

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

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE
NOVOS COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE Ru(II) COM
LIGANTES MERCAPTOS OU ACILTIOUREIAS”**

Gabriel Henrique Ribeiro*

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

*Bolsista CAPES

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 Gabriel Henrique Ribeiro, realizada em 11/12/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)

Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (UNICAMP)

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (UFC)

Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago (EMBRAPA)

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.

“...Fosse o que fosse, podia-se ter a certeza de que cada palavra era pura ortodoxia, puro IngTol. Olhando a cara sem olhos, a mandíbula mexendo sem parar, Winston teve a sensação curiosa de não se tratar de um legítimo ente humano, mas de uma espécie de manequim. Não era o cérebro do homem que falava, era a laringe. O que saía da boca era constituído de palavras, mas não era fala genuína: era um barulho inconsciente, como o grasnido dum pato....”

George Orwell / Trecho do Livro 1984

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida mãe Rosely Aparecida Ribeiro, pelo amor incondicional, incentivo em todos os momentos. Por todos os valores e ensinamentos transmitidos que levo para minha vida inteira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a minha mãe Rosely pelo apoio incondicional durante toda a minha vida e seus inúmeros esforços para que eu pudesse trilhar essa jornada. Também, gostaria de agradecer a minha querida família Ribeiro, a que tenho tanto orgulho e carinho, mesmo com a distância ao longo destes anos, sempre estarão em meus pensamentos.

Em especial ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, pela oportunidade oferecida, pela orientação, pelas discussões científicas e ensinamentos. Por apesar de seus inúmeros afazeres, mostrar-se presente em todos os momentos necessários. Enfim, por todas suas contribuições em minha formação acadêmica e pessoal.

Aos amigos e colegas do Laboratório LERCI: Adriana, Angélica, Analu, Ana Plutin, Anislay, Beatriz, Celis, Claudia (*in memoriam*), Gregory, Legna, Wilmer, João Paulo, Katia, Monize, Taíse, Tamires, Jocely, João Honorato, Leticia Pires, Letícia Klein, Luciano, Legna, Rodrigo, Rafael, Raul, Majo. Obrigado a todos pelas discussões e conhecimentos trilhados por proporcionarem um convívio muito agradável. Agradeço muito a vocês, principalmente por se tornarem “minha família” durante esses anos e pelos momentos de descontração. Pessoal! Eu aprendi muito com vocês...

À Dr^a Adriana Guedes e à Dr^a Tamires Donizette, pela realização dos ensaios biológicos;

Ao Prof. Dr. Eduardo Castelano e Dr. João Honorato pela resolução das estruturas cristalográficas.

Ao Prof. Antônio Gilberto Ferreira e à Luciana Vizotto pela realização de algumas medidas de RMN específicas.

Ao Prof. Felipe R. Teixeira e à Camila R. de Correia pela realização dos testes de inibição de proteassomo.

À Prof. Dr. Fillipe V. Rocha (DQ-UFSCar), pela disponibilidade da sua estrutura para a realização dos testes de inibição de topoisomerase.

Aos amigos e colegas que tive o prazer de fazer ao longo desta jornada em São Carlos. Os nomes não me atrevo a colocar aqui, pois certamente cometerei alguma injustiça e esquecerei alguma pessoal. Porém, me atrevo a citar pelas turmas: aos amigos do laboratório e logicamente os cônjuges, de convívio verdadeiramente familiar; aos amigos formados desde a chegada em Sanca, pelos inúmeros momentos de descontração, mas principalmente pela amizade; ao amigo de tereré e churras, pela amizade durante esses anos; aos amigos e colegas do Clube, pelos diversos momentos de descontração; aos amigos e colegas adquiridos durante os 6 anos na República Dinho e Lola.

Aos técnicos do Departamento de Química da UFSCar Luciana Vizotto e Ademir Sartori por serem prestativos e eficientes em todos os momentos. Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani, por serem sempre atenciosas e prestativas.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ao Departamento de Química e Programa de Pós Graduação pela oportunidade.

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

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1- Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos AMP	62
TABELA 4.2- Principais ângulos (°) e comprimentos de ligação (Å) selecionados em torno do centro metálico das estruturas cristalinas dos complexos.....	65
TABELA 4.3- Dados de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série AMP	70
TABELA 4.4- Valores dos principais parâmetros eletroquímicos dos complexos AMP	93
TABELA 4.5- Tentativa de atribuição das principais frequências vibracionais características nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos AMP , em KBr.....	95
TABELA 4.6- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em 48 h dos complexos AMP em diferentes linhagens histológicas de células e índices de seletividade.	99
TABELA 4.7- Lipofilicidade dos complexos AMP	102
TABELA 4.8- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e índices de seletividade (IS) dos complexos sintetizados no LERCI na linhagem celular de câncer de mama. ^{46,61-65}	105
TABELA 4.9- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e índices de seletividade (IS) dos complexos sintetizados no LERCI na linhagem celular de câncer de pulmão. ^{46,61-65}	106
TABELA 4.10- Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_{lig}), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas.....	110
TABELA 4.11- Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos SPPM	144

TABELA 4.12- Principais ângulos ($^{\circ}$) e comprimentos de ligação (\AA) selecionados em torno do centro metálico das estruturas cristalinas dos complexos.....	146
TABELA 4.13- Dados de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série SPPM ..	151
TABELA 4.14- Deslocamentos químicos dos átomos de carbono referente aos grupos C=O e C=S dos ligantes aciltioureias livres, bem como nos complexos SPPM	159
TABELA 4.15- Valores dos principais parâmetros eletroquímicos dos complexos SPPM	162
TABELA 4.16- Tentativa de atribuição dos estiramentos característicos dos ligantes aciltioureias nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos SPPM e dos ligantes aciltioureias livres, em KBr.	165
TABELA 4.17- Tentativa de atribuição das principais frequências vibracionais características nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos SPPM , em KBr.	166
TABELA 4.18- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em 48 h dos complexos SPPM em diferentes linhagens histológicas de células e índices de seletividade (IS).	168
TABELA 4.19- Lipofilicidade dos complexos SPPM	170
TABELA 4.20- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e índices de seletividade (IS) dos complexos sintetizados no LERCI na linhagem celular de câncer de pulmão.	173

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Estruturas químicas dos complexos à base de platina em uso clínico como quimioterápicos, no tratamento do câncer.....	3
FIGURA 1.2- Representação de alguns mecanismos de ação dos complexos de rutênio com atividade citotóxica (Adaptada ²⁸).....	8
FIGURA 1.3- Estruturas dos complexos de rutênio que são destaques pelo progresso em estudos clínicos. *Complexos que continuam em estudos clínicos.	10
FIGURA 1.4- Estruturas químicas base dos principais complexos de rutênio sintetizados no LERCI e testados como agentes quimioterápicos.....	12
FIGURA 1.5- (A) Estruturas dos ligantes mercaptos empregados na síntese de complexos. (B) Estruturas químicas dos complexos fosfínicos de rutênio com ligantes mercaptos, juntamente com os valores de IC _{50(48 h)} frente às linhagens tumorais humanas de pulmão (A549) e mama (MDA-MB-231), e valores de índice de seletividade (IS) para células tumorais A549 e MDA-MB-231 em comparação as respectivas células não tumorais MRC-5 (pulmão) e MCF-10A (mama).....	15
FIGURA 1.6- Estruturas dos complexos fosfínicos de rutênio com o ligante 2-mercapto-4(3H)quinazolina, juntamente com os valores de IC _{50(48 h)} frente às linhagens tumorais humanas de pulmão (A549) e mama (MDA-MB-231), e valores de índice de seletividade (IS) para células tumorais A549 e MDA-MB-231 em comparação as respectivas células não tumorais MRC-5 (pulmão) e MCF-10A (mama).....	17
FIGURA 1.7- Estrutura base dos ligantes aciltioureas, com alguns dos principais substituintes (R1) e (R2) utilizados no LERCI.	20
FIGURA 1.8- (A) Estruturas de complexos fosfínicos de platina com ligantes aciltiourea, juntamente com os valores de IC _{50(48 h)} frente à linhagem tumoral humana de mama (MDA-MB-231). (B) Estruturas químicas de complexos	

fosfínicos de rutênio com ligantes aciltiourea, juntamente com os valores de IC ₅₀ frente à linhagem tumoral de próstata (DU-145).	22
FIGURA 1.9- Modos de coordenação do ligante dphppy empregados na síntese de complexos de coordenação.....	25
FIGURA 1.10- Estruturas dos complexos precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dphppy)(dppb)] e [Ru(LL)(dphppy)(dppb)] ⁺ , juntamente com as estruturas dos ligantes mercaptos e aciltioureas utilizados na execução deste projeto.	26
FIGURA 4.1- Estruturas cristalinas dos complexos AMP e do precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dphppy)(dppb)], com elipsoides a 50% de probabilidade. Para melhor visualização os átomos de hidrogênio e o contraíon PF ₆ ⁻ foram omitidos.	64
FIGURA 4.2- Comprimento das ligações C—S e C—N do ligante mercapto nas formas tautoméricas tiol e tiona, e após a coordenação ao rutênio.....	68
FIGURA 4.3- (A, B) Representação das interações intramolecular do tipo π–π e (C) interações intermoleculares do tipo Ru–S···H–CH–dppb na estrutura do complexo AMP4	69
FIGURA 4.4- Espectros de RMN de ³¹ P { ¹ H} dos precursores e complexos AMP em CD ₃ CN.....	71
FIGURA 4.5- Espectro de RMN de ³¹ P { ¹ H} ampliado do complexo AMP1 em CD ₃ CN, com a descrição do sistema de acoplamento AMX.....	74
FIGURA 4.6- Espectro de RMN de ¹ H do complexo AMP4 em CD ₃ CN. *Determinação dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio pelo mapa de correlação HSQC ¹ H- ¹³ C (TABELAS A1-A5 no Apêndice).....	77
FIGURA 4.7- Nomenclatura e deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do complexo AMP4 no espectro de RMN ¹ H. Observação: Para os hidrogênios com a multiplicidade do sinal descrita como multipletto, os deslocamentos químicos foram definidos pela faixa das curvas de níveis referentes ao acoplamento entre o(s) átomo(s) de hidrogênio e o respectivo carbono no mapa de correlação de HSQC ¹ H- ¹³ C.	78

FIGURA 4.8- Mapas de contorno de HMBC ^1H - ^{31}P (A) à 12 Hz e (B) à 6 Hz, e (C) COSY ^1H - ^1H do complexo AMP4 em CD_3CN . Inserida a estrutura do complexo AMP4 com a nomenclatura.	81
FIGURA 4.9- (A) Representação genérica das correntes de anel e linhas de forças induzidas em um anel aromático (adaptada ¹¹³); (B) Representação genérica das regiões de blindagem e desblindagem gerada pela corrente de anel; (C) Representação genérica de diferentes efeitos anisotrópicos devido a posição espacial dos hidrogênios na interações π - π stacking entre anéis aromáticos (adaptada ¹¹⁴); (D) Interações π - π stacking nas estruturas cristalinas dos complexos AMP , representada pelo AMP1 , o que pode promover efeitos anisotrópicos.....	84
FIGURA 4.10- Região desblindada do espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo AMP4 em CD_3CN . Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono dos complexos estão descritos nas TABELAS A1-A5, no Apêndice. .	86
FIGURA 4.11- Mapas de contorno de (A) HMBC ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e (B) HSQC ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo AMP4 em CD_3CN	87
FIGURA 4.12- Mapas de contorno de (A) HMBC ^1H - ^{31}P com constante de acoplamento de 6 Hz e (B) HSQC ^1H - ^{13}C do complexo AMP4 na região alifática, em CD_3CN . Inserida a parte alifática da estrutura química do complexo AMP4	91
FIGURA 4.13- Voltamograma cíclico do AMP1 em solução 0,1 mol L ⁻¹ de PTBA em diclorometano à 100 mV s ⁻¹ . Eletrodo de trabalho de platina.	92
FIGURA 4.14- Classificação dos complexos AMP em grupos de acordo com a atividade citotóxica frente às linhagens celulares tumorais.	100
FIGURA 4.15- (A) Estrutura cristalográfica da albumina de soro humana (adaptada ¹⁰⁰); (B) Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto AMP1 (b-g; b= 5 μM ; c= 10 μM ; d= 15 μM ; e= 20 μM ; f= 25 μM e g= 30 μM), com concentração constante da HSA de 5 μM . Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6.....	108

- FIGURA 4.16- (A) Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos **AMP** (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μM) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares [composto]/[DNA]=0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 ;0,25 e 0,30, com concentração constante de CT-DNA de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; *Estrutura cristalina de um fragmento de DNA contendo o tiazol intercalado (adaptada)⁵¹; (B) Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 (46 μM) na ausência e presença dos complexos (0,0; 11,5; 23,0 e 46 μM), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] (a=0,25; b= 0,50 e c=1,00); MPM - Marcador de peso molecular; DNA- Controle negativo (em tampão Trisma-HCl); CTL- Controle negativo (10% DMSO); (C) Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos compostos **AMP** (b-k; b= 7,5 μM ; c= 15 μM ; d= 22,5 μM ; e= 30,0 μM ; f= 37,5 μM ; g= 45 μM ; h= 52,5 μM ; i= 60 μM ; j= 67,5 e k= 75,0), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM , respectivamente. Razão [Complexo]/[DNA-Hoechst]= 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0. Comprimento de onda de excitação a 340 nm, em tampão Trisma-HCl. **Estrutura cristalina de um fragmento de DNA inserido o Hoechst no sulco menor do DNA (adaptada)⁵¹..... 113
- FIGURA 4.17- Ensaio de relaxamento do DNA plasmidial superenovelado por Topo-IB na ausência (CTL) e presença de diferentes concentrações dos complexos **AMP** (a=0,5 e b= 5,0 μM); DNA- DNA plasmidial em tampão Trisma-HCl em 3% DMSO. Estrutura cristalina da topoisomerase com um fragmento de DNA (adaptada). 119
- FIGURA 4.18- Inibição do proteassomo *in vitro* pelos complexos **AMP2** (1 μM), **AMP4** (0,9 μM), **AMP5** (3,7 μM) e o composto MG132 (10 μM) utilizado como controle positivo. (B) Inibição da atividade quimiotripsina-like do proteassomo 20S pelos complexos; (C-F) Células HEK293T-uGFP tratadas com inibidor proteasomal MG132 (C), complexo **AMP2** (D), **AMP4** (E) e **AMP5** (F) nos períodos indicados. 123

-
- FIGURA 4.19- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem de célula A549, após tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M), $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M) e $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M)) por 48 h. (A) Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da área de colônia..... 127
- FIGURA 4. 20- Alterações morfológicas das células tumorais de pulmão (A549) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)). As células foram tratadas com o **AMP4** e fotografadas por diferentes períodos. Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas 128
- FIGURA 4.21- (A) Dot plots de Anexina V-PE vs 7-ADD, para determinação de células A549 em apoptose após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)) por 48 h. Análise de citometria de fluxo usando a coloração dupla de anexina V-PE e 7-AAD. (B) Gráfico da porcentagem de células em apoptose inicial, tardia e necrose após o tratamento com o complexo. Diferenças significativas do controle são indicadas por *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001. 131
- FIGURA 4.22- Ciclo de replicação celular esquemático para célula em mitose. 133
- FIGURA 4.23- Ciclo celular das células tumorais de pulmão A549 após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)). (A) Histogramas do perfil de fluorescência PI (eixo x) vs contagens de células (eixo y), definindo as células em diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e com conteúdo anormal de DNA (sub-G1). Os histogramas são correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da distribuição das células A549 em diferentes fases do ciclo celular e Sub-G1, após tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** por 48 h. Diferenças significativas do controle são indicadas por *p <0,05; **p <0,01 e ***p <0,001..... 135
-

FIGURA 4.24- Ensaio de fechamento da Wound healing das células A549. Imagens micrográficas do fechamento da área da risca obtidas das células sem tratamento (controle negativo) e tratadas com diferentes concentrações do complexo AMP4 ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M)). Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas.	138
FIGURA 4.25- Estruturas químicas dos complexos SPPM	143
FIGURA 4.26- Estruturas cristalinas dos complexos SPPM , como elipsoides a 50% de probabilidade. Para melhor visualização o contraíon PF_6^- foi omitido.	145
FIGURA 4.27- (A) Comprimento de ligação de alguns fragmentos do ligante aciltioureia livre e após a coordenação ao rutênio, juntamente com a variação dos comprimentos de ligação ($\Delta \text{\AA} = \text{\AA}_{\text{cord}} - \text{\AA}_{\text{livre}}$); (B) Representação da conformação espacial do ligante aciltioureia e do anel aromático C32-P3, e da interação intramolecular do tipo $\pi-\pi$ stacking.	149
FIGURA 4.28- Espectros de RMN de $^{31}P \{^1H\}$ do precursor e complexos SPPM em $CDCl_3$	151
FIGURA 4.29- Espectros de RMN 1H do complexo SPPM2 em $CDCl_3$. *Determinação dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio pelo mapa de correlação HSQC $^1H-^{13}C$ (TABELAS A9-A13 no Apêndice).	153
FIGURA 4.30- Nomenclatura e deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do complexo SPPM2 no espectro de RMN 1H . Observação: Os hidrogênios com a multiplicidade do sinal descrita como multipletto, os deslocamentos químicos foram definidos pela faixa das curvas de níveis referentes ao acoplamento entre o(s) átomo(s) de hidrogênio e respectivo carbono no mapa de correlação de HSQC $^1H-^{13}C$	154
FIGURA 4.31- Mapas de correlação de RMN 2D (A) $^1H-^{31}P$ HMBC (constante de acoplamento de curta distância, 12 Hz) e (B) $^1H-^{31}P$ HMBC (constante de acoplamento de longa distância, 6 Hz) do complexo $[Ru(dmbth)(dphppy)(dppb)]PF_6$ (SPPM2) em $CDCl_3$	156

FIGURA 4.32- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dmbth})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (SPPM2) em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono dos complexos estão descritos nas TABELAS A9-A13, no Apêndice.	158
FIGURA 4.33- Mapas de contorno de (A) HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ e (B) HMBC $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ (constante de acoplamento de longa distância, 6 Hz) do complexo $[\text{Ru}(\text{dmbth})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (SPPM2) na região alifática, em CDCl_3 . Inserida a estrutura química do complexo SPPM2	161
FIGURA 4.34- Voltamograma cíclico do SPPM2 , em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA, em diclorometano à 100 mV s^{-1} . Eletrodo de trabalho de platina.	162
FIGURA 4.35- Classificação dos complexos SPPM de acordo com a atividade citotóxica nas linhagens celulares tumorais.	170
FIGURA 4.36- (A) Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos SPPM (0,0; 7,5; 15; 30; 45 e $60 \mu\text{M}$) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares $[\text{composto}]/[\text{DNA}] = 0,05; 0,10; 0,20; 0,3$ e $0,40$, com concentração constante da DNA de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$; *Estrutura cristalina de um fragmento de DNA contendo o tiazol intercalado (adaptada) ⁵¹ ; (B) Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pUC18 ($58 \mu\text{M}$) na ausência e presença dos complexos (0, 29 e $58 \mu\text{M}$), em diferentes razões molares $[\text{Complexo}]/[\text{plasmídeo}]$ (a= 0,50 e b=1,00); MPM - Marcador de peso molecular; DNA- Controle negativo (em tampão Trisma-HCl com 10% DMSO); (C) Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos compostos SPPM2 (b-f; b= $7,5 \mu\text{M}$; c= $15 \mu\text{M}$; d= $22,5 \mu\text{M}$; e= $30,0 \mu\text{M}$ e f= $37,5 \mu\text{M}$), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e $2,5 \mu\text{M}$, respectivamente. Razão $[\text{Complexo}]/[\text{DNA-Hoechst}] = 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4$ e $0,5$. Comprimento de onda de excitação a 350 nm, em tampão Trisma-HCl. **Estrutura cristalina de um fragmento de DNA inserido o Hoechst no sulco menor do DNA (adaptada) ⁵¹	177

-
- FIGURA 4.37- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem de célula A549, após tratamento com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M), $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)) por 48 h. (A) Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da área de colônias. 179
- FIGURA 4.38- Alterações morfológicas das células tumorais de pulmão (A549) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M), $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (0,48 μ M)). As células foram tratadas com o **AMP4** e micrografadas por diferentes períodos. Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas. 181
- FIGURA 4.39- Ciclo celular das células tumorais de pulmão A549 após tratamento com o complexo **SPPM4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)). (A) Histogramas do perfil de fluorescência PI (eixo x) vs contagens de células (eixo y), definindo as células em diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e com conteúdo anormal de DNA (sub-G1). Os histogramas são correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da distribuição do ciclo celular das células A549 em diferentes fases do ciclo celular e Sub-G1, após tratamento com diferentes concentrações do **SPPM4** por 48 h. Diferenças significativas do controle são indicadas por *p <0,05; **p <0,01 e ***p <0,001. 182
- FIGURA 4.40- Ensaio de fechamento da “*Wound healing*” das células A549. Imagens micrográficas do fechamento da risca obtidas das células na ausência de tratamento (controle negativo) e tratadas com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M)). Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas. 184
-

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1- Rota sintética para a obtenção dos complexos da série **AMP**.
Reagentes e condições: (a) dphppy, tolueno, agitação (3 h); (b) tolueno, refluxo (20 h); (b') tolueno, refluxo (24 h); (c) ligante mercaptos (NS), KPF_6 , metanol, agitação (12 h). 61

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE Ru(II) COM LIGANTES MERCAPTOS E ACILTIOUREIAS. O presente trabalho teve como objetivos principais a síntese, caracterização e avaliação biológica de duas séries de complexos fosfínicos de rutênio contendo ligantes mercaptos ou aciltioureas. A primeira série foi composta de cinco complexos com fórmula geral $[Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF_6$ (**AMP1-AMP5**) [dppb= 1,4-bis(difenilfosfina)butano; dphppy= 2-(difenilfosfina)piridina; NS= 2-mercaptopiridina (pyS; **AMP1**), 2-mercaptotiazolina (tzdt; **AMP2**), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca; **AMP3**), 2-mercaptopirimidina (pySm; **AMP4**) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp; **AMP5**)]. Os complexos da segunda série apresentaram fórmula geral $[Ru(OS)(dphppy)(dppb)]PF_6$ (**SPPM2-SPPM6**) [OS (aciltioureas)= dmbth= N,N-(dimetil)-N'-benzoiltiourea (**SPPM2**), debth= N,N-(dietil)-N'-benzoiltiourea (**SPPM3**), depth= N,N-(dipropil)-N'-benzoiltiourea (**SPPM4**), dbbth= N,N-(dibutil)-N'-benzoiltiourea (**SPPM5**), dfbth= N,N-(difenil)-N'-benzoiltiourea (**SPPM6**)]. Todos os complexos foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e do UV/visível, análise elementar, condutividade molar, voltametria cíclica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H , ^{13}C { 1H } e ^{31}P { 1H } e difração de raios X de monocristais. A atividade citotóxica dos complexos foi avaliada frente às linhagens celulares derivadas de tumores humanos, MDA-MB-231 (câncer de mama) e A549 (câncer de pulmão) e frente às linhagens celulares humanas não tumorais derivadas de pulmão MCR-5 e de mama MCF-10A. Os complexos apresentaram excelentes atividades citotóxicas nas linhagens tumorais, com valores de IC_{50} significativamente inferiores em relação aos ligantes livres e a cisplatina. Nas células tumorais de pulmão, os complexos com mercaptos apresentaram valores de IC_{50} na faixa de 0,12-2,59 μM , e os complexos com aciltioureas na faixa de

0,10-0,98 μM . Os valores de IC_{50} frente às células tumorais de mama foram na faixa de 0,08-0,36 μM e 0,25-1,05 μM para as séries **AMP** e **SPPM**, respectivamente. Os complexos também apresentaram seletividade pelas células tumorais MDA-MB-231 e A549 em relação às respectivas linhagens celulares não tumorais. Destaca-se a seletividade dos complexos com ligantes aciltioureas pela linhagem A549, com índices de seletividade acima ou igual a 10. Os compostos **AMP4** (IS= 6,7) e **SPPM4** (IS= 33) foram escolhidos para estudos adicionais nas células tumorais de pulmão, devido aos melhores índices de seletividade em sua respectiva série. Ambos os complexos foram capazes de inibir a formação de colônias e alterar a morfologia das células tumorais da linhagem A549. Na análise do ciclo celular, os complexos induziram um acúmulo de células com conteúdo anormal de DNA, denominadas de células Sub-G1, que representa a fração de células mortas e com DNA fragmentado. A fragmentação do DNA pode ser referente ao processo de apoptose celular, confirmado para as células tratadas com o **AMP4**. Para as células A549 tratadas com o complexo **SPPM4**, possivelmente outros processos de morte celular estão envolvidos. Também foram estudados possíveis alvos biológicos dos complexos que possam atuar como gatilhos para desencadear o processo de morte celular. Os complexos apresentaram interações reversíveis e fracas via sulco menor do DNA, porém não causam alterações nas estruturas secundária e terciária da biomolécula. Tais resultados apontam que provavelmente o DNA não é o alvo principal dos compostos. A inibição da atividade da enzima topoisomerase IB pelos complexos com os ligantes mercaptos foi analisada pelo processo de relaxamento do plasmídeo superenovelado. A inibição da enzima hTopoIB em concentrações próximas ao IC_{50} , mesmo de forma parcial, pelos complexos fornece indícios que a enzima Topo-IB pode ser considerada como um dos possíveis alvos biológicos. Entre os complexos avaliados em células HEK293T-uGFP, o composto **AMP5** foi um inibidor da atividade quimi tripsina-like do proteassomo 26S em células viáveis, indicando que a enzima é alvo biológico.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF NEW Ru(II)-PHOSPHINE COMPLEXES WITH MERCAPTO OR ACYLTHIOUREA LIGANDS. In this thesis, two series of new Ru-phosphine complexes containing mercapto or acylthiourea ligands were synthesized, characterized and assessed their cytotoxic activities. The first series is composed of five complexes of general formula $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dpphy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**AMP1-AMP5**) [dpphy = diphenyl-2-pyridylphosphine, NS = 2-mercaptopyridine (pyS; **AMP1**), 2-thiazoline-2-thiol (tzdt; **AMP2**), 6-mercaptopyridine-3-carboxylic acid (mpca, **AMP3**), 2-mercaptopyrimidine (pySm, **AMP4**) and 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidine (damp, **AMP5**); dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane]. In the second series, complexes present the general formula $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dpphy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**SPPM2-SPPM6**) [OS= N,N-(dimethyl)-N'-benzoylthiourea (dmbth; **SPPM2**), N, N-(diethyl)-N'-benzoylthiourea (debth, **SPPM3**), N,N-(dipropyl)-N'-benzoylthiourea (**SPPM4**), N,N-(dibutyl)-N'-benzoylthiourea (dbbth, **SPPM5**), N,N-(diphenyl)-N'-benzoylthiourea (dpbth, **SPPM6**)]. The complexes were characterized by elemental analysis, spectroscopic techniques (IR, UV/Visible, 1D and 2D NMR) and X-ray diffraction. In the characterization, the correlation between the phosphorous atoms with their respective aromatic hydrogens of the compounds in the assignment stands out, by ^1H - ^{31}P HMBC experiments. The cytotoxic activity of the complexes was evaluated against cell lines derived from human tumors, MDA-MB-231 (breast cancer) and A549 (lung cancer) and against non-tumoral human cell lines derived from lung MCR-5 and breast MCF-10A. The compounds showed good to excellent anticancer activities against cancer cell lines, with IC₅₀ values significantly lower than the free ligands and cisplatin. For A549 tumor cells, the complexes with mercaptos had IC₅₀ values in the range of 0.12-2.59 μM , and the complexes with acylthiourea in the range of 0.10-0.98 μM . In the breast tumor cells, IC₅₀ values were in the range of

0.08-0.36 μM and 0.25-1.05 μM for the **AMP** and **SPPM** series, respectively. All complexes were also selective for tumor cells in comparison to the respective non-tumoral cell lines. The complexes with acylthiourea showed expressive selectivity toward lung tumor cells, with selectivity indexes (SI) values above (or equal to) 10. The compounds **AMP4** (SI= 6.7) and **SPPM4** (SI= 33) were chosen for further studies in lung tumor cells, due to the better selectivity index in their respective series. Both complexes were able to inhibit colony formation and alter the morphology of tumor cells A549. In the cell cycle analysis of the cells, the complexes induced an accumulation of cells with abnormal content, called Sub-G1 cells, which represents the fraction of dead cells and fragmented DNA. The fragmentation of DNA is due to the cell apoptosis process, confirmed for cells treated with the **AMP4**. For A549 cells treated with the **SPPM4** complex, possibly other cell death processes are involved. The possible biological targets of the complexes that could act as triggers for the cell death process were also studied. The complexes presented weak reversible interactions via minor groove of the DNA. The complexes caused no significant changes in the tertiary and secondary DNA structures, indicating that this biomolecule is probably not the primary target for them. Study with enzymatic target, especially targets overexpressed in tumor cells that justify the cytotoxic activity of the compounds were carried out. And it was found that the complexes are capable of partially inhibiting the Top IB catalytic activity, at low concentrations, close to the IC_{50} values of cancer cell lines. Overall, the proteasome enzyme can be a biological target for these complexes. The results indicate that ruthenium complexes containing mercaptos or acylthiourea present promising cytotoxic activities for the development of chemotherapeutics for the treatment of cancer. Among the complexes assayed in HEK293T-uGFP cells, complex **AMP5** was able to diminish the proteasomal chymotrypsin-like activity to a greater extent, indicating that the proteasome 26S enzyme can be a biological target of the compound.

SUMÁRIO

1	- INTRODUÇÃO	1
1.1	- Câncer: contextualização e problemática	3
1.2	- Desenvolvimento de complexos de rutênio para quimioterapia.....	6
1.3	- Complexos fosfínicos de rutênio com atividade antitumoral	11
1.4	- Complexos fosfínicos de Ru(II) com ligantes mercaptos.....	14
1.5	- Complexos fosfínicos de Ru(II) com ligantes aciltioureias.....	20
1.6	- Ligante 2-(difenilfosfina)piridina	24
1.7	- Hipóteses e desenvolvimento dos complexos, objetos desta tese .	25
2	- OBJETIVOS	27
3	- PARTE EXPERIMENTAL.....	29
3.1	- Obtenção da atmosfera inerte.....	30
3.2	- Solventes	30
3.3	- Reagentes químicos em geral.....	30
3.4	- Síntese dos complexos precursores de rutênio	31
3.4.1	- Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$	31
3.4.2	- Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{PPh}_3)]$	31
3.4.3	- Síntese do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dphppy})(\text{dppb})]$	32
3.5	- Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (AMP1 – AMP5), onde 2-mercaptopiridina (pyS; AMP1), 2-mercaptotiazolina (tzdt; AMP2), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca; AMP3), 2-mercaptopirimidina (pySm; AMP4) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp; AMP5)	32
3.6	- Síntese dos ligantes aciltioureia: N,N-(dimetil)-N'-benzoiltioureia (dmbth), N,N-(dietil)-N'-benzoiltioureia (debth), N,N-(dipropil)-N'-benzoiltioureia (dpbth), N,N-(dibutil)-N'-benzoiltioureia (dbbth), N,N-(difenil)-N'-benzoiltioureia (dfbth)	33
3.7	- Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (SPPM2 - SPPM6), onde OS= N,N-(dimetil)-N'-benzoiltioureia (dmbth; SPPM2), N,N-(dietil)-N'-benzoiltioureia (debth; SPPM3), N,N-(dipropil)-N'-benzoiltioureia (dpbth; SPPM4), N,N-(dibutil)-N'-benzoiltioureia (dbbth; SPPM5), N,N-(difenil)-N'-benzoiltioureia (dfbth; SPPM6)	34

3.8	- Instrumentação	34
3.8.1	- Experimentos voltamétricos	34
3.8.2	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)....	35
3.8.3	- Difração de raios X	35
3.8.4	- Análise elementar	36
3.8.5	- Condutividade molar.....	36
3.8.6	- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível	36
3.8.7	- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	36
3.8.8	- Determinação do coeficiente de partição.....	37
3.9	-Estudo de estabilidade dos complexos em meio aquoso	38
3.10	- Estudos de interação dos complexos com biomoléculas	38
3.10.1	- Estudos de interação dos complexos com o DNA.....	39
3.10.2	- Ensaio da supressão da fluorescência da HSA	45
3.10.3	- Estudo de inibição da atividade enzimática da Topoisomerase IB	47
3.10.4	- Ensaio com o sistema proteassomo	49
3.11	- Avaliação Biológica.....	50
3.11.1	- Cultivo celular.....	50
3.11.2	- Ensaio de viabilidade celular	51
3.11.3	- Ensaio de morfologia celular	52
3.11.4	- Ensaio de sobrevivência clonogênica	52
3.11.5	- Ensaio de Wound healing	53
3.11.6	- Ensaio de apoptose.....	54
3.11.7	- Ensaio de ciclo celular	56
4	- RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	- Complexos de fórmula geral [Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (Série AMP).....	60
4.1.1	- Estabilidade dos complexos AMP	97
4.1.2	- Ensaio de viabilidade celular dos complexos	98
4.1.3	- Interação dos complexos com albumina de soro humano	107

4.1.4	Estudos de interação entre os complexos e DNA	112
4.1.5	- Inibição da atividade enzimática da Topoisomerase IB	118
4.1.6	- Estudos de inibição do sistema de proteassomo	121
4.1.7	- Ensaio biológico com o complexo AMP4 com as células A549.....	126
4.1.8	Conclusões da série AMP	139
4.2	Complexos de fórmula geral [Ru(OS)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (Série SPPM).....	142
4.2.1	- Estabilidade dos complexos SPPM	166
4.2.2	- Ensaio de viabilidade celular dos complexos	167
4.2.3	- Estudos de interação entre os complexos e o DNA.....	174
4.2.4	- Ensaio biológico	178
4.2.5	- Conclusão da série SPPM	185
5	- CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	189
6	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195
7	- APÊNDICE	208

1 - INTRODUÇÃO

O “estado da arte” da química de coordenação foi alcançado ao longo do tempo, iniciando com Alfred Werner, quando realizou a primeira tentativa para elucidar as ligações existentes no que hoje conhecemos como complexos de coordenação, o que foi descrito pela teoria dos compostos de coordenação em 1883, até os dias atuais e que apresenta certamente um futuro longínquo.^{1,2}

Os avanços na química inorgânica possibilitaram uma ampla aplicabilidade desses compostos, em diversas áreas, que incluem mineração, metalurgia, ciências médicas, entre outras. O uso dos catalisadores baseados em compostos metálicos aplicados em processos industriais de química fina, para a fabricação em grande escala de produtos farmacêuticos, agroquímicos, fragrâncias, entre outros, é um exemplo da importância desses compostos.³

Na medicina os compostos inorgânicos têm sido usados há séculos, datados dos períodos das antigas civilizações da Mesopotâmia, do Egito, da Índia e da China.^{4,5} Entretanto, um marco na química inorgânica responsável pelo uso moderno dos compostos metálicos na medicina foi à descrição em 1969 por Barnett Rosenberg, Loretta Van Camp e Thomas Krigas da atividade antiproliferativa de um composto inorgânico, posteriormente descrito como o *cis*-diaminodicloroplatina(II), comumente denominado como cisplatina (FIGURA 1.1).⁶ Após ensaios clínicos em 1978, o composto teve uma rápida aprovação para o uso no tratamento de câncer pela United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). A descoberta veio em um momento em que a triagem dos compostos anticâncer focava apenas em pequenas moléculas orgânicas. Posteriormente, outros complexos inorgânicos foram desenvolvidos, resultando na segunda e terceira geração dos fármacos baseados na platina (FIGURA 1.1), levando à aprovação pela U.S. FDA dos compostos carboplatina⁷ e oxaliplatina⁸ como quimioterápicos. Em países específicos, outros três compostos foram aprovados para uso clínico (FIGURA 1.1), nedaplatina,⁹ lobaplatina¹⁰ e heptaplatina.¹¹ Os medicamentos à base de platina

tornaram-se quimioterápicos de primeira linha no tratamento do câncer devido às suas significativas eficácias antitumorais.¹²

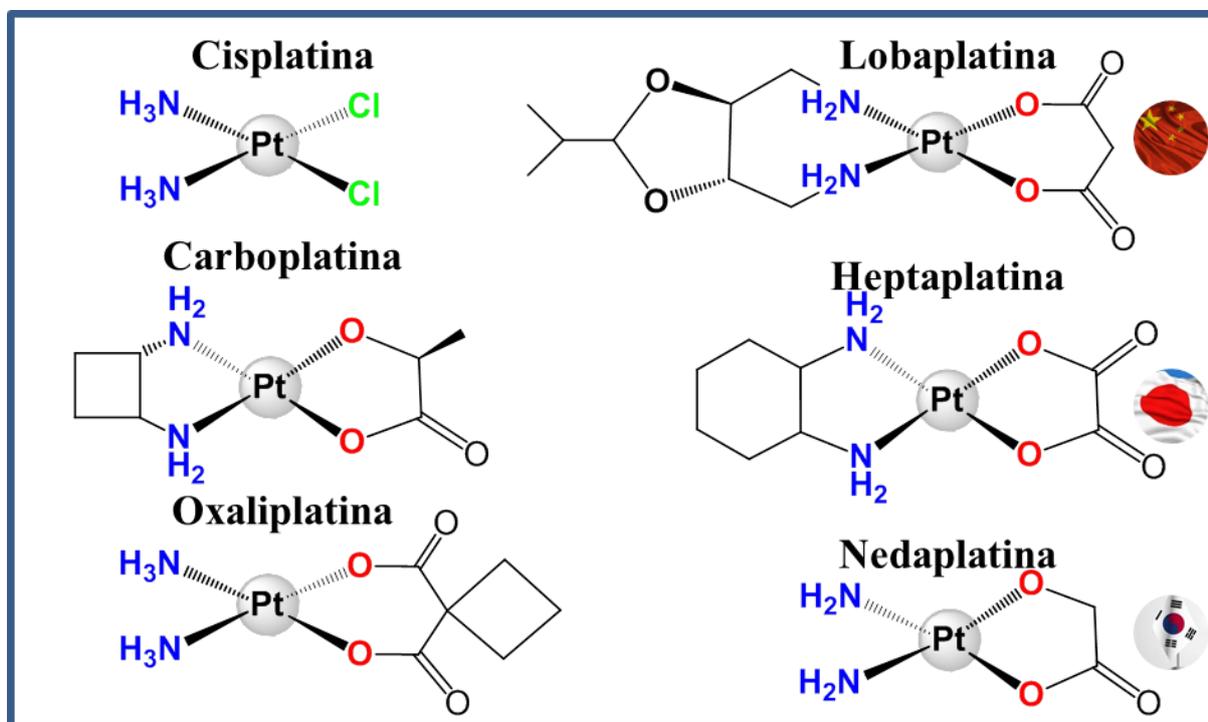


FIGURA 1.1- Estruturas químicas dos complexos à base de platina em uso clínico como quimioterápicos, no tratamento do câncer.

1.1 - Câncer: contextualização e problemática

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2018, estima-se que ocorreram 18,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 9,6 milhões de mortes em todo o mundo causadas por esta enfermidade. O relatório da OMS aponta que o câncer é a segunda causa de morte no cenário mundial, perfazendo aproximadamente 17% do total, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. A International Agency for Research on Cancer (IARC) projeta que em 2040 sejam diagnosticados aproximadamente 29,5 milhões de novos casos de câncer e 16,4 milhões de mortes no mundo.¹³

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) tem apontado que o panorama esperado para os próximos anos no Brasil

é semelhante ao global. As estimativas válidas para cada ano do triênio 2020-2022 indicam a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer. A estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (177 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (66 mil), mama feminina (66 mil), cólon e reto (41 mil) e pulmão (30 mil).¹⁴

O câncer refere-se a mais de 277 tipos de doenças cancerígenas implicando em elevados níveis de especificidade, bem como as distintas características adquiridas pelas células cancerígenas durante o processo de desenvolvimento de tumores. A formação do câncer ocorre por um processo de múltiplos passos e que pode levar várias décadas para que haja formação de um tumor primário.¹⁵⁻¹⁷ Um dos passos é uma série de mutações sucessivas em genes, acarretando a disfunção dos genes vitais e mudanças nas funções celulares. Os proto-oncogenes responsáveis por codificar importantes proteínas para divisão, crescimento e diferenciação celular em condições normais se tornam oncogenes durante o processo de mutação genética. Adicionalmente, a mutação dos genes supressores de tumor faz as células cancerígenas perderem a capacidade de codificar proteínas que regulam as etapas do ciclo celular. Esses distúrbios gênicos afetam o ciclo das células induzindo à proliferação celular anormal.¹⁶

A proliferação celular, sem restrições, tem como consequência a formação de corpos sólidos e irregulares chamados, tumores. Os tumores que se espalham ou invadem tecidos vizinhos são chamados malignos. Além disso, à medida que esses tumores se desenvolvem, algumas células de crescimento podem se separar e migram por meio do sangue e/ou dos linfonodos e iniciam novos tumores cancerígenos, distantes do tumor primário. Por outro lado, os tumores benignos não espalham ou atacam os tecidos próximos, processo denominado metástase. Após os procedimentos de tratamento, os tumores benignos são erradicados.^{17,18}

O paciente com a neoplasia recebe tratamento de acordo com o tipo, localização e estágio clínico do tumor, e estado de saúde geral do paciente, entre outros fatores. A maioria dos pacientes é submetida a uma combinação de tratamentos. O uso de agentes quimioterapêuticos antineoplásicos é certamente, e provavelmente continuará sendo, a abordagem mais utilizada entre as modalidades terapêuticas, mesmo com advento das novas estratégias terapêuticas para a cura do câncer. A quimioterapia é empregada, principalmente, para reduzir metástases e tumores primários, o que é particularmente importante, haja vista que a mortalidade de pacientes com câncer é muitas vezes atribuída à proliferação metastática, ao invés do tumor primário.^{12,18} Neste contexto, os quimioterápicos à base dos complexos de platina se destacam, e estima-se que aproximadamente 60–70% dos tratamentos de neoplasias via quimioterapia têm-se prevalecido do uso destes.

Os medicamentos à base de platina são administrados via injeção ou infusão intravenosa lenta. A fim de retardar a reatividade do complexo, a cisplatina é formulada em solução salina a 0,9% (NaCl), enquanto a carboplatina e oxaliplatina são formuladas em soluções de glicose a 5%. Contudo, os quimioterápicos têm seus ônus, pois os compostos não são específicos às células neoplásicas, também são citotóxicos às células normais, especialmente os tecidos com células de alta taxa de replicação. São reportados em torno de 40 efeitos colaterais possíveis dos quimioterápicos, cujas implicações no tratamento levam desde a limitação das doses prescritas à prescrição de medicamentos adicionais para minimizar ou reverter os efeitos colaterais. Dentre os tecidos e órgãos atingidos incluem as mucosas da boca, estômago e intestinos, o que leva a toxicidades gastrointestinais. A medula óssea que pode resultar em redução da produção de glóbulos brancos e vermelhos. Também exibem nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. O dano renal surge porque a excreção das drogas ocorre pela urina e toxicidade hepática surge porque o corpo tenta metabolizar e desintoxicar as drogas de platina no fígado, proporcionando a absorção pelas

células destes órgãos. Além disso, os pacientes necessitam de monitoramento extenso de suas bioquímicas, função renal (creatina) e hepática (ácido úrico) e, dependendo da droga, testes auditivos. A toxicidade dose-limitante para a cisplatina é regida pela nefrotoxicidade, para carboplatina é a mielossupressão, enquanto para a oxaliplatina é neurotoxicidade.^{12,19,20} Adicionalmente, a resistência celular aos medicamentos à base de platina também é uma das principais preocupações, o que implica na substituição ou aumento das doses do fármaco no tratamento.^{21,22} Ressalte-se que os pacientes tratados com medicamentos orgânicos também são acometidos pelos mesmos, ou similares efeitos colaterais e resistência celular.

Entre os êxitos e as problemáticas dos medicamentos à base de platina, a busca por novos agentes quimioterápicos é fomentada no intuito de contornar as problemáticas dos tratamentos sistêmicos. Na linha de frente, há um progresso no desenvolvimento de novos compostos baseados nos diversos metais de transição para o diagnóstico e/ou tratamento do câncer, compostos cujos mecanismos de ação também são distintos dos vários compostos clínicos de platina, com a descrição de maior segurança e perfil citotóxico.^{2,23-27} Inúmeros compostos baseados em metais estão em progresso nos estudos clínicos.²⁶ Neste contexto, destaca-se os complexos de rutênio.

1.2 - Desenvolvimento de complexos de rutênio para quimioterapia

Uma grande quantidade de artigos descreve a atividade citotóxica *in vitro* e a atividade antitumoral em modelos *in vivo* de complexos de rutênio, os quais endossam a busca por candidatos no âmbito de uma potencial “Rutenioterapia”, do inglês “*Ruthenotherapy*”.²⁸⁻³⁰

Os compostos de rutênio são pautados por propriedades antitumorais descritas como “únicas”. Contudo, atualmente há consenso que algumas afirmações são equivocadamente propagadas acriticamente e aceitas

universalmente pelo puro peso da repetição. Como descrito na perspectiva do autor no artigo “... Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds...”,³¹ propriedades demonstradas para grupos específicos de complexos são generalizadas a “todos” os compostos de rutênio. Dentre as generalizações destacam-se: (I) A capacidade do rutênio, que no caso está coordenado a ligantes, de mimetizar o cátion ferro nas interações com biomoléculas; (II) como consequência da afirmação (I), têm-se a entrada dos compostos de rutênio nos tecidos cancerígenos mediada pela transferrina; (III) baixa toxicidade dos compostos, o que é frequentemente confundida com citotoxicidade; (IV) ativação dos complexos de Ru(III) pela redução a Ru(II) no ambiente hipóxico do tumor, proporcionando seletividade; (V) acumulação específica dos complexos de rutênio nos tumores; (VI) propriedades metastáticas dos compostos.³¹

Indubitavelmente a bem estabelecida química sintética do rutênio provê amplas abordagens no desenvolvimento de novos compostos deste metal. A diversidade estrutural e de reatividade são refletidas nos diferentes mecanismos de ação, alvos biológicos e nas propriedades antitumorais reportados para os complexos de rutênio. Na FIGURA 1.2 são apresentadas algumas vias de ação dos complexos de rutênio que induzem a morte celular. Adicionalmente, as habilidades descritas de interagir e/ou inibir a ação de alvos farmacológicos intracelulares e extracelulares que desempenham papéis relevantes nos processos celulares, tornam estes compostos interessantes e proporcionam a possibilidade de atuarem como gatilho molecular, que induzem a morte celular.^{4,32-36}

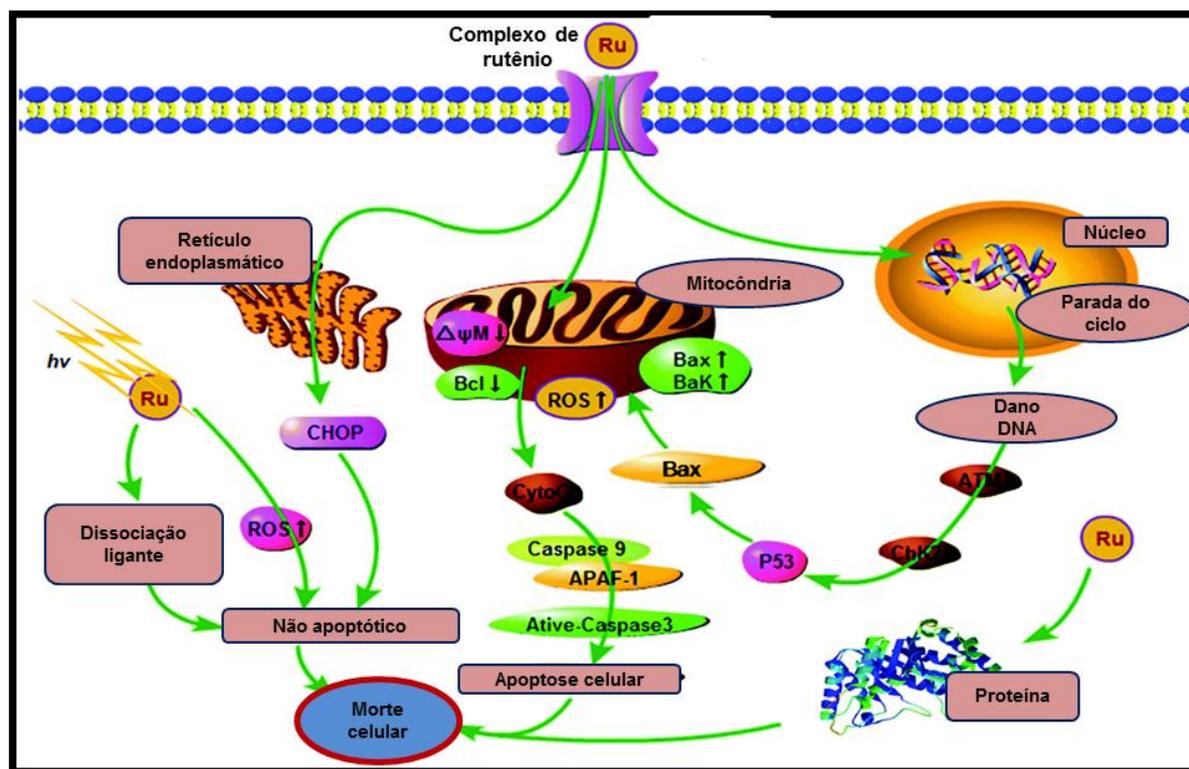


FIGURA 1.2- Representação de alguns mecanismos de ação dos complexos de rutênio com atividade citotóxica (Adaptada²⁸).

Diversas classes de complexos de rutênio com atividade antitumoral são destaques e temas de revisões bibliográficas que pontuam suas particularidades. Os compostos de Ru(III), sem dúvida, reinaram por um longo período neste campo, tendo como “âncora” os complexos desenvolvidos por Kepler e Alessio.^{37,38} A temática da “ativação por redução”, em que os complexos de Ru(III) são inertes e quando reduzidos a Ru(II) são ativados, foi descrita para inúmeros complexos de Ru(III).^{37,38}

Ao longo de um período alguns dos seguintes complexos de rutênio(III) se tornaram um marco no cenário pelo pioneirismo em progredir nos estudos clínicos. São eles, o NAMI-A {[ImH][*trans*-RuCl₄(dmsO)(Im)]} onde Im = imidazol e ImH = íon imidazolium, KP1019 {[IndH][*trans*-RuCl₄(Ind)₂] onde Ind = indazol e IndH = íon imidazolium e NKP1339 {Na[*trans*-RuCl₄(Ind)₂] (FIGURA 1.3).^{31,37,38} O NAMI-A mostrou eficácia na

inibição de tumores metastáticos. Ensaios *in vivo* mostraram redução de metástase pulmonar de até 100%. Entretanto, os estudos clínicos de fase II revelaram efeitos colaterais graves em pacientes e, portanto, não foram realizadas investigações adicionais.³⁷ As investigações clínicas do KP1019 também foram interrompidas devido à sua baixa solubilidade em água, efeitos colaterais graves e eficácia insatisfatória para os estudos clínicos.^{30,37,39} No entanto, o problema da baixa solubilidade foi contornado com a síntese de um análogo, o complexo de sal de sódio mais solúvel em água, o NKP1339, que atualmente está em estudos clínicos.^{37,40}

Os complexos de rutênio(II) ganharam visibilidade, inicialmente com os complexos contendo os ligantes polipiridínicos.^{33,41} Atualmente, dentre a geração de agentes anticâncer à base de rutênio, os compostos organometálicos Ru(II)-areno são os que têm maior visibilidade na literatura pelos promissores resultados, tendo como principais representantes as séries RAPTA e RAED (FIGURA 1.3). Os complexos antimetastáticos da série RAPTA apresentam excelentes resultados em estudos avançados, *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, após a administração intraperitoneal do composto RAPTA-C (40 mg kg⁻¹) por uma semana nos camundongos enxertados com células de carcinoma de ascite de Ehrlich, foi observada a redução do crescimento do tumor em 50%, quando comparado ao controle negativo. Porém, o composto RAPTA-C (FIGURA 1.3) não mais está em estudo clínico.^{34,38,39} Outro exemplo de composto de Ru(II) é o fotossensibilizador TLD1443 (FIGURA 1.3), que combina as propriedades fotofísicas e químicas necessárias para uma terapia fotodinâmica.²⁸ O composto possui uma eficácia terapêutica significativa no câncer de bexiga e atualmente está em fase de ensaios clínicos de fase II.^{34,42}

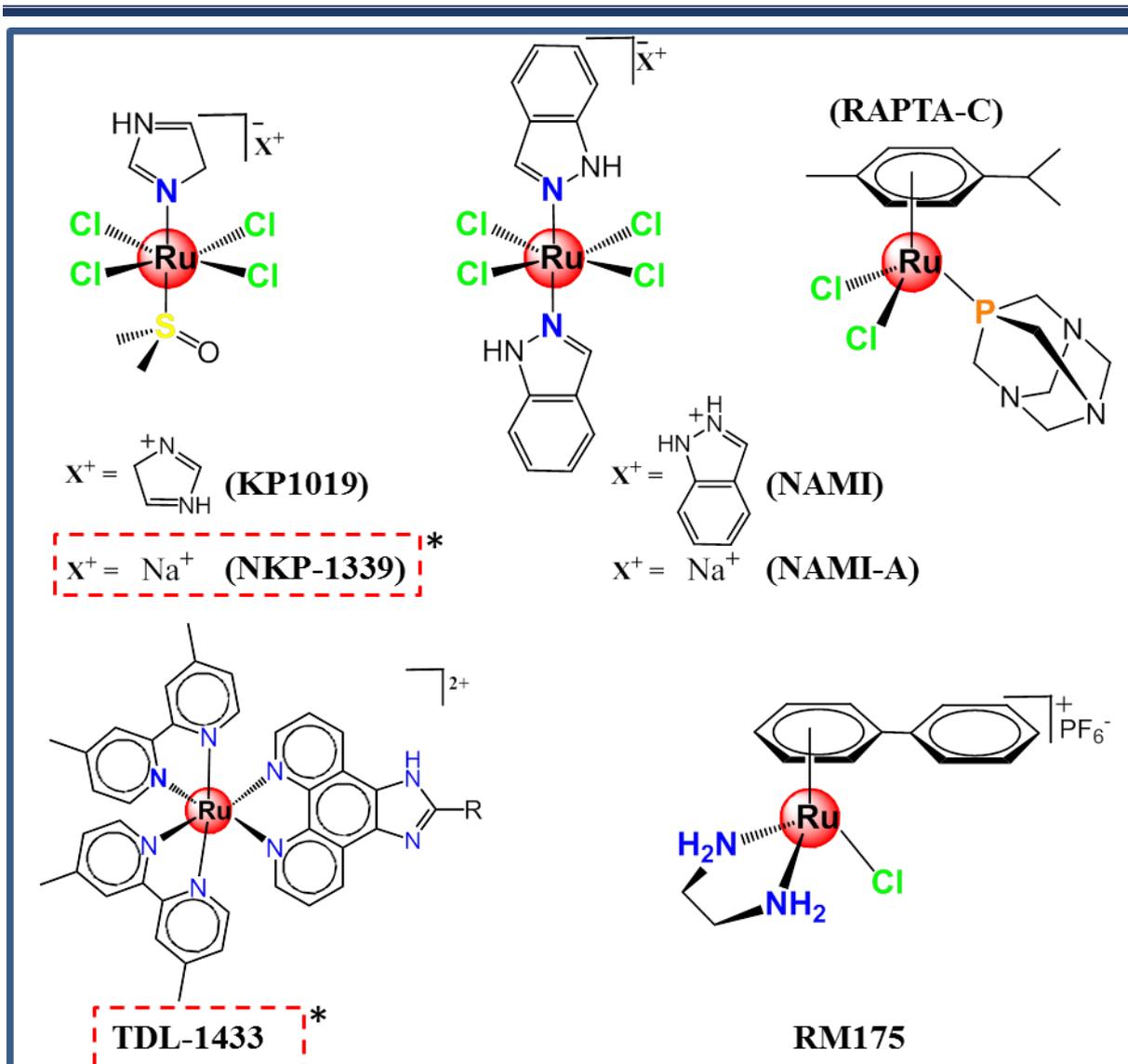


FIGURA 1.3- Estruturas dos complexos de rutênio que são destaques pelo progresso em estudos clínicos. *Complexos que continuam em estudos clínicos.

Neste contexto de desenvolvimento de complexos metálicos com atividade antitumoral, destaca-se a pesquisa de quase duas décadas associada à classe de compostos fosfínicos de rutênio desenvolvida no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), alocado no DQ-UFSCar e coordenado pelo Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. Estes complexos, em geral, emergem com resultados promissores e comparáveis aos descritos na literatura. Em sua maioria, os complexos apresentam expressiva citotoxicidade *in vitro* contra diversos tipos histológicos de células cancerosas.

1.3 - Complexos fosfínicos de rutênio com atividade antitumoral

Nos anos que antecederam o início da “fase dos testes biológicos”, o grupo LERCI foi, e ainda é, marcado pela excelência em uma química sintética de compostos de coordenação diversificada, com investigações das propriedades espectroscópicas e eletroquímicas, principalmente alicerçada em complexos fosfínicos de rutênio(II). Os progressos adquiridos permitiram a consolidação da “química básica dos complexos fosfínicos de rutênio” que deram base aos avanços realizados nos dias atuais. Atualmente uma das áreas de pesquisa é direcionada a ensaios que fornecem subsídios para elucidação dos possíveis mecanismos de ação relacionados à citotoxicidade dos compostos sintetizados.

Uma das características dos complexos fosfínicos de Ru(II) é de interagir e inibir a ação de diversos alvos biológicos que podem atuar como gatilho molecular, que desencadeiam os processos que induzem à morte celular. Dentre os alvos estudados destes complexos destacam-se o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “deoxyribonucleic acid”), a enzima topoisomerase, bem como a biomolécula fundamental na farmacocinética de fármacos, a albumina de soro humana (HSA, do inglês “human serum albumin”).

Muitos complexos de rutênio com uma diversidade de ligantes já foram sintetizados. A maioria dos complexos é derivada dos seguintes cerne estruturais, principalmente contendo ligantes diimínicos (NN), bifosfínicos (PP), monofosfínicos e η^6 -areno: $[\text{Ru}(\text{L})(\text{NN})(\text{PP})]\text{PF}_6$,⁴³⁻⁴⁵ $[\text{Ru}(\text{L})(\text{PP})_2]\text{PF}_6$,⁴⁶ $[\text{Ru}(\text{L})(\text{NN})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$,^{47,48} $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{PP})]$,⁴⁹ e $[\text{Ru}(\text{L})(\eta^6\text{-areno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ ⁵⁰⁻⁵³ (FIGURA 1.4).

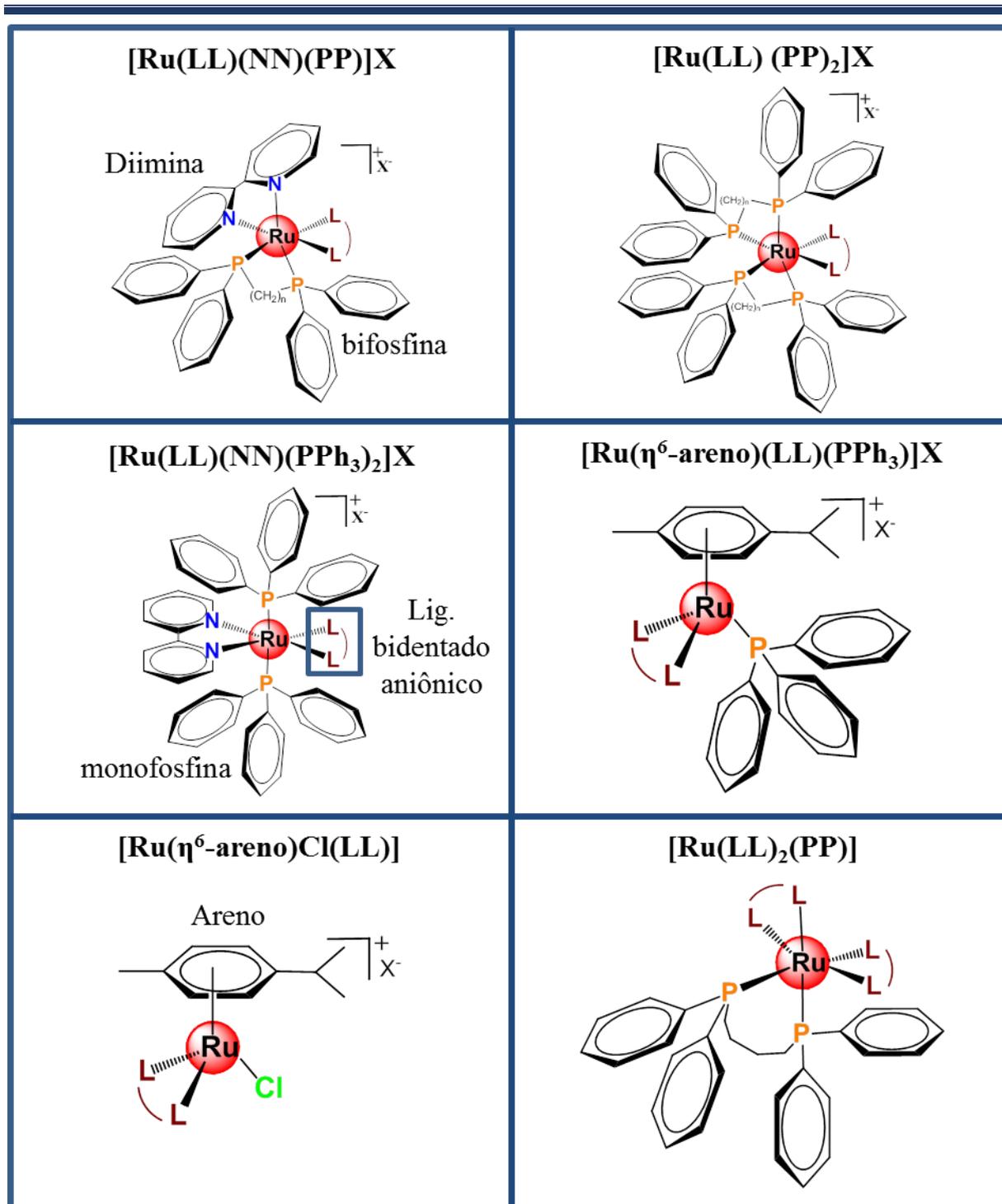


FIGURA 1.4- Estruturas químicas base dos principais complexos de rutênio sintetizados no LERCI e testados como agentes quimioterápicos.

Pautado na estabilidade eletroquímica do centro metálico se faz uso de fosfinas hábeis em estabilizar os baixos estados de oxidação do rutênio. As fosfinas possuem orbitais com simetria π , e energia adequada, em relação ao

vetor metal – ligante. Em princípio, o orbital d do átomo de fósforo tem simetria disponível para uma sobreposição construtiva com os orbitais t_{2g} do metal. Alternativamente, a ligação σ entre o átomo fósforo e seus substituintes, possui um orbital antiligante σ^* , que também tem uma simetria adequada para sobrepor ao vetor metal – P.⁵⁴ Portanto, a combinação destes orbitais geram os orbitais híbridos $3p\sigma^*d\pi$ vazios das fosfinas, os quais são adequados à retrodoação com o centro metálico.

Além da rica química de coordenação dos ligantes fosfínicos, a experiência adquirida com o estudo de compostos de rutênio contendo ligantes fosfínicos, permite afirmar que estes ligantes têm papel fundamental na atividade citotóxica dos compostos, cuja importância dos ligantes fosfínicos tem sido evidenciada em alguns trabalhos publicados pelo LERCI. Um exemplo é o composto $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{bipy})(\text{dppm})]\text{PF}_6$ ($\text{IC}_{50(24\text{ h})} = 4,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$) foi 20× mais citotóxico que seu análogo com duas bipyridinas, $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$ ($\text{IC}_{50(24\text{ h})} = 99,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$), nas células tumorais de mama (MDA-MB-231).⁵⁵ Comportamento similar foi observado nas outras cinco linhagens tumorais testadas. Uma das sugestões refere-se a característica lipofílica dos ligantes fosfínicos, que repassada aos complexos, facilita que eles permeiem a membrana celular por difusão passiva, acarretando uma eficiente acumulação celular.⁵⁵

Dentre os inúmeros ligantes (L-L) empregados que possibilitam a diversidade estrutural dos complexos sintetizados, os complexos Ru-fosfina com os ligantes mercaptos, bem como com os ligantes aciltioureas, se destacam tanto pela atividade citotóxica quanto pela seletividade frente à diversos tipos histológicos de células cancerosas. A fim de contextualizar sobre a proposta desta tese, nas subseções a seguir, é apresentado um breve panorama e pontuados alguns aspectos que exemplificam o progresso dos estudos dos complexos fosfínicos de rutênio com ligantes mercaptos e aciltioureas, desenvolvido no LERCI.

1.4 - Complexos fosfínicos de Ru(II) com ligantes mercaptos

Os compostos mercaptos (NS) fazem parte de uma classe de ligantes orgânicos utilizados desde o primórdio do laboratório. Os primeiros compostos sintetizados foram os Ru-nitrosilo com o ligante mercaptiol 4,6'-dimetil-2-mercaptopirimidina (SpymMe₂), [Ru(κ^2 -SpymMe₂)(κ^1 -S-SpymMe₂)(NO)(PP)]PF₆ (onde P-P= dpmm e dppen). A ênfase nestes compostos era a liberação fotoquímica de NO.^{56,57}

Posteriormente, muitos complexos com ligantes bifosfínicos (PP) com a estrutura base [Ru(NS)(bipy)(PP)]PF₆, foram sintetizados.^{58,59} Fez-se o uso de diferentes ligantes bifosfínicos (I) e mercaptos (II): (I) 1,2'-*bis*(difenilfosfina)etano (dppe), 1,3'-*bis*(difenilfosfina)propano (dppp), 1,4'-*bis*(difenilfosfina)butano (dppb) e 1,1-*bis*(difenilfosfina)ferroceno (dppf); (II) 2-mercaptopiridina (pyS), 2-mercaptopirimidina (pySm) e 4,6'-dimetil-2-mercaptopirimidina. Todos complexos demonstraram atividade citotóxica frente à linhagem celular tumoral de mama MDA-MB-231, com valores de IC_{50(48 h)} entre 0,14 e 0,62 μ M, cujas diferenças estatísticas não permitiram avaliar a influência entre os diferentes ligantes mercaptos.^{58,60} Trabalhos posteriores realizados por colaboradores, avaliaram a atividade citotóxica frente à outras linhagens celulares e, principalmente, estudos avaliando como os compostos induzem à morte celular.⁶¹

A partir de meados desta década, um novo conjunto de complexos foi sintetizado e testado com novos ligantes mercaptos, dentro da hipótese “o papel de átomos e grupos não coordenados dos ligantes mercaptos na atividade citotóxica dos complexos, bem como nas interações moleculares com biomoléculas”.⁶⁰ Os novos ligantes empregados foram: 2-mercaptotizolina (tdzt), 2-mercapto-1-metilimidazol (mimi), 4,6-diametil-2-mercaptopirimidina, 2-tiouracil, 6-metil-2-tiouracil, 2-mercapto-4(3H)quinazolina (2mq), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp) (FIGURA 1.5-A).

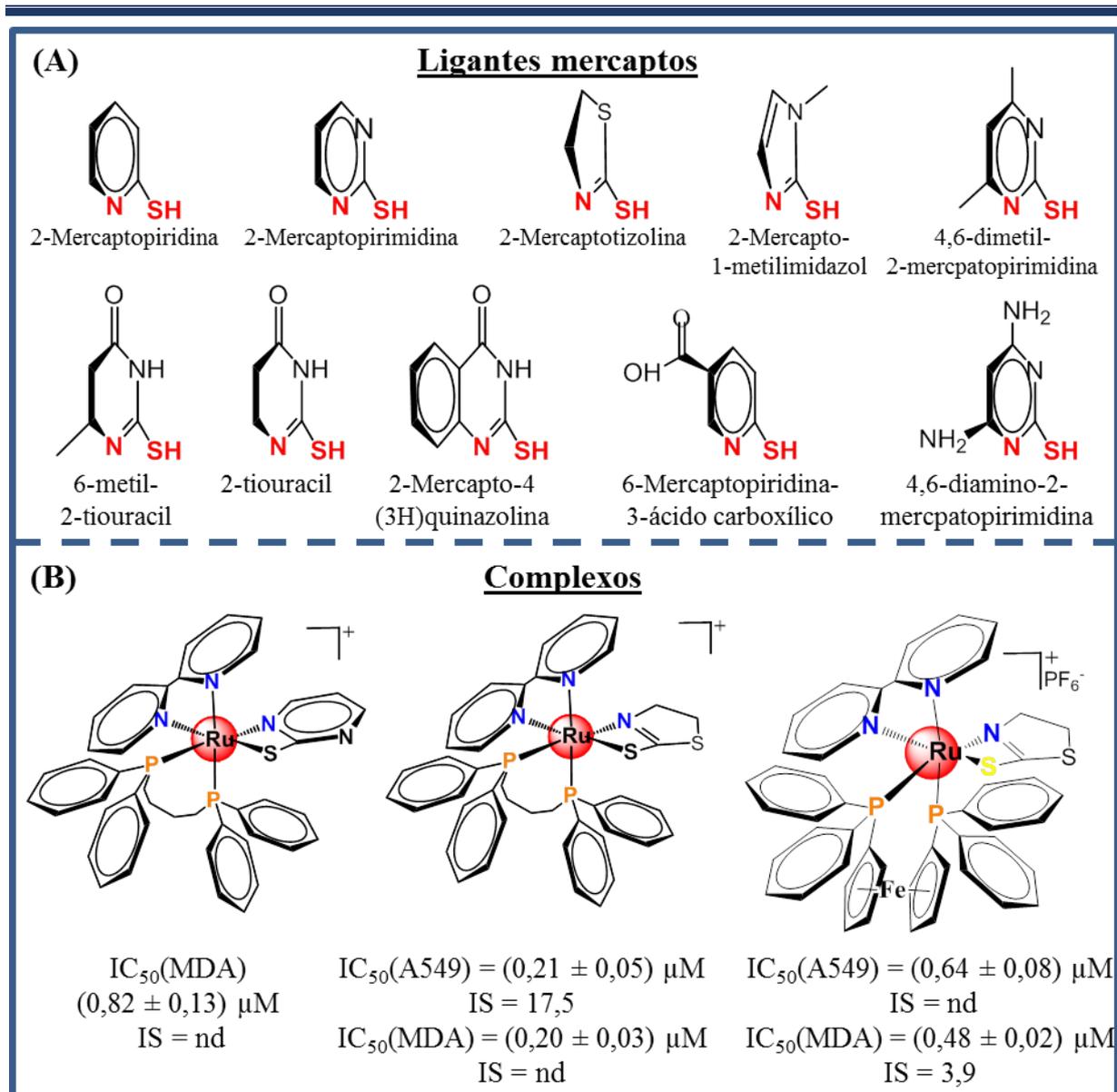


FIGURA 1.5- (A) Estruturas dos ligantes mercaptos empregados na síntese de complexos. (B) Estruturas químicas dos complexos fosfínicos de rutênio com ligantes mercaptos, juntamente com os valores de $IC_{50(48 \text{ h})}$ frente às linhagens tumorais humanas de pulmão (A549) e mama (MDA-MB-231), e valores de índice de seletividade (IS) para células tumorais A549 e MDA-MB-231 em comparação as respectivas células não tumorais MRC-5 (pulmão) e MCF-10A (mama).

No contexto de desenvolvimento de novos complexos, alguns dos ligantes foram coordenados aos precursores, formando os seguintes complexos: $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6^{46}$, $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6^{46,62}$ $[\text{Ru}(\text{NS})_2(\text{dppb})]^{62}$ e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{PP})]\text{PF}_6$ (onde PP = dppb ou dppf).⁶²⁻⁶⁴ A influência dos ligantes na atividade citotóxica e seletividade à células tumorais dos compostos não serão mencionadas nesta seção, pois serão abordadas nos Resultados e Discussão desta tese de posse dos resultados alcançados neste trabalho.

Os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6^{46}$ e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6^{62}$ são referenciados por seus potenciais citotóxicos em várias linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231, A549 e MCF-7), com valores de $\text{IC}_{50(48\text{ h})}$ na concentração de nM (30-210 nM) em alguns casos. Tais resultados foram importantes por evidenciarem o potencial citotóxico dos complexos com duas bifosfinas. Destaca-se a expressiva seletividade do complexo $[\text{Ru}(2\text{mq})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ à linhagem tumoral de pulmão A549 ($\text{IC}_{50(\text{A549}, 48\text{ h})} = 0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$; $\text{IS} = 114$)⁶², quando comparada a linhagem não tumoral de pulmão MRC-5 (FIGURA 1.6). Entretanto, quando se compara tanto os valores de IC_{50} quanto os índices de seletividade (IS) dos demais complexos com o ligante 2mq o comportamento não é similar (FIGURA 1.6). Por exemplo, os complexos $[\text{Ru}(2\text{mq})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ ($\text{IC}_{50(\text{A549})} = 3,16 \pm 0,17 \mu\text{M}$; $\text{IS} = 1,7$)⁶⁵ e $[\text{Ru}(2\text{mq})_2(\text{dppb})]$ ($\text{IC}_{50(\text{A549})} > 200 \mu\text{M}$)⁶² apresentam resultados de citotoxicidade distintos, o que evidência a importância do cerne estrutural do complexo, de todos os ligantes e da carga do complexo.

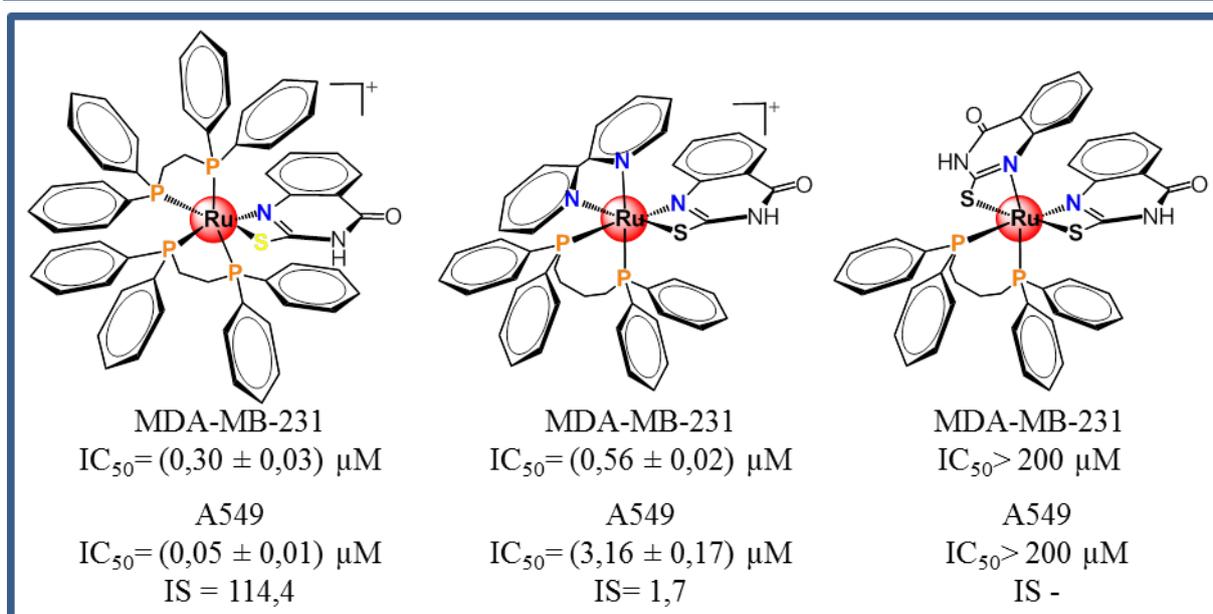


FIGURA 1.6- Estruturas dos complexos fosfínicos de rutênio com o ligante 2-mercapto-4(3H)quinazolina, juntamente com os valores de $IC_{50(48 \text{ h})}$ frente às linhagens tumorais humanas de pulmão (A549) e mama (MDA-MB-231), e valores de índice de seletividade (IS) para células tumorais A549 e MDA-MB-231 em comparação as respectivas células não tumorais MRC-5 (pulmão) e MCF-10A (mama).

No campo dos possíveis alvos biológicos, os estudos da capacidade dos complexos de atuarem como inibidores da enzima topoisomerase IB (Top IB) é um destaque.^{62,63,66} As topoisomerases são enzimas nucleares que controlam e modificam o estado topológico do DNA nos processos celulares vitais, como replicação do DNA, condensação e segregação cromossômica. Especificamente, as enzimas do tipo IB catalisam a quebra de uma fita simples no DNA, em um ciclo catalítico de várias etapas.⁶⁷⁻⁶⁹ Nas células cancerígenas, as enzimas topoisomerases são hiperexpressadas e hiperativadas devido à desregulação de suas funções homeostáticas. Portanto, a inibição da atividade catalítica da Top IB é considerada como uma das possíveis vias de ativação dos processos de morte celular. Alguns quimioterápicos (camptotecina, topotecano e

irinotecano) têm suas ações baseadas na inibição da atividade enzimática da topoisomerase IB.⁶⁹⁻⁷¹

De modo geral, os mais de 20 complexos Ru-bisfosfina contendo ligantes mercaptos testados no LERCI inibiram parcialmente ou totalmente a atividade catalítica da enzima Top IB em concentrações que variaram de 3-200 μM . Como exemplo, os complexos $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$,⁶⁵ $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$,⁶³ $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ ⁶⁶ e $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ ⁶² inibiram totalmente a atividade catalítica da enzima em concentrações entre 5 e 10 μM . Os dois primeiros complexos citados são inibidores catalíticos da Top IB, inibindo apenas a etapa da clivagem de uma das fitas do DNA. Os complexos $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ são inibidores mistos da enzima, atuando tanto na etapa da clivagem quanto na etapa da religação do ciclo catalítico da Top IB. Estudos de modelagem molecular sugeriram que alguns compostos interagem preferencialmente no grupo Arg634 próximo dos resíduos do sítio ativo quando a Top IB está livre, e no sulco menor do DNA do sítio de clivagem do complexo Top IB_DNA.⁶⁶ Com base nos dados, a enzima pode ser considerada como um dos possíveis alvos biológicos dos complexos. Entretanto, uma sistematização no que tange a influência dos ligantes na interação com a enzima é algo difícil de se concluir.

Os complexos mencionados ao longo desta seção compartilham uma importante característica, eles induzem a morte celular em diferentes tipos de células tumorais, via mecanismos apoptóticos, sendo observados tanto pela via de sinalização extrínseca quanto pela via intrínseca.^{46,61,64} Atualmente, já se observou diversas cascatas de eventos moleculares associados a apoptose celular, tais como aumento na expressão gênica das proteínas pró-apoptóticas Bax, Caspase 9 e Tp53 e supressão da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2,⁶¹ bem como alterações no potencial da membrana mitocondrial.⁶⁴ De modo geral, a depender da linhagem celular, os complexos induzem a parada no

ciclo celular nas fases G0 e/ou G1. Os complexos também levam ao acúmulo de células com quantidade anormal de DNA fragmentado, referidas como “células Sub-G1”^{46,61,64}.

Os compostos heterobimetálicos [Ru(mim)(bipy)(dppf)]PF₆ (0,33 ± 0,03 μM) e [Ru(tzdt)(bipy)(dppf)]PF₆ (0,48 ± 0,02 μM) induzem apoptose nas células tumorais de mama (MDA-MB-231). A apoptose celular ocorre via ativação mitocondrial levando a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), seguida pelo aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas caspase-3 e p53 nas células tratadas com os complexos. Adicionalmente, os complexos de rutênio inibiram a formação de vasos sanguíneos em membranas cório-alantoide transplantadas com células cancerígenas MDA-MB-231 quando comparados ao controle negativo, indicando uma ação antiangiogênica.⁶⁴

A atividade anticâncer *in vivo* dos complexos [Ru(mimi)(bipy)(dppb)]PF₆ (**1**) e [Ru(tzdt)(bipy)(dppb)]PF₆ (**2**) foi avaliada em camundongos C.B-17 SCID enxertados com células HepG2.⁴⁴ Por 21 dias ininterruptos, os camundongos foram tratados com os complexos nas doses de 0,5 mg kg⁻¹ dia (D1) e 1,0 mg kg⁻¹ dia (D2) por injeções intraperitoneais. Ambos os complexos foram capazes de inibir o crescimento das células HepG2 nos animais em comparação com os grupos do controle negativo. Em termos percentuais em comparação com os animais do grupo do controle negativo, as taxas de inibição da massa tumoral foram de 31,5% (D1) e 45,4% (D2) para os animais tratados com o complexo 1, enquanto para o complexo 2 foi de 46,9% (D1) e 67,7%. O composto doxorrubicina amplamente utilizado no tratamento do câncer foi utilizado como controle positivo. O composto, na dose de 0,3 mg kg⁻¹ dia, reduziu a massa do tumor em 36,8%. Aspectos toxicológicos também foram avaliados nos camundongos tratados com os complexos. Não houve alterações significativas na massa corporal dos animais e na massa úmida do fígado, rim, pulmão e coração dos animais tratados com os complexos em

relação aos animais do controle. O número de leucócitos (células sanguíneas brancas) e eritrócitos permaneceu inalterado após o tratamento com os complexos. Análises morfológicas do fígado, rins, pulmões e coração em todos os grupos, indicaram que o tratamento não provocou alterações significativas nos órgãos.⁴⁴

1.5 - Complexos fosfínicos de Ru(II) com ligantes aciltioureas

A estrutura geral dos ligantes aciltioureas, $-N(S)NC(O)C-$, possibilita inúmeras estruturas, por meio da utilização de diferentes substituintes (R) (FIGURA 1.7). Esses compostos podem ser classificados como monossustituídos ou dissustituídos, a depender dos substituintes R2 ligados ao grupo tiourea.^{72,73}

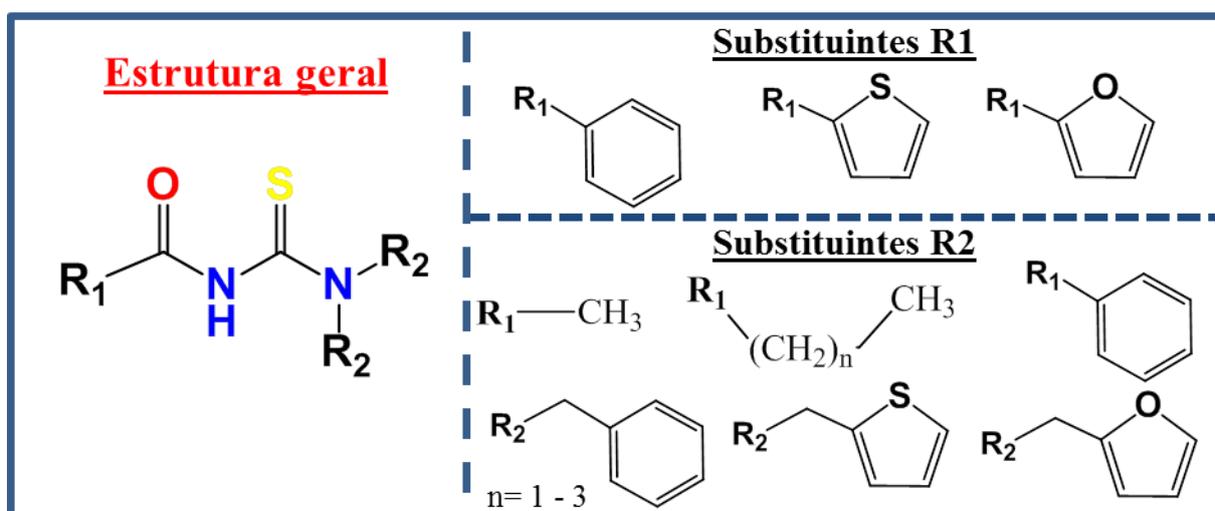


FIGURA 1.7- Estrutura base dos ligantes aciltioureas, com alguns dos principais substituintes (R1) e (R2) utilizados no LERCI.

As aciltioureas contêm no arcabouço de sua estrutura principal três átomos suscetíveis à coordenação a centros metálicos. Distintos modos de coordenação desses ligantes são encontrados na literatura, tanto em sua forma neutra quanto na forma aniônica: (I) coordenação na forma neutra: coordenação

monodentada, via átomo de S ou N e coordenação bidentada, via átomos de O e S; (II) coordenação na forma aniônica: coordenação bidentada, via átomos de O e S; coordenação bidentada, via átomos de O e N; coordenação bidentada, via átomos de S e N, e em ponte via átomo de N.^{72,73}

Os compostos fosfínicos de platina(II) e paládio(II) foram os primeiros sintetizados empregando aciltioureas dissustituídas como ligantes, no grupo LERCI. Os trabalhos reportando os complexos de estrutura geral $[\text{Pt}(\text{acth-S,O})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ e $[\text{Pd}(\text{acth-S,O})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (onde acth= aciltioureas) concentram-se nos ensaios de atividade citotóxica frente às linhagens tumorais humanas de mama (MDA-MB-231) e próstata (DU-145).^{74,75} Adicionalmente, a atividade antibacteriana frente à *Mycobacterium tuberculosis*⁷⁶ e antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*⁷⁴ também foi explorada em compostos com estruturas similares. Em geral a atividade citotóxica destes compostos é modesta frente às linhagens de câncer de mama e pulmão, com valores de IC_{50} entre 1,00 a $>200 \mu\text{M}$ (FIGURA 1.8-A). Com base nos dados, os complexos de platina contendo os ligantes com substituintes R2 alifáticos são sistematicamente mais citotóxicos quando comparados aos complexos análogos com substituintes R2 aromáticos.^{74,75}

Em relação aos complexos de rutênio de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{acth-S,O})(\text{NN})(\text{PP})]\text{PF}_6$, a citotoxicidade de cinco complexos foi avaliada frente à linhagem tumoral de próstata (DU-145). Baixos valores de IC_{50} (0,25 a 0,61 μM) foram observados, neste caso o composto com substituintes R2 aromáticos foi mais ativo que os complexos com substituintes alifáticos (FIGURA 1.8-B).⁷⁷

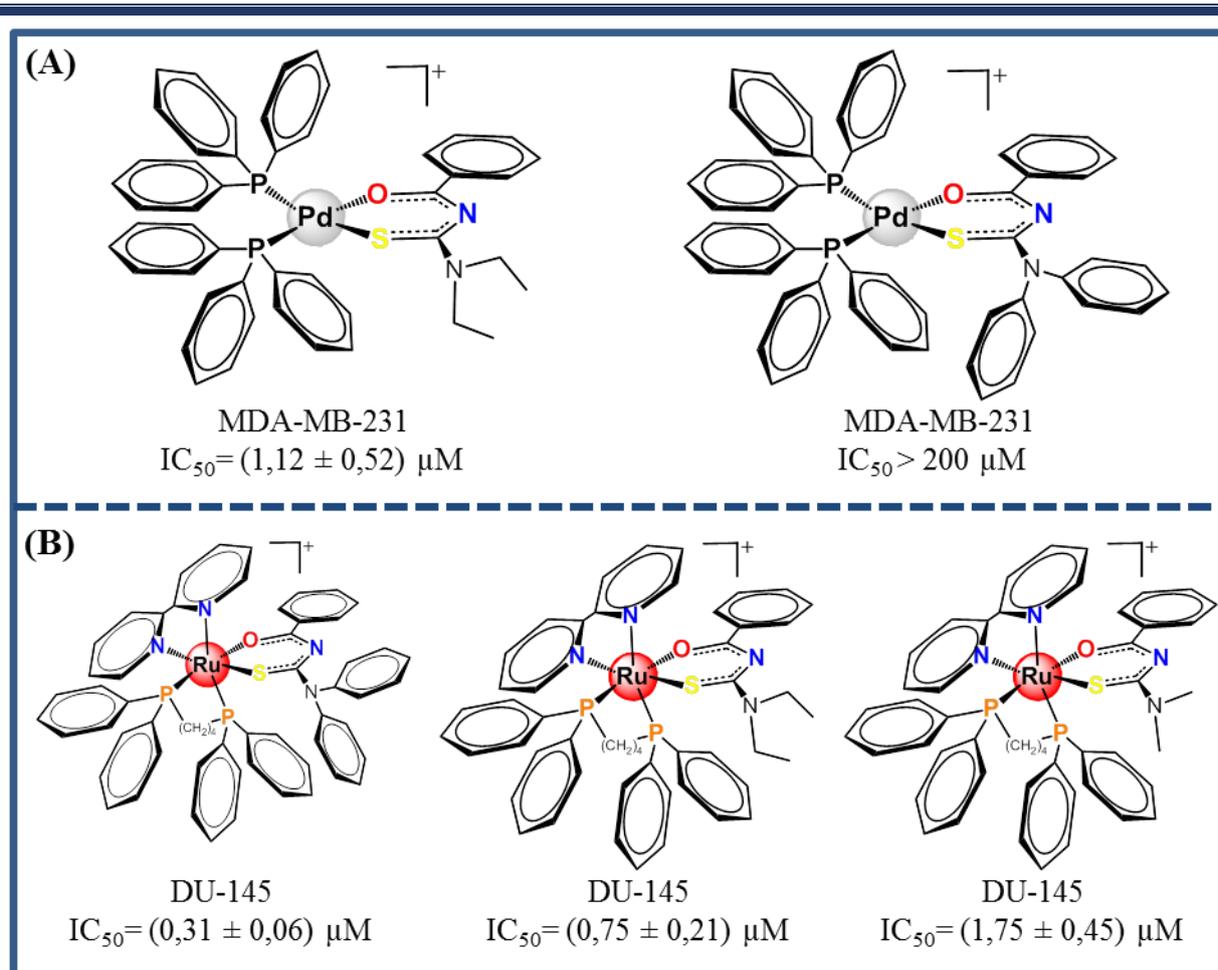


FIGURA 1.8- (A) Estruturas de complexos fosfínicos de platina com ligantes aciltiourea, juntamente com os valores de $IC_{50(48 h)}$ frente à linhagem tumoral humana de mama (MDA-MB-231). (B) Estruturas químicas de complexos fosfínicos de rutênio com ligantes aciltiourea, juntamente com os valores de IC_{50} frente à linhagem tumoral de próstata (DU-145).

