

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

**CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO
CONTENDO AMINOÁCIDOS SULFURADOS EM CÉLULAS
TUMORAIS**

Celisnolia Morais Leite*

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

Orientadora: Profa. Dra. Wania da Conceição Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

***Bolsista Capes**

São Carlos – SP

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

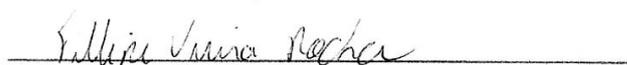
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Celisnolia Morais Leite, realizada em 28/07/2016:



Profa. Dra. Wania da Conceição Moreira
UFSCar



Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha
UFSCar



Prof. Dr. Antonio Carlos Massabni
UNESP

À minha família e ao Mitchell por todo apoio dado durante minha vida acadêmica, sem o qual não conseguiria chegar até aqui.

Dedico

“Depois de termos conseguido subir a uma grande montanha, só descobrimos que existem ainda mais grandes montanhas para subir”. ***Nelson Mandela***

“Tudo parece impossível até que seja feito”. ***Nelson Mandela***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui;

À minha família e ao Mitchell pelo apoio e incentivo;

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e à Profa. Dra. Wania da Conceição Moreira pela oportunidade e orientação;

Ao Departamento de Química da UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Química, em especial às secretarias Ariane, Cristina e Luciane;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química que contribuíram para a minha formação;

À Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti (Gerontologia-UFSCar) pela disponibilidade de seu laboratório para a execução dos testes biológicos e à Msc. Legna Colina - Vegas, pela realização dos ensaios com as células tumorais;

Aos meus amigos maranhenses pela amizade e momentos de descontração;

Aos meus amigos do LERCI e da UFSCar pela amizade e valiosas discussões;

Aos técnicos Ademir Sartori pelo conserto e manufatura das vidrarias solicitadas, Luciana Vizotto pela realização de alguns dos experimentos de RMN e Paulo Lambertucci pela realização dos experimentos de análise elementar dos compostos;

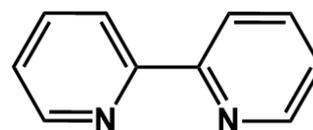
Ao CNPq e à Fapesp que contribuíram para a realização deste trabalho com financiamento de projetos no laboratório.

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

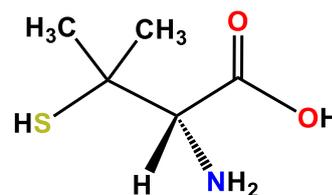
LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS ESTRUTURAIS

CT-DNA	Calf Thymus Deoxyribonucleic Acid
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
FDA	Food and Drug Administration
HSA	Human Serum Albumin
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTBA	perclorato de tetrabutílamônio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Meios Roswell Park Memorial Institute

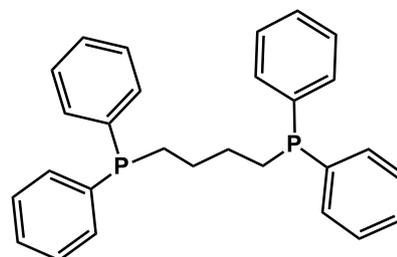
bipy 2,2'- bipyridina



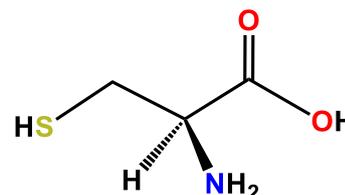
D-pen D-penicilamina



dppb 1,4-bis(difenilfosfina)butano

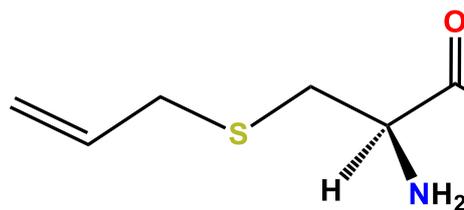


L-cis L-cisteína

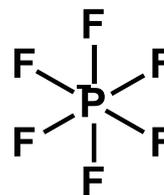


L-deo

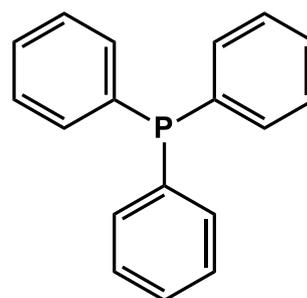
L-deoxialliina

PF₆⁻

ión hexafluorofosfato

PPh₃

Trifenilfosfina



LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Valores de IC ₅₀ de alguns complexos de Rutênio contra as linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 e a não tumoral L-929.	22
TABELA 3.1 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados nas sínteses e caracterizações dos compostos	33
TABELA 4.1 - Dados de δ (deslocamento químico), multiplicidade e J (constante de acoplamento) para os complexos contendo os aminoácidos.....	46
TABELA 4.2 - Deslocamento químico para os sinais referentes aos carbonos dos aminoácidos livres, em CD ₃ OD	50
TABELA 4.3 - Deslocamentos químicos para o C1 dos aminoácidos e seus respectivos complexos	52
TABELA 4.4 - Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados nos espectros de absorção na região do IV dos aminoácidos livres.....	53
TABELA 4.5 - Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados nos espectros de absorção na região do IV para os novos compostos e valores de $\Delta \text{ cm}^{-1}$	55
TABELA 4.6 - Dados de absorvidade molar (ϵ) e tentativa de atribuição de bandas	61
TABELA 4.7 - Dados eletroquímicos para todos os complexos sintetizados	64
TABELA 4.8 - Dados percentuais dos teores de C, H, N e S, teóricos e experimentais, e condutividade molar de soluções $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em CH ₂ Cl ₂ para os complexos sintetizados	67
TABELA 4.9 - Distâncias de ligações [Å] para as ligações com o Ru	70
TABELA 4.10 - Coeficiente de partição (Log P) para os compostos sintetizados ..	74
TABELA 4.11 - Resultados obtidos para as constantes K _{sv} e K _q dos complexos ..	83
TABELA 4.12 - Resultados obtidos para as constantes K _b e n para os complexos	85
TABELA 4.13 - Parâmetros termodinâmicos para os complexos estudados	86
TABELA 4.14 - Atividade citotóxica in vitro (IC ₅₀) e índice de seletividade para os complexos nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e V79, depois de 48h.	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Fórmula estrutural da cisplatina.	18
FIGURA 1.2 - Fórmulas estruturais dos complexos análogos da cisplatina.	19
FIGURA 1.3 - Fórmulas estruturais dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e RAPTAC.	21
FIGURA 1.4 - Fórmula estrutural geral dos aminoácidos.	23
FIGURA 1.5 - Fórmulas estruturais dos aminoácidos utilizados como ligantes nas sínteses dos complexos.	24
FIGURA 1.6 - Representação das ligações σ e π (retrodoação) entre metal-ligante.	27
FIGURA 1.7 - Representação dos possíveis modos de interação complexo-DNA. FONTE: (BARRA e NETTO, 2015).	29
FIGURA 3.1- Reação de redução do MTT a formazan.....	41
FIGURA 4.1 – Representação da rota de síntese para a obtenção dos complexos contendo os aminoácidos.....	42
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo precursor cis-[RuCl ₂ (dppb)(bipy)], em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.....	44
FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3), em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.....	45
FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.....	46
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2), em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.....	47
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de ^1H obtido para o aminoácido L-cisteína.HCl, em CD ₃ OD, supressão de H ₂ O.	47
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CD ₃ OD.	48
FIGURA 4.8 – Mapa de contorno COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) obtido para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CD ₃ OD.	49
FIGURA 4.9 - Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 obtidos para o composto [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CD ₃ OD.	50
FIGURA 4.10 – Mapa de contorno HSQC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) obtido para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CD ₃ OD.	51

FIGURA 4.11 - Espectros de absorção na região do IV para o aminoácido L-deoxialliina e para o complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3).....	54
FIGURA 4.12 - Espectros de absorção na região do IV para o aminoácido L-cisteína e para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1).....	56
FIGURA 4.13 - Espectros de absorção na região do IV para o aminoácido D-penicilamina e para o complexo [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2).	57
FIGURA 4.14-Espectros eletrônicos na região do UV-vis do precursor cis-[RuCl ₂ (dppb)(bipy)] 8,6 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e do complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3) 5,5 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , em CH ₂ Cl ₂	59
FIGURA 4.15 - Espectros eletrônicos na região do UV-vis dos complexos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1) 5,3 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2) 8,9 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , em CH ₂ Cl ₂	60
FIGURA 4.16 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para os complexos A - [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), B - [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2) e C - [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3) em diferentes concentrações.	62
FIGURA 4.17 - Voltamogramas cíclicos dos complexos 1, 2 e 3, em solução de PTBA 0,1 mol L ⁻¹ em CH ₂ Cl ₂	64
FIGURA 4.18 - Voltamogramas de pulso diferencial dos complexos 1, 2 e 3 em solução de PTBA 0,1 mol L ⁻¹ em CH ₂ Cl ₂	65
FIGURA 4.19 - Voltamogras de pulso diferencial para os aminoácidos em tampão Tris pH = 7,4.	66
FIGURA 4.20 - Estrutura de raios X do complexo 1 , mostrando os dois diastereoisômeros identificados como Λ , L (esquerda) e Δ , L (direita). Os átomos elipsóides são colhidos com 50% de probabilidade.	68
FIGURA 4.21 - Principais diferenças intramoleculares dos dois isômeros do complexo 1	69
FIGURA 4.22 - (A) Estrutura cristalográfica do complexo 2 (ORTEP 50% de probabilidade). (B) Ligação intermolecular H entre Cl- e COOH no complexo 2. .	70
FIGURA 4.23 - Espectros de RMN de ³¹ P { ¹ H} ao longo de 48h para o composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3). DMSO/ capilar de D ₂ O.....	71
FIGURA 4.24 - Espectros de RMN de ³¹ P { ¹ H} ao longo de 48h para o composto [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1) em DMSO/capilar de D ₂ O.....	72
FIGURA 4.25 - Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1) no período de 48h em DMSO/capilar de D ₂ O.....	73

FIGURA 4.26 - Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ao longo de 48h para o composto $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2) em DMSO/capilar de D_2O	73
FIGURA 4.27 - Espectros de titulações espectroscópicas dos complexos A) $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1), B) $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2) e C) $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. $[\text{DNA}]_{\text{inicial}} = 4,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em pH 7,4.	77
FIGURA 4.28 - Gráfico $[\text{DNA}]/(\varepsilon a - \varepsilon f)$ versus $[\text{DNA}]$ para o composto $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	78
FIGURA 4.29 - Efeito do aumento das concentrações dos complexos e do Laranja de Tiazol na viscosidade relativa do CT-DNA ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão tris-HCL a $25 (\pm 0.1) ^\circ\text{C}$	79
FIGURA 4.30 - Espectros de emissão da HSA em concentrações crescentes dos complexos A) $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1), B) $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2) e C) $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (3). Concentração da HSA = $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, pH = 7,4 e T = 310 K.	81
FIGURA 4.31 – Gráficos F_0/F versus $[Q]$ dos complexos A) $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1), B) $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2) e C) $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (3) em diferentes temperaturas.	83
FIGURA 4.32 - Gráfico de viabilidade celular para as linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e V79 para todos os complexos.	87

RESUMO

“CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO AMINOÁCIDOS SULFURADOS EM CÉLULAS TUMORAIS”

O trabalho apresenta a síntese e a caracterização de três novos complexos de rutênio II contendo aminoácidos sulfurados, a fim de avaliar a provável influência dos aminoácidos, sobre a atividade citotóxica dos complexos. Estes compostos foram caracterizados pelas espectroscopias de RMN de ^{31}P , ^1H e ^{13}C , infravermelho e UV-visível, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, condutividade molar, análise elementar e difração de raios X de monocristal. Foram realizados estudos de lipofilicidade, sendo que os valores de Log P para os compostos estão dentro dos limites indicados pela literatura para uma boa absorção. Foi realizado também o estudo de reatividade dos complexos quanto à possibilidade de troca dos ligantes pelo DMSO, sendo que em dois dos compostos foi observada a troca. No entanto essa troca não foi total, no tempo estudado de 48h. Nos estudos de interação dos complexos com o DNA obteve-se resultados de titulação espectrofotométrica e viscosidade que indicaram que os compostos interagem fracamente com o DNA, podendo ser interação do tipo eletrostática ou entre os sulcos. No estudo de interação dos complexos com a HSA, por titulação espectrofluorimétrica, os compostos apresentaram constante de ligação (K_b) da ordem de 10^4 , que indicaram que os compostos interagem com a HSA, sendo o mecanismo de interação estático e as forças envolvidas hidrofóbicas. Também foi avaliada a citotoxicidade dos complexos frente às linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e uma célula não tumoral, a V79 (fibroblastos de hamster chinês), nas quais os compostos foram ativos. Dentre os compostos, o complexo 2 destacou-se por apresentar um bom índice de seletividade (3,79) com relação a linhagem tumoral de mama triplo negativo (MDA-MB-231). Portanto os resultados obtidos neste trabalho foram de grande relevância para contribuir para a geração de conhecimento acerca da importância dos aminoácidos no planejamento de novos compostos como potenciais antitumorais.

ABSTRACT

“CYTOTOXICITY OF RUTHENIUM COMPLEX CONTAINING SULPHUR AMINO ACIDS IN TUMOR CELLS.”

The work presents the synthesis and characterization of three new ruthenium II complexes containing sulfur amino acids, to evaluate the probable influence of the amino acids on the complexes cytotoxic activity. The complexes were characterized by ^{31}P , ^1H and ^{13}C NMR, infrared and UV-visible spectroscopies, cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry, molar conductivity, elemental analysis, and monocystal X-ray diffraction. The studies of lipophilicity showed Log P values for the compounds, within the limits indicated by the literature for good absorption. The reactivity study of the complexes showed that in compounds 1 and 2 there is an exchange of ligands when exposed to DMSO, generating several species in solution after the period of 48 h. While in compound 3 this exchange did not occur. In the interaction studies of the complexes with the DNA, results of spectrophotometric titration and viscosity were obtained, which indicated that the compounds interact weakly with the DNA, which may be electrostatic or between the grooves. In the study of the interaction of the complexes with the HSA, by spectrofluorimetric titration, the compounds showed a binding constant (K_b) of the order of 10^4 , which indicated that the compounds interact with the HSA, with the mechanism of static interaction and the involved forces, are hydrophobic forces. The cytotoxicity of the complexes also evaluated against breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) and a non-tumor cell, V79 (Chinese hamster fibroblasts), in which the compounds were active. The complex 2 stood out for presenting a selectivity index good (3.79) about the triple-negative breast tumor line (MDA-MB-231). Therefore, the results obtained in this study were relevant to contribute to the generation of knowledge about the importance of amino acids in the planning of new compounds as potential antitumor agents.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS ESTRUTURAIS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 - INTRODUÇÃO.....	17
1.1 - Câncer: estatística e definições.....	17
1.2 - O uso de compostos inorgânicos na terapia do câncer.....	18
1.2.1 - Complexos de rutênio, potenciais quimioterápicos.....	20
1.3 - Aminoácidos como ligantes.....	23
1.3.1 - Penicilamina.....	24
1.3.2 - Cisteína.....	25
1.3.3 - Deoxialliina.....	25
1.4 - O precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)] no planejamento de novos complexos.....	26
1.5 - Interação com biomoléculas.....	28
1.5.1 - Interação com o DNA.....	29
1.5.2 - Interação com HSA.....	30
2 - OBJETIVOS.....	32
2.1 - Objetivo Geral.....	32
2.2 - Objetivos específicos.....	32
3 - METODOLOGIA.....	33
3.1 - Reagentes e solventes.....	33
3.2 - Síntese dos precursores de rutênio.....	33
3.2.1 - Síntese do complexo [RuCl ₂ (PPh ₃) ₃].....	33
3.2.2 - Síntese do complexo [RuCl ₂ (dppb)] ₂ (μ-dppb).....	34

3.2.3 - Síntese do complexo [RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	34
3.3 - Síntese dos complexos de rutênio contendo os aminoácidos	34
3.3.1 - Complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	34
3.3.2 - Complexo [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	35
3.3.3 - Complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	35
3.4 - Caracterização dos complexos de rutênio contendo aminoácidos	35
3.4.1 - Análise elementar	35
3.4.2 - Condutividade molar	36
3.4.3 - Eletroquímica	36
3.4.4 - Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV)	36
3.4.5 - Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)	37
3.4.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	37
3.5 - Lipofilicidade.....	37
3.6 - Estudo de interação com o DNA.....	38
3.6.1 - Titulação espectrofotométrica	38
3.6.2 - Medidas da viscosidade do DNA	39
3.7 - Estudo de interação com a HSA.....	40
3.7.1 - Medidas espectrofluorimétricas.....	40
3.8 - Ensaio de Viabilidade celular	40
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 - Síntese dos complexos contendo os aminoácidos	42
4.2 - Caracterização dos complexos contendo os aminoácidos.....	43
4.2.1 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ³¹ P { ¹ H}.....	43
4.2.2 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	47
4.2.3 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	52
4.2.4 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e do visível.....	58

4.2.5 - Estudo eletroquímico	62
4.2.6 - Análise elementar e condutividade molar.....	66
4.2.7 - Difração de raios X	68
4.3 - Estudo de reatividade em DMSO dos novos complexos	70
4.4 - Determinação do coeficiente de partição.....	74
4.5 - Estudo de interação dos complexos com o DNA.....	75
4.5.1 - Titulação espectrofotométrica	75
4.5.2 - Medidas de viscosidade.....	78
4.6 - Estudo de interação dos complexos com a HSA	80
4.7 - Determinação da citotoxicidade dos complexos	86
5 - CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE I.....	102
APÊNDICE II.....	109

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer: estatística e definições

Baseada nas estatísticas de incidência e mortalidade do câncer, a Organização Mundial da Saúde (OMS), alerta para o aumento da incidência dessa doença, cujos novos casos no mundo podem chegar a 22 milhões nas duas próximas décadas. No Brasil uma estimativa feita para o ano de 2016, e válida para o ano de 2017, apontou aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente na população brasileira com aproximadamente 180 mil novos casos, seguido pelos cânceres de próstata (61 mil), o mais incidente dentre os homens e o de mama (58 mil), o mais incidente dentre as mulheres (INCA, 2015).

O câncer é a palavra utilizada para denominar várias doenças que possuem em comum o crescimento desordenado das células. Essas células podem ainda invadir os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Esse processo de desenvolvimento do câncer pode ser causado por fatores externos que estão relacionados ao meio ambiente, ou hábitos sócio-culturais, e aos fatores internos que, na maioria das vezes, são geneticamente pré-determinados. Alguns dos fatores externos bem conhecidos são o cigarro que pode causar câncer de pulmão e a exposição excessiva ao sol que pode causar câncer de pele (COLDITZ et al, 2006).

Atualmente estão disponíveis para o tratamento do câncer a cirurgia, tratamento mais recomendado no caso de condições favoráveis à retirada do tumor; a radioterapia, utilizada principalmente em tumores localizados que não podem ser retirados por cirurgia e a quimioterapia que utiliza medicamentos que destroem, controlam ou inibem o crescimento das células cancerígenas. Essas formas de tratamento também podem ser usadas em combinação (DE ALMEIDA et al., 2005; WHO, 2008;)

A radioterapia é um tratamento no qual se utilizam radiações ionizantes para destruir ou impedir que as células do tumor aumentem. Essas radiações podem gerar efeitos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias do DNA ao interagirem com os tecidos. Assim a morte celular pode ocorrer por diferentes mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua

incapacidade de reprodução. Alguns efeitos colaterais são frequentes, entre eles estão cansaço, reações na pele, perda de apetite e dor ao engolir (INCA, 2016).

Os quimioterápicos agem pelos mais variados mecanismos possíveis, sendo que na maioria dos casos ainda não existe conhecimento claro sobre o modo de ação dos compostos. Os agentes quimioterápicos, além de afetarem as células cancerígenas, também afetam as células normais o que provoca efeitos colaterais (DE ALMEIDA et al., 2005).

Apesar dos vários avanços no tratamento da doença todos os métodos são limitados, havendo a necessidade da busca do aperfeiçoamento de todos eles. No ramo da quimioterapia os esforços estão direcionados para o desenvolvimento de novos fármacos que possuam eficiência no tratamento e que possam minimizar os efeitos colaterais que são observados com os atuais quimioterápicos. Nesse contexto, compostos inorgânicos têm chamado a atenção desde a descoberta da citotoxicidade da cisplatina e de sua eficácia no tratamento de vários tipos de câncer.

1.2 - O uso de compostos inorgânicos na terapia do câncer

O uso de compostos inorgânicos na terapia do câncer iniciou-se com a descoberta da citotoxicidade da cisplatina (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]) (Figura 1.1) por Rosenberg e colaboradores na década de 60, quando estudavam o crescimento de uma colônia da bactéria *Escherichia coli*. Em seguida o composto foi testado em ratos inoculados com sarcoma 180 e leucemia L1210, mostrando-se bastante ativo, sendo aprovado para testes clínicos fase I em 1971 e aprovado para o tratamento do câncer de próstata em 1978 (HIGBY et al. 1974; NEVES e VARGAS, 2011; ROSENBERG et al., 1965; ROSENBERG et al. 1967; ROSENBERG e VAN CAMP, 1970).

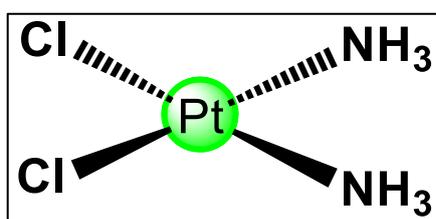


FIGURA 1.1 - Fórmula estrutural da cisplatina.

A cisplatina apresenta algumas limitações como resistência adquirida por alguns tumores, baixa solubilidade em meio aquoso, o que limita sua administração à via intravenosa, além dos efeitos colaterais que são apresentados pelos pacientes como, nefrotoxicidade (lesão renal), neurotoxicidade (danos ao sistema nervoso), ototoxicidade (perda auditiva), pressão arterial elevada, diarreia, náuseas e vômitos (KARASAWA e STEYGER, 2015; KELLAND, 2007; MCWHINNEY et al., 2009; SHEN et al., 2012).

Os problemas relacionados a cisplatina mostraram a necessidade do desenvolvimento de novos quimioterápicos buscando reduzir a toxicidade e aumentar o número de tipos de câncer que poderiam ser tratados. Com isso vários análogos da cisplatina foram desenvolvidos e atualmente são empregados como agentes antineoplásicos (Figura 1.2) (NEVES E VARGAS, 2011; PASETTO et al., 2006; WHEATE et al., 2010).

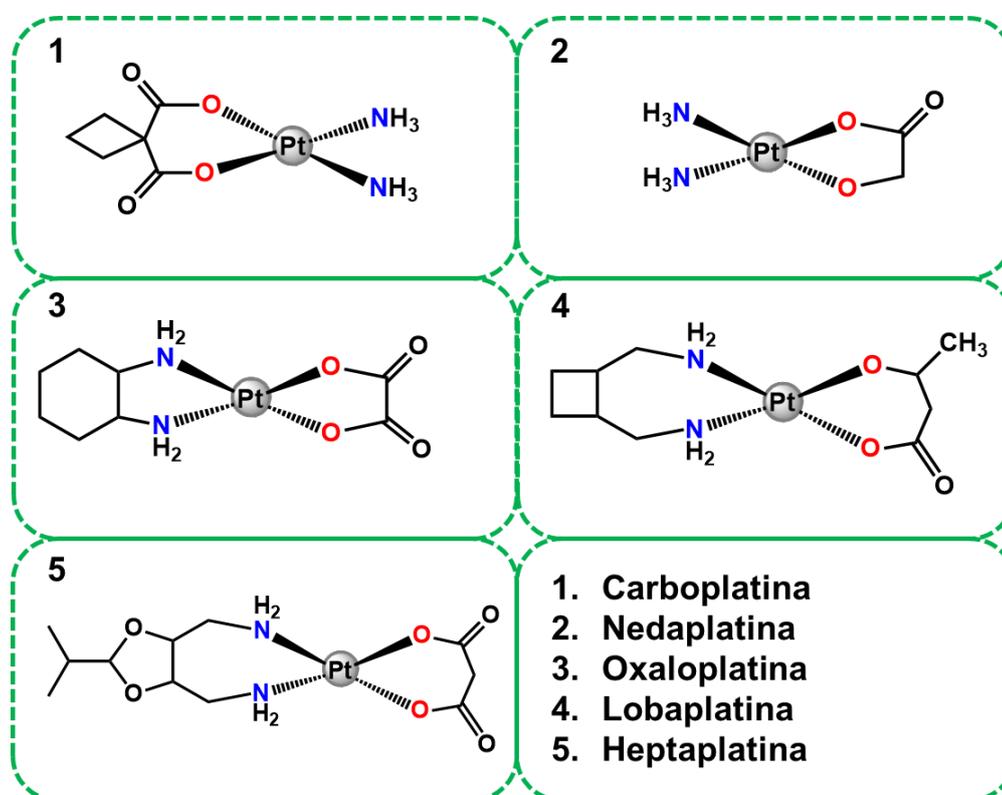


FIGURA 1.2 - Fórmulas estruturais dos complexos análogos da cisplatina.

A carboplatina, segundo fármaco de platina aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico, se diferencia da cisplatina pela presença de ligantes do tipo carboxilato (ligantes bidentados) no lugar dos cloretos, o que confere a esse composto maior solubilidade em água. Ele também se liga em

menor extensão às proteínas do plasma e é mais facilmente excretado pela urina, tornando-o menos tóxico ao organismo humano. Porém esse fármaco é menos ativo em alguns tipos de câncer quando comparado à cisplatina (NEVES E VARGAS, 2011).

A oxaloplatina, que difere da cisplatina pela presença do grupo oxalato e do ligante diamino-ciclohexano possui a vantagem de formar adutos platina-DNA, que não são reconhecidos pelo sistema de reparo do DNA, fazendo com que esse fármaco seja mais ativo em linhagens de células resistentes à cisplatina. Além disso a oxaloplatina apresenta ausência de nefrotoxicidade. Foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 2002 e é empregado no tratamento de câncer colorretal metastático na França e em outros países Europeus (PASETTO et al., 2006).

Além da carboplatina e da oxaplatina, outros fármacos foram aprovados para uso clínico: nedaplatina, cuja comercialização é restrita ao Japão, a lobaplatina, utilizada na China e a heptaplatina, na Coreia (WHEATE et al., 2010).

Apesar de toda a eficácia dos compostos de platina muitas limitações no seu uso ainda são observadas, o que impulsiona a pesquisa em direção ao desenvolvimento de novos fármacos que contenham outros centros metálicos. Dentre esses metais o rutênio se apresenta como um dos principais candidatos a obtenção desses novos fármacos, como será enfatizado a seguir.

1.2.1 - Complexos de rutênio, potenciais quimioterápicos

Os complexos de rutênio apresentam vantagens que têm chamado a atenção de vários pesquisadores, como por exemplo, citotoxicidade seletiva para as células cancerígenas e atividade contra linhagens celulares resistentes às drogas de platina ou ainda atividade contra linhagens em que a cisplatina é inativa (BERGAMO et al., 2012; BRABEC e NOVAKOVA, 2006).

Algumas propriedades dos compostos de rutênio como possibilidade de se ligar com moléculas doadoras de O e N de uma forma muito semelhante às drogas de platina e possibilidade de obter pró-drogas (rutênio no estado de oxidação 3+), que podem ser reduzidas seletivamente em tumores sólidos onde o baixo teor de oxigênio cria um ambiente redutor, podem justificar suas vantagens em relação a outros centros metálicos. Além disso o rutênio pode mimetizar o ferro,

podendo ser transportado pela transferrina para as células tumorais, dada a maior necessidade de ferro dessas células (ANTONARAKIS e EMADI, 2010; BERGAMO et al., 2012).

Os complexos mais promissores de Ru desenvolvidos até hoje foram o $[trans-RuCl_4(1H-imidazol)(DMSO-S)]$ (NAMI-A), o $[trans-RuCl_4(1H-indazol)_2]$ (KP1019) e o RAPTA-C (Figura 1.3) (BACAC et al., 2004; HARTINGER et al., 2006; SAVA, et al., 2003).

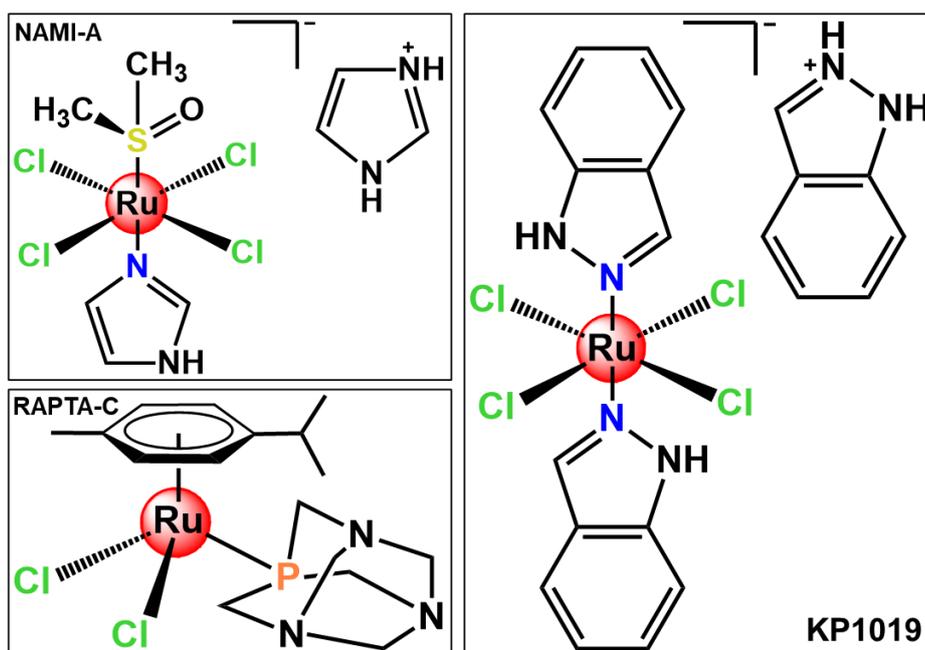


FIGURA 1.3 - Fórmulas estruturais dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e RAPTA-C.

O NAMI-A chamou a atenção porque apresentou a propriedade de prevenir a formação de metástase e inibir o seu crescimento devido a sua capacidade de aumentar a espessura da membrana ao redor do tumor primário impedindo que as células invadam os vasos sanguíneos e tecidos vizinhos (SAVA et al., 2002; ALESSIO et al., 2004; BACAC et al., 2004). O KP1019 desenvolvido pelo grupo de Keppler, mostrou-se promissor devido à sua atividade contra tumores resistentes à cisplatina, como por exemplo, o MAC15A (modelo de carcinoma de cólon). Seu mecanismo de ação provavelmente envolve acumulação no receptor de transferrina, subsequente redução a espécies de Ru (II), interação com o DNA e indução de apoptose (HARTINGER et al., 2006). O RAPTA-C possui o ligante PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) que confere ao complexo ativação seletiva

em ambiente com baixo teor de oxigênio (BERGAMO et al., 2006). O NAMI-A e o KP1019, estão na fase II de ensaios clínicos, sendo que o KP1019 está em desenvolvimento clínico como o sal de sódio NKP-1339 (CHELLAN e SADLER, 2015).

Nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos) também vem desenvolvendo uma série de compostos de Ru que têm apresentado resultados promissores, como os mostrados na Tabela 1.1, em que os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50 % da viabilidade celular) são inferiores aos da cisplatina demonstrando a importância do desenvolvimento de compostos de rutênio como potenciais quimioterápicos.

TABELA 1.1 - Valores de IC₅₀ de alguns complexos de Rutênio contra as linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7 e a não tumoral L-929.

COMPOSTOS	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		
	MDA-MB-231	MCF-7	L-929
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,48 ± 0,20*	-	0,62 ± 0,55*
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	0,50 ± 0,20*	-	0,23 ± 0,10*
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	0,73 ± 0,50*	-	2,40 ± 0,40*
[Ru(lap)(dppb)(bipy)]PF ₆	-	0,70 ± 0,59**	0,80 ± 0,15**
[Ru(lau)(dppb)(bipy)]PF ₆	-	0,30 ± 0,18**	0,70 ± 0,23**
[Ru(lau)(dppb)(fen)]PF ₆	-	0,20 ± 0,19**	1,22 ± 0,74**
[Ru(dmpm)(dppp)(bipy)]PF ₆	0,19 ± 0,52 [#]	-	-
[Ru(dmpm)(dppe)(bipy)]PF ₆	0,14 ± 1,19 [#]	-	-
cc-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,90 ± 0,40 ^{##}	-	-
tc-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF ₆	2,50 ± 0,60 ^{##}	-	-
[RuCl(lm)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,56 ± 0,00 [§]	-	-
[RuCl(alo)(dppb)(5mebipy)]PF ₆	0,66 ± 0,86 [§]	-	-
[RuCl(AcPyBz)(dppb)]	0,40 ± 0,80 ^{§§}	-	-
Cisplatina	2,40 ± 0,20	8,91 ± 2,60**	20,10 ± 0,20**

Sendo: bipy = 2,2'-bipiridina, dmpm = 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano, dppe = 1,2-bis(difenilfosfina)etano, ABz = ácido benzóico, AG = ácido gálico, lap = lapachol, lau = lausona, fen = fenantrolina, lm = imidazol, alo = alopurinol, AcPyBz = S-benzil-N-(2-acetilpiridina)ditiocarbazato (^{##}BARBOSA, 2007; ^{§§}GRAMINHA, 2010; [#]LIMA, 2010; [§]CORREA, 2013; ^{*}OLIVEIRA, 2014; ^{**}GRAMINHA, 2015).

1.3 - Aminoácidos como ligantes

Aminoácidos são importantes moléculas biológicas, constituintes das proteínas, que desde há muito tem atraído a atenção da química de coordenação e organometálica, como ligantes versáteis. Eles possuem diferentes pontos de coordenação, podendo ligar-se ao metal pelos átomos dos grupos doadores amino, carboxilato ou tiol. Todos eles têm um carbono alfa, ao qual encontram-se ligados quatro grupos: um hidrogênio, um grupo carboxílico, um grupo amino e um grupo R (Figura 1.4), sendo que o grupo R é o lado da molécula que os diferem (BECK et al., 1998; LEHNINGER et al., 2006; STANILA et al., 2007).

