

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

**“Complexos Semi-Sanduíche de Ru<sup>II</sup>/Areno e Produtos Naturais:  
Uma Promissora Combinação para Novos Metalofármacos”**

João Honorato de Araujo Neto\*

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

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa  
\* bolsista CNPQ

São Carlos - SP  
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato João Honorato de Araujo Neto, realizada em 15/10/2020.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Terra Martins (UFG)

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (USP)

Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza (UFG)

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (UNESP)

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

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

“No essencial, unidade.  
No não essencial, liberdade.  
E em tudo, amor.”

*John Wesley*

*Dedico este trabalho aos milhares de brasileiros que foram vitimados pela COVID-19 e aos incansáveis profissionais de saúde, que por amor ao próximo e honrando sua profissão, se arriscam todos os dias para salvar vidas.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e consumidor da vida, em cuja existência subsistimos. Ao meu pai, Sebastião Honorato, minha mãe, Maria Celeste (*in memoriam*) e a minha avó, Luiza Maria, que empenharam com muito amor parte de suas vidas e recursos em minha criação e educação. Ao meu irmão, Matheus Araujo, pela amizade e companhia, mesmo distante algumas centenas de quilômetros.

Ao querido Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por me conceder a honra de sua orientação, proporcionando as melhores condições para a realização deste trabalho, sempre se dispondo a discutir os dados e mediar parcerias, bem como os momentos de convivência que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, legando experiências e conhecimento que carregarei por toda a vida.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Cominetti (Gerontologia-UFSCar), pela disponibilidade da sua estrutura para a realização dos testes biológicos. À Dr<sup>a</sup>. Legna Colina A. Vegas, Dr<sup>a</sup>. Katia Mara de Oliveira, Dr<sup>a</sup>. Adriana Pereira Mundim Macedo Guedes e a MSc. Celisnolia Morais Leite, pela realização dos ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa, não somente pela importante coorientação, mas também pela valiosa amizade e ensinamentos.

Aos Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano e Dr. Javier Ellena, que me adotaram como “aprendiz de cristalografia”, ensinando a teoria e prática em coleta e refinamento, principalmente permitindo amplo acesso aos difratômetros.

Ao Departamento de Química da UFSCar, especialmente aos servidores Ademir Sartori, Luciana Vizotto e Paulo Lambertucci e ao Programa de Pós-Graduação em Química, em especial às secretárias Ariane, Cristina e Luciani, pela disponibilidade e ajuda prestada.

Aos colegas de laboratório e “anexos” que ao longo dos anos se tornaram grandes amigos: Adriana, Analu, Angelica, Angel, Caio, Catão, Carlos

Jr., Claudia, Celis, Chico, Gabriel, Gelson, Gregory, João Paulo, Jocely, Jully, Katia, Legna, Letícia Klein, Letícia Pires, Luciano, Marília, Mitchel, Murilo, Maria José, Monize, Rafael, Rodrigo, Taíse, Tamires, Tássia, Tiago Almeida, e Wilmer.

Especialmente aos grandes amigos, Rafael, Beatriz, Adriana, Carlos Jr. e Gabriel, que se fizeram bastante presentes no meu dia-a-dia, se tornando não só meus amigos, mas também minha família em São Carlos.

A todos os queridos irmãos da Igreja Evangélica Assembleia de Deus, ministério de Madureira, em São Carlos. Povo de Deus que me acolheu e permitiu a honra de poder trilhar, junto deles, essa maratona rumo ao alvo que é Jesus.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

---

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1.1 – Valores de IC <sub>50</sub> encontrados para os complexos de formula geral [RuL(bipy)(P-P)]PF <sub>6</sub> e [RuL(P-P) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> frente as linhagens tumoral (MDA-MB-231) e não tumoral (MCF-10A) de mama humana.....	28
TABELA 4.1 – Comprimentos de ligação das carboxilas livres e coordenadas dos complexos <b>A1</b> , <b>A3</b> e <b>A4</b> . .....	59
TABELA 4.2 – Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos <b>A1-A4</b> (valores teóricos da condutividade molar entre parêntesis).....	62
TABELA 4.3 – Atribuições das frequências vibracionais (cm <sup>-1</sup> ) dos estiramentos assimétricos ( $\nu_a\text{COO}^-$ ) e simétricos ( $\nu_s\text{COO}^-$ ) do íon carboxilato livre e coordenado para os ligantes livres e coordenados. ....	63
TABELA 4.4 - Valores de IC <sub>50</sub> obtidos para os complexos <b>A1-A4</b> , ligantes, precursor e o fármaco cisplatina, frente às linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h. ....	72
TABELA 4.5 – Valores do índice de seletividade obtidos para os complexos <b>A1-A4</b> , precursor e o fármaco cisplatina. Os valores são obtidos a partir da divisão dos valores de IC <sub>50</sub> das células tumorais pelas células não tumorais.....	73
TABELA 4.6 – Deslocamento químico ( $\delta$ ) exibido pelos carbonos 1, 2 e 4 nos espectros de RMN <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} em CDCl <sub>3</sub> . ....	157
TABELA 5.1 – Comprimentos de ligação (Å) entre alguns pares atômicos dos complexos <b>B2</b> , <b>B3</b> , <b>B6</b> e ligantes lausona e lapachol.....	87
TABELA 5.2 – Dados de análise elementar e condutividade para o complexo de	

---

rutênio (Valores teóricos entre parêntesis).....	92
TABELA 5.3– Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) exibidos pelos carbonos C1, C2 e C4 nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CDCl}_3$ .....	97
TABELA 5.4 – Distâncias de ligação Rutênio-areno dos complexos que possuem estrutura cristalográfica elucidada. Considera-se como ponto de medida no ligante areno o centroide do anel aromático. ....	109
TABELA 5.5 – Comprimentos de ligação ( $\text{\AA}$ ) entre alguns pares atômicos dos complexos B8, B9, B10, B12, ligantes lausona ( $\text{L}_1$ ) e lapachol ( $\text{L}_2$ ).....	113
TABELA 5.6 – Dados de análise elementar e condutividade para o complexo de rutênio (Valores teóricos entre parêntesis).....	117
TABELA 5.7 – Deslocamento químico ( $\delta$ ) exibido pelos carbonos 1, 2 e 4 nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CDCl}_3$ . ....	120
TABELA 5.8 – Dados obtidos nos experimentos de otimização das estruturas pelo método computacional DFT utilizando o programa GAUSSIAN09, que fornece os valores teóricos das distâncias Ru-areno, energia relativa, das cargas naturais atômicas (CNA), energia dos orbitais HOMO, LUMO e potencial de ionização (I), medidos em eV. *Valores experimentais referentes a distância Ru-areno..	123
TABELA 5.9 – Valores de $\text{IC}_{50}$ e índice de seletividade obtidos para os complexos <b>B1-B12</b> , ligantes, precursor e o fármaco cisplatina, frente as linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h. Os valores são obtidos a partir da divisão dos valores de $\text{IC}_{50}$ das células tumorais pelas células não tumorais...	128
TABELA 6.1 – Comprimentos de ligação ( $\text{\AA}$ ) entre alguns pares atômicos dos	

---



---

complexos <b>C1</b> , <b>C3</b> e alizarina. ....	147
TABELA 6.2 – Dados de análise elementar e condutividade molar obtidos para os complexos da Série C (Valores teóricos entre parêntesis). ....	152
TABELA 6.3 – Rendimento quântico observado para os complexos <b>C1-C3</b> e ligante alizarina em soluções de concentração 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em DMSO. Como padrão de fluorescência foi empregado a porfina TPyP (100%). ....	164
TABELA 6.4 – Valores de $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade* obtidos para os complexos <b>C1-C3</b> , alizarina (L), precursores e cisplatina (Cisp.), frente as linhagens de células tumorais e não-tumorais, no período de 48 h. Os valores de índice de seletividade* são obtidos a partir da divisão dos valores de $\text{IC}_{50}$ das células tumorais pelas células não tumorais.....	165
TABELA 6.5 – Valores de hipocromismo e constantes de interação encontrados para os complexos C1-C3 nos experimentos de titulação espectrofotométrica com o <i>ct</i> -DNA. ....	175

---

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1.1 – Etapas comumente percorridas por novos candidatos para o tratamento de doenças. ....	3
FIGURA 1.2 – Fases investigativas de novos medicamentos em pacientes portadores da doença/condição. <sup>7</sup> .....	5
FIGURA 1.3 – Medicamentos a base de platina empregados no tratamento do câncer ao redor do mundo. (NSCLC = <i>Non-Small-Cell Lung Carcinoma</i> , SCLC = <i>Small-Cell Lung Carcinoma</i> e CML = <i>Chronic Myeloid Leukemia</i> ). ....	9
FIGURA 1.4 – Estruturas químicas de complexos de Ru <sup>III</sup> que foram avaliados em testes clínicos no tratamento do câncer. ....	12
FIGURA 1.5 – Representação das ligações $\sigma$ e $\pi$ entre um metal e o ligante carbonilo. ....	16
FIGURA 1.6 – Estrutura do complexo RAPTA-C, indicando cada um dos componentes da proposta estrutural dos compostos do tipo RAPTA. ....	18
FIGURA 1.7 – Complexos de fórmula geral de fórmula $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\eta^6\text{-areno})\text{PTA}]$ pertencentes a classe RAPTA. ....	20
FIGURA 1.8 – Estrutura de algumas moléculas pertencentes as classes das antraquinonas e naftoquinona. Em verde estão representadas as subestruturas básicas de cada classe e em vermelho os substituintes que caracterizam os derivados. ....	23
FIGURA 1.9 – Estrutura cristalina de um fragmento de DNA (CGATCG) contendo duas moléculas de doxorubicina intercaladas. (PDB 151d). ....	25

---

---

FIGURA 1.10 – Estrutura dos complexos contendo os ligantes lapachol e lausona sintetizados pelo LERCI., onde L = lapachol ou lausona. ....	27
FIGURA 4.1 - Estrutura cristalina do composto $[\text{Ru}_2(\text{L}_1)_4(\text{CH}_3\text{OH})(\text{PPh}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]$ , resultante da labilização dos ligantes areno. Os anéis da trifenilfosfina foram omitidos para melhor visualizar a molécula.....	55
FIGURA 4.2 – Estrutura cristalina do composto $[\text{Ru}_2(\text{L}_1)_4(\text{CH}_3\text{OH})(\text{PPh}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]$ , apresentando os diferentes modos de coordenação para os ligantes ácido benzoico. Os anéis da trifenilfosfina foram omitidos para melhor visualizar a molécula.....	56
FIGURA 4.3 – Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos <b>A1</b> , <b>A3</b> e <b>A5</b> , respectivamente (o contra-íon $\text{BF}_4$ foi omitido para melhor visualização das moléculas), átomos representados no modo ORTEP (elipsoides em 30%).....	57
FIGURA 4.4 – Histograma da distribuição dos comprimentos de ligação Ru-O para 490 estruturas cristalinas da base cristalográfica CCDC. Dados gerados utilizando o programa MOGUL.....	59
FIGURA 4.5 – Interações do tipo N=O...H-C pertencentes ao complexo <b>A3</b> , vemos quatro moléculas equivalentes relacionadas por um centro de simetria (i). ....	60
FIGURA 4.6 – Mapa de Hirshfeld mostrando os pontos por onde ocorrem os principais contatos intermoleculares para o complexo <b>A3</b> . Imagem gerada utilizando o programa Crystal Explorer.....	61
FIGURA 4.7 – Perfil isotópico experimental e teórico para os cátions metálicos	

---

dos complexos, correspondendo aos íons $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]^+$ ( <b>A1-A3</b> ) e $[\text{RuL}_4(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)+\text{H}]^+$ ( <b>A4</b> ).....	64
FIGURA 4.8 – Espectro de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) obtido para o complexo <b>A3</b> em clorofórmio deuterado ( $d\text{-CDCl}_3$ ). .....	66
FIGURA 4.9 - Espectros de RMN de hidrogênio dos complexos <b>A1-A4</b> em $d\text{-CDCl}_3$ . A seta azul indica o efeito ativador provocado pelo substituinte ( $\text{OH}^-$ ) e a seta vermelha indica o efeito de desativação provocado pelo substituinte ( $\text{NO}_2^-$ ). .....	67
FIGURA 4.10 - Correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY obtido para o complexo <b>A3</b> em $d\text{-CDCl}_3$ . Vemos destacados os diferentes grupos de acoplamentos exibidos pelo complexo. ....	68
FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) obtido para o complexo <b>A3</b> em clorofórmio deuterado ( $d\text{-CDCl}_3$ ). .....	69
FIGURA 4.12 - Amplificações dos mapas de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY obtido para o complexo <b>A3</b> em $d\text{-CDCl}_3$ . (A) Amplificação demonstrando os acoplamentos presentes no ligante $p$ -cimeno e (B) no ligante $p$ -nitrobenzoico. ....	70
FIGURA 4.13 - Estudo de estabilidade do complexo <b>A1</b> , em acetona/RPMI (2:1). .....	71
FIGURA 4.14 – Micrografias obtidas para as culturas celulares da célula tumoral MDA-MB-231 em diferentes concentrações de <b>A1</b> (proporcionais ao valor de $\text{IC}_{50}$ encontrado) e controle negativo (DMSO).....	74
FIGURA 4.15 – (A) Imagem dos poços onde foram cultivadas as células MDA-	

MB-231 em diferentes concentrações de **A1**. (B) Distribuição do número de colônias em cada concentração. (C) Distribuição da intensidade das colônias em cada concentração. Valores de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ..... 75

FIGURA 4.16 – (A) Micrografias dos experimentos de inibição da capacidade migratória de células tumorais de mama MDA-MB-231. (B) Gráfico da correlação entre as concentrações empregadas de **A1** e a porcentagem de fechamento da risca em 24 e 48 horas de experimento. Valores de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ..... 77

FIGURA 4.17 – Distribuição do ciclo celular das células MDA-MB-231 após tratamento com **A1** por 48 h. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . ..... 78

FIGURA 4.18 – Concentrações de rutênio ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) nas células tumorais MDA-MB-231, no meio de cultura em 0 e 24 h. As células foram cultivadas com tratamento de 5  $\mu\text{M}$  do complexo **A1** durante 24 h. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes. ..... 79

FIGURA 5.1 – Estrutura cristalográfica obtida para os complexos **B2**<sup>129</sup>, **B3** e **B6**. Os átomos estão representados no modelo ORTEP (elipsoides em 30%). Na representação do complexo **B6** o contraíon  $\text{PF}_6^-$  foi omitido afim de melhor se visualizar a molécula. .... 86

FIGURA 5.2 – a. Representação da interação  $\pi$ - $\pi$  presente no empacotamento cristalino do complexo **B3**. b. Gráfico de distribuição dos contatos intermoleculares presentes em **B2**, **B3** e **B6**. c. Gráfico *Fingerprint* obtido para o

---

complexo <b>B3</b> representando todos os contatos intermoleculares. d. Mapa de Hirshfeld obtido para o complexo <b>B3</b> , onde as regiões em vermelho, branco e azul representam respectivamente os contatos menores, iguais e maiores que a soma dos raios de van der Waals dos átomos participantes do contato. ....	88
FIGURA 5.3 – Plano do empacotamento cristalino ( <i>a/c</i> ) contendo o complexo <b>B6</b> . Em destaque temos as regiões onde predominam os contatos hidrofóbicos. ....	91
FIGURA 5.4 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}$ dos complexos <b>B4-B6</b> e $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ em $\text{CDCl}_3$ .....	92
FIGURA 5.5 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo <b>B3</b> em $\text{CDCl}_3$ ...	93
FIGURA 5.6 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo <b>B6</b> em $\text{CDCl}_3$ ...	93
FIGURA 5.7 – Mapa de contorno COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ obtido para o complexo <b>B3</b> em $\text{CDCl}_3$ . ....	94
FIGURA 5.8 – Espectro de RMN de carbono $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo <b>B3</b> em $\text{CDCl}_3$ . ....	95
FIGURA 5.9 – Espectro de RMN de carbono $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo <b>B6</b> em $\text{CDCl}_3$ . ....	96
FIGURA 5.10 – Mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC obtido para o complexo <b>B3</b> em $\text{CDCl}_3$ . ....	97
FIGURA 5.11 – Perfil isotópico experimental e teórico para os cátions metálicos dos complexos <b>B3</b> e <b>B6</b> , correspondendo aos íons $[\text{M-Cl}]^+$ em <b>B3</b> e $[\text{M-PF}_6]^+$ para <b>B6</b> .....	99
FIGURA 5.12 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante <b>L3</b>	

---

(3-estiril-lausona), complexos <b>B3</b> e <b>B6</b> .....	100
FIGURA 5.13 – Estudo de estabilidade dos complexos <b>B4-B6</b> em DMSO empregando a técnica de RMN $^{31}\text{P}$ . .....	101
FIGURA 5.14 – Espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos no estudo de estabilidade em $d_6$ -DMSO do complexo <b>B6</b> em 0 e 6 horas. ....	102
FIGURA 5.15 – (a) Espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos no estudo de estabilidade em $d_6$ -DMSO do complexo <b>B6</b> em 0, 2, 4, 6 e 12 horas. (b) – Esquema da reação que ocorre ao se dissolver os complexos da Série B em DMSO, onde X = Cl ( <b>B1-B3</b> ) ou $\text{PPh}_3$ ( <b>B4-B6</b> ).....	103
FIGURA 5.16 – Estudo de estabilidade do complexo <b>B6</b> em DMSO/RPMI (2:1) empregando a técnica de RMN $^{31}\text{P}$ . Os espectros foram registrados em 0, 24 e 48 horas. ....	104
FIGURA 5.17 – Acompanhamento da reação de labilização do ligante p-cimeno do complexo <b>B4</b> através da técnica de RMN $^{31}\text{P}$ e esquema estrutural da reação observada.....	105
FIGURA 5.18 – Estrutura cristalina dos obtidas para os monocristais provenientes do experimento de estabilidade do complexo <b>B4</b> em DMSO/RPMI (2:1). Elipsoides representadas com 30% de probabilidade. ....	106
FIGURA 5.19 – Estrutura cristalina dos complexos precursores <b>P1</b> , [ $\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2$ ], e <b>P2</b> , [ $\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{PPh}_3)$ ], destacando as distâncias de ligação Rutênio-areno. O centroide dos ligantes areno são representados pela esfera vermelha. CCDC 1895287 ( <b>P1</b> ) e 677336 ( <b>P2</b> ) .....	108

---

FIGURA 5.20 – Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos <b>B8</b> , <b>B9</b> , <b>B10</b> e <b>B12</b> . Elipsoides representadas com 30% de probabilidade.....	112
FIGURA 5.21 – (a). Representação da interação C-H...Cl presente no empacotamento cristalino do complexo <b>B8</b> . (b). Gráfico de distribuição dos contatos intermoleculares presentes em <b>B8</b> , <b>B9</b> , <b>B10</b> e <b>B12</b> . (c). Gráfico <i>Fingerprint</i> do complexo <b>B8</b> representando todos os contatos intermoleculares. (d). Mapa de Hirshfeld obtido para o complexo <b>B8</b> , onde as regiões em vermelho, branco e azul representam respectivamente os contatos menores, iguais e maiores que a soma dos raios de van der Waals dos átomos participantes do contato. .	115
FIGURA 5.22 – Gráficos <i>Fingerprint</i> do complexo <b>B8</b> representando as contribuições de cada um dos contatos intermoleculares. ....	116
FIGURA 5.23 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos <b>B7-B12</b> . Os espectros foram obtidos utilizando pastilhas de KBr como suporte. ....	118
FIGURA 5. 24 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo <b>B9</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	119
FIGURA 5.25 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo <b>B12</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	119
FIGURA 5.26 – Exemplos de interações intermoleculares realizadas pelos grupos metila pertencentes ao DMSO coordenado pertencente ao complexo <b>B9</b> .....	120
FIGURA 5. 27 – Espectro de RMN de carbono <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} do complexo <b>B12</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	121

---



---

FIGURA 5.28 – Espectro de RMN de carbono $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo <b>B9</b> em $\text{CDCl}_3$ . .....	121
FIGURA 5.29 – Micrografias obtidas para as culturas da linhagem celular MCF-7 nas concentrações do $\text{IC}_{50}$ obtidas para os complexos <b>B3</b> , <b>B6</b> , <b>B9</b> e <b>B12</b> . ....	130
FIGURA 5.30 – (a) Imagem dos poços onde foram cultivadas as células MCF-7 nas concentrações de $\text{IC}_{50}$ dos complexos <b>B3</b> , <b>B6</b> , <b>B9</b> e <b>B12</b> . (b) Distribuição do número de colônias em cada concentração. ....	132
FIGURA 5.31 – Fases do ciclo celular de células eucarióticas. ....	133
FIGURA 5.32 - Distribuição do ciclo celular das células MCF-7 após tratamento com os complexos <b>B3</b> , <b>B6</b> , <b>B9</b> , <b>B12</b> e controles negativo por 48 h. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ . ....	134
FIGURA 5.33 – Representação dos possíveis modos de interação de complexos com o DNA. ....	136
FIGURA 5.34 – Estudo de estabilidade do complexo <b>B10</b> na mistura <i>d</i> -DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$ através da técnica de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e $^1\text{H}$ em 0, 1, 24 e 48 horas. ....	137
FIGURA 5.35 – Bandas observadas para as formas mais comuns de DNA (PBR322) em experimentos de electroforese em gel. ....	138
FIGURA 5.36 – Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 em diferentes $R_i$ ( $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$ ) do complexo <b>B11</b> e controles (cisplatina e tiazol laranja). Em destaque as bandas referentes ao DNA superenovelado (S) e linear (L). ....	139

---

---

FIGURA 6.1 – Estrutura cristalográfica obtida para os complexos <b>C1</b> e <b>C3</b> . Elipsoides representadas com 30% de probabilidade. ....	146
FIGURA 6.2 – (a). Representação das interações H...Cl e H...O presentes no empacotamento cristalino do complexo <b>C1</b> . (b). Gráfico de distribuição dos contatos intermoleculares presentes em <b>C1</b> e <b>C3</b> . (c). Gráfico <i>Fingerprint</i> do complexo <b>C1</b> representando todos os contatos intermoleculares. (d). Superfície de Hirshfeld obtida para o complexo <b>C1</b> . ....	148
FIGURA 6.3 – Gráficos <i>Fingerprint</i> obtidos através do programa <i>Crystalexplorer</i> , <sup>131</sup> cada gráfico exhibe os contatos específicos pertencentes aos complexos <b>C1</b> e <b>C3</b> . ....	151
FIGURA 6.4 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos <b>C1-C3</b> . Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr como suporte. ....	153
FIGURA 6.5 – Espectros de <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H} RMN dos complexos <b>P2</b> , <b>P3</b> , <b>C2</b> e <b>C3</b> em clorofórmio. Foi empregado como solvente deuterado o D <sub>2</sub> O em um capilar de vidro. ....	154
FIGURA 6.6 – Espectro de RMN de carbono <sup>1</sup> H do complexo <b>C1</b> em CDCl <sub>3</sub> . .....	155
FIGURA 6.7 – Mapa de contorno <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY obtido para o complexo <b>A3</b> em <i>d</i> -CDCl <sub>3</sub> . Vemos destacados em cores diferentes os diferentes grupos de acoplamentos vicinais exibidos pelo complexo. ....	156
FIGURA 6.8 – Espectro de RMN de carbono <sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} do complexo <b>C1</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	157

---

- FIGURA 6.9 – Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **C2** em  $\text{CDCl}_3$ . Evidenciados estão os sinais referentes aos átomos envolvidos nas ligações C–O. .... 158
- FIGURA 6.10 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos no estudo de estabilidade em  $\text{CDCl}_3$  e *d*-DMSO (5:1) do complexo **C1** em 0, 1, 24, e 48 horas. .... 160
- FIGURA 6.11 – Espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN obtidos no estudo de estabilidade em DMSO/RPMI (2:1) do complexo **C3** em 0, 24, e 48 horas. .... 160
- FIGURA 6.12 – Espectros normalizados de absorção e emissão ( $\lambda_{\text{ex}}$  420 nm) obtidos para a alizarina ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em DMSO. .... 162
- FIGURA 6.13 – Espectros normalizados de absorção e emissão ( $\lambda_{\text{ex}}$  420 nm) obtidos para o complexo **C1** ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em DMSO. .... 163
- FIGURA 6.14 – Micrografias obtidas para as culturas da linhagem celular MDA-MB-231 em diferentes concentrações dos complexos **C1** e **C2**. .... 167
- FIGURA 6.15 - Imagem dos poços onde foram cultivadas as células MDA-MB-231 em diferentes concentrações dos complexos **C1** e **C2**. .... 169
- FIGURA 6.16 – Distribuição da área das colônias em cada concentração para o controle e os complexos **C1** e **C2** na linhagem MDA-MB-231. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . .... 170
- FIGURA 6.17 – Micrografias obtidas no experimento de (*Wound Healing*), onde avalia-se o efeito antimigratório do **C1** em células tumorais de mama MDA-MB-231. As micrografias foram obtidas com 4 vezes de aumento. .... 171
- FIGURA 6.18 – Gráfico da porcentagem de fechamento da risca após 24 e 48

---

horas de incubação das células na presença dos complexos **C1** e **C2**. Os experimentos foram realizados em triplicata, resultando nas faixas de erro apresentadas (\* $p < 0,05$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). ..... 172

FIGURA 6.19 – (a) Gráfico da distribuição da contagem de células para as fases  $G_2/M$ , S,  $G_1/G_0$  e  $SubG_1$  do controle negativo e do complexo **C2** ( $2 \times IC_{50}$ ). (b) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em diferentes concentrações do complexo **C2**. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ..... 173

FIGURA 6.20 – Espectros de absorção na região do UV-Vis obtidos para o complexo **C1** com a adição de sucessivas alíquotas de *ct*-DNA ..... 174

FIGURA 6.21 - Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial pBR322 em diferentes  $R_i$  dos complexos **C1-C3**. Em destaque as bandas referentes ao DNA superenovelado (S) e linear (L). ..... 176

FIGURA 6.22 – Micrografia obtidas empregando a microscopia de fluorescência para a visualização das células MDA-MB-231 tratadas com o complexo **C1** e com o marcador DAPI. .... 177

FIGURA 7.1 – Representação do aumento da estabilidade dos complexos com a diminuição da tensão interna do anel quelato metal/ligante. .... 182

---

**LISTA DE ESQUEMAS**

ESQUEMA 4.1 - Rota sintética dos precursores $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$ e $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ .....	53
ESQUEMA 4.2 - Rota sintética representativa dos complexos pertencentes à Série A. ....	54
ESQUEMA 5.1 – Rota sintética para a síntese dos complexos <b>B1-B6</b> . ....	85
ESQUEMA 5.2 – Rota sintética dos precursores <i>fac</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{O-DMSO})]$ e <i>fac</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{PPh}_3)]$ .....	110
ESQUEMA 5.3 – Esquema reacional para a obtenção dos complexos de fórmula geral <i>fac</i> - $[\text{RuCl}_x(\text{S-DMSO})_3]$ ( <b>B7-B9</b> ) e <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_x(\text{S-DMSO})_2(\text{PPh}_3)]$ ( <b>B10-B12</b> ). ....	111
ESQUEMA 6.1 – Rota sintética empregada para os complexos envolvidos na Série C. ....	145

---

**RESUMO**

“COMPLEXOS SEMI-SANDUÍCHE DE Ru<sup>II</sup>/ARENO E PRODUTOS NATURAIS: UMA PROMISSORA COMBINAÇÃO PARA NOVOS METALOFÁRMACOS” Nesta tese são apresentadas a síntese, caracterização e avaliação de atividade antitumoral de dezenove complexos organometálicos de Ru<sup>II</sup>/areno neutros e monocatiônicos contendo ligantes derivados de produtos naturais. Os complexos foram divididos em três Séries baseadas nas classes de produtos naturais utilizadas (todos coordenados ao centro metálico por átomos de oxigênio na forma bidentada), sendo elas: Série A, complexos de fórmula geral [RuL<sub>x</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)], onde PPh<sub>3</sub>=trifenilfosfina e L<sub>x</sub>=ácido benzoico (**A1**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**A2**), ácido *p*-nitrobenzoico (**A3**) e ácido tereftálico (**A4**); Série B, complexos de fórmula geral [RuClL<sub>x</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)] (**B1-B3**), [RuCl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)] (**B4-B6**), *fac*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>] (**B7-B9**) e *cis*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (**B10-B12**), onde PPh<sub>3</sub>=trifenilfosfina, L<sub>x</sub>=lausona, lapachol e 3-estiril-lausona; Série C, complexos de fórmula geral [RuLCl(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)] (**C1**), [RuL<sub>x</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (**C2**) e [Ru(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PEt<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (**C3**), onde PPh<sub>3</sub>=trifenilfosfina, PEt<sub>3</sub>=trietilfosfina e L<sub>x</sub>=alizarina. Na caracterização dos complexos foram realizadas medidas de análise elementar, condutividade molar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear 1D e 2D (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}, <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}), espectrometria de massas e difração de raios X de monocristal. Todos os complexos foram estudados quanto as suas estabilidades nos solventes empregados nos testes biológicos, onde a Série A e C apresentaram estabilidade na mistura empregadas, enquanto os complexos **B1-B6** da Série B foram instáveis nessas misturas, resultando nos complexos de fórmula geral *fac*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>] (**B7-B9**) e *cis*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (**B10-B12**). A citotoxicidade dos complexos deste trabalho foi avaliada nas células tumorais de mama (MDA-MB-237 e MCF-7), pulmão (A549), próstata (DU-145) e as correspondentes não tumorais de mama (MCF-10A), pulmão (MRC-5) e próstata (PNT2), variando o

número de linhagens em cada Série. Na Série A os complexos **A1-A2** ( $IC_{50}=11,0-19,3 \mu M$ ) foram mais ativos que **A3** ( $IC_{50}=40,5-60,7 \mu M$ ) em todas as linhagens tumorais testadas, sendo o maior índice de seletividade exibido por **A1** na linhagem MDA-MB-231 (3,5). Na Série B observou-se a influência da trifenilfosfina ( $PPh_3$ ) nos valores de  $IC_{50}$ , sendo os complexos com  $PPh_3$  mais ativos que os correspondentes contendo o ligante clorido, além disso a labilização do ligante *p*-cimeno tornou os complexos sem  $PPh_3$  (**B1-B3**,  $IC_{50} > 10 \mu M$ ) mais ativos, isto comparando com os complexos com **B7-B9** ( $IC_{50}=8,01-0,70 \mu M$ ), enquanto em **B4-B6** ( $IC_{50}=18,09-0,33 \mu M$ ) comparados com **B10-B12** ( $IC_{50}=17,36-0,31 \mu M$ ) nota-se que a labilização do areno pouco afeta a citotoxicidade dos compostos. Na Série C, **C2** ( $IC_{50}=17,8-6,5 \mu M$ ) foi o mais citotóxico, enquanto **C1** ( $IC_{50}=32,8->100 \mu M$ ) e **C3** ( $IC_{50}=41,6->100 \mu M$ ) foram menos ativos e seletivos. Os complexos estáveis das Séries B e C foram avaliados quanto a interação com DNA, apresentando apenas interações fracas, excetuando **C1**, que exibiu interações de fortes/moderadas do tipo covalente. De modo geral, os complexos em sua maioria foram capazes de inibir a formação de colônias, **A1**, **C2** e **C3** inibiram a migração celular e **B6**, **B12** foram capazes de induzir alterações morfológicas nas linhagens tumorais. Além disso, os complexos **A1**, **B3**, **B6**, **B9**, **B12** e **C2** promoveram acúmulo na fase Sub- $G_1$  do ciclo celular. Na Série A constatou-se que o complexo **A1** é capaz de se acumular nas células MDA-MB-231 (dados de ICP-MS). Na Série C a fluorescência exibida por **C1** permitiu observar o acúmulo do mesmo nas células MDA-MB-231, através da técnica de microscopia confocal, evidenciando a internalização do complexo.

---

**ABSTRACT**

“HALF-SANDWICH Ru<sup>II</sup>/ARENE COMPLEXES AND NATURAL PRODUCTS: A PROMISING COMBINATION FOR NEW METALOPHARMACEUTICS” This thesis presents the synthesis, characterization and evaluation of antitumor activity of nineteen neutral and monocationic organometallic complexes containing ligands derived from natural products. The complexes were divided into three Series based on the employed classes of natural products (all coordinated by oxygen atoms in the bidentate form), which are: Series A, complexes of general formula [RuL<sub>x</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimene)(PPh<sub>3</sub>)], where PPh<sub>3</sub>=triphenylphosphine and L<sub>x</sub>=benzoic acid (**A1**), *p*-hydroxybenzoic acid (**A2**), *p*-nitrobenzoic acid (**A3**) and terephthalic acid (**A4**); Series B, complexes of general formula [RuClL<sub>x</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)] (**B1-B3**), [RuCl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)] (**B4-B6**), *fac*- [RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>] (**B7-B9**) and *cis*- [RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (**B10-B12**), where PPh<sub>3</sub>=triphenylphosphine and L<sub>x</sub>=lawsone, lapachol and 3-styryl-lawsone; Series C, complexes of general formula [RuL<sub>x</sub>Cl(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)] (**C1**), [RuL<sub>x</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (**C2**) and [Ru(η<sup>6</sup>-*p*-cimene)(PEt<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (**C3**), where PPh<sub>3</sub>=triphenylphosphine, PEt<sub>3</sub>=triethylphosphine and L<sub>x</sub>=alizarin. All complexes were characterized by elemental analysis, molar conductivity, infrared absorption spectroscopy, 1D and 2D nuclear magnetic resonance (<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H}, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}), mass spectrometry and single-crystal X-ray diffraction. The stability of the compounds was investigated in solvents for biological tests, where Series A and C showed stability in the mixture used. In other hand, in Series B, **B1-B6** were unstable in these mixtures, resulting in the complexes of the general formula *fac*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>] (**B7-B9**) and *cis*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (**B10-B12**). The cytotoxicity of the complexes were evaluated in the tumor cells of breast (MDA-MB-237 and MCF-7), lung (A549), prostate (DU-145) and the corresponding non-tumoral cells of breast (MCF-10A), lung (MRC-5) and prostate (PNT2) cell lines, varying the number of strains in each Series. In Serie A, the **A1-A2**

---



( $IC_{50}=11,0-19,3 \mu M$ ) were more active than **A3** ( $IC_{50}=40,5-60,7 \mu M$ ) in all tumor cell lines tested, with the highest selectivity index displayed by **A1** for MDA-MB-231 cell line (3,5). In Series B, the influence of triphenylphosphine ( $PPh_3$ ) on the  $IC_{50}$  values were observed. The complexes with  $PPh_3$  were more active than those ones containing the chloride ligand, besides that the *p*-cymene labilization became the complexes without  $PPh_3$  (**B1-B3**,  $IC_{50}>10 \mu M$ ) more active, this comparing with **B7-B9** ( $IC_{50}= 8,01-0,70 \mu M$ ). Additionally, in the complexes **B4-B6** ( $IC_{50}=18,09-0,33 \mu M$ ) when compared with **B10-B12** ( $IC_{50}=17.36-0,31 \mu M$ ) it is noted that the labilization of the arene perform insignificant effect on the cytotoxicity of the complexes. In Series C, **C2** ( $IC_{50}=17.8-6.5 \mu M$ ) was the most cytotoxic complex, while **C1** ( $IC_{50}=32,8-> 100 \mu M$ ) and **C3** ( $IC_{50}=41.6-> 100 \mu M$ ) were less active and selective. The stable complexes of B and C Series were evaluated for DNA interaction, showing only weak interactions, except for **C1**, which exhibited strong/moderate interactions of covalent type. In general, the complexes were able to inhibit the colony formation, **A1**, **C2** and **C3** inhibited cell migration and **B6**, **B12** were able to induce morphological changes in tumor lines. In addition, **A1**, **B3**, **B6**, **B9**, **B12** and **C2** promoted the cell cycle arrest in the Sub- $G_1$  phase. In A Series it was found that the **A1** is able to accumulate in MDA-MB-231 cells (ICP-MS data) and in the C Series, the fluorescence displayed by **C1** allowed to observe the cellular uptake in MDA-MB-231 cells, through the confocal microscopy technique, showing the internalization of the complex.

---

**SUMÁRIO**

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Os recentes desafios no desenvolvimento de novos fármacos. .....	2
1.2 - Câncer, um problema mundial de saúde. ....	6
1.3 - Os complexos de platina no tratamento do câncer.....	8
1.4 - Compostos de rutênio como alternativa aos de platina. ....	11
1.5 - A química dos compostos organometálicos. ....	15
1.6 - A versatilidade dos complexos de Ru <sup>II</sup> /areno .....	18
1.7 - Moléculas bioativas provenientes de metabólitos secundários de plantas superiores.....	20
1.8 - As contribuições do LERCI na química bioinorgânica.....	26
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	31
2.1 - Objetivo geral .....	32
2.2 - Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	35
3.1 - Materiais .....	36
3.1.1 - Obtenção da atmosfera de Argônio .....	36
3.1.2 - Solventes.....	36
3.1.3 - Reagentes químicos em geral .....	36
3.2 - Sínteses dos complexos .....	36
3.2.1 - Síntese dos precursores .....	36
3.2.1.1 - Síntese do complexo [ $\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2$ ] .	36
3.2.1.2 - Síntese do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$ .	37

---

3.2.1.3 - Síntese do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PEt}_3)]$ ..	37
3.2.1.4 - Síntese do complexo $fac\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{O-DMSO})]$ .....	37
3.2.1.5 - Síntese do complexo $fac\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{PPh}_3)]$ .....	37
3.2.2 - Síntese dos complexos da Série A.....	37
3.2.2.1 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{BF}_4$ (A1-A3).....	37
3.2.2.2 - Síntese do complexo de fórmula geral $[\text{Ru}_2(\mu^2\text{-L})(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2(\text{PPh}_3)_2](\text{BF}_4)_2$ (A4).....	38
3.2.3 - Síntese dos complexos da Série B.....	38
3.2.3.1 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuClL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]$ (B1-B3).....	38
3.2.3.2 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (B4-B6) .....	39
3.2.3.3 - Síntese dos complexos de fórmula geral $fac\text{-}[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_3]$ (B7-B9).....	39
3.2.3.4 - Síntese dos complexos de fórmula geral $cis\text{-}[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_2(\text{PPh}_3)]$ (B10-B12) .....	39
3.2.4 - Síntese dos complexos da Série C.....	40
3.2.4.1 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuClL}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]$ (C1).....	40
3.2.4.2 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuL}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (C2) .....	40
3.2.4.3 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PEt}_3)]\text{PF}_6$ (C3) .....	41

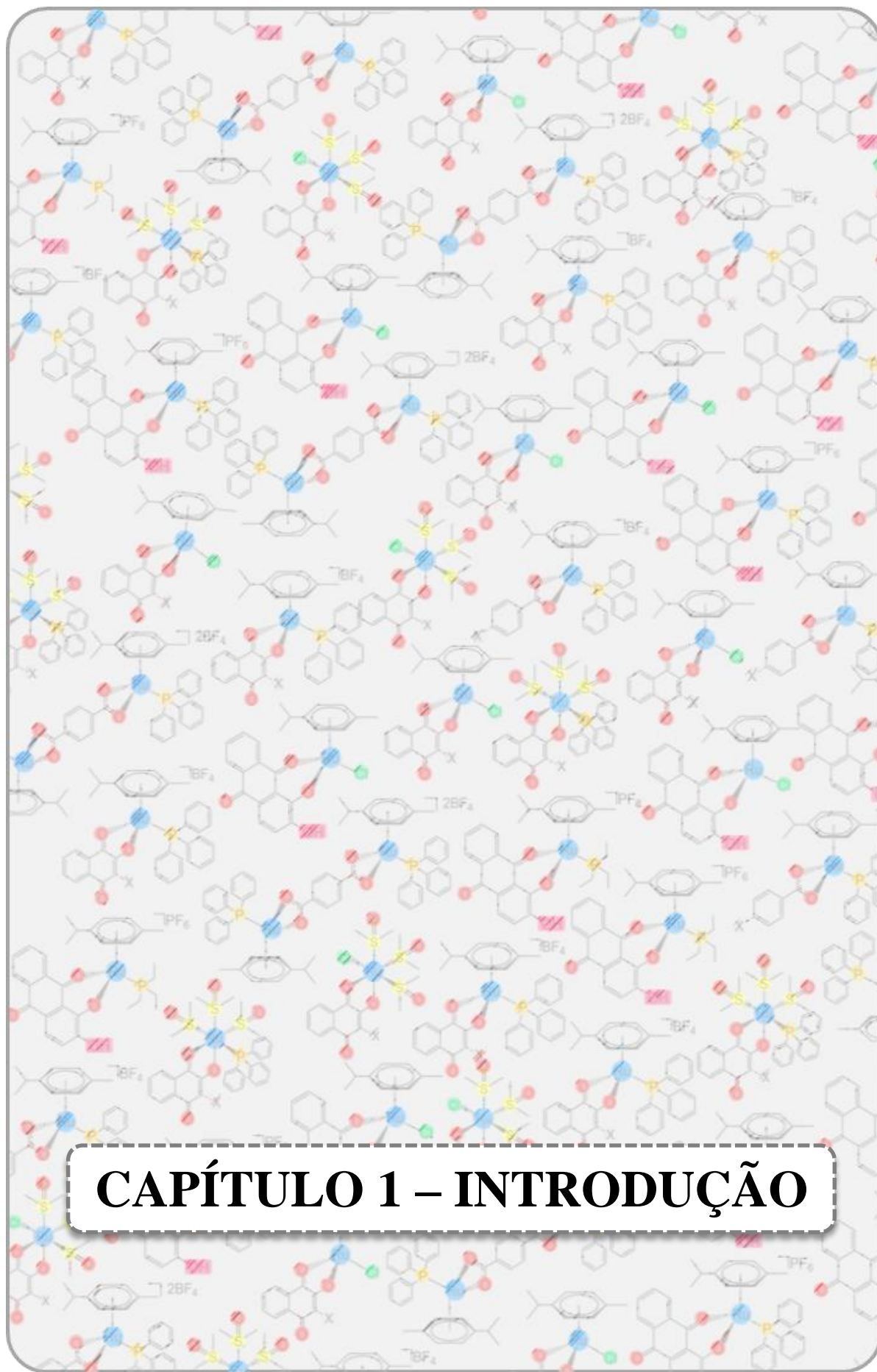
---

---

3.3	- Instrumentação .....	41
3.3.1	- Condutividade Molar.....	41
3.3.2	- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho ....	41
3.3.3	- Análise elementar (C, H, N e S).....	42
3.3.4	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	42
3.3.5	- Difração de raios X.....	42
3.3.6	- Cálculos teóricos .....	43
3.3.7	- Espectrometria de massas (MALDI-TOF).....	43
3.4	- Obtenção dos Dados Biológicos.....	43
3.4.1	- Teste de estabilidade dos complexos em solução .....	43
3.4.2	- Linhagens e Cultura Celular.....	44
3.4.3	- Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT) .....	44
3.4.4	- Análise do ciclo celular .....	45
3.4.5	- Morfologia Celular .....	46
3.4.6	- Ensaio de Migração Celular “ <i>Wound Healing</i> ” .....	46
3.4.7	- Ensaio de sobrevivência clonogênica.....	47
3.4.8	- Cultivo celular para os ensaios de acúmulo do complexo .	47
3.4.9	- Medidas de ICP-MS das células cultivadas .....	48
3.4.10-	Microscopia confocal das células MDA-MB-231 .....	49
3.4.11-	Titulação espectroscópica por UV-visível do DNA.....	49
3.4.12-	Ensaio de Eletroforese em gel do DNA plasmidial.....	50
CAPÍTULO 4 – SÉRIE A RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		51
4.1	- Síntese e caracterização dos complexos da Série A.....	52

---

4.2	- Estudos biológicos dos complexos da Série A.....	71
4.3	- Conclusões parciais da Série A.....	80
CAPÍTULO 5 – SÉRIE B RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		83
5.1	- Síntese e caracterização dos complexos da Série B. ....	84
5.2	- Estudos biológicos dos complexos da Série B.....	125
5.3	- Conclusões parciais da Série B.....	140
CAPÍTULO 6 – SÉRIE C RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		143
6.1	- Síntese e caracterização dos complexos da Série C. ....	144
6.2	- Estudos biológicos dos complexos da Série C.....	164
6.3	- Conclusões parciais da Série C.....	178
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES .....		181
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		186
APÊNDICE .....		207



# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Esta tese de doutorado é dedicada ao relato dos resultados obtidos na pesquisa de complexos do tipo  $\text{Ru}^{\text{II}}$ /areno contendo monofosfinas e produtos naturais como ligantes, explorando o potencial citotóxico dos mesmos frente a células tumorais. Para situar o leitor, neste capítulo são expostas informações relevantes quanto ao estado da arte da química organometálica como fonte de compostos com eficiência anticancerígena.

## **1.1 - Os recentes desafios no desenvolvimento de novos fármacos.**

O ano de 2020 ficará marcado na história da ciência e da humanidade. A pandemia causada pelo novo coronavírus Sars-CoV-2, causador da doença chamada de Covid-19, aflige o mundo e intervém em todas as estruturas da sociedade contemporânea, colocando a prova os sistemas mundiais e levando a humanidade a uma das maiores crises da história, gerando impactos sociais, econômicos, culturais e políticos, sem precedentes na história recente. As decisões tomadas pelas nações neste turbulento período irão surtir efeitos muito além dos esperados imediatamente, definindo também qual será a realidade do século XXI, pois os desafios resultantes da batalha travada pela humanidade contra essa doença, embora haja a inestimável perda de milhares de vidas, levarão a grandes avanços em vários aspectos da vida do homem, além de grandes rupturas com costumes e pensamentos pertencentes a tempos passados.

Uma das protagonistas desta história é a ciência, pois sem ela não haveriam métodos de isolamento e identificação do vírus, diagnóstico, controle e tratamento da doença. As palavras ciência, cientistas, pesquisa e outras pertencentes ao meio investigativo passaram a fazer parte do cotidiano da população, onde muitos descobriram a importância do trabalho desenvolvido por aqueles que se dedicam ao avanço do conhecimento científico. A corrida mundial por medicamentos antivirais e vacinas de imunização ao Sars-CoV-2 passou a ser conhecida por muitos, principalmente com a popularização feita pela mídia, deixando bastante claro a todos o quão desafiador, caro, longo e penoso é o

desenvolvimento de novos fármacos, principalmente quando passam para estágios clínicos avançados.<sup>1-4</sup> A Figura 1.1 ilustra a trajetória a ser percorrida por um candidato às prateleiras das farmácias, evidenciando o passo-a-passo do desenvolvimento de novos medicamentos.

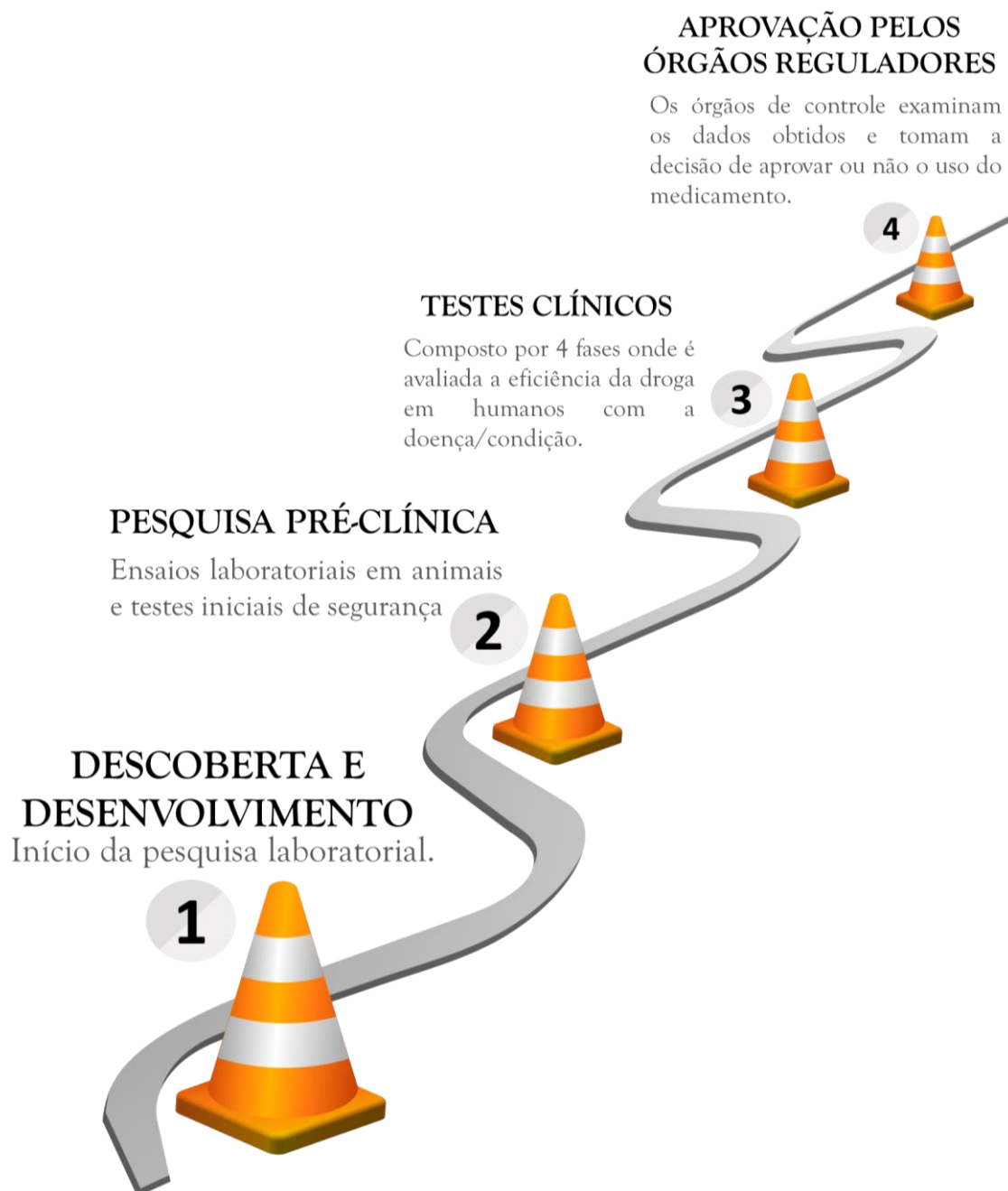


FIGURA 1.1 – Etapas comumente percorridas por novos candidatos para o tratamento de doenças.

O início da trajetória dos fármacos dá-se com a descoberta e o desenvolvimento das propostas em um laboratório, tanto na iniciativa pública como na privada, exigindo um grande número de horas de trabalho de cientistas,



que sempre estão atentos aos estudos científicos mais recentes, principalmente quanto às inovações que surgem todos os dias no mercado.

Ao validar a eficácia da descoberta frente a doença/condição em testes *in vitro*, dá-se início a etapa pré-clínica, onde pesquisas preliminares básicas envolvendo a experimentação do composto em animais são realizadas, incluindo testes iniciais de segurança, abrangendo estudos de genotoxicidade, mutagenicidade, farmacologia e toxicologia. Esses resultados preliminares devem reunir todas as informações necessárias para a transposição segura de um medicamento em teste com animais para humanos, garantindo a segurança dos estudos a serem realizados.<sup>5,6</sup>

Conhecendo a segurança e eficácia do candidato a medicamento, e com o devido aval dos conselhos reguladores e de ética das instituições envolvidas, inicia-se a pesquisa clínica, onde uma grande equipe de profissionais passa a integrar o trabalho, sendo eles: químicos, farmacêuticos, médicos, microbiologistas, estatísticos, administradores, entre outros. Esta etapa se divide em 4 fases, onde cada uma delas varia quanto aos objetivos e quantidade de pacientes envolvidos. A Figura 1.2 apresenta um detalhamento geral dessas, descrevendo inclusive a taxa de sucesso em cada uma delas, baseando-se na quantidade de medicamentos que conseguem prosseguir nos estudos.<sup>7</sup> As agências reguladoras como o FDA (*Food and Drug Administration* - USA) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasil), possuem padrões específicos para ensaios clínicos envolvendo pacientes, que incluem os profissionais envolvidos nos testes científicos, os critérios de seleção dos pacientes, o cenário em que os testes clínicos ocorrem e vários outros pré-requisitos. Em outubro de 2019, haviam cerca de 318.901 mil estudos clínicos em andamento no mundo inteiro, representando um aumento de 150 vezes em relação ao ano 2000, onde foram registrados apenas 2.119 estudos.<sup>8</sup> Com a recente pandemia, em 2020 deve ser registrado um salto nesse número, dados os vários testes conduzidos ao redor do mundo com o objetivo de combater o COVID-19.

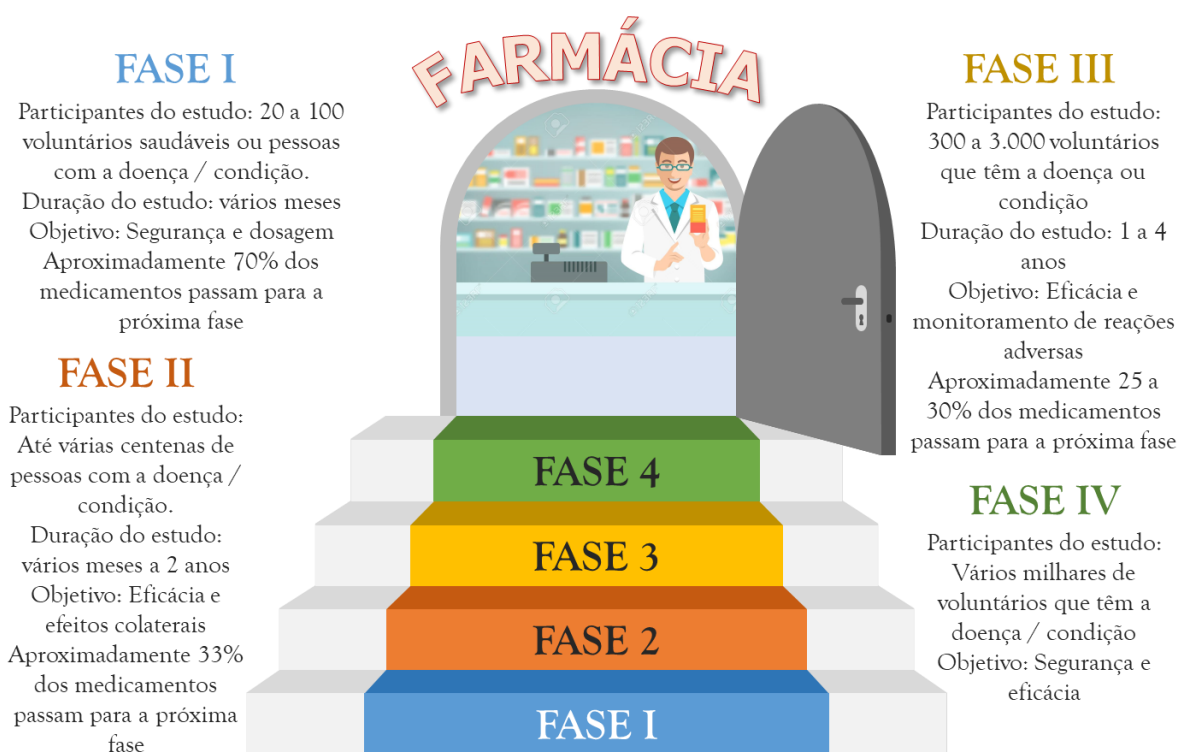


FIGURA 1.2 – Fases investigativas de novos medicamentos em pacientes portadores da doença/condição.<sup>7</sup>

Nos últimos 20 anos, avanços significativos nos protocolos *in vitro* e *in vivo* de farmacocinética e metabolismo de substâncias melhoraram a capacidade de seleção de moléculas promissoras. Em 1991, 40% dos medicamentos que entraram em ensaios em humanos foram reprovados devido a farmacocinética inadequada, principalmente em função da baixa biodisponibilidade dos compostos, entretanto esse número caiu para 5% no período de 2000-2005 e 4% em 2006-2010, evidenciando o avanço nos estudos de triagem de candidatos ao tratamento de doenças.<sup>8,9</sup>

Na quarta etapa representada na Figura 1.1, as instituições envolvidas enviam os resultados das pesquisas e descobertas para os órgãos de regulação, onde a eficácia e segurança do medicamento é atestada e o uso do fármaco é regulamentado. Mesmo liberando o uso, o monitoramento de segurança pós-aprovação de um medicamento comercializado é realizado nos anos seguintes, acompanhando também os tipos de publicidade realizadas para os medicamentos, a fim de garantir a precisão da finalidade, modo de administração e faixa etária de

uso. Estimativas baseadas nos novos medicamentos aprovados pelo FDA têm mostrado que o custo aproximado para todo o processo de validação de um medicamento pode variar entre US 314 milhões a US 2,8 bilhões, sendo o custo, na maioria dos casos, bancado por grandes multinacionais farmacêuticas.<sup>10</sup>

## **1.2- Câncer, um problema mundial de saúde.**

Dentre as áreas de desenvolvimento de medicamentos, uma das que mais se destacam é a oncologia, correspondendo a 27% de todas as aprovações dadas pelo FDA desde 2010. Da década de 80 até o ano de 2019, 126 novas moléculas foram aprovadas para o tratamento do câncer, englobando vários tipos da doença.<sup>11</sup> Entretanto esses números ainda são baixos frente a urgência e o tamanho que este problema representa, pois o câncer é o principal problema de saúde pública na maioria dos países, já figurando entre as quatro principais causas de morte prematura no mundo. No período de 2009-2018 as novas drogas propostas para os tratamentos oncológicos foram as que apresentaram as menores taxas de sucesso nas fases I, II e III da etapa de estudo clínico, sendo elas iguais a 3,4 (fase I), 6,7 (Fase II) e 35,5 (fase III).<sup>10</sup>

Inicialmente o câncer constituía a principal causa de morte apenas nos países desenvolvidos, entretanto os países em desenvolvimento passaram também a exibir essa característica, isto devido as melhorias socioeconômicas que resultam na mudança de hábitos da saúde (melhor alimentação, prática de exercícios físicos e outros) e melhores condições de vida (saneamento básico, acesso a atendimento médico/hospitalar e outros), aumentando a expectativa de vida e conseqüentemente a chance de exibir a doença. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil a estimativa para 2020 indica que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, sendo o maior número de casos correspondentes ao câncer de pele (não melanoma, 28,3%), seguido pelos cânceres de mama e próstata (ambos 10,6% cada), colorretal (6,6%), pulmão (4,8%) e estômago (3,4%).<sup>12,13</sup>

A alta incidência e mortalidade dessa doença deve-se a complexidade que a mesma exhibe, correspondendo a mais de cem tipos de doenças, sendo todas elas caracterizadas por um grupo de células pertencentes a qualquer órgão ou tecido do corpo, que começam a se dividir incontrolavelmente. Estas células tornam-se menos especializadas nas suas funções em relação as correspondentes normais e iniciam um processo de crescimento além dos limites aceitáveis, podendo invadir partes próximas ao local de surgimento ou até mesmo se espalhar para outros órgãos, levando a um processo chamado de metástase. Todos esses processos são originados de mutações genéticas, que podem ser associadas tanto a fatores internos como a externos ao paciente, correspondendo os internos a predisposições genéticas, podendo ser inclusive de cunho hereditário, enquanto os externos estão associados ao estilo de vida e fatores ambientais, podendo ser correlacionados a diversos hábitos pessoais como também a costumes culturais.

Com o avanço dos tratamentos para esta doença a taxa de cura tem aumentado consideravelmente, havendo diversos recursos terapêuticos para os diferentes tipos de câncer nos diferentes estágios em que a doença pode se encontrar. As principais formas de intervenção contra o câncer são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, entretanto o diagnóstico precoce é um dos fatores que mais influenciam no processo curativo da doença e no tipo de tratamento a ser empregado, podendo ser composto por um único procedimento ou por uma combinação deles. Na cirurgia realiza-se a remoção física do tumor local, enquanto a radioterapia utiliza raios ionizantes sobre a região do tumor, com a finalidade de reduzir o volume do mesmo.

A quimioterapia, o mais utilizado dentre os tratamentos, tem sido a mais utilizada dentre os tratamentos, empregando fármacos com atividade antitumoral no tratamento das diversas formas da doença, podendo ser ministrados tanto via oral como intravenosa. Os medicamentos quimioterápicos podem ser empregados nos diferentes quadros exibidos pelos pacientes, tanto visando a cura da doença como também de modo paliativo, conferindo sobrevida

ao paciente. Assim como em todos os tratamentos que envolvem medicamentos, o principal inconveniente causado pelos quimioterápicos são os efeitos colaterais, que em alguns casos podem ser severos, além da possibilidade do desenvolvimento resistência ao tratamento, se tornando um grande limitante no emprego dessa ferramenta.<sup>14,15</sup>

Recentemente outros tipos de intervenção terapêutica vêm sendo empregados, sendo a imunoterapia e hormonioterapia as mais comuns. Os medicamentos empregados na imunoterapia, conhecidos como inibidores de *checkpoint* imunológico, funcionam bloqueando as proteínas envolvidas nessa verificação em células com crescimento descontrolado, gerando uma resposta imunológica ao fazer com que linfócitos voltem a identificar células tumorais. A hormonioterapia já utiliza outra ferramenta para o tratamento do câncer, nesse tratamento o alvo são células que possuem receptores hormonais, como o câncer de mama e próstata. Esses medicamentos atuam como bloqueadores dos hormônios sexuais (testosterona ou estrógeno), desestimulando o crescimento das células tumorais.<sup>16</sup>

### **1.3- Os complexos de platina no tratamento do câncer.**

Dentre as diversas fontes de pequenas moléculas para os tratamentos quimioterápicos, os metalofármacos têm recebido grande destaque. Pesquisadores ao redor do mundo têm dedicado suas carreiras ao desenvolvimento de complexos metálicos e a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação dos mesmos em organismos vivos. O motivador inicial para estas pesquisas foi a principal descoberta da área, a atividade antitumoral do cisplatina em 1965 pelo Dr. Barnett Rosenberg. A aprovação do cisplatina como quimioterápico em 1978 possibilitou tratamentos eficazes contra uma variedade de cânceres que naquele tempo exibiam altos níveis de mortalidade, principalmente o testicular, ovariano, cabeça e pescoço e pulmonar. Entretanto, já no início do uso desses compostos notou-se que a eficácia era limitada em outros tipos da doença, além de exibir efeitos

colaterais inerentes a alta reatividade do cisplatina, levando a uma alta toxicidade e resultando na limitação da dosagem do medicamento. Afim de regular essa alta reatividade outros fármacos a base de platina foram sintetizados e testados no tratamento do câncer, sendo algum deles aprovados para o uso clínico. Na Figura 1.3 tem-se representado a evolução estrutural dos análogos ao cisplatina ao longo dos anos, obtendo alguns a aprovação mundial para o uso e outros com aprovação restrita a alguns países. O amplo uso dos complexos a base de platina e sua eficácia comprovada transformou os mesmos em um dos componentes mais comuns no tratamento do câncer, compondo cerca de 50-70% dos tratamentos realizados atualmente.<sup>17-22</sup>

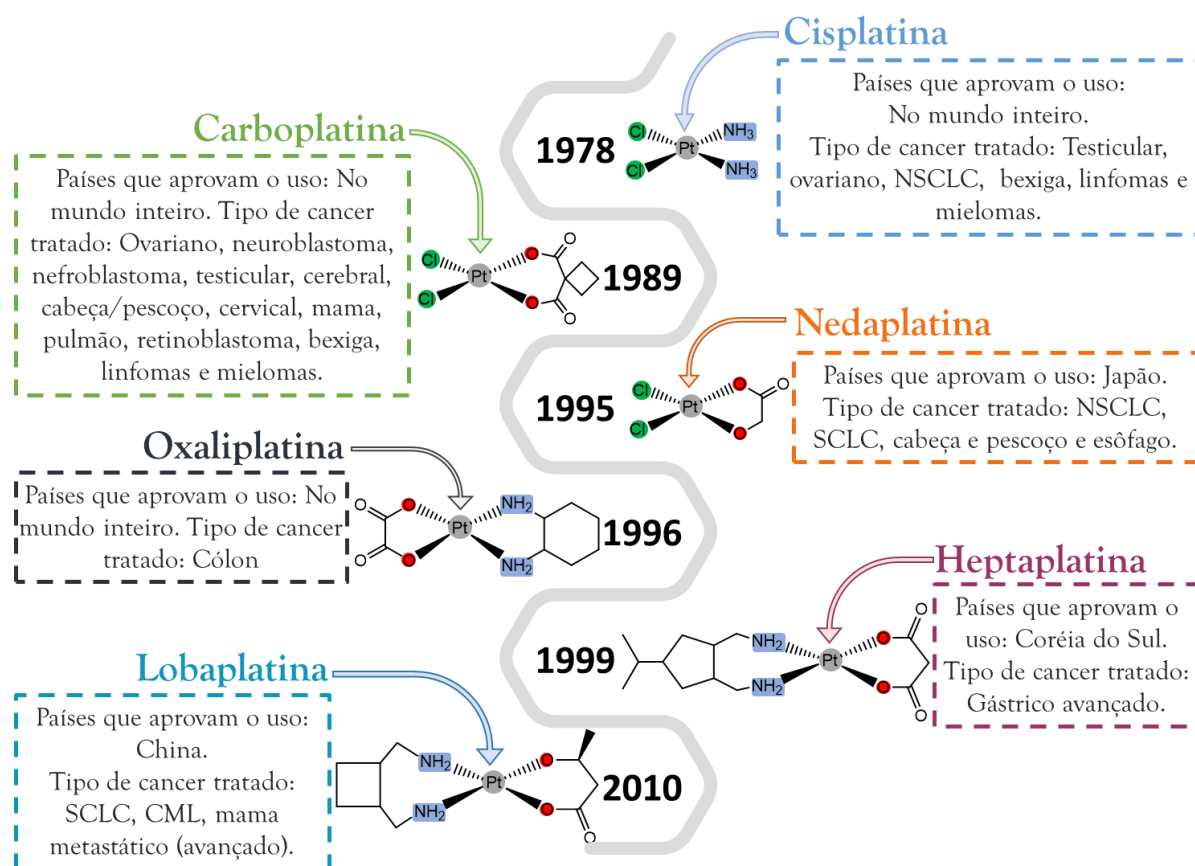


FIGURA 1.3 – Medicamentos a base de platina empregados no tratamento do câncer ao redor do mundo. (NSCLC = *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*, SCLC = *Small-Cell Lung Carcinoma* e CML = *Chronic Myeloid Leukemia*).

Todos os antineoplásicos análogos ao cisplatina empregados no tratamento do câncer são administrados por via intravenosa, apresentando afinidade as proteínas séricas, principalmente a albumina humana podendo esta

atuar como uma transportadora dos fármacos. Dentre os vários mecanismos de transporte estudados para estes complexos sabe-se que a difusão passiva possui alta contribuição para a biodisponibilidade dos mesmos. A baixa concentração de sais no meio intracelular leva ao aumento da absorção do fármaco, levando a perda de seus ligantes lábeis como os cloridos ou ligantes à base de carboxila, isto ao ser internalizado. Por possuir ligantes lábeis e por ser a  $Pt^{2+}$  um núcleo mole, os medicamentos à base de platina se ligam facilmente a bases moles contendo enxofre, principalmente proteínas e peptídeos, como ocorre com a glutathione, que uma vez ligada ao centro metálico não cumpre seu papel de antioxidante.

Embora haja vários alvos conhecidos para o cisplatina e análogos, devido à alta reatividade dos mesmos, o alvo mais estudado para os metalofármacos a base de platina é o DNA. A hidrólise dos ligantes cloridos ou carboxilatos permitem que o centro metálico se coordene às bases nitrogenadas do DNA, principalmente ao nitrogênio na posição 7 de guanina, levando à fragmentação e inativação dessa biomolécula. Ao danificar o DNA, os esses complexos impedem a transcrição e replicação do DNA, desencadeando uma cascata metabólica que resulta no início da morte programada de célula, fenômeno conhecido por apoptose.

Embora tenham surgidos os outros fármacos análogos ao cisplatina, conforme exibido na Figura 1.3, alguns efeitos indesejados permaneceram para os três medicamentos mais usados desta classe, totalizando mais de 40 efeitos colaterais específicos que podem ser manifestados ao longo do tratamento, envolvidos principalmente com processos que levam à nefrotoxicidade, ototoxicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade, hepatotoxicidade e gastrotoxicidade.<sup>23</sup>

Outra limitação recorrente aos complexos à base de platina é a resistência ao tratamento, que se desenvolve ao longo do processo, sendo resultante de quatro mecanismos conhecidos: (i) aumento da degradação e

desativação da droga antes que ela atinja o DNA nuclear, (ii) diminuição da captação das drogas nas células cancerosas, (iii) formação reduzida de adutos de DNA-droga e (iv) um aumento do reparo do DNA danificado com a interação com a platina. Esses fatores são um dos grandes incentivos a busca de outros complexos metálicos que sejam alternativa aos tratamentos quimioterápicos, principalmente buscando complexos mais ativos frente as células e com efeitos colaterais atenuados.<sup>17,24,25</sup>

#### **1.4 - Compostos de rutênio como alternativa aos de platina.**

Uma das opções mais exploradas na busca de drogas alternativas a platina no tratamento do câncer são os complexos de rutênio. Algumas vantagens apresentadas por esses compostos são os estados de oxidação (II e III) mais inertes (devido a maior carga nuclear efetiva) e o maior número de coordenação em relação a platina (II), possibilitando uma grande variedade de arranjos de ligantes ao redor do centro metálico. Entretanto mesmo os complexos com estados de oxidação mais altos, podem ser reduzidos ao estado II, dado que a célula cancerosa apresenta um ambiente altamente redutor. Todo conhecimento sobre a química dos complexos de Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> já está bem estabelecida, principalmente nos campos de materiais, catálise e química medicinal, e os estudos sobre seu uso como agentes antitumorais é amplamente estudado e debatido ao redor do mundo.<sup>24,26,27</sup>

Na química medicinal os principais complexos que trouxeram o rutênio para as capas das revistas científicas foram os compostos KP1019 e NAMI-A. Em 1986, o grupo de pesquisa liderado pelo professor Dr. Bernhard Keppler relatou pela primeira vez sobre a atividade antitumoral de um complexo de Ru<sup>III</sup> aniônico e solúvel em água, que foi chamado de KP418 (Figura 1.4), sendo constituído por ligantes clorido, imidazol (Im) e contra-íon imidazol protonado (ImH), apresentando fórmula (ImH)*trans*-[Ru(Cl)<sub>4</sub>(Im)<sub>2</sub>], exibindo alta



eficácia contra em células tumorais de tecido colorretal, inclusive quando comparado ao efeito da cisplatina ou 5-fluorouracil.<sup>28,29</sup>

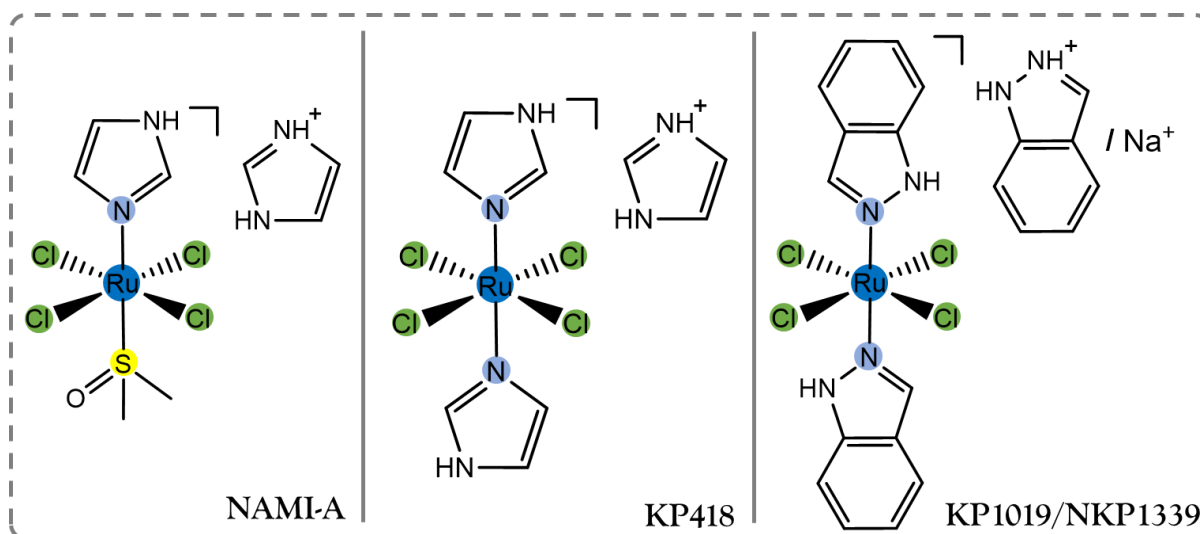


FIGURA 1.4 – Estruturas químicas de complexos de Ru<sup>III</sup> que foram avaliados em testes clínicos no tratamento do câncer.

Dado a maior toxicidade do composto com imidazol, uma nova proposta estrutural similar foi testada, empregando o similar, com o indazol (In), de fórmula geral (InH)*trans*-[Ru(Cl)<sub>4</sub>(In)<sub>2</sub>], menos tóxico aos tecidos não tumorais, que inibiu nos testes *in vivo* o crescimento de tumores em 90%, sendo batizado com o código KP1019, que mais tarde resultou em uma nova versão mais solúvel contendo o sódio como contraíon, chamado de NKP1339 (Figura 1.4).

No início de 1990, com os resultados divulgados para os complexos KP418 e KP1019, a busca por outros complexos de rutênio passou a ser alvo de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo. Um exemplo disso foram os estudos desenvolvidos pelo grupo do Dr. Enzo Alessio que preparou um novo complexo de Ru<sup>III</sup> com notável semelhança estrutural aos compostos do tipo KP, uma vez que realizou a troca de um dos ligantes imidazólicos do KP418 por uma molécula de DMSO resultando no complexo (ImH)*trans*-[Ru(Cl)<sub>4</sub>(S-DMSO)(Im)], chamado de NAMI-A (Figura 1.4). A principal diferença desse complexo foram os testes *in vivo* realizados em tumores sólidos metastáticos de camundongo, onde embora não tenha sido observado a redução do tumor original, foi notado que o complexo induzia a redução da formação de metástases no pulmão do animal,

evidenciando o potencial antimetastático desse composto. Um fator interessante observado foi a baixa toxicidade *in vitro* dos compostos do tipo KP e do NAMI-A, que convencionalmente não passariam pela triagem de citotoxicidade nos ensaios *in vitro* comumente realizados em laboratório, apresentando toxicidade 1000 vezes menor que a cisplatina em muitas linhagens de células tumorais.<sup>26,30-</sup>

32

O NAMI-A foi o primeiro complexo de rutênio a ser testado em humanos, sendo testado a partir de 1999 em adultos portadores de tumores sólidos variados. O perfil de toxicidade inicialmente exibido pelo NAMI-A foi consideravelmente distinto dos fármacos à base de platina, exibindo nefrotoxicidade leve nas doses mais altas, além de hematotoxicidade inexistente. Entretanto nas doses máximas ministradas (400 mg/m<sup>2</sup>/dia) foram observadas bolhas dolorosas nos dedos das mãos nos pés dos pacientes, mal-estar geral leve / moderado, náuseas, vômitos e diarreia. A priori observou-se que os pacientes com NSCLC (*Non-small cell lung cancer*) avançado apresentaram a estabilização da doença por 21 semanas após o tratamento.<sup>33</sup>

Conhecendo esse efeito sobre os tumores sólidos de pulmão, o NAMI-A passou a ser testado em combinação com a gencitabina, que é um fármaco antitumoral amplamente utilizado no tratamento do câncer de pulmão, em conjunto com a cisplatina. Nestes estudos foram observados os mesmos efeitos colaterais exibidos nos testes anteriores, entretanto a eficácia do tratamento acabou sendo menor do que o esperado para a gencitabina sozinha, mostrando que a combinação com o NAMI-A não teve o efeito esperado. Esses resultados levaram os pesquisadores a classificarem o NAMI-A como composto com propriedades insuficientes, no tipo de câncer estudado.<sup>34</sup>

O NKP1339, também chamado de BOLD-100, é o único medicamento anticâncer à base de rutênio que continua está sendo testado atualmente, nos Estados Unidos, em ensaios clínicos de fase I pela empresa *Bold*

*Pharmaceutics* (código *Clinical Trials*: NCT04421820).<sup>35</sup> Os estudos nesta etapa avançada da fase I estão programados para o decorrer dos anos de 2020/2021 em aproximadamente 80 pacientes que exibem quadro clínico de câncer de pâncreas, gástrico ou colorretal. Estudo do mecanismo de ação dos complexos KP1019 e NKP1339 mostraram que ambos possuem forte afinidade a proteínas séricas, como albumina e transferrina, atuando ambos como pró-fármacos (devido à hidrólise dos ligantes azóis), causando intenso distúrbio do equilíbrio redox celular e desencadeando mecanismos de morte e bloqueio do ciclo celular (Fase G<sub>2</sub>/M), além de induzir apoptose via despolarização mitocondrial. Alguns relatos vem mostrando que os efeitos colaterais observados em ensaios clínicos iniciais da fase I foram bastante atenuados, exibindo a vantagem desta classe de drogas de rutênio em comparação com outros quimioterápicos.<sup>26,36</sup>

Os estudos resultantes desses complexos de destaque na literatura, que já estão a 30 anos sendo investigados, permitindo a realização de uma análise crítica sobre o que se tem de concreto na ação de complexos de rutênio em células tumorais. Revisões recentes escritas pelos grupos dos Dr. Enzo Alessio e Bernhard Kepler tem feito um balanço sobre o tema e expondo uma série de mitos criados a partir das evidências experimentais obtidas para esses complexos, chegando à conclusões bem estabelecidas sobre o assunto, como as que seguem:<sup>26,30,32</sup>

- Os complexos NAMI-A, KP1019 e 1339 de fato são estruturalmente similares, entretanto existem algumas diferenças químicas pequenas que afetam consideravelmente suas respectivas reatividades e performance em meio biológico;
- Ambos os compostos são instáveis em meios fisiológicos, atuando como pró-drogas em organismos vivos;
- Ambos os compostos são solúveis em água o suficiente para serem ministrados aos pacientes sem o emprego de outros solventes;

- Embora esses complexos apresentem grande afinidade por proteínas séricas, quantidades consideráveis dos complexos podem se distribuir por todo o corpo e atingir tumores distribuídos pelo corpo de forma eficaz.
- Os 3 complexos apresentam baixa toxicidade sistêmica e podem ser usados com bastante segurança em concentrações consideravelmente altas;
- Embora similares estruturalmente, os mecanismos de ações desses complexos em meio biológico são distintos, pois o KP1019 produz um efeito citotóxico mais proeminente e é capaz de se acumular no interior das células, enquanto NAMI-A se acumula na membrana celular, pouco permeabilizando para o meio intracelular, e mesmo exibindo baixa citotoxicidade apresenta efeito antimetastático considerável.

### **1.5 - A química dos compostos organometálicos.**

A química dos complexos organometálicos, além de muito bela e clássica, também tem se destacado como fonte de moléculas que tem exibido várias aplicações importantes, já sendo amplamente empregadas na indústria de catalisadores e recentemente fornecendo novas estruturas com variadas atividades em meio biológico. O estudo dos complexos organometálicos abrange uma grande variedade de compostos de coordenação e suas transformações, principalmente buscando compreender e explorar suas principais características: As ligações sigma ( $\sigma$ ) e pi ( $\pi$ ) entre átomos de metal e carbono, conforme demonstrado na Figura 1.5.

O principal evento que alavancou os estudos sobre complexos organometálicos foi a descoberta da estrutura cristalográfica do ferroceno, através da técnica de raios X em 1956, onde a resolução da estrutura cristalina indicou que a substância obtida na tentativa de síntese do fulvaleno era um complexo onde um átomo de ferro estava no meio de dois ciclopentadienil, assim como um hambúrguer é envolto entre dois pedaços de pão, batizando esses complexos de sanduíche. Essa descoberta foi tão significativa que os pesquisadores responsáveis

pelo desenvolvimento desses complexos, Geoffrey Wilkinson e Ernest Otto Fischer, compartilharam o Prêmio Nobel de Química de 1973 "por seu trabalho pioneiro, realizado de forma independente, sobre a química dos organometálicos, os chamados compostos sanduíche".<sup>37,38</sup>

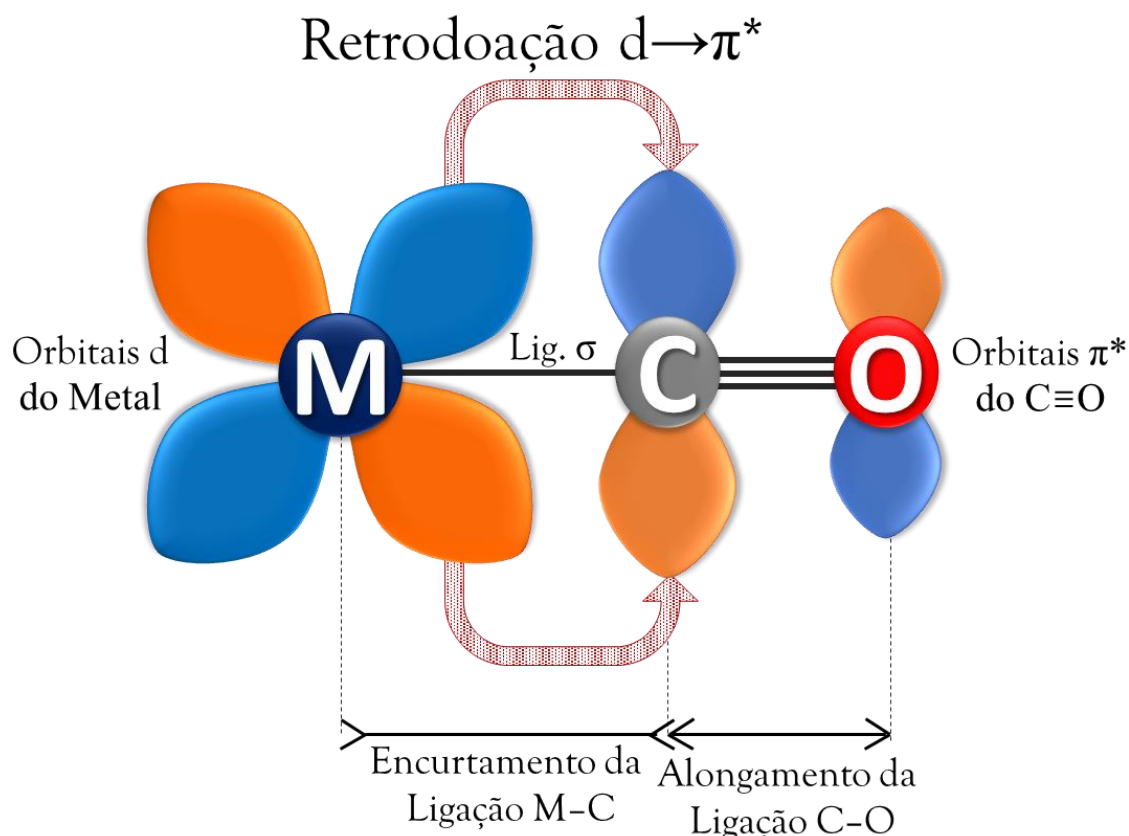


FIGURA 1.5 – Representação das ligações  $\sigma$  e  $\pi$  entre um metal e o ligante carbonilo.

A química organometálica já possui 6 prêmios Nobel em seu hall de laureados, com descobertas e aplicações das mais variadas, por exemplo temos a descoberta da existência de compostos desse tipo no nosso organismo, a vitamina B12, que consiste em um complexo de cobalto que contém uma ligação  $\sigma$  cobalto-carbono. Esta descoberta foi feita pela química Dorothy Crowfoot Hodgkin, premiada em 1965 “pelo emprego de técnicas de raios X na resolução estrutural de importantes substâncias bioquímicas”.<sup>39</sup>

Uma característica comum aos complexos de coordenação e organometálicos são as diferentes maneiras de interação entre os ligantes e centros

metálicos, sendo dependente da orientação dos orbitais que compõem a ligação. Nessas interações os ligantes podem ser classificados de acordo com os tipos de orbital do ligante, sendo do tipo (i)  $\sigma$  doador, (ii)  $\pi$  acceptor e  $\pi$  doador ou (iii)  $\sigma$  doador e  $\pi$  doador. Nos ligantes com características  $\sigma$  doadoras, o par de elétrons no ligante é doado ao metal, sendo estabilizado através da formação de um orbital molecular ligante de menor energia e um orbital antiligante desocupado de maior energia.

Embora a caracterização da ligação em complexos metálicos seja dada através da interação de uma base de Lewis (ligante) com um ácido de Lewis (metal), existe a possibilidade de, além da componente  $\sigma$ , haver uma outra ligação complementar, e isto é permitido quando ligantes específicos possuem a capacidade de aceitar a densidade eletrônica de um metal, dispondo de orbitais com simetria e energias adequadas para tal, surgindo uma nova componente da ligação chamada de  $\pi$ . O exemplo mais clássico desse tipo de ligação são os complexos contendo o ligante carbonilo (monóxido de carbono) que funciona como um doador em  $\sigma$ , empregando para tal um par de elétrons de seu orbital molecular ocupado mais alto (HOMO), porém adicionalmente o ligante carbonilo possui orbital de caráter antiligante ( $\pi^*$ ) com energia e orientação favorável a receber elétrons do metal, ocorrendo assim o efeito chamado de retrodoação, onde um par de elétrons do metal é doado ao ligante, de modo contrário a ligação  $\sigma$ . A Figura 1.5 ilustra o relato anterior, deste efeito conhecido como retrodoação.

Essas duas ligações descritas para o ligante são sinérgicas, onde quanto mais efetiva a doação de  $\sigma$ , maior será a densidade de elétrons no metal e conseqüentemente maior será a capacidade do metal de doar elétrons de volta para o ligante, sendo a existência dessa componente um fator que leva ao fortalecimento da ligação entre o metal e o ligante. Uma consequência direta da retrodoação dos elétrons do metal em orbitais  $\pi^*$  é o enfraquecimento da ligação  $C\equiv O$ , levando a um decréscimo na ordem de ligação e conseqüente aumento da distância  $C\equiv O$ , sendo a capacidade de retrodoação influenciada por vários fatores,

incluindo a carga do metal e também os demais ligantes coordenados ao mesmo. Estes efeitos possuem consolidadas evidências experimentais discutidas na literatura, principalmente com o suporte de técnicas de difração de raios X e espectroscopia de absorção na região do infravermelho, cujas informações espectroscópicas embasam o efeito descrito acima.<sup>40,41</sup>

## 1.6 - A versatilidade dos complexos de Ru<sup>II</sup>/areno

Outra classe de compostos organometálicos com bastante representatividade são os complexos do tipo “semi sanduíche” (*half sandwich*), onde o metal central está coordenado a um anel aromático ( $\eta^5$ ,<sup>6</sup>), que em sistemas octaédricos ocupa três pontos de coordenação, sobrando assim outros três pontos de coordenação para serem ocupados com outras moléculas de interesse. Nesses complexos a ligação entre o rutênio e o anel de 6 membros ocorre através da doação dos elétrons  $\pi$  do anel aromático aos orbitais  $d$  do rutênio formando a ligação em  $\sigma$  e concomitantemente a retrodoação dos orbitais  $d$  do metal para os orbitais  $\pi^*$  do anel aromático, e de modo similar ao observado para os complexos carbonílicos o efeito líquido das ligações  $\sigma$  e  $\pi$  levam ao aumento da dimensão tamanho das distâncias C-C no anel aromático.<sup>40-42</sup>

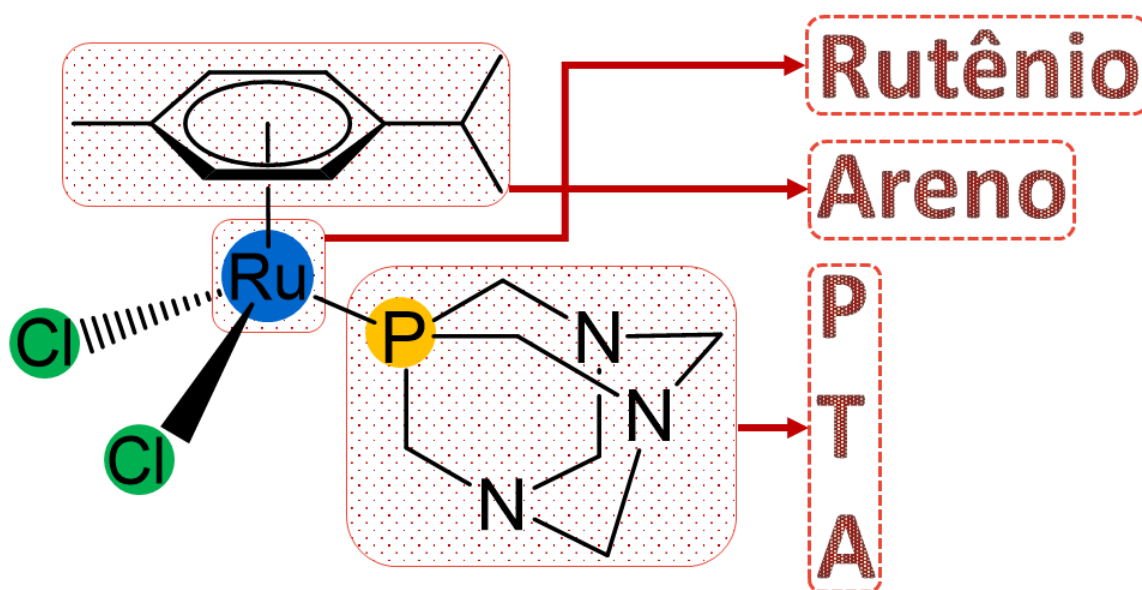


FIGURA 1.6 – Estrutura do complexo RAPTA-C, indicando cada um dos componentes da proposta estrutural dos compostos do tipo RAPTA.

Os complexos do tipo RAPTA são os representantes mais conhecidos da classe “semi sanduíche” de Ru<sup>II</sup>, compartilhando uma estrutura química básica de fórmula  $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\eta^6\text{-areno})\text{PTA}]$ , sendo PTA = 1,3,5-triazo-7-fosfadamantano, que é uma monofosfina nitrogenada e solúvel em água. O complexo mais conhecido dessa Série é o RAPTA-C, onde o ligante areno é o *p*-cimeno, conforme descrito na Figura 1.6.

Os complexos do tipo RAPTA exibem comportamento similar ao compostos KP e NAMI-A em sua atividade antitumoral, não apresentando alta citotoxicidade em culturas de células tumorais, onde na maioria das vezes os valores de IC<sub>50</sub> frente a várias linhagens são >100 μM, entretanto apresentam expressiva atividade em experimentos *in vivo*, destacando quando a capacidade antimetastática e antiangiogênica. Quando administrado em animais implantados com tumores sólidos, o RAPTA-C é mais eficaz na inibição do crescimento do mesmo do que o composto altamente citotóxico doxorrubicina (fármaco orgânico empregado no tratamento de alguns tipos de câncer), mesmo em doses baixas. Uma outra vantagem exibida pela classe RAPTA é a solubilidade em água e estabilidade em baixo pH, possibilitando a administração por via oral. Outra característica potente exibida pelo complexo RAPTA-C é sua capacidade de desencadear mecanismos de resposta imune diretamente no local do tumor, isto principalmente por meio do bloqueio de proteínas associadas às células T (PD-1, PD-L1 ou CTLA-4). Todas essas características corroboram com a possível entrada RAPTA-C nos ensaios clínicos em pacientes com câncer, tanto visando a atividade antimetastática como a também a ação imunoterapêutica exibida pelos mesmos.

Outro viés abordado nessa classe de compostos é a alteração dos substituintes no anel aromático, desde substituintes mais simples como no RAPTA-T até os mais sofisticados, como é o caso do RAPTA-EA (Figura 1.7). O RAPTA-T contém o tolueno como ligante areno, e se destaca por exibir considerável atividade antimetastática, principalmente por interferir nas



propriedades adesivas das células estudadas.<sup>24,43-45</sup> Já o complexo batizado de RAPTA-EA combina ao anel da unidade RAPTA com o ácido etacrínico, que é conhecido por ser um inibidor da enzima Glutathione S-transferase (GST). A GST é uma enzima envolvida na aquisição de resistência das células tumorais aos tratamentos quimioterápicos, e ao ser inibida ocorre o bloqueamento do desenvolvimento de mecanismos de resistência, aumentando a chance de sucesso do tratamento.<sup>43,46,47</sup>

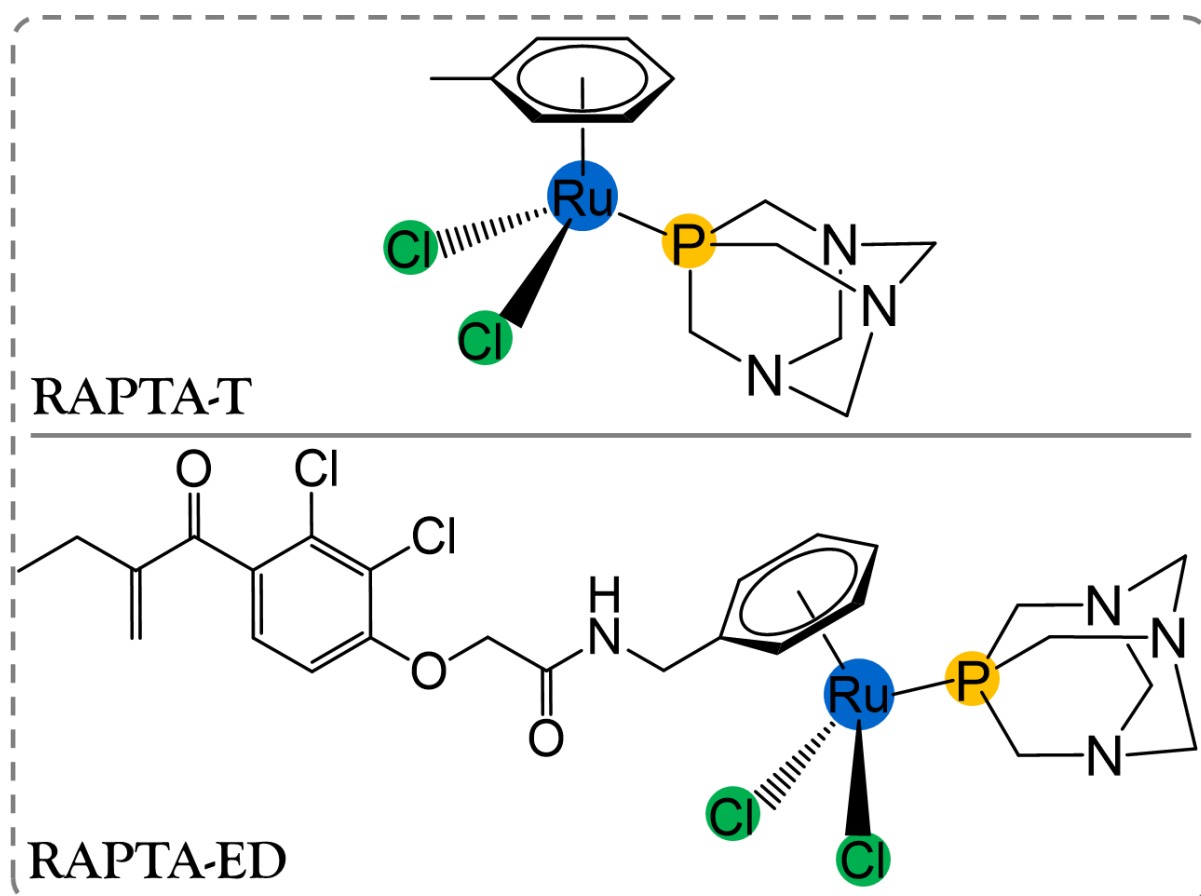


FIGURA 1.7 – Complexos de fórmula geral de fórmula  $[Ru(Cl)_2(\eta^6\text{-areno})PTA]$  pertencentes a classe RAPTA.

### 1.7 - Moléculas bioativas provenientes de metabólitos secundários de plantas superiores.

A natureza é a principal fonte de inspiração do homem no desenvolvimento científico, onde a observação das incontáveis transformações nela presentes leva o mesmo a compreensão dos fenômenos naturais e aplicação do conhecimento gerado no desenvolvimento de tecnologias, gerando avanços nas

várias áreas da ciência. As primeiras descrições sobre o uso de plantas medicinais pelo homem remontam a aproximadamente 5000 anos atrás, onde em uma tabuinha de argila o povo sumério relatou o emprego de 250 espécies diferentes de plantas, como a papoula, mandrágora e meimendro (todas ricas em alcaloides), na confecção de medicamentos para usos diversos.<sup>48,49</sup> O interesse contínuo e perpétuo do homem pelas plantas medicinais tem resultado em uma moderna e sofisticada química de produtos naturais, que tem se devotado não somente a extração e caracterização desses compostos, mas também na síntese e biossíntese dessas substâncias provenientes de organismos vivos.

Desde esses tempos imemoriais até os dias atuais, os compostos derivados de metabólitos secundários de plantas têm sido a uma rica fonte de medicamentos para aliviar a dor e curar várias doenças, como prova disto temos a riqueza da medicina popular presente em diferentes culturas de diversas partes do mundo. A variedade estrutural exibida pelas moléculas provenientes desses metabólitos de plantas pode ser atestada ao se verificar a presença nesses organismos de compostos simples, como o ácido benzoico, e substâncias de grande complexidade estrutural, como peptídeos que contém mais de 100 aminoácidos em suas estruturas, e todas essas substâncias igualmente importantes em processos e mecanismos que viabilizam o funcionamento dos organismos em que estão presentes.

Dentre as moléculas pequenas, uma das subunidades estruturais mais recorrentes são os carboxilatos aromáticos, como o ácido benzoico e similares, que estão comumente presentes em tecidos vegetais, animais e microrganismos, e servem como uma molécula plataforma para a produção de vários outros metabólitos derivados como sais, ésteres alquílicos, parabenos, álcool benzílico, benzaldeído, peróxido de benzoíla e outros, que em sua maioria exibem ação antibacteriana e antifúngica, atuando tanto como conservante natural em alimentos como também de forma artificial, sendo adicionado a produtos que necessitam de conservantes.<sup>50,51</sup> Muito além das derivações provenientes das

alterações no grupo carboxílico, existem várias substituições possíveis que podem ser realizadas nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático, dando origem a dezenas de novas moléculas, onde o estudo de estrutura e atividade biológica dessas substâncias permite a compreensão da influência desses substituintes, tanto quanto a quantidade como o tipo de função orgânica empregada na substituição.

O Brasil possui uma das farmacopeias populares baseadas em plantas mais variadas do mundo, e isto como resultado da riqueza da flora nacional compostas por variados biomas, como também da miscigenação cultural que resulta na formação do povo brasileiro, envolvendo africanos, europeus, indígenas e resultando no sincretismo da medicina popular de diferentes partes do mundo. Uma das plantas que se destacam não somente por seu uso na medicina popular, como também por sua beleza é o ipê, uma árvore comum nas américas central e do sul, caracterizada por sua madeira de alta durabilidade e por suas flores que dependendo da espécie podem ser brancas, roxas, amarelas, rosas e lilases. São conhecidas atualmente quase 45 espécies de ipê, todos pertencentes aos gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus*, onde as principais diferenças entre essas espécies são as cores das flores, o tipo do lenho e o arranjo floral nos galhos. O Brasil é um país privilegiado, pois possui em sua flora 40 espécies de ipê, elegendo a flor do ipê, por sua abundância, beleza e presença na cultura popular, como a flor nacional.

Dentre as substâncias isoladas do ipê, a mais conhecida é a naftoquinona lapachol (Figura 1.8), presente em abundância na casca e no caule principalmente do ipê roxo (*Handroanthus heptaphyllus* e *Tabebuia avellanae*). O lapachol é conhecido por possuir atividade anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica, sendo amplamente estudado no Brasil quanto a suas propriedades, principalmente no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) que inclusive o disponibiliza na forma de cápsulas (250 mg) em estudos desenvolvidos em parcerias com várias universidades. Em um dos estudos realizados o LAFEPE foi observado que o

lapachol inibiu o crescimento de tumores primários em ensaios pré-clínicos em camundongos, avançando assim para os ensaios clínicos em pacientes com câncer em 1974, exibindo também capacidade de inibir o crescimento de tumores. Entretanto foi observado o surgimento de efeitos colaterais variados, que resultaram no interrompimento dos estudos.<sup>52-54</sup>

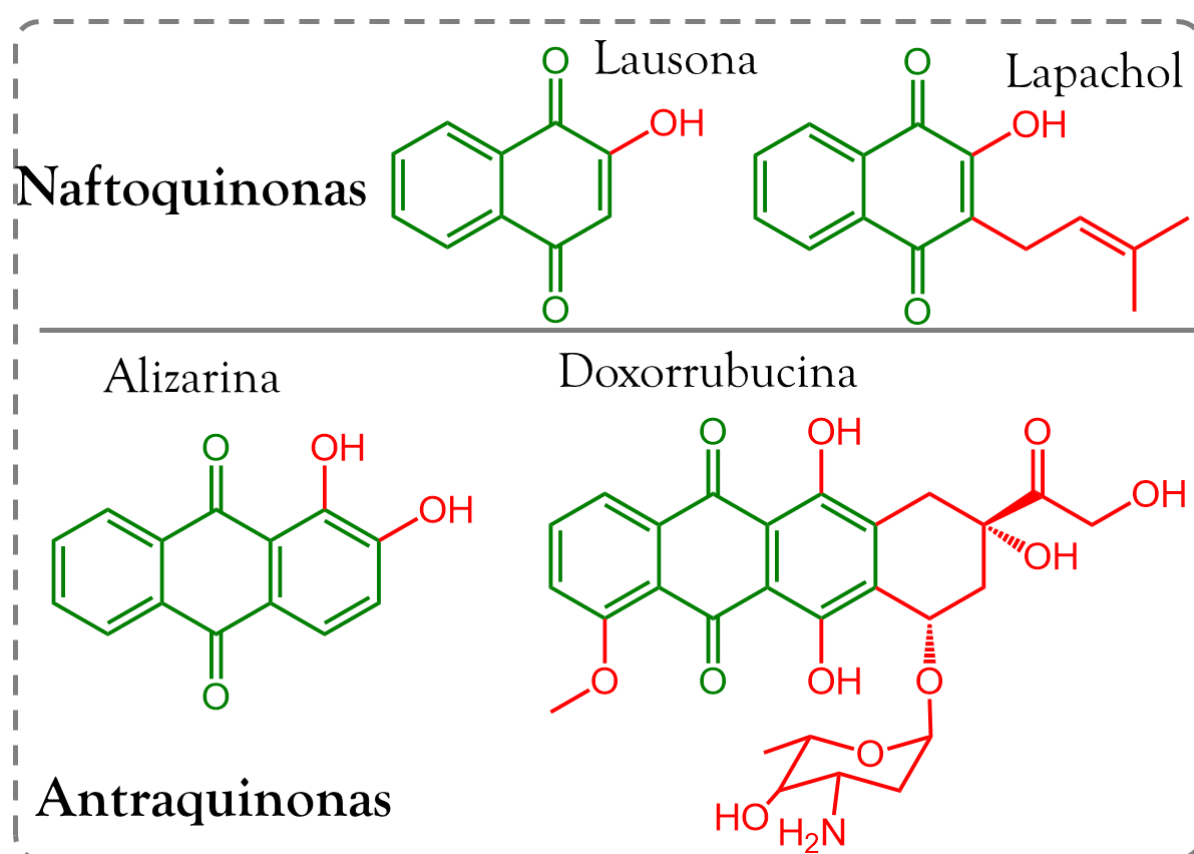


FIGURA 1.8 – Estrutura de algumas moléculas pertencentes as classes das antraquinonas e naftoquinona. Em verde estão representadas as subestruturas básicas de cada classe e em vermelho os substituintes que caracterizam os derivados.

Dentre as propriedades que conferem ao lapachol essas habilidades frente à células tumorais são destacadas as capacidades de induzir o estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo estas capazes de danificar componentes celulares essenciais, levando ao desequilíbrio do ciclo celular e ao desencadeamento dos mecanismos que levam à morte celular por apoptose. Além disso o lapachol também exibe a capacidade de interagir e inativar enzimas do tipo topoisomerases I e II, que são participantes pelo processo de replicação e empacotamento do DNA na divisão celular, onde a inativação

desta enzima também leva à morte por apoptose.<sup>53</sup>

Outra naftoquinona proveniente de plantas é a lausona (Figura 1.8), que possui além da estrutura básica das naftoquinonas uma função álcool adicional (2-hidroxi-1,4-naftoquinona). Ela é o componente mais conhecido das folhas das árvores de Henna (*Lawsonia Inermis*), comumente encontrada em algumas regiões da África, Índia, Sri Lanka e Oriente Médio. As folhas de Henna são empregadas na composição de tintas avermelhadas para tatuagens e pinturas de pele, havendo relatos deste uso desde o Egito antigo, sendo a lausona o principal componente que confere a cor vermelha ao extrato. Além do emprego como corante, a lausona também já foi empregada na medicina popular e estudada por diferentes grupos de pesquisa quanto à sua capacidade antibacteriana e anti-inflamatória.<sup>55-57</sup>

Outra classe de quinonas de ocorrência natural também bastante explorada quanto às suas propriedades são as antraquinonas, principalmente devido à presença de dois anéis aromáticos na estrutura básica desta classe, possibilitando síntese de vários derivados a partir da inserção de substituintes nesses anéis. Uma antraquinona amplamente empregada na indústria de pigmentos é a alizarina (Figura 1.9), substância encontrada abundantemente nas raízes da *Rubia tinctorum*, que tem sido usada para tingir tecidos e na composição de tintas para pinturas em geral, sendo empregada para tal desde 2000 A.C.. Os diferentes tratamentos dados a alizarina, principalmente alterando o pH das soluções em que se encontra, permite a obtenção de vários tons, indo do alaranjado até o vermelho escuro. Alguns trabalhos na literatura empregam a alizarina em estudos biológicos, principalmente devido à intensa fluorescência exibida pela mesma. Além disso a alizarina possui capacidade de se acumular em tecidos ósseos, sendo empregada não somente como um agente fluorescente nestes tecidos como também em ensaios de tratamento de tumores ósseos.<sup>58-60</sup>

Uma das antraquinonas mais conhecidas é a doxorrubicina, uma

antraquinona mais complexa que contém em sua estrutura uma unidade de açúcar e outras funções álcool substituídas. Sua principal aplicação é derivada de sua atividade antineoplásica, agindo eficazmente frente à diferentes tipos de câncer, como o de bexiga, mama, estômago, pulmão, ovário, tireoide, mieloma múltiplo e algumas leucemias. Sua atividade é atribuída em parte à sua capacidade de interagir com o DNA, intercalando entre os pares de base e levando à inativação e consequente inibição de sua replicação (Figura 1.9). O FDA aprovou o uso da doxorubicina no ano de 1974, sendo amplamente empregada até hoje no tratamento do câncer. Um dos limitantes do seu uso são os efeitos colaterais comuns aos quimioterápicos como perda de cabelo, supressão da medula óssea, vômitos e outros.<sup>61-64</sup>

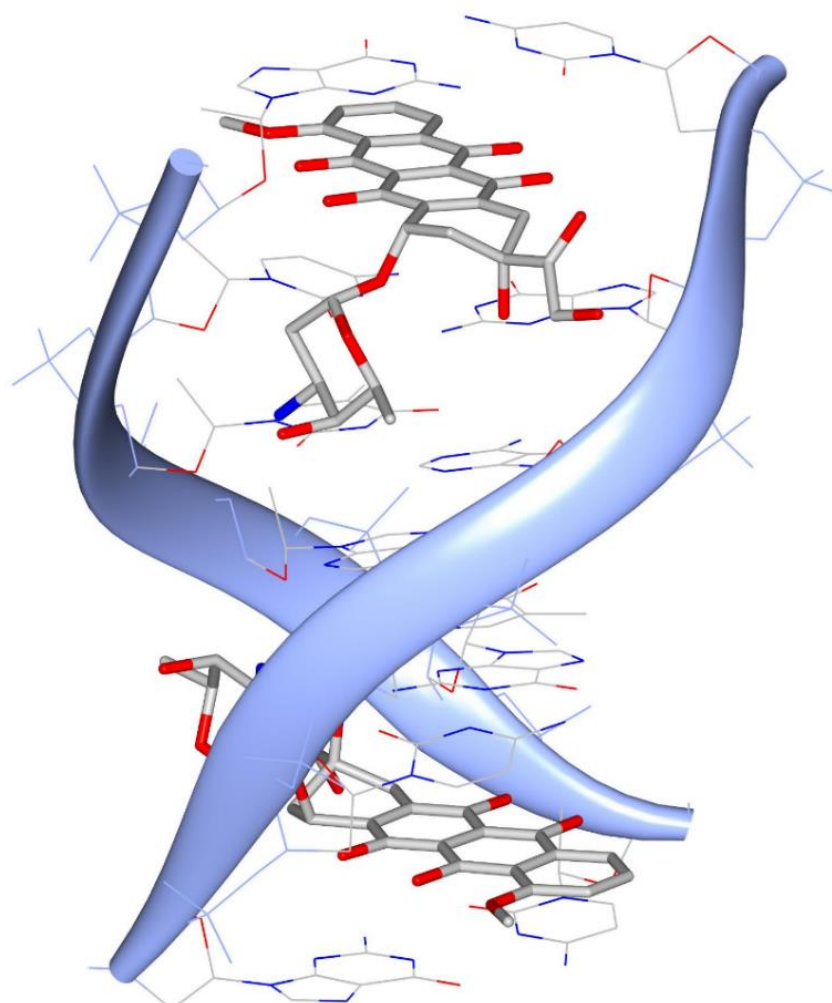


FIGURA 1.9 – Estrutura cristalina de um fragmento de DNA (CGATCG) contendo duas moléculas de doxorubicina intercaladas. (PDB 151d)

## 1.8 - As contribuições do LERCI na química bioinorgânica.

O Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) tem dedicado os últimos 15 anos a compreensão das propriedades químicas e biológicas de complexos de coordenação com variados centros metálicos. Algumas centenas de compostos inéditos são fruto do trabalho do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e seus alunos, principalmente na última década onde um dos objetivos principais tem sido a compreensão de como esses complexos agem em sistemas vivos, procurando novos metalofármacos para o tratamento de diversas doenças como: câncer,<sup>65-74</sup> tuberculose,<sup>75-84</sup> malária,<sup>85,86</sup> leishmaniose<sup>87,88</sup> e mais recentemente buscando compostos com atividade antiviral. A química dos complexos organometálicos também é uma das áreas exploradas pelo LERCI, havendo já reportado na literatura complexos do tipo Ru<sup>II</sup>/*p*-cimeno contendo ligantes como bipyridinas,<sup>66</sup> fosfinas,<sup>89</sup> aciltiouréias,<sup>74,90,91</sup> cloroquina,<sup>66,85</sup> e azóis (cetoconazol, clotrimazol, fluconazol e itraconazol)<sup>75,92</sup>, explorando em sua grande parte as atividades antitumorais e antiparasitárias desses compostos.

O principal foco dos complexos sintetizados pelo LERCI é a atividade antitumoral, onde inicialmente se realiza um desenho racional das estruturas a serem sintetizadas afim de se conhecer a performance desses complexos não somente quanto a atividade antitumoral mas também quanto aos mecanismos envolvidos que levam a toxicidade exibida, estudando os mecanismos de morte celular, as alterações causadas no ciclo de divisão celular e também na capacidade desses complexos interagirem com biomoléculas atuantes nesses mecanismos, como o DNA e outras proteínas (albumina de soro humano (HSA), topoisomerasas, proteassomas e outros). Um destaque recente dentre os resultados obtidos pelo LERCI foi o índice de seletividade exibido por um complexo de paládio/trifenilfosfina/aciltiouréia que exibiu grande seletividade

frente as células tumorais de mama (MDB-MB-231) em relação a não tumoral de camundongo (V79), sendo 322 vezes mais ativo para a linhagem tumoral de mama.<sup>93</sup>

Dentre as centenas de compostos de diversas classes estruturais, o LERCI também tem buscado associar a versatilidade dos complexos de rutênio com as propriedades exibidas por moléculas provenientes de produtos naturais. Vários trabalhos do grupo tem se dedicado a síntese e caracterização de complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos, bipyridínicos, e as naftoquinonas lapachol e lausona em suas estruturas.<sup>65,87,94,95</sup> A Figura 1.10 mostra as estruturas e fórmulas gerais exibidas pelos complexos contendo naftoquinonas já estudados pelo grupo.

