sistêmica, podendo ser administrados em regime ambulatorio. A terapêutica hormonal é outra forma de terapia do cancro e pode funcionar de duas formas: parar a produção de determinadas hormonas ou para impedir que determinadas hormonas atinjam as células malignas. Apenas os tipos de cancros que expressam recetores hormonais específicos é que podem ser tratados deste modo, como é o caso de alguns tipos de cancro da mama e da próstata.⁴

No entanto, o método mais utilizado no combate ao cancro é sem dúvida a quimioterapia, que consiste na administração de fármacos, quer sejam metalofármacos ou compostos orgânicos, usualmente por via intravenosa embora também possam ser administrados por via oral. Maioritariamente estes agentes têm como alvo a molécula de DNA e são capazes de interatuar com ela fazendo com que a sua replicação seja quase interrompida, impedindo assim que as células cancerígenas permaneçam em contínua e descontrolada divisão, eventualmente provocando a morte celular.⁴

1.3.Metalofármacos utilizados (atualmente) na terapia do cancro

Apesar dos metais de transição ocuparem uma importante posição em processos biológicos, os metalofármacos são desvalorizados pela indústria farmacêutica, que tradicionalmente aposta mais no desenvolvimento de moléculas orgânicas.¹³ No entanto, face a uma molécula orgânica, um metalofármaco (que contém um ião metálico ligado a moléculas orgânicas, designadas por ligandos) pode oferecer a possibilidade de seleccionar o metal e os seu(s) ligando(s), permitindo combinar sinergicamente o efeito terapêutico do ião metálico com o efeito terapêutico do ligando, podendo obter-se assim um agente com um desempenho global mais promissor que o ligando só por si só. Alguns compostos de coordenação são utilizados na terapêutica de várias doenças, como por exemplo, complexos de ouro contra a artrite, fármacos de bismuto contra úlceras ou, os compostos de platina contra o cancro.¹³

A cisplatina, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (figura1.3), cujas propriedades anticancerígenas foram descobertas nos anos 60 por Barnet Rosenberg, marcou o início da investigação em

metalofármacos para o tratamento do cancro, sendo juntamente com os seus análogos carboplatina e oxiplatina, um dos agentes quimioterapêuticos mais eficazes em uso clínico a nível mundial.¹⁴

O mecanismo de acção da cisplatina no interior da célula é bem conhecido. Sabe-se que depois de hidrolisado, o centro metálico de Pt(II) interage diretamente com o DNA formando aductos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais.¹⁵ No entanto, a cisplatina apresenta diversos efeitos secundários severos, nos quais se incluem, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade, além de uma resistência intrínseca ou adquirida de alguns tipos de tumores a este tratamento, limitando muito a sua aplicação.^{15,16}

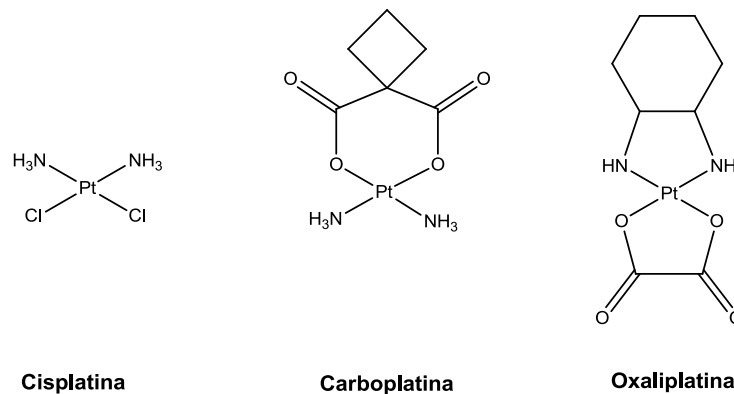


Figura 1.3 – Fórmula estrutural dos metalofármacos de platina atualmente em uso clínico em quimioterapia.

Estes fatores desencadearam um enorme interesse no desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos de platina, com vista a reduzir a sua toxicidade e/ou aumentar a sua actividade em casos onde existia resistência do tumor ao tratamento com a cisplatina, seja ela primária ou adquirida, de forma a melhorar a sua potencial eficiência clínica.^{17,18} Assim, nos últimos 30 anos foram sintetizados e avaliados enquanto potenciais agentes anticancerígenos centenas de compostos de platina, mas apenas dois, a carboplatina e a oxaliplatina (figura 1.3) entraram em uso clínico mundial, em 1993 e 2002, respectivamente.

Estes compostos diferem da cisplatina, na sua estabilidade à hidrólise, que é aumentada pela presença de ligandos bidentados. Em conjunto com a cisplatina, a sua expressão como agentes anti-tumorais a nível mundial é bastante significativa, participando em mais de 50% dos regimes quimioterapêuticos.¹⁵

A carboplatina aprovada pela FDA em 1989 é usada, em conjunto com outros medicamentos ou sozinha, para o tratamento do cancro do pulmão (caso de cancro recidivo ou associado a metástases e não podendo ser tratado por cirurgia) e para o cancro do ovário

(caso de cancro recidivo após o tratamento com quimioterapia, cancro não tratado e em estado avançado de evolução, ou como tratamento paliativo).¹ A carboplatina está também a ser estudada para o tratamento de outros tipos de cancro.¹

A oxaliplatina foi o primeiro fármaco a ser aprovado capaz de superar a resistência tumoral através da formação de diferentes aductos com o DNA,¹⁷ pensando-se que o ligando oxalato seja o responsável pela diminuição significativa dos efeitos secundários quando comparado à cisplatina.¹⁷ Este fármaco está aprovado para ser usado com outros medicamentos para o tratamento do cancro colo-retal (recidivo ou em estado avançado) e na fase III do cancro do colón, sendo usado como terapia adjuvante em pacientes que tiveram cirurgia para remover o cancro; ¹ está também a ser estudada para o tratamento de outros tipos de cancro.¹

A procura de compostos antitumorais eficientes com outros centros metálicos, para além da platina, intensificou-se ao longo dos anos.¹⁹ Entre as vantagens de usar outros iões de metais de transição estão: uma acessibilidade de locais de coordenação adicionais em complexos octaédricos, alterações na afinidade dos ligandos e cinética de substituição e, variabilidade de estados de oxidação disponíveis.²⁰ Neste contexto, quer o ruténio quer o cobre se têm salientado como bastante promissores, como será focado nos subcapítulos seguintes.

1.4.Complexos de ruténio

1.4.1. Complexos de ruténio em ensaios clínicos

O ruténio possui uma série de características que o torna uma alternativa interessante relativamente à platina tais como: a possibilidade de oferecer várias posições de coordenação devido à sua geometria de coordenação octaédrica; o facto de ter uma química muito rica pois tem capacidade de assumir diversos estados de oxidação acessíveis biologicamente (Ru^{II}, Ru^{III} e Ru^{IV}) e a possibilidade de combinação com ligandos que podem modular a sua atividade.¹⁹

A reduzida toxicidade dos compostos de ruténio, quando comparada com os de platina, é frequentemente atribuída à sua capacidade de mimetizar o ferro na ligação a várias moléculas biológicas, tais como a transferrina. Como as células cancerosas têm uma elevada divisão celular e necessitam assim de uma quantidade maior de ferro, os recetores de transferrina são expressados nestas células em maior quantidade que uma célula saudável, e

assim a ligação dos fármacos de ruténio possibilita uma distribuição mais eficiente nas células cancerosas.¹⁴

Os casos de sucesso entre os compostos de ruténio são os dois agentes antitumorais de Ru(III), *trans*-imidazoledimetilsulfóxidotetraclororutenato^{III} de imidazólio, conhecido como NAMI-A, e *trans*-[tetraclorobis(1H-indazole)rutenato^{III} de indazólio (conhecido como KP1019) encontrando-se ambos na fase II de ensaios clínicos (figura 1.4).²¹ Embora a sua estrutura seja muito semelhante, a sua resposta biológica é completamente diferente.

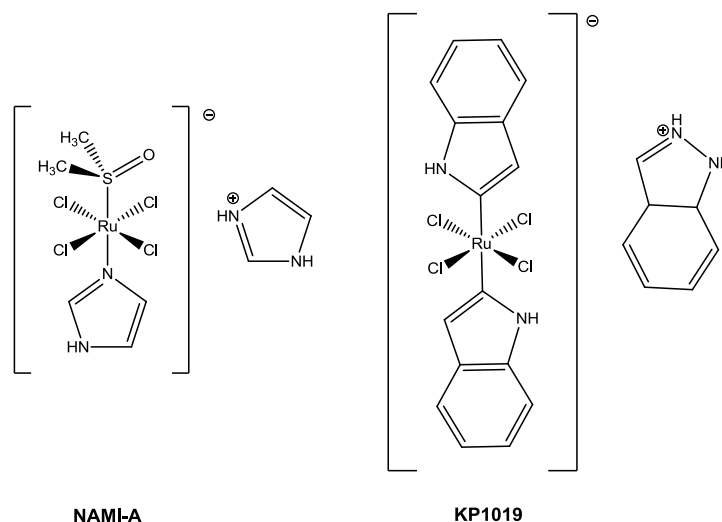


Figura 1.4 – Estruturas químicas dos agentes antitumorais NAMI-A e KP1019, os primeiros compostos de ruténio submetidos a ensaios clínicos.

Desenvolvido por Alessio e Sava, o primeiro agente de ruténio a dar entrada em estudos clínicos foi o NAMI-A (figura 1.4). Em estudos preliminares *in vitro*, o NAMI-A, mostrou-se completamente inativo contra mais de 60 linhas celulares tumorais primárias. No entanto, a avaliação *in vivo* mostrou que, embora sem interferir com o tumor primário, este agente impede a formação de novas metástases nos pulmões e reduz o tamanho das metástases já formadas.²² A atividade do NAMI-A é mais eficiente nos pulmões onde o tempo de meia-vida de eliminação é cerca de oito vezes superior ao observado nas massas do tumor primário, provavelmente devido ao elevado conteúdo em colagénio ao qual o NAMI-A se liga eficientemente.²² Além disso, foi observado que o NAMI-A se liga mais fortemente a proteínas transportadoras existentes no sangue, como a transferrina ou albumina, não sendo o DNA o seu principal alvo, pois a interação é muito reduzida quando comparada com a de complexos de platina.^{14,23}

O KP1019, o segundo agente antitumoral de ruténio que progrediu até à fase de ensaios clínicos, foi desenvolvido por Keppler e, contrariamente ao observado ao NAMI-A,

apresenta citotoxicidade contra tumores primários. A sua atividade foi testada *in vivo* em tumores colo-retais de ratos, tendo-se mostrado eficiente na redução da massa do tumor, enquanto que a cisplatina se mostrou inativa.^{13,14} O KP1019 liga-se muito rapidamente à albumina e é muito eficientemente transportado por esta proteína. Na vizinhança das células tumorais liga-se à transferrina e é transportado para dentro da célula através do recetor de transferrina.¹⁹ Está estudado que na presença de transferrina e albumina em condições que mimetizam as condições do plasma (onde a concentração de cada uma destas proteínas é muito diferente) a maior parte da espécie de Ruténio (80-90%) no fluxo de sangue está ligado a albumina, ao passo que a transferrina é assumido para desempenhar um papel importante no processo de transporte da droga.^{13,14,24} Um dos obstáculos associados à progressão nos testes clínicos dos complexos de coordenação de ruténio mencionados (NAMI-A e KP1019) é a sua grande instabilidade em solução aquosa e o complicado mecanismo de troca de ligandos.²⁵

Várias famílias de complexos de ruténio têm sido estudadas, tais como complexos organometálicos com ligandos areno e ciclopentadienilo^{21,25}, e complexos inorgânicos de ruténio(II) com ligandos polipiridínicos.^{26,27} É de esperar que com um aumento da estabilidade origine candidatos a fármacos antitumorais mais promissores.

1.4.2. Complexos Organometálicos de Ruténio

Complexos de Ruténio(II) com ligandos areno

O alvo biológico “clássico” para aplicações quimioterapêuticas de metalofármacos considerou-se ser, durante muito tempo, o DNA. A estratégia de síntese dos complexos de ruténio foi baseada nos modelos da platina, conduzindo a compostos que provocassem a morte celular por interação com o DNA, embora visando preferencialmente novos mecanismos de ação de modo a vencer a resistência das células tumorais. Neste contexto, vários complexos organometálicos de ruténio(II) foram sintetizados tendo em vista o DNA como alvo principal.²⁸ Assim, foram desenvolvidas e estudadas, fundamentalmente, duas famílias de complexos organometálicos (figura 1.5): complexos de ruténio(II)-(η^6 -areno), como por exemplo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{en})\text{Cl}]^+$ (en=etilenodiamina) (figura 1.5); complexos conhecidos como RAPTA e sintetizados por Dyson e os seus colaboradores, que são compostos organometálicos de ruténio(II)-areno com o ligando PTA (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamanteno) (figura 1.5).¹⁴

Em ambos os casos, a estrutura básica assenta numa geometria do tipo “banco de piano”²⁹ baseando-se a sua reatividade na saída dos ligandos cloreto, tal como acontece com a cisplatina.

Os complexos de Ru(II)(areno) (desenvolvidos por Sadler e colaboradores) são estáveis, na sua maioria são bastantes solúveis em água e, na forma de sal hexafluorofosfato, demonstraram ser ativos tanto *in vitro* como *in vivo* contra a linha celular do carcinoma humano do ovário (A2780) com valores de IC₅₀ comparáveis aos da cisplatina.⁵ Sadler e colaboradores verificaram também que complexos Ru(areno) contendo dois ligandos monodentados (com átomos doadores azotados) em vez de um ligando quelante (bidentado do tipo N,N) são praticamente inactivos contra a linha celular A2780.⁵

A família RAPTA são compostos caracterizados pela presença de um ligando monodentado PTA altamente solúvel em água ao complexo, e pela presença do ligando η⁶-areno, ligeiramente hidrofóbico. Além disso, demonstram ser altamente estáveis em água e ao ar, sendo agentes tumorais de toxicidade baixa e elevada selectividade face às células cancerosas.¹⁴ O protótipo [(η⁶-*p*-cimeno)Ru(PTA)Cl₂], conhecido como RAPTA-C (figura 1.5) tem tido um papel central na avaliação biológica sendo o composto de referência apartir do qual os outros compostos RAPTA são desenvolvidos.¹⁴ Um estudo empregando um extenso número de complexos RAPTA com ligandos areno modificados, mostrou que, no geral, estes complexos são ligeiramente tóxicos contra linhas celulares tumorais e completamente não tóxicos para células saudáveis, apresentando assim uma seletividade para as células tumorais.²¹ No entanto, o que impressiona nestes complexos, é que *in vivo*, um dos complexos desta família, o RAPTA-T, [(η⁶-tolueno)Ru(PTA)Cl₂] (Figura 1.5), demonstrou inibir seletivamente o desenvolvimento e o crescimento de metástases do pulmão.²¹ Além disso, foi observado que embora o RAPTA-T consiga induzir danos ao nível do ADN, este não é o seu alvo principal, tal como acontece com outros complexos metálicos, como a cisplatina.²¹ Verificou-se que os complexos RAPTA se ligam preferencialmente a proteínas-chaves envolvidas na regulação do ciclo celular, alterando assim a expressão e atividade destas proteínas, levando eventualmente à morte celular por apoptose.²¹

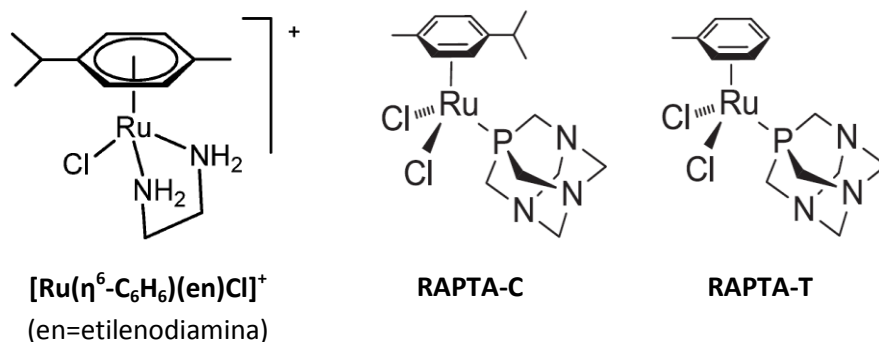


Figura 1.5 – Fórmula estrutural de complexos com o fragmento “Ru(η⁶-areno)” com actividade anti-tumoral.

Outros agentes promissores para quimioterapia do cancro são os complexos de ruténio em que um (ou mais) dos seus co-ligandos têm actividade biológica só por si só. Dentro do vasto grupo de organometálicos, um exemplo prometedora é a série de compostos $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cym})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$ (*p*-cym = *p*-cimeno; X= Cl, PF₆) em que os ligandos orgânicos (L) são tiossemicarbazonas contendo o grupo 5-nitrofuril (figura 1.6). São complexos binucleares de ruténio onde a geometria adotada pelos átomos do centro metálico é quadrangular planar, com os dois ligandos tiossemicarbazona em ponte coordenando-se através do heteroátomo de enxofre a ambos os iões metálicos e pelo heteroátomo de azoto a cada Ru(II); a esfera de coordenação é completada por um ligando *p*-cimeno e este é um derivado da família Ru(areno) que não possui o habitual cloreto lábil.

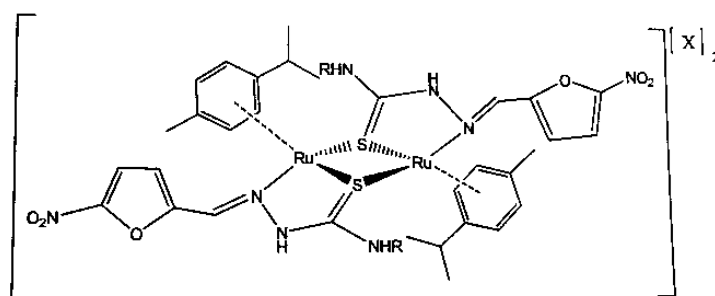


Figura 1.6 – Fórmula estrutural de complexos diméricos $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{R-TSC})_2]\text{X}_2$ de ruténio(II) com ligandos do tipo tiossemicarbazona (R=H;CH₃; CH₂CH₃;CH₆CH₅ e X= Cl; PF₆).

A citotoxicidade destes complexos, assim como a dos seus ligandos tiossemicarbazona, foi avaliada em linhas tumorais humanas do ovário (A2780), da mama (MCF7) e da próstata (PC3, grau IV).³⁰ Os resultados mais promissores na avaliação biológica foram obtidos com o complexo contendo o ligando com o grupo fenilo, R=C₆H₆, tendo-se comprovado que este seria

um bom agente anticancerígeno devido ao seu largo espectro de acção e a alta citotoxicidade *in vitro*, especialmente contra células PC3 resistentes a cisplatina (grau IV do carcinoma da próstata com potencial metastático)³⁰. Os outros complexos e ligandos, apesar de também serem citotóxicos, não são tão eficientes comparativamente a este último, sendo inactivos contra a linha celular do cancro da próstata.³⁰

Complexos de ruténio(II) com ligandos ciclopentadienilo

Uma família diferente de compostos organometálicos de ruténio é a de complexos contendo o fragmento Ru(II)-(η⁵-C₅H₅) ou Ru(Cp).

Uma extensa família de complexos do tipo [Ru(Cp)LP], em que L é um ligando heterocíclico azotado (mono ou bidentado), P um ligando derivado de fosfano (bi- ou monodentado, consoante a denticidade de L) e Cp é o ligando ciclopentadienilo (η⁵-C₅H₅) tem sido desenvolvida pelo grupo de Química Organometálica e Bioorganometálica da FCUL, onde parte deste trabalho foi realizado, com excelentes resultados no contexto do desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos de ruténio.^{31,32,33} Embora também com estrutura do tipo “banco de piano”, uma grande diferença entre estes compostos organometálicos de Ru(Cp) e os da bibliografia (de Ru(arenos) em especial) é o fato de os primeiros não possuírem um co-ligando lábil (como o cloreto).

Dos vários compostos desenvolvidos no grupo, destacam-se dois com largo espectro de acção antitumoral, nomeadamente, o complexo [RuCp(bipy)(PPh₃)[CF₃SO₃] (Cp = ciclopentadienilo; bipy = 2,2'-bipiridina, PPh₃ = trifenilfosfano) (figura 1.7), que mostrou ser cerca de 15 vezes mais ativo que a cisplatina contra células humanas de carcinoma do ovário, A2780, e particularmente ativo contra as linhas de células resistentes à cisplatina (200 vezes mais citotóxico contra as A2780cisR e 100 vezes mais ativo contra as linhas celulares do cancro da mama, MCF7, e do carcinoma da próstata humano, PC3).³¹ Para além deste, também o complexo homólogo [RuCp(Me₂bipy)(PPh₃)[CF₃SO₃] (Me₂bipy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, figura 1.7, apresentou uma elevada atividade contra a linha celular MCF7.³⁴

Verificou-se que o complexo [RuCp(bipy)(PPh₃)[CF₃SO₃] interatua com diversas proteínas, atuando também como inibidor da enzima Poli-(ADP-ribose)-polimerase (PARP-1). Este complexo mostrou inibir esta enzima de forma mais eficiente que o NAMI-A e o RAPTA-T, sendo cerca de 30 vezes mais ativo que o inibidor de referência (a 3-aminobenzamida).³¹ De acordo com o estudo de distribuição celular realizado para o complexo [RuCp(bipy)(PPh₃)[CF₃SO₃], verificou-se que este complexo se acumula seletivamente na membrana celular e no citosol (90%) em células tumorais do ovário, A2780, e da mama, MDA-

MB-231.³⁵ Todos estes resultados sugerem que o mecanismo de acção destes complexos seja distinto do da cisplatina.

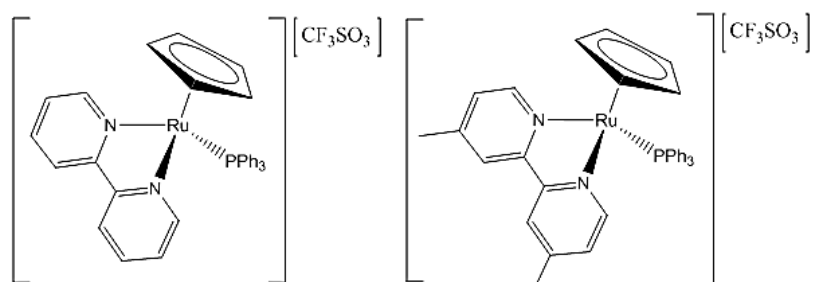


Figura 1.7 – Fórmula estrutural de complexos $[\text{RuCp}(\text{bipy})(\text{PPh}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (esquerda) e $[\text{RuCp}(\text{Me}_2\text{bipy})(\text{PPh}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (direita).

As cinases proteicas regulam muitos aspectos da vida celular e são um dos alvos principais dos fármacos. Estas cinases são enzimas que transferem grupos fosfatos de moléculas doadoras de elevada energia (por exemplo, ATP) para moléculas alvo específicas. A *estaurosporina* (figura 1.8) é um inibidor muito potente, no entanto, é relativamente não específico para muitas cinases proteicas.

Com vista a desenvolver outra família de compostos, Meggers e os seus colaboradores descreveram um complexo organometálico de ruténio que mimetiza a forma da *estaurosporina* (figura 1.8).^{14,36}

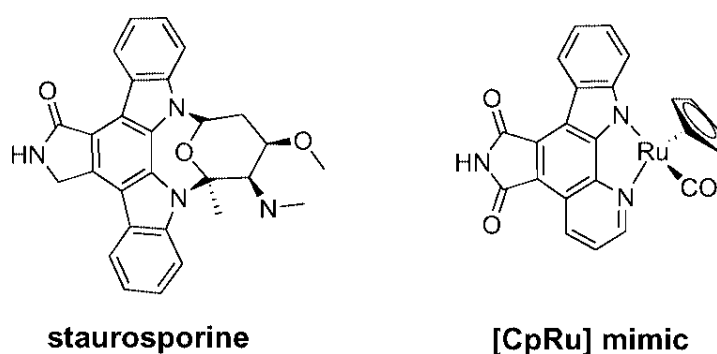


Figura 1.8 – Estaurosporina (esquerda) e um exemplo de complexo organometálico inspirado na sua estrutura e desenvolvido por Meggers (direita).

A estratégia utilizada explorou a facilidade em obter uma conformação espacial específica com um ião metálico como o ruténio para imitar aspectos de um inibidor que não são facilmente acessíveis usando um composto puramente orgânico.¹⁴ Os autores demonstraram ainda a ligação do composto de ruténio a uma cinase proteica PIM-1, e descreveram a co-cristalização da proteína com o complexo de ruténio.^{14,36} Este composto é, no mínimo, duas vezes mais potente contra a PIM-1 do que a estaurosporina, que é um inibidor inespecífico.³⁶ Provou-se também a importância que toda a esfera de coordenação do ruténio (do ião metálico, em geral) tem para a concepção de inibidores enzimáticos. Isto foi a base para o desenvolvimento de outros inibidores enzimáticos baseados em metais de transição que levaram a novos tipos de agentes terapêuticos organometálicos com um alvo específico.¹⁴ Este tipo de complexos continuam a ser estudados estando descritos complexos que inibem farmacologicamente as células do cancro colo-retal.³⁶

Estudos de interação dos metalofármacos a nível de proteínas e enzimas, com a deteção de interações específicas de ligação a proteínas (como no caso de complexos de ruténio ciclopentadienilo inertes que apresentam uma excelente ligação à proteína cinase PIM-1²¹) levaram à proposta de alvos “não-clássicos” para os complexos RAPTA, para além do DNA¹⁴, abrindo caminho para outros modos de ação em aplicações quimioterapêuticas para os complexos de ruténio.

1.4.3. Complexos inorgânicos de ruténio

Complexos de ruténio com ligandos polipiridínicos

Os ligandos polipiridínicos, ligandos heteroaromáticos de azoto bidentados (frequentemente), são bons agentes quelantes para muitos metais. No caso do ruténio, estabilizam o ião metálico no seu estado de oxidação (II), originando complexos estáveis em solução aquosa.

As propriedades que os compostos de ruténio com grupos polipiridínicos apresentam têm sido intensamente investigadas. Alguns destes compostos existem como moléculas quirais capazes de um reconhecimento enantioselectivo do DNA, podendo ser usados como sondas fluorescentes úteis na visualização de alterações na estrutura do DNA.³⁷ Foram também sintetizados complexos de ruténio contendo – para além dos ligandos polipiridínicos – ligandos

aqou ou cloro, tendo-se verificado que se ligam covalentemente ao DNA em meio aquoso por substituição dos ligandos aquo ou cloro presentes na esfera de coordenação destes complexos.^{14,20}

A citotoxicidade dos complexos $[\text{Ru}(\text{II})\text{Cl}(\text{bipy})(\text{terpy})]\text{Cl}$, *cis* - $[\text{Ru}(\text{II})(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ e *mer* - $[\text{Ru}(\text{II})\text{Cl}_3(\text{terpy})]$, (bipy = 2,2'-bipiridilo, terpy = 2,2':6',2''-terpiridina) (figura 1.9) foi demonstrada em linhas de culturas de células de tumores humanos e murinos.

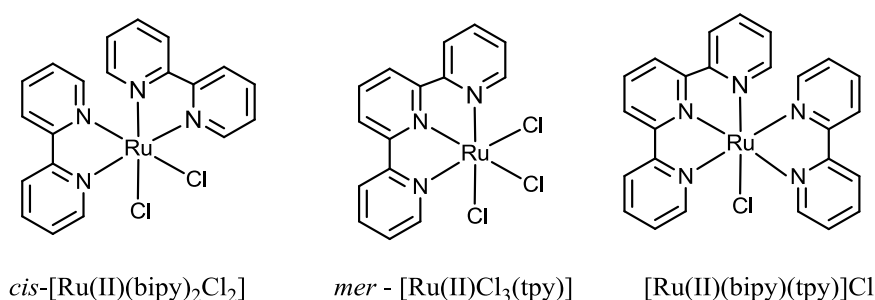
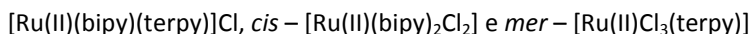


Figura 1.9 - Fórmulas de estruturas de alguns complexos polipiridínicos de ruténio:



O complexo *mer*- $[\text{Ru}(\text{II})\text{Cl}_3(\text{terpy})]$ exibe uma citotoxicidade consideravelmente superior à dos outros compostos e, em contraste com os complexos menos activos, exibe uma coordenação por formação de aductos intracadeia com o DNA. Assim esta classe de compostos (que combina ligandos polipiridilo com ligandos lábeis coordenados ao centro metálico de ruténio) pode potencialmente actuar através de um mecanismo que envolva a formação de aductos intracadeia com o DNA.^{20,37}

Nos últimos anos, vários grupos de investigação têm explorado o modo de ação de compostos de ruténio, com especial foco na interacção entre complexos de ruténio activos e alvos biológicos possíveis tais como o “clássico” DNA, RNA, transferrina, albumina, e citocromo-c, entre outros.²⁷

Mais recentemente tem-se investigado o envolvimento de organelos como a mitocôndria na actividade de complexos de ruténio.^{38,39}

Todos estes resultados sugerem que o desenvolvimento de compostos de ruténio pode contribuir de modo muito significativo para uma melhoria no futuro de agentes quimioterapêuticos.

1.5.Complexos de cobre

O cobre é um ião metálico com bastante potencial em aplicações terapêuticas, e a potencial atividade antitumoral de complexos de cobre tem sido avaliada recentemente mostrando resultados promissores.⁴⁰ A vantagem da utilização do cobre na formação de complexos, quando comparado com outros metais de transição, é que se encontra presente naturalmente em organismos vivos. O cobre é um cofactor de algumas enzimas, como o citocromo oxidase. O seu ciclo redox permite a existência de espécies Cu(I) e Cu(II), e apresenta afinidade por resíduos de aminoácidos como cisteína, metionina, ácido aspártico, ácido glutamâmico e histidina.⁴¹ O cobre está envolvido em funções essenciais tais como transferência de eletrões, reações de oxigenação, e transporte de oxigénio,⁴² entre outras. Neste contexto, os complexos de cobre têm sido investigados no pressuposto de que o metal pode ser menos tóxico para as células normais do que para as células cancerosas.

O cobre é também um co-factor essencial para processos do angiogeneses do tumor. Níveis elevados de cobre foram encontrados em muitos tipos de cancro, incluindo o da próstata, da mama e cerebral.⁴³ Compostos tais como o 8-hidroxiquinolina de cobre(II), pertencem a uma nova geração de inibidores de proteassoma (complexos enzimáticos envolvidos no processo de degradação proteica que está na base de processos celulares importantes) e são indutores da apoptose de células tumorais.⁴⁴ O complexo de cobre(II) com o ligando pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), um conhecido antioxidante, dá forma a um poderoso inibidor da proteassoma no cancro da mama que não afecta células normais. Compostos orgânicos não tóxicos tais como PDTC podem espontaneamente ligar-se com cobre celular da célula tumoral, dando origem a um inibidor proteassoma e a um indutor de apoptose *in situ*.^{43,44}

A pesquisa em compostos de cobre como agentes para o tratamento do cancro é, portanto, uma via com boas perspectivas na área do desenvolvimento de metalofármacos, em especial se se utilizarem ligandos com actividade biológica, como é o caso das tiossemicarbazonas.

1.6.Ligandos orgânicos da família das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas ($R^1R^2C^2=N^3-N^2(H)-C^1(=S)N^1R^3R^4$) (figura 1.10) são compostos com interesse para o desenvolvimento de fármacos.⁴⁵ O interesse neste tipo de compostos

advém das suas importantes propriedades químicas e da sua actividade biológica de largo espectro, nomeadamente antibacteriana, antiviral, antiprotozoária e anti-tumoral, entre outras.⁴⁶ Devido ao seu perfil farmacológico e à sua capacidade quelante, as tiossemicarbazonas têm sido extensivamente exploradas em Química Inorgânica Medicinal.¹⁴⁰

Neste tipo de compostos há a possibilidade de ocorrência de tautomeria tiona-tiol, do que resulta a sua forma neutra (tiona) ou monoaniónica (tiol). A forma tiona é a forma predominante no estado sólido; em solução, porém, tanto a forma tiona como a forma tiol podem existir. Tanto na forma neutra como na forma aniónica, as tiossemicarbazonas comportam-se usualmente como ligandos bidentados versáteis, podendo formar ligações coordenadas com metais através do átomo de enxofre e do átomo do nitrogénio azometínico (C=N).⁴⁷ Esta capacidade de coordenar iões metálicos é aumentada se houver grupos doadores de eletrões ao carbono da função azometino⁴⁶; as tiossemicarbazonas podem também coordenar-se de modo tridentado consoante a estrutura dos seus substituintes.

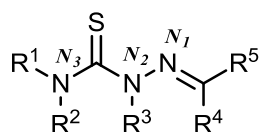


Figura 1.10 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas (R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 : H, arilo ou alquilo).

Estudos de atividade demonstraram que derivados das tiossemicarbazonas contendo grupos fenólicos têm propriedades anticancerígenas interessantes. Foi observado que várias substituições (incluindo grupos nitro, metóxi, fenóxi) com os átomos de azoto tioamida, N_3 , têm efeito significativo sobre a eficácia biológica destes compostos. Por exemplo, o heterocíclico- N_3 -tiossemicarbazona demonstrou atividade promissora contra o cancro da mama, bem como a presença do grupo aromático em N_3 de derivados tiossemicarbazonas isatina- β mostraram aumento da citotoxicidade contra as linhas de células KB-3-1 e da P-glicoproteína KB-V1.⁴⁸

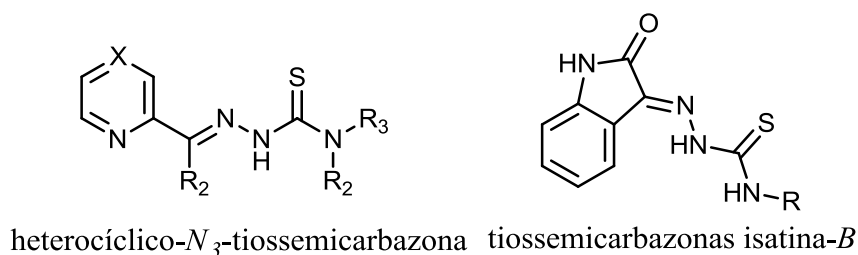


Figura 1.11 – Estrutura do heterocíclico- N_3 -tiossemicarbazona e de derivado de tiossemicarbazona isatina- β

O mecanismo de ação das tiossemicarbazonas é complexo e ainda não está bem estabelecido, sendo sugerido que deve acontecer através da inibição de múltiplos alvos.⁴⁶ Alguns estudos sugerem que a sua atividade biológica possa ser exercida por três tipos de mecanismo: (i) inibição da enzima ribonucleósido difosfato redutase (essencial para a síntese de DNA); (ii) criação de lesões de DNA por rutura oxidativa; (iii) e ligações a bases de azoto de DNA e RNA bloqueando ou impedindo a replicação do DNA.⁴⁹ Outros autores consideram que as suas propriedades biológicas estão relacionadas com a capacidade que formarem *in vivo* complexos com catiões metálicos.⁴⁶

Complexos com ligandos do tipo tiossemicarbazona têm mostrado interessantes propriedades biológicas, nomeadamente antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-cancro, e essas propriedades parecem estar relacionadas com a possibilidade de o complexo se difundir através da membrana semi-permeável das linhas celulares.⁵⁰ O efeito reforçado pode ser atribuído a um aumento da lipofilicidade dos complexos quando comparados com o ligando livre.⁵⁰

Complexos de ruténio com co-ligandos tiossemicarbazona

No extenso domínio dos complexos octaédricos de ruténio desenvolvidos para aplicação terapêutica tem especial interesse para o presente trabalho a classe de compostos que combina este centro metálico com ligandos com atividade biológica já reconhecida, em particular ligandos do tipo tiossemicarbazona. São conhecidos exemplos na bibliografia complexos quer de Ru(III) quer de Ru(II).

Um exemplo é o complexo $[\text{Ru}(\text{III})(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2(\text{Y-TSC})]$, ($\text{Y}=\text{Cl}; \text{NO}_2$) (figura 1.12), constituído por dois ligandos trifenilfosfano e dois ligandos lábeis cloreto. A sua avaliação biológica mostrou que embora o ligando Y-TSC não fosse activo por si só contra a linha celular humana do cancro da mama (MCF7), a sua citotoxicidade se tornava bastante elevada quando ligado ao ião metálico naquela esfera de coordenação.⁵¹ Este resultado é interessante por indicar uma sinergia entre ligandos e centro metálico, e salienta que a atividade final de um metalofármaco é o resultado combinado do efeito do ião metálico e dos seus ligandos.

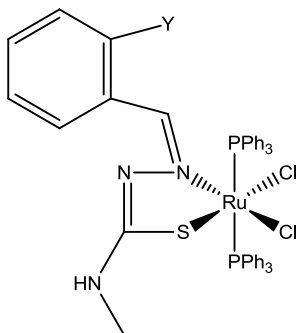


Figura 1.12 - Estrutura química do agente antitumoral inorgânico de ruténio $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{PPh}_3)_2(\text{Y-TSC})]$ ($\text{Y}=\text{Cl}; \text{NO}_2$).

Foram também estudados outras famílias de complexos como $\text{Ru}(\text{II})(\text{areno})$ contendo N^3 -fenil-TSC (TSC= tiossemicarbazona) como co-ligandos.⁵² As atividades *in vitro* dessa família de compostos foram avaliadas em células de cancro gástrico humano SGC-7901, cancro humano de fígado BEL-7404 e células não cancerosas HEK-293T, e comparadas com a cisplatina e oxaliplatina.⁵² Em comparação com os compostos $[(p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{TSC})\text{Cl}]\text{Cl}$, a maior parte dos derivados $[(p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{TSC})\text{Cl}][p\text{-cimeno})\text{RuCl}_3]$ mostraram coeficientes de citotoxicidade IC_{50} semelhantes às da cisplatina.

Não foram encontrados na literatura muitos complexos de ruténio(II) com ligandos do tipo polipiridina e co-ligando tiossemicarbazona. Um exemplo é a série de complexos que contêm a diimina 1,10-fenantrolina (phen) ou a 2,2'-bipiridina (bipy) e o derivado tiossemicarbazona 9-antraldeído. (figura 1.13) Estes complexos apresentaram boa atividade citotóxica contra células MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma da mama), bem como em linhas celulares HCT 116 e HT-29 (carcinoma colo-rectal). Contudo, os complexos que contêm phen são mais ativos do que os complexos bipy em todas as linhas de células testadas.⁵³

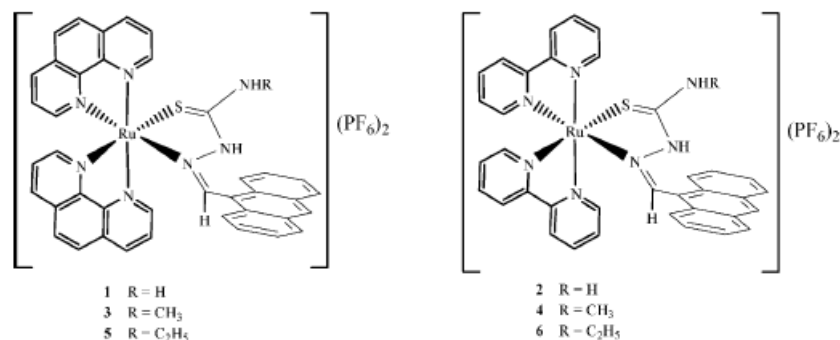


Figura 1.13 - Estrutura do exemplo do complexo de rutênio⁵³.

Complexos de cobre com ligandos tiossemicarbazona

A pesquisa em compostos de cobre como metalofármacos é, como já foi mencionado, uma via com boas perspectivas na área do desenvolvimento de novos fármacos contra o cancro. A coordenação de tiossemicarbazonas a iões metálicos de cobre é um campo vasto de investigação, uma vez que os doadores NS da tiossemicarbazona são adequados para o cobre. Até à data, são conhecidos muitos exemplos de compostos de cobre com ligandos monotiossemicarbazona (bidendados, com doadores NS) ou bistiossemicarbazona (tetradendados, com doadores N₂S₂), e os modos de coordenação mais comuns são na forma neutra ou aniónica.⁵⁰

Alguns exemplos mostraram-se particularmente promissores: complexos de cobre(II) de piridoxal tiossemicarbazona inibiram células de eritroleucemia de Friend em ratos e complexos de cobre(II) de formiluracil tiossemicarbazona mostraram-se capazes de inibir o crescimento de linhas celulares de leucemia humana K562 e CEM55.⁴⁰ Alguns deles induziram apoptose celular.⁴⁰ Tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos naturais como citronelal, citral, octanal e octenal e os seus complexos de cobre(II) foram capazes de inibir o crescimento de células U937, mas em geral não induziram apoptose celular *in vitro*.⁴⁰

Por outro lado, complexos de cobre(II) da tiossemicarbazona derivada de ácido α -cetoglutárico induziram apoptose em linhagens de leucemia humana U937 e K562. Finalmente, um complexo de cobre(II) de 10-deacetilbacatina tiossemicarbazona, derivada do análogo de taxol 10-deacetilbacatina provocou a interrupção do crescimento do tumor de mama MCF-759.⁴⁰

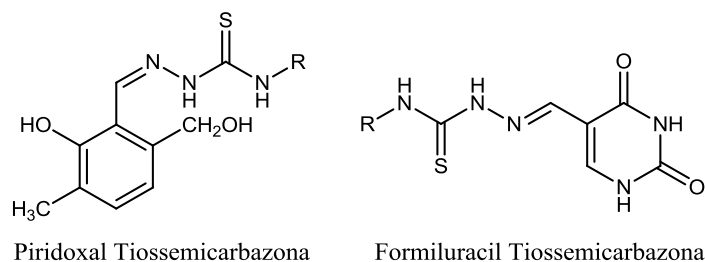


Figura 1.14 - Exemplos de tiossemicarbazonas piridoxal e formiluracil.

1.7. Enquadramento do presente trabalho

Como já foi dito, o cancro é uma doença com uma grande incidência, muito frequentemente mortal e os dados estatísticos disponíveis estimam um aumento da sua incidência nos próximos anos. Os agentes terapêuticos baseados em metais são atualmente objeto de investigação intensa e têm-se demonstrado muito promissores como opção terapêutica viável.

Com base nos resultados publicados na literatura, neste trabalho propôs-se a síntese de quatro novos ligandos orgânicos do tipo aril tiossemicarbazona (figura1.15), três dos quais são sintetizados pela primeira vez. Estudos anteriores³⁰ indicavam que a presença do grupo fenilo no azoto (N3) da estrutura-base da tiossemicarbazona era muito benéfico para a atividade em complexos de ruténio(II)(cimeno). Assim decidiu-se manter esta subestrutura, variando a parte arílica ligada em N1, para estudar o efeito na atividade quer dos ligandos quer dos complexos.

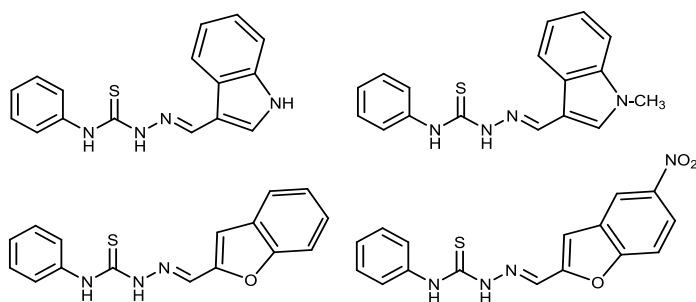


Figura1.15 – Fórmula estrutural dos ligandos orgânicos que se propôs desenvolver.

No caso dos complexos de ruténio, o ligando 2,2'-bipiridina (bipy) é bem conhecido como um excelente agente quelante, e o ruténio é estabilizado no estado de oxidação(II)

quando tem na sua esfera de coordenação dois ligandos bipy. De facto, espera-se que complexos do tipo $[Ru(II)(bipy)_2(TSC)]$ (em que TSC designa o ligando tiossemicarbazona sintetizado) são tipicamente complexos octaédricos estáveis em solução aquosa e de solubilidade adequada a ensaios biológicos. O desenvolvimento do presente trabalho mostrou ser um tema desafiante pelo facto dos complexos com tiossemicarbazonas e polipiridinas serem relativamente pouco explorados.

No que se refere aos complexos de cobre, são conhecidos na literatura muitos complexos com ligandos tiossemicarbazona com propriedades anticancerígenas. No entanto, não foram encontrados na bibliografia referência de compostos de cobre com estes ligandos em particular. Dessa forma, sintetizar complexos de cobre do tipo $Cu(TSC)_2$ (onde TSC seja o ligando tiossemicarbazona sintetizado) para testar a sua eventual actividade tornou-se também um objectivo a explorar.

O trabalho efectuado durante esta tese de mestrado está descrito nos capítulos seguintes. No capítulo 2 apresenta-se a síntese e a caracterização dos novos compostos orgânicos do tipo aril tiossemicarbazonas que foram sintetizados. O capítulo 3 reúne a síntese e caracterização dos novos complexos do tipo ' $Ru(II)(bipy)_2$ ' com os ligandos obtidos e o capítulo 4 refere-se à síntese e caracterização de novos complexos de cobre com os ligandos mencionados. No capítulo 5 sumarizam-se os resultados de estudos biológicos de citotoxicidade que foi possível efectuar até ao final da execução deste trabalho. A descrição experimental é incluída no capítulo 6 e a conclusão e perspectivas futuras são apresentadas no último capítulo da dissertação, o capítulo 7.

CAPÍTULO 2

*Síntese e caracterização de novos ligandos
orgânicos do tipo aril-tiosemicarbazonas*

2. Síntese e caracterização de novos ligandos orgânicos do tipo aril-tiossemicarbazonas

2.1. Considerações gerais

As tiossemicarbazonas são formalmente consideradas derivados do grupo funcional imina e são facilmente obtidos através da condensação entre uma tiossemicarbazida e um aldeído ou cetona, podendo apresentar estruturas muito diversificadas, de acordo com os substituintes da cetona/aldeído ou da tiossemicarbazida de partida (figura 2.1).

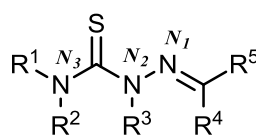


Figura 2.1 - Estrutura geral de tiossemicarbazonas (R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 : H, arilo ou alquilo).

As tiossemicarbazonas podem existir como isômeros geométricos *E* e *Z* à volta da dupla ligação C=N, sendo a configuração adotada função dos vários substituintes.

Por outro lado, podem também existir como confórmeros *syn* e *anti* (figura 2.2) com respeito à posição relativa entre o azoto do grupo C=N e o enxofre do grupo tiocarbonilo. De acordo com a literatura, grupos substituintes na posição N_3 , favorecem a conformação *syn* entre o átomo de azoto da imina e o átomo do enxofre.⁴⁶



Figura 2.2 - Confórmeros *syn* e *anti* de tiossemicarbazonas.

À semelhança de outros compostos carbonílicos, nestes compostos existe a possibilidade de ocorrência em solução de tautomeria tiona-tiol⁴⁶ (figura 2.2). A forma tiona é predominante no estado sólido porém, em solução, tanto a forma tiona como a forma tiol podem existir.

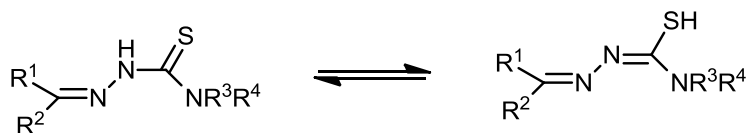
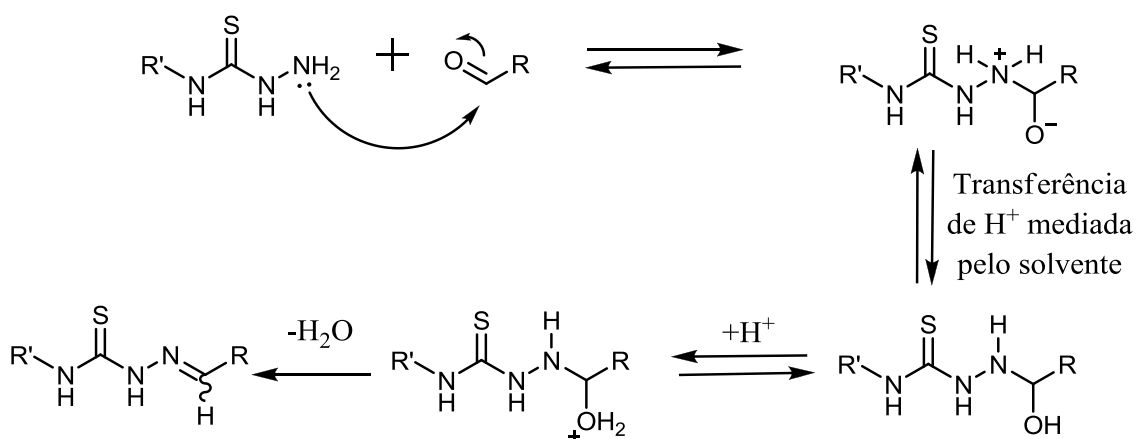


Figura 2.3 - Equilíbrio tautomérico estabelecido em solução entre as formas tiona e tiol de tiossemicarbazonas.

Do ponto de vista mecanístico a reação de formação da tiossemicarbazona inicia-se por uma adição nucleofílica do grupo amina primário da *N*-hidrazinacarbottiamida (nucleófilo) ao grupo carbonilo do aldeído ou cetona (electrófilo), com formação de um intermediário zwiteriônico. Este intermediário dá origem ao correspondente hemiaminal através da transferência intramolecular mediada pelo solvente de um dos prótons do íão imónio para o oxigénio do grupo alcóxido. O último passo da reacção implica a perda de uma molécula de água (processo mediado pelas moléculas de solvente) e a formação da dupla ligação carbono-azoto (esquema 2.1).



Esquema 2.1 - Mecanismo reacional geral da síntese de tiossemicarbazonas.