A avaliação biológica dos compostos organometálicos de rutênio com aciltioureas (acth) também já é bem estabelecida, principalmente para os complexos de fórmula geral $[Ru(\eta^6-p\text{-cimeno})Cl_x(\text{acth})]PF_6$ e $[Ru(\eta^6-p\text{-cimeno})Cl_x(\text{acth})(PPh_3)]PF_6$. Três distintos modos de coordenação dos ligantes aciltioureas foram descritos, os corriqueiros da literatura ($k^2\text{-S,O}$ e $x=1$; $k^1\text{-S}$ e $x=2$) e o não habitual modo bidentado via átomos de S e N ($x=1$).⁵⁰⁻⁵² Nestes trabalhos há uma diversidade de ligantes empregados, com os substituintes R2 com grupos alifáticos, aromáticos e cíclicos. Os complexos de

fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_x(\text{acth})]\text{PF}_6$ apresentaram moderada citotoxicidade nas linhagens celulares MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 5,8$ a $37,1 \mu\text{M}$) e A549 ($\text{IC}_{50} = 16,1$ a $44,2 \mu\text{M}$).⁵² Os compostos com o ligante trifenilfosfina apresentam pronunciadas citotoxicidades nestas linhagens celulares, com baixos valores de IC_{50} entre $0,28$ a $0,74 \mu\text{M}$ frente às células de mama e na faixa de $0,25$ a $1,83 \mu\text{M}$ contra às células de pulmão.^{50,51} Quando as células tratadas com os compostos organometálicos foram comparadas com as células do controle negativo, observou-se uma diminuição das proporções das células em cada fase do ciclo celular, bem como o acúmulo significativos de células hipodiplóides (células sub-G1), o que demonstra a morte das células A549.

Estudos recentes reportaram a citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais MDA-MB-231 e não tumoral MCF-10A do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{dmbth})(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$ ($\text{IC}_{50} = 8,81 \pm 0,81 \mu\text{M}$; $\text{IS} = 1,67$)⁴⁸, onde *dmbth* = N,N-(dimetil)-N'-benzoiltiourea, *bipy* = 2,2'-bipiridina e PPh_3 = trifenilfosfina. Posteriormente, a toxicidade *in vivo* do complexo foi avaliada em camundongos por meio da administração do composto nas doses de 50 e 300 mg kg^{-1} via injeções intraperitoneais durante um período de 24 h. O teste de toxicidade aguda com a administração da dose de 50 mg kg^{-1} do composto, não acarretou mortes de animais nas primeiras 24 h. Em relação aos aspectos toxicológicos não foram observados comportamentos anormais e alteração na massa corporal dos animais. A análise histopatológica não mostrou sinais de inflamação ou degeneração nos rins. Adicionalmente, não foram observadas alterações morfológicas ou patológicas no baço, fígado e coração. Em suma, o complexo não causou toxicidade nos órgãos analisados. A avaliação genotóxica indicou que os animais tratados com a dose mais alta apresentaram danos ao DNA, de maneira similar ao controle positivo (doxorrubicina).⁴⁸

1.6 - Ligante 2-(difenilfosfina)piridina

A classe dos ligantes hemilábeis que incorporam os átomos de fósforo e nitrogênio, doadores “mole” e “duro”, respectivamente, tem sido o método mais eficiente de dessimetração dos ligantes fosfínicos.^{78,79} No que se refere à química de coordenação, os ligantes bifuncionais são muito versáteis, uma vez que esses podem se coordenar de diferentes formas a depender das características do centro metálico.

Há um amplo interesse no uso destes ligantes para a síntese de complexos metálicos para catálise, especialmente a assimétrica.^{80,81} A combinação das propriedades eletrônicas dos átomos de P e N pode auxiliar na estabilização dos estados de oxidação intermediários do centro metálico que se formam durante um ciclo catalítico. Além disso, os ligantes P, N podem exercer efeito regioseletivo pelo efeito *trans* do átomo de fósforo e efeitos estéricos efetuados pelos substituintes fenil de tais ligantes.

Inúmeros complexos de rutênio com ligantes aminofosfínicos são descritos na literatura. O enfoque aqui será no ligante 2-(difenilfosfina)piridina (dphppy).⁸²⁻⁸⁴ Quando a coordenação ao centro metálico é monodentada, pelo átomo de fósforo, o ligante dphppy apresenta características do ligante trifenilfosfina (PPh₃). Além disso, o ligante coordena ao centro metálico por diferentes maneiras, tais como (I) monodentada, (II) em ponte e (III) bidentada (FIGURA 1.9). Especificamente, o interesse neste ligante se respalda na combinação de uma parte de um ligante bifosfínico e outra de um ligante piridínico, quando coordenado de maneira bidentada. Tal característica proporciona ao complexo um caráter lipofílico com um volume menor, quando comparado aos ligantes bifosfínicos.^{85,86}

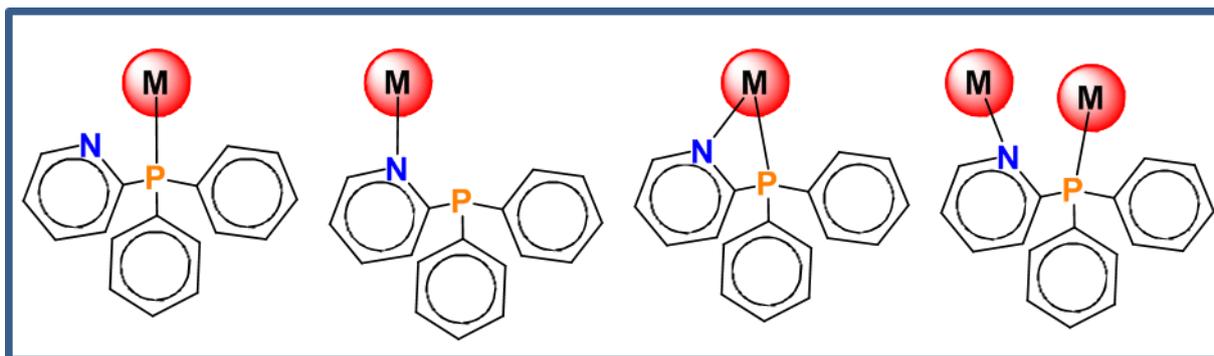


FIGURA 1.9- Modos de coordenação do ligante dphppy empregados na síntese de complexos de coordenação.

1.7 - Hipóteses e desenvolvimento dos complexos, objetos desta tese

Frente ao exposto anteriormente, a execução do presente trabalho teve como proposta a avaliação da atividade citotóxica de 10 novos complexos fosfínicos de rutênio com os ligantes mercaptos e aciltioureas, sintetizados a partir do precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)]⁸⁷ (FIGURA 1.10) pouco explorado na literatura. O complexo *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] tem como diferencial, aos já utilizados no laboratório LERCI, a bifosfina 2-(difenilfosfina)piridina, cujas características citadas anteriormente, apresenta a junção de um ligante piridínico a uma porção fosfínica. A outra vertente do trabalho foi avaliar uma possível capacidade dos complexos atuarem em diferentes alvos biológicos, cujas inibições ou danos podem representar a ativação dos processos de morte celular por diferentes vias.

O planejamento estrutural dos complexos foi embasado em algumas hipóteses propostas:

- (I) O uso de uma fosfina hemilábil, juntamente com o ligante bifosfínico dppb;
- (II) Uso de ligantes mercaptos com diferenças estruturais, ligantes sem grupos funcionais ligados ao anel, bem como de ligantes com grupos funcionais ligados no anel (FIGURA 1.10). Para esta classe de novos compostos, almejou-se

sistematizar a influência destes aspectos estruturais na atividade citotóxica dos complexos;

- (III) Uso dos ligantes aciltioureias. Para esta classe de novos compostos, tentou-se sistematizar a influência dos substituintes R2 na atividade citotóxica, tanto no que se refere ao tamanho da cadeia alifática quanto aos substituintes aromáticos (FIGURA 1.10).

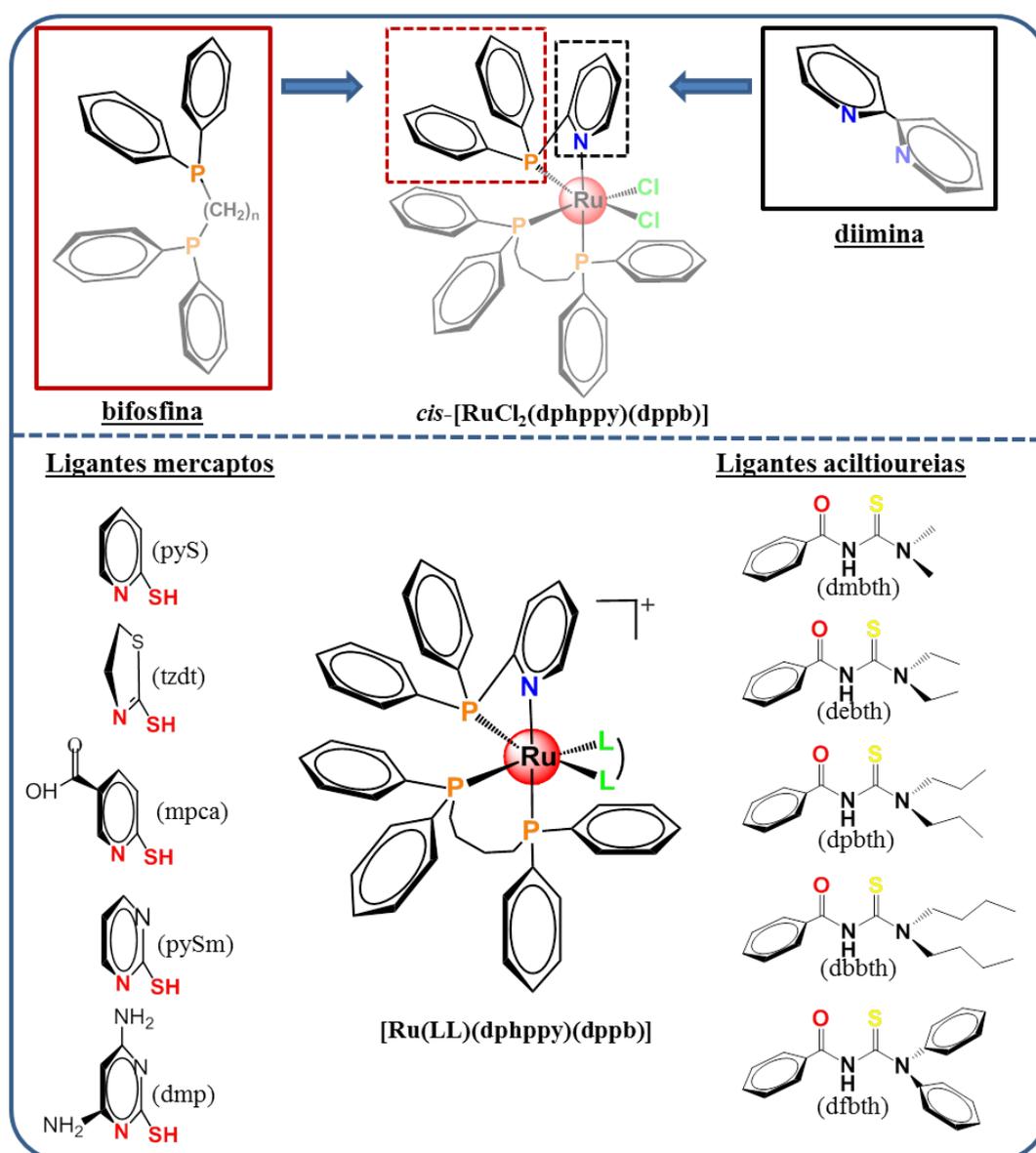


FIGURA 1.10- Estruturas dos complexos precursor $cis-[RuCl_2(dphppy)(dppb)]$ e $[Ru(LL)(dphppy)(dppb)]^+$, juntamente com as estruturas dos ligantes mercaptos e aciltioureias utilizados na execução deste projeto.

2 - OBJETIVOS

Alinhado com as hipóteses levantadas na seção anterior, o presente trabalho teve como objetivos a síntese e caracterização de complexos fosfínicos de rutênio com ligantes mercaptos ou aciltioureas, bem como a avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos complexos. Além disso, objetiva-se o estudo dos possíveis mecanismos pelos quais os compostos induzem à morte celular e os possíveis alvos biológicos. De uma maneira sistemática, os objetivos gerais foram concretizados por meio dos seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ onde dphppy = 2-(difenilfosfina)piridina; dppb = 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano; NS = 2-mercaptopiridina (pyS), 2-mercaptotizolina (tzdt), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca), 2-mercaptopirimidina (pySm) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp); OS = N,N-(dimetil)-N'-benzoiltiourea (dmbth), N,N-(dietil)-N'-benzoiltiourea (debth), N,N-(dipropil)-N'-benzoiltiourea (dpbth), N,N-(dibutil)-N'-benzoiltiourea (dbbth), N,N-(difenil)-N'-benzoiltiourea (dfbth)].
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos complexos frente à diferentes tipos histológicos de células tumorais: de pulmão (A549) e mama (MDA-MB-231), e células não tumorais humanas de pulmão (MRC-5) e mama (MCF-10A);
- Avaliar a influência dos complexos na morfologia celular, sobrevivência clonogênica e distribuição do ciclo celular na linhagem tumoral A549.
- Avaliar a interação dos complexos com o ácido desoxirribonucleico.
- Avaliar a capacidade dos complexos em inibir a enzima topoisomerase IB.
- Avaliar a capacidade dos complexos com os ligantes 2-mercaptotizolina, 2-mercaptopirimidina e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina em inibir a enzima proteassoma em células viáveis HEK293T-uGFP.
- Avaliar a interação dos complexos com os ligantes mercaptos com a proteína albumina do soro humano (HSA).

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Obtenção da atmosfera inerte

Todas as sínteses foram realizadas sob atmosfera inerte de Argônio. O gás foi obtido pela passagem de fluxo do gás argônio, de procedência AGA (atual Linde Gás) ou White Martins, por um sistema de colunas contendo: sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador do tipo BTS-R-3-11 (Fluka Chemika), aquecida a 60 °C para o catalisador permanecer ativado. Os procedimentos descritos foram necessários para eliminação de oxigênio e água do gás comercial.

3.2 - Solventes

Os principais solventes utilizados foram: acetona (Synth P. A.), diclorometano (Synth P. A.), éter dietílico (Synth P. A.), hexano (Synth P. A.) e metanol (Synth P. A.). Os solventes deuterados utilizados foram CD₃CN (Aldrich®), CDCl₃ (Cambridge Isotope Lab.), DMSO-d₆ (Sigma-Aldrich®).

3.3 - Reagentes químicos em geral

O tricloreto de rutênio hidratado (RuCl₃.3H₂O) de procedência Aldrich foi utilizado como recebido. Os ligantes trifenilfosfina (PPh₃), 2-(difenilfosfina)piridina (dphppy), 1,4'-bis(difenilfosfina)butano (dppb), 2-mercaptopiridina (pyS), 2-mercaptotiazolina (tzdt), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca), 2-mercaptopirimidina (pySm) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp) são de procedência Aldrich. Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA; procedência Fluka) também foi utilizado como recebido.

Os reagentes empregados nos ensaios biológicos foram utilizados como fornecidos: trizma base (Sigma-Aldrich®) e trizma-HCl (Sigma-Aldrich®); DNA do timo de bezerro (CT-DNA, Sigma-Aldrich®), Albumina do soro humano (HSA, Sigma-Aldrich®), Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®),

iodeto de propídio (BD Biosciences), kit Anexina-V (BD Bioscience), azul de tripano (Sigma-Aldrich[®]), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Aldrich), tripsina (Vitrocell), tampão fosfato (PBS, Vitrocell), soro fetal bovino (SFB, Vitrocell), meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM e DMEM/F12, Vitrocell).

3.4 - Síntese dos complexos precursores de rutênio

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

O complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ foi sintetizado conforme procedimento reportado por Wilkinson e Stephenson.⁸⁸ Solubilizou-se o sal de tricloreto de rutênio hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$; 1,00 g; 3,5 mmol) em metanol desaerado (200 mL), mantendo a solução resultante em refluxo por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se o ligante trifenilfosfina (PPh_3 ; 5,75 g; 21,7 mmol) e novamente a mistura reacional foi refluxada por 3 h. O precipitado marrom escuro formado durante a reação foi filtrado em um funil de placa porosa, lavado com metanol à quente (4×40 mL) e hexano à quente (4×40 mL). O sólido foi seco sob vácuo. Rendimento 3,38 g (83%).

3.4.2 - Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{PPh}_3)]$

O complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{PPh}_3)]$ foi sintetizado conforme procedimento reportado por Calton et al.⁸⁹ Misturou-se o complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ (1,00 g; 1,2 mmol) e um equivalente molar de 1,4'-bis(difenilfosfina)butano (dppb; 0,49 g; 1,2 mmol) em diclorometano desaerado (20 mL), mediante agitação. A bifosfina dppb foi adicionada lentamente à solução do complexo de rutênio para não ocasionar a formação de precipitado, o complexo binuclear $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})$, durante a reação.

Após 30 min. de agitação, o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 5 mL e precipitou-se um sólido verde com adição de etanol (30 mL). O precipitado foi filtrado em um funil de placa porosa, lavado com etanol (3×15 mL) e hexano à quente (5×15 mL). O sólido foi seco sob vácuo. Rendimento 0,61 g (67%).

3.4.3 - Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)]

O complexo *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] foi sintetizado conforme procedimento descrito por Schutte et al.⁸⁷ Solubilizou-se o precursor [RuCl₂(dppb)(PPh₃)] (1,00 g; 1,2 mmol) e o ligante 2-difenilfosfinapiridina (dphppy; 0,46 g; 1,7 mmol) em tolueno desaerado (100 mL), mantendo a solução resultante em refluxo por 24 h. O precipitado amarelo formado durante a reação foi filtrado em um funil de placa porosa, lavado com tolueno à quente (5×20 mL), éter dietílico (5×20 mL) hexano à quente (5×20 mL). O sólido foi seco sob vácuo. Rendimento 0,91 g (88%).

3.5 - Síntese dos complexos [Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF₆ (AMP1 – AMP5), onde 2-mercaptopiridina (pyS; AMP1), 2-mercaptotiazolina (tzdt; AMP2), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca; AMP3), 2-mercaptopirimidina (pySm; AMP4) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp; AMP5)

Adicionaram-se 1,5 equivalentes molar do respectivo ligante mercapto (0,17 mmol; pyS, tzdt, mpca, pySm ou damp) em uma suspensão do precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] (100 mg; 0,11 mmol) em metanol desaerado (30 mL). O sistema reacional permaneceu em agitação por 12 h sob atmosfera de argônio. Posteriormente, adicionou-se o sal KPF₆ (30 mg; 0,17 mmol) e reduziu-se o volume da solução resultante para aproximadamente

10 mL. A solução foi mantida em agitação (aproximadamente 20 min.) até a precipitação de um sólido amarelo. O precipitado foi filtrado em um funil de placa porosa, lavado com éter dietílico (5×15 mL) e água (3×15 mL). O sólido foi seco sob vácuo. Rendimentos: **AMP1**, 99 mg (82%); **AMP2**, 92 mg (75%); **AMP3**, 109 mg (86%); **AMP4**, 108 mg (89%); **AMP5**, 99 mg (79%).

3.6 - Síntese dos ligantes aciltiourea: N,N-(dimetil)-N'-benzoiltiourea (dmbth), N,N-(dietil)-N'-benzoiltiourea (debth), N,N-(dipropil)-N'-benzoiltiourea (dpbth), N,N-(dibutil)-N'-benzoiltiourea (dbbth), N,N-(difenil)-N'-benzoiltiourea (dfbth)

Os ligantes aciltioureas foram sintetizados conforme os procedimentos reportados na literatura.⁹⁰ Na suspensão de tiocianato de amônio (NH₄SCN; 30 mmol) em acetona seca (20 mL) adicionaram-se 50 mL de uma solução de cloreto de benzoil (30 mmol) em acetona seca. A adição foi realizada de forma lenta. Após a precipitação de um sólido de coloração branca (KCl), a suspensão foi resfriada em banho de gelo para a adição lenta do respectivo ligante amina (30 mmol; amina, dietilamina, dipropilamina, dibutilamina e difenilamina). A mistura reacional foi mantida em agitação por 12 h em temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se água gelada para a precipitação de um sólido. O precipitado foi filtrado em um funil de placa porosa, lavado com água (3×15 mL) e seco sob vácuo. O sólido foi recristalizado em uma mistura acetona/água (50:50 (v:v)).

3.7 - Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (SPPM2-SPPM6), onde OS= N,N-(dimetil)-N'-benzoiltioureia (dmbth; SPPM2), N,N-(dietil)-N'-benzoiltioureia (debth; SPPM3), N,N-(dipropil)-N'-benzoiltioureia (dpbth; SPPM4), N,N-(dibutil)-N'-benzoiltioureia (dbbth; SPPM5), N,N-(difenil)-N'-benzoiltioureia (dfbth; SPPM6)]

Adicionaram-se 1,1 equivalentes molar do respectivo ligante aciltioureia (0,12 mmol; dmbth, debth, dpbth, dbbth ou dfbth) em uma solução do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dphppy})(\text{dppb})]$ (100 mg; 0,11 mmol) em metanol/diclorometano desaerado (1:1; 50 mL). A solução foi mantida em refluxo por 18 h. Posteriormente, adicionou-se o sal KPF_6 (40 mg; 0,22 mmol) e reduziu-se o volume da solução resultante para aproximadamente 10 mL. A solução foi mantida em agitação (aproximadamente 30 min.) até a precipitação de um sólido amarelo. O precipitado foi filtrado em um funil de placa porosa, lavado com éter dietílico (2×15 mL) e água (5×15 mL). O sólido foi seco sob vácuo. Rendimentos: **SPPM2**, 99 mg (79%); **SPPM3**, 104 mg (81%); **SPPM4**, 101 mg (77%); **SPPM5**, 113 mg (84%); **SPPM6**, 99 mg (69%).

3.8 - Instrumentação

3.8.1 - Experimentos voltamétricos

Os experimentos voltamétricos foram realizados no potenciostato/galvanostato EGeG Princeton Applied Research Model 262A, em uma célula eletroquímica de compartimento único com sistema de três eletrodos. O eletrodo de Ag/AgCl em solução 0,1 mol L⁻¹ de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA, Fluka Chemica) em diclorometano como eletrodo de referência, eletrodo de platina empregado como contra-eletrodo e eletrodo de trabalho. As medidas eletroquímicas foram realizadas em solução dos complexos em

diclorometano. O eletrólito de suporte utilizado foi o perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados na faixa de 0.0 a 1.8 V ou 0.0 a 1.6 V, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

3.8.2 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos de ressonância magnética nuclear de 1D (¹H, ³¹P{¹H} e ¹³C{¹H}) e 2D (COSY ¹H-¹H, HSQC ¹H-¹³C e HMBC ¹H-¹³C) foram obtidos no equipamento Bruker 9,4 Tesla modelo NanoBay, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. As amostras foram analisadas à temperatura ambiente. Os experimentos de HMBC ¹H-³¹P foram realizados no equipamento Bruker Avance III de 9,4 T (400 MHz para frequência o núcleo de hidrogênio), equipado com uma sonda PABBI de 5,0 mm de diâmetro interno e gradiente de campo, acessório automático de “tuning and matching” (ATMA). Os solventes deuterados utilizados foram CD₃CN (Aldrich®), CDCl₃ (Cambridge Isotope Lab.) e DMSO-d₆ (Sigma-Aldrich®). Na obtenção dos espectros de ³¹P{¹H}, em alguns casos, utilizou-se diclorometano como solvente na presença de um tubo capilar com água deuterada (D₂O).

3.8.3 - Difração de raios X

Os experimentos de difração de raios X de monocristais foram realizados no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos pelo Prof. Dr. Eduardo Castellano e Dr. João Honorato. As reflexões de Bragg foram coletadas nos difratômetros Enraf-Nonius Kappa-CCD e Apex II Duo, ambos empregando uma fonte de radiação MoK α monocromada por grafite. Os dados de difração coletados foram tratados utilizando-se o pacote de programas do WINGX.⁹¹ As estruturas foram resolvidas usando os métodos diretos, com o programa SHELXS-97.^{92,93} Os modelos obtidos foram refinados (mínimos quadrados de matriz completa) em F2 usando o programa SHELXL-97.⁹³ As

representações gráficas das estruturas foram realizadas nos programas ORTEP-3⁹⁴ e Mercury 2.0.⁹⁵

3.8.4 - Análise elementar

A determinação dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos compostos foi realizada em um analisador CHNS modelo EA 1108 da FISIONS, na Central Analítica do Departamento de Química da UFSCar.

3.8.5 - Condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas no condutivímetro MICRONAL, modelo B-330, equipado com célula de Pt. As soluções dos complexos foram preparadas em diclorometano ou dimetilsulfóxido, em concentrações de 1 mM. A determinação do tipo de eletrólitos dos complexos sintetizados foi realizada por meio da comparação com valores descritos na literatura.⁹⁶

3.8.6 - Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram realizados em um espectrofotômetro HEWLETT PACKARD DIODE ARRAY-8452A, na região compreendida entre 190 e 800 nm. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Os valores de absorvidade molar das bandas dos complexos foram determinados por meio de curvas analíticas, obtida após o registro dos espectros de absorção na região de UV/Vis em diferentes concentrações.

3.8.7 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos nos espectrofotômetros Bomem modelo MB-Séries (para a série **AMP**) e FT-IR Shimadzu modelo IR-Prestige21 (para a série **SPPM**), com resolução de 4 cm⁻¹,

na região compreendida entre 4000 e 300 cm^{-1} . As amostras foram diluídas em KBr (Merck, P.A.) e analisadas em forma de pastilhas.

3.8.8 - Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição foi determinado pelo método de shake-flash,⁹⁷ empregando n-octanol (Sigma-Aldrich) e água. O procedimento descrito foi realizado em triplicata para cada composto. Inicialmente, uma alíquota de 50 μL da solução estoque do composto (0,5 mM) em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) foi diluída em 575 μL de n-octanol (Sigma-Aldrich®) e em seguida, acrescidos mais 575 μL de água. As amostras foram incubadas a 400 rpm a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 1 min. a 1000 rpm e a fase orgânica foi recolhida. As absorbâncias dos complexos na fase n-octanol foram medidas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível. O valor médio das triplicatas das absorbâncias foi empregado para determinar a concentração por meio de uma curva analítica.

As curvas analíticas de absorbância em função da concentração dos complexos no solvente n-octanol foram construídas para determinar as concentrações dos complexos na fase orgânica. As curvas analíticas foram construídas por meio da adição de alíquotas da solução estoque do complexo em DMSO no solvente n-octanol. As concentrações dos complexos em água foram determinadas pela subtração do número de mols adicionado inicialmente, com o número de mols encontrado na fase orgânica.

O coeficiente de partição foi calculado com base na Equação 1:

$$\text{Log } P = \log \left(\frac{C_o}{C_a} \right) \text{ Eq. 1}$$

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

3.9 -Estudo de estabilidade dos complexos em meio aquoso

Os estudos de estabilidade dos complexos foram realizados por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ nos seguintes meios e solvente: DMSO; DMSO/tampão Trisma-HCl (estudos de interação com biomoléculas) e DMSO/meio de cultura celular DMEM (do inglês, “Dulbecco's Modified Eagle's médium”). Os espectros dos de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram registrados em diferentes tempos, 0 horas (imediatamente após a solubilização dos complexos), 24 hora e 48 h. Os espectros dos complexos **AMP** também foram registrados com 60 horas.

Para a série de complexo **AMP**, a concentração dos complexos foi de aproximadamente 1,75 mM tanto em DMSO quanto em DMSO/meio aquoso, e a proporção de DMSO e do respectivo meio aquoso foi de 40:60 (v/v). Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos compostos **AMP** foram coletados com 5K de scans (5120 ns). Para a série de complexo **SPPM**, a concentração dos complexos foi de aproximadamente 2,00 mM tanto em DMSO quanto em DMSO/meio aquoso, e a proporção de DMSO e solução aquosa foi de 75:25 (v/v). Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos compostos **AMP** foram coletados com 8K de scans (8192 ns).

3.10- Estudos de interação dos complexos com biomoléculas

Os complexos são insolúveis em água ou meio aquoso. Entretanto, eles são solúveis em uma mistura DMSO/meio aquoso, em concentrações de $\mu\text{ mol L}^{-1}$ dos complexos. A porcentagem de DMSO nos testes com biomoléculas variou de 5-10%, à depender da concentração dos complexos. Nos ensaios biológicos com células, a porcentagem de DMSO no meio de cultura foi de 0,5%.

O procedimento foi realizado com a preparação de uma solução estoque de concentração desejada, por meio da solubilização dos complexos em DMSO e, posteriormente realizou a diluição no meio aquoso de interesse, caso

necessário acrescentou-se DMSO para atingir a porcentagem desejada do solvente na solução.

3.10.1- Estudos de interação dos complexos com o DNA

O ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro CT-DNA do inglês, DeoxyriboNucleic Acid sodium salt from *Calf Thymus*) foi dissolvido em tampão Trisma-HCl (0,5 mmol L⁻¹ Tris-base (Sigma-Aldrich[®]), 4,5 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (Sigma-Aldrich[®]) e 50 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,4). Inicialmente, uma solução estoque de DNA foi preparada pela solubilização de 12 mg do CT-DNA (Sigma-Aldrich[®]) em 12 mL de tampão Trisma-HCl. As soluções de DNA em tampão Trisma-HCl de concentração desejada para utilização nos experimentos foram preparadas pela diluição da solução estoque de DNA também em tampão Trisma-HCl. A concentração das soluções de DNA foi calculada por UV-Vis, empregando o valor da absorbância do DNA em 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

3.10.1.1 - Medidas de viscosidade

O preparado das soluções para as medidas de viscosidade está descrito no próximo parágrafo. Os volumes exatos empregados de: solução estoque de complexo em DMSO, solvente dimetilsulfóxido e solução estoque de DNA em tampão Trisma-HCl (1,34 ou 1,00 mmol L⁻¹) estão descritos detalhadamente nas TABELAS A18 e A19, no Apêndice – Parte XI.

Inicialmente, as soluções estoque da DNA à 1,34 e 1,00 mmol L⁻¹ foram preparadas como descrito no item 3.9.1. Posteriormente, alíquotas de 0 – 400 μL das soluções estoque dos complexos (concentração de 0,6 mmol L⁻¹ para ambas as séries) foram adicionadas em um tubo de ensaio, seguida pela adição de alíquotas de 0 – 400 μL dimetilsulfóxido. A soma dos volumes das alíquotas citadas perfaz um volume total de 400 μL (TABELAS A18 e A19, no Apêndice). Posteriormente, nas soluções dos complexos foram adicionadas

3000 μL de tampão Trisma-HCl, seguidos pela adição de uma alíquota de 600 μL solução estoque do DNA (1,34 mmol L^{-1} para série **AMP** e 1,00 mmol L^{-1} para a série **SPPM**).

Portanto, foram preparadas 4 mL de soluções do DNA na ausência e presença dos complexos em diferentes concentrações molares em tampão Trisma-HCl (10% DMSO), mantendo-se a concentração constante do DNA. Para cada série de complexos foi empregado uma concentração final de DNA, sendo 200 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ (série **AMP**) e 150 $\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ (série **SPPM**). As concentrações molares dos complexos foram: Série **AMP**: 10; 20; 30; 40; 50 e 60 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}] = 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25$ e $0,30$. Para a série **SPPM** foi: 7,5; 15; 30; 45 e 60 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}] = 0,05; 0,10; 0,20; 0,30$ e $0,40$. A solução de DNA em tampão Trisma-HCl (10% DMSO) foi empregada como negativo controle. As soluções de DNA em tampão na ausência de DMSO e tampão Trisma-HCl na presença de DMSO (10%) também foram preparadas e os tempos de escoamento verificados.

Após o preparo das soluções, o tempo de escoamento de cada solução foi aferido em quintuplicata no viscosímetro de Ostwald (Aldrich), com o auxílio de um cronômetro digital. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim o controle da temperatura em $(25,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$. Por meio do valor médio das medidas quintuplicata, a viscosidade relativa do DNA na presença e ausência dos complexos foi calculada a partir da Equação 2.^{98,99} Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. $[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{(t_{DNA} - t_0)} \quad Eq. 2$$

Onde t_0 é o tempo de escoamento da solução de tampão Trisma-HCl na presença de DMSO (10%) e nas ausências tanto de complexo quanto do DNA; t_{DNA} é o tempo de escoamento da solução de CT-DNA (10% DMSO); t é o tempo de escoamento da solução de complexo/CT-DNA. Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. [complexo]/[CT-DNA], onde η é a viscosidade do DNA na presença dos complexos e η_0 é a viscosidade do DNA na ausência de complexo.

3.10.1.2 - Ensaio de deslocamento do Hoechst

O ensaio de deslocamento do Hoechst no sistema DNA-Hoechst mediante as interações dos compostos foi realizado pelo monitoramento da supressão da fluorescência do sistema DNA-Hoechst.

O preparado das soluções para as medidas de fluorescência está descrito no próximo parágrafo. Os volumes exatos empregados de: solução estoque de complexo em DMSO, solvente dimetilsulfóxido e solução estoque de DNA-Hoechst em tampão Trisma-HCl estão descritos detalhadamente nas TABELAS A20 e A21, no Apêndice – Parte XI.

Inicialmente, uma solução estoque da Hoechst à 0,484 mmol L⁻¹ foi preparada pela solubilização de 1 mg de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich®) em 4 mL de água destilada. Importante, a concentração da solução estoque de Hoechst foi determinada por UV-Vis, empregando absorvidade molar do Hoechst ($\epsilon = 46000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ em água). Também, 50 mL de solução estoque de DNA de aproximadamente 84 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparados como descrito no item 3.9.1.

Posteriormente a preparação das soluções estoque, uma alíquota de 300 μL da solução Hoechst 33258 foi adicionada à solução de 50 mL da solução estoque de DNA. Novamente, as concentrações do DNA e Hoechst foram

aferidas após o preparo da solução DNA-Hoechst por UV-Vis. A concentração de ambas as espécies na solução estoque DNA-Hoechst foram 84 e 2,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A solução foi usada imediatamente após a mistura das soluções.

Em microtubos de 2 mL, alíquotas de 0 – 100 μL das soluções estoque dos complexos (verificar concentrações nas TABELAS A20 e A21) foram adicionadas, seguida pela adição de alíquotas de 0 – 100 μL dimetilsulfóxido. A soma dos volumes das alíquotas citadas perfaz um volume total de 100 μL . Posteriormente, nas soluções dos complexos foram adicionados 900 μL da solução estoque de DNA-Hoechst. Portanto, foram preparadas soluções de DNA-Hoechst (1 mL) na ausência e presença dos complexos em diferentes concentrações molares em tampão Trisma-HCl (10% DMSO), mantendo-se a concentração constante do DNA-Hoechst em 75 e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. As concentrações molares dos complexos foram: Série **AMP**: 7,5; 15,0; 22,5; 30,0; 37,5; 45,0; 52,5; 60,0; 67,5 e 75,0 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA-Hoechst}] = 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9$ e 1,0. Para a série **SPPM**: 7,5; 15,0; 22,5; 30,0 e 37,5 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA-Hoechst}] = 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4$ e 0,5. A solução de DNA-Hoechst em tampão Trisma-HCl (10% DMSO) foi empregada como controle. Soluções dos complexos em tampão Trisma-HCl (10% DMSO), nas maiores concentrações utilizadas (75 ou 37,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), foram empregadas para averiguar a ausência de emissão de fluorescência dos complexos.

Imediatamente ao preparo das soluções, três alíquotas de 200 μL de cada solução foram adicionadas em três poços (200 $\mu\text{L}/\text{poço}$) de uma placa opaca de 96 poços. Desta maneira foram realizadas as triplicadas das medidas das soluções. Após o plaqueamento das soluções, os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na região de 370 a 700 nm, com o comprimento de excitação de 340 nm. As medidas foram realizadas na temperatura de 37 °C

para a série **AMP** e de 25 °C para a série **SPPM**. Os experimentos foram realizados no fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador empregando uma placa opaca de 96 poços.

Correção da intensidade da fluorescência devido ao efeito de filtro para série SPPM

À correção da intensidade da fluorescência devido ao efeito de filtro foi realizada para o ensaio com os complexos da série **SPPM**. Contudo, não foi empregada para o experimento com os complexos da série **AMP**. Para a correção da intensidade da fluorescência devido ao efeito de filtro, os espectros de absorbância das soluções preparadas DNA-Hoechst na ausência e presença dos compostos também foram registrados (FIGURA A80, no Apêndice – Parte X), exatamente as mesmas soluções plaqueadas na placa opaca de 96 poços que foram registrados os espectros de fluorescência. A correção da intensidade de fluorescência foi realizada empregando a Equação 3.

$$F_{cor} = F_{obs} \times e^{\frac{(A_{ex} + A_{em})}{2}} \quad Eq. 3$$

Sendo F_{cor} é a intensidade de fluorescência corrigida, F_{obs} é a intensidade de fluorescência observada; A_{ex} e A_{em} são as absorbâncias das soluções preparadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

3.10.1.3 - Ensaio de mobilidade eletroforética de DNA plasmidial

Para o experimento de mobilidade eletroforética em gel de agarose empregou-se o DNA plasmidial pBR322 para a série **AMP** e o plasmídeo pUC18 para a série **SPPM**. Inicialmente, uma solução estoque do DNA foi preparada pela diluição em tampão Trisma-HCl da solução estoque do DNA plasmidial. A concentração da solução de plasmídeo foi aferida em um espectrofotômetro NanoDrop. Os volumes estão descritos detalhadamente nas TABELAS A16 e A17, no Apêndice – Parte XI.

Em microtubos, uma alíquota de 9 μL da solução estoque DNA plasmidial ($51 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou $64 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi adicionada, seguida pela adição de uma alíquota de 1 μL das soluções estoque dos complexos em DMSO. Portanto, foram preparadas soluções de DNA plasmidial (10 μL) na ausência e presença dos complexos em diferentes concentrações molares em tampão Trisma-HCl (10% DMSO), mantendo-se a concentração constante do DNA em $46 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a série **AMP** e $58 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a série **SPPM**. As concentrações molares dos complexos foram: Série **AMP**: 11,5; 23,0; 46,0 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}] = 0,0; 0,25; 0,50$ e $1,00$; Para a série **SPPM**: 29 e 58 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}] = 0,0; 0,50$ e $1,0$. A solução de DNA plasmidial em tampão Trisma-HCl (10% DMSO) foi empregada como negativo controle. As soluções foram incubadas a 37°C durante 18 h.

Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 500 rpm por 30 segundos. Posteriormente, nas amostras foram adicionados 2 μL de tampão de corrida (Gel-loading buffer). O tampão de corrida contendo sacarose, glicerol e azul de bromofenol foi usado para aumentar a densidade e dar cor as amostras, o qual facilita que as amostras entre nos poços pela força da gravidade e no monitoramento da corrida. Em seguida, as alíquotas foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TAE (m/v). Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA, uma amostra de *ladder* (marcador de massa

moleclular) foi preparada e adicionada a um poço para corrida eletroforética. A amostra foi preparada com 3 μL de ladder, 7 μL tampão Tris-HCl e 2 μL de tampão de corrida.

O gel foi preparado com agarose (MERCK) em tampão TAE (0,45 M Tris-HCl; 0,45 M ácido acético; 10 mM de EDTA; pH 7,4). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba de eletroforese horizontal (BioRad) com tampão TAE a 40 V durante 6 horas. Após a corrida, o gel foi corado por 10 minutos em uma solução aquosa de brometo de etídio (1 μM) e revelado sob luz ultravioleta no fotodocumentador Gel DocTM EZ Bio-Rad. As imagens obtidas foram tratadas e analisadas empregando o software ImageLabTM 6.0.0.

3.10.2- Ensaio da supressão da fluorescência da HSA

O estudo de interação entre os compostos sintetizados e a proteína albumina de soro humano foi realizado por meio do monitoramento da supressão da fluorescência da HSA na presença dos compostos. O preparado das soluções para as medidas está descrito no próximo parágrafo. Os volumes exatos empregados de: solução estoque de complexo (1 mM) em DMSO, solvente dimetilsulfóxido e solução estoque de HSA em tampão Tris-HCl estão descritos detalhadamente na TABELA A22, no Apêndice – Parte XI.

Uma importante consideração a ser citada, a correção do efeito de filtro não foi realizada. Considerando a absorção dos complexos fosfínicos de rutênio na região analisada é recomendável a realização da correção dos valores fluorescências observados.

Inicialmente, uma solução estoque da HSA à 5,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada pela solubilização de 17,5 mg de HSA (Sigma-Aldrich[®]) em 50 mL de tampão Tris-HCl. A concentração da solução estoque da HSA foi determinada por UV-vis, empregando o valor da absorvidade molar da HSA em 280 nm. A solução foi preparada com 14 h de antecedência, mantida sobre refrigeração. Posteriormente, alíquotas de 0 – 30 μL das soluções estoque dos

complexos (concentração de 1 mmol L^{-1}) foram adicionadas em um microtubo de 2 mL, seguida pela adição de alíquotas de 0 – 50 μL dimetilsulfóxido. A soma dos volumes das alíquotas citadas perfaz um volume total de 50 μL (TABELA A22, no Apêndice). Posteriormente, nas soluções dos complexos foram adicionadas 950 μL da solução estoque de albumina ($5,25 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Portanto, foram preparadas soluções (1 mL) da proteína HSA com diferentes concentrações molares dos complexos em Trisma-HCl (5% DMSO), mantendo-se a concentração constante da albumina em $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. As concentrações molares dos complexos AMP foram 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{HSA}] = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ e 6. A solução de HSA em tampão Trisma-HCl (5% DMSO) foi empregada como negativo controle. Soluções dos complexos em tampão Trisma-HCl (5% DMSO), nas maiores concentrações utilizadas ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$), foram empregadas para averiguar a ausência de emissão de fluorescência dos complexos.

Imediatamente ao preparo das soluções HSA/complexo, três alíquotas de 200 μL de cada solução foram adicionadas em três poços (200 $\mu\text{L}/\text{poço}$) de uma placa opaca de 96 poços. Desta maneira foram realizadas as triplicadas das medidas das soluções. Após o plaqueamento das soluções, os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na região de 300 a 700 nm, com o comprimento de excitação de 270 nm. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 25 e 37 °C. Os experimentos foram realizados no fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador empregando uma placa opaca de 96 poços.

O mecanismo de supressão da fluorescência da HSA pelo agente supressor (Q), no caso o complexo de rutênio, foi analisado pela Equação de Stern-Volmer (4):^{100,101}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \text{ Eq. 4}$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do agente supressor, respectivamente; K_{SV} é a constante de supressão da fluorescência de Stern-Volmer; k_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de vida médio da fluorescência (6,2 ns) e $[Q]$ é a concentração do complexo de rutênio, o agente supressor.

Quando moléculas se ligam aos sítios de uma dada biomolécula, o equilíbrio entre as moléculas livres e ligadas é dado pela Equação 5:

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_{lig} + n \log [Q] \text{ Eq. 5}$$

Onde K_{lig} é a constante de ligação à um sítio e n é o número de sítios de ligação por molécula de HSA.

Os parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos e HSA foram calculados usando as Equações termodinâmicas de Van't Hoff (6 e 7):¹⁰¹

$$\ln \left[\frac{K_{lig2}}{K_{lig1}} \right] = \frac{1}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \Delta H \text{ Eq. 6}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_{lig} = \Delta H - T \Delta S \text{ Eq. 7}$$

Onde K_{lig} é constante de ligação na temperatura (T) correspondente; R é a constante dos gases ideais, com valor de 8,314 KJ mol⁻¹; ΔG é a variação da energia livre de Gibbs; ΔH é a variação da entalpia e ΔS é a variação da entropia do sistema.

3.10.3- Estudo de inibição da atividade enzimática da Topoisomerase IB

O ensaio de inibição da enzima Topoisomerase IB foi realizado com o kit de relaxação do DNA fornecido pela Inspiralis Limited, cedido pelo professor Dr. Fillipe Rocha do DQ-UFSCar.

Em microtubos, uma alíquota de 1 μL da solução estoque DNA pBR322 superenovelado (concentração de 0.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) foi adicionada, seguida pela adições de uma alíquota de 3 μL de tampão de ensaio e 24 μL de água deionizada. Posteriormente, uma alíquota de 1 μL das soluções estoque dos complexos (15 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) também foi acrescida na solução. Por fim, uma alíquota de 1 μL da solução estoque (4,0 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) da topoisomerase IB humana foi adicionada nas amostras. O volume total fez um volume total de 30 μL . As concentrações finais dos complexos nestas soluções foram 0,5 e 5,0 μM . Em relação as análises controles: (I) Controle negativo, para atestar a atuação correta da enzima, foi realizado igualmente descrito inicialmente, porém com a substituição do volume adicionado da solução estoque do complexo pelo o mesmo volume de DMSO; (I) Apenas o plasmídeo, a solução foi preparada a partir de alíquota de 1 μL da solução estoque DNA pBR322 superenovelado (concentração de 0,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$), seguida pela adições de alíquotas de 3 μL de tampão de ensaio e 25 μL de água deionizada. Posteriormente, uma alíquota de 1 μL de DMSO, perfazendo também o volume de 30 μL .

As soluções preparadas foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 40 min. Posteriormente, para interromper o processo enzimático foram adicionados 3 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) nas soluções e realizado um choque térmico a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min. Logo após foram adicionados 15 μL de STEB (40% (m/v) de sacarose; 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris-HCl; 1 mmol L^{-1} de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 0,5 mg mL^{-1} de azul de bromofenol; pH 7,5) e 60 μL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. e a fase aquosa recolhida. As alíquotas aquosas foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% (m/v). O gel foi preparado com agarose 1% (m/v) em tampão TBE (0,45 M Tris-HCl; 0,45 M borato; 10 mM de EDTA; pH 8,2). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba de eletroforese horizontal (BioRad) com tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) a 20 V durante 12 h. Após a corrida, o gel foi corado

por 10 minutos em uma solução aquosa de brometo de etídio (1 μM) e revelado sob luz ultravioleta no fotodocumentador Gel DocTM EZ Gel Bio-Rad. As imagens obtidas foram tratadas e analisadas empregando o software ImageLabTM 6.0.0.

3.10.4- Ensaios com o sistema proteassomo

Os experimentos de inibição do proteassomo foram realizados pela aluna Camila R. S. T. B. de Correia, sob supervisão do professor Felipe R. Teixeira do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar.

3.10.4.1 - Ensaio de inibição da subunidade 20S do proteassomo

A inibição do proteassomo foi realizada usando 1 μg da subunidade 20S do proteassomo (Boston Biochem) diluída em tampão HEPES (50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 7,6). O proteassomo 20S purificado foi incubado com os complexos de rutênio **AMP2**, **AMP4** e **AMP5** nas concentrações 1 μM , 0,9 μM e 3,5 μM , respectivamente, por 150 min. a 37 °C. Em seguida, o substrato de proteassomo (Suc-LLVY-AMC) (Boston Biochem) foi adicionado a cada reação na concentração final de 200 μM . A fluorescência do grupo succinato clivado pelo proteassomo foi detectada por SpectraMax i3 (Molecular Devices). O comprimento de excitação em 380 nm e emissão em 460 nm. O ensaio de inibição da subunidade foi realizado com 0,5% de DMSO (controle negativo) e com o inibidor clássico do proteassomo MG132 (10 μM), utilizado como controle positivo.

3.10.4.2 - Ensaio de inibição do proteassomo 26S em células viáveis HEK293T-uGFP

A linhagem celular HEK293T que expressa estavelmente uma versão instável da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês “*green fluorescent protein*”) foi cultivada a 37 °C em atmosfera umidificada contendo

5% de CO₂.¹⁰² Para o ensaio de inibição do proteassomo, as células foram tratadas com complexos de rutênio **AMP2**, **AMP4** e **AMP5** nas concentrações 1 µM, 0,9 µM e 3,5 µM, respectivamente. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e colhidas em PBS/EDTA 10 mM. Os grânulos celulares foram obtidos por centrifugação a 1000 × g/5 min/4 °C e, ressuspensos em PBS e paraformaldeído (1%) por 15 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas a 1000 × g/5 min/4 °C, depois lavadas com PBS e centrifugadas nas mesmas condições. Finalmente, os sedimentos celulares foram ressuspensos em Iodeto de Propídio (10 µg mL⁻¹) e as quantificações foram realizadas por um citômetro de fluxo usando filtro FITC (BD Accuri). O ensaio de inibição do proteassomo também foi realizado com 0,5% de DMSO (controle negativo) e com o inibidor clássico do proteassomo MG132 (10 µM), utilizado como controle positivo.

3.11 - Avaliação Biológica

Os ensaios de avaliação biológica dos complexos foram realizados pela Dra. Adriana Guedes. A avaliação da atividade citotóxica dos complexos da série **AMP** pelo ensaio de MTT foi realizado pela Dra. Tamires Tavares.

3.11.1 - Cultivo celular

As células das linhagens humanas MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano de fenótipo mesenquimal; *American Type Culture Collection* (ATCC) No. HTB-26), A549 (adenocarcinoma epitelial alveolar de células basais de pulmão humano; ATCC No. CCL-185) e a MRC-5 (não tumoral de pulmão; ATCC No. CCL-171) foram cultivadas em meio de cultura Meio Dulbecco Modificado (DMEM, do inglês “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*”), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). A linhagem MCF-10A (não tumoral de mama humana; ATCC No. CRL-10317) foi cultivada em meio DMEM/F-12, suplementado com 5% de soro de cavalo,

fator de crescimento epidermal humano (EGF) (20 ng/mL), hidrocortisona (0,05 mg/mL), insulina (0,01 mg/mL), penicilina (1%), estreptomicina (1%) e L-glutamina (2 mM). As linhagens celulares foram mantidas em incubadora umidificada com atmosfera de CO₂ (5%) a 37 °C.

3.11.2 - Ensaio de viabilidade celular

A atividade citotóxica dos complexos frente às linhagens celulares foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium).¹⁰³ O ensaio de MTT é utilizado para avaliar a viabilidade celular e consiste na redução enzimática do MTT para MTT-formazan, catalisada pela succinato desidrogenase mitocondrial.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço, em 150 µL de meio suplementado, foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação (5% de CO₂ à 37 °C), as células foram tratadas com 0,75 µL das soluções estoque dos complexos dissolvidos em DMSO, sendo empregadas oito concentrações dos compostos. As placas foram novamente mantidas na incubadora (5% de CO₂ a 37 °C) por 48 h. Posteriormente, adicionaram-se 50 µL de uma solução de MTT (1 mg mL⁻¹) em cada poço, a qual foi mantida em incubação por 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente descartada e foram adicionados 100 µL de isopropanol por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro/fluorímetro Synergy/H1-Biotek. As células do controle negativo receberam 0,5% do solvente DMSO. Os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) dos complexos foram determinados por meio de uma curva dose resposta, utilizando o software GraphPad Prism 5.01.

3.11.3 - Ensaio de morfologia celular

A morfologia das células A549 foi avaliada durante o tratamento com os complexos. Para o ensaio, alíquotas de 1,5 mL de uma suspensão das células A549 foram adicionadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e incubadas por 24 h para aderirem a superfície da placa. Após este período, as células foram tratadas com alíquotas de 10 μ L das soluções estoque dos complexos, cujas foram diluídas em 490 μ L de meio de cultura e posteriormente adicionadas a cada poço. As concentrações dos complexos nos poços são equivalentes ao IC_{50} do composto na linhagem tumoral ($0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$). Em diferentes intervalos de tempo (0 h, 24 h e 48 h), micrografias das células em cultura foram capturadas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000). A morfologia das células tratadas com os complexos foi comparada com a morfologia das células do controle negativo (0,5% DMSO).

3.11.4 - Ensaio de sobrevivência clonogênica

O ensaio de sobrevivência clonogênica foi realizado para avaliação da viabilidade reprodutiva das células A549 após o tratamento com os compostos. Os parâmetros utilizados foram o número e tamanho das colônias. Para o experimento de sobrevivência clonogênica, alíquotas de 1,5 mL de uma suspensão das células foram semeadas em placas de 6 poços (300 células/poço) e incubadas (5% de CO_2 a 37 °C) por 24 h. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com alíquotas de 10 μ L das soluções estoque dos complexos, cujas foram diluídas em 490 μ L de meio de cultura e posteriormente adicionadas a cada poço e, novamente mantidas na incubadora por 48 h. As concentrações dos complexos nos poços são equivalentes ao IC_{50} do composto na linhagem tumoral ($0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$). Após o período de tratamento, o meio contendo o composto foi retirado, as células foram lavadas com 2 mL do tampão salino de fosfato (PBS, do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”) e

adicionado novamente o meio de cultura (4 mL) com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram novamente incubadas (5% de CO₂ a 37 °C) durante 10 dias. Finalmente, as células foram lavadas com PBS (2 mL) e fixadas com 2 mL solução de metanol e ácido acético (3:1 (v/v)) durante 5 min. Em seguida, as células passaram pelo seguinte processo com cada corante do kit corante panótico (Newprov): as células foram coradas com a adição de 2 mL do respectivo corante panótico (Newprov), após 30 segundos, o corante foi descartado e as placas foram lavadas com água destilada (3 mL) para remoção do excesso do corante. Por fim, as placas contendo as células fixadas e coradas foram mantidas em temperatura ambiente para a secagem. O número de colônias e seus tamanhos também foram determinados para as células tratadas apenas com 0,5% de DMSO, utilizadas como controle negativo. As imagens das placas contendo as células foram registradas por meio do escaneamento da placa, com auxílio de um escâner. O número de colônias e seus tamanhos foram determinados empregando o software ImageJ.

3.11.5 - Ensaio de Wound healing

O ensaio de *wound healing* é uma técnica *in vitro* empregada para estudar o movimento coordenado de uma população de células.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ O ensaio consiste em remover células de uma área, criando uma zona livre de células (denominada de “risca”) em uma monocamada confluenta de células. Devido ao fato das células ficarem expostas à área livre induz a migração celular.¹⁰⁴ As informações são obtidas a partir do cálculo do fechamento da zona livre.

Alíquotas de 1,5 mL de uma suspensão das células A549 foram adicionadas em placas de 12 poços (1×10⁵ células/poço) e mantidas na incubadora (5% de CO₂ a 37°C) até a cultura atingir uma confluência de 90–100%. Posteriormente, células foram removidas de uma certa área, por meio de um risco no centro do poço com o auxílio de uma ponteira de 200 µL. Em seguida, os poços foram lavados com PBS (2 mL), com o objetivo de remover as

células desaderidas. O meio de cultura (2 mL) e uma alíquota de 10 µL das soluções estoque dos complexos foram adicionadas aos poços. As concentrações dos complexos nos poços são equivalentes ao IC₅₀ do composto na linhagem tumoral ($\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$ e $\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50}$). Em diferentes intervalos de tempo (0 h, 24 h e 48 h) de tratamento, micrografias das células em cultura foram capturadas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000). O ensaio também foi realizado para as células tratadas apenas com 0,5 % de DMSO, como controle negativo.

A área de fechamento da risca pela migração celular foi determinada por meio do software ImageJ. A porcentagem da área fechada em um determinado tempo foi calculada por meio da Equação 7, empregando a área livre antes da adição do complexo (A_{0h}) e a área livre após o tratamento em um determinado tempo ($A_{\Delta t}$).

$$\% \text{ área fechada} = \left[\frac{A_{0h} - A_{\Delta t}}{A_{0h}} \right] \times 100 \text{ Eq. 8}$$

3.11.6 - Ensaio de apoptose

O método é utilizado para quantificar as células viáveis, apoptóticas e necróticas. A morte celular das células da linhagem A549 foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit de detecção de apoptose com os marcadores Anexina V conjugada com o fluorocromo ficoeritrina (PE) e 7-amino-actinomomicina (7-AAD).

Alíquotas de 1,5 mL de uma suspensão das células A549 foram semeadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e incubadas (5% de CO₂ à 37°C). Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com alíquotas de 10 µL das soluções estoque dos complexos em DMSO, cujas foram diluídas em 490 µL de meio de cultura e posteriormente adicionadas a cada poço. Novamente, as células foram mantidas na incubadora por 48 h. As concentrações dos complexos nos poços são equivalentes ao IC₅₀ do composto

na linhagem tumoral ($0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$). Posteriormente, o meio de cultura foi retirado de cada poço, os quais foram lavados com PBS, em seguida, a cada poço foi adicionado uma alíquota de 200 μ L de tampão de ligação (10 mM HEPES\NaOH; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$), proveniente do kit de ensaio.

O meio de cultura e PBS utilizados não foram descartados, os quais foram misturados e centrifugados, e imediatamente, o pellet celular proveniente desta solução foi lavado com PBS e novamente centrifugado. As células do “pellet celular” resultante foram ressuspensas em 70 μ L de tampão de ligação, e as células devolvidas aos respectivos poços.

Logo após, foram adicionados os corantes Anexina V-PE (2,5 μ L/poço) e 7-AAD (2,5 μ L/poço) em cada poço. Finalmente, as células foram mantidas em temperatura ambiente por 20 min. na ausência de luz, e desaderidas por via mecânica empregado o scraper. Finalmente, a suspensão celular de cada poço foi centrifugada, e as células foram novamente ressuspensas em 200 μ L de tampão de ligação do kit de ensaio. As células foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri C6. A fluorescência foi quantificada com o software CellQuest e os dados tratados no software GraphPad Prism 5.01.

O ensaio também foi realizado para as células tratadas apenas com 0,5% de DMSO, utilizadas como controles. Para o controle positivo de morte celular por apoptose, as células foram tratadas com a camptotecina. Para o controle positivo de morte celular por necrose, as células foram mantidas em aquecimento à 80 °C por 2 horas e marcada apenas com 7-AAD, também as células que passaram pelo mesmo tratamento foram marcadas apenas com Anexina V-PE. A fim de utilizar como controles também foram analisadas no citômetro: células sem tratamento e não marcadas com a Anexina V-PE e 7-AAD; células sem tratamento e com duplamente marcadas com a Anexina V-PE e 7-AAD.

3.11.7 - Ensaio de ciclo celular

O ensaio do ciclo celular é baseado na quantificação de DNA intracelular por citometria de fluxo empregando o iodeto de propídio (PI) como marcador.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Para a realização do ensaio de ciclo celular, alíquotas de 1,5 mL de uma suspensão das células A549 foram semeadas em placas de 12 poços ($0,5 \times 10^5$ células/poço) e mantidas por 24 h em uma incubadora (5% de CO₂ a 37°C). Em seguida, as células foram tratadas com alíquotas de 10 µL das soluções estoque dos complexos em DMSO, cujas foram diluídas em 490 µL de meio de cultura e posteriormente adicionadas a cada poço. Novamente, as células foram mantidas na incubadora por 48 h. As concentrações dos complexos nos poços são equivalentes ao IC₅₀ do composto na linhagem tumoral ($0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$). Posteriormente, o meio de cultura foi retirado de cada poço, os quais foram lavados com PBS. Em seguida, as células foram tripsinizadas após a adição de 0,5 mL de uma solução de tripsina (1%), após 2 minutos, o meio de cultivo (2 mL) foi adicionado afim de inibir a atividade da tripsina.

O meio de cultura e PBS retirados dos poços e recolhidos, juntamente com a respectiva suspensão celular obtida da tripsinização foram misturados e centrifugados, e o pellet celular resultante foi lavado com PBS e novamente centrifugado. As células do “pellet celular” foram ressuspensas e mantidas em álcool etílico 70% (2 mL) durante 18 h a -20°C. Após o período, as células foram centrifugadas e o álcool etílico removido, e foram ressuspensas em PBS gelado e novamente centrifugadas. O pellet celular foi ressuspensos com 300 µL da enzima ribonuclease A ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$; RNaseA), sendo incubado por 30 min. a 37 °C na estufa. A suspensão foi novamente centrifugada e lavada com PBS gelado, e novamente centrifugada. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação com iodeto de propídeo ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram mantidas por 1 h em gelo, na ausência de luz.

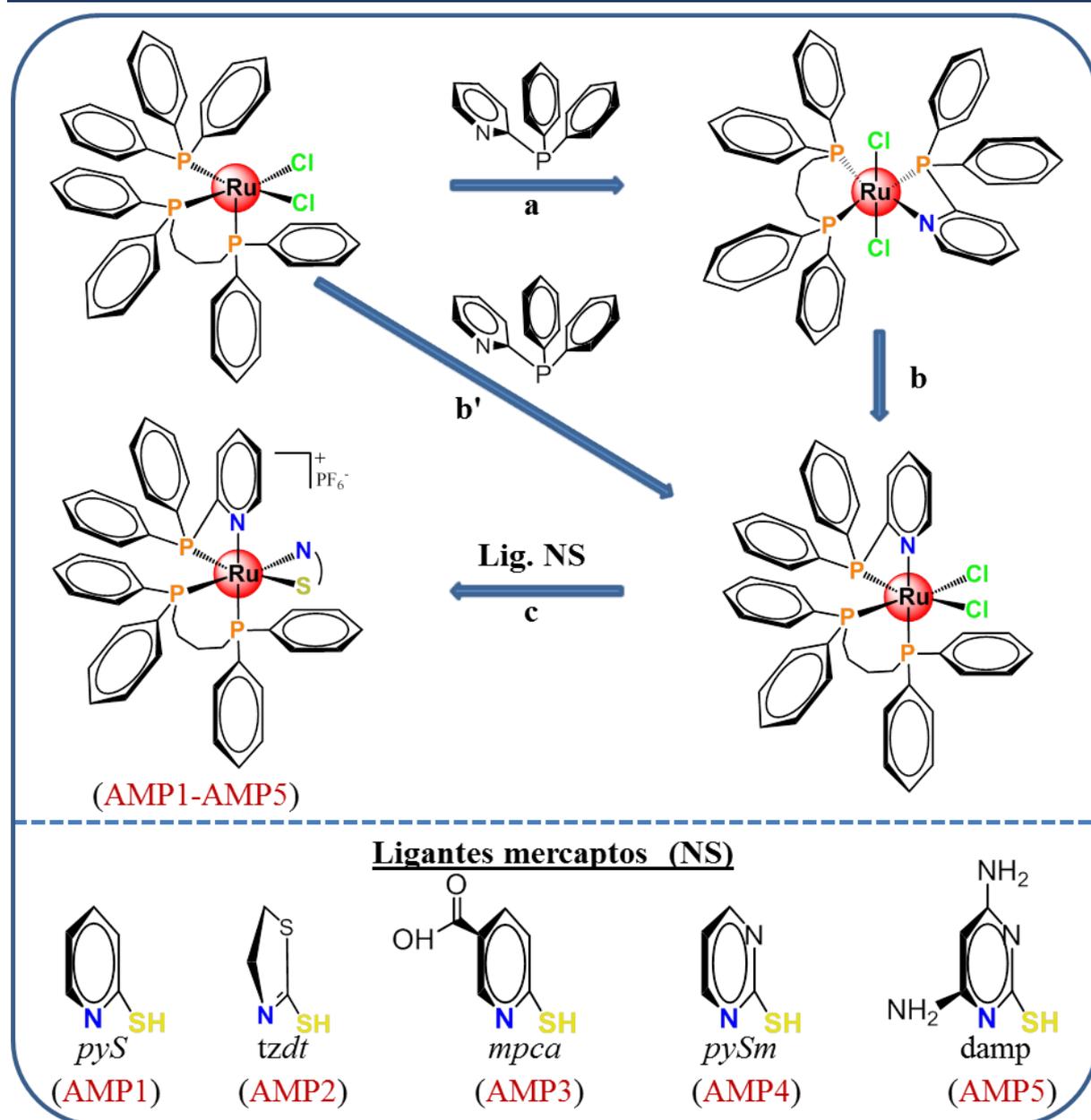
Posteriormente, as células foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri C6. A fluorescência foi quantificada com o software CellQuest e os dados foram tratados no software GraphPad Prism 5.01. O ensaio também foi realizado para as células tratadas com 0,5% de DMSO (controle negativo). Todo o processo as células foram mantidas em baixa de temperatura com a auxílio de um banho de gelo e as centrifugações realizadas à 4 °C.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de facilitar para o leitor a apresentação dos resultados nesta seção, os complexos sintetizados foram descritos em duas séries. Em comum, os complexos de ambas as séries foram obtidos a partir do precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)]. A primeira série de complexos foi obtida a partir da coordenação dos ligantes mercaptos ao complexo precursor, enquanto a segunda série empregou-se os ligantes aciltioureas dissubstituídas.

4.1 - Complexos de fórmula geral [Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF₆ (Série AMP)

Os complexos de fórmula geral [Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF₆ (**AMP1-AMP5**) [onde dppb= 1,4'-*bis*(difenilfosfina)butano; dphppy= 2-(difenilfosfina)piridina; NS= 2-mercaptopiridina (pyS; **AMP1**), 2-mercaptotiazolina (tzdt; **AMP2**), 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico (mpca; **AMP3**), 2-mercaptopirimidina (pySm; **AMP4**) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp; **AMP5**)] foram sintetizados com a substituição dos ligantes cloridos do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] pelos respectivos ligantes mercaptos. A rota sintética para os complexos **AMP** está ilustrada no ESQUEMA 4.1.



ESQUEMA 4.1- Rota sintética para a obtenção dos complexos da série AMP. Reagentes e condições: (a) dpphy, tolueno, agitação (3 h); (b) tolueno, refluxo (20 h); (b') tolueno, refluxo (24 h); (c) ligante mercaptos (NS), KPF₆, metanol, agitação (12 h).

A desprotonação dos ligantes mercaptos ocorreu na presença do solvente metanol, sem a necessidade da adição de base no meio reacional. A coordenação bidentada e monoaniônica dos ligantes mercaptos ao centro metálico resultou na formação dos complexos catiônicos,

$[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]^+$. O sal KPF_6 foi adicionado no meio reacional para que o ânion PF_6^- atuasse como o contraíon dos complexos. As medidas de condutividade molar (TABELA 4.1) dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) estão de acordo com a presença de eletrólito 1:1.⁹⁶ Os dados de análise elementar dos complexos também são coerentes com as estruturas propostas (TABELA 4.1).

TABELA 4.1- Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos AMP.

Composto	% N*	% C*	% H*	%S*	Cond. **
$[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$	1,97 (2,47)	57,05 (57,25)	4,32 (4,71)	2,91 (3,06)	33,7
$[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$	2,83 (3,07)	63,06 (63,21)	5,35 (5,42)	6,92 (7,03)	36,1
$[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6 \cdot 1/4 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$	2,29 (2,51)	55,47 (55,26)	3,96 (4,48)	2,69 (2,88)	34,1
$[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$	3,27 (3,90)	54,99 (54,95)	4,43 (4,55)	2,87 (2,97)	33,9
$[\text{Ru}(\text{damc})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6 \cdot 3/2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$	5,71 (6,16)	52,48 (52,48)	4,57 (4,55)	2,68 (2,82)	35,4

*Análise elementar: Experimental (teórico); **Condutividade molar ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$); Faixa para eletrólito 1:1 em DMSO 20-62 $\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$.⁹⁶

A técnica de difração de raios X por monocristais foi empregada para a elucidação estrutural dos complexos sintetizados e do precursor no estado sólido. Os cristais foram obtidos pela técnica de evaporação lenta de solvente, na qual cada complexo foi solubilizado em solução de diclorometano e metanol (razão 1:1 v/v). O complexo precursor foi cristalizado por evaporação lenta de uma solução em diclorometano. Para o precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] e todos os complexos **AMP** obteve-se as estruturas cristalinas, como evidenciadas na FIGURA 4.1. Os ângulos e comprimentos das ligações em torno do centro metálico nos complexos estão apresentados na TABELA 4.2. Os parâmetros cristalográficos estão descrito nas TABELAS A6 e A7, no Apêndice – Parte II.

A estrutura cristalina do complexo precursor foi resolvida no sistema monoclinico, de grupo espacial P2_{1/n}. O precursor hexacoordenado apresenta estrutura octaédrica distorcida em torno do centro metálico, com a coordenação bidentada do ligante dphppy via átomos de nitrogênio e fósforo. Os ligantes cloridos encontram-se em uma configuração *cis* em relação um ao outro, com o ângulo Cl1—Ru1—Cl2 de 97°. Ambos comprimentos de ligação Ru—Cl que estão coordenados *trans* aos átomos de fósforos dos ligantes fosfínicos dphppy (2,437 Å; Ru—Cl1) e dppb (2,433 Å; Ru—Cl2) são praticamente idênticos.

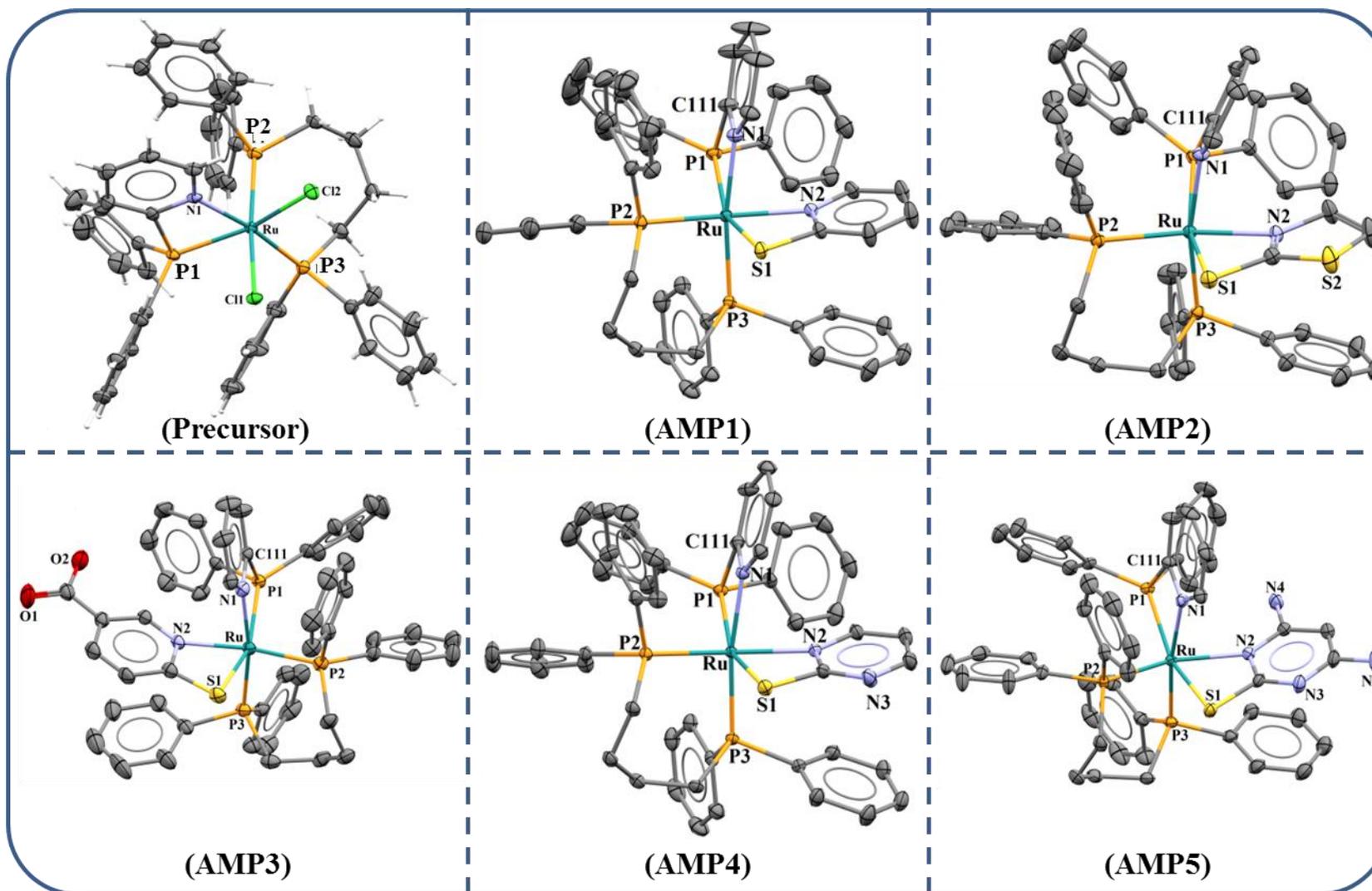


FIGURA 4.1- Estruturas cristalinas dos complexos AMP e do precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)], com elipsoides a 50% de probabilidade. Para melhor visualização os átomos de hidrogênio e o contraíon PF₆⁻ foram omitidos.

TABELA 4.2- Principais ângulos (°) e comprimentos de ligação (Å) selecionados em torno do centro metálico das estruturas cristalinas dos complexos.

	Comprimento de ligação (Å)					
	AMP1	AMP2	AMP3	AMP4	AMP5	Precursor
Ru—N1	2,149(3)	2,186(6)	2,139(4)	2,145(2)	2,148(3)	2,157(5)
Ru—P1	2,368(9)	2,354(10)	2,366(13)	2,363(7)	2,392(11)	2,305(1)
Ru—P2	2,331(8)	2,308(11)	2,326(16)	2,332(7)	2,328(11)	2,296(1)
Ru—P3	2,318(9)	2,308(11)	2,317(14)	2,329(7)	2,313(12)	2,335(1)
Ru—N2	2,173(3)	2,195(3)	2,144(4)	2,157(2)	2,249(4)	-
Ru—S1	2,399(8)	2,433(10)	2,405(13)	2,416(7)	2,391(12)	-
S1—C1	1,740(3)	1,708(4)	1,703(6)	1,722(3)	1,731(5)	-
Ru—Cl1	-	-	-	-	-	2,437(1)
Ru—Cl2	-	-	-	-	-	2,433(1)

	Ângulo de ligação (°)				
	AMP1	AMP2	AMP3	AMP4	AMP5
N1—Ru—P1	67,46(8)	67,06(9)	67,05(11)	67,53(6)	67,03(10)
P2—Ru—P3	95,23(3)	95,23(4)	96,08(6)	95,92(3)	96,15(4)
N2—Ru—S1	67,49(7)	66,54(9)	67,14(12)	67,29(7)	66,57(10)
N1—Ru—P3	171,33(8)	167,55(9)	170,04(12)	171,09(6)	171,09(10)
C111—N1—Ru	105,4(2)	103,2(3)	106,3(3)	105,7(2)	107,0(3)
N1—C111—P1	103,4(3)	103,6(3)	102,9(3)	103,2(2)	102,3(3)
C111—P1—Ru	83,7(1)	83,7(1)	83,7(2)	83,5(1)	83,6(2)

Os complexos **AMP1**, **AMP3** e **AMP5** cristalizaram no sistema cristalino monoclinico, grupo espacial P21/c (**AMP1**, **AMP3**) e P21/n (**AMP5**), enquanto os complexos **AMP2** e **AMP4** apresentam grupo espacial triclinico P1. Nos complexos [Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF₆, o ligante aciltiourea (NS) está coordenado de maneira bidentada, no qual o átomo de nitrogênio N2 está em posição *trans* ao átomo de fósforo (P2) do ligante dppb e o átomo de enxofre *trans* ao átomo de N_{py} do ligante dphppy.

A coordenação bidentada do ligante 2-(difenilfosfina)piridina tanto no precursor quanto nos complexos é assimétrica por meio de um anel quelato de quatro membros com ângulo de mordida P1—Ru—N1 rígido de aproximadamente 67°. O ligante tem flexibilidade limitada devido ao anel piridil, no qual o átomo de fósforo é tensionado para “fora do eixo” em direção ao átomo de nitrogênio do anel piridínico. Da mesma forma, os demais ângulos do quelato, C111—N1—Ru, N1—C111—P1 e C111—P1—Ru, também apresentam uma compressão angular significativa.⁷⁹ Os valores dos ângulos referentes aos fragmentos C111—N1—Ru e N1—C111—P1 são menores em comparação ao valor ideal de 120°, e os ângulos observados para o fragmento C111—P1—Ru também são menores do que o valor ideal de 109,5°. Devido a essa deformação do quelato, a coordenação bidentada do dphppy é instável em vários complexos de rutênio relatados na literatura.^{85,110} Nestes casos, a coordenação monodentada é via átomo de fósforo do ligante, devido ao seu maior carácter π -receptor comparativamente ao átomo N_{py}, o que faz com que a ligação a este átomo P seja preferencial com metais de valência baixa. Em relação a este aspecto específico, mesmo os ligantes NS e dphppy formando quelatos de quatro membros, os compostos **AMP** são estáveis. Para tal, provavelmente um dos fatores que contribui é o quelato do ligante dppb de sete membros formado após a coordenação ao centro metálico, que proporciona flexibilidade e uma diminuição da tensão das ligações do rutênio.

A diminuição da densidade eletrônica sobre o rutênio, como será apresentado adiante, é um dos aspectos mais marcantes após a substituição dos ligantes cloridos (características σ -doador e π -doador) do precursor pelos ligantes mercaptos (características σ -doador e π -aceptor). Tal fato reflete diretamente em alguns comprimentos de ligação. O aumento dos comprimentos de ligação Ru—P2 (2,31 – 2,33 Å) e, principalmente, Ru—P1 (2,36 – 2,40 Å) dos complexos quando comparado ao precursor (Ru—P1, 2,30 Å; Ru—P2, 2,30 Å) é algo notável. O enfraquecimento da ligação Ru—P1 é ocasionado, principalmente, pela troca do átomo *trans* com características distintas. Também pela menor densidade eletrônica do centro metálico nos complexos **AMP** em comparação ao precursor, que reflete na diminuição de sua capacidade de realizar retrodoação aos orbitais adequados dos átomos de fósforo (P2), culminando na diminuição das distâncias de ligação.

Os comprimentos de ligação entre os átomos dos ligantes mercaptos e o rutênio, Ru—N2 e Ru—S1, estão condizentes com a literatura.^{46,62,111,112} As distâncias de ligação nos complexos envolvendo o carbono (C2) dos ligantes mercaptos indicam uma deslocalização de elétrons no sistema S1—C2—N1. A distância de ligação CS nos complexos mostra uma diminuição do caráter de dupla ligação devido à desprotonação do ligante ao se coordenar ao rutênio, quando comparada aos comprimentos de ligação das formas tautoméricas tiol (~1,81 Å) e tiona (~1,68 Å) dos ligantes livres (FIGURA 4.2). Em contrapartida, as distâncias de ligação N1—C2 (~1,34 Å) são mais curtas nos complexos em relação aos ligantes (~1,38 Å).^{58,111}

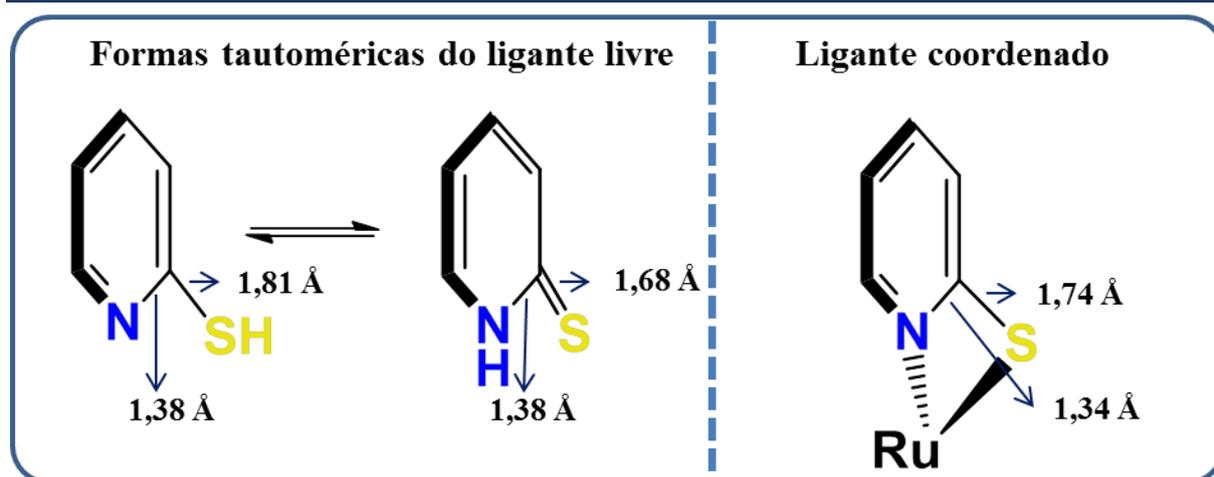


FIGURA 4.2- Comprimento das ligações C—S e C—N do ligante mercapto nas formas tautoméricas tiol e tiona, e após a coordenação ao rutênio.

Nas estruturas cristalinas dos complexos são observadas interações intramoleculares do tipo π - π . Nos complexos, com exceção do **AMP2**, há interações intramoleculares π - π stacking entre os respectivos ligantes mercaptos e o anel fenílico, nomeado C32, do fósforo P3 do ligante dppb. As interações são caracterizadas pelo empilhamento “face a face deslocada” dos anéis com distâncias entre os centroides de 3,84 à 4,05 Å (FIGURA 4.3-A). Outros contatos de curto alcance envolvendo interações intramoleculares π - π entre o anel piridínico do ligante dphppy e o anel C21-dppb são observados (FIGURA 4.3-B). Também, ressaltam-se as interações intermoleculares do tipo C—H \cdots π nos complexos **AMP1-AMP4**, mediante o hidrogênio do carbono adjacente ao átomo de N1 dos ligantes mercaptos com o agrupamento fenílico do anel C13/C12-dphppy. A distância do grupo C—H ao centroide do anel aromático compreende a faixa de 2,82-3,45 Å. No complexo **AMP5** foi observado as interações do tipo N—H \cdots π , entre os hidrogênios da amina (N4—H) com o anel aromático C13-dphppy. As inúmeras interações intramoleculares envolvendo os anéis fenílicos são possíveis devido à liberdade conformacional passível de rotação em torno das ligações P—C. As interações intramoleculares, mesmo no estado sólido, são informações importantes nas

análises de alguns padrões nos deslocamentos químicos dos hidrogênios nos espectros de RMN, como será apresentado.

Para os compostos **AMP1** e **AMP4** também foram observadas interações intermoleculares do tipo C—H...S envolvendo o S-mercapto atuando como acceptor de hidrogênio e o grupo metileno da CH₂-dppb como doador de hidrogênio (FIGURA 4.3-C), com distâncias de 2,25 Å. As interações formam dímeros moleculares que podem desempenhar um papel importante na estabilização do empacotamento cristalino.

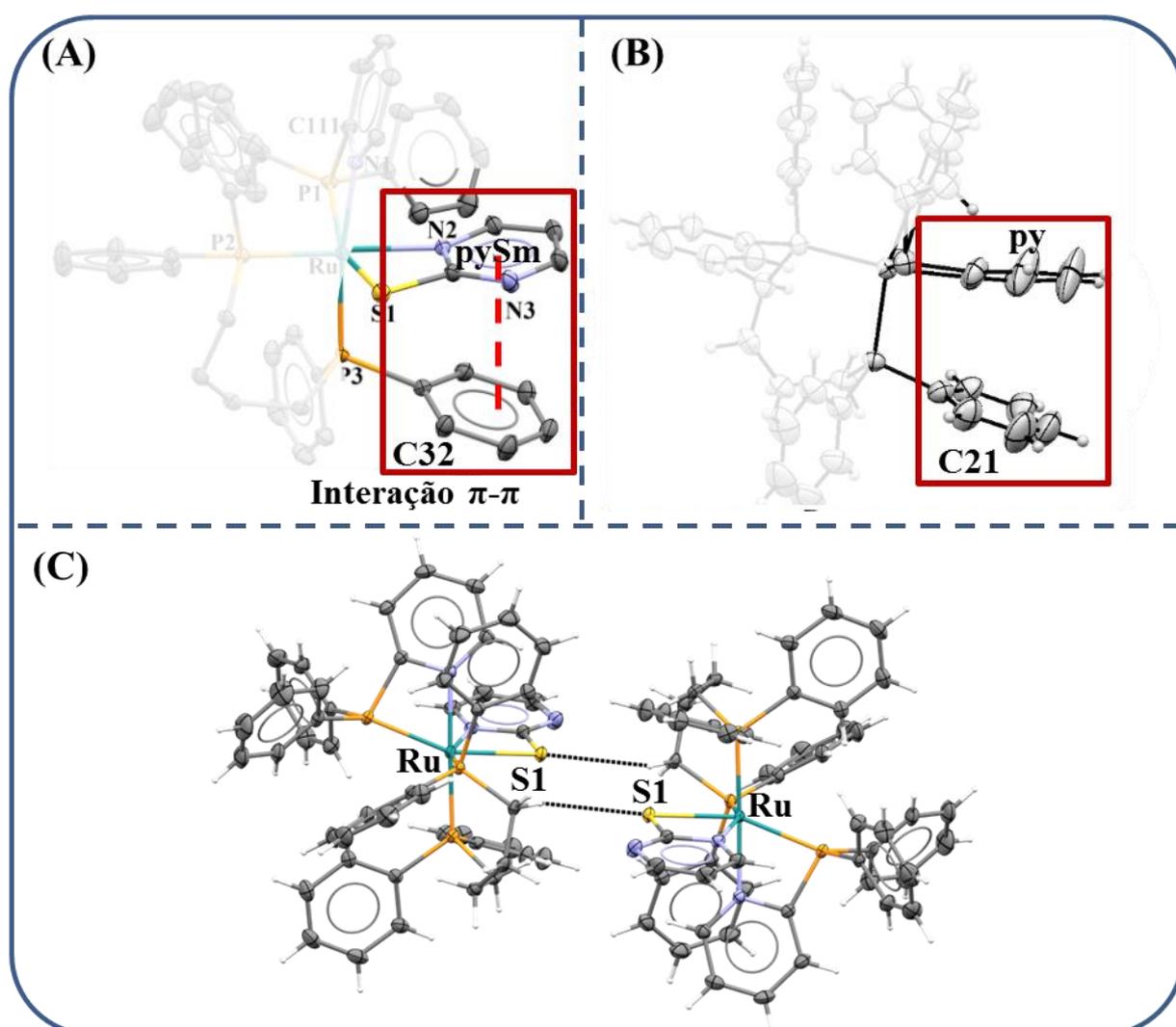


FIGURA 4.3- (A, B) Representação das interações intramolecular do tipo π - π e (C) interações intermoleculares do tipo Ru-S...H-CH-dppb na estrutura do complexo **AMP4**.

Os complexos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear em três núcleos diferentes, com experimentos 1D (^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, ^{31}P $\{^1\text{H}\}$) e 2D (COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{31}P , HMBC ^1H - ^{13}C e HSQC ^1H - ^{13}C).