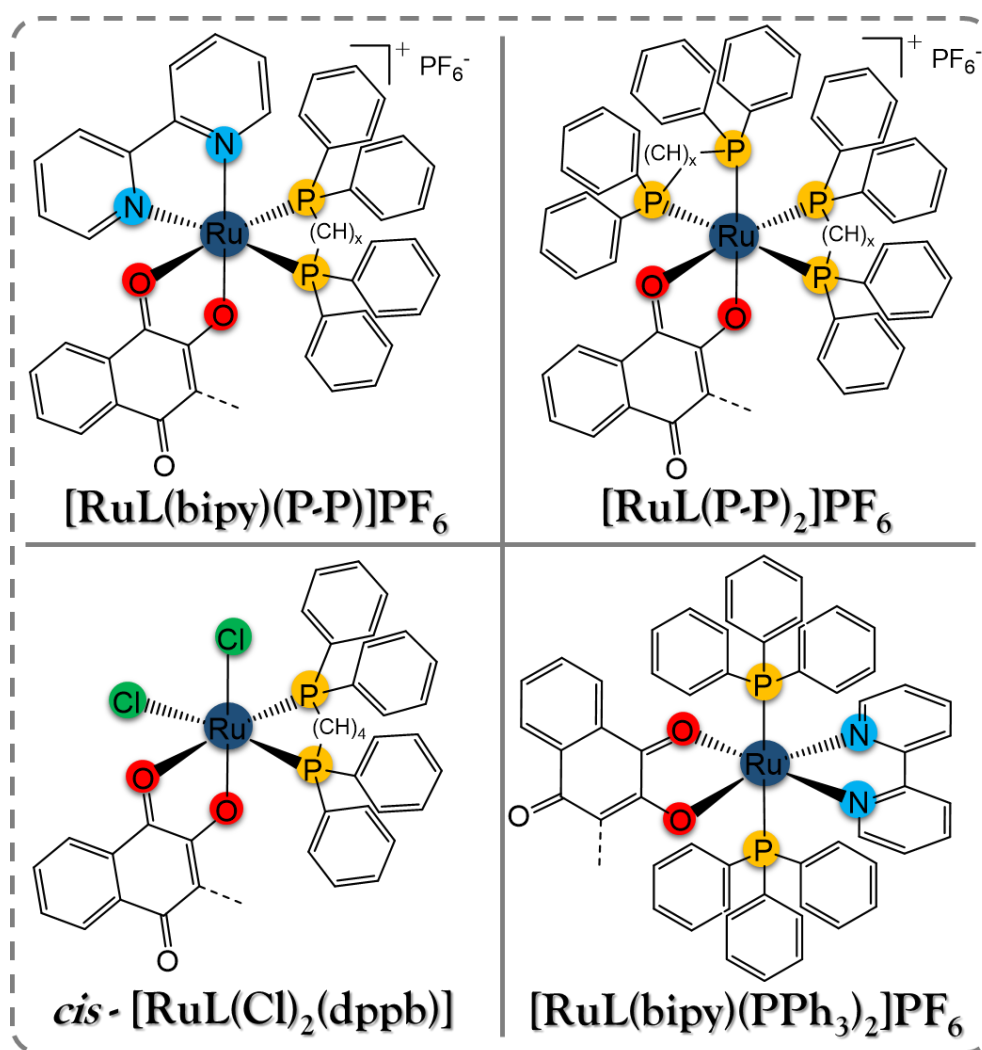


FIGURA 1.10 – Estrutura dos complexos contendo os ligantes lapachol e lausona sintetizados pelo LERCI., onde L = lapachol ou lausona.



Os complexos de fórmula geral  $[\text{RuL}(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{Cl})_2\text{L}(\text{dppb})]$  foram avaliados quanto a atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*, onde os complexos foram consideravelmente mais ativos frente aos parasitas do que os respectivos ligantes livres, havendo um destaque com complexo  $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{Lap})(\text{dppb})]$  (Lap = lapachol) que dentre todos foi o composto antiparasitário mais potente e seletivo, exibindo atividade comparável aos medicamentos de referência no tratamento destas doenças.<sup>87</sup>

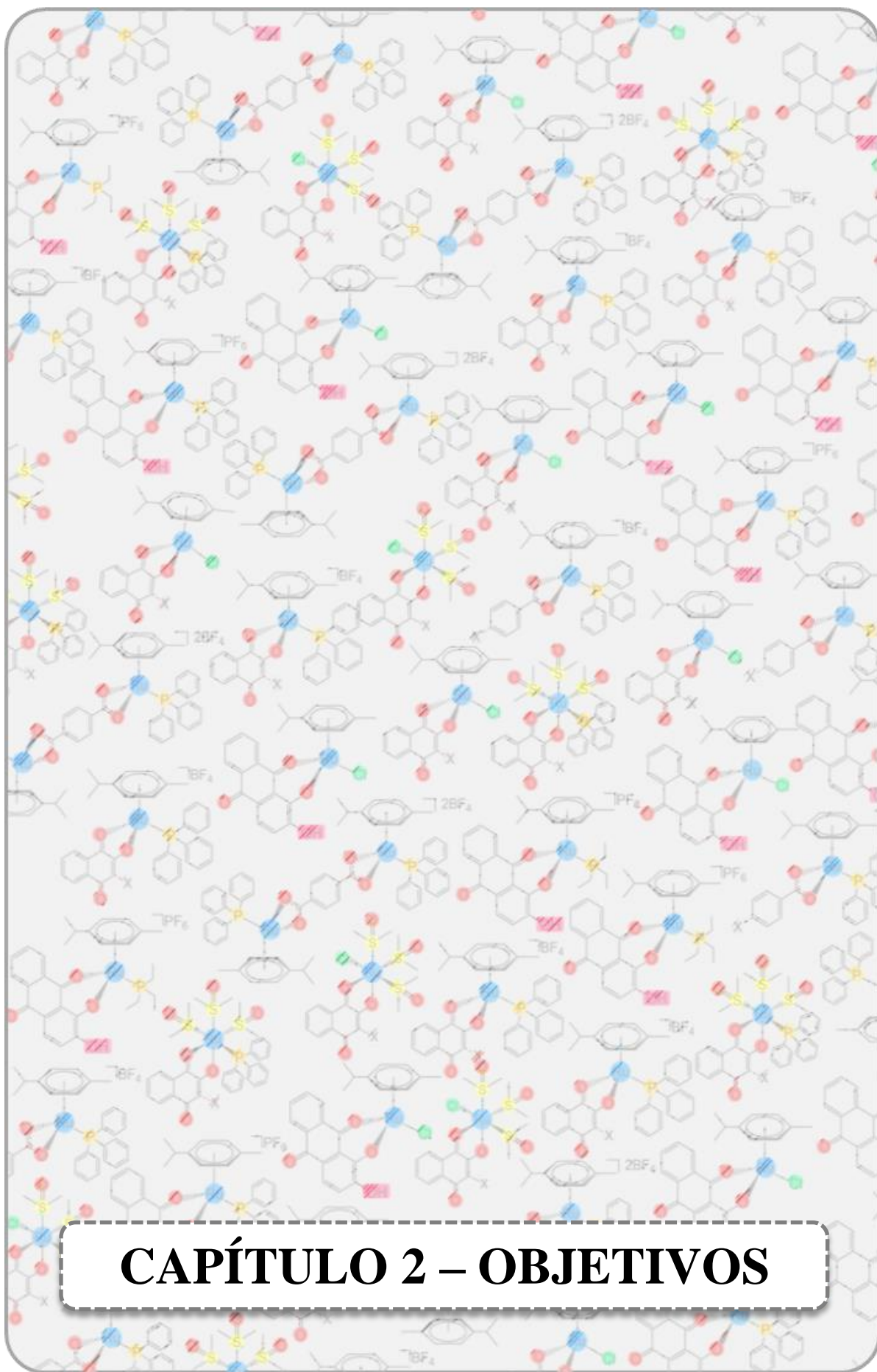
Os complexos do tipo  $[\text{RuL}(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$  e  $[\text{RuL}(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$  (Figura 1.10) também foram avaliados quanto a atividade antitumoral frente à algumas linhagens celulares. Na Tabela 1.1 destacamos os valores de citotoxicidade encontrados para a linhagem de tumoral de mama MDA-MB-231 e sua correspondente não tumoral MCF-10A. Destaque foram os complexos contendo o lapachol como ligante, sendo eles mais seletivos do que os similares com lausona. Todos os complexos foram mais ativos nas linhagens tumorais que a cisplatina, exibindo atividade no mínimo quinze vezes maior, além de apresentarem seletividade similar ou maior que a cisplatina na maioria dos casos. Uma característica marcante foi a capacidade do complexo  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  de alterar o potencial de membrana mitocondrial e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) em células MDA-MB-231 levando à morte celular por apoptose.

TABELA 1.1 – Valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade (IS) encontrados para os complexos do tipo Ru/bifosfina/naftoquinona frente as linhagens tumoral (MDA-MB-231) e não tumoral (MCF-10A) de mama humana.

	MDA-MB-231	MCF-10A	IS
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$	(0,09 ± 0,02)	(0,55 ± 0,07)	6,1
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$	(0,13 ± 0,01)	(2,70 ± 0,50)	20,8
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,11 ± 0,04)	(0,72 ± 0,01)	6,5
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,15 ± 0,03)	(2,76 ± 0,30)	18,4
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,06 ± 0,01)	(0,58 ± 0,02)	9,7
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,07 ± 0,03)	(0,77 ± 0,03)	11,0
Cisplatina	(2,43 ± 0,20)	(29,45 ± 0,85)	12,1
Lausona	> 100	> 100	-
Lapachol	> 100	> 100	-

Estudos ainda não publicados pelo grupo mostraram a eficiência desses complexos em inibir o crescimento de tumores primário em camundongos, exibindo atividade similar ao cisplatina, sem causar efeitos colaterais observados para o fármaco de platina, exibindo ausência de nefrotoxicidade e mantendo a massa corporal do animal. Estes compostos encontram-se patenteados no Brasil sobre o título “Processo de Obtenção de Compostos de Rutênio, Compostos de Rutênio Obtidos e seu uso” (BR 10 2016 016535 0 A2). Assim os resultados anteriormente obtidos e a necessidade de novos fármacos para o tratamento do câncer nos estimulam a continuar o estudo destes sistemas para melhor compreensão da atividade de tais complexos e possível obtenção de novos metalofármacos.





**CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS**

## 2.1 - Objetivo geral

Com o propósito de obter compostos inéditos com potencial citotóxico frente às células tumorais, o presente trabalho objetivou o estudo das propriedades estruturais e biológicas de novos complexos metálicos carregados e neutros do tipo Ru<sup>II</sup>/areno, contendo ligantes monofosfínicos e derivados/similares de produtos naturais.

## 2.2 - Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral descrito anteriormente foram executados os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar dezenove novos complexos de Ru<sup>II</sup> contendo os ligantes derivados de produtos naturais que se coordenam no modo bidentado pelos oxigênios, sendo ele agrupados em três Séries:

- ❖ Série A, complexos de fórmula geral  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  sendo  $\text{L}_x$  os ligantes derivados de ácido benzoico *p*-substituídos (**A1-A4**);

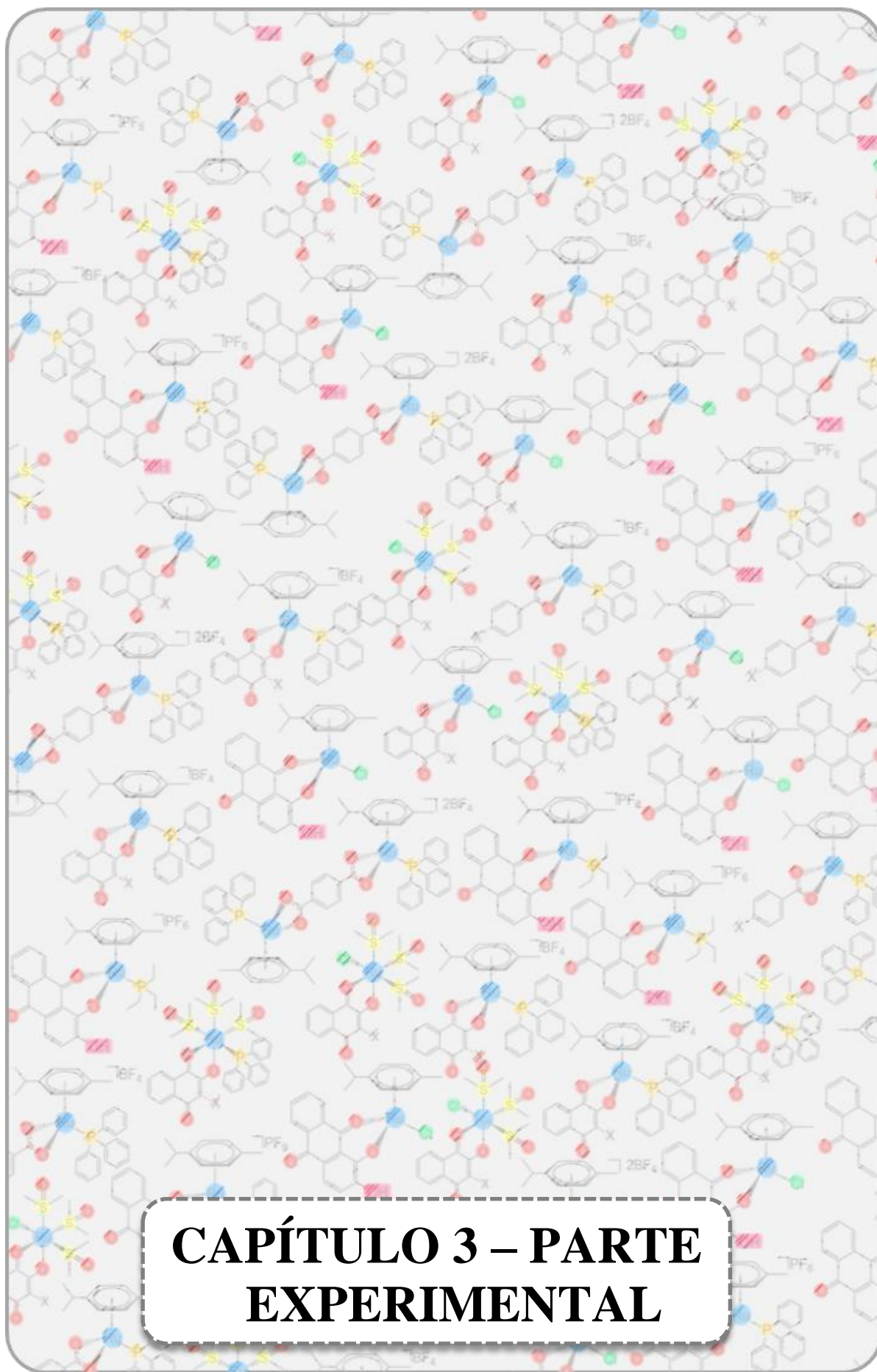
- ❖ Série B, complexos de fórmula geral  $[\text{Ru}(\text{Cl})\text{L}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]$ ,  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ , *fac*- $[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_3]$  e *cis*- $[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_2(\text{PPh}_3)]$  (**B1-B12**) sendo  $\text{L}_x$  os ligantes naftoquinônicos;

- ❖ Série C, complexos de fórmula geral  $[\text{RuLCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]$  (**C1**),  $[\text{RuL}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (**C2**) e  $[\text{RuL}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PEt}_3)]\text{PF}_6$  (**C3**), onde L é o ligante antraquinônico alizarina;

- Caracterizar os complexos empregando técnicas espectroscópicas 1D e 2D RMN, análise elementar, condutividade molar, espectrometria de massas e difração de raios X de monocristal (quando possível a obtenção dos mesmos);

- Estudar a estabilidade estrutural dos complexos nos solventes utilizados como veículos e meios de cultura nos testes envolvendo experimentos biológicos;
- Determinar a citotoxicidade dos complexos frente a linhagens humanas tumorais e não tumorais de pulmão, próstata e mama;
- Avaliar as células tratadas com os complexos quanto a morfologia celular, capacidade de migração, sobrevivência clonogênica e impacto no ciclo celular;
- Avaliar a capacidade dos complexos de acumularem nas células (Série A)
- Realizar testes de interação dos complexos com DNA (calf thymus e plasmídeo pBR322), isto empregando os complexos que foram estáveis nos veículos empregados (Série B e C).





**CAPÍTULO 3 – PARTE  
EXPERIMENTAL**



Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados, as sínteses e caracterizações dos compostos organometálicos de Ru<sup>II</sup>/areno com ligantes derivados de produtos naturais, bem como a descrição de procedimentos referente aos estudos da atividade biológica dos complexos.

### **3.1 - Materiais**

#### **3.1.1 - Obtenção da atmosfera de Argônio**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob atmosfera de Argônio, de procedência White Martins, para garantir atmosfera inerte. O gás é conduzido por uma coluna com sílica gel e posteriormente para uma coluna com catalisador BTS-R-3-11 (Fluka Chemika), aquecida a 60°C para eliminação de oxigênio.

#### **3.1.2 - Solventes**

Os solventes orgânicos utilizados neste trabalho foram submetidos à purificação prévia, segundo os métodos usuais. Os solventes deuterados foram utilizados como fornecidos pela Sigma-Aldrich.

#### **3.1.3 - Reagentes químicos em geral**

O sal base RuCl<sub>3</sub>.xH<sub>2</sub>O, os ligantes  $\alpha$ -felandreno, trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>), trietilfosfina (PEt<sub>3</sub>), ácido benzoico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-nitrobenzoico, ácido tereftálico, lausona, alizarina, hexafluorofosfato de potássio (KPF<sub>6</sub>) e tetrafluoroborato de prata (AgBF<sub>4</sub>) são de procedência Sigma-Aldrich. O lapachol foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Diogo Moreira do Instituto Gonzalo Muniz em Salvador (IGM-FIOCRUZ) e o ligante 3-estiril-lausona foi sintetizado pelo grupo do Prof. Dr. Chaquip Daher Netto (UFRJ - Macaé).

### **3.2 - Sínteses dos complexos**

#### **3.2.1 - Síntese dos precursores**

##### **3.2.1.1 - Síntese do complexo [ $\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2$ ]**

Dissolveu-se 1,00 g (3,5 mmol) de RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O em 80 mL de metanol desaerado e adicionou-se 5 mL de  $\alpha$ -felandreno (35 mmol). A solução

resultante foi refluxada por 4 h, mediante constante agitação. A solução foi concentrada, sob pressão reduzida, até a precipitação do sólido vermelho escuro. A mistura foi resfriada e o sólido foi filtrado, lavado com etanol ( $3 \times 5$  mL), éter dietílico ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### 3.2.1.2 - Síntese do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)]$

Solubilizou-se 1,00 g (1,63 mmol) de  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  em 80 mL de metanol desaerado e adicionou-se 0,94 g de trifenilfosfina (3,59 mmol). A mistura foi refluxada, sob agitação, durante 4 h. A solução foi concentrada, sob pressão reduzida, e o sólido vermelho filtrado. O produto foi lavado com etanol ( $3 \times 5$  mL), éter dietílico ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### 3.2.1.3 - Síntese do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PEt}_3)]$

Solubilizou-se 1,00 g (1,63 mmol) de  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  em 80 mL de metanol desaerado e adicionou-se 0,43 g de trietilfosfina (3,59 mmol). A mistura foi refluxada, sob agitação, durante 4 h. A solução foi concentrada, sob pressão reduzida, e o sólido vermelho filtrado. O produto foi lavado com etanol ( $3 \times 5$  mL), éter dietílico ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### 3.2.1.4 - Síntese do complexo *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{O-DMSO})]$

Dissolveu-se 1,00 g (3,5 mmol) de  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 80 mL de etanol previamente desaerado, após 30 minutos em refluxo evaporou-se o solvente e adicionou-se 40 mL de DMSO desaerado. Após 30 minutos de refluxo pó amarelo resultante foi filtrado e lavado com éter dietílico ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### 3.2.1.5 - Síntese do complexo *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{PPh}_3)]$

Dissolveu-se 1,00 g (1,04 mmol) do complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$  em DMSO previamente desaerado, após 1 hora de refluxo o pó amarelo pálido resultante foi filtrado e lavado com éter dietílico ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

## 3.2.2 - Síntese dos complexos da Série A

### 3.2.2.1 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{BF}_4$ (A1-A3)

Em um schlenk contendo 50 mL de acetona previamente desaerada foram dissolvidos 100 mg (0,17 mmol) do precursor  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(\text{PPh}_3)(\text{Cl})_2]$ , 0,17 mmol do ligante ácido benzoico *p*-substituído ( $\text{L}_x$ ) e 75,9 mg (0,39 mmol) de  $\text{AgBF}_4$ . A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, a solução foi filtrada em um funil contendo celite, isto para a remoção de um precipitado branco formado ( $\text{AgCl}$ ). A solução obtida foi seca, solubilizada em aproximadamente 3 mL de metanol e a precipitação foi realizada com a adição de água. O precipitado amarelo formado foi separado por filtração e lavado com água ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### **3.2.2.2 - Síntese do complexo de fórmula geral $[\text{Ru}_2(\mu^2\text{-L})(\eta^6\text{-p-cymene})_2(\text{PPh}_3)_2](\text{BF}_4)_2$ (A4)**

Em um Schlenk contendo 50 mL de acetona previamente deaerada foram dissolvidos 100 mg (0,17 mmol) do precursor  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(\text{PPh}_3)(\text{Cl})_2]$ , 0,085 mmol do ácido tereftálico (L) e 75,9 mg (0,39 mmol) de  $\text{AgBF}_4$ . A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, a solução foi filtrada em um funil contendo celite, isto para a remoção de um precipitado amarelo formado. O filtro foi lavado logo após com diclorometano para a solubilização do pó amarelo. A solução obtida foi seca, solubilizada em aproximadamente 3 mL de metanol e a precipitação foi realizada com a adição de água. O precipitado amarelo formado foi separado por filtração e lavado com água ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### **3.2.3 - Síntese dos complexos da Série B**

#### **3.2.3.1 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuClL}_x(\eta^6\text{-p-cimeno})]$ (B1-B3)**

Em um Schlenk contendo 50 mL de metanol previamente desaerado foram dissolvidos 0,08 mmol do ligante naftoquinonico ( $\text{L}_x$ ) e 3,3 mg de NaOH

(0,08 mmol), após 20 minutos de agitação a temperatura ambiente, 50,0 mg (0,08 mmol) do precursor  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  foi adicionado. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 2 h. O precipitado preto formado foi filtrado e lavado com metanol gelado ( $3 \times 5$  mL) e água ( $3 \times 5$  mL).

### **3.2.3.2 - Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (B4-B6)**

Em um Schlenk contendo 25 mL de acetona previamente deaerada foram dissolvidos 50 mg (0,09 mmol) do precursor  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ , 0,09 mmol do ligante naftoquinonico ( $\text{L}_x$ ) e 38,9 mg (0,20 mmol) de  $\text{AgBF}_4$ . A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, a solução foi filtrada em um funil contendo celite, isto para a remoção de um precipitado branco formado ( $\text{AgCl}$ ). A solução obtida foi seca, solubilizada em aproximadamente 3 mL de metanol, adicionado 36,8 mg de  $\text{KPF}_6$  (0,20 mmol) e a precipitação foi realizada com a adição de água. O precipitado vermelho escuro formado foi separado por filtração, lavado com água ( $3 \times 15$  ml) e seco sob vácuo.

### **3.2.3.3 - Síntese dos complexos de fórmula geral *fac*- $[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_3]$ (B7-B9)**

Em um schlenk contendo 50 mL de metanol previamente desaerado foram dissolvidos 0,10 mmol do ligante naftoquinonico ( $\text{L}_x$ ) e 4,1 mg de  $\text{NaOH}$  (0,10 mmol), após 20 minutos de agitação a temperatura ambiente 50,0 mg (0,10 mmol) do precursor *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{O-DMSO})]$  foi adicionado. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 2 hrs. O precipitado negro formado foi filtrado, lavado com metanol gelado ( $3 \times 5$  mL), água ( $3 \times 5$  mL) e seco sob vácuo.

### **3.2.3.4 - Síntese dos complexos de fórmula geral *cis*- $[\text{RuClL}_x(\text{S-}$**

## **DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (B10-B12)**

Em um schlenk contendo 25 mL de acetona previamente deaerada foram dissolvidos 50 mg (0,07 mmol) do precursor *fac*-[RuCl<sub>2</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>)], 0,07 mmol do ligante naftoquinonico (L<sub>x</sub>) e 33,5 mg (0,17 mmol) de AgBF<sub>4</sub>. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, a solução foi filtrada em um funil contendo celite, isto para a remoção de um precipitado branco formado (AgCl). A solução obtida foi seca, solubilizada em aproximadamente 3 mL de metanol, adicionado 31,6 mg de KPF<sub>6</sub> (0,17 mmol) e a precipitação foi realizada com a adição de água. O precipitado vermelho escuro formado foi separado por filtração, lavado com água e seco sob vácuo.

### **3.2.4 - Síntese dos complexos da Série C**

#### **3.2.4.1 - Síntese dos complexos de fórmula geral [RuClL(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)] (C1)**

Em um schlenk contendo 50 mL de metanol previamente desaerado foram dissolvidos 21,1 mg de alizarina (0,09 mmol) e 3,5 mg de NaOH (0,09 mmol), após 20 minutos de agitação a temperatura ambiente, 50,0 mg (0,09 mmol) do precursor [RuCl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)] foi adicionado. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 2 hrs. O precipitado negro formado foi filtrado e lavado com metanol gelado (3 × 5 mL), água (3 × 5 mL) e seco sob vácuo.

#### **3.2.4.2 - Síntese dos complexos de fórmula geral [RuL(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (C2)**

Em um schlenk contendo 25 mL de acetona previamente deaerada foram dissolvidos 50 mg (0,09 mmol) do precursor [RuCl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)], 21,1 mg (0,09 mmol) da alizarina (L<sub>x</sub>) e 38,9 mg (0,20 mmol) de AgBF<sub>4</sub>. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas.

Após este período, a solução foi filtrada em um funil contendo celite, isto para a remoção de um precipitado branco formado (AgCl). A solução obtida foi seca, solubilizada em aproximadamente 3 mL de metanol, adicionado 36,8 mg de KPF<sub>6</sub> (0,20 mmol) e a precipitação foi realizada com a adição de água. O precipitado vermelho escuro formado foi separado por filtração, lavado com água e seco sob vácuo.

### **3.2.4.3 - Síntese dos complexos de fórmula geral [Ru( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(PEt<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (C3)**

Em um schlenk contendo 25 mL de acetona previamente deaerada foram dissolvidos 50 mg (0,12 mmol) do precursor [RuCl<sub>2</sub>( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(PEt<sub>3</sub>)], 28,3 mg (0,12 mmol) da alizarina (L<sub>x</sub>) e 52,7 mg (0,27 mmol) de AgBF<sub>4</sub>. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, a solução foi filtrada em um funil contendo celite, isto para a remoção de um precipitado branco formado (AgCl). A solução obtida foi seca, solubilizada em aproximadamente 3 mL de metanol, adicionado 36,8 mg de KPF<sub>6</sub> (0,20 mmol) e a precipitação foi realizada com a adição de água. O precipitado vermelho escuro formado foi separado por filtração e lavado com água e seco a vácuo.

## **3.3 - Instrumentação**

### **3.3.1 - Condutividade Molar**

As medidas de condutância foram feitas utilizando um aparelho Meter Lab., modelo CDM230. As medidas foram realizadas mediante soluções dos complexos em acetona na concentração de 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>.

### **3.3.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho**

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Bomem Michelson FT MB-102,

na região compreendida entre 4000 e 240  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras sólidas foram diluídas com KBr (mantido em estufa a 120°C) e preparadas minutos antes das análises.

### 3.3.3 - Análise elementar (C, H, N e S)

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos complexos foram determinados em um analisador CHN modelo EA 1108 da FISIONS, no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

### 3.3.4 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (100 MHz) e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (162 MHz) foram registrados a partir de análises realizadas no equipamento BRUKER 9.4 T, modelo AVANCE III, no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Utilizou-se solvente deuterado (acetona) para as medidas relacionadas aos experimentos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , COSY, HSQC e HMBC, enquanto que para os experimentos de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  usou-se capilar  $\text{D}_2\text{O}$  (referência externa).

### 3.3.5 - Difração de raios X

As coletas de difração de raio X foram realizadas em um difratômetro Rigaku XtaLAB mini II, radiação  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ), no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, na Universidade de São Paulo. As estruturas foram resolvidas com o programa SHELXT<sup>96</sup> usando métodos diretos, sucessivos mapas de Diferença de Fourier permitiram a localização dos átomos não hidrogênios. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL.<sup>97</sup> Os cálculos dos parâmetros da célula unitária e as correções por absorção foram realizados usando o software CrysAlisPro. As representações das moléculas e tabelas de dados cristalográficos foram geradas utilizando os programas OLEX<sup>2</sup> e MERCURY.<sup>98,99</sup>

Detalhes específicos sobre coleta de dados e os parâmetros para cada complexo são fornecidos no Apêndice.

### **3.3.6 - Cálculos teóricos**

A otimização estrutural dos complexos **B1-B12**, bem como dos seus respectivos ligantes, foi calculada pelos métodos de estrutura eletrônica assim como a carga natural atômica de todos os átomos (NBO). Nas otimizações realizadas foram empregados DFT/SVWN5 com funções de base 6-31G+(d,p) para C, H, N, O e P, enquanto para o centro metálico foi usado LANL2DZ com pseudo potencial (ECP). Os arquivos de input foram gerados a partir das coordenadas cristalográficas para otimização, exceto para os complexos **B2**, **B4** e **B5** (sem coordenadas cristalográficas), empregando o pacote de programas Gaussian 09.<sup>100</sup>

### **3.3.7 - Espectrometria de massas (MALDI-TOF)**

Para a aquisição dos dados de espectrometria de massas 1 mg dos complexos foram solubilizados em 100 µL de metanol contendo 0,5 mM do ácido 2,3-diidróxibenzoico. As amostras foram particionadas em 3 sobre o suporte de análise e após a secagem do metanol (temperatura ambiente) os dados foram adquiridos em um espectrômetro de massas Autoflex (Bruker daltonics) controlado pelo programa FlexControl 3.3.

## **3.4 - Obtenção dos Dados Biológicos**

Os testes envolvendo o cultivo de linhagens celulares foram realizados pelas alunas do LERCI: MSc. Celisnolia Leite, Dr<sup>a</sup>. Kátia Mara de Oliveira, Dr<sup>a</sup>. Legna Colina-Vegas e Dr<sup>a</sup>. Adriana Mundim. Alguns ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar, coordenado pela Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cominetti.

### **3.4.1 - Teste de estabilidade dos complexos em solução**



A estabilidade dos complexos foi avaliada em solventes utilizados para os testes biológicos, sendo acetona na Série A e DMSO nas Séries B e C. Duas soluções foram avaliadas, uma com o composto em DMSO ou acetona e a outra o composto em uma mistura de solvente contendo DMSO/meio de cultura (2:1). Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  e  $^1\text{H}$  foram registrados em tempos variados distribuídos entre 0 e 48 h.

### 3.4.2 - Linhagens e Cultura Celular

As linhagens de células tumorais humanas, de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC N. HTB-26), pulmão A549 (ATCC N. CCL-185) e não tumoral humana de pulmão MRC-5 (ATCC N. CCL-171), foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo penicilina ( $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), estreptomicina ( $100 \text{mg}.\text{mL}^{-1}$ ), L-glutamina (2 mM) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As linhagens de células tumorais humanas, de mama MCF-7 (ATCC N. HTB-22), próstata DU-145 (ATCC N. HTB-81), e não tumoral de próstata PNT2 (Sigma N. 95012613) foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% de SFB e antibióticos. A célula não tumoral de mama humano da linhagem MCF-10A (ATCC No. CRL-10317), foi cultivada em meio DMEM/F12, suplementado com 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidermal humano (EGF) ( $20 \text{ng}.\text{mL}^{-1}$ ), hidrocortisona ( $0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), insulina ( $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e 1% de penicilina/estreptomicina. As linhagens celulares foram mantidas em cultura a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  em estufa umidificada, para serem utilizadas em ensaios ou cultivadas em garrafas de cultura.

### 3.4.3 - Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT)

Para avaliar o efeito citotóxico dos complexos frente às linhagens celulares tumorais e não tumoral utilizou-se o método colorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método foi descrito por Mosman<sup>103</sup>, que consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Para o teste,  $1,0 \times 10^5$  células do TAE (célula em suspensão) e  $1,0-1,5 \times 10^4$  das demais células (células aderentes) foram semeadas em microplacas de 96 poços. Após 24 h, para as linhagens aderentes, as células foram tratadas em oito concentrações diferentes dos complexos de rutênio dissolvidos em DMSO (1% (v/v) na solução de tratamento), e como fármaco de referência utilizou-se a cisplatina dissolvida em dimetilformamida (DMF, 1% (v/v) na solução de tratamento). No controle negativo, as células foram tratadas somente com DMSO 1% (v/v). Após o tratamento, as células foram deixadas em estufa, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h (linhagem MDA-MB-231) e 48 h (todas as linhagens celulares). Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços da placa, 50 µL de MTT na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup>, e após 3 h de incubação com MTT, foram acrescentados 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% diluído em HCl/0,01N ou somente com álcool isopropílico para dissolver os cristais azul de formazan. A absorbância da densidade óptica da solução foi medida em 545 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology). O valor de IC<sub>50</sub> (concentração (µM) que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 para Windows.<sup>101,102</sup>

### 3.4.4 - Análise do ciclo celular

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, que quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo. Para análise do ciclo celular,  $3 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 12 poços, após 24 h de incubação as células foram tratadas com os complexos nas concentrações de  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, no controle negativo não foi colocado complexo. Após exposição das células aos complexos, por 48 h, estas foram removidas da placa, centrifugadas e na sequência lavadas com PBS. Ao final da lavagem o sobrenadante foi desprezado, e o “pellet” celular

foi incubado com 2 mL de álcool etílico gelado (70%) por 24 h, a -20 °C. Ao final da incubação as células foram lavadas novamente com PBS e em seguida incubadas por 15 min em uma solução contendo ribonuclease A (RNase A) 0,05% e iodeto de propídio (50 µg.mL<sup>-1</sup>). A análise da porcentagem de células em fase subG<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), através do software ModFit.<sup>101,102</sup>

### 3.4.5 - Morfologia Celular

Afim de avaliar a morfologia das células MDA-MB-231 quando expostas aos complexos, foram semeadas 1×10<sup>5</sup> células/poço em placas de 6 poços e mantidas na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com as concentrações de ½ IC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> dos complexos. Com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam – 1.3 Megapixels) as imagens das células foram capturadas nos períodos de 0, 24 e 48 h. As alterações morfológicas e proliferativas das células foram analisadas a partir das imagens obtidas.<sup>101,102</sup>

### 3.4.6 - Ensaio de Migração Celular “Wound Healing”

O ensaio de *wound healing* é muito utilizado para estudar as características do processo migratório das células e avaliar os compostos capazes de inibir a migração celular. As células MDA-MB-231 (2,0×10<sup>5</sup>) foram cultivadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até a cultura atingir uma confluência de 90-100%. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira, de volume máximo 200 µL, e uma régua, foi feita uma risca no centro de cada poço. Cuidadosamente, os poços foram lavados com PBS para remoção de fragmentos celulares e células desaderidas da área riscada. As células foram tratadas com os complexos na concentração de ½ IC<sub>50</sub>, exceto os controles que receberam apenas meio cultura. Após tratamento, imagens da risca de cada poço, foram capturadas em dois campos diferentes, nos tempos 0 (após tratamento), 24 e 48 h, utilizando um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS

100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000-1.3 *Megapixels Live Resolution*). A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software ImageJ*, e a porcentagem de fechamento da risca foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ Fechamento da risca} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / (A_{t=0h})] \times 100$$

onde,  $A_{t=0h}$ : medida da área riscada no tempo de 0 h e  $A_{t=\Delta h}$ : medida da área riscada no tempo de 24 e 48 h.<sup>101,102</sup>

### 3.4.7 - Ensaio de sobrevivência clonogênica

Para avaliar a capacidade dos complexos de inibir a formação de colônias e/ou diminuir o tamanho delas,  $4 \times 10^2$  das células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24 h, as células foram tratadas (exceto os controles) com diferentes concentrações dos complexos, em seguida foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 48 h. Após o período de tratamento, o meio foi removido, as células lavadas cuidadosamente com PBS e posteriormente adicionado o meio de cultura com 10% de FBS. As células foram novamente incubadas na mesma condição por 10 dias. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1 v/v) durante cinco minutos e em seguida, coradas com o corante panótico. O número de colônias e seu tamanho foram medidos utilizando o *plugin Colony Area* para o programa Image J.

### 3.4.8 - Cultivo celular para os ensaios de acúmulo do complexo

Um dia antes do tratamento com o complexo,  $1,5 \times 10^6$  células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas em um frasco Corning Costar 125 cm<sup>2</sup>. O meio foi substituído por um novo contendo 5 μM do complexo A1 e incubado com as células por 24 h a 37 °C. Um frasco contendo o meio com o complexo, sem células, foi usado como controle. No final do período de incubação, o meio foi transferido para um tubo, centrifugado (1200 rpm, 5 min) para remoção das

células flutuantes, e o sobrenadante foi coletado para posterior análise. As células foram lavadas duas vezes com 10 mL de água ultrapura gelada, tripsinizadas com 4,0 mL de solução de tripsina-EDTA por 2 min e 6 mL de meio de cultura foram adicionados. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para um tubo, centrifugada (1200 rpm, 5 min, 2 °C), e a solução sobrenadante foi cuidadosamente removida com uma pipeta. Finalmente, as células foram lavadas com 2 mL de água ultrapura resfriada, peletizadas e armazenadas a -20 °C para análise posterior.<sup>103</sup>

### 3.4.9 - Medidas de ICP-MS das células cultivadas

Estes Ensaios foram realizados pela Dr<sup>a</sup>. Legna Colina-Vegas, sobre a supervisão do Prof. Dr. Joaquim Nóbrega do DQ UFSCar. HNO<sub>3</sub> (14 M) para análise de traços de metal foi previamente purificado por destilação em um aparelho Distillacid™ BSB-939-IR. (Berghof, Eningen, Alemanha). Solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH, Sigma) 25% foi usada como recebida. Todas as determinações de conteúdo de metal foram conduzidas monitorando o sinal <sup>102</sup>Ru em um ICP-MS Agilent 7800 equipado com um nebulizador concêntrico e uma câmara de pulverização de passagem dupla Scott. Uma solução padrão de Ru foi usada para calibrações do ICP-MS, ela foi preparada diluindo 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Ru (Qhemis, São Paulo, SP, Brasil) em meio HNO<sub>3</sub> 0,14 mol.L<sup>-1</sup>. As soluções analíticas para calibração continham de 0,010 a 200 µg.L<sup>-1</sup> de cada analito e os padrões internos foram adicionados a 10,0 µg.L<sup>-1</sup> às soluções analíticas de calibração, brancos analíticos e amostras. Os pellets celulares foram digeridos com 200 µL de TMAH e acidificados com 200 µL de HNO<sub>3</sub>. Posteriormente, as digestões foram diluídas com água para 5% v v<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. O meio de cultura foi digerido usando 1 mL do meio inicial ou final e 250 µL de HNO<sub>3</sub> diretamente nos vasos de digestão de perfluoroalcoxi (PFA) e digerido por micro-ondas usando um forno de câmara de reação única (UltraWave™, Milestone, Sorisole, Itália). A câmara foi pressurizada com gás nitrogênio (99,9%,

White Martins Praxair) a 40 bar. O programa de aquecimento por microondas foi aplicado da seguinte forma: (1) 10 min para atingir 180° C e (2) 10 min para mantê-lo a 180° C. Posteriormente, os digeridos foram diluídos para 20,0 mL com água destilada-deionizada e uma alíquota de cada solução foi diluída 50 vezes apropriadamente, seguida de quantificação por ICP-MS. Os meios de cultura inicial e final são definidos como o meio preparado com 5 µM do complexo 1, antes e após a exposição celular.<sup>103</sup>

### **3.4.10 - Microscopia confocal das células MDA-MB-231**

O estudo de acúmulo celular do complexo C1 foi realizado em células MDA-MB-231 tratadas com 40 µM do complexo (0,5% de DMSO), sendo a leitura realizada com 15 minutos de exposição das células ao complexo. As micrografias foram registradas com o auxílio de microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) coordenado pelo Prof. Dr. Francisco Guimarães docente do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

### **3.4.11 - Titulação espectroscópica por UV-visível do DNA**

Para os estudos de interação com o DNA, foi preparado uma solução estoque de CT-DNA (*calif thymus*). Aproximadamente 2 mg de CT-DNA foi solubilizada em 1 mL de tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4. A concentração de DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-visível empregando um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452A. A partir da absorvidade molar do DNA em 260 nm,  $6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ , do caminho óptico ( $b=1 \text{ cm}$ ) e da absorbância, determinou se a concentração do CT-DNA por meio da relação de Lambert-Beer:  $A_{260} = \epsilon_{260} \times b \times C$ .

As titulações espectroscópicas foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1 (branco), adicionou-se o tampão tris-HCl e DMSO, e na cubeta 2 foi adicionado o tampão Tris-HCl e a solução do complexo em DMSO. Após sucessivas adições de 20 µL de CT-DNA, solubilizado em tampão Tris-HCl,

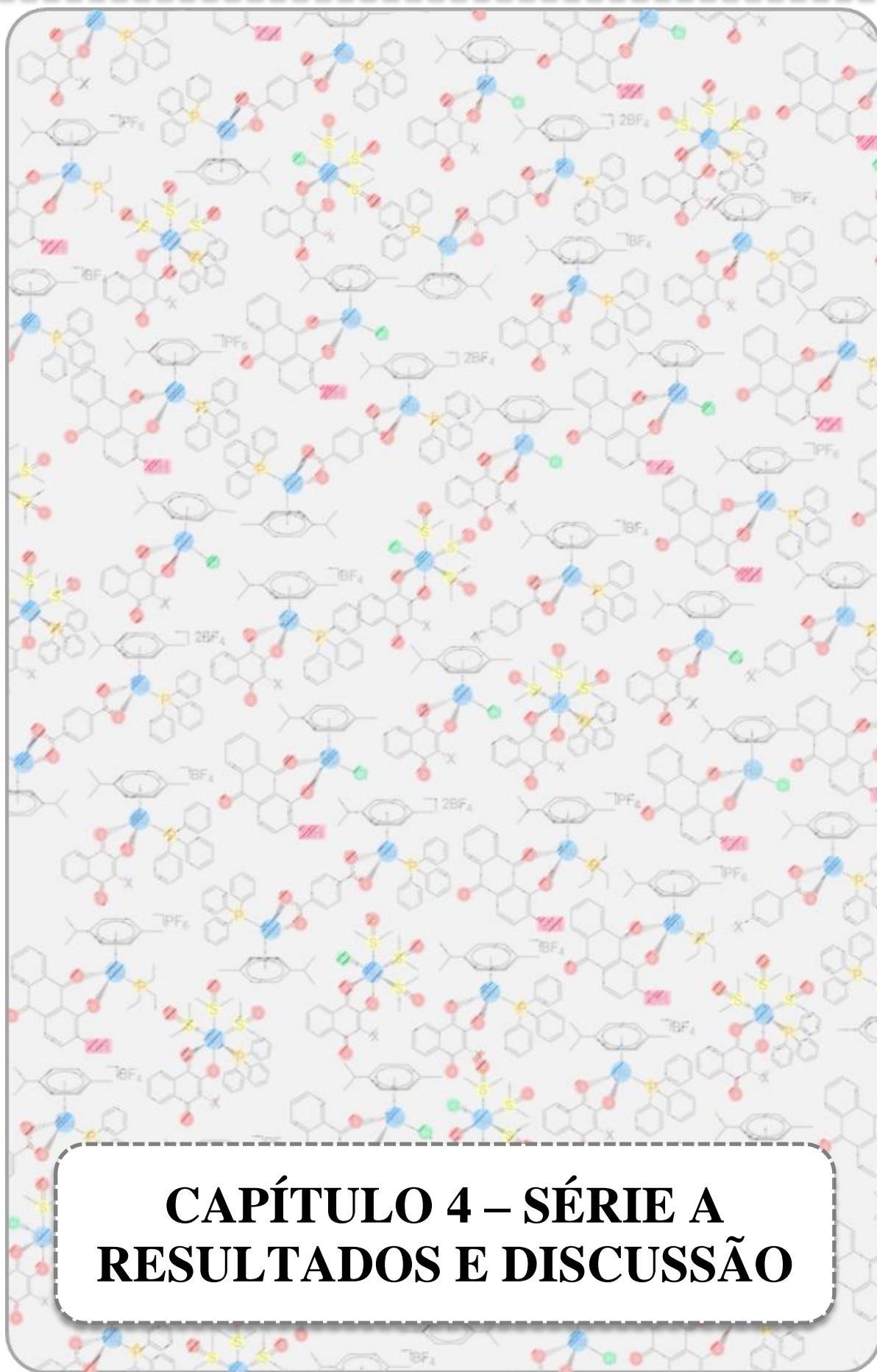
pH 7,4, em ambas cubetas, registrou-se os espectros a cada adição. A constante de interação ( $K_b$ ) com o DNA foi determinada pela equação abaixo:

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

Onde:  $\varepsilon_a$  = é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorvância medida e a concentração do complexo (observada/complexo);  $\varepsilon_f$  = absorvância molar do complexo livre (sem adição de DNA);  $\varepsilon_b$  = absorvância molar do complexo ligado ao DNA e  $K_b$  = constante de interação entre o complexo e o DNA.<sup>101,102</sup>

### 3.4.12 - Ensaios de Eletroforese em gel do DNA plasmidial

Neste ensaio, diferentes concentrações dos complexos foram incubados com o plasmídeo pBR322 (38  $\mu\text{M}$ ) a 37 C° por 18 h. As medidas de mobilidade eletroforética foram realizadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE (0.45 M Tris-HCl, 0.45 M ácido acético, 10 mM EDTA), marcado com brometo de etídeo (2  $\mu\text{L}/50 \text{ mL}$ ). Uma cuba de eletroforese horizontal (BioRad) foi utilizada e os parâmetros de corrida corresponderam a 80 V durante 1,5 h. Os géis foram revelados usando um transluminador ChemiDoc.<sup>102</sup>



**CAPÍTULO 4 – SÉRIE A  
RESULTADOS E DISCUSSÃO**



A fim de situar o leitor acerca dos resultados discutidos nesta seção, descrevemos sucintamente o processo que delineou e resultou na obtenção de 19 complexos compostos por ligantes coordenados ao rutênio, que aqui foram abordados. Os compostos foram divididos em três Séries, baseadas em 3 tipos distintos de ligantes:

Série A – Ácido benzoico *para*-substituído;

Série B – Naftoquinonas;

Série C – Antraquinona (Alizarina).

De modo a separar os respectivos resultados experimentais referentes a este trabalho, os resultados e discussões concernentes a cada Série serão apresentados separadamente. Em cada uma das Séries os dados serão abordados em duas partes, conforme segue:

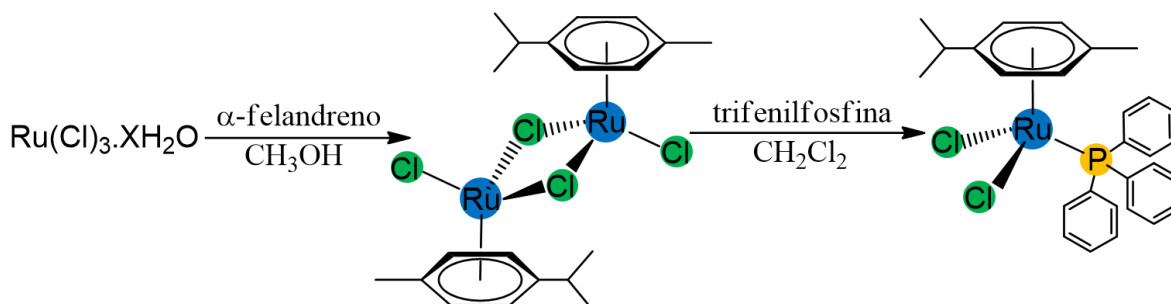
1. Síntese e caracterização dos complexos;
2. Estudos biológicos dos complexos.

Os resultados apresentados a seguir já se encontram publicados em forma de artigo científico na revista *The Journal of Brazilian Chemical society* com o título “*Half-sandwich*”/Ru(II) Anticancer Complexes Containing Triphenylphosphine and *p*-substituted Benzoic Acids.”<sup>103</sup>

#### **4.1 - Síntese e caracterização dos complexos da Série A.**

Nesta Série foram sintetizados quatro novos complexos de Rutênio(II)/areno/trifenilfosfina partindo do precursor  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{(PPh}_3)]$ . Para a obtenção deste precursor é necessário realizar duas sínteses prévias partindo do sal de rutênio(III), onde em metanol solubiliza-se o sal  $\text{RuCl}_3$  e o ligante  $\alpha$ -felandreno levando à obtenção do complexo binuclear  $[(\text{RuCl}_2)_2(\mu\text{-Cl})_2]$ , cuja síntese já se encontra descrita desde 1975.<sup>104</sup> A solubilização do complexo  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  e trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ )

em diclorometano resulta no precursor dos complexos finais,  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ , cuja quebra das pontes formadas pelo ligante clorido cedem espaço para a coordenação da trifenilfosfina. Estas reações, referentes aos precursores empregados na Série A, estão representadas no Esquema 4.1.

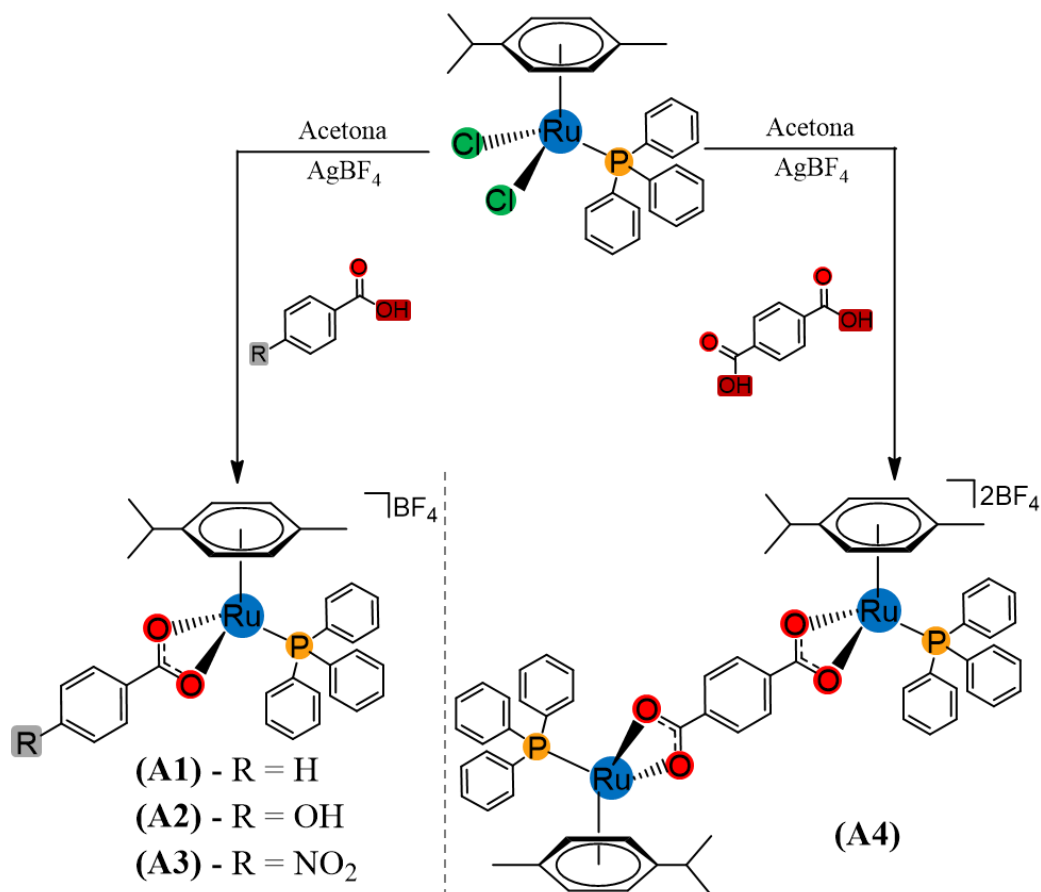


ESQUEMA 4.1 - Rota sintética dos precursores  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  e  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ .

A reação ocorre pela substituição dos cloretos pelos ligantes ácido benzoico *p*-sustituídos (ácido benzoico - **L1**, ácido *p*-hidroxibenzoico - **L2**, ácido *p*-nitrobenzoico - **L3** e ácido tereftálico - **L4**) na forma bidentada através dos átomos de oxigênio (O-O), resultando em complexos de fórmula  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ . O esquema 4.2 apresenta as rotas sintéticas simplificadas para a obtenção dos complexos desta Série. Apenas solubilizando o precursor  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$  e ligante ácido benzoico, não se observa o completo consumo dos reagentes, sendo necessária assim a adição do sal de prata ( $\text{AgBF}_4$ ) em excesso. O íon de prata ( $\text{Ag}^+$ ) atua removendo os ligantes clorido do precursor imediatamente após sua solubilização, levando ao surgimento de precipitado branco ( $\text{AgCl}$ ), que é facilmente removido por filtração ao final da reação. Para os complexos **A1-A3** não foram empregados excessos dos ligantes e precursor, assim a proporção final foi 1:1:2,3 (complexo precursor/ligante/sal de prata).

O complexo **A4**, que emprega o ácido tereftálico como ligante, foi sintetizado utilizando uma estequiometria diferente do que a utilizada para os demais complexos. Como este ligante possui duas carboxilas, temos a possibilidade de obter um composto binuclear, sendo assim empregada a proporção 1:2 (ligante/complexo precursor) para a obtenção do mesmo,

resultando em um produto de fórmula final  $[[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]_2(\mu\text{-L}_4)](\text{BF}_4)_2$ . No esquema 4.2 temos o esquema de síntese referente aos complexos da Série A.



ESQUEMA 4.2 - Rota sintética representativa dos complexos pertencentes à Série A.

Uma importante ferramenta empregada neste trabalho é a ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN de  $^{31}\text{P}$ ), onde utilizando um capilar fechado contendo  $\text{D}_2\text{O}$  (reutilizável) é possível acompanhar a evolução da reação ao registrar o espectro de alíquotas do meio reacional. Em uma das tentativas de se obter os compostos anteriores sem a utilização de prata, foi realizado o refluxo do precursor  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$  em metanol na presença de excesso de benzoato de sódio. Os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  revelaram o surgimento de vários produtos proveniente desta mistura, entretanto ao realizar a evaporação lenta do solvente empregado na reação, um destes

produtos foi separado por cristalização, correspondendo a um complexo que exibe um singlete em 51 ppm no espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ .

Na estrutura cristalográfica proveniente dos cristais obtidos obteve-se um complexo com características singulares e significativas. Conforme exibido na Figura 4.1 este complexo é um composto binuclear resultante da labilização dos ligantes *p*-cimeno contendo coordenados 4 ligantes benzoato, 2 trifenilfosfinas, 1 água e 1 metanol, resultando na fórmula  $[\text{Ru}_2(\text{L}_1)_4(\text{CH}_3\text{OH})(\text{PPh}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]$ . A labilização do ligante *p*-cimeno é um fenômeno já relatado na literatura, principalmente quando se tenta coordenar ao complexo rutênio/areno ligantes com acentuado carácter  $\pi$ -aceptor, o que diminui consideravelmente a densidade eletrônica do metal, favorecendo a saída dos ligantes  $\sigma$ -doadores mais fracos, como o *p*-cimeno.<sup>105</sup>

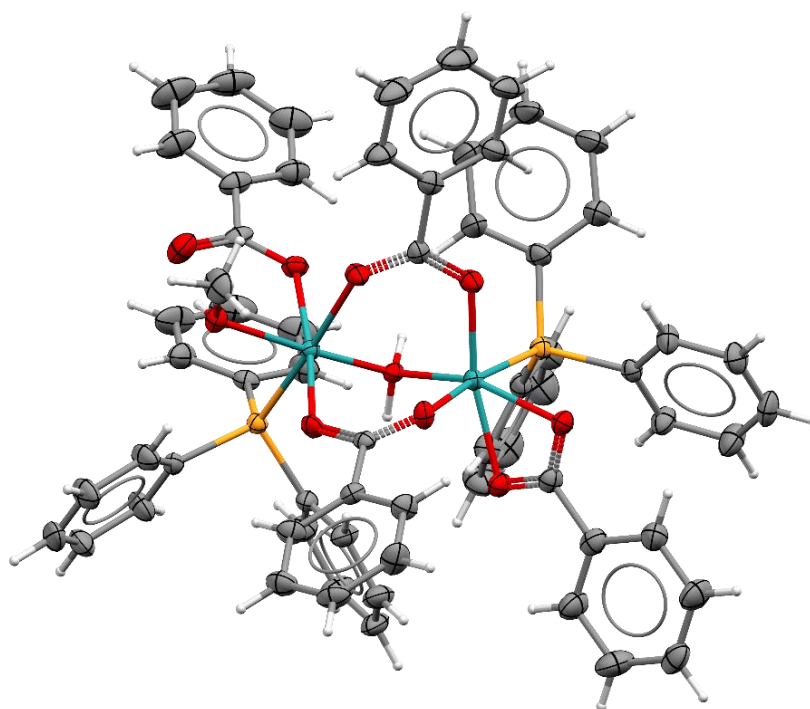


FIGURA 4.1 - Estrutura cristalina do composto  $[\text{Ru}_2(\text{L}_1)_4(\text{CH}_3\text{OH})(\text{PPh}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]$ , resultante da labilização dos ligantes areno. Os anéis da trifenilfosfina foram omitidos para melhor visualizar a molécula.

Outro aspecto interessante e inédito na estrutura obtida foi a presença dos três modos de coordenação possíveis para o ácido benzoico, em um só composto, sendo estes monodentado, bidentado e bidentado em ponte. Não há

relato na literatura de compostos contendo carboxilatos como ligantes que contenham estas mesmas características observadas. O estado de oxidação dos metais foi determinado a partir do resultado de EPR, onde não se observou sinais referentes à espécies paramagnéticas de  $\text{Ru}^{\text{III}}$ , confirmando que o estado de oxidação do rutênio é 2+.

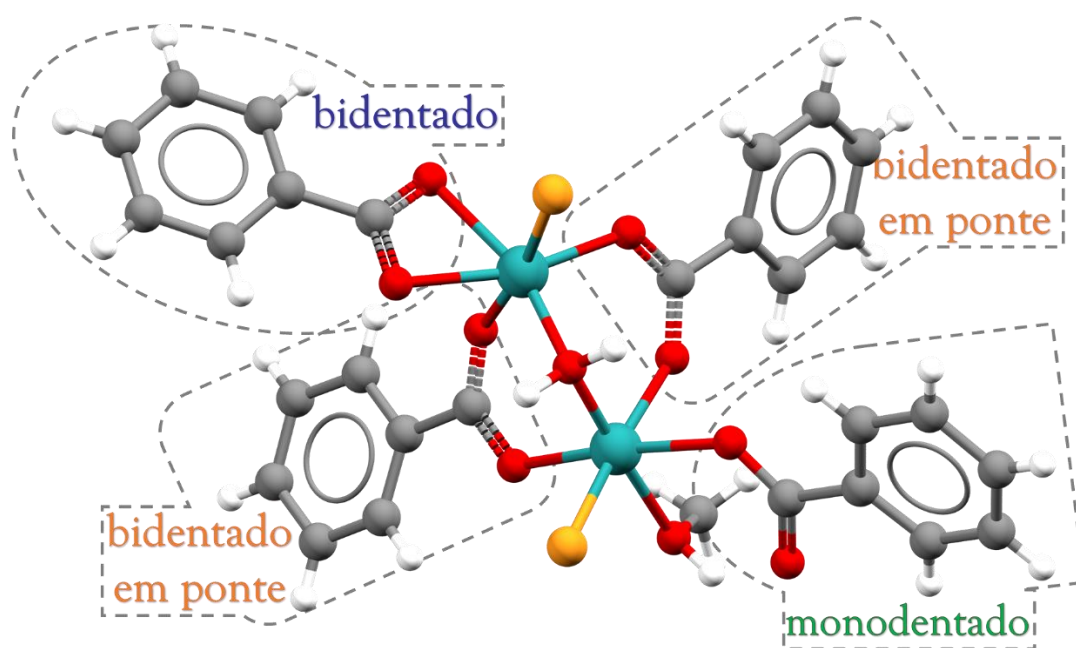


FIGURA 4.2 – Estrutura cristalina do composto  $[\text{Ru}_2(\text{L}_1)_4(\text{CH}_3\text{OH})(\text{PPh}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]$ , apresentando os diferentes modos de coordenação para os ligantes ácido benzoico. Os anéis da trifenilfosfina foram omitidos para melhor visualizar a molécula.

Uma estrutura cristalina similar contendo o ácido *p*-metoxibenzoico foi relatada na literatura, porém ela não exibe a forma monodentada nem a molécula de metanol coordenada, dando lugar à coordenação bidentada.<sup>106</sup> Esta nova estrutura nos permite enxergar a beleza, diversidade e riqueza da química de coordenação, onde um ligante simples como o ácido benzoico une-se ao metal em diferentes arranjos dentro de uma mesma molécula.

Para os complexos **A1**, **A3** e **A4**, foi possível a obtenção de monocristais, e empregando a técnica de difração de raios X obtivemos as estruturas cristalinas referentes aos complexos propostos para esta Série (Figura 4.3). Estas três estruturas somam-se a única similar presente na literatura, o

complexo  $[\text{Ru}(\text{CO}_3)(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ , onde o ligante carbonato encontra-se ligado na forma bidentada, sendo até então o único relato de estrutura cristalina de um complexo Ru/*p*-cimeno/ $\text{PPh}_3$  ligado a um ligante do tipo O-O formando um anel de 4 membros.<sup>107</sup>

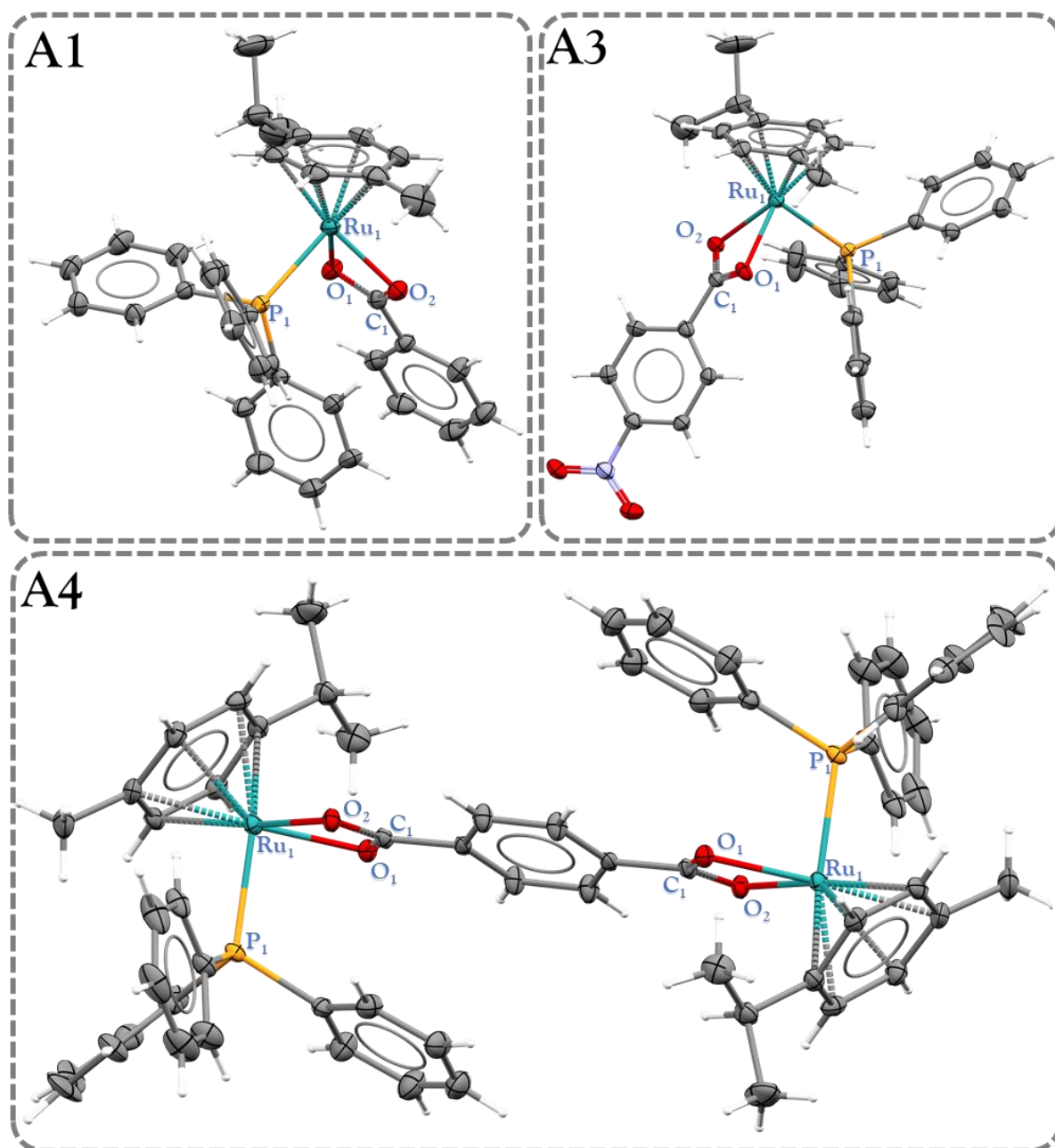


FIGURA 4.3 – Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos **A1**, **A3** e **A5**, respectivamente (o contra-íon  $\text{BF}_4$  foi omitido para melhor visualização das moléculas), átomos representados no modo ORTEP (elipsoides em 30%)

Os complexos **A1** e **A3** se cristalizaram com a adição do sal  $\text{KPF}_6$ , apresentando o ânion  $\text{PF}_6^-$  como contra-íon, enquanto o complexo 4 se cristalizou

com 2 íons  $\text{BF}_4^-$  provenientes do sal  $\text{AgBF}_4$  empregado na reação, sem a necessidade de adicionar  $\text{KPF}_6$ . O modo de coordenação do ânion carboxilato ao rutênio via átomos de O-O na forma bidentada foi inequivocamente confirmado, conforme proposto inicialmente. Os dados de refinamento estruturais são apresentados no apêndice. Todos os complexos se cristalizaram no grupo espacial triclinico  $P_{-1}$ , apresentando o complexo **A3** uma molécula por unidade assimétrica ( $Z'=1$ ), enquanto **A1** apresentou duas moléculas equivalentes em sua unidade assimétrica ( $Z'=2$ ). A unidade assimétrica do complexo **A4** apresenta somente a metade da molécula proposta ( $Z'=0,5$ ), sendo a estrutura completa gerada através do centro de inversão localizado no meio do anel tereftálico.

Em todos os complexos as ligações  $\text{C}_1\text{-O}_1$  e  $\text{C}_1\text{-O}_2$  possuem aproximadamente o mesmo tamanho, o que comprova o desprotonamento da carboxila e a deslocalização da carga resultante, este fato também é comprovado ao se comparar estes comprimentos de ligação dos ligantes coordenados com os respectivos ligantes livres, uma vez que as ligações C-O após a coordenação apresentam comprimento intermediário ( $\approx 1,25 \text{ \AA}$ ) entre uma ligação dupla ( $\approx 1,21 \text{ \AA}$ ) e simples ( $\approx 1,33 \text{ \AA}$ ), como podemos ver nos dados apresentados pela Tabela 4.1.

Embora seja conhecido que a presença da deslocalização dos elétrons no ânion carboxilato incrementa a estabilidade das ligações Ru-O, um tenso e distorcido anel de 4 membros (ângulos  $\neq 90^\circ$ , Tabela 4.1) é formado entre o rutênio e o ânion carboxilato. Como prova deste fato temos que os comprimentos de ligação Ru-O para os compostos desta Série, com um valor médio de  $2,13 \text{ \AA}$  são maiores do que o normalmente encontrado para este tipo de ligação, como pode ser visto compostos similares descritos nas demais Séries deste trabalho (ligantes O-O sem deslocalização), que formam anéis de 5 e 6 membros e possuem ligação Ru-O menores. A Figura 4.4 nos apresenta um histograma contendo a distribuição dos comprimentos de ligação para 490 complexos reportados na literatura contendo a ligação Ru-O, sendo o tamanho médio para este tipo de

ligação igual a 2,08 Å, ou seja, menor que do que a média encontrada para os complexos desta Série (2,13 Å).

TABELA 4.1 – Comprimentos de ligação das carboxilas livres e coordenadas dos complexos **A1**, **A3** e **A4**.

	Ângulos de ligação (°)					
	1	3	4	L <sub>1</sub> *	L <sub>3</sub> **	L <sub>4</sub> ***
<b>O<sub>1</sub>-Ru<sub>1</sub>-O<sub>2</sub></b>	61,32(7)	59,80(2)	60,84(2)	-	-	-
<b>P<sub>1</sub>-Ru<sub>1</sub>-O<sub>2</sub></b>	84,58(6)	90,41(9)	87,89(8)	-	-	-
<b>P<sub>1</sub>-Ru<sub>1</sub>-O<sub>1</sub></b>	92,25(5)	88,19(9)	85,79(8)	-	-	-
<b>O<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-O<sub>2</sub></b>	116,6(3)	117,7(4)	117,1(7)	123,6	123,5	123,47
Comprimento de ligação (Å)						
<b>Ru<sub>1</sub>-O<sub>2</sub></b>	2,123(9)	2,150(3)	2,114(6)	-	-	-
<b>Ru<sub>1</sub>-O<sub>1</sub></b>	2,129(8)	2,141(3)	2,120(6)	-	-	-
<b>Ru<sub>1</sub>-P<sub>1</sub></b>	2,385(7)	2,379(2)	2,363(2)	-	-	-
<b>C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub></b>	1,277(3)	1,248(5)	1,257(9)	1,252	1,232	1,239
<b>C<sub>1</sub>-O<sub>2</sub></b>	1,272(3)	1,252(5)	1,256(7)	1,281	1,314	1,305

\* código CCDC 787428; \*\* código CCDC 1401975; \*\*\* código CCDC 875232.

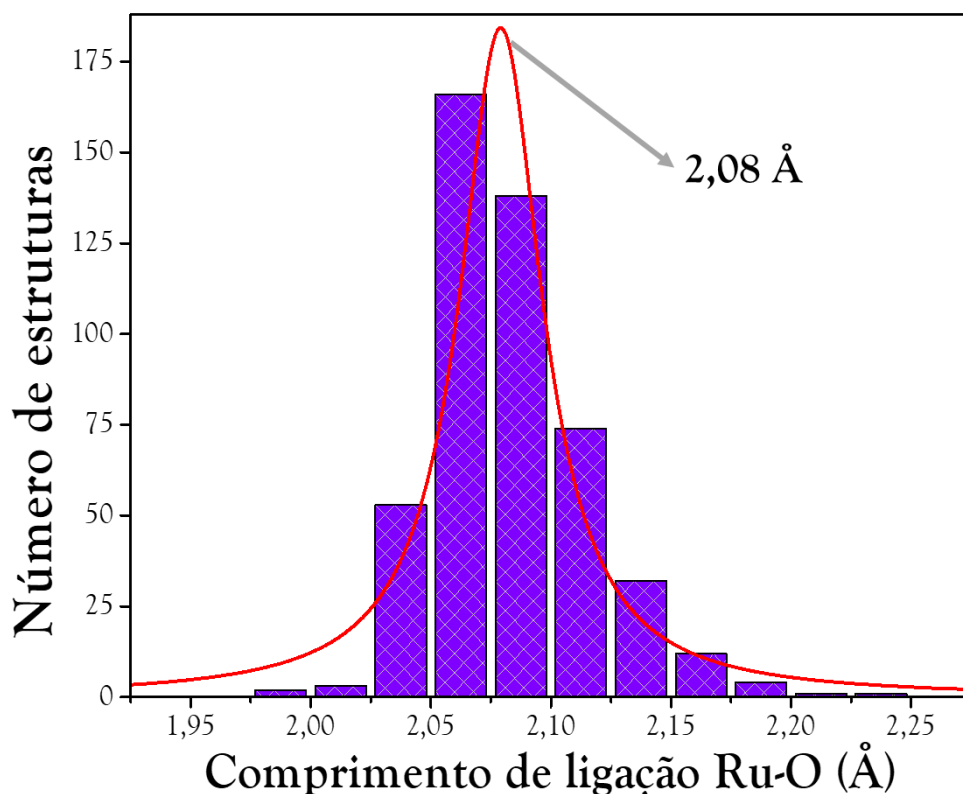


FIGURA 4.4 – Histograma da distribuição dos comprimentos de ligação Ru-O para 490 estruturas cristalinas da base cristalográfica CCDC. Dados gerados utilizando o programa MOGUL.



Em todos os complexos encontramos interações intermoleculares fracas com os contra-íons, do tipo F...H-C, interações C...H, e no complexo **A3** encontramos também interações do tipo N=O...H-C entre no substituinte NO<sub>2</sub> e hidrogênios das metilas do ligante *p*-cimeno e dos anéis da trifenilfosfina. Na Figura 4.5 as interações do tipo N=O...H-C observadas para o complexo **A3**, onde as quatro moléculas equivalentes interagem entre si formando um tetrâmero, estando estas moléculas relacionadas através de um centro de inversão (*i*). Estas interações são importantes na formação do empacotamento cristalino, pois mesmo sendo fracas são numerosas e conferem estabilidade a rede cristalina formada. A Figura 4.6 mostra o mapa de Hirshfeld para o complexo **A3**, nela podemos ver em vermelho as regiões ao redor das moléculas por onde estas interações ocorrem.

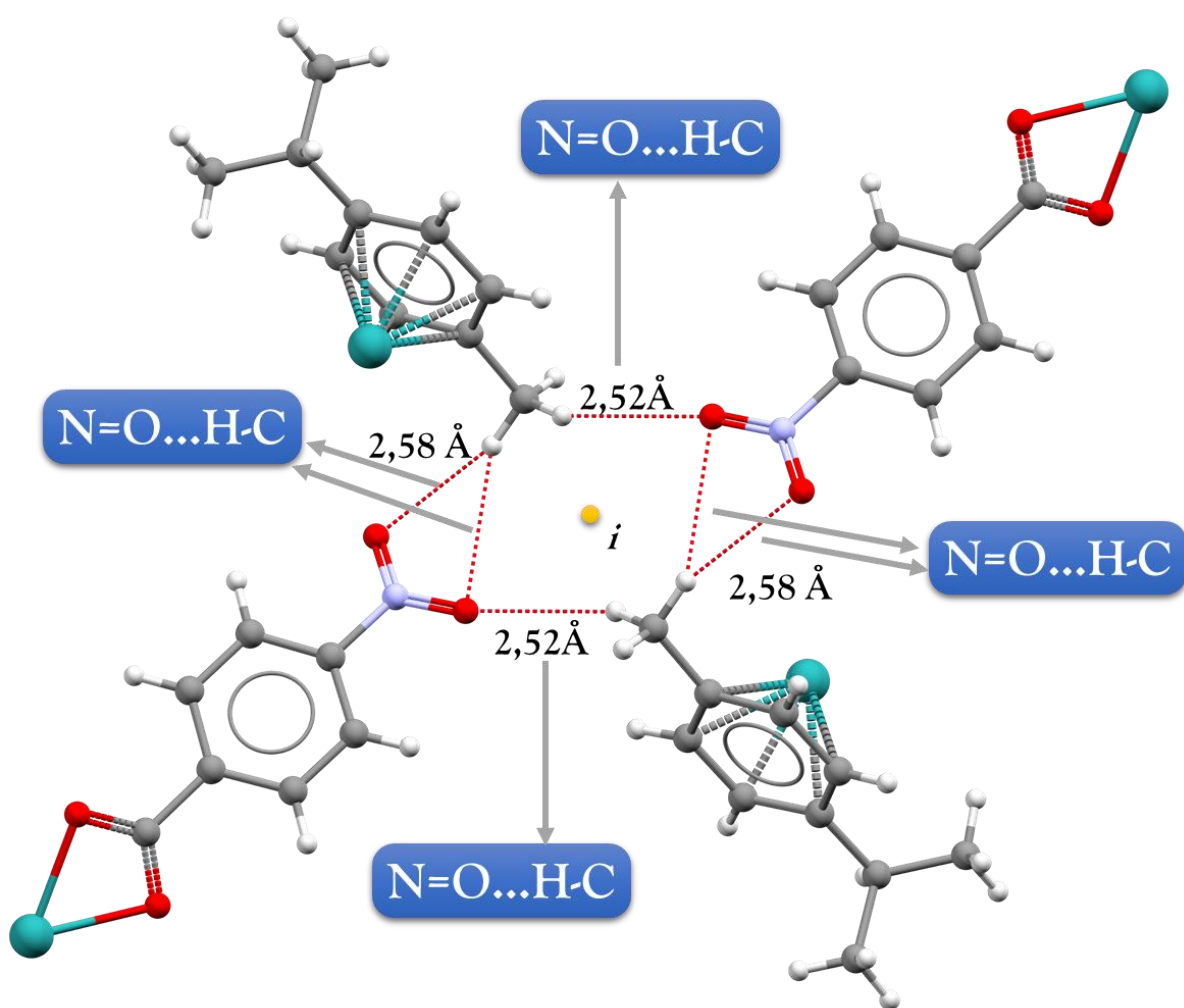


FIGURA 4.5 – Interações do tipo N=O...H-C pertencentes ao complexo **A3**, vemos quatro moléculas equivalentes relacionadas por um centro de simetria (*i*).

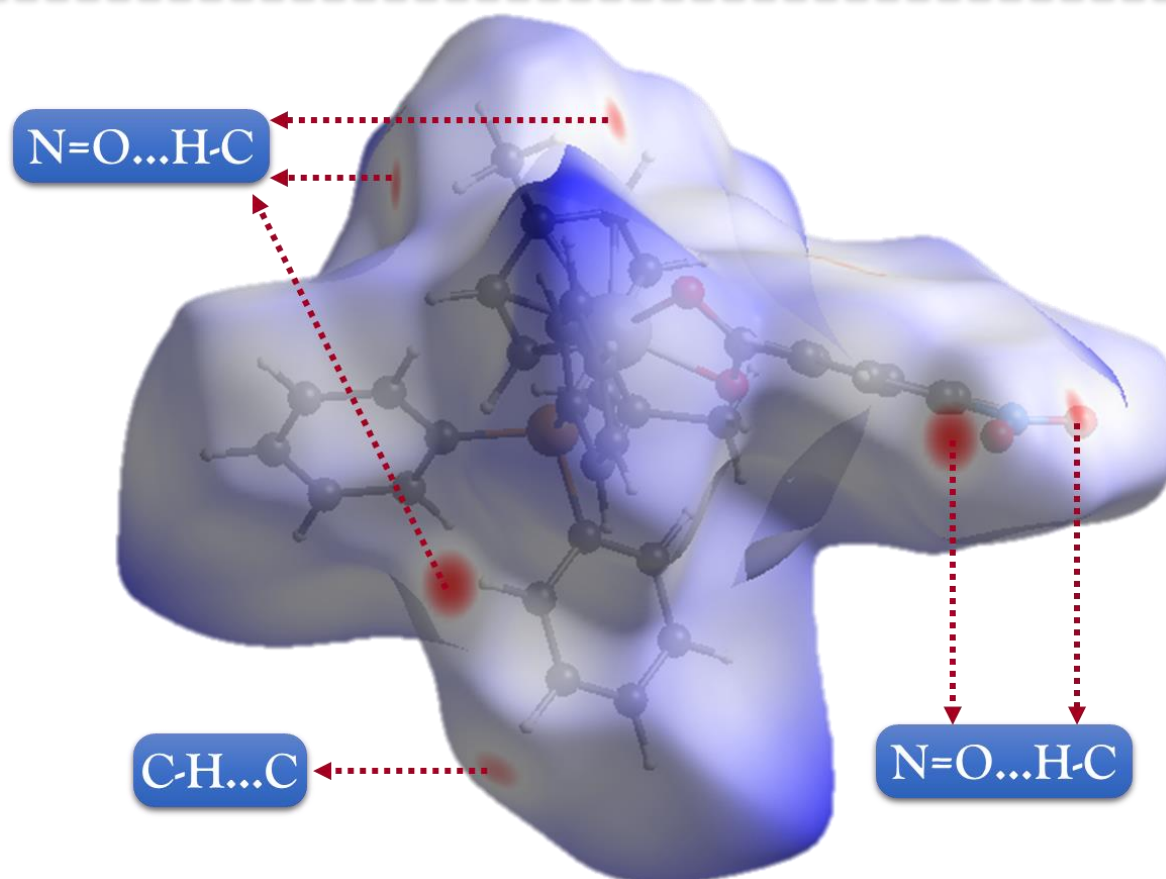


FIGURA 4.6 – Mapa de Hirshfeld mostrando os pontos por onde ocorrem os principais contatos intermoleculares para o complexo A3. Imagem gerada utilizando o programa Crystal Explorer

A composição química dos complexos foi determinada por análise elementar, que indica os teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio presentes na amostra, os quais são comparados os valores teóricos obtidos a partir das estruturas propostas. A Tabela 4.2 mostra os valores experimentais obtidos, sendo todos eles condizentes com os valores teóricos esperados. As medidas de condutividade molar dos compostos foram realizadas em acetona e os valores encontrados para os complexos de **A1-A3** estão na faixa de eletrólito 1:1 (12 - 77 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> em diclorometano) segundo a literatura, comprovando a presença de uma espécie monocatiônica em solução (complexo) seu respectivo ânion (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). O complexo **A4** apresenta baixa solubilidade em diclorometano e foi solubilizado em metanol para o experimento de condutividade, como o complexo é dicatiônico a condutividade encontrada é maior que a determinada para os demais complexos e corresponde a um eletrólito do tipo 2:1 (87 - 204 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> em metanol).

TABELA 4.2 – Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos **A1-A4** (valores teóricos da análise elementar entre parêntesis).

	C(%)	H(%)	N(%)	Condutividade (S cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> )
<b>A1</b>	59,55 (59,59)	4,81 (4,86)	-	25,2
<b>A2</b>	58,49 (58,26)	4,97 (4,75)	-	22,5
<b>A3</b>	55,56 (56,01)	4,94 (4,43)	1,89 (1,87)	12,4
<b>A4.H<sub>2</sub>O</b>	56,79 (56,90)	4,43 (4,78)	-	105,3

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada como uma técnica complementar na caracterização dos complexos. Os modos vibracionais observados entre os ligantes, precursor e complexo final, podem confirmar a coordenação do ligante ao metal além de inferir os possíveis modos de coordenação do ânion carboxilato.

Nos espectros de absorção na região do infravermelho dos sais de potássio do ácido benzoico e análogos *p*-substituídos as bandas características dos estiramentos assimétricos ( $\nu_a\text{COO}^-$ ) e simétricos ( $\nu_s\text{COO}^-$ ) do ânion carboxilato foram observadas em torno de 1600 e 1400 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, e nos espectros dos complexos, observa-se um considerável deslocamento destas bandas, o que é decorrente da coordenação. O modo de coordenação na forma bidentada pode ser confirmado a partir da do perfil de deslocamento desses estiramentos  $\nu\text{COO}^-$  para os sais dos ligantes livres e correspondentes coordenados. Quando a coordenação ocorre pelo modo monodentado, a diferença ( $\Delta\nu$ ) entre  $\nu_s\text{COO}^-$  e  $\nu_a\text{COO}^-$  (cm<sup>-1</sup>) é maior para o complexo do que o encontrado para o sal do ligante livre, enquanto no modo bidentado essa diferença é menor.<sup>108,109</sup> A Tabela 4.3 traz os valores referentes a estes estiramentos e mostra que de fato o valor de  $\Delta\nu$  para o complexo é menor do que os valores encontrados para os ligantes livres, corroborando com o modo de coordenação bidentado observado nas estruturas cristalinas já apresentadas.

TABELA 4.3 – Atribuições das frequências vibracionais ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos estiramentos assimétricos ( $\nu_a\text{COO}^-$ ) e simétricos ( $\nu_s\text{COO}^-$ ) do íon carboxilato livre e coordenado para os ligantes livres e coordenados.

	$\nu_a\text{COO}^- (\text{cm}^{-1})^*$	$\nu_s\text{COO}^- (\text{cm}^{-1})^*$	$\Delta\nu (\text{cm}^{-1})^*$
<b>A1</b>	1602 (1596)	1481 (1413)	121 (140)
<b>A2</b>	1602 (1612)	1479 (1416)	123 (132)
<b>A3</b>	1593 (1618)	1477 (1390)	116 (187)
<b>A4</b>	1627 (1567)	1471 (1394)	156 (173)

\* Valores para os ligantes livres entre parêntesis.

Além dos estiramentos anteriormente citados, destacam-se outros modos vibracionais característicos das estruturas obtidas, como as bandas observadas em aproximadamente  $1435 \text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos  $\nu\text{C}=\text{C}$  dos anéis aromáticos,  $1090 \text{ cm}^{-1}$  proveniente dos estiramentos  $\nu\text{B-F}$  do contraíon  $\text{BF}_4^-$ ,  $520$ ,  $500$  e  $480 \text{ cm}^{-1}$  pertencentes ao estiramento  $\nu\text{Ru-P}$  e  $450 \text{ cm}^{-1}$  originado a partir do estiramento  $\nu\text{Ru-O}$ . Os complexos **A2** e **A3** exibiram os estiramentos referentes os substituintes, onde **A2** exibiu os estiramentos em  $\nu 3400$  e  $\nu 1284$  pertencentes aos estiramentos  $\nu\text{O-H}$  e  $\nu\text{C-O}$  respectivamente, enquanto **A3** apresentou as bandas referentes aos modos simétrico e assimétrico do grupo  $\text{NO}_2$  em  $\nu 1548$  e  $\nu 1384 \text{ cm}^{-1}$ .

Outra técnica empregada na caracterização dos complexos **A1-A4** foi a espectrometria de massas através do método de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI*), nela podemos encontrar os sinais referentes ao íon molecular dos complexos catiônicos descritos neste trabalho, além das respectivas fragmentações de cada um. Nos espectros obtidos para os complexos **A1-A3** destacam-se os sinais que exibiram o padrão isotópico do rutênio, cujos cátions monocarregados  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]^+$ , representado por  $\text{M}^+$ , resultaram em razões massa/carga ( $m/z$ ) =  $619,08$  (**A1**),  $635,26$  (**A2**) e  $664,16$  (**A3**) sendo todos eles condizentes com os

espectros simulados provenientes das fórmulas mínimas das espécies catiônicas. O complexo **A4**, dicatiônico, não exibiu a sinal referente a razão massa carga esperada para o complexo não fragmentado, porém foram identificados os sinais referentes aos fragmento mononuclear protonado  $[\text{RuL}_4(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)+\text{H}]^+$ , com  $m/z = 664,13$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Os sinais descritos anteriormente estão representados nos espectros da Figura 4.7, além dos respectivos espectros simulados para as formulas moleculares dos cátions.

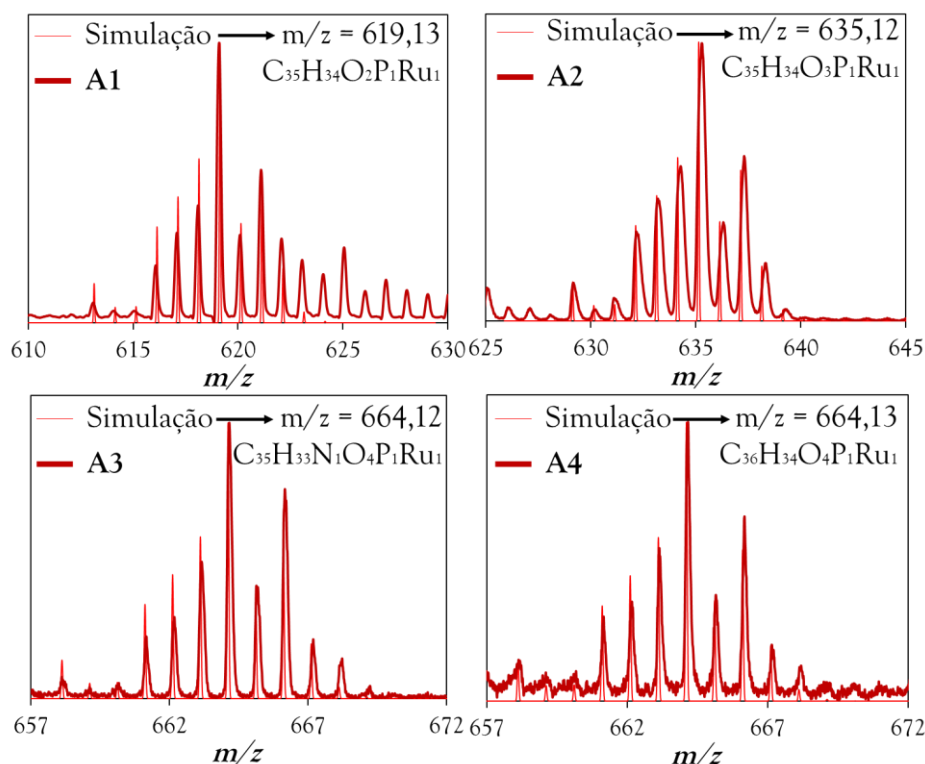


FIGURA 4.7 – Perfil isotópico experimental e teórico para os cátions metálicos dos complexos, correspondendo aos íons  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]^+$  (**A1-A3**) e  $[\text{RuL}_4(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)+\text{H}]^+$  (**A4**).

Outros sinais provenientes da fragmentação dos íons anteriormente citados foram observados, como a espécie  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]^+$  sem um próton  $(\text{M}-\text{H})^+$ , com  $m/z = 497,03$ , sendo sinal mais abundante em todos os espectros registrados. Esses sinais observados são similares aos já descritos na literatura para os complexos  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ ,  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PCy}_3)]$  e  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PTA})]$  (RAPTA-C) cujos padrões de fragmentação foram determinados usando técnicas de dissociação induzida por colisão.<sup>110</sup> Outro sinal foi observado em  $m/z = 651,15$  e corresponde a espécie

[Ru( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> provavelmente coordenada a matriz utilizada para a realização do experimento, o ácido 2,3-diidóxicoibenzoico, que ao se desprotonar pode coordenar ao rutênio formando também uma espécie [RuL<sub>x</sub>( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>, que em seu espectro simulado resulta em um sinal em  $m/z = 651,12$ .

A ressonância magnética nuclear é outra técnica amplamente empregada neste trabalho, tanto no acompanhamento das reações como na caracterização dos complexos finais, e isto empregando técnicas 1D e 2D em núcleos como fósforo (<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}), carbono (<sup>13</sup>C) e hidrogênio (<sup>1</sup>H). Os espectros de RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} do complexo precursor [Ru( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)(Cl)<sub>2</sub>] apresenta um singlete referente ao fósforo da trifenilfosfina, sendo ele em  $\delta$  24,2 ppm. Após a coordenação o sinal desloca-se para regiões desblindadas do espectro (campo baixo), apresentando os complexos **A1-A4** um singlete em  $\delta$  35 ppm, aproximadamente. O deslocamento do sinal referente ao fósforo da trifenilfosfina indica que átomo de fósforo se encontra menos protegido (em relação ao complexo precursor), ou seja, os fósforos estão doando mais em  $\sigma$  do que recebendo em  $\pi$ . Este fato é característico da troca dos átomos de cloro por oxigênio, sendo que dada a maior eletronegatividade do oxigênio, temos que o mesmo desblinda o átomo de fósforo com mais eficiência que os ligantes cloretos, levando ao deslocamento do sinal para maiores frequências.

No experimento de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (<sup>1</sup>H) para os complexos pôde-se observar os sinais referentes aos ligantes coordenados ao centro metálico, evidenciando a presença dos mesmos conforme visto na técnica de raios X. A Figura 4.8 exemplifica os espectros obtidos, mostrando o espectro obtido para **A3**, onde temos a atribuição de todos os hidrogênios presentes nos ligantes coordenados ao rutênio. Três conjuntos distintos de sinais se destacam, a primeira na região dos alifáticos correspondendo aos grupos metila (*a,c*) do ligante *p*-cimeno ( $\delta$  1,0-2,0 ppm), a segunda por volta

de  $\delta$  5,5 ppm pertencendo aos hidrogênios aromáticos do *p*-cimeno (*c*) e a última na região de  $\delta$  7.5-8,0 ppm condizendo com os hidrogênio pertencentes aos anéis do ligante ácido benzoico *p*-substituído e (*c*) e da trifenilfosfina (*o/m/p*).

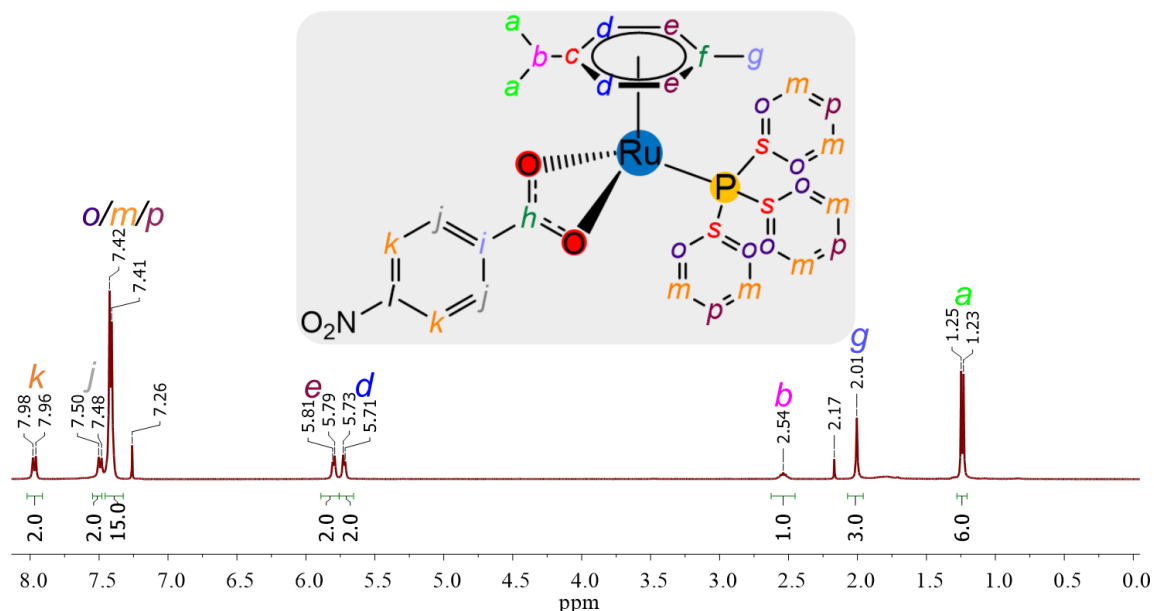


FIGURA 4.8 – Espetro de RMN de hidrogênio (<sup>1</sup>H) obtido para o complexo **A3** em clorofórmio deuterado (*d*-CDCl<sub>3</sub>).

É interessante ressaltar o efeito de blindagem sobre os hidrogênios aromáticos *p*-cimeno, que quando coordenado apresenta dois dubletos na região entre  $\delta$  5,5-6,0 ppm, porém o equivalente livre (*p*-cimeno não coordenado) apresenta os mesmos sinais em  $\delta$  7,1 ppm. Sabe-se que raramente se encontra sinais referentes a hidrogênios aromáticos com tão baixos deslocamentos em espectros de <sup>1</sup>H, ocorrendo nestes casos o efeito de blindagem sobre os mesmos devido à forte retrodoação que ocorre do metal para os orbitais  $\pi$  do *p*-cimeno, que aumentam a densidade eletrônica do anel e conseqüentemente ocasiona o efeito observado.

É notável o efeito dos substituintes da posição *para* dos ligantes L<sub>2</sub> (OH) e L<sub>3</sub> (NO<sub>2</sub>) nos perfis dos sinais encontrados para os hidrogênios *e/f*, conforme apresentado na Figura 4.9. Enquanto no complexo **A2** os hidrogênios *e/f* encontram-se mais blindados que os hidrogênios da trifenilfosfina ( $\approx$  7,4 ppm), no complexo **A3** estes mesmos hidrogênios estão em deslocamentos mais

desblindados, possuindo deslocamento superior aos da trifenilfosfina. Este fenômeno deve-se ao forte efeito eletrônico exercido por estes grupos nos anéis onde estão substituídos, sabe-se que o grupo OH (**A2**) atua como ativadores, doando elétrons para o anel aromático e conseqüentemente blindando os hidrogênios ligados ao mesmo anel, assim um efeito contrário é observado para o anel com substituinte NO<sub>2</sub>, que exerce um efeito contrário, desblindando os hidrogênios do anel e conseqüentemente conferindo aos mesmos um maior deslocamento químico.

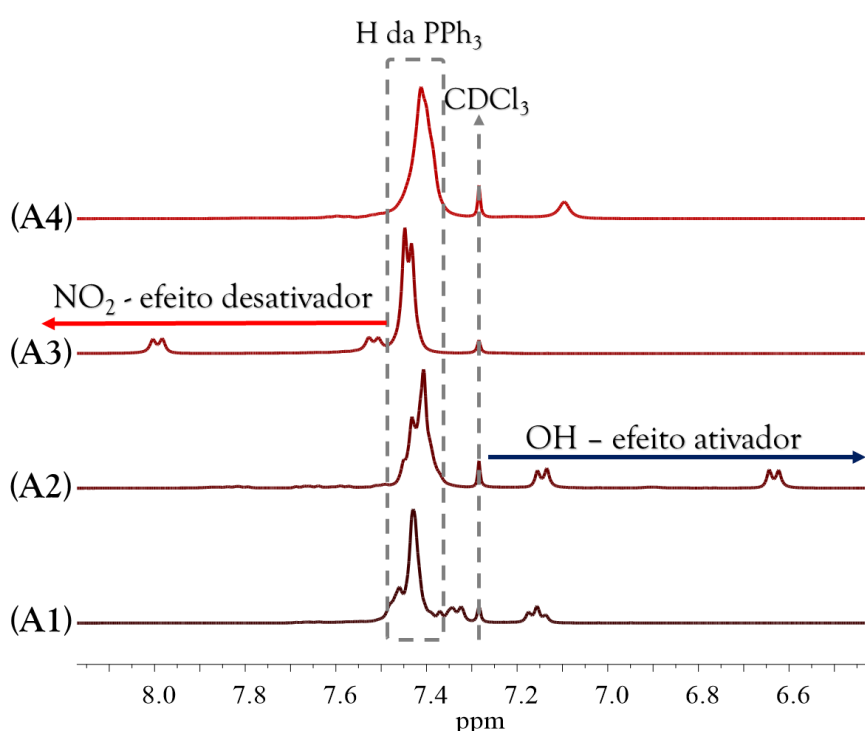


FIGURA 4.9 - Espectros de RMN de hidrogênio dos complexos **A1-A4** em *d*-CDCl<sub>3</sub>. A seta azul indica o efeito ativador provocado pelo substituinte (OH<sup>-</sup>) e a seta vermelha indica o efeito de desativação provocado pelo substituinte (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Os experimentos de correlação 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY confirmaram as atribuições anteriores, onde observamos os acoplamentos entre os hidrogênios vizinhos, como os exibidos entre os hidrogênios ligados aos carbonos *j/k* (hidrogênios aromáticos do ácido *p*-nitrobenzoico), *d/e* (hidrogênios aromáticos do *p*-cimeno), *a/b* (hidrogênios alifáticos do grupo propil do *p*-cimeno) e *o/m/p* (hidrogênios aromáticos dos anéis da trifenilfosfina), conforme indicado na Figura 4.10 que exemplifica o obtido para os complexos **A1-A4**.



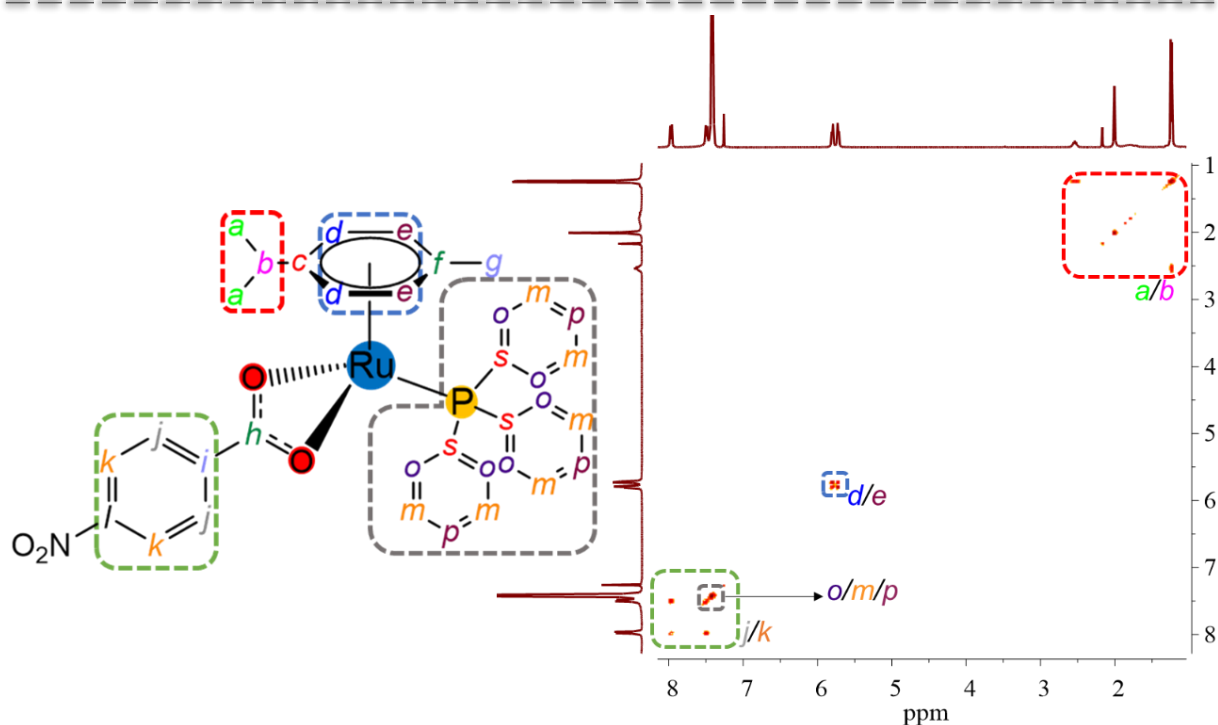


FIGURA 4.10 - Correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **A3** em  $d\text{-CDCl}_3$ . Vemos destacados os diferentes grupos de acoplamentos exibidos pelo complexo.

Os espectros de RMN de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) de todos os complexos exibiram o sinal mais desblindado em torno de 180 ppm, sendo ele atribuído ao carbono do grupo carboxilato coordenado. Este sinal apresenta um deslocamento considerável em relação ao ligante livre (173 ppm), sendo este efeito proveniente da deslocalização de elétrons  $\pi$  presentes no íon carboxilato e sua coordenação ao centro metálico, promovendo um efeito de desblindagem deste carbono quaternário. Esta observação é uma importante evidência da coordenação do metal ao ligante através do grupo carboxílico, sendo um forte indicativo da ocorrência da reação.<sup>103,111</sup> A atribuição de todos os sinais observados nos espectros de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) foi facilitada mediante a interpretação dos espectros bidimensionais de HSQC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ), que mostram acoplamento entre carbonos e hidrogênios que estão diretamente ligados, permitindo a atribuição dos sinais referentes aos carbonos aromáticos e alifáticos presentes na molécula, como demonstrado para o complexo **A3** na Figura 4.11.

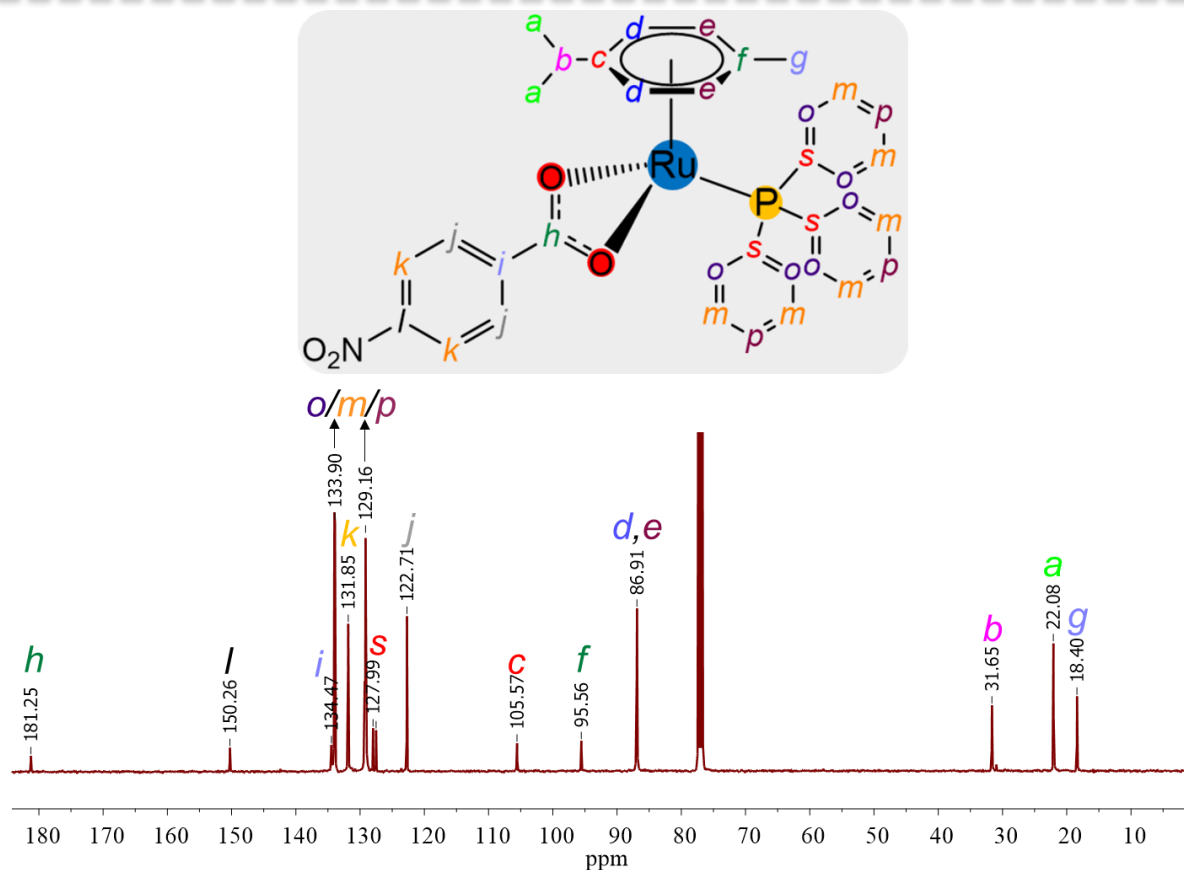


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) obtido para o complexo **A3** em clorofórmio deuterado ( $d\text{-CDCl}_3$ ).

Assim, sabendo que os carbonos quaternários não apresentam acoplamentos neste experimento, foi possível identificá-los com segurança. Entretanto, a distinção entre os diferentes sinais referentes a carbonos quaternários foi possível a partir dos dados obtidos pela técnica bidimensional HMBC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ), que consiste na visualização de acoplamentos entre carbonos e hidrogênios a múltiplas ligações. Como exemplo podemos citar a diferenciação entre os carbonos *d* e *e* do anel do *p*-cimeno (Figura 4.12), onde o carbono *c* acopla com os hidrogênios ligados aos carbonos *d*, e *a*, enquanto o carbono *f* acopla somente com os hidrogênios ligados aos carbonos *e* e *g*. De semelhante modo podemos diferenciar os carbonos *i* e *l* do ligante *p*-nitrobenzoico coordenado, onde *h* acopla com os hidrogênios ligados a *j*, enquanto *l* acopla com os hidrogênios ligados a *k* e a *j*, permitindo-nos assim atribuir corretamente estes sinais.

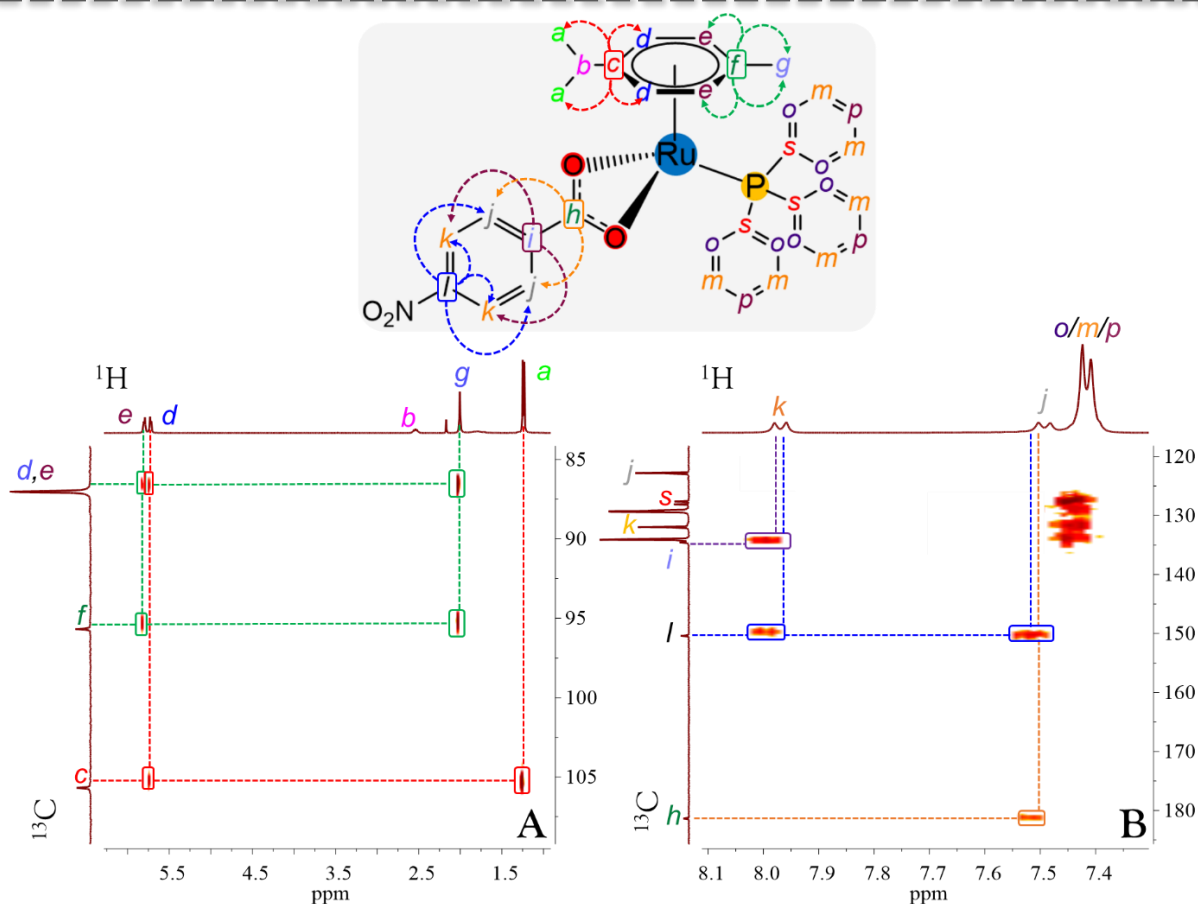


FIGURA 4.12 - Amplificações dos mapas de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **A3** em  $d\text{-CDCl}_3$ . (A) Amplificação demonstrando os acoplamentos presentes no ligante *p*-cimeno e (B) no ligante *p*-nitrobenzoico.

Para a realização dos testes biológicos uma importante informação é a estabilidade dos complexos sintetizados em solução, principalmente no meio biológico empregado para a cultura das células tumorais e no solvente utilizado para dissolver os compostos. Assim foi estudada a estabilidade dos complexos utilizando o RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  em Acetona, DMSO e na mistura destes solventes no meio biológico RPMI. Em DMSO e DMSO/RPMI (2:1) todos os compostos não foram estáveis formando logo após a dissolução vários subprodutos, sendo estes provenientes da labilização dos ligantes e coordenação do DMSO, que é uma molécula coordenante, e/ou itens presentes no meio de cultura, como aminoácidos e sais como o íon cloro, inviabilizando assim o emprego do DMSO como solvente. Na mistura Acetona/RPMI (2:1) os complexos foram estáveis, dentro do tempo de experimento realizado (96 h), não havendo o surgimento de outros sinais referentes a subprodutos, provavelmente devido a acetona ser uma molécula

pouco coordenante coordenante. Na Figura 4.13 vemos os espectros registrados para o complexo **A1**, onde os sinais observados referem-se ao complexo ( $\delta \approx 37$  ppm) e ao sal de fosfato presente no meio biológico ( $\delta \approx 0$  ppm). Relatos da literatura mostram que em culturas de células tumorais como MCF-7 (mama) o solvente que possui menor inibição da viabilidade celular é a acetona (0,1-1,0% v/v), seguido do DMSO e etanol.<sup>112</sup> Assim a acetona foi empregada nesta Série como solvente nos experimentos descritos a seguir.

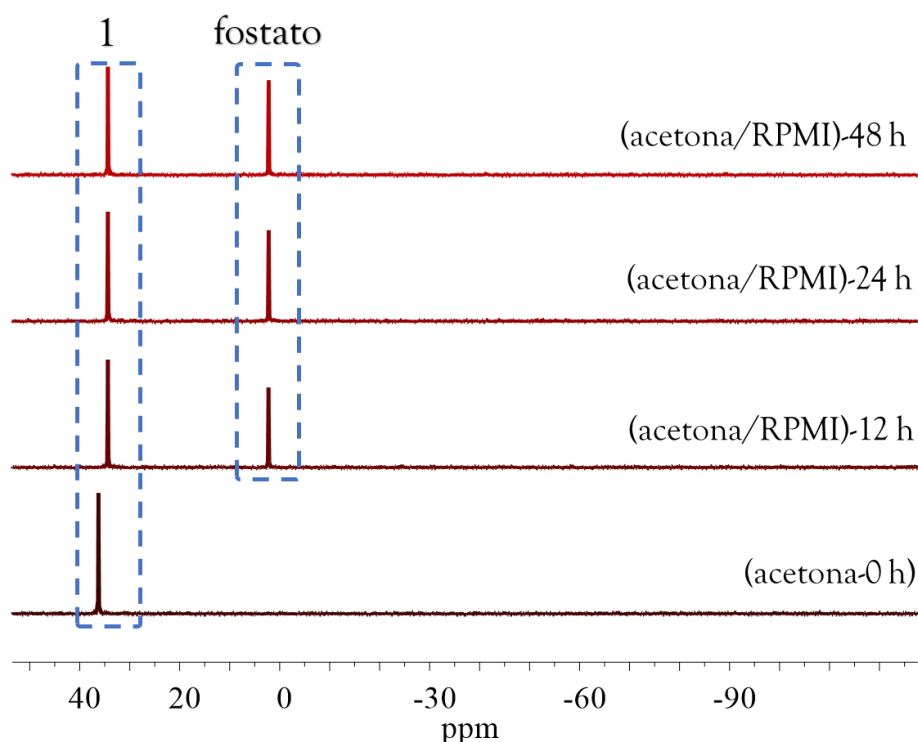


FIGURA 4.13 - Estudo de estabilidade do complexo **A1**, em acetona/RPMI (2:1).