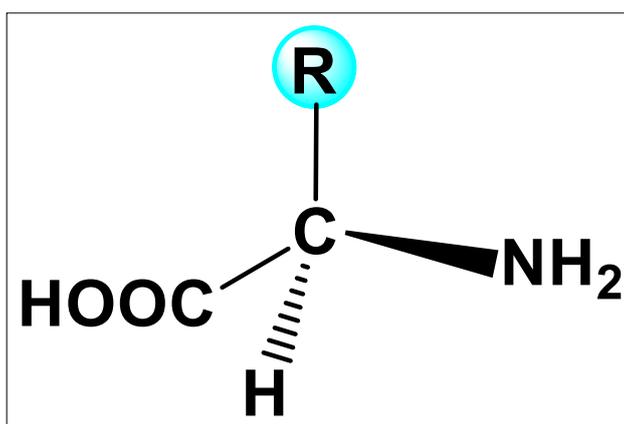


FIGURA 1.4 - Fórmula estrutural geral dos aminoácidos.

São vinte os aminoácidos naturais indispensáveis para um bom funcionamento de um grande número de funções biológicas nos seres vivos, os quais podem ser classificados de acordo com a polaridade do grupo R, variando de não polares até altamente polares. Quando em solução aquosa, a pH= 7, os aminoácidos existem na forma de íon dipolar, zwitterion, podendo atuar como um ácido ou como uma base (LEHNINGER et al., 2006).

Neste trabalho optou-se por sintetizar compostos de rutênio tendo como ligantes, aminoácidos sulfurados que apresentam propriedades como por exemplo, forte capacidade de quelação a íons de metais de transição, além disso, alguns destes compostos (tióis de baixo peso molecular) têm sido utilizados como adjuvantes em quimioterapia devido a suas propriedades de eliminação de radicais livres, reduzindo assim a toxicidade ao tecido normal. Eles também têm apresentado efeitos citotóxicos ou citostáticos em diferentes tipos de células

cancerígenas, podendo esses efeitos estarem associados a geração de espécies reativas de oxigênio, inibição da atividade de enzimas por quelação a cofatores de metais como cobre ou zinco, modulação de proteínas celulares e da membrana por formação de ligação dissulfeto em resíduos de cisteína ou ainda, efeito sobre vias de sinalização celular por apoptose (WADHWA e MUMPER, 2013). Assim foram utilizados como ligantes para a síntese dos complexos os aminoácidos, D-penicilamina, L-cisteína e L-deoxialliina (S-alil-L-cisteína) (Figura 1.5).

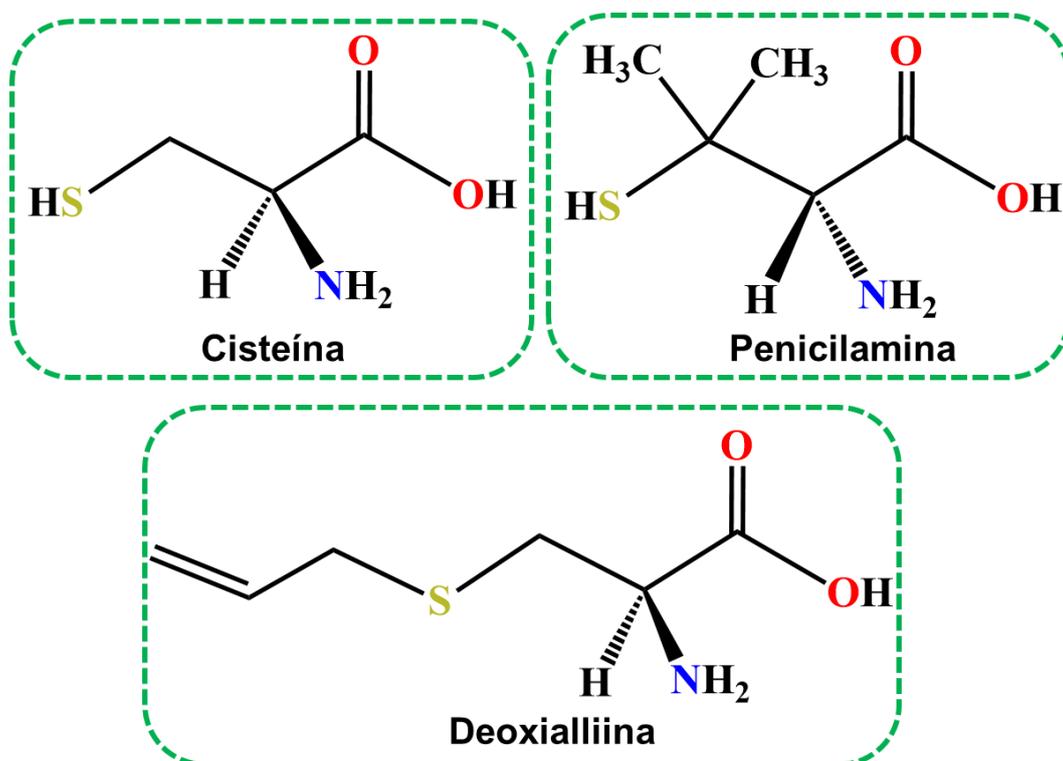


FIGURA 1.5 - Fórmulas estruturais dos aminoácidos utilizados como ligantes nas sínteses dos complexos.

1.3.1 - Penicilamina

A penicilamina é um forte agente quelante que reage com a maioria dos metais pesados. Tem uma grande importância farmacêutica, sendo usada para o tratamento de algumas doenças como artrite (mecanismo de ação não conhecido) e doença de Wilson. É também utilizada em casos de envenenamento com metais pesados e apenas o enantiômero D é terapêutico, sendo o L-enantiômero considerado altamente tóxico (interferência no metabolismo dos L-aminoácidos), uma vez que possui a mesma configuração dos L-aminoácidos que são

constituintes das proteínas. É relatado na literatura efeitos citotóxicos da penicilamina em células de leucemia e câncer de mama, quando esta é combinada ao sulfato de cobre (GUPTE e MUMPER, 2007; WADHWA e MUMPER, 2013).

1.3.2 - Cisteína

A cisteína é um aminoácido que possui na sua cadeia lateral o grupo tiol. É sintetizada a partir da metionina através da via de transulfuração. É principalmente encontrada em proteínas e no tripéptido glutatona. A cisteína quando exposta ao ar ou sob determinadas condições fisiológicas oxida-se formando cistina, composta por duas cisteínas unidas por uma ligação dissulfeto. Possui atividade antioxidante, devido sua grande capacidade de inativar os radicais livres. Algumas proteínas têm suas atividades fortemente dependentes da cisteína, como por exemplo, as caspases que participam na proteólise em apoptose celular. Na estrutura protéica, as pontes dissulfeto entre resíduos das cadeias laterais de cisteínas são responsáveis pelo arcabouço tridimensional, sendo desta maneira responsável pela estabilidade e manutenção da função biológica de algumas proteínas e enzimas endógenas (DOBROWOLSKI et al., 2007).

1.3.3 - Deoxialliina

A deoxialliina, (S-alil-cisteína), é um aminoácido derivado da cisteína, possui um átomo de enxofre em sua estrutura e é um produto de origem vegetal, presente na cebola e no alho. Estudos tem mostrado que a deoxialliina pode ser considerada como antagonista biológica da nitrosomorfolina, substância que é uma das causas do desenvolvimento de câncer hepático em seres humanos (DION et al., 1997). Complexos de Pd (II) e Pt (II) com este aminoácido, foram avaliados em células tumorais Hela (célula tumoral de colo uterino humana) e TM5 (célula murina de melanoma), apresentando resultados promissores *in vitro* (CORBI et al., 2005). O complexo de Pd (II), também demonstrou possuir atividade antibacteriana contra cepas de bactérias patogênicas de *S. aureus* e *E. coli* (SPERA, et al., 2011).

1.4 - O precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] no planejamento de novos complexos

O precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] é bastante interessante porque alia ao centro metálico Ru, duas classes de ligantes que são bastante versáteis, as fosfinas e as bipyridinas, além de um átomo de cloro lábil. Este complexo é hexacoordenado, com geometria octaédrica no qual o rutênio encontra-se no estado de oxidação +2 (QUEIROZ et al., 1998).

O rutênio é um metal pouco abundante encontrado na natureza junto com os metais do grupo da platina: Pt, Pd, Ir, Os e Rh. Na tabela periódica localiza-se no bloco d, grupo 8, quinto período. Apresenta configuração eletrônica [Kr] 4d⁷ 5s¹. Os estados de oxidação mais comuns do rutênio são +2, +3 e +4, mas podem ser encontrados compostos desse metal cujo número de oxidação varia de -2 a +8 (LEE, 1999). O rutênio forma um elevado número de compostos de coordenação que podem ser aplicados desde o uso na catálise até a sensibilizadores em células solares (CHI et al. 2015; KUMAR et al., 2014; MANIKANDAN e JEGANMOHAN, 2015; REES e BARANOFF, 2014).

O rutênio é um metal que também vem sendo utilizado no desenvolvimento de compostos de coordenação como potenciais quimioterápicos para o tratamento do câncer, sendo conhecida uma variedade de compostos de rutênio (II) e também rutênio (III) que apresentam atividade citotóxica em diversas linhagens de células de câncer e em modelos animais (BRABEC e NOVÁKOVÁ, 2006; BERGAMO et al., 2012). É atribuído aos compostos de rutênio menor toxicidade quando comparados aos compostos de platina devido à capacidade do elemento de mimetizar a ligação do ferro com biomoléculas, assim o rutênio utiliza os mesmos mecanismos de defesa do organismo para eliminação de ferro em excesso (ANTONARAKIS e EMADI, 2010).

As fosfinas são ligantes que apresentam um par de elétrons capaz de formar ligações σ estáveis e orbitais híbridos ($3p\sigma^*d\pi$) capazes de receber elétrons (ligantes σ -doador e π -receptor de densidade eletrônica) e, portanto, apropriados à retrodoação. Esse tipo de interação entre metais e ligantes ocorre quando o metal possui uma rica densidade de elétrons, e pode doar estes a orbitais vazios do ligante, que apresentem simetria adequada (Figura 1.6) (VALLE et al., 2008; LIMA, 2010).

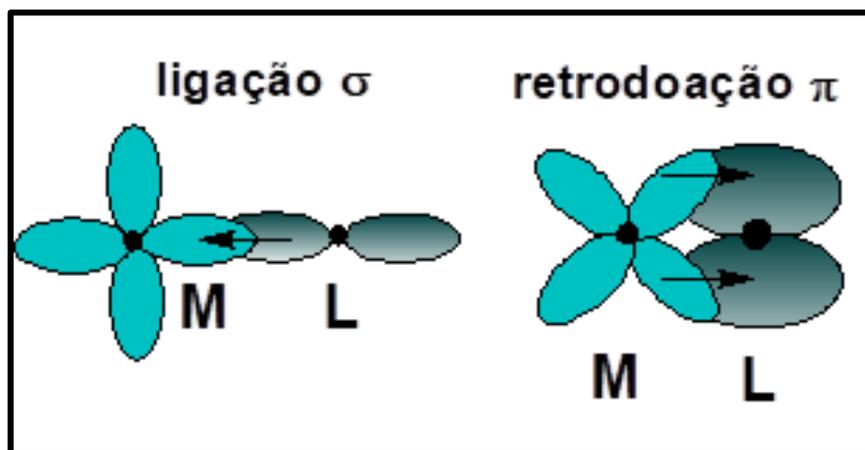


FIGURA 1.6 - Representação das ligações σ e π (retrodoação) entre metal-ligante.

Os ligantes fosfínicos, devido a possibilidade de variar o grupo R com grupos doadores e receptores de densidade eletrônica, são capazes de estabilizar compostos de coordenação de altos e baixos estados de oxidação. Por exemplo, sendo o grupo R um metil (CH_3) o ligante fosfínico será um forte σ -doador e um pobre π -receptor, pois o metil é um bom doador de densidade eletrônica. O contrário ocorre substituindo-se os grupos metil por flúor. Neste caso o ligante fosfínico terá um pobre caráter σ -doador e forte caráter π -receptor, devido à alta eletronegatividade do flúor (QUEIROZ e BATISTA, 1996).

As fosfinas são também úteis no estudo do efeito dos ligantes na labilidade da ligação de alguns complexos do tipo P-M-L, como também na afinidade do centro metálico pelo ligante. Outra característica das fosfinas é o acentuado efeito *trans*, que junto aos efeitos estéricos, leva à formação de complexos facilmente dissociáveis, o que é indispensável em catalisadores homogêneos e também de interesse na citotoxicidade de complexos fosfínicos (VALLE et al., 2008; COTTON e WILKINSON, 1980; QUEIROZ e BATISTA, 1996).

As bipyridinas, são dímeros da piridina que são pouco polares e, devido aos pares de elétrons não-ligantes dos átomos de nitrogênio nos anéis heteroaromáticos são muito usados na química de coordenação. Esses ligantes se coordenam ao metal em uma interação σ -doadora e π -receptora de elétrons do átomo de nitrogênio. Uma característica importante dessa classe de ligantes é a capacidade de assemelhar-se estruturalmente a moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas e enzimas, entre outras (SANTIAGO, 2004; CUNHA et al., 1999).

As bupiridinas destacam-se por suas propriedades catalíticas, luminescentes e condutoras de eletricidade, e atualmente em estudos de interação com o DNA e reconhecimento molecular quiral. Por exemplo, complexos com ligantes polipiridínicos têm sido utilizados como ferramenta para clivagem de DNA através de fotoirradiação (KE et al. 2014).

Desta forma sintetizaremos complexos de rutênio contendo este precursor e os ligantes aminoácidos para avaliação de suas propriedades citotóxicas.

1.5 - Interação com biomoléculas

O estudo de interação dos fármacos com biomoléculas é um passo importante para o entendimento do mecanismo de ação destes, no entanto, esta é uma tarefa complexa, uma vez que não se sabe como estes irão se comportar no organismo. As possibilidades de comportamento dos fármacos são as mais variadas, que pode ir desde a liberação de algum ligante no meio biológico até a interação com biomoléculas, que podem acarretar algum dano à célula e impedir sua replicação.

O DNA (ácido desoxirribonucléico) e a HSA (albumina do soro humana) são algumas das biomoléculas mais estudadas descritas na literatura. O DNA é o alvo farmacológico de vários fármacos usados atualmente em terapias e levando-se em conta que ele é o responsável por armazenar e transmitir a informação genética na célula, a ideia de atingi-lo para regular as funções celulares via modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação, é bastante lógica (HANNON, 2007). Já a HSA se torna importante devido ao fato desta ser a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, podendo funcionar como uma carreadora dos fármacos, uma vez que ela realiza o transporte e distribuição de várias substâncias endógenas e exógenas no organismo. Além disso ela possui outras funções como a regulação da pressão osmótica sanguínea e manutenção do pH do sangue (FEHSKE et al., 1981; HE e CARTER, 1992).

1.5.1 - Interação com o DNA

O DNA é formado por nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster. Os nucleotídeos são constituídos por um grupo fosfato, um açúcar (pentose) e uma base nitrogenada. A cadeia de açúcar-fosfato aniônica é hidrofílica e permanece em contato com a solução aquosa do meio intracelular, enquanto as bases nitrogenadas, que são planares e mais hidrofóbicas, orientam-se para o interior do DNA. A orientação das ligações no DNA faz com que se formem duas cavidades (fendas), ditas sulco maior e sulco menor. A estrutura supramolecular da hélice dupla é mantida por várias forças não-covalentes, tais como, interações π - π entre os anéis aromáticos; ligações de hidrogênio entre as bases; atração eletrostática entre as cadeias açúcar-fosfato (negativas) e os cátions em solução (CALLADINE et al., 2004). Dessa forma o DNA pode interagir com metalofármacos das mais variadas formas devido à sua riqueza estrutural (KEENE et al., 2009).

Na Figura 1.7 são mostradas as várias possibilidades de interação de compostos com o DNA. Interação do tipo covalente em que o composto interage de forma direta com as bases nitrogenadas do DNA. Interação do tipo não-covalente que podem ser eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor do DNA, ou por intercalações. Essas interações são regidas por diversos fatores, como densidade eletrônica; fatores estéricos; possibilidade de ligação de hidrogênio entre os complexos e o DNA; labilidade dos ligantes presentes no complexo e características estruturais e eletrônicas de ligantes planares rígidos, ricos em elétrons π que favorecem a intercalação, entre outros (BARRA e NETTO, 2015).

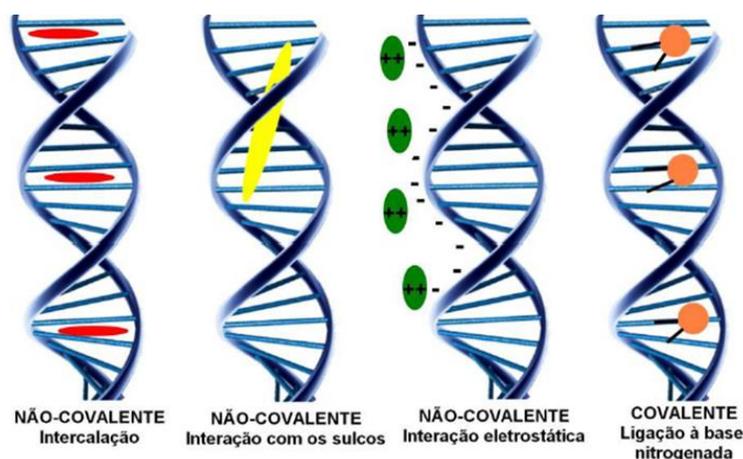


FIGURA 1.7 - Representação dos possíveis modos de interação complexo-DNA. FONTE: (BARRA e NETTO, 2015).

Existe uma variedade de técnicas que podem ser utilizadas para o estudo de interação de compostos com o DNA. Entre elas temos o experimento de medidas de viscosidade relativa do DNA que permite distinguir alguns dos principais tipos de interação (BARRA e NETTO, 2015) e a titulação espectrofotométrica para a determinação do K_b que utiliza da capacidade que tanto o DNA quanto os complexos possuem de absorver na região do UV-visível. Assim se houver interação composto/DNA suas bandas de absorção podem sofrer mudanças que podem ser monitoradas (SIRAJUDDIN et al., 2013). Estes experimentos serão realizados neste trabalho e posteriormente discutidos.

1.5.2 - Interação com HSA

A albumina sérica humana é um monômero de 66,5 kDa produzido no fígado, e a espécie mais abundante do plasma sanguíneo. Ela é composta de vários segmentos em alfa hélice, que se agrupam para formar dois subdomínios (A e B). Três pares idênticos destes subdomínios se unem para formar a albumina. A HSA é formada por 585 aminoácidos e 17 pontes dissulfetos (CARTER e HO, 1994; HE e CARTER, 1992).

Como já mencionado esta proteína possui a habilidade de se ligar a uma ampla variedade de moléculas e assim, é utilizada em estudos que buscam o entendimento da distribuição e concentração de drogas no organismo (ENYEDY et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2011). Um certo grau de afinidade do composto pela HSA é desejável, para ajudar a solubilizar substâncias que de outra forma poderiam ser pobremente distribuídas. Porém esta afinidade não pode ser tão elevada a ponto de as drogas chegarem aos sítios de ação lentamente, ou até não chegarem, e de não poderem ser eficientemente eliminadas. Além disso compostos com uma grande afinidade pela albumina requereriam grandes doses para atingir uma concentração efetiva *in vivo*.

Uma das características estruturais da albumina que permite o estudo de interação desta com outras moléculas, é a presença de 1 resíduo de triptofano que exibe a propriedade de fluorescência. Dessa forma uma das técnicas utilizadas para esse estudo é a espectroscopia de fluorescência. Este experimento permite avaliar o quanto essa propriedade é suprimida na presença do composto de interesse, e por meio de um tratamento quantitativo desse processo utilizando a

equação de Stern-Volmer, calcula-se a constante de ligação (K_b) que nos dá uma ideia da afinidade da albumina pelo composto (WU et al., 2008; IGLESIAS et al., 2015). Esta técnica será utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Sintetizar três novos complexos de rutênio que contenham como ligantes, aminoácidos sulfurados e avaliar se essa característica estrutural dos aminoácidos é determinante para o potencial citotóxico desses complexos frente às células tumorais.

2.2 - Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar compostos de rutênio contendo os aminoácidos D-penicilamina; L-cisteína ou L-deoxialliina, e o precursor $[RuCl_2(dppb)(bipy)]$, no qual a dppb = 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano e bipy = 2,2'-bipiridina;
- Avaliar a interação desses compostos com o DNA e a HSA;
- Determinar a atividade citotóxica dos complexos sintetizados frente às células tumorais;
- Avaliar se existe uma correlação estrutura-atividade com relação a presença ou não do enxofre no aminoácido.

3 - METODOLOGIA

3.1 - Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica, como indicado na Tabela 3.1. Todos os solventes de procedência Synth, utilizados nas sínteses foram devidamente purificados segundo métodos da literatura, sendo que os principais utilizados foram o metanol, diclorometano, éter etílico, tolueno e hexano. O solvente deuterado utilizado foi CD₃OD, de procedência ALDRICH e pureza 99,8 %.

TABELA 3.1 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados nas sínteses e caracterizações dos compostos

Reagente	Procedência	Pureza
Tricloreto de rutênio (RuCl ₃ ·nH ₂ O)	Sigma-Aldrich	99%
Trifenilfosfina (PPh ₃)	Sigma-Aldrich	99%
1,4-bis(difenilfosfina)butano	Sigma-Aldrich	99%
2,2'-bipiridina	Sigma-Aldrich	99%
Perclorato de tetrabutilamônio	Fluka	>98%
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Mallinckrodt	100%
D-penicilamina	Sigma-Aldrich	98-101%
L-cisteína. HCl.H ₂ O	Riedel-De Haen AG Seelze-Hannover	99%
L-deoxialliina	Sigma-Aldrich	98-101%

3.2 - Síntese dos precursores de rutênio

3.2.1 - Síntese do complexo [RuCl₂(PPh₃)₃]

O complexo [RuCl₂(PPh₃)₃] foi sintetizado segundo procedimento a seguir: adicionou-se RuCl₃·nH₂O (1,00 g; 4,82 mmol) em aproximadamente 250 mL de metanol previamente desaerado por 12h. Em seguida a solução de RuCl₃·nH₂O foi refluxada por 20 min sob atmosfera inerte. Depois resfriou-se a solução, adicionou-se a trifenilfosfina (PPh₃) (6,32 g; 24,09 mmol) e manteve-se o sistema

em refluxo por mais 3h. O precipitado marrom escuro formado foi filtrado, lavado com metanol e seco sob vácuo. Este procedimento foi descrito por STEPHESON e WILKINSON, 1966. Rendimento de 80,00%.

3.2.2 - Síntese do complexo $[RuCl_2(dppb)]_2(\mu-dppb)$

O complexo $[RuCl_2(dppb)]_2(\mu-dppb)$ foi sintetizado segundo procedimento descrito por BRESSAN e RIGO, 1975. Para tanto foram adicionados 1,00 g (1,04 mmol) do complexo $[RuCl_2(PPh_3)_3]$ e 1,33 g (3,12 mmol) da 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb) em 200 mL de hexano previamente desaerado. O sistema foi mantido em refluxo por 6h. O precipitado verde formado foi filtrado, lavado com hexano e seco sob vácuo. Rendimento de 85,00%.

3.2.3 - Síntese do complexo $[RuCl_2(dppb)(bipy)]$

O complexo $[RuCl_2(dppb)(bipy)]$ foi sintetizado conforme o seguinte procedimento: adicionou-se em 300 mL de tolueno previamente desaerados 0,60 g (0,37 mmol) do complexo $[RuCl_2(dppb)]_2(\mu-dppb)$ e dois equivalentes e meio da 2,2'-bipiridina (0,14 g; 0,93 mmol). A solução foi refluxada por 72h sob atmosfera inerte e agitação magnética. O precipitado vermelho formado foi filtrado, lavado com tolueno e hexano a quente e seco sob vácuo. Este procedimento foi descrito por QUEIROZ, et al. 1998. Rendimento: 87%.

3.3 - Síntese dos complexos de rutênio contendo os aminoácidos

3.3.1 - Complexo $[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)]$ (1)

Em um balão de 50 mL, L-cisteína.HCl (0,105 g; 0,598 mmol) foi dissolvida em 30 mL de metanol. Em seguida foi adicionado o $NaHCO_3$ (0,050g; 0,598 mmol) com o intuito de desprotonar a cisteína. Depois o precursor $[RuCl_2(bipy)(dppb)]$ (0,150 g; 0,199 mmol) foi adicionado à solução observando-se o aparecimento de uma coloração verde. O sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 1h. Após decorrido esse tempo o volume do metanol foi reduzido e em seguida água foi adicionada, ocorrendo a formação de um precipitado verde que foi

recolhido por filtração. Esse precipitado foi lavado com água e seco em dessecador sob pressão reduzida. Rendimento: 80,00%.

3.3.2 - Complexo $[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)]$ (2)

Em um balão de 50 mL, a D-penicilamina (0,060 g; 0,402 mmol) foi dissolvida em 30 mL de metanol. Depois o precursor $[RuCl_2(bipy)(dppb)]$ (0,150 g; 0,199 mmol) foi adicionado à solução observando-se o aparecimento de uma coloração verde. O sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 20h. Decorrido esse tempo o metanol foi removido e em seguida diclorometano foi adicionado para remoção do excesso da D-penicilamina, por filtração. Na solução coletada foi adicionado hexano que provocou a formação de um precipitado verde, recolhido em um funil de placa porosa, lavado com éter dietílico e seco em dessecador sob pressão reduzida. Rendimento: 75,00%.

3.3.3 - Complexo $[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF_6$ (3)

Em um balão de 100 mL, a L-deoxialliina (0,043 g; 0,268 mmol) foi dissolvida em 50 mL de metanol. Depois o precursor $[RuCl_2(bipy)(dppb)]$ (0,100 g; 0,133 mmol) foi adicionado à solução observando-se o aparecimento de uma coloração laranja. Em seguida foi adicionado o NH_4PF_6 (0,026 g; 0,159mmol). O sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 48h. Depois de decorrido esse tempo, o volume de metanol foi reduzido e água foi adicionada provocando a formação de um precipitado laranja, recolhido em um funil de placa porosa, lavado com água e seco em dessecador sob pressão reduzida. Rendimento: 85,00%.

3.4 - Caracterização dos complexos de rutênio contendo aminoácidos

3.4.1 - Análise elementar

Para a determinação do teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, os compostos depois de precipitados, foram macerados e secos e levados para um analisador CHN modelo EA 1108 da FISONs, no Laboratório de Análise

do Departamento de Química da UFSCar. Esta técnica é baseada no método de Pregl-Dumas em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector de condutividade térmica. A quantificação foi feita via calibração externa.

3.4.2 - Condutividade molar

Para as medidas de condutividade molar foram preparadas soluções dos compostos na concentração de $1,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 . As soluções foram levadas a um condutímetro Meter Lab., modelo CDM230, onde as medidas foram obtidas.

3.4.3 - Eletroquímica

As medidas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram feitas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Electrochemical Analyzer, modelo BAS 100B e uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: o de referência (Ag/AgCl) e os eletrodos de trabalho e auxiliar de platina, mergulhados em solução do eletrólito PTBA $0,102 \text{ mol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 .

3.4.4 - Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV)

As medidas espectroscópicas na região do infravermelho foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB – 102. As leituras foram medidas na faixa de $200 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, sendo realizados 32 scans. A técnica utilizada foi a de pastilhamento, nas quais as amostras foram preparadas diluindo-se as mesmas em Brometo de potássio (KBr).

3.4.5 - Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

As medidas espectroscópicas na região do ultravioleta-visível foram realizadas em um HP 8452A DIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com 1 cm de espessura (faixa de leitura: 200 a 800 nm). O volume total das soluções na cubeta foi de 2 mL. As soluções dos compostos foram preparadas em CH₂Cl₂ obtendo soluções nas concentrações de partida de 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹, que posteriormente foram diluídas para concentrações na ordem de grandeza de 10⁻⁵. As medidas foram realizadas em diferentes concentrações para a determinação da absorvidade molar dos compostos.

3.4.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas em um espectrômetro BRUKER DRX que pertence ao Departamento de Química da UFSCar. Os dados foram processados empregando-se os softwares MestReNOVA e ACDLABS 10.02. Na obtenção dos espectros de ³¹P{¹H} utilizou-se tubo capilar com água deuterada (D₂O) e solvente não deuterado (diclorometano). Para as análises de RMN de ¹³C foram preparadas soluções em que 20 mg dos compostos foram diluídas em 600 µL do solvente deuterado. Para as análises de RMN de ¹H as soluções foram obtidas diluindo-se 10 mg de composto em 600 µL do solvente também deuterado. Os deslocamentos químicos foram determinados usando-se como referência o tetrametilsilano (TMS). O solvente deuterado utilizado foi o metanol-d₄. Também foram realizados experimentos em duas dimensões de ¹³C e ¹H.

3.5 - Lipofilicidade

Para o estudo de lipofilicidade, foi utilizado o método *shake-flask* (TUTE, 1996) no sistema de solvente octanol-água. Para tanto 0,5 mg do composto foram dissolvidos em 1,00 mL de n-octanol e em seguida 1,00 mL de água foi adicionada a essa solução. Esse sistema foi mantido sob agitação e temperatura

controlada de 37 °C por um período de 24h. Em seguida as amostras foram levadas ao espectrofotômetro ultravioleta-visível HP 8452A DIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER onde foram determinadas as absorvâncias dos compostos. Com esses valores de absorvância e com a curva de calibração foram determinadas as concentrações dos compostos e conseqüentemente o Log P. A curva de calibração de cada composto foi obtida em octanol para a determinação da absorvância molar (ϵ) e conseqüentemente dos valores de Log P. Para a construção das curvas, 8 soluções de cada composto com concentrações conhecidas foram preparadas e levadas ao espectrofotômetro UV-vis. Assim o gráfico Abs *versus* b[COM] foi construído obedecendo a lei de Lambert-Beer, em que $Abs = \epsilon bc$, onde Abs é a absorvância da amostra em um determinado comprimento de onda (λ), ϵ é a absorvância molar dada em $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$, b é o caminho óptico da cela utilizada (1 cm) e c é o valor das concentrações das soluções preparadas, em mol L^{-1} . O valor do Log P foi determinado através dos dados de concentração obtidos nas duas fases para os compostos em triplicata de *shake-flask*.

$$\text{Log } P = \log \frac{[COM]_{\text{oct}}}{[COM]_{\text{água}}}$$

em que, a $[COM]_{\text{oct}}$ é a concentração do composto na fase orgânica (n-octanol) e $[COM]_{\text{água}}$ é a concentração do composto na fase aquosa (água).

3.6 - Estudo de interação com o DNA

3.6.1 - Titulação espectrofotométrica

Inicialmente preparou-se uma solução de DNA pela adição de aproximadamente 30 mg de CT-DNA (calf thymus) em 15 mL de tampão Tris-HCl, pH 7,4. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria UV-vis. Para isso, em uma cubeta contendo apenas o tampão (2000 μL) foram adicionados 50 μL da solução de DNA e realizada a medida. Sabe-se que a absorvância molar do DNA em 260 nm é $6600 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$. Assim, conhecendo-se a absorvância e a

absortividade molar em 260 nm, e o caminho óptico ($b = 1$ cm), determinou-se a concentração do DNA por meio da lei de Lambert-Beer:

$$Abs_{260} = \varepsilon_{260} \times b \times c$$

Para o estudo de interação foram utilizadas duas cubetas: na 1ª cubeta foram adicionados 1700 μ L de tampão Tris e 300 μ L de DMSO, correspondendo ao branco, e na 2ª cubeta foram adicionados 1700 μ L de tampão Tris e 300 μ L da solução de complexo em DMSO (esse procedimento foi realizado de tal forma que a concentração de complexo não ultrapassasse a lei de Lambert-Beer). Em seguida, sucessivas adições de 30 μ L de CT-DNA foram adicionadas em ambas as cubetas que foram homogeneizadas por cerca de 1 min, e depois registrado o espectro. O experimento foi realizado em triplicata. A utilização do branco foi para garantir que a variação espectral fosse exclusivamente devido à interação do complexo com o DNA.

3.6.2 - Medidas da viscosidade do DNA

O experimento de viscosidade foi realizado utilizando-se um viscosímetro de Ostwald mantido a uma temperatura constante de 25,0 ($\pm 0,2$) °C em um banho termostático. A viscosidade relativa do CT-DNA foi medida na presença de quantidades crescentes de cada complexo. Para tanto, soluções dos complexos foram preparadas com valores de R_i ($[COM]/[DNA]$) que variaram de 0 - 0,6. A porcentagem de DMSO foi de 15%. Foi utilizada uma concentração fixa de DNA de $1,02 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os tempos de escoamento foram medidos com um temporizador automatizado. Cada uma das amostras foi medida em triplicata, e um tempo médio de fluxo foi calculado. Os dados obtidos são apresentados como R_i versus $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, onde η é a viscosidade relativa do DNA na presença do composto com 15% de DMSO e η_0 é a viscosidade do DNA na solução tampão com 15% de DMSO, na ausência de composto. Volume total das soluções foi de 4,00 mL.

3.7 - Estudo de interação com a HSA

3.7.1 - Medidas espectrofluorimétricas

O estudo de interação dos complexos com a HSA foi realizado por meio da medida de supressão da fluorescência do resíduo triptofano. Para isso foi empregada uma solução $5,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HSA em tampão Tris pH 7,4. A extinção da intensidade de emissão do resíduo de triptofano em 305 nm (comprimento de onda de excitação 280 nm) foi monitorada utilizando os complexos como supressores em diferentes concentrações ($5\text{-}50 \mu\text{mol L}^{-1}$), solubilizados em DMSO.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 950 μL de HSA e 50 μL de solução do complexo em DMSO. As medidas foram efetuadas em um leitor de microplaca Synergy/ H1 (Biotek) nas seguintes temperaturas: 25 e 37°C.

3.8 - Ensaio de Viabilidade celular

Os complexos sintetizados foram avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento de células de adenocarcinoma humano de mama MCF-7 não metastático, adenocarcinoma metastático de mama MDA-MB-231 e células normais de pulmão de camundongo V79.