Os sinais nos espectros de RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos na região de alta frequência são atribuídos aos átomos de fósforo da bifosfina dppb. Para os átomos de fósforo (P_A e P_M) coordenados em posição *trans* aos átomos de nitrogênio dos ligantes mercaptos e dphppy, os deslocamentos químicos ocorreram na região de δ 50,1-53,7 e 37,9-40,2, respectivamente. Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento estão descritos na TABELA 4.3. Os espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos **AMP** estão apresentados na FIGURA 4.4. A descrição dos sinais e acoplamentos $^2J_{\text{PP}}$ estão descritos na FIGURA 4.5.

TABELA 4.3- Dados de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série **AMP**.

Complexo	Deslocamento químico				Constante de acoplamento			
	P_A	P_M	P_X	$\text{P}(\text{PF}_6^-)$	$^2J_{\text{AM}}$	$^2J_{\text{Ax}}$	$^2J_{\text{MX}}$	$^1J_{\text{PF}_6^-}$
Precursor	47,2	37,3	-19,4	-	34	26	27	-
AMP1	51,9	37,9	-9,3	-144,5	33	20	21	711
AMP2	53,7	40,2	-6,3	-144,5	34	21	22	711
AMP3	51,4	37,9	-10,5	-144,5	34	20	22	711
AMP4	51,4	38,6	-10,0	-144,5	34	20	22	711
AMP5	50,1	38,6	-17,4	-144,5	34	19	22	711

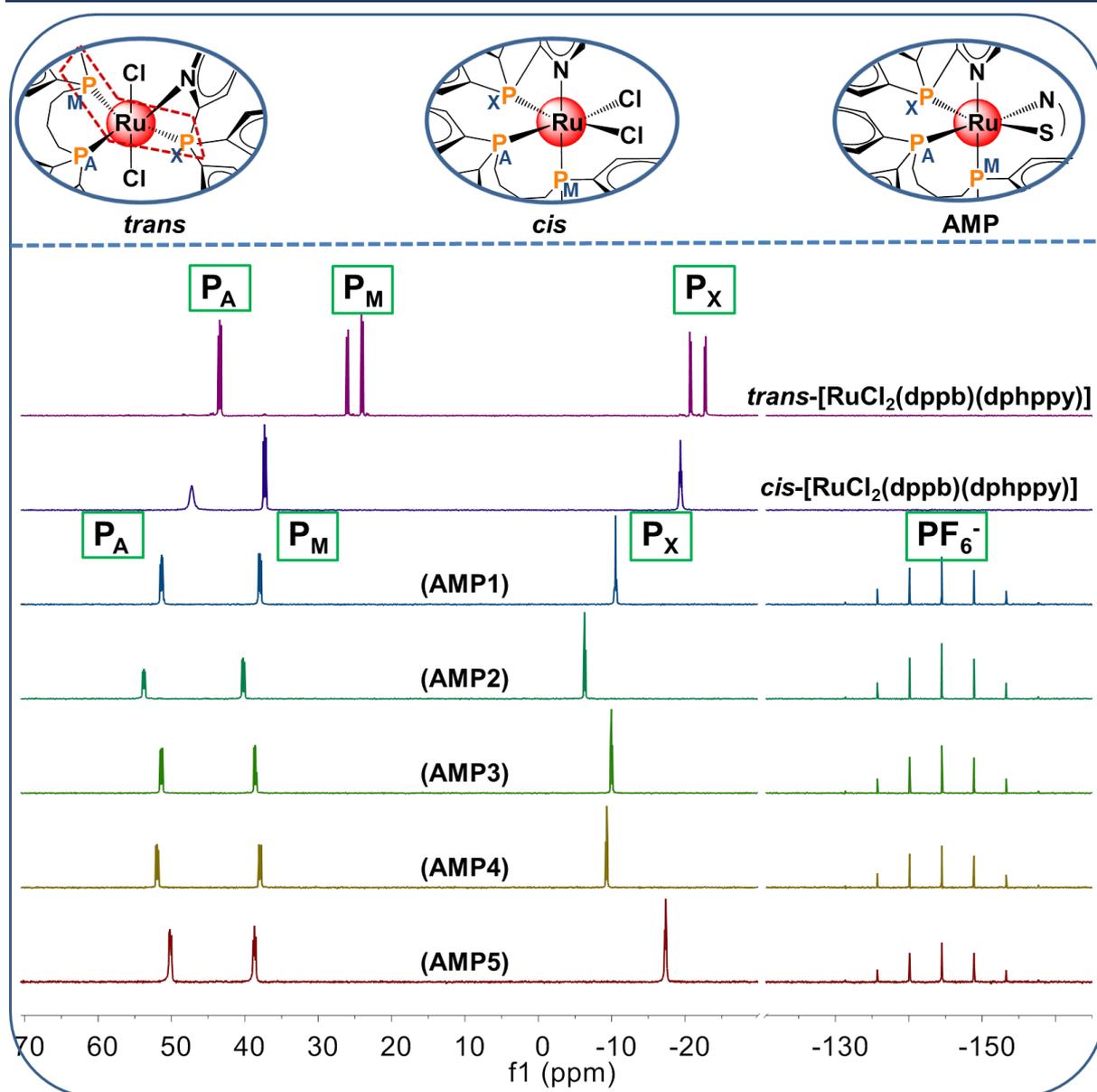


FIGURA 4.4- Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos precursores e complexos AMP em CD_3CN .

A alteração no ambiente químico dos átomos de fósforo causa alterações nos sinais nos espectros de RMN. Os efeitos estéricos e eletrônicos são importantes fatores para determinar o deslocamento químico dos sinais. Dentre as inúmeras variáveis que determinam o deslocamento químico de RMN de fósforo estão: (I) efeitos eletrônicos dos substituintes ligados ao átomo de fósforo; (II) efeitos estéricos, que pode ser determinado pelo ângulo derivado do cone formado entre as superfícies de van der Waals geradas pelos substituintes

da fosfina e o metal central, denominado ângulo de cone ou ângulo de Tollman os ângulos de cone, bem como por meio do ângulo de mordida; (III) características do átomo em posição *trans* ao átomo de fósforo; (IV) efeitos anisotrópicos.

O primeiro aspecto a ser abordado é referente ao comportamento distinto dos deslocamentos químicos dos átomos de fósforo dos ligantes dppb e dphppy após a coordenação ao centro metálico. No ligante livre, os átomos de fósforo da bifosfina dppb são magneticamente equivalentes com deslocamento químico em δ_P -16 e após a coordenação ao rutênio os sinais são fortemente deslocados para região de maior frequência do espectro. Este comportamento reflete a tendência geral relatada na literatura, cujos ligantes fosfínicos livres são mais blindados quando comparados aos respectivos ligantes coordenados. A desblindagem magnética dos átomos de fósforos após a formação do quelato é em decorrência principalmente da desproteção dos átomos de fósforo devido ao uso dos pares de elétrons livres para a coordenação ao centro metálico.

Dentre os ligantes bifosfínicos, a dppb é uma das bifosfinas que apresenta o maior ângulo de mordida referente às ligações P—Ru—P. Neste trabalho, os ângulos de mordida para os complexos foram de aproximadamente 95°, o que está de acordo com a literatura. De maneira geral, o maior ângulo de mordida proporciona maior blindagem dos átomos de fósforo da dppb nos complexos, quando comparado aos complexos análogos com os demais ligantes bifosfínicos descritos na literatura,⁶¹ com exceção dos complexos com a bisfosfina dppe.

O sinal na região de baixa frequência dos espectros dos complexos é correspondente ao átomo de fósforo do ligante dphppy. Contudo, o átomo de fósforo do ligante 2-difenilfosfinapiridina apresentou um comportamento inverso dos átomos do ligante dppb após a coordenação ao rutênio, pois o sinal foi deslocado para regiões de menor frequência do espectro de RMN ³¹P. O deslocamento químico do fósforo do ligante não coordenado ocorre em δ_P -3,8,

enquanto nos complexos compreendeu dentro da faixa de δ_P -6,3 a -17,4. A coordenação bidentada do ligante dphppy ao centro metálico ocorre com a formação do quelato de quatro membros com o ângulo entre P1—Ru—N1 de 67°, fazendo com que os ângulos do átomo de fósforo com seus substituintes ligados aumentem em comparação ao ligante livre. Devido ao elevado ângulo de cone P-R₃, o caráter s do par de elétrons σ aumentou, promovendo um efeito de blindagem do átomo de fósforo. Assim, o efeito no caráter σ apresenta grande influência sobre o deslocamento químico do sinal observado, deslocando a ressonância do átomo de fósforo P_X-dphppy dos complexos **AMP** para valores mais negativos quando comparado ao apresentado pelo ligante livre dphppy (δ -3,8). Em alguns complexos descritos na literatura com a coordenação monodentada do ligante dphppy, via o átomo de fósforo, resulta no deslocamento do sinal para região de maior frequência do espectro de RMN ³¹P, sendo idêntico ao do átomo de fósforo do ligante trifenilfosfina. Tal fato é explicado pelo ângulo de cone formado entre o centro metálico e as superfícies de van der Waals geradas pelos substituintes fenílicos e piridínicos no ligante dphppy ser equivalente ao ângulo de cone formado na trifenilfosfina.

O espectro de RMN de ³¹P {¹H} de cada complexo apresenta um hepteto, dois duplo-dubletos e um pseudo triplete. O hepteto é referente ao íon PF₆⁻, empregado como contra-íon para estabilizar a carga positiva do complexo. Os duplo-dubletos e pseudo triplete são referentes aos três átomos de fósforo dos ligantes fosfínicos (dppb e dphppy) magneticamente não equivalentes, os quais são um exemplo clássico de sistema de acoplamento spin AMX. A FIGURA 4.5 apresenta o espectro de RMN de ³¹P{¹H} do complexo **AMP1**, com a descrição dos acoplamentos a duas ligações entre os núcleos de fósforos (²J_{PP}).

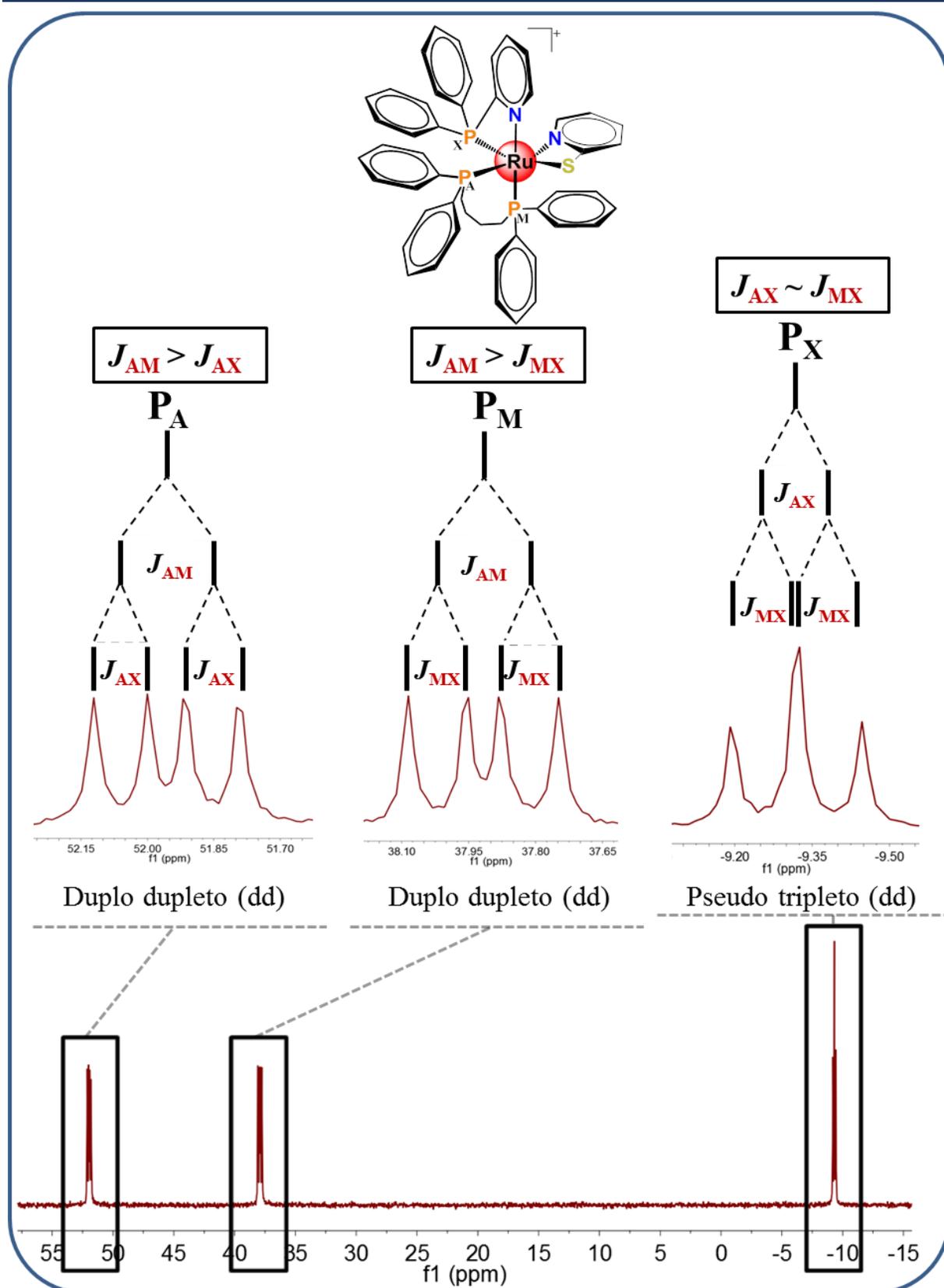


FIGURA 4.5- Espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ ampliado do complexo AMP1 em CD_3CN , com a descrição do sistema de acoplamento AMX.

A constante de acoplamento entre os átomos de fósforo do ligante dppb (${}^2J_{AM}$) tem valor de aproximadamente 36 Hz, enquanto os valores das constantes de acoplamento (${}^2J_{AX}$ e ${}^2J_{MX}$) do átomo de fósforo P_x com os átomos do ligante bifosfínico são menores (20-21 Hz). Os sinais dos átomos de fósforo do ligante bifosfínico dppb com multiplicidade duplo-dupletos é devido as constantes de acoplamento distintas, como já dito, o valor de ${}^2J_{AM}$ é maior do que as constantes ${}^2J_{AX}$ ou ${}^2J_{MX}$ (${}^2J_{AM} > {}^2J_{AX}$; ${}^2J_{AM} > {}^2J_{MX}$). O sinal com a multiplicidade de um tripleto, que na verdade é um pseudo tripleto, é decorrente da coalescência entre as linhas internas dos sinais dupletos, uma vez que os valores das constantes de acoplamento ${}^2J_{AM}$ e ${}^2J_{AX}$ são próximos (${}^2J_{AM} \approx {}^2J_{AX}$).

Após a coordenação dos ligantes mercaptos ao centro metálico, os sinais dos átomos de fósforos foram deslocados para regiões mais desblindadas dos espectros quando comparados aos sinais do complexo precursor. Isto se deve pela substituição dos ligantes cloridos (σ -doador σ -receptor) por ligantes com características distintas (σ -doador e π -receptor). As maiores variações dos valores dos deslocamentos químicos foram dos átomos de fósforos P_A e P_X , devido à influência da troca dos átomos em posição *trans* a estes átomos.

O caráter π -receptor dos ligantes mercaptos tem um papel na desblindagem dos átomos de fósforo, uma vez que coordenado, o ligante também pode receber elétrons do rutênio por meio da retrodoação. Conseqüentemente, há uma diminuição da densidade eletrônica sobre o rutênio, promovendo uma reorganização das retrodoações realizadas pelo metal. Por fim, ocorre a diminuição da capacidade do centro metálico de realizar retrodoação com os ligantes fosfínicos, devido a existência de um efeito competitivo dos ligantes em posição *trans* na esfera de coordenação pela retrodoação do centro metálico. A diminuição da capacidade do centro metálico doar densidade eletrônica aos orbitais híbridos da fosfina para realização da retrodoação, resulta na diminuição da densidade eletrônica nas ligações Ru—P e, como consequência, há uma desblindagem dos átomos de fósforo, acarretando à

variação dos deslocamentos químicos dos átomos de fósforos nos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$.

Nos diversos trabalhos com complexos Ru/bifosfina, de forma geral, as atribuições dos sinais dos espectros de ^1H são complicadas de serem realizadas. De forma simplificada, determinam-se os hidrogênios que são referentes aos anéis fosfínicos e, em alguns casos, as posições dos hidrogênios no anel quando os sinais são definidos e separados no espectro. Contudo, dificilmente são correlacionados os hidrogênios fenílicos com seu respectivo átomo de fósforo. Neste aspecto, o presente trabalho para a série **AMP** realizou tais atribuições e determinou o deslocamento químico de todos os hidrogênios dos complexos por meio dos experimentos de RMN 2D. No Apêndice – Parte I estão apresentados todos os espectros e mapas de correlação de RMN, e principalmente as TABELAS A1-A5 com a atribuição dos átomos de hidrogênio, carbono e fósforo para os complexos **AMP**.

Na FIGURA 4.6 apresenta-se o espectro de RMN de ^1H do complexo **AMP4**, e os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio estão apresentados na FIGURA 4.7. Para os hidrogênios com a multiplicidade do sinal descrita como multipletto, os deslocamentos químicos foram definidos pela faixa das curvas de níveis referentes ao acoplamento entre o(s) átomo(s) de hidrogênio e respectivo carbono no mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C .

Os espectros de RMN ^1H dos complexos da série **AMP** apresentaram de forma geral o mesmo perfil (Apêndice – Parte I), com a particularidade dos sinais referentes aos ligantes mercaptos. A baixa simetria dos complexos e os efeitos anisotrópicos provocaram a não equivalência magnética dos hidrogênios fenílicos dos ligantes fosfínicos, com a sobreposição de sinais na região dos hidrogênios aromáticos.

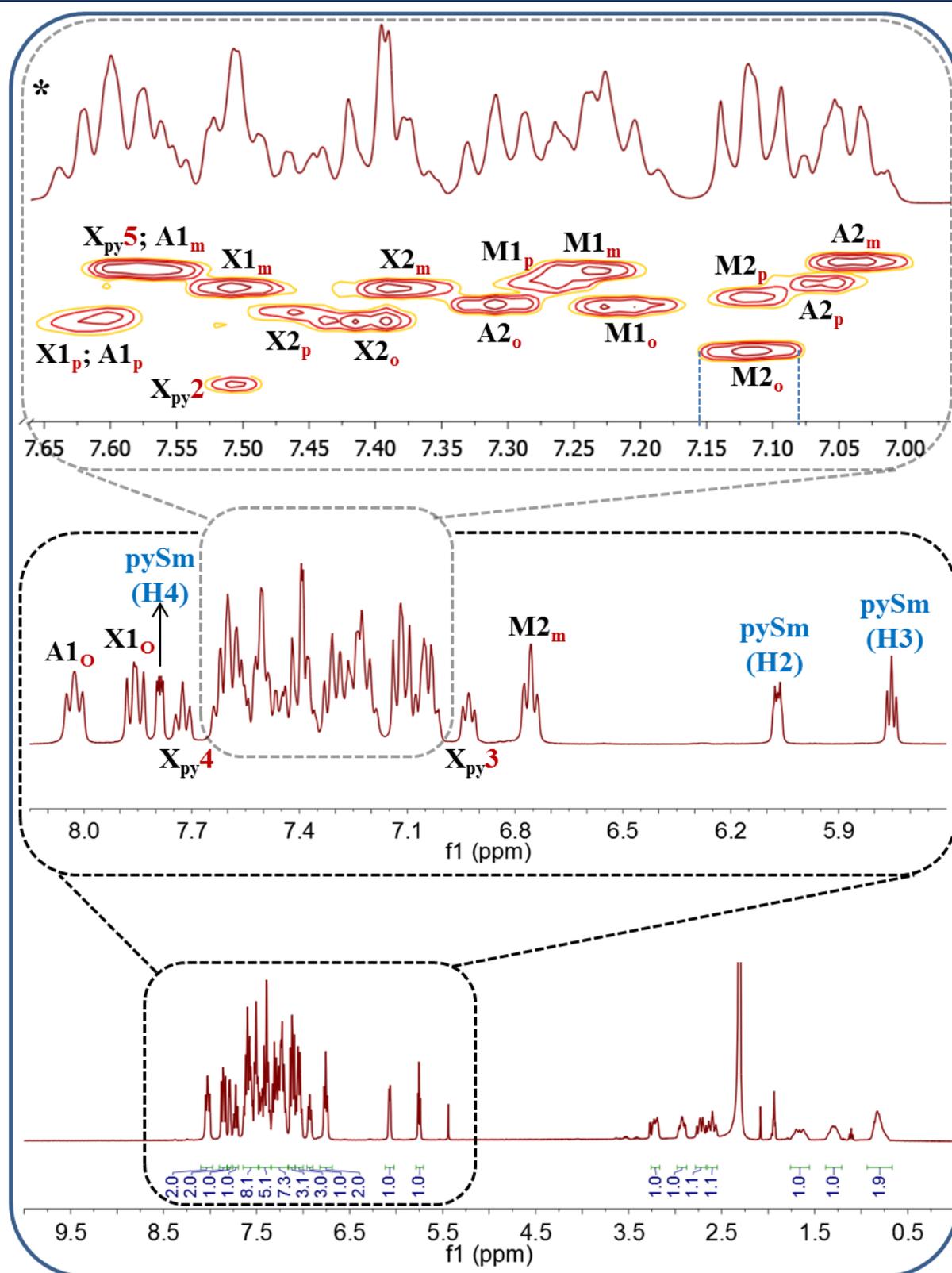


FIGURA 4.6- Espectro de RMN de ^1H do complexo AMP4 em CD_3CN .
 *Determinação dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio pelo mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C (TABELAS A1-A5 no Apêndice).

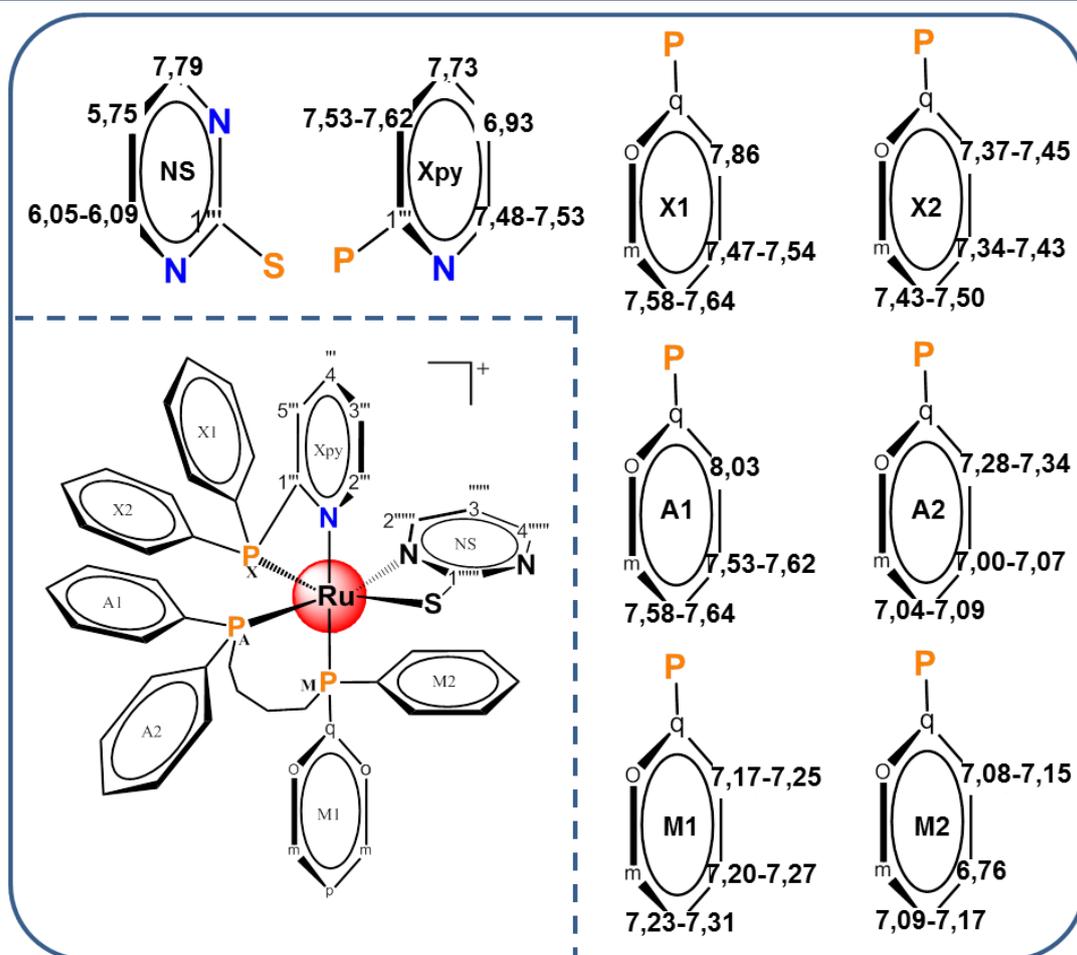


FIGURA 4.7- Nomenclatura e deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do complexo AMP4 no espectro de RMN ^1H . Observação: Para os hidrogênios com a multiplicidade do sinal descrita como multipletto, os deslocamentos químicos foram definidos pela faixa das curvas de níveis referentes ao acoplamento entre o(s) átomo(s) de hidrogênio e o respectivo carbono no mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C .

Na correlação heteronuclear a múltiplas ligações entre hidrogênio e fósforo, HMBC ^1H - ^{31}P , possibilitou realizar as correlações escalares entre os hidrogênios fenílicos e os respectivos átomos de fósforos dos ligantes fosfínicos. A configuração do experimento foi realizada para que haja predominância dos acoplamentos de curto alcance, empregando o valor de constante de acoplamento de 12 Hz. No mapa de correlação de HMBC ^1H - ^{31}P , os sinais mais intensos são referentes aos acoplamentos entre os hidrogênios fenílicos de

posição *orto* (H_O) e o respectivo átomo de fósforo. Também foram realizados experimentos de HMBC 1H - ^{31}P com a configuração para observar acoplamentos de longo alcance, empregando o valor de constante de acoplamento de 6 Hz. Nesta configuração também são observados acoplamentos dos hidrogênios de posição meta ($^4J_{PH}$) com o respectivo átomo de fósforo.

Nos experimentos HMBC 1H - ^{31}P observa-se um conjunto de cross-peaks que mostram que dois spins estão mutuamente experimentando uma relaxação cruzada escalar. Por meio da análise dos mapas de correlação HMBC 1H - ^{31}P (12 Hz) dos complexos **AMP** foi observado que para cada átomo de fósforo há duas correlações, os quais são correspondentes aos acoplamentos entre os hidrogênios fenílicos de posição *orto* dos anéis aromáticos com o respectivo átomo de fósforo, ligado diretamente ao anel aromático. O átomo de P_X do ligante dphppy apresenta um sinal adicional, referentes ao acoplamento com o hidrogênio do anel piridínico do ligante.

O **AMP4** foi empregado para representar o comportamento dos complexos da série. No mapa de correlação de HMBC 1H - ^{31}P do **AMP4** (FIGURA 4.8-A) são evidenciados os acoplamentos do fósforo P_A com os hidrogênios em δ_H 8,03 (H_{A1o}) e 7,28-7,34 (H_{A2o}), e o fósforo P_M com os hidrogênios em δ_H 7,17-7,25 (H_{M1o}) e 7,08-7,15 (H_{M2o}). No caso do fósforo P_X , as correlações são com os átomos em δ_H 7,86 (H_{X1o}); 7,37-7,45 (H_{X2o}) e 7,48-7,53 ($H_{Xpy5''}$). Tais deslocamentos químicos indicam os respectivos hidrogênios fenílicos de posição *orto* e do hidrogênio $H_{Xpy5''}$ do anel piridínico. Em todos os complexos, os hidrogênios fenílicos *orto*, denominados $Ho_{(PA1)}$ e $Ho_{(PX1)}$, ligados aos fósforos P_A e P_X foram, respectivamente, apresentaram os sinais mais desblindados dos espectros. Os hidrogênios fenílicos *orto* ligados aos anéis do átomo de fósforo P_M são os mais blindados entre os hidrogênios de mesma posição. Para os complexos, a seguinte ordem foi estabelecida para os deslocamentos químicos dos hidrogênios de posição *orto* dos diferentes anéis aromáticos: $\delta Ho_{(PA1)} > \delta Ho_{(PX1)} > \delta Ho_{(PX2)} \approx \delta Ho_{(PA2)} > \delta Ho_{(PM1)} \approx \delta Ho_{(PM2)}$. O

fato importante, é que os hidrogênios *orto* dos anéis ligados ao mesmo átomo de fósforo apresentam deslocamentos químicos distintos. Os diferentes ambientes químicos gerados nas moléculas pelos diferentes anéis aromáticos proporcionam efeitos anisotrópicos sobre os hidrogênios, o que resulta em diferentes efeitos de blindagem sobre os hidrogênios dos complexos.

A atribuição dos demais hidrogênios aromáticos de posição *meta* e *para* dos anéis aromáticos foi realizada pela análise dos mapas de correlação de HMBC ^1H - ^{31}P , COSY ^1H - ^1H e HSQC ^1H - ^{13}C . Como exemplo, os deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel denominado A1 para o complexo **AMP4** (FIGURA 4.8-B), são δ 8,03 para os dois átomos de hidrogênio $\text{H}_{o(\text{PA1})}$, δ 7,53-7,62 referente aos átomos de hidrogênios $\text{H}_{m(\text{PA1})}$ e δ 7,58-7,64 para o átomo de hidrogênio $\text{H}_{p(\text{PA1})}$. Para a maioria dos anéis, os sinais dos hidrogênios de posição *orto* são os mais desblindados entre os hidrogênios fenílicos. Entretanto, diferentes configurações são observadas para os deslocamentos químicos nos hidrogênios dos anéis aromáticos, cuja racionalização não foi possível de ser realizada, devido à complexidade dos sinais.

No espectro de ^1H do ligante 2'-mercaptopirimidina (pySm) livre, os hidrogênios ($\text{H2}''''/\text{H4}''''$) ligados nos carbonos adjacentes aos nitrogênios apresentam apenas um sinal em δ 8,31, enquanto o sinal mais desblindado do espectro, em δ 6,85, é atribuído ao hidrogênio denominado $\text{H3}''''$. Após a coordenação do ligante pySm ao rutênio, os hidrogênios $\text{H2}''''$ e $\text{H4}''''$ não apresentaram equivalência magnética, bem como nenhum dos hidrogênios do anel. O mapa de correlação de RMN COSY ^1H - ^1H do complexo **AMP4** (FIGURA 4.8-C) mostra um conjunto de curvas de níveis oriundo de acoplamentos entre os hidrogênios do ligante mercapto. Os três átomos hidrogênios apresentam deslocamentos químicos distintos, os átomos hidrogênios ligados aos carbonos adjacentes aos átomos de nitrogênio mostram sinais em δ 7,79 ($\text{H2}''''$) e δ 6,05-6,09 ($\text{H4}''''$). O hidrogênio nomeado $\text{H3}''''$ apresenta um sinal em δ 5,75.

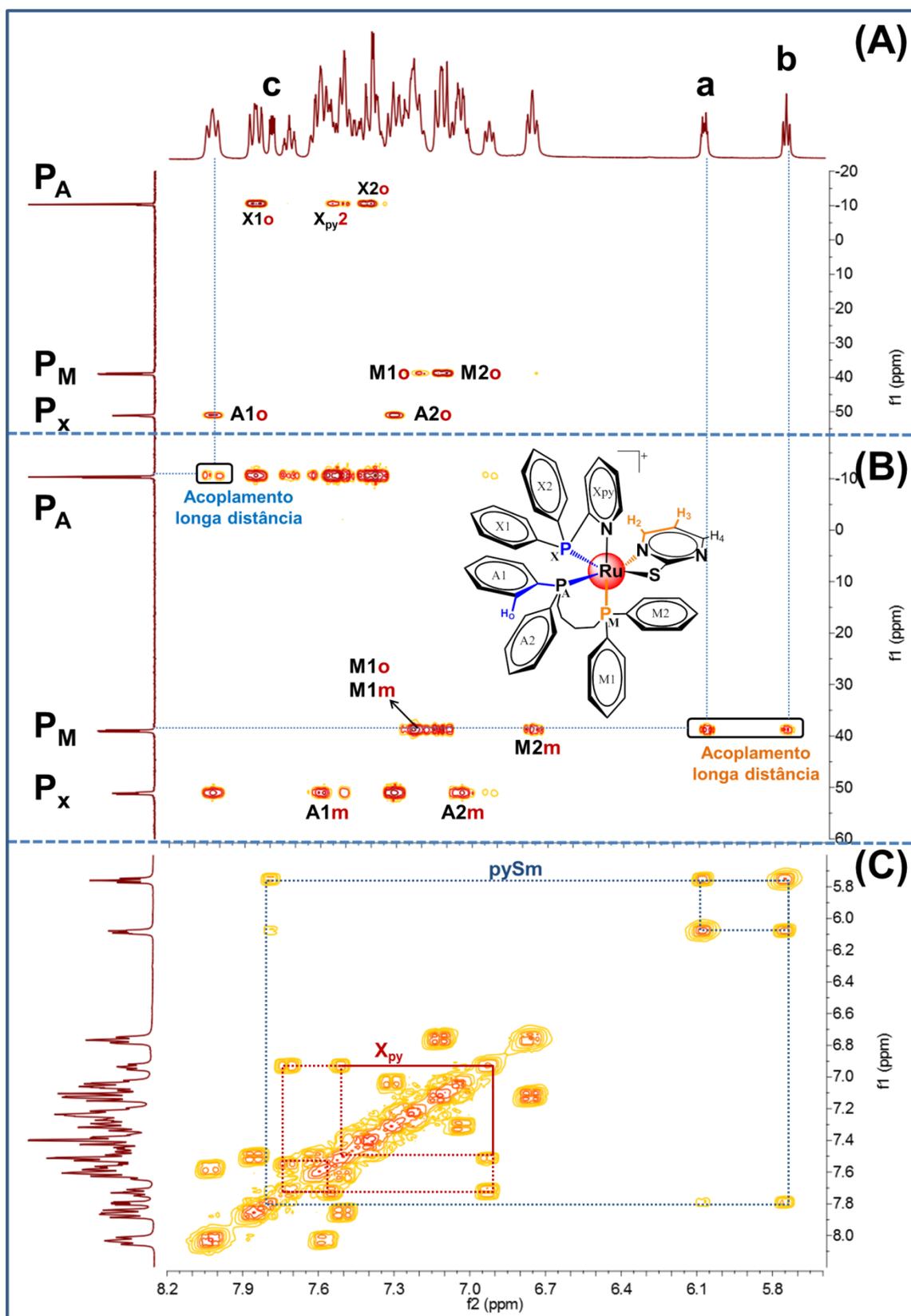


FIGURA 4.8- Mapas de contorno de HMBC ¹H-³¹P (A) à 12 Hz e (B) à 6 Hz, e (C) COSY ¹H-¹H do complexo AMP4 em CD₃CN. Inserida a estrutura do complexo AMP4 com a nomenclatura.

As interações intramoleculares dos complexos, principalmente envolvendo os anéis aromáticos, como por exemplo as interações do tipo π - π stacking, demonstram o potencial do alcance dos efeitos anisotrópicos, gerados pelos diferentes anéis aromáticos. A corrente eletrônica dos elétrons π dos anéis aromáticos é capaz de gerar um campo magnético induzido, o qual possui sentido oposto ao campo aplicado externamente (FIGURA 4.9-A).¹¹³ Este fenômeno origina regiões de blindagem magnética, denominada de “cone de proteção”, em relação a um campo magnético externo aplicado em torno do anel aromático (FIGURA 4.9-B). Também, origina regiões específicas próximas ao anel com o efeito de desblindagem (FIGURA 4.9-B).¹¹³ Os átomos de hidrogênios, de outra parte da molécula, que estão localizados em alguma destas regiões são fortemente blindados ou desblindados. Em suma, os efeitos de anisotropia originados pelas correntes de anel afetam significativamente o deslocamento químico de RMN dos átomos de hidrogênios que estão na região espacial de influência destes efeitos.

Os complexos **AMP** apresentam diferentes anéis aromáticos, os quais promovem diferentes efeitos anisotrópicos nos átomos de hidrogênios. É bem estabelecido que as interações π - π stacking entre anéis aromáticos resultam na blindagem dos átomos de hidrogênios devido ao efeito de corrente de anel anisotrópico. Como um dos exemplos, nas estruturas cristalinas dos complexos **AMP** observam-se as interações intramoleculares do tipo π - π stacking caracterizadas pelo empilhamento “face a face deslocada” entre o anel dos respectivos ligantes mercaptos e o anel fenílico P3-C32, que neste caso no RMN é nomeado como o anel M2 ligado ao átomo de fósforo P_M do ligante dppb (FIGURA 4.9-D). Nestas interações π - π stacking há um efeito de “cone de proteção” gerado pelos anéis aromáticos que se encontram empilhados, gerando um forte efeito de blindagem nos hidrogênios. O “cone de proteção” gerado pelo anel fenílico P3-C32 (anel P_M -M2) é um dos fatores que explica a forte blindagem dos átomos de hidrogênios dos ligantes mercaptos após a

coordenação, com $\Delta\delta$ de até -2,5 ppm, em todos os complexos com destaque para os complexos **AMP1** e **AMP4**. É importante ressaltar que a posição geometria dos hidrogênios que estão no “cone de proteção” é determinante para o maior ou menor efeito da “corrente de anel” sobre os átomos (FIGURA 4.9-C).¹¹⁴ Os complexos fosfínicos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{PP})_2]^{+46,61}$ e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{PP})]^{+58,62}$ têm-se efeitos anisotrópicos devido as interações do tipo π - π stacking.

Em todos os complexos **AMP**, os átomos de hidrogênio do anel fenílico P3-C32 (nomeado no RMN, P_M-M2) foram os mais blindados, juntamente com os hidrogênios fenílicos A2, quando comparados com os demais anéis fenílicos. Contudo, o “cone de proteção” gerado pelos ligantes mercaptos aromáticos parece não ser um efeito significativo nos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios do anel fenílico P_M-M2 ($\delta\text{H}_{\text{M2}}$). Tal fato foi sugerido, uma vez que os deslocamentos $\delta\text{H}_{\text{M2}}$ no complexo **AMP2** são praticamente idênticos aos deslocamentos $\delta\text{H}_{\text{M2}}$ dos demais complexos **AMP**, cujo ligante mercaptotiazolina do complexo **AMP2** é alifático e cíclico, e conseqüentemente, não gera um campo magnético induzido, ou seja, não origina um “cone de proteção”. Portanto, sugere-se que há uma maior efetividade do campo magnético gerado pela densidade de corrente de elétrons dos anéis fenílicos P_M-M2 da bisfofina que se encontram empilhados com os anéis dos ligantes mercaptos.

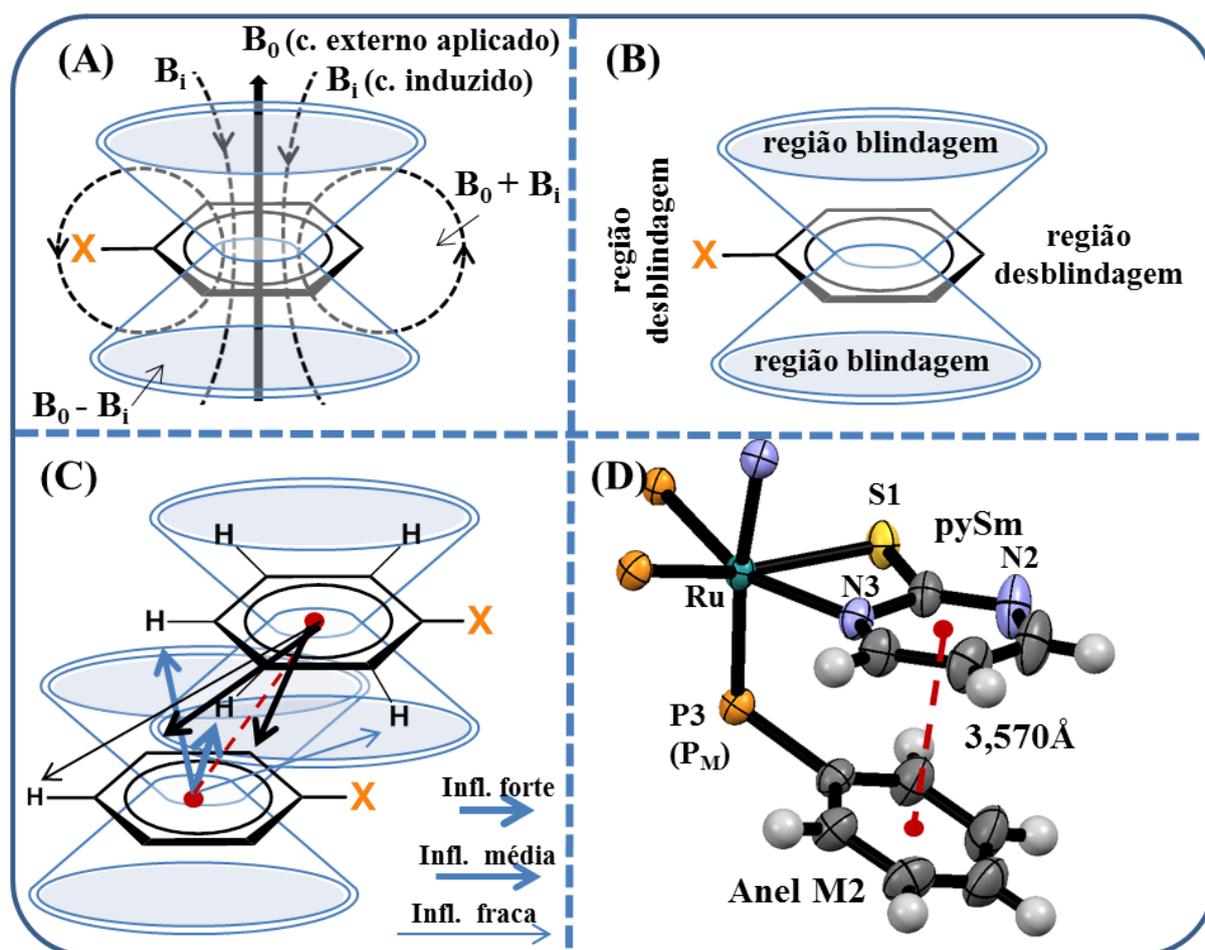


FIGURA 4.9- (A) Representação genérica das correntes de anel e linhas de forças induzidas em um anel aromático (adaptada¹¹³); (B) Representação genérica das regiões de blindagem e desblindagem gerada pela corrente de anel; (C) Representação genérica de diferentes efeitos anisotrópicos devido a posição espacial dos hidrogênios na interações π - π stacking entre anéis aromáticos (adaptada¹¹⁴); (D) Interações π - π stacking nas estruturas cristalinas dos complexos AMP, representada pelo AMP1, o que pode promover efeitos anisotrópicos.

Nos experimentos de RMN HMBC ^1H - ^{31}P podem ser observados os acoplamentos escalar de longo alcance, via centro metálico, entre alguns hidrogênios dos ligantes mercaptos, com átomos de fósforo. Os acoplamentos entre os hidrogênios H2''' e H3''' do ligante 2-mercaptopirimidina com o átomo de fósforo P_M (δ 40,1) podem ser observados como as curvas de níveis no mapa de correlação de HMBC ^1H - ^{31}P (Figura 4.9-B), via centro metálico a quatro e cinco ligações, respectivamente. Outro acoplamento observado se encontra entre o átomo de fósforo P_X com os hidrogênios *orto* do anel ligado ao fósforo P_A via cinco ligações. O acoplamento heteronuclear H-P é escalar e acontece via orbital $d\pi$ metal e $p\pi$ ligante, possibilitando o acoplamento de longo alcance entre os átomos.

Os espectros de RMN de ^{13}C dos complexos apresentaram perfis similares, tendo as particularidades dos sinais referentes a cada ligante mercapto. De forma geral e simplificada, os sinais dos carbonos apresentam-se em três regiões dos espectros. Os sinais na região entre δ_c 20 e 35 são referentes aos carbonos alifáticos dos ligantes bifosfínicos. Os sinais dos carbonos fenílicos e piridínicos foram atribuídos aos que se encontram na região entre δ_c 110 e 140, enquanto na região acima de δ_c 140 são atribuídos os sinais referentes a alguns dos carbonos dos ligantes mercaptos e piridínicos. Os sinais de carbono foram determinados por suas correlações com os hidrogênios pelas técnicas de RMN 2D.

Na FIGURA 4.10 é apresentado o espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo **AMP4** e na FIGURA 4.11 são apresentados os mapas de correlação de HMBC ^1H - ^{13}C e HSQC ^1H - ^{13}C .

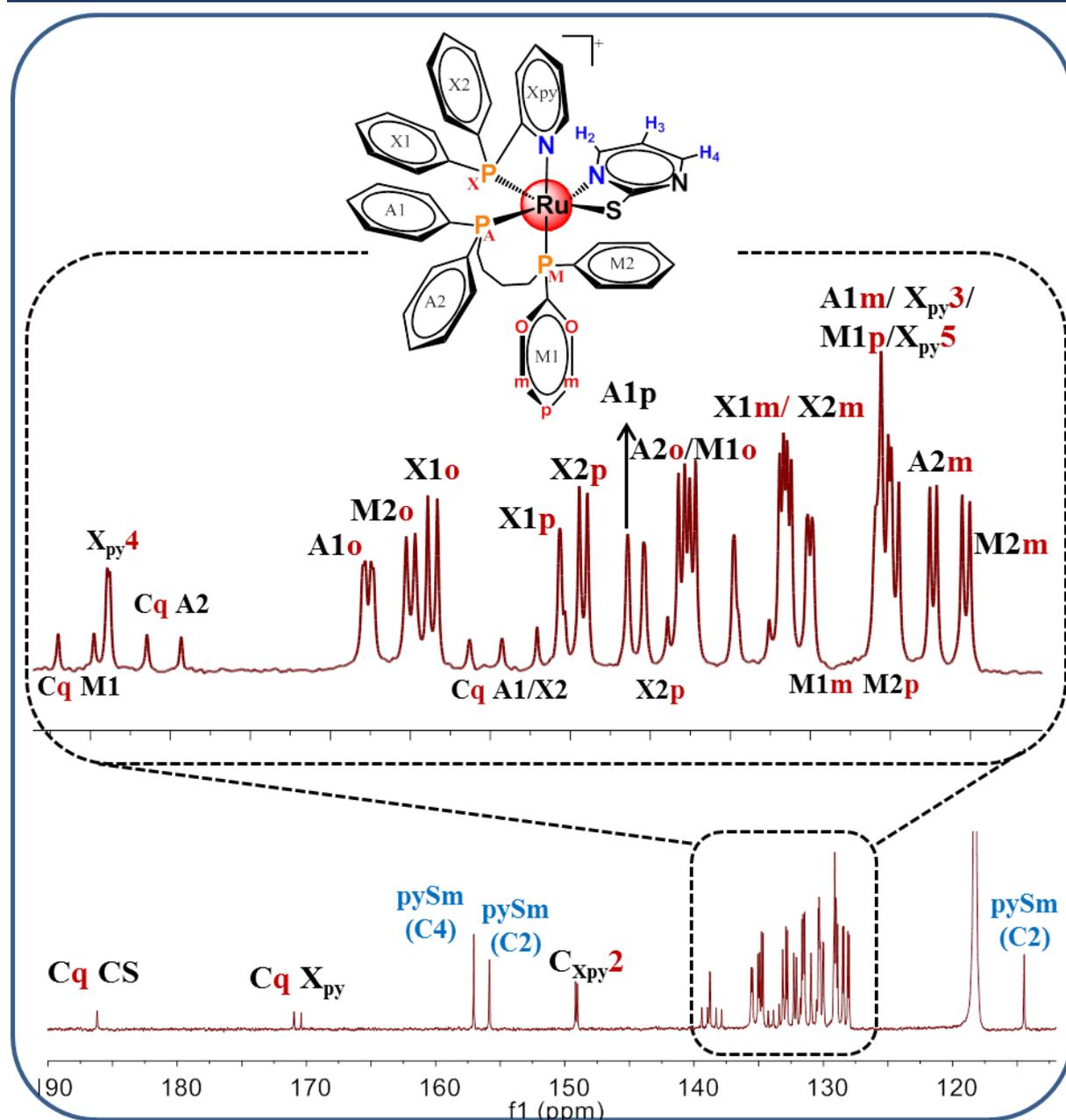


FIGURA 4.10- Região desblindada do espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo AMP4 em CD_3CN . Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono dos complexos estão descritos nas TABELAS A1-A5, no Apêndice.

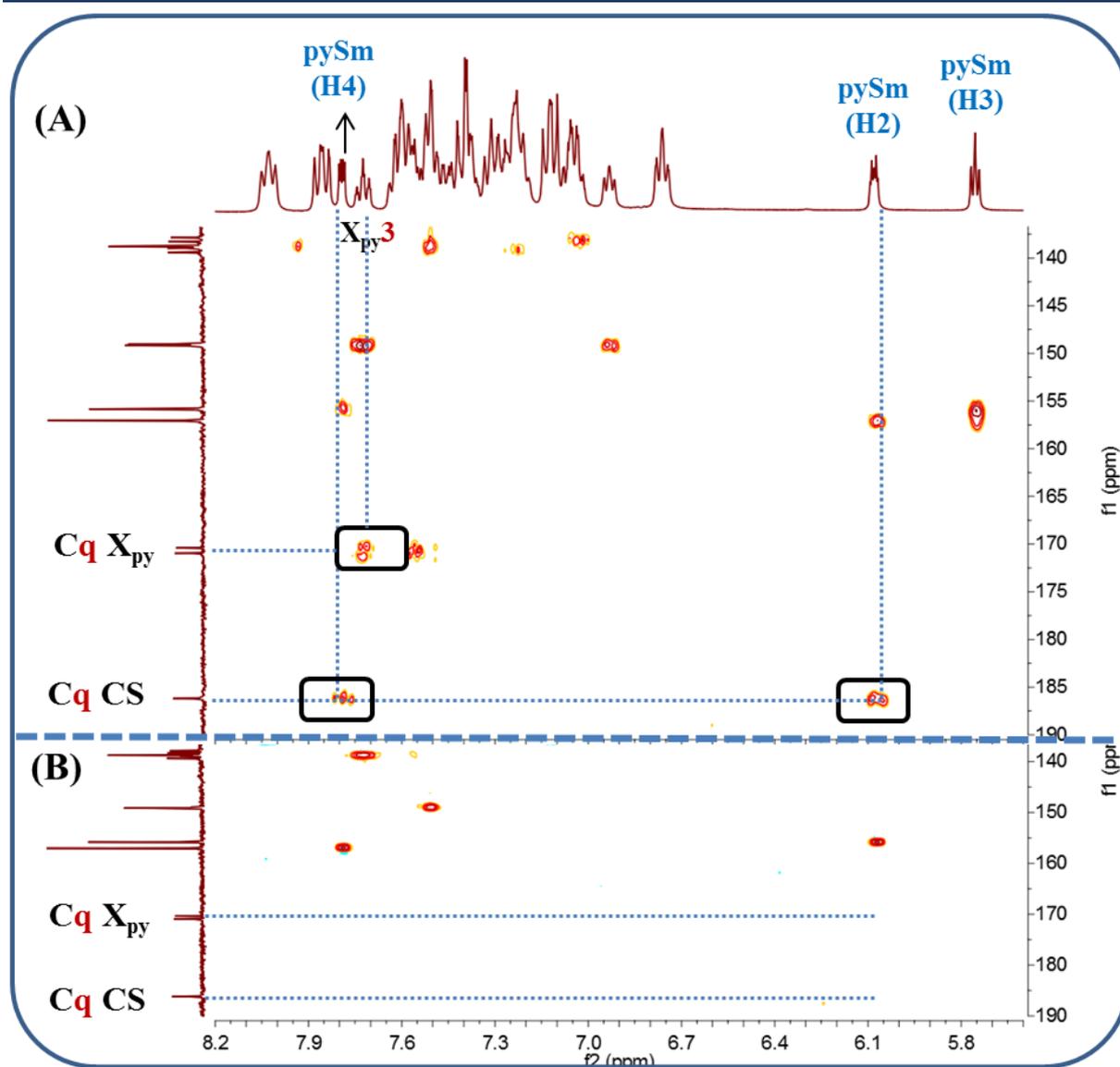


FIGURA 4.11- Mapas de contorno de (A) HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e (B) HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **AMP4** em CD_3CN .

Para todos os complexos, o sinal mais desblindado do espectro é correspondente ao carbono quaternário (CS) do ligante mercapto na região entre δ_c 175– 180. A atribuição do simpleto é baseada nas curvas de níveis referentes às correlações do carbono quaternário com os átomos dos hidrogênios dos ligantes mercaptos, nos mapas de correlação HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$. Após a coordenação do ligante mercapto, o sinal do carbono quaternário CS foi deslocado para região mais desblindada dos espectros dos complexos. Com a coordenação do átomo de enxofre ao centro metálico, a distância de ligação CS

nos complexos mostra uma diminuição do caráter de dupla ligação. Neste sentido, o átomo de carbono fica mais desblindado em comparação ao ligante livre.

Nos espectros de carbono dos complexos podem ser observadas diferentes multiplicidades dos sinais, sendo predominantemente dupletos. A multiplicidade dos sinais ocorre em decorrência dos acoplamentos entre os átomos de carbono e fósforo. Nos anéis aromáticos dos ligantes fosfínicos, as constantes de acoplamento entre o átomo de fósforo ligado diretamente aos átomos de carbonos quaternários ($^1J_{PC}$) varia na faixa de 35 a 45 Hz. Adicionalmente, os sinais destes carbonos quaternários fosfínicos são caracterizados pela baixa intensidade dos mesmos. Porém, a atribuição dos sinais é dificultada pela sobreposição das curvas de níveis nos mapas de HMBC 1H - ^{13}C . Os acoplamentos P—C também são observados nos espectros para os sinais dos carbonos *orto* e *meta*, com valores de constantes de acoplamento $^3J_{CP}$ e $^2J_{CP}$ na faixa de 8-11 Hz.

Os sinais encontrados na região δ_c 115–150 dos espectros correspondem aos átomos de carbono referentes aos anéis aromáticos de posição *orto* (C_o), *meta* (C_m) e *para* (C_p) dos ligantes fosfínicos. Em todos os casos, há um padrão no deslocamento químico dos carbonos, obedecendo a seguinte ordem: $\delta C_m < \delta C_p < \delta C_o$. Os carbonos apresentam uma faixa de deslocamento químico de 128,1–130,3 (C_m), 129,7–133,3 (C_p) e 131,5–135,7 (C_o) independente do complexo e do anel.

Em relação aos hidrogênios e carbonos do grupo piridínico do ligante dphppy, em geral, todos sinais se diferenciam entre si, os quais foram atribuídos por meio dos mapas de correlação dos complexos. Partindo-se do subsistema piridínico do ligante dphppy no complexo **AMP4**, observa-se que os hidrogênios $H_{X_{py2}}$ e $H_{X_{py5}}$ são multipletos (δ_H em 7,48–7,53 e 7,53–7,62, respectivamente) que, por possuírem deslocamentos químicos muito próximos, se sobrepõem. O hidrogênio $H_{X_{py2}}$ (δ_H em 7,48–7,53) está ligado ao carbono

com deslocamento químico em δ_C 149,1. O duplete referente ao C_{Xpy2} é o sinal mais desprotegido do anel piridínico dentre os carbono hidrogenado, uma vez que está ligado ao átomo de nitrogênio do anel. A multiplicidade duplete deste sinal é devido ao acoplamento do carbono com o átomo de fósforo P_X . O triplo-triplete com deslocamento químico δ_H 7,73, é oriundo do hidrogênio mais desprotegido do anel H_{Xpy4} . Este, por sua vez, mostra dois sinais de acoplamentos no mapa de COSY 1H - 1H com os hidrogênios H_{Xpy3} e H_{Xpy5} . No mapa de HSQC 1H - ^{13}C , o hidrogênio H_{Xpy4} mostra correlação com o carbono em δ_C 138,8. Por fim, o hidrogênio mais blindado do anel piridínico correspondente ao sinal tripleto com deslocamento químico δ_H 6,93 (H_{Xpy3}). O hidrogênio H_{Xpy3} mostra correlação com o carbono com deslocamento químico em δ_C 128,8–129,3, no mapa de HSQC 1H - ^{13}C . O mesmo comportamento foi observado para os hidrogênios piridínicos do ligante dphppy dos demais complexos da série.

O mesmo padrão de comportamento dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos referentes à cadeia alifática do ligante bifosfínico dppb foi observado para todos os complexos. Em todos os complexos, todos os hidrogênios alifáticos possuem deslocamentos químicos distintos, inclusive os hidrogênios geminais (hidrogênios ligados ao mesmo carbono). Tal comportamento, é causado pelo diferente ambiente químico sentido para cada átomo de hidrogênio (efeito de anisotropia), o que resulta em hidrogênios magneticamente não equivalentes. Por meio dos espectros de RMN 1H foram obtidos todos os δ_H , cujos sinais foram multipletos entre δ 3,50–0,50 cada um destes com área proporcional para um hidrogênio. Nos espectros de RMN 1H do complexo **AMP4** os quatro sinais na faixa de δ_H 3,50–2,50 são referentes aos hidrogênios dos carbonos ligados diretamente aos átomos de fósforos. Nos mapas de HMBC 1H - ^{31}P são observadas as correlações dos hidrogênios com seu respectivo átomo de fósforo. Nos espectros de ^{13}C dos complexos, os dubletos com deslocamento químico na faixa de δ_H 32-25 com constante de acoplamento

P—C ($^1J_{PC}$) de aproximadamente 33 Hz são referentes aos carbonos ligados diretamente aos átomos de fósforos. Os hidrogênios metínicos mais protegidas (δ_H 1.8-0,50) mostram correlações com os carbonos na faixa de δ_C 25-20 referentes aos carbonos alifáticos C2'''''' e C3'''''''. Os hidrogênios metílicos também apresentaram acoplamentos com os átomos de fósforo, como é possível observar no mapa de correlação HMBC 1H - ^{31}P . Para todos os complexos também foi possível estabelecer o padrão de deslocamento químico dos hidrogênios alifáticos, obedecendo a seguinte ordem: $\delta H_{1a(alf)} > \delta H_{4a(alf)} > \delta H_{1b(alf)} > \delta H_{4b(alf)} > \delta H_{3a(alf)} > \delta H_{2a(alf)} > \delta H_{3b(alf)} > \delta H_{2b(alf)}$. Nos espectros de RMN ^{13}C , o padrão de deslocamento químico dos sinais dos átomos de carbono alifáticos obedecem a seguinte ordem: $\delta C_{4alf} > \delta C_{1alf} > \delta C_{3alf} > \delta C_{2alf}$. Na FIGURA 4.12 são apresentados os mapas de correlação de HMBC 1H - ^{31}P e HMBC 1H - ^{13}C do complexo **AMP4**, que exemplifica o comportamento descrito para os complexos da série.

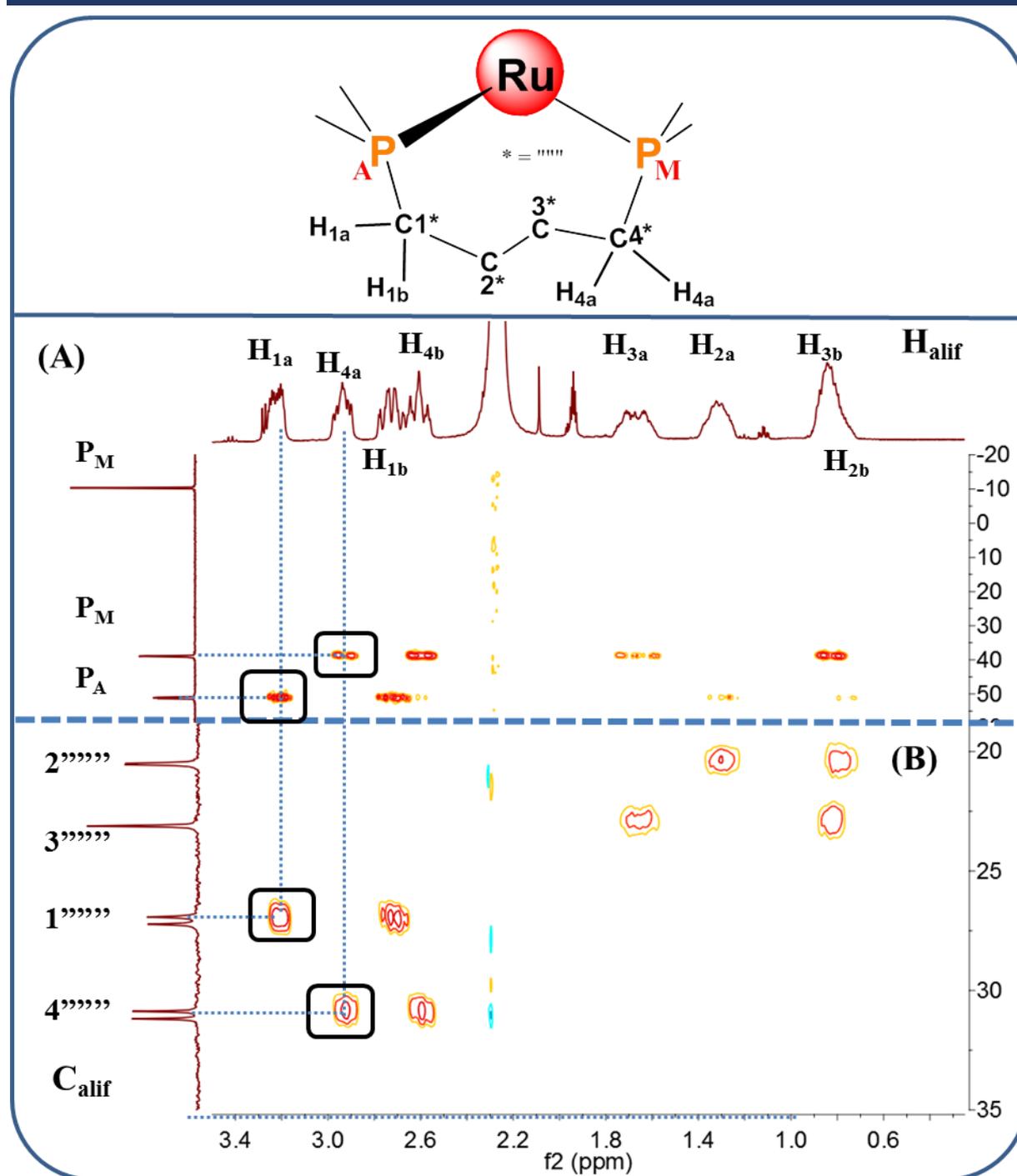


FIGURA 4.12- Mapas de contorno de (A) HMBC ^1H - ^{31}P com constante de acoplamento de 6 Hz e (B) HSQC ^1H - ^{13}C do complexo **AMP4** na região alifática, em CD_3CN . Inserida a parte alifática da estrutura química do complexo **AMP4**.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados com o intuito de avaliar os potenciais redox e a reversibilidade eletroquímica dos complexos, no intervalo de potencial realizado. Os complexos **AMP** apresentam comportamentos eletroquímicos similares. O voltamograma cíclico (FIGURA 4.13) registrado em presença do complexo **AMP1**, em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em diclorometano, ilustra o comportamento redox para os demais complexos da série (FIGURA A32, no Apêndice – Parte III).

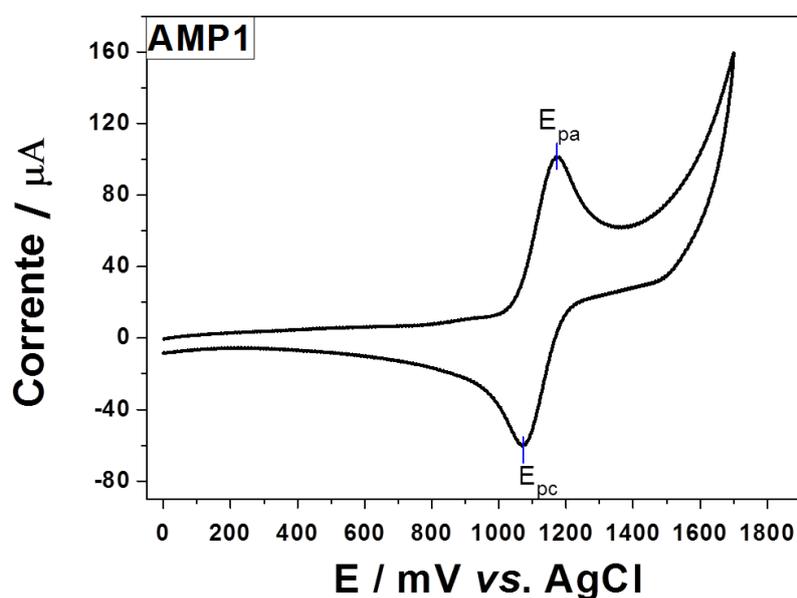


FIGURA 4.13- Voltamograma cíclico do **AMP1** em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em diclorometano à 100 mV s^{-1} . Eletrodo de trabalho de platina.

No voltamograma cíclico de cada complexo observou-se um par de picos redox quasi-reversível, referente à transferência de um elétron do par redox Ru(II)/Ru(III). Na varredura anódica, tem-se um pico de oxidação referente à oxidação do Ru(II)/Ru(III), enquanto o correspondente pico catódico na varredura reversa é atribuído à redução do centro metálico. Os valores dos potenciais dos processos redox dos complexos estão ilustrados na TABELA 4.4.

TABELA 4.4- Valores dos principais parâmetros eletroquímicos dos complexos AMP.

Complexo	E_{pa}/V	E_{pc}/V	$\Delta E_p/V$	$E_{1/2}/V$	I_{pa1}/I_{pc2}
AMP1	1,17	1,07	0,10	1,12	1,38
AMP2	1,39	1,27	0,12	1,33	1,26
AMP3	1,19	0,98	0,21	1,09	1,33
AMP4	1,33	1,23	0,10	1,28	1,29
AMP5	1,09	1,02	0,08	1,02	1,32

O aumento dos potenciais de oxidação dos complexos após a coordenação do ligante mercapto contribui para maior estabilização do rutênio em relação ao precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] ($E_{1/2} = 0,87 V$).⁸⁷ O comportamento está relacionado com as características dos ligantes, a substituição dos ligantes cloridos (π -doador) pelos ligantes mercaptos (π -aceptor) promove uma diminuição da densidade eletrônica do rutênio. O processo de oxidação do metal com potenciais mais anódicos é para os complexos que possuem ligantes mais retiradores de elétrons, e os potenciais menos anódicos são para os complexos que possuem ligantes mais doadores e/ou menos retiradores de elétrons.

Os critérios de reversibilidade para as reações redox dos complexos foram a diferença de potencial (ΔE) e a razão das correntes de pico. Em sistemas eletroquímicos reversíveis em meio orgânico com a transferência de um elétron, a diferença entre os potenciais de oxidação e redução ($\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$) é de 100 mV, bem como não há variação dos potenciais de pico com a velocidade de varredura de potencial. Os valores de diferença de potencial para os complexos foram de 80 à 210 mV. O outro critério foi a razão da corrente de pico anódico e catódico ($|I_{pa}/I_{pc}|$) igual à uma unidade, em sistemas eletroquímicos reversíveis. O processo redox do rutênio nos complexos foram quase-reversível, uma vez que os valores da razão foram 1,26 à 1,38, ou seja, nem todo produto do processo de oxidação gerado próximo a superfície do eletrodo foi totalmente

reduzido na reação eletroquímica inversa, gerando um pico de redução assimétrico ao pico da oxidação.

Os complexos análogos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6^{65}$ apresentam menor potencial de oxidação do par $\text{Ru}(\text{II})/\text{Ru}(\text{III})$ (1,01-1,04 V *vs.* Ag/AgCl), quando comparados com os respectivos complexos apresentados neste trabalho. Esta diferença é explicada em termos das propriedades σ -doadoras e π -acceptor dos ligantes bipy e dphppy. O maior E° ($\text{Ru}^{3+/2+}$) dos complexos **AMP** é atribuído à maior capacidade π -acceptor do ligante dphppy em comparação com o ligante bipy, devido à presença do átomo de fósforo, melhor receptor de elétrons que o nitrogênio.

A técnica de espectroscopia de absorção na região UV-Vis foi realizada com o intuito de avaliar os tipos de transições eletrônicas existentes nos complexos. Os espectros eletrônicos de absorção na região UV-Vis obtidos a partir de soluções dos complexos **AMP** em dimetilsulfóxido apresentam perfis semelhantes. Em geral, os espectros dos complexos (FIGURA A33, no Apêndice – Parte IV) apresentam uma banda de absorção centrada em 262 nm de alto valor de absorvidade molar (TABELA A8, no Apêndice – Parte IV), referente às transições eletrônicas intraligantes ($\pi \rightarrow \pi^*$) dos anéis aromáticos dos ligantes fosfínicos. A banda na região do ultravioleta dos espectros de 300-310 nm é referente à sobreposição das transições eletrônicas intraligantes ($\pi \rightarrow \pi^*$) dos ligantes fosfínicos, mercapto e anel piridínico da dphppy. As bandas de transferência de carga metal-ligante (MLCT) do tipo $d\pi\text{Ru} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi$ (bifosfina) e $d\pi\text{Ru} \rightarrow \pi^*(\text{grupo Npy e NS})$ foram observadas na região de 350-370 nm. Já é descrito na literatura que os complexos de rutênio com ligantes N-heterocíclicos, apresentam bandas de absorção referentes às transferências de elétrons dos orbitais $d\pi$ do metal para os orbitais de simetria e energia apropriada dos ligantes.^{58,62}

A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho também foi empregada como uma técnica complementar na

caracterização dos complexos no estado sólido. As atribuições foram realizadas por meio de comparações dos espectros dos ligantes livres e precursor, e dados da literatura. O espectro de absorção na região do infravermelho do complexo está apresentado na seção Apêndice (FIGURA A34, na Parte IV). A TABELA 4.5 apresenta as tentativas de atribuição das principais bandas vibracionais dos complexos AMP.

TABELA 4.5- Tentativa de atribuição das principais frequências vibracionais características nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos AMP, em KBr.

Atribuições	Frequência Vibracional (cm ⁻¹)				
	Compostos				
	AMP1	AMP2	AMP3	AMP4	AMP5
ν NH ₂			3617		3460
ν CH (ϕ)	3072	3071	3071	3059	3059
ν C=O			1705		
ν C=C py	1585	1588	1585	1583	1584
ν C=N	1433	1435	1433	1433	1433
ν C=C(ϕ)	1420	1413	1408	-	1409
ν COOH			1369		
ν C—S	1268	1273	1265	1257	1253
β C—H (ϕ)	1159	1159	1152	1160	1160
ν C—S	1136	1132	1135	1136	1130
q	1093	1095	1092	1094	1091
ν anel	1001	999	1001	1001	999
ν PF ₆	840	837	845	839	847
ν PF ₆	558	557	561	558	558
ν Ru—P	527	527	527	527	527
ν P—C (ϕ)	518	519	519	519	519
y	508	507	507	508	507
ν Ru—S	464	563	461	461	462
ν Ru—N	413	413	420	420	424

ν = designa uma vibração de estiramento; β = designa uma vibração de deformação no plano; q= estiramentos dos átomos carbono e hidrogênio com

contribuições dos P-fenil; γ = as deformações angulares dos átomos carbono e hidrogênio com contribuições dos P-fenil; (ϕ)= anel fenílico.

Os espectros dos complexos da série **AMP** são similares aos complexos análogos já descritos na literatura. O que se observa para os espectros dos compostos quando comparados aos dos respectivos ligantes mercaptos livres, é a ausência das bandas alargadas atribuídas aos estiramentos ν S—H e ν N—H nas regiões de 2500–2400 cm^{-1} e 3400–3100 cm^{-1} , respectivamente. Tais observações indicam a natureza aniônica dos ligantes mercaptos após na coordenação ao centro metálico. As bandas de alta intensidade em torno de 840 e 557 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais de estiramento e flexão, respectivamente, das ligações P—F do anión hexafluorofosfato (PF_6^-).

Os ligantes piridinotióis apresentam modos vibracionais característicos na região do infravermelho. As principais bandas são correlacionadas aos estiramentos das ligações C=N e C—S no tautômero tiol e os estiramentos C=S e C—N atribuídos ao tautômero tiona.^{115–117} No estado sólido os ligantes livres encontram-se preferencialmente na forma tiona, cujos modos vibracionais característicos são observados na região de 1600-700 cm^{-1} . As principais bandas correspondentes aos ligantes após a coordenação são nas faixas de 1570-1395 cm^{-1} (ν C-N), 1420-1260 cm^{-1} (ν C-N e ν C=S), entre 1140-940 cm^{-1} (ν C-N + ν C=S).^{58,62} De modo geral, as bandas referentes à ligação CS apresentaram deslocamentos para regiões de menores energias em relação aos ligantes livres. Tal fato é característico da diminuição do caráter de dupla ligação C=S. Como discutido anteriormente, estas observações corroboram com as variações dos comprimentos de ligação do sistema S2—C2—N1 observadas nas estruturas de raios X dos complexos.

As bandas de absorção nos espectros atribuídas aos sistemas aromáticos dos ligantes fosfínicos dppb e dphppy foram comuns para todos os

espectros dos compostos. Entre 1600-1300 cm^{-1} estão os estiramentos vibracionais de C=N e C=C dos grupos aromáticos. Na faixa entre 3100-2850 cm^{-1} têm-se as bandas largas de média e baixa intensidade características dos estiramentos C—H alifáticos e aromáticos dos ligantes fosfínicos, além dos ligantes mercapto. Na região de maior energia, observaram-se as deformações angulares no plano e fora do plano das ligações C—H. De acordo com relatos descritos por Von Poelhsitz¹¹⁸, há também os modos vibracionais dependentes da natureza dos substituintes dos anéis fosfínicos, no caso fósforo, envolvendo estiramentos dos átomos carbono e hidrogênio com contribuições dos P-fenil (nomeados modos **q**, **r** e **t**), bem como as deformações angulares de tais átomos (nomeados modo **y**).

Em torno do centro metálico, destacam-se as bandas pouco intensas na região de 527 cm^{-1} e 413-424 cm^{-1} , referentes aos estiramentos Ru—P e Ru—N, respectivamente. A banda referente ao estiramento Ru—S foi atribuída na faixa 461-464 cm^{-1} , porém a confiabilidade da atribuição é relativa devido às sobreposições dos modos vibracionais nesta região.^{58,62}

4.1.1 - Estabilidade dos complexos AMP

A estabilidade dos complexos nas soluções aquosas empregadas nos ensaios de interação com biomoléculas e de viabilidade celular foi investigada com a finalidade de determinar possíveis modificações estruturais dos compostos no meio biológico. Os complexos são insolúveis nestes meios aquosos, contudo são solúveis em misturas de DMSO/meio aquoso em concentrações de $\mu\text{mol L}^{-1}$. O problema é contornado pela solubilização dos compostos em DMSO e, posterior, diluição no meio aquoso.

Os estudos de estabilidade dos complexos foram realizados por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ durante 60 horas (tempo superior aos utilizados nos estudos), nos seguintes meios e solventes: DMSO; DMSO/tampão Trisma-HCl (estudos de interação com biomoléculas) e DMSO/meio de cultura celular DMEM (do

inglês, “Dulbecco's Modified Eagle's médium”). Em ambos casos, a concentração dos complexos foi de aproximadamente 1,75 mM, e a proporção de DMSO e solução aquosa foi de 40:60 (v/v). Os sinais nos espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos compostos **AMP** (FIGURAS A30 e A31, no Apêndice – Parte I) em DMSO/meio de cultura DMEM (60:40, v/v) após 60 h permaneceram inalterados comparados aos das soluções recém preparadas, bem como para as demais soluções. Os resultados indicaram que os complexos são estruturalmente estáveis nas condições testadas.

4.1.2 - Ensaios de viabilidade celular dos complexos

Os ensaios de citotoxicidade dos complexos **AMP** foram realizados frente às linhagens celulares derivadas de tumores humanos, MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano de fenótipo mesenquimal) e A549 (adenocarcinoma epitelial alveolar de células basais de pulmão humano) e, frente às linhagens celulares humanas não tumorais derivadas de pulmão MCR-5 e de mama MCF-10A. Os valores de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular) em 48 h estão apresentados na TABELA 4.6.

A coordenação dos ligantes mercaptos proporcionou compostos mais citotóxicos em todas as linhagens celulares, exceto o **AMP3** na MRC-5, quando comparados com o complexo precursor e aos ligantes livres. Os ligantes mercaptos não apresentaram atividades citotóxicas frente às diferentes linhagens histológicas avaliadas, que possibilitaram a determinação dos valores de IC_{50} em concentrações de até 100 μM . Os complexos **AMP** apresentaram excelentes atividades citotóxicas nas linhagens tumorais, os quais são consideravelmente mais citotóxicos que o fármaco de referência, cisplatina. Na linhagem tumoral de pulmão A549, os valores de IC_{50} dos complexos foram de 120 a 5 vezes menores em comparação ao valor da cisplatina. Para a linhagem tumoral de mama, o valor de IC_{50} da cisplatina foi 24 a 2 vezes maior em relação aos valores dos complexos **AMP**.

TABELA 4.6- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em 48 h dos complexos AMP em diferentes linhagens histológicas de células e índices de seletividade.

Complexos	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e índices de seletividade (IS)					
	Linhagens celulares de mama			Linhagens celulares de pulmão		
	Tumoral MDA-MB- 231	Não tumoral MCF-10A	IS <u>MCF-10A</u> MDA-MB-231	Tumoral A549	Não-tumoral MRC-5	IS <u>MRC-5</u> A549
AMP1	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,05	3,5	0,14 ± 0,02	0,51 ± 0,02	3,8
AMP2	0,17 ± 0,01	0,30 ± 0,05	1,8	0,23 ± 0,03	0,99 ± 0,11	4,3
AMP3	0,98 ± 0,02	2,14 ± 0,30	2,2	2,59 ± 0,19	17,44 ± 1,95	6,7
AMP4	0,14 ± 0,01	0,42 ± 0,02	3,0	0,12 ± 0,01	0,88 ± 0,05	7,1
AMP5	0,36 ± 0,03	0,58 ± 0,02	1,6	1,78 ± 0,67	3,73 ± 0,15	2,1
Precursor	3,51 ± 0,56	4,07 ± 0,28	1,1	9,76 ± 1,57	5,20 ± 0,67	0,5
Cisplatina	2,44 ± 0,20	23,90 ± 0,70	9,8	14,42 ± 1,45	29,09 ± 0,78	2,1

^aDados estão expressados como média ± SD (n= 3) com intervalo de confiança de 95%; Para os ligantes livres, $IC_{50} > 50$ μM ; Ensaio com 48 h de incubação dos compostos; $IS = IC_{50(\text{MCF-10A})} / IC_{50(\text{MDA-MB-231})}$; $IS = IC_{50(\text{MRC-5})} / IC_{50(\text{A459})}$.

Independente da linhagem celular tumoral, a atividade citotóxica dos complexos segue um padrão, $AMP1 \approx AMP2 \approx AMP4 > AMP5 > AMP3 > precursor$. De forma geral, é possível dividir os complexos em dois grupos a partir dos valores de IC_{50} : (I) O primeiro grupo formado pelos complexos **AMP1**, **AMP2** e **AMP4** apresentam uma elevada atividade citotóxica, com uma baixa diferença estatística entre os valores de IC_{50} entre si; (II) O segundo grupo formado pelos complexos **AMP3** e **AMP5** com atividade citotóxica sistematicamente menor do que o primeiro grupo de complexos (FIGURA 4.14).

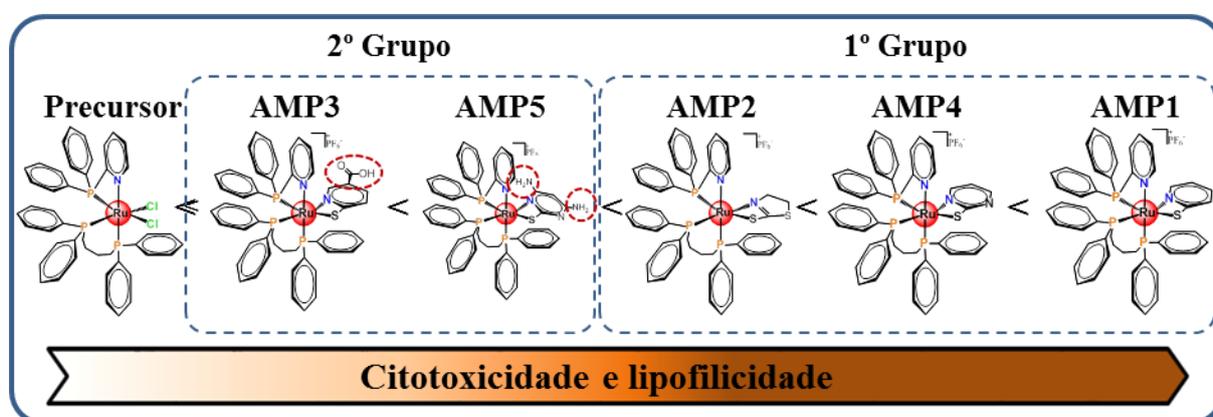


FIGURA 4.14- Classificação dos complexos **AMP** em grupos de acordo com a atividade citotóxica frente às linhagens celulares tumorais.

Os complexos do primeiro grupo **AMP1**, **AMP2** e **AMP4** de elevada atividade citotóxica frente às linhagens tumorais tem em seus cernes os respectivos ligantes mercaptopiridina, mercaptotiazolina e mercaptopirimidina. Analisando em termos dos ligantes mercaptos, eles não possuem grupos substituintes ligados ao anel, apenas átomos substituintes nos anéis. Essa tendência do primeiro grupo também é observada para os complexos fosfínicos de rutênio com ligantes mercaptos com apenas grupos hidrofóbicos ligados ao anel, tal como 2-mercaptopiridina e 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina.

Por outro lado, o segundo grupo composto pelos complexos **AMP3** e **AMP5** contendo os ligantes 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico e

4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, respectivamente, apresentou menor atividade citotóxica em comparação aos complexos do primeiro grupo. Em comum, os complexos possuem grupos funcionais amins e ácido carboxílico ligados ao anel mercapto. Estes grupos substituintes hidrofílicos se caracterizam por realizarem ligações de hidrogênio, que podem modular as interações intermoleculares do composto no meio intracelular. Mesmo que os complexos fosfínicos exibem uma característica predominantemente hidrofóbica, os grupos hidrofílicos conferem uma região hidrofílica ao composto. Outros trabalhos com complexos fosfínicos de Ru(II) com os ligantes mercaptos derivados de 2'-tiouracil ou mercapto-quinazolina, cujos ligantes apresentam o grupo amida cíclica, apresentam a mesma tendência na atividade citotóxica frente às linhagens tumorais do segundo grupo.

De fato, novos ensaios deverão ser realizados para averiguar com clareza a influência dos substituintes ligados ao anel dos ligantes mercaptos e, principalmente, quais propriedades estes substituintes têm a capacidade de modular e influenciar na atividade citotóxica dos compostos. A hipótese sugerida é referente ao caráter lipofílico/hidrofílico, o que influencia na difusão passiva dos complexos para o meio intracelular, bem como na intensificação das interações hidrofóbicas intracelular. Porém, reafirma-se que muito a se realizar a fim de comprovar tal hipótese ou sugerir uma nova.

Um dos parâmetros que podem ser correlacionados aos resultados de citotoxicidade é a lipofilicidade dos compostos (TABELA 4.7). O coeficiente de partição em n-octanol/meio aquoso é a medida quantitativa da lipofilicidade, essencial no desenvolvimento de compostos para aplicações biológicas, pois está relacionado a processos de distribuição, absorção entre outros, no meio biológico.^{119,120} Os valores positivos dos coeficientes de distribuição mostram que os complexos **AMP** têm maior afinidade pela fase orgânica em relação à fase aquosa. Este método é comumente utilizado para estimar a facilidade de um composto permear as membranas plasmáticas constituídas de uma bicamada

lipídica por difusão passiva. Os resultados dos coeficientes de distribuição sugerem que os complexos **AMP** são permeáveis pela membrana plasmática por difusão passiva, devido à natureza lipofílica dos compostos.

TABELA 4.7- Lipofilicidade dos complexos **AMP**.

Composto		Lipofilicidade ^a
[Ru(pyS)(dphppy)(dppb)]PF ₆	(AMP1)	(1,34 ± 0,28)
[Ru(tzdt)(dphppy)(dppb)]PF ₆	(AMP2)	(1,14 ± 0,22)
[Ru(mpca)(dphppy)(dppb)]PF ₆	(AMP3)	(0,88 ± 0,14)
[Ru(pySm)(dphppy)(dppb)]PF ₆	(AMP4)	(1,21 ± 0,10)
[Ru(damc)(dphppy)(dppb)]PF ₆	(AMP5)	(0,72 ± 0,19)

^aCoefficiente de distribuição em água e n-octanol.

A partir dos valores de coeficiente de distribuição em água e n-octanol (5% DMSO) é possível correlacionar com a citotoxicidade, de maneira que os complexos **AMP1** (1,34 ± 0,28), **AMP2** (1,14 ± 0,22) e **AMP4** (1,21 ± 0,10) com maior atividade citotóxica frente aos diferentes tipos histológicos de células cancerosas, também apresentam maior lipofilicidade e, conseqüentemente, permeabilidade na membrana celular, quando comparados aos complexos **AMP3** (0,88 ± 0,14) e **AMP5** (0,72 ± 0,19). Uma hipótese é que os grupos substituintes aminas e ácido carboxílico proporcionam um menor caráter lipofílico aos complexos em comparação aos demais complexos. Este caráter, pode tanto diminuir a entrada ou acúmulo dos complexos nas células, quanto inibir interações hidrofóbicas com biomoléculas.

Um dos principais fatores analisados para a triagem dos complexos é a seletividade, que está relacionada com a habilidade do complexo ser mais ativo frente às células tumorais, quando comparada às células não tumorais. Os complexos são seletivos as linhagens tumorais MDA-MB-231 e A549 em relação às respectivas linhagens não tumorais MCF-10A e MRC-5. Importante destacar, que todos os compostos são mais seletivos para a linhagem tumoral de

pulmão do que a cisplatina. Em especial, ressalta-se o composto **AMP4**, com valor de $IS_{(MRC-5/A549)}$ em torno de 3,5 vezes maior do que o composto cisplatina. Diferentemente da atividade citotóxica, para a seletividade dos complexos frente às células tumorais não foi observada nenhuma tendência, que possa ser racionalizada.

No intuito de buscar uma correlação da atividade citotóxica dos diferentes complexos fosfínicos de rutênio contendo ligantes mercaptos sintetizados no laboratório LERCI, os valores de IC_{50} e IS dos compostos frente às linhagens tumorais de mama (TABELA 4.8) e pulmão (TABELA 4.9) foram sistematizados. De modo geral, todos os complexos apresentam alta citotoxicidade frente às linhagens tumorais citadas.^{46,60,61,64,65}

Para as linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) e pulmão (A549), a tendência já reportada anteriormente para a série **AMP** também é observada para as diferentes séries de complexos contendo ligantes mercaptos descritas no LERCI, $[Ru(NS)(bipy)(dppb)]PF_6$,^{61,65} $[Ru(NS)(bipy)(dppf)]PF_6$,⁶⁴ $[Ru(NS)(bipy)(dpphos)]PF_6$, $[Ru(NS)(dppe)_2]PF_6$ ⁶² (onde, $dpphos = bis[(2\text{-difenilfosfino})\text{fenil}]éter$). Para todas as séries citadas, os compostos com os ligantes mercaptopiridina, mercaptotiazolina e mercaptopirimidina apresentam baixos valores de IC_{50} menores que 1 μM . Em contrapartida, diversos complexos do segundo grupo contendo ligantes com grupos funcionais ligados ao anel (mpca, damp e 2mq) apresentam valores de IC_{50} acima de 1 μM , com valor chegando à 11 μM . No entanto há exceções, principalmente para os complexos da série $[Ru(NS)(dppe)_2]PF_6$ que independente do ligante e tipo histológico de células são ativos.