## 4.2- Estudos biológicos dos complexos da Série A.

A atividade citotóxica dos complexos sintetizados nesta Série foi avaliada frente às diferentes linhagens de células tumorais e não-tumorais empregando o método de ensaio de MTT. A partir dos dados obtidos para estes testes foi feita uma triagem, onde para o composto mais citotóxico e mais seletivo foi dado prosseguimento aos demais testes visando o conhecimento da atuação dos complexos nas células. Os valores de  $IC_{50}$  (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular) foi calculado para células tumorais de mama (MDA-MB-237 e MCF-7), pulmão (A549), próstata (DU-145) e as correspondentes não tumorais

de mama (MCF-10A), pulmão (MRC-5) e próstata (PNT2). Os valores obtidos correspondem ao IC<sub>50</sub> após 48 horas de exposição das células empregadas em diferentes concentrações dos complexos. A Tabela 4.4 Apresenta os valores obtidos para os complexos **A1-A4**, ligantes e precursor [RuCl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)].

TABELA 4.4 - Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os complexos **A1-A4**, ligantes, precursor e o fármaco cisplatina, frente às linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h.

	IC <sub>50</sub> (μM)						
	MDA- MB-231	MCF-7	A549	DU-145	MCF- 10A	MRC-5	PNT2
<b>A1</b>	12,0 ± 0,7	19,3 ± 1,9	12,5 ± 0,8	15,5 ± 0,7	42,3 ± 7,0	20,1 ± 1,5	15,7 ± 2,2
<b>A2</b>	12,8 ± 0,9	11,0 ± 0,5	11,5 ± 0,5	11,5 ± 0,5	18,1 ± 2,8	9,3 ± 2,0	6,1 ± 0,2
<b>A3</b>	40,5 ± 4,0	49,9 ± 0,4	57,5 ± 2,8	60,7 ± 6,7	56,2 ± 2,2	35,9 ± 2,3	59,7 ± 5,8
<b>A4</b>	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
<b>Precursor*</b>	21,6 ± 1,3	18,2 ± 0,6	12,7 ± 1,2	49,7 ± 1,8	19,1 ± 1,0	50,6 ± 0,2	-
<b>Ligante**</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>Cisplatina</b>	2,4 ± 0,2	13,9 ± 2,0	14,4 ± 1,4	2,3 ± 0,4	29,4 ± 0,8	29,1 ± 0,8	21,4 ± 6,0

\*[RuCl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)]. \*\*Ácidos benzoico para substituídos.

Os ligantes ácido benzoico *p*-substituídos não foram ativos nas concentrações testadas, assim como o complexo binuclear **A4**, que foi insolúvel em concentrações maiores que 30 μM, sendo testado somente em concentrações menores do que esta. Observamos que quando comparados individualmente os complexos **A1**, **A2** e **A3** apresentaram valores de IC<sub>50</sub> similares frente às células tumorais, enquanto ao realizar uma comparação dentre os complexos observamos que **A1** e **A2** foram, de modo geral, 3 vezes mais ativos que **A3** nas linhagens tumorais. Além disso, **A1** e **A2** exibiram valores de IC<sub>50</sub> nas linhagens MCF-7 e A549 similares a cisplatina, que é o fármaco inorgânico de referência.

Comparando com o precursor  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ , a coordenação do ligante ácido benzoico *p*-substituído contribuiu para o aumento da capacidade de inibição da viabilidade celular dos compostos **A1** e **A2**, principalmente frente a linhagem tumoral de próstata (DU-145). Uma característica marcante destes complexos são os valores de  $\text{IC}_{50}$  que são consideravelmente menores do que a grande maioria dos dados exibido para outros complexos rutênio/areno reportados na literatura. De modo geral, os complexos relatados são neutros e possuem o cloreto como ligante, o que tem impacto considerável na reatividade e lipofilicidade desses complexos,<sup>105,109,113,114</sup> sendo que a presença do cloreto pode favorecer reações irreversíveis entre os complexos e proteínas do plasma sanguíneo ou outras proteínas que não estão correlacionadas com vias de morte celular, diminuindo a biodisponibilidade do composto. Da mesma forma, a presença da fosfina incrementa consideravelmente a lipofilicidade desses complexos, facilitando o transporte dos mesmos por difusão através da membrana das células.<sup>115–117</sup>

TABELA 4.5 – Valores do índice de seletividade obtidos para os complexos **A1-A4**, precursor e o fármaco cisplatina. Os valores são obtidos a partir da divisão dos valores de  $\text{IC}_{50}$  das células tumorais pelas células não tumorais.

	Índice de Seletividade			
	MCF-10A / MDA-MB-231	MCF-10A / MCF-7	MRC-5 / A549	PNT2 / DU-145
<b>A1</b>	3,5	2,2	1,6	1,0
<b>A2</b>	1,4	1,6	0,8	0,5
<b>A3</b>	1,4	1,1	0,6	0,9
<b>A4</b>	-	-	-	-
<b>Precursor</b>	0,8	1,0	4,0	-
<b>Cisplatina</b>	12	2,1	2,0	9,3

De modo geral, os complexos exibiram melhores seletividades frente as linhagens tumorais de mama, sendo pouco seletivos nas linhagens de pulmão e próstata, conforme apresentado na Tabela 4.5. Destaca-se o complexo **A1**, que em comparação aos demais apresentou os melhores índices de seletividade, sendo

selecionado para o prosseguimento dos estudos quanto à influência do mesmo no ciclo celular, capacidade de inibição de migração, clonogenicidade e acúmulo no meio intracelular de células tumorais MDA-MB-231.

Uma importante informação para o prosseguimento dos testes biológicos é a influência dos complexos na morfologia das células, onde acompanhamos as tendências morfológicas das linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) em soluções com diferentes concentrações de **A1**. Por exemplo, nos testes de acúmulo celular é necessário que as células estejam íntegras em sua morfologia para que se possa analisar a concentração de metal em seu interior, empregando assim uma concentração menor que o  $IC_{50}$  para a realização do teste, sendo a integridade da morfologia celular avaliada pelo ensaio morfológico nas concentrações e no tempo empregado para o experimento de acúmulo celular.

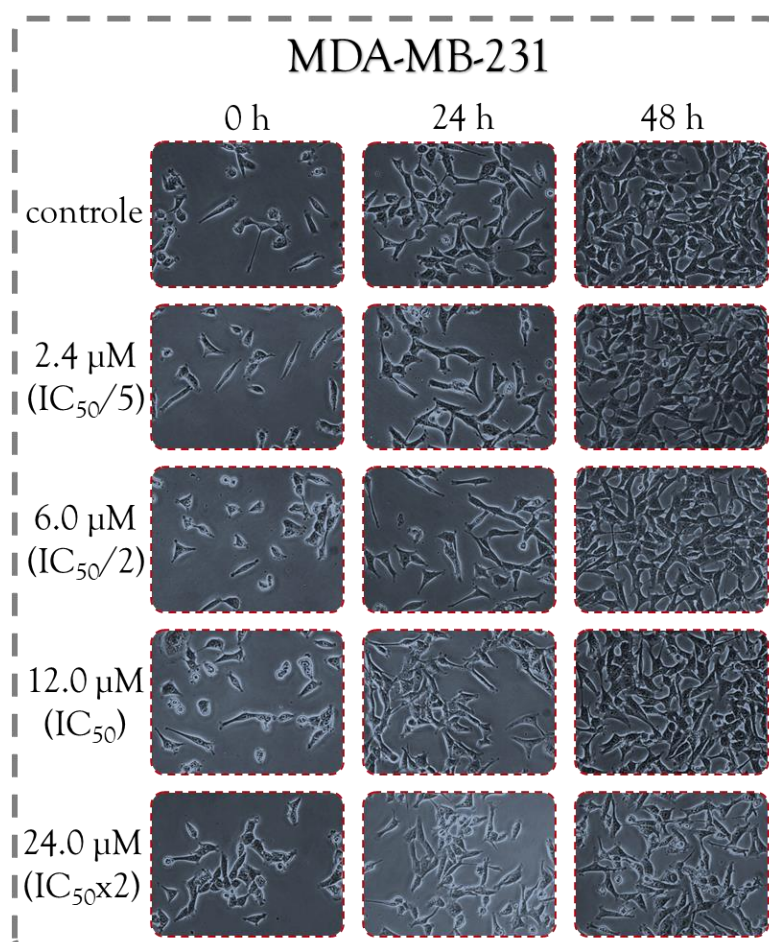


FIGURA 4.14 – Micrografias obtidas para as culturas celulares da célula tumoral MDA-MB-231 em diferentes concentrações de **A1** (proporcionais ao valor de  $IC_{50}$  encontrado) e controle negativo (DMSO).

Ao observar as micrografias referentes ao controle, apresentadas na Figura 4.14, vemos a morfologia da linhagem MDA-MB-231 na ausência de tratamento com os compostos, apresentando formato alongado devido as projeções da membrana plasmática (por ser uma célula com capacidade migratória). Alterações consideráveis na morfologia das células são observadas somente na concentração igual ao dobro do valor de  $IC_{50}$  em 48 h, onde a confluência entre as células é menor e nota-se maior quantidade de células em formato esférico, sendo um indicativo de inviabilização das mesmas e desencadeamento de mecanismos de morte celular.<sup>74,118-122</sup> Nas concentrações iguais ou menores que o  $IC_{50}$  não foram observados nenhum tipo de alteração morfológica, demonstrando que nessas condições as células mantêm sua integridade morfológica, sendo indistinguível do experimento controle.

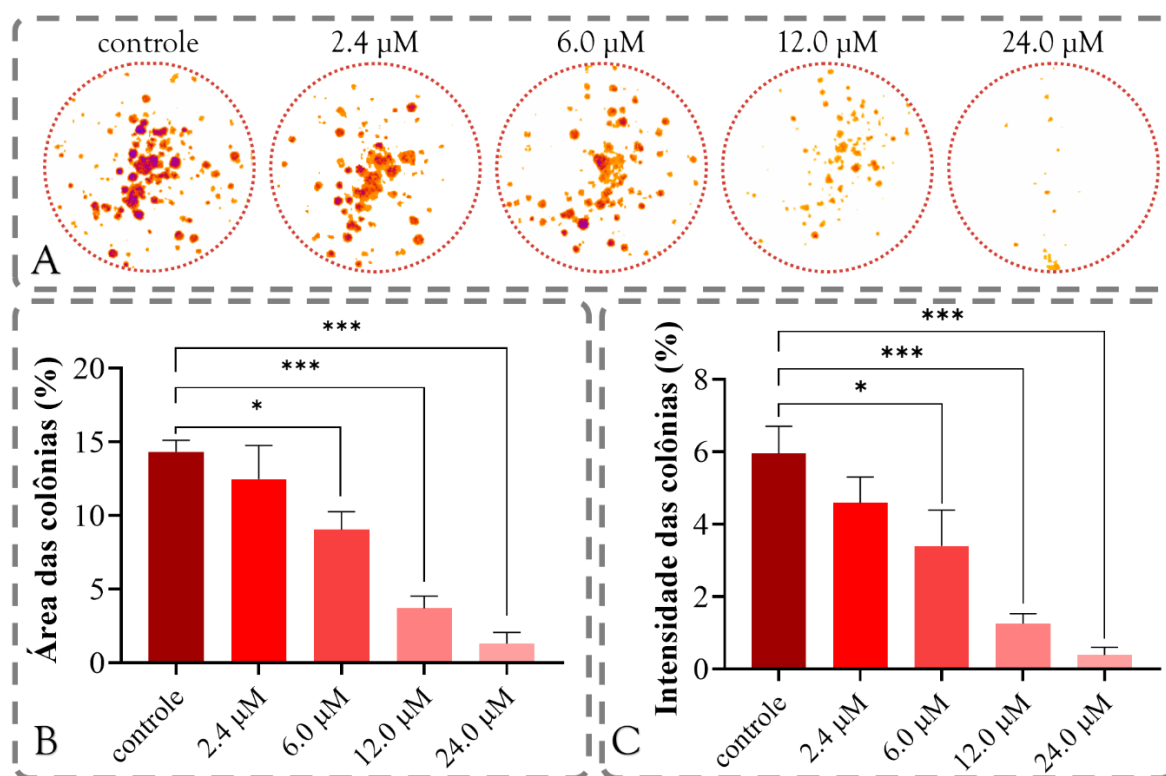


FIGURA 4.15 – (A) Imagem dos poços onde foram cultivadas as células MDA-MB-231 em diferentes concentrações de **A1**. (B) Distribuição do número de colônias em cada concentração. (C) Distribuição da intensidade das colônias em cada concentração. Valores de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Avaliou-se também a sobrevivência clonogênica das células da linhagem MDA-MB-231 quando tratadas com o complexo **A1**. Neste teste



tratamos a cultura celular com diferentes concentrações do complexo, e após 48 horas de incubação é feita a remoção do meio de cultura contendo complexo e as células são expostas a um novo meio de cultura sem tratamento, onde avaliamos a capacidade dessas células formarem colônias após serem tratadas com o complexo.<sup>123</sup> A figura 4.15 nos mostra os resultado obtidos.

Ao analisar os dados observamos a existência de uma correlação concentração-resposta, dada a perda contínua da clonogenicidade das células à medida que se aumenta a concentração, evidenciando o efeito citotóxico e citostático do complexo **A1** sobre as células tumorais de mama MDA-MB-231. De modo diferente do exibido por **A1**, a maioria dos compostos metálicos testados exibe a eliminação completa da clonogenicidade já na concentração do IC<sub>50</sub>, não apresentando (com o aumento da concentração do composto) uma queda contínua tanto no número de colônias como em sua intensidade. Assim, sabendo que a metástase é composta por vários processos que envolvem migração, invasão e sobrevivência dessas células, a inibição da clonogenicidade é um importante indicativo de capacidade antimetastática de um composto.<sup>124-126</sup>

A inibição da capacidade migratória das células MDA-MB-231 foi avaliada utilizando o ensaio de fechamento da risca, onde a extensão do fechamento foi medido na ausência e na presença do complexo **A1**, empregando uma concentração igual a metade do valor de IC<sub>50</sub>, por 48 h. Quando um composto é capaz de inibir o fechamento da risca feita, atribui-se a este a capacidade de inibir a migração celular, sendo esta uma das etapas envolvidas no processo de metástase. Lembrando que conforme dito anteriormente, nesta concentração não foi observado alterações na morfologia, viabilizando a avaliação da capacidade de migração das células. Na Figura 4.16A, é possível observar que no experimento realizado para o controle negativo ocorre o fechamento completo da risca em 48 h. Porém, nos experimentos tratados com **A1**, observa-se a inibição do fechamento da ferida, o que é confirmado ao analisar os dados exibidos nos gráficos das Figura 4.16B-C, tanto em 24 como em 48 horas. O complexo

apresenta 63% de fechamento da risca em 48 horas, onde o controle já apresenta 100% de fechamento, demonstrando a capacidade de inibição da migração exercida por **A1** nas condições empregadas. Outra informação importante é a relação concentração/resposta observada, onde vemos que o tamanho da risca está significativamente correlacionado com a concentração do complexo, assim como observado para os experimentos de sobrevivência clonogênica, confirmando uma possível ação antimetastática de **A1**.

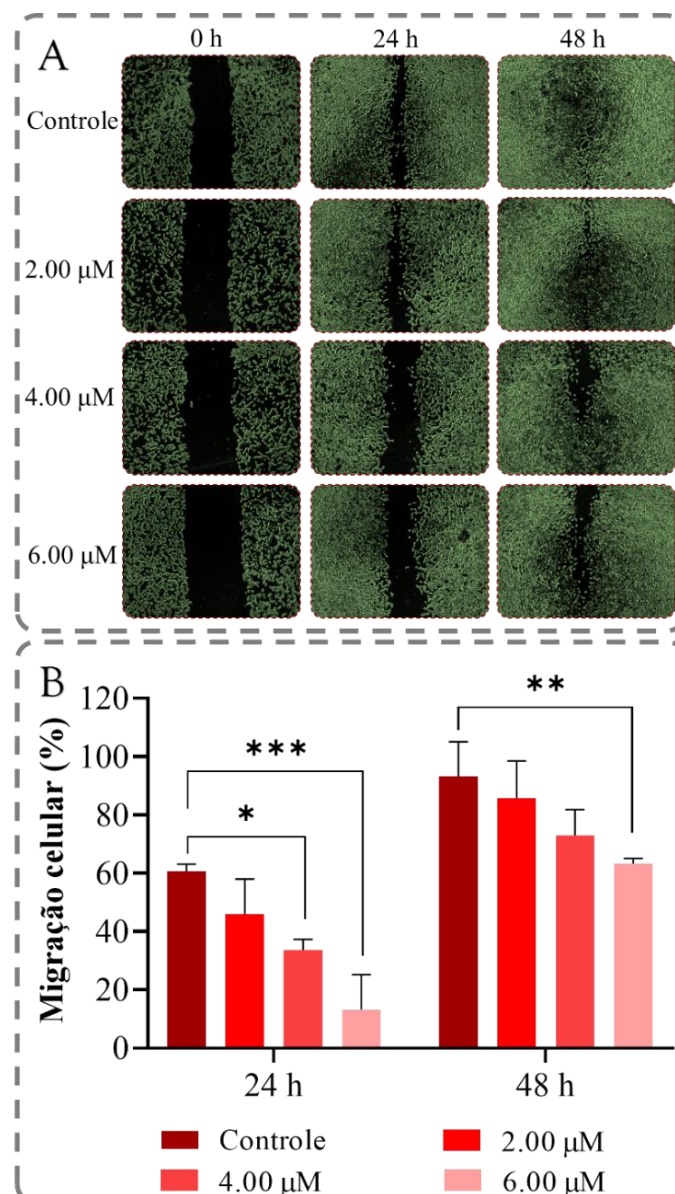


FIGURA 4.16 – (A) Micrografias dos experimentos de inibição da capacidade migratória de células tumorais de mama MDA-MB-231. (B) Gráfico da correlação entre as concentrações empregadas de A1 e a porcentagem de fechamento da risca em 24 e 48 horas de experimento. Valores de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

O efeito citotóxico dos compostos frente às células cancerígenas pode ser resultado da parada do ciclo celular e consequente acúmulo em uma das fases. Para investigar o efeito dos complexos na distribuição do ciclo celular, as células MDA-MB-231 foram expostas as concentrações de  $\frac{1}{2}$   $IC_{50}$  e  $IC_{50}$  dos complexos no período de 48 h. A porcentagem de células em cada fase foi estudada utilizando citometria de fluxo em células coradas com iodeto de propídio. A Figura 4.17 mostram o gráfico da distribuição do ciclo das células MDA-MB-231 na presença e na ausência do complexo **A1**. No controle negativo, é observado que a maioria das células MDA-MB-231 estão em fases  $G_0/G_1$  e  $G_2/M$ . A porcentagem de células tratadas com os complexos nas concentrações de de  $3,00 \mu M$  ( $IC_{50}/4$ ) a  $12,00 \mu M$  ( $IC_{50}$ ) não apresentaram alteração significativa em relação ao controle, sendo observado acúmulo de células na fase  $SubG_1$  apenas na concentração de  $2xIC_{50}$  ( $24,00 \mu M$ ), que pode ser um indicativo de morte celular por apoptose.<sup>127</sup>

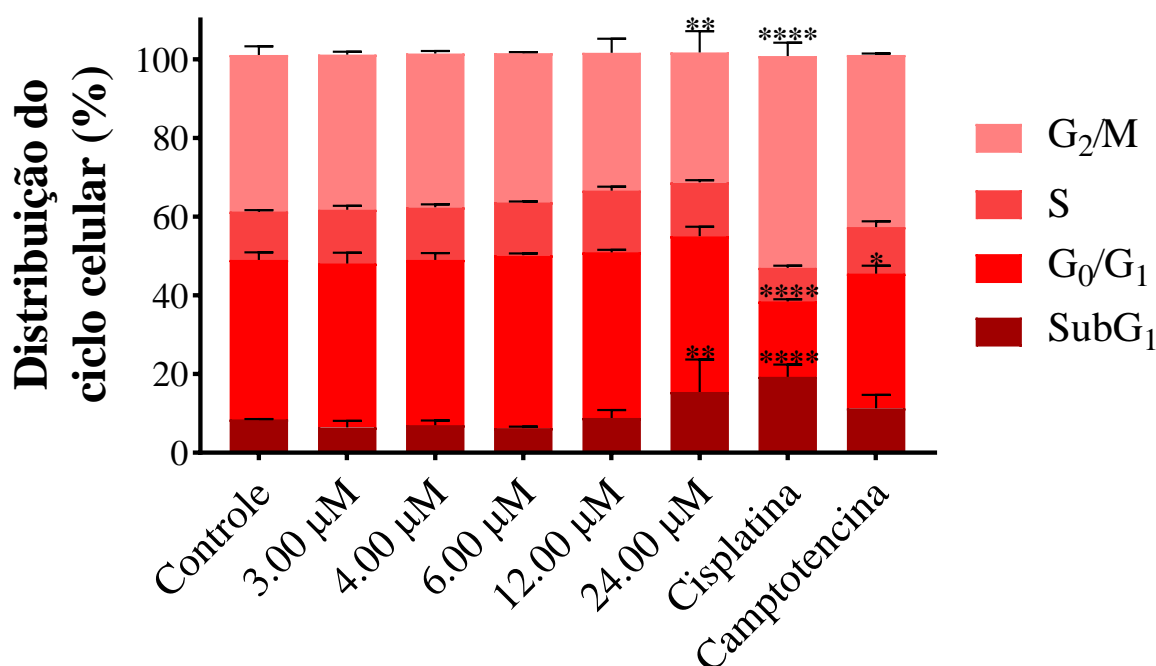


FIGURA 4.17 – Distribuição do ciclo celular das células MDA-MB-231 após tratamento com **A1** por 48 h. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Outro experimento que aporta importante informação ao conhecimento da ação de complexos metálicos é o estudo da acumulação dos

metais nas células. Uma vez que o metal se acumula em células tumorais podemos deduzir com maior certeza a capacidade do mesmo ser transportado para o interior das células como também participação do mesmo em mecanismos internos que desencadeiam a morte celular. Uma técnica que tem viabilizado a obtenção desses dados é a Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* - ICP-MS), principalmente devido à capacidade de determinar a concentração de analitos metálicos em amostras com concentrações de até  $10^{-15}$  grama (1 fentograma =  $10^{-15}$  grama) do analito, sendo útil em ensaios como os realizados neste trabalho, onde se trabalha com células tratadas com complexos em concentrações na casa das microgramas ( $10^{-6}$  g).

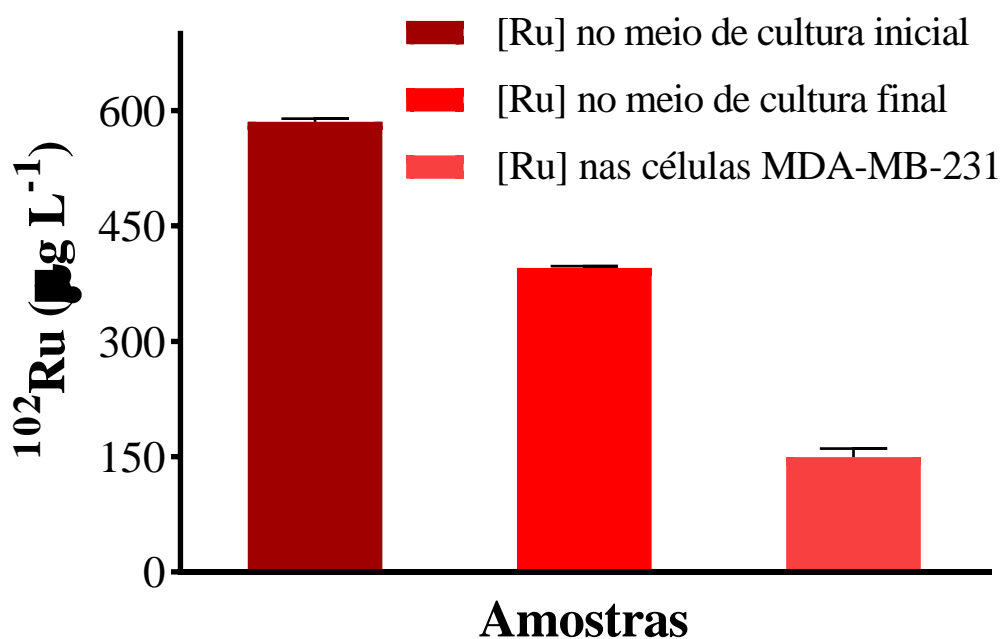


FIGURA 4.18 – Concentrações de rutênio ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) nas células tumorais MDA-MB-231, no meio de cultura em 0 e 24 h. As células foram cultivadas com tratamento de  $5 \mu\text{M}$  do complexo **A1** durante 24 h. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

Empregando esta técnica, a concentração de rutênio, proveniente do tratamento das células com o complexo **A1**, foi determinada nas células tumorais aderentes MDA-MB-231 e no meio de cultura, que foi analisado no início e no final do experimento (24 h). A Figura 4.18 mostra a concentração de  $^{102}\text{Ru}$  (abundância natural de 36%), expressa em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , para as células tratadas e para

o meio de cultura. Como pode ser visto, as células tumorais aderentes apresentaram aproximadamente 30% de captação celular do metal em relação ao meio de cultura inicial. A concentração remanescente de rutênio foi encontrada no meio de cultura final, o que valida os dados obtidos no experimento. As concentrações do analito determinadas nas amostras não apresentaram diferenças significativas (teste t-pareado com 95% de confiança). A concentração média de Ru após 24 h de incubação com o complexo **A1** foi de  $250 \pm 16$  fg por célula MDA-MB-231. Nossos resultados estão de acordo com publicações anteriores sobre a captação de rutênio nas linhas de células tumorais. Os resultados publicados revelaram uma média de 0,9 fg de Ru por célula A2780 incubada com RAPTA-C,<sup>128</sup> 30 fg de Ru por célula SW180 incubada com o composto KP1019<sup>129</sup> e 206-298 fg de Ru por célula A459, incubados com complexos de Ru/metilimidazol.<sup>130</sup>

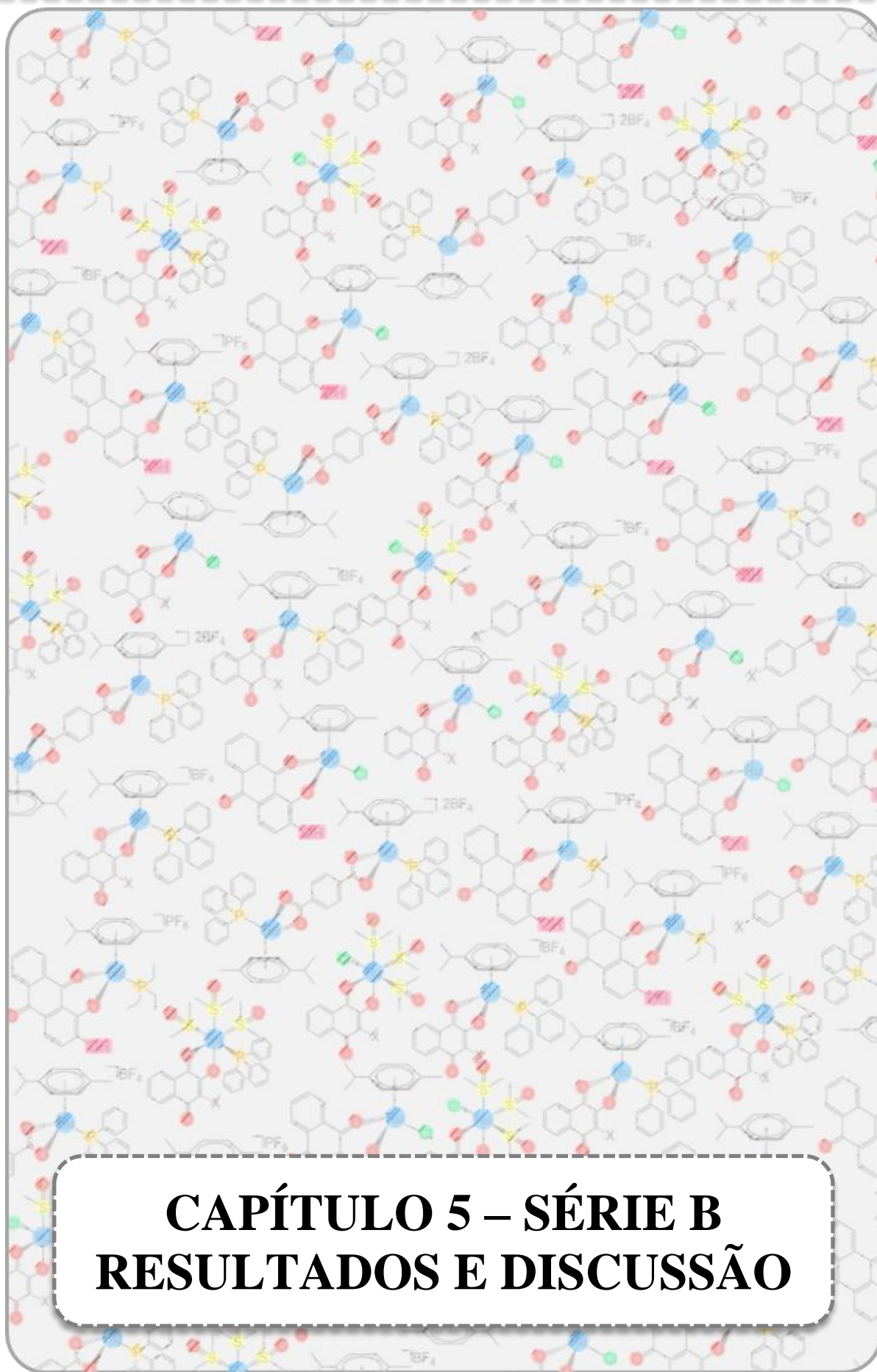
### 4.3 – Conclusões parciais da Série A.

Em suma, nesta série avaliamos algumas das propriedades antitumorais (*in vitro*) de quatro novos complexos do tipo Ru<sup>II</sup>/areno/trifenilfosfina contendo ácidos benzóicos *p*-substituídos como ligantes. Três destes complexos são mononucleares (**A1-A3**) e um binuclear (**A4**), sendo todos sintetizados caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas e de raios X. Uma característica marcante desses compostos é a instabilidade em solventes coordenantes, sendo empregado para os testes biológicos a acetona como veículo. As atividades citotóxicas destes compostos foram avaliadas frente às linhagens tumorais MDA-MB-231, MCF-7 (mama), DU-145 (próstata) e A549 (pulmão) e não tumorais MCF-10A (mama), MRC-5 (pulmão) e PNT2 (próstata), em 48 h de exposição aos complexos. Com exceção do complexo binuclear **A4** (insolúvel no meio biológico), todos os complexos foram citotóxicos frente às células trabalhadas, onde o complexo **A1** apresentou o maior índice de seletividade, isto na linhagem mamária MDA-MB-231. O complexo **A1** se

---

mostrou capaz de inibir a formação de colônias e a migração celular, com considerável tendência à concentração-resposta, estes fatos demonstram a possibilidade de haver uma possível ação antimetastática para este complexo. Além disso, o complexo **A1** não causa interferência significativa no ciclo celular e morfologia das células em concentrações abaixo dos valores de  $IC_{50}$ , além de exibir a capacidade de se acumular em células MDA-MB-231, conforme mostrado em experimentos de absorção celular. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, para compreender efetivamente os mecanismos de ação exibidos por estes complexos frente à organismos vivos.<sup>103</sup>





**CAPÍTULO 5 – SÉRIE B**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**



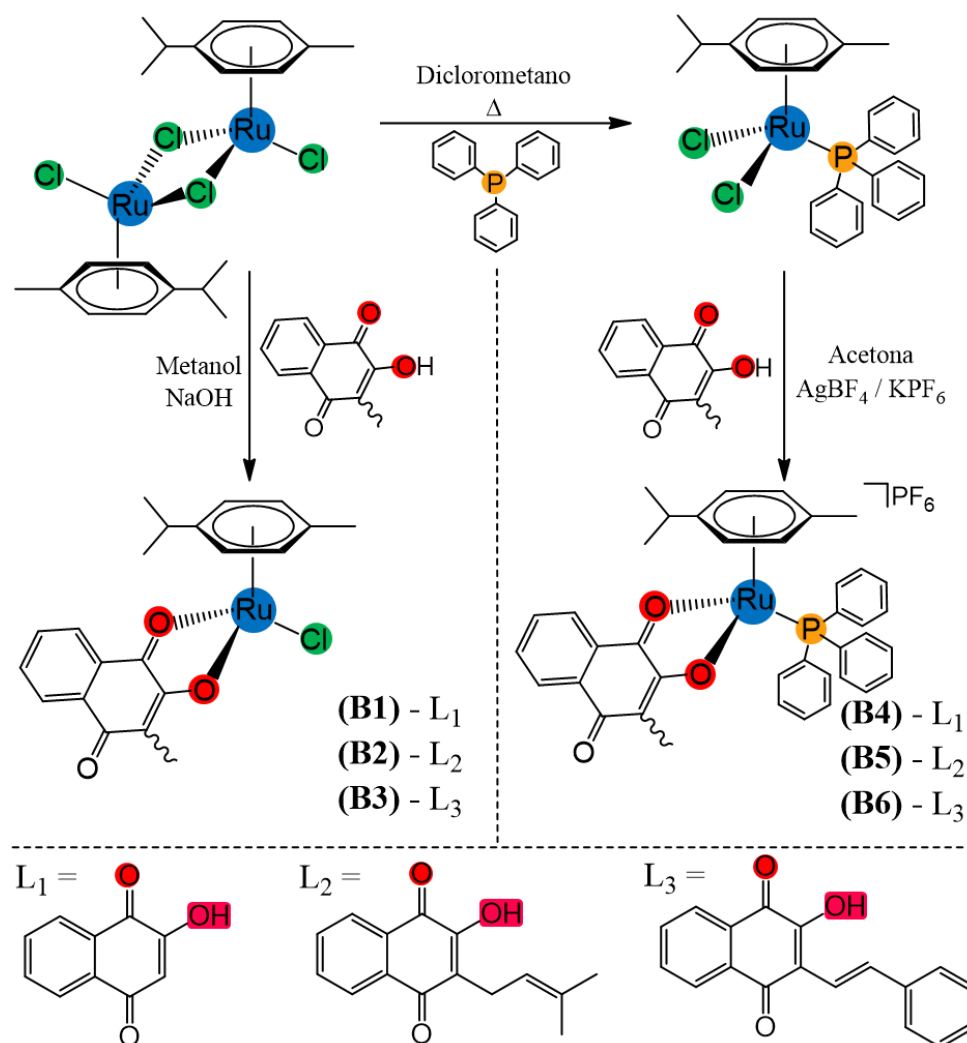
Conhecendo a versatilidade dos ligantes naftoquinônicos (seção 1.7), exemplificada pelo uso clínico da doxorubicina como droga antineoplásica, e a crescente atenção dada aos complexos organometálicos do tipo Ru<sup>II</sup>/areno (seção 1.6), propusemos a síntese e caracterização de uma nova série de compostos provenientes da combinação dessas duas classes de substâncias. Isto visando obter complexos que agregassem as importantes características antineoplásicas exibidas por ambos precursores, obtendo assim novos compostos com potencial ação frente a tumores humanos.

### 5.1 - Síntese e caracterização dos complexos da Série B.

Propusemos inicialmente nesta série a síntese de 6 novos compostos contendo como ligantes o *p*-cimeno (areno), naftoquinonas (L<sub>1</sub> = lausona, L<sub>2</sub> = lapachol ou L<sub>3</sub> = 3-estiril-lausona) e como substituinte monodentado o ligante clorido ou trifenilfosfina. A obtenção destes complexos nos permitiu avaliar as influências do ligante trifenilfosfina, da carga final dos complexos, como também a influência dos diferentes substituintes hidrocarbonetos das naftoquinonas, e isto quanto a ação frente as diferentes linhagens de células tumorais. Para a obtenção dos referidos complexos foram empregados os precursores [ $\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2$ ], para os complexos de neutros contendo o clorido como substituinte monodentado, apresentando a fórmula  $[\text{RuClL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]$  (**B1-B3**), e  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$  para os complexos monocatiônicos contendo a trifenilfosfina como ligante monodentado, com fórmula  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (**B4-B6**).

No Esquema 5.1 vemos a descrição das condições reacionais e estruturas propostas para estes complexos. Para a obtenção dos compostos **B1-B3**, empregou-se o hidróxido de sódio (NaOH) como agente desprotonante do grupo hidroxila da naftoquinona, devido à baixa acidez do mesmo, uma vez que não houve o completo consumo do precursor sem o emprego desta base forte. Um fator crucial para a obtenção dos complexos **B4-B6** foi o uso do sal AgBF<sub>4</sub> como

agente labilizante do ligante clorido, onde a formação do sal insolúvel AgCl leva à rápida coordenação da naftoquinona, sem a necessidade de se adicionar um agente desprotonante. O complexo **B2** já se encontra reportado na literatura, sendo novamente sintetizado a fim de se estabelecer uma relação estrutura/atividade em comparação aos demais compostos.<sup>131</sup>



ESQUEMA 5.1 – Rota sintética para a síntese dos complexos **B1-B6**.

Para os complexos **B3** e **B6** foi possível a obtenção de monocristais, levando assim à confirmação das estruturas propostas no Esquema 5.1, onde vemos a coordenação ocorrendo pelo modo bidentado através dos átomos de oxigênio dos grupos  $\text{C}_1=\text{O}_1$  e  $\text{C}_2-\text{O}_2$ , conforme já observado em trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa.<sup>65,87,94,95</sup> Além disso, a presença do contraíon  $\text{PF}_6^-$  na unidade assimétrica do complexo **B6** confirma o caráter

catiônico do mesmo. Na Figura 5.1 observamos a estrutura cristalina obtida para **B2**, **B3** e **B6**, sendo a estrutura do complexo **B2** apresentada a nível de comparação, uma vez que a mesma já se encontra reportada na base de dados cristalográficos (CCDC 918728).<sup>131</sup>

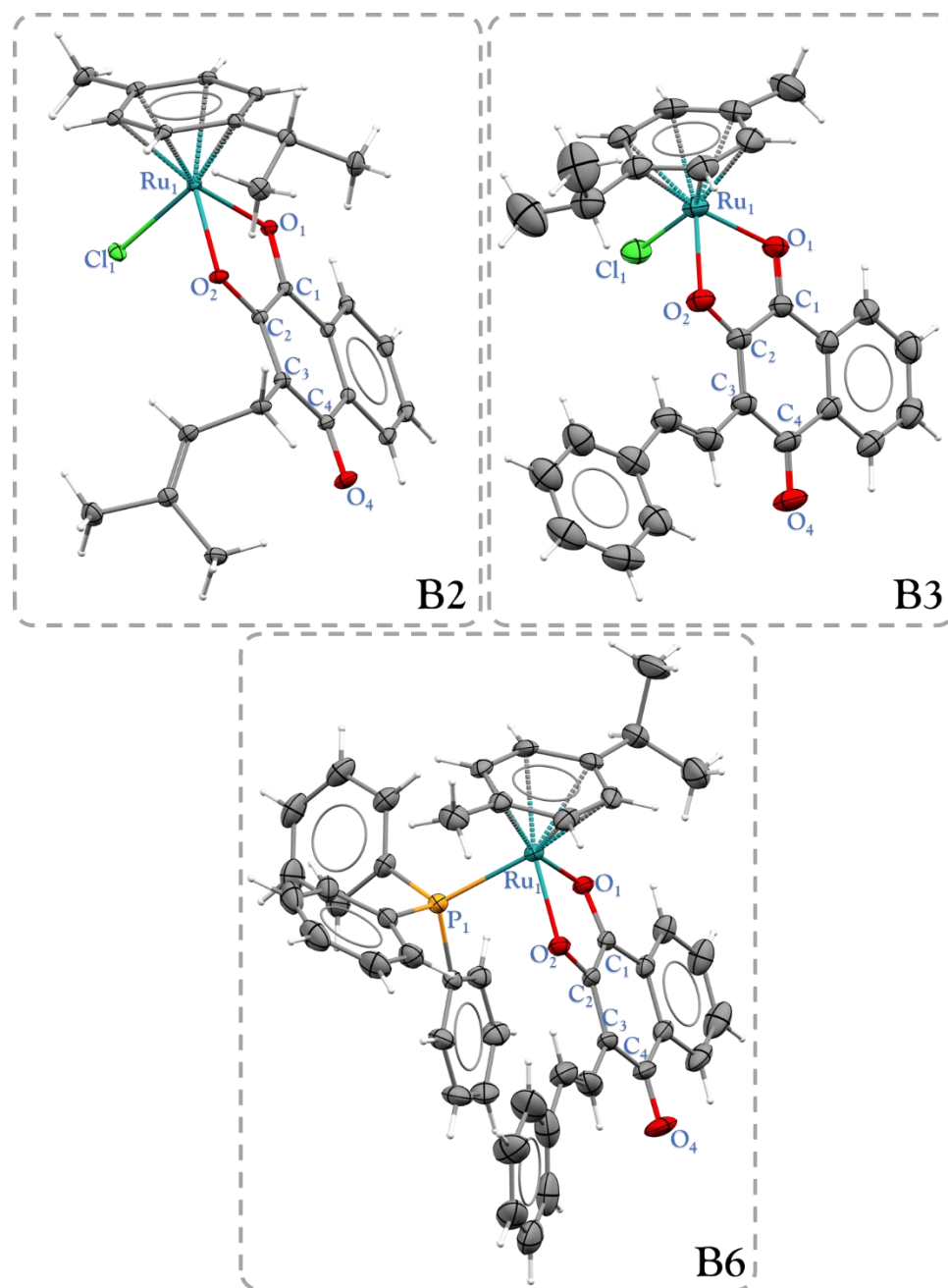


FIGURA 5.1 – Estrutura cristalográfica obtida para os complexos **B2**<sup>131</sup>, **B3** e **B6**. Os átomos estão representados no modelo ORTEP (elipsóides em 30%). Na representação do complexo **B6** o contraíon  $\text{PF}_6^-$  foi omitido afim de melhor se visualizar a molécula.

O complexo **B3** se cristaliza em um grupo espacial triclínico P-1, enquanto **B6** se cristaliza no grupo monoclinico P2<sub>1</sub>/n, sendo que ambas estruturas

crystalinas apresentaram uma molécula do complexo por unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ). Diferente da Série A, não há efeito de ressonância entre as ligações  $C_1=O_1$  e  $C_2-O_2$  (átomos envolvidos na coordenação) nos complexos obtidos nesta Série, isto por serem estruturalmente menos favorecidas, devido a existência da dupla ligação adjacente a hidroxila  $C_2-O_2$ , fazendo com o sistema ressonante surja entre  $C_2-O_2/C_3/C_4=O_4$ . Deste modo, como mostrado na Tabela 5.1, observa-se uma tendência nos comprimentos da ligação simples  $C_2-O_2$  ( $\approx 1,30 \text{ \AA}$ ), que se tornam mais curtos após a coordenação, além de um pequeno alongamento da ligação dupla  $C_1=O_1$  ( $\approx 1,24 \text{ \AA}$ ), isto quando comparamos as estruturas cristalográficas dos ligantes livres e coordenados. De modo similar ao exibido pelos compostos da Série A, os comprimentos de ligação Ru-O permaneceram próximos a média encontrada a partir dos valores disponíveis na literatura para ligações desse tipo ( $2,08 \text{ \AA}$ , Figura 4.4). As tabelas contendo os parâmetros cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos **B3** e **B6** constam nas tabelas de dados cristalográficos para a Série B no apêndice.

TABELA 5.1 – Comprimentos de ligação ( $\text{\AA}$ ) entre alguns pares atômicos dos complexos **B2**, **B3**, **B6** e ligantes lausona e lapachol.

	Comprimento de Ligação ( $\text{\AA}$ )				
	$L_1^a$	$L_2^b$	<b>B2</b> <sup>c</sup>	<b>B3</b>	<b>B6</b>
<b>C<sub>1</sub>=O<sub>1</sub></b>	1,227	1,236	1,247(2)	1,243(4)	1,254(4)
<b>C<sub>2</sub>-O<sub>2</sub></b>	1,335	1,349	1,303(2)	1,294(4)	1,298(4)
<b>C<sub>4</sub>=O<sub>4</sub></b>	1,226	1,232	1,229(2)	1,222(4)	1,220(5)
<b>Ru<sub>1</sub>-O<sub>1</sub></b>	-	-	2,107 (1)	2,074(2)	2,074(2)
<b>Ru<sub>1</sub>-O<sub>2</sub></b>	-	-	2,076(1)	2,080(2)	2,078(2)
<b>Ru<sub>1</sub>-Cl<sub>1</sub></b>	-	-	2,407(1)	2,382(9)	-
<b>Ru<sub>1</sub>-P<sub>1</sub></b>	-	-	-	-	2,380(9)

<sup>a</sup>CCDC 1268837, <sup>b</sup>CDCC 1189905 e <sup>c</sup>CDCC 918728.

O composto **B3** apresenta interações intermoleculares fracas do tipo C-H...O=C e Ru-Cl...H-C, interações hidrofóbicas do tipo C-H...H-C e C...H-C, e interações  $\pi$ - $\pi$  entre os anéis do ligante *p*-cimeno. Embora sejam interações fracas, todas possuem importante relevância, sendo o conjunto de todas responsável pela

estabilização do empacotamento cristalino observado. A cela unitária é composta pelo dímero formado a partir das interações C-H...O=C (2,460 Å), onde a ligação C=O participante é a pertencente à porção naftoquinona não coordenada (C<sub>4</sub>=O<sub>4</sub>) e os hidrogenios do anel do areno (C5'-H5'). A interação  $\pi$ - $\pi$  encontrada é composta entre ligantes *p*-cimeno de moléculas vizinhas através da sobreposição do tipo C=C...C=C (3,330Å), entretanto não pode ser classificado como uma interação “ $\pi$ -stacking” por não haver empilhamento efetivo entre os anéis do ligante *p*-cimeno (Figura 5.2(a)).<sup>132</sup>

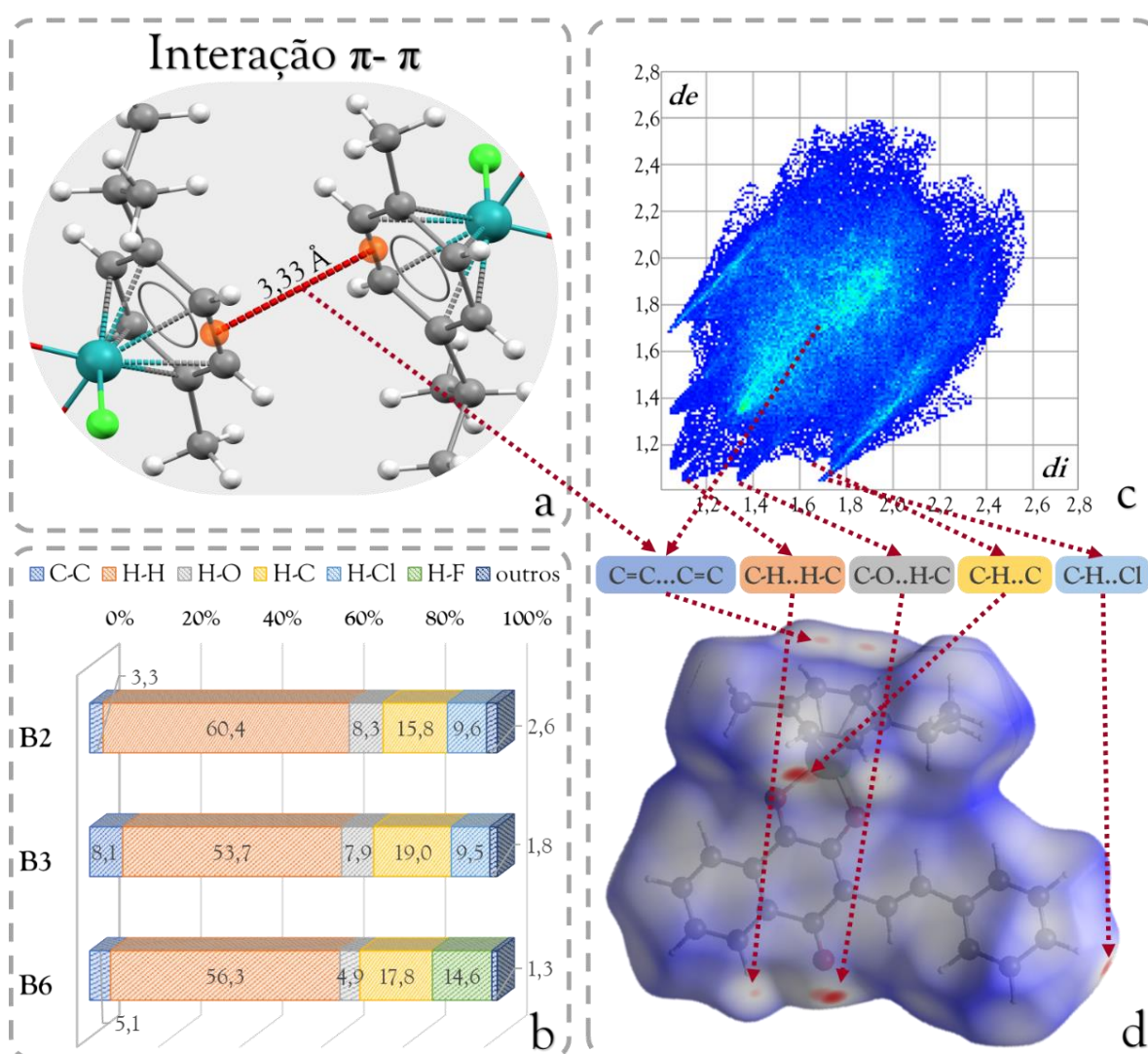


FIGURA 5.2 – a. Representação da interação  $\pi$ - $\pi$  presente no empacotamento cristalino do complexo **B3**. b. Gráfico de distribuição dos contatos intermoleculares presentes em **B2**, **B3** e **B6**. c. Gráfico *FingerPrint* obtido para o complexo **B3** representando todos os contatos intermoleculares. d. Mapa de Hirshfeld obtido para o complexo **B3**, onde as regiões em vermelho, branco e azul

representam respectivamente os contatos menores, iguais e maiores que a soma dos raios de van der Waals dos átomos participantes do contato.

O composto **B6**, apresenta interações intermoleculares similares a **B3**, com ligações de hidrogênio fracas do tipo C-H...O<sub>4</sub>=C<sub>4</sub>, interações hidrofóbicas C-H...H-C e C...H-C e interações não clássicas do tipo C-H...F-P envolvendo os anéis aromáticos da trifenilfosfina e o contraíon PF<sub>6</sub><sup>-</sup>.

Para melhor compreender as interações intermoleculares presentes nos complexos no estado sólido foi realizada uma comparação geral dos contatos intermoleculares entre complexos, empregando o programa Crystal Explorer.<sup>133</sup> Este programa permite descrever os contatos intermoleculares entre os átomos através do cálculo da superfície de Hirshfeld<sup>134</sup> e pelo gráfico *Fingerprint*.<sup>135</sup> Nas superfícies de Hirshfeld normalizadas para cada um dos complexos, observa-se os contatos intermoleculares em função do raio de van der Waals, apresentando em vermelho os contatos intermoleculares mais intensos, sendo estes referentes aos contatos cujas dimensões são menores que a soma dos raios de van der Waals dos átomos que constituem a interação. Em uma transição entre branco-azul, os contatos menos intensos ou mais distantes são representados, sendo que o em branco representa as regiões onde exatamente as esferas de van der Waals se tocam e o em azul refere-se às distâncias maiores que o raio de van der Waals.<sup>134</sup> Na Figura 5.2(d) observamos o mapa de superfície obtido para o complexo **B3**, onde a pequena parcela de pontos em vermelho (contatos fortes) ocorrem principalmente em torno dos grupos doadores e aceptores participantes das interações descritas anteriormente, como por exemplo ao redor do grupo carbonilo não coordenado (C<sub>4</sub>=O<sub>4</sub>) e na interação  $\pi$  entre os ligantes *p*-cimeno. Nota-se o predomínio dos contatos mais distantes (cor azul e branco) que se localizam ao redor das regiões hidrofóbicas das moléculas, próximos aos átomos de hidrogênio da trifenilfosfina e dos anéis aromáticos da naftoquinona.

O gráfico *fingerprint* fornece a projeção da superfície de Hirshfeld em duas dimensões (FIGURA 5.2(c)). A projeção obtida, é considerada uma

impressão digital dos contatos intermoleculares observados para uma substância no estado sólido, sendo exclusivas da estrutura cristalina que representa. O gráfico é construído por dois eixos, a projeção do eixo *de* (em y) que representa as distâncias entre a superfície e os átomos externos que participam do contato intermolecular, versus o eixo *di* (em x) que é a distância entre um átomo interno e o contorno da superfície obtida. Esses gráficos permitem analisar, separadamente, as projeções referentes aos contatos H...C, H...O, H...H, C...H, C...C, F...C, Cl...C, dentre outros presentes nas moléculas de interesse. Além disso, dado o conhecimento do número total de contatos, é possível realizar cálculos da porcentagem de cada tipo de interação em relação ao todo.

Na Figura 5.2(b) observamos o gráfico da distribuição da porcentagem de cada interação para as estruturas cristalinas **B2**, **B3** e **B6**. Vemos a predominância de contatos do tipo H...H, resultante de interações hidrofóbicas, sendo responsáveis por aproximadamente 50% do total de contatos observados. Este fato corrobora com a predominância da cor azul e branco nas superfícies de Hirshfeld, que representam interações com contatos mais distantes, de característica hidrofóbica (regiões apolares que não interagem com água). A Figura 5.3 representa o empacotamento cristalino do complexo **B6** apresentando regiões que participam desses contatos hidrofóbicos. Para espécies quimicamente diferentes, ferramentas como o *fingerprint* e a superfície de Hirshfeld ilustram eficientemente a presença, quantidade e intensidade de um dado tipo de contato. De modo geral, as várias possibilidades de interações intermoleculares encontradas em substâncias de estrutura conhecida podem ser um ponto chave para a compreensão da ação de fármacos com promissoras atividades farmacológicas, pois estas interações observadas na estrutura cristalina também podem vir a ocorrer com moléculas presentes no meio biológico.<sup>136,137</sup>

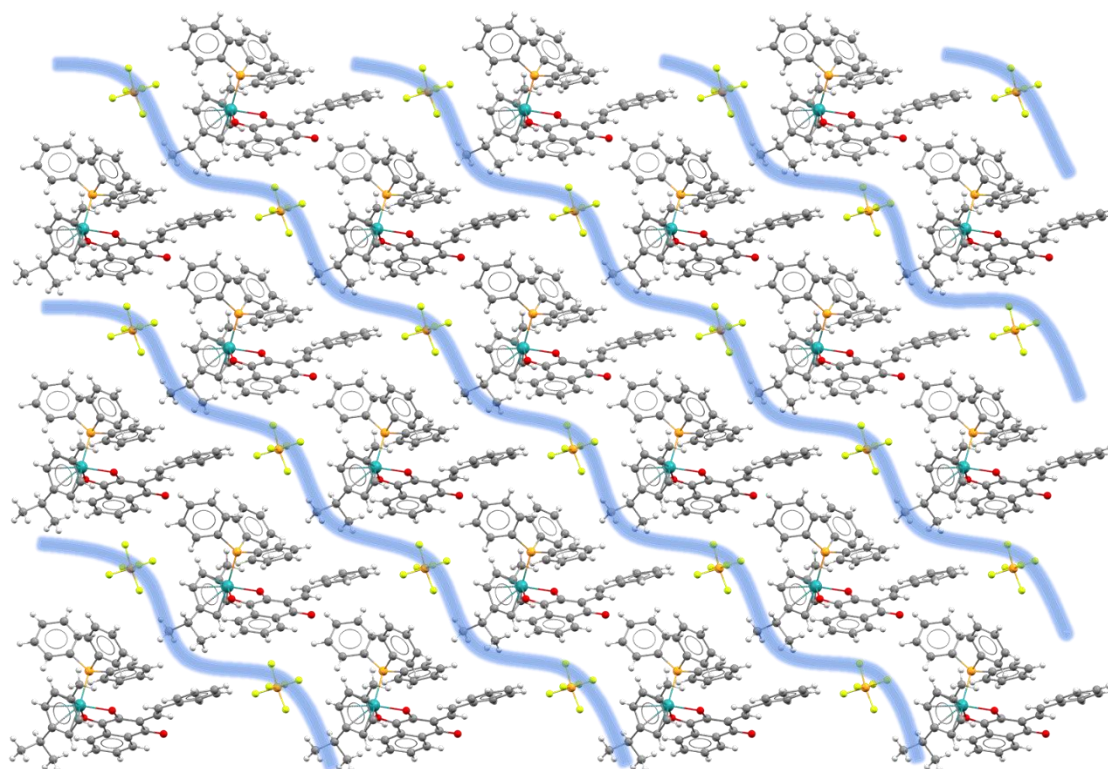


FIGURA 5.3 – Plano do empacotamento cristalino (*a/c*) contendo o complexo B6. Em destaque temos as regiões onde predominam os contatos hidrofóbicos.

As composições químicas dos complexos foram determinadas por análise elementar. Os valores experimentais obtidos estão de acordo com as propostas estruturais, confirmando a composição química dos complexos para os elementos testados, conforme apresentado na Tabela 5.2, os quais se encontram dentro dos teores esperados.

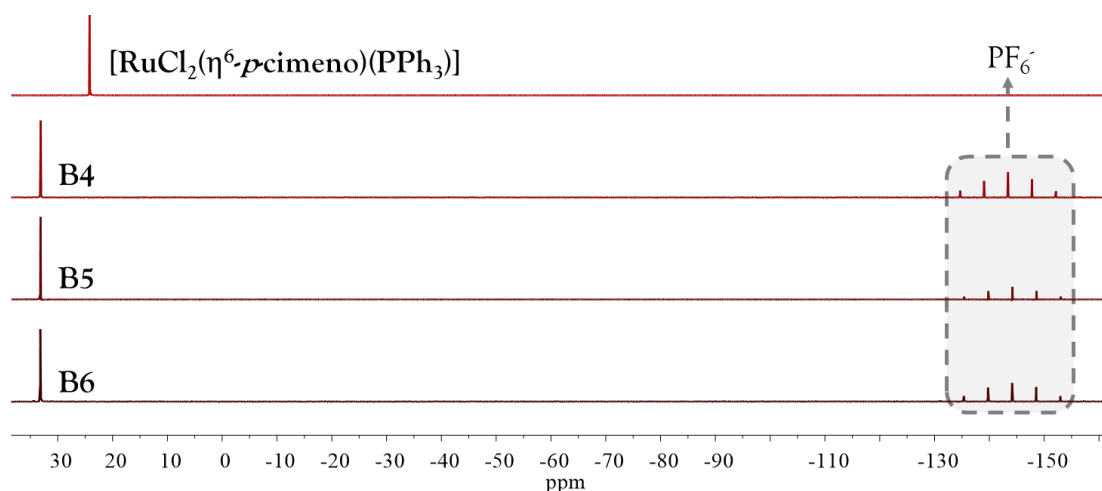
As medidas de condutividade molar, também apresentadas na Tabela 5.2, foram realizadas em diclorometano e os valores encontrados para os complexos **B1-B3** indicaram, conforme esperado, que os compostos são neutros, não exibindo condutividade considerável na concentração empregada. Já os complexos **B4-B6** apresentaram condutividade na faixa de eletrólito 1:1 ( $12 - 77 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ ), evidenciando a obtenção destes complexos na forma iônica, sendo  $\text{PF}_6^-$  o contraíon, conforme já evidenciados nos dados de difração de raios X.



TABELA 5.2 – Dados de análise elementar e condutividade para o complexo de rutênio (Valores teóricos entre parêntesis)

	C(%)	H(%)	Condutividade (S.cm <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup> )
<b>B1</b>	55.22 (54.12)	4.22 (4.31)	0,2
<b>B2</b>	57.73 (58.65)	5.35 (5.32)	0,9
<b>B3</b>	62.30 (61.59)	4.54 (4.61)	0,7
<b>B4</b>	56.18 (55.95)	4.47 (4.20)	33,4
<b>B5</b>	57.78 (58.65)	4.79 (4.32)	29,3
<b>B6</b>	60.03 (60.22)	5.21 (4.39)	35,6

De modo similar à Série A, os espectros de RMN <sup>31</sup>P dos complexos **B4-B6** apresentam um singlete referente ao fósforo da trifenilfosfina, em  $\approx \delta$  33 ppm (Figura 5.4), além disso observa-se também o multipeto referente ao ânion PF<sub>6</sub><sup>-</sup> em  $\approx \delta$  -144 ppm. O deslocamento químico do ligante PPh<sub>3</sub> nos novos complexos em relação ao precursor indica que o átomo de fósforo se encontra menos protegido (em relação ao precursor,  $\delta$  24 ppm), fato característico da troca dos ligantes cloridos pelos oxigênios das naftoquinonas, sendo que dada a maior eletronegatividade do oxigênio, temos que o mesmo promove a desblindagem o átomo de fósforo com mais eficiência que os ligantes cloretos, levando ao deslocamento do sinal para maiores frequências.

FIGURA 5.4 – Espectros de RMN de <sup>31</sup>P dos complexos **B4-B6** e [RuCl<sub>2</sub>( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(PPh<sub>3</sub>)] em CDCl<sub>3</sub>.

Nos experimentos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) para os complexos **B1-B6** pôde-se observar e atribuir todos os sinais referentes aos hidrogênios presentes nos complexos. Nas Figuras 5.5 e 5.6 observamos os espectros obtidos para os complexos **B3** e **B6**, onde estão destacados os sinais e suas respectivas atribuições. Todos os espectros de  $^1\text{H}$  registrados para esta série são apresentados no Apêndice.

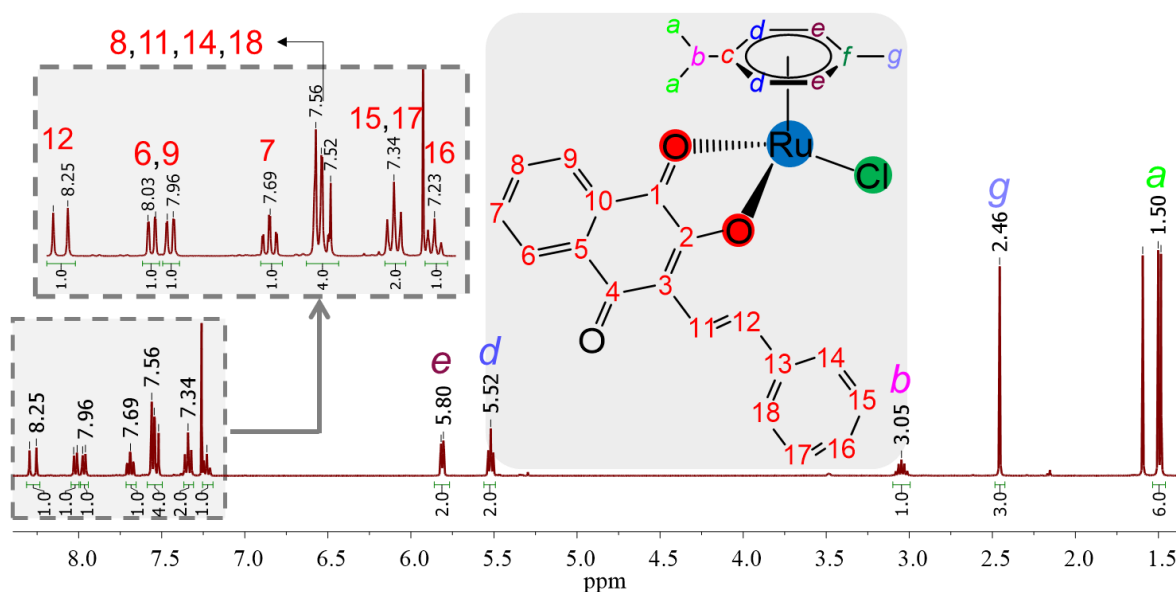


FIGURA 5.5 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo **B3** em  $\text{CDCl}_3$

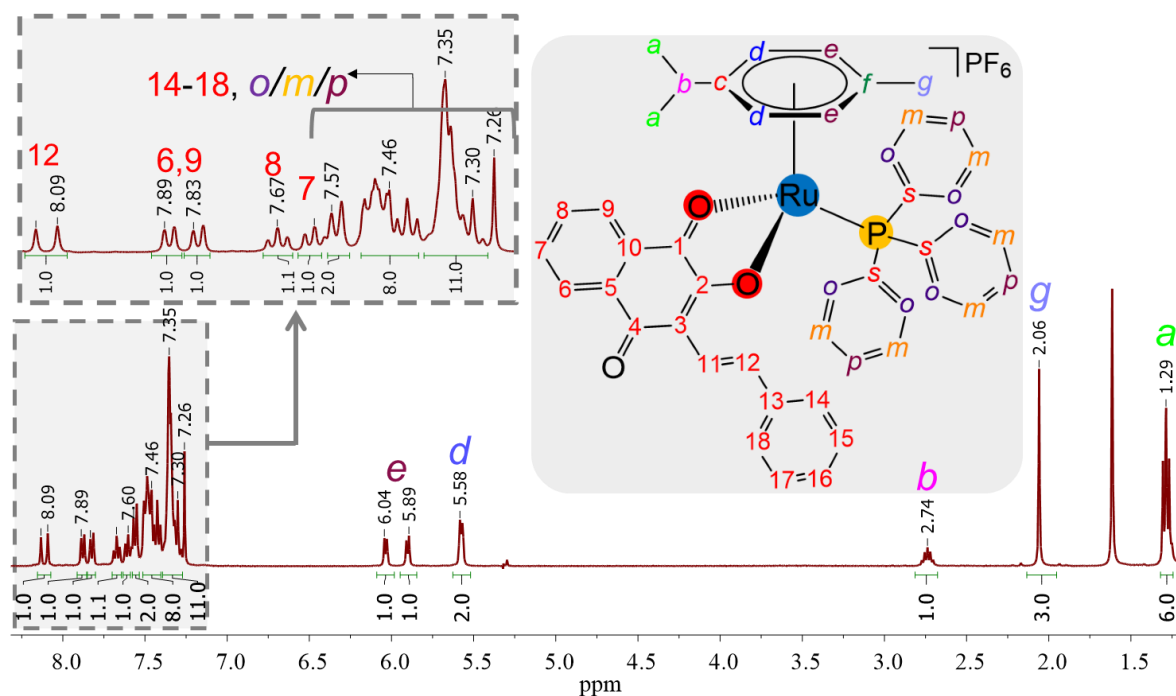


FIGURA 5.6 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo **B6** em  $\text{CDCl}_3$ .

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  representados nas Figuras 5.5 e 5.6, observamos três grupos distintos de sinais, o primeiro referente aos hidrogênios alifáticos presentes no ligante *p*-cimeno ( $\delta$  1,0-3,0 ppm, ligados aos carbonos *a/b/g*), o segundo por volta de  $\delta$  5,5 ppm referente aos carbonos ligados ao anel do areno coordenado (ligados aos carbonos carbonos *d/e*) e o terceiro e mais abundante em sinais referente aos hidrogênios aromáticos das naftoquinonas (**B1-B6**) e trifenilfosfina (**B4-B6**). Esses sinais são facilmente atribuídos com o auxílio dos mapas de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , onde destacam-se os acoplamentos dos hidrogênios vizinhos, evidenciando os grupos de sinais citados anteriormente. Na Figura 5.7 destacamos os acoplamentos presentes entre os sinais referentes ao ligante *p*-cimeno no complexo **B3**, como no grupo isopropil( $a \leftrightarrow b$ ) e entre os hidrogênios aromáticos do anel ( $d \leftrightarrow e$ ), e além destes visualiza-se também os vários acoplamentos existentes entre os hidrogênios da naftoquinona na região entre  $\delta$  7,0 e 8,5 ppm, sendo todos devidamente identificados.

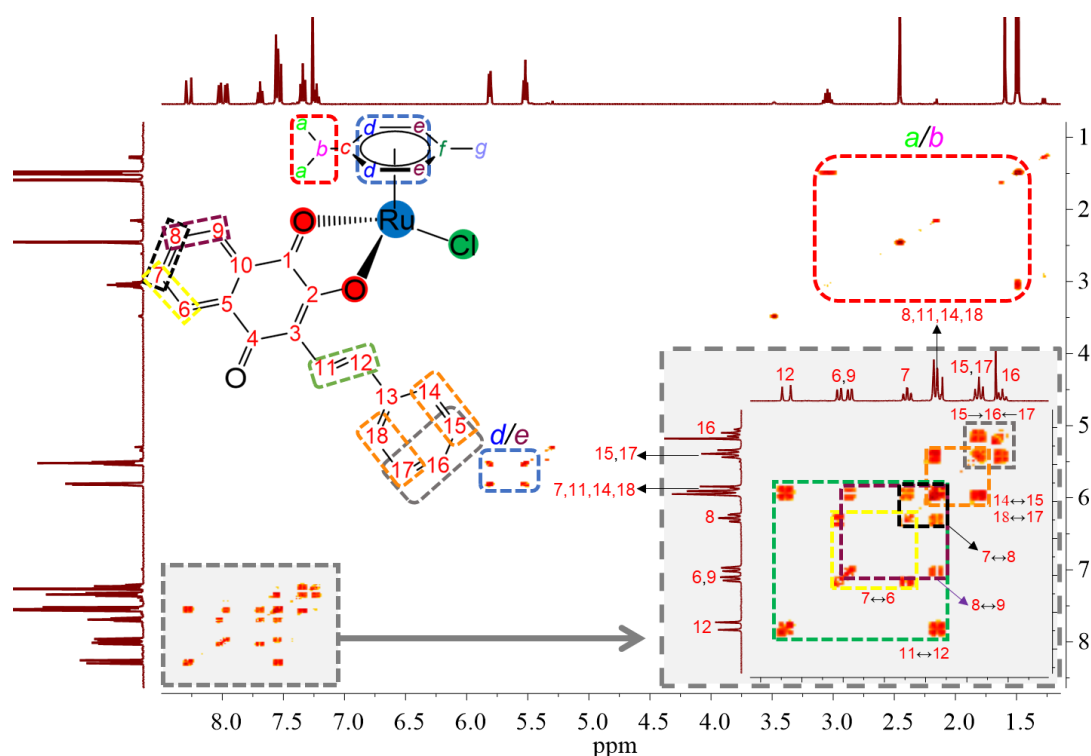


FIGURA 5.7 – Mapa de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  obtido para o complexo **B3** em  $\text{CDCl}_3$ .

Diferente da Série A, os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do ligante *p*-cimeno sofrem desdobramento, uma vez que na Série A os mesmos

sempre são registrados como 2 dubletos, enquanto nesta Série os mesmos se desdobram em dubletos (hidrogênio ligado ao carbono *e* em B6) ou falsos tripletos (hidrogênio ligado ao carbono *d* em B3). Isto pode estar relacionado ao fato da quebra da simetria com a coordenação de ligantes assimétricos, levando ao desdobramento dos sinais, uma vez que na Série A os ligantes ácido benzoico *p*-substituídos são simétricos e nesta Série as naftoquinonas empregadas são assimétricas.

Os sinais exibidos nos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ) foram atribuídos com o auxílio das técnicas 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) e HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*). No mapa de contorno HSQC observamos os acoplamentos entre os hidrogênios e carbonos diretamente ligados, permitindo atribuir uma série de sinais referentes aos carbonos *a/b/d/e/g* do ligante *p*-cimeno e carbonos ligados aos hidrogênios presentes na naftoquinona. Com os dados do mapa de contorno HMBC determinamos os carbonos quaternários presentes nos complexos, e isto através da observação dos acoplamentos entre eles e os hidrogênios distantes em até 3 ligações. Nas Figuras 5.8 e 5.9 são apresentados os espectros de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  obtidos para os complexos **B3** e **B6** contando as atribuições para todos os sinais observados. Todos os espectros de RMN 1D e 2D obtidos para esta série constam do Apêndice.

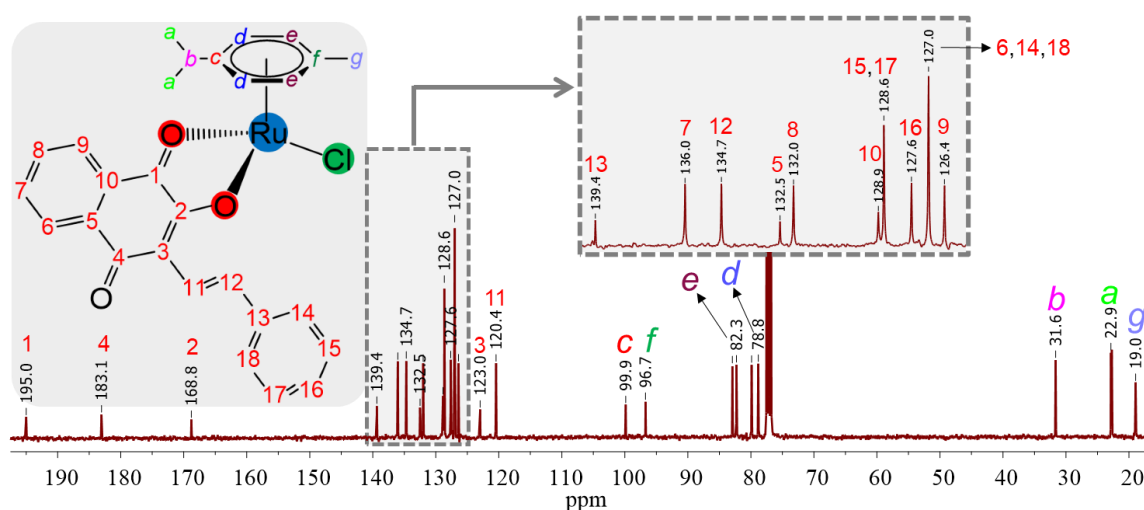


FIGURA 5.8 – Espectro de RMN de carbono  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B3** em  $\text{CDCl}_3$ .

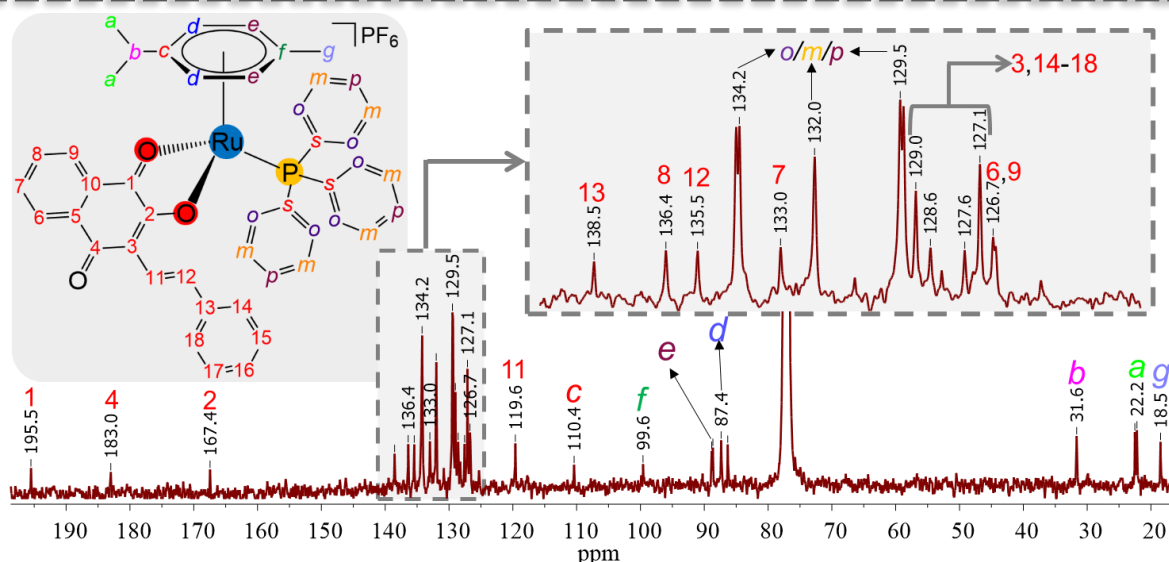


FIGURA 5.9 – Espectro de RMN de carbono  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B6** em  $\text{CDCl}_3$ .

Na Figura 5.10 exemplificamos o emprego da técnica  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC na atribuição dos carbonos quaternários 1, 2 e 4, onde vemos o acoplamento a múltiplas ligações de 1 com o hidrogênio ligado ao carbono 9, 2 acoplado com o hidrogênio ligado ao carbono 11, e o carbono 4 acoplado aos hidrogênios ligados aos carbonos 11 e 6. De modo similar ao observado nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , os sinais referentes aos carbonos *d/e* se desdobram em 4 singletos, enquanto na Série A os carbonos *d/e* correspondem a apenas um singletto intenso, fato também correlacionado à coordenação do um ligante naftoquinona, que é assimétrico e pode levar ao desdobramento observado. Outros trabalhos da literatura que empregam ligantes assimétricos em compostos Ru/*p*-cimeno também levam ao desdobramento observado, confirmando a hipótese da correlação com o abaixamento da simetria do complexo em relação ao precursor.<sup>74,92</sup>

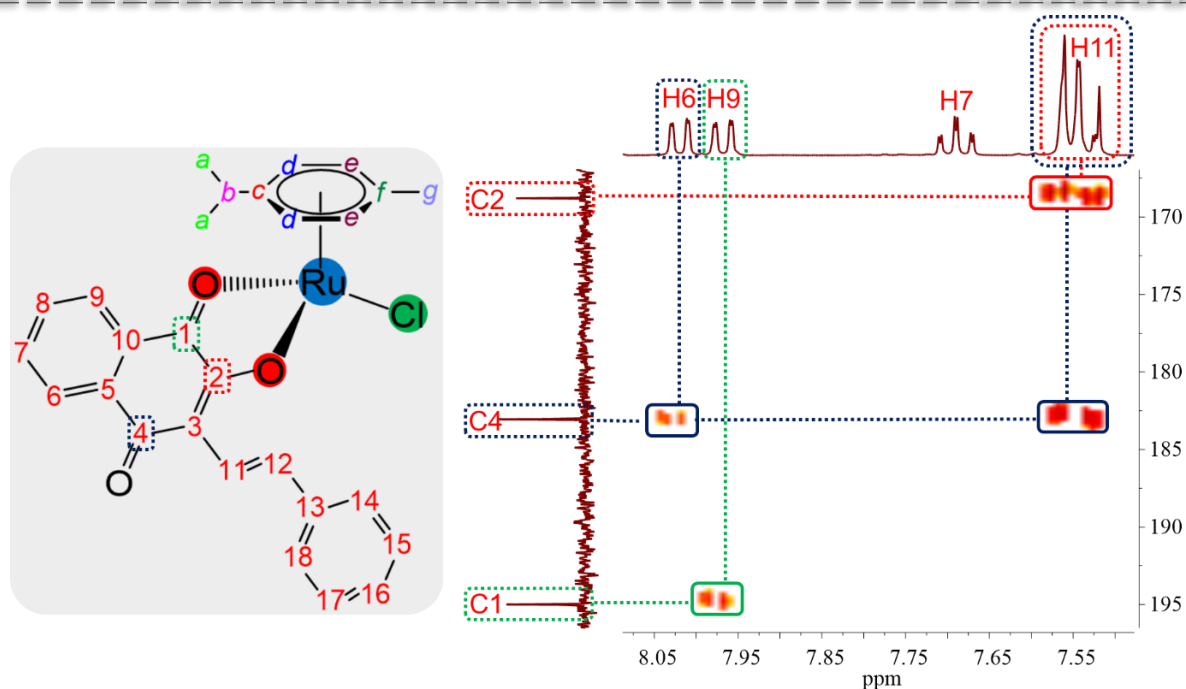


FIGURA 5.10 – Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B3** em  $\text{CDCl}_3$ .

Na Tabela 5.3 observamos os valores dos deslocamentos químicos obtidos para os carbonos C1, C2 e C4 dos ligantes naftoquinônicos livres e coordenados. Nota-se o maior deslocamento químico para C1 e C2 com a coordenação e pouca variação para o carbono C4, o que condiz com o esperado, dado que as maiores mudanças ocorrem nos sinais que condizem aos carbonos ligados aos oxigênios que se coordenam ao centro metálico. A desblindagem dos sinais referentes a C1 e C2 ocorre devido à diminuição da densidade eletrônica destes átomos em decorrência da coordenação ao centro metálico.

TABELA 5.3– Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) exibidos pelos carbonos C1, C2 e C4 nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{CDCl}_3$ .

	$\delta$ (ppm)								
	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	B1	B2	B3	B4	B5	B6
<b>C1</b>	182,1	181,8	181,2	197,7	196,8	195,0	198,2	197,4	195,5
<b>C2</b>	156,5	152,8	151,8	171,9	168,9	168,8	170,7	167,8	167,4
<b>C4</b>	185,1	184,7	184,3	183,7	182,8	183,1	183,7	182,7	183,0

Nos espectros obtidos na espectrometria de massas empregando o método de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI*), foram observados alguns sinais referentes aos complexos obtidos nesta Série e respectivas fragmentações. Os complexos em sua forma não ionizada serão representados pela letra M, sendo os fragmentos observados em decorrência da fragmentação de M representados por  $[M-(F)]^x$ , onde F é o fragmento que foi labilizado e X é a carga final do fragmento resultante. Para os complexos **B1-B3** o sinal de maior intensidade exibido foi o referente ao fragmento  $[M-Cl]^+$ , resultante da labilização do ligante clorido, cujos sinais exibiram razões massa/carga ( $m/z$ ) = 409,04 (**B1**), 477,00 (**B2**) e 510,99 (**B3**) sendo todos eles condizentes com os espectros simulados provenientes das fórmulas químicas referentes aos fragmentos, conforme vemos exemplificado para o complexo **B3** na Figura 4.28. Os complexos moncatiônicos **B4-B6**, exibiram o sinal do íon molecular não fragmentado  $[M-PF_6^-]^+$  com  $m/z$  = 671,38 (**B4**), 739,52 (**B5**) e 773,39 (**B6**). Na Figura 5.11 vemos as comparações entre os sinais obtidos nos espectros experimentais e a simulação feita baseando-se na fórmula química dos fragmentos. Os complexos **B4-B6** também mostram o mesmo sinal exibido pelos complexos **B1-B3** porém neste caso provenientes da labilização da trifenilfosfina gerando o fragmento  $[M-PPh_3]^+$  com  $m/z$  = 409,02 (**B4**), 477,09 (**B5**) e 511,00 (**B6**), estando todos eles também condizentes com os respectivos sinais teóricos calculados para cada fragmento. Diferente da Série A, não foi observado sinal em  $m/z$  = 651,15 correspondente a labilização do ligante naftoquinona e coordenação da matriz empregada no experimento (ácido 2,3-diidóxi benzoico), o que nos evidencia uma maior estabilidade do quelato naftoquinona/rutênio em relação ao quelato ácido benzoico/rutênio, provavelmente por causa da menor tensão do anel quelato nesta Série (5 membros) em relação a Série A (4 membros), fato que pode conferir maior estabilidade ao complexo.

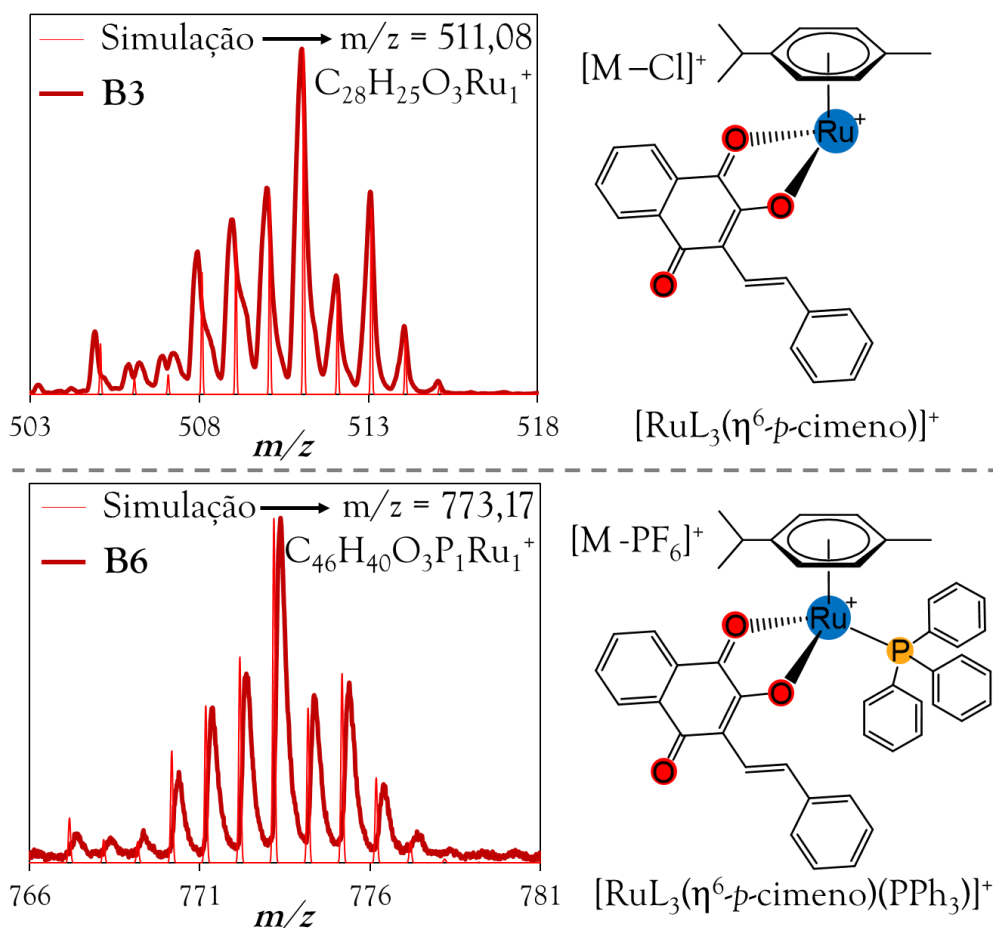


FIGURA 5.11 – Perfil isotópico experimental e teórico para os cátions metálicos dos complexos **B3** e **B6**, correspondendo aos íons  $[M-Cl]^+$  em **B3** e  $[M-PF_6]^+$  para **B6**.

Nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **B1-B6** foi possível obter importantes informações que dão aporte à proposta estrutural, corroborando com as demais técnicas de caracterização empregadas neste trabalho. Em um primeiro momento, na região de alta frequência dos espectros registrados, pode-se observar a ausência do estiramento  $\nu(O-H)$  referente às hidroxilas dos ligantes naftoquinônicos, que em suas formas livres (não coordenadas) apresentam a banda  $\nu(O-H)$  em torno de  $3200\text{ cm}^{-1}$ . Esta ausência indica a coordenação dos ligantes através dos átomos de oxigênio em suas formas desprotonadas. Conforme observamos na Figura 5.12, outras informações importantes podem ser extraídas das vibrações de estiramento  $\nu(C_1=O_1)$  e  $\nu(C_4=O_4)$  presentes nas naftoquinonas em  $1660$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, uma vez que por não participar da coordenação  $\nu(C_4=O_4)$  pouco



se desloca, enquanto a banda ( $C_1=O_1$ ), por coordenar-se, se desloca com maior intensidade para regiões de frequências mais baixas, devido à diminuição da densidade eletrônica, conforme já observado na técnica de RMN. No caso da ligação  $C_2-O_2$ , a banda correspondente a esta ligação sofre deslocamento no espectro (com a coordenação ao rutênio), aumentando o caráter de dupla ligação e conseqüentemente deslocando para regiões de maiores frequências, fato também observado no comprimento desta ligação nas estruturas cristalinas obtidas, onde ao coordenar ela se torna mais forte (Tabela 5.1).<sup>132</sup> A carbonila  $C_4=O_4$  também sofreu deslocamento no espectro de absorção na região do infravermelho, se deslocando para frequências mais baixas, devido à mudança de densidade eletrônica no anel após a coordenação do ligante ao rutênio, contudo, o deslocamento é menos pronunciado se comparado à carbonila coordenada  $C_1=O_1$ .

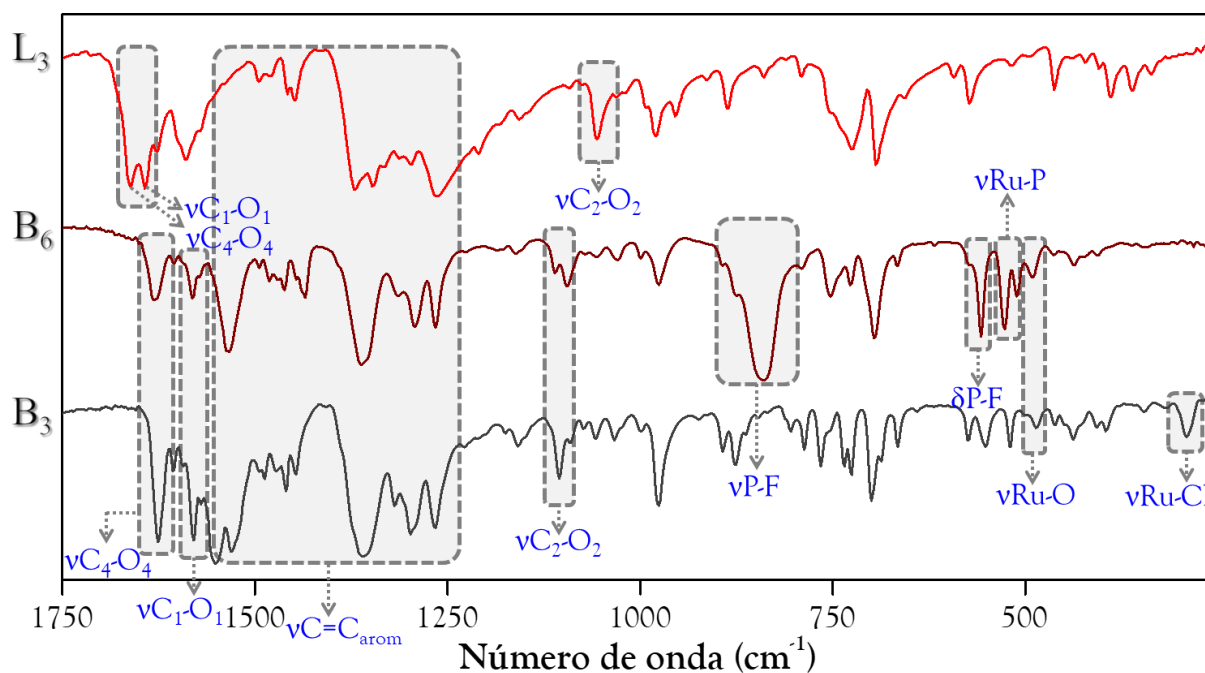


FIGURA 5.12 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante **L3** (3-estiril-lausona), complexos **B3** e **B6**.

Os espectros apresentam também outras bandas características de cada complexo, como em **B6** as bandas em 839  $\nu(P-F)$  e 557  $\delta(P-F)$   $cm^{-1}$  pertencentes ao ânion  $PF_6^-$  e  $\nu(Ru-P)$  em 528  $cm^{-1}$ , em **B3** a banda  $\nu(Ru-Cl)$  em 291  $cm^{-1}$  e em ambos complexos a banda  $\nu(Ru-O)$  em 486  $cm^{-1}$ .<sup>108</sup> Todos os

complexos sintetizados apresentaram um comportamento semelhante, e os seus espectros são apresentados no Apêndice da Série B.

Afim de avaliar a estabilidade dos complexos **B1-B6**, foram realizados estudos de estabilidade dos compostos nas soluções empregadas nos testes biológicos, como DMSO e o meio de cultura RPMI, através da técnica de RMN. Analisando o perfil dos sinais exibidos para o átomo de fósforo pertencente à trifenilfosfina em experimentos de RMN  $^{31}\text{P}$  de soluções em DMSO dos complexos **B4-B6**, observou-se a formação de um subproduto, cuja intensidade do sinal aumenta com o passar do tempo. Na Figura 5.13, como descrito acima, o sinal referente aos complexos **B4-B6** ( $\approx \delta$  33 ppm) sendo consumido, levando ao surgimento de um novo sinal em  $\approx \delta$  43 ppm. Além disso, notou-se que a degradação de **B4** era muito rápida, ocorrendo consumo completo da espécie em 6 horas, enquanto **B5** se estabilizava em 24 horas após a degradação de 60% e **B6** em 48 horas chegando ao equilíbrio com o consumo de 30% do composto de partida.

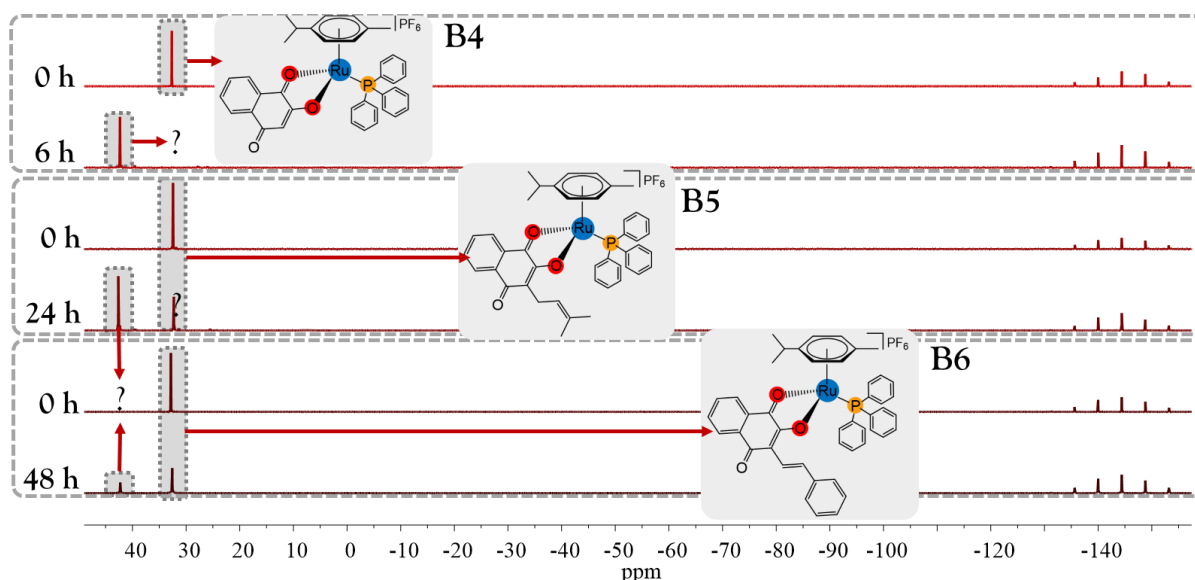


FIGURA 5.13 – Estudo de estabilidade dos complexos **B4-B6** em DMSO empregando a técnica de RMN  $^{31}\text{P}$ .

Analisando os espectros dos complexos **B4-B6** em  $d_6$ -DMSO empregando a técnica de RMN  $^1\text{H}$  foi possível observar a mudança dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio, permitindo uma melhor compreensão do que

ocorre com os complexos em DMSO. Na Figura 5.14 vemos os espectros obtidos para o experimento realizado com **B4**, neles obtivemos uma informação muito importante ao comparar os espectros obtidos em 0 e 6 horas, onde observou-se que em 6 horas os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do ligante *p*-cimeno coordenado desapareciam ( $\delta$  5,8-6,3 ppm), enquanto surgia um multipletto em  $\delta$  7,1 ppm. O mesmo ocorreu com os hidrogênios aromáticos, onde os sinais referentes ao substituinte isopropil desapareciam, dando lugar a sinais similares em outros deslocamentos.

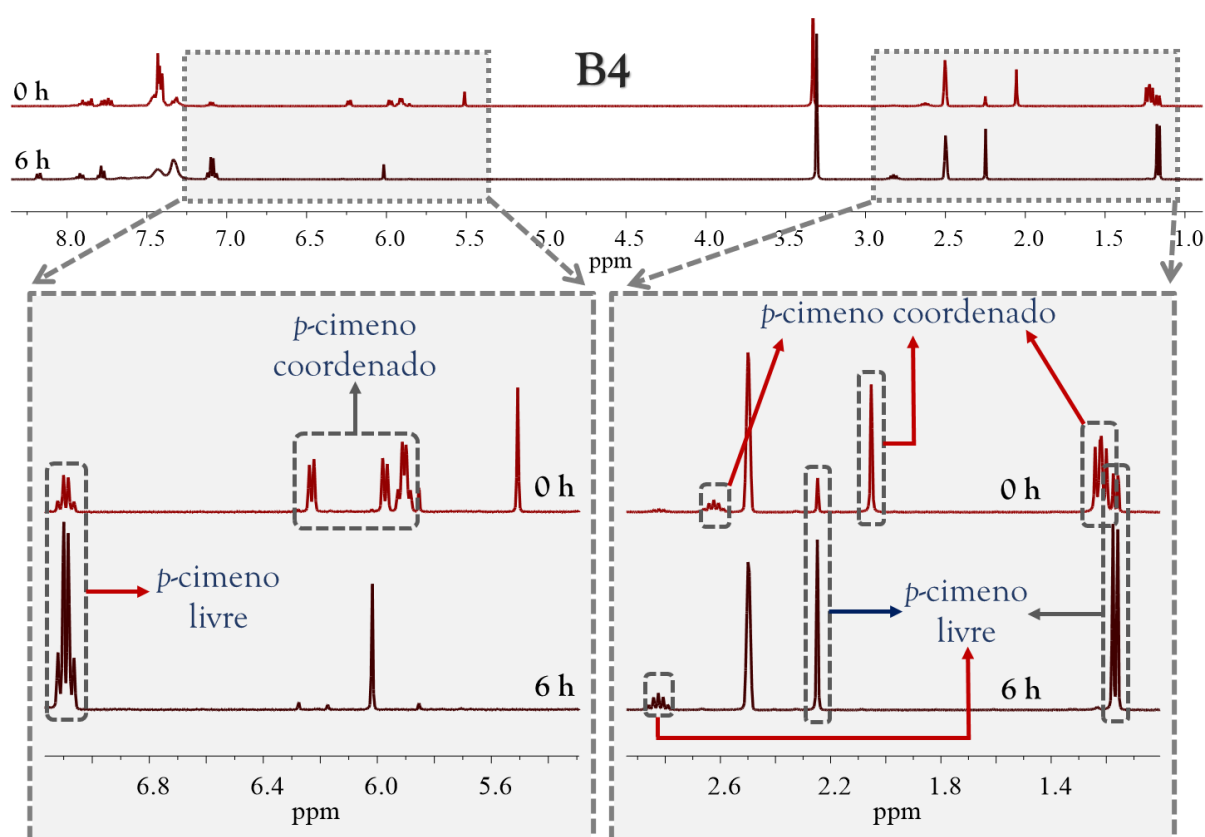


FIGURA 5.14 – Espectros de RMN <sup>1</sup>H obtidos no estudo de estabilidade em *d*<sub>6</sub>-DMSO do complexo **B6** em 0 e 6 horas.

O mesmo experimento foi realizado empregando os complexos **B1-B3**, afim de observar se a instabilidade se dava apenas nos complexos contendo o ligante trifenilfosfina, entretanto o mesmo efeito relatado anteriormente foi encontrado, exibindo o desaparecimento dos sinais referentes ao ligante *p*-cimeno coordenado e o surgimento de novos deslocamentos para os sinais do mesmo (Figura 5.15(a)). Em todos os experimentos realizados os novos sinais exibidos

pelo ligante *p*-cimeno possuem o mesmo deslocamento químico, concluindo que se trata de uma mesma espécie sendo formada em todos os experimentos, sendo esta espécie o *p*-cimeno em sua forma livre (não coordenada), condizendo com os deslocamentos químicos relatados na literatura para o mesmo.

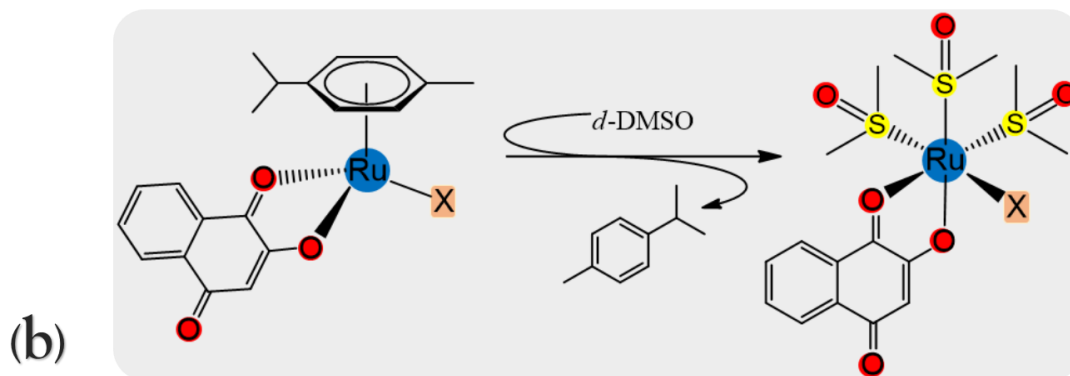
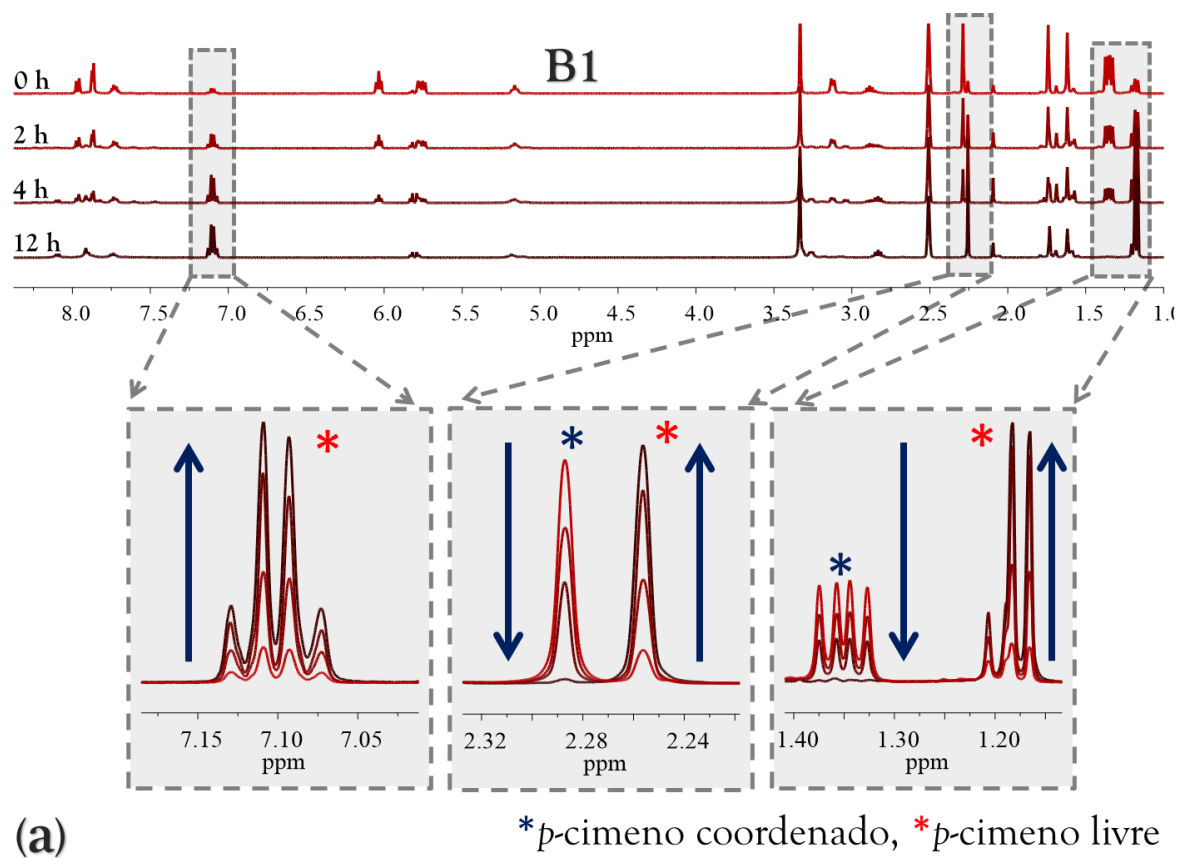


FIGURA 5.15 – (a) Espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos no estudo de estabilidade em  $d_6$ -DMSO do complexo **B6** em 0, 2, 4, 6 e 12 horas. (b) – Esquema da reação que ocorre ao se dissolver os complexos da Série B em DMSO, onde X = Cl (**B1-B3**) ou  $\text{PPh}_3$  (**B4-B6**).

Sabendo que o DMSO é um solvente coordenante e no experimento descrito anteriormente detectou-se a presença do ligante *p*-cimeno livre, o acontecimento mais provável é a coordenação do DMSO nos sítios vacantes do

metal resultantes da labilização do *p*-cimeno, conforme exemplificado na Figura 5.15(b). Outro teste realizado foi a análise da estabilidade dos complexos **B4-B6** na mistura DMSO/RPMI, sendo RPMI um dos meio de cultura empregados no cultivo de células normais ou tumorais, e composto principalmente por sais [NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], glicose, aminoácidos e vitaminas. Na Figura 5.16, observamos o perfil dos sinais formados na solução DMSO/RPMI (2:1) nos espectros de RMN <sup>31</sup>P, indicando a degradação do complexo **B6** nesta mistura, levando ao quase desaparecimento do sinal referente ao mesmo, e já em 24 horas o surgimento de vários sinais, que podem ser resultantes da labilização do ligante *p*-cimeno e coordenação as várias substâncias existentes no meio de cultura. Com 48 horas de experimento, destaca-se o surgimento do sinal próximo de 40 ppm, que se torna a espécie majoritária na solução.

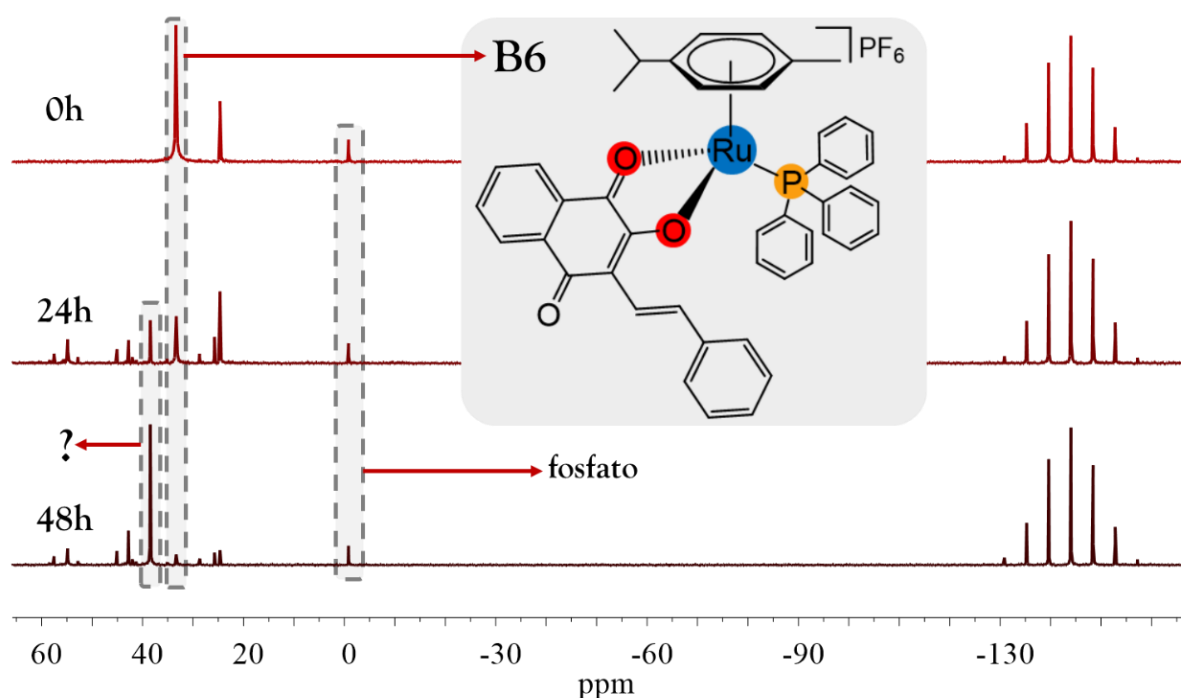


FIGURA 5.16 – Estudo de estabilidade do complexo **B6** em DMSO/RPMI (2:1) empregando a técnica de RMN <sup>31</sup>P. Os espectros foram registrados em 0, 24 e 48 horas.

Na tentativa de se obter o produto da degradação dos complexos, simulou-se adicionou-se o complexo **B4** em uma mistura CHCl<sub>3</sub>/DMSO (2:1), sob atmosfera inerte, e realizou-se o acompanhamento da reação por RMN <sup>31</sup>P. Conforme mostra a Figura 5.17, observou-se um perfil similar ao obtido na reação

em DMSO puro, resultando no completo consumo de **B4** e surgimento do sinal em  $\approx \delta$  44 ppm. Como o componente em maior abundância no meio RPMI é o sal NaCl, adicionou-se uma quantidade do mesmo no experimento, fazendo com que o sinal em  $\approx \delta$  44 ppm desaparecesse dando lugar a um novo sinal em  $\approx \delta$  38 ppm, mesmo deslocamento observado para o sinal de maior intensidade observado em 48 horas no experimento empregando DMSO/RPMI (2:1). De posse dessas informações, a proposta estrutural para a reação é a labilização do ligante *p*-cimeno e coordenação de 3 moléculas de DMSO, conforme já proposto acima, e com a adição do NaCl o ligante clorido se coordena no lugar do DMSO na posição *trans* à fosfina, devido ao efeito *trans* labilizador exercido pela mesma (Figura 4.34).

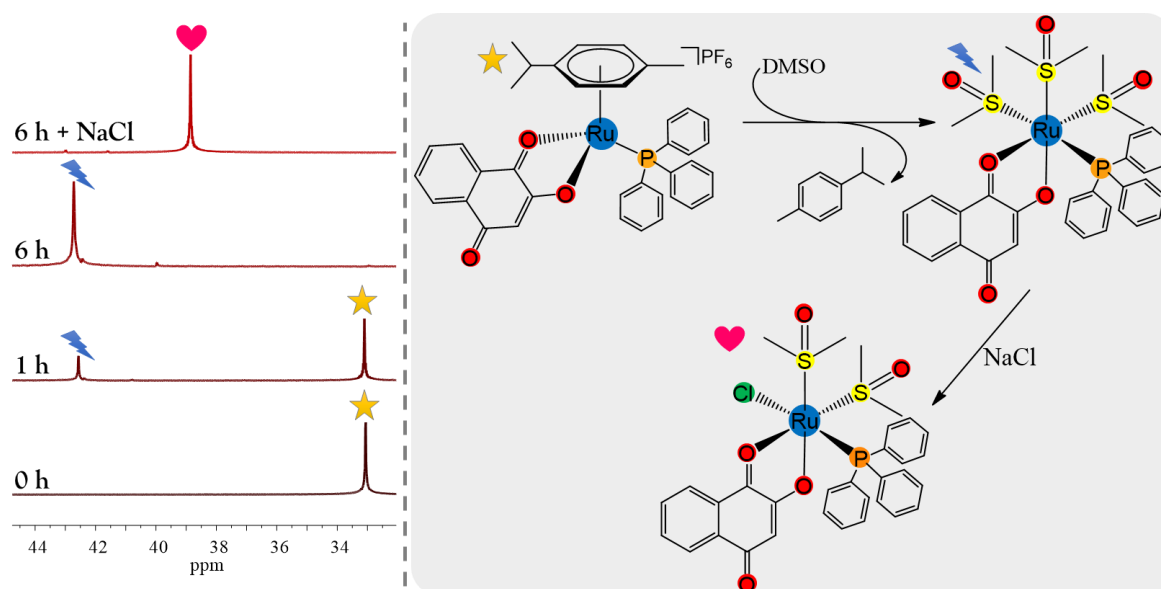


FIGURA 5.17 – Acompanhamento da reação de labilização do ligante *p*-cimeno do complexo **B4** através da técnica de RMN  $^{31}\text{P}$  e esquema estrutural da reação observada.

No experimento realizado com **B6** na mistura DMSO/RPMI (2:1), após 48 horas, observou-se a formação de grande quantidade de um precipitado escuro e cristalino, que por se tratar de um sólido monocristalino, foi analisado por difração de raios X. O resultado do refinamento confirmou a proposta estrutural anterior, confirmando que a espécie majoritária observada no experimento de estabilidade é o complexo *cis*-[RuCl(L<sub>3</sub>)(DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (Figura 5.18), nos permitindo determinar a estrutura do complexo majoritário no meio biológico

onde é feito o cultivo das células analisadas neste trabalho. Ressalta-se também o fato que esse efeito de labilização do ligante *p*-cimeno não foi observado em solventes não coordenantes como diclorometano, clorofórmio ou solventes coordenantes fracos como metanol e etanol.

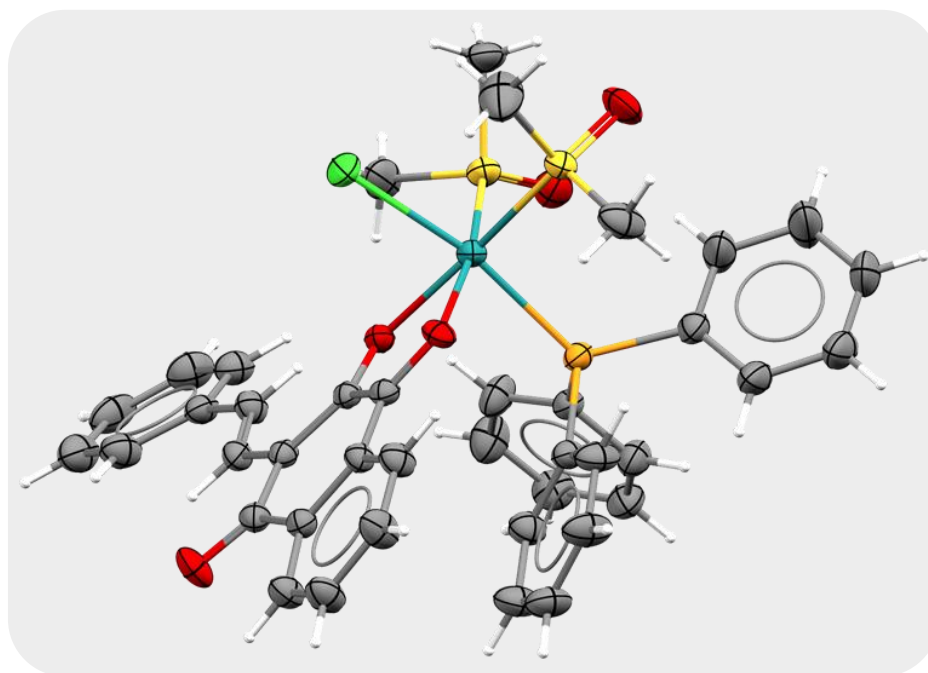


FIGURA 5.18 – Estrutura cristalina dos obtidas para os monocristais provenientes do experimento de estabilidade do complexo **B4** em DMSO/RPMI (2:1). Elipsoides representadas com 30% de probabilidade.