Este último passo de desidratação é o responsável pela formação dos dois isómeros geométricos *E* e *Z*, sendo a configuração determinada pela posição dos substituintes em torno da dupla ligação C=N da imina. O isómero *E* é aquele que, na maioria das vezes, se forma preferencialmente, por ser termodinamicamente mais estável.⁴⁶

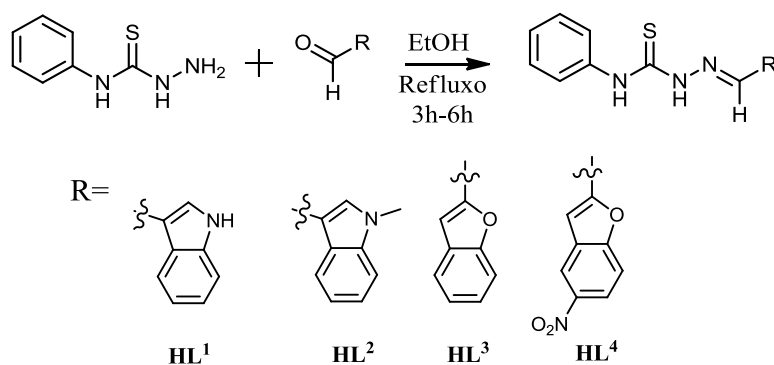
Um dos objetivos do estudo apresentado nesta dissertação consistiu na síntese de novas aril-tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos ligados a heterociclos aromáticos, com dois objetivos distintos mas complementares. Por um lado, pretendeu-se avaliar a sua atividade citotóxica contra várias linhas de células tumorais, já que está descrito na

literatura^{40,46,48,54} um largo espectro de atividades para esta família de compostos; por outro lado, tirando partido da existência, nestes compostos, de vários átomos doadores com capacidade coordenante, pretendeu-se utilizar as novas aril-tiossemicarbazonas para sintetizar complexos de rutênio (II) e de cobre, com vista a avaliar a sua potencialidade como metalofármacos para a terapia do cancro.

A escolha desta classe específica de tiossemicarbazonas teve como base a investigação realizada no grupo em que parte deste trabalho foi desenvolvido, na qual tiossemicarbazonas derivadas do 5-nitrofuraldeído^{6,30} foram usadas na preparação de complexos binucleares de rutênio (II), tendo estes últimos apresentado resultados promissores contra o carcinoma de grau IV próstata (em células PC3), e contra o adenocarcinoma de mama (em células MCF-7).

2.2. Análise e discussão de resultados

As tiossemicarbazonas sintetizadas neste trabalho foram obtidas por condensação entre a *N*-hidrazinacarbotiamida e o aril-carboxaldeído, numa reação num único passo (esquema 2.2) de acordo com o procedimento descrito no capítulo 6.



Esquema 2.2 - Esquema geral de síntese das tiossemicarbazonas obtidas neste trabalho.

Os compostos obtidos foram extensivamente caracterizados pelas técnicas de RMN (¹H, ¹³C, DEPT-135 e técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC), FTIR e UV-Vis. Foram também realizados estudos eletroquímicos por voltametria cíclica e o grau de pureza dos compostos foi avaliado por análise elementar. Os resultados de voltametria cíclica obtidos para estes compostos são apresentados apenas nos capítulos 3 e 4, uma vez que são discutidos em conjunto com os resultados obtidos para os respetivos complexos.

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos pelas restantes técnicas de caracterização.

2.2.1. Ligando HL¹

(E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida⁽⁵⁵⁾

Este ligando foi obtido como um sólido cristalino de cor amarela, com uma faixa de fusão 215,7 – 216,3°C e um rendimento de 83,17%.

A estrutura do ligando HL¹ apresenta-se na figura 2.4 com a indicação da numeração atribuída aos respetivos protões e carbonos, de acordo com as regras de IUPAC, e as tabelas 2.1 e 2.2 apresentam as atribuições feitas aos sinais de RMN ¹H e RMN ¹³C, respetivamente.

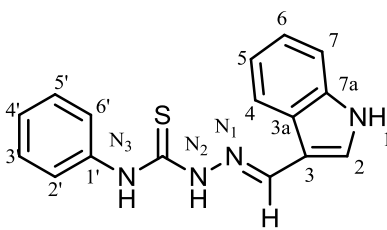


Figura 2.4 – Estrutura do ligando HL¹ e numeração dos respetivos protões e carbonos.

Caracterização por espectroscopia de RMN

A análise e atribuição dos sinais nos espetros de RMN ¹H e RMN ¹³C foi feita com recurso à experiência DEPT-135 (que permite diferenciar os carbonos de acordo com a fase do espetro em que aparecem: carbonos primários e terciários apresentam-se na mesma fase, geralmente positiva, e carbonos secundários apresentam-se na fase oposta, geralmente negativa), às correlações homonucleares COSY (¹H-¹H) e heteronucleares HMQC (¹H-¹³C, correlação direta) e HMBC (¹H-¹³C, correlação a duas e três ligações).

Os espetros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT-135, COSY, HMBC e HMQC para a molécula HL¹ podem ser consultados nos Anexos 2.1-2.6.

Tabela 2.1 - Dados de RMN ¹H 1D e COSY para a o ligando HL¹ em DMSO-*d*₆.

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
11,69	Singleto	1 H	-	-	H-1
11,58	Singleto	1 H	-	-	C=N-N-H
9,61	Singleto	1 H	-	-	Ph-N-H
8,41	Singleto	1 H	-	-	N=C-H
8,23	Dupleto	1 H	7,64	7,15	H-4
7,90	Singleto	1 H	-	-	H-2
7,64	Dupleto	2 H	7,64	7,38	H-2'/H-6'
7,45	Dupleto	1 H	7,88	7,20	H-7
7,37	Tripleto	2 H	7,80	-	H-3'/H-5'
7,20	Multiplete	1 H	-	7,45	H-6
7,19	Multiplete	1 H	-	-	H-4'
7,15	Multiplete	1 H	-	8,20	H-5

Tabela 2.2 - Dados de RMN ¹³C 1D e 2D para o ligando HL¹ em DMSO-*d*₆.

Desvio químico δ /(ppm)	DEPT	HMQC	HMBC	Atribuição
174,54	-	-	11,58	C=S
141,46	CH	8,41	11,58	C=N
139,37	-	-	9,60; 7,64; 7,37	C-1'
137,18	-	-	8,22; 7,90; 7,20	C-7a
131,48	CH	7,90	8,41	C-2
128,31	CH	7,37	7,37	C-3'
125,25	CH	7,64	9,60; 7,64; 7,37; 7,20	C-2'
125,13	CH	7,19		C-4'
124,16	-	-	11,69; 8,41; 7,90; 7,45; 7,15	C-3a
122,86	CH	7,20	8,22; 7,45	C-6
121,97	CH	8,22	8,22; 7,20	C-7
120,89	CH	7,15	7,45	C-5
112,04	CH	7,45	7,15	C-4
111,06	-	-	11,69; 8,41; 7,90	C-3

A análise dos espectros de RMN permitiu identificar, para além dos sinais correspondentes à funcionalidade tiossemicarbazona, a presença de dois sistemas de spin pertencentes aos dois sistemas aromáticos distintos, grupo *N*-fenilo e grupo indole. O sinal no espectro de RMN ¹³C a 174,5 indica que a tiossemicarbazona, em solução, se encontra na forma tiona.

A inexistência no espectro de RMN ¹³C do sinal δ 184,86 ppm, correspondente ao grupo aldeído do material de partida, e o aparecimento do sinal δ 141,5 ppm associado ao protão a δ 8,41 ppm indicou claramente de que a reação tinha sido bem conseguida. O desvio para

campo mais alto de ambos os sinais é devido a substituição do oxigênio pelo azoto, uma vez que sendo este menos eletronegativo blindará mais os átomos a ele ligados. O sinal δ 111,1 ppm foi atribuído a C-3 devido às correlações HMBC com H singuleto a δ 8,41 (H imínico) e com sinal δ 7,90.

Os quatro sinais a δ 8,22ppm (1H, d, H-4), δ 7,45 ppm (1H, d, H-7), 7,20 (1H, m, H-6) e δ 7,15 ppm (1H, m, H-5) constituem o sistema ABCD típico do anel carboaromático do indole. Esta atribuição foi feita com base no desdobramento dos sinais, nas correlações COSY e HMBC e na comparação com os desvios publicados na literatura.⁵⁵

Os prótons aromáticos do grupo *N*-fenilo aparecem no espectro de RMN ¹H sob forma de duplete (δ 7,64; H-2'/H-6'), tripleto (δ 7,37; H-3') e multiplete (δ 7,20; H-4'), tal como seria de esperar.

A análise do espectro de NOESY (Anexo 2.7) foi crucial para elucidar a estereoquímica da molécula, permitindo concluir acerca da geometria do grupo C=N e identificar o conformero predominante. Comprovou-se que o ligando existe maioritariamente sob a forma de conformero *syn* e o isômero predominante é o *E* (existência de correlação entre os prótons N=C-H e o H-2 e, correlação entre os prótons N=C-H e C=N-N-H por NOESY) (Figura 2.5).

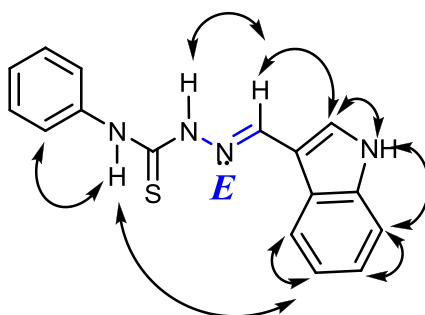


Figura 2.5 – Correlações NOESY observadas para o ligando **HL**¹.

Análise Elementar

Os resultados obtidos na análise elementar de **HL**¹ mostraram uma elevada concordância entre os valores calculados e os determinados experimentalmente para a fórmula C₁₆H₁₄N₄S, confirmando assim a sua formulação e grau de pureza.

Tabela 2.3 – Resultados de análise elementar para o ligando HL¹.

	%C	%H	%N	%S
Experimental	65,10	4,80	19,30	11,00
Calculado para C ₁₆ H ₁₄ N ₄ S	65,28	4,79	19,03	10,89

2.2.2. Ligando HL²

((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida)

Este ligando foi obtido como um sólido cristalino de cor amarela, com uma faixa de fusão 202,9 – 203,5°C e um rendimento de 77,5%.

Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT-135 e correlações COSY, HMQC e HMBC foram interpretados para o ligando HL² (Figura 2.5) de um modo análogo ao efectuado para o ligando HL¹. Nas tabelas 2.4 e 2.5 apresentam-se as atribuições feitas para os sinais de RMN ¹H e RMN ¹³C observados nos espectros para esta molécula.

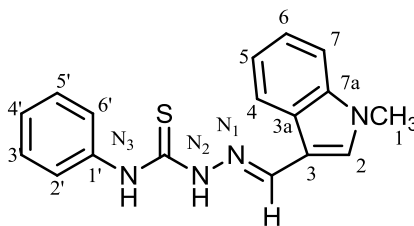


Figura 2.6 - Estrutura do ligando HL² e numeração dos respetivos protões e carbonos.

Caracterização por espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT-135, COSY, HMBC e HMQC para a molécula HL² podem ser consultados nos Anexos 2.8-2.13.

Uma vez que a única diferença entre HL¹ e HL² é a substituição no azoto indólico, que em HL² é um grupo metilo, as diferenças mais relevantes nos respetivos espectros de RMN podem ser atribuídas a esta distinta substituição. O aparecimento no espectro de RMN ¹H de um sinal muito blindado sob a forma de singuleto (3H, δ3,83) e o desaparecimento do sinal a δ11,68 ppm confirma a substituição em HL² de um hidrogénio por um grupo metilo.

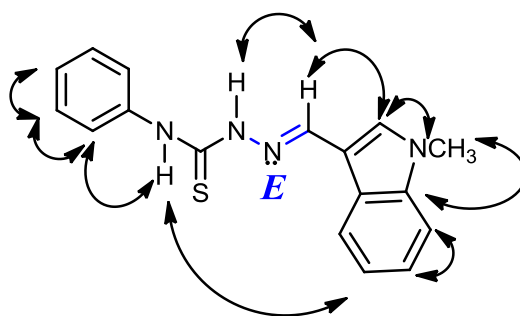
Tabela 2.4 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o ligando HL^2 em $\text{DMSO-}d_6$.

Desvio químico δ / (ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
11,58	Singleto	1 H	-	-	C=N-N-H
9,63	Singleto	1 H	-	-	Ph-N-H
8,39	Singleto	1 H	-	-	N=C-H
8,26	Dupleto	1 H	7,80	7,20	H-4
7,91	Singleto	1 H	-	-	H-2
7,64	Dupleto	2 H	7,88	7,38	H-2'/H-6'
7,51	Dupleto	1 H	8,12	7,28	H-7
7,38	Tripleto	2 H	7,70	7,20	H-3'/H-5'
7,28	Tripleto	1 H	-	-	H-6
7,20	Tripleto	2 H	-	-	H-4'
3,83	Singleto	3 H	-	-	NCH ₃

Tabela 2.5 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o ligando HL^2 em $\text{DMSO-}d_6$.

Desvio químico δ / (ppm)	DEPT	HMQC	HMBC	Atribuição
174,44	-	-	11,59	C=S
140,78	CH	8,39	11,59; 7,90	C=N
139,32	-	-	9,63; 7,64; 7,37	C-1'
137,59	-	-	8,26; 7,90; 7,27; 3,83	C-7a
134,98	CH	7,90	8,39; 3,83	C-2
128,15	CH	7,37	7,37	C-3'
125,21	CH	7,64	9,63; 7,37; 7,20	C-2'
124,97	CH	7,20	7,64	C-4'
124,43	-	-	8,39; 7,90; 7,51; 7,20;	C-3a
122,77	CH	7,28	8,26	C-6
122,10	CH	8,26	7,27	C-4
120,97	CH	7,20	7,51	C-5
110,97	-	-	8,39; 8,26; 7,90	C-3
110,27	CH	7,51	7,20	C-7
32,90	CH ₃	3,83	7,90	CH ₃

O espectro de NOESY (Anexo 2.14) permitiu, tal como no caso anterior, identificar geometria da dupla ligação C=N como *E* e o conformero predominante como *syn* – figura 2.7.

Figura 2.7 –Correlações NOESY observadas para o ligando HL^2 .

Análise Elementar

A análise elementar de HL² veio confirmar a sua formulação e pureza, dada a elevada concordância entre os valores calculados e os determinados experimentalmente para a fórmula empírica C₁₇H₁₆N₄S.

Tabela 2.6 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C,H,N,S para o ligando HL².

	%C	%H	%N	%S
Experimental	66,25	5,25	18,55	10,0
Calculado para C ₁₇ H ₁₆ N ₄ S	66,21	5,23	18,17	10,40

2.2.3. Ligando HL³

(E)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida

Este ligando foi obtido como um sólido cristalino de cor amarela, com uma faixa de fusão 202,6 – 203,7°C e um rendimento de 76,4%.

Os espetros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT-135 e correlações COSY, HMQC e HMBC foram igualmente interpretados para esta tiossemicarbazona, HL³. Nas tabelas 2.7 e 2.8 seguintes apresentam-se as atribuições feitas dos sinais de RMN ¹H, RMN ¹³C, tal como o efeito anteriormente.

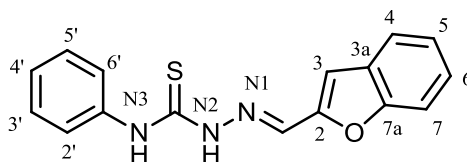


Figura 2.8 - Estrutura do ligando HL³ e numeração dos respectivos protões e carbonos.

Caracterização por espectroscopia de RMN

Os espetros de RMN ¹H, RMN ¹³C, DEPT-135, COSY, HMBC e HMQC para a molécula HL³ podem ser consultados nos Anexos 2.15-2.20.

Tabela 2.7 - Dados de RMN ¹H 1D e COSY para o ligando HL³ em DMSO-d₆.

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
12,07	Singleto	1 H	-	-	C=N-N-H
10,05	Singleto	1 H	-	-	Ph-N-H
8,21	Singleto	1 H	-	-	N=C-H
7,71	Dupleto	1 H	7,64	7,30	H-4
7,61	Multiplete	3 H	-	7,38	H-7; H-2'/H-6'
7,52	Singleto	1 H	-	-	H-3
7,38	Multiplete	3 H	-	7,21	H-6; H-3'/H-5'
7,29	Triplete	1 H	7,30	-	H-5
7,21	Triplete	1 H	3,36	-	H-4'

Tabela 2.8 - Dados de RMN ¹³C 1D e 2D para o ligando HL³ em DMSO-d₆.

Desvio químico δ /(ppm)	DEPT	HMQC	HMBC	Atribuição
176,03	-	-	-	C=S
154,81	-	-	7,71; 7,52; 7,38	C-7a
151,26	-	-	8,21; 7,52	C-2
138,93	-	-	7,61; 7,38	C-1'
132,66	CH	8,21	-	HC=N
128,25	CH	7,38	7,61; 7,38; 7,30	C-3'
127,99	-	-	7,52	C-3a
126,21	CH	7,39	7,71	C-6
125,53	CH	7,22	7,38	*C-2'
125,47	CH	7,60	7,61; 7,20	*C-4'
123,71	CH	7,27	7,61	C-5
121,97	CH	7,70	7,38	C-4
111,47	CH	7,63	7,30	C-7
109,59	CH	7,52	7,30; 7,71	C-3

*Carbonos intermutáveis

Comparando os espetros de RMN deste ligando com os de HL¹ e HL² existem marcadas diferenças do anel heteroaromático, não só devido à substituição do azoto pelo oxigénio, como também pela diferente posição do grupo imina em relação ao anel. O desvio para campo mais alto do sinal do carbono íminico, passando de aproximadamente δ 140 ppm para δ 132,66 ppm é provavelmente devido ao facto do oxigénio ser mais eletronegativo do que o azoto.

Existe também um grande desblindamento de C-2 comparativamente aos outros ligandos, devido à ligação ao oxigénio e ao grupo imina simultaneamente.

Tal como seria de esperar não se observaram alterações significativas nos desvios correspondentes aos prótons e carbonos do anel aromático ligado a N₃.

Análise Elementar

Tal como para os outros ligandos, a análise elementar veio confirmar a formulação e a pureza de **HL³**, uma vez que há uma elevada concordância entre os valores calculados e os determinados experimentalmente para a fórmula empírica C₁₆H₁₃N₃OS.

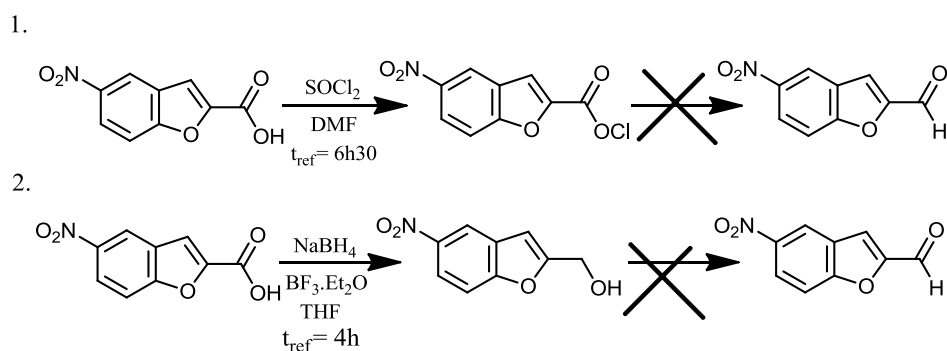
Tabela 2.9 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C,H,N,S para o ligando **HL³**.

	%C	%H	%N	%S
Experimental	65,05	4,45	14,55	11,0
Calculado para C ₁₆ H ₁₃ N ₃ OS	65,07	4,44	14,23	10,85

2.2.4. Ligando HL⁴

2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida

Para a síntese deste ligando foram tentadas duas abordagens, partindo do ácido 5-nitro-benzofurano-2-carboxílico comercial de forma a obter o aldeído correspondente, uma vez que o aldeído desejado não está disponível comercialmente (esquema 2.3). Numa das abordagens usou-se o cloreto de tionilo para se obter o cloreto de ácido, que posteriormente seria reduzido com um agente específico para reduzir cloretos de ácidos a aldeídos. Na outra abordagem tentou-se reduzir o ácido carboxílico com o redutor NaBH₄ a álcool para posteriormente oxidá-lo a aldeído. O processo de síntese necessitou de um redutor que não fosse demasiado forte de modo a não reduzir o grupo NO₂.



Esquema 2.3 – Esquemas das sínteses realizadas para o ligando **HL⁴**.

Só se conseguiu realizar a primeira parte das reações que foram monitorizadas por c.c.f e no fim da reação foi realizado RMN ^1H no qual nos indicava que a reação não tinha acontecido. As razões pelas quais a reação não funcionou não são conclusivas.

A descrição das sínteses realizadas encontram-se no capítulo 6, não tendo sido possível sintetizar o composto desejado (durante o tempo disponível para a realização deste trabalho).

2.2.5. Caracterização por espectroscopia de IV dos ligandos HL¹, HL², HL³

A informação retirada dos espectros de IV dos compostos sintetizados (Anexo 2.21-2.23) está concordante com a estrutura proposta para os mesmos. Apresenta-se na tabela 2.10 as frequências de vibração das ligações mais importantes dos ligandos sintetizados, que se encontram dentro das frequências características dos respetivos grupos funcionais.^{53,55,56,57}

Tabela 2.10 - Dados espectroscópicos de IV para os ligandos HL¹, HL² e HL³.

Ligando	$\nu_{\text{C=S}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C=N}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C=C}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C-H(arom)}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{N-H}}$ (cm^{-1})
HL ¹	1246	1602	1541	3116	3412;3319
HL ²	1253	1620	1535	3165	3412;3165
HL ³	1251	1612	1535	3126	3304

Como se disse anteriormente, os ligandos do tipo tiossemicarbazonas, por possuírem um grupo tioureia, em solução podem existir em equilíbrio tautomérico entre as duas formas, tiona e tiol. No caso dos ligandos sintetizados, é observada no espectro de IV uma banda aproximadamente a 1250 cm^{-1} , atribuída à vibração da ligação C=S. Para além disso, devido a ausência de bandas que se estendem na região $2500\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ (região da vibração da ligação S-H) é possível comprovar que, no estado sólido, o ligando não se encontra sob a forma tiol.⁵³

Estes resultados comprovam a conclusão tirada através das outras técnicas analíticas, de que no estado sólido, a forma predominante dos ligandos é a forma tiona.

2.2.6. Caracterização por espectroscopia de UV-vis dos ligandos HL¹, HL², HL³

A realização dos espectros eletrónicos constituiu uma ferramenta adicional de caracterização dos ligandos. A identificação das bandas correspondentes aos ligandos pode facilitar a interpretação dos espectros eletrónicos dos complexos.

O valor de absorvidade molar e o respetivo comprimento de onda, para cada composto em estudo, encontra-se apresentado na tabela 2.11. O espectro eletrónico de todos os compostos é semelhante, apresentando essencialmente 2 bandas intensas na gama do ultravioleta. Pela sua intensidade, pode concluir-se que as bandas observadas para todos os ligandos corresponderão a transições π - π^* .

Tabela 2.11 - Dados obtidos dos espectros eletrónicos de UV-vis relativos aos ligandos HL¹, HL² e HL³.

Composto	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)		
	Etanol	Acetonitrilo	DMSO
HL ¹	280 (19200) 339 (51800)	335 (29300)	284 (16700) 343 (47600)
HL ²	280 (19900) 343 (58510)	281 (13700) 341 (40300)	283 (16100) 347 (48700)
HL ³	344 (75000) 356 (71200)	342 (57425) 354 (54889)	352 (15100) 363 (14500)

CAPÍTULO 3

Síntese e caracterizações de novos complexos

*Ru(II) com os ligandos **HL¹**, **HL²** e **HL³***

3. Síntese e caracterização dos novos complexos de ruténio(II)

3.1. Considerações Gerais

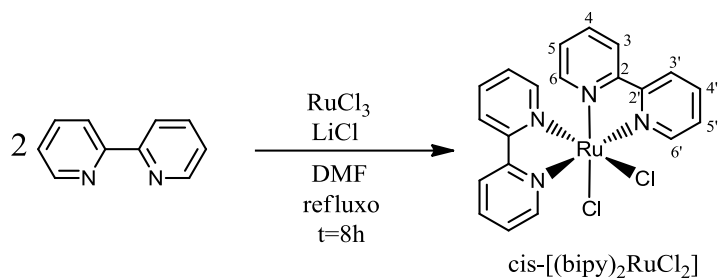
Os complexos de ruténio com biperidinas e co-ligandos do tipo tiossemicarbazona têm mostrado resultados promissores enquanto potenciais agentes terapêuticos (anti-cancerígenos e anti-microbianos) constituindo uma área de investigação que possui potencial para continuar a ser desenvolvida.⁵³

Neste capítulo descreve-se a síntese e caracterização de novos complexos de ruténio(II) pertencentes a esta família.

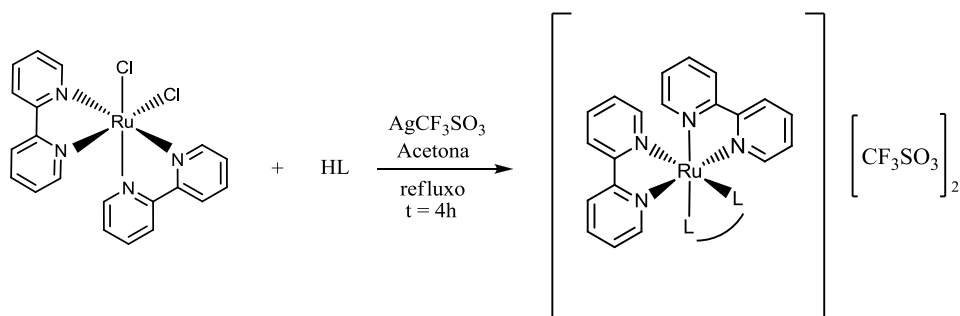
Para a obtenção destes complexos foi sintetizado (a partir de RuCl_3 comercial) o complexo *cis*-bis(2,2'-biperidina)diclouro ruténio(II) *cis*- $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ que foi posteriormente utilizado como precursor para a síntese dos novos complexos do tipo $-\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL})$, onde HL designa aqui cada um dos ligandos HL^1 , HL^2 e HL^3 .

As técnicas espectroscópicas usadas para a caracterização do precursor e dos complexos foram RMN (^1H , ^{13}C /APT e técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC), FTIR, UV-Vis. Os complexos foram ainda caracterizados por espectrometria de massa com ionização por electro-spray (ESI-MS). A análise elementar foi utilizada para determinar a fórmula empírica dos complexos e para avaliar do seu grau de pureza. Foram também realizados estudos eletroquímicos por voltametria cíclica dos complexos sintetizados.

A primeira etapa do processo sintético foi a síntese do precursor *cis*- $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ de acordo com o processo descrito por B.P. Sullivan D.J. Salmon and T.J. Meyer⁵⁸, e otimizado no grupo de investigação em que este trabalho foi realizado (esquema 3.1). Os complexos **1**, **2** e **3** foram obtidos por reação entre o *cis*- $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ e os ligandos HL^1 , HL^2 e HL^3 de acordo com o procedimento experimental descrito no capítulo 6 e que se encontra resumido no esquema 3.2.



Esquema 3.1 - Esquema de síntese do precursor *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].



Esquema 3.2: Síntese geral dos complexos **1,2 e 3** (HL=Ligando **HL¹**, **HL²** e **HL³**), isolados com o contra-íon triflato.

3.2. Análise e discussão de resultados

3.2.1. Caracterização por espectroscopia de RMN do precursor [*cis*-Ru(bipy)₂Cl₂]

Este complexo foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor roxa, com um rendimento de 79,3%.

Nas tabelas 3.1 e 3.2 apresentam-se as atribuições feitas aos sinais observados nos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, e técnicas bidimensionais COSY, HMBC e HMQC, respectivamente, podendo os respectivos espectros serem consultados nos Anexos 3.1 – 3.5.

Os valores obtidos estão de acordo com o descrito na literatura.⁵⁹

O espectro de RMN ¹H do precursor apresenta oito sinais distintos e bem definidos (contrariamente à bipyridina de partida que apresenta apenas quatro sinais) devido à

geometria de coordenação *cis* à volta do átomo de rutênio. Nos espetros de HMBC, verifica-se que os dois anéis de bipyridina são simétricos entre si e que estão na posição *cis*.

Tabela 3.1 - Resultados de RMN ^1H 1D e COSY para o composto de partida *cis*-[Ru(bipy) $_2$ Cl $_2$] em DMSO- d_6 .

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
9,94	Dupleto	1 H	5,28	7,75	H-6
8,61	Dupleto	1 H	8,12	8,04	H-3
8,45	Dupleto	1 H	8,04	7,66	H-3'
8,04	Tripleto	1 H	7,41	7,75	H-4
7,75	Tripleto	1 H	6,40	8,04	H-5
7,66	Tripleto	1 H	-	8,45	H-4'
7,48	Dupleto	1 H	5,32	7,08	H-6'
7,08	Tripleto	1 H	-	7,48	H-5'

Tabela 3.2 - Resultados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o composto de partida *cis*-[Ru(bipy) $_2$ Cl $_2$] em DMSO- d_6 .

Desvio químico δ /(ppm)	DEPT	HMQC	HMBC	Atribuição
160,31	-	-	8,61; 8,45; 7,66; 7,48	C-2'
158,30	-	-	9,94; 8,61; 8,45; 8,04	C-2
153,30	CH	9,96	8,04; 7,75	C-6
152,13	CH	7,48	7,66; 7,08	C-6'
134,83	CH	8,04	9,94	C-4
133,56	CH	7,66	7,48	C-4'
125,56	CH	7,75	9,94; 8,61	C-5
125,44	CH	7,08	8,45; 7,48	C-5'
123,0	CH	8,45	7,08	C-3'
122,60	CH	8,61	7,75	C-3

Observa-se que os prótons 3, 4, 5 e 6 não estão no mesmo ambiente dos 3', 4', 5' e 6' respetivamente (uma das extremidades do ligando bipyridilo aponta para o Cl e a outra extremidade não). O resultado deste arranjo é que os prótons de um dos anéis encontram-se a campo mais alto do que os do outro anel, devido à sua proximidade com os ligandos Cl $^-$.⁶⁰

3.2.2. Caracterização por espectroscopia de RMN e análise elementar dos complexos 1,2 e 3

A caracterização dos complexos **1**, **2** e **3** decorreu da análise conjunta das várias técnicas analíticas utilizadas, e a proposta de estrutura que se apresenta nesta tese é a que se revela mais robusta à luz dos resultados obtidos até à data. A caracterização por RMN é uma das ferramentas fundamentais para perceber o tipo de coordenação da tiossemicarbazona ao ruténio, nomeadamente se a coordenação se faz na forma tiona da tiossemicarbazona, ou se durante este processo se dá a tautomerização para a forma tiol. Uma das formas de fazer esta distinção é pela observação inequívoca no espectro de RMN¹³C do sinal correspondente ao tiocarbonilo, que geralmente aparece neste tipo de compostos perto de $\delta 180$ ppm. Dada a complexidade destes complexos, só é possível obter um bom espectro de RMN ¹³C recorrendo a um espectrómetro de 500MHz (disponível noutra instituição que não a FCUL); até á data de conclusão deste trabalho não foi possível obter espectros nesse espectrómetro para todos os complexos, razão pela qual só para o complexo **2** foi possível fazer uma atribuição inequívoca dos sinais observados.

A análise por ¹H RMN dos três novos complexos mostrou que, além dos sinais correspondentes aos ligandos, estão presentes dezasseis sinais nítidos e bem resolvidos na região aromática, pertencentes aos quatro anéis da piridina magneticamente não-equivalentes quando coordenados. Pode assim inferir-se que houve uma efetiva coordenação dos ligandos ao ruténio e que os complexos **1-3** apresentam uma geometria *cis*-heteroléptica com dois anéis piridínicos *trans* em relação ao ligando e os dois *trans* em relação um ao outro.⁶¹

Os resultados de análise elementar para todos os três novos complexos são compatíveis com a existência de 2 contra-íões triflato e estão concordantes com a coordenação de um ligando tiossemicarbazona na forma neutra, o que está também de acordo com as bandas observadas nos espectros de IV. Nos espectros de massa também se pode observar o fragmento dipositivo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL})]^{2+}$ compatível com uma coordenação na forma tiona.

Complexo 1: $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$

Este complexo foi obtido como um sólido amorfo vermelho, com um rendimento em produto limpo de 9,55%, consequência do longo processo de purificação que se revelou necessário.

A estrutura proposta para o complexo **1** encontra-se desenhada na figura 3.1 com a indicação da numeração atribuída aos respectivos prótons e carbonos.

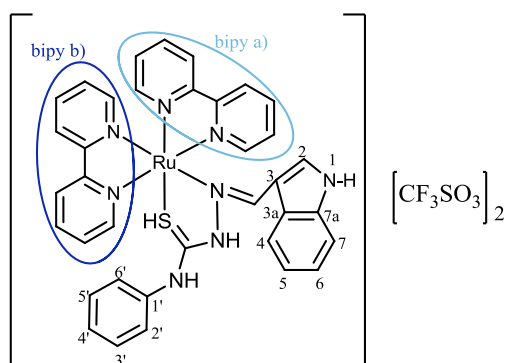


Figura 3.1 - Estrutura proposta para o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo **1**).

Caracterização por espectroscopia de RMN

As tabelas 3.3 e 3.4 reúnem as atribuições feitas para os sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C , respectivamente. Na figura 3.2 apresenta-se uma ampliação dos espectros de RMN ^1H do precursor, ligando HL^1 e complexo **1** entre $\delta 6,5$ e 13ppm , aproximadamente. Os espectros de RMN ^1H , COSY, HMBC e HMQC para o complexo **1** podem ser consultados nos Anexos 3.6 – 3.9. Pelas razões acima expostas, para o complexo **1** as atribuições dos carbonos foram realizadas através das correlações observadas em HMBC, e por comparação com os valores obtidos para o complexo **2** (para o qual foi possível obter um bom espectro de RMN ^{13}C), podendo por isso ter algum grau de imprecisão.

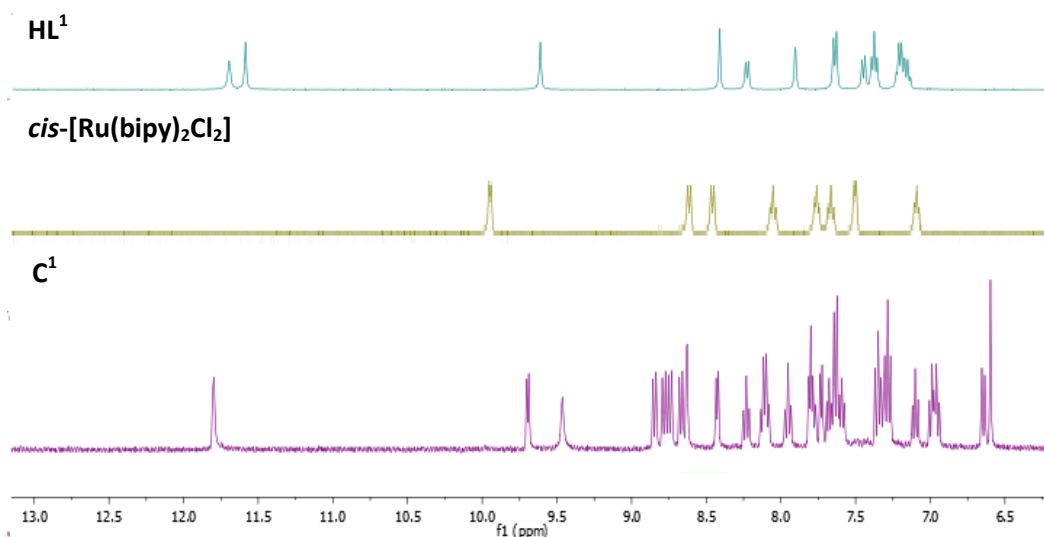


Figura 3.2 – Espectro de RMN ^1H em DMSO para Complexo **1**, HL^1 e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$.

Tabela 3.3 - Resultados de RMN ^1H 1D e COSY obtidos em $\text{DMSO-}d_6$ para o complexo **1** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$.

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
11,81	Singlete	1 H	-	-	*H-1
9,71	Dupleto	1 H	5,28	7,82	bipy a)-6
9,47	Singlete	1 H	-	-	*C=N-N-H
8,85	Dupleto	1 H	8,32	8,24	bipy a)-3'
8,79	Dupleto	1 H	8,16	8,13	bipy a)-3
8,75	Dupleto	1 H	8,28	8,10	bipy b)-3
8,68	Dupleto	1 H	8,12	7,96	bipy b)-3'
8,64	Dupleto	1 H	2,56	-	H-2
8,44	Dupleto	1 H	5,56	7,64	bipy b)-6
8,24	Tripleto	1 H	-	-	bipy a)-4'
8,13	Tripleto	1 H	-	7,80	bipy a)-4
8,10	Tripleto	1 H	-	7,64	bipy b)-4
7,96	Tripleto	1 H	-	7,36	bipy b)-4'
7,82	Multiplete	1 H	-	7,62	bipy a)-6'
7,80	Multiplete	1 H	-	-	bipy a)-5
7,74	Dupleto	1 H	5,24	7,34	bipy b)-6'
7,67	Tripleto	1 H	7,0	-	bipy b)-5
7,64	Dupleto	2 H	7,8	7,28	H-2'/H-6'
7,62	Tripleto	1 H	-	8,24	bipy a)-5'
7,36	Dupleto	5 H	8,32	7,11	H-7
7,34	Multiplete	1 H	-	-	bipy b)-5'
7,28	Multiplete	2 H	-	6,99	H-3'/H-5'
7,11	Tripleto	1 H	-	-	H-6
6,99	Tripleto	1 H	-	-	H-4'
6,96	Tripleto	1 H	-	7,11	H-5
6,65	Dupleto	1 H	7,96	-	H-4
6,60	Singlete	1 H	-	-	N=C-H

*Sinais intermutáveis.

Tabela 3.4 - Resultados de RMN ^{13}C 1D e 2D obtidos em DMSO- d_6 para o complexo **1** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DMSO- d_6 .

Desvio (ppm)	HMQC	HMBC	Atribuição
157,10	-	9,71; 8,79; 8,85	bipy a)-2
157,09	-	8,85; 7,80	bipy a)-2'
156,99	-	7,96; 7,74	bipy b)-2'
156,7	-	8,44; 8,75; 8,68	bipy b)-2
152,58	9,71	8,13	bipy a)-6
151,09	8,44	-	bipy b)-6
150,85	7,74	-	bipy b)-6'
150,05	7,80	-	bipy a)-6'
141,81	6,60	8,64	<u>C=N</u>
136,76	8,24	-	bipy a)-4'
136,09	8,13	-	bipy a)-4
135,90	7,96	-	bipy b)-4'
135,05	8,10	8,44	bipy b)-4
134,91	-	8,64; 6,65	C-7a
131,14	8,64	6,60	C-2
128,39	7,28	-	C-3'
127,45	7,62	8,85	bipy a)-5'
126,51	7,80	8,79	bipy a)-5
126,20	7,34	-	bipy b)-5'
125,63	-	8,64; 6,96	C-3a
123,40	8,75	-	bipy b)-3
122,50	8,85	-	bipy a)-3'
122,12	7,10	-	C-6
121,80	6,99	-	C-5
121,76	6,96	-	C-4'
120,41	7,64	6,99	C-2'
115,56	6,65	-	C-4
111,90	7,36	-	C-7

*Todos os carbonos foram atribuídos através das correlações heteronucleares HMQC e HMBC

Comparando os espectros de RMN do ligando, do precursor e do complexo, podem facilmente observar-se marcadas diferenças que levam a concluir que houve de facto coordenação do ligando ao centro metálico.

A característica mais marcante no espectro RMN ^1H do complexo **1** é o conjunto de sinais relativo aos prótons dos quatro anéis piridínicos, que aparecem bem definidos e individualizados pelas razões já expostas anteriormente. Verifica-se também o desaparecimento do próton C=N-NH, o que poderia levar a pensar que neste complexo a tiossemicarbazona estaria coordenada na forma de tiolato. Embora para o complexo **1** não tenha sido possível obter um espectro RMN ^{13}C bem acumulado, que permitisse detetar o grupo tiocarbonilo, não se observou neste espectro nenhum sinal que pudesse ser atribuído a

um carbono tiólico que tipicamente aparece a campo muito mais alto (entre 125 e 135 ppm de acordo com a substituição).⁶² Quando se conjugam estes resultados com os obtidos pelas outras técnicas, a hipótese da coordenação na forma tiona parece ser a mais consistente. Um outro aspeto importante é o grande blindamento do protão azometínico que passa de δ 8,41 ppm para δ 6,60 ppm, mantendo-se o carbono praticamente inalterado. Verifica-se também um blindamento igualmente significativo para H-4 do anel indólico, que passa de δ 8,20 para δ 6,64 ppm. O sinal de H-2, pelo contrário, sofre um desblindamento em relação ao sinal homólogo do ligando, passando de δ 7,90 para δ 8,63ppm. Estes factos podem estar relacionados com efeitos estereoquímicos.

Análise Elementar

A análise elementar do complexo **1** é compatível com a formula empírica $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2 \cdot \frac{1}{2} \text{CH}_2\text{Cl}_2$, suportando a coordenação do ligando na forma tiona, e apresenta uma concordância entre os valores calculados e os determinados experimentalmente dentro dos parâmetros geralmente considerados admissíveis pela comunidade científica (tipicamente diferenças inferiores a 0.4%). Os resultados sumarizam-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo **1**.

	%C	%H	%N	%S
Experimental	42,2	2,9	10,55	9,0
Calculado para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2 \cdot \frac{1}{2} \text{CH}_2\text{Cl}_2$	44,11	2,98	10,69	9,17

Complexo 2: $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$

Este complexo foi obtido como um sólido amorfo vermelho com um rendimento em produto puro de 10,5%, consequência das várias recristalizações envolvidas no seu processo de purificação. A sua estrutura está indicada na figura 3.3.

Caracterização por espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e correlações COSY, HMQC e HMBC foram interpretados para o complexo **2** de um modo análogo ao efetuado para o complexo **1**. Nas tabelas 3.6 e 3.7 apresentam-se as atribuições feitas dos sinais de RMN ^1H , RMN ^{13}C , tal como efeito anteriormente.

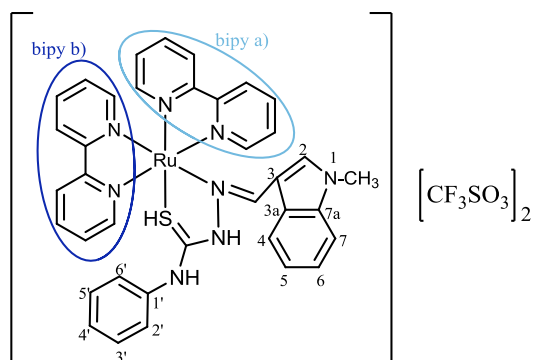


Figura 3.3 - Estrutura proposta para o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (complexo **2**).

Os espectros de RMN ^1H e correlações COSY, HMBC e HMQC para o complexo **2** podem ser consultados nos Anexos 3.10 – 3.13. Na figura 3.4 apresenta-se uma ampliação dos espectro de RMN ^1H do precursor, ligando HL^1 e complexo **2**.

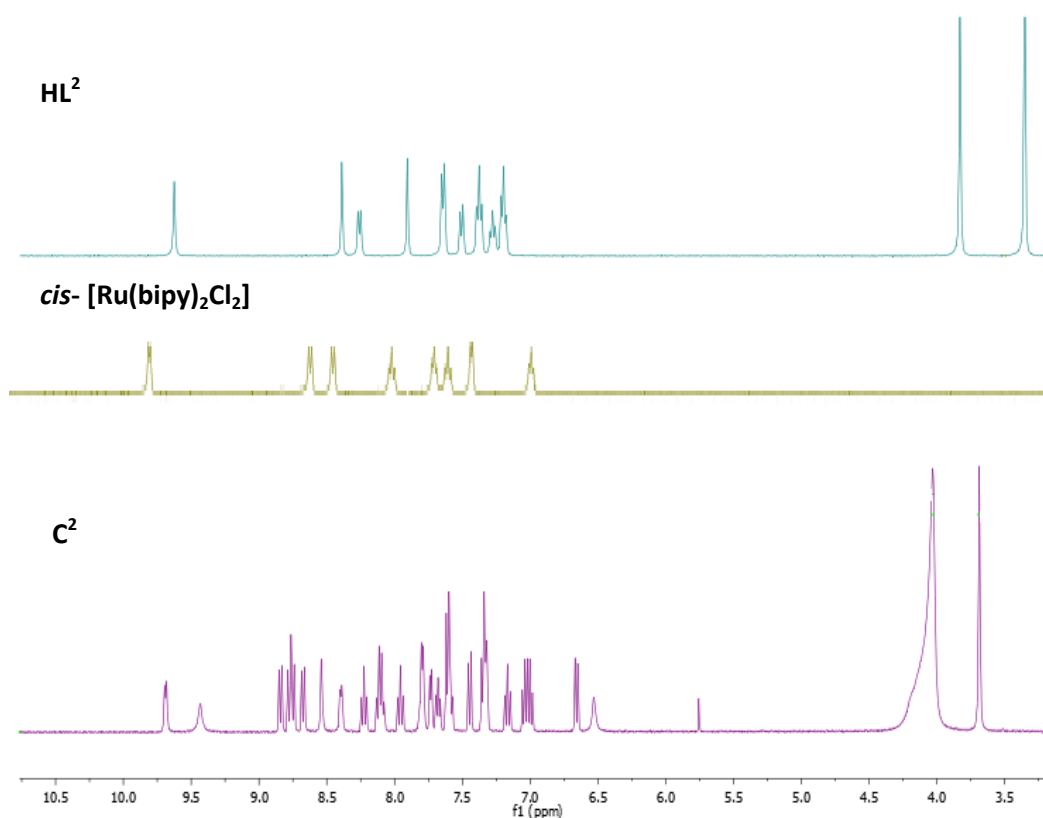


Figura 3.4 – Espectro de NMR ^1H em DMSO para complexo **2**, ligando HL^2 e *cis*- $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$.

A interpretação dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , e correlações COSY, HMQC e HMBC foi efetuada de um modo análogo ao do complexo **1**, pois a única diferença entre complexo **1** e **2** é a substituição no azoto indólico do ligando, que no complexo **2** é um grupo metilo.

Comparando o espectro de próton e de carbono do ligando livre com os respectivos espectros do complexo em DMSO- d_6 (figura 3.4), verificam-se, tal como no complexo **1**, blindamentos significativos do próton azometínico que passa de $\delta 8,39$ ppm para $\delta 6,55$ ppm e do próton H4 do anel indólico que passa de $\delta 8,26$ para $\delta 6,67$ ppm. Pelo contrário, o próton H-2 do anel indólico desblinda significativamente, passando de $\delta 7,90$ ppm para $\delta 8,54$ ppm. Verifica-se também a inexistência do sinal correspondente ao próton C=N-NH. No entanto, e suportando a hipótese de coordenação do ligando na forma tiona, tem-se para este complexo, no espectro de RMN ^{13}C , o sinal correspondente ao tiocarbonilo a $\delta 176,35$ ppm, cerca de 2 ppm para campo mais baixo do observado no ligando livre.

Tabela 3.6 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo **2** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DMSO- d_6 .

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
9,69	Dupleto	1 H	5,35	7,80	bipy a)-6
9,43	Singuleto	1 H	-	-	PhN-H
8,84	Dupleto	1 H	8,1	8,22	bipy a)-3'
8,78	Multiplete	1 H	-	8,11	bipy a)-3
8,75	Multiplete	1 H	-	8,10	bipy b)-3
8,67	Dupleto	1 H	8,2	7,96	bipy b)-3'
8,54	Singuleto	1 H	-	-	H-2
8,40	Dupleto	1 H	5,55	7,69	bipy b)-6
8,22	Triplete	1 H	-	7,59	bipy a)-4'
8,11	Multiplete	1 H	-	-	bipy a)-4
8,10	Multiplete	1 H	-	7,69	bipy b)-4
7,96	Triplete	1 H	-	7,34	bipy b)-4'
7,80	Dupleto	1 H	-	8,11	bipy a)-5
7,79	Dupleto	1 H	-	7,59	bipy a)-6'
7,74	Dupleto	1 H	5,54	7,34	bipy b)-6'
7,69	Triplete	1 H	-	-	bipy b)-5
7,61	Multiplete	2 H	-	7,34	H-2'/H-6'
7,59	Multiplete	1 H	-	-	bipy a)-5'
7,45	Dupleto	1 H	8,3	7,17	H-7
7,34	Multiplete	3 H	-	7,04	bipy b)-5' ; H-3'/H-5'
7,17	Triplete	1 H	-	7,01	H-6
7,04	Multiplete	1 H	-	-	H-4'
7,01	Multiplete	1 H	-	6,66	H-5
6,66	Dupleto	1 H	8,05	-	H-4
6,53	Singuleto	1 H	-	-	N=C-H
3,69	Singuleto	3 H	-	-	H-1

Tabela 3.7 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo **2** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em $\text{DMSO}-d_6$.

Desvio químico δ /(ppm)	HMQC	HMBC	Atribuição
176,35	-	-	$\underline{\text{C}}=\text{S}$
157,17	-	-	bipy a)-2
157,13	-	-	bipy a)-2'
157,01	-	7,96; 7,74	bipy b)-2'
156,78	-	8,75; 8,67	bipy b)-2
152,66	9,69	8,11	bipy a)-6
151,26	8,40	8,10	bipy b)-6
151,13	7,74	7,96	bipy b)-6'
150,35	7,80	8,22	bipy a)-6'
141,55	6,53	-	$\underline{\text{C}}=\text{N}-\text{H}$
141,45	-	7,34	C-1'
136,97	8,22	-	bipy a)-4'
136,22	8,11	-	bipy a)-4
135,98	7,96	7,74	bipy b)-4'
135,54	-	-	C-7a
135,44	8,10	-	bipy b)-4
135,07	8,54	3,69	$\underline{\text{C}}-2$
128,49	7,34	-	C-3'
127,45	7,59	8,84	bipy a)-5'
127,08	7,69	8,75	bipy b)-5
126,75	7,80	-	bipy a)-5
126,42	7,34	7,74	bipy b)-5'
125,93	-	7,45; 7,01	C-3a
124,08	8,78	-	bipy a)-3
123,79	8,75	7,59	bipy b)-3
123,63	8,84	-	bipy a)-3'
123,25	8,67	-	bipy b)-3'
122,55	7,17	6,66	C-6
122,45	7,04	-	C-4'
121,29	7,61	7,34; 7,04	C-2'
120,77	7,01	7,45; 6,66	C-5
116,09	6,66	7,17	C-4
110,61	7,45	-	C-7
32,82	3,69	-	CH_3

*Todos os valores foram retirados dos espectros de HMBC e HMQC

Análise Elementar

A análise elementar do complexo **2** é compatível com a fórmula empírica $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, suportando a coordenação do ligando na forma tiona, confirmando-se a pureza do complexo obtido. Os resultados experimentais são concordantes com os valores calculados (tabela3.8).