As células foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio DMEM ou RPMI, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10%. Penicilina e estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram usadas como antibióticos. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 . Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração de células. Em seguida, aplicou-se as células em placas de cultura de 96 poços (estéril) (densidade de células $1,50 \times 10^4$). As placas foram armazenadas em estufa (37 °C/ 5% CO_2) por 24 h para a adesão celular. Após este tempo os complexos em diferentes concentrações foram adicionados à placa que foi novamente mantida na estufa por 48 horas. Após este período, retirou-se todo o meio de cultura das placas e adicionou-se 50 μL de MTT ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$). As placas foram mais uma vez deixadas em estufa por um período de 3-4 horas e adicionou-se isopropanol para solubilizar os cristais formados.

No período de incubação o MTT é reduzido pela dehidrogenase mitocondrial (Figura 3.1) e assume-se que a viabilidade celular (correspondente à atividade redutiva) é proporcional à produção de cristais de formazan (violeta) que, depois de solubilizados, são medidos espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983). A densidade óptica (absorbância dos poços) foi medida em um leitor de microplacas, a 540 nm. Para verificar o efeito do solvente DMSO, controles adicionais receberam 0,50% deste solvente.

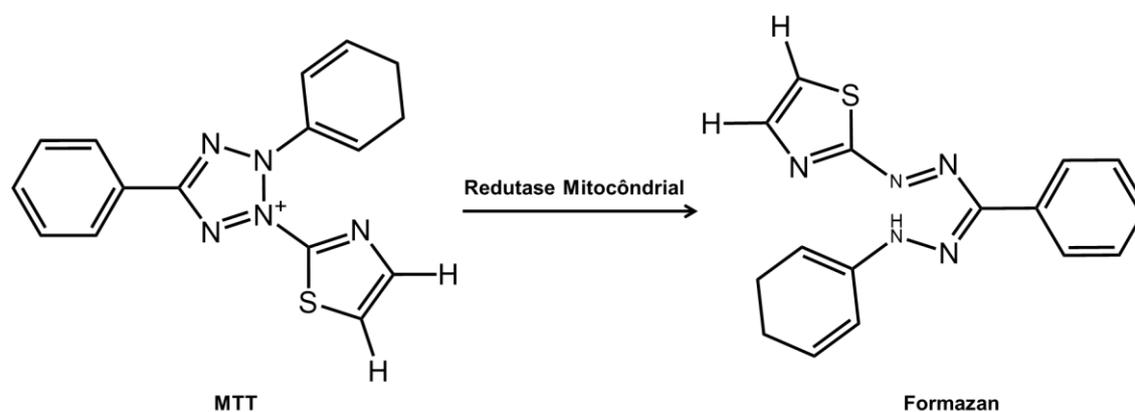


FIGURA 3.1- Reação de redução do MTT a formazan

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese dos complexos contendo os aminoácidos

Os complexos contendo os aminoácidos foram obtidos partindo-se do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$. Em todas as reações (Figura 4.1), os aminoácidos atuaram como ligantes bidentados substituindo dois clorídios. Também foi observada a formação de diastereoisômeros. Com os aminoácidos L-cisteína e D-penicilamina ocorreu a formação de complexos neutros, cuja coordenação se deu via S-N e com a L-deoxialiina formou-se um complexo 1:1 e coordenação via O-N. Todos esses resultados foram comprovados pelas técnicas de caracterização. O solvente utilizado em todas as reações foi o metanol.

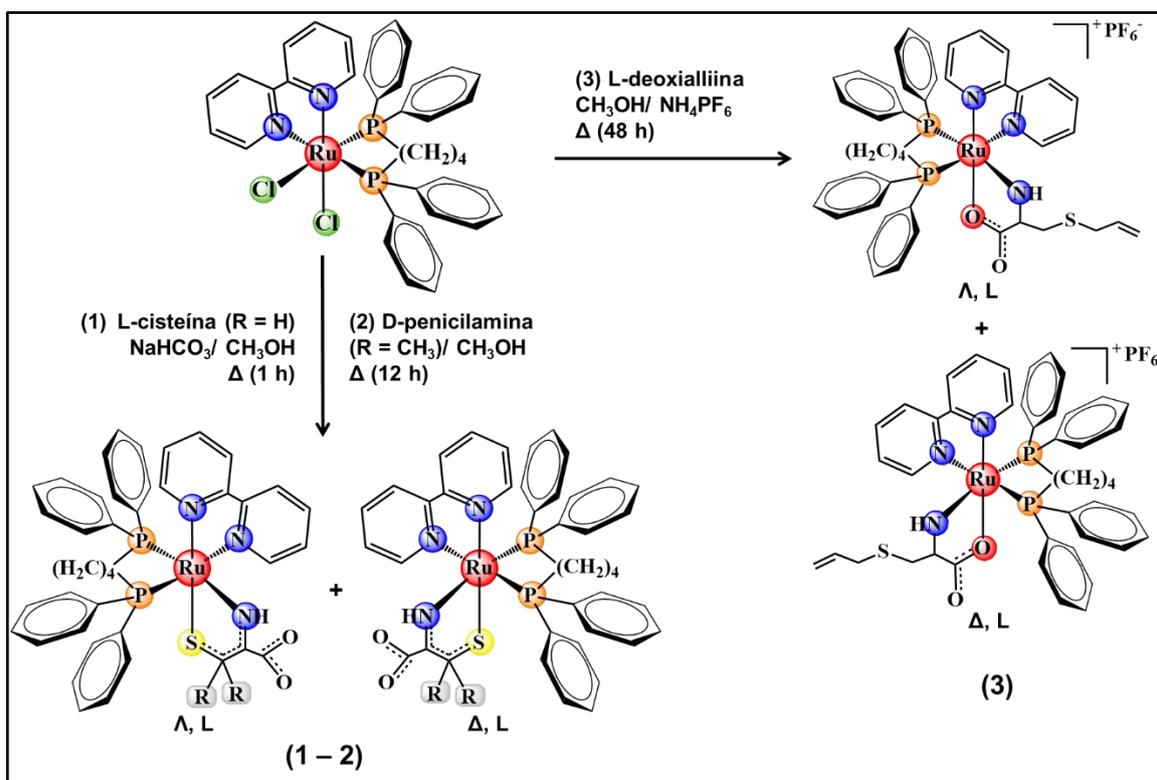


FIGURA 4.1 – Representação da rota de síntese para a obtenção dos complexos contendo os aminoácidos.

4.2 - Caracterização dos complexos contendo os aminoácidos

4.2.1 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$

O espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (1), em CH₂Cl₂ (Figura 4.2) apresenta 2 dupletos com deslocamentos químicos (δ) de 42,18 ppm e 30,49 ppm, com constante de acoplamento de $^2J = 32,40$ Hz, condizente com um sistema AX (PAVIA et al., 2015). Porém, após as reações com os aminoácidos, além dos deslocamentos químicos mudarem, ocorreu a duplicação dos sinais, indicando que a coordenação foi efetiva e que houve a formação de diastereoisômeros (Figura 4.3). Segundo a literatura, a formação de diastereoisômeros nesse tipo de sistema, ocorre devido ao fato de o rutênio estar coordenado a três ligantes bidentados, quelatos, constituindo um elemento de quiralidade helicoidal, ao mesmo tempo que o aminoácido contém um carbono assimétrico constituindo um outro elemento de quiralidade. Dessa forma, a presença desses dois elementos de quiralidade no mesmo composto levou à formação de diastereoisômeros (AMOURI e GRUSELLE, 2008).

SHINODA et al. (1982) também demonstraram por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ a formação de diastereoisômeros em compostos do tipo [RuCl(aminoácido)(PPh₃)₂]. ALMEIDA et al. (2014) mostraram a formação desse tipo de isomeria, em compostos similares aos aqui sintetizados.

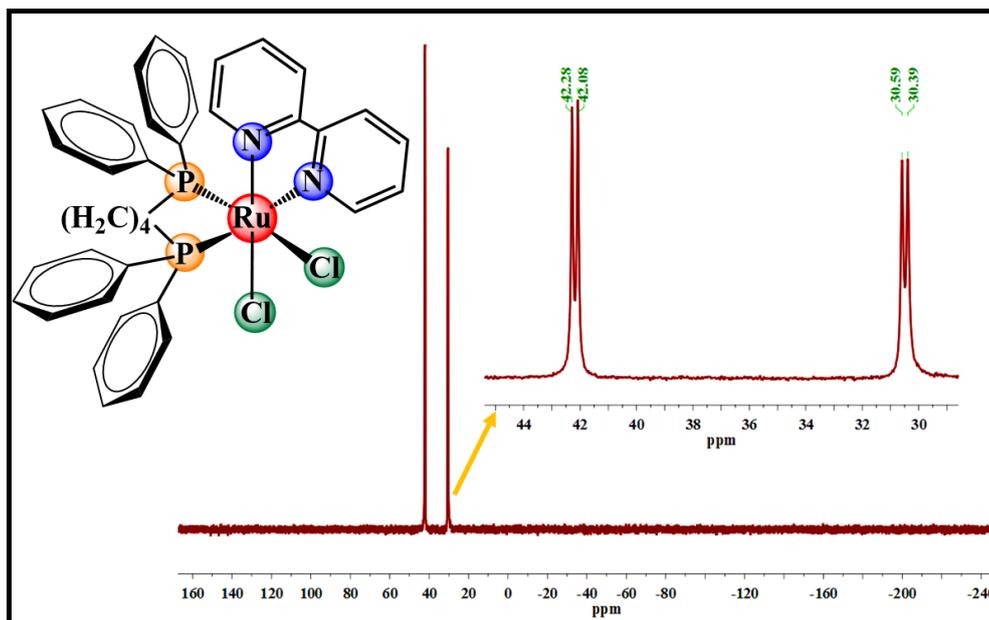


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ para o complexo precursor $cis-[RuCl_2(dppb)(bipy)]$, em CH_2Cl_2/D_2O .

Os espectros de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ dos complexos contendo os aminoácidos, mostraram a não equivalência dos átomos de fósforo do ligante bifosfínico. Além disso, foi possível observar que os deslocamentos dos sinais ocorreram para regiões de maiores valores de δ em relação ao precursor. Isso pode ser explicado pelo fato de os aminoácidos serem mais eficientes em desblindarem os átomos de fósforos do que os cloridos (doador σ e π).

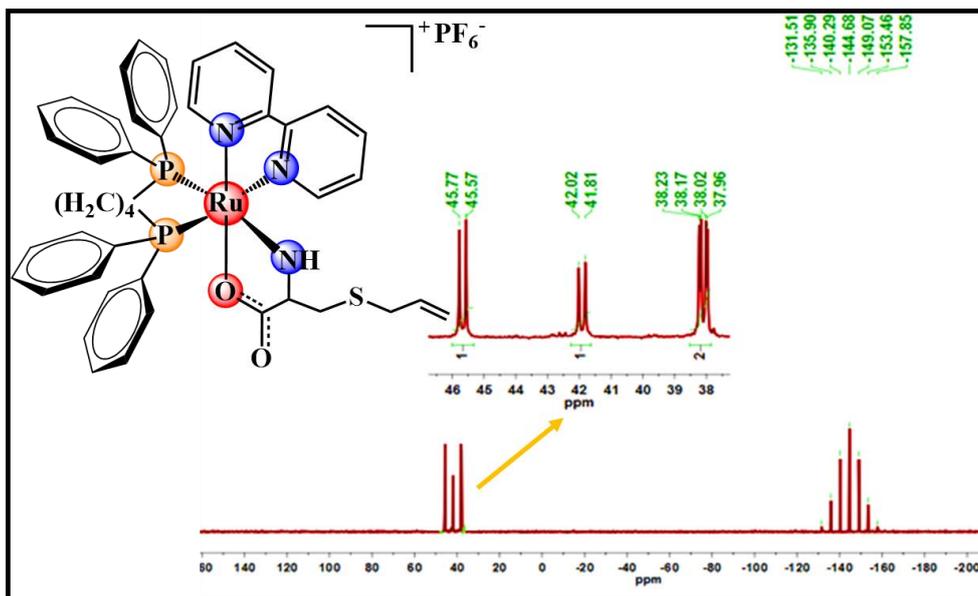


FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**), em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

Na Figura 4.3 é apresentado o espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**), em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$, o qual apresentou deslocamentos químicos em 45,67, 41,92, 38,20 e 37,99 ppm. Observa-se que os dupletos com menores deslocamentos químicos podem ser atribuídos ao átomo de fósforo *trans* ao nitrogênio da L-deoxialliina, enquanto os dupletos em maiores deslocamentos são atribuídos ao átomo de fósforo *trans* ao nitrogênio da 2,2'-bipiridina. Os dupletos com menores deslocamentos químicos podem ser consequência do efeito de blindagem causado pelo aminoácido que é mais eficiente em doar densidade eletrônica para o sistema que a 2,2'-bipiridina. Isto é descrito por ALMEIDA et al. (2014) em que um experimento utilizando aminoácido marcado com ^{15}N , por meio da técnica de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ acoplado a ^{15}N , ajuda a elucidar a estrutura do composto e mostra que o ^{15}N que está *trans* ao átomo de fósforo da 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano é o que aparece em menor deslocamento químico.

Os outros 2 complexos apresentaram resultados semelhantes, sendo apresentado na Tabela 4.1 os dados de deslocamento químico e constantes de acoplamento. Os espectros para os complexos 1 e 2 são mostrados nas Figuras 4.4 e 4.5.

TABELA 4.1 - Dados de δ (deslocamento químico), multiplicidade e J (constante de acoplamento) para os complexos contendo os aminoácidos

Complexo	δ (multiplicidade)	$^2J_{PP}$ (Hz)
[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	43,75 (d); 42,84 (d); 42,50 (d) e 40,06 (d)	37,26
[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	41,46 (d); 41,22 (d); 38,12 (d) e 37,98 (d)	37,25
[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	45,67 (d); 41,92 (d); 38,20 (d) e 37,99 (d)	32,40

Analisando os valores dos deslocamentos químicos para estes complexos e suas respectivas constantes de acoplamento ($^2J_{pp}$) podemos observar que não há diferença significativa entre eles. Isto infere que a variação da estrutura dos aminoácidos não influenciou o comportamento do núcleo de ^{31}P nos complexos, sugerindo-se que o ambiente químico dos fósforos em todos eles, é muito semelhante. O fato dos valores de $^2J_{pp}$ serem iguais para os isômeros confirma que para as duas espécies, o átomo dos aminoácidos que está *trans* ao átomo de fósforo é o mesmo, sendo assim esses isômeros não são isômeros de ligação, pois se o fossem, os valores de $^2J_{pp}$ seriam bastante diferentes.

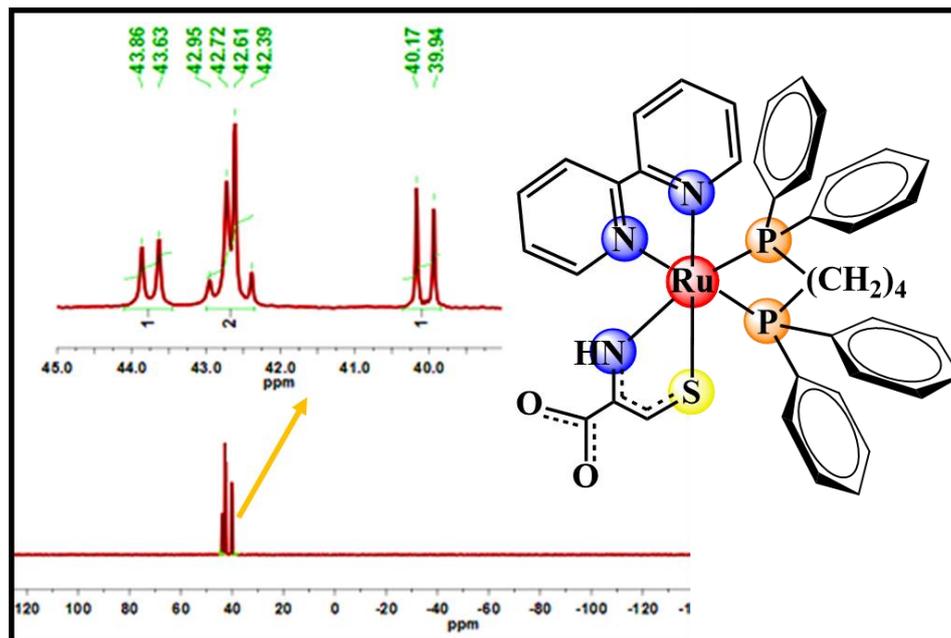


FIGURA 4.4 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**), em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

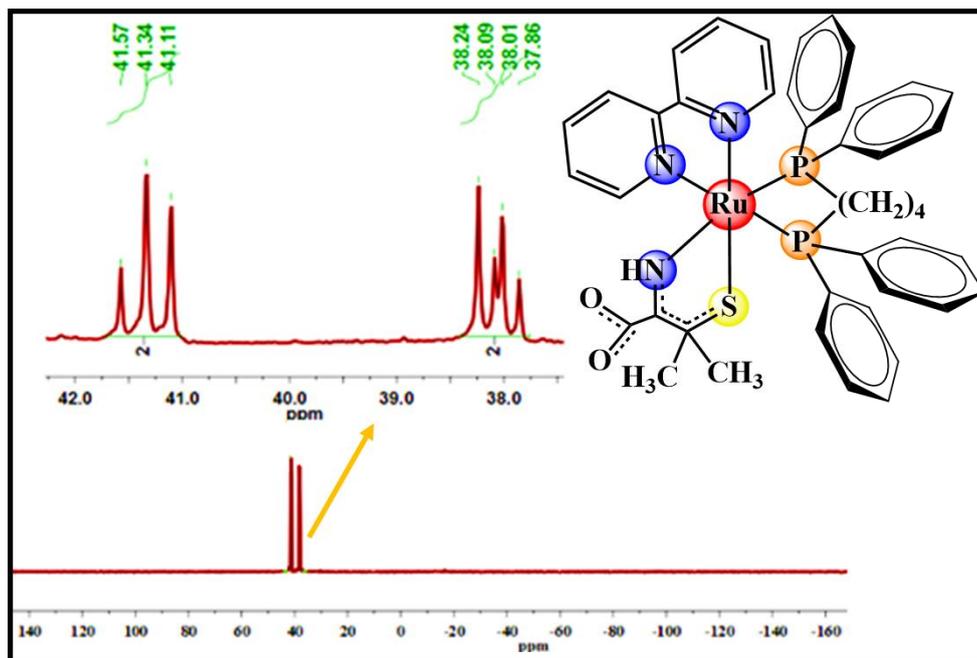


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2), em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$

4.2.2 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H dos complexos obtidos em CD_3OD apresentaram sinais característicos dos ligantes. Na Figura 4.6 é apresentado o espectro do ligante L-cisteína livre, cujos sinais de todos os hidrogênios foram atribuídos. Os espectros e as atribuições para os demais aminoácidos são apresentados no apêndice I.

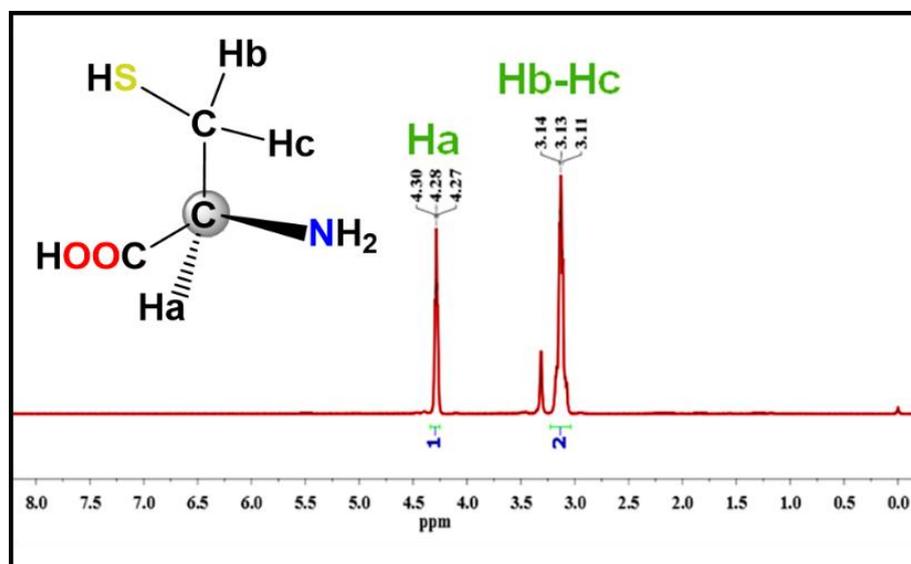


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de ^1H obtido para o aminoácido L-cisteína.HCl, em CD_3OD , supressão de H_2O .

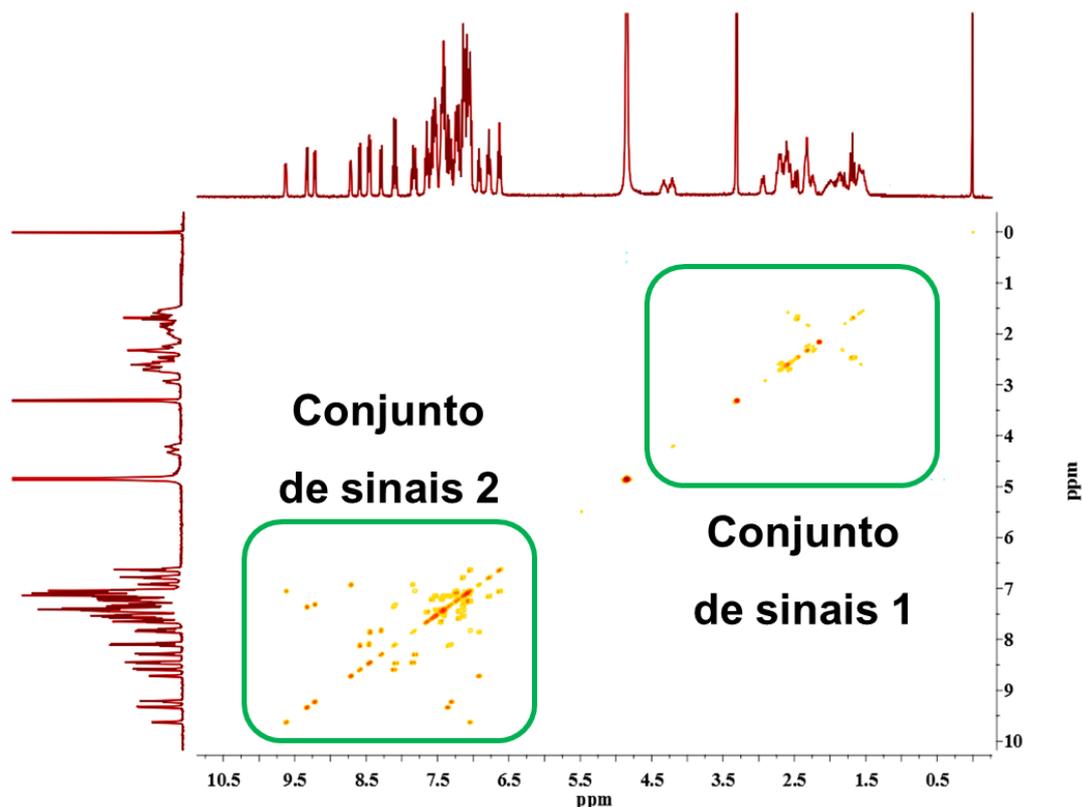


FIGURA 4.8 – Mapa de contorno COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1), em CD_3OD .

Os mapas de contorno COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) dos compostos 2 e 3 são apresentados no apêndice I.

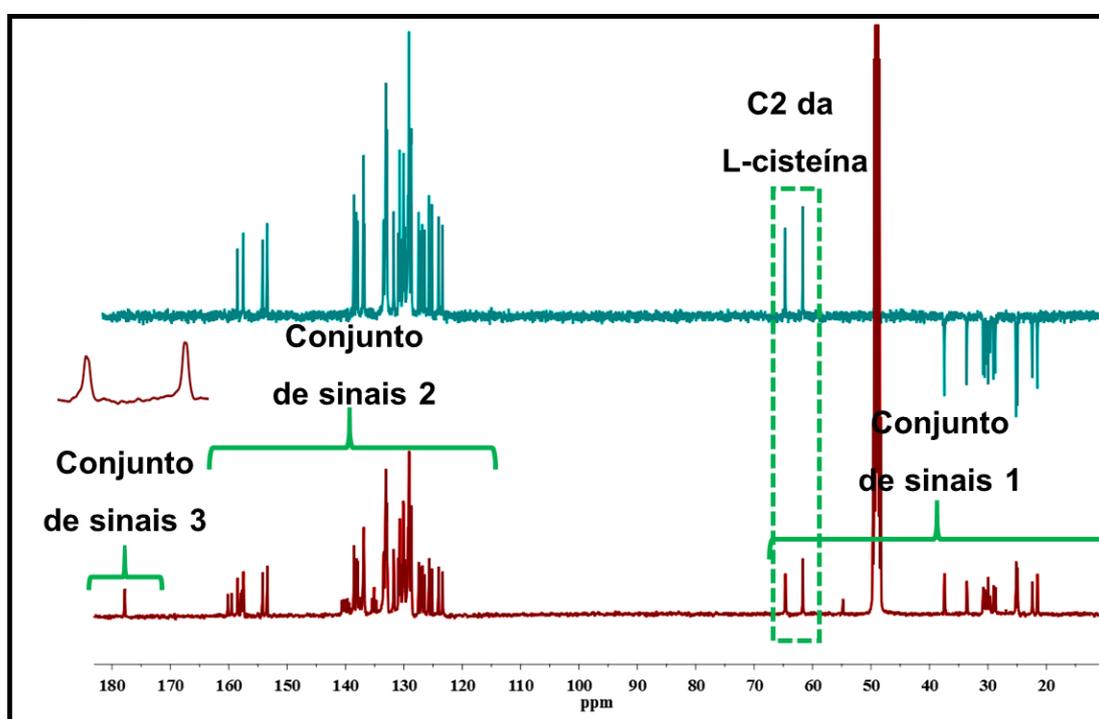
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C além de contribuir para a elucidação da estrutura foi utilizada com o intuito de também comprovar a existência de diastereoisômeros.

Para os aminoácidos foram atribuídos todos os sinais referentes aos carbonos. As atribuições encontram-se listadas na Tabela 4.2, onde pode-se observar que os deslocamentos químicos para os carbonos referentes aos grupos carboxílicos aparecem por volta de 170 ppm. Os espectros de RMN de ^{13}C para todos os aminoácidos encontram-se no apêndice I.

TABELA 4.2 - Deslocamento químico para os sinais referentes aos carbonos dos aminoácidos livres, em CD₃OD

Aminoácido	Deslocamento químico (δ)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
L-cisteína	169,85	55,63	25,21	-	-	-
D-penicilamina	169,84	65,01	43,78	36,18	26,96	-
L-deoxialiina	172,73	55,05	35,31	32,82	135,09	118,36

Como para os espectros de RMN de ¹H, não foi possível fazer as atribuições específicas de todos os sinais individuais dos carbonos. Dessa forma dividimos os sinais em três conjuntos, como observado na Figura 4.9, onde são apresentados os espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 para o composto [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1).

FIGURA 4.9 - Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135 obtidos para o composto [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CD₃OD.

O primeiro conjunto entre 21 e 65 ppm, pertence aos carbonos CH₂ da cadeia alifática da bifosfina e aos carbonos CH₂ e CH do aminoácido, sendo possível atribuir os sinais em 64,66 e 61,67 ppm ao C2 do aminoácido. Essas atribuições foram confirmadas pelo experimento DEPT-135, onde carbonos CH₂ possuem intensidade negativa como o observado para os carbonos da bifosfina e

do aminoácido e CH₃ e CH possuem intensidade positiva como o apresentado para o CH do aminoácido.

O segundo conjunto de sinais (123 e 161 ppm) é referente aos carbonos dos anéis aromáticos dos ligantes, constituído por carbonos quaternários e carbonos ligados a hidrogênios conforme pode ser visto pela correlação direta destes sinais com os do espectro de hidrogênio, o que proporciona os acoplamentos C-H observados no mapa de contorno HSQC (¹H-¹³C) (Figura 4.10).

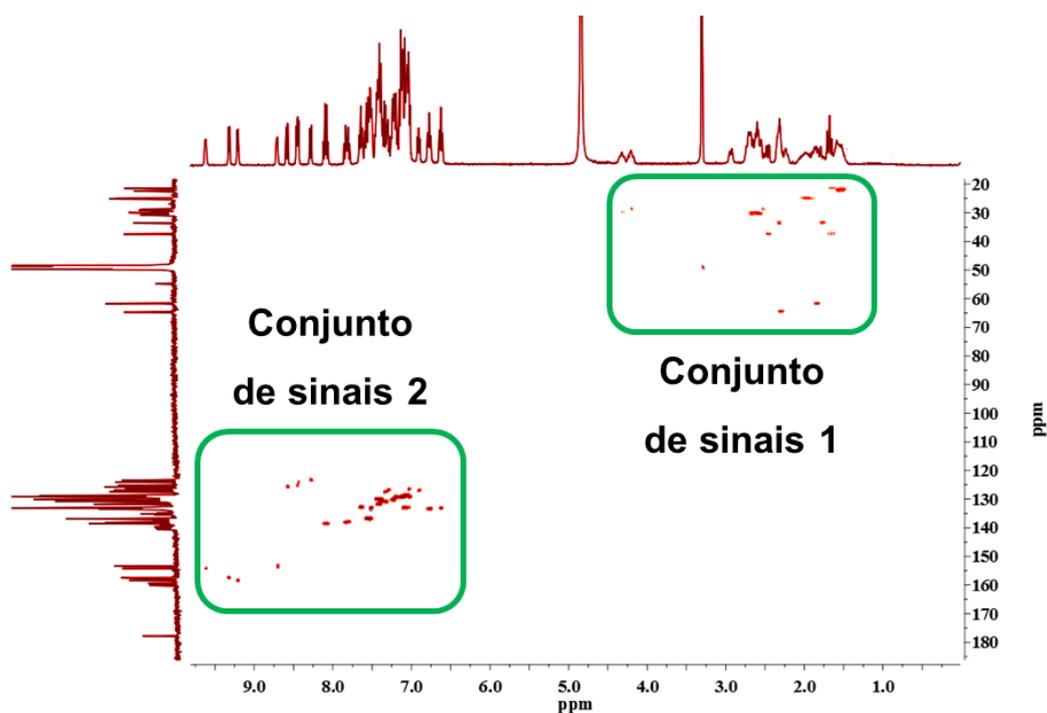


FIGURA 4.10 – Mapa de contorno HSQC (¹H – ¹³C) obtido para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), em CD₃OD.

O terceiro conjunto é referente aos carbonos quaternários dos grupos carboxílicos que são evidenciados pela ausência de acoplamento no mapa de contorno HSQC e também pela ausência nos espectros de RMN DEPT-135.

Uma das principais observações realizada nos espectros de RMN de ¹³C é a duplicação dos sinais, confirmando a presença de diastereoisômeros. Isto é ainda melhor observado para o carbono do grupo carboxílico do aminoácido que se encontra em uma região mais limpa, com deslocamento em (177, 83 e 177, 07 ppm). Para o aminoácido livre este mesmo carbono é observado em menor deslocamento químico (169, 85 ppm). Isto é justificável, uma vez que, quando o aminoácido se coordena, ocorre uma redistribuição eletrônica, onde seu núcleo de

^{13}C fica mais desprotegido sentindo mais o campo magnético e, portanto, indo para maiores deslocamentos. Comportamento similar é observado para todos os complexos, cujos valores de deslocamento referentes ao carbono do grupo carboxílico encontram-se listados na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 - Deslocamentos químicos para o C1 dos aminoácidos e seus respectivos complexos

AMINOÁCIDOS	δ (ppm) C1	COMPOSTOS	δ (ppm) C1
L-cisteína	169,85	[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	177,07 e 177,83
D-penicilamina	169,84	[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	174,39 e 173,69
L-deoxialliina	172,73	[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	183,04 e 183,97

Uma outra observação que pode ser feita a partir da Tabela 4.3 é a magnitude do deslocamento químico sofrido pelo C1. No composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (3) o carbono da carboxila desloca mais em relação ao aminoácido livre do que nos compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1) e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2). Isto nos dá indícios que a coordenação no composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (3) ocorreu via O-N influenciando de forma mais efetiva o deslocamento do C1, uma vez que o O está diretamente ligado a esse carbono. Já nos outros compostos se sugere coordenação pelos átomos de S e N. Os espectros de RMN de ^{13}C , DEPT-135 e HSQC para os demais compostos são mostrados no apêndice I.

4.2.3 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

As atribuições para os espectros dos complexos contendo os aminoácidos foram feitas através de comparações dos espectros dos ligantes livres, do precursor e dados da literatura.

Os aminoácidos apresentam como principais modos vibracionais os estiramentos assimétricos e simétricos do grupo (-COO⁻) e as deformações do grupo (-NH₃⁺), uma vez que, eles se encontram na forma de zwitterions no estado cristalino (NAKAMOTO, 2009). A Tabela 4.4 apresenta a tentativa de atribuição dos principais modos de vibração para os aminoácidos livres.

TABELA 4.4 - Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados nos espectros de absorção na região do IV dos aminoácidos livres

Atribuições	L-cisteína (cm ⁻¹)	D-penicilamina (cm ⁻¹)	L-deoxialiina (cm ⁻¹)
$\nu_{\text{ass}}\text{COO}^-$ (F)	1583	1587	1587
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (F)	1383	1396	1394
$\delta_{\text{ass}}\text{NH}_3^+$ (F)	1615	1630	1614
$\delta_{\text{s}}\text{NH}_3^+$ (F)	1525	1541	1502
$\nu(\text{N-H})$ (m)	3123	3059	3155
$\nu(\text{C-H})$ (m)	2972	2970	2976
$\nu(\text{S-H})$ (f)			-

F: forte; m: média; f: fraca; ν_{ass} : estiramento assimétrico; ν_{s} : estiramento simétrico; δ_{ass} : deformação assimétrica e δ_{s} : deformação simétrica.

A coordenação pelo íon carboxilato é a forma mais frequente encontrada para complexos com aminoácidos, e isso pode ser observado no espectro de absorção na região do infravermelho pelo monitoramento dos deslocamentos sofridos pelos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo carboxílico (MELNIKOV et al., 2000; REFAT et al., 2008a).