Este comportamento químico de complexos de rutênio<sup>II</sup>/areno em muitos casos se assemelha aos análogos de ferro correspondentes, como no caso dos complexos ferroceno e rutenoceno. Se tratando dos complexos semi-sanduíche rutênio<sup>II</sup>/areno, os ligantes areno estão fortemente ligados ao centro metálico e raramente são substituídos em baixas temperaturas (<120 °C). Entretanto, existem relatos na literatura de complexos rutênio<sup>II</sup>/areno que também sofrem a labilização do ligante areno em certas condições, sendo elas extremas, em sua maioria, como no caso do relato para os complexos utilizados como precursores nesta Série,  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  e  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ , que perdem o ligante *p*-cimeno quando refluxados em acetonitrila à 120 °C ou quando expostos à radiação U.V., gerando vários subprodutos provenientes não só da labilização do areno mas também da

degradação dos ligantes.<sup>138,139</sup> Uma característica interessante inerente à labilização do ligante areno é a correlação com a carga do metal, onde quanto maior a mesma, mais lábeis os ligantes areno se tornam. Por exemplo, complexos dicatiônicos estão mais susceptíveis à saída do areno do que complexos monocatiônicos, que conseqüentemente são mais suscetíveis que complexos neutros, principalmente quando o ligante de entrada é um solvente coordenante polar, devido ao fato de altas cargas favorecerem o ataque nucleofílico do ligante de entrada (solvente coordenante), ocorrendo em sua maioria via mecanismo associativo.<sup>140-143</sup> Esta observação é válida para os complexos desta Série, uma vez que observamos que o tempo gasto para a completa labilização do areno no complexo **B1** (neutro) em DMSO é de 12 horas, enquanto que o complexo **B4** (catiônico) sofre completa substituição em 6 horas, portanto mais rápido, conforme observamos anteriormente nas Figuras 5.14 e 5.15(a).

Outro fator associado ao observado, é o caráter  $\pi$  acceptor de elétrons dos ligantes naftoquinônicos empregados nesta Série. Relatos da literatura têm mostrado que a coordenação de ligantes com alto caráter  $\pi$  acceptor de elétrons ocasionam a competição efetiva com o areno pelos elétrons dos orbitais  $d\pi$  do metal, aumentando consideravelmente a carga positiva do rutênio e conseqüentemente a possibilidade de labilização.<sup>140,144</sup> Embora tenhamos visto que a ligação Ru-O<sub>2</sub> não dispõe de retrodoação do metal para o ligante, a ligação Ru-O<sub>1</sub> apresenta forte componente de retrodoação, conforme demonstrado na diminuição da frequência do estiramento  $\nu(C_1=O_1)$  observado nos espectros de absorção na região do infravermelho, o que nos prova que há retrodoação do rutênio para os ligantes naftoquinônicos, levando a competição pelos elétrons  $d\pi$  do metal e possibilitando a labilização do ligante *p*-cimeno.

Um parâmetro utilizado para conhecer a força da ligação Ru-areno, é a distância de ligação entre o centroide do anel do *p*-cimeno e o centro metálico, e isto em estruturas cristalinas obtidas para este tipo de complexos, sendo que quanto menos esta distância mais forte é esta ligação. Sabendo que quanto maior



a capacidade dos demais ligantes em receber os elétrons  $d\pi$  do metal, maior será a competição pelos elétrons com o ligante areno, podemos correlacionar a força da ligação Ru-areno com a característica  $\pi$  aceptora dos ligantes, onde quanto maior a capacidade  $\pi$  aceptora dos ligantes mais fraca será a ligação Ru-areno e consequentemente maior será o seu tamanho.<sup>40,41</sup> Na Figura 5.19 observamos as estruturas cristalinas dos complexos precursores  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  (**P1**) e  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$  (**P2**) e as respectivas distâncias de ligação entre o rutênio e o centroide do ligante  $p$ -cimeno.

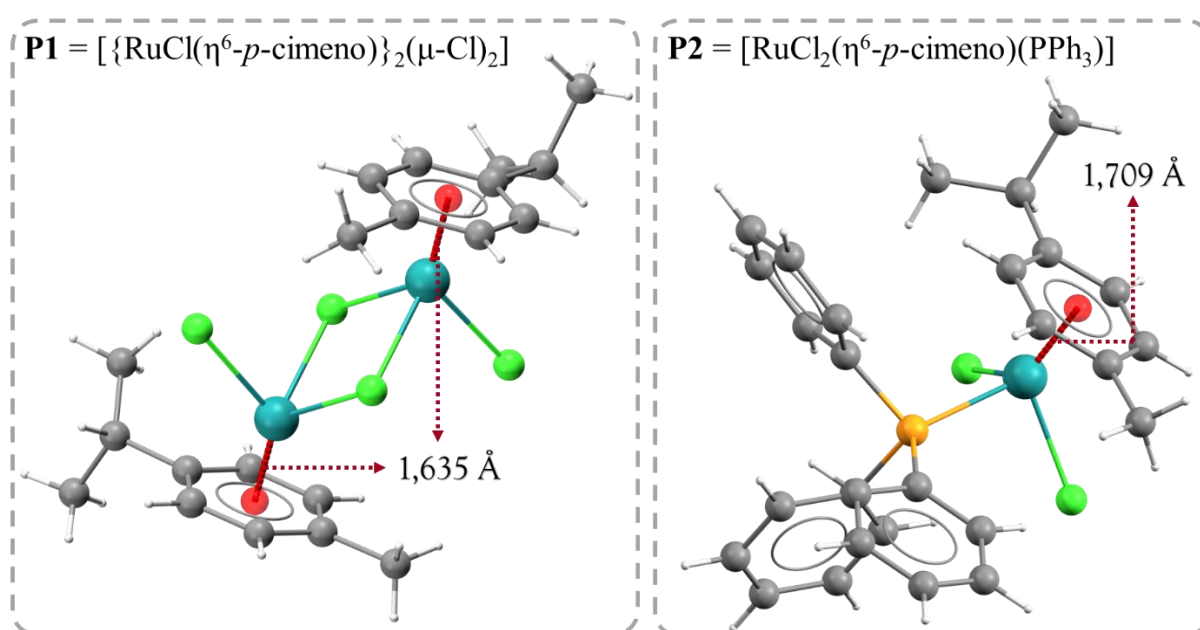


FIGURA 5.19 – Estrutura cristalina dos complexos precursores **P1**,  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$ , e **P2**,  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]$ , destacando as distâncias de ligação Rutênio-areno. O centroide dos ligantes areno são representados pela esfera vermelha. CCDC 1895287 (**P1**) e 677336 (**P2**)

Os valores da Tabela 5.4 exemplificam esse efeito, pois vemos que o precursor **P1** apresenta distância Rutênio-areno menor do que no precursor **P2**, sendo a principal diferença entre eles a presença do ligante trifenilfosfina em **P2**, que por ser um forte aceptor  $\pi$  compete com o ligante  $p$ -cimeno pelos elétrons do metal, enfraquecendo a ligação Rutênio-areno, enquanto o complexo **P1** apresenta apenas os ligantes clorido, forte doador  $\sigma$ , exibindo assim uma menor e mais forte ligação Rutênio-areno. Observamos o mesmo ao comparar **B3** com **B6**, onde **B6**

possui o ligante trifenilfosfina e conseqüentemente possui a distância Rutênio-areno maior que o correspondente que possui o ligante clorido (**B3**).

TABELA 5.4 – Distâncias de ligação Rutênio-areno dos complexos que possuem estrutura cristalográfica elucidada. Considera-se como ponto de medida no ligante areno o centroide do anel aromático.

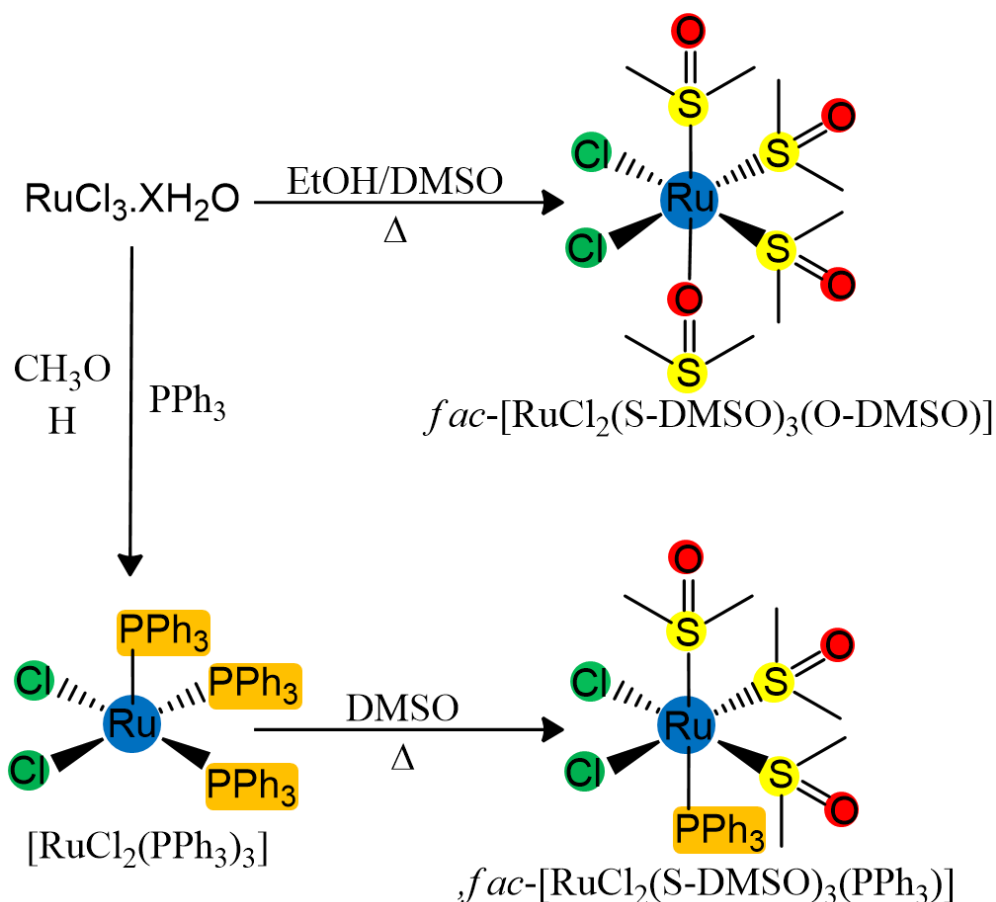
	Distância Ru-areno (Å)
<b>B2</b>	1,650
<b>B3</b>	1,635
<b>B6</b>	1,697
<b>P1</b> *	1,635
<b>P2</b> *	1,709

\*P1 =  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimenos})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  e P2 =  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimenos})(\text{PPh}_3)]$

A partir dessas informações propusemos a síntese de seis novos complexos contendo o DMSO como ligante no lugar do *p*-cimenos, sendo esses novos complexos equivalentes ao produto obtido quando solubilizamos **B1-B6** na mistura DMSO/RPMI. Em uma primeira abordagem, foram realizados experimentos similares ao descrito na Figura 5.17, onde a partir dos complexos originais de fórmula  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimenos})\text{Cl}]$  (**B1-B3**) e  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimenos})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (**B4-B6**), em DMSO, tentou-se obter os produtos sem o ligante *p*-cimenos. Obteve-se sucesso com este método apenas para os complexos **B1** e **B4**, sendo estes os únicos em que a reação de labilização se completa, enquanto os demais atingem um equilíbrio entre produtos e reagentes, sem o consumo total do complexo original, conforme já observado na Figura 5.13. Mesmo com utilização de aquecimento o consumo total do complexo em sua forma original não ocorre, ocasionando a formação de vários subprodutos nas tentativas realizadas para os complexos **B2**, **B3**, **B5** e **B6**.

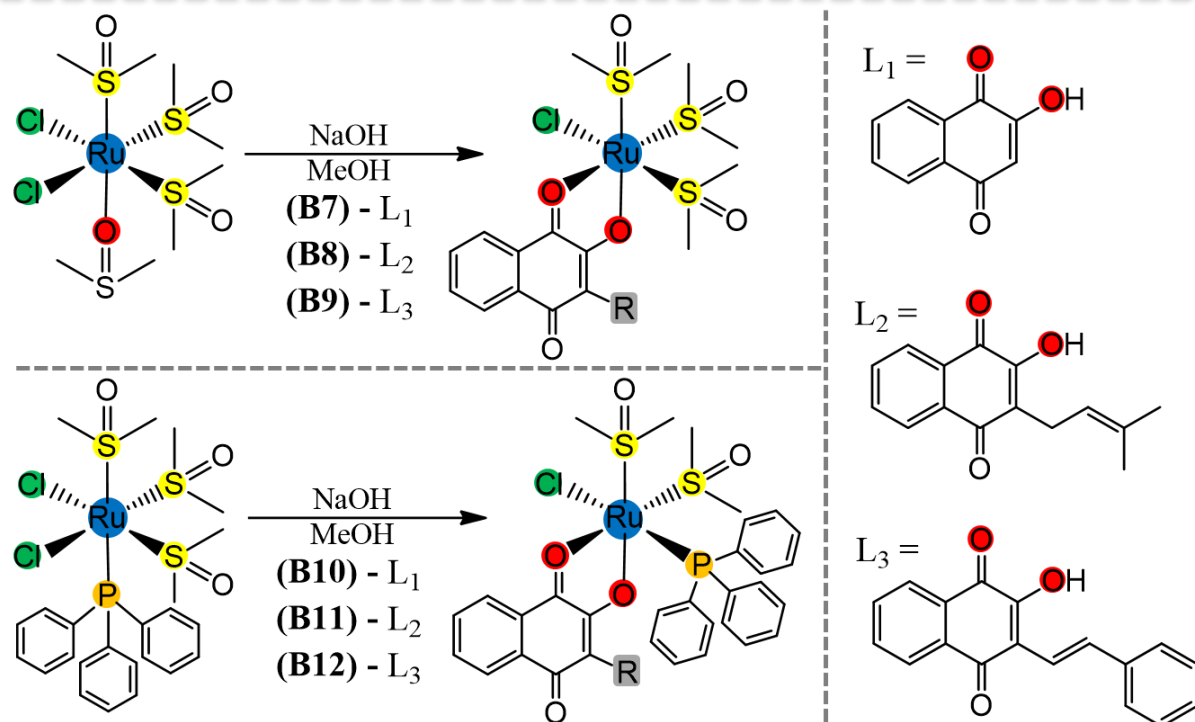
A síntese dos novos complexos foi viabilizada apenas partindo dos precursores *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{O-DMSO})]$  e *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{S-DMSO})_3(\text{PPh}_3)]$ , cuja rota sintética encontra-se descrita no Esquema 5.2. Ambos precursores são já

conhecidos da literatura, sendo empregada a rota sintética já descrita para os mesmos.<sup>145-147</sup>



ESQUEMA 5.2 – Rota sintética dos precursores *fac*-[RuCl<sub>2</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>(O-DMSO)] e *fac*-[RuCl<sub>2</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>)].

No Esquema 5.3 vemos a descrição das condições reacionais e estruturas propostas para estes novos complexos nomeados de **B7-B12**. Para a síntese de todos eles empregou-se o hidróxido de sódio (NaOH) como agente desprotonante do grupo hidroxila da naftoquinona, de modo similar ao realizado para a obtenção dos complexos **B1-B3**. Nesta síntese a precipitação dos complexos ocorreram sem a necessidade de adição de um solvente em que os complexos fossem menos solúveis, sendo o pó final obtido apenas através da filtração do meio reacional e posterior lavagem com água para a remoção do NaCl formado.



ESQUEMA 5.3 – Esquema reacional para a obtenção dos complexos de fórmula geral *fac*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>3</sub>] (**B7-B9**) e *cis*-[RuClL<sub>x</sub>(S-DMSO)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)] (**B10-B12**).

Conforme já indicado na Figura 5.18, foram obtidos monocristais para os complexos provenientes da labilização do ligante *p*-cimeno, não somente permitindo a determinação das estruturas cristalográficas dos compostos **B8**, **B9**, **B10** e **B12**, a Figura 4.20 exibe as estruturas cristalográficas obtidas. Todos exibiram um sistema cristalino monoclinico nos grupos espaciais P21/c (**B8** e **B12**) e P21/n (**B9** e **B10**) contendo uma molécula por unidade assimétrica ( $Z' = 1$ ) com o metal apresentando uma geometria octaédrica distorcida. Uma importante informação fornecida pelas estruturas obtidas é o tipo de isômero obtido para os complexos, devido à possibilidade de diferentes arranjos de ligantes que resultam nos isômeros *fac/mer* para os complexos **B7-B9** e *cis/trans* para os complexos **B10-B12**, confirmando assim a configuração facial (*fac*) em **B8**, **B9** e *cis* em **B10**, **B12** para os ligantes DMSO. Esta característica provavelmente é direcionada pela presença da mesma nos precursores, mantendo a posição das moléculas de DMSO nos complexos resultantes. Além disso, em todos os casos, os ligantes DMSO sempre se encontram em posição *trans* aos oxigênios coordenados do ligante naftoquinona.

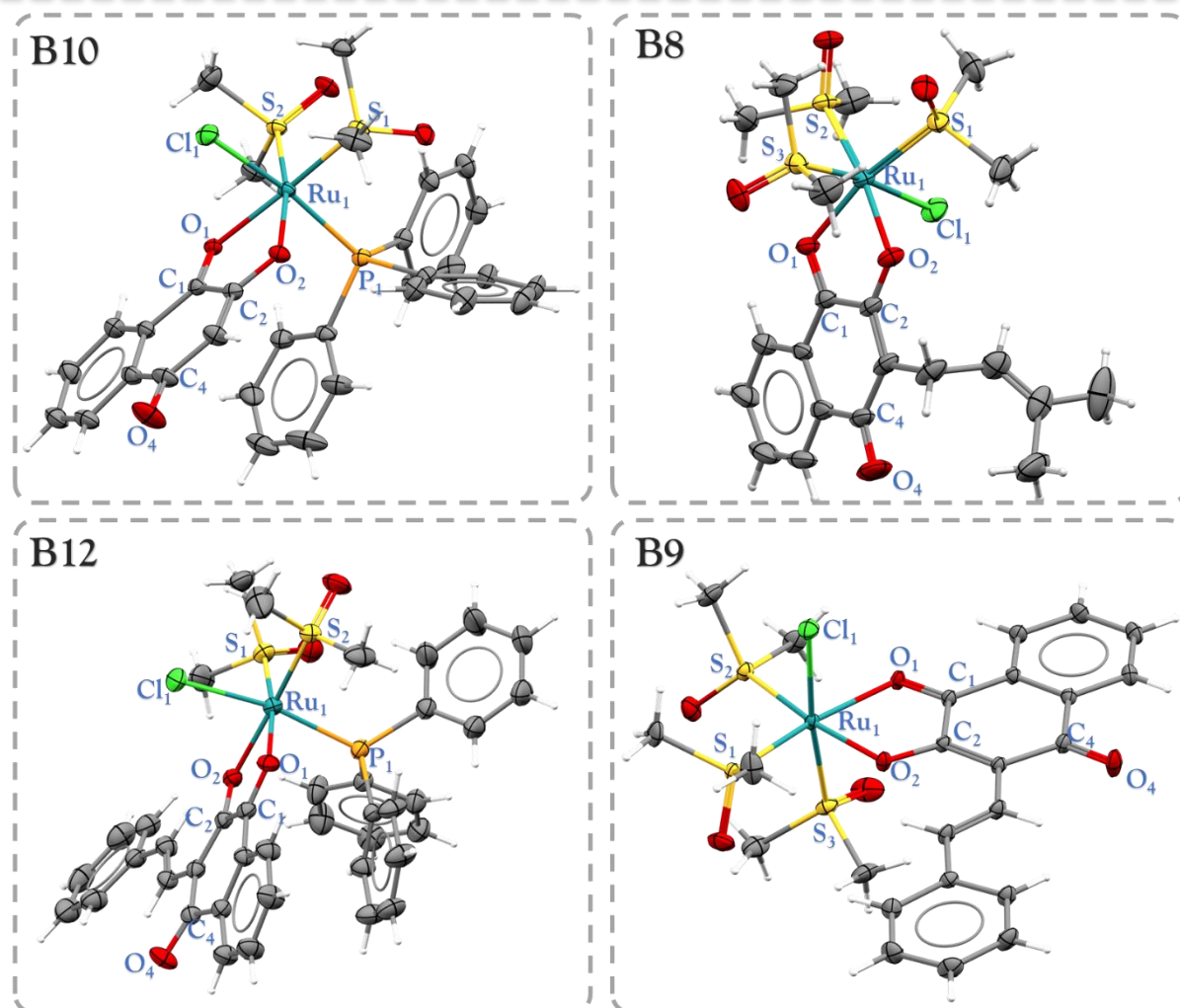


FIGURA 5.20 – Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos **B8**, **B9**, **B10** e **B12**. Elipsoides representadas com 30% de probabilidade.

Os complexos **B8**, **B9**, **B10** e **B12** exibiram as mesmas tendências de distâncias de ligações previamente observados para as estruturas cristalinas dos complexos **B2**, **B3** e **B6**, onde  $C_4=O_4$  pouco sofre alteração por não participar da coordenação com o centro metálico, enquanto  $C_1=O_1$  e  $C_2=O_2$  exibem diferenças significativas quando comparadas com os ligantes livres. De modo similar,  $C_2=O_2$  foi o que exibiu maior diferença, diminuindo em média  $0,05 \text{ \AA}$ , mostrando que esta ligação se fortalece com a coordenação. Esta diminuição das ligações  $C_2=O_2$  observadas em todos os complexos desta Série, em uma primeira análise parece contraditória, pois o mais comumente observado na literatura é o alongamento da ligação C-O ao se coordenar devido a retrodoação que ocorre dos orbitais  $d\pi$  do metal para os orbitais moleculares  $\pi^*$  (antiligante) do C-O, diminuindo a ordem

de ligação e conseqüentemente o seu tamanho, conforme observado para a ligação  $C_1=O_1$ . Entretanto, a ligação  $C_2-O_2$  é uma hidroxila desprotonada, que na química dos organometálicos é classificada como um grupo  $RO^-$ , cujos ligantes são conhecidos por possuírem forte característica  $\sigma$  e  $\pi$  doadora, e sendo o  $Ru^{2+}$  ( $d^6$ ) um metal que ao receber elétrons em  $\sigma$ , dispõe orbitais  $d\pi$  aptos a transferir densidade eletrônica, a retrodoação  $Ru \rightarrow O_2-C_2$  fica impossibilitada de ocorrer, impedindo o decréscimo na ordem de ligação observada para  $C_1=O_1$ .<sup>40,41,148</sup> Além disso, alguns trabalhos vem mostrando o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) da ligação CO possui predominância de caráter antiligante, e considerando que são os elétrons pertencentes a este orbital que participam da ligação em sigma entre o metal e o ligante, o compartilhamento dos mesmos resulta no aumento da ordem de ligação  $C_2-O_2$ , tornando-a mais forte e mais curta,<sup>149</sup> conforme observado nos dados experimentais das constantes nas Tabelas 5.1 e 5.5.

TABELA 5.5 – Comprimentos de ligação (Å) entre alguns pares atômicos dos complexos B8, B9, B10, B12, ligantes lausona ( $L_1$ ) e lapachol ( $L_2$ ).

	$L_1^a$	$L_2^b$	B8	B9	B10	B12
$C_1=O_1$	1,217	1,236	1,244(6)	1,249(4)	1,244(3)	1,253(6)
$C_2-O_2$	1,335	1,349	1,296(7)	1,299(3)	1,289(4)	1,298(6)
$C_4=O_4$	1,226	1,232	1,227(7)	1,219(4)	1,230(4)	1,219(6)
$Ru_1-O_1$	-	-	2,107(4)	2,097(2)	2,097(2)	2,106(4)
$Ru_1-O_2$	-	-	2,083(4)	2,079(2)	2,116(2)	2,096(3)
$Ru_1-Cl_1$	-	-	2,405 (1)	2,413(1)	2,413(1)	2,418(2)
$Ru_1-P_1$	-	-	-	-	2,340(8)	2,352(2)
$Ru_1-S_1$	-	-	2,237(2)	2,250(1)	2,243(8)	2,255(2)
$Ru_1-S_2$	-	-	2,238(2)	2,237(1)	2,235(8)	2,262(2)
$Ru_1-S_3$	-	-	2,259(2)	2,271(1)	-	-

<sup>a</sup>CCDC 1268837, <sup>b</sup>CDCC 1189905

Nas ligações entre o metal e o ligante, as tendências anteriormente

observadas para as ligações Ru-O são mantidas, a ligação Ru-Cl apresenta a maior ligação com o metal, provavelmente por ser o cloro um ligante sem capacidade  $\pi$  aceptora, o que torna essa ligação mais fraca. Outro fator que também influencia a distância da ligação Ru-Cl é a influência *trans* exercida pela fosfina em **B10** e **B12** ou pelo DMSO em **B8** e **B9** acarretando no alongamento da mesma.

Os novos complexos apresentam interações intermoleculares fracas do tipo C-H...O=C, C-H...O=S, Ru-Cl...H-C e interações hidrofóbicas do tipo C-H...H-C e C...H-C, sendo algumas delas entre moléculas relacionadas por um centro de inversão, como apresentado na Figura 5.21(a), onde observamos interações do tipo e Ru-Cl...H-C (2,688 Å) aos pares entre duas moléculas diferentes formando um dímero, efeito este que também é observado para as algumas interações do tipo C-H...O=S. Nos mapas de superfície de Hirshfeld obtidos para os complexos **B7-B12** (Figura 5.21(d)), observamos pontos em vermelho (contatos fortes) relacionados às interações C-H...O=C e C-H...O=S, sendo mais abundantes os pontos referentes às interações C-H...O=S por serem as ligações O=S em maior quantidade (3 em **B7-B9** e 2 em **B10-B12**) em relação a C=O que é apenas uma (C<sub>4</sub>=O<sub>4</sub>). De modo similar aos complexos **B1-B6**, predominam os contatos mais distantes (cor azul e branco) localizados ao redor das regiões hidrofóbicas das moléculas, como exibido no entorno da trifenilfosfina.

Analisando as porcentagens de cada tipo de interação informadas no gráfico constante na Figura 5.21(b), vemos que se manteve a predominância dos contatos do tipo H...H, resultante de interações hidrofóbicas, continuando sendo responsáveis por aproximadamente 50% do total de contatos observados, porém temos praticamente o dobro de contatos O...H em relação a **B10-B12**, isto devido a coordenação de moléculas de DMSO que dispõe de oxigênios não coordenados ligados a enxofre, estes se tornam bons doadores de elétrons em interações com hidrogênios, conforme destacado nas superfícies de Hirshfeld. No gráfico *fingerprint* obtido para o complexo **B8** (Figura 5.21(c)) temos um exemplo que

representa os demais gráficos obtidos, onde se observa os contatos H...O e Cl...H que se destacam em meio à grande maioria dos contatos H...H, que mesmo sendo em menor número, são os que possuem menor extensão de interação, contribuindo também com a estabilização do empacotamento cristalino.

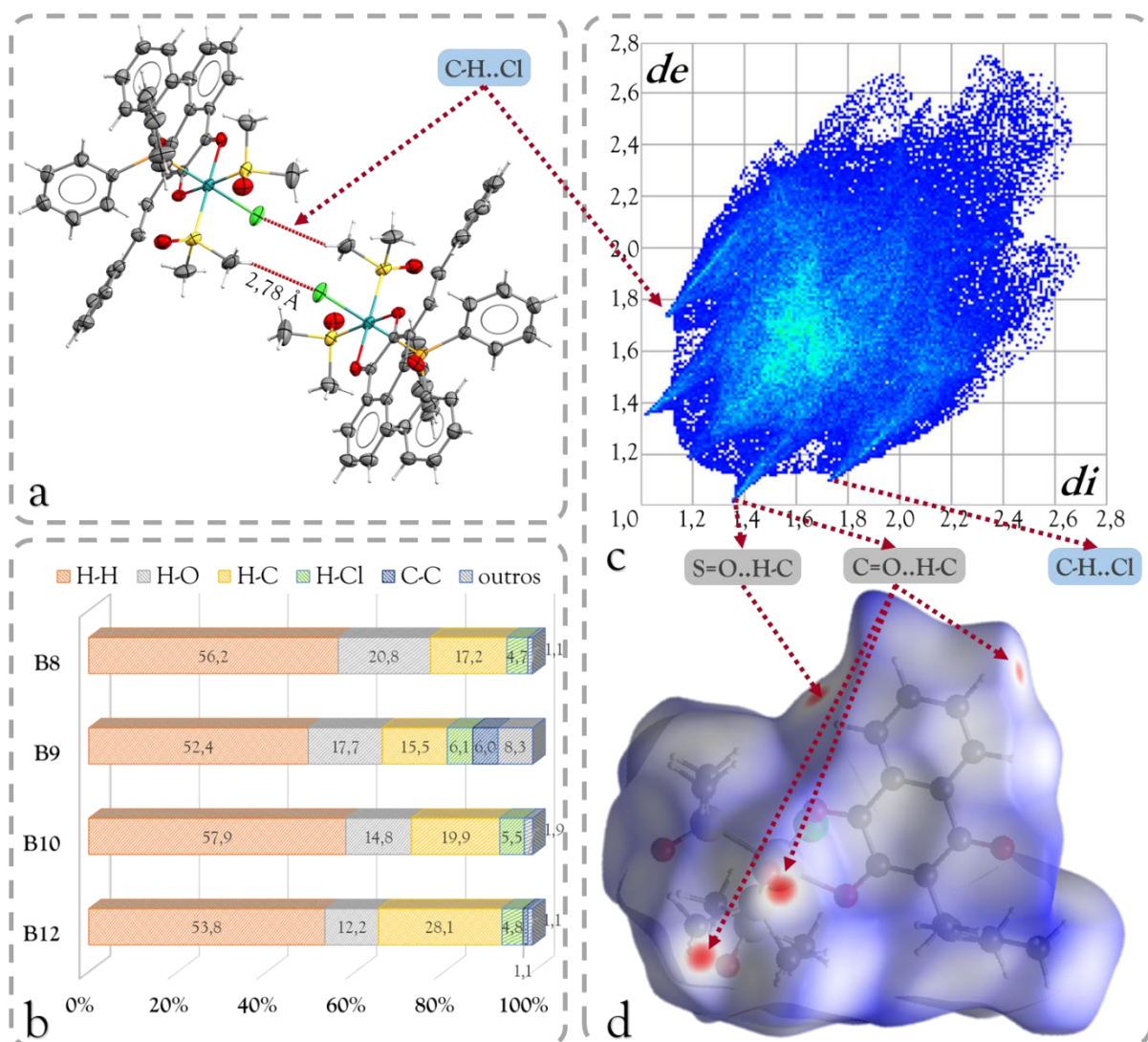


FIGURA 5.21 – (a). Representação da interação C-H...Cl presente no empacotamento cristalino do complexo **B8**. (b). Gráfico de distribuição dos contatos intermoleculares presentes em **B8**, **B9**, **B10** e **B12**. (c). Gráfico *Fingerprint* do complexo **B8** representando todos os contatos intermoleculares. (d). Mapa de Hirshfeld obtido para o complexo **B8**, onde as regiões em vermelho, branco e azul representam respectivamente os contatos menores, iguais e maiores que a soma dos raios de van der Waals dos átomos participantes do contato.

Os destaques para as interações H...O e Cl...H podem ser vistos nos gráficos representados na Figura 5.22, onde as distribuições dos contatos em função de suas distâncias revelam que os contatos intermoleculares mais curtos



se sobressaem em forma de dois finos traços simétricos que ocorrem em torno de 1,0 e 1,4 Å ( $de, di$ ) para as interações H...O e 1,1 e 1,7 Å ( $de, di$ ) para as interações H...Cl.

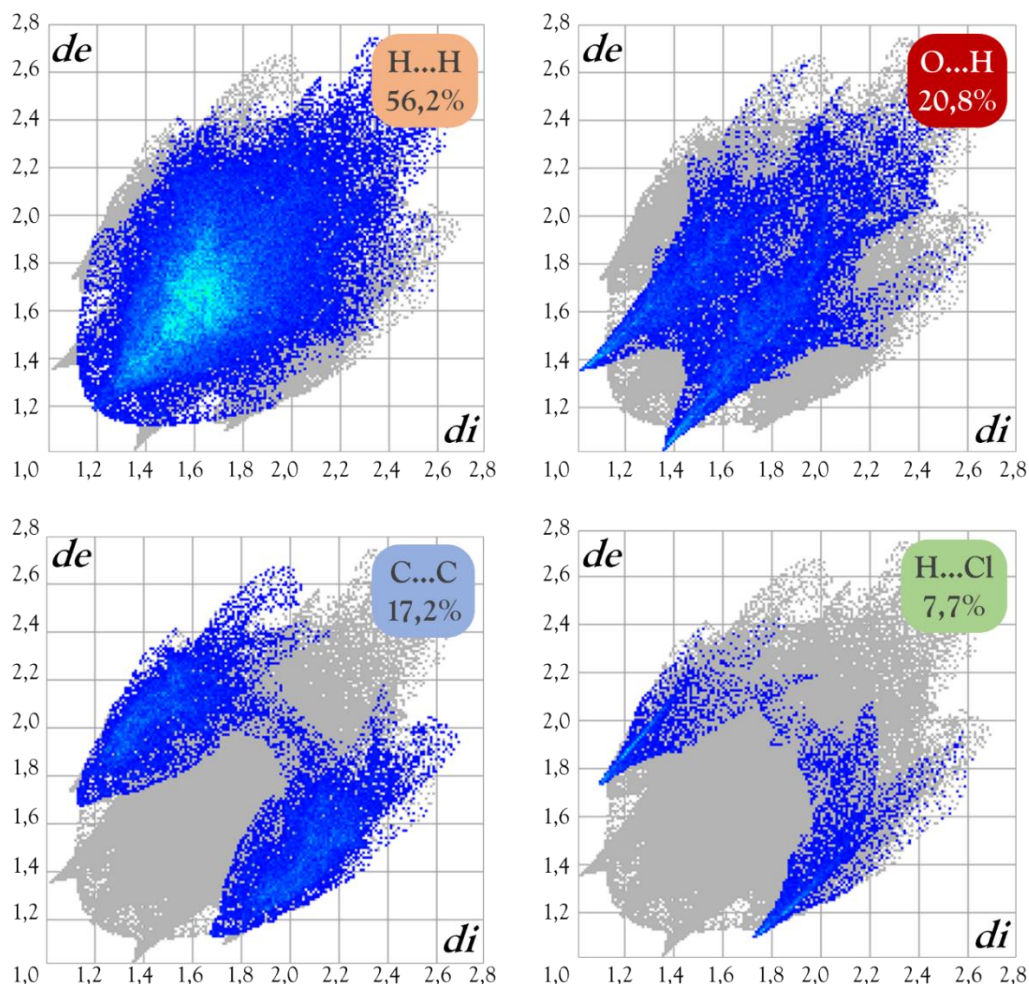


FIGURA 5.22 – Gráficos *FingerPrint* do complexo **B8** representando as contribuições de cada um dos contatos intermoleculares.

A composição química dos complexos **B7-B12** foi determinada por análise elementar, fornecendo-nos informações sobre os teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio presentes no pó obtido para estes complexos. A Tabela 5.6 mostra os valores experimentais obtidos, sendo todos eles condizentes com os valores teóricos esperados. As medidas de condutividade molar dos compostos foram realizadas em diclorometano e os valores encontrados para os complexos de **B7-B12** são menores que faixa de eletrólito 1:1 neste solvente (12 - 77 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> em diclorometano), comprovando a neutralidade esperada para os novos complexos derivados da labilização do ligante *p*-cimeno.

TABELA 5.6 – Dados de análise elementar e condutividade para o complexo de rutênio (Valores teóricos entre parêntesis).

	C (%)	H (%)	S (%)	Condutividade (S.cm <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup> )
<b>B7</b>	35,03 (35,32)	3,80 (4,26)	21,32 (17,68)	1,4
<b>B8</b>	42,74 (41,20)	4,84 (5,10)	16,47 (15,71)	1,7
<b>B9</b>	44,36 (44,61)	4,03 (4,52)	16,35 (14,89)	0,9
<b>B10</b>	51,32 (52,78)	4,13 (4,43)	9,08 (8,81)	2,4
<b>B11</b>	55,06 (55,80)	4,73 (4,45)	7,68 (8,05)	0,3
<b>B12</b>	57,65 (57,86)	4,20 (4,61)	7,41 (7,72)	1,6

Nos espectros de absorção na região do infravermelho registrados para os complexos **B7-B12** observamos o mesmo comportamento relatado para as bandas  $\nu(\text{C}_1=\text{O}_1)$ ,  $\nu(\text{C}_4=\text{O}_4)$  e  $\text{C}_2-\text{O}_2$  observadas em **B1-B6**, onde os maiores deslocamentos são os relatados para  $\nu(\text{C}_1=\text{O}_1)$  e  $\nu(\text{C}_2-\text{O}_2)$  por estarem diretamente envolvidos na coordenação ao metal, acarretando no deslocamento para menores frequências da banda  $\nu(\text{C}_1=\text{O}_1)$ , devido ao enfraquecimento da ligação com a retrodoação, enquanto  $\nu(\text{C}_2-\text{O}_2)$  desloca-se para maiores frequências ( $1089 \text{ cm}^{-1}$ ), dado o fortalecimento da ligação dado a ausência de retrodoação e compartilhamento de elétrons de orbital antiligante, conforme já relatado anteriormente. Os espectros exibem outras bandas características desses complexos, como as bandas pertencentes ao ligante DMSO com os estiramentos  $\nu(\text{S}=\text{O})$  em  $1090$  e  $\nu(\text{C}-\text{S})$  em  $750 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{Ru}-\text{P})$  em  $\approx 530 \text{ cm}^{-1}$  (**B10-B12**),  $\nu(\text{Ru}-\text{O})$  em  $480 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu(\text{Ru}-\text{S})$  em  $\approx 426 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>108</sup> Dada a similaridade estrutural para estes complexos, os espectros obtidos apresentam notável semelhança, sendo as principais diferenças destacadas na Figura 5.23, onde vemos, por exemplo os estiramentos  $\nu(\text{Ru}-\text{P})$  presentes somente nos complexos **B10-B12**. Todos os espectros obtidos para esta Série encontram-se reportados no Apêndice para a Série B.

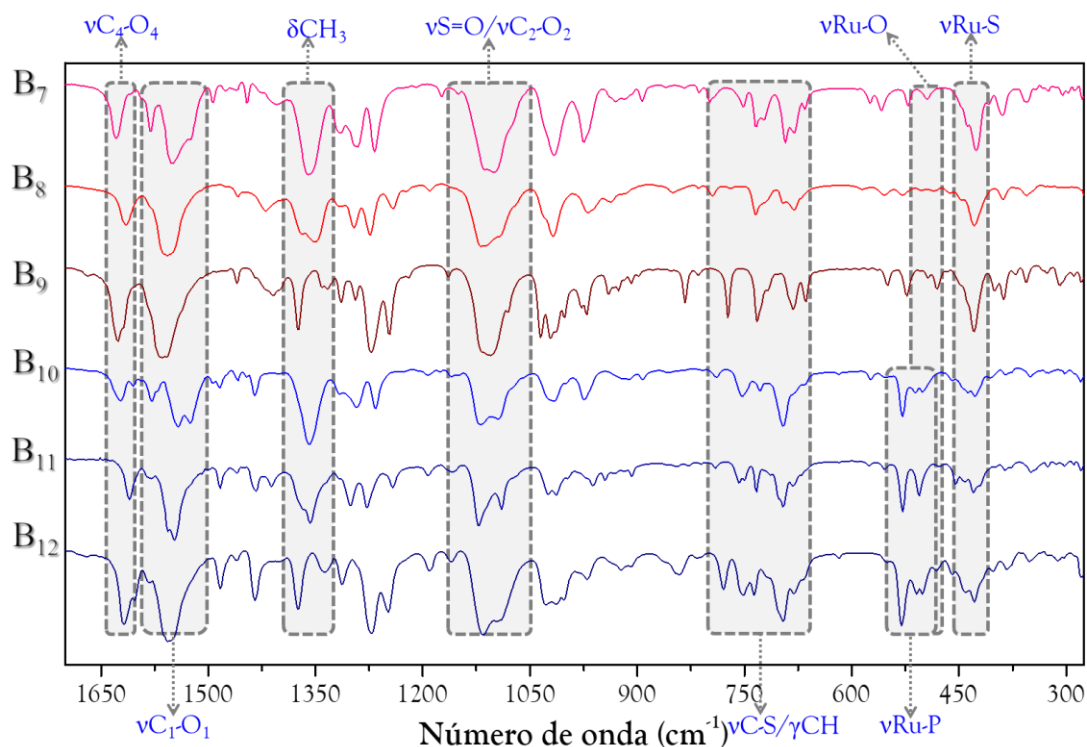


FIGURA 5.23 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **B7-B12**. Os espectros foram obtidos utilizando pastilhas de KBr como suporte.

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  representados nas Figuras 5.24 e 5.25 vemos os **B9** e **B12** que exemplificam o obtido para os demais complexos obtidos com a labilização do ligante *p*-cimeno. Em todos eles observamos que os sinais se dividem em dois grupos distintos, o primeiro referente aos hidrogênios das metilas do DMSO ( $\delta$  1,0 - 3,7 ppm) e o referente aos hidrogênios aromáticos das naftoquinonas em **B7-B9** e naftoquinonas / trifenílfosfina em **B10-B12** ( $\delta$  7,0 - ppm). Esses sinais são facilmente atribuídos com o auxílio dos mapas de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , conforme já descrito para os complexos contendo o ligante *p*-cimeno. Observamos que os hidrogênios referentes as metilas do DMSO exibem sinais próximos em diferentes deslocamentos químicos, exibindo cada metila o seu sinal independente dos demais, não se juntando em um apenas. Este fato pode estar correlacionado a dois fatores, primeiramente os diferentes ambientes químicos onde se encontram, que são influenciado pelos ligantes na posição *trans* ao DMSO que pertence, como em **B10-B12** onde temos o ligante DMSO *trans* a  $\text{C}_1=\text{O}_1$ ,  $\text{C}_2-\text{O}_2$  e clorido, que são ligantes com diferentes eletronegatividades e intensidades de retrodoação, o que afeta diretamente no ambiente químico do

ligante do lado oposto. Outro fator que também afeta o deslocamento químico das metilas é a existência de diferentes tipos de interação intermolecular para cada uma delas, como demonstrado nos dados cristalográficos onde observamos metilas participando de contatos intermoleculares com átomos variados, conforme podemos ver na Figura 5.26, que exhibe os diferentes contatos feitos pelas metilas presentes no complexo **B9**, sendo eles do tipo C=O...H-C, S=O...C-H, C-H...C-H e C-H... $\pi$ . Como essas interações envolvem atrações entre as nuvens eletrônicas dos átomos que a compõem, o ambiente magnético dos hidrogênios também são afetados, ocasionando os efeitos observados, que embora constem no estado sólido podem ser favorecidas do mesmo modo em solução.

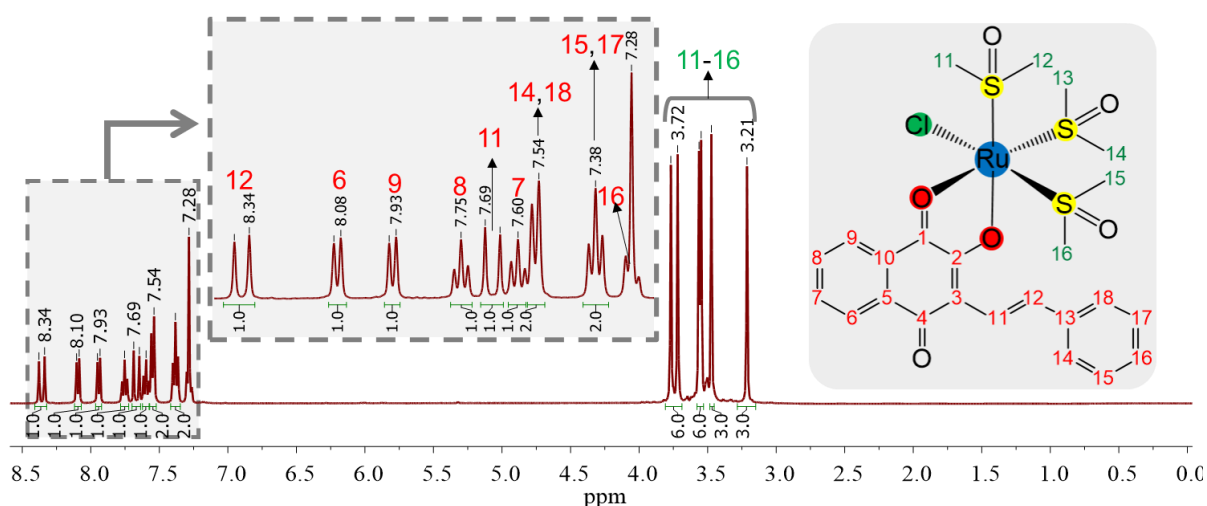


FIGURA 5.24 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo **B9** em  $\text{CDCl}_3$ .

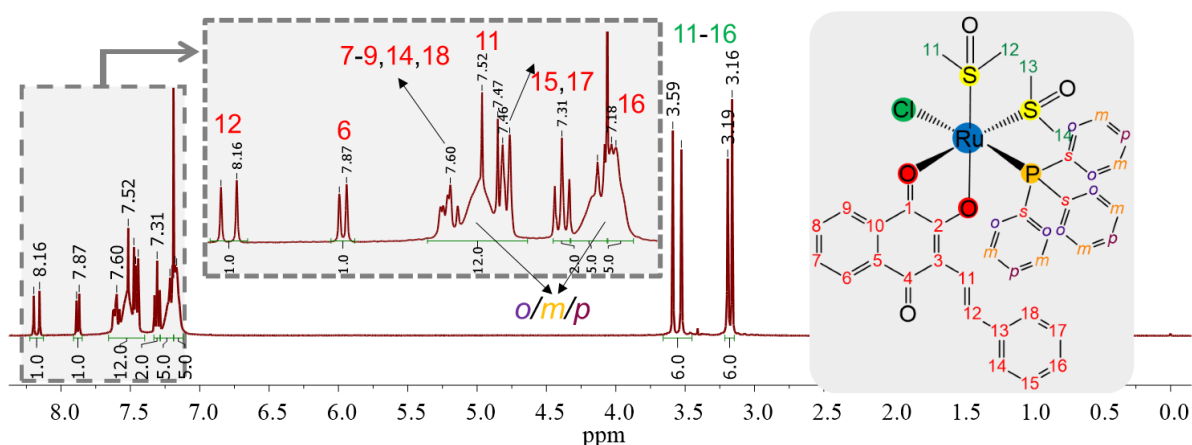


FIGURA 5.25 – Espectro de RMN de hidrogênio do complexo **B12** em  $\text{CDCl}_3$ .

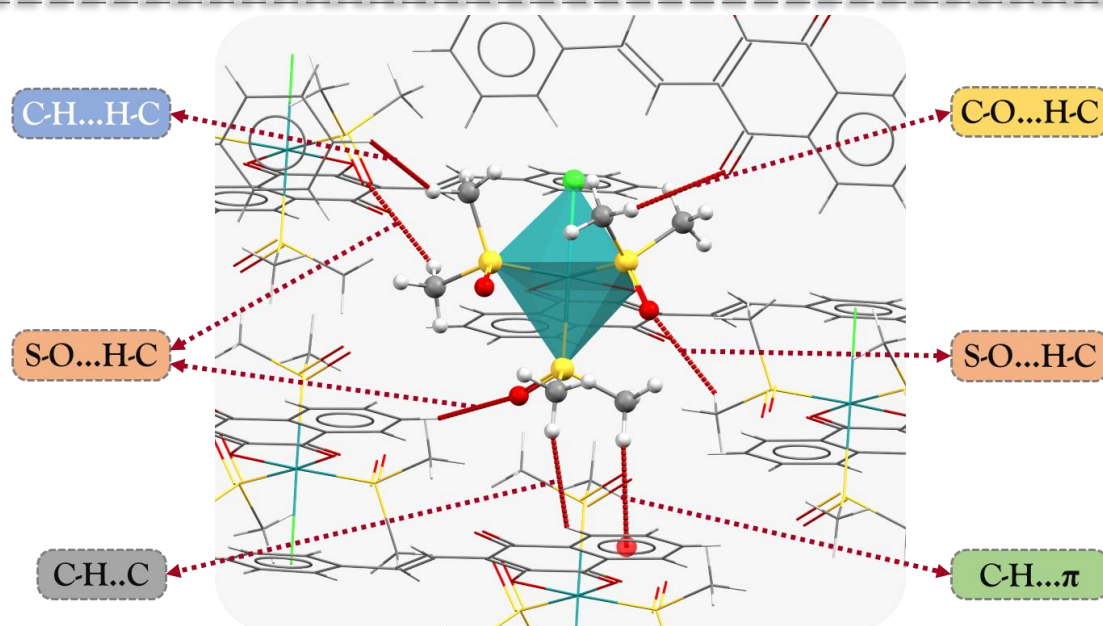


FIGURA 5.26 – Exemplos de interações intermoleculares realizadas pelos grupos metila pertencentes ao DMSO coordenado pertencente ao complexo **B9**.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ) foram observados os sinais referentes aos novos complexos contendo os ligantes DMSO, sendo igualmente atribuídos com o auxílio das técnicas 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e HSQC. As Figuras 5.27 e 5.28 apresentam os espectros de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  obtidos para os complexos **B9** e **B12** e respectivas atribuições dos sinais observados. Todos os espectros de RMN 1D e 2D obtidos para esta Série constam no Apêndice.

TABELA 5.7 – Deslocamento químico ( $\delta$ ) exibido pelos carbonos 1, 2 e 4 nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{CDCl}_3$ .

	$\delta$ (ppm)								
	<b>L<sub>1</sub></b>	<b>L<sub>2</sub></b>	<b>L<sub>3</sub></b>	<b>B7</b>	<b>B8</b>	<b>B9</b>	<b>B10</b>	<b>B11</b>	<b>B12</b>
<b>C1</b>	182,1	181,8	181,2	199,7	198,4	196,9	198,8	198,0	196,2
<b>C2</b>	156,5	152,8	151,8	171,9	168,6	168,5	171,5	168,7	168,5
<b>C4</b>	185,1	184,7	184,3	184,2	183,0	183,6	183,5	182,5	182,9

Na Tabela 5.7 vemos os deslocamentos químicos referentes aos carbonos quaternários 1, 2 e 4, onde todos apresentaram o mesmo padrão

observado para os complexos contendo o ligante *p*-cimeno (**B1-B6**), fato demonstrado pela técnica de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, onde observamos o acoplamento carbono C1 com o hidrogênio ligado a C9, C2 com o hidrogênio ligado a C11 e C4 acoplado com os hidrogênios ligados a C6 e C11, fato comum a todos os complexos desta Série. Vemos também os diferentes deslocamentos exibidos pelos carbonos pertencentes às metilas do DMSO entre 47 e 50 ppm, fato também correlacionado com as interações intermoleculares e efeitos dos ligantes na posição *trans* ao DMSO no campo magnético desses carbonos, fato já discutido anteriormente. Todos os espectros de RMN obtidos para os complexos B7-B12 estão apresentados no Apêndice.

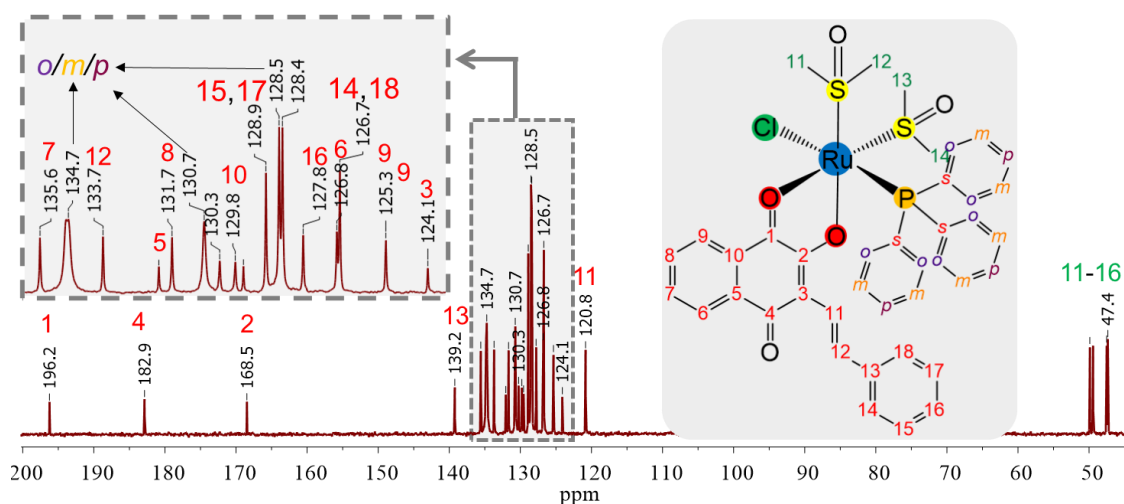


FIGURA 5. 27 – Espectro de RMN de carbono  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B12** em  $\text{CDCl}_3$ .

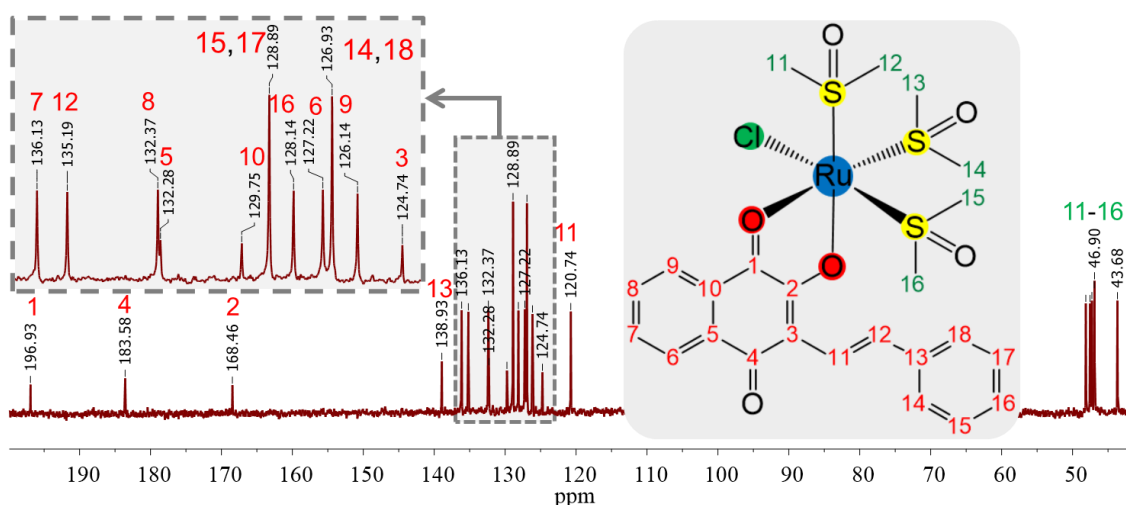


FIGURA 5.28 – Espectro de RMN de carbono  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B9** em  $\text{CDCl}_3$ .

Um conjunto de ferramentas que tem ganhado grande destaque na química de coordenação e organometálica são os métodos baseados na teoria do funcional de densidade (*Density Functional Theory - DFT*), pois a mesma tem possibilitado a predição do comportamento químico, físico e biológico de moléculas de variados tipos. Desde a predição de espectros de RMN e de absorção na região do infravermelho até a análise de interação entre complexos e biomoléculas como o DNA (através da metodologia de *docking*), os métodos DFT tem auxiliado na análise de parâmetros que ajudam os pesquisadores a melhor compreender os seus sistemas, principalmente sistemas complexos, elucidando características específicas de certos sistemas químicos.

Afim de melhor compreender os complexos desta Série, com o auxílio da ferramenta computacional de DFT, foram realizados cálculos de otimização das estruturas dos complexos **B1-B12** empregando as estruturas cristalinas dos complexos que formaram cristais ou partindo da proposta estrutural inicial para os complexos que não formaram monocristais. Nestes cálculos foram obtidos algumas informações, como a energia total dos complexos, a carga natural de cada átomo (através do método de cálculo *Natural Bond Orbital – NBO*), a energia dos orbitais ocupados de maior energia (*Highest Occupied Molecular Orbital – HOMO*), energia dos orbitais vazios de menor energia (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital – LUMO*), a diferença de energia entre HOMO e LUMO (GAP), potencial de ionização (I), dureza ( $\eta$ ) e índice de eletrofilicidade ( $\omega$ ). Afim de melhor compreender o efeito de solvatação exercido pelo DMSO foram realizados os cálculos tanto no vácuo como também em DMSO, que é o solvente onde os complexos **B1-B6** foram instáveis, como também é utilizado como veículo nos testes biológicos.

Na Tabela 5.8 vemos os dados obtidos para os complexos **B1-B12** e precursores  $[\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\}_2(\mu\text{-Cl})_2]$  (**P1**) e  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{PPh}_3)]$  (**P2**) nos cálculos de otimização estrutural e de NBO.

TABELA 5.8 – Dados obtidos nos experimentos de otimização das estruturas pelo método computacional DFT utilizando o programa GAUSSIAN09, que fornece os valores teóricos das distâncias Ru-areno, energia relativa, das cargas naturais atômicas (CNA), energia dos orbitais HOMO, LUMO e potencial de ionização (I), medidos em eV. \*Valores experimentais referentes a distância Ru-areno.

	Distância Ru-areno (Å)	Energia Relativa	CNA Ru	CNA O1	HOMO	LUMO	GAP	I	
<b>Vácuo</b>	<b>B1</b>	1,730	0,00	0,127	-0,466	-0,204	-0,107	0,097	0,204
	<b>B2</b>	1,732 (1,650)*	0,10	0,132	-0,467	-0,195	-0,106	0,089	0,195
	<b>B3</b>	1,733 (1,635)*	0,15	0,132	-0,473	-0,181	-0,109	0,072	0,181
	<b>B4</b>	1,832	0,28	-0,027	-0,475	-0,306	-0,205	0,101	0,306
	<b>B5</b>	1,835	0,38	-0,021	-0,479	-0,288	-0,202	0,086	0,288
	<b>B6</b>	1,834 (1,697)*	0,44	-0,022	-0,490	-0,271	-0,200	0,071	0,271
	<b>B7</b>	-	0,63	-0,631	-0,475	-0,211	-0,112	0,099	0,211
	<b>B8</b>	-	0,72	-0,627	-0,478	-0,203	-0,111	0,092	0,203
	<b>B9</b>	-	0,77	-0,625	-0,482	-0,186	-0,114	0,072	0,186
	<b>B10</b>	-	0,86	-0,645	-0,484	-0,202	-0,107	0,095	0,202
	<b>B11</b>	-	0,95	-0,641	-0,489	-0,196	-0,106	0,090	0,196
	<b>B12</b>	-	1,00	-0,634	-0,496	-0,182	-0,110	0,072	0,182
	<b>P1</b>	(1,635)*	-	-	-	-	-	-	-
	<b>P2</b>	1,803 (1,709)*	0,44	-0,411	-	-0,195	-0,060	0,135	0,195
<b>DMSO</b>	<b>B1</b>	1,743	0,00	0,150	-0,464	-0,217	-0,118	0,099	0,217
	<b>B2</b>	1,745 (1,650)*	0,10	0,154	-0,467	-0,209	-0,117	0,092	0,209
	<b>B3</b>	1,746 (1,635)*	0,15	0,154	-0,471	-0,194	-0,119	0,075	0,194
	<b>B4</b>	1,833	0,27	-0,018	-0,461	-0,226	-0,126	0,100	0,226
	<b>B5</b>	1,834	0,38	-0,017	-0,466	-0,217	-0,124	0,093	0,217
	<b>B6</b>	1,837 (1,697)*	0,43	-0,013	-0,471	-0,200	-0,126	0,074	0,200
	<b>B7</b>	-	0,62	-0,602	-0,474	-0,221	-0,120	0,101	0,221
	<b>B8</b>	-	0,70	-0,599	-0,477	-0,212	-0,118	0,094	0,212
	<b>B9</b>	-	0,76	-0,596	-0,480	-0,195	-0,121	0,074	0,195
	<b>B10</b>	-	0,84	-0,606	-0,475	-0,216	-0,118	0,098	0,216
	<b>B11</b>	-	0,93	-0,603	-0,480	-0,209	-0,116	0,093	0,209
	<b>B12</b>	-	1,00	-0,598	-0,483	-0,193	-0,119	0,074	0,193
	<b>P1</b>	(1,635)*	-	-	-	-	-	-	-
	<b>P2</b>	1,816 (1,709)*	0,43	-0,379	-	-0,215	-0,077	0,138	0,215



=====  
Analisando os dados da Tabela 5.8, vemos uma Série de correlações com as afirmações anteriormente feitas quanto à energia dos complexos. Observa-se que a energia relativa dos complexos, que está normalizada entre 0 e 1 por ser o seu valor dado em unidades arbitrárias. Assim vemos que os complexos estão coincidentemente enumerados em ordem crescente de energia, seguindo a seguinte sequência crescente:  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}]$  (**B1-B3**) <  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (**B4-B6**) < *fac*- $[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_3]$  (**B7-B9**) < *cis*- $[\text{RuClL}_x(\text{S-DMSO})_2(\text{PPh}_3)]$  (**B10-B12**), confirmando que os complexos sem o ligante areno possuem menor energia, e conseqüentemente mais estáveis que os complexos com areno. Observamos também que, quanto aos ligantes naftoquinônicos, há uma ordem de energia, onde nos complexos de mesma fórmula geral, os que contém a lausona são mais energéticos, enquanto os que estão coordenados ao ligante 3-estiril-lausona são menos energéticos, fato que corrobora com o experimento de estabilidade em DMSO mostrado na Figura 5.13, onde observamos que no caso dos complexos **B4-B6**, o complexo contendo a lausona (**B4**) apresenta uma menor estabilidade em DMSO, enquanto **B6** (3-estiril-lausona) apresenta maior estabilidade.

Quanto aos valores de carga natural atômica do átomo de rutênio (CNA-Ru), os complexos **B1-B3** exibem a maior carga positiva, havendo decréscimo conforme se aumenta a energia relativa, apresentando os complexos **B10-B12** a menor carga sobre o átomo de rutênio. Esta observação correlaciona-se à intensidade da retrodoação dos ligantes constantes na esfera de coordenação do rutênio, onde a troca do ligante *p*-cimeno pelas moléculas de DMSO diminui a carga positiva sobre o metal, por diminuir a competição pelos elétrons  $d\pi$  do metal. E de modo interessante, nos complexos de mesma fórmula estrutural a CNA-Ru aumenta conforme se aumenta a estabilidade relativa do composto, apresentando os complexos que contém o ligante lausona menor carga sobre o rutênio do que os que contém o ligante 3-estiril-lausona (mais positivo). Vemos a influência da retrodoação ao se substituir o cloro pela fosfina, em que os

complexos **B1-B3** (Cl,  $\sigma$  doador forte) apresentam maiores valores de CNA para o rutênio comparados com os complexos **B4-B6** (PPh<sub>3</sub>,  $\pi$  acceptor forte), corroborando mais uma vez com a diminuição da carga sobre o rutênio com a transferência de carga do metal para o ligante. Este efeito é confirmado quando analisamos os valores de potencial de ionização, onde os complexos que contém trifenilfosfina apresentam maiores valores de energia para os orbitais HOMO e conseqüente maiores valores de energia de ionização, isto em função da retrodoação, que leva a uma menor densidade eletrônica sobre o metal.

Nas estruturas otimizadas obtivemos também os dados calculados referentes às distâncias Ru-areno (Å), apresentando os complexos contendo a trifenilfosfina (**B1-B3**) um comprimento é maior que os correspondentes que contém o ligante clorido (**B4-B6**), semelhante à tendência experimental representada nos valores entre parêntese na Tabela 5.8., fato que também se correlaciona a maior competição pelos elétrons  $d\pi$  do metal nos complexos contendo o ligante fosfínico, enfraquecendo a coordenação do areno e aumentando sua distância em relação ao centro metálico e conseqüentemente resultando na instabilidade observada para esses complexos.

## 5.2 - Estudos biológicos dos complexos da Série B.

O potencial citotóxico e antiproliferativo dos complexos de rutênio/areno/naftoquinona apresentados nesta Série foram avaliados frente à diferentes linhagens de células humanas tumorais e normais (saudáveis), além disso calculamos os referentes índices de seletividade, obtidos a partir da divisão entre os valores de IC<sub>50</sub> obtidos na célula normal pelo valor obtido para sua respectiva não tumoral, onde quanto maior o valor encontrado, melhor a seletividade para o tecido tumoral. Para tal, empregamos linhagens de células não tumorais MCF-10A (mama) e MRC5 (pulmão), e tumorais MDB-MB-231 (mama, triplo negativo), MCF-7 (mama) e A549 (pulmão), que foram tratadas empregando protocolos de administração dos compostos por experimentos

independentes (triplicata) com concentrações de até 100  $\mu\text{M}$  e valores de  $\text{IC}_{50}$  calculados em 48 horas de exposição aos complexos. Para comparação dos resultados obtidos, a citotoxicidade do cisplatina também foi analisada, uma vez que é um agente antineoplásico inorgânico e amplamente utilizado na clínica, em combinação com outros fármacos.<sup>23</sup> Além disso foram testados os ligantes naftoquinônicos empregados neste trabalho, onde nenhum deles apresentaram efeito citotóxico nas concentrações utilizadas ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Hartinger e colaboradores já avaliaram a citotoxicidade do complexo **B2** frente à linhagem tumoral de pulmão (A549), apresentando valor de  $\text{IC}_{50}$  de 20  $\mu\text{M}$  em 96 horas de tratamento.<sup>131</sup> Na Tabela 5.9 são apresentados os dados de  $\text{IC}_{50}$  e índice de seletividade encontrados para os complexos **B1-B12**, vemos que o valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrado para o complexo **B2** (18,09  $\mu\text{M}$  em 48 h) se assemelha ao já relatado na literatura, evidenciando que neste caso o tempo de exposição aos complexos não exerce grande influência no valor de  $\text{IC}_{50}$ . Os ligantes naftoquinônicos e o precursor **P2** não foram ativos nas concentrações testadas, enquanto o precursor **P1** exibiu citotoxicidade frente a todas as células utilizadas, isto por possuir a trifenilfosfina que o torna mais lipofílico e conseqüentemente mais biodisponível para as células. Entretanto os complexos provenientes da coordenação das naftoquinonas ao precursor **P1** diminuíram consideravelmente os valores de  $\text{IC}_{50}$ , resultando em complexos mais citotóxicos às linhagens testadas, que o referido precursor.

De modo geral, os complexos contendo os ligantes lapachol (**L2**) e 3-estiril-lausona (**L3**) foram mais ativos que os similares contendo o ligante lausona (**L1**), sendo em alguns casos 10 vezes mais ativos. Este fato pode estar correlacionado à presença da substituição no carbono  $\text{C}_3$  nos ligantes **L2** e **L3**, o que aumenta consideravelmente a possibilidade de interações intermoleculares com biomoléculas, além de conferirem maior lipofilicidade também. Vemos essa tendência ao analisar os valores de  $\log P$  dos ligantes naftoquinônicos livres, que apresentam a seguinte ordem crescente: **L1** ( $1,5 \pm 0,8$ ) < **L3** ( $3,5 \pm 0,7$ ) < **L2** ( $4,08$ )

± 0,6), comprovando a menor lipofilicidade da lausona.

TABELA 5.9 – Valores de IC<sub>50</sub> e índice de seletividade obtidos para os complexos **B1-B12**, ligantes, precursor e o fármaco cisplatina, frente as linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h. Os valores são obtidos a partir da divisão dos valores de IC<sub>50</sub> das células tumorais pelas células não tumorais.

Complexos	Citotoxicidade, IC <sub>50</sub> (μM)					Índice de Seletividade		
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A	A549	MRC-5	MCF-10A / MCF-7	MCF-10A / MDB-MB-231	MRC-5 / A549
<b>B1</b>	> 50	> 50	>50	> 50	> 50	-	-	-
<b>B2</b>	11,11 ± 1,70	13,65 ± 0,36	13,43 ± 1,50	18,09 ± 1,11	11,17 ± 0,86	1,2	1,0	0,6
<b>B3</b>	9,07 ± 0,71	11,23 ± 1,27	8,89 ± 1,54	27,80 ± 4,86	8,22 ± 1,00	1,0	0,8	0,3
<b>B4</b>	4,42 ± 0,50	3,96 ± 0,39	3,11 ± 0,36	18,52 ± 1,02	4,65 ± 0,17	0,7	0,8	0,2
<b>B5</b>	0,88 ± 0,05	0,66 ± 0,16	0,66 ± 0,05	0,33 ± 0,08	0,26 ± 0,05	0,8	1,0	0,8
<b>B6</b>	0,42 ± 0,12	0,34 ± 0,08	0,43 ± 0,06	0,43 ± 0,05	0,28 ± 0,01	1,0	1,2	0,7
<b>B7</b>	0,63 ± 0,11	1,92 ± 0,18	2,71 ± 0,39	8,01 ± 0,61	1,28 ± 0,22	4,3	1,4	0,2
<b>B8</b>	0,87 ± 0,17	0,84 ± 0,11	0,72 ± 0,05	1,50 ± 0,09	1,16 ± 0,14	0,8	0,8	0,8
<b>B9</b>	0,70 ± 0,13	0,90 ± 0,09	0,84 ± 0,11	1,15 ± 0,22	0,47 ± 0,15	1,2	0,9	0,4
<b>B10</b>	5,65 ± 1,81	15,29 ± 0,47	7,19 ± 0,32	17,36 ± 0,17	34,26 ± 3,57	1,3	0,5	2,0
<b>B11</b>	0,56 ± 0,01	1,06 ± 0,16	1,11 ± 0,10	0,93 ± 0,03	1,94 ± 0,07	2,0	1,0	2,0
<b>B12</b>	0,31 ± 0,03	1,13 ± 0,04	1,44 ± 0,13	0,50 ± 0,02	0,60 ± 0,05	4,6	1,3	0,3
<b>P1</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>P2</b>	18,23 ± 0,61	21,65 ± 1,34	49,70 ± 1,77	12,73 ± 1,22	50,64 ± 0,25	2,7	2,3	4,0
<b>L1</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>L2</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>L3</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>Cisplatina</b>	8,91 ± 2,60	2,44 ± 0,20	13,98 ± 2,02	14,40 ± 1,40	29,09 ± 0,78	1,6	5,7	2,0

Os complexos **B1-B3** exibiram maiores valores de  $IC_{50}$ , semelhante ao já observado para outros complexos Ru/areno/Cl,<sup>131,150</sup> acompanhando a tendência vista nos precursores, onde a ausência da  $PPh_3$  acarreta em menor lipofilicidade e biodisponibilidade, o que é confirmado nos valores encontrados para os compostos **B4-B6**, que possuem a  $PPh_3$  e conseqüentemente foram mais ativos. Quando comparamos os complexos **B1-B3** com os similares sem o ligante *p*-cimeno (**B7-B9**) nota-se a maior citotoxicidade dos complexos coordenados ao DMSO, mostrando que a labilização do ligante areno resulta em compostos mais ativos. Já os complexos **B4-B6** quando comparados a **B10-B12** não apresentam grandes mudanças nos valores de  $IC_{50}$  com a labilização do ligante areno, provavelmente devido à presença da trifenilfosfina em ambos grupos, já os tornando consideravelmente ativos, deve-se levar em conta também a rápida labilização do ligante *p*-cimeno no meio biológico, sendo os complexos **B10-B12** as espécie majoritárias nas soluções dos complexos **B4-B6** (DMSO/RPMI), conforme constatamos nos estudos de estabilidade. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, onde outros complexos rutênio/bifosfinas/naftoquinonas exibiram valores de  $IC_{50}$  similares aos complexos desta Série, principalmente frente as linhagens tumorais de mama, comprovando o potencial citotóxico desse tipo de combinação.<sup>65</sup>

Na Tabela 5.9 são apresentados também os índices de seletividade para os complexos **B1-B12**, onde quanto maior o valor encontrado, maior é a seletividade do complexo para a linhagem não tumoral. De modo geral, os complexos foram mais ativos nas linhagens de mama do que nas de pulmão, com exceção dos complexos **P2**, **B10** e **B11** que nas células de pulmão apresentaram seletividade similar a cisplatina, além disso os maiores índices de seletividade foram encontrados para as células MCF-7 sendo na maioria dos casos maiores para esta célula do que para a correspondente triplo negativa (MDA-MB-231). O maior índice de seletividade encontrado foi exibido pelo complexo **B12** frente à linhagem MCF-7, superando também o encontrado para o fármaco inorgânico

cisplatina. Assim, por exibirem bons índices de seletividade e também baixos valores de  $IC_{50}$ , escolhemos os complexos contendo os ligantes **L3** para prosseguir com os demais estudos biológicos, avaliando melhor os efeitos causados pelo mesmo na linhagem MCF-7.

Para analisar as mudanças morfológicas promovidas pelos complexos **B3**, **B6**, **B9** e **B12** na linhagem tumoral MCF-7, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (proporcionais aos valores de  $IC_{50}$ ) e micrografias foram feitas no início do tratamento (0 h) e em 24 e 48 horas. Na Figura 5.29 vemos as imagens obtidas nas concentrações iguais ao  $IC_{50}$ .

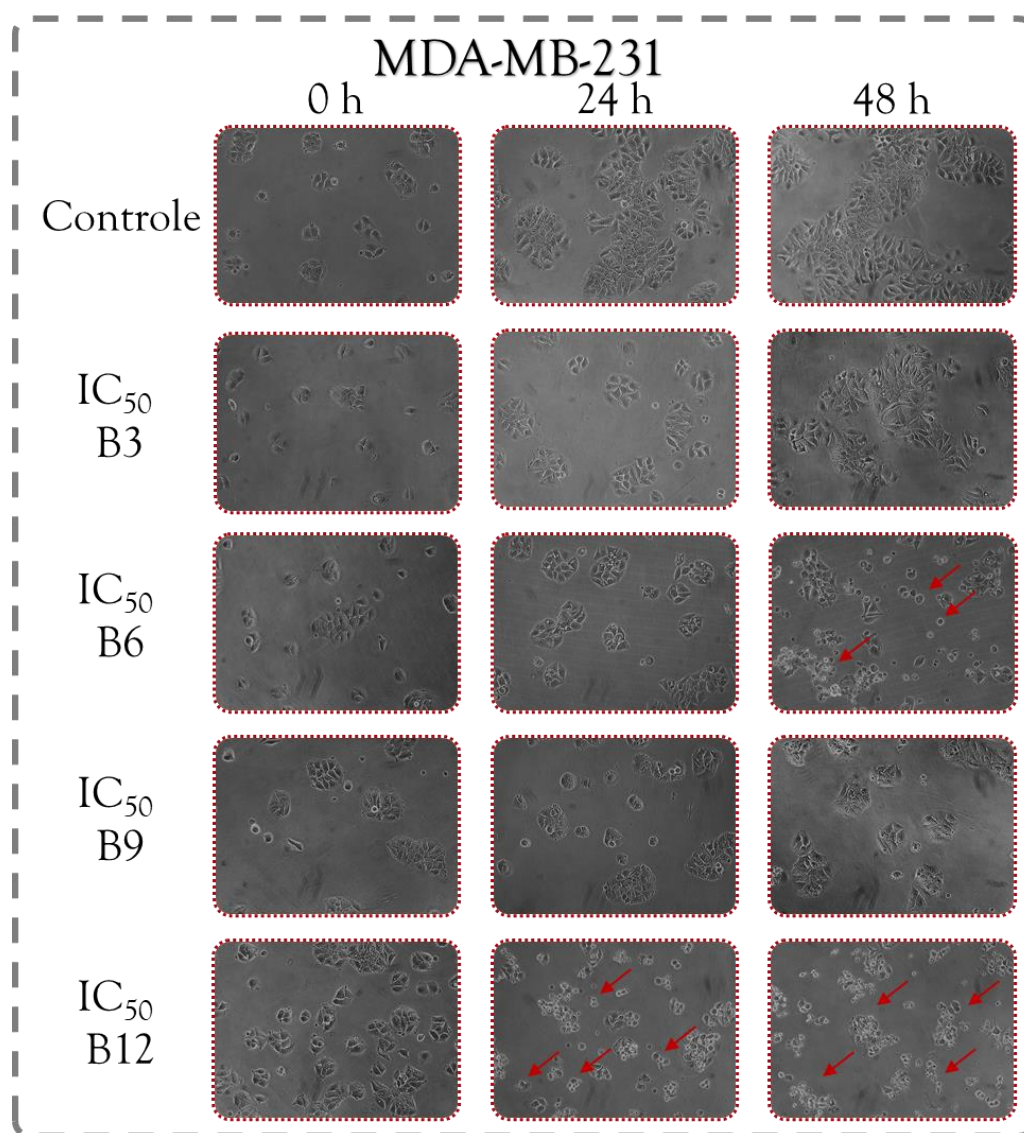


FIGURA 5.29 – Micrografias obtidas para as culturas da linhagem celular MCF-7 nas concentrações do  $IC_{50}$  obtidas para os complexos **B3**, **B6**, **B9** e **B12**.

Quando comparamos os estudos de morfologia constantes nas demais séries vemos as diferenças morfológicas entre as células MBA-MB-231 (invasiva) e a MCF-7 (não invasiva) estudadas aqui, apresentando a primeira um formato mais alongado com projeções da membrana celular em maior destaque, enquanto a MCF-7 exibe estrutura mais agregada ao redor do núcleo, sem projeções de membrana e se agregando em forma de colônias, o que é bem visível nas imagens da Figura 5.29.<sup>151</sup> Quando comparamos o obtido para os complexos com o experimento controle observamos que em 48 horas os complexos sem  $\text{PPh}_3$  (**B3** e **B7**) não acarretam mudanças morfológicas perceptíveis, enquanto os complexos contendo a monofosfina (**B6** e **B12**) levam à perda da morfologia e perda da adesão ao fundo da placa, sendo este efeito observado também em 24 h para o complexo **B12**. Assim vemos que a presença da fosfina não somente influencia nos valores de  $\text{IC}_{50}$  como também tornam os compostos mais agressivos às células, levando a maiores alterações morfológicas às células do que os demais complexos testados.

Este mesmo efeito é observado quando analisamos os efeitos dos complexos **B3**, **B6**, **B9** e **B12** nos testes de sobrevivência clonogênica das células MCF-7. Na Figura 4.30(a) são apresentadas as imagens obtidas para os poços contendo o cultivo das células MCF-7 após o tratamento com os complexos, onde vemos as colônias formadas nos experimentos. Ao compararmos com o experimento controle vemos que os complexos **B6**, **B9** e **B12** praticamente eliminaram a clonogenicidade das células tratadas, enquanto o complexo **B3** leva a uma diminuição de 40% na formação de colônias (Figura 5.30(b)). Estas informações evidenciam que tanto a labilização do ligante areno como a presença da  $\text{PPh}_3$  coordenada ao centro metálico, tornam os complexos desta série mais aptos a promoverem danos às células, resultando na perda da capacidade das mesmas de formar colônias, o que é importante, pois mesmo sendo as células MCF-7 uma linhagem não invasiva, a inibição da formação de colônias mostra que os complexos são capazes de induzir danos nos mecanismos envolvidos na



replicação celular.<sup>123,126,152</sup>

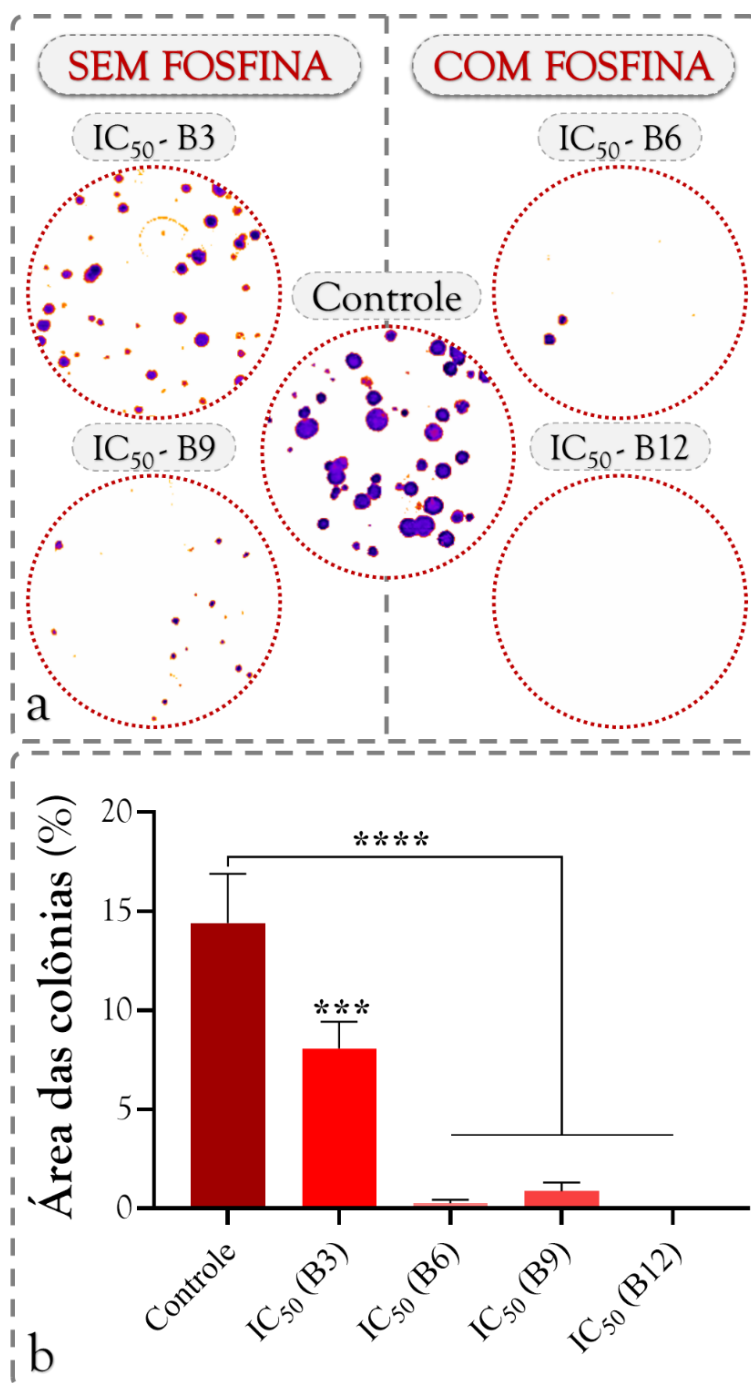


FIGURA 5.30 – (a) Imagem dos poços onde foram cultivadas as células MCF-7 nas concentrações de IC<sub>50</sub> dos complexos **B3**, **B6**, **B9** e **B12**. (b) Distribuição do número de colônias em cada concentração.

O ciclo de reprodução de uma célula eucariótica é composto por uma série de eventos coordenados e sequenciais compostos por etapas onde a célula duplica todo o seu conteúdo intracelular e se divide. Na Figura 5.31 vemos um esquema representando as fases do ciclo celular, que se divide em mitose e

intérfase. Na mitose (M) ocorre a divisão celular, enquanto na intérfase temos várias fases envolvidas, dividindo-se em 4 etapas denominadas de  $G_0/G_1$ , S,  $G_2$  e  $SubG_1$ . Na fase  $G_0/G_1$  a célula se prepara para a síntese do DNA, que ocorre na fase S, enquanto na fase  $G_2$  a célula se prepara para divisão celular que ocorrerá na fase M, completando o ciclo. Uma vez na fase  $G_0/G_1$  as células podem entrar em um estado onde não há atividade inerente a replicação, conhecido como  $SubG_1$ . Em todo o ciclo existem pontos de checagem, onde são checados os componentes celulares duplicados, avaliando se as células irão prosseguir no ciclo celular, o que somente ocorre quando anomalias não são observadas, como danos ao DNA ou organelas. Células tumorais exibem mutações que levam à perda desses pontos de checagem, fazendo com que as células permaneçam sempre no ciclo de reprodução, levando à divisão descontrolada das células.<sup>130,153–156</sup>

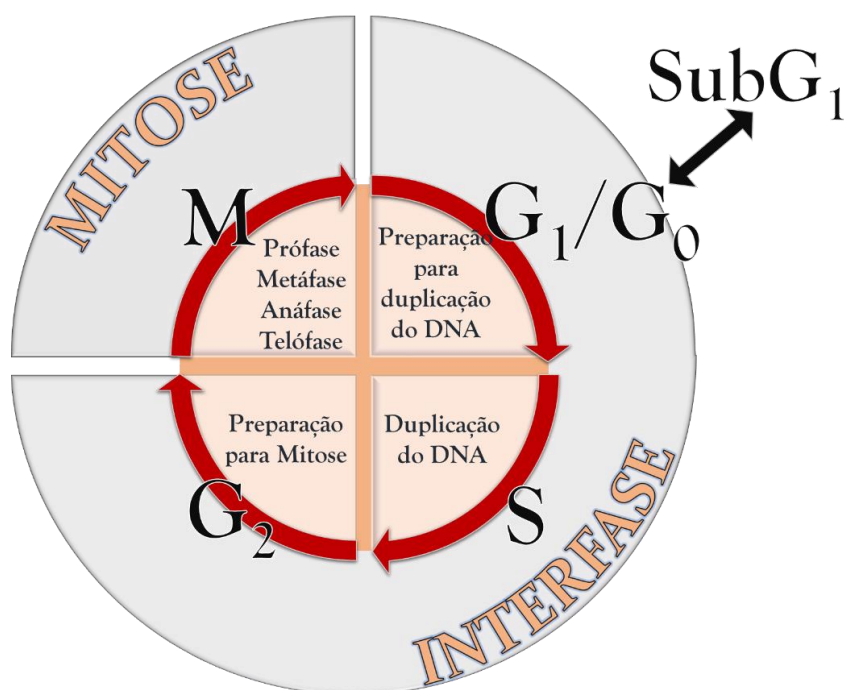


FIGURA 5.31 – Fases do ciclo celular de células eucarióticas.

Nos gráficos apresentados na Figura 5.32 podemos ver o resultado obtido o ciclo celular das células MCF-7 tratadas com os complexos **B3**, **B6**, **B9** e **B12** concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$ . Foram realizados experimentos controle empregando a cisplatina e a camptotecina. A camptotecina

é um fármaco que apresenta uma considerável atividade antitumoral cujo mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase I.<sup>157,158</sup>

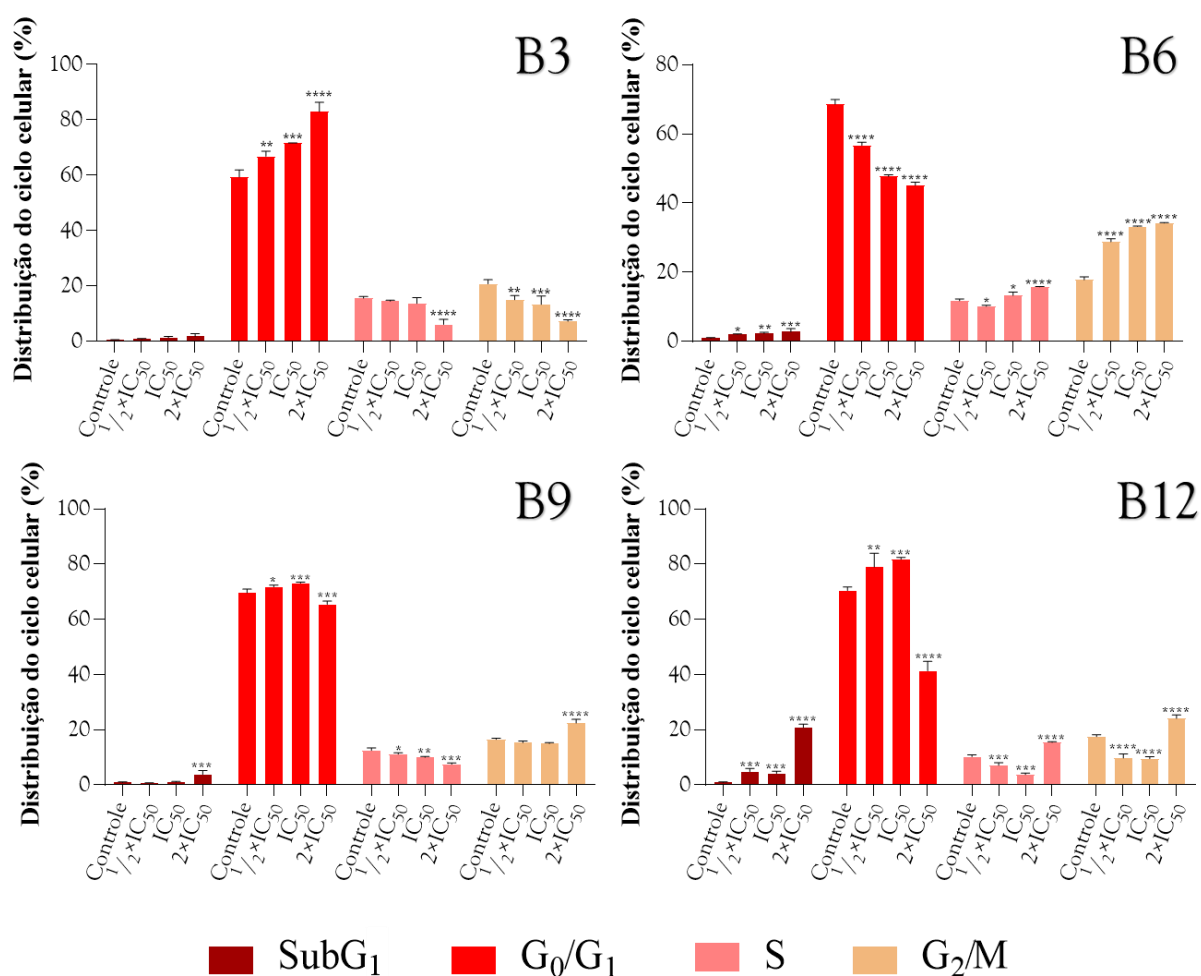


FIGURA 5.32 - Distribuição do ciclo celular das células MCF-7 após tratamento com os complexos **B3**, **B6**, **B9**, **B12** e controles negativo por 48 h. Diferenças significativas em relação ao controle são indicadas por \* p < 0,05; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 e \*\*\*\* p < 0,0001.

Ao observar o perfil de distribuição dos complexos em cada fase do ciclo celular vemos que os compostos interferiram de maneira diferente, causando paradas em diferentes fases. Comparando o controle negativo com o obtido para o complexo **B3** é possível notar acúmulo das células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e consequente diminuição das fases S e G<sub>2</sub>/M, sendo uma tendência significativa desde a menor concentração do complexo (1/2\*IC<sub>50</sub>). Já para o complexo **B6** é possível notar uma tendência inversa, exibindo acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>/M e consequente diminuição da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, além de um acúmulo significativo das células em SubG<sub>1</sub>. As diferentes tendências observadas nos mostram que a presença da

trifenilfosfina muda completamente o caminho de ação do complexo, promovendo paradas em diferentes fases do ciclo, provavelmente por mudar completamente o perfil de interação com biomoléculas ativas em cada fase.

Já os complexos **B9** e **B12** apresentaram uma tendência com o aumento da concentração, onde até a concentração igual ao  $IC_{50}$  houve acúmulo das células na fase  $G_0/G_1$  e diminuição da fase S, permanecendo a fase  $G_2/M$  inalterada em **B9**. O que muda na concentração igual a  $2 \times IC_{50}$ , ocorrendo acúmulo das células foi na fase  $G_2/M$  e diminuição da fases  $G_0/G_1$ , sendo observado apenas para **B12** aumento do número de células na fase S. Os complexos **B6**, **B9** e **B12** provocaram acúmulo significativo das células em  $SubG_1$  o que pode ser um indicativo de morte celular por apoptose, diferente de **B3** onde não houve mudança significativa nessa fase, corroborando com o perfil menos agressivo deste complexo observado nos outros experimentos.

Uma das biomoléculas mais exploradas na literatura quanto à interação com complexos metálicos é o DNA, principalmente devido à correlação da atividade antitumoral do cisplatina com esta biomolécula, o que fez dos estudos de interação complexo/DNA uma importante ferramenta na elucidação de mecanismos de ação de compostos de coordenação. A estrutura do DNA é composta pelas bases nitrogenadas adenina, timina, guanina e citosina que ligadas a um açúcar e um fosfato formam uma subunidade conhecida como nucleotídeo, a associação de nucleotídeos levam à formação de uma fita única, onde na união entre esses nucleotídeos são realizadas ligações formadas entre as pentoses e os fosfatos. Essas fitas compostas pelos nucleotídeos interagem entre si aos pares, através de ligações de hidrogênio formadas especificamente entre bases nitrogenadas adenina/timina e guanina/citosina, cuja cadeia sofre uma torção dando origem a um formato de dupla hélice ao redor do eixo central da fita.

A interação entre complexos metálicos e DNA são regidos por ligações covalentes e não covalentes, sendo as não covalentes compostas por

interações eletrostáticas ou intercalativas (entre os pares de base ou nos sulcos), conforme apresentado na Figura 5.33. A interação covalente envolve a labilização de um ligante coordenado ao centro metálico (geralmente cloridos), ocorrendo a coordenação do complexo com as bases nitrogenadas do DNA, assim ocorre com o cisplatina. As interações eletrostáticas ocorrem entre complexos catiônicos e grupos carregados presentes no DNA (como o grupo fosfato), complexos neutros de modo geral pouco interagem com o DNA, exibindo somente interações específicas como ligações de hidrogênio (quando existem grupos doadores/aceptores de hidrogênio) e/ou hidrofóbicas. As intercalações se processam quando os complexos dispõem de substituintes planares, aromáticos e sem impedimento estérico, ocorrendo a inserção espontânea desses substituintes entre os pares de bases exibindo interações com os pares de base por forças de van der Waals e principalmente interações  $\pi$ - $\pi$ .<sup>159-163</sup>

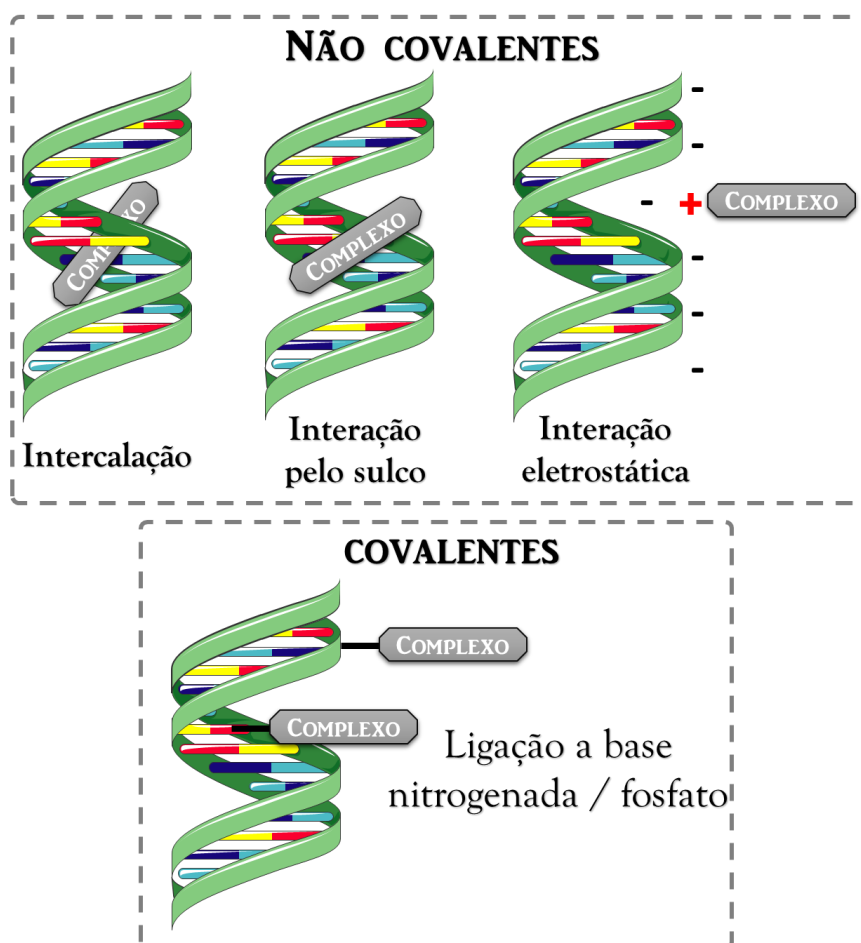


FIGURA 5.33 – Representação dos possíveis modos de interação de complexos com o DNA.

Como vimos anteriormente, a ocorrência de interações covalentes são precedidas pela labilização de um dos ligantes coordenados ao centro metálico, e como já detalhado nos estudos de estabilidade dos complexos **B1-B6** em DMSO, os mesmos sofrem a labilização do ligante *p*-cimeno dando lugar à coordenação ao DMSO e ligantes clorido, resultando nos complexos **B7-B12**. Como os complexos **B7-B12** possuem ligante clorido coordenado ao centro metálico, realizamos estudos de hidrólise/solvólise dos mesmos em soluções *d*-DMSO/D<sub>2</sub>O, acompanhando as mudanças estruturais com o tempo através de medidas de RMN. Na Figura 5.34 vemos os espectros obtidos para as soluções *d*-DMSO/D<sub>2</sub>O (5:1), não sendo possível analisar em maiores teores de água deuterada devido à precipitação dos complexos nessas condições.

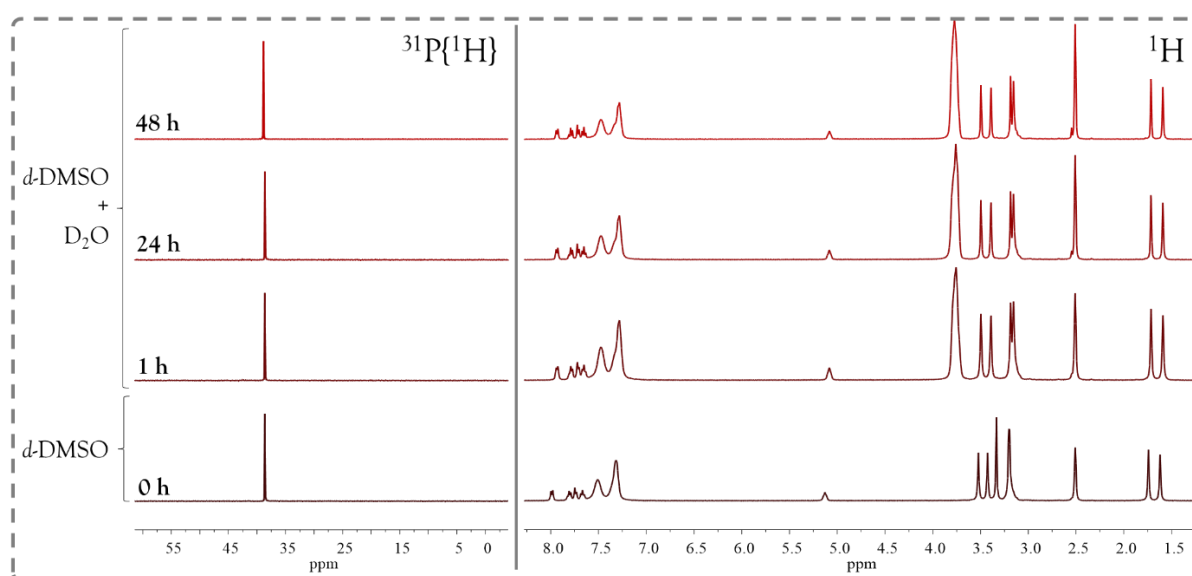


FIGURA 5.34 – Estudo de estabilidade do complexo **B10** na mistura *d*-DMSO/D<sub>2</sub>O através da técnica de RMN <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} e <sup>1</sup>H em 0, 1, 24 e 48 horas.

Mesmo nos complexos **B10-B12** que possuem o ligante clorido em posição *trans* a PPh<sub>3</sub>, não foi observado a labilização do ligante clorido em nenhum dos compostos, permanecendo inalterados os espectros obtidos durante o período de 48 horas, comprovando que os ligantes clorido estão fortemente ligados ao centro metálico, provavelmente por serem os únicos  $\sigma$  doadores fortes ligados ao metal, impossibilitando a ocorrência de interações covalentes para estes complexos.

Para se verificar a possível existência de interações do tipo não covalente entre complexo/DNA, foram realizados experimentos de interação com DNA plasmidial empregando a técnica de eletroforese em gel. Esta técnica emprega o princípio de separação de moléculas a partir de sua mobilidade, e isto durante a aplicação de uma diferença de potencial em uma solução contendo uma matriz polimérica e o DNA, onde a carga negativa predominante no DNA faz com que o mesmo migre para o polo positivo dos eletrodos onde se aplica a carga. A separação ocorre em função do tamanho e forma das moléculas de DNA, onde quanto maior o tamanho menor será a mobilidades dessas partículas em uma matriz. O DNA plasmidial empregado neste trabalho foi o PBR322 (proveniente de *Escherichia coli*), que apresenta basicamente três formas predominantes, a superenovelada (S), circular aberta (C) e linear (L), conforme ilustrado na Figura 5.35. Na presença de agentes que interajam com o DNA a forma superenovelada pode ser degradada, se convertendo na forma circular aberta, o que é característico de interações eletrostáticas mais fortes ou intercalativas. Interações covalentes não somente ao desaparecimento da forma superenovelada como também a clivagem da forma circular, ocorrendo em alguns casos até a clivagem da forma linear, levando ao desaparecimento das bandas.

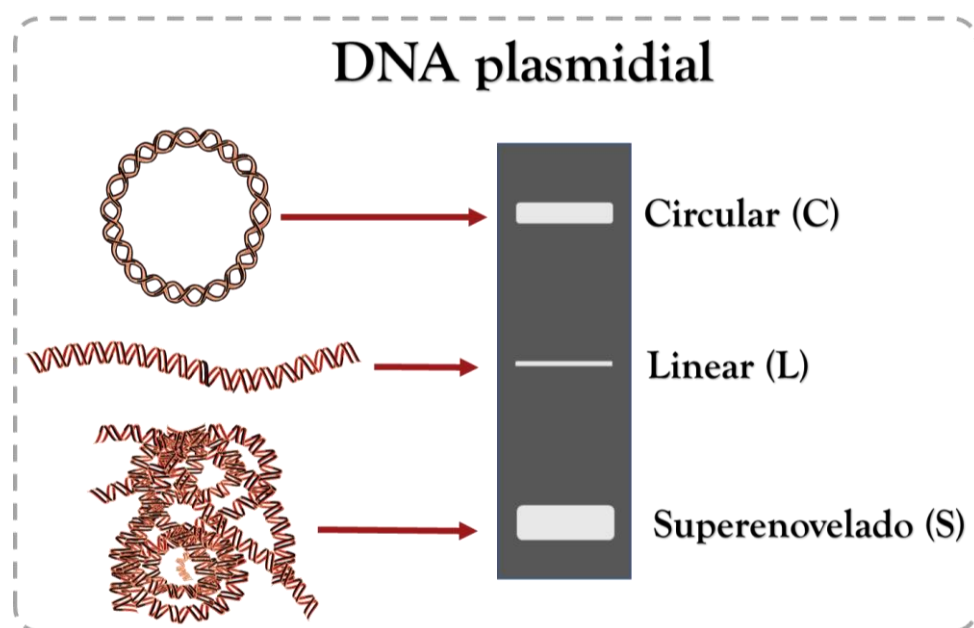


FIGURA 5.35 – Bandas observadas para as formas mais comuns de DNA (PBR322) em experimentos de eletroforese em gel.

Para a realização do estudo dos compostos de controle (cisplatina e tiazol laranja) e DNA foram encubados previamente por 24 h, a 37 °C. Na Figura 5.36 são apresentados os resultados obtidos, onde podemos ver que o complexo **B11**, assim como os demais complexos testados (**B7-B12**), não ocasionaram mudanças de intensidade ou de posição das bandas do DNA, mesmo nas maiores concentrações empregadas para os complexos. O que não ocorre com os controles, onde vemos alterações significantes no perfil das bandas, como no caso do cisplatina, que na maior concentração leva à fragmentação do DNA, resultando no desaparecimento das bandas, isto por exibir interações covalentes com o DNA. O tiazol laranja, na maior concentração, leva ao desaparecimento da banda referente a forma superenovelada, devido o deslocamento do brometo de etídeo, cujo fluorescência permite visualizar as bandas, enquanto em menores concentrações vemos o surgimento da banda referente ao DNA linear, que aparece devido a intercalação do tiazol laranja entre os pares de base, levando a abertura das estruturas circulares resultando nos fragmentos lineares.<sup>72,164,165</sup>

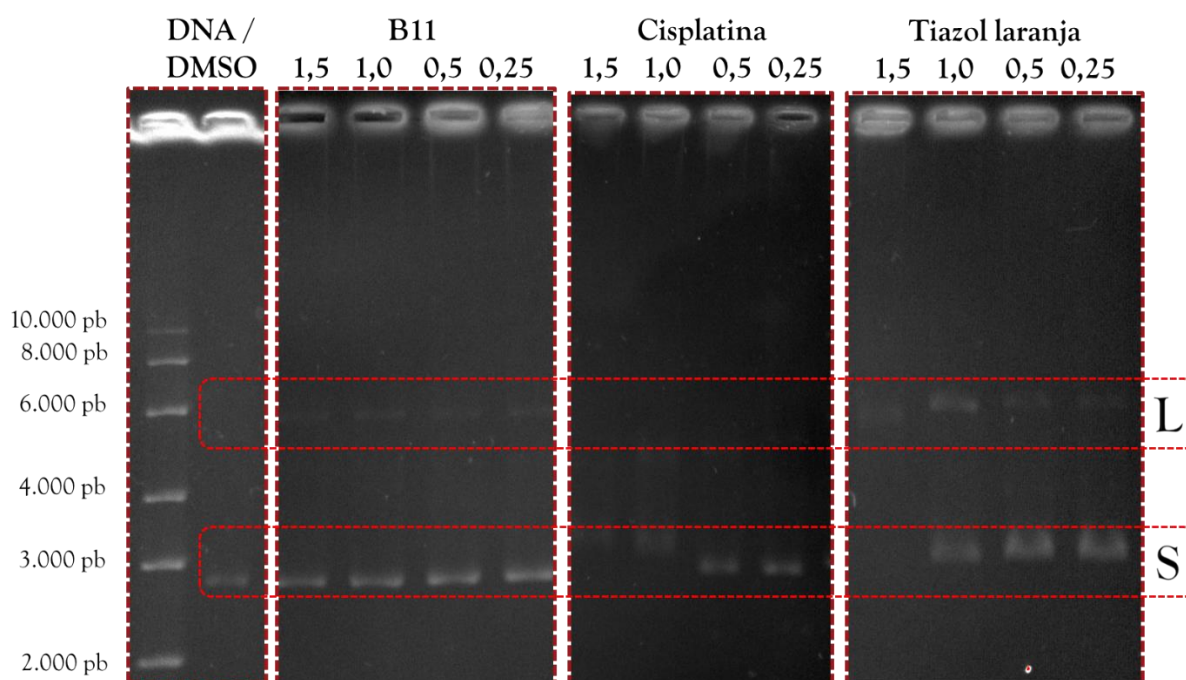


FIGURA 5.36 – Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 em diferentes  $R_i$  ( $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$ ) do complexo **B11** e controles (cisplatina e tiazol laranja). Em destaque as bandas referentes ao DNA superenovelado (S) e linear (L).



A ausência de mudanças nas bandas em detrimento da interação dos complexos desta série com o DNA já era esperada, uma vez que não existe grande possibilidade de interações covalentes, por não haver ligantes lábeis. Além disso, temos a ausência de carga no complexo, que por ser neutro não exhibe interações eletrostáticas, limitando as interações complexo/DNA a interações hidrofóbicas, que não são fortes o suficiente para induzir alterações no perfil eletroforético do DNA.

### 5.3– Conclusões parciais da Série B.

Nesta série foram sintetizados 12 complexos de rutênio contendo ligantes naftoquinônicos (lausona, lapachol e 3-estiril-lausona), os quais foram caracterizados por técnicas de condutividade molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D de  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  e difração de raios X. Os complexos de fórmula geral *fac*- $[\text{RuClL}_x(\text{DMSO})_3]$  (**B7-B9**) e *cis*- $[\text{RuClL}_x(\text{DMSO})_2(\text{PPh}_3)]$  (**B10-B12**) surgiram a partir da análise da estabilidade química dos complexos  $[\text{RuClL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})]$  (**B1-B3**) e  $[\text{RuL}_x(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (**B4-B6**) no período de 48 h, em solvente coordenante (DMSO) e em meio de cultura de celular (RPMI). Nestes experimentos de estabilidade, observamos a labilização do ligante *p*-cimeno nos complexos **B1-B6**, levando a coordenação de cloridos e moléculas de DMSO presentes em solução, resultando nos complexos **B7-B12**. Esta descoberta foi viabilizada por técnicas de RMN e difração de raios X, e as informações obtidas foram fundamentais para o conhecimento das espécies formadas em solução, fato que é ignorado em alguns trabalhos similares reportados na literatura. A labilidade do ligante areno foi correlacionada a característica  $\pi$  acceptora dos ligantes presentes na esfera de coordenação, que ao competir pelos elétrons dos orbitais d do metal, levam ao enfraquecimento da ligação  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{areno}$  e sua troca por DMSO.

Ao avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa dos complexos

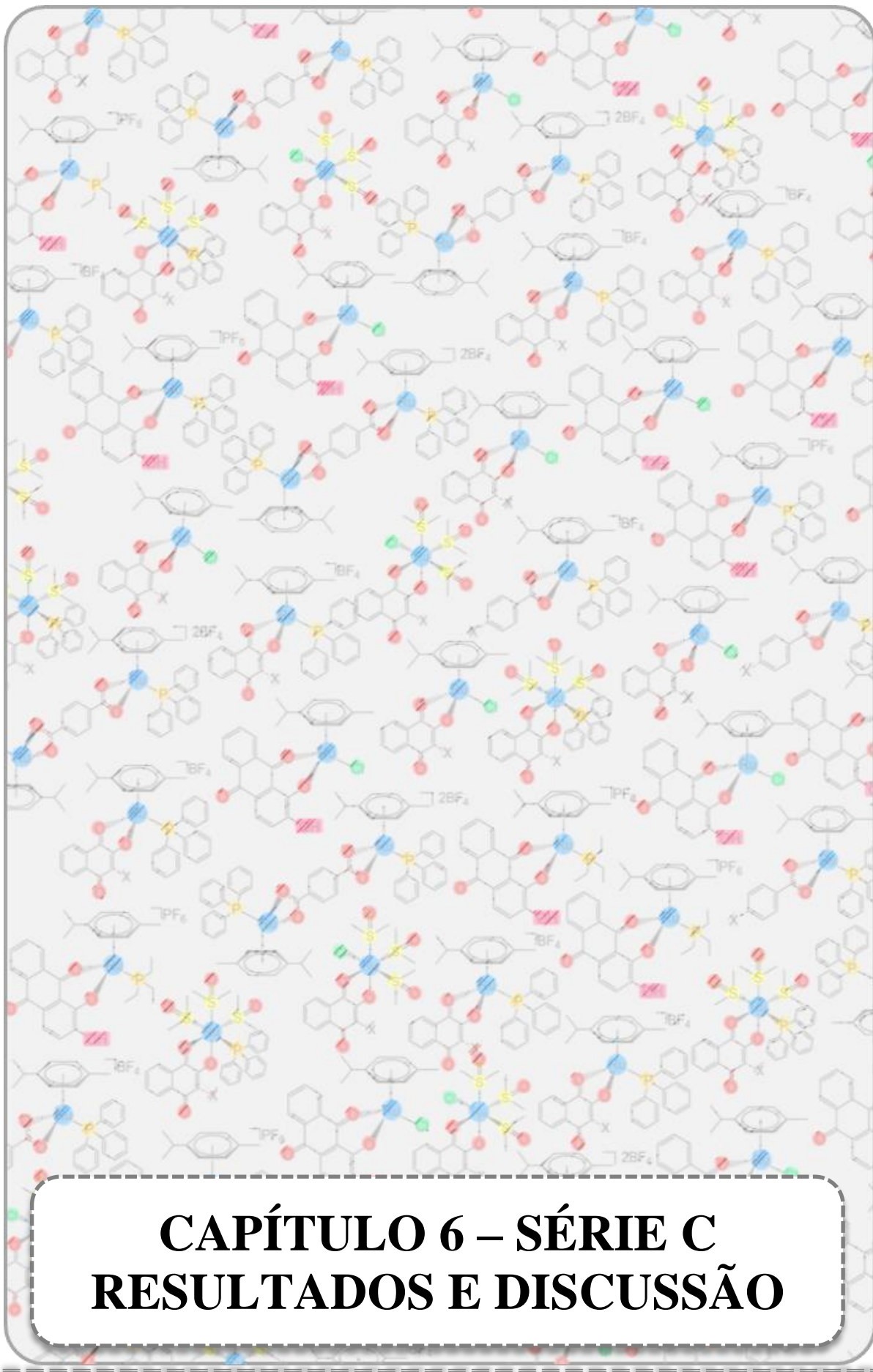
frente a diferentes linhagens de células tumorais, foi possível notar que os compostos foram mais seletivos para as células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) do que na linhagem de pulmão (A549), entretanto na maioria dos casos os valores de  $IC_{50}$  foram similares ou menores que o fármaco de referência. Os maiores índices de seletividade foram encontrados frente a linhagem MCF-7, sendo inclusive maiores do que o exibido pela cisplatina. Para os complexos **B1-B3** a labilização do ligante areno levou a diminuição considerável dos valores de  $IC_{50}$ , sendo os complexos **B7-B9**, em média, 10 vezes mais ativos frente às linhagens testadas. Nos complexos **B4-B6** esse efeito foi menos pronunciado, permanecendo os valores de  $IC_{50}$  para os complexos sem areno (**B10-B12**) próximos aos seus equivalentes contendo o ligante areno. Os complexos contendo o ligante 3-estiril-lausona (**B3, B6, B9 e B12**) apresentaram os melhores valores de índice de seletividade, sendo estes escolhidos para os demais ensaios biológicos.