Tabela 3.8 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo **2**.

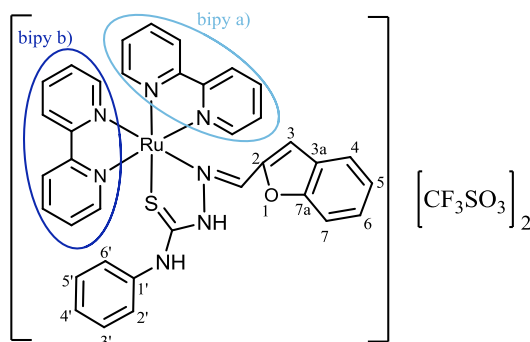
	%C	%H	%N	%S
Experimental	43,75	2,9	10,35	9,0
Calculado para [Ru(bipy) ₂ (HL ²)] [CF ₃ SO ₃] ₂ ·CH ₂ Cl ₂	45,93	3,16	10,99	9,91

Complexo 3: [Ru(bipy)₂(HL³)] [CF₃SO₃]₂

Este complexo, para o qual se propõe a estrutura representada na figura 3.5, é um sólido amorfo vermelho, obtido com um rendimento de 12,3% em consequência das várias recristalizações envolvidas no seu processo de purificação.

Caracterização por espectroscopia de RMN

Nas tabelas 3.9 e 3.10 seguintes apresentam-se as atribuições feitas para os sinais de RMN ¹H e RMN ¹³C.

**Figura 3.5** - Estrutura proposta para o complexo [Ru(bipy)₂(HL³)] [CF₃SO₃]₂ (complexo **3**).

Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C/APT, COSY e HMQC para o complexo **3** podem ser consultados nos Anexos 3.14 – 3.17. Os espectros de RMN ¹H do precursor, ligando HL³ e complexo **3** são apresentados na figura 3.6.

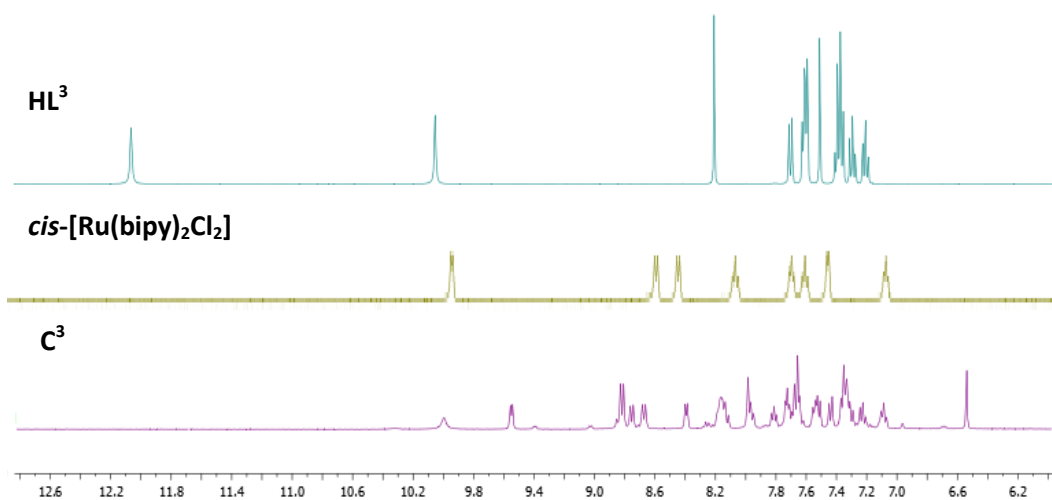


Figura 3.6 – Espectro de NMR ^1H em DMSO para Complexo **3**, ligando HL^3 e $\text{cis-Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Tabela 3.9 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo **3** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
9,97	Singlete	1 H	-	-	PhN-H
9,55	Dupleto	1 H	5,44	7,84	bipy a)-6
8,83	Dupleto	2 H	8,16	8,16	bipy a)-3; bipy a)-3'
8,76	Dupleto	1 H	8,4	8,13	bipy b)-3
8,68	Dupleto	1 H	8,16	7,97	bipy b)-3'
8,38	Dupleto	1 H	5,44	7,72	bipy b)-6
8,17	Multiplete	1 H	-	8,83	bipy a)-4
8,16	Multiplete	1 H	-	7,54	bipy a)-4'
8,13	Multiplete	1 H	-	7,72	bipy b)-4
7,98	Triplete	1 H	-	-	H-3
7,96	Triplete	1 H	-	7,33	bipy b)-4'
7,84	Triplete	1 H	-	8,17	bipy a)-5
7,73	Triplete	1 H	-	7,54	bipy a)-6'
7,72	Triplete	1 H	-	-	bipy b)-5
7,65	Multiplete	3 H	-	7,35	bipy b)-6'; H-2'/H-6'
7,53	Multiplete	1 H	-	-	bipy a)-5'
7,52	Multiplete	1 H	-	7,23	H-4
7,45	Dupleto	1 H	8,22	7,31	H-7
7,36	Multiplete	1 H	-	7,09	H-3'/H-5'
7,33	Multiplete	1 H	-	7,65	bipy b)-5';
7,31	Multiplete	1 H	-	7,24	H-6
7,24	Triplete	1 H	-	-	H-5
7,10	Triplete	1 H	-	-	H-4'
6,53	Singlete	1 H	-	-	N=C-H

Tabela 3.10 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo **3** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Desvio (ppm)	APT	HMQC	Atribuição
180,49	-	-	C=S
*157,22	-	-	-
*156,74	-	-	-
*156,67	-	-	-
*156,59	-	-	-
*153,03	-	-	-
152,96	CH	9,55	bipy a)-6
151,31	CH	8,40	bipy b) -6
150,96	CH	7,66	bipy b) -6'
150,11	CH	7,74	bipy a)-6'
*148,70	-	-	-
*141,06	-	-	-
*137,51	CH	-	-
*136,83	CH	-	-
136,75	CH	6,54	<u>C=N-H</u>
136,55	CH	7,97	bipy b)-4'
136,11	CH	8,18	bipy a) -4
128,58	CH	7,35	C-3'
*128,37	-	-	-
*127,77	CH	-	-
*127,49	CH	-	-
*127,14	CH	-	-
*126,70	CH	-	-
*126,44	CH	-	-
*124,37	CH	-	-
*124,13	CH	-	-
*123,85	CH	-	-
*123,64	CH	-	-
*123,41	CH	-	-
123,22	CH	7,09	C-4'
*122,33	-	-	-
121,82	CH	7,52	C-4
121,66	CH	7,66	C-2'
*119,13	-	-	-
112,32	CH	7,98	C-3
111,17	CH	7,43	C-7

*A atribuição não foi devidamente realizada devido a falta de espectro de HMBC

Comparando os espectros de RMN deste complexo com os dos complexos **1** e **2** são evidentes as diferenças nos sinais correspondentes ao anel heteroaromático do ligando, devido à substituição do azoto pelo oxigênio e à diferente posição do grupo imina em relação ao anel.

Ao se comparar os espectros do próton do ligando com o do respectivo complexo, verifica-se a existência de apenas 1 próton NH, o que poderia apontar para o facto do ligando se ter coordenado na forma de tiolato. No entanto, para este complexo foi possível obter-se um espectro RMN ^{13}C bem acumulado que permitiu detetar o grupo tiocarbonilo a $\delta 180,49\text{ppm}$, havendo um desblindagem de $4,16\text{ ppm}$ relativamente ao desvio do ligando livre, que aparece a $\delta 170,03\text{ppm}$. Tal como para os complexos **1** e **2**, verifica-se uma blindagem significativa do próton azometínico, que passa de $\delta 8,21$ para $\delta 6,54\text{ppm}$. Quando se conjugam estes resultados com os obtidos pelas outras técnicas, a hipótese da coordenação do ligando HL^3 na forma tiona é a mais consistente.

Análise Elementar

A análise elementar do complexo **3** é compatível com a fórmula empírica $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2 \cdot \frac{3}{4} \text{CH}_2\text{Cl}_2$, suportando a coordenação do ligando na forma tiona. Também neste caso, a boa concordância entre os valores experimentais e calculados, vieram confirmar a pureza do complexo obtido – tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo **3**.

	%C	%H	%N	%S
Experimental	43,7	2,85	8,85	9,0
Calculado para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2 \cdot \frac{3}{4} \text{CH}_2\text{Cl}_2$	43,47	2,87	9,16	8,98

3.2.3. Caracterização por espectroscopia de IV dos complexos 1,2 e 3

Os espectros de IV (anexos 3.18 a 3.21) para os complexos de rutênio foram comparados com os do ligando tiossemicarbazona correspondente livre de modo a observar-se se o desvio das bandas mais características era compatível com a coordenação ao íon metálico. A tabela 3.12 reúne algumas das bandas mais características presentes nos espectros de IV dos complexos.

Tabela 3.12 – Dados espectroscópicos de IV dos complexos **1**, **2** e **3**.

Complexo	$\nu_{\text{C=S}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C=N}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C-H(arom)}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{Ru-N}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{Ru-S}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{CF}_3\text{SO}_3}$ (cm^{-1})
1	1255	1600	3111	472	418	1157 + 636
2	1253	1598	3076	516	420	1157 + 636
3	1255	1593	3145	570	516	1159 + 636

Comparando as frequências de vibração dos principais grupos funcionais presentes nos complexos, com as do respetivo ligando livre, a coordenação do ligando ao centro de rutênio através dos átomos de azoto imínico e de enxofre é detetado em todos os complexos de rutênio, através da observação do deslocamento das bandas ν (C=N) e ν (C=S).⁶²

Comparando os ligandos HL¹, HL² e HL³ com os complexos 1,2 e 3 observa-se que a banda associada à vibração da ligação C=N desloca-se para comprimentos de onda mais baixos quando coordenado ao metal: no ligando HL¹ aparece a 1602 cm^{-1} e no complexo **1** a 1600 cm^{-1} , deslocando-se apenas 2 cm^{-1} ; no ligando HL³ aparece a 1612 cm^{-1} e no complexo **3** a 1593 cm^{-1} . Para o ligando HL² a banda associada à vibração da ligação C=N também se desloca para comprimentos de onda mais baixos quando coordenado ao metal, passando de 1620 cm^{-1} no ligando para 1588 cm^{-1} no complexo **2**.

Assim, após a coordenação, são observados alterações das bandas ν (C=N) dos ligandos livres tiossemicarbazona, a cerca de 1500-1600 cm^{-1} , no qual estes são deslocados

ligeiramente para energia menor.⁵³ Esta alteração é coerente com a coordenação dos ligandos tiossemicarbazona através do azoto imínico.⁶²

Quando se compara a frequência de absorção referente à vibração C=S do ligando livre e dos respetivos complexos, verifica-se, de um modo geral, um deslocamento para números de onda mais elevados. No ligando **HL**¹ a banda de estiramento $\nu_{C=S}$ encontra-se a 1246 cm^{-1} e no complexo **1** aparece a 1255 cm^{-1} . No ligando **HL**³ também existe um deslocamento do número de onda associado à ligação C=S, passando de 1251 cm^{-1} no ligando livre para 1253 cm^{-1} no complexo **3**. Para o ligando **HL**² e respetivo complexo **2** não se observa alteração da banda de vibração C=S.

As bandas correspondentes às ligações Ru-S e Ru-N são observadas entre $420\text{-}580\text{ cm}^{-1}$.

Observam-se ainda bandas a 1156 e 637 cm^{-1} atribuídas à presença do contra-íão CF_3SO_3^- .^{56,57}

3.2.4. Caracterização por massa (ESI-MS) dos complexos 1,2 e 3

Os espectros de massa obtidos por ESI de baixa resolução para os três complexos ser consultados nos anexos 3.27-3.29. É possível detetar-se sempre o íão molecular esperado para a formulação $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL})]^{2+}$, compatível com uma coordenação do ligando na forma de tiona:

Complexo 1: m/z 353,95 compatível com $[\text{Ru}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2)_2(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S})]^{2+}$;

Complexo 2: m/z 360,99 compatível com $[\text{Ru}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2)_2(\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S})]^{2+}$;

Complexo 3: m/z 354,42 compatível com $[\text{Ru}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2)_2(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS})]^{2+}$

Para o complexo **1** este pico é também o pico base.

Nos espetros de todos os complexos é possível também observar um segundo pico, que no caso dos complexos **2** e **3** corresponde ao pico base, atribuível a uma espécie monopositiva do tipo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{L})]^+$. Esta espécie corresponde a um complexo em que o ligando se deverá coordenar ao ruténio na forma de tiolato. Estes picos podem ser devidos a um processo ocorrido durante a própria ionização, em que para além da perda dos dois contra-íões triflato, se dá também desprotonação de um dos grupos NH da tiossemicarbazona,

como proposto na figura. 3.7 para o caso do complexo **1**. Este fenómeno foi observado também para outros complexos de rutênio com ligandos mistos do tipo $[\text{Ru}(\text{fenantrolina})_2(\text{tiossemicarbazona})][\text{PF}_6]_2$.⁵³

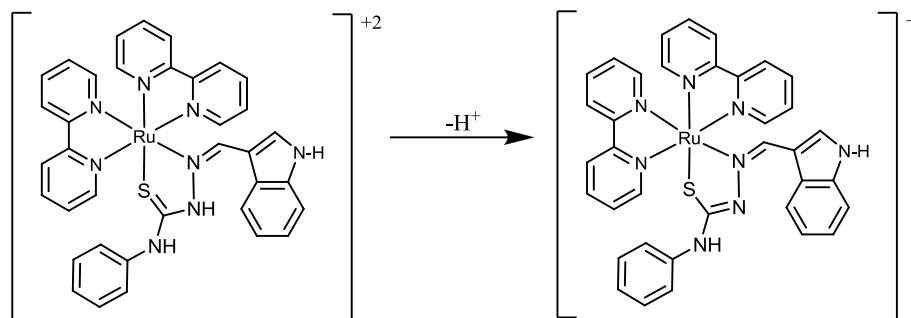


Figura 3.7 - Formação da espécie monopositiva durante o processo de ionização do complexo **1**.

3.2.5. Caracterização por espectroscopia de UV-Vis dos complexos **1,2** e **3**

Com a realização de estudos por espectroscopia de UV-Vis dos complexos procurou-se caracterizar os seus espectros electrónicos e inferir sobre a possível existência de bandas de transferência de carga ocorrentes entre o metal e os ligandos, quer sejam bandas de transferências de carga do metal para o ligando (MLCT), quer sejam bandas de transferência de carga do ligando para o metal (LMCT).

O comportamento na região de UV-vis de alguns compostos pode variar de acordo com o solvente utilizado, e ao variar a polaridade do solvente pode inferir-se sobre a existência de bandas de transferência de carga. O efeito mais notável desta influência é designado por *solvatocromismo* e é definido pela modificação da posição, intensidade e forma da banda de absorção com a polaridade do meio. A espécie a caracterizar, no estado excitado, não fica em equilíbrio com as moléculas de solvente vizinhas, uma vez que o tempo que a espécie permanece no estado excitado não é suficiente para que se dê reorganização da esfera de solvatação. É desta forma que se consegue, muitas vezes, distinguir as bandas de transferência de carga das bandas π - π^* , uma vez que só as bandas de transferência de carga sofrem as alterações mencionadas.^{63,64}

Os espectros de UV-Vis dos compostos foram obtidos de soluções de concentração 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M, em dimetilsulfóxido e diclorometano. A tabela 3.13 resume os dados dos espectros electrónicos para os complexos **1 a 3**, para os respetivos ligandos e para o precursor,

encontrando-se nela reunidos os valores de comprimento de onda (λ) e coeficiente de absorção molar (ϵ) dos compostos.

Tabela 3.13 – Dados espectroscópicos de UV-Vis dos complexos **1**, **2** e **3** (Sh=Ombro).

Composto	Solvente	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Complexo 1 [Ru(bipy) ₂ (HL ¹)](CF ₃ SO ₃) ₂	DMSO	353 (45400)
		396 (Sh) (39800)
		461 (28300)
		519 (Sh) (21100)
		581 (Sh) (14000)
	DCM	246 (38400)
		291 (61100)
		337 (18900)
		395 (Sh) (13700)
Complexo 2 [Ru(bipy) ₂ (HL ²)](CF ₃ SO ₃) ₂	DMSO	362 (39800)
		399 (34900)
		462 (24400)
		518 (Sh) (15000)
		570 (Sh) (72200)
	DCM	243 (Sh) (76300)
		291 (118000)
		339 (37100)
		402 (Sh) (26700)
Complexo 3 [Ru(bipy) ₂ (HL ³)](CF ₃ SO ₃) ₂	DMSO	351 (Sh) (67500)
		386 (59000)
		452 (Sh) (36300)
		477 (Sh) (34400)
		554 (Sh) (10100)
	DCM	244 (56000)
		292 (101000)
		350 (453000)
		444 (Sh) (22400)

Pode observar-se nos anexos 3.22 a 3.24 que quando se diminui a polaridade do solvente, as bandas deslocam-se para comprimentos de onda menores, isto é, ocorre um

deslocamento hipsocrômico das bandas de absorção nos espectros dos complexos. A característica mais importante dos espectros eletrônicos dos complexos **1**, **2** e **3** é a presença de bandas largas e intensas na região entre 350 e 500 nm, região onde são esperadas as transições correspondentes à transferência de carga entre o Ru(II) e os ligandos (570-300 nm).^{65,65}

No caso do complexo **1**, verifica-se que a banda a $\lambda=337$ nm (em DCM) é afetada pela polaridade do solvente, sendo que pela região espectral onde se encontra e pelo valor de absorvidade molar, deva corresponder a uma banda de transferência de carga metal→ligando. Nos complexos **2** e **3** estas bandas de transferência de carga metal→ligando são detetadas, em CH_2Cl_2 , a $\lambda=339$ nm e a $\lambda=444$ nm, respetivamente.

São ainda observadas uma banda a 290 nm, que é atribuída a uma transição $\pi-\pi^*$ do ligando bipyridina.⁶⁵

Nas figuras 3.8 a 3.10 pode-se observar o espectro electrónico do complexo com o respectivo ligando.

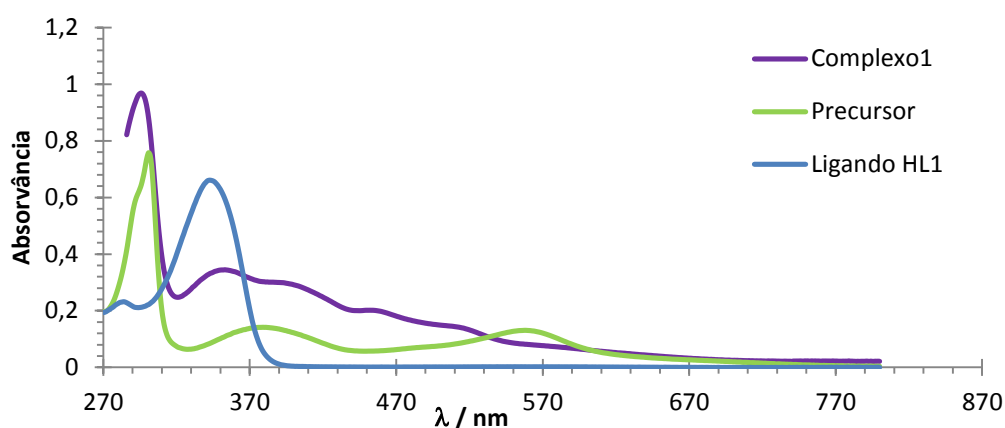


Figura 3.8 – Espectro electrónico ligando HL^1 ($C_{\text{ligando HL}^1}=1,42 \times 10^{-5} \text{M}$), precursor *cis*-Ru(bipy)₂Cl₂ ($C_{\text{precursor}}=2,02 \times 10^{-5} \text{M}$) e complexo **1** ($C_{\text{complexo 1}}=8,70 \times 10^{-6} \text{M}$), em DMSO.

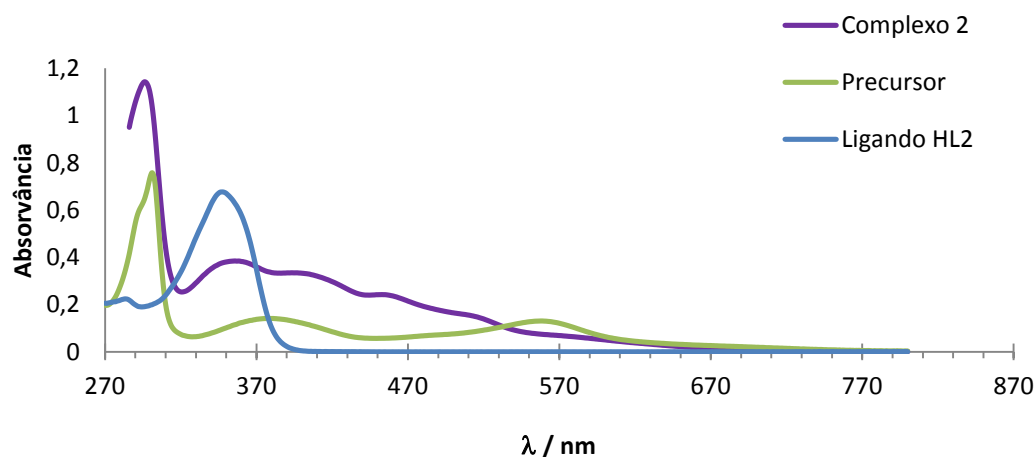


Figura 3.9 – Espectro eletrônico ligando HL^2 ($C_{\text{ligando } HL^2} = 1,44 \times 10^{-5} M$), precursor $cis\text{-Ru}(bipy)_2Cl_2$ ($C_{\text{precursor}} = 2,02 \times 10^{-5} M$) e complexo **2** ($C_{\text{complexo 2}} = 9,55 \times 10^{-6} M$), em DMSO.

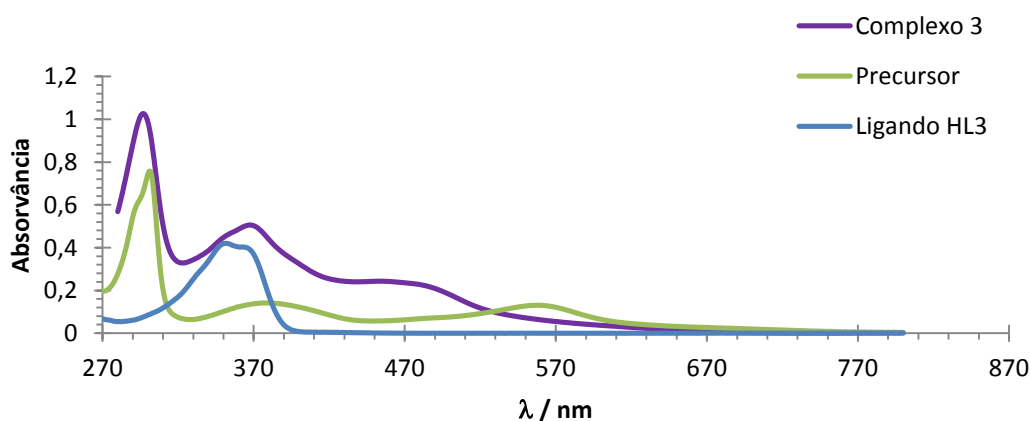


Figura 3.10 – Espectro eletrônico ligando HL^3 ($C_{\text{ligando } HL^3} = 1,42 \times 10^{-5} M$), precursor $cis\text{-Ru}(bipy)_2Cl_2$ ($C_{\text{precursor}} = 2,02 \times 10^{-5} M$) e complexo **3** ($C_{\text{complexo 3}} = 6,70 \times 10^{-6} M$), em DMSO.

3.3. Estudos Electroquímicos por Voltametria Cíclica dos complexos **1,2** e **3**

A voltametria cíclica tem um papel importante na investigação de processos redox em complexos de metais de transição, permitindo a obtenção de informação acerca da sua reactividade e do comportamento das espécies.

Com o objectivo de estudar o comportamento redox dos complexos metálicos e dos ligandos coordenados, estudou-se o comportamento electroquímico dos complexos **1,2** e **3**, do precursor $cis\text{-[Ru}(bipy)_2Cl_2]$ e dos ligando HL^1 , HL^2 e HL^3 por voltametria cíclica em

diclorometano e acetonitrilo, usando como eletrólito de suporte o hexafluorofosfato de tetrabutílamónio (0,1M) e uma célula electroquímica contendo três eléctrodos. Como eléctrodo de trabalho usou-se um eléctrodo de disco de platina (1nm), sendo que estes estudos foram realizados em atmosfera inerte e à temperatura ambiente. Na tabela 3.14 encontram-se resumidos os resultados obtidos.

Tabela 3.14 – Dados electroquímicos dos ligandos **HL¹**, **HL²**, **HL³**, do precursor *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂] e complexo **1**, complexo **2** e complexo **3**.

Composto	Diclorometano					Acetonitrilo				
	E _{pa} (V)	E _{pc} (V)	E _{1/2} (V)	E _{pa} -E _{pc} (V)	I _c /I _a (V)	E _{pa} (V)	E _{pc} (V)	E _{1/2} (V)	E _{pa} - E _{pc} (V)	I _c /I _a (V)
HL¹	1,48	-	-	-	-	1,08	-	-	-	-
	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HL²	1,41	-	-	-	-	1,37	-	-	-	-
	1,06	-	-	-	-	0,95	-	-	-	-
HL³	1,52	-	-	-	-	1,69	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-1,69	-	-	-
[Ru(bipy)₂Cl₂]	0,40	0,33	0,36(5)	70	1,0	0,36	0,28	0,32	80	0,8
	-	-	-	-	-	-	-1,77	-	-	-
Complexo 1	1,98	-	-	-	-	1,69	-	-	-	-
	1,60	-	-	-	-	1,46	-	-	-	-
	1,21	-	-	-	-	1,10	-	-	-	-
	0,80	-	-	-	-	0,63	0,52	0,57	110	1,0
	-	-	-	-	-	-1,50	-1,55	-1,525	50	0,9
	-	-	-	-	-	-1,75	-1,81	-1,78	60	1,0
Complexo 2	1,62	-	-	-	-	1,59	-	-	-	-
	1,24	-	-	-	-	1,42	-	-	-	-
	0,90	-	-	-	-	1,36	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	0,94	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-1,49	-1,57	-1,53	80	-
	-	-	-	-	-	-1,72	-1,81	-1,765	90	0,85
Complexo 3	1,74	-	-	-	-	1,35	-	-	-	-
	1,42	-	-	-	-	0,87	-	-	-	-
	0,96	0,86	0,91	100	0,9	-1,60	-1,70	-1,65	100	-
	-	-	-	-	-	-1,78	-1,72	-1,75	60	-

Nas figuras 3.11, 3.12 e 3.13 apresenta-se, para cada um dos ligandos tiossemicarbazona **HL¹** a **HL³**, um exemplo de voltamograma cíclico obtido para cada composto. Os voltamogramas cíclicos mostram, em ambos os solventes, um ou dois processos oxidativos irreversíveis na zona de potenciais positivos. O ligando **HL²** tornou-se instável em solução ao longo do tempo, ou seja, observa-se uma modificação do comportamento electroquímico em ambos os solventes. A substituição do anel indole por um anel benzofurano

origina um aumento grande no potencial de oxidação e o desaparecimento de um dos processos oxidativos. Assim, esta substituição torna a oxidação do ligando mais difícil.

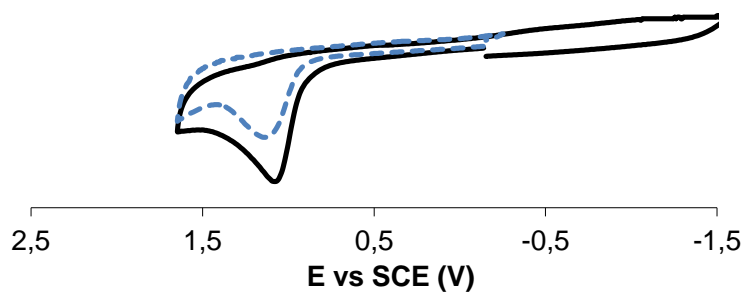


Figura 3.11 – Voltamograma cíclico do ligando HL¹ em ACN ($v = 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

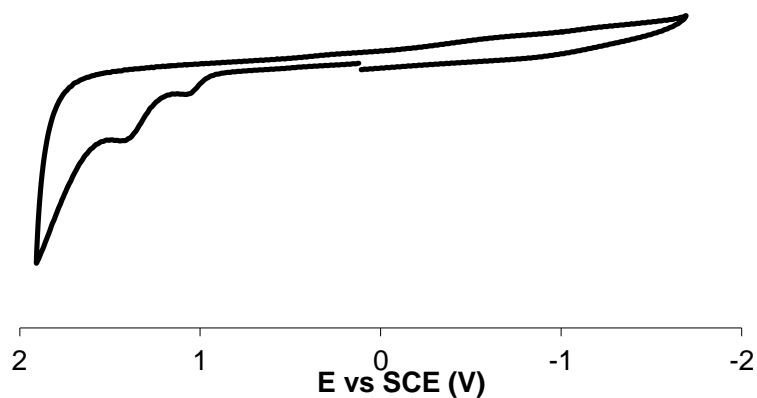


Figura 3.12 - Voltamograma cíclico do ligando HL² em DCM ($v = 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

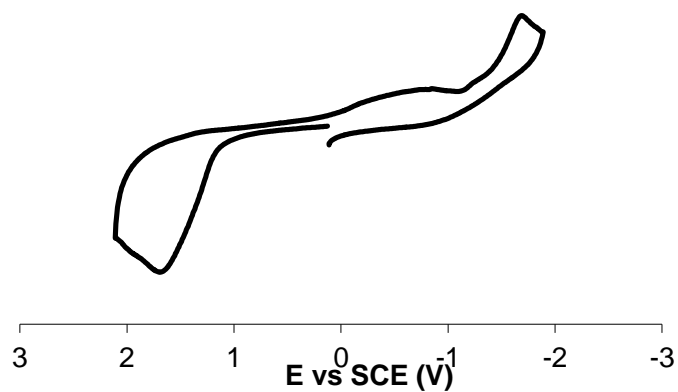


Figura 3.13 - Voltamograma cíclico do ligando HL³ em ACN ($v = 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

Quanto ao precursor *cis*-bis(2,2'-bipiridina)diclororuténio(II), o voltamograma do complexo *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂] mostra um processo redox quase-reversível a 0.32 V em ACN (figura 3.14) atribuído ao centro de ruténio, que é observado a 0.37 V em DCM. A substituição de um ou dois ligandos cloro no complexo *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂] (neutro) pelo ligando tiossemicarbazona deve originar complexos catiónicos e uma subida do valor de potencial para o processo redox centrado no ruténio.

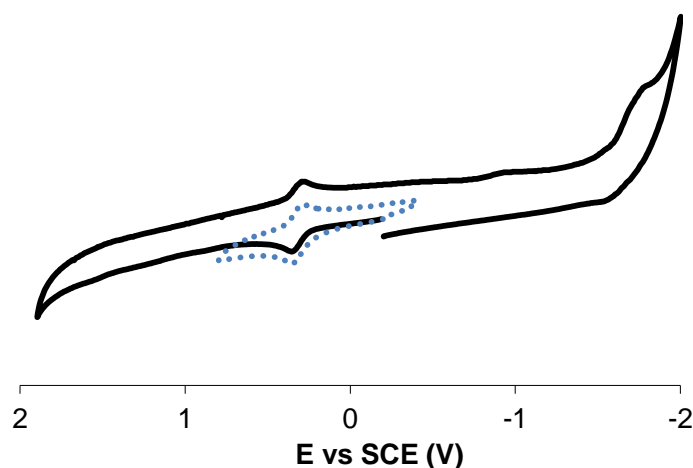


Figura 3.14 - Voltamograma cíclico do complexo [Ru(bipy)₂Cl₂] em ACN ($v = 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$); a azul processo redox quase-reversível observado na zona -0,5V a 1V e atribuído ao centro de ruténio.

Apresentam-se nas figuras 3.15 a 3.19 alguns dos voltamogramas cíclicos obtidos para os complexos [Ru(bipy)₂(HL)](CF₃SO₃)₂ (onde HL designa cada um dos ligandos HL¹ a HL³). De uma forma geral, os complexos de ruténio apresentam dois processos oxidativos na zona de potenciais positivos e dois processos redutivos na zona de potenciais negativos. Os processos oxidativos são na generalidade irreversíveis, enquanto que os processos a potenciais negativos (que são atribuídos aos ligandos bipiridina coordenados)⁶⁶ se tornam quasi-reversíveis especialmente a velocidades de varrimento mais elevadas. De uma forma geral, os valores de potencial em diclorometano são mais elevados que os encontrados em acetonitrilo.

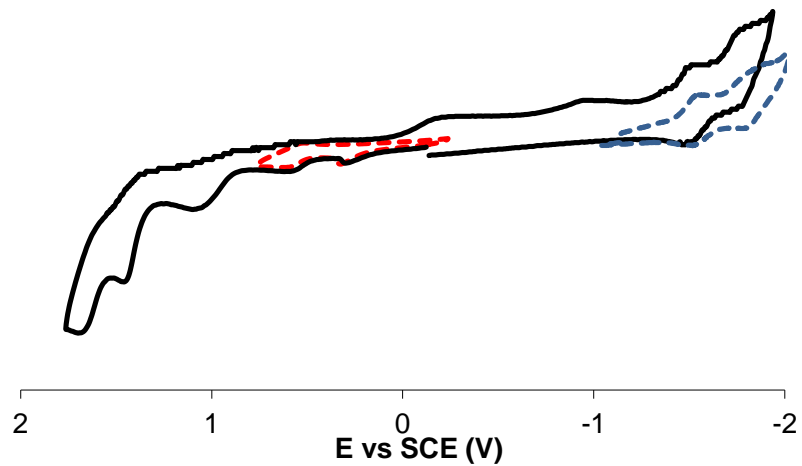


Figura 3.15 – Voltamograma cíclico do complexo **1** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN ($v = 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), evidenciando o processo a vermelho associado ao centro metálico e o processo a azul associado às bipyridinas.

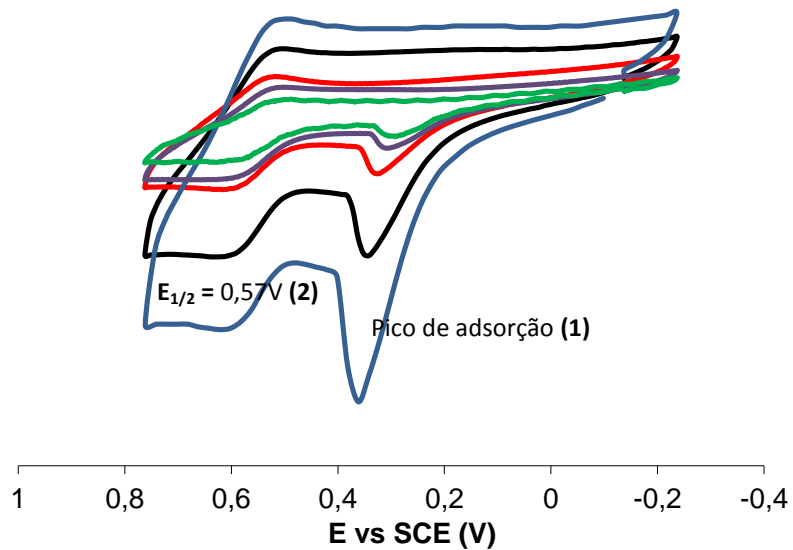


Figura 3.16 - Voltamograma cíclico do complexo **1** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN a diferentes velocidades de varrimento na zona de potencial -0.4V a 0.8 V; **(1)** pico de adsorção, **(2)** processo redox atribuído ao centro metálico Ru(II)/Ru(III).

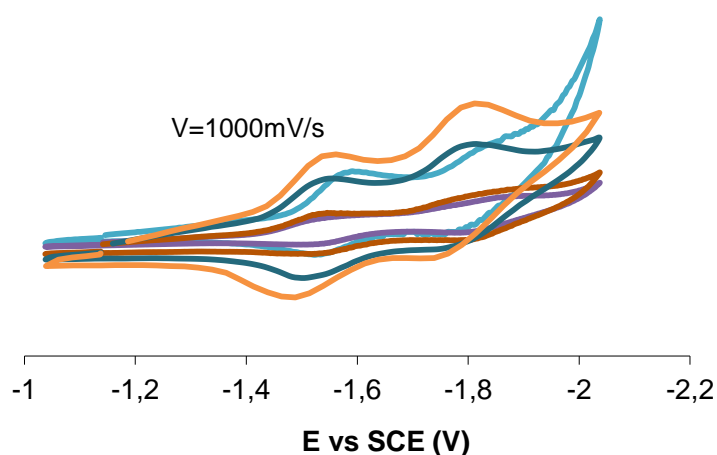


Figura 3.17 - Voltamograma cíclico do complexo **1** $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN na zona de potenciais negativos, evidenciando os redox quasi-reversíveis processos atribuídos aos ligandos bipyridina coordenados

Para o caso do complexo **1**, observam-se no voltamograma em acetonitrilo quatro processos oxidativos irreversíveis a potenciais positivos (figura 3.15). O primeiro processo torna-se quasi-reversível ($E_{1/2} = 0.57$ V) quando a direcção do varrimento é imediatamente revertida após o processo de oxidação (figura 3.16). Observa-se ainda a formação de um pico de adsorção no eléctrodo a 0.36 V. Uma comparação com o respectivo ligando mostra que o processo a 1.10 V poderá estar relacionado com um processo de oxidação no ligando tiossemicarbazona coordenado. Assim, o primeiro processo redox, reversível quando isolado, deverá corresponder ao par redox Ru(II)/Ru(III). A valores de potenciais negativos observam-se dois processos redox quasi-reversíveis, que ocorrem nos ligandos bipyridina coordenados (figura 3.17). Os processos redox a potenciais negativos aumentam a sua reversibilidade a velocidades maiores. O comportamento deste complexo em diclorometano é igual, observando-se também quatro processos oxidativos irreversíveis a potenciais positivos.

Nas figuras 3.18 e 3.19 podem observar-se voltamosgramas obtidos para o complexo **2** (em ACN) e para o complexo **3** (em DCM), respectivamente.

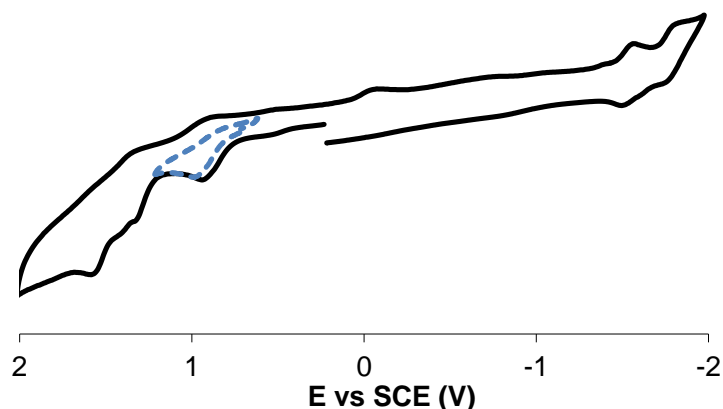


Figura 3.18 - Voltamograma cíclico do complexo 2 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em ACN ($v= 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), evidenciando, a azul, o processo irreversível associado à oxidação Ru(II)/Ru(III).

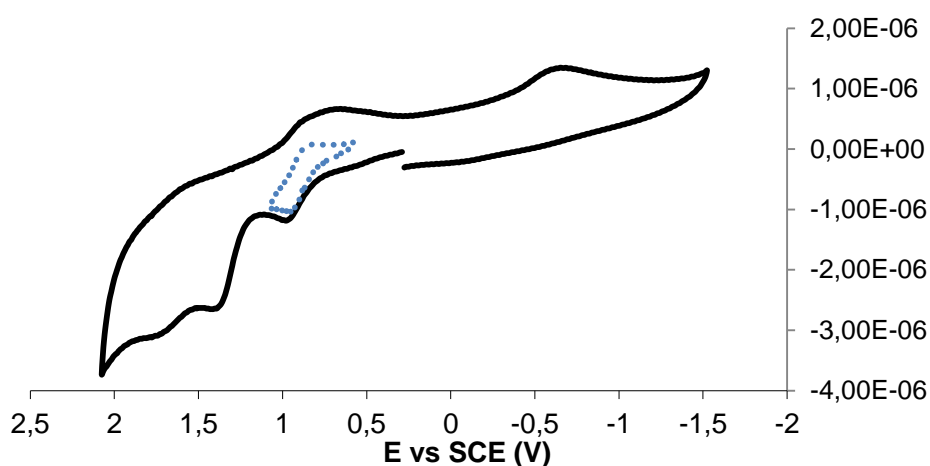


Figura 3.19 - Voltamograma do complexo 3 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DCM ($v= 200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$); o processo a tracejado é o processo redox atribuído ao centro metálico.

3.4. Estabilidade dos complexos 1,2 e 3

Sabe-se que os complexos de rutênio podem atuar como pró-drogas, sofrer hidrólise no meio biológico e ser reduzidos gerando espécies ativas que apresentam propriedades terapêuticas.⁶⁶ Por este motivo, de modo a não haver interpretações erradas dos ensaios biológicos, é necessário saber se o complexo inicial mantém a sua integridade estrutural ou se é transformado em outra espécie que poderá ser responsável pela actividade observada.

A estabilidade química em geral caracteriza a capacidade de um NCE para preservar as suas características físicas e químicas sob condições específicas. A estabilidade em solução

pode ser avaliada depois de um longo período de incubação ou em condições extremas (por exemplo, temperatura ou pH, etc) e quantificando usando HPLC, CE, cromatografia de camada fina (TLC) ou por LC/MS. A escolha de uma abordagem analítica adequada é fundamental para a qualidade do ensaio de estabilidade química.⁶⁷

Neste contexto, a estabilidade dos complexos foi avaliada em meio celular 99% DMEM/1% DMSO. Para isso, utilizou-se a técnica de UV-vis, pois qualquer mudança que pudesse ocorrer com os complexos ao longo do tempo poderia ser facilmente observado pelo deslocamento e/ou surgimento de novas bandas.

Nas figuras 3.20, 3.21 e 3.22 apresenta-se a estabilidade dos complexos 1,2 e 3 respectivamente, no período de 24h na ausência de luz. Pode-se observar que os complexos são estáveis nas primeiras 6 horas em solução.

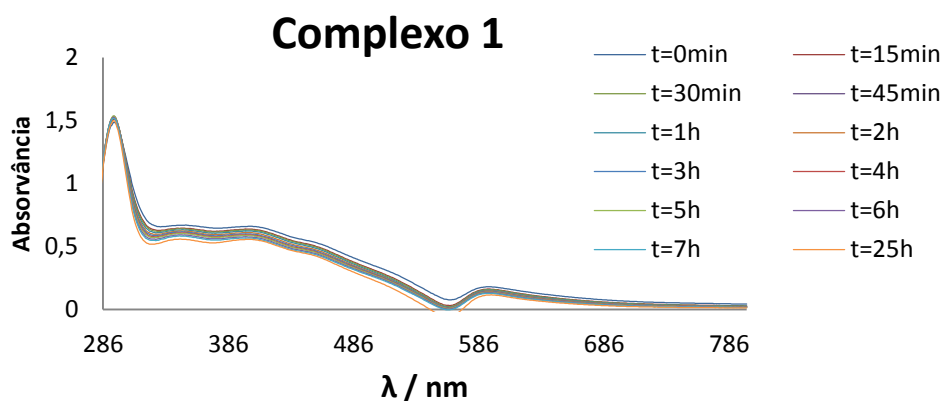


Figura 3.20 - Espectro de estabilidade do complexo 1, ($C_{\text{complexo 1}}=2,00E^{-5}M$).

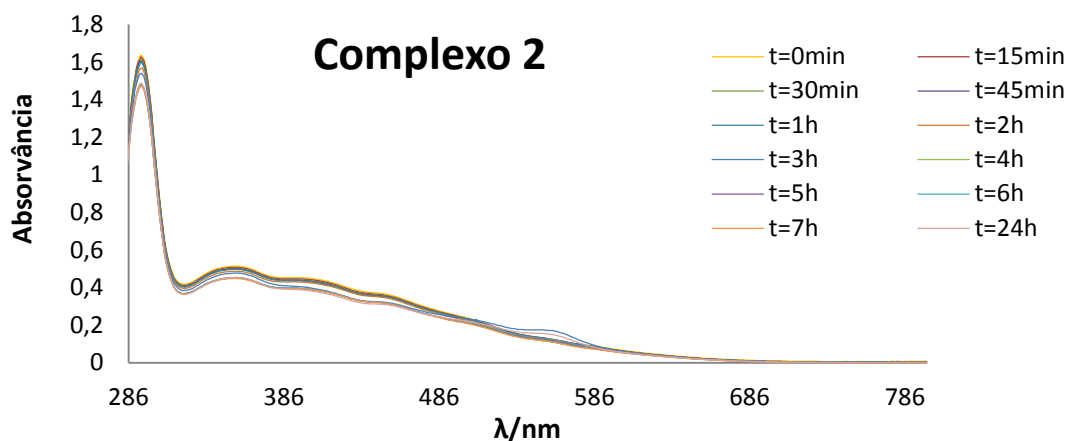


Figura 3.21 - Espectro de estabilidade do complexo 2, ($C_{\text{complexo 2}}=3,60E^{-5}M$).

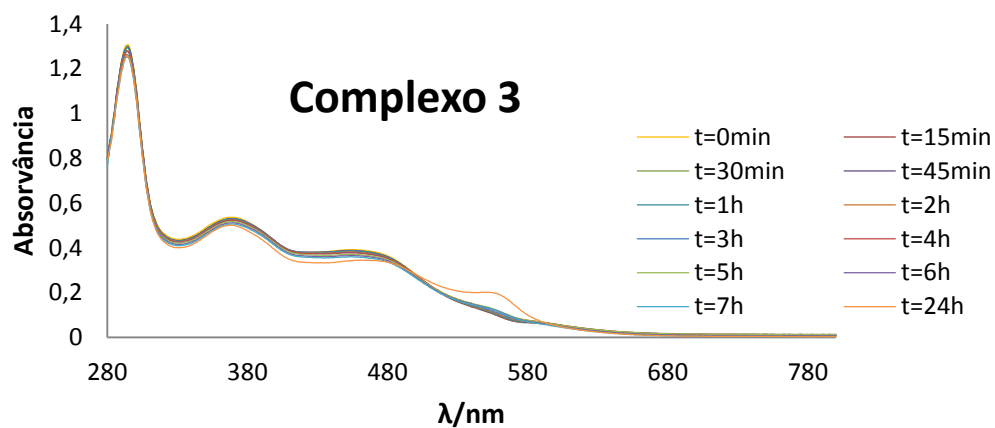


Figura 3.22 - Espectro de estabilidade do complexo 3, ($C_{\text{complexo 3}} = 2,00E^{-5}M$).

CAPÍTULO 4

*Síntese e caracterização dos novos complexos de
cobre com os ligandos aril-tiossemicarbazonas*

HL¹, HL² e HL³

4. Síntese e caracterização dos novos complexos de cobre

4.1. Considerações Gerais

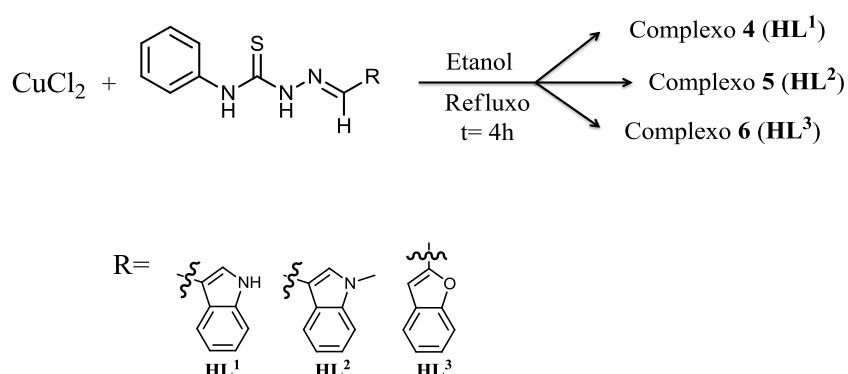
Neste capítulo descreve-se a síntese e caracterização dos novos complexos de cobre, complexos **4**, **5** e **6**, obtidos por coordenação dos ligandos orgânicos **HL¹**, **HL²** e **HL³**.

As técnicas usadas para a caracterização preliminar dos complexos foram a análise elementar, espectroscopia de RMN (¹H, ¹³C e técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC), FTIR e UV-Vis, além de espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS).

4.2. Análise e discussão de resultados

Os complexos **4**, **5** e **6** foram obtidos por reação entre o CuCl₂ e os ligandos **HL¹**, **HL²** e **HL³** de acordo com o procedimento experimental descrito no capítulo 6 e que se encontra resumido no esquema 4.1.

Nas secções seguintes apresentam-se os resultados obtidos para a sua caracterização. A Análise Elementar, a espectroscopia de RMN e a espectrometria de massa ESI-MS foram as técnicas mais relevantes para permitir formular e propor uma estrutura para os complexos **4** e **5**, pelo que este subcapítulo se inicia com a discussão dos resultados obtidos por estas técnicas, seguindo-se então a caracterização por espectroscopia UV-Vis e IV.



Esquema 4.1 - Síntese geral dos complexos **4**.