Na Figura 4.11 são apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho para o aminoácido L-deoxialiina e para o complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**), nos quais pode-se observar que houve deslocamento dos modos vibracionais do grupo carboxílico, indicando uma possível coordenação pelo mesmo, sendo que esta pode ocorrer de três maneiras, monodentada, bidentada ou em ponte (NAKAMOTO, 2009).

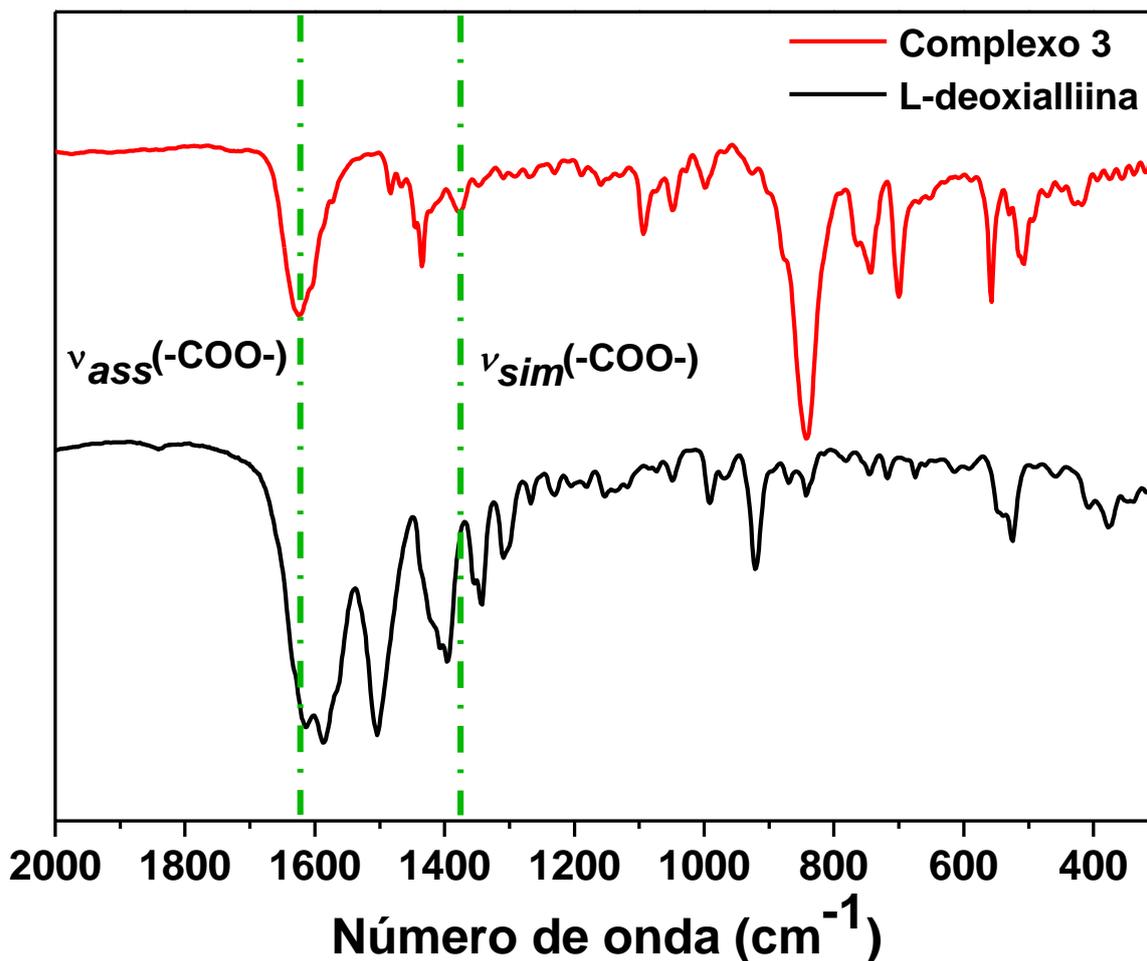


FIGURA 4.11 - Espectros de absorção na região do IV para o aminoácido L-deoxialiina e para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**).

A distinção entre as duas formas de coordenação pode ser feita calculando-se a diferença entre os estiramentos simétricos e assimétricos do grupo carboxilato ($\Delta \text{ cm}^{-1}$), que quando coordenado de forma monodentada apresenta Δ maior que no aminoácido livre e quando coordenado de forma bidentada apresenta valores significativamente menores de Δ em relação ao aminoácido livre. (NAKAMOTO, 2009). Dessa maneira, tentativas de atribuição para esses modos de vibração, entre outros, e os valores de Δ , são apresentadas na Tabela 4.5 para todos os compostos.

TABELA 4.5 - Tentativa de atribuição dos principais modos vibracionais observados nos espectros de absorção na região do IV para os novos compostos e valores de Δ cm^{-1}

Atribuições	[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (cm^{-1})	[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (cm^{-1})	[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)] (cm^{-1})
$\nu_{\text{ass}}\text{COO}^-$ (F)	1585	1714	1624
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (f)	1387	1376	1377
$\delta(\text{N-H})$ (F)	1601	1628	1607
$\nu(\text{N-H})$ (F)	3414	3398	3406
$\nu(\text{C=N})$ (m)	1433	1433	1435
$\nu_{\text{ass}}(\text{P-F})$ (F)	-	-	845
$\nu_{\text{s}}(\text{P-F})$ (m)	-	-	557
$\nu(\text{Ru-N})$ (m)	515	510	509
$\nu(\text{Ru-O})$ (f)	-	-	419
γ anel (m)	702	696	702
Δ para ligantes	200	191	193
Δ para complexos	198	338	247

F: forte; m: média; ν_{ass} : estiramento assimétrico; ν_{s} : estiramento simétrico; δ_{ass} : deformação assimétrica e δ_{s} : deformação simétrica.

Analisando a Tabela 4.5, segundo os valores de Δ (cm^{-1}) podemos sugerir que o aminoácido L-deoxialliina se coordenou de forma monodentada ao rutênio, pelo grupo carboxilato, uma vez que, o valor de Δ encontrado para o composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**) é maior que no aminoácido livre. Além disso esse valor é semelhante aos encontrados na literatura para sistemas (ALMEIDA, 2009). E ainda, NAKAMOTO et al., (1961) realizou uma série de medidas de deslocamento dos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo carboxilato dos aminoácidos após coordenados e a diferença (Δ cm^{-1}) desses estiramentos apresentam valores semelhantes ao Δ para o complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**).

Pode-se ainda notar, a partir da Tabela 4.5, que ao compararmos os valores de Δ para o complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**) e para a L-cisteína não houve diferença significativa dos mesmos, sugerindo que não houve coordenação nesse ponto da molécula como pode ser observado nos espectros ilustrados na Figura 4.12. Lembremos que no caso desse aminoácido ainda existe um outro ponto de coordenação que é pelo grupo tiol (-SH). Esses resultados corroboram com o que foi sugerido pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C.

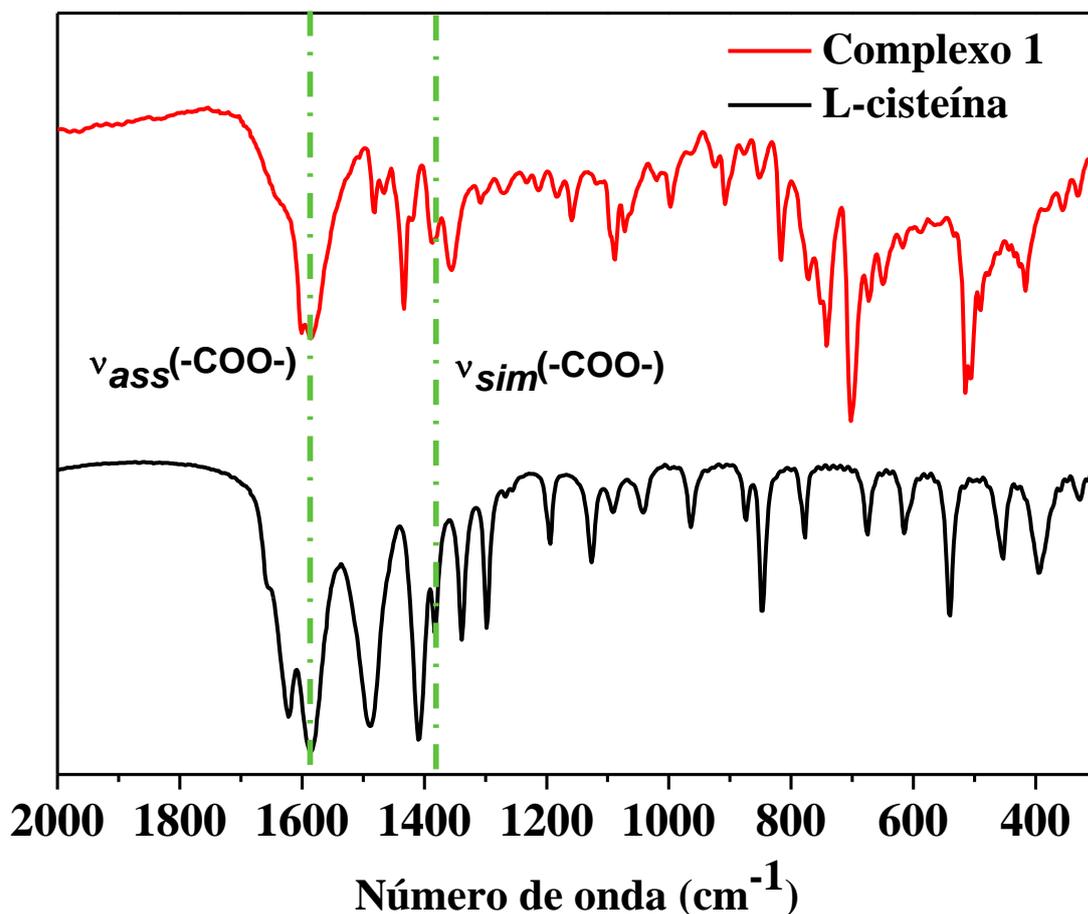


FIGURA 4.12 - Espectros de absorção na região do IV para o aminoácido L-cisteína e para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1).

Diferente do que foi apresentado para o complexo contendo o aminoácido L-cisteína, o composto $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2) apresentou valor de Δ de 338 cm^{-1} , enquanto que a D-penicilamina de 191 cm^{-1} . Esses resultados nos levariam a sugerir que a coordenação ocorreu pelo carboxilato de forma monodentada. No entanto este fato não é observado na estrutura cristalográfica deste composto (vide seção 4.2.7), o que nos leva a pensar que possivelmente interações intermoleculares podem ter interferido no estiramento assimétrico do grupo $-\text{COO}^-$ deste composto de maneira significativa, que diferente dos demais aparece em 1714 cm^{-1} , como mostra a Figura 4.13.

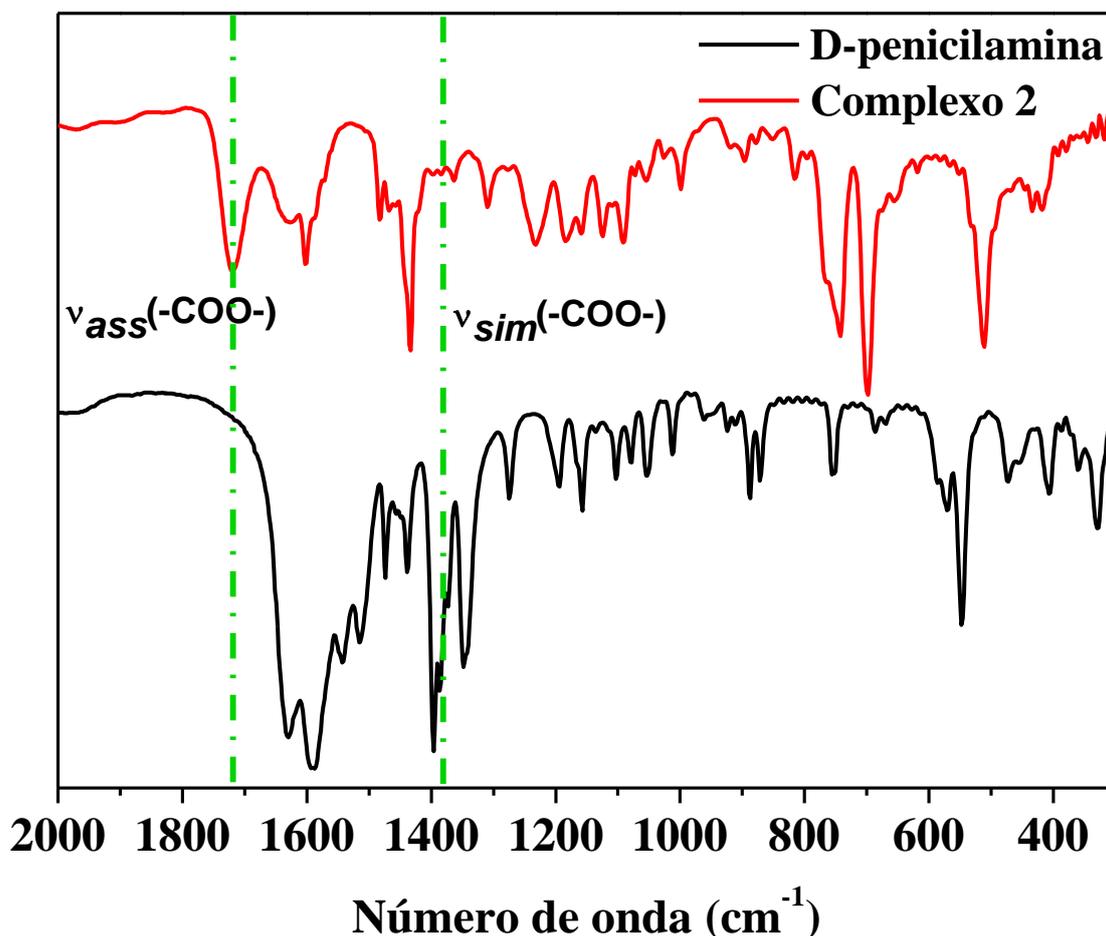


FIGURA 4.13 - Espectros de absorção na região do IV para o aminoácido D-penicilamina e para o complexo $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**).

Analisando de um modo geral, todos os complexos apresentaram um modo vibracional alargado próximo a 3400 cm^{-1} , que pode ser atribuído aos estiramentos do grupo $-\text{NH}_2$. Nessa região é também provável encontrarmos $\nu_{\text{ass}}(\text{OH})$, devido a água de hidratação do composto, o que faz o modo vibracional ficar alargado (REFAT et al., 2008b). Próximo a 700 cm^{-1} é observada um modo vibracional que pode ser atribuída à deformação do anel piridínico da bipy. Também é possível observar o $\nu(\text{Ru-N})$ por volta de 500 cm^{-1} . Apenas no composto $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**) foi possível observar os modos vibracionais referentes ao contração PF_6^- com $\nu_{\text{ass}}(\text{P-F})$ forte em 845 cm^{-1} e $\nu_{\text{s}}(\text{P-F})$ médio em 557 cm^{-1} , além do modo vibracional referente ao $\nu(\text{Ru-O})$ por volta de 419 cm^{-1} (NAKAMOTO, 2009).

4.2.4 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e do visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e do visível são importantes para a compreensão da estrutura eletrônica dos complexos. Para complexos de metais de transição as bandas de absorção estão geralmente associadas com transições envolvendo principalmente o íon metálico. São elas as transições d-d ou as transições entre orbitais moleculares do metal para o ligante e/ou do ligante para o metal (bandas de transferência de carga) (LEVER, 1984).

Na Figura 4.15 são apresentados os espectros de absorção na região do ultravioleta e do visível para o precursor e para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**). Como pode-se observar o complexo estudado apresenta bandas de absorção intensas próximos de 290 nm e outra alargada de intensidade mais baixa, em torno de 430 nm. A banda em torno de 290 nm é atribuída às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos dos ligantes. A banda em torno de 430 nm é atribuída às transições de transferência de carga metal-ligante (MLCT) dos orbitais $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi_{(\text{bifosfina})}$ e $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow \pi^*_{(\text{bipiridina})}$. Ao se comparar o espectro eletrônico do precursor com o do complexo com aminoácido, observa-se que há um deslocamento das bandas para energias mais altas. Isto acontece devido a menor disponibilidade de elétrons neste complexo, em relação ao precursor. Ou seja, ao substituir os cloros do precursor por um aminoácido, pode ocorrer perturbações de energia que surgem de efeitos indutivos e deslocalização eletrônica. Esse fato é observado para uma série de compostos similares reportados pela literatura (ALMEIDA, 2009; dos SANTOS, 2011).

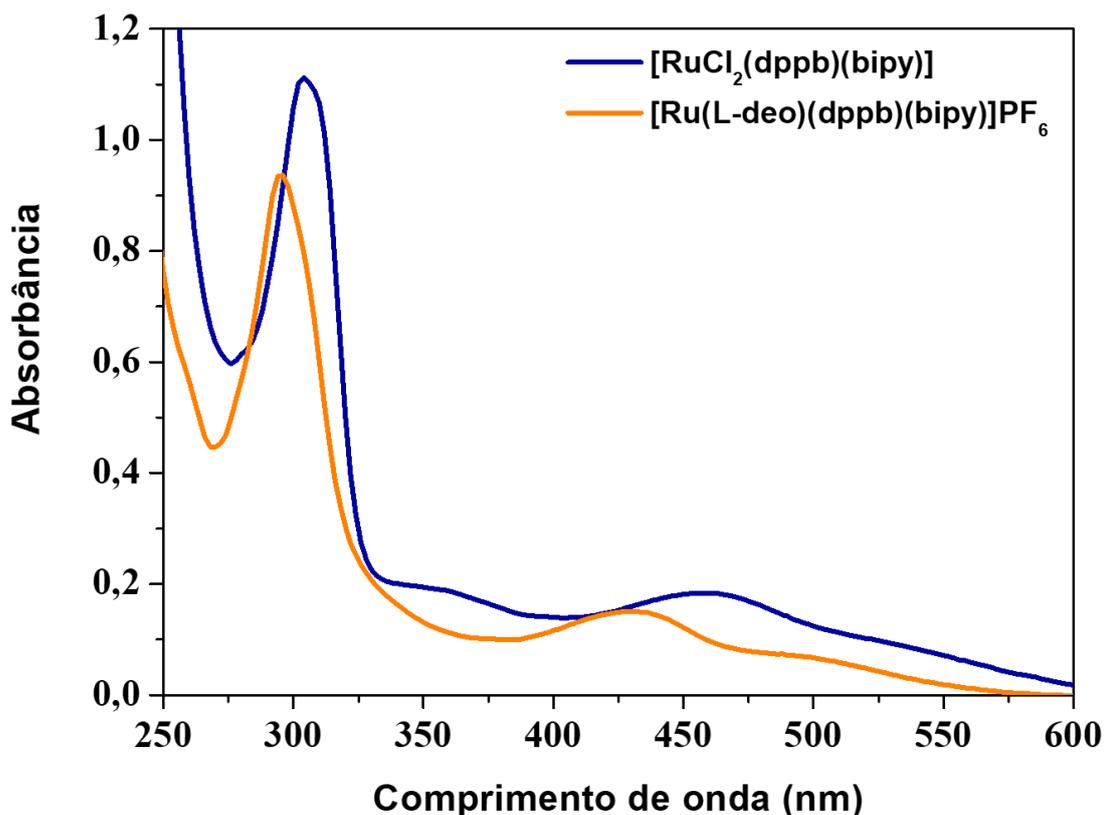


FIGURA 4.14-Espectros eletrônicos na região do UV-vis do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] $8,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e do complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**) $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em CH₂Cl₂.

As transições de transferência de carga do metal para o ligante normalmente são mais observadas em complexos com ligantes que possuem orbitais π^* de baixa energia, especialmente ligantes aromáticos. Estas transições ocorrem em energias baixas se o íon metálico tiver um número de oxidação baixo e seus orbitais d estiverem relativamente altos em energia. Compostos que contêm ligantes que possuem átomos de N doadores (é o caso dos compostos em estudo), são os normalmente mais envolvidos em TCML (SHRIVER e ATKINS, 2008). No que diz respeito às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ observadas para o complexo [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**) devido ao fato do ligante N-heterocíclico absorver na mesma região da fosfina não é possível fazer uma atribuição mais precisa das bandas de transição, o que podemos dizer é que bandas que aparecem nessa região são misturas das transições intra e/ou inter ligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante N-heterocíclico, da bifosfina e dos aminoácidos. Esse perfil de espectro é observado para os demais compostos estudados neste trabalho (Figura 4.16).

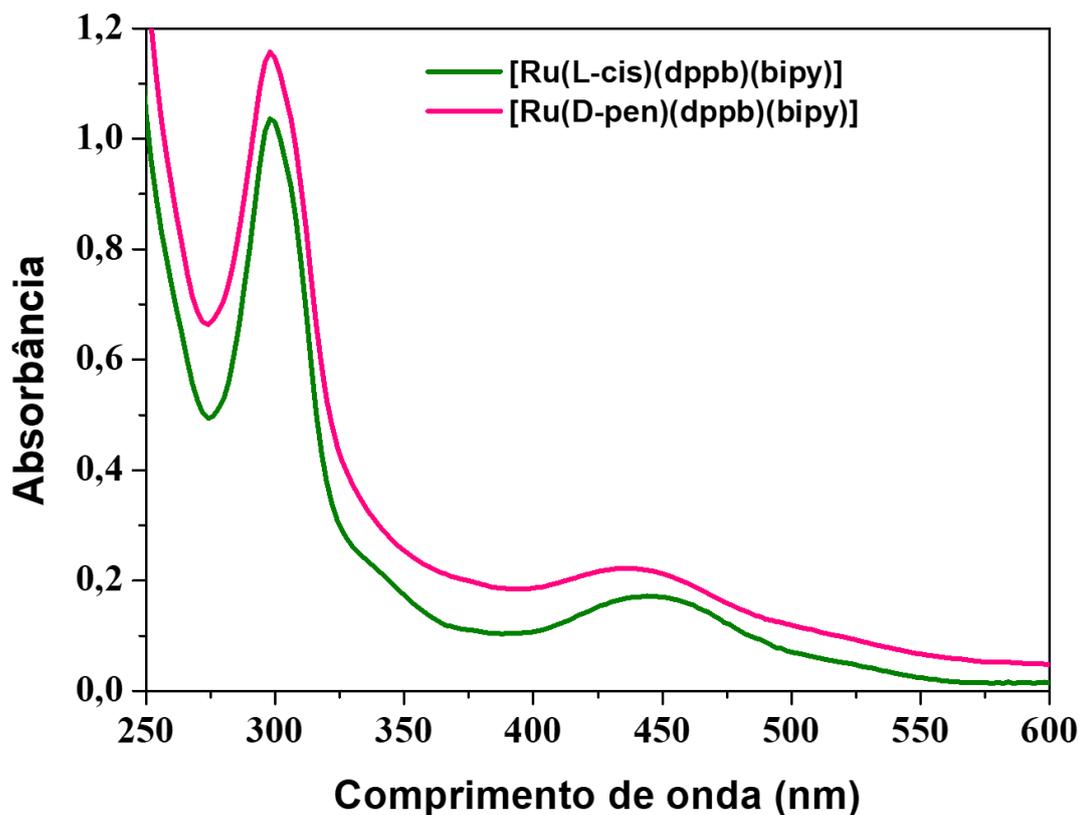


FIGURA 4.15 - Espectros eletrônicos na região do UV-vis dos complexos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1) $5,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2) $8,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em CH_2Cl_2 .

As bandas de transição d-d são proibidas por Laporte, possuindo baixos valores de coeficientes de extinção molar e são facilmente encobertas por outras bandas, como bandas de TCML, TCLM e IL. Em todos os compostos as bandas referentes às transições d-d do metal devem estar encobertas pelas bandas de transferência de carga do metal para o ligante.

Na Tabela 4.6 são apresentados os coeficientes de extinção molar para os compostos que foram calculados pela lei de Lambert-Beer, bem como uma tentativa de atribuição das bandas. Uma informação que pode ser obtida dessa tabela é o fato que no comprimento de onda em torno de 290 nm a transição eletrônica é mais permitida com valores de absorvância molar maiores, o que já era esperado, pois estas bandas são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$.

TABELA 4.6 - Dados de absorvidade molar (ϵ) e tentativa de atribuição de bandas

COMPLEXOS	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L)	TRANSIÇÃO
[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	298	19075	$\pi \rightarrow \pi^*$
	444	3197	TCML
[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	298	15121	$\pi \rightarrow \pi^*$
	436	2843	TCML
[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	296	17697	$\pi \rightarrow \pi^*$
	430	2652	TCML

Na literatura, complexos de Ru (II) com ligantes N-heterocíclicos, como a 2,2'-bipiridina e derivados apresentam bandas intensas na região do UV-visível onde são observadas bandas TCML entre 320 e 600 nm (BATISTA et al., 2001). O complexo [Ru(bipy)₃]²⁺ por exemplo, apresenta duas bandas, em 286 e 451 nm, que são atribuídas às transições intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$ e $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bipy})$ (TCML) respectivamente, que são semelhantes aos complexos do tipo [Ru(bipy)₂L], onde L= Cl, Br (PEARSON et al., 2008). Esses relatos estão condizentes com os resultados apresentados para os complexos em estudo.

Os espectros eletrônicos em diferentes concentrações utilizados para o cálculo da absorvidade molar para todos os complexos são apresentados na Figura 4.17.

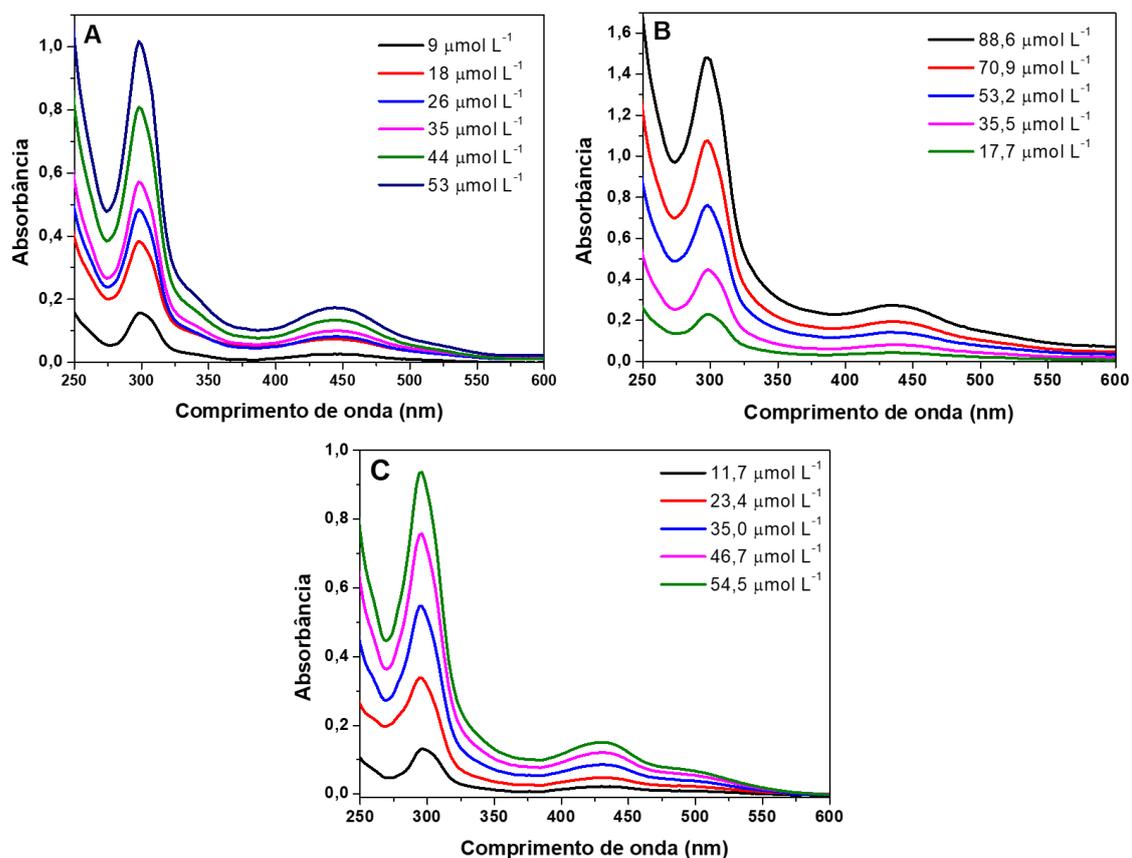


FIGURA 4.16 - Espectros eletrônicos de absorção na região do UV-vis para os complexos **A**- [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**), **B**- [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**) e **C**- [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**) em diferentes concentrações.

4.2.5 - Estudo eletroquímico

Os dados eletroquímicos obtidos permitiram observar que os compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**) e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**) apresentaram um deslocamento dos potenciais de oxidação Ru (II)/ Ru (III) para regiões menos positivas, enquanto que o composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**) um deslocamento para regiões mais positivas quando comparados ao potencial do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)]. Isto sugere diferenças na esfera de coordenação do rutênio nos dois casos.

Os compostos que apresentam potencial de oxidação mais baixo que o do precursor a coordenação dos ligantes ao metal pode ter ocorrido pelos átomos de nitrogênio e enxofre, enquanto que o composto que apresenta potencial mais alto pelos átomos de nitrogênio e oxigênio, o que corrobora com os dados obtidos pelo RMN de ¹³C e pela espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

O fato dos compostos $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**) e $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) possuírem potencial mais baixo que o precursor, é totalmente compreensível ao passo que o átomo de enxofre possui um caráter doador de densidade eletrônica mais forte que os cloridos deixando o centro metálico mais rico em elétrons e portanto, mais susceptível à oxidação. Já a coordenação pelos átomos de nitrogênio e oxigênio diminuem a densidade eletrônica do rutênio deslocando os potenciais de oxidação para valores mais positivos, uma vez que, ao se substituir um ou dois átomos de cloro por um ligante que tenha a capacidade de deixar o centro metálico mais deficiente em elétrons, seja por efeito de retrodoação ou pela menor capacidade de doação σ e π , acarretará um aumento do potencial de oxidação do centro metálico. O que como descreve a literatura, já foi observado para uma série de compostos similares contendo aminoácidos coordenados ao rutênio pelos átomos de N e O (ALMEIDA et al., 2014).

Na Figura 4.18 são apresentados os voltamogramas cíclicos para os complexos $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**), $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) e $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**), nos quais são atribuídos os processos redox do rutênio em 375, 374, e 1186 mV respectivamente. No complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ o processo redox é observado em 600 mV e é um processo reversível (QUEIROZ et al., 1998), diferente dos observados para os novos complexos que apresentam processos quasi-reversíveis.

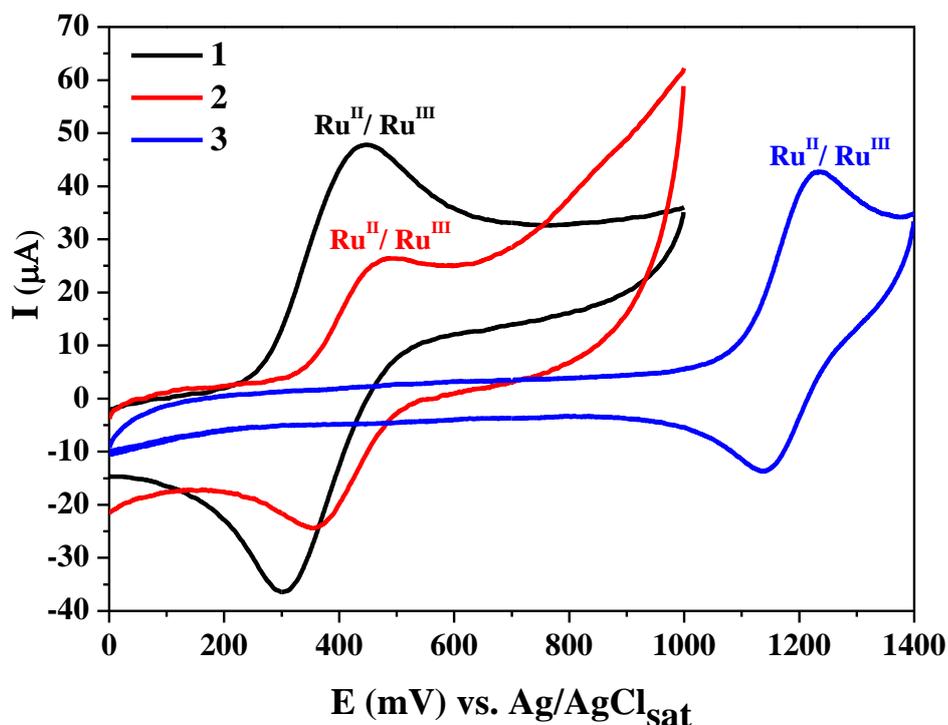


FIGURA 4.17 - Voltamogramas cíclicos dos complexos 1, 2 e 3, em solução de PTBA 0,1 mol L⁻¹ em CH₂Cl₂.

Na Tabela 4.7 são apresentados os potenciais anódicos, catódicos, os potenciais de meia onda e a razão das correntes anódicas e catódicas para todos os complexos. Analisando esses dados observa-se que os compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**) e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**) são bastante similares no que diz respeito ao potencial redox, enquanto que o composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (**3**) apresenta potencial redox muito maior, indicando assim uma maior estabilidade do centro metálico para o mesmo. Pode-se ainda observar que os valores de I_{pa}/I_{pc} indicam processos redox quase-reversíveis para os compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**) e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**).

TABELA 4.7 - Dados eletroquímicos para todos os complexos sintetizados

COMPLEXOS	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	$E_{1/2}$	I_{pa}/I_{pc}
[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	445	304	375	0,96
[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	445	302	374	0,93
[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	1234	1137	1186	1,75

Para todos os complexos, tanto nos voltamogramas cíclicos, quanto nos voltamogramas de pulso diferencial, foi observado um segundo processo de

oxidação que é atribuído ao aminoácido. Na literatura são descritos processos de oxidação do grupo COO^- (OGURA et al., 1998) e nos casos da cisteína e penicilamina, processos relacionados ao grupo $-\text{SH}$ (SPĂTARU et al., 2001; FEI et al., 2005). Assim, na Figura 4.19 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial onde os processos referentes aos aminoácidos são melhor observados.