Ao avaliar a cinética do ciclo celular, os dados sugerem que os complexos induziram parada do ciclo em diferentes fases, evidenciando que as mudanças estruturais afetam consideravelmente a ação dos compostos nas células testadas, atuando cada um deles em diferentes mecanismos. A única tendência geral observada foi o acúmulo na fase  $SubG_1$ , onde as células se encontram fora do ciclo de divisão, em detrimento dos danos causados pelos complexos em suas estruturas e mecanismos essenciais. Os resultados obtidos a partir das observações das alterações morfológicas das células (MCF-7) em função do tempo, nos permitiram saber que a presença da trifenilfosfina, nos complexos **B6 e B12** (em concentrações iguais ao  $IC_{50}$ ), tornam esses compostos mais agressivos às estruturas celulares que os correspondentes sem fosfina (**B3 e B9**), levando a maiores alterações morfológicas e perda de adesão, conforme atestado pelas micrografias obtidas. Além disso, os complexos foram capazes de prevenir a formação de colônias, em baixas concentrações, evidenciando um efeito citotóxico e citostático, e de modo similar ao estudo morfológico, observamos

---

maior efeito inibidor desses fatores nos complexos contendo a monofisfina.

Demais estudos serão realizados para melhor compreender os possíveis mecanismos de ação exibidos pelos complexos desta série, determinando o mecanismo de morte celular (apoptose/necrose), capacidade de levar ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, capacidade de gerar a despolarização mitocondrial e outros.



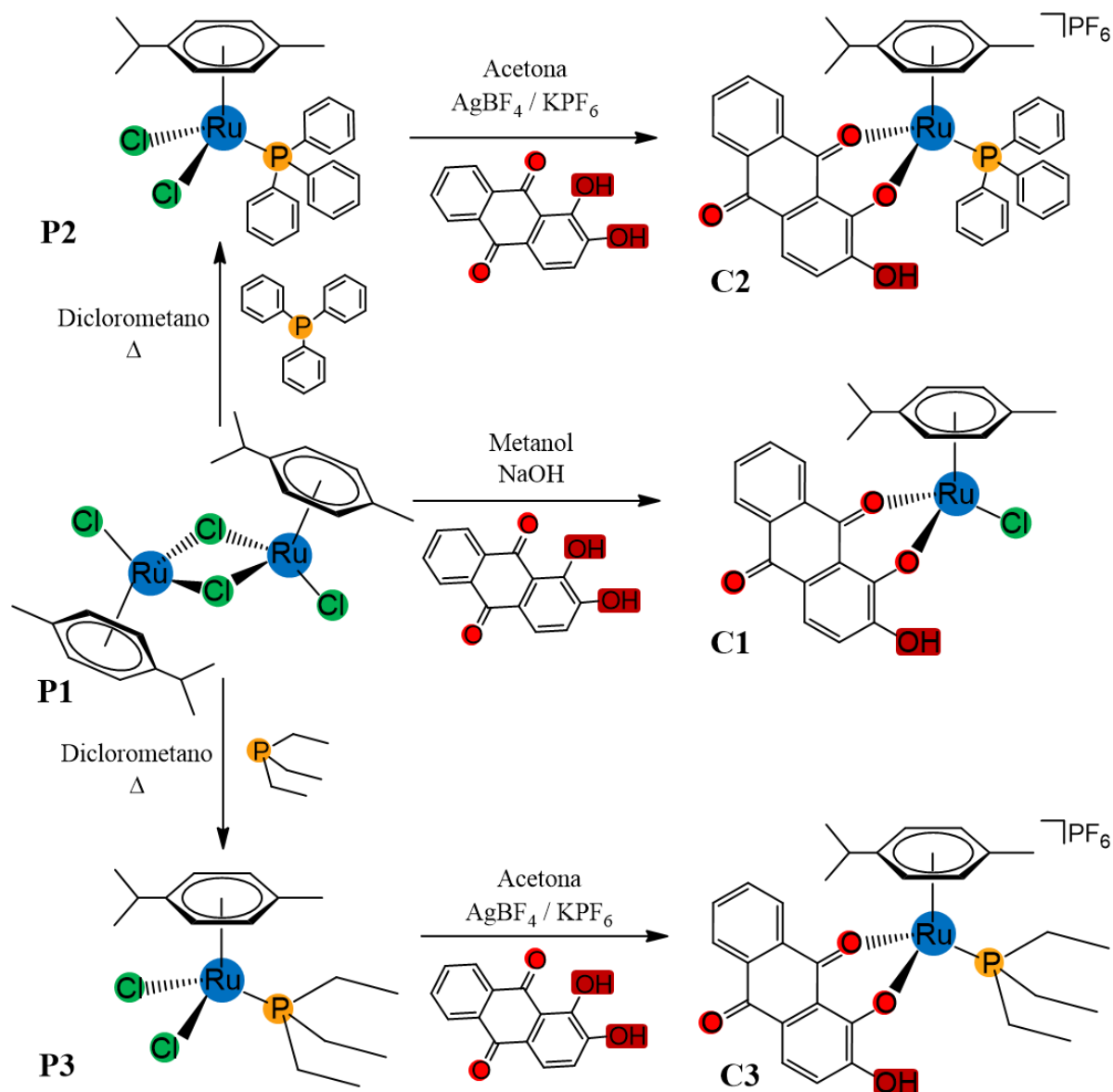
Neste capítulo encontram-se descritas as sínteses e caracterização dos complexos Rutênio/areno contendo a alizarina e monofosfinas como ligantes, resultando em novos complexos que foram avaliados quanto à atividade citotóxica frente à células tumorais. Um dos intuitos desta Série foi incorporar aos complexos a fluorescência exibida pela alizarina, sendo que a manutenção desta característica permite a realização de experimentos adequados para o aprofundamento do entendimento sobre alguns aspectos do modo de ação destes complexos em células, como a capacidade de permear a membrana celular e se acumular em componentes específicos do meio intracelular.

### 6.1 - Síntese e caracterização dos complexos da Série C.

Nesta série foram obtidos três novos complexos de Rutênio(II)/areno/alizarina partindo dos precursores [ $\{\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\}_2(\mu\text{-Cl})_2$ ] (**P1**), [ $\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{PPh}_3)$ ] (**P2**) e [ $\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{PEt}_3)$ ] (**P3**), onde  $\text{PPh}_3$  = trifenilfosfina e  $\text{PEt}_3$  = trietilfosfina. Os precursores **P1** e **P2** são os mesmos empregados nas séries anteriores e **P3** foi sintetizado para esta série a partir de uma rota sintética similar à empregada para a síntese de **P2**, onde a solubilização do complexo **P1** e trietilfosfina ( $\text{PEt}_3$ ) resulta em **P3**, que é formado a partir da quebra das pontes formadas pelo ligante clorido, cedendo o ponto de coordenação para a trietilfosfina. O Esquema 6.1 representa a rota sintética utilizada para a síntese dos precursores **P2** e **P3**.

Partindo dos precursores **P1-P3**, obteve-se os complexos de fórmula geral [ $\text{RuClL}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})$ ] (**C1**), [ $\text{RuL}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (**C2**) e [ $\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{PEt}_3)]\text{PF}_6$  (**C3**), onde L = alizarina. O complexo **C1** foi sintetizado a partir do precursor **P1**, onde a solubilização do precursor e alizarina em proporção 1:2 resulta na formação do complexo, que precipita no meio reacional. Lembrando que previamente se emprega NaOH para o desprotonamento da alizarina, que muda de cor com a retirada do hidrogênio, fazendo com que a solução inicialmente vermelha bordô passe a exibir coloração alaranjada. Os complexos

**C2** e **C3**, são sintetizados a partir dos precursores **P2** e **P3**, respectivamente, sendo necessário o emprego do sal  $\text{AgBF}_4$  para a retirada dos ligantes clorido, uma vez que sem o emprego da prata o precursor metálico não é completamente consumido. O emprego do sal de prata dispensa o desprotonamento da alizarina com uma base forte, que se desprotona com a coordenação, conforme ilustrado no Esquema 6.1 onde vemos as estruturas propostas para os complexos **C1-C3**.



ESQUEMA 6.1 – Rota sintética empregada para os complexos envolvidos na Série C.

Foram obtidos monocristais para os complexos **C1** e **C3** a partir das soluções empregadas para os experimentos de RMN, onde as estruturas cristalinas obtidas nos permitiram comprovar a proposta estrutural inicial para esta Série,

confirmando a coordenação na forma bidentada pelos oxigênios O<sub>1</sub> e O<sub>3</sub> da alizarina, conforme apresentados na Figura 6.1. Ambos complexos cristalizaram em um grupo espacial P21/c (14) apresentando 1 molécula por unidade assimétrica, sendo que **C3** apresenta também o contraíon PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, par iônico do complexo formado. A estrutura cristalina de **C3** apresentou desordem nos ligantes *p*-cimeno (refinado em duas partes com ocupação igual a 50%), trietilfosfina (refinado em duas partes com ocupação de 45% e 55%, respectivamente) e no contraíon PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (refinados em duas posições com ocupação de 50% cada).

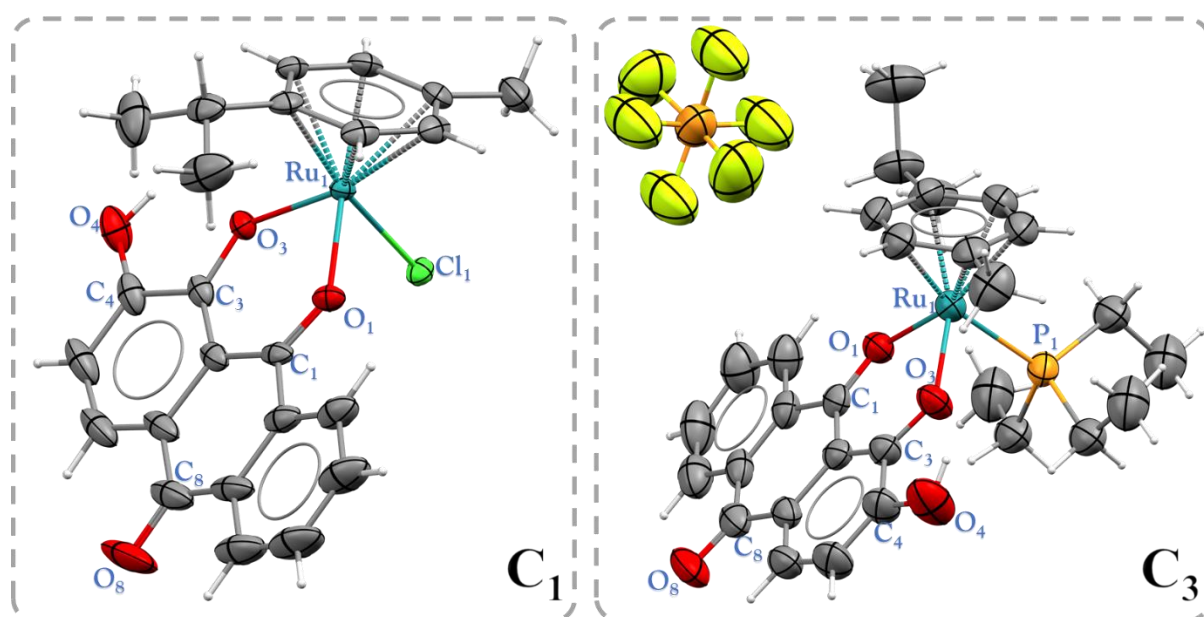


FIGURA 6.1 – Estrutura cristalográfica obtida para os complexos **C1** e **C3**. Elipsoides representadas com 30% de probabilidade.

Os ângulos de mordida O-Ru-O foram os maiores dentre os complexos sintetizados neste trabalhos, 85°, enquanto as Séries B e A apresentaram valores de 76° e 60°, respectivamente resultando na seguinte ordem decrescente: O-Ru-O Série C > O-Ru-O Série B > O-Ru-O Série A. Vemos que a Série C exhibe os maiores ângulos da ligação entre o metal e os pontos de coordenação do ligante, fator que provavelmente confere maior estabilidade a estes compostos devido a menor tensão interna do anel formado com a coordenação, de modo contrário à Série A possui um tenso anel formado entre o rutênio e os ligantes carboxilados, resultando em complexos bastante instáveis.

Observamos nesta Série tendências para o tamanho das ligações C-O similares ao exibido na Série B, onde estas ligações quando coordenadas (C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub> e C<sub>3</sub>-O<sub>3</sub>) sofrem alterações em seu tamanho, enquanto as que permanecem livres não exibem alterações consideráveis (C<sub>4</sub>-O<sub>4</sub> e C<sub>8</sub>-O<sub>8</sub>), conforme podemos ver nos comprimentos das ligações C-O da alizarina livre e coordenada, apresentados na Tabela 6.1. Quando comparamos o comprimento das carbonilas C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub> (coordenada) e C<sub>8</sub>-O<sub>8</sub> (livre), vemos que a coordenação leva ao aumento da distância interatômica, fato ligado à retrodoação do metal para os orbitais  $\pi^*$  do ligante, diminuindo a ordem de ligação e conseqüentemente enfraquecendo a mesma. De modo contrário a ligação C<sub>3</sub>-O<sub>3</sub> diminui de distância, isto devido a inexistência da retrodoação nesta ligação e principalmente por serem doados através da ligação sigma os elétrons pertencentes a um orbital antiligante do ligante, aumentando a ordem de ligação em C<sub>3</sub>-O<sub>3</sub> e conseqüentemente tornando a mesma mais forte com a coordenação, conforme já descrito na Série B.

TABELA 6.1 – Comprimentos de ligação (Å) entre alguns pares atômicos dos complexos C1, C3 e alizarina.

Tipo de Ligação	Comprimento de ligação (Å)		
	Alizarina*	C1	C3
<b>C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub></b>	1,245(7)	1,252(5)	1,25(1)
<b>C<sub>3</sub>-O<sub>3</sub></b>	1,347(5)	1,295(5)	1,29(1)
<b>C<sub>4</sub>-O<sub>4</sub></b>	1,343(5)	1,339(7)	1,35(1)
<b>C<sub>8</sub>-O<sub>8</sub></b>	1,224(7)	1,239(7)	1,21(1)
<b>Ru-O<sub>1</sub></b>	-	2,075(3)	2,068(6)
<b>Ru-O<sub>3</sub></b>	-	2,057(2)	2,063(5)
<b>Ru-P</b>	-	-	2,350(2)
<b>Ru-Cl</b>	-	2,439(1)	-
<b>Ru-areno</b>	-	1,652	1,694

\*Código CCDC 800614

Vemos também outra tendência expressada nas ligações Ru-O, que nesta série apresentaram valores médios entre 2,057 e 2,075 Å (menores do que a



média encontrada nos valores da literatura apresentados na Figura 4.4, 2,08 Å), enquanto na Série B esse valor varia entre 2,084 e 2,116 Å, e na Série A varia entre 2,114 e 2,150 Å. Observamos assim que esses valores apresentam a seguinte ordem decrescente: Ru-O Série A > Ru-O Série B > Ru-O Série C, que é exatamente a ordem inversa observada para tendência dos ângulos O-Ru-O observada para os compostos apresentados neste trabalho, mostrando que quanto maior o ângulo O-Ru-O, menores são os comprimentos de ligação Ru-O e conseqüentemente mais fortes as ligações entre o metal e o ligante, fator que pode incrementar a estabilidade dos complexos.

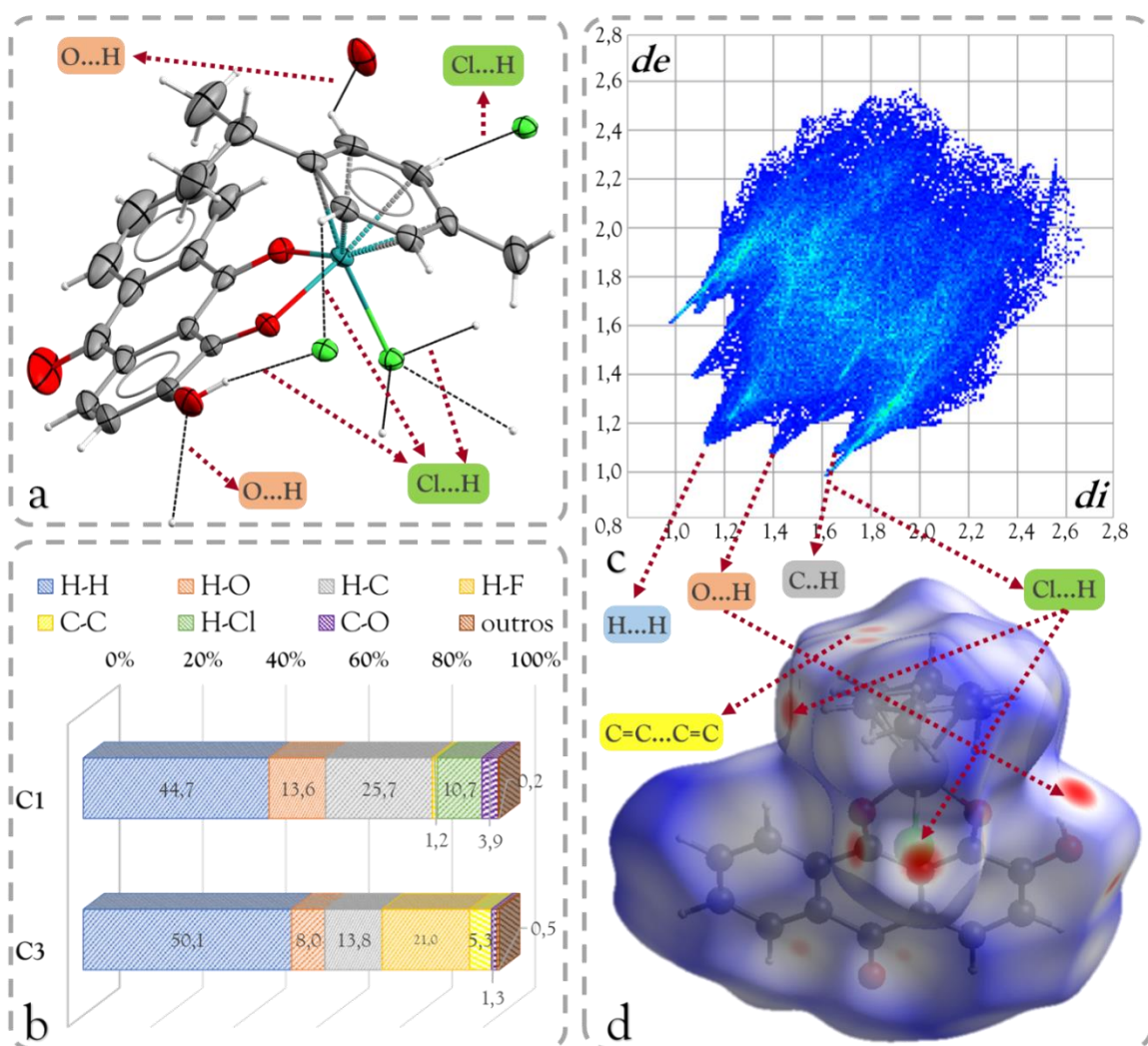


FIGURA 6.2 – (a). Representação das interações H...Cl e H...O presentes no empacotamento cristalino do complexo **C1**. (b). Gráfico de distribuição dos contatos intermoleculares presentes em **C1** e **C3**. (c). Gráfico *Fingerprint* do complexo **C1** representando todos os contatos intermoleculares. (d). Superfície de Hirshfeld obtida para o complexo **C1**.

Ao analisar os contatos intermoleculares exibidos pelos complexos **C1** e **C3**, destacam-se claras diferenças entre as interações exibidas pelos mesmos. Em **C1** observamos majoritariamente contatos do tipo O...H, C...H, Cl...H, H...H e C...O, enquanto em **C3** observamos os mesmos contatos com exceção da inexistência de contatos do tipo Cl...H (por possuir o ligante PEt<sub>3</sub> no lugar do clorido) e presença de contatos F...H (devido a presença do contraíon PF<sub>6</sub><sup>-</sup>). A Figura 6.2(a) apresenta algumas destas interações descritas para o entorno do complexo **C1**.

No gráfico apresentado na Figura 6.2(b) observamos as distribuições dos contatos observados para os complexos (**C1** e **C3**) destacando a maior quantidade de contatos do tipo H-H para o complexo **C3**, devido à presença do ligante trietilfosfina que além disso encontra-se desordenado, fato correlacionado ao maior número de interações hidrofóbicas que o mesmo apresenta, uma vez que estes tipos de interação pouco contribuem com a estabilização do empacotamento cristalino quando comparado com as demais interações com maior grau de polaridade como as H...O e H...Cl. Além disso, observamos as consequências do efeito estérico exercido pela PEt<sub>3</sub> sobre os demais contatos intermoleculares, onde o grande volume ocupado pela monofosfina leva a uma diminuição do número de contatos H...O, H...C e C...O, que estão em menor porcentagem em **C3** quando comparado com **C1**, que possui como substituinte monodentado o ligante clorido que é bem pequeno quando comparado a PEt<sub>3</sub>.

Na superfície de Hirshfeld encontrada para os complexos **C1** e **C3** destacam-se (em vermelho) os contatos intermoleculares mais intensos exibidos pelos complexos, sendo a maioria deles pertencentes as interações do tipo H...Cl e H...O em **C1** e H...O e H...F em **C3**, aparecendo em maior número em **C3** devido ao grande volume da trietilfosfina, que participa de um maior número de contatos. O ligante clorido presente no complexo **C1** participa de três diferentes contatos com átomos diferentes, como podemos conferir na Figura 6.2(a), que exhibe o cloridos interagindo com os hidrogênios aromáticos do anel do *p*-cimeno e com o

hidrogênio da hidroxila não coordenada da alizarina, resultando em três pontos ao redor do átomo de cloro, onde a distância entre os átomos são menores que a soma do raio de van der Waals, exibindo três pontos vermelhos ai redor do clorido no mapa de Hirshfeld, conforme destacado na Figura 6.2(d). Outro destaque apresentado por **C1** é o contato C...C que compõe uma interação  $\pi$  do tipo C=C...C=C (3,29 Å), interiormente descrito para o complexo **B3**, que embora não seja abundante como as H...H destaca-se no mapa de Hirshfeld, apresentando dois pontos avermelhados ao redor dos carbonos participantes no ligante *p*-cimeno, conforme descrito na Figura 5.20(a) da Série B, e na Figura 6.2(d).

No gráfico *Fingerprint* do complexo **C1** apresentado na Figura 6.2(c), observamos a distribuição de  $di/de$  dos contatos intermoleculares dos complexos, onde vemos predominantemente as interações de tipo H...H sobrepondo os demais contatos, o que é mais intenso em **C3** do que em **C1**, dado as presença da  $\text{PEt}_3$  que aumenta o número de contatos H...H indo até 0,8 Å ( $di/de$ ), enquanto em **C1** vai até 1,1 Å ( $di/de$ ). Na Figura 6.3 podemos visualizar o descrito anteriormente, assim como as linhas exibidas pelos contados H...Cl e H...O que se destacam em relação as demais.

Essas abundantes interações hidrofóbicas existentes entres os complexos são características de substâncias com predominante caráter lipofílico, e são importantes em interação com biomoléculas, que na presença desses tipos de compostos sofrem alteração em suas estruturas terciárias através de contatos do tipo H...H com regiões hidrofóbicas das biomolécula, levando a alteração estrutural e perda de função em proteínas ou DNA através destes tipos de interação ou até mesmo aumentando a captação celular dos compostos em questão.<sup>130,166–168</sup>

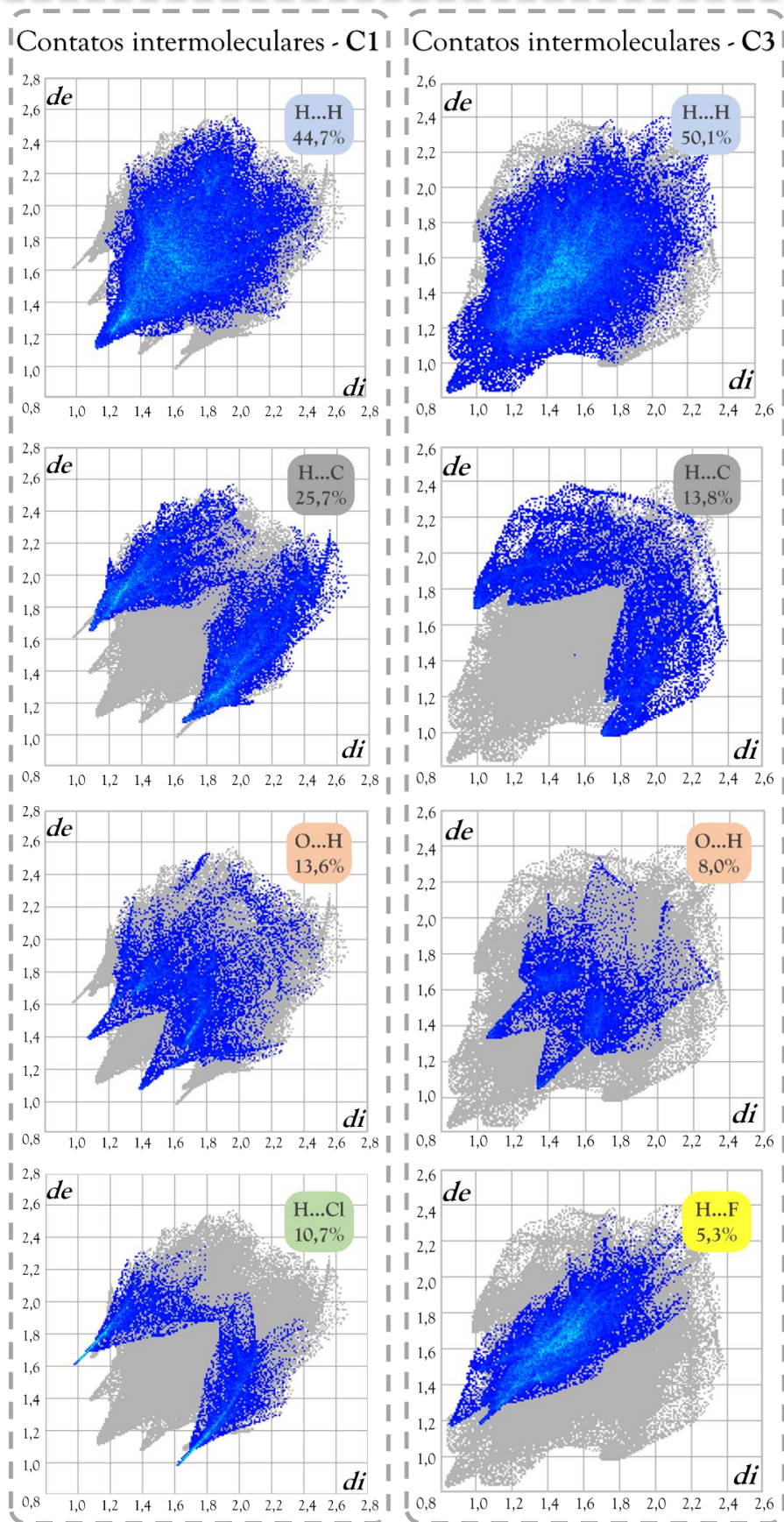


FIGURA 6.3 – Gráficos *Fingerprint* obtidos através do programa *Crystalexplorer*,<sup>133</sup> cada gráfico exibe os contatos específicos pertencentes aos complexos C1 e C3.

Os dados de análise elementar obtidos para os complexos **C1-C3** desta Série confirmaram a composição química inicialmente planejada, sendo os valores experimentais obtidos condizentes com os valores teóricos esperados, conforme exibido na Tabela 6.1. As medidas de condutividade molar dos complexos foram realizadas em soluções de concentração 1,0 mM em diclorometano, sendo os valores encontrados para os complexos **C2** e **C3** condizente com a faixa de eletrólito 1:1 (12 - 77 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup> em diclorometano), comprovando a presença do par iônico dos complexos. Como **C1** é neutro, não foi observado condutividade na solução preparada, conforme esperado.

TABELA 6.2 – Dados de análise elementar e condutividade molar obtidos para os complexos da Série C (Valores teóricos entre parêntesis).

	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>Condutividade (S.cm<sup>2</sup>.mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>C1</b>	56,80 (56,53)	4,78 (4,15)	1,4
<b>C2</b>	56,06 (57,21)	4,30 (4,12)	43,0
<b>C3</b>	49,01 (48,85)	4,74 (4,92)	67,1

Nos espectros de absorção na região do infravermelho observamos as bandas referentes aos modos vibracionais pertencentes às funções orgânicas presentes nos complexos desta série, e por serem bastantes similares aos complexos das séries anteriores, demonstram as mesmas tendências. Na Figura 6.4 vemos os espectros obtidos para os complexos **C1-C3** e do ligante alizarina, onde a sobreposição dos mesmos nos permite visualizar as tendências exibidas pelas bandas.

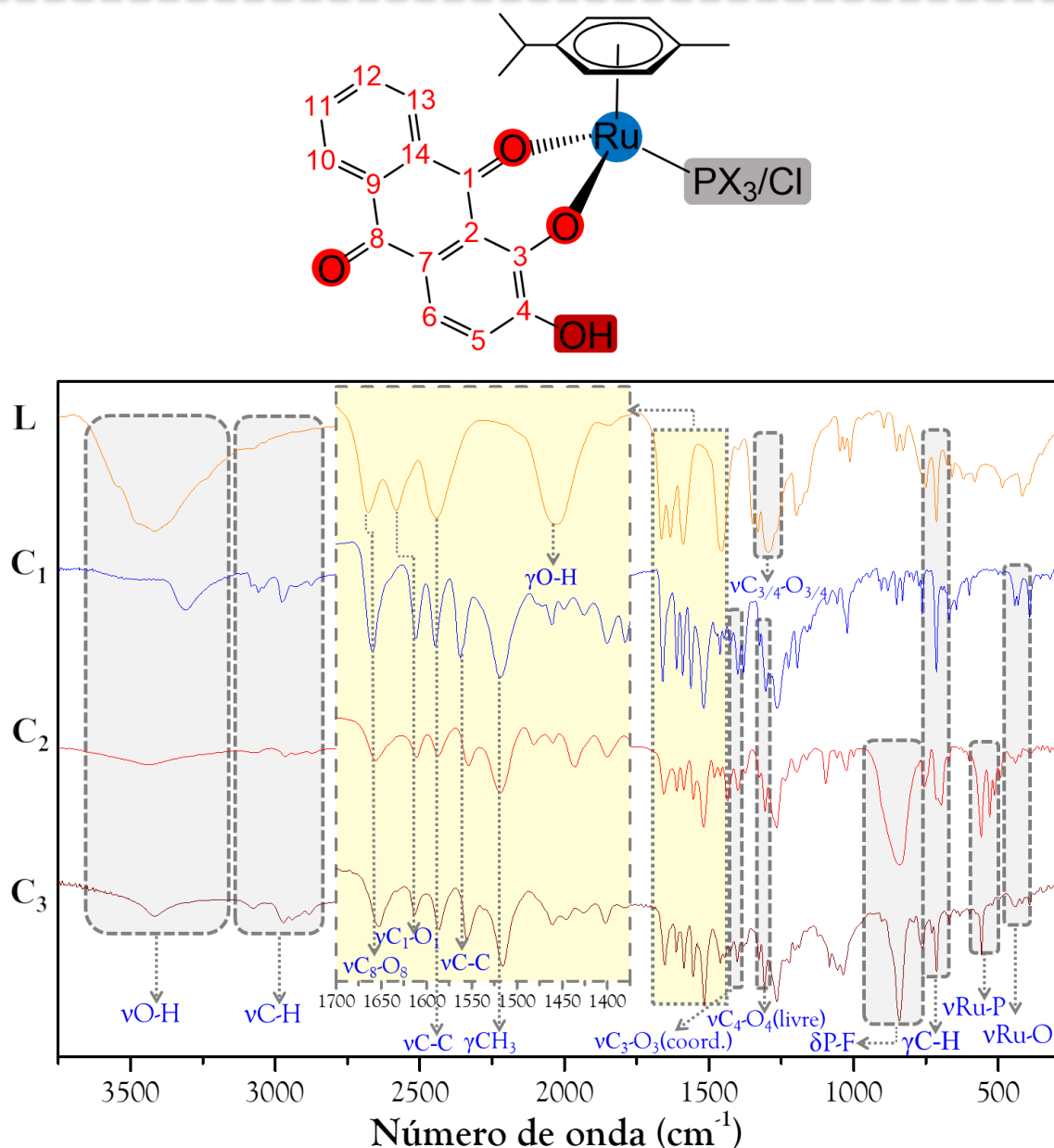


FIGURA 6.4 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos C1-C3. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr como suporte.

Observamos a diminuição considerável da intensidade do estiramento  $\nu\text{OH}$  em  $\approx 3350\text{ cm}^{-1}$  quando comparamos os espectros dos complexos com alizarina livre, isto devido à desprotonação que ocorre, seguida da coordenação, não desaparecendo completamente por permanecer uma hidroxila protonada no complexo. Outra importante alteração que ocorre com a coordenação é a alteração das bandas referentes aos pontos de coordenação  $\nu\text{C}_1\text{-O}_1$  e  $\nu\text{C}_3\text{-O}_3$ , enquanto as bandas referentes aos similares não coordenados pouco deslocam, conforme vemos nos espectros da Figura 6.4.<sup>169</sup> Por exemplo, vemos o

deslocamento maior sofrido por  $\nu\text{C}_1\text{-O}_1$  do que  $\nu\text{C}_8\text{-O}_8$ . Enquanto a banda referente à carbonila coordenada desloca  $\approx 25\text{ cm}^{-1}$ , o referente à carbonila não coordenada desloca-se menos do que  $\approx 5\text{ cm}^{-1}$ , isto devido a diminuição do caráter de dupla ligação da carbonila coordenada que se desloca para menores frequências, portanto menor energia. De modo similar observamos o aumento da frequência referente a ligação  $\text{C}_3\text{-O}_3$ , que como vimos nos dados obtidos através das estruturas cristalinas, diminui a distância interatômica com a coordenação e conseqüentemente sofre deslocamento no espectro de  $\approx 100\text{ cm}^{-1}$  para maiores frequências, como conseqüência do fortalecimento da ligação.<sup>170</sup> Além disso observamos a presença de outras bandas específicas dos estiramentos referentes às ligações formadas entre o metal e os ligantes, como os estiramentos fracos em  $557\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{Ru-P}$ ) para **C2** e **C3**,  $435\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{Ru-O}$ ) em todos os complexos, e a banda forte referente ao contração presente em **C2** e **C3** em  $840\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{P-F}$ ).

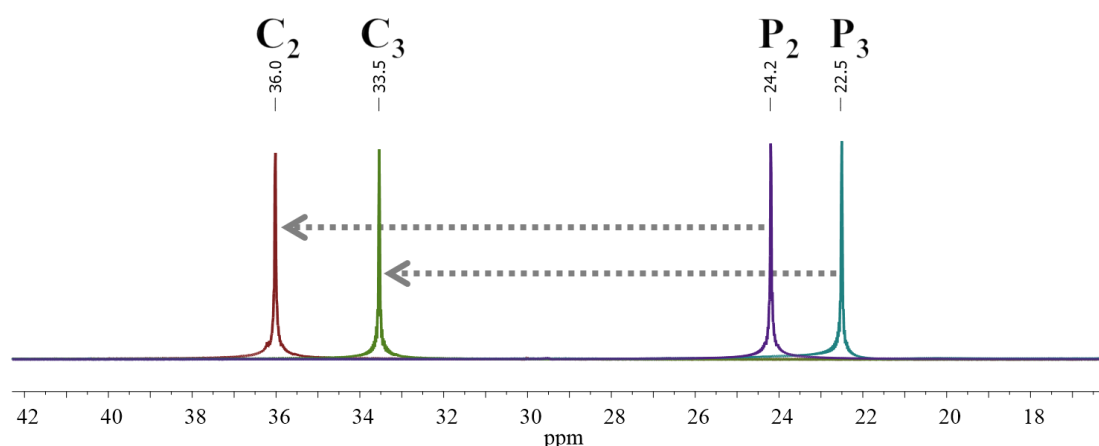


FIGURA 6.5 – Espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN dos complexos **P2**, **P3**, **C2** e **C3** em clorofórmio. Foi empregado como solvente deuterado o  $\text{D}_2\text{O}$  em um capilar de vidro.

Nos experimentos de ressonância magnética nuclear 1D e 2D encontramos evidências que confirmam as informações estruturais obtidas a partir das técnicas de caracterização descritas anteriormente. Além disso, através dos espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN obtidos a partir do meio reacional, foi feito o acompanhamento das reações de síntese dos precursores e complexos finais, onde a troca dos átomos de cloro (forçada pela formação de  $\text{AgCl}$ ) pelos ligantes

antraquinônicos, leva a desblindagem dos sinais referentes aos fósforos das monofosfinas, principalmente devido a maior eletronegatividade do oxigênio em relação aos ligantes clorido, o que também está correlacionado a maior capacidade  $\pi$  acceptora do oxigênio em relação ao cloro.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  também foi possível identificar os sinais referentes aos hidrogênios presentes nos complexos propostos nesta Série, que de forma similar às outras séries também se agrupam em três grupos distintos de sinais. Tomando como exemplo geral o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para o complexo **C1** (Figura 6.6), o primeiro grupo consiste nos sinais blindados, pertencente aos hidrogênios alifáticos ligados aos carbonos *a*, *b* e *g* do ligante *p*-cimeno ( $\delta$  1,14 - 2,80 ppm), o segundo corresponde aos hidrogênios ligados ao anel aromático do ligante *p*-cimeno e é representado pelas letras *d* e *e* ( $\delta$  5,34 - 6,20 ppm), enquanto o terceiro grupo de sinais pertence aos hidrogênios ligados aos carbonos 6-5 e 10-13, condizendo com os hidrogênios aromáticos da alizarina ( $\delta$  6,71 - 8,33 ppm). Cada grupo descrito acima pode ser melhor visualizado com o auxílio do mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY apresentado na Figura 6.7, onde são exibidos os acoplamentos dos hidrogênios vicinais presentes nos complexos.

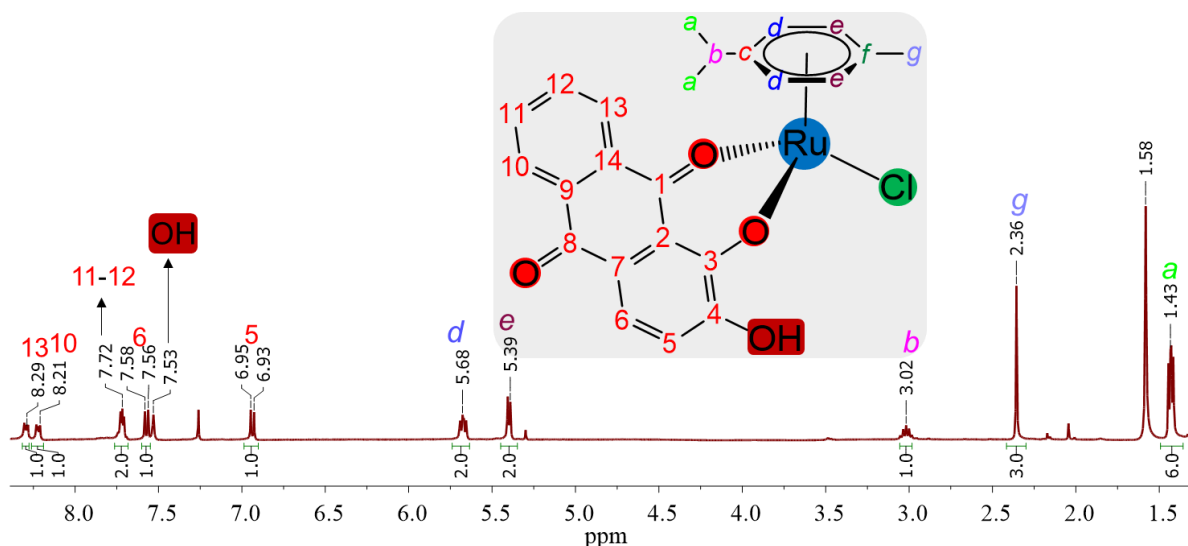


FIGURA 6.6 – Espectro de RMN de carbono  $^1\text{H}$  do complexo **C1** em  $\text{CDCl}_3$ .

Outro sinal observado no espectro de  $^1\text{H}$  RMN é o singlete em  $\delta$  7,53 ppm, que no mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY não apresenta nenhum acoplamento



vicinal, sendo assim atribuído ao hidrogênio do grupo hidroxila não coordenado, que no ligante livre apresenta deslocamento em  $\delta$  12,74 ppm, sofrendo efeito de blindagem com a coordenação ao centro metálico.

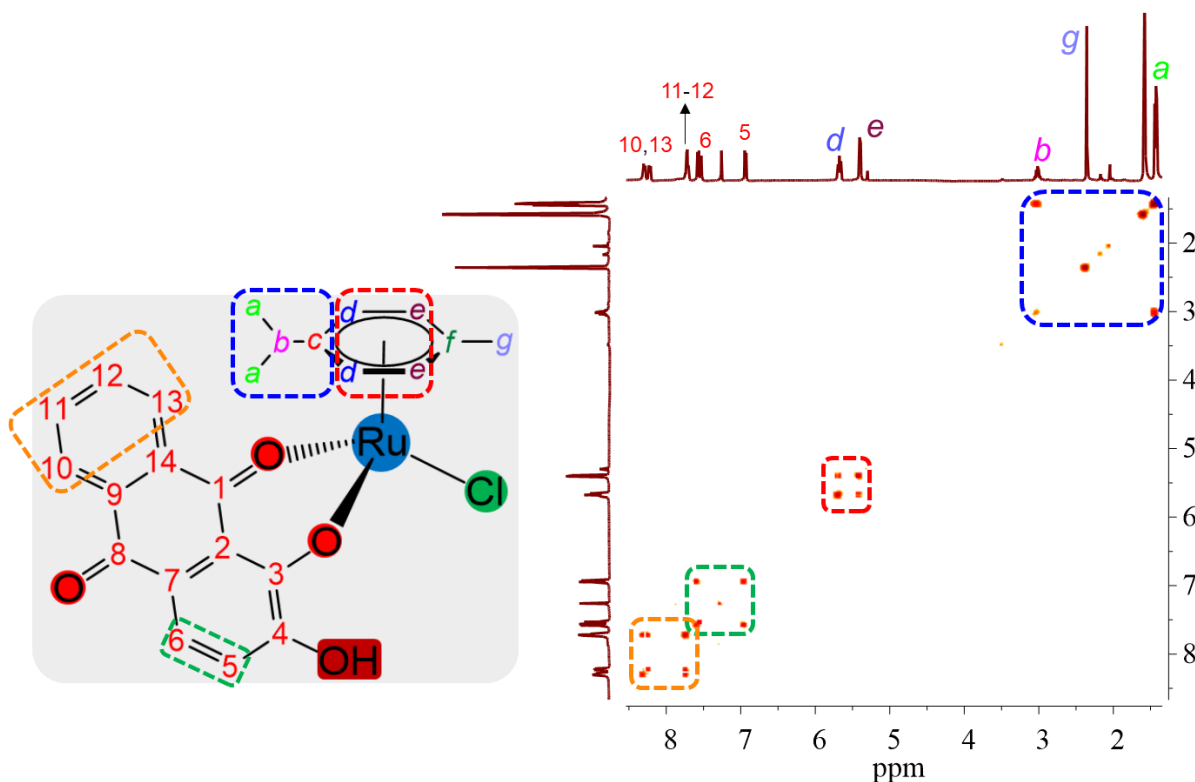


FIGURA 6.7 – Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY obtido para o complexo **A3** em *d*-CDCl<sub>3</sub>. Vemos destacados em cores diferentes os diferentes grupos de acoplamentos vicinais exibidos pelo complexo.

Nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} também foi possível identificar todos os sinais referentes aos carbonos pertencente aos complexos, e isto com o auxílio das técnicas bidimensionais <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC e HSQC, onde os acoplamentos exibidos foram úteis para a confirmação da atribuição apresentada na Figura 6.8, que exibe o espectro de RMN de <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} obtido para o complexo **C1** e clorofórmio deuterado. Os sinais exibem as mesmas tendências das Séries A e B, onde observamos os sinais também se dividindo nos grupos de sinais alifáticos e aromáticos, como os descritos para o espectro de RMN de <sup>1</sup>H. Uma característica interessante que ocorre em todas as Séries é a blindagem dos sinais pertencentes aos carbonos e hidrogênios do anel do *p*-cimeno, onde os sinais que deveriam cair na região dos aromáticos apresentam deslocamento próximo a

região dos alifáticos, assim como observamos para os carbonos *d* e *e* do complexo **C1** ( $\delta$  79,35 - 83,55 ppm), enquanto no *p*-cimeno livre estes mesmos carbonos exibem deslocamento em  $\delta \approx 125$  ppm. Esta observação está correlacionada ao efeito de retrodoação que ocorre entre o metal e o ligante *p*-cimeno, que aumenta a densidade eletrônica no anel proporcionando o efeito de blindagem desses carbonos e hidrogênios, apresentando assim um menor deslocamento em relação ao ligante livre.

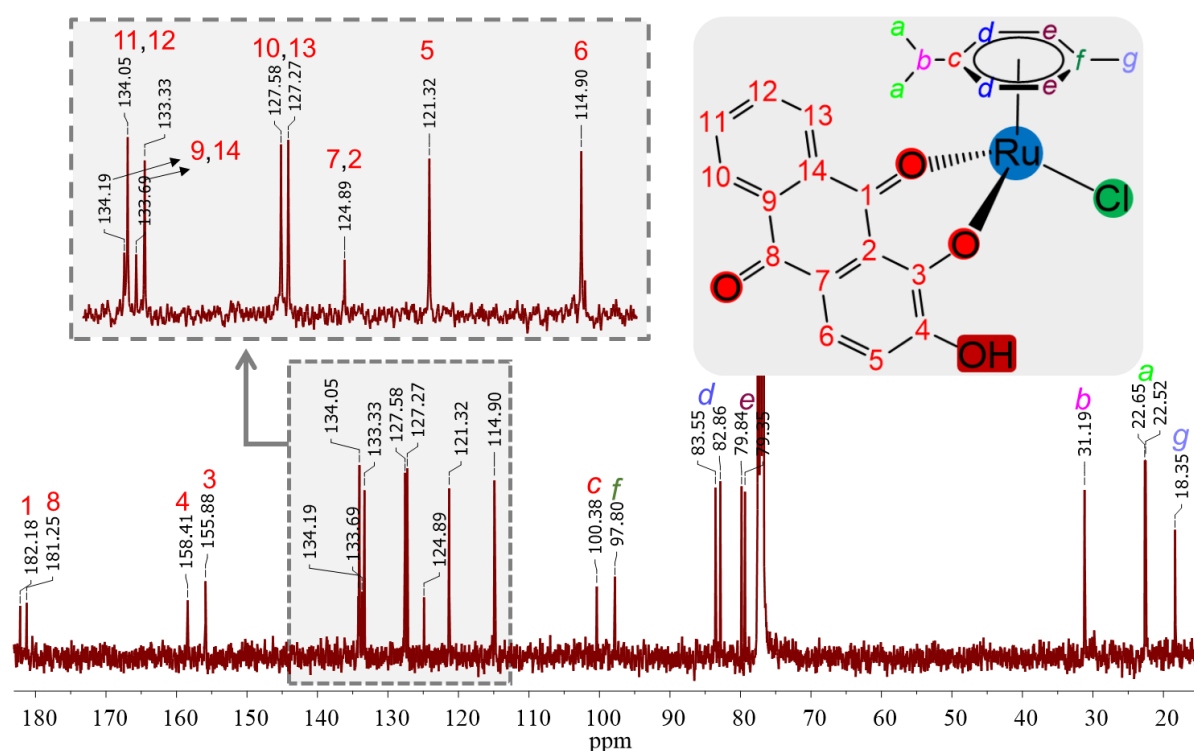


FIGURA 6.8 – Espectro de RMN de carbono  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **C1** em  $\text{CDCl}_3$ .

TABELA 4.6 – Deslocamento químico ( $\delta$ ) exibido pelos carbonos 1, 2 e 4 nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  em  $\text{CDCl}_3$ .

	Alizarina	C1	C2	C3
<b>C1</b>	181,5	182,2	182,5	184,5
<b>C3</b>	151,0	155,9	157,2	158,5
<b>C4</b>	149,3	158,4	157,2	156,6
<b>C8</b>	189,5	181,2	180,5	180,5

Na Tabela 4.8 os deslocamentos químicos dos carbonos ligados à oxigênio são apresentados, e observamos que todos os sinais sofrem deslocamento com a coordenação, mas de modo contrário as Séries anteriores o sinal que mais se desloca com a coordenação é o C8 que não se coordena, provavelmente devido à perturbação eletrônica decorrente da coordenação da alizarina ao centro metálico. A atribuição desses sinais é possível com a ajuda do experimento de HMBC, onde observamos os acoplamentos que nos permitem distinguir os sinais, como no caso dos carbonos C1 e C8, onde C1 acopla somente com o hidrogênio ligado a C13, enquanto C8 acopla com os hidrogênios ligados a C6 e C10, conforme exibido na Figura 6.9, permitindo atribuir esses sinais.

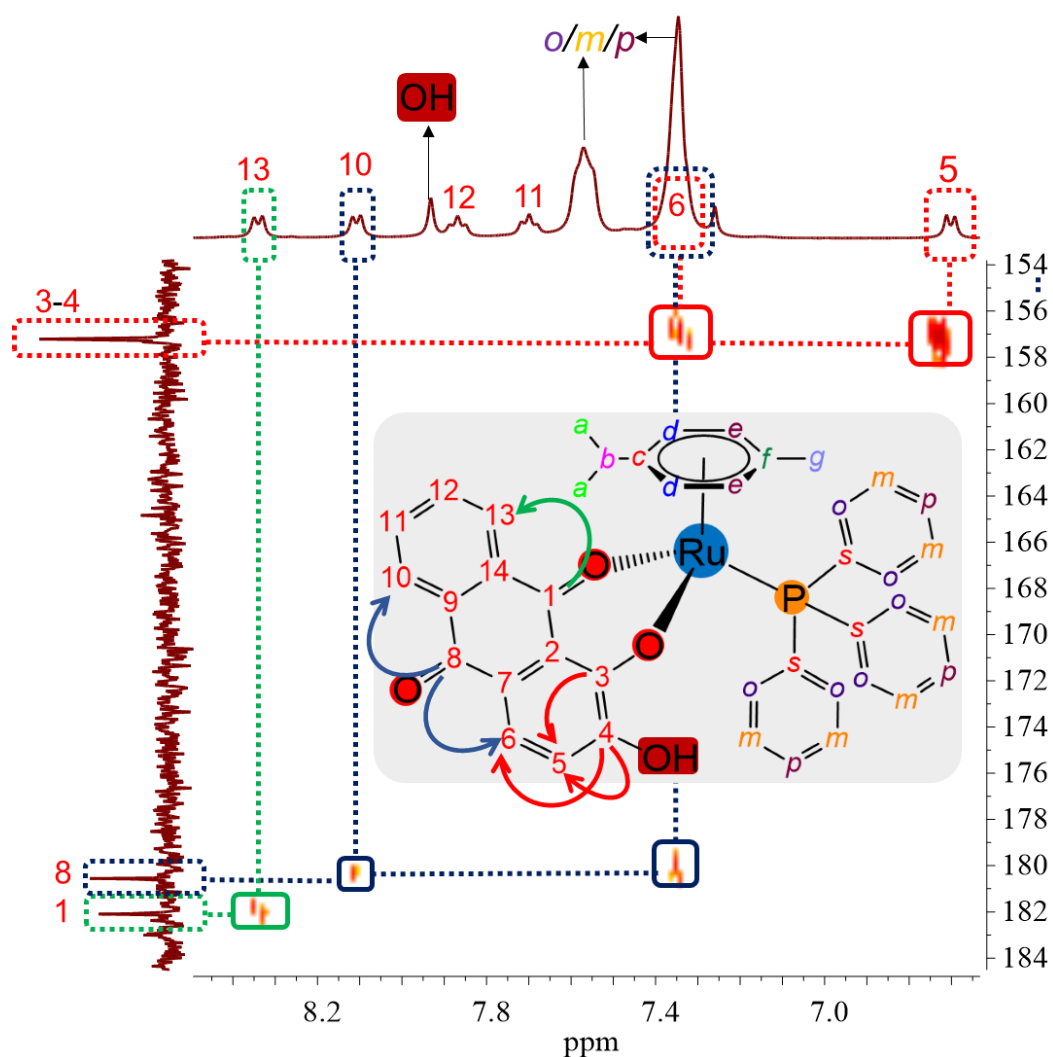


FIGURA 6.9 – Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo C2 em  $\text{CDCl}_3$ . Evidenciados estão os sinais referentes aos átomos envolvidos nas ligações C–O.

A técnica de RMN também possibilita a obtenção de informações importantes quanto à estabilidade de compostos de coordenação, o que é facilitado neste trabalho devido à presença das monofosfinas, através do registro de espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  em DMSO e na mistura DMSO/RPMI (meio de cultura empregado no cultivo de células). A presença de vários sais e moléculas orgânicas (aminoácidos açúcares, e outros) nos permite saber se os complexos são disponibilizados as células em sua forma original, sem a labilização de ligantes.

O complexo **C1** foi testado quanto à sua estabilidade em uma mistura de  $\text{CDCl}_3$  e *d*-DMSO (5:1) empregando a técnica de RMN de  $^1\text{H}$ , e conforme apresentado na Figura 6.10, não observamos a labilização do ligante *p*-cimeno como na Série B, mostrando que a estabilidade da ligação metal/areno nesta Série é consideravelmente maior que na Série B, isto quando dissolvido em DMSO. Entretanto, mesmo não observando o sinal referente ao *p*-cimeno não coordenado, observamos o surgimento de ao menos três espécies em solução, o que pode ser constatado no sinal referente ao grupo propil do *p*-cimeno (Figura 6.10), que na mistura  $\text{CDCl}_3/d$ -DMSO apresenta três grupos independentes de sinais. Estas espécies formadas podem ser resultantes da labilização do ligante clorido, que na presença de outras moléculas coordenantes (como no caso deste experimento o DMSO ou água) pode ser substituído pelas mesmas. Este efeito é amplamente discutido na literatura, uma vez que este fato possibilita a coordenação a biomoléculas, como o DNA ou proteínas ao centro metálico, sendo já descrito para outros complexos similares.<sup>42,45,171–174</sup>

Os complexos **C2** e **C3** também foram avaliados quanto a suas estabilidades no meio de cultura e DMSO, sendo ambos estáveis em DMSO puro (48 horas de experimento). Na mistura DMSO/RPMI (2:1) já no início do experimento observamos a formação de duas espécies adicionais em  $\delta$  24 e 28 ppm, que se mantiveram como espécies minoritárias até 48 horas, permanecendo os complexos originais em quantidade majoritária, conforme exibido na Figura 6.11.

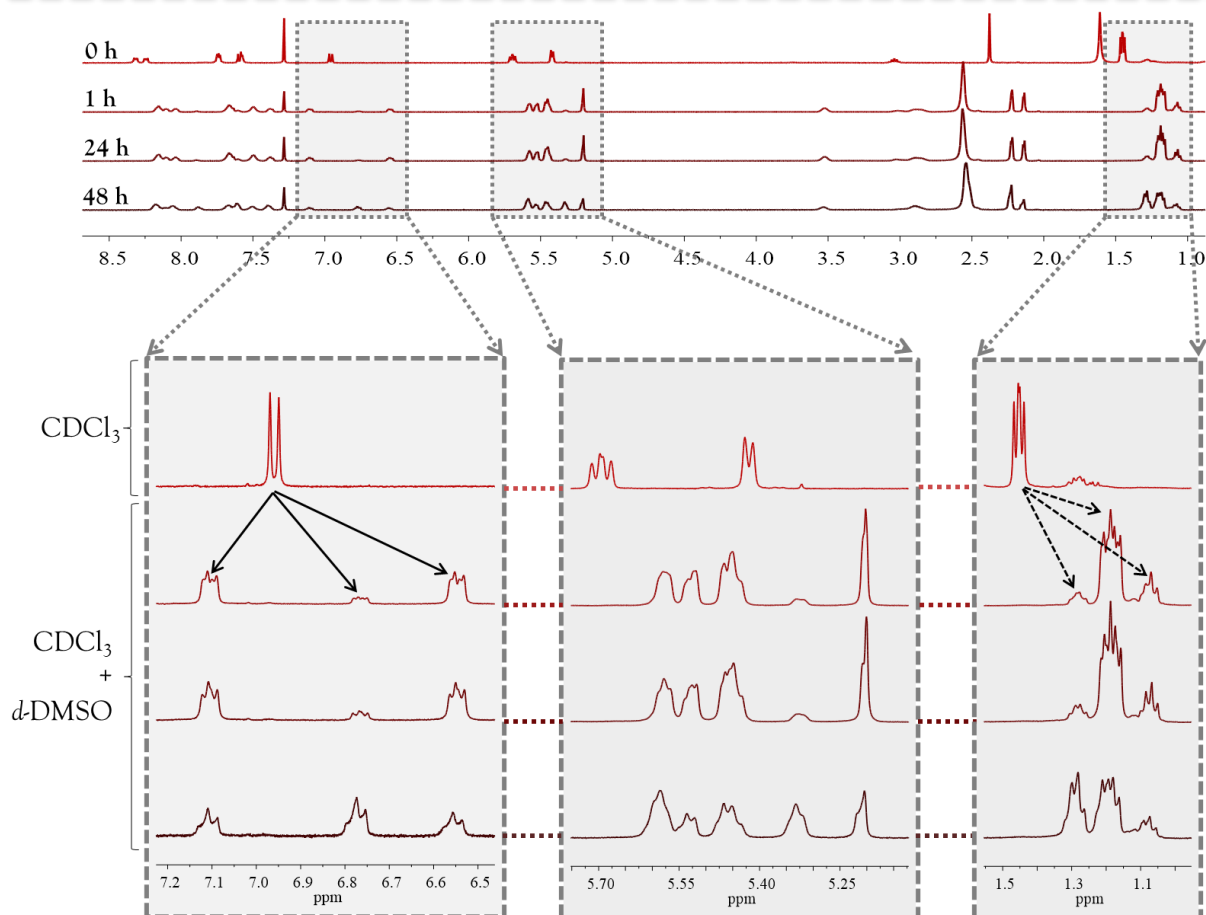


FIGURA 6.10 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos no estudo de estabilidade em  $\text{CDCl}_3$  e  $d\text{-DMSO}$  (5:1) do complexo **C1** em 0, 1, 24, e 48 horas.

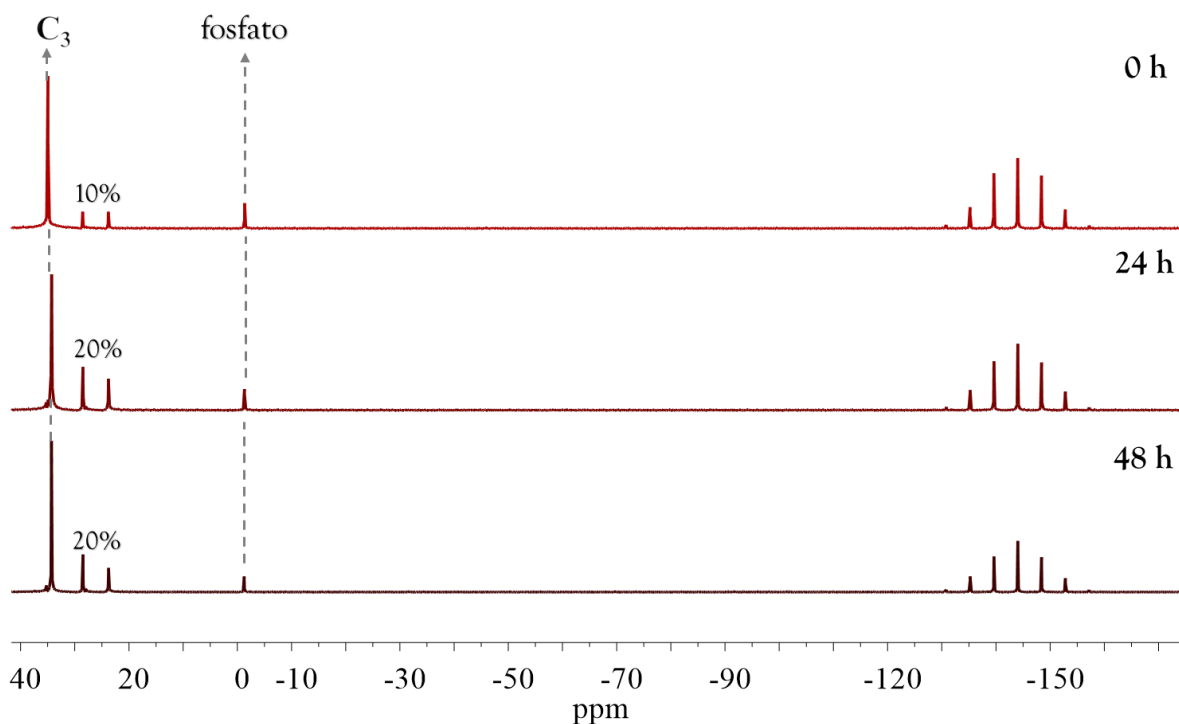


FIGURA 6.11 – Espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  RMN obtidos no estudo de estabilidade em  $\text{DMSO/RPMI}$  (2:1) do complexo **C3** em 0, 24, e 48 horas.

Um dos componentes em maior quantidade no meio de cultura de células são os sais de cloreto ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ), carbonato ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e fosfato ( $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), e como vimos na caracterização dos precursores, o complexo **P2** exibe sinal no experimento de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  em  $\delta$  24 ppm, podendo corresponder à espécie encontrada com mesmo deslocamento no experimento de estabilidade, uma vez que a alta concentração de cloretos pode levar à labilização da alizarina. Como vimos na síntese dos complexos **C2** e **C3**, para a retirada completa dos cloridos do precursor empregamos um sal de prata ( $\text{AgBF}_4$ ), pois sem o mesmo a troca dos cloridos pela alizarina não é completa, evidenciando a afinidade do metal pelos ligantes clorido, o que deve-se a presença de dois ligantes  $\pi$  aceptores fortes (monofosfinas e *p*-cimeno), o que aumenta a afinidade do metal por elétrons e consequentemente por ligantes  $\sigma$  doadores fortes.

Dentre as propriedades exibidas pela alizarina, uma das mais exploradas é a fluorescência, uma vez que ao se coordenar ao rutênio podemos integrar essa característica ao complexo final, assim exploramos as características emissivas dos complexos **C1-C3** em dimetilsulfóxido (DMSO), afim de descobrir se a capacidade fluorescente da alizarina foi mantida. Informações prévias da literatura mostram que a fluorescência da alizarina é proveniente de emissão em aproximadamente em 650 nm resultantes da absorção em 420 nm, isto em DMSO, sendo a absorção em 420 nm uma absorção do tipo intramolecular  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>175-177</sup> Na figura 6.12 são apresentados os espectros de emissão e absorção em DMSO para o ligante livre em uma solução de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

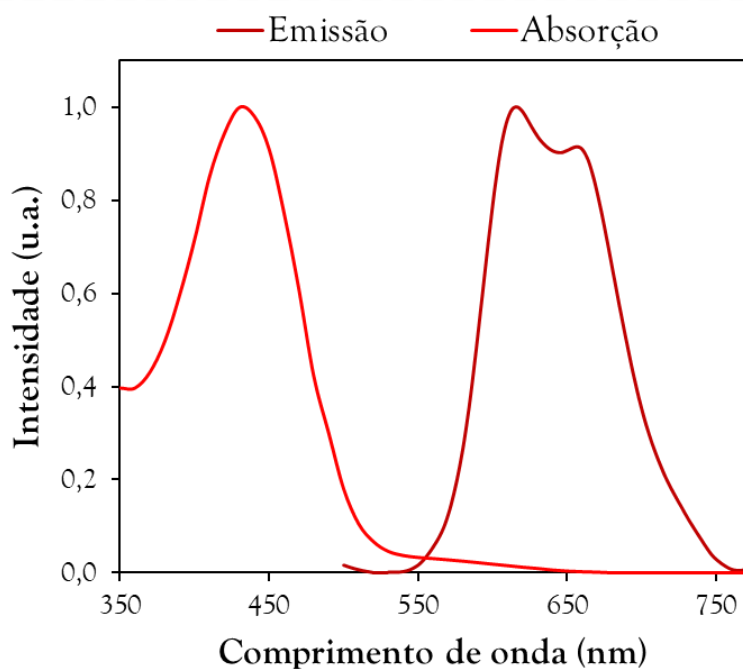


FIGURA 6.12 – Espectros normalizados de absorção e emissão ( $\lambda_{\text{ex}}$  420 nm) obtidos para a alizarina ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em DMSO.

Nos espectros obtidos para os complexos apenas o complexo **C1** apresentou fluorescência quando excitado em  $\lambda_{\text{ex}}$  414 nm (máxima intensidade encontrada para a banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  nos complexos **C1-C3**), resultando em uma banda alargada de emissão, similar ao observado para a alizarina, na região de 550 - 750 nm (Figura 6.13). Os complexos **C2** e **C3** não apresentaram bandas de emissão quando irradiados em  $\lambda_{\text{ex}}$  420 nm ou em outros comprimentos de onda maiores ou menores, mostrando que embora a alizarina esteja presente na estrutura, conforme apresentado nas estruturas de raios X, a banda de emissão exibida pela alizarina sofreu supressão ao se coordenar com os precursores **P2** e **P3**, que são os que contém monofosfinas em suas estruturas. Alguns trabalhos da literatura e experiências do nosso próprio laboratório vem demonstrando que fosfinas podem promover a supressão de processos de emissão quando associadas a moléculas fluorescentes, onde a partir do estado excitado da molécula as fosfinas promovem o decaimento eletrônico em modos não perceptíveis na região do UV-Vis.<sup>178,179</sup>

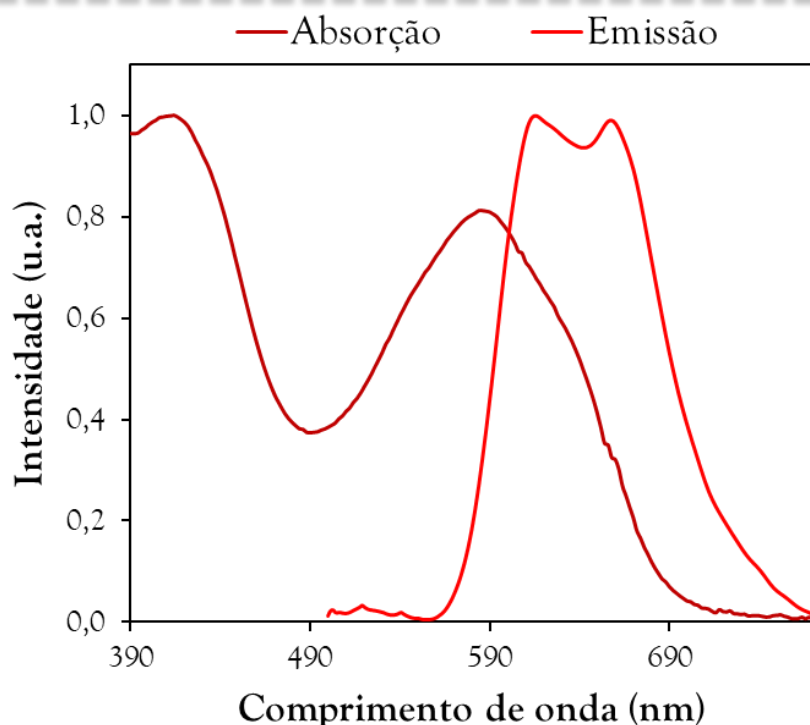


FIGURA 6.13 – Espectros normalizados de absorção e emissão ( $\lambda_{\text{ex}}$  420 nm) obtidos para o complexo **C1** ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em DMSO.

Outra possibilidade para supressão da fluorescência observada em **C2** e **C3** é a formação de agregados moleculares, onde em soluções concentradas algumas moléculas que exibem interações intermoleculares em grande número e/ou fortes, passam a se agrupar em pequenos agregados suspensos em solução sem causar precipitação do complexo, sendo que a formação desses agregados ocasionam a supressão de processos fotoluminescentes levando a diminuição do rendimento quântico.<sup>180–183</sup> Como vimos na descrição das interações intermoleculares do complexo **C1** e **C3**, o complexo contendo trietilfosfina (**C3**) apresenta maior número de interações do tipo H...H, e também mais intensas que as observadas em **C1**, o que pode ser constatado nos gráficos *fingerprint*, onde se observa contatos com distância de até  $0,8 \text{ \AA}$  ( $di/de$ ), enquanto em **C1** estas mesmas interações apresentavam distâncias de até  $1,1 \text{ \AA}$  ( $di/de$ ), portanto menos intensas. Assim, o fato de as interações envolvendo **C3** serem mais intensas podem contribuir com a formação de agregados em solução e conseqüentemente causar a supressão da fluorescência observada para os complexos contendo monofosfinas.



Empregando a porfirina 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina (TPyP) como padrão, foram realizados os cálculos de rendimento quântico dos processos de emissão registrados para os complexos desta Série, em DMSO e em soluções de mesma concentração ( $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) dos complexos e padrão. Na Tabela 6.3 observamos os dados obtidos para o rendimento quântico dos complexos, onde o observado corrobora com a constatação visual feita nos gráficos de emissão.

TABELA 6.3 – Rendimento quântico observado para os complexos **C1-C3** e ligante alizarina em soluções de concentração  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em DMSO. Como padrão de fluorescência foi empregado a porfina TPyP (100%).

	DMSO (%)
<b>C1</b>	12,0
<b>C2</b>	0,5
<b>C3</b>	0,9
<b>Alizarina</b>	16,2

Vemos que o complexo **C1** exibe rendimento quântico 24 vezes maior que **C2** e 13 vezes maior que **C3**, confirmando assim o efeito de supressão da fluorescência pela fosfina, além disso **C1** apresenta rendimento quântico apenas 4% menor do que a alizarina (em relação ao padrão TPyP), comprovando assim a manutenção da capacidade fluorescente da antraquinona neste complexo, sendo suficiente para a realização de ensaios biológicos que explorem esta propriedade.

## 6.2 - Estudos biológicos dos complexos da Série C.

O perfil citotóxico dos complexos foi avaliado em linhagens celulares humanas tumorais e não tumorais de mama e pulmão, sendo as linhagens tumorais as células MDA-MB-231 (mama), MCF-7 (mama), MRC-5 (pulmão) e não tumorais MCF-10A (mama) e MRC-5 (pulmão). Nos testes foram realizados empregando protocolos de tratamento das células empregando DMSO como solvente, porém sem ultrapassar o limite de 0,5% do volume final, sendo o período de exposição das células aos complexos igual a 48 horas. Na Tabela 6.4 temos os

valores de IC<sub>50</sub> (concentração do complexo capaz de inibir 50% da proliferação celular) encontrados para os complexos, alizarina e precursores frente as diferentes linhagens de células analisadas.

TABELA 6.4 – Valores de IC<sub>50</sub> (µM) e índice de seletividade\* obtidos para os complexos **C1-C3**, alizarina (L), precursores e cisplatina (Cisp.), frente as linhagens de células tumorais e não-tumorais, no período de 48 h. Os valores de índice de seletividade\* são obtidos a partir da divisão dos valores de IC<sub>50</sub> das células tumorais pelas células não tumorais.

	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A	A549	MRC-5	IS <sub>1</sub>	IS <sub>2</sub>	IS <sub>3</sub>
<b>C1</b>	42,2 ± 3,6	32,8 ± 1,2	57,0 ± 0,6	> 100	53,9 ± 0,5	1,3	1,7	-
<b>C2</b>	6,5 ± 0,1	9,0 ± 0,1	10,0 ± 0,3	17,8 ± 0,8	7,7 ± 0,1	1,5	1,1	0,4
<b>C3</b>	45,4 ± 1,4	> 100	41,6 ± 0,1	52,6 ± 1,2	25,0 ± 0,1	0,9	-	0,5
<b>L</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>P1</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>P2</b>	46,8 ± 0,6	> 100	18,2 ± 0,6	41,2 ± 0,3	23,9 ± 0,1	0,4	-	0,6
<b>P3</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-	-
<b>Cisp.</b>	8,9 ± 2,6	2,4 ± 0,20	14,0 ± 2,0	14,4 ± 1,4	29,1 ± 0,8	2,7	9,8	2,0

IS<sub>1</sub> = IC<sub>50</sub>(MCF-10A) / IC<sub>50</sub>(MDA-MB-231); IS<sub>2</sub> = IC<sub>50</sub>(MCF-10A) / IC<sub>50</sub>(MCF-7); IS<sub>3</sub> = IC<sub>50</sub>(MRC-5) / IC<sub>50</sub>(A549)

O precursor **P1**, **P3** e a alizarina (L) não apresentaram citotoxicidade frente às células na maior concentração testada (100 µM), enquanto o precursor **P3** apresentou considerável citotoxicidade, inclusive com valores próximos ao exibido pela cisplatina nas células não tumorais. O complexo **C2** exibiu maior inibição da citotoxicidade frente as células, apresentando em todos os casos valores de IC<sub>50</sub> no mínimo três vezes menores do que **C1** e **C3** e pouco menores que a cisplatina nas células MDA-MB-231 e MCF-10A. Ao comparar complexos e precursores observamos que em todos os casos, os compostos contendo trifenilfosfina foram os mais ativos (**C2** e **P2**), exibindo valores consideravelmente menores que os demais em todas as linhagens celulares testadas. Este fato pode estar correlacionado a maior lipofilicidade exibida pela trifenilfosfina, que em sua forma livre apresenta valor de coeficiente de partição

n-octanol/água (logP) igual a 5,69, enquanto na trietilfosfina livre este valor é igual a 2,41, que é menor que a metade do valor exibido pela  $PPh_3$ , assim a  $PPh_3$  provavelmente confere maior lipofilicidade ao complexo do que o correspondente contendo a  $PEt_3$ , que por sua vez deve ser mais lipofílico do que o complexo **C1** que não possui monofosfina.

É sabido que a os compostos lipofílicos possuem maior afinidade com as proteínas que compõem a membrana de células eucarióticas, onde através de interações com essas proteínas essas moléculas tornam-se mais propensas a sofrer transporte ativo do meio extracelular para o intracelular, sendo assim capazes de desencadear mecanismos de morte celular inerentes a moléculas pertencentes ao interior das células e apresentando assim maior citotoxicidade.<sup>137,184</sup> Assim, o menor valor de  $IC_{50}$  exibido por **C2** pode estar correlacionado com essa característica, exibindo assim maior capacidade de inibição da habilidade proliferativa das células.

Na Tabela 6.4 são apresentados também os valores de seletividade encontrados para os complexos, onde apenas nas linhagens de mama houve seletividade para as células tumorais, sendo o maior deles apresentado para **C1**, que foi 1,7 vezes mais seletivo para a linhagem MCF-7 do que para a respectiva não tumoral. Entretanto, a seletividade exibida pelos complexos foram bem abaixo do encontrado para a cisplatina, isso por exibirem forte efeito citotóxico nas linhagens não tumorais.

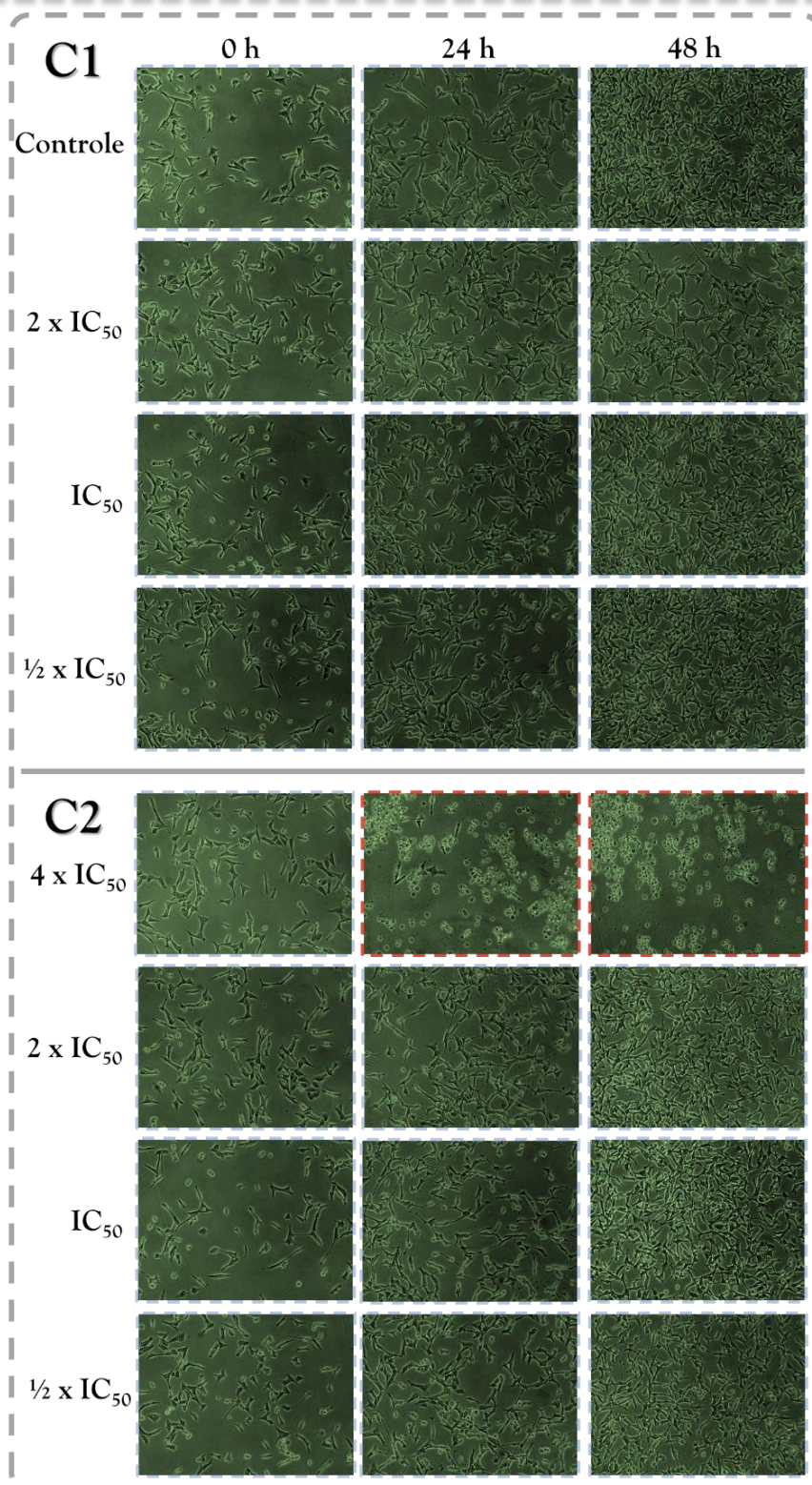


FIGURA 6.14 – Micrografias obtidas para as culturas da linhagem celular MDA-MB-231 em diferentes concentrações dos complexos **C1** e **C2**.

Afim de conhecer a influência dos complexos na morfologia das células MDA-MB-231, selecionamos os complexos **C1** e **C2** para serem avaliados, isto por serem os que apresentaram maior índice de seletividade dentre

os complexos desta Série. A linhagem escolhida foi tratada com concentrações proporcionais aos valores de  $IC_{50}$  ( $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $2 \times IC_{50}$  e  $4 \times IC_{50}$ ) e imagens dos poços contendo as células tratadas com os complexos em meio de cultura foram registradas nos tempos de 0, 24 e 48h, além disso foi realizado também um experimento similar como controle, onde as células não foram tratadas com complexos, sendo registrado somente o crescimento normal das mesmas.

Ao analisar as imagens obtidas (Figura 6.14) observamos que **C1** e **C2** não ocasionaram mudanças significativas nas concentrações iguais a  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$ , com exceção composto **C1** em 48 horas na concentração de  $2 \times IC_{50}$  onde observamos a perda da confluência celular, estando as células mais espaçadas do que no observado no experimento controle. A maior alteração é observada somente na concentração igual a  $4 \times IC_{50}$ , onde vemos que já em 24 horas de experimento as células apresentam alterações na morfologia e perda da adesão ao fundo da placa.

Afim de se avaliar o efeito citostático dos complexos sobre a linhagem MDA-MB-231 realizamos os ensaios de sobrevivência clonogênica, onde é possível determinar a aptidão de uma célula, após ser exposta aos complexos, de se proliferar formando uma colônia de células (50 células). Os dados obtidos permitem avaliar o dano ocasionado pelos complexos sobre a capacidade das células de se dividirem e conseqüentemente formar colônias, que são avaliadas quanto ao tamanho e o número.<sup>123,152</sup> Em uma placa de 6 poços foram semeadas 300 células, que foram tratadas com concentrações proporcionais aos valores de  $IC_{50}$  ( $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$ ), por 48 horas. Logo após esse período, o meio de cultura contendo os complexos foi descartado e um novo meio adicionado, as placas foram encubadas novamente por 10 dias para o crescimento das colônias resultantes. As colônias foram coradas com cristal violeta, contadas e medidas, resultando assim no resultado apresentado na Figura 6.15.

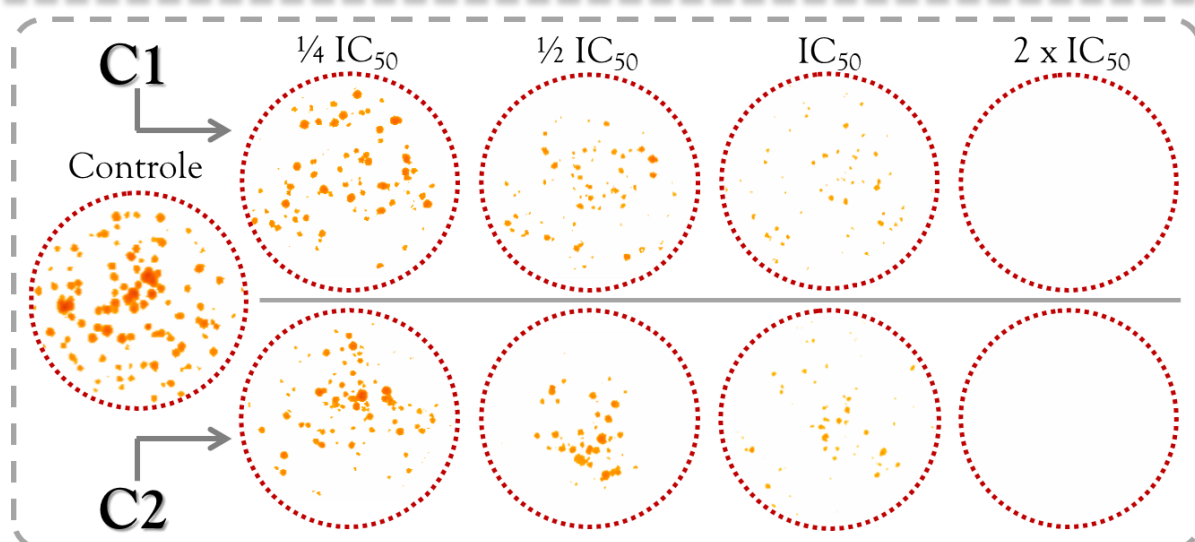


FIGURA 6.15 - Imagem dos poços onde foram cultivadas as células MDA-MB-231 em diferentes concentrações dos complexos **C1** e **C2**.

O resultado obtido confirmou a atividade antiproliferativa de ambos complexos, induzindo os mesmos a perda da clonogenicidade das células à medida que se aumenta a concentração dos complexos, onde na concentração de  $2 \times IC_{50}$  observamos a completa inibição da capacidade das células formarem colônias, não sendo observada no poço qualquer coloração que indique a presença de colônias. Este resultado é interessante, uma vez que mesmo mantendo a morfologia das células (como observado no ensaio morfológico), na concentração de  $2 \times IC_{50}$  as células aparentam sofrer danos irreversíveis, afetando diretamente a capacidade de formar colônias, indicando assim uma provável ação antimetastática de **C1** e **C2**.

O efeito dose-dependente pode ser observado no gráfico exposto na Figura 6.16, que exibe a área total das colônias formadas em função da área total do poço, onde o decréscimo da área com o aumento da concentração é considerável, sendo que a diferença da área entre uma concentração e outra exibe considerável significância. No  $IC_{50}$ , para ambos complexos observamos que poucas células ainda conseguem formar colônias, evidenciando a forte capacidade inibitória dos complexos.

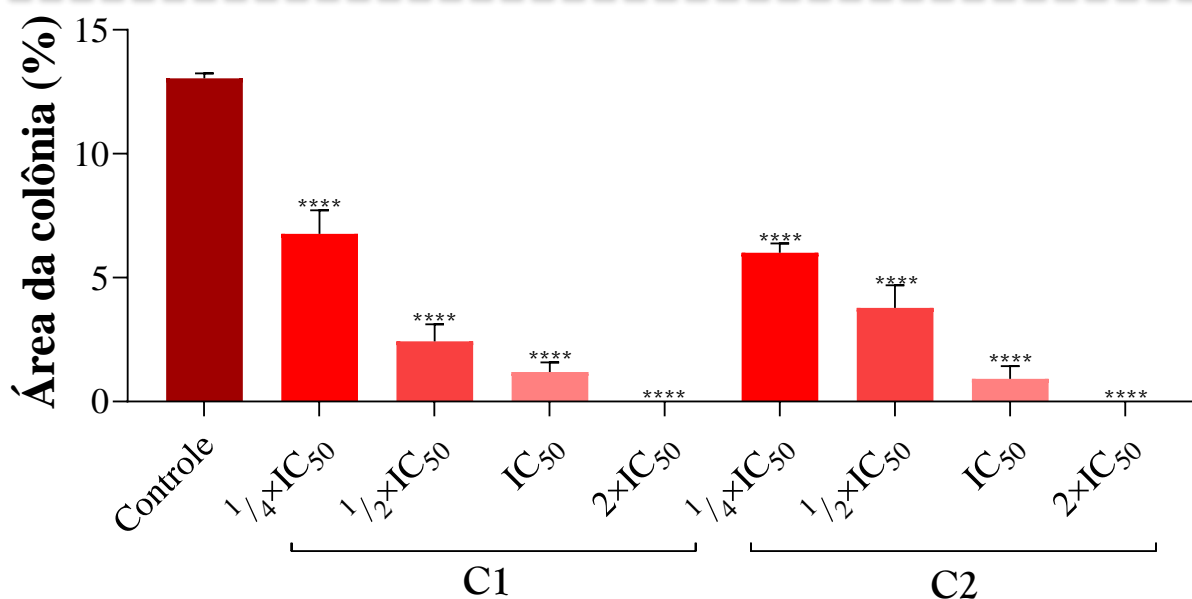


FIGURA 6.16 – Distribuição da área das colônias em cada concentração para o controle e os complexos **C1** e **C2** na linhagem MDA-MB-231. \*\*\*\*p <0,0001.

Outra informação importante que traz aporte à atividade antimetastática dos complexos é a capacidade dos mesmos de inibir a migração das células, para isto uma das ferramentas empregadas é o experimento de cicatrização de feridas (*Wound Healing*), onde cultivamos as células, em uma placa de 12 poços e após a confluência das células chegar a 80% é um risco sobre a superfície que contém as células, resultando em um espaço vazio entre o grupo de células, conforme podemos constatar na Figura 6.17 no experimento controle em 0 horas. A partir daí realizamos o tratamento das células com os complexos nas concentrações iguais a  $\frac{1}{4}IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}IC_{50}$ , e  $IC_{50}$ , acompanhando a capacidade das células de fecharem o risco feito após a administração do complexo. Para tal empregamos as células MDA-MB-231 e registramos micrografias das mesmas em 0, 24 e 48 horas de experimento.

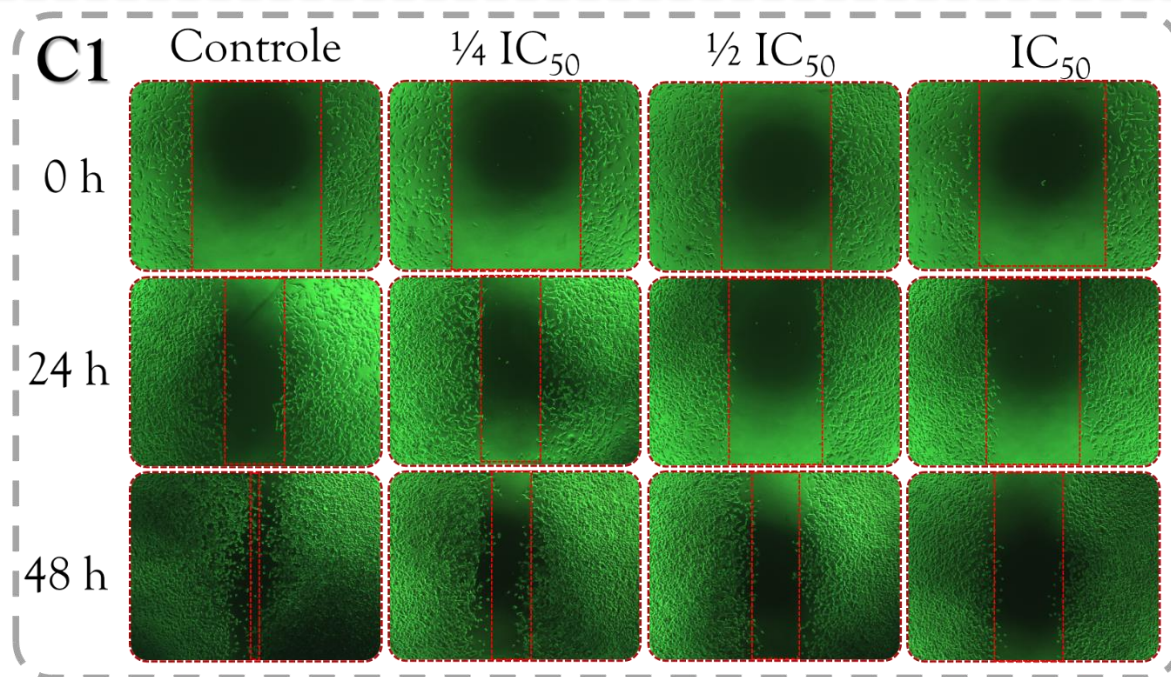


FIGURA 6.17 – Micrografias obtidas no experimento de (*Wound Healing*), onde avalia-se o efeito antimigratório do **C1** em células tumorais de mama MDA-MB-231. As micrografias foram obtidas com 4 vezes de aumento.

Com o tratamento das células com o complexo observou-se a capacidade dos mesmos em inibir o fechamento da risca nas concentrações empregadas, fato que fica mais claro quando comparamos com o experimento controle (1% de DMSO) evidenciando que em 48 horas de experimento as células praticamente fecharam o espaço vazio, enquanto nas concentrações iguais a  $\frac{1}{2}IC_{50}$ , e  $IC_{50}$  não observamos fechamento similar ao controle. Esta observação fica mais clara ao analisar os dados de porcentagem de fechamento apresentados no gráfico da Figura 6.18, onde vemos que enquanto no controle a área do risco diminui 50% (24 horas) no complexo **C1** esta diminuição é de 24% e com **C2** é menor ainda, fechando apenas 13%. Em 48 horas área do risco do controle encontra-se praticamente fechado, entretanto em todos os tratamentos observamos inibição na migração, exibindo **C2** na maior concentração inibição de 65% da migração. É importante ressaltar que o efeito de inibição de migração foi observado também nas concentrações menores que o  $IC_{50}$ , o que nos indica que o efeito observado se deve majoritariamente a inibição da migração celular e não ao efeito citotóxico.



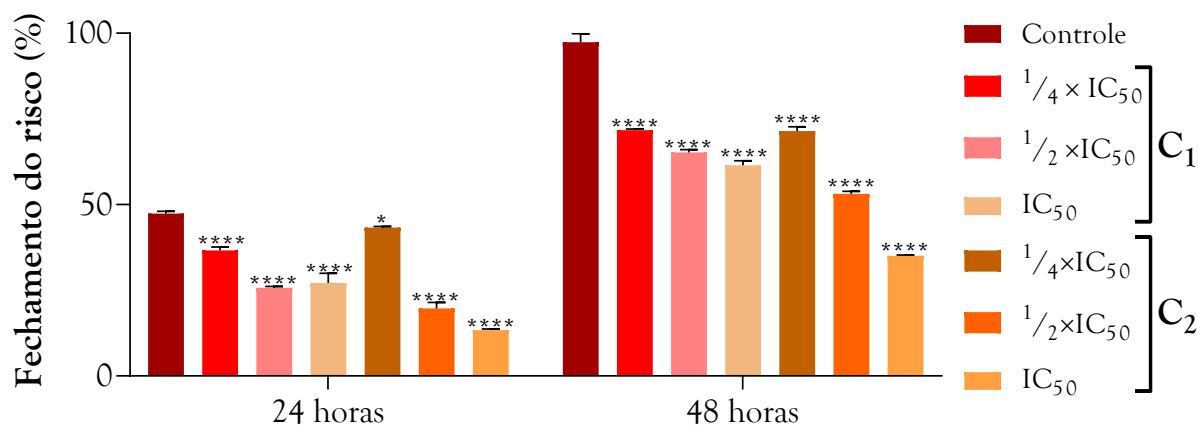


FIGURA 6.18 – Gráfico da porcentagem de fechamento da risca após 24 e 48 horas de incubação das células na presença dos complexos **C1** e **C2**. Os experimentos foram realizados em triplicata, resultando nas faixas de erro apresentadas (\* $p < 0,05$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Sabendo que os complexos possuem ação antiproliferativa e provável ação antimetastática frente às células MDA-MB-231, realizou-se a análise do efeito que o complexo **C2** (menores valores de  $IC_{50}$ ) sobre a distribuição do ciclo celular desta linhagem celular. Como vimos na Série B, a divisão celular é dividida em duas fases, a mitose e a interfase, sendo a mitose a fase onde ocorre a separação dos cromossomos novos em duas novas unidades celulares (mitose). Na interfase ocorre a replicação do material genético, a síntese e crescimento celular, sendo dividida nas fases  $G_1$ , S e  $G_2$ . Na fase  $G_1$  a célula se prepara para a síntese do DNA (também chamada de  $G_0$ ), que ocorre na fase S, sendo seguido por um intervalo chamado de  $G_2$ , onde ocorre a preparação para a mitose (M) (Figura 5.29). Além disso, durante a fase  $G_1$  existe a possibilidade de as células entrarem em um estado de repouso conhecido como  $SubG_1$ . Os gráficos da Figura 6.18 apresentam a distribuição das células nas fases do ciclo celular para os experimentos controle e na concentração de  $2 \times IC_{50}$ .

Comparando os gráficos da Figura 6.19(a) vemos que em comparação ao controle o complexo **C2** desencadeia alterações no ciclo celular das células MDA-MB-231, levando ao aumento do número de células na fase  $SubG_1$  e diminuição nas fases  $G_2/M$  e principalmente  $G_1$ . No gráfico da Figura 6.19(a) estas tendências ficam mais claras ao visualizar o aumento da quantidade

de células na fase SubG<sub>1</sub> com o aumento da concentração dos complexo, sendo já significativo na concentração mais baixa ( $\frac{1}{4}\times IC_{50}$ ). O diminuição da quantidade de células em G<sub>2</sub>/M é um indicativo de que os danos causados as estruturas celulares são de difícil reparo, levando ao conseqüente aumento de células em SubG<sub>1</sub>, que é uma resposta natural da célula aos danos causados, levando a mesma a iniciar mecanismos que levam a morte celular por apoptose.<sup>185-187</sup>

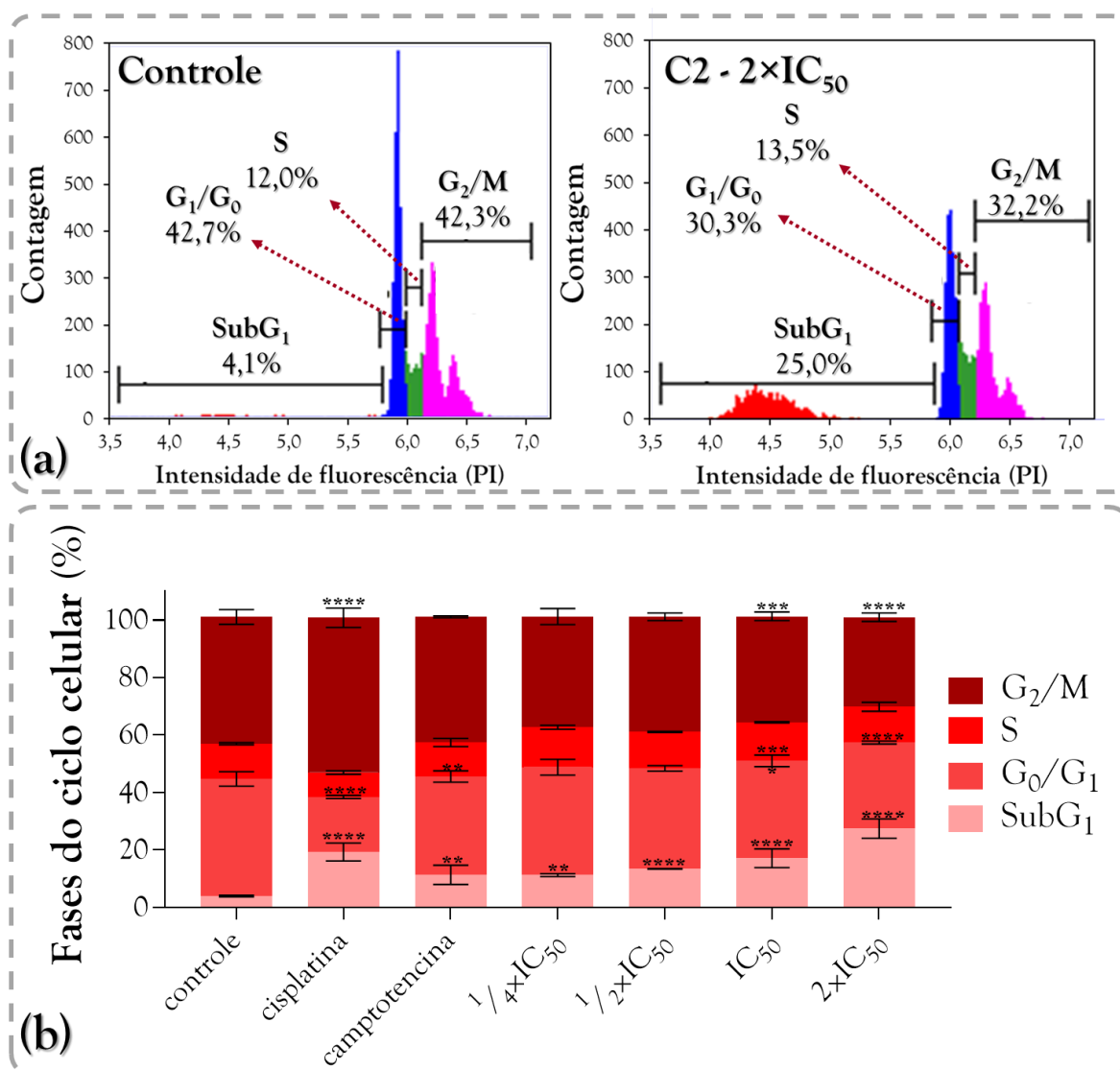


FIGURA 6.19 – (a) Gráfico da distribuição da contagem de células para as fases G<sub>2</sub>/M, S, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> e SubG<sub>1</sub> do controle negativo e do complexo **C2** (2×IC<sub>50</sub>). (b) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em diferentes concentrações do complexo **C2**. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

Nesta Série realizamos também ensaios de interação com DNA com os complexos **C1-C3**, e dada a solubilidade destes complexos em uma mistura

DMSO/tampão (TRISMA 7,4), realizamos experimentos por titulação espectrofotométrica. Baseando-se na espectroscopia de absorção do Ultravioleta-Visível, monitoramos as bandas de transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  (330 nm) exibidas pelos complexos, afim de observar diminuição na intensidade (hipocromismo) ou deslocamento (batocromismo) das mesmas a medida que se adiciona alíquotas de *ct*-DNA (*calf thimus* - DNA). A afinidade exibida entre complexo e DNA pode ser aferida através do cálculo da constante de ligação ( $K_b$ ) que se baseia nos máximos de absorção da banda observada, onde empregando a equação de Neighbor-Exclusion é possível encontrar esses valores.

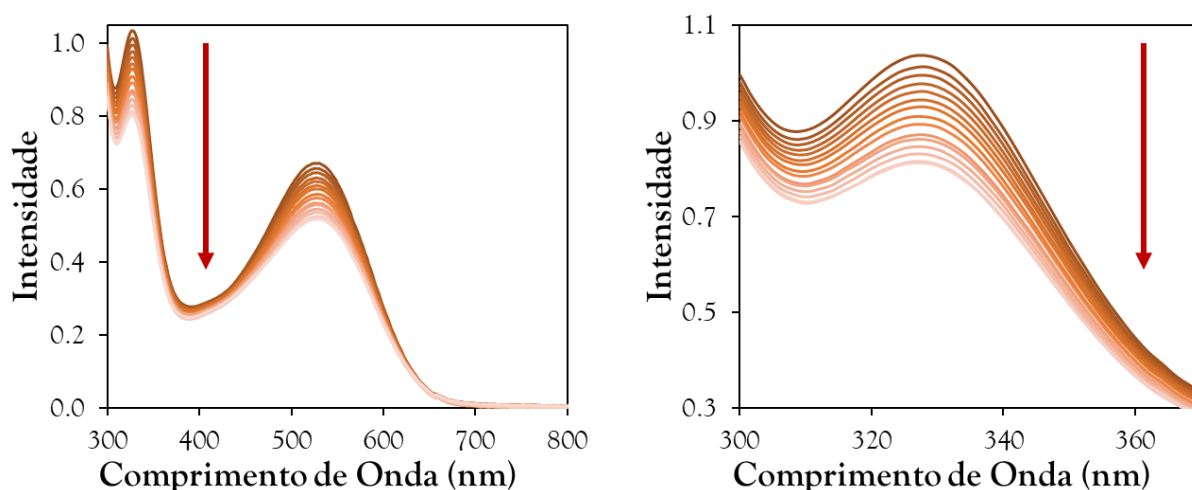


FIGURA 6.20 – Espectros de absorção na região do UV-Vis obtidos para o complexo **C1** com a adição de sucessivas alíquotas de *ct*-DNA

Como se pode ver na Figura 6.20, nos experimentos realizados para os complexos **C1-C3**, ao se incrementar alíquotas de DNA a uma solução contendo os complexos nota-se uma diminuição da intensidade de absorção (efeito hipocrômico) das bandas observadas, onde esta diminuição da intensidade de absorção ocorre devido ao efeito de diluição e também em detrimento das variações na energia da transição eletrônica ocasionando mudança na intensidade de absorção devido às interações entre o complexo e o DNA. Afim de se avaliar a contribuição do efeito de diluição para cada complexo foi realizado a parte um experimento adicionando alíquotas de tampão, determinando o hipocromismo proveniente da diluição do complexo. Na Tabela 6.5 são apresentados os valores de hipocromismo e as constantes de interação ( $K_b$ ) resultantes deste experimento.

TABELA 6.5 – Valores de hipocromismo e constantes de interação encontrados para os complexos C1-C3 nos experimentos de titulação espectrofotométrica com o *ct*-DNA.

Complexo	Hipocromismo (%)	$K_b$ (mol L <sup>-1</sup> )
<b>C1</b>	25	$2,5 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$
<b>C2</b>	-	-
<b>C3</b>	3,0	$1,1 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$

O valor obtido no cálculo da constante de interação ( $K_b$ ) para o complexo **C3** é característico de interações fracas entre complexo e DNA, além do baixo hipocromismo encontrado, assim como também observado para o complexo **C2**, onde o hipocromismo resultante da titulação foi igual ao obtido no experimento de avaliação do efeito de diluição, mostrando que as interações exibidas por **C3** também são fracas, limitando-se a interações eletrostáticas (por serem complexos catiônicos) e/ou hidrofóbicas. Já o complexo **C1** apresentou constante de interação da ordem de  $10^4$  mol L<sup>-1</sup>, que corresponde a interações de intensidade moderada a forte, resultando em um hipocromismo de 25%, evidenciando a existência de interações do complexo **C1** com o DNA.

Conforme observado nos experimentos de estabilidade do complexo **C1** em DMSO, observamos que o mesmo exibe a formação de outras espécies na presença deste solvente, podendo estas serem provenientes da labilização do ligante clorido. Como vimos as interações do tipo covalente ocorrem quando um ligante lábil é trocado pela base nitrogenada do DNA, coordenando o centro metálico ao nitrogênio das bases nitrogenadas. Assim a interação moderada/forte observada para **C1** pode ser resultante da existência de interação do tipo covalente, em detrimento da labilização do clorido, viabilizando a interação.

Para confirmar essas observações realizamos os ensaios de interação com DNA plasmidial (PBR322) com ajuda da técnica de eletroforese em gel, e isto em soluções de mesma concentração de DNA e diferentes concentrações dos complexos, nas proporções [complexo]/[DNA] ( $R_i$ ) 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5; sendo

todas as amostras pré-incubadas, em agitação por 24 horas a 37°C. Na Figura 6.21 são apresentados os resultados obtidos para esses experimentos.

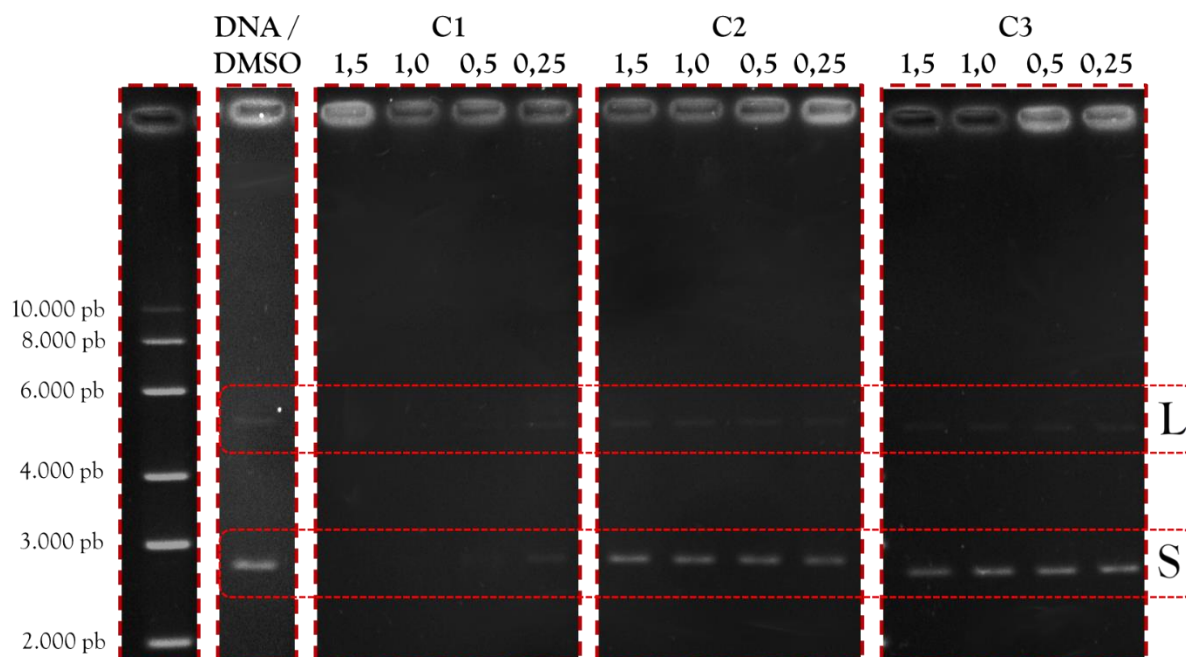


FIGURA 6.21 - Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial pBR322 em diferentes Ri dos complexos **C1-C3**. Em destaque as bandas referentes ao DNA superenovelado (S) e linear (L).

Ao comparar as bandas exibidas nos experimentos contendo os complexos com as do controle negativo (DNA+DMSO), observamos que os compostos **C2** e **C3** não induziram mudanças na posição e na intensidade das bandas do DNA superenovelado, mostrando que não ocorrem interações fortes entre estes complexos e o DNA, conforme já visto no experimento de titulação espectrofotométrica. Corroborando com o experimento anterior, o complexo **C1** exibiu um resultado diferente dos demais, mostrando o completo desaparecimento das bandas nas concentrações maiores, o que é característico de interações fortes entre o complexo e o DNA, conforme observamos para a cisplatina nos resultados exibidos na Série anterior. Deste modo a existência de interações do tipo covalente para o complexo **C1** fica evidenciada como predominante este complexo, podendo compor seu mecanismo de ação frente as células testadas.

Uma premissa importante para a interação com o DNA é a internalização do composto na célula, uma vez que o DNA não somente é um

componente intracelular, como também se encontra localizado dentro do núcleo, sendo necessária a permeabilização do complexo para que interações com biomoléculas inerentes ao meio intracelular ocorra.<sup>188-191</sup> Embora existam mecanismos de morte celular que podem ser desencadeados através de interações com proteínas das membranas ou com componentes da matriz extracelular,<sup>192-194</sup> existem vários outros mecanismos conhecidos que ocorrem envolvendo moléculas presentes no núcleo e citoplasma. Deste modo, explorando a fluorescência do complexo **C1** realizamos o tratamento de células MDA-MB-231 empregando a concentração de  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ . De forma a delimitar o núcleo das células utilizamos o marcador de DNA DAPI, que quando irradiado em 360 nm exibindo fluorescência em 460 nm, exibindo coloração azul. Afim de captar a fluorescência proveniente do complexo **C1**, as células foram irradiadas em 420 nm (máximo de absorção da banda responsável pela fluorescência).

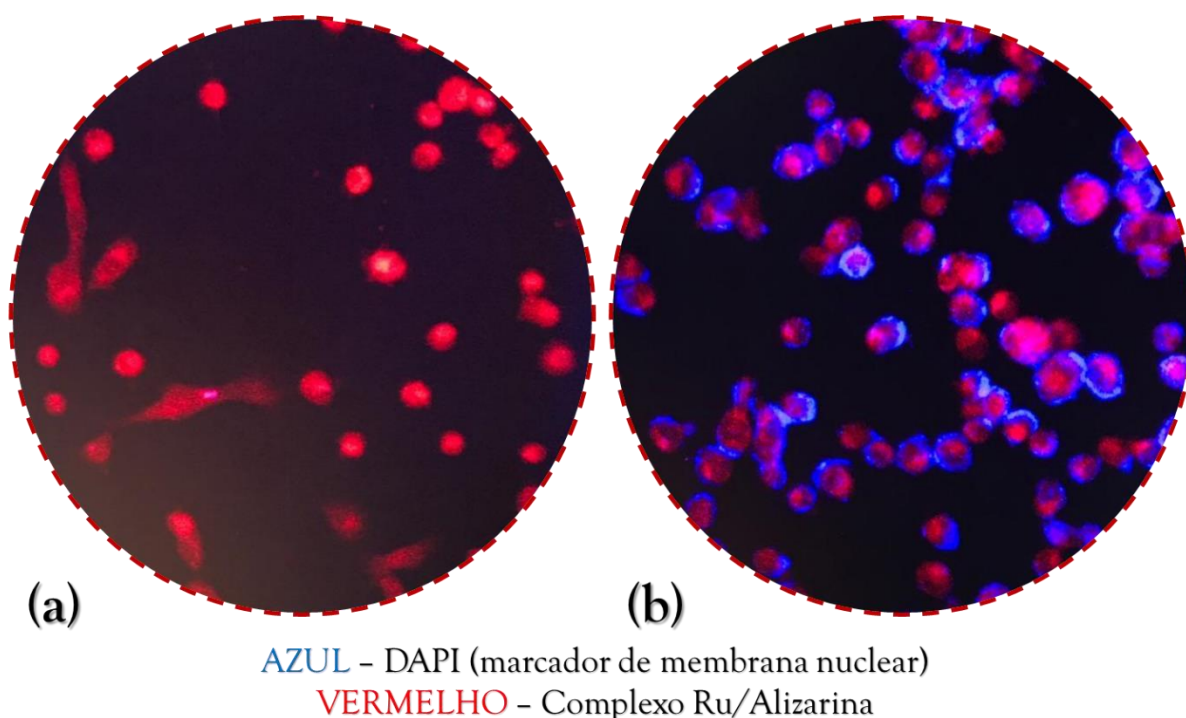


FIGURA 6.22 – Micrografia obtidas empregando a microscopia de fluorescência para a visualização das células MDA-MB-231 tratadas com o complexo **C1** e com o marcador DAPI.

Como mostrado na Figura 6.22, o complexo **C1** exibiu fluorescência em 650 nm, assim como observado nos experimentos de cálculo de rendimento

quântico, como ilustrado na Figura 6.22(a) onde vemos em vermelho as células demarcadas com o complexo. Essas informações nos mostram que o complexo está sendo internalizado pelas células, e isto já no início do tratamento, uma vez que a micrografia foi registrada poucos minutos após a administração do composto. Além disso vemos a sobreposição da marcação do núcleo feita com o DAPI e a coloração vermelha exibida pelo complexo, mostrando que o complexo não somente é internalizado como também se acumula no núcleo da célula.

