

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

**“Avaliação das propriedades antitumorais de complexos de rutênio(II) contendo os ligantes lapachol ou lausona”**

**Katia Mara de Oliveira\***

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

**Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista**

\* Bolsista FAPESP (Processo 2014/04147-9) e BEPE (Processo 2016/18530-4)

**São Carlos – SP**  
**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Katia Mara de Oliveira, realizada em 29/06/2018:

---

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista  
UFSCar

---

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto  
UNESP

---

Profa. Dra. Denise Crispim Tavares  
UNIFRAN

---

Prof. Dr. Filipe Vieira Rocha  
UFSCar

---

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira  
UFSCar

Aos meus pais **Valdete** e **Jader** (*in memoriam*),  
Aos meus irmãos **Kledson** e **Isabelle**,  
Ao **Tiago**.

**Dedico**

## Agradecimentos

A **Deus**, por me guiar e me permitir chegar até aqui!

Ao **Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista** pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação, confiança depositada e ensinamentos ao longo desses anos.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Corrêa** e ao **MSc. João Honorato** pela resolução das estruturas cristalográficas.

À **Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti** pela colaboração e por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos ensaios biológicos.

Aos amigos do LERCI, **Adriana, Ana Lu, Beatriz, Celis, Gabriel, Gregory, João Honorato, Legna, Letícia, Luciano, Maria José, Mariana, Monize, Rafael, Rodrigo, Sabrina, Taíse, Tamires, Wilmer, Vanessa, João Paulo, Marília, Lucas, Angelica** e a **Claudia** (*in memoriam*) que nos faz tanta falta, pelas discussões científicas e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos momentos de diversão, por cada churrasco na casa do João e do Gabriel, por cada almoço e pelas risadas. Obrigada pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Agradeço também aos “agregados” do LERCI, **Mitchel, Tiago, Welma, Jocely, Tássia, Júnio, David, Angel, July** e aos pequenos **Ruben e Angel**.

Às meninas do Laben **Amanda, Cecília, Angelina, Liany, Marina e Marcela** pela amizade e pela disponibilidade para ajudar na realização dos ensaios biológicos e tirar dúvidas.

Ao **Prof. Dr. Nicholas Farrell** por ter aberto as portas do seu laboratório me dando a oportunidade de viver uma experiência incrível, tanto profissional como também pessoal. Obrigada pelas discussões e ensinamentos!

Aos amigos do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Nicholas Farrell da Virginia Commonwealth University em Richmond, nos EUA: **Eric Ginsburg, Erica, Thomas, Samantha, Wyatt, James e David** por toda a ajuda, acolhimento e discussões científicas durante a minha estadia em Richmond. I don't know how to thank you guys!

Ao **Eric Ginsburg** pela amizade, pelo acolhimento, por toda a ajuda e pelos momentos de descontração. Thank you very much!

Aos amigos **Angelica, Veroni, Alice e Helena** por terem me acolhido tão bem em Richmond e por toda a imensa ajuda e os incríveis momentos que me proporcionaram!

À minha amiga **Fran** por todo o carinho e amizade desde o tempo da graduação.

À minha mãe **Valdete** e ao meu pai **Jader** (*in memoriam*), que sempre batalharam para que eu pudesse conquistar os meus sonhos. Obrigada pelo carinho, dedicação, incentivo e por sempre acreditarem em mim! Vocês são meu exemplo de força e determinação. Se hoje cheguei até aqui foi por vocês, e espero um dia conseguir retribuir todos os seus esforços! Amo vocês!

Aos meus irmãos **Kledson e Isabelle** por serem os melhores presentes que a vida me deu. Obrigada pela torcida, e por serem os melhores irmãos! O tempo e a distância não me permitiu estar com vocês em vários momentos, mas vocês estão sempre no meu coração! Amo vocês!

Ao **Tiago**, meu companheiro de todas as horas, pelo amor, carinho, paciência e por sempre me apoiar e me incentivar. A caminhada ao seu lado tornou tudo mais fácil e prazeroso! Te Amo!

Aos meus sogros, **Selmes e Cleiton** e seus familiares pelo apoio e por sempre torcerem por mim. Obrigada pelos excelentes momentos que me proporcionaram! Ao **Marcos, Quéren** e a pequena **Letícia**, pelo carinho.

Ao Departamento de Química da UFSCar e ao Programa de Pós-graduação em Química, em especial às secretárias **Ariane, Cristina e Luciani**.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar que contribuíram para a minha formação.

Aos técnicos do DQ-UFSCar **Ademir Sartori, Luciana Vizoto e Paulo Lambertucci**.

À FAPESP no âmbito do convênio FAPESP/CAPES pela bolsa de doutorado concedida (Processo 2014/04147-9) e pela BEPE (Processo 2016/18530-4).

**MUITO OBRIGADA!**

### **Agradecimento à FAPESP**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no âmbito do convênio FAPESP/CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) processos nº 2014/04147-9 e BEPE processo nº 2016/18530-4.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

“Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir.  
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida  
e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.  
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades  
para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.”

**Clarice Lispector**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano
bipy	2,2'-bipiridina
dppm	<i>bis</i> (difenilfosfina)metano
dppe	1,2'- <i>bis</i> (difenilfosfina)etano
dppb	1,4'- <i>bis</i> (difenilfosfina)butano
dppf	1,1'- <i>bis</i> (difenilfosfina)ferroceno
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
N-N	Ligantes N-heterocíclicos
P-P	Ligantes bifosfínicos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama (triplo negativo)
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MCF-10A	Células não tumorais de mama humana
A549	Câncer de pulmão
DU-145	Câncer de próstata
FGH	Células não tumorais de gengiva humana
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
CHO-K1	Células de ovário de hamster chinês
CHO-pgsA745	Células de ovário de hamster chinês (sem HS e CS)
HS	Heparan Sulfato
CS	Sulfato de Condroitina
TAMRA-R <sub>9</sub>	Peptídeo de nona-arginina R <sub>9</sub> acoplado ao carboxitetrametilrodamina
IC <sub>50</sub>	Concentração que Inibe 50% do crescimento celular
FBS	Soro fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
DMEM	Meio Dulbecco Modificado ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PBS	Tampão salino de fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
EGF	Receptor do fator de crescimento epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )

VEGFA	Fator de Crescimento Endotelial Vascular A ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> )
PGF	Fator de Crescimento Placentário ( <i>Placental Growth Factor</i> )
ANG1	Angiopietina-1
HER-2	Receptor do Fator de Crescimento Humano 2 ( <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> )
ER	Receptor de Estrógeno ( <i>Estrogen Receptor</i> )
PR	Receptor de Progesterona ( <i>Progesteron Receptor</i> )
TNBC	Câncer de mama triplo negativo ( <i>Triple Negative Breast Cancer</i> )
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2 ( <i>Fibroblast Growth Factor 2</i> )
BSA	Albumina de Soro Bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
HSA	Albumina de Soro Humana ( <i>Human Serum Albumin</i> )
CT-DNA	Ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro ( <i>DeoxyriboNucleic Acid sodium salt from Calf Thymus</i> )
pBR322	DNA plasmidial
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
PTBA	Perclorato de tetrabutílamônio
IL	Transição eletrônica intraligante
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante
ppm	Partes por milhão
RMN <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H}	Ressonância magnética nuclear de fósforo desacoplado do <sup>1</sup> H
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
UV-vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível
<i>trans</i>	Isômero de posição <i>trans</i> , de um composto inorgânico ou orgânico
<i>cis</i>	Isômero de posição <i>cis</i> , de um composto inorgânico ou orgânico
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente
δ	Deslocamento químico nos espectros de RMN
ε	Absortividade molar

$\lambda$	Comprimento de onda
nm	Nanômetro
$\pi$	Ligação pi
$\sigma$	Ligação sigma
$\mu$	Micro ( $1 \times 10^{-6}$ )
attomol	$10^{-18}$
J	Constante de acoplamento
$\nu$	Frequência de estiramento
$E_{ox}$	Potencial de oxidação
Hz	Hertz

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> - Valores de IC <sub>50</sub> em μM e índice de seletividade (IS) para os complexos de rutênio e cisplatina nas linhagens L929 e MCF-7 <sup>80</sup> .....	24
<b>TABELA 2</b> - Dados de condutividade molar e análise elementar dos complexos sintetizados.....	51
<b>TABELA 3</b> - Dados de absorvidade molar (ε) e tentativa de atribuição das bandas.....	55
<b>TABELA 4</b> - Principais valores de distância e ângulos de ligação para as estruturas dos complexos (1) [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> e (2) [Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> .....	67
<b>TABELA 5</b> - Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} do ligante lapachol livre e do complexo [Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> , em DMSO-d <sub>6</sub> .....	71
<b>TABELA 6</b> - Potenciais de oxidação Ru <sup>II</sup> /Ru <sup>III</sup> para os complexos contendo lap ou lau, e para os complexos precursores.....	72
<b>TABELA 7</b> - Resultados obtidos para constantes K <sub>SV</sub> , k <sub>q</sub> , K <sub>b</sub> e n para os complexos contendo lau ou lap.....	78
<b>TABELA 8</b> - Parâmetros termodinâmicos para os complexos contendo lau ou lap.....	80
<b>TABELA 9</b> - Constantes de ligação (K <sub>b</sub> ) obtidas para as titulações espectroscópicas entre complexo e CT-DNA. ....	83
<b>TABELA 10</b> - Coeficiente de partição para os complexos contendo lap ou lau.....	91
<b>TABELA 11</b> - Valores de IC <sub>50</sub> e índice de seletividade (IS) para os complexos precursores, complexos contendo lap ou lau, ligantes livres e cisplatina nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A, após 48 h de incubação....	93
<b>TABELA 12</b> - Valores de IC <sub>50</sub> e IS para os complexos precursores, complexos contendo lap ou lau, ligantes livres e cisplatina nas linhagens A549, DU-145 e FGH, após 48 h de incubação.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Características adquiridas pelas células tumorais durante o desenvolvimento de tumores. Adaptado de Hanahan e Weinberg <sup>7</sup> .	3
<b>FIGURA 2</b> - Principais passos na formação da metástase. Adaptado de Fidler <sup>11</sup> .	4
<b>FIGURA 3</b> - Interruptor angiogênico. (a) Nódulos dormentes, (b) desprendimento perivascular e dilatação do vaso, (c) brotação angiogênica, (d) formação e maturação dos vasos, com o recrutamento de células perivasculares, (e) continua formação de vasos sanguíneos. Adaptado de Bergers e Benjamin <sup>6</sup> .	5
<b>FIGURA 4</b> - Formação de novos vasos sanguíneos. (a) Os novos vasos sanguíneos surgem dos vasos preexistentes, (b) os pericitos (em verde) se separam e os vasos se dilatam, degradando a matriz extracelular, (c) as células endoteliais (em vermelho) migram para o espaço perivascular em direção a estímulos angiogênicos, (d) ocorre a proliferação de células endoteliais, se guiando pelos pericitos, (e) as células endoteliais aderem entre si formando novos vasos. Adaptado de Bergers e Benjamin <sup>6</sup> .	6
<b>FIGURA 5</b> - Anatomia da glândula mamária. Adaptado de ACS, 2017 <sup>17</sup> .	7
<b>FIGURA 6</b> - (A) Estruturas dos complexos de platina empregados globalmente no tratamento de câncer e (B) complexos de platina que tiveram seus estudos interrompidos.	13
<b>FIGURA 7</b> - Estruturas dos complexos de rutênio desenvolvidos como potenciais agentes quimioterapêuticos.	15
<b>FIGURA 8</b> - Estruturas das naftoquinonas lapachol e lausona e imagens do ipê roxo e das folhas de Henna, de onde são extraídas.	20
<b>FIGURA 9</b> - Representação da ligação entre metal e fosfina. Adaptado de Shriver e Atkins <sup>72</sup> .	22
<b>FIGURA 10</b> - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lau e do complexo $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ , em pastilhas de KBr.	53
<b>FIGURA 11</b> - Espectro de absorção na região do UV-vis para os ligantes (A) lau e (B) lap, em DMSO.	53
<b>FIGURA 12</b> - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os ligantes (A) lap e (B) lau, protonados e desprotonados, em DMSO.	54
<b>FIGURA 13</b> - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os complexos $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , em DMSO.	56

<b>FIGURA 14</b> - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos precursores (A) <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe) <sub>2</sub> ] e (B) <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ] em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O.....	56
<b>FIGURA 15</b> - Diagrama de desdobramento de sinais dos átomos de fósforo... 57	57
<b>FIGURA 16</b> - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo [Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O.....	58
<b>FIGURA 17</b> - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos precursores (A) <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe)(bipy)] e (B) <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppf)(bipy)] em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O. ....	59
<b>FIGURA 18</b> - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub> em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O.....	60
<b>FIGURA 19</b> - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O e estrutura cristalina para o complexo <i>cis</i> -[Ru(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (lap)] <sup>80</sup> .....	61
<b>FIGURA 20</b> - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> , (A) precipitado com água, e (B) precipitado sozinho, em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O. ....	62
<b>FIGURA 21</b> - Estrutura cristalina do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> . Essa estrutura apresenta uma molécula de éter etílico como solvato e o contra íon PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> , que foram omitidos para melhor clareza.....	63
<b>FIGURA 22</b> - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(lap)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> , (A) precipitado com água e (B) precipitado sozinho, em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O. ....	64
<b>FIGURA 23</b> - Estrutura cristalina para o complexo [Ru(lap)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> . A estrutura apresenta uma molécula de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e o contra íon PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> , que foram omitidas <sup>80</sup> .....	65
<b>FIGURA 24</b> - Estrutura cristalina para o complexo [Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> . A estrutura apresenta uma molécula de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> e o contra íon PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> , que foram omitidos para maior clareza. ....	66
<b>FIGURA 25</b> - Espectro de RMN (A) <sup>1</sup> H e (B) <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} para o lapachol, em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	68
<b>FIGURA 26</b> - Espectro de RMN (A) <sup>1</sup> H e (B) <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} para o [Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> , em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	69
<b>FIGURA 27</b> - (A) Voltamograma cíclico e (B) de pulso diferencial do [Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> em 0,1 M de PTBA, em meio de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . ....	72
<b>FIGURA 28</b> - (A) Voltamograma cíclico e de (B, C) pulso diferencial do [Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub> em 0,1 M de PTBA, em meio de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	73
<b>FIGURA 29</b> - (A) Fotos da reação do produto da eletrólise do complexo [Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub> com K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] após adição de NaOH e HCl (B) e da reação com NH <sub>4</sub> SCN.....	74

- FIGURA 30** - Estrutura da HSA e BSA, evidenciando os resíduos de triptofano, Trp-214 na HSA e Trp-212 e Trp-134, na BSA. Adaptado de Belatik e colaboradores<sup>105</sup>. ..... 75
- FIGURA 31** - (A) Espectro de emissão da BSA em concentrações crescentes do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ . Concentração da BSA = 10  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex.}} = 280$  nm, pH = 7,4 e T = 37°C, (B) Gráfico da intensidade de emissão ( $F_0/F$ ) vs. concentração de complexo [Q]. ..... 76
- FIGURA 32** - Espectro de absorção do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , na presença de adições de CT-DNA. [Complexo] =  $3,33 \times 10^{-5}$  M, [DNA] = 5,08 mM. Gráfico inserido:  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus [DNA]. ..... 82
- FIGURA 33** - Espectro de CD para o CT-DNA (50  $\mu\text{M}$ ) na presença do complexo (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl (pH 7,4). ..... 84
- FIGURA 34** - Ilustração das possíveis formas do DNA plasmidial. .... 85
- FIGURA 35** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na conformação do DNA plasmidial pBR322. M = marcador de peso molecular; DNA = pBR322 (38  $\mu\text{M}$ ) contendo 10% de DMSO; Relação molar complexo/DNA: a = 0,05; b = 0,2; c = 0,4; d = 0,6; e = 0,8; f=1 e g = 2. ... 86
- FIGURA 36** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na conformação do DNA plasmidial pBR322. M = marcador de peso molecular; DNA = pBR322 (38  $\mu\text{M}$ ) contendo 10% de DMSO; Relação molar complexo/DNA: a = 0,05; b = 0,2; c = 0,4; d = 0,6; e = 0,8; f=1 e g = 2. .... 87
- FIGURA 37** - Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na presença de guanossina (1:2), em DMSO em diferentes intervalos de tempo. Ao lado estrutura do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ . ..... 89
- FIGURA 38** - Espectros de emissão do Hoechst (2,7  $\mu\text{M}$ ), CT-DNA (125  $\mu\text{M}$ ), contendo diferentes relações molares  $[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$  (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , a 37°C com  $\lambda_{\text{ex.}} = 340$  nm. .... 90
- FIGURA 39** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na morfologia das células tumorais de mama, (A) MDA-MB-231 e não tumoral de mama, (B) MCF-10A. Cada imagem corresponde a uma das triplicatas, registradas no aumento de 10 $\times$  da objetiva. .... 97
- FIGURA 40** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na morfologia das células tumorais de mama, (A) MDA-MB-231 e não tumorais de mama, (B) MCF-10A. Cada imagem corresponde a uma das triplicatas, registradas no aumento de 10 $\times$  da objetiva. .... 98

- FIGURA 41** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  sobre a formação de colônias nas células tumorais de mama, MDA-MB-231. (A) Gráfico do número de colônias, e (B) Gráfico do tamanho de colônias. \*  $p < 0,02$  e \*\*  $p < 0,009$ . ..... 99
- FIGURA 42** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  sobre a formação de colônias nas células tumorais de mama, MDA-MB-231. (A) Gráfico do número de colônias, e (B) Gráfico do tamanho de colônias. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,0001$ . ..... 100
- FIGURA 43** - Efeito dos complexos (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na migração das células tumorais de mama MDA-MB-231 em ensaio de *Wound Healing* (Aumento de 4× da objetiva). Representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após 24 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata e as imagens apresentadas são representativas de cada condição. .... 103
- FIGURA 44** - Representação esquemática do experimento de migração quimiotática..... 104
- FIGURA 45** - Efeito dos complexos (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na migração celular da linhagem MDA-MB-231. Controle positivo (C+) representa as células não tratadas em meio com FBS e controle negativo (C-) representa as células não tratadas na presença de meio sem FBS. Gráfico do número de células que migraram em função das concentrações dos complexos. O experimento foi realizado em triplicata e as imagens apresentadas são representativas de cada campo das membranas. .... 105
- FIGURA 46** - Efeito inibitório da formação de túbulos vasculares nas células HUVEC (A) Imagens representativas dos túbulos formados e (B) Comprimento dos tubos (%) após 12 h de exposição com os complexos (1)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (2)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em comparação com o controle positivo e suramina. Dados expressos como a média de dois experimentos independentes. .... 107
- FIGURA 47** - Efeito inibitório na formação de túbulos vasculares em células HUVEC na presença do fator de crescimento FGF-2. (A) Imagens representativas dos túbulos formados e (B) Quantificação da extensão dos tubos para os complexos (1)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (2)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . Dados expressos como a média de dois experimentos independentes. \*  $p < 0,03$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . ..... 108

- FIGURA 48** - Quantificação de rutênio nas células MDA-MB-231 após tratamento com os complexos de rutênio *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)(bipy)], *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>], [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, após 3 e 6 h de incubação..... 110
- FIGURA 49** - Quantificação de rutênio nas células MDA-MB-231 e MCF-10A após tratamento com os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, após 3 e 6 h de incubação. \* p < 0,01 e \*\* p < 0,004. .... 111
- FIGURA 50** - (A) Análise da competição entre os complexos de rutênio (1) [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> e (2) [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a sonda TAMRA-R9 na acumulação celular em células da linhagem CHO-K1 e (B) Gráfico de barras da fluorescência relativa da acumulação celular do TAMRA-R<sub>9</sub> e dos complexos de rutênio em comparação com os controles. .... 113
- FIGURA 51** - Acumulação celular de rutênio nas células CKO-K1 e CHO-pgsA-745 após tratamento com 5 μM dos complexos [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> por 3 e 6 h de incubação. \* p ≤ 0,04 e \*\*\* p < 0,0006..... 114
- FIGURA 52** - Estágios do ciclo celular. Adaptado de Vermeulen *et al.*<sup>129</sup>. .... 115
- FIGURA 53** - Efeito do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> na distribuição do ciclo celular de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, após 24 h de incubação. \*\* p < 0,009. .... 116
- FIGURA 54** - Efeito do complexo [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> na distribuição do ciclo celular de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, após 24 h de incubação. \* p ≤ 0,04 e \*\*\*\* p < 0,0001. .... 116
- FIGURA 55** - (A) Efeitos do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> na indução de apoptose nas células tumorais de mama MDA-MB-231. (B) Gráfico da porcentagem de células apoptóticas. \*\* p < 0,002, \*\*\* p < 0,0002 e \*\*\*\* p < 0,0001. .... 118
- FIGURA 56** - (A) Efeitos do complexo [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> na indução de apoptose nas células tumorais de mama MDA-MB-231. (B) Gráfico da porcentagem de células apoptóticas. \*\* p < 0,006, \*\*\* p < 0,0006 e \*\*\*\* p < 0,0001. .... 119
- FIGURA 57** - Representação esquemática da acumulação do JC-1 em células saudáveis, com o potencial de membrana da mitocôndria intacto (JC-1 agregado) e em células com alteração no potencial de membrana da mitocôndria (JC-1 monômero)..... 121
- FIGURA 58** - (A) Gráfico da distribuição das células com potencial de membrana da mitocôndria sem alteração (R1) e alterado (R2), utilizando

- como sonda o corante JC-1 em células MDA-MB-231 tratadas com os complexos **(1)**  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e **(2)**  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e **(B)** Gráfico da porcentagem de células que tiveram o potencial de membrana da mitocôndria alterado (em R2) em função da concentração dos complexos. \*\*  $p < 0,004$  ..... 122
- FIGURA 59** - Imagem representativa da lâmina de vidro e mapa das 19 moléculas de sinalização analisados pelo kit PathScan. .... 124
- FIGURA 60** - Análise da modificação de moléculas envolvidas nas vias de sinalização apoptótica em células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com os complexos de rutênio  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  (A, C) e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  (C, D) e quantificação por densitometria empregando o ImageJ. A expressão dos níveis de  $\alpha$ -Tubulina foram usados para normalizar os sinais. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. .... 125
- FIGURA 61** - Indução de ROS em células MDA-MB-231. **(A)** Imagens representativas das células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lapachol e os complexos de rutênio **(1)**  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e **(2)**  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e **(B)** fluorescência detectada para células em presença dos tratamentos. .... 128

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1</b> - Rota sintética empregada para obtenção dos complexos contendo lap ou lau. ....	49
---	----

**RESUMO**

“AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO(II) CONTENDO OS LIGANTES LAPACHOL OU LAUSONA” Complexos metálicos contendo ligantes que apresentam atividade biológica tem despertado o interesse no campo de desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento do câncer. O lapachol e a lausona são produtos naturais importantes para essa finalidade devido às suas propriedades antitumorais. Diante disso, no presente trabalho foram sintetizados e caracterizados novos complexos de rutênio(II) contendo os ligantes lapachol ou lausona, bem como ligantes bifosfínicos e bipyridina, com o intuito de obter potenciais agentes antitumorais. Os complexos com as seguintes fórmulas estruturais:  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$ , onde L = lapachol ou lausona, P-P = dppf = 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno, dppe = 1,2'-bis(difenilfosfina)etano, dppm = bis(difenilfosfina)metano e bipy = 2,2'-bipyridina, foram caracterizados pelas técnicas: análise elementar, condutimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e do ultravioleta e visível, voltametria cíclica e de pulso diferencial, ressonância magnética nuclear de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e difração de raios X de monocristal, quando possível a obtenção de cristais. Estudos de interação complexo/DNA, por meio das técnicas de titulação espectroscópica, dicroísmo circular, eletroforese em gel de agarose e fluorescência, conduziram à conclusão de que os complexos interagem com o DNA pelos sulcos menores. Análise da capacidade dos complexos interagir com a BSA, por meio da técnica de fluorescência, permitiu concluir que os complexos apresentam interação moderada com a proteína, com constantes de ligação da ordem de  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ . As interações ocorreram de forma espontânea, como evidenciado pelos valores negativos de  $\Delta G^\circ$ , envolvendo forças hidrofóbicas e eletrostáticas. A atividade citotóxica dos complexos foi investigada empregando as linhagens celulares tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), pulmão (A549), próstata (DU-145), não tumoral de mama (MCF-10A) e fibroblasto de gengiva humana

(FGH). Os complexos foram ativos frente as linhagens celulares avaliadas, apresentando menores valores de  $IC_{50}$  do que os complexos precursores, ligantes livres e a cisplatina. Os complexos  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  e  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  mostraram-se mais seletivos frente às células tumorais de mama, MDA-MB-231, se comparado com os resultados para as células não tumorais de mama, MCF-10A. Assim, estes complexos foram selecionados para a investigação do possível mecanismo de ação frente à linhagem MDA-MB-231. Estudos morfológicos mostraram que os complexos causaram maiores alterações na morfologia das células MDA-MB-231 do que nas células MCF-10A. Além disso, os complexos foram capazes de atuar no processo de formação de colônias, diminuindo o número e o tamanho das mesmas. Ensaio de migração celular permitiram verificar que os complexos atuam na inibição do processo de migração das células. Outra propriedade observada foi que os complexos inibem a formação de tubos em células HUVEC, na presença ou não do fator de crescimento FGF-2, demonstrando assim que são antiangiogênicos. Análise do ciclo celular das células MDA-MB-231 mostrou um acúmulo de células na fase Sub-G1, com um bloqueio na fase S. Ensaio de acumulação celular mostraram que os complexos apresentam uma maior acumulação nas células MDA-MB-231 do que em células não tumorais, MCF-10A. Além disso, os complexos induziram a morte celular por apoptose, causaram a despolarização do potencial de membrana da mitocôndria e a formação de ROS. Igualmente, observou-se a ativação da sinalização celular através das vias Hsp27, Bad, caspase 3, SAPK/JNK e Smad. Diante destes resultados, pode-se dizer que o estresse oxidativo é um possível mecanismo de morte celular para estes complexos. Estes resultados indicam que os complexos de rutênio contendo lapachol ou lausona apresentam propriedades promissoras para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento do câncer.

**ABSTRACT**

“EVALUATION OF ANTITUMOR PROPERTIES OF RUTHENIUM(II) COMPLEXES CONTAINING LAPACHOL OR LAWSONE AS LIGANDS” Metal complexes containing ligands that present biological activity have been attracting interest in the field of development of new drugs for the treatment of cancer. Lapachol and lawsone are examples of important natural products that exhibit antitumor properties. Thus, in the present work, new ruthenium(II) complexes containing lapachol or lawsone, phosphinic and bipyridine ligands, were synthesized and characterized, in order to obtain potential antitumor agents. Complexes were obtained with the following structural formulas:  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  and  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$ , where L = lapachol or lawsone, P-P = dppf = 1,1'-*bis*(diphenylphosphine)ferrocene, dppe = 1,2'-*bis*(diphenylphosphine)ethane, dppm = *bis*(diphenylphosphine)methane and bipy = 2,2'-bipyridine. The complexes were characterized by the techniques: elemental analysis, conductimetry, absorption spectroscopy in the infrared and in the visible ultraviolet region, cyclic and differential pulse voltammetry,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, and X-ray diffraction of monocrystal (for the cases in which it was possible to obtain crystals). DNA interaction studies using spectroscopic titration, circular dichroism, agarose gel electrophoresis and fluorescence techniques showed that the complexes interact with the DNA by minor grooves. Analysis of the ability to interact with BSA by fluorescence measurements, allowed to conclude that the complexes exhibit a moderate interaction with the protein, with binding constants in the order of  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ . In addition, the interactions occurred spontaneously, as evidenced by the negative values of  $\Delta G^\circ$ , involving hydrophobic and electrostatic forces. The cytotoxic activity of the complexes was investigated using the tumor cell lines of breast (MDA-MB-231 and MCF-

7), lung (A549), prostate (DU-145) and non-tumor breast (MCF-10A) and fibroblast of gingiva (FGH). All complexes were active against the evaluated cell lines, presenting  $IC_{50}$  values lower than those obtained for the precursor complexes, free ligands and cisplatin. The complexes  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  and  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  showed to be more selective against breast tumor cells, MDA-MB-231, when compared to results obtained for non-tumor cells, MCF-10A. Therefore, these complexes were selected for the investigation of the possible mechanism of action against the MDA-MB-231 cells. Studies showed that these complexes caused greater changes in the morphology of MDA-MB-231 than in MCF-10A cells. In addition, the complexes showed to be able to act in the colonies formation process, reducing the number and size of the colonies. Cell migration assays have shown that the complexes act inhibiting the cell migration process. Another interesting property observed for the complexes was that they inhibit the formation of tubes in HUVEC cells, with or without FGF-2 growth factor, demonstrating that the complexes are antiangiogenic. Cell cycle analysis of MDA-MB-231 cells showed accumulation of cells in Sub- $G_1$  phase, with a decrease in S phase. Cell accumulation assays showed that the complexes exhibit a greater accumulation in MDA-MB-231 than in non-tumor cells, MCF-10A. The complexes induced cell death by apoptosis, caused depolarization of the membrane potential of mitochondria, and induced ROS formation. In addition, was observed the activation of protective cell signaling through Hsp27, Bad, caspase 3, SAPK/JNK and Smad pathways. Given these results, the oxidative stress is a possible mechanism of cell death for the proposed complexes. The obtained results indicate that ruthenium complexes containing lapachol or lawsone present promising properties for the development of new chemotherapeutics for the treatment of cancer.

**SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ESQUEMAS .....	xvi
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT.....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Câncer: incidência e causas .....	1
1.2 Patologia do câncer.....	2
1.2.1 Metástases .....	3
1.2.2 Angiogênese.....	4
1.4 Tratamento do câncer .....	8
1.5 Complexos metálicos como quimioterápicos .....	10
1.5.1 Complexos de rutênio como potenciais quimioterápicos .....	14
1.6 Naftoquinonas no desenvolvimento de quimioterápicos.....	18
1.7 Ligantes fosfínicos e bipyridínicos no desenvolvimento de quimioterápicos .....	21
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 Obtenção de atmosfera inerte .....	26
3.2 Solventes e reagentes.....	26
3.3 Instrumentação e conduta experimental .....	27
3.3.1 Análise elementar.....	27
3.3.2 Condutividade molar.....	27
3.3.3 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho .....	27
3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível .....	27
3.3.5 Eletroquímica .....	28
3.3.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	28
3.3.7 Difração de raios X de monocristal.....	28
3.4 Síntese dos complexos precursores .....	29
3.4.1 Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ .....	29
3.4.2 Síntese do complexo <i>cis, trans</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]$ .....	29
3.4.3 Síntese do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$ .....	29

3.4.4 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppf)(bipy)] .....	30
3.4.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (DMSO) <sub>4</sub> ].....	30
3.4.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe) <sub>2</sub> ] .....	30
3.4.7 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ] .....	31
3.5 Síntese dos complexos contendo lap ou lau .....	31
3.5.1 Síntese do complexo [Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> .....	31
3.5.2 Síntese dos complexos [Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	32
3.5.3 Síntese do complexo [Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> .....	32
3.5.4 Síntese do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> .....	33
3.5.5 Síntese dos complexos [Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub> .....	33
3.6 Estudos de interação dos complexos com a BSA.....	34
3.7 Estudos de interação dos complexos com DNA.....	34
3.7.1 Titulação espectroscópica .....	34
3.7.2 Dicroísmo circular.....	35
3.7.3 Eletroforese em gel de agarose .....	36
3.7.4 Fluorescência .....	36
3.8 Determinação da lipofilicidade (log <i>P</i> ) .....	37
3.9 Linhagens e cultivo celular.....	37
3.9.1 Determinação da atividade citotóxica .....	38
3.9.2 Morfologia celular.....	39
3.9.3 Formação de colônias.....	39
3.9.4 Ensaio de migração celular.....	40
3.9.5 Análise da formação de túbulos vasculares .....	41
3.9.6 Formação de túbulos vasculares na presença de FGF-2 .....	42
3.9.7 Quantificação celular de rutênio por ICP-MS.....	43
3.9.8 Ensaio de competição dos complexos com a sonda TAMRA-R <sub>9</sub> .....	43
3.9.9 Análise do ciclo celular.....	44
3.9.10 Ensaio de apoptose com Anexina V .....	45
3.9.11 Análise do potencial de membrana mitocondrial.....	46
3.9.12 <i>Apoptosis array</i> .....	46
3.9.13 Análise da formação de espécies reativas de oxigênio .....	47
3.9.14 Análise estatística.....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1 Síntese e caracterização dos complexos de rutênio contendo lap ou lau ..	49
4.2 Estudos de interação dos complexos com a BSA.....	74

---

4.3 Estudos de interação dos complexos com o DNA.....	81
4.3.1 Titulações espectroscópicas .....	81
4.3.2 Dicroísmo circular.....	84
4.3.3 Eletroforese em gel de agarose .....	85
4.3.4 Competição com Hoechst e CT-DNA .....	89
4.4 Determinação da lipofilicidade (log P).....	90
4.5 Ensaio Biológicos .....	92
4.5.1 Determinação da atividade citotóxica .....	92
4.5.2 Morfologia celular.....	96
4.5.3 Formação de colônias.....	98
4.5.4 Ensaio de migração celular.....	101
4.6 Análise da formação de túbulos vasculares .....	105
4.7 Quantificação celular de rutênio por ICP-MS.....	108
4.8 Ensaio de competição dos complexos com a sonda TAMRA-R <sub>9</sub> .....	111
4.9 Análise do Ciclo Celular .....	114
4.10 Avaliação da morte celular por apoptose com Anexina V .....	117
4.11 Análise do potencial de membrana da mitocôndria .....	120
4.12 <i>Apoptosis Array</i> .....	123
4.13 Análise da formação de espécies reativas de oxigênio.....	127
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
<b>7 APÊNDICE.....</b>	<b>145</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer: incidência e causas

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2012 registrou-se 1,3 milhões de mortes devido ao câncer na América, sendo que 47% dos casos ocorreram na América Latina e Caribe. Estima-se que entre os anos de 2012 e 2030 o número de mortes passará a 2,1 milhões nesta mesma região, por ano<sup>1</sup>.

Uma estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o biênio 2018-2019, prevê a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano, no Brasil. Os tipos de cânceres que serão mais incidentes, com exceção do câncer de pele não-melanoma (cerca de 170 mil novos casos), serão os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres. Além disso, pode-se destacar os cânceres de cólon e reto, pulmão, estômago, colo do útero, cavidade oral, sistema nervoso central, leucemias e esôfago, que também irão apresentar altas taxas de incidência<sup>2</sup>.

O câncer de mama apresenta a maior incidência e mortalidade na população feminina em todo o mundo. No ano de 2012 foram 1,67 milhões de novos casos no mundo, representando 25% de todos os tipos de cânceres que acometeram as mulheres. Ainda, para o biênio 2018-2019, no Brasil, estima-se a ocorrência de 56,33 casos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres. O câncer de mama é o mais incidente em mulheres das regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil), sem considerar os cânceres de pele não melanoma. No Norte, o câncer de mama é o segundo mais frequente (19,21/100 mil), sendo o de colo de útero mais incidente (25,62/100 mil)<sup>2</sup>. Os principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de câncer podem ser relacionados ao meio ambiente e ao estilo de vida da população, como por exemplo o sedentarismo, alimentação inadequada,

consumo excessivo de álcool e o tabagismo. Além disso, pode ser devido a fatores genéticos e hereditários, que são transmitidos de pais para filhos<sup>3,4</sup>.

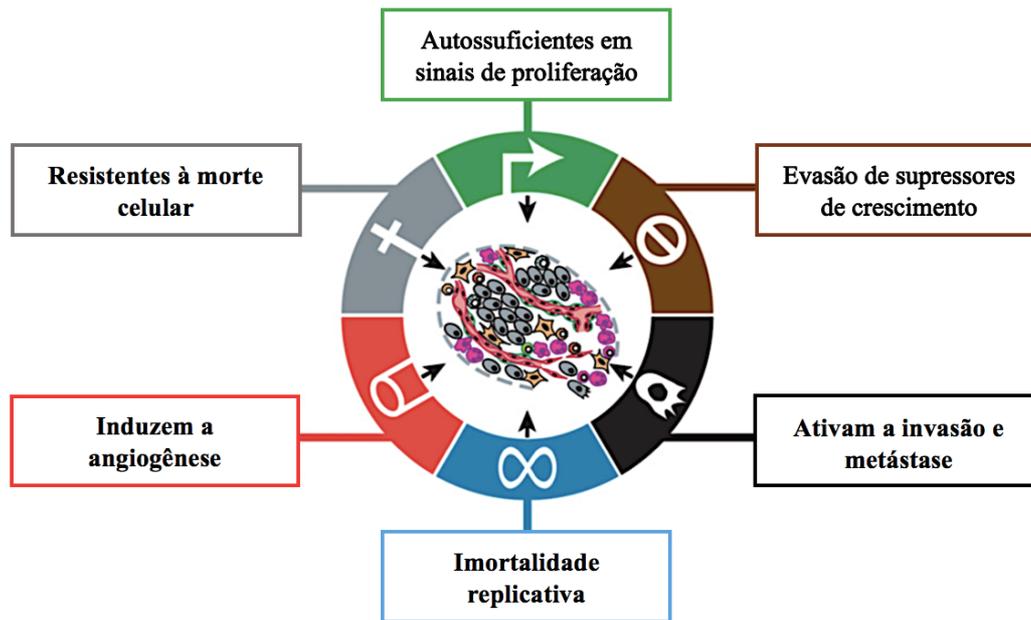
Diante do exposto, verifica-se que os fatores que podem ocasionar o desenvolvimento de câncer são bastante diversificados. Desta forma, a medida preventiva e a detecção precoce são as formas mais eficazes de se combater essa doença.

## **1.2 Patologia do câncer**

O câncer não é uma única doença, trata-se de um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, que em algum momento sofreram desvios nos mecanismos de controle responsáveis pela proliferação e diferenciação celular, dando origem a uma célula mutada, denominada tumoral. Essas células tumorais são capazes de se proliferar indefinidamente, não respondendo aos sistemas de reparo de danos, gerando os tumores<sup>5,6</sup>.

Os tecidos normais controlam e liberam sinais para o crescimento e a divisão celular, mantendo dessa forma a arquitetura e o funcionamento normal das funções do tecido. Contudo, células cancerígenas desregulam esses sinais, os quais são conduzidos em grande parte por fatores de crescimento, que se ligam a receptores específicos da superfície celular. Esses receptores emitem sinais que regulam o processo de progressão do ciclo celular, aumentando o crescimento das células, e influenciando na sobrevivência e no metabolismo energético celular<sup>7,8</sup>.

As células cancerígenas podem ser distinguidas por um conjunto de características fundamentais, tais como: a autossuficiência na produção de sinais para a proliferação e evasão de supressores de crescimento, são resistentes aos sinais de morte, de imortalidade replicativa, são capazes de induzir a angiogênese e ativar a invasão e a metástase (Figura 1)<sup>7</sup>.



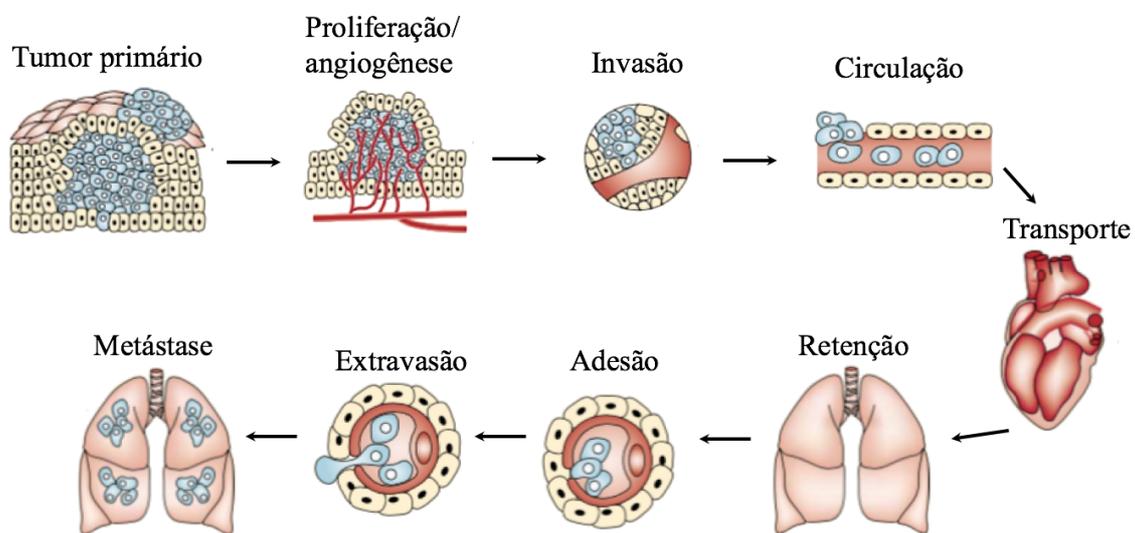
**FIGURA 1** - Características adquiridas pelas células tumorais durante o desenvolvimento de tumores. Adaptado de Hanahan e Weinberg<sup>7</sup>.

### 1.2.1 Metástases

Um dos grandes desafios encontrados no tratamento do câncer é a formação de metástases. A metástase consiste no processo de migração das células tumorais de um local definido, e a disseminação pelo corpo, se alojando em tecidos e órgãos distantes, dando origem a um novo tumor<sup>9,10</sup>.

O processo de formação de metástases consiste numa série de etapas, as quais são representadas na Figura 2. Inicialmente, as células tumorais são capazes de alterar inúmeras vias de sinalização que controlam o processo de proliferação, o ciclo celular, a migração das células, bem como a angiogênese. Assim, as células tumorais estimulam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, como representando na Figura 2, que além da função de levar nutrientes às células, auxiliam no processo de migração celular. As células entram na circulação sanguínea e ou linfática, e circulam pelo corpo até encontrar uma região ou órgão onde são retidas. Nesse novo ambiente

ocorrerá a adesão, seguida da invasão às células endoteliais e da membrana basal, e o crescimento de um tumor secundário. Ocorrerá novamente o processo de angiogênese, e o ciclo se repete. Vale ressaltar que apesar de a maioria das células serem mortas pelo sistema imune ou por apoptose durante a formação da metástase, esse processo ainda é muito eficiente, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos de mortes por câncer. Diante disso, a busca por novas drogas que possam evitar a formação de metástases é fundamental para gerar tratamentos mais eficazes do que os atuais<sup>11,12</sup>.



**FIGURA 2** - Principais passos na formação da metástase. Adaptado de Fidler<sup>11</sup>.

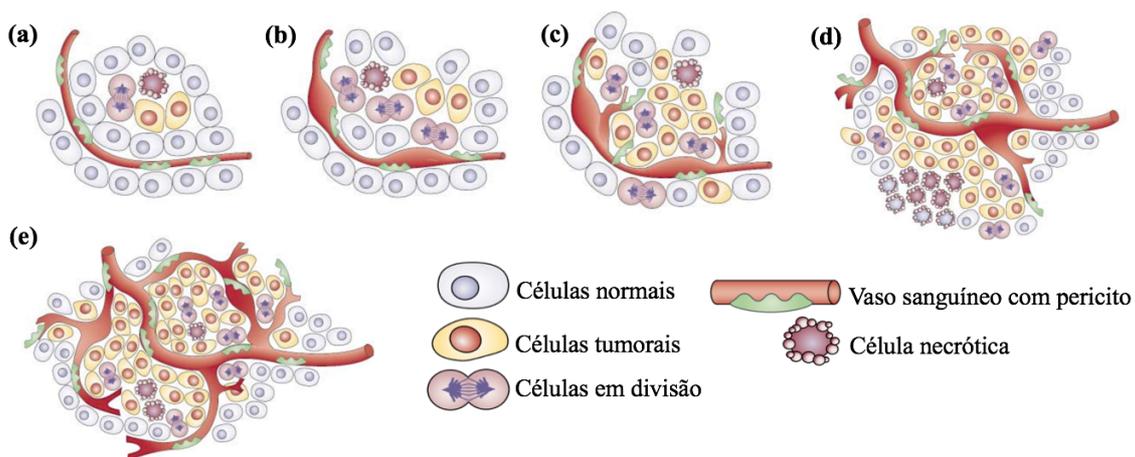
### 1.2.2 Angiogênese

A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos, está diretamente relacionada à propagação e à progressão do tumor. Assim como as células normais, as células tumorais requerem nutrientes e oxigênio para o seu desenvolvimento. Contudo, as células tumorais, por apresentarem um metabolismo mais acelerado, sentem uma maior necessidade de nutrientes. Desta forma elas estimulam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos ao

redor do ambiente tumoral para que irriguem os tumores com os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento<sup>8</sup>.

O processo de formação de novos vasos sanguíneos faz parte da fisiologia normal do organismo, durante a formação de novos tecidos, sendo fundamental na embriogênese, bem como no reparo de feridas. O que difere o processo de angiogênese fisiológica normal e a patológica é que na angiogênese fisiológica normal os vasos se desenvolvem até atingir uma estabilidade, e o processo se encerra. Entretanto, em regiões tumorais, a formação desses vasos é intensificada, e o seu crescimento é contínuo<sup>6,13</sup>.

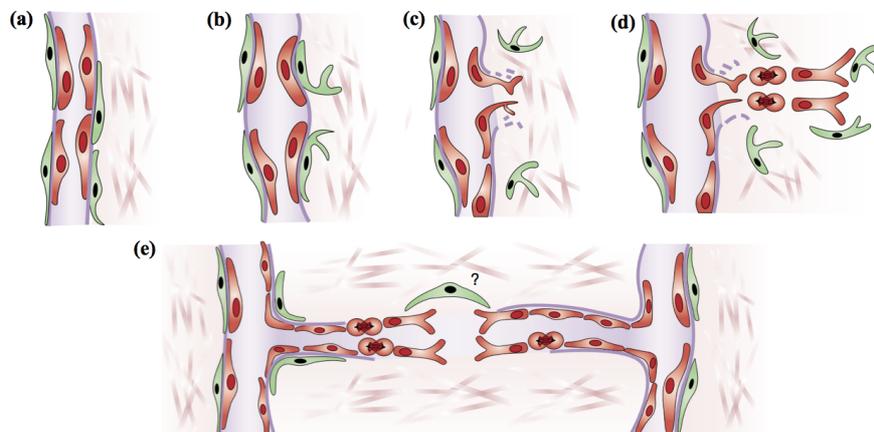
O estímulo principal para iniciar a formação dos vasos em ambientes tumorais é a hipóxia, ou seja, ambientes com baixo teor de oxigênio. O início da angiogênese, se dá pelo desprendimento perivascular e a dilatação do vaso sanguíneo. Nessa etapa fatores de crescimento das células são liberados pelas células tumorais para estimular o processo de formação dos vasos sanguíneos. Esses fatores de crescimento irão se ligar a receptores específicos das células endoteliais, e assim iniciará a brotação angiogênica, seguida da maturação e crescimento dos vasos sanguíneos (Figura 3)<sup>6</sup>.



**FIGURA 3** - Interruptor angiogênico. (a) Nódulos dormentes, (b) desprendimento perivascular e dilatação do vaso, (c) brotação angiogênica, (d) formação e maturação dos vasos, com o recrutamento de células perivasculars, (e) continua formação de vasos sanguíneos. Adaptado de Bergers e Benjamin<sup>6</sup>.

As células endoteliais, precursoras da angiogênese, são mobilizadas a partir da medula óssea, sendo assim transportadas pela corrente sanguínea, até que ocorra a incorporação das mesmas nas paredes dos vasos sanguíneos onde iniciará o processo angiogênico. Os fatores de crescimento, tais como VEGFA (Fator de crescimento endotelial vascular A), PlGF (Fator de crescimento placentário) e ANG1 (Angiopietina-1) estimulam este processo<sup>14,15</sup>.

Para que os brotos dos vasos sanguíneos se iniciem, primeiramente as células murais, ou pericitos, que se situam ao redor dos vasos são removidas, e a membrana basal e a matriz extracelular são degradadas. Uma nova matriz é sintetizada pelas células estromais, juntamente com os fatores de crescimento celulares, promovendo assim a migração e a proliferação das células endoteliais. As células endoteliais se prendem formando uma monocamada, que dará origem a um novo vaso sanguíneo. Rapidamente ocorre o aumento da vasculatura ao redor do ambiente tumoral (Figura 4)<sup>14,6</sup>.

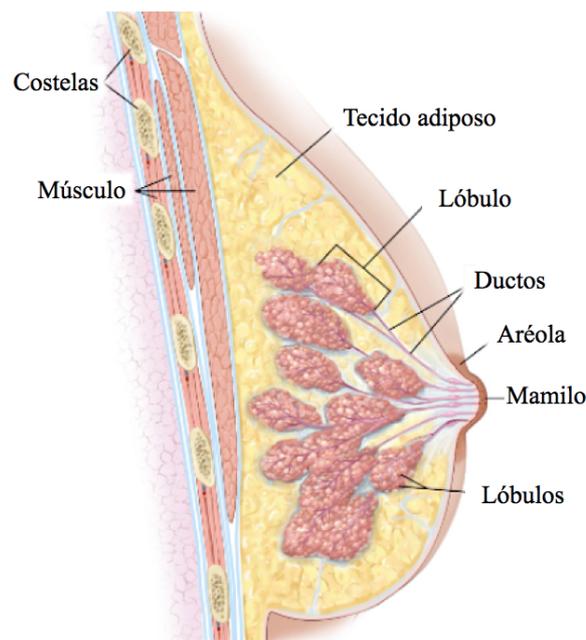


**FIGURA 4** - Formação de novos vasos sanguíneos. (a) Os novos vasos sanguíneos surgem dos vasos preexistentes, (b) os pericitos (em verde) se separam e os vasos se dilatam, degradando a matriz extracelular, (c) as células endoteliais (em vermelho) migram para o espaço perivascular em direção a estímulos angiogênicos, (d) ocorre a proliferação de células endoteliais, seguindo pelos pericitos, (e) as células endoteliais aderem entre si formando novos vasos. Adaptado de Bergers e Benjamin<sup>6</sup>.

### 1.3 Câncer de mama

O câncer de mama é uma das doenças que mais acomete as mulheres e apesar dos diversos avanços nas pesquisas, ainda é um grande desafio a realização de diagnósticos e tratamentos eficazes, tendo em vista a grande heterogeneidade da enfermidade<sup>16</sup>.

A glândula mamária humana é constituída pelos lóbulos (glândulas responsáveis pela produção de leite), ductos (tubos que transportam o leite até o mamilo) e pelo estroma (tecido adiposo e conjuntivo que envolve os lóbulos, ductos e vasos sanguíneos e linfáticos) (Figura 5)<sup>17</sup>.



**FIGURA 5** - Anatomia da glândula mamária. Adaptado de ACS, 2017<sup>17</sup>.

O câncer de mama pode ser classificado de acordo com a sua origem, ductal (originário dos ductos) e o lobular (originário dos lóbulos). Esses cânceres podem ainda ser categorizados como *in situ*, se é delimitado, ou invasivo, se invadem tecidos adjacentes, podendo gerar metástases<sup>16</sup>.

Existem também os cânceres que começam em outras regiões da mama, como os sarcomas, linfomas e o inflamatório, que são tipos menos

comuns de câncer, que na maioria das vezes não apresenta nódulos, e dentre os principais sintomas, pode-se destacar o inchaço, vermelhidão e aumento da temperatura da mama<sup>17</sup>.

Além dessas classificações, os cânceres de mama podem ainda ser divididos em três grupos principais, de acordo com a presença ou não de receptores hormonais que estimulam o seu crescimento. Assim, pode-se classificá-los como tumores que contém receptores de estrogênio (ER) ou progesterona (PR) positivo, tumores que contem o fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 amplificado (HER-2 positivo) com e sem receptor ER / PR, e os tumores triplo negativo (TNBC - *Triple Negative Breast Cancer*), que não expressam os receptores ER, PR e HER-2<sup>18,16,19</sup>.

#### **1.4 Tratamento do câncer**

Os tratamentos para o câncer variam muito de acordo com o tipo, característica e estágio da doença. Alguns pacientes recebem um único tipo de tratamento, enquanto outros recebem uma combinação deles. Existem vários tipos de tratamento, podendo-se destacar a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, terapia direcionada ou terapia hormonal. Dentre esses, os mais comuns são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia<sup>3</sup>.

A cirurgia é empregada em casos onde o tumor esta localizado em uma região onde é possível realizar a sua completa remoção. Dessa forma, é um tratamento eficiente para tumores localizados em uma única região, ou seja, que não tenha sofrido metástase. A cirurgia pode ser empregada sozinha, ou ainda em conjunto com a radioterapia e a quimioterapia<sup>17</sup>.

A radioterapia é realizada empregando a radiação para destruir ou danificar as células tumorais. Danificando as células, é possível interromper o crescimento e, conseqüentemente, a divisão celular, causando a morte celular.

Células não tumorais também podem ser afetadas durante o tratamento, e por isso são observados os efeitos colaterais<sup>17</sup>.