4.2.1. Caracterização dos complexos de cobre por análise elementar, ESI-MS e espectroscopia de RMN

Complexo 4: $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$

Este complexo foi obtido na forma de um sólido amorfo amarelo com um rendimento de 37,76%. A estrutura proposta está indicada na figura 4.1.

Análise Elementar e ESI-MS

A análise elementar para o complexo **4** (cujos resultados estão reunidos na tabela 4.1) apresenta uma elevada concordância entre os valores calculados e os determinados experimentalmente, confirmando que o complexo foi obtido com um elevado grau de pureza.

Tabela 4.1 – Valores calculados e experimentais das percentagens de C, H, N, S para o complexo **4**.

	%C	%H	%N	%S
Experimental	55,6	4,25	16,0	9,0
Calculado para $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ ($\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{S}_2\text{CuCl}$)	55,89	4,10	16,29	9,32

Estes resultados são compatíveis com a fórmula empírica $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$, ou seja, $[\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S})_2]\text{Cl}$, indicando a presença de dois ligandos bidentados neutros por cada ião cobre, e a presença de apenas um ião cloreto. A hipótese de desprotonação de HL^1 e coordenação na forma de tiolato foi testada e originaria uma formulação com valores esperados de %C, %N, %S e %H com um desvio maior aos valores experimentais, em especial o valor deste último (%H(calc.) = 3.82%), que se afasta demasiado do valor experimental. Desta formulação pode deduzir-se que no complexo formado o cobre se deverá encontrar no estado de oxidação I, um facto que também é consistente com a sua cor amarela.⁶⁸ A redução de sais de cobre (II) a cobre (I) durante processos de complexação com ligandos do tipo tiossemicarbazonas está descrita na literatura, resultando na formação de complexos de cobre dinucleares.⁶⁹

O espectro de ESI-MS obtido em modo positivo para este complexo (anexo 4.12) apresenta um ião molecular a m/z 651,14 (100%), correspondente à fórmula empírica $\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{CuN}_8\text{S}_2$, e mostra o padrão isotópico esperado para um composto com um ião cobre(I), suportando assim a formulação e estrutura propostas para o complexo **4** (figura 4.1).

Caracterização por espectroscopia de RMN

O diamagnetismo inerente ao cobre (I) permitiu a caracterização do complexo por RMN. Nas tabelas 4.2 e 4.3, apresentam-se as atribuições feitas para os sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C , tal como feito para os complexos 1-3. Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C /APT, COSY, HMBC e HMQC para o complexo 4 podem ser consultados nos Anexos 4.1-4.5. Na figura 4.2 apresenta-se uma ampliação dos espectros de RMN ^1H do ligando HL^1 e do complexo 4 entre $\delta 12,2$ e $\delta 6,6$ ppm.

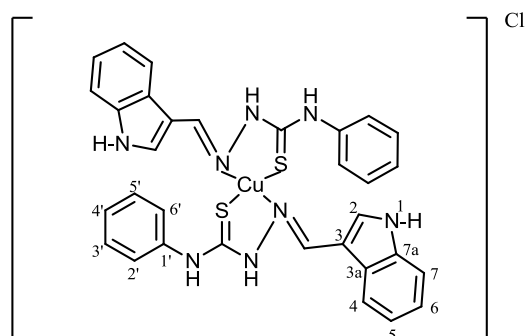


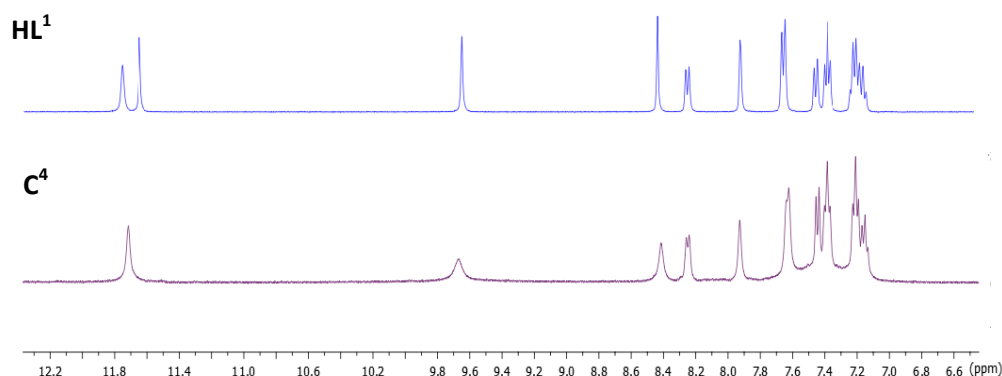
Figura 4.1 - Estrutura proposta para o complexo 4 $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ e numeração dos respectivos prótons e carbonos.

Tabela 4.2 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo 4 $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO}-d_6$.

Desvio químico δ / (ppm)	Multiplicidade	Integração	J (Hz)	COSY	Atribuição
11,74	Singleto	2 H	-	-	H-1/C=NNH
9,82	Singleto	1 H	-	-	Ph-N-H
8,46	Singleto	1 H	-	-	N=C-H
8,29	Dupleto	1 H	4,5	7,15	H-4
7,95	Singleto	1 H	-	-	H-2
7,55	Singleto	2 H	-	7,39	H-2'/H-6'
7,44	Multiplete	1 H	-	7,22	H-7
7,39	Multiplete	2 H	-	-	H-3'/H-5'
7,24	Multiplete	1 H	-	-	H-4'
7,22	Multiplete	1 H	-	-	H-6
7,15	Multiplete	1 H	-	-	H-5

Tabela 4.3 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo **4** $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO}-d_6$.

Desvio químico δ / (ppm)	APT	HMQC	HMBC	Atribuição
143,15	CH	8,45	-	C=N
138,66	-	-	7,39	C-1'
137,07	-	-	8,29; 7,95; 7,22	C-7a
132,22	CH	7,95	-	C-2
128,29	CH	7,39	-	C-3'
126,23	CH	7,55	7,24	C-2'
125,81	CH	7,24	7,55	C-4'
123,95	-	-	7,95; 7,44; 7,15; 11,73	C-3a
122,80	CH	7,22	8,29	C-6
122,26	CH	8,29	7,22	C-4
120,77	CH	7,15	7,44	C-5
111,84	CH	7,44	7,15	C-7
110,64	-	-	7,95; 11,73	C-3

**Figura 4.2** – Ampliação do espectro de RMN ^1H em $\text{DMSO}-d_6$ para o complexo **4** e o respectivo ligando HL^1 .

Quando se compara os espectros de RMN do ligando livre e do complexo as diferenças são muito subtis, e não fornecem uma indicação inequívoca do modo de coordenação ao íon metálico. No entanto, a análise dos espectros permite detetar um conjunto de sinais referentes ao ligando, o que quando coordenado com os resultados obtidos por análise elementar e ESI-MS, é consistente com a presença de dois ligandos simétricos.

Um dos aspetos mais elucidativos do espectro de RMN ^1H do complexo **4**, é a presença dos três sinais correspondentes aos prótons NH, o que é indicativo de que o ligando não sofreu desprotonação durante o processo de complexação. No entanto, contrariamente ao que acontece para o ligando livre, não se consegue detetar qualquer correlação no espectro HMBC entre os prótons NH ligados ao tiocarbonilo e qualquer carbono, o mesmo acontecendo com o

protão azometínico. Verificou-se que, após a coordenação, a maior parte dos protões do ligando desblindam, ainda que pouco significativamente, sendo o protão PhN-H aquele que sofre o maior deslocamento, cerca de $\sim 0,22$ ppm para campo mais baixo. No espectro de carbono a alteração mais significativa foi a não deteção do sinal correspondente ao grupo C=S. No entanto, esse fato não é uma indicação da sua não existência já que, para todos os outros complexos estudados neste trabalho, o tiocarbonilo só foi detetado em espectros adquiridos num aparelho de 500 MHz, o que não foi possível efetuar para este composto (até à data de conclusão deste trabalho).

Complexo 5: [Cu(HL²)₂Cl]

Este complexo foi obtido na forma de um sólido amorfo amarelo, com um rendimento de 50,96%. Na figura 4.3 está representada a estrutura proposta.

Análise Elementar e ESI-MS

A análise elementar confirmou a pureza do complexo **5** obtido, com valores concordantes entre os resultados experimentais e os valores previstos para a formulação [Cu(HL²)₂Cl], ou seja, C₃₄H₃₂N₈S₂CuCl (tabela 4.4). Estes resultados são assim compatíveis com a presença de um átomo de cloro e com uma coordenação do ligando HL² ao metal na forma neutra, tal como observado para o complexo **4**, o que indica que também neste caso o cobre se encontrará no estado de oxidação I. O ajuste a qualquer outra formulação plausível (como, por exemplo, Cu(HL²)Cl₂, CuL₂, Cu(HL²)₂Cl₂ – considerando Cu(II) – Cu(HL²)Cl ou CuL²Cl considerando Cu(I)) resultou em valores esperados com um grande desvio aos valores experimentais, à exceção da formulação [Cu(HL²)(L²)Cl], compatível com Cu(II). Neste caso, os dois ligandos seriam diferentes: um estaria coordenado na forma desprotonada, monoaniónica, e o outro na forma neutra, o que é pouco provável.

A confirmar a hipótese da presença de dois ligandos neutros estão, mais uma vez, os resultados na análise do espectro de ESI-MS (anexo 4.13), onde se pode detetar o ião molecular a m/z 679,24 (100%), correspondente à fórmula empírica C₃₄H₃₂CuN₈S₂ (*i.e.* [Cu(HL²)₂Cl]) e apresentando o padrão isotópico esperado para um composto com um ião cobre, suportando assim a estrutura proposta para o complexo **5** (representada na figura 4.4). Além disso, a hipótese da existência de dois ligandos diferentes não é suportada pelos resultados de RMN – ver secção seguinte.

Tabela 4.4 - Valores calculados e experimentais das percentagens de C,H,N,S para o complexo **5**.

	%C	%H	%N	%S
Calculado	56,9	4,4	15,8	9,0
Experimental para $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2]\text{Cl}$ ($\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{S}_2\text{CuCl}$)	57,05	4,51	15,65	8,96

Caracterização por espectroscopia de RMN

Nas tabelas 4.5 e 4.6 seguintes apresentam-se as atribuições feitas dos sinais de RMN ^1H , RMN ^{13}C , tal como o efeito anteriormente.

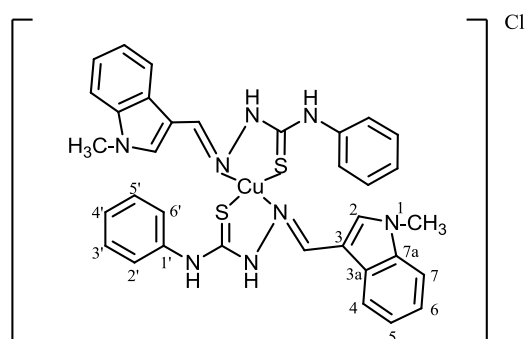


Figura 4.3 - Estrutura proposta para o complexo **5** $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2]\text{Cl}$ e numeração dos respetivos protões e carbonos.

Os espectros de RMN ^1H , COSY, RMN ^{13}C /APT e HMQC para complexo **5** podem ser consultados nos Anexos 4.6-4.9. Na figura 4.4 apresenta-se uma ampliação entre $\delta 11,8$ e $\delta 6,6$ ppm dos espectros de RMN ^1H do ligando HL^1 e do complexo **5**.

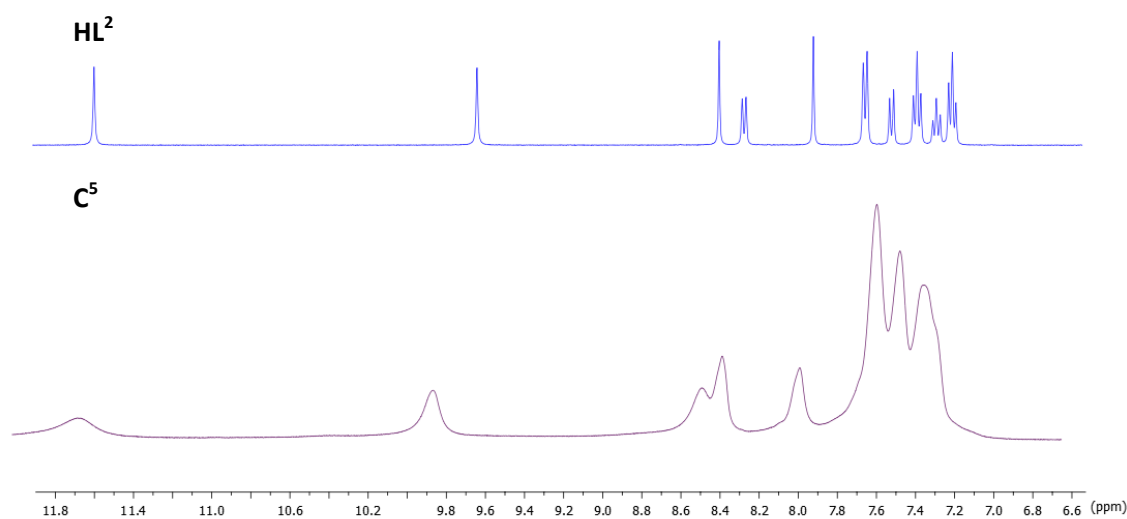
Tabela 4.5 - Dados de RMN ^1H 1D e COSY para o complexo **5** $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2]\text{Cl}$ em $\text{DMSO}-d_6$.

Desvio químico δ /(ppm)	Multiplicidade	Integração	COSY	Atribuição
11,82	Singleto	1 H	-	C=N-N-H
9,91	Singleto	1 H	-	Ph-N-H
8,46	Singleto	1 H	-	N=C-H
8,36	Singleto	1 H	7,27	H-4
7,94	Singleto	1 H	-	H-2
7,70-7,0	Multipleteo	8 H	-	H-2'/H-6'; H-3'/H-5'; H-5, H-6; H-7; H-4'
3,84	Singleto	3 H	-	NCH ₃

Tabela 4.6 - Dados de RMN ^{13}C 1D e 2D para o complexo **5** $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$.

Desvio químico δ /(ppm)	APT	HMQC	Atribuição
*142,43	-	8,47	C=N
138,50	-	-	C-1'
137,48	-	-	C-7a
135,68	CH	7,94	C-2
128,16	CH	7,40	C-3'
126,23	CH	7,52	C-2'
125,72	CH	7,27	C-4'
124,19	-	-	C-3a
122,74	CH	7,27	C-6
122,34	CH	8,36	C-7
120,92	CH	7,20	C-5
110,11	CH	7,52	C-4
109,45	-	-	C-3
32,81	CH_3	3,83	C-1

*valor retirado das correlações HMBC

**Figura 4.4** – Ampliação do espectro de RMN ^1H para o complexo **5** e o ligando HL^2 em $\text{DMSO-}d_6$.

O espectro de RMN ^1H do complexo **5** apresenta-se em algumas zonas menos resolvido do que o do complexo **4** e com sinais muito mais alargados, o que dificultou a atribuição dos sinais. É possível que a oxidação do complexo **5** tenha ocorrido em pequena extensão e que a presença em solução de uma fração de espécies paramagnéticas de $\text{Cu}(\text{II})$ seja a causa do alargamento dos sinais de RMN. O espectro de RMN ^1H apresenta novamente apenas um conjunto de sinais correspondente ao ligando, o que é compatível com a existência de dois ligandos simétricos. A coordenação na forma tiona é suportada pela presença dos dois sinais

correspondentes aos prótons NH. Como não foi possível obter um bom espectro de HMBC, as atribuições dos sinais feitas por comparação com as efetuadas para o complexo 4.

Complexo 6: [Cu(HL³)₂][Cl]₂

Este complexo foi isolado como um sólido amorfo amarelo, com um rendimento de 54,32%. Ao contrário dos complexos anteriores, não foi possível obter resultados consistentes entre as várias técnicas usadas que permitissem propor uma formulação para este complexo.

Os resultados de análise elementar são compatíveis com a fórmula empírica [Cu(HL³)₂][Cl]₂, ou seja [Cu(C₁₆H₁₃N₃SO)₂][Cl]₂, suportando a presença de dois cloretos e que o ligando HL³ se coordenaria ao metal na forma neutra. Desta formulação pode deduzir-se que no complexo formado o cobre se encontrará no estado de oxidação II. Este complexo não está puro, pois embora a análise elementar seja compatível com [Cu(C₁₇H₁₆N₄SO)₂][Cl]₂, os valores experimentais de %C e de %S são algo díspares entre duas análises consecutivas do mesmo sólido, que indicam que o composto isolado não é homogêneo e que pode conter impurezas.

No espectro de ESI-MS, pode detetar-se o ião molecular a m/z 653,23 compatível com uma formulação [Cu(C₁₆H₁₃N₃SO)₂][Cl], o que implicaria que o cobre estivesse no estado de oxidação (I), em contradição com os resultados obtidos por AE.

A caracterização por espectroscopia de RMN não foi de grande ajuda na formulação de uma estrutura para o complexo. O espectro de RMN ¹H apresentou picos muito alargados e sobrepostos e o espectro de RMN ¹³C, embora adquirido num aparelho de 500MHz e com um longo período de acumulação (5000 scans) não permitiu detetar todos os sinais, e apresentou também picos muito alargados de difícil interpretação.

Assim, não foi possível conjugar as técnicas de caracterização utilizadas e propor uma formulação plausível para este composto.

4.3. Caracterização por espectroscopia de IV dos complexos 4 e 5

Os espectros de infravermelho (anexos 4.10 e 4.11) dos complexos **4** e **5** foram comparados com os dos respectivos ligandos livres a fim de se confirmar o modo de coordenação proposto. A tabela 4.7 mostra algumas das bandas mais características presentes nos espectros de IV dos complexos. O principal aspeto a ter em conta é a existência, nos dois complexos, de bandas atribuíveis à ligação C=S o que corrobora a informação fornecida pelas outras técnicas de que a coordenação do ligando ao centro metálico se faz na forma de tiona, neutro.

Tabela 4.7 – Dados espectroscópicos de IV dos complexos **4** e **5**.

Complexo	$\nu_{C=S}$ (cm^{-1})	$\nu_{C=N}$ (cm^{-1})	$\nu_{C-H(\text{arom})}$ (cm^{-1})	ν_{Cu-N} (cm^{-1})	ν_{Cu-S} (cm^{-1})
4	1267	1606	3130	472	835
5	1253	1608	3124	499	810

Quando se compara a frequência de absorção referente à vibração C=S do ligando livre e dos respectivos complexos, verifica-se, de um modo geral, um deslocamento para números de onda mais elevados. No ligando **HL**¹ a banda de estiramento $\nu_{C=S}$ encontra-se a 1246 cm^{-1} e no complexo aparece a 1267 cm^{-1} , deslocando-se 19 cm^{-1} . Para o ligando **HL**² e respetivo complexo **5** não se observa alteração da banda de vibração C=S. De um modo geral, estes deslocamentos são pouco significativos, para poderem fornecer informação sobre o tipo de coordenação entre o ligando e o centro metálico.

Nos ligandos tiossemicarbazona não se observam deslocamentos significativos das bandas associadas à vibração da ligação C=N: no ligando **HL**¹ observa-se a 1602 cm^{-1} e no complexo **4** a 1606 cm^{-1} , deslocando-se apenas 4 cm^{-1} .⁷⁰ Para o ligando **HL**² a banda associada à vibração da ligação C=N desloca-se para comprimentos de onda mais baixos quando coordenado ao metal, passando de 1620 cm^{-1} no ligando para 1608 cm^{-1} no complexo **5**.

A região a $3100\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ é caracterizada por uma multiplicidade de sinais atribuídos aos diferentes alongamentos N-H.⁷⁰ Outras bandas surgem nos espetros dos complexos na região entre $472\text{-}852 \text{ cm}^{-1}$, características dos estiramentos entre metal e os átomos de enxofre e azoto que são: ν_{Cu-N} em $472,56\text{-}499,56 \text{ cm}^{-1}$ e ν_{Cu-S} em $810,10\text{-}852,54 \text{ cm}^{-1}$. Os valores

de número de onda observados nos espectros dos complexos **4** e **5** estão indicados na tabela 4.7.

4.4. Espectroscopia de UV-vis

Com a realização e estudo dos espectros eletrônicos procurou-se inferir sobre a possível existência de bandas de transferência de carga $M \leftarrow L$ ou $M \rightarrow L$. Os espectros de UV-vis dos compostos foram obtidos de soluções de concentrações entre 10^{-3} e $10^{-6}M$, em dimetilsulfóxido e dimetilformamida (os solventes em que os complexos são solúveis) e encontram-se nas figuras 4.8 e 4.9. A tabela 4.8 resume os dados dos espectros eletrônicos para os vários complexos, reunindo os valores de comprimento de onda (λ) e absorvidade molar (ϵ) das bandas observadas.

Tabela 4.8 – Dados espectroscópicos de UV-Vis do complexo **4** e complexo **5**.

Composto	Solvente	$\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/M^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Complexo 4	DMSO	285 (44000)
		346 (60900)
		~385 (37700)
	DMF	284 (30400)
		343 (40400)
Complexo 5	DMSO	285 (545)
		359 (705)
		~380 (567)
	DMF	288 (1420)
		383 (1700)

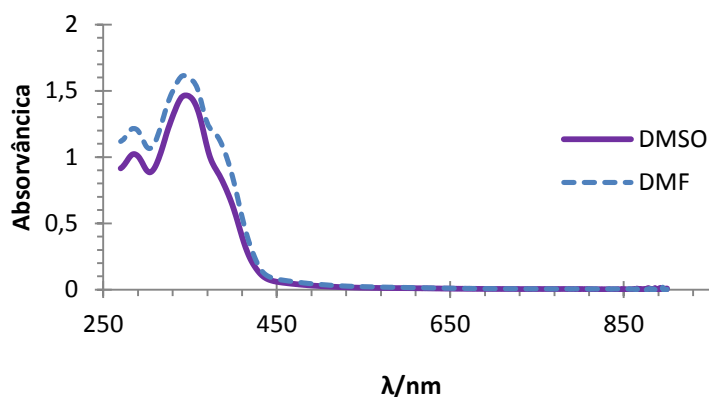


Figura 4.5 – Espectro eletrônico do complexo **4** [Cu(HL¹)₂Cl] em dimetilsulfóxido e dimetilformamida.

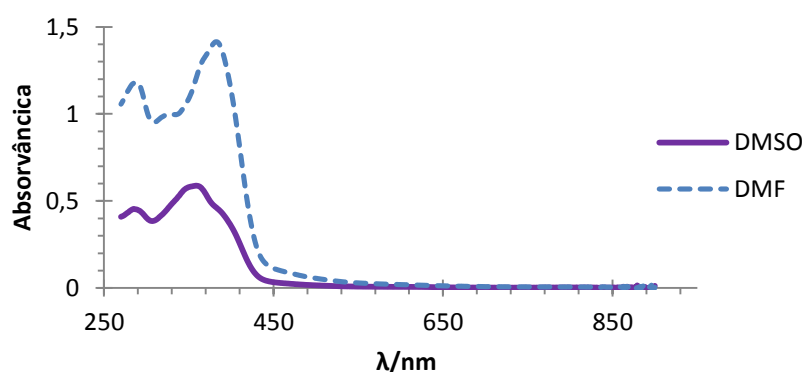


Figura 4.6 – Espectro eletrônico do complexo **5** [Cu(HL²)₂Cl] em dimetilsulfóxido e dimetilformamida.

Os espectros de absorção dos dois complexos em DMSO apresentam entre 280-450 nm duas bandas intensas a 285 nm e a 346 (complexo **4**) ou 359 nm (complexo **5**) que, por comparação com os espectros do ligando correspondente no mesmo solvente, poderiam ser atribuídas a transições às transições π - π^* do ligando coordenado (Figuras 4.7 e 4.8). Observa-se também um ombro (a 385 nm, no caso do complexo **4**, ou a 380 nm, no caso do complexo **5**) que, pela sua intensidade e pelo lugar onde se encontra no espectro, se crê ser uma banda de transferência de carga metal \rightarrow ligando.

A diferença de polaridade dos dois solventes utilizados não é grande, sendo o DMSO ligeiramente mais polar que a DMF. Verifica-se, pelas figuras 4.5 e 4.6, que no caso do complexo **4**, as diferenças não são muito significativas e, no caso do complexo **5**, quando se aumenta a polaridade do solvente, a forma do espectro varia ligeiramente, o que sugere que as bandas de menor energia serão bandas de transferência de carga.

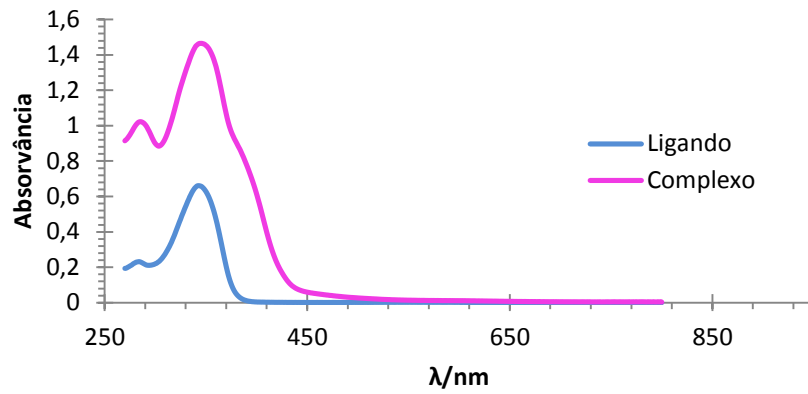


Figura 4.7 – Espectro eletrônico do ligando HL¹ e complexo 4 em DMSO.

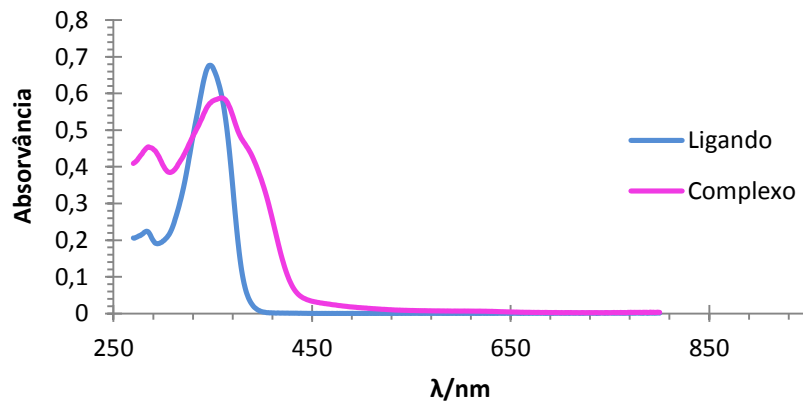


Figura 4.8 – Espectro electrónico do ligando HL² e complexo 5 em DMSO.

CAPÍTULO 5

Estudios Biológicos

5. Estudos biológicos

A avaliação da actividade biológica dos compostos sintetizados, não sendo um objectivo directo desta tese, é importante para efectivamente avaliar o seu potencial como agentes anticancerígenos uma vez que se pretende descobrir novos agentes antitumorais.

Até à data de conclusão desta dissertação tinha sido possível avaliar a actividade dos ligandos tiossemicarbazona **HL**² e **HL**³ e dos respectivos complexos de “Ru(bipy)” (complexos **2** e **3**), nomeadamente a sua citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas. Esses resultados são apresentados neste capítulo.

A viabilidade celular por ação dos complexos de ruténio e dos ligandos orgânicos foi avaliada *in vitro* usando um ensaio colorimétrico baseado no corante de tetrazólio MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol).⁷¹ O MTT, um tetrazole de coloração amarela, é reduzido a formazan (violeta), por acção de enzimas redutases existentes na mitocôndria das células. Uma vez que esta redução apenas acontece em células vivas, a medição, por espectrofotometria, da quantidade de formazan formado reflecte o grau de viabilidade celular. É assim possível obter perfis de dose-resposta e calcular o respectivo valor de IC₅₀.

A obtenção de baixos valores IC₅₀ (valor correspondente à concentração necessária para induzir a morte em 50% da população celular) é indicadora de uma elevada citotoxicidade ou actividade antiproliferativa a baixas concentrações de composto. Considera-se, para os efeitos desta discussão, que um composto que apresente um valor de IC₅₀ superior a ~100 µM não apresenta actividade para a linha celular testada.

Neste estudo utilizaram-se células humanas da linhagem tumoral do ovário (A2780, adenocarcinoma do ovário) e da mama (MDA-MB-231, adenocarcinoma da mama, com grande potencial metastático⁷²). As células humanas MDAMB231 da mama são altamente agressivas.

A tabela 5.1 sistematiza os resultados do estudo para os ligandos tiossemicarbazona **HL**² e **HL**³ e para os respectivos complexos de ruténio, complexos **2** e **3**, tendo as células sido incubadas com cada um dos compostos durante um período de 24horas e/ou 72horas, à temperatura de 37°C. Os valores para a cisplatina (o metalofármaco em uso clínico) são indicados para comparação. O precursor *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂] tinha já sido testado em células A2780 nas quais se verificou que não é activo⁷³. Sendo as células MDAMB231 mais agressivas, em princípio, não se esperaria que apresentasse atividade para esta linha celular, mas é

necessário testá-lo (o que não tinha ainda sido possível até à data de conclusão deste trabalho).

Tabela 5.1 – Valores de IC_{50} ($\mu M \pm$ desvio padrão) obtidos para os ligandos HL^1 , HL^2 e HL^3 , complexos (1),(2) e (3) e fármaco de referência para a linha celular A2780 (após 72h e 24h) e MDAMB231 (após 72h), a 37°C.

Composto	A2780		MDA-MB-231
	IC_{50} (24h) / μM	IC_{50} (72h) / μM	IC_{50} (72h) / μM
HL^2	154 \pm 50	4.5 \pm 1.7	4.49 \pm 1.4
HL^3	>200	-	-
<i>cis</i> -[Ru(bipy) ₂ Cl ₂]	-	184	-
Complexo (2)	1.96 \pm 0.45	0.15 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02
Complexo (3)	6.49 \pm 0.99	-	-
Cisplatina	36 \pm 8.0 ³⁵	2.5 \pm 0.3 ⁷⁴	730 ⁵³

A tiossemicarbazona HL^3 (com $IC_{50} > 200 \mu M$) não é activa em qualquer das condições testadas. A tiossemicarbazona HL^2 não é activa às 24h contra células do adenocarcinoma de ovário humano. No entanto, às 72h, o seu valor de IC_{50} é comparável ao da cisplatina nas A2780 e é muito inferior ao deste metalofármaco nas células resistentes da mama. Estes resultados sugerem que a tiossemicarbazona HL^2 é bastante promissora como potencial fármaco para o cancro.

O complexo 2 nas A2780 é activo mesmo às 24h e mais que a cisplatina, cerca de 18 vezes mais activa. Às 72h, ainda nas A2780, a actividade aumenta e é também mais activa que a cisplatina. O complexo é também muito activo para a linha celular mais agressiva, na gama do sub-micro molar.

Em todos os casos testados, e apesar do ligando TSC também ser citotóxico, a actividade do complexo é sempre superior, na escala do sub-micro molar – em relação a actividade dos ligandos, às 72h, o HL^2 é activo para um tipo de cancro muito agressivo (contra células humanas MDAMB231 altamente agressivas triple-negativo da mama) e com a coordenação ao centro de “Ru(bipy)₂” aumenta notavelmente a actividade, sendo por essa razão que faz sentido tentar combinar ligandos com actividade biológica com metais.

Concluindo, embora ainda não estejam disponíveis resultados para todos os ligandos e complexos sintetizados, os dados já reunidos permitem prever que esta família do tipo aril tiosemicarbazona e em especial os seus complexos de ruténio com a estrutura-base “Ru(bipy)₂” é muito promissora para aplicações como potenciais agentes anti-tumorais.

CAPÍTULO 6

Descrição Experimental

6. Descrição Experimental

6.1. Procedimentos Gerais

As sínteses de complexos de rutênio descritas neste capítulo foram realizadas usando técnicas de *Schlenk* em atmosfera inerte de azoto ou sob vácuo, de acordo com os protocolos de manipulação habituais neste tipo de trabalho.

Os reagentes utilizados para sintetizar os ligandos orgânicos foram adquiridos comercialmente à Aldrich e foram usados sem purificação adicional, com exceção do cloreto de tionilo que foi previamente destilado à pressão atmosférica.

Os solventes utilizados nas sínteses orgânicas e inorgânicas, à exceção da acetona, etanol e éter etílico de grau PA, usados sem purificação adicional, foram secos e destilados em atmosfera inerte de acordo com os métodos publicados na literatura.⁷⁵

Os solventes utilizados nos estudos de UV-vis foram usados, salvo especificação em contrário, sem qualquer purificação ou secagem.

A cromatografia em camada fina (c.c.f) foi utilizada para monitorizar o decorrer das reações de síntese dos ligandos e para verificar a pureza dos compostos inorgânicos. Foram usadas placas de sílica-gel 60 F254, com 0,25mm de espessura (ref.Merck 5554). A composição e a proporção volúmica dos componentes dos eluentes variaram consoante o carácter dos compostos e a visualização das manchas foi feita por irradiação das placas cromatográficas com luz ultravioleta numa câmara Camag (ref8120) a um comprimento de onda 254nm.

6.2. Métodos de caracterização

As experiências de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas, á temperatura ambiente, num espectrofotómetro *Brucker Avance 400*, operando a uma frequência de 400 MHz para ^1H e 100,4 MHz para ^{13}C , ou *Brucker Avance 500* (operando a uma frequência de 500MHz para ^1H , 125,7 MHz para ^{13}C), usando o software TopSpin (versão 3.2) para aquisição e tratamento dos dados. O solvente deuterado dimetilsulfóxido, DMSO- d_6 (99,9%), adquirido comercialmente á Sigma-Aldrich ou à CIL foi usado sem purificação adicional. Os desvios químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) usando como referência o sinal de um padrão interno de TMS (0,00ppm) ou o sinal residual do solvente ($\delta_{\text{H}} =$

2,50 ppm e $\delta_c = 39,5$ ppm). Os dados obtidos nos capítulos 2,3 e 4 encontram-se indicados pela seguinte ordem: desvio químico, multiplicidade, constante de acoplamento (J , em Hertz), integração e atribuição na estrutura segundo a numeração apresentada nos capítulos 2,3 e 4 para cada composto.

Os espectros eletrônicos dos ligandos e dos complexos sintetizados foram traçados num espectrofotômetro *Jasco* V-660 de feixe duplo usando células de quartzo com comprimento ótico igual a 1cm, utilizando o software *Spectra Manager*.

Os espectros de IV dos ligandos e dos complexos sintetizados foram obtidos num espectrofotômetro *Schimidzu IRAffinity-1 FTIR*, utilizando o software *IR Solution*. Foram preparadas pastilhas de KBr (feitas ao ar) não tendo sido realizada qualquer calibração adicional.

As análises elementares de C,H,N,S foram realizadas no laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico, num equipamento *Fisons Instruments*, modelo EA1108.

Os espectros de massa (ESI-MS) foram realizados no laboratório de massa do Instituto Superior Técnico num equipamento espectrômetro de massa 500-MS *Ion Trap* (*Varian Inc. Palo Alto, CA. USA*). Os compostos foram dissolvidos em metanol ou acetonitrilo imediatamente antes da análise. O espectro de massa final foi obtido por combinação de vários varrimentos individuais das amostras.

Os pontos de fusão dos ligandos sintetizados foram obtidos utilizando um aparelho *Stuart Scientific, SMP3*.

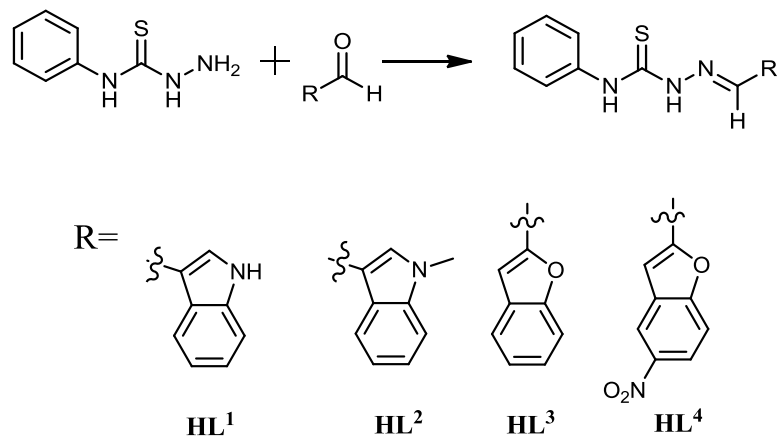
Os estudos eletroquímicos foram realizados no laboratório da Professora Paula Robalo no Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, tendo-se utilizado um potencióstato/galvanóstato *EG&G Princeton Applied Research Model 273 A*, sendo aquisição dos dados feita num computador usando o software *Electrochemistry PowerSuit v2.51* da *Princeton Applied Research*. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos a partir de soluções 0,1M do eletrólito de suporte hexafluorofosfato de tetrabutilamônio em acetonitrilo e diclorometano, usando uma configuração de três elétrodos: como elétrodo de trabalho foi usado um elétrodo de disco de platina (1.0 mm de diâmetro); como referência foi usado um pseudo-elétrodo de prata, ligado à solução por um capilar de Luggin e; como elétrodo auxiliar (contra-elétrodo) foi usado um fio de platina. As medidas foram realizadas sob azoto e à temperatura ambiente. Os potenciais redox dos complexos foram medidos utilizando ferroceno como padrão interno, sendo os valores experimentais relacionados com o Elétrodo Saturado de Calomelanos (SCE) usando o potencial do par redox ferrocino/ferroceno ($E_{p/2}=0,40V$ vs SCE para CH_3CN ; $E_{p/2}=0,46V$ para CH_2Cl_2).

O eletrólito de suporte foi adquirido à Sigma Aldrich, seco durante uma noite na linha de vácuo e mantido sob atmosfera de azoto, não tendo sido sujeito a nenhum processo de purificação. Os solventes acetonitrilo e diclorometano foram previamente secos e destilados. Foram utilizados os critérios usuais na avaliação da reversibilidade dos processos⁷⁶: $E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ mV, $|I_a/I_c| = 1$, $E_{p1/2}$ independente da velocidade (v) de varrimento e I proporcional a $v^{1/2}$.

6.3. Síntese dos ligandos orgânicos

6.3.1. Procedimento geral de síntese

A uma solução aquecida do aldeído em etanol (10mL) foi adicionada, sob agitação, *N*-fenil-hidrazinacarbotiamida (1 equivalente) em etanol quente (15mL). A mistura amarelada foi levada a refluxo tendo-se verificado o aparecimento, quase instantâneo, de um precipitado amarelo que solubilizou posteriormente. No fim da reação (detetada através de monitorização por c.c.f), arrefeceu-se a mistura reaccional até á temperatura ambiente e filtrou-se o solvente a vácuo, tendo-se obtido um produto da reação sob a forma de um pó amarelo.



Esquema 6.1 - Esquema geral da síntese dos ligandos.

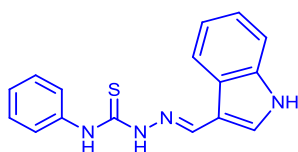
Na tabela 6.1 reúnem-se as condições reacionais específicas a síntese de cada ligando orgânico.

Tabela 6.1 - Condições reacionais para a síntese dos compostos tiosemicarbazona.

	Aldeído de partida (quantidade química)	Tempo de reação (a refluxo)	Eluente usado para c.c.f:	Rendimento (η)
HL ¹	(indol-3-carboxaldeído) 6mmol (0,879g)	3 h	diclorometano:metanol (6:0,1)	83,17% (1,47g)
HL ²	(1-metil-indol-3- carboxaldeído) 6mmol (0,959g)	6 h	hexano-acetato etilo (2:1)	77,5% (1,473g)
HL ³	(2-benzofuranocarboxaldeído) 3,43 mmoles (0,500g)	4h	hexano-acetato etilo (2:0,2)	76,4% (0,77g)

Nas secções seguintes resumem-se os resultados da caracterização de cada composto sintetizado.

6.3.2. Ligando HL¹



((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida)

Estado físico: sólido cristalino amarelo.

P.f: 215,7 – 216,3 °C.

Análise Elementar, experimental (calculada para C₁₆H₁₄N₄S): C 65,10 (65,28); H 4,80 (4,79); N 19,30 (19,03); S 11,00 (10,89).

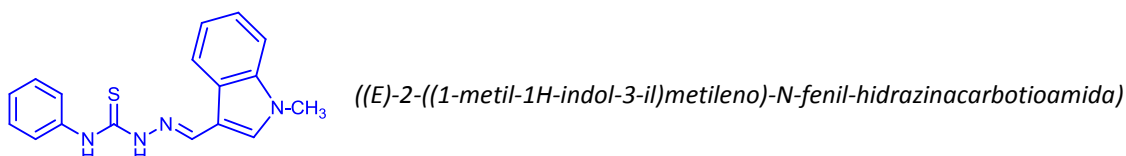
¹H RMN [DMSO-*d*₆, (CH₃)₄Si, δ /ppm]: 11,69 [s; 1,00; H-1], 11,58 [s; 1,00; C=N-N-H], 9,61 [s; 1,00; PhN-H], 8,41 [s; 1,00; N=C-H], 8,23 [d; 1,00; H-4], 7,90 [s; 1,00; H-2], 7,64 [d; 2,00; H-2'/H-6'], 7,45 [d; 1,00; H-7], 7,37 [t; 2,00; H-3'/H-5'], 7,20 [m; 1,00; H-6], 7,19 [m; 1,00; H-4'], 7,15 [m; 1,00; H-5].

^{13}C RMN [DMSO- d_6 , δ /ppm]: 174,5 [C=S], 141,46 [C=N], 139,37 [C-1'], 137,18 [C-7a], 131,48 [C-2], 128,31 [C-3'], 125,25 [C-2'], 125,13 [C-4'], 124,16 [C-3a], 122,86 [C-6], 121,97 [C-7], 120,89 [C-5], 112,04 [C-4], 111,06 [C-3].

FTIR [KBr, cm^{-1}]: 3412; 3319 (estiramento N-H), 3116 (estiramento C-H aromático), 1602 (estiramento C=N), 1541 (estiramento C=C), 1246 (estiramento C=S).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 284 (16700); 343 (47600).

6.3.3. Ligando HL²



Estado físico: sólido cristalino amarelo.

P.f: 202,9 – 203,5 °C.

Análise Elementar, experimental (calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{S}$): C 66,25 (66,21); H 5,25 (5,23); N 18,55 (18,17); S 10,0 (10,40).

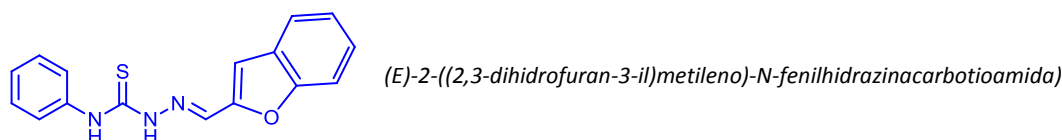
^1H RMN [DMSO- d_6 , $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, δ /ppm]: 11,58 [s; 1,00; C=N-N-H], 9,63 [s; 1,00; PhN-H], 8,39 [s; 1,00; N=C-H], 8,26 [d; 1,00; H-4], 7,91 [s; 1,00; H-2], 7,64 [d; 2,00; H-2'/H-6'], 7,51 [d; 1,00; H-7], 7,38 [t; 2,00; H-3'/H-5'], 7,28 [t; 1,00; H-6], 7,20 [t; 2,00; H-4'], 3,83 [s; 3,00; NCH₃].

^{13}C RMN [DMSO- d_6 , δ /ppm]: 174,4 [C=S], 140,78 [C=N], 139,32 [C-1'], 137,59 [C-7a], 134,98 [C-2], 128,15 [C-3'], 125,21 [C-2'], 124,97 [C-4'], 124,43 [C-3a], 122,77 [C-6], 122,10 [C-4], 120,97 [C-5], 110,97 [C-3], 110,27 [C-7], 32,90 [CH₃].

FTIR [KBr, cm^{-1}]: 3412; 3165 (estiramento N-H), 3165 (estiramento C-H aromático), 1620 (estiramento C=N), 1535 (estiramento C=C), 1253 (estiramento C=S).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 283 (16100); 347 (48700).

6.3.4. Ligando HL³



Esta reação foi repetida duas vezes, reportando-se a seguir as condições experimentais médias.

Estado físico: sólido cristalino amarelo.

P.f: 202,6 – 203,7 °C.

Análise Elementar, experimental (calculada para C₁₆H₁₃N₃OS): C 65,05 (65,07); H 4,45 (4,44); N 14,55 (14,23); S 11,00 (10,85).

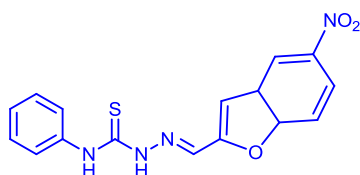
¹H RMN [DMSO-*d*₆, (CH₃)₄Si, δ/ppm]: 12,07 [s; 1,00; C=N-N-H], 10,05 [s; 1,00; Ph-N-H], 8,21 [s; 1,00; N=C-H], 7,71 [d; 1,00; H-4], 7,61 [m; 3,00; H-7; H-2'/H-6'], 7,52 [s; 1,00; H-3], 7,38 [m; 3,00; H-6; H-3'/H-5'], 7,29 [t; 1,00; H-5], 7,21 [t; 1,00; H-4'].

¹³C RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm]: 176,03 [C=S], 154,81 [C-7a], 151,26 [C-2], 138,93 [C-1'], 132,66 [HC=N], 128,25 [C-3'], 127,99 [C-3a], 126,21 [C-6], 125,53 [C-2'], 125,47 [C-4'], 123,71 [C-5], 121,97 [C-4], 111,47 [C-7], 109,59 [C-3].

FTIR [KBr, cm⁻¹]: 3304 (estiramento N-H), 3126 (estiramento C-H aromático), 1612 (estiramento C=N), 1535 (estiramento C=C), 1251 (estiramento C=S).

UV-Vis [DMSO, λ_{máx}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 352 (15100); 363 (14500).

6.3.5. Tentativas de síntese do ligando HL⁴



(E)- (5-nitro-2-benzofurano-2-carboxilideno)-3-fenilhidrazinacarbotiamida

Procedimento A) Adicionaram-se ao ácido 5-nitro-2-benzofurano-2-carboxílico (0,50g; 2,4mmol), 2gotas de DMF seca e rapidamente cloreto de tionilo (0,5mL). A mistura foi aquecida a aproximadamente 60°C durante 6h30. Passado o tempo de reação arrefeceu-se a mistura reacional até á temperatura ambiente e deixou-se a secar. Esta reação foi repetida duas vezes.

Não se conseguiu chegar ao composto pretendido, pelo que não se continuou com a caracterização.

Procedimento B) A uma solução de ácido 5-nitro-2-benzofurano-2-carboxílico (0,5g; 2,4mmol) em THF seco (14mL), adicionou-se, lentamente e sob agitação, uma solução de NaBH₄ (0,137g; 3,6mmol) em THF seco (7mL). De seguida, adicionou-se, gota a gota, uma mistura de THF seco (3mL) e BF₃.Et₂O (5mL). Colocou-se a refluxo durante 4h a temperatura de 60°C.

Após esse tempo de reação, a mistura foi arrefecida e colocou-se sobre gelo. Adicionou-se água destilada (6mL) até atingir a temperatura de 10°C. Após 10 minutos, o THF foi evaporado, e adicionou-se diclorometano (10mL) sob agitação durante mais 1h. Após o tempo de agitação, lavou-se com uma solução saturada de cloreto de sódio, separou-se a fase de orgânica e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (3vezes). Secaram-se as fases orgânicas combinadas com o sulfato de sódio anidro, filtrou-se e levou-se ao evaporador rotativo.⁷⁷

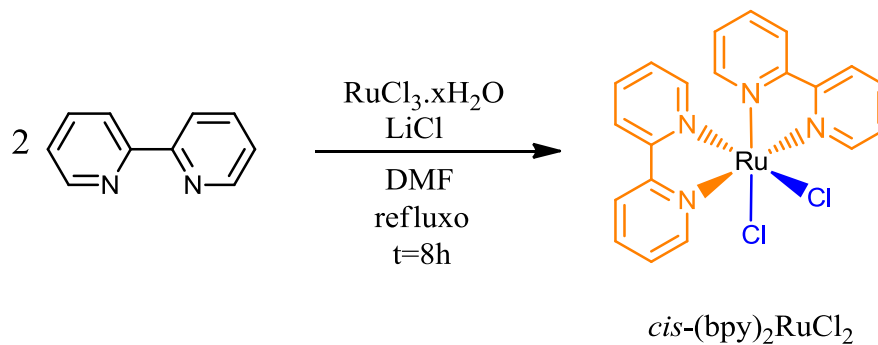
Esta reação foi repetida duas vezes, uma das vezes foi realizada em atmosfera inerte.

Não foi possível obter o composto pretendido, pelo que não se continuou a caracterização.

6.4.Síntese do precursor *cis*-bis(2,2'-bipiridina)dicloro ruténio(II) [*cis*-Ru(bipy)₂Cl₂]

A síntese do precursor *cis*-Ru(bipy)₂Cl₂ foi realizada de acordo com o procedimento descrito por B.P. Sullivan D.J. Salmon e T.J. Meyer⁵⁸ e foi repetida sete vezes, de acordo com a necessidade de sintetizar mais quantidade dos complexos de Ruténio. Apresenta-se em seguida uma síntese padrão.

Uma mistura de RuCl₃·xH₂O (0,4g; 1,91mmol), 2,2'-bipiridina (0,56g; 3,82mmol) e LiCl (0,0054g; 0,1282mmol) foi aquecida a refluxo durante 8h em DMF seco (7mL). Concentrou-se a mistura por evaporação de alguma DMF, adicionou-se 35mL de acetona e deixou-se a solução resultante a 0°C durante uma noite. Adicionou-se uma mistura de acetona e diclorometano de modo a facilitar a evaporação da DMF. O sólido resultante foi lavado com água, éter dietílico (3vezes) e posteriormente seca a vácuo, dando origem a um sólido amorfo roxo escuro.



Esquema 6.2 - Esquema de síntese do precursor $cis-(bpy)_2RuCl_2$.

Rendimento: 79,3% (258mg).