Esses dados aportam importantes informações a este trabalho, nos permitindo saber que o complexo é internalizado pela célula, sendo assim possível interagir com moléculas do meio intracelular tanto do núcleo como do citoplasma, podendo assim desencadear mecanismos de morte celular ao interagir elas, levando a perda de função e causando danos ao funcionamento celular.<sup>195-202</sup>

### 6.3 – Conclusões parciais da Série C.

Nesta série foram apresentados os produtos obtidos a partir da combinação dos complexos Ru<sup>II</sup>/areno/monofosfinas e a antraquinona alizarina, resultando em três novos compostos que foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto a suas atividades citotóxicas. Em relação as demais séries, estes complexos foram os mais estáveis em solução contendo o meio biológico (RPMI), permanecendo os complexos originais como substância majoritária em solução nos experimentos de estabilidade. O complexo contendo o clorido como substituinte (**C1**) sofreu solvólise em DMSO, isto em decorrência da labilização do ligante clorido, fato que já é bastante conhecido em compostos Ru<sup>II</sup>/areno/clorido. O objetivo inicial de obter compostos com fluorescência foi atingido com o complexo **C1**, que exibiu fluorescência decorrente dessa característica preexistente da alizarina. Esta propriedade foi inibida nos complexos **C2** e **C3** devido a supressão da fluorescência pelas monofosfinas.

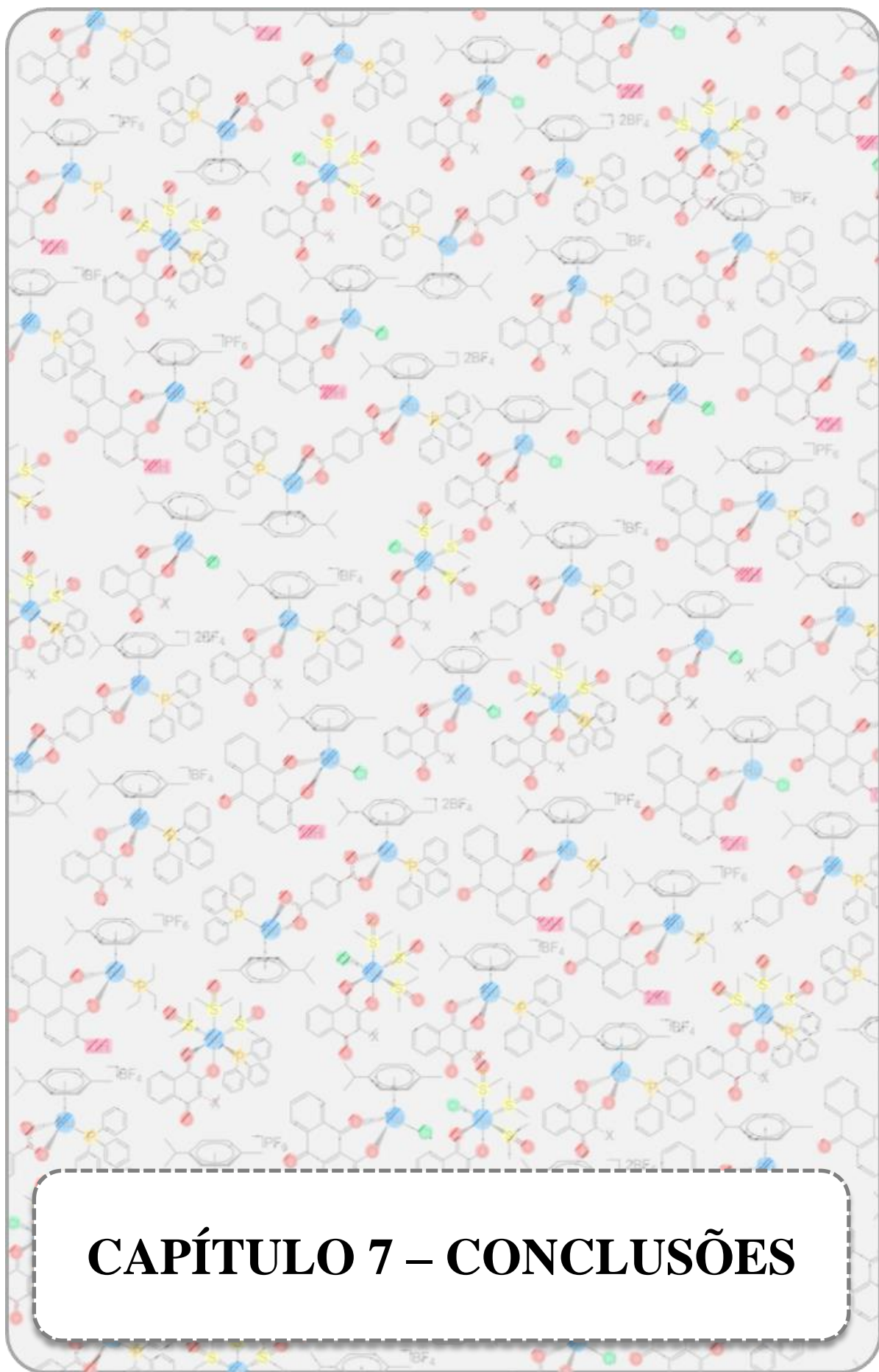
O complexo **C2** apresentou os menores valores de IC<sub>50</sub> frente as linhagens de mama e pulmão testadas, fato correlacionado a maior lipofilicidade

conferida pelo ligante trifenilfosfina. Os complexos **C1** e **C2** foram os seletivos, principalmente nas células mamárias, exibindo índice de seletividade de 1,1 a 1,7. O complexo **C2** levou ao acúmulo das células na fase SubG<sub>1</sub> do ciclo celular, sendo que nesta fase as células saem do ciclo de divisão celular como resposta natural aos danos causados pelos compostos nas estruturas celulares. Nos experimentos de análise morfológica das células (MDA-MB-231) tratadas com os compostos **C1** e **C2** vimos que somente foram exibidas alterações morfológicas nas concentrações iguais a 4×IC<sub>50</sub> em 24 h, sendo que nas demais concentrações não foram observadas alterações morfológicas consideráveis. Nos testes de clonogenicidade foram observados efeitos citotóxicos e citostáticos dose-dependentes para **C1** e **C2**, sendo estes mais proeminentes em **C2**. Nos ensaios de migração celular tivemos indícios de uma possível ação antimetastática dos complexos **C1** e **C2**, inibindo ambos a migração celular avaliada através do fechamento da risca, exibindo **C2** a maior capacidade inibitória (65%, em 48 h).

Os compostos **C2** e **C3** apresentaram interações fracas (eletrostáticas) com o DNA, conforme evidenciado pelos experimentos de titulação espectrofotométrica (*ct*-DNA) e eletroforese em gel (PBR322). O complexo **C1**, por possuir um ligante lábil (clorido), exibiu interações covalentes com o DNA, conforme evidenciado pelo desaparecimento das bandas observadas na corrida eletroforética do DNA PBR322. Um grande destaque dessa série foi a fluorescência exibida pelo complexo **C1**, que administrado às células do tipo MDA-MB-231 exibiu fluorescência no interior das células, conforme demonstrado nas micrografias obtidas em um microscópio confocal, se acumulando no núcleo das mesmas. Este fato comprova que **C1**, mesmo com a ausência da trifenilfosfina, é capaz de permear a membrana celular e se acumular no interior das células, possibilitando a ação do complexo nos mecanismos de morte celular que ocorrem no meio intracelular.







**CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos no presente trabalho nos possibilitaram progredir no conhecimento do perfil químico e biológico de complexos do tipo Ru<sup>II</sup>/areno contendo produtos naturais e seus derivados como ligantes. Independente da Série estudada, um único modo de coordenação foi observado, sendo este bidentado através dos átomos de oxigênios dos ânions carboxilatos na Série A e através dos oxigênios das quinonas e hidroxilas adjacentes nas Séries B e C. Uma característica presente em todos os complexos foi a instabilidade das estruturas propostas em sistemas havendo moléculas coordenantes como o DMSO, ficando claro com os dados obtidos nas três séries que a quantidade de membros do anel quelato formado entre os ligantes carboxilatos/naftoquinônicos/antraquinônicos e o metal está correlacionado com a estabilidade, onde quanto mais tenso o anel (4 membros), mais instável se torna a molécula, conforme exemplificado na Figura 7.1.

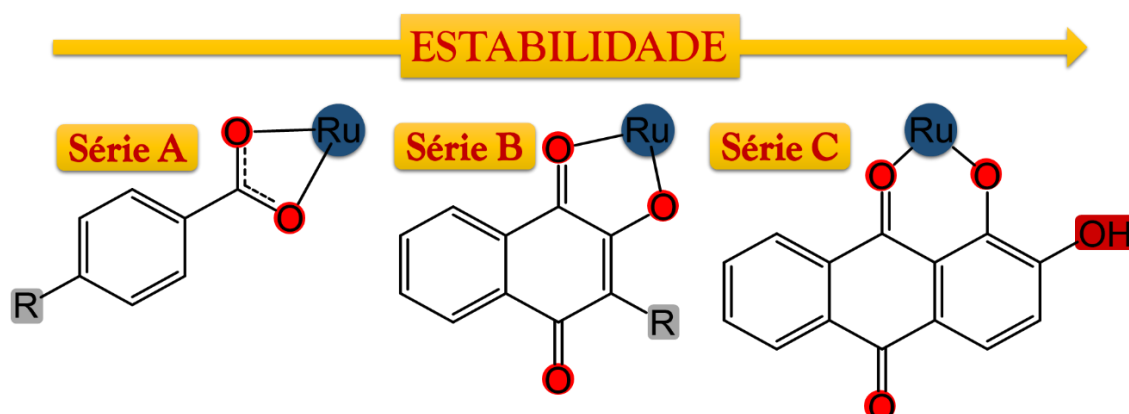


FIGURA 7.1 – Representação do aumento da estabilidade dos complexos com a diminuição da tensão interna do anel quelato metal/ligante.

Uma característica marcante da Série B foi a identificação de um produto majoritário na mistura DMSO/RPMI (meio de cultura) dos complexos **B1-B6**, diferente das Séries A e C, uma vez que em A não foi caracterizado um produto majoritário nesta mistura, exibindo vários subprodutos em 48 h, enquanto em C a maior estabilidade levou a manutenção da estrutura inicialmente proposta. Na Série B, com auxílio das técnicas de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} e difração de raios X de monocristal foi possível identificar as o que ocorreu no experimento de estabilidade, onde a presença do DMSO (solvente coordenante) levou a

substituição do ligante *p*-cimeno e coordenação de moléculas de DMSO, levado ao surgimento dos complexos **B7-B12**, que foram sintetizados e caracterizados. A labilização do ligante areno é atribuída ao grande número de moléculas  $\pi$  aceptoras coordenadas ao centro metálico, que com a retrodoação diminuem a densidade eletrônica no metal levando a troca dos ligantes com componentes  $\sigma$  doadoras mais fracas (*p*-cimeno) por mais fortes (DMSO). Este efeito possui evidências nas distâncias Ru/areno, onde vemos que a troca de um clorido ( $\sigma$  doador) por uma trifenilfosfina ( $\sigma$  doador e  $\pi$  aceptor) leva ao aumento desta distância e conseqüente enfraquecimento das ligações Ru/areno.

Nos dados cristalográficos obtidos observamos que as interações intermoleculares presentes nos empacotamentos cristalinos em sua grande maioria são do tipo hidrofóbicas, não exibindo interações fortes (como ligações de hidrogênio), principalmente nas moléculas contendo trifenilfosfina, fato que confere maior lipofilicidade a estes complexos.

Ao analisar os valores de  $IC_{50}$  encontrados para os complexos das 3 séries fica clara a influência da trifenilfosfina nos valores de citotoxicidade exibidos pelos mesmos, onde os complexos de Ru/areno contendo o ligante clorido foram menos ativos do que os similares contendo as monofosfinas, promovendo uma diminuição nos valores de  $IC_{50}$  de até 65 vezes. Além disso, de modo geral, os produtos naturais e seus derivados coordenados aos precursores  $Ru^{II}$ /areno neste trabalho levam a potencialização da atividade antitumoral de ambos, precursores e ligantes. Em todas as Séries o índice de seletividade dos complexos é superior nas linhagens de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) do que nas linhagens de pulmão (A549) e próstata (DU-145), mesmo sendo os valores de  $IC_{50}$  similares nestas células. Dentre todos os complexos o composto B12 exibiu o melhor índice de seletividade frente a linhagem MCF-7, sendo três vezes mais seletivos que a cisplatina nessa linhagem.

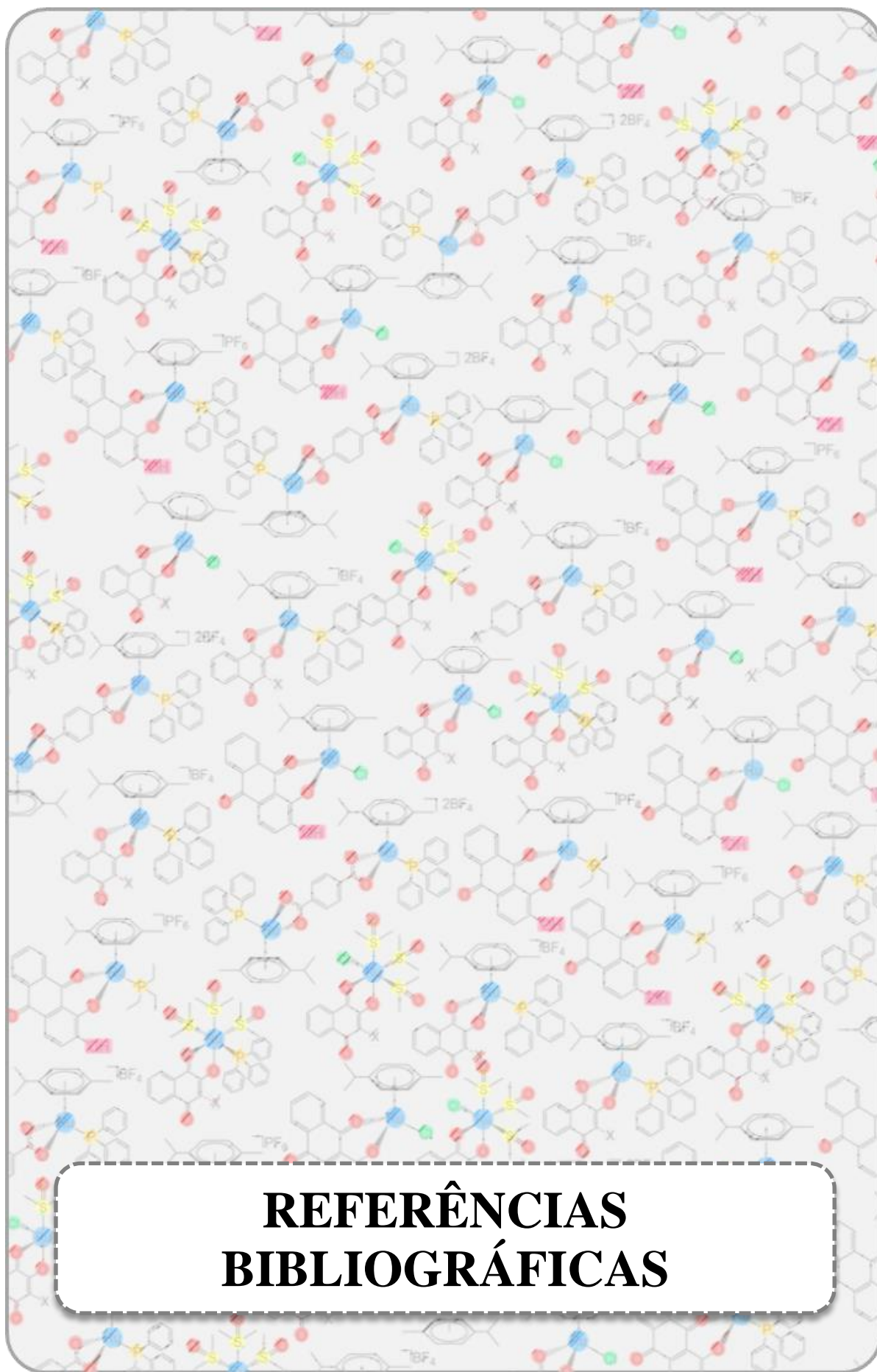
Os complexos estáveis das Séries B e C foram avaliados quanto a

interação com DNA, apresentando apenas interações fracas, excetuando **C1**, que exibiu interações de fortes/moderadas do tipo covalente, isto por possuir um ligante clorido lábil, enquanto os complexos **B7-B12** mesmo possuindo o ligante clorido interagem fracamente com o DNA (interações eletrostáticas), por serem pouco lábeis

De modo geral, os complexos em sua maioria foram capazes de inibir a formação de colônias, apresentando nas Séries A e B uma resposta dose-dependente, onde o número de colônias tem um decréscimo escalar com o aumento da concentração, enquanto na Série B na concentração do  $IC_{50}$  os complexos testados eliminam completamente a clonogenicidade das células. **A1**, **C2** e **C3** inibiram a migração celular levando a inibição do fechamento da risca em uma monocamada das células MDA-MB.231, sendo este efeito mais pronunciado em **C2**. Alterações morfológicas nas linhagens tumorais MDA-MB-231 (Séries A e C) e MCF-7 (Série B) foram observadas, destacando os complexos contendo a trifetilfosfina, onde nas concentrações proporcionais ao  $IC_{50}$ , vemos a perda da adesão e alteração da morfologia celular principalmente para os complexos **B6**, **B12** e **C2**. Nos Ensaios de análise de ciclo células das células tratadas com os complexos **A1**, **B3**, **B6**, **B9**, **B12** e **C2**, observou-se que todos promoveram acúmulo na fase Sub- $G_1$  do ciclo celular, que é um indicativo de morte celular por apoptose, entretanto o aumento em Sub- $G_1$  ocorre em função da diminuição em fases diferentes para cada complexo, mostrando que as diferenças estruturais entre os mesmos levam a atuação em diferentes mecanismos celulares. Na Série A, com o auxílio da técnica de ICP-MS, constatou-se que o complexo **A1** é capaz de se acumular nas células MDA-MB-231, isto em quantidades superiores aos relatados para os complexos do tipo RAPTA. Na Série C a fluorescência exibida por **C1**, proveniente da emissão pertencente a alizarina, permitiu observar o acúmulo do mesmo nas células MDA-MB-231, confirmando a internalização do complexo.

Todo o estudo apresentado aqui, fundamentado na parte química e

biológica, nos possibilitou uma melhor compreensão do sistema Ru<sup>II</sup>-areno/monofosfina/produtos naturais. A potencialidade dos complexos para a aplicabilidade na área medicinal evidenciada neste trabalho encoraja a continuidade de estudos neste âmbito.



**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

1. DA COSTA, V. G.; MORELI, M. L.; & SAIVISH, M. V. “The Emergence of SARS, MERS and Novel SARS-2 Coronaviruses in the 21st Century.” *Arch. Virol.*, 165 (7): 1517, 2020.
2. SOUZA, D. de O. “The COVID-19 Pandemic beyond Health Sciences: Reflections on Its Social Determination.” *Cienc. e Saude Coletiva*, 25 (1): 2469, 2020.
3. LI, R.; PEI, S.; CHEN, B.; SONG, Y.; ZHANG, T.; YANG, W.; & SHAMAN, J. “Substantial Undocumented Infection Facilitates the Rapid Dissemination of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2).” *Science*, 368 (6490): 489, 2020.
4. Coronavirus latest: Trump halts funding for WHO <http://www.nature.com/articles/d41586-020-00154-w> (accessed Aug 3, 2020).
5. ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S. K.; SCHWANKE, R. C.; SIQUEIRA, J. M.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; & CALIXTO, J. B. “Non-Clinical Studies in the Process of New Drug Development - Part II: Good Laboratory Practice, Metabolism, Pharmacokinetics, Safety and Dose Translation to Clinical Studies.” *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 49 (12): e5646, 2016.
6. SINGH, S. “Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs.” *Curr. Drug Metab.*, 7 (2): 165, 2006.
7. Etapa 3: Pesquisa Clínica | FDA <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research> (accessed Aug 5, 2020).
8. HAY, M.; THOMAS, D. W.; CRAIGHEAD, J. L.; ECONOMIDES, C.; & ROSENTHAL, J. “Clinical Development Success Rates for Investigational Drugs.” *Nat. Biotechnol.*, 32 (1): 40, 2014.
9. PARASRAMPURIA, D. A.; BENET, L. Z.; & SHARMA, A. “Why Drugs Fail in Late Stages of Development: Case Study Analyses from the Last Decade and Recommendations.” *AAPS J.*, 20 (3): 1, 2018.
10. WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; & LUYTEN, J. “Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018.” *JAMA*, 323 (9): 844, 2020.
11. Cancer Drugs Account for Over a Quarter of All New Drug Approvals in the US - The ASCO Post <https://www.ascopost.com/news/september-2019/cancer-drugs-account-for-over-a-quarter-of-all-new-drug-approvals-in-the-us/> (accessed Aug 5, 2020).
12. Estimativa 2020 - Apresentação | INCA - Instituto Nacional de Câncer <https://www.inca.gov.br/estimativa> (accessed Aug 7, 2020).
13. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; & JEMAL, A. “Cancer Statistics, 2020.”



- CA. *Cancer J. Clin.*, 70 (1): 7, 2020.
14. Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> (accessed Aug 7, 2020).
  15. ARRUEBO, M.; VILABOA, N.; SÁEZ-GUTIERREZ, B.; LAMBEA, J.; TRES, A.; VALLADARES, M.; & GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Á. "Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies." *Cancers*, 3 (3): 3279, 2011.
  16. PUCCI, C.; MARTINELLI, C.; & CIOFANI, G. "Innovative Approaches for Cancer Treatment: Current Perspectives and New Challenges." *Ecancermedalscience*, 13: 961, 2019.
  17. KHOURY, A.; DEO, K. M.; & ALDRICH-WRIGHT, J. R. "Recent Advances in Platinum-Based Chemotherapeutics That Exhibit Inhibitory and Targeted Mechanisms of Action." *J. Inorg. Biochem.*, 207: 111070, 2020.
  18. DE LIRA-QUEZADA, C. E.; VILLARREAL-GONZALEZ, R. V.; GONZALEZ-DIAZ, S. N.; & CARRASCO-DIAZ, L. L. "Successful Oxaliplatin Desensitization Protocol in a Patient with Colorectal Metastatic Cancer." *J. Oncol. Pharm. Pract.*, : in press, 2020.
  19. GALANSKI, M.; JAKUPEC, M. A.; & KEPPLER, B. K. "Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches." *Curr. Med. Chem.*, 12 (18): 2075, 2005.
  20. WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; & OUN, R. "The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials." *Dalton Trans.*, 39 (35): 8113, 2010.
  21. CHEN, X.; WU, Y.; DONG, H.; Y. ZHANG, C.; & ZHANG, Y. "Platinum-Based Agents for Individualized Cancer Treatment." *Curr. Mol. Med.*, 13 (10): 1603, 2013.
  22. GHOSH, S. "Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug." *Bioorg. Chem.*, 88: 102925, 2019.
  23. OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; & WHEATE, N. J. "The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists." *Dalton Trans.*, 47 (19): 6645, 2018.
  24. COVERDALE, J. P. C.; LAROYIA-MCCARRON, T.; & ROMERO-CANELÓN, I. "Designing Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug Candidates?" *Inorganics*, 7 (3): 31, 2019.
  25. APPS, M. G.; CHOI, E. H. Y. Y.; & WHEATE, N. J. "The State-of-Play and Future of Platinum Drugs." *Endocr. Relat. Cancer*, 22 (4): R219, 2015.

26. ALESSIO, E.; & MESSORI, L. “NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry.” *Molecules*, 24 (10): 1995, 2019.
27. KENNY, R. G.; & MARMION, C. J. “Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs—A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?” *Chem. Rev.*, 119 (2): 1058, 2019.
28. HUDEJ, R.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M.; TODOROVIC, V.; SERSA, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G.; MARTINCIC, A.; SCANCAR, J.; KEPPLER, B. K.; & TUREL, I. “Modulation of Activity of Known Cytotoxic Ruthenium(III) Compound (KP418) with Hampered Transmembrane Transport in Electrochemotherapy In Vitro and In Vivo.” *J. Membr. Biol.*, 247 (12): 1239, 2014.
29. GROESSL, M.; REISNER, E.; HARTINGER, C. G.; EICHINGER, R.; SEMENOVA, O.; TIMERBAEV, A. R.; JAKUPEC, M. A.; ARION, V. B.; & KEPPLER, B. K. “Structure–Activity Relationships for NAMI-A-Type Complexes (HL)[Trans-RuCl<sub>4</sub>L(S-DMSO)Ruthenate(III)] (L = Imidazole, Indazole, 1,2,4-Triazole, 4-Amino-1,2,4-Triazole, and 1-Methyl-1,2,4-Triazole): Aquation, Redox Properties, Protein Binding, and Anti.” *J. Med. Chem.*, 50 (9): 2185, 2007.
30. ALESSIO, E.; & MESSORI, L. “The Deceptively Similar Ruthenium(III) Drug Candidates KP1019 and NAMI-A Have Different Actions. What Did We Learn in the Past 30 Years?” *Met. Ions Life Sci.*, 18: 303, 2018.
31. PLUIM, D.; VAN WAARDENBURG, R. C. A. M.; BEIJNEN, J. H.; & SCHELLENS, J. H. M. “Cytotoxicity of the Organic Ruthenium Anticancer Drug Nami-A Is Correlated with DNA Binding in Four Different Human Tumor Cell Lines.” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54 (1): 71, 2004.
32. ALESSIO, E. “Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective.” *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017 (12): 1549, 2017.
33. SAVA, G.; GAGLIARDI, R.; BERGAMO, A.; ALESSIO, E.; & MESTRONI, G. “Treatment of Metastases of Solid Mouse Tumours by NAMI-A: Comparison with Cisplatin, Cyclophosphamide and Dacarbazine.” *Anticancer Res.*, 19 (2 A): 969, 1999.
34. LEIJEN, S.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN WERKHOVEN, E.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J. H.; & SCHELLENS, J. H. M. “Phase I/II Study with Ruthenium Compound NAMI-A and Gemcitabine in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer after First Line Therapy.” *Invest. New Drugs*, 33 (1): 201, 2015.
35. BOLD-100 in Combination With FOLFOX for the Treatment of Advanced, Solid Tumours - Full Text View - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov)

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04421820> (accessed Aug 11, 2020).
36. TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W.; & KEPPLER, B. K. "NKP-1339, the First Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application." *Chem. Sci.*, 5 (8): 2925, 2014.
  37. The Nobel Prize in Chemistry 1973 <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1973/summary/> (accessed Aug 12, 2020).
  38. WILKINSON, G. "The Iron Sandwich. A Recollection of the First Four Months." *J. Organomet. Chem.*, 100 (1): 273, 1975.
  39. Dorothy Crowfoot Hodgkin - Facts - NobelPrize.org <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1964/hodgkin/facts/> (accessed Aug 13, 2020).
  40. SPESSARD, G. O.; & MIESSLER, G. L. *Organometallic Chemistry*, 2a ed. New York, OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2010.
  41. CRABTREE, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*. Hoboken, John Wiley & Sons, 2014.
  42. FISH, R. H. "A Bioorganometallic Chemistry Perspective: Organometallic Chemistry at the Interface with Biology." *J. Organomet. Chem.*, 782: 3, 2015.
  43. MURRAY, B. S.; BABAK, M. V.; HARTINGER, C. G.; & DYSON, P. J. "The Development of RAPTA Compounds for the Treatment of Tumors." *Coord. Chem. Rev.*, 306 (P1): 86, 2016.
  44. TIMERBAEV, A. R. "Role of Metallomic Strategies in Developing Ruthenium Anticancer Drugs." *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 80: 547, 2016.
  45. BACHER, F.; & ARION, V. B. "Ruthenium Compounds as Antitumor Agents: New Developments." IN: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2014.
  46. MJOS, K. D.; ORVIG, C.; RAUSCH, M.; DYSON, P. J.; NOWAK-SLIWINSKA, P.; MJOS, K. D.; & ORVIG, C. "Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry." *Chem Rev*, 114 (8): 4540, 2014.
  47. LEE, R. F. S.; CHERNOBROVKIN, A.; RUTISHAUSER, D.; ALLARDYCE, C. S.; HACKER, D.; JOHNSON, K.; ZUBAREV, R. A.; & DYSON, P. J. "Expression Proteomics Study to Determine Metallodrug Targets and Optimal Drug Combinations." *Sci. Rep.*, 7 (1): 1, 2017.
  48. PETROVSKA, B. B. "Historical Review of Medicinal Plants' Usage." *Pharmacogn. Rev.*, 6 (11): 1, 2012.
  49. BOY, H. I. A.; RUTILLA, A. J. H.; SANTOS, K. A.; TY, A. M. T.; YU, A. I.; MAHBOOB, T.; TANGPOONG, J.; & NISSAPATORN, V.

- “Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review.” *Digit. Chinese Med.*, 1 (2): 131, 2018.
50. E. C. FREIRE, F.; H. DE A. NETO, J.; P. DA SILVA, D.; C. GONÇALVES, R.; CARLOS S. MENEZES, A.; & LÁZARO F. NAVES, P. “Inhibitory Activity of 3,4,5-Tris(Acetyloxy)Benzoic Acid against Bacterial Biofilms Formation.” *Rev. Virtual Química*, 10 (4): 767, 2018.
51. PINTO, J.; SILVA, D.; HONORATO, J.; MENEZES, A.; PINTO, E.; & NAVES, P. “Antifungal Activity and Toxicity of the 3,4,5-Trihydroxybenzoic and 3,4,5-Tris(Acetyloxy)Benzoic Acids.” *Adv. Microbiol.*, 05 (07): 517, 2015.
52. ALMEIDA, E. R. de. “Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone.” *Open Nat. Prod. J.*, 2 (1): 42, 2009.
53. EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; & KISS, R. “Lapachol and Its Congeners as Anticancer Agents: A Review.” *Phytochem. Rev.*, 13 (1): 37, 2014.
54. ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; & ROLIM NETO, P. J. “Lapachol: Segurança e Eficácia Na Terapêutica.” *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12: 57, 2002.
55. LÓPEZ LÓPEZ, L. I.; NERY FLORES, S. D.; SILVA BELMARES, S. Y.; & SÁENZ GALINDO, A. “Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivatives — a Structured Review | Naftoquinonas: Propiedades Biológicas y Síntesis de Lawsona y Derivados – Una Revisión Estructurada.” *Vitae*, 21 (3)2014.
56. MUHAMMAD, H. S.; & MUHAMMAD, S. “The Use of Lawsonia Inermis Linn. (Henna) in the Management of Burn Wound Infections.” *African J. Biotechnol.*, 4 (9): 934, 2005.
57. JORDÃO, A. K.; VARGAS, M. D.; PINTO, A. C.; DA SILVA, F. D. C.; & FERREIRA, V. F. “Lawsone in Organic Synthesis.” *RSC Adv.*, 5 (83): 67909, 2015.
58. FOTIA, C.; AVNET, S.; GRANCHI, D.; & BALDINI, N. “The Natural Compound Alizarin as an Osteotropic Drug for the Treatment of Bone Tumors.” *J. Orthop. Res.*, 30 (9): 1486, 2012.
59. ANGELINI, L. G.; PISTELLI, L.; BELLONI, P.; BERTOLI, A.; & PANCONESI, S. “Rubia Tinctorum a Source of Natural Dyes: Agronomic Evaluation, Quantitative Analysis of Alizarin and Industrial Assays.” *Ind. Crops Prod.*, 6 (3–4): 303, 1997.
60. KAUR, P.; CHANDEL, M.; KUMAR, S.; KUMAR, N.; SINGH, B.; & KAUR, S. “Modulatory Role of Alizarin from *Rubia Cordifolia* L. against Genotoxicity of Mutagens.” *Food Chem. Toxicol.*, 48 (1): 320, 2010.
61. CORTES, E. P.; HOLLAND, J. F.; WANG, J. J.; & SINKS, L. F.

- “Doxorubicin in Disseminated.” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 221 (10): 1132, 1972.
62. YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; & HENIKOFF, S. “Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier, January 1, 2014, p. 84–89.
63. SPETH, P. A. J.; VAN HOESEL, Q. G. C. M.; & HAANEN, C. “Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin.” *Clinical Pharmacokinetics*. Springer, November 4, 1988, p. 15–31.
64. THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E.; & ALTMAN, R. B. “Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects.” *Pharmacogenet. Genomics*, 21 (7): 440, 2011.
65. OLIVEIRA, K. M.; PETERSON, E. J.; CARROCCIA, M. C.; COMINETTI, M. R.; DEFLON, V. M.; FARRELL, N. P.; BATISTA, A. A.; & CORREA, R. S. “Ru(II)-Naphthoquinone Complexes with High Selectivity for Triple-Negative Breast Cancer.” *Dalton Trans.*, 2020.
66. COLINA-VEGAS, L.; VILLARREAL, W.; NAVARRO, M.; DE OLIVEIRA, C. R.; GRAMINHA, A. E.; MAIA, P. I. D. 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. Inorg. Biochem.*, 153: 150, 2015.
67. OLIVEIRA, K. M.; LIANY, L.-D.; CORRÊA, R. S.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. “Selective Ru(II)/Lawsonic Acid Complexes Inhibiting Tumor Cell Growth by Apoptosis.” *J. Inorg. Biochem.*, 176: 66, 2017.
68. 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 Inorg Biochem*, 150: 63, 2015.
69. D'SOUSA, C. O.; ARAUJO, J. H.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; VALVERDE, F.; VIDAL, M. T. A.; SALES, C. B. S.; ROCHA, C. A. G.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; BATISTA, A. A.; & BEZERRA, D. P. “Novel Piplartine-Containing Ruthenium Complexes: Synthesis, Cell Growth Inhibition, Apoptosis Induction and ROS Production on HCT116 Cells.” *Oncotarget*, 8 (61): 104367, 2017.
70. POPOLIN, C. P.; REIS, J. P. B.; BECCENERI, A. B.; GRAMINHA, A. E.; ALMEIDA, M. A. P.; CORRÊA, R. S.; COLINA-VEGAS, L. A.;

- ELLENA, J.; BATISTA, A. A.; & COMINETTI, M. R. "Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple Negative Breast Cancer Cells." *PLoS One*, 12 (9): e0183275, 2017.
71. COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTÍN, A. M.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Half Sandwich Ru(II)-Acylthiourea Complexes: DNA/HSA-Binding, Anti-Migration and Cell Death in a Human Breast Tumor Cell Line." *Dalton Trans.*, 46 (38): 12865, 2017.
72. COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTÍN, A. M.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Half Sandwich Ru(II)-Acylthiourea Complexes: DNA/HSA-Binding, Anti-Migration and Cell Death in a Human Breast Tumor Cell Line." *Dalton Trans.*, 46 (38): 12865, 2017.
73. LOPES, J. C. S.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, P. F.; GUEDES, A. P. M.; TAVARES, D. C.; DEFLON, V. M.; LOPES, N. P.; PIVATTO, M.; BATISTA, A. A.; MAIAG, P. I. S.; & VON POELHSITZ, G. "Ruthenium(II) Complexes Containing Anti-Inflammatory Drugs as Ligands: Synthesis, Characterization and in Vitro Cytotoxicity Activities on Cancer Cell Lines." *J. Braz. Chem. Soc.*, 26 (9): 1838, 2015.
74. CUNHA, B. N.; COLINA-VEGAS, L.; PLUTÍN, A. M.; SILVEIRA, R. G.; HONORATO, J.; OLIVEIRA, K. M.; COMINETTI, M. R.; FERREIRA, A. G.; CASTELLANO, E. E.; & BATISTA, A. A. "Hydrolysis Reaction Promotes Changes in Coordination Mode of Ru(II)/Acylthiourea Organometallic Complexes with Cytotoxicity against Human Lung Tumor Cell Lines." *J. Inorg. Biochem.*, 186: 147, 2018.
75. COLINA-VEGAS, L.; DUTRA, J. L.; VILLARREAL, W.; HONORATO, J.; COMINETTI, M. R.; PAVAN, F.; NAVARRO, M.; & BATISTA, A. A. "Ru(II)/Clotrimazole/Diphenylphosphine/Bipyridine Complexes: Interaction with DNA, BSA and Biological Potential against Tumor Cell Lines and Mycobacterium Tuberculosis." *J. Inorg. Biochem.*, 162: 135, 2016.
76. PLUTÍN, A. M.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; RAMOS, R.; CASTELLANO, E. E.; DA SILVA, M. M.; COLINA-VEGAS, L.; PAVAN, F. R.; & BATISTA, A. A. "Anti-Mycobacterium Tuberculosis Activity of Platinum(II)/N,N-Disubstituted-N'-Acyl Thiourea Complexes." *Inorg. Chem. Commun.*, 63: 74, 2016.
77. DA MAIA, P. I. S.; GRAMINHA, A.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; BATISTA, A. A.; BACK, D. F.; LANG, E. S.; ELLENA, J.; DE S. LEMOS, S.; SALISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; & DEFLON, V. M. "Palladium(II) Complexes with Thiosemicarbazones. Syntheses, Characterization and Cytotoxicity against Breast Cancer Cells and Anti-Mycobacterium

- Tuberculosis Activity.” *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (7): 1177, 2010.
78. LIMA, B. A. V.; CORRÊA, R. S.; GRAMINHA, A. E.; KUZNETSOV, A.; ELLENA, J.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; & BATISTA, A. A. “Anti-Mycobacterium Tuberculosis and Cytotoxicity Activities of Ruthenium(II)/Bipyridine/Diphosphine/Pyrimidine-2-Thiolate Complexes: The Role of the Non-Coordinated n-Atom.” *J. Braz. Chem. Soc.*, 27 (1): 30, 2016.
79. DOS SANTOS, E. R.; MONDELLI, M. A.; POZZI, L. V.; CORRÊA, R. S.; SALISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; ELLENA, J.; MALTA, V. R. S.; MACHADO, S. P.; & BATISTA, A. A. “New Ruthenium(II)/Phosphines/Diimines Complexes: Promising Antitumor (Human Breast Cancer) and Mycobacterium Tuberculosis Fighting Agents.” *Polyhedron*, 51 (1): 292, 2013.
80. PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; DA CUNHA, L. V. P.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; CHO, S. H.; FRANZBLAU, S. G.; DE CAMARGO, M. S.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; & LEITE, C. Q. F. “In Vitro and In Vivo Activities of Ruthenium(II) Phosphine/Diimine/Picolinate Complexes (SCAR) against Mycobacterium Tuberculosis.” *PLoS One*, 8 (5): e64242, 2013.
81. PLUTÍN, A. M.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; RAMOS, R.; CASTELLANO, E. E.; DA SILVA, M. M.; VILLARREAL, W.; PAVAN, F. R.; MEIRA, C. S.; FILHO, J. S. R.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; & BATISTA, A. A. “Palladium(II)/ N , N -Disubstituted- N '-Acylthioureas Complexes as Anti- Mycobacterium Tuberculosis and Anti-Trypanosoma Cruzi Agents.” *Polyhedron*, 132: 70, 2017.
82. BARBOSA, M. I. F.; CORRÊA, R. S.; POZZI, L. V.; LOPES, É. D. O.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; ELLENA, J.; MACHADO, S. D. P.; POELHSITZ, G. Von; & BATISTA, A. A. “Ruthenium(II) Complexes with Hydroxypyridinecarboxylates: Screening Potential Metallodrugs against Mycobacterium Tuberculosis.” *Polyhedron*, 85: 376, 2015.
83. PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. Von; DO NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; & LEITE, C. Q. F. F. “Ruthenium(II) Phosphine/Picolinate Complexes as Antimycobacterial Agents.” *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (2): 598, 2010.
84. PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; & LEITE, C. Q. F. “Ruthenium(II) Phosphine/Diimine/Picolinate Complexes: Inorganic Compounds as Agents against Tuberculosis.” *Eur. J. Med. Chem.*, 46 (10): 5099, 2011.
85. MACEDO, T. S.; COLINA-VEGAS, L.; DA PAIXÃO, M.; NAVARRO,

- M.; BARRETO, B. C.; OLIVEIRA, P. C. M.; MACAMBIRA, S. G.; MACHADO, M.; PRUDÊNCIO, M.; D'ALESSANDRO, S.; BASILICO, N.; MOREIRA, D. R. M.; BATISTA, A. A.; & SOARES, M. B. P. "Chloroquine-Containing Organoruthenium Complexes Are Fast-Acting Multistage Antimalarial Agents." *Parasitology*, 143 (12): 1543, 2016.
86. MACEDO, T. S.; VILLARREAL, W.; COUTO, C. C.; MOREIRA, D. R. M.; NAVARRO, M.; MACHADO, M.; PRUDÊNCIO, M.; BATISTA, A. A.; & SOARES, M. B. P. "Platinum(II)-Chloroquine Complexes Are Antimalarial Agents against Blood and Liver Stages by Impairing Mitochondrial Function." *Metallomics*, 9 (11): 1548, 2017.
87. BARBOSA, M. I. F.; CORRÊA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; RODRIGUES, C.; ELLENA, J.; NASCIMENTO, O. R.; ROCHA, V. P. C.; NONATO, F. R.; MACEDO, T. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOARES, M. B. P.; & BATISTA, A. A. "Antiparasitic Activities of Novel Ruthenium/Lapachol Complexes." *J. Inorg. Biochem.*, 136: 33, 2014.
88. COLINA-VEGAS, L.; LIMA PRADO GODINHO, J.; COUTINHO, T.; CORREA, R. S.; DE SOUZA, W.; COLA FERNANDES RODRIGUES, J.; BATISTA, A. A.; & NAVARRO, M. "Antiparasitic Activity and Ultrastructural Alterations Provoked by Organoruthenium Complexes against: *Leishmania Amazonensis*." *New J. Chem.*, 43 (3): 1431, 2019.
89. HIGUERA-PADILLA, A. R.; BATISTA, A. A.; COLINA-VEGAS, L.; VILLARREAL, W.; & COLNAGO, L. A. "Synthesis of the  $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{DPPB})\text{Cl}]\text{PF}_6$  Complex and Catalytic Activity in the Transfer Hydrogenation of Ketones." *J. Coord. Chem.*, 70 (20): 3541, 2017.
90. COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTÍN, A. M.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Half Sandwich Ru(II)-Acylthiourea Complexes: DNA/HSA-Binding, Anti-Migration and Cell Death in a Human Breast Tumor Cell Line." *Dalton Trans.*, 46 (38): 12865, 2017.
91. CUNHA, B. N.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTIN, A. M.; SILVEIRA, R. G.; HONORATO, J.; CAIRO, R. R.; DE OLIVEIRA, T. D.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E.; & BATISTA, A. A. "Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation." *Inorg. Chem.*, 59 (7): 5072, 2020.
92. COLINA-VEGAS, L.; OLIVEIRA, K.; CUNHA, B.; COMINETTI, M.; NAVARRO, M.; & AZEVEDO BATISTA, A. "Anti-Proliferative and Anti-Migration Activity of Arene–Ruthenium(II) Complexes with Azole Therapeutic Agents." *Inorganics*, 6 (4): 132, 2018.
93. PLUTÍN, A. M.; RAMOS, R.; MOCELO, R.; ALVAREZ, A.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; OLIVEIRA, K. M.; DONIZETH DE OLIVEIRA, T.; SILVA, T. E. M.; S. CORREA, R.; &



- BATISTA, A. A. "Antitumor Activity of Pd(II) Complexes with N,S or O,S Coordination Modes of Acylthiourea Ligands." *Polyhedron*, 184: 114543, 2020.
94. OLIVEIRA, K. M.; CORRÊA, R. S.; BARBOSA, M. I. F.; ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Ruthenium(II)/Triphenylphosphine Complexes: An Effective Way to Improve the Cytotoxicity of Lapachol." *Polyhedron*, 130: 108, 2017.
95. DE GRANDIS, R. A.; SANTOS, P. W. da S. dos; OLIVEIRA, K. M. de; MACHADO, A. R. T.; AISSA, A. F.; BATISTA, A. A.; ANTUNES, L. M. G.; & PAVAN, F. R. "Novel Lawsone-Containing Ruthenium(II) Complexes: Synthesis, Characterization and Anticancer Activity on 2D and 3D Spheroid Models of Prostate Cancer Cells." *Bioorg. Chem.*, 85: 455, 2019.
96. SHELDRIK, G. M.; & IUCR. "*SHELXT* – Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination." *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.*, 71 (1): 3, 2015.
97. SHELDRIK, G. M. "Crystal Structure Refinement with *SHELXL*." *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, 71 (1): 3, 2015.
98. DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.; & PUSCHMANN, H. "OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program." *J. Appl. Crystallogr.*, 42 (2): 339, 2009.
99. MACRAE, C. F.; BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDGINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; RODRIGUEZ-MONGE, L.; TAYLOR, R.; VAN DE STREEK, J.; & WOOD, P. A. "Mercury CSD 2.0– New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures." *J. Appl. Crystallogr.*, 41 (2): 466, 2008.
100. M. J. FRISCH, G. W. TRUCKS, H. B. SCHLEGEL, G. E. SCUSERIA, M. A. ROBB, J. R. CHEESEMAN, G. SCALMANI, V. BARONE, B. MENNUCCI, G. A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. CARICATO, X. LI, H. P. HRATCHIAN, A. F. IZMAYLOV, J. BLOINO, G. ZHENG, J. L. SONNENBERG, M. HAD, and D. J. F.; FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A. V.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCHIAN, H. P.; ORTIZ, J. V.; IZMAYLOV, A. F.; SONNENBERG, J. L.; WILLIAMS; DING, F.; LIPPARINI, F.; EGIDI, F.; GOINGS, J.; PENG, B.; PETRONE, A.; HENDERSON, T.; RANASINGHE, D.; ZAKRZEWSKI, V. G.; GAO, J.; REGA, N.; ZHENG, G.; LIANG, W.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; THROSSELL, K.;

- MONTGOMERY JR., J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M. J.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E. N.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T. A.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A. P.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; ADAMO, C.; CAMMI, R.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; & FOX, D. J. "Gaussian 09." Wallingford CT, Gaussian, Inc., 2009.
101. MACÊDO, A. P. M. G., Desenvolvimento de Potenciais Metalofármacos de Rutênio Contendo 1,1'-Bis(Difenilfosfino)Ferroceno e Ligantes Mercapto. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2019. Tese de Doutorado, 200 p.
102. CUNHA, B. N. da., Avaliação das Propriedades Química e Citotóxicas de Novos Compostos Organometálicos de Ru(II) com Aciltioureas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2018. Tese de Doutorado, 227 p.
103. HONORATO, J.; OLIVEIRA, K.; LEITE, C.; COLINA-VEGAS, L.; NÓBREGA, J.; CASTELLANO, E.; ELLENA, J.; CORREA, R.; & BATISTA, A. "Half-Sandwich'/RuII Anticancer Complexes Containing Triphenylphosphine and p-Substituted Benzoic Acids." *J. Braz. Chem. Soc.*, 31 (11): 2237, 2020.
104. BRESSAN, M.; & RIGO, P. "Five-Coordinate Complexes of Ruthenium(II) with Di(Tertiary Phosphines)." *Inorg. Chem.*, 14 (9): 2286, 1975.
105. LARI, M.; MARTÍNEZ-ALONSO, M.; BUSTO, N.; MANZANO, B. R.; RODRÍGUEZ, A. M.; ACUÑA, M. I.; DOMÍNGUEZ, F.; ALBASANZ, J. L.; LEAL, J. M.; ESPINO, G.; & GARCÍA, B. "Strong Influence of Ancillary Ligands Containing Benzothiazole or Benzimidazole Rings on Cytotoxicity and Photoactivation of Ru(II) Arene Complexes." *Inorg. Chem.*, 57 (22): 14322, 2018.
106. DAS, B. K.; & CHAKRAVARTY, A. R. "Diruthenium(III) Compounds,  $Ru_2O(O_2CAr)_2(MeCN)_4(PPh_3)_2(ClO_4)_2 \cdot nH_2O$  and  $Ru_2O(O_2CAr)_4(PPh_3)_2$ , with an  $\{Ru_2(\mu-O)(\mu-O_2CAr)_2\}^{2+}$  Core as Model Systems for the Diiron Centers in Hemerythrin." *Inorg. Chem.*, 29 (11): 2078, 1990.
107. DRAKE, J. L.; MANNA, C. M.; & BYERS, J. A. "Enhanced Carbon Dioxide Hydrogenation Facilitated by Catalytic Quantities of Bicarbonate and Other Inorganic Salts." *Organometallics*, 32 (23): 6891, 2013.
108. NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.*, 6a ed. Hoboken, John Wiley & Sons, 2008.
109. HONORATO, J.; COLINA-VEGAS, L.; CORREA, R. S.; GUEDES, A. P.

- M.; MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; ELLENA, J.; & BATISTA, A. A. "Esterification of the Free Carboxylic Group from the Lutidinic Acid Ligand as a Tool to Improve the Cytotoxicity of Ru(II) Complexes." *Inorg. Chem. Front.*, 6 (2): 376, 2019.
110. CZERWINSKA, I.; FAR, J.; KUNE, C.; LARRIBA-ANDALUZ, C.; DELAUDE, L.; & DE PAUW, E. "Structural Analysis of Ruthenium-Arene Complexes Using Ion Mobility Mass Spectrometry, Collision-Induced Dissociation, and DFT." *Dalton Trans.*, 45 (15): 6361, 2016.
111. GRAMINHA, A. E.; HONORATO, J.; DULCEY, L. L.; GODOY, L. R.; BARBOSA, M. F.; COMINETTI, M. R.; MENEZES, A. C.; & BATISTA, A. A. "Evaluation of the Biological Potential of Ruthenium(II) Complexes with Cinnamic Acid." *J. Inorg. Biochem.*, 206: 111021, 2020.
112. JAMALZADEH, L.; GHAFOORI, H.; SARIRI, R.; RABUTI, H.; NASIRZADE, J.; HASANI, H.; & AGHAMAALI, M. R. "Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *Avicenna J. Med. Biochem.*, 4 (1): 10, 2016.
113. CASSELLS, I.; STRINGER, T.; HUTTON, A. T.; PRINCE, S.; & SMITH, G. S. "Impact of Various Lipophilic Substituents on Ruthenium(II), Rhodium(III) and Iridium(III) Salicylaldimine-Based Complexes: Synthesis, in Vitro Cytotoxicity Studies and DNA Interactions." *J. Biol. Inorg. Chem.*, 23 (5): 763, 2018.
114. GLANS, L.; EHNBOM, A.; DE KOCK, C.; MARTÍNEZ, A.; ESTRADA, J.; SMITH, P. J.; HAUKKA, M.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; & NORDLANDER, E. "Ruthenium(II) Arene Complexes with Chelating Chloroquine Analogue Ligands: Synthesis, Characterization and in Vitro Antimalarial Activity." *Dalton Trans.*, 41 (9): 2764, 2012.
115. FONTEH, P.; ELKHADIR, A.; OMONDI, B.; GUZEI, I.; DARKWA, J.; & MEYER, D. "Impedance Technology Reveals Correlations between Cytotoxicity and Lipophilicity of Mono and Bimetallic Phosphine Complexes." *Biometals*, 28 (4): 653, 2015.
116. MCKEAGE, M. J.; BERNERS-PRICE, S. J.; GALETTIS, P.; BOWEN, R. J.; BROUWER, W.; DING, L.; ZHUANG, L.; & BAGULEY, B. C. "Role of Lipophilicity in Determining Cellular Uptake and Antitumour Activity of Gold Phosphine Complexes." *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 46 (5): 343, 2000.
117. MUÑOZ-OSSES, M.; SIEGMUND, D.; GÓMEZ, A.; GODOY, F.; FIERRO, A.; LLANOS, L.; ARAVENA, D.; & METZLER-NOLTE, N. "Influence of the Substituent on the Phosphine Ligand in Novel Rhenium(I) Aldehydes. Synthesis, Computational Studies and First Insights into the Antiproliferative Activity." *Dalton Trans.*, 47 (39): 13861, 2018.

118. ABBRO, L.; & DINI, L. "Common Morphological Features of Apoptotic Cell Blebs." *Ital. J. Zool.*, 70 (4): 297, 2003.
119. SYED ABDUL RAHMAN, S. N.; ABDUL WAHAB, N.; & ABD MALEK, S. N. "In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma Zedoaria*." *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2013: 257108, 2013.
120. RICHTER, V.; VOIT, F.; KIENLE, A.; & SCHNECKENBURGER, H. "Light Scattering Microscopy with Angular Resolution and Its Possible Application to Apoptosis." *J. Microsc.*, 257 (1): 1, 2015.
121. WEN, Y.; CHEN, Z.; LU, J.; ABLES, E.; SCEMAMA, J.-L.; YANG, L. V; LU, J. Q.; & HU, X.-H. "Quantitative Analysis and Comparison of 3D Morphology between Viable and Apoptotic MCF-7 Breast Cancer Cells and Characterization of Nuclear Fragmentation." *PLoS One*, 12 (9): e0184726, 2017.
122. RIBEIRO, G. H.; COLINA-VEGAS, L.; CLAVIJO, J. C. T.; ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Ru(II)/N-N/PPh<sub>3</sub> Complexes as Potential Anticancer Agents against MDA-MB-231 Cancer Cells (N-N = diimine or Diamine)." *J. Inorg. Biochem.*, 193: 70, 2019.
123. FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; & VAN BREE, C. "Clonogenic Assay of Cells in Vitro." *Nat. Protoc.*, 1 (5): 2315, 2006.
124. CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; & MACDONALD, I. C. "Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites." *Nat. Rev. Cancer*, 2 (8): 563, 2002.
125. VAN ZIJL, F.; KRUPITZA, G.; & MIKULITS, W. "Initial Steps of Metastasis: Cell Invasion and Endothelial Transmigration." *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, 728 (1-2): 23, 2011.
126. TUBIANA, M.; & KOSCIELNY, S. "On Clonogenic Tumour Cells and Metastasis-Forming Cells." *Nat. Rev. Cancer*, 8 (12): 990, 2008.
127. HUANG, X.; HALICKA, H. D.; TRAGANOS, F.; TANAKA, T.; KUROSE, A.; & DARZYNKIEWICZ, Z. "Cytometric Assessment of DNA Damage in Relation to Cell Cycle Phase and Apoptosis." *Cell Prolif.*, 38 (4): 223, 2005.
128. BLUNDEN, B. M.; LU, H.; & STENZEL, M. H. "Enhanced Delivery of the RAPTA-C Macromolecular Chemotherapeutic by Conjugation to Degradable Polymeric Micelles." *Biomacromolecules*, 14 (12): 4177, 2013.
129. EGGER, A. E.; RAPPEL, C.; JAKUPEC, M. A.; HARTINGER, C. G.; HEFFETER, P.; & KEPPLER, B. K. "Development of an Experimental Protocol for Uptake Studies of Metal Compounds in Adherent Tumor Cells." *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (1): 51, 2009.

130. CHEN, L. M.; PENG, F.; LI, G. D.; JIE, X. M.; CAI, K. R.; CAI, C.; ZHONG, Y.; ZENG, H.; LI, W.; ZHANG, Z.; & CHEN, J. C. "The Studies on the Cytotoxicity in Vitro, Cellular Uptake, Cell Cycle Arrest and Apoptosis-Inducing Properties of Ruthenium Methylimidazole Complex  $[\text{Ru}(\text{MeIm})_4(\text{p-Cpip})]^{2+}$ ." *J. Inorg. Biochem.*, 156: 64, 2016.
131. KANDIOLLER, W.; BALSANO, E.; MEIER, S. M.; JUNGWIRTH, U.; GÖSCHL, S.; ROLLER, A.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W.; KEPPLER, B. K.; & HARTINGER, C. G. "Organometallic Anticancer Complexes of Lapachol: Metal Centre-Dependent Formation of Reactive Oxygen Species and Correlation with Cytotoxicity." *Chem. Commun.*, 49 (32): 3348, 2013.
132. THAKURIA, R.; NATH, N. K.; & SAHA, B. K. "The Nature and Applications of  $\pi$ - $\pi$  Interactions: A Perspective." *Cryst. Growth Des.*, 19 (2): 523, 2019.
133. S.K. WOLFF, D.J. GRIMWOOD, J.J. MCKINNON, M.J. TURNER, D. JAYATILAKA, M. A. S. "CrystalExplorer." University of Western Australia, 2012.
134. SPACKMAN, M. A.; & JAYATILAKA, D. "Hirshfeld Surface Analysis." *CrystEngComm*, 11 (1): 19, 2009.
135. SPACKMAN, M. A.; & MCKINNON, J. J. "Fingerprinting Intermolecular Interactions in Molecular Crystals." *CrystEngComm*, 4 (66): 378, 2002.
136. GRACIANI, F. S.; & XIMENES, V. F. "Investigation of Human Albumin-Induced Circular Dichroism in Dansylglycine." *PLoS One*, 8 (10): e76849, 2013.
137. DITZINGER, F.; PRICE, D. J.; ILIE, A.-R.; KÖHL, N. J.; JANKOVIC, S.; TSAKIRIDOU, G.; ALEANDRI, S.; KALANTZI, L.; HOLM, R.; NAIR, A.; SAAL, C.; GRIFFIN, B.; & KUENTZ, M. "Lipophilicity and Hydrophobicity Considerations in Bio-Enabling Oral Formulations Approaches." *J. Pharm. Pharmacol.*, 71 (4): 464, 2019.
138. BENNETT, M. A.; & SMITH, A. K. "Arene Ruthenium(II) Complexes Formed by Dehydrogenation of Cyclohexadienes with Ruthenium(III) Trichloride." *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1 (2): 233, 1974.
139. BENNETT, M. A.; & ENNETT, J. P. "Synthesis and Spectroscopic Characterization of Dinuclear Mono( $\mu$ -Hydrido) Arene Complexes of Divalent Ruthenium." *Organometallics*, 3 (9): 1365, 1984.
140. BETANZOS-LARA, S.; NOVAKOVA, O.; DEETH, R. J.; PIZARRO, A. M.; CLARKSON, G. J.; LISKOVA, B.; BRABEC, V.; SADLER, P. J.; & HABTEMARIAM, A. "Bipyrimidine Ruthenium(II) Arene Complexes: Structure, Reactivity and Cytotoxicity." *J. Biol. Inorg. Chem.*, 17 (7): 1033, 2012.
141. KÜNDIG, E. P. "Synthesis of Transition Metal H<sub>6</sub>-Arene Complexes"

- Berlin, Springer, 2004. p. 3–20.
142. WALTON, J. W.; & WILKINSON, L. A. “ $\pi$ -Coordinated Arene Metal Complexes and Catalysis.” ACS Symp. Ser., 1311: 125, 2018.
143. SHVYDKIY, N. V.; & PEREKALIN, D. S. “Reactions of Arene Replacement in Transition Metal Complexes.” Coord. Chem. Rev., 411: 213238, 2020.
144. DOUGAN, S. J.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; PARSONS, S.; & SADLER, P. J. “Phenylazo-Pyridine and Phenylazo-Pyrazole Chlorido Ruthenium(II) Arene Complexes: Arene Loss, Aquation, and Cancer Cell Cytotoxicity.” Inorg. Chem., 45 (26): 10882, 2006.
145. BRATSOS, I.; ALESSIO, E.; FELLAY, C.; LAURENCZY, G.; BISCHOF, S. M.; PERIANA, R. A.; BRATSOS, I.; & ALESSIO, E. “Ruthenium Complexes.” IN: Inorganic Syntheses. RAUCHFUSS, T. B. (Ed.). John Wiley & Sons, 2010. Vol. 35, p. 148–163.
146. STEPHENSON, T. A.; & WILKINSON, G. “New Complexes of Ruthenium (II) and (III) with Triphenylphosphine, Triphenylarsine, Trichlorostannate, Pyridine and Other Ligands.” J. Inorg. Nucl. Chem., 28 (4): 945, 1966.
147. RILEY, D. P.; THOMPSON, M. R.; & LYON, J. “Isolation and Characterization of a Dimeric Ruthenium(II) Complex. an Intermediate in the Ruthenium-Catalyzed Oxygen Oxidation of Thioethers to Sulfoxides.” J. Coord. Chem., 19 (1–3): 49, 1988.
148. STRAUB, B. F. “Organotransition Metal Chemistry. From Bonding to Catalysis.” Angew. Chemie Int. Ed., 49 (42): 7622, 2010.
149. CHAQUIN, P.; CANAC, Y.; LEPETIT, C.; ZARGARIAN, D.; & CHAUVIN, R. “Estimating Local Bonding/Antibonding Character of Canonical Molecular Orbitals from Their Energy Derivatives. The Case of Coordinating Lone Pair Orbitals.” Int. J. Quantum Chem., 116 (17): 1285, 2016.
150. KURZWERNHART, A.; KANDIOLLER, W.; BÄCHLER, S.; BARTEL, C.; MARTIC, S.; BUCZKOWSKA, M.; MÜHLGASSNER, G.; JAKUPEC, M. A.; KRAATZ, H.-B.; BEDNARSKI, P. J.; ARION, V. B.; MARKO, D.; KEPPLER, B. K.; & HARTINGER, C. G. “Structure–Activity Relationships of Targeted Ru II ( $\eta^6$ -*p*-Cymene) Anticancer Complexes with Flavonol-Derived Ligands.” J. Med. Chem., 55 (23): 10512, 2012.
151. CAMPBELL, J. J.; HUSMANN, A.; HUME, R. D.; WATSON, C. J.; & CAMERON, R. E. “Development of Three-Dimensional Collagen Scaffolds with Controlled Architecture for Cell Migration Studies Using Breast Cancer Cell Lines.” Biomaterials, 114: 34, 2017.
152. MUNSHI, A.; HOBBS, M.; & MEYN, R. E. “Clonogenic Cell Survival

- Assay.” IN: Chemosensitivity. New Jersey, Humana Press, 2005. p. 021–028.
153. MJOS, K. D.; & ORVIG, C. “Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry.” *Chem Rev*, 114 (8): 4540, 2014.
154. JOVANOVIĆ, K. K.; TANIC, M.; IVANOVIĆ, I.; GLIGORIJEVIĆ, N.; DOJCINOVIĆ, B. P.; & RADULOVIĆ, S. “Cell Cycle, Apoptosis, Cellular Uptake and Whole-Transcriptome Microarray Gene Expression Analysis of HeLa Cells Treated with a Ruthenium(II)-Arene Complex with an Isoquinoline-3-Carboxylic Acid Ligand.” *J Inorg Biochem*, 163: 362, 2016.
155. MALUMBRES, M.; & BARBACID, M. “Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm.” *Nat Rev Cancer*, 9 (3): 153, 2009.
156. KHODJAKOV, A.; & RIEDER, C. L. “The Nature of Cell-Cycle Checkpoints: Facts and Fallacies.” *J. Biol.*, 8 (10): 88, 2009.
157. STAKER, B. L.; HJERRILD, K.; FEESE, M. D.; BEHNKE, C. A.; BURGIN, A. B.; & STEWART, L. “The Mechanism of Topoisomerase I Poisoning by a Camptothecin Analog.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (24): 15387, 2002.
158. POMMIER, Y. “Topoisomerase I Inhibitors: Camptothecins and Beyond.” *Nat. Rev. Cancer*, 6 (10): 789, 2006.
159. BARRA, C. V.; & NETTO, A. V. G. “Antitumour Complexes and DNA Interactions and Their Tools of Analysis: An Approach to Metalointercalators.” *Rev. Virtual Química*, 7 (6): 1998, 2015.
160. GKIONIS, K.; PLATTS, J. A.; & HILL, J. G. “Insights into DNA Binding of Ruthenium Arene Complexes: Role of Hydrogen Bonding and Pi Stacking.” *Inorg Chem*, 47 (9): 3893, 2008.
161. RILAK SIMOVIĆ, A.; MASNIKOSA, R.; BRATSOS, I.; & ALESSIO, E. “Chemistry and Reactivity of Ruthenium(II) Complexes: DNA/Protein Binding Mode and Anticancer Activity Are Related to the Complex Structure.” *Coord. Chem. Rev.*, 398: 113011, 2019.
162. SATHYADEVI, P.; KRISHNAMOORTHY, P.; BUTORAC, R. R.; COWLEY, A. H.; BHUVANESH, N. S.; & DHARMARAJ, N. “Effect of Substitution and Planarity of the Ligand on DNA/BSA Interaction, Free Radical Scavenging and Cytotoxicity of Diamagnetic Ni(II) Complexes: A Systematic Investigation.” *Dalton Trans*, 40 (38): 9690, 2011.
163. PAGES, B. J.; ANG, D. L.; WRIGHT, E. P.; & ALDRICH-WRIGHT, J. R. “Metal Complex Interactions with DNA.” *Dalton Trans*, 44 (8): 3505, 2015.
164. XING, Y. P.; LIU, C.; ZHOU, X. H.; & SHI, H. C. “Label-Free Detection of Kanamycin Based on a G-Quadruplex DNA Aptamer-Based Fluorescent Intercalator Displacement Assay.” *Sci Rep*, 5: 8125, 2015.

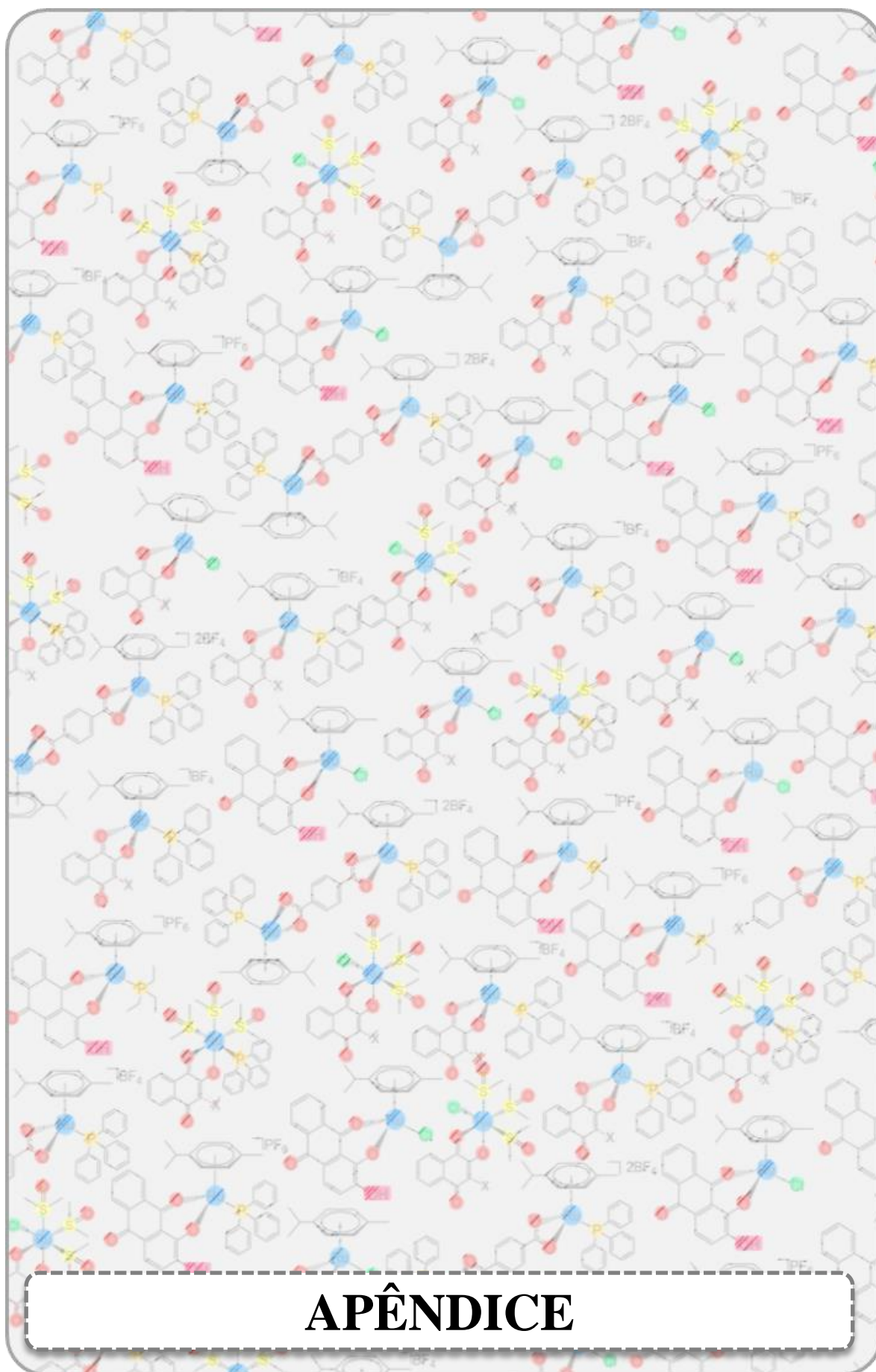
165. MONCHAUD, D.; ALLAIN, C.; & TEULADE-FICHO, M. P. "Development of a Fluorescent Intercalator Displacement Assay (G4-FID) for Establishing Quadruplex-DNA Affinity and Selectivity of Putative Ligands." *Bioorg Med Chem Lett*, 16 (18): 4842, 2006.
166. SHI, J.-H.; CHEN, J.; WANG, J.; & ZHU, Y.-Y. "Binding Interaction between Sorafenib and Calf Thymus DNA: Spectroscopic Methodology, Viscosity Measurement and Molecular Docking." *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 136: 443, 2015.
167. TANG, B.; SHEN, F.; WAN, D.; GUO, B. H.; WANG, Y. J.; YI, Q. Y.; & LIU, Y. J. "DNA-Binding, Molecular Docking Studies and Biological Activity Studies of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes." *RSC Adv.*, 7 (56): 34945, 2017.
168. GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M. A.; & PALANIANDAVAR, M. "New Ruthenium(II) Arene Complexes of Anthracenyl-Appended Diazacycloalkanes: Effect of Ligand Intercalation and Hydrophobicity on DNA and Protein Binding and Cleavage and Cytotoxicity." *Dalton Trans.*, 43 (3): 1203, 2014.
169. PAGLIAI, M.; OSTICIOLI, I.; NEVIN, A.; SIANO, S.; CARDINI, G.; & SCHETTINO, V. "DFT Calculations of the IR and Raman Spectra of Anthraquinone Dyes and Lakes." *J. Raman Spectrosc.*, 49 (4): 668, 2018.
170. CYRAŃSKI, M. K.; JAMRÓZ, M. H.; RYGULA, A.; DOBROWOLSKI, J. C.; DOBRZYCKI, Ł.; & BARANSKA, M. "On Two Alizarin Polymorphs." *CrystEngComm*, 14 (10): 3667, 2012.
171. WANG, F.; CHEN, H.; PARKINSON, J. A.; MURDOCH, P. del S.; & SADLER, P. J. "Reactions of a Ruthenium(II) Arene Antitumor Complex with Cysteine and Methionine." *Inorg. Chem.*, 41 (17): 4509, 2002.
172. WANG, F.; XU, J.; HABTEMARIAM, A.; BELLA, J.; & SADLER, P. J. "Competition between Glutathione and Guanine for a Ruthenium(II) Arene Anticancer Complex: Detection of a Sulfenato Intermediate." *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (50): 17734, 2005.
173. ARCHIBALD, S. J.; & SMITH, R. "Protein-Binding Metal Complexes: Noncovalent and Coordinative Interactions." IN: *Comprehensive Inorganic Chemistry II*. Elsevier, 2013. p. 661–682.
174. BEŠKER, N.; COLETTI, C.; MARRONE, A.; & RE, N. "Binding of Antitumor Ruthenium Complexes to DNA and Proteins: A Theoretical Approach." *J. Phys. Chem. B*, 111 (33): 9955, 2007.
175. SANGSEFEDI, S. A.; SHARIFI, S.; REZAION, H. R. M.; & AZARPOUR, A. "Fluorescence and Nonlinear Optical Properties of Alizarin Red S in Solvents and Droplet." *J. Fluoresc.*, 28 (3): 815, 2018.



176. JEN, M.; LEE, S.; JEON, K.; HUSSAIN, S.; & PANG, Y. “Ultrafast Intramolecular Proton Transfer of Alizarin Investigated by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy.” *J. Phys. Chem. B*, 121 (16): 4129, 2017.
177. RAHMAN, D. S.; CHATTERJEE, H.; & GHOSH, S. K. “Excess Surface Energy at the Tips of Gold Nanospikes: From Experiment to Modeling.” *J. Phys. Chem. C*, 119 (25): 14326, 2015.
178. MARCONDES, M. E. R.; TOSCANO, V. G.; & WEISS, R. G. “Fluorescence Quenching of Substituted Anthracenes by Tris(Pentafluorophenyl)Phosphine.” *J. Photochem.*, 10 (6): 425, 1979.
179. VAUGHAN, J. C.; DEMPSEY, G. T.; SUN, E.; & ZHUANG, X. “Phosphine Quenching of Cyanine Dyes as a Versatile Tool for Fluorescence Microscopy.” *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (4): 1197, 2013.
180. LIANG, Z. Q.; LI, Y. X.; YANG, J. X.; REN, Y.; & TAO, X. T. “Suppression of Aggregation-Induced Fluorescence Quenching in Pyrene Derivatives: Photophysical Properties and Crystal Structures.” *Tetrahedron Lett.*, 52 (12): 1329, 2011.
181. WU, P. C.; CHEN, C. Y.; & CHANG, C. W. “The Fluorescence Quenching and Aggregation Induced Emission Behaviour of Silver Nanoclusters Labelled on Poly(Acrylic Acid-: Co -Maleic Acid).” *New J. Chem.*, 42 (5): 3459, 2018.
182. HUANG, Y.; XING, J.; GONG, Q.; CHEN, L. C.; LIU, G.; YAO, C.; WANG, Z.; ZHANG, H. L.; CHEN, Z.; & ZHANG, Q. “Reducing Aggregation Caused Quenching Effect through Co-Assembly of PAH Chromophores and Molecular Barriers.” *Nat. Commun.*, 10 (1): 1, 2019.
183. SADHU, K. K.; MIZUKAMI, S.; WATANABE, S.; & KIKUCHI, K. “Turn-on Fluorescence Switch Involving Aggregation and Elimination Processes for  $\beta$ -Lactamase-Tag.” *Chem. Commun.*, 46 (39): 7403, 2010.
184. SAVLA, R.; BROWNE, J.; PLASSAT, V.; WASAN, K. M.; & WASAN, E. K. “Review and Analysis of FDA Approved Drugs Using Lipid-Based Formulations.” IN: *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Taylor and Francis Ltd., 2017. p. 1743–1758.
185. CABRERA, M.; GOMEZ, N.; REMES LENICOV, F.; ECHEVERRÍA, E.; SHAYO, C.; MOGLIONI, A.; FERNÁNDEZ, N.; & DAVIO, C. “G<sub>2</sub>/M Cell Cycle Arrest and Tumor Selective Apoptosis of Acute Leukemia Cells by a Promising Benzophenone Thiosemicarbazone Compound.” *PLoS One*, 10 (9): e0136878, 2015.
186. PAN, Z.; ZHANG, X.; YU, P.; CHEN, X.; LU, P.; LI, M.; LIU, X.; LI, Z.; WEI, F.; WANG, K.; ZHENG, Q.; & LI, D. “Cinobufagin Induces Cell Cycle Arrest at the G<sub>2</sub>/M Phase and Promotes Apoptosis in Malignant Melanoma Cells.” *Front. Oncol.*, 9: 853, 2019.

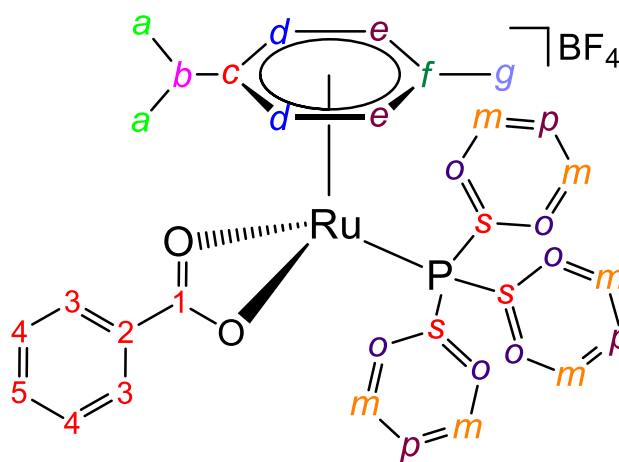
187. YIN, H.; JIANG, M.; PENG, X.; CUI, H.; ZHOU, Y.; HE, M.; ZUO, Z.; OUYANG, P.; FAN, J.; & FANG, J. "The Molecular Mechanism of G<sub>2</sub>/M Cell Cycle Arrest Induced by AFB<sub>1</sub> in the Jejunum." *Oncotarget*, 7 (24): 35592, 2016.
188. WANG, J. Q.; ZHANG, P. Y.; QIAN, C.; HOU, X. J.; JI, L. N.; & CHAO, H. "Mitochondria Are the Primary Target in the Induction of Apoptosis by Chiral Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes in Cancer Cells." *J. Biol. Inorg. Chem.*, 19 (3): 335, 2014.
189. OLDFIELD, S. P.; HALL, M. D.; & PLATTS, J. A. "Calculation of Lipophilicity of a Large, Diverse Dataset of Anticancer Platinum Complexes and the Relation to Cellular Uptake." *J. Med. Chem.*, 50 (21): 5227, 2007.
190. PUCKETT, C. A.; & BARTON, J. K. "Methods to Explore Cellular Uptake of Ruthenium Complexes." *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (1): 46, 2007.
191. QIAN, C.; WANG, J. Q.; SONG, C. L.; WANG, L. L.; JI, L. N.; & CHAO, H. "The Induction of Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells by Ruthenium(II) Asymmetric Complexes." *Metallomics*, 5 (7): 844, 2013.
192. MEREDITH, J. E.; FAZELI, B.; & SCHWARTZ, M. A. "The Extracellular Matrix as a Cell Survival Factor." *Mol. Biol. Cell*, 4 (9): 953, 1993.
193. SHAKED, G. M.; KUMMER, M. P.; LU, D. C.; GALVAN, V.; BREDESEN, D. E.; KOO, E. H.; SHAKED, G. M.; KUMMER, M. P.; LU, D. C.; GALVAN, V.; BREDESEN, D. E.; & KOO, E. H. "A $\beta$  Induces Cell Death by Direct Interaction with Its Cognate Extracellular Domain on APP (APP 597–624)." *FASEB J.*, 20 (8): 1254, 2006.
194. IRYO, Y.; MATSUOKA, M.; WISPRIYONO, B.; SUGIURA, T.; & IGISU, H. "Involvement of the Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) Pathway in the Induction of Apoptosis by Cadmium Chloride in CCRF-CEM Cells." *Biochem. Pharmacol.*, 60 (12): 1875, 2000.
195. GILL, M. R.; & THOMAS, J. A. "Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes and DNA—from Structural Probes to Cellular Imaging and Therapeutics." *Chem. Soc. Rev.*, 41 (8): 3179, 2012.
196. YU, Q.; LIU, Y.; XU, L.; ZHENG, C.; LE, F.; QIN, X.; LIU, Y.; & LIU, J. "Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes: Cellular Uptake, Cell Image and Apoptosis of HeLa Cancer Cells Induced by Double Targets." *Eur. J. Med. Chem.*, 82: 82, 2014.
197. ZHANG, P.; CHIU, C. K. C.; HUANG, H.; LAM, Y. P. Y.; HABTEMARIAM, A.; MALCOMSON, T.; PATERSON, M. J.; CLARKSON, G. J.; O'CONNOR, P. B.; CHAO, H.; & SADLER, P. J. "Organoiridium Photosensitizers Induce Specific Oxidative Attack on Proteins within Cancer Cells." *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 56 (47): 14898,

- 2017.
198. LIU, X.; & HUMMON, A. B. "Chemical Imaging of Platinum-Based Drugs and Their Metabolites." *Sci. Rep.*, 6 (1): 38507, 2016.
199. GOVINDARAJU, S.; RENGARAJ, A.; ARIVAZHAGAN, R.; HUH, Y. S.; & YUN, K. "Curcumin-Conjugated Gold Clusters for Bioimaging and Anticancer Applications." *Bioconjug. Chem.*, 29 (2): 363, 2018.
200. MA, W.; GUO, L.; TIAN, Z.; ZHANG, S.; HE, X.; LI, J.; YANG, Y.; & LIU, Z. "Rhodamine-Modified Fluorescent Half-Sandwich Iridium and Ruthenium Complexes: Potential Application as Bioimaging and Anticancer Agents." *Dalton Trans.*, 48 (15): 4788, 2019.
201. ZOU, T.; LUM, C. T.; CHUI, S. S. Y.; & CHE, C. M. "Gold(III) Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene Ligands: Thiol 'Switch-on' Fluorescent Probes and Anti-Cancer Agents." *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 52 (10): 2930, 2013.
202. MA, W.; ZHANG, S.; TIAN, Z.; XU, Z.; ZHANG, Y.; XIA, X.; CHEN, X.; & LIU, Z. "Potential Anticancer Agent for Selective Damage to Mitochondria or Lysosomes: Naphthalimide-Modified Fluorescent Biomarker Half-Sandwich Iridium (III) and Ruthenium (II) Complexes." *Eur. J. Med. Chem.*, 181: 111599, 2019.

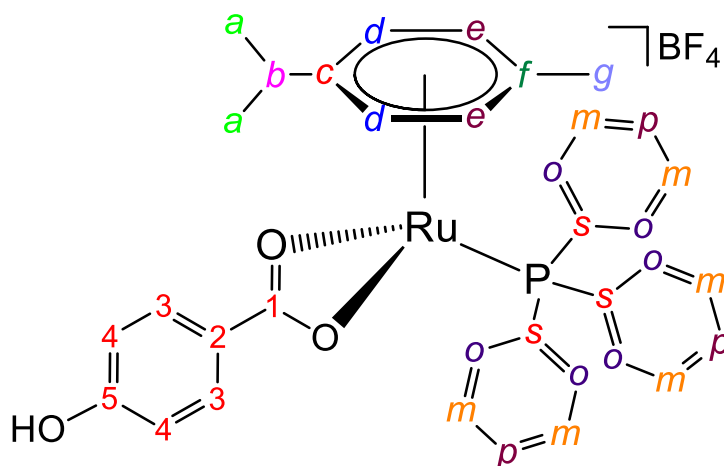


**MATERIAL SUPLEMENTAR - SÉRIE A**

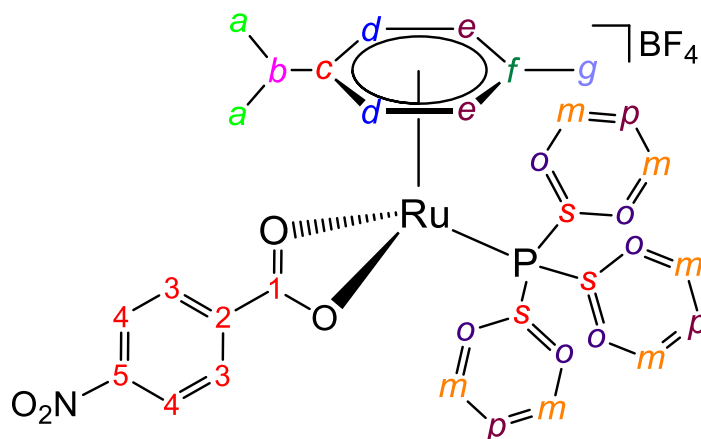
**[Ru( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)(L<sub>1</sub>)]BF<sub>4</sub> (A1)** - Rendimento: 78%; Anal. Calc. for C<sub>35</sub>H<sub>34</sub>B<sub>1</sub>F<sub>4</sub>O<sub>2</sub>P<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 59.55 (59.59); H, 4.81 (4.86) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub>OH) 25.2; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1602 ( $\nu_{\text{asy}}\text{COO}^-$ ); 1481 ( $\nu_{\text{sym}}\text{COO}^-$ ); 1436 ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ); 1064 ( $\nu\text{P}-\text{CH}$  and  $\nu\text{B}-\text{F}$ ); 526 ( $\nu\text{Ru}-\text{P}$ ); 460 ( $\nu\text{Ru}-\text{O}$ ). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-(L)-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)+(DHB)]<sup>+</sup>: 651.157 m/z, [M-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)]<sup>+</sup>: 619.080 m/z, [M-L-H-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)]<sup>+</sup>: 497.034 m/z. <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) NMR (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 35.59 (s). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 7.46-7.36 (16H, m, 15H – *o*, *m*, *p* + 1H - 5); 7.31 (2H, d, 3); 7.26 (CDCl<sub>3</sub>); 7.13 (2H, t, 4); 5.80 (2H, d, *d*); 5.70 (2H, d, *e*); 2.56 (1H, m, *b*); 1.99 (3H, s, *g*); 1.25 (6H, d, *a*). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 170.65 (1C, *l*); 184.22, 134.60-127.55 (*o*, *m*, *p*); 106.23, 95.85, 86.89 (2-4); 31.76 (*b*); 22.24 (*a*), 18.48 (*g*).



**[Ru( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)(L<sub>2</sub>)]BF<sub>4</sub> (A2)** - Rendimento: 105 mg 83%; Anal. Calc. for C<sub>35</sub>H<sub>34</sub>B<sub>1</sub>F<sub>4</sub>O<sub>3</sub>P<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 58.49 (58.26); H, 4.97 (4.75) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub>OH) 22.5. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 3410 ( $\nu$ OH); 1602 ( $\nu_{\text{asy}}$ COO<sup>-</sup>); 1479 ( $\nu_{\text{sym}}$ COO<sup>-</sup>); 1436 ( $\nu$ C=C); 1087 ( $\nu$ P-CH e  $\nu$ B-F); 526 ( $\nu$ Ru-P); 453 ( $\nu$ Ru-O). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-(L)-(BF<sub>4</sub>)<sup>-</sup>+(DHB)]<sup>+</sup>: 651.334 m/z, [M-(BF<sub>4</sub>)<sup>-</sup>]<sup>+</sup>: 635.263 m/z, [M-L-H-(BF<sub>4</sub>)<sup>-</sup>]<sup>+</sup>: 497.058 m/z. <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) NMR (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 35.17 (s). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 7.43-7.37 (15H, m, *o*, *m*, *p*); 7.26 (CDCl<sub>3</sub>); 7.12 (2H, d, 3); 6.61 (2H, d, 4); 5.67 (2H, d, *d*); 5.56 (2H, *e*); 2.53 (1H, m, *b*); 1.96 (3H, s, *g*); 1.21 (6H, d, *a*). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 184.76 (*I*); 162.02 (5); 134.59-114.92 (3-5, *o*, *m*, *p*); 106.16, 95.57, 86.03 (*d*, *e*); 31.70 (*b*); 22.25 (*a*) and 18.42 (*g*).



**[Ru( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)(L<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (A3)** - Rendimento: 110 mg (83%). Anal. Calc. for C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>B<sub>1</sub>F<sub>4</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>P<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 55.56 (56.01); H, 4.94 (4.43); N, 1.89 (1.87) %. Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub>OH) 12.4. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1627 ( $\nu_{\text{asy}}\text{COO}^-$ ); 1523 ( $\nu_{\text{asy}}\text{NOO}$ ); 1477 ( $\nu_{\text{sym}}\text{COO}^-$ ); 1438 ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ); 1384 ( $\nu_{\text{sym}}\text{NOO}$ ); 1087 ( $\nu\text{P}-\text{CH}$  and  $\nu\text{B}-\text{F}$ ); 524 ( $\nu\text{Ru}-\text{P}$ ); 460 ( $\nu\text{Ru}-\text{O}$ ). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-(L)-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)+(DHB)]<sup>+</sup>: [M-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)]<sup>+</sup>: 664.160 m/z, 651.145 m/z, [M-L-H-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)]<sup>+</sup>: 497.034 m/z. <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) NMR (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 35.73 (s). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 7.97 (2H, d, *f*); 7.49 (2H, d, *e*); 7.42 (15H, m, *o*, *m*, *p*); 7.26 (CDCl<sub>3</sub>); 5.80 (2H, d, *d*); 5.72 (2H, *e*); 2.54 (1H, m, *b*); 2.01 (3H, s, *g*); 1.24 (6H, d, *a*). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 181.37 (*l*); 150.38 (*5*); 134.59-122.83 (*2-4*, *o*, *m*, *p*); 105.69, 95.68, 87.02 (*d*, *e*); 31.77 (*b*); 22.19 (*g*) and 18.52 (*a*).



**{[Ru( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]( $\mu$ -L<sub>4</sub>)}(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (A4)** - Rendimento: 80 mg (63%). Anal. Calc. for [C<sub>64</sub>H<sub>62</sub>B<sub>2</sub>F<sub>8</sub>O<sub>4</sub>P<sub>2</sub>Ru<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O: exp. (calc) C, 56.79 (56.90); H, 4.43 (4.78) %. Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub>OH) 50.3. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1608 ( $\nu_{\text{asy}}\text{COO}^-$ ); 1471 ( $\nu_{\text{sym}}\text{COO}^-$ ); 1525; 1427 ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ); 1047 ( $\nu\text{P}-\text{CH}$  and  $\nu\text{B}-\text{F}$ ); 516 ( $\nu\text{Ru}-\text{P}$ ); 449 ( $\nu\text{Ru}-\text{O}$ ). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) {M-[Ru(*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-2(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)+H}<sup>+</sup>: 664.171 m/z, [M-(L)-(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)+(DHB)]<sup>+</sup>: 651.157 m/z, [M-L-H(BF<sub>4</sub><sup>-</sup>)]<sup>+</sup>: 497.012 m/z. <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) NMR (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 35.42 (s). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 7.42-7.37 (30H, m, *o*, *m*, *p*); 7.08 (4H, d, 3, 4); 7.26 (CDCl<sub>3</sub>); 5.72 (4H, m, *d*, *e*); 2.53 (2H, m, *c*); 2.02 (6H, s, *g*); 1.22 (12H, d, *a*). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 182.65 (*l*); 134.60-127.14 (3, 4, *o*, *m*, *p*); 105.49, 95.79, 87.16 (*d*, *e*); 31.74 (*b*); 22.25 (*a*) and 18.60 (*g*).

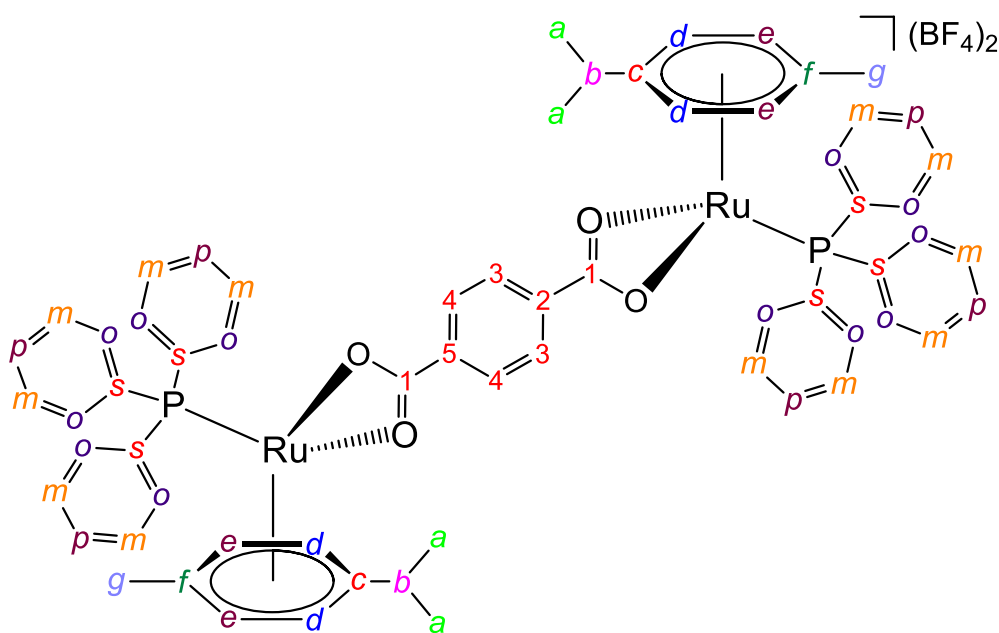
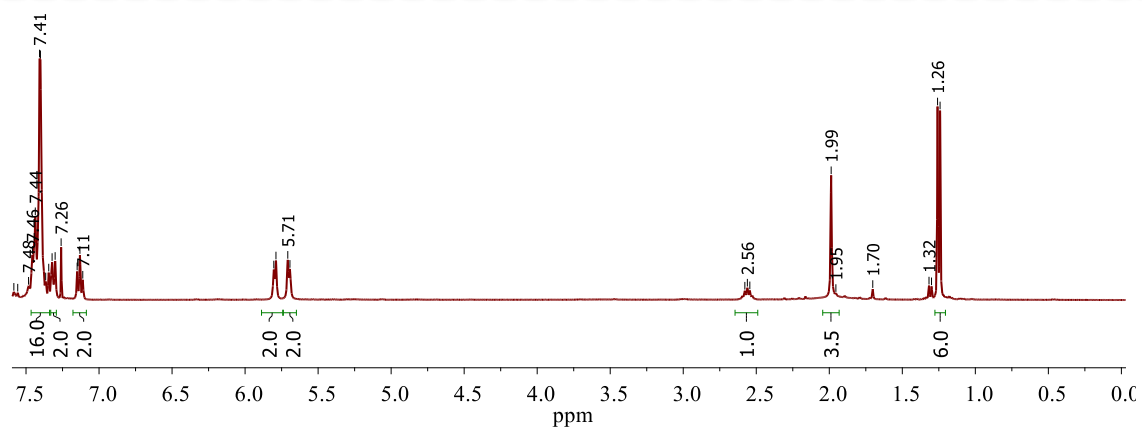
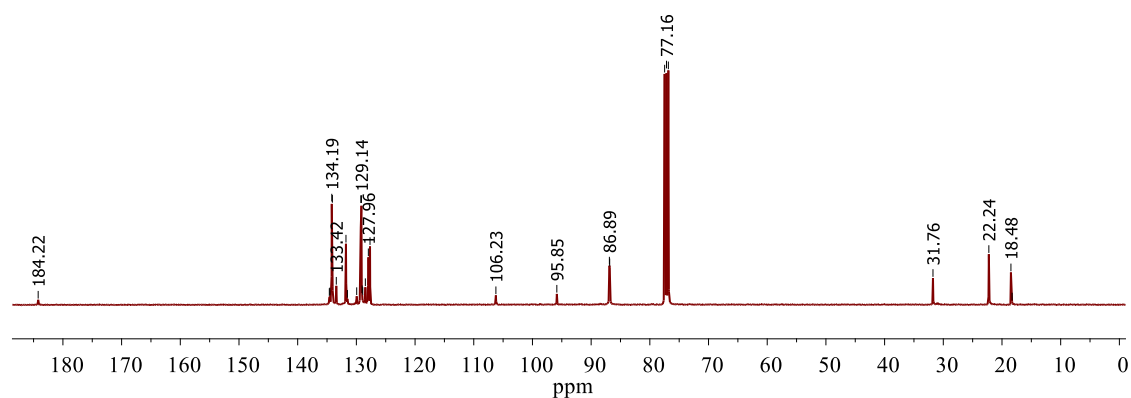
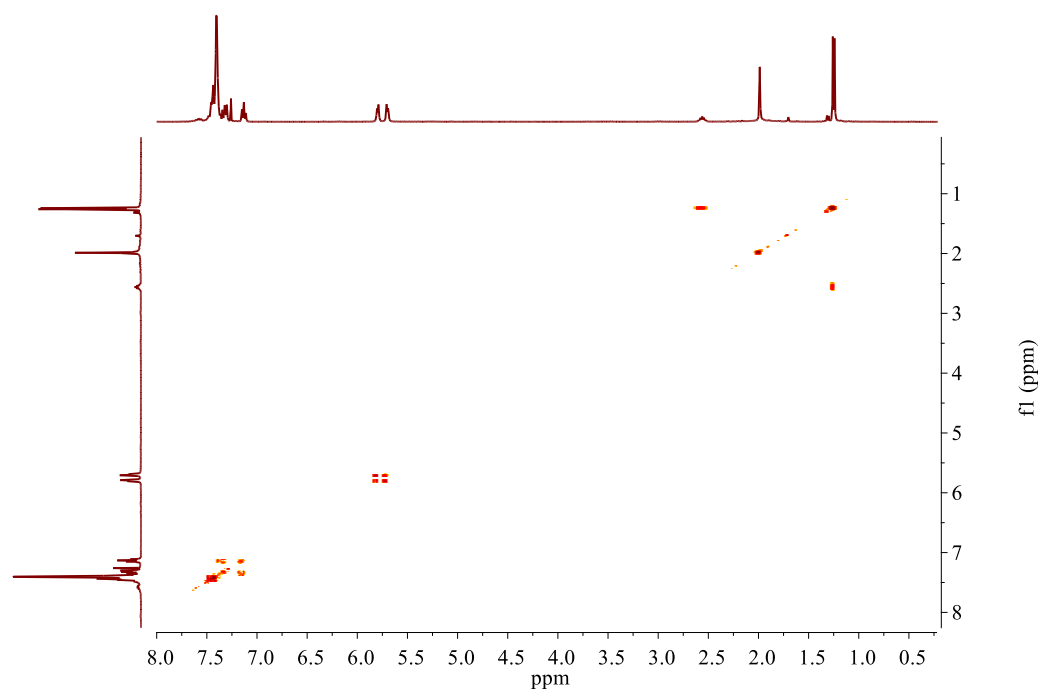




Tabela A1 - Dados de cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **A1**, **A3**, **A4** and **A5**.

Complex	A1	A2	A4	A5
Código CCDC	1974084	1974085	1974086	1974087
Fórmula Empírica	C <sub>35</sub> H <sub>34</sub> F <sub>6</sub> O <sub>2</sub> P <sub>2</sub> Ru	C <sub>35</sub> H <sub>33</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> P <sub>2</sub> Ru	C <sub>64</sub> H <sub>62</sub> B <sub>2</sub> F <sub>8</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> Ru <sub>2</sub>	C <sub>65</sub> H <sub>56</sub> O <sub>10</sub> P <sub>2</sub> Ru <sub>2</sub>
Massa molecular	763,63	808,63	1332,83	1261,17
Temperatura/K	296,15	293(2)	293(2)	296,15
Sistema Cristalino	triclinico	triclinico	triclinico	monoclinico
Gropo espacial	P-1	P-1	P-1	P2 <sub>1</sub>
a/Å	9,6509(2)	9,5957(5)	9,9988(6)	11,1522(2)
b/Å	14,2954(4)	13,3302(7)	10,6282(7)	20,9292(5)
c/Å	24,9771(7)	14,1639(7)	16,7930(13)	12,4956(3)
α/°	94,4270(10)	84,313(4)	74,555(6)	90
β/°	100,8480(10)	73,022(5)	75,417(6)	103,3820(10)
γ/°	93,1420(10)	80,358(4)	86,067(5)	90
Volume/Å <sup>3</sup>	3365,78(15)	1705,88(16)	1664,7(2)	2837,37(11)
Z	4	2	1	4
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1,507	1,574	1,329	1,476
μ/mm <sup>-1</sup>	0,625	0,626	0,566	0,649
F(000)	1552	820	678	1288
Tamanho do cristal / mm <sup>3</sup>	0,1 × 0,1 × 0,1	0,374 × 0,155 × 0,109	0,451 × 0,344 × 0,154	0,191 × 0,122 × 0,111
Radiação	MoKα (λ = 0,71073)	MoKα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)	MoKα (λ = 0,71073)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	2,864 á 53,538	5,816 á 51,5	5,188 á 51,496	4,228 á 54,862
Intervalos de índice	-12 ≤ h ≤ 10, -18 ≤ k ≤ 18, -31 ≤ l ≤ 31	-11 ≤ h ≤ 11, -16 ≤ k ≤ 16, -17 ≤ l ≤ 17	-12 ≤ h ≤ 12, -12 ≤ k ≤ 12, -20 ≤ l ≤ 20	-14 ≤ h ≤ 14, -26 ≤ k ≤ 27, -16 ≤ l ≤ 16
Reflecções coletadas	49514	34101	32664	25719
Reflexões independentes	14117 [R <sub>int</sub> = 0,0436, R <sub>sigma</sub> = 0,0396]	6536 [R <sub>int</sub> = 0,0501, R <sub>sigma</sub> = 0,0395]	6354 [R <sub>int</sub> = 0,0858, R <sub>sigma</sub> = 0,0501]	12687 [R <sub>int</sub> = 0,0299, R <sub>sigma</sub> = 0,0484]
Dados/restricções/parametros	14117/72/847	6536/44/481	6354/147/337	12687/4/717
Melhor ajuste de F <sup>2</sup>	1,024	1,125	1,082	1,087
Índices R finais [I ≥ 2σ (I)]	R <sub>1</sub> = 0,0337, wR <sub>2</sub> = 0,0804	R <sub>1</sub> = 0,0503, wR <sub>2</sub> = 0,1136	R <sub>1</sub> = 0,0951, wR <sub>2</sub> = 0,2432	R <sub>1</sub> = 0,0363, wR <sub>2</sub> = 0,0760
Índices R finais [todos os dados]	R <sub>1</sub> = 0,0438, wR <sub>2</sub> = 0,0864	R <sub>1</sub> = 0,0681, wR <sub>2</sub> = 0,1329	R <sub>1</sub> = 0,1018, wR <sub>2</sub> = 0,2504	R <sub>1</sub> = 0,0444, wR <sub>2</sub> = 0,0880
Maior diferença pico/vale / e Å <sup>-3</sup>	0,57/-0,35	0,95/-0,80	3,61/-1,86	0,50/-0,57
Parâmetro Flack				0,46(3)

FIGURA A1 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo A1 (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA A2 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo A1 (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA A3 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY obtido para o complexo A1 (CDCl<sub>3</sub>-d).

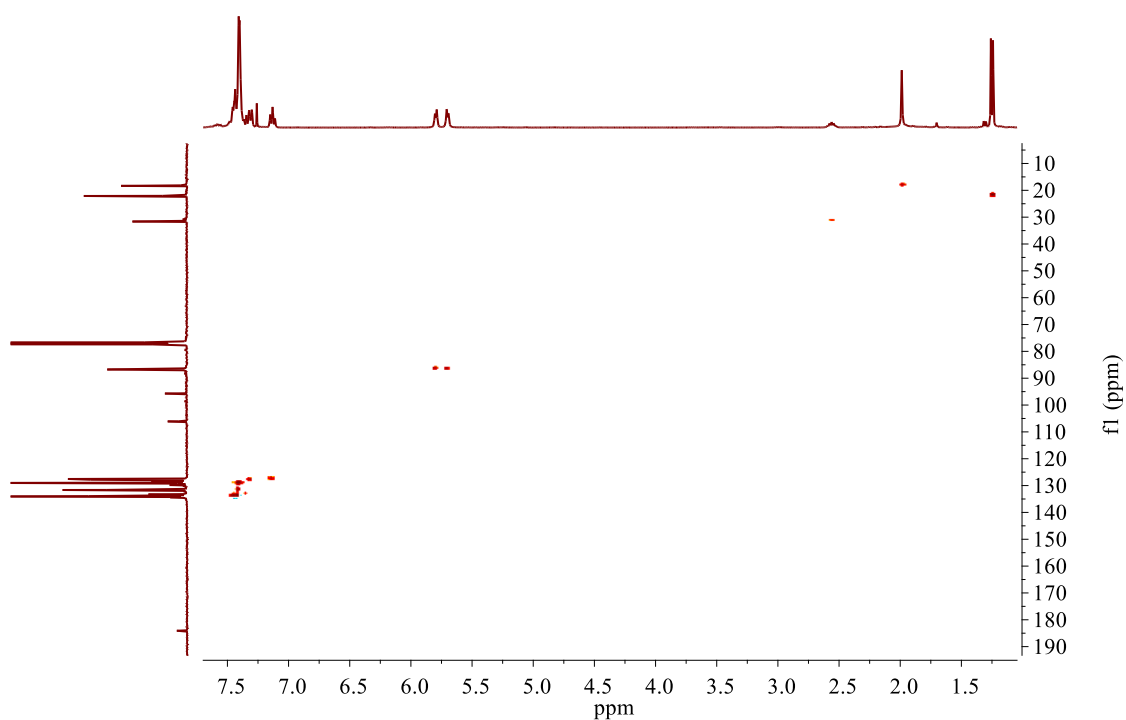


FIGURA A 4 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A1** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

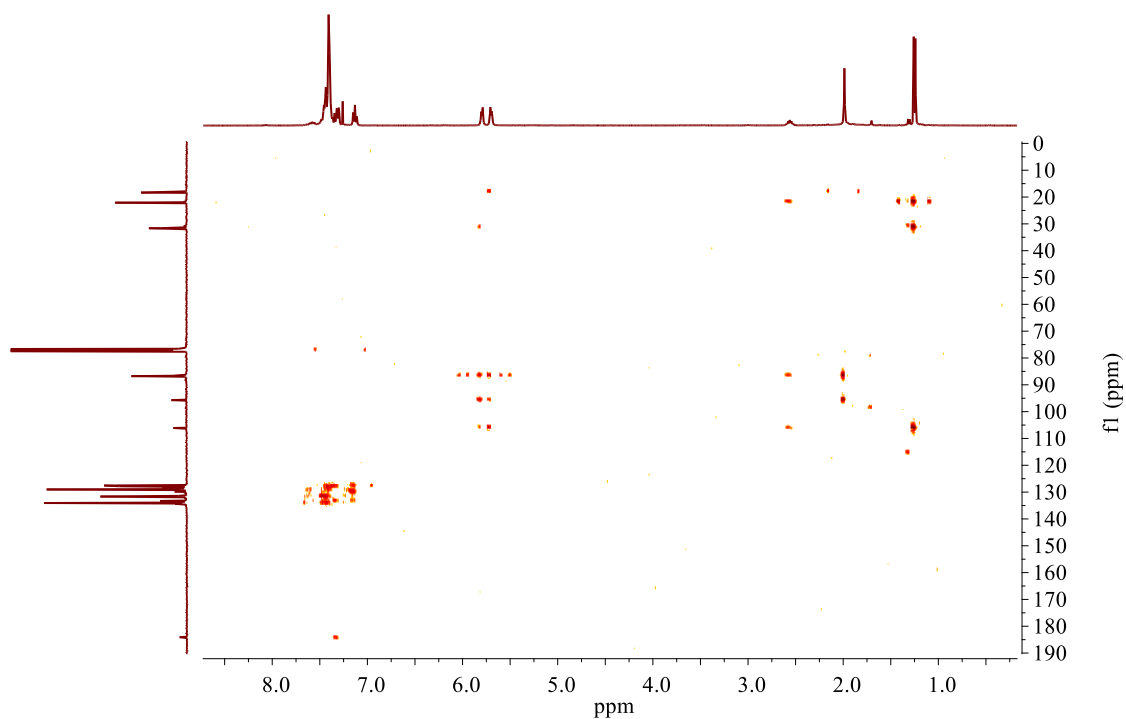
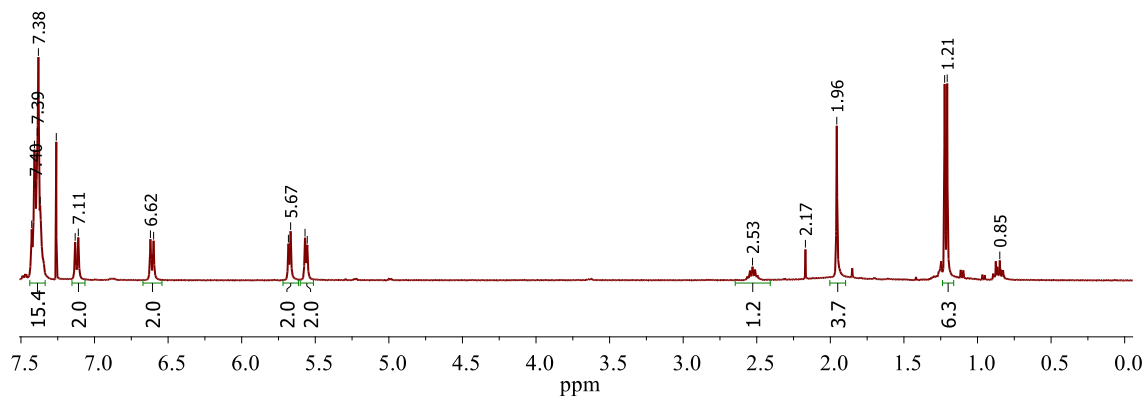
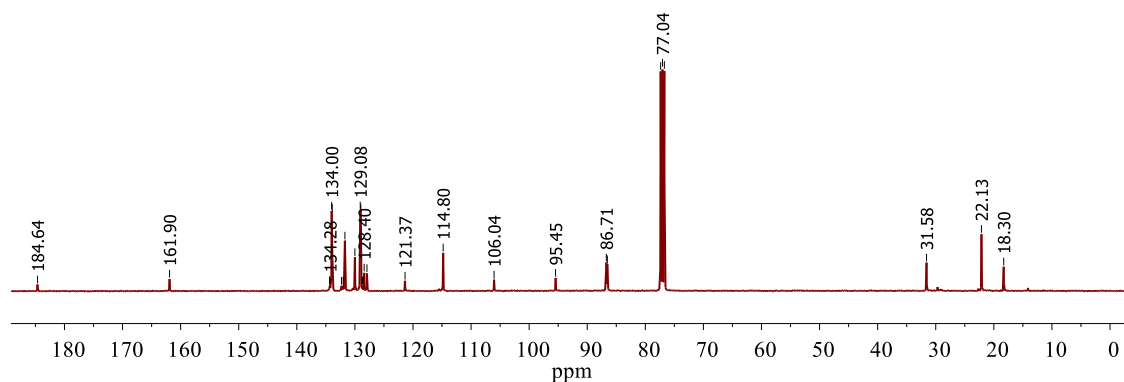
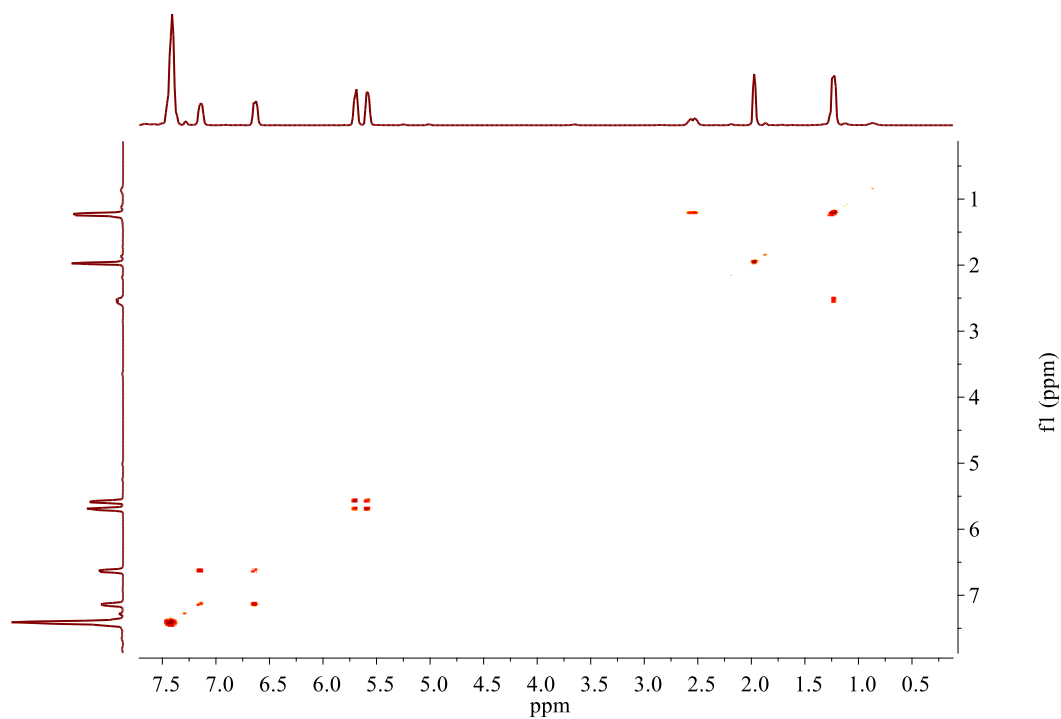


FIGURA A5 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **A1** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA A6 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **A2** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).FIGURA A7 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **A2** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).FIGURA A8 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **A2** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).

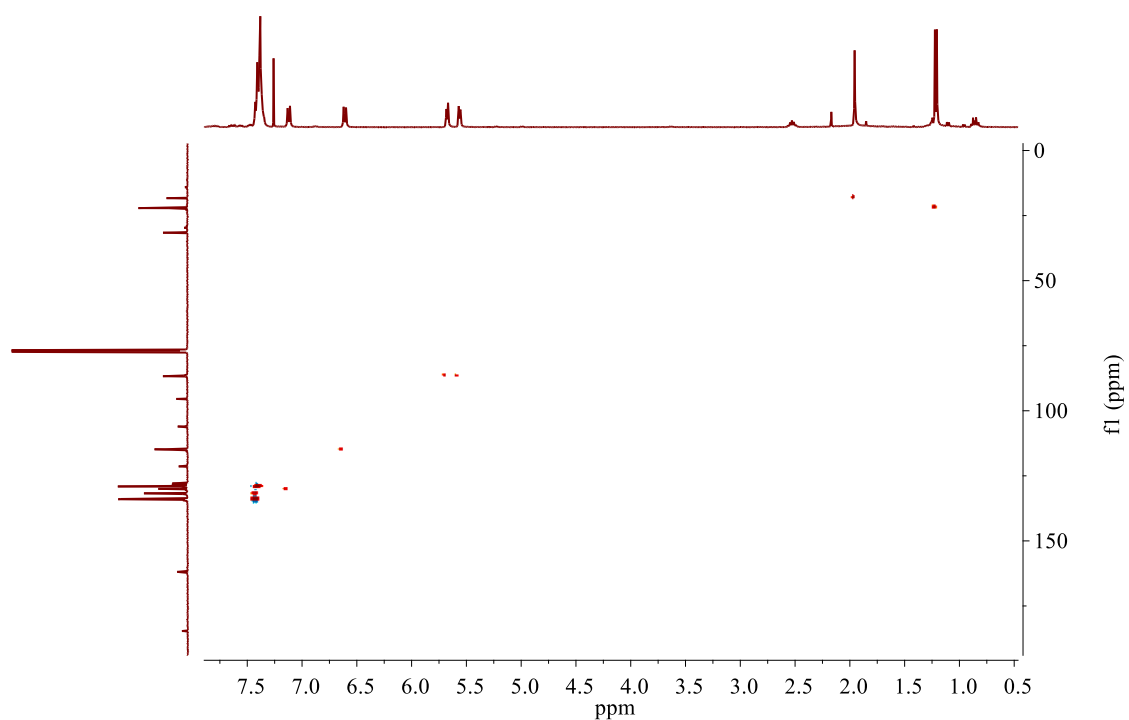


FIGURA A9 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A2** ( $\text{CDCl}_3$ - $d$ ).

