

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA GERAL E INORGÂNICA**

Juan Camilo Rojas Sterling

Síntese, caracterização e atividade biológica de complexos de rutênio contendo
tiossemicarbazona derivada de vanilina

Araraquara

2022

Juan Camilo Rojas Sterling

Síntese, caracterização e atividade anticâncer de complexos de rutênio contendo
tiossemicarbazona derivada de vanilina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira

Araraquara

2022

S838s Sterling, Juan Camilo Rojas
Síntese, caracterização e atividade biológico de complexos de rutênio contendo tiossemicarbazona derivada de vanilina / Juan Camilo Rojas Sterling. -- Araraquara, 2022
88 f. : il.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: José Clayston Melo Pereira

1. Rutênio. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Complexos metálicos. 4. Câncer. 5. DNA. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

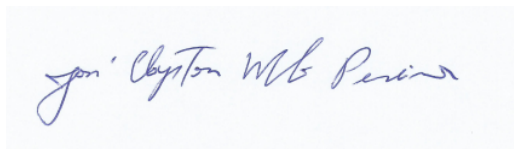
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Síntese, caracterização e atividade anticâncer de complexos de rutênio contendo tiossemicarbazona derivada de vanilina".

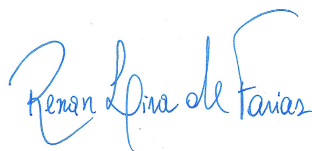
AUTOR: JUAN CAMILO ROJAS STERLING**ORIENTADOR: JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA****COORIENTADOR: JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA (Participação Virtual)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. RENAN LIRA DE FARIAS (Participação Virtual)

Departamento de Química / Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC - Rio de Janeiro



Prof. Dr. DANIELA RAMOS TRUZZI (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica / Instituto de Química - USP - São Paulo

Araraquara, 07 de outubro de 2022

DADOS CURRICULARES

Juan Camilo Rojas Sterling

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara - UNESP.

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Jardim Quitandinha - Araraquara/SP - CEP 14800-060. E-mail: jcamilors@hotmail.com.

Formação Acadêmica

2020-2022 Mestrado em Química

- Grande área: Ciências Exatas e da Terra.
- Subárea: Química Inorgânica / Especialidade: Compostos organo-metálicos.
- Título: Síntese, caracterização e atividade anticâncer de complexos de rutênio contendo tiossemicarbazona derivada de vanilina.
- Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira. (clayston@iq.unesp.br).
- Agência financiadora: CAPES.

2014-2020 Graduação em Química – Universidad Santiago de Cali (Colômbia)

- Grande área: Ciências Exatas.
- Subárea: Sucroquímica.
- Título: Fast and selective synthesis of mono-substituted sucrose methacrylate ester monomer. Carbohydrate Research (2022).
- Orientador: Prof. Dra. Julieth Orduña Ortega.

Experiência Profissional e Didática

- Monitor da Extensão, Faculdade de Ciências Básicas, Universidad Santiago de Cali - 2016 (1 ano).
- Estadia de investigação no laboratório de Sucroquímica e Química Analítica, Instituto de Biociências, Cartas e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP) - 2018 (3 meses).
- Analista químico em plantas galvanizadas, cromadas e cromadas de plástico, Multipartes de Colombia SAS - 2019 (6 meses).
- Acoustic cavitation-assisted synthesis of sucrose methacrylate. Juan C. Rojas- Sterling , Julieth Orduña-Ortega, Jorge A. Mora-Vargas, Mauricio Boscolo. Carbohydrate Research, Volume 511, 2022, 108465, ISSN 0008-6215, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108465>.

Agradezco a Dios y a la vida por darme la oportunidad de vivir esto, a mi familia por apoyarme y siempre estar para mí y a todas las personas que hicieron parte de este proceso.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a vida e o universo por me permitir estar aqui, por cada dia e por cada oportunidade. A minha família que sempre esteve para mim mesmo na distância me apoiando e mostrando seu amor já quem sem eles, nada teria sido possível.

A meu orientador, José Clayston Melo Pereira, por estar presente no desenvolvimento do projeto e ao professor Adriano Bof de Oliveira, pelo apoio e contribuição.

Aos técnicos Nivaldo Borallo e Rafael Romano Domenegueti pela ajuda e suporte nos experimentos.

Aos meus amigos brasileiros, Gian, Maria Isabella, Valeta, por fazerem me sentir em casa, por me apoiar e acompanhar nesta etapa da minha vida enchendo-a de bons momentos, risadas e experiências maravilhosas.

Aos meus amigos em Colômbia, pelo amor e apoio e por me fazerem sentir como se nunca fui embora.

Por fim, agradeço a UNESP pela infraestrutura, e a coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 pela bolsa concedida.

RESUMO

O câncer é uma doença que abrange mais de 12% das causas de óbito no mundo. Em casos avançados da doença, é recomendada a radioterapia com uso de fármacos que são tóxicos ao corpo e/ou ineficientes dependendo das características particulares do organismo. Este tratamento é agressivo para o paciente com diversos efeitos colaterais. Além disso, tem-se observado crescente resistência celular a esta forma de terapia. Dentro das propostas de tratamento está o uso de complexos de rutênio contendo moléculas orgânicas bioativas, como as tiosemicarbazonas derivadas da vanilina o qual por meio da coordenação ao centro metálico pode favorecer uma possível atuação farmacológica dos complexos. Neste trabalho, diversas técnicas instrumentais foram utilizadas, tais como espectroscopia no UV-Vis, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, Ressonância Paramagnética de Elétron, Espectrometria de Massas e Análise Elementar para a caracterização dos ligantes e dos complexos os quais foram submetidos a experimentos com moléculas de interesse biológico.

Palavras-chave: *Câncer, Rutênio, Tiosemicarbazonas, DNA, Complexos metálicos.*

ABSTRACT

Cancer is a disease that comprises more than 12% of the causes of death worldwide. In advanced cases, radiotherapy and drugs are recommended. However, that procedure is toxic to the body and inefficient depending on the particular characteristics of the organism. This treatment is aggressive to the patient, with several side effects. In addition, increasing cellular resistance to this form of therapy has been observed. This work proposes using ruthenium complexes containing biologically active organic molecules, such as thiosemicarbazones derived from vanillin, which through coordination with the metal center, can favor a possible pharmacological action of the complexes. In this work, several instrumental techniques were used, such as UV-Vis spectroscopy, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, electron paramagnetic resonance, mass spectrometry, and elemental analysis for the characterization of ligands and complexes, which were subjected to experiments with molecules of biological interest.

Keywords: *Cancer, Ruthenium, Thiosemicarbazones, AND, Metallic complexes.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2022.	17
Figura 2- Formação de células cancerígenas a partir da mutação genética em células somáticas.	18
Figura 3- Estrutura química de alguns compostos à base de platina (II) aprovados para uso clínico. a) cisplatina, b) carboplatina, c) oxaliplatina, d) loboplatina.....	19
Figura 4- Mecanismo de ação geral da cisplatina.	20
Figura 5- Estrutura dos complexos: a) $[Ru(terpy)_2]^{2+}$, b) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, c) $[Ru(phen)_3]^{2+}$	22
Figura 6- estrutura dos complexos: a) NAMI-A, b) KP1019, c) NKP1339 e d) TLD1443.	23
Figura 7- Mecanismo de reação para a formação de tiossemicarbazonas.	25
Figura 8- Representação dos possíveis tipos de coordenação das tiossemicarbazonas.....	26
Figura 9- Estrutura dos complexos de rutênio (II) obtidos por Beckford.	26
Figura 10- Estrutura dos complexos de rutênio (II) obtidos por Anchuri, S. S.....	27
Figura 11- Estrutura química para tiossemicarbazonas derivados de vanilina.....	28
Figura 12- Estrutura proposta para os complexos do tipo $[Ru(TSC)_3]$ contendo tiossemicarbazonas derivadas da vanilina.	28
Figura 13- Estruturas químicas da vanilina, tiosemicarbazidas y tiosemicarbazona formadas.	32
Figura 14- Estruturas tautoméricas possíveis para as tiossemicarbazonas.....	37
Figura 15- Espectro infravermelho dos ligantes tiossemicarbazona sintetizados.	38
Figura 16- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VTSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm.....	39
Figura 17- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VMTSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm.....	40
Figura 18- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VETSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 330 nm.....	41
Figura 19- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VFTSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 336 nm.....	42
Figura 20- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VTSC sintetizado.	44
Figura 21- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VMTSC sintetizado.	45
Figura 22- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VETSC sintetizado	47
Figura 23- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VFTSC sintetizado.....	48
Figura 24- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VTSC em MeOH (modo positivo).	49
Figura 25- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VMTSC em MeOH (modo positivo).	49

Figura 26- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VETSC em MeOH (modo positivo).	50
Figura 27- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VFTSC em MeOH (modo positivo).	50
Figura 28- Representação dos possíveis tipos de fragmentação para as tiossemicarbazonas derivadas da vanilina.	51
Figura 29- Espectro infravermelho dos complexos sintetizados.	52
Figura 30- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VTSC e o complexo [Ru(VTSC) ₃].	53
Figura 31- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VMTSC e o complexo [Ru(VMTSC) ₃].	54
Figura 32- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VETSC e o complexo [Ru(VETSC) ₃].	54
Figura 33- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VFTSC e o complexo [Ru(VFTSC) ₃].	55
Figura 34- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo [Ru(VTSC) ₃] em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 332 nm. Erro! Indicador não definido.	
Figura 35- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo [Ru(VMTSC) ₃] em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 333 nm. ...	57
Figura 36- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo [Ru(VETSC) ₃] em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 335 nm. ...	58
Figura 37- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo [Ru(VFTSC) ₃] em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 339 nm. ...	59
Figura 38- Comparativa do espectro ultravioleta do ligante VTSC e o complexo [Ru(VTSC) ₃].	60
Figura 39- Mecanismo de reação para a oxidação da tiosemicarbazona.	61
Figura 40- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo [Ru(VTSC) ₃] em metanol (modo positivo).	62
Figura 41- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo [Ru(VMTSC) ₃] em metanol (modo positivo).	63
Figura 42- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo [Ru(VETSC) ₃] em metanol (modo positivo).	63
Figura 43- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo [Ru(VFTSC) ₃] em metanol (modo positivo).	64
Figura 44- Espectros de EPR de banda X do complexo [Ru(VTSC) ₃] a 77 K.	66
Figura 45- Espectros de EPR de banda X do complexo [Ru(VMTSC) ₃] a 77 K.	67

Figura 46- Espectros de EPR de banda X do complexo [Ru(VETSC) ₃] a 77 K.....	67
Figura 47- Estabilidade do complexo [Ru(VTSC) ₃] em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).	68
Figura 48- Estabilidade do complexo [Ru(VMTSC) ₃] em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).	69
Figura 49- Estabilidade do complexo [Ru(VETSC) ₃] em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).	69
Figura 50- Estabilidade do complexo [Ru(VFTSC) ₃] em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).	70
Figura 51- Espectro UV-Vis contendo o complexo [Ru(VTSC) ₃] e aumentando concentração de ct-DNA em tampão tris-HCl (pH 7,3).	72
Figura 52- Gráfico de $A_0/(A - A_0)$ vs $1/[DNA]$ para a determinação da constante de ligação do aduto ADN-[Ru(VTSC) ₃].	72
Figura 53- Espectros de CD após adições crescentes do complexo [Ru(VTSC) ₃] ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em DMSO) para ct-DNA ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl, r = concentrações de razão molar [complexo]/[DNA].	73
Figura 54- Interação entre o corante Hoechst 33258 e o ct-DNA.	74
Figura 55- Espectros de emissão do aduto Hoechst -DNA na presença de concentrações crescentes de [Ru(VTSC) ₃] em tampão Tris-HCl. [DNA] = 60 M; [Hoechst] = 6 M.	75
Figura 57- Estrutura química do Laranja de Tiazol (TO).....	76
Figura 58- Espectros de emissão do aduto TO-DNA na presença de concentrações crescentes de [Ru(VTSC) ₃] em tampão Tris-HCl. [DNA] = 60 M; [TO] = 6 M.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais atribuições na espectroscopia na região do Infravermelho para os ligantes tiossemicarbazona sintetizados.	38
Tabela 2- Valores de absorção e absortividade molar em UV-Vis para os ligantes tiossemicarbazona sintetizados.	42
Tabela 3- Dados de RMN 1D de VTSC.	43
Tabela 4- Dados de RMN 1D de VMTSC.	44
Tabela 5- Dados de RMN 1D de VETSC.	46
Tabela 6- Dados de RMN 1D de VFTSC.	47
Tabela 7- Vibrações principais dos ligantes e complexos.	55
Tabela 8- Valores de absorção e absortividade molar em UV-Vis para os complexos sintetizados.	60
Tabela 9. Dados de análise elementar teórico e experimental dos complexos obtidos.	65
Tabela 10- Valores de g dos respectivos complexos em estado sólido.	67
Tabela 11. Viabilidade celular (%) dos complexos e os ligantes obtidos.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
MS	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
Hz	Hertz
ESI	Ionização por eletrospray
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	massa/carga
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
EPR	Ressonância paramagnética de elétron
<i>s</i>	Singleto
UV	Ultravioleta
IV	Infravermelho
Vis	Visível
TSC	Tiossemicarbazona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Panorama mundial do câncer.....	16
1.2 Natureza do câncer	17
1.3 Tratamento	19
1.4 Complexos de rutênio.....	22
1.5 Tiossemicarbazonas derivadas da vanilina	25
2 Objetivos	29
2.1 Objetivos específicos	29
3 Procedimento experimental.....	30
3.1 Consumíveis.....	30
3.2 Equipamentos	30
3.3 Síntese dos ligantes tiossemicarbazona (TSC)	32
3.4 Síntese do complexo [Ru(TSC) ₃]	33
3.5 Métodos Instrumentais	33
3.5.1 Espectroscopia vibracional no Infravermelho	33
3.5.2 Espectroscopia de absorção UV-Vis	33
3.5.3 Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN).....	34
3.5.5 Análise elementar.....	34
3.5.6 Ressonância paramagnética de elétrons (RPE).....	34
3.6 Ensaios biológicos.....	35
3.6.1 Titulação Espectrofotométrica com DNA.....	35
3.6.2 Dicroísmo Circular	35
3.6.3 Ensaio de Competição com Hoechst 33258 e Laranja de Tiazol	35
3.6.4 Ensaio de Viabilidade Celular.....	36
4 Resultados e discussão.....	37
4.1 Ligantes tiossemicarbazona (TSC)	37
4.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho.....	37
4.1.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta	39
4.1.3 Ressonância magnética nuclear	43
4.1.4 Espectrometria de massas	49
4.2 Complexos [Ru(TSC) ₃]	52
4.2.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho	52
4.2.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível.....	56

4.2.3 Espectrometria de massas	61
4.2.4 Análise elementar.....	65
4.2.5 Ressonância paramagnética de elétron	66
4.2.5 Estudos de Estabilidade em Solução	68
4.3 Testes biológicos.....	71
4.3.1 Ensaio de Interação com DNA	71
4.3.1.1 Titulação espectrofotométrica	71
4.3.1.2 Dicroísmo circular.....	73
4.3.1.3 Ensaio de competição com Hoechst 33258	74
4.3.1.4 Ensaio de competição com Laranja de Tiazol	76
5 Ensaio de Viabilidade Celular.....	78
6 Conclusões.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

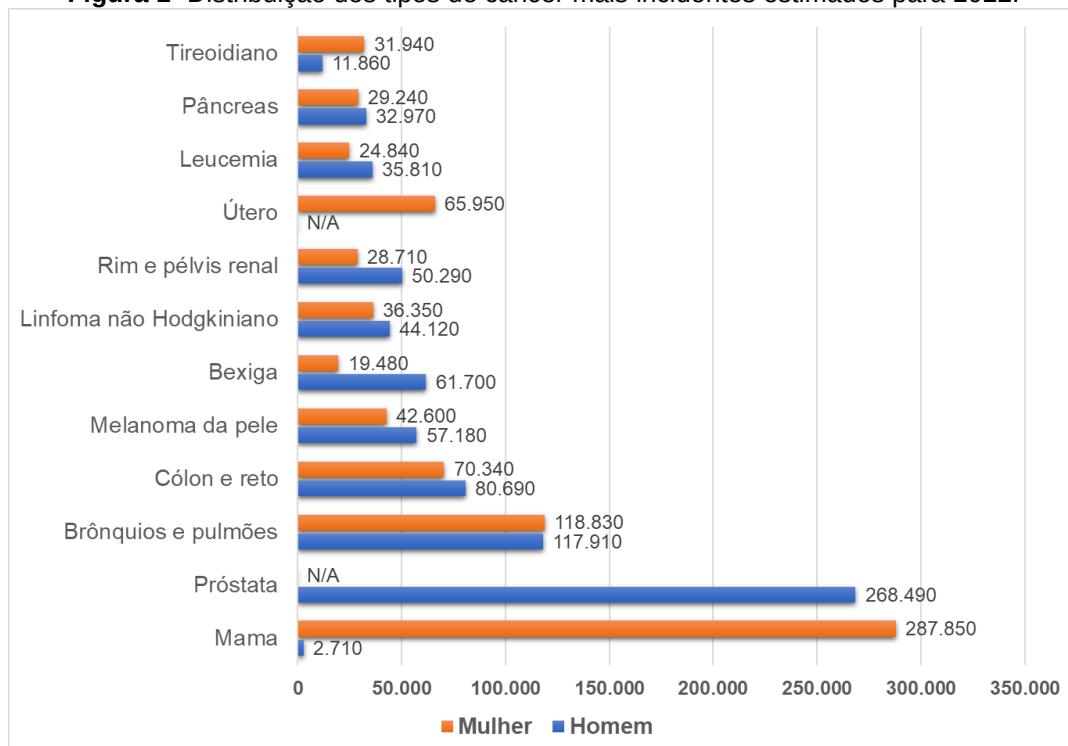
1.1 Panorama mundial do câncer

O câncer é a principal causa de morte no mundo, em torno de 10 milhões de mortes em 2020, quase um óbito de cada seis casos ¹. Em 2020, o número de casos atingiu 19,3 milhões de pessoas e levou a óbito dez milhões de vidas em todo o mundo, tornando-a a segunda principal causa de morte segundo a OMS, sendo que 70% das mortes por esta doença ocorreram em países de baixa e média renda. Atualmente, uma em cada cinco pessoas sofre de câncer em algum momento de suas vidas, causando a morte de um em cada oito homens e uma em onze mulheres diagnosticadas com algum tipo de câncer e estima-se que nos próximos anos os novos casos vão aumentar para quase 50% até 2040 ².

Em 2022, estima-se que aproximadamente 1,9 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer nos EUA, das quais 287.850 mulheres e 2.710 homens serão diagnosticados com câncer de mama, sendo este o diagnóstico mais comum. O câncer de próstata é o principal diagnóstico entre os homens e o segundo diagnóstico mais comum em geral, com 268.490 casos esperados. O câncer de pulmão e brônquios é o terceiro diagnóstico de câncer mais comum, com cerca de 236.740 novos casos ³. Segundo a American Cancer Society (ACS), os 12 locais mais comuns de câncer que vão representar mais de três quartos de todos os novos casos estão apresentados na **figura 1**.

Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer representa a segunda causa de mortalidade na população adulta brasileira, perdendo apenas para doenças cardiovasculares ^{4,5}.

Figura 1- Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2022.



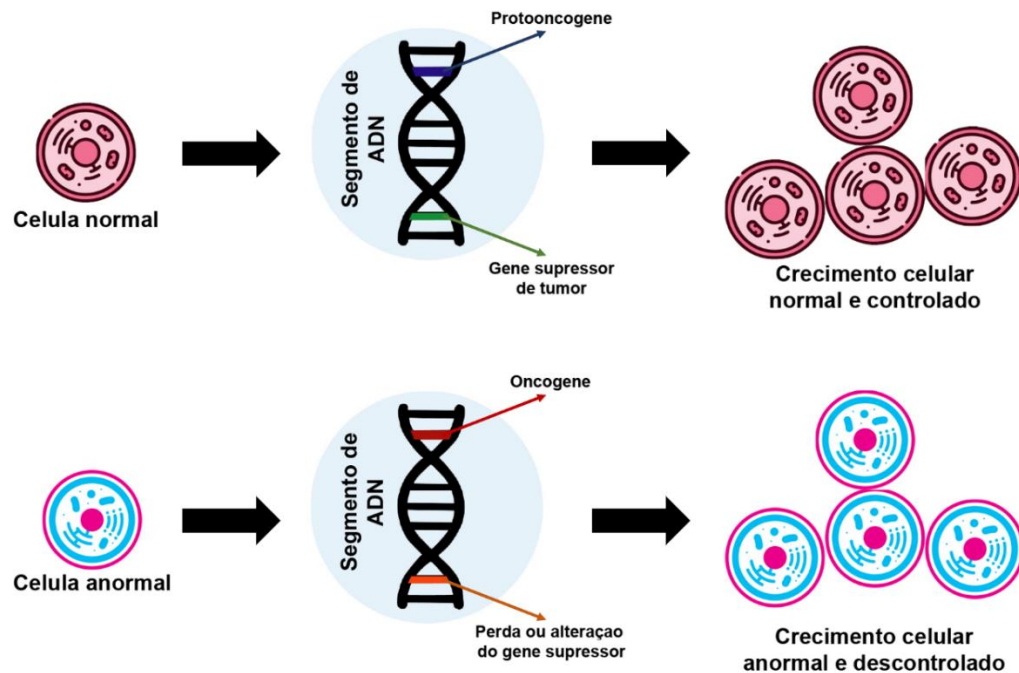
Fonte: American Cancer Society (ACS), 2022.

1.2 Natureza do câncer

Quase todos os casos de câncer têm como causa anomalias celulares adquiridas por meio de erros na replicação do DNA que são ocasionados por fatores hereditários, ou resultado dos efeitos de carcinógenos, como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos ^{6,7}. O crescimento de forma desordenada (maligno) de células de câncer que invadem os tecidos e órgãos pode se proliferar para outras partes do corpo. Estas anomalias podem ser próprias de fatores genéticos em que as células passam por alterações devido aos genes específicos da oncogenes e os supressores de tumores (**Figura 2**) ⁸. Os proto-oncógenos desempenham um papel importante no controle da divisão celular e da morte celular durante nosso desenvolvimento. Entretanto, se um proto-oncogene sofrer uma mutação, inserções, deleções ou justaposição pode provocar um crescimento desordenado e então denominado de oncogene o qual é responsável por uma divisão celular descontrolada. Desta forma, um proto-oncogene contribui para o desenvolvimento de uma célula cancerígena a partir de uma célula normal ⁹. Por outro lado, os supressores de tumor que estão envolvidos em atividades de divisão celular, apoptose e reparação

de danos no DNA levam ao desenvolvimento descontrolado de células devido a sua inativação ¹⁰.

Figura 2- Formação de células cancerígenas a partir da mutação genética em células somáticas.



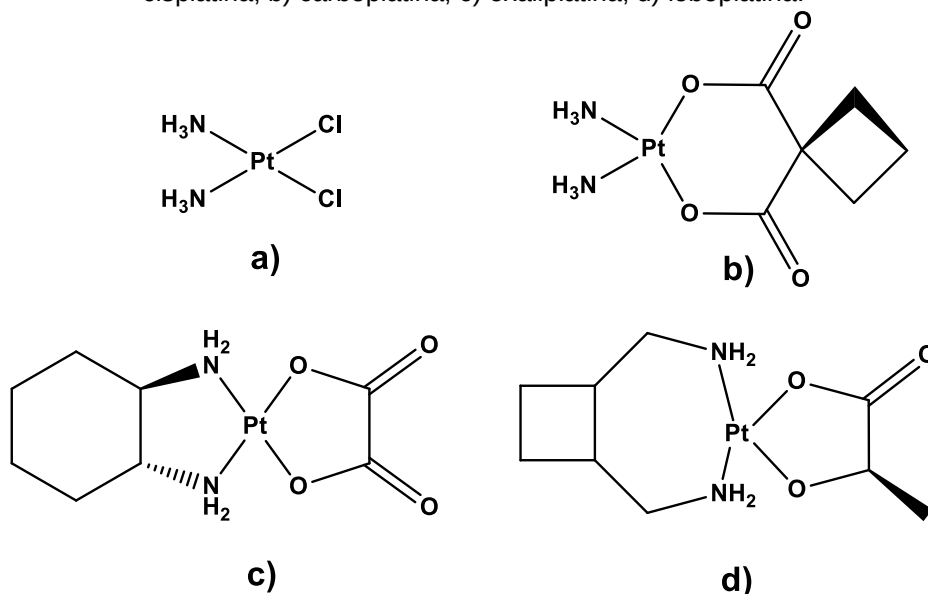
Fonte: adaptado de Zanetti et. al, 2017.

Devido às mutações genéticas, as células cancerígenas têm uma alta capacidade de proliferação e resistência a sinais antiproliferativos e apoptóticos e, portanto, essas células podem produzir vasos sanguíneos (angiogênese) ou invadir outros tecidos (metástase), sendo este último a principal causa de morte em pacientes com câncer ^{11,12}.

1.3 Tratamento

O tratamento de câncer pode ser cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou uma combinação destes procedimentos a depender do local e extensão do tumor primário. Em 50% dos tratamentos de quimioterapia, utilizam-se fármacos à base de platina(II) como agentes quimioterápicos ^{13,14}. Nesta família de compostos se destaca a cisplatina e seus análogos (**Figura 3**).

Figura 3- Estrutura química de alguns compostos à base de platina(II) aprovados para uso clínico. a) cisplatina, b) carboplatina, c) oxaliplatina, d) loboplatina.

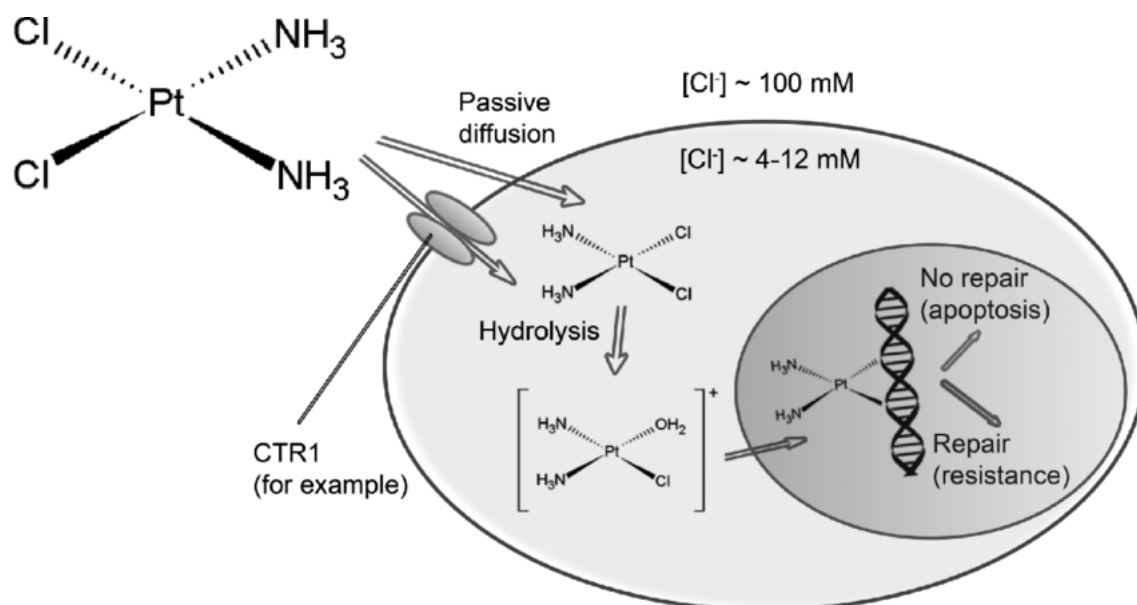


Fonte: Autor.