Outro fator a destacar é a tendência de quanto mais grupos fosfínicos no cerne do complexo maior é a atividade citotóxica, o que se justifica pelo maior caráter lipofílico dos mesmos. Comparando os valores de IC_{50} , os compostos **AMP** estão entre os mais citotóxicos em relação aos demais complexos frente às linhagens celulares tumorais de mama (MDA-MB-231) e

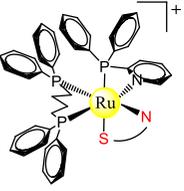
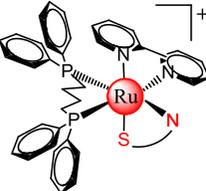
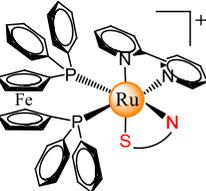
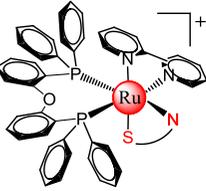
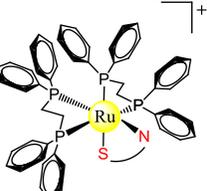
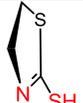
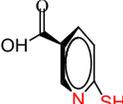
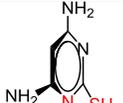
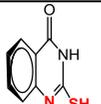
pulmão (A549). Especificamente, quando se compara com seus respectivos análogos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$,^{61,65} os compostos com o ligante fosfínico dphppy apresentam os menores valores de IC_{50} , a destacar, o composto $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ que é 11× mais citotóxico para as células de câncer de mama triplo negativo do que seu correspondente, $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$.⁶⁵ Em alguns casos, os complexos **AMP** são tão citotóxicos quanto os respectivos compostos com duas bifosfinas,⁶² principalmente nas células de mama MDA-MB-231. Porém, quando se compara a citotoxicidade nas células tumorais de pulmão (A549), os compostos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ ^{46,62} se sobressaem.

Ao analisar a seletividade dos compostos pelas células tumorais, não é possível sistematizar as tendências dos valores em termos dos ligantes mercaptos. De maneira predominante, os compostos analisados têm seletividade pelas linhagens tumorais, em especial, a derivada de pulmão. A destacar, os compostos $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ pelos surpreendentes valores de IS de 114 e 19, respectivamente.

TABELA 4.8- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e índices de seletividade (IS) dos complexos sintetizados no LERCI na linhagem celular de câncer de mama.^{46,61-65}

	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (MDA-MB-231) e índices de seletividade (IS)				
	$0,10 \pm 0,01$ 3,3	$0,51 \pm 0,41$ nd	$0,20 \pm 1,42$ Nd	- -	- -
	$0,14 \pm 0,01$ 1,7	$0,82 \pm 0,43$ nd	$0,18 \pm 1,61$ Nd	- -	$0,32 \pm 0,04$ nd
	$0,17 \pm 0,01$ 3,0	$0,20 \pm 0,03$ nd	$0,48 \pm 0,02$ 3,9	$0,10 \pm 0,06$ 6,0	$0,03 \pm 0,01$ nd
	$0,98 \pm 0,02$ 2,2	$10,74 \pm 0,62$ nd	$3,78 \pm 0,18$ 1,6	- -	$1,97 \pm 0,03$ nd
	$0,36 \pm 0,03$ 1,6	$2,02 \pm 0,23$ nd	$1,74 \pm 0,04$ 4,2	$2,18 \pm 0,16$ 1,1	$0,20 \pm 0,02$ nd
	- -	$0,56 \pm 0,02$ nd	$2,02 \pm 0,17$ 1,5	- -	$0,30 \pm 0,03$ nd

TABELA 4.9- Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e índices de seletividade (IS) dos complexos sintetizados no LERCI na linhagem celular de câncer de pulmão.^{46,61-65}

IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (A549) e índices de seletividade (IS)					
					
	$0,14 \pm 0,02$ 3,8	- -	- -	- -	- -
	$0,12 \pm 0,01$ 4,3	$0,22 \pm 0,04$ nd	- -	- -	$0,14 \pm 0,07$ 2,3
	$0,23 \pm 0,03$ 7,1	- -	$0,64 \pm 0,08$ Nd	$0,13 \pm 0,02$ 5,3	$0,12 \pm 0,07$ 6,6
	$2,59 \pm 0,19$ 6,7	$11,74 \pm 0,52$ 1,0	$7,07 \pm 0,63$ Nd	- -	$1,02 \pm 0,09$ 19,2
	$1,78 \pm 0,67$ 2,1	$4,21 \pm 0,58$ 2,0	$5,66 \pm 0,35$ Nd	$0,14 \pm 0,02$ 1,9	$0,89 \pm 0,09$ 2,9
	- -	$3,61 \pm 0,17$ 1,5	$5,62 \pm 1,05$ Nd	- -	$0,05 \pm 0,01$ 114

4.1.3 - Interação dos complexos com albumina de soro humano

A afinidade de ligação à albumina de soro humano (HSA) é uma das principais etapas determinantes na farmacocinética de potenciais fármacos, desempenhando papel importante na distribuição no corpo, atividade farmacológica, toxicidade, eficácia do fármaco entre outros. Outro aspecto relevante é a capacidade de aumentar a solubilidade de drogas hidrofóbicas no plasma. A albumina é considerada o modelo ideal no estudo inicial de interação de compostos com proteína sérica, *in vitro*.^{100,121}

A HSA é uma proteína globular de cadeia polipeptídica simples constituída por 583 resíduos de aminoácidos e contendo três domínios homólogos de hélices, denominados I, II e III, e divididos nos subdomínios A e B, como demonstrado na estrutura cristalina da HSA (FIGURA 4.15-A). Os subdomínios IIA e IIIA, denominados também como sítios Sudlow I e II, respectivamente, são as principais regiões responsáveis pelas interações de compostos à albumina.^{11,100,122}

A HSA tem um fragmento de triptofano, localizado na posição 214 no subdomínio IIA do arcabouço proteico (Sudlow II), conferindo a biomolécula uma fluorescência intrínseca.^{122,123} Neste contexto, a interação dos compostos **AMP** com a proteína HSA foi avaliada pela supressão de fluorescência do fragmento do triptofano. Os espectros de fluorescência da HSA na ausência e presença do composto **AMP1** em diferentes concentrações estão apresentados na FIGURA 4.15-B (os espectros dos demais complexos na FIGURA A35, no Apêndice – Parte V).

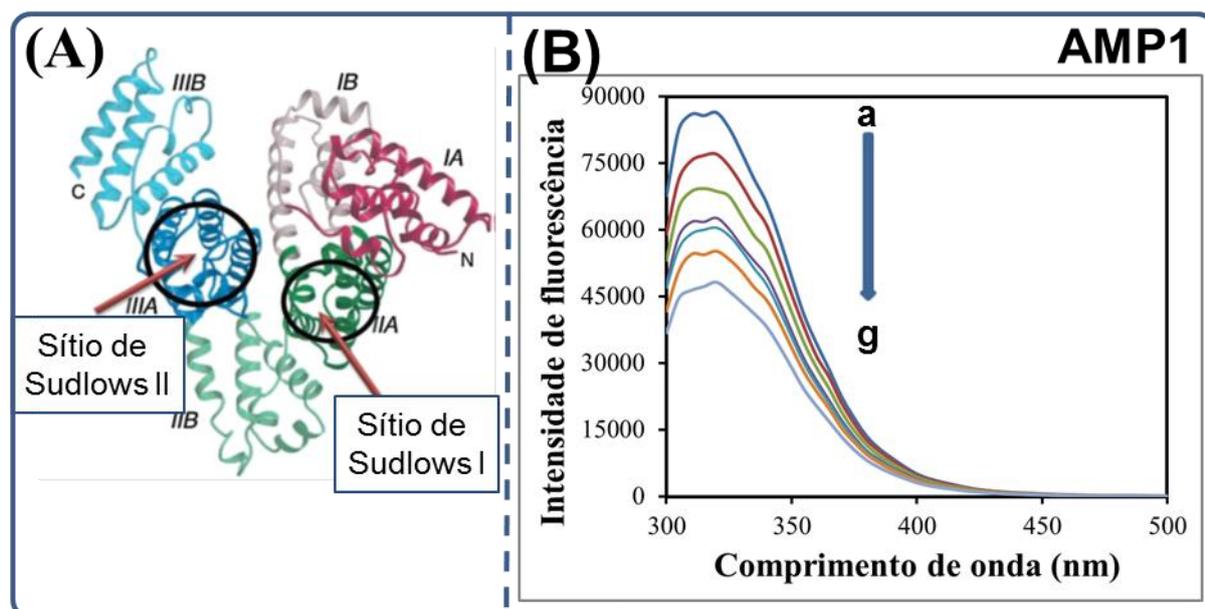


FIGURA 4.15- (A) Estrutura cristalográfica da albumina de soro humana (adaptada¹⁰⁰); (B) Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto **AMP1** (b-g; b= 5 μM ; c= 10 μM ; d= 15 μM ; e= 20 μM ; f= 25 μM e g= 30 μM), com concentração constante da HSA de 5 μM . Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6.

Os resultados apresentados mostram uma supressão da fluorescência da HSA na presença dos compostos **AMP**, sugerindo que a interação entre as espécies causa mudanças conformacionais no microambiente do resíduo do fluoróforo Trp-214. Um decréscimo nas intensidades da fluorescência da HSA foi observado com as quantidades crescentes dos complexos nas soluções, com quedas que variaram de 61 a 38% do valor inicial da fluorescência na maior concentração dos complexos (30 μM).

A supressão da fluorescência da HSA na presença de um supressor ocorre principalmente por meio de dois mecanismos, que são usualmente classificados como processos dinâmico e estático. Os mecanismos foram distinguidos examinando a dependência dos valores de constantes de supressão (K_{sv}) com a temperatura e pela constante de supressão biomolecular (k_q).^{101,124}

A Equação de Stern-Volmer foi aplicada para determinar a constante de K_{sv} pela regressão linear do gráfico (F_0/F) vs [Complexo] (Gráficos nas FIGURAS A36 e A37, no Apêndice – Parte V), enquanto k_q foi calculada a partir dos valores de K_{sv} assumindo $\tau_0 = 6$ ns.¹²⁴ A linearidade dos gráficos de Stern-Volmer sugere o envolvimento de apenas um tipo de mecanismo de supressão. A diminuição nos valores de K_{sv} (TABELA 4.10) com o aumento da temperatura indica o mecanismo de supressão estática. A supressão estática se caracteriza por suprimir a emissão de um fluoróforo a partir da formação de um intermediário fluoróforo-supressor no estado fundamental, assim a única emissão observada é a parte dos fluoróforos não complexada. Na supressão estática, o aumento da temperatura implica em uma diminuição na estabilidade do intermediário fluoróforo-supressor, conseqüentemente um menor efeito de supressão, resultando em diminuição da constante de K_{sv} .^{100,123} O valor máximo da constante de supressão biomolecular (k_q) para a supressão dinâmica de biopolímeros é de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,¹²⁴ os valores da constante k_q determinadas foram maiores para todos complexos. Portanto, os resultados corroboram com o mecanismo de supressão estático.

Os dados de fluorescência foram tratados usando a Equação de Scatchard modificada para determinar a constante de ligação K_{lig} e o número de sítios de ligação da interação entre HSA e os complexos **AMP** (TABELA 4.10). A partir das constantes de ligação, os parâmetros termodinâmicos foram calculados usando a equação termodinâmica de Van't Hoff.¹⁰¹

TABELA 4.10- Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_{lig}), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas.

Temperatura	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	k_q ($\times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$)	K_{lig} ($\times 10^5 M^{-1}$)	n	ΔH° (KJ mol $^{-1}$)	ΔS° (J mol $^{-1} K^{-1}$)	ΔG° (J mol $^{-1} K^{-1}$)
AMP1							
295	2,73 \pm 0,11	8,01 \pm 0,15	0,74 \pm 0,09	1,09	118	487	-(27,7 \pm 0,3)
310	1,79 \pm 0,04	7,88 \pm 0,08	4,52 \pm 0,11				-(32,2 \pm 0,1)
AMP2							
295	3,05 \pm 0,13	5,63 \pm 0,13	4,38 \pm 0,24	1,27	240	914	-(32,2 \pm 0,1)
310	2,86 \pm 0,06	5,47 \pm 0,16	186 \pm 48				-(41,4 \pm 0,7)
AMP3							
295	4,60 \pm 0,08	7,13 \pm 0,07	19,70 \pm 4,83	1,36	161	660	-(35,9 \pm 0,6)
310	3,76 \pm 0,10	7,10 \pm 0,20	242 \pm 33				-(41,5 \pm 2,4)
AMP4							
295	2,39 \pm 0,07	8,01 \pm 0,05	5,45 \pm 0,85	1,30	192	675	-(32,7 \pm 0,4)
310	2,30 \pm 0,01	7,44 \pm 0,18	75,82 \pm 9,36				-(36,5 \pm 4,9)
AMP5							
295	2,74 \pm 0,08	9,44 \pm 0,03	4,89 \pm 1,53	1,26	65,12	753	-(31,5 \pm 1,6)
310	2,49 \pm 0,05	8,57 \pm 0,11	97,83 \pm 2,71				-(39,6 \pm 0,5)

Os valores relativamente altos de K_{lig} sugerem interações moderadas a fortes entre os complexos e a HSA. Os valores de constante de associação aumentaram com acréscimo na temperatura, sugerindo um aumento no tempo de retenção do complexo no interior do arcabouço da proteína. O número de sítios de ligação sugere uma estequiometria de aproximadamente 1:1 entre os complexos de rutênio e a HSA.

Os sinais e magnitudes dos parâmetros termodinâmicos foram analisados para avaliar as principais forças intermoleculares envolvidas na interação entre os compostos e a HSA. Os valores negativos de ΔG revelam que os processos de interação entre todos os compostos e HSA são espontâneos em ambas as temperaturas avaliadas. Os valores positivos de ΔH e ΔS sugerem que as inserções dos complexos na estrutura proteica são determinadas por interações hidrofóbicas. Como sugerido por Ross e Subramanian,¹⁰¹ o aumento da entropia ocorre no processo inicial de aproximação do composto à albumina e nas alterações conformacionais no microambiente do subdomínio IIA, as quais expõem os fragmentos apolares do resíduo da proteína Trp-214 para o solvente. Essas mudanças típicas induzem o rearranjo das moléculas de água em torno do intermediário supressor-proteína formado, maximizando o efeito hidrofóbico na interação complexo-HSA. Esta reorganização do solvente também é favorecida por agentes supressores hidrofóbicos, sendo o caso dos complexos fosfínicos de rutênio.

Os resultados apresentados na TABELA 4.10 indicam que os complexos apresentam uma moderada e alta afinidade pela albumina, viabilizando o transporte e a solubilidade dos compostos **AMP** no plasma humano pela HSA. Entretanto, a alta afinidade de associação também pode limitar a distribuição dos compostos nos tecidos do corpo devido à estabilidade do aduto HSA-complexo formado.

4.1.4 Estudos de interação entre os complexos e DNA

A busca por possíveis alvos biológicos dos complexos metálicos é um importante estudo para desvendar os prováveis mecanismos de ação dos compostos. Esta seção tem como objetivo explorar os possíveis modos de interação entre os complexos **AMP** e o ácido desoxirribonucleico (DNA)^{125,126} e, como consequência, avaliar se a biomolécula é um possível alvo biológico. De acordo com as estruturas e estudos de reatividade realizados com os complexos, temos que alguns tipos de interação com o DNA são improváveis. Os estudos sugerem que os complexos são estáveis, evidenciando que a ligação covalente às bases nitrogenadas do DNA é improvável. Da mesma forma, a interação reversível por intercalação entre os pares de base do DNA não é provável devido à ausência de ligantes planares heterocíclicos. Portanto, as interações mais plausíveis são a eletrostática, entre os complexos catiônicos e os grupos fosfatos do DNA, com o objetivo de minimizar as repulsões de carga-carga, e pelos sulcos do DNA que são baseadas em um conjunto de interações, como forças de Van der Waals, ligação de hidrogênio e, contatos hidrofóbicos e eletrostáticos.¹²⁶

Diversas técnicas foram empregadas para os estudos das interações entre os complexos e o DNA, como medidas de viscosidade do DNA (FIGURA 4.16-A), avaliação da mobilidade eletroforética de plasmídeo em gel de agarose (FIGURA 4.16-B) e estudo por fluorescência do deslocamento do Hoechst do DNA (FIGURA 4.16-C, e FIGURA A38 no Apêndice – Parte V).

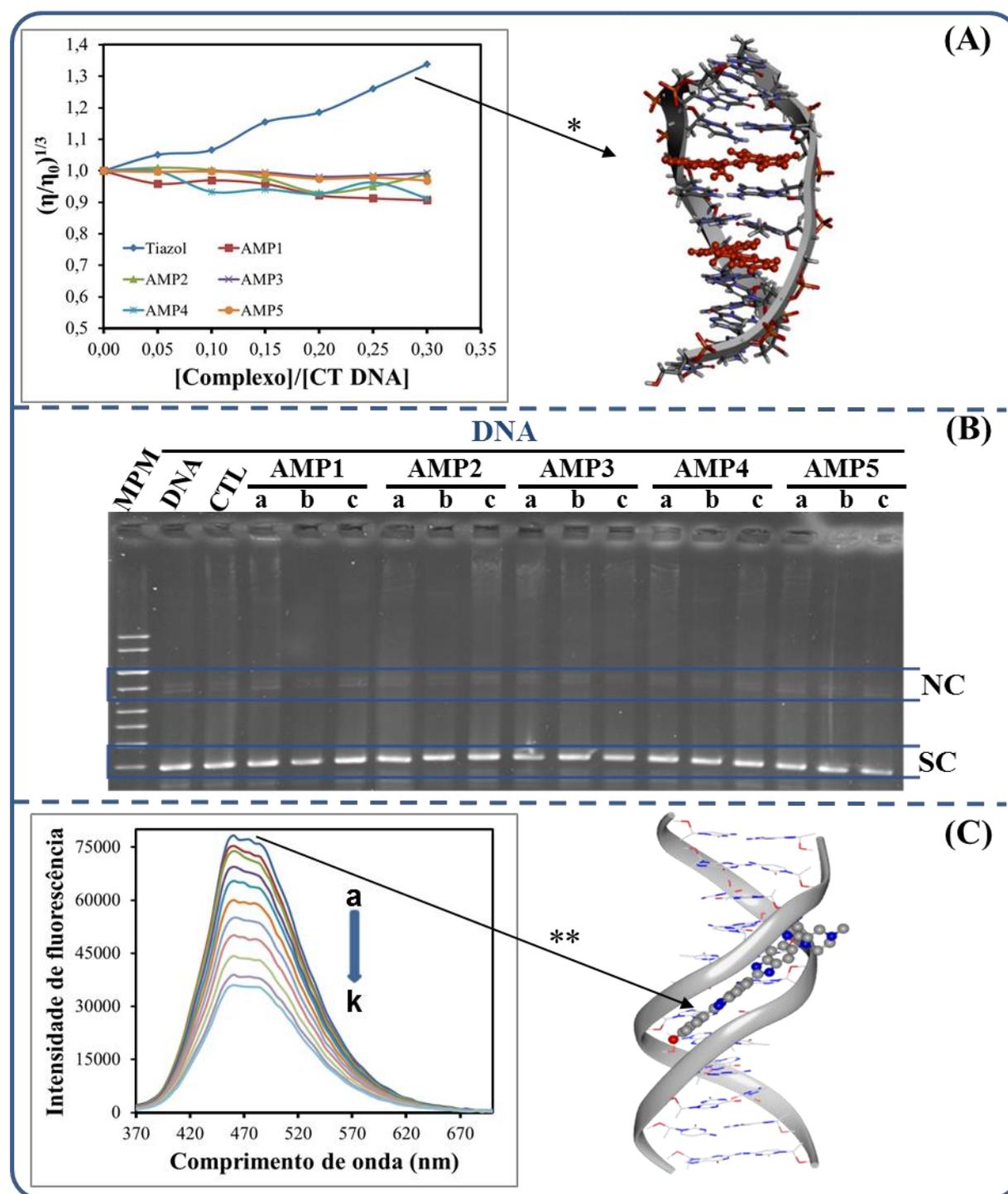


FIGURA 4.16- (A) Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos AMP (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μM) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares $[\text{composto}]/[\text{DNA}] = 0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25$ e $0,30$, com concentração constante de CT-DNA de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; *Estrutura cristalina de um fragmento de DNA contendo o tiazol intercalado (adaptada)⁵¹; (B) Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 ($46 \mu\text{M}$) na ausência e

presença dos complexos (0,0; 11,5; 23,0 e 46 μM), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] (a=0,25; b= 0,50 e c=1,00); MPM - Marcador de peso molecular; DNA- Controle negativo (em tampão Trisma-HCl); CTL- Controle negativo (10% DMSO); (C) Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos compostos **AMP** (b-k; b= 7,5 μM ; c= 15 μM ; d= 22,5 μM ; e= 30,0 μM ; f= 37,5 μM ; g= 45 μM ; h= 52,5 μM ; i= 60 μM ; j= 67,5 e k= 75,0), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM , respectivamente. Razão [Complexo]/[DNA-Hoechst]= 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0. Comprimento de onda de excitação a 340 nm, em tampão Trisma-HCl. **Estrutura cristalina de um fragmento de DNA inserido o Hoechst no sulco menor do DNA (adaptada)⁵¹.

4.1.4.1 - Estudo de medidas de viscosidade

A viscosidade é uma propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao fluxo de escoamento, podendo ser estimada aferindo o tempo para que uma determinada quantidade de fluido passe através de um volume conhecido.⁹⁸ A viscosidade fornece uma medida do volume hidrodinâmico efetivo do DNA em solução, o qual é dependente tanto do tamanho quanto da conformação da biomolécula em solução, que por sua vez, é extremamente sensível à interação com o meio. Por isso, as medições hidrodinâmicas são consideradas como um dos testes menos ambíguo e mais crítico do modo de interação entre complexos e o CT-DNA em solução.¹²⁶

As medidas de viscosidade foram realizadas das soluções de CT-DNA na ausência e presença dos complexos **AMP** em diferentes razões molares complexo/DNA (FIGURA 4.16-A). A viscosidade do CT-DNA na presença de um ligante intercalador¹²⁷, tal como tiazol laranja, exhibe um acréscimo acentuado. A inserção do agente intercalador entre os pares de bases nitrogenadas resulta no alongamento da dupla hélice nos locais da intercalação, tendo como consequência o aumento do volume da biomolécula.^{127,128} Em

contraste, a ligação covalente implica em torções significativas e diminuição do comprimento axial da dupla hélice do DNA, ocasionando uma drástica diminuição na viscosidade.¹²⁹

A viscosidade do CT-DNA após a adição dos complexos **AMP** não apresentou alterações significativas nas razões complexo/DNA analisadas, sugerindo que não há modificações drásticas na estrutura secundária do CT-DNA. Além disso, o comportamento é distinto dos modos de ligação citados anteriormente. Tal resultado aponta que as interações entre os complexos **AMP** e DNA são reversíveis e fracas, sendo provavelmente entre os sulcos do DNA e/ou eletrostática.

4.1.4.2 Estudo de mobilidade eletroforética de plasmídeo em gel de agarose

O princípio da análise do DNA por eletroforese baseia-se no fato da biomolécula possuir carga negativa, e conseqüentemente, quando submetida a um campo elétrico em uma matriz de gel, migra em direção ao polo positivo. A velocidade de migração do DNA através do gel depende do tamanho, carga e conformação adotada pelos fragmentos de DNA, por isso os diferentes fragmentos são separados na matriz.^{130,131}

Os plasmídeos são excelentes modelos para os estudos de mobilidade do DNA, haja vista os pequenos fragmentos de DNA de tamanho variável, de poucos a mais de cem mil pares de bases. O plasmídeo pode adotar diferentes conformação de diferentes mobilidade eletroforética, a depender das quebras das fitas do DNA. O DNA plasmidial sem clivagem na fita dupla adota a conformação superenrolada (SC) com migração relativamente rápida. A ruptura de uma fita do DNA superenrolado gera uma forma mais relaxada, a conformação circular (NC), de movimento eletroforético mais lento em comparação a conformação SC. Finalmente, a clivagem de ambas as fitas de DNA gera uma conformação linear (LC), que exhibe migração entre as conformações superenovelada e circular. As conformações do plasmídeo citadas

apresentam mobilidades eletroforética distintas (NC < LC < SC) que possibilita a separação das formas quando submetidas à diferença de potencial em uma matriz gel.¹³⁰

A capacidade dos complexos em alterar as conformações do DNA plasmidial foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (FIGURA 4.16-B). O plasmídeo pBR322 em tampão Trisma-HCl submetido à corrida eletroforética (DNA, linha 2) exibiu as conformações circular (NC) e superenovelada (SC). No controle negativo (CTL, linha 3), o DNA plasmidial em tampão Trisma-HCl com 10% de DMSO também apresentou as bandas das conformações NC e SC. As amostras de plasmídeo tratadas com diferentes concentrações dos complexos **AMP** (linhas 3-18) apresentaram mobilidades eletroforéticas semelhantes do controle (Linha 3). Tais resultados sugerem que os complexos não causam torções, relaxamento ou mudanças conformacionais significativas na estrutura terciária do DNA, que sejam capazes de alterar a taxa de migração do plasmídeo.

4.1.4.3 - Estudo por fluorescência do deslocamento do Hoechst do DNA

O Hoechst livre, utilizado como sonda fluorescente do DNA, apresenta uma emissão máxima em 460 nm de baixo rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 340 nm. Entretanto, o complexo DNA-Hoechst formado após a ligação do composto ao sulco menor do DNA em regiões ricas em pares de base adenina-timina, exibe um rendimento quântico de fluorescência elevado quando comparado ao corante livre, resultante da supressão do relaxamento rotacional e proteção de colisões com moléculas do solvente. O complexo DNA-Hoechst exibe um amplo espectro de emissão, com máximo de emissão em 460 nm, quando excitado em 340 nm.^{132,133}

Para avaliar se os complexos **AMP** interagem no sulco menor do DNA ou em regiões próximas, foi realizado o ensaio de deslocamento do Hoechst 33324 do sulco menor do CT-DNA por meio da supressão da

fluorescência do composto DNA-Hoechst. A espécie biomolecular foi excitada em 340 nm, e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa de 370 a 700 nm.

Os complexos **AMP** atuaram como agentes supressores da fluorescência do complexo DNA-Hoechst, tendo como consequência um decréscimo nas intensidades da fluorescência com as quantidades crescentes dos complexos **AMP** nas soluções. Na maior concentração, o complexo **AMP1** levou a uma queda na intensidade de emissão de 39% do valor inicial (FIGURA 4.16-C), os demais complexos apresentaram comportamento similar, com decréscimo de 39% a 58% (FIGURA A38, no Apêndice – Parte V). A supressão da fluorescência indica que os compostos têm a habilidade, via ação direta ou mesmo por pequenas alterações em torno do sulco menor, de deslocar o Hoechst do sulco menor do DNA. É reconhecida a capacidade dos compostos de rutênio de interagir com DNA via sulco menor.^{134,135} Outros complexos fosfínicos de rutênio em concentrações menores, tais como [Ru(OS)(bipy)(dppm)]PF₆, são responsáveis por suprimir em até 90% da fluorescência inicial.^{50,136}

4.1.4.4 - Considerações finais dos estudos de interação com DNA

Diante do exposto, pode-se sugerir que o “gatilho” para a morte celular não envolve a “atuação direta” dos complexos ao DNA, ou seja, a biomolécula não é um alvo primário dos complexos **AMP**. Os resultados de mobilidade eletroforética do DNA plasmidial na presença dos complexos **AMP** em gel agarose convergem com os ensaios realizados com o CT-DNA por viscosidade e deslocamento do Hoechst. Os complexos **AMP** não causam alterações nas estruturas secundária e terciária do DNA, sugerindo interações reversíveis e fracas via sulco menor do DNA. Como descrito por Pages *et. al*¹²⁵ e Kellett *et. al*¹²⁶, as interações nos sulcos do DNA são baseadas em um conjunto de interações intermoleculares na contribuição da estabilização das mesmas,

como interações hidrofóbicas, eletrostáticas, de Van der Waals e ligação de hidrogênio, sendo condizentes com as características estruturais dos complexos. Por fim, aponta-se que as diferenças entre os ligantes mercaptos não influenciam diretamente nas interações. Em geral, os complexos fosfínicos contendo ligantes mercaptos reportados apresentam comportamento semelhante aos dos complexos AMP.^{46,62-64}

4.1.5 - Inibição da atividade enzimática da Topoisomerase IB

A inibição da atividade enzimática da topoisomerase IB pelos complexos foi avaliada mediante o ensaio de relaxamento do DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Inicialmente, os compostos também foram incubados com o DNA superenovelado, sem a presença da enzima TopIB, cujas mobilidades eletroforéticas dos fragmentos não foram alteradas na presença dos compostos.

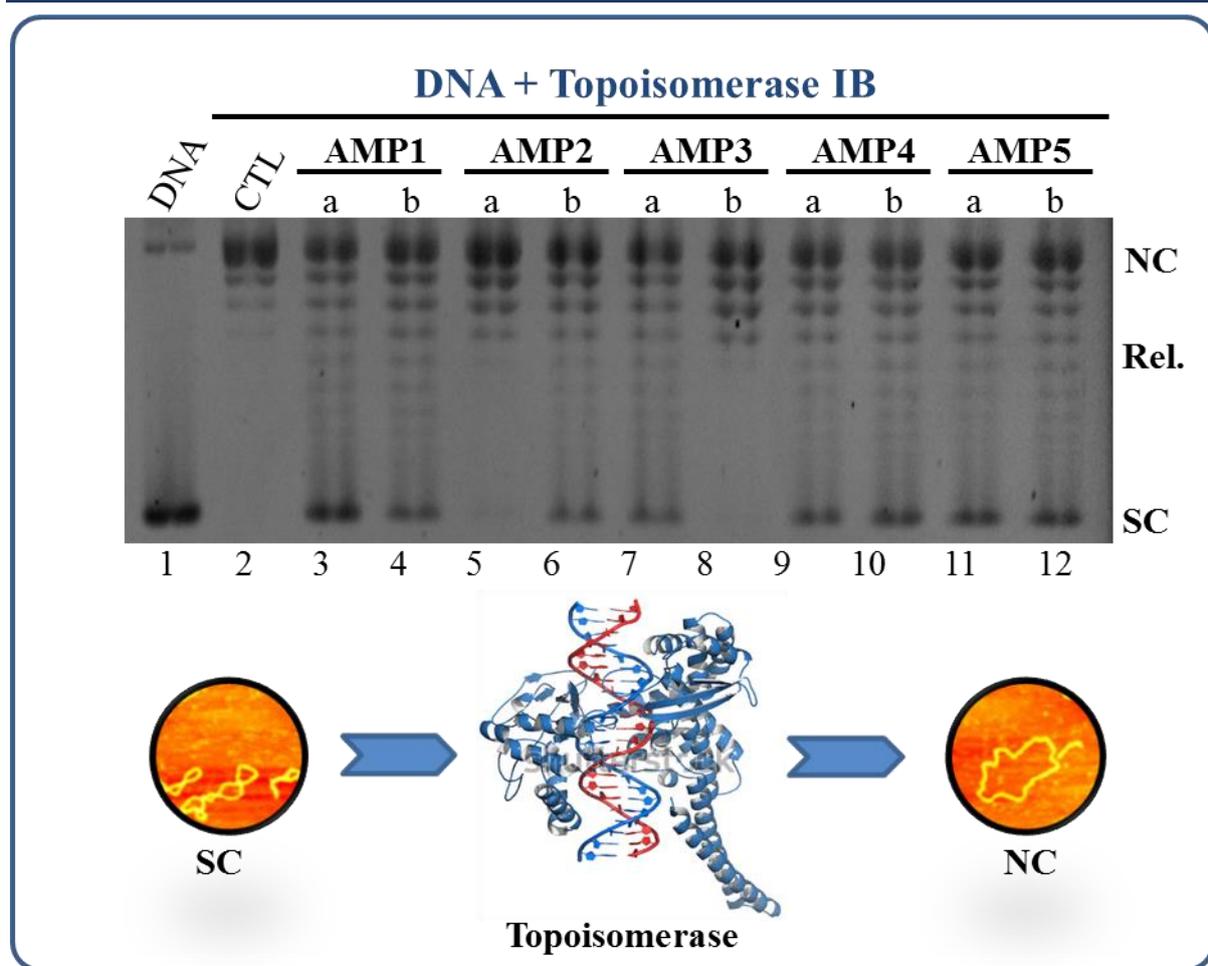


FIGURA 4.17- Ensaio de relaxamento do DNA plasmidial superenovelado por Topo-IB na ausência (CTL) e presença de diferentes concentrações dos complexos AMP (a=0,5 e b= 5,0 μ M); DNA- DNA plasmidial em tampão Trisma-HCl em 3% DMSO. Estrutura cristalina da topoisomerase com um fragmento de DNA (adaptada).

No controle negativo, FIGURA 4.17 (linha 1), observou-se majoritariamente a banda de migração do DNA superenovelada (SC), enquanto no controle positivo (CTL; linha 2) encontra-se o ácido nucleico sobre efeito da ação enzimática da Topo-IB. O processo de relaxação do DNA superenovelado gera diversos produtos com padrões de migração mais lentos em relação ao inicial. A ausência da banda do DNA superenovelado no controle positivo confirma que a enzima está desempenhando sua função catalítica corretamente.

As amostras de DNA plasmidial tratadas com a topoisomerase e os complexos **AMP1**, **AMP4** e **AMP5**, na concentração de 0,5 μM , apresentaram um padrão de migração semelhante tanto do controle negativo (linha 1) quanto do controle positivo (linha 2). Tais resultados demonstram que em baixas concentrações, estes complexos inibem parcialmente a atividade da Topo-IB no relaxamento do plasmídeo. Em contrapartida, os complexos **AMP2** e **AMP3**, na concentração de 0,5 μM , foram ineficazes e não inibiram a ação da Topo-IB, com padrão de migração do DNA plasmidial similar ao encontrado para o controle positivo. Contudo, todos os complexos, na concentração de 5 μM , inibiram parcialmente a atividade catalítica da Topo-IB. A inibição da enzima se mostrou de maneira dose dependente das concentrações dos complexos. Em ensaios já reportados, os ligantes mercaptos não apresentam efeitos inibitórios sobre a enzima topoisomerase IB, nas concentrações analisadas.^{63,65,66} A ação dos complexos pode ser diretamente sobre a enzima e/ou complexo Topo_DNA. Faz-se necessário ensaios adicionais para compreender a atuação dos complexos **AMP** no ciclo catalítico da enzima, bem como se a atividade inibitória é observada também no meio celular.

A inibição da enzima de maneira dose dependente também foi observada para os complexos análogos com a bipyridina, $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$. De fato, em baixas concentrações a inibição parcial da enzima foi observada, comportamento similar ao verificado para os compostos **AMP**. Em relação à inibição total da enzima, foi constatada apenas para os complexos com os ligantes 2-mercaptopiridina, 2-mercaptotizolina e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, entretanto em concentrações elevadas, acima de 25 μM .^{63,65,66}

A topoisomerase é superexpressada em células tumorais e o processo de relaxação do DNA superenovelado desempenhado pela Topo-IB na manutenção e replicação do DNA é essencial para proliferação celular.^{69,70} A inibição da enzima, mesmo de forma parcial em estudos *in vitro*, em ação direta

pelos complexos fornece indícios que a enzima Topo-IB pode ser considerada como um dos possíveis alvos biológicos. Uma vez que, o interrompimento da ação desta enzima pode desencadear a apoptose celular.

4.1.6 - Estudos de inibição do sistema de proteassomo

Para avaliar uma possível interação direta entre a unidade 20S do proteassomo e os complexos **AMP2**, **AMP4** e **AMP5** (FIGURA 4.18-B), a inibição da atividade catalítica do proteassomo 20S purificado foi realizada por quantificação de fluorescência emitida pela hidrólise do substrato fluorogênico Suc-LLVY-AMC, específico da atividade da quimiotripsina-like.^{137,138} A partir da análise dos resultados, o complexo **AMP2** não demonstrou efeito de inibição da atividade quimiotripsina do proteassomo 20S. Em contrapartida, as amostras de proteassomo 20S tratadas com os complexos **AMP4** e **AMP5** exibiram uma atividade catalítica de apenas 29% e 9%, respectivamente. Portanto, a inibição da atividade proteassomal da unidade 20S foi de 71% (**AMP4**) e 91% (**AMP5**) em relação ao controle positivo. Os resultados de inibição quimiotripsina-like indicam que estes compostos interagem diretamente com a unidade 20S. No controle positivo, empregando o composto MG132, a inibição da atividade proteolítica foi de 95%. O efeito inibitório dos complexos **AMP4** e **AMP5** nas concentrações testadas de 0,9 e 3,7 μM , respectivamente, é comparável ao inibidor clássico, pois ressalta-se que a concentração do composto MG132 (10 μM) é aproximadamente de 10 \times e 2,5 \times maior em comparação aos complexos.

O ensaio mais significativo foi avaliação da inibição do proteassomo em células viáveis *in vitro* pelos complexos. O ensaio consiste no monitoramento da degradação de uma proteína nas células viáveis HEK293T. Para tanto faz-se necessário o uso da Proteína Verde Fluorescente (GFP; do inglês “*Green Fluorescent Protein*”). Quando excitada com luz ultravioleta em 397 ou 495 nm, a proteína GFP emite luz verde em 506 nm. Devido à

fluorescência intrínseca, esta proteína possui diversas aplicações na biologia molecular, porém a mais comum é de marcador molecular em células vivas, a fim de visualizar a localização, movimentação e respostas químicas de proteínas-alvo fusionadas com GFP.

Para a avaliação do sistema ubiquitina-proteassoma que é responsável pela degradação seletiva de diversas proteínas regulatórias, a proteína GFP foi fusionada a seu N-terminal com uma molécula de ubiquitina. Desta maneira, assim que a proteína uGFP (do inglês “*Green Fluorescent Protein ubiquitin*”) é expressa, ela é imediatamente sinalizada e direcionada para a degradação pelo proteassoma via ubiquitina-independente. Os experimentos foram realizados com as células HEK293T (derivadas de rim embrionário humano), as quais são modificadas para expressarem estavelmente a proteína uGFP¹⁰². As células foram transduzidas com vetor retroviral expressando uGFP e este gene foi integrado no genoma das células, constituindo desta forma uma linhagem estável uGFP-HEK293T. A inibição do proteassomo pelos compostos nas células viáveis foi quantificada pela fluorescência emitida pela proteína uGFP acumulada (FIGURA 4.18, D-F) por citometria de fluxo.

. As concentrações dos compostos **AMP2** (1,0 μM), **AMP4** (0,9 μM), **AMP5** (3,7 μM) e MG132 (10 μM ; controle positivo), empregadas não são citotóxicas para células HEK293T nos devidos tempos, o que garantiu a viabilidade das células para o experimento. As concentrações estipuladas também foram as utilizadas nos ensaios de inibição da atividade do proteassomo 20S.

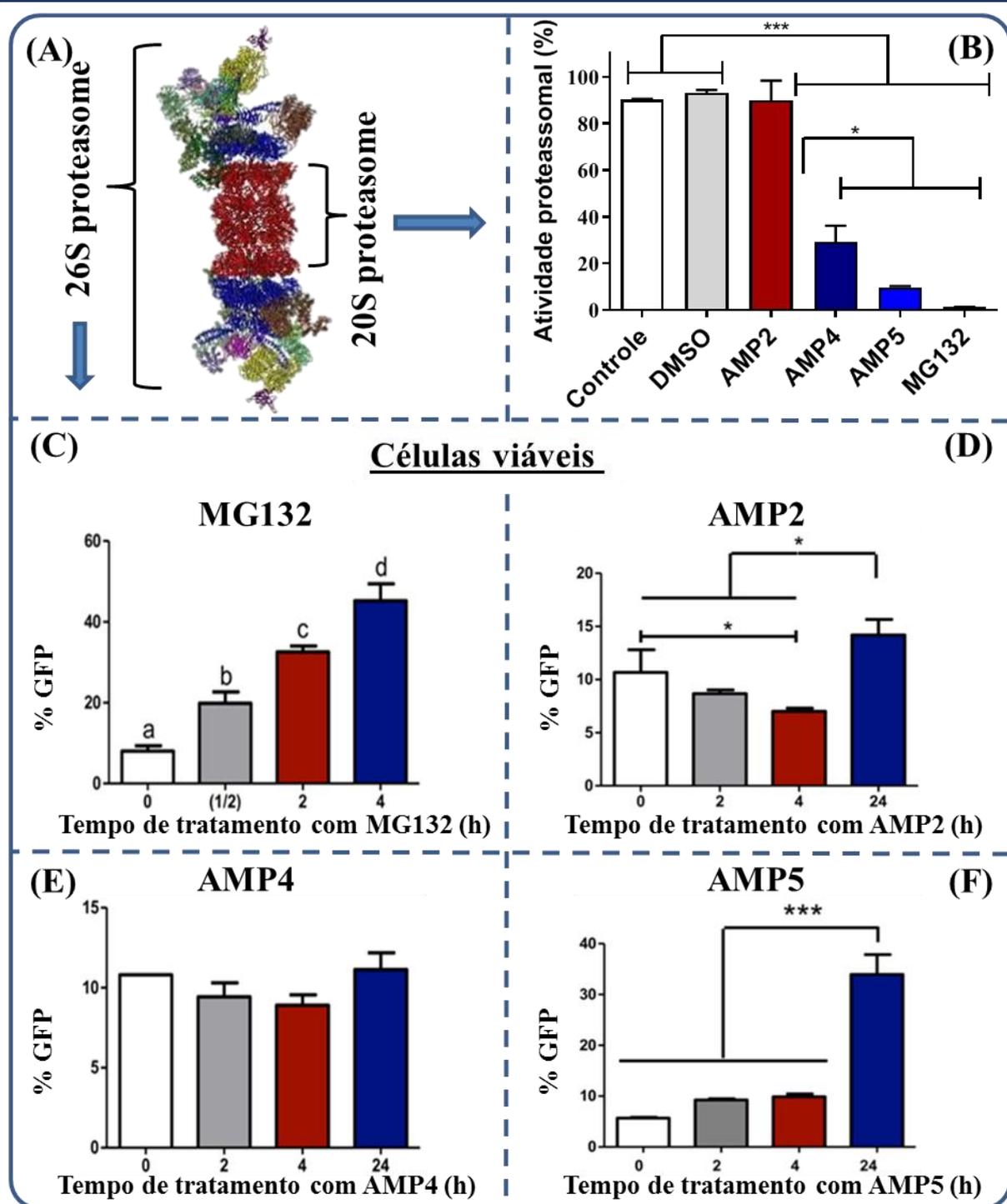


FIGURA 4.18- Inibição do proteassomo *in vitro* pelos complexos AMP2 (1 μ M), AMP4 (0,9 μ M), AMP5 (3,7 μ M) e o composto MG132 (10 μ M) utilizado como controle positivo. (B) Inibição da atividade quimiotripsina-like do proteassomo 20S pelos complexos; (C-F) Células HEK293T-uGFP tratadas com inibidor proteassomal MG132 (C), complexo AMP2 (D), AMP4 (E) e AMP5 (F) nos períodos indicados.

O ensaio foi realizado por meio da medição da intensidade de fluorescência das células HEK293T-uGFP tratadas em diferentes tempos de com os complexos. Portanto, as células que não há inibição da atividade proteassomal 26S, há pouco acúmulo de células com a proteína uGFP, uma vez que após a uGFP ser expressada, ela é imediatamente degradada pela enzima. Como é o observado no controle negativo, com 0 h de tratamento com os complexos AMP e o composto MG132, houve um baixo acúmulo de GFP, que variou de 12-6%. Os resultados evidenciam a eficiente atuação do proteassomo 26S na degradação da GFP.

Como pode ser notado, o acúmulo de GFP das células tratadas com o composto MG132 na concentração de 10 μ M foi gradativamente aumentando com o tempo. No tempo de 4 h de tratamento, o acúmulo de GFP foi máximo com $(45,2 \pm 4,2)\%$, enquanto no controle negativo foi $(8,0 \pm 1,3)\%$ de GFP em apenas 4 h.

Nas células tratadas com os complexos **AMP2** e **AMP4** por 2, 4 e 24 h, não houve diferenças significativas no acúmulo de GFP nas células em comparação com as células sem tratamento. Curiosamente, os resultados de inibição do proteassomo 26S nas células HEK293T foram parcialmente distintos dos obtidos nos ensaios de inibição da unidade 20S. O complexo **AMP4** que nos estudos com a unidade 20S apresentou um significativo efeito inibitório, nas células uGFP-HEK293T não mostrou atividade inibitória do proteassomo 26S (FIGURA 4.18-E). A incapacidade do complexo em interagir com o proteassomo no meio intracelular pode ser justificada por algumas hipóteses, como o direcionamento do complexo a interações preferenciais a outras espécies em solução, bem como a interferência na interação devido às subunidades 19S. Para o complexo **AMP4**, se observa a complexidade quando se extrapola os experimentos em um ensaio direto para ensaios celulares, cujos comportamentos distintos podem ser observados. Por sua vez, o complexo **AMP2** que não

apresenta ação direta na unidade do proteassomo 20S, também não exibiu atividade inibitória nas células HEK293T (FIGURA 4.18-D).

Após 24 h de tratamento das células uGFP-HEK293T com o **AMP5** (FIGURA 4.18-F), a porcentagem de GFP acumulada foi de $(34 \pm 4)\%$, enquanto no controle negativo foi de $(8,0 \pm 4)\%$. O resultado é equiparável com o inibidor MG132 (FIGURA 4.18-C), uma vez que a concentração do **AMP5** $2,5\times$ menor quando comparado com o MG132 ($10 \mu\text{M}$). Os resultados satisfatórios em ambos os experimentos, sugerem que o composto é um inibidor da atividade quimiotripsina-like do proteassomo.

As diferenças estruturais entre os complexos, no caso dos ligantes mercaptos foram sensivelmente importantes para a inibição do proteassomo. Os ensaios realizados não fornecem dados para sugerir o modo de ligação entre os complexos e o proteassomo, principalmente com a unidade 20S. Novos ensaios deverão ser realizados para estudar a nível molecular os mecanismos de interação dos complexos de rutênio com o proteassomo. Especificamente, determinar as regiões do composto e da enzima envolvidas diretamente nas interações, proporcionando o mapeamento de epítomos a uma estrutura 3D completa da interação intermolecular. Tais experimentos poderão ser realizados por meio dos experimentos de “docking” molecular. Também, ensaios com o intuito de estudar o efeito da inibição do proteassomo no acúmulo de proteínas ubiquitinadas essenciais nas vias de sinalização do ciclo celular e apoptose deverão ser realizados.^{137–141}

4.1.7 - Ensaio biológico com o complexo AMP4 com as células A549

4.1.7.1 - Ensaio de sobrevivência celular

O ensaio clonogênico é um experimento de sobrevivência celular *in vitro*, com base na capacidade das células formarem colônias. O ensaio avalia essencialmente a capacidade das células sobreviverem e reproduzirem para formar colônias após o tratamento com o agente citotóxico. As células tumorais de pulmão A549 foram tratadas com diferentes concentrações do composto **AMP4** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M), $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M) e $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M)) por 48 h, e as características citadas anteriormente foram avaliadas após um período de 10 dias (FIGURA 4.19-A). Quando comparado ao controle negativo, o número e tamanho das colônias das células A549 tratadas com o composto **AMP4**, foram inibidos drasticamente (FIGURA 4.19-B). Na concentração de IC_{50} , o composto inibiu totalmente a formação de colônias. O ensaio de sobrevivência das células tumorais de pulmão (A549) demonstrou que o composto **AMP4** em baixas concentrações já apresenta efeito citotóxico e citostático nas células.¹⁴²

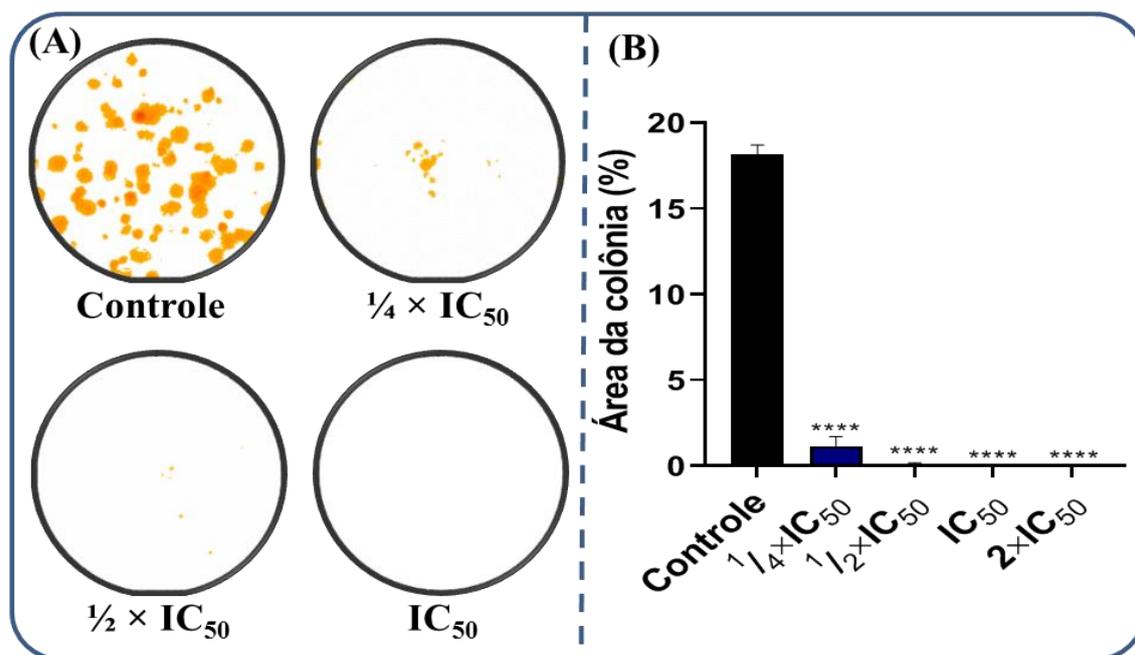


FIGURA 4.19- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem de célula A549, após tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M), $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M) e $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M)) por 48 h. (A) Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da área de colônia.

4.1.7.2 - Ensaio de morfologia celular

As mudanças morfológicas nas células tumorais de pulmão A549 relacionadas ao tratamento com o complexo **AMP4**, em concentrações de $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M) foram investigadas com o auxílio de um microscópio invertido acoplado a uma câmera fotográfica. As células foram micrografadas com 0, 24 e 48 h de exposição ao composto (FIGURA 4.20).

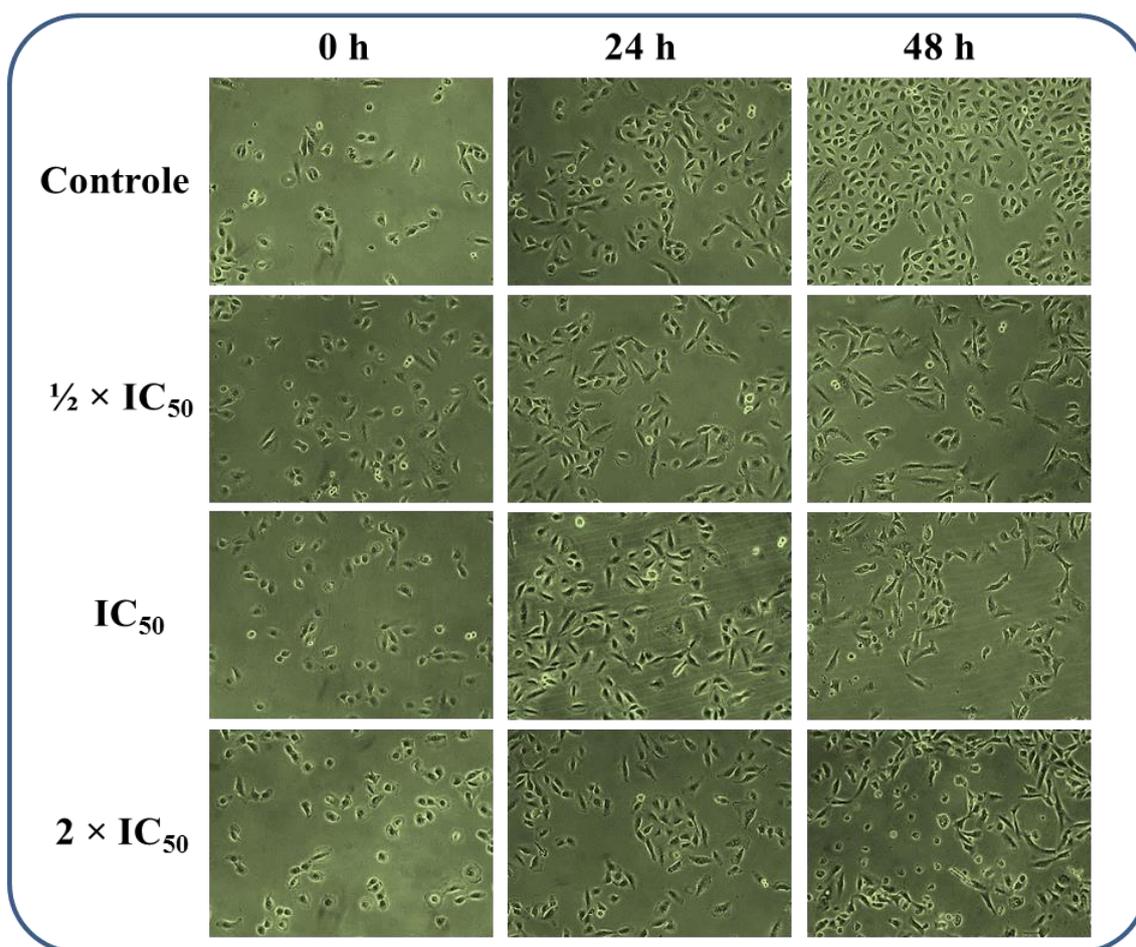


FIGURA 4. 20- Alterações morfológicas das células tumorais de pulmão (A549) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μM), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μM) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μM)). As células foram tratadas com o **AMP4** e fotografadas por diferentes períodos. Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas

As células A549 tratadas com o **AMP4** após 24 h, nas concentrações de IC_{50} e $2 \times IC_{50}$, apresentaram estruturas alongadas em comparação com as células não tratadas. Em 48 h de tratamento na concentração de $0,5 \times IC_{50}$, a confluência celular diminuiu e o formato das células alongadas foi predominante, sendo esses efeitos intensificados na concentração de IC_{50} . Adicionalmente, na concentração $2 \times IC_{50}$, algumas das células apresentaram características arredondadas com encolhimento celular e desaderência da

superfície da placa de cultura. Além disso, notam-se a formação de detritos celulares. As alterações morfológicas são características de morte celular por apoptose e não há indícios de necrose, como a perda da integridade da membrana celular.⁶⁴

4.1.7.3 - Ensaio de apoptose e Anexina

As células somáticas são geradas por mitose e morrem por diversas maneiras, principalmente via apoptose. A apoptose celular desempenha um papel fundamental na patogênese de inúmeras doenças. No caso do câncer, é um dos cenários em que há uma redução no processo de apoptose. A morte celular programada é um processo celular complexo, ordenado e orquestrado, que ocorre em condições fisiológicas e patológicas específicas, envolvendo inúmeras vias de ativação. Uma das estratégias do tratamento contra o câncer é à indução de apoptose, por isso estudos são realizados para avaliar se os compostos podem restaurar as vias de sinalização apoptótica rumo à indução da morte das células tumorais.^{143,144}

A fim de avaliar o processo de morte celular em resposta ao complexo **AMP4** foi realizado o ensaio com os marcadores anexina V conjugada com o fluorocromo ficoeritrina (PE), e 7-amino-actinomomicina (7-AAD). O método é utilizado para quantificar as células viáveis, apoptóticas e necróticas pelos marcadores.

A anexina V é uma proteína que se liga à fosfolipídeos da membrana plasmática e, principalmente, apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina na presença de íons cálcio. Em células viáveis, a fosfatidilserina se encontra na superfície da membrana celular voltado para o citosol. No início do processo apoptótico, a integridade da membrana celular é mantida, porém sofre uma reorganização estrutural. Nesta etapa ocorre a sinalização da morte programada mediante a externalização da fosfatidilserina para o reconhecimento dos fagócitos. Assim sendo, nesta etapa a proteína anexina V conjugada com o

fluoróforo é utilizada como uma sonda que se liga a fosfatidilserina, proporcionando a identificação e quantificação das células apoptóticas por citometria de fluxo. Em contrapartida, o 7-AAD é usado como marcador de células que apresentam perda da integridade da membrana celular, tais como necróticas e em estágios finais de apoptose, possibilitando a permeabilidade do corante pela membrana. Após a internalização no núcleo das células, o 7-AAD intercala entre as bases nitrogenadas do DNA, levando a uma emissão de fluorescência quando excitado. Em virtude do elevado peso molecular do marcador, não é internalizado em células com membrana plasmática intacta.^{107,144,145}

As células tumorais A549 foram tratadas com o complexo **AMP4** em concentrações equivalentes ao IC_{50} ($1/2 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$) por 48 h e analisadas por citometria de fluxo em conjunto com os corantes. Os dados de intensidade das fluorescências emitidas pelos marcadores estão apresentados nos gráficos de dot plot (FIGURA 4.21-A). O gráfico foi dividido em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4). As células viáveis são negativas para ambos os marcadores e estão representadas no Q1; A intensidade de fluorescência representada no Q2 é referente às células em apoptose inicial, marcadas com o fluorocromo anexina V-PE; o Q3 representa a intensidade de fluorescência das células em apoptose tardia, marcadas simultaneamente com anexina V-PE e 7-ADD; e finalmente, o Q4 representa a intensidade de fluorescência das células em necrose positivas para o 7-ADD.¹⁰⁷

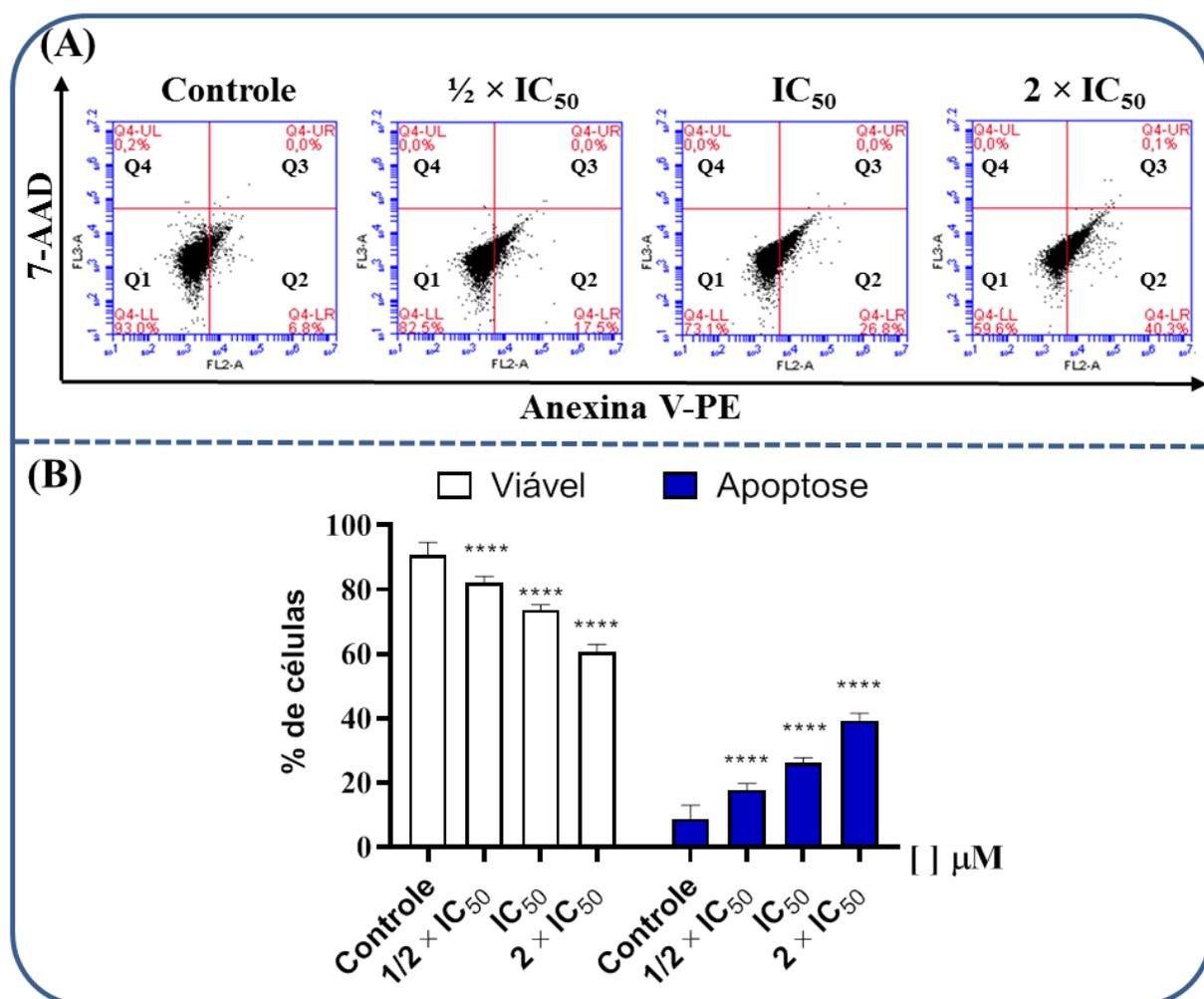


FIGURA 4.21- (A) Dot plots de Anexina V-PE vs 7-ADD, para determinação de células A549 em apoptose após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)) por 48 h. Análise de citometria de fluxo usando a coloração dupla de anexina V-PE e 7-AAD. (B) Gráfico da porcentagem de células em apoptose inicial, tardia e necrose após o tratamento com o complexo. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As células não tratadas com o complexo, empregadas como controle negativo (0,5% de DMSO), a porcentagem de células viáveis foi de 93%, enquanto a porcentagem de células em apoptose inicial foi de 6,8%. Para as células tumorais A549 tratadas com o complexo **AMP4** na concentração de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, um total de 17% das células estavam em processo de morte celular

por apoptose em fase inicial (FIGURA 4.21-B). A medida em que se aumentou as concentrações do complexo, as populações de células positivas para a anexina V cresceram e, conseqüentemente, houve um decréscimo na porcentagem de células viáveis. Na concentração de IC₅₀ do complexo, a proporção total de células apoptóticas foi de 27%, enquanto no controle a porcentagem foi de 7%. A proporção de células em apoptose inicial cresceu significativamente à 40%, após o tratamento com 0,24 µM (2×IC₅₀) do complexo **AMP4**. Analisando os resultados, as células são induzidas a morte por apoptose de uma maneira dose-dependente da concentração do complexo **AMP4** e não são observadas células positivas apenas para o 7-ADD, ou seja, células em necrose.^{143,145}

4.1.7.4 - Ensaio de ciclo celular

A duplicação celular ocorre por meio de um conjunto de eventos, denominado ciclo celular (FIGURA 4.22). Nesta sequência de acontecimentos, as informações genéticas são repassadas para a próxima geração celular por meio da replicação do genoma durante a fase S e, em seguida, ocorre a segregação para as novas células durante a mitose (fase M). As fases S e M são ordenadas em um processo cíclico que permite a duplicação correta das células sem acumular anomalias genéticas. Entre essas fases, existem duas fases preparatórias, a G₁ entre as fases M e S e, G₂ entre as S e M. Na fase G₁, as células são preparadas para a duplicação, por meio da produção de constituintes celulares para as novas células, bem como a preparação para a síntese de DNA.^{108,146}

Na fase G₂ do ciclo celular é realizada a síntese de componentes para a mitose celular, como a produção do fuso mitótico. Por fim, as células entram em um estado de repouso, conhecido como fase G₀. A verificação dos eventos do ciclo celular é monitorada através dos pontos de controle que ocorrem nas fases G₁/S, S/G₂ e G₂/M. Caso haja algum problema no processo

de duplicação celular verificados nos pontos de controle, o processo de crescimento é interrompido permitindo que a célula repare os danos e, posteriormente, a continuação na progressão no ciclo celular. Caso o dano não seja reparado, a célula entra em processo apoptose.^{108,109,146}

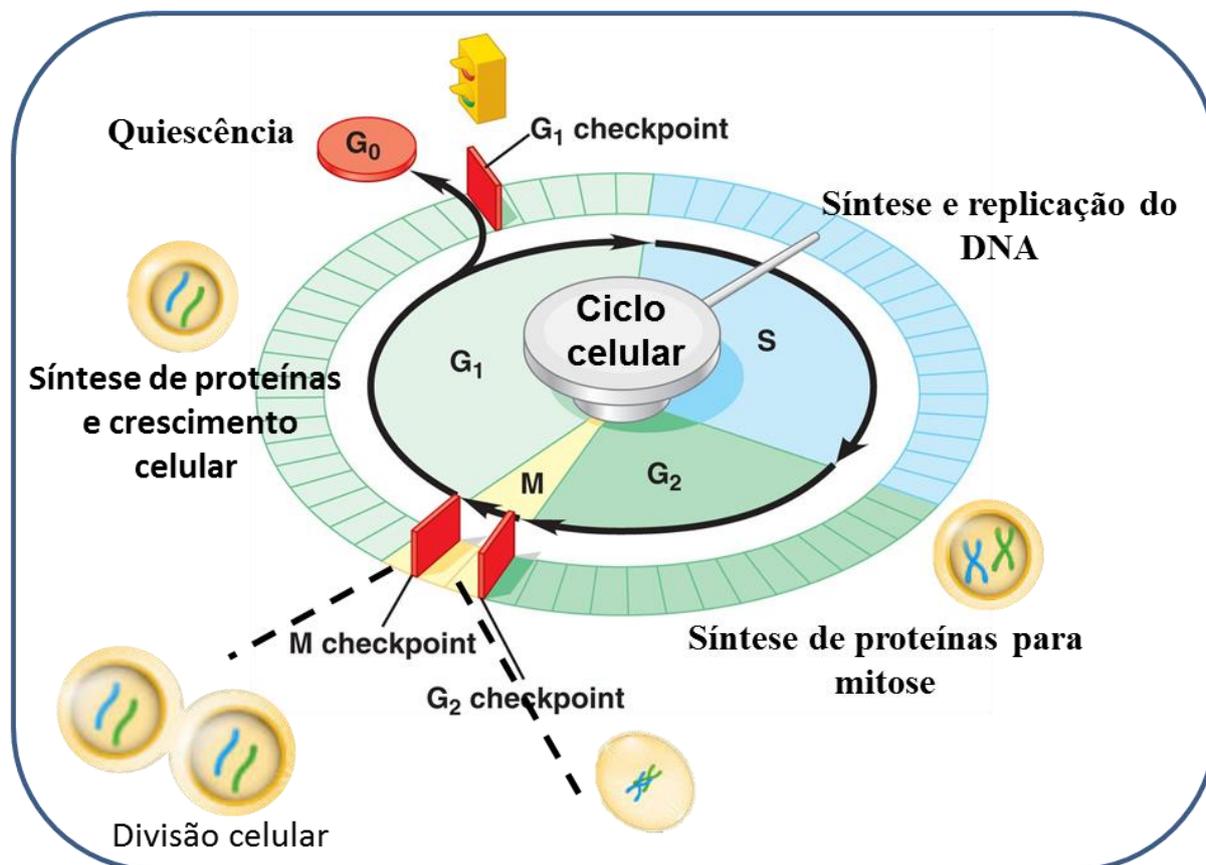


FIGURA 4.22- Ciclo de replicação celular esquemático para célula em mitose.

Nas células tumorais o ciclo celular perde sua regulação, permitindo que as células se multipliquem de forma irrestrita. Diversos compostos com atividade antitumoral exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, inibindo a divisão celular.^{146,147} Assim, a capacidade do complexo **AMP4** em alterar o conjunto de eventos responsável pela duplicação das células tumorais A549 foi investigada (FIGURA 4.23-A).

As células em diferentes fases do ciclo celular apresentam quantidades distintas de DNA. Assim, o ensaio do ciclo celular é baseado na

quantificação de DNA intracelular por citometria de fluxo empregando o iodeto de propídio (PI) como marcador. A citometria de fluxo possibilita a quantificação e distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. A intensidade da fluorescência do iodeto de propídio é proporcional ao DNA celular, por sua vez é dependente da fase do ciclo celular em que cada célula se encontra. As células nas fases G0 e G1 têm uma cópia do DNA, enquanto as células nas fases G2 e M têm o dobro de cópias do DNA cromossômico. As células na fase S têm um número intermediário de cópias do DNA. Portanto, as células nas fases G2 e M emitem uma maior intensidade de fluorescência referentes as duas copias do DNA cromossômico. As células nas fases G0 e G1 exibem uma menor intensidade menor em comparação células G2/M. Por fim, as células S são representadas por uma intensidade de fluorescência intermediária.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

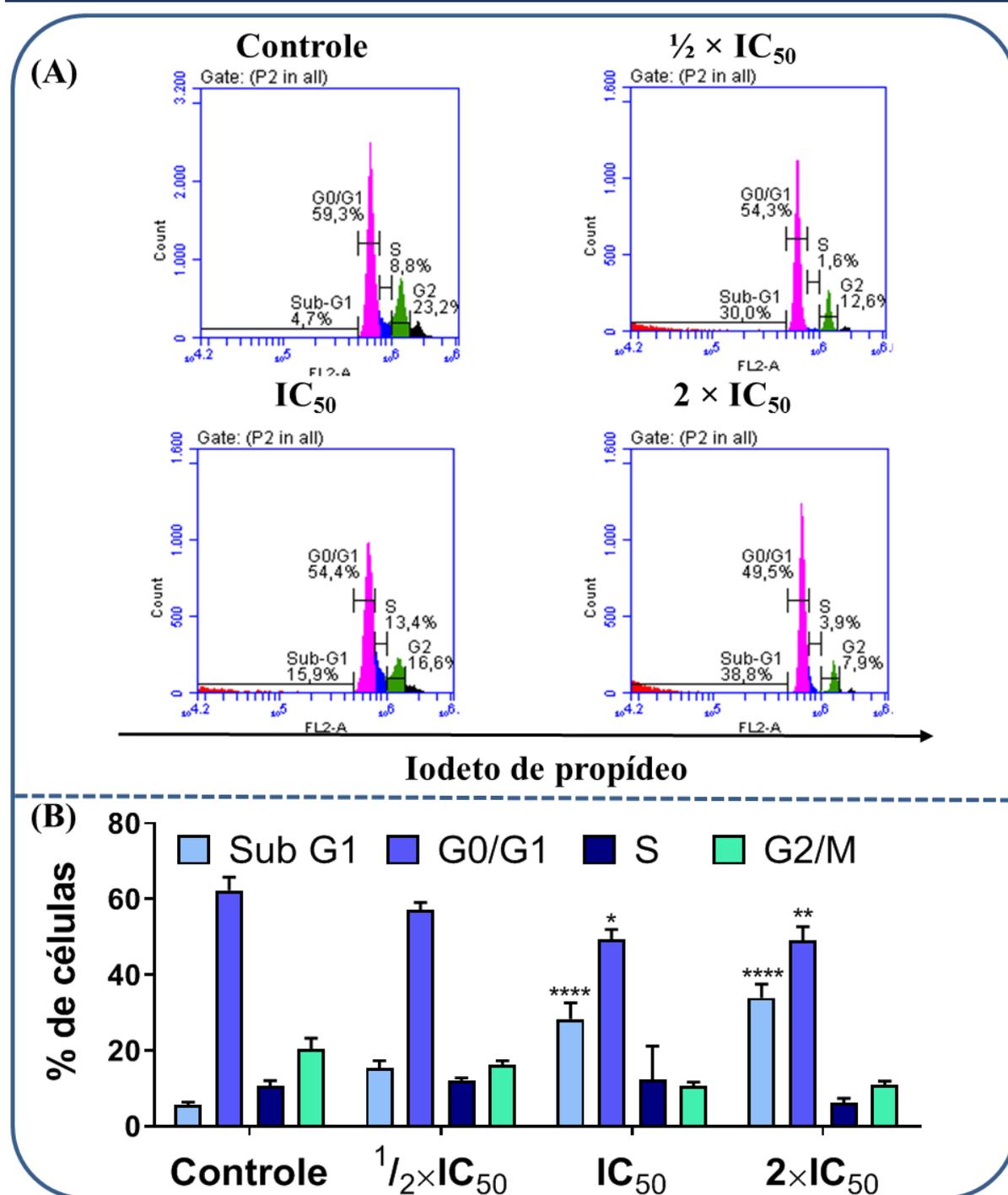


FIGURA 4.23- Ciclo celular das células tumorais de pulmão A549 após o tratamento com diferentes concentrações do complexo AMP4 ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M)). (A) Histogramas do perfil de fluorescência PI (eixo x) vs contagens de células (eixo y), definindo as células em diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e com conteúdo anormal de DNA (sub-G1). Os histogramas são correspondentes a uma das triplicatas

representativas; (B) Gráfico da distribuição das células A549 em diferentes fases do ciclo celular e Sub-G1, após tratamento com diferentes concentrações do complexo **AMP4** por 48 h. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento das células tumorais com o composto **AMP4** alterou a proporção de células entre as fases do ciclo celular em comparação com as células não tratadas. Também, as células A549 tratadas com o **AMP4** nas diferentes concentrações apresentaram um aumento gradativo da população com padrão anormal no conteúdo de DNA, denominadas de células sub-G1. A população de células com baixa quantidade de DNA são observadas devido à baixa intensidade de fluorescência em relação as demais populações de célula, como demonstrado nos histogramas. A população de Sub-G1 são células hipodiplóides, ou seja, que representa a fração de células mortas e com DNA fragmentado, justificando a baixa quantidade de DNA nas células.

Nas células do controle negativo, a distribuição das células entre as fases do ciclo celular G0/G1, G2/M e S foi de 62,3; 10,7 e 20,5% e, a porcentagem de células hipodiplóides (sub-G1) foi de 5,6%. As células tratadas nas concentrações de 0,06; 0,12 e 0,24 μM do **AMP4** apresentaram um aumento gradativo da população das células hipodiplóides (sub-G1) 15,5%, 28,3% e 33,9%, respectivamente em relação ao controle negativo (5,6%). Conseqüentemente, a proporção de células nas fases G0/G1 e G2/M apresentou um decréscimo, quando comparadas ao controle das células não tratadas.

A diminuição da proporção das fases do ciclo celular sugere que o complexo interfere de maneira significativa na progressão do ciclo celular. Adicionalmente, o acúmulo de células hipodiplóides é compatível com a ocorrência de apoptose, uma vez que o processo de morte por apoptose leva a fragmentação do DNA, devido à atuação das enzimas nucleases. Tal resultado

corroborar com o ensaio de Anexina V, que demonstrou que o complexo induz a morte das células A549 por apoptose.

Por meio dos resultados, conclui-se que o composto **AMP4** age de uma maneira dependente do status do ciclo celular, haja vista que formas reguladas de morte celular, como apoptose, geralmente dependem de pontos de verificação específicos para mediar esses processos. Por outro lado, na morte celular não regulamentada, tal como necrose, espera-se que seja independente do ciclo celular.^{109,146}

4.1.7.5 Ensaio de Wound healing

A migração celular descontrolada é um dos fatores necessário para que ocorra o processo de invasão de células cancerígenas em tecidos circundantes e na vasculatura, sendo uma das principais etapas no processo de metástase. Por isso, compostos capazes de inibir o processo de migração de células tumorais são de grande interesse na terapia de tumores metastáticos.^{104,105}

A capacidade do composto **AMP4** de inibir a migração das células tumorais A549 foi avaliada pelo ensaio de Wound healing, com diferentes períodos de exposição ao complexo **AMP4** (FIGURA 4.24). As concentrações dos complexos ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M)) utilizadas não causam morte celular, o que garante que as alterações na área da ferida se devem à migração celular.

No controle negativo, as células permanecem em contato durante o seu movimento coordenado nas bordas, ocorrendo a migração celular coletiva para o fechamento da ferida. Após 48 h, as células tumorais fecharam praticamente 100% da área ferida. Em contrapartida, observou-se uma ligeira diminuição na capacidade das células migrarem com 24 h de exposição ao complexo **AMP4** nas concentrações equivalentes a $1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), quando comparadas com as células do controle negativo. Após 48 h de tratamento, o fechamento da área ferida das células foi inibido em

aproximadamente 2,2% ($1/4 \times IC_{50}$) e 16,3% ($1/2 \times IC_{50}$), em comparação com o controle negativo. Em resumo, o complexo atua de maneira dose-dependente da concentração, porém nas concentrações testadas mostra uma baixa capacidade de agir como um inibidor da migração celular.

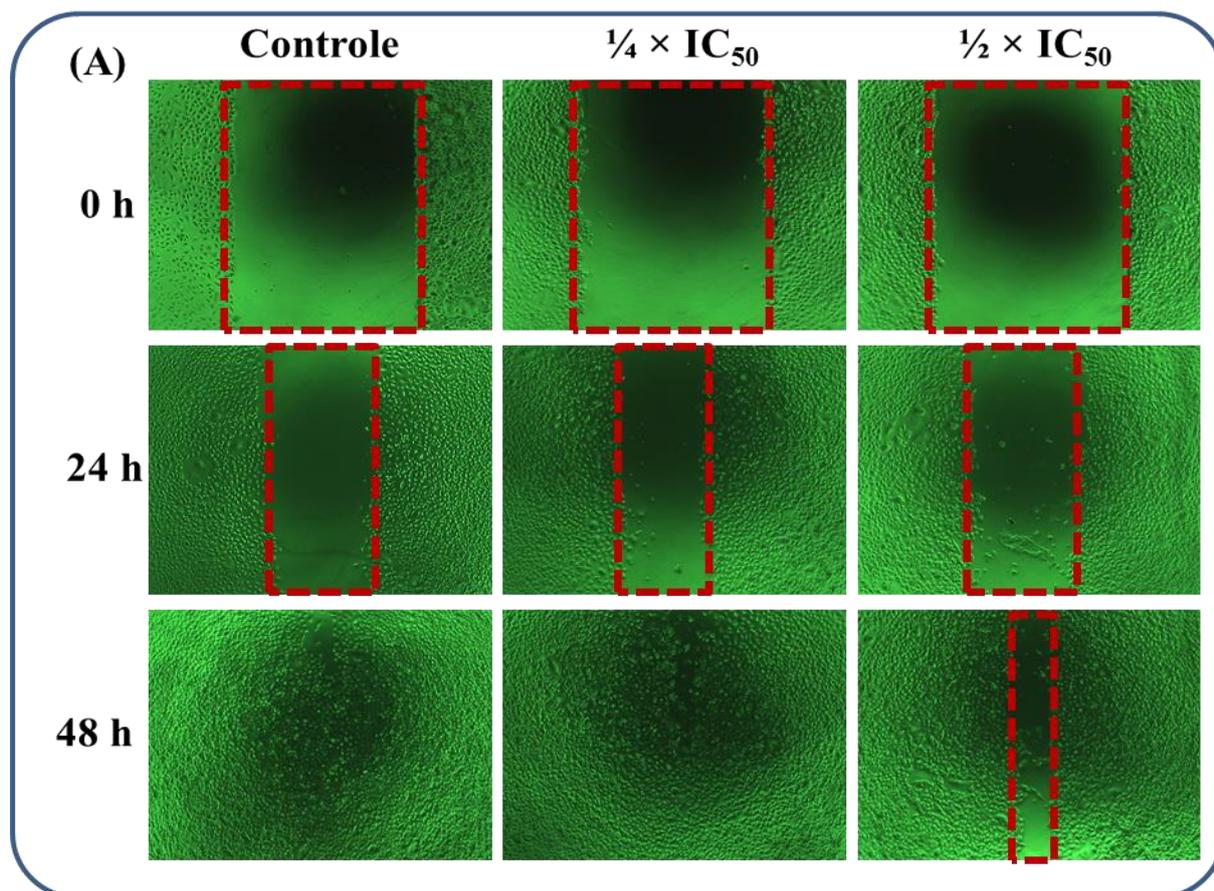


FIGURA 4.24- Ensaio de fechamento da Wound healing das células A549. Imagens micrográficas do fechamento da área da risca obtidas das células sem tratamento (controle negativo) e tratadas com diferentes concentrações do complexo AMP4 ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M)). Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas.

4.1.8 Conclusões da série AMP

Nesta seção do trabalho foi apresentada uma nova série de cinco novos complexos fosfínicos de rutênio contendo os ligantes mercaptos, de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**AMP**). Por meio dos dados das estruturas cristalinas de todos os complexos **AMP**, obtidas por difração de raios X, observou-se a coordenação bidentada dos ligantes fosfínicos. Os ligantes mercaptos estão coordenados de maneira bidentada com o átomo de nitrogênio N2 em posição *trans* ao átomo de fósforo (P2) do ligante dppb e o átomo de enxofre S1 *trans* ao átomo de N_{py} do ligante dphppy, formando um anel quelato estável de quatro membros. Os espectros de RMN ¹H dos complexos são consistentes com compostos de baixa simetria, em solução. Para todos os complexos, os sinais referentes aos hidrogênios dos ligantes mercaptos são blindados quando comparados com respectivos sinais do ligante livre. Além disso, nos experimentos de RMN HMBC ¹H-³¹P foram observados os acoplamentos escalares de longo alcance via centro metálico entre alguns hidrogênios dos ligantes mercaptos com o átomo de fósforo P_M, a quatro e cinco ligações de distâncias entre os átomos.

Os novos complexos apresentaram excelente atividade citotóxica frente às linhagens celulares derivadas de tumores humanos, MDA-MB-231 (câncer de mama) e A549 (câncer de pulmão), apresentando valores de IC₅₀ consideravelmente inferiores quando comparados aos dos ligantes livres, precursor e o composto cisplatina. Na linhagem de mama MDA-MB-231, os valores de IC₅₀ dos complexos foram na faixa de 0,10 a 0,98 μM, enquanto os valores foram de 0,12 a 2,59 μM na linhagem de pulmão A549. Os compostos foram seletivos frente às células tumorais tanto de pulmão A549 quanto de mama MDA-MB-231 quando comparado as respectivas linhagens não tumorais, com destaque aos índices de seletividade para as células tumorais de pulmão A549 de 2,1 a 7,1. Em relação atividade citotóxica da série **AMP**, os compostos **AMP3** e **AMP5** com os ligantes 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico e

4,6-diamino-2-mercaptopirimidina apresentaram sistematicamente menor atividade citotóxica quando comparados com os complexos **AMP1**, **AMP2** e **AMP4** com os ligantes 2'-mercaptopiridina, 2'-mercaptotiazolina e 2'-mercaptopirimidina sem grupos substituintes ligado ao anel. Os grupos funcionais aminas e ácido carboxílico ligados ao anel mercapto com capacidade de realizarem ligações de hidrogênio são hidrofílicos, o que proporciona uma menor lipofilicidade aos respectivos complexos quando comparados com os demais composto da série.

Diante desses resultados de seletividade para as células A549, o composto [Ru(pySm)(dphppy)(dppb)]PF₆ (**AMP4**) com melhor índice de seletividade da série **AMP** foi selecionado para estudos adicionais nas células tumorais de pulmão. O complexo foi capaz de inibir a formação de colônias e alterar a morfologia condizentes com morte celular apoptótica, porém não mostrou capacidade de inibir a migração celular quando avaliados pelo ensaio de Wound Healing. As células A549 tratadas com o **AMP4** nas diferentes concentrações apresentaram um aumento gradativo da população com padrão anormal no conteúdo de DNA, denominadas de células sub-G1, que representa a fração de células mortas e com DNA fragmentado (células hipodiplóides). A proporção de células nas fases G0/G1 e G2/M também apresentou um decréscimo, quando comparadas ao controle das células não tratadas. A partir de tais resultados sugere que o complexo interfere de maneira significativa na progressão do ciclo celular e age de uma maneira dependente do status do ciclo celular. Adicionalmente, o acúmulo de células hipodiplóides é compatível com a ocorrência de apoptose, uma vez que o processo de morte por apoptose leva a fragmentação do DNA. O mecanismo de morte das células tumorais de pulmão A549 por apoptose foi confirmado para o composto da série **AMP4**, por meio da realização do experimento de apoptose via citometria de fluxo, utilizando o marcador fluorescente Anexina V-PE.

Na busca dos possíveis alvos biológicos dos complexos foram realizados estudos de interação com DNA e de inibição das enzimas topoisomerase IB humana (hTopIB) e proteassomo 26S. Os compostos **AMP** apresentaram interações reversíveis e fracas via sulco menor do DNA, porém não causaram alterações nas estruturas secundária e terciária da biomolécula. Tal resultado, sugere que provavelmente o DNA não é o alvo principal dos compostos. Em baixas concentrações (0,5 e 5,0 μM), os complexos **AMP** inibem parcialmente a atividade da Topo-IB no relaxamento do DNA plasmidial. A inibição da enzima, mesmo de forma parcial, pelos complexos fornece indícios de que a enzima hTopoIB pode ser considerada um dos possíveis alvos biológicos para desencadear o processo de morte celular. Dentre os complexos avaliados frente à enzima proteassomo 26S, o composto $[\text{Ru}(\text{damc})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**AMP4**) levou o acúmulo de proteína verde fluorescente ubiquitinada (uGFP) em células viáveis derivadas de rim embrionário humano (HEK293T), indicando que o complexo inibi a atividade proteolítica do proteassomo 26S no meio intracelular.

Os complexos da série **AMP** apresentaram de moderada a alta afinidade pela proteína HSA, o que pode viabilizar o transporte e a solubilidade dos compostos na corrente sanguínea. O processo de interação entre os complexos e HSA ocorre de forma espontânea e por meio de interações hidrofóbicas.

Os resultados dos complexos **AMP2**, **AMP3** e **AMP5** foram publicados em forma de artigo científico no periódico *Inorganic Chemistry* com o título “Ruthenium(II) Phosphine/Mercapto Complexes: Their in Vitro Cytotoxicity Evaluation and Actions as Inhibitors of Topoisomerase and Proteasome Acting as Possible Triggers of Cell Death Induction”.¹⁴⁸

4.2 Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (Série SPPM)

Os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (SPPM2-SPPM6, FIGURA 4.25) [onde OS= N,N-(dimetil)-N'-benzoiltioureia (dmbth, SPPM2), N,N-(dietil)-N'-benzoiltioureia (debth, SPPM3), N,N-(dipropil)-N'-benzoiltioureia (dpbth, SPPM4), N,N-(dibutil)-N'-benzoiltioureia (dbbth, SPPM5), N,N-(difenil)-N'-benzoiltioureia (dfbth, SPPM6)] foram sintetizados com a saída dos ligantes cloridos do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dphppy})(\text{dppb})]$ e a coordenação do respectivo ligante aciltioureia na forma aniônica, ao centro metálico. A carga do íon complexo sintetizado é positiva, cujo contraíon é o ânion PF_6^- . As medidas de condutividade molar dos compostos (TABELA 4.11) em diclorometano indicam a presença de eletrólito 1:1.⁹⁶ Os dados de análise elementar dos complexos (TABELA 4.11) contribuíram para aferir as estruturas propostas.