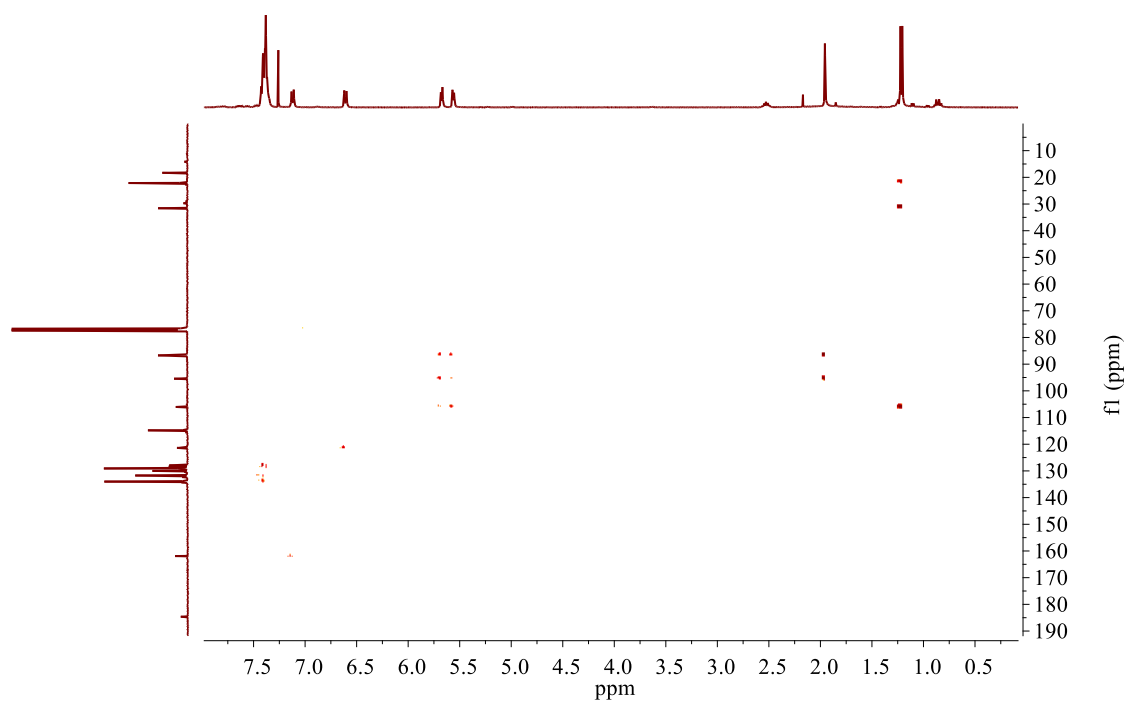
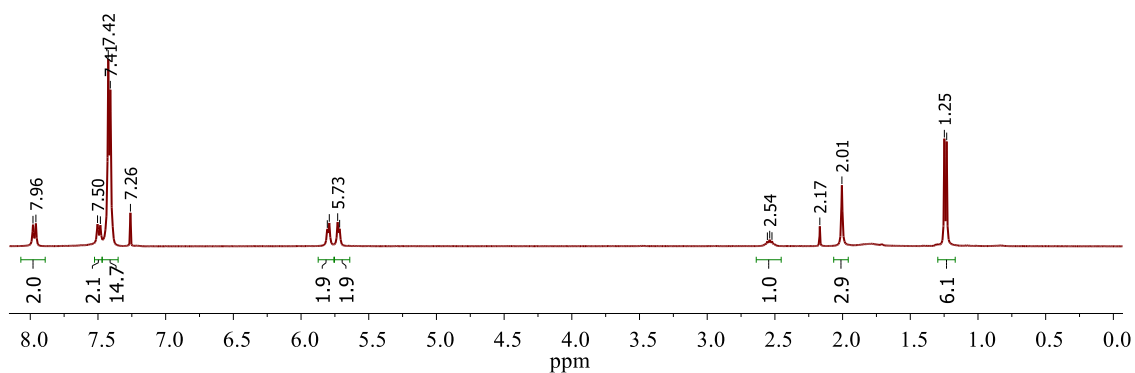
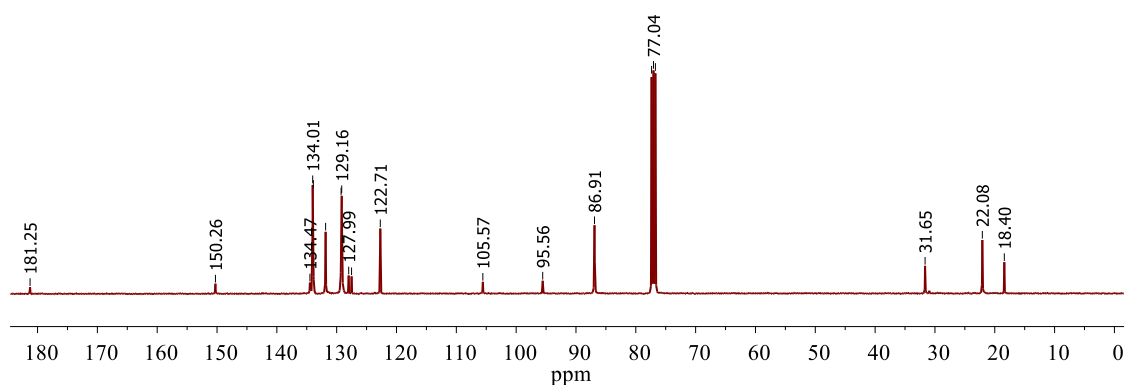
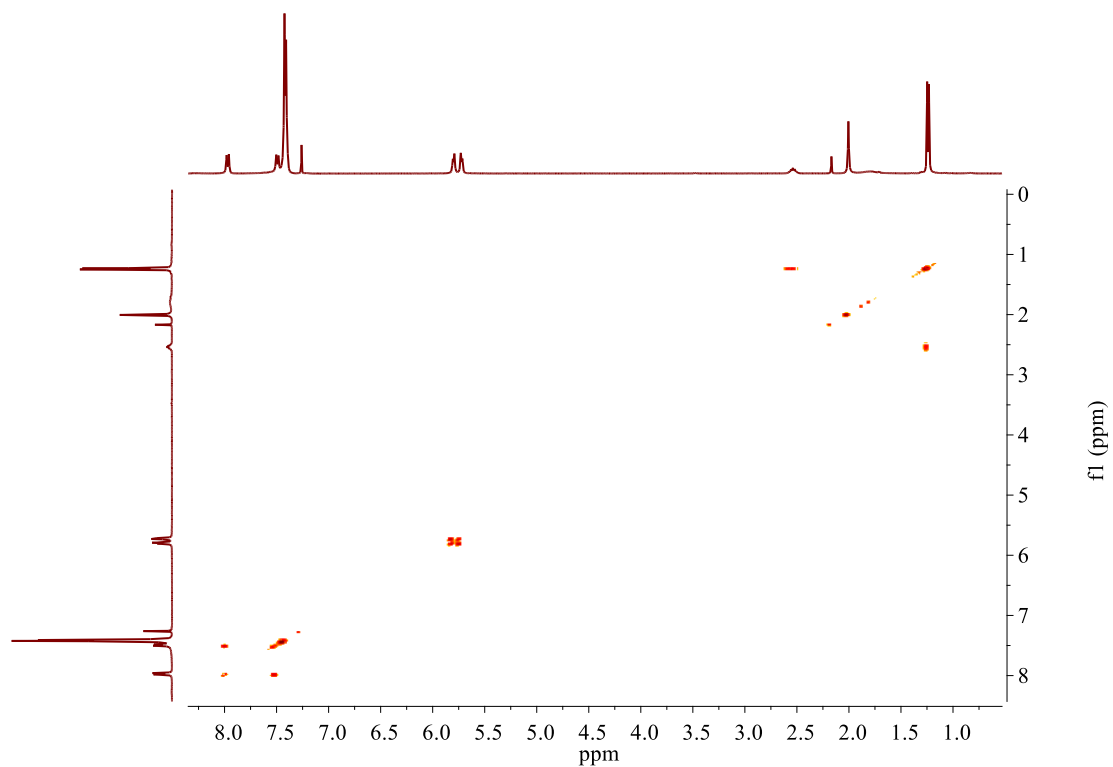


FIGURA A10 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A2** ( $\text{CDCl}_3$ - $d$ ).

FIGURA A11 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **A3** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA A12 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **A3** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA A13 - Mapa de contorno 1H-1H COSY obtido para o complexo **A3** (CDCl<sub>3</sub>-d).

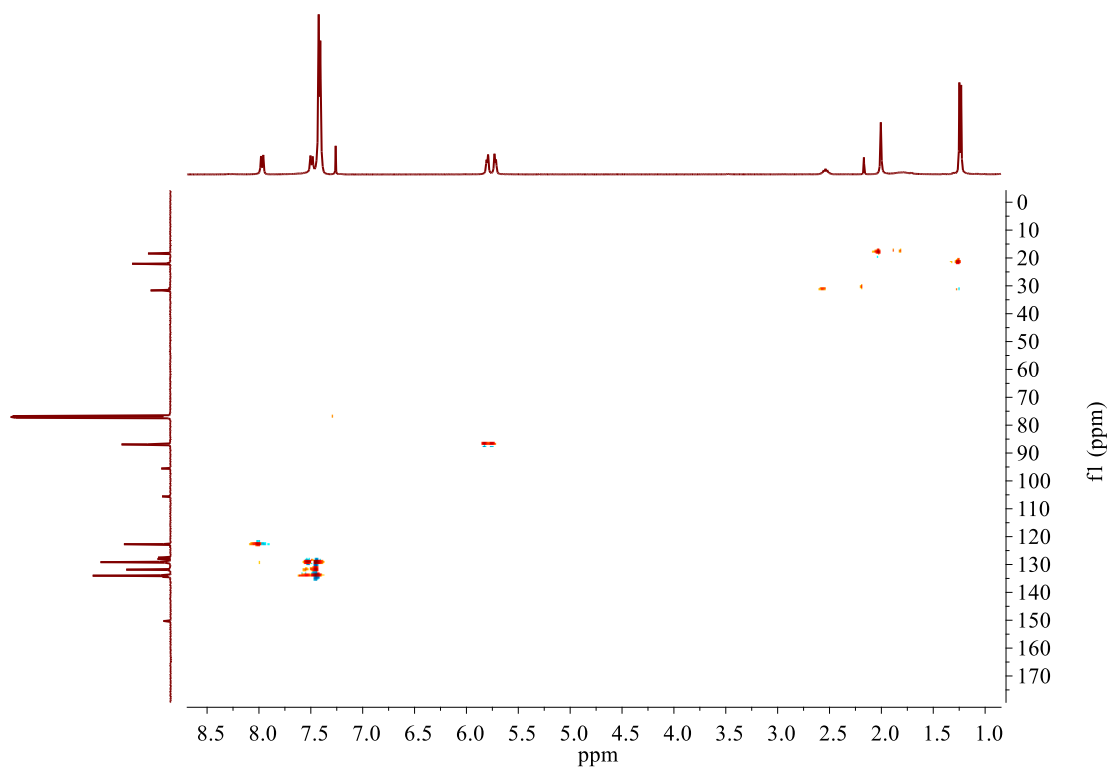


FIGURA A14 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A3** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

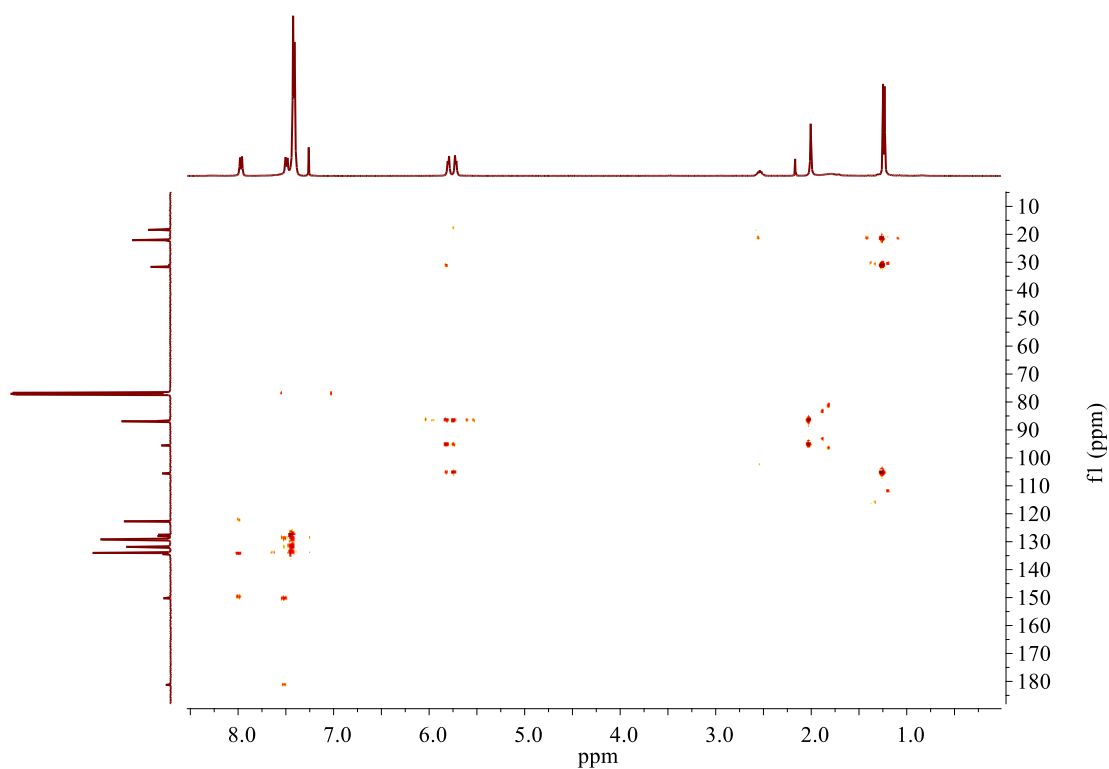
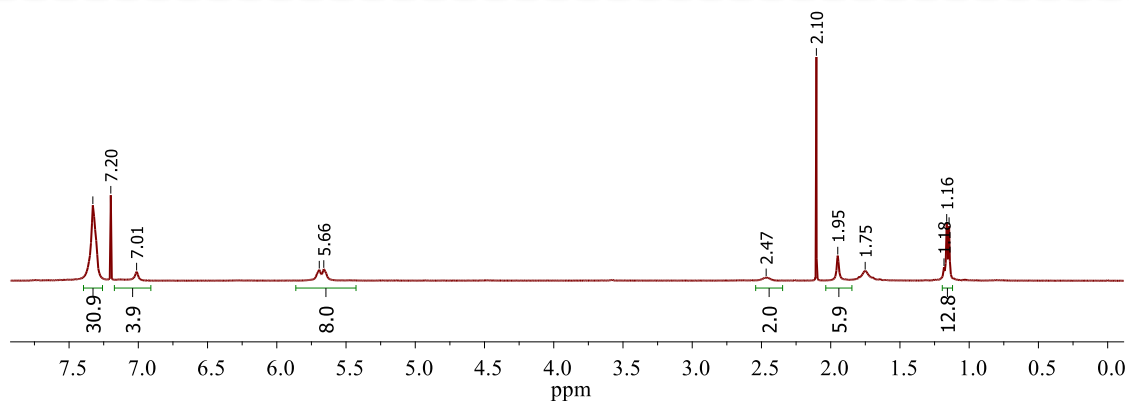
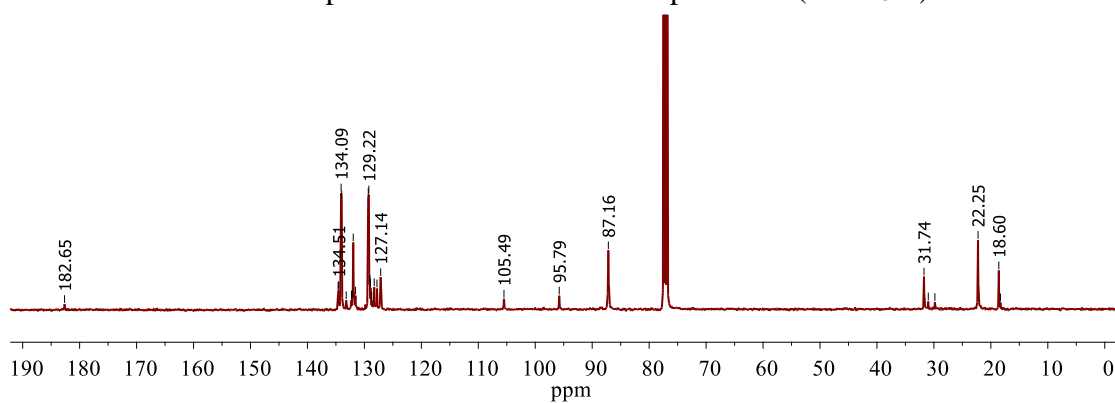
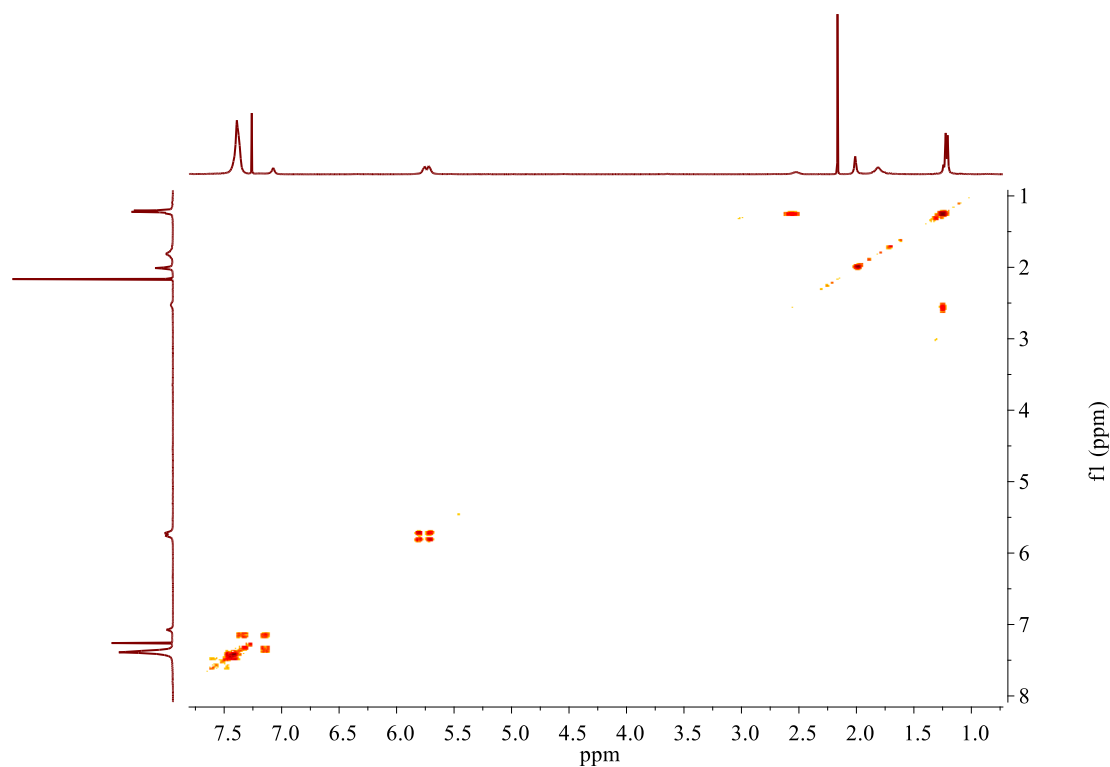


FIGURA A15 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A3** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA A16 -  $^1\text{H}$  NMR Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **A4** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA A17 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **A4** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA A18 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **A4** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).



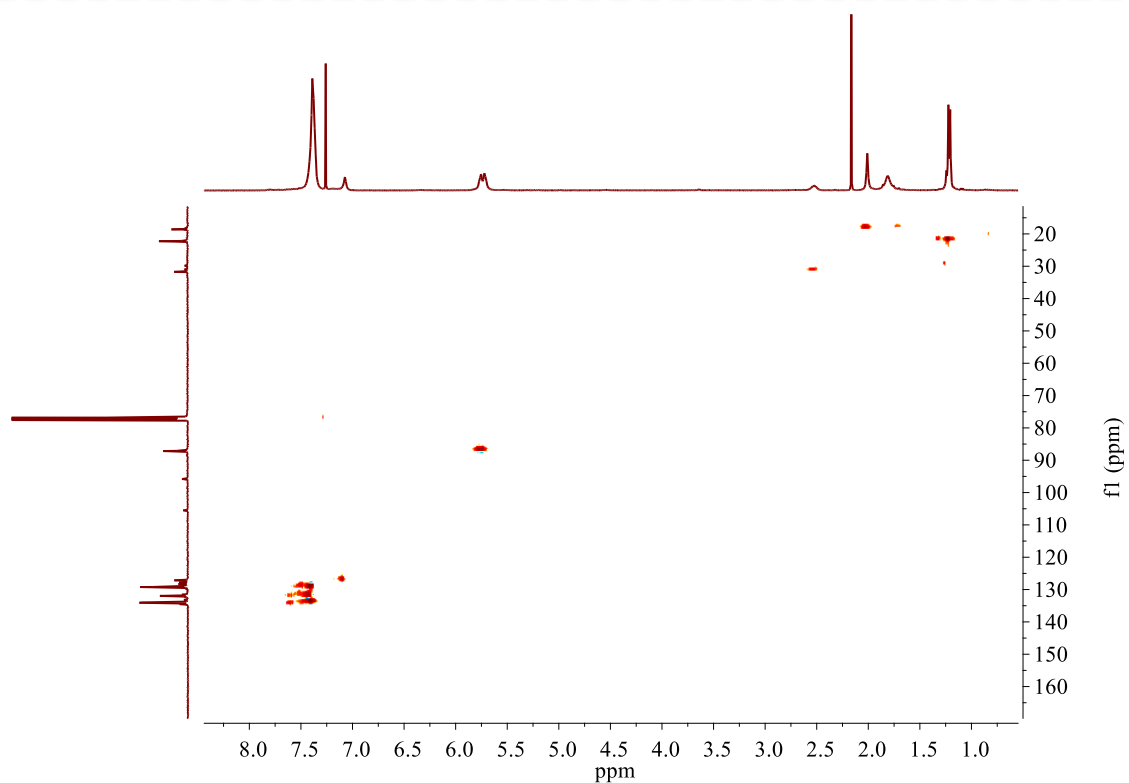


FIGURA A19 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A4** ( $\text{CDCl}_3$ - $d$ ).

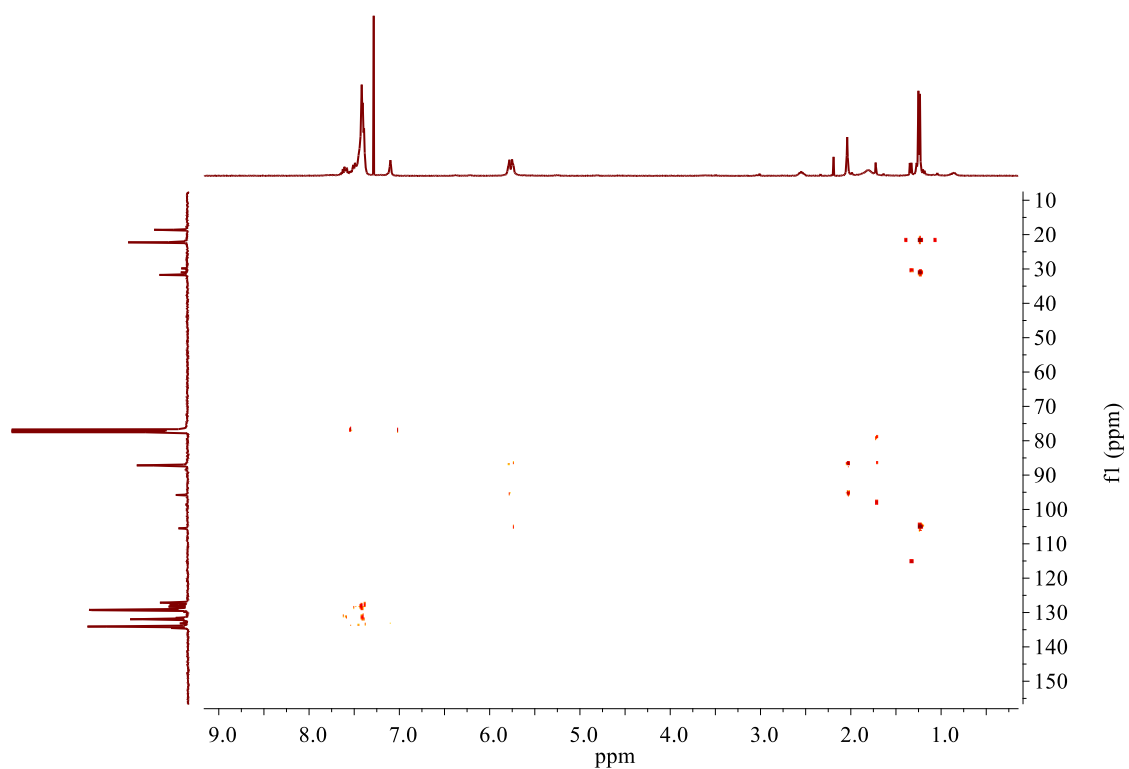


FIGURA A20 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **A2** ( $\text{CDCl}_3$ - $d$ ).

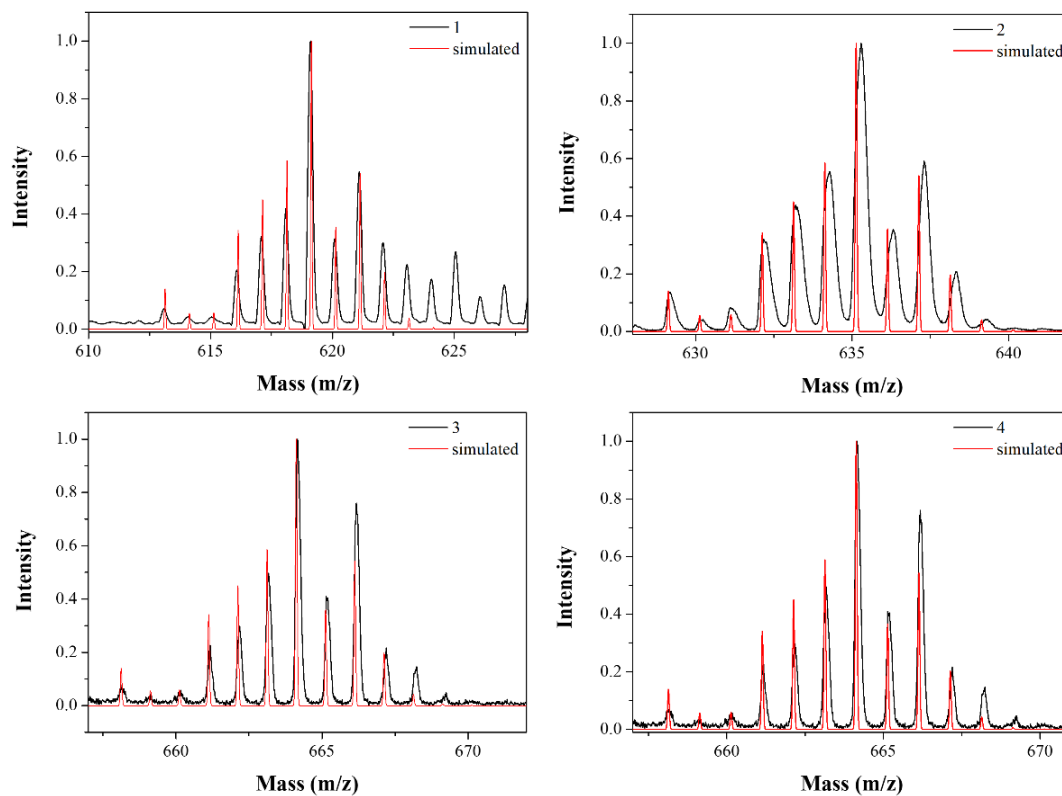
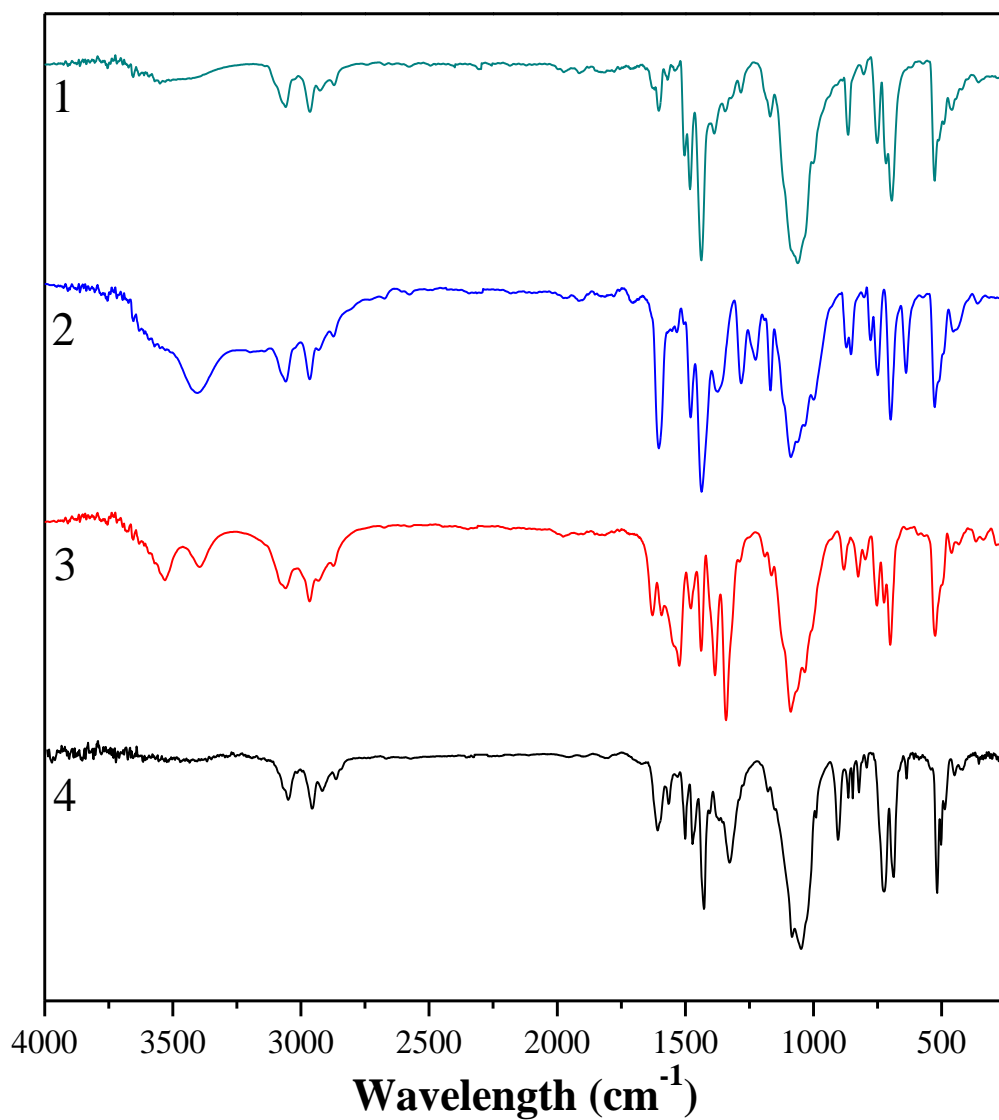
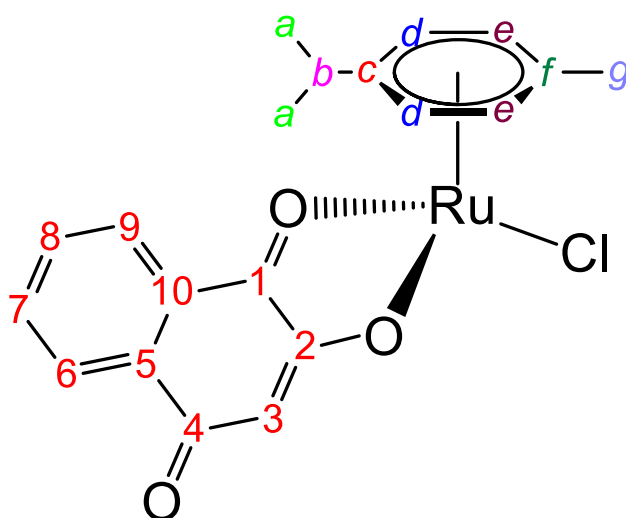


FIGURA A21 – Espectros de massa obtidos para os complexos **A1-A4** em um equipamento MALDI-TOF/MS. O ácido diidroxibenzóico foi utilizado como calibrante.

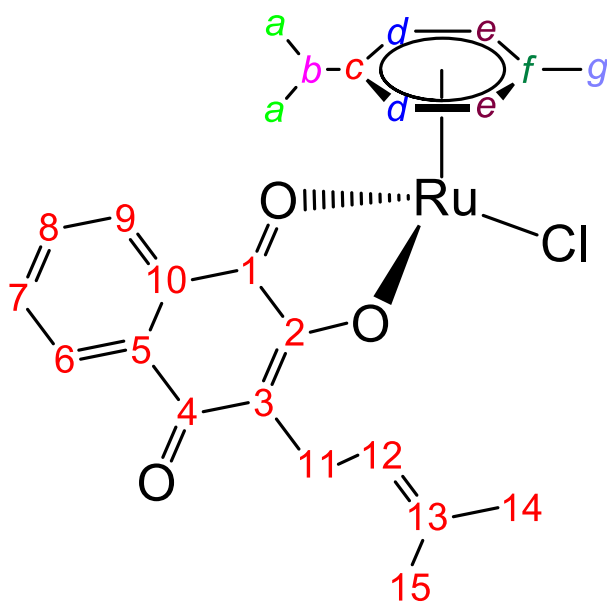
FIGURA A22 - Espectros FT-IR dos complexos **A1-A4** (em pastilhas de KBr).

**MATERIAL SUPLEMENTAR - SÉRIE B**

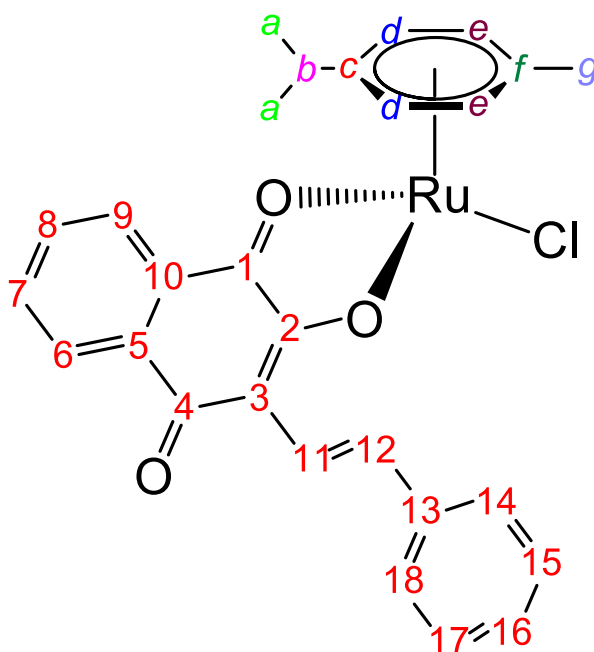
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B1)** - Rendimento: 75%; Anal. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 55,22 (54,12); H, 4,22 (4,31) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 0,2; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1612 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1564 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1114 (νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 447 (νRu-O); 289 (νRu-Cl). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-Cl]<sup>+</sup>: 408,99 m/z. <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 8,00 (2H, t, 6, 9); 7,74 (1H, t, 8); 7,57 (1H, t, 7); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 6,10 (1H, s, 3); 5,76 (2H, t, e); 5,52 (2H, d, d); 2,98 (1H, m, b); 2,38 (3H, s, g); 1,77 (s, H<sub>2</sub>O) 1,40 (6H, d, a). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ(ppm): 197,7 (1C, l); 183,7 (1C, 4); 171,9 (1C, 2); 136,8 (1C, 7); 133,0 (1C, l0); 131,7 (1C, 8); 128,2 (1C, 5); 127,0; 126,9 (1C, 9); 112,9; 101,2 (1C, c); 96,78 (1C, f); 81,4-79,1 (4C, d, e); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 31,5 (1C, b); 22,6 (2C, a); 18,9 (1C, g).



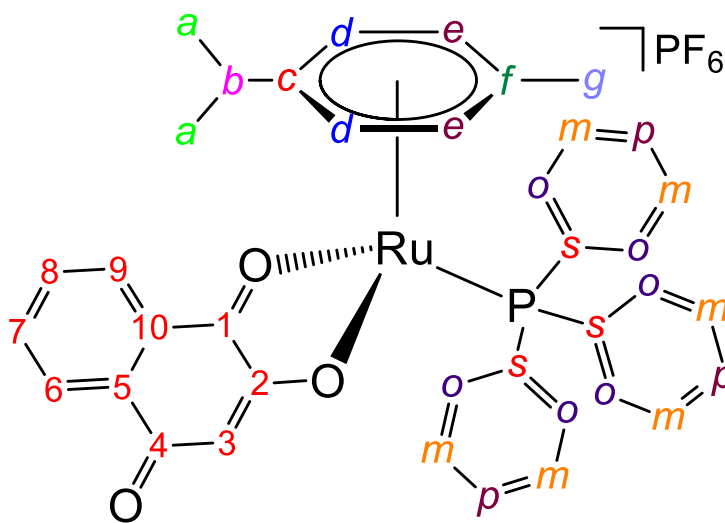
**[Ru(L<sub>2</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B2)** - Rendimento: 81%; Anal. Calc. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 57,73 (58,65); H, 5,35 (5,32) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 0,9; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1612 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1564 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1189 (νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 455 (νRu-O); 287 (νRu-Cl). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-Cl]<sup>+</sup>: 477,09 m/z. <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 7,93 (2H, t, 6, 9); 7,65 (1H, t, 8); 7,49 (1H, t, 7); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 5,73 (2H, d, e); 5,46 (2H, t, d); 5,27 (1H, t, 12); 3,32-3,26 (2H, m, 11); 2,97 (1H, m, b); 2,38 (3H, s, g); 1,80 (3H, s, 14-15); 1,77 (s, H<sub>2</sub>O); 1,65 (3H, d, 14/15); 1,42-1,37 (6H, s, a). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 196,8 (1C, 1); 182,8 (1C, 4); 168,9 (1C, 2); 136,2 (1C, 8); 133,0 (1C, 10); 132,0 (1C, 3); 131,4 (1C, 7); 128,2 (1C, 5); 126,6-126,4 (2C, 6, 9); 126,5 (1C, 13); 122,1 (1C, 12); 100,5 (1C, c); 96,79 (1C, f); 82,3-78,4 (4C, d, e); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 31,6 (1C, b); 26,0 (1C, 14/15); 22,8 (1C, 11); 22,6 (1C, a); 18,8 (1C, g); 18,3 (1C, 14/15).



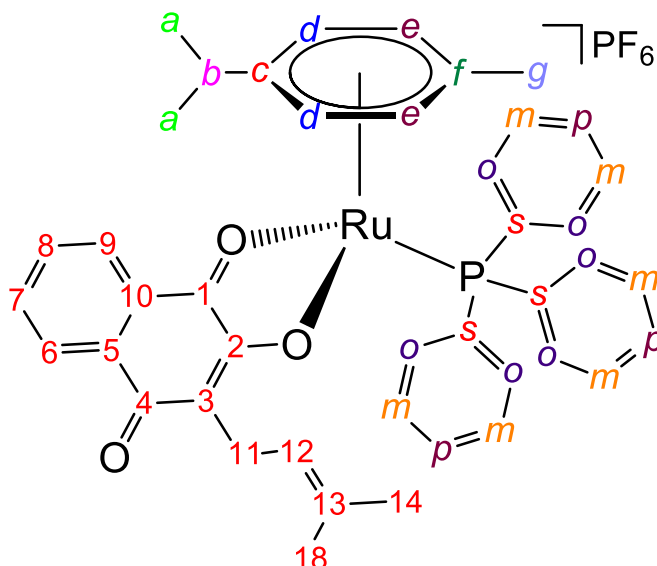
**[Ru(L1)( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B3)** - Rendimento: 77% Anal. Calc. for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>Cl<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 62,30 (61,59); H, 4,54 (4,61) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 0,7; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1625 ( $\nu$ C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1579 ( $\nu$ C<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1105 ( $\nu$ C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 486 ( $\nu$ Ru-O); 291 ( $\nu$ Ru-Cl). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-Cl]<sup>+</sup>: 511,08 m/z. <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 8,30-8,25 (1H, d, 12); 8,03 (1H, d, 6); 7,96; (1H, d, 9); 7,69 (1H, t, 7); 7,56-7,52 (4H, m, 8, 11, 14, 18); 7,34 (2H, t, 15, 17) 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 7,23 (1H, t, 16); 5,82 (2H, t, e); 5,52 (2H, t, d); 3,05 (1H, m, b); 2,46 (3H, s, g); 1,59 (s, H<sub>2</sub>O); 1,59-1,48 (6H, s, a). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm): 195,0 (1C, 1); 183,1 (1C, 4); 168,8 (1C, 2); 139,4 (1C, 13); 136,0 (1C, 7); 134,7 (1C, 12); 132,5 (1C, 10); 132,0 (1C, 8); 128,9 (1C, 10); 128,6 (2C, 17, 15); 127,6 (1C, 16); 127,0 (6, 14, 18); 126,4 (1C, 9); 123,0 (1C, 3); 124,4 (1C, 11); 99,9 (1C, c); 96,7 (1C, f); 81,9-82,3 (2C, e); 79,9-78,8 (2C, d); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 31,6 (1C, b); 22,9 (2C, a); 19,0 (1C, g).



**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B4)** - Rendimento: 96%; Anal. Calc. for C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>F<sub>6</sub>O<sub>2</sub>P<sub>2</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 56,18 (55,95); H, 4,47 (4,20) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 33,4; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1620 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1562 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1095 (νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 842 (νP-F); 557 (σP-F); 528 (νRu-P); 487 (νRu-O). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-(BF<sub>4</sub>)]<sup>+</sup>: 671,10 m/z. RMN <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 33.57 (s). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 7,96 (1H, d, *δ*); 7,81 (1H, d, *ρ*); 7,73 (1H, t, *δ*); 7,63 (1H, t, *γ*); 7,46-7,38 (15H, m, *o*, *m*, *p*) 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 6,09, 5,89 (2H, d, *e*); 5,63 (1H, s, *β*); 5,51, 5,41 (2H, d, *d*); 2,76 (1H, m, *b*); 1,95 (3H, s, *g*); 1,26 (6H, d, *a*). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 198,2 (1C, *l*); 183,7 (1C, *4*); 170,7 (1C, *2*); 137,3 (1C, *δ*); 134,4, 134,3 (6C, *o*); 132,6 (1C, *γ*); 132,0 (3C, *p*); 131,3 (1C, *l*<sub>0</sub>); 129,6, 129,5 (6C, *m*); 127,6 (3C, *s*); 127,4 (1C, *δ*); 126,5 (1C, *4*); 126,1 (1C, *ρ*); 113,9 (1C, *β*); 111,7 (1C, *c*); 99,6 (1C, *f*); 88,4 (2C, *e*); 86,3 (2C, *d*); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 31,5 (1C, *b*); 22,3 (2C, *a*); 18,4 (1C, *g*).

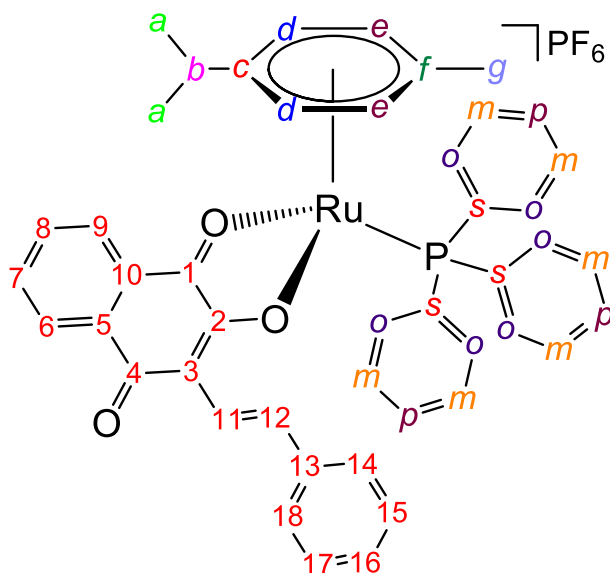


**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B5)** - Rendimento: 91%; Anal. Calc. for C<sub>43</sub>H<sub>42</sub>F<sub>6</sub>O<sub>3</sub>P<sub>2</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 57,78 (58,65); H, 4,79 (4,32) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 29,3; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1640 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1556 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1095 (νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 842 (νP-F); 557 (σP-F); 528 (νRu-P); 489 (νRu-O). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-(BF<sub>4</sub>)]<sup>+</sup>: 739,43 m/z. RMN <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 33,12 (s). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 7,87 (1H, d, 6); 7,79 (1H, d, 9); 7,67 (1H, t, 8); 7,57 (1H, t, 7); 7,46 (6H, m, *m*); 7,43 (9H, m, *o, p*) 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 6,00, 5,84 (2H, d, *e*); 5,57, 5,44 (2H, d, *d*); 4,93 (1H, t, 12); 3,08 (2H, m, 11); 2,69 (1H, m, *b*); 1,97 (3H, s, *g*); 1,73 (3H, s, 14/15); 1,53 (3H, s, 14/15), 1,25 (6H, m, *a*). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 197,4 (1C, 1); 182,7 (1C, 4); 167,8 (1C, 2); 136,6 (1C, 8); 134,4, 134,3 (6C, *o*); 132,4 (1C, 7); 132,2 (1C, 13); 131,9 (3C, *p*); 131,3 (1C, 10); 129,4, 129,3 (6C, *m*); 127,7 (1C, 5); 127,3 (3C, *s*); 126,8 (1C, 6); 126,2 (1C, 9); 121,0 (1C, 12); 110,3 (1C, *c*); 99,6 (1C, *f*); 88,8, 88,5 (2C, *e*); 86,8, 86,11 (2C, *d*); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 31,5 (1C, *b*); 25,7 (1C, 14/15); 22,3 (2C, *a*); 22,2 (1C, 11); 18,3 (1C, 14/15); 18,1 (1C, *g*).

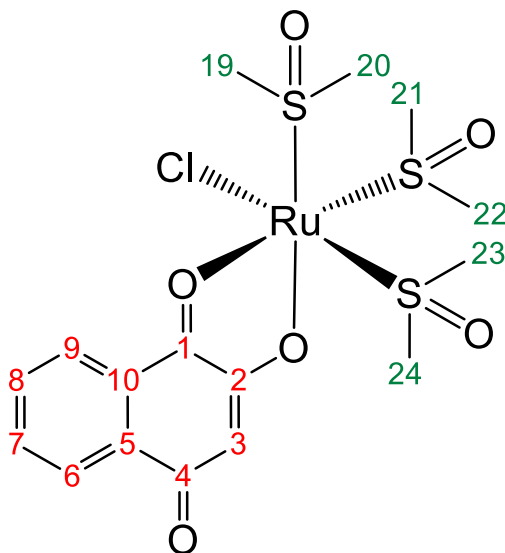




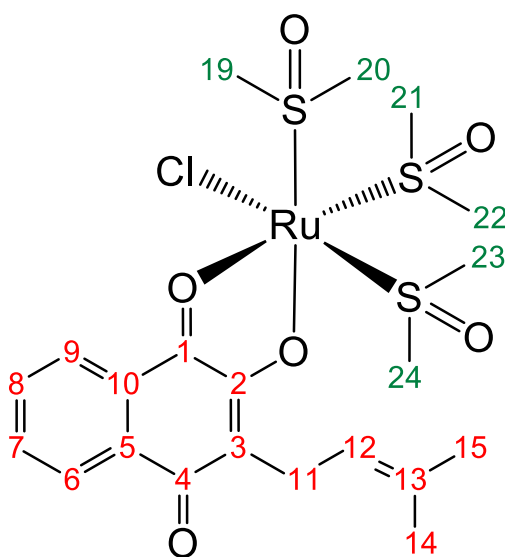
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-p-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B6)** - Rendimento: 95%; Anal. Calc. for C<sub>46</sub>H<sub>4</sub>F<sub>6</sub>O<sub>3</sub>P<sub>2</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 60.03 (60.22); H, 5.21 (4.39) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 35,6; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1631 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1537 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1095 (νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 844 (νP-F); 557 (σP-F); 526 (νRu-P); 489 (νRu-O). MALDI-TOF/MS (CH<sub>3</sub>OH/DHB) [M-Cl]<sup>+</sup>: 773,17 m/z. RMN <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 33,11 (s). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 8,13 (1H, d, 12); 7,89 (1H, d, 6); 7,83 (1H, d, 9); 7,67 (1H, t, 8), 7,60 (1H, t, 7), 7,57 (8H, m, 14-18, o, m, p); 7,35 (11H, m, 14-18, o, m, p); (CDCl<sub>3</sub>); 6,04, 5.89 (2H, d, e); 5,58 (2H, t, d); 2,74 (1H, m, b); 2,06 (3H, s, g); 1,61 (s, H<sub>2</sub>O); 1,29 (6H, d, a). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 195,5 (1C, 1); 183,0 (1C, 4); 167,4 (1C, 2); 138,1 (1C, 13); 136,5 (1C, 8); 135,5 (1C, 12); 134,2 (6C, o); 133,0 (1C, 7); 132,0 (3C, p); 129,5 (6C, m); 129,0 - 126,6 (4C, 10, 5, 15-17); 127,1 (3C, 3, 14, 18); 126,7 (2C, 6,9); 119,6 (1C, 11); 110,4 (1C, c); 99,6 (1C, f); 88,8, 88,7 (2C, e); 87,4, 86,3 (2C, d); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 31,6 (1C, b); 22,5, 22,2 (2C, a); 18,5 (1C, g).



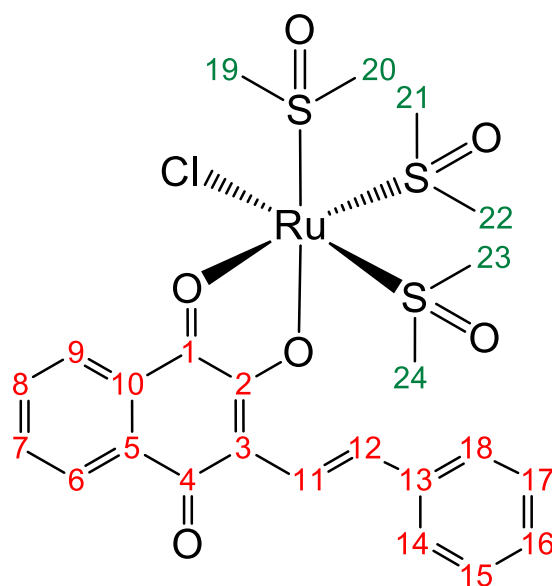
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B7)** - Rendimento: 88%; Anal. Calc. for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>6</sub>S<sub>3</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 35,03 (35,32); H, 3,80 (4,26); S, 21,32 (17,68) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 1,4; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1629 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1550 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1359 (δCH<sub>3</sub>); 1109 (νSO/νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 734 (νCS); 495 (νRuO); 426 (νRuS). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 8,05 (1H, d, 6); 7,96 (1H, d, 9); 7,77 (1H, t, 8); 7,58 (1H, t, 7); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 6,25 (1H, s, 3); 3,72 (3H, s, 19-24); 3,53 (3H, s, 19-24); 3,49-3,47 (6H, s, 19-24), 3,41 (3H, s, 19-24), 3,19 (3H, s, 19-24). RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 199,7 (1C, 1); 184,2 (1C, 4); 171,9 (1C, 2); 136,9 (1C, 8); 132,9 (1C, 10); 131,9 (1C, 7); 129,1 (1C, 5); 126,7; 126,7 (1C, 6, 9); 114,8 (1C, 3); 77,7 (CDCl<sub>3</sub>), 48,1-43,7 (6C, 19-24).



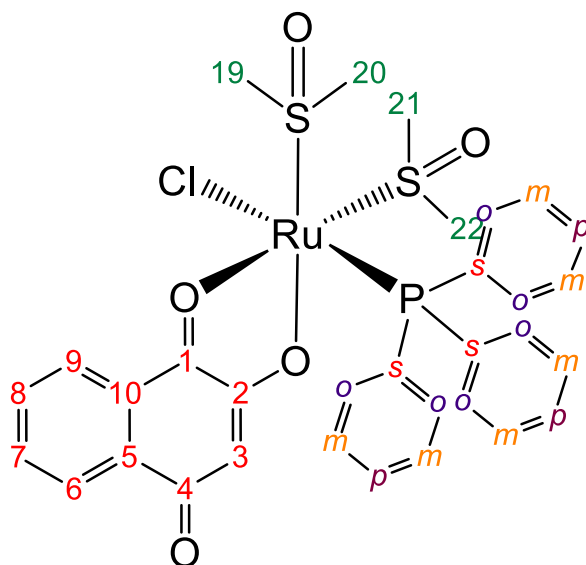
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-p-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B8)** - Rendimento: 78%; Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>6</sub>S<sub>3</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 42,74 (41,20); H, 4,84 (5,10); S, 16,47 (15,71) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 1,7; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1614 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1556 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1360 (δCH<sub>3</sub>); 1110 (νSO/νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 734 (νCS); 484 (νRuO); 426 (νRuS). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 8,02 (1H, d, 6); 8,00 (1H, d, 9); 7,71 (1H, t, 8); 7,52 (1H, t, 7); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 5,23 (1H, t, 12); 3,71 (3H, s, 19-t, 24); 3,56 (3H, s, 19-24); 3,49 (6H, s, 19-24), 3,42-3,40 (3H, s, 19-24; 2H, m, 12), 3,14 (3H, s, 11-16); 1,78 (3H, s, 14/15); 1,64 (3H, s, 14/15). RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 198,4 (1C, 1); 183,0 (1C, 4); 168,6 (1C, 2); 136,1 (1C, 8); 132,6 (1C, 10); 131,7 (1C, 3); 131,6 (1C, 7); 128,9 (1C, 5); 128,3 (1C, 13); 126,7, 126,02 (1C, 6, 9); 122,2 (1C, 12); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 48,0-43,0 (6C, 19-24); 25,8 (1C, 14/15); 22,8 (1C, 11); 18,2 (1C, 14/15).



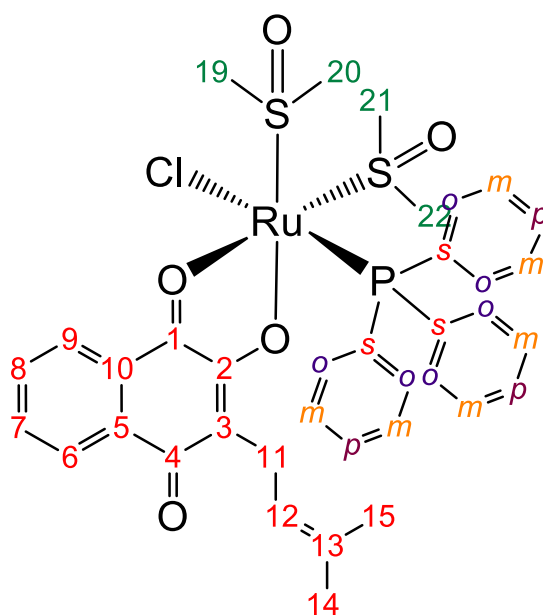
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B9)** - Rendimento: 74%; Anal. Calc. for C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>6</sub>S<sub>3</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 44,36 (44,61); H, 4,03 (4,52); S, 16,35 (14,89) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 0,9; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1627 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1558 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1373 (δCH<sub>3</sub>); 1107 (νSO/νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 732 (νCS); 482 (νRuO); 428 (νRuS). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 8,38 (1H, d, 12); 8,10 (1H, d, 6); 7,95 (1H, d, 9); 7,75 (1H, t, 8); 7,69 (1H, d, 11); 7,60 (1H, t, 7); 7,54 (2H, d, 14, 18); 7,38 (2H, t, 15, 17); 7,28 (1H, m, 16, CDCl<sub>3</sub>); 3,77-3,72 (6H, s, 19-24); 3,56-3,55 (6H, s, 19-24); 3,47 (3H, s, 19-24), 3,21 (3H, s, 19-24). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ(ppm): 196,9 (1C, 1); 183,6 (1C, 4); 168,5 (1C, 2); 138,9 (1C, 13); 136,1 (1C, 7), 135,2 (1C, 12); 132,4 (1C, 8); 132,3 (1C, 10) 129,8 (1C, 5); 128,9 (2C, 15, 17); 128,1 (1C, 16); 127,2 (1C, 6); 126,9 (2C, 14, 18); 126,1 (1C, 11); 124,7 (1C, 3); 120,7 (1C, 9); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 48,1-43,7 (6H, 19-24).



**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B10)** - Rendimento: 89%; Anal. Calc. for C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>P<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 51,32 (52,78); H, 4,13 (4,43), S, 9,08 (8,81) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 2,4. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1624 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1554 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1358 (δCH<sub>3</sub>); 1116 (νSO/νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 729 (νCS); 462 (νRuO); 528 (νRuP); 428 (νRuS). RMN<sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 42,90 (s). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 7,93 (1H, d, 6); 7,71 (2H, m, 8, 9); 7,54 (9H, m, 7, *o*, *m*, *p*); 7,30 (9H, m, *o*, *m*, *p*); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 5,97 (1H, s, 3); 3,57 (6H, s, 19-22); 3,23 (3H, s, 19-22); 3,09 (3H, s, 19-22); 1,67 (s, H<sub>2</sub>O). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 198,8 (1C, 1); 183,5 (1C, 4); 171,5 (1C, 2); 136,2 (1C, 8); 134,8, 134,7 (6C, *o*); 132,6 (1C, 10); 131,2 (1C, 7); 130,8 (3C, *p*); 130,3 (1C, *s*); 129,8, (1C, *s*) 129,0 (1C, 5); 128,5, 128,4 (3C, *m*); 126,4 (1C, 6); 125,8 (1C, 9); 114,3 (1C, 3); 49,8-46,7 (4H, 19-22).

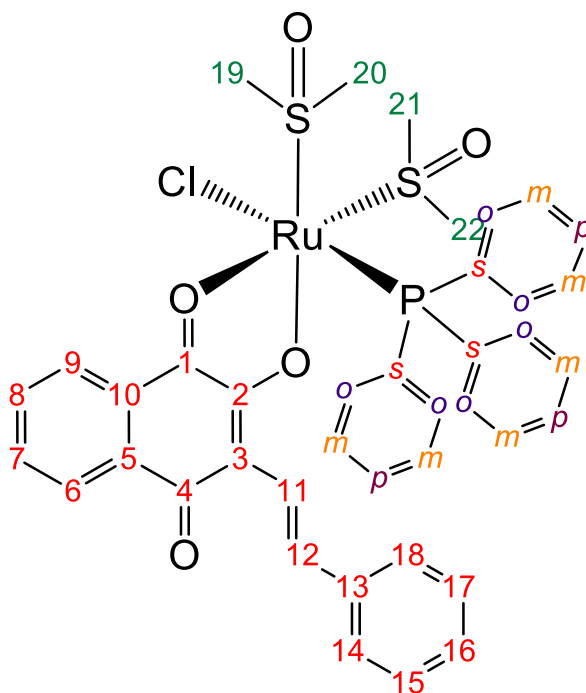


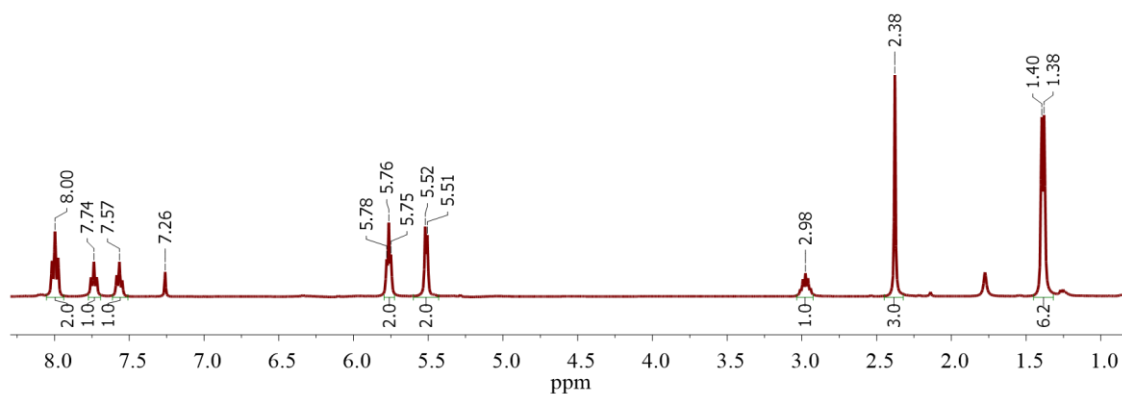
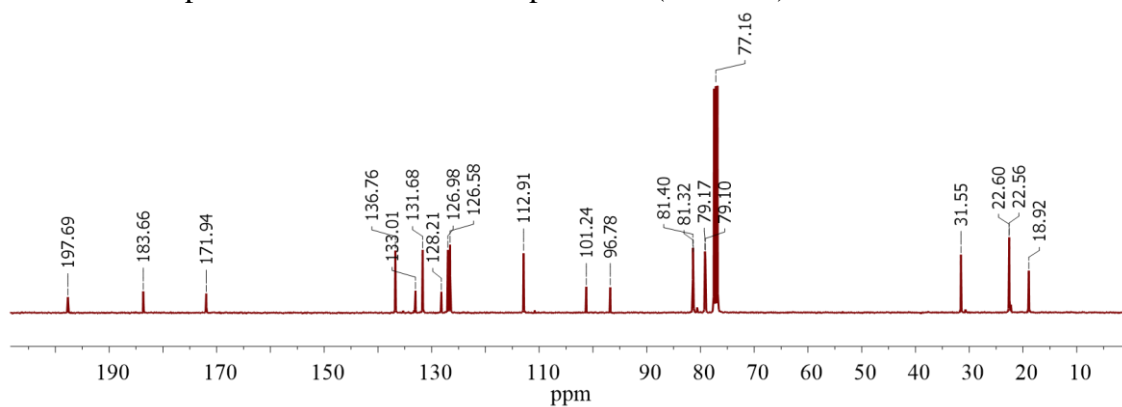
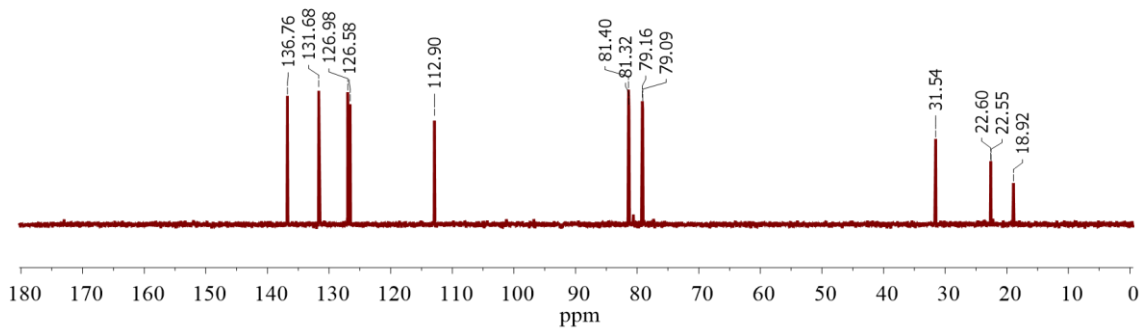
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B11)** - Rendimento: 90%; Anal. Calc. for C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>P<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 55,06 (55,80); H, 4,73 (4,45); S, 7,68 (8,05) %. Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 0,3. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1610 (νC<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 1548 (νC<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1357 (δCH<sub>3</sub>); 1118 (νSO/νC<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 732 (νCS); 480 (νRuO); 528 (νRuP); 430 (νRuS). RMN <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 43.59 (s). <sup>1</sup>H RMN (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) δ(ppm): 7,90 (1H, d, 6); 7,65-7,58 (8H, m, 8, 9, o); 7,48 (1H, t, 7); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 7,27 (9H, m, *m/p*); 5,22 (1H, t, 12); 3,59, 3,54 (6H, s, 19-22); 3,33 (2H, t, 11); 3,18 (6H, s, 19-22); 1,81 (3H, s, 14/15); 1,70 (3H, s, 14/15) 1,64 (s, H<sub>2</sub>O). <sup>13</sup>C RMN (100.62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 198,0 (1C, 1); 182,5 (1C, 4); 168,7 (1C, 2); 135,6 (1C, 8); 134,7, 134,6 (6C, o); 132,6 (1C, 10); 131,6 (3C, 13); 131,0 (1C, 7); 130,6 (3C, *p*); 130,2 (3C, *s*); 128,8 (1C, 5); 128,4-128,3 (6C, *m*); 127,5 (1C, 3); 126,4 (1C, 6); 126,2 (1C, 9); 122,6 (1C, 12); 77,0 (CDCl<sub>3</sub>); 50,0-46,6 (4C, 19-22); 25,9 (1C, 19/22); 22,9 (1C, 11); 22,2 (1C, 11); 18,3 (1C, 14/15).



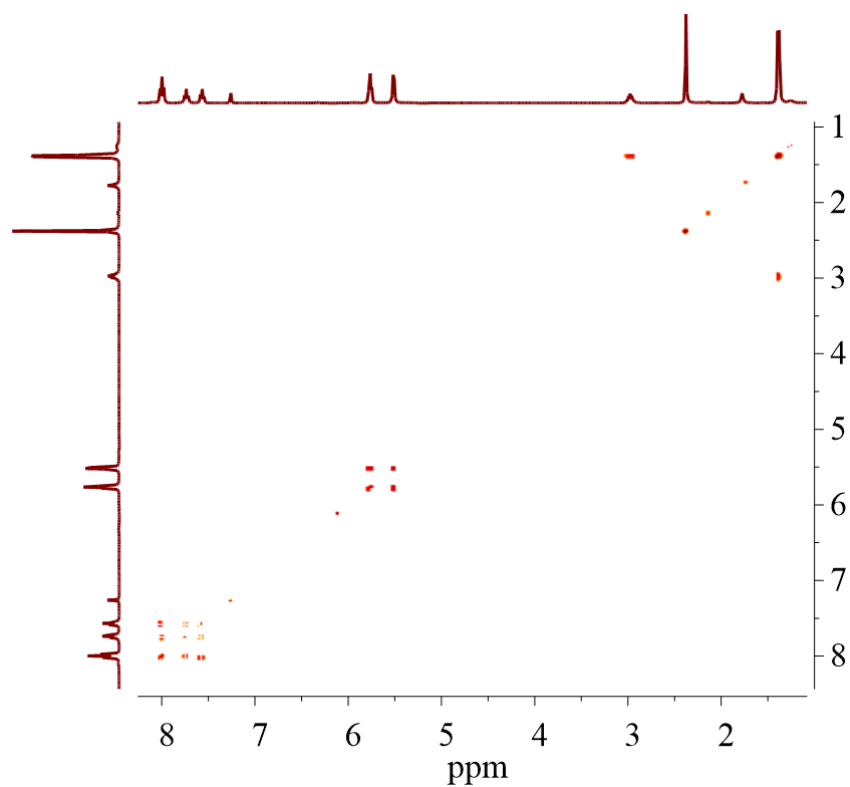
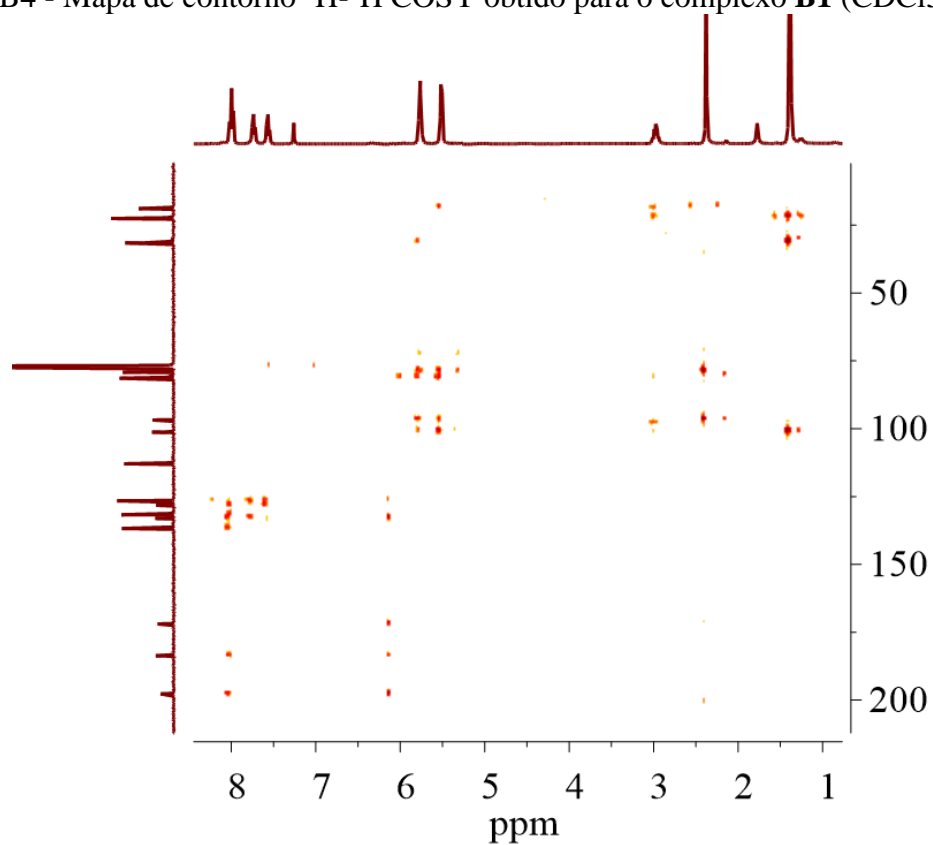
**[Ru(L<sub>1</sub>)(η<sup>6</sup>-*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (B12)** - Rendimento: 87%; Anal. Calc. for C<sub>40</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>P<sub>1</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 57,65 (57,86); H, 4,20 (4,61), S, 7,41 (7,72) %.

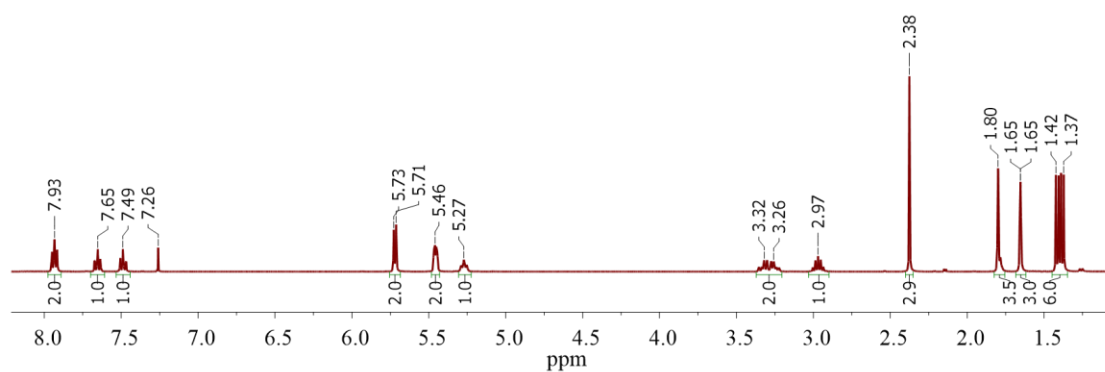
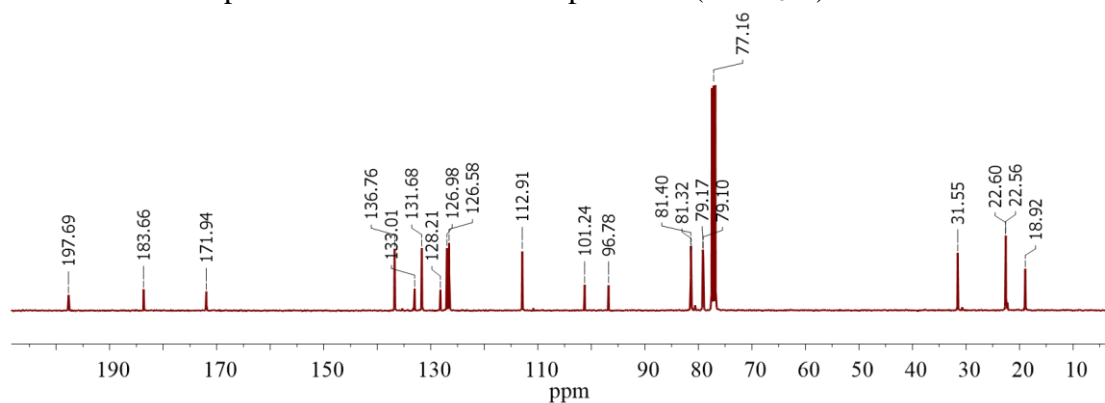
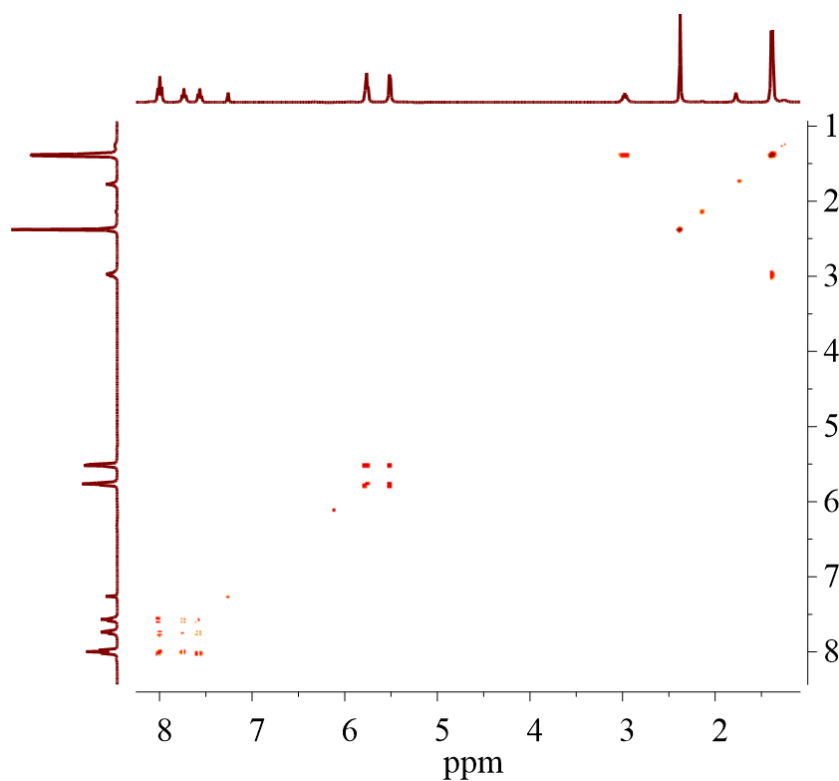
Conductividade Molar ( $S\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 1,6. IR (KBr, bandas selecionadas,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1619 ( $\nu\text{C}_4\text{O}_4$ ); 1554 ( $\nu\text{C}_1\text{O}_1$ ); 1375 ( $\delta\text{CH}_3$ ); 1114 ( $\nu\text{SO}/\nu\text{C}_2\text{O}_2$ ); 736 ( $\nu\text{CS}$ ); 482 ( $\nu\text{RuO}$ ); 530 ( $\nu\text{RuP}$ ); 428 ( $\nu\text{RuS}$ ).  $^1\text{H}$  RMN (400.132 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K)  $\delta(\text{ppm})$ : 8,27 (1H, d, 12); 7,96 (1H, d, 6) 7,67-7,51 (11H, m, 7-9, o, p); 7,38 (2H, t, 15, 17); 7,29-7,24 (10H, m, 14, 18, 16, m) 7,26 ( $\text{CDCl}_3$ ); 3,66, 3,60, 3,26, 3,23 (12H, s, 19/22).  $^{13}\text{C}$  RMN (100.62 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta(\text{ppm})$ : 196,2 (1C, 1); 182,9 (1C, 4); 168,5 (1C, 2); 139,2 (1C, 13) 135,6 (1C, 7); 134,7 (6C, o) 133,7 (1C, 12); 132,1 (1C, 10); 131,7 (1C, 8); 130,7 (3C, p); 130,3 (3C, s); 129,8 (1C, 5); 128,9 (2, 15, 17); 128,5-128,4 (6C, m); 127,8 (1C, 16); 126,8 (1C, 6); 126,7 (2C, 14, 18); 125,3 (1C, 9); 124,1 (1C, 3); 120,8 (1C, 11); 77,0 ( $\text{CDCl}_3$ ); 49,5-47,4 (4C, 19/22).



FIGURA B1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **B1** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA B2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B1** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA B3 - Espectro de RMN DEPT  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B1** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).



FIGURA B4 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B1** ( $\text{CDCl}_3$ -d).FIGURA B5 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B1** ( $\text{CDCl}_3$ -d).

FIGURA B6 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **B2** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).FIGURA B7 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B2** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).FIGURA B8 - Mapa de contorno  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B2** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).

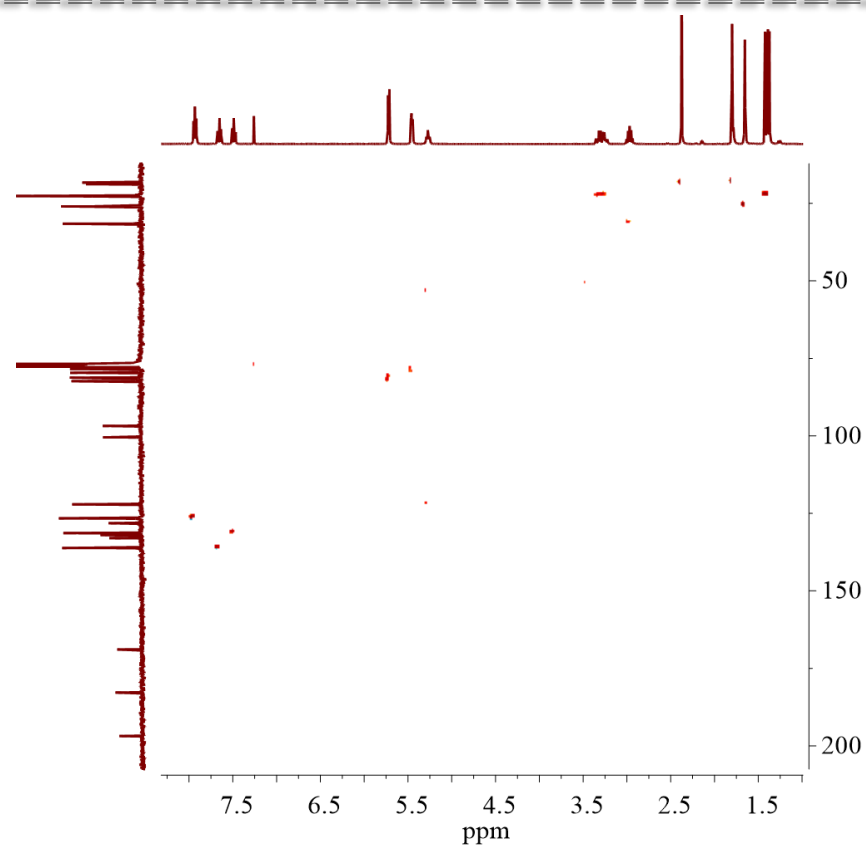


FIGURA B9 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B2** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

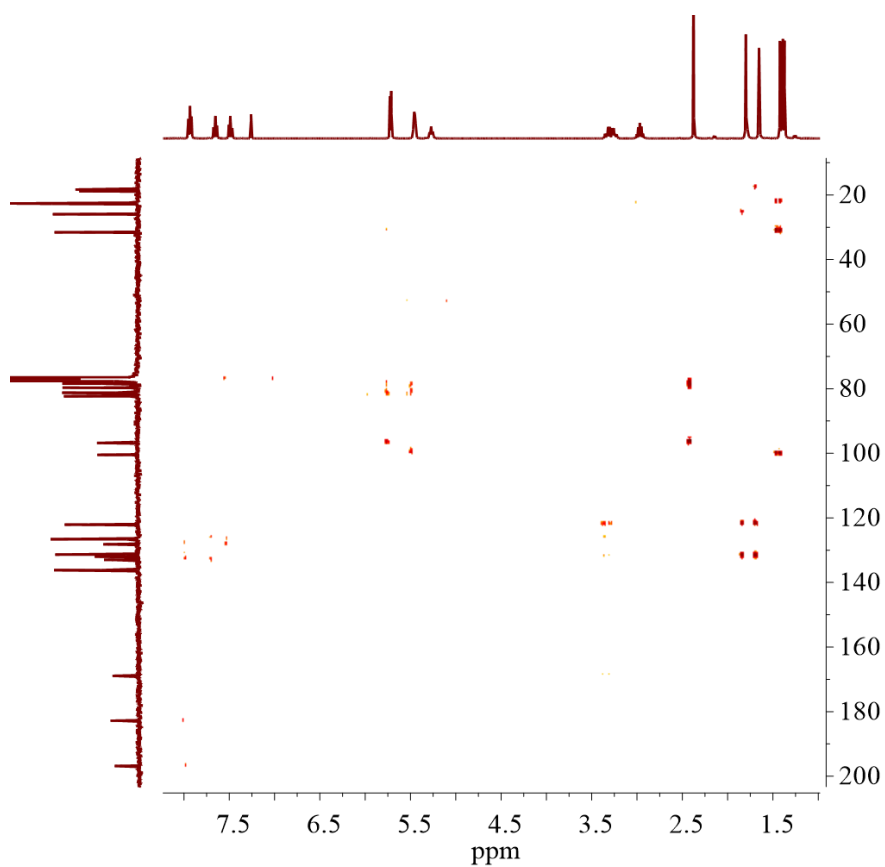
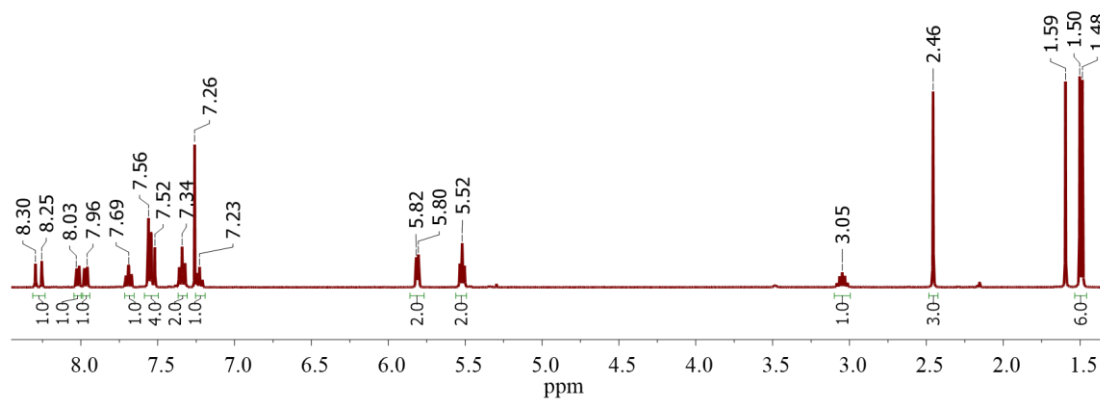
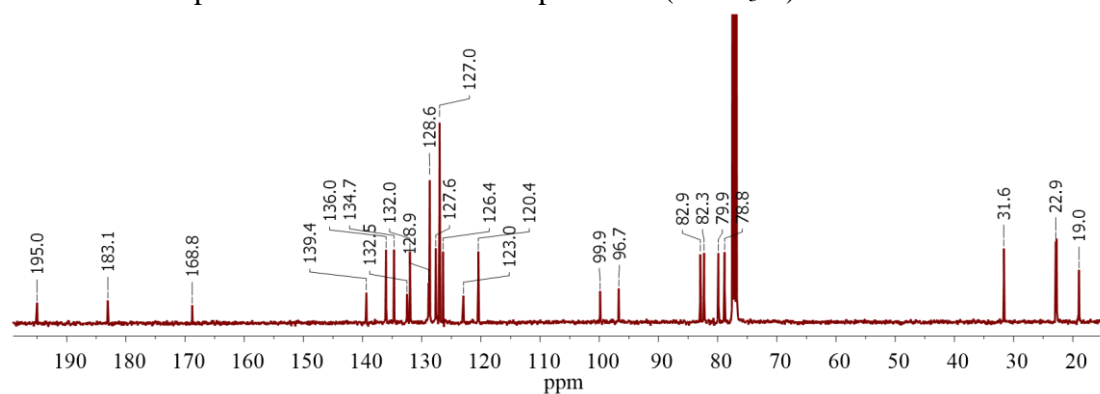
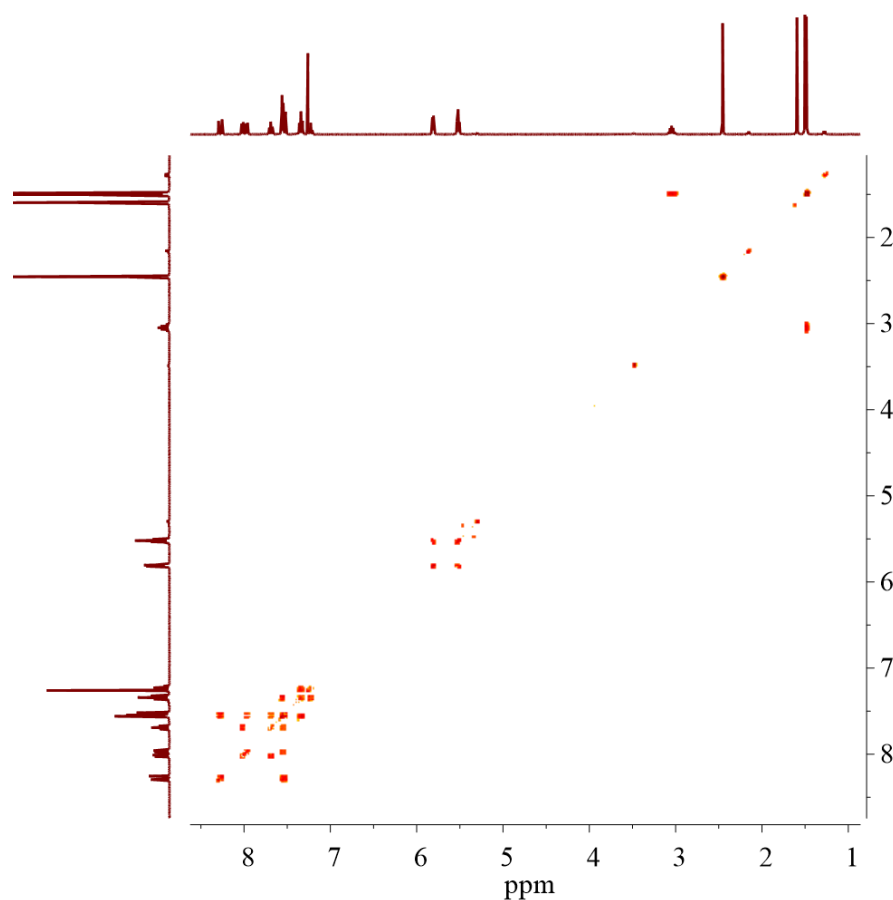


FIGURA B10 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B2** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B11 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **B3** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).FIGURA B12 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B3** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).FIGURA B13 - Mapa de contorno  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B3** ( $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ).

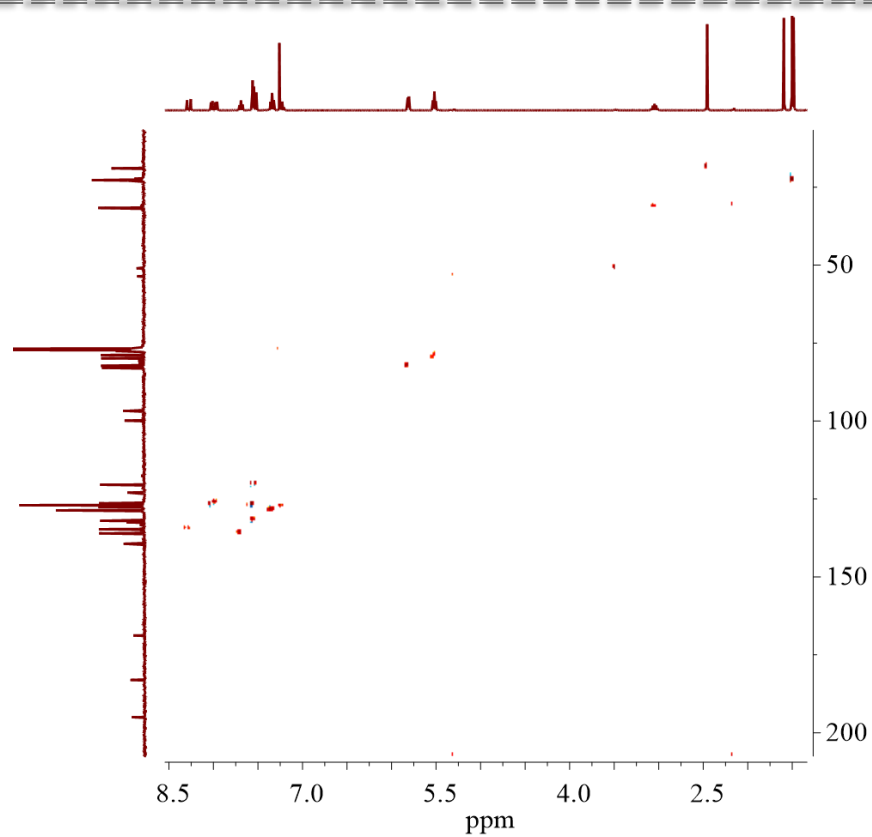


FIGURA B14 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B3** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

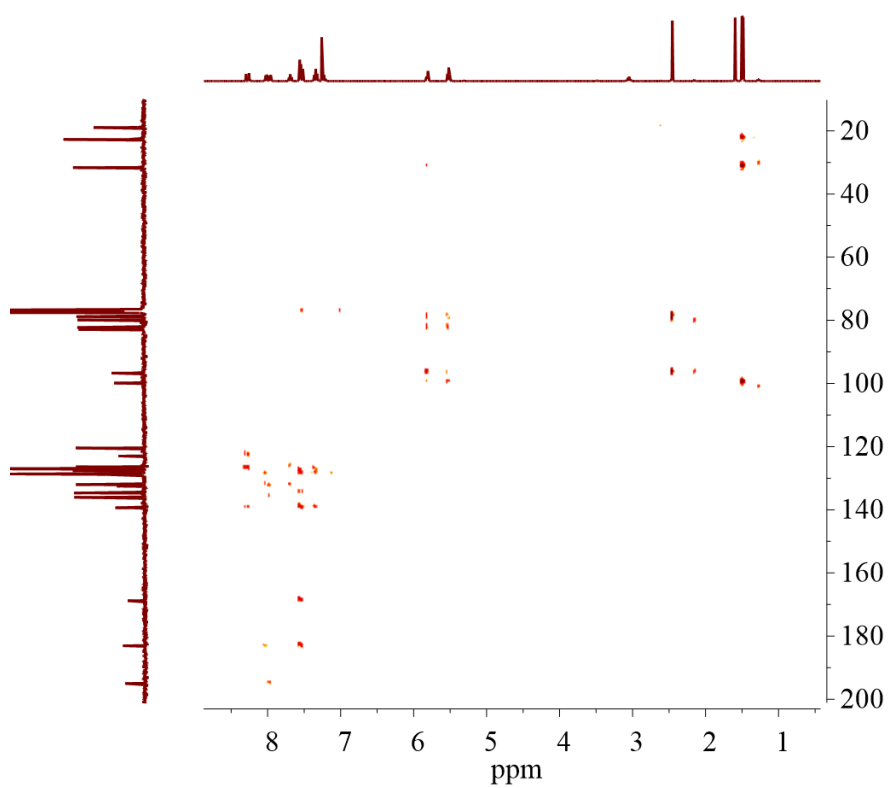
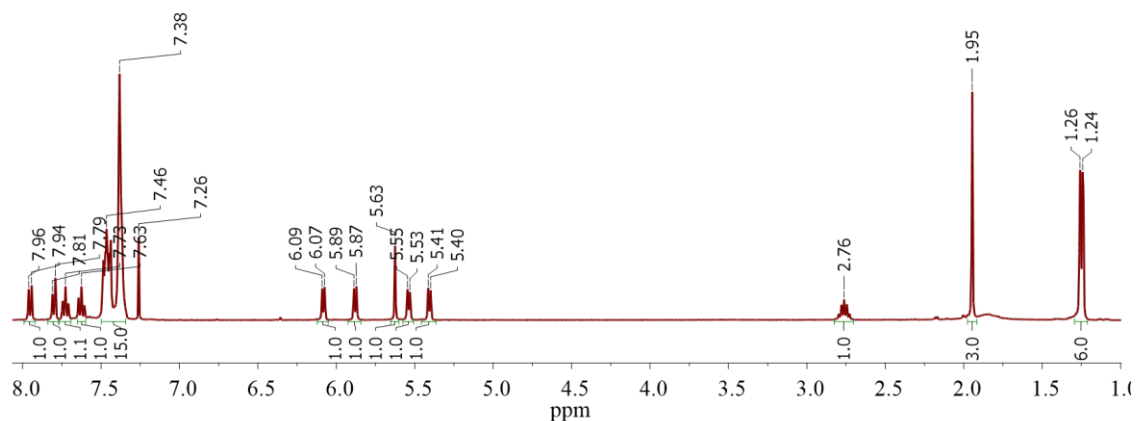
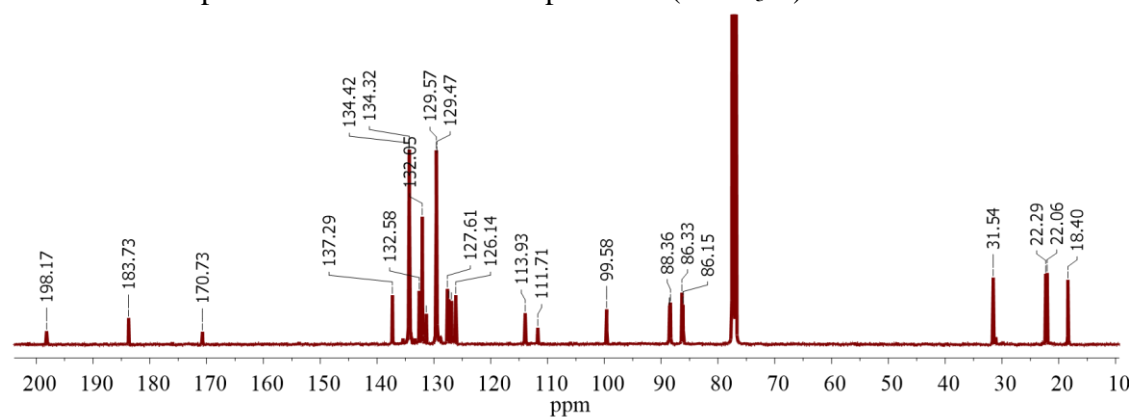
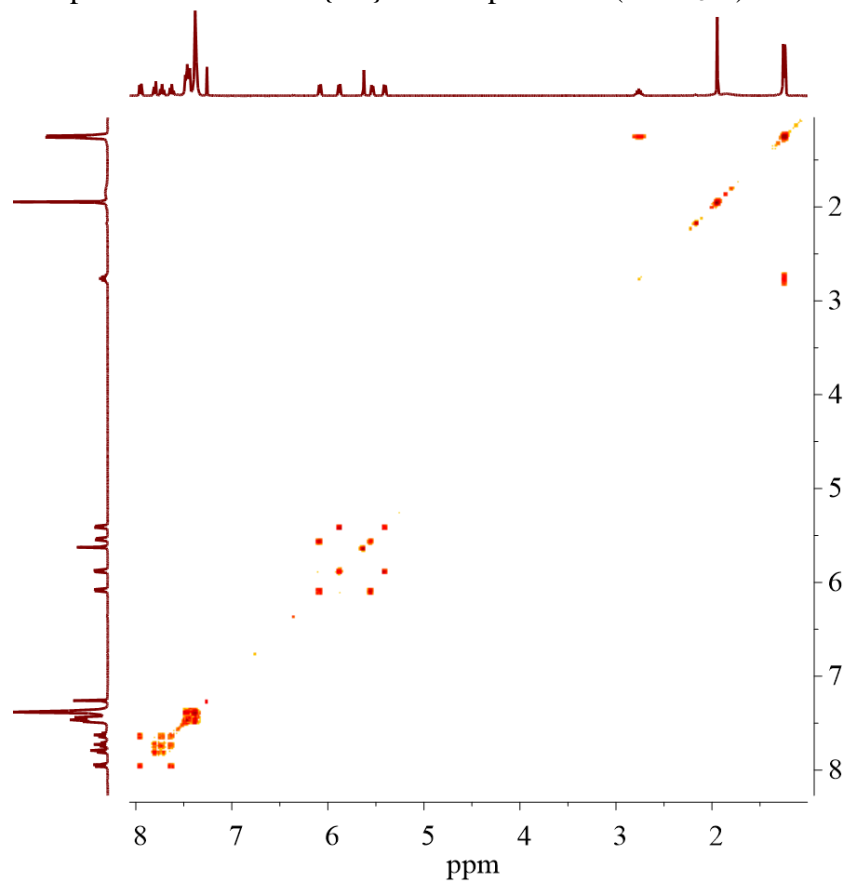


FIGURA B15 - - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B3** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B16 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **B4** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B17 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B4** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B18 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY obtido para o complexo **B4** (CDCl<sub>3</sub>-d).

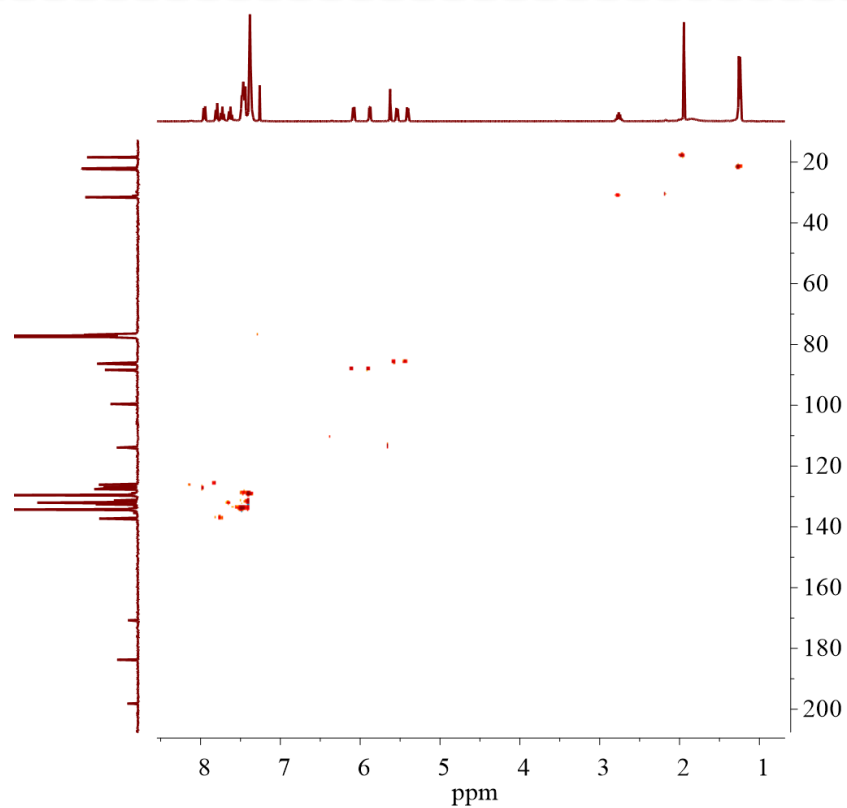


FIGURA B19 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B4** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

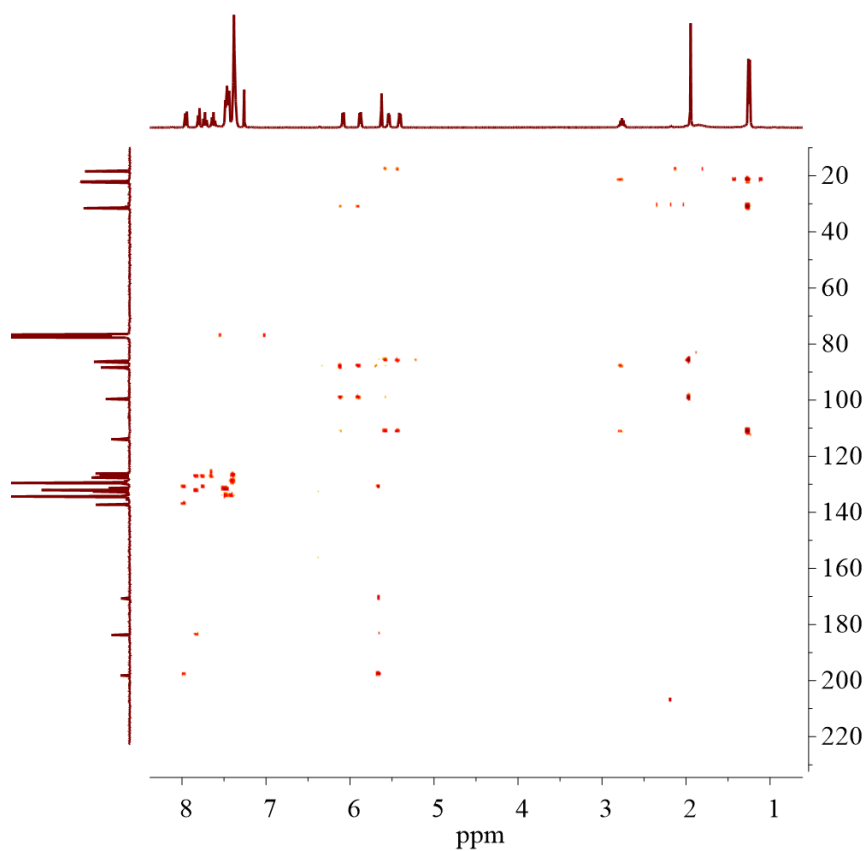
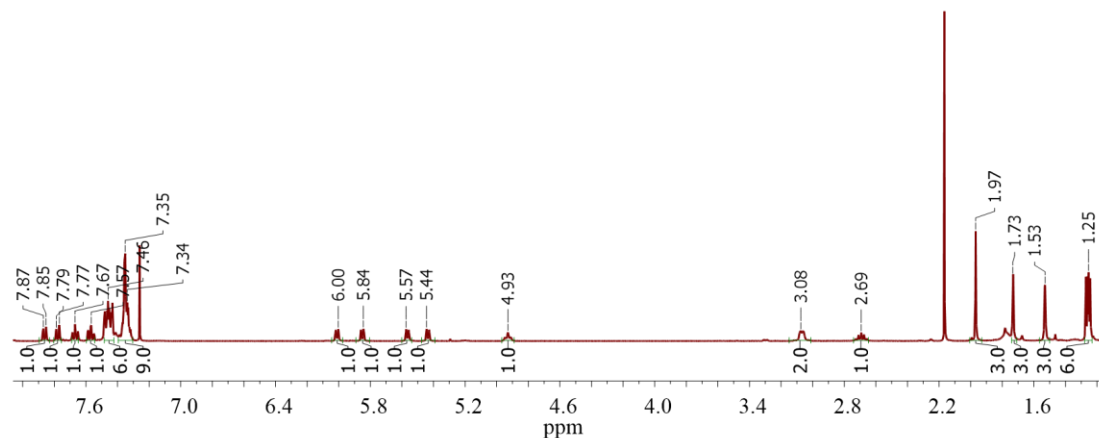
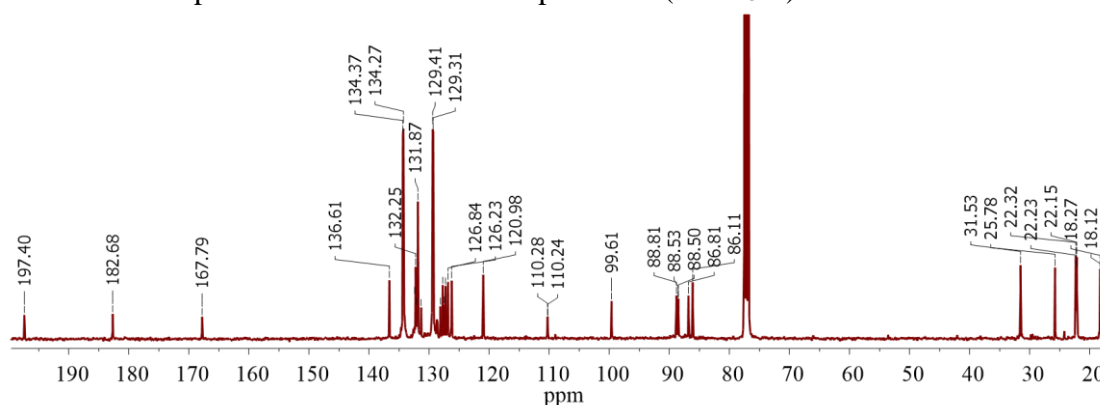
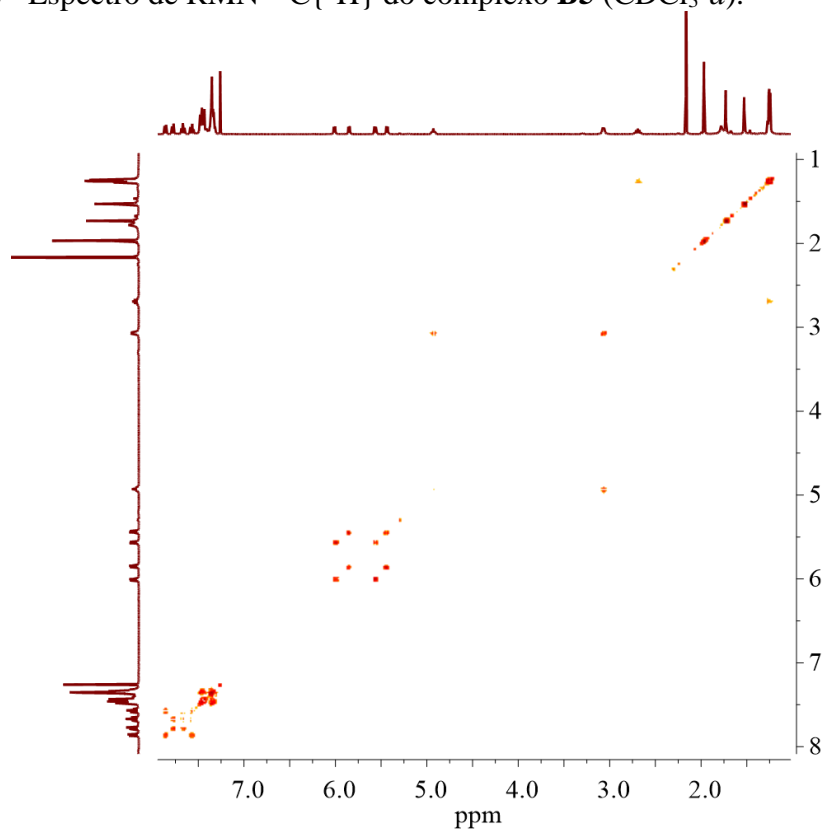


FIGURA B20 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B4** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B21 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **B5** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B22 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B5** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B23 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY obtido para o complexo **B5** (CDCl<sub>3</sub>-d).



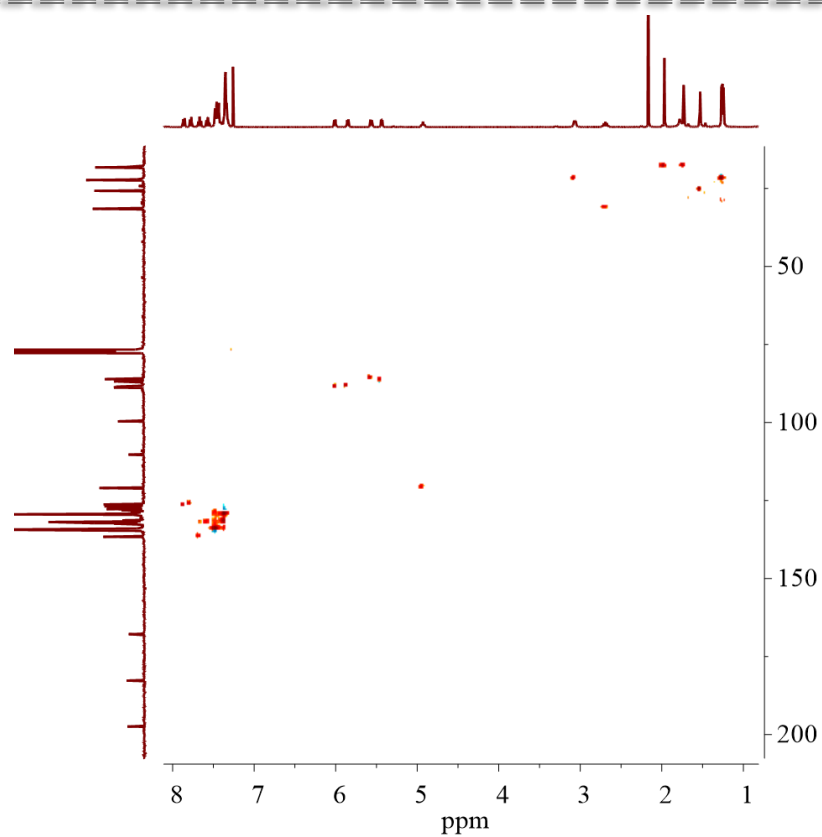


FIGURA B24 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B5** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

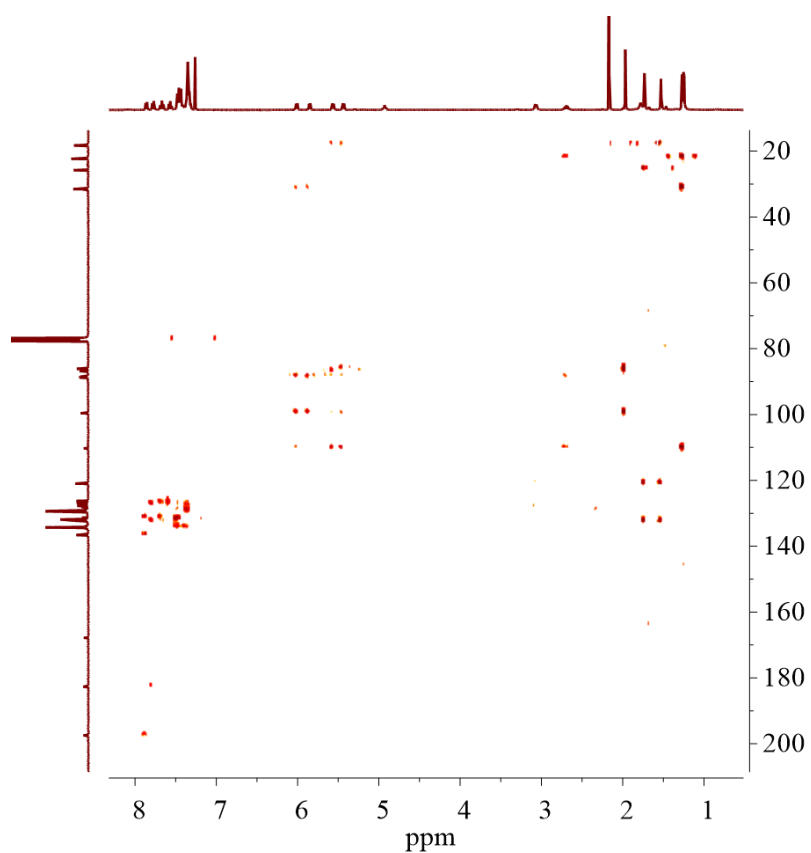
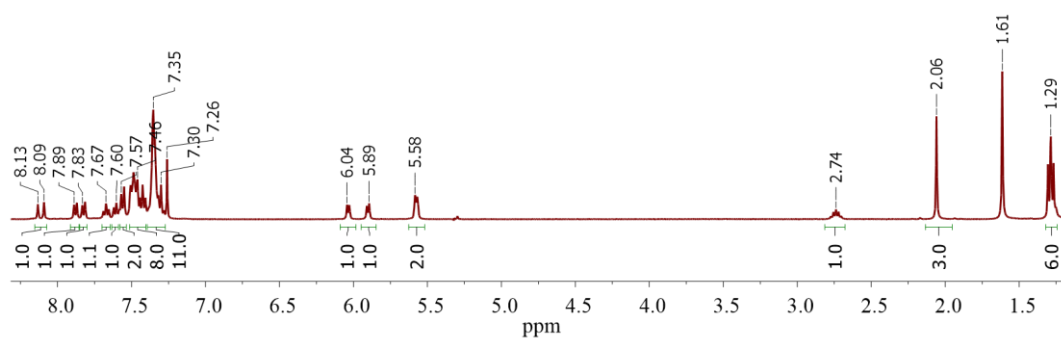
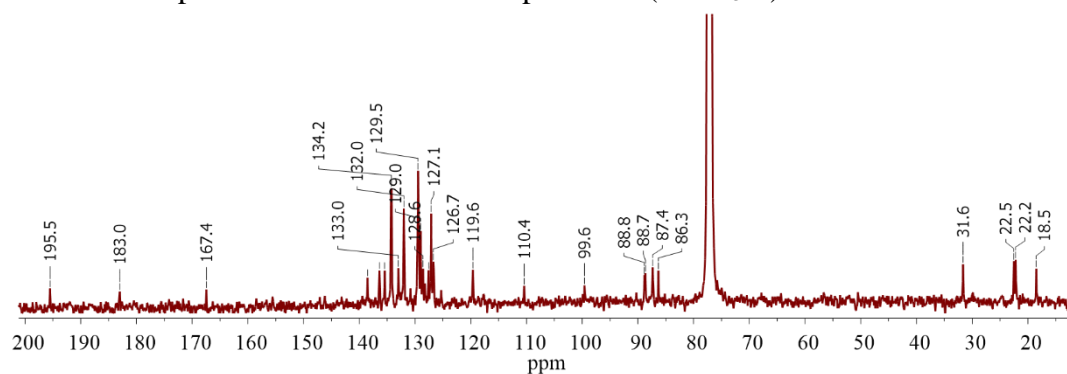
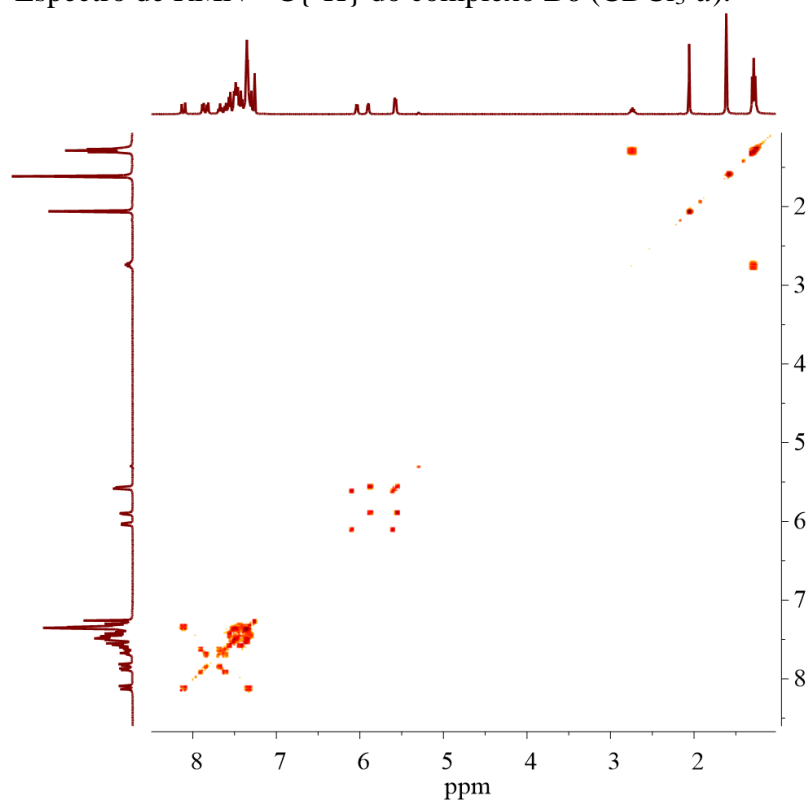


FIGURA B25 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B5** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B26 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **B6** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA B27 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B6** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA B28 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B6** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).