A quimioterapia consiste no uso de quimioterápicos que podem atuar no corpo inteiro, inibindo o crescimento e a proliferação das células tumorais. Esse tipo de tratamento pode ser realizado de forma oral, intravenosa, intraperitoneal ou tópica. Problemas de efeitos colaterais também são observados, tendo em vista que os quimioterápicos podem atuar de forma não específica e assim causar danos às células normais. Como resultado, os pacientes podem apresentar sintomas de náuseas, vômitos, queda de cabelo, nefrotoxicidade, ototoxicidade, entre outros<sup>20</sup>.

Em se tratando do tratamento do câncer de mama, o mais comum é a realização da cirurgia para a retirada do tumor primário, seguida da quimioterapia, ou ainda a terapia hormonal, dependendo do tipo de câncer de mama. No caso de cânceres de mama que apresentam receptores hormonais, são comumente empregadas a cirurgia e a radioterapia, além da terapia hormonal, que consiste no emprego de substâncias para atuar especificamente nas células tumorais, podendo ser a terapia hormonal, imunológica ou antiangiogênica<sup>21</sup>. Dentro desse tipo de terapia, pode-se destacar o Trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que é derivado de uma proteína do sistema imunológico, que atua pela ligação ao HER-2, inibindo a proliferação de tumores que super-expressam HER-2<sup>22</sup>.

Em pacientes portadores do TNBC, não é possível a realização do tratamento com terapias baseadas em receptores hormonais, tendo em vista que esse tipo de tumor não apresenta receptores tais como ER, PR e HER-2<sup>18,23</sup>. Para esses tumores as modalidades de tratamento são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, em conjunto ou individual<sup>24</sup>. No caso da quimioterapia pode-se destacar alguns agentes citotóxicos mais usados, tais como as Antraciclinas e Taxanos, bem como complexos de platina, como a cisplatina. Esses compostos são capazes de atuar via interação com o DNA, inibindo o processo

de replicação das células cancerosas e dessa forma induzindo a morte celular<sup>18</sup>.

Contudo, como os cânceres da classe TNBC apresentam bastante heterogeneidade, sendo muito agressivos e metastáticos, o tratamento é mais difícil e os pacientes apresentam altas taxas de recaída e menor sobrevida. Assim, há uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias que sejam mais efetivas para o tratamento de cânceres TNBC, principalmente quimioterápicos que atuem na inibição do processo de formação de metástases.

### 1.5 Complexos metálicos como quimioterápicos

Em 1960, quando Barnett Rosenberg, físico americano, estudava o crescimento de bactérias de *Escherichia Coli* sob o efeito do campo elétrico, ele observou que as bactérias adquiriam a forma de filamentos alongados e tiveram o crescimento inibido. Esse efeito foi atribuído à um complexo que foi gerado em solução como resultado da eletrólise dos eletrodos de platina, o qual posteriormente foi identificado como *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], denominado cisplatina ou *cis*-diaminodicloroplatina(II) (Figura 6)<sup>25,26</sup>. Esse complexo já havia sido sintetizado e reportado em 1845 por Michel Peyrone, que o chamou de cloreto de Peyrone, e teve sua estrutura química elucidada por Alfred Werner em 1893<sup>27,28</sup>.

Depois da observação de Rosenberg vários estudos utilizando a cisplatina foram realizados. Estudos em modelos animais, empregando camundongos que tiveram o tumor de sarcoma-180 transplantado, mostraram que quando administrado 8 mg de cisplatina por kg do animal, houve uma significativa redução do tumor. Em 1971, testes clínicos em pacientes foram realizados pelo US *National Cancer Institute* (NCI). Muito rapidamente, no ano de 1978, a cisplatina foi aprovada para uso clínico pela US *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>29,26</sup>.

A descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina foi um marco para a Química Inorgânica, mais especificamente, para a Bioinorgânica, pois até então estudos para o desenvolvimento de novos fármacos baseava-se apenas em compostos orgânicos<sup>26</sup>.

Estudos desenvolvidos para avaliar o mecanismo de ação da cisplatina demonstraram que ao ser administrada via intravenosa, a cisplatina encontra uma alta concentração de cloreto no plasma sanguíneo (100 mM) e, dessa forma, não ocorre a substituição dos ligantes cloretos por água. A cisplatina que permanece intacta, ou seja, que não interage com proteínas presentes no soro humano, entra na célula via difusão através da membrana celular. No meio intracelular a concentração de cloreto é menor (em torno de 4-20 mM), e assim um dos cloretos é substituído por uma molécula de água, formando uma espécie carregada. Essa nova espécie interage com as bases do DNA, mais especificamente com a guanina, formando um aduto com o DNA. O segundo cloro também sofre labilização e forma um aduto bifuncional com o DNA. Esse processo causa distorções na estrutura do DNA, que dificultam o processo de replicação das células cancerosas, acarretando a morte celular<sup>30,31</sup>.

A cisplatina é muito efetiva no tratamento de cânceres sólidos, tais como cabeça, pescoço e, principalmente, ovário e testículos. No entanto, existem alguns problemas relacionados ao tratamento com a cisplatina, como resistência adquirida e efeitos colaterais. Dentre os efeitos colaterais causados por este fármaco, pode-se destacar a nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas, vômitos e perda de apetite<sup>28</sup>.

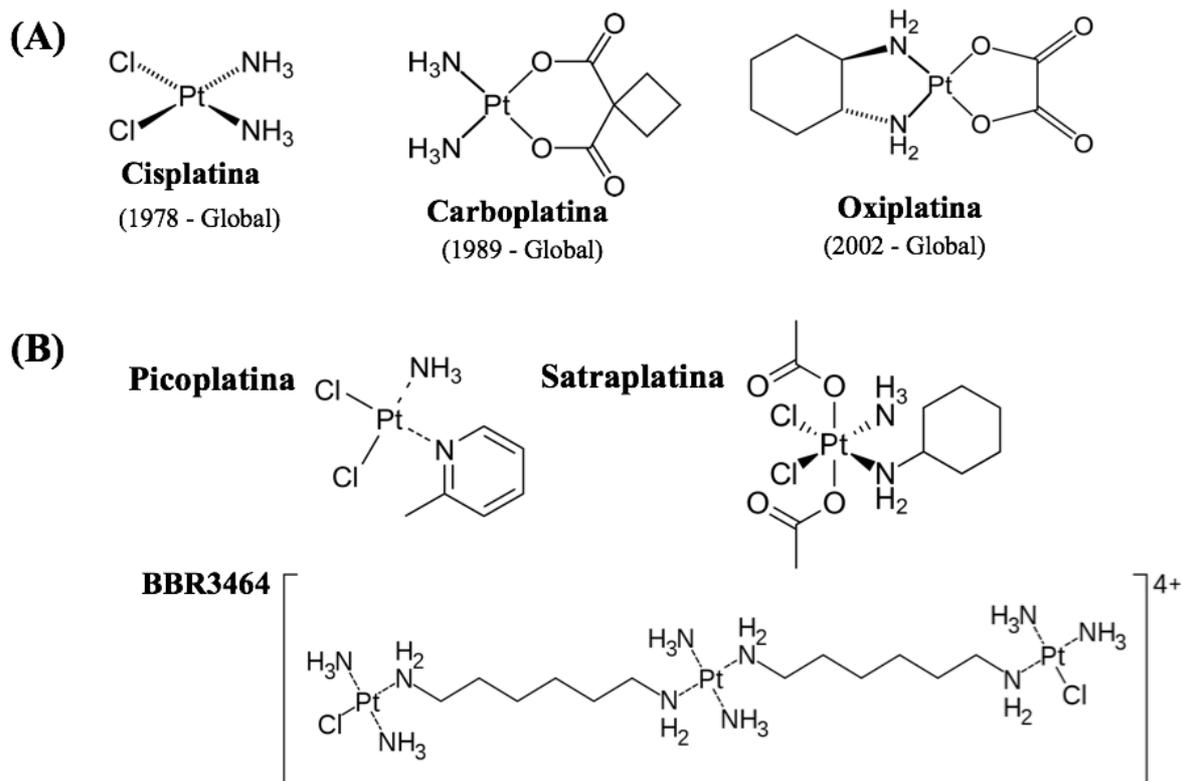
Nesse sentido, uma grande variedade de complexos de platina(II) e (IV) tem sido desenvolvidos, buscando melhorar a aplicabilidade e ampliar a janela terapêutica da cisplatina. A carboplatina (Figura 6) é um destes análogos que foi aprovada pela FDA e introduzida na clínica em 1989. A carboplatina foi desenvolvida baseando-se na ideia de que complexos menos lábeis poderiam apresentar menor toxicidade. De fato, a carboplatina, quando comparada à

cisplatina, apresenta menos efeitos nefrotóxicos e gastrointestinais, todavia, causa efeitos como mielossupressão e trombocitopenia, o que limita a dose a ser administrada<sup>26,28</sup>.

A oxaliplatina (Figura 6) foi aprovada pela FDA em 2002, para o tratamento de câncer colorretal metastático, em conjunto com o 5-fluoracil e com a leucovorin. A cisplatina, carboplatina e oxaliplatina são fármacos aprovados para o uso mundial. Existem ainda outros análogos, a nedaplatina, heptaplatina e a lobaplatina que são aprovados para uso apenas no Japão, China e Coreia do Sul, respectivamente<sup>31</sup>.

A satraplatina, complexo de platina(IV) que contém dois grupos acetatos nas posições axiais, os quais melhoram a biodisponibilidade oral, é o primeiro complexo de platina que se transformado em fármaco seria administrado oralmente. Ensaio pré-clínicos mostraram uma boa atividade antitumoral em modelos de câncer ovariano, se comparado à cisplatina e à carboplatina, que são administrados via intravenosa. A satraplatina atuaria como uma pró-droga, pois quando administrada, gera um subproduto, denominado JM216<sup>32,26,33</sup>.

A picoplatina foi desenvolvida buscando contornar um problema de ligação às proteínas. Ensaio *in vitro* demonstraram que a picoplatina é citotóxica frente às linhagens celulares resistentes à cisplatina e à carboplatina. Estudos *in vivo* mostraram promissoras propriedades antitumorais frente ao tumor de ovário, em camundongos, retardando o crescimento tumoral por 34 dias, em contraste com a cisplatina (10,4 dias) e carboplatina (6,4 dias)<sup>34</sup>.



**FIGURA 6** - (A) Estruturas dos complexos de platina empregados globalmente no tratamento de câncer e (B) complexos de platina que tiveram seus estudos interrompidos.

Uma outra classe de complexos de platina que apresenta um comportamento diferente dos até então investigados, são os complexos polinucleares, mais especificamente o triplatin (BBR3464) (Figura 6). O triplatin contém três centros de platina ligados por cadeias de diaminas. Este complexo forma diferentes tipos de adutos com o DNA, como cross-links intra e intercadeias, os quais não são possíveis para complexos mononucleares de platina. Em ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, mostrou-se muito mais citotóxico do que a cisplatina em linhagens resistentes à mesma. Ensaios em modelos animais com tumores resistentes à cisplatina, mostraram uma grande eficácia deste complexo, principalmente em tumores mutados em p53<sup>35</sup>. No entanto, assim como a satraplatina e a picoplatina, o triplatin teve o desenvolvimento clínico interrompido devido a problemas de farmacocinética<sup>36</sup>.

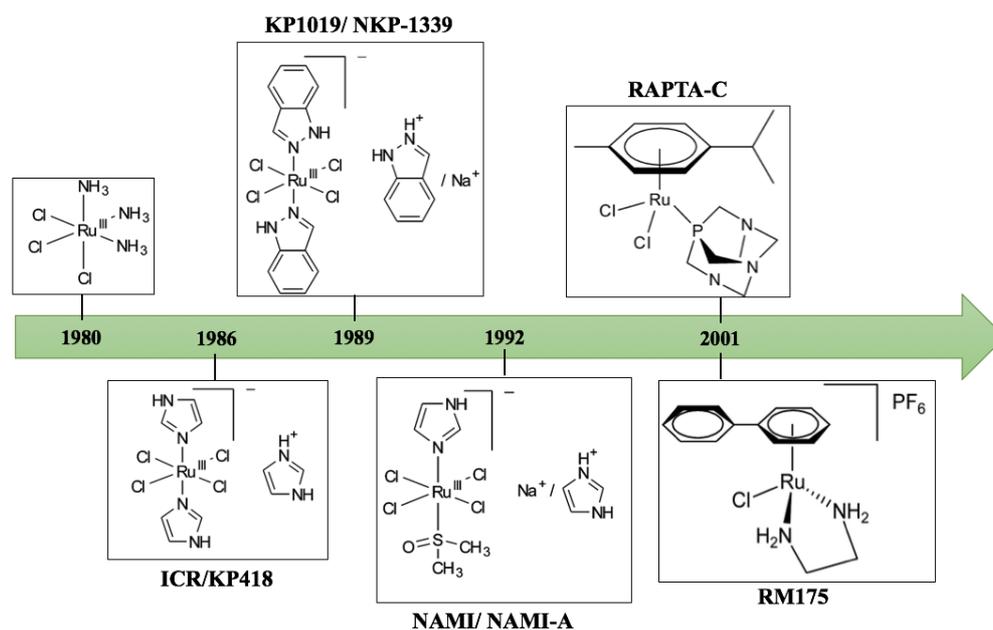
Apesar dos promissores resultados encontrados para os complexos de platina, ainda persiste os problemas relacionados aos efeitos colaterais e resistência. Por isto, crescentes e incessantes buscas por novos complexos têm sido realizadas, empregando outros metais. Neste sentido, encontra-se uma vasta gama de complexos de paládio, cobre, ouro, gálio, titânio, ródio, irídio e rutênio, entre outros<sup>37</sup>.

### 1.5.1 Complexos de rutênio como potenciais quimioterápicos

Dentre os metais mais utilizados para a síntese de novos complexos com propriedades antitumorais, destaca-se o rutênio. Complexos baseados neste metal têm atraído o interesse dos pesquisadores devido às propriedades deste metal, podendo destacar a facilidade de atingir diferentes estados de oxidação, tais como II, III e IV, em fluídos biológicos. Dessa forma, complexos de rutênio podem atuar como pró-drogas, ou seja, complexos de rutênio(III), por exemplo, podem ser facilmente reduzidos e assim ativados seletivamente em ambientes tumorais com baixo teor de oxigênio, que criam um ambiente redutor. A química do rutênio é semelhante a química do ferro e, por isso, ele tem a habilidade de mimetizar o ferro na ligação com biomoléculas. Complexos de rutênio podem ainda ser transportados até os tumores por meio de ligação à transferrina, tendo em vista a grande necessidade das células tumorais por ferro. Todas essas propriedades resultam em complexos com mecanismo de ação, biodistribuição e toxicidade diferentes dos complexos de platina<sup>38</sup>.

O primeiro relato de propriedades antitumorais de complexos de rutênio se deu por volta de 1980, quando Clarke e seus colaboradores estudavam complexos de Ru<sup>II</sup> e Ru<sup>III</sup> de fórmula geral  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_{6-x}\text{Cl}_x]^{n+}$ . Foi observado que o complexo *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$  (Figura 7), assim como a cisplatina, inibia a divisão celular de bactérias de *Escherichia coli*<sup>39,40</sup>. Estudos *in vivo* em camundongos com sarcoma EMT-6 empregando o complexo *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$

revelaram que o mesmo foi eficaz no combate ao crescimento do tumor. Entretanto, devido à baixa solubilidade, os estudos foram interrompidos<sup>41</sup>.



**FIGURA 7** - Estruturas dos complexos de rutênio desenvolvidos como potenciais agentes quimioterapêuticos.

Uma alternativa encontrada para melhorar a solubilidade dos complexos foi desenvolver complexos iônicos, e de preferência com ligantes halogenados. Nesse sentido, surgiu o complexo denominado ICR ou KP418 (Figura 7), desenvolvido por Keppler e colaboradores em 1986, o qual mostrou-se ativo frente a tumores de leucemia murina P388 e melanoma B16. Em 1989, os mesmos pesquisadores desenvolveram um análogo ao KP418, denominado KP1019 (Figura 7), que apresentou atividade superior ao KP418, quando investigado em modelos de câncer de cólon. Modelos animais tratados com o KP1019 tiveram uma redução de 95% do volume do tumor<sup>41</sup>.

Buscando resolver problemas de solubilidade, recentemente foi desenvolvido o NKP-1339, que é análogo ao KP1019, diferenciando apenas pela presença do contra íon sódio, o qual aumentou consideravelmente a solubilidade do complexo. O NKP-1339 e o KP1019 são administrados via intravenosa e apresentam forte interação com proteínas encontradas no sangue, tais como

albumina e transferrina. Estudos têm demonstrado que essas proteínas são responsáveis pelo transporte destes complexos no organismo<sup>41</sup>.

Atualmente apenas o NKP-1339 tem obtido mais avanços em ensaios clínicos, e como resultado de triagens em fase I, mostrou-se muito favorável ao tratamento de diversos tipos de tumores, tais como câncer de pulmão de células não pequenas, tumor neuroendócrino e câncer de cólon<sup>42</sup>.

Paralelamente à descoberta do KP1019, Sava e colaboradores desenvolveram os complexos *cis* e *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>], e verificaram que o isômero *trans* apresentou interessantes propriedades antimetastáticas em modelos animais com tumor de pulmão. Essa descoberta permitiu o desenvolvimento de um novo complexo, o NAMI-A (H<sub>2</sub>im) [*trans*-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Him)], (Him = 1*H*-imidazol) (Figura 7), o qual foi reportado em 1992. Ensaios pré-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que o NAMI-A é capaz de inibir consideravelmente o crescimento de tumores metastáticos em vários tipos de cânceres de pulmão. O mecanismo de ação do NAMI-A consiste na parada do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>M, inibição de metaloproteinases de matriz, aumento da matriz extracelular em torno de vasculatura tumoral, prevenindo que as células invadam tecidos e vasos sanguíneos adjacentes. Além disso, liga-se a ácidos nucleicos, apresentando efeito direto pela inibição da replicação do DNA. A característica mais interessante desse complexo é o fato de apresentar efeitos antimetastáticos em pequenas dosagens, sendo assim, sua ação é independente do tipo de tumor primário e do estágio em que se encontra a metástase<sup>41</sup>.

As propriedades antimetastáticas do NAMI-A o tornou o primeiro complexo de rutênio(III) a entrar para triagem clínica. O NAMI-A entrou em ensaios clínicos de fase I/II em combinação com a gencitabina (análogo de nucleosídeo usado como quimioterápico), em pacientes com câncer de pulmão, contudo essa combinação foi menos efetiva do que a gencitabina sozinha, e assim o estudo foi interrompido<sup>43</sup>.

Uma nova classe de complexos de rutênio foi introduzida com os trabalhos de Dyson<sup>44,45</sup> e Sadler<sup>46</sup> em 2001, os organometálicos de rutênio com estruturas “*piano-stool*”. Em seus trabalhos Dyson e colaboradores reportaram a síntese do RAPTA-C (Figura 7), um complexo contendo como ligantes o *p*-cimeno e a fosfina PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano). Assim como observado com o NAMI-A, experimentos *in vivo* empregando o RAPTA-C em modelos xenográfico de carcinomas mamários, mostraram uma redução no crescimento de metástases pulmonares, não afetando o tumor primário<sup>47</sup>.

Sadler e colaboradores introduziram uma nova classe de complexos organometálicos de rutênio contendo diiminas como ligantes. Em particular pode-se destacar o RM175, o qual apresenta como ligante a 1,2-etilenodiamina (Figura 7). Esse complexo apresentou uma alta atividade antiproliferativa contra câncer de ovário da linhagem celular A2780. Além disso, o RM175 demonstrou ser capaz de inibir o crescimento de tumor em modelos xenográficos de câncer de ovário, *in vivo*, resistentes à cisplatina<sup>47</sup>.

Sadler observou em uma série de complexos análogos ao RM175, que quando o ligante quelante é a etilenodiamina, e o grupo abandonador é o cloreto, a citotoxicidade frente ao câncer de ovário é dependente do tamanho do areno coordenado. Se o tamanho do areno aumenta, aumenta também a citotoxicidade do complexo<sup>48</sup>.

Pode-se verificar que grandes avanços foram obtidos no campo de desenvolvimento de novos compostos para fins de aplicação na quimioterapia antitumoral, desde o descobrimento das propriedades antitumorais da cisplatina, entretanto, além dos platinícos, nenhuma outra classe de complexos metálicos entrou no mercado até o momento. Vários complexos foram desenvolvidos, apresentando promissoras propriedades antitumorais. Contudo, ainda existem muitas questões a serem respondidas e investigadas. A busca por novos compostos que sejam eficientes e que respondam de maneira a não provocar efeitos colaterais é uma tarefa que exige grandes esforços de químicos, físicos,

médicos, biólogos, farmacêuticos, entre outros. Uma estratégia que vem sendo explorada pelos pesquisadores no desenvolvimento de novos candidatos a quimioterápicos contra o câncer é o emprego de produtos naturais, que apresentem prévia atividade biológica, como ligantes.

### **1.6 Naftoquinonas no desenvolvimento de quimioterápicos**

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos desde os nossos antepassados. Ela é uma fonte inesgotável para a descoberta de novos fármacos, tendo em vista a grande diversidade de produtos naturais com as mais variadas propriedades biológicas que podem ser encontrados. Com o avanço das técnicas que permitem o isolamento e purificação de novos compostos, está se tornando cada vez mais explorado o estudo de produtos naturais no desenvolvimento de fármacos<sup>49,50</sup>.

As quinonas são uma classe de produtos naturais que podem ser encontradas em animais, plantas e microorganismos, e que apresentam uma grande variedade de propriedades biológicas. Esses compostos desempenham importantes funções nas células, como por exemplo no transporte de elétrons na cadeia respiratória, na coagulação sanguínea e na carboxilação de glutamatos<sup>51</sup>.

Atualmente várias quinonas são empregadas na quimioterapia do câncer, tais como a daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitomicina-C, entre outros<sup>52</sup>.

As quinonas podem ser classificadas em três grupos de acordo com o sistema aromático: as benzoquinonas (contem em suas estruturas um anel benzênico), as naftoquinonas (apresentam um anel naftalênico) e as antraquinonas (que contem um antracênico linear ou angular). Em se tratando das naftoquinonas, pode-se destacar o lapachol, principal representante da classe, e a lausona<sup>53</sup>.

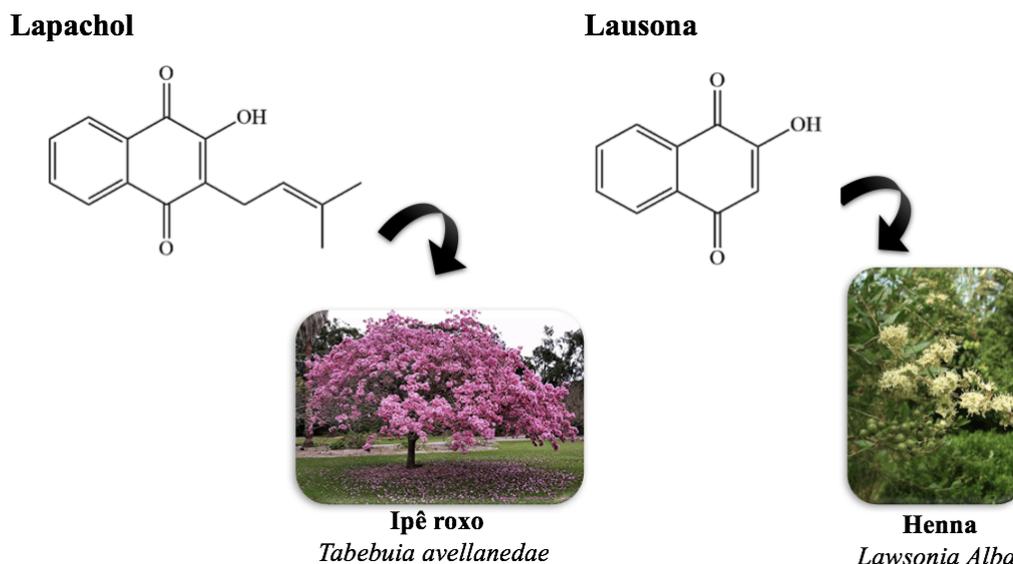
O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) (Figura 8) foi isolado pela primeira vez por E. Paterno em 1882, de uma árvore

da família das Bignoniaceae, do gênero *Tabebuia avellanedae*, conhecida como ipê roxo<sup>54</sup>. O lapachol pode ainda ser encontrado em plantas da família das Verbenaceae e Proteaceae, contudo, a sua maior ocorrência é na família das Bignoniaceae, sendo obtido por meio da extração da serragem da madeira das árvores. O lapachol apresenta uma grande diversidade de propriedades biológicas, tais como antitumoral<sup>55,56</sup>, antibacteriana<sup>57,58</sup>, antitripanossomicida<sup>59</sup>, entre outras<sup>54,60</sup>.

Os primeiros ensaios farmacológicos, no Brasil, com o lapachol foram realizados no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco na década de 60, por Osvaldo Gonçalves de Lima e colaboradores. Foram obtidos importantes resultados que demonstraram a eficácia do lapachol na redução de tumores em camundongos e em humanos<sup>61</sup>. Em 1974 o lapachol entrou para estudos clínicos de fase I, e o NCI reportou que apesar do interessante efeito terapêutico, o lapachol causava efeitos colaterais, e assim a pesquisa foi descontinuada<sup>54</sup>.

A lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) (Figura 8) é encontrada nas folhas de henna, e é uma das mais simples naftoquinonas de ocorrência natural<sup>54</sup>. A lausona é obtida como um sólido de coloração laranja, a partir do extrato das folhas secas de Henna, uma árvore do gênero *Lawsonia Inermis*, comumente encontrada no norte da África e sul da Ásia. Essa naftoquinona pode também ser encontrada em plantas do gênero *Lawsonia alba* e *Lawsonia spinosa*. Ela é responsável pela coloração vermelha das tintas de henna, sendo muito utilizada na coloração de cabelos, tatuagens e em pinturas de pele, desde os tempos do antigo Egito<sup>62,51</sup>.

Extratos de Henna são empregados na medicina popular para o tratamento de feridas, queimaduras, e diversas doenças tais como tuberculose, cândida albicans, bronquite, entre outras. Além disso, em alguns países a Henna é considerada uma planta sagrada, sendo muito empregada em cerimônias religiosas<sup>51,63</sup>.



**FIGURA 8** - Estruturas das naftoquinonas lapachol e lausona e imagens do ipê roxo e das folhas de Henna, de onde são extraídas.

Em se tratando de propriedades antitumorais, a lausona e o lapachol são importantes pela capacidade que apresentam de induzir o estresse oxidativo pela formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). Os ROS danificam componentes celulares importantes, interferindo na divisão celular induzindo apoptose<sup>64</sup>. Além disso, essas naftoquinonas inibem a atividade das enzimas topoisomerasas I e II, as quais são fundamentais para o funcionamento normal da célula, pois elas participam do processo de replicação e empacotamento do DNA. Alterações no funcionamento dessas enzimas, ocasionam danos suficientes para induzir apoptose<sup>53</sup>.

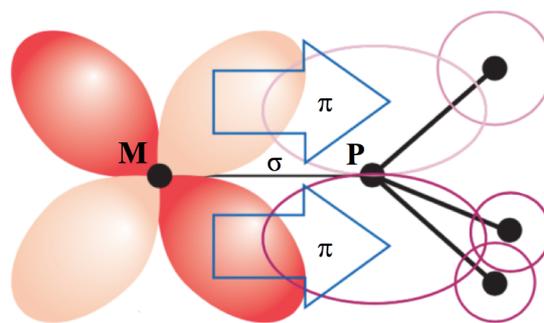
Como relatado anteriormente, o desenvolvimento de novos compostos para aplicação na quimioterapia evoluiu muito nos últimos anos e muitos compostos têm sido estudados. Contudo, muitos deles eles falham quando entram em ensaios clínicos devido a problemas tais como baixa biodisponibilidade, baixa eficácia e efeitos colaterais graves<sup>65</sup>. Nesse sentido, uma alternativa encontrada por pesquisadores para desenvolver novos

candidatos a quimioterápicos tem sido a coordenação de ligantes derivados de produtos naturais que possuam atividade biológica prévia, buscando aumentar a solubilidade e biodisponibilidade dos compostos, reduzir a toxicidade, bem como aumentar e diferenciar os modos de ação<sup>50,65</sup>. Partindo dessa premissa, a coordenação das naftoquinonas lapachol e lausona ao rutênio é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos compostos, podendo assim minimizar os efeitos colaterais apresentados pelo lapachol, e melhorar a atividade biológica dos ligantes livres<sup>56,66,67</sup>.

Recentemente, Hartinger e colaboradores reportaram a síntese de complexos metálicos de rutênio contendo como ligantes naftoquinonas derivadas da lausona, e foram encontrados resultados promissores frente à algumas linhagens tumorais<sup>67</sup>.

### **1.7 Ligantes fosfínicos e bipyridínicos no desenvolvimento de quimioterápicos**

As fosfinas são uma classe de ligantes bastante versáteis que podem se comportar como uma base de Lewis doando densidade eletrônica para o metal por meio do par de elétrons isolado no átomo de fósforo, servindo como um doador  $\sigma$ . Esses ligantes possuem ainda orbitais vazios no átomo de fósforo, que sobrepõem com orbitais ocupados do metal, e assim recebem densidade eletrônica do metal, atuando como ligantes  $\pi$  receptores sendo, portanto, adequados à retrodoação (Figura 9)<sup>71,72</sup>.



**FIGURA 9** - Representação da ligação entre metal e fosfina. Adaptado de Shriver e Atkins<sup>72</sup>.

Existe uma grande variedade de ligantes fosfínicos, tais como fosfinas substituídas ( $\text{PMe}_3$ ,  $\text{Pet}_3$ ,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{P(OMe)}_3$ , entre outras), e as difosfinas, que são fosfinas multidentadas em ponte (por exemplo,  $\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{PPh}_2 = \text{dppe}$ ). Os substituintes podem atuar modulando as propriedades  $\sigma$  doadora e  $\pi$  receptora das fosfinas. Grupos substituintes retiradores de densidade eletrônica diminuem a capacidade de doação  $\sigma$  e, conseqüentemente, diminuem a energia dos orbitais  $\sigma^*$ , intensificando o processo de retrodoação<sup>72,73</sup>.

As fosfinas se caracterizam pela habilidade de estabilizar centros metálicos tanto em baixos como em altos estados de oxidação, além de apresentar o efeito *trans*, que juntamente com os efeitos estéricos, permite a formação de complexos dissociáveis, com a presença de sítios vagos, sendo muito empregados em processos catalíticos, e também são conhecidas por possuir atividade citotóxica<sup>74</sup>. Vale destacar ainda que as fosfinas atuam no aumento da lipofilicidade do complexo, o que contribui para o aumento da permeabilidade do mesmo através da membrana celular<sup>73</sup>.

Os primeiros relatos da atividade antitumoral de complexos metálicos contendo fosfinas se deu a partir de estudos com a Auranofina,  $(\text{Et}_3\text{PAuSGlu}(\text{Ac})_4$ , fármaco usado para o tratamento da artrite reumatóide, que mostrou-se capaz de inibir a proliferação de células tumorais em ensaios *in vitro*, e também *in vivo* em camundongos portadores de leucemia P388<sup>75</sup>. A partir

disso vários complexos metálicos contendo fosfinas como ligantes foram desenvolvidos e promissoras propriedades antitumorais foram observadas.

Assim como as fosfinas, os ligantes bipyridínicos apresentam propriedades promissoras para o desenvolvimento de complexos metálicos, pois possuem orbitais  $\rho\pi$  antiligantes vazios, disponíveis para receber elétrons do metal, e um par de elétrons capaz de formar ligações  $\sigma$  fortes, estabilizando os íons metálicos em vários estados de oxidação, sendo também adequados a retrodoação. Além disso, esses ligantes são capazes de mimetizar estruturas de moléculas biológicas, tais como ácidos nucleicos, proteínas e enzimas. A 2,2'-bipyridina é uma representante dessa classe de ligantes, e se coordena a uma grande variedade de íons metálicos, formando complexos estáveis, e com propriedades eletroquímicas e fotoquímicas interessantes, permitindo o seu uso em diversas aplicações, tais como em sensores, catalisadores, sistemas supramoleculares e de transferências de elétrons, bem como aplicações biológicas<sup>76-79</sup>.

Com base nas potencialidades biológicas dos complexos de rutênio, e dos ligantes pertencentes a classe das naftoquinonas, fosfinas e bipyridinas, nosso grupo de pesquisa vem investindo no desenvolvimento de complexos de rutênio contendo esses ligantes<sup>68-70</sup>. Na Tabela 1 são apresentados os resultados de citotoxicidade obtidos para complexos de rutênio contendo a bifosfina dppb (1,4'-bis(difenilfosfina)butano), a trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>), ligantes bipyridínicos (bipy = 2,2'-bipyridina, mebipy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipyridina, fen = 1,10-fenantrolina, meobipy = 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipyridina), lapachol (lap) e lausona (lau), desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa<sup>80</sup>.

**TABELA 1** - Valores de IC<sub>50</sub> em μM e índice de seletividade (IS) para os complexos de rutênio e cisplatina nas linhagens L929 e MCF-7<sup>80</sup>

Complexos	L929	MCF-7	IS*
[Ru(lap)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,80 ± 0,15	0,70 ± 0,59	1,14
[Ru(lap)(dppb)(mebipy)]PF <sub>6</sub>	0,26 ± 0,18	0,27 ± 0,19	0,96
[Ru(lap)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub>	1,00 ± 0,38	0,62 ± 0,28	1,61
[Ru(lau)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,70 ± 0,23	0,30 ± 0,18	2,33
[Ru(lau)(dppb)(mebipy)]PF <sub>6</sub>	0,26 ± 0,25	0,22 ± 0,12	1,18
[Ru(lau)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub>	1,22 ± 0,74	0,20 ± 0,19	6,10
<i>trans</i> -[Ru(lau)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (bipy)]PF <sub>6</sub>	0,55 ± 0,25	0,26 ± 0,18	2,11
<i>trans</i> -[Ru(lau)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (mebipy)]PF <sub>6</sub>	0,31 ± 0,18	0,23 ± 0,18	1,35
<i>trans</i> -[Ru(lau)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (meobipy)]PF <sub>6</sub>	0,37 ± 0,19	0,32 ± 0,23	1,16
<i>trans</i> -[Ru(lau)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (fen)]PF <sub>6</sub>	0,27 ± 0,18	0,24 ± 0,18	1,12
Cisplatina	20,14 ± 0,19	8,91 ± 2,60	2,26

**L929** = não tumoral de fibroblasto de camundongo e **MCF-7** = adenocarcinoma de mama.

\***IS** = Índice de seletividade IC<sub>50</sub> L929/IC<sub>50</sub> MCF-7

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se que os complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos, biperidínicos, lapachol ou lausona apresentam promissores valores de citotoxicidade quando comparado ao fármaco cisplatina, usado como referência. Além disso, ressalta-se que a citotoxicidade dos complexos com diferentes ligantes biperidínicos foi semelhante entre si. Diante desses resultados, busca-se neste trabalho sintetizar e caracterizar novos complexos de rutênio do tipo [Ru(L)(P-P)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(L)(P-P)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, onde L = lapachol ou lausona, P-P = *bis*(difenilfosfina)metano, 1,2'-*bis*(difenilfosfina)etano e 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno e bipy = 2,2'-biperidina, com o objetivo de investigar a influência de diferentes ligantes bifosfínicos na atividade biológica dos complexos. Além disso, esse trabalho teve por finalidade o estudo do possível mecanismo de ação dessa classe de complexos frente a células tumorais.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de complexos do tipo rutênio-naftoquinonas com potencial atividade citotóxica frente a células tumorais. Para alcançar o objetivo geral, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- Síntese e caracterização de complexos do tipo  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ ,  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , onde L = lap ou lau;
- Determinação do coeficiente de partição dos complexos obtidos;
- Estudos da interação dos complexos com o CT-DNA, pBR322 e BSA;
- Determinação da citotoxicidade dos complexos nas linhagens de câncer de pulmão (A549), próstata (DU-145), mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e não tumorais de fibroblasto de gengiva humana (FGH) e de mama (MCF-10A);
- Avaliação do possível mecanismo de ação dos complexos:
  - I. Ensaio de migração por *Wound Healing* e migração quimiotática;
  - II. Ensaio de formação de colônias;
  - III. Análise do ciclo celular;
  - IV. Ensaio de apoptose;
  - V. Análise do potencial de membrana mitocondrial;
  - VI. Análise da formação de espécies reativas de oxigênio;
  - VII. Análise de proteínas por ensaio de *apoptosis array*;
  - VIII. Análise da internalização dos complexos usando TAMRA-R<sub>9</sub> como sonda;
  - IX. Análise da acumulação celular de rutênio por ICP-MS;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de atmosfera inerte

As sínteses e análises eletroquímicas foram realizadas sob atmosfera de argônio, obtida pela passagem de fluxo de argônio por um sistema de colunas contendo: sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador do tipo BTS-R-3-11 (Fluka Chemika, mantido a 60°C para o catalisador permanecer ativado). Estes procedimentos foram necessários para desoxigenar e secar o gás comercial, de procedência da White Martins.

#### 3.2 Solventes e reagentes

Todos os solventes, Synth P.A. ou Merck P.A., passaram por processos de purificação segundo os métodos usuais da literatura, sendo os principais: diclorometano, metanol, éter etílico, tolueno e hexano. Os reagentes  $\text{PPh}_3$  = trifenilfosfina,  $\text{dppm}$  = *bis*(difenilfosfina)metano,  $\text{dppe}$  = 1,2'-*bis*(difenilfosfina)etano,  $\text{dppf}$  = 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno, 2,2'-bipiridina (*bipy*), tricloreto de rutênio hidratado ( $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), lausona (*lau*), trietilamina e o  $\text{KPF}_6$ , de procedência Aldrich, foram utilizados como recebidos. O perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), de procedência Fluka, foi utilizado na preparação de soluções de eletrólito suporte para análise eletroquímica. O lapachol (*lap*) foi gentilmente fornecido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

### **3.3 Instrumentação e conduta experimental**

#### **3.3.1 Análise elementar**

A determinação do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada em um analisador C H N modelo EA 1108 da FISONs, no Laboratório de Microanálise do Departamento de Química da UFSCar.

#### **3.3.2 Condutividade molar**

As medidas de condutividade molar foram realizadas utilizando-se um condutivímetro Meter Lab., modelo CDM230. As soluções foram preparadas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> na concentração de  $1 \times 10^{-3}$  M e os valores encontrados foram comparados segundo a literatura<sup>81</sup>.

#### **3.3.3 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB - 102 e pastilhas de KBr (Brometo de Potássio) preparadas minutos antes das análises.

#### **3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível**

Os espectros de absorção no ultravioleta e visível foram adquiridos utilizando espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452<sup>A</sup> utilizando cubetas com caminho óptico de 1 cm.

### 3.3.5 Eletroquímica

As análises por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Electrochemical Analyzer, modelo BAS 100B. As medidas foram efetuadas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: um eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl<sub>sat.</sub>)), e eletrodos de trabalho e auxiliar de platina, mergulhados em solução de eletrólito suporte de PTBA (0,1 M em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### 3.3.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises por Ressonância Magnética Nuclear foram executadas em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz pertencente ao Departamento de Química da UFSCar. Os dados foram processados empregando-se software XWIN – NMR versão 1.3, e ACDLABS 10.02. Para as amostras de RMN <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} utilizou-se solventes não deuterados, com um capilar (45 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro interno) contendo D<sub>2</sub>O.

### 3.3.7 Difração de raios X de monocristal

As medidas de difração de raios X foram realizados pelo Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa e o MSc. João Honorato de Araújo Neto, utilizando o difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD, com radiação da linha MoK $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) monocromada por grafite, instalado no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP de São Carlos. As estruturas foram resolvidas pelos métodos direto usando o programa SHELXS-97<sup>82</sup> e SHELXL-97<sup>83</sup>. Os modelos obtidos foram refinados (mínimos quadrados de matriz completa) em F<sup>2</sup> usando o programa SHELXL-97. Os programas ORTEP-3<sup>84</sup>, Mercury 1.1.4<sup>85</sup> foram usados para analisar e elaborar representações gráficas das estruturas.

### 3.4 Síntese dos complexos precursores

#### 3.4.1 Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$

O complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$  foi sintetizado conforme descrito por Stephenson e Wilkinson<sup>86</sup>. Primeiramente, adicionou-se  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  1,00 g (4,82 mmol) em 200 mL de metanol deaerado que foram refluxados por 15 minutos sob atmosfera de argônio. A solução foi resfriada e posteriormente, adicionou-se  $\text{PPh}_3$  5,75g (21,92 mmol). O sistema foi mantido em refluxo por 3 horas. O produto marrom escuro formado foi filtrado, lavado com metanol e seco sob vácuo. Rendimento 95%.

#### 3.4.2 Síntese do complexo *cis, trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]$

O complexo *cis,trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]$  foi sintetizado a partir do complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$  conforme descrito por Batista e colaboradores<sup>87</sup>. Em um balão de duas bocas foram adicionados 0,50 g (0,52 mmol) do complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$  em ~ 15 mL de diclorometano deaerado. Em seguida, foram adicionados 0,09 g (0,55 mmol) da bipy. A mistura reacional foi mantida sob agitação e atmosfera de argônio por aproximadamente 1 hora. Após esse período reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 2 mL e éter etílico deaerado foi adicionado para a precipitação do produto. O precipitado foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento 85%.

#### 3.4.3 Síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$

O complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  foi sintetizado partindo-se da reação de 0,50 g (0,59 mmol) do complexo *cis,trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]$  com 0,47 g (1,18 mmol) de dppe em 40 mL de tolueno deaerado. A solução foi

refluxada por 48 horas sob agitação magnética. O formado foi filtrado, lavado com éter etílico deaerado e seco sob vácuo. Rendimento 87%.

#### 3.4.4 Síntese do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(bipy)]

O complexos *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(bipy)] foi sintetizado como descrito por Ma e colaboradores<sup>88</sup>. Inicialmente foram adicionados 0,35 g (0,62 mmol) de dppf a uma solução de 0,50 g (0,52 mmol) do complexo [RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] em 50 mL de diclorometano deaerado. Após 30 minutos de reação adicionou-se 0,98 g (0,62 mmol) de bipy e manteve-se a reação por mais 30 minutos. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e precipitou-se usando éter etílico. O produto formado foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 85%.

#### 3.4.5 Síntese do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>]

O complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] foi sintetizado segundo procedimento descrito por Evans e colaboradores<sup>89</sup>. Adicionou-se o RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O 0,50 g (2,41 mmol) em dimetilsulfóxido (5 mL) que foi refluxado por 15 minutos. O sistema foi resfriado a temperatura ambiente e adicionou-se acetona (20 mL) formando um precipitado amarelo, o qual foi lavado com acetona e éter etílico e seco a vácuo. Rendimento: 60 %.

#### 3.4.6 Síntese do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)<sub>2</sub>]

O complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)<sub>2</sub>] foi obtido segundo metodologia descrita por Bautista e colaboradores<sup>90</sup>. Misturou-se o complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>] 0,50 g (1,03 mmol) e a bifosfina dppe 0,94 g (2,37 mmol) em 20 mL de diclorometano. A reação foi mantida em agitação por 5 horas e

posteriormente o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e adicionou-se hexano formando um precipitado amarelo claro. O precipitado foi solubilizado em uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:hexano (6:1) e cristalizado após 12 horas à -5°C. Rendimento 70%.

### 3.4.7 Síntese do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>]

Inicialmente foi sintetizado o complexo *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] seguindo a metodologia descrita por Sullivan e Meyer<sup>91</sup>. Para isso partiu-se da reação de 0,30 g (1,44 mmol) de RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O e da bifosfina dppm 1,15 g (2,99 mmol) em 30 mL de etanol. A mistura reacional foi mantida em refluxo em atmosfera inerte por um período de 3 horas, observando-se então a formação de um precipitado amarelo, monocristalino. O sólido obtido foi separado por filtração, lavado com etanol quente e éter etílico, deaerados.

Para obtenção do *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] foi refluxado em 30 mL de dicloroetano 0,50 g (0,53 mmol) o *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] por um período de 10 horas. O volume foi reduzido e adicionados 30 mL de hexano. O sólido obtido foi coletado por filtração e seco a vácuo. Rendimento: 80%.

## 3.5 Síntese dos complexos contendo lap ou lau

### 3.5.1 Síntese do complexo [Ru(lau)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>

Em um recipiente do tipo Schlenk contendo metanol e diclorometano (1:2), sob atmosfera inerte, foram adicionados 0,10 g (0,10 mmol) do complexo precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)<sub>2</sub>] e 0,04 g (0,21 mmol) de KPF<sub>6</sub>, os quais foram mantidos em agitação por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,02 g (0,13 mmol) de lausona e 50 µL de trietilamina para desprotonação do mesmo. A mistura que inicialmente apresentava coloração

amarela tornou-se azul escuro. O sistema foi mantido em refluxo por aproximadamente 12 horas. O volume do solvente foi reduzido restando praticamente a solução metanólica, assim precipitou-se um sólido azul escuro após adição de água. O produto obtido foi lavado com água destilada e éter etílico, com o intuito de eliminar excesso do ligante lausona. Rendimento: 73%.

### 3.5.2 Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$

Em um recipiente do tipo Schlenk contendo 30 mL de metanol, sob atmosfera inerte, foram adicionados 0,02 g (0,14 mmol) de lau e 50  $\mu\text{L}$  de trietilamina para desprotonação do mesmo. O sistema foi mantido em agitação por 15 minutos e posteriormente foram adicionados 0,10 g (0,11 mmol) do complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$  e 0,04 g (0,21 mmol) de  $\text{KPF}_6$ . A solução que inicialmente era avermelhada tornou-se esverdeada. A reação foi mantida em refluxo por 18 horas e foi observado a formação de um precipitado de coloração escura, o qual foi filtrado e lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 70 %. O mesmo procedimento foi realizado para a síntese empregando o lapachol. Rendimento: 77%.

### 3.5.3 Síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

Em um balão de duas bocas contendo metanol e diclorometano (1:2) foram adicionados 0,03 g (0,18 mmol) da lau e 20  $\mu\text{L}$  de trietilamina. Em seguida 0,10 g (0,14 mmol) do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  e 0,05 g (0,27 mmol) de  $\text{KPF}_6$  foram adicionados. A reação foi mantida em agitação por aproximadamente 12 horas e a solução que no início era vermelha, tornou-se roxa escura. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e um sólido foi precipitado com água destilada. O produto foi lavado com água destilada e éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 70%.

### 3.5.4 Síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

Adicionou-se 0,04 g (0,18 mmol) de lapachol em um balão de duas bocas contendo metanol e diclorometano e 50  $\mu\text{L}$  de trietilamina. Após 20 minutos adicionou-se o complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  0,1 g (0,14 mmol) e 0,05 g (0,27 mmol) de  $\text{KPF}_6$ . A reação foi mantida por 12 horas sob agitação e temperatura ambiente. Então, reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 3 mL e manteve o sistema em agitação até observar a formação de um precipitado de coloração escura. O mesmo foi filtrado, lavado com água destilada e éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 75,5%.

Nesta síntese foram empregadas duas formas de precipitação do produto, uma descrita acima e outra forma foi pela redução do volume da reação e precipitação com água.

### 3.5.5 Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

Em um balão de duas bocas contendo metanol e diclorometano (1:2) deaerados foram adicionados 0,10 g (0,11 mmol) do complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$  e 0,04 g (0,22 mmol) de  $\text{KPF}_6$ , os quais foram mantidos em agitação por cerca de 20 minutos para solubilização. Em seguida, adicionou-se 0,03 g (0,17 mmol) do ligante lausona e 20  $\mu\text{L}$  de trietilamina. A solução que apresentava coloração vermelha tornou-se roxa escura. A reação foi mantida em agitação por um período de 12 horas e em seguida o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL, e um sólido foi precipitado com água destilada. O produto foi lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 82%. Procedimento análogo foi empregado para a síntese do complexo contendo o lap. Rendimento: 80 %.

### 3.6 Estudos de interação dos complexos com a BSA

Este estudo foi realizado com base na medida da supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes na BSA. Para isso foi empregada uma solução de 10  $\mu\text{M}$  de BSA em tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4. A concentração da BSA foi determinada a partir da absorvidade molar da mesma em 280 nm,  $43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A extinção da intensidade de emissão dos resíduos de triptofano em 340 nm (comprimento de onda de excitação 280 nm) foi monitorada utilizando os complexos como supressores em diferentes concentrações (0 – 90  $\mu\text{M}$ ), solubilizados em DMSO.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços (costar). Em cada poço foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo BSA e os complexos, em diferentes concentrações. A porcentagem de DMSO na solução final foi de 10%. Medidas dos complexos sem BSA foram realizadas para verificar se os complexos não apresentam fluorescência na mesma região da proteína. As medidas foram efetuadas em um fluorímetro SpectraMax M3 nas seguintes temperaturas: 25 e 37°C.

### 3.7 Estudos de interação dos complexos o com DNA

#### 3.7.1 Titulação espectroscópica

Inicialmente preparou-se uma solução estoque de DNA pela solubilização de aproximadamente 2 mg de CT-DNA (calf thymus) em 1 mL de tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4. A concentração de DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis. A partir da absorvidade molar do DNA em 260 nm,  $6600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ , do caminho óptico ( $b = 1 \text{ cm}$ ) e da absorbância, determinou-

se a concentração do CT-DNA por meio da lei de Lambert-Beer:

$$A_{260} = \epsilon_{260} \times b \times C.$$

As titulações espectroscópicas foram realizadas empregando-se duas cubetas de quartzo, uma contendo o tampão Tris-HCl e DMSO (Branco) a outra contendo o tampão Tris-HCl e o complexo solubilizado em DMSO (amostra), em uma concentração que não ultrapasse o permitido pela Lei de Lambert-Beer. Foram realizadas sucessivas adições de 20  $\mu$ L de CT-DNA em ambas cubetas e a cada adição foi registrado o espectro. A porcentagem de DMSO usada foi de 10%. Vale ressaltar que o CT-DNA foi adicionado tanto no branco como na amostra para garantir que toda a variação espectral fosse oriunda da interação do complexo com o CT-DNA.

As constantes de ligação ( $K_b$ ) entre o CT-DNA e os complexos foram obtidas utilizando-se a seguinte equação<sup>92</sup>:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]}$$

onde:  $\epsilon_a$  = é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração do complexo ( $A_{\text{observada}}/[\text{Complexo}]$ );  $\epsilon_f$  = absorvância molar do complexo livre (sem adição de DNA);  $\epsilon_b$  = absorvância molar do complexo ligado ao DNA;  $K_b$  = constante de ligação.

### 3.7.2 Dicroísmo circular

Os complexos foram incubados a 37°C por 18 h com o CT-DNA (50  $\mu$ M) em diferentes relações molares CT-DNA/complexo (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4) e as medidas foram efetuadas empregando um espectropolarímetro Jasco J-720 acoplado a um computador. Os complexos foram preparados em DMSO e foram adicionados ao CT-DNA em tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4, mantendo uma

porcentagem de DMSO de 10%. Empregou-se uma cubeta circular de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As varreduras foram feitas de 240 a 350 nm a uma velocidade de 200 nm/min, fazendo 3 acumulações a cada medida e mantendo constante o fluxo de nitrogênio.

### 3.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Para realização deste experimento empregou-se o DNA plasmidial pBR322 (Sigma Aldrich). Inicialmente, os complexos foram incubados com o pBR322 (38  $\mu$ M) em diferentes relações molares, por 18 h à 37°C. Em seguida, as amostras foram corridas em um gel de agarose a 1% com TAE (0,45 M Tris-HCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM de EDTA, pH 7,4), que foi corado com brometo de etídio (3  $\mu$ L). As imagens foram capturadas utilizando Chemi Doc MP imager (BioRad Laboratories).

### 3.7.4 Fluorescência

Este ensaio baseou-se na avaliação da competição dos complexos com Hoechst no CT-DNA, conforme descrito por Sarwar e colaboradores<sup>93</sup>. Para isso empregou-se uma placa opaca de 96 poços (costar), onde adicionou-se 200  $\mu$ L (volume final) de solução contendo CT-DNA (125  $\mu$ M), Hoechst (2,7  $\mu$ M) e os complexos em diferentes relações molares CT-DNA/complexo (0,1 - 0,9), em tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4, mantendo uma porcentagem de DMSO de 10%. As amostras foram analisadas em um fluorímetro Synergy/H1-Biotek, a 37 °C, realizando a excitação em 340 nm. Em 455 nm observou-se a banda de emissão do CT-DNA e Hoechst, a qual foi monitorada usando os complexos de rutênio como supressores da fluorescência. Os espectros foram registrados de 370 a 700 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.8 Determinação da lipofilicidade ( $\log P$ )

Para a realização deste experimento foi empregado *n*-octanol como fase orgânica, e a água. O  $\log P$  foi determinado pelo método *shake flash*<sup>94</sup>. Os complexos foram solubilizados em 750  $\mu\text{L}$  de *n*-octanol e 750  $\mu\text{L}$  de água (foi utilizado 7% de DMSO para auxiliar na solubilização dos complexos em *n*-octanol). Os complexos foram mantidos em agitação a 1000 rpm por 18 horas a 37°C. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 500 rpm. As fases foram separadas e a concentração dos complexos na fase orgânica e aquosa foi determinada empregando-se a espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível. Os experimentos foram realizados em triplica e o valor de  $\log P$  foi obtido empregando-se a seguinte Equação:

$$\log P = \log (C_o/C_a)$$

onde,  $C_o$  e  $C_a$  são as concentrações do complexo na fase orgânica e aquosa, respectivamente.