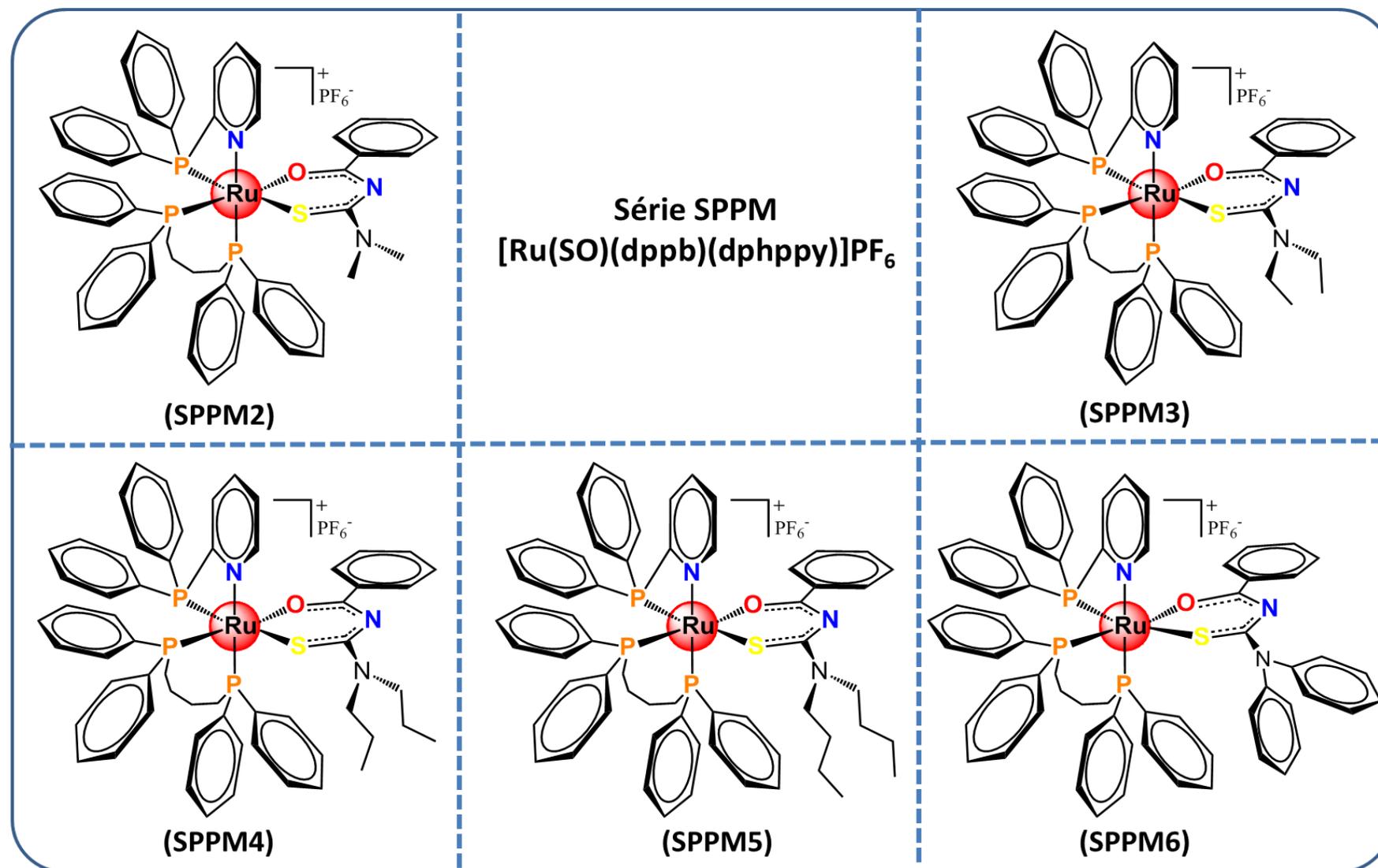


FIGURA 4.25- Estruturas químicas dos complexos SPPM.

TABELA 4.11- Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos SPPM.

Composto	%N*	%C*	%H*	Cond. **
[Ru(dmbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆	4,39 (3,68)	57,93 (57,79)	4,34 (4,67)	44,3
[Ru(debth)(dphppy)(dppb)]PF ₆	4,20 (4,91)	58,08 (58,46)	4,88 (4,91)	41,6
[Ru(dpbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆	3,95 (3,50)	56,70 (59,09)	4,99 (5,13)	45,4
[Ru(dbbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆	3,85 (3,42)	56,63 (59,70)	5,20 (5,34)	42,8
[Ru(dfbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆	4,40 (3,32)	61,37 (61,61)	4,81 (4,53)	45,9

*Análise elementar: Experimental (teórico); **Condutividade molar (S cm² mol⁻¹); Faixa para eletrólito 1:1 em CH₂Cl₂ 11 – 77 S cm² mol⁻¹.⁹⁶

As estruturas cristalinas dos complexos **SPPM2**, **SPPM4** e **SPPM6** (FIGURA 4.26) foram resolvidas no sistema triclinico, de grupo espacial P-1. Os complexos hexacoordenados apresentaram estruturas octaédricas distorcidas em torno do centro metálico. Nestas estruturas, os ligantes aciltioureas se coordenaram ao rutênio de maneira bidentada via átomos de enxofre (S1) e oxigênio (O1), ocupando uma posição no eixo axial com o átomo de oxigênio *trans* ao P2 da bifosfina, enquanto o átomo de enxofre ocupa uma posição no plano equatorial *trans* ao átomo de P1 do ligante dphppy. Os ângulos e comprimentos das ligações em torno do centro metálico nos complexos estão ilustrados na TABELA 4.12. Os parâmetros cristalográficos estão descrito na TABELA A14, no Apêndice – Parte VII.

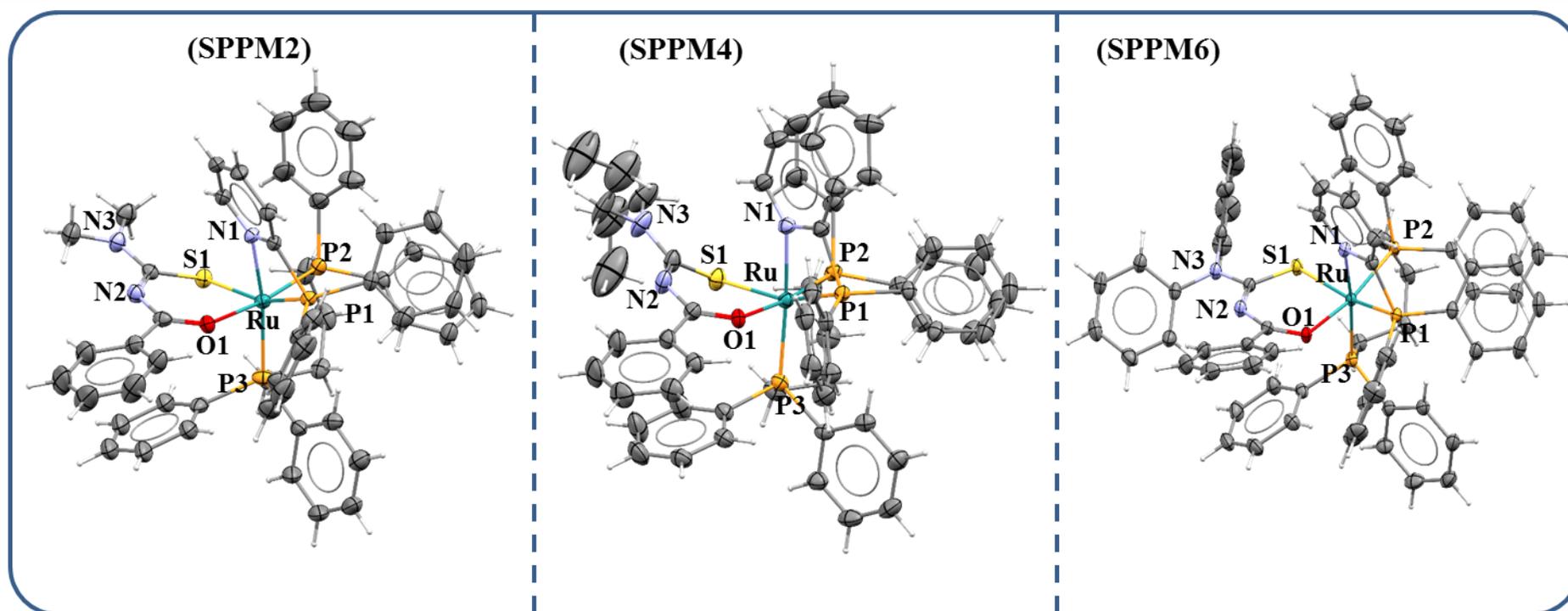


FIGURA 4.26- Estruturas cristalinas dos complexos **SPPM**, como elipsoides a 50% de probabilidade. Para melhor visualização o contraíon PF_6^- foi omitido.

TABELA 4.12- Principais ângulos ($^{\circ}$) e comprimentos de ligação (\AA) selecionados em torno do centro metálico das estruturas cristalinas dos complexos.

	Comprimento de ligação (\AA)			Diferença de c. de ligação (lig.Coordenado – lig.livre [*])	
	SPPM2	SPPM4	SPPM6	SPPM2	SPPM6
Ru—N1	2,151(2)	2,170(3)	2,148(2)		
Ru—P1	2,395(7)	2,362(9)	2,394(6)		
Ru—P2	2,310(9)	2,309(10)	2,315(6)		
Ru—P3	2,301(8)	2,312(9)	2,323(6)		
Ru—O1	2,116(19)	2,119(2)	2,115(14)		
Ru—S1	2,356(8)	2,372(10)	2,334(6)		
C8—S1	1,721(3)	1,735(4)	1,711(2)	0,045	0,051
N2—C1	1,320(4)	1,313(5)	1,326 (3)	-0,070	-0,083
N2—C8	1,328(4)	1,324(5)	1,321 (3)	-0,068	-0,086
C1—O1	1,258(4)	1,268(4)	1,256(3)	0,045	0,054
C8—N3	1,338(4)	1,341(5)	1,365 (3)	0,018	0,015
C1—C2	1,496(4)	1,492(5)	1,493 (3)	0,004	0,007

	Ângulo de ligação ($^{\circ}$)		
	SGPPM2	SGPPM4	SGPPM6
P2—Ru—P3	96,4(3)	95,6(3)	96,8(2)
N1—Ru—P1	66,9 (6)	67,2(8)	66,8 (5)
P1—C111—N1	104,3(19)	104,3(2)	103,3(15)

*Estruturas dos ligantes livres N,N-(dimetil)-N'-benzoiltiourea¹⁴⁹ e N,N-(difetil)-N'-benzoiltiourea.¹⁵⁰

A coordenação dos ligantes aciltioureas nos complexos ocorre pela formação de um quelato de seis membros, com ângulos de ligação S1—Ru—O1 rígido de aproximadamente $89,5^{\circ}$, adotando a conformação U em relação às posições das ligações (1)O=C(1)—N(2)—C(8)=S(1). Após a coordenação dos ligantes, os comprimentos de ligação das ligações do anel formado O(1)=C(1), N(2)—C(1), N(2)—C(8) e C(8)=S(1) apresentaram variações significativas

quando comparados aos ligantes livres (TABELA 4.12), o que leva a sugerir uma deslocalização eletrônica no sistema para este modo de coordenação. As distâncias das ligações C=S e C=O nos complexos são maiores comparadas aos ligantes livres devido ao enfraquecimento destas ligações após a coordenação dos átomos de enxofre e oxigênio ao metal. Em contrapartida, as ligações N(2)—C(1) e N(2)—C(8) apresentaram diminuição nos comprimentos de ligação, sendo coerente com a inserção do par de elétrons do grupo amina para o anel formado e a deslocalização dos elétrons π após a coordenação do ligante ao metal (FIGURA 4.27-A). Em todos os casos, os comprimentos destas ligações apresentaram um caráter intermediário em comparação com as distâncias de ligação simples e duplas. Tal comportamento é coerente com os relatos descritos nos diversos trabalhos envolvendo Ru-aciltioureia.^{50,77,136}

A substituição dos ligantes cloridos pelos ligantes aciltioureias também proporcionou um aumento significativo dos comprimentos da ligação Ru—P1 (2,36-2,40 Å), em relação ao precursor (Ru—P1, 2,30 Å). O comportamento já é esperado pelas características distintas dos átomos substituintes, culminando na diminuição da densidade eletrônica do centro metálico e na sua capacidade de realizar retrodoação. Os aspectos estruturais observados para o ligante fosfínico 2-(difenilfosfina)piridina (dphppy) nas estruturas cristalinas dos complexos **AMP** podem ser estendidos aos complexos **SPPM**, uma vez que nesse aspecto houve semelhança entre as duas séries de compostos. Os comprimentos das ligações Ru—O1 e Ru—S1 estão de acordo com os valores relatados na literatura para complexos em que os ligantes aciltioureias apresentam o mesmo modo de coordenação.^{47,77,136}

Um aspecto relevante nas estruturas cristalinas é a disposição espacial de certos grupos em torno do ligante aciltioureia, a depender dos substituintes R2 (FIGURA 4.27-B). No caso do complexo **SPPM2**, o anel aromático C32 do ligante dppb fica alocado próximo ao centro do quelato formado no ligante aciltioureia, uma vez que os grupos metilas ficam distantes

do anel aromático do ligante fosfínico. Ao contrário, os grupos volumosos propil no complexo **SPPM4**, fazem com que seja adotada uma posição diferente do anel aromático. O anel C32-P3 está mais próximo do anel aromático do ligante aciltiourea do que ao centro do quelato. Para o complexo **SPPM6**, cujos grupos substituintes R2 são anéis fenílicos, o rearranjo do anel C32-P3 é similar ao adotado pelo complexo **SPPM2**. Os contatos intramoleculares entre os anéis aromáticos também são observados nas estruturas cristalinas dos complexos, destacando-se a interação do tipo π - π stacking entre o grupo piridínico do ligante dphppy e o anel fenílico C31-P3 do ligante dppb, com distâncias entre os centroides na faixa de 3,76 a 3,92 Å.

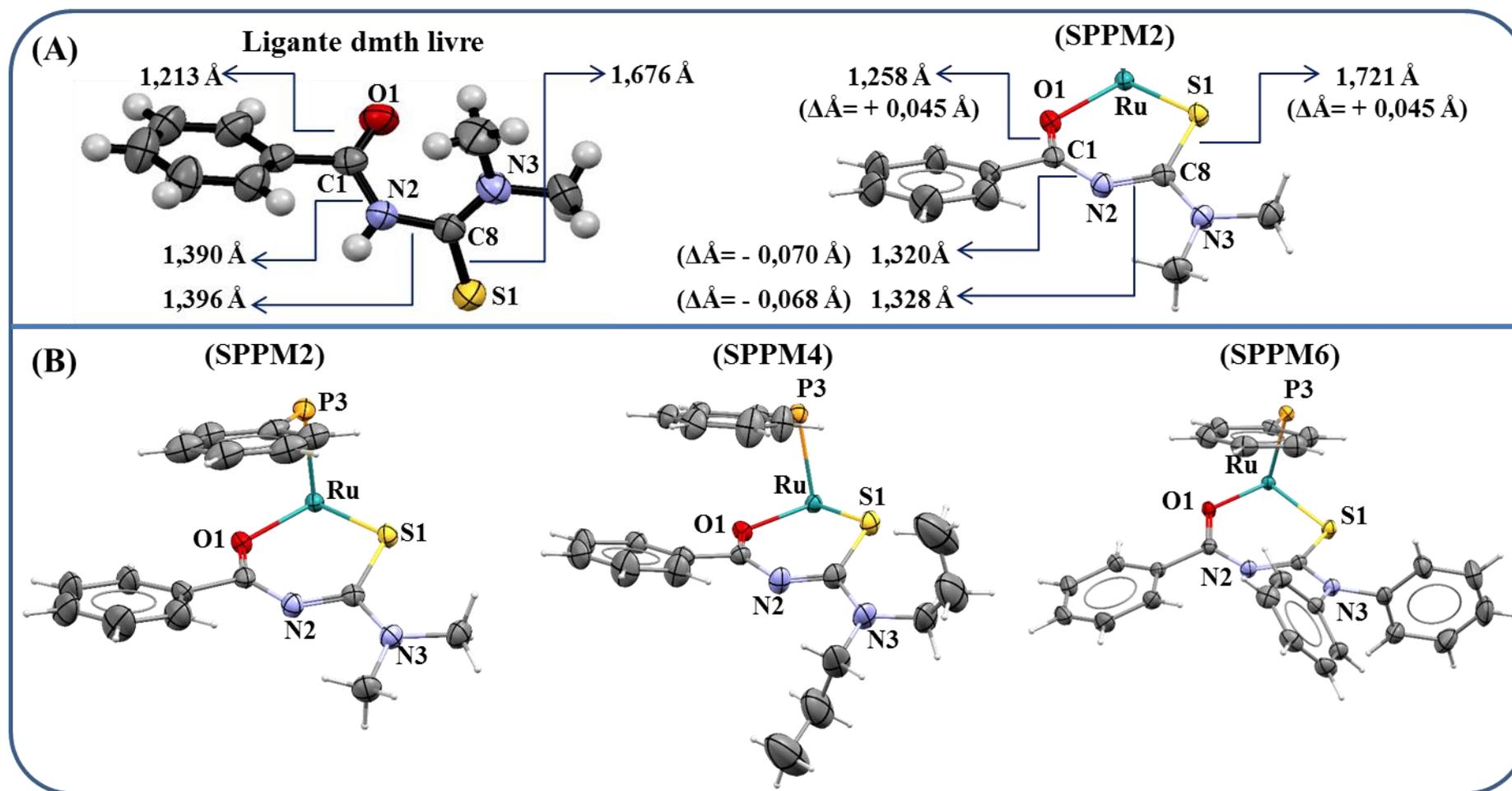


FIGURA 4.27- (A) Comprimento de ligação de alguns fragmentos do ligante aciltiourea livre e após a coordenação ao rutênio, juntamente com a variação dos comprimentos de ligação ($\Delta\text{Å} = \text{Å}_{\text{cord}} - \text{Å}_{\text{livre}}$); (B) Representação da conformação espacial do ligante aciltiourea e do anel aromático C32-P3, e da interação intramolecular do tipo π - π stacking.

Como esperado, o conjunto de sinais nos espectros de RMN de $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$ dos complexos **SPPM** (FIGURA 4.28) é similar ao apresentado pelos complexos da série **AMP**. Os compostos apresentam o sistema de acoplamento de spin AMX com dois duplo-dubletos referentes aos fósforos da bifosfina dppb e um pseudo triplete atribuído ao átomo de fósforo do ligante dphppy. Adicionalmente, o hepteto é referente ao contra-íon PF_6^- .

Os deslocamentos químicos dos átomos de fósforo nos complexos **SPPM** em relação ao precursor (TABELA 4.13), são observados em regiões de maior frequência nos espectros (mais desblindados). A variação dos sinais é devido à substituição dos ligantes cloridos (σ e π doador) do complexo precursor pelo ligantes aciltioureas com caráter σ -doador e π -receptor. Como já explicado, os ligantes com a capacidade π receptora podem exercer influência de enfraquecer a ligação em posição *trans*. Os átomos de fósforo dos ligantes fosfínicos apresentam um forte caráter π -receptor e quando estão em posição *trans* a átomos que apresentam esta mesma característica, há um efeito competitivo entre os ligantes opostos na esfera de coordenação pela retrodoação do metal. Conseqüentemente, a menor retrodoação para os átomos de fósforo causa uma diminuição na densidade eletrônica sobre os mesmos, e fazendo com que os mesmos se encontrem mais desblindados.

O triplete observado na região negativa dos espectros de RMN $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$ referente ao átomo de fósforo do ligante dphppy (P_X) em posição *trans* ao átomo de enxofre do ligante aciltiourea apresentou uma variação do deslocamento químico de aproximadamente $\Delta\delta$ 5 nos complexos em relação ao precursor. Contudo, os valores de deslocamentos químicos do fósforo P_X não mostraram diferenças entre os complexos **SPPM**. Tal resultado nos sugere que as diferenças eletrônicas, devido aos efeitos indutivo e estérico dos diferentes tamanhos da cadeia alifática e dos grupos fenil dos substituintes R2 nas aciltioureas, não são efetivas nos núcleos dos átomos de fósforo.

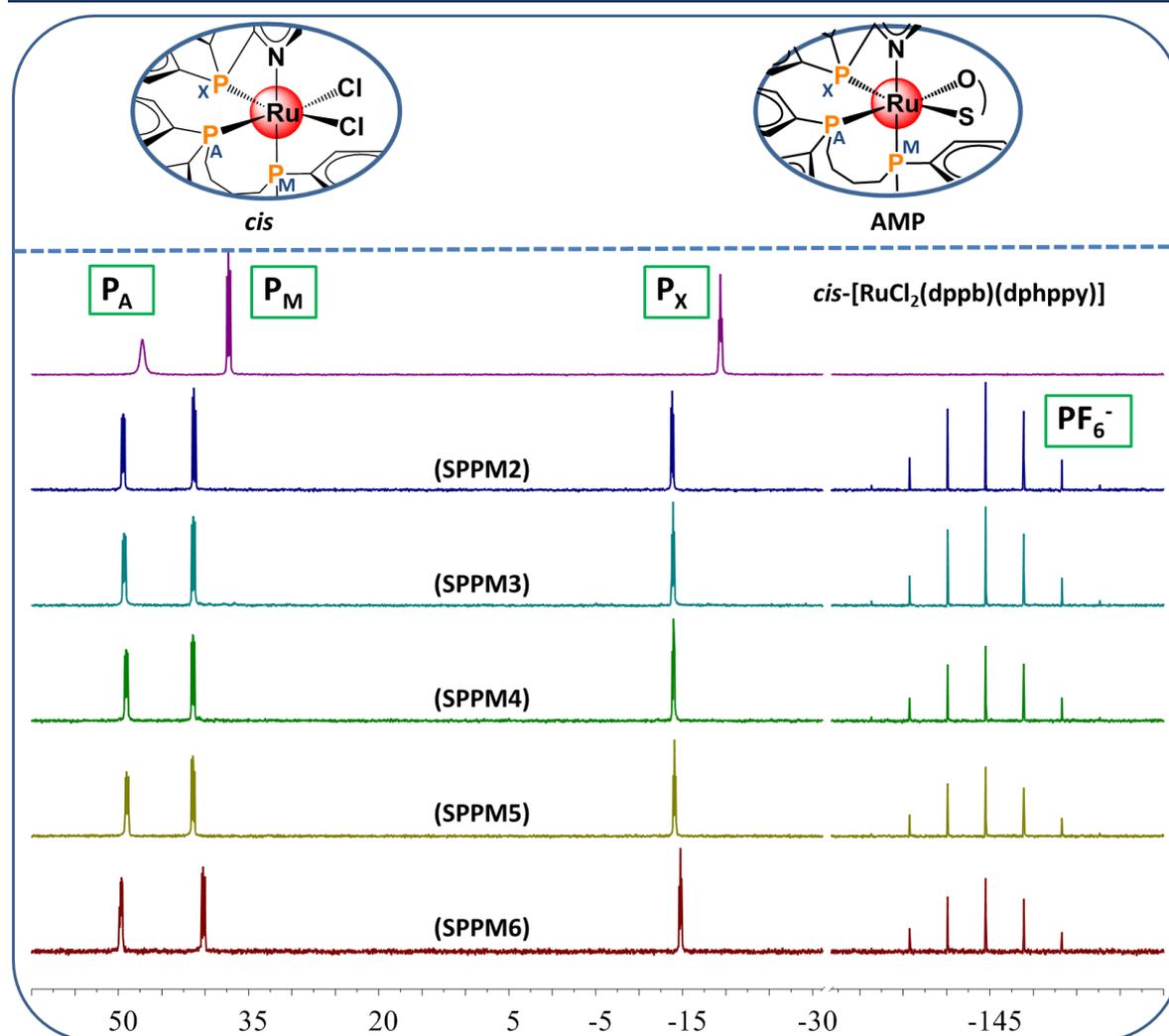


FIGURA 4.28- Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ do precursor e complexos SPPM em CDCl_3 .

TABELA 4.13- Dados de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série SPPM.

Complexo	Deslocamento químico				Constante de acoplamento			
	P_A	P_M	P_X	$\text{P}(\text{PF}_6^-)$	$^2J_{AM}$	$^2J_{Ax}$	$^2J_{MX}$	$^1J_{\text{PF}_6^-}$
Precursor	47,2	37,3	-19,4	-	34	26	27	-
SPPM2	49,4	41,3	-13,8	-144,5	34	20	24	711
SPPM3	49,3	41,4	-13,9	-144,5	34	20	24	711
SPPM4	49,1	41,4	-13,9	-144,5	34	20	24	711
SPPM5	49,0	41,4	-14,1	-144,5	34	20	24	711
SPPM6	48,9	41,2	-14,7	-144,5	34	20	24	711

O sinal mais desblindado nos espectros de RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ é atribuído ao átomo de fósforo da bifosfina dppb em posição *trans* ao átomo de oxigênio do ligante aciltiourea e o segundo sinal ao átomo fósforo em posição *trans* ao átomo nitrogênio do ligante monofosfínico. Em ambos os casos, ocorre a variação dos deslocamentos químicos dos átomos de fosforo P_A e P_M dos complexos **SPPM** em relação aos sinais do precursor. Porém, a maior variação entre os átomos de fósforo é do átomo P_M presente no ligante bifosfínico, o que evidencia que outros fatores influenciam no espectro de RMN de fósforo dos compostos, e não somente, o efeito da troca do átomo em posição *trans* ao átomo de fósforo. Além dos possíveis efeitos de anisotropia, também está relacionado com o efeito da diminuição da densidade eletrônica do metal após a coordenação do ligante aciltiourea, uma vez que pode ocorrer também a diminuição da retrodoação ao átomo de fósforo P_M .

A atribuição dos sinais nos espectros de RMN ^1H dos complexos da série **SPPM** foi realizada por meio das técnicas de COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{31}P , HMBC ^1H - ^{13}C e HSQC ^1H - ^{13}C . Os espectros dos complexos exibiram perfis semelhantes na região aromática, apresentando padrões de ressonância consistentes com a baixa simetria dos compostos, bem como não se observa um padrão definido das multiplicidades dos sinais.

A FIGURA 4.29 apresenta o espectro de RMN de ^1H do complexo **SPPM2** (demais espectros no Apêndice – Parte VI), e os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios estão apresentados na FIGURA 4.30. Para os hidrogênios com a multiplicidade do sinal descrita como multipletto, os deslocamentos químicos foram definidos pela faixa das curvas de níveis referentes aos acoplamento entre o átomo de hidrogênios e respectivo carbono no mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C .

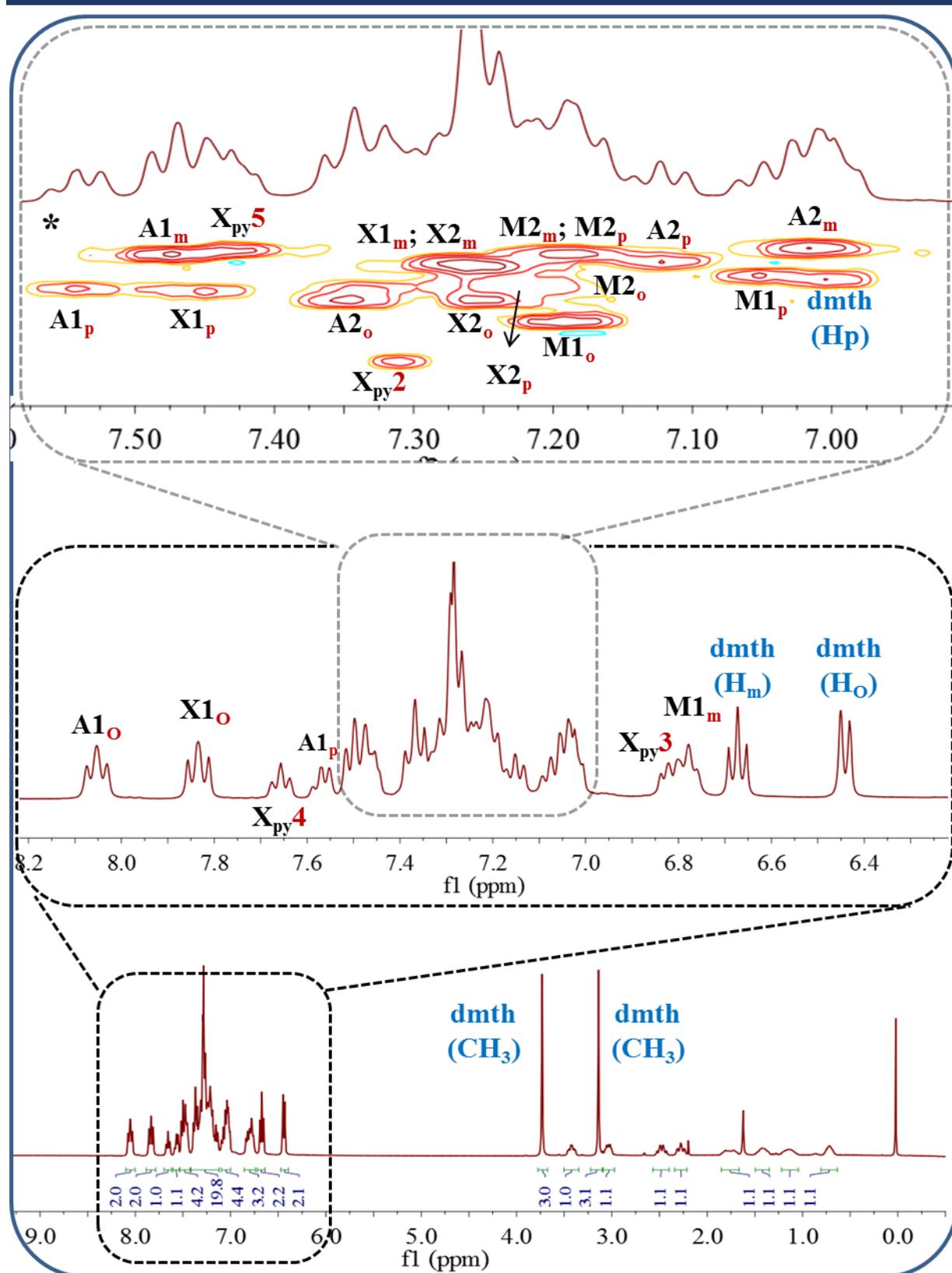


FIGURA 4.29- Espectros de RMN ^1H do complexo SPPM2 em CDCl_3 .
 *Determinação dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio pelo mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C (TABELAS A9-A13 no Apêndice).

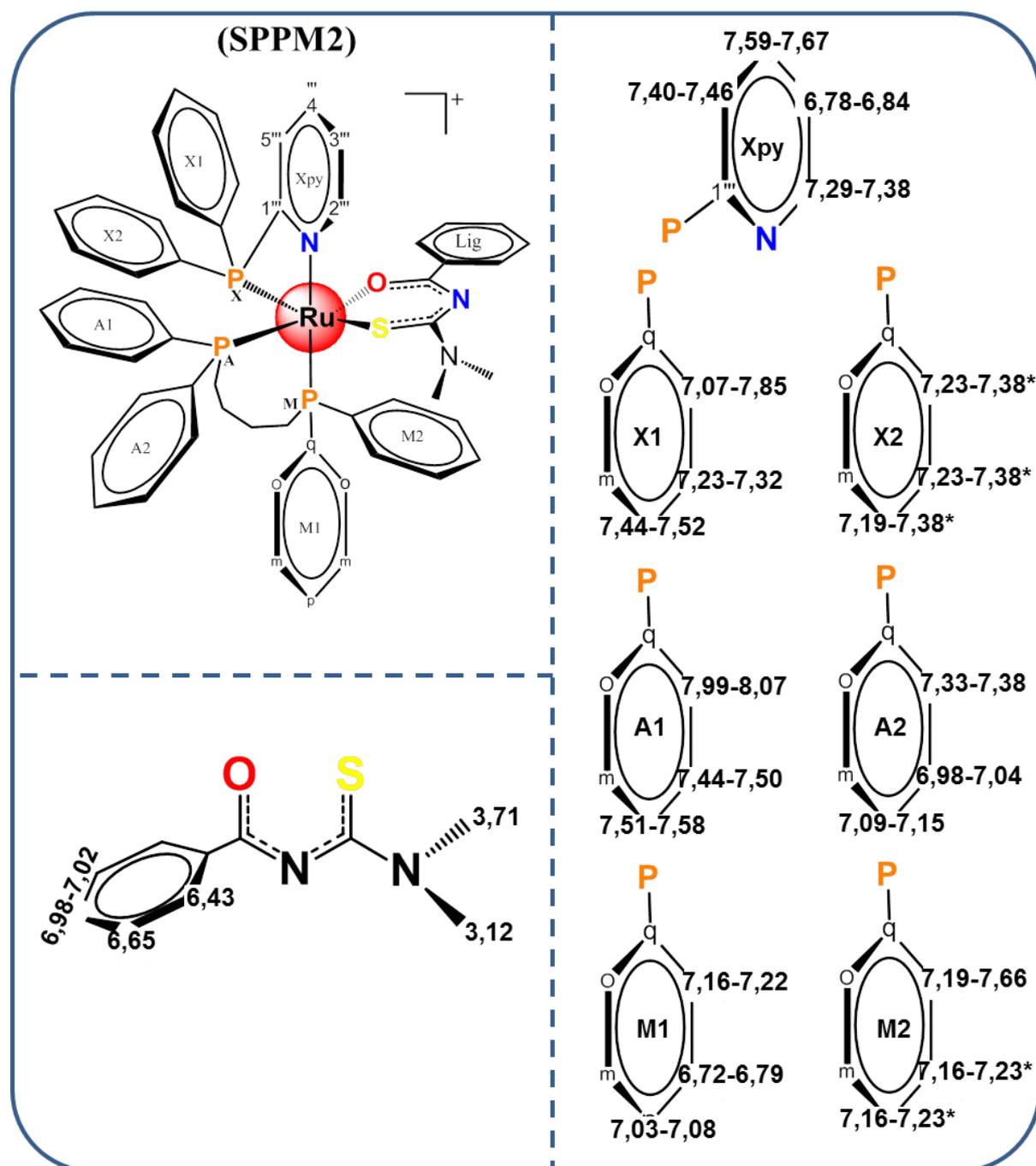


FIGURA 4.30- Nomenclatura e deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do complexo **SPPM2** no espectro de RMN ^1H . Observação: Os hidrogênios com a multiplicidade do sinal descrita como multipletto, os deslocamentos químicos foram definidos pela faixa das curvas de níveis referentes ao acoplamento entre o(s) átomo(s) de hidrogênio e respectivo carbono no mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C .

O padrão de distribuição dos sinais na região aromática dos complexos foi determinado por meio da análise dos mapas de correlação de RMN HBMC ^1H - ^{31}P . Nos complexos com os ligantes aciltioureas também apresentam a não equivalência magnética dos anéis aromáticos dos ligantes fosfínicos, levando a uma ampla faixa de deslocamento químicos tanto dos átomos de hidrogênio, quanto dos átomos de carbono. Em todos os complexos da série, os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios fenílicos de posição *orto* são classificados, na seguinte ordem: $\delta\text{H}_{(\text{PA}1)} > \delta\text{H}_{(\text{PX}1)} > \delta\text{H}_{(\text{PX}2)} \sim \delta\text{H}_{(\text{PA}2)} > \delta\text{H}_{(\text{PM}1)} \sim \delta\text{H}_{(\text{PM}2)}$. Os hidrogênios de posição *orto* foram os mais desblindados em relação aos demais hidrogênios do respectivo anel aromático, como também observado para a série **AMP**.

Nos mapas de correlação de HBMC ^1H - ^{31}P do complexo **SPPM2** (FIGURA 4.31, A e B), empregado para representar os complexos da série, são evidenciados os acoplamentos com os átomos de fósforo. Os hidrogênios fenílicos dos anéis ligados ao fósforo P_A compreendem uma ampla região aromática (δ_{H} 8,07-6,98), enquanto os hidrogênios dos anéis ligados ao átomo de P_M são os mais blindados (δ_{H} 7,26-6,72) entre os hidrogênios fenílicos dos complexos. Os hidrogênios dos anéis do átomo P_X foram observados na região de δ_{H} 7,85-6,78.

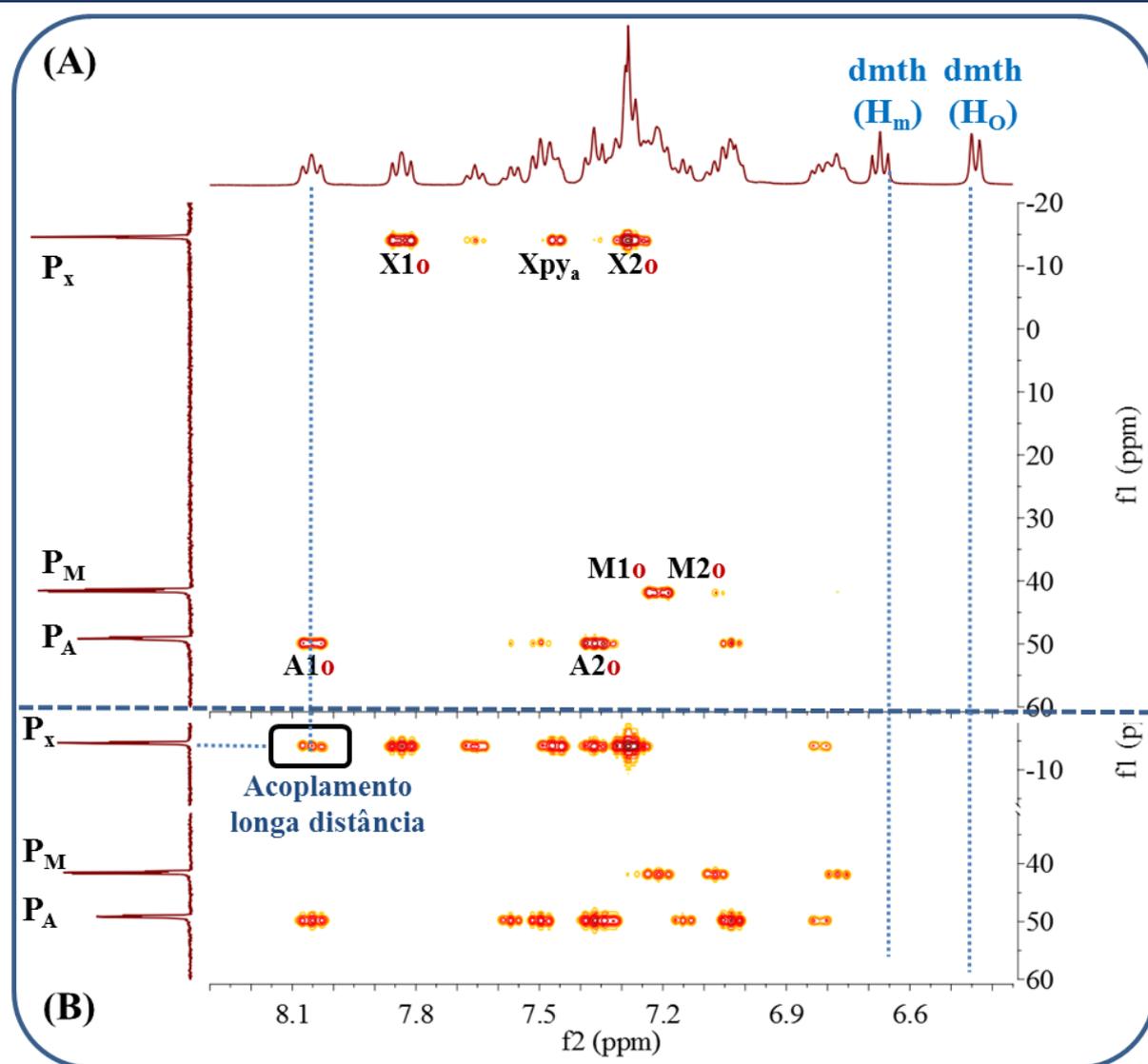


FIGURA 4.31- Mapas de correlação de RMN 2D (A) ^1H - ^{31}P HMBC (constante de acoplamento de curta distância, 12 Hz) e (B) ^1H - ^{31}P HMBC (constante de acoplamento de longa distância, 6 Hz) do complexo $[\text{Ru}(\text{dmbth})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**SPPM2**) em CDCl_3 .

Os átomos de hidrogênio do substituinte fenil ligado ao grupo acila das aciltioureas exibem três sinais nos espectros de RMN de ^1H dos ligantes aciltioureas livres, cujos sinais são dois dubletos em δ_{H} 6,65 e δ_{H} 6,65, e um tripleto de δ_{H} 6,65, referentes aos hidrogênios de posição *orto*, *meta* e *para*, respectivamente. Após a coordenação dos ligantes aciltioureas ao complexo precursor, todos os hidrogênios fenílicos do ligante apresentaram-se mais

blindados, quando comparados aos átomos de hidrogênio dos ligantes livres. Os espectros de RMN de ^1H dos complexos também apresentaram três sinais referentes aos hidrogênios fenílicos do ligante aciltiourea, nas regiões de: δ_{H} 6,21-6,49 referente aos átomos de hidrogênio de posição *orto*; δ_{H} 6,63-6,72 referente aos átomos de hidrogênio de posição *meta*; δ_{H} 6,98-7,10 referente aos átomos de hidrogênio de posição *para*. Portanto, as variações dos deslocamentos químicos após a coordenação foram de aproximadamente $\Delta\delta_{\text{H}}$ -1,4 (H_{O}), $\Delta\delta_{\text{H}}$ -0,8 (H_{m}) e $\Delta\delta_{\text{H}}$ -0,6 (H_{p}). No mapa de correlação de HMBC ^1H - ^{31}P , com configuração para determinar acoplamentos de longo alcance, não foram observadas curvas de níveis que indiquem acoplamentos entre os átomos de fósforos e os hidrogênios fenílicos das aciltioureas.

Os sinais dos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos foram atribuídos a partir de técnicas bidimensionais de RMN (HMBC ^1H - ^{13}C e HSQC ^1H - ^{13}C). O espectro de RMN de ^{13}C do complexo **SPPM2** pode ser observado na (FIGURA 4.32), de maneira representativa aos espectros dos demais complexos.

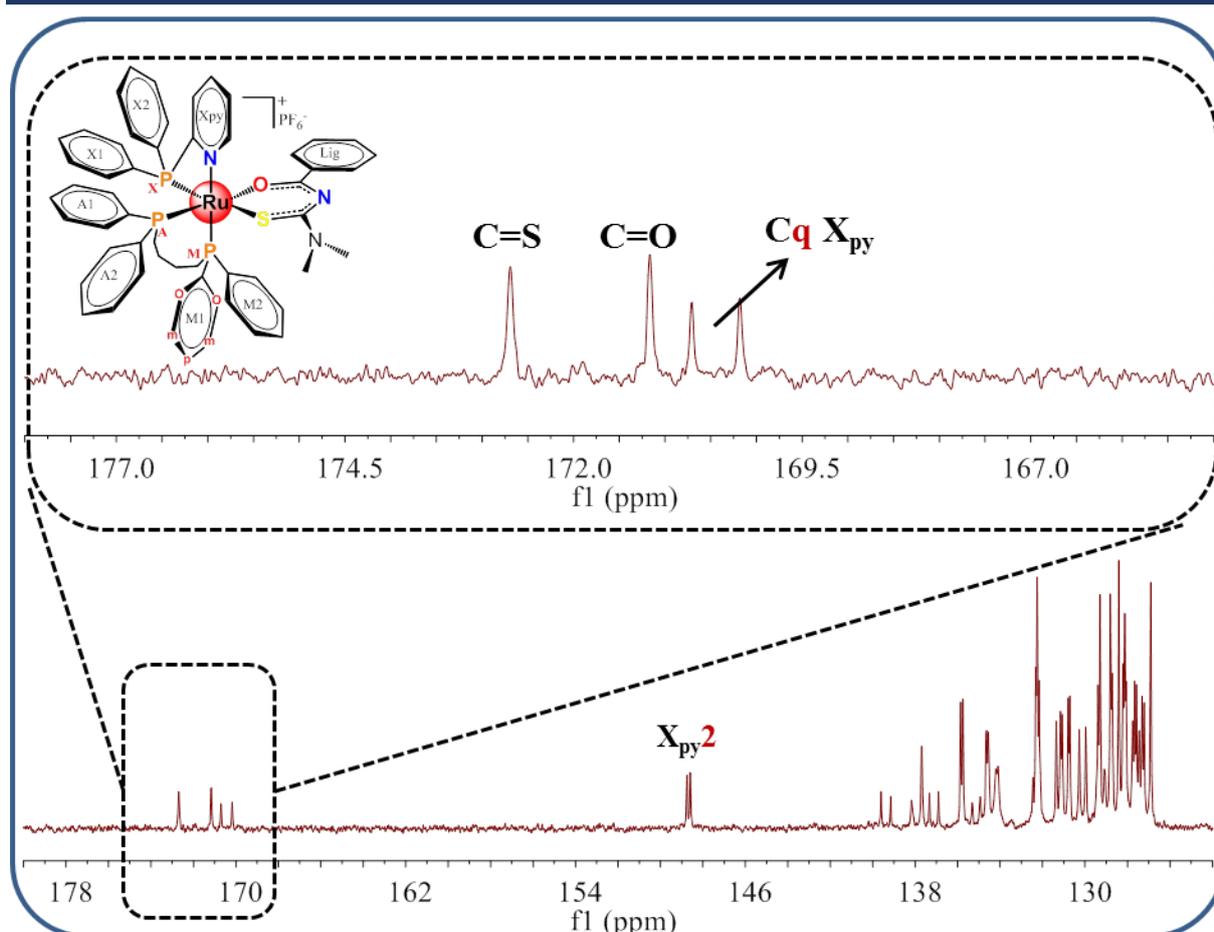


FIGURA 4.32- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dmbth})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**SPPM2**) em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono dos complexos estão descritos nas TABELAS A9-A13, no Apêndice.

Os sinais dos átomos de carbono mais desblindados, nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos são referentes aos carbonos quaternários $\text{C}=\text{S}$ e $\text{C}=\text{O}$ dos ligantes aciltioureias. No mapa de correlação HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ do complexo **SPPM2** (FIGURA 4.33) observou-se a correlação dos átomos de hidrogênios dos grupos metílicos (δ_{C} 3,71 e 3,12) do ligante aciltioureia com o carbono em δ_{C} 172,7, sendo este atribuído ao carbono $\text{C}=\text{S}$. A correlação dos átomos de hidrogênios fenílicos de posição *orto* do ligante aciltioureia (δ_{H} 6,40) com o átomo de carbono em δ_{C} 171,7, sugere que o simpleto é referente ao

grupo funcional C=O. Para todos os complexos **SPPM**, o sinal atribuído ao carbono do grupo tiol foi deslocado significativamente para regiões de menor frequência do espectro após a coordenação ao centro metálico, enquanto os sinais do carbono da carbonila apresentaram deslocamento para regiões de maior frequência, quando comparadas com os respectivos ligantes livres (TABELA 4.14).^{50,51}

TABELA 4.14- Deslocamentos químicos dos átomos de carbono referente aos grupos C=O e C=S dos ligantes aciltioureas livres, bem como nos complexos **SPPM**.

	Deslocamento químico (ppm)				$\Delta\delta^*$ (ppm)		
	Ligantes livres		Complexos		$\delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}}$		
	$\delta_{\text{C=S}}$	$\delta_{\text{C=O}}$	$\delta_{\text{C=S}}$	$\delta_{\text{C=O}}$	$\Delta\delta_{\text{C=S}}$	$\Delta\delta_{\text{C=O}}$	
dmth	180,2	163,6	SPPM2	172,7	171,7	-7,5	8,1
deth	179,3	163,8	SPPM3	171,5	171,1	-7,8	7,3
dpth	180,0	163,6	SPPM4	172,0	170,9	-8,0	7,3
dbth	179,3	163,9	SPPM5	171,8	171,1	-7,5	7,2
dfth	180,1	163,5	SPPM6	175,9	172,4	-4,2	8,9

* $\Delta\delta$ = variação do deslocamento químico dos átomos de carbono, $\Delta\delta = \delta_{\text{com}} - \delta_{\text{lig}}$.

Os sinais presentes na região alifática dos espectros de ^1H e ^{13}C dos complexos foram atribuídos tanto aos hidrogênios da cadeia alifática do ligante dppb quanto aos hidrogênios dos substituintes R2 dos ligantes aciltioureas. Em relação aos sinais referentes aos hidrogênios alifáticos do ligante foram atribuídos aos simpletos em δ_{H} 3,71 e 3,12 no espectro de ^1H do complexo **SPPM2** (FIGURA 4.29). Os grupos de hidrogênios quimicamente distintos demonstram o forte efeito de anisotropia. Estes sinais são correspondentes às duas metilas ligadas diretamente ao átomo de nitrogênio, o que provoca a desblindagem dos átomos de hidrogênios, normalmente os sinais atribuídos a estes grupos teriam deslocamento químico na faixa de δ_{H} 0,5 a 1,5. É importante ressaltar, que neste caso, não houve variações significativas nos valores de

deslocamento químico após a coordenação do ligante aciltiourea. Os átomos de hidrogênio do grupo $-CH_3$ em δ_H 3,71 são referentes ao carbono em δ_C 42,0 (FIGURA 4.33-A), enquanto os hidrogênios em δ_H 3,12 estão ligados ao carbono com o sinal em δ_C 40,5. Para os demais substituintes alifáticos R2 dos complexos, os hidrogênios fenílicos foram identificados. Via de regra e como esperado, tanto para os carbonos quanto para os hidrogênios da cadeia alifática dos ligantes, os átomos mais distantes do nitrogênio foram os mais blindados.

Outro fato importante é a ocorrência do acoplamento de longo alcance dos hidrogênios metílicos, ilustrado no mapa de correlação de HMBC $^1H-^{31}P$ (FIGURA 4.33-B), com o fósforo P_X . Neste caso, os acoplamentos entre os átomos de hidrogênios e fósforo podem ser observados como curvas de níveis de baixa intensidade, devido às distâncias entre os átomos de 6 ligações.

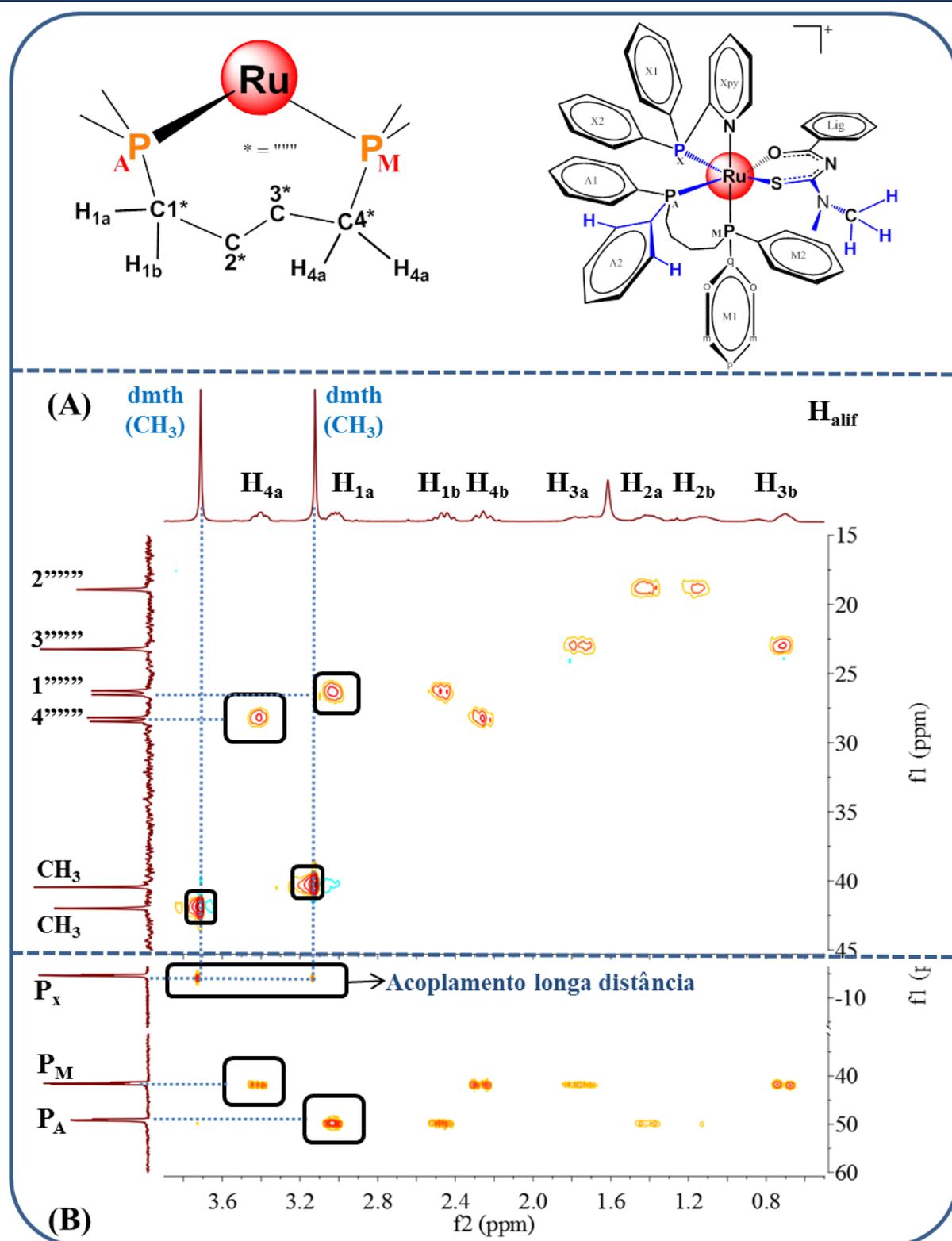


FIGURA 4.33- Mapas de contorno de (A) HMBC ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ e (B) HMBC ${}^1\text{H}$ - ${}^{31}\text{P}$ (constante de acoplamento de longa distância, 6 Hz) do complexo $[\text{Ru}(\text{dmth})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (SPPM2) na região alifática, em CDCl_3 . Inserida a estrutura química do complexo SPPM2.

O comportamento eletroquímico dos complexos desta série foi avaliado utilizando-se a técnica de voltametria cíclica, onde observou-se que todos os compostos apresentam processos redox similares. O voltamograma cíclico (FIGURA 4.34) registrado na presença do complexo **SPPM2** em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano, ilustra o comportamento redox similar dos demais complexos da série (FIGURA A72, no Apêndice – Parte VIII). Os valores dos potenciais dos processos redox dos complexos estão ilustrados na TABELA 4.15.

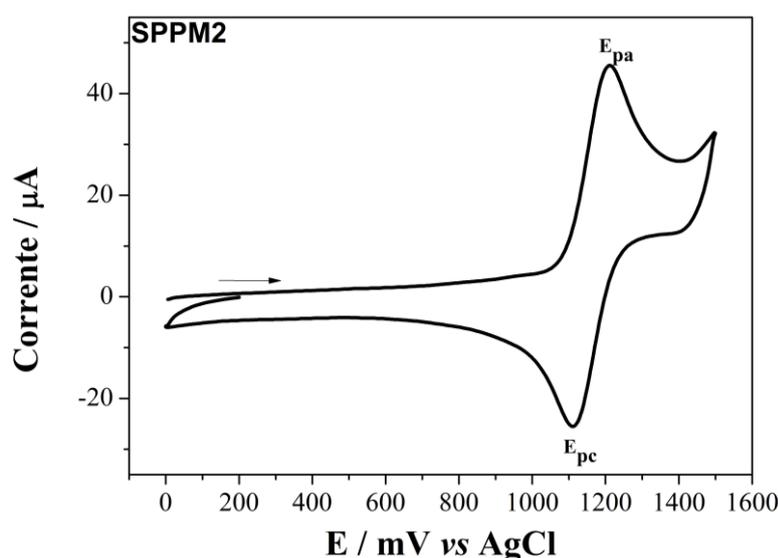


FIGURA 4.34- Voltamograma cíclico do **SPPM2**, em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA, em diclorometano à 100 mV s⁻¹. Eletrodo de trabalho de platina.

TABELA 4.15- Valores dos principais parâmetros eletroquímicos dos complexos **SPPM**.

Complexo	E _{pa1} / V	E _{pc2} / V	ΔE _p / V	E _{1/2} / V	I _{pa1} /I _{pc2}
SPPM2	1,21	1,10	0,11	1,16	1,33
SPPM3	1,25	1,13	0,12	1,19	1,36
SPPM4	1,21	1,09	0,12	1,15	1,34
SPPM5	1,24	1,14	0,10	1,19	1,21
SPPM6	1,26	1,16	0,10	1,21	1,42

No voltamograma cíclico de cada complexo observou-se um par de picos redox quasi-reversível, referente à transferência de um elétron do processo redox do centro metálico. Na varredura anódica dos voltamogramas cíclico, um pico é atribuído à oxidação do Ru(II)/Ru(III), enquanto na varredura catódica um pico referente à redução do Ru(III)/Ru(II). De maneira geral, o efeito indutivo dos diferentes substituintes alifáticos e fenílicos das aciltioureas não acarretou diferenças significativas nos potenciais $E_{1/2}$ (1,15-1,21 V vs Ag/AgCl) dos complexos **SPPM**. No conjunto das caracterizações, sugere-se que os diferentes substituintes alifáticos não ocasionaram diferenças relacionadas a efeitos eletrônicos.

Os potenciais redox dos complexos **SPPM** apresentaram um aumento após a coordenação dos ligantes aciltioureas em relação ao precursor *cis*-[RuCl₂(dphppy)(dppb)] ($E_{1/2}$ = 0,87 V).⁸⁷ Isso implica na maior estabilização eletroquímica do centro metálico, o que promove à diminuição da densidade eletrônica do rutênio e, conseqüentemente afeta a capacidade de realizar a retrodoação. Tal característica é correlacionada com diversos aspectos observados nas propriedades dos complexos, tais como as variações nos deslocamentos químicos dos fósforos no RMN de ³¹P{¹H} e o aumento de alguns comprimentos de ligação relacionados ao centro metálico.

Como esperado, os potenciais de oxidação do par Ru(II)/Ru(III) dos complexos análogos, contendo o ligante bipyridina (0,94-1,04 V vs Ag/AgCl), [Ru(OS)(bipy)(dppb)]PF₆,⁷⁷ sintetizados com os mesmos ligantes aciltioureas empregados neste trabalho são menores quando comparados com os complexos **SPPM**. De fato, o ligante dphppy deixa o centro metálico mais deficiente em elétrons, estabilizando melhor o estado de oxidação Ru(II) quando comparado com a bipyridina, uma vez que é mais difícil de retirar um elétron do mesmo. Como explicado anteriormente, o átomo de fósforo tem propriedades π -receptoras mais acentuadas que o átomos de nitrogênio dos anéis piridínicos, da bipyridina.

Os espectros eletrônicos de absorção na região UV-Vis obtidos a partir da solução dos complexos **SPPM** em diclorometano (FIGURA A73, no Apêndice – Parte IX) apresentaram um comportamento espectral idêntico. Uma banda de absorção com alto valor de absortividade molar (TABELA A15, no Apêndice – Parte IX) centrada em 230 nm foi observada, sendo atribuída às transições eletrônicas intraligante do tipo IL ($\pi \rightarrow \pi^*$), presentes nos anéis aromáticos dos ligantes fosfínicos. Na região de 362-340 nm, observou-se uma sobreposição das transições eletrônicas intraligante do tipo IL ($\pi \rightarrow \pi^*$) dos ligantes fosfínicos, grupo fenil do ligante aciltioureia e do anel piridínico da dphppy. Duas bandas de absorção de menor absortividade molar foram observadas em torno de 350 e 370 nm, atribuídas as transições de carga metal-ligante (MLCT) do tipo $d\pi Ru \rightarrow 3p\sigma^* d\pi$ (bifosfina) e $d\pi Ru \rightarrow \pi^*$ (grupo aciltioureia). Estas bandas, também têm contribuições das transições $n-\pi^*$ do ligante aciltioureia sobrepostas às bandas de transferência de carga metal-ligante. Os resultados estão em concordância com os resultados relatados para complexos similares.^{151,152}

As atribuições dos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram realizadas por meio de comparações dos espectros dos ligantes livres, precursor e dados da literatura. Os espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **SPPM** estão apresentados na seção Apêndice – Parte IX. As TABELAS 4.16 e 4.17 apresentam as tentativas de atribuição das principais bandas vibracionais dos complexos **SPPM**.

Nos espectros dos complexos da série **SPPM** é notada a ausência da banda alargada atribuídas ao estiramento $\nu N-H$ na região de 3200-3180 cm^{-1} , a qual é observada nos espectros dos ligantes livres. Tal observação indica a natureza aniônica dos ligantes aciltioureia após a coordenação ao centro metálico. As bandas de alta intensidade em torno de 840 e 557 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais do contraíon hexafluorofosfato (PF_6^-).

Nos complexos, os modos vibracionais dos ligantes aciltioureias C=O e C=S são característicos na região do infravermelho (TABELA 4.16). Após a coordenação do ligante, a banda referente ao estiramento C=S apresenta um forte deslocamento para regiões de menor energia. De modo sistemático, as variações dos comprimentos de onda da banda foram de 193-181 cm^{-1} após a coordenação. De maneira menos intensa, a banda atribuída ao estiramento C=S também apresentou deslocamento para regiões de menor energia em relação aos ligantes livres. Como discutido na seção de raios X, a coordenação ao centro metálico diminuiu o caráter de dupla das ligações C=S e C=O e conseqüentemente, promove o deslocamento para menores frequências destas.^{50,51}

TABELA 4.16- Tentativa de atribuição dos estiramentos característicos dos ligantes aciltioureias nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **SPPM** e dos ligantes aciltioureias livres, em KBr.

	Frequência Vibracional (cm^{-1})						
	Ligantes livres			Complexos			
	νNH	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C=S}$	νNH	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C=S}$	
dmth	3188	1694	1286	SPPM2	-	1501	1257
deth	3209	1682	1283	SPPM3	-	1500	1253
dpth	3178	1674	1281	SPPM4	-	1496	1252
dbth	3201	1687	1292	SPPM5	-	1506	1244
dfth	3184	1678	1285	SPPM6	-	1495	1259

ν = designa uma vibração de estiramento.

As bandas de absorção nos espectros atribuídas aos sistemas aromáticos dos ligantes fosfínicos dppb e dphppy foram comuns para todos os compostos. Entre 1600-1300 cm^{-1} estão os estiramentos vibracionais de C=N e C=C dos grupos aromáticos. Na faixa entre 3100-2800 cm^{-1} têm-se as bandas largas de média e baixa intensidade características dos estiramentos C—H alifáticos e aromáticos dos ligantes fosfínicos, além dos substituintes R2 das

aciltioureias. Em torno do centro metálico destacam-se as bandas pouco intensas na região de $490\text{-}501\text{ cm}^{-1}$ e $490\text{-}501\text{ cm}^{-1}$, referentes aos estiramentos Ru—S e Ru—O, respectivamente.⁵⁰

TABELA 4.17- Tentativa de atribuição das principais frequências vibracionais características nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **SPPM**, em KBr.

Atribuições	Frequência Vibracional (cm^{-1})				
	SPPM2	SPPM3	SPPM4	SPPM5	SPPM6
ν CH	3060	3060	3058	3056	3057
ν C=O	1501	1500	1496	1506	1495
ν C=N / ν C=C	1421	1417	1417	1418	1423
δ CH ₃	1360	1373	1364	1366	1360
ν C—S	1257	1253	1252	1244	1259
β C—H (ϕ)	1160	1159	1159	1159	1156
ν C—S	1132	1134	1136	1136	1134
q	1095	1093	1095	1093	1094
ν anel	1000	1000	998	999	999
ν PF ₆	839	838	842	840	843
ν PF ₆	557	556	558	557	559
ν Ru—P	525	524	527	528	522
y	506	507	508	506	508
ν Ru—S	437	443	445	440	443
ν Ru—N	420	420	419	413	419

ν = designa uma vibração de estiramento; β = designa uma vibração de deformação no plano; q = estiramentos dos átomos carbono e hidrogênio com contribuições dos P-fenil; y = as deformações angulares dos átomos carbono e hidrogênio com contribuições dos P-fenil; (ϕ)= anel fenílico.

4.2.1 - Estabilidade dos complexos SPPM

Da mesma forma que os complexos da série **AMP**, os complexos **SPPM** são insolúveis em meio aquoso, sendo apenas solúveis na mistura de DMSO/meio aquoso em concentrações de $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os estudos de estabilidade dos complexos foram realizados por RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ durante 48 h na mistura

DMSO/meio de cultura DMEM. A concentração dos complexos foi de 2,00 mM, e a proporção de DMSO e DMEM foi de 75:25 (v/v). Os sinais dos espectros permaneceram inalterados após 48 h (FIGURAS A70 e A71, no Apêndice – Parte VI), atestando que os complexos não sofrem alterações estruturais.

4.2.2 - Ensaios de viabilidade celular dos complexos

O ensaio de citotoxicidade dos complexos **SPPM** foi realizado frente às linhagens celulares derivadas de tumor humano, MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano de fenótipo mesenquimal) e A549 (adenocarcinoma epitelial alveolar de células basais de pulmão humano) e, frente às linhagens celulares humanas não tumorais derivadas de pulmão (MRC-5) e de mama (MCF-10A). Os valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em 48 h estão apresentados na TABELA 4.18.

A atividade citotóxica dos complexos contendo os ligantes aciltioureas frente às diferentes linhagens histológicas tumorais é consideravelmente maior quando comparada aos respectivos ligantes livres e ao precursor. De maneira sistemática, os compostos **SPPM** são ligeiramente mais citotóxicos nas células tumorais de pulmão em relação às células tumorais de mama. Também, quando comparados ao composto cisplatina, os complexos apresentam valores menores de IC_{50} em ambas as linhagens tumorais, o que evidência o potencial dos novos compostos. Nas células A549, o valor de IC_{50} da cisplatina foi 180 a 40 vezes maior em relação aos valores dos complexos **SPPM**. Contudo, a diferença de citotoxicidade entre eles na linhagem de mama tumoral foi consideravelmente menor, sendo os compostos aproximadamente de 10 a 2× mais ativos.

TABELA 4.18- Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) em 48 h dos complexos SPPM em diferentes linhagens histológicas de células e índices de seletividade (IS).

Complexos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) e índices de seletividade (IS)					
	Linhagem celular de mama			Linhagem celular de pulmão		
	Tumoral MDA-MB- 231	Não tumoral MCF-10A	IS <u>MCF-10</u> MDA	Tumoral A549	Não-tumoral MRC-5	IS <u>MRC5</u> A549
SPPM2	0,25 ± 0,02	1,60 ± 0,05	6,4	0,08 ± 0,02	0,80 ± 0,01	10
SPPM3	0,28 ± 0,01	1,44 ± 0,09	5,1	0,10 ± 0,01	1,12 ± 0,12	11
SPPM4	0,94 ± 0,02	1,20 ± 0,01	1,3	0,12 ± 0,02	3,97 ± 0,03	33
SPPM5	1,05 ± 0,10	1,74 ± 0,01	1,7	0,36 ± 0,01	6,44 ± 0,25	18
SPPM6	0,95 ± 0,15	1,61 ± 0,06	1,7	0,30 ± 0,02	4,60 ± 0,08	15
Precursor	3,51 ± 0,56	4,07 ± 0,28	1,1	9,76 ± 1,57	5,20 ± 0,67	0,5
Cisplatina	2,44 ± 0,20	23,90 ± 0,70	11,9	14,42 ± 1,45	29,09 ± 0,78	2,1

^aDados estão expressados como média ± SD (n= 3) com intervalo de confiança de 95%; Ensaio com 48 h de incubação dos compostos; IS= IC_{50(MCF-10A)}/ IC_{50(MDA-MB-231)}; IS= IC_{50(MRC-5)}/ IC_{50(A459)}.

A análise pontual da influência dos substituintes R2 dos ligantes aciltioureias na citotoxicidade dos compostos não é algo simples de se realizar, haja vista que para cada linhagem celular segue uma tendência. Alguns trabalhos do grupo com complexos contendo essa classe de ligantes, principalmente com centro metálico de platina, expõem a correlação entre os substituintes R2 dos ligantes aciltioureias e a citotoxicidade dos complexos metálicos, indicando que os grupos alifáticos de cadeia curta são mais citotóxicos do que os cadeia longa, pautadas frequentemente no menor volume, que de alguma forma favorecem tais complexos.^{74,76} O que de fato justifica, uma vez que a diferença do tamanho da cadeia alifática é mais representativa no volume total dos complexos fosfínicos de platina e paládio. Entretanto, no caso dos complexos **SPPM** a adoção destes argumentos, para explicar tal correlação é complexa.

Na análise a partir dos dados na linhagem tumoral de pulmão, os valores de IC₅₀ dos complexos **SPPM2**, **SPPM3** e **SPPM4** são estatisticamente iguais, os quais são um terço dos valores dos compostos **SPPM5** e **SPPM6**. Para a linhagem tumoral MDA-MB-231, o comportamento foi similar, com exceção do **SPPM4** que apresentou citotoxicidade semelhante aos complexos com os substituintes volumosos. Portanto, os complexos **SPPM2** e **SPPM3** com os substituintes (R2) alifáticos de cadeia curta (metil e etil) são ligeiramente mais citotóxicos frente às células tumorais em relação aos complexos **SPPM5** e **SPPM6** com os grupos butil e fenil. Já o complexo **SPPM4** com substituinte propil, possui comportamento dependente da linhagem celular (FIGURA 4.35).

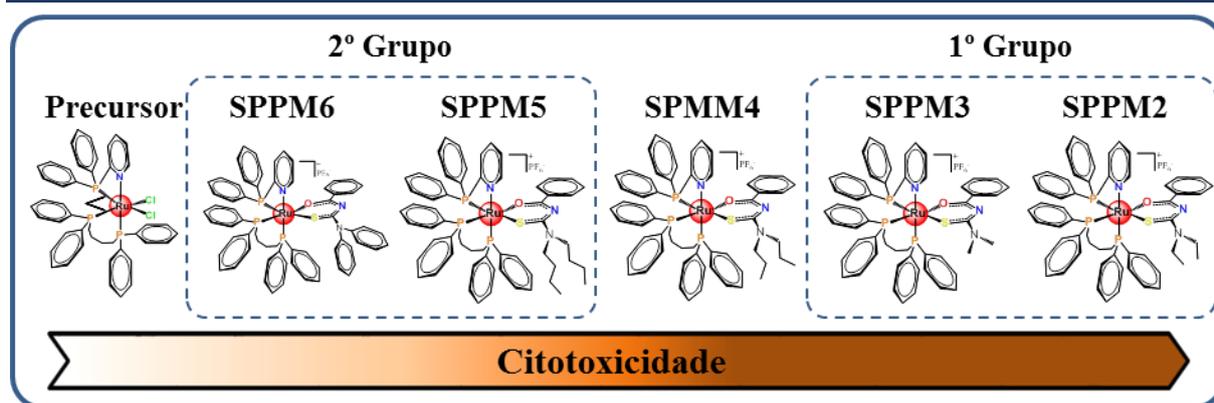


FIGURA 4.35- Classificação dos complexos **SPPM** de acordo com a atividade citotóxica nas linhagens celulares tumorais.

Em relação a lipofilicidade dos complexos (TABELA 4.19), não há uma relação direta entre o coeficiente de distribuição em água e n-octanol (5% DMSO) com a atividade citotóxica. O complexo **SPPM6** ($0,80 \pm 0,12$) com substituintes R_2 fenílicos apresenta o menor valor do coeficiente de distribuição entre os complexos. Adicionalmente, os valores do coeficiente de distribuição dos complexos com os substituintes R_2 alifáticos não apresentam diferenças significativas, **SPPM2** ($0,91 \pm 0,17$), **SPPM3** ($0,95 \pm 0,13$), **SPPM4** ($1,15 \pm 0,22$) e **SPPM5** ($1,12 \pm 0,16$). Portanto, para os complexos **AMP** não há diferença estática significativa entre os valores, o que demonstra que os diferentes substituintes R_2 dos ligantes aciltioureas não promovem diferença de lipofilicidade entre os complexos.

TABELA 4.19- Lipofilicidade dos complexos **SPPM**.

Composto	Lipofilicidade ^a
[Ru(dmbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (SPPM2)	(0,91 ± 0,17)
[Ru(debth)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (SPPM3)	(0,95 ± 0,13)
[Ru(dpbtth)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (SPPM4)	(1,15 ± 0,22)
[Ru(dbbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (SPPM5)	(1,12 ± 0,16)
[Ru(dfbth)(dphppy)(dppb)]PF ₆ (SPPM6)	(0,80 ± 0,12)

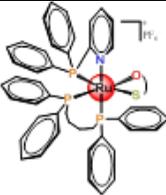
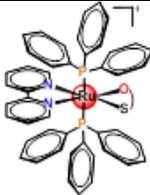
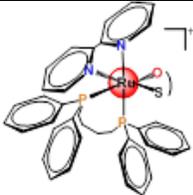
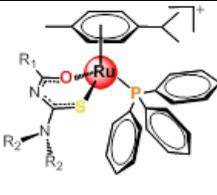
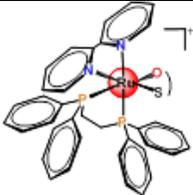
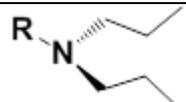
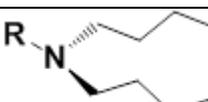
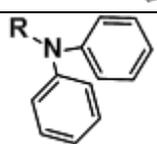
^aCoeficiente de distribuição em água e n-octanol.

Quando analisamos os índices de seletividade, todos os complexos demonstraram ser mais seletivos às células tumorais MDA-MB-231 e A549 em relação às respectivas linhagens celulares não tumorais. No par de linhagens de pulmão MRC-5 (não tumoral) e A549 (tumoral) é notável os índices de seletividade acima ou igual a 10 para todos os compostos. Destaca-se o índice de seletividade do complexo **SPPM4** com valor de 33, cujo IS é 16 vezes maior do que o cisplatina. Em relação aos valores de IS nas linhagens celulares de mama, os complexos **SPMM2** e **SPPM3** foram os destaques da série com os melhores valores. Estes resultados nos permitem reafirmar que sistematizar a seletividade de complexos frente às células é improvável.

A biblioteca de complexos fosfínicos de Ru(II) com os ligantes aciltioureias empregados neste trabalho não é vasta como a dos complexos fosfínicos de platina e paládio.^{74,75} Complexos fosfínicos de rutênio com os ligantes aciltioureias N,N-(dipropil)-N'-benzoiltioureia (dpbth) e N,N-(dibutil)-N'-benzoiltioureia (dbbth) não há descritos no grupo, com exceção dos complexos análogos [Ru(OS)(bipy)(dppb)]PF₆.^{77,136} Os compostos análogos com a bipyridina aos descritos neste trabalho, não foram avaliados frente às linhagens celulares tumorais de mama (MDA-MB-231) e de pulmão, inviabilizando a comparação entre as séries de complexos. Contudo, selecionamos os poucos compostos de Ru similares já descritos na literatura do grupo para analisar as atividades citotóxicas frente às células tumorais A549, bem como a seletividade em relação à respectiva linhagem celular não tumoral (TABELA 4.20). A partir da análise dos valores de IC₅₀ nas células tumorais de pulmão, observa-se que os compostos com ligantes aciltioureias são notavelmente ativos. Destaca-se a citotoxicidade dos complexos [Ru(dmth)(dphppy)(dppb)]PF₆ (**SPPM2**), quando se compara com demais complexos com o ligante dmth. O complexo **SPPM2** apresenta valor de IC₅₀ 3× menor quando se compara com os análogos bifosfínicos contendo a bipyridina. Em termos de índice de seletividade às células tumorais de pulmão, os

compostos contendo biperidina apresentam valores modestos, enquanto a série de complexos **SPPM** se diferencia pelos altos valores de IS.

TABELA 4.20- Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) e índices de seletividade (IS) dos complexos sintetizados no LERCI na linhagem celular de câncer de pulmão.

IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) (A549) e índices de seletividade (IS)					
					
	0,08 ± 0,01 10	-	0,23 ± 0,01 3,1	2,41 ± 0,03 0,76	0,25 ± 0,06 3,2
	0,10 ± 0,02 11	-	-	0,87 ± 0,02 1,0	-
	0,12 ± 0,02 33	-	-	-	-
	0,36 ± 0,01 18	-	-	-	-
	0,30 ± 0,02 15	0,28 ± 0,15 Nd	-	-	-

4.2.3 - Estudos de interação entre os complexos e o DNA

A fim de avaliar se o ácido desoxirribonucleico (DNA) é um possível alvo biológico dos complexos, os possíveis modos de interação entre os compostos **SPPM** e o DNA foram avaliados. As técnicas empregadas para o estudo foram medidas de viscosidade do DNA (FIGURA 4.36-A), avaliação da mobilidade eletroforética de plasmídeo em gel de agarose (FIGURA 4.36-B) e estudo por fluorescência do deslocamento do Hoechst do DNA (FIGURA 4.36-C). Alguns conceitos referentes aos ensaios foram abordados na secção 4.1.4 (Estudos de interação entre os complexos e DNA) descrita para os complexos da série **AMP**.

As medidas de viscosidade do CT-DNA foram realizadas em diferentes concentrações de complexos. Os efeitos dos complexos e do padrão na viscosidade da biomolécula estão apresentados na FIGURA 4.36-A, expressos em uma relação $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus [complexo]/[DNA]. No experimento utilizou-se o composto laranja de tiazol como padrão. Como esperado, o laranja de tiazol utilizado como padrão do modo intercalativo, ocasionou o aumento da viscosidade da biomolécula.^{127,128} A viscosidade do CT-DNA após a adição dos complexos **SPPM** não foi alterada significativamente nas razões complexo/DNA analisadas, sugerindo que não há modificações drásticas na estrutura secundária da biomolécula.

O efeito dos complexos sobre a estrutura do plasmídeo também foi avaliado pela capacidade de tais compostos em modificar a mobilidade do plasmídeo pUC18 no ensaio de eletroforese em gel.^{130,131} A FIGURA 4.36-B ilustra o gel de eletroforese do plasmídeo pUC18 em presença e ausência dos complexos. Na linha 2, encontra-se o controle, o DNA plasmidial em tampão Trisma-HCl à 10% DMSO, é possível observar as conformações circular (NC) e superenovelado (SC) do plasmídeo. As amostras de plasmídeo pUC18 tratadas com diferentes concentrações dos complexos (razões molares complexo/pUC18 de 0,5 e 1,0) estão representadas nas linhas 3-12. As amostras de plasmídeo

tratadas com os complexos apresentaram mobilidade eletroforética semelhante do controle (Linha 2). Tais resultados sugerem que os complexos não causam clivagem das fitas, torções, relaxamento ou mudanças conformacionais significativas no DNA, que sejam capazes de alterar a taxa de migração do plasmídeo.

Uma vez que as técnicas empregadas mostraram que os complexos não levam a alterações significativas nas estruturas secundária e terciária do DNA, realizou-se o ensaio competitivo com Hoechst 33324, com o intuito de averiguar se os compostos são capazes de deslocar o corante do sulco menor do DNA. O experimento possibilitou avaliar se os complexos **SPPM** interagem no sulco menor do DNA ou em regiões próximas.

Os espectros obtidos da espécie biomolecular DNA-Hoechst após a adição crescente do complexo **SPPM2** (FIGURA 4.36-C e, FIGURA A79 no Apêndice – Parte X), mostraram que o complexo levou a uma diminuição na intensidade de fluorescência do aduto. Todos os complexos da série **SPPM** atuaram como agentes supressores da fluorescência do DNA-Hoechst, de maneira que a supressão foi crescente com o aumento da concentração dos compostos. Na maior concentração dos complexos teve-se um decréscimo na intensidade do sinal de 75% a 86% do valor inicial (FIGURA A79-F, no Apêndice – Parte X). Os resultados demonstram a capacidade dos complexos em deslocar o marcador fluorescente e, conseqüentemente, indicando que os mesmos interagem no sulco menor do DNA ou regiões próximas.

Quando se analisa as afinidades de ligação do DNA com os complexos fosfínicos de rutênio com ligantes aciltioureas, praticamente todos os relatos literários associam às interações reversíveis, e na sua maioria são fracas, descartando os modos de ligação covalente e intercalativo ao DNA. Os compostos que foram avaliados por ensaios que possibilitaram a averiguação da interação no sulco menor do DNA, apresentaram resultados positivos.^{50,51,136} Sendo assim, o modo de associação reversível com o DNA via sulco menor é

característico desta classe de complexos. Por fim, analisando os resultados, sugerimos que não há "ação direta" dos complexos ao DNA, uma vez que as técnicas convergiram para conclusões semelhantes, os complexos não causam alterações significativas nas estruturas secundária e terciária do DNA. Desta forma, conclui-se que provavelmente o mecanismo de ação dos complexos que leva a morte celular não está relacionado à uma "ação direta" ao DNA, como é o caso de diversos compostos de rutênio relatados na literatura.

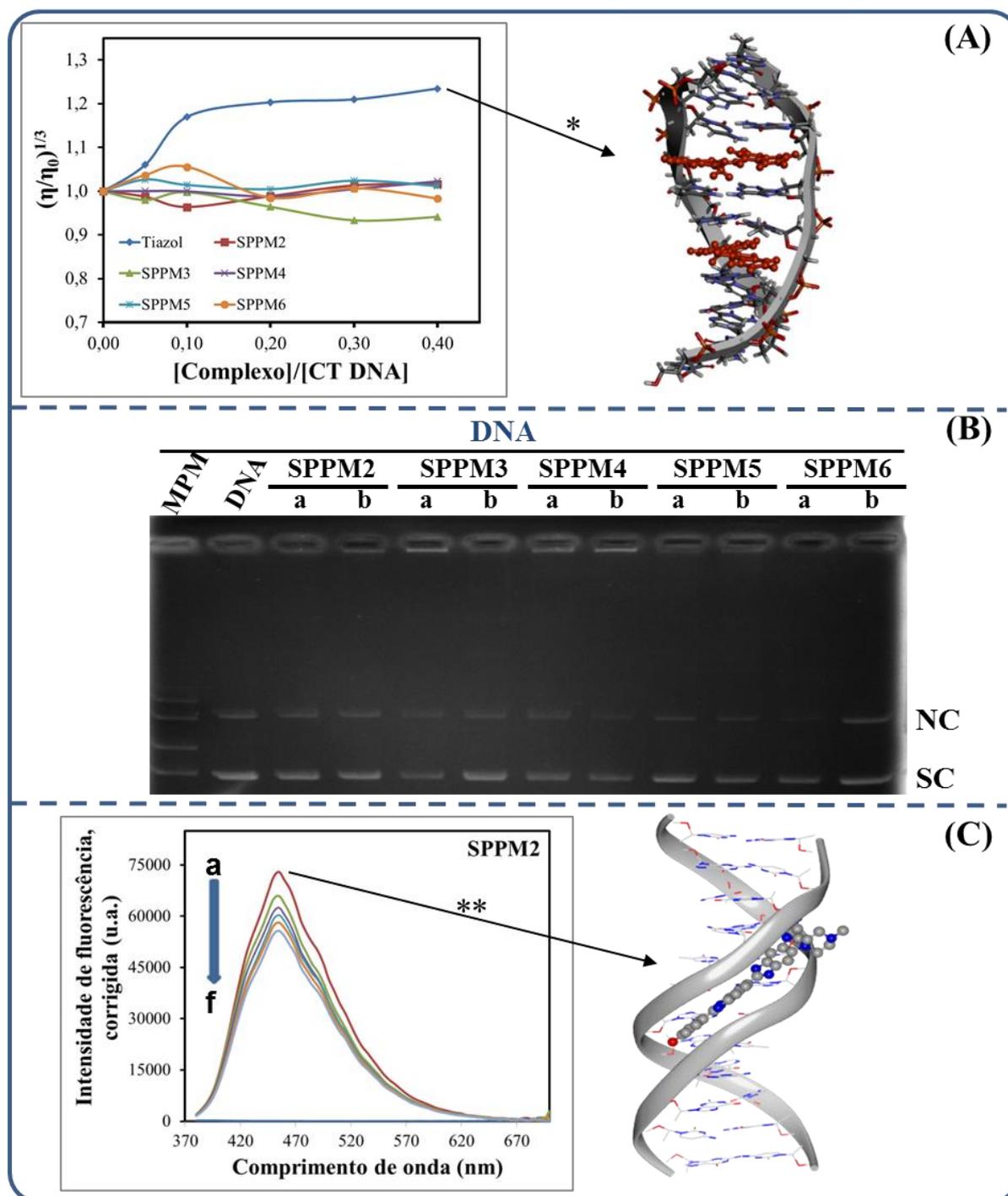


FIGURA 4.36- (A) Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos **SPPM** (0,0; 7,5; 15; 30; 45 e 60 μM) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares $[\text{composto}]/[\text{DNA}] = 0,05; 0,10; 0,20; 0,3$ e $0,40$, com concentração constante da DNA de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$; *Estrutura cristalina de um fragmento de DNA contendo o tiazol intercalado (adaptada)⁵¹; (B) Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pUC18 ($58 \mu\text{M}$) na ausência e presença dos

complexos (0, 29 e 58 μM), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] ($a= 0,50$ e $b=1,00$); MPM - Marcador de peso molecular; DNA- Controle negativo (em tampão Trisma-HCl com 10% DMSO); (C) Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos compostos **SPPM2** (b-f; $b= 7,5 \mu\text{M}$; $c= 15 \mu\text{M}$; $d= 22,5 \mu\text{M}$; $e= 30,0 \mu\text{M}$ e $f= 37,5 \mu\text{M}$), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM , respectivamente. Razão [Complexo]/[DNA-Hoechst]= 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5. Comprimento de onda de excitação a 350 nm, em tampão Trisma-HCl. **Estrutura cristalina de um fragmento de DNA inserido o Hoechst no sulco menor do DNA (adaptada)⁵¹.

4.2.4 - Ensaio biológicos

A partir da triagem dos complexos baseada na citotoxicidade e, principalmente na seletividade, o complexo **SPPM4** que se destacou frente à linhagem tumoral de pulmão (A549) foi selecionado para os estudos biológicos *in vitro* frente às células desta linhagem. O objetivo foi investigar as mudanças morfológicas, bem como a influência do composto no ciclo celular.

4.2.4.1 - Ensaio de sobrevivência celular

A capacidade das células tumorais A549 sobreviverem e se proliferarem para a formação de colônias foi avaliada pelo ensaio de sobrevivência celular. Após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50}$ (0,03 μM), $\frac{1}{2} \times \text{IC}_{50}$ (0,06 μM), $1 \times \text{IC}_{50}$ (0,12 μM) e $2 \times \text{IC}_{50}$ (0,24 μM)) por 48 h, as células foram mantidas por um período de 10 dias em condições adequadas para proliferarem e, ao fim foram registradas as fotografias apresentadas na FIGURA 4.37-A. Na concentração de $\frac{1}{4} \times \text{IC}_{50}$, as células que sobreviveram à exposição ao complexo conseguiram se proliferar e formar colônias, de maneira semelhante as células não tratadas. Contudo, nas demais concentrações do composto, as células foram drasticamente afetadas. O

número e tamanho de colônias formadas decresceram proporcionalmente com o aumento da concentração do **SPPM4**. Na concentração de $2 \times IC_{50}$, o composto inibiu totalmente a formação de colônias. O ensaio de sobrevivência demonstrou que o complexo apresenta efeito citotóxico e citostático nas células tumorais de pulmão (A549), a depender da concentração do composto.¹⁴²

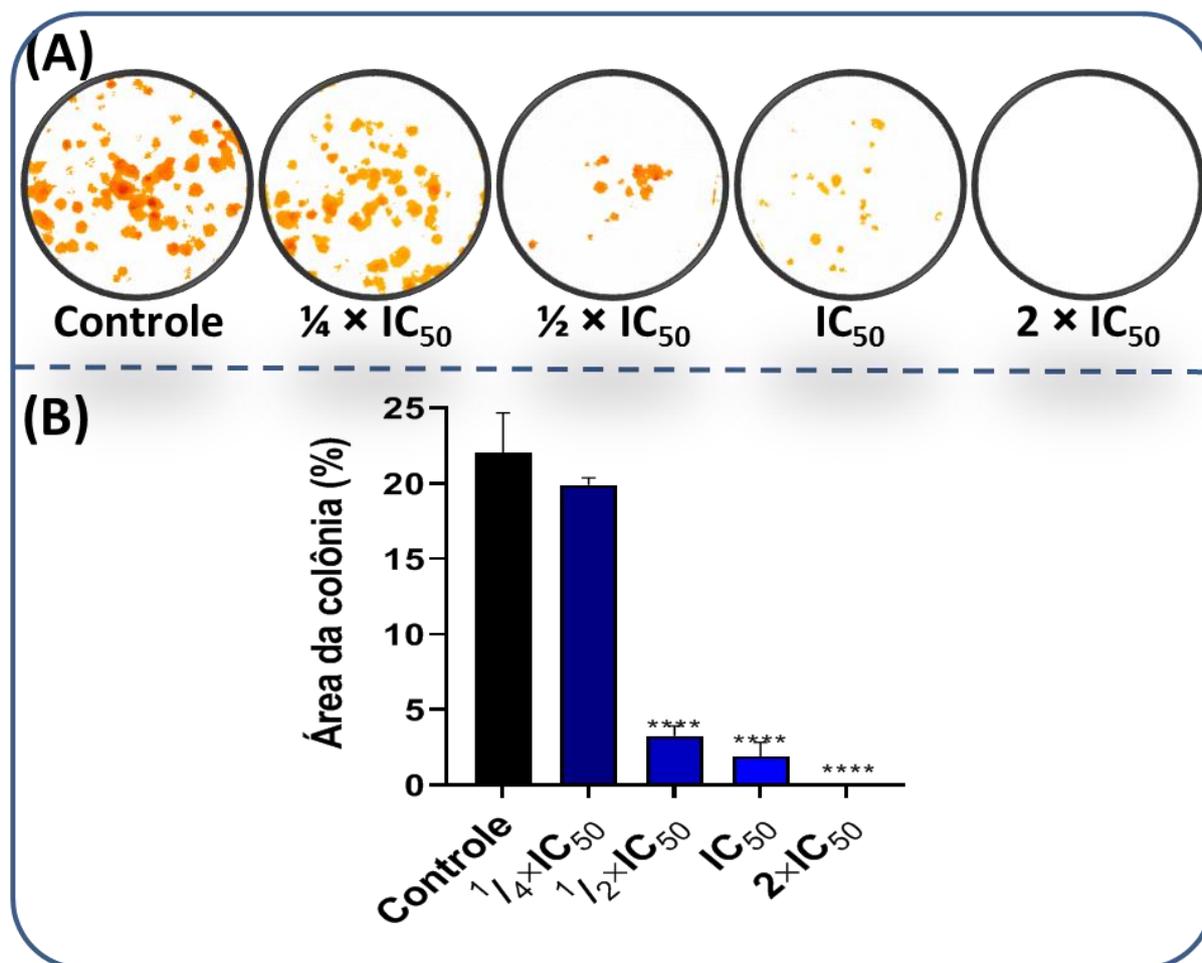


FIGURA 4.37- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem de célula A549, após tratamento com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($\frac{1}{4} \times IC_{50}$ (0,03 μM), $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,06 μM), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μM) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μM)) por 48 h. (A) Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da área de colônias.