Para a certificação que o segundo processo de oxidação é referente ao aminoácido livre voltamogramas dos mesmos foram obtidos (Figura 4.20), nos quais podemos observar que os potenciais de oxidação são mais baixos que nos complexos. Isto acontece devido a coordenação do aminoácido ao centro metálico que influencia na estrutura eletrônica dos mesmos.

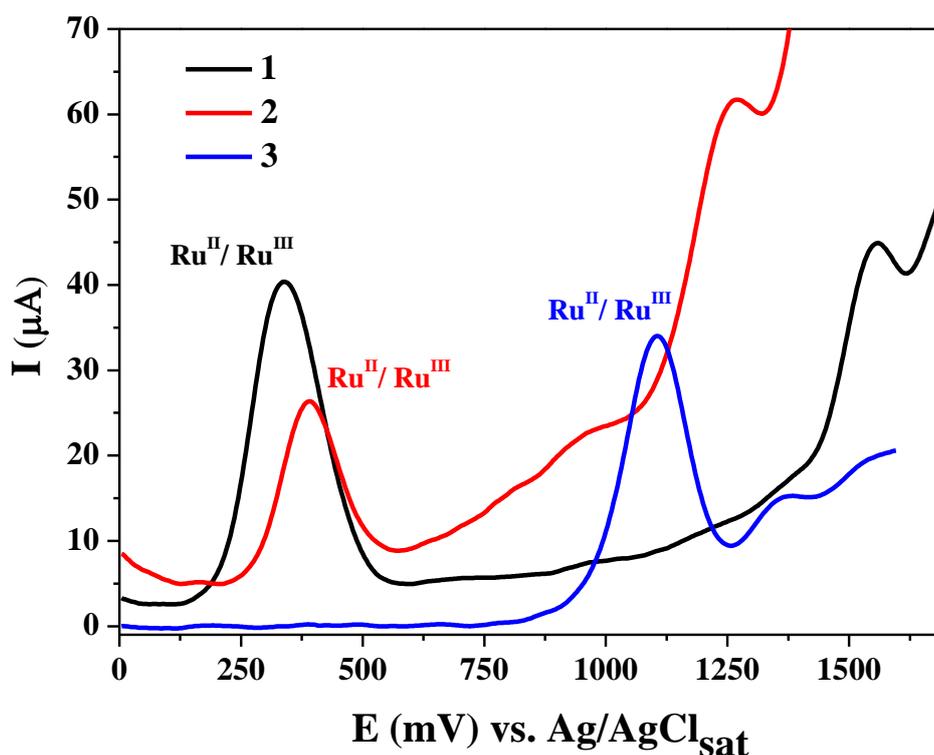


FIGURA 4.18 - Voltamogramas de pulso diferencial dos complexos 1, 2 e 3 em solução de PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 .

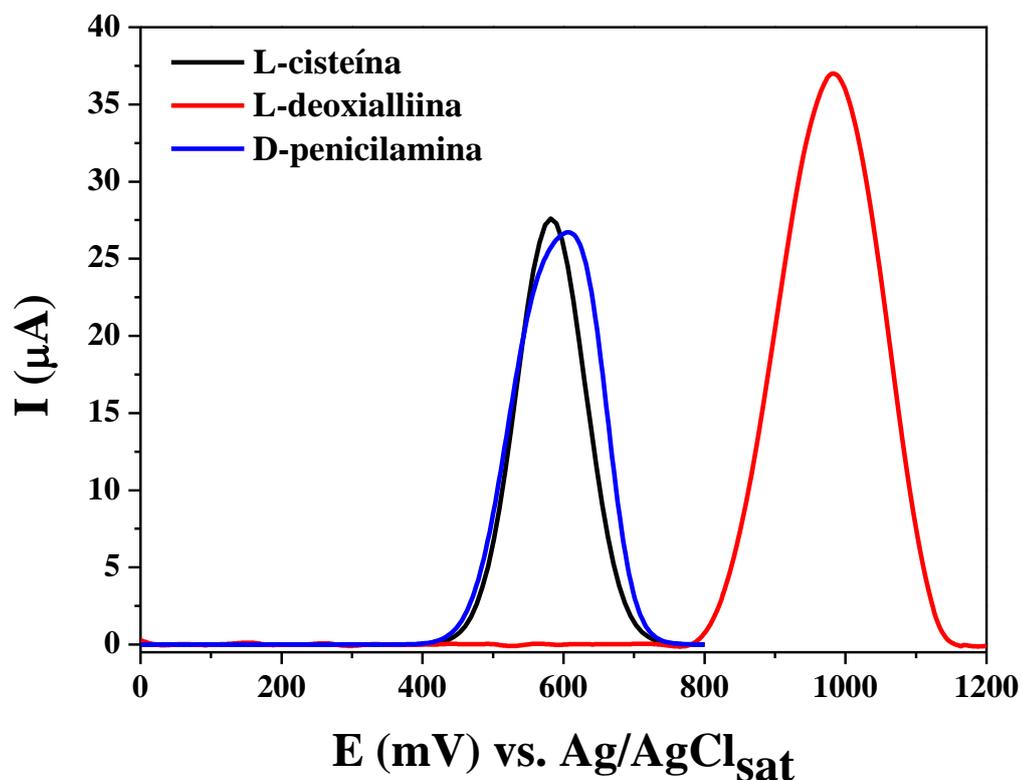


FIGURA 4.19 - Voltamogramas de pulso diferencial para os aminoácidos em tampão Tris pH = 7,4.

Os estudos eletroquímicos mostraram que, quando os aminoácidos se coordenam ao rutênio por átomos que são bons doadores de densidade eletrônica o potencial redox desloca para regiões menos positivas tornando o composto menos estável eletroquimicamente quando comparado ao precursor. No entanto quando a coordenação ocorre por átomos que não são bons doadores, os compostos formados por estes são mais estáveis que o precursor, e quando na presença de ligantes como as fosfinas o estado de oxidação +2 do rutênio é estabilizado. Portanto, pode-se concluir que este estudo forneceu informações sobre a diferença no modo de coordenação dos aminoácidos ao rutênio, indicando dois grupos de compostos, os que coordenam ao metal pelos átomos de nitrogênio e enxofre, e o que coordenada pelos átomos de nitrogênio e oxigênio.

4.2.6 - Análise elementar e condutividade molar

Interferências como impurezas nas amostras, formulação errônea da composição e presença de solventes podem levar a uma não concordância entre os valores experimentais e teóricos para a análise elementar. No entanto, como

apresentado na Tabela 4.8, os resultados para os compostos aqui sintetizados estão consistentes com as formulações sugeridas mediante resultados das demais técnicas.

Não foi possível comprovar a existência de H₂O adicionada a análise elementar, via RMN de ¹H, uma vez que o CD₃OD utilizado nas análises já possuía uma quantidade bastante expressiva de H₂O. No entanto nos espectros de infravermelho observa-se o modo vibracional referente a mesma.

Os resultados de condutividade molar para os compostos, também são mostrados na Tabela 4.8. Segundo estes, os complexos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**) e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**) são compostos neutros, indicando que os respectivos aminoácidos se coordenaram de forma dianiônica ao rutênio devido a desprotonação dos grupos tiol e carboxílico, enquanto que no composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ de forma aniônica onde apenas o grupo carboxílico se desprotonou. Assim, este composto é um complexo iônico (eletrólito 1: 1) com a presença do contra íon PF₆⁻. A faixa em CH₂Cl₂ para eletrólito 1:1 = 12 – 77 ohm⁻¹ cm² mol⁻¹ (VELHO, 2006).

TABELA 4.8 - Dados percentuais dos teores de C, H, N e S, teóricos e experimentais, e condutividade molar de soluções 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, em CH₂Cl₂ para os complexos sintetizados

COMPLEXOS	ANÁLISE ELEMENTAR				CONDUTIVIDADE MOLAR (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)	
	% C	% H	% N	% S	Branco	Amostra
[Ru(L-Cis)(dppb)(bipy)] (1) C ₄₁ H ₄₁ N ₃ O ₂ P ₂ RuS.3H ₂ O	57,48 (57,47)	5,40 (5,53)	4,98 (4,90)	3,94 (3,74)	0,046	3,097
[Ru(D-Pen)(dppb)(bipy)] (2) C ₄₃ H ₄₅ N ₃ O ₂ P ₂ RuS. 6H ₂ O	54,76 (55,00)	6,32 (6,12)	4,07 (4,47)	3,63 (3,41)	0,035	3,281
[Ru(L-Deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3) C ₄₄ H ₄₅ F ₆ N ₃ O ₂ P ₃ RuS.1H ₂ O.1CH ₃ OH	51,76 (52,07)	5,25 (4,95)	4,14 (4,05)	3,13 (3,09)	0,051	36,80

*valores teóricos entre parênteses

Portanto, os valores obtidos de condutividade molar estão condizentes com as formulações propostas, e complementam as informações obtidas pela análise elementar.

4.2.7 - Difração de raios X

A estrutura cristalina do complexo [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (**1**) foi determinada por difração de raios X e os resultados confirmam a presença de diastereoisômeros, como os sugeridos pelos dados de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN. Na estrutura cristalina, o L-cisteinato é coordenado ao rutênio em uma forma bidentada, como mostrado na Figura 4.21. Na unidade assimétrica da estrutura de raios X, existem duas moléculas do complexo identificadas como Λ , L- Isômero e Δ , L- Isômero, que são diastereoisômeros. A principal diferença intramolecular entre os dois isômeros pode ser destacada pela interação intramolecular CH... π que está presente no Δ , isômero L com separação de centróide e hidrogênio de 2.590 Å, enquanto esse tipo de interação está ausente no Λ , isômero L (Figura 4.22).

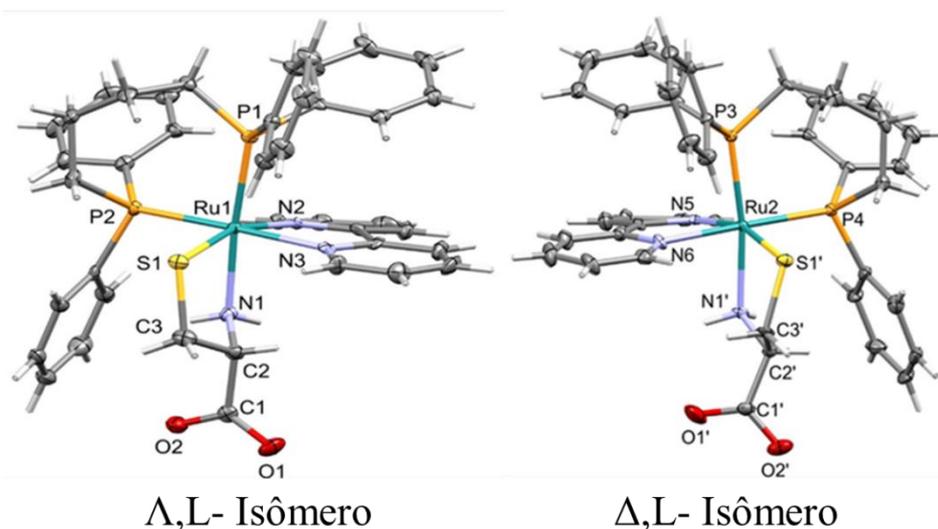


FIGURA 4.20 - Estrutura de raios X do complexo **1**, mostrando os dois diastereoisômeros identificados como Λ , L (esquerda) e Δ , L (direita). Os átomos elipsóides são colhidos com 50% de probabilidade.

O complexo neutro de Ru (II) apresenta geometria octaédrica distorcida, como mostrada pelos parâmetros geométricos dos ângulos de ligação, na qual os valores angulares são diferentes das estruturas octaédricas regulares, apresentando valores de 180° e 90° .

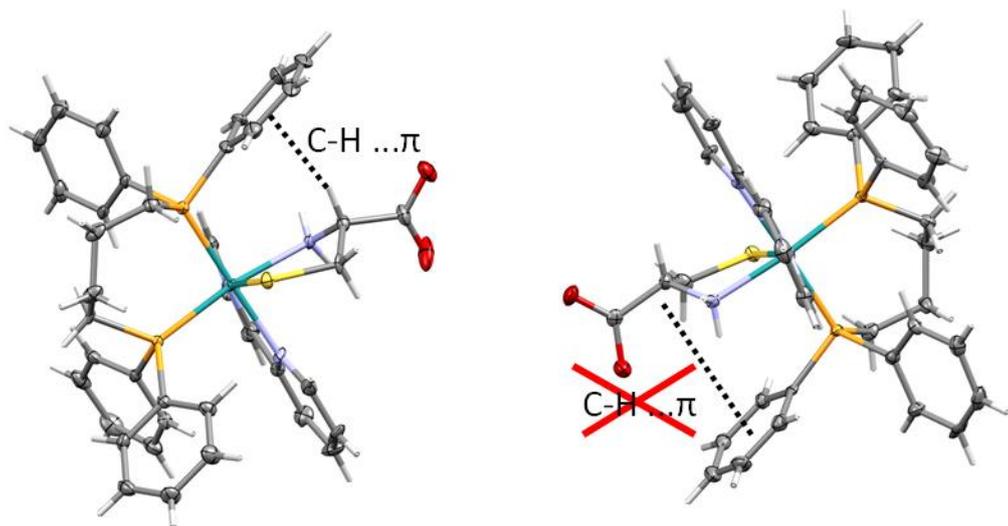


FIGURA 4.21 - Principais diferenças intramoleculares dos dois isômeros do complexo **1**.

O complexo $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) foi caracterizado estruturalmente por cristalografia de raios-X (Figura 4.23). De acordo com a condição de cristalização, usando uma gota de HCl, em uma solução de metanol, o complexo **2** foi cristalizado como $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{Cl}$, em que o carboxilato é protonado e um clorido é o contra-íon do complexo. Assim, a interação intermolecular entre $-\text{COOH}\dots\text{Cl}^-$ contribui para estabilizar o cristal. No entanto, devido à baixa qualidade dos cristais, não foi possível refinar totalmente a estrutura. Assim, os comprimentos e ângulos determinados da ligação não são suficientemente precisos para uma discussão significativa. No entanto, informações úteis podem ser extraídas do estudo de difração, especialmente a coordenação com o metal e a estereoquímica complexa. Além disso, a estrutura de raios X do complexo **2**, está de acordo com o sugerido pelas outras técnicas de caracterização.

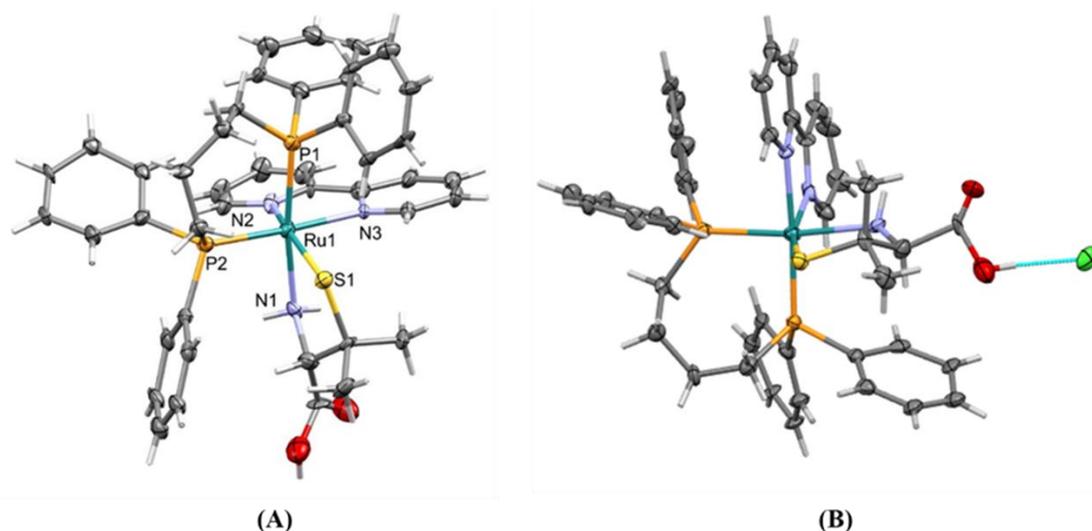


FIGURA 4.22 - (A) Estrutura cristalográfica do complexo **2** (ORTEP 50% de probabilidade). (B) Ligação intermolecular H entre Cl⁻ e COOH no complexo **2**.

Os parâmetros cristalográficos das estruturas estão apresentados no apêndice II. Os dados de valores de distâncias [Å] de ligação para as ligações com o Ru do complexo **1** são apresentados na Tabela 4.9 e esses comprimentos de ligação, envolvendo o metal estão dentro do esperado para complexos rutênio/aminoácido similares descritos na literatura (ALMEIDA et al, 2014).

TABELA 4.9 - Distâncias de ligações [Å] para as ligações com o Ru

Ligações	Comprimentos de	Comprimento de	Comprimento de
	ligação [Å]	ligação [Å]*	ligação [Å]*
	[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)]	[Ru(gly)(dppb)(bipy)]PF ₆	[Ru(L-leu)(dppb)(bipy)] PF ₆
Ru-N1	2,149 (6)	2,095(3)	2,066(13)
Ru-N2	2,130 (5)	2,080(3)	2,034(13)
Ru-N3	2,154 (6)	2,179(3)	2,160(12)
Ru-P1	2,3109 (19)	2,3165(9)	2,325(4)
Ru-P2	2,3082 (18)	2,3139(9)	2,335(4)
Ru-S	2,4013 (18)	-	-

*compostos já descritos na literatura (ALMEIDA et al., 2014)

4.3 - Estudo de reatividade em DMSO dos novos complexos

Testar a reatividade dos compostos frente ao DMSO é importante porque os estudos biológicos são realizados na presença deste solvente, sendo

necessário a certificação de que o composto final adicionado às células ou na interação com as biomoléculas, seja de fato o composto sintetizado, e não um produto e/ou produtos secundários formados, pela troca com o DMSO já que este é um solvente coordenante.

Na Figura 4.24 são mostrados os espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ para o composto $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**) ao longo de 48h, que é o tempo que dura o experimento de viabilidade celular, ensaio mais longo realizado neste trabalho. Podemos notar que o composto se mantém inalterado ao longo desse período garantindo assim que os resultados dos testes biológicos com este composto podem ser atribuídos ao próprio ou a espécies secundárias geradas após contanto com o meio de cultura ou na própria célula.

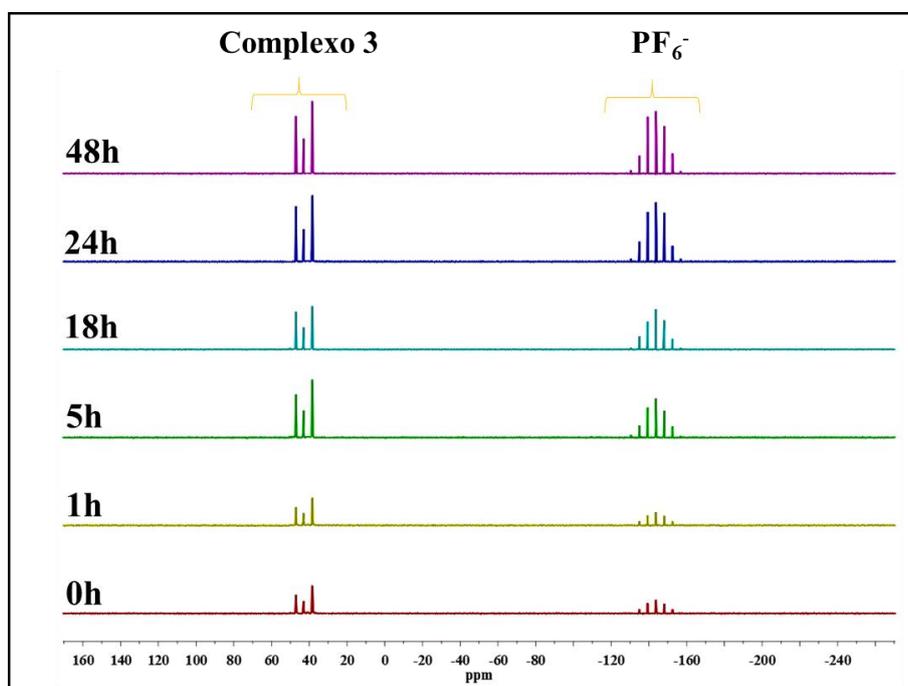


FIGURA 4.23 - Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ao longo de 48h para o composto $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**). DMSO/ capilar de D_2O .

Diferente do apresentado para o composto **3** os complexos $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**) e $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) não apresentaram a estabilidade esperada diante do DMSO, ocorrendo a formação de espécies secundárias.

Na Figura 4.25 são apresentados os espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ao longo de 48h para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**), onde pode-se observar o surgimento de um singlete em aproximadamente 5h de exposição ao

DMSO. Esse singlete aparece em 30, 28 ppm, mesmo deslocamento químico da 1,4-bis(difenilfosfina)butano oxidada, o que nos leva a inferir que o singlete é referente a essa bifosfina que é labilizada da estrutura do complexo. Pode-se ainda observar que com 18h de exposição além do singlete em 30,28 ppm aumentar de intensidade, surge um outro em 46,68 ppm cuja atribuição não foi possível realizar. Com 48h de exposição observamos o aumento da intensidade dos singletos citados anteriormente, além do aparecimento de um outro singlete em -16 ppm que corresponde à fosfina livre.

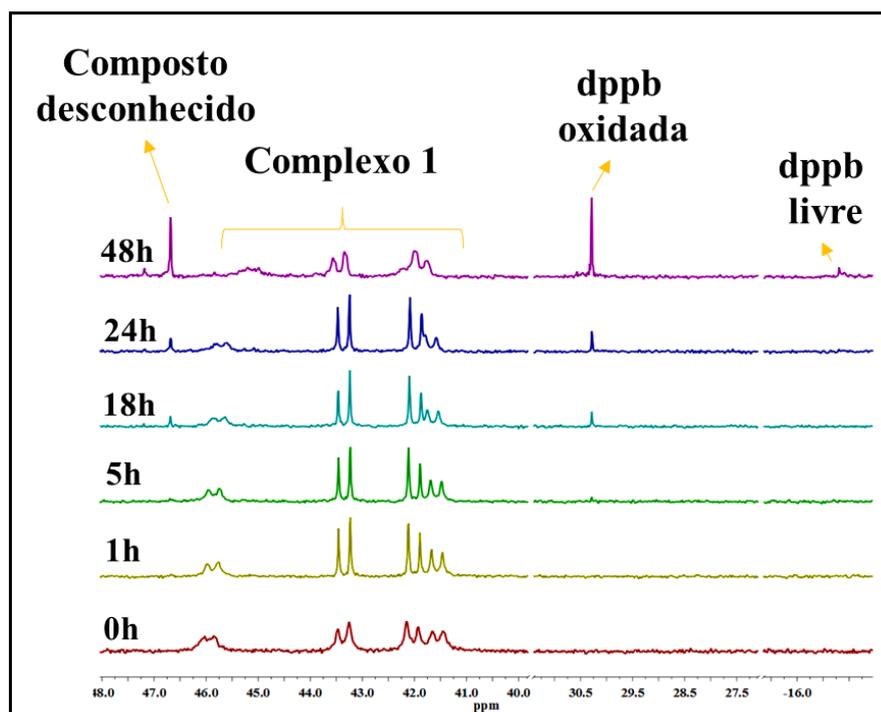


FIGURA 4.24 - Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ao longo de 48h para o composto $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1) em DMSO/capilar de D_2O .

É importante ressaltar que o composto inicial ainda existe em uma porcentagem apreciável (aproximadamente 60%) ao fim das 48h como apresentado na Figura 4.26 que mostra as integrais nesse período de tempo (apesar do RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ não ser tão adequado no sentido quantitativo é uma boa aproximação).

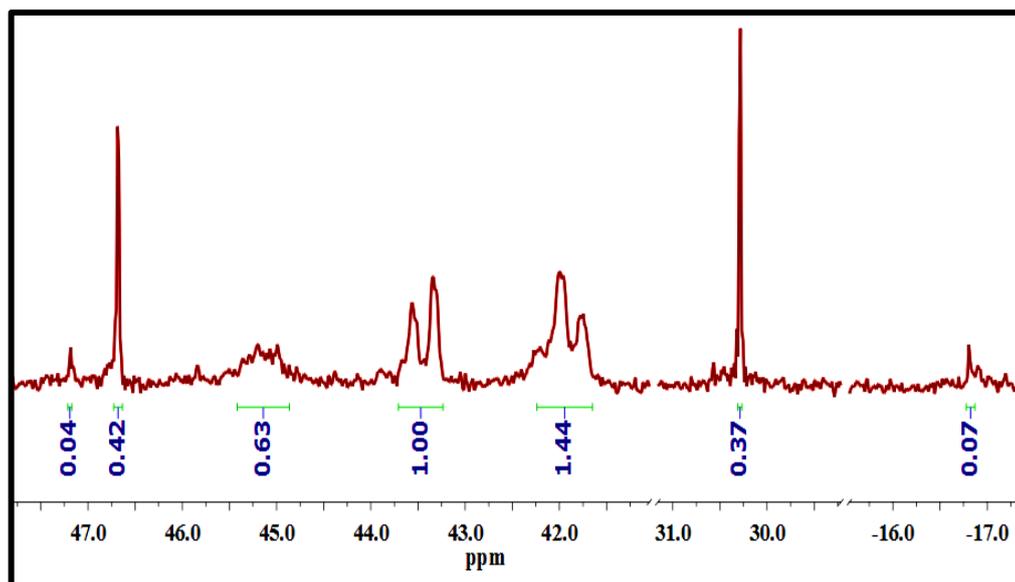


FIGURA 4.25 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**) no período de 48h em DMSO/capilar de D_2O .

Na Figura 4.27 são apresentados os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ao longo de 48h para o complexo $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**), sendo que a reatividade do mesmo já é observada nos primeiros minutos de exposição ao DMSO.

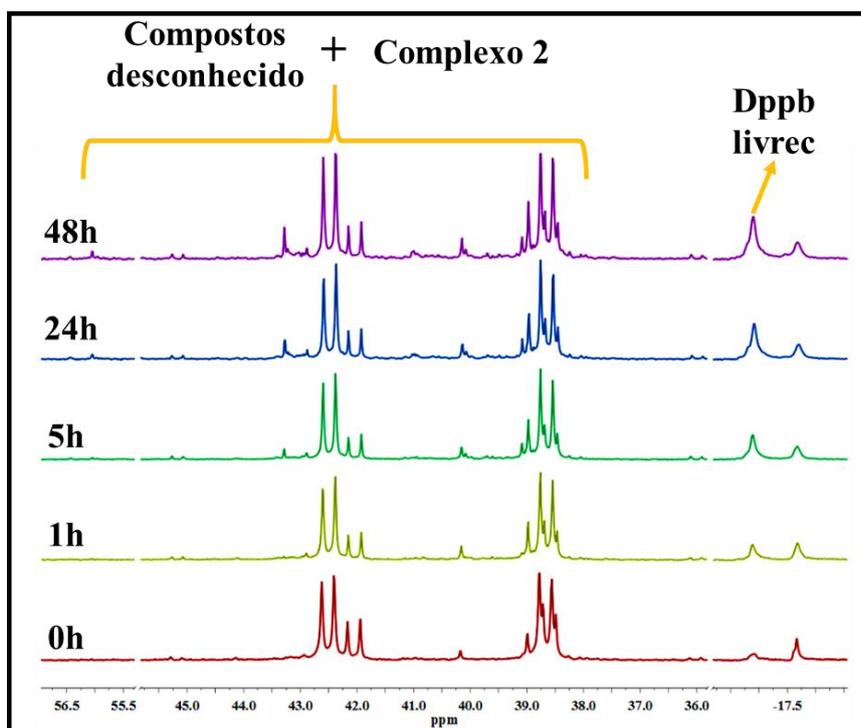


FIGURA 4.26 - Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ao longo de 48h para o composto $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) em DMSO/capilar de D_2O .

Pode-se ainda observar que não foi possível fazer a atribuição de todos os sinais. Também não foi possível saber o quanto de composto inicial ainda existia ao fim das 48h uma vez que, os produtos originados devido a presença do DMSO aparecem em deslocamento bem próximos aos do composto de início não havendo a possibilidade de obter as integrais com precisão. Porém visualmente podemos notar que os perfis dos espectros não mudam muito, o que nos leva a sugerir um certo equilíbrio na troca dos ligantes nesse período de tempo. Além disso podemos notar que existe uma dificuldade em distinguir os sinais nos que diz respeito a serem singletos ou dupletos, o que dificulta ainda mais a atribuição dos sinais.

4.4 - Determinação do coeficiente de partição

A absorção de um composto em sistemas biológicos depende de vários fatores, e entre eles da lipofilicidade do mesmo. Esta propriedade físico-química é importante, tanto para a solubilidade aquosa do composto, quanto para a permeabilidade através da bicamada fosfolipídica da membrana biológica.

O grau de lipofilicidade de um composto é comumente avaliada pelo coeficiente de partição em octanol/água, que é expresso de forma logarítmica, denominado de Log P.

Na Tabela 4.10 são apresentados os valores do Log de P para os complexos sintetizados. Pode-se observar que todos apresentam Log P entre 0,5 – 1,7 indicando grau de lipofilicidade dentro dos limites adequados para uma boa absorção do composto. Vale lembrar que o grau de lipofilicidade não é o único parâmetro para a predição da permeabilidade de um composto.

TABELA 4.10 - Coeficiente de partição (Log P) para os compostos sintetizados

COMPLEXO	Log P
[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	1,66 ($\pm 1, 00$)
[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	0,58 ($\pm 0, 02$)
[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	0,82 ($\pm 0, 03$)

Na literatura é descrita a regra dos 5 introduzida por Lipinski, um modelo bastante aceito para a aplicação de propriedades físico-químicas para a

predição do grau de absorção de um fármaco. Esse modelo é baseado em um estudo de aproximadamente 2250 fármacos e prevê altos valores de absorção para compostos que se enquadrem em pelo menos duas das seguintes características: grau de lipofilicidade (Log P) de até 5, Peso molecular (PM) de até 500 e Número doadores de ligação de hidrogênio (HBD) inferior a 5 (LIPINSKI et al., 2012). Portanto os valores de lipofilicidade para os compostos aqui apresentados estão enquadrados dentro dos limites de Log P.

E ainda, Kansy e colaboradores (2001) utilizaram um grupo de aproximadamente 115 fármacos estruturalmente diversos para buscar entender a correlação entre permeabilidade intestinal e Log de P e verificaram que para um conjunto de fármacos com Log P abaixo de 0,5, a fração permeada foi de aproximadamente 20%, para os com Log P entre 1 e 2,5 a fração foi entre 60 - 100%, enquanto que os fármacos com Log P superior a 2,5 tiveram seu grau de permeação reduzido novamente (KANSY et al., 2001). De acordo com esse trabalho o composto com a melhor permeação seria o [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1). Portanto, todas essas informações nos permitem concluir que compostos muito hidrofílicos ou muito lipofílicos estão associados a uma absorção incompleta.

4.5 - Estudo de interação dos complexos com o DNA

4.5.1 - Titulação espectrofotométrica

A avaliação da interação dos complexos com o DNA é uma das formas de investigar o possível mecanismo de ação dos compostos. Sabemos que esta é uma tarefa bastante complexa tendo em vista as inúmeras possibilidades do comportamento dos complexos no meio biológico. Na literatura por exemplo, é relatado que o possível mecanismo de ação da cisplatina é devido sua interação com as bases nitrogenadas do DNA, que causa danos à célula, impedindo sua replicação (SIDDIK, 2003; NEVES e VARGAS, 2011; DASARI e TCHOUNWOU, 2014). Portanto, neste trabalho optou-se por avaliar se existe a possibilidade de interação dos complexos sintetizados com o DNA.

A titulação espectrofotométrica é amplamente utilizada neste tipo de estudo determinando a afinidade que o composto apresenta para interagir com o DNA, por meio da determinação da constante de ligação entre o complexo e o DNA,

K_b (SIRAJUDDIN et al., 2013; BARRA E NETTO, 2015). Esta constante é determinada com base nos máximos de absorção para cada complexo, empregando a seguinte equação:

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{[K_b (\varepsilon_b - \varepsilon_f)]}$$

Onde: ε_a = é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração do complexo ($A_{obs}/[Complexo]$); ε_f = absorvância molar do complexo livre (sem adição de DNA); ε_b = absorvância molar do complexo ligado ao DNA; K_b = constante de ligação que é determinada pela razão entre os coeficientes angular e linear de um gráfico $[DNA]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ versus $[DNA]$.

Na Figura 4.28 são apresentados os espectros eletrônicos dos complexos $[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)]$ (1), $[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)]$ (2) e $[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF_6$ (3). Podemos observar que à medida que adicionamos CT-DNA às soluções dos complexos ocorre um hipocromismo (diminuição do coeficiente de extinção molar do complexo) nas bandas dos espectros sem significativa mudança do $\lambda_{m\acute{a}x}$. No caso dos compostos $[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)]$ (1) e $[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)]$ (2) não foi possível calcular K_b , uma vez que, o hipocromismo oriundo da diluição foi o mesmo apresentado devido a adição do DNA.