### 3.9 Linhagens e cultivo celular

Os experimentos envolvendo a avaliação das propriedades biológicas dos complexos de rutênio foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), sob supervisão da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti, no Departamento de Gerontologia da UFSCar e no Massey Cancer Center da Virginia Commonwealth University (VCU), sob supervisão do Prof. Dr. Nicholas Farrell.

Foram empregadas as seguintes linhagens celulares tumorais: MDA-MB-231 (Adenocarcinoma de mama - triplo negativo), MCF-7 (Adenocarcinoma de mama - hormônio dependente), A549 (Câncer de pulmão), DU-145 (Câncer de próstata), e as linhagens não tumorais CHO-K1 (Células de ovário de hamster chinês), CHO-pgsA-745 (Células de ovário de hamster chinês mutante, sem heparano sulfato (HS) e sem sulfato de condroitina (CS)), HUVEC

(Células endoteliais de veia umbilical humana), FGF (Fibroblasto de gengiva humana) e MCF-10A (Células epiteliais de mama).

As linhagens celulares MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26), A549 (ATCC: CCL-185), FGH (ATCC: CRL-2014), (CHO-K1 (ATCC: CCL-61) e CHO-pgsA-745 (ATCC: CRL-2242) foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e L-glutamina (2 mM). As linhagens DU-145 (ATCC: HTB-81) e MCF-7 (ATCC: HTB-22) foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contendo 10% de FBS, penicilina (100 UI mL<sup>-1</sup>), estreptomicina (100 mg mL<sup>-1</sup>) e L-glutamina (2 mM). A linhagem MCF-10A (ATCC: CRL-10317) foi cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12* (DMEM F-12) contendo 5% de soro de cavalo, EGF (20 ng mL<sup>-1</sup>), hidrocortisona (0,5 µg mL<sup>-1</sup>), insulina (0,01 mg mL<sup>-1</sup>), 1% de penicilina e 1% de estreptomicina. A linhagem HUVEC (ATCC: CRL-1730) foi cultivada em meio *Vasculife Basal Medium* contendo 5% de FBS e fatores de crescimento (Lifeline Cell Technology). Todas as linhagens celulares foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e com temperatura constante de 37°C em garrafas de cultura para serem utilizadas nos ensaios descritos a seguir.

### 3.9.1 Determinação da atividade citotóxica

A citotoxicidade dos complexos foi determinada empregando-se o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o qual preconiza que a viabilidade celular é proporcional à formação de cristais de formazan (produto da redução do MTT).

Inicialmente as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração das células e, em seguida, semeadas em placas de cultura de 96 poços (Corning Costar) (1,5 × 10<sup>4</sup> células/poço). As placas foram armazenadas

em estufa (37°C - 5% CO<sub>2</sub>) por 24 h para a adesão celular. Após este tempo adicionou-se os complexos em diferentes concentrações (50 a 0,003 µM) e a placa foi mantida na estufa por 48 horas. A porcentagem de DMSO empregada neste experimento foi de 0,5% e os controles receberam esta mesma porcentagem de DMSO. Após 48 h, o meio de cultura foi removido das placas e foram adicionados 50 µL de MTT (0,5 mg mL<sup>-1</sup> em PBS em cada poço, as quais foram posteriormente incubadas na estufa (37°C - 5% CO<sub>2</sub>) por um período de 3 – 4 horas. Os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de isopropanol e a absorbância dos poços registrada utilizando-se um leitor de microplacas (Labtech LT4000) em um comprimento de onda de 540 nm. Após a determinação da citotoxicidade dos complexos frente às linhagens celulares mencionadas, a linhagem MDA-MB-231 foi selecionada para dar prosseguimento aos demais estudos biológicos.

### **3.9.2 Morfologia celular**

Para avaliar o efeito dos complexos na morfologia das células MDA-MB-231 e MCF-10A, estas foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/poço) em placas de 12 poços, e mantidas na estufa a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C, por 24 horas para aderência celular. Posteriormente os complexos, em diferentes concentrações, foram adicionados às células e imagens foram registradas em diferentes intervalos de tempo (0, 24 e 48 horas), com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3MP Live Resolution) registrou-se imagens para analisar a morfologia das células.

### **3.9.3 Formação de colônias**

Este ensaio permite determinar se após as células serem expostas aos complexos de rutênio elas serão capazes proliferar e formar colônias. Para isso, as células MDA-MB-231 foram semeadas (300 células/placa de Petri de 6 cm) e

incubadas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos de rutênio, e incubados por 48 horas na estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. Após este tempo, o meio de cultura contendo o complexo foi removido e um novo meio foi adicionado (6 mL), e as placas foram mantidas na estufa por 10 dias. O meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas com PBS e as células foram fixadas com uma mistura metanol/ácido acético (3:1) por 5 minutos. Posteriormente as células foram coradas com uma solução de cristal violeta 5% em água, por 25 minutos. As placas de Petri foram fotografadas e as colônias foram contadas e seu tamanho medido utilizando o *software* Image J. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.9.4 Ensaios de migração celular

#### 3.9.4.1 *Wound Healing*

O ensaio de *Wound Healing* foi utilizado com o intuito de avaliar se os complexos são capazes de interferir no processo migratório das células<sup>95</sup>. Para isso, foram semeadas  $1,5 \times 10^5$  células/poço de MDA-MB-231 em placas de 12 poços, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, para aderência. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira estéril, foi efetuada uma risca na monocamada aderente de células. O meio de cultura foi removido para retirar os restos celulares e as células desaderidas. Um novo meio de cultura contendo os complexos nas concentrações de 0,05; 0,5 e 1 µM foi adicionado. Os controles receberam 0,5% de DMSO. Imagens das riscas foram registradas nos tempos de 0, 8 e 24 h, com o auxílio de uma câmera (Moticam 1000 - 1.3 *Megapixels Live Resolution*) acoplada ao microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100). O experimento foi realizado em triplicata. A distância média da área interna foi determinada como a porcentagem de fechamento, utilizando o *software* Image J e empregando a seguinte equação<sup>96</sup>:

$$\% \text{ de fechamento} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=24h})}{(A_{t=0h})} \times (100)$$

### 3.9.4.2 Migração quimiotática - Câmara de Boyden

Para investigar o efeito dos complexos sobre a migração das células MDA-MB-231 pelo ensaio da câmara de Boyden, empregou-se insertos que contem membranas de politereftalato de etileno com poros de 8  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences), em placas de 24 poços. Inicialmente as membranas dos insertos foram hidratadas com meio sem FBS, por um período de 2 horas. As células MDA-MB-231 foram tripsinizadas e a concentração ajustada para  $0,5 \times 10^5$  células/poço, em um volume de 350  $\mu\text{L}$ . No controle negativo foi adicionado meio sem FBS (750  $\mu\text{L}$  fora e 350  $\mu\text{L}$  dentro do inserto), e no controle positivo utilizou-se meio com FBS dentro e fora do inserto. Os complexos foram adicionados nas concentrações de 0,05; 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , dentro dos insertos e incubados por 24 horas na estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 horas, com o auxílio de uma pinça, os insertos foram removidos e o meio descartado. As células que foram capazes de migrar pelos poros foram fixadas em metanol por 5 minutos e coradas com azul de toluidina diluído em bórax e água destilada, por 5 minutos. Os insertos foram lavados com água destilada e após a secagem as membranas foram removidas e lâminas histológicas foram preparadas com o auxílio de óleo de imersão. Fotos de 5 campos de cada membrana foram registradas empregando uma câmera acoplada ao microscópio invertido. A contagem das células foi realizada utilizando o *software* Image J. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.9.5 Análise da formação de túbulos vasculares

Para verificar as propriedades antiangiogênicas dos complexos de rutênio foi empregada a linhagem celular HUVEC, a qual apresenta a

capacidade de formar túbulos vasculares que simulam a formação de vasos sanguíneos<sup>97</sup>. Desta forma, as células da linhagem HUVEC em passagem inferior a 3, foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> até atingir aproximadamente 60% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura da garrafa foi substituído por um meio contendo 2% de FBS, e a mesma foi incubada por 12 h. Após descongelado *overnight* na geladeira o matrigel (*Corning Matrigel Growth Factor Reduced*) foi adicionado em uma placa de 96 poços, e incubado por 30 minutos a 37 °C na estufa para solidificar.  $1,1 \times 10^4$  células em meio de cultura contendo 2% de FBS contendo diferentes concentrações de complexos de rutênio (0,05 e 0,5 µM) foram adicionadas à placa de 96 poços cobertas com matrigel. Para controle positivo as células foram adicionadas aos poços em meio de cultura contendo 5% de FBS, e no controle negativo as células foram adicionadas em meio contendo 2% de FBS. A suramina, fármaco antiangiogênico empregado no tratamento do câncer, foi utilizado como controle inibidor. A placa foi incubada na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e após 12 h foi observado a formação de túbulos vasculares, os quais foram fotografados e suas extensões foram analisadas utilizando o *software* ImageJ.

### 3.9.6 Formação de túbulos vasculares na presença de FGF-2

O mesmo ensaio de formação de túbulos vasculares descrito em 3.9.5 foi realizado empregando-se o fator de crescimento FGF-2 (Fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2) (Cell Signaling), o qual é um estimulador da formação de túbulos. As células HUVEC foram cultivadas e ao atingir aproximadamente 60% de confluência em passagem inferior a 3, foram tripsinizadas e coletadas empregando-se meio de cultura sem FBS.  $1,1 \times 10^4$  células em meio de cultura sem FBS, contendo os complexos em diferentes concentrações (0,05 e 0,5 µM), foram adicionadas à placa de 96 poços contendo matrigel. A cada amostra foi adicionado 10 ng de FGF-2, exceto no controle

negativo. Para controle positivo foi utilizado 10 ng de FGF-2. Depois de 8h de incubação foi observado a formação de tubos, os quais foram fotografados e analisados, empregando-se o *software* ImageJ.

### 3.9.7 Quantificação celular de rutênio por ICP-MS

Experimentos de quantificação celular de rutênio foram realizados com o intuito de quantificar o metal contido nas amostras celulares. Para isso empregou-se as linhagens celulares CHO-K1 (contém heparan sulfato) e CHO-pgsA-745 (não contém heparan sulfato)<sup>98</sup>, a fim de investigar se a acumulação celular de rutênio depende da presença do heparan sulfato. Além disso, utilizou-se as linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-10A.

$2 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placas de 100 mm e após 24 h as células foram tratadas com 5  $\mu$ M dos complexos e incubadas por 3 e 6 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido por sucção, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, coletas em falcons de 15 mL e lavadas 2 $\times$  com PBS. As células foram ressuspensas em PBS e contadas utilizando uma câmara de Neubauer. Os pellets foram dissolvidos em 1 mL de ácido nítrico ultrapuro e incubados por 3 dias. Subsequentemente, 2 mL de água destilada foram adicionadas a cada amostra e as mesmas filtradas para remover possíveis sólidos empregando-se filtros com poros de 0.45  $\mu$ m. A análise de rutênio foi realizada em um espectrômetro de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Varian 820-MS). A curva de calibração foi construída empregando-se  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  nas concentrações de 0,4 - 250 ppb.

### 3.9.8 Ensaio de competição dos complexos com a sonda TAMRA-R<sub>9</sub>

Para investigar se os complexos de rutênio podem ser internalizados nas células via interação com a heparan sulfato, foi utilizado a sonda TAMRA-

R<sub>9</sub> (Composto por um peptídeo de nona-arginina R<sub>9</sub> acoplado com o TAMRA (carboxitetrametilrodamina)), que é capaz de entrar nas células via ligação com heparan sulfato<sup>98</sup>.

Desta forma semeou-se  $1 \times 10^5$  células/poço da linhagem celular CHO-K1 (a qual contém heparan sulfato em sua membrana celular) em placas de 6 poços. Após 24 h os complexos de rutênio foram adicionados a cada poço e incubados por 5 minutos. Em seguida, 1  $\mu$ M de TAMRA-R<sub>9</sub> foi adicionado a cada poço e a placa incubada a 37°C durante 1h. Posteriormente, as células foram lavadas 6× com PBS, tripsinizadas e lavadas novamente com PBS (2×). As amostras foram analisadas em 588 nm empregando-se um citômetro de fluxo da FACSort (Becton Dickinson).

### 3.9.9 Análise do ciclo celular

As células MDA-MB-231 foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 12 poços, e incubadas por 24 horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os complexos foram adicionados e mantidos incubados por 24 horas. Utilizou-se a concentração do IC<sub>50</sub> de 24 horas e duas concentrações abaixo. No controle negativo foi adicionado 0,5% de DMSO. Após 24 horas removeu-se o meio de cultura dos poços e reservou-os em falcons. As células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Coletou-se o PBS bem como o meio com o conteúdo. As células foram centrifugadas a 1000 rpm, por 5 minutos e a 4°C. Todo o procedimento seguinte foi realizado em gelo. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 250  $\mu$ L de PBS e 500  $\mu$ L de etanol 70% gelado. As amostras foram incubadas no freezer por uma noite. Posteriormente as células foram centrifugadas a 1000 rpm, por 5 minutos e a 4°C, ressuspendidas em 300  $\mu$ L de RNase 0,2 mg mL<sup>-1</sup> e incubadas a 37°C por 30 minutos em um banho maria. Posteriormente as amostras foram transferidas

para o gelo e incubadas por 1 hora com 200  $\mu\text{L}$  da solução de HFS (*Hypotonic fluorochrome solution*), a qual é constituída por tampão de ligação (2,4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2,1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM KCl, 0,15 M NaCl e 0,01 M HEPES, pH 7,4), 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PI (Iodeto de propídeo), citrato de sódio 0,1% e triton-X100 0,5%. Logo após as amostras foram analisadas no citômetro BD Accuri C6 utilizando o canal FL2. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.9.10 Ensaio de apoptose com Anexina V

Para investigação do efeito dos complexos sobre a atividade apoptótica das células MDA-MB-231 empregou-se o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). As células MDA-MB-231 foram semeadas, na concentração de  $7 \times 10^4$  células/poço, em uma placa de 24 poços. A placa foi mantida na estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Logo após as células foram tratadas com os complexos de rutênio em diferentes concentrações e incubados novamente por 24 horas. A placa foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos e a 4°C, o meio coletado em microtubos e os poços lavados com PBS. Todas as próximas etapas foram realizadas mantendo as amostras em gelo. Os microtubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e a 4°C e as células foram ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 1 $\times$ . As células foram adicionadas aos poços de origem e os corantes PE-Anexina V e 7-AAD (2,5  $\mu\text{L}$  de cada) foram adicionados e incubados no escuro por 20 minutos. A placa foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 200  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 1 $\times$  foi adicionado. Com o auxílio de um *scraper* as células foram removidas, adicionadas aos tubos de citometria, e a análise foi realizada no citômetro BD Accuri C6, utilizando os canais FL2 e FL3, e a fluorescência foi quantificada através do software CSampler. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 3.9.11 Análise do potencial de membrana mitocondrial

A integridade do potencial das membranas das mitocôndrias celulares foi avaliada empregando-se o kit BD MitoScreen (JC-1) Kit (BD BioSciences) o qual contém o corante JC-1 (5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-iodeto de tetraetil benzimidazolil carbocanina) que é catiônico, lipofílico e permeável a células.

Para isso plaqueou-se  $1 \times 10^5$  células/poço de MDA-MB-231 em placas de 12 poços as quais foram mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. As células foram tratadas com os complexos nas concentrações do (IC<sub>50</sub> de 24 h e 2× IC<sub>50</sub> de 24 h) e incubadas por 4h. As células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 200 µL da solução de JC-1 e incubados por 15 minutos a 37°C. As células foram lavadas e centrifugadas a 400 g por 5 minutos (2×), ressuspensas em 300 µL de tampão (fornecido pelo kit) e analisadas no citômetro BD Accuri C6 utilizando os canais FL1 e FL2.

### 3.9.12 Apoptosis array

O ensaio de *apoptose array* foi realizado buscando identificar as proteínas envolvidas no processo de apoptose e para isso utilizou-se o kit PathScan Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit) (Cell Signaling).  $2 \times 10^6$  células da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 100 mm e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. As células foram tratadas com 5 µM dos complexos e incubadas por 6, 12, 18 e 24 h. Completado o tempo de incubação, as células foram tripsinizadas e lisadas utilizando uma solução de lise contendo proteases e inibidores de fosfatases (fornecida pelo kit). As proteínas foram quantificadas utilizando o ensaio de Bradford. 75 µg de proteína de cada amostra foram incubadas overnight a 4 °C na lâmina do kit de matriz de

anticorpo de sinalização de apoptose. Após a incubação a lâmina foi lavada e a membrana incubada por 1 min com peróxido de hidrogênio. A detecção dos sinais referentes as proteínas expressas foram visualizadas por quimiluminescência, empregando-se filmes de raios X.

### 3.9.13 Análise da formação de espécies reativas de oxigênio

Para investigação da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi empregado o H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) (Sigma Aldrich), que é um composto não fluorescente capaz de permear a membrana celular, mas quando em presença de ROS, ocorre a clivagem do grupo acetato formando o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).

$6 \times 10^5$  células/poço de MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 6 poços e após 24 h foram tratadas com os complexos de rutênio ( $2 \times IC_{50}$  de 24 h) e com o lapachol livre (10  $\mu$ M) por 4 h. Utilizou-se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) como controle positivo, o qual foi incubado por 30 minutos. As células foram lavadas  $1 \times$  com PBS e 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>DCFDA foi adicionado e incubado por 30 minutos no escuro. As células foram lavadas com 1 mL de PBS gelado ( $3 \times$ ), coletadas por tripsinização e centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, e ressuspensas em PBS. As medidas de fluorescência foram registradas em um fluorímetro SpectraMax M3, e as imagens foram capturadas com auxílio do software CoolSNAP, Image Pro Plus, 4.1 (Media Cynernetics), acoplado à um microscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation) em campos diferentes utilizando o aumento de  $10 \times$ .

### 3.9.14 Análise estatística

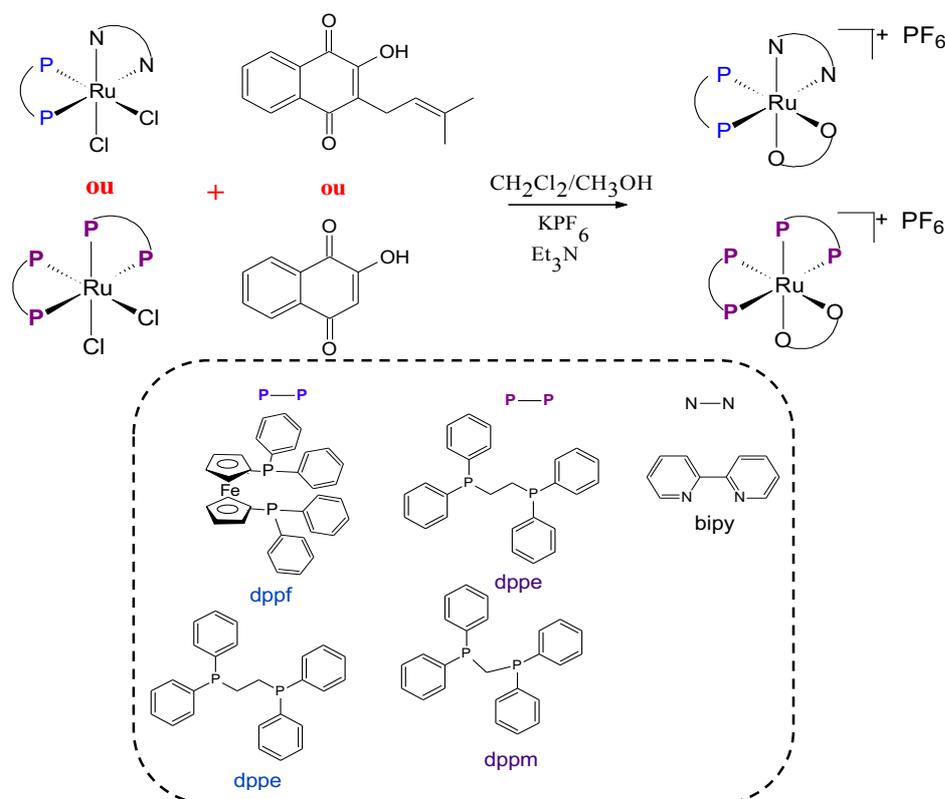
Os ensaios de formação de túbulos vasculares, quantificação celular de rutênio e *apoptosis array* foram realizados em dois experimentos

independentes, sendo efetuada a triplicata em cada um dos experimentos. Os demais ensaios foram realizados em triplicata, onde cada experimento foi repetido três vezes. A análise estatística foi realizada empregando o *software* GraphPad Prism 6. Para isso a média e o desvio padrão foram determinados, e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) e os testes de Tukey e Bonferroni.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese e caracterização dos complexos de rutênio contendo lap ou lau

Os complexos contendo lapachol ou lausona foram sintetizados a partir dos precursores *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)<sub>2</sub>], *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>], *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)(bipy)] e *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(bipy)], pela substituição dos ligantes cloretos conforme ilustrado no Esquema 1.



**ESQUEMA 1** - Rota sintética empregada para obtenção dos complexos contendo lap ou lau.

Com a coordenação bidentada (O,O) dos ligantes lap ou lau, formou-se um anel de cinco membros com o rutênio, obtendo-se assim complexos estáveis. A presença das bifosfinas nos complexos, além de estabilizar o centro metálico e apresentar propriedades biológicas, contribui para o aumento da lipofilicidade dos mesmos, o que pode facilitar o processo destes em atravessar a

membrana plasmática celular.

Todos os complexos obtidos são sólidos, estáveis ao ar, possuem coloração roxa, ou verde escuro, em solução, insolúveis em água e solúveis em acetona, metanol, etanol, diclorometano, dimetilsulfóxido e dimetilformamida.

Medidas de condutividade molar dos complexos foram realizadas em diclorometano e os resultados obtidos indicaram que eles são eletrólitos 1:1 (faixa  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1 = 12 – 77  $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ )<sup>81</sup>. Isso indica a formação de complexos iônicos com a presença do contra íon  $\text{PF}_6^-$ , pois o lap e a lau encontram-se coordenados ao metal na forma aniônica devido à desprotonação da hidroxila do grupamento fenólico. Os dados encontrados estão dispostos na Tabela 2 juntamente com os dados de análise elementar (% C, H, N), os quais estão de acordo com as composições propostas. Vale ressaltar que para os complexos  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foram observadas moléculas de solvente em suas composições.

**TABELA 2** - Dados de condutividade molar e análise elementar dos complexos sintetizados

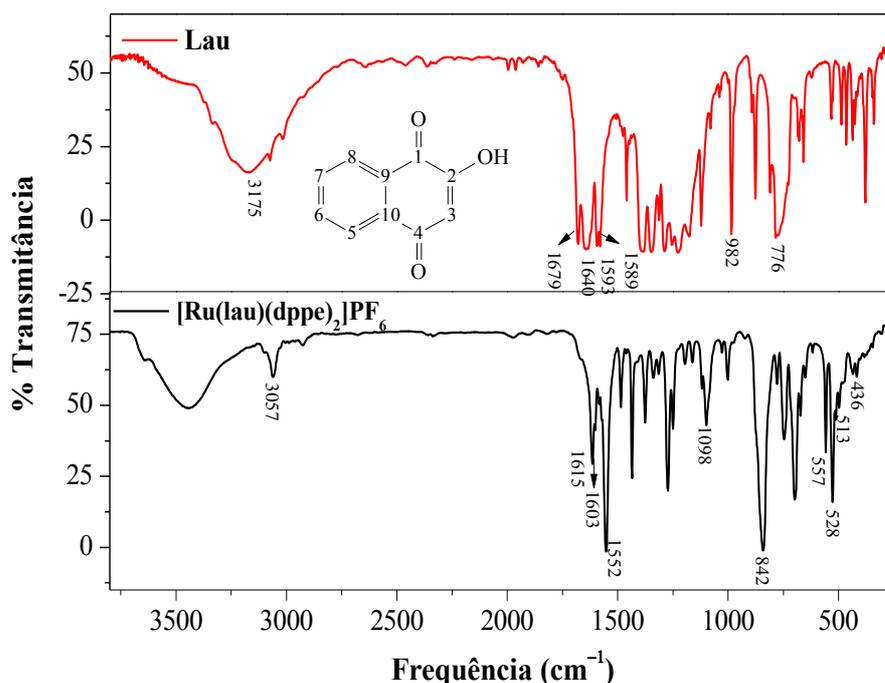
COMPLEXOS	%C	%H	%N	Condutividade <sup>#</sup>
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(61,24) 61,26	(4,39) 4,44	--	62,9
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(60,66) 61,14	(4,20) 4,73	---	48,2
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(62,15) 61,74	(4,57) 4,80	---	54,6
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> . 1C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	(57,31) 57,69	(4,52) 4,26	(2,67) 2,64	44,5
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> . 1C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	(59,19) 59,22	(4,97) 5,51	(2,51) 2,43	39,8
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(57,41) 57,51	(3,66) 3,99	(2,48) 2,25	48,0
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(59,16) 59,35	(4,12) 4,32	(2,34) 2,24	45,8

\*Valores teóricos estão entre parênteses. <sup>#</sup>Condutividade em  $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$  e concentração dos complexos: 1 mM.

Com base nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos foi possível obter informações importantes, principalmente na região de alta frequência, visto que os ligantes livres lap e lau apresentam o estiramento  $\nu(\text{O-H})$  em torno de  $3200 \text{ cm}^{-1}$  e esta banda não foi observada nos espectros dos complexos, indicando a desprotonação dos ligantes, e a coordenação ao rutênio pelo oxigênio. Além disso, os ligantes lap e lau apresentam bandas intensas na região entre  $1640$  e  $1680 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de estiramento  $\nu(\text{C}_1=\text{O}_1)$  e  $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$ , respectivamente. Quando complexados foi observado um deslocamento destas bandas para regiões de frequências mais baixas, devido a diminuição da densidade eletrônica. No caso da carbonila  $\text{C}_1=\text{O}_1$ , o deslocamento foi mais pronunciado devido à ligação ao rutênio. Com a coordenação, o oxigênio doa densidade eletrônica para o rutênio, e assim a

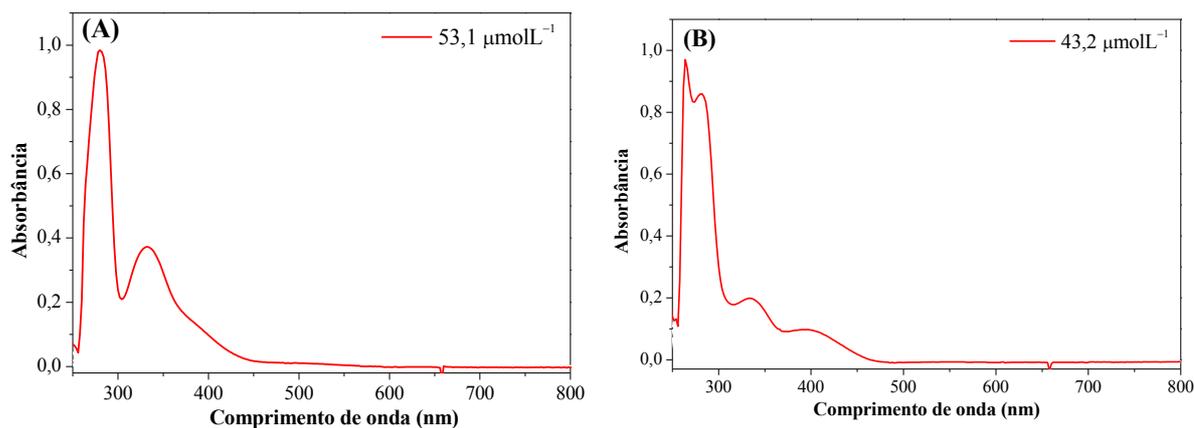
ligação  $C_1=O_1$  fica mais fraca e conseqüentemente a frequência de estiramento ocorre em uma região de frequências mais baixas. A carbonila  $C_4=O_4$  também sofreu deslocamento para frequências mais baixas devido a mudança de densidade eletrônica no anel após a coordenação ao rutênio, contudo, o deslocamento é menos pronunciado se comparado à carbonila  $C_1=O_1$ , pois essa carbonila não está coordenada.

Para o complexo  $[Ru(lau)(dppe)_2]PF_6$  (Figura 10) foi observado que o estiramento da carbonila  $\nu(C_1=O_1)$  se deslocou para frequência mais baixa (passou de  $1679\text{ cm}^{-1}$  para  $1603\text{ cm}^{-1}$ ), condizente com a diminuição da ordem de ligação da carbonila após a coordenação do ligante ao centro metálico. O estiramento referente à ligação  $C_4=O_4$  também se deslocou para menores frequências, passando de  $1640$  para  $1615\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1098\text{ cm}^{-1}$  é observada a banda referente ao estiramento de ligação  $\nu(C_2-O_2)$ , a qual apresenta estiramento em  $982\text{ cm}^{-1}$  na lausona livre. Estes deslocamentos observados ocorreram devido às alterações na densidade eletrônica das ligações após a coordenação da lausona ao rutênio<sup>99</sup>. Bandas fortes na região entre  $1500$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a estiramentos  $\nu(C=C)$  dos ligantes lausona e dppe. As fortes bandas em  $842\text{ cm}^{-1}$   $\nu(P-F)$  e  $557\text{ cm}^{-1}$   $\delta(P-F)$  confirmam a presença do ânion  $PF_6^-$  no complexo. Na região entre  $528$  a  $436\text{ cm}^{-1}$  são observados estiramentos  $\nu(Ru-P)$  e  $\nu(Ru-O)$ <sup>100</sup>. Todos os complexos sintetizados apresentaram um comportamento semelhante, e os seus espectros são apresentados no apêndice, nas Figuras A1 - A6.



**FIGURA 10** - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lau e do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ , em pastilhas de KBr.

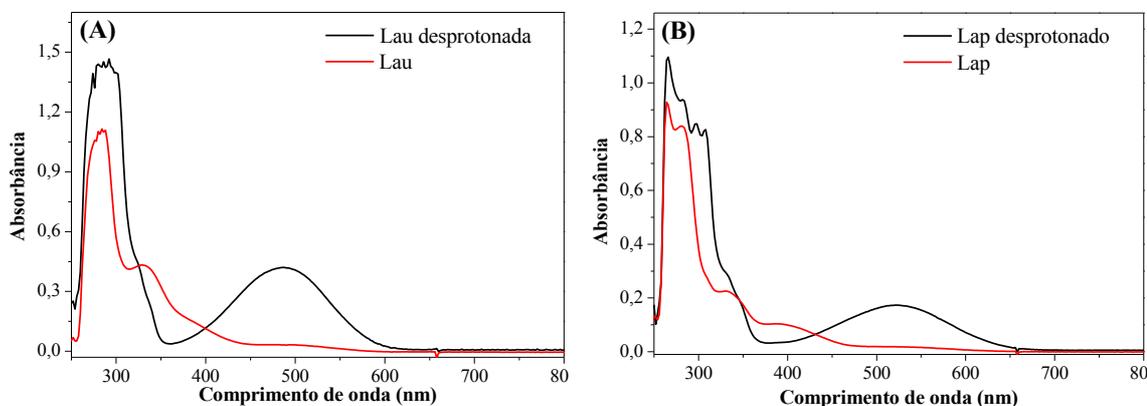
Os espectros eletrônicos dos ligantes lapachol e lausona são apresentados na Figura 11, onde são observadas bandas intensas em 280 e 332 nm, para o caso da lau e bandas em 280, 334 e 396 nm para o lap, as quais são referentes às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis aromáticos.



**FIGURA 11** - Espectro de absorção na região do UV-vis para os ligantes (A) lau e (B) lap, em DMSO.

Quando os ligantes lapachol e lausona são desprotonados (Figura 12) é observado o surgimento de uma banda em torno de 500 nm que é atribuída a

transição  $n \rightarrow \pi^*$ , também característica de complexos contendo quinonas, sendo responsável pela coloração escura (roxo, azul, verde ou marrom) dos complexos<sup>101,102</sup>.



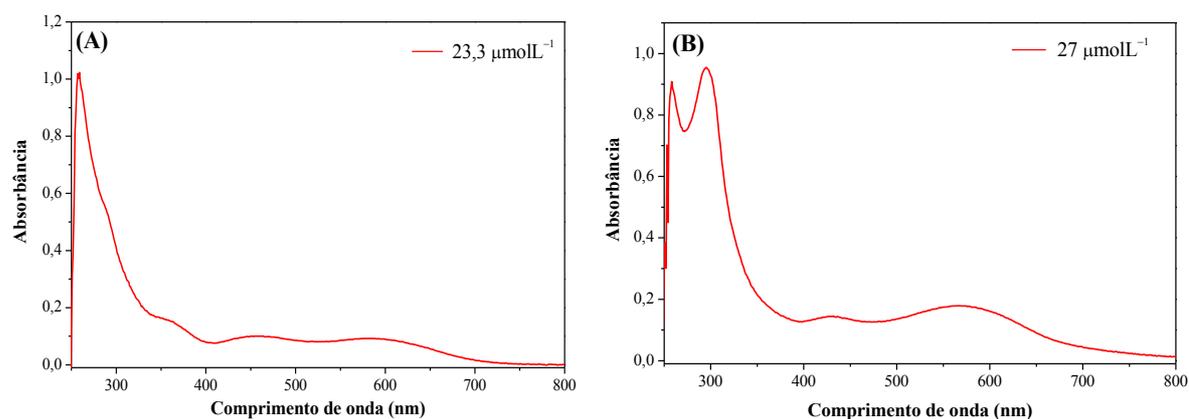
**FIGURA 12** - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os ligantes (A) lap e (B) lau, protonados e desprotonados, em DMSO.

Os espectros de UV-vis dos complexos são semelhantes entre si, tanto em número e formato de bandas, quanto em energia e valores de absorvidade molar. As absorções mais intensas, em torno de 260 e 290 nm podem ser atribuídas às transições intraligante ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) dos anéis aromáticos dos ligantes bifosfínicos, bipyridina, lap e lau. As demais bandas em torno de 400 a 600 nm, são atribuídas à transferência de carga metal ligante (MLCT) as quais referem-se às transições dos orbitais  $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi_{(\text{bifosfina})}$  e  $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow \pi^*$  (bipyridina, lap e lau). As bandas provenientes de transições  $d-d$  possuem baixos valores de coeficientes de extinção molar e são facilmente encobertas por outras bandas, e por isso não foram claramente detectadas para estes complexos.

Na Tabela 3 são apresentados os dados de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para os complexos e para os ligantes lap e lau, bem como uma tentativa de atribuição das bandas. Os valores de absorvidade molar foram calculados pela lei de Lambert-Beer. Na Figura 13 são apresentados os espectros de UV-vis para os complexos  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ .

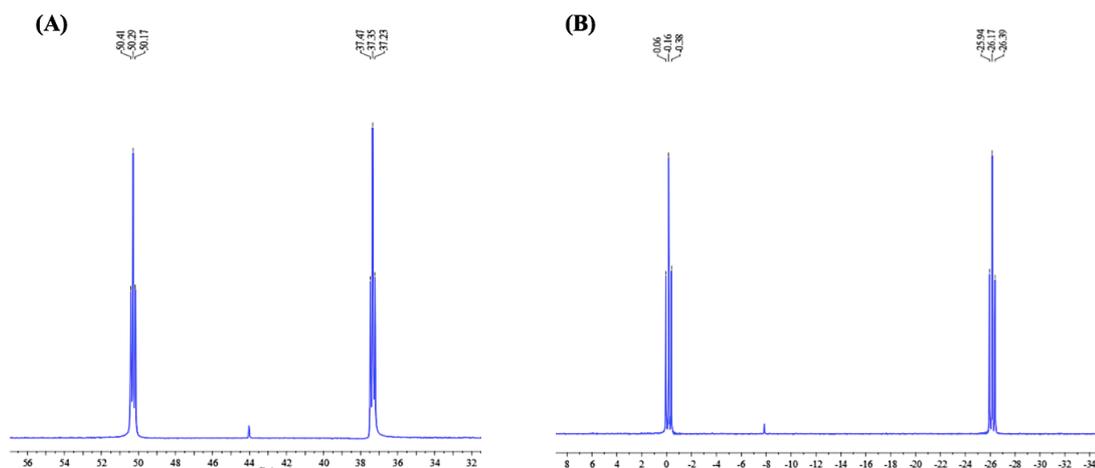
**TABELA 3** - Dados de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e tentativa de atribuição das bandas

Compostos	$\lambda(\text{nm})$	$\epsilon (\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{L})$	Transição
Lau	280	$2,14 \times 10^4$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$
	332	$5,68 \times 10^3$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$
lau desprotonada	487	$3,07 \times 10^4$	$n \rightarrow \pi^*$
Lap	280	$1,72 \times 10^4$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$
	334	$4,23 \times 10^3$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$
	396	$1,74 \times 10^3$	IL $\pi \rightarrow \pi^*$
lap desprotonado	521	$6,86 \times 10^4$	$n \rightarrow \pi^*$
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	258	$4,34 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	289	ombro	$\pi \rightarrow \pi^*$
	362	$6,40 \times 10^3$	IL e MLCT
	456	$4,42 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$
	590	$4,05 \times 10^3$	MLCT, $d-d$ e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	258	$4,59 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	292	ombro	$\pi \rightarrow \pi^*$
	357	$6,54 \times 10^3$	IL e MLCT
	450	$3,64 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$
	585	$4,61 \times 10^3$	MLCT, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$ e $d-d$
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	258	$4,74 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	295	ombro	$\pi \rightarrow \pi^*$
	365	$6,31 \times 10^3$	IL e MLCT
	448	$3,77 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lap})}$
	615	$4,49 \times 10^3$	MLCT, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lap})}$ e $d-d$
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	258	$2,55 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	293	$3,52 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	426	$4,87 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$
	552	$6,50 \times 10^3$	MLCT, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$ e $d-d$
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	258	$2,57 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	297	$3,26 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	450	$4,74 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lap})}$
	564	$5,08 \times 10^3$	MLCT, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lap})}$ e $d-d$
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	257	$3,32 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	295	$3,52 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	430	$5,26 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$
	567	$6,68 \times 10^3$	MLCT, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lau})}$ e $d-d$
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	258	$3,25 \times 10^4$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	295	$3,31 \times 10^3$	$\pi \rightarrow \pi^*$
	438	$4,93 \times 10^3$	MLCT e $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lap})}$
	564	$4,45 \times 10^3$	MLCT, $n \rightarrow \pi^*_{(\text{lap})}$ e $d-d$



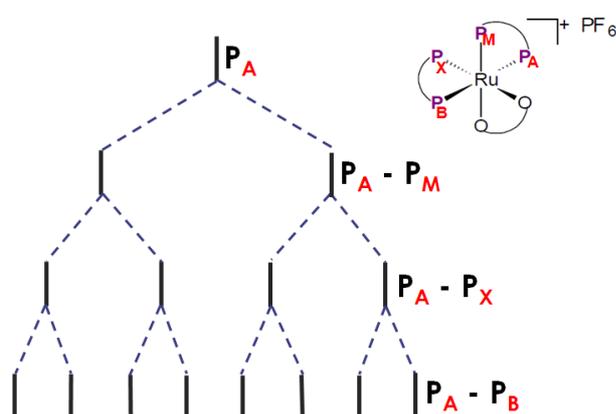
**FIGURA 13** - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os complexos  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , em DMSO.

Os espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos complexos precursores contendo duas bifosfinas, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$  e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$ , apresentaram dois tripletos em  $\delta$  50,29 e 37,35 ppm ( $^3J_{\text{P-P}} = 19,6$  Hz) e  $\delta$  -0,65 e -26,17 ppm ( $^3J_{\text{P-P}} = 35,6$  Hz), respectivamente, que é um padrão típico para sistemas contendo duas bifosfinas *cis* posicionadas a dois ligantes que completam a esfera de coordenação do centro metálico. Esse tipo de sistema contém dois tipos de fósforos ( $\text{P}_\text{A}$  e  $\text{P}_\text{B}$ ), cada um deles tendo dois vizinhos, gerando assim dois tripletos (Figura 14).



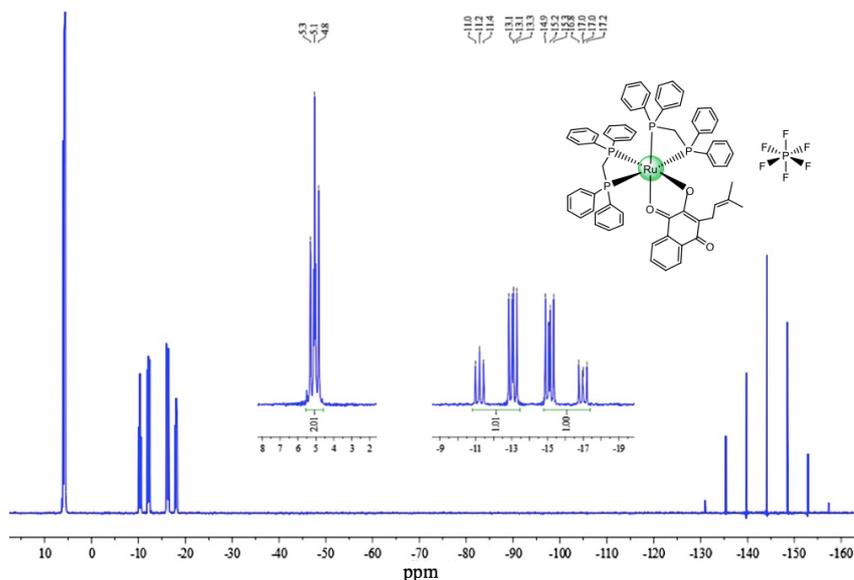
**FIGURA 14** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos complexos precursores (A) *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$  e (B) *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

Comparando os sinais de deslocamentos químicos dos precursores com os complexos obtidos, observa-se que com a coordenação dos ligantes lap ou lau ocorreu um desdobramento dos sinais dos fósforos. Neste caso o complexo passou a ter quatro átomos de fósforos não equivalentes ( $P_A$ ,  $P_B$ ,  $P_M$  e  $P_X$ ), apresentando assim quatro sinais em um padrão de duplo duplo dubleto, onde cada sinal está relacionado a um átomo de fósforo específico. Para exemplificar é mostrado na Figura 15 o desdobramento que ocorre para cada átomo de fósforo. O fósforo  $P_A$  acopla com fósforo vizinho  $P_M$  gerando um sinal que se desdobra em dois, e assim sucessivamente. Assim, cada átomo de fósforo dá origem a um sinal com multiplicidade 8, e é classificado como um clássico sistema ABMX.



**FIGURA 15** - Diagrama de desdobramento de sinais dos átomos de fósforo.

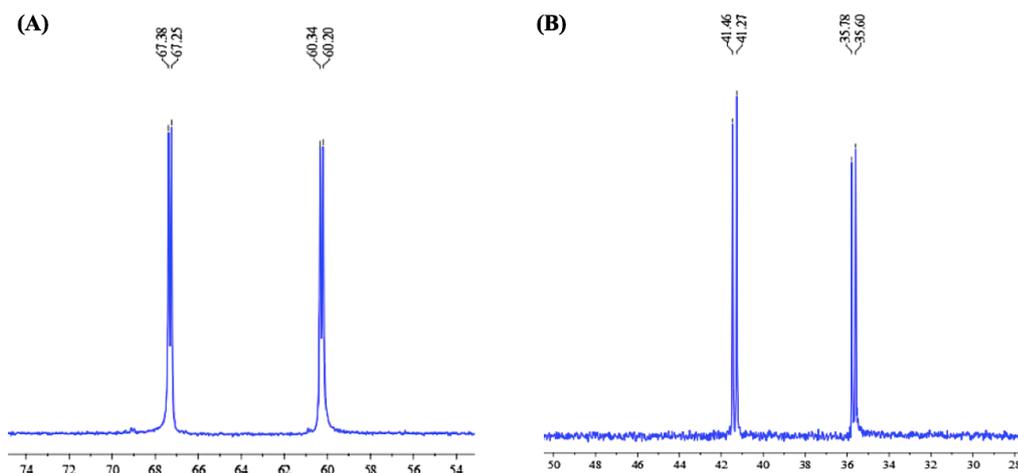
Na Figura 16 é mostrado o espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ . Os sinais referentes aos átomos de fósforo do complexo contendo o lap deslocaram para regiões de maiores frequências em relação ao complexo precursor (Figura 14B), isso se deve ao fato do ligante lap desblindar mais eficientemente os átomos de fósforo do que os cloretos.



**FIGURA 16** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

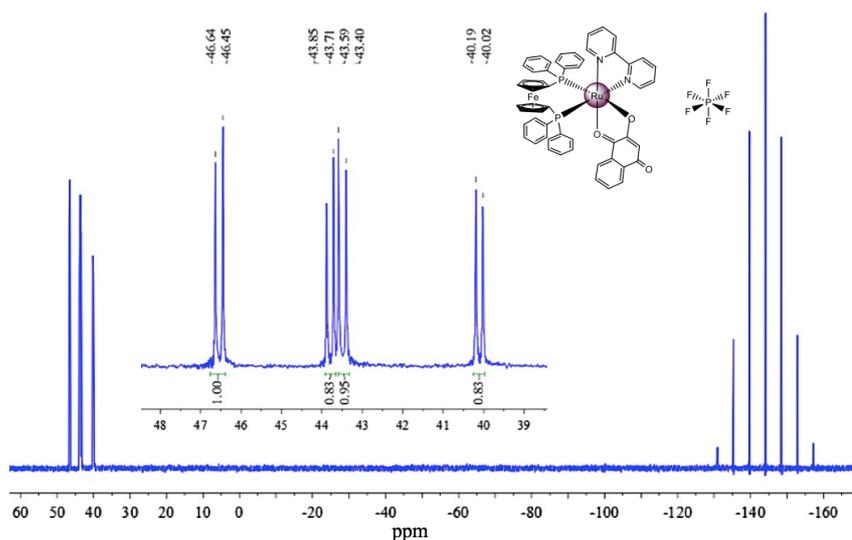
De acordo com a Figura 16, ocorre uma sobreposição dos sinais, originando multipletos que correspondem a quatro átomos de fósforo não equivalentes, conforme verificado pelos valores das integrais. Alguns dos sinais não apresentam o padrão de oito linhas dos duplo duplo dubletos, devido a sobreposição das linhas. Vale ressaltar ainda que os sinais em  $\delta$  -11 e -13 ppm e  $\delta$  -15 e -17 ppm, são equivalentes a dois átomos de fósforos, respectivamente, como observado pela integral. Contudo, o desdobramento desses sinais em dois conjuntos de sinais se deve ao maior acoplamento dos átomos de fósforo *trans* a fósforo, devido ao efeito *trans*. Em  $\delta$  -144 ppm verifica-se um hepteto que corresponde ao átomo de fósforo do contra íon  $\text{PF}_6^-$ . O mesmo comportamento foi observado para o caso dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , e os espectros são apresentados no apêndice nas Figuras A9 e A12.

Os espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para os precursores *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$  apresentaram deslocamentos químicos em  $\delta$  67,38 e 60,34 ppm ( $^2J_{\text{P-P}} = 21,87$  Hz) e  $\delta$  41,44 e 35,78 ppm ( $^2J_{\text{P-P}} = 29,16$  Hz) respectivamente (Figura 17), condizente com um sistema AX.



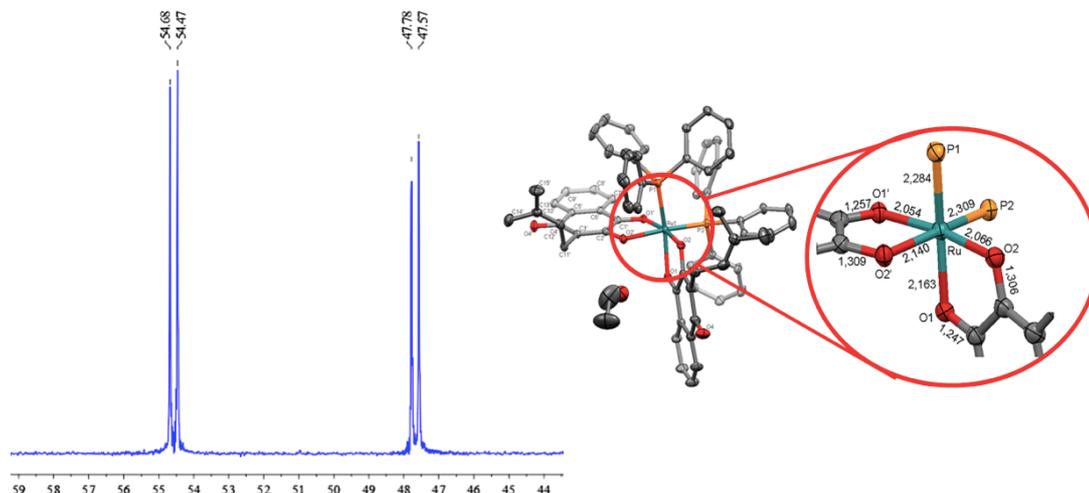
**FIGURA 17** - Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos complexos precursores (A)  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  e (B)  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

Os complexos sintetizados a partir destes precursores apresentaram comportamento diferente dos complexos contendo duas bifosfinas. No caso das sínteses realizadas com o precursor,  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$ , esperava-se que com a substituição dos cloros no precursor pelos ligantes lap ou lau, os dois átomos de fósforo da bifosfina dppf continuariam não equivalentes, visto que um átomo estaria *trans* ao nitrogênio biperidínico e outro *trans* ao oxigênio dos ligantes lap ou lau, sendo assim, seriam observados no RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  a presença de dois dubletos. Contudo, os produtos das reações entre  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$  e lau ou lap apresentaram quatro dubletos no RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , conforme pode ser observado na Figura 18.



**FIGURA 18** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

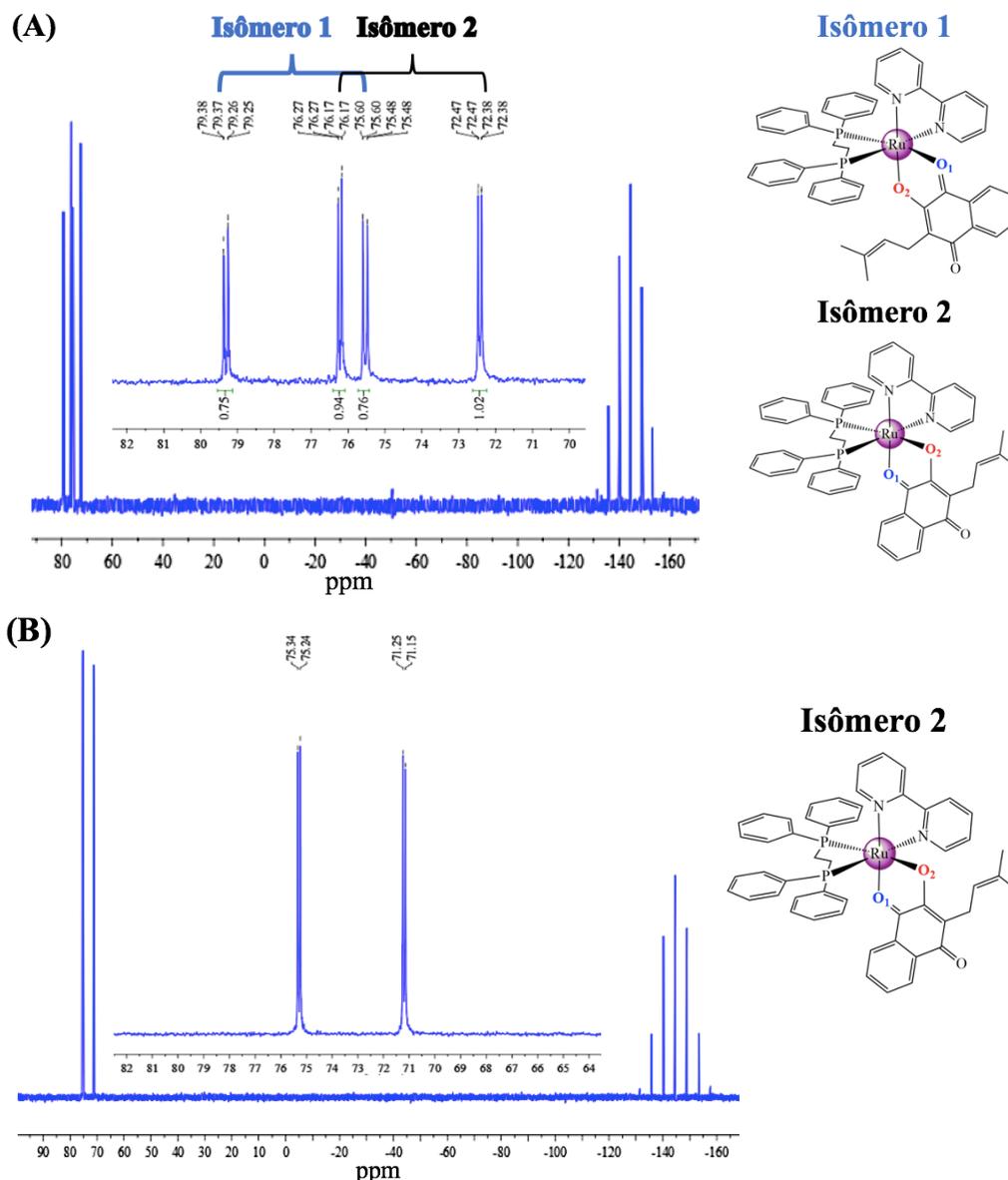
Uma explicação para isso é a formação de isômeros, onde em um complexo o oxigênio da carbonila dos ligantes lap e lau esta *trans* ao átomo de fósforo da dppf e em outro, o oxigênio da hidroxila esta *trans* ao fósforo da dppf. A hipótese de que esteja formando esse tipo de isômero foi baseada no resultado obtido para a síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{lap})_2(\text{PPh}_3)_2]$ <sup>70</sup>, o qual apresentou dois dubletos em  $\delta$  54,6 e 47, 7 ppm ( $^2J_{\text{P-P}} = 34,3$  Hz) no espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ . Como pode-se observar na Figura 19, a estrutura cristalina para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{lap})_2(\text{PPh}_3)_2]$  apresenta um átomo de fósforo da  $\text{PPh}_3$  ( $\text{P}_1$ ) em posição *trans* ao oxigênio da carbonila ( $\text{O}_1$ ), enquanto o fósforo ( $\text{P}_2$ ) encontra-se *trans* ao oxigênio da hidroxila ( $\text{O}_2$ ). Analisando as distâncias de ligação verifica-se que as ligações  $\text{C}_1=\text{O}_1$  apresentam caráter de ligação dupla (1,257 e 1,247 Å) enquanto as ligações  $\text{C}_2-\text{O}_2$  apresentam caráter de ligação simples (1,309 e 1,306 Å).