4.2.4.2 - Ensaio de morfologia celular

A influência do composto **SPPM4** na morfologia das células tumorais de pulmão A549 foi investigada com o auxílio de um microscópio invertido acoplado a uma câmera fotográfica. As células foram micrografadas em 0, 24 e 48 h de exposição ao composto em concentrações distintas (FIGURA 4.38).

Após 24 h de exposição ao composto, não foi possível observar modificações morfológicas em comparação as células do controle negativo. No entanto, nas células tratadas com o composto após 48 h, foram observadas algumas alterações, como a diminuição da confluência celular em todas as amostras, e uma morfologia distinta das células do controle nas concentrações superiores ao IC_{50} . Essas diferenças são mais significativas na concentração de $4 \times IC_{50}$, em que células com formato irregular e circular podem ser observadas. Esses danos na morfologia das células, principalmente na concentração de $4 \times IC_{50}$, são indicativos de morte celular.⁶⁴

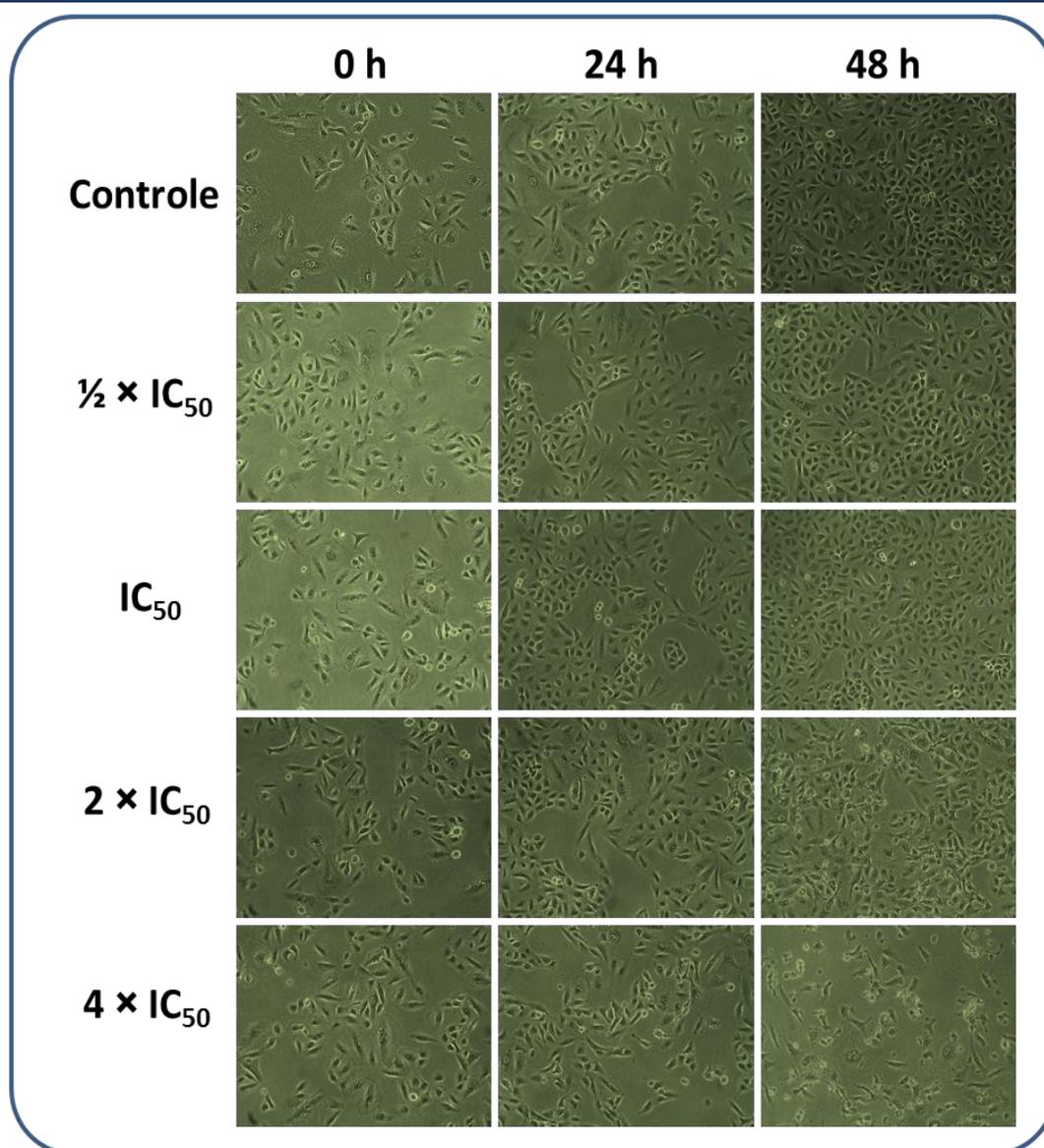


FIGURA 4.38- Alterações morfológicas das células tumorais de pulmão (A549) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M), $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (0,48 μ M)). As células foram tratadas com o **AMP4** e micrografadas por diferentes períodos. Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas.

4.2.4.3 - Ensaio de ciclo celular

A capacidade do complexo **SPPM4** em alterar o ciclo celular das células tumorais da linhagem A549 foi avaliada pela quantificação do DNA intracelular a partir da técnica de citometria de fluxo (FIGURA 4.39).

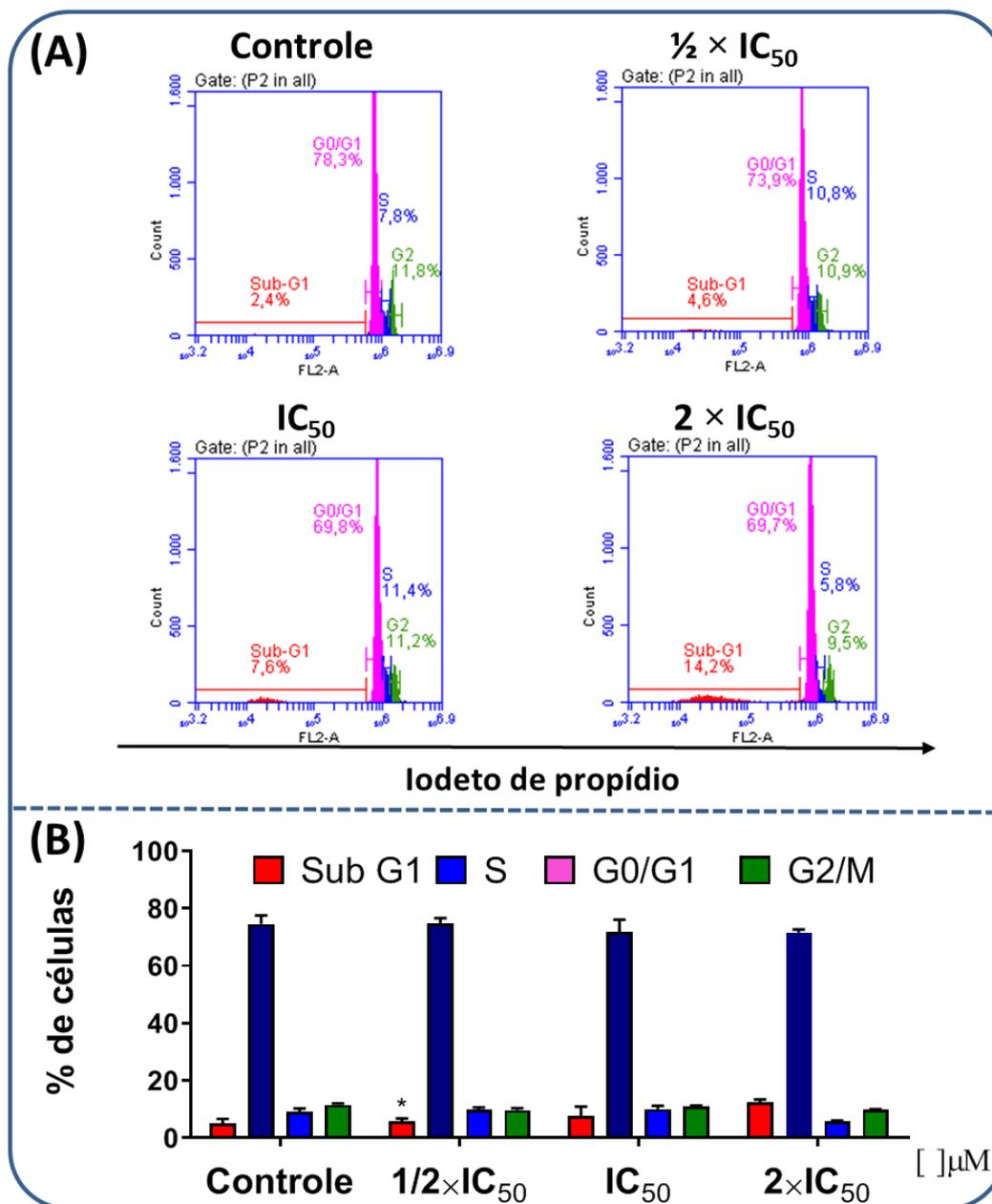


FIGURA 4.39- Ciclo celular das células tumorais de pulmão A549 após tratamento com o complexo **SPPM4** ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,06 μ M), $1 \times IC_{50}$ (0,12 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (0,24 μ M). (A) Histogramas do perfil de fluorescência PI (eixo x) vs contagens de células (eixo y), definindo as células em diferentes fases do ciclo

celular (G0/G1, S e G2/M) e com conteúdo anormal de DNA (sub-G1). Os histogramas são correspondentes a uma das triplicatas representativas; (B) Gráfico da distribuição do ciclo celular das células A549 em diferentes fases do ciclo celular e Sub-G1, após tratamento com diferentes concentrações do **SPPM4** por 48 h. Diferenças significativas do controle são indicadas por *p <0,05; **p <0,01 e ***p <0,001.

Nas células A549 do controle negativo (0,5% DMSO), a proporção das células as fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M foi de 74,6; 9,1 e 11,6%, respectivamente, e a porcentagem de células hipodiplóides (sub-G1) foi de 5,1%. O tratamento das células tumorais com o composto **SPPM4** alterou pouco a proporção de células das fases do ciclo celular em comparação com as células não tratadas. Na maior concentração de complexo (0,24 μ M), a população das células tratadas foi estatisticamente diferente quando comparada das células do controle negativo. Como pode ser observado no histograma da FIGURA 4.39-B, há um decréscimo na porcentagem das células na fase S, ($5,8 \pm 0,3$)%, tratadas com 0,24 μ M de complexo, enquanto nas células não tratadas foi de ($9,1 \pm 1,6$)%. Para as células das demais fases do ciclo celular não foram observadas variações. A porcentagem de células mais afetada foi referente às células fora do ciclo celular (células sub-G1), com padrão anormal no conteúdo de DNA. Nas células tratadas com 0,24 μ M do complexo, a fração de células mortas e com DNA fragmentado mais que duplicou, ($12,4 \pm 1,3$)%, quando comparada com a população no controle negativo ($5,1 \pm 2,2$)%.

O acúmulo de células hipodiplóides é compatível com a ocorrência de apoptose celular, uma vez que o processo de morte por apoptose leva a fragmentação do DNA. Tal resultado deverá ser confirmado com o ensaio de apoptose por Anexina V. Contudo, outros processos de morte celular, como autofagia, poderão estar envolvidos na morte das células A549.^{109,146}

4.2.4.4 - Ensaio de “Wound healing”

A habilidade do complexo **SPPM4** de inibir a migração das células tumorais A549 foi avaliada pelo experimento de “Wound healing” em uma monocamada celular confluyente com diferentes períodos de exposição ao composto (FIGURA 4.40).

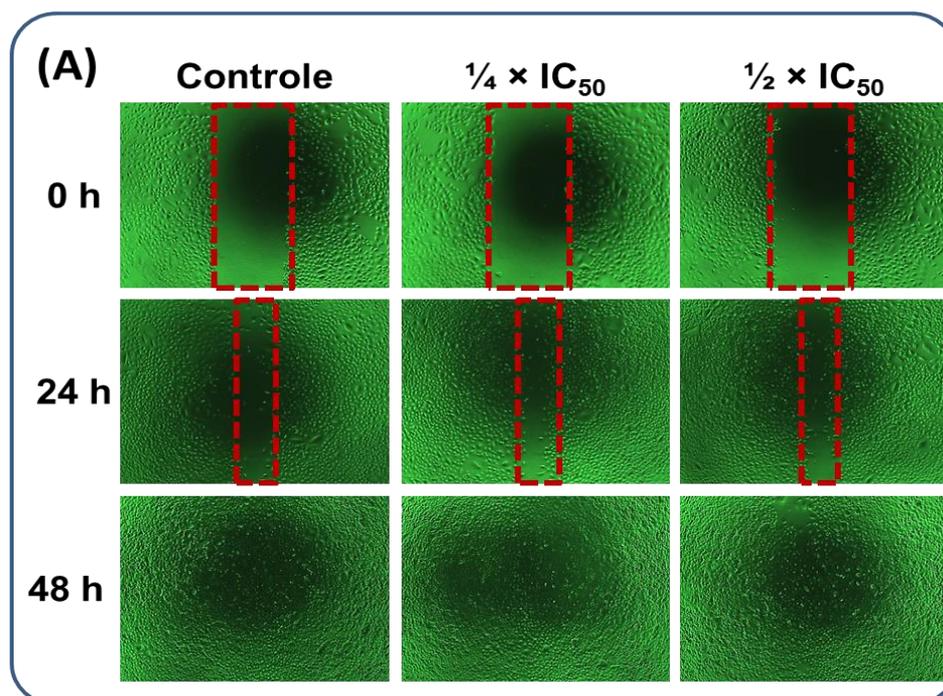


FIGURA 4.40- Ensaio de fechamento da “Wound healing” das células A549. Imagens micrográficas do fechamento da risca obtidas das células na ausência de tratamento (controle negativo) e tratadas com diferentes concentrações do complexo **SPPM4** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,03 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,06 μ M)). Imagens correspondentes a uma das triplicatas representativas.

No controle negativo, a área livre foi ocupada pelas células após 48 h, cuja porcentagem de fechamento foi de aproximadamente 99%. De forma semelhante ao controle, as células expostas as diferentes concentrações do composto mantiveram suas capacidades de migrar para a zona livre de células. Após 48 h de tratamento, o fechamento da ferida das células tratadas com o composto também foi completo em ambas as concentrações testadas. Em suma,

o complexo **SPPM4** não inibiu a migração das células tumorais A549, nas concentrações que não causam morte celular.

4.2.5 - Conclusão da série SPPM

Nesta seção do trabalho foi apresentada a série dos complexos fosfínicos de rutênio contendo os ligantes aciltioureias, de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**SPPM**). Por meio dos dados das estruturas cristalinas dos complexos **SPPM2**, **SPPM4** e **SPPM6** obtidos por difração de raios X, observou-se a coordenação dos ligantes aciltioureias de maneira bidentada com o átomo de oxigênio O1 em posição *trans* ao átomo de fósforo (P2) do ligante dppb e, o átomo de enxofre (S1) *trans* ao átomo de N_{py} do ligante dphppy. A coordenação do ligante leva a formação de um quelato de seis membros com ângulo de ligação S1—Ru—O1 rígido de aproximadamente 89,5°, adotando à conformação U em relação às posições das ligações (1)O=C(1)—N(2)—C(8)=S(1). Os espectros de RMN ¹H dos complexos também são consistentes com complexos de baixa simetria, em solução. Após a coordenação dos ligantes aciltioureias ao complexo precursor, os hidrogênios fenílicos do ligante aciltioureia foram blindados quando comparados aos dos ligantes livres, enquanto os hidrogênios alifáticos não apresentaram variações significativas nos deslocamentos químicos. Nos experimentos de RMN HMBC ¹H-³¹P foram observadas as curvas de níveis de baixa intensidade referentes aos acoplamentos de longo alcance dos hidrogênios metílicos dos ligantes aciltioureias com o átomo de fósforo P_X.

Os novos complexos apresentaram excelente atividade citotóxica frente às linhagens celulares derivadas de tumores humanos, MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano de fenótipo mesenquimal) e A549 (adenocarcinoma epitelial alveolar de células basais de pulmão humano). Os valores de IC₅₀ foram consideravelmente inferiores quando comparados aos dos ligantes aciltioureias, precursor e o composto cisplatina. Na linhagem de

mama MDA-MB-231, os valores de IC₅₀ dos complexos foram na faixa de 0,25 a 1,05 µM. Os valores de IC₅₀ foram de 0,08 a 0,36 µM na linhagem tumoral de pulmão A549. Contudo, o destaque para esta série foi a seletividade frente às células tumorais de pulmão A549 em comparação a respectiva linhagem não tumoral de pulmão (MRC-5). Os valores dos índices de seletividade foram acima ou igual a 10 para todos os compostos, sendo para o **SPPM4** de 33. Em relação à análise pontual da influência dos substituintes R2 das aciltioureias na citotoxicidade dos compostos, observa-se que os compostos **SPPM2** e **SPPM3** com substituintes alifáticos de cadeia curta (metil e etil) são ligeiramente mais citotóxicos em células tumorais em relação aos complexos **SPPM5** e **SPPM6** com os grupos butil e fenil.

O composto **SPPM4** foi escolhido para os estudos adicionais nas células tumorais de pulmão. O complexo exibiu efeito citotóxico e citostático nas células tumorais de pulmão (A549), levando a inibição da formação de colônias e diminuição do tamanho de colônias. Além disso, o complexo promoveu alterações morfológicas das células da linhagem A549, bem como a diminuição da confluência celular, porém não mostrou capacidade de inibir a migração celular quando avaliado pelo ensaio de Wound Healing. O tratamento das células tumorais com o composto **SPPM4** alterou pouco a proporção de células das fases do ciclo celular em comparação com as células não tratadas. A alteração observada foi um ligeiro decréscimo na porcentagem das células na fase S. A porcentagem de células mais afetada foi referente às células que não estão em nenhuma fase do ciclo celular, com padrão anormal no conteúdo de DNA, denominadas de células sub-G1. O acúmulo de células hipodiplóides (células sub-G1) é compatível com a ocorrência de apoptose, uma vez que o processo de morte por apoptose leva a fragmentação do DNA. Entretanto, devido a porcentagem da população das células hipodiplóides, também sugere-se que outros processos de morte das células tratadas com o composto **SPPM4** podem estar envolvidos.

Os complexos **SPPM** apresentaram interações reversíveis via sulco menor do DNA, conforme evidenciado no ensaio de deslocamento do Hoechst do sulco menor-DNA devido às interações dos complexos. Os complexos não causam alterações significativas nas estruturas secundária e terciária do DNA, o que nos permite sugerir que o mecanismo de ação dos complexos **SPMM** que leva a morte celular não está relacionado à uma “ação direta” ao DNA.

5 - CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho foram sintetizados e caracterizados complexos fosfínicos de rutênio de fórmulas gerais $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**AMP**) e $[\text{Ru}(\text{OS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**SPPM**), contendo os ligantes fosfínicos 1,2'-bis(difenilfosfina)butano (dppb) e 2-(difenilfosfina)piridina (dphppy), bem como os ligantes mercaptos (NS) ou aciltioureas (OS). As estruturas cristalinas dos complexos de ambas as séries, obtidas por difração de raios X demonstraram a coordenação bidentada do ligante 2-(difenilfosfina)piridina de forma assimétrica por meio de um anel quelato de quatro membros com ângulo rígido de aproximadamente 67° no fragmento P1—Ru—N1. Nos complexos da primeira série **AMP**, os ligantes mercaptos estão coordenados de maneira bidentada com o átomo de nitrogênio N2 em posição *trans* ao átomo de fósforo (P2) do ligante dppb e, o átomo de enxofre (S1) *trans* ao átomo de N_{py} do ligante dphppy. Já o modo de coordenação dos ligantes aciltioureas nos complexos **SPPM** foi via átomos de enxofre e oxigênio, mantendo a conformação em *U* dos ligantes.

A técnica de RMN de HMBC ^1H - ^{31}P permitiu a atribuição dos hidrogênios fenílicos com seu respectivo átomo de fósforo, bem como a posição *orto*, *meta* e *para* dos hidrogênios. Para os complexos de ambas as séries, a seguinte ordem foi estabelecida para os deslocamentos químicos dos hidrogênios de posição *orto* dos diferentes anéis fenílicos dos ligantes fosfínicos: $\delta\text{Ho}_{(\text{PA}1)} > \delta\text{Ho}_{(\text{PX}1)} > \delta\text{Ho}_{(\text{PX}2)} \approx \delta\text{Ho}_{(\text{PA}2)} > \delta\text{Ho}_{(\text{PM}1)} \approx \delta\text{Ho}_{(\text{PM}2)}$. Para a maioria dos anéis, os hidrogênios de posição *orto* são os mais desblindados entre os hidrogênios fenílicos. Nos experimentos de RMN HMBC ^1H - ^{31}P também foram observados acoplamentos escalar de longo alcance via centro metálico entre os hidrogênios dos ligantes mercaptos ou aciltioureas com os átomos de fósforo.

Os novos complexos apresentaram de boas a excelentes atividades citotóxicas frente às linhagens celulares derivadas de tumores humanos, MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo humano de fenótipo

mesenquimal) e A549 (adenocarcinoma epitelial alveolar de células basais de pulmão humano). Além disso, os compostos foram mais seletivos frente às células tumorais de pulmão e de mama quando comparado as linhagens não tumorais. Todos os 10 compostos foram mais seletivos as células tumorais de pulmão, quando comparado ao composto cisplatina, fármaco comercial amplamente usado no tratamento do câncer. Quando se compara as atividades citotóxicas das duas séries de complexos, ambas apresentaram elevada atividade citotóxica nas linhagens tumorais testadas. Os melhores complexos da cada série exibiram valores próximos de citotoxicidades, porém a principal diferença entre as séries é a seletividade frente à linhagem tumoral de pulmão A549, uma vez que os complexos com os ligantes aciltioureas são menos citotóxicos para a linhagem não tumoral de pulmão (MRC-5), quando comparados aos complexos com os ligantes mercaptos. Os valores dos índices de seletividade para a série **SPPM** foram igual ou acima de 10 para todos os compostos, enquanto o maior valor para a série **AMP** foi de 6,7. Para ambas as séries, as análises pontuais da influência dos ligantes mercaptos e aciltioureas foram realizadas e estão descritas nas conclusões de cada série.

Outro aspecto analisado foi a presença do ligante monofosfínico 2-difenilfosfinapiridina (dphppy) no cerne dos complexos, o qual resultou em compostos mais citotóxicos que os correspondentes complexos análogos contendo a bipyridina, $[\text{Ru}(\text{L})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$. Nossa sugestão é que a presença do ligante monofosfínico dphppy aumenta o caráter lipofílico dos complexos em comparação aos análogos com bipyridina, o que possivelmente proporcionar maior acúmulo e interações hidrofóbicas no meio intracelular. Desta forma, destaca-se a tendência de quanto mais grupos fosfínicos, maior é a citotoxicidade dos complexos frente às linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231) e pulmão (A549). O maior conjunto de dados para os complexos com os ligantes mercaptos possibilitou uma comparação da atividade citotóxica entre diferentes cernes de complexos. Comparando os valores de IC_{50} ,

os compostos **AMP** estão entre os mais citotóxicos em relação aos demais complexos de Ru-mercaptopurina/acilcitiourea, especificamente, quando se compara com seus respectivos análogos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$,^{61,65} e, em alguns casos tão citotóxicos quanto os respectivos compostos com duas bifosfinas⁶².

Diante desses resultados de seletividade para as células A549, o composto com melhor índice de seletividade de cada série foi selecionado para estudos adicionais nas células tumorais de pulmão, sendo eles o composto $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**AMP4**) da primeira série e o $[\text{Ru}(\text{dpbth})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (**SPPM4**) da segunda série. Ambos os complexos foram capazes de inibir a formação de colônias e alterar a morfologia de células da linhagem A549 nas concentrações próximas ao IC_{50} , e não mostraram capacidade de inibir a migração celular quando avaliados pelo ensaio de Wound Healing.

Uma característica principal para as células A549 tratadas com os complexos **AMP4** e **SPPM4** foi observada no ensaio de quantificação e distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. As células A549 tratadas com os compostos nas diferentes concentrações apresentaram um acúmulo da população com padrão anormal no conteúdo de DNA, denominadas de células sub-G1. A população de Sub-G1 são células hipodiplóides, ou seja, que representa a fração de células mortas e com DNA fragmentado, justificando a baixa quantidade de DNA nas células. A proporção de células nas fases do ciclo celular G0/G1 e G2/M também apresentou variação, quando comparadas ao controle das células não tratadas. A variação na proporção das fases do ciclo celular sugere que os complexos interferem na progressão do ciclo celular, principalmente o complexo **AMP4**. Adicionalmente, o acúmulo de células hipodiplóides é compatível com a ocorrência de apoptose, uma vez que o processo de morte por apoptose leva a fragmentação do DNA. O mecanismo de morte por apoptose foi confirmado para os compostos da série **AMP4**, a partir da realização do experimento de apoptose via citometria de fluxo, utilizando o

marcador fluorescente Anexina V-PE. Entretanto, possivelmente outros processos de morte celular das células tratadas com o composto **SPPM4** estão envolvidos.

Na busca dos possíveis alvos biológicos dos complexos, os complexos foram avaliados em relação a interação com o DNA. Os complexos de ambas as séries apresentaram interações reversíveis e fracas via sulco menor do DNA, porém não causaram danos na estrutura da biomolécula. Sendo assim, possivelmente os compostos não interferem nos processos de transcrição, replicação e outros do DNA, em uma “ação direta” na biomolécula. Conseqüentemente, o DNA não é considerado um alvo principal dos compostos. Por outro lado, os compostos inibiram parcialmente a atividade enzimática da topoisomerase IB, em concentrações próximas do IC₅₀. O estudo de relaxamento do plasmídeo superenovelado forneceu indícios iniciais que a topoisomerase IB humana é um potencial alvo biológico para os complexos da série **AMP**. Também, a capacidade dos compostos **AMP2**, **AMP4** e **AMP5** de inibir a atividade proteassomal foi avaliada. O composto [Ru(damc)(dphppy)(dppb)]PF₆ (**AMP5**) levou o acúmulo de proteína verde fluorescente ubiquitinada (uGFP) em células viáveis derivadas de rim embrionário humano (HEK293T), indicando que o complexo inibi a atividade proteolítica do proteassomo 26S no meio intracelular.

Os complexos da série **AMP** apresentaram de moderada a alta afinidade pela proteína HSA, viabilizando o transporte e a solubilidade dos compostos na corrente sanguínea. O processo de interação entre os complexos e HSA ocorre de forma espontânea e por meio de interações hidrofóbicas.

Por fim, reitera-se que os novos complexos apresentados neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de uma biblioteca sobre a atividade citotóxica e possíveis alvos biológicos dos complexos fosfínicos de rutênio contendo os ligantes mercaptos ou aciltioureias. A potencialidade dos complexos estimula a continuação de novos estudos neste âmbito.

Como perspectivas futuras a esse trabalho, novos ensaios podem ser sugeridos, os quais podemos citar:

(I) A condução de novos ensaios a fim de melhor compreender os mecanismos bioquímicos da ação citotóxica dos complexos frente às células tumorais, como por exemplo a análise das principais proteínas envolvidas nos mecanismos de morte celular induzidos pelos compostos pela técnica de Western Blotting.

(III) Pretende-se avaliar a toxicidade aguda associada aos complexos *in vivo* empregando o modelo Zebrafish. Os testes toxicológicos possibilitarão uma triagem toxicológica mais completa que permita a obtenção de resultados plausíveis para determinação da toxicidade aguda, toxicidade crônica, endócrina, genotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade.

(III) Como principal perspectiva futura, pretende se realizar testes de toxicidade e atividade antitumoral associada aos complexos *in vivo* em camundongos para avaliar a segurança e eficiência dos complexos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- (1) Kauffman, G. B. "Theories of Coordination Compounds". 2, **1994**.
 - (2) Kenny, R. G.; Marmion, C. J. "Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs - A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?". *Chem. Rev.* 119:, 1058, **2019**.
 - (3) Beller, M. "“Organometallics as Catalysts in the Fine Chemical Industry”". *J. Chem. Educ.* 57:, 272, **2013**.
 - (4) Mjos, K. D.; Orvig, C. "Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry". *Chem. Rev.* 114:, 4540, **2014**.
 - (5) Orvig, C.; Abrams, M. J. "Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction". *Chem. Rev.* 99:, 2202, **1999**.
 - (6) Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J.; Mansour, V. "Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents". *Nature* 222:, 385, **1969**.
 - (7) Calvert, H. "The Clinical Development of Carboplatin – A Personal Perspective". *Inorganica Chim. Acta* 498:, 118987, **2019**.
 - (8) Ibrahim, A.; Hirschfeld, S.; Cohen, M. H.; Griebel, D. J.; Williams, G. A.; Pazdur, R. "FDA Drug Approval Summaries: Oxaliplatin". *Oncologist* 9:, 8, **2004**.
 - (9) Shimada, M.; Itamochi, H.; Kigawa, J. "Nedaplatin: A Cisplatin Derivative in Cancer Chemotherapy". *Cancer Manag. Res.* 5:, 67, **2013**.
 - (10) Limited, A. I. "Lobaplatin". *Drugs R&D* 4:, 369, **2003**.
 - (11) Kang, J. H.; Kuh, H. J.; Lee, J. H.; Shin, J. Y.; Lee, K. S.; Jung, J. A.; Chang, D. Y. "Phase I/II Clinical and Pharmacokinetic Trial of Heptaplatin and 5-FU Combination Treatment in Advanced Head and Neck Cancer". *J. Clin. Oncol.* 23:, 5550, **2005**.
 - (12) Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J. "The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists". *Dalt. Trans.* 47:, 6645, **2018**.
 - (13) IARC. Cancer <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?projection=globe> (accessed Mar 20, 2020).
 - (14) Schilithz, A. O. C.; de Lima, F. C. da S.; Oliveira, J. F. P. O.; Santos, M. de O. S.; Rebelo, M. S. *Estimativa 2020: Incidência de Câncer No Brasil*; Rio de Janeiro, 2019.
 - (15) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. "Hallmarks of Cancer: The next Generation". *Cell* 144:, 646, **2011**.
 - (16) Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. "Review of Cancer from Perspective of Molecular". *J. Cancer Res. Pract.* 4:, 127, **2017**.
 - (17) Fouad, Y. A.; Aanei, C. "Revisiting the Hallmarks of Cancer". *Am J Cancer Res* 7:, 1016, **2017**.
 - (18) Fidler, I. "The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The ‘Seed and Soil’ Hypothesis Revisited". *Nat. Rev.* 3:, 46, **2003**.
 - (19) Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action". *Eur. J. Pharmacol.* 740:, 364, **2014**.
-

-
- (20) Aldossary, S. A. "Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin". *Biomed. Pharmacol. J.* 12:, 7, **2019**.
- (21) Kartalou, M.; Essigmann, J. M. "Mechanisms of Resistance to Cisplatin". *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 478:, 23, **2001**.
- (22) Rocha, C.; Silva, M.; Quinet, A.; Cabral-Neto, J.; Menck, C.; Rocha, C. R. R.; Silva, M. M.; Quinet, A.; Cabral-Neto, J. B.; Menck, C. F. M. "DNA Repair Pathways and Cisplatin Resistance: An Intimate Relationship". *Clinics* 73:, 1, **2018**.
- (23) Chen, D.; Milacic, V.; Frezza, M.; Dou, Q. "Metal Complexes, Their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy". *Curr. Pharm. Des.* 15:, 777, **2009**.
- (24) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. "Metal-Based Drugs That Break the Rules". *Dalt. Trans.* 45:, 3201, **2016**.
- (25) Englinger, B.; Pirker, C.; Heffeter, P.; Terenzi, A.; R. Kowol, C.; K. Keppler, B.; Berger, W. "Metal Drugs and the Anticancer Immune Response". *Chem. Rev.* 119:, 1519, **2018**.
- (26) Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M. "Metal Complexes in Cancer Therapy – An Update from Drug Design Perspective". *Drug Des. Devel. Ther.* 11:, 599, **2017**.
- (27) Pedrosa, P.; Carvalho, A.; Baptista, P.; Alexandra, F. Inorganic Coordination Chemistry: Where We Stand in Cancer Treatment? In *Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordination Chemistry*; Takashiro, A., Ed.; IntechOpen: London, 2018; Vol. 1, pp 37–65.
- (28) Zeng, L.; Gupta, P.; Chen, Y.; Wang, E.; Ji, L.; Chao, H.; Chen, Z. S. "The Development of Anticancer Ruthenium(II) Complexes: From Single Molecule Compounds to Nanomaterials". *Chem. Soc. Rev.* 46:, 5771, **2017**.
- (29) Lin, K.; Zhao, Z.-Z.; Bo, H.-B.; Hao, X.-J.; Wang, J.-Q. "Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy". *Front. Pharmacol.* 9:, 1323, **2018**.
- (30) Bacher, F.; Arion, V. B. "Ruthenium Compounds as Antitumor Agents: New Developments". *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.* 1, **2014**.
- (31) 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:, 1549, **2017**.
- (32) Gianferrara, T.; Bratsos, I.; Alessio, E. "A Categorization of Metal Anticancer Compounds Based on Their Mode of Action". *Dalt. Trans.* 37, 7588, **2009**.
- (33) Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A. "Noble Metals in Medicine: Latest Advances". *Coord. Chem. Rev.* 284:, 329, **2015**.
- (34) Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Crans, D. C.; Barreiro, E. J. "Ru(II)
-

- Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics?". *J. Med. Chem.* 61:, 5805, **2018**.
- (35) Lenis-Rojas, O. A.; Robalo, M. P.; Tomaz, A. I.; Carvalho, A.; Fernandes, A. R.; Marques, F.; Folgueira, M.; Yáñez, J.; Vázquez-García, D.; López Torres, M.; Fernández, A.; Fernández, J. J. "RuII(*p*-Cymene) Compounds as Effective and Selective Anticancer Candidates with No Toxicity in Vivo". *Inorg. Chem.* 57:, 13150, **2018**.
- (36) Peña, B.; Saha, S.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Dunbar, K. R. "Ruthenium(II)-Polypyridyl Compounds with π -Extended Nitrogen Donor Ligands Induce Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma (A549) Cells by Triggering Caspase-3/7 Pathway". *Inorg. Chem.* 57:, 12777, **2018**.
- (37) 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:, 1, **2019**.
- (38) Meier-Menches, S. M.; Gerner, C.; Berger, W.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. "Structure-Activity Relationships for Ruthenium and Osmium Anticancer Agents-towards Clinical Development". *Chem. Soc. Rev.* 47:, 909, **2018**.
- (39) Babak, M. V.; Meier, S. M.; Huber, K. V. M.; Reynisson, J.; Legin, A. A.; Jakupec, M. A.; Roller, A.; Stukalov, A.; Gridling, M.; Bennett, K. L.; Colinge, J.; Berger, W.; Dyson, P. J.; Superti-Furga, G.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G. "Target Profiling of an Antimetastatic RAPTA Agent by Chemical Proteomics: Relevance to the Mode of Action". *Chem. Sci.* 6:, 2449, **2015**.
- (40) 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:, 2925, **2014**.
- (41) Gill, M. R.; Cecchin, D.; Walker, M. G.; Mulla, R. S.; Battaglia, G.; Smythe, C.; Thomas, J. A. "Targeting the Endoplasmic Reticulum with a Membrane-Interactive Luminescent Ruthenium(II) Polypyridyl Complex". *Chem. Sci.* 4:, 4512, **2013**.
- (42) Smithen, D. A.; Yin, H.; Beh, M. H. R.; Hetu, M.; Cameron, T. S.; McFarland, S. A.; Thompson, A. "Synthesis and Photobiological Activity of Ru(II) Dyads Derived from Pyrrole-2-Carboxylate Thionoesters". *Inorg. Chem.* 56:, 4121, **2017**.
- (43) De Grandis, R. A.; de Camargo, M. S.; da Silva, M. M.; Lopes, É. O.; Padilha, E. C.; Resende, F. A.; Peccinini, R. G.; Pavan, F. R.; Desideri, A.; Batista, A. A.; Varanda, E. A. "Human Topoisomerase Inhibition and DNA/BSA Binding of Ru(II)-SCAR Complexes as Potential Anticancer Candidates for Oral Application". *BioMetals* 30:, 321, **2017**.
- (44) Neves, S. P.; de Carvalho, N. C.; da Silva, M. M.; Rodrigues, A. C. B. C.; Bomfim, L. M.; Dias, R. B.; Sales, C. B. S.; Rocha, C. A. G.; Soares, M. B. P.; Batista, A. A.; Bezerra, D. P. "Ruthenium Complexes Containing

- Heterocyclic Thioamidates Trigger Caspase-Mediated Apoptosis Through MAPK Signaling in Human Hepatocellular Carcinoma Cells". *Front. Oncol.* 9:, 562, **2019**.
- (45) 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". *Dalt. Trans.* **2020**.
- (46) Velozo-Sá, V. S.; Pereira, L. R.; Lima, A. P.; Mello-Andrade, F.; Rezende, M. R. M.; Goveia, R. M.; Pires, W. C.; Oliveira, K. M.; Ferreira, A. G.; Atista, A. A.; Silveira-Lacerda, E. P. "In Vitro Cytotoxicity and in Vivo Zebrafish Toxicity Evaluation of Ru(II)/2-Mercaptopyrimidine Complexes". *Dalt. Trans.* 48:, 6026, **2019**.
- (47) 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**.
- (48) Becceneri, A. B.; Popolin, C. P.; Plutin, A. M.; Maistro, E. L.; Castellano, E. E.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. "The Trans-[Ru(PPh₃)₂(O,S)(Bipy)]PF₆ Complex Has pro-Apoptotic Effects on Triple Negative Breast Cancer Cells and Presents Low Toxicity in Vivo". *J. Inorg. Biochem.* 186:, 70, **2018**.
- (49) da Silva, M.; de Camargo, M.; Castelli, S.; de Grandis, R.; Castellano, E.; Deflon, V.; Cominetti, M.; Desideri, A.; Batista, A. "Ruthenium(II)-Mercapto Complexes with Anticancer Activity Interact with Topoisomerase IB". *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**.
- (50) 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**.
- (51) 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:, 5072, **2020**.
- (52) 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". *Dalt. Trans.* 46:, 12865, **2017**.
- (53) 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**.
- (54) Valle, E. M. A.; Nascimento, F. B. do; Ferreira, A. G.; Batista, A. A.; Monteiro, M. C. R.; Machado, S. de P.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Azevedo, E. R. de. "Sobre Uma Degenerescência Acidental Nos Deslocamentos Químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Em Complexos Difosfínicos de Rutênio". *Quim. Nova* 31:, 807, **2008**.
- (55) 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 Lawsonsone-Containing Ruthenium(II) Complexes: Synthesis, Characterization and Anticancer Activity on 2D and 3D Spheroid Models of Prostate Cancer Cells". *Bioorg. Chem.* 85:, 455, **2019**.
- (56) Von Poelhsitz, G.; Batista, A. A.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Lang, E. S. "Synthesis and Characterization of Nitrosyl Complexes Containing 4,6-Dimethyl-Pyrimidine-2-Thiolato ('SpymMe2') as Ligand: $[\text{Ru}(\text{'SpymMe2'},-\text{N},-\text{S})(\text{'SpymMe2'},-\text{S})(\text{NO})(\text{P}-\text{P})](\text{PF}_6)$ (P-P = 1,2-Bis(Diphenylphosphino)Ethane or 1,2-Bis(Diphenylphosphino)Ethylene: X-R". *Inorg. Chem. Commun.* 8:, 805, **2005**.
- (57) Poelhsitz, G. Von; Batista, A. A.; Castellano, E. E.; Ellena, J. "On a Ruthenium Nitrosyl and Monocoordinated Biphosphine Monoxide Complex: Synthesis, Characterization and X-Ray Structure of $[\text{Ru}(\text{PyS})_2(\text{NO})(\text{DppmO}-\text{P})]\text{Cl}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ". *Inorg. Chem. Commun.* 9:, 773, **2006**.
- (58) Lima, B. A. V. Avaliação Das Atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfínicos de Rutênio (Células Tumorais MDA-MB 231) Benedicto, UFSCar, 2010.
- (59) do Nascimento, F. B.; Von Poelhsitz, G.; Pavan, F. R.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Deflon, V. M.; Batista, A. A. "Synthesis, Characterization, X-Ray Structure and in Vitro Antimycobacterial and Antitumoral Activities of Ru(II) Phosphine/Diimine Complexes Containing the "SpymMe2" Ligand, SpymMe2=4,6-Dimethyl-2-Mercaptopyrimidine". *J. Inorg. Biochem.* 102:, 1783, **2008**.
- (60) 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:, 30, **2016**.
- (61) Pires, W. C.; Lima, B. A. V.; de Castro Pereira, F.; Lima, A. P.; Mello-

- Andrade, F.; Silva, H. D.; da Silva, M. M.; Colina-Vegas, L.; Ellena, J.; Batista, A. A.; de Paul Silveira-Lacerda, E. "Ru(II)/Diphenylphosphine/Pyridine-6-Thiolate Complexes Induce S-180 Cell Apoptosis through Intrinsic Mitochondrial Pathway Involving Inhibition of Bcl-2 and P53/Bax Activation". *Mol. Cell. Biochem.* 438:, 199, **2018**.
- (62) Silva, M. M. Busca Por Complexos De Rutênio (II) Com Propriedades Quimioterapêuticas: Avaliação Da Atividade Antitumoral, Potencial Mutagênico E Inibição Da Enzima Topoisomerase IB, UFSCar, 2017.
- (63) Takarada, J. E.; Guedes, A. P. M.; Correa, R. S.; Silveira-Lacerda, E. de P.; Castelli, S.; Iacovelli, F.; Deflon, V. M.; Batista, A. A.; Desideri, A. "Ru/Fe Bimetallic Complexes: Synthesis, Characterization, Cytotoxicity and Study of Their Interactions with DNA/HSA and Human Topoisomerase IB". *Arch. Biochem. Biophys.* 636:, 28, **2017**.
- (64) Guedes, A. P. M.; Mello-Andrade, F.; Pires, W. C.; de Sousa, M. A. M.; da Silva, P. F. F.; de Camargo, M. S.; Gemeiner, H.; Amauri, M. A.; Gomes Cardoso, C.; de Melo Reis, P. R.; Silveira-Lacerda, E. de P.; Batista, A. A. "Heterobimetallic Ru(II)/Fe(II) Complexes as Potent Anticancer Agents against Breast Cancer Cells, Inducing Apoptosis through Multiple Targets". *Metallomics* 12:, 547, **2020**.
- (65) Da Silva, M. M.; De Camargo, M. S.; Correa, R. S.; Castelli, S.; De Grandis, R. A.; Takarada, J. E.; Varanda, E. A.; Castellano, E. E.; Deflon, V. M.; Cominetti, M. R.; Desideri, A.; Batista, A. A. "Non-Mutagenic Ru(II) Complexes: Cytotoxicity, Topoisomerase IB Inhibition, DNA and HSA Binding". *Dalt. Trans.* 48:, 14885, **2019**.
- (66) Camargo, M. S.; da Silva, M. M.; Correa, R. S.; Vieira, S. D.; Castelli, S.; D'Anessa, I.; De Grandis, R.; Varanda, E.; Deflon, V. M.; Desideri, A.; Batista, A. A. "Inhibition of Human DNA Topoisomerase IB by Nonmutagenic Ruthenium(II)-Based Compounds with Antitumoral Activity". *Metallomics* 8:, 179, **2016**.
- (67) Stewart, L.; Redinbo, M. R.; Qiu, X.; Hol, W. G. J.; Champoux, J. J. "A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I". *Science* (80-.). 279:, 1534, **1998**.
- (68) Pommier, Y. "Diversity of DNA Topoisomerases II and Inhibitors". *Biochimie* 80:, 255, **1998**.
- (69) Sordet, O.; Khan, Q. A.; Kohn, K. W.; Pommier, Y. "Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors". *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* 3:, 271, **2003**.
- (70) Bjornsti, M. A.; Kaufmann, S. H. "Topoisomerases and Cancer Chemotherapy: Recent Advances and Unanswered Questions". *F1000Research* 8:, 1, **2019**.
- (71) You, F.; Gao, C. "Topoisomerase Inhibitors and Targeted Delivery in Cancer Therapy". *Curr. Top. Med. Chem.* 19:, 713, **2019**.

-
- (72) Saeed, A.; Mustafa, M. N.; Zain-ul-Abideen, M.; Shabir, G.; Erben, M. F.; Flörke, U. "Current Developments in Chemistry, Coordination, Structure and Biological Aspects of 1-(Acyl/Aroyl)-3- (Substituted)Thioureas: Advances Continue". *J. Sulfur Chem.* 40:, 312, **2019**.
- (73) Saeed, A.; Flörke, U.; Erben, M. F. "A Review on the Chemistry, Coordination, Structure and Biological Properties of 1-(Acyl/Aroyl)-3- (Substituted) Thioureas". *J. Sulfur Chem.* 35:, 318, **2014**.
- (74) 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**.
- (75) Plutín, A. M.; Mocelo, R.; Alvarez, A.; Ramos, R.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Graminha, A. E.; Ferreira, A. G.; Batista, A. A. "On the Cytotoxic Activity of Pd(II) Complexes of N,N-Disubstituted-N'-Acylthioureas". *J. Inorg. Biochem.* 134:, 76, **2014**.
- (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'-Acylthiourea Complexes". *Inorg. Chem. Commun.* 63:, 74, **2016**.
- (77) Barolli, J. P.; Maia, P. I. S.; Colina-Vegas, L.; Moreira, J.; Plutin, A. M.; Mocelo, R.; Deflon, V. M.; Cominetti, M. R.; Camargo-Mathias, M. I.; Batista, A. A. "Heteroleptic Tris-Chelate Ruthenium(II) Complexes of N,N-Disubstituted-N'-Acylthioureas: Synthesis, Structural Studies, Cytotoxic Activity and Confocal Microscopy Studies". *Polyhedron* 126:, 33, **2017**.
- (78) Maggini, S. "Classification of P,N-Binucleating Ligands for Hetero- and Homobimetallic Complexes". *Coord. Chem. Rev.* 253:, 1793, **2009**.
- (79) Essoun, E.; Wang, R.; Aquino, M. A. S. "Disassembly of Diruthenium(II,III) Tetraacetate with P–N Donor Ligands". *Inorganica Chim. Acta* 454:, 97, **2017**.
- (80) Chelucci, G.; Orrù, G.; Pinna, G. A. "Chiral P,N-Ligands with Pyridine-Nitrogen and Phosphorus Donor Atoms. Syntheses and Applications in Asymmetric Catalysis". *Tetrahedron* 59:, 9471, **2003**.
- (81) Carroll, M. P.; Guiry, P. J. "P,N Ligands in Asymmetric Catalysis". *Chem. Soc. Rev.* 43:, 819, **2014**.
- (82) Wajda-Hermanowicz, K.; Ciunik, Z.; Kochel, A. "Syntheses and Molecular Structure of Some Rh and Ru Complexes with the Chelating Diphenyl (2-Pyridyl)Phosphine Ligand". *Inorg. Chem.* 45:, 3369, **2006**.
- (83) Espinet, P.; Soulantica, K. "Phosphine-Pyridyl and Related Ligands in Synthesis and Catalysis". *Coord. Chem. Rev.* 193–195:, 499, **1999**.
- (84) Zhang, Z.-Z.; Cheng, H. "Chemistry of 2-(Diphenylphosphino)Pyridine".
-

- Coord. Chem. Rev.* 147:, 1, **1996**.
- (85) Kumar, P.; Yadav, M.; Singh, A. K.; Pandey, D. S. "Synthesis and Characterization of Some Novel Ruthenium(II) Complexes Containing Thiolate Ligands". *J. Organomet. Chem.* 695:, 994, **2010**.
- (86) Kumar, P.; Singh, A. K.; Sharma, S.; Pandey, D. S. "Structures, Preparation and Catalytic Activity of Ruthenium Cyclopentadienyl Complexes Based on Pyridyl-Phosphine Ligand". *J. Organomet. Chem.* 694:, 3643, **2009**.
- (87) Schutte, R. P.; Rettig, S. J.; Joshi, A. M.; James, B. R. "Synthesis, Structure, and Reactivity of [RuCl(PP)L]PF₆ (PP) = (PPh₃)₂, Ph₂P(CH₂)₄PPh₂; L) P(Py)₃, PPh(Py)₂, Py) 2-Pyridyl). The "Missing" P,N,N'-Coordination Mode for 2-Pyridylphosphines". *Inorg. Chem.* 36:, 5809, **1997**.
- (88) 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:, 945, **1966**.
- (89) Jung, C. W.; Garrou, P. E.; Hoffman, P. R.; Caulton, K. G. "Reexamination of the Reactions of Ph₂P(CH₂)_nNPPh₂ (n = 1-4) with RuCl₂(PPh₃)₃". *Inorg. Chem.* 23:, 726, **1984**.
- (90) Cairo, R. R.; Stevens, A. M. P.; de Oliveira, T. D.; Batista, A. A.; Castellano, E. E.; Duque, J.; Soria, D. B.; Fantoni, A. C.; Corrêa, R. S.; Erben, M. F. "Understanding the Conformational Changes and Molecular Structure of Furoyl Thioureas upon Substitution". *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 176:, 8, **2017**.
- (91) Farrugia, L. J. "WinGX Suite for Small-Molecule Single-Crystal Crystallography". *J. Appl. Crystallogr.* 32:, 837, **1999**.
- (92) Farrugia, L. J. "WinGX and ORTEP for Windows: An Update". *J. Appl. Crystallogr.* 45:, 849, **2012**.
- (93) Sheldrick, G. M. "A Short History of SHELX". *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 64:, 112, **2008**.
- (94) Farrugia, L. J. "ORTEP-3 for Windows- a Version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI)". *30:*, 568, **1997**.
- (95) 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:, 466, **2008**.
- (96) Garcia Velho, R. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico, 2006.
- (97) Baka, E.; Comer, J. E. A.; Takács-Novák, K. "Study of Equilibrium Solubility Measurement by Saturation Shake-Flask Method Using Hydrochlorothiazide as Model Compound". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46:, 335, **2008**.
- (98) Gilroy, E. L.; Hicks, M. R.; Smith, D. J.; Rodger, A. "Viscosity of

-
- Aqueous DNA Solutions Determined Using Dynamic Light Scattering". *Analyst* 136:, 4159, **2011**.
- (99) Scruggs, R. L.; Ross, P. D. "Viscosity Study of DNA". *Biopolymers* 2:, 593, **1964**.
- (100) Naveenraj, S.; Anandan, S. "Binding of Serum Albumins with Bioactive Substances – Nanoparticles to Drugs". *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 14:, 53, **2013**.
- (101) Ross, P. D.; Subramanian, S. "Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability¹". *Biochemistry* 20:, 3096, **1981**.
- (102) Dantuma, N. P.; Lindsten, K.; Glas, R.; Jellne, M.; Masucci, M. G. "Short-Lived Green Fluorescent Proteins for Quantifying Ubiquitin/Proteasome- Dependent Proteolysis in Living Cells". *Nat. Biotechnol.* 18:, 538, **2000**.
- (103) Mosmann, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays". *J. Immunol. Methods* 65:, 55, **1983**.
- (104) Yamaguchi, H.; Wyckoff, J.; Condeelis, J. "Cell Migration in Tumors". *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:, 559, **2005**.
- (105) Paul, C. D.; Mistriotis, P.; Konstantopoulos, K. "Cancer Cell Motility: Lessons from Migration in Confined Spaces". *Nat. Rev. Cancer* 17:, 131, **2017**.
- (106) Clark, A. G.; Vignjevic, D. M. "Modes of Cancer Cell Invasion and the Role of the Microenvironment". *Curr. Opin. Cell Biol.* 36:, 13, **2015**.
- (107) Carbalho, A. T.; Ribeiro, G. A.; Nogueira, R. F.; dos Santos, Á. L. B. *Citometria de Fluxo*; Rio de Janeiro, 2010.
- (108) Otto, T.; Sicinski, P. "Cell Cycle Proteins as Promising Targets in Cancer Therapy". *Nat. Rev. Cancer* 17:, 94, **2017**.
- (109) Gordon, E.; Ravicz, J.; Liu, S.; Chawla, S.; Hall, F. "Cell Cycle Checkpoint Control: The Cyclin G1/Mdm2/P53 Axis Emerges as a Strategic Target for Broad-spectrum Cancer Gene Therapy - A Review of Molecular Mechanisms for Oncologists". *Mol. Clin. Oncol.* 9:, 115, **2018**.
- (110) Kumar, P.; Singh, A. K.; Yadav, M.; Li, P. Z.; Singh, S. K.; Xu, Q.; Pandey, D. S. "Synthesis and Characterization of Ruthenium(II) Complexes Based on Diphenyl-2-Pyridylphosphine and Their Applications in Transfer Hydrogenation of Ketones". *Inorganica Chim. Acta* 368:, 124, **2011**.
- (111) Corrêa, R. S.; Da Silva, M. M.; Graminha, A. E.; Meira, C. S.; Dos Santos, J. A. F.; Moreira, D. R. M.; Soares, M. B. P.; Von Poelhsitz, G.; Castellano, E. E.; Bloch, C.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. "Ruthenium(II) Complexes of 1,3-Thiazolidine-2-Thione: Cytotoxicity against Tumor Cells and Anti-Trypanosoma Cruzi Activity Enhanced upon Combination with Benznidazole". *J. Inorg. Biochem.* 156:, 153, **2016**.
-

-
- (112) El-khateeb, M.; Damer, K.; Görls, H.; Weigand, W. "Pyridine- and Pyrimidine-2-Thiolate Complexes of Ruthenium". *J. Organomet. Chem.* 692:, 2227, **2007**.
- (113) Caramor, G. F.; Oliveira, K. T. de. "Aromaticidade – Evolução Histórica Do Conceito e Critérios Quantitativos". *Quim. Nova* 32:, 1871, **2009**.
- (114) Lin, C.; Skufca, J.; Partch, R. E. "New Insights into Prediction of Weak π - π Complex Association through Proton-Nuclear Magnetic Resonance Analysis". *BMC Chem.* 14:, 1, **2020**.
- (115) Abbehausen, C.; de Paiva, R. E. F.; Formiga, A. L. B.; Corbi, P. P. "Studies of the Tautomeric Equilibrium of 1,3-Thiazolidine-2-Thione: Theoretical and Experimental Approaches". *Chem. Phys.* 408:, 62, **2012**.
- (116) Gómez-Zavaglia, A.; Reva, I. D.; Frija, L.; Cristiano, M. L.; Fausto, R. "Molecular Structure, Vibrational Spectra and Photochemistry of 5-Mercapto-1-Methyltetrazole". *J. Mol. Struct.* 786:, 182, **2006**.
- (117) Spinner, E. "The Infrared Spectra and Structures of the Hydrochlorides of 4-Mercaptopyridine and 4-Mercaptoquinoline". *Spinner* 604:, 3127, **1962**.
- (118) Poelhsitz, G. Von. Nitrosilo Complexos De Rutênio Com Ligantes Bifosfínicos: Espectroscopia, Eletroquímica, Estudo Da Reatividade E Liberação De NO, UFScar, 2005.
- (119) Tavares, L. C. "QSAR: A Abordagem de Hansch". *Quim. Nova* 27:, 631, **2004**.
- (120) Andrés, A.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. M. "Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (Log D) from Low Drug Amounts". *Eur. J. Pharm. Sci.* 76:, 181, **2015**.
- (121) Lee, P.; Wu, X. "Review: Modifications of Human Serum Albumin and Their Binding Effect". *Curr Pharm Des.* 21:, 1862, **2015**.
- (122) Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. "Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of Human Serum Albumin". *J. Mol. Biol.* 353:, 38, **2005**.
- (123) 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:, 1, **2019**.
- (124) Helms, M. K.; Petersen, C. E.; Bhagavan, N. V.; Jameson, D. M. "Time-Resolved Fluorescence Studies on Site-Directed Mutants of Human Serum Albumin". *FEBS Lett.* 408:, 67, **1997**.
- (125) Pages, B. J.; Ang, D. L.; Wright, E. P.; Aldrich-Wright, J. R. "Metal Complex Interactions with DNA". *Dalt. Trans.* 44:, 3505, **2015**.
- (126) Kellett, A.; Molphy, Z.; Slator, C.; McKee, V.; Farrell, N. P. "Molecular Methods for Assessment of Non-Covalent Metallodrug-DNA Interactions". *Chem. Soc. Rev.* 48:, 971, **2019**.
-

-
- (127) Wei, Y.; Guo, L. H. "Binding Interaction between Polycyclic Aromatic Compounds and DNA by Fluorescence Displacement Method". *Environ. Toxicol. Chem.* 28:, 940, **2009**.
- (128) Biver, T.; García, B.; Leal, J. M.; Secco, F.; Turriani, E. "Left-Handed DNA: Intercalation of the Cyanine Thiazole Orange and Structural Changes. A Kinetic and Thermodynamic Approach". *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12:, 13309, **2010**.
- (129) Villarreal, W.; Colina-Vegas, L.; Rodrigues De Oliveira, C.; Tenorio, J. C.; Ellena, J.; Gozzo, F. C.; Cominetti, M. R.; Ferreira, A. G.; Ferreira, M. A. B.; Navarro, M.; Batista, A. A. "Chiral Platinum(II) Complexes Featuring Phosphine and Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents". *Inorg. Chem.* 54:, 11709, **2015**.
- (130) Makovets, S. *DNA Electrophoresis- Methods and Protocols*, 1st ed.; Walker, J. M., Ed.; Humana Press: London, 2013.
- (131) Alotaibi, S. H.; Momen, A. A. Anticancer Drugs' Deoxyribonucleic Acid (DNA) Interactions. In *Biophysical Chemistry - Advance Applications resembles*; Chetty, G., Ed.; IntechOpen: London, 2012; pp 1–24.
- (132) Chen, J. C.; Jockusch, R. A. "Protomers of DNA-Binding Dye Fluoresce Different Colours: Intrinsic Photophysics of Hoechst 33258". *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21:, 16848, **2019**.
- (133) Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaite, R. "The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond". *Chemosensors* 6:, 1, **2018**.
- (134) Morávek, Z.; Neidle, S.; Schneider, B. "Protein and Drug Interactions in the Minor Groove of DNA". *Nucleic Acids Res.* 30:, 1182, **2002**.
- (135) Oguey, C.; Foloppe, N.; Hartmann, B. "Understanding the Sequence-Dependence of DNA Groove Dimensions: Implications for DNA Interactions". *PLoS One* 5:, 1, **2010**.
- (136) de Oliveira, T. D.; Plutín, A. M.; Luna-Dulcey, L.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. "Cytotoxicity of Ruthenium-N,N-Disubstituted-N'-Acylthioureas Complexes". *Mater. Sci. Eng. C* 115:, 111106, **2020**.
- (137) Bianchi, G.; Oliva, L.; Cascio, P.; Pengo, N.; Fontana, F.; Cerruti, F.; Orsi, A.; Pasqualetto, E.; Mezghrani, A.; Calbi, V.; Palladini, G.; Giuliani, N.; Anderson, K. C.; Sitia, R.; Cenci, S. "The Proteasome Load versus Capacity Balance Determines Apoptotic Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to Proteasome Inhibition". *Blood* 113:, 3040, **2009**.
- (138) Manasanch, E. E.; Orłowski, R. Z. "Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy". *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14:, 417, **2017**.
- (139) Rastogi, N.; Mishra, D. P. "Therapeutic Targeting of Cancer Cell Cycle Using Proteasome Inhibitors". *Cell Div.* 7:, 1, **2012**.
- (140) Siu, F. M.; Lin, I. W. S.; Yan, K.; Lok, C. N.; Low, K. H.; Leung, T. Y. C.; Lam, T. L.; Che, C. M. "Anticancer Dirhodium(II,II) Carboxylates as
-

- Potent Inhibitors of Ubiquitin-Proteasome System". *Chem. Sci.* 3:, 1785, **2012**.
- (141) Tong, M.; Smeekens, J. M.; Xiao, H.; Wu, R. "Systematic Quantification of the Dynamics of Newly Synthesized Proteins Unveiling Their Degradation Pathways in Human Cells". *Chem. Sci.* 11:, 3557, **2020**.
- (142) Santos, A. F.; Schiefer, E. M.; Atherino, M. C.; Atherino, J. C.; Negri, L. H.; Weffort-Santos, A. M.; Crisma, A. R.; de Souza, W. M.; Felipe, K. B. "Schiefer Counter: An Alternative Method for Clonogenic Assay Evaluation". *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 106911, **2020**.
- (143) Carneiro, B. A.; El-Deiry, W. S. "Targeting Apoptosis in Cancer Therapy". *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17:, 395, **2020**.
- (144) Chaudhry, R. J. G.-S. "Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics". *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* 7:, 113, **2015**.
- (145) Lin, L.; Baehrecke, E. H. "Autophagy, Cell Death, and Cancer". *Mol. Cell. Oncol.* 2:, 1, **2015**.
- (146) Pucci, B.; Kasten, M.; Giordano, A. "Cell Cycle and Apoptosis 1". *Neoplasia* 2:, 291, **2000**.
- (147) Almeida, V. L. De; Leitão, A.; Barrett, C.; Alberto, C.; Luis, C. "Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução". *Quim. Nova* 28:, 118, **2005**.
- (148) Ribeiro, G. H.; Guedes, A. P. M.; de Oliveira, T. D.; de Correia, C. R. S. T. B.; Colina-Vegas, L.; Lima, M. A.; Nóbrega, J. A.; Cominetti, M. R.; Rocha, F. V.; Ferreira, A. G.; Castellano, E. E.; Teixeira, F. R.; Batista, A. A. "Ruthenium(II) Phosphine/Mercapto Complexes: Their in Vitro Cytotoxicity Evaluation and Actions as Inhibitors of Topoisomerase and Proteasome Acting as Possible Triggers of Cell Death Induction". *Inorg. Chem.* 59:, **2020**.
- (149) Pérez, H.; Corrêa, R. S.; Plutín, A. M.; Álvarez, A.; Mascarenhas, Y. "N-Benzoyl-N',N'-Dimethylthiourea". *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* 67:, 1, **2011**.
- (150) Arslan, H.; Flörke, U.; Külçü, N. "N'-(4-Chloro-benzoyl)-N,N-Di-phenyl-thio-urea". *Acta Crystallogr. Sect. E* 59:, o641, **2003**.
- (151) Barolli, J. P.; Corrêa, R. S.; Miranda, F. S.; Ribeiro, J. U.; Bloch, C.; Ellena, J.; Moreno, V.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. "Polypyridyl Ruthenium Complexes: Novel DNA-Intercalating Agents against Human Breast Tumor". *J. Braz. Chem. Soc.* 28:, 1879, **2017**.
- (152) 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". *Dalt. Trans.* 46:, 12865, **2017**.

7 - APÊNDICE

Caracterizações - Complexos [Ru(NS)(dppb)(dphppy)]PF₆ (Série AMP)

Parte I- Dados de ressonância magnética nuclear 1D e 2D

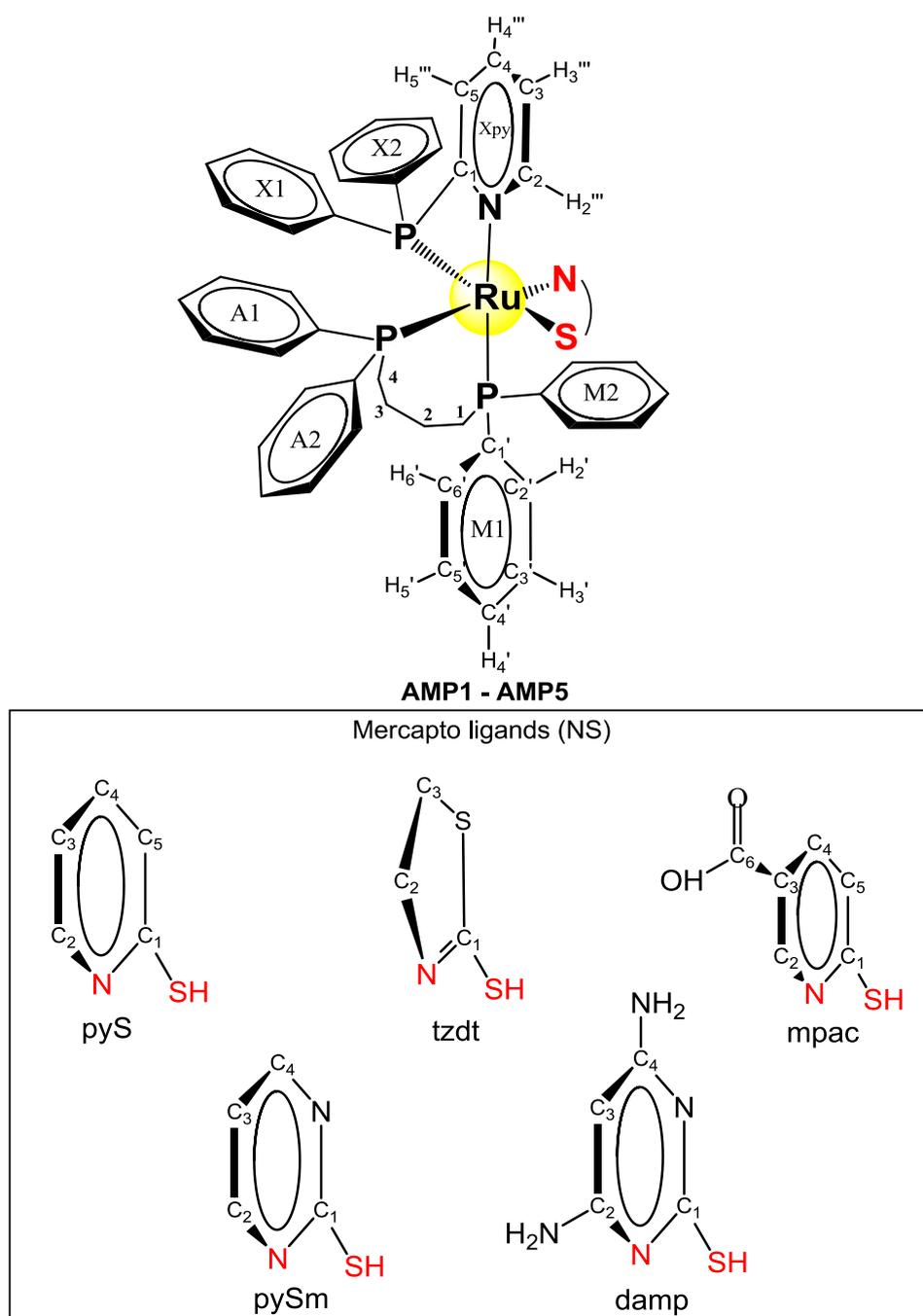


FIGURA A1- Padrão de numeração das estruturas dos complexos AMP para as atribuições de RMN.

No.	No.	³¹ P	¹³ C	¹ H via HSQC	¹ H- ³¹ P HMBC	¹ H- ¹³ C HMBC
*	Px	---	---	---	---	---
**	X1	1' ***	134.9 d (44)	7.88 t(9.1) 2H	-10.0 ****	134.9 *****
		2',6'	135.0 d (12)	7.88 t(9.1) 2H	-10.0	
		3',5'	130.2 dd (21; 10)	7.49 t(7.1) 2H	-10.0	
		4'	132.7 – 133.2 m	7.57 – 7.62 m 1H	-10.0	
**	X2	1'	134.0 d (35)			
		2',6' ***	132.7 – 133.2 m	7.38 – 7.43 m 2H	-10.0	
		3',5'	130.2 dd (21; 10)	7.34 – 7.40 m 2H	-10.0	134.0
		4'	131.6 – 132.3 m	7.40 – 7.45 m 1H	-10.0	

Ex. ³¹P; -10.0 t (21)

*(referente ao átomo de fósforo)

** (referente a qual anel)

Ex. ¹³C; 134.9 d (44)

*** (referente a posição do(s) átomo(s) de H e C no anel)

**** (átomo(s) de fósforo que acopla com o respectivo hidrogênio(s))

Ex. ¹H; 7.88 t(9.1) 2H

***** (átomo(s) de carbono que acopla com o respectivo hidrogênio(s))

Ex. ¹³C; 132.7 – 133.2 m

*a (deslocamento químico)

*b (multiplicidade do sinal)

Ex. ¹H; 7.57 – 7.62 m 1H

*c (valor da constante de acoplamento)

*d (quantidade de átomos de hidrogênio correspondente ao sinal)

*e (faixa do deslocamento químico ref. ao multipletto)

ESQUEMA A1- Detalhamento geral dos significados dos termos das TABELAS A1-A5 e A9-A13, que descrevem a atribuição dos dados de RMN dos complexos **AMP** e **SPPM**.

TABELA A1- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em acetonitrila para AMP1. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C	^1H via HSQC	$^1\text{H}-^{31}\text{P}$ HMBC	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC
Px	-----	-10.0 t (21)	-----	-----		
X1	1'		134.9 d (44)			
	2',6'		135.0 d (12)	7.88 tl (9.1) 2H	-10.0	
	3',5'		130.2 dd (21; 10)	7.49 tl (7.1) 2H	-10.0	134.9
	4'		132.7 – 133.2 m	7.57 – 7.62 m 1H	-10.0	
X2	1''		134.0 d (35)			
	2'',6''		132.7 – 133.2 m	7.38 – 7.43 m 2H	-10.0	
	3'',5''		130.2 dd (21; 10)	7.34 – 7.40 m 2H	-10.0	134.0
	4''		131.6 – 132.3 m	7.40 – 7.45 m 1H	-10.0	
Xpy	1'''		171.1 d (55)			
	2'''		149.1 d (15)	7.56 – 7.61 m 1H	-10.0	128.9; 138.4; 171.3
	3'''		129.9 d (7)	6.90 tl (6.0) 1H	51.4; -10.0	128.9; 139.5; 149.1
	4'''		137.8 – 138.9 m (138.6 d (2))	7.70 tl (7.5; 1.3) 1H	-10.0	149.1; 171.1
	5'''		128.9 d (7)	7.53 – 7.62 m 1H		171.3
PA		51.4 dd (34; 21)				
A1	1'		130.6 – 131.3 m (131.0 d (40))			
	2',6'		135.4 – 135.9 m	8.03 tl (8.2) 1H	51.4; -10.0	
	3',5'		128.9 d (7)	7.53 – 7.62 m 2H	51.4	131.0
	4'		131.6 – 132.3 m	7.57 – 7.65 m 1H	51.4; -10.0	
A2	1''		138.0 – 138.9 m (138.4 d (44))			
	2'',6''		131.6 – 132.3 m (131.8 t (6))	7.32 – 7.41 m 2H	51.4; -10.0	
	3'',5''		128.13 dd (17; 9)	6.95 – 7.04 m 2H	51.4	138.4
	4''		129.9 – 130.4 m (129.7 s)	7.00 – 7.07 m 1H		
PM		38.0 dd (34; 21)				
M1	1'		139.5 d (44)			
	2',6'		131.6 – 132.3 m	7.17 – 7.25 m 2H	38.0	
	3',5'		128.9 d (7)	7.19 – 7.27 m 2H	38.0	139.5
	4'		129.9 – 130.4 m (130.2 dd (21; 10))	7.23 – 7.31 m 1H	38.0	
M2	1''		138.1 – 127.3 (*)			
	2'',6''		135.0 d (12)	7.07 – 7.15 m 2H	38.0	
	3'',5''		128.13 dd (17; 9)	6.73 – 6.81 m 2H	38.0	
	4''		130.6 – 131.3 m (130.8 s)	7.10 – 7.17 m 1H	38.0	
pyS	1''''		180.3 s			

	2 ^{''''}		148.6 d (44)	6.05 tl (6.5; 1.1) 1H	38.0	116.7; 135.6; 180.3
	3 ^{''''}		116.9 s	5.70 dl (5.2) 1H	38.0	127.3; 148.7
	4 ^{''''}		135.4 – 135.9 m	6.82 dl (8.1) 1H		148.7; 180.3
	5 ^{''''}		127.3 s	6.38 tl (7.8; 1.1) 1H		116.7; 180.3
Alif.	1 ^{''''''}		27.3 d (31)	3.21 – 3.30 m 1H	51.4	
			27.3 d (31)	2.63 – 2.77 m 1H	51.4	
	2 ^{''''''}		20.5 d (5)	1.21 – 1.35 m 1H	51.4	
			20.5 d (5)	0.76 – 0.91 m 1H	51.4	
	3 ^{''''''}		23.0 (s)	1.56 – 1.73 m 1H	38.0	
			23.0 (s)	0.76 – 0.93 m 1H	38.0	
	4 ^{''''''}		30.4 d (31)	2.84 – 2.96 m 1H	38.0	
			30.4 d (31)	2.43 – 2.55 m 1H	38.0	
PF_6^-		-144.5 hept (¹ J _{PF} = 705)				

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripleto,
tt- triplo tripleto.

TABELA A2- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em acetonitrila para AMP2. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C	^1H via HSQC	^1H - ^{31}P HMBC	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-7.1 t (21)				
X1	1	-----	132.1 d (37)			
	2',6'	-----	135.3 – 135.9 m	7.87 dd (11.1; 7.8) 2H	-7.1	
	3',5'	-----	129.6 d (10)	7.41 – 7.47 m 2H	-7.1	132.1
	4'	-----	130.9 (s)	7.53 – 7.59 m 1H	-7.1	
X2	1''	-----	133.4 d (37)			
	2'',6''	-----	132.8 – 133.1 m	7.30 – 7.37 m 2H	-7.1	
	3'',5''	-----	129.8 – 130.5 m	7.32 – 7.37 m 2H	-7.1	133.4
	4''	-----	131.9 – 132.4 m (132.1 s)	7.42 – 7.48 m 1H	-7.1	
Xpy	1'''	-----	171.7 d (56)			
	2'''		148.9 d (15)	7.60 – 7.63 m 1H	-7.1	138.8
	3'''	-----	128.8 – 129.2 m	7.06 – 7.10 m 1H	-7.1	128.0; 148.9
	4'''	-----	138.8 d (3)	7.79 tl (7.8; 1.6) 1H	-7.1	148.9; 171.7
	5'''	-----	128.0 d (10)	7.50 – 7.55 m 1H		171.7
PA		53.3 dd (34; 21)				
A1	1	-----	133.9 d (40)			
	2',6'	-----	135.3 – 135.9 m	8.01 dd (9.6; 8.4) 2H	53.3; -7.1	
	3',5'	-----	128.2 – 128.8 m	7.55 – 7.60 m 2H	53.3	133.9
	4'	-----	131.5 dd (7; 4)	7.60 – 7.66 m 1H	53.3	
A2	1''	-----	140.6 d (43)			
	2'',6''	-----	131.5 dd (7; 4)	7.60 – 7.66 m 2H	53.3	
	3'',5''	-----	128.0 d (10)	7.33 – 7.40 m 2H	53.3	140.6
	4''	-----	132.8 – 133.2 m	7.30 – 7.37 m 1H	53.3	
PM		40.1 dd (34; 21)				
M1	1	-----	139.4 d (44)			
	2',6'	-----	131.5 dd (7; 4)	7.16 tl (7.9) 2H	40.1	
	3',5'	-----	128.8 – 129.2 m	7.22 – 7.30 m 2H	40.1	139.5
	4'	-----	129.9 s	7.25 – 7.31 m 1H	40.1	
M2	1''	-----	130.5 d (39)			
	2'',6''	-----	135.0 d (11)	7.01 – 7.08 m 2H	40.1; -7.1	
	3'',5''	-----	128.0 d (10)	6.72 t (7.2) 2H	40.1	130.5
	4''	-----	130.9 s	7.07 – 7.12 m 1H	40.1	
tzdt	1''''	-----	185.8 s			
	2''''	-----	58.3 d (5)	2.19 – 2.29 m 1H		185.8; 31.6
		-----	58.3 d (5)	1.58 – 1.70 m 1H	40.1	185.8; 31.6
	3''''	-----	31.0 – 31.6 m	2.26 – 2.34 m 1H		185.8; 58.3
	-----	31.0 – 31.6 m	2.02 – 2.12 m 1H		58.3	
Alif	1'''''	-----	27.5 d (30)	3.05 – 3.15 m 1H	53.3	
		-----	27.5 d (30)	2.68 – 2.83 m 1H	53.3	
	2'''''	-----	20.5 d (5)	1.20 – 1.34 m 1H	53.3	

		-----	20.5 d (5)	0.60 – 0.77 m 1H	53.3	
	3 ^{'''}	-----	23.2 s	1.57 – 1.71 m 1H	40.1	
		-----	23.2 s	0.74 – 0.86 m 1H	40.1	
	4 ^{'''}	-----	31.6 – 31.0 m	2.72 – 2.83 m 1H	40.1	
			31.6 – 31.0 m	2.48 – 2.61 m 1H	40.1	
PF_6^-		-144.5 hept (¹ J _{FF} = 705)				

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripleto,
 tt- triplo tripleto.

TABELA A3- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em acetonitrila para AMP3. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C	^1H via HSQC	^1H - ^{31}P HMBC	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-11.0 t (21)	-----	-----		
X1	1'	-----	131.3 d (35)			
	2',6'	-----	134.2 – 134.8 m (134.5 d (12))	7.88 dd (10.1; 7.5) 2H	-11.0	
	3',5'	-----	130.3 d (10)	7.45 – 7.62 m 2H	-11.0	131.3
	4'	-----	133.3 s	7.56 – 7.62 m 1H	-11.0	
X2	1''	-----	133.6 d (35)			
	2'',6''	-----	132.8 d (10)	7.36 – 7.41 m 2H	-11.0	
	3'',5''	-----	130.3 d (10)	7.32 – 7.39 m 2H	-11.0	133.6
	4''	-----	132.2 s	7.40 – 7.46 m 1H	-11.0	
Xpy	1'''	-----	170.9 d (55)			
	2'''		149.3 d (15)	7.54 – 7.60 m 1H	-11.0	129.1; 138.7
	3'''	-----	129.1 dd (20; 11)	6.90 – 6.96 m 1H	-11.0	129.1; 149.3
	4'''	-----	138.7 d (3)	7.72 t (7.8) 1H	-11.0; 50.7	149.3; 170.9
	5'''	-----	129.1 dd (20; 11)	7.53 – 7.61 m 1H		170.9
PA		50.7 dd (34; 20)				
A1	1'	-----	134.2 – 134.8 m (134.5 d (40))			
	2',6'	-----	135.5 d (8)	8.02 t (8.7) 2H	50.7; -11.0	
	3',5'	-----	129.1 dd (20; 11)	7.53 – 7.61 m 2H	50.7	134.5
	4'	-----	132.2 s	7.56 – 7.63 m 1H	50.7;	
A2	1''	-----	137.9 d (43)			
	2'',6''	-----	131.7 t (8)	7.28 – 7.36 m 2H	50.7; -11.0	
	3'',5''	-----	128.3 d (9)	6.95 – 7.01 m 2H	50.7	137.9
	4''	-----	129.7 s	6.98 – 7.05 m 1H	50.7	
PM		38.0 dd (34; 22)				
M1	1'	-----	139.2 d (45)			
	2',6'	-----	131.7 t (8)	7.16 – 7.25 m 2H	38.0	
	3',5'	-----	129.1 dd (20; 11)	7.20 – 7.25 m 2H	38.0	139.2
	4'	-----	130.0 s	7.25 – 7.30 m 1H	38.0	
M2	1''	-----	130.5 – 131.0 m (130.7 d (37))			
	2'',6''	-----	134.9 d (11)	7.05 – 7.13 m 2H	38.0	130.7
	3'',5''	-----	128.0 d (10)	6.76 tl (7.0) 2H	38.0	
	4''	-----	130.7 – 131.0 m (130.9 s)	7.08 – 7.14 m 1H	38.0	
mpca	1'''	-----	186.4 s			
	2'''	-----	151.0 s	6.82 s 1H	38.0	119.6; 135.8; 165.0; 186.4
	3'''	-----	119.6 s			
	4'''	-----	135.8 s	7.25 – 7.31 m 1H		186.4; 165.0; 151.0

	5 ^{'''}		126.7 s	6.44 d (8.6) 1H		119.6; 186.4
	6 ^{'''}		165.0 s			
Alif.	1 ^{''''}	-----	27.3 d (31)	3.14 – 3.26 m 1H	50.7	
		-----	27.3 d (31)	2.65 – 2.79 m 1H	50.7	
	2 ^{''''}	-----	20.4 d (5)	1.21 – 1.36 m 1H	50.7	
		-----	20.4 d (5)	0.76 – 0.92 m 1H	50.7	
	3 ^{''''}	-----	23.1 (s)	1.55 – 1.73 m 1H	38.0	
		-----	23.1 (s)	0.74 – 0.87 m 1H	38.0	
	4 ^{''''}	-----	30.4 d (31)	2.83 – 2.94 m 1H	38.0	
			30.4 d (31)	2.45 – 2.57 m 1H	38.0	
PF_6^-		-144.5 hept ($^1J_{PF} = 705$)				

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripleto, tt- triplo tripleto.

TABELA A4- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em acetonitrila para AMP4. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C	^1H via HSQC	^1H - ^{31}P HMBC	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-10.8 t (21)	-----	-----		
X1	1'	-----	131.3 – 131.9 (131.7 d (39))	-----	-----	-----
	2',6'	-----	134.7 d (12)	7.86 tl (7.61) 2H	-10.8	
	3',5'	-----	130.3 dd (9; 5)	7.47-7.54 m 2H	-10.8; 50.6	
	4'	-----	132.2 s	7.58-7.64 m 1H	-10.8	131.7
X2	1''	-----	133.2 d (35)	-----	-----	
	2'',6''	-----	132.8 d (10)	7.37-7.45 m 2H	-10.8	
	3'',5''	-----	130.3 dd (9; 5)	7.34 – 7.43 m 2H	-10.8	133.2
	4''	-----	132.1 s	7.43 – 7.50 m 1H	-10.8	
Xpy	1'''	-----	170.7 d (55)	-----	-----	
	2'''	-----	149.1 d (15)	7.48-7.53 m 1H	-10.8; 50.6	129.2; 138.8
	3'''	-----	128.8 – 129.3 m	6.93 t (6.30) 1H	-10.8; 50.6	129.2; 149.1
	4'''	-----	138.8 d (3)	7.73 tt (7.8; 1.7) 1H	-10.8	130.0; 149.1; 170.7
	5'''	-----	128.8 – 129.3 m	7.53-7.62 m 1H	-10.8; 50.6	129.2
PA		50.6 dd (34; 21)				
A1	1'	-----	134.1 d (41)	-----	-----	
	2',6'	-----	135.5 d (8)	8.03 tl (8.5) 1H	50.6; -10.8	
	3',5'	-----	128.8 – 129.3 m	7.53 – 7.62 m 1H	50.6	134.1
	4'	-----	132.8 d (10)	7.58 – 7.64 m 1H	50.6	
A2	1''	-----	138.1 d (43)			
	2'',6''	-----	131.5 dd (14; 7)	7.28 – 7.34 m 2H	50.6	
	3'',5''	-----	128.5 d (9)	7.00 – 7.07 m 2H	50.6	138.1
	4''	-----	130.0 d (6)	7.04 – 7.09 m 1H	50.6	
PM		38.5 dd (34; 21)				
M1	1'	-----	139.2 d (45)	-----	-----	
	2',6'	-----	131.5 dd (14; 7)	7.17 – 7.25 m 2H	38.5	
	3',5'	-----	128.8 – 129.3 m	7.20 – 7.27 m 2H	38.5	139.2
	4'	-----	130.0 d (6)	7.23 – 7.31 m 1H	38.5	
M2	1''	-----	130.5 – 131.0 (130.7 d (39))			
	2'',6''	-----	135.0 d (11)	7.08 – 7.15 m 2H	38.5	
	3'',5''	-----	128.1 d(10)	6.76 tl (7.4) 2H	38.5	130.7
	4''	-----	130.8 – 131.1 m (130.9 s)	7.09 – 7.14 m 1H	38.5	
pySm	1''''	-----	186.2 s	-----	-----	
	2''''	-----	155.8 s	6.05 – 6.09 m 1H	38.5	114.5; 157.1; 186.2
	3''''	-----	114.5 s	5.75 t (J = 5.30) 1H	38.5	157.1
	4''''	-----	157.1 s	7.79 dd (4.7; 2.3) 1H		129.2; 155.8; 186.2
Alif	1'''''	-----	27.1 d (31)	3.16 – 3.26 m 1H	50.6	
		-----	27.1 d (31)	2.65 – 2.78 m 1H	50.6	

	2 ^{''''}	-----	20.5 d (5)	1.22 – 1.37 m 1H	50.6	
		-----	20.5 d (5)	0.71 – 0.88 m 1H	50.6	
	3 ^{''''}	-----	23.1 s	1.58 – 1.74 m 1H	38.5	
		-----	23.1 s	0.76 – 0.88 m 1H	38.5	
	4 ^{''''}	-----	31.1 d (31)	2.87 – 2.98 m 1H	38.5	
		-----	31.1 d (31)	2.54 – 2.65 m 1H	38.5	
PF_6^-		-144.5 hept (¹ J _{PF} = 705)				

Tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripletto,
tt- triplo tripletto.