A cisplatina (cis-diaminobis(clorido)platina(II)), por sua vez, é o complexo inorgânico mais frequentemente utilizado para o tratamento de câncer desde 1978 quando a agência americana “Food and Drugs Administration (FDA)” permitiu seu uso clínico contra câncer de ovário e de testículo ¹⁵. A cisplatina e seus análogos compartilham mecanismos de ação no organismo (**Figura 4**). A cisplatina mantém sua estrutura no meio extracelular devido a que contém altas concentrações de cloreto ($[Cl^-] \approx 100 \text{ mM}$). O complexo inicialmente entra na célula tanto por difusão passiva como por absorção ativa, principalmente através do transportador de membrana de cobre CTR1 ¹⁶. Uma vez dentro da célula, o ambiente intracelular apresenta uma concentração menor de íons cloreto ($[Cl^-] \approx 12\text{-}4 \text{ mM}$), favorecendo a reação de aquação da cisplatina ¹⁷⁻¹⁹. No meio intracelular, o complexo cis-[PtCl₂(NH₃)₂] libera o ligante clorido formando os complexos *cis*-[PtCl(NH₃)₂(H₂O)]⁺ e *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ (equação 1 e 2) ²⁰. O produto hidrolisado é um bom eletrófilo que pode reagir com

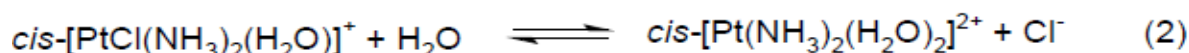
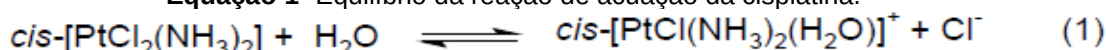
nucleófilos, como os grupos sulfidrílicos de proteínas e os átomos doadores de nitrogênio dos ácidos nucleicos. A ligação da cisplatina ao centro reativo N7 sobre resíduos purínicos impedindo a transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA) nas células cancerígenas. Devido a isso, há um bloqueio subsequente da divisão celular que resulta, em última instância, na morte apoptótica da célula ^{19,21}.

Figura 4- Mecanismo de ação geral da cisplatina.



Fonte: Tomado de Holzer et. al, 2006.

Equação 1- Equilíbrio da reação de acuação da cisplatina.



Em casos avançados, o paciente pode ser tratado com radioterapia combinado com uso de cisplatina associada à outras drogas tais como o antimetabólico 5-Fluoracil (5-FU) ^{22,23}. Este último é utilizado contra câncer devido à capacidade de bloquear bioquimicamente a síntese do DNA do tumor. Outro antimetabólico bastante conhecido é a 6-mercaptopurina utilizado para o tratamento de leucemia. A sua atividade anticancerígena tem relação com esta capacidade de descontinuar a reprodução celular, e como as células tumorais são as que estão mais envolvidas com o processo reprodutivo, elas são as mais afetadas ²⁴. Especialistas em tratamento contra câncer costumam administrar diferentes fármacos simultaneamente no

procedimento de quimioterapia ^{24,25}. Esta estratégia visa combinar os efeitos benéficos e mecanismos de ação antitumoral dos diferentes fármacos, geralmente resultando em aumento da eficiência do tratamento ²⁶.

A busca por alternativas para o uso da cisplatina tem relação com a resistência crescente de células de câncer a ação desta droga e seu baixo índice de seletividade gerando nos pacientes tratados efeitos colaterais, como por exemplo náusea, vômito, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, mielossupressão entre outros ^{18,27,28}. Por exemplo, o sistema enzimático glutathione/glutathione transferases (GSH/GSTs) catalisa a conjugação da glutathione com a cisplatina o qual pode levar a eliminação deste complexo do meio celular e restringir sua ação antineoplásica. Este sistema enzimático também apresenta outros mecanismos relacionados à resistência celular a múltiplos fármacos tais como alterações nos níveis de glutathione (GSH) e/ou na expressão dos genes que codificam as enzimas relacionadas à síntese de GSH e alterações na expressão dos genes que codificam as glutathione transferases ²⁹.

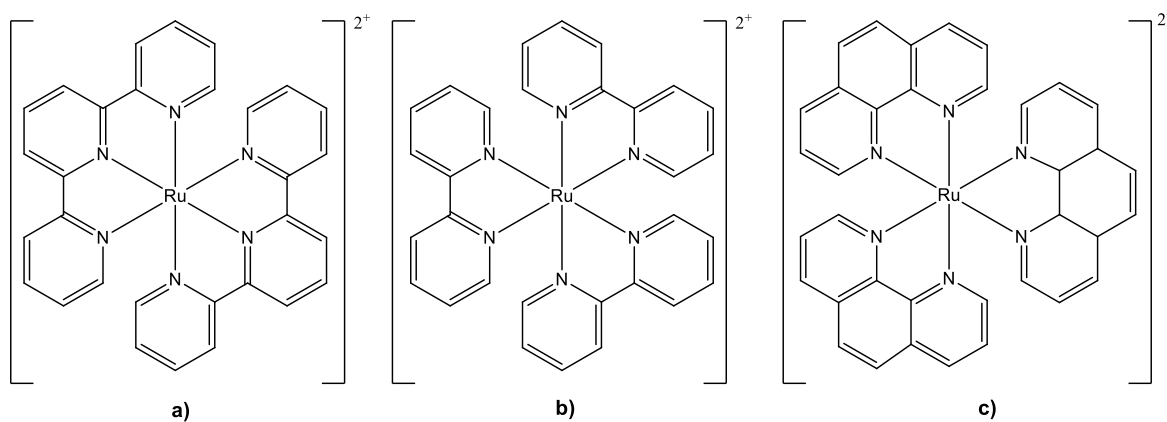
Portanto, em vista do exposto acima, há uma forte necessidade de desenvolver novos compostos que tenham atividade antitumoral e possam ser usados como agentes antineoplásicos, especialmente em células que mostram resistência celular às drogas comumente comercializadas.

1.4 Complexos de rutênio

Situado no meio do quinto período da segunda série de transição, o rutênio exibe tanto as propriedades do metal de transição precoce quanto as do metal de transição tardia³⁰. Na busca de compostos biologicamente ativos eficazes baseados em centros metálicos, os complexos de rutênio vêm ganhando importância em pesquisas de novos metalofármacos^{31,32}. Esta popularidade crescente é devida a algumas características elencadas a seguir: vários estados de oxidação estável (II,III,IV) que são acessíveis ao meio biológico sendo o estado reduzido mais reativo³³, formação de complexos estáveis em soluções aquosas e alcoólicas e menos sensível ao oxigênio e ao enxofre³⁴, baixa toxicidade sendo considerado uma alternativa aos fármacos à base de platina, apresenta uma alta seletividade para células cancerígenas³⁵. Estes fenômenos podem ser devidos à capacidade do rutênio de imitar o ferro em sua ligação com biomoléculas³⁶. A superexpressão dos receptores de transferrina nas células cancerígenas, devido ao aumento da demanda por ferro, pode permitir que os complexos de rutênio cheguem efetivamente às células cancerígenas³⁷.

Em 1952, Dwyer e colaboradores desenvolveram pela primeira vez uma série de complexos Polipiridinicos de rutênio(II) (**Figura 5**) que exibiam atividade biológica e despertaram interesse na busca de agentes terapêuticos e diagnósticos baseados neste metal³⁸.

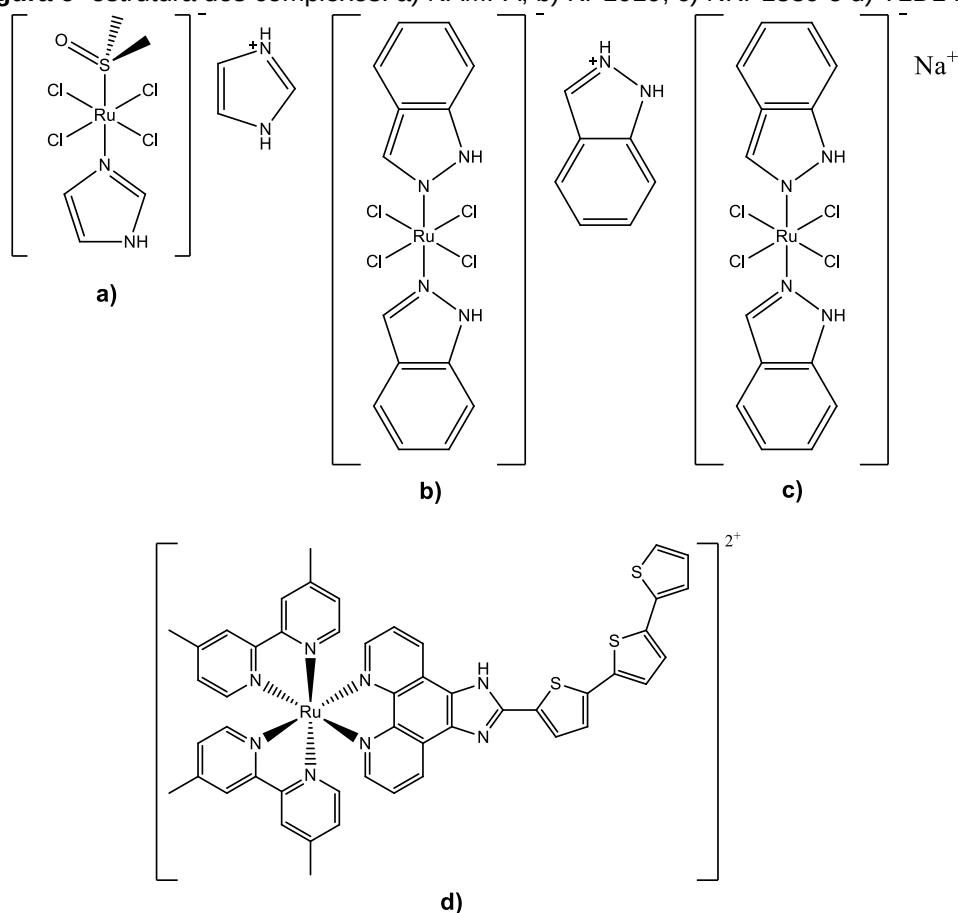
Figura 5- Estrutura dos complexos: a) $[\text{Ru}(\text{terpy})_2]^{2+}$, b) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, c) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.



Fonte: Autor.

O principal foco de pesquisa é a síntese de novos complexos de rutênio (Ru(II) e Ru(III)) como agentes terapêuticos potenciais no tratamento do câncer e a investigação de seu mecanismo de ação ³⁹. Vários agentes anticancerígenos à base de rutênio foram sintetizados até hoje, mas nenhum deles está em uso clínico como fármacos para o tratamento desta patologia. Compostos como NAMI-A ⁴⁰, KP1019 ⁴¹, NKP1339 ⁴² e TLD1443 ⁴³ ganharam entrada em ensaios clínicos além de outros compostos de rutênio que foram relatados relevantes devido as atividades *in vitro* e *in vivo* promissoras (**Figura 6**). Como resultado, complexos biologicamente ativos baseados em rutênio são considerados uma importante área de pesquisa de moléculas anticancerígenas ^{44,45}.

Figura 6- estrutura dos complexos: a) NAMI-A, b) KP1019, c) NKP1339 e d) TLD1443.



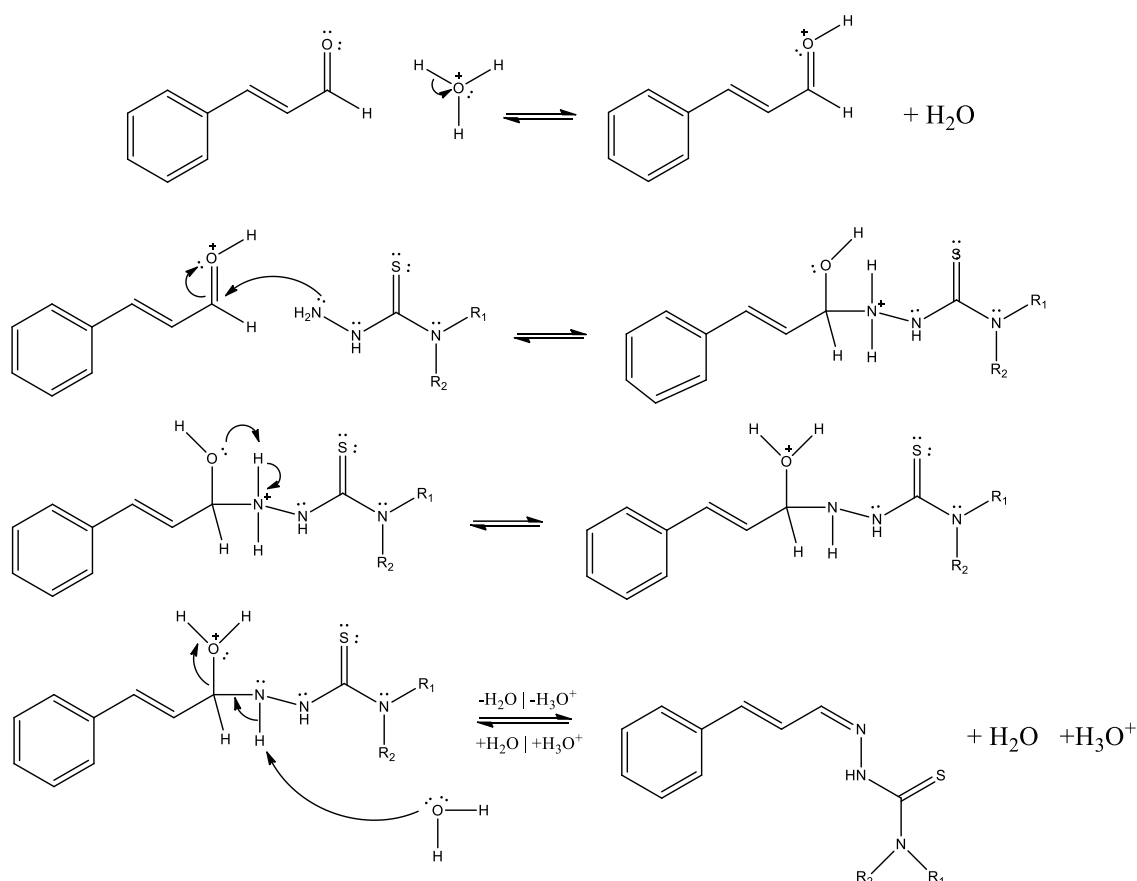
Fonte: Autor.

Apesar das semelhanças estruturais, a NAMI-A e a KP1019 têm mostrado atividades *in vitro* e *in vivo* bastante diferentes. A NAMI-A mostrou atividades anti-angiogênicas e anti-metastáticas em tumores secundários enquanto o KP1019 é ativo para um amplo espectro de tumores primários ^{46,47}. O NKP1339, uma versão de sal de sódio do KP1019, foi inicialmente desenvolvido como precursor do KP1019, mas foi reavaliado como candidato clínico devido a sua maior solubilidade aquosa, permitindo a aplicação clínica de doses mais altas aos pacientes ⁴⁸. O TLD1433 entrou na Fase I e na Fase II de ensaios clínicos para o tratamento do câncer de bexiga em sinergia com a terapia fotodinâmica (PDT) ⁴⁹.

1.5 Tiossemicarbazonas derivadas da vanilina

As tiossemicarbazonas (TSC), geralmente obtidas por condensação de tiosemicarbazidas com aldeídos e cetonas, o mecanismo de reação inicia-se com a protonação em meio ácido do oxigênio da carbonila do aldeído/cetona para formar o intermediário íon oxônio, quem vai sofrer um ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiosemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Posteriormente, este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se a tiossemicarbazona (**Figura 7**)^{50,51}.

Figura 7- Mecanismo de reação para a formação de tiossemicarbazonas.

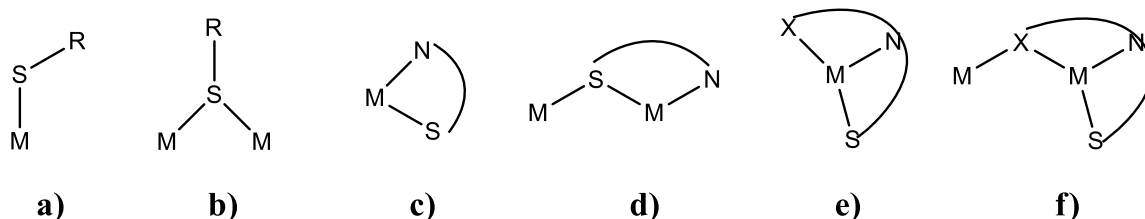


Fonte: Adaptado de Galavotti et. al, 2019.

As tiossemicarbazonas são compostos promissores no tratamento de muitas doenças e seu desenvolvimento continua até hoje^{52,53}. Na literatura, são relatadas propriedades tais como atividade antibacteriana, antiviral, antitumoral, antifúngica e anticonvulsiva^{54–56}. Isto representa uma grande versatilidade farmacológica desses compostos aplicados na síntese de fármacos sintéticos⁵⁷. A presença de grupos imina

e tiocarbamida em sua estrutura torna os ligantes tiossemicarbazona polidentados (ligantes N, S doador) e, devido a estas propriedades, muitos complexos de tiossemicarbazona com diferentes modos de coordenação foram preparados e caracterizados (**Figura 8**)⁵⁸.

Figura 8- Representação dos possíveis tipos de coordenação das tiossemicarbazonas.
a) S- doador, b) S- doador bifurcado, c) N, S- doador, d) N, S- doador S- doador, e) N, S, X- doador, f) N, S, X- doador X- doador.

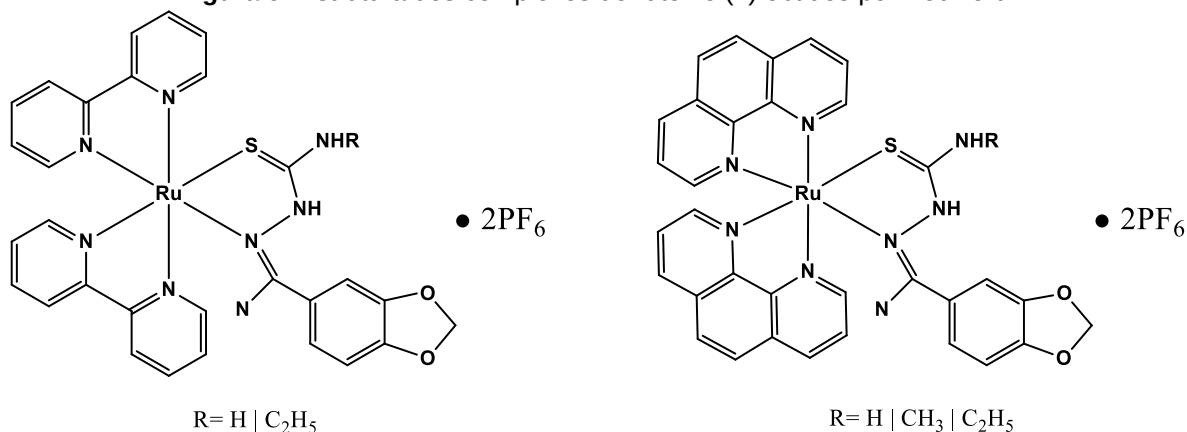


Fonte: Adaptado de Galavotti et. al, 2019.

Alguns desses complexos metálicos contendo tiossemicarbazonas têm demonstrado ter diversas atividades biológicas como anticancerígeno, antitumoral, antibacteriano, antimicrobiano e antifúngico⁵⁹⁻⁶¹.

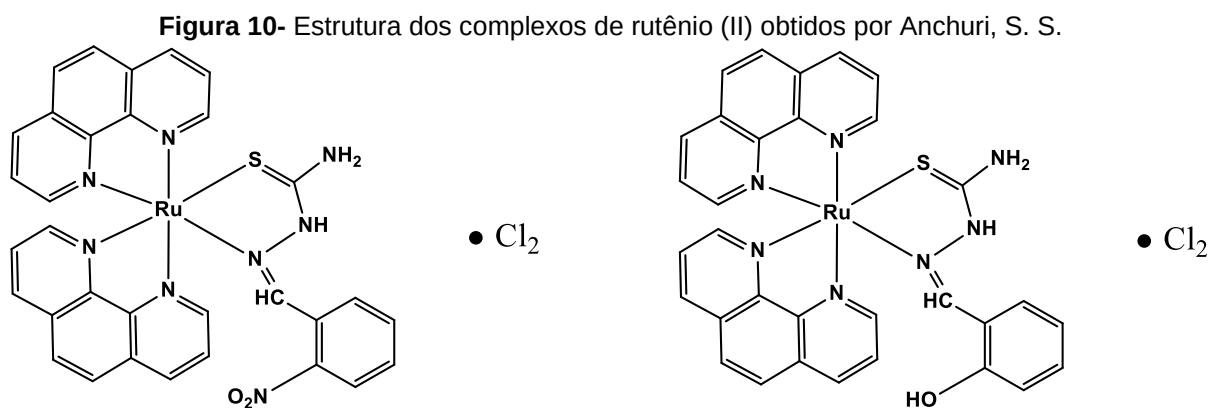
Os complexos de rutênio(II) contendo tiossemicarbazona diimino-piperonal obtidos por Beckford et al. Em 2011 (**Figura 9**) apresentam bons resultados em testes *in vitro* contra as células humanas de câncer de cólon Caco-2 e HCT-116 além de ter seletividade citotóxica para as células cancerígenas. Os valores de IC₅₀ para estes complexos variam de 7 a 159 µM após 72 h de incubação do medicamento⁶².

Figura 9- Estrutura dos complexos de rutênio (II) obtidos por Beckford.



Fonte: Autor.

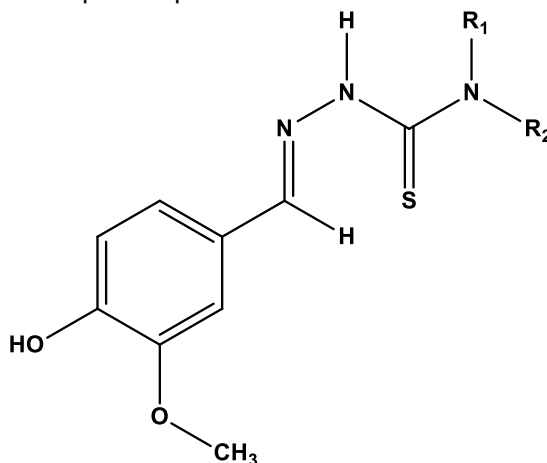
Por outro lado, em 2012 Anchuri, S. S. e colaboradores avaliaram as propriedades anticancerígenas *in vivo* dos compostos de rutênio Ru(1,10-fenantrolina) 2(2-nitrofenil tiossemicarbazona)Cl₂ e Ru(1, 10-fenantrolina) 2(2-hidroxifenil tiossemicarbazona)Cl₂ (**Figura 10**) em ratos com carcinoma de ascite Ehrlich (EAC).



Os compostos foram testados em doses de 2 e 4 mg/kg de peso corporal mostrando uma atividade biológica promissora, especialmente na diminuição do volume de tumores, na contagem de células ascíticas viáveis e no peso corporal, prolongando assim a vida útil (% ILS) e o tempo médio de sobrevivência (MST) dos ratos portadores de tumores ⁶³.

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um composto orgânico usado amplamente em indústrias tais como a alimentícia, de bebidas e farmacêutica ⁶⁴. Estudos demonstraram que a vanilina apresenta uma atividade anticancerígena interessante tendo um efeito inibidor de crescimento celular, anti-metástico e indutor de apoptose⁶⁵. Por outro lado, a vanilina tiossemicarbazona (**Figura 11**) demonstrou propriedades farmacológicas de grande potencial, como ação antibacteriana, antiviral e antitumoral. Tornando-os, assim, um composto de grande interesse para os pesquisadores ⁶⁶.

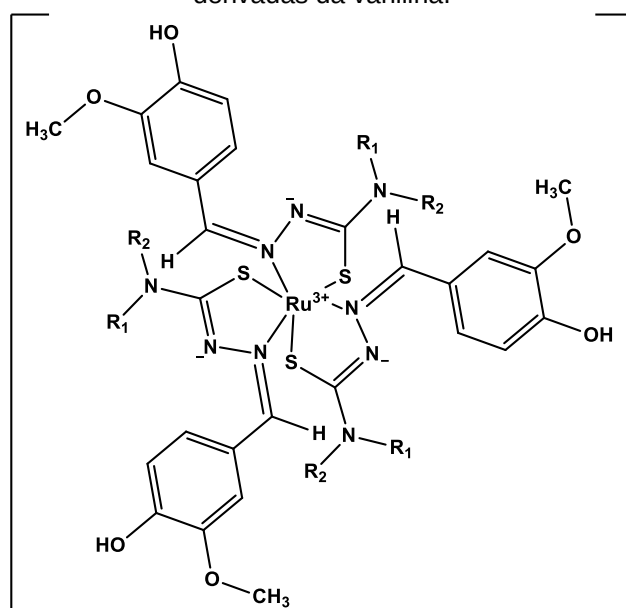
Figura 11- Estrutura química para tiossemicarbazonas derivados de vanilina.



Fonte: Autor.

Dentro destas propriedades, é sua atividade anticâncer a mais explorada. O mecanismo antitumoral atua na inibição da síntese do DNA através de processos envolvendo complexos e / ou enzimas associadas ao desenvolvimento de células cancerosas e geração de espécies reativas de oxigênio além de uma interessante capacidade de aumento do número de macrófago⁵⁴. Neste projeto, propomos sintetizar e caracterizar complexos de rutênio do tipo $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$ (**Figura 12**) contendo tiossemicarbazonas derivadas da vanilina para posteriormente avaliar sua atividade biológica.

Figura 12- Estrutura proposta para os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$ contendo tiossemicarbazonas derivadas da vanilina.



Fonte: Autor.

2 Objetivos

Sintetizar, caracterizar e estudar o potencial biológico de complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar os ligantes tiosemicarbazona e caracterizar mediante espectroscopia na região do ultravioleta-visível e na região do infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).
- Sintetizar e caracterizar o complexo $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$ mediante análise elementar de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio, espectroscopia na região do ultravioleta-visível e na região do infravermelho, ressonância paramagnética de elétrons (RPE) e espectrometria de massas com ionização por eletronspray.
- Estudar a interação entre os complexos e o DNA.

3 Procedimento experimental

3.1 Consumíveis

- Água destilada.
- Cloreto de rutênio hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) – Marca: Sigma-Aldrich.
- Ácido clorídrico - Marca: Merck.
- Vanilina – Marca: Sigma-Aldrich.
- Tiosemicarbazida – Marca: Sigma-Aldrich.
- 4-Metil-3-Tiosemicarbazina - Marca: Sigma-Aldrich.
- 4-Etil-3-Tiosemicarbazina - Marca: Sigma-Aldrich.
- 4-Fenil-3-Tiosemicarbazina - Marca: Sigma-Aldrich.
- Etanol - Marca: NEON Comercial LTDA.
- Acetona – Marca: NEON Comercial LTDA.
- Cloreto de sódio – Marca: Sigma-Aldrich.