**FIGURA 19** - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$  e estrutura cristalina para o complexo  $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{lap})_2]^{80}$ .

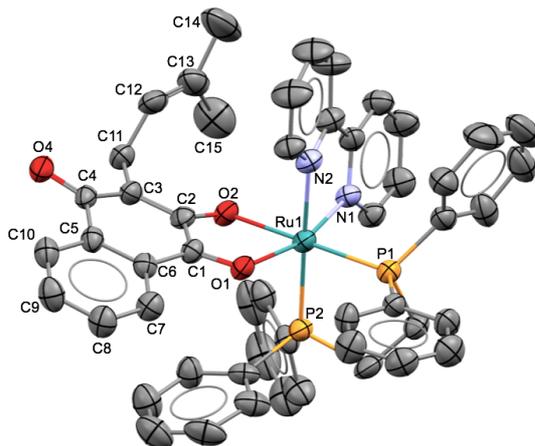
Durante a síntese do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  também foi observada a formação de isômeros, contudo, foi possível isolar apenas um dos isômeros, por meio da redução do volume da reação para aproximadamente 3 mL e mantendo em agitação, até observar a formação de um precipitado. O sólido foi filtrado e o RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  apresentou dois dubletos, enquanto que o RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  da solução remanescente apresentou quatro dubletos (Figura 20). A separação dos isômeros foi possível pela diferença de solubilidade existente entre eles. De acordo com as integrais, os pares de dubletos com deslocamentos químicos em  $\delta$  79,37 e 75,48 e  $\delta$  76,27 e 72,38 ppm referem-se aos isômeros 1 e 2, respectivamente. Além disso, os sinais em  $\delta$  72,38 e 75,48 ppm referem-se aos átomos de fósforos *trans* ao oxigênio, e os sinais em  $\delta$  76,27 e 79,37 ppm, aos átomos de fósforos *trans* ao nitrogênio. Essa atribuição é baseada na diferença entre os sinais do precursor  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  (Figura 17A) e do complexo contendo o lap. No precursor o dubleto em  $\delta$  67,38 é referente ao átomo de fósforo *trans* ao nitrogênio da bipy, e o sinal em  $\delta$  60,34 ppm, do fósforo *trans* ao cloro<sup>76</sup>. Assim, pode-se inferir que o dubleto em  $\delta$  72,38 ou 75,48 ppm refere-se aos átomos de fósforos *trans* ao oxigênio, pois sofreram

uma maior alteração com a coordenação do ligante lap (passou de  $\delta$  60,34 ppm para  $\delta$  72,38 ou 75,48 ppm).



**FIGURA 20** - Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , **(A)** precipitado com água, e **(B)** precipitado sozinho, em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

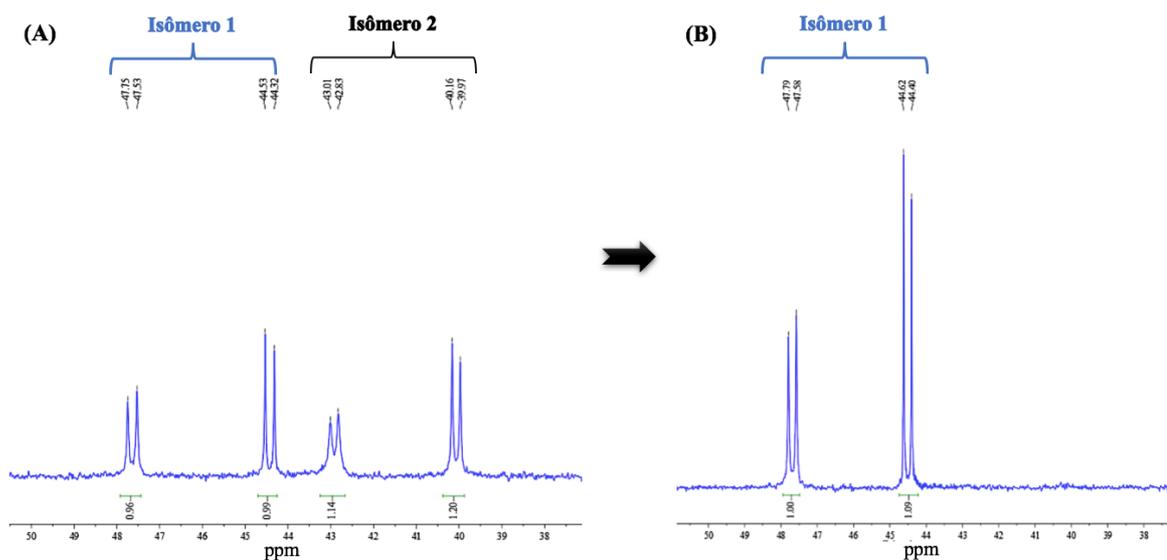
Foi obtido um monocristal do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , que apresentou dois dubletos no espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , e o diagrama ORTEP é mostrado na Figura 21.



**FIGURA 21** - Estrutura cristalina do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . Essa estrutura apresenta uma molécula de éter etílico como solvato e o contra íon  $\text{PF}_6^-$ , que foram omitidos para melhor clareza.

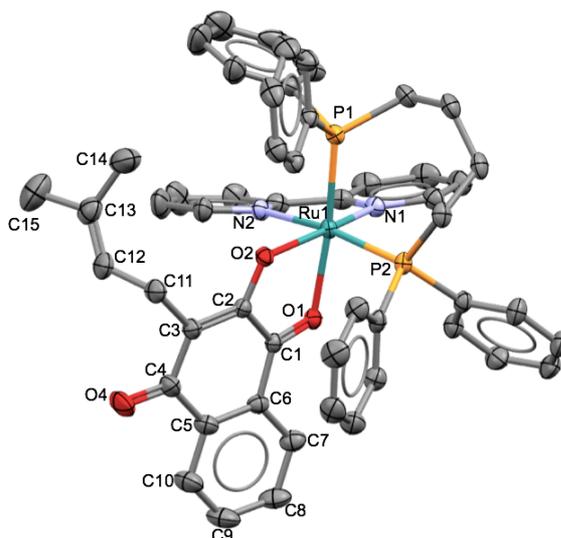
A partir da estrutura cristalina do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foi possível comprovar a coordenação do lap e ainda verificar que o átomo de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) da hidroxila encontra-se *trans* ao átomo de fósforo. Analisando a ligação  $\text{C}_1=\text{O}_1$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , a distância de ligação  $\text{C}_1=\text{O}_1$  (1,264 Å) é mais curta se comparada à ligação  $\text{C}_2-\text{O}_2$  (1,290 Å), sugerindo que a ligação  $\text{C}_1=\text{O}_1$  apresenta um maior caráter de dupla. A ligação  $\text{Ru}-\text{O}_2$  (2,124 Å) apresenta uma maior distância de ligação do que a ligação  $\text{Ru}-\text{O}_1$  (2,115 Å), o que está de acordo com o fato de que a ligação  $\text{Ru}-\text{O}_2$  está *trans* ao átomo de fósforo da dppe, enquanto que a  $\text{Ru}-\text{O}_1$  está *trans* ao nitrogênio da bipy, e devido à influência *trans* do fósforo, a ligação  $\text{Ru}-\text{O}_2$  é mais longa do que a ligação  $\text{Ru}-\text{O}_1$ . Os parâmetros cristalográficos de refinamento da estrutura estão apresentados no apêndice.

Uma síntese efetuada com o complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$  apresentou um comportamento semelhante a síntese com a bifosfina dppe e ajudou a comprovar a formação de isômeros. Na Figura 22 é apresentado o espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para o produto contendo a mistura de isômeros e, também, o produto isolado.



**FIGURA 22** - Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , **(A)** precipitado com água e **(B)** precipitado sozinho, em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

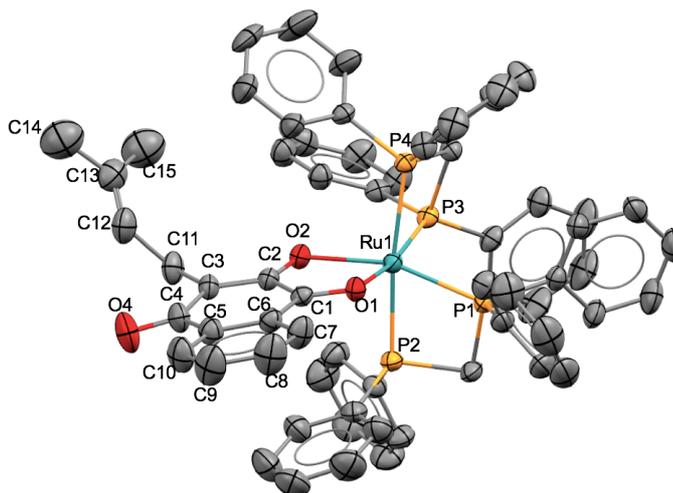
No caso do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  os sinais em  $\delta$  47,75 e 44,53 ppm são equivalentes ao isômero 1 e os sinais em  $\delta$  43,00 e 40,17 ppm, ao isômero 2. Diferentemente do complexo com a bifosfina dppe, neste caso foi isolado o isômero que apresenta um deslocamento químico em região de mais alta frequência. Foi obtido um cristal para o isômero isolado e a estrutura cristalina é mostrada na Figura 23. Observou-se que o átomo de oxigênio da carbonila do lap encontra-se *trans* ao átomo de fósforo. Desta forma, a suposição inicial de que a presença dos quatro dubletos estaria relacionada à formação de isômeros, onde um apresenta o átomo de fósforo *trans* ao oxigênio da carbonila e o outro *trans* ao oxigênio da hidroxila esta correta. De acordo com os dados dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  pode-se dizer que o conjunto de dubletos em regiões de maiores frequências se deve ao isômero contendo a carbonila *trans* ao fósforo, e os outros dubletos em frequências menores, o oxigênio da hidroxila encontra-se *trans* ao fósforo.



**FIGURA 23** - Estrutura cristalina para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . A estrutura apresenta uma molécula de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e o contra íon  $\text{PF}_6^-$ , que foram omitidas<sup>80</sup>.

Vale ressaltar que no caso das sínteses empregando o precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$  com o lap e lau, e o *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$  com a lau, não foi possível separar os isômeros formados, devido a similaridade na solubilidade dos mesmos.

A estrutura cristalina do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  também foi determinada por difração de raios X de monocristal. Na Figura 24 é apresentada o diagrama ORTEP para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ .



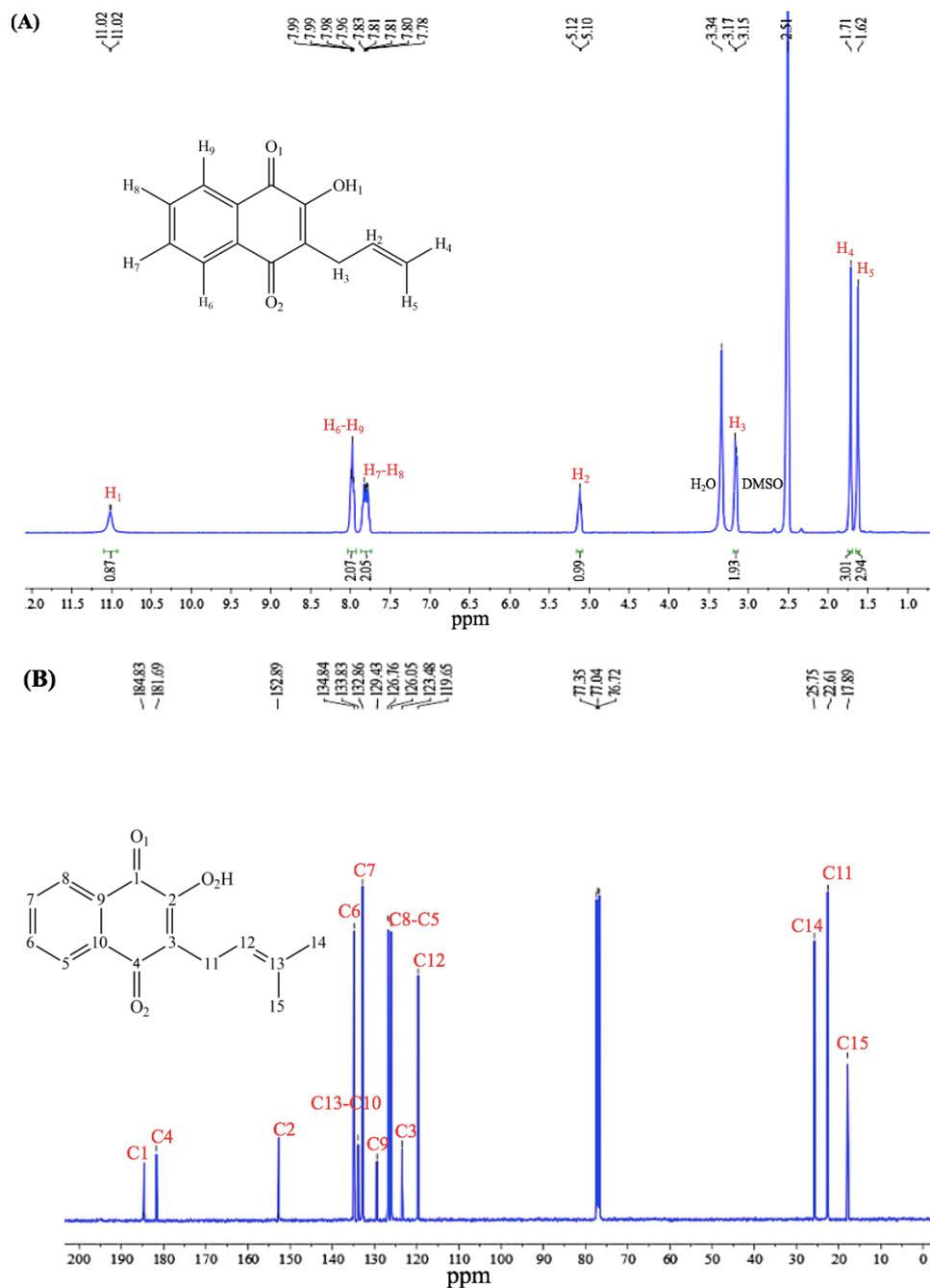
**FIGURA 24** - Estrutura cristalina para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ . A estrutura apresenta uma molécula de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e o contra íon  $\text{PF}_6^-$ , que foram omitidos para maior clareza.

Os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  que tiveram suas estruturas cristalinas determinadas durante o desenvolvimento deste trabalho, apresentam uma geometria octaédrica distorcida, com base nos valores de ângulos de ligação. As principais distâncias e ângulos de ligação dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  são apresentados na Tabela 4.

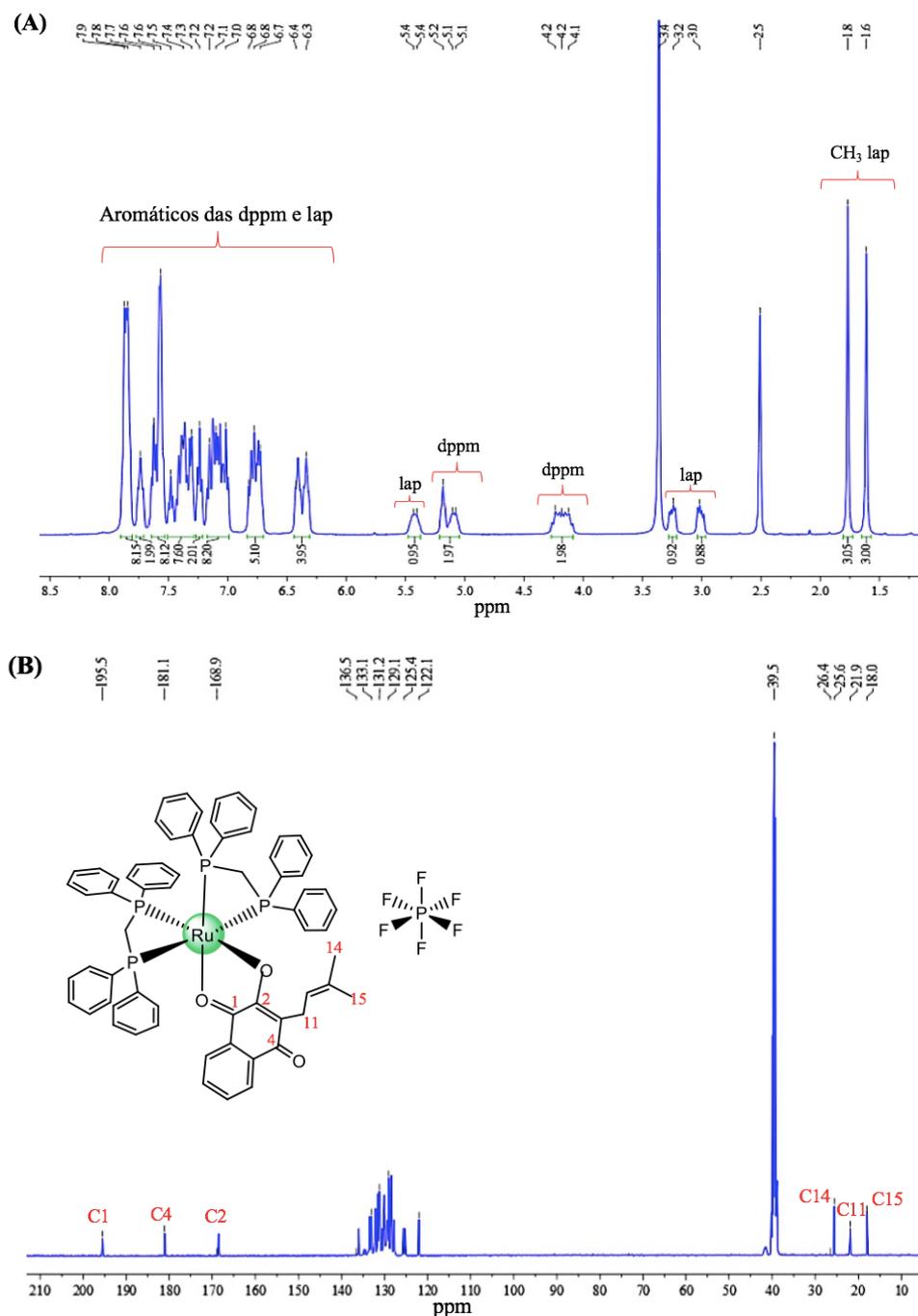
**TABELA 4** - Principais valores de distância e ângulos de ligação para as estruturas dos complexos (1)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e (2)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$

Ligação	Distância (Å)	
	(1)	(2)
Ru(1)–O(1)	2.115(3)	2.138(4)
Ru(1)–O(2)	2.124(3)	2.136(4)
Ru(1)–P(1)	2.2678(12)	2.3031(13)
Ru(1)–P(2)	2.2974(12)	2.3429(14)
Ru(1)–P(3)	---	2.2972(14)
Ru(1)–P(4)	---	2.3643(13)
Ru(1)–N(1)	2.048(4)	---
Ru(1)–N(2)	2.098(4)	---
O(1)–C(1)	1.264(5)	1.232(7)
O(2)–C(2)	1.290(6)	1.297(7)
O(4)–C(4)	1.232(5)	1.232(8)
C(1)–C(2)	1.481(7)	1.490(7)
	Ângulo (°)	
	(1)	(2)
O(1)–Ru(1)–O(2)	77.00(13)	75.52(14)
O(2)–Ru(1)–P(2)	177.60(10)	91.17(12)
O(2)–Ru(1)–P(3)	---	101.43(11)
O(2)–Ru(1)–P(4)	---	94.73(11)
O(1)–Ru(1)–P(2)	88.59(9)	88.72(11)
O(1)–Ru(1)–P(3)	---	168.80(11)
O(1)–Ru(1)–P(4)	---	97.92(11)
P(2)–Ru(1)–P(1)	83.94(5)	71.65(5)
P(3)–Ru(1)–P(2)	---	102.19(5)
P(1)–Ru(1)–P(4)	---	103.29(5)
P(1)–Ru(1)–P(2)	---	71.65(5)
P(2)–Ru(1)–P(4)	---	172.04(5)
N(2)–Ru(1)–N(1)	78.45(15)	---
N(1)–Ru(1)–P(2)	102.29(11)	---

Os complexos sintetizados foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  empregando  $\text{DMSO-}d_6$ . Na Figura 25 são apresentados os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para o lapachol livre e na Figura 26 para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ .



**FIGURA 25** - Espectro de RMN (A)  $^1\text{H}$  e (B)  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  para o lapachol, em  $\text{DMSO-}d_6$ .



**FIGURA 26** - Espectro de RMN (A)  $^1\text{H}$  e (B)  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  para o  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , em  $\text{DMSO-}d_6$ .

O lapachol livre apresenta em 11,09 ppm um sinal referente ao hidrogênio da hidroxila. Na região de 7,99 - 7,78 ppm são observados sinais referentes aos 4 hidrogênios do anel aromático, e em 5,10 e 3,17 ppm, os deslocamentos químicos de um e dois hidrogênios da cadeia alifática,

respectivamente. Além disso, em 1,71 e 1,62 ppm são observados singletos referentes às metilas.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  apresenta um conjunto de sinais sobrepostos na região de 7,9 - 6,3 ppm que são atribuídos aos hidrogênios aromáticos das fosfinas dppm e do lapachol. Em 5,4 ppm é observado o sinal de um hidrogênio da cadeia alifática do lap e em 5,1 e 4,2 ppm, quatro hidrogênios da cadeia alifática das dppm. Em 3,2 - 3,0 ppm são observados os sinais de dois hidrogênios da cadeia alifática do lap e em 1,8 e 1,6 ppm, os sinais referentes às metilas do lap. Vale ressaltar que não foi possível realizar a atribuição individual de todos os sinais devido à sobreposição dos mesmos, contudo com base nos valores das integrais a composição esta de acordo com a estrutura proposta para o complexo.

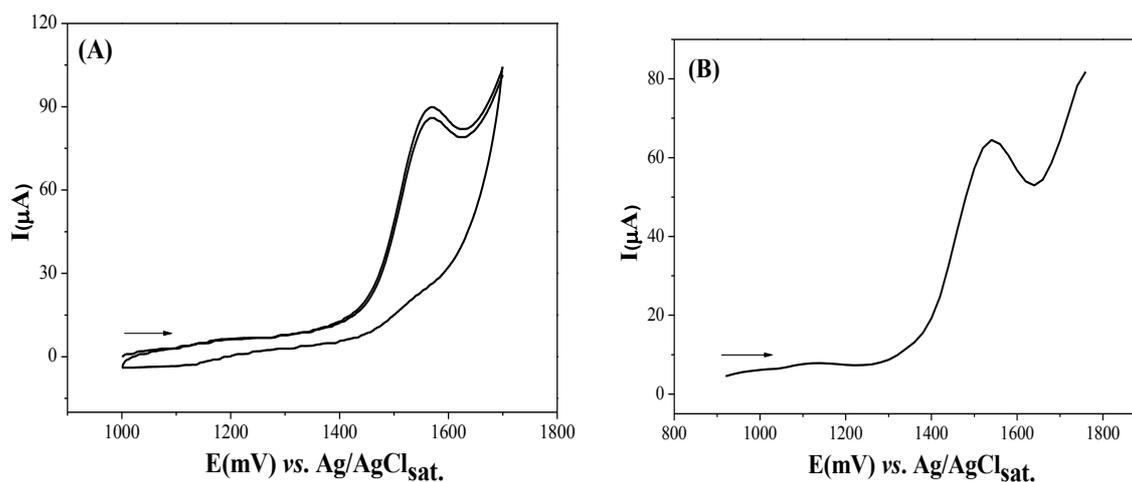
Do mesmo modo, nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  não foi possível atribuir cada sinal de carbono, contudo os deslocamentos químicos para os carbonos das carbonilas  $\text{C}_1=\text{O}_1$  e  $\text{C}_4=\text{O}_4$ , bem como  $\text{C}_2-\text{O}_2$ , foram identificados, e seus respectivos valores são apresentados na Tabela 5. Observou-se um deslocamento dos sinais para uma região de maior frequência quando comparado com o lapachol livre, indicando a coordenação, e por isso a diminuição da densidade eletrônica dos carbonos  $\text{C}_1$  da carbonila e  $\text{C}_2$ , após a ligação ao rutênio, deixando os mesmos mais desblindados. Os espectros para os demais complexos apresentaram um comportamento semelhante ao descrito para o  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , e os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  para cada um podem ser encontrados no apêndice nas Figuras A10 - A24.

**TABELA 5** - Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do ligante lapachol livre e do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , em  $\text{DMSO-d}_6$ 

	$\delta$ ppm	
	Lapachol	$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$
C1=O1	184,8	195,5
C4=O4	181,7	181,1
C2-O2	152,9	168,9

Posteriormente, realizou-se o estudo eletroquímico dos complexos em solução de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,1 M de PTBA). A partir dos dados eletroquímicos foi possível observar um deslocamento dos potenciais de oxidação  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  para regiões mais positivas, se comparado com os potenciais dos respectivos precursores. Isso de fato está relacionado com a substituição de dois cloretos nos precursores pelos ligantes lap ou lau. Os cloretos são bons doadores  $\sigma$  e  $\pi$ , enquanto os átomos de oxigênio dos ligantes lap e lau apresentam fraco caráter doador de densidade eletrônica. Dessa forma ocorrerá uma diminuição da densidade eletrônica do rutênio, conduzindo a um aumento do potencial de oxidação. Vale ressaltar que a substituição de um ou dois átomos de cloro por um ligante qualquer que tenha a capacidade de deixar o centro metálico mais deficiente em elétrons, seja por efeito de retrodoação ou pela menor capacidade de doação  $\sigma$  e  $\pi$ , acarretará um aumento do potencial de oxidação do centro metálico.

Na Figura 27 é mostrado o voltamograma cíclico e de pulso diferencial para o  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ . O processo de oxidação  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  é observado em 1570 mV e no complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$  esse processo é observado em 959 mV.



**FIGURA 27** - (A) Voltamograma cíclico e (B) de pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  em 0,1 M de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

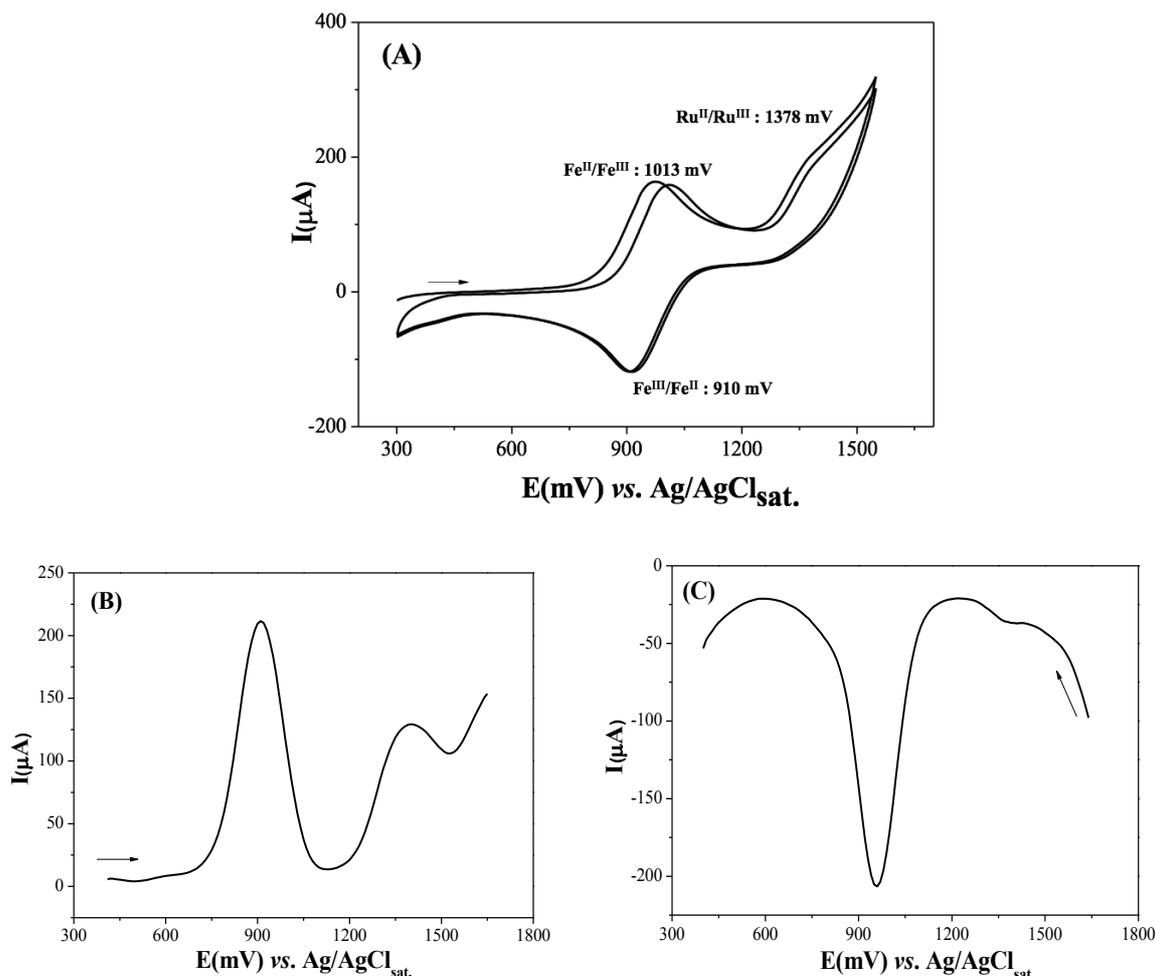
Na Tabela 6 são apresentados os potenciais de oxidação para os complexos contendo lap ou lau, bem como para os precursores.

**TABELA 6** - Potenciais de oxidação  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  para os complexos contendo lap ou lau, e para os complexos precursores

Complexos	$E_{\text{ox.}}$ (mV)	Complexos	$E_{\text{ox.}}$ (mV)	$E_{\text{red.}}$ (mV)
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1570	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$	959	517
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$	1435	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$	1043	838
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$	1373	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})(\text{bipy})]$	730	522
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1115	<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$	637 (986)*	544(880)*
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1274	<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1378 (1013)*	--- (910)*
		<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1337 (996)*	--- (909)*

\*Potenciais de oxidação e redução do Fe da dppf.

Para o caso dos complexos contendo a bifosfina dppf foi observado um processo de oxidação e redução referente ao ferro da bifosfina. Na Figura 28 pode-se observar o voltamograma cíclico e de pulso diferencial para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ .

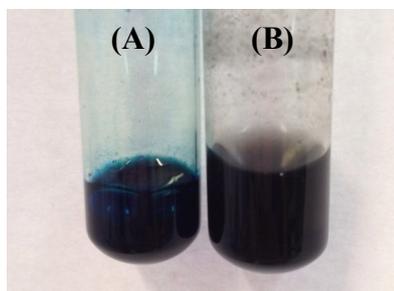


**FIGURA 28** - (A) Voltamograma cíclico e de (B, C) pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em 0,1 M de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

No voltamograma cíclico do precursor  $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$  é observado o processo de oxidação  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  em 637 mV, e de redução  $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$  em 544 mV. Em 986 mV é observado o processo de oxidação do  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  e em 880 mV verifica-se a redução  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ . Já o complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  apresenta um processo de oxidação  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  irreversível em 1337 mV e um processo de oxidação  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  em 1013 mV e de redução  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  em 910 mV. Observa-se que os processos referentes ao rutênio e ao ferro trocam de posição em relação ao complexo precursor. Isso se deve à maior estabilidade do complexo após a coordenação da lau. Como o ligante lau se liga diretamente ao rutênio é coerente supor que o processo irreversível observado seja referente ao

par redox  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  visto que o rutênio é mais sensível à variação dos ligantes do que o ferro.

Para confirmar a atribuição dos processos eletroquímicos observados no complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foi realizada a eletrólise em uma solução de PTBA 0,1 M em DMF num potencial de 1050 mV (potencial no qual se oxida o  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) e reagiu-se o produto dessa eletrólise com  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , o que gerou uma solução avermelhada, característica da formação de  $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ . Reagindo o produto da eletrólise com NaOH, foi observado a formação de um precipitado de coloração marrom ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), que após adição de HCl diluído formou o  $\text{FeCl}_3$  e com a adição de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  a solução tornou-se azul devido à formação do composto  $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (azul da Prússia), que apresenta coloração característica (Figura 29). Com isso foi possível confirmar que o primeiro processo observado no voltamograma do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  se deve a oxidação do  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  e o segundo ao  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ . O mesmo comportamento foi observado para o complexo contendo o lapachol,  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ .



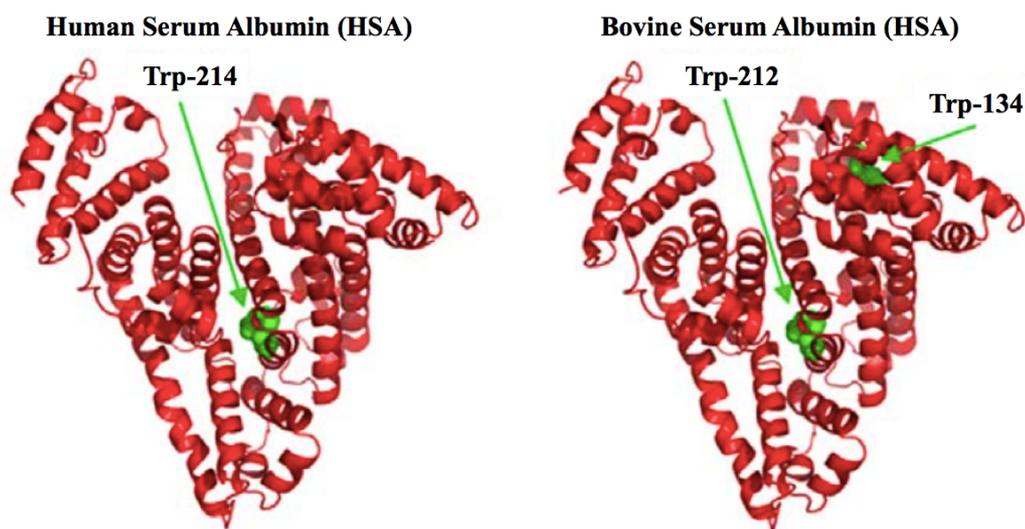
**FIGURA 29** - (A) Fotos da reação do produto da eletrólise do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  com  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  após adição de NaOH e HCl (B) e da reação com  $\text{NH}_4\text{SCN}$ .

#### 4.2 Estudos de interação dos complexos com a BSA

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica importante para investigar a conformação de proteínas quando seu ambiente e sua estrutura sofrem alterações. A albumina é uma biomolécula interessante para estudos com possíveis metalofármacos. Sabendo-se que a administração intravenosa de um

fármaco deve seguir um longo caminho até alcançar a célula cancerosa, é interessante avaliar a interação dos fármacos com possíveis alvos biológicos presentes no plasma sanguíneo, na membrana celular ou no citoplasma. A albumina é um alvo importante, visto que é a proteína responsável pelo transporte e distribuição de várias substâncias endógenas, e exógenas, como hormônios, aminoácidos, íons metálicos e fármacos no organismo<sup>103</sup>.

A BSA (Albumina de Soro Bovino) é empregada como proteína modelo em sistemas biomiméticos, pois é a proteína mais abundante no sangue bovino (concentração típica de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e possui uma estrutura muito similar à estrutura da HSA, apresentando uma porcentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76% (Figura 30)<sup>104</sup>.



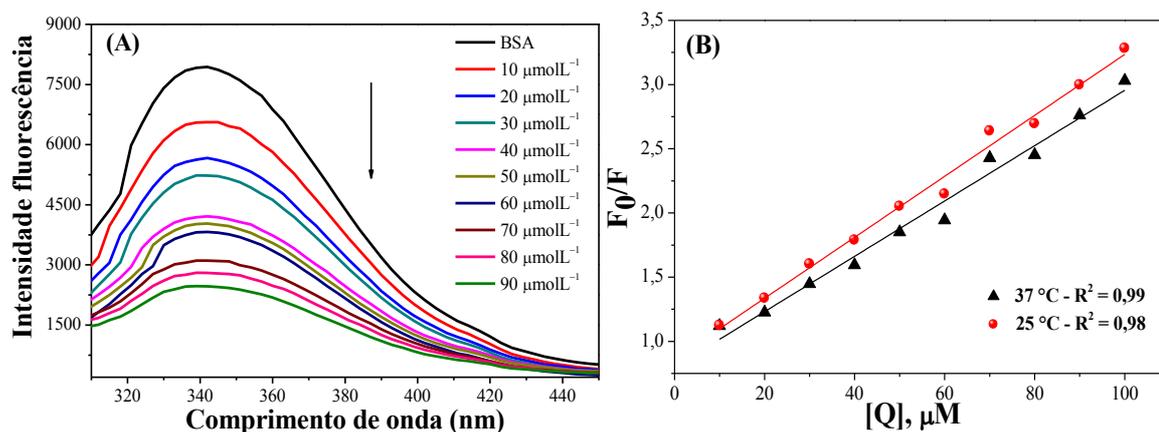
**FIGURA 30** - Estrutura da HSA e BSA, evidenciando os resíduos de triptofano, Trp-214 na HSA e Trp-212 e Trp-134, na BSA. Adaptado de Belatik e colaboradores<sup>105</sup>.

A BSA é uma cadeia polipeptídica simples, de 583 resíduos de aminoácidos, que são divididos em 3 domínios homólogos I, II e III. Ela apresenta 2 resíduos de triptofano Trp-134 e Trp-212, localizados no subdomínio IB e IIA, respectivamente. O Trp-134 é localizado em uma região hidrofílica, próximo à superfície da BSA, enquanto o Trp-212 está localizado em um ambiente hidrofóbico, dentro de uma região protéica. Em solução a BSA

exibe um forte sinal de fluorescência devido aos resíduos de triptofano, com um máximo em 340 nm quando excitada em 280 nm<sup>106</sup>.

Neste contexto os complexos sintetizados foram avaliados quanto à interação com a BSA, em diferentes temperaturas. O espectro de fluorescência da BSA foi obtido na presença de diferentes concentrações dos complexos, numa faixa de 300 a 450 nm, sob excitação em 280 nm.

Na Figura 31 é mostrado o espectro de fluorescência da BSA em diferentes concentrações do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ , onde é possível observar o decréscimo da fluorescência com o aumento da concentração de complexo.



**FIGURA 31 - (A)** Espectro de emissão da BSA em concentrações crescentes do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ . Concentração da BSA = 10  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex.}}$  = 280 nm, pH = 7,4 e T = 37°C, **(B)** Gráfico da intensidade de emissão ( $F_0/F$ ) vs. concentração de complexo [Q].

A extinção da fluorescência pode ser oriunda de dois mecanismos: dinâmico, quando ocorre a colisão entre o fluoróforo (BSA) e o supressor (complexos de rutênio) no estado excitado, e estático, quando ocorre a formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor, no estado fundamental. Os mecanismos dinâmico ou estático podem ser distinguidos pela diferente dependência da temperatura e viscosidade. O mecanismo dinâmico depende da difusão, assim altas temperaturas resultam em um coeficiente de difusão alto, e

consequentemente as constantes de supressão devem aumentar com o aumento da temperatura. Em contrapartida, na supressão estática o aumento da temperatura resulta em valores baixos das constantes de supressão<sup>107</sup>.

Uma análise quantitativa do processo de supressão de fluorescência da BSA foi realizada empregando-se a equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_0[Q]$$

Onde  $F_0$  equivale à intensidade de fluorescência na ausência do complexo;  $F$  é a intensidade de fluorescência na presença do complexo;  $[Q]$  é a concentração do complexo e  $K_{sv}$  é a constante de Stern-Volmer,  $k_q$  é a constante de velocidade de supressão biomolecular,  $\tau_0$  é o tempo médio de vida de fluorescência da BSA sem o complexo<sup>108</sup>. A constante  $K_{sv}$  é obtida por meio de um gráfico de  $F_0/F$  versus  $[Q]$  e a constante  $k_q$  é obtida pela razão entre  $K_{sv}$  e  $\tau_0$  ( $6,2 \times 10^{-9}$  s).

Na Tabela 7 são apresentados os valores para a constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), bem como a constante de velocidade de supressão biomolecular ( $k_q$ ).

**TABELA 7** - Resultados obtidos para constantes  $K_{sv}$ ,  $k_q$ ,  $K_b$  e  $n$  para os complexos contendo lau ou lap

Complexos	T (°C)	$K_{sv}$ ( $10^4$ )	$k_q$ ( $10^{12}$ )	$K_b$	$n$
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	25	(2,14 ± 0,16)	3,45	(2,34 ± 0,62) × 10 <sup>4</sup>	1,24
	37	(2,32 ± 0,13)	3,74	(3,74 ± 0,27) × 10 <sup>4</sup>	1,12
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	25	(2,15 ± 0,10)	3,47	(2,27 ± 0,37) × 10 <sup>4</sup>	1,18
	37	(2,34 ± 0,11)	3,77	(2,41 ± 0,20) × 10 <sup>4</sup>	1,07
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	25	(2,21 ± 0,24)	3,56	(8,55 ± 0,38) × 10 <sup>4</sup>	1,16
	37	(2,28 ± 0,14)	3,68	(9,33 ± 0,83) × 10 <sup>4</sup>	1,15
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	(2,43 ± 0,20)	3,92	(2,06 ± 0,23) × 10 <sup>5</sup>	1,30
	37	(2,79 ± 0,13)	4,50	(2,49 ± 0,52) × 10 <sup>5</sup>	1,16
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	(2,52 ± 0,43)	4,06	(4,39 ± 0,37) × 10 <sup>5</sup>	1,22
	37	(3,11 ± 0,22)	5,02	(5,37 ± 0,18) × 10 <sup>5</sup>	1,33
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	(3,17 ± 0,09)	5,11	(3,79 ± 0,12) × 10 <sup>5</sup>	1,26
	37	(3,02 ± 0,09)	4,87	(2,33 ± 0,71) × 10 <sup>5</sup>	1,22
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	(3,60 ± 0,04)	5,81	(4,69 ± 0,45) × 10 <sup>5</sup>	1,27
	37	(3,47 ± 0,06)	5,60	(3,55 ± 0,14) × 10 <sup>5</sup>	1,24

\*Unidades de  $K_{sv} = M^{-1}$ ;  $k_q = M^{-1} s^{-1}$  e  $K_b = M^{-1}$ .

De acordo com os valores obtidos para  $K_{sv}$  observa-se um aumento da constante com o aumento da temperatura (exceto para os complexos com a bifosfina dppf), o que é notado em casos de mecanismo dinâmico. No caso dos complexos com a bifosfina dppf foi observado uma diminuição da constante com o aumento da temperatura, indicando um mecanismo estático. Contudo, os valores de  $k_q$  observados são maiores do que o valor máximo possível para o mecanismo dinâmico  $(2,0 \times 10^{10} L mol^{-1} s^{-1})^{107}$ , para todos os complexos. Isso sugere que para os complexos contendo as bisfosfinas dppe e dppm ocorrem os mecanismos dinâmico e estático, simultaneamente. No caso dos complexos contendo a dppf o mecanismo que predomina é o estático.

A ligação independente de pequenas moléculas à macromoléculas permite calcular a constante de ligação ( $K_b$ ) e também o número de sítios de ligação ( $n$ ), empregando-se a seguinte equação:

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

Onde  $K_b$  é a constante de ligação entre o complexo e a BSA,  $n$  é o número de sítios de ligação por molécula de BSA. A constante  $K_b$  é obtida a partir do coeficiente linear da reta obtida por meio do gráfico de  $\log(F_0 - F)/F$  versus  $\log[Q]$ . O número de sítios de ligação do complexo ( $n$ ) também pode ser calculado a partir do coeficiente angular desta mesma equação da reta<sup>109</sup>.

De acordo com os dados da Tabela 7 verifica-se que os complexos apresentam uma interação moderada com a BSA, tendo em vista que  $K_b$  é da ordem de  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

A fim de avaliar o tipo de interação incluindo interação hidrofóbica, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, entre outras, que atuam entre os complexos e a BSA, parâmetros termodinâmicos como energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), variação de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ), e variações de entropia ( $\Delta S^\circ$ ) foram determinados com base nas seguintes equações:

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

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

Onde  $K_{b1}$  e  $K_{b2}$  são as constantes de ligação nas temperaturas  $T_1$  e  $T_2$ , respectivamente,  $R$  é a constante dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $\Delta H^\circ$  é a variação de entalpia,  $\Delta G^\circ$  é a variação da energia livre de Gibbs e  $\Delta S^\circ$  é a variação da entropia. Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos para os parâmetros termodinâmicos.

**TABELA 8** - Parâmetros termodinâmicos para os complexos contendo lau ou lap

Complexos	T (°C)	$\Delta G^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	25	-24,92	29,99	184,26
	37	-27,14		184,29
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	25	-24,99	3,83	96,71
	37	-25,85		95,74
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	25	-28,13	5,58	113,12
	37	-29,49		113,13
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	-30,31	12,12	142,38
	37	-32,02		142,39
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	-32,19	12,89	151,27
	37	-34,00		151,26
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	-31,82	-31,11	2,38
	37	-31,85		2,39
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	25	-32,35	-17,81	48,79
	37	-32,94		48,81

Os tipos de interações que atuam entre os complexos e a BSA podem ser indicados a partir do sinal e da magnitude dos parâmetros termodinâmicos:

- (i) Valores positivos para  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  indicam o envolvimento de interações hidrofóbicas entre os complexos e a BSA;
- (ii) Valores negativos para  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  correspondem às forças de van der Waals e interações por ligações de hidrogênio;
- (iii) Valores negativos de  $\Delta H^\circ$  e positivos para  $\Delta S^\circ$  indicam interação eletrostática<sup>107</sup>.

Analisando os dados da Tabela 8 verifica-se que os complexos contendo as bisfosfinas dppm e dppe apresentam o envolvimento de forças hidrofóbicas. Já os complexos contendo a bifosfina dppf predominam as interações eletrostáticas. Além disso, a interação dos complexos com a BSA é espontânea, uma vez que os valores de  $\Delta G^\circ$  são negativos.

### 4.3 Estudos de interação dos complexos com o DNA

#### 4.3.1 Titulações espectroscópicas

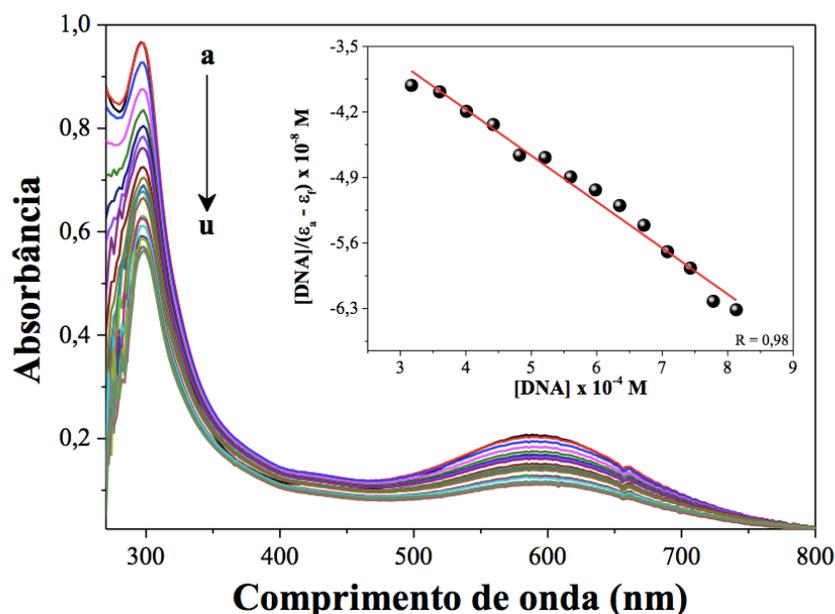
Qualquer tipo de alteração na estrutura do DNA pode resultar em modificações conformacionais da biomolécula, que pode ocasionar desregulação da mensagem da sequência genética. Essas alterações podem inibir a síntese de proteínas ou dar origem a proteínas com estruturas alteradas, modificando a atividade enzimática, ou ainda suas especificidades. Como consequência o crescimento celular pode ser alterado<sup>110</sup>.

O marco no estudo do mecanismo de ação do fármaco cisplatina foi a descoberta de que ele é capaz de se ligar aos pares de bases do DNA, impedindo-o de se replicar e, conseqüentemente, ocasionar a morte celular. Diante disso, o DNA é um alvo muito estudado quando se trata do desenvolvimento de compostos para a terapia anticâncer<sup>111</sup>. Diversas técnicas podem ser empregadas para estudar interações entre complexos e DNA, contudo, no presente trabalho serão descritas as titulações espectroscópicas, eletroforese em gel, dicroísmo circular e fluorescência.

Inicialmente, a interação dos complexos de rutênio com o CT-DNA foi investigada por meio de titulações espectroscópicas. Para isso monitorou-se uma banda de absorção de cada complexo após sucessivas adições de solução de CT-DNA. No caso dos complexos contendo um ligante bifosfínico e uma bipyridina, foi monitorada a banda de absorção em torno de 295 nm, atribuída à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis aromáticos dos ligantes bifosfínicos, bipyridina, lap ou lau, a qual sofreu um decréscimo de absorbância (hipocromismo) à medida que sucessivas adições de CT-DNA foram feitas. Na Figura 32 são apresentados os espectros de absorção para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , na ausência e na presença de CT-DNA. A fim de quantificar a afinidade da interação entre o CT-DNA e os complexos, calculou-se a constante de ligação ( $K_b$ ) e os valores obtidos são apresentados na Tabela 9. Todos os complexos apresentaram

valores próximos de  $K_b$ , com a mesma ordem de grandeza ( $10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Comparando esses valores com o valor observado para o clássico intercalador do DNA, o brometo de etídio, que apresenta uma constante de interação de magnitude mais elevada ( $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )<sup>112</sup>, os complexos de rutênio apresentam interação mais fraca.

Os valores de  $K_b$  encontrados para os complexos aqui descritos são semelhantes a complexos descritos por nosso grupo de pesquisa<sup>113</sup>, os quais apresentam duas monofosfinas, uma bipyridina e o ligante de interesse, apresentando constantes de interação de ordem  $10^3 \text{ M}^{-1}$ .



**FIGURA 32** - Espectro de absorção do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , na presença de adições de CT-DNA.  $[\text{Complexo}] = 3,33 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $[\text{DNA}] = 5,08 \text{ mM}$ . Gráfico inserido:  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$ .