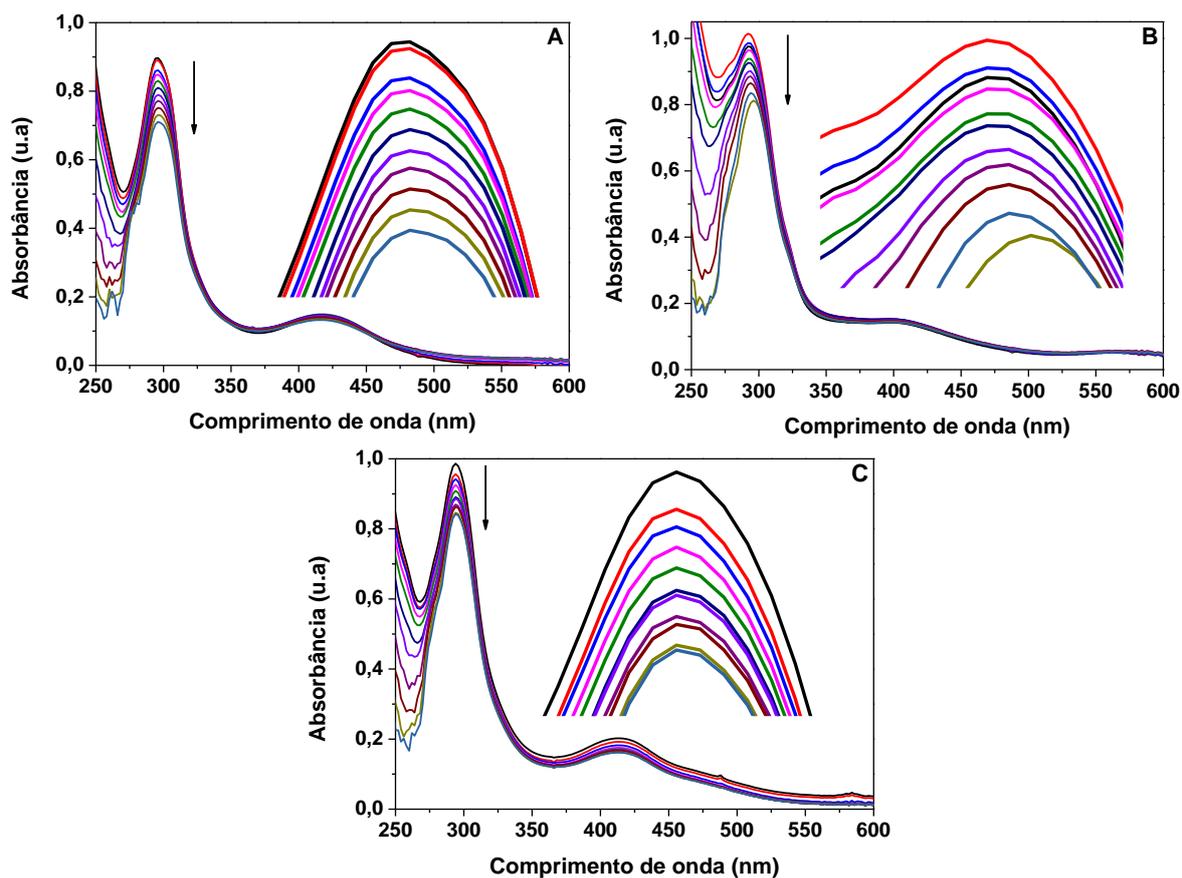


FIGURA 4.27 - Espectros de titulações espectroscópicas dos complexos **A**) $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**), **B**) $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) e **C**) $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. $[\text{DNA}]_{\text{inicial}} = 4,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em pH 7,4.

O composto $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**) apresentou constante de ligação K_b , da ordem de 10^4 mostrando afinidade com o DNA (Figura 4.29). O valor de K_b é semelhante aos valores reportados para compostos de Co (II), Ni (II) e Zn (II) contendo bases de Schiff, que interagem eletrostaticamente com o DNA e com compostos de Ru (II) contendo tioureias em que se sugere interação por via eletrostática (RAMAN et al., 2011; CORREA et al., 2015). Além disso, esse valor da constante é menor do que os valores relatados para intercaladores clássicos como o brometo de etídio e compostos de rutênio contendo fenantrolina e seus derivados, cuja constantes de ligação verificaram-se ser da ordem de $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}$. (WARING, 1965; AMBROISE e MAIYA, 2000; ANBU et al., 2012). Também apresentam constantes da ordem de grandeza de 10^6 compostos π -areno rutênio (II) contendo o ligante cloroquina, que também são descritos como intercaladores (COLINA-VEGAS et al., 2015).

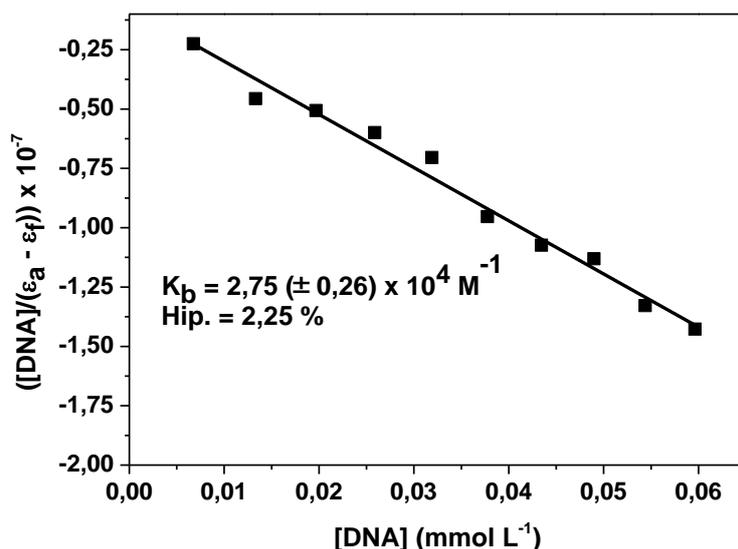


FIGURA 4.28 - Gráfico $[DNA]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ versus $[DNA]$ para o complexo $[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF_6$

Assim levando em consideração os resultados obtidos com esta técnica, a comparação com dados da literatura, a estrutura molecular e a carga positiva do complexo $[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF_6$ (**3**) podemos sugerir, que este interage com o DNA, podendo ser interação do tipo eletrostática envolvendo os grupos fosfatos que são carregados negativamente. Além disso também é possível propor que os compostos $[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)]$ (**1**) e $[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)]$ (**2**) não interagem com o DNA, uma vez que não foi possível obter uma constante de ligação.

4.5.2 - Medidas de viscosidade

A medida da viscosidade do DNA é um experimento de baixo custo que permite distinguir três dos principais tipos de interação com o DNA: intercalação pois interações desse tipo podem causar alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice causando um aumento da viscosidade da solução com o aumento da quantidade do composto, interação do tipo covalente, pois distorcem a dupla hélice do DNA, diminuindo seu comprimento e, portanto, sua viscosidade e interações do tipo eletrostática ou nos sulcos do DNA, onde a viscosidade do mesmo não sofre mudança significativa. Uma observação a ser levada em consideração é que esse experimento não distingue entre não interação,

interação eletrostática e interação nos sulcos do DNA (WHEATE et al., 2007; BARRA e NETTO, 2015).

Na Figura 4.30 é mostrado o efeito do aumento das concentrações dos compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2), [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (3) e do padrão de intercalação Laranja de Tiazol na viscosidade relativa do CT-DNA. Observa-se que todos os compostos apresentaram perfil de curva constante, ou seja, o aumento das concentrações dos compostos não alterou de forma significativa a viscosidade do DNA, indicando que os compostos podem está interagindo eletrostaticamente, entre os sulcos do DNA ou não interagindo, não sendo possível distinguir entre estas. Porém esta técnica já foi determinante para excluir a possibilidade de intercalação, uma vez que, os perfis das curvas para os compostos se apresentariam da mesma forma que o padrão Laranja de Tiazol, havendo um aumento da viscosidade. Também podemos excluir interação covalente já que segundo a literatura haveria uma diminuição da viscosidade do DNA (ANBU et al., 2012; BARRA e NETTO, 2015).

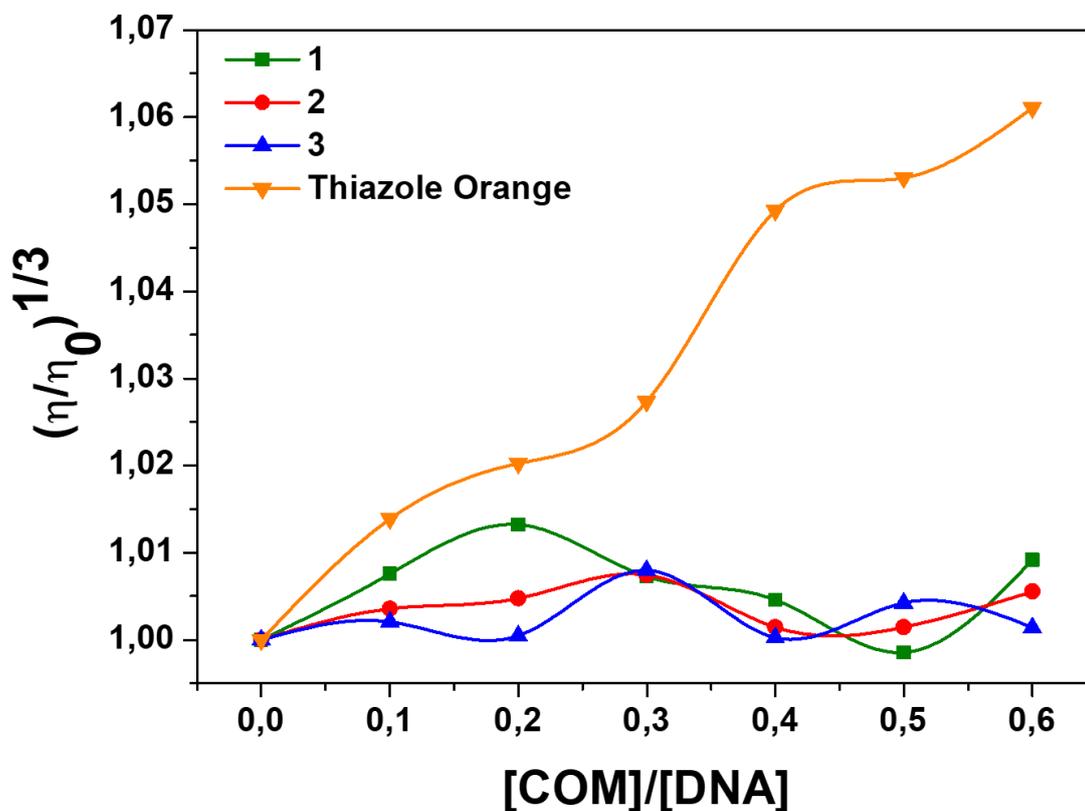


FIGURA 4.29 - Efeito do aumento das concentrações dos complexos e do Laranja de Tiazol na viscosidade relativa do CT-DNA (10^{-4} mol L⁻¹) em tampão tris-HCL a 25 (± 0.1) °C.

Na literatura são encontrados outros compostos que apresentam comportamento semelhante a estes, como por exemplo, complexos de rutênio contendo ligantes tioureias e complexos de cobre contendo quinolonas, onde sugere-se interações do tipo eletrostáticas ou interações fracas não clássicas (ZIVEC et al., 2012; CORREA et al., 2015).

Correlacionando esta técnica e a de titulação espectrofotométrica pode-se dizer que os compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1) e [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2) não interagem com o DNA, enquanto que o composto [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (3) interage eletrostaticamente ou entre os sulcos, sendo estas interações fracas e que portanto, não influenciam de forma significativa a viscosidade relativa do DNA.

4.6 - Estudo de interação dos complexos com a HSA

O estudo de interação com a HSA (Albumina Soro Humana) é importante tendo em vista que o fármaco ao ser administrado de forma intravenosa deverá interagir com biomoléculas antes de alcançar a célula cancerosa, e sendo a albumina, a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, além de ser responsável pelo transporte de uma grande variedade de moléculas endógenas ou exógenas, a investigação sobre a interação do possível fármaco com HSA é essencial para o entendimento do comportamento dos complexos no organismo (ANGUIZOLA et al., 2013).

A HSA possui um resíduo de triptofano, que em solução exibe sinal de fluorescência, com um máximo em 305 nm quando excitado em 280 nm. E é a supressão desse sinal que é monitorado no estudo de interação com complexos metálicos. Para isso o espectro de fluorescência com a HSA foi obtido na presença de diferentes quantidades dos complexos (MOREIRA et al., 2015).

Na Figura 4.31 são mostrados os espectros de fluorescência da HSA na presença dos compostos [Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1), [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2) e [Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF₆ (3), onde é possível observar a supressão da fluorescência com o aumento das concentrações dos compostos, indicando interação dos mesmos com a HSA. Esta variação de intensidade das bandas é atribuída às mudanças conformacionais da proteína próximas ao resíduo do triptofano (MOREIRA et al., 2015).

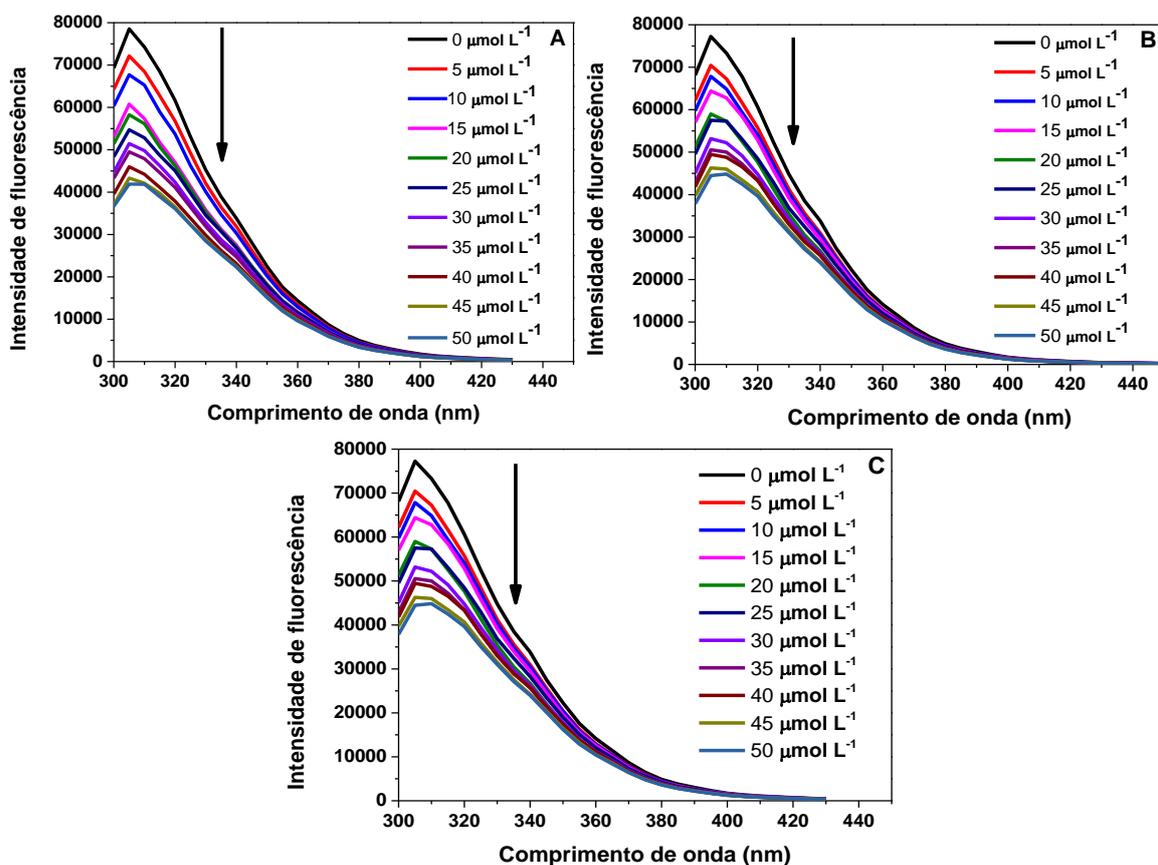


FIGURA 4.30 - Espectros de emissão da HSA em concentrações crescentes dos complexos **A)** $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**), **B)** $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**) e **C)** $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**3**). Concentração da HSA = $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

Como a supressão da fluorescência foi observada fez-se necessário uma análise quantitativa desse processo empregando-se a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q t_0 [Q]$$

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, t_0 é o tempo médio de vida de fluorescência da HSA sem o complexo. 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 t_0 (10^{-9} s) (SIEMIARCZUK et al., 2004; AMIRI et al., 2010).

A supressão da fluorescência pode ocorrer segundo mecanismos de supressão estático ou dinâmico. No mecanismo dinâmico, a interação do complexo com a HSA ocorre durante o tempo de vida do estado excitado da biomolécula, sendo que após a colisão do composto metálico com a albumina excitada, a biomolécula retorna ao estado fundamental sem emissão de fluorescência. Já no mecanismo estático ocorre a formação de um complexo não fluorescente entre a proteína e o composto metálico no estado fundamental (LAKOWICZ, 2006). Em geral, a diferença entre esses mecanismos pode ser dada pela diferente dependência da temperatura que os mesmos apresentam. Para um mecanismo de supressão dinâmico ocorre um aumento da constante K_{sv} com o aumento da temperatura, uma vez que esse mecanismo depende da difusão, e o aumento da temperatura promove a diminuição da viscosidade do meio favorecendo a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado, aumentando, portanto, as colisões do composto metálico com a HSA excitada. Já o mecanismo de supressão estático resulta em uma diminuição das constantes com o aumento da temperatura porque a estabilidade do complexo intermediário é diminuída em temperaturas mais altas (LAKOWICZ, 2006).

Dessa forma, para inferir o mecanismo de supressão da fluorescência dos compostos de rutênio na HSA foi feita uma análise da dependência da constante K_{sv} com o aumento da temperatura através da equação de Stern-Volmer. Na Figura 4.32 são mostrados os gráficos F_0/F em função da concentração do complexo, onde podemos observar perfis lineares das curvas e sendo, os valores de K_{sv} obtidos a partir de regressões lineares em diferentes temperaturas. Esses valores são apresentados na Tabela 4.11, bem como os valores de K_q .

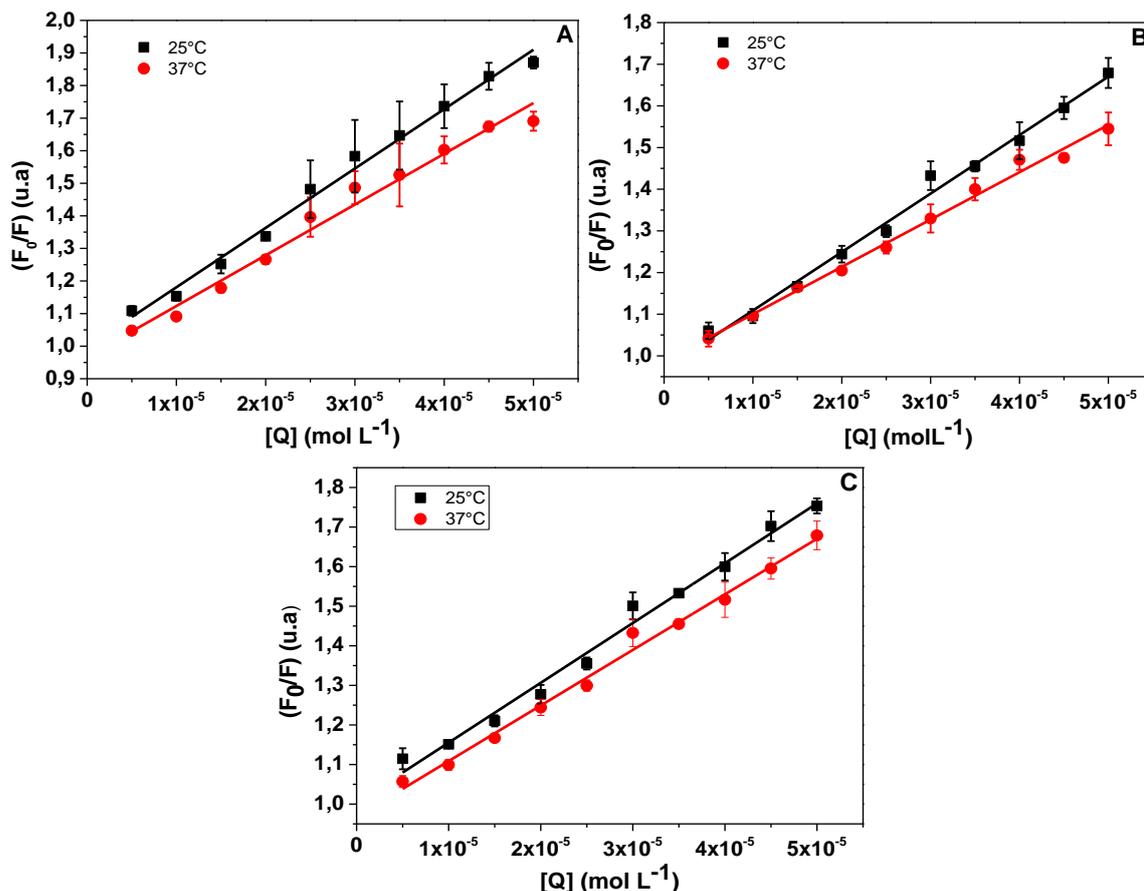


FIGURA 4.31 – Gráficos F_0/F versus $[Q]$ dos complexos **A**) $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1), **B**) $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2) e **C**) $[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (3) em diferentes temperaturas.

TABELA 4.11 - Resultados obtidos para as constantes K_{sv} e K_q dos complexos

COMPLEXOS	T (K)	K_{sv} (10^4 L mol^{-1})	K_q ($10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
$[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (1)	298	1,82 ($\pm 0,06$)	1,82
	310	1,56 ($\pm 0,08$)	1,56
$[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (2)	298	1,40 ($\pm 0,05$)	1,40
	310	1,14 ($\pm 0,03$)	1,14
$[\text{Ru}(\text{L-deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (3)	298	1,51 ($\pm 0,06$)	1,51
	310	1,40 ($\pm 0,04$)	1,40

Analisando a Figura 4.32 e a Tabela 4.11, verifica-se que o aumento da temperatura resultou em uma diminuição dos valores de K_{sv} indicando que a inserção do composto metálico no arcabouço protéico ocorreu predominantemente por mecanismo estático. Além disso, os valores de K_q também indicam mecanismo estático (valor máximo possível para mecanismo dinâmico $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Uma vez definido o mecanismo de supressão, é importante analisar o grau de interação entre os compostos de rutênio e a proteína HSA. Essa afinidade é medida pelos valores da constante de ligação entre o complexo e a HSA e pelos números de sítios de ligação por molécula de HSA. Esses parâmetros são obtidos pela equação mostrada abaixo:

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

Onde K_b é a constante de ligação entre o complexo e a HSA, n é o número de sítios de ligação por molécula de HSA e $[Q]$ é a concentração do composto. 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 também é obtido por meio desta mesma equação da reta, a partir do coeficiente angular.

Na Tabela 4.12 são apresentados os resultados obtidos de K_b e n para os complexos sintetizados. Podemos observar que em ambos os sistemas, o número de sítio de ligação é aproximadamente 1, evidenciando que apenas uma molécula do complexo de rutênio está inserida no arcabouço protéico. Também segundo esses dados a HSA possui afinidade pelos complexos, tendo em vista que K_b é da ordem de 10^4 . Na literatura, complexos metálicos também apresentam afinidade com a HSA, com constantes de ligação da ordem de grandeza que variam entre 10^3 e 10^6 (LIU et al., 2012; TOMAZ et al., 2012; CACITA e NIKOLAOU, 2016). Se compararmos estes resultados podemos sugerir que os complexos em análise interagem moderadamente com a HSA podendo assim o transporte destes na corrente sanguínea, ocorrer através desta proteína de forma que o metalofármaco atinja seu alvo.

TABELA 4.12 - Resultados obtidos para as constantes K_b e n para os complexos

COMPLEXOS	T (K)	K_b (L mol ⁻¹)	n
[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	298	1,55 (\pm 0,21) x 10 ⁴	0,99
	310	1,91 (\pm 0,23) x 10 ⁴	1,25
[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	298	4,42 (\pm 0,18) x 10 ⁴	1,12
	310	5,45 (\pm 0,16) x 10 ⁴	1,16
[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	298	5,04 (\pm 0,26) x 10 ³	0,89
	310	4,71 (\pm 0,15) x 10 ⁴	1,13

O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação dos complexos de rutênio com a biomolécula HSA. De acordo com a literatura, a partir desses parâmetros é possível descrever a espontaneidade e inferir a natureza das interações (ROSS e SUBRAMANIAN, 1981). Assim os valores de ΔH° (variação de entalpia) foram calculados utilizando a equação:

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

E a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) e variação de entropia (ΔS°) foram calculadas utilizando as equações:

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

Onde K_b é a constante de ligação, $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e T a temperatura em Kelvin, em ambas as equações.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos são apresentados na Tabela 4.13, e indicam que as interações entre os complexos de rutênio e a HSA são espontâneas e que as inserções desses compostos no arquebouço da proteína são estabelecidas por interações hidrofóbicas (MOREIRA et al., 2015).

TABELA 4.13 - Parâmetros termodinâmicos para os complexos estudados

COMPLEXOS	T (K)	ΔG° (KJ mol⁻¹)	ΔH° (KJ mol⁻¹)	ΔS° (J mol⁻¹K)											
[Ru(L-cis)(dppb)(bipy)] (1)	298	-23,91	160,80	619,82											
	310	-31,34			[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	298	-26,50	13,39	133,87	310	-28,11	[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	298	-21,12	143,06
[Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (2)	298	-26,50	13,39	133,87											
	310	-28,11			[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	298	-21,12	143,06	550,93	310	-27,73				
[Ru(L-deo)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	298	-21,12	143,06	550,93											
	310	-27,73													

As forças hidrofóbicas podem ser explicadas considerando que a presença dos complexos ao redor da HSA altera parcialmente a estrutura da proteína e expõe fragmentos apolares do interior proteico para o solvente. Esta mudança conformacional leva a uma reorganização das moléculas do solvente ao redor da proteína aumentando o efeito hidrofóbico. Este efeito é uma tendência de moléculas apolares. Portanto, as forças hidrofóbicas passam a ser determinantes para a estabilização do sistema HSA-complexo (da SILVA et al., 2014; MOREIRA et al., 2015)

4.7 - Determinação da citotoxicidade dos complexos

A citotoxicidade dos compostos foi dada através dos valores de IC₅₀, que é a menor concentração de complexo capaz de inibir o crescimento de 50% das células. Esses valores são baseados nos resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular nas linhagens MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo negativo) e V79 (não tumoral de pulmão de hamster chinês) (Figura 4.33). E ainda, para nível de comparação também se realizou os ensaios no complexo precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] e no fármaco inorgânico comercial, a cisplatina.

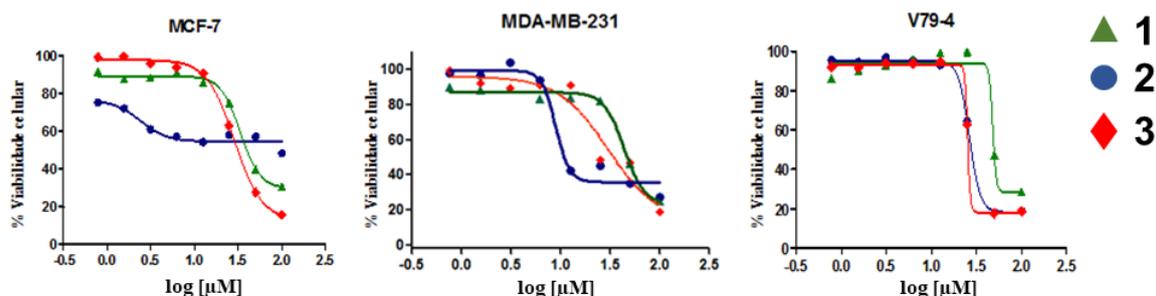


FIGURA 4.32 - Gráfico de viabilidade celular para as linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e V79 para todos os complexos.

Os resultados para os ensaios são apresentados na Tabela 4.14, na qual podemos observar que os aminoácidos livres apresentaram valores de IC_{50} maiores que $100 \mu\text{M}$ nas linhagens avaliadas. Além disso, constatou-se que após a complexação os IC_{50} diminuíram significativamente, destacando a importância do metal na atividade citotóxica dos compostos.

Os valores de IC_{50} encontrados para os compostos na linhagem MCF-7 são menores que para o complexo precursor, porém maiores que para a cisplatina com exceção do complexo $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**) que apresenta IC_{50} menor que a mesma. Esses resultados mostram que além da importância do metal, o aminoácido também contribui para esses valores, fazendo com que o composto como um todo seja relevante para a atividade citotóxica.

Na linhagem MDA-MB-231, ao contrário da MCF-7, o composto $[\text{Ru}(\text{L-cis})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**1**) apresentou valor de IC_{50} maior que para o precursor. Neste caso a complexação do aminoácido não foi determinante para a atividade do composto. Porém como os aminoácidos são os constituintes das proteínas e podem participar de processos como o de biotransformação de compostos metálicos, sua utilização é importante no sentido de que esses compostos podem ajudar no reconhecimento de processos como metabolismo do fármaco ou desintoxicação. Por exemplo, a espécie $[\text{Pt}(\text{L-Met})_2]$ foi isolada a partir da urina dos pacientes de câncer tratados com a cisplatina sendo o único metabólito conhecido dessa droga (ALDEN e REPTA, 1984; MELVIK e PETERSEN, 1987). O composto com melhor IC_{50} nessa linhagem foi o $[\text{Ru}(\text{D-pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (**2**).

TABELA 4.14 - Atividade citotóxica *in vitro* (IC₅₀) e índice de seletividade para os complexos nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e V79, depois de 48h.

COMPOSTO	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)			IS	
	MCF-7	MDA-MB-231	V79	V79/ MCF-7	V79/ MDA-MB-231
Aminoácidos	>100	>100	>100	-	-
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]*	40,15 ± 10,93	25,02 ± 0,59	n.t	-	-
[Ru(L- <i>cis</i>)(dppb)(bipy)] (1)	10,19 ± 0,70	31,50 ± 5,20	26,14 ± 0,56	2,57	0,83
[Ru(D- <i>pen</i>)(dppb)(bipy)] (2)	28,72 ± 3,68	10,52 ± 1,40	39,83 ± 6,26	1,38	3,79
[Ru(L- <i>deo</i>)(dppb)(bipy)]PF ₆ (3)	30,18 ± 5,14	20,30 ± 1,20	27,32 ± 1,40	0,90	1,35
[Ru(L- <i>met</i>)(dppb)(bipy)]PF ₆ **	n.t	5,00 ± 1,50	n.t	-	-
[Ru(<i>gly</i>)(dppb)(bipy)]PF ₆ **	n.t	14,50 ± 0,40	n.t	-	-
[Ru(L- <i>ala</i>)(dppb)(bipy)]PF ₆ **	n.t	28,5 ± 5,20	n.t	-	-
[Ru(L- <i>ser</i>)(dppb)(bipy)]PF ₆ **	n.t	24,1 ± 3,60	n.t	-	-
[Ru(L- <i>try</i>)(dppb)(bipy)]PF ₆ **	n.t	21,3 ± 2,50	n.t	-	-
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]***	13,98 ± 2,02	2,44 ± 0,20	21,60 ± 1,28	1,55	8,85

*Precursor; **composto já descrito na literatura (ALMEIDA et al., 2014); ***fármaco inorgânico comercial (Cisplatina); n.t = não testado

O composto já descrito na literatura [Ru(L-*met*)(dppb)(bipy)]PF₆ apresentou a melhor atividade citotóxica (5,00 ± 1,50 μmol L⁻¹) na linhagem MDA-MB-231, sendo que foi em função desse valor que decidiu-se pesquisar se aminoácidos que continham enxofre em suas estruturas influenciariam na atividade dos compostos, já que nesse trabalho realizou-se um estudo com diversos aminoácidos sendo que o complexo com melhor atividade foi o [Ru(L-*met*)(dppb)(bipy)]PF₆, único da série que possuía enxofre (ALMEIDA et al., 2014). Porém o que se observou é que os aminoácidos sem o átomo de enxofre apresentaram valores de IC₅₀ (Tabela 4.14) semelhantes aos aqui sintetizados não sendo possível observar influência significativa dos aminoácidos que contém enxofre na atividade dos complexos, não havendo possibilidade de fazer uma correlação entre estrutura e atividade, como esperado.

Também tentando correlacionar os resultados de IC₅₀ com o de lipofilicidade não foi possível chegar a uma conclusão uma vez que, não se obteve tendências bem definidas. No caso da linhagem MCF-7 o composto mais ativo foi o mais lipofílico ([Ru(L-*cis*)(dppb)(bipy)] (**1**), já no caso da MDA-MB-231 o mais ativo

foi o menos lipofílico ([Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**). Estes resultados podem ser compreensíveis ao passo que outras propriedades físico-químicas não estudadas neste trabalho, influenciam na capacidade de absorção do composto. Além disso as características das células também são determinantes para a ação dos mesmos, o que justifica a diferença na relação lipofilicidade/atividade dos complexos.

Com relação a interação com as biomoléculas DNA e HSA foi observado que os compostos mais ativos nas duas linhagens foram também os compostos que não interagiram com o DNA, indicando que esses compostos agem por outros alvos. Já no que diz respeito a HSA todos os complexos apresentaram K_b da ordem de 10^4 não havendo possibilidade de correlacionar atividade citotóxica com interação HSA-complexo.

Vale ressaltar ainda que os compostos mais ativos não chegam intactos nas células como mostra o estudo de estabilidade e, portanto, as atividades citotóxicas podem não estar relacionadas unicamente aos complexos iniciais. No entanto, o estudo de reatividade foi realizado com 100% de DMSO, enquanto que o estudo de viabilidade celular foi feito em apenas 0,5%. Além disso pode-se observar que ao final das 48h os compostos ainda existem em uma porcentagem bastante apreciável, sendo que para o composto [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**) não foi possível calcular a porcentagem.

Com os valores de índice de seletividade (IS) apresentados na Tabela 4.13 para todos os complexos, pode-se concluir que, de um modo geral os compostos são pouco seletivos sendo que o mais deles é o [Ru(D-pen)(dppb)(bipy)] (**2**) para a linhagem MDA-MB-231. Esta é uma característica desejada uma vez que, um composto mais seletivo poderá causar menos danos às células saudáveis e conseqüentemente, menos efeitos colaterais.

Na literatura existem poucas descrições sobre o estudo da atividade citotóxica para complexos metálicos contendo os aminoácidos utilizados neste trabalho. Entre eles, Corbi (2005) reporta um complexo de paládio com dois ligantes deoxialliina que foi ativo para as linhagens Hela e TM5 sendo que na concentração de $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ a proliferação da Hela foi totalmente eliminada, enquanto que da TM5 a proliferação celular foi de apenas 25% em um período de 24h (CORBI et al., 2005).

5 - CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados três novos complexos de Ru (II) contendo os aminoácidos sulfurados L-cisteína, D-penicilamina ou L-deoxialliina, bem como o ligante 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano e o ligante 2,2'-bipiridina, os quais foram caracterizados por diversas técnicas. Os complexos **1** e **2** são compostos neutros, com estrutura octaédrica distorcida, em que os ligantes se coordenaram ao metal pelos átomos de N e S, enquanto o complexo **3** é um composto catiônico, cuja carga é balanceada pelo contraíon PF_6^- , sendo que o aminoácido deoxialliina se coordenou pelos átomos de N e O ao rutênio, formando um composto também de geometria octaédrica. Com o estudo de reatividade frente ao DMSO foi possível concluir que o complexo **3** é estável no tempo estudado (48 h), não havendo troca dos ligantes pelo DMSO, enquanto que os compostos **1** e **2** não se mostraram estáveis havendo a geração de várias espécies em solução depois de um período de exposição ao DMSO.