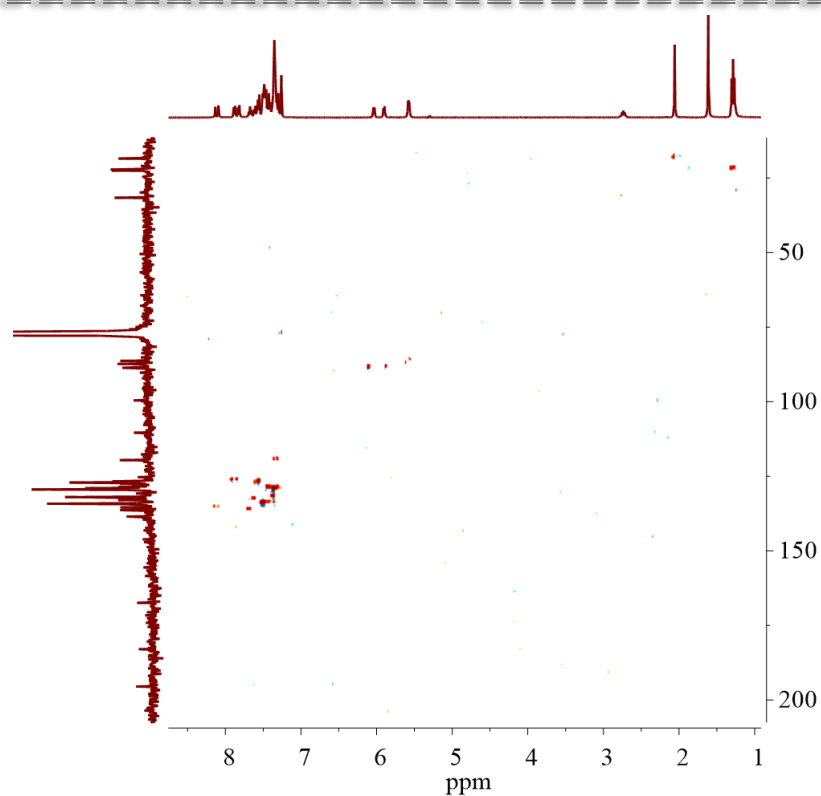


FIGURA B29 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B6** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

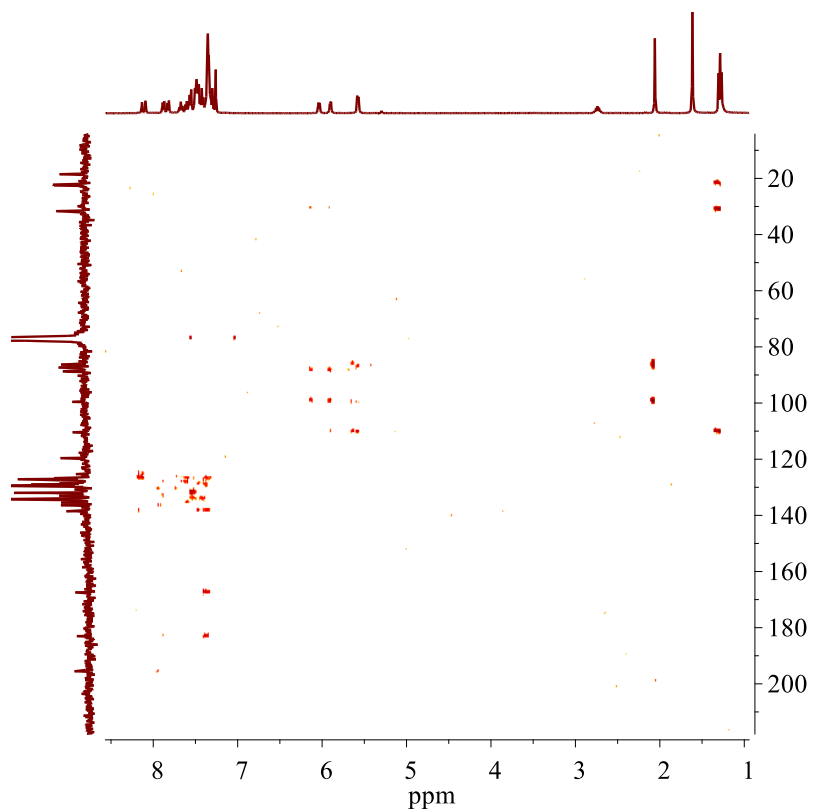
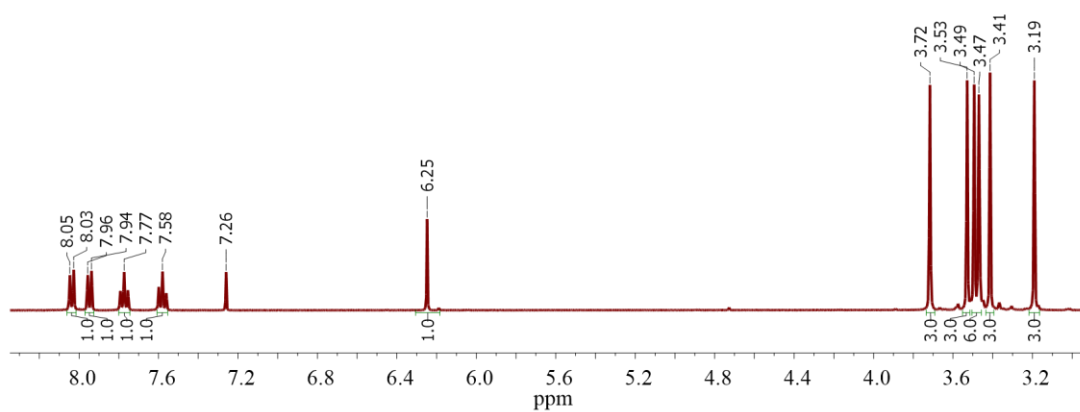
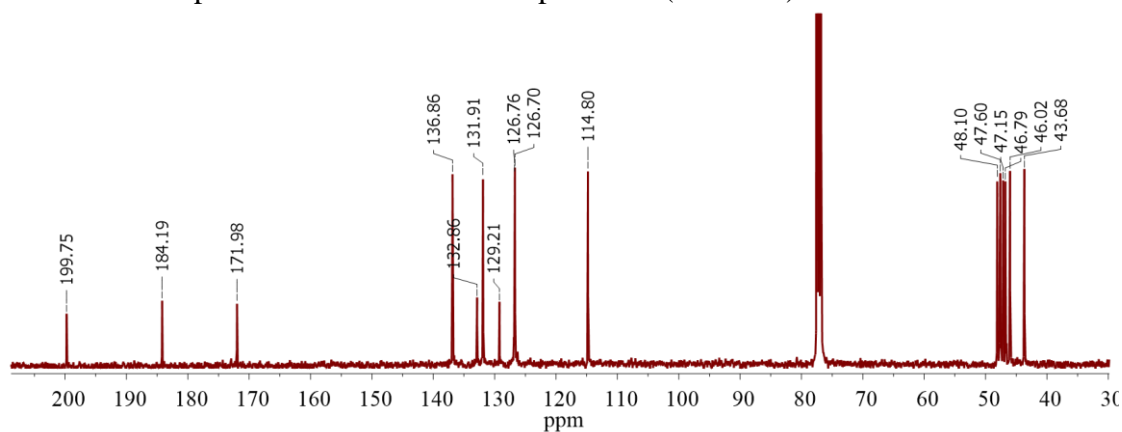
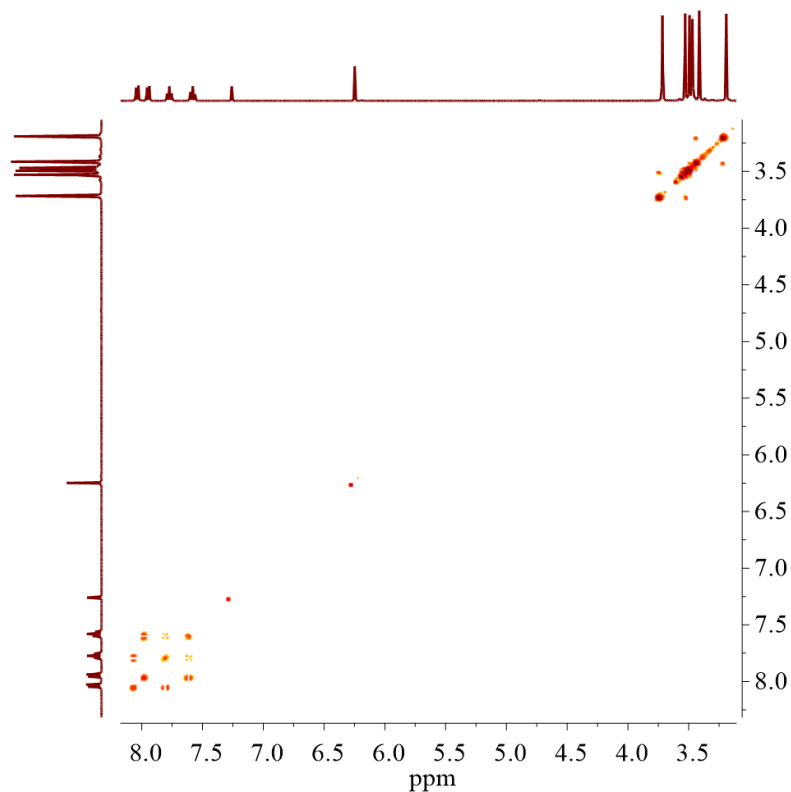


FIGURA B30 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B6** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B31 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **B7** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).FIGURA B32 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B7** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).FIGURA B33 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B7** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).

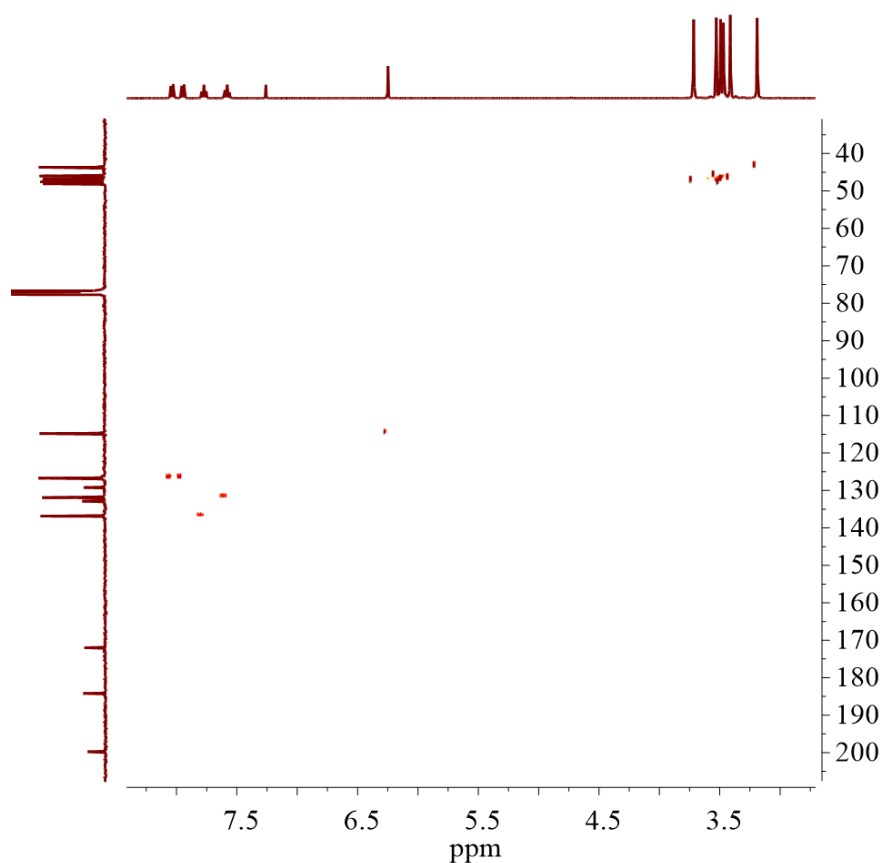


FIGURA B34 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B7** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

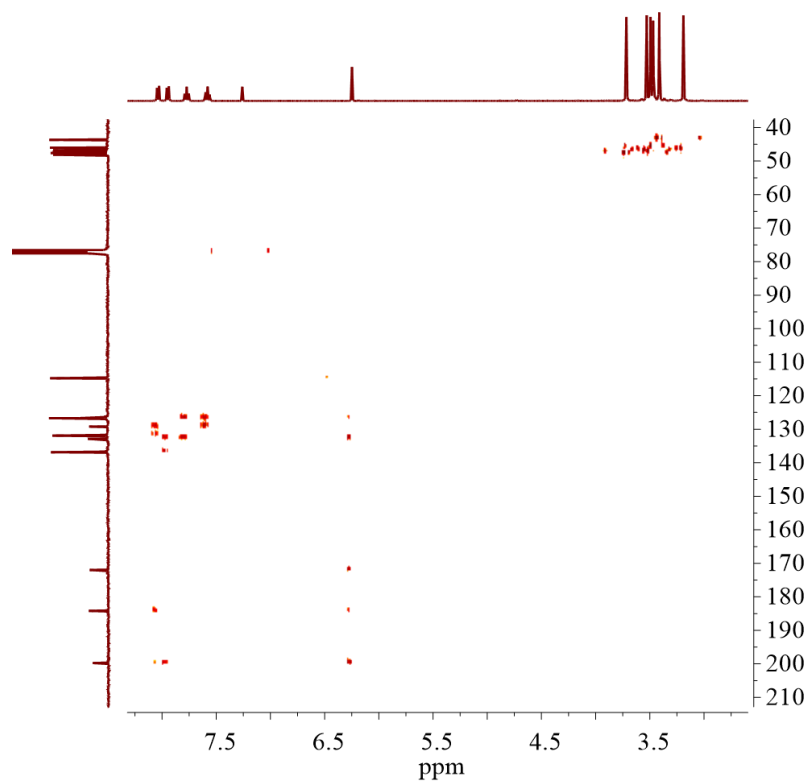
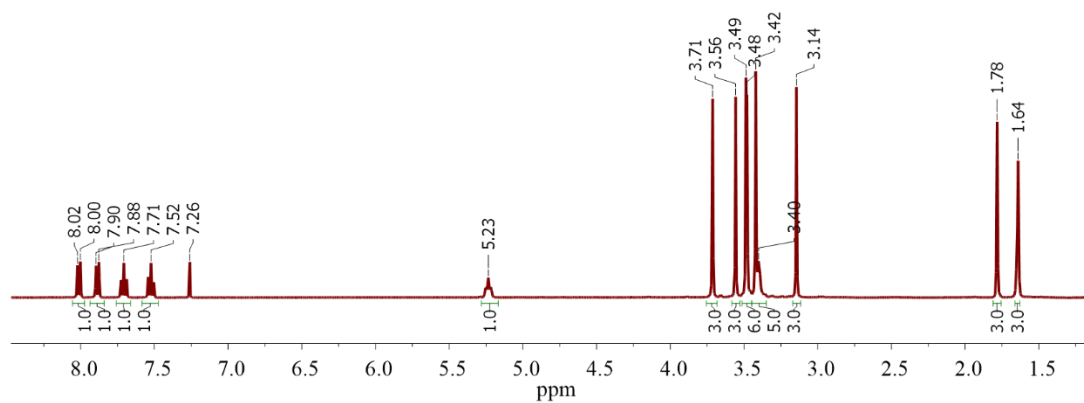
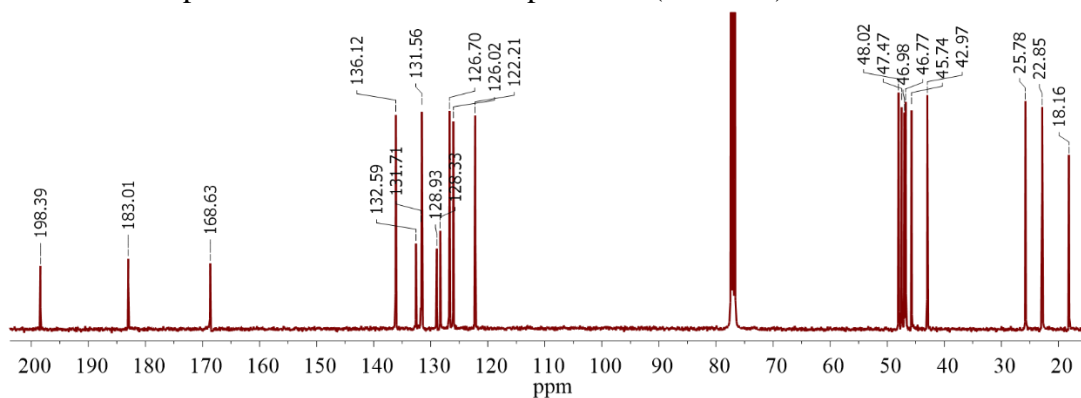
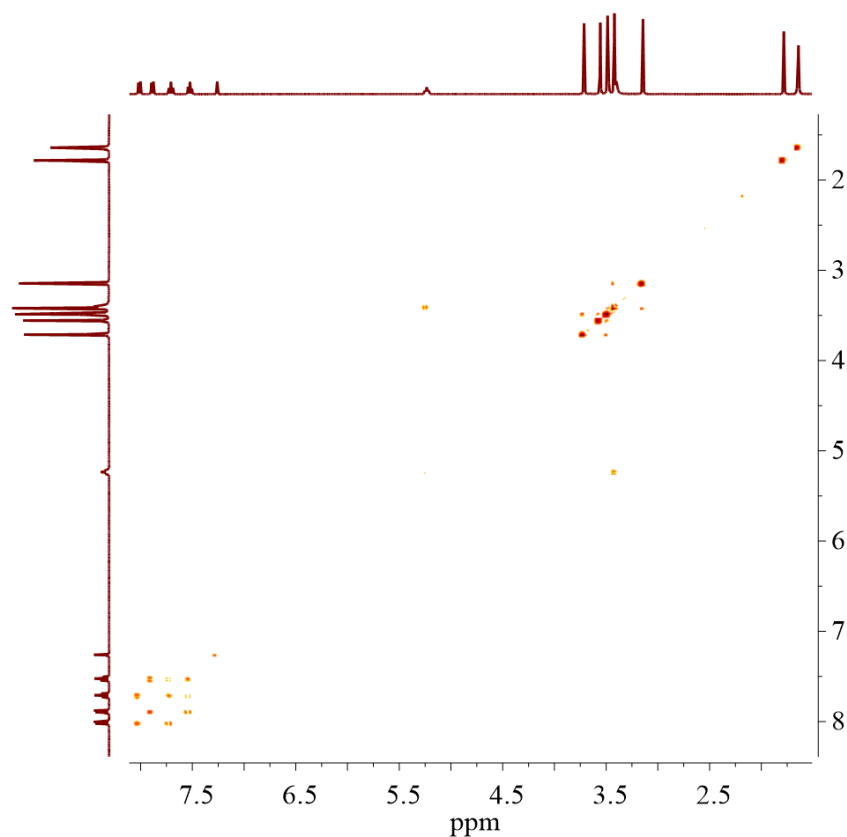


FIGURA B35 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B7** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B36 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **B8** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B37 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B8** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B38 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY obtido para o complexo **B8** (CDCl<sub>3</sub>-d).

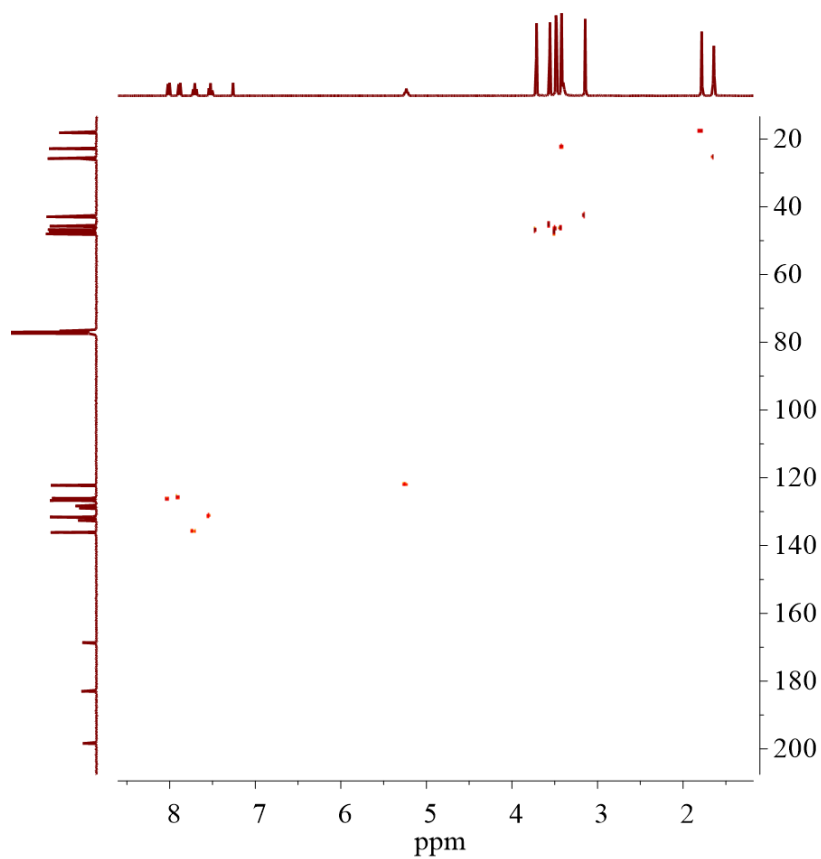


FIGURA B39 - - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B8** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

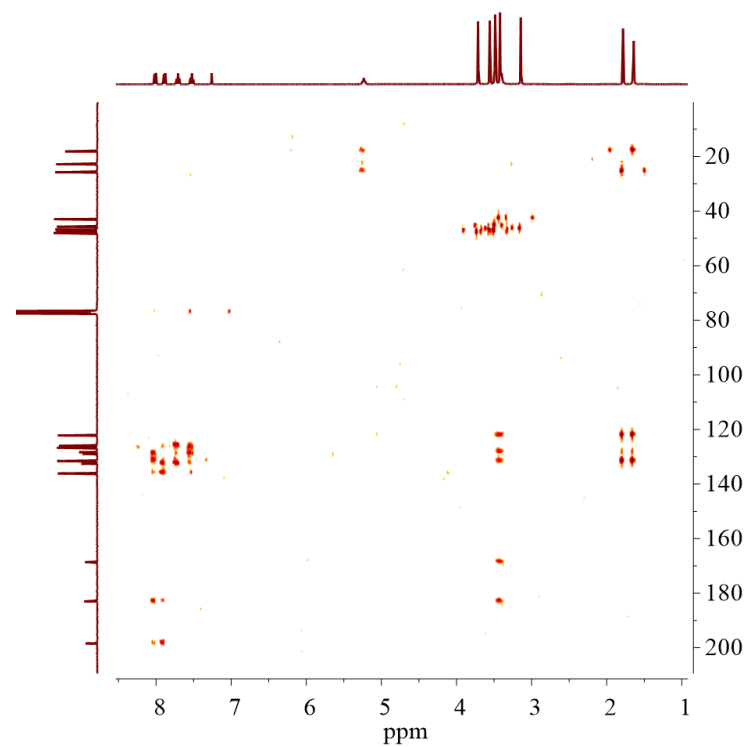
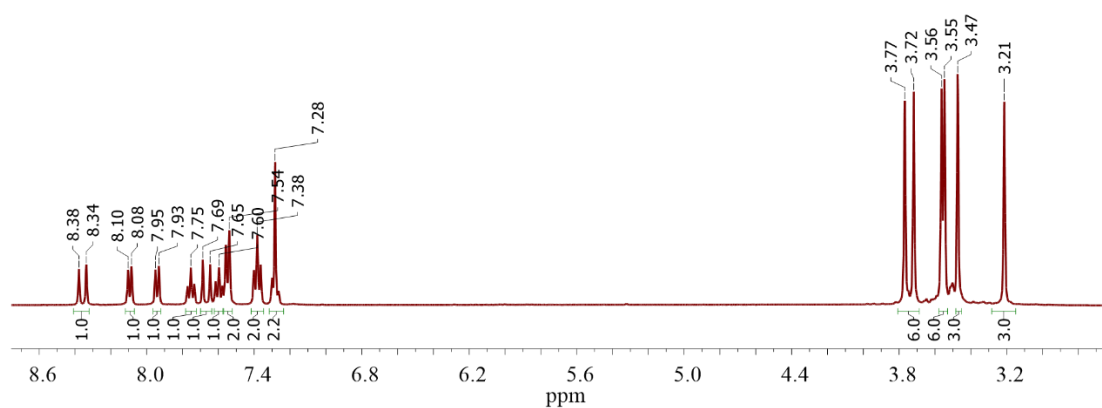
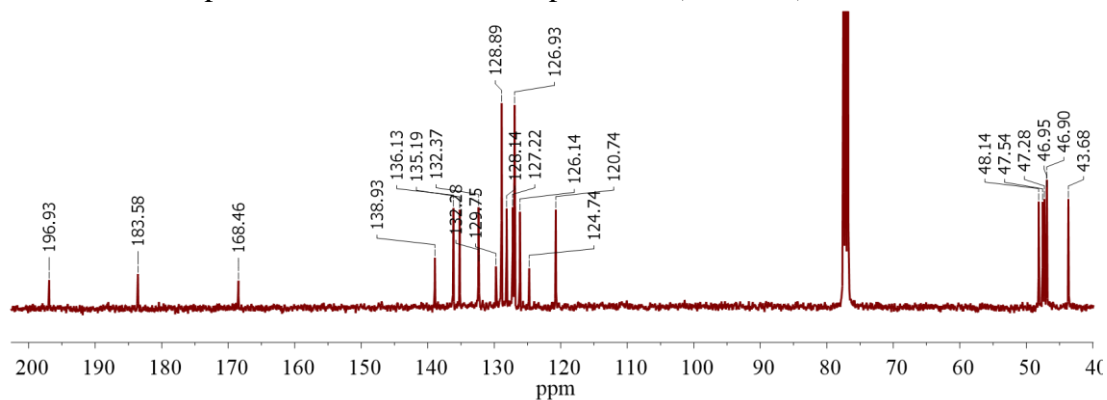
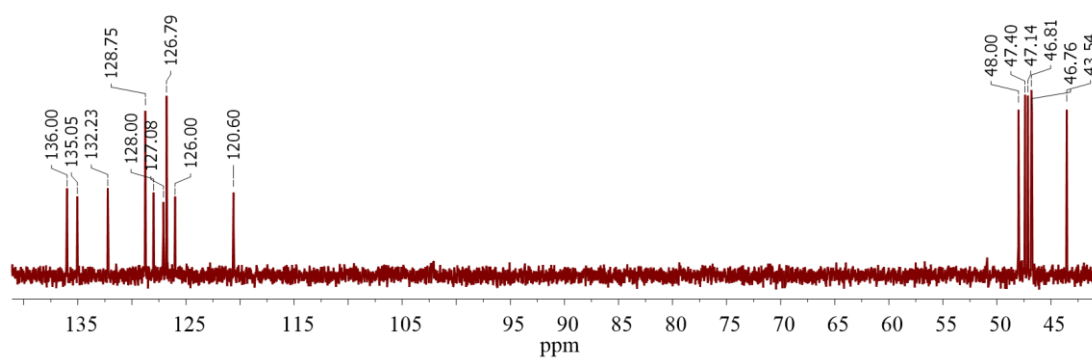
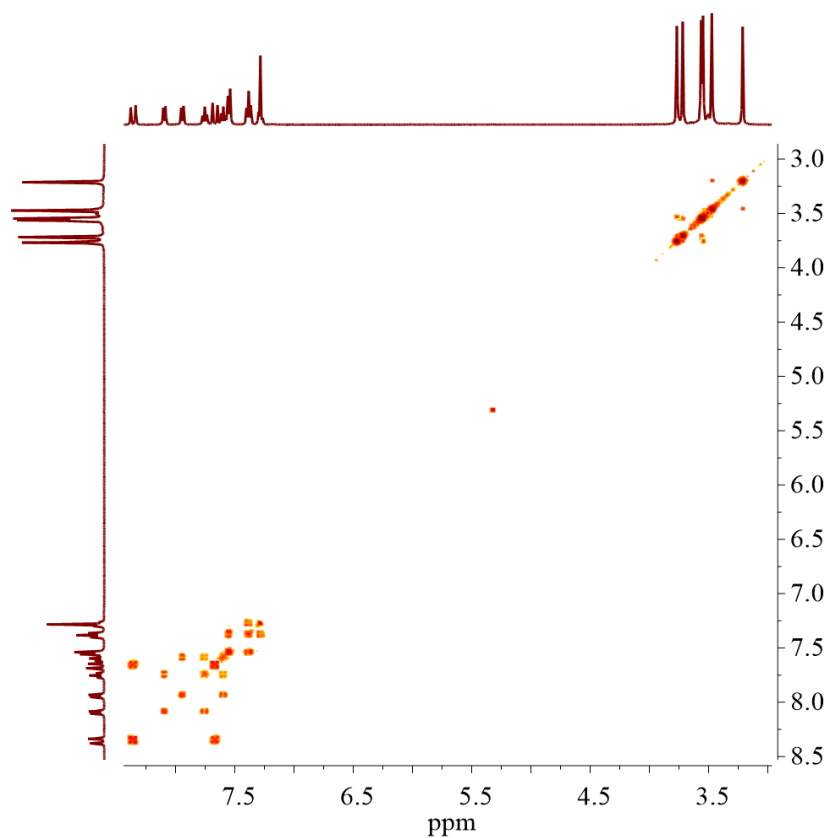
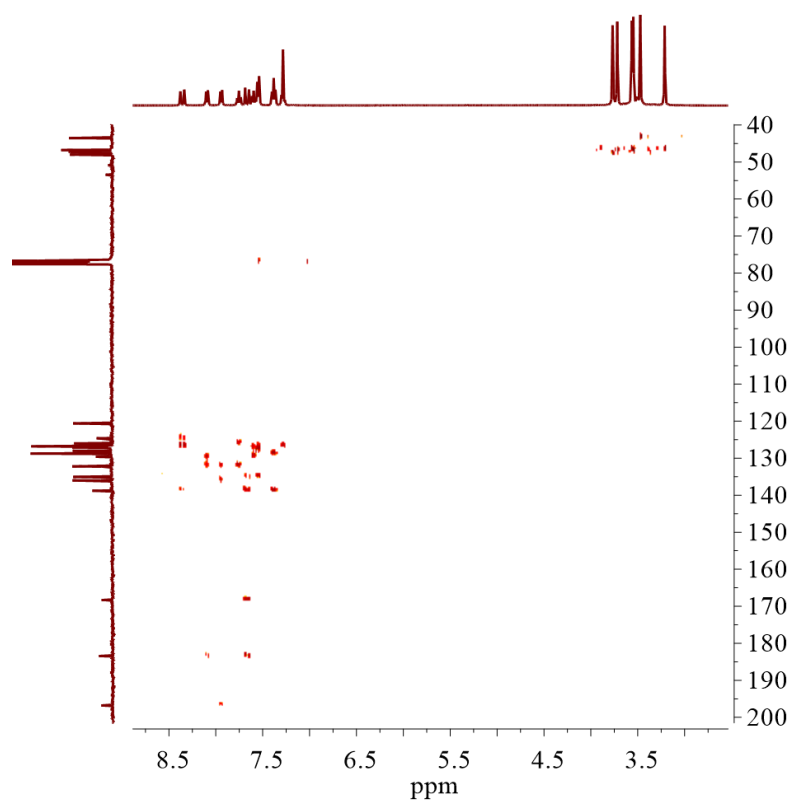
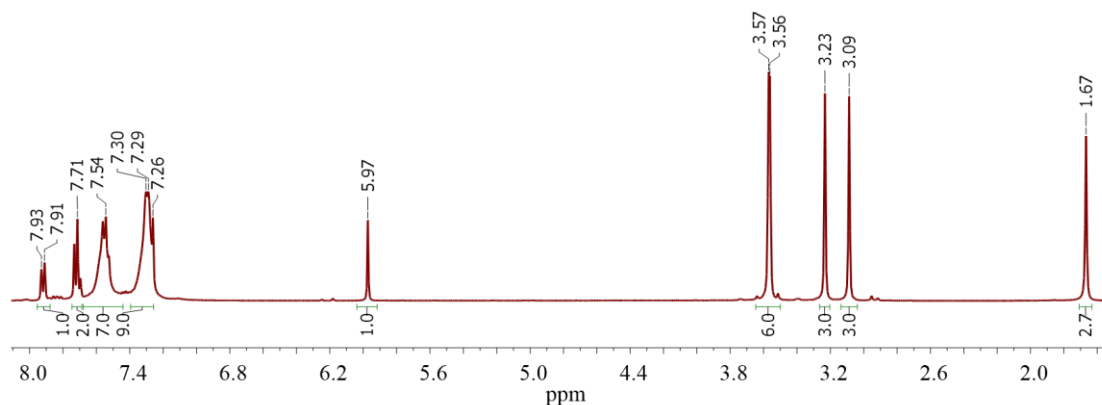
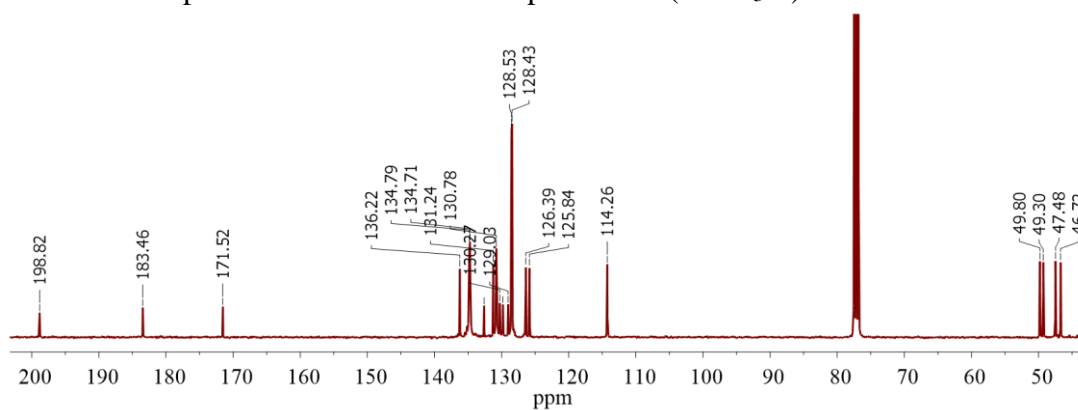
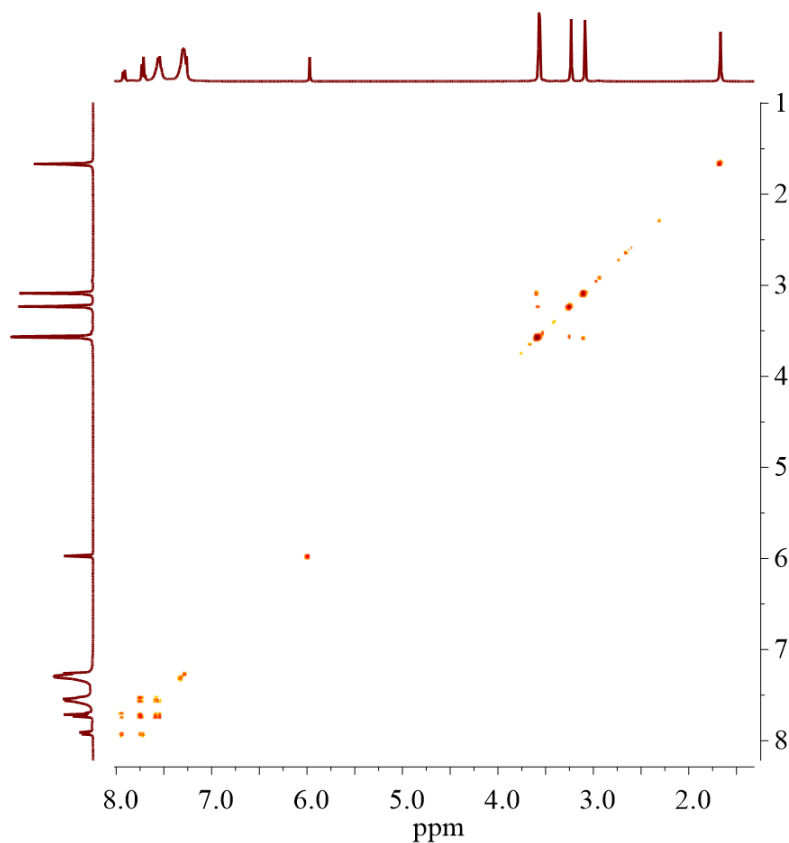


FIGURA B40 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B8** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B41 - - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **B9** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B42 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B9** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B43 - Espectro de RMN DEPT <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B9** (CDCl<sub>3</sub>-d).



FIGURA B44 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B9** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).FIGURA B45 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B9** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B46 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **B10** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA B47 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **B10** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).FIGURA B48 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **B10** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).

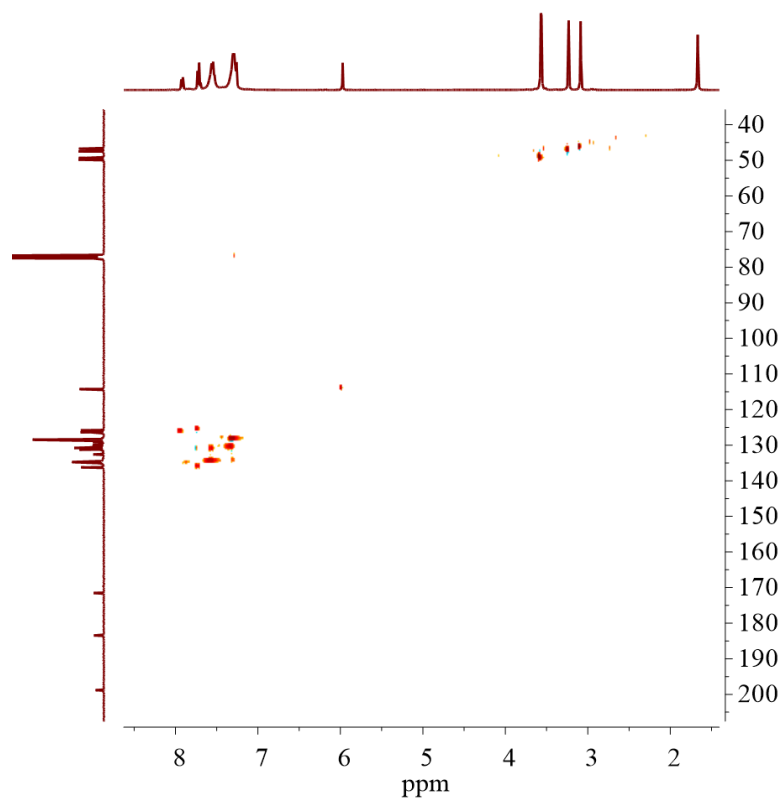


FIGURA B49 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B10** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

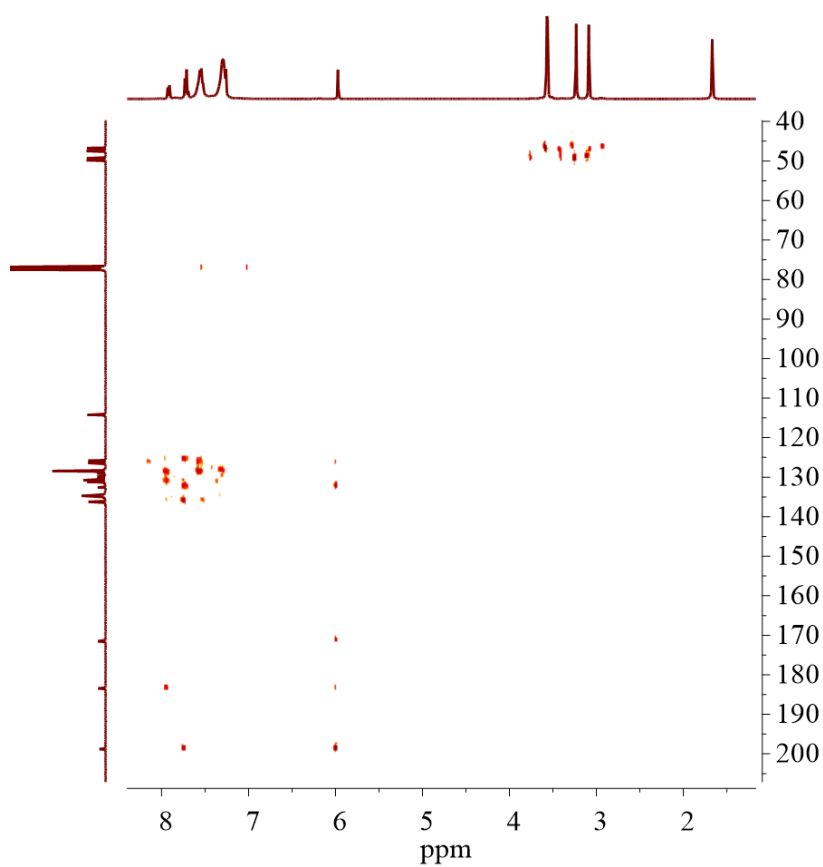
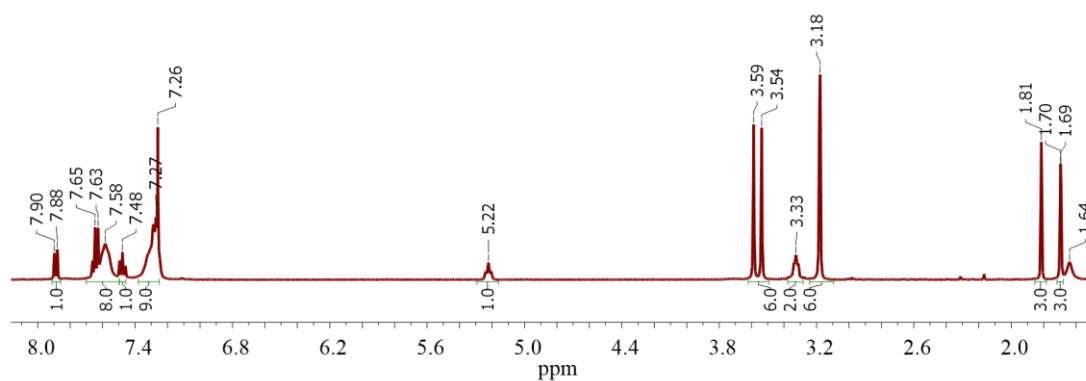
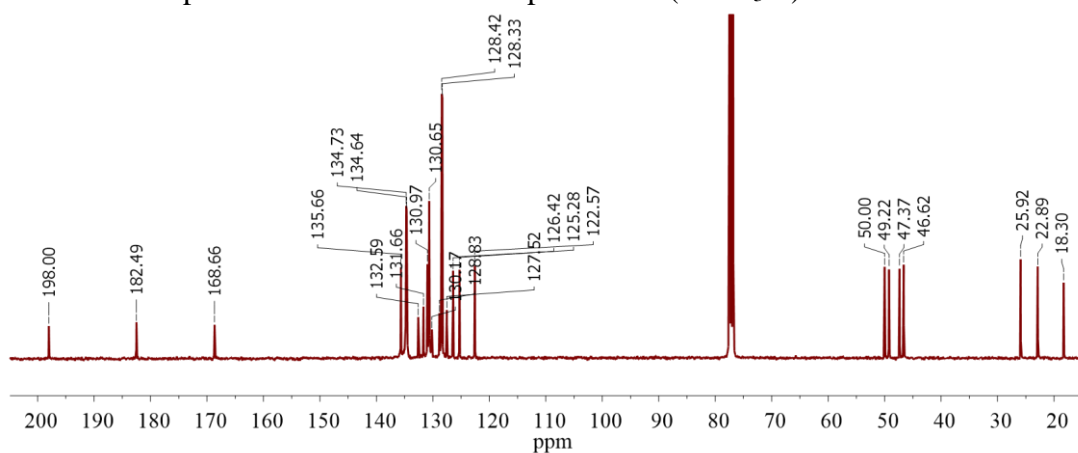
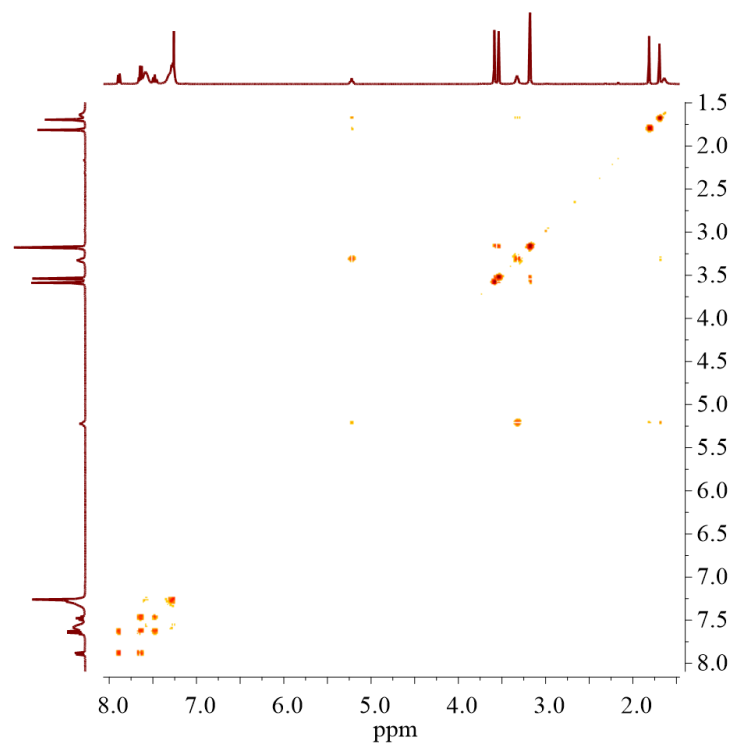


FIGURA B50 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B10** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B51 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **B11** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B52 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B11** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B53 - - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY obtido para o complexo **B11** (CDCl<sub>3</sub>-d).

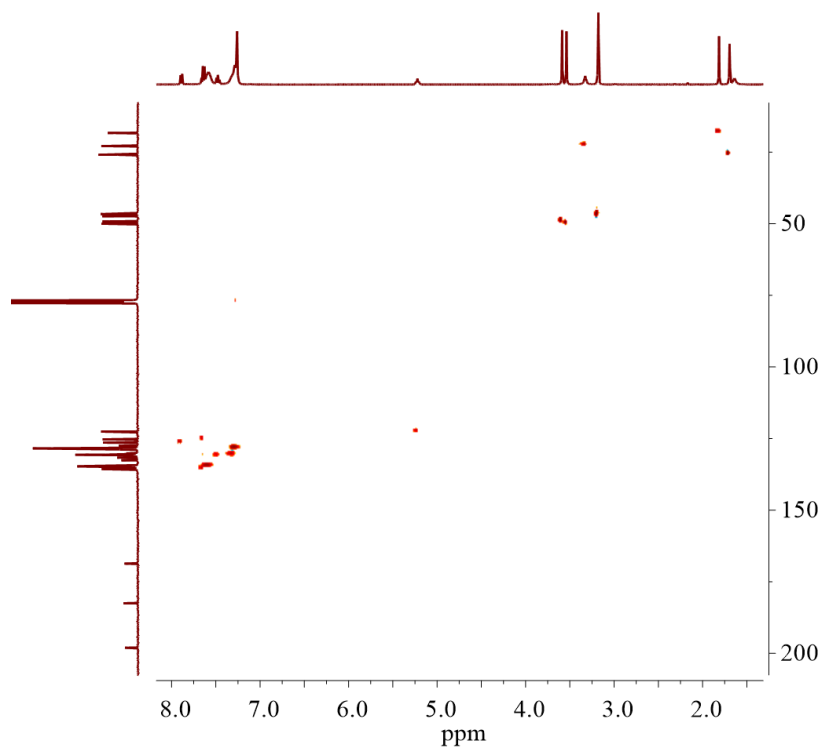


FIGURA B54 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B11** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

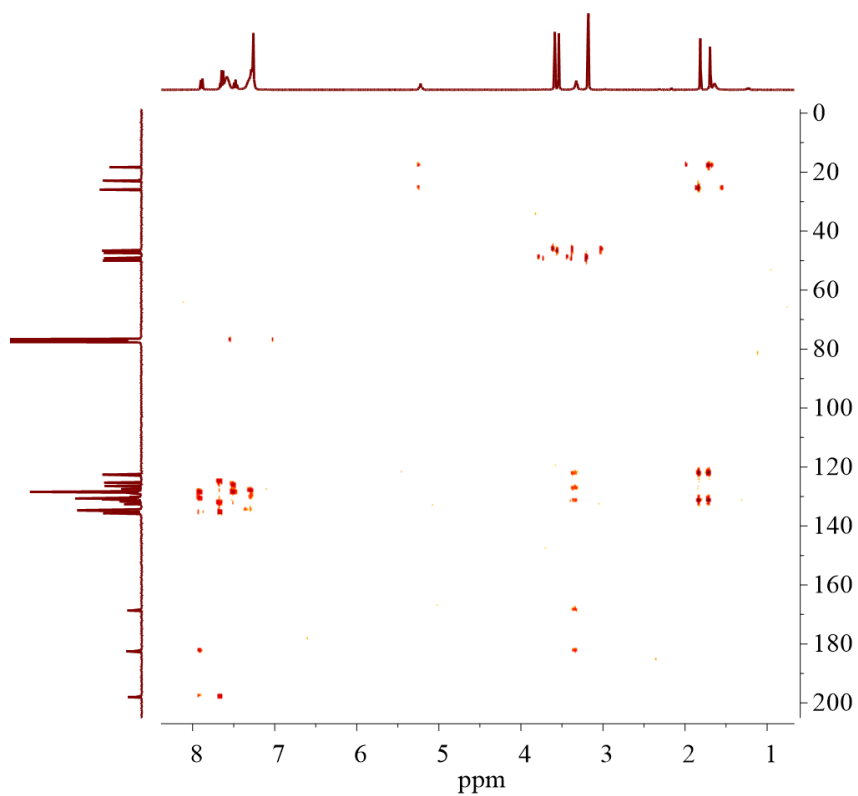
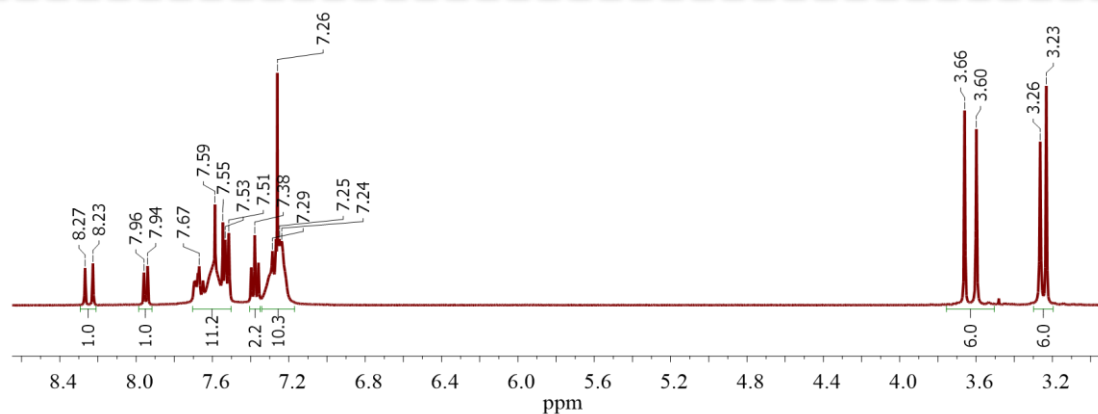
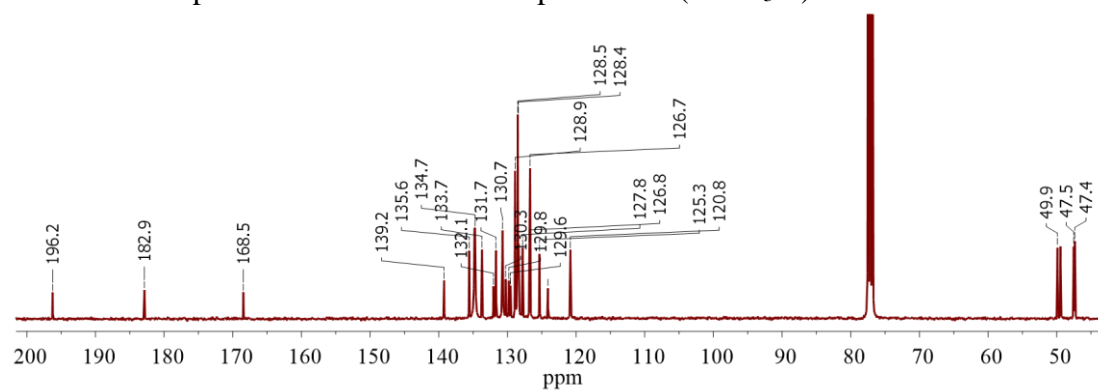
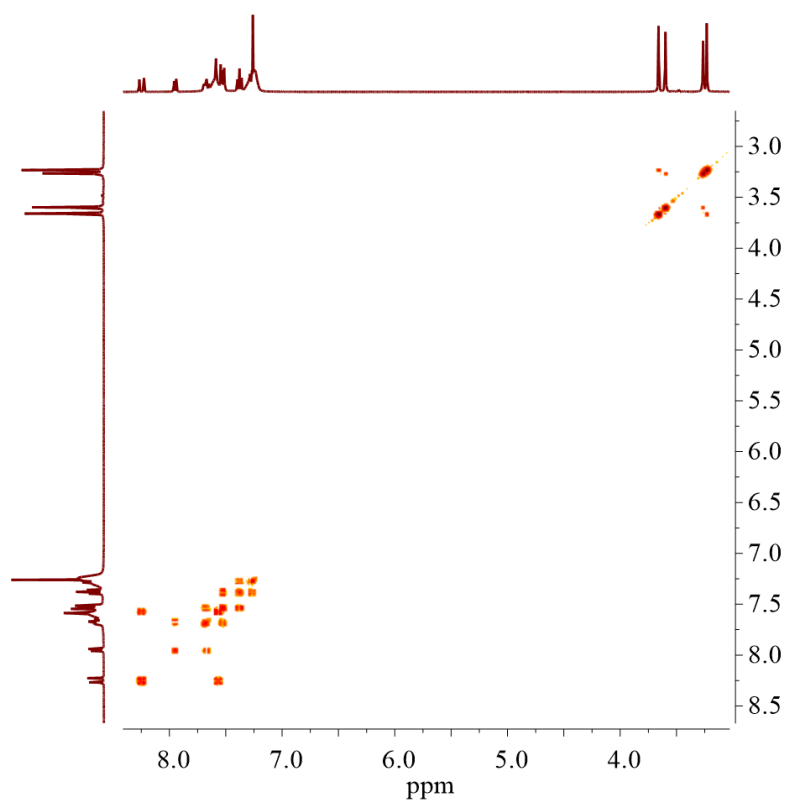


FIGURA B 55 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B11** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

FIGURA B56 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do complexo **B12** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B57 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} do complexo **B12** (CDCl<sub>3</sub>-d).FIGURA B58 - Mapa de contorno <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C COSY obtido para o complexo **B12** (CDCl<sub>3</sub>-d).

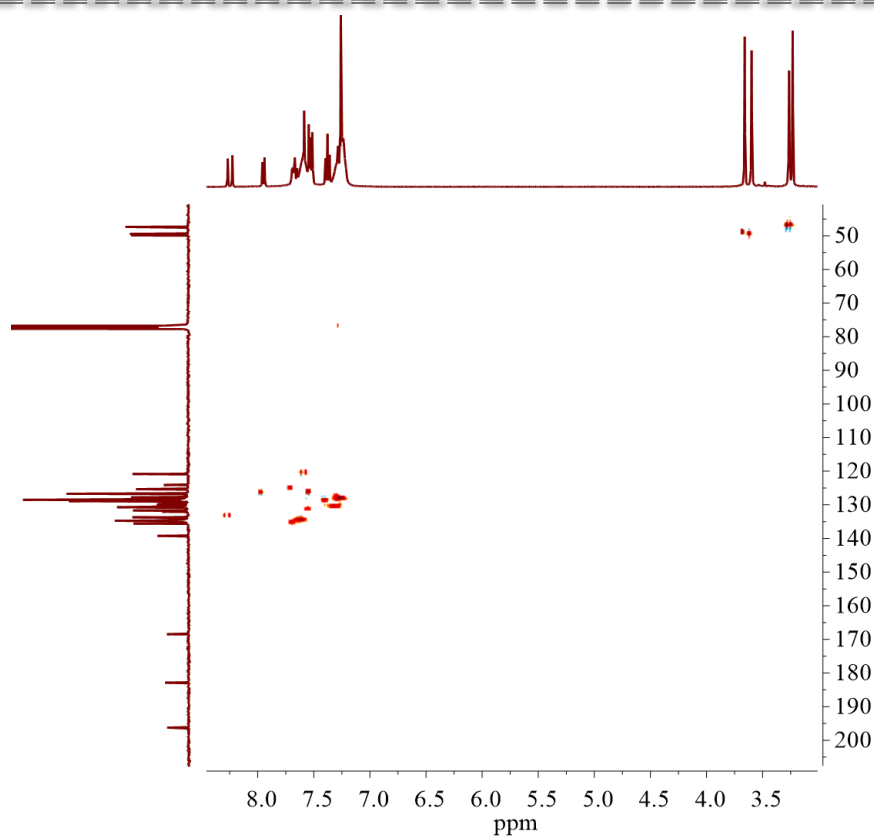


FIGURA B59 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **B12** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

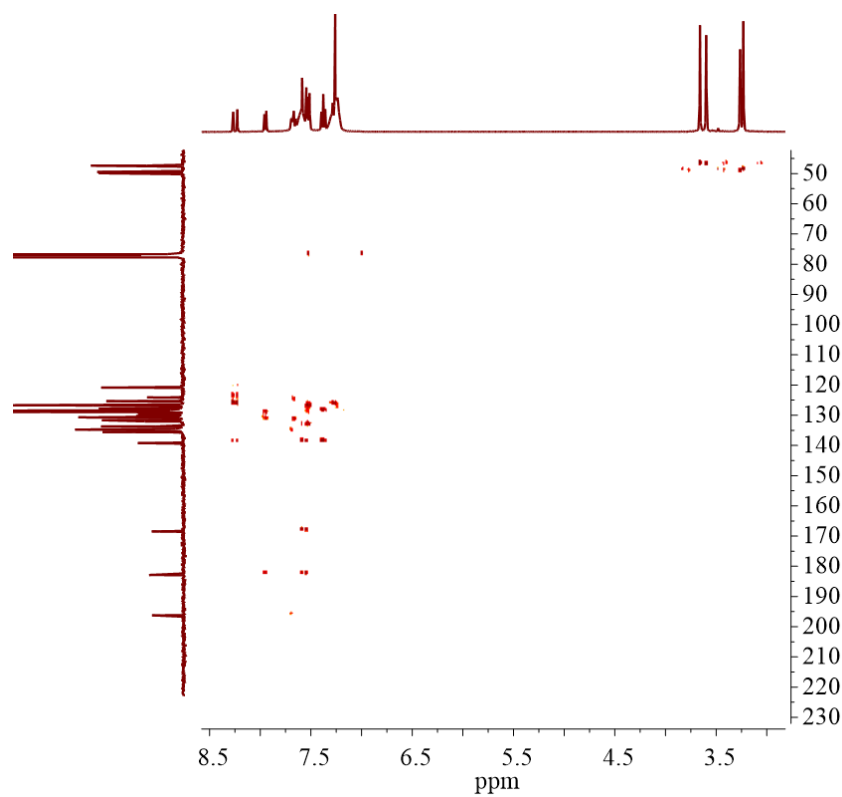


FIGURA B60 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **B12** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

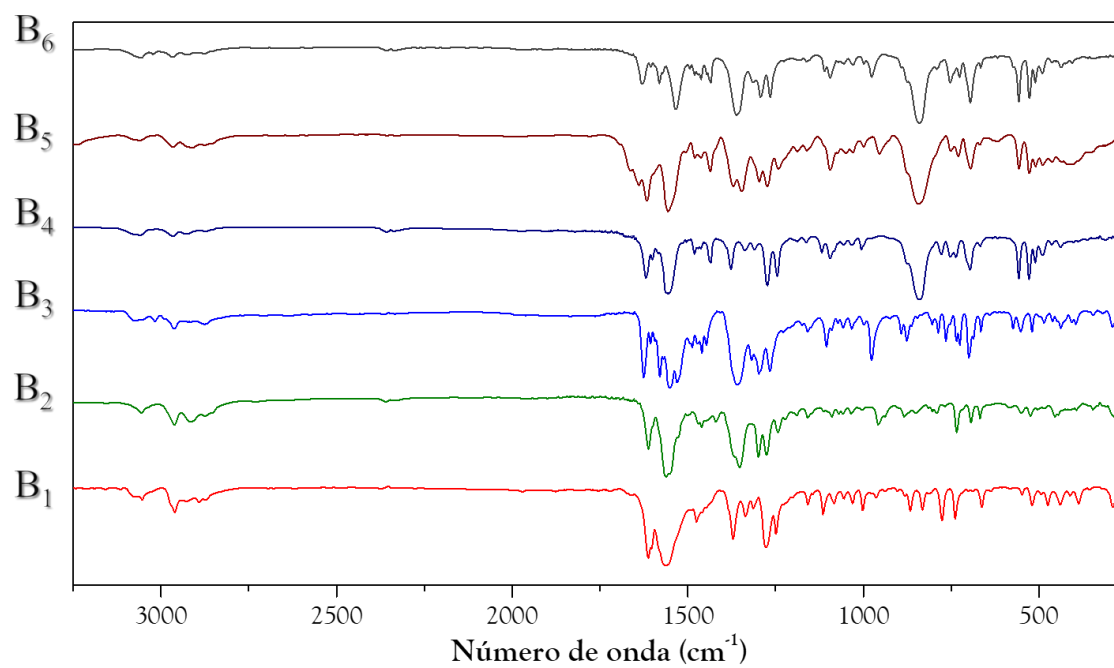
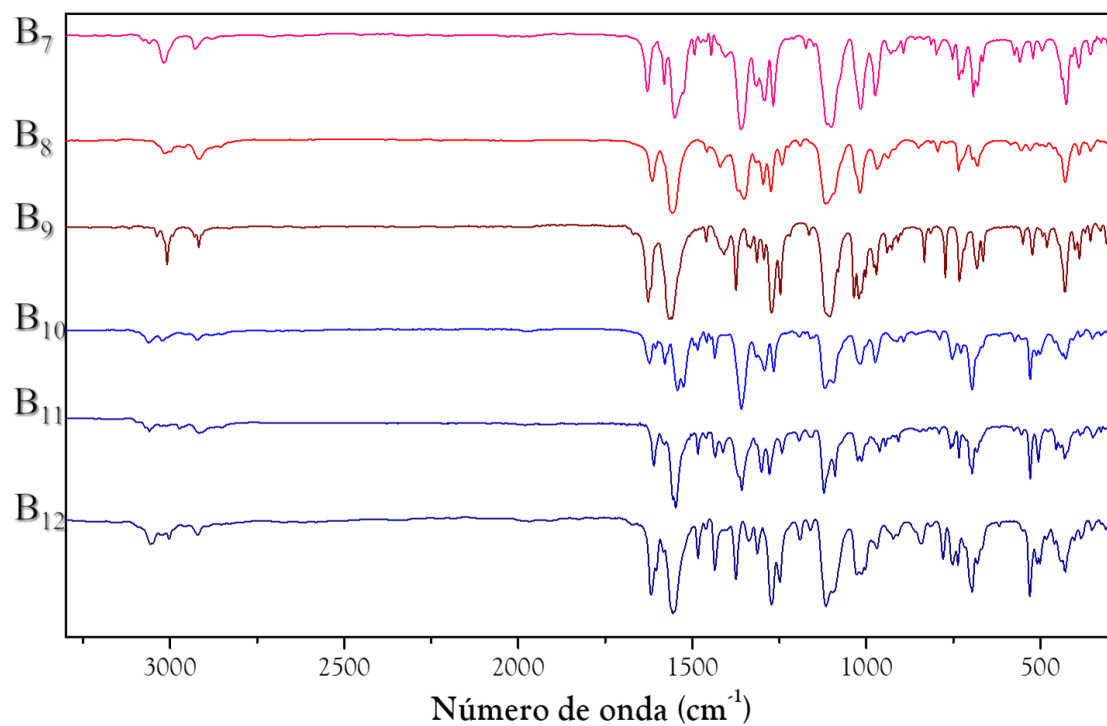


FIGURA B61 - Espectros FT-IR dos complexos **B1-B12** (em pastilhas de KBr).



Tabela B1 - Dados de cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **B6**, **B3** e **B8**.

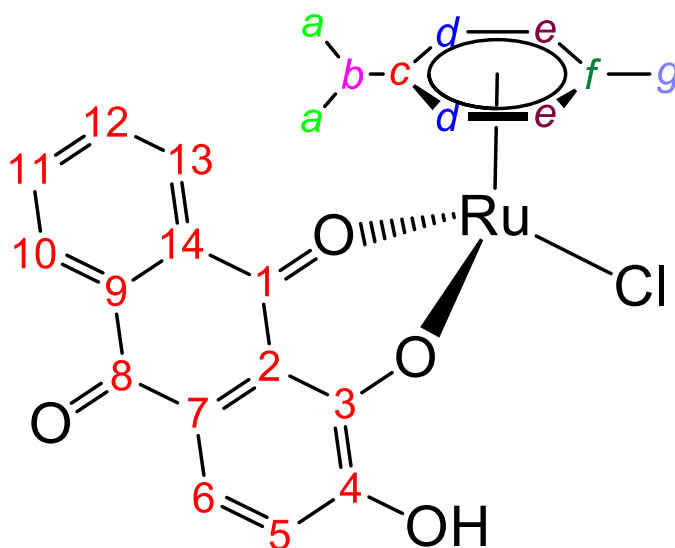
Complexo	B3	B6	B8
Fórmula Empírica	C <sub>28</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>3</sub> Ru	C <sub>46</sub> H <sub>40</sub> F <sub>6</sub> O <sub>3</sub> P <sub>2</sub> Ru	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> ClO <sub>6</sub> RuS <sub>3</sub>
Massa molecular	546,00	917,79	612,16
Temperatura/K	293(2)	293(2)	293(2)
Sistema Cristalino	triclinico	monoclinico	monoclinico
Grupo espacial	P-1	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub> /c
a/Å	8,9972(4)	15,0263(3)	8,8548(3)
b/Å	11,0757(4)	14,2166(3)	21,9076(5)
c/Å	12,2336(5)	18,5474(3)	13,6228(3)
α/°	81,339(3)	90	90
β/°	83,666(3)	90,404(2)	96,699(2)
γ/°	78,652(3)	90	90
Volume/Å <sup>3</sup>	1177,52(8)	3962,05(13)	2624,61(12)
Z	1	1	4
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1,540	1,539	1,549
μ/mm <sup>-1</sup>	0,807	0,547	0,971
F(000)	556,0	1872,0	1256,0
Tamanho do cristal / mm <sup>3</sup>	0,14 × 0,11 × 0,04	0,477 × 0,327 × 0,287	0,201 × 0,223 × 0,564
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	5,398 to 51,358	5,422 to 53,998	5,544 to 51,498
Intervalos de índice	-10 ≤ h ≤ 10, -13 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 14	-18 ≤ h ≤ 19, -18 ≤ k ≤ 18, -21 ≤ l ≤ 23	-10 ≤ h ≤ 10, -26 ≤ k ≤ 26, -16 ≤ l ≤ 16
Refleções coletadas	23233	44348	51498
Reflexões independentes	4460 [R <sub>int</sub> = 0,0326, R <sub>sigma</sub> = 0,0215]	8651 [R <sub>int</sub> = 0,0248, R <sub>sigma</sub> = 0,0167]	5012 [R <sub>int</sub> = 0,0270, R <sub>sigma</sub> = 0,0118]
Dados/restrições/parâmetros	4460/0/301	8651/295/529	5012/0/297
Melhor ajuste de F <sup>2</sup>	1,094	1,144	1,060
Índices R finais [I >= 2σ (I)]	R <sub>1</sub> = 0,0351, wR <sub>2</sub> = 0,0897	R <sub>1</sub> = 0,0471, wR <sub>2</sub> = 0,1247	R <sub>1</sub> = 0,0579, wR <sub>2</sub> = 0,1341
Índices R finais [todos os dados]	R <sub>1</sub> = 0,0425, wR <sub>2</sub> = 0,0980	R <sub>1</sub> = 0,0612, wR <sub>2</sub> = 0,1460	R <sub>1</sub> = 0,0631, wR <sub>2</sub> = 0,1399
Maior diferença pico/vale / e Å <sup>-3</sup>	1,01/-0,48	1,31/-0,72	3,76/-1,59

Tabela B2 - Dados de cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **B9**, **B10** e **B12**.

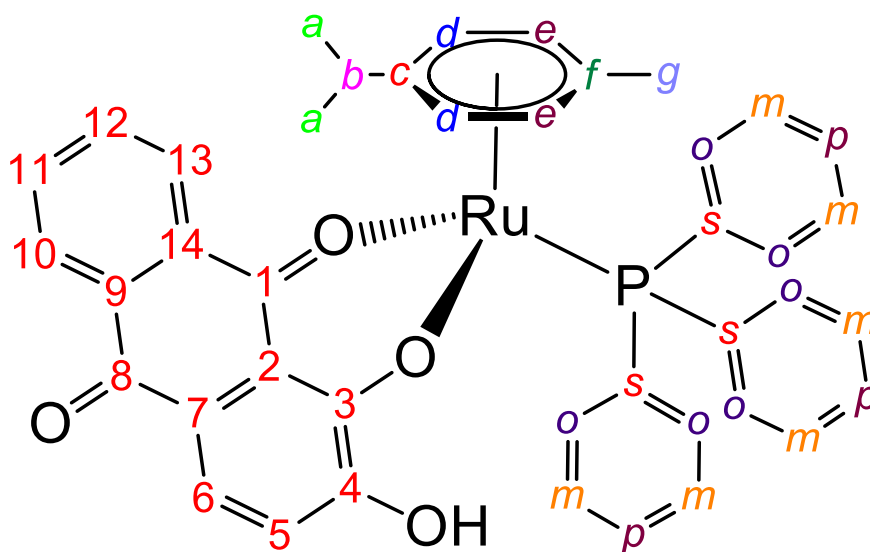
Complexo	B9	B10	B12
Fórmula Empírica	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> ClO <sub>6</sub> RuS <sub>3</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>38</sub> ClO <sub>6</sub> PRuS <sub>3</sub>	C <sub>40</sub> H <sub>38</sub> ClO <sub>5</sub> PRuS <sub>2</sub>
Massa molecular	646,210	806,31	830,31
Temperatura/K	293(2)	293(2)	293(2)
Sistema Cristalino	monoclinico	monoclinico	monoclinico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub> /c
a/Å	8,2809(3)	14,6306(3)	12,1272(9)
b/Å	20,5621(7)	11,7775(3)	12,0349(7)
c/Å	15,3897(7)	21,4135(5)	24,8640(15)
α/°	90	90	90
β/°	98,880(4)	97,695(2)	96,577(7)
γ/°	90	90	90
Volume/Å <sup>3</sup>	2589,04(18)	3656,57(15)	3605,0(4)
Z	4	4	4
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1,658	1,465	1,530
μ/mm <sup>-1</sup>	0,989	0,758	0,714
F(000)	1317,7	1656,0	1704,0
Tamanho do cristal / mm <sup>3</sup>	0,122 × 0,343 × 0,498	0,223 × 0,258 × 0,443	0,537 × 0,194 × 0,14
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	MoKα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	5,28 to 51,5	5,168 to 51,496	5,186 to 51,496
Intervalos de índice	-12 ≤ h ≤ 12, -31 ≤ k ≤ 30, -24 ≤ l ≤ 22	-17 ≤ h ≤ 17, -14 ≤ k ≤ 14, -26 ≤ l ≤ 26	-14 ≤ h ≤ 14, -14 ≤ k ≤ 12, -30 ≤ l ≤ 30
Refleções coletadas	57004	70821	21745
Reflexões independentes	4938 [R <sub>int</sub> = 0,0633, R <sub>sigma</sub> = 0,0592]	6980 [R <sub>int</sub> = 0,0315, R <sub>sigma</sub> = 0,0143]	6889 [R <sub>int</sub> = 0,0374, R <sub>sigma</sub> = 0,0420]
Dados/restrições/parâmetros	4938/0/347	6980/72/383	6889/0/455
Melhor ajuste de F <sup>2</sup>	1,077	1,186	1,262
Índices R finais [I >= 2σ (I)]	R <sub>1</sub> = 0,0289, wR <sub>2</sub> = 0,0640	R <sub>1</sub> = 0,0358, wR <sub>2</sub> = 0,0720	R <sub>1</sub> = 0,0615, wR <sub>2</sub> = 0,1142
Índices R finais [todos os dados]	R <sub>1</sub> = 0,0407, wR <sub>2</sub> = 0,0712	R <sub>1</sub> = 0,0437, wR <sub>2</sub> = 0,0792	R <sub>1</sub> = 0,0904, wR <sub>2</sub> = 0,1311
Maior diferença pico/vale / e Å <sup>-3</sup>	0,60/-0,40	0,38/-0,34	0,58/-0,64

**MATERIAL SUPLEMENTAR - SÉRIE C**

**[Ru(Aliz)(Cl)( $\eta^6$ -*p*-cymene)] (C1) -** Rendimento: 78%; Anal. Calc. for C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>1</sub>O<sub>4</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 56,80 (56,53); H, 4,78 (4,15) %; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 1,4; IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1660 ( $\nu$ C<sub>8</sub>O<sub>8</sub>); 1612 ( $\nu$ C<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1517 ( $\delta$ CH<sub>3</sub>); 1328 ( $\nu$ C<sub>3</sub>O<sub>3</sub>); 1265 ( $\nu$ C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 441 ( $\nu$ Ru-O). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 8,29 (1H, d, 13); 8,21 (1H, d, 10); 7,72 (2H, m, 11-12); 7,58 (1H, d, 6); 7,53 (1H, s, OH); 7.26 (CDCl<sub>3</sub>); 6,95 (1H, d, 5); 5,68 (2H, d, d); 5,39 (2H, d, e); 3,02 (1H, m, b); 1,58 (H<sub>2</sub>O); 2,36 (3H, s, g); 1,43 (6H, d, a). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 182,2 (1C, 1); 181,2 (1C, 8); 158,4 (1C, 4); 155,9 (1C, 3); 134,2/133,3 (2C, 9, 14); 134,0/133,3 (2C, 11, 12); 127,6/127,7 (2C, 13, 10); 124,9 (2C, 7, 2); 121,3 (1C, 5); 114,9 (1C, 6); 100,4 (1C, c); 97,8 (1C, f); 83,5/82,9 (2C, d); 79,8/79,4 (2C, e); 31,2 (1C, b); 22,6 (1C, a), 18,4 (1C, g).



**[Ru(Aliz)( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> (C2)** - Rendimento: 93%; Anal. Calc. for C<sub>42</sub>H<sub>36</sub>F<sub>6</sub>O<sub>4</sub>P<sub>2</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 56,06 (57,21); H, 4,30 (4,12)%; Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 43,0. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1656 ( $\nu$ C<sub>8</sub>O<sub>8</sub>); 1612 ( $\nu$ C<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1518 ( $\delta$ CH<sub>3</sub>); 1305 ( $\nu$ C<sub>3</sub>O<sub>3</sub>); 1267 ( $\nu$ C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 842 ( $\nu$ PF); 528 ( $\nu$ Ru-P); 439 ( $\nu$ Ru-O). <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) NMR (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 35.93 (s). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 8,33 (1H, d, *l3*); 8,10 (1H, d, *l0*); 7,93 (1H, s, *OH*); 7,87 (1H, t, *l2*); 7,70 (1H, t, *l1*); 7,57 (6H, m, *m*); 7,35 (10H, m, *6, o, p*); 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 6,71 (1H, d, *5*); 6,20 (2H, d, *d*); 5,34 (2H, d, *e*); 2,80 (1H, m, *b*); 1,84 (3H, s, *g*); 1,69 (H<sub>2</sub>O); 1,14 (6H, d, *a*). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 182,1 (1C, *l*); 180,5 (1C, *8*); 157,2 (2C, *3, 4*); 135,0/133,7 (2C, *9, 14*); 134,5/133,5 (2C, *11, 12*); 134,4 (6C, *m*); 134,6 (3C, *p*); 129,0 (6C, *o*); 128,1 (3C, *s*); 127,6 (1C, *l3*); 126,7 (1C, *l0*); 123,8 (2C, *7, 2*); 121,5 (1C, *6*); 115,9 (1C, *c*); 115,3 (1C, *5*); 100,7 (1C, *f*); 91,1/89,7 (2C, *d*); 85,8/84,4 (2C, *e*); 31,0 (1C, *b*); 22,2/21,8 (2C, *a*); 18,3 (1C, *g*).



**[Ru(Aliz)( $\eta^6$ -*p*-cymene)(PEt<sub>3</sub>)]BF<sub>4</sub> (C3)** - Rendimento: 110 mg (89%). Anal. Calc. for C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>F<sub>6</sub>O<sub>4</sub>P<sub>2</sub>Ru<sub>1</sub>: exp. (calc) C, 49,01 (48,85); 4,74 (4,92) %. Condutividade Molar (S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 67,1. IR (KBr, bandas selecionadas, cm<sup>-1</sup>): 1652 ( $\nu$ C<sub>8</sub>O<sub>8</sub>); 1614 ( $\nu$ C<sub>1</sub>O<sub>1</sub>); 1516 ( $\delta$ CH<sub>3</sub>); 1307 ( $\nu$ C<sub>3</sub>O<sub>3</sub>); 1265 ( $\nu$ C<sub>4</sub>O<sub>4</sub>); 840 ( $\nu$ PF) 557 ( $\nu$ Ru-P); 439 ( $\nu$ Ru-O). <sup>31</sup>P(<sup>1</sup>H) NMR (161.976 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 33.54 (s). <sup>1</sup>H NMR (400.132 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K)  $\delta$ (ppm): 8,29 (1H, d, 13); 8,00 (1H, d, 10); 7,81 (3H, m, 11, 12); 7,63 (1H, d, 6) 7,26 (CDCl<sub>3</sub>); 7,12 (1H, s, OH); 7,05 (1H, d, 5); 6,02/5,95 (4H, d, d, e); 2,65 (1H, m, b); 2,14 (3H, s, g); 1,88 (6H, m, s); 1,70 (H<sub>2</sub>O); 1,32 (6H, t, a); 1,09 (9H, m, t). <sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 184,5 (1C, 1); 180,5 (1C, 8); 158,4 (2C, 4); 156,6 (1C, 3) 135,1/134,3 (2C, 11, 12); 133,5 (2C, 9, 14); 127,9 (1C, 13); 126,8 (1C, 10); 124,8 (2C, 7, 2); 122,2 (1C, 6); 116,1 (1C, 5); 106,2 (1C, c); 96,9 (1C, f); 89,3/88,2/86,5 (2C, d, e); 31,0 (1C, b); 22,2 (2C, a); 17,6 (1C, g); 15,56 (3C, s); 7,32 (3C, t).

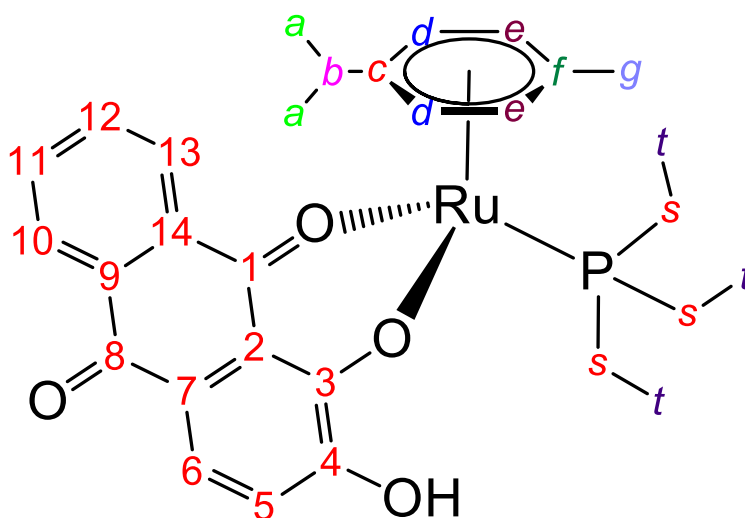
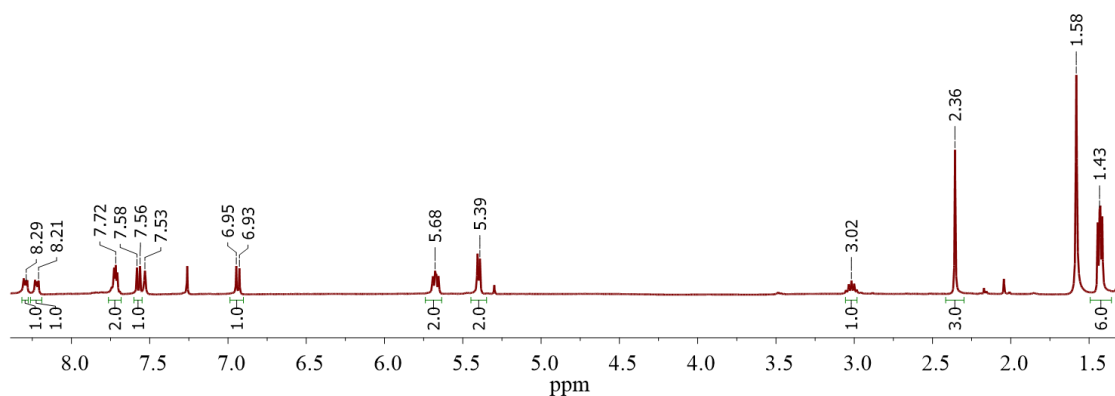
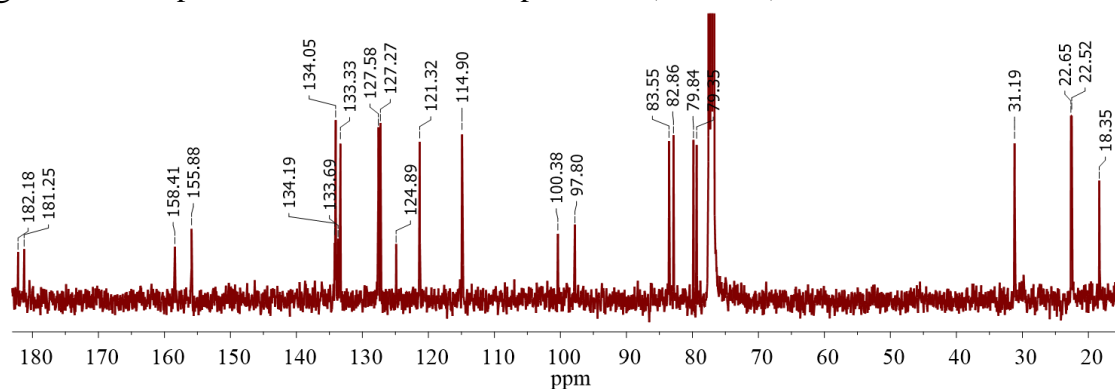
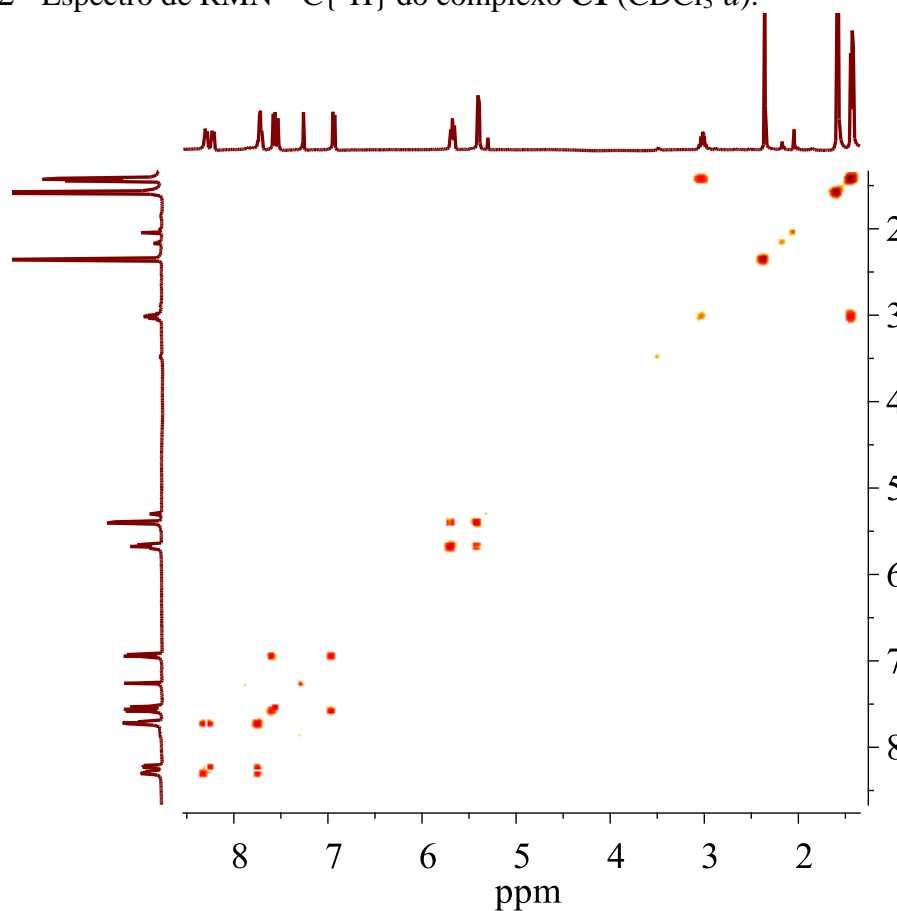




Tabela C1 - Dados de cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **C1** e **C3**.

Complexo	C1	C3
Fórmula Empírica	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> ClO <sub>4</sub> Ru	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> F <sub>6</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> Ru
Massa molecular	509,949	737,60
Temperatura/K	296,15	293(2)
Sistema Cristalino	monoclinic	monoclinic
Gropo espacial	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub> /c
a/Å	14,9870(6)	8,3925(6)
b/Å	7,9444(3)	29,3799(18)
c/Å	17,9927(6)	12,9331(9)
α/°	90	90
β/°	107,795(1)	102,510(7)
γ/°	90	90
Volume/Å <sup>3</sup>	2039,77(13)	3113,2(4)
Z	4	4
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1,661	1,574
μ/mm <sup>-1</sup>	0,929	0,677
F(000)	1028,1	1504,0
Tamanho do cristal / mm <sup>3</sup>	0,21 × 0,18 × 0,12	0,402 × 0,165 × 0,095
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	2,86 to 51,4	5,162 to 51,494
Intervalos de índice	-19 ≤ h ≤ 19, -10 ≤ k ≤ 9, -23 ≤ l ≤ 18	-10 ≤ h ≤ 10, -35 ≤ k ≤ 34, -15 ≤ l ≤ 15
Refleções coletadas	17137	26231
Reflexões independentes	3876 [R <sub>int</sub> = 0,0358, R <sub>sigma</sub> = 0,0365]	5954 [R <sub>int</sub> = 0,0521, R <sub>sigma</sub> = 0,0456]
Dados/restrições/parametros	3876/108/300	5954/161/431
Melhor ajuste de F <sup>2</sup>	1,084	1,130
Índices R finais [I >= 2σ (I)]	R <sub>1</sub> = 0,0339, wR <sub>2</sub> = 0,0866	R <sub>1</sub> = 0,0809, wR <sub>2</sub> = 0,1761
Índices R finais [todos os dados]	R <sub>1</sub> = 0,0440, wR <sub>2</sub> = 0,0946	R <sub>1</sub> = 0,1160, wR <sub>2</sub> = 0,2080
Maior diferença pico/vale / e Å <sup>-3</sup>	1,39/-0,45	0,59/-0,49

Figura C1 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **C1** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).Figura C2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **C1** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).Figura C3 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **C1** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).



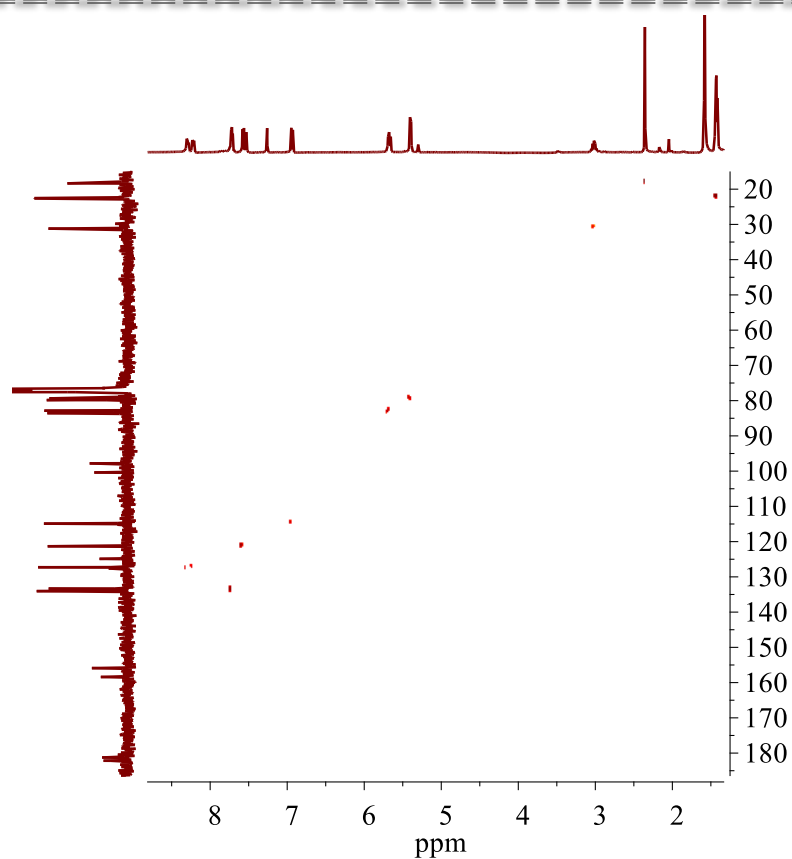


Figura C4 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo C1 ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

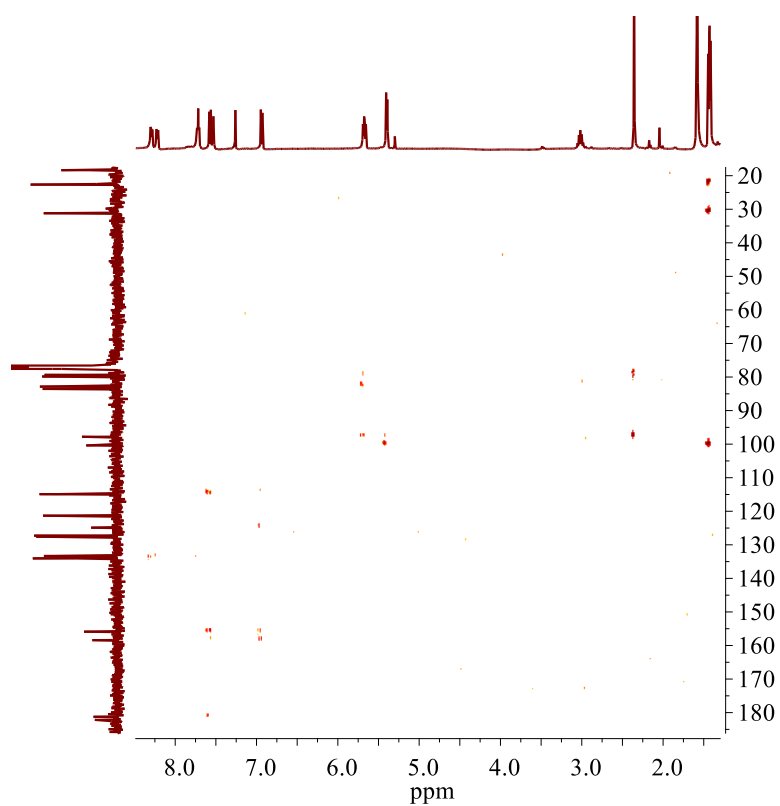
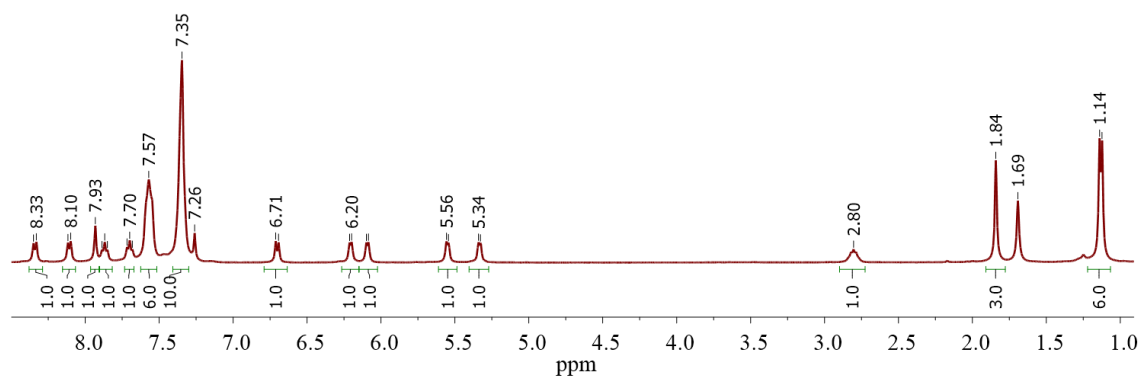
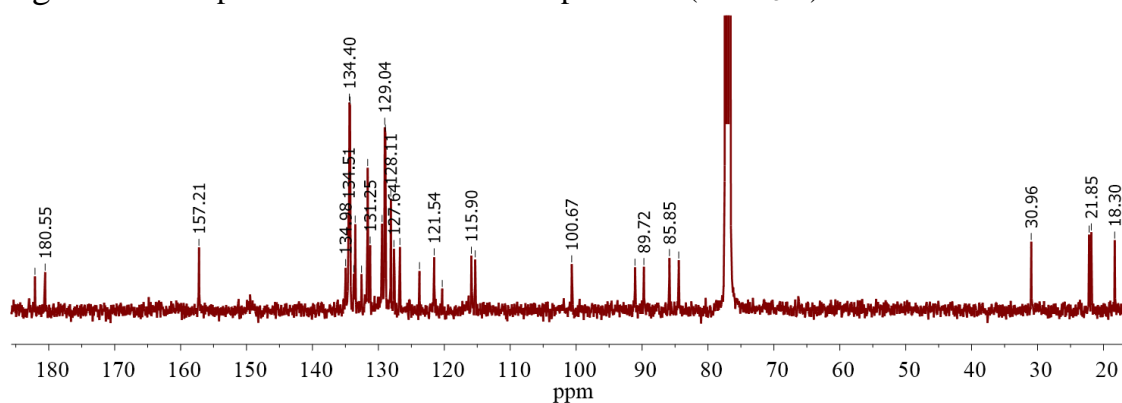
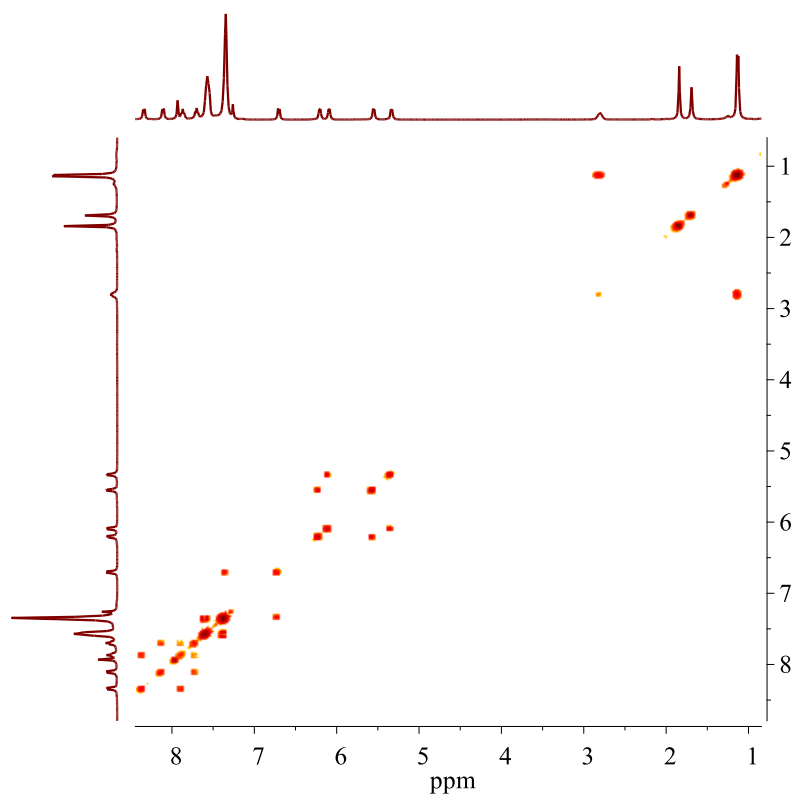


Figura C5 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo C1 ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

Figura C6 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **C2** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).Figura C7 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **C2** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ),Figura C8 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **C2** ( $\text{CDCl}_3\text{-}d$ ).

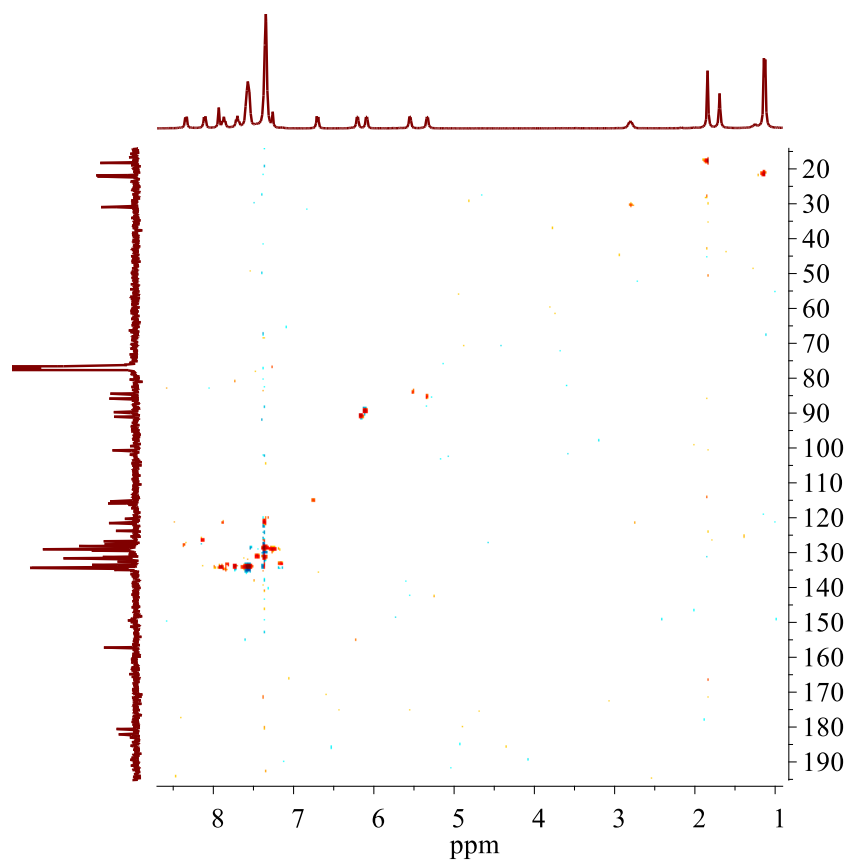


Figura C9 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo C3 ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

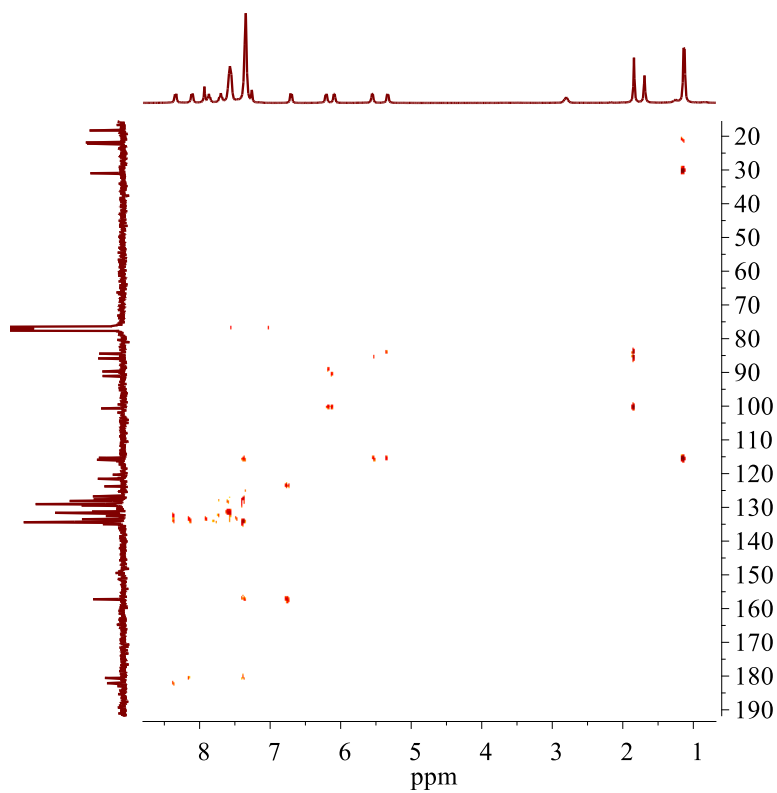
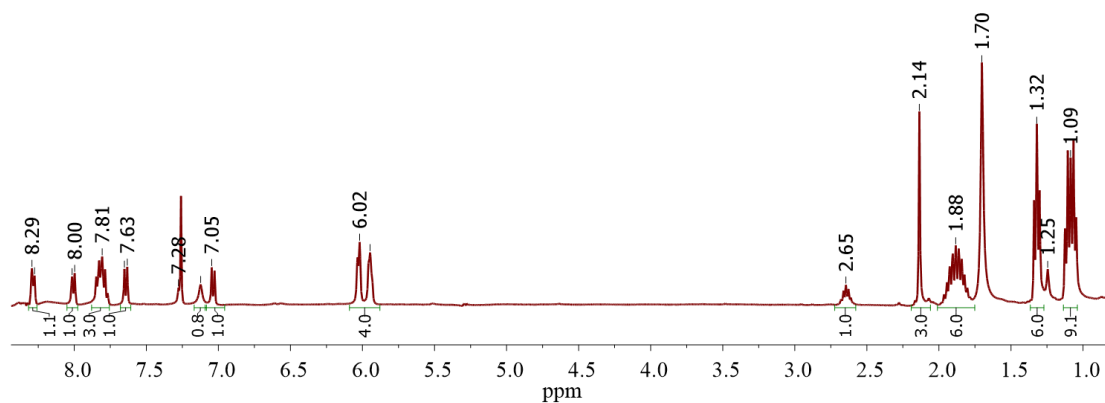
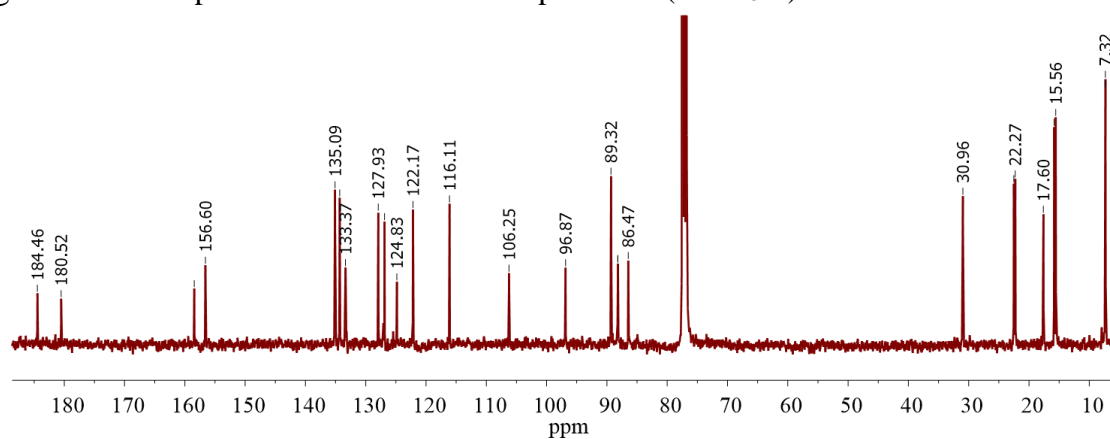
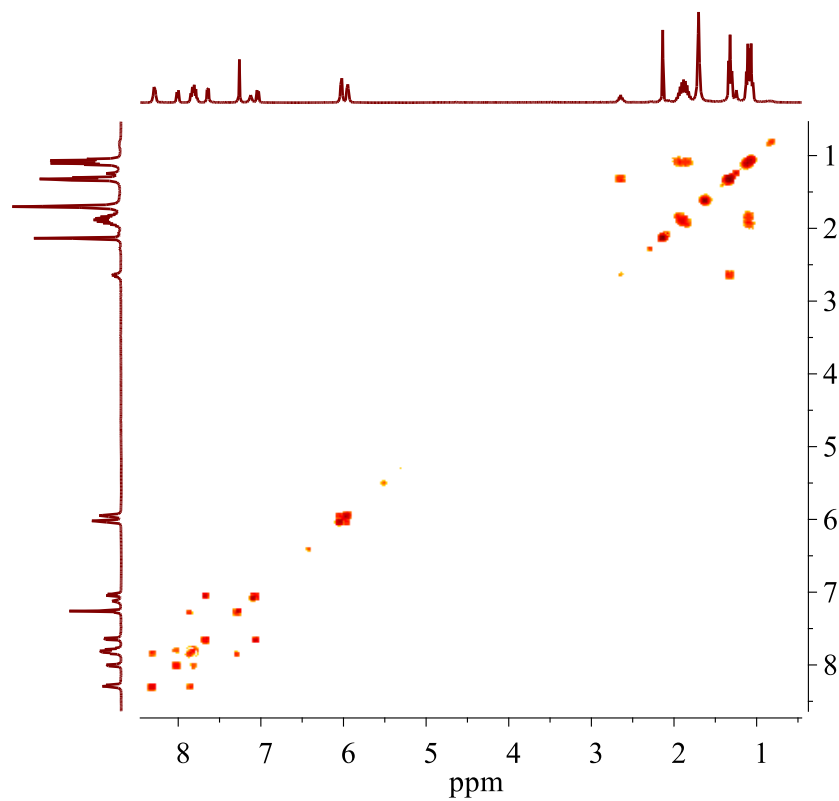


Figura C10 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo C2 ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

Figura C11 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **C3** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).Figura C12 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo **C3** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).Figura C13 - Mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY obtido para o complexo **C3** ( $\text{CDCl}_3-d$ ).

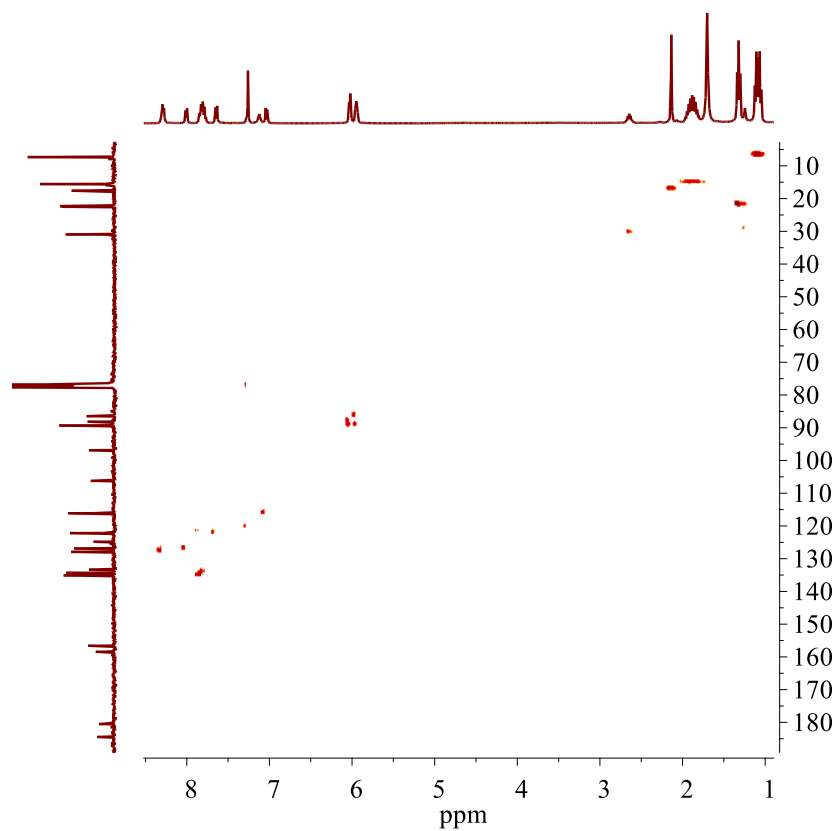


Figura C14 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC obtido para o complexo **C3** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).

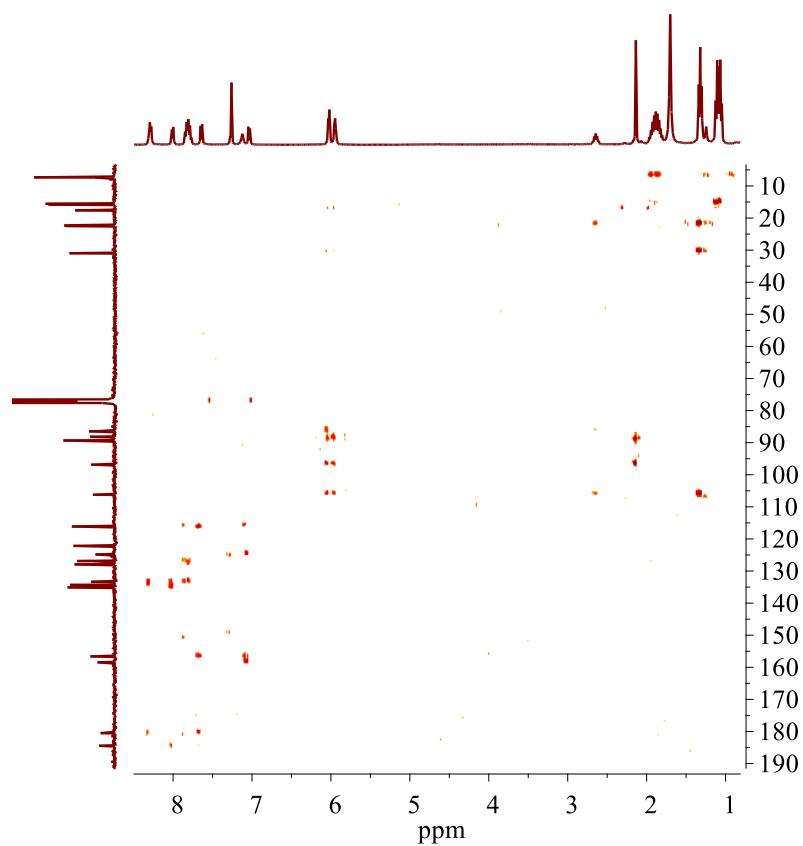


Figura C15 - Mapa de contorno da correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC obtido para o complexo **C3** ( $\text{CDCl}_3$ -*d*).