TABELA A5- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em acetonitrila para AMP5. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C	^1H via HSQC	^1H - ^{31}P HMBC	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-18.0 t (21)	-----	-----		
X1	1'	-----	136.0 d (30)	-----	-----	-----
	2',6'	-----	134.0 d (11)	7.81 – 7.88 m 2H	-18.0	
	3',5'	-----	130.4 – 130.6 m	7.41 – 7.47 m 2H	-18.0	136.0
	4'	-----	132.6 – 132.9 m	7.52 – 7.57 (t) 1H	-18.0	
X2	1''	-----	134.5 – 135.0 m	-----	-----	
	2'',6''	-----	131.5 – 131.9 m	7.40 – 7.46 m 2H	-18.0	
	3'',5''	-----	130.0 – 130.3 m (130.2 d(9))	7.25 – 7.34 m 2H	-18.0	
	4''	-----	131.5 – 131.9 m	7.30 – 7.34 m 1H	-18.0	134.9
Xpy	1'''	-----	170.6 d (54)	-----	-----	
	2'''		148.8 d (16)	7.59 – 7.63 m 1H	-18.0; 49.7	170.6
	3'''	-----	130.4 – 130.7 m	7.00 – 7.06 m 1H	-18.0; 49.7	148.8
	4'''	-----	138.7 d (J = 3)	7.78 tt (7.7;1.3) 1H	-18.0	170.6; 148.8
	5'''	-----	130.4 – 130.7 m	7.59 – 7.64 m 1H	-18.0	170.6
PA		49.7 dd (35 / 21)				
A1	1'	-----	136.5 d (40)	-----	-----	
	2',6'	-----	135.6 dd (10; 2)	8.08 – 8.15 m 2H	49.7; -18.0	
	3',5'	-----	128.9 – 129.2 m	7.59 – 7.65 m 2H	49.7	
	4'	-----	132.1 s	7.65 – 7.69 m 1H	49.7	136.5
A2	1''	-----	139.9 d (44)			
	2'',6''	-----	132.6 – 133.0 m	7.37 – 7.44 m 2H	49.7	
	3'',5''	-----	128.1 dd (9; 4)	7.06 – 7.13 m 2H	49.7	139.9
	4''	-----	129.6 s	7.13 – 7.20 m 1H	49.7	
PM		38.5 dd (35 / 21)				
M1	1'	-----	138.6 – 139.2 m (138.9 d (45))	-----	-----	
	2',6'	-----	132.3 d (8)	7.22 – 7.29 m 2H	38.5	
	3',5'	-----	128.7 d (9)	7.18 – 7.24 m 2H	38.5	138.9
	4'	-----	N.D.	7.18 – 7.24 m 1H*	38.5	
M2	1''	-----	131.1 d (38)			
	2'',6''	-----	134.6 d (10)	7.06 – 7.13 m(t) 2H	38.5	
	3'',5''	-----	128.1 dd (9; 4)	7.79 – 6.85 m(t) 2H	38.5	131.1
	4''	-----	130.4 – 130.7 m	7.06 – 7.12 m 1H	38.5	
damp	1'''	-----	183.6 s	-----	-----	
	2'''	-----	162.6 s	-----		
	3'''	-----	79.1 s	4.26 s 1H	38.5	183.6; 162.6; 162.3
	4'''	-----	162.3 s	-----		
	NH ₂			4.76 s 2H		
	NH ₂			3.55 s 2H		

Alif.	1 ^{''''}	-----	27.6 d (31)	3.11 – 3.21 m 1H	49.7	
		-----	27.6 d (31)	2.63 – 2.51 m 1H	49.7	
	2 ^{''''}	-----	20.3 d (4)	1,24 – 1.42 m 1H	49.7	
		-----	20.3 d (4)	0.81 – 1.01 m 1H	49.7	
	3 ^{''''}	-----	23.7 s	1.46 – 1.61 m 1H	38.5	
		-----	23.7 s	0.65 – 0.77 m 1H	38.5	
	4 ^{''''}	-----	31.1 d (32)	2.85 – 2.96 m 1H	38.5	
		-----	31.1 d (32)	2.21 – 2.34 m 1H	38.5	
PF_6^-		-144.5 hept (¹ J _{PF} = 705)				

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripeto,
 tt- triplo tripleto.

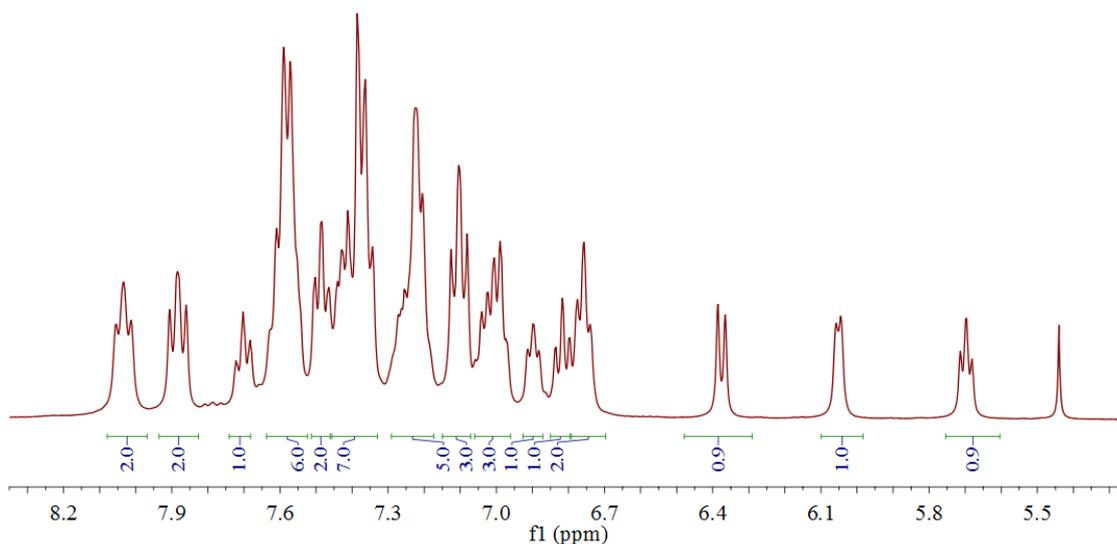
Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(pyS)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP1), Figura A2 à Figura A8

FIGURA A2- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(pyS)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP1) em CD₃CN.

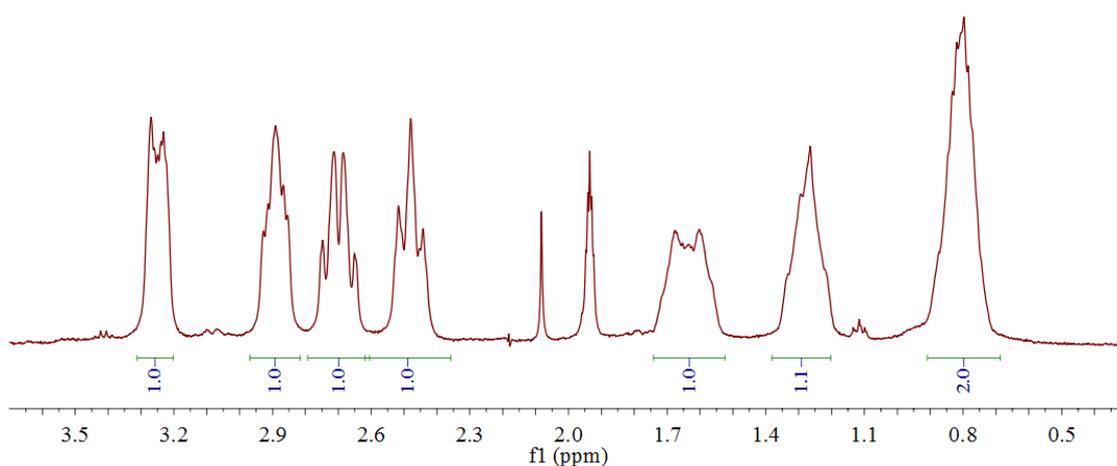


FIGURA A3- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(pyS)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP1) em CD₃CN.

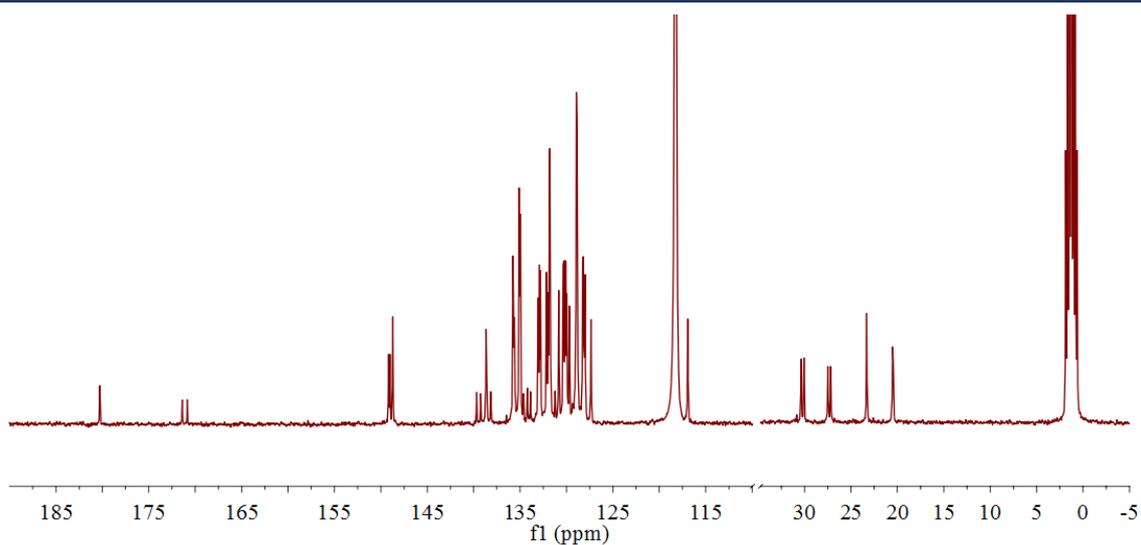


FIGURA A4- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP1**) em CD_3CN .

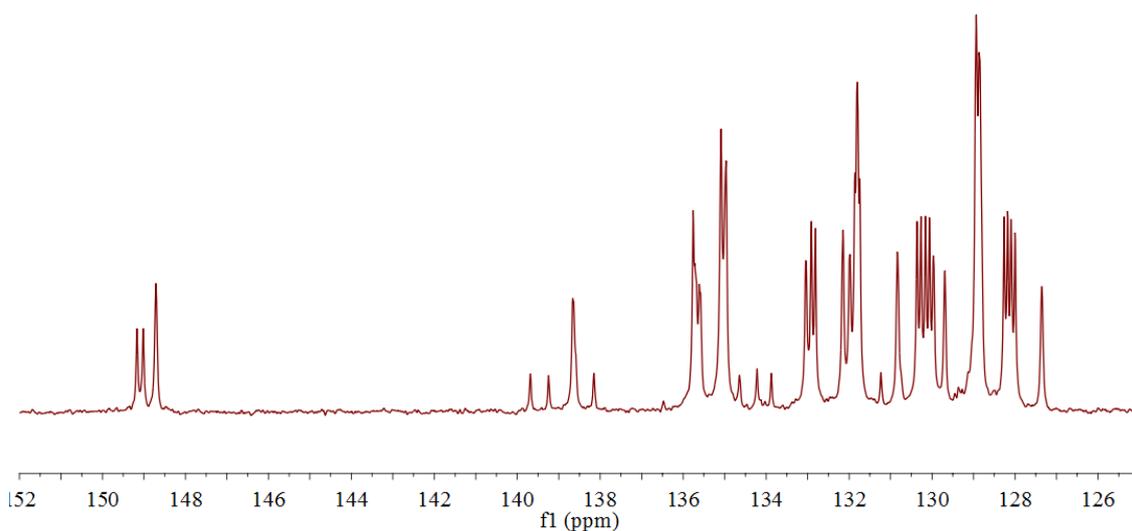


FIGURA A5- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP1**) em CD_3CN .

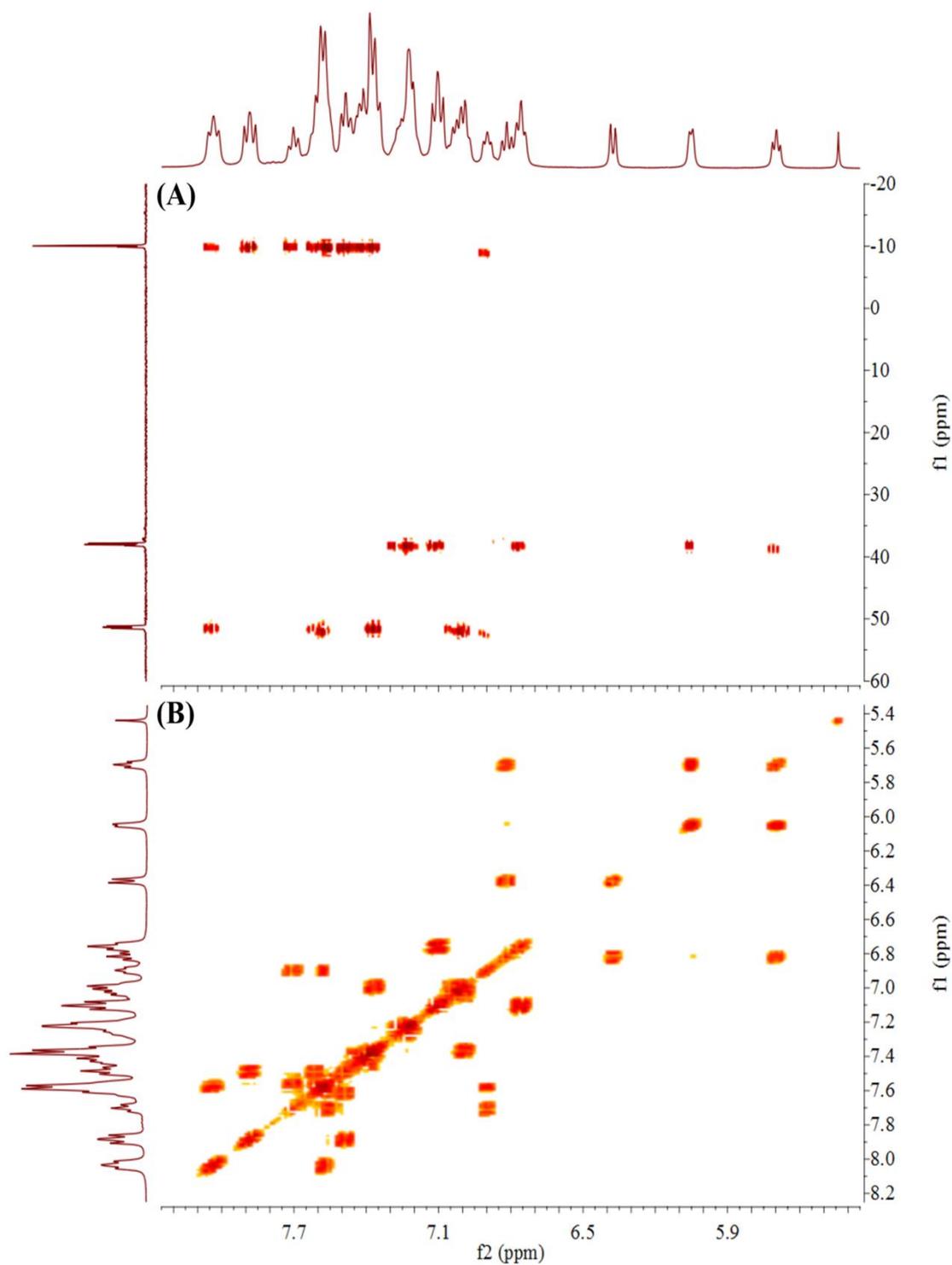


FIGURA A6- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{31}P HMBC (constante de acoplamento de curta distância, 6 Hz) e (B) ^1H - ^1H COSY do complexo $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP1**) em CD_3CN .

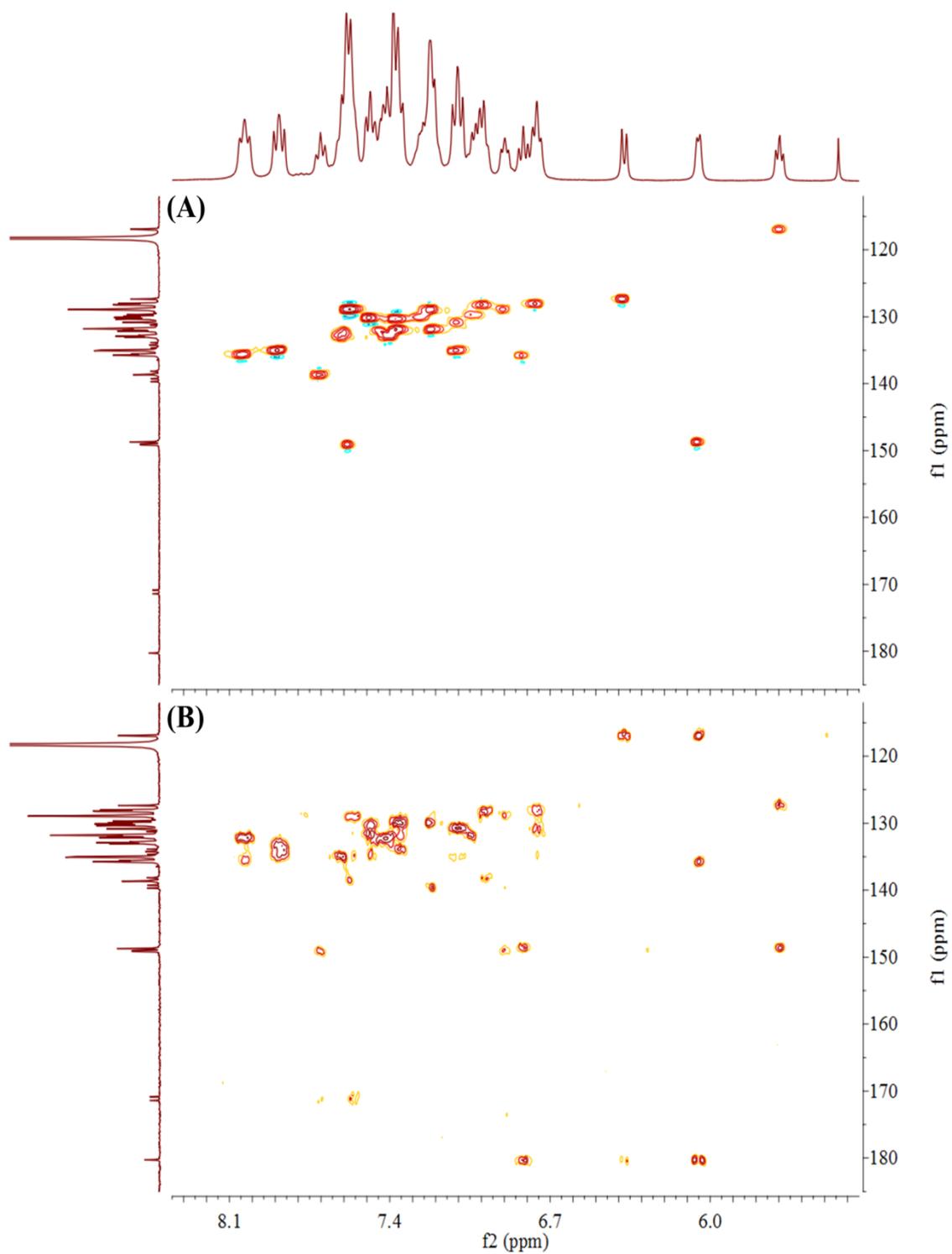


FIGURA A7- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{13}C HSQC e (B) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1) em CD_3CN .

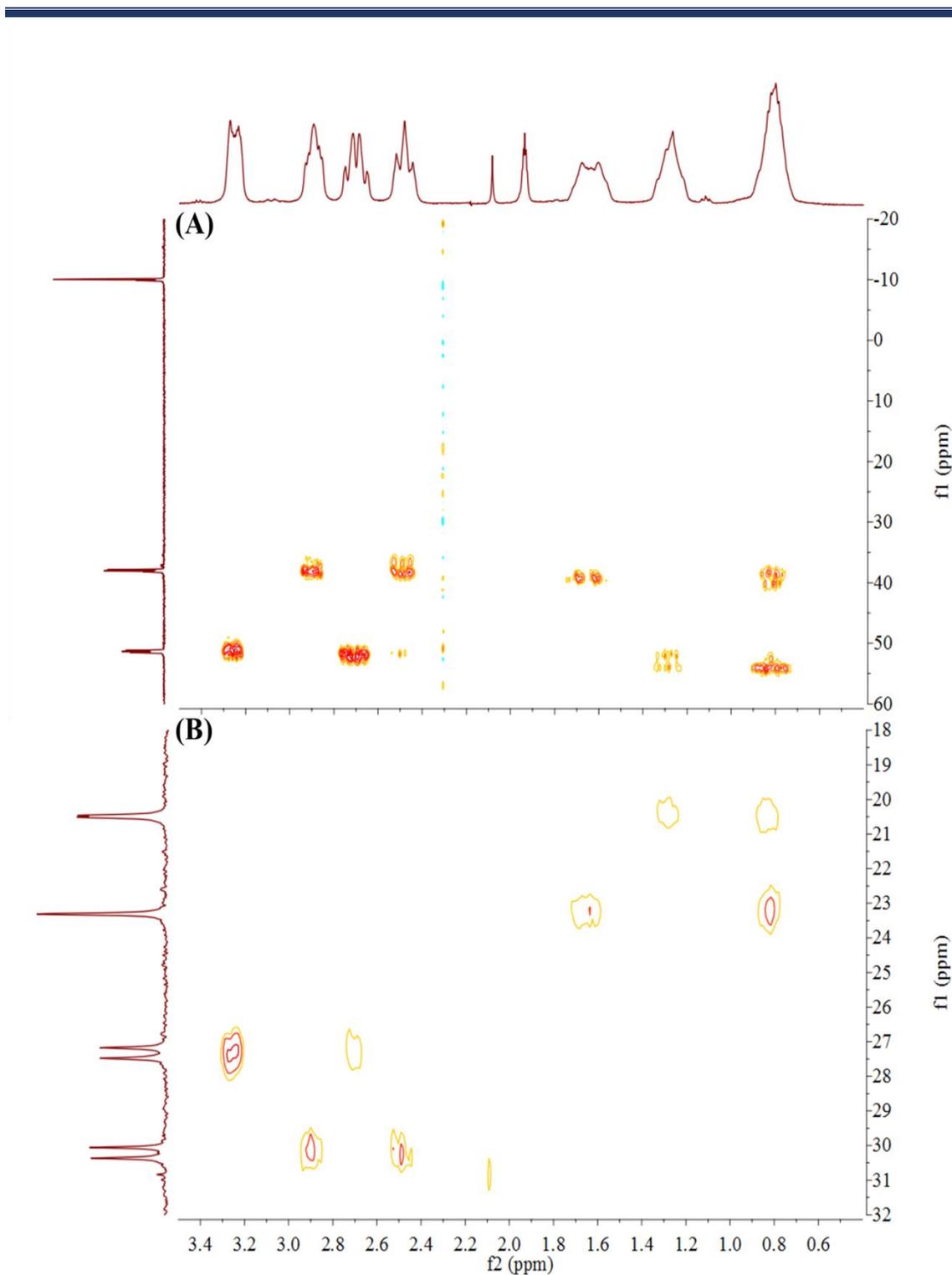


FIGURA A8- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{31}P HMBC (constante de acoplamento de curta distância, 6 Hz) e (B) ^1H - ^{13}C HSQC do complexo $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP1**) em CD_3CN .

Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(tzdt)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP2), Figura A9 à Figura A15

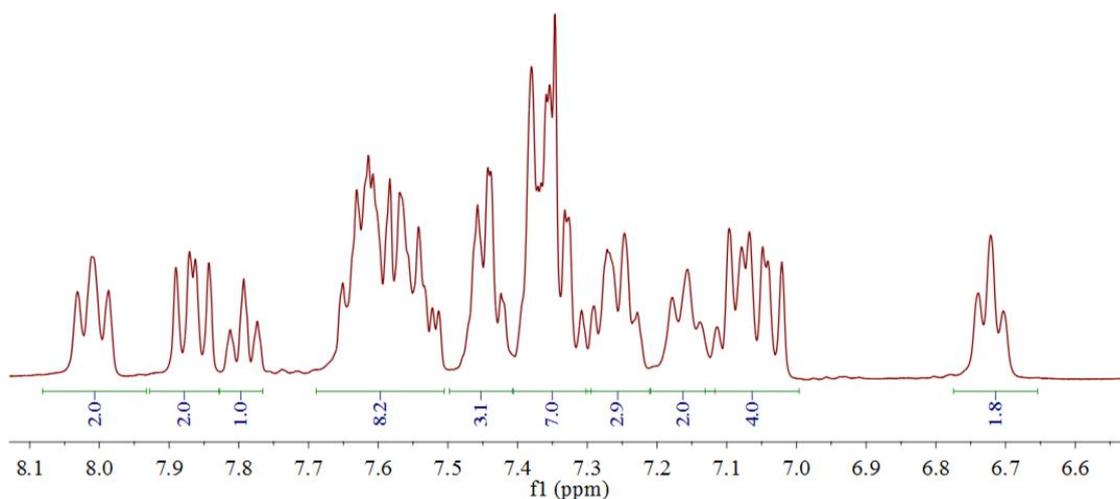


FIGURA A9- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(tzdt)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP2) em CD₃CN.

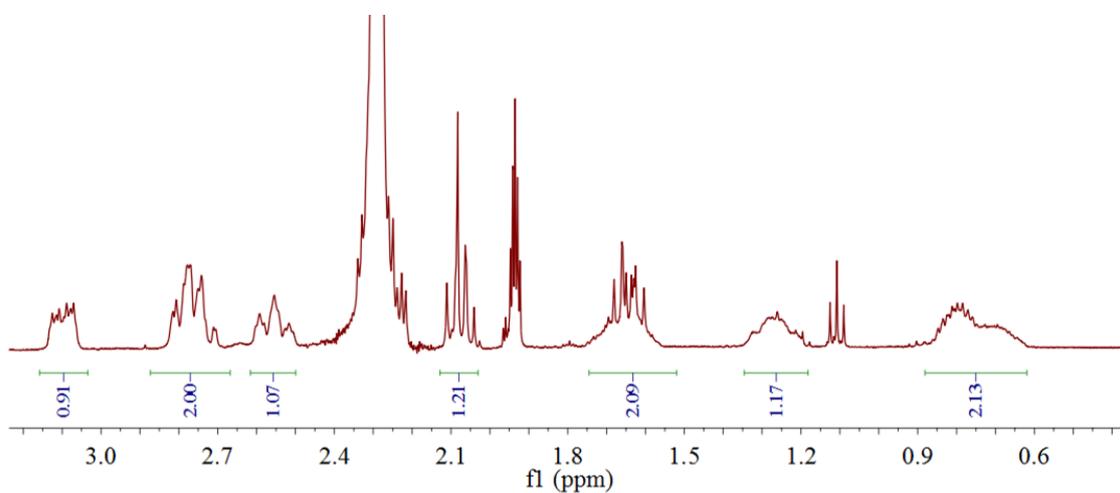


FIGURA A10- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(tzdt)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP2) em CD₃CN.

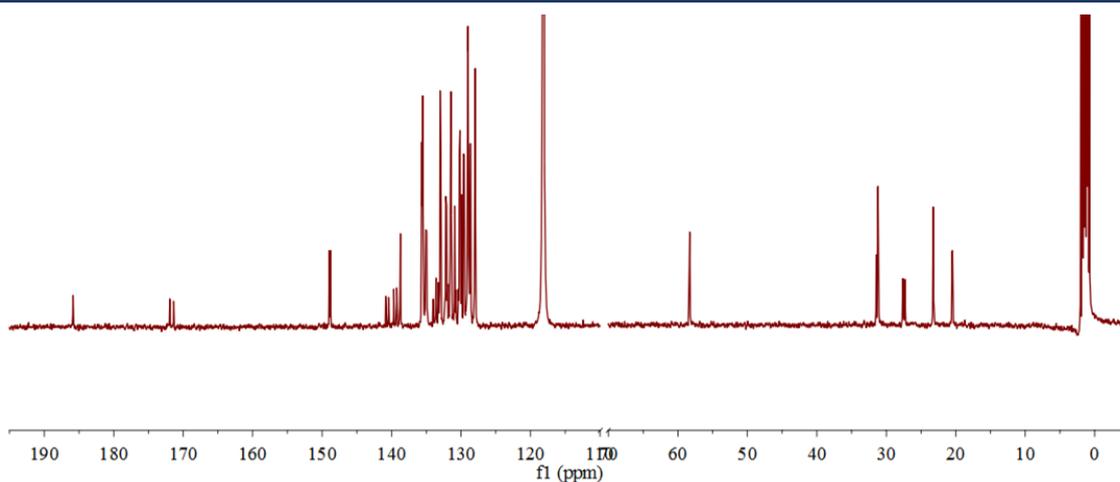


FIGURA A11- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP2**) em CD_3CN .

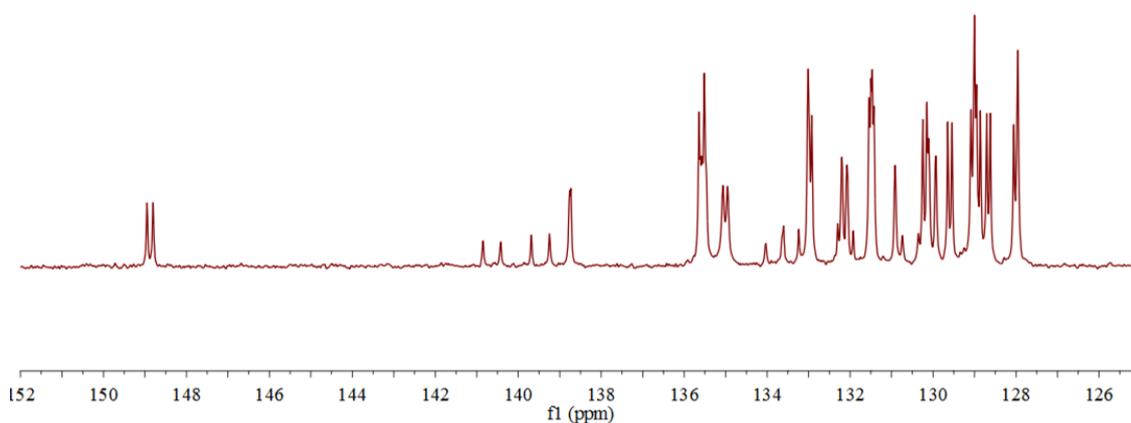


FIGURA A12- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP2**) em CD_3CN .

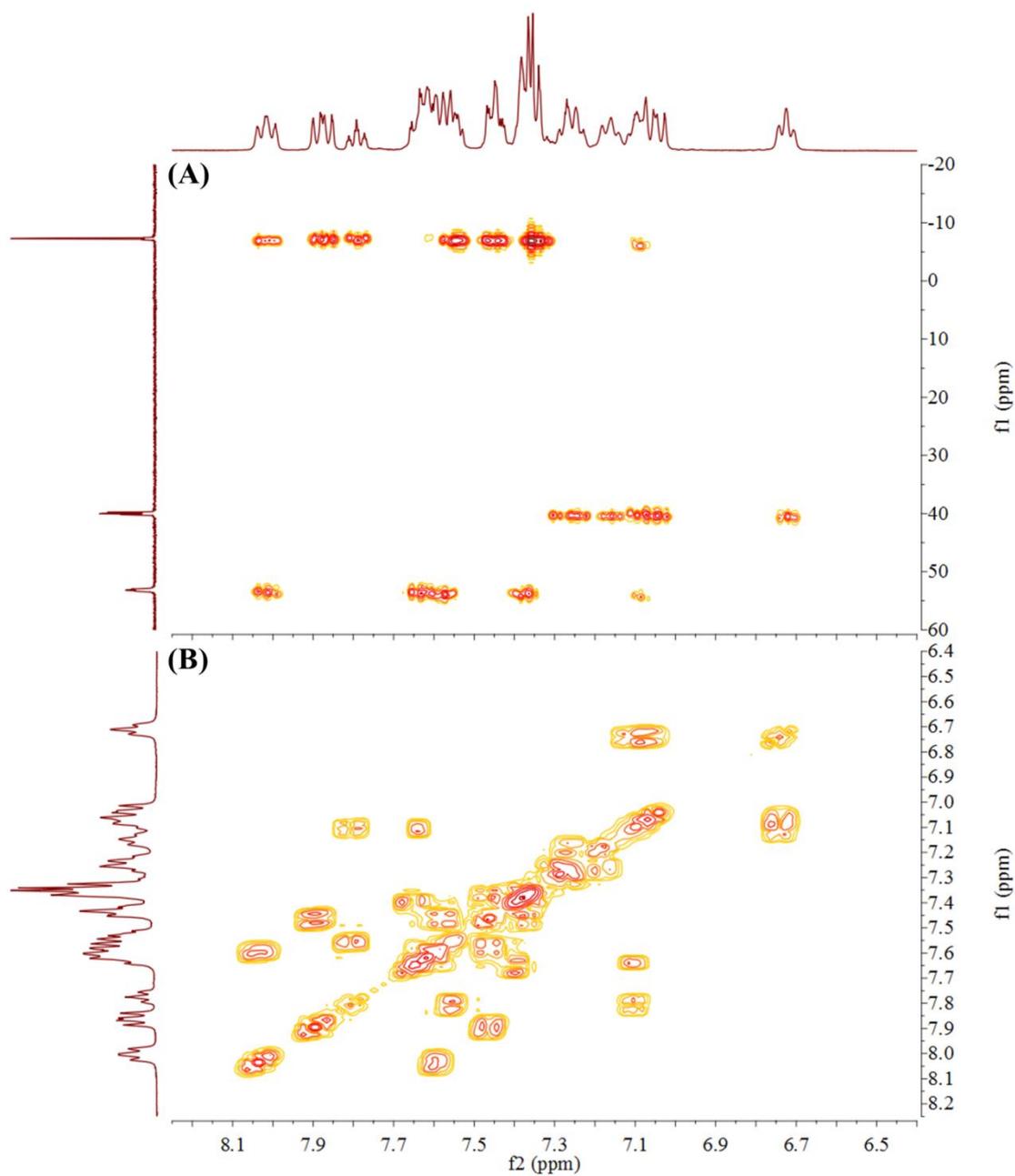


FIGURA A13- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{31}P HMBC (constante de acoplamento de curta distância, 6 Hz) e (B) ^1H - ^1H COSY do complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP2**) em CD_3CN .

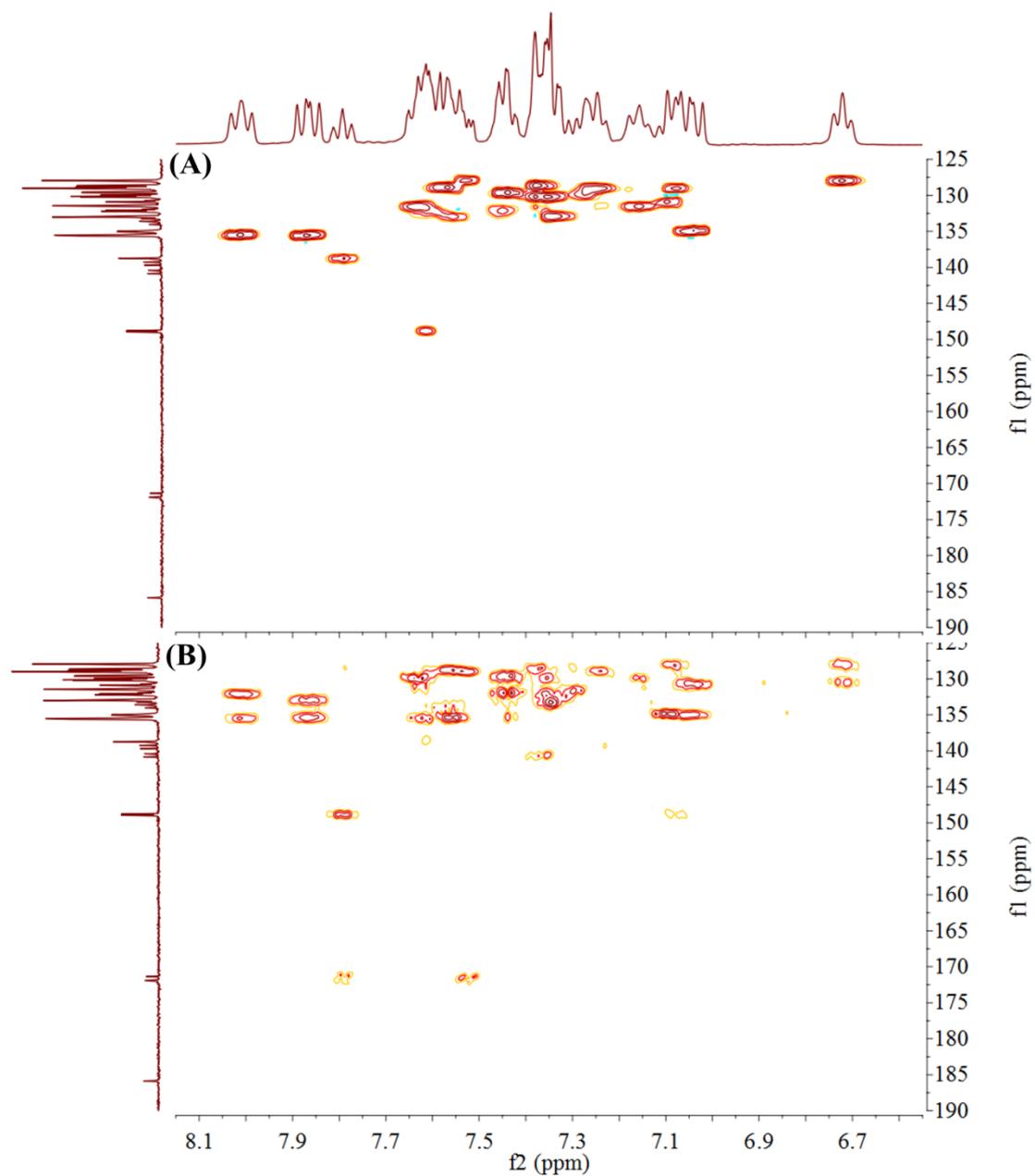


FIGURA A14- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{13}C HSQC e (B) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2) em CD_3CN .

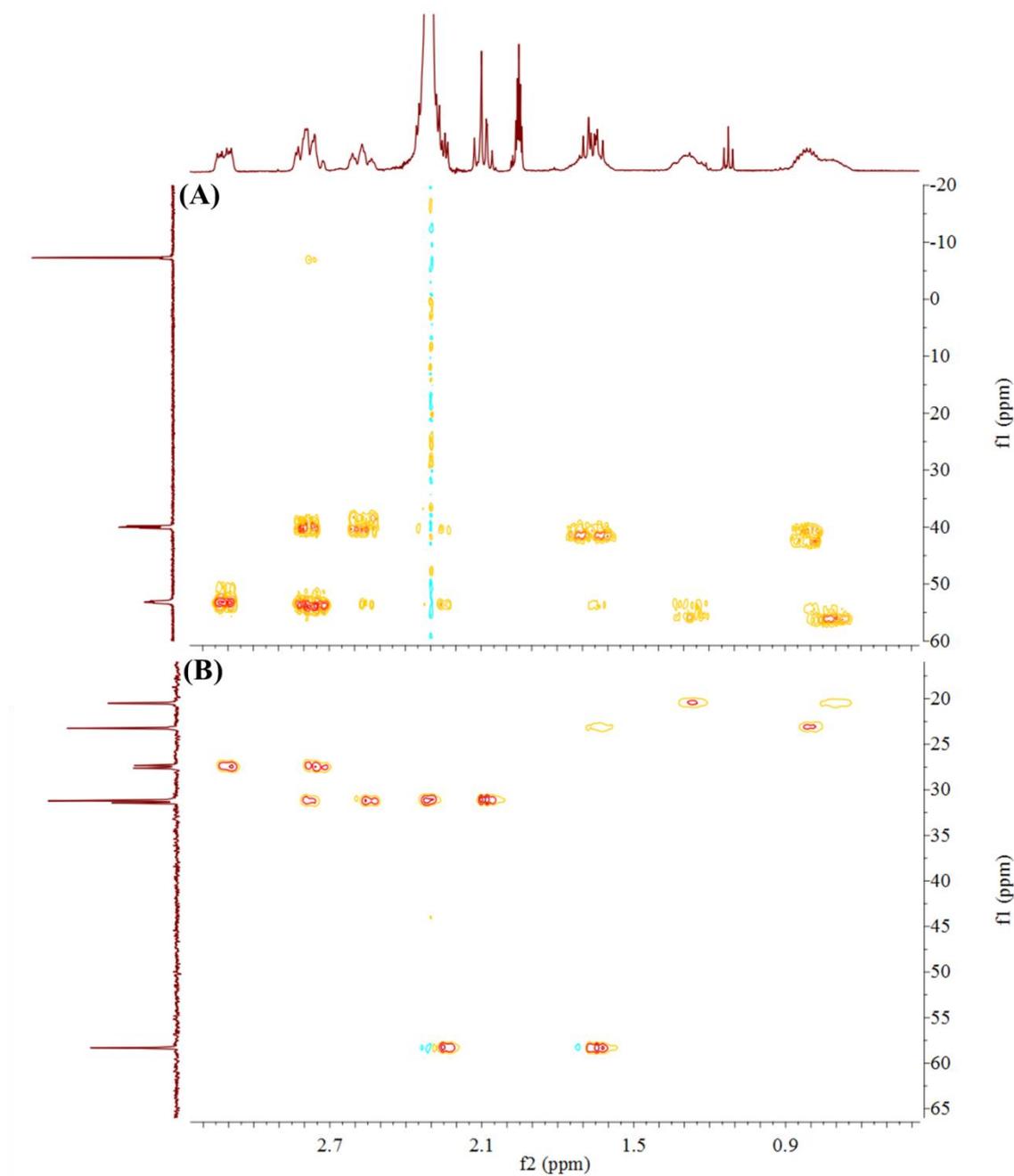


FIGURA A15- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{31}P HMBC (constante de acoplamento de curta distância, 6 Hz) e (B) ^1H - ^{13}C HSQC do complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP2**) em CD_3CN .

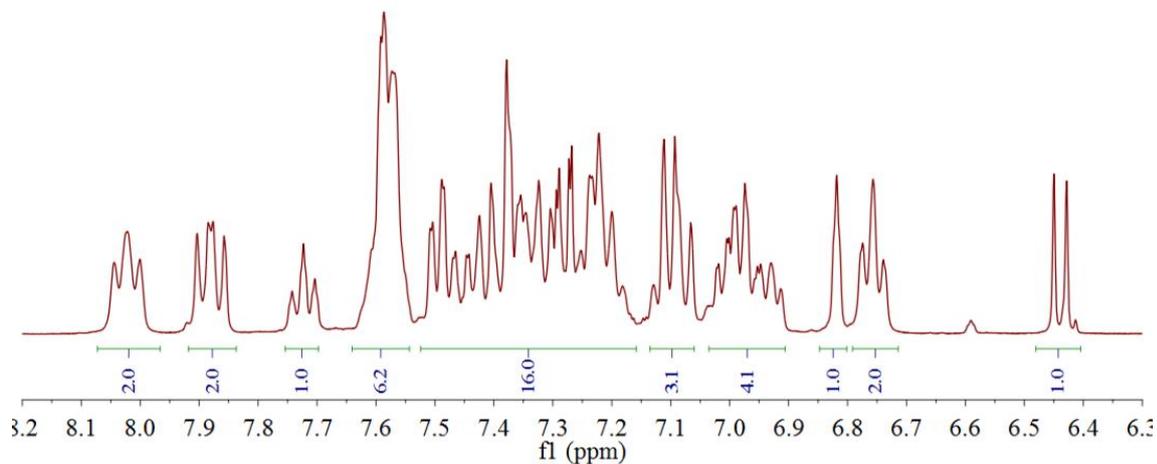
Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(mpca)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP3), Figura A16 à Figura A22

FIGURA A16- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(mpca)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP3) em CD₃CN.

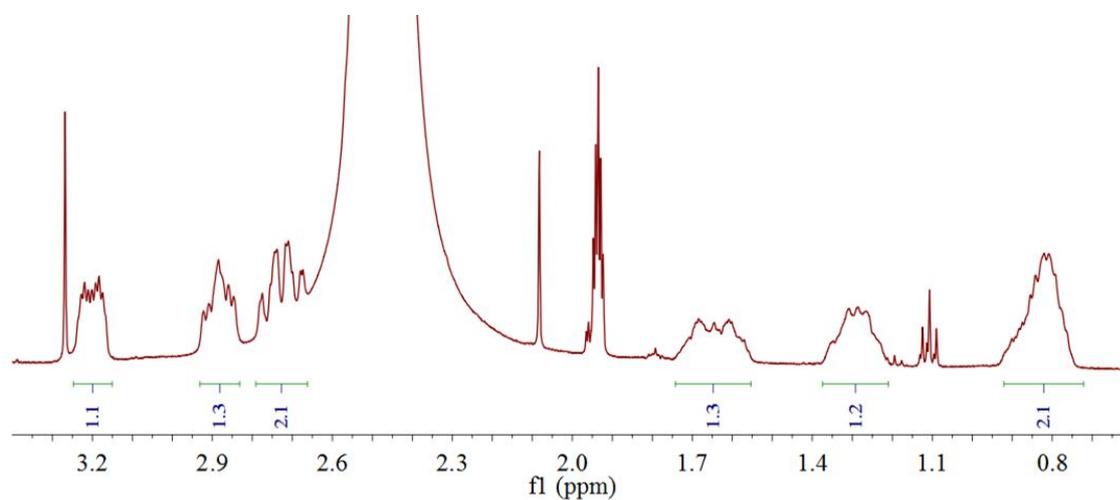


FIGURA A17- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(mpca)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP3) em CD₃CN.

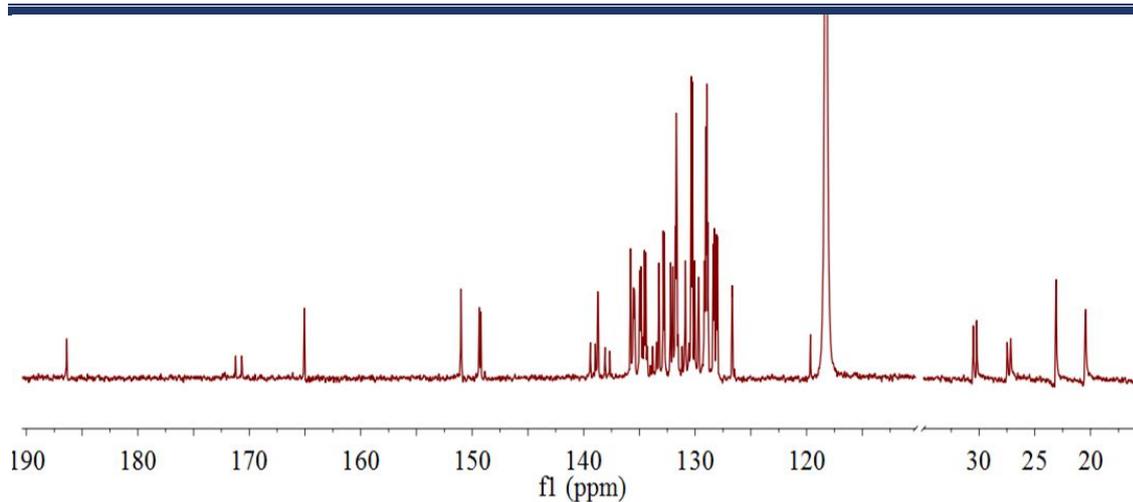


FIGURA A18- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP3**) em CD_3CN .

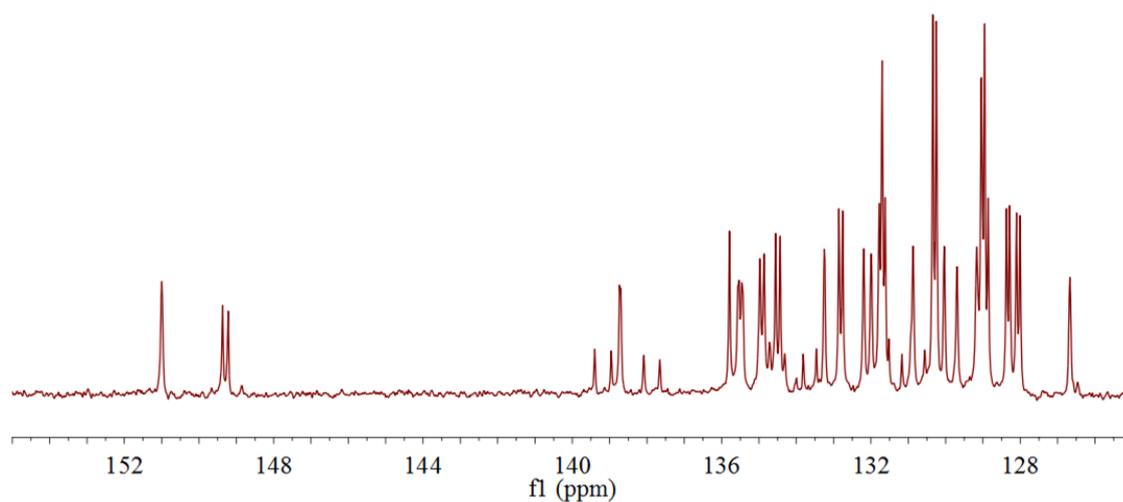


FIGURA A19- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP3**) em CD_3CN .

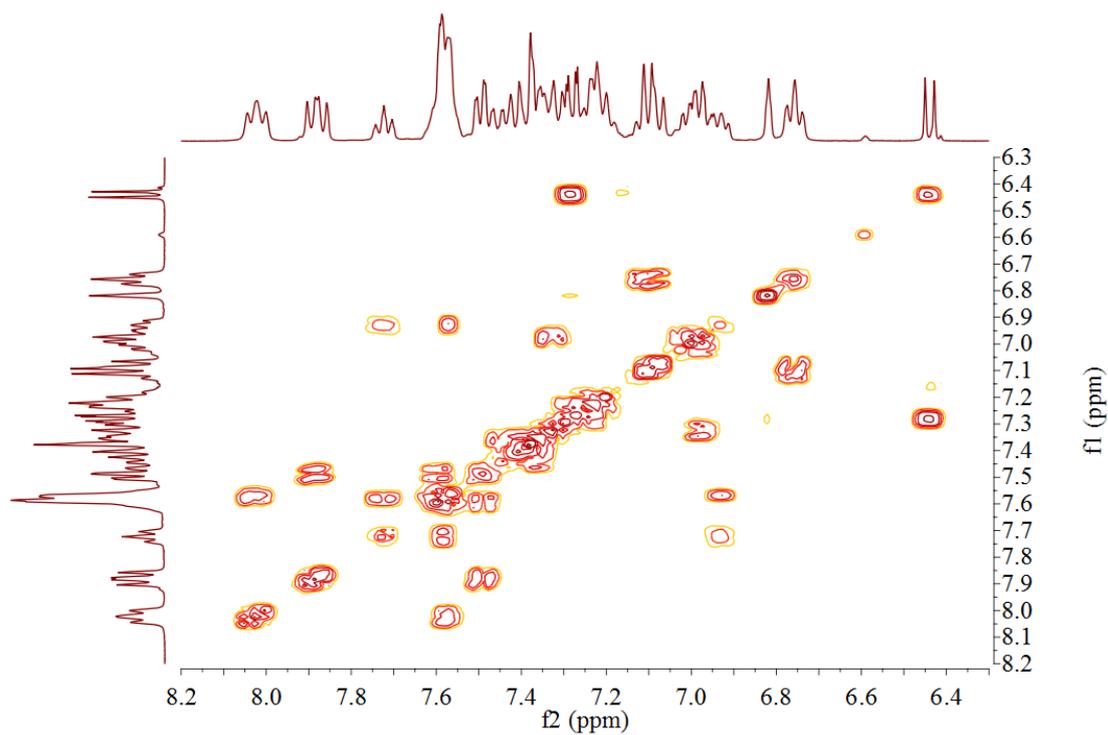


FIGURA A20- Mapa de correlação de RMN 2D ^1H - ^1H COSY do complexo $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP3**) em CD_3CN .

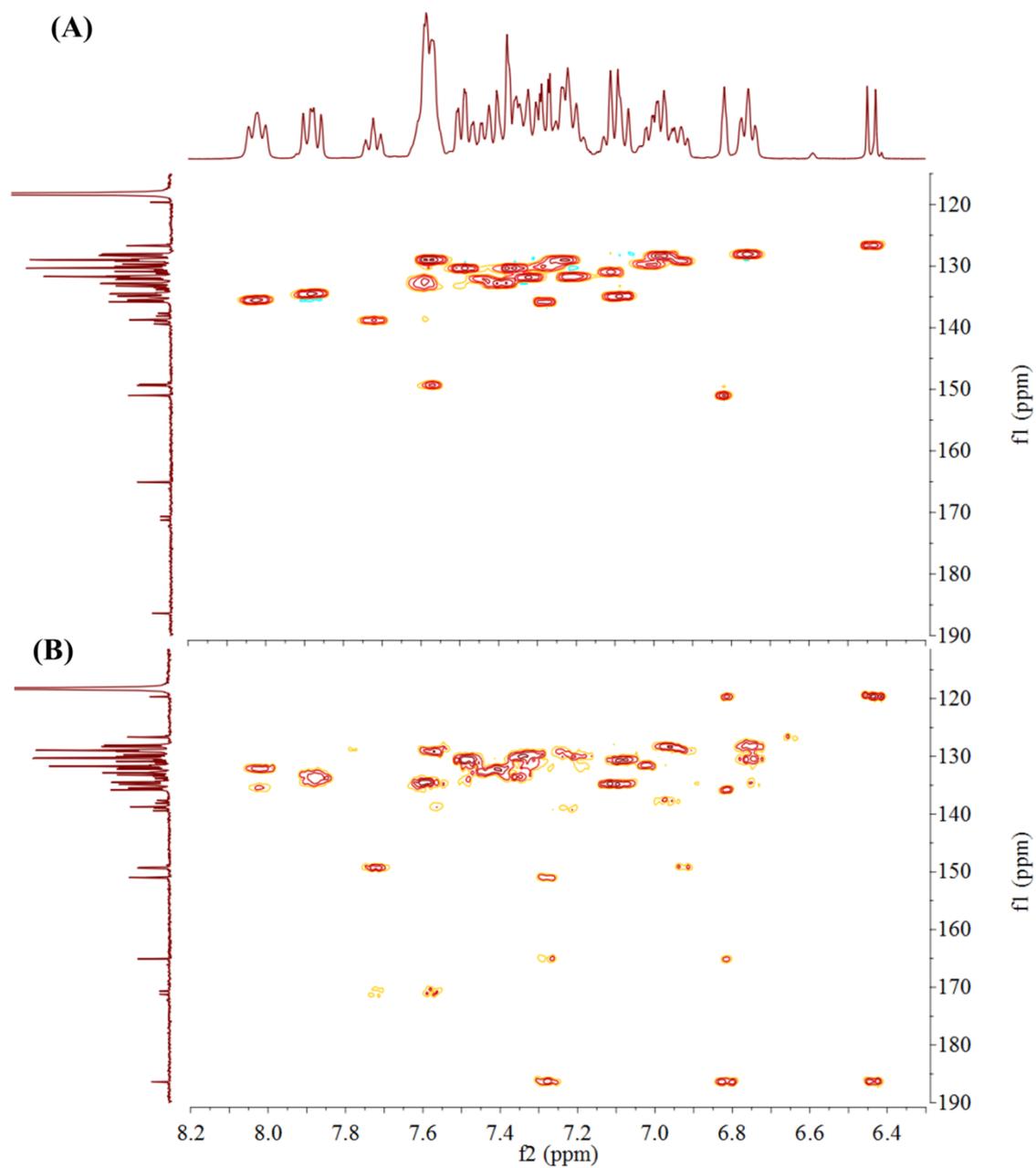


FIGURA A21- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{13}C HSQC e (B) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{mzca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP3**) em CD_3CN .

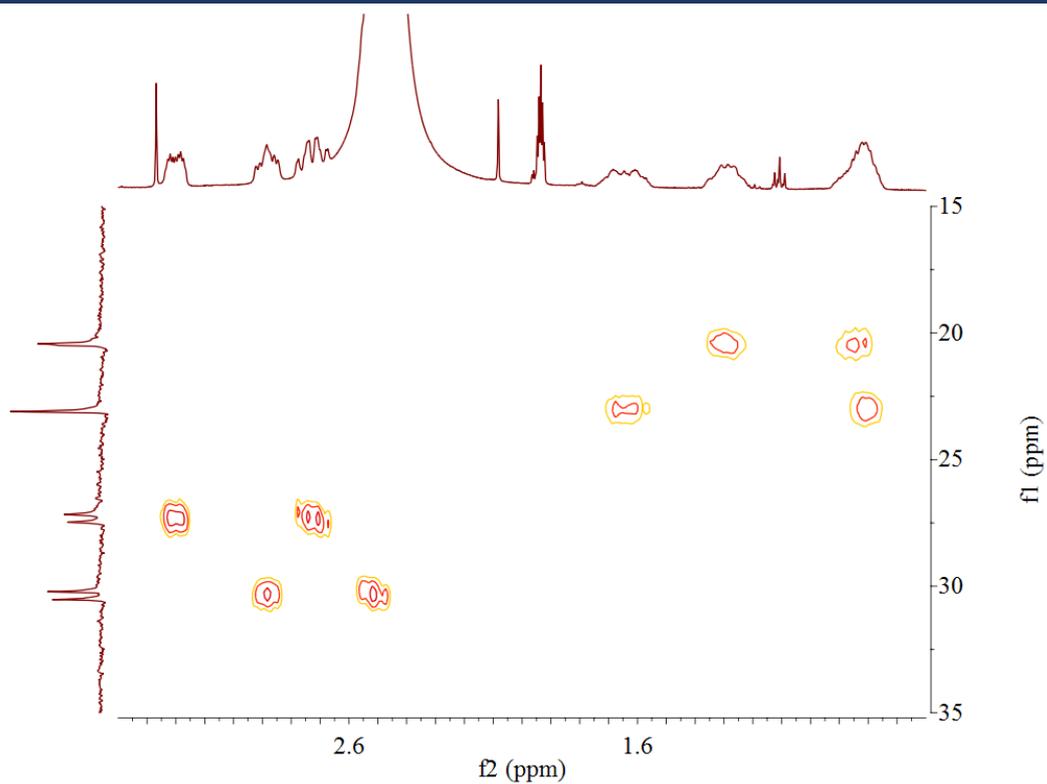


FIGURA A22- Mapa de correlação de RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC do complexo $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP3**) em CD_3CN .

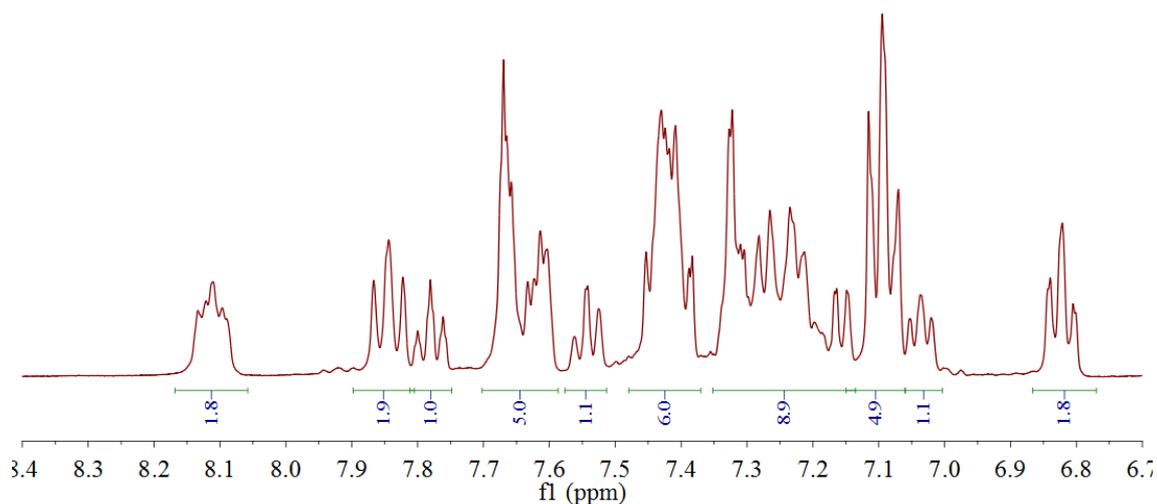
Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(damp)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP5), Figura A23 à Figura A29

FIGURA A23- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(damp)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP5) em CD₃CN.

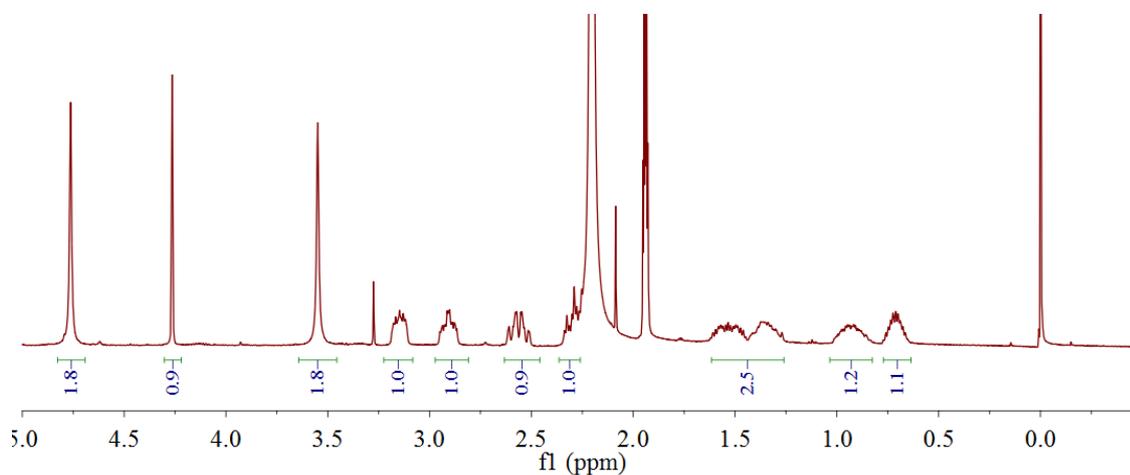


FIGURA A24- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(damp)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP5) em CD₃CN.

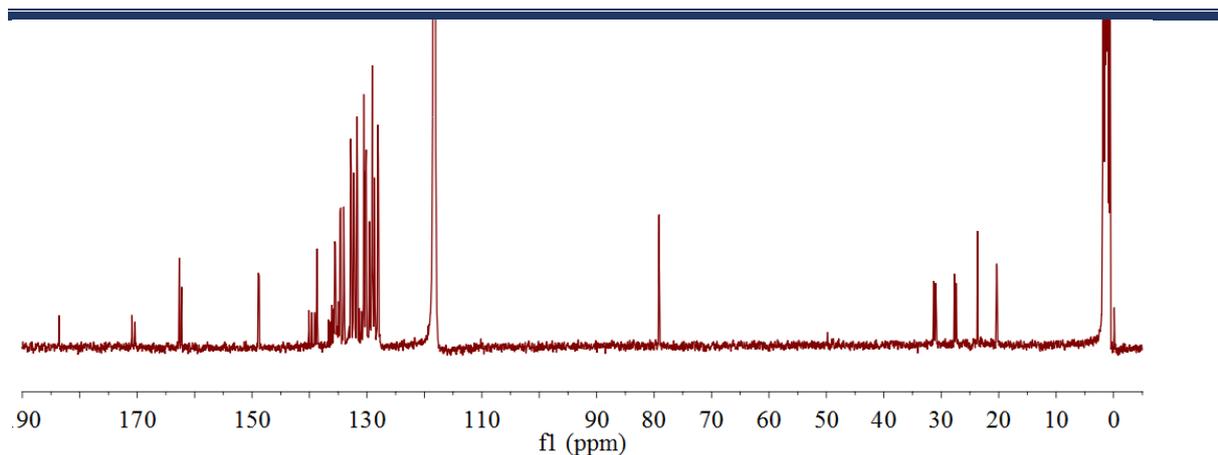


FIGURA A25- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP5**) em CD_3CN .

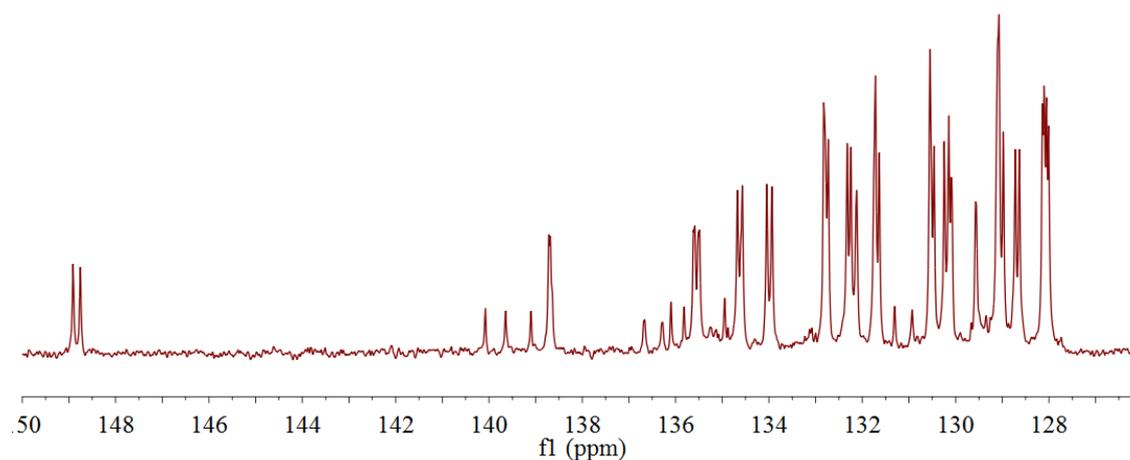


FIGURA A26- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP5**) em CD_3CN .

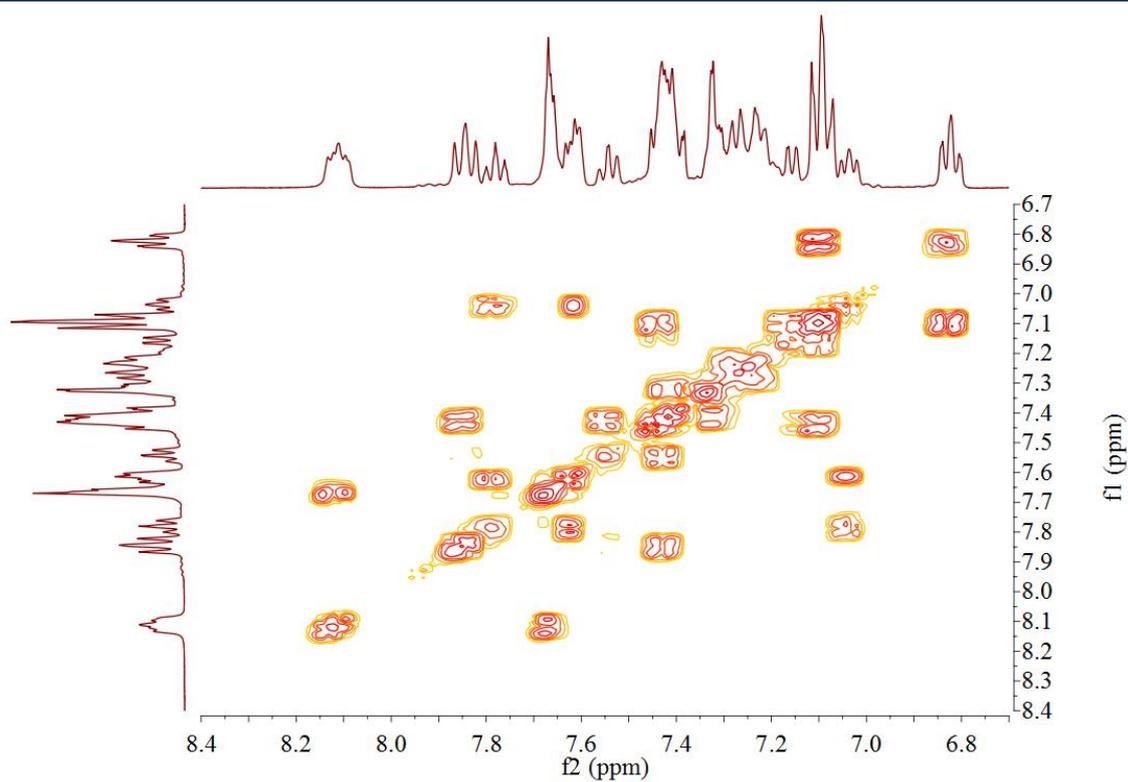


FIGURA A27- Mapa de correlação de RMN 2D ¹H-¹H COSY do complexo [Ru(damp)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**AMP5**) em CD₃CN.

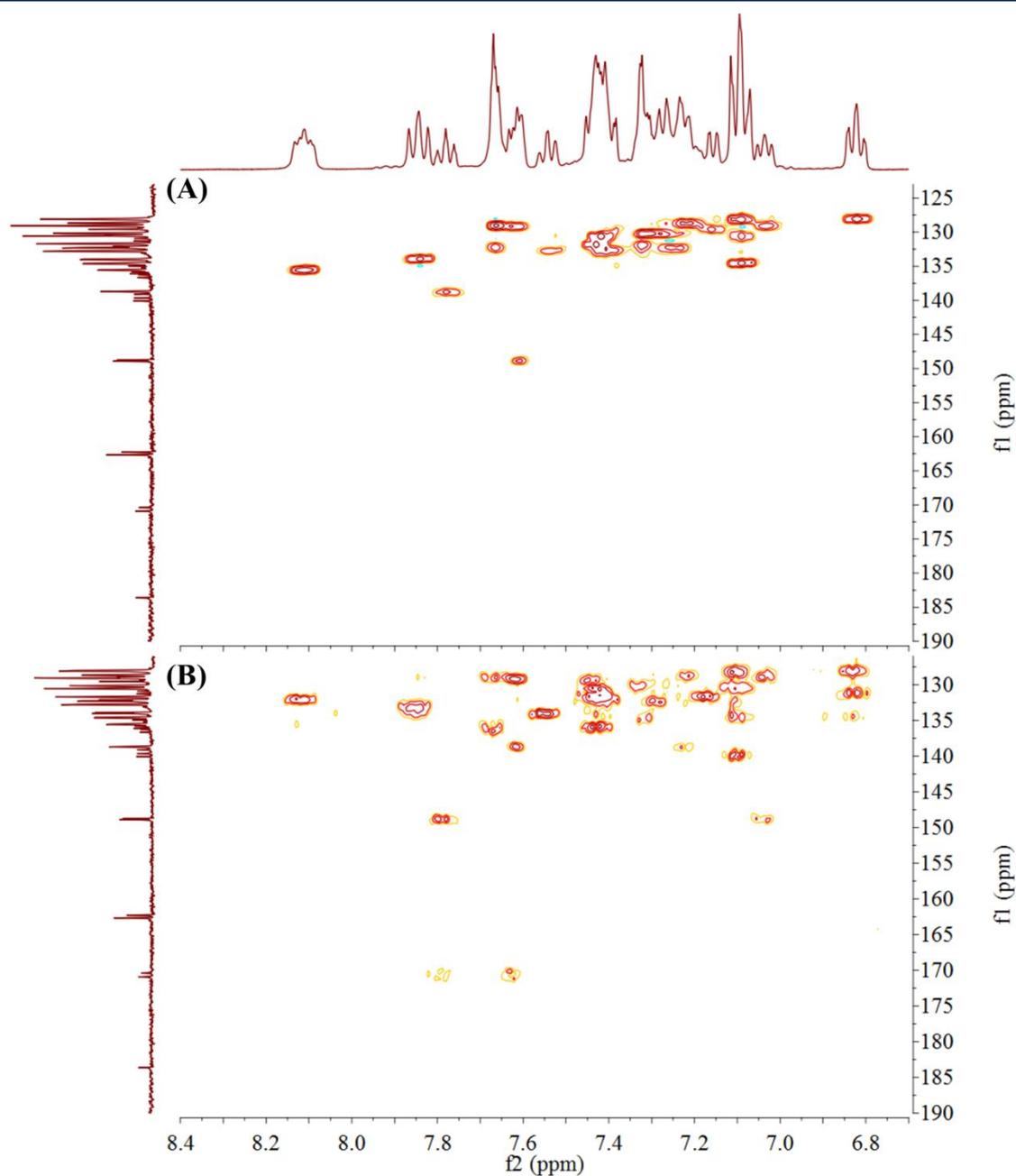


FIGURA A28- Mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^{13}C HSQC e (B) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP5**) em CD_3CN .

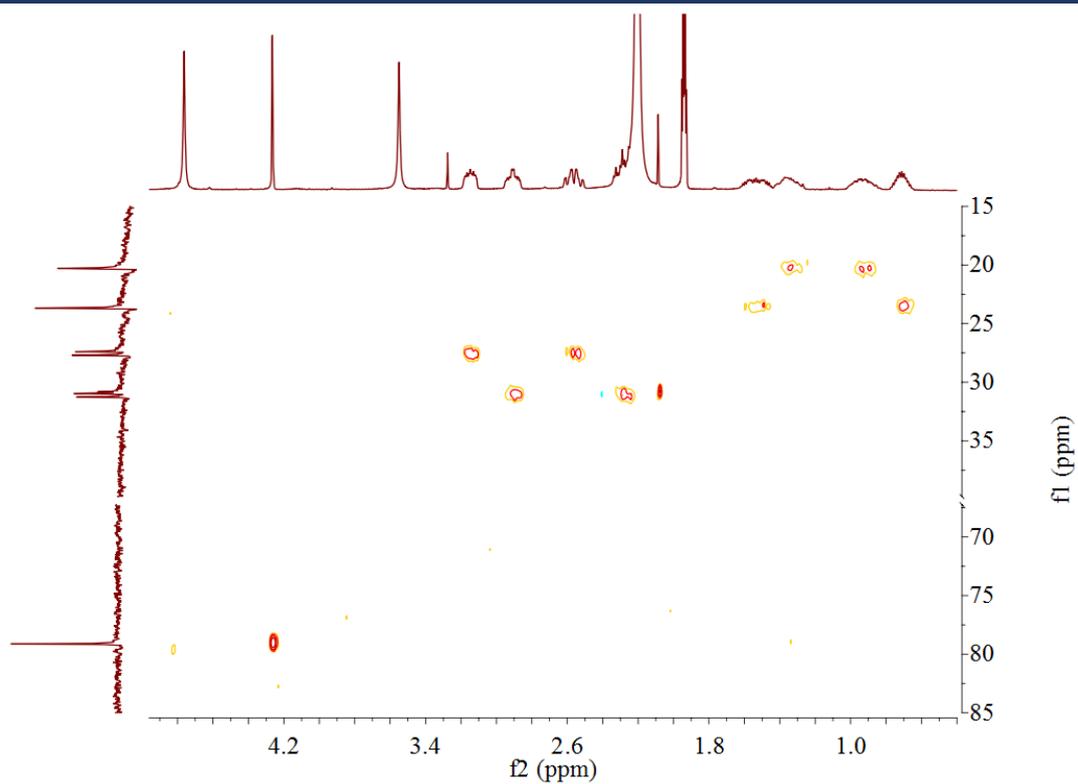


FIGURA A29- Mapa de correlação de RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC do complexo $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**AMP5**) em CD_3CN .

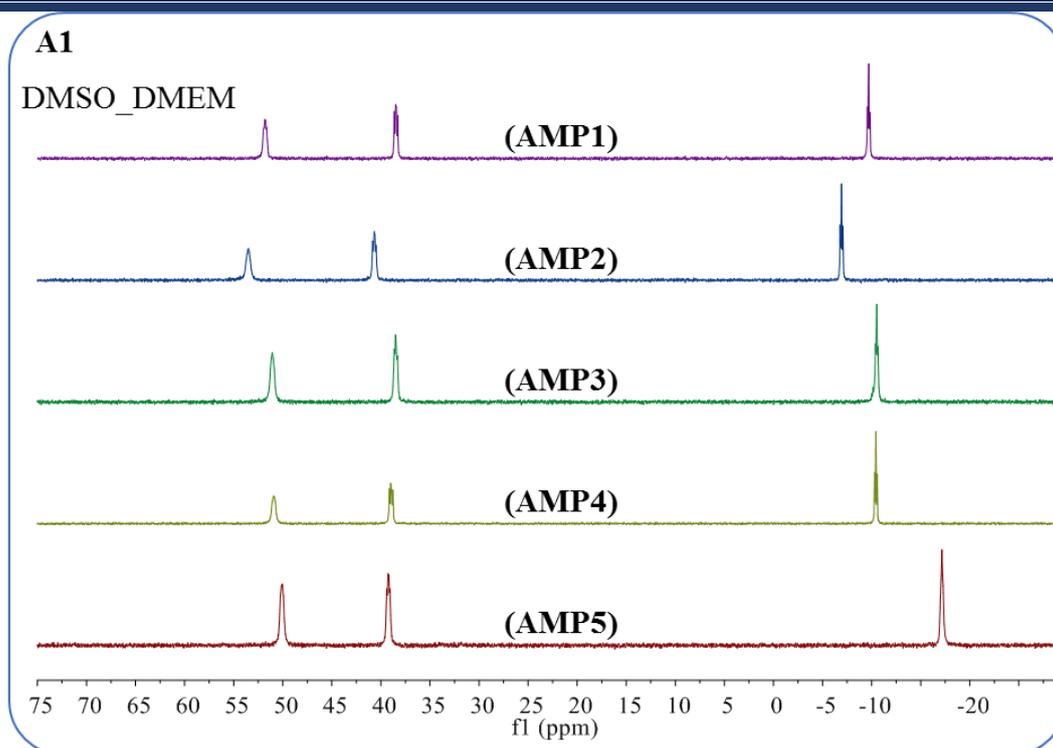


FIGURA A30- Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos AMP em DMSO/DMEM registrados com 0,5 h. Espectros registrados com 5K de scans.

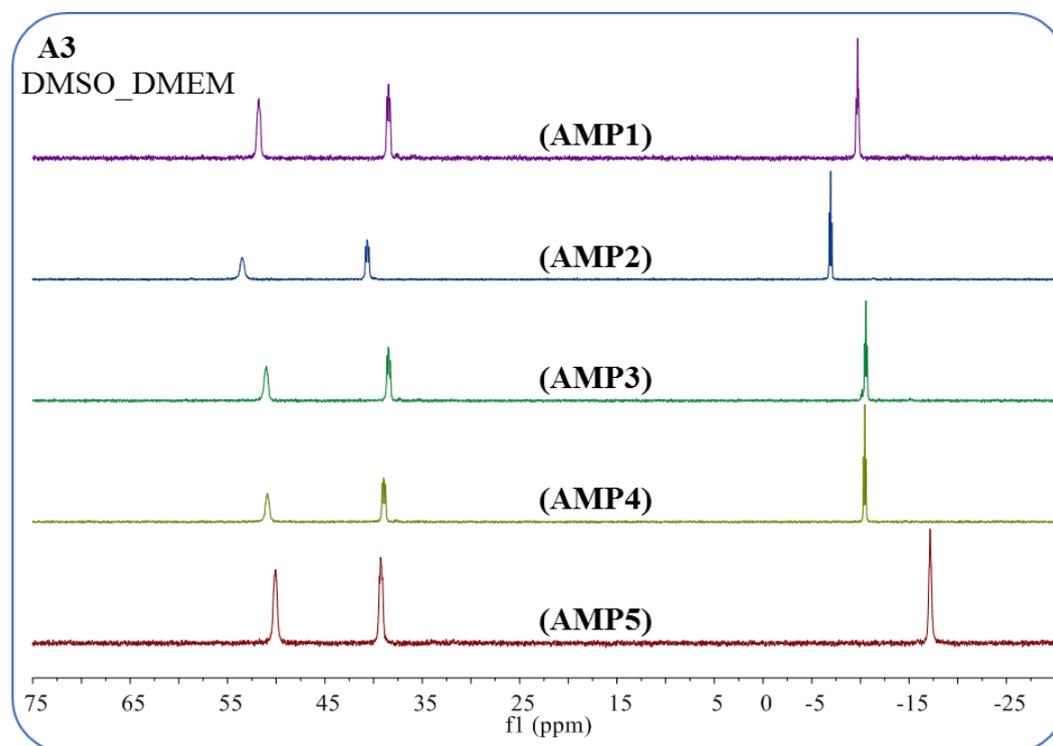


FIGURA A31- Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos AMP em DMSO/DMEM registrados com 60 h. Espectros registrados com 5K de scans.

Parte II- Dados cristalográficos dos complexos

TABELA A6- Principais parâmetros cristalográficos para as estruturas obtidas para os complexos [Ru(pyS)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP1) e [Ru(tzdt)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP2).

Compound	AMP1	AMP2
Empirical formula	C ₅₀ H ₄₆ F ₆ N ₂ P ₄ Ru S	C ₄₈ H ₄₄ F ₆ N ₂ P ₄ Ru S ₂
Formula weight	1045.90	1051.92
Temperature	296(2) K	293(2) K
Wavelength	0.71073 Å	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic	Triclinic
Space group	P 21/c	P -1
Unit cell dimensions	a = 14.966(2) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 15.4067(19) Å $\beta = 107.280(4)^\circ$ c = 21.782(3) Å $\gamma = 90^\circ$	a = 11.9069(6) Å $\alpha = 88.592(4)^\circ$ b = 13.6132(7) Å $\beta = 89.434(4)^\circ$ c = 14.6833(8) Å $\gamma = 76.637(4)^\circ$
Volume	4795.7(11) Å ³	2314.9(2) Å ³
Z	4	2
Density (calculated)	1.449 Mg/m ³	1.509 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.564 mm ⁻¹	0.628 mm ⁻¹
F(000)	2136	1072
Crystal size	0.172 x 0.1331 x 0.111 mm ³	0.097 x 0.089 x 0.076 mm ³
Theta range for data collection	1.425 to 25.996°	2.452 to 25.997°
Index ranges	-16 ≤ h ≤ 18, -19 ≤ k ≤ 17, -26 ≤ l ≤ 26	-14 ≤ h ≤ 14, -16 ≤ k ≤ 16, -18 ≤ l ≤ 18
Reflections collected	46741	46382
Independent reflections	9413 [R(int) = 0.0345]	9092 [R(int) = 0.0646]
Completeness to theta = 25.242°	100.0%	99.9%
Max. and min. transmission	None	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	9413 / 0 / 577	9092 / 0 / 569
Goodness-of-fit on F ²	1.074	1.059
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0393, wR2 = 0.0951	R1 = 0.0464, wR2 = 0.1096
R indices (all data)	R1 = 0.0567, wR2 = 0.1095	R1 = 0.0704, wR2 = 0.1281
Extinction coefficient	n/a	0.0011(4)
Largest diff. peak and hole	0.814 and -0.783 e.Å ⁻³	0.960 and -0.793 e.Å ⁻³

TABELA A7- Principais parâmetros cristalográficos para as estruturas obtidas para os complexos [Ru(mpca)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**AMP3**) e [Ru(pySm)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**AMP4**) e [Ru(damp)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**AMP5**).

Compound	AMP3	AMP4	AMP5
Empirical formula	C ₅₃ H ₅₂ F ₆ N ₂ O ₃ P ₄ Ru S	C ₅₀ H ₄₇ Cl ₂ F ₆ N ₃ P ₄ Ru S	C ₄₉ H ₄₇ F ₆ N ₅ P ₄ Ru S
Formula weight	1135.97	1131.81	1076.92
Temperature	293(2) K	296(2) K	296(2) K
Wavelength	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Monoclinic
Space group	P 21/c	P -1	P 21/n
Unit cell dimensions	a = 16.7548(14) Å β = 90° b = 14.7953(10) Å γ = 97.661(7)° c = 20.9407(16) Å α = 90°	a = 11.6100(3) Å β = 83.7760(10)° b = 15.2784(4) Å γ = 73.4450(10)° c = 15.6993(4) Å α = 69.3920(10)°	a = 15.4939(3) Å β = 90° b = 18.2001(4) Å γ = 108.5310(10)° c = 18.9303(4) Å α = 90°
Volume	5144.7(7) Å ³	2498.43(11) Å ³	5061.39(18) Å ³
Z	4	2	4
Density (calculated)	1.467 Mg/m ³	1.504 Mg/m ³	1.413 Mg/m ³
Abs. coefficient	0.536 mm ⁻¹	0.652 mm ⁻¹	0.538 mm ⁻¹
F(000)	2328	1152	2200
Crystal size	0.222 x 0.213 x 0.122 mm ³	0.121 x 0.111 x 0.097 mm ³	0.166 x 0.155 x 0.131 mm ³
Theta range for data collection	2.571 to 25.998°.	1.424 to 25.999°.	1.486 to 26.000°.
Index ranges	-20 ≤ h ≤ 15, -18 ≤ k ≤ 16, -25 ≤ l ≤ 24	-14 ≤ h ≤ 13, -18 ≤ k ≤ 18, -19 ≤ l ≤ 19	-19 ≤ h ≤ 19, -22 ≤ k ≤ 21, -23 ≤ l ≤ 18
Reflections collected	19790	45059	40907
Independent reflections	10110 [R(int) = 0.0562]	9798 [R(int) = 0.0404]	9957 [R(int) = 0.1260]
Completeness to theta = 25.242°	99.9%	99.8%	100.0%
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	None	None
Max. and min. transmission	1.00000 and 0.92730	none	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	10110 / 0 / 632	9798 / 0 / 604	9957 / 0 / 595
Goodness-of-fit on F ²	1.024	1.042	0.805
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0576, wR2 = 0.1386	R1 = 0.0390, wR2 = 0.1011	R1 = 0.0616, wR2 = 0.1727
R indices (all data)	R1 = 0.1115, wR2 = 0.1737	R1 = 0.0442, wR2 = 0.1065	R1 = 0.0801, wR2 = 0.1951
Extinction coefficient	n/a	n/a	n/a
Largest diff. peak and hole	0.821 and -0.719 e.Å ⁻³	0.928 and -0.816 e.Å ⁻³	0.934 and -1.094 e.Å ⁻³

Parte III- Dados de voltametria dos complexos

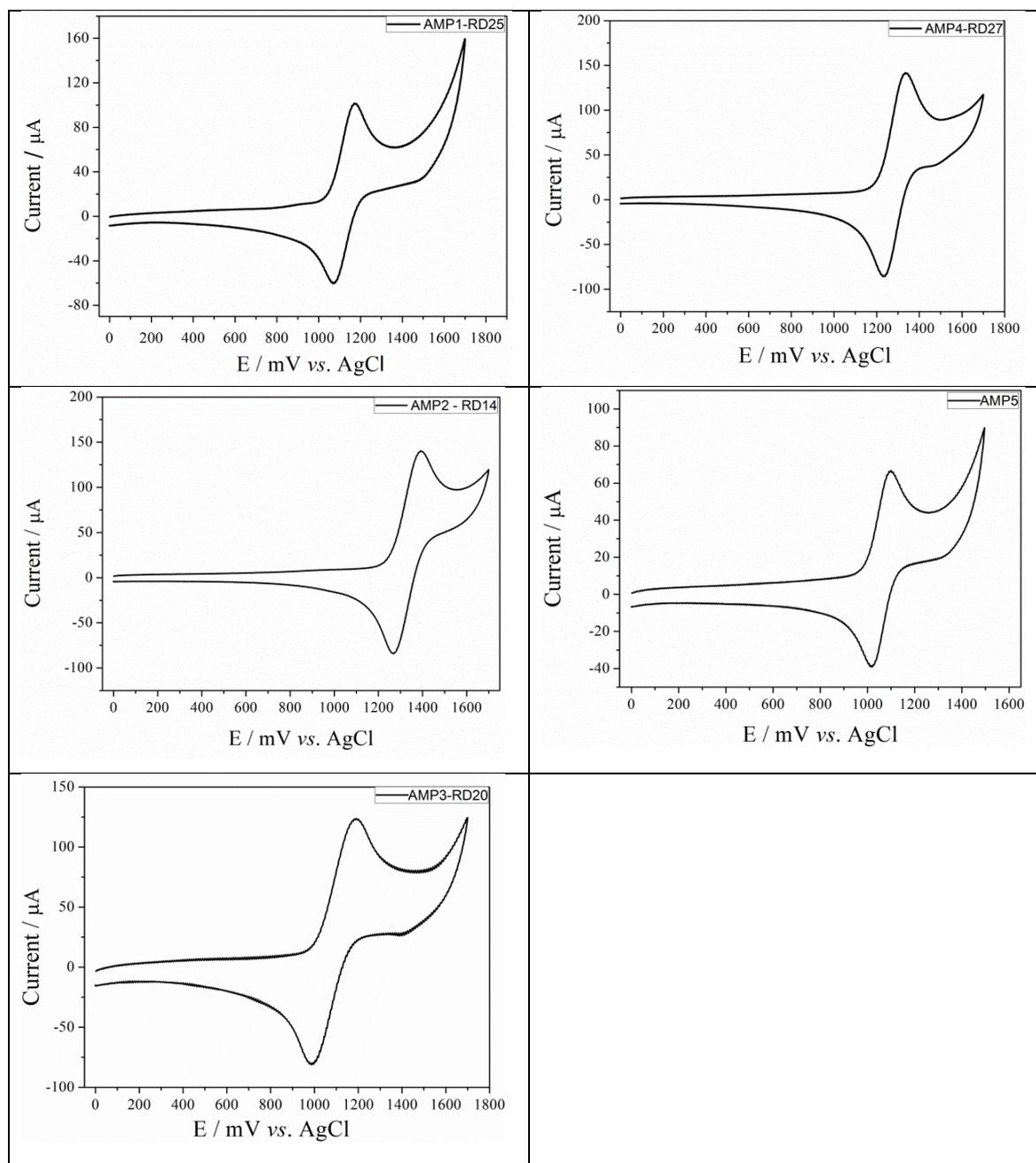


FIGURA A32- Voltamogramas cíclico registrado em presença de: (A) $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1), (B) $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2), (C) $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP3), (D) $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP4) e (E) $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP5) em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em diclorometano à 100 mV s^{-1} .