3.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific, resolução de 2 cm^{-1} , na região de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, com 32 scans de background e leitura da amostra com 32 scans, utilizando-se de pastilhas de KBr. Espectros registrados no software Ominic.
- Espectrofotômetro de absorção na região do UV /Vis / NIR com esfera integradora, Lambda 1050 da Perkin Elmer com faixa de leitura de 200 a 800 nm;
- Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP AB Sciex. As amostras foram analisadas em MeOH. Ionização por eletrospray (ESI), modo positivo, voltagem do conjunto do capilar em 5500 v, circuito de gás / pressão do nebulizador a 12 psi e energia de colisão de 25 v;
- Espectrômetro RMN Bruker Avance III HD 600 (14,1 T) equipado com criossonda de 5 mm com detecção inversa;
- Espectrômetro de EPR Bruker EMX Plus banda X com frequência de 9,77 GHz, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 4G, potência

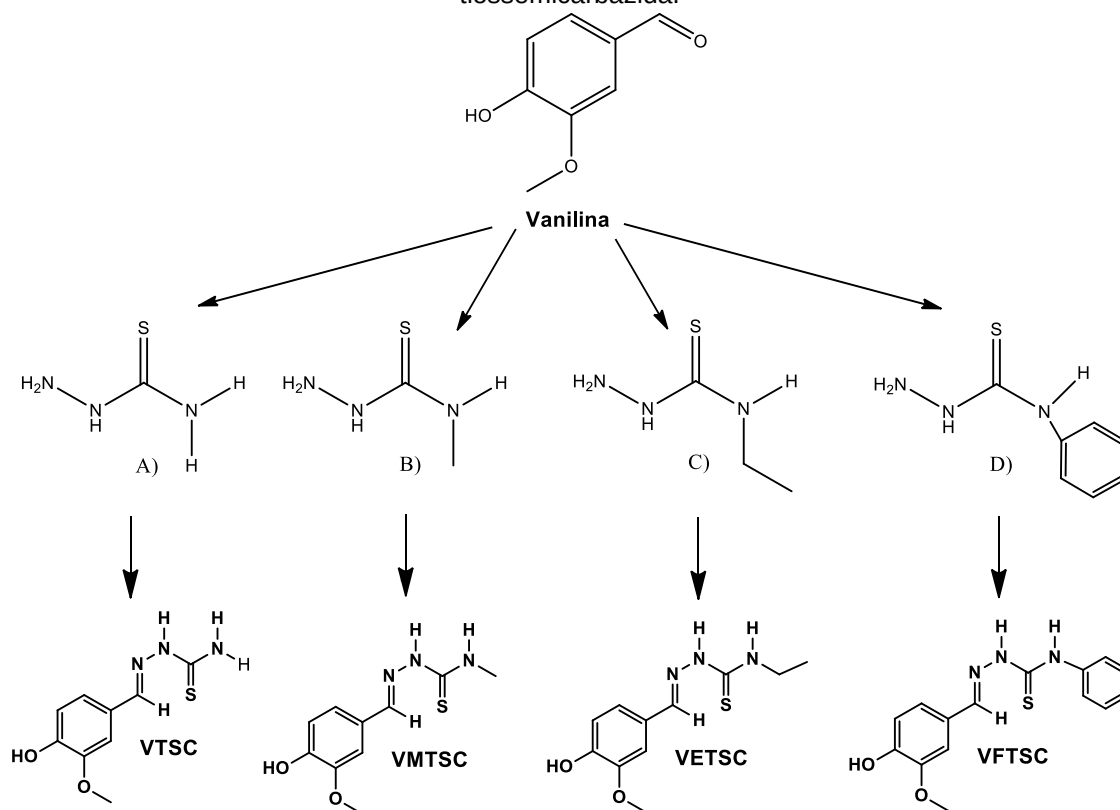
de microondas de 6,33 mW, constante de tempo de 81,92 ms e número de scans igual a 8.

- Analisador automático dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio da Perkin-Elmer, modelo 240, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP - São Paulo.
- Espectropolarímetro J-815 da JASCO com o Peltier a 25°C.

3.3 Síntese dos ligantes tiossemicarbazona (TSC)

Em um balão de fundo redondo contendo 20 ml de etanol foi dissolvido uma quantidade equimolar de vanilina e a tiossemicarbazida correspondente (**Figura 13**). A solução foi mantida agitada a 60 °C até à solubilização parcial ou completa dos reagentes. Depois, o ácido clorídrico diluído (pH entre 4-5) foi adicionado ao meio de reação ^{50,51}. A solução resultante foi mantida em refluxo com agitação e aquecimento durante 5 horas. No final do período, o aquecimento foi interrompido e o frasco foi lentamente esfriado à temperatura ambiente, obtendo-se a formação de cristais. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com água e seco no dessecador para posterior análise das amostras.

Figura 13- Estruturas químicas da vanilina, tiossemicarbazidas y tiossemicarbazona formadas.
A) Tiossemicarbazida, B) 4-metil-3-tiossemicarbazida, C) 4-etil-3-tiossemicarbazida D) 4-Fenil-3-tiossemicarbazida.



Fonte: Autor.

3.4 Síntese do complexo [Ru(TSC)₃]

Num balão de fundo redondo, com agitação magnética, temperatura, pressão e atmosfera ambientes, foram dissolvidos 100 mg de cloreto de rutênio ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) em acetona. Em paralelo, 300 mg da TSC correspondente foram dissolvidos em acetona e adicionados no balão. Esta solução foi mantida em refluxo com agitação e aquecimento durante 3 horas para posteriormente deixar reduzir o volume. Posteriormente, 80 mL de uma solução 0,1 M de cloreto de sódio foram adicionados para precipitar o complexo final. O complexo obtido foi filtrado, lavado com água e éter etílico e armazenado no dessecador para posterior análise ⁶⁷.

3.5 Métodos Instrumentais

Os compostos obtidos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (espectroscopia na região do ultravioleta-visível e na região do infravermelho), por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas com ionização por electrospray, assim como análise elementar e ressonância paramagnética de elétrons (RPE).

3.5.1 Espectroscopia vibracional no Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific, resolução de 2 cm^{-1} , na região de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, com 32 scans de background e leitura da amostra com 32 scans, utilizando-se de pastilhas de KBr. Espectros registrados no software Ominic.

3.5.2 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os espectros eletrônicos foram obtidos no espectrômetro Thermo Scientific Evolution Array UV-Vis, com varredura de 190 a 1100 nm, 10 scans por amostra em células de 1 cm. Os espectros foram adquiridos no software Vision Collect.

3.5.3 Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram registrados nos Espectrômetros multinuclear Bruker, modelos Fourier 300 (7,0 T, Sonda: Easy Probe Dul 300MHz S1 5mm z Gradient) Avance III 600 HD (14,1 T, Sonda: Triple Inverse TCI Cryo-probehead), localizados no IQ-UNESP de Araraquara.

Utilizou-se acetona- d_6 para dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos foram referenciados pelos solventes. O Software utilizado para aquisição foi o TopSpin v.3.2.

3.5.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos através do espectrômetro modelo 3200 QTRAP LC/MS/MS contendo analisador híbrido triplo quadrupolo/armadilha de íons linear (LIT), pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP - São Paulo. A análise foi realizada por infusão direta MS/MS utilizando-se DMSO padrão LC-MS para as tiossemicarbazonas e MeOH padrão LC-MS para os complexos como solvente no modo positivo de ionização por electrospray. Parâmetros: IonSpray (IS): 5000 V, DP: 20V, EP: 10V. Experimentos: varredura de íons (200 – 1000) e enhanced resolution (ER). As amostras foram preparadas dissolvendo-se 1mg de analito e posteriormente diluído a concentrações adequadas para o experimento.

3.5.5 Análise elementar

As análises quantitativas dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram efetuadas no analisador automático da Perkin-Elmer, modelo 240, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP - São Paulo.

3.5.6 Ressonância paramagnética de elétrons (RPE)

Os espectros de ressonância paramagnética de elétrons (RPE) foram registrados no espectrômetro de EPR Bruker EMX Plus banda X com frequência de 9,77 GHz, temperatura de 77 K, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 4G, potência de microondas de 1,26 mW, constante de tempo de 81,92 ms e número de scans igual a 8, localizados no IQ;USP, São Carlos.

3.6 Ensaios biológicos

3.6.1 Titulação Espectrofotométrica com DNA

Para a medida de absorção da interação entre os complexos e o DNA foi usado como branco uma solução contendo 2940 μL de tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,3) e 60 μL de DMSO. Posteriormente, se realizou a leitura do espectro de absorção do complexo metálico solubilizado em DMSO com concentração final fixa em $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em função da adição de *ct*-DNA ($0 - 6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). As medidas foram obtidas por meio do espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific's Evolution Array UV-Visible de feixe único.

3.6.2 Dicroísmo Circular

O *ct*-DNA foi solubilizado em tampão tris-HCl (tris-HCl 5mM e NaCl 50mM, pH 7,3) junto com concentrações crescentes do complexo metálico ($0 - 19,6 \mu\text{M}$) para posteriormente ser incubado durante 24h a 37°C . Em seguida, as medidas de dicroísmo circular foram realizadas usando um espectropolarímetro J-815 da JASCO com o Peltier a 25°C .

3.6.3 Ensaio de Competição com Hoechst 33258 e Laranja de Tiazol

Mediante o espectropolarímetro J-815 da JASCO e junto ao módulo de Peltier, foi realizada a medida de fluorescência a 25°C de um sistema contendo *ct*-DNA, com concentração fixa de $60 \mu\text{M}$, e Laranja de Tiazol ou Hoechst 33258 ($6,0 \mu\text{M}$), na ausência e na presença do complexo metálico ($0 - 60 \mu\text{M}$). Para as medidas usando Hoechst 33258, utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 350 nm, enquanto para o Laranja de Tiazol, o comprimento de onda usado foi de 480 nm. A faixa de leitura compreendeu de 358-660 nm e 500-680 nm respectivamente.

3.6.4 Ensaio de Viabilidade Celular

A determinação da atividade citotóxica dos compostos, foram determinados nas linhagens celulares MRC-5 e MDA-MB-231, por meio do método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

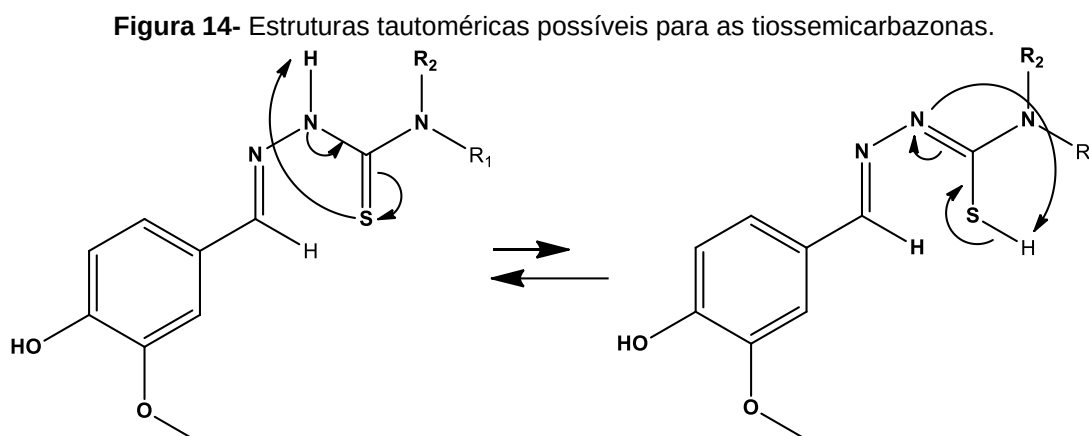
As células MRC-5 e MDA-MB-231, foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, em 150 μL de meio suplementado. Após 24 h de incubação (5% de CO_2 à 37 °C), as células foram tratadas com 0,75 μL das soluções estoque do composto em DMSO, sendo empregadas oito concentrações dos compostos (100; 50; 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6 e 0,8) μM . As placas foram novamente mantidas na incubadora (5% de CO_2 a 37 °C) por 48 h. Posteriormente, adicionaram-se 50 μL de uma solução de MTT (1 mg/mL) em cada poço, a qual foi mantida em incubação por 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente descartada e foram adicionados 100 μL de isopropanol por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio do leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. A viabilidade celular foi obtida através do seguinte cálculo: (Médiada da absorbância dos compostos/ média dos controles) x 100 ⁶⁸.

4 Resultados e discussão

4.1 Ligantes tiossemicarbazona (TSC)

4.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes tiossemicarbazona sintetizados (**Figura 14**), apresentaram absorções no intervalo de 3157 a 3527 cm^{-1} que correspondem à presença de estiramento NH. Também, se tem absorções em torno de 1500 cm^{-1} que sugerem a presença de tiomida I ($\delta \text{NH} + \delta \text{CH} + (\nu \text{C}=\text{N})$)⁶⁹. Na região de 2600 a 2500 cm^{-1} se observa a ausência de bandas o que indica que o estiramento da forma tiol ($\nu \text{S-H}$) é menos favorecido que ao da forma ($\nu \text{C}=\text{S}$), sendo ambas as formas tautoméricas para as tiossemicarbazonas (**Figura 14**)⁷⁰.



Fonte: Galavotti et. al, 2019.

As absorções entre 1475 - 1600 cm^{-1} sugerem a presença de C=C de aromáticos⁷¹. Entre 1200 - 1300 cm^{-1} as bandas sugerem a presença de tioamida II ($\delta \text{NH} + \delta \text{CH} + (\nu \text{C}=\text{N}) + (\nu \text{C}=\text{S})$)⁶⁹. Em torno de 1000 cm^{-1} corresponde ao grupo tioamida III ($(\nu \text{C}=\text{N}) + (\nu \text{C}=\text{S})$) e na faixa de 700 - 850 o grupo tioamida IV ($\nu \text{C}=\text{S}$)⁶⁹. Absorções encontradas entre 1100 - 1300 cm^{-1} pertencem ao estiramento do grupo C-O, que pode estar sobreposto às absorções do grupo tioamida⁷⁰. Na **Tabela 1** encontram-se as principais atribuições dadas a cada ligante.

Figura 15- Espectro infravermelho dos ligantes tiossemicarbazona sintetizados.

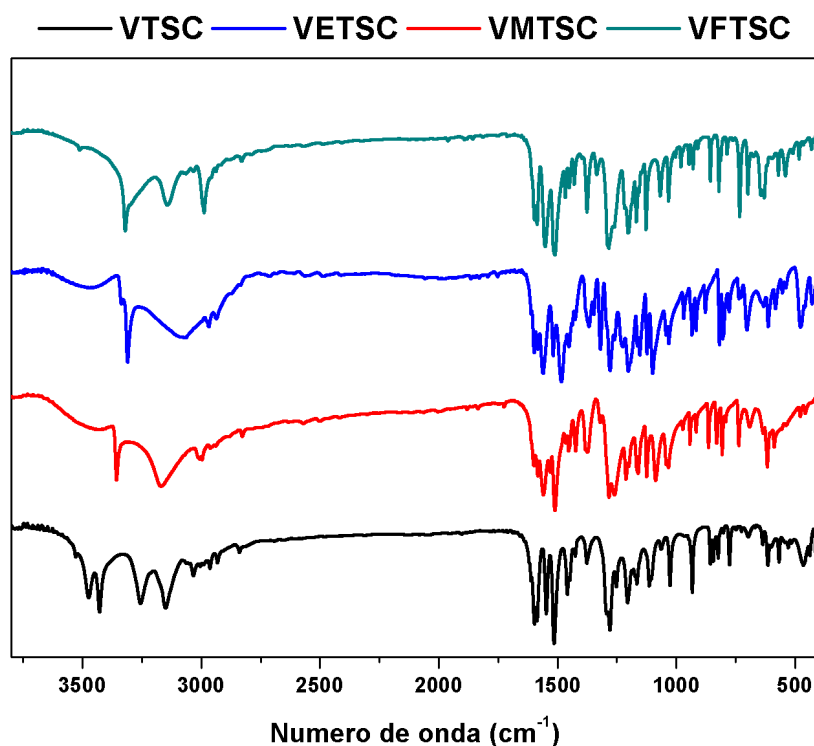


Tabela 1- Principais atribuições na espectroscopia na região do Infravermelho para os ligantes tiossemicarbazona sintetizados.

Ligante	Número de onda (cm ⁻¹)				
	ν (NH)	Tioamida I	Tioamida II	Tioamida III	Tioamida IV
VTSC	3527,06	1544,77; 1514,11	1275,73	1029,05	836,86; 815,13
VMTSC	3358,56	1556,48; 1531,73	1282,39	1033,41	829,29; 807,46
VETSC	3309,96	1557,68; 1517,61	1277,14	1031,72	818,91; 802,80
VFTSC	3318,98	1549,48; 1508,20	1283,31	1032,61	856,75; 819,78

Fonte: Adaptado de ⁷².

4.1.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta

Para os espectros de absorção UV obtidos dos ligantes tiossemicarbazona sintetizados (**Figura 16 a 19**) foram observadas bandas de absorção na faixa de 328 a 335 nm. Estas bandas são atribuídas às transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e/ou $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo Tioamida ⁷³. As bandas na região de 293 a 304 nm foram atribuídas às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo $C=N$ ⁷¹. Na faixa de 260 a 360 nm encontram-se as transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ dos cromóforos $C=N$ enquanto que em torno de 230 nm foi observado a excitação eletrônica dos anéis aromáticos ^{71,74}. Na **Tabela 2** encontram-se as principais absorções dadas a cada ligante.

Figura 16- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VTSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm.

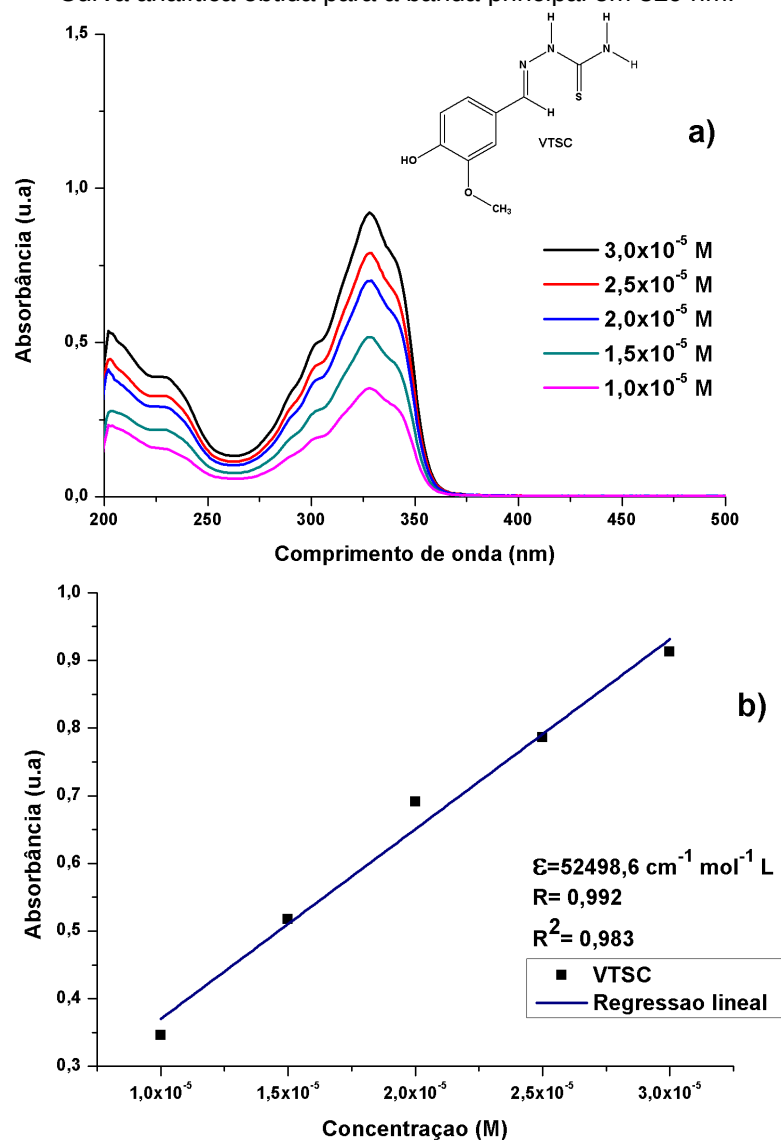


Figura 17- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VMTSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 329 nm.

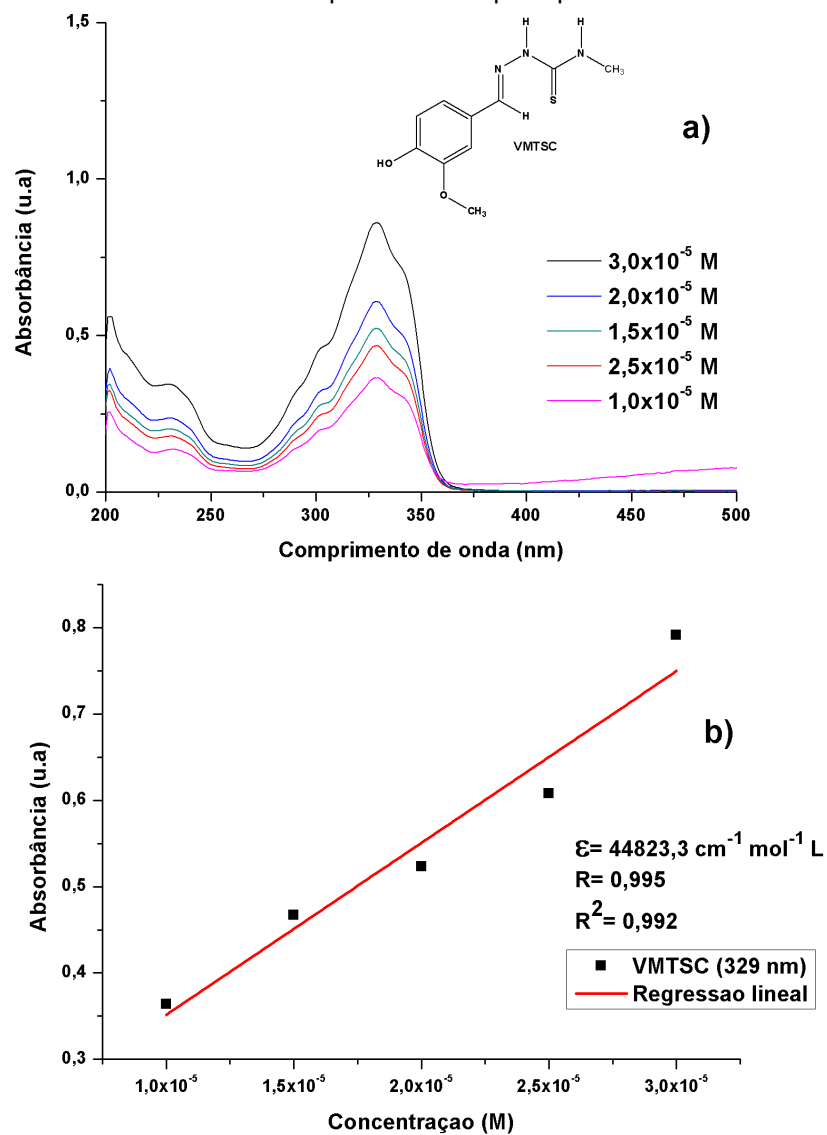


Figura 18- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VETSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 330 nm.

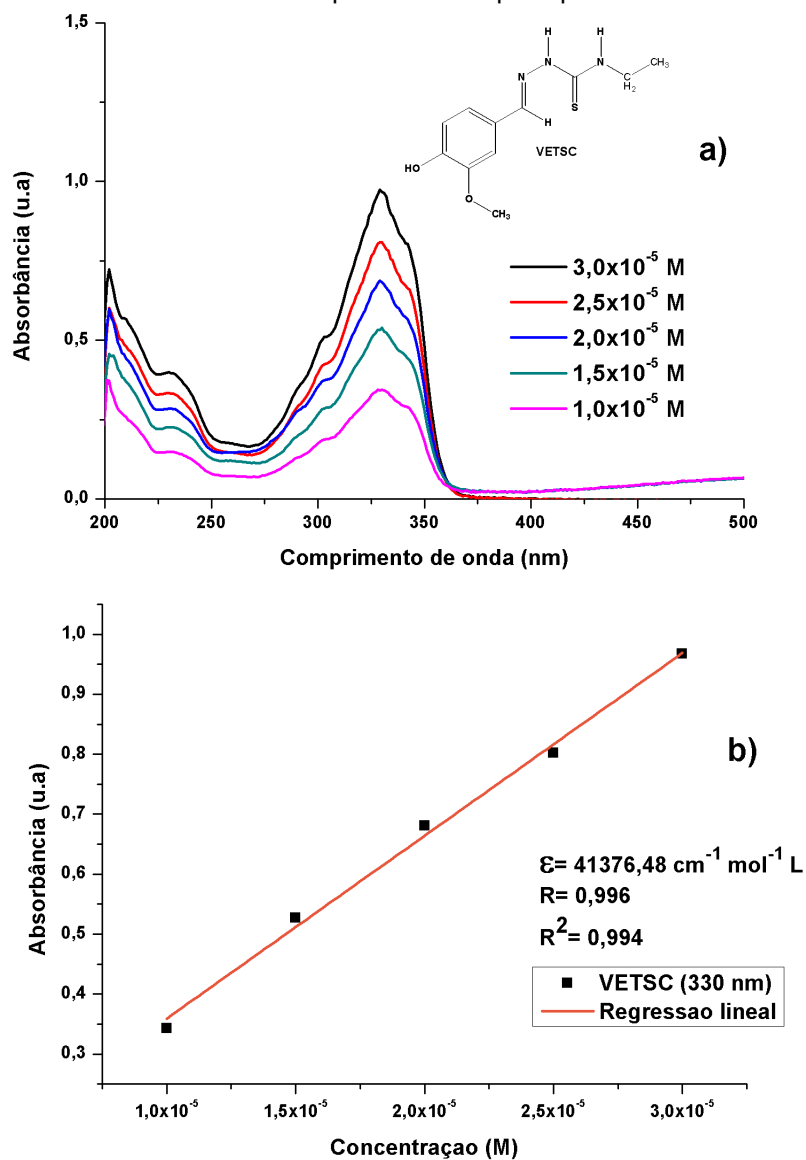


Figura 19- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do ligante VFTSC em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 336 nm.