**TABELA 9** - Constantes de ligação ( $K_b$ ) obtidas para as titulações espectroscópicas entre complexo e CT-DNA.

Complexos	$\lambda$ (nm)	$K_b$ ( $L mol^{-1}$ )	% Hipocromismo
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ] $PF_6$	244	$(1,28 \pm 0,03) \times 10^3$	50
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ] $PF_6$	244	$(1,11 \pm 0,14) \times 10^3$	69
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ] $PF_6$	244	$(1,07 \pm 0,09) \times 10^3$	51
[Ru(lap)(dppe)(bipy)] $PF_6$	298	$(2,25 \pm 0,67) \times 10^3$	21
[Ru(lau)(dppe)(bipy)] $PF_6$	298	$(2,15 \pm 0,15) \times 10^3$	7
[Ru(lap)(dppf)(bipy)] $PF_6$	298	$(4,33 \pm 0,24) \times 10^3$	2
[Ru(lau)(dppf)(bipy)] $PF_6$	298	$(3,75 \pm 0,25) \times 10^3$	24

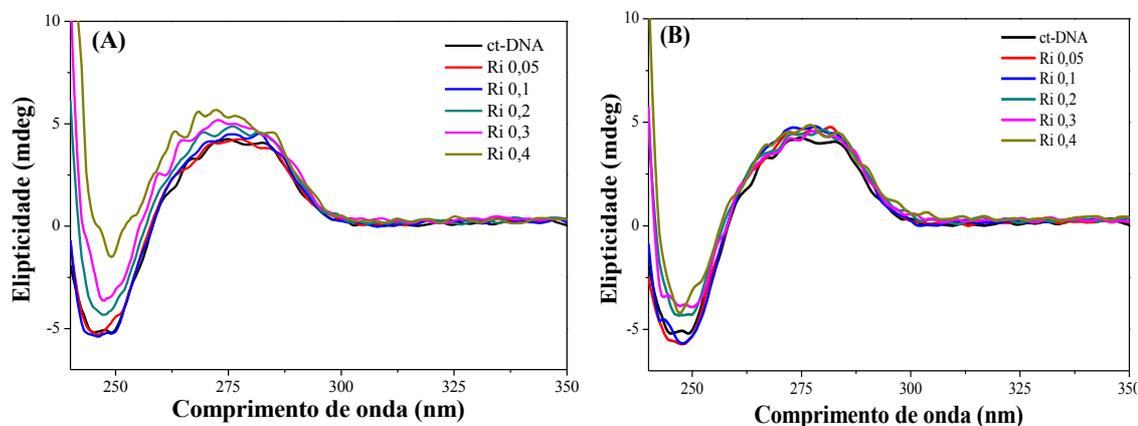
Vale ressaltar que para o caso dos complexos contendo duas bifosfinas, observou-se uma absorção intensa na região de 244 nm, a qual está relacionada às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos anéis aromáticos dos ligantes bifosfínicos, lap ou lau. Essa banda foi monitorada durante o experimento de interação com o CT-DNA por se tratar da banda de maior intensidade do espectro, bem como a de maior definição, visto que a banda em torno de 290 nm trata-se de um ombro. Como esta banda se localiza em uma região onde existe absorção do solvente (DMSO) e também do CT-DNA, fez-se o registro do branco, para comprovar que a banda observada realmente devia-se à absorção do complexo e não a dos possíveis interferentes. Para isso empregou-se três amostras no experimento, onde duas foram usadas como branco (contendo DMSO, tampão Tris e CT-DNA) e outra contendo o complexo em DMSO, tampão Tris e CT-DNA. Assim registrou-se o espectro do branco a fim de comprovar que a absorção em 244 nm era de fato do complexo analisado.

Em suma, os resultados obtidos por meio de titulações espectroscópicas indicam uma fraca interação dos complexos com o CT-DNA, contudo, não é possível afirmar o modo exato de interação que ocorre apenas com os dados obtidos por essa técnica.

### 4.3.2 Dicroísmo circular

O Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica muito útil e sensível para monitorar alterações conformacionais na estrutura do DNA. A forma B do DNA demonstra duas bandas na região do UV, uma banda positiva, em 275 nm, devido ao empilhamento de bases, e uma banda negativa em 245 nm, devido a helicidade do DNA (giro para a direita)<sup>114</sup>. Alterações no espectro de CD do DNA, na presença de outras moléculas, podem ser atribuídas às alterações em sua estrutura.

Para avaliar o efeito dos complexos na conformação do CT-DNA os mesmos foram incubados em diferentes relações molares à 37 °C, por 18 h. Na Figura 33 são mostrados os espectros de CD para o CT-DNA na presença de concentrações crescentes dos complexos (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ .



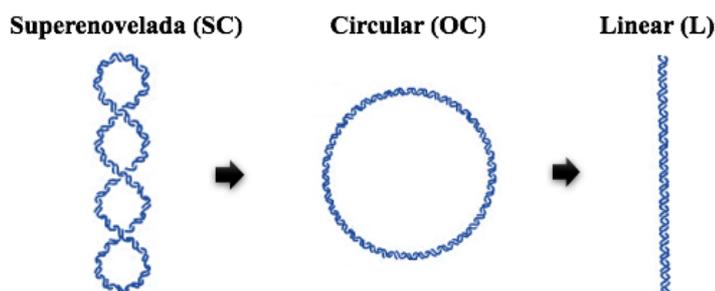
**FIGURA 33** - Espectro de CD para o CT-DNA (50  $\mu\text{M}$ ) na presença do complexo (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  (2,5 – 20  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl (pH 7,4).

Analisando-se os espectros da Figura 33 nota-se um pequeno aumento na elipticidade das bandas em 275 e 245 nm para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , e no caso do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  apenas a banda em 245 nm sofreu uma pequena alteração. Interações por intercalação ou

pelos sulcos do CT-DNA, são capazes de induzir mudanças na intensidades de ambas as bandas do DNA devido a estabilização da forma B do mesmo<sup>115</sup>. Contudo, não foram observadas mudanças significativas no espectro do DNA após a incubação com os complexos, não sendo possível afirmar que esteja ocorrendo intercalação ou interações pelos sulcos do DNA, por essa técnica.

### 4.3.3 Eletroforese em gel de agarose

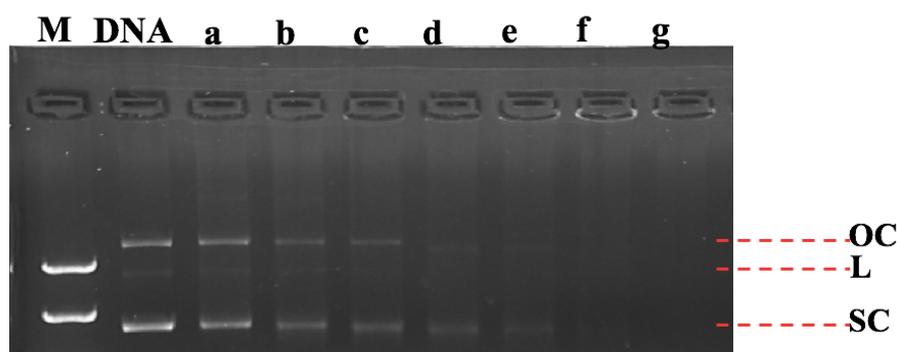
Outra técnica empregada para avaliar a interação dos complexos com o DNA foi a eletroforese em gel de agarose, a qual baseia-se no fato de que a molécula de DNA, com carga negativa, quando submetida a um campo elétrico migra em direção ao polo positivo (ânodo). A mobilidade eletroforética do DNA será dependente do seu tamanho e da sua forma. Neste caso foi empregado o DNA plasmidial pBR322 que é uma molécula circular, fechada (forma superenovelada – *supercoiled* – SC). Essa forma superenovelada pode ser convertida na forma circular (open *circular* – OC), ou ainda na forma linear (linear – L) (Figura 34). A forma superenovelada (SC) é a mais compacta, portanto apresenta uma maior facilidade de passar entre os poros do gel de agarose, e assim sua velocidade de migração é maior. A forma circular (OC) é mais volumosa, pois se parece com um anel, de modo que sua mobilidade eletroforética é menor. A mobilidade da forma linear (L) é intermediária entre as formas SC e OC<sup>116</sup>.



**FIGURA 34** - Ilustração das possíveis formas do DNA plasmidial.

A interação dos complexos com o pBR322 pode causar a relaxação da forma SC, e alterar a mobilidade eletroforética, já que as formas relaxadas (OC e L) migram mais lentamente<sup>117</sup>. Para avaliar esse efeito os complexos foram incubados com o pBR322 em diferentes relações molares por um período de 18 h a 37 °C, e depois submetidos a corrida eletroforética.

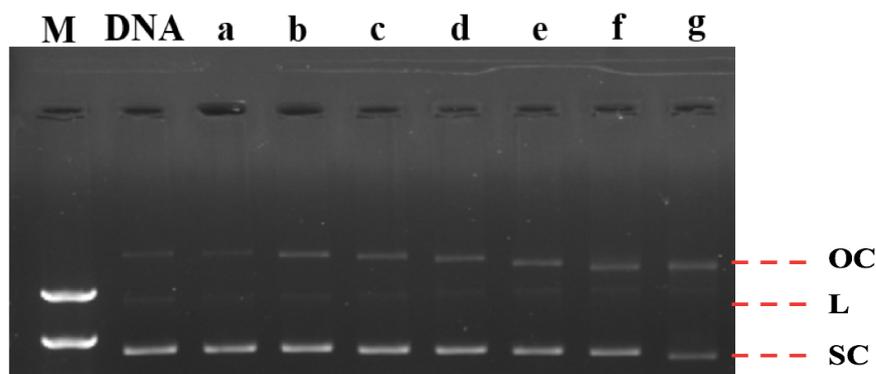
Na Figura 35 encontra-se o gel de eletroforese do pBR322 na presença do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , em diferentes relações molares. Na linha do DNA é possível observar a presença das três bandas do DNA plasmidial pBR322, sendo a forma SC majoritária. Além disso, verifica-se que a porcentagem de DMSO usada não afeta o experimento. Nas linhas **a** – **g** observa-se a influência do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na estrutura do DNA, notando-se que a partir da linha **c** ocorre a diminuição da intensidade das bandas OC, L e SC, e a partir da linha **f**, ou seja, da relação molar 1, tem-se o completo desaparecimento das bandas OC, L e SC. O desaparecimento destas bandas indica que o brometo de etídio foi expulso do DNA plasmidial após a interação do complexo com o DNA, suprimindo a sua emissão. Comportamento semelhante foi observado para complexos de rutênio(II) contendo diiminas<sup>118</sup>.



**FIGURA 35** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na conformação do DNA plasmidial pBR322. M = marcador de peso molecular; DNA = pBR322 (38  $\mu\text{M}$ ) contendo 10% de DMSO; Relação molar complexo/DNA: a = 0,05; b = 0,2; c = 0,4; d = 0,6; e = 0,8; f = 1 e g = 2.

Ao realizar o estudo de interação com o DNA plasmidial pBR322 para os complexos contendo a lau, verificou-se um comportamento diferente dos

complexos contendo o lap. Na Figura 36 é mostrada a imagem do gel de agarose para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . Neste caso foi observado um pequeno deslocamento das bandas SC e OC, a medida que a concentração de complexo foi aumentada. O desaparecimento das bandas OC, L e SC não foi observado como no caso do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . A diferença estrutural do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  está apenas nos ligantes lap e lau. Ao contrário da lau, o lap apresenta uma cadeia carbônica, a qual provavelmente influenciou a interação dos complexos com o DNA.



**FIGURA 36** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na conformação do DNA plasmidial pBR322. M = marcador de peso molecular; DNA = pBR322 (38  $\mu\text{M}$ ) contendo 10% de DMSO; Relação molar complexo/DNA: a = 0,05; b = 0,2; c = 0,4; d = 0,6; e = 0,8; f = 1 e g = 2.

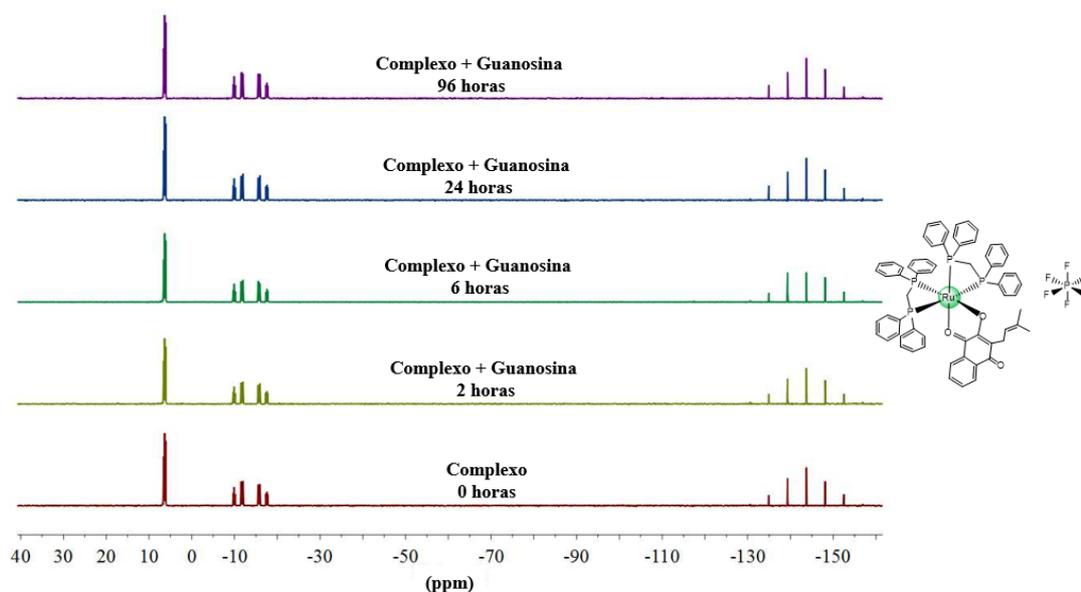
Diante do exposto, os tipos de interações possíveis entre os complexos estudados e o DNA são: eletrostática, interações pelos sulcos ou intercalação.

O desaparecimento das bandas no gel de eletroforese pode indicar três tipos de interações: intercalação, interação pelos sulcos ou covalência. Se o complexo é intercalador ele pode expulsar o brometo de etídio (intercalador clássico). O brometo de etídio quando intercalado ao DNA e exposto à luz ultravioleta apresenta emissão, e é esta emissão que permite observar as bandas do DNA na eletroforese em gel. Assim, se o brometo de etídio for expulso da

estrutura do DNA plasmidial não será possível observar suas bandas, pois o brometo de etídio não emitirá mais fluorescência. Da mesma forma se o complexo apresentar interação pelos sulcos ele poderá causar uma distorção na estrutura do DNA, e conseqüentemente, liberar o brometo de etídio.

Se o complexo apresenta covalência, irá ocorrer a dissociação de um ligante de sua esfera de coordenação e a ligação a um átomo das bases nitrogenadas do DNA. Dessa forma o DNA será fragmentado em filamentos pequenos e suas bandas não serão mais observadas.

Sendo assim, um estudo foi realizado empregando-se o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e a guanosina, nucleosídeo que compreende uma guanina ligada a um anel de ribose, para verificar a possibilidade de o complexo apresentar covalência. Para isso, solubilizou-se o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e a guanosina em uma proporção 1:2 e registrou-se espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  durante diferentes intervalos de tempo. A dissociação de um ligante da esfera de coordenação do complexo e a coordenação da guanosina implicaria no aparecimento de novos sinais no RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  referentes à nova espécie formada. Contudo, como observa-se nos espectros da Figura 37, não ocorreu nenhuma alteração no espectro do complexo após a adição da guanosina. Dessa forma descarta-se possibilidade de interação por covalência, complexo/DNA.



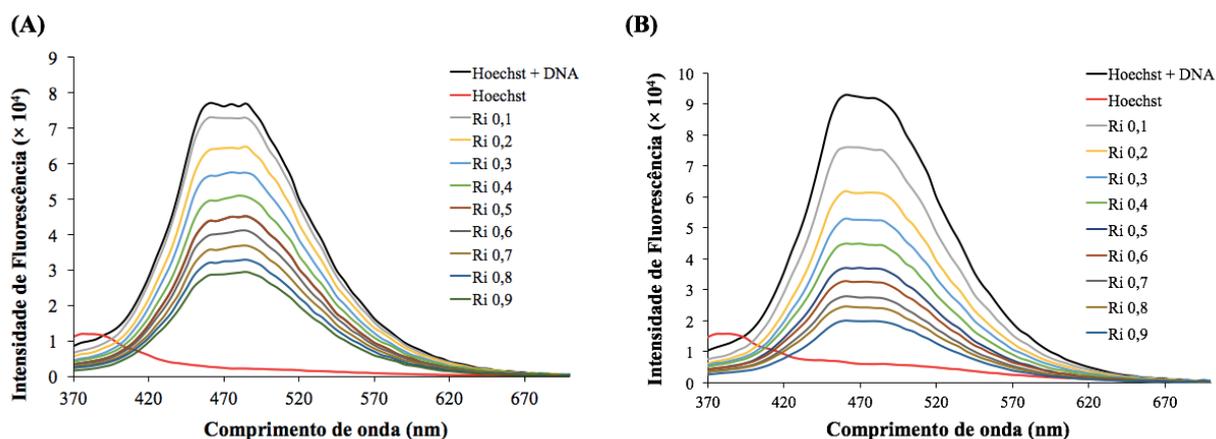
**FIGURA 37** -Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na presença de guanósina (1:2), em DMSO em diferentes intervalos de tempo. Ao lado estrutura do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ .

#### 4.3.4 Competição com Hoechst e CT-DNA

Uma das possibilidades de interação dos complexos com o CT-DNA é via interação pelos sulcos do DNA. Para investigar essa forma de interação realizou-se o ensaio de competição empregando o corante fluorescente Hoechst 33258, o qual é conhecido por interagir com o DNA via sulcos menores<sup>119</sup>. Dessa forma o Hoechst funciona como uma sonda, o qual ao interagir com o DNA, emite uma fluorescência em 470 nm, quando excitado em 340 nm. Dessa forma, compostos que apresentam a capacidade de interagir com o DNA via sulcos menores, podem competir com o Hoechst, expulsando-o da estrutura do DNA, e conseqüentemente, diminuindo a intensidade de fluorescência do sistema Hoechst-DNA<sup>93</sup>.

Na Figura 38 são mostrados os espectros de fluorescência do Hoechst-DNA na presença de diferentes concentrações dos complexos (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . Verifica-se que ao

adicionar os complexos de rutênio ao sistema Hoechst-DNA ocorreu uma significativa diminuição na intensidade da fluorescência, o que indica que os complexos são capazes de expulsar o Hoechst, e interagir com o DNA via sulcos menores.



**FIGURA 38** - Espectros de emissão do Hoechst (2,7  $\mu\text{M}$ ), CT-DNA (125  $\mu\text{M}$ ), contendo diferentes relações molares  $[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$  (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , a  $37^\circ\text{C}$  com  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ .

#### 4.4 Determinação da lipofilicidade ( $\log P$ )

O coeficiente de partição ( $P$ ) é a medida da lipofilicidade de um composto, ou seja, a tendência do composto em solubilizar na fase orgânica ou aquosa. A lipofilicidade de um composto é determinada pela razão da concentração, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases. Para determinação deste parâmetro são empregados dois solventes imiscíveis, um orgânico, geralmente *n*-octanol e a água.

A lipofilicidade de um composto é um parâmetro essencial na fase de desenvolvimento de compostos com aplicações biológicas, pois está diretamente relacionado a processos de distribuição, absorção, metabolismo e excreção.

Para a realização do experimento solubilizou-se os complexos em *n*-octanol, contendo 7% de DMSO, para auxiliar na solubilização, e adicionou-se água. A quantificação dos complexos na fase orgânica foi determinada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis. Inicialmente foi construída uma curva de calibração e após a incubação dos complexos em *n*-octanol e água retirou-se uma alíquota da fase orgânica e registrou-se o espectro de absorção na região do UV-vis. Conhecendo a concentração inicial do complexo e sabendo a concentração na fase orgânica (empregando a curva de calibração), obteve-se a concentração na fase aquosa pela simples subtração. Os valores de lipofilicidade ( $\log P$ ) foram obtidos empregando-se a seguinte relação:

$$\log P = \log \frac{[n\text{-octanol}]}{[\text{água}]}$$

Na Tabela 10 encontram-se os valores para os coeficientes de partição, sob a forma de  $\log P$ .

**TABELA 10** - Coeficiente de partição para os complexos contendo lap ou lau

Complexos	Log <i>P</i>	Complexos	Log <i>P</i>
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,43	[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	0,86
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,38	[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	0,63
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,30	[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	0,32
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	0,30		

Todos os complexos apresentaram  $\log P$  maiores do que zero, indicando que a concentração dos mesmos na fase orgânica foi maior do que na fase aquosa.

## 4.5 Ensaio Biológicos

### 4.5.1 Determinação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos complexos de rutênio, dos ligantes bifosfínicos, bipyridina, lap, lau e a cisplatina, foram determinadas frente às linhagens tumorais MDA-MB-231, MCF-7, A549, DU-145 e as células não tumorais FGH e MCF-10A. Para realização deste ensaio utilizou-se o MTT, o qual é reduzido pelas redutases mitocondriais em células viáveis, formando cristais violeta, de formazan. A partir das medidas de absorvância determinou-se os valores de  $IC_{50}$  (concentração de complexo que inibe 50% do crescimento celular) por meio de curvas dose-resposta para cada composto (encontram-se no apêndice nas Figuras A30 - A35) utilizando o *software* GraphPadPrism 5.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que para cada concentração fez-se 3 determinações.

As Tabelas 11 e 12 mostram os resultados de  $IC_{50}$  obtidos para os ligantes livres, precursores de rutênio, complexos contendo lap ou lau, e para o fármaco cisplatina.

**TABELA 11** - Valores de IC<sub>50</sub> e índice de seletividade (IS) para os complexos precursores, complexos contendo lap ou lau, ligantes livres e cisplatina nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A, após 48 h de incubação

Compostos	IC <sub>50</sub> (μM)				
	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A	IS <sup>1</sup>	IS <sup>2</sup>
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(0,08 ± 0,02)	(1,53 ± 0,09)	(0,60 ± 0,03)	7,5	0,40
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(0,09 ± 0,02)	(1,15 ± 0,19)	(0,55 ± 0,07)	6,11	0,48
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(0,13 ± 0,01)	(2,03 ± 0,26)	(2,70 ± 0,50)	20,77	1,33
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(0,11 ± 0,04)	(0,87 ± 0,01)	(0,72 ± 0,01)	6,54	0,83
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> <b>2D</b>	(0,15 ± 0,01)	(2,40 ± 0,07)	(2,76 ± 0,30)	18,4	1,15
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> <b>4D</b>	(0,13 ± 0,03)	(1,09 ± 0,02)	(1,71 ± 0,01)	13,15	1,57
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(0,06 ± 0,01)	(0,70 ± 0,01)	(0,58 ± 0,02)	9,67	0,83
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(0,07 ± 0,03)	(1,20 ± 0,05)	(0,77 ± 0,03)	11	0,64
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(0,77 ± 0,04)	(0,91 ± 0,08)	(3,15 ± 0,09)	4,10	3,46
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	(1,10 ± 0,09)	(1,17 ± 0,21)	(3,11 ± 0,04)	2,83	2,66
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(26,06 ± 4,84)	(8,99 ± 3,14)	(25,51 ± 0,18)	0,98	2,84
Lap	> 100	> 100	> 100	----	----
Lau	> 100	> 100	> 100	----	----
<b>Cisplatina</b>	(2,43 ± 0,20)	(13,98 ± 2,02)	(29,45 ± 0,85)	12,12	2,11

\***2D** e **4D** refere-se aos isômeros, 2D significa que é o isômero isolado e 4D apresenta os dois isômeros juntos, mostrando que a atividade citotóxica nos dois casos é semelhante e não depende de um só isômero. **IS<sup>1</sup>** = Índice de seletividade IC<sub>50</sub> MCF-10A/IC<sub>50</sub> MDA-MB-231 e **IS<sup>2</sup>** = Índice de seletividade IC<sub>50</sub> MCF-10A/IC<sub>50</sub> MCF-7.

**TABELA 12** - Valores de IC<sub>50</sub> e IS para os complexos precursores, complexos contendo lap ou lau, ligantes livres e cisplatina nas linhagens A549, DU-145 e FGH, após 48 h de incubação

Compostos	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )			IS <sup>1</sup>	IS <sup>2</sup>
	A549	DU-145	FGH		
[Ru(lau)(dppe) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	(0,043 ± 0,007)	(0,040 ± 0,003)	(0,14 ± 0,01)	3,35	3,5
[Ru(lau)(dppm) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	(0,03 ± 0,01)	(0,06 ± 0,02)	(0,19 ± 0,14)	6,33	3,17
[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	(0,06 ± 0,02)	(0,11 ± 0,05)	(0,25 ± 0,09)	4,17	2,27
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(0,58 ± 0,02)	(0,42 ± 0,17)	(1,31 ± 0,03)	2,26	3,11
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> <b>2D</b>	(0,53 ± 0,05)	(0,39 ± 0,07)	(0,78 ± 0,04)	1,47	2
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub> <b>4D</b>	(0,56 ± 0,05)	(0,31 ± 0,07)	(0,57 ± 0,06)	1,01	1,83
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(0,32 ± 0,06)	(0,18 ± 0,01)	(0,48 ± 0,03)	1,5	2,67
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(0,06 ± 0,01)	(0,12 ± 0,04)	(0,29 ± 0,05)	4,83	2,42
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	(0,40 ± 0,06)	(0,61 ± 0,20)	nd	---	---
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> PF <sub>6</sub>	(0,35 ± 0,07)	(1,17 ± 0,01)	nd	---	---
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	(21,26 ± 0,43)	(27,30 ± 1,18)	nd	---	---
Lap	> 100	> 100	> 100	---	---
Lau	> 100	> 100	> 100	---	---
<b>Cisplatina</b>	(11,54 ± 1,19)	(2,00 ± 0,47)	(1,42 ± 0,99)	0,12	0,71

IS<sup>1</sup> = Índice de seletividade IC<sub>50</sub> FGH/IC<sub>50</sub> A549 e IS<sup>2</sup> = Índice de seletividade IC<sub>50</sub> FGH/IC<sub>50</sub> DU-145

Os ligantes dppf, dppe, dppm e bipy foram avaliados quanto à atividade citotóxica em todas as linhagens estudadas, contudo, nenhum efeito citotóxico foi observado, até 100 μM (concentração máxima utilizada).

De acordo com os dados expostos nas Tabelas 11 e 12 verifica-se que os ligantes lapachol e lausona não apresentaram citotoxicidade à 100 μM (máxima concentração investigada) frente às linhagens celulares investigadas. Todavia, após a coordenação ao rutênio, a citotoxicidade foi aumentada consideravelmente. Pode-se ressaltar ainda que a citotoxicidade dos complexos precursores também foi aumentada após a coordenação dos ligantes lap e lau, evidenciando a importância da coordenação dos mesmos para o desenvolvimento de novos potenciais metalofármacos. Vale ressaltar que o precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(bipy)] não foi avaliado quanto à sua atividade citotóxica devido à sua baixa solubilidade em DMSO.

Verificou-se que todos os complexos contendo lap ou lau foram ativos frente às linhagens avaliadas, apresentando valores de  $IC_{50}$  menores do que o fármaco cisplatina, usado como referência. Ressalta-se ainda que analisando os valores de lipofilicidade apresentados na Tabela 9, não é possível observar relação entre os valores de  $\log P$  e os valores de  $IC_{50}$ . Além disso, comparando os resultados de  $IC_{50}$  para os complexos apresentados nas Tabelas 11 e 12, com os resultados obtidos para complexos contendo os ligantes lapachol ou lausona citados na Tabela 1, verifica-se que no caso da linhagem MCF-7, os complexos da Tabela 1 são mais efetivos. Contudo os complexos contendo duas bifosfinas e contendo a bifosfina dppf mostraram-se mais ativos do que os complexos apresentados na Tabela 1.

A presença de diferentes ligantes bifosfínicos apresentou maior influência na citotoxicidade dos complexos quando foram empregados dois ligantes bifosfínicos, isso pode ser relacionado ao aumento da lipofilicidade, e conseqüentemente a maior facilidade para atravessar a membrana celular.

De forma geral todos os complexos foram muito ativos nas linhagens estudadas, contudo, os complexos  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  e  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  apresentaram uma preferência à linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, quando comparado aos resultados para a linhagem não tumoral MCF-10A, também de mama.

Vale a pena ressaltar que a linhagem MDA-MB-231 é classificada como TNBC, ou hormônio independente, ou seja, não depende de hormônios para o crescimento e proliferação, e por essa razão é um câncer muito agressivo, com propriedades metastáticas. Por ser mais agressivo, o tratamento para esse tipo de câncer é mais difícil, pois não responde aos tratamentos convencionais que apresentam como alvo os hormônios. Dessa forma é importante verificar que os complexos foram mais ativos para essa linhagem tumoral do que frente a linhagem MCF-7, tendo em vista que esta linhagem apresenta receptores de ER e EGF, sendo dependente deles para o crescimento, e não é invasiva.

Diante disso, e sabendo-se da importância do desenvolvimento de compostos seletivos para o tratamento do câncer, os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foram selecionados para uma maior investigação acerca de suas propriedades biológicas, frente à linhagem MDA-MB-231.

#### 4.5.2 Morfologia celular

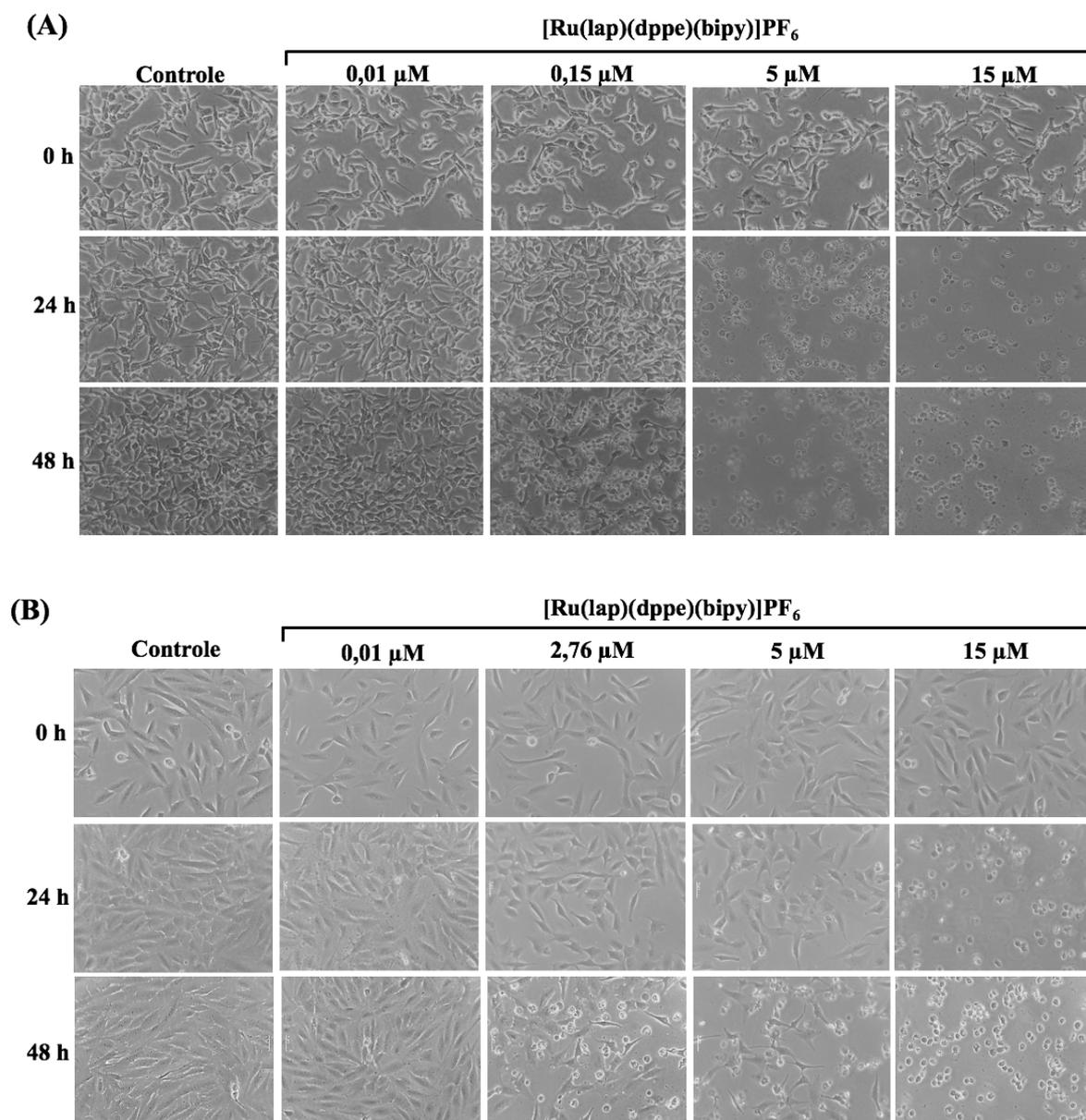
A avaliação da morfologia celular foi realizada empregando as linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-10A, na presença de diferentes concentrações dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . As imagens foram registradas em diferentes intervalos de tempo e nas Figuras 39 e 40 são ilustradas as alterações morfológicas.

Analisando-se as imagens ilustradas na Figura 39, verifica-se que na presença de 5 e 15  $\mu\text{M}$  dos complexos, após 24 e 48 h de incubação, o complexo altera drasticamente a morfologia celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A, observando-se que as células estão em formatos circulares, com perda de aderência e diminuição da densidade celular. Além disso é possível verificar a formação de alguns detritos celulares, principalmente em 48 horas.

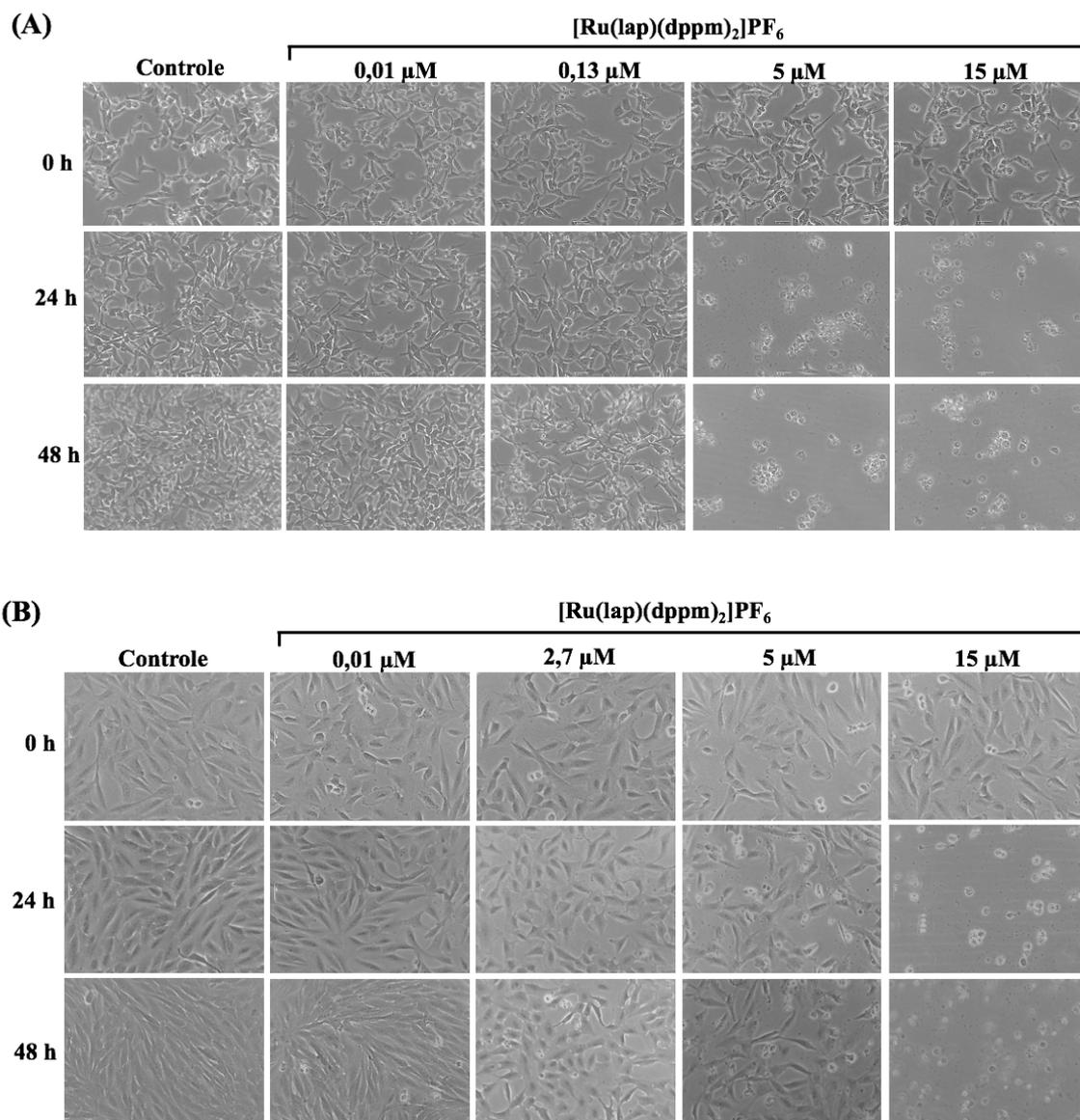
Vale destacar ainda que nas concentrações de 0,15 e 2,76  $\mu\text{M}$ , que são os valores de  $\text{IC}_{50}$  em 48 horas, nas duas linhagens celulares, nota-se uma menor densidade celular (em comparação com o controle) e a presença de células em formato circular e desaderidas.

Na Figura 40 são apresentadas as imagens registradas para as células MDA-MB-231 e MCF-10A, tratadas com o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ . Da mesma forma que para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , foram observadas alterações após 24 e 48 horas de incubação com 5 e 15  $\mu\text{M}$ . Entretanto, menores alterações foram observadas para a concentração de 5  $\mu\text{M}$ , em comparação com as alterações observadas na linhagem MDA-MB-231. Algumas células

perderam a aderência e ocorreu a diminuição do volume celular, embora algumas células aderidas ainda tenham sido observadas. Estas observações confirmam os resultados de citotoxicidade, mostrando que os complexos apresentam mais efeitos sobre as células tumorais MDA-MB-231, do que sobre as não tumorais, MCF-10A.



**FIGURA 39** - Efeito do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> na morfologia das células tumorais de mama, (A) MDA-MB-231 e não tumoral de mama, (B) MCF-10A. Cada imagem corresponde a uma das triplicatas, registradas no aumento de 10× da objetiva.



**FIGURA 40** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na morfologia das células tumorais de mama, (A) MDA-MB-231 e não tumorais de mama, (B) MCF-10A. Cada imagem corresponde a uma das triplicatas, registradas no aumento de  $10\times$  da objetiva.

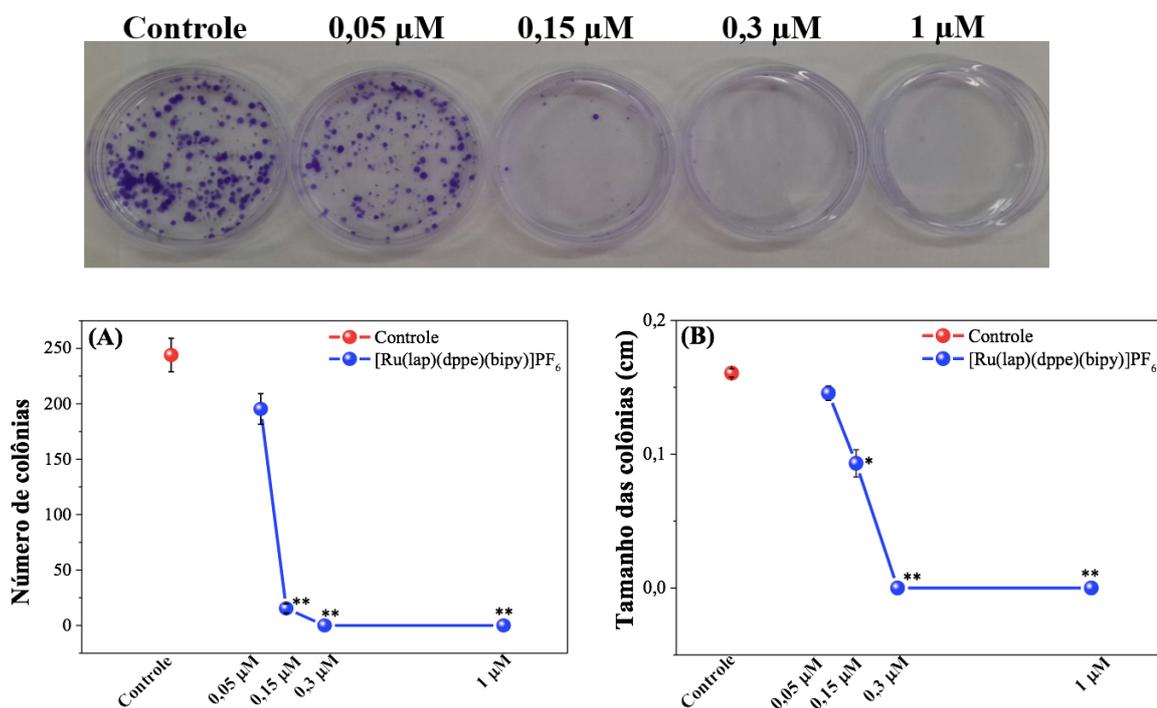
#### 4.5.3 Formação de colônias

O ensaio de sobrevivência clonogênica determina a capacidade que uma única célula apresenta de se proliferar indefinidamente, de modo a formar uma colônia. Uma colônia é constituída de pelo menos 50 células<sup>120</sup>. Esse efeito é avaliado após as células terem contato com o composto de interesse, nesse

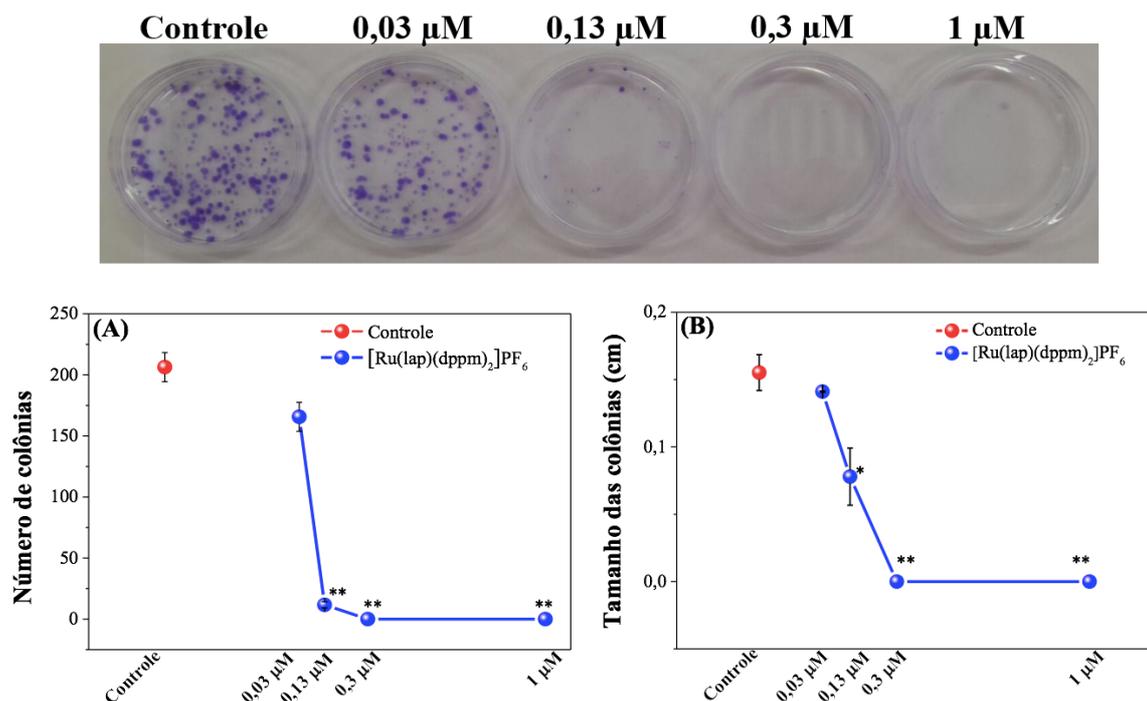
caso os complexos de rutênio. Assim é possível avaliar o dano causado pelos complexos sobre a capacidade de inibir a formação de colônias, o tamanho e o número de colônias na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.

Para isso foram semeadas 300 células em uma placa de Petri e submetidas ao tratamento com os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em diferentes concentrações, por 48 horas. Logo após, o meio de cultura contendo os complexos foi retirado e um novo meio adicionado, e as placas deixadas em estufa por 10 dias. As colônias foram coradas com cristal violeta e contadas, sendo possível avaliar a capacidade reprodutiva das células.

Nas Figuras 41 e 42 são mostradas as imagens das placas de Petri após o tratamento das células tumorais MDA-MB-231 com os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ .



**FIGURA 41** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  sobre a formação de colônias nas células tumorais de mama, MDA-MB-231. (A) Gráfico do número de colônias, e (B) Gráfico do tamanho de colônias. \*  $p < 0,02$  e \*\*  $p < 0,009$ .



**FIGURA 42** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  sobre a formação de colônias nas células tumorais de mama, MDA-MB-231. (A) Gráfico do número de colônias, e (B) Gráfico do tamanho de colônias. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,0001$ .

Analisando-se as imagens apresentadas nas Figuras 41 e 42, bem como os gráficos (A) e (B), verifica-se que os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , nas concentrações do  $\text{IC}_{50}$  de 48 horas, 0,15 e 0,13  $\mu\text{M}$ , respectivamente, inibiram significativamente a formação de colônias, quando comparado com o controle. Além disso, verificou-se que nas concentrações de 0,3 e 1  $\mu\text{M}$  houve a inibição total da formação de colônias. Desta forma pode-se dizer que estes complexos de rutênio são capazes de inibir a formação de colônias, bem como de diminuir o tamanho destas, na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. Sendo assim, os complexos apresentam efeito citostático, ou seja, são capazes de se opor ao crescimento, desenvolvimento e a multiplicação celular e também são citotóxicos, pois atuam na destruição das células tumorais.

#### 4.5.4 Ensaios de migração celular

A migração celular é um processo fundamental para o desenvolvimento e funcionamento do organismo, atuando no sistema de defesa, como por exemplo na cicatrização, bem como no reparo e desenvolvimento de tecidos. Todavia, qualquer desregulação no processo de migração pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças, como o câncer<sup>121</sup>.

Em se tratando do câncer, a migração está diretamente relacionada à metástase, pois trata-se da capacidade de migração das células tumorais para outros órgãos do corpo, disseminando via circulação sanguínea e linfática<sup>122</sup>. Nesse sentido, uma alternativa que vem sendo bastante explorada no tratamento dessa doença é o uso de compostos que sejam capazes de controlar ou inibir a ocorrência de metástase de células tumorais<sup>123</sup>.

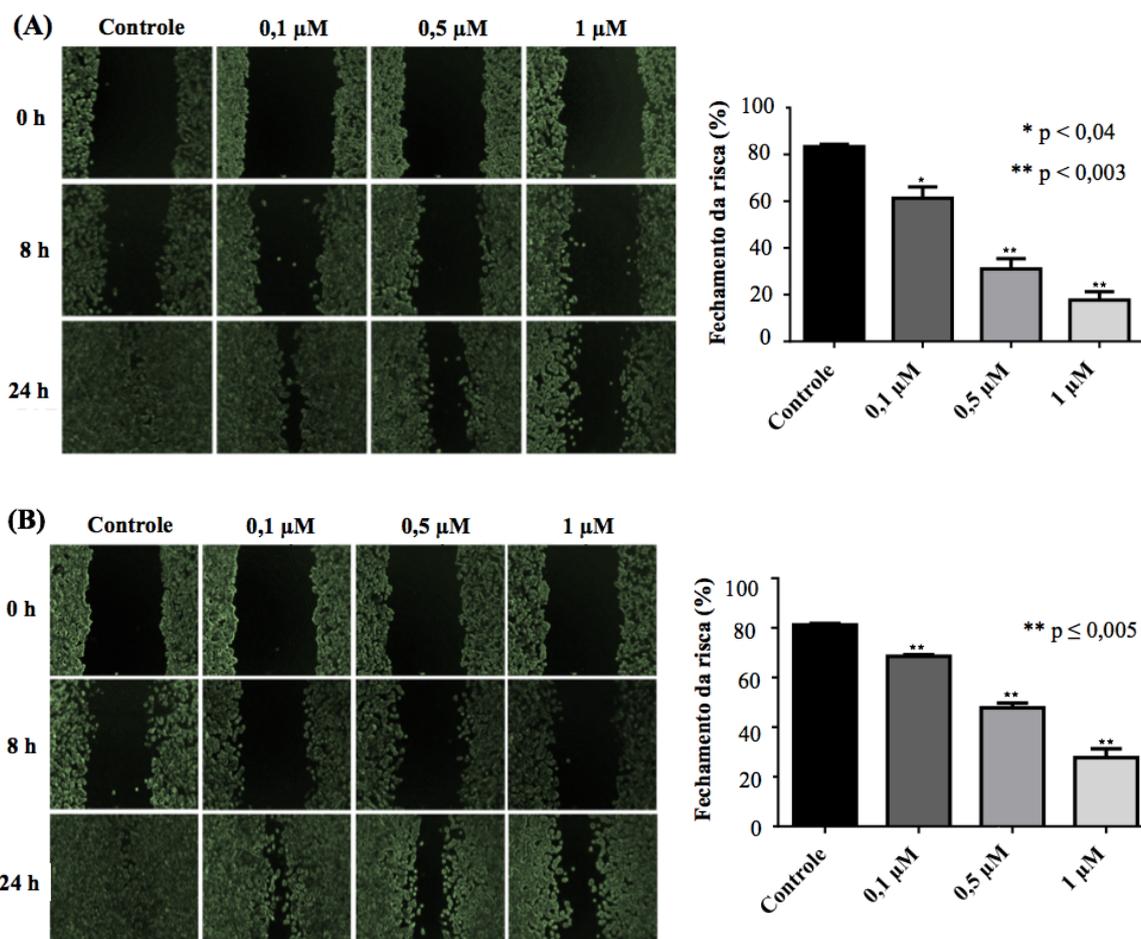
Desta forma é interessante compreender como os complexos de rutênio sintetizados se comportam frente ao processo de migração celular. Com esse intuito, experimentos de migração por *Wound Healing* e migração quimiotática (Câmara de Boyden) foram executados.

##### 4.5.4.1 *Wound Healing*

Para realização do ensaio de *Wound Healing* as células tumorais de mama, MDA-MB-231, foram semeadas em placas de 12 poços e após atingir a confluência de 80% foi feita uma risca sobre a superfície contendo as células. Os complexos foram adicionados em diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ) e o fechamento da risca foi monitorado até 24 horas. Na Figura 43 são apresentadas as imagens registradas para as células MDA-MB-231 tratadas com os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ .

Após o tratamento com os complexos de rutênio verificou-se que eles são capazes de inibir a migração celular nas concentrações utilizadas, pois na presença dos complexos não houve o fechamento completo da risca, se

comparado aos controles (contendo 0,5% de DMSO). O complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> na concentração de 1 μM inibiu 83% do fechamento da risca, em comparação com o controle, que inibiu 17%. Já para o complexo [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> a inibição na concentração de 1 μM foi de 73%, enquanto o controle foi de 19%. É importante ressaltar que a escolha das concentrações de complexos a serem empregadas neste ensaio foi baseada nos valores de IC<sub>50</sub> para os complexos após 24 h de incubação. Os resultados obtidos foram de (1,65 ± 0,15 μM) e (1,27 ± 0,10 μM), para os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, respectivamente. Sendo assim, utilizou-se concentrações menores do que os valores de IC<sub>50</sub> em 24 h para que o efeito observado fosse apenas de inibição da migração celular e não efeito citotóxico.

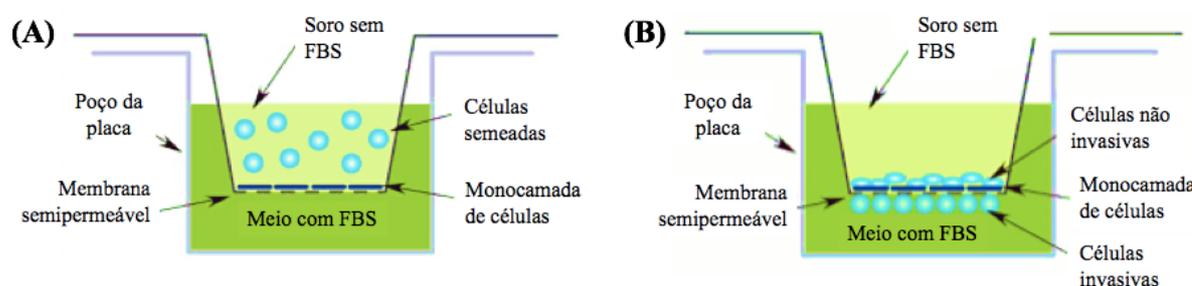


**FIGURA 43** - Efeito dos complexos (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na migração das células tumorais de mama MDA-MB-231 em ensaio de *Wound Healing* (Aumento de  $4\times$  da objetiva). Representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após 24 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata e as imagens apresentadas são representativas de cada condição.