Quanto ao estudo da lipofilicidade dos compostos, todos eles apresentaram valores de Log P dentro dos limites indicados pela literatura para uma boa absorção. No que diz respeito ao estudo de interação com o DNA, por titulação espectrofotométrica e viscosidade, pode-se concluir que o composto **3** apresentou afinidade pelo DNA com constante de ligação de $2,75 (\pm 0,26) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, podendo ser interação do tipo eletrostática ou entre os sulcos do DNA, sendo que o perfil da curva da viscosidade relativa do DNA se manteve constante, não sendo possível distinguir entre essas duas formas de interação. Já os compostos **1** e **2** não apresentaram afinidade significativa pelo DNA, podendo ser sugerido que o mecanismo de ação desses compostos não ocorre via interação com o DNA. Com a HSA todos os compostos interagiram, com constantes de ligação da ordem de 10^4 e essa interação ocorreu pelo mecanismo de supressão de fluorescência estático, sendo essa interação espontânea (ΔG° negativo) e as forças envolvidas foram as hidrofóbicas (ΔH° e ΔS° positivos).

Os resultados de citotoxicidade mostraram-se bons, destacando a importância do composto como um todo, uma vez que não se observou nenhuma tendência em relação ao uso de aminoácidos sulfurados e dessa forma não foi possível fazer uma correlação estrutura/atividade como esperado. Podemos destacar ainda o resultado de IC_{50} na linhagem MCF-7 obtido para o composto **1**

que foi de $10,19 \pm 0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$, valor comparável ao do fármaco de referência, a cisplatina que é de $13,98 \pm 2,02 \mu\text{mol L}^{-1}$. Também podemos destacar o índice de seletividade do composto **2** com relação a MDA-MB-231, uma linhagem celular de câncer de mama triplo negativo. Em fim nossos resultados foram importantes para contribuir com a geração de conhecimento acerca da inserção dos aminoácidos no planejamento de novos compostos de coordenação como potenciais antitumorais.

REFERÊNCIAS

ALDEN, W. W.; REPTA, A. J. "Exacerbation of cisplatin-induced nephrotoxicity by methionine". *Chem.–Biol. Interactions*, **48**: 121, 1984.

ALMEIDA, M. A. P. Complexos de rutênio contendo aminoácidos, com propriedades citotóxicas em células tumorais. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2009. Dissertação de Mestrado, 130 p.

ALMEIDA, M. A. P.; NASCIMENTO, F. B.; GRAMINHO, A. E.; FERREIRA, A. G.; ELLENA, J.; MELLO, F. M. dos S.; LIMAD, A. P.; SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; BATISTA, A. A. "Structural features and cytotoxic activities of [Ru(AA-H)(dppb)(bipy)]PF₆ complexes". *Polyhedron*, **81**, 735, 2014.

AMBROISE, A.; MAIYA, B. G. "Ruthenium(II) Complexes of redox-related, modified dipyridophenazine ligands: Synthesis, characterization, and DNA Interaction". *Inorg. Chem.*, **39**: 4256, 2000.

AMIRI, M.; JANKEJE, K.; ALBANI, J. R. "Origin of fluorescence lifetimes in Human Serum Albumin. studies on native and denatured protein". *J Fluoresc*, **20**: 651, 2010.

AMOURI, H.; GRUSELLE, M. Chirality in transition metal chemistry: molecules, supramolecular assemblies and materials. Paris: Wiley, 2008, p. 246.

ANBU, S.; RAVISHANKARAN, R.; KARANDE, A. A.; KANDASWAMY, M. DNA targeting polyaza macrobicyclic dizinc(II) complexes promoting high in vitro caspase dependent anti-proliferative activity against human carcinoma cancer cells. *Dalton Trans.*, **41**: 12970, 2012.

ANGUIZOLA, J.; MATSUDA, R.; BARNABY, O. S.; HOY, K. S.; WA, C.; DEBOLT, E.; KOKE, M.; HAGE, D. S. "Review: Glycation of human serum albumin". *Clinica Chimica Acta* **425**: 64, 2013.

ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. "Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?". *Cancer Chemother Pharmacol*, **66**: 1, 2010.

BACAC, M.; HOTZE, A. C. G.; SCHILDEN, K. VAN DER.; HAASNOOT, J. G.; PACOR, S.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; REEDIJK, J. "The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: an NMR evaluation". *J of Inorg Biochem*, **98**: 402, 2004.

BARBOSA, M. I. F., Complexos Carbonílicos de Rutênio. De um Gás Tóxico a Uma Droga com Potencial Agente Citotóxico. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado, 127 p.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. "Interações entre complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análise: um enfoque nos metalintercaladores". *Rev. Virtual Quim. In press*, 2015.

- BATISTA, A. A.; SANTIAGO, M.; DONNICI, C.; MOREIRA, I.; HEALY, P.; BERNERS-PRINCE, S.; QUEIROZ, S.; "Electrochemical and spectroscopic studies on $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N})_2$ and $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N-N})$ complexes (N= pyridine derivatives and N-N= phenanthroline or bipyridine derivatives). X-ray structure of $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{phen})$ ". *Polyhedron*, **20**: 2123, 2001.
- 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. of Inorg Biochem*, **106**: 90, 2012.
- BERNE, S.; KOVACIC, L.; SOVA, M.; KRASEVEC, N.; GOBEC, S.; KRIZAJ, I.; KOMEL, R. "Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: design, synthesis, structure–activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**: 4264, 2015.
- BRABEC, V.; NOVAKOVA, O. "DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity". *Drug Resistance Updates*, **9**: 111, 2006.
- BRESSAN, M.; RIGO, P. "Five-coordinate complexes of ruthenium(II) with ditertiary phosphine". *Inorg. Chem.*, **14**: 2286, 1975.
- CACITA, N.; NIKOLAOU, S. "Studying the interaction between trinuclear ruthenium complexes and human serum albumin by means of fluorescence quenching". *J of Luminescence*, **169**: 115, 2016.
- CALLADINE, C. R.; DREW, H. R.; LUISI, B. F.; TRAVERS, A. A. "Understanding DNA: the molecule and how it works". 3^a ed. Amsterdam, Elsevier, 2004. p. 334.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. "Structure of serum albumin". *Adv. Protein Chem.* **45**:153, 1994.
- CHELLAN, P.; SHADLER, P. J. The elements of life and medicines. *Phil. Trans. R. Soc, c. A 373*: 20140182. <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2014.0182>, 2015.
- CHI, Y.; WU, K.; WEI, T. Ruthenium and osmium complexes that bear functional azolate chelates for dye-sensitized solar cells. *Chem. Asian J.*, **10**: 1098, 2015.
- COLDITZ, G. A.; SELLERS, T. A.; TRAPIDO, E. "Perspectives: epidemiology-identifying the causes and preventability of cancer?". *Nature reviews/ cancer*, **6**: 75, 2006.
- COLINA-VEGAS, L.; VILLARREAL, W.; NAVARRO, M.; de OLIVEIRA, C. R.; GRAMINHA, A. E.; MAIA, P. I. da S.; DEFLON, V. M.; FERREIRA, A. G.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Cytotoxicity of Ru(II) piano–stool complexes with chloroquine and chelating ligands against breast and lung tumor cells: Interactions with DNA and BSA". *J of Inorg. Biochem.*, **153**: 150, 2015.
- CORBI, P. P.; MELNIKOV, P.; MASSABNI, A. C. "A solid nickel(II) complex with methionine sulfoxide". *Journal of Alloys and Compounds*, **308**: 153, 2000.

CORBI, P. P.; MASSABNI, A. C.; MOREIRA, A. G.; MEDRANO, F. J.; JASIULIONIS, M. G.; COSTA-NETO, C. M. "Synthesis, characterization, and biological activity of a new palladium(II) complex with deoxyalliin". *Can. J. Chem.* **83**: 104, 2005.

CORREA, R. S., Complexos de Rutênio com Ligantes de Interesse Biológico Aspectos Químicos, Estruturais e Avaliação de Suas Atividades Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 127 p.

CORREA, R. S.; de OLIVEIRA, K. M.; DELOLO, F. G.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; PLUTIN, A. M.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A. "Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'-(disubstituted)thiourea ligands: Synthesis, characterization, BSA- and DNA-binding studies of new cytotoxic agents against lung and prostate tumour cells". *J of Inorg. Biochem.* **150**: 63, 2015.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G.; *Advanced Inorganic chemistry*; Jonh Wiley e Sons: New York, 1980, 1396 p.

CUNHA, C. J.; DODSWORTH, E. S.; MONTEIRO, M. A.; LEVER, A. B. P. "Bis(2,2'-bipyridine)(1,2-diimino-9,10-anthraquinone)ruthenium(II) derivatives: A ZINDO analysis of a redox series involving coupled proton and electron transfers". *Inorganic Chemistry*, 38 (23): 5399, 1999.

DA SILVA, R. E.; TOLEDO, K. C. F.; JORGE, H. B.; NETO, B. M.; DE SOUZA, V. R.; NAKATANI, H. S. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção Amperométrica de ácido ascórbico. *Quim. Nova*, XY: (00), 1, 2014.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action". *European Journal of Pharmacology*, 740: 364, 2014.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. "Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução". *Quim. Nova*, 28 (1): 118, 2005.

DION, M. E.; ANGLER, M.; MILNER, J. A. "S-allyl cysteine inhibits nitrosomorpholine formation and bioactivation". *Nutr Cancer*, 28 (1): 1, 1997.

DOBROWOLSKI, J. Cz.; RODE, J.E.; SADLEJ, J. Cysteine conformations revisited. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **810**: 129, 2007.

DOS SANTOS, E. R. Síntese e caracterização de complexos de fórmula geral [Ru(AA)(P-P)(N-N)]PF₆, onde (AA= aminoácidos; P-P= bifosfinas; N-N= 2,2'-bipiridina e derivados e 1,10-fenantrolina) – avaliação de suas potencialidades citotóxicas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2011. Tese de Doutorado, 305 p.

ENYEDY, E. A.; MÉSZÁROS, J. P.; DÖMÖTÖR, O.; HACKL, C. M.; ROLLER, A.; KEPPLER, B. K.; KANDIOLLER, W. "Comparative solution equilibrium studies on

pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes of 2,2'-bipyridine and ethylenediamine and their interaction with human serum albumin". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **152**: 93, 2015.

FEHSKE, K. J.; MULLER, W. E.; WOLLERT, V. "The location of drug binding sites in human serum albumin". *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 687, 1981.

GUPTA, A.; MUMPER, R. J. "Copper chelation by D-penicillamine generates reactive oxygen species that are cytotoxic to human leukemia and breast cancer cells". *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 1271, 2007.

FEI, S.; CHEN, J.; YAO, S.; DENG, G.; HE, D.; KUANG, Y. "Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum". *Analytical Biochemistry*, **339**: 29, 2005.

GRAMINHA, A. E., Complexos de Ru e Pd com Bases de Schiff de Ditiocarbazatos com Interesse Bioinorgânico e Quimioterápico. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 144 p.

GRAMINHA, A. E. Produtos naturais e derivados, complexação com o rutênio, visando aumento da atividade antitumoral. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2015. Tese de Doutorado, 160 p.

HANNON, M. J. Supramolecular DNA recognition. *Chemical Society Reviews*, **36**: 280, 2007.

HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. "From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)". *J of Inorg Biochem*, **100**: 891, 2006.

HE, X. M.; CARTER, D. C. "Atomic structure and chemistry of human serum albumin". *Nature*. **358**: 209, 1992.

HIGBY, D. J.; WALLACE, H. J.; ALBERT, D. J.; HOLLAND, J. "Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors". *Cancer*, **33**: 1219, 1974.

IGLESIAS, B. A.; BARATA, J. F. B.; PEREIRA, P. M. R.; GIRÃO, H.; FERNANDES, R.; TOMÉ, J. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. "New platinum(II)-bipyridyl corrole complexes: Synthesis, characterization and binding studies with DNA and HSA". *J of Inorg Biochem*, **153**: 32, 2015.

INCA- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. 122 p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acessado em: 11 de março de 2016.

INCA- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Radioterapia. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=100. Acessado em 11 de março de 2016.

Institut Curie. De la tumeur initiale aux métastases: une multitude d'événements. 2013. Disponível em: <http://curie.fr/fondation/tumeur-initiale-aux-metastases-multitude-d%E2%80%99evenements?prehome=0>. Acessado em: 20 de dezembro de 2015.

KANSY, M.; FISCHER, H.; KRATZAT, K.; SENNER, F.; WAGNER, B.; PARRILLA, I. High-Throughput artificial membrane permeability studies in early lead discovery and development. In: TESTA, B.; van de WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G.; GUY, R. (Eds). Pharmacokinetic optimization in drug research. Zurich: VHCA; Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 2001. p. 446-464.

KARASAWA, T.; STEYGER, P. S. "An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity". *Toxicology Letters*, **237**: 219, 2015.

KE, H.; MA, W.; HONGDA, W.; CHENG, G.; YUAN, H.; WONG, W-K.; KWONG, D. W. J.; TAM, H-L.; CHEAH, K-W.; Chan, C-F.; WONG, K-L. Synthesis, singlet-oxygen photogeneration, two-photon absorption, photo-induced DNA cleavage and cytotoxic properties of an amphiphilic β -Schiff-base linked Ru(II) polypyridyl-porphyrin conjugate. *Journal of Luminescence*, **154**: 356, 2014.

KEENE, F. R.; SMITH, J. A.; COLLINS, J. G. "Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids". *Coordination Chemistry Reviews*, **253**: 2021, 2009.

KELLAND, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy". *Nature Rev. Cancer*, **7**: 573, 2007.

KIM, J. Y. "Antimelanogenic and antioxidant properties of Gallic Acid". *Biol. Pharm. Bull.*, **30** (6): 1052, 2007.

KUMAR, P.; GUPTA, R. K.; PANDEY, D. S. Half-sandwich arene ruthenium complexes: synthetic strategies and relevance in catalysis. *Chem. Soc. Rev.*, **43**: 707, 2014.

LAKOWICZ, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3a ed. Springer Science, 2006.

LEE, J.D. *Química inorgânica não tão concisa*. São Paulo: Edgard Blücher, 1999

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. I.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. São Paulo, SARVIER, 2006. p.1202.

LEVER, A. B. P. *Inorganic electronic spectroscopy*. Amsterdam: Elsevier, 1984. 864 p.

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, 2010. Dissertação de Mestrado, 207 p.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**: 4, 2012.

LIU, Y.; YU, Q.; WANG, C.; SUN, D.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; LIU, J. "Ruthenium (II) complexes binding to human serum albumin and inducing apoptosis of tumor cells". *Inorg. Chem. Communications*, **24**: 104, 2012.

MANIKANDAN, R.; JEGANMOHAN, M. Recent advances in the ruthenium-catalyzed hydroarylation of alkenes with aromatics: synthesis of trisubstituted alkenes. *Org. Biomol. Chem.*, **13**: 10420, 2015.

MARTÍNEZ, A.; SUÁREZ, J.; SHAND, T.; MAGLIOZZO, R. S.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. "Interactions of arene–Ru(II)–chloroquine complexes of known antimalarial and antitumor activity with human serum albumin (HSA) and transferrin". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**: 39, 2011.

MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRONBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. "Inflammation in prostate carcinogenesis". *Nature Reviews/ Cancer*, **7**: 256, 2007.

MELNIKOV, P.; CORBI, P. P.; AGUILA, C. D.; ZACHARIAS, M A.; CAVICCHIOLI, M.; MASSABNI, A. C. "Iron(II) djenkolate: synthesis and properties". *Journal Alloys and Compounds*, **307**: 179-183, 2000.

MELVIK, J. E.; PETTERSEN, E. O. "Reduction of cis-Dichlorodiammineplatinum-induced cell inactivation by Methionine". *Inorganica Chimica Acta*, **137**: 115, 1987.

MCWHINNEY, S. R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H. L. "Platinum neurotoxicity pharmacogenetics". *Mol. Cancer Ther*, **8** (1): 10, 2009.

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; de SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; de SOUZA, V. R. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por Complexo de rutênio. *Quim. Nova*, **38** (2): 227, 2015.

MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for aellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Methods.*, **65**: 55, 1983.

NAKAMOTO, K.; MORIMOTO, Y.; MARTELL, A. E. "Infrared spectra of aqueous solutions. metal chelate compounds of amino acids". *Journal of the American Chemical Society*, **83**: 4528, 1961.

NAKAMOTO, K. Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds part B: applications in coordination, organometallic and bioinorganic chemistry. New Jersey: John Wiley, 2009. 408 p.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. "Complexos de Platina (II) na terapia do c ncer". *Rev. Virtual Quim.*, **3** (3): 196, 2011.

SPĂȚARU, N.; SARADA, B. V.; POPA, E.; TRYK, D. T.; FUJISHIMA, A. Voltammetric determination of L-Cysteine at conductive diamond electrodes. *Anal. Chem.* **73**: 514, 2001.

NIEHUES, M.; BARROS, V. P.; EMERY, F. S.; DIAS-BARUFFI, M.; ASSIS, M. D.; LOPES, N. P. "Biomimetic in vitro oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the in vivo phase I metabolism of bioactive compounds". *Eur. J. Med. Chem.*, **54**: 804, 2012.

OGURA, K.; KOBAYASHI, M.; NAKAYAMA, M.; MIHO, Y. Electrochemical and in situ FTIR studies on the adsorption and oxidation of glycine and lysine in alkaline médium. *J of Electroanalytical Chemistry*, **449**: 101, 1998.

OLIVEIRA, K. M. Complexos de Rutênio Contendo Lapachol e Lausona: Síntese, Caracterização e suas Propriedades Quimioterapêuticas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2014. Dissertação de Mestrado, 125 p.

PASETTO, L. M.; D'ANDREA, M. R.; BRANDES, A. A.; ROSSI, E.; MONFARDINI, S. "The development of platinum compounds and their possible combination". *Critical Rev. in Oncology/Hematology*, **60**: 59, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2015, 692 p.

PEARSON, P.; BOND, A. M.; DEACON, G. B.; FORSYTH, C.; SPICCIA, L. "Synthesis and characterisation of *bis*(2,20-bipyridine)-(4-carboxy-40-(pyrid-2-ylmethylamido)2,20-bipyridine)-ruthenium(II) di(hexafluorophosphate) Comparison of spectroelectrochemical properties with related complexes". *Inorganica Chimica Acta*, **361**: 601, 2008.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. "Complexos fosfínicos e suas aplicações na Medicina". *Quím. Nova*, 19 (6): 651, 1996.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A.; OLIVA, G.; GAMBARDELLA, M. T.; SANTOS, R. H. A.; MACFARLANE, K. S.; RETTIG, S. J.; JAMES, B. R. "The reactivity of five coordinate Ru(II)[1,4-*bis*(diphenylphosphino)butano] complexes with the N-donor ligands: amônia, pyridine, 4-substitued pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(pyridil)amine, 1,10-phenantroline, 4,7-diphenylphenantroline and ethylenediamine". *Inorg. Chimica. Acta.*, **267**: 209, 1998.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; BONGARD, D. VAN DEN.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. "A phase I and pharmacological study with imidazolium-*trans*-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel Ruthenium anticancer agent". *Clinical Cancer Research*, **10**: 3717, 2004.

RAMAN, N.; POTHIRAJ, K.; BASKARAN, T. DNA interaction, antimicrobial, electrochemical and spectroscopic studies of metal(II) complexes with tridentate heterocyclic Schiff base derived from 20-methylacetoacetanilide. *Journal of Molecular Structure*, **1000**: 135, 2011.

REES, T. W.; BARANOFF, E. Ruthenium complexes with tridentate ligands for dye-sensitized solar cells. *Polyhedron*, **82**: 37, 2014.

REFAT, M. S.; EL-KORASHY, S.; KUMAR, D. N.; AHMED, A. S. "FTIR, magnetic, ^1H NMR spectral and thermal studies of some chelates of caproic acid: Inhibitory effect on different kinds of bacteria". *Spectrochimica Acta Part A*, **70**: 217, 2008.

REFAT, M. S.; EL-KORASHY, S.; AHMED, A. S. "Preparation, structural characterization and biological evaluation of L-tyrosinate metal ion complexes". *Journal of Molecular Structure*, **881**: 28, 2008.

RÍOS-LUCI, C.; BONIFAZI, E. L.; LEÓN, L. G.; MONTERO, J. C.; BURTON, G.; PANDIELLA, A.; MISICO, R. I.; PADRÓN, J. M. " β -Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity". *Eur. J. Med. Chem.*, **53**: 264, 2012.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. "Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode". *Nature*, **205**: 698, 1965.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; GRIMLEY, E. B.; THOMSON, A. J. "The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of Platinum(IV) complexes". *J. Biol. Chem.*, **242** (6): 1347, 1967.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. "The successful regression of large solid Sarcoma 180 tumors by Platinum compounds". *Cancer Res.*, **30**: 1799, 1970.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *biochemistry*, **20**: 3096, 1981.

SANTIAGO, M. O. Síntese, caracterização e estudos cinéticos da isomerização de compostos de Ru(II) contendo ligantes (X-bipy) (X=-H, -NO₂, -Me, -COOH, -SMe, O=SMe, -Cl, -OMe). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 147 p.

SAVA, G.; ZORZET, S.; TURRIN, C.; VITA, F.; SORANZO, M. R.; ZABUCCHI, G.; COCCHIETTO, M.; BERGAMO, A.; DIGIOVINE, S.; PEZZONI, G.; SARTOR, L.; GARBISA, S. "Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen". *Clinical Cancer Research*, **9**: 1898, 2003.

SHEN, D-W.; POULIOT, L. M.; HALL, M. D.; GOTTESMAN, M. M. "Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes". *Pharmacol. Rev.*, **64** (3): 706, 2012.

SHELDRIK, W.; EXNER, R. "Reaction of $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ with α -amino acids. Synthesis structural characterization of the Schiff base complexes $\{\text{Ru}[(\text{CH}_3)_2\text{C}:\text{NCH}(\text{R})\text{COO}]_2(\text{PPh}_3)_2\}$ (R - H, CH₃)". *Inorganica Chimica Acta*, **175**: 261, 1990.

- SHINODA, S.; INOUE, N.; TAKITA, K.; SAITO, Y. "Synthesis of RuCl(amino acido)(PPh₃)₂, a catalyst for oxidative dehydrogenation of glycerin". *Inorganica Chimica Acta*, **65**: L21, 1982.
- SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. *Química Inorgânica*. Porto Alegre: Bookman, 2008, 848p.
- SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22**: 7265, 2003.
- SIEMIARCZUK, A.; PETERSEN, C. E.; HA, C-E.; YANG, J.; BHAGAVAN, N. V. "Analysis of tryptophan fluorescence lifetimes in a series of Human Serum Albumin mutants with substitutions in subdomain 2A". *Cell Biochemistry and Biophysics*, **40**: 115, 2004.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. "Drug- DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **124**: 1, 2013.
- SOUZA, M. A.; JOHANN, S.; LIMA, L. A. R. S.; CAMPOS, F. F.; MENDES, I. C.; BERALDO, H.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ALVES, T. M. .; Á, N. P.; Z NI, C. L. "The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **108** (3): 1, 2013.
- SPERA, M. B. M.; QUINTÃO, F. A.; FERRARESI, D. K. D.; LUSTRI, W. R.; MAGALHÃES, A.; FORMIGA, A. L. B.; CORBI, P. P. Palladium (II) complex with S-allyl-Lcysteine: New solid-state NMR spectroscopic measurements, molecular modeling and antibacterial assays. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **78**: 313, 2011.
- STANILA, A.; MARCU, A.; RUSU, D.; DAVID, L. "Spectroscopic studies of some copper (II) complexes with amino acids". *Journal of Molecular Structure*, **834**: 364, 2007.
- STEPHESON, T. A.; WILKINSON, G. "New complexes of ruthenium(II) and ruthenium(III) with diphenylphosphine, triphenylarizine, trichlorostannate, pyridine and other ligands". *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **28**: 945, 1966.
- TOMAZ, A. I.; JAKUSCH T.; MORAIS, T. S.; MARQUES, F.; DE ALMEIDA, R. F. M.; MENDES, F.; ENYEDY, E. A.; SANTOS, I.; PESSOA, J. C.; KISS, T.; GARCIA, M. H. "[Ru^{II}(η⁵-C₅H₅)(bipy)(PPh₃)]⁺, a promising large spectrum antitumor agent: cytotoxic activity and interaction with human serum albumin". *J of Inorg. Biochem.*, **117**: 261, 2012.
- TUTE, M. S. Lipophilicity: a history. In: MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; TIMMERMAN, H. (Eds.). *Methods and principles in medicinal chemistry: lipophilicity in drug action and toxicology*. New York, Basel, Cambridge, Tokio: VCH, 1996. p 7-24.
- VALLE, E. M. A.; DO NASCIMENTO, F. B.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.;

MONTEIRO, M. C. R.; MACHADO, S. P.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; AZEVEDO, E. R. "Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em complexos difosfínicos de rutênio". *Química Nova*, 31 (4): 807-812, 2008.

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.

ZIVEC, P.; PERDIH, F.; TUREL, I.; GIESTER, G.; PSOMAS, G. "Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA- and albumin-binding". *J of Inorg. Biochem.*, **117**: 35, 2012.

WADHWA, S.; MUMPER, R. J. "D-penicillamine and other low molecular weight thiols: Review of anticancer effects and related mechanisms". *Cancer Letters*, **337**: 8, 2013.

WARING, M. J. Complex formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.*, **13**: 269, 1965.

WHEATE, N. J.; BRODIE, C. R.; COLLINS, J. G.; KEMP, S.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. "DNA Intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis". *Mini-Reviews in Medicinal Chem.*, **7**: 627, 2007.

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. "The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials". *Dalton Transactions*, **39**: 8113, 2010.

WHO - World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. World cancer report 2008. Geneva, 2008. 509 p.

WU, S.; YUAN, W.; WANG, H.; ZHANG, Q.; LIU, M.; YU, K. "Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (N,N'-dibenzylethane-1,2-diamine) transition metal complexes". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**: 2026, 2008.

APÊNDICE I

➤ Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{31}C

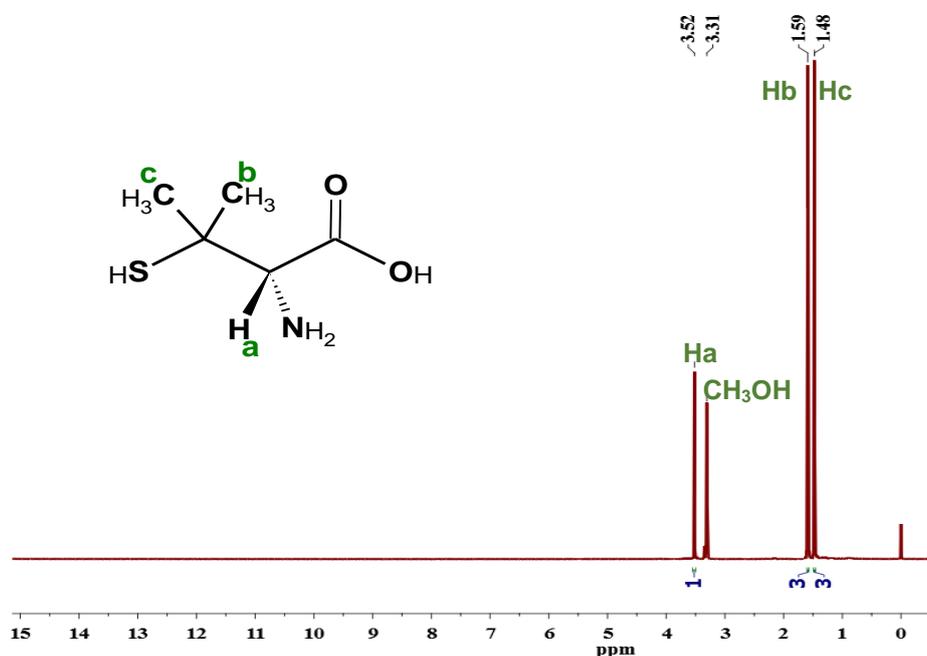


FIGURA I.A – Espectro de RMN de ^1H obtido para o aminoácido D-Penicilamina, em $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$

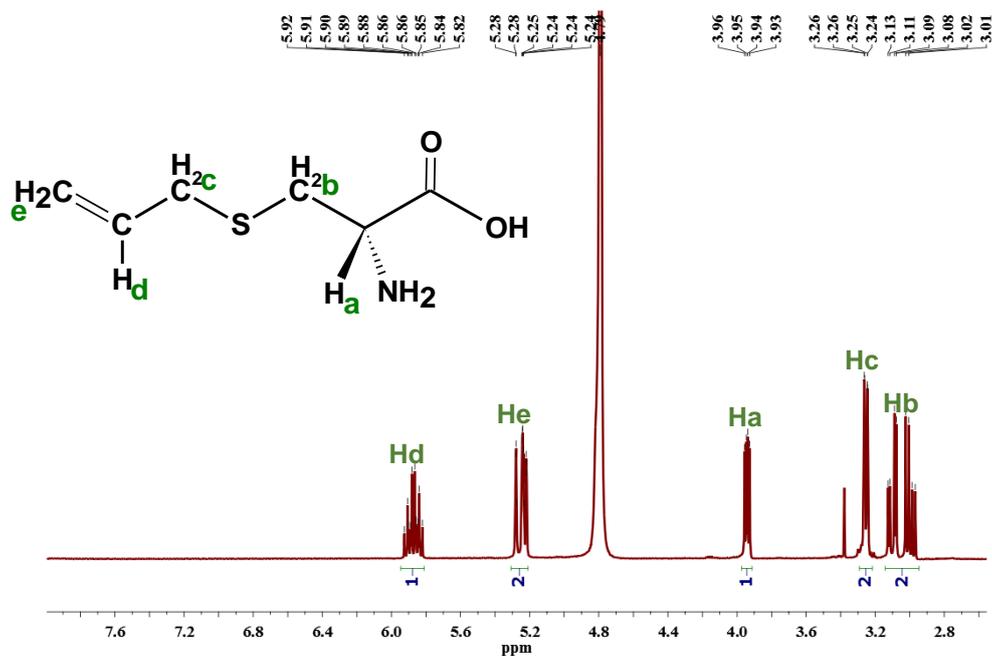


FIGURA I.B – Espectro de RMN de ^1H obtido para o aminoácido L-Deoxiallina, em D_2O

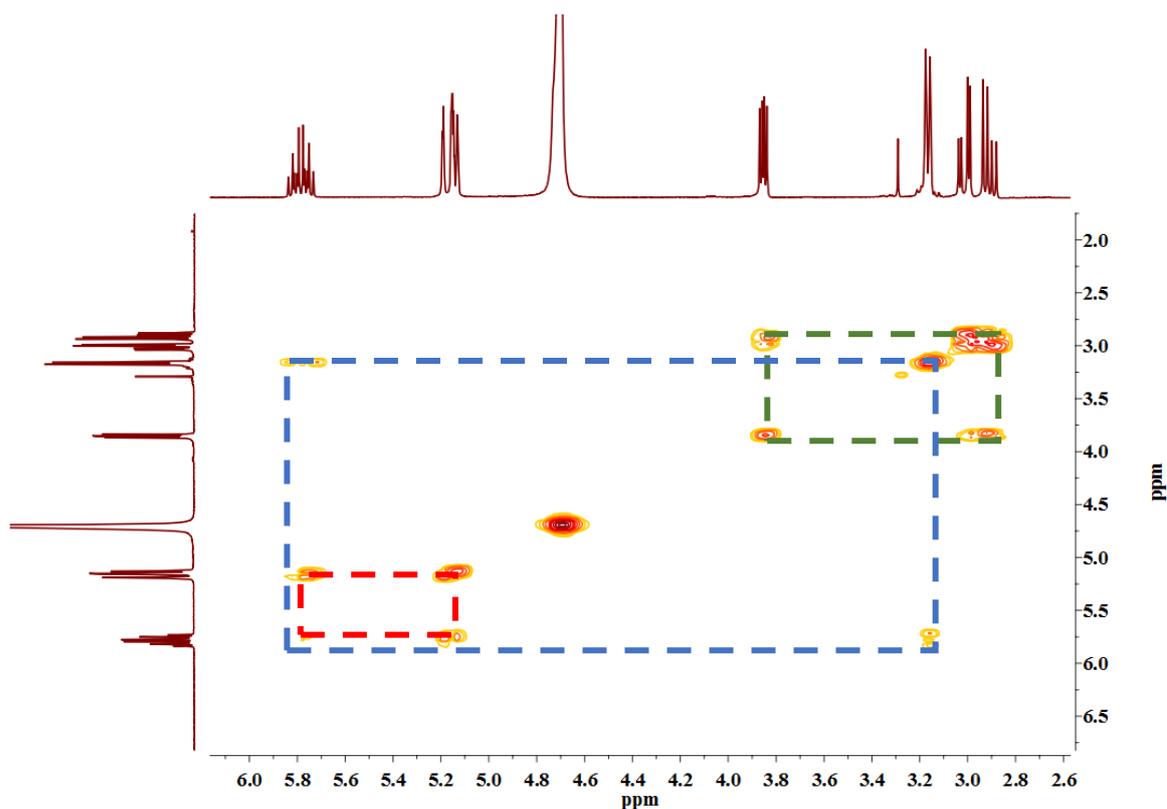


FIGURA I.C – Espectro de RMN COSY de ^1H obtido para o aminoácido L-Deoxiallina, em D_2O