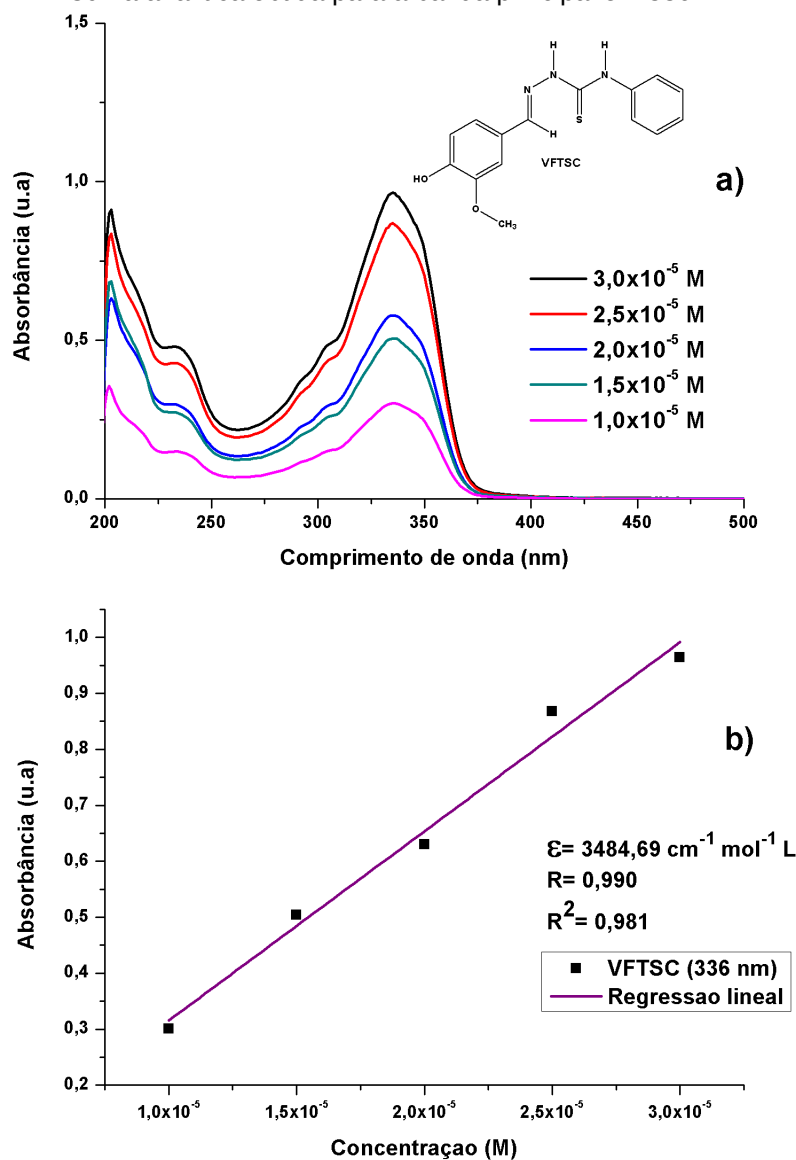


Tabela 2- Valores de absorção e absortividade molar em UV-Vis para os ligantes tiossemicarbazona sintetizados.

Ligante	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{ L}$)
VTSC	341, 329, 302, 290, 230	52498,6 (329 nm)
VMTSC	343, 329, 301, 288, 234	44823,3 (329 nm)
VETSC	342, 330, 301, 289, 231	41376,5 (330 nm)
VFTSC	336, 304, 291, 238	33484,7 (336 nm)

4.1.3 Ressonância magnética nuclear

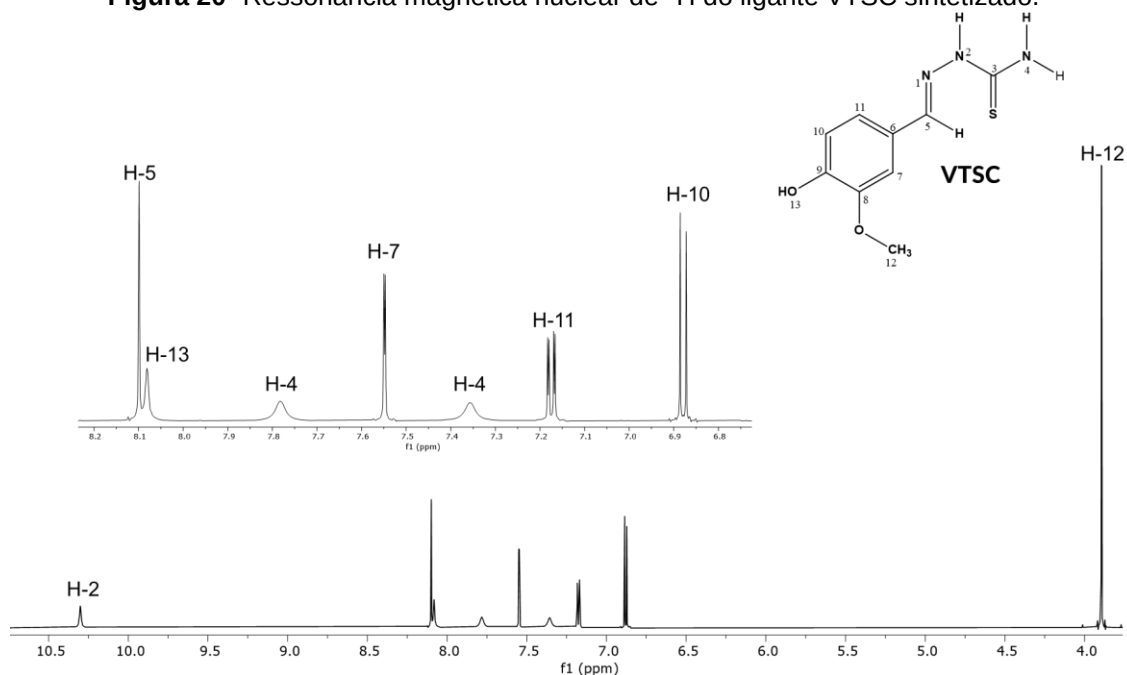
O espectro de RMN de ^1H obtido para o ligante VTSC (**Figura 20**) apresenta os sinais esperados de acordo com a estrutura proposta. Na região de maior deslocamento obtemos um singlete em δ 10,30 que corresponde ao hidrogênio da ligação NH número 2. Depois temos dois sinais em δ 8,10 e 8,09 às ligações CH=N e O-H respectivamente. Para os hidrogênios da ligação NH_2 número 4 obtemos dois simpletos em δ 7,78 e 7,35 em lugar de um, este fenômeno é devido à conformação da molécula e a rotação da ligação ⁵⁰. Na região dos hidrogênios aromáticos, observamos um duplete em δ 6,87 com constante de acoplamento equivalente a 8,1 Hz, um duplo duplete em δ 7,17 ($J = 8,1$ e $1,8$ Hz) e um duplete em δ 7,54 com $J = 2,0$ Hz. Por último, um simpleto em δ 3,89 correspondente aos hidrogênios presentes na ligação O- CH_3 .

Tabela 3- Dados de RMN 1D de VTSC.

Nº átomo	VTSC	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, Nº H, Mult, J (Hz)	δ_{C}
1	-	-
2	-	-
3	-	179,37
4	10,30	-
5	8,10 (1H; s)	143,00
6	-	148,96
7	7,54 (1H; d ; 2,0)	108,90
8	-	147,95
9	-	126,27
10	6,87 (1H; d ; 8,1)	114,96
11	7,17 (1H; dd ; 1,8 e 8,1)	122,49
12	3,89 (3H; s)	55,46

13	8,09 (1H; 1s)	-
----	---------------	---

Figura 20- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VTSC sintetizado.



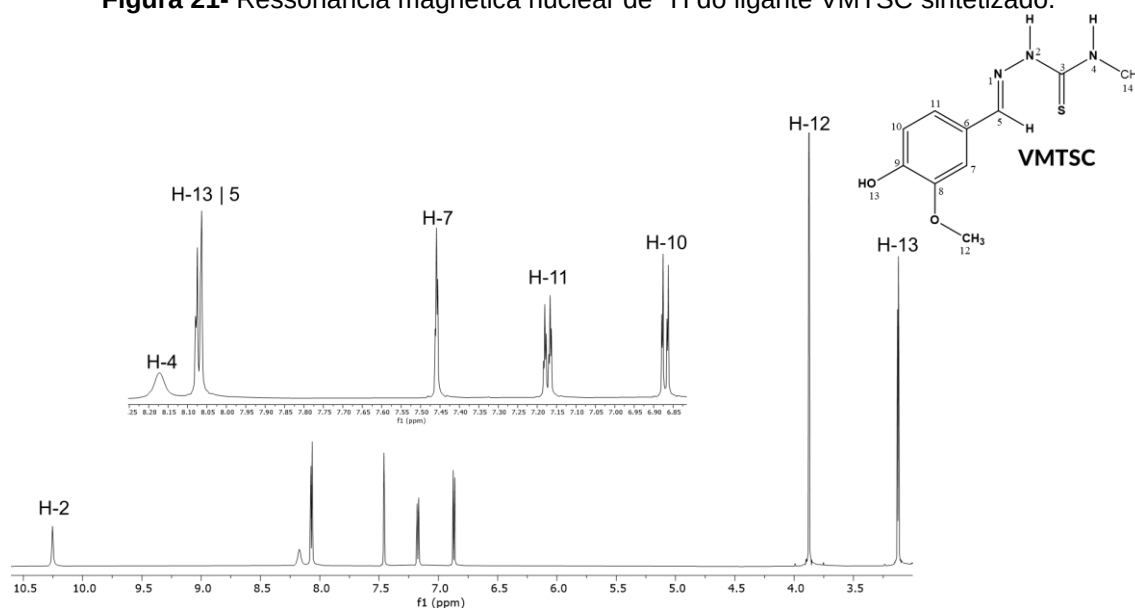
Para o ligante VMTSC, o espectro de RMN de ^1H (**Figura 21**) na região de maior deslocamento obtemos um singlete em δ 10,25 que corresponde ao hidrogênio da ligação NH número 2. Depois temos três sinais em δ 8,17, 8,07 e 8,06 atribuídos às ligações NH número 4, CH=N e O-H, respectivamente. Na região dos hidrogênios aromáticos, observamos um duplete em δ 6,87 com constante de acoplamento equivalente a 8,1 Hz, um duplo duplete em δ 7,13 ($J = 8,1$ e 1,7 Hz) e um duplete em δ 7,45 com $J = 1,9$ Hz. Por último, um simpleto em δ 3,85 correspondente aos hidrogênios presentes na ligação O-CH₃ enquanto que para a metila número 14 temos um duplete em δ 3,12.

Tabela 4- Dados de RMN 1D de VMTSC.

Nº átomo	VMTSC	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, Nº H, Mult, J (Hz)	δ_{C}
1	-	-
2	10,25	-
3	-	178,93

4	8,17	-
5	8,07 (1H; s)	142,24
6	-	148,83
7	7,45 (1H; d; 1,9)	109,25
8	-	147,96
9	-	126,40
10	6,87 (1H; d; 8,1)	115,10
11	7,13 (1H; dd; 1,7 e 8,1)	122,18
12	3,85 (3H; s)	55,57
13	8,06 (1H; 1s)	-
14	3,12 (3H; d; 4,6)	30,34

Figura 21- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VMTSC sintetizado.



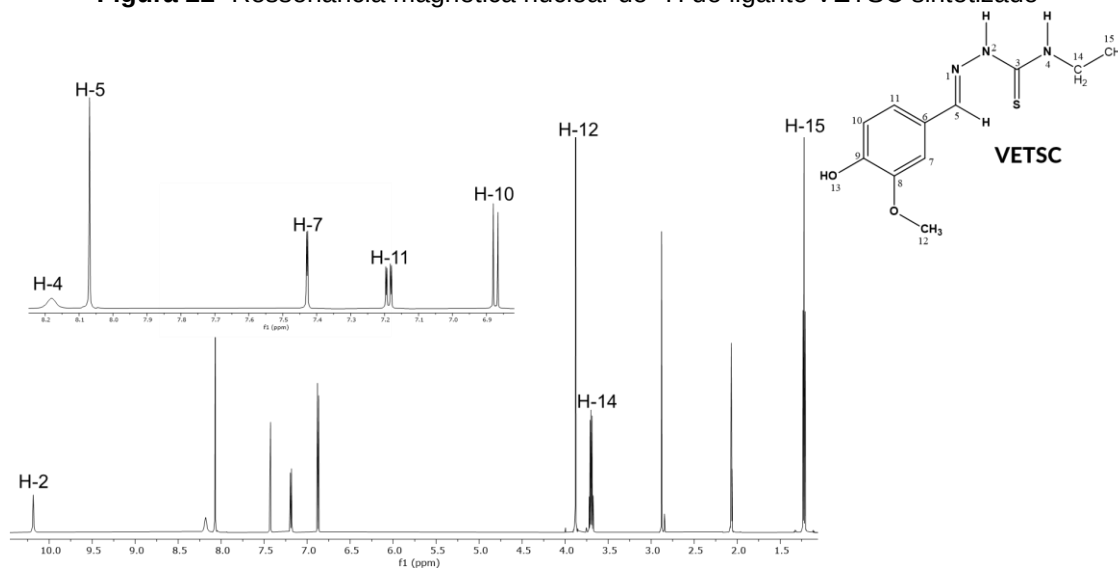
Por outro lado, para o ligante VETSC, o espectro de RMN de ^1H (**Figura 22**) na região de maior deslocamento obtemos um singlete em δ 10,18 que corresponde ao hidrogênio da ligação NH número 2. Depois temos dois sinais em δ 8,18 e 8,06 atribuídos às ligações NH número 4 e $\text{CH}=\text{N}$, respectivamente. Na região dos hidrogênios aromáticos, observamos um duplete em δ 6,87 com constante de

acoplamento equivalente a 8,2 Hz, um duplo duplete em δ 7,18 ($J = 8,1$ e $1,9$ Hz) e um duplete em δ 7,42 com $J = 1,9$ Hz. Para a ligação O-CH₃ temos um simpleto em δ 3,87. Por último, temos um quintupeto em δ 3,69 e um triplete em δ 1,22 que correspondem aos hidrogênios metilênicos e metílicos, respectivamente.

Tabela 5- Dados de RMN 1D de VETSC.

Nº átomo	VETSC	
	δ_H^a , Nº H, Mult, J (Hz)	δ_C
1	-	-
2	10,18	-
3	-	177,89
4	8,18	-
5	8,06 (1H; s)	142,34
6	-	148,82
7	7,42 (1H; d ; 1,9)	109,37
8	-	147,92
9	-	126,34
10	6,87 (1H; d ; 8,2)	115,03
11	7,18 (1H; dd ; 1,9 e 8,2)	122,02
12	3,87 (3H; s)	55,42
13	-	-
14	3,69 (2H; qd ; 5,9 e 7,1)	38,61
15	1,22 (3H; t ; 7,1 e 5,9Hz)	14,03

Figura 22- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VETSC sintetizado



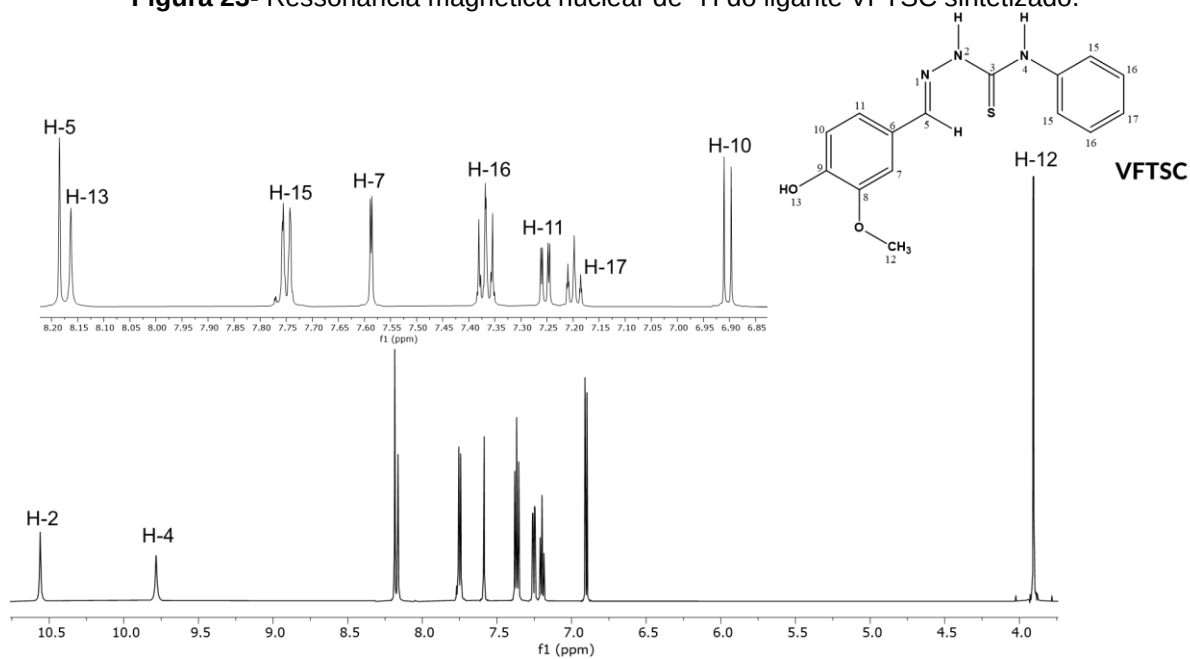
O espectro de RMN de ^1H de VFTSC (**Figura 23**) na região de maior deslocamento obtemos dois singlete em δ 10,55 e 9,78 que correspondem ao hidrogênio da ligação NH número 2 e 4, respectivamente. Depois temos dois sinais em δ 8,18 e 8,16 atribuídos às ligações $\text{CH}=\text{N}$ e $\text{O}-\text{H}$, respectivamente. Na região dos hidrogênios aromáticos, observamos que para o anel principal temos um duplete em δ 6,90 com constante de acoplamento equivalente a 8,2 Hz, um duplo duplete em δ 7,25 ($J = 8,2$ e 1,9 Hz) e um duplete em δ 7,58 com $J = 1,9$ Hz. Além disto, para o anel do radical obtemos um sinal de duplete em δ 7,75 para o H-15, um triplo tripleto em δ 7,36 para o H-16 e um triplo tripleto em δ 7,19 para o H-17. Por último, para a ligação $\text{O}-\text{CH}_3$ temos um simpleto em δ 3,90.

Tabela 6- Dados de RMN 1D de VFTSC.

Nº átomo	VFTSC	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, Nº H, Mult, J (Hz)	δ_{C}
1	-	-
2	10,55	-
3	-	176,25

4	9,78	-
5	8,18 (1H; s)	143,28
6	-	149,29
7	7,58 (1H; <i>d</i> ; 1,9)	109,36
8	-	148,03
9	-	126,04
10	6,90 (1H; <i>d</i> ; 8,2)	115,00
11	7,25 (1H; <i>dd</i> ; 1,9 e 8,2)	122,61
12	3,90 (3H; s)	55,55
13	8,16 (1H; 1s)	-
14	-	139,29
15	7,75 (1H; <i>d</i>)	124,59
16	7,36 (1H; <i>tt</i>)	128,05
17	7,19 (1H; <i>tt</i>)	124,69

Figura 23- Ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante VFTSC sintetizado.

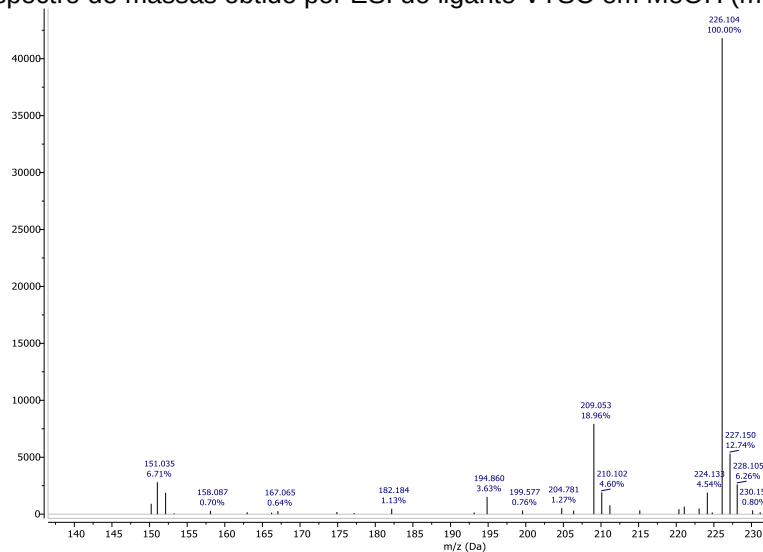


4.1.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massa para as moléculas protonadas dos ligantes tiossemicarbazona realizados em MeOH e modo positivo, indicou uma relação m/z compatível com a fórmula molecular de cada um dos compostos.

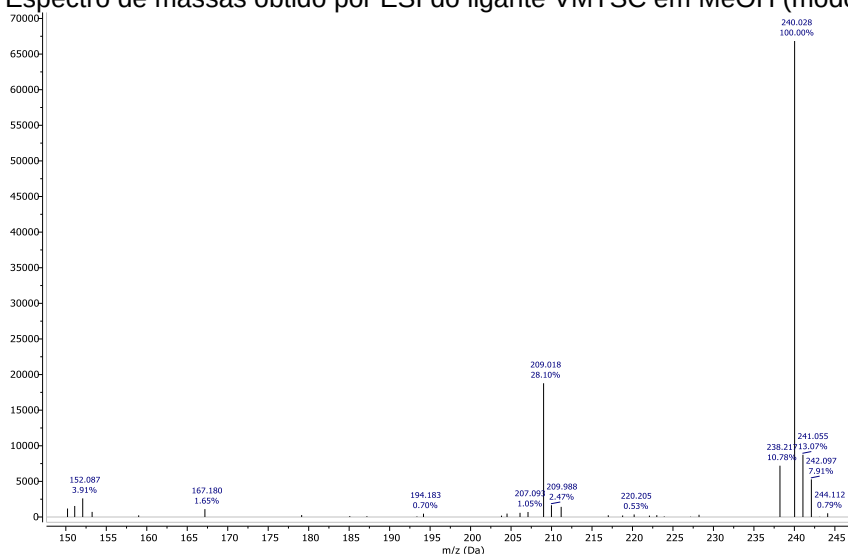
Para o ligante VTSC se obteve um espectro de massas que indicou uma m/z de 226,1 (**Figura 24**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_9H_{11}O_2N_3S$.

Figura 24- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VTSC em MeOH (modo positivo).



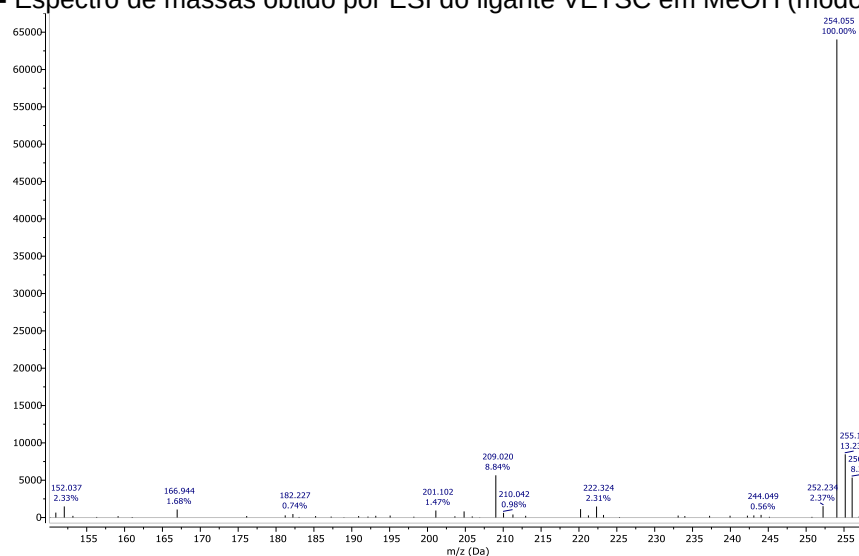
Para o ligante VMTSC se obteve um espectro de massas que indicou uma m/z de 240,0 (**Figura 25**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{13}O_2N_3S$.

Figura 25- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VMTSC em MeOH (modo positivo).



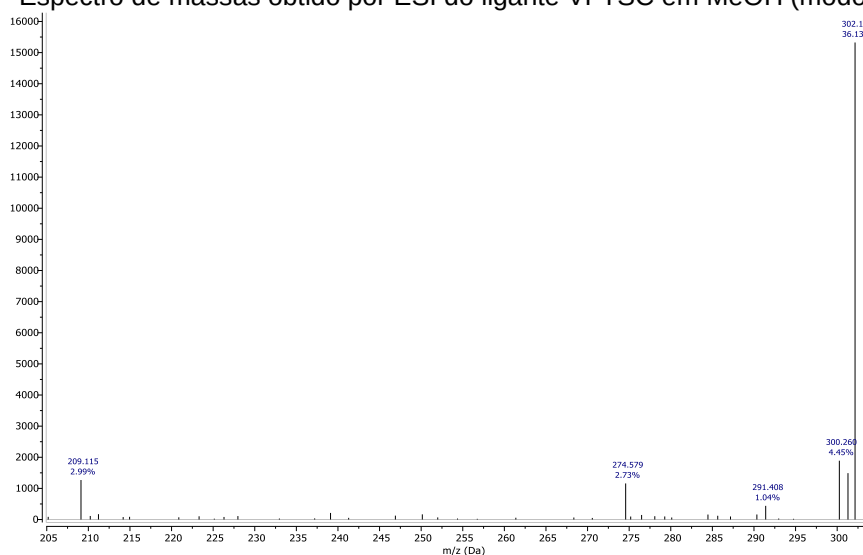
Para o ligante VETSC se obteve um espectro de massas que indicou uma m/z de 254,0 (**Figura 26**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_{15}O_2N_3S$.

Figura 26- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VETSC em MeOH (modo positivo).



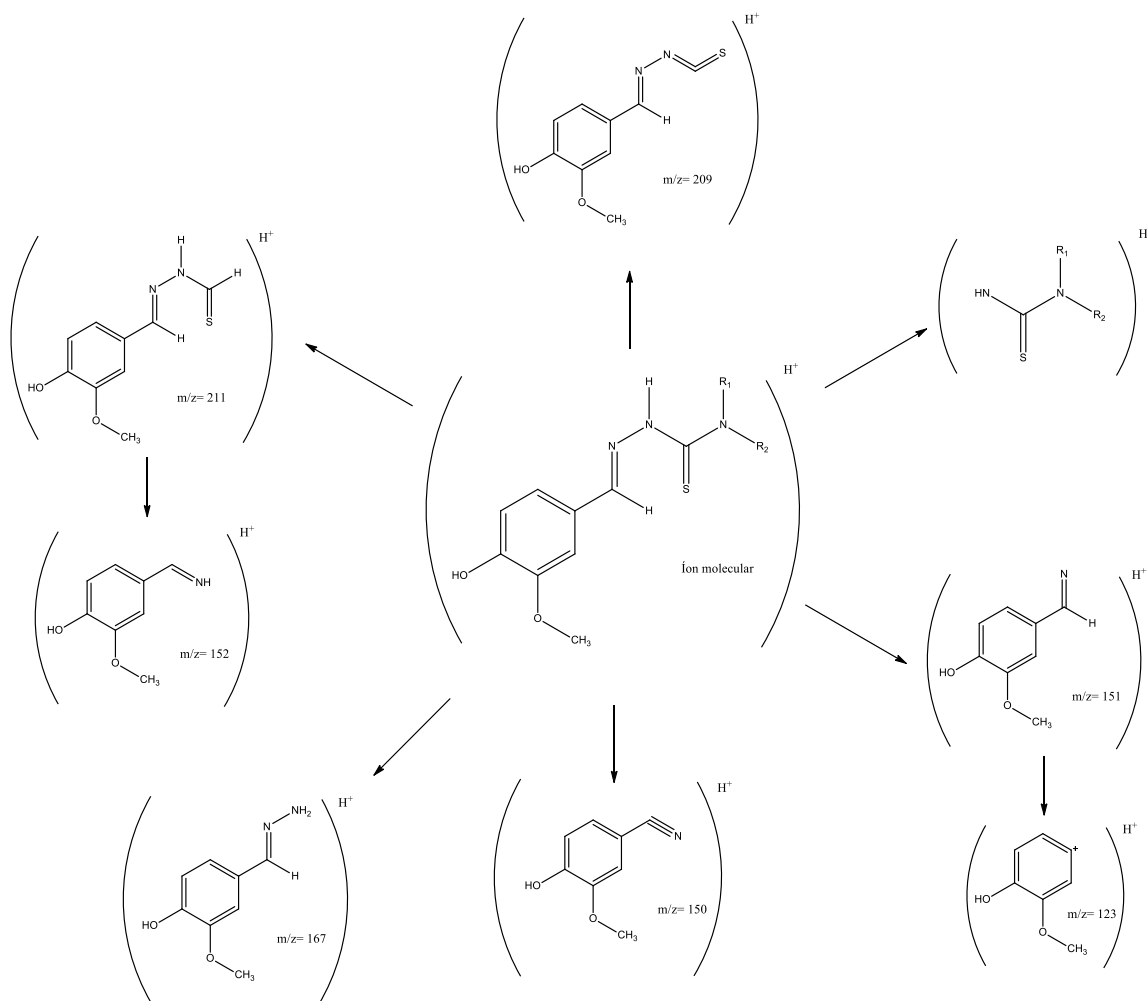
Para o ligante VFTSC se obteve um espectro de massas que indicou uma m/z de 302,1 (**Figura 27**) sendo compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{15}O_2N_3S$.