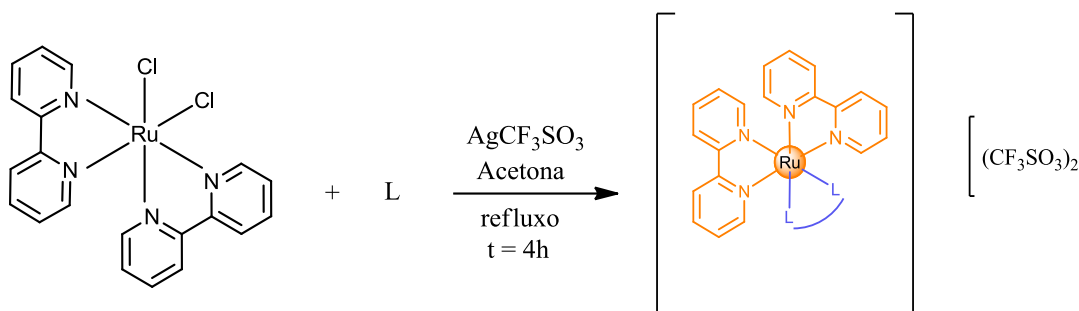
1H RMN [DMSO- d_6 , $(CH_3)_4Si$, δ/ppm]: 9,94 [d; 1,00; H-6], 8,61 [d; 1,00; H-3], 8,45 [d; 1,00; H-3'], 8,04 [t; 1,00; H-4], 7,75 [t; 1,00; H-5], 7,66 [t; 1,00; H-4'], 7,48 [d; 1,00; H-6'], 7,08 [t; 1,00; H-5'].

^{13}C RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 160,31 [C-2'], 158,30 [C-2], 153,30 [C-6], 152,13 [C-6'], 134,83 [C-4], 133,56 [C-4'], 125,56 [C-5], 125,44 [C-5'], 123,0 [C-3'], 122,60 [C-3].

6.5. Síntese dos complexos de Ru(II)

6.5.1. Procedimento geral de síntese

A uma solução de $cis-(bpy)_2RuCl_2$ em acetona (20mL), adicionou-se, sob agitação, 2 equivalentes de $AgCF_3SO_3$ e deixou-se a reagir durante cerca de 1h, tendo-se observado a formação de um precipitado branco de $AgCl$. Adicionou-se de seguida 1 equivalente de ligando e aqueceu-se a refluxo durante 4h. O precipitado de $AgCl$ foi separado por filtração e a solução avermelhada obtida foi evaporada sob pressão reduzida. Recristalizou-se o produto com os solventes adequados. O produto assim obtido foi adicionalmente purificado por dissolução num solvente apropriado, filtração sobre celite e evaporação do solvente sob pressão reduzida.



Esquema 6.3 - Esquema geral da síntese dos complexos de ruténio ($L=HL^1$, HL^2 , HL^3).

Na tabela 6.2 reúnem-se as condições reaccionais específicas para a síntese de cada complexo de ruténio.

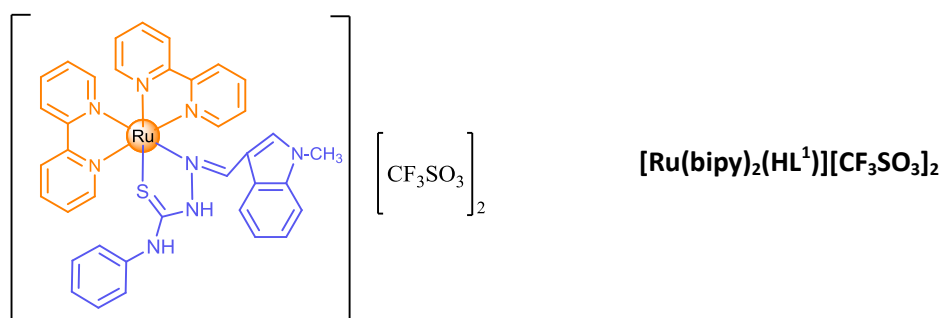
Tabela 6.2 - Condições reaccionais para a síntese dos complexos de ruténio.

	Ligando (quantidade química)	<i>cis</i> -(bipy) ₂ (quantidade química)	AgCF ₃ SO ₃ (quantidade química)	Tempo de reacção (a refluxo)	Solventes de Recristalização	Rend. (η)
1	0,2mmol (0,0603g)	0,2mmol (0,0969g)	0,4mmol (0,1653g)	4 h	*DCM-ETDT (1:3)	9,55 % (19,2mg)
					*DCM-HEX (1:3)	
2	0,2mmol (0,069g)	0,2mmol (0,100g)	0,4mmol (0,130g)	4 h	*DCM-ETDT (1:3)	10,5% (21,4mg)
3	0,2mmol (0,0750g)	0,2mmol (0,0980g)	0,4mmol (0,137g)	4h	*DCM-ETDT (1:3)	12,3% (24,8mg)
					*DCM - HEX (1:3)	

*Para a recristalização, só o DCM e o HEX é que foram secos

Nas secções seguintes resumem-se os resultados da caracterização de cada composto sintetizado.

6.5.2. Complexo 1



Esta reação foi repetida duas vezes.

Estado físico: sólido amorfo vermelho.

Análise Elementar, experimental (calculado para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)]\text{[CF}_3\text{SO}_3]_2 \cdot \frac{1}{2} \text{CH}_2\text{Cl}_2$, ou seja, $\text{C}_{37}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{S}_3\text{O}_6\text{RuF}_6 \cdot \frac{1}{2} \text{CH}_2\text{Cl}_2$): C 44,2 (44,11); H 2,9 (2,98); N 10,55 (10,69); S 9,0 (9,17).

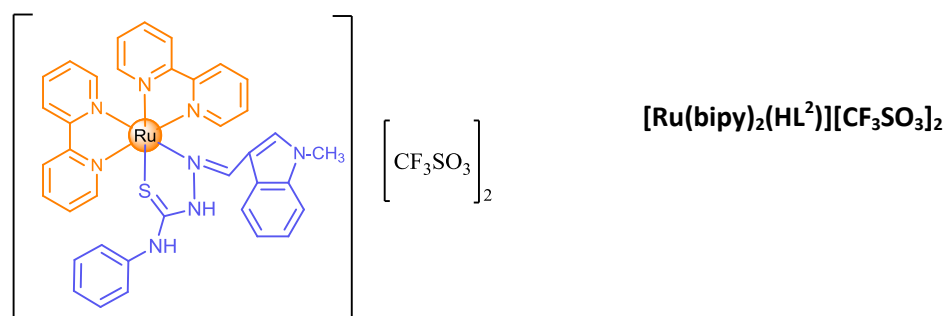
$^1\text{H RMN}$: [DMSO- d_6 , $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, δ/ppm]: 11,81 [s; 1,00; H-1], 9,71 [d; 1,00; bipy a)-6], 9,47 [s; 1,00; C=N-N-H], 8,85 [d; 1,00; bipy a)-3'], 8,79 [d; 1,00; bipy a)-3], 8,75 [d; 1,00; bipy b)-3], 8,68 [d; 1,00; bipy b)-3'], 8,64 [d; 1,00; H-2]; 8,44 [d; 1,00; bipy b)-6], 8,24 [t; 1,00; bipy a)-4'], 8,13 [t; 1,00; bipy a)-4], 8,10 [t; 1,00; bipy b)-4], 7,96 [t; 1,00; bipy b)-4'], 7,82 [m; 1,00; bipy a)-6'], 7,80 [m; 1,00; bipy a)-5], 7,74 [d; 1,00; bipy b)-6']; 7,67 [t; 1,00; bipy b)-5], 7,64 [d; 2,00; H-2'/H-6'], 7,62 [t; 1,00; bipy a)-5']; 7,36 [d; 5,00; H-7]; 7,34 [m; 1,00; bipy b)-5']; 7,28 [m; 2,00; H-3'/H-5']; 7,11 [t; 1,00; H-6]; 6,99 [t; 1,00; H-4']; 6,96 [t; 1,00; H-5]; 6,65 [d; 1,00; H-4]; 6,60 [s; 1,00; N=C-H].

$^{13}\text{C RMN}$ [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 157,10 [bipy a)-2], 157,09 [bipy a)-2'], 156,99 [bipy b)-2'], 156,70 [bipy b)-2], 152,58 [bipy a)-6], 151,09 [bipy b)-6], 150,85 [bipy b)-6'], 150,05 [bipy a)-6'], 141,81 [C=N]; 136,76 [bipy a)-4'], 136,09 [bipy a)-4], 135,90 [bipy b)-4'], 135,05 [bipy b)-4], 134,91 [C-7a], 131,14 [C-2], 128,39 [C-3'], 127,45 [bipy a)-5'], 126,51 [bipy a)-5], 126,20 [bipy b)-5'], 125,63 [C-3a], 123,40 [bipy b)-3], 122,50 [bipy a)-3'], 122,12 [C-6], 121,80 [C-5], 121,76 [C-4'], 120,41 [C-2'], 115,56 [C-4], 111,90 [C-7].

FTIR [KBr, cm^{-1}]: 3111 (estiramento C-H aromático), 1600 (estiramento C=N), 1255 (estiramento C=S), 1255+636 (vibração CF_3SO_3), 472 (vibração Ru-N), 418 (vibração Ru-S).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 353 (45400); 396 (39800); 461 (28300); 519 (21100); 581 (14000).

6.5.3. Complexo 2



Esta reação foi repetida duas vezes.

Estado físico: sólido amorfo vermelho.

Análise Elementar, experimental (calculado para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, ou seja, $\text{C}_{38}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{S}_3\text{O}_6\text{RuF}_6 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$): C 43,75 (45,93); H 2,9 (3,16); N 10,35 (10,99); S 9,0 (9,91).

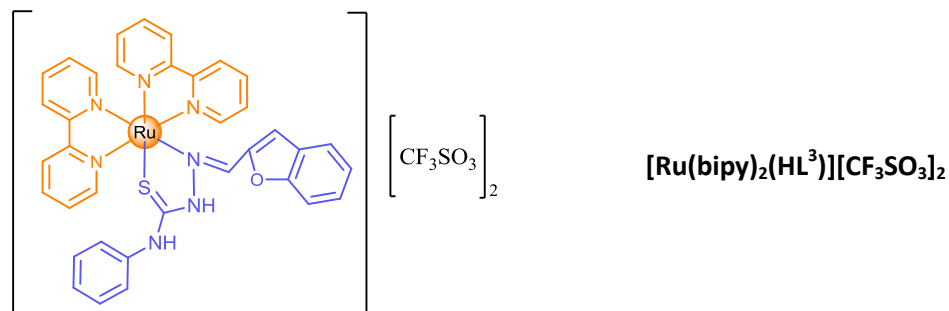
^1H RMN: [DMSO- d_6 , $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, δ/ppm]: 9,69 [d; 1,00; bipy a)-6], 9,43 [s; 1,00; PhN-H], 8,84 [d; 1,00; bipy a)-3'], 8,78 [m; 1,00; bipy a)-3], 8,75 [m; 1,00; bipy b)-3], 8,67 [d; 1,00; bipy b)-3'], 8,54 [s; 1,00; H-2]; 8,40 [d; 1,00; bipy b)-6], 8,22 [t; 1,00; bipy a)-4'], 8,11 [m; 1,00; bipy a)-4], 8,10 [m; 1,00; bipy b)-4], 7,96 [t; 1,00; bipy b)-4'], 7,80 [d; 1,00; bipy a)-5], 7,79 [d; 1,00; bipy a)-6'], 7,74 [d; 1,00; bipy b)-6']; 7,69 [t; 1,00; bipy b)-5], 7,61 [m; 2,00; H-2'/H-6'], 7,59 [m; 1,00; bipy a)-5']; 7,45 [d; 1,00; H-7]; 7,34 [m; 3,00; bipy b)-5'; H-3'/H-5']; 7,17 [t; 1,00; H-6]; 7,04 [m; 1,00; H-4']; 7,01 [m; 1,00; H-5]; 6,66 [d; 1,00; H-4]; 6,53 [s; 1,00; N=C-H]; 3,69 [s; 1,00; H-1].

^{13}C RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 176,36 [C=S], 157,17 [bipy a)-2], 157,13 [bipy a)-2'], 157,01 [bipy b)-2'], 156,78 [bipy b)-2], 152,66 [bipy a)-6], 151,26 [bipy b)-6], 151,13 [bipy b)-6'], 150,35 [bipy a)-6'], 141,55 [$\underline{\text{C}}=\text{N-H}$]; 141,45 [C-1'], 136,97 [bipy a)-4'], 136,22 [bipy a)-4], 135,98 [bipy b)-4'], 135,54 [C-7a], 135,44 [bipy b)-4], 135,07 [C-2], 128,49 [C-3'], 127,45 [bipy a)-5'], 127,08 [bipy b)-5], 126,75 [bipy a)-5], 126,42 [bipy b)-5'], 125,93 [C-3a], 124,08 [bipy a)-3], 123,79 [bipy b)-3], 123,63 [bipy a)-3'], 123,25 [bipy b)-3'], 122,55 [C-6], 122,45 [C-4'], 121,29 [C-2'], 120,77 [C-5], 116,09 [C-4], 110,61 [C-7], 32,82 [CH_3].

FTIR [KBr, cm^{-1}]: 3076 (estiramento C-H aromático), 1598 (estiramento C=N), 1253 (estiramento C=S), 1253+636 (vibração CF_3SO_3), 516 (vibração Ru-N), 420 (vibração Ru-S).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 362 (39800); 399 (34900); 462 (24400); 518 (15000); 570 (72200).

6.5.4. Complexo 3



Esta reacção foi repetida duas vezes.

Estado físico: sólido amorfo vermelho.

Análise Elementar, experimental (calculado para $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2 \cdot \frac{3}{4} \text{CH}_2\text{Cl}_2$, ou seja, $\text{C}_{37}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{S}_3\text{O}_7\text{RuF}_6 \cdot \frac{3}{4} \text{CH}_2\text{Cl}_2$): C 43,7 (43,47); H 2,85 (2,87); N 8,85 (9,16); S 9,0 (8,98).

^1H RMN [DMSO- d_6 , $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, δ/ppm]: 9,97 [s; 1,00; PhN-H], 9,55 [d; 1,00; bipy a)-6], 8,83 [d; 1,00; bipy a)-3; bipy a)-3'], 8,76 [d; 1,00; bipy b)-3], 8,68 [d; 1,00; bipy b)-3'], 8,38 [d; 1,00; bipy b)-6], 8,17 [m; 1,00; bipy a)-4], 8,16 [m; 1,00; bipy a)-4'], 8,13 [m; 1,00; bipy b)-4], 7,98 [t; 1,00; H-3], 7,96 [t; 1,00; bipy b)-4'], 7,84 [t; 1,00; bipy a)-5], 7,73 [t; 1,00; bipy a)-6'], 7,72 [t; 1,00; bipy b)-5]; 7,65 [m; 3,00; bipy b)-6']; H-2'/H-6'], 7,53 [m; 1,00; bipy a)-5'], 7,52 [m; 1,00; H-4]; 7,45 [d; 1,00; H-7]; 7,36 [m; 1,00; H-3'/H-5'], 7,33 [m; 1,00; bipy b)-5'], 7,31 [m; 1,00; H-6], 7,24 [t; 1,00; H-5]; 7,10 [t; 1,00; H-4'], 6,53 [s; 1,00; N=C-H].

^{13}C RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 180,49 [C=S], 152,96 [bipy a)-6], 151,31 [bipy b)-6], 150,96 [bipy b)-6'], 150,11 [bipy a)-6'], 136,75 [C=N-H], 136,55 [bipy b)-4'], 136,11 [bipy a)-4], 128,58 [C-3'], 123,22 [C-4'], 121,82 [C-4], 121,66 [C-2'], 112,32 [C-3], 111,17 [C-7].

FTIR [KBr, cm^{-1}]: 3145 (estiramento C-H aromático), 1593 (estiramento C=N), 1255 (estiramento C=S), 1255+636 (vibração CF_3SO_3), 570 (vibração Ru-N), 516 (vibração Ru-S).

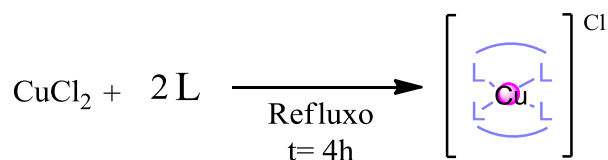
UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]: 351 (67500); 386 (59000); 452 (36300); 477 (34400); 554 (10100).

6.6. Síntese dos complexos de Cobre

A síntese dos complexos de cobre foi efectuada sem recurso a técnicas de Schlenk, utilizando solventes de grau de pureza p.a. sem pré-secagem. Os complexos foram obtidos a partir de cloreto de cobre(II) tal como sumarizado no esquema 6.4. Estas reacções são descritas pormenorizadamente em seguida.

6.6.1. Procedimento geral de síntese

A uma solução de ligando tiosemicarbazona em etanol (15mL) adicionou-se uma solução de CuCl_2 em etanol (5mL) e colocou-se a mistura reaccional sob refluxo durante 4h. Deixou-se arrefecer até a temperatura ambiente e filtrou-se a solução sob vácuo, obtendo-se um precipitado amarelo.



Esquema 6.4 - Esquema geral da síntese dos complexos de cobre ($\text{L}=\text{HL}^1, \text{HL}^2, \text{HL}^3$)

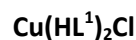
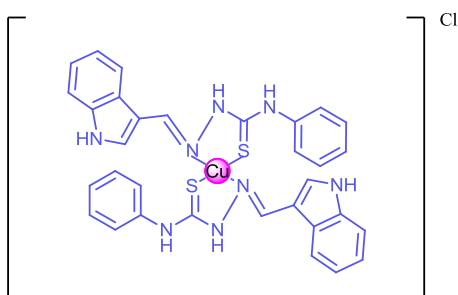
Na tabela 6.3 reúnem-se as condições reaccionais específicas para a síntese de cada complexo de cobre.

Tabela 6.3 - Condições reaccionais para a síntese dos complexos de cobre.

	Ligando (quantidade química)	CuCl_2 (quantidade química)	Tempo de reacção (a refluxo)	Rendimento (η)
4	2,5mmol (0,7311g)	1,25mmol (0,1653g)	4 h	37,76 % (324,9mg)
5	2,5mmol (0,7710g)	1,25mmol (0,1680g)	4 h	50,96 % (474,2mg)
6	2,5mmol (0,7390g)	2,5mmol (0,7390g)	4h	54,32% (487,8mg)

Nas secções seguintes resumem-se os resultados da caracterização de cada composto sintetizado.

6.6.2. Complexo 4



Sólido físico: sólido amorfo amarelo.

Análise Elementar, experimental (calculado para $[\text{Cu}(\text{HL}^1)_2[\text{Cl}]$ ou seja, $[\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S})_2\text{Cl}]$): C 55,6 (55,89); H 4,25 (4,10); N 16,0 (16,29); S 9,0 (9,32).

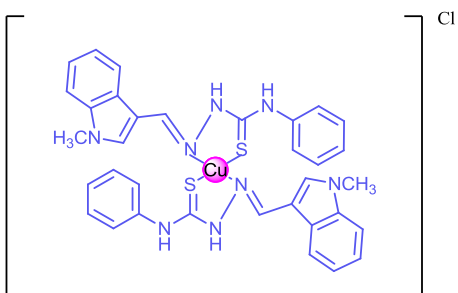
^1H RMN [DMSO- d_6 , $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, δ/ppm]: 11,74 [s; 2,00; H-1/C=N-N-H], 9,82 [s; 1,00; Ph-N-H], 8,46 [s; 1,00; N=C-H], 8,29 [d; 1,00; H-4], 7,95 [s; 1,00; H-2], 7,55 [s; 2,00; H-2'/H-6'], 7,44 [m; 1,00; H-7], 7,39 [m; 2,00; H-3'/H-5'], 7,24 [m; 1,00; H-4'], 7,22 [m; 1,00; H-6], 7,15 [m; 1,00; H-5].

^{13}C RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 143,15 [C=N], 138,66 [C-1'], 137,07 [C-7a], 132,22 [C-2], 128,29 [C-3'], 126,23 [C-2'], 125,81 [C-4'], 123,95 [C-3a], 122,80 [C-6], 122,26 [C-4], 120,77 [C-5], 111,84 [C-7], 110,64 [C-3].

FTIR [KBr, cm^{-1}]: 3130 (estiramento C-H aromático), 1606 (estiramento C=N), 1267 (estiramento C=S), 835 (vibração Cu-S), 472 (vibração Cu-N).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]: 285 (15400); 346 (22100).

6.6.3. Complexo 5



Sólido físico: sólido amorfo amarelo.

Análise Elementar, experimental (calculado para $[\text{Cu}(\text{HL}^2)_2[\text{Cl}]$ ou seja, $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{S}_2\text{CuCl}$): C 56,9 (57,05); H 4,4 (4,51); N 15,8 (15,65); S 9,0 (8,96).

¹H RMN [DMSO-*d*₆, (CH₃)₄Si, δ/ppm]: 11,82 [s; 1,00; C=N-N-H], 9,91 [s; 1,00; Ph-N-H], 8,46 [s; 1,00; N=C-H], 8,36 [s; 1,00; H-4], 7,94 [s; 1,00; H-2], 7,70-7,0 [m; 8,00; H-2'/H-6'; H-3'/H-5'; H-5; H-6; H-7; H-4'], 3,84 [s; 3,00; NCH₃].

¹³C RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm]: 142,43 [C=N], 138,50 [C-1'], 137,48 [C-7a], 135,68 [C-2], 128,16 [C-3'], 126,23 [C-2'], 125,72 [C-4'], 124,19 [C-3a], 122,74 [C-6], 122,34 [C-7], 120,92 [C-5], 110,11 [C-4], 109,45 [C-3], 32,81 [C-1].

FTIR [KBr, cm⁻¹]: 3124 (estiramento C-H aromático), 1608 (estiramento C=N), 1253 (estiramento C=S), 810 (vibração Cu-S), 499 (vibração Cu-N).

UV-Vis [DMSO, λ_{máx}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹)]: 285 (545); 359 (705).

6.7. Estudo de espectroscopia de Ultravioleta-Vísivel dos complexos (1)-(5) e estudo de estabilidade dos complexos (1)-(3)

Nos estudos de caracterização por espectroscopia de Ultravioleta-Vísivel, os solventes utilizados foram etanol, acetonitrilo, diclorometano, dimetilsulfóxido, DMF e metanol, tendo as leituras sido feitas ao ar e á temperatura ambiente. A concentração das soluções utilizadas para traçar os espectros encontram-se na gama dos 10⁻³M a 10⁻⁶M e o intervalo de comprimento de onda observado foi 200-900nm.

O estudo de estabilidade dos complexos foi feita recorrendo à espectroscopia de Ultravioleta-Vísivel. No estudo de estabilidade dos complexos utilizou-se meio celular (DMEM). O comportamento dos compostos foi seguido durante 24h, depois da dissolução no meio celular, sendo que as primeiras leituras foram feitas de 15 em 15 minutos até se completar a primeira hora. De seguida, foram feitas leituras de hora a hora até de completar as 7horas; e por fim realizou-se ainda uma última medição, 24horas depois de se ter iniciado o estudo.

6.8. Estudo de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas

Os ensaios biológicos foram realizados no Centro de Ciências Tecnológicas e Nucleares (C2TN-IST) pela Dr^a Fernanda Marques, tendo sido utilizadas linhas celulares MDAMB231 e A2780, e a citotoxicidade avaliada pelo ensaio de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). A citotoxicidade dos compostos foi quantificada

(quando possível) e calculado o respectivo IC_{50} , tendo por base a análise dos resultados de dose-resposta. Os resultados da viabilidade celular correspondem à média e desvio padrão de pelo menos 3 replicados, obtidos para os períodos de exposição de 24 e 72 horas.

CAPÍTULO 7

Conclusão e perspectivas futuras

7. Conclusões e perspectivas futuras

Com o aumento de casos de cancro por todo o mundo, é cada vez mais necessário ter novos métodos de tratamento para esta doença e, neste sentido, a investigação na área de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos anti-cancerígenos é de uma enorme importância.

No âmbito desta tese foram sintetizadas três tiossemicarbazonas, (*E*)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida)-**HL**¹, ((*E*)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida)-**HL**² e (*E*)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina carbotioamida)-**HL**³ (duas das quais novas), com o objetivo de se avaliar a sua eventual atividade citotóxica em linhas celulares neoplásicas e de serem utilizadas como ligandos na síntese de complexos de ruténio e de cobre. As tiossemicarbazonas foram extensivamente caracterizadas por RMN, FTIR, UV-Vis, ESI-MS e AE, tendo-se concluído que todas elas se apresentam na forma neutra tiona, com geometria *E* à volta da ligação C=N, e conformação *syn* com respeito à estereoquímica entre o átomo de enxofre e o azoto imínico.

Neste trabalho foram também sintetizados três novos complexos de ruténio(II), os complexos **1**, **2** e **3**, usando as tiossemicarbazonas, **HL**¹, **HL**² e **HL**³ e como co-ligando a 2,2'-bipiridina. Os complexos foram obtidos a partir do precursor *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂], também sintetizado e caracterizado neste trabalho. A caracterização destes compostos foi feita usando técnicas de RMN, FTIR, UV-Vis, ESI-MS, AE e adicionalmente métodos eletroquímicos de voltametria cíclica.

Os resultados obtidos permitem propor que a formulação dos complexos seja [(bipy)₂Ru(HL)][CF₃SO₃]₂, com a tiossemicarbazona neutra (HL) coordenada de um modo bidentado através do átomo de enxofre (sob a forma de tiona, C=S) e do azoto imínico. O rendimento da síntese destes complexos foi baixo devido ao difícil processo de purificação que envolveu várias recristalizações sucessivas.

Foram ainda sintetizados dois novos complexos de cobre, complexos **4** e **5**, utilizando como ligandos as tiossemicarbazonas **HL**¹ e **HL**², que foram caracterizados preliminarmente, usando as mesmas técnicas que para os complexos de ruténio. A análise dos resultados obtidos permitiu propor que a sua formulação seja do tipo [Cu(HL)₂]Cl, encontrando-se a

tiossemicarbazona coordenada na sua forma neutra (HL) e, portanto, o cobre no estado de oxidação (I). Foi possível ainda sintetizar um terceiro complexo de cobre, complexo **6**, com o ligando tiossemicarbazona **HL**³, para o qual não se conseguiu uma concordância inequívoca entre as várias técnicas utilizadas para estabelecer a sua formulação. É possível que este complexo não seja estável (ao ar e em solução) e que a dificuldade na sua caracterização pelas técnicas mencionadas seja consequência dessa instabilidade.

Foram realizados estudos de estabilidade para os complexos de Ru(II) em 1% de DMSO e 99% de meio celular DMEM tendo-se verificado que os complexos são estáveis nas primeiras 6h em solução.

A citotoxicidade das tiossemicarbazonas **HL**² e **HL**³ e dos respetivos complexos de Ru(II), os complexos **2** e **3**, foi avaliada nas linhas celulares A2780 (carcinoma humano do ovário) e MDAMB231 (adenocarcinoma humano da mama), usando um ensaio colorimétrico baseado no corante de tetrazólio MTT. Das medidas de viabilidade celular determinadas às 24h de incubação para as células A2780, pode concluir-se que ambos os ligandos não apresentam citotoxicidade apreciável, mas que os complexos **2** e **3** já são bastante ativos, com valores de IC₅₀ de (1.96±0.45) µM e de (6.49±0.99) µM, respetivamente. Após uma incubação de 72h, os valores de IC₅₀ obtidos para os compostos nas células A2780 revelaram que o ligando **HL**² atinge valores de citotoxicidade comparáveis aos da cisplatina (4.5±1.7µM), e que para o complexo **2** se obtêm valores bastante melhores (0.15±0.04µM) do que para este fármaco de controle. Quer o ligando **HL**² quer o complexo **2** se revelaram extremamente ativos quando testados em células altamente agressivas do cancro da mama triplo-negativo, MDAMB231, com valores de IC₅₀ (4.49±1.4) µM e (0.11±0.02) µM respetivamente, na avaliação às 72h de incubação, ultrapassando largamente o valor da cisplatina.

Relativamente a trabalhos futuros, para completar os estudos apresentados nesta tese, propõe-se: i) utilizar novas abordagens sintéticas de modo a poder obter a tiossemicarbazona **HL**⁴; ii) otimizar a síntese e purificação dos complexos de ruténio de modo a melhorar o seu rendimento; iii) otimizar as condições de síntese do complexo **6**, o complexo de cobre com o ligando **HL**³, de modo a permitir uma caracterização exaustiva e inequívoca da sua estrutura; iv) complementar a caracterização já efetuada para os complexos de cobre **4** e **5** com estudos de EPR e medidas de suscetibilidade magnética à temperatura ambiente, de modo a confirmar o estado de oxidação do ião metálico nestes complexos, e estudos ao longo do tempo para esclarecer se os complexos são isolados na forma Cu(I) moderadamente estável, passando com o tempo a Cu(II).

No que se refere à actividade dos compostos tiosemicarbazona e dos seus complexos de Ru(II), os resultados já obtidos neste trabalho devem ser complementados com testes de citotoxicidade para os ligandos **HL**¹ e **HL**³, para o precursor e para o complexo **1** nas mesmas linhas celulares (e aos mesmos tempos de incubação) em que foram testados o ligando **HL**² e os complexos **2** e **3**. Será interessante testar também a actividade dos complexos de cobre nestas linhas celulares, e eventualmente expandir os estudos de actividade a mais linhas humanas tumorais.

Propõe-se estudar o efeito dos compostos numa linha celular humana saudável, para tentar compreender qual a sua selectividade, se será mais activo para células cancerígenas ou para células saudáveis.

Para os compostos já testados (e para os restantes que se revelarem ativos), o passo seguinte será tentar perceber o seu modo de ação, ou seja, interessa saber como o composto se distribui nas células e onde poderão estar os seus alvos celulares.

Este trabalho demonstrou que a família de compostos aril tiosemicarbazonas e os seus complexos, em concreto os de Ru(II) com o fragmento [Ru(bipy)₂], são muito promissores e têm potencial para desenvolvimento futuro como agentes anticancerígenos.

**Referências
Bibliográficas**

Referências Bibliográficas

1. Nacional Cancer Institute (<http://www.cancer.gov/>), consultado a 5 de Setembro 2015;
2. Liga Portuguesa Contra o Cancro (<http://www.ligacontracancro.pt/#>), consultado a 15 de Setembro 2015;
3. World Health Organization (<http://www.who.int/cancer/en/>), consultado a 4 de Setembro 2015;
4. Cancer Research UK (<http://www.cancerresearchuk.org/>), consultado a 5 de Setembro 2015;
5. G. Süss-Fink, "Arene ruthenium complexes as anticancer agents.," *Dalton Trans.*, 39 (2010), 1673–1688;
6. Globocan 2012, IARC (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>), consultado a 4 de Setembro 2015;
7. M. J. Quinn, a. d'Onofrio, B. Møller, R. Black, C. Martinez-Garcia, H. Møller, M. Rahu, C. Robertson, L. J. Schouten, C. La Vecchia, and P. Boyle, "Cancer mortality trends in the EU and acceding countries up to 2015," *Ann. Oncol.*, 14 (2003), 1148–1152;
8. M. Malvezzi, P. Bertuccio, T. Rosso, M. Rota, F. Levi, C. La Vecchia, and E. Negri, "European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women?," *Ann. Oncol.*, 26 (2015), 779-786;
9. Leonor Côrte-Real, "Complexos de Ruténio como potenciais agentes terapêuticos: estudos dos mecanismos de captação celular e modulação de enzimas metabólicos", Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, 2012;
10. Cancer Center (<http://www.cancercenter.com/treatments/immunotherapy/>), consultado a 15 de Setembro 2015;
11. American Cancer Society (<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-what-is-immunotherapy>), consultado a 15 de Setembro 2015;
12. PIPOP (<http://www.pipop.info/gca/index.php?id=55>), consultado a 15 de Setembro 2015;
13. C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. a. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, and B. K. Keppler, "From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)," *J. Inorg. Biochem.*, 100 (2006), 891–904;

14. H. A. Wee and P. J. Dyson, "Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy," *Eur. J. Inorg. Chem.*, 20 (2006), 4003–4018;
15. M. Galanski, M. a Jakupec, and B. K. Keppler, "Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches.," *Curr. Med. Chem.*, 12 (2005), 2075–2094, 2005;
16. P. C. Bruijninx and P. J. Sadler, "New trends for metal complexes with anticancer activity," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12 (2008), 197–206;
17. N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, and R. Oun, "The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials.," *Dalton Trans.*, 39 (2010), 8113–8127;
18. P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, and W. Berger, "Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities," *Drug Resist. Updat.*, 11 (2008), 1–16;
19. A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, and G. Sava, "Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates," *J. Inorg. Biochem.*, 106 (2012), 90–99;
20. V. Brabec and O. Nováková, "DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity," *Drug Resist. Updat.*, 9 (2006), 111–122;
21. W. H. Ang, A. Casini, G. Sava, and P. J. Dyson, "Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action," *J. Organomet. Chem.*, 696 (2011), 989–998;
22. P. J. Dyson and G. Sava, "Metal-based antitumour drugs in the post genomic era.," *Dalton Trans.*, 2006, 1929–1933;
23. J. B. Aitken, S. Antony, C. M. Weekley, B. Lai, L. Spiccia, and H. H. Harris, "Distinct cellular fates for KP1019 and NAMI-A determined by X-ray fluorescence imaging of single cells," *Metallomics*, 4 (2012), 1051-1056;
24. J. C. Pessoa and I. Tomaz, "Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components.," *Curr. Med. Chem.*, 17 (2010), 3701–3738;
25. C. S. Allardyce, A. Dorcier, C. Scolaro, and P. J. Dyson, "Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals," *Appl. Organomet. Chem.*, 19 (2005), 1–10;
26. A. Levina, A. Mitra, and P. a Lay, "Recent developments in ruthenium anticancer drugs.," *Metallomics*, 1 (2009), 458–470;
27. W. M. Motswainyana and P. A. Ajibade, "Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium (II) Coordination Complexes," 2015, 2015;
28. H.-K. Liu and P. J. Sadler, "Metal complexes as DNA intercalators.," *Acc. Chem. Res.*, 44 (2011), 349–359;

29. A. a. Nazarov, C. G. Hartinger, and P. J. Dyson, "Opening the lid on piano-stool complexes: An account of ruthenium(II)arene complexes with medicinal applications," *J. Organomet. Chem.*, 751 (2014), 251–260;
30. B. Demoro, R. F. M. de Almeida, F. Marques, C. P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, I. Santos, A. Rodríguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino, and A. I. Tomaz, "Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism.," *Dalton Trans.*, 42 (2013), 7131–46;
31. A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. de Almeida, F. Mendes, É. a. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss, and M. H. Garcia, "[Ru(II)(η^5 -C₅H₅)(bipy)(PPh₃)]⁺, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin," *J. Inorg. Biochem.*, 117 (2012) 261–269, 2012;
32. T. S. Morais, F. C. Santos, L. Corte-Real, and M. H. Garcia, "Exploring the effect of the ligand design on the interactions between [Ru(η^5 -C₅H₅)(PPh₃)(N,O)][CF₃SO₃] complexes and human serum albumin.," *J. Inorg. Biochem.*, 129 (2013), 94–101;
33. A. Valente, M. H. Garcia, F. Marques, Y. Miao, C. Rousseau, and P. Zinck, "First polymer 'ruthenium-cyclopentadienyl' complex as potential anticancer agent," *J. Inorg. Biochem.*, 127 (2013), 79–81;
34. T. S. Morais, F. Santos, L. Côte-Real, F. Marques, M. P. Robalo, P. J. A. Madeira, and M. H. Garcia, "Biological activity and cellular uptake of [Ru(η^5 -C₅H₅)(PPh₃)(Me₂bpy)][CF₃SO₃] complex.," *J. Inorg. Biochem.*, 122 (2013), 8–17;
35. L. Côte-Real, A. P. Matos, I. Alho, T. S. Morais, A. I. Tomaz, M. H. Garcia, I. Santos, M. P. Bicho, and F. Marques, "Cellular uptake mechanisms of an antitumor ruthenium compound: the endosomal/lysosomal system as a target for anticancer metal-based drugs.," *Microsc. Microanal.*, 19 (2013), 1122–1130;
36. E. Meggers, G. E. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. P. Mulcahy, N. Pagano, and D. S. Williams, "Exploring chemical space with organometallics: Ruthenium complexes as protein kinase inhibitors," *Synlett*, 2007, 1177–1189;
37. L. Zhou, L. Gan, H. Li, and X. Yang, "Studies on the interactions between DNA and PAMAM with fluorescent probe [Ru(phen)2dppz]2⁺," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007), 330–334;
38. C. Tan, S. Lai, S. Wu, S. Hu, L. Zhou, Y. Chen, M. Wang, Y. Zhu, W. Lian, W. Peng, L. Ji, and A. Xu, "Nuclear Permeable Ruthenium(II) β -Carboline Complexes Induce Autophagy To Antagonize Mitochondrial-Mediated Apoptosis," *J. Med. Chem.*, 53 (2010), 7613–7624;
39. W. M. Motswainyana and P. a Ajibade, "Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium (II) Coordination Complexes," 2015 (2015), 1-21;
40. H. Beraldo, "Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos," *Quim. Nova*, 27 (2004), 461–471;

41. R. a. Festa and D. J. Thiele, "Copper at the Front Line of the Host-Pathogen Battle," *PLoS Pathog.*, 8 (2012), 9–12;
42. F. Harris and L. Pierpoint, "Photodynamic Therapy Based on 5-Aminolevulinic Acid and Its Use as an Antimicrobial Agent," *Med. Res. Rev.*, 30 (2012), 1292–1327;
43. D. Chen, F. Peng, Q. C. Cui, K. G. Daniel, S. Orlu, J. Liu, and Q. P. Dou, "Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis.," *Front. Biosci.*, 10 (2005), 2932–2939;
44. K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, and Q. P. Dou, "Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells", *Biochem. Pharmacol.*, 67 (2004), 1139–1151;
45. G. Pelosi, "Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity", *Open Crystallogr. J.*, 3 (2010), 16–28;
46. R. P. Tenório, a. J. S. Góes, J. G. De Lima, A. R. De Faria, A. J. Alves, and T. M. De Aquino, "Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica," *Quim. Nova*, 28 (2005), 1030–1037;
47. D. X. West, J. K. Swearingen, A. K. El-sawaf, F. Van Meurs, A. Castineiras, I. Garcia, and E. Bermejo, "Spectral and structural studies of iron (III), cobalt (II,III) and nickel (II) complexes of 2-pyridineformamide N (4) -methylthiosemicarbazone," 18 (1999), 2919–2929;
48. M. a. Hussein, M. A. Iqbal, M. I. Umar, R. a. Haque, and T. S. Guan, "Synthesis, structural elucidation and cytotoxicity of new thiosemicarbazone derivatives," *Arab. J. Chem.*, 2015;
49. S. Chandra, S. Parmar, and Y. Kumar, "Synthesis, spectroscopic, and antimicrobial studies on bivalent zinc and mercury complexes of 2-formylpyridine thiosemicarbazone," *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2009 (2009), pp. 0–5;
50. T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, and S. Khanna, "Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals-An overview," *Coord. Chem. Rev.*, 253 (2009), 977–1055;
51. K. Sampath, S. Sathiyaraj, G. Raja, and C. Jayabalakrishnan, "Mixed ligand ruthenium(III) complexes of benzaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazones with triphenylphosphine/triphenylarsine co-ligands: Synthesis, DNA binding, DNA cleavage, antioxidative and cytotoxic activity," *J. Mol. Struct.*, 1046 (2013), 82–91;
52. W. Su, Z. Tang, Q. Xiao, P. Li, Q. Qian, X. Lei, S. Huang, B. Peng, J. Cui, and C. Huang, "Synthesis, structures, antiproliferative activity of a series of ruthenium(II) arene derivatives of thiosemicarbazones ligands," *J. Organomet. Chem.*, 783 (2015), 10–16;
53. Floyd A. Beckford, Michael Shaloski, Jr., Gabriel Leblanc, Jeffrey Thessing, Lesley C. Lewis-Alleyne, Alvin A. Holder, Liya Li and Navindra P. Seeram, "Microwave synthesis of

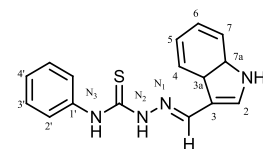
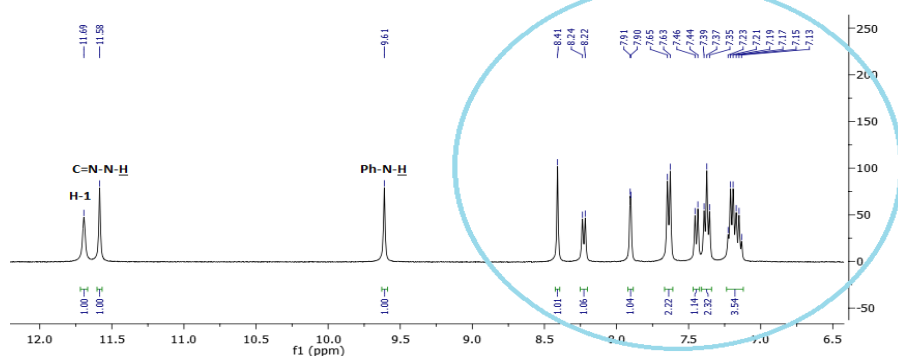
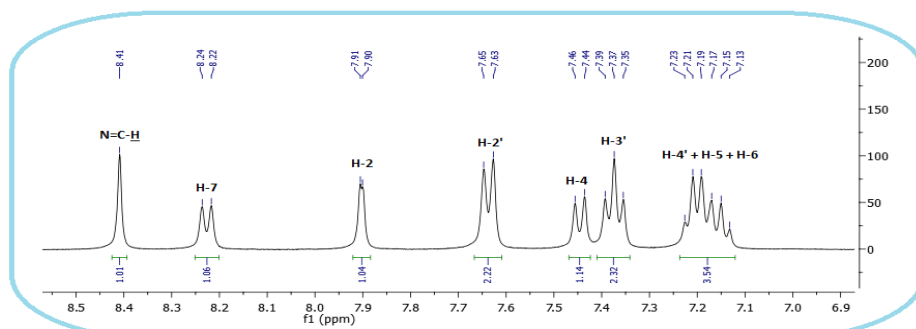
mixed ligand diimine–thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): biophysical reactivity and cytotoxicity,” *Dalton Trans.*, 2009 , 10757–10764;

54. S. Kumar and N. Kumar, “Synthesis , Characterization and Antimicrobial Studies on Some Transition Metal Complexes of Thiosemicarbazone,” 4 (2013), 305–311;
55. C. M. Dos Reis, D. S. Pereira, R. D. O. Paiva, L. F. Kneipp, and A. Echevarria, “Microwave-Assisted Synthesis of New N1,N4-Substituted Thiosemicarbazones,” *Molecules*, 16 (2011), 10668–10684;
56. R. Teixeira, “Desenvolvimento de potenciais metalofármacos para a terapia do cancro”, Tese de Licenciatura, Universidade de Lisboa, 2014;
57. A. D. Cross, *Infra-Red Spectroscopy*, Second Edi. Apartado 2679, Mexico, 1964;
58. B. P. Sullivan, D. J. Salmon, and T. J. Meyer, “Mixed Phosphine 2,2’-Bipyridine Complexes of Ruthenium,” *Inorg. Chem.*, 17 (1978), 3334–3341;
59. Z. PIKRAMENOU and N. Rogers, “Coated nanoparticles,” WO2013004989 A1;
60. M. J. Atkins, D. J. Harwood, and R. B. Lowry, “Synthesis and characterisation of a novel ruthenium organometallic cis-[Ru(bpy)(2)(npp)(Cl)]center dot BF4 where bpy=2,2’-bipyridyl and npp=4-(N-pyrrolyl)pyridine,” *Inorg. Chim. Acta*, 244 (1996), 277–280;
61. F. Paper, “New Amphiphilic Polypyridyl Ruthenium (II) Sensitizer and Its Application in Dye-Sensitized Solar Cells,” *Program*, 27 (2007), 168–171;
62. M. Pagano, B. Demoro, J. Toloza, L. Boiani, M. González, H. Cerecetto, C. Olea-Azar, E. Norambuena, D. Gambino, and L. Otero, “Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones,” *Eur. J. Med. Chem.*, 44 (2009), 4937–4943;
63. D. Shriver, P. Atkins, *Inorganic Chemistry*, 4th edition, W.H. Freeman, New York 2006;
64. P. Atkins, J. Paula, *Atkins Physical Chemistry*, 9th edition, Oxford University Press, 2010;
65. M. Hossain, S. K. Chattopadhyay, and S. Ghosh, “Synthesis and characterization of bis (2, 2’-bipyridine) ruthenium complexes containing thiosemicarbazide ligands: unique redox series,” *Polyhedron*, 16 (1997), 4313–4321;
66. Carolina Riverin Cardoso, “Complexos de Ruténio Bioativos: Síntese, Caracterização e Ensaio Biológicos, Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2014.
67. J. Wang, J. Wang, L. Urban, and L. Urban, “The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy”, *Drug Discov. World*, 2004, 73–86;
68. R. L. De Lima, L. R. D. S. Teixeira, T. M. G. Carneiro, and H. Beraldo, “Nickel(II), Copper(I) and Copper(II) Complexes of Bidentate Heterocyclic Thiosemicarbazones,” *J. Braz. Chem. Soc.*, 10 (1999), 184–188;

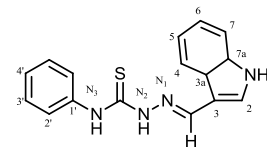
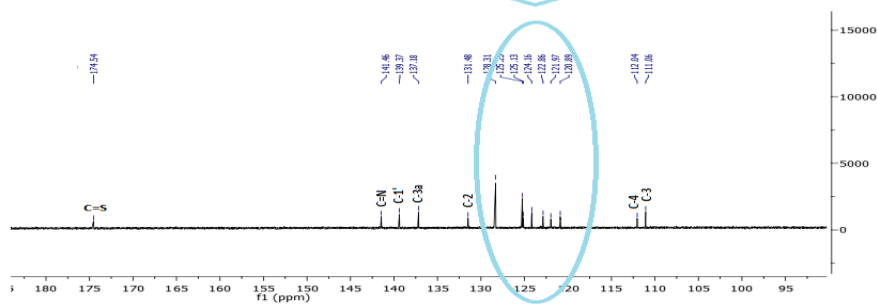
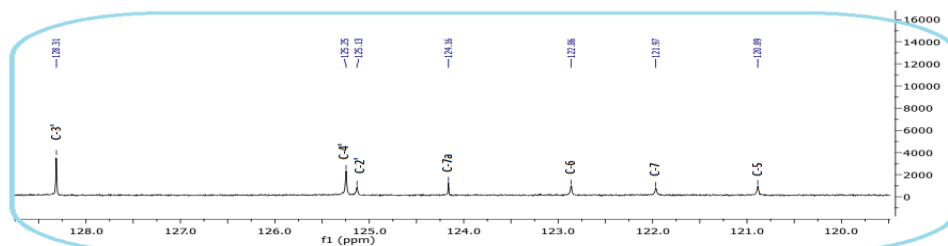
69. T. Lobana, P. Kumari, A. Castineiras, and R. Butcher, "Metal derivatives of thiosemicarbazones: crystal and molecular structures of mono- and di-nuclear copper(I) complexes with N1-substituted thiosemicarbazones," *J. Coord. Chem.*, 62 (2009), 1754–1765;
70. F. Bisceglie, S. Pinelli, R. Alinovi, M. Goldoni, A. Mutti, A. Camerini, L. Piola, P. Tarasconi, and G. Pelosi, "Cinnamaldehyde and cuminaldehyde thiosemicarbazones and their copper(II) and nickel(II) complexes: A study to understand their biological activity," *J. Inorg. Biochem.*, 140 (2014), 111–125;
71. M. Berridge, A. Tan, K. McCoy, and R. Wang, "The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts," *Biochemica*, 1996, 4–9;
72. Y.-F. Tu, B. a. Kaiparettu, Y. Ma, and L.-J. C. Wong, "Mitochondria of highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 exhibits increased autophagic properties," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1807 (2011), 1125–1132;
73. Oscar Armando Lenis Rojas, "Síntese de compostos citotóxicos de Ruténio com potenciais aplicações terapêuticas", Projeto final de curso da Licenciatura em Química, Universidade da Corunha, realizado na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Programa ERASMUS, 2011.
74. A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. de Almeida, F. Mendes, É. a. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss, and M. H. Garcia, "[RuII(η^5 -C₅H₅)(bipy)(PPh₃)]⁺, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin," *J. Inorg. Biochem.*, 2012;
75. W. A. and D. R. P. D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemical*, 2nd editio. New York, 1980.
76. M. L. Gonçalves, *Métodos Instrumentais para Análises de Soluções*. 1983.
77. S. Cho, Y. Park, J. Kim, J. R. Falck, and Y. Yoon, "Facile Reduction of Carboxylic Acids , Esters , Acid Chlorides , Amides and Nitriles to Alcohols or Amines Using NaBH₄ /BF₃·Et₂O," 25 (2004), 407–409;

Anexos

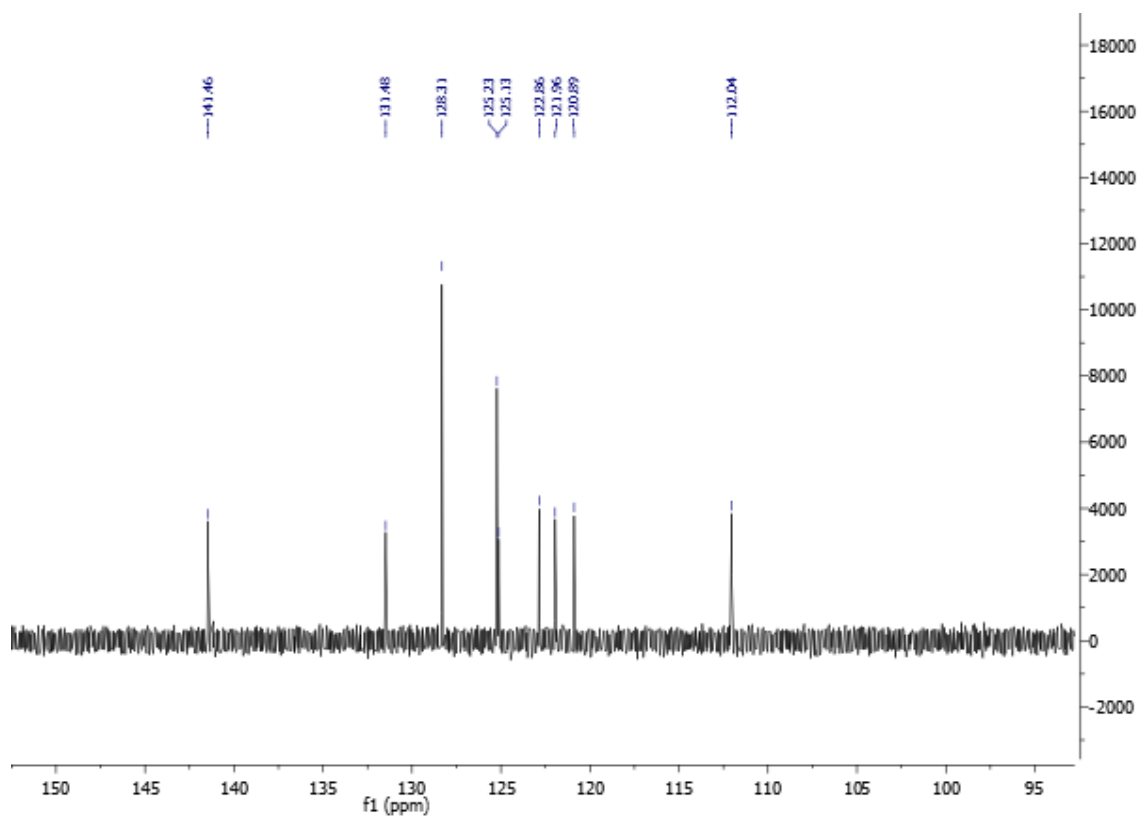
I. Espectroscopia de RMN do ligando HL¹



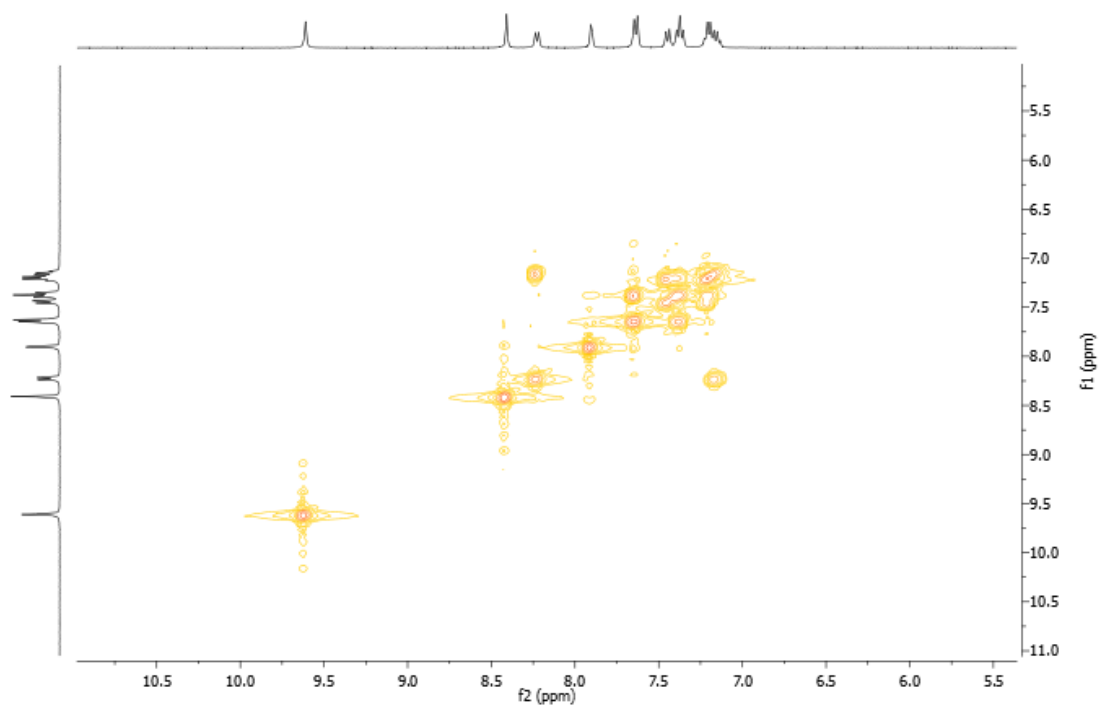
Anexo 2.1 - Espetro de RMN ¹H da ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO-d⁶ (ligando HL¹).