#### 4.5.4.2 Migração quimiotática

Outra maneira de analisar as propriedades antimigratórias dos complexos de rutênio foi pelo ensaio de migração quimiotática, o qual consiste na avaliação da capacidade dos complexos de inibir a migração das células, de forma dependente do soro fetal bovino (FBS), que funciona como quimioatraente. Na Figura 44 é apresentado um esquema de como o experimento é executado. Como pode-se verificar, as células juntamente com o

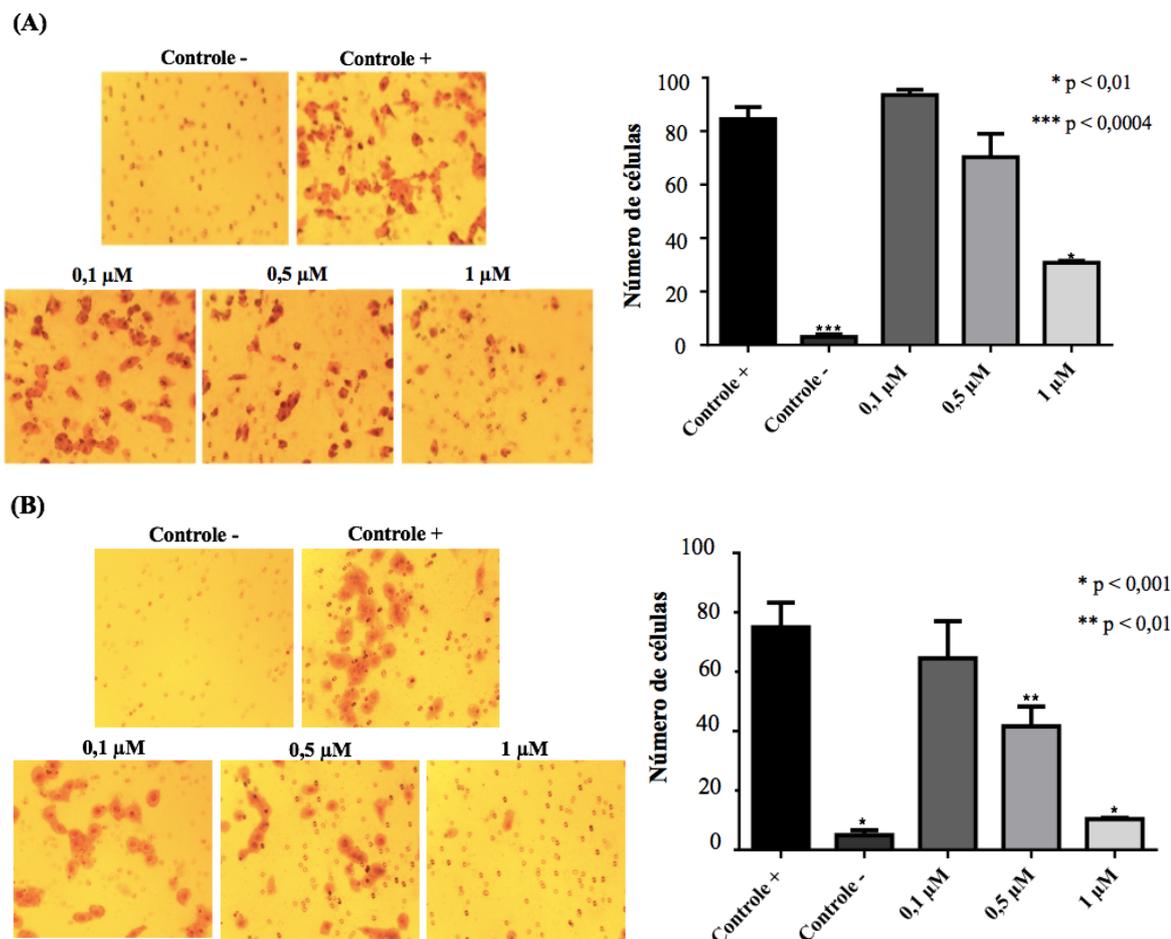
complexo em diferentes concentrações, são adicionadas dentro do inserto contendo meio sem FBS. O inserto é colocado dentro de um poço maior contendo meio com FBS, que funciona como quimioatrativo para as células migrarem. Dessa forma é possível verificar se o complexo irá inibir a migração celular pela contagem das células que migraram e fazendo uma comparação com o controle positivo (contendo 0,5% de DMSO) e com o controle negativo (neste caso há meio sem FBS dentro e fora do inserto, e assim não ocorre a migração das células).



**FIGURA 44** - Representação esquemática do experimento de migração quimiotática.

Na Figura 45 são apresentadas as imagens registradas das membranas, bem como os gráficos do número de células que migraram em função da concentração de complexo.

Analisando a Figura 45 verifica-se que os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  inibiram significativamente a migração das células tumorais MDA-MB-231, se comparado ao controle positivo, principalmente nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ . Desta forma pode-se dizer que os complexos apresentam a propriedade de inibir a migração de células tumorais da linhagem MDA-MB-231, o que os torna muito promissores para o tratamento de câncer.



**FIGURA 45** - Efeito dos complexos (A)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e (B)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na migração celular da linhagem MDA-MB-231. Controle positivo (C+) representa as células não tratadas em meio com FBS e controle negativo (C-) representa as células não tratadas na presença de meio sem FBS. Gráfico do número de células que migraram em função das concentrações dos complexos. O experimento foi realizado em triplicata e as imagens apresentadas são representativas de cada campo das membranas.

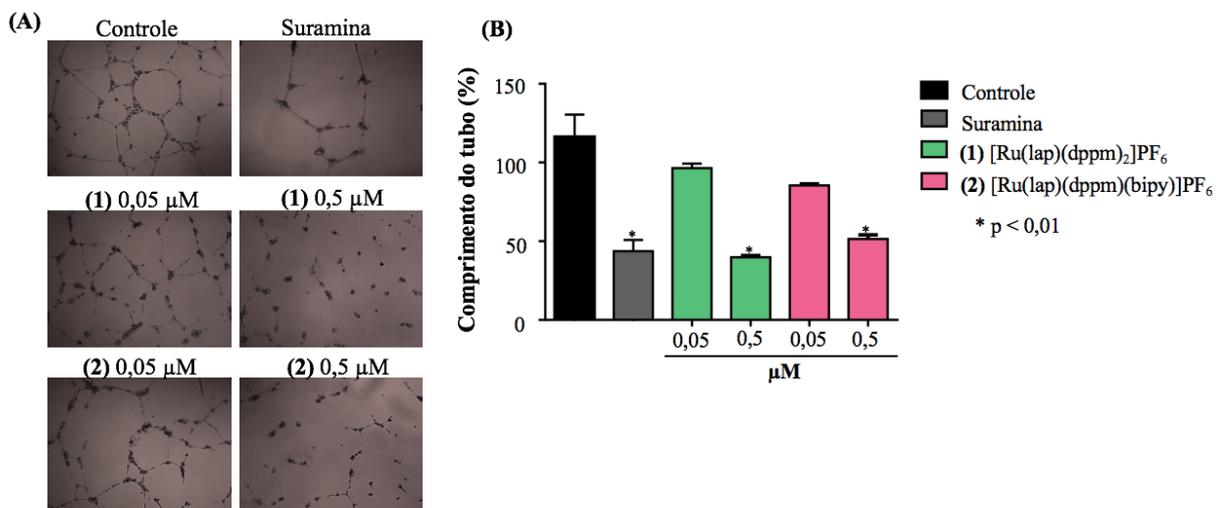
#### 4.6 Análise da formação de túbulos vasculares

Como se sabe, todas as células necessitam de oxigênio e suplementos metabólicos para crescer e proliferar. Contudo, as células tumorais, já que apresentam um metabolismo acelerado, tem uma maior necessidade destes nutrientes, e com isso, é observado um aumento significativo na formação de vasos sanguíneos, os quais são cruciais no processo de transporte de nutrientes.

A este processo dá-se o nome de angiogênese. Uma estratégia para controlar o crescimento tumoral e combatê-lo é o desenvolvimento de novos agentes antitumorais que sejam capazes de inibir o processo de angiogênese<sup>124</sup>. Diante disso, com o intuito de verificar se os complexos de rutênio apresentam propriedades antiangiogênicas, realizou-se o estudo de inibição da formação de tubos em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Essas células foram empregadas nesse experimento pois são capazes de proliferar e migrar em resposta a sinais angiogênicos, formando estruturas semelhantes a capilares/tubos.

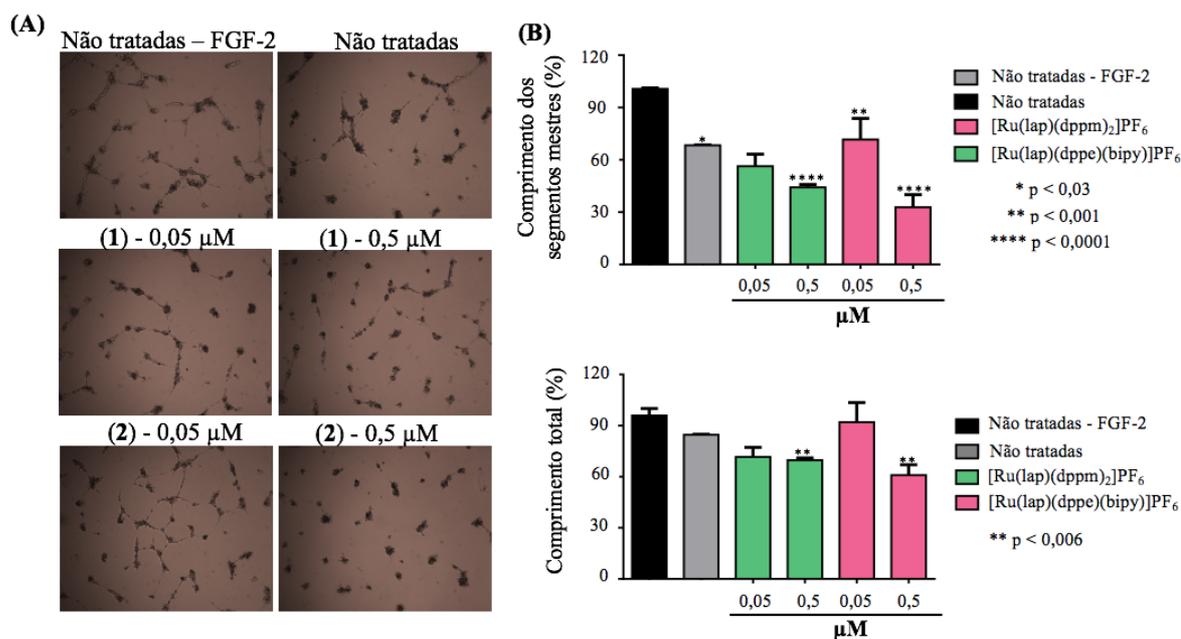
Previamente à realização do ensaio de formação de tubos determinou-se a citotoxicidade dos complexos frente às células HUVEC após 24 h de incubação. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos foram ( $1,62 \pm 0,21$  e  $1,50 \pm 0,30$   $\mu\text{M}$  para os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , respectivamente). Tendo como base os valores de IC<sub>50</sub>, selecionou-se concentrações inferiores a estes ( $0,05$  e  $0,5$   $\mu\text{M}$ ), visando excluir o efeito citotóxico dos complexos.

As células HUVEC foram adicionadas juntamente com os complexos em placas de 96 poços, as quais tiveram seus poços previamente cobertos com matrigel. Após 12 h de incubação na estufa a  $37^\circ\text{C}$  foi observada a formação de tubos. Como verifica-se na Figura 46 uma inibição significativa na formação de tubos foi observada na presença de ambos complexos, de forma dependente da concentração, quando comparado ao controle. Além disso, na concentração de  $0,05$   $\mu\text{M}$  os complexos apresentaram comportamento similar ao inibidor suramina.



**FIGURA 46** - Efeito inibitório da formação de túbulos vasculares nas células HUVEC (A) Imagens representativas dos túbulos formados e (B) Comprimento dos tubos (%) após 12 h de exposição com os complexos (1)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (2)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em comparação com o controle positivo e suramina. Dados expressos como a média de dois experimentos independentes.

Devido ao grande potencial inibidor da formação de tubos apresentado pelos complexos, questionou-se se os mesmos poderiam inibir a formação de tubos na presença do fator de crescimento FGF-2, o qual é conhecido por atuar no processo de angiogênese. Desregulação na expressão de FGF-2 pode inibir o crescimento celular e a angiogênese. Desta forma, analisou-se a formação de tubos na presença dos complexos (0,05 e 0,5  $\mu\text{M}$ ) e 10 ng de FGF-2. Observa-se na Figura 47, que o FGF-2 estimula a formação de tubos nas células HUVEC quando comparado às células sem FGF-2 (Não tratadas). Além disso, a presença de tubos foi menos abundante na presença dos complexos de rútenio, especialmente nas células tratadas com 0,5  $\mu\text{M}$  dos complexos.



**FIGURA 47** - Efeito inibitório na formação de túbulos vasculares em células HUVEC na presença do fator de crescimento FGF-2. **(A)** Imagens representativas dos túbulos formados e **(B)** Quantificação da extensão dos tubos para os complexos **(1)** [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> e **(2)** [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub>. Dados expressos como a média de dois experimentos independentes. \* p < 0,03, \*\* p < 0,001 e \*\*\*\* p < 0,0001.

Frente aos resultados encontrados para o ensaio de formação de tubos sem e com FGF-2, conclui-se que os complexos de rutênio são promissores inibidores do processo de angiogênese.

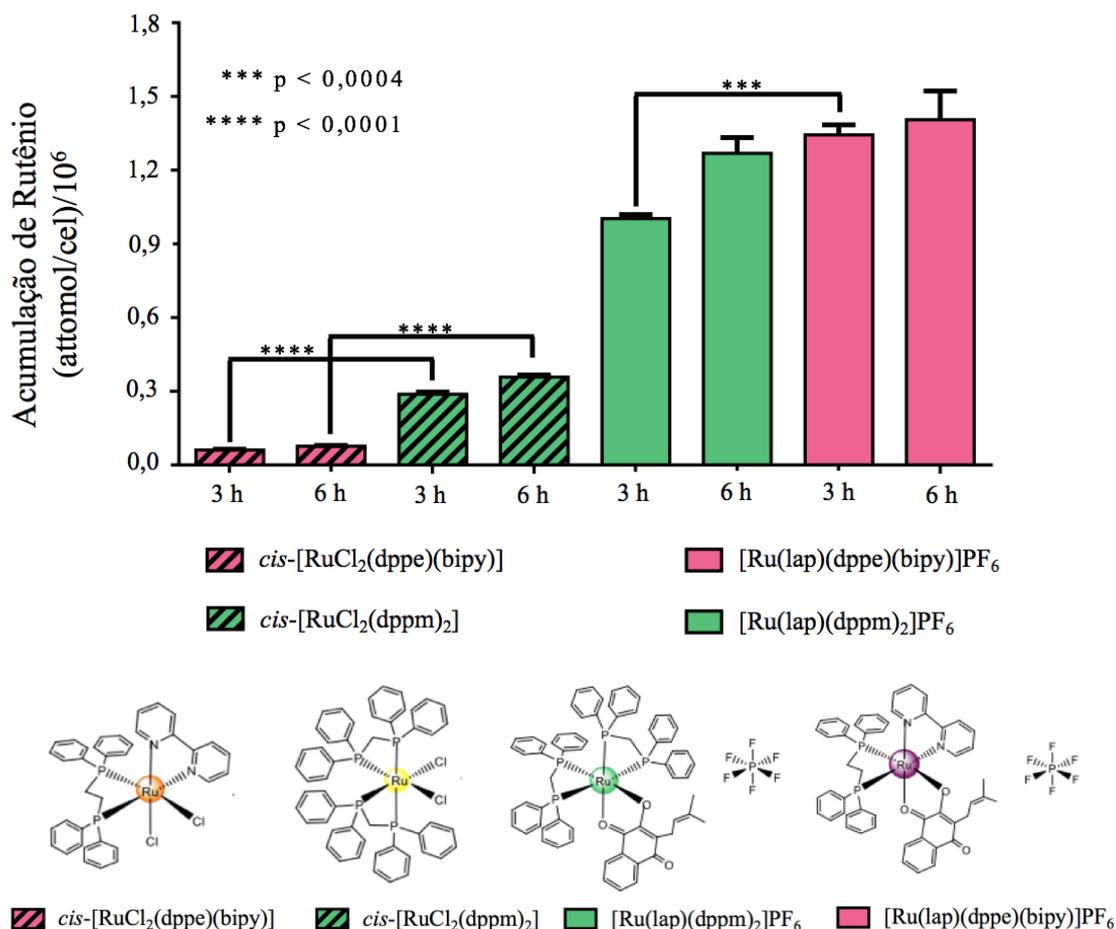
#### 4.7 Quantificação celular de rutênio por ICP-MS

Com o intuito de avaliar se os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> são capazes de entrar nas células, realizou-se a quantificação celular de rutênio empregando a técnica de ICP-MS. Para isso empregou-se os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, e os respectivos complexos precursores, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)(bipy)] e *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>]. As células MDA-MB-231 foram tratadas com 5  $\mu$ M de cada complexo e incubadas por 3 e 6 h.

Como ilustrado na Figura 48, foram observadas diferenças significativas na quantificação celular de rutênio oriundo dos complexos com lapachol e os respectivos complexos precursores. O complexo precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] apresentou uma melhor acumulação celular do que o *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)(bipy)], o que pode ser diretamente correlacionado com a atividade citotóxica dos mesmos, onde os valores de IC<sub>50</sub> são (2,43 ± 0,17 μM) e (48,02 ± 7,02 μM), respectivamente. No mesmo sentido, a acumulação celular de rutênio proveniente dos complexos contendo lapachol foi maior do que para os complexos precursores, o que mostra a importância da coordenação do lapachol nos complexos precursores para facilitar a acumulação celular e, conseqüentemente, a citotoxicidade.

Comparando a acumulação de rutênio para os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, estas foram similares, o que está de acordo com a citotoxicidade, onde os valores de IC<sub>50</sub> em 24 h são (1,65 ± 0,15) e (1,27 ± 0,10 μM), respectivamente. Neste estudo, a correlação da atividade citotóxica com a acumulação celular segue a ordem [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> ~ [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> > *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] > *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)(bipy)].

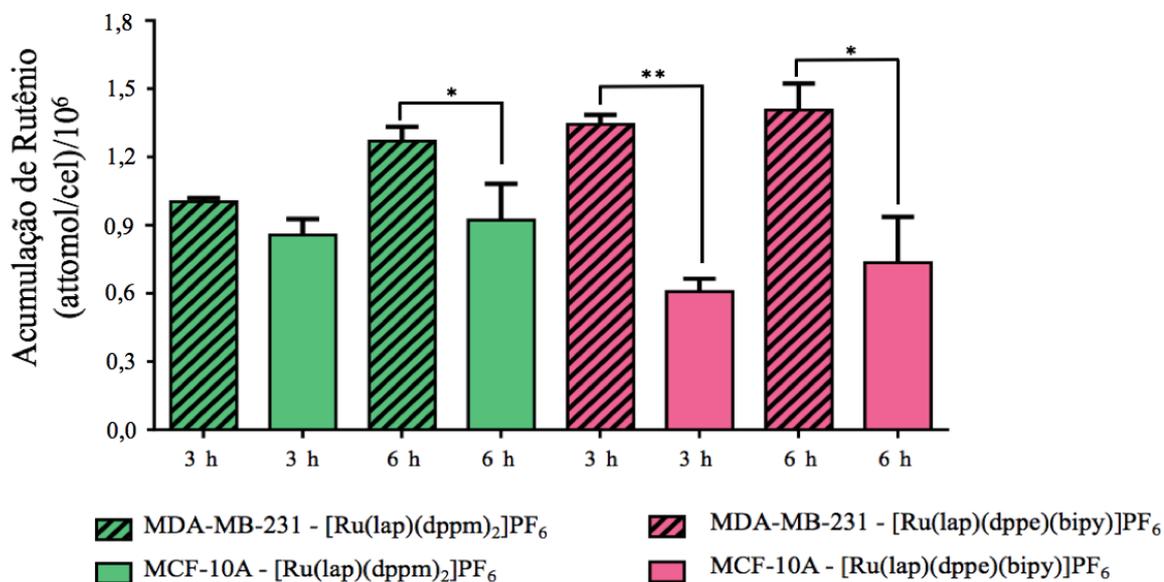
A lipofilicidade dos complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> são 0,32 e 0,38, respectivamente, resultando em uma acumulação celular e citotoxicidade similares. A lipofilicidade para os precursores não foi determinada devido a baixa solubilidade dos mesmos.



**FIGURA 48** - Quantificação de rutênio nas células MDA-MB-231 após tratamento com os complexos de rutênio *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)(bipy)], *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>], [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>, após 3 e 6 h de incubação.

Durante a avaliação da citotoxicidade dos complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>PF<sub>6</sub> verificou-se que eles são mais seletivos para a linhagem tumoral MDA-MB-231, do que para a linhagem não tumoral MCF-10A. Dessa forma, realizou-se o ensaio de quantificação celular de rutênio empregando essas duas linhagens celulares. Os resultados são apresentados na Figura 49, e mostraram que os complexos são capazes de acumular mais nas células MDA-MB-231 do que nas células MCF-10A, o que esta de acordo com a seletividade observada no ensaio de citotoxicidade. Vale ressaltar ainda que as células tumorais por apresentar um metabolismo acelerado, possuem um maior número de receptores de transferrina e sabendo

que o rutênio apresenta a capacidade de mimetizar o ferro, uma hipótese é que os complexos possam estar sendo internalizados nas células via receptores de transferrina.



**FIGURA 49** - Quantificação de rutênio nas células MDA-MB-231 e MCF-10A após tratamento com os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , após 3 e 6 h de incubação. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,004$ .

#### 4.8 Ensaio de competição dos complexos com a sonda TAMRA-R<sub>9</sub>

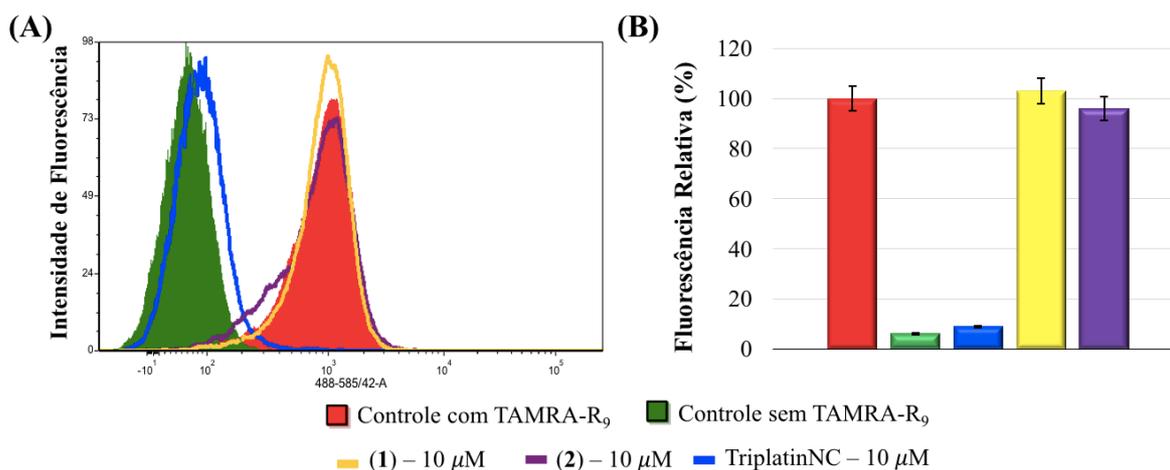
Buscando entender como ocorre o processo de internalização dos complexos nas células, e sabendo que alguns complexos de platina se acumulam nas células via interação com o heparan sulfato (HS)<sup>98</sup>, realizou-se o ensaio de competição empregando o TAMRA-R<sub>9</sub>, para verificar se os complexos de rutênio podem apresentar comportamento semelhante aos de platina.

O HS é um proteoglicano da família dos glicosaminoglicanos, expresso na superfície de células animais e pode ser encontrado como um componente da matriz extracelular e da membrana basal. HS apresenta a habilidade de interagir com muitas proteínas regulando várias atividades biológicas, tais como proliferação celular, inflamação, angiogênese,

infectividade viral e desenvolvimento<sup>125</sup>. Além da HS, outros glicosaminoglicanos tais como heparina, sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatano (DS) e sulfato de queratina, os quais contém grupos carboxílicos e sulfato, constituem uma importante fonte de poliânions macromoleculares, que estão presentes em diversos tipos de células<sup>98,126</sup>. Trabalhos tem reportado que a ligação a proteoglicanos de superfície celular tem sido uma importante etapa no processo de internalização celular de peptídeos, bem como a acumulação celular de espermidina e espermina, via ligação à heparina<sup>127,128</sup>.

Estudos relataram que células que apresentam deficiência em glicosaminoglicanos apresentam uma menor acumulação da sonda fluorescente de arginina, TAMRA-R<sub>9</sub>, indicando que a ligação ao heparan sulfato está diretamente relacionado com a sua internalização. Nesse sentido, na busca por investigar a internalização celular do TAMRA-R<sub>9</sub> na presença dos complexos de rutênio, empregou-se a linhagem celular CHO-K1 (câncer de ovário de hamster chinês, a qual contém HS), e o TAMRA-R<sub>9</sub> como sonda. O TriplatinNC, com carga 8+ foi utilizado como controle positivo, tendo em vista que estudos já demonstraram que esse complexo é capaz de inibir a acumulação celular do TAMRA-R<sub>9</sub>, por inibição competitiva dependente de cargas.

Após a incubação das células com os complexos, medidas foram realizadas por citometria de fluxo. Conforme apresentado na Figura 50, os complexos de rutênio não apresentaram a capacidade de alterar a fluorescência da sonda TAMRA-R<sub>9</sub>, ou seja, em células tratadas com os complexos de rutênio, os mesmos não foram capazes de prevenir a ligação do TAMRA-R<sub>9</sub> aos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular, e conseqüentemente a sua acumulação celular. Por outro lado, o TriplatinNC, por competição, inibiu completamente a acumulação do TAMRA-R<sub>9</sub>, conforme o esperado. Assim, diferentemente de complexos polinucleares de platina (PPCs)<sup>98</sup>, o mecanismo de entrada em células tumorais provavelmente não está relacionado com a presença de glicosaminoglicanos.

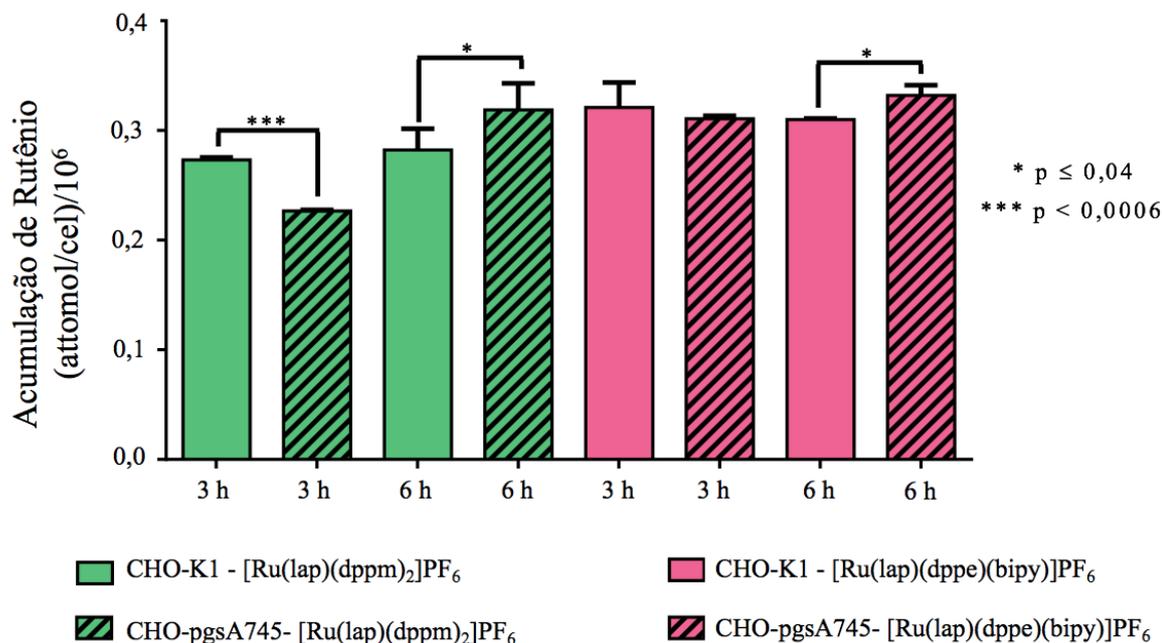


**FIGURA 50** - (A) Análise da competição entre os complexos de rutênio **(1)**  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e **(2)**  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  com a sonda TAMRA-R<sub>9</sub> na acumulação celular em células da linhagem CHO-K1 e (B) Gráfico de barras da fluorescência relativa da acumulação celular do TAMRA-R<sub>9</sub> e dos complexos de rutênio em comparação com os controles.

De acordo com os resultados obtidos pelo ensaio de competição com o TAMRA-R<sub>9</sub>, os complexos de rutênio não foram capazes de competir com o TAMRA-R<sub>9</sub> e entrar nas células via interação com os glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular. Entretanto, para confirmar se a internalização dos complexos de rutênio não está relacionada com os glicosaminoglicanos, realizou-se o ensaio de acumulação celular de rutênio, o qual não envolve a competição de cargas, como foi o caso do ensaio descrito anteriormente. Para isso empregou-se as células CKO-K1 e CHO-pgsA-745 (células de câncer de ovário com mutação, as quais são deficientes em HS e sulfato de condroitina).

As células CKO-K1 e CHO-pgsA-745 foram plaqueadas e após aproximadamente 24 h, as mesmas foram tratadas com 5 μM dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , por períodos de 3 e 6 h. Conforme observado na Figura 51, a acumulação celular de rutênio nas células CKO-K1 e CHO-pgsA-745 foi muito semelhante nas duas condições de incubação analisadas. Este resultado está em concordância com o obtido pelo

ensaio de competição com o TAMRA-R<sub>9</sub> e indica que os complexos não dependem da presença de proteoglicanos para que ocorra a acumulação celular.

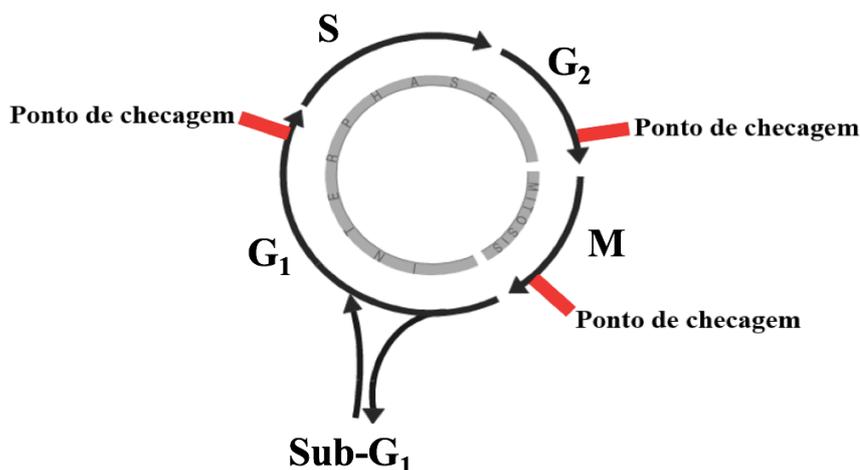


**FIGURA 51** - Acumulação celular de rutênio nas células CHO-K1 e CHO-pgsA-745 após tratamento com 5  $\mu$ M dos complexos [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> por 3 e 6 h de incubação. \*  $p \leq 0,04$  e \*\*\*  $p < 0,0006$ .

#### 4.9 Análise do Ciclo Celular

Após verificar que os complexos são capazes de penetrar nas células MDA-MB-231, realizou-se a análise do efeito que esses complexos podem causar na distribuição do ciclo celular. A divisão celular está classificada em duas fases, a mitose e a intérfase, as quais podem ser caracterizadas pela replicação do DNA e pela segregação dos cromossomos replicados em duas novas células. Na intérfase ocorre a duplicação do DNA, a síntese e crescimento celular, sendo dividida nas fases G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>. Na fase G<sub>1</sub> a célula se prepara para a síntese do DNA, que ocorre na fase S, que é seguida por um intervalo

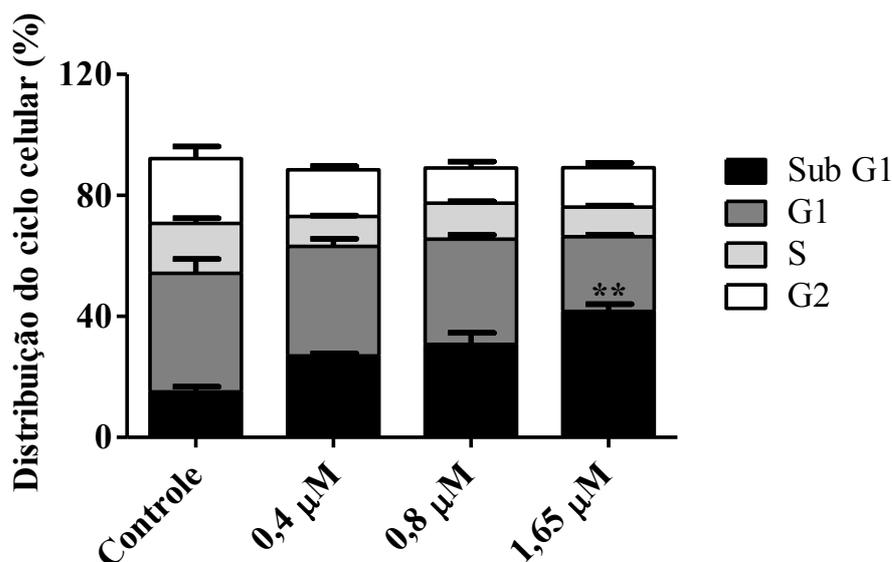
determinado  $G_2$ , onde a célula se prepara para a mitose (M). As fases  $G_1$ , S,  $G_2$  e M constituem as subdivisões do ciclo celular (Figura 52). As células em fase  $G_1$  podem, antes da replicação do DNA, entrar em um estado de repouso chamado Sub- $G_1$ <sup>129</sup>.



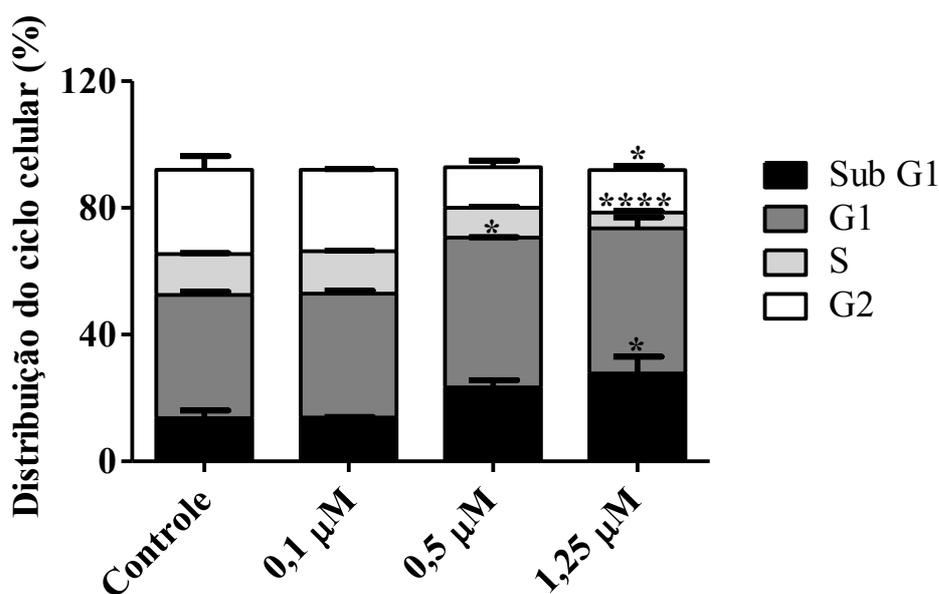
**FIGURA 52** - Estágios do ciclo celular. Adaptado de Vermeulen *et al.*<sup>129</sup>.

Existem três pontos de checagem no ciclo celular, um da fase  $G_1$  para a fase S, da  $G_2$  para M e da fase M para  $G_1$ . Nestes pontos de checagem a célula é avaliada quanto à integridade do DNA, e se forem observados danos eles serão reparados para depois prosseguir para a replicação. A perda destes pontos de checagem é uma característica de células tumorais, pois neste caso o DNA mutado não é reparado e as células continuam se multiplicando descontroladamente. Desta forma a regulação destes pontos de checagem tem implicações importantes na clínica, pois pode ocorrer alteração da sensibilidade das células tumorais frente aos quimioterápicos<sup>130</sup>.

Neste trabalho analisou-se a possibilidade de os complexos de rutênio apresentarem capacidade de alterar a distribuição do ciclo celular das células tumorais da linhagem MDA-MB-231. Nas Figuras 53 e 54 são apresentados os gráficos da porcentagem de distribuição do ciclo celular em diferentes concentrações dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lac})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lac})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ .



**FIGURA 53** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na distribuição do ciclo celular de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, após 24 h de incubação. \*\*  $p < 0,009$ .



**FIGURA 54** - Efeito do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na distribuição do ciclo celular de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, após 24 h de incubação. \*  $p \leq 0,04$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Analisando o gráfico apresentado na Figura 53 verifica-se que o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , na concentração de  $0,4 \mu\text{M}$  não altera o

ciclo celular das células MDA-MB-231, quando comparado ao controle (contendo 0,5% de DMSO). Contudo, na concentração de 0,8  $\mu\text{M}$  ocorre um pequeno aumento na porcentagem de células na fase sub- $G_1$ . Já na concentração de 1  $\mu\text{M}$  verifica-se que o número de células na fase sub- $G_1$  aumenta consideravelmente, com relação ao controle. Além disso, ocorre uma diminuição do número de células na fase S, indicando que o complexo bloqueia as células na fase S, o que é muito importante, visto que é nesta fase que ocorre a síntese do DNA. Comportamento semelhante foi observado para o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  (Figura 54).

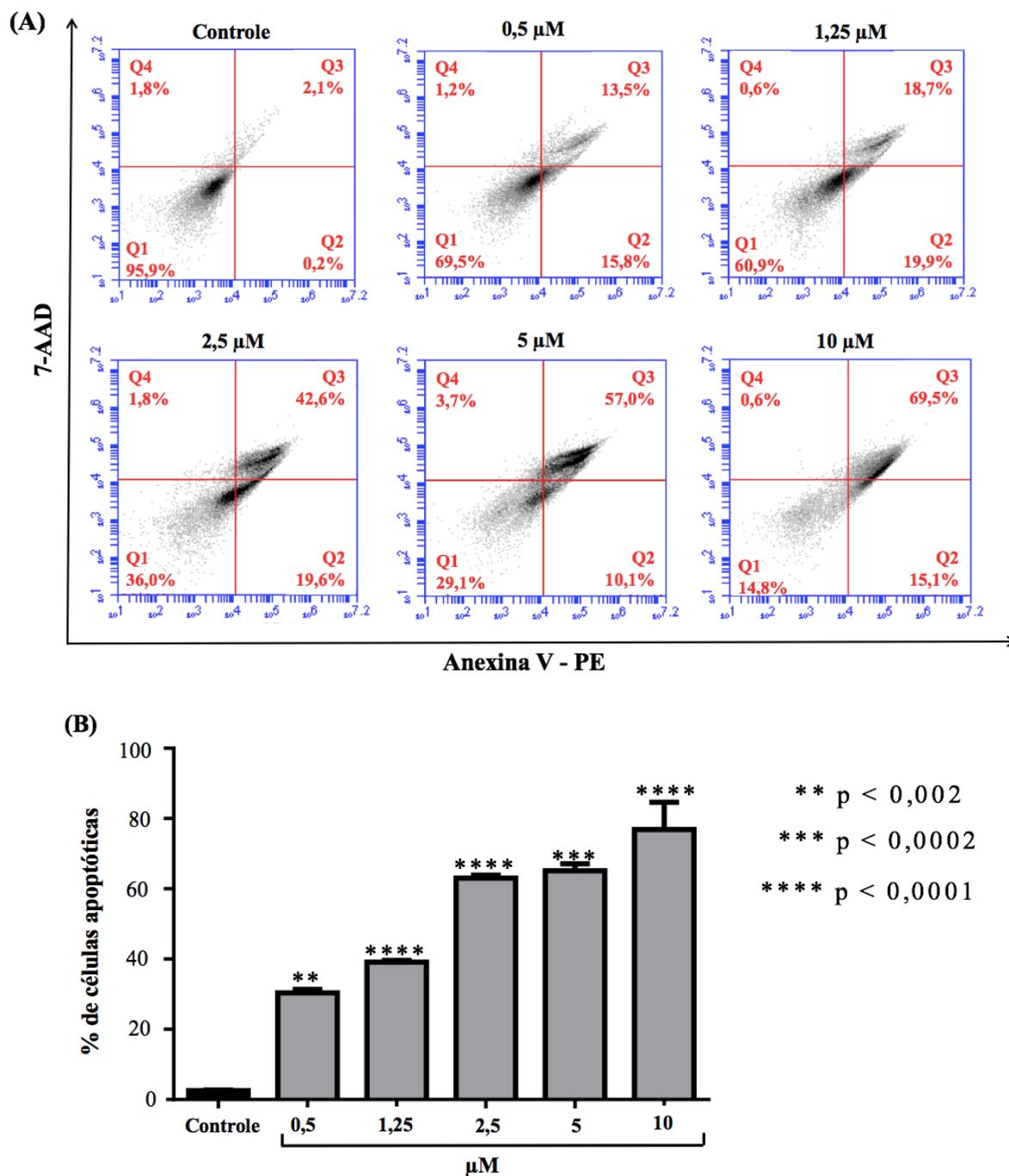
#### 4.10 Avaliação da morte celular por apoptose com Anexina V

Com o intuito de analisar o tipo de morte celular causada pelos complexos de rutênio realizou-se o ensaio empregando o kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit*, que permite distinguir se os complexos estão matando as células por apoptose ou necrose.

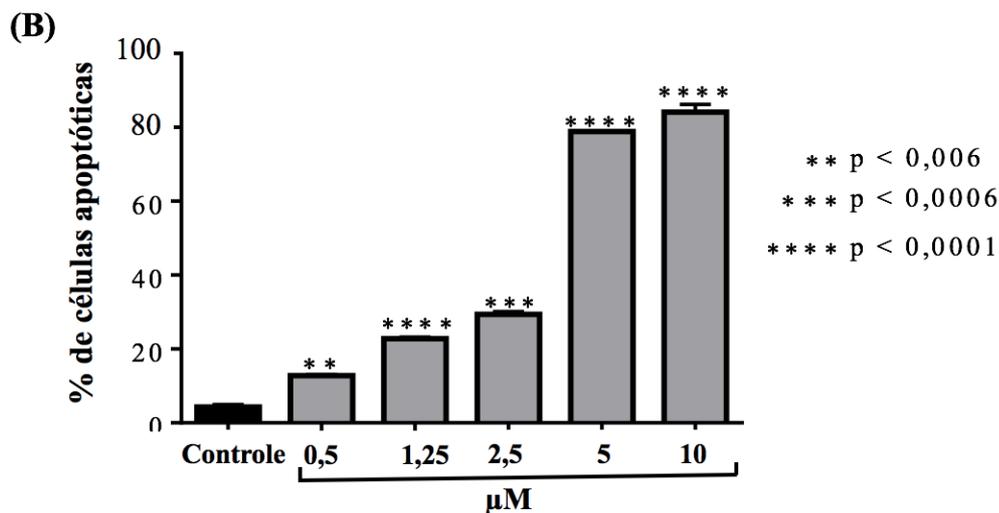
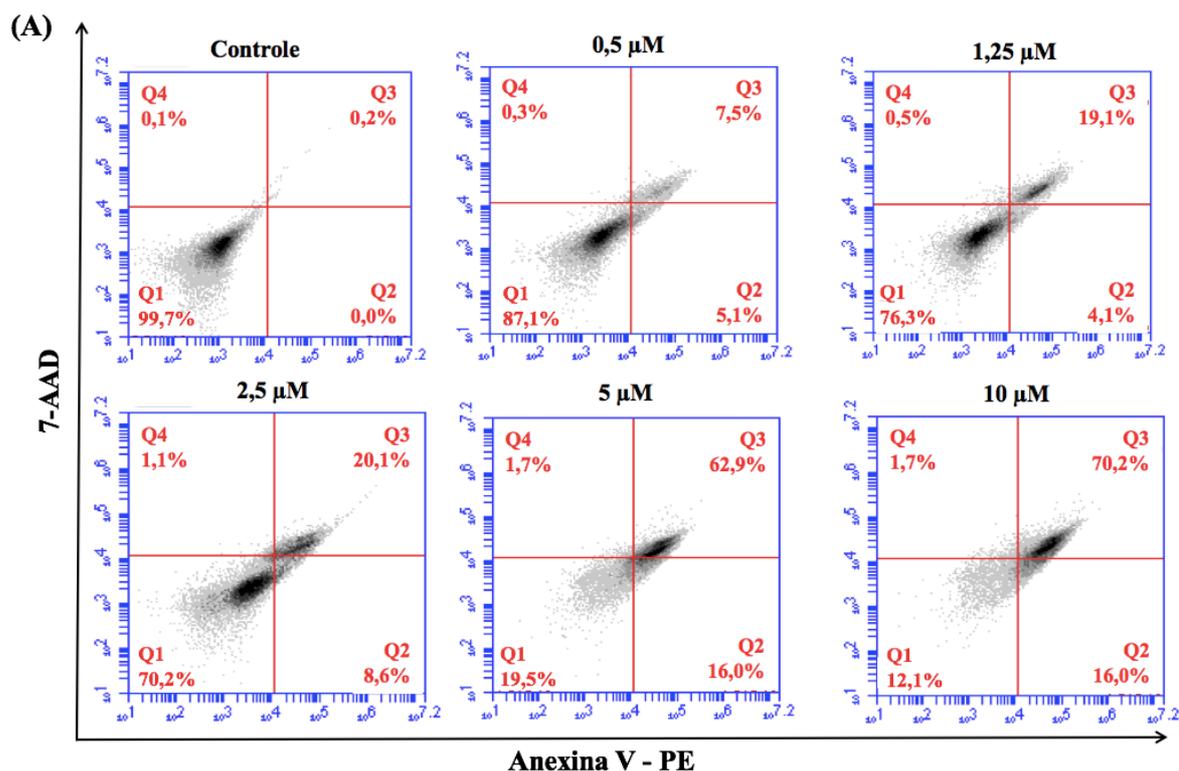
Neste ensaio as células da linhagem tumoral MDA-MB-231 foram tratadas com os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  nas concentrações de 0,5; 1,25; 2,5; 5 e 10  $\mu\text{M}$  por um período de 24 h. Em seguida foram utilizados dois corantes para fazer a marcação das células, a Anexina V - PE (proteína) e o 7-AAD (7-aminoactinomicina).

A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico que é mantido no lado citosólico das membranas celulares. Quando a célula está entrando em apoptose ocorre a externalização da fosfatidilserina. A Anexina V - PE apresenta a capacidade de se ligar à fosfatidilserina, gerando um sinal fluorescente. O 7-AAD é um composto que apresenta a capacidade de se intercalar ao DNA. Dessa forma, quando a membrana celular está comprometida, o 7-AAD permeabiliza e se intercala no DNA, emitindo uma fluorescência que pode ser detectada por citometria de fluxo.

Nas Figuras 55 e 56 são apresentados os gráficos que mostram o efeito dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.



**FIGURA 55 - (A)** Efeitos do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  na indução de apoptose nas células tumorais de mama MDA-MB-231. **(B)** Gráfico da porcentagem de células apoptóticas. \*\*  $p < 0,002$ , \*\*\*  $p < 0,0002$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**FIGURA 56** - (A) Efeitos do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  na indução de apoptose nas células tumorais de mama MDA-MB-231. (B) Gráfico da porcentagem de células apoptóticas. \*\* p < 0,006, \*\*\* p < 0,0006 e \*\*\*\* p < 0,0001.

Analisando as imagens do efeito dos complexos sobre a linhagem MDA-MB-231, verifica-se que as células representadas nas Figuras 55 e 56, estão contidas em gráficos que apresentam quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4). As células contidas no Q1 são células vivas, as contidas no Q2 estão em

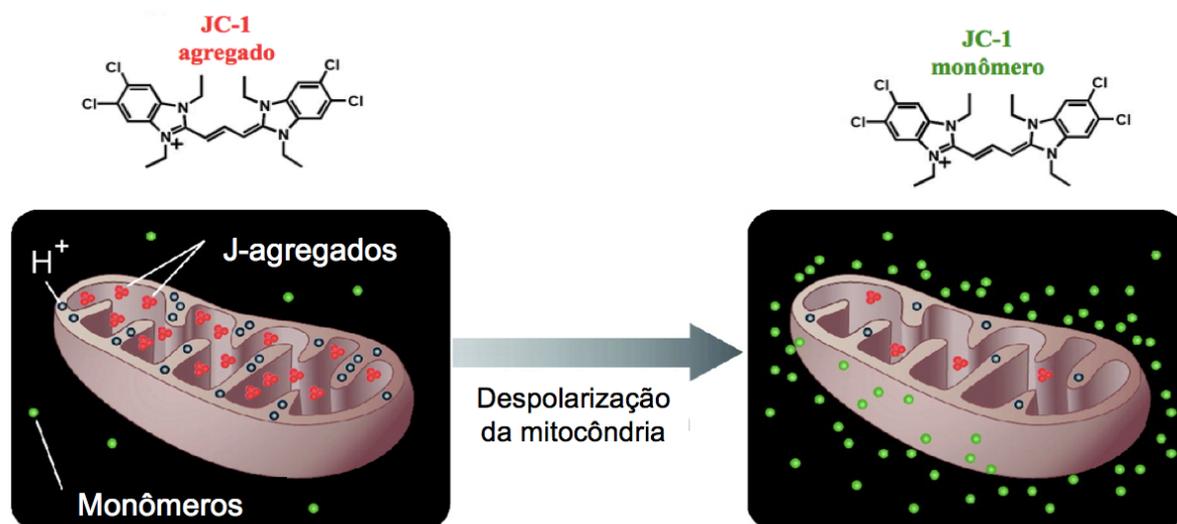
apoptose recente, Q3 em apoptose tardia, e as células em Q4, estão em necrose. Dessa forma verifica-se que a medida que aumenta a concentração dos complexos de rutênio aumenta a porcentagem de células nos quadrantes Q2 e Q3, com correspondente diminuição de células vivas. Sendo assim, pode-se dizer que os complexos induzem à apoptose, se comparado ao controle (contendo 0,5% de DMSO). Analisando os dois complexos na concentração de 5  $\mu$ M verifica-se que 67,1% e 86,2% das células estão em apoptose para os complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , respectivamente. Frente ao exposto pode-se dizer que ambos complexos são capazes de induzir a morte das células MDA-MB-231 por apoptose, e ainda que o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  apresenta uma maior capacidade de induzir apoptose do que o complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ .

#### 4.11 Análise do potencial de membrana da mitocôndria

A mitocôndria é uma organela conhecida como a fábrica de energia celular, sendo responsável pela produção de ATP e metabólitos necessários para as demandas celulares. Essas organelas são alvos no processo de tratamento do câncer, tendo em vista que grande parte dos processos relacionados com a apoptose ocorrem nas mitocôndrias, como por exemplo, a liberação do citocromo c, mudanças no transporte de elétrons e a despolarização do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Sendo assim, o potencial de membrana mitocondrial é um importante parâmetro para indicar se as células estão saudáveis ou não. Uma diminuição desse potencial indica um funcionamento anormal da mitocôndria, o que pode ocasionar a morte celular<sup>131</sup>.