Figura 27- Espectro de massas obtido por ESI do ligante VFTSC em MeOH (modo positivo).



Os resultados obtidos são compatíveis com a análise de fragmentos realizada por Galavotti et al. 2019 (**Figura 28**)⁷⁵. Com base na caracterização feita, podemos concluir que os ligantes derivados de vanilina tiossemicarbazona foram sintetizados e isolados com sucesso.

Figura 28- Representação dos possíveis tipos de fragmentação para as tiossemicarbazonas derivadas da vanilina.



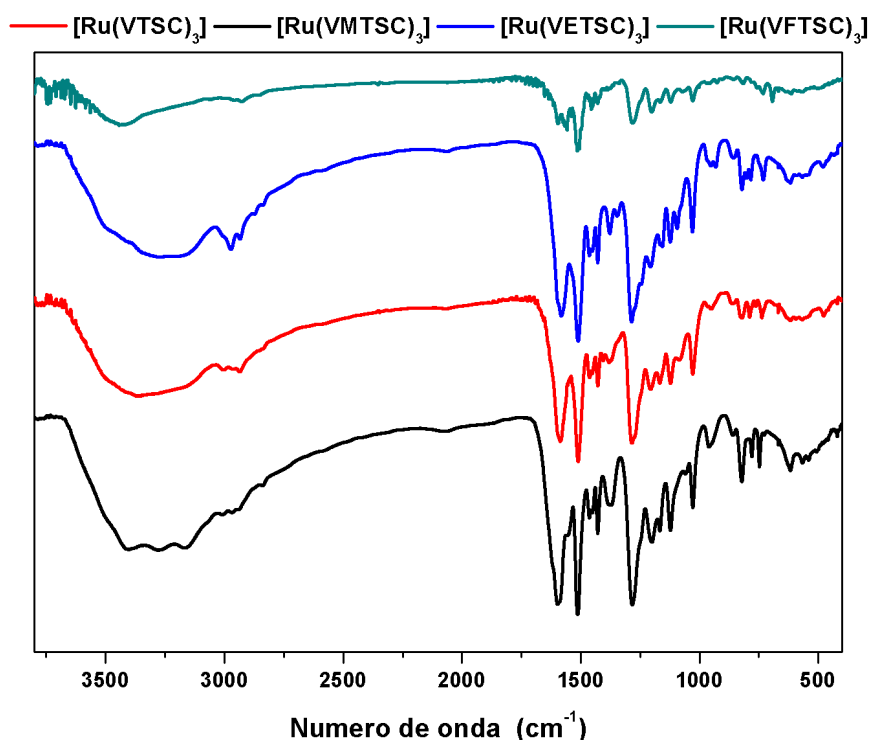
Fonte: Adaptado de Galavotti et. al, 2019.

4.2 Complexos [Ru(TSC)₃]

4.2.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Nos espectros vibracionais na região do infravermelho dos complexos sintetizados (**Figura 29**), podemos observar que apresentaram absorções similares entre si e aos ligantes livres com alguns deslocamentos.

Figura 29- Espectro infravermelho dos complexos sintetizados.



As faixas de aproximadamente 1600 a 1400 cm⁻¹ correspondem ao estiramento da ligação C-H do anel aromático ⁷⁶. Quando comparamos os espectros dos complexos com dos ligantes livres (**Figura 30 a 33**) observamos que, os complexos obtidos mostram uma banda larga de cerca de 3400 cm⁻¹ que foi considerada indicativa da vibração νO-H das moléculas de água presentes na rede do composto ⁷⁷. Os picos fracos observados na região de 3300 a 3100 cm⁻¹ podem ser atribuídos às vibrações de estiramento dos grupos NH ⁷⁸. Esta diminuição da intensidade do sinal é atribuída a tiossemicarbazona coordenada na forma iônica ⁷⁹.

Para determinar o modo de coordenação, foram comparadas as frequências vibracionais mais significativas dos complexos metálicos obtidos com os ligantes livres (**Tabela 7**). As faixas observadas entre 1601 e 1597 cm^{-1} atribuídas à frequência de estiramento do grupo C=N dos ligantes livres mudaram para uma frequência mais baixa nos espectros dos complexos entre 1591 e 1585 cm^{-1} indicando coordenação através do átomo N ⁷⁹. Para os ligantes livres se observou um sinal entre 817 e 856 cm^{-1} atribuído à vibração da ligação C=S. Por outro lado, este sinal não está presente nos complexos, mas uma nova faixa foi observada entre 789 e 815 cm^{-1} correspondente à ligação C-S. Isto sugere que o segundo local de coordenação entre o tiossemicarbazona e o átomo de rutênio é através do tiolato ^{80,81}. A faixa de intensidade média na região 567 a 565 cm^{-1} é atribuída à vibração da ligação Ru-N, enquanto na região 432 a 420 cm^{-1} temos os sinais atribuídos à ligação Ru-S ^{79,82}.

Figura 30- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VTSC e o complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$.

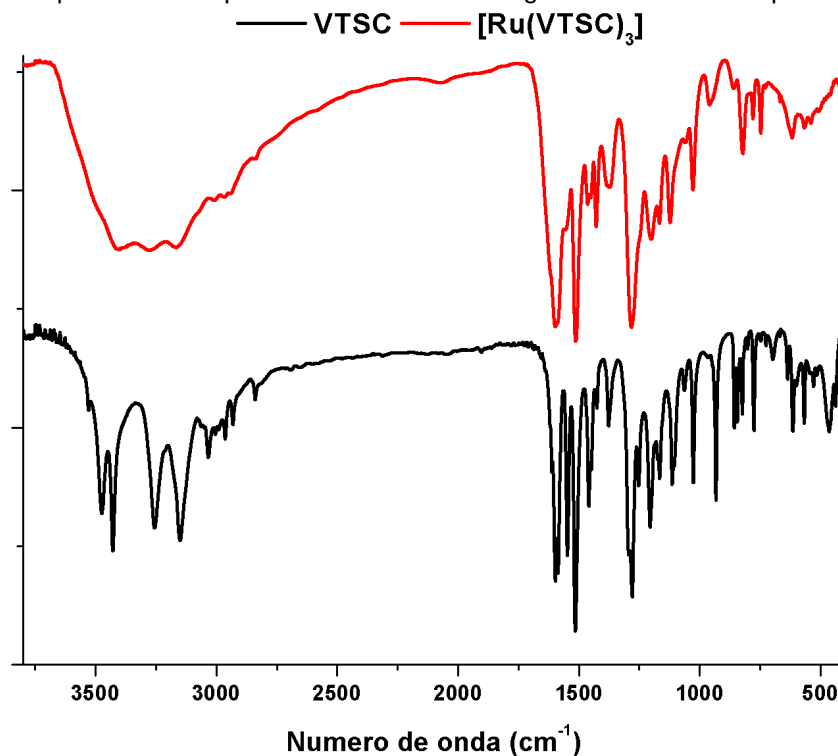


Figura 31- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VMTSC e o complexo $[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$.

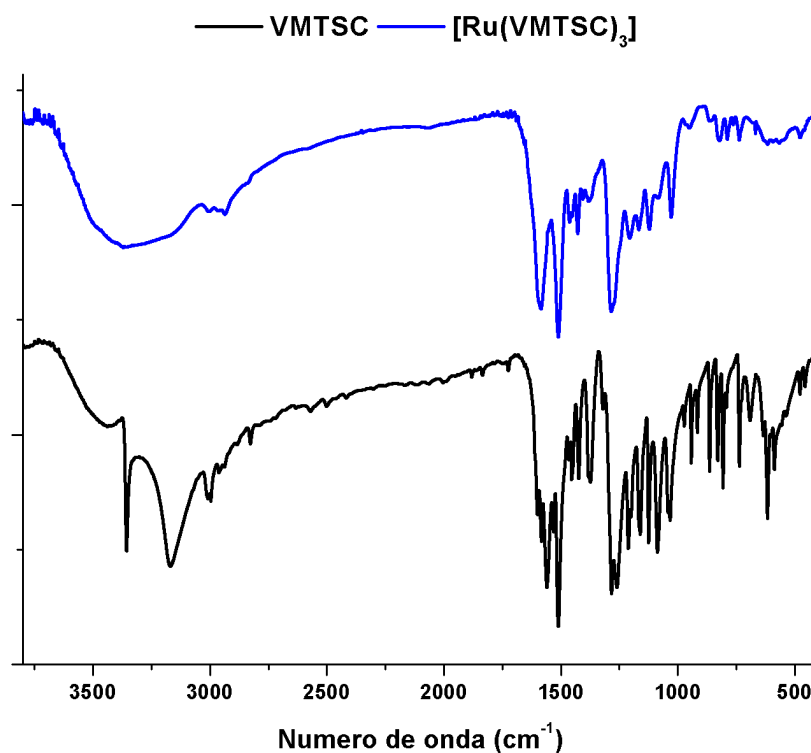


Figura 32- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VETSC e o complexo $[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$.

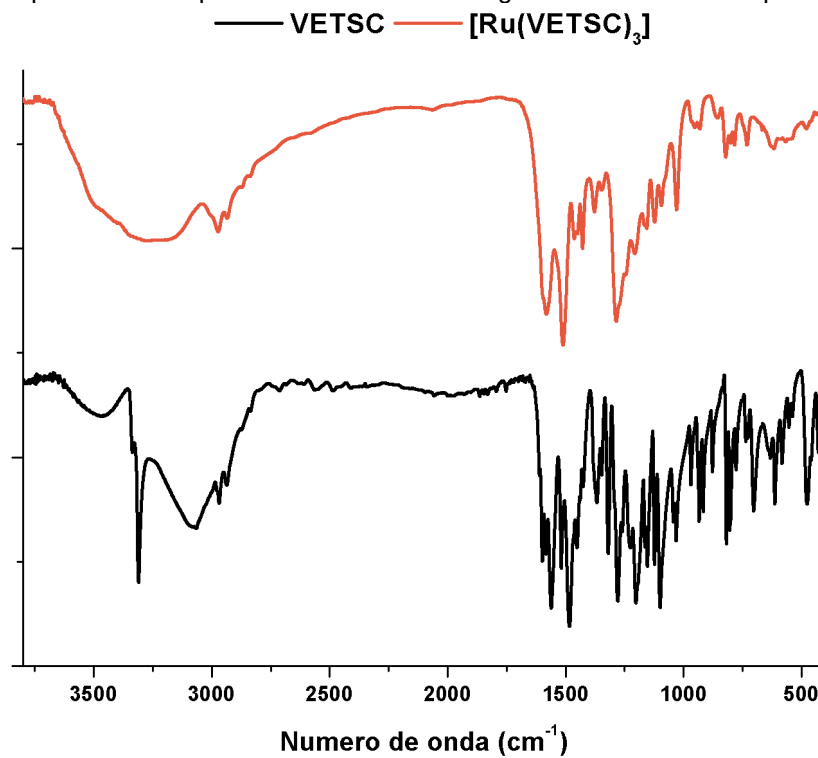


Figura 33- Comparativa do espectro infravermelho do ligante VFTSC e o complexo [Ru(VFTSC)₃].

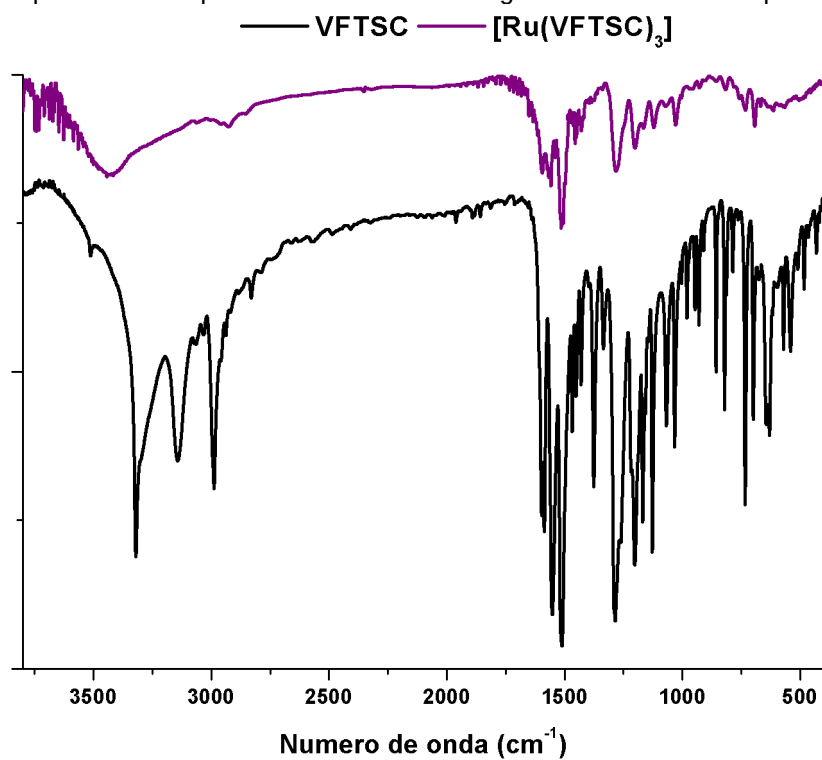


Tabela 7- Vibrações principais dos ligantes e complexos.

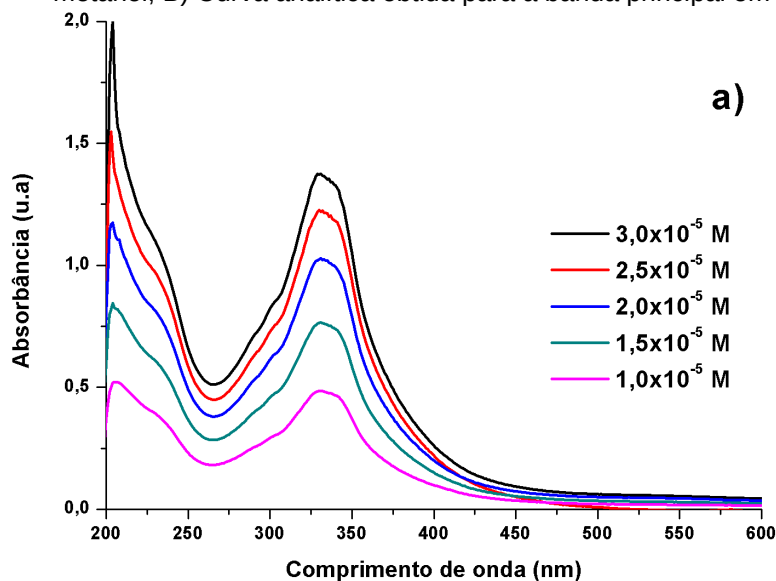
Ligante / Complexo	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$	$\nu(\text{Ru}-\text{N})$	$\nu(\text{Ru}-\text{S})$
VTSC	1598	845	-	-	-
[Ru(VTSC) ₃]	1585	-	799	566	420
VMTSC	1601	826	-	-	-
[Ru(VMTSC) ₃]	1589	-	789	567	420
VETSC	1599	817	-	-	-
[Ru(VETSC) ₃]	1579	-	800	566	432
VFTSC	1597	856	-	-	-
[Ru(VFTSC) ₃]	1591	-	815	565	426

Valores em cm^{-1}

4.2.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível

O espectro de absorção na região do UV/vis para os complexos $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$ obtidos em metanol (**Figura 34 a 37**) mostrou um padrão de absorções muito similar aos espectros dos ligantes livres com pequenos deslocamentos. As bandas observadas faixa entre 328 nm a 335 nm correspondem a transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo tioamida. As Bandas observadas entre 293 nm a 304 nm são atribuídas a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ de $\text{C}=\text{N}$ e em torno de 230 nm a excitação de elétrons dos aromáticos. Além disso, também foram observadas bandas em torno de 250 nm atribuídas às transições $n \rightarrow \pi^*$ de cromóforos $\text{C}=\text{N}$. As bandas supracitadas são indícios de coordenação dos ligantes nos correspondentes complexos. Além das bandas descritas acima foi observada uma banda de baixa intensidade em torno dos 500 nm que pode ser atribuída a uma transição do tipo d-d entre os orbitais do centro metálico (**Figura 38**)⁸³.

Figura 34- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 332 nm.



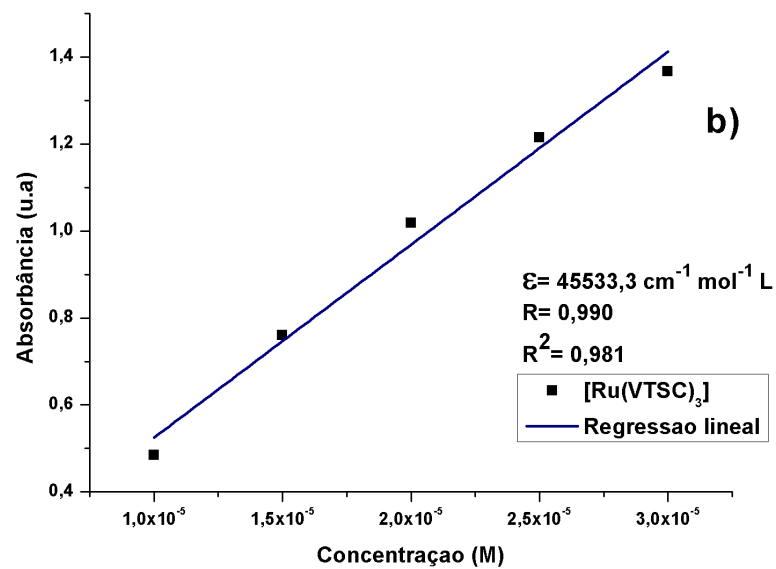
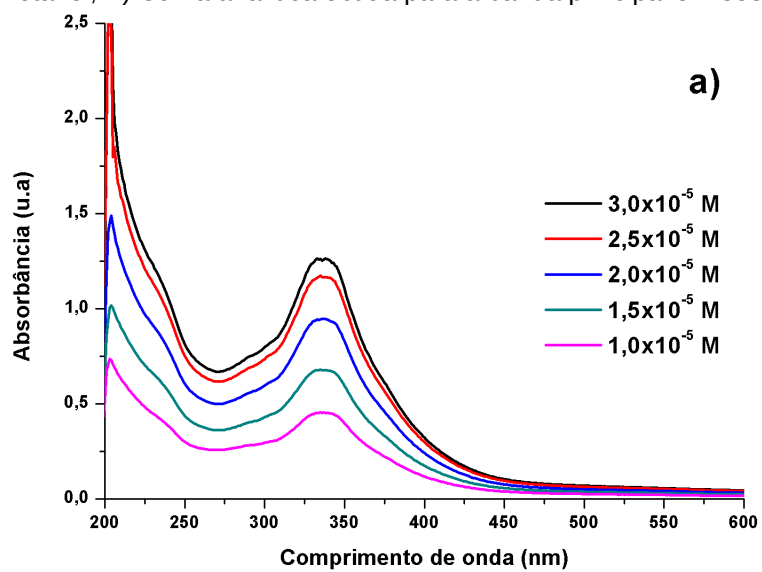


Figura 35- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo $[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$ em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 333 nm.



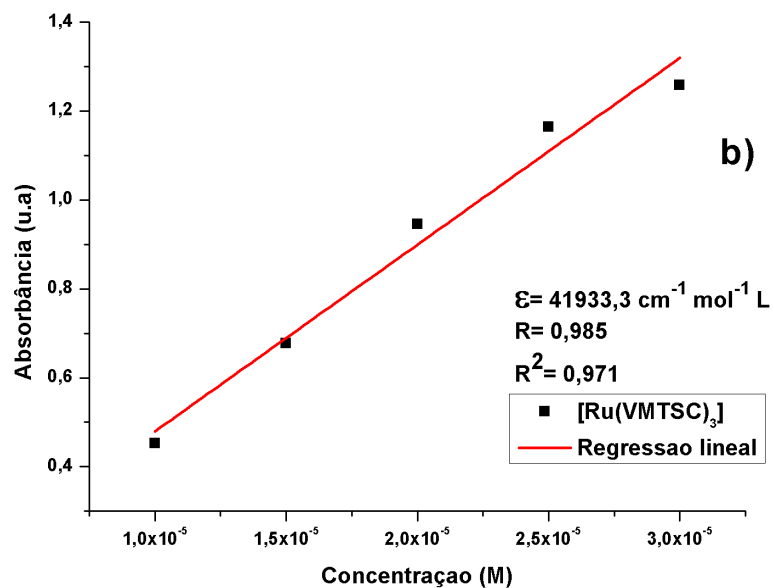


Figura 36- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo $[\text{Ru(VETSC)}_3]$ em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 335 nm.

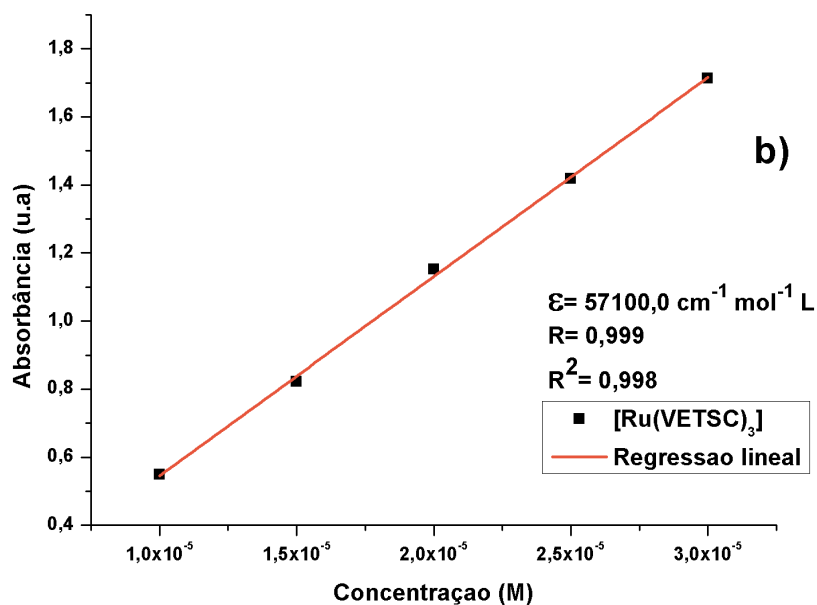
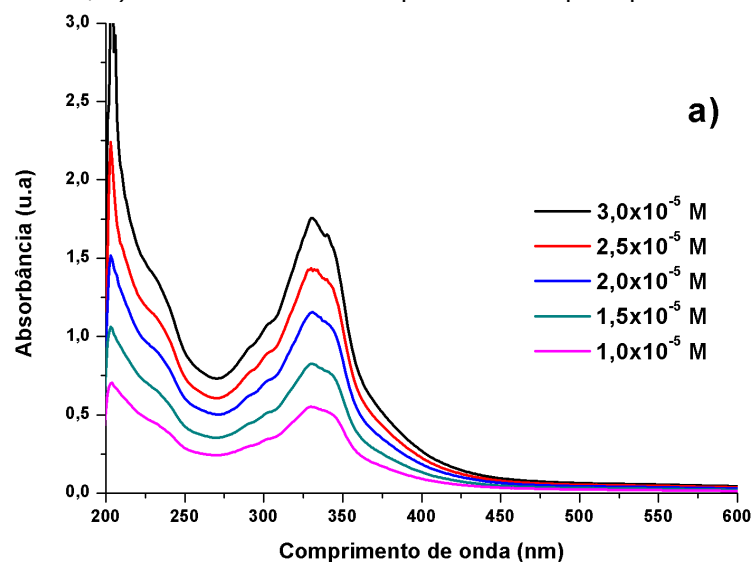


Figura 37- Espectro de absorção na região UV – Vis. A) Espectro do complexo $[\text{Ru}(\text{VFTSC})_3]$ em metanol, B) Curva analítica obtida para a banda principal em 339 nm.

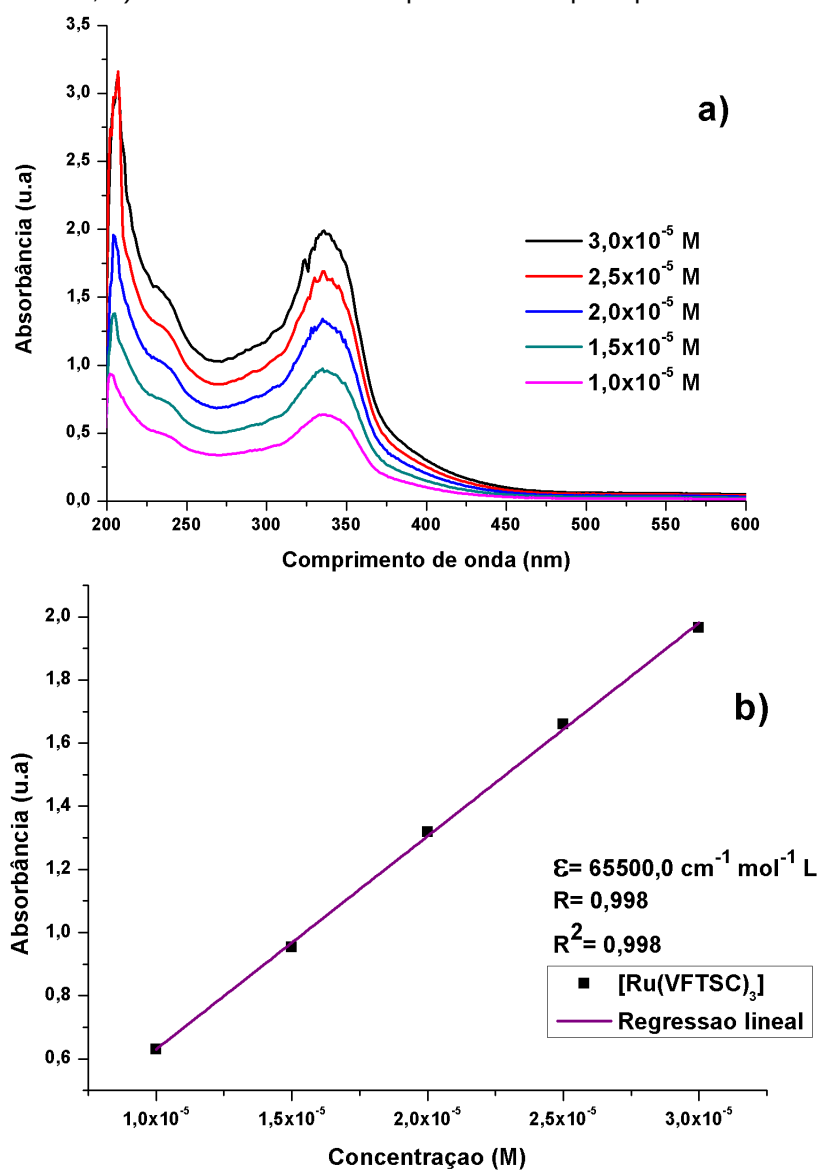


Figura 38- Comparativa do espectro ultravioleta do ligante VTSC e o complexo [Ru(VTSC)₃].