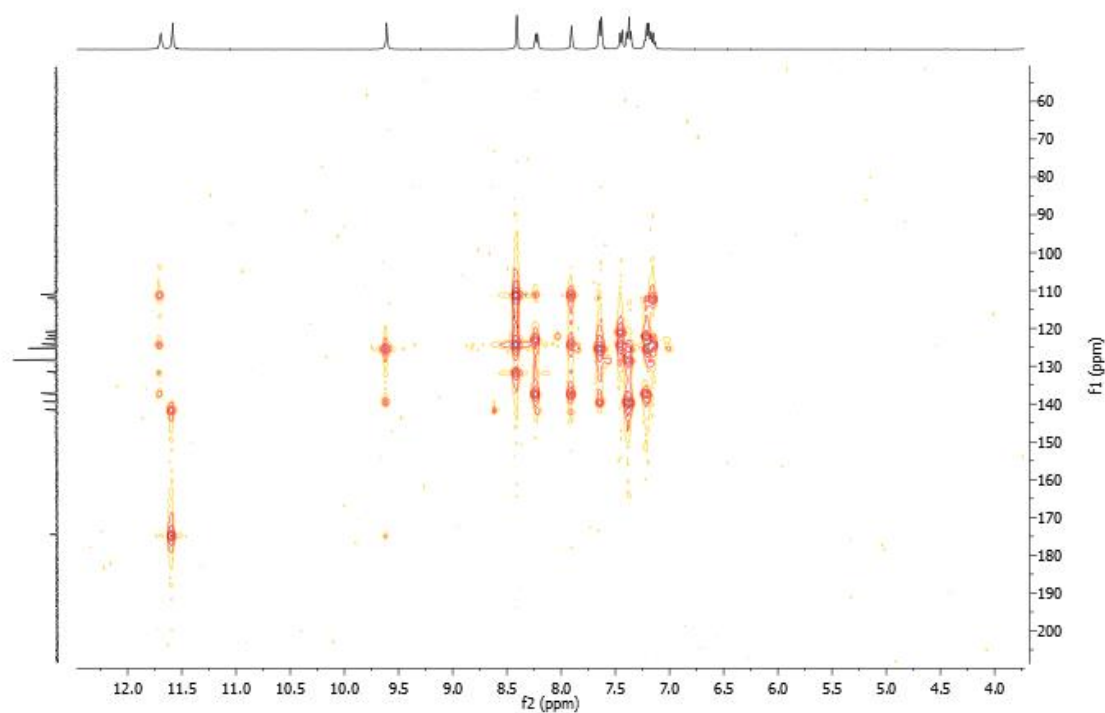
Anexo 2.2 - Espectro de RMN ^{13}C da ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida) em DMSO- d^6 (ligando HL 1).



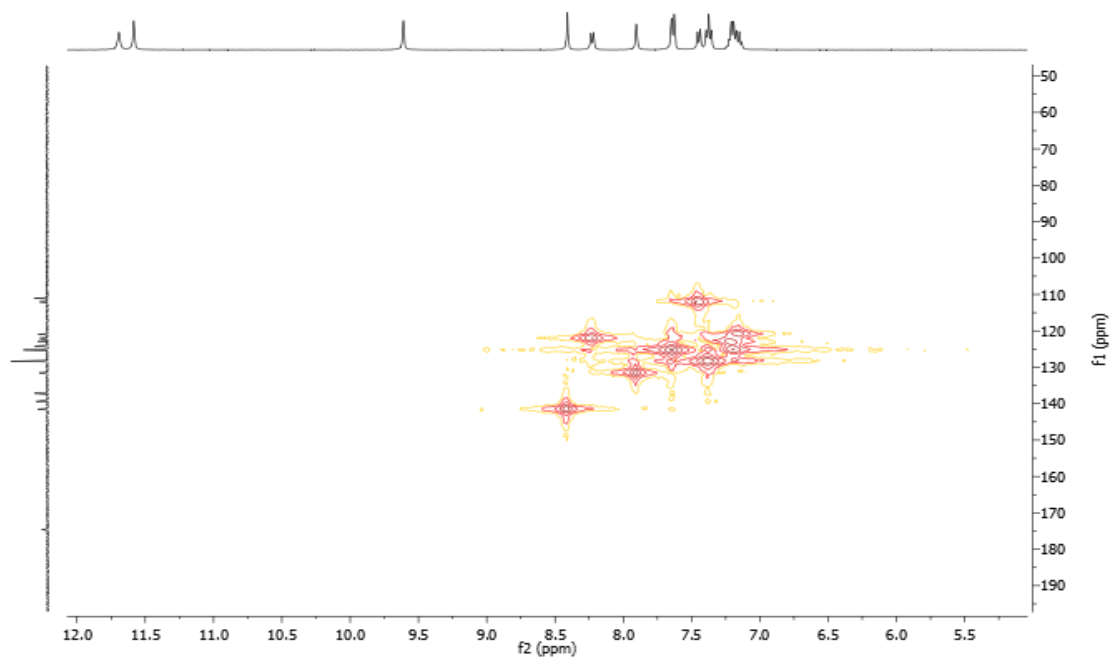
Anexo 2.3 - Espectro de DEPT da ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida) em DMSO- d^6 (ligando HL 1).



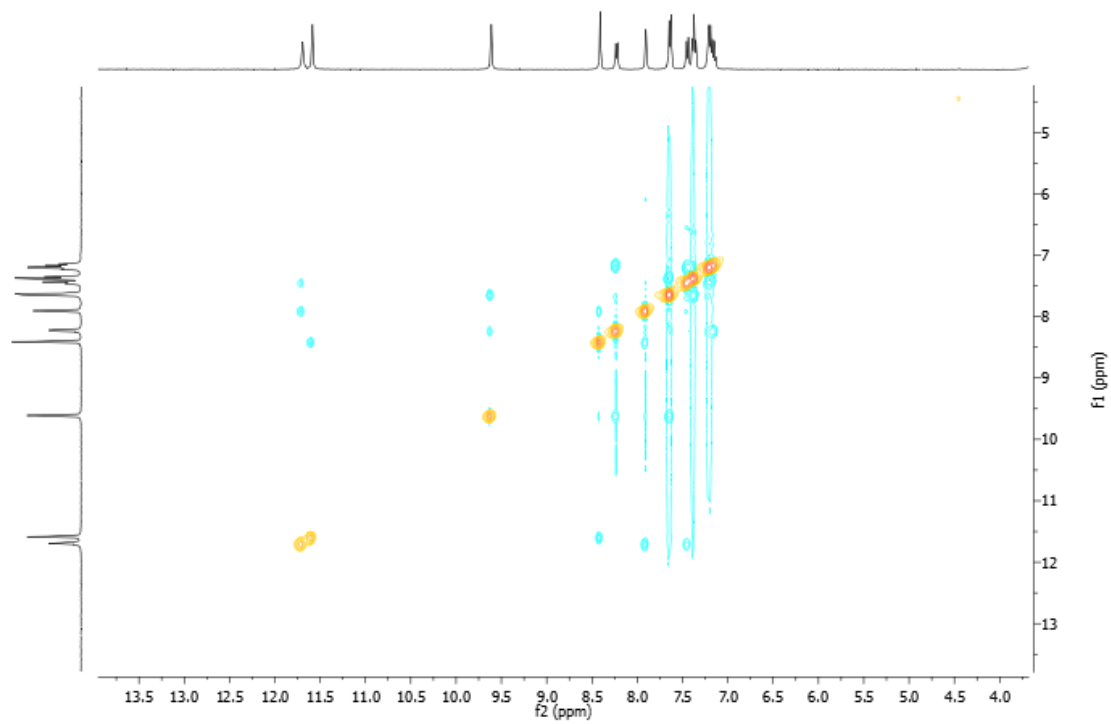
Anexo 2.4 - Espectro de COSY da ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL¹).



Anexo 2.5 - Espectro de HMBC da ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL¹).

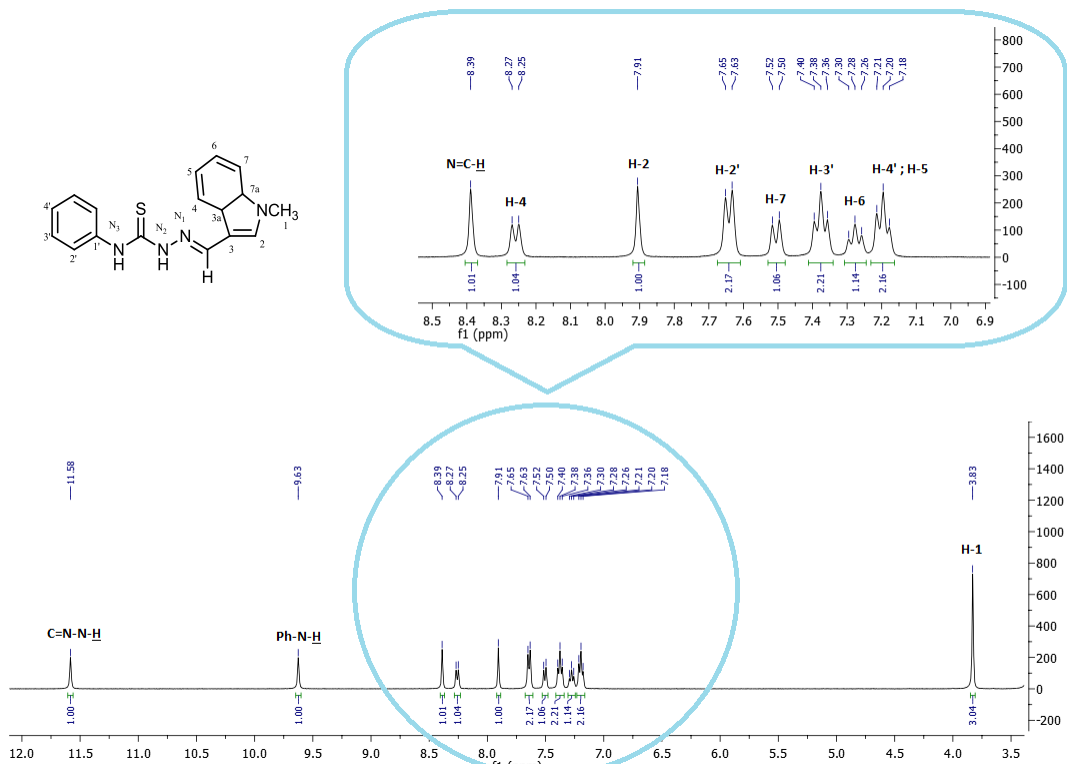


Anexo 2.6 - Espectro de HMQC da ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL¹).

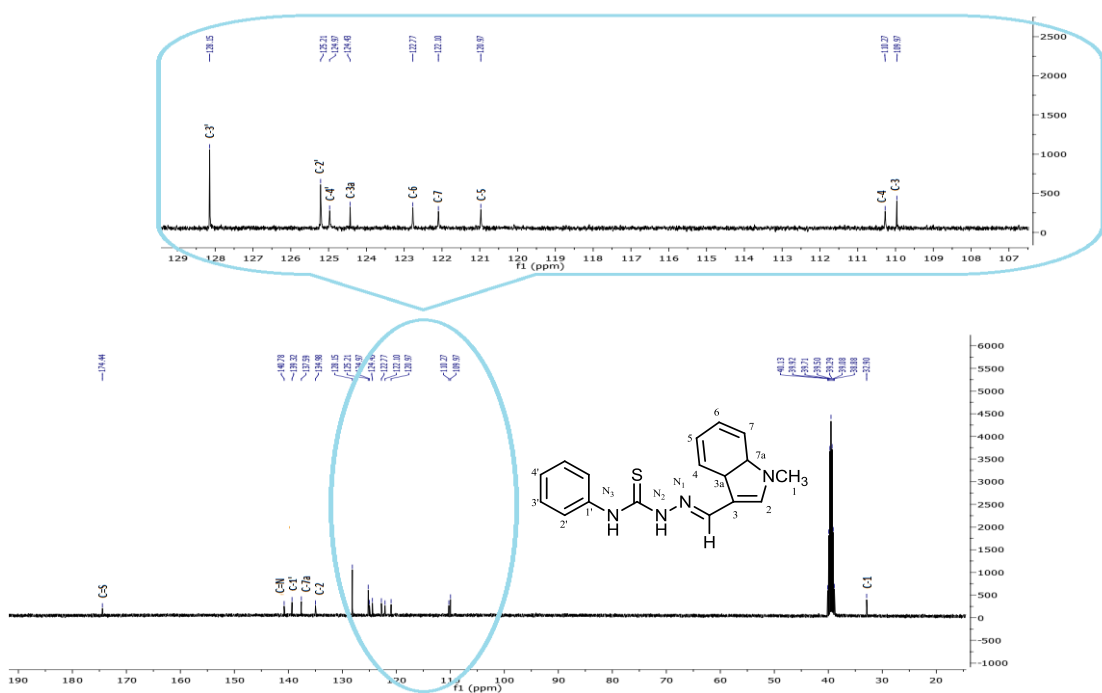


Anexo 2.7 - Espetro de NOESY da *((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida)* em DMSO- d^6 (ligando HL¹).

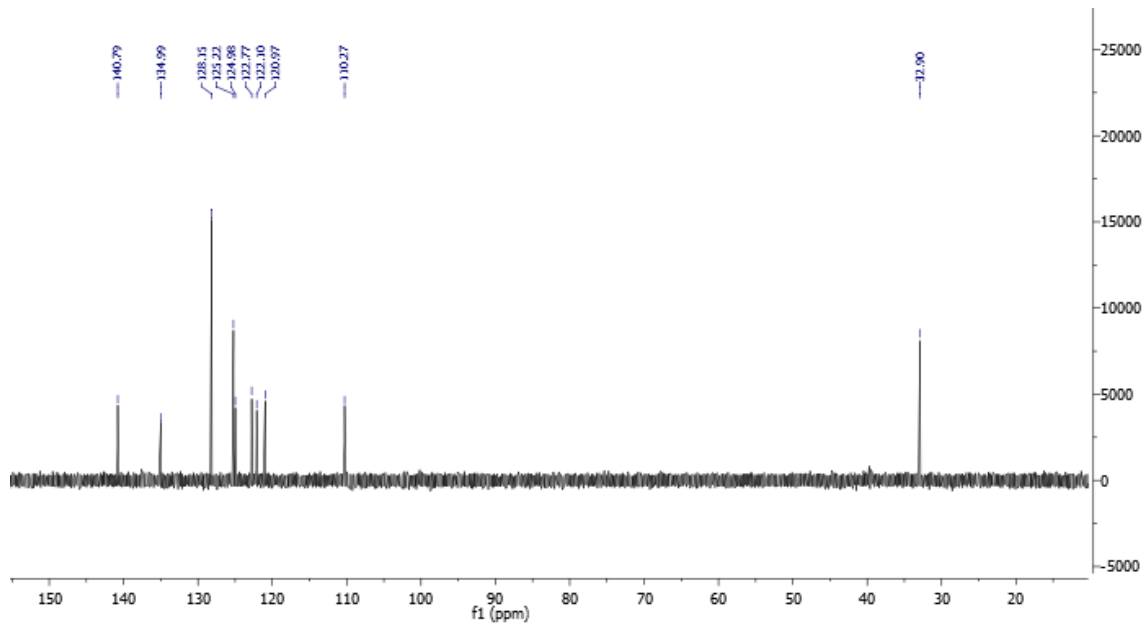
II. Espectroscopia de RMN do ligando HL²



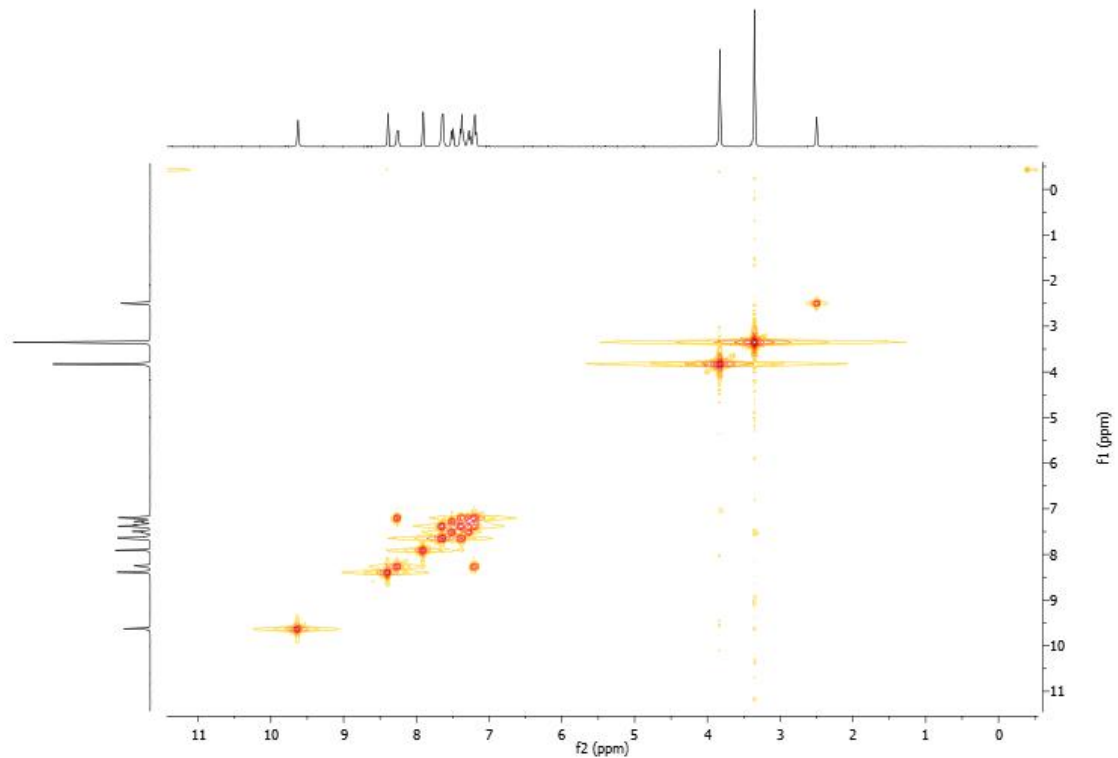
Anexo 2.8 - Espetro de RMN ¹H da ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida) em DMSO-d₆ (ligando HL²).



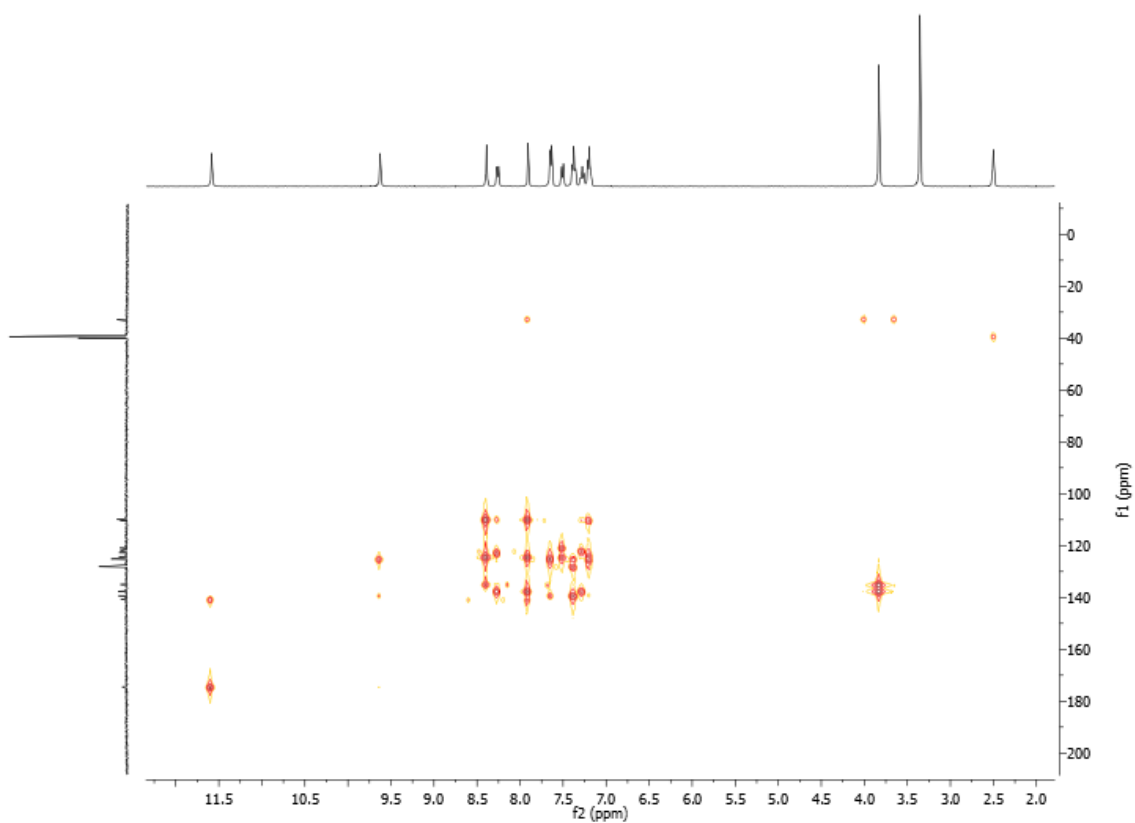
Anexo 2.9 - Espectro de RMN ^{13}C da ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL 2).



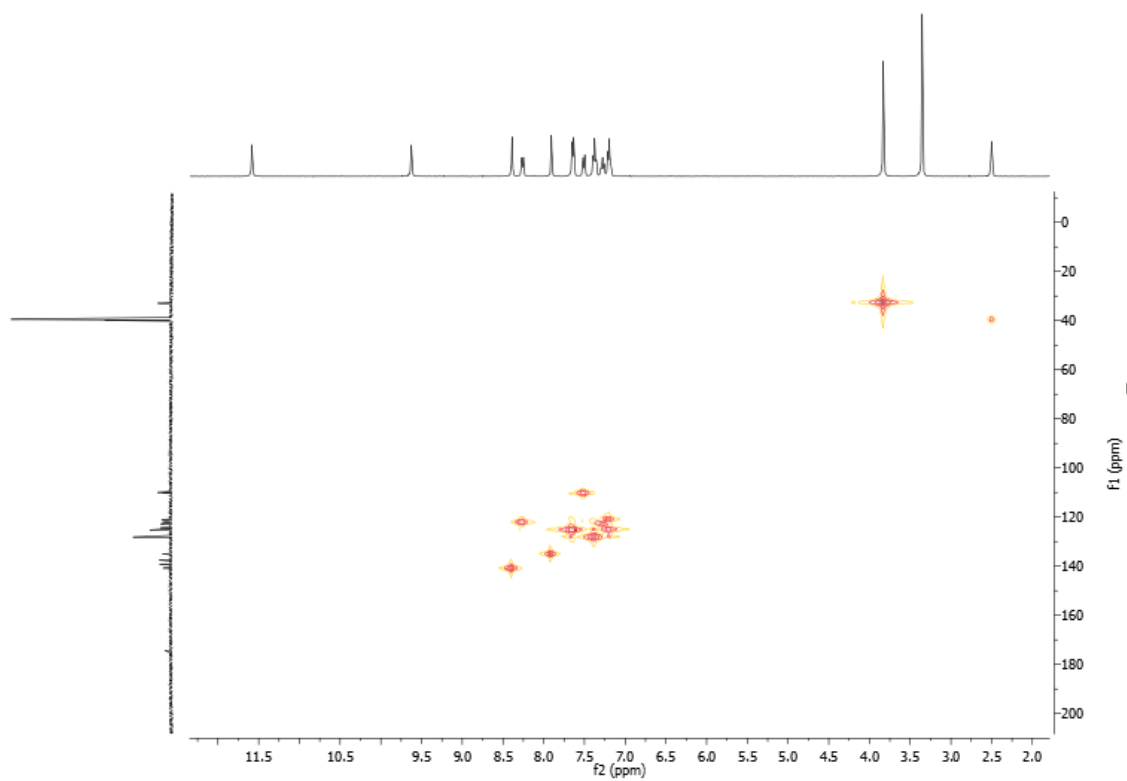
Anexo 2.10 - Espectro de DEPT da ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL 2).



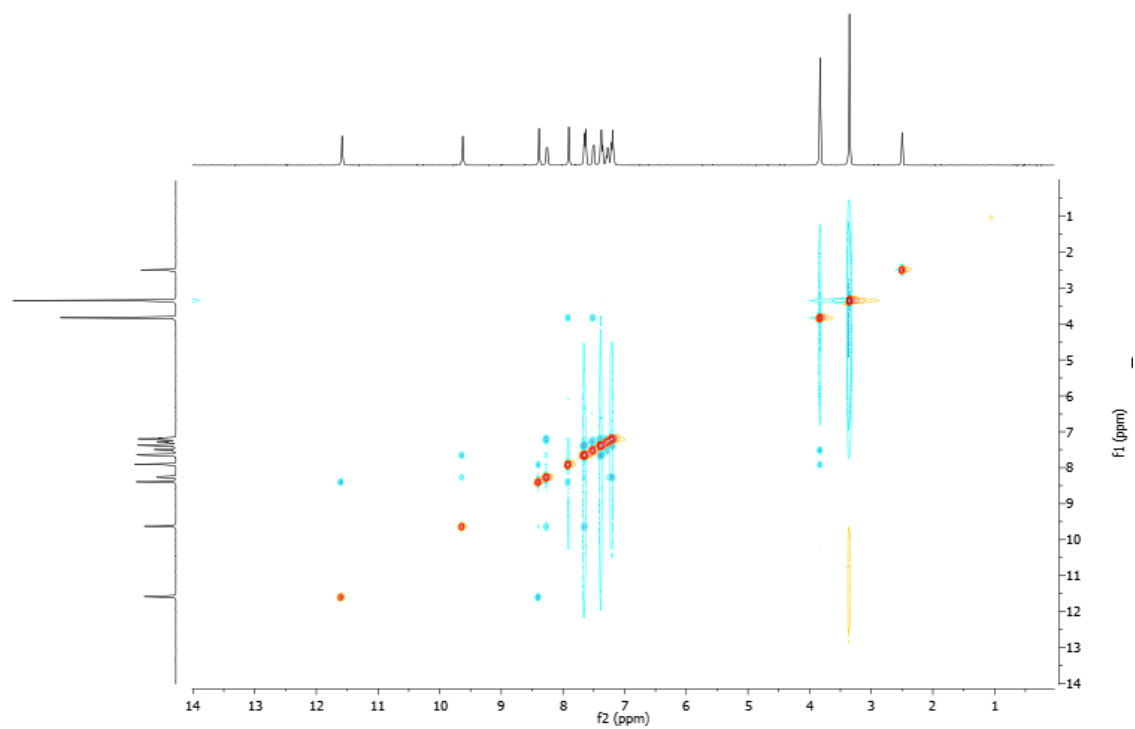
Anexo 2.11 - Espectro de COSY da ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL 2).



Anexo 2.12 - Espectro de HMBC da ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL²).

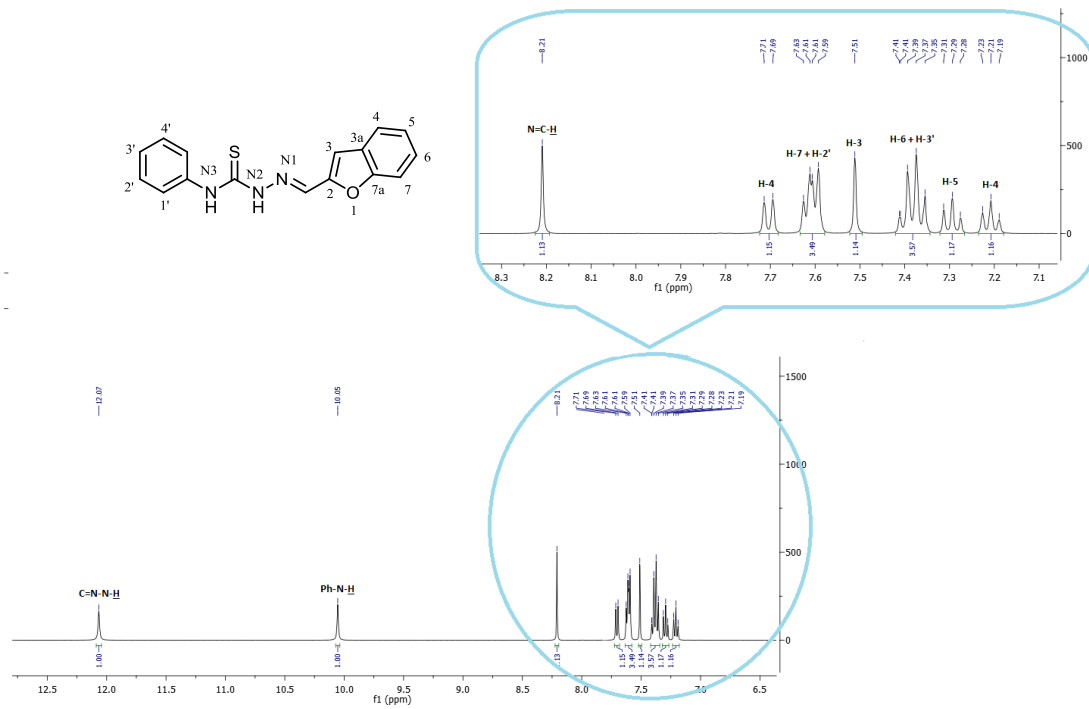


Anexo 2.13 - Espectro de HMQC da ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenilhidrazinacarbotoamida) em DMSO- d^6 (ligando HL²).

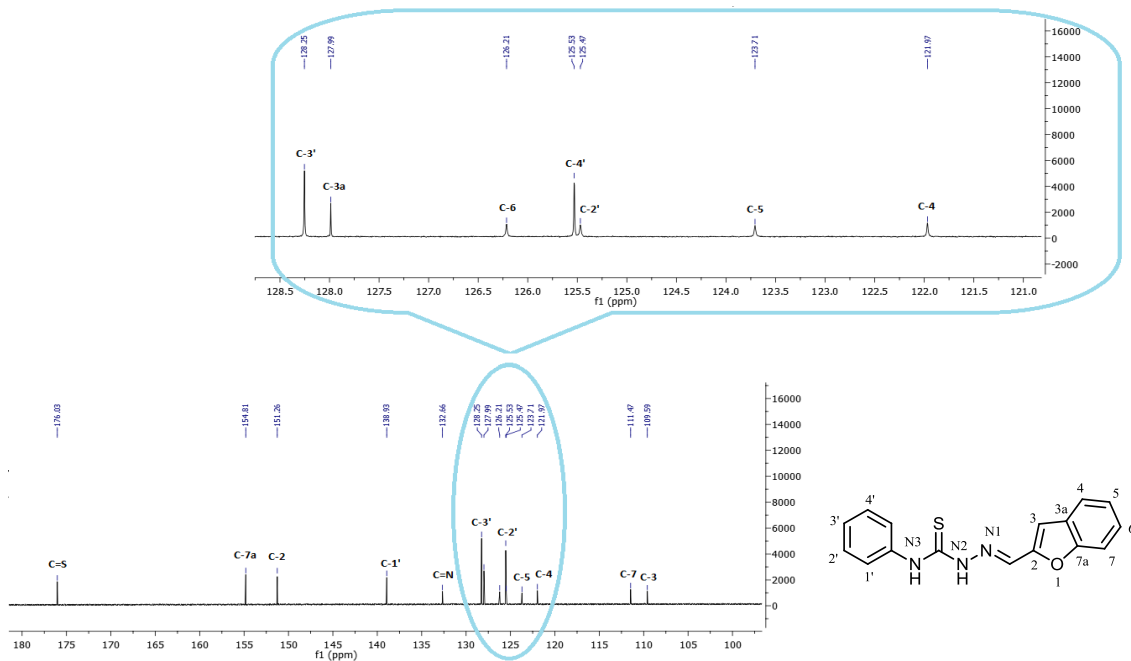


Anexo 2.14 - Espectro de NOESY da *((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida)* em DMSO-*d*⁶ (ligando HL²).

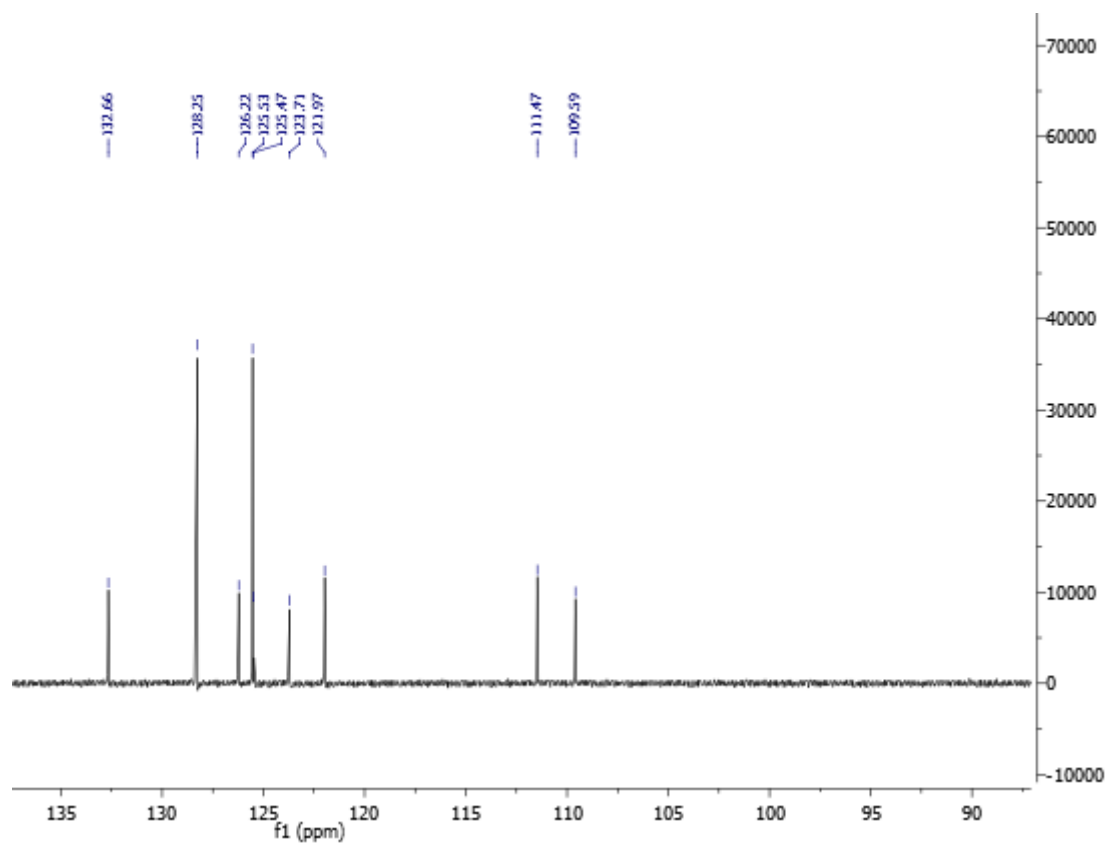
III. Espectroscopia de RMN do ligando HL³



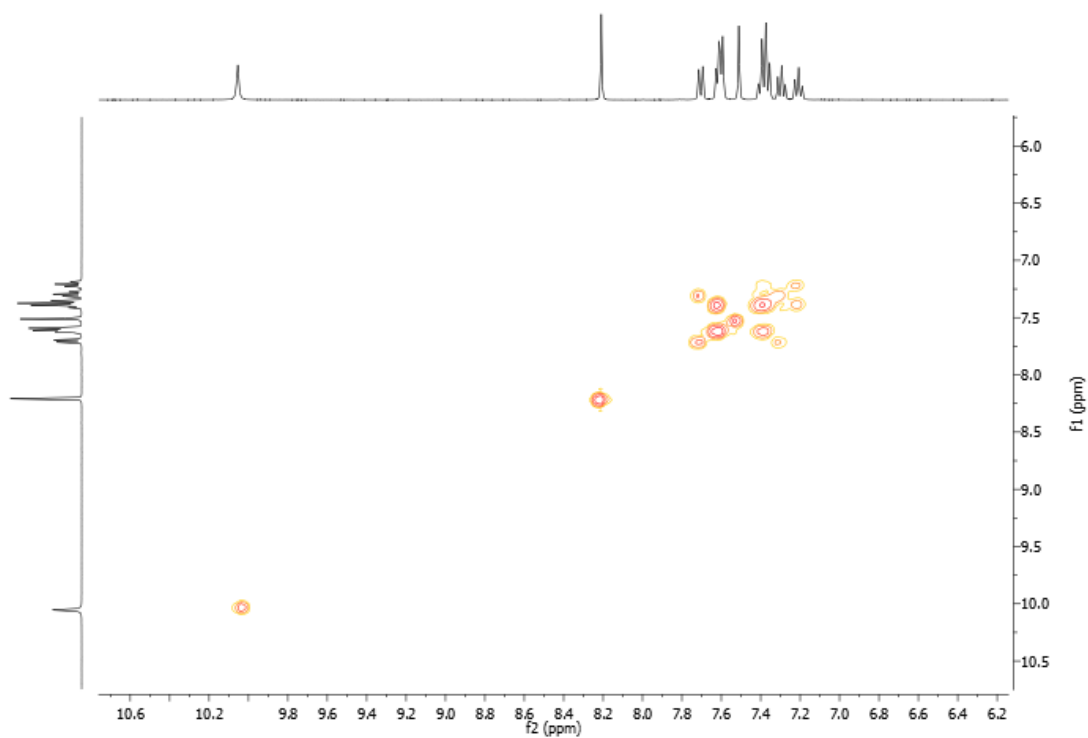
Anexo 2.15 - Espetro de RMN ¹H da (E)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO-d⁶ (ligando HL³).



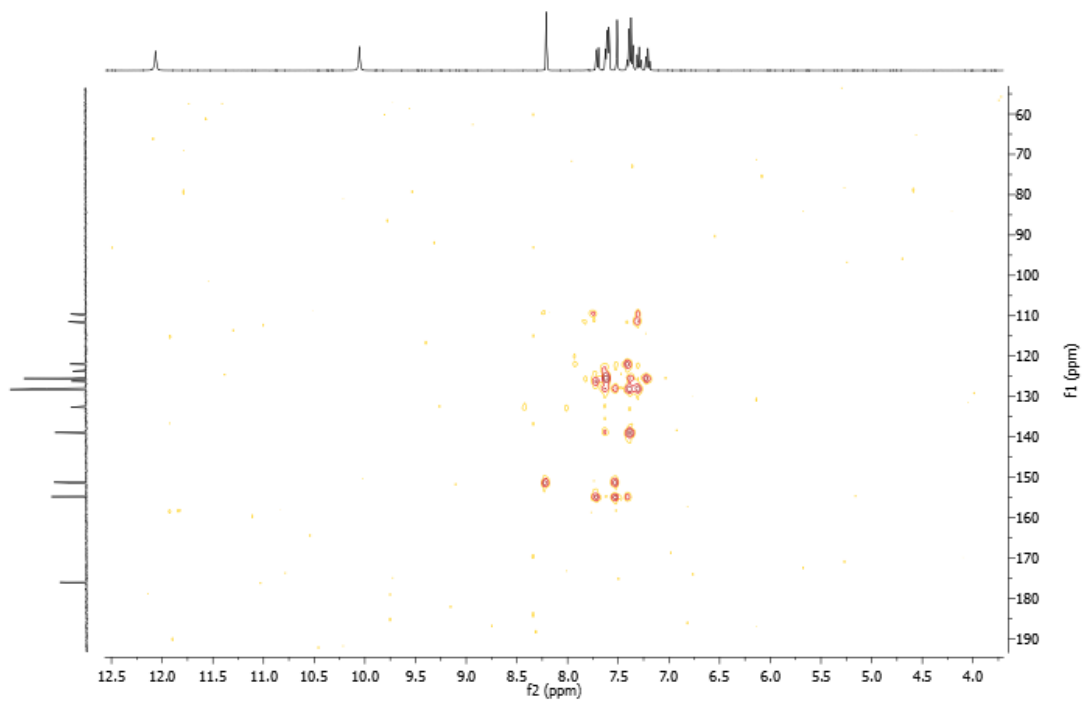
Anexo 2.16 - Espetro de RMN ¹³C da (E)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida) em DMSO-d⁶ (ligando HL³).



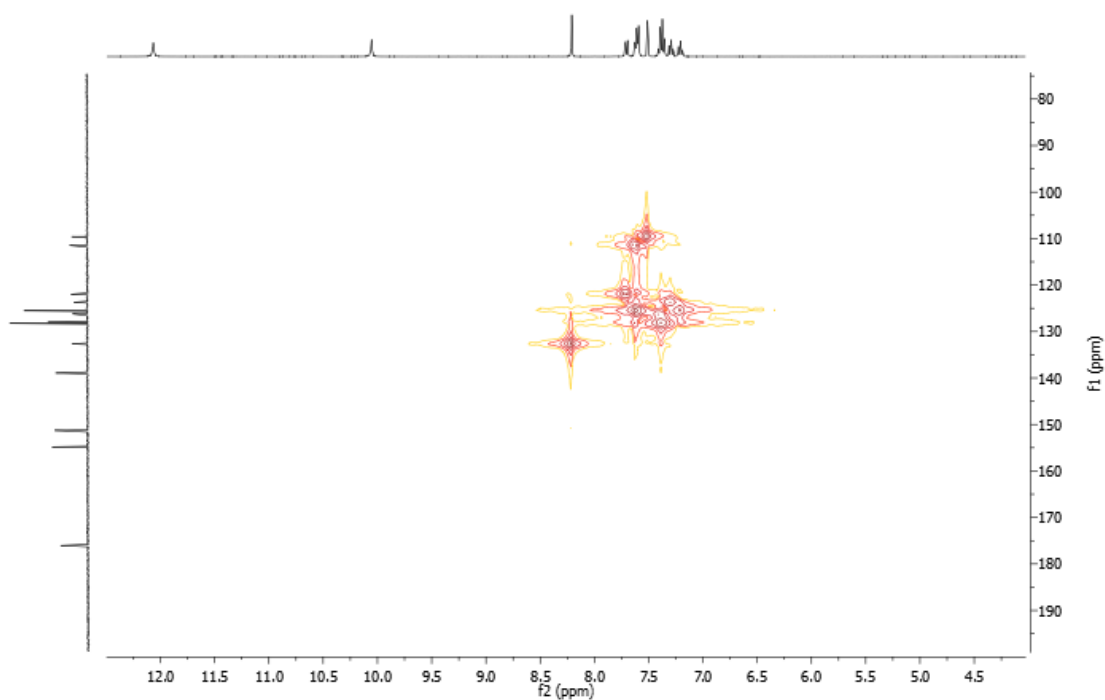
Anexo 2.17 - Espectro de DEPT da *(E)*-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida em DMSO- d^6 (ligando HL³).



Anexo 2.18 - Espectro de COSY da *(E)*-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida em DMSO- d^6 (ligando HL³).

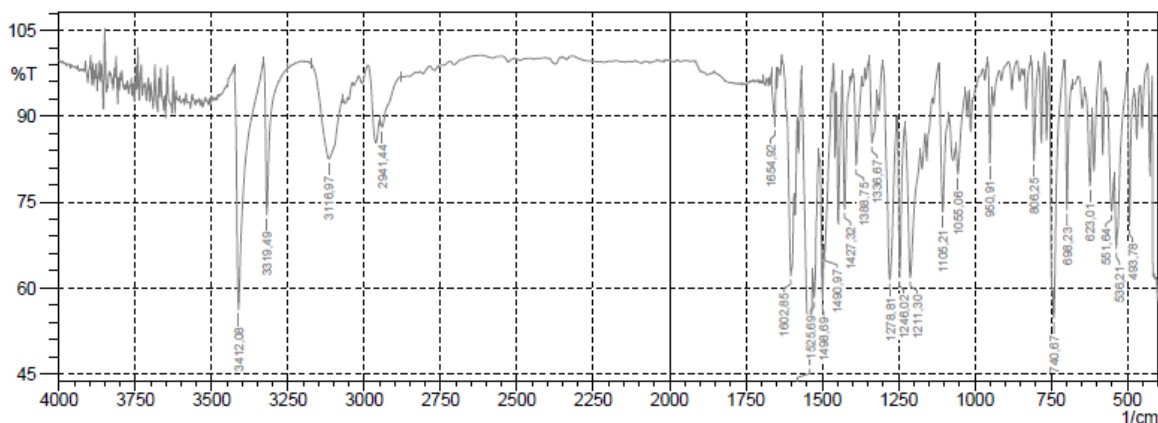


Anexo 2.19 - Espectro de HMBC da (*E*)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida) em DMSO- d^6 (ligando HL³).

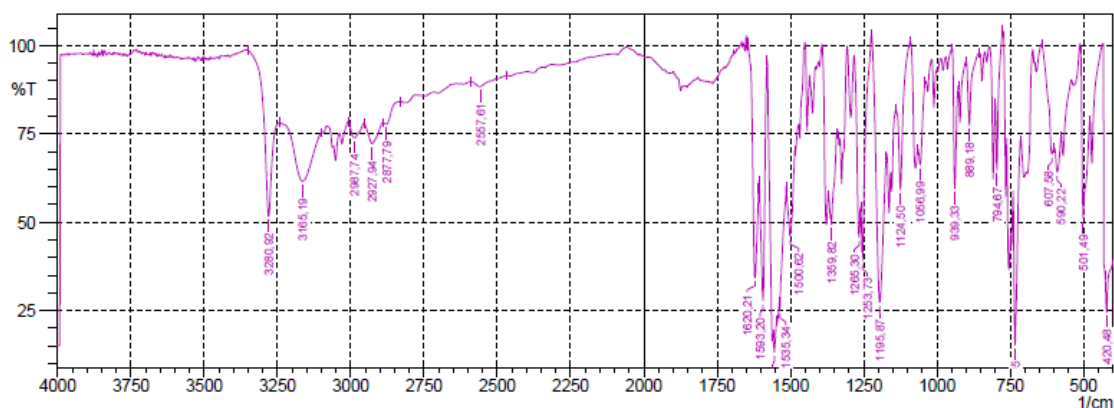


Anexo 2.20 - Espectro de HMQC da (*E*)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida) em DMSO- d^6 (ligando HL³).