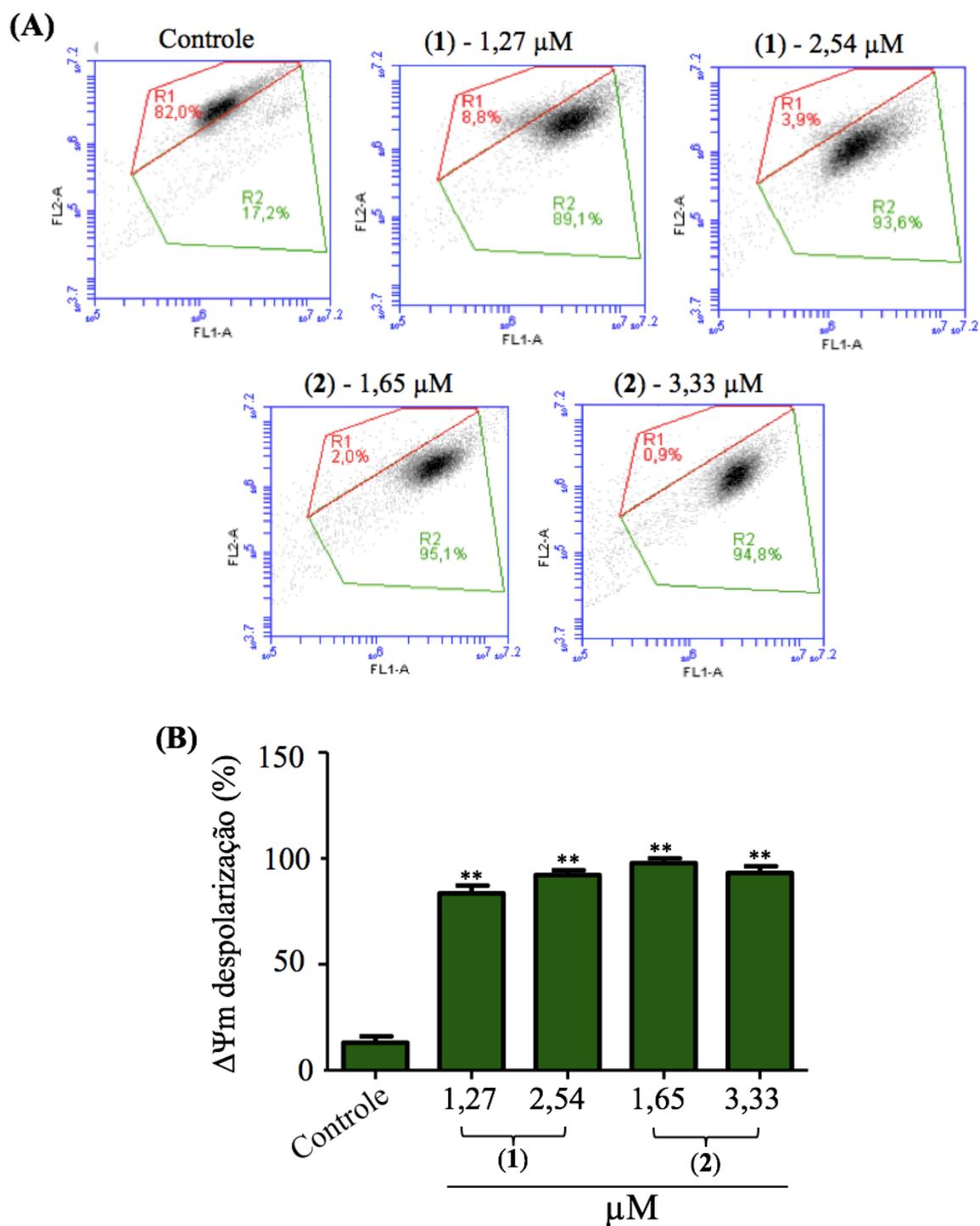
Nesse sentido, o potencial de membrana mitocondrial das células MDA-MB-231, tratadas com os complexos de rutênio, foi analisado por citometria de fluxo empregando o corante catiônico JC-1, o qual apresenta a habilidade de acumular dentro da mitocôndria devido à sua natureza catiônica e

lipofílica, podendo ser quantificado pela mudança de fluorescência, do verde para o vermelho. Em células saudáveis a mitocôndria apresenta alto potencial mitocondrial, e o corante JC-1 forma agregados com intensa coloração vermelha. Por outro lado, em células não saudáveis, iniciando o processo de apoptose, o potencial mitocondrial é baixo, e o JC-1 permanece na forma monomérica, apresentando uma alta fluorescência verde (Figura 57)<sup>132</sup>.



**FIGURA 57** - Representação esquemática da acumulação do JC-1 em células saudáveis, com o potencial de membrana da mitocôndria intacto (JC-1 agregado) e em células com alteração no potencial de membrana da mitocôndria (JC-1 monômero).

As células MDA-MB-231 foram tratadas com os complexos de rutênio, nas concentrações do  $IC_{50}$  de 24 h e duas vezes esse valor, por um período de 4 h e foram analisadas por citometria de fluxo usando os canais FL1 (530 nm) e FL2 (585 nm). Na Figura 58 são apresentados os gráficos de distribuição das células MDA-MB-231 após o tratamento com os complexos (1)  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  e (2)  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  e incubação com a sonda fluorescente JC-1.



**FIGURA 58** - (A) Gráfico da distribuição das células com potencial de membrana da mitocôndria sem alteração (R1) e alterado (R2), utilizando como sonda o corante JC-1 em células MDA-MB-231 tratadas com os complexos (1)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e (2)  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e (B) Gráfico da porcentagem de células que tiveram o potencial de membrana da mitocôndria alterado (em R2) em função da concentração dos complexos. \*\*  $p < 0,004$

De acordo com a Figura 58 as células MDA-MB-231 representadas em R1 são as células com o potencial de membrana da mitocôndria intacta, enquanto que as células em R2 são as células com o potencial de membrana alterado. Observa-se que as células tratadas com os complexos de rutênio apresentaram uma elevada alteração no potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle negativo (células contendo 0,5% de DMSO), saindo de uma população de 17,2% no controle negativo, e indo para 89,1% e 93,6% para as células tratadas com 1,27 e 2,54  $\mu\text{M}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , respectivamente, e 95,1% e 94,8% para células tratadas com 1,65 e 3,33  $\mu\text{M}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , respectivamente. Dessa forma é possível concluir que os complexos são capazes de diminuir o potencial de membrana da mitocôndria em todas as concentrações avaliadas, evidenciando uma via apoptótica desencadeada por ativação de sinais mitocondriais.

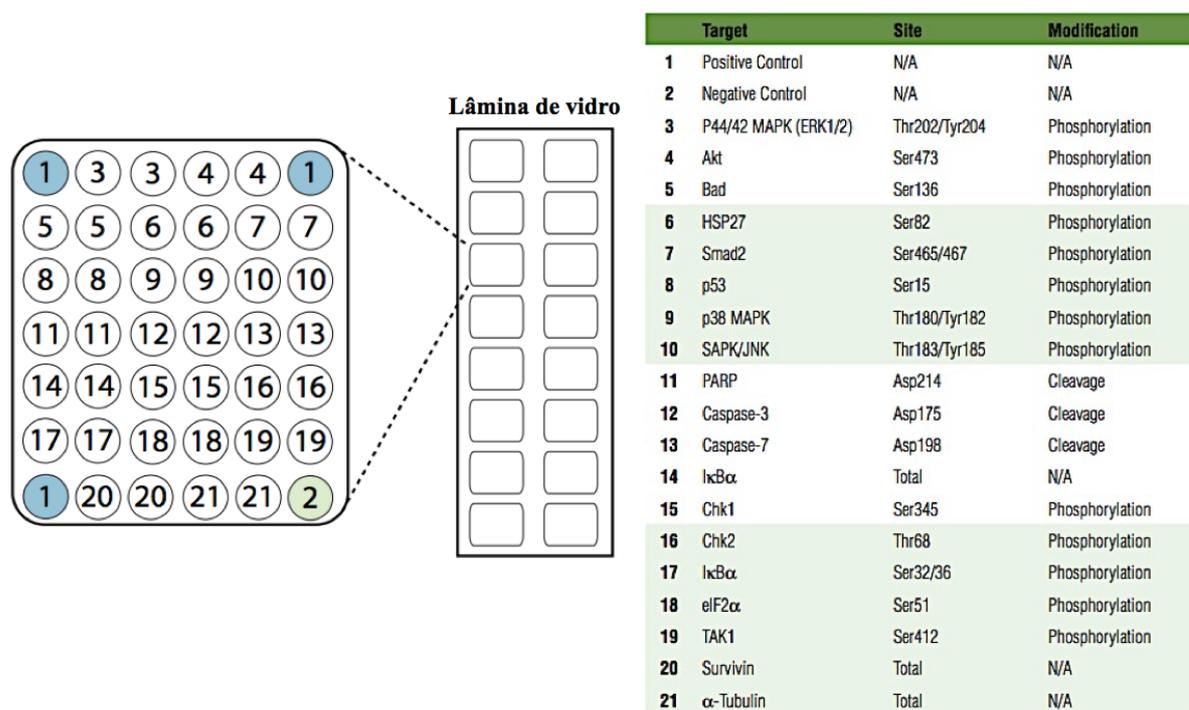
#### 4.12 *Apoptosis Array*

A morte celular é um processo que pode ocorrer por várias circunstâncias, tais como a falta de nutrientes, a incapacidade de gerar ou armazenar energia para as funções metabólicas, além de danos irreparáveis ao funcionamento do sistema. Antes de iniciar os caminhos pró ou anti-apoptóticos, as células integram vários sinais de uma variedade de fontes, que levam a morte celular. Uma maneira de analisar esse efeito é pelo monitoramento de mudanças em vários componentes de sinalização, pois quando as células são expostas a diferentes estresses ambientais, várias vias de sinalizações são ativadas. Algumas dessas vias são responsáveis por promover a sobrevivência celular, e outras, por iniciar a morte celular.

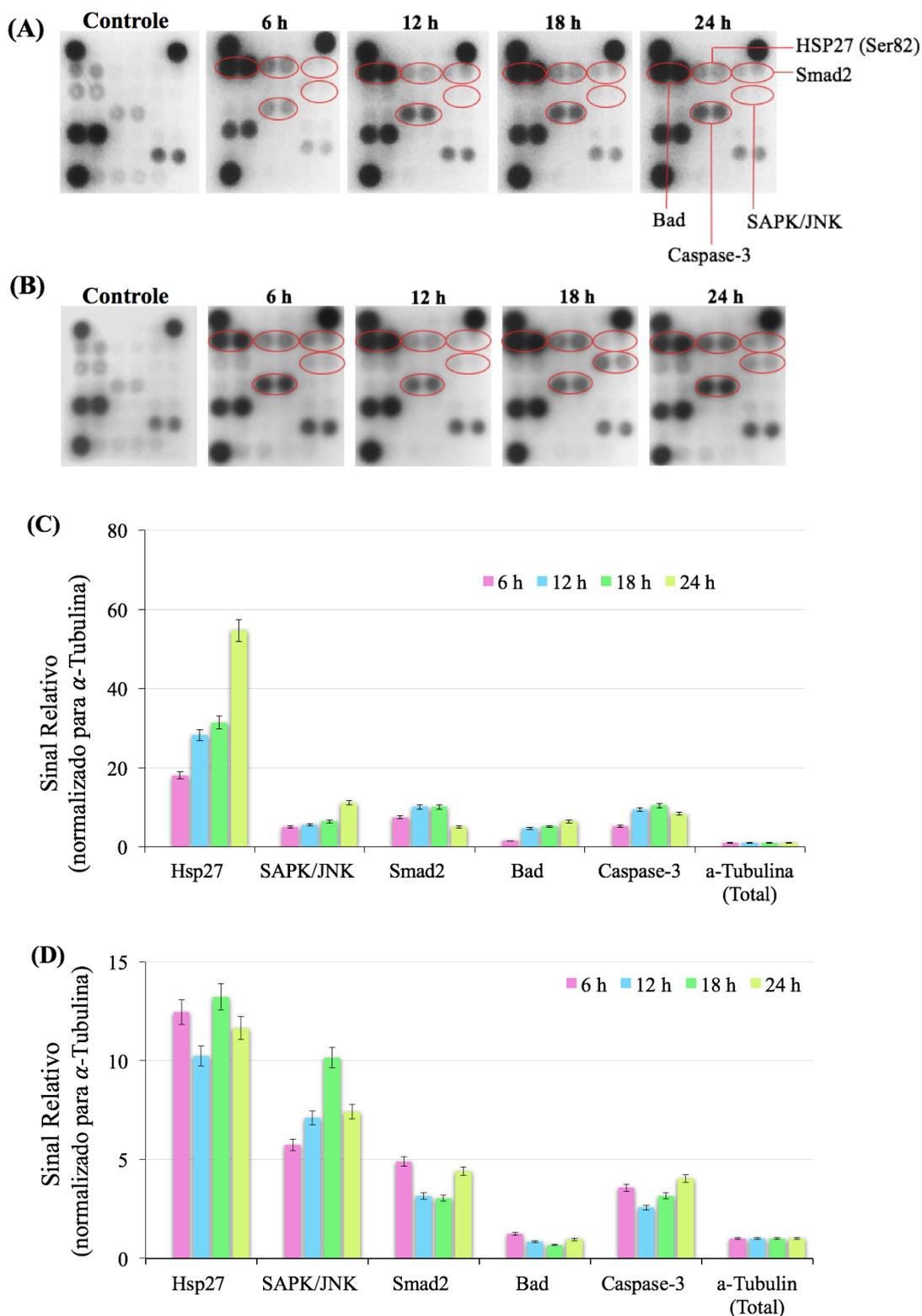
Diante disso, realizou-se o ensaio de *apoptosis array* com o intuito de investigar o efeito dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  nas vias de sinalização apoptóticas. Para isso

empregou-se o kit *PathScan Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array*, que permite a análise simultânea de 19 moléculas de sinalização que estão envolvidas na regulação da resposta ao estresse e apoptose, conforme esquematizado na Figura 59.

As células MDA-MB-231 foram tratadas com 5  $\mu$ M dos complexos  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , por tempos de 6, 12, 18 e 24 h. Na Figura 60 são apresentados os resultados obtidos, com destaque para as moléculas que tiveram modificações mais significativas, que foram a Hsp27 (Ser82), Bad (Ser136), caspase 3 (Asp175), SAPK/JNK (Thr183/Tyr182) e Smad2 (Ser465/467).



**FIGURA 59** - Imagem representativa da lâmina de vidro e mapa das 19 moléculas de sinalização analisados pelo kit PathScan.



**FIGURA 60** - Análise da modificação de moléculas envolvidas nas vias de sinalização apoptótica em células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com os complexos de rutênio  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  (A, C) e  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  (C, D) e quantificação por densitometria empregando o ImageJ. A expressão dos níveis de  $\alpha$ -Tubulina foram usados para normalizar os sinais. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

A caspase-3, protease pró-apoptótica, é ativada pela clivagem em Asp175 e pode ser observado neste ensaio modificações para essa protease em células MDA-MB-231 tratadas com os dois complexos analisados. Já a Hsp27 é um mediador do estresse celular que está diretamente relacionada com a proteção da estrutura e função das proteínas celulares de danos oriundos de fatores tais como radicais livres, aquecimento, toxinas, entre outros. A expressão desta proteína está relacionada com condições letais, o que é comum quando as células apresentam algum estresse<sup>133,134</sup>. A Hsp27 é ativada pela fosforilação em Ser82, e como observado na Figura 60, houve modificação nos sinais referente a fosforilação em Ser82 para ambos complexos.

As proteínas da família Bcl-2 são caracterizadas pela habilidade de controlar a via mitocondrial. Esta família inclui proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bad) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL). As proteínas pró-apoptóticas são capazes de induzir a formação de poros na membrana externa das mitocôndrias, que permite a liberação do citocromo c no citoplasma e assim ativar a cascata apoptótica<sup>135</sup>. Como observado na Figura 60 houve uma modificação nos níveis de Bad (Ser136) diretamente proporcional ao tempo de tratamento para os dois complexos, quando comparado com o controle.

Nas células tratadas com o complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> observou-se a fosforilação no resíduo Ser465/467 da Smad2. Esta proteína pertence à família de proteínas que estão envolvidas no processo de regulação de múltiplos processos celulares, como proliferação, apoptose e diferenciação.

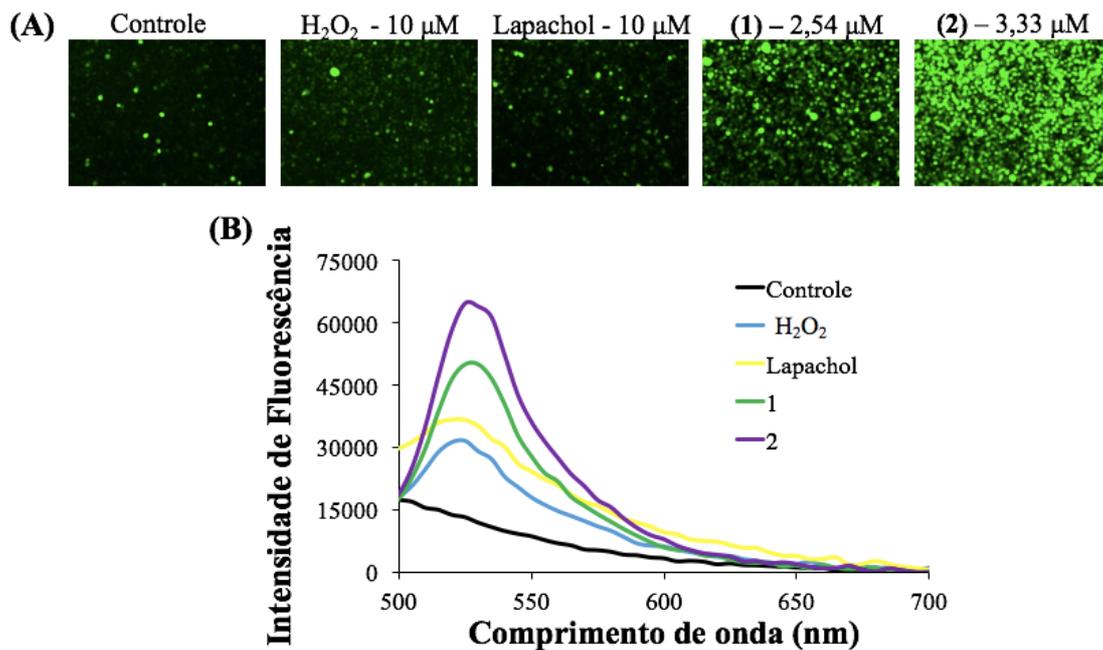
Observou-se também modificações nos níveis de fosforilação da SAPK/JNK (Thr183/Tyr185). SAPK/JNK pertence a família das MAPK (Proteína-quinases ativadas por mitógenos), as quais exercem importantes funções no processo de proliferação celular e apoptose, entre outros<sup>136</sup>.

#### 4.13 Análise da formação de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser geradas pelo metabolismo normal ou por exposição xenobiótica. ROS são envolvidos em muitos processos fisiológicos, por exemplo, como mediadores na transdução de sinais, na ativação da tirosina quinase, entre outros. Contudo, um excesso de ROS pode causar estresse oxidativo e desencadear a ativação da sinalização apoptótica, causando a morte celular.

Neste contexto, a habilidade dos complexos de rutênio induzirem a formação de ROS em células MDA-MB-231 foi investigada. Para isso, empregou-se como sonda o 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), o qual exibe uma fluorescência verde após a clivagem do grupo acetato, por ROS, produzindo o composto fluorescente, nomeado de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Nesse sentido, esse corante foi utilizado para quantificar os ROS gerados nas células MDA-MB-231, as quais foram tratadas com os complexos nas concentrações de 2 × IC<sub>50</sub> de 24 h, por um período de 4 h. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi empregado como controle positivo, bem como o lapachol livre, para efeitos de comparação com os complexos.

Os níveis de ROS intracelular foram medidos por fluorescência e os resultados obtidos são apresentados na Figura 61. As células MDA-MB-231, quando expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ao lapachol, demonstraram uma significativa fluorescência verde em relação ao controle negativo. Contudo, após a exposição das células aos complexos de rutênio, um aumento considerável de fluorescência foi observado, principalmente para o caso do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub>. Nesse sentido, pode-se afirmar que os complexos de rutênio são capazes de induzir a formação de ROS e que o estresse oxidativo é um plausível mecanismo de morte celular causado pelos complexos.



**FIGURA 61** - Indução de ROS em células MDA-MB-231. (A) Imagens representativas das células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lapachol e os complexos de rutênio (1) [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>PF<sub>6</sub> e (2) [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e (B) fluorescência detectada para células em presença dos tratamentos.

## 5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões:

✓ Foram sintetizados e caracterizados sete novos complexos de rutênio contendo as naftoquinonas lapachol ou lausona, bem como ligantes bifosfínicos e bipyridina, com as seguintes fórmulas gerais:  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$ , onde L = lapachol ou lausona, P-P = dppm = *bis*(difenilfosfina)metano, dppe = 1,2'-*bis*(difenilfosfina)etano, dppf = 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno e bipy = 2,2'-bipyridina.

✓ Observou-se a formação de isômeros para os complexos com fórmula geral  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P-P})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , onde L = lapachol ou lausona, P-P = dppe = 1,2'-*bis*(difenilfosfina)etano, dppf = 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno e bipy = 2,2'-bipyridina. Um dos isômeros apresenta o átomo de oxigênio da carbonila dos ligantes lapachol ou lausona *trans* ao átomo de fósforo da bifosfina, e o outro apresenta o oxigênio da hidroxila *trans* ao átomo de fósforo. A formação dos isômeros foi evidenciada pela técnica de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , pela duplicação dos sinais referentes aos fósforos, hidrogênios e carbonos dos complexos. Durante a síntese do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foi possível isolar os isômeros, e foi obtido um monocristal para o isômero contendo o átomo de oxigênio da hidroxila *trans* ao fósforo. Durante a síntese de um outro complexo contendo a bifosfina dppb,  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , obteve-se o monocristal do isômero contendo o átomo de oxigênio da carbonila *trans* ao fósforo.

✓ Foram realizados estudos de interação dos complexos com o DNA por meio das técnicas de titulação espectroscópica, dicroísmo circular, eletroforese

em gel de agarose e fluorescência. Observou-se que os complexos apresentam fraca interação com o DNA, com constantes de ligação da ordem de  $10^3 \text{ M}^{-1}$ . Os espectros de dicroísmo circular do DNA, na presença de diferentes concentrações dos complexos, não sofreram alterações significativas. Nos ensaios por eletroforese em gel de agarose observou-se que para os complexos contendo o lapachol ocorre uma diminuição na intensidade das bandas circular, linear e superenovelada a partir da relação molar 0,4, com um completo desaparecimento das bandas nas relações molares 1 e 2. No entanto, os complexos contendo a lausona apresentaram um comportamento diferente, e não ocorreu o completo desaparecimento das bandas do DNA. A diferença estrutural existente entre os complexos é a presença da cadeia carbônica do lapachol, que influencia diretamente na interação com o DNA. Empregando a técnica de fluorescência, realizou-se o ensaio de competição com o Hoechst 33258, o qual é um corante que apresenta a capacidade de interagir pelos sulcos menores do DNA. Verificou-se que os complexos de rutênio são capazes de competir com o Hoechst, expulsando-o da estrutura do DNA, e interagindo via sulcos menores do DNA.

✓ Estudou-se a interação dos complexos com a BSA empregando-se a técnica de fluorescência. Observou-se que os complexos apresentam uma moderada interação com a BSA, apresentando constantes de ligação da ordem de  $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Além disso, verificou-se que o processo de interação ocorre de forma espontânea, como observado pelos valores negativos de  $\Delta G^\circ$ , e ainda que os complexos contendo as bifosfinas dppm e dppe apresentam o envolvimento de interações hidrofóbicas, e para os complexos contendo a bifosfina dppf predominam as interações eletrostáticas.

✓ Avaliou-se a citotoxicidade dos complexos frente às linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), pulmão (A549), próstata (DU-

145) e frente às não tumorais de mama (MCF-10A) e fibroblasto de gengiva humana (FGH). Todos os complexos foram citotóxicos frente as linhagens estudadas, apresentando valores de  $IC_{50}$  inferiores aos dos complexos precursores, dos ligantes livres, e da cisplatina, usada como referência. Os complexos  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  e  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  mostraram-se seletivos à linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, se comparado aos resultados obtidos para a linhagem celular não tumoral de mama, MCF-10A. Além disso, foram mais seletivos à MDA-MB-231, do que para a MCF-7, o que é importante tendo em vista que a linhagem MDA-MB-231 é triplo negativa, tratando-se de um tipo de tumor mais agressivo e metastático. Diante desses resultados, os complexos  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  e  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  foram selecionados para o estudo do possível mecanismo de ação. Analisando ainda a influência dos diferentes ligantes bifosfínicos na citotoxicidade dos complexos, verificou-se que a mesma foi aumentada com o aumento do número de bifosfinas coordenadas, ou seja, os complexos contendo duas bifosfinas foram mais citotóxicos do que os contendo apenas uma bifosfina, o que pode estar relacionado com o aumento da lipofilicidade e conseqüentemente maior facilidade em atravessar a membrana celular.

✓ Os complexos  $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$  e  $[Ru(lap)(dppm)_2]PF_6$  alteram a morfologia das células MDA-MB-231 e MCF-10A, apresentando maior efeito sobre as células MDA-MB-231. Além disso, foram capazes de inibir a formação de colônias nas células MDA-MB-231 em concentrações superiores ao  $IC_{50}$ , sendo que nas concentrações do  $IC_{50}$ , o número de colônias e os seus tamanhos foram significativamente reduzidos, em comparação com o controle.

✓ Empregando-se os ensaios de migração por *Wound Healing* e migração quimiotática, verificou-se que os complexos são capazes de inibir a migração das células MDA-MB-231. Os complexos apresentaram efeitos na formação de

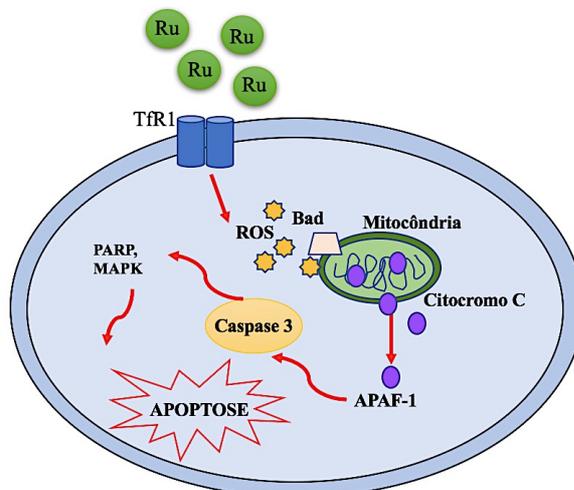
tubos em células do tipo HUVEC, inibindo significativamente o número e tamanho dos tubos formados, em células tratadas ou não com o fator de crescimento FGF-2. Dessa forma, pode-se afirmar que os complexos apresentam propriedades antimetastáticas e antiangiogênicas.

✓ Análise da internalização dos complexos, empregando a técnica de ICP-MS mostrou que os complexos apresentam uma maior acumulação nas células MDA-MB-231, do que nas células MCF-10A, de acordo com a seletividade observada no ensaio de citotoxicidade. Para investigar se a acumulação dos complexos tem relação com a interação com glicosaminoglicanos, realizou-se o ensaio de competição com o TAMRA-R<sub>9</sub>. Contudo, verificou-se que os complexos não competem com o TAMRA-R<sub>9</sub>. Ensaio de acumulação celular empregando as células CHO-K1 e CHO-pgsA745 (deficiente em HS), mostrou que não há diferenças significativas na acumulação de rutênio nessas duas células, confirmando que a acumulação celular não é dependente da interação com o heparan sulfato.

✓ Análise do ciclo celular de células MDA-MB-231 tratadas com os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> mostrou que eles são capazes de alterar o ciclo celular, aumentando a porcentagem de células na fase Sub-G<sub>1</sub>, e diminuir consideravelmente o número de células na fase S.

✓ Os complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> induziram a morte celular por apoptose, causaram a despolarização do potencial de membrana da mitocôndria, causaram modificações nos resíduos das proteínas Hsp27, Bad, caspase 3, SAPK/JNK e Smad2. E por fim, induziram a formação de espécies reativas de oxigênio nas células MDA-MB-231.

Diante dessas informações pode-se propor o seguinte resumo da atuação dos complexos de rutênio nas células MDA-MB-231:



Pode-se afirmar que os complexos de rutênio contendo as naftoquinonas lapachol ou lausona são promissores candidatos a quimioterapia do câncer de mama do tipo triplo negativo. Faz-se necessário a realização de mais estudos com esses complexos para avaliar o potencial *in vivo*, além de investigar a toxicidade dos mesmos.

## 6 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> acessado em 28 de junho de 2017.
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018-Incidência de Câncer No Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>> acessado em 10 de março de 2018.
3. NCI - National Cancer Institute. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/>> acessado em 20 de janeiro de 2017.
4. WIDSCHWENDTER, M.; JONES, A.; EVANS, I.; REISEL, D.; DILLNER, J.; SUNDSTRÖM, K.; STEYERBERG, E. W.; VERGOUWE, Y.; WEGWARTH, O.; REBITSCHKE, F. G.; SIEBERT, U.; SROCZYNSKI, G.; DE BEAUFORT, I. D.; BOLT, I.; CIBULA, D.; ZIKAN, M.; BJØRGE, L.; COLOMBO, N.; HARBECK, N.; DUDBRIDGE, F.; TASSE, A.-M.; KNOPPERS, B. M.; JOLY, Y.; TESCHENDORFF, A. E.; PASHAYAN, N. "Epigenome-based cancer risk prediction: rationale, opportunities and challenges". *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, In press, 2018.
5. UMAR, A.; DUNN, B. K.; GREENWALD, P. "Future directions in cancer prevention". *Nat. Rev. Cancer.*, **12** (12): 835, 2012.
6. BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. "Tumorigenesis and the angiogenic switch". *Nat. Rev. Cancer.*, **3** (6): 401, 2003.
7. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell.*, **144** (5): 646, 2011.
8. HAHN, W.; WEINBERG, R. "Rules for making human tumor cells". *Nejm.*, **347** (20): 1593, 2002.
9. BODENSTINE, T. M.; WELCH, D. R. "Metastasis suppressors and the tumor microenvironment". *Cancer Microenviron.*, **1** (1): 1, 2008.
10. MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. "Metastatic colonization by circulating tumour cells". *Nature.*, **529** (7586): 298, 2016.
11. FIDLER, I. J. "Timeline: the pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited". *Nat. Rev. Cancer.*, **3** (6): 453, 2003.
12. MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. "Metastasis: a question of life or death". *Nat. Rev. Cancer.*, **6** (6): 449, 2006.
13. CARMELIET, P. "Angiogenesis in life, disease and medicine". *Nature.*, **438** (7070): 932, 2005.
14. PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis". *AJP Cell Physiol.*, **282** (5): C947, 2008.

15. YANCOPOULOS, G. D.; DAVIS, S.; GALE, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; HOLASH, J. "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation". *Nature.*, **407** (6801): 242, 2000.
16. POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. "Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications". *Tumor Biol.*, **37** (11): 14479, 2016.
17. American Cancer Society. Disponível em <<http://www.cancer.org>>, acessado em 15 de Dezembro de 2017.
18. ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K. M.; BØRRESEN-DALE, A.-L. "Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets". *Am. J. Pathol.*, **183** (4): 1064, 2013.
19. WEIGELT, B.; MACKAY, A.; A'HERN, R.; NATRAJAN, R.; TAN, D. S. P.; DOWSETT, M.; ASHWORTH, A.; REIS-FILHO, J. S. "Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis". *Lancet Oncol.*, **11** (4): 339, 2010.
20. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>, acessado em 10 de Março de 2018.
21. VICI, P.; PIZZUTI, L.; NATOLI, C.; GAMUCCI, T.; DI LAURO, L.; BARBA, M.; SERGI, D.; BOTTI, C.; MICHELOTTI, A.; MOSCETTI, L.; MARIANI, L.; IZZO, F.; D'ONOFRIO, L.; SPERDUTI, I.; CONTI, F.; ROSSI, V.; CASSANO, A.; MAUGERI-SACCÀ, M.; MOTTOLESE, M.; MARCHETTI, P. "Triple positive breast cancer: a distinct subtype?". *Cancer Treat. Rev.*, **41** (2): 69, 2015.
22. JOHNSTON, S.; PIPPEN, J.; PIVOT, X.; LICHINITSER, M.; SADEGHI, S.; DIERAS, V.; GOMEZ, H. L.; ROMIEU, G.; MANIKHAS, A.; KENNEDY, M. J.; PRESS, M. F.; MALTZMAN, J.; FLORANCE, A.; O'ROURKE, L.; OLIVA, C.; STEIN, S.; PEGRAM, M. "Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor - positive metastatic breast cancer". *J. Clin. Oncol.*, **27** (33): 5538, 2009.
23. PERRIER, A.; GLIGOROV, J.; LEFÈVRE, G.; BOISSAN, M. "The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer". *Lab. Investig.*, In press, 2018.
24. WAHBA, H. A.; EL-HADAAD, H. A. "Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer". *Cancer Biol. Med.*, **12** (2): 106, 2015.
25. ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. "Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode". *Nature.*, **205** (4972): 698, 1965.
26. KELLAND, L. "The Resurgence of platinum-based cancer chemotherapy". *Nat. Rev. Cancer.*, **7** (8): 573, 2007.
27. KAUFFMAN, B.; COWAN, D. O.; SLUSARCZUK, G.; KIRSCHNER, S. "Cis and trans-dichlorodiammineplatinum(II)". *Inorg. Synth.*, **7**: 239, 1963.

28. SHALOAM, D.; TCHOUNWOU, P. B. "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action". *Eur. J. Pharmacol.*, **740**: 364, 2014.
29. ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents". *Nature.*, **222** (5191): 385, 1969.
30. ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. "The discovery and development of cisplatin". *J. Chem. Educ.*, **83** (5): 728, 2006.
31. BRABEC, V.; HRABINA, O.; KASPARKOVA, J. "Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents". *Coord. Chem. Rev.*, **351**: 2, 2017.
32. KELLAND, L. R.; ABEL, G.; MCKEAGE, M. J.; JONES, M.; GODDARD, P. M.; VALENTI, M.; MURRER, B. A.; HARRAP, K. R. "Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum (IV): an orally active platinum drug preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum (IV): an orally active platinum drug". *Cancer Res.*, **53** (11): 2581, 1993.
33. BHARGAVA, A.; VAISHAMPAYAN, U. N. "Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents". *Expert Opin. Investig. Drugs.*, **18** (11): 1787, 2009.
34. WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. "The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials". *Dalt. Trans.*, **39** (35): 8113, 2010.
35. BRABEC, V.; KAŠPÁRKOVÁ, J.; VRÁNA, O.; NOVÁKOVÁ, O.; COX, J. W.; QU, Y.; FARRELL, N. DNA "Modifications by a Novel Bifunctional Trinuclear Platinum Phase I Anticancer Agent". *Biochemistry.*, **38** (21): 6781, 1999.
36. FARRELL, N. P. "Multi-platinum anti-cancer agents. substitution-inert compounds for tumor selectivity and new targets". *Chem. Soc. Rev.*, **44**: 8773, 2015.
37. LIANG, J.-X.; ZHONG, H.-J.; YANG, G.; VELLAISAMY, K.; MA, D.-L.; LEUNG, C.-H. "Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity". *J. Inorg. Biochem.*, **177**: 276, 2017.
38. BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H.; SAVA, G. "Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates". *J. Inorg. Biochem.*, **106** (1): 90, 2012.
39. MONTI-BRAGADIN, C.; RAMANI, L.; SAMER, L.; MESTRONI, G.; ZASSINOVICH, G. "Effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II) and related transition metal complexes on Escherichia Coli". *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **7** (6): 825, 1975.
40. DURIG, J. R.; DANNEMAN, J.; BEHNKE, W. D.; MERCER, E. E. "The induction of filamentous growth in Escherichia Coli by ruthenium and palladium complexes". *Chem. Biol. Interact.*, **13** (3-4): 287, 1976.
41. TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W.; KEPPLER, B. K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application". *Chem. Sci.*, **5** (8): 2925, 2014.

42. SCHOENHACKER-ALTE, B.; MOHR, T.; PIRKER, C.; KRYEZI, K.; KUHN, P. S.; BUCK, A.; HOFMANN, T.; GERNER, C.; HERMANN, G.; KOELLENSPERGER, G.; KEPPLER, B. K.; BERGER, W.; HEFFETER, P. "Sensitivity towards the GRP78 inhibitor KP1339/IT-139 is characterized by apoptosis induction via caspase 8 upon disruption of ER homeostasis". *Cancer Lett.* **404**: 79, 2017.
43. LEIJEN, S.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN WERKHOVEN, E.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. "Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy". *Invest. New Drugs.* **33** (1): 201, 2015.
44. HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J. "Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications". *Chem. Soc. Rev.* **38** (2): 391, 2009.
45. ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; ELLIS, D. J.; HEATH, S. L. "[Ru( $\eta^6$ -P-cymene)Cl<sub>2</sub>(pta)] (Pta = 1,3,5-Triaza-7-phosphatricyclo[3.3.1.1]decane): A water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells". *Chem. Commun.*, **2** (15): 1396, 2001.
46. MORRIS, R. E.; AIRD, R. E.; MURDOCH, S.; CHEN, H.; CUMMINGS, J.; HUGHES, N. D.; PARSONS, S.; PARKIN, A.; BOYD, G.; JODRELL, D. I.; SADLER, P. J. "Inhibition of cancer cell growth by ruthenium (II) arene complexes". *J. Med. Chem.*, **44** (22): 3616, 2001.
47. HABTEMARIAM, A.; MELCHART, M.; FERNÁNDEZ, R.; PARSONS, S.; OSWALD, I. D. H.; PARKIN, A.; FABBIANI, F. P. A.; DAVIDSON, J. E.; DAWSON, A.; AIRD, R. E.; JODRELL, D. I.; SADLER, P. J. "Structure-activity relationships for cytotoxic ruthenium(II) arene complexes containing N,N-, N,O-, and O,O-chelating ligands". *J. Med. Chem.*, **49** (23): 6858, 2006.
48. AL, E. T.; CHAN, K.; JENSEN, N.; BRIEN, P. J. O. "Structure – activity relationships for thiol reactivity and rat or human hepatocyte toxicity induced by substituted P-benzoquinone compounds". *J. Appl. Toxicol.*, **28**: 608, 2008.
49. DE CASTRO, S. L.; EMERY, F. S.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. "Synthesis of quinoidal molecules: strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones". *Eur. J. Med. Chem.*, **69**: 678, 2013.
50. CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. "Impact of natural products on developing new anti-cancer agents". *Chem Rev.*, **109**: 3012, 2009.
51. JORDÃO, A. K.; VARGAS, M. D.; PINTO, A. C.; DA SILVA, F. DE C.; FERREIRA, V. F. "Lawsone in Organic Synthesis". *RSC Adv.*, **5** (83): 67909, 2015.
52. WELLINGTON, K. W. "Understanding Cancer and the Anticancer Activities of Naphthoquinones – a Review". *RSC Adv.*, **5** (26): 20309, 2015.
53. SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F. .; SOUZA, M. C. B. V. DE. "Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados". *Quim. Nova.*, **26** (3): 407, 2003.

54. HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R. "Lapachol: an overview". *Arkivoc.*, **2**: 145, 2007.
55. MAEDA, M.; MURAKAMI, M.; TAKEGAMI, T.; OTA, T. "Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **229** (2): 232, 2008.
56. TABRIZI, L.; CHINIFOROSHAN, H. "Designing new iridium(II) arene complexes of naphthoquinone derivatives as anticancer agents: a structure–activity relationship study". *Dalt. Trans.*, **46** (7): 2339, 2017.
57. INBARAJ, J. J.; CHIGNELL, C. F. "Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT Keratinocytes". *Chem. Res. Toxicol.*, **17** (1): 55, 2004.
58. HUANG, S. T.; KUO, H. S.; HSIAO, C. L.; LIN, Y. L. "Efficient synthesis of “redox-switched” naphthoquinone thiol-crown ethers and their biological activity evaluation". *Bioorganic Med. Chem.*, **10** (6): 1947, 2002.
59. DOS SANTOS, ALDENIR FEITOSA; FERRAZ, PATRICIA A. L.; DE ABREU, FABIANE CAXICO; CHIARI, ÉGLER; GOULART, MARÍLIA O. F.; SANTANA, A. E. G. "Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives". *Planta Med.*, **67** (1), 92, 2001.
60. SASAKI, K.; ABE, H.; YOSHIZAKI, F. "In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives". *Biol. Pharm. Bull.*, **25** (5): 669, 2002.
61. RODRIGUES DE ALMEIDA, E. "Preclinical and clinical studies of lapachol and beta-lapachone". *Open Nat. Prod. J.*, **2**: 42, 2009.
62. MCMILLAN, D. C.; SARVETE, S. D.; OATIS, J. E.; JOLLOW, D. J. "Role of oxidant stress in lawsone-induced hemolytic anemia". *Toxicol. Sci.*, **82** (2): 647, 2004.
63. MUHAMMAD., H. S.; MUHAMMAD, S. "The use of lawsonia inermis linn. (Henna) in the management of burn wound infections". *African J. Biotechnol.*, **4** (9): 934, 2005.
64. WELLINGTON, K. W. "Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review". *RSC Adv.*, **5** (26): 20309, 2015.
65. RENFREW, A. K. "Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery". *Metallomics.* **6**: 1324, 2014.
66. TABRIZI, L.; CHINIFOROSHAN, H. "Ruthenium(II) P-cymene complexes of naphthoquinone derivatives as antitumor agents: a structure - activity relationship study". *J. Organomet. Chem.*, **822**: 211, 2016.
67. KUBANIK, M.; KANDIOLLER, W.; KIM, K.; ANDERSON, R. F.; KLAPPROTH, E.; JAKUPEC, M. A.; ROLLER, A.; SÖHNEL, T.; KEPPLER, B. K.; HARTINGER, C. G. "Towards targeting anticancer drugs: ruthenium(II)– arene complexes with biologically active naphthoquinone-derived ligand systems". *Dalt. Trans.*, **45**: 13091, 2016.
68. BARBOSA, M. I. F.; CORRÊA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; RODRIGUES, C.;

- ELLENA, J.; NASCIMENTO, O. R.; ROCHA, V. P. C.; NONATO, F. R.; MACEDO, T. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOARES, M. B. P.; BATISTA, A. A. "Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes". *J. Inorg. Biochem.*, **136**: 33, 2014.
69. OLIVEIRA, K. M.; LIANY, L.-D.; CORRÊA, R. S.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis". *J. Inorg. Biochem.*, **176**: 66, 2017.
70. OLIVEIRA, K. M.; CORRÊA, R. S.; BARBOSA, M. I. F.; ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Ruthenium(II)/triphenylphosphine complexes: an effective way to improve the cytotoxicity of lapachol". *Polyhedron*. **130**: 108, 2017.
71. QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. "Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina". *Quim. Nova*. **19** (6): 651, 1996.
72. SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; OVERTON, T. L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A. *Química Inorgânica*, 4. ed.-P.; 2006.
73. POELHSITZ, G. VON. "Nitrosilo complexos de rutênio com ligantes bifosfínicos: espectroscopia, eletroquímica, estudo da reatividade e liberacao de NO", São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 284 p.
74. LIMA, B. A. V. Avaliação das atividades citotóxicas de alguns complexos fosfínicos de rutênio (células tumorais MDA-MB-231), São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Dissertação de mestrado, 207 p.
75. PRABHAKARAN, R.; KALAIVANI, P.; POORNIMA, P.; DALLEMER, F.; PARAMAGURU, G.; VIJAYA PADMA, V.; RENGANATHAN, R.; HUANG, R.; NATARAJAN, K. One pot synthesis of structurally different mono and dimeric Ni(II) thiosemicarbazone complexes and n-arylation on a coordinated ligand: a comparative biological study. *Dalt. Trans.* **41** (31): 9323, 2012.
76. SANTIAGO, M. O. Síntese, Caracterização E Seus Estudos Cinéticos Da Isomerização de Compostos de Ru(II) Contendo Ligantes (X-bipy)(X= -H, -NO<sub>2</sub>, -Me, -COOH, -SMe, O=SMe, -Cl, -OMe), São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de doutorado, 147 p.
77. LEE, W. Y. "Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence in analytical science". *Mikrochim. Acta*. **127**: 19, 1997.
78. BAI, G. Y.; WANG, K. Z.; DUAN, Z. M.; GAO, L. H. "Luminescent pH sensing and DNA binding properties of a novel ruthenium(II) complex". *J. Inorg. Biochem.* **98** (6): 1017, 2004.
79. MORAIS, T. S.; SANTOS, F. C.; JORGE, T. F.; CÔRTE-REAL, L.; MADEIRA, P. J. A.; MARQUES, F.; ROBALO, M. P.; MATOS, A.; SANTOS, I.; GARCIA, M. H. "New water-soluble ruthenium(II) cytotoxic complex: biological activity and cellular distribution". *J. Inorg. Biochem.* **130** (1): 1, 2014.
80. DE OLIVEIRA, K. M. Complexos de rutênio contendo lapachol e lausona: síntese, caracterizacao e suas propriedades quimioterapêuticas, São Carlos, Programa de Pós-

Graduação em Química - UFSCar, 2014. Dissertação de mestrado, 142 p.

81. VELHO, R. G. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 60 p.

82. SHELDRIK, G. M. "A short history of SHELX". *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.*, **64** (1): 112, 2007.

83. SHELDRIK, G. M. "Crystal structure refinement with SHELXL". *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, **71**: 3, 2015.

84. FARRUGIA, L. J. "ORTEP -3 for windows - a version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI) by J. Farrugia". *J. Appl. Crystallogr.*, **30** (5): 568, 1997.

85. MACRAE, C. F.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; SHIELDS, G. P.; TAYLOR, R.; TOWLER, M.; VAN DE STREEK, J. "Mercury: visualization and analysis of crystal structures". *J. Appl. Crystallogr.*, **39** (3): 453, 2006.

86. STEPHSON, T. A.; WILKINSON, G. "New complexes of ruthenium(II) and ruthenium(III) with diphenylphosphine, triphenylarzne, trichlorostannate, pyridine and other ligands". *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **28**: 945, 1966.

87. BATISTA, A. A.; SANTIAGO, M. O.; DONNICI, C. L.; MOREIRA, I. S.; HEALY, P. C.; BERNERS-PRICE, S. J.; QUEIROZ, S. L. "Electrochemical and spectroscopic studies on RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N)<sub>2</sub> and RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N-N) complexes (N=pyridine Derivatives and N-N=phenanthroline or Bipyridine Derivatives). X-Ray structure of RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(phen)". *Polyhedron*, **20** (17): 2123, 2001.

88. MA, G.; MCDONALD, R.; FERGUSON, M.; CAVELL, R. G.; PATRICK, B. O.; JAMES, B. R.; HU, T. Q. "Ruthenium(II) diphosphine/diamine/diimine complexes and catalyzed hydrogen-transfer to ketones". *Organometallics*. **26** (4): 846, 2007.

89. EVANS, I. P.; SPENCER, A.; WILKINSON, G. "Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes". *Dalt. Trans.* **2**: 204, 1971.

90. BAUTISTA, M. T.; CAPPELLANI, E. P.; DROUIN, S. D.; MORRIS, R. H.; SCHWEITZER, C. T.; SELLA, A.; ZUBKOWSKI, J. "Preparation and spectroscopic properties of the 2-dihydrogen complexes [MH<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>)(PR<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>PR<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (M = Fe, Ru; R = Ph, Et) and trends in properties down the iron group triad". *J. Am. Chem. Soc.*, **113**: 4876, 1991.

91. SULLIVAN, B. P.; MEYER, T. J. "Comparisons of the physical and chemical properties of isomeric pairs. 2. photochemical, thermal, and electrochemical cis-trans isomerizations of M(Ph<sub>2</sub>PCH<sub>2</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (M = Ru<sup>II</sup>, Os<sup>II</sup>)". *Inorg. Chem.*, **21** (3): 1037, 1982.

92. PYLE, A. M.; REHMANN, J. P.; MESHOYRER, R.; KUMAR, C. V.; TURRO, N. J.; BARTON, J. K. "Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA". *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (8): 3051, 1989.

93. SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; REHMAN, S. U.; ISHQI, H. M.; TABISH, M. "Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with Calf Thymus DNA". *Mol. BioSyst.* **11** (2): 522, 2015.
94. BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2): 335, 2008.
95. YARROW, J. C.; PERLMAN, Z. E.; WESTWOOD, N. J.; MITCHISON, T. J. "A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods". *BMC Biotechnol.* **4**: 1, 2004.
96. YUE, P. Y. K.; LEUNG, E. P. Y.; MAK, N. K.; WONG, R. N. S. "A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates". *J. Biomol. Screen.* **15** (4): 427, 2010.
97. Wu, H. T.; Lin, S. H.; Chen, Y. H. "Inhibition of cell proliferation and in vitro markers of angiogenesis by indole-3-carbinol, a major indole metabolite present in cruciferous vegetables". *J. Agric. Food Chem.* **53** (13): 5164, 2005.
98. SILVA, H.; FRÉZARD, F.; PETERSON, E. J.; KABOLIZADEH, P.; RYAN, J. J.; FARRELL, N. P. "Heparan sulfate proteoglycan-mediated entry pathway for charged tri-platinum compounds: differential cellular accumulation mechanisms for platinum". *Mol. Pharm.* **9** (6): 1795, 2012.
99. CARUSO, F.; MARTÍNEZ, M. A.; ROSSI, M.; GOLDBERG, A.; VILLALBA, M. E. C.; AYMÓNINO, P. J. "Crystal and molecular structure of manganese(II) lapacholate, a novel polymeric species undergoing temperature-reversible metal to ligand electron transfer". *Inorg. Chem.* **48** (8): 3529, 2009.
100. NAKAMOTO, K. Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds, 6ª edição, Editora Wiley Inter-Science, 2009. p.285.
101. RAMON A. FARFÁN, JOSÉ A. ESPÍNDOLA, MIGUEL A. MARTÍNEZ, OSCAR E. PIRO, P. J. A. "Synthesis and crystal structure of a new lapacholate complex with nickel(II), [Ni(Lap)<sub>2</sub>(DMF)(H<sub>2</sub>O)]". *J. Coord. Chem.*, **62** (23): 3738, 2009.
102. SINGH, I.; OGATA, R. T.; MOORE, R. E.; CHANG, C. W. J.; SCHEUER, P. J. "Electronic spectra of substituted naphthoquinones". *Tetrahedron.* **24** (18): 6053, 1968.
103. CHARBONNEAU, D. M.; TAJMIR-RIahi, H. A. "Study on the interaction of cationic lipids with bovine serum albumin". *J Phys Chem B.*, **114** (2): 1148, 2010.
104. LI, X.; WANG, G.; CHEN, D.; LU, Y. "Interaction of procyanidin B3 with bovine serum albumin". *RSC Adv.* **4** (14): 7301, 2014.
105. BELATIK, A.; HOTCHANDANI, S.; CARPENTIER, R.; TAJMIR-RIahi, H. A. "Locating the binding sites of Pb(II) ion with human and bovine serum albumins". *Plos One.* **7** (5): e36723, 2012.
106. KANDAGAL, P. B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S. M. T.;

- JADEGOUD, Y.; IJARE, O. B. "Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41** (2): 393, 2006.
107. GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M. A.; PALANIANDAVAR, M. "New ruthenium(II) arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity". *Dalton Trans.*, **43** (3): 1203, 2014.
108. ZHANG, G.; CHEN, X.; GUO, J.; WANG, J. "Spectroscopic investigation of the interaction between chrysin and bovine serum albumin". *J. Mol. Struct.*, **921** (1–3): 346, 2009.
109. TABASSUM, S.; AL-ASBAHY, W. M.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. "Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with human serum albumin (HSA): spectroscopic and molecular docking investigations". *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **114**: 132, 2012.
110. PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA Binding Modes for Metal Anticancer Complexes. *Biochimie*. **91** (10): 1198, 2009.
111. BARONE, G.; TERENCE, A.; LAURIA, A.; ALMERICO, A. M.; LEAL, J. M.; BUSTO, N.; GARCÍA, B. "DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: structure-affinity relationships". *Coord. Chem. Rev.*, **257** (19–20): 2848, 2013.
112. LEPECQ, J. B.; PAOLETTI, C. "A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. physical-chemical characterization". *J. Mol. Biol.*, **27** (1): 87, 1967.
113. CORRÊA, R. S.; DA SILVA, M. M.; GRAMINHA, A. E.; MEIRA, C. S.; DOS SANTOS, J. A. F.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; VON POELHSITZ, G.; CASTELLANO, E. E.; BLOCH, C.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. Ruthenium(II) Complexes of 1,3-Thiazolidine-2-Thione: Cytotoxicity against Tumor Cells and Anti-Trypanosoma Cruzi Activity Enhanced upon Combination with Benznidazole. *J. Inorg. Biochem.*, **156**: 153, 2016.
114. DASH, S. P.; PANDA, A. K.; PASAYAT, S.; DINDA, R.; BISWAS, A.; TIEKINK, E. R. T.; PATIL, Y. P.; NETHAJI, M.; KAMINSKY, W.; MUKHOPADHYAY, S.; BHUTIA, S. K. "Syntheses and structural investigation of some alkali metal ion-mediated  $L^V O_2^-$  ( $L^{2-}$  = tridentate ONO ligands) species: DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxic activities". *Dalt. Trans.*, **43** (26): 10139, 2014.
115. KRISHNAMOORTHY, P.; SATHYADEVI, P.; BUTORAC, R. R.; COWLEY, A. H.; BHUVANESH, N. S. P.; DHARMARAJ, N. "Copper(I) and nickel(II) complexes with 1:1 vs. 1:2 coordination of ferrocenyl hydrazone ligands: do the geometry and composition of complexes affect DNA binding/cleavage, protein binding, antioxidant and cytotoxic activities". *Dalt. Trans.*, **41** (15): 4423, 2012.
116. MAROTO-DÍAZ, M.; ELIE, B. T.; GÓMEZ-SAL, P.; PÉREZ-SERRANO, J.; GÓMEZ, R.; CONTEL, M.; JAVIER DE LA MATA, F. "Synthesis and anticancer activity of carbosilane metallodendrimers based on arene ruthenium(II) complexes". *Dalt. Trans.*, **45** (16): 7049, 2016.