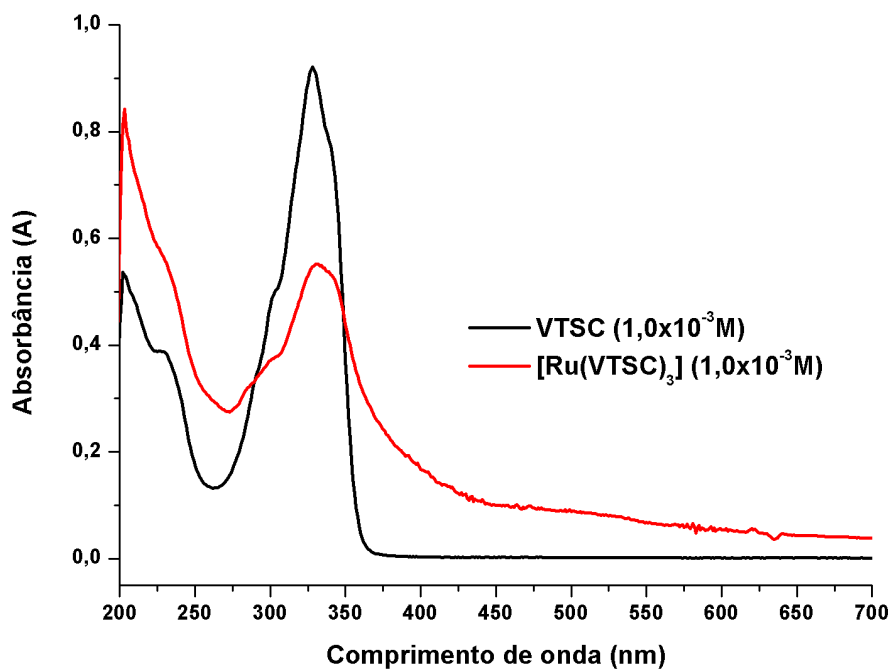


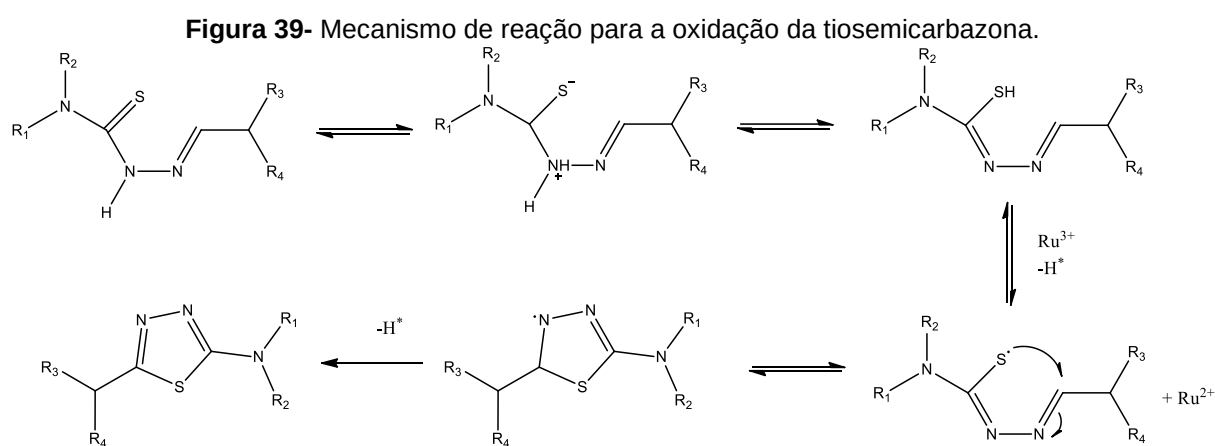
Tabela 8- Valores de absorção e absortividade molar em UV-Vis para os complexos sintetizados.

Complexo	ϵ (cm ⁻¹ mol ⁻¹ L)
[Ru(VTSC) ₃]	45553,3 (332 nm)
[Ru(VMTSC) ₃]	41933,3 (333 nm)
[Ru(VETSC) ₃]	57100,0 (335 nm)
[Ru(VFTSC) ₃]	65500,0 (339 nm)

4.2.3 Espectrometria de massas

Observando os espectros de massa obtidos para os complexos sintetizados $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$ (**Figuras 40 a 43**), podemos observar a presença de sinais com um valor m/z compatível com as fórmulas moleculares dos tiadiazóis derivados de seus correspondentes tiossemicarbazona. Além disso, podemos observar os sinais correspondentes aos complexos de rutênio formados contendo três moléculas de coordenadas aniônicas de tiossemicarbazona e para alguns é possível observar fragmentos indicando a perda de um ligante.

Este fenômeno de redução do rutênio para a ciclização da tiossemicarbazona pode ser explicado de acordo com a proposta de Skagius e colaboradores onde a utilização de uma solução de cloreto de ferro resultou na oxidação da tiossemicarbazona para formar um 1,3,4-tiadiazol (**Figura 39**)⁸⁴.

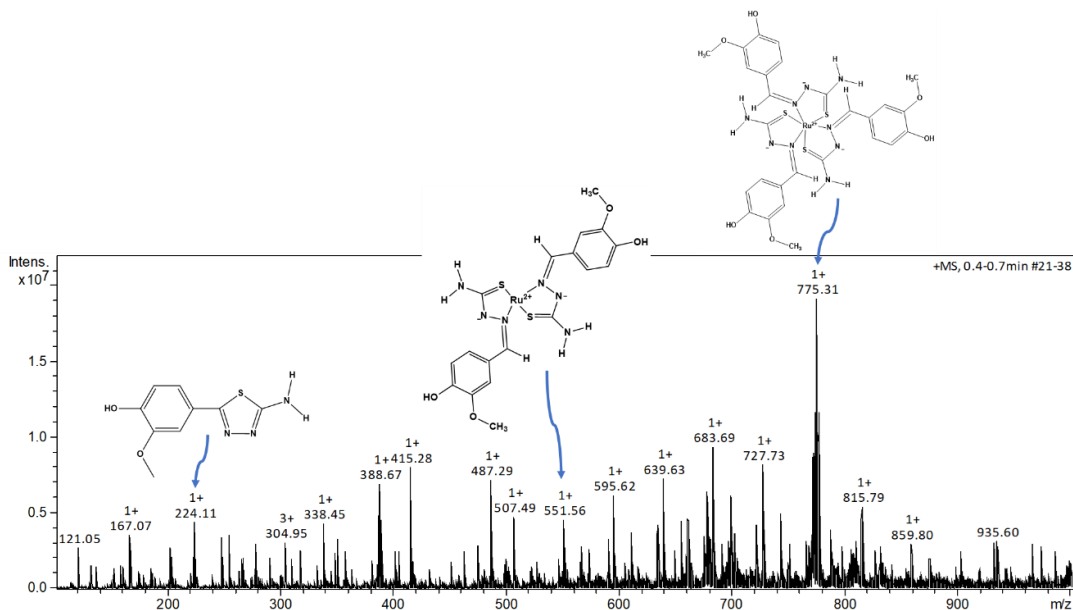


Fonte: Adaptado de Skagius et al, 1960.

O processo de dissociação da tiossemicarbazona dos complexos $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$ durante o processo de ionização da amostra poderia levar à ciclização oxidativa deste ligante formando o tiadiazol. Porém, o mecanismo exato da formação desta molécula nestes complexos não foi estudado neste trabalho sendo alvo de hipótese a ser verificada.

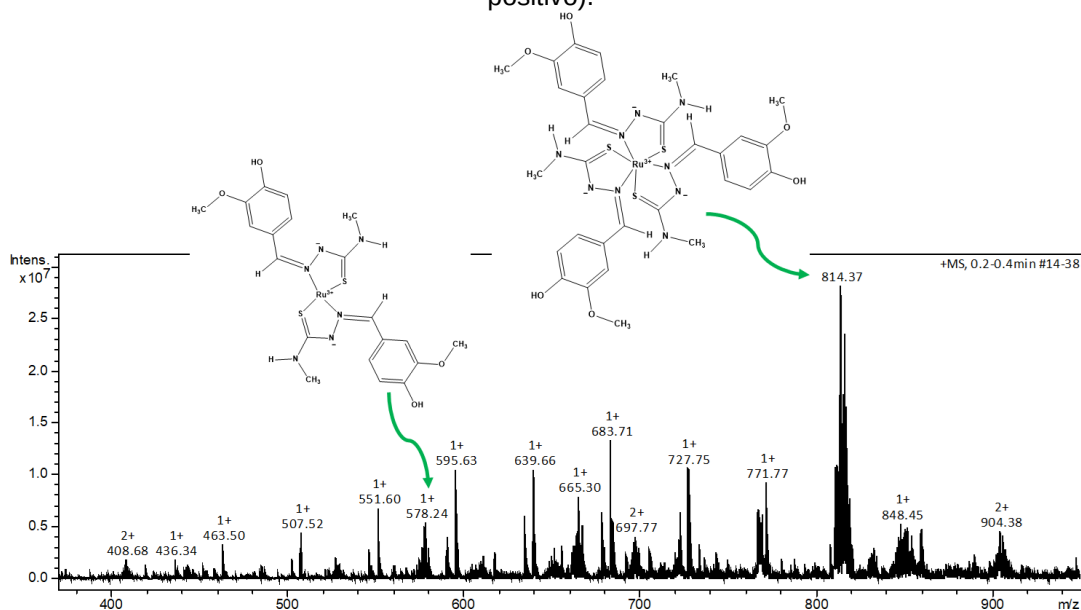
A espectrometria de massas do complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ indicou o resultado esperado para o composto, apresentou um fragmento de massa 775,31 indicativo coordenação dos três ligantes, VTSC, ao centro metálico. Ademais, se observa um fragmento de massa 551,56 indicativo da perda de um dos ligantes.

Figura 40- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ em metanol (modo positivo).



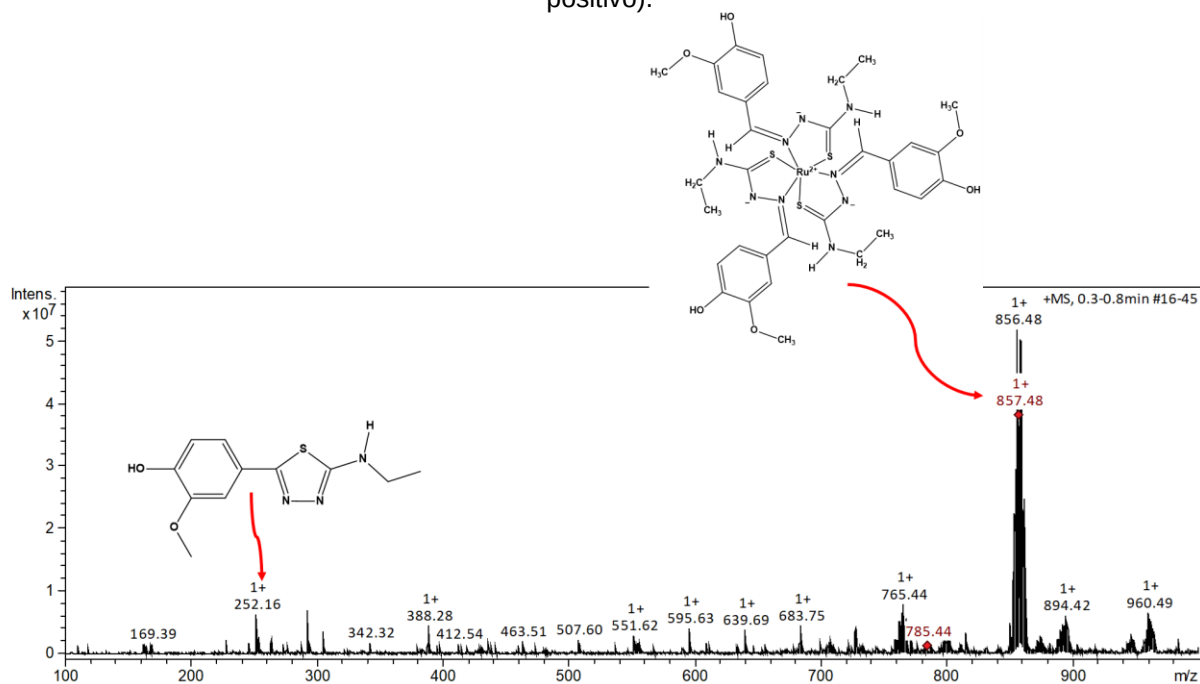
A espectrometria de massas do complexo $[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$ indicou o resultado esperado para o composto, apresentou um fragmento de massa 814,37 indicativo coordenação dos três ligantes, VMTSC, ao centro metálico. Ademais, se observa um fragmento de massa 578,24 indicativo de perda de um dos ligantes.

Figura 41- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo $[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$ em metanol (modo positivo).



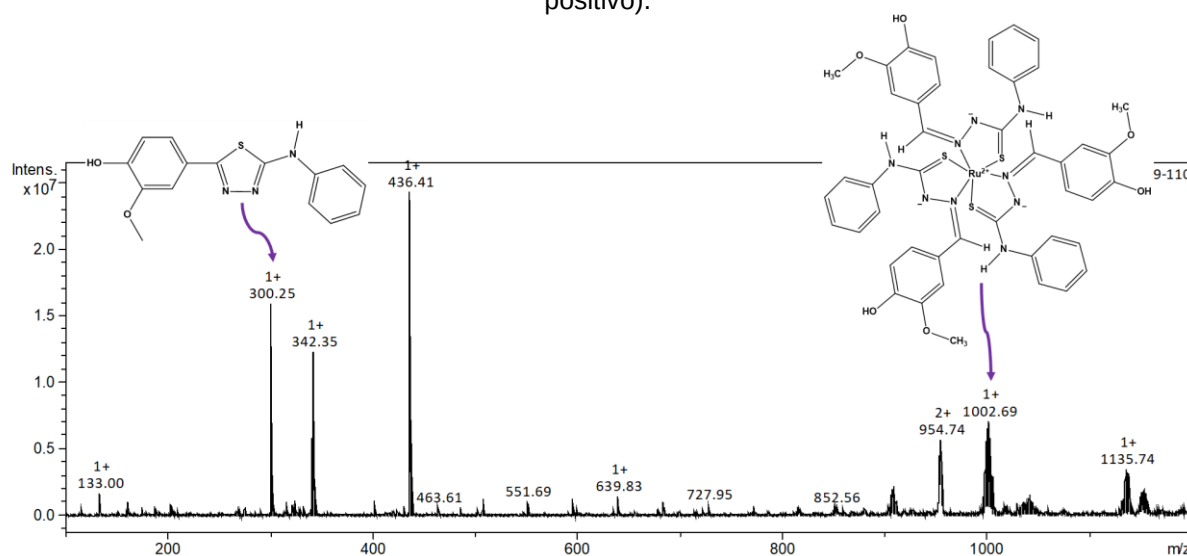
A espectrometria de massas do complexo $[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$ indicou o resultado esperado para o composto, apresentou um fragmento de massa 857,48 indicativo da coordenação dos três ligantes, VETSC, ao centro de rutênio.

Figura 42- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo $[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$ em metanol (modo positivo).



A espectrometria de massas do complexo $[\text{Ru}(\text{VFTSC})_3]$ indicou o resultado esperado para o composto, apresentou um fragmento de massa 1002,69 indicativo da coordenação dos três ligantes, VFTSC, ao centro metálico.

Figura 43- Espectro de massas obtido por ESI para o complexo $[\text{Ru}(\text{VFTSC})_3]$ em metanol (modo positivo).



4.2.4 Análise elementar

Os valores de análise elementar de C, H e N obtidos para os complexos estão resumidos abaixo (**Tabela 9**). Podemos notar que os valores experimentais e teóricos são próximos quando consideramos a água de hidratação nas amostras analisadas. De acordo a estes resultados se sugere que os complexos se encontram pentahidratados.

Tabela 9. Dados de análise elementar teórico e experimental dos complexos obtidos.

	[Ru(VTSC) ₃]·5H ₂ O		[Ru(VMTSC) ₃]·5H ₂ O		[Ru(VETSC) ₃]·5H ₂ O		[Ru(VFTSC) ₃]·5H ₂ O	
	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.
Carbono	37,71	37,54	38,50	39,77	41,94	41,81	49,99	49,48
Hidrogênio	4,12	4,67	4,13	5,12	4,64	5,53	3,94	4,80
Nitrogênio	11,62	14,59	12,07	13,93	12,65	13,30	10,94	11,54

4.2.5 Ressonância paramagnética de elétron

Os espectros de EPR dos complexos sintetizados foram registrados em estado sólido a 77 K. Analisando os sinais obtidos (**Figura 44 a 46**) podemos observar que os compostos mostram um padrão rômboico o qual reflete a assimetria do ambiente eletrônico da esfera de coordenação de complexos Ru(III) com configuração eletrônica d⁵ e spin eletrônico $S = \frac{1}{2}$ ⁸³ (**Tabela 10**).

A literatura mostra que a partir de valores de g₁, g₂, e g₃ obtidos de espectros de complexos de estrutura rômboica é possível obter indícios do caráter iônico ou covalente do composto. Os maiores valores de Δg ($\Delta g = g_{\max} - g_{\min}$) obtidos dos espectros indicam que os complexos têm caráter predominantemente iônico. Por outro lado, valores menores de Δg indicam maior caráter covalente entre o metal e o ligante ⁸⁵.

Os espectros obtidos em nosso estudo mostram que o caráter iônico do complexo prevalece o qual sugere que o elétron desemparelhado deve ser sensivelmente deslocalizado sobre a estrutura do centro metálico ⁸⁵. A hipótese da ocorrência de interação eletrostática entre o centro de Ru(III) e o ânion tiolato também é condizente com os dados de infravermelho e com os dados de espectroscopia de massas dos complexos.

Figura 44- Espectros de EPR de banda X do complexo [Ru(VTSC)₃] a 77 K.

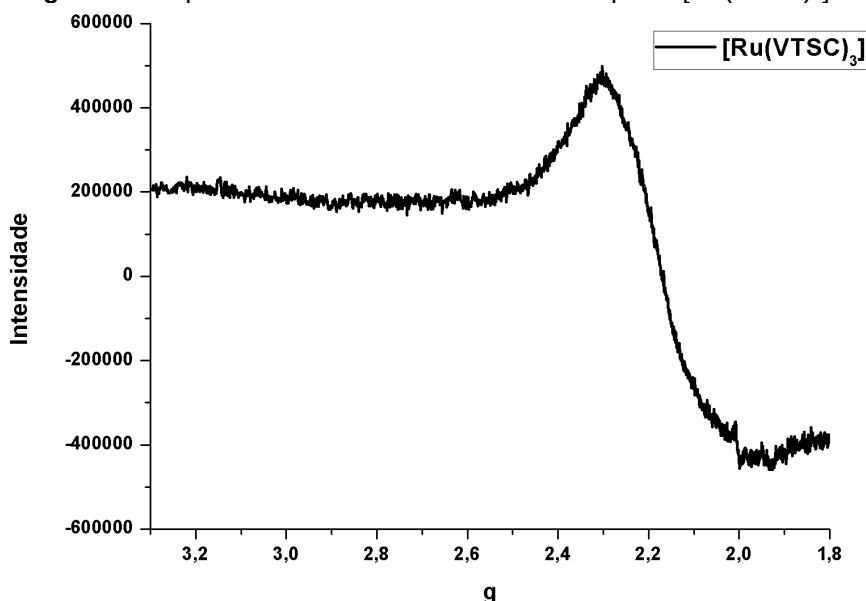


Figura 45- Espectros de EPR de banda X do complexo $[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$ a 77 K.

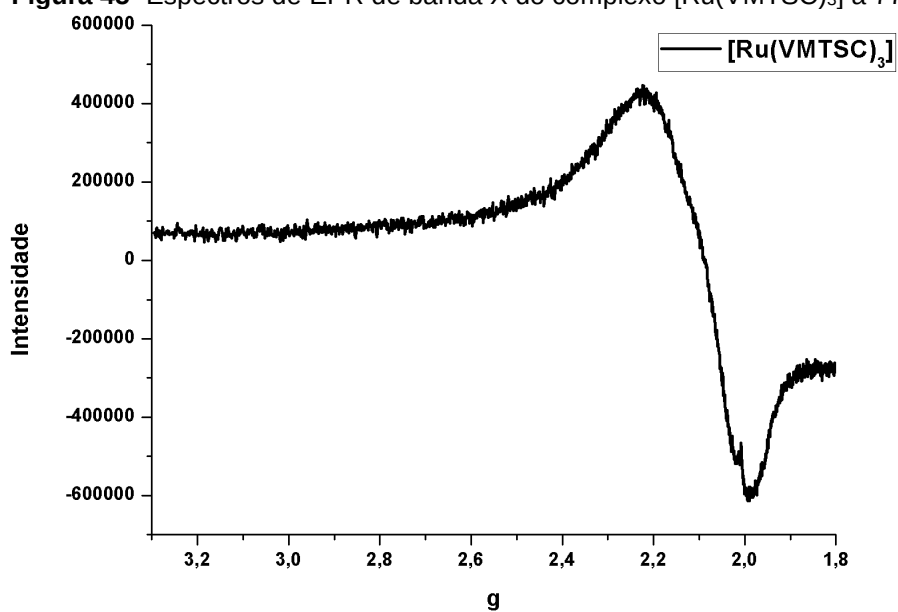


Figura 46- Espectros de EPR de banda X do complexo $[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$ a 77 K.

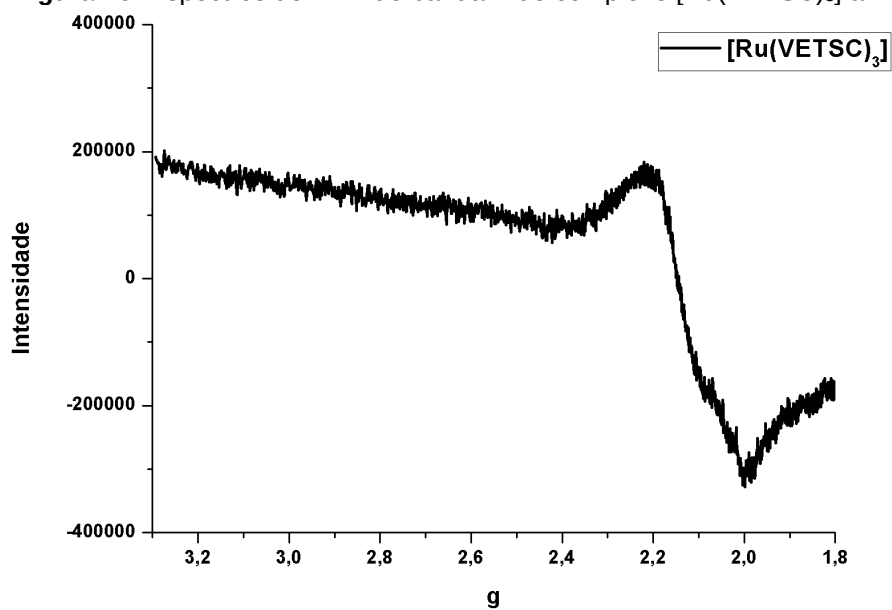


Tabela 10- Valores de g dos respectivos complexos em estado sólido.

Complexo	g1	g2	g3	Δg
$[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$	2,30	2,24	2,00	0,30
$[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$	2,22	2,11	2,01	0,21
$[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$	2,19	2,09	2,01	0,18

4.2.5 Estudos de Estabilidade em Solução

O comportamento dos complexos em solução foi estudado durante um período de tempo de 0, 24 e 48 horas. Para isto, foi preparada uma solução 3×10^{-5} M de cada um dos complexos usando DMSO e uma solução 8:2 de DMSO:Tampão tris-HCl (pH 7,3). Os espectros de absorção na região UV-Vis de cada uma dessas soluções foram registrados em 0, 24 e 48 horas após a preparação, a fim de monitorar se ocorreu alguma alteração na estrutura das espécies de estudo.

Analisando os espectros obtidos (**Figura 47 a 50**), não foram observadas mudanças espectrais significativas durante este período, indicando que a troca de ligantes com o solvente DMSO não ocorreu para os complexos. Os compostos também se mostraram estáveis durante o tempo de estudo na presença de íon cloreto. Os espectros UV-Vis dos complexos em tampão tris-HCl (pH 7,3, $[\text{Cl}^-] = 50 \text{ mM}$) obtidos em 0, 24 e 48h não foram afetados pela presença deste íon, sugerindo que os ligantes tiossemicarbazona não são facilmente substituídos por cloreto.

Figura 47- Estabilidade do complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).

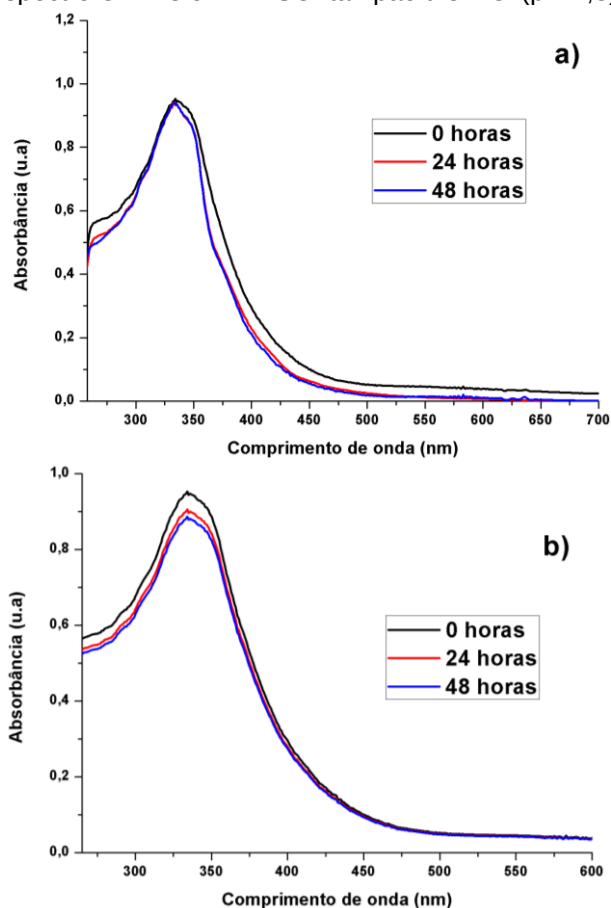


Figura 48- Estabilidade do complexo $[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$ em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).