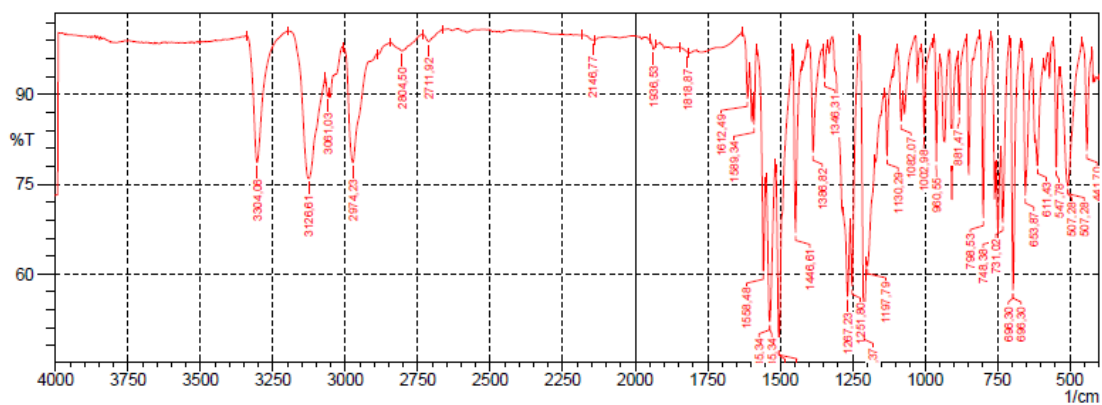
IV. Espectroscopia de IV dos ligandos HL¹, HL² e HL³



Anexo 2.21 - Espectro de IV do ((E)-2-((1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida) (ligando HL¹).

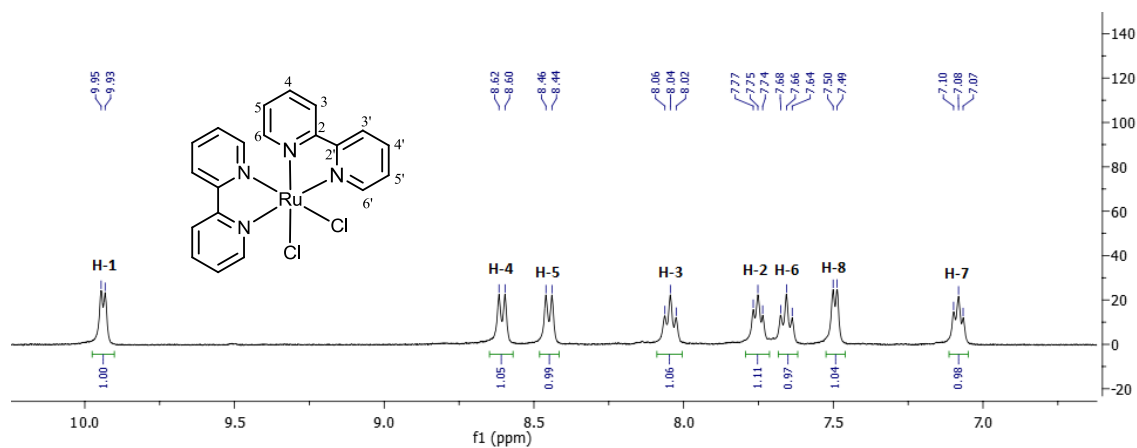


Anexo 2.22 - Espectro de IV do ((E)-2-((1-metil-1H-indol-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida) (ligando HL²).

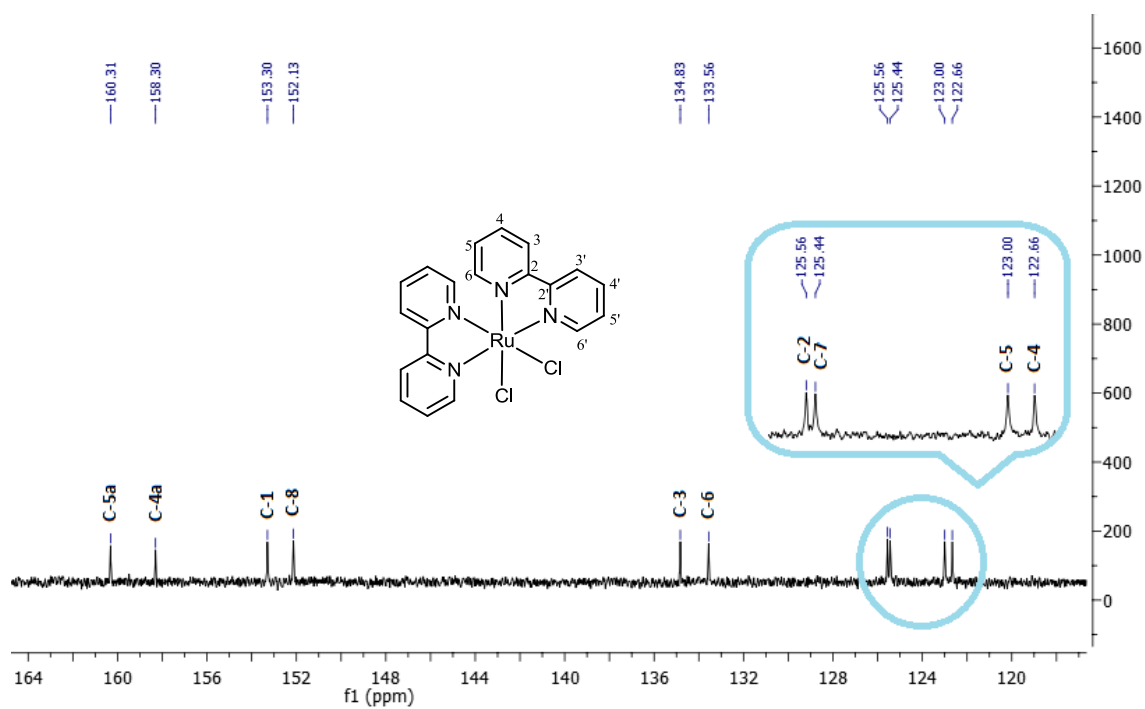


Anexo 2.23 - Espectro de IV do ((E)-2-((2,3-dihidrofuran-3-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida) (ligando HL³).

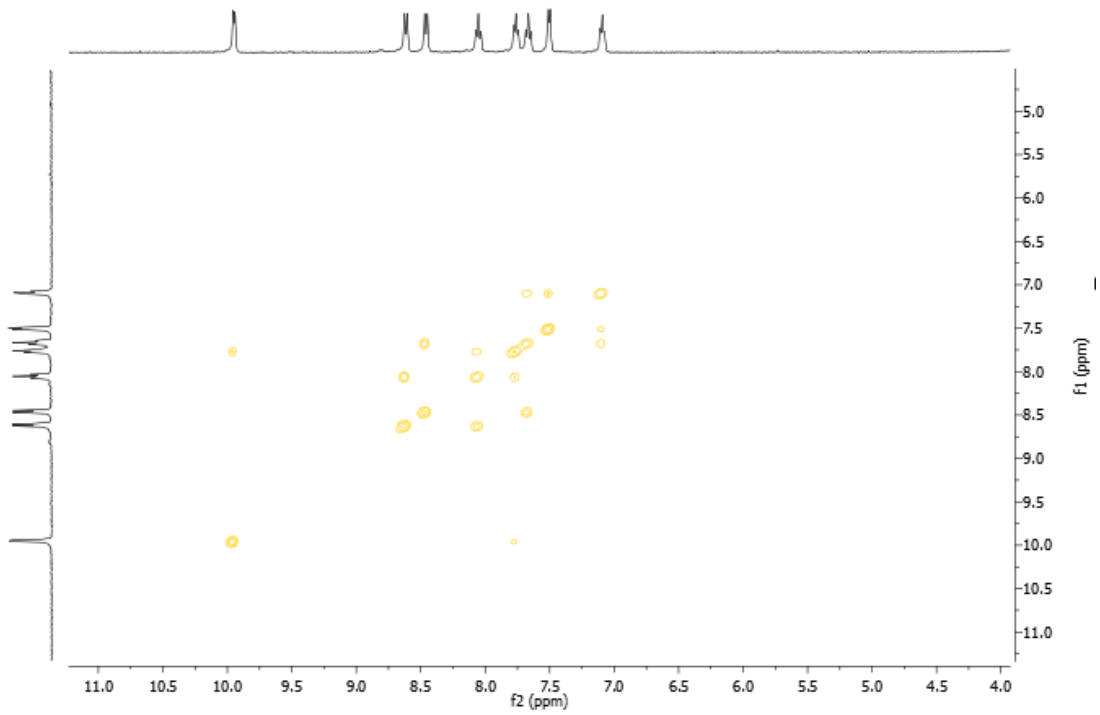
V. Espectroscopia de RMN do precursor *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂]



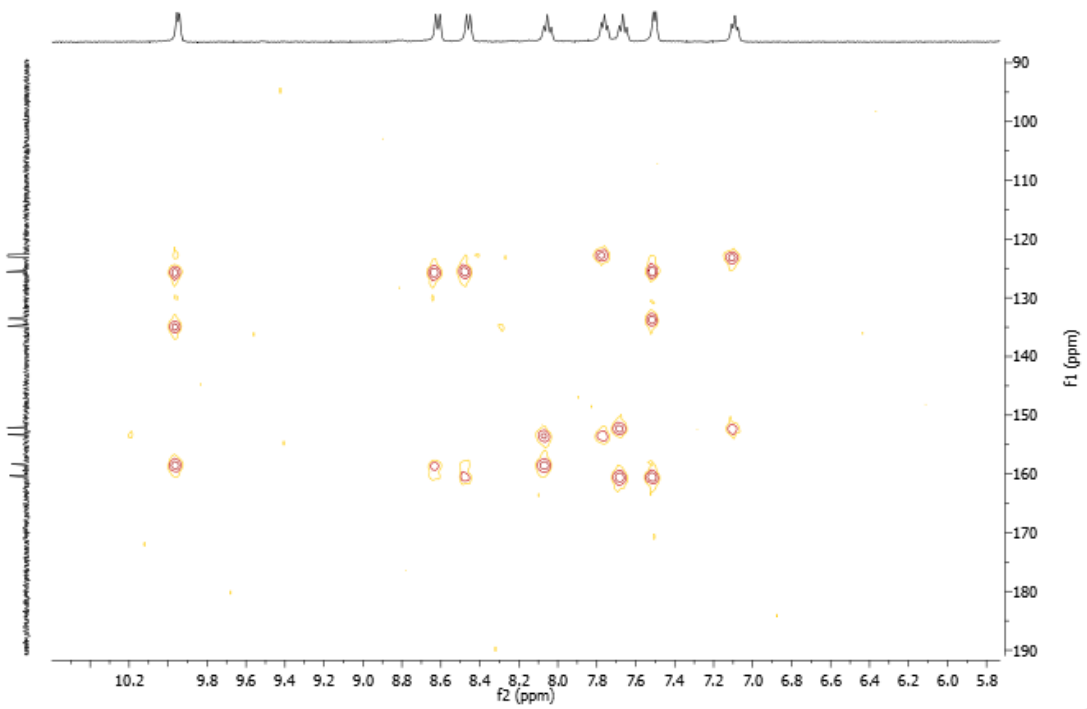
Anexo 3.1 - Espectro de RMN ¹H do composto de partida *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].



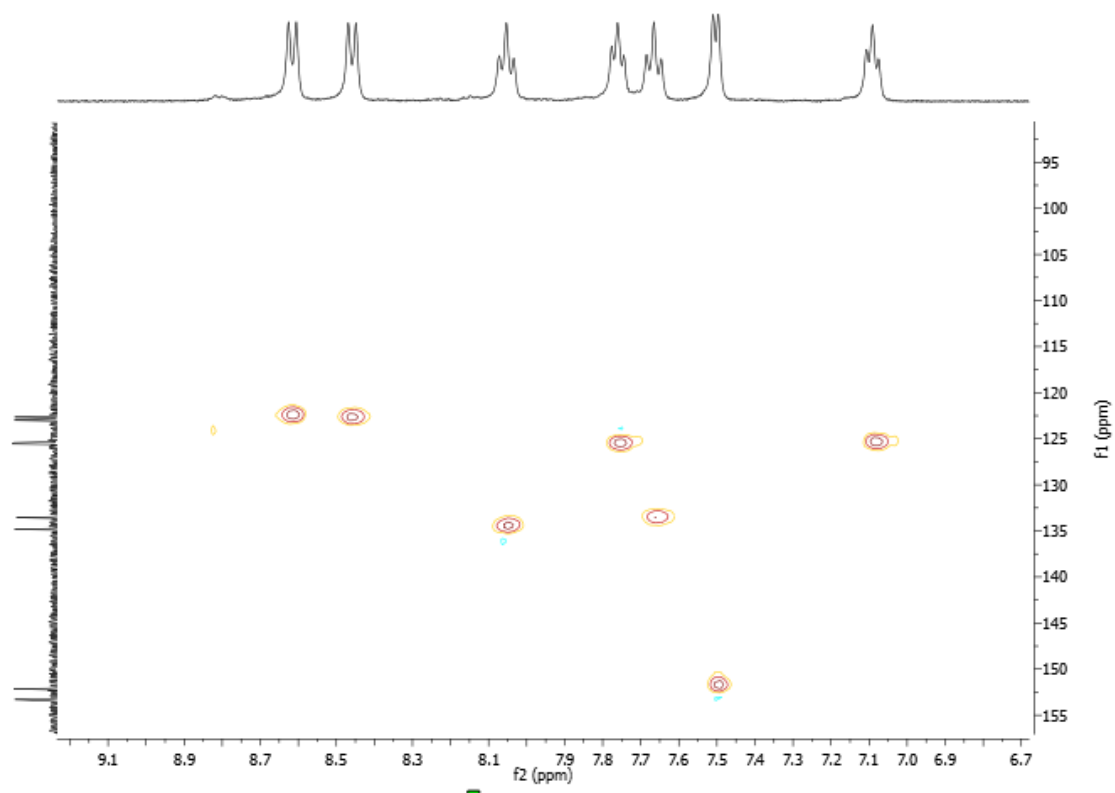
Anexo 3.2 - Espectro de RMN ¹³C do composto de partida *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].



Anexo 3.3 - Espectro de COSY do composto de partida *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].

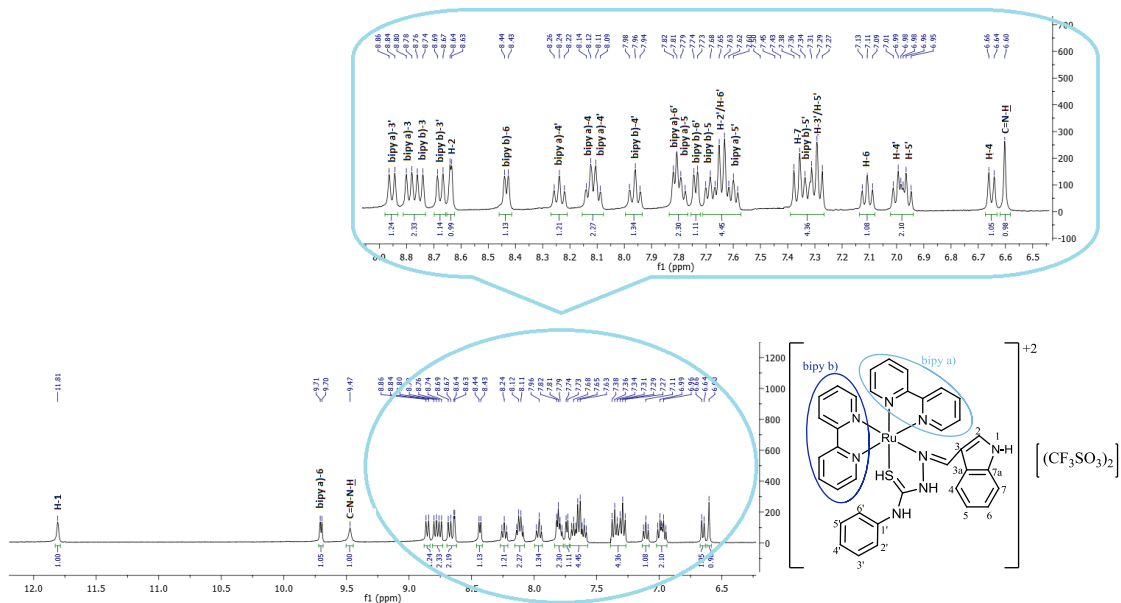


Anexo 3.4 - Espectro de HMBC do composto de partida *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].

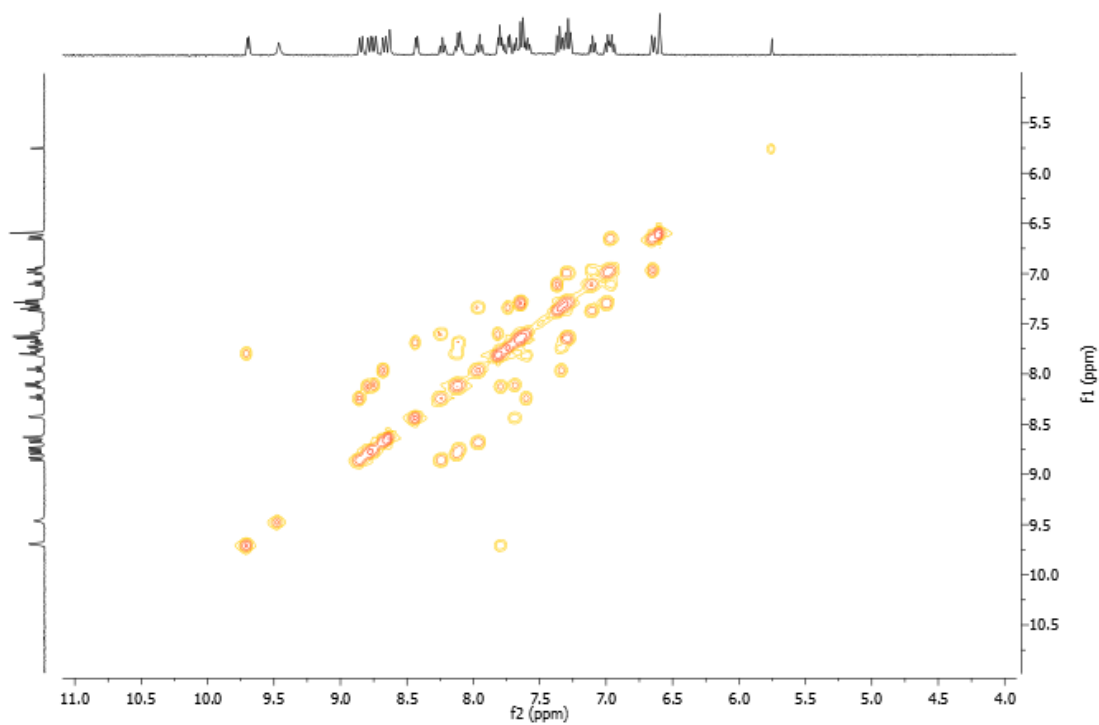


Anexo 3.5 - Espectro de HMQC do composto de partida *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂].

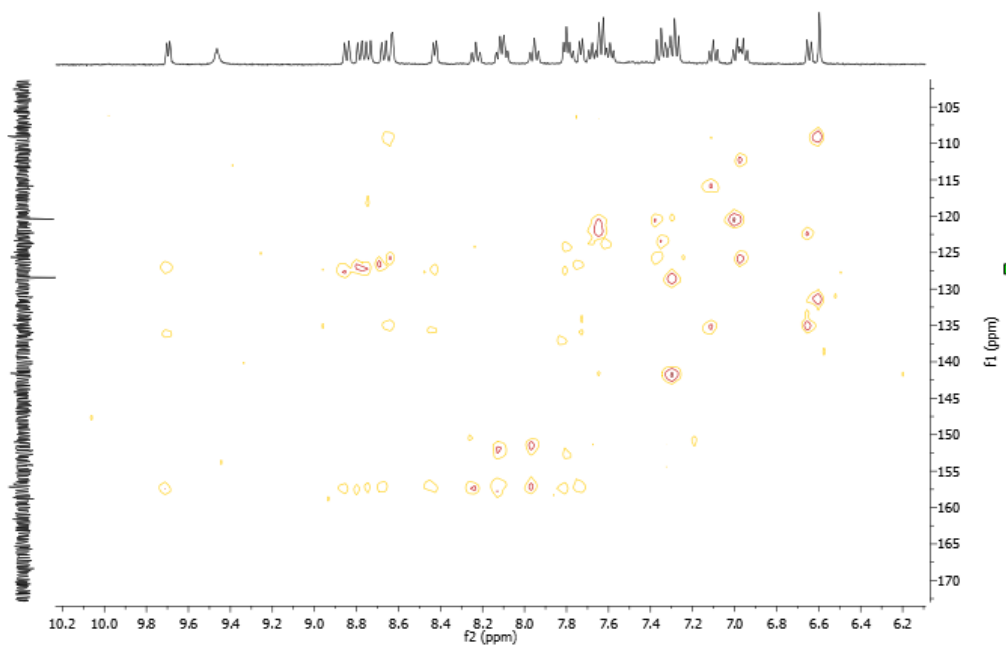
VI. Espectroscopia de RMN do complexo 1



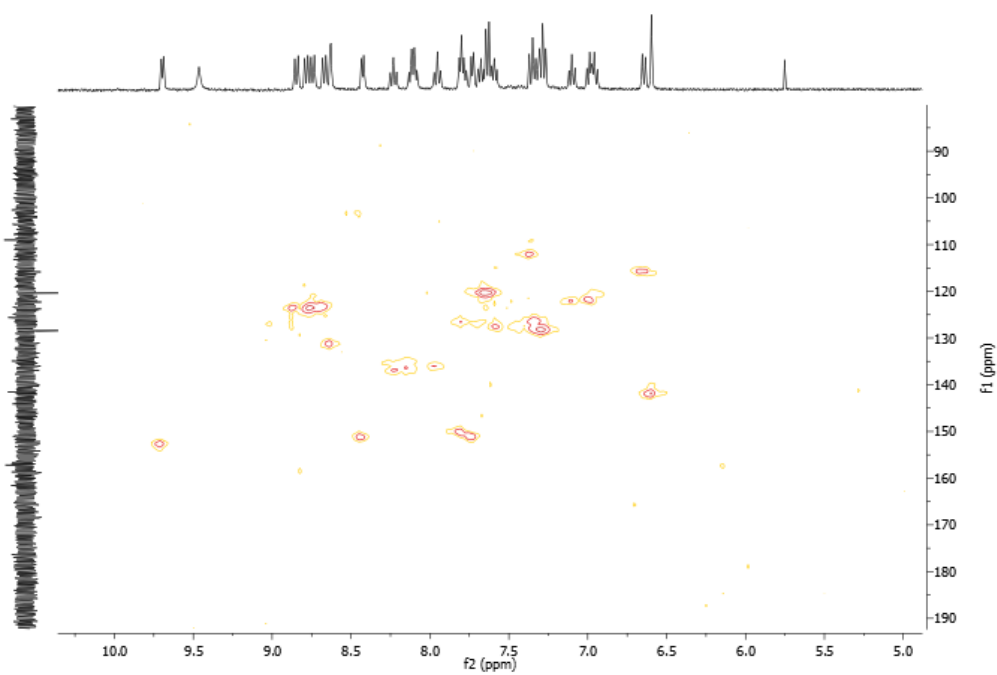
Anexo 3.6 - Espectro de RMN ^1H do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (complexo 1).



Anexo 3.7 - Espectro de COSY do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (complexo 1).

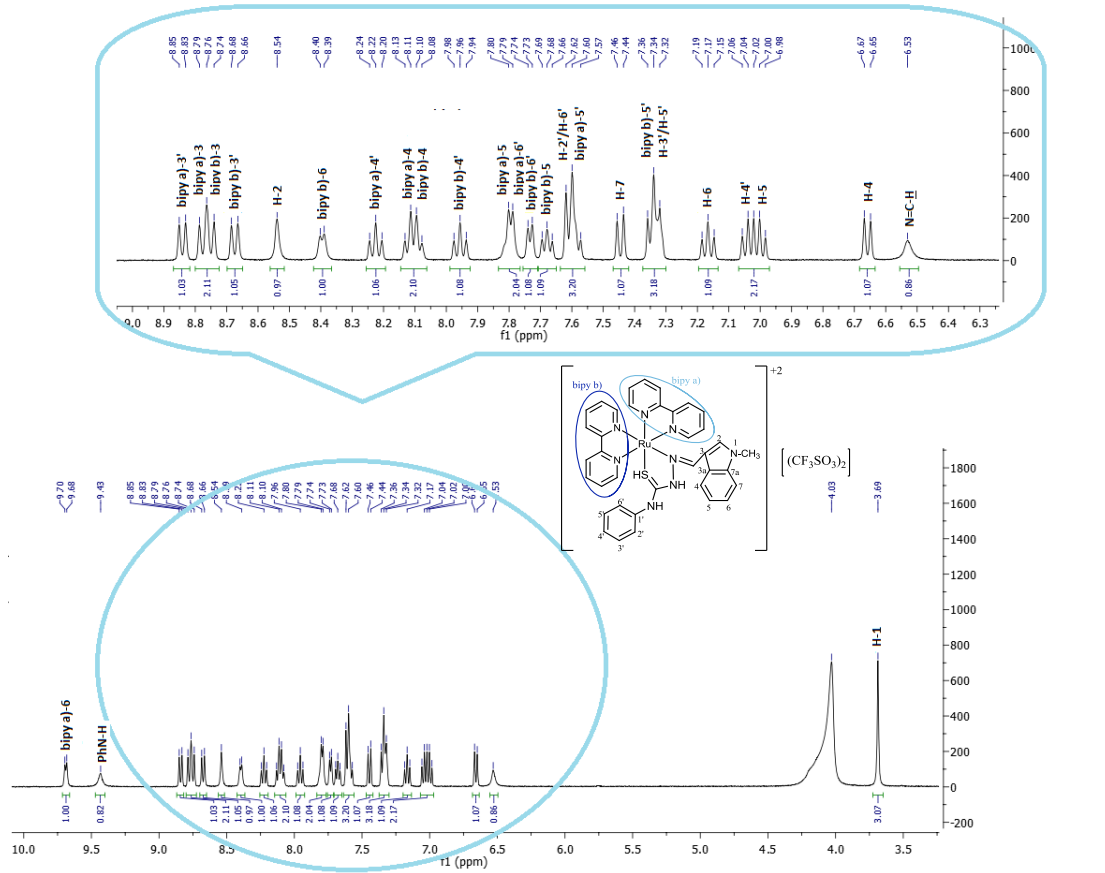


Anexo 3.8 - Espectro de HMBC do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 1).

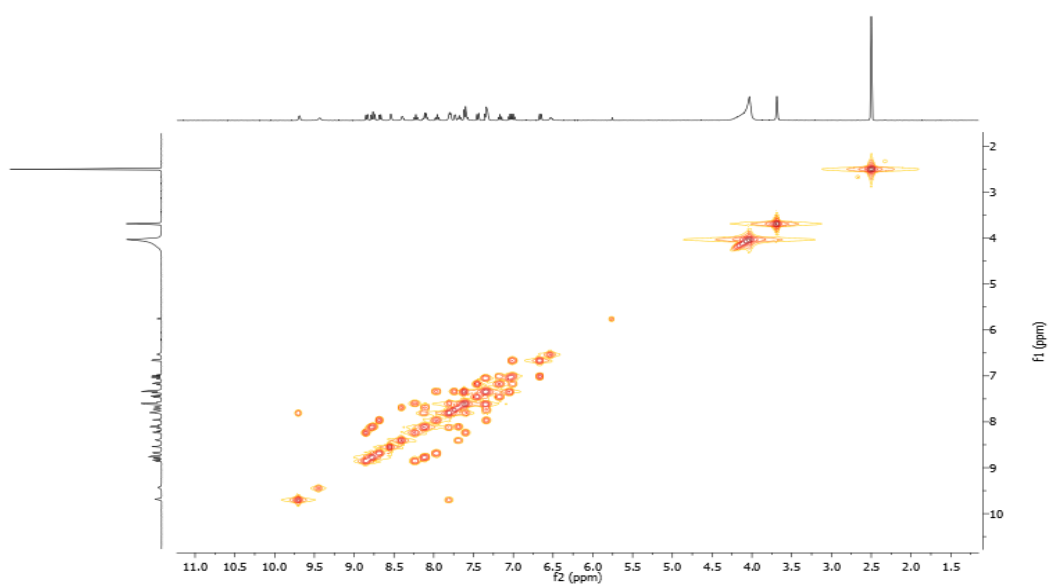


Anexo 3.9 - Espectro de HMQC do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 1).

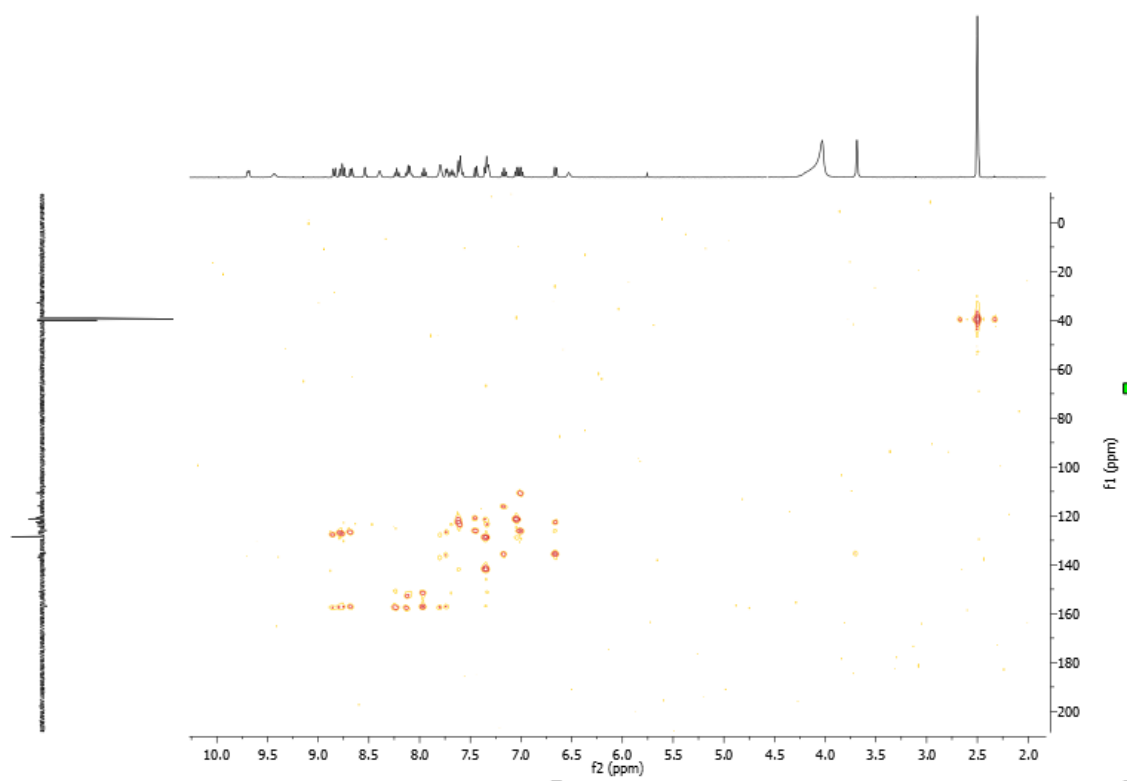
VII. Espectroscopia de RMN do complexo 2



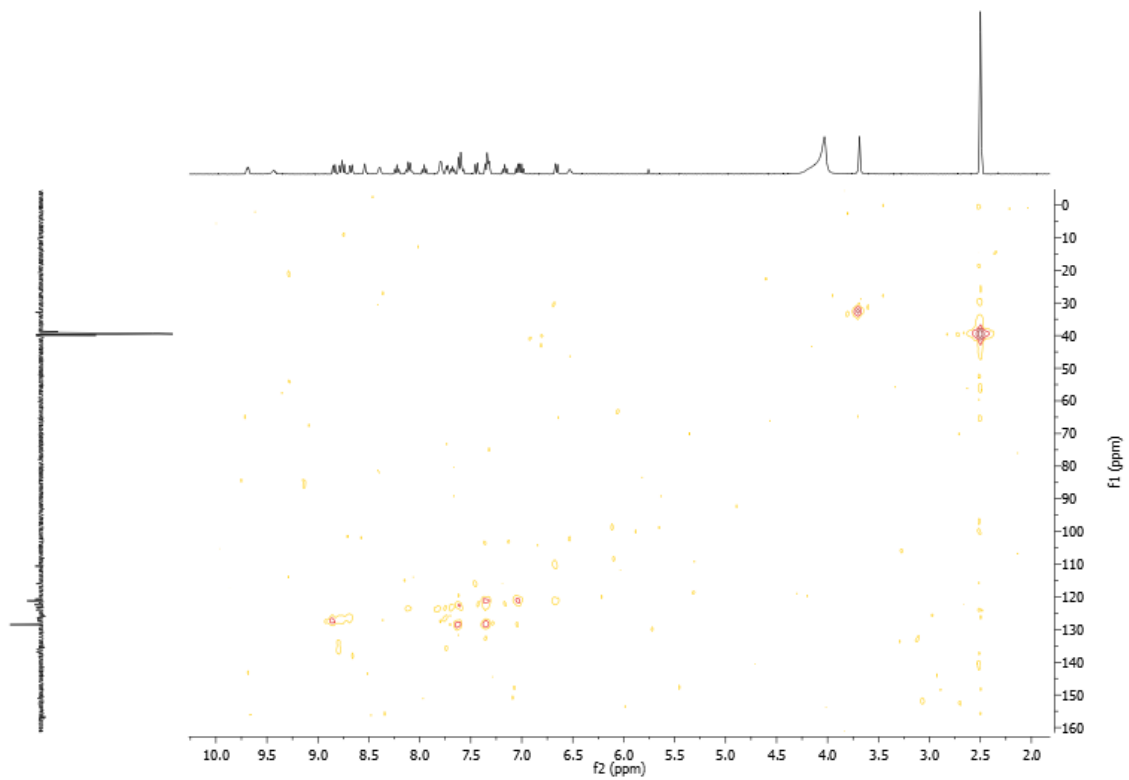
Anexo 3.10 - Espetro de RMN ^1H do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (complexo 2).



Anexo 3.11 - Espetro de COSY do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (complexo 2).

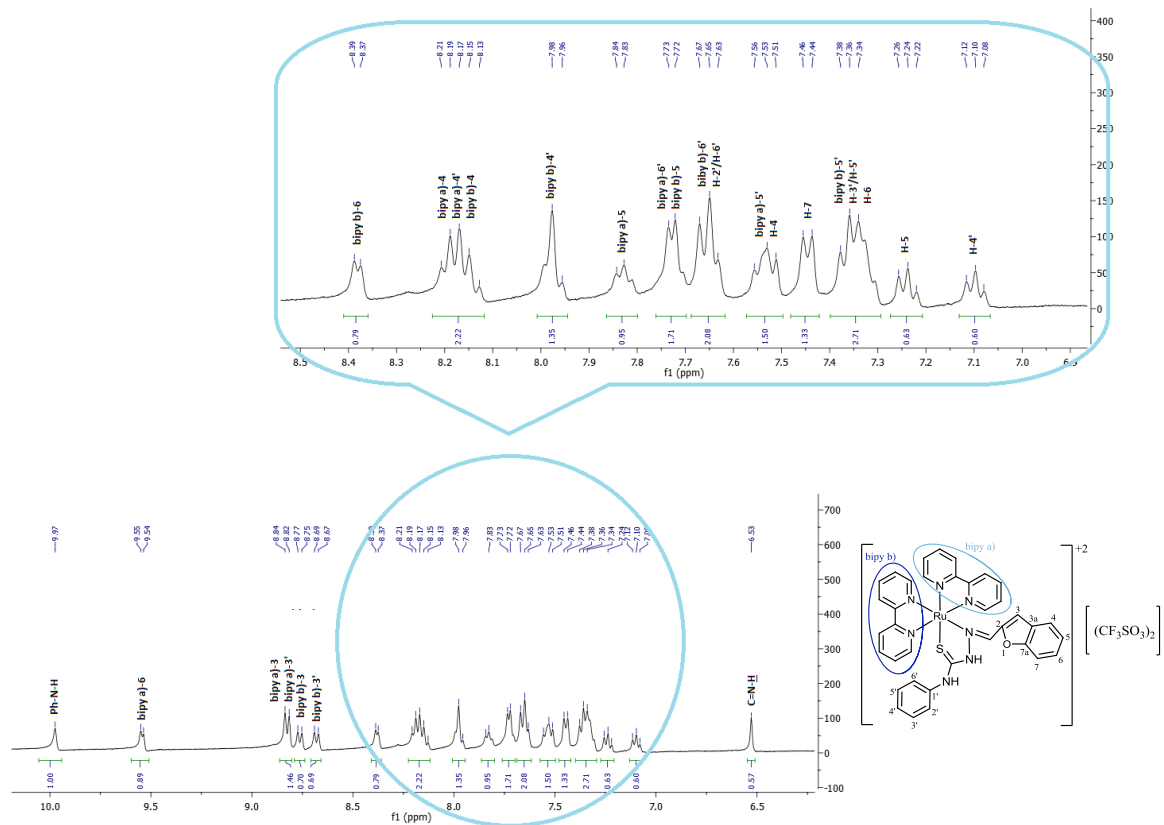


Anexo 3.12 - Espectro de HMBC do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 2).

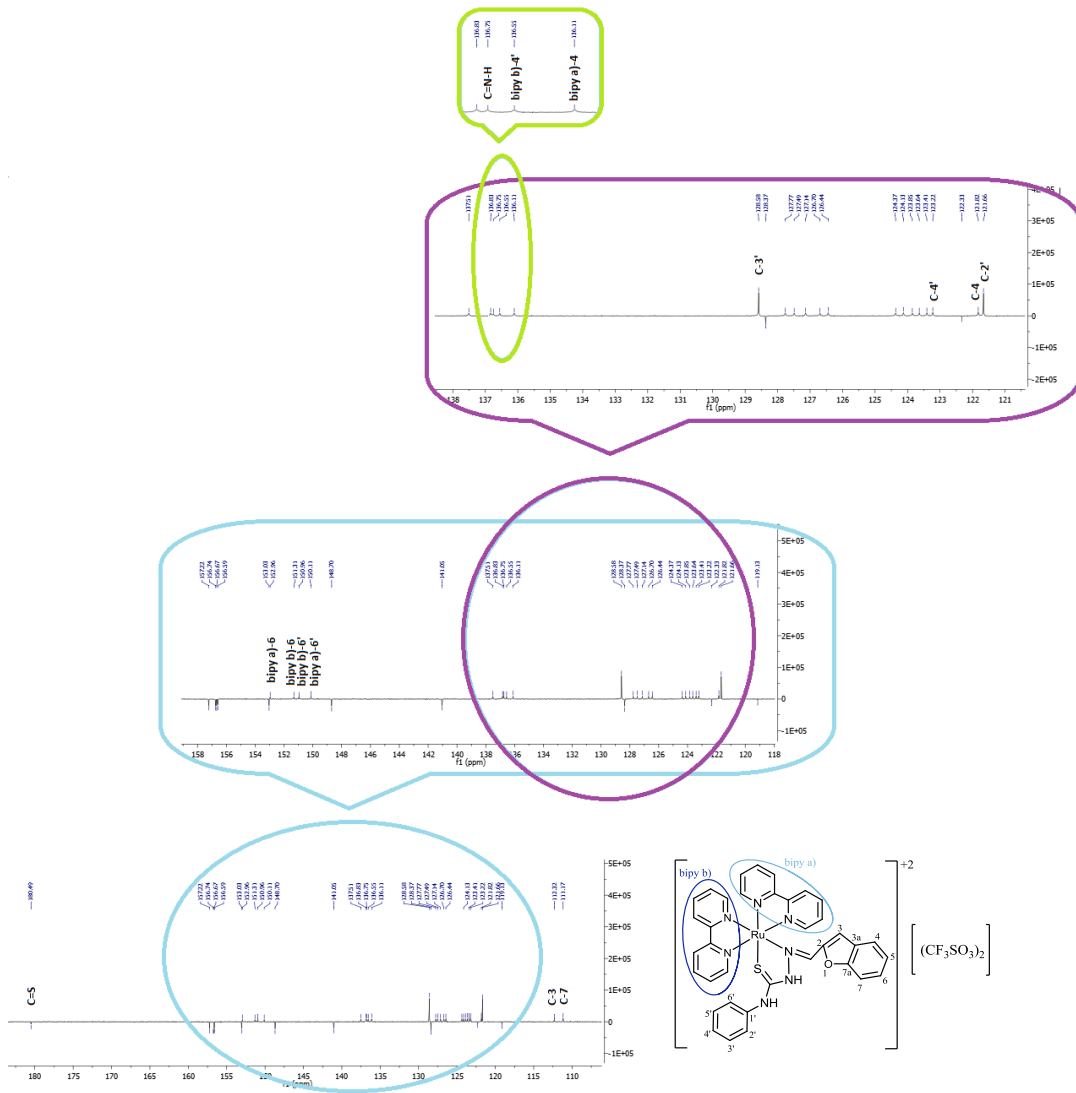


Anexo 3.13 - Espectro de HMQC do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 2).

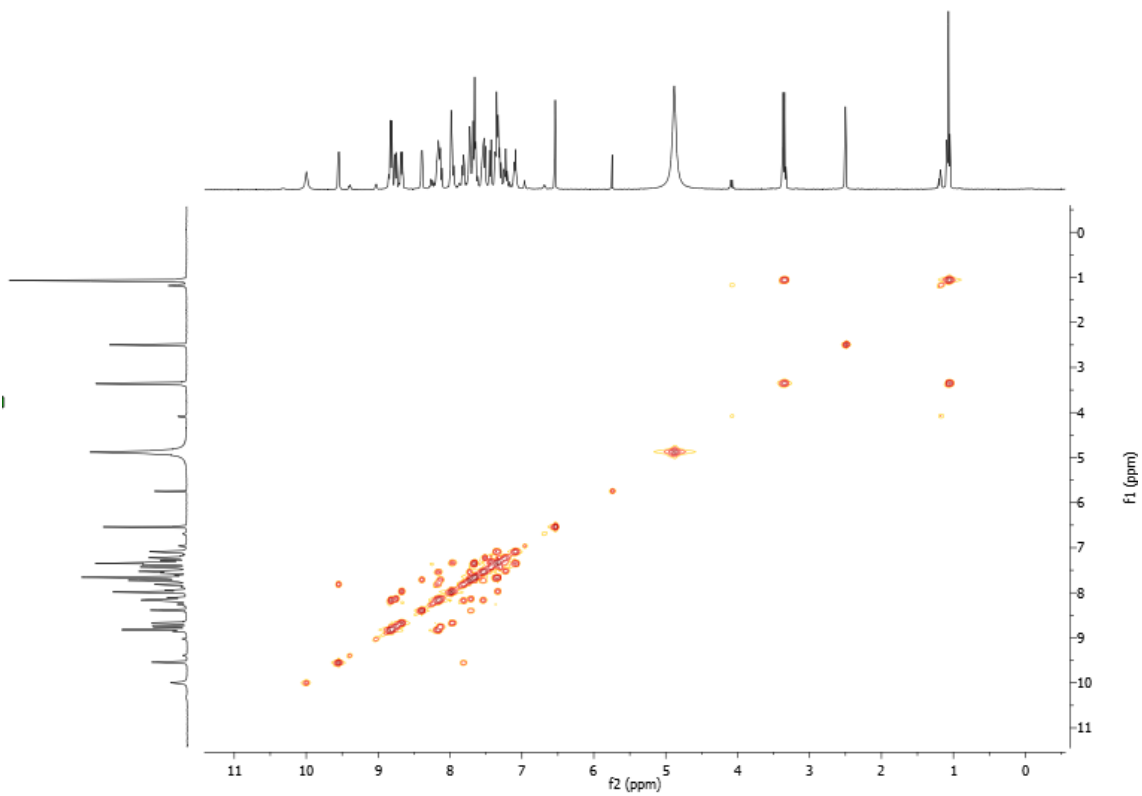
VIII. Espectroscopia de RMN do complexo 3



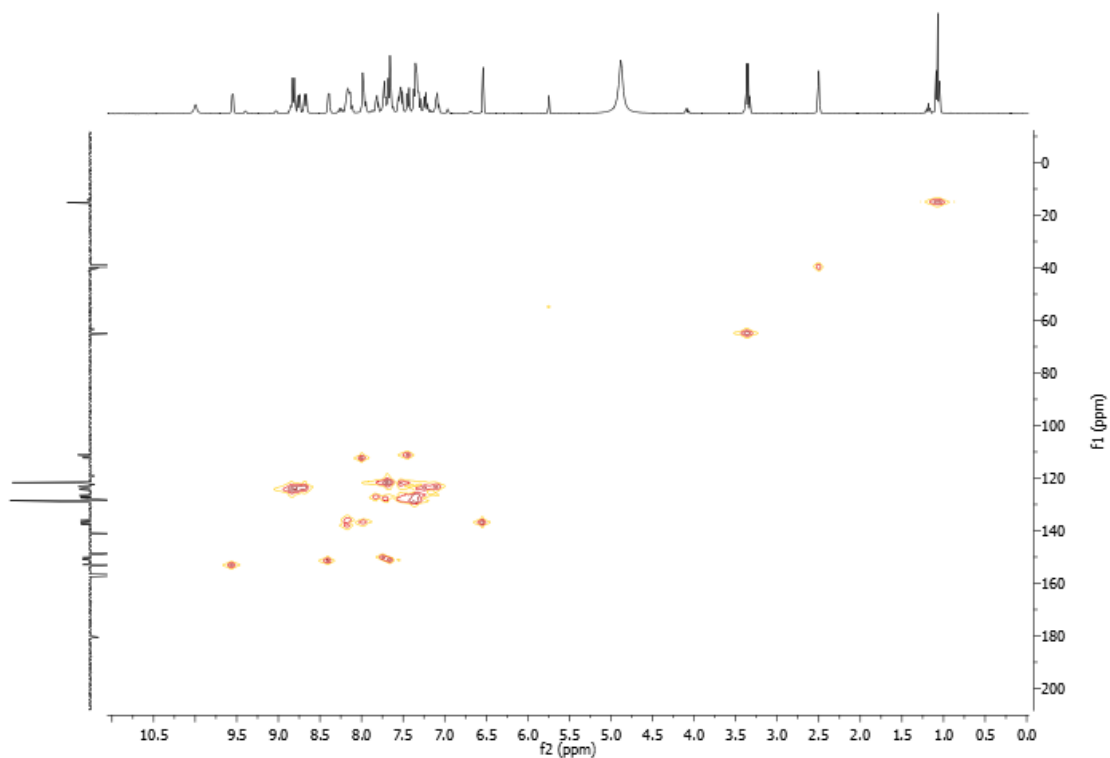
Anexo 3.14 - Espectro de RMN ^1H do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]$ (complexo 3).



Anexo 3.15 - Espetro de RMN ^{13}C do $[Ru(bipy)_2(HL^3)][CF_3SO_3]_2$ (complexo 3).

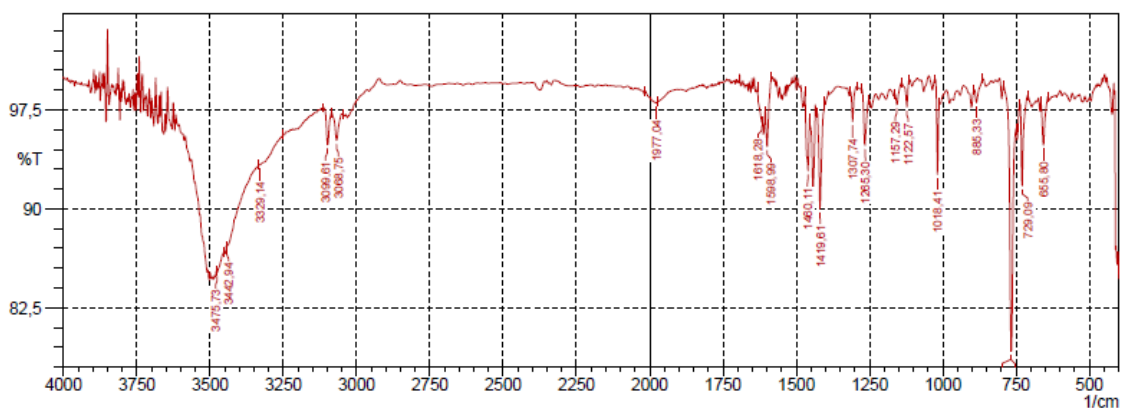


Anexo 3.16 - Espectro de COSY do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 3).

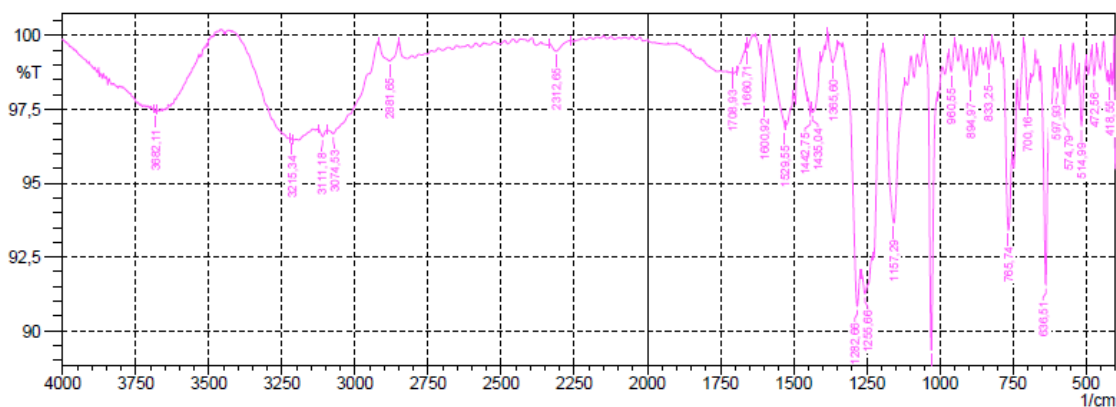


Anexo 3.17 - Espectro de HMBC do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 3).