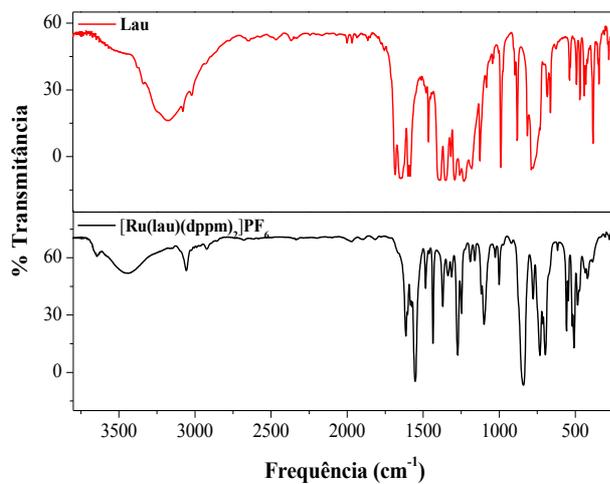
117. FRIK, M.; JIMÉNEZ, J.; VASILEVSKI, V.; CARREIRA, M.; ALMEIDA, A.; GASCÓN, E.; BENOIT, F.; SANAÚ, M.; CASINI, A.; CONTEL, M. "Luminescent iminophosphorane gold, palladium and platinum complexes as potential anticancer agents". *Inorg. Chem. Front.*, **3** (10): 231, 2014.
118. RAJENDIRAN, V.; MURALI, M.; SURESH, E.; PALANIANDAVAR, M.; PERIASAMY, V. S.; AKBARSHA, M. A. "Non-covalent DNA binding and cytotoxicity of certain mixed-ligand ruthenium(II) complexes of 2,2'-dipyridylamine and diimines". *Dalt. Trans.*, **4** (16): 2157, 2008.
119. SILVA, E. F.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S. "DNA interaction with Hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes". *J. Phys. Chem. B.* **117** (24): 7292, 2013.
120. FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. "Clonogenic assay of cells in vitro". *Nat. Protoc.*, **1** (5): 2315, 2006.
121. VALSTER, A.; TRAN, N. L.; NAKADA, M.; BERENS, M. E.; CHAN, A. Y.; SYMONS, M. "Cell migration and invasion assays". *Methods.*, **37** (2): 208, 2005.
122. YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. "Cell migration in tumors". *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**: 559, 2005.
123. ECCLES, S. A.; WELCH, D. R. "Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies". *Lancet.*, **369** (9574): 1742, 2007.
124. FERRARA, N.; KERBEL, R. S. "Angiogenesis as a therapeutic target". *Nature.* **438** (7070): 967, 2005.
125. SANDERSON, R. D. "Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis". *Semin. Cell Dev. Biol.*, **12** (2): 89, 2001.
126. KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. "Proteoglycans: structures and interactions". *Annu. Rev. Biochem.*, **60**: 443, 1991.
127. BELTING, M.; PERSSON, S.; FRANSSON, L. A. "Proteoglycan involvement in polyamine uptake". *Biochem. J.*, **338**: 317, 1999.
128. FUCHS, S. M.; RAINES, R. T. "Pathway for polyarginine entry into mammalian cells". *Biochemistry*, **43** (9): 2438, 2004.
129. VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N.; VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer". *Cell Prolif.*, **36** (3): 131, 2003
130. STEWART, Z. A.; WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. "Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy". *Trends Pharmacol. Sci.*, **24** (3): 139, 2003.
131. YANG, J.; ZHAO, J. X.; CAO, Q.; HAO, L.; ZHOU, D.; GAN, Z.; JI, L. N.; MAO, Z. W. "Simultaneously inducing and tracking cancer cell metabolism repression by mitochondria-immobilized rhenium(I) complex". *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9** (16): 13900,

---

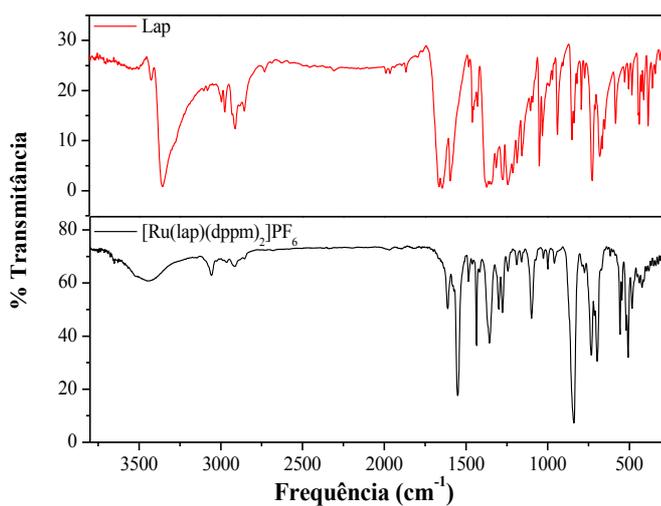
2017.

132. SAKAMURU, S.; LI, X.; ATTENE-RAMOS, M. S.; HUANG, R.; LU, J.; SHOU, L.; SHEN, M.; TICE, R. R.; AUSTIN, C. P.; XIA, M. "Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function". *Physiol. Genomics.*, **44** (9): 495, 2012.
133. FERNS, G.; SHAMS, S.; SHAFI, S. "Heat shock protein 27 : its potential role in vascular disease". *Int. J. Exp. Pathol.*, **87** (4): 253, 2006.
134. OEHNINGER, L.; SPRECKELMEYER, S.; HOLENYA, P.; MEIER, S. M.; CAN, S.; ALBORZINIA, H.; SCHUR, J.; KEPPLER, B. K.; WO, S.; OTT, I. "Rhodium(I) N - heterocyclic carbene bioorganometallics as in vitro antiproliferative agents with distinct effects on cellular signaling". *J. Med. Chem.*, **58** (24): 9591, 2015.
135. XU, S.; YAO, H.; LUO, S.; ZHANG, Y.; YANG, D.; LI, D.; CHEN, Z.; XU, J. "A novel potent anticancer compound optimized from a natural oridonin scaffold induces apoptosis and cell cycle arrest through the mitochondrial pathway". *J. Med. Chem.*, **60** (4): 1449, 2017.
136. NISHINA, H.; WADA, T.; KATADA, T. "Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway". *J. Biochem.*, **136** (2): 123, 2004.

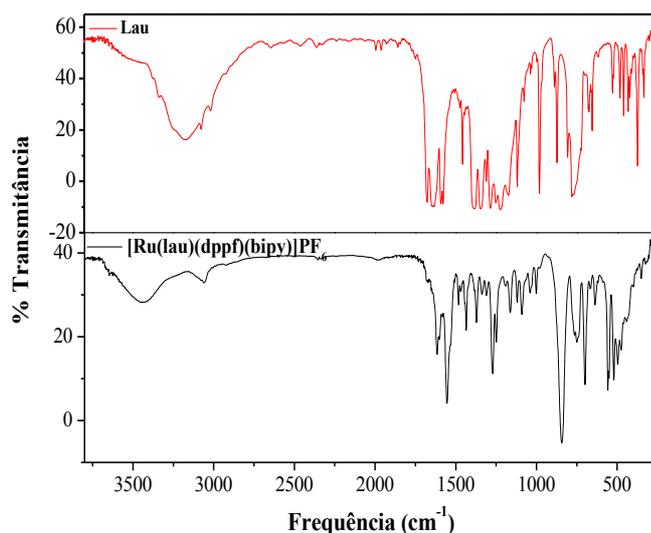
## 7 APÊNDICE



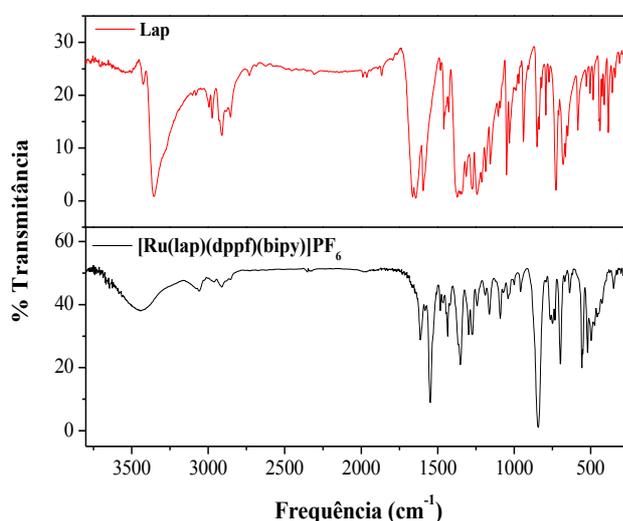
**FIGURA A1** - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lau e do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , em pastilhas de KBr.



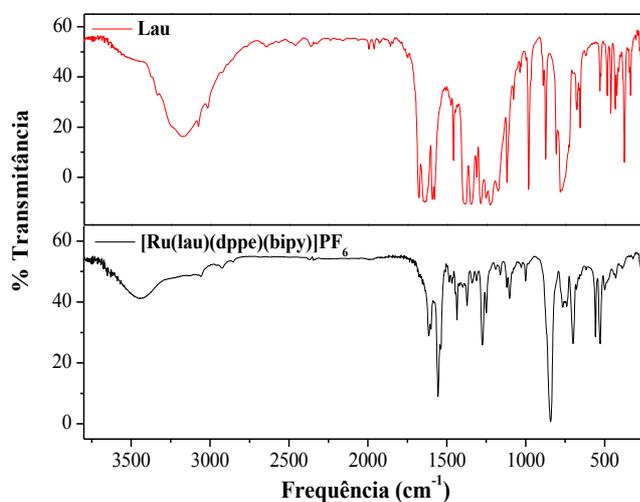
**FIGURA A2** - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lap e do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ , em pastilhas de KBr.



**FIGURA A3** - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lau e do complexo [Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF<sub>6</sub>, em pastilhas de KBr.



**FIGURA A4** - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lap e do complexo [Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF<sub>6</sub>, em pastilhas de KBr.



**FIGURA A5** - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lau e do complexo [Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub>, em pastilhas de KBr.

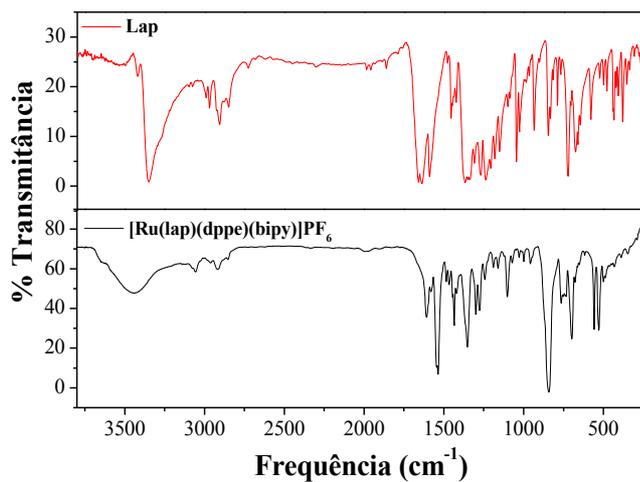


FIGURA A6 - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante lap e do complexo [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub>, em pastilhas de KBr.

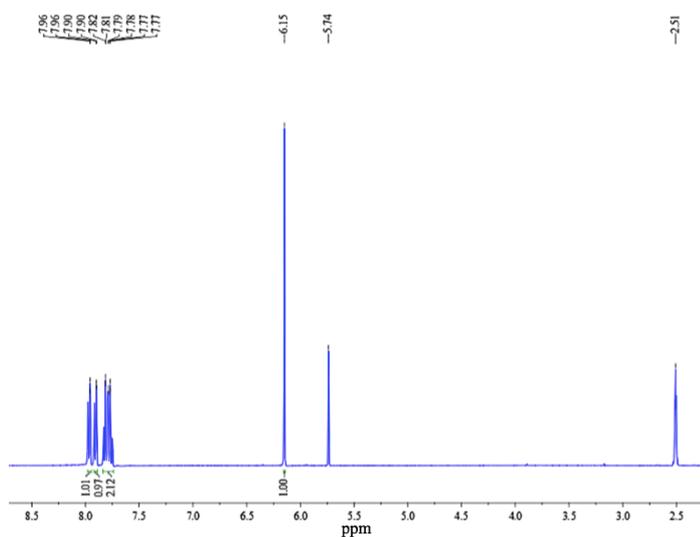


FIGURA A7 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da lausona em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

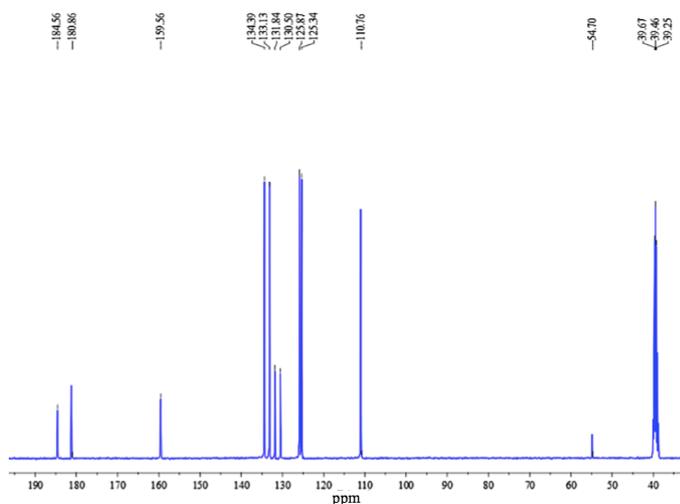


FIGURA A8 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} da lausona em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

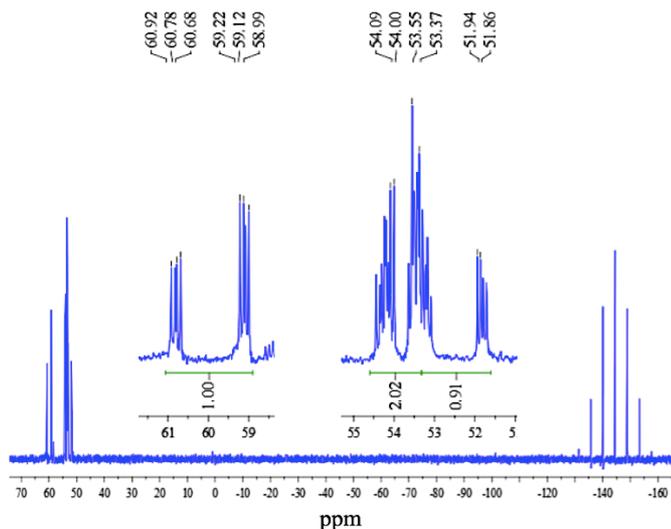


FIGURA A9 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

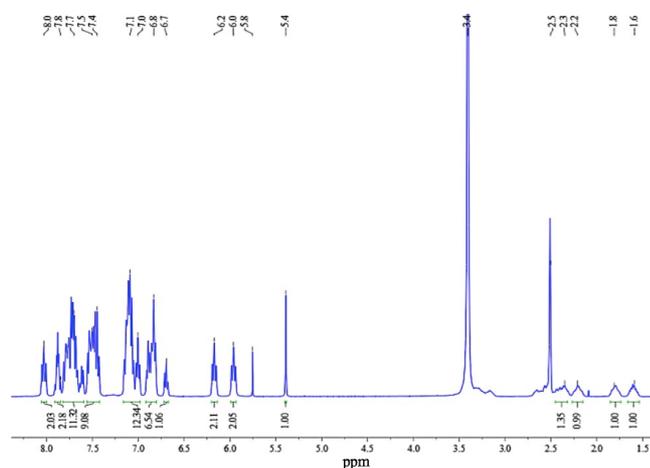


FIGURA A10 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO}-d_6$ .

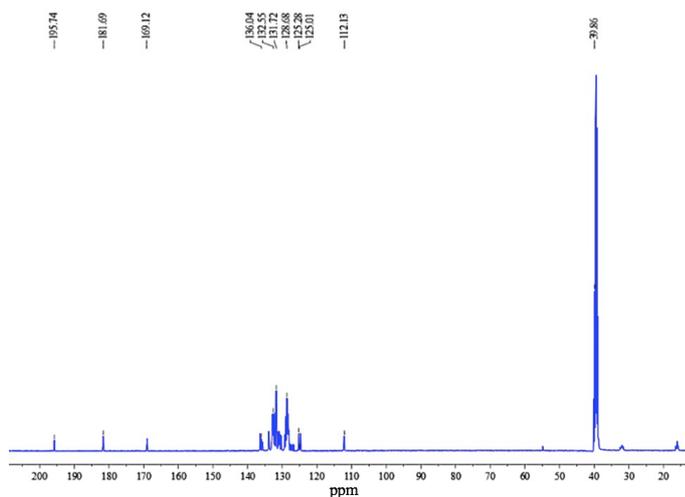


FIGURA A11 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO}-d_6$ .

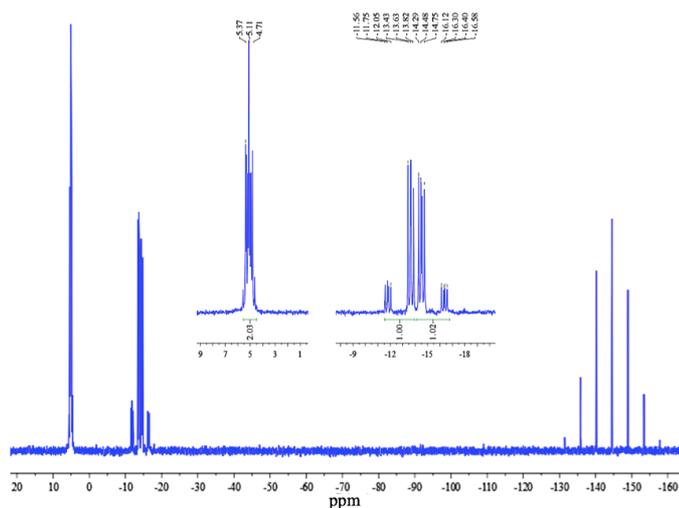


FIGURA A12 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

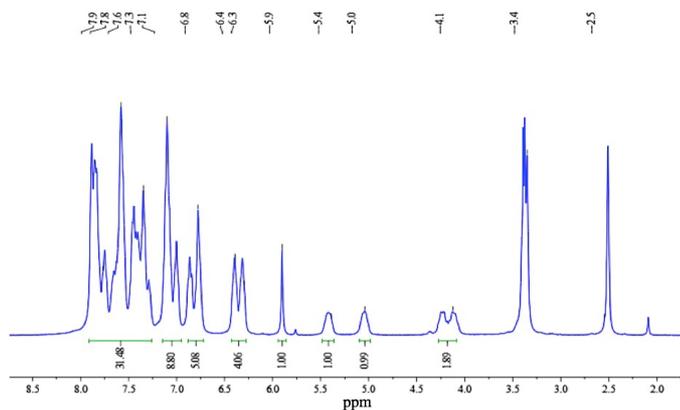


FIGURA A13 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO}-d_6$ .

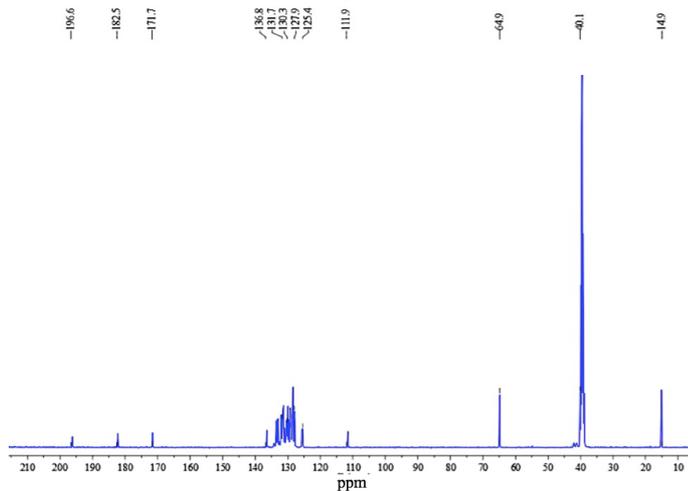


FIGURA A14 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO}-d_6$ .

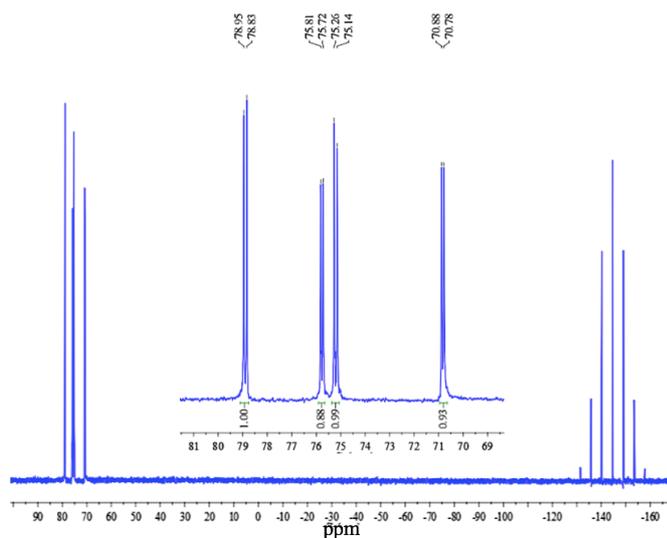


FIGURA A15 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

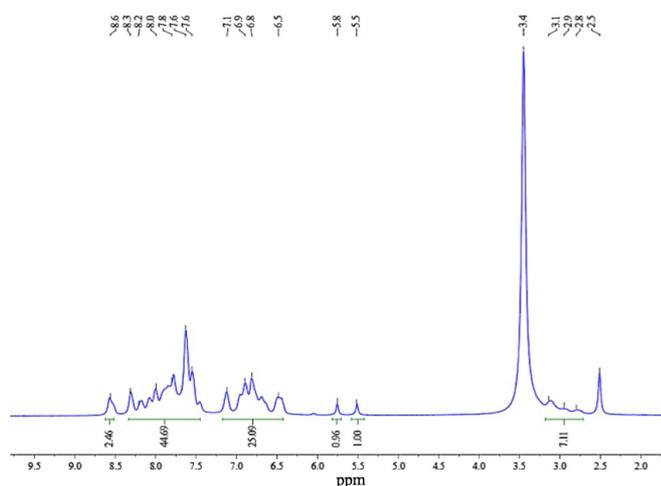


FIGURA A16 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

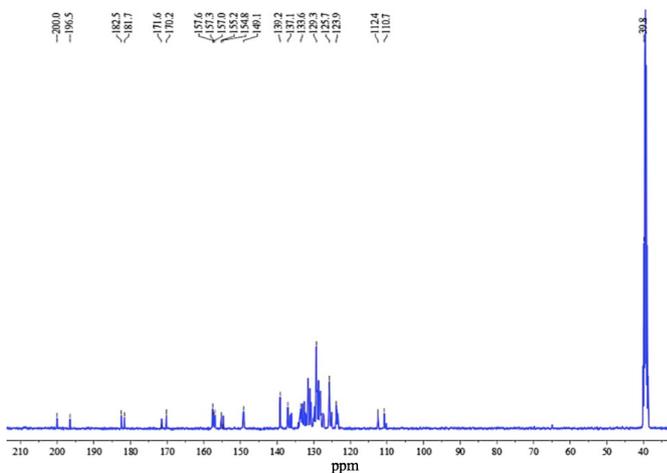


FIGURA A17 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

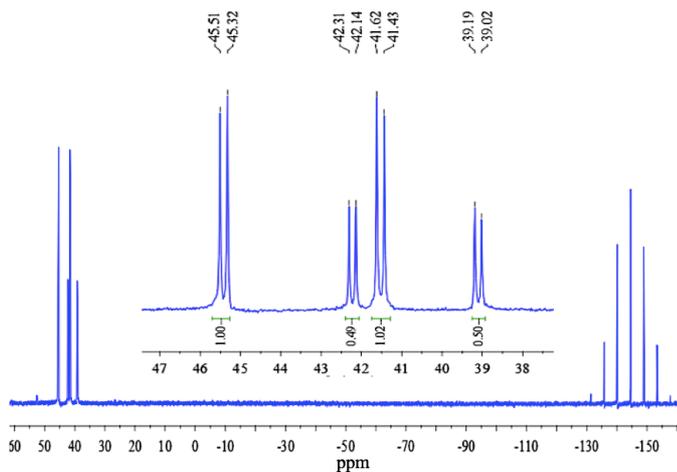


FIGURA A18 - Espectro de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ .

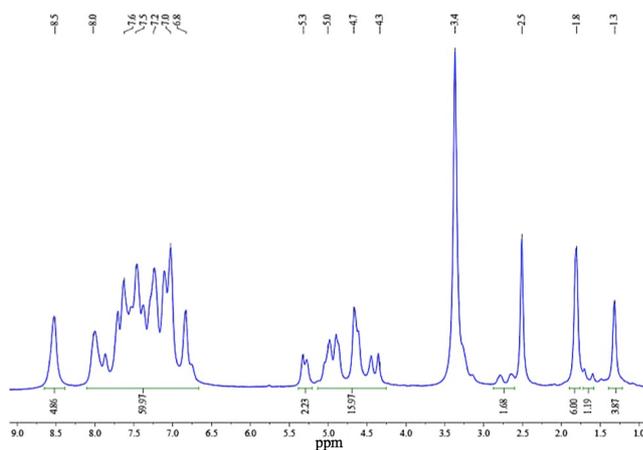


FIGURA A19 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

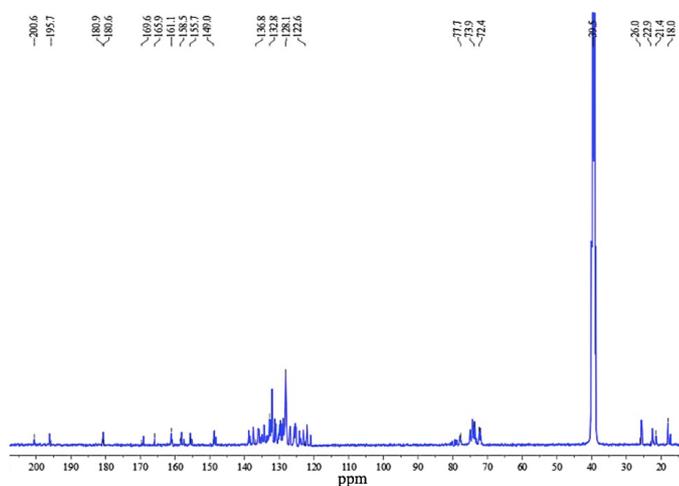


FIGURA A20 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

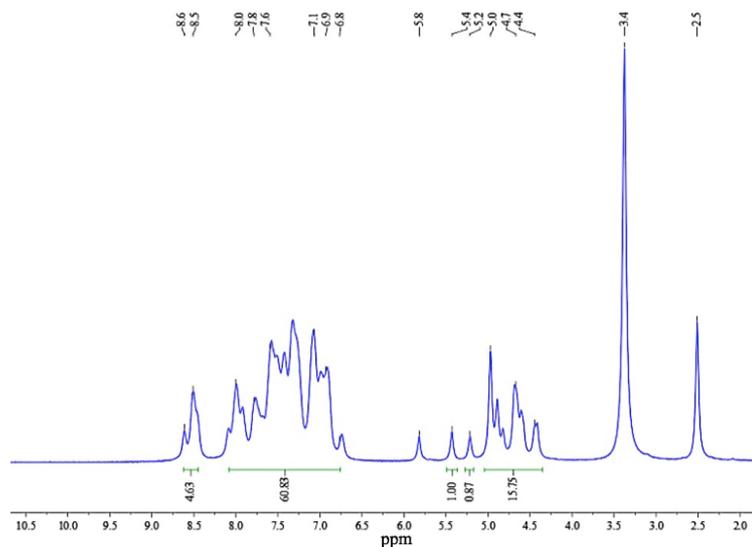


FIGURA A21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

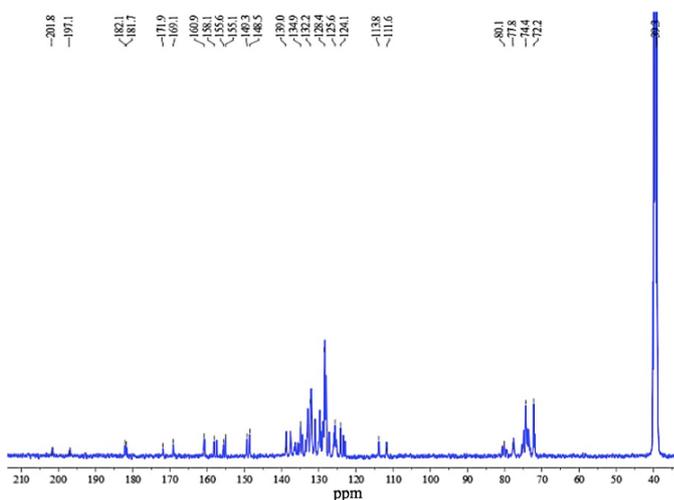


FIGURA A22 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .

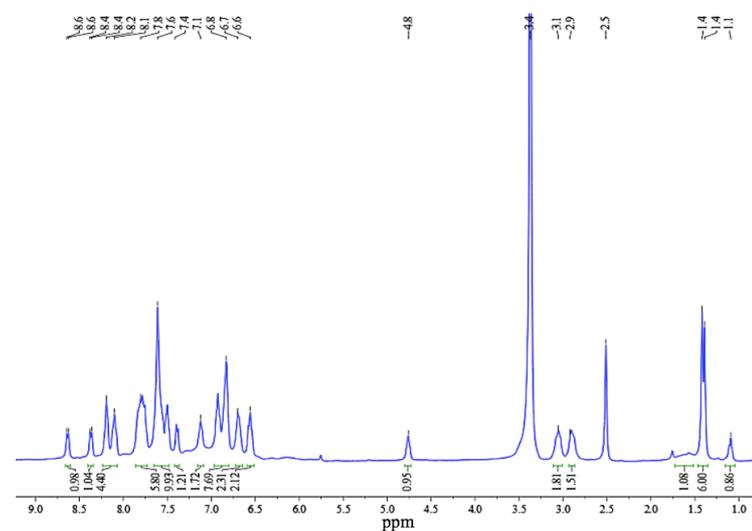
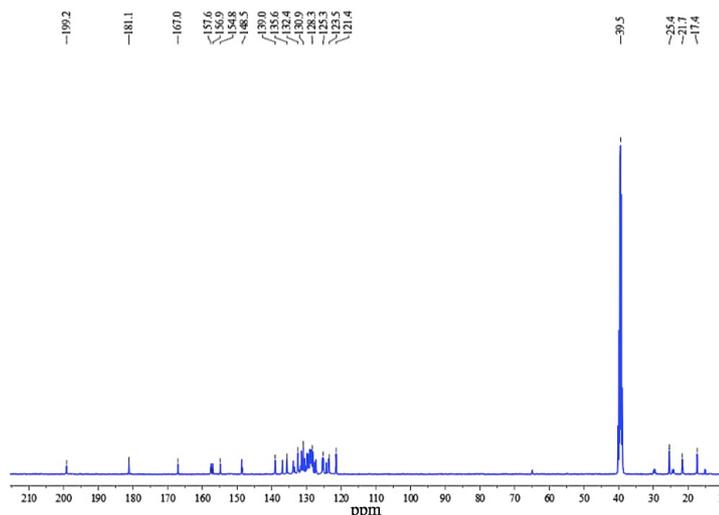
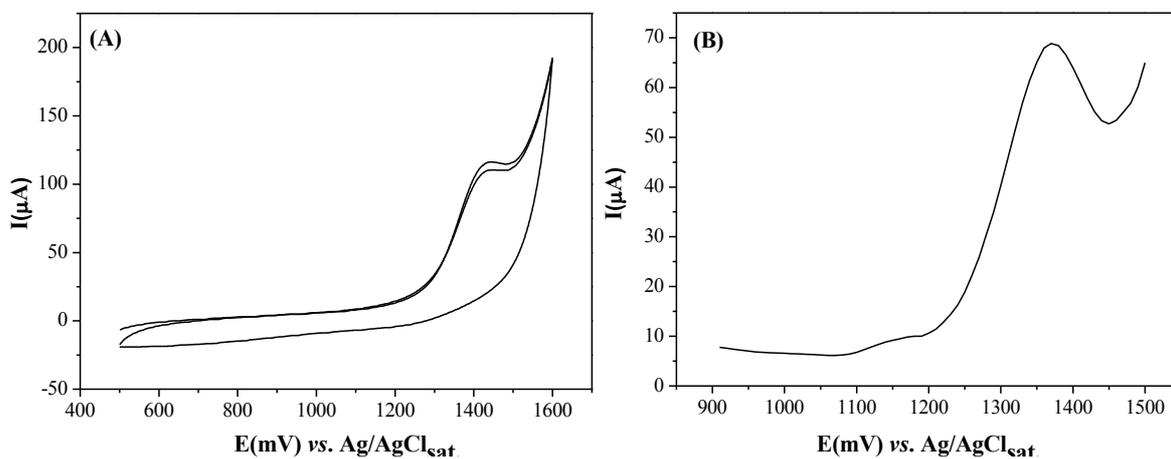


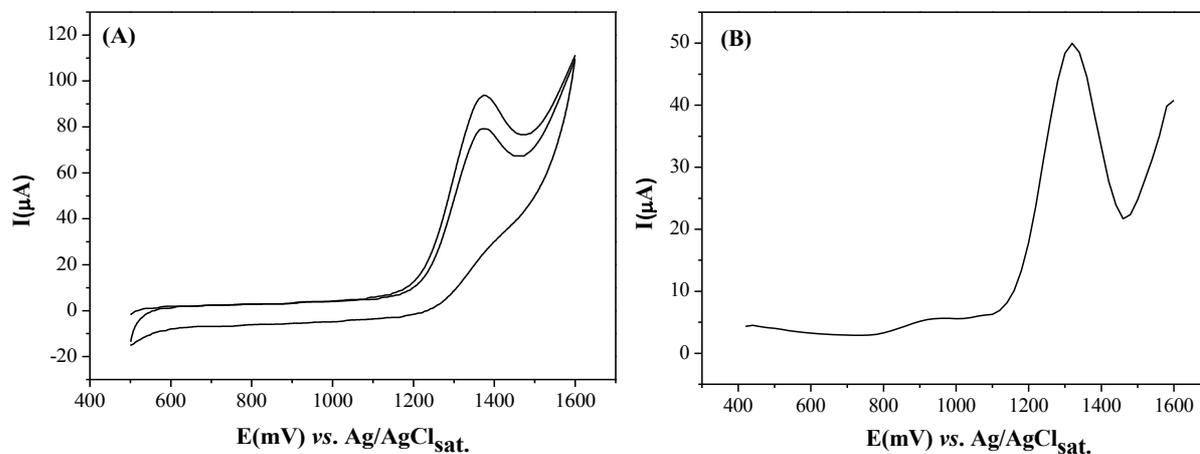
FIGURA A23 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO-}d_6$ .



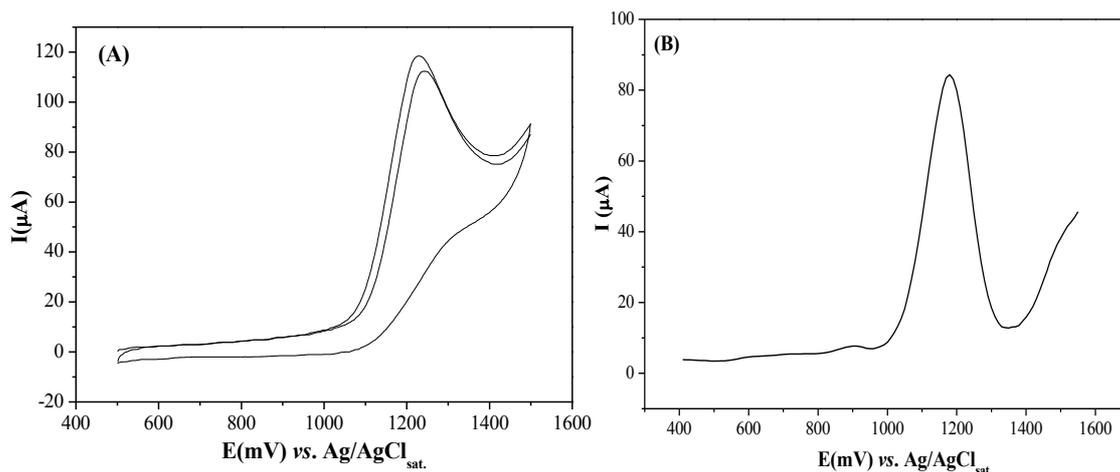
**FIGURA A24** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $\text{DMSO}-d_6$ .



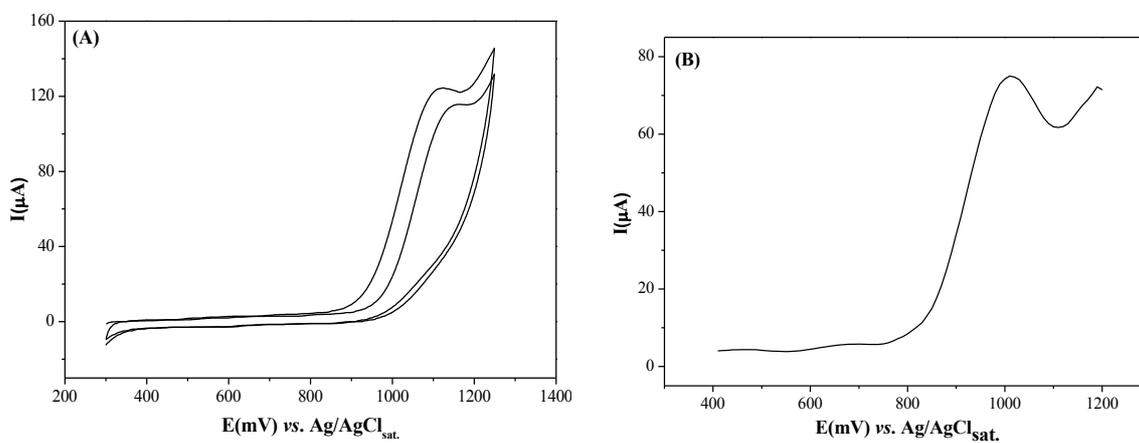
**FIGURA A25** - (A) Voltamograma cíclico e (B) de pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



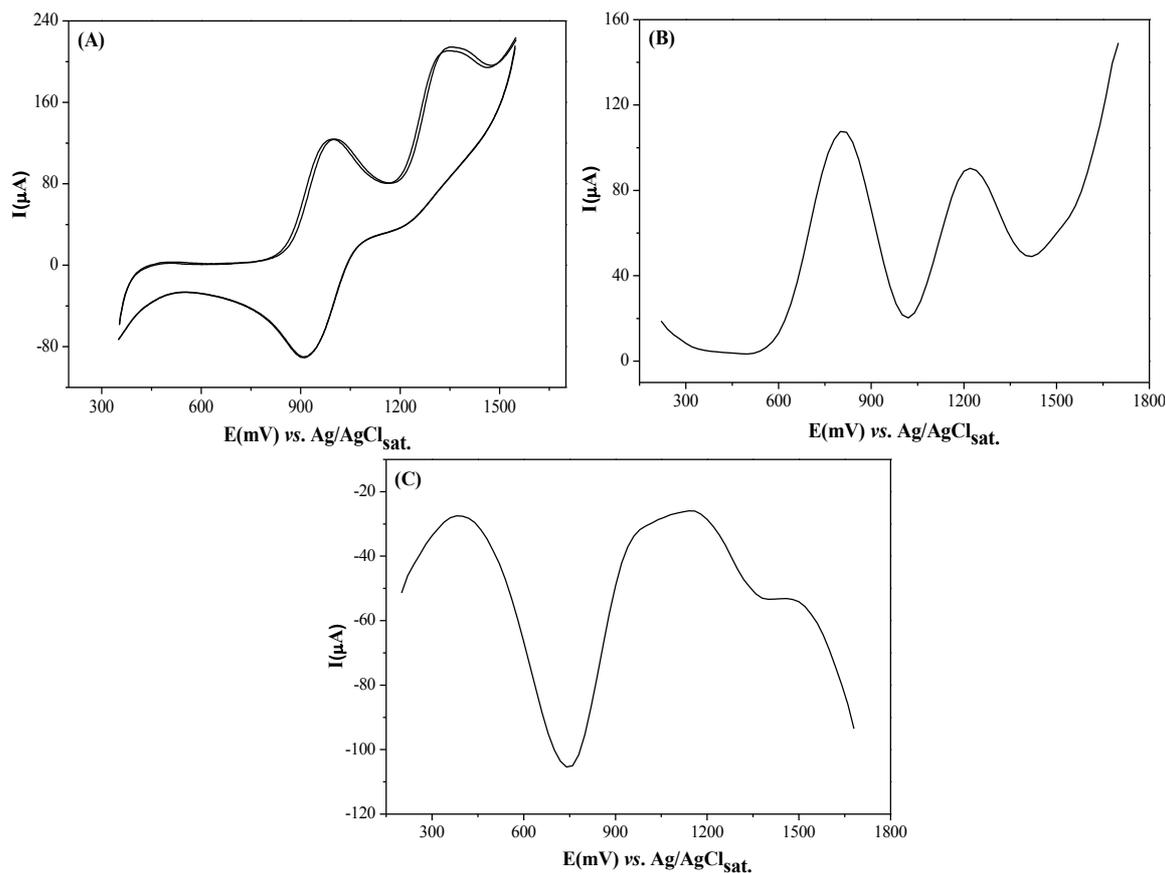
**FIGURA A26** - (A) Voltamograma cíclico e (B) de pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



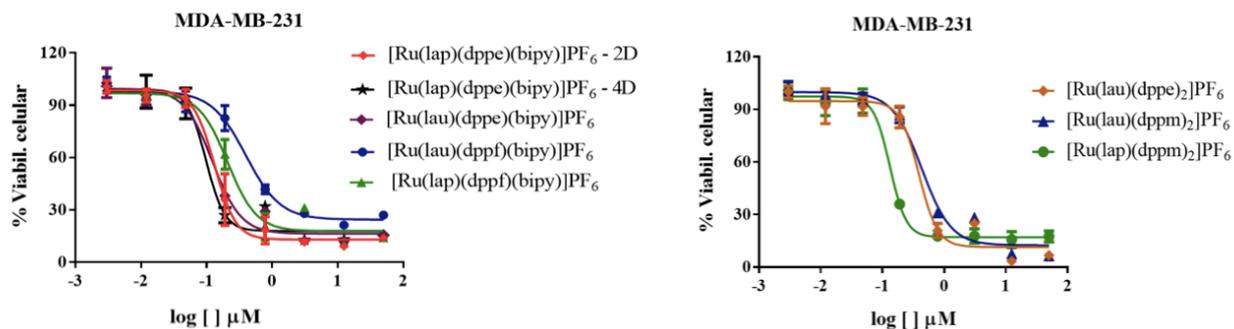
**FIGURA A27** - (A) Voltamograma cíclico e (B) de pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



**FIGURA A28** - (A) Voltamograma cíclico e (B) de pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



**FIGURA A29** - (A) Voltamograma cíclico e (B, C) de pulso diferencial do  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppf})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PTBA, em meio de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



**FIGURA A30** - Gráficos de viabilidade celular dos complexos contendo lapachol ou lausona na linhagem celular MDA-MB-231, após 48 h de incubação.

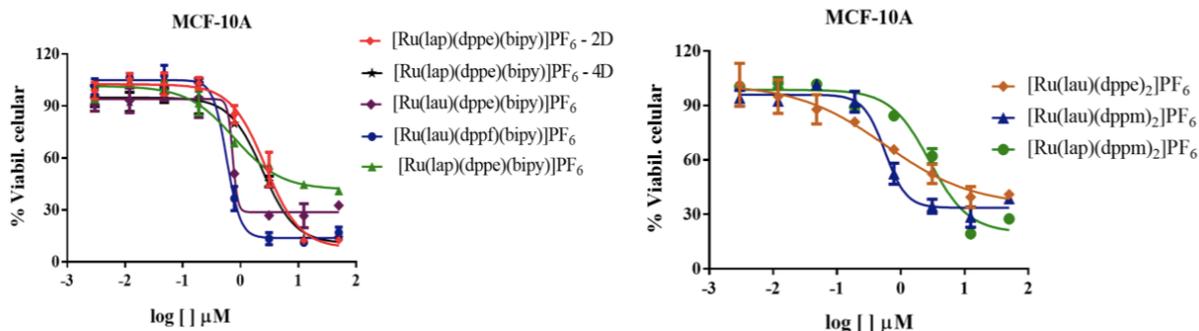


FIGURA A31 - Gráficos de viabilidade celular dos complexos contendo lapachol ou lausona na linhagem celular MCF-10A, após 48 h de incubação.

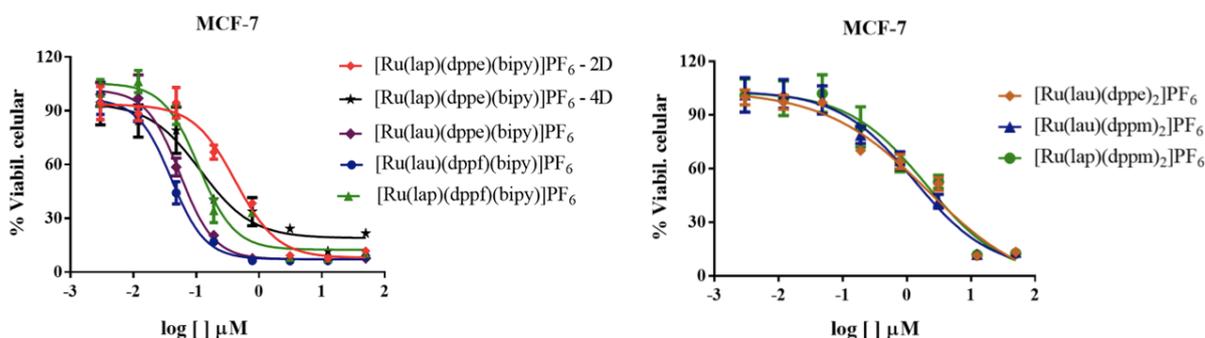


FIGURA A32 - Gráficos de viabilidade celular dos complexos contendo lapachol ou lausona na linhagem celular MCF-7, após 48 h de incubação.

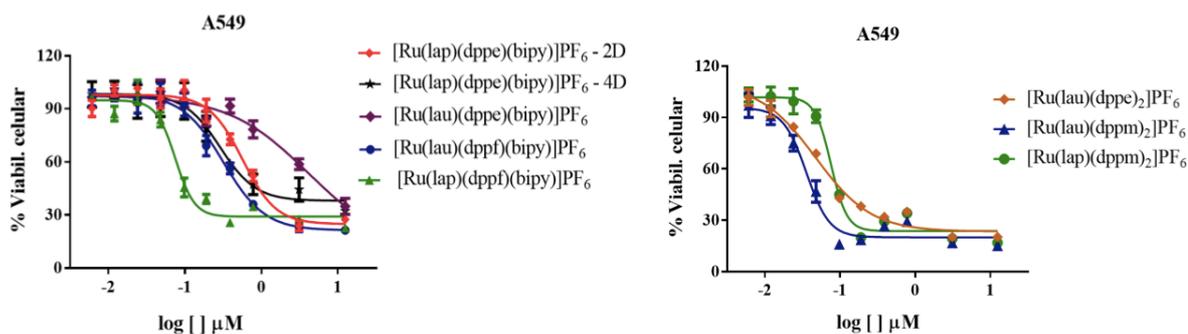
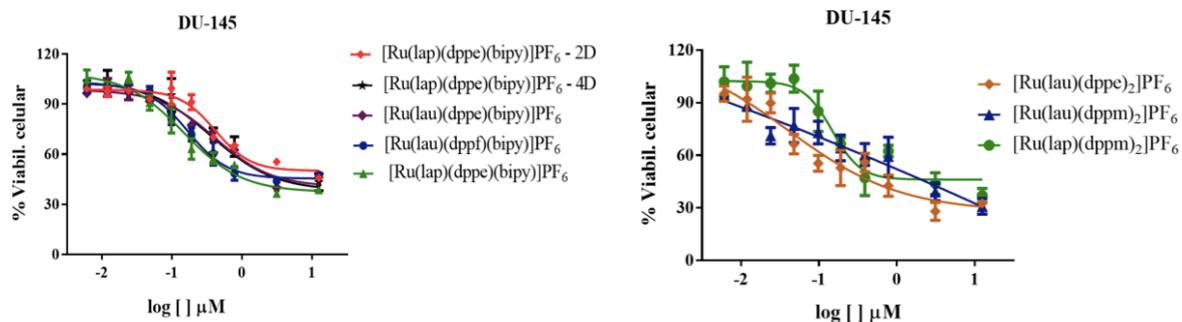
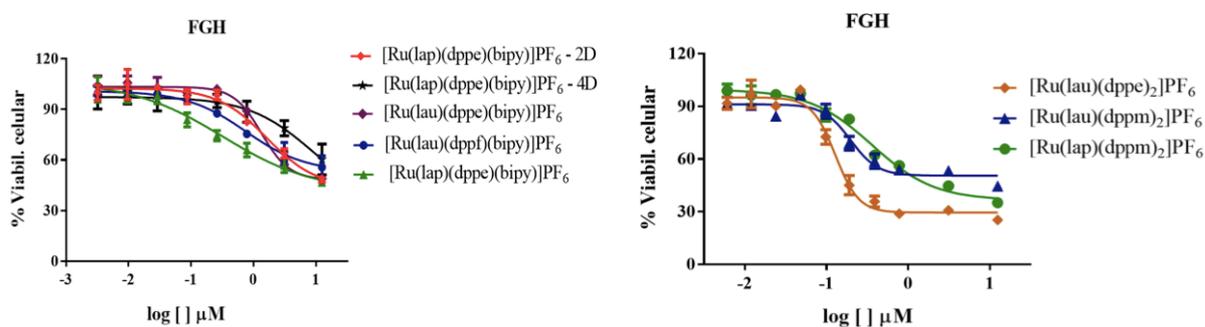


FIGURA A33 - Gráficos de viabilidade celular dos complexos contendo lapachol ou lausona na linhagem celular A549, após 48 h de incubação.



**FIGURA A34** - Gráficos de viabilidade celular dos complexos contendo lapachol ou lausona na linhagem celular DU-145, após 48 h de incubação.



**FIGURA A35** - Gráficos de viabilidade celular dos complexos contendo lapachol ou lausona na linhagem celular FGH, após 48 h de incubação.

**TABELA A1** - Dados das estruturas de raios X dos complexos [Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF<sub>6</sub> e [Ru(lap)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>

	[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF <sub>6</sub>	[Ru(lap)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>
Fórmula	[RuC <sub>51</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> · ½(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	[RuC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ]PF <sub>6</sub> · CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Massa molar	1078,93 g/mol	1340,95 g/mol
Sistema cristalino	Tetragonal	Monoclínico
Grupo espacial	I-4	Pn
Dimensões da cela unitária	a = 28,638(1) α = 90°	a = 15,2072(3) α = 90°
	b = 28,638(1) β = 90°	b = 12,0840(2) β = 93,999(2)°
	c = 13,096(1) γ = 90°	c = 16,9387(3) γ = 90°
Volume	10740,5 Å <sup>3</sup>	3105,14(10) Å <sup>3</sup>
Z	8	2
Densidade (calculada)	1,334 mg/m <sup>3</sup>	1,434 mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorção	0,445 mm <sup>-1</sup>	0,531 mm <sup>-1</sup>
F(000)	4424	1372,0
Tamanho do cristal	0,22 × 0,22 × 0,50 mm <sup>3</sup>	0,3 × 0,26 × 0,2 mm <sup>3</sup>
Alcance de θ para coleta	3,11 para 26,37°	5,028 para 52,744°
Alcances dos índices	-35 ≤ h ≤ 35, -33 ≤ k ≤ 35, -16 ≤ l ≤ 15	-19 ≤ h ≤ 19, -15 ≤ k ≤ 15, -21 ≤ l ≤ 21
Reflexões coletadas	20830	126993
Reflexões independentes	9874 [R <sub>int</sub> = 0,0589]	12649 [R <sub>int</sub> = 0,0367, R <sub>sigma</sub> = 0,0165]
Método de refinamento	Matriz dos mínimos quadrado em F <sup>2</sup>	Matriz dos mínimos quadrado em F <sup>2</sup>
Índices R final [I > 2 σ(I)]	R1 = 0,0449, wR2 = 0,1017	R1 = 0,0375, wR2 = 0,0933
Índices R (todos)	R1 = 0,0701, wR2 = 0,1142	R1 = 0,0456, wR2 = 0,1047
Residual máx. min.	0,472 e -0,437 e.Å <sup>-3</sup>	0,75/-0,36 e.Å <sup>-3</sup>