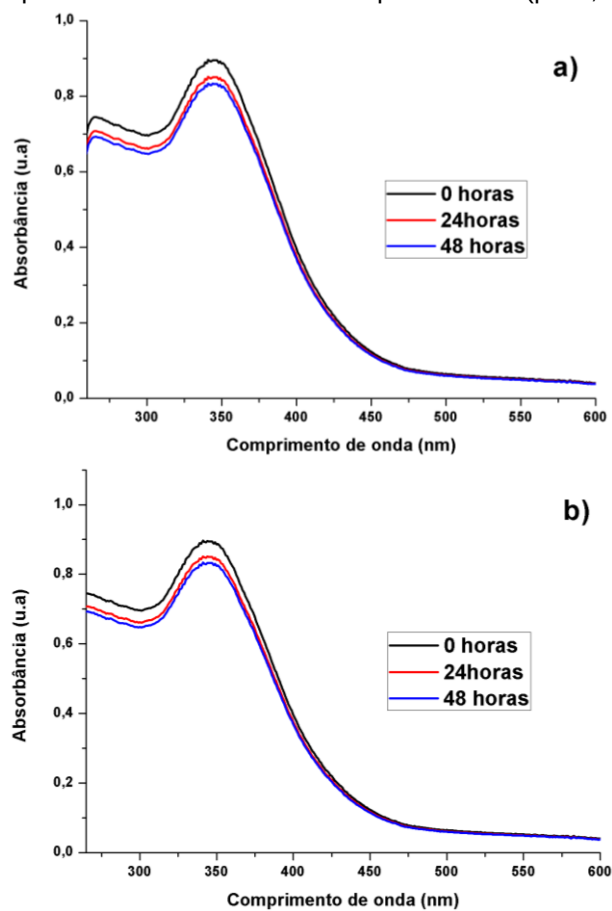
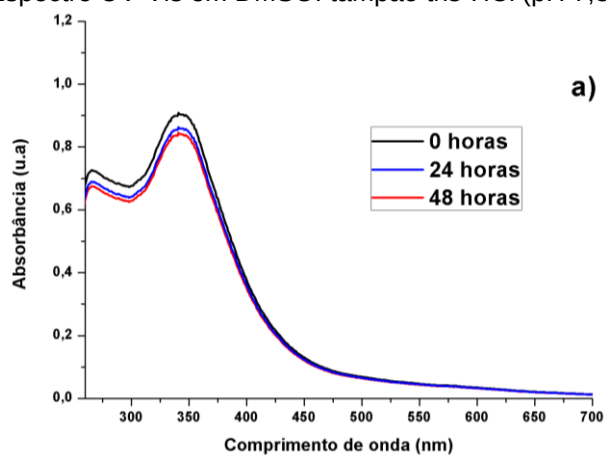


Figura 49- Estabilidade do complexo $[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$ em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).



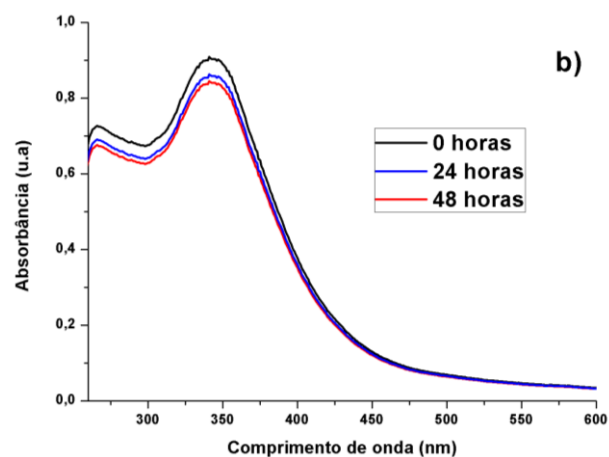
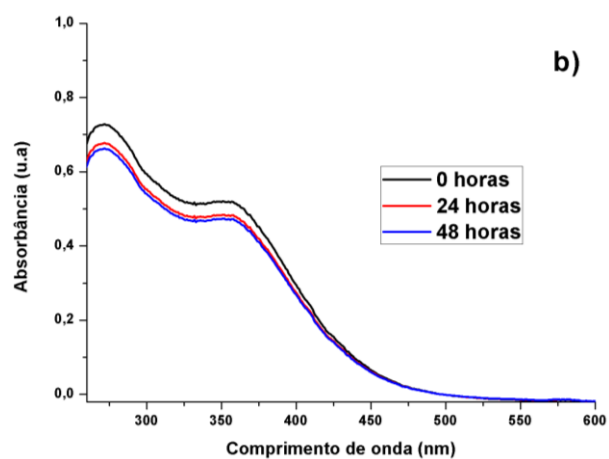
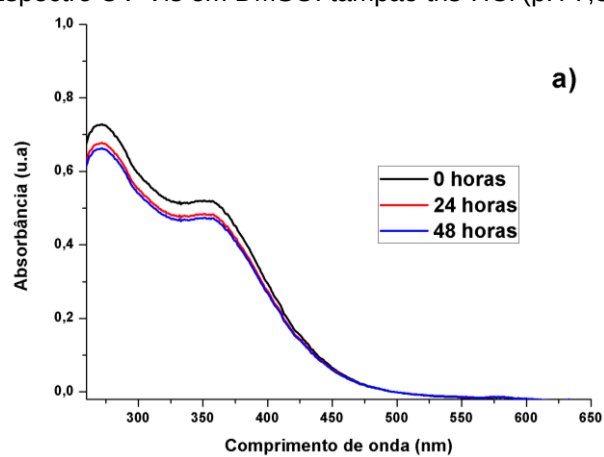


Figura 50- Estabilidade do complexo [Ru(VFTSC)₃] em solução. a) Espectro UV-Vis em DMSO. b) Espectro UV-Vis em DMSO: tampão tris-HCl (pH 7,3).



4.3 Testes biológicos

Devido às condições experimentais utilizadas para realizar os ensaios com DNA, não foi possível estudar os complexos [Ru(VMTSC)₃], [Ru(VETSC)₃] e [Ru(VFTSC)₃] devido à pouca solubilidade dos mesmos em tampão tris-HCl (pH= 7,3), impossibilitando uma medição representativa. Devido a isso, os testes com DNA foram realizados utilizando apenas o complexo [Ru(VTSC)₃].

4.3.1 Ensaios de Interação com DNA

4.3.1.1 Titulação espectrofotométrica

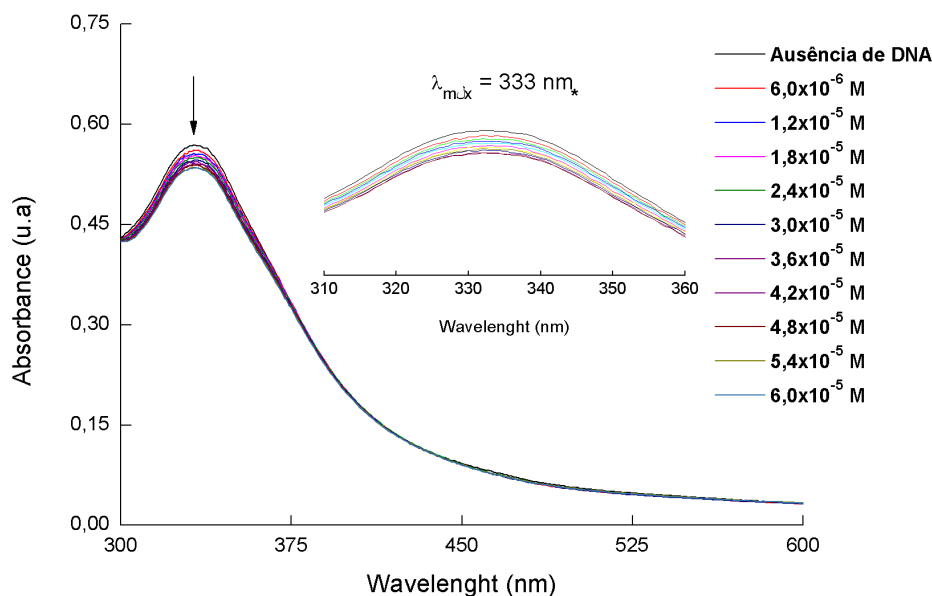
As constantes intrínsecas de ligação (K_b) para a interação do complexo [Ru(VTSC)₃] com *ct*-DNA foi determinada mediante titulação de absorção UV-Vis. As medidas foram realizadas adicionando quantidades crescentes de DNA (0 - $6,0 \times 10^{-5}$ M) a uma quantidade fixa do complexo (2×10^{-5} M). As alterações na absorção foram monitoradas no comprimento de onda máximo de 333 nm. O valor da constante intrínseca de ligação (K_b) para a ligação do complexo ao DNA foi determinado usando a equação de Benesi-Hildebrand (**Equação 2**) na qual, A e A_0 são as absorções do composto livre e do aduto DNA-complexo respectivamente. ϵ_C e ϵ_{D-C} são os coeficientes de absorção do composto livre e do aduto DNA-complexo respectivamente. Determinou-se K_b por meio da relação de coeficientes linear e angular da equação da reta obtida no gráfico ao plotar $1/(A-A_0)$ vs. $1/[DNA]$ ⁸⁶.

Equação 2- equação de Benesi-Hildebrand.

$$\frac{A}{(A - A_0)} = \frac{\epsilon_C}{(\epsilon_D - c - \epsilon_C)} \times \frac{1}{K_b [DNA]}$$

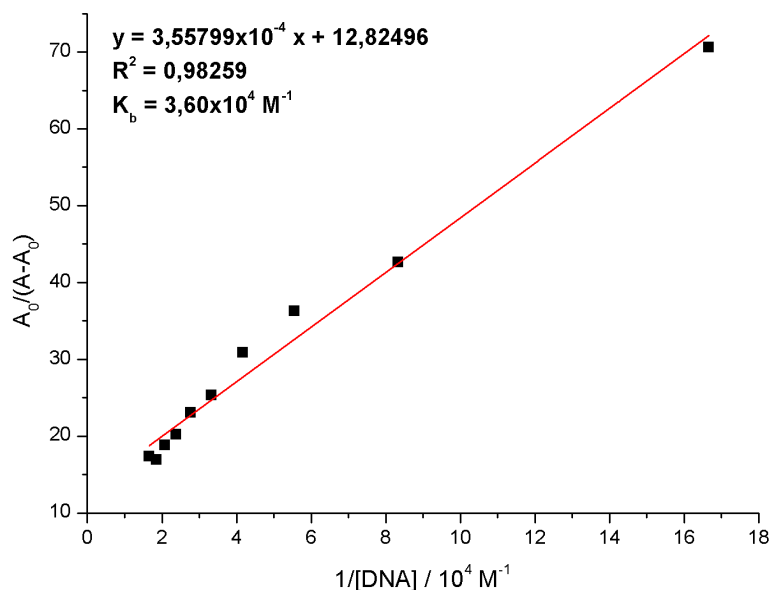
Analisando os espectros de absorção obtidos (**Figura 51**), podemos observar que, em função do aumento da concentração de *ct*-DNA, houve um efeito hipocrômico sobre a banda observada na faixa de 333 nm de aproximadamente 6% no valor da absorbância sem um deslocamento significativo para o vermelho da faixa em 264 nm. Regressão lineal.

Figura 51- Espectro UV-Vis contendo o complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ e aumentando concentração de *ct*-DNA em tampão tris-HCl (pH 7,3).



O valor da constante de ligação obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ ($K_b = 3,60 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (**Figura 52**) é inferior ao valor das constantes de ligação reportadas na literatura para os metalo-intercaladores e intercaladores clássicos (10^7 M^{-1})^{87,88}. Isto pode indicar que a interação entre o complexo de estudo e o DNA seja de natureza fraca. A fim de fornecer mais informação sobre o modo de interação entre o complexo e o *ct*-DNA, foram realizados outros experimentos como dicroísmo circular (CD) e ensaios de competição.

Figura 52- Gráfico de $A_0/(A - A_0)$ vs $1/[\text{DNA}]$ para a determinação da constante de ligação do aduto ADN- $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$.

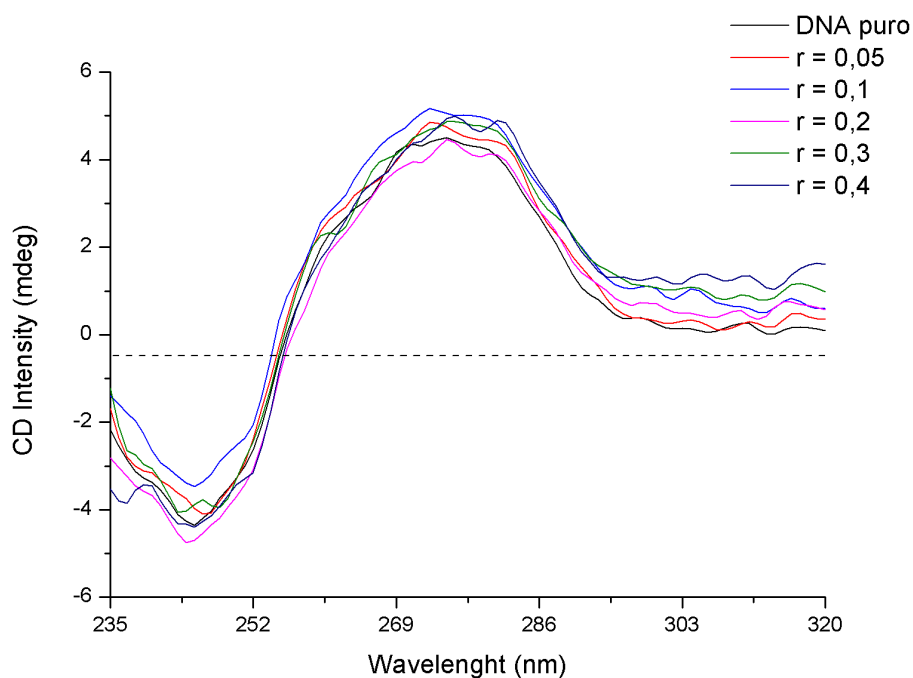


4.3.1.2 Dicroísmo circular

A espectroscopia do dicroísmo circular (CD) é uma técnica usada para observar mudanças conformacionais resultantes da ligação de pequenas moléculas ⁸⁹. O espectro CD do *ct*-DNA apresenta duas faixas típicas entre a (-) 245 e (+) 275 nm. A banda negativa é atribuída à forma de hélice destra do DNA e a banda positiva é atribuída ao empilhamento de bases π - π^* ⁹⁰. Um aumento no sinal das bandas positiva e negativa é indicativo de uma interação do tipo intercalador, enquanto para as interações nos sulcos ou eletrostáticas apresentam pouca ou nenhuma modificação nestas bandas ⁹¹.

Os espectros CD do *ct*-DNA em a ausência e presença do complexo [Ru(VTSC)₃] (Figura 53) foram registrados após uma incubação de 24 h a 37 °C. Analisando os resultados obtidos, podemos observar que, em função do aumento da concentração do complexo, não foi detectada nenhuma mudança significativa no perfil espectral do CD, sugerindo uma interação eletrostática e/ou encadernação de ranhuras.

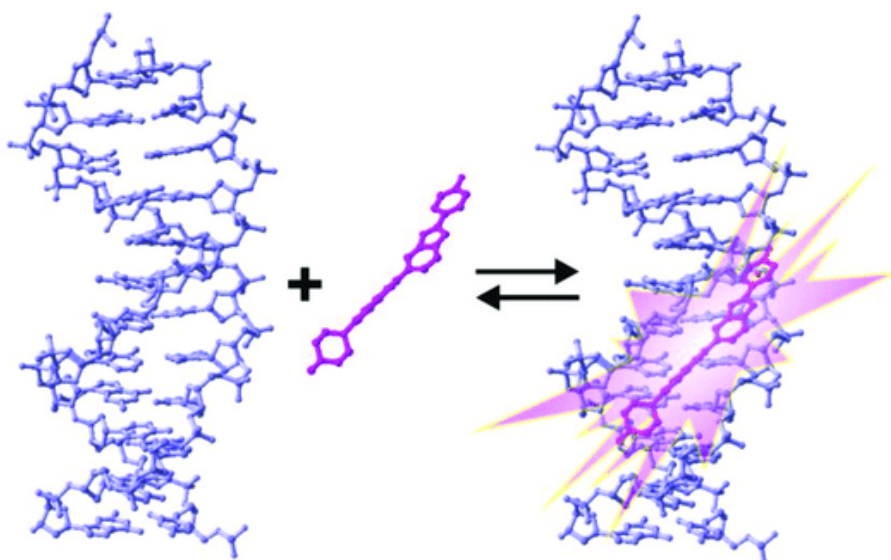
Figura 53- Espectros de CD após adições crescentes do complexo [Ru(VTSC)₃] ($1,0 \times 10^{-3}$ M, em DMSO) para *ct*-DNA ($7,09 \times 10^{-5}$ M) em tampão Tris-HCl, r = concentrações de razão molar [complexo]/[DNA].



4.3.1.3 Ensaio de competição com Hoechst 33258

Os ensaios de competição fornecem informação indireta para entender o modo de interação entre uma molécula e o DNA. O Hoechst 33258 é um corante não intercalador que interage com o DNA interagindo com o sulco menor da hélice nas regiões ricas em A-T deste gerando um aduto altamente fluorescente (**Figura 54**)⁹².

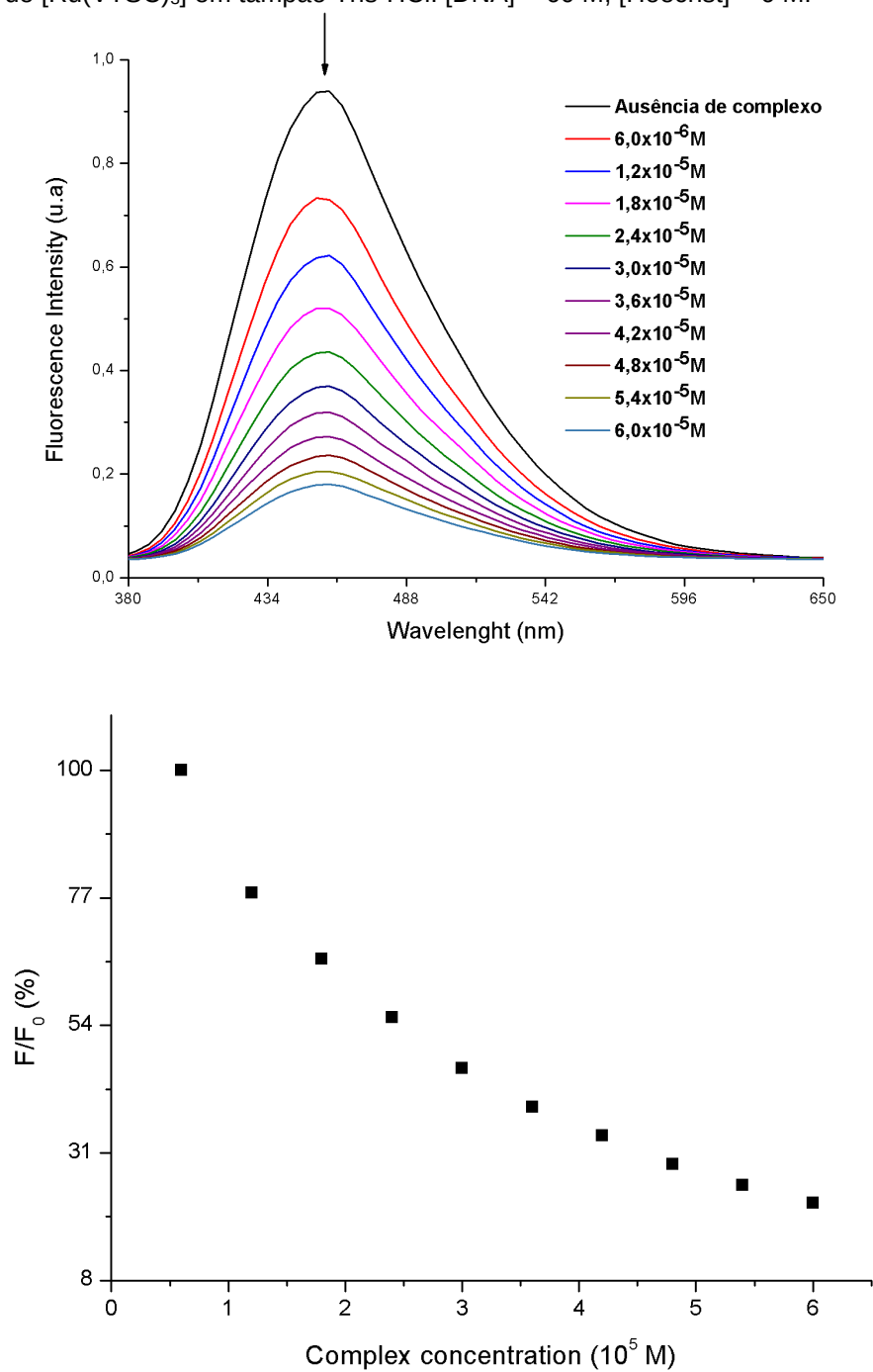
Figura 54- Interação entre o corante Hoechst 33258 e o ct-DNA.



Fonte: Bucevičius et. al, 2018.

O espectro de emissão do aduto Hoechst-DNA foi monitorado na presença de concentrações crescentes do complexo $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ (**Figura 55**). Analisando os dados obtidos, pode-se observar que a intensidade de emissão diminuiu 80,81 %, indicando que a Hoechst está sendo significativamente deslocado pelo composto. Isto pode sugerir que o complexo é capaz de interagir no sulco menor do DNA, deslocando a Hoechst 33258.

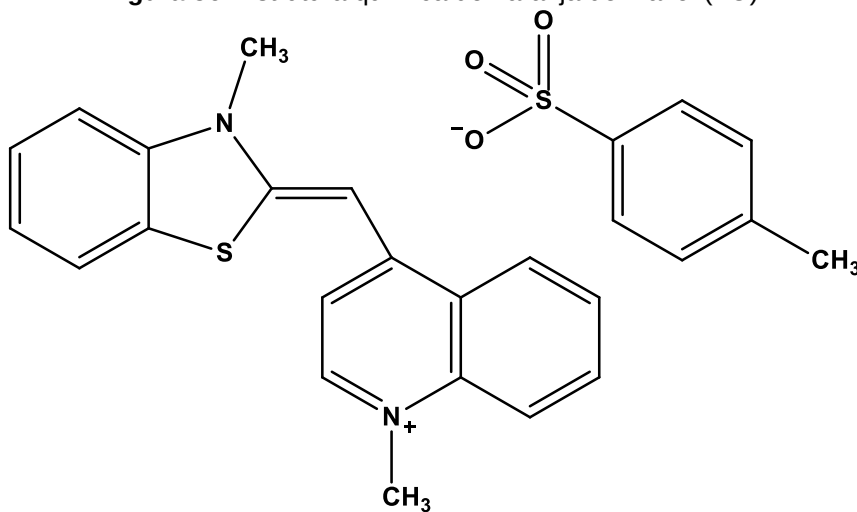
Figura 55- Espectros de emissão do aduto Hoechst -DNA na presença de concentrações crescentes de $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ em tampão Tris-HCl. $[\text{DNA}] = 60 \text{ M}$; $[\text{Hoechst}] = 6 \text{ M}$.



4.3.1.4 Ensaio de competição com Laranja de Tiazol

O Laranja de Tiazol (TO) (Figura 56) é um intercalador de DNA que se torna fluorescente após a intercalação (3000 vezes)⁹³. Este experimento é utilizado para fornecer informações a respeito do modo de interação de um determinado composto com o *ct*-DNA. A presença de outro composto intercalador reduz a fluorescência emitida pelo sistema TO-DNA, em função da competição pelos sítios na biomolécula⁹⁴.

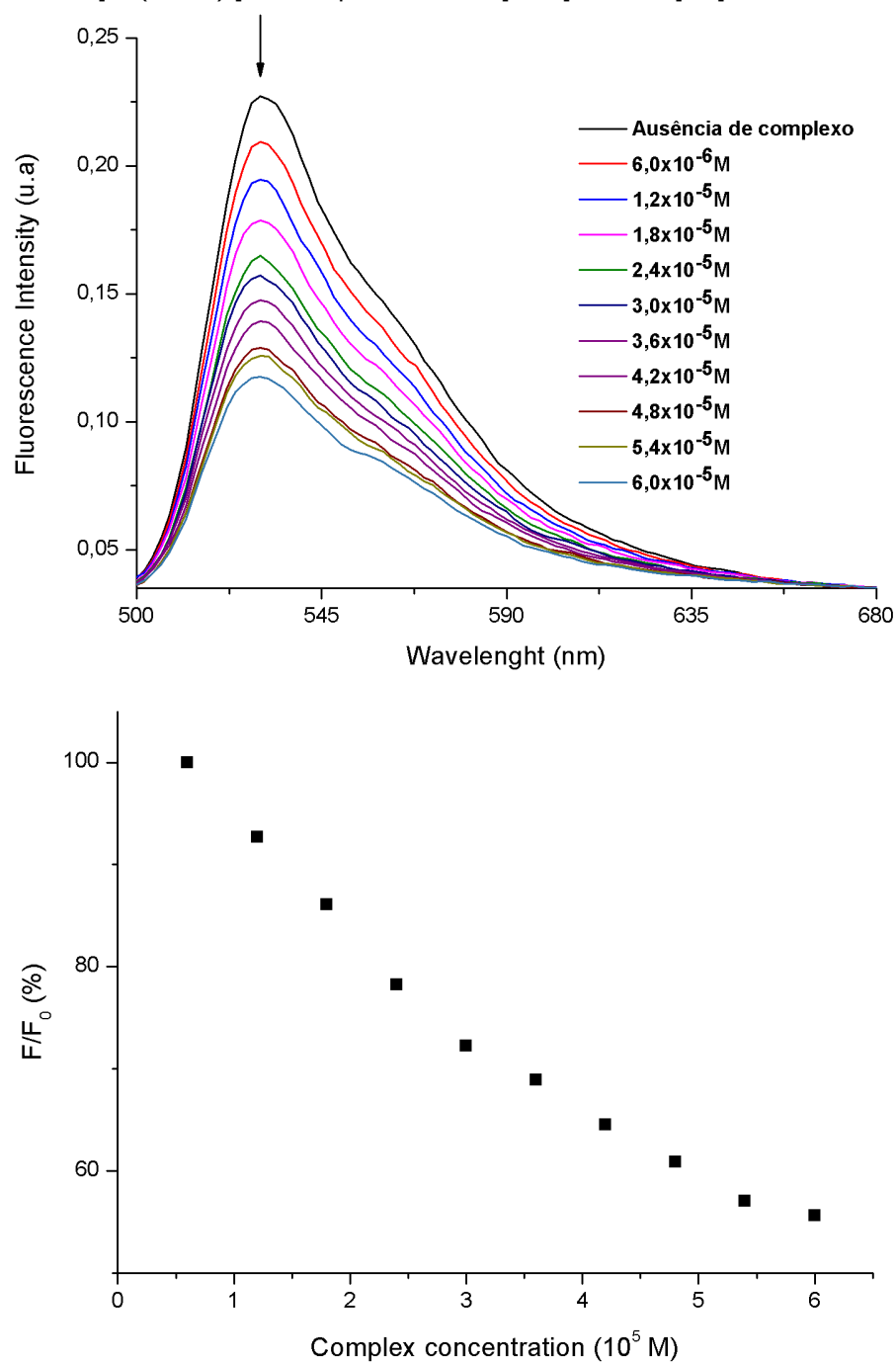
Figura 56- Estrutura química do Laranja de Tiazol (TO).



Fonte: Autor.