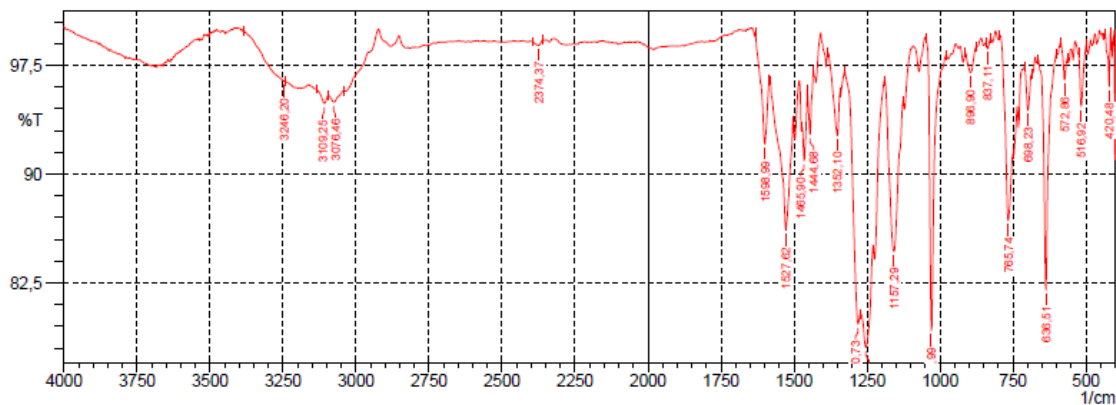
IX. Espectroscopia de IV do precursor $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$ e dos complexos 1,2 e 3



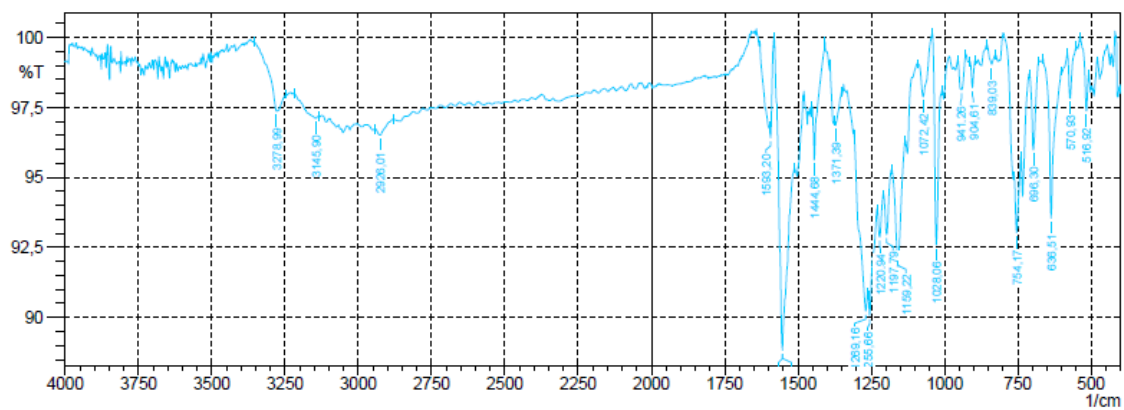
Anexo 3.18 - Espectro de IV do composto de partida $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2$].



Anexo 3.19 - Espectro de IV do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 1).

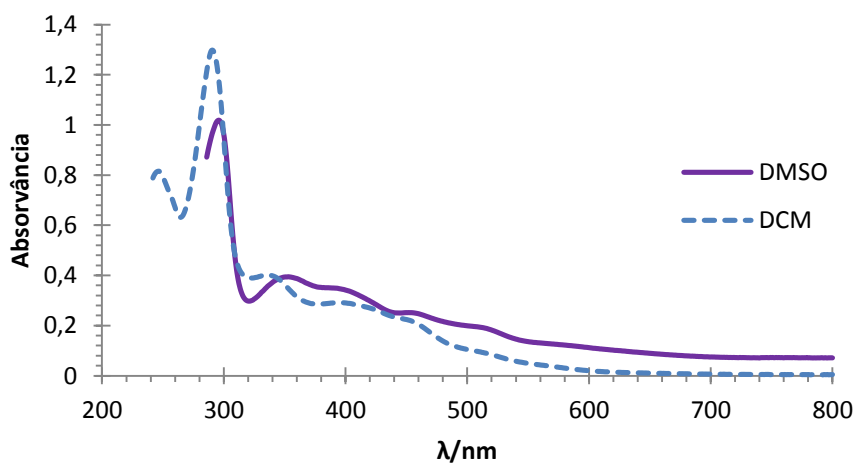


Anexo 3.20 - Espectro de IV do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 2).

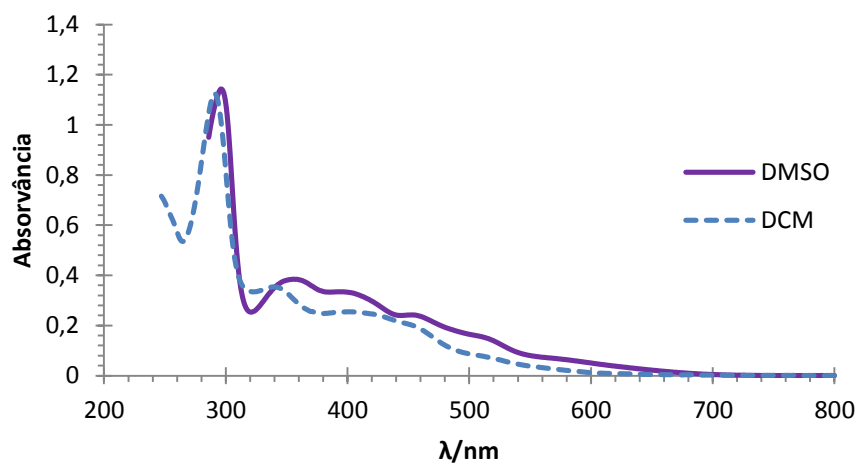


Anexo 3.21 - Espectro de IV do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 3).

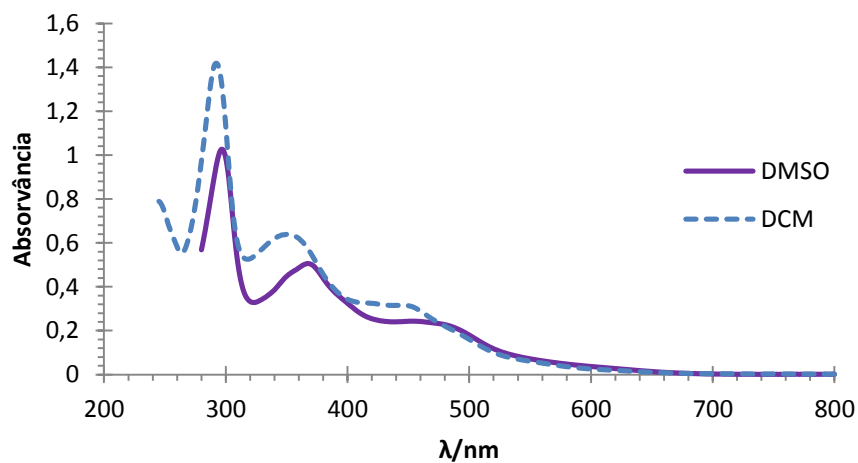
X. Espectroscopia de UV-Vísivel



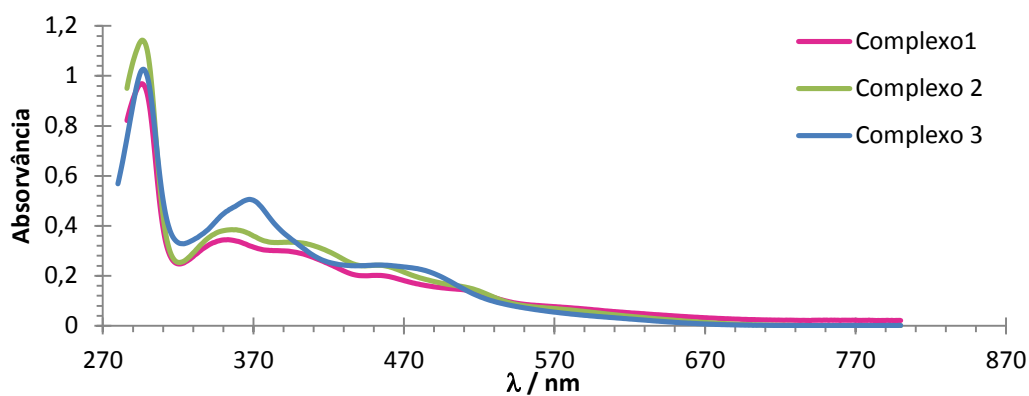
Anexo 3.22 – Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em dimetilsulfóxido e diclorometano.



Anexo 3.23 – Espectro eletrônico do complexo $[Ru(bipy)_2(HL^2)](CF_3SO_3)_2$ em dimetilsulfóxido e diclorometano.



Anexo 3.24 – Espectro eletrônico do complexo $[Ru(bipy)_2(HL^3)](CF_3SO_3)_2$ em dimetilsulfóxido e diclorometano.



Anexo 3.25 – Espectro electrónico dos complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DMSO

($C_{\text{complexo 1}}=8,70 \times 10^{-6} \text{M}$; $C_{\text{complexo 2}}=9,55 \times 10^{-6} \text{M}$; $C_{\text{complexo 3}}=6,70 \times 10^{-6} \text{M}$).

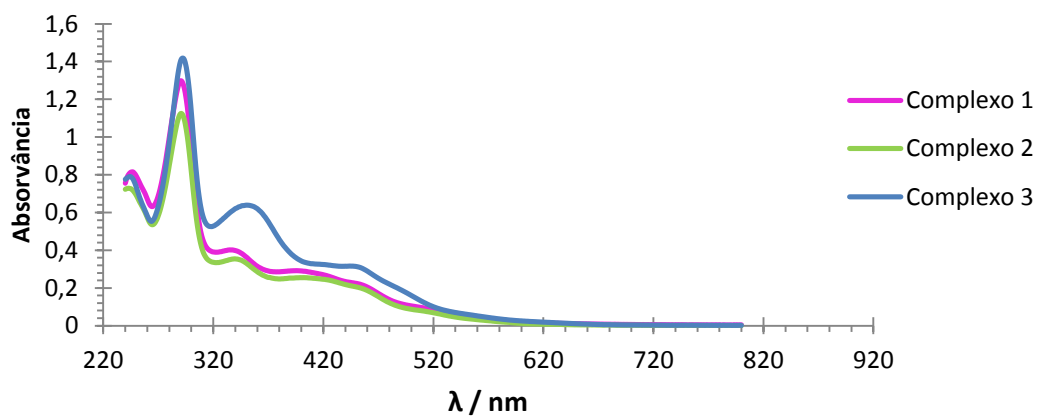
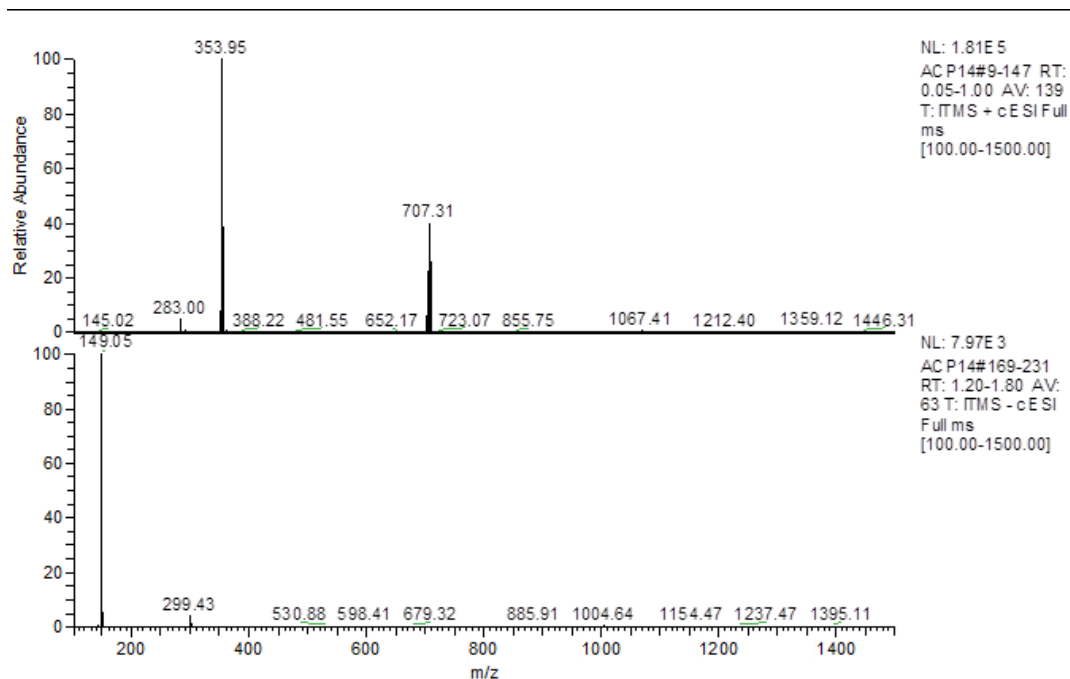


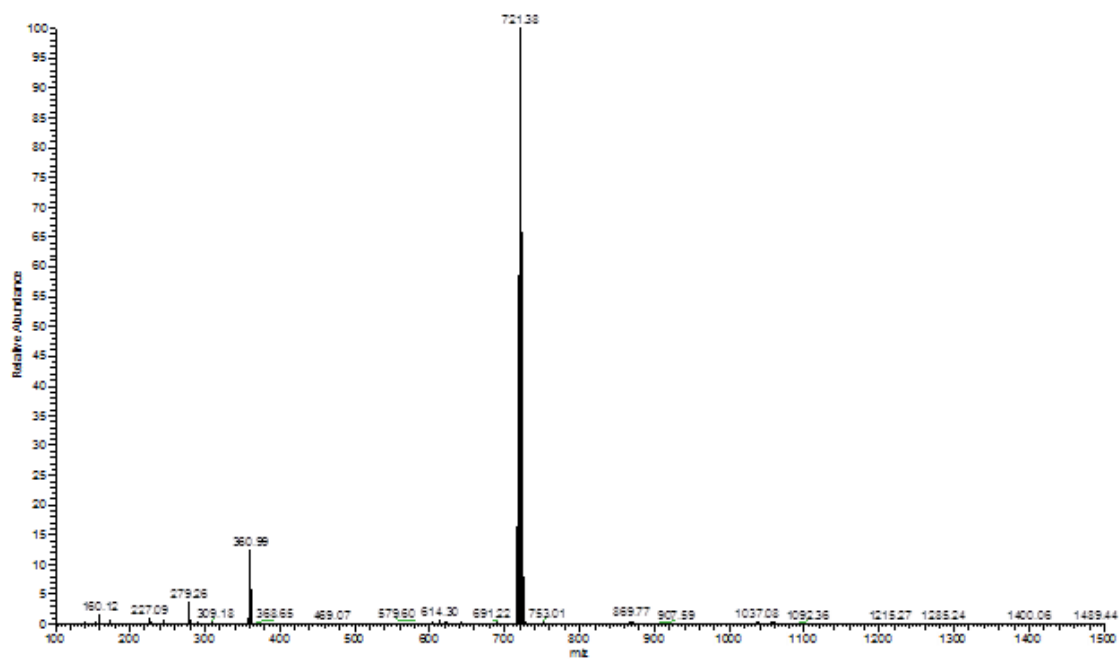
Figura 3.26 – Espectros electrónicos dos três complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ em DCM.

($C_{\text{complexo 1}}=2,12 \times 10^{-5} \text{M}$; $C_{\text{complexo 2}}=9,55 \times 10^{-6} \text{M}$; $C_{\text{complexo 3}}=1,41 \times 10^{-5} \text{M}$).

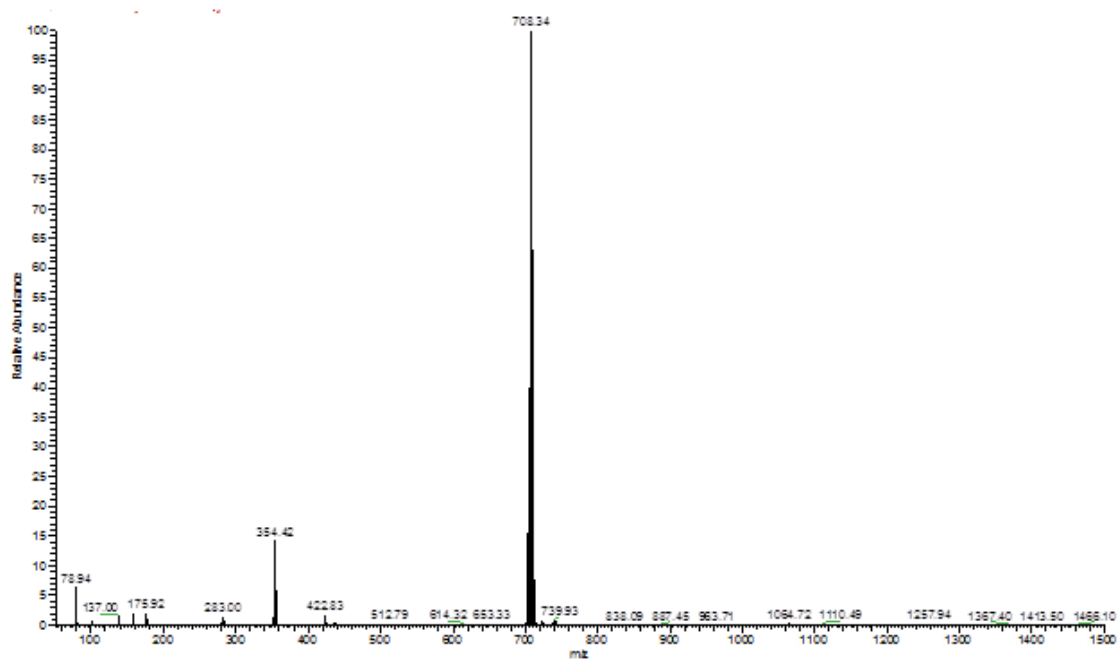
XI. Espectroscopia de massa (ESI-MS) dos complexos 1,2 e 3



Anexo 3.27 – Espetro de massa do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^1)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 1).

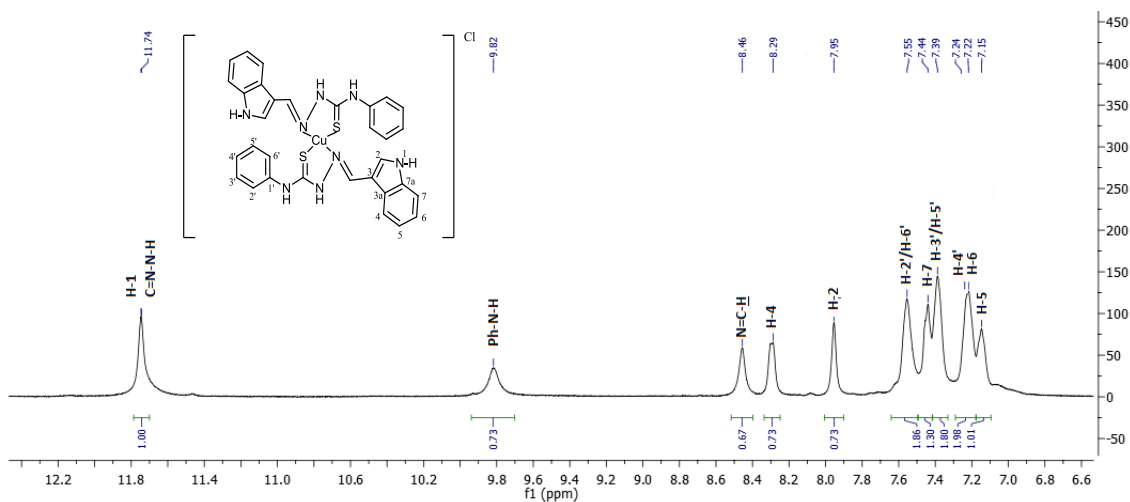


Anexo 3.28 – Espetro de massa do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^2)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ (complexo 2).

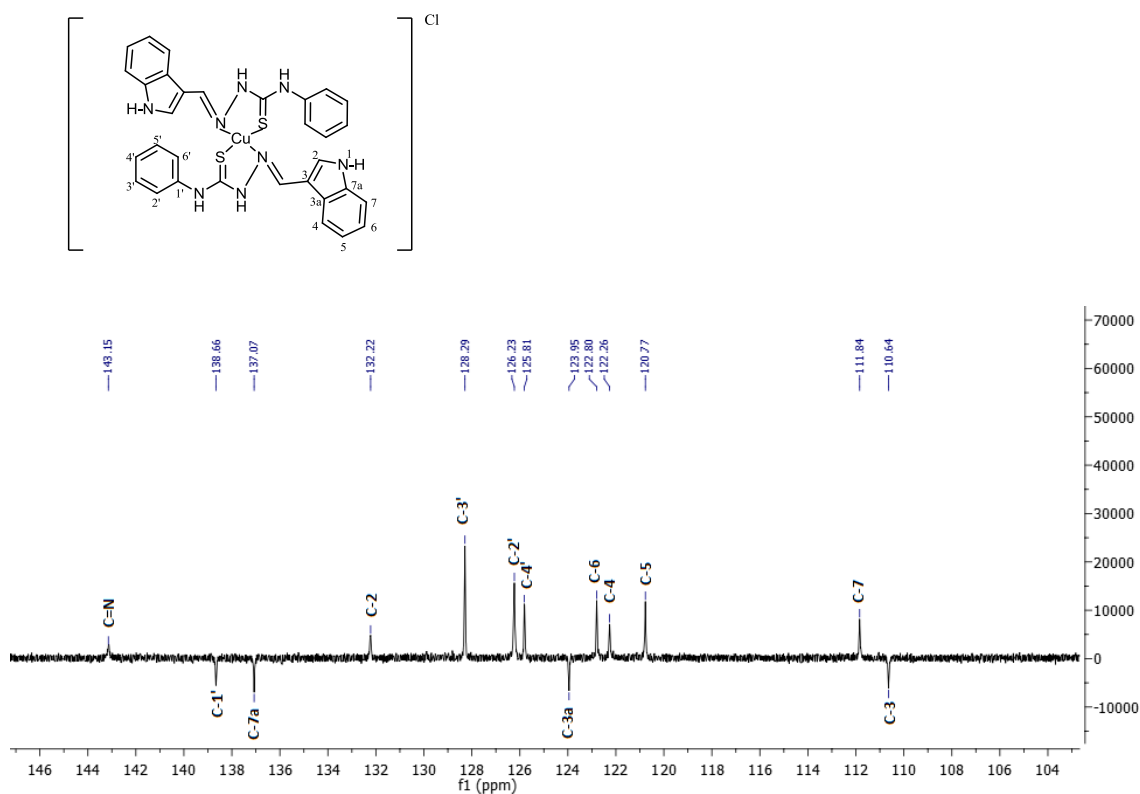


Anexo 3.29 – Espetro de massa do $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{HL}^3)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (complexo **3**).

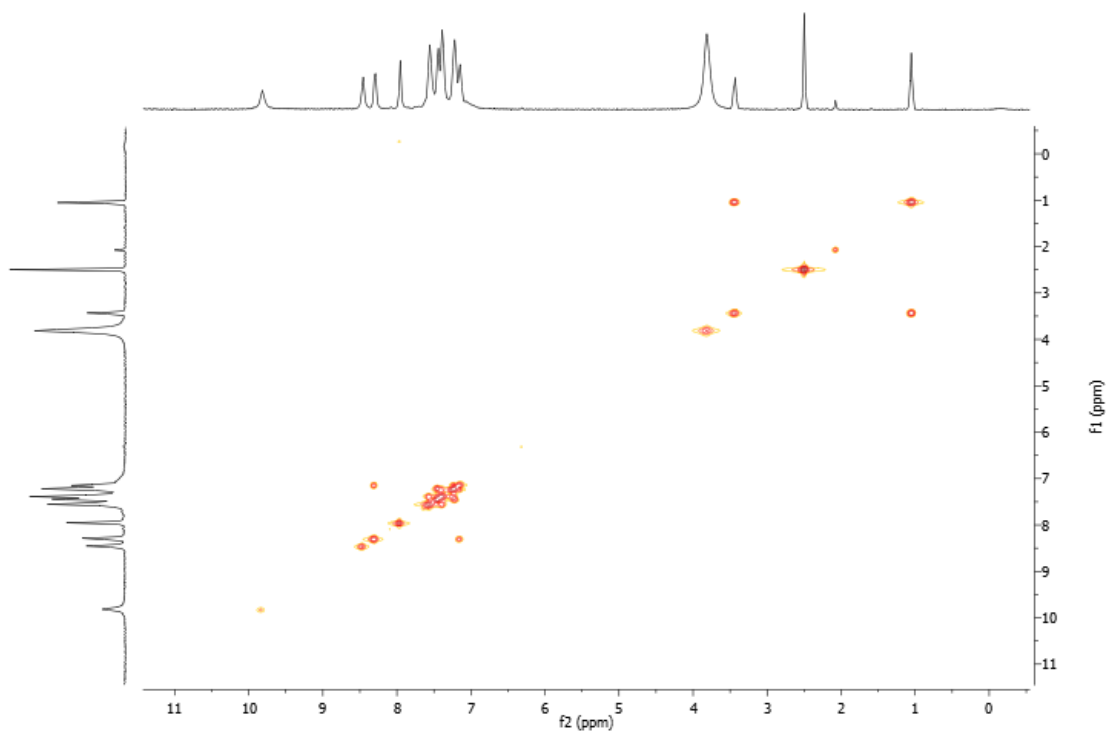
I. Espectroscopia de RMN do complexo 4



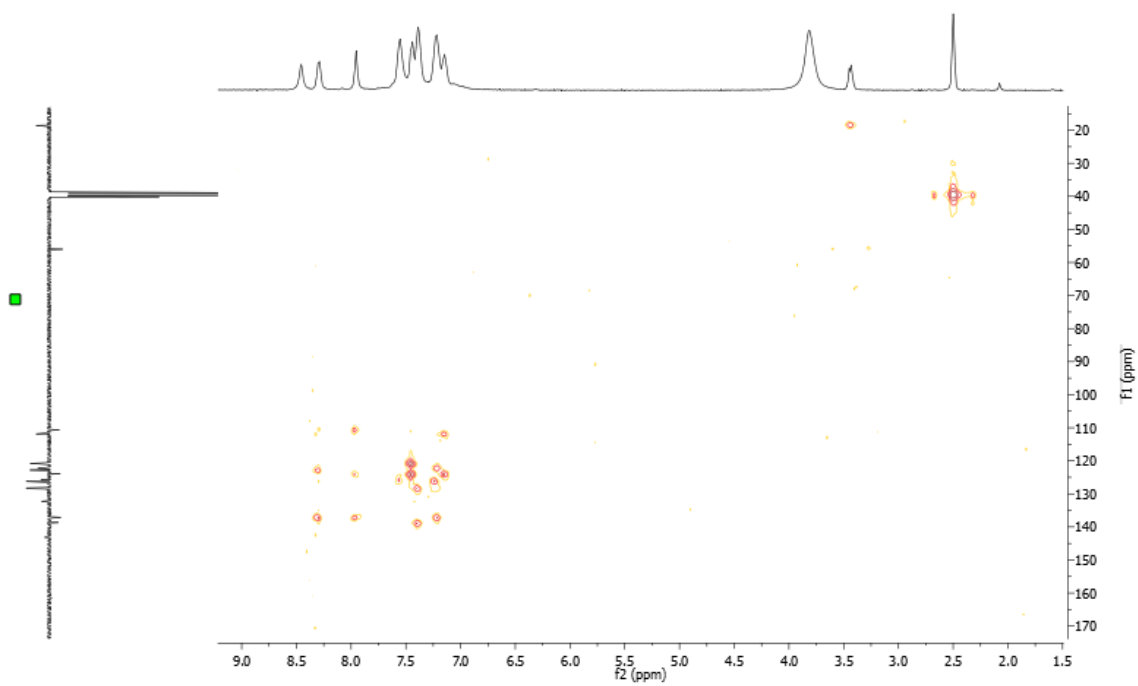
Anexo 4.1 - Espectro de RMN ¹H do [Cu(Cl)(HL¹)] (complexo 4).



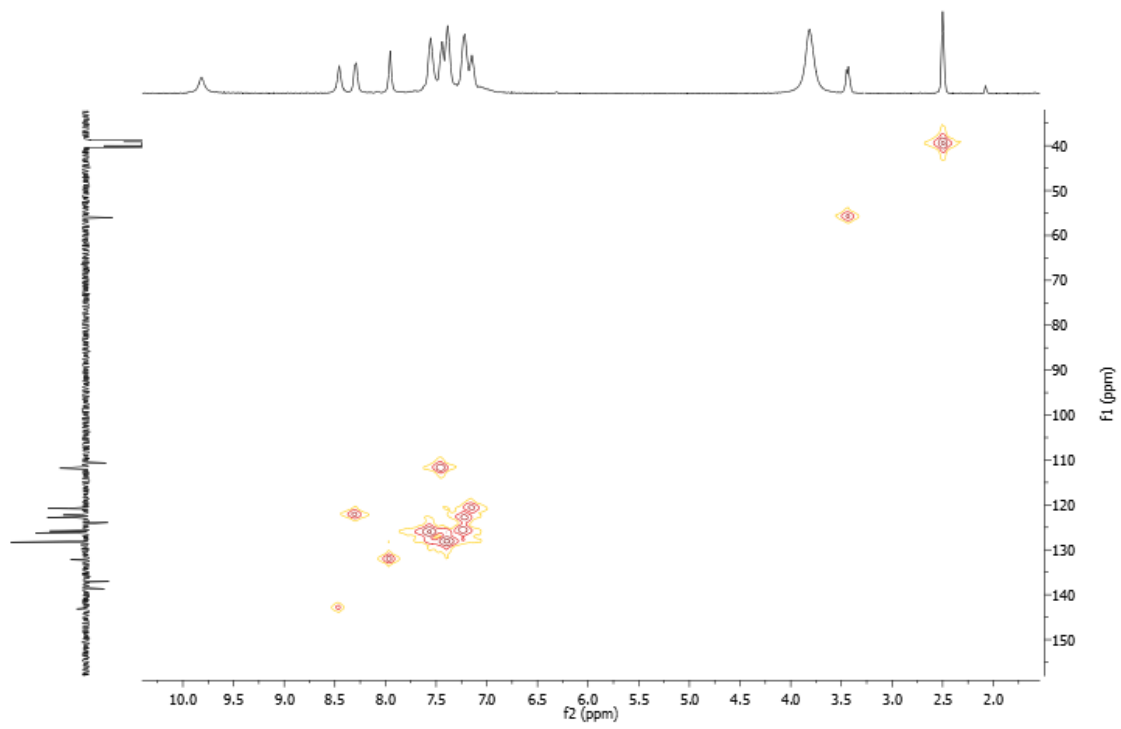
Anexo 4.2 - Espectro de RMN ¹³C/APT do [Cu(Cl)(HL¹)] (complexo 4).



Anexo 4.3 - Espectro de COSY do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^1)]$ (complexo 4).

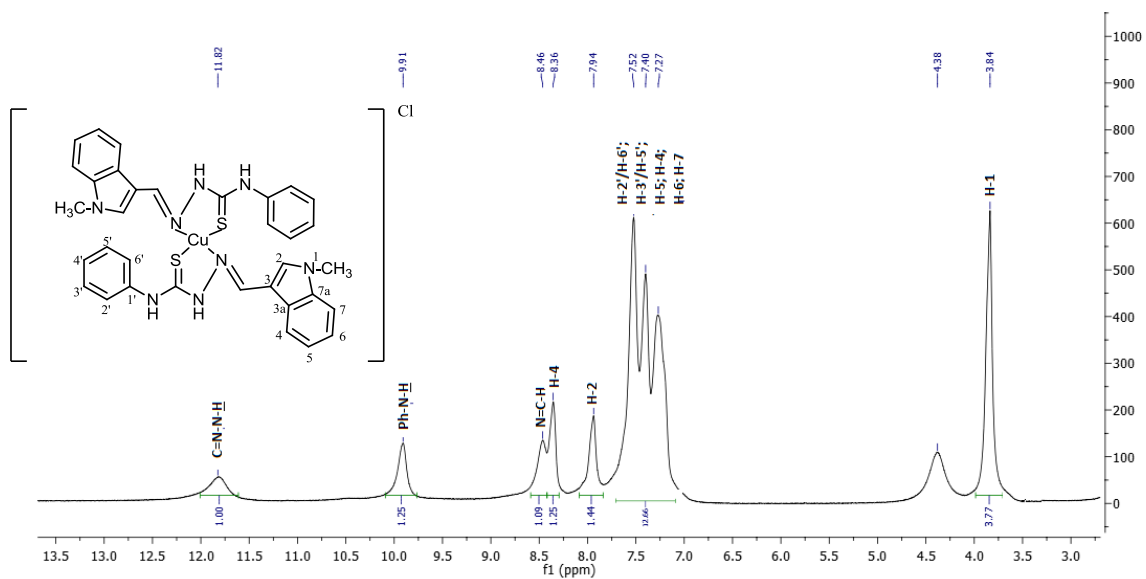


Anexo 4.4 - Espectro de HMBC do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^1)]$ (complexo 4).

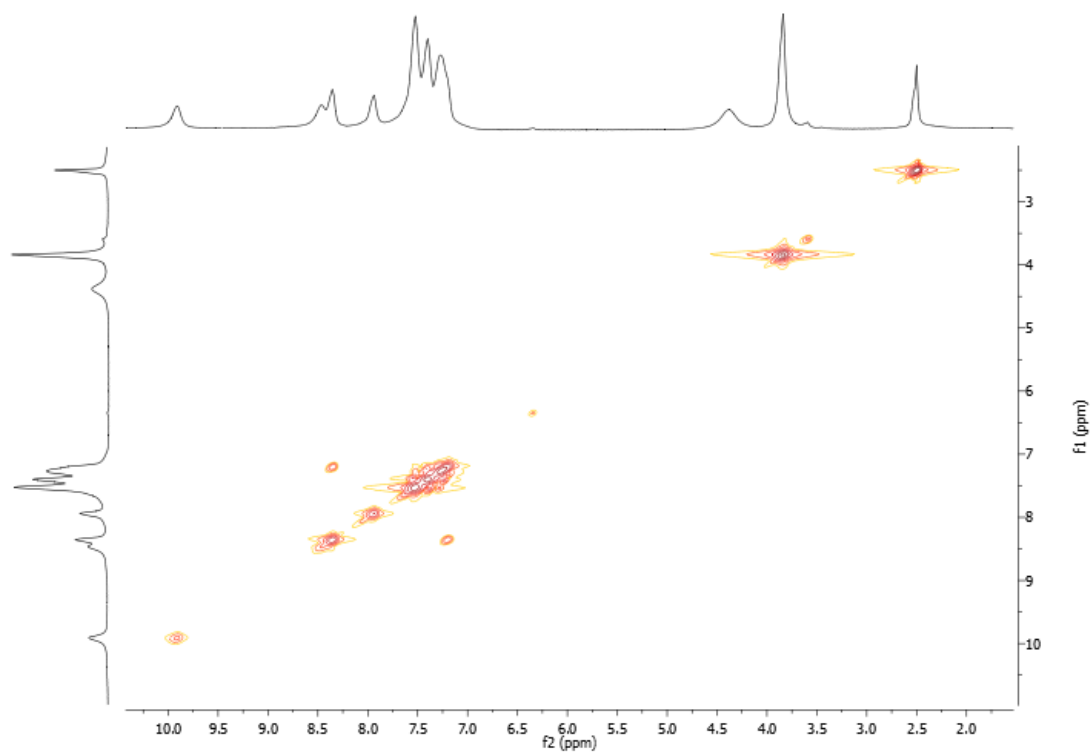


Anexo 4.5 - Espectro de HMQC do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^1)]$ (complexo 4).

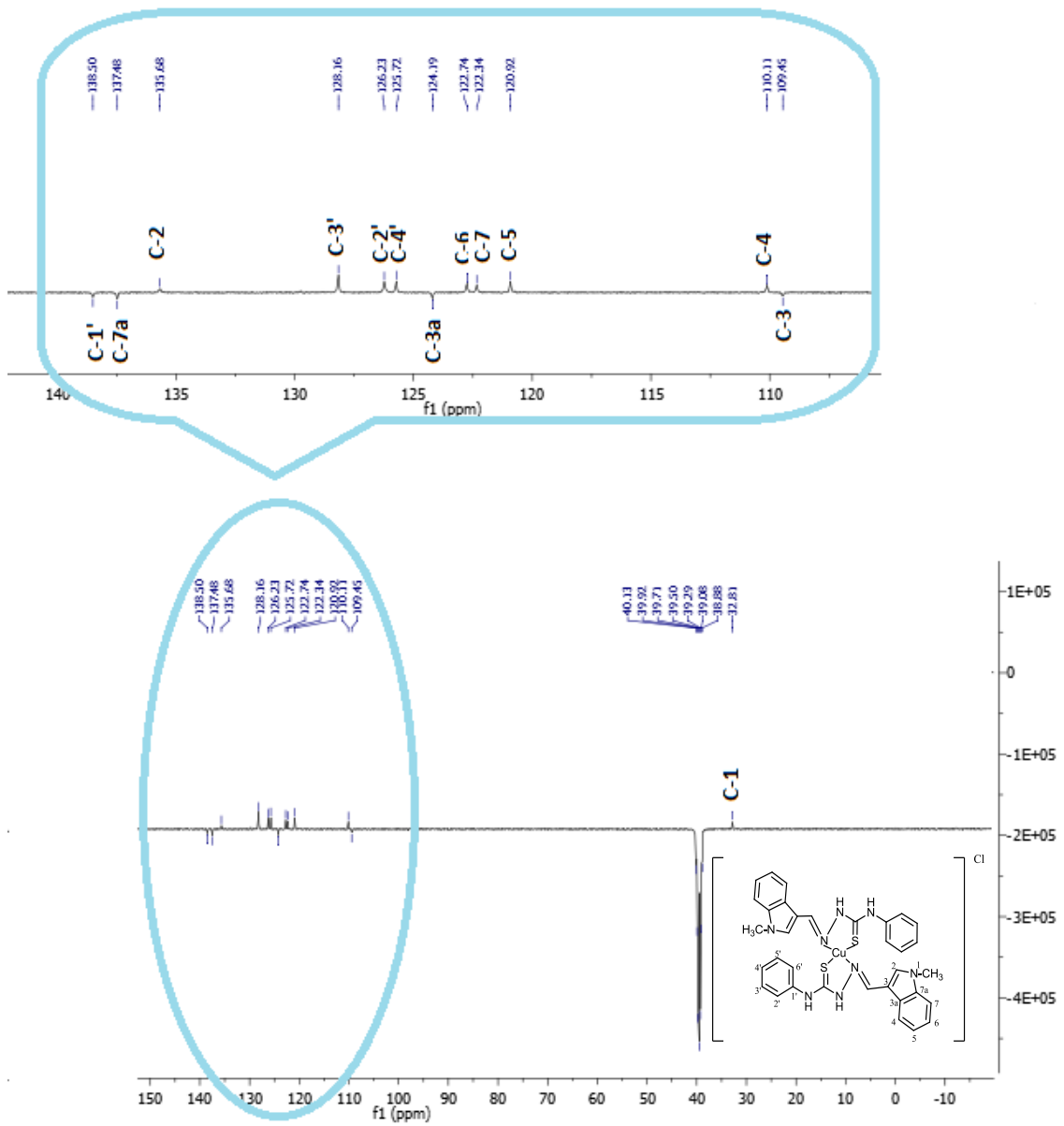
II. Espectroscopia de RMN do complexo 5



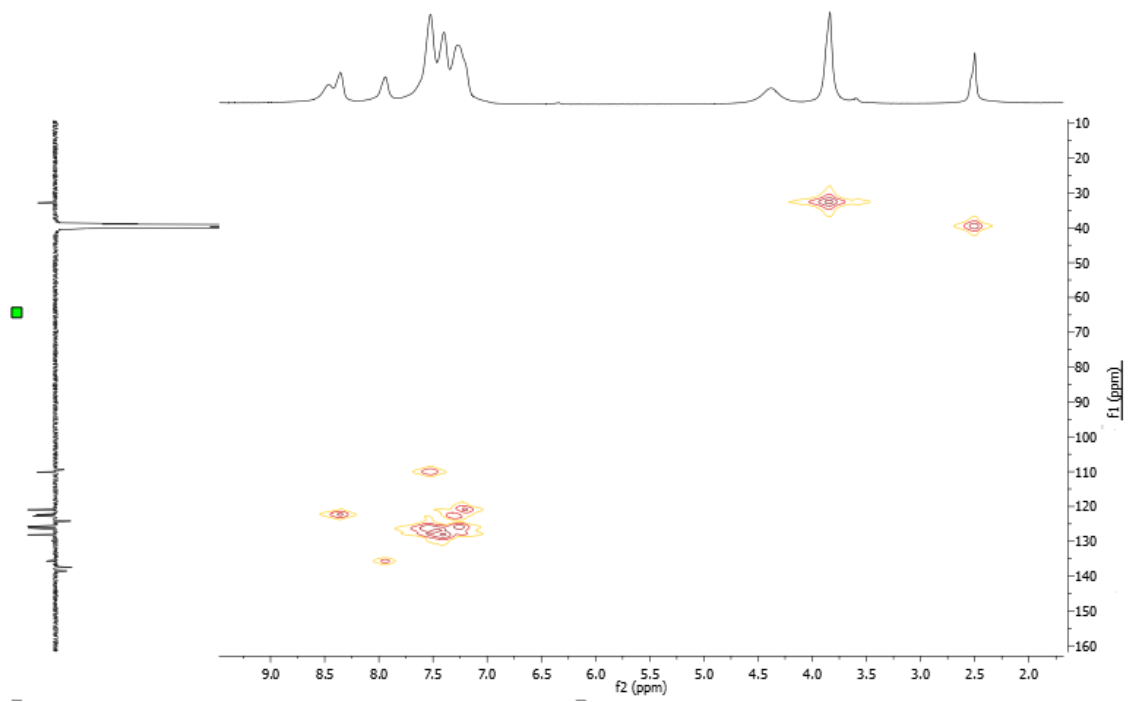
Anexo 4.6 - Espectro de RMN ^1H do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^2)]$ (complexo 5).



Anexo 4.7 - Espectro de COSY do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^2)]$ (complexo 5).

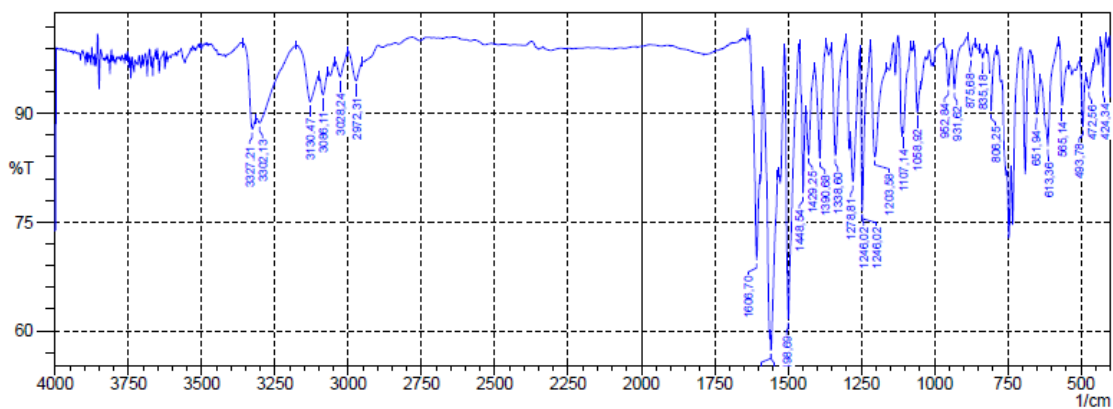


Anexo 4.8 - Espetro de $^{13}\text{C}/\text{APT}$ do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^2)]$ (complexo 5).

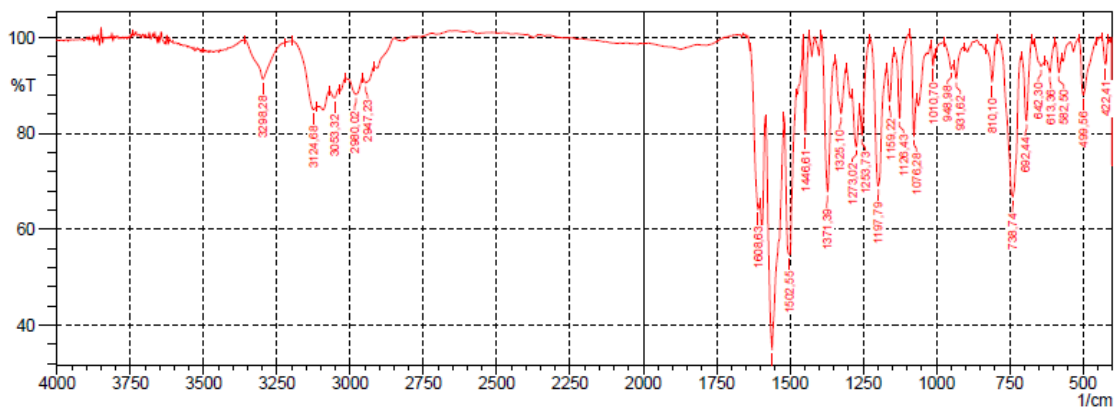


Anexo 4.9 - Espectro de HMQC do $[\text{Cu}(\text{Cl})(\text{HL}^2)]$ (complexo 5).

III. Espectroscopia de IV dos complexos 4 e 5

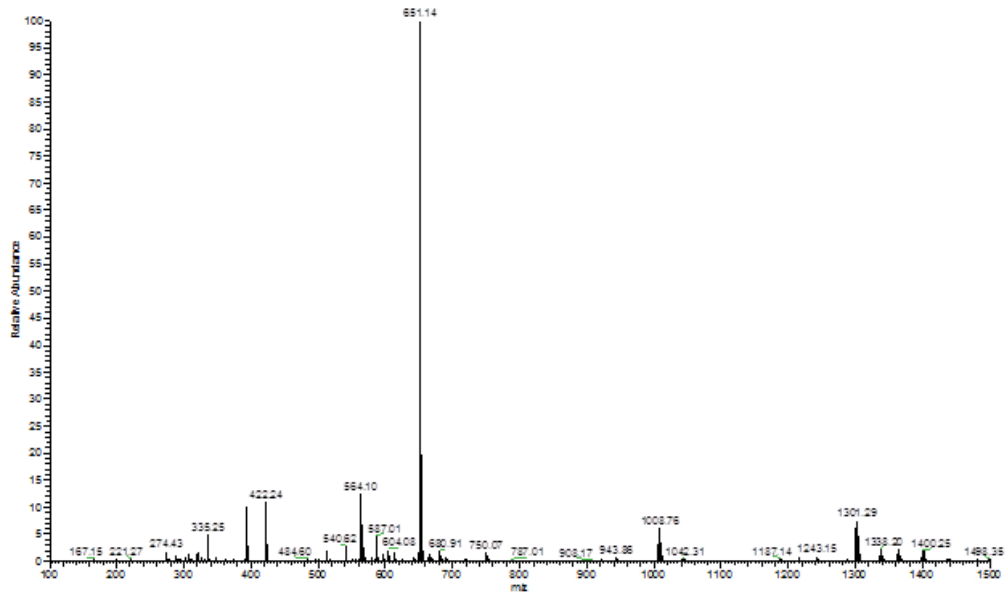


Anexo 4.10 - Espectro de IV do $[\text{Cu}(\text{Cl})_2(\text{HL}^1)]$ (complexo 4).

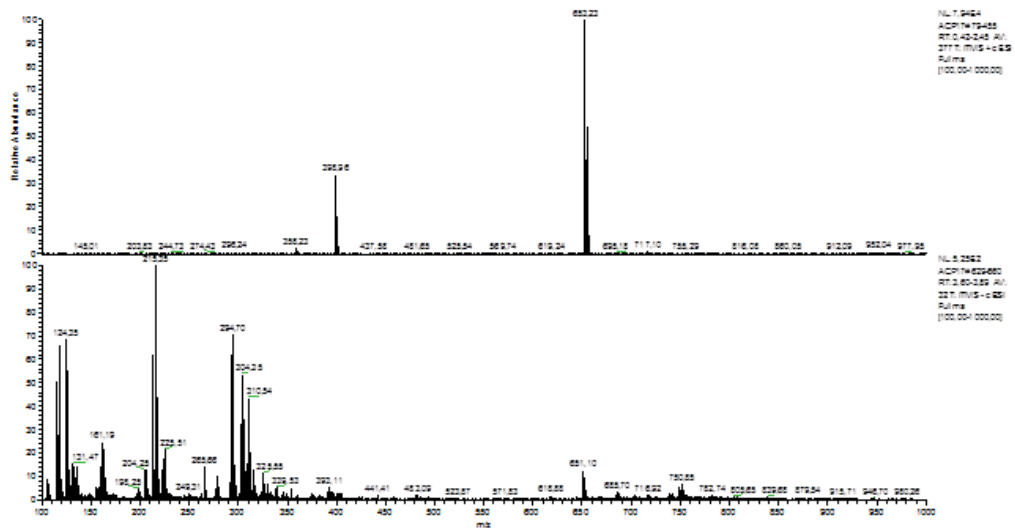


Anexo 4.11 - Espectro de IV do $[\text{Cu}(\text{Cl})_2(\text{HL}^2)]$ (complexo 5).

IV. Espectroscopia de massa (ESI-MS) dos complexos 4 e 5



Anexo 4.12 – Espectro de massa do $[\text{Cu}(\text{Cl})_2(\text{HL}^1)]$ (complexo 4).



Anexo 4.13 – Espectro de massa do $[\text{Cu}(\text{Cl})_2(\text{HL}^2)]$ (complexo 5).