Parte IV- Dados de análise elementar, condutividade e espectroscopia de absorção na região do infravermelho e UV/visível dos complexos

[Ru(pyS)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP1). Rendimento 99 mg (82%). Análise elementar (%) Calc. para C₅₀H₄₆F₆N₂P₄RuS: C 57.05; H 4.32; N 1.97; S 2.91 Encontrado: C 57.25; H 4.71; N 2.47; S 3.06. Seleccionado IR (KBr, cm⁻¹): ν (C—H) 3072, 2936 e 2864; ν (C=C, py) 1585; ν C=N / δ C—N 1549; ν (C = C, ring phosphine) 1489; ν (C=N, py) 1450; ν (C=N) 1433; ν (C=C, ϕ) 1420; ν (C—S) 1268; β (C—H, ϕ) 1159; ν (C—S) 1136; ρ 1093; ν ring 1001; ν (PF₆⁻) 840; γ (C—S) 740; γ (CH, ϕ) 695; ν (P—CH₂) 664; ν (PF₆) 558; ν (P—C, ϕ) 518; ν 508; ν (Ru—S) 464; ν (Ru—N) 413. UV/vis [DMSO; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 262 (31958), 396 (13201), 352 (5392). Condutividade molar (μ S/cm, DMSO) 33.7.

[Ru(tzdt)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP2) Rendimento 92 mg (75%). Análise elementar (%) Calc. for C₄₈H₄₆F₆N₂P₄RuS₂: C 63.21; H 5.42; N 3.07; S 7.03; Encontrado: C 63.06; H 5.35; N 2.83; S 6.92. Seleccionado IR (KBr, cm⁻¹): ν (C—H) 3071, 2932 and 2848; ν (C=C, py) 1588; ν (C = C, ring phosphine) 1482; ν (C=N, py) 1449; ν (C=N) 1435; ν (C=C, ϕ) 1413; ν (C—S) 1273; β (C—H, ϕ) 1159; ν (C—S) 1132; ρ 1095; ν ring 999; ν (PF₆) 837; γ (C—S) 740; γ (CH, ϕ) 698; ν (P—CH₂) 660; ν (PF₆) 557; ν (P—C, ϕ) 519; ν 507; ν (Ru—S) 463; ν (Ru—N) 413. UV/vis [DMSO; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 262 (30815), 308 (6061), 366 (2207). Condutividade molar (μ S/cm, DMSO) 36.1.

[Ru(mpca)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP3). Rendimento 109 mg (86%). Análise elementar (%) Calc. for C₅₁H₄₆F₆N₂O₂P₄RuS.1/4CH₂Cl₂: C 55.26; H 4.48; N 2.51; S 2.88; Encontrado: C 55.47; H 3.96; N 2.29; S 2.69. Selected IR (KBr, cm⁻¹): ν (O—H) 3351; ν (C—H) 3071, 2935 and 2862; ν (C=O) 1715; ν (C=C)py 1585; ν C=N / δ C—N 1546; ν (C = C, ring phosphine) 1481;

ν (C=N, py) 1451; ν (C=N) 1433; ν (C=C, ϕ) 1408; ν (COO⁻) 1369; ν (C—S) 1265; β (C—H, ϕ) 1152; ν (C—S) 1135; ρ 1092; ν ring 1001; ν (PF₆⁻) 845; γ (C—S) 738; γ (CH, ϕ) 695; ν (P—CH₂) 660; ν (PF₆⁻) 561; ν (P—C, ϕ) 519; ν 507; ν (Ru—S) 461; ν (Ru—N) 420. UV/vis [DMSO; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 262 (28277), 358 (6832). Condutividade molar (μ S/cm, DMSO) 34.1.

[Ru(pySm)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP4). Rendimento 108 mg (89%). Análise elementar (%) Calc. for C₄₉H₄₅F₆N₃P₄RuS: C 54,95; H 4,55; N 3,90; S 2,97; Encontrado: C 54,99; H 4,43; N 3,27; S 2,87. Seleccionado IR (KBr, cm⁻¹): ν (C—H) 3059, 2939 and 2866; ν (C=C) py 1583; ν C=N / δ C—N 1543; ν (C=C, ring phosphine) 1482; ν (C=N, py) 1450; ν (C=N) 1433; ν (C—S) 1257; β (C—H, ϕ) 1160; ν (C—S) 1136; ρ 1094; ν ring 1001; ν (PF₆) 839; γ (C—S) 738; γ (CH, ϕ) 695; ν (P—CH₂) 668; ν (PF₆) 558; ν (P—C, ϕ) 519; ν 508; ν (Ru—S) 464; ν (Ru—N) 420. UV/vis [DMSO; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 262 (25185), 306 (8456), 356 (ombro). Condutividade molar (μ S/cm, DMSO) 33.9.

[Ru(damp)(dppb)(dphppy)]PF₆ (AMP5). Rendimento 99 mg (79%). Análise elementar (%) Calc. for C₄₉H₄₇F₆N₅P₄RuS.3/2CH₂Cl₂: C 52,48; H 4,55; N 6,16; S 2,82; Encontrado: C 52,48; H 4,57; N 5,71; S 2,68. Seleccionado IR (KBr, cm⁻¹): ν (N—H, NH₂) 3503 – 3200; ν (C—H) 3059, 2932 and 2856; δ (N—H, NH₂) 1543 ν (C=C, py) 1584; ν C=N / δ C—N 1535; ν (C = C, ring phosphine) 1474; ν (C=N, py) 1448; ν (C=N) 1433; ν (C=C, ϕ) 1409; δ (N—H) and ν (C=C) 1321; ν (C—S) 1253; β (C—H, ϕ) 1160; ν (C—S) 1130; ρ 1091; ν ring 999; ν (PF₆⁻) 847; γ (C—S) 744; γ (CH, ϕ) 700; ν (P—CH₂) 656; ν (PF₆⁻) 558; ν (P—C, ϕ) 519; ν 507; ν (Ru—S) 462; ν (Ru—N) 424. UV/vis [DMSO; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 262 (30982), 306 (9087), 368 (2296). Condutividade molar (μ S/cm, DMSO) 35.4.

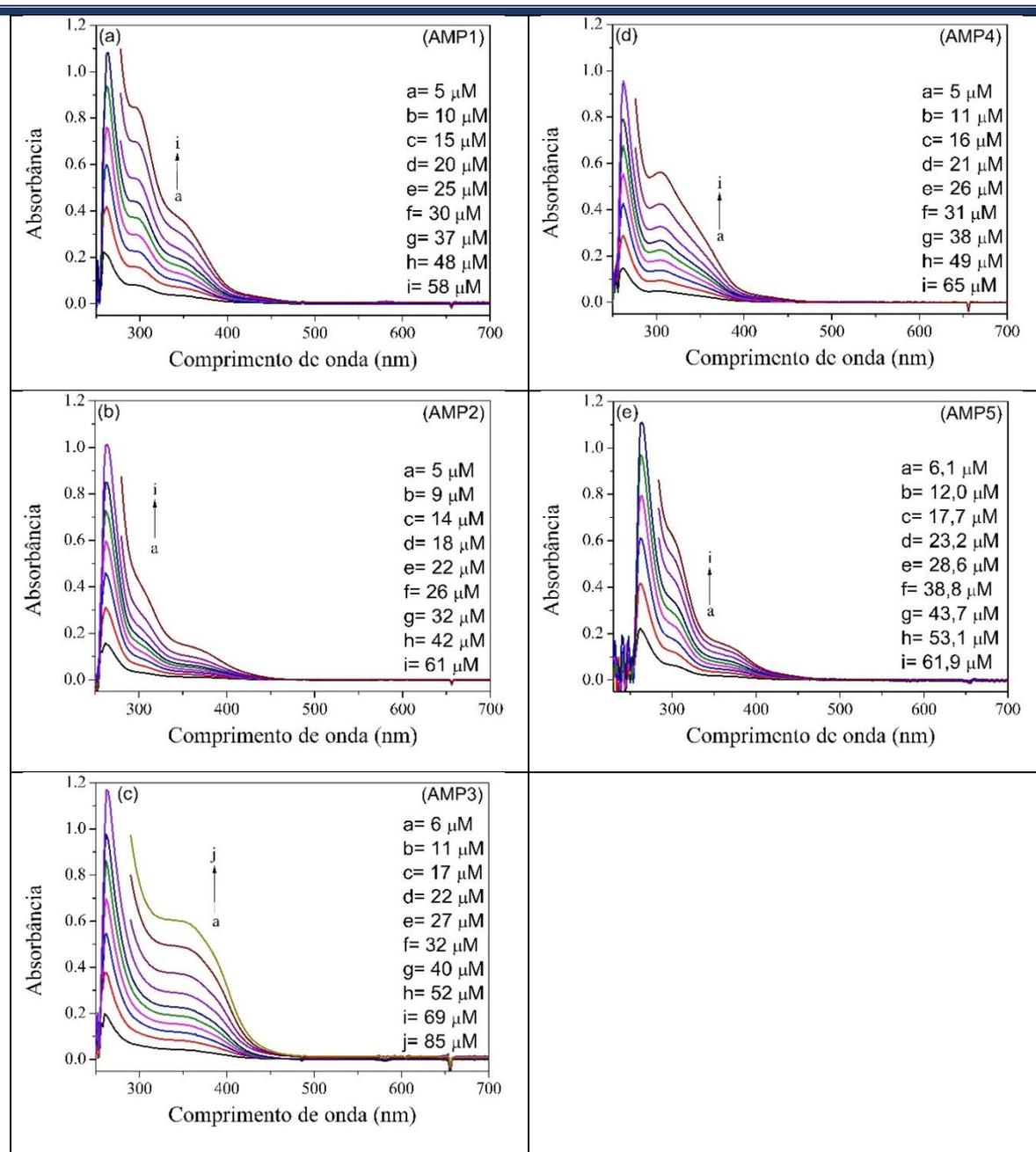


FIGURA A33- Espectros de absorção na região do UV/Vis para (A) $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1), (B) $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2), (C) $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP3), (D) $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP4) e (E) $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP5) em dimetilsulfóxido.

TABELA A8- Dados dos espectros de absorção na região do UV/Vis dos complexos.

Complexo	λ (nm)	Absortividade molar (ϵ) ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$)
AMP1	262	31958 ± 2914
	296	13201 ± 911
	352	5392 ± 382
AMP2	262	30815 ± 434
	308	6061 ± 14
	366	2207 ± 21
AMP3	262	28277 ± 489
	358	6832 ± 44
AMP4	262	25185 ± 462
	306	8456 ± 60
	356*	Ombro
AMP5	262	30982 ± 1707
	306	9087 ± 21
	368	2296 ± 4

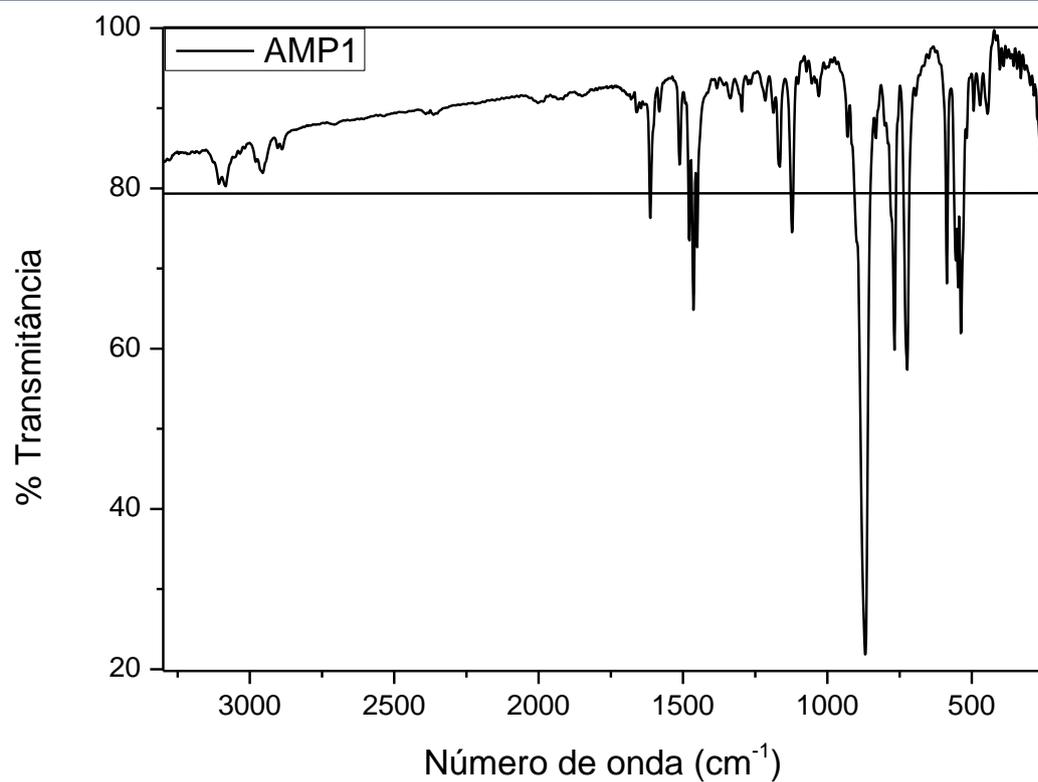


FIGURA A34- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo AMP1.

Parte V- Dados de espectroscopia da supressão da fluorescência da HSA

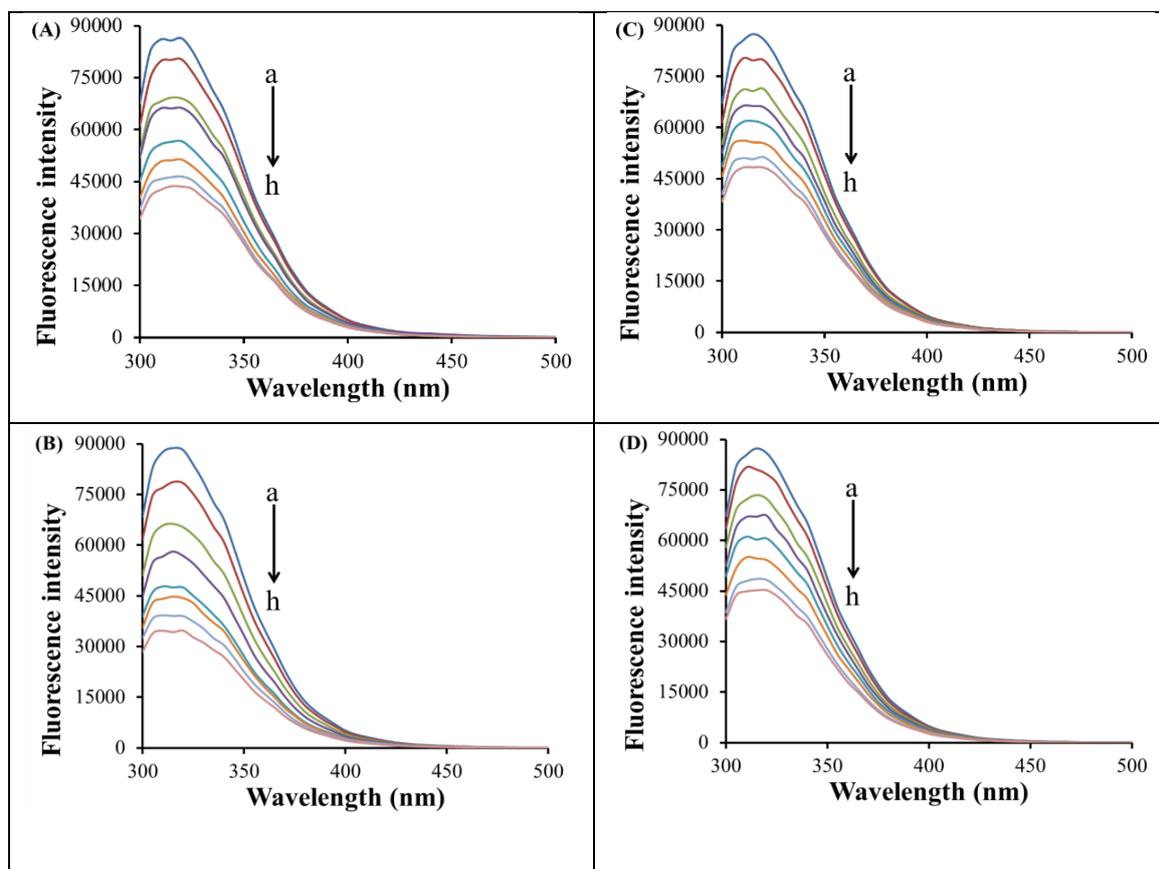


FIGURA A35- Espectros de fluorescência da HSA na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[HSA] (a= 0; b= 1; c= 2; d= 3; e= 4; f= 5; g= 6 e h= 7), com comprimento de onda de excitação a 270 nm, a 25°C em tampão Tris-HCl: (A) $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1), (B) $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2), (C) $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP3), (D) $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP4) e (E) $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP5).

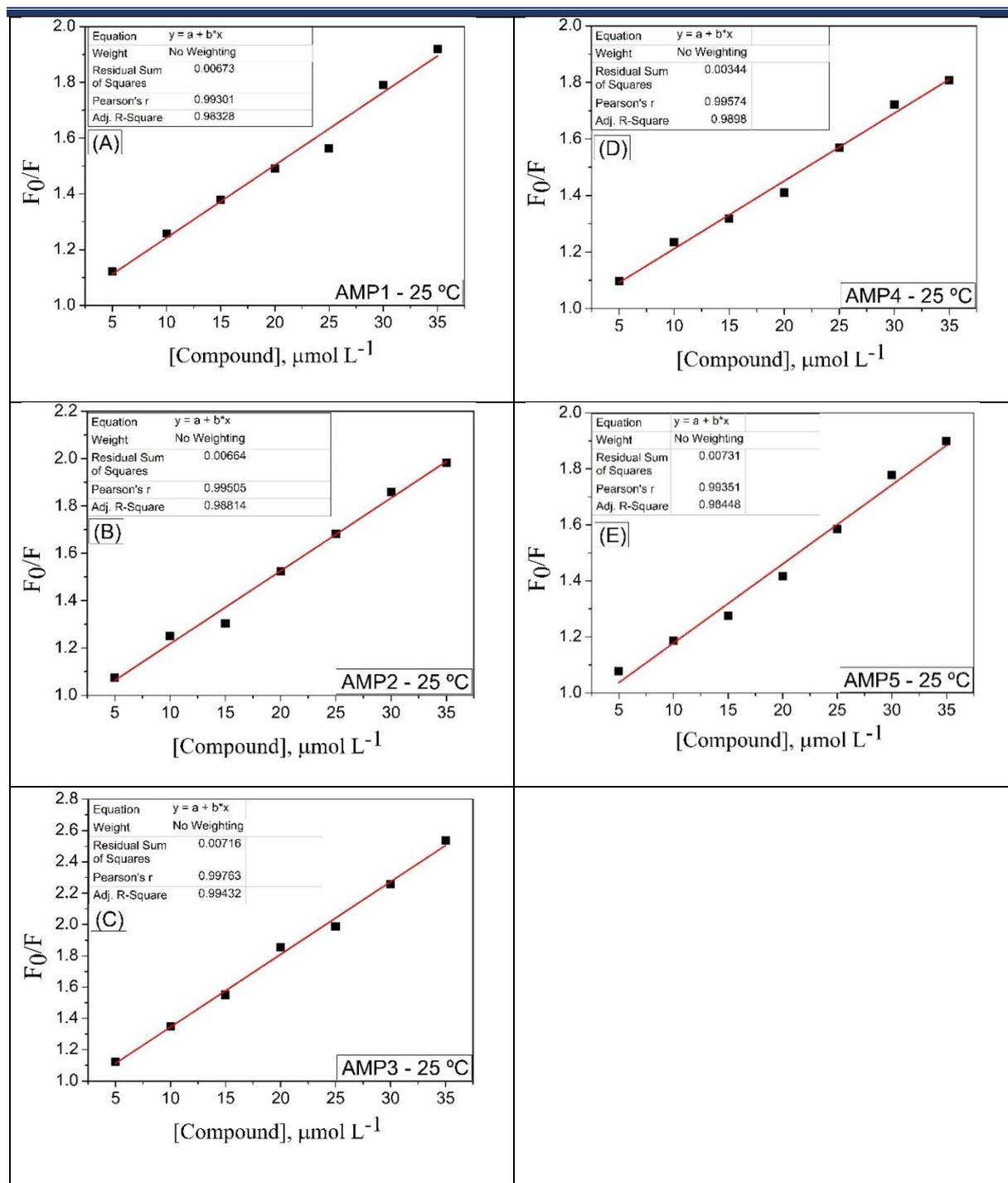


FIGURA A36- Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na ausência e presença dos compostos à 25 °C. (A) $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1), (B) $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2), (C) $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP3), (D) $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP4) e (E) $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP5). Representação de uma das triplicadas.

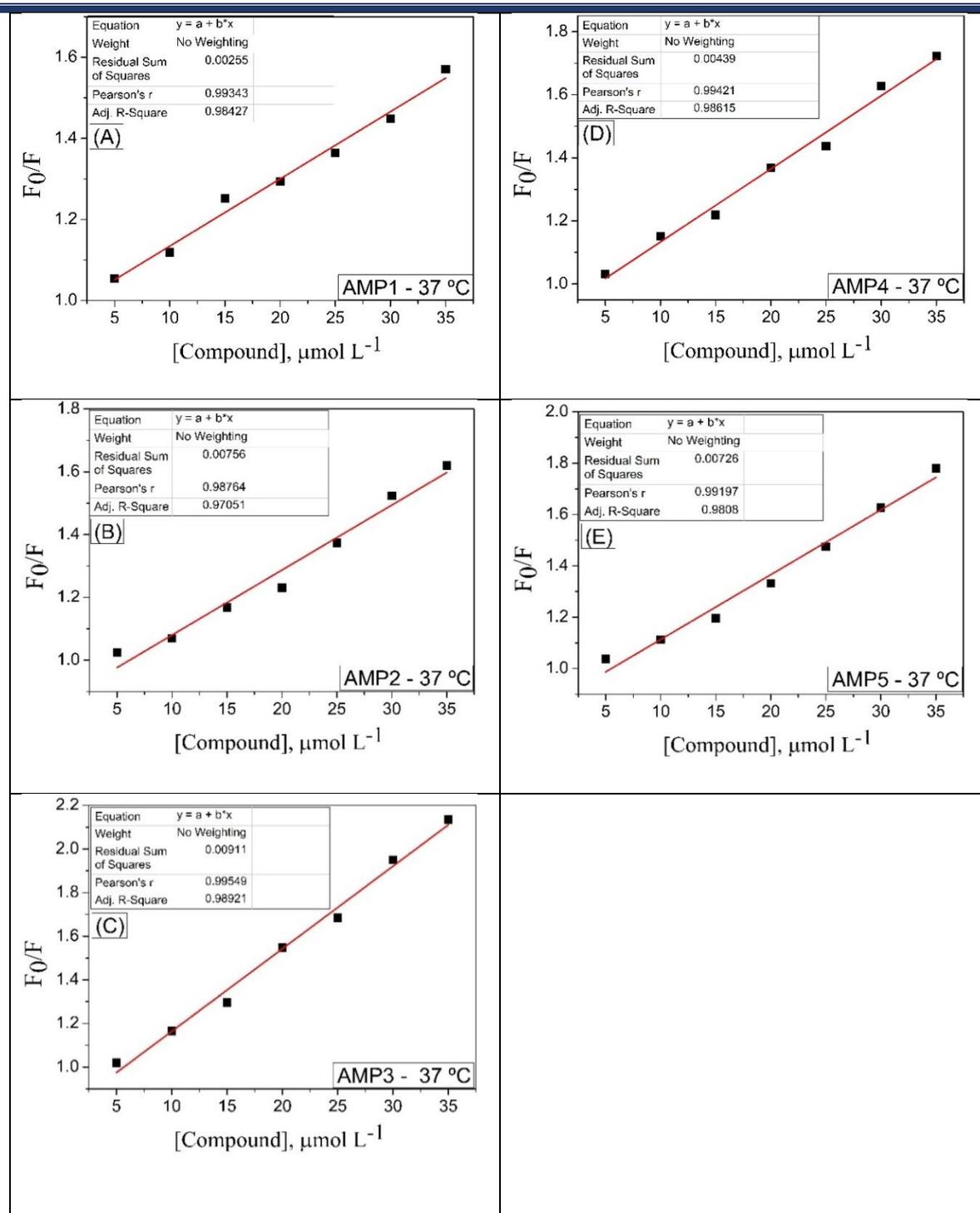


FIGURA A37- Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na ausência e presença dos compostos à 37 °C. (A) $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1), (B) $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2), (C) $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP3), (D) $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP4) e (E) $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP5). Representação de uma das triplicadas.

Parte V- Espectroscopia da fluorescência do DNA-Hoechst, série AMP

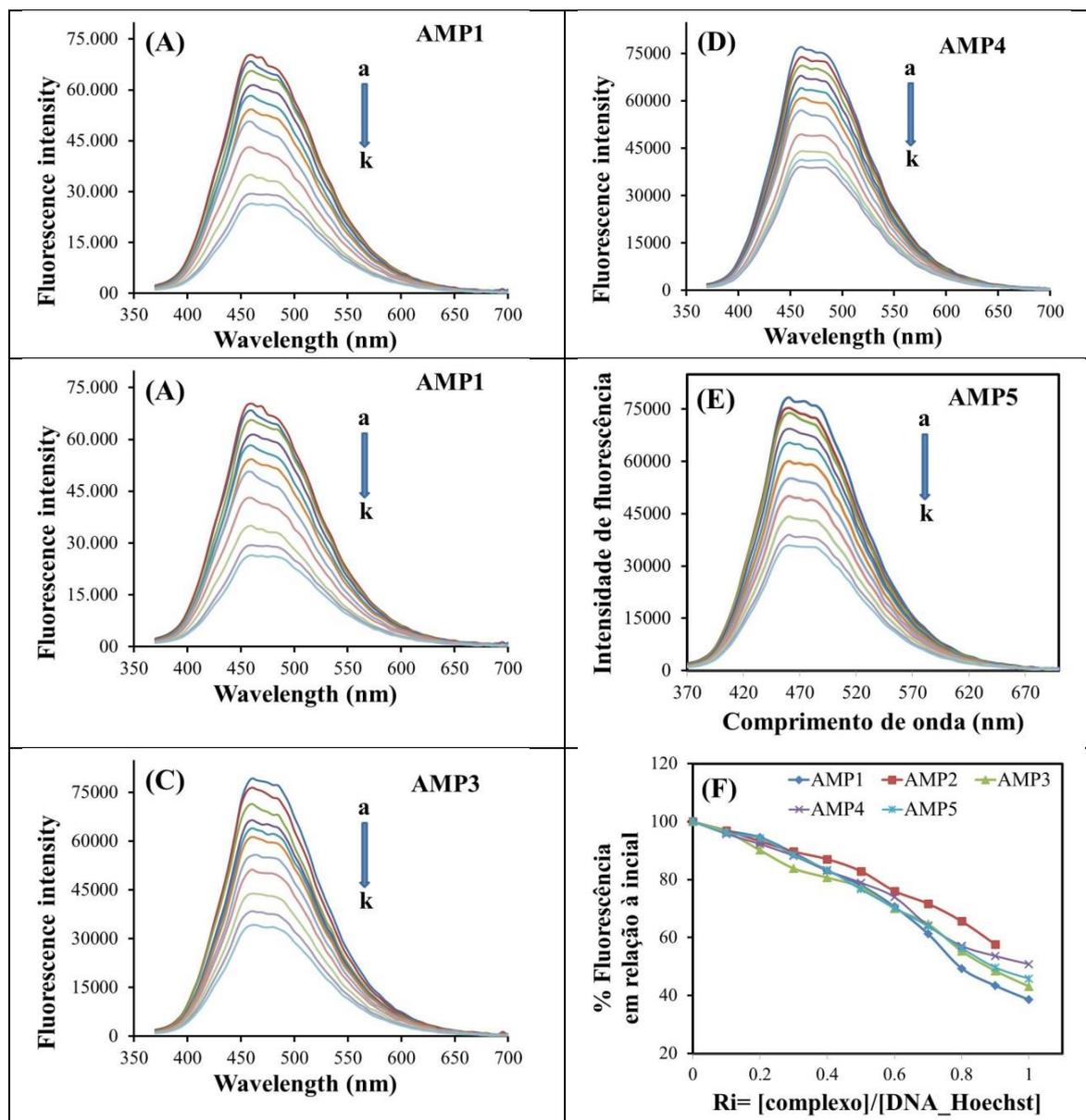


FIGURA A38- Espectros de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[DNA-Hoechst] ($a=0$; $b=1$; $c=2$; $d=3$; $e=4$; $f=5$; $g=6$; $h=7$; $i=8$; $j=9$ e $*k=10$), com comprimento de onda de excitação a 340 nm, a 37 °C em tampão Trisma-HCl: (A) $[\text{Ru}(\text{pyS})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP1), (B) $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP2), (C) $[\text{Ru}(\text{mpca})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP3), (D) $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP4) e (E) $[\text{Ru}(\text{damp})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (AMP5); (F) Gráfico de decaimento da intensidade da fluorescência em função das diferentes razões [composto]/[DNA-Hoechst].

Caracterizações- Complexos [Ru(SO)(dppb)(dphppy)]PF₆
(Série SPPM)

Parte VI- Dados de ressonância magnética nuclear 1D e 2D

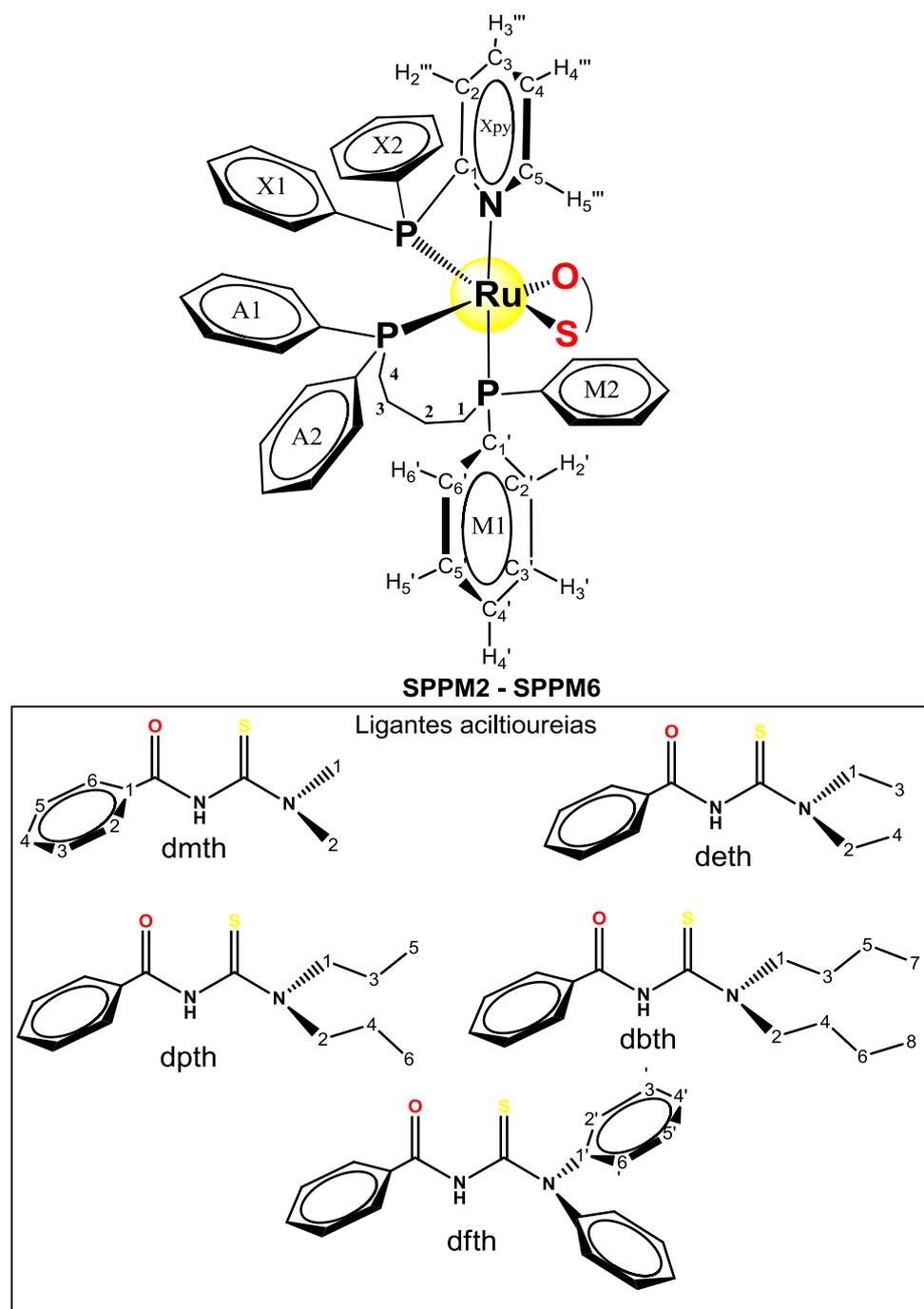


FIGURA A39- Padrão de numeração das estruturas dos complexos para as atribuições de RMN.

TABELA A9- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em clorofórmio para **SPPM2**. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C via HSQC	^1H	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-13.8 dd (24; 20)			
X1	1'		131.9 – 138.4 (*)		
	2',6'	-----	135.8 d (11)	7.77 – 7.85 m 2H [7.81 t (8.7)]	
	3',5'	-----	128.6 – 128.9 m [128.8 d(9)]	7.23 – 7.32 m 2H	
	4'	-----	131.1 d (8) (*)	7.44 – 7.52 m 1H	
X2	1''	-----	131.9 – 138.4 (*)		
	2'',6''	-----	132.0 – 132.5 (*)	7.23 – 7.38 2H (*)	
	3'',5''	-----	129.2 – 129.5 (*)	7.23 – 7.29 2H (*)	
	4''	-----	130.8 d (7) (*)	7.19 – 7.38 1H (*)	
Xpy	1'''	-----	170.4 d (53)		
	2'''		148.7 d (15)	7.29 – 7.33 m 1H	170.4; 138.1; 137.7
	3'''	-----	127.4 s	6.78 – 6.84 m 1H	148.6
	4'''	-----	137.7 d (2)	7.59 – 7.67 m 1H [7.63 tl (7.8)]	170.4; 148.6
	5'''	-----	127.8 s	7.40 – 7.46 m 1H	170.4;
PA		49.4 dd (34; 20)			
A1	1'	-----	131.9 – 138.4 (*)		
	2',6'	-----	134.6 dd (10; 3)	7.99 – 8.07 m 2H [8.03 t (8.7)]	
	3',5'	-----	127.9 – 128.3 m	7.44 – 7.50 m 2H	
	4'	-----	131.1 d (8)	7.51 – 7.58 m 1H	
A2	1''	-----	137.1 d (43)		
	2'',6''	-----	132.0 – 132.6 m	7.33 – 7.38 m 2H	
	3'',5''	-----	127.6 d (8)	6.98 – 7.04 m 2H	137.1
	4''	-----	128.6 – 128.9 m (128.8 s)	7.09 – 7.15 m 1H	
PM		41.3 dd (34; 24)			
M1	1'	-----	131.9 – 138.4 (*)		
	2',6'	-----	134.2 d (10)	7.16 – 7.22 m 2H	
	3',5'	-----	127.3 d (10)	6.72 – 6.79 m 2H	
	4'	-----	130.0 s	7.03 – 7.08 m 1H	
M2	1''	-----	19.4 d (46)		
	2'',6''	-----	132.6 - 130.6 (*)	7.19 – 7.26 m 2H	
	3'',5''	-----	127.9 – 128.3 m (*)	7.16 – 7.23 2H (*)	139.4
	4''	-----	127.9 – 130.8 m (*)	7.16 – 7.26 1H (*)	
Lig. dmth					
	C=S		172.7 s		
	C=O		171.7 s		
Subst. R1	1''''	-----	138.2 s		

	2 ^{'''}	----	128.4 s	6.40 – 6.45 m 2H [6.43 d (7.6)]	171.7; 130.3
	3 ^{'''}	----	126.9 s	6.62 – 6.69 m 2H [6.65 t (7.6)]	138.2
	4 ^{'''}	----	130.3 s	6.98 – 7.02 m 1H	
Subst. R2	1 ^{''''}		42.0 s	3.71 s 3H	172.7
	2 ^{''''}		40.5 s	3.12 s 3H	172.7
Alif-dppb	1 ^{'''''}	----	26.4 d (30)	2.97 – 3.08 m 1H	
		----	26.4 d (30)	2.39 – 2.52 m 1H	
	2 ^{'''''}	----	18.9 s	1.33 – 1.50 m 1H	
		----	18.9 s	1.05 – 1.23 m 1H	
	3 ^{'''''}	----	23.2 s	1.68 – 1.85 m 1H	
		----	23.2 s	0.65 – 0.80 m 1H	
	4 ^{'''''}	----	28.3 d (30)	3.36 – 3.48 m 1H	
			28.3 d (30)	2.20 – 2.31 m 1H	
PF_6^-		-144.5 hept (* ¹ J _{PF} = 705)			

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripletto, tt- triplo tripletto e (*) determinação imprecisa do deslocamento químico do átomo.

TABELA A10- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em clorofórmio para **SPPM3**. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C via HSQC	^1H	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-13.9 dd (24; 20)			
X1	1'	-----	129.0 – 138.5 (*)		
	2',6'	-----	135.1 d (39)	7.73 – 7.81 m 2H	
	3',5'	-----	128.7 – 129.0 m	7.23 – 7.31 m 2H	
	4'	-----	130.7 – 131.4 m [131.2 s]	7.44 – 7.52 m 1H	
X2	1"	-----	129.0 – 138.5 (*)		
	2",6"	-----	130.7 – 132.7 m (*)	7.18 – 7.35 m 2H (*)	
	3",5"	-----	128.4 – 130.3 m (*)	7.18 – 7.31 m 2H (*)	
	4"	-----	128.4 – 132.7 (*)	7.18 – 7.31 m 1H (*)	
Xpy	1'''	-----	170.3 d (54)		
	2'''		148.6 d (15)	7.24 – 7.29 m 1H	170.3; 137.9;
	3'''	-----	127.4 s	6.81 – 6.88 m 1H	148.6
	4'''	-----	137.7 – 138.0 m [137.9 d (2)] *	7.65 – 7.71 m 1H	170.3; 148.6
	5'''	-----	127.8 – 128.4 m	7.39 – 7.44 m 1H	170.3
PA		49.3 dd (34; 20)			
A1	1'	-----	129.0 – 138.5 (*)		
	2',6'	-----	134.6 d (7)	7.99 – 8.08 m 2H	
	3',5'	-----	127.9 – 128.4 m	7.44 – 7.52 m 2H	
	4'	-----	130.7 – 131.4 m [131.2 s]	7.55 – 7.60 m 1H	
A2	1"	-----	137.3 d (43)		
	2",6"	-----	132.1 d (8)	7.28 – 7.37 m 2H	
	3",5"	-----	127.7 d (8)	6.88 – 6.96 m 2H	137.3
	4"	-----	128.7 – 129.0 m	6.96 – 7.02 m 1H	
PM		41.4 dd (34; 24)			
M1	1'	-----	129.0 – 138.5 (*)		
	2',6'	-----	134.1 d (10)	7.10 – 7.19 m 2H	
	3',5'	-----	127.3 d (10)	6.70 – 6.78 m 2H	
	4'	-----	130.2 s	6.98 – 7.07 m 1H	
M2	1"	-----	139.3 d (46)		
	2",6"	-----	128.7 – 132.5 (*)	7.16 – 7.33 2H (*)	
	3",5"	-----	128.4 – 127.9 m	7.13 – 7.22 m 2H	139.3
	4"	-----	132.5 – 128.7 (*)	7.16 – 7.33 2H (*)	
Lig. deth					
	C=S		171.5 s		
	C=O		171.1 s		
Subst. R1	1'''	-----	138.4 d (4)		
	2'''	-----	128.6 s	6.41 – 6.48 m 2H	171.1

				6.46 d (7.0)	
	3 ^{'''}	-----	126.8 s	6.63 – 6.70 m 2H	138.4; 171.1
	4 ^{'''}	-----	130.0 s	6.98 – 7.07 m 1H	
Subst. R2	1 ^{'''}		46.4 s	4.20 – 4.36 m 1H	171.5
				3.94 – 4.14 m 1H	171.5
	2 ^{'''}		45.4 s	3.43 – 3.74 m 2H	171.5
	3 ^{'''}		13.5 d (14)	1.43 – 1.80 m 3H	
	4 ^{'''}		13.5 d (14)	0.93 – 1.22 m 3H	
Alif-dppb	1 ^{'''}	-----	26.5 d (30)	2.89 – 3.11 m 1H	
		-----	26.5 d (30)	2.37 – 2.56 m 1H	
	2 ^{'''}	-----	19.3 s	1.34 – 1.60 m 1H	
		-----	19.3 s	0.98 – 1.20 m 1H	
	3 ^{'''}	-----	23.0 s	1.67 – 1.80 m 1H	
		-----	23.0 s	0.65 – 0.84 m 1H	
	4 ^{'''}	-----	27.8 d (30)	3.20 – 3.43 m 1H	
			27.8 d (30)	2.12 – 2.31 m 1H	
PF_6^-		-144.5 hept ($^1J_{PF} = 705$)			

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripletto, tt- triplo tripletto e (*) determinação imprecisa do deslocamento químico do átomo.

TABELA A11- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em clorofórmio para **SPPM4**. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C via HSQC	^1H	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-13.9 dd (24; 20)	-----	-----	
X1	1'	-----	129.0 – 138.3 (*)		
	2',6'	-----	135.3 d (11)	7.75 – 7.83 m 2H	
	3',5'	-----	128.4 – 129.9 m	7.25 – 7.34 m 2H	
	4'	-----	130.6 – 131.3 m	7.47 – 7.55 m 1H	
X2	1''	-----	129.0 – 138.3 (*)		
	2'',6''	-----	132.4 – 130.6 (*)	7.29 – 7.33 (*) 2H	
	3'',5''	-----	129.6 – 128.4 (*)	7.45 – 7.37 (*) 2H	
	4''	-----	132.3 – 130.6 (*)	7.19 – 7.37 (*) 1H	
Xpy	1'''	-----	170.1 d (54)		
	2'''	-----	148.4 d (15)	7.23 – 7.27 m 1H	
	3'''	-----	127.3 – 127.7 m (127.5 s)	6.86 – 6.96 m 1H	
	4'''	-----	137.9 – 138.3 m	7.73 – 7.80 m 1H	170.1; 148.4
	5'''	-----	127.7 – 128.4 m	7.44 – 7.50 m 1H	
PA		49.1 dd (34; 20)			
A1	1'	-----	129.0 – 138.3 (*)		
	2',6'	-----	134.4 d (10)	8.03 – 8.10 m 2H [8.07 t (8.8)]	
	3',5'	-----	127.7 – 128.4 m 128.0 dd (15 / 9)	7.50 – 7.55 m 2H	
	4'	-----	130.6 – 131.3 m	7.56 – 7.64 m 1H	
A2	1''	-----	137.3 d (43)		
	2'',6''	-----	131.8 – 132.3 m	7.30 – 7.36 m 2H	
	3'',5''	-----	127.3 – 127.7 m	6.87 – 6.95 m 2H	137.3
	4''	-----	128.4 – 129.9 m (128.6 s)	6.97 – 7.03 m 1H	
PM		41.4 dd (34; 24)			
M1	1'	-----	129.0 – 138.3 (*)		
	2',6'	-----	133.9 d (11)	7.11 – 7.19 m 2H	
	3',5'	-----	127.2 d (10)	6.73 – 6.80 m 2H [6.77 t (6.9)]	
	4'	-----	130.1 s	7.03 – 7.10 m 1H	
M2	1''	-----	139.0 d (46)		
	2'',6''	-----	132.3 – 130.6 (*)	7.19 – 7.27 (*) 2H	
	3'',5''	-----	128.3 – 127.8 (*)	7.18 – 7.24 (*) 2H	139.0
	4''	-----	132.3 – 130.6 (*)	7.19 – 7.27 (*) 1H	
Liga. dpth					
	C=S		172.0 s		
	C=O		170.9 s		
Subst. R1	1'''	-----	137.9 – 138.3 m		

			[138.0 s]		
	2 ^{'''}	-----	128.4 – 129.9 m	6.49 d (7.4) 2H	170.9
			[128.5 s]		
	3 ^{'''}	-----	126.7 s	6.72 t (7.4) 2H	138.0
	4 ^{'''}	-----	129.9 s	7.03 – 7.10 m 1H	
Subst. R2	1 ^{''''}		53.8 s	4.17 – 4.29 m 1H	172.0
				3.90 – 4.00 m 1H	172.0
	2 ^{''''}		52.9 s	3.45 – 3.64 m 2H	172.0
	3 ^{''''}		21.5 d (12)	1.97 – 2.12 m 2H	
	4 ^{''''}		21.5 d (12)	1.50 – 1.59 m 2H	
	5 ^{''''}		11.8 s	1.18 – 1.30 m 3H [1.27 t (7.3)]	
	6 ^{''''}		11.4 s	0.79 – 0.94 m 3H [0.87 t (7.3)]	
Alif-dppb	1 ^{''''}	-----	26.5 d (30)	2.97 – 3.10 m 1H	
		-----	26.5 d (30)	2.44 – 2.57 m 1H	
	2 ^{''''}	-----	19.3 s	1.43 – 1.59 m 1H	
		-----	19.3 s	1.12 – 1.29 m 1H	
	3 ^{''''}	-----	22.8 s	1.65 – 1.77 m 1H	
		-----	22.8 s	0.69 – 0.85 m 1H	
	4 ^{''''}	-----	27.4 d (30)	3.26 – 3.39 m 1H	
			27.4 d (30)	2.19 – 2.30 m 1H	
PF_6^-		-144.5 hept ($^1J_{PF} = 705$)			

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripletto, tt- triplo tripletto e (*) determinação imprecisa do deslocamento químico do átomo.

TABELA A12- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em clorofórmio para **SPPM5**. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C via HSQC	^1H	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	-14.1 dd (24; 20)			
X1	1'	-----	135.2 d (40)		
	2',6'	-----	135.5 d (11)	7.74 – 7.82 m 2H	
	3',5'	-----	128.7 – 129.1 m (128.9 d (10))	7.23 – 7.32 m 2H	135.2
	4'	-----	130.7 – 131.4 m (131.2 s)	7.44 – 7.52 m 1H	
X2	1''	-----	129.1 – 135.7 (*)		
	2'',6''	-----	130.7 – 132.4 (*)	7.28 – 7.36 (*) 2H	
	3'',5''	-----	128.5 – 129.6 (*)	7.23 – 7.31 (*) 2H	
	4''	-----	130.7 – 132.4 (*)	7.28 – 7.36 (*) 1H	
Xpy	1'''	-----	170.2 d (53)		
	2'''	-----	148.5 d (15)	7.24 – 7.27 m 1H	170.2; 138.1
	3'''	-----	127.5 s	6.84 – 6.90 m 1H (6.86 t (6.6))	148.5
	4'''	-----	138.1 s	7.71 – 7.77 m 1H	170.2; 148.5
	5'''	-----	127.9 – 128.5 m (128.3 s)	7.43 – 7.53 m 1H	170.2;
PA		49.0 dd (34; 20)			
A1	1'	-----	129.1 – 135.7 (*)		
	2',6'	-----	134.5 d (7)	8.00 – 8.08 m 2H [8.04 tl (8.7)]	
	3',5'	-----	127.9 – 128.5 m (128.2 d (9))	7.42 – 7.53 m 2H	
	4'	-----	130.7 – 131.4 m (131.2 s)	7.54 – 7.61 m 1H	
A2	1''	-----	137.4 d (43)		
	2'',6''	-----	131.9 – 132.3 m (132.1 d (8))	7.29 – 7.35 m 2H	
	3'',5''	-----	127.7 d (8)	6.90 – 6.96 m 2H	137.4
	4''	-----	128.7 – 129.0 m (128.8 s)	6.97 – 7.04 m 1H	
PM		41.4 dd (34; 24)			
M1	1'	-----	129.10 – 129.9 m		
	2',6'	-----	134.0 d (11)	7.11 – 7.18 m 2H	
	3',5'	-----	127.3 d (10)	6.73 – 6.80 m 2H (6.76 t (6.9))	129.1
	4'	-----	130.2 s	7.01 – 7.09 m 1H	
M2	1''	-----	139.1 d (46)		
	2'',6''	-----	131.9 – 132.4 m	7.21 – 7.26 m 2H	
	3'',5''	-----	127.9 – 128.4 m	7.15 – 7.23 m 2H	139.1
	4''	-----	130.7 – 131.5 m	7.18 – 7.23 m 1H	

Lig. dpth					
	C=S		171.8 s		
	C=O		171.1 s		
Subst. R1	1 ^{ttt}	-----	138.4 d (4)		
	2 ^{ttt}	-----	128.6 s	6.45 – 6.50 m 2H 6.47 d (7.6)	171.1
	3 ^{ttt}	-----	126.8 s	6.66 – 6.73 m 2H 6.69 t (7.6)	138.4
	4 ^{ttt}	-----	130.0 s	7.01 – 7.09 m 1H	
Subst. R2	1 ^{tttt}		52.1 s	4.15 – 4.27 m 1H	171.8
				3.92 – 4.02 m 1H	171.8
	2 ^{tttt}		51.2 s	3.55 – 3.64 m 1H	
				3.45 – 3.55 m 1H	
	3 ^{tttt}		30.3 d (4)	1.91 – 2.07 m 2H	
	4 ^{tttt}		30.3 d (4)	1.39 – 1.54 m 2H	
	5 ^{tttt}		20.7	1.58 – 1.76 m 2H	
	6 ^{tttt}		20.5	1.24 – 1.36 m 2H	
	7 ^{tttt}		14.3	1.14 – 1.33 m 3H [1.21 t (7.4)]	
	8 ^{tttt}		14.0	0.85 – 1.01 m 3H [0.89 t (7.4)]	
Alif-dppb	1 ^{ttttt}	-----	26.7 d (30)	2.95 – 3.08 m 1H	
		-----	26.7 d (30)	2.43 – 2.56 m 1H	
	2 ^{ttttt}	-----	19.4 s	1.40 – 1.55 m 1H	
		-----	19.4 s	1.14 – 1.29 m 1H	
	3 ^{ttttt}	-----	23.0 s	1.65 – 1.77 m 1H	
		-----	23.0 s	0.69 – 0.83 m 1H	
	4 ^{ttttt}	-----	27.6 d (30)	3.24 – 3.37 m 1H	
			27.8 d (30)	2.16 – 2.29 m 1H	
PF_6^-		-144.5 hept ($^1J_{PF} = 705$)			

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripletto, tt- triplo tripletto e (*) determinação imprecisa do deslocamento químico do átomo.

TABELA A13- Atribuições dos espectros de RMN de ^1H , ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e dados de correlação heteronuclear 2D em clorofórmio para **SPPM6**. Deslocamento químico (ppm), constantes de acoplamento (Hz), multiplicidade e integral.

No.	No.	^{31}P	^{13}C via HSQC	^1H	^1H - ^{13}C HMBC
Px	-----	- 14.7 dd (24; 20)	-----	-----	
X1	1'	-----	128.3 – 135.4 (*)		
	2',6'	-----	135.1 d (11)	7.77 – 7.84 m 2H	
	3',5'	-----	128.6 – 129.7 m	7.29 – 7.37 m 2H	
	4'	-----	130.9 – 131.3 m	7.49 – 7.56 m 1H	
X2	1''	-----	128.3 – 135.4 (*)		
	2'',6''	-----	128.3 – 129.6 (*)	7.23 – 7.37 (*) 2H	
	3'',5''	-----	128.3 – 129.6 (*)	7.23 – 7.37 (*) 2H	
	4''	-----	128.3 – 129.6 (*)	7.23 – 7.37 (*) 1H	
Xpy	1'''	-----	169.8 d (53)		
	2'''		148.3 d (16)	7.38 – 7.43 m 1H	169.8; 138.1
	3'''	-----	127.6 – 127.9 m	6.99 – 7.09 m 1H	148.3
	4'''	-----	138.1 s	7.77 – 7.84 m 1H	169.8; 148.3
	5'''	-----	127.6 – 129.6 (*)	7.45 – 7.56 m 1H	169.8
PA		48.9 dd (34; 21)			
A1	1'	-----	128.3 – 135.4 (*)		
	2',6'	-----	134.5 d (8)	8.02 – 8.10 m 2H [8.06 t (8.8)]	
	3',5'	-----	127.5 – 128.3 m	7.46 – 7.56 m 2H	
	4'	-----	130.9 – 131.4 m	7.58 – 7.65 m 2H	
A2	1''	-----	136.9 – 137.5 m [137.2 d (43)]		
	2'',6''	-----	132.3 d (8)	7.38 – 7.44 m 2H	
	3'',5''	-----	127.6 – 128.3 m	7.00 – 7.07 m 2H	137.2
	4''	-----	128.7 – 129.6 m	7.06 – 7.12 m 2H	
PM		41.2 dd (34; 21)			
M1	1'	-----	128.3 – 135.4 (*)		
	2',6'	-----	133.9 d (10)	7.07 – 7.15 m 2H	
	3',5'	-----	127.2 d (10)	6.70 – 6.76 m 2H [6.75 t (7.1)]	
	4'	-----	129.9 s	7.03 – 7.09 m 1H	
M2	1''	-----	138.9 d (47)		
	2'',6''	-----	131.9 d (10)	7.18 – 7.26 m 2H	
	3'',5''	-----	127.6 – 128.3 m	7.15 – 7.22 m 2H	138.9
	4''	-----	132.5 – 127.1 (*)	7.15 – 7.33 (*) 1H	
Lig. dfth					
	C=S		175.9 s		
	C=O		172.4 s		
Subst. R1	1'''	-----	136.9 – 137.5 m [137.2]		

	2 ^{'''} , 6 ^{'''}	-----	128.3 – 129.5 m [129.1 s]	6.18 – 6.24 m 2H [6.21 d (8.0)]	172.4
	3 ^{'''} , 5 ^{'''}	-----	126.7 s	6.55 – 6.63 m 2H [6.60 t (8.0)]	137.2
	4 ^{'''}	-----	130.5 – 130.8 m	6.98 – 7.04 m 1H	
Subst. R2'					
	1 ^{'''}	-----	127.0 – 131.6 (*)		
	2 ^{'''} , 6 ^{'''}	-----	127.6 – 128.3 m	7.15 – 7.22 m 2H	
	3 ^{'''} , 5 ^{'''}	-----	130.5 – 130.8 [130.7 s]	6.87 – 6.95 m 2H	
	4 ^{'''}	-----	127.4 – 131.7 (*)	7.23 – 7.45 (*) 1H	
Subst. R2''	1 ^{'''}	-----	127.0 – 131.6 (*)		
	2 ^{'''} , 6 ^{'''}	-----	127.0 – 131.6 (*)	6.97 – 7.43 (*) 2H	
	3 ^{'''} , 5 ^{'''}	-----	127.0 – 131.6 (*)	6.97 – 7.43 (*) 2H	
	4 ^{'''}	-----	127.0 – 131.6 (*)	6.97 – 7.43 (*) 1H	
Alif.-dppb	1 ^{''''}	-----	26.6 d (30)	2.73 – 2.82 m 1H	
		-----	26.6 d (30)	2.37 – 2.53 m 1H [2.45 dd (25; 13)]	
	2 ^{''''}	-----	18.8 s	1.26 – 1.43 m 1H	
		-----	18.8 s	1.01 – 1.20 m 1H	
	3 ^{''''}	-----	22.8 s	1.50 – 1.63 m 1H	
		-----	22.8 s	0.55 – 0.71 m 1H	
	4 ^{''''}	-----	27.2 d (30)	2.83 – 2.94 m 1H	
		-----	27.2 d (30)	1.93 – 2.05 m 1H	
PF ₆ ⁻		-144.5 hept (¹ J _{PF} = 705)			

tl- tripleto largo, dd- duplo dubleto, hept- hepteto, s- simpleto, t-tripletto, tt- triplo tripletto e (*) determinação imprecisa do deslocamento químico do átomo.

Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM2), Figura A40 à Figura A45.

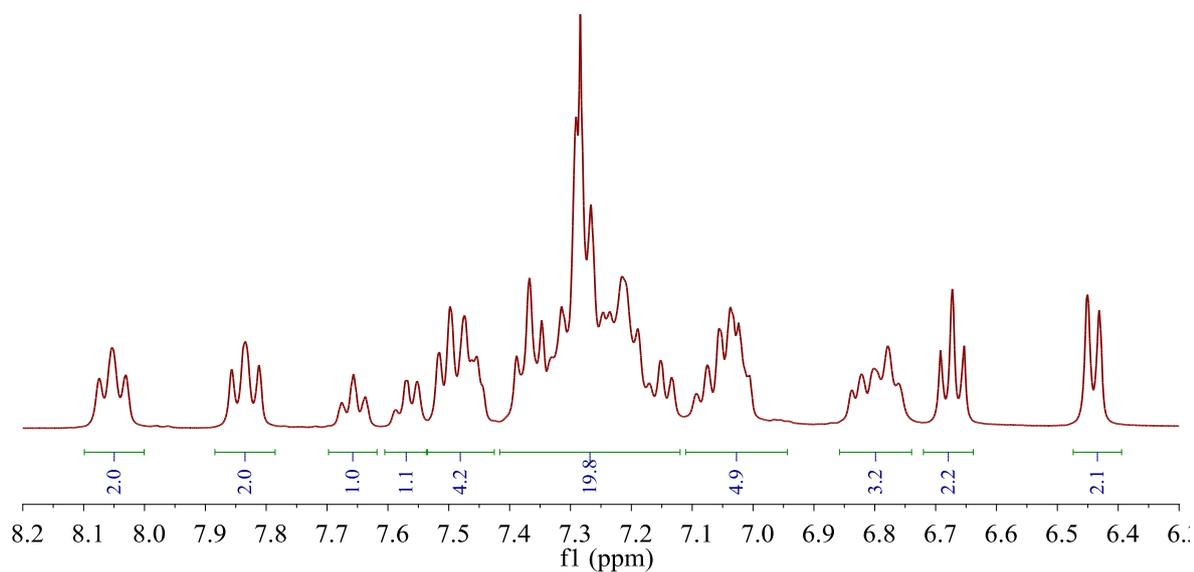


FIGURA A40- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM2) em CDCl₃.

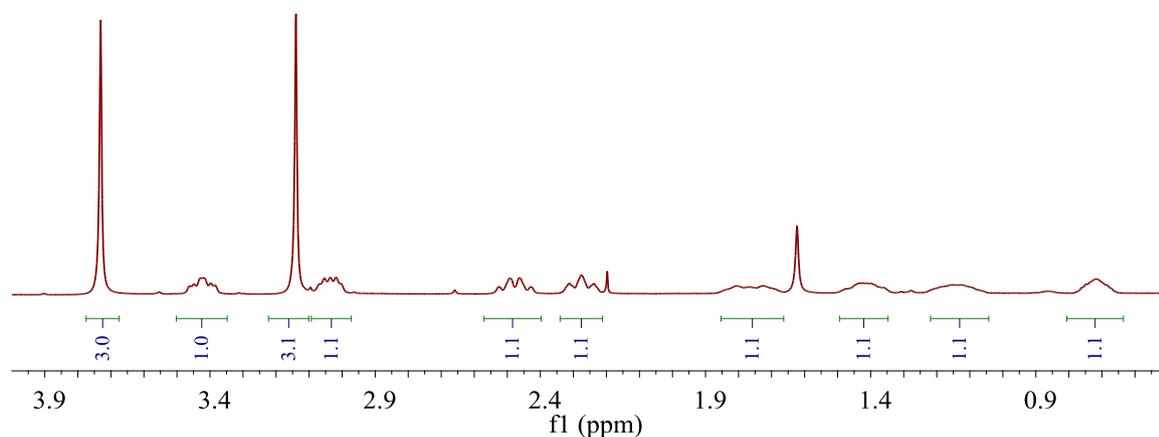


FIGURA A41- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM2) em CDCl₃.

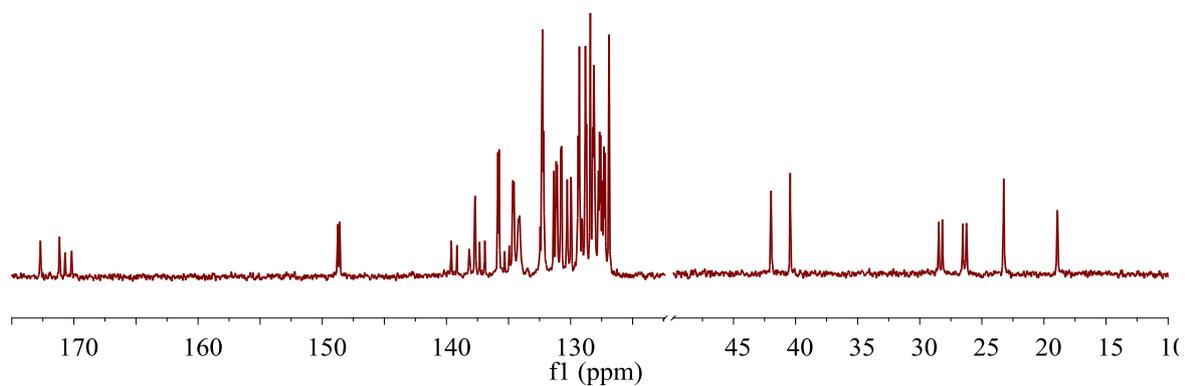


FIGURA A42- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dmth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM2**) em CDCl_3 .

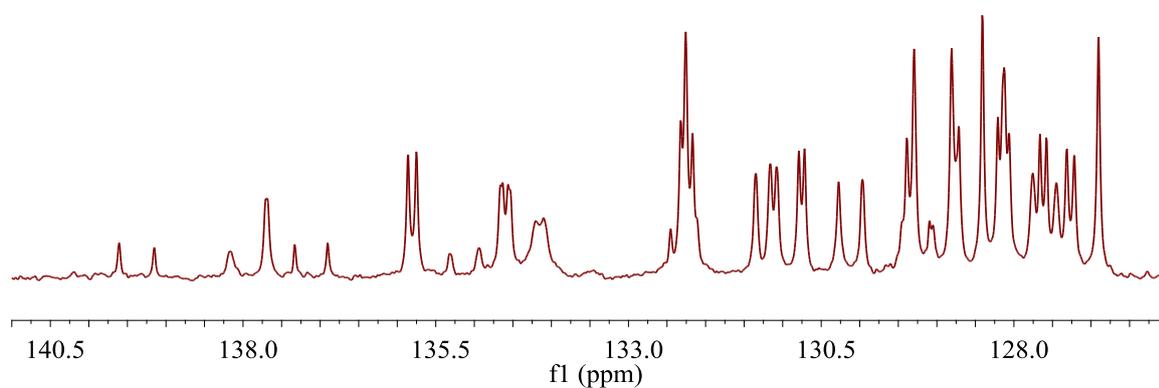


FIGURA A43- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{SO})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM2**) em CDCl_3 .

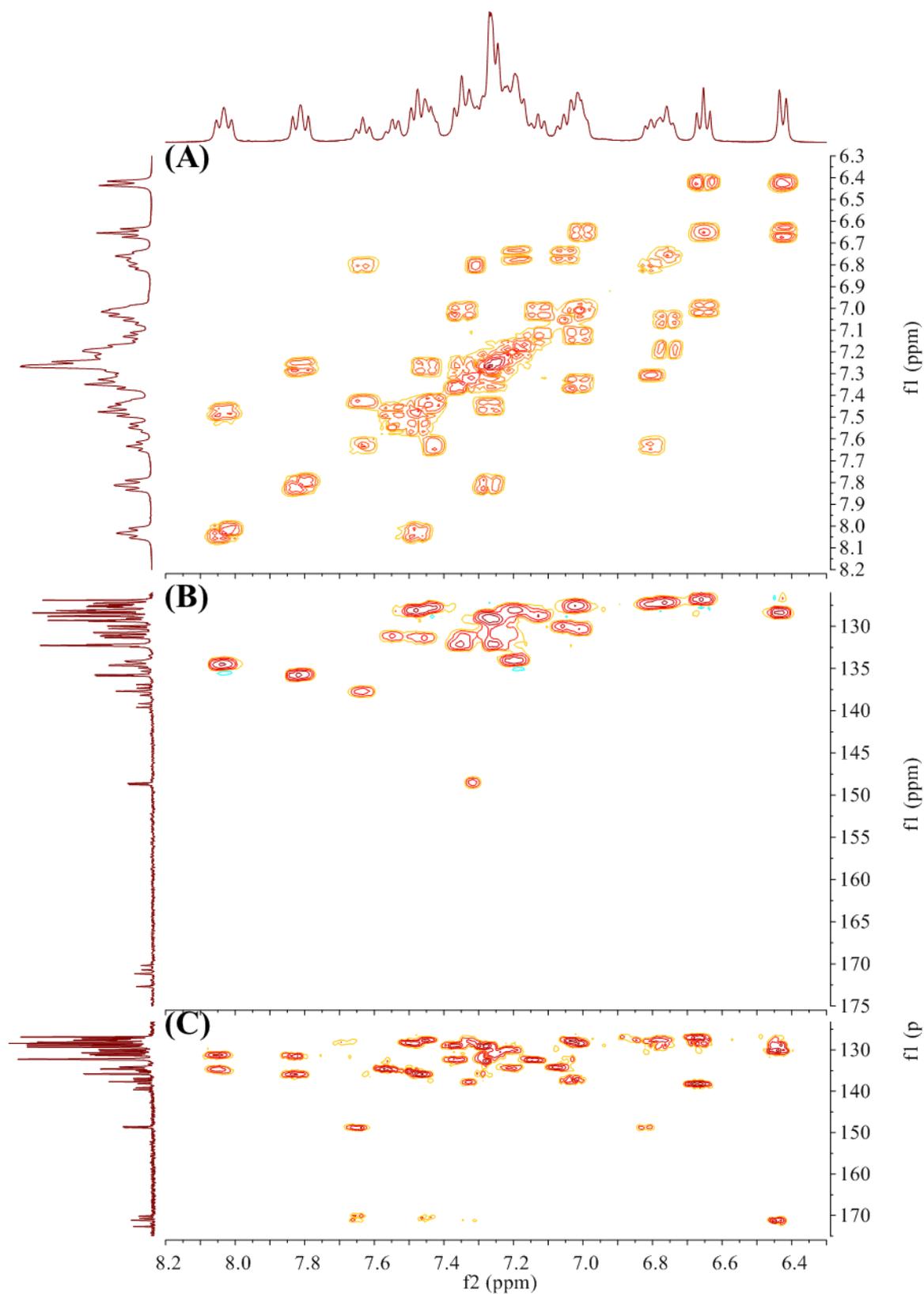
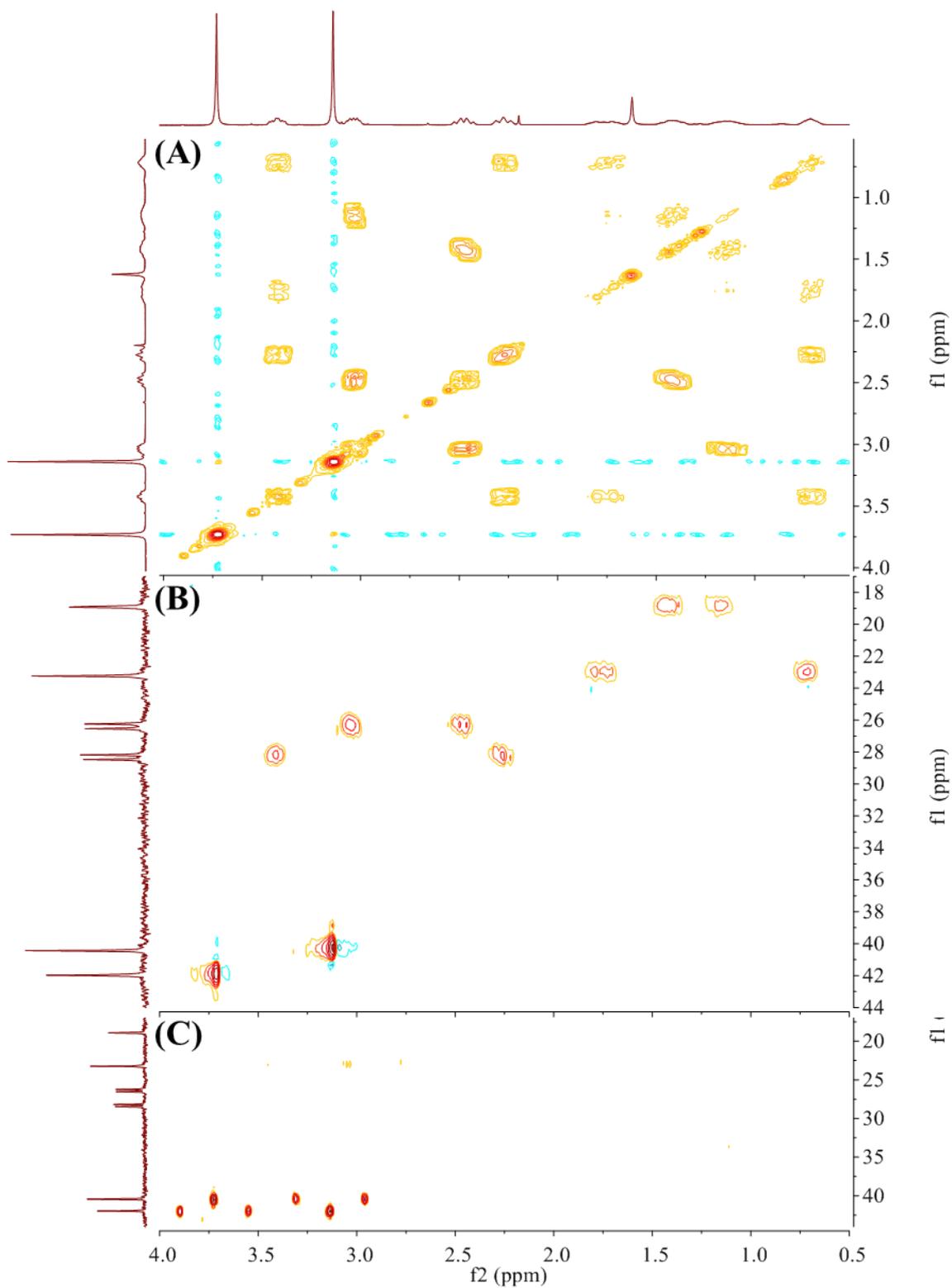


FIGURA A44- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{dmth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM2**) em CDCl_3 .



Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM3), Figura A46 à Figura A51.

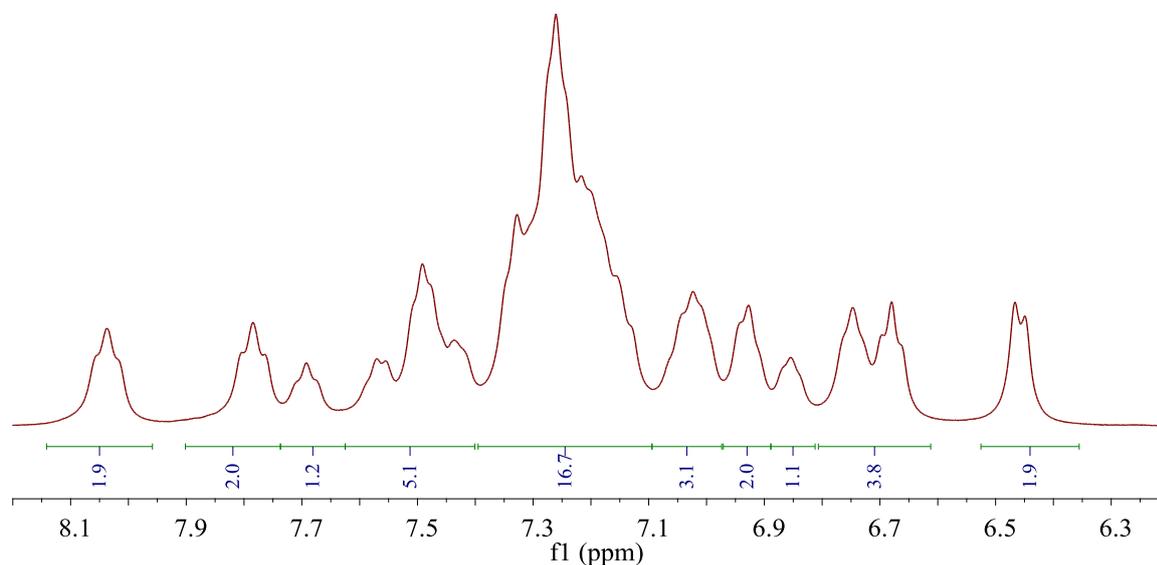


FIGURA A46- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM3) em CDCl₃.

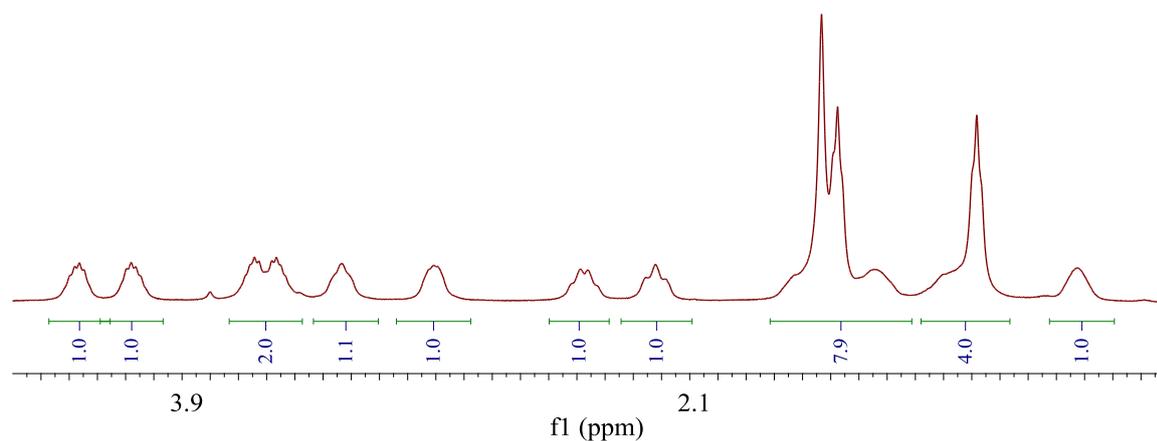


FIGURA A47- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM) em CDCl₃.

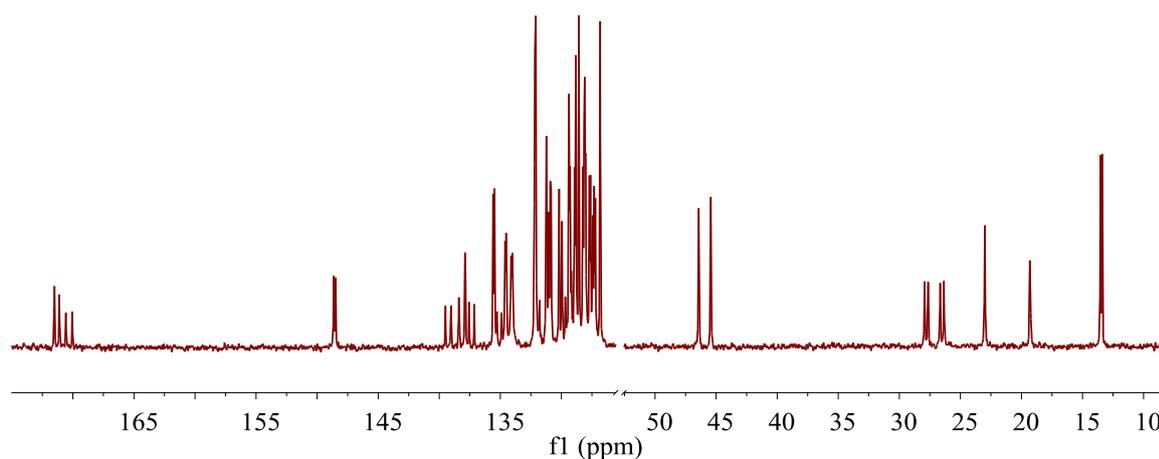


FIGURA A48- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{deth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM3**) em CDCl_3 .

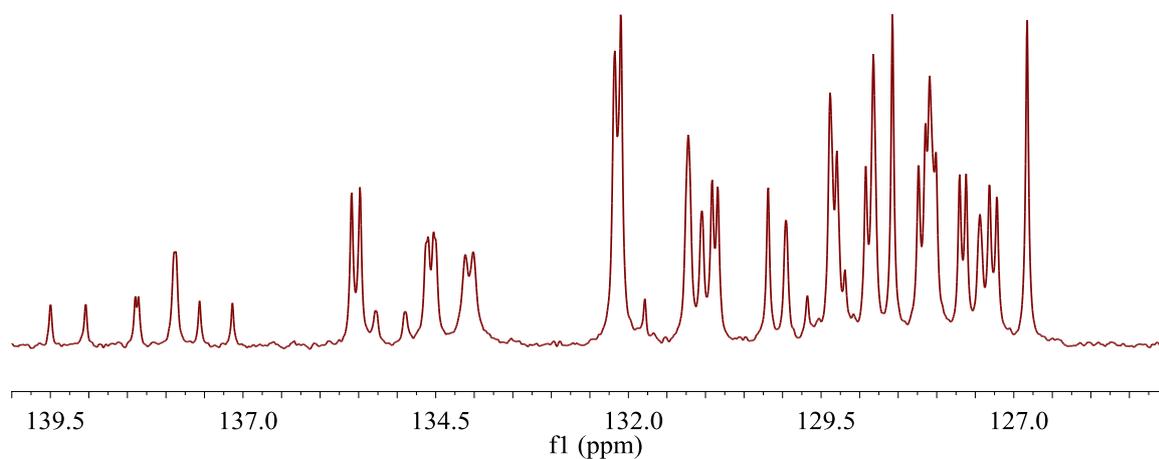


FIGURA A49- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{deth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM3**) em CDCl_3 .

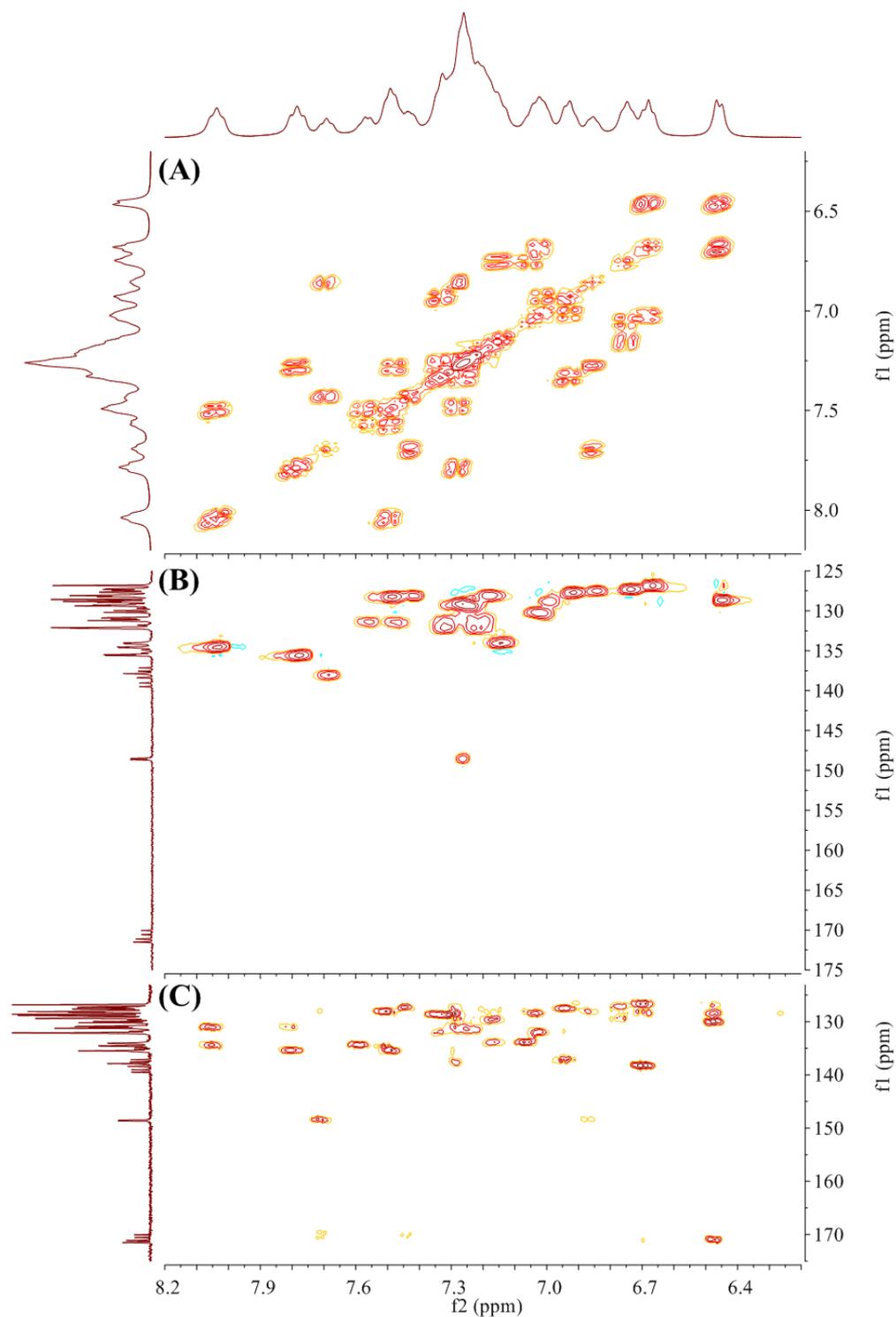


FIGURA A50- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{deth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM3**) em CDCl_3 .

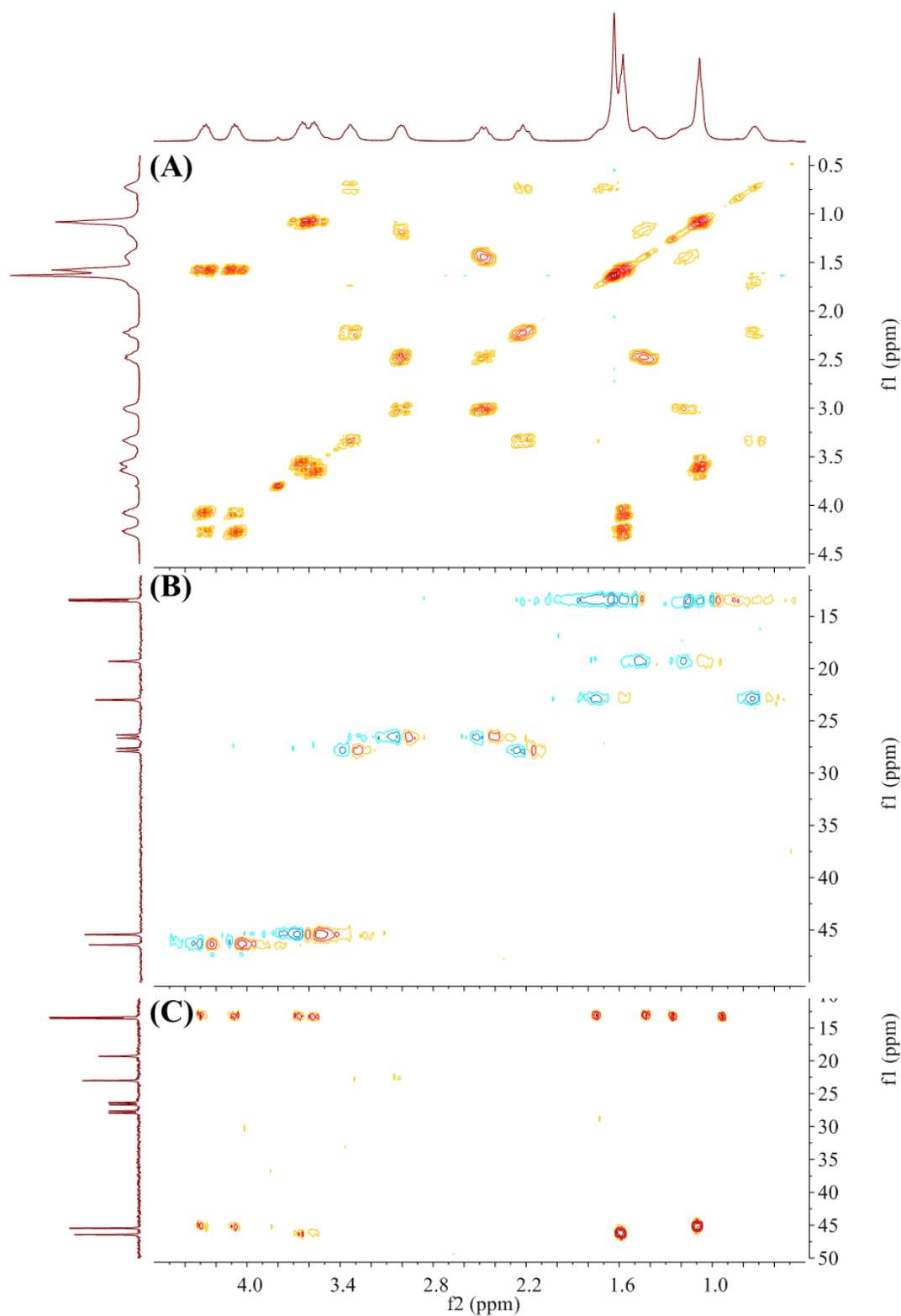


FIGURA A51- Região blindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{SO})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM3**) em CDCl_3 .

Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(dpth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM4), Figura A52 à Figura A57

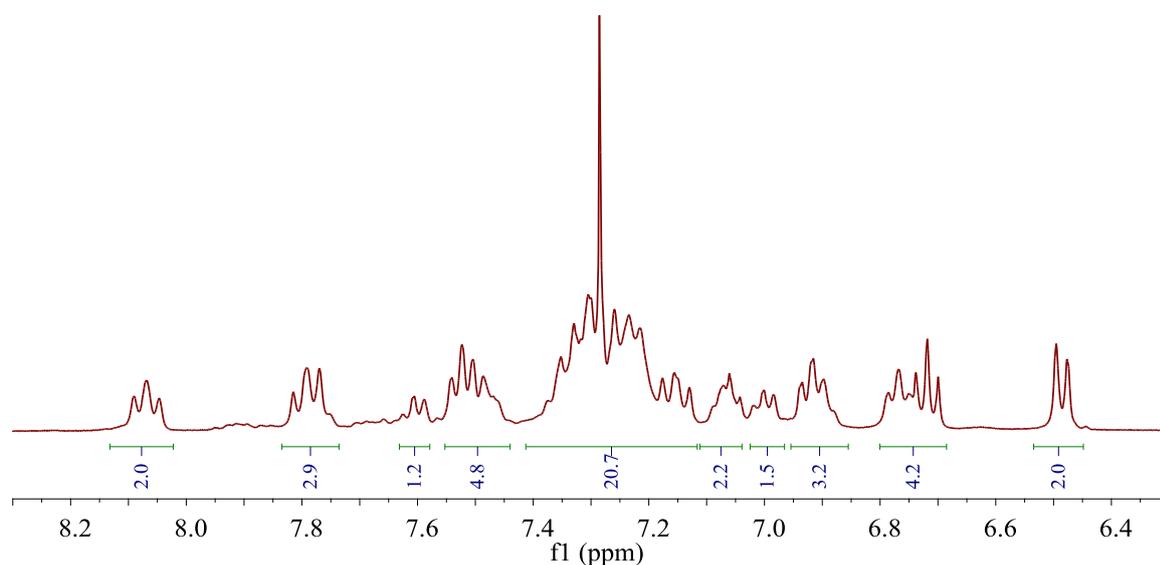


FIGURA A52- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dpth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM4) em CDCl₃.