Mediante os espectros de emissão de fluorescência com o Laranja de Tiazol (TO) na presença de *ct*-DNA, foi possível observar o comportamento do complexo [Ru(VTSC)₃]. Analisando os espectros obtidos (Figura 57), pode-se observar uma supressão na fluorescência de 47,88%. Isto indica que ao aumentar a concentração de complexo para a solução TO-DNA, a fluorescência do aduto é progressivamente suprimida pelo composto em estudo. Uma vez que a supressão por parte do complexo foi inferior a 100%, pode-se sugerir que a interação do complexo com o *ct*-DNA é mais fraca que o Laranja de Tiazol com a biomolécula.

Figura 57- Espectros de emissão do aduto TO-DNA na presença de concentrações crescentes de $[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$ em tampão Tris-HCl. $[\text{DNA}] = 60 \text{ M}$; $[\text{TO}] = 6 \text{ M}$.



5 Ensaio de Viabilidade Celular

O cálculo de viabilidade celular foi realizado para a concentração de 100 μM , que se encontra resumido na **Tabela 11**. Os dados obtidos para o complexo $\text{Ru}(\text{VETSC})_3$ na concentração de 100 μM apontam seu maior efeito na viabilidade nas células tumorais (**MDA-MB-231**) do que nas células não tumorais (**MRC5**). Além disso, é o único complexo da série que é mais ativo que o ligante livre.

Tabela 11. Viabilidade celular (%) dos complexos e os ligantes obtidos.

Composto	MRC-5	MDA-MB-231
$[\text{Ru}(\text{VTSC})_3]$	$82,90 \pm 4,15$	$100,20 \pm 3,94$
VTSC	$107,99 \pm 3,56$	$111,37 \pm 3,26$
$[\text{Ru}(\text{VMTSC})_3]$	$133,62 \pm 3,32$	$111,67 \pm 3,00$
VMTSC	$78,99 \pm 4,42$	$100,54 \pm 4,75$
$[\text{Ru}(\text{VETSC})_3]$	$98,67 \pm 4,84$	$75,62 \pm 5,10$
VETSC	$74,48 \pm 1,66$	$81,37 \pm 4,03$
$[\text{Ru}(\text{VFTSC})_3]$	$94,39 \pm 3,55$	$101,94 \pm 3,50$
VFTSC	$57,02 \pm 2,13$	$48,11 \pm 2,48$

6 Conclusões

Para os ligantes tiossemicarbazonas usados, por serem compostos já estudados, caracterizados e apresentarem sínteses simples e com metodologias estabelecidas, estes não apresentaram grandes desafios nas sínteses e elucidação. Portanto, suas obtenções foram exitosas. As análises dos dados indicam que ocorreu formação de complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{TSC})_3]$. Após análise dos resultados de caracterização dos complexos podemos dizer que a obtenção destes foi bem sucedida. Os complexos testados frente às linhagens de células tumorais apresentaram pouca ou nenhuma atividade para células de câncer de mama. Porém, de acordo com os resultados obtidos nos testes com DNA, de acordo com a literatura, a possível aplicação destes compostos como anticancerígenos pode ser promissora para outros tipos de câncer.

REFERÊNCIAS

- (1) World Health Organization. *Câncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 2022-04-26).
- (2) ONU. *El cáncer mató a diez millones de personas en 2020, la mayoría en países de renta baja y media El cáncer de mama se ha convertido en el más común a nivel mundial, sobrepasando al de pulmón | Noticias ONU*. <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492> (accessed 2022-05-02).
- (3) National Cancer Institute. *Sitios comunes de cáncer: datos estadísticos sobre el cáncer*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/common.html> (accessed 2022-05-03).
- (4) INCA. *Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco*. <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/> (accessed 2022-04-26).
- (5) Landis, S. H.; Murray, T.; Bolden, S.; Wingo, P. A. Cancer Statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* **1998**, 48 (1), 6–29. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.48.1.6>.
- (6) Wight, A. J.; Ogden, G. R. Possible Mechanisms by Which Alcohol May Influence the Development of Oral Cancer--a Review. *Oral Oncol* **1998**, 34 (6), 441–447. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(98\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(98)00022-0).
- (7) Haorah, J.; Zhou, L.; Wang, X.; Xu, G.; Mirvish, S. S. Determination of Total N-Nitroso Compounds and Their Precursors in Frankfurters, Fresh Meat, Dried Salted Fish, Sauces, Tobacco, and Tobacco Smoke Particulates. *J Agric Food Chem* **2001**, 49 (12), 6068–6078. <https://doi.org/10.1021/JF010602H>.
- (8) Weinberg, R. A. How Cancer Arises. *Sci Am* **1996**, 275 (3), 62–70.
- (9) Hesketh, Robin. *The Oncogene and Tumour Suppressor Gene Factsbook*. **1997**, 549.
- (10) Sherr, C. J. Principles of Tumor Suppression. *Cell* **2004**, 116 (2), 235–246. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01075-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01075-4).
- (11) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, 144 (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>.
- (12) Bacac, M.; Stamenkovic, I. Metastatic Cancer Cell. *Annu Rev Pathol* **2008**, 3, 221–247. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PATHMECHDIS.3.121806.151523>.
- (13) Ghosh, S. Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorg Chem* **2019**, 88. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2019.102925>.
- (14) Khoury, A.; Deo, K. M.; Aldrich-Wright, J. R. Recent Advances in Platinum-Based Chemotherapeutics That Exhibit Inhibitory and Targeted Mechanisms of Action. *J Inorg Biochem* **2020**, 207. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2020.111070>.
- (15) de Almeida, V. L.; Leitão, A.; Barrett Reina, L. D. C.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular

Específicos e Ciclo-Cellular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução. *Quim Nova* **2005**, 28 (1), 118–129. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>.

- (16) Holzer, A. K.; Manorek, G. H.; Howell, S. B. Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Mol Pharmacol* **2006**, 70 (4), 1390–1394. <https://doi.org/10.1124/MOL.106.022624>.
- (17) Yu, C.; Wang, Z.; Sun, Z.; Zhang, L.; Zhang, W.; Xu, Y.; Zhang, J. J. Platinum-Based Combination Therapy: Molecular Rationale, Current Clinical Uses, and Future Perspectives. *J Med Chem* **2020**, 63 (22), 13397–13412. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C00950>.
- (18) Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Trans* **2018**, 47 (19), 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>.
- (19) Mariggiò, M. A.; Cafaggi, S.; Ottone, M.; Parodi, B.; Vannozzi, M. O.; Mandys, V.; Viale, M. Inhibition of Cell Growth, Induction of Apoptosis and Mechanism of Action of the Novel Platinum Compound Cis-Diaminechloro-[2-(Diethylamino) Ethyl 4-Amino-Benzoate, N(4)]-Chloride Platinum (II) Monohydrochloride Monohydrate. *Invest New Drugs* **2004**, 22 (1), 3–16. <https://doi.org/10.1023/B:DRUG.00000006170.38419.C9>.
- (20) Green, M.; Garner, M.; Orton, D. M. Literature Highlights—29. *Transition Metal Chemistry* 1992 17:2 **1992**, 17 (2), 164–176. <https://doi.org/10.1007/BF02910812>.
- (21) Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance. *Oncogene* **2012**, 31 (15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.384>.
- (22) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer* **2003**, 3 (5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/NRC1074>.
- (23) Pinedo, H. M.; Peters, G. F. J. Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology. *J Clin Oncol* **1988**, 6 (10), 1653–1664. <https://doi.org/10.1200/JCO.1988.6.10.1653>.
- (24) Cmelak, A. J. Current Issues in Combined Modality Therapy in Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2012**, 84 (2), 261–273. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2012.04.004>.
- (25) Cervantes, A.; Roda, D.; Tarazona, N.; Roselló, S.; Pérez-Fidalgo, J. A. Current Questions for the Treatment of Advanced Gastric Cancer. *Cancer Treat Rev* **2013**, 39 (1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2012.09.007>.
- (26) Perez-Rebolledo, A.; Ayala, J. D.; de Lima, G. M.; Marchini, N.; Bombieri, G.; Zani, C. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H. Structural Studies and Cytotoxic

- Activity of N(4)-Phenyl-2-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone Sn(IV) Complexes. *Eur J Med Chem* **2005**, 40 (5), 467–472. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2005.01.006>.
- (27) Tchounwou, P. B.; Dasari, S.; Noubissi, F. K.; Ray, P.; Kumar, S. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *J Exp Pharmacol* **2021**, 13, 303. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>.
- (28) Caires, A. C. F. Recent Advances Involving Palladium (II) Complexes for the Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **2007**, 7 (5), 484–491. <https://doi.org/10.2174/187152007781668661>.
- (29) Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Substrate Recognition and Transport by Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett* **2006**, 580 (4), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.12.036>.
- (30) Grubbs, R. H. RUTHENIUM. *Chemical & Engineering News* **2010**, 81 (36), 112. <https://doi.org/10.1021/CEN-V081N036.P112>.
- (31) Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem Rev* **2014**, 114 (8), 4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>.
- (32) Renfrew, A. K. Transition Metal Complexes with Bioactive Ligands: Mechanisms for Selective Ligand Release and Applications for Drug Delivery. *Metallomics* **2014**, 6 (8), 1324–1335. <https://doi.org/10.1039/c4mt00069b>.
- (33) Jabłońska-Wawrzycka, A.; Rogala, P.; Michałkiewicz, S.; Hodorowicz, M.; Barszcz, B. Ruthenium Complexes in Different Oxidation States: Synthesis, Crystal Structure, Spectra and Redox Properties. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (17), 6092–6101. <https://doi.org/10.1039/C3DT32214A>.
- (34) Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, 7th Edition.; 2019.
- (35) Gasser, G.; Metzler-Nolte, N. The Potential of Organometallic Complexes in Medicinal Chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **2012**, 16 (1), 84–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.01.013>.
- (36) Brabec, V.; Nováková, O. DNA Binding Mode of Ruthenium Complexes and Relationship to Tumor Cell Toxicity. *Drug Resistance Updates* **2006**, 9 (3), 111–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.05.002>.
- (37) Gatter, K. C.; Brown, G.; Trowbridge, I. S.; Woolston, R. E.; Mason, D. Y. Transferrin Receptors in Human Tissues: Their Distribution and Possible Clinical Relevance. *J Clin Pathol* **1983**, 36 (5), 539. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.5.539>.
- (38) DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; ROGERS, W. P.; KOCH, J. H. Biological Activity of Complex Ions. *Nature* **1952**, 170 (4318), 190–191. <https://doi.org/10.1038/170190a0>.
- (39) Allardyce, C.; Dyson, P. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platin Met Rev* **2001**, 45, 62–69.

- (40) Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-Trans-DMSO-Imidazole-Tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clinical Cancer Research* **2004**, *10* (11), 3717–3727. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0746>.
- (41) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. KP1019, a New Redox-Active Anticancer Agent--Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem Biodivers* **2008**, *5* (10), 2140–2155. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200890195>.
- (42) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, the First Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application. *Chem Sci* **2014**, *5* (8), 2925–2932. <https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>.
- (43) Smithen, D. A.; Yin, H.; Beh, M. H. R.; Hetu, M.; Cameron, T. S.; McFarland, S. A.; Thompson, A. Synthesis and Photobiological Activity of Ru(II) Dyads Derived from Pyrrole-2-Carboxylate Thionoesters. *Inorg Chem* **2017**, *56* (7), 4121–4132. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00072>.
- (44) Süss-Fink, G. Arene Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. *Dalton Transactions* **2010**, *39* (7), 1673–1688. <https://doi.org/10.1039/B916860P>.
- (45) Merlino, A. Interactions between Proteins and Ru Compounds of Medicinal Interest: A Structural Perspective. *Coord Chem Rev* **2016**, *326*, 111–134. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2016.08.001>.
- (46) Kapitza, S.; Pongratz, M.; Jakupec, M. A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Lackinger, L.; Keppler, B. K.; Marian, B. Heterocyclic Complexes of Ruthenium(III) Induce Apoptosis in Colorectal Carcinoma Cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **2005**, *131* (2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0617-0>.
- (47) Sava, G.; Bergamo, A.; Zorzet, S.; Gava, B.; Casarsa, C.; Cocchietto, M.; Furlani, A.; Scarcia, V.; Serli, B.; Iengo, E.; Alessio, E.; Mestroni, G. Influence of Chemical Stability on the Activity of the Antimetastasis Ruthenium Compound NAMI-A. *Eur J Cancer* **2002**, *38* (3), 427–435. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00389-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00389-6).
- (48) Thompson, D. S.; Weiss, G. J.; Jones, S. F.; Burris, H. A.; Ramanathan, R. K.; Infante, J. R.; Bendell, J. C.; Ogden, A.; von Hoff, D. D. NKP-1339: Maximum Tolerated Dose Defined for First-in-Human GRP78 Targeted Agent. *Journal of Clinical Oncology* **2012**, *30* (15_suppl), 3033. https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.3033.
- (49) Monro, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges,

- Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem Rev* **2019**, *119* (2), 797–828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211>.
- (50) Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; de Lima, J. G.; de Faria, A. R.; Alves, A. J.; de Aquino, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. *Quim Nova* **2005**, *28* (6), 1030–1037. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600018>.
- (51) PILLI, R.; PINHEIRO, S.; Costa, P. R. R.; VASCONCELLOS, M. Substâncias Carboniladas e Derivados. **2003**, 411.
- (52) Klayman, D. L.; Bartosevich, J. F.; Griffin, T. S.; Mason, C. J.; Scovill, J. P. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones. 1. A New Class of Potential Antimalarial Agents. *J Med Chem* **1979**, *22* (7), 855–862. https://doi.org/10.1021/JM00193A020/SUPPL_FILE/JM00193A020_SI_001.PDF.
- (53) Quiroga, A. G.; Pérez, J. M.; López-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Luque, A.; Román, P.; Edwards, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. Novel Tetranuclear Orthometalated Complexes of Pd(II) and Pt(II) Derived from p-Isopropylbenzaldehyde Thiosemicarbazone with Cytotoxic Activity in Cis-DDP Resistant Tumor Cell Lines. Interaction of These Complexes with DNA. *J Med Chem* **1998**, *41* (9), 1399–1408. https://doi.org/10.1021/JM970520D/SUPPL_FILE/JM1399.PDF.
- (54) de Siqueira, L. R. P.; de Moraes Gomes, P. A. T.; de Lima Ferreira, L. P.; de Melo Rêgo, M. J. B.; Leite, A. C. L. Multi-Target Compounds Acting in Cancer Progression: Focus on Thiosemicarbazone, Thiazole and Thiazolidinone Analogues. *Eur J Med Chem* **2019**, *170*, 237–260. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.03.024>.
- (55) Pelosi, G.; Bisceglie, F.; Bignami, F.; Ronzi, P.; Schiavone, P.; Re, M. C.; Casoli, C.; Pilotti, E. Antiretroviral Activity of Thiosemicarbazone Metal Complexes. *J Med Chem* **2010**, *53* (24), 8765–8769. https://doi.org/10.1021/JM1007616/SUPPL_FILE/JM1007616_SI_001.PDF.
- (56) Pedro, P. I.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Lemos, S. S.; de Sousa, G. F.; Batista, A. A.; Nascimento, O. R.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Niquet, E.; Deflon, V. M. Vanadium Complexes with Thiosemicarbazones: Synthesis, Characterization, Crystal Structures and Anti-Mycobacterium Tuberculosis Activity. *Web of Science* **2009**, *28* (2), 398–406. <https://doi.org/10.1016/J.POLY.2008.11.017>.
- (57) Bal, T. R.; Anand, B.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. Synthesis and Evaluation of Anti-HIV Activity of Isatin Beta-Thiosemicarbazone Derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15* (20), 4451–4455. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2005.07.046>.
- (58) Lobana, T. S.; Sharma, R.; Bawa, G.; Khanna, S. Bonding and Structure Trends of Thiosemicarbazone Derivatives of Metals—An Overview. *Coord Chem Rev* **2009**, *253* (7–8), 977–1055. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2008.07.004>.

- (59) Deng, J.; Yu, P.; Zhang, Z.; Wang, J.; Cai, J.; Wu, N.; Sun, H.; Liang, H.; Yang, F. Designing Anticancer Copper(II) Complexes by Optimizing 2-Pyridine-Thiosemicarbazone Ligands. *Eur J Med Chem* **2018**, *158*, 442–452. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.09.020>.
- (60) Jouad, E. M.; Larcher, G.; Allain, A.; Riou, A.; Bouet, G. M.; Khan, M. A.; Thanh, X. do. Synthesis, Structure and Biological Activity of Nickel(II) Complexes of 5-Methyl 2-Furfural Thiosemicarbazone. *J Inorg Biochem* **2001**, *86* (2–3), 565–571. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00220-3).
- (61) Mendes, I. C.; Moreira, J. P.; Mangrich, A. S.; Balena, S. P.; Rodrigues, B. L.; Beraldo, H. Coordination to Copper(II) Strongly Enhances the in Vitro Antimicrobial Activity of Pyridine-Derived N(4)-Tolyl Thiosemicarbazones. *Polyhedron* **2007**, *26* (13), 3263–3270. <https://doi.org/10.1016/J.POLY.2007.03.002>.
- (62) Beckford, F. A.; Thessing, J.; Shaloski, M.; Mbarushimana, P. C.; Brock, A.; Didion, J.; Woods, J.; Gonzalez-Sarrías, A.; Seeram, N. P. Synthesis and Characterization of Mixed-Ligand Diimine-Piperonal Thiosemicarbazone Complexes of Ruthenium(II): Biophysical Investigations and Biological Evaluation as Anticancer and Antibacterial Agents. *J Mol Struct* **2011**, *992* (1–3), 39–47. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2011.02.029>.
- (63) Anchuri, S. S.; Dhulipala, S.; Thota, S.; Bongoni, R. N.; Yerra, R.; Reddy, A. R. N. Antimicrobial and Antimalarial Activity of Novel Synthetic Mononuclear Ruthenium(II) Compounds. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2013**, *60* (2), 153–159. <https://doi.org/10.1002/JCCS.201200301>.
- (64) Dausch, A.; Pastore, G. Obtenção de Vanilina: Oportunidade Biotecnológica. *Quim Nova* **2005**, *28* (4), 642–645. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400017>.
- (65) Lirdprapamongkol, K.; Sakurai, H.; Kawasaki, N.; Choo, M. K.; Saitoh, Y.; Aozuka, Y.; Singhirunnusorn, P.; Ruchirawat, S.; Svasti, J.; Saiki, I. Vanillin Suppresses in Vitro Invasion and in Vivo Metastasis of Mouse Breast Cancer Cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *25* (1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2005.01.015>.
- (66) Md Shahan Shahriar, S.; Mohsin Ali, S. M.; Jesmin, M.; Khairul Islam, M.; Mondal, S. In Vivo Anticancer Activity of Vanillin, Benzophenone and Acetophenone Thiosemicarbazones on Swiss Albino Mice. *Journal of Coastal Life Medicine* **2014**. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.201414B35>.
- (67) Ljubijankić N; Tešević V; Grgurić-Šipka S; Jadranin M; Begić S; Buljubašić L; Markotić E; Ljubijankić S. Synthesis and Characterization of Ru(III) Complexes with Thiosemicarbazide-Based Ligands. **2016**.
- (68) Singh, B.; Rukhaiyar, M. M. P.; Sinha, R. J. Thioamide Bands and Nature of Bonding—IV: Chelating Behaviour of 2-Mercaptoquinazole-4-One. *Journal of*

Inorganic and Nuclear Chemistry **1977**, 39 (1), 29–32.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1902\(77\)80426-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1902(77)80426-0).

- (69) Gastaca, B.; Sánchez, H. R.; Menestrina, F.; Caputo, M.; Schiavoni, M. de las M.; Furlong, J. J. P.; Gastaca, B.; Sánchez, H. R.; Menestrina, F.; Caputo, M.; Schiavoni, M. de las M.; Furlong, J. J. P. Thiosemicarbazones Synthesized from Acetophenones: Tautomerism, Spectrometric Data, Reactivity and Theoretical Calculations. *Int J Anal Mass Spectrom Cromatogr* **2019**, 7 (2), 19–34. <https://doi.org/10.4236/IJAMSC.2019.72003>.
- (70) Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G.; Vyvyan, J. Introdução à Espectroscopia. *Cengage Learning* **2012**, 700.
- (71) Galavotti, J. S. O. Síntese, Caracterização e Avaliação de Atividades Biológicas de Tiossemicarbazonas e Semicarbazonas Vanilínicas e Seus Derivados de Dinitrosilos de Ferro, 2019.
- (72) Rodríguez Riobó, R. Complejos Metálicos Con Tiosemicarbazonas Derivadas de La 2-Pirazinaformamida. **2008**.
- (73) Issa, R. M.; Khedr, A. M.; Rizk, H. ¹H NMR, IR and UV/VIS Spectroscopic Studies of Some Schiff Bases Derived from 2-Aminobenzothiazole and 2-Amino-3-Hydroxypyridine. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2008**, 55 (4), 875–884. <https://doi.org/10.1002/JCCS.200800131>.
- (74) Souza, J.; Galavotti, O. Síntese, Caracterização e Avaliação de Atividades Biológicas de Tiossemicarbazonas e Semicarbazonas Vanilínicas e Seus Derivados de Dinitrosilos de Ferro. **2019**. <https://doi.org/10.17616/R31NJN39>.
- (75) Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry: Sixth Edition. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry: Sixth Edition* **2008**, 1–419. <https://doi.org/10.1002/9780470405840>.
- (76) Ghosh, B.; Adak, P.; Naskar, S.; Pakhira, B.; Mitra, P.; Dinda, R.; Chattopadhyay, S. K. Ruthenium(II) Complexes of Thiosemicarbazones: Synthesis, X-Ray Crystal Structures, Spectroscopy, Electrochemistry, DFT Studies and Fluoride Sensing Properties. *Inorganica Chim Acta* **2017**, 459, 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2017.01.011>.
- (77) Jabłońska-Wawrzycka, A.; Rogala, P.; Michałkiewicz, S.; Hodorowicz, M.; Barszcz, B. Ruthenium Complexes in Different Oxidation States: Synthesis, Crystal Structure, Spectra and Redox Properties. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (17), 6092–6101. <https://doi.org/10.1039/C3DT32214A>.
- (78) Grgurić-Šipka. Synthesis and Characterization of Ru (III) Complexes with Thiosemicarbazide-Based Ligands. **2016**.
- (79) Al-Amiery, A. A.; Al-Majedy, Y. K.; Abdulreazak, H.; Abood, H. Synthesis, Characterization, Theoretical Crystal Structure, and Antibacterial Activities of

Some Transition Metal Complexes of the Thiosemicarbazone (Z)-2-(Pyrrolidin-2-Ylidene)Hydrazinecarbothioamide. *Bioinorg Chem Appl* **2011**, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/483101>.

- (80) Sampath, K.; Jayabalakrishnan, C. Ruthenium(III) Thiosemicarbazone Complexes: Synthesis, Characterization, DNA Binding, Antibacterial, In Vitro Anticancer and Antioxidant Studies. *DJ Journal of Engineering Chemistry and Fuel* **2016**, 1 (1), 40–53. <https://doi.org/10.18831/DJCHEM.ORG/2016011004>.
- (81) El-Bahnasawy, R.; Sharafeldein, Dr. L.; El-Tabl, A.; Wahba, M.; El-Mensef, A. ELECTRICAL CONDUCTIVITY OF SALICYLALDEHYDE THIOSEMICARBAZONE AND Pd(II), Cu(II) AND Ru(III). *Eur. Chem. Bull* **2014**, 3, 441–446.
- (82) Ghosh, B.; Adak, P.; Naskar, S.; Pakhira, B.; Mitra, P.; Dinda, R.; Chattopadhyay, S. K. Ruthenium(II) Complexes of Thiosemicarbazones: Synthesis, X-Ray Crystal Structures, Spectroscopy, Electrochemistry, DFT Studies and Fluoride Sensing Properties. *Inorganica Chim Acta* **2017**, 459, 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2017.01.011>.
- (83) de Andrade Danin Barbosa, G.; de Aguiar, A. P. Synthesis of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives and Microbiological Activities: A Review. *Revista Virtual de Quimica* **2019**, 11 (3), 806–848. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190058>.
- (84) Ghosh, B.; Adak, P.; Naskar, S.; Pakhira, B.; Mitra, P.; Chattopadhyay, S. K. Ruthenium(II/III) Complexes of Redox Non-Innocent Bis(Thiosemicarbazone) Ligands: Synthesis, X-Ray Crystal Structures, Electrochemical, DNA Binding and DFT Studies. *Polyhedron* **2017**, 131, 74–85. <https://doi.org/10.1016/J.POLY.2017.04.013>.
- (85) Sousa, L. M.; Souza, W. A.; Paixão, D. A.; Fazzi, R. B.; Tezuka, D. Y.; Lopes, C. D.; Carneiro, Z. A.; Moreira, M. B.; Pivatto, M.; Netto, A. V. G.; de Albuquerque, S.; Ferreira, F. B.; de Oliveira, R. J.; Resende, J. A. L. C.; Lino, R. C.; de Oliveira Júnior, R. J.; da Costa Ferreira, A. M.; Guerra, W. DNA Binding, Cleavage, Apoptosis and Cytotoxicity Studies of Three Heteroleptic Nickel Complexes Bearing β -Diketones. *Inorganica Chim Acta* **2020**, 511, 119824. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2020.119824>.
- (86) Ghosh, K.; Kumar, P.; Tyagi, N.; Singh, U. P.; Aggarwal, V.; Baratto, M. C. Synthesis and Reactivity Studies on New Copper(II) Complexes: DNA Binding, Generation of Phenoxyl Radical, SOD and Nuclease Activities. *Eur J Med Chem* **2010**, 45 (9), 3770–3779. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2010.05.026>.
- (87) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J Photochem Photobiol B* **2013**, 124, 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2013.03.013>.
- (88) Silva, D. E. S.; Becceneri, A. B.; Solcia, M. C.; Santiago, J. V. B.; Moreira, M. B.; Gomes Neto, J. A.; Pavan, F. R.; Cominetti, M. R.; Pereira, J. C. M.; Netto, A. V.

- G. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Ternary Silver(I) Complexes Bearing 2-Formylpyridine Thiosemicarbazones and 1,10-Phenanthroline. *Dalton Transactions* **2020**, 49 (16), 5264–5275. <https://doi.org/10.1039/D0DT00253D>.
- (89) Webb, L. Circular Dichroism and Linear Dichroism Alison Rodger and Bengt Nordén. Oxford University Press, Oxford, U.K. 1997. x + 150 Pp. 19.5 × 25 Cm. ISBN 0-19-855897-X. \$60.00. *J Med Chem* **1997**, 40 (25), 4160–4160. <https://doi.org/10.1021/JM9705622>.
- (90) Rehman, S. U.; Sarwar, T.; Husain, M. A.; Ishqi, H. M.; Tabish, M. Studying Non-Covalent Drug-DNA Interactions. *Arch Biochem Biophys* **2015**, 576, 49–60. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.03.024>.
- (91) Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaite, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* **2018**, 6 (2). <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS6020018>.
- (92) Boger, D. L.; Tse, W. C. Thiazole Orange as the Fluorescent Intercalator in a High Resolution Fid Assay for Determining DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity of Small Molecules. *Bioorg Med Chem* **2001**, 9 (9), 2511–2518. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00243-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00243-7).
- (93) Boger, D. L.; Tse, W. C. Thiazole Orange as the Fluorescent Intercalator in a High Resolution Fid Assay for Determining DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity of Small Molecules. *Bioorg Med Chem* **2001**, 9 (9), 2511–2518. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00243-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00243-7).