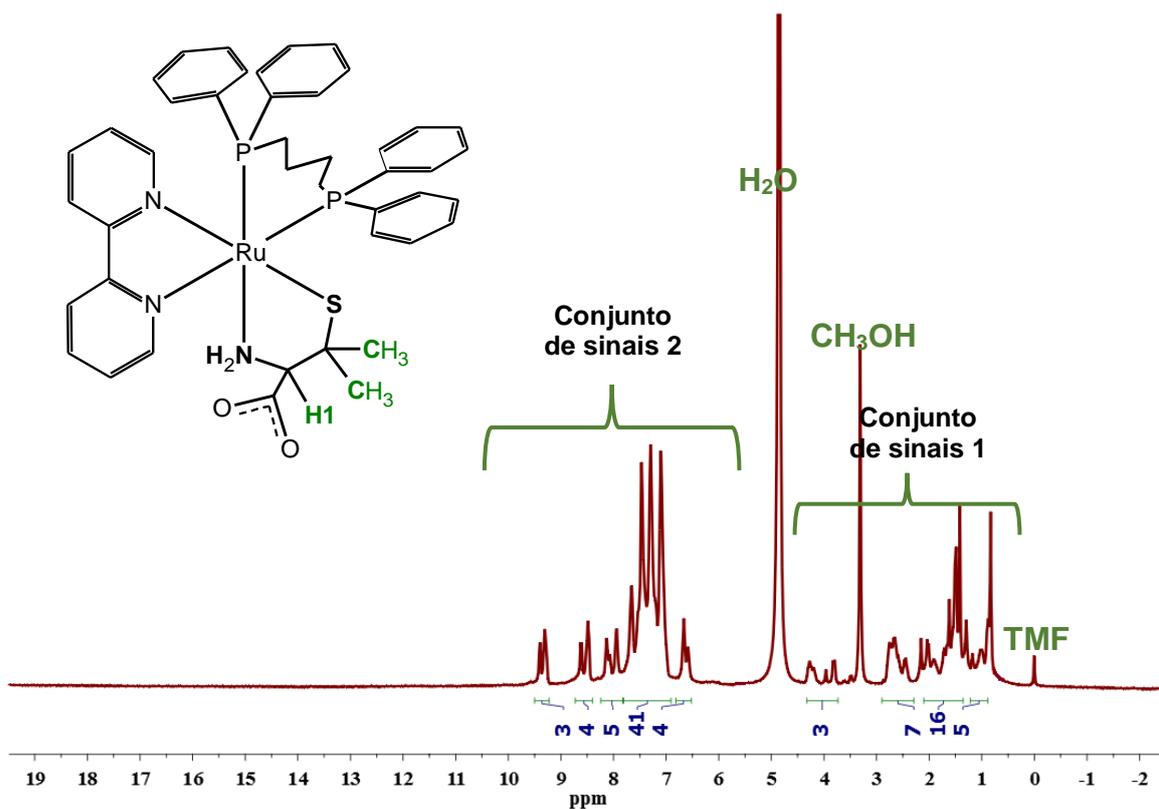


FIGURA I.D – Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{D-Pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$, em $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$

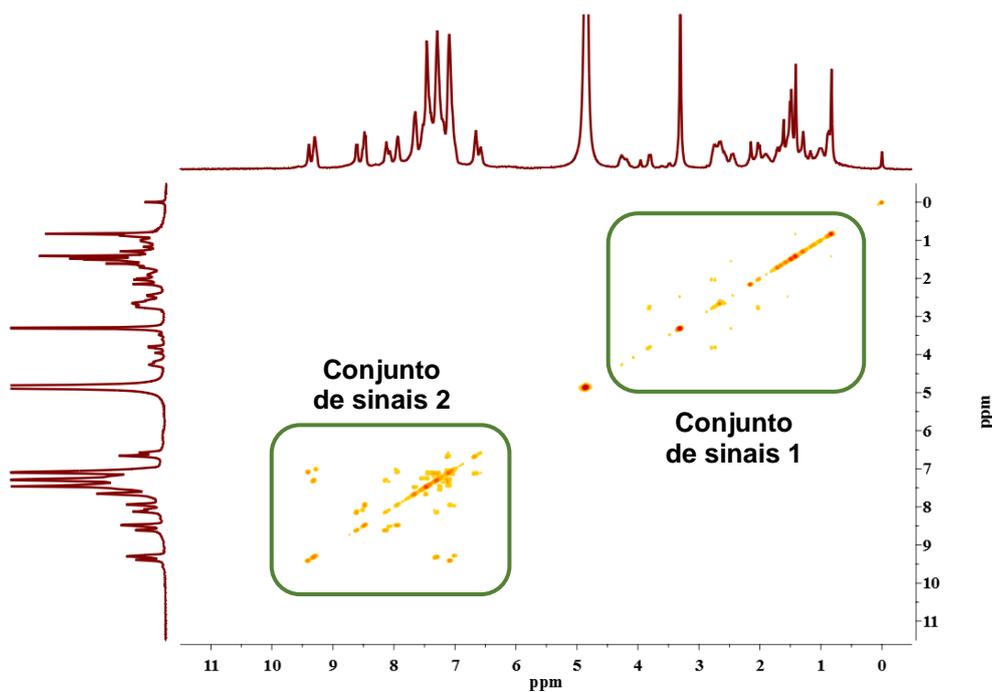


FIGURA I.E – Espectro de RMN COSY de ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{D-Pen})(\text{dppb})(\text{bipy})]$, em $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$

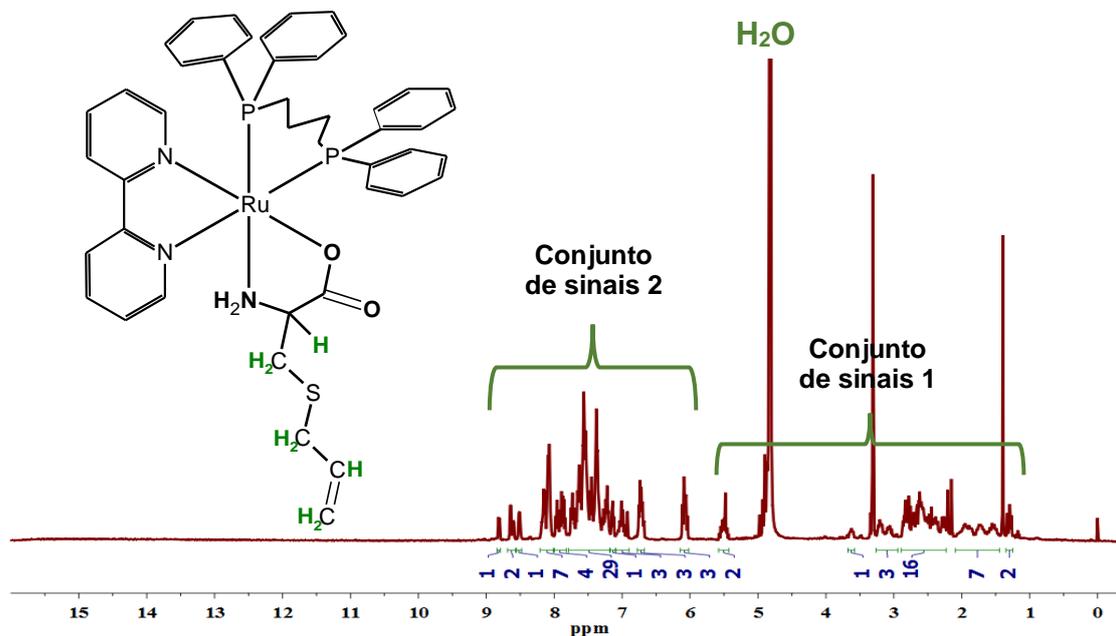


FIGURA I.F – Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-Deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$

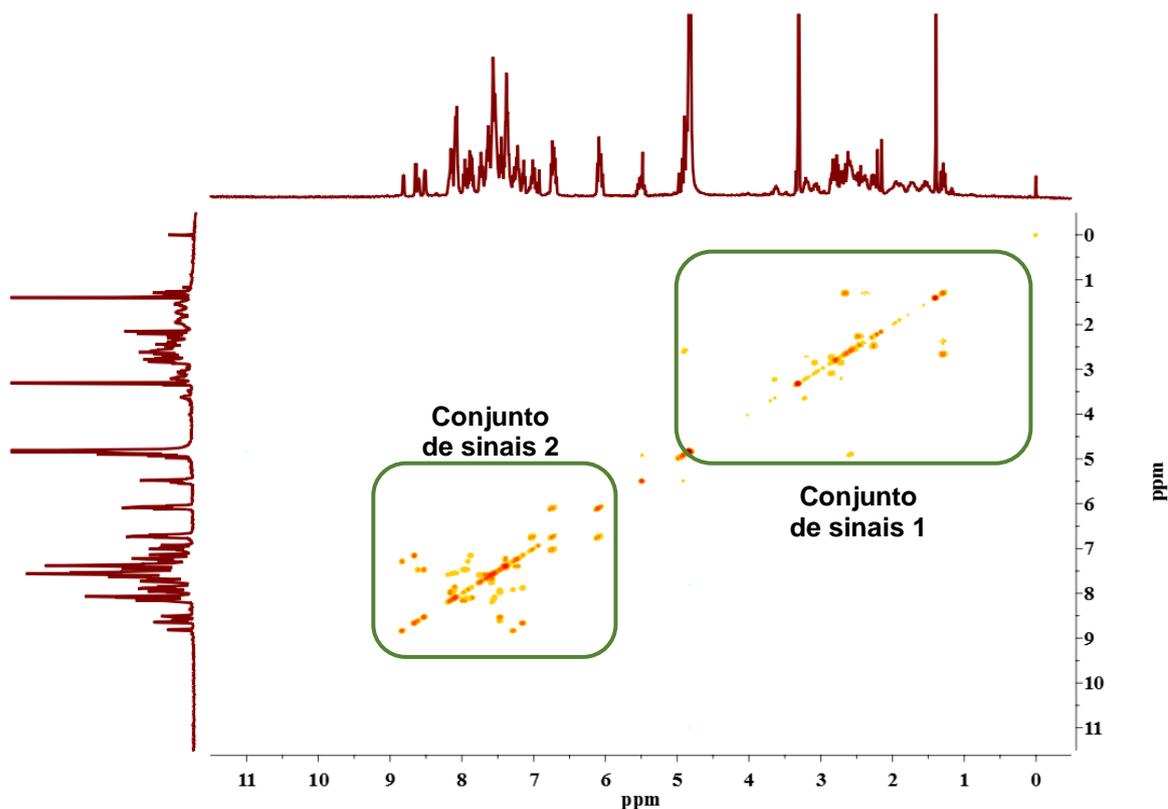


FIGURA I.G – Espectro de RMN COSY de ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(\text{L-Deo})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em CD_3OD

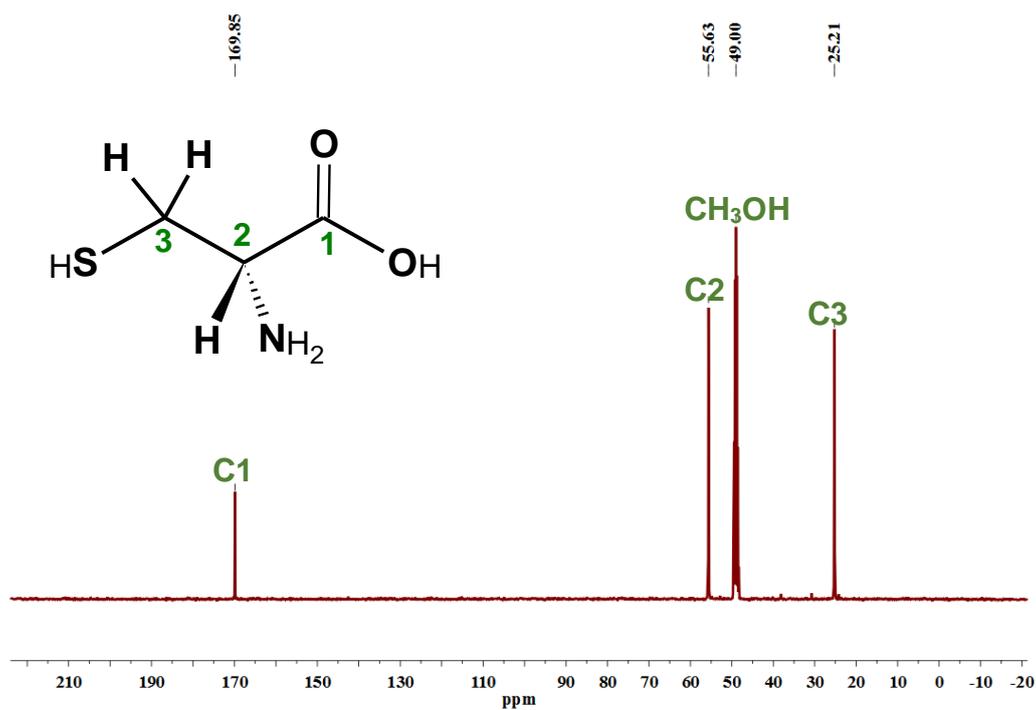


FIGURA I.H – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o aminoácido L-Cisteína, em CD_3OD

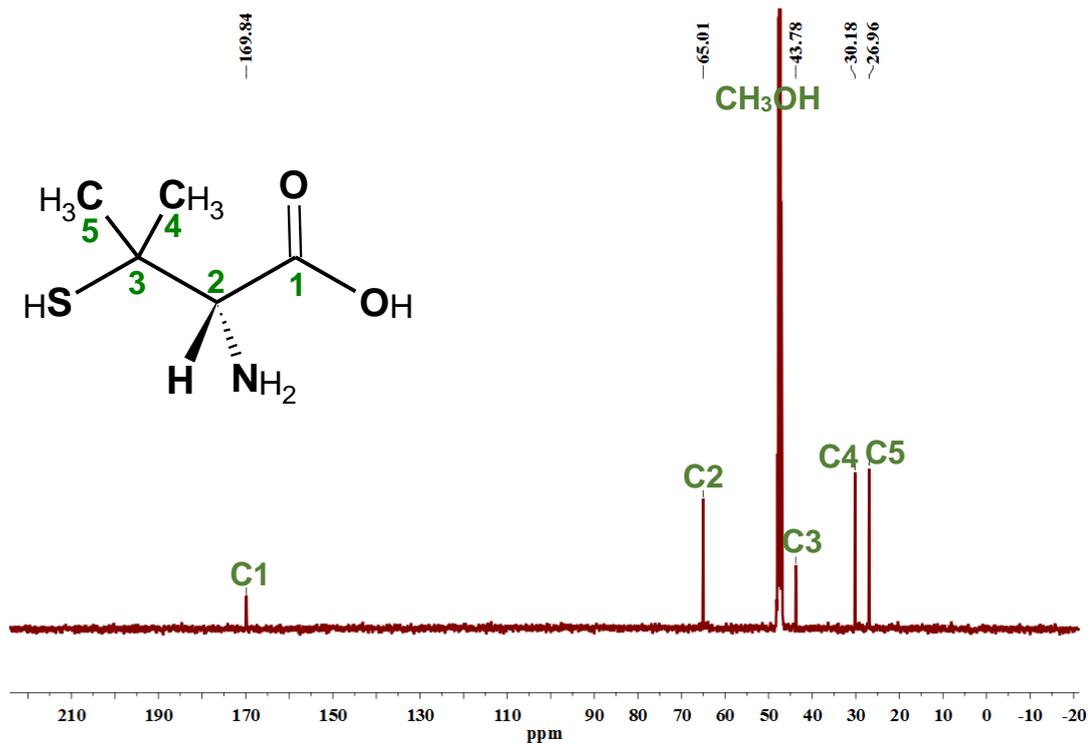


FIGURA I.I – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o aminoácido D-Penicilamina, em CD_3OD

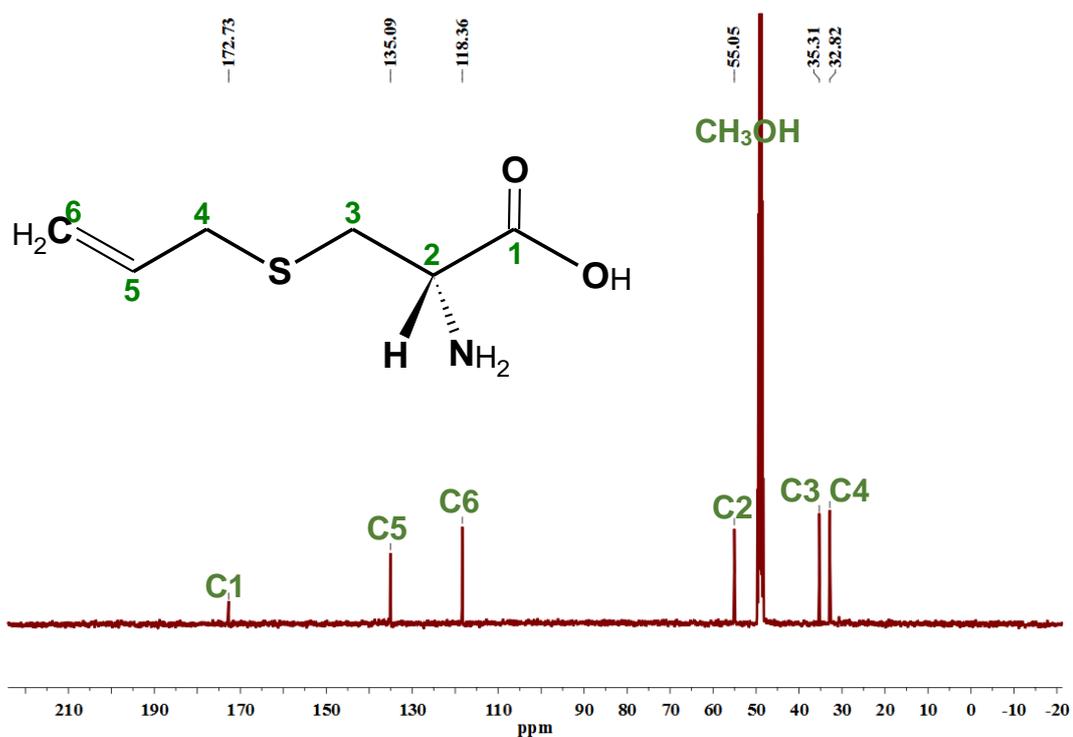


FIGURA I.J – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o aminoácido L-deoxialliina, em CD_3OD

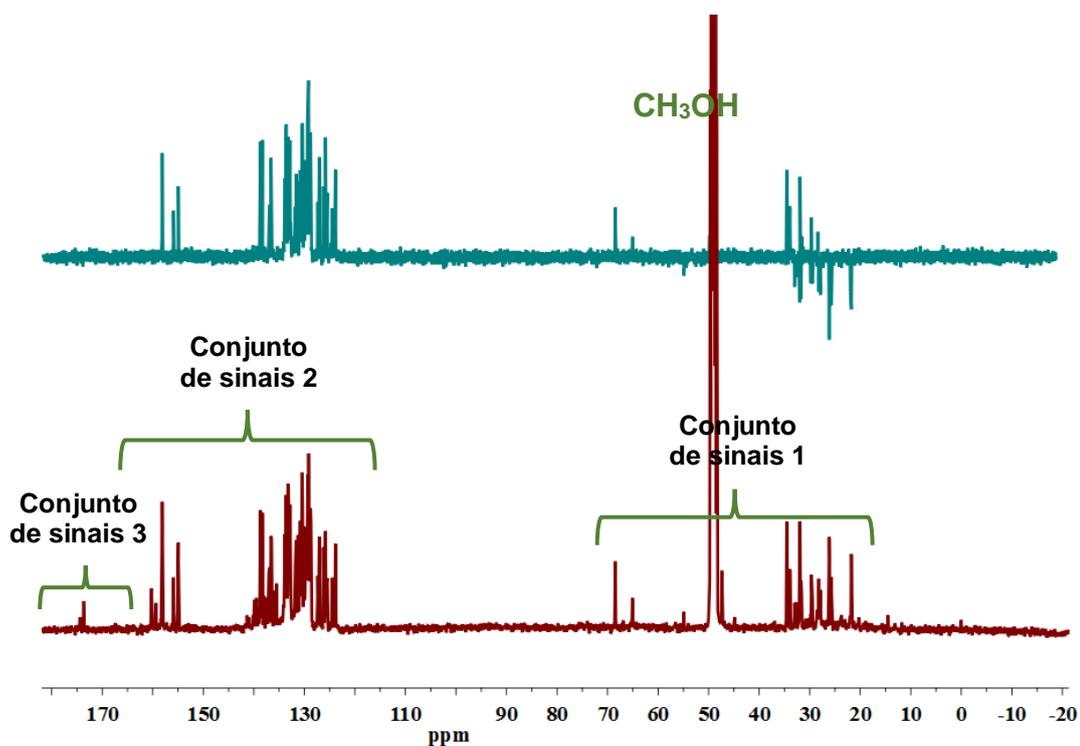


FIGURA I.K – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 obtido para o complexo $[Ru(D-Pen)(dppb)(bipy)]$, em CD_3OD

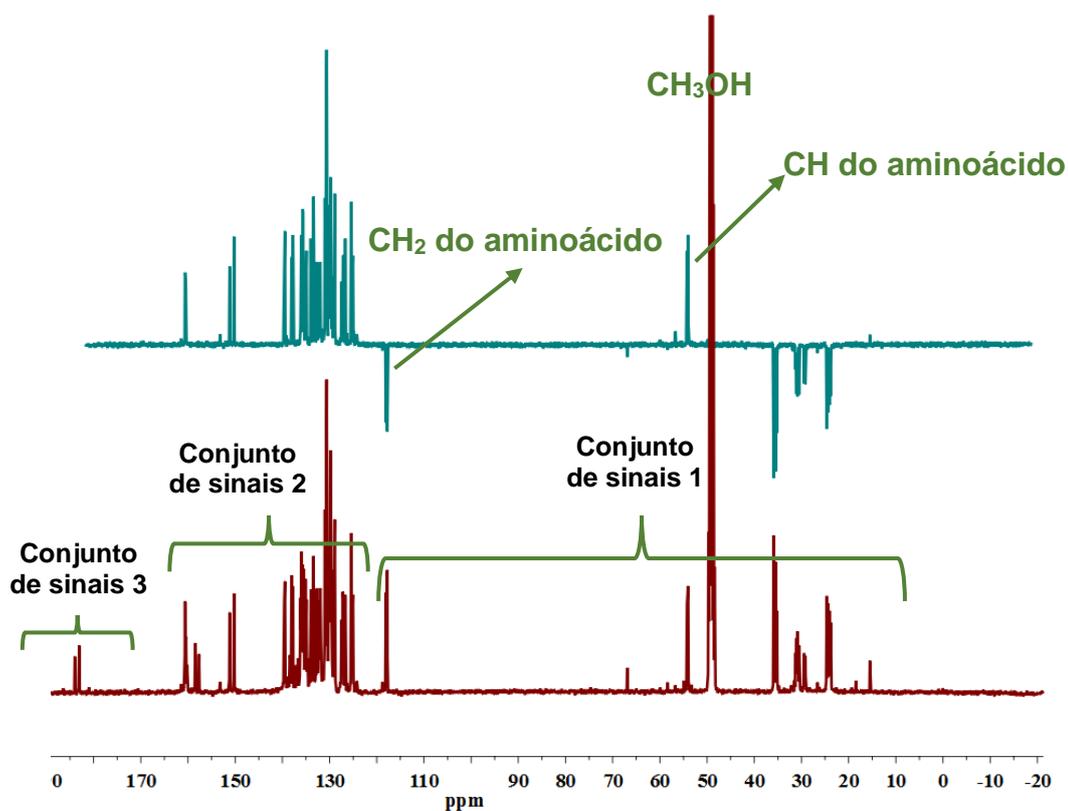


FIGURA I.L – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 obtido para o complexo $[Ru(L-Deo)(dppb)(bipy)]PF_6$, em CD_3OD

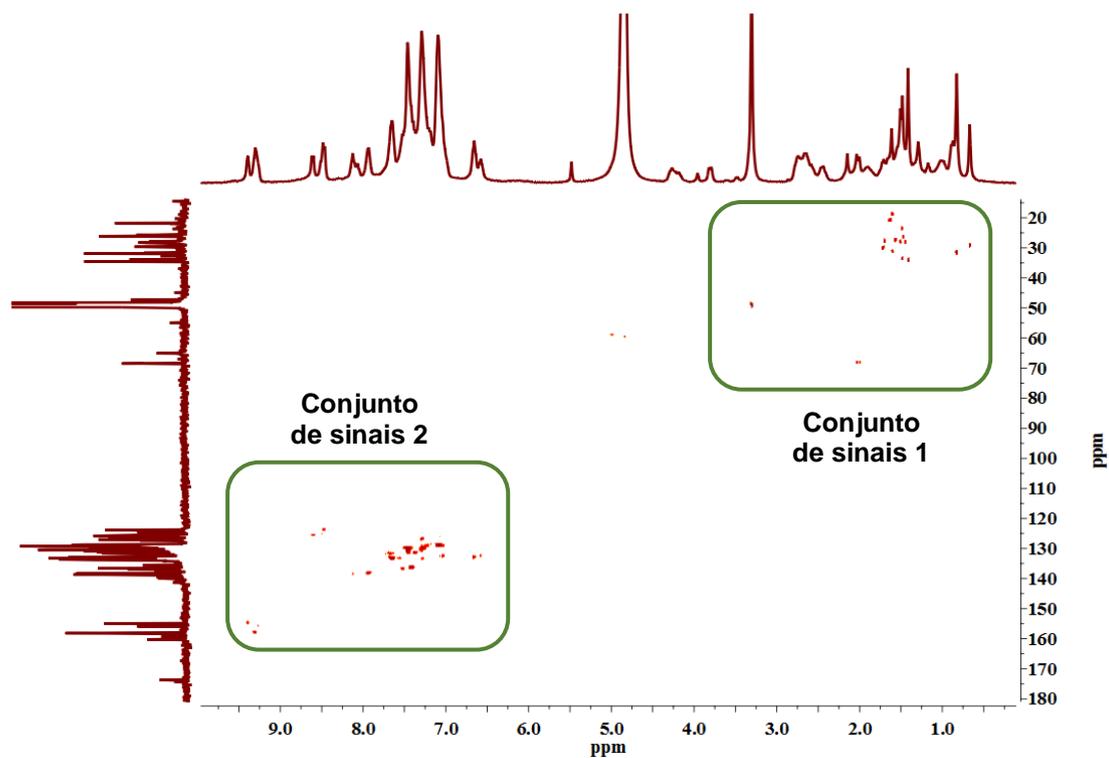


FIGURA I.M – Espectro de RMN HSQC obtido para o complexo [Ru(D-Pen)(dppb)(bipy)], em CD₃OD

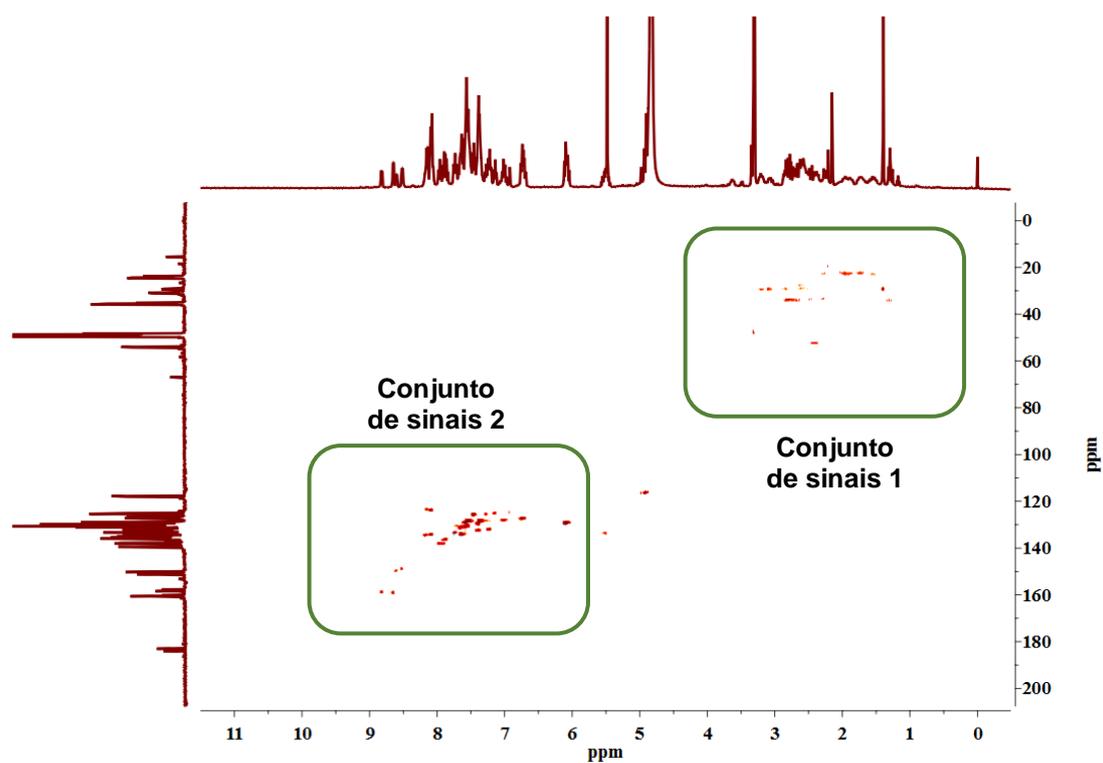


FIGURA I.N – Espectro de RMN HSQC obtido para o complexo [Ru(L-Deo)(dppb)(bipy)]PF₆, em CD₃OD

APÊNDICE II

Tabela 1 - Dados do cristal e refinamento da estrutura para o complexo 1.

Empirical formula	2(RuC ₄₁ H ₄₁ N ₃ O ₂ P ₂ S). 11.5 H ₂ O
Formula weight	1812.85
Temperature	100(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P1
Unit cell dimensions	a = 10.0210(8) Å; □ = b = 11.6888(9) Å; □ = c = 19.4115(14) Å; □ =
Volume	2073.1(3) Å ³
Z, Z'	1, 2
Density (calculated)	1.452 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.560 mm ⁻¹
F(000)	943
Crystal size	0.549 × 0.068 × 0.052 mm ³
Theta range for data collection	1.849 to 27.445°.
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 12, -15 ≤ k ≤ 15, -25 ≤ l ≤
Reflections collected	46495
Independent reflections	18660 [R(int) = 0.0286]
Completeness to theta = 25.242°	99.9 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	18660 / 3 / 1019
Goodness-of-fit on F ²	1.028
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0288, wR2 = 0.0645
R indices (all data)	R1 = 0.0350, wR2 = 0.0678
Absolute structure parameter	0.002(13)
Largest diff. peak and hole	0.622 and -0.523 e.Å ⁻³

Tabela 2 - Comprimentos de ligação [Å] e ângulos [°] para o complexo 1.

C(1')-O(1')	1.248(9)	N(2)-Ru(1)-P(2)	104.52(15)
C(1')-O(2')	1.262(8)	N(1)-Ru(1)-P(2)	92.67(16)
C(1')-C(2')	1.538(8)	N(3)-Ru(1)-P(2)	178.45(18)
C(1)-O(1)	1.248(8)	N(2)-Ru(1)-P(1)	96.07(15)
C(1)-O(2)	1.267(8)	N(1)-Ru(1)-P(1)	174.69(16)
C(1)-C(2)	1.540(9)	N(3)-Ru(1)-P(1)	88.82(16)
C(2)-N(1)	1.492(7)	P(2)-Ru(1)-P(1)	92.63(7)
C(2)-C(3)	1.527(8)	N(2)-Ru(1)-S(1)	161.71(15)
bC(2')-N(1')	1.471(7)	N(1)-Ru(1)-S(1)	81.39(16)
C(2')-C(3')	1.511(8)	N(3)-Ru(1)-S(1)	93.65(16)
C(3)-S(1)	1.839(7)	P(2)-Ru(1)-S(1)	85.58(6)
C(3')-S(1')	1.829(7)	P(1)-Ru(1)-S(1)	98.68(6)
N(1)-Ru(1)	2.149(6)	N(5)-Ru(2)-N(6)	76.5(2)
N(2)-Ru(1)	2.130(5)	N(5)-Ru(2)-N(1')	81.6(2)
N(3)-Ru(1)	2.154(6)	N(6)-Ru(2)-N(1')	82.6(2)
N(1')-Ru(2)	2.188(6)	N(5)-Ru(2)-P(3)	95.67(15)
N(5)-Ru(2)	2.128(5)	N(6)-Ru(2)-P(3)	88.75(17)
N(6)-Ru(2)	2.145(6)	N(1')-Ru(2)-P(3)	171.33(16)
P(1)-Ru(1)	2.3109(19)	N(5)-Ru(2)-P(4)	104.15(15)
P(2)-Ru(1)	2.3082(18)	N(6)-Ru(2)-P(4)	178.68(19)
P(3)-Ru(2)	2.3062(19)	N(1')-Ru(2)-P(4)	96.32(16)
P(4)-Ru(2)	2.3065(18)	P(3)-Ru(2)-P(4)	92.33(6)
S(1)-Ru(1)	2.4013(18)	N(5)-Ru(2)-S(1')	162.13(15)
S(1')-Ru(2)	2.3973(17)	N(6)-Ru(2)-S(1')	94.85(17)
N(2)-Ru(1)-N(1)	82.9(2)	N(1')-Ru(2)-S(1')	81.75(15)
N(2)-Ru(1)-N(3)	75.9(2)	P(3)-Ru(2)-S(1')	99.78(6)
N(1)-Ru(1)-N(3)	85.9(2)	P(4)-Ru(2)-S(1')	84.22(6)

Tabela 3 - Dados do cristal e refinamento de estrutura para shelx_a.

Identification code	shelx_a
Empirical formula	C ₄₃ H ₄₂ ClN ₃ O ₃ P ₂ RuS
Formula weight	879.31
Temperature/K	293(2)
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
a/Å	10.8585(18)
b/Å	13.5023(15)
c/Å	28.375(5)
α /°	90
β /°	90.629(8)
γ /°	90
Volume/Å ³	4159.9(11)
Z	4
ρ_{calc} /cm ³	1.404
μ /mm ⁻¹	0.610
F(000)	1808.0
Crystal size/mm ³	? x ? x ?
Radiation	MoK α (λ = 0.71073)
2 θ range for data collection/°	3.34 to 41.018
Index ranges	? \leq h \leq ?, ? \leq k \leq ?, ? \leq l \leq ?
Reflections collected	2998
Independent reflections	2998 [R _{int} = ?, R _{sigma} = 0.4593]
Data/restraints/parameters	2998/0/269
Goodness-of-fit on F ²	0.955
Final R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0966, wR ₂ = 0.2007
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.2484, wR ₂ = 0.2646
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.69/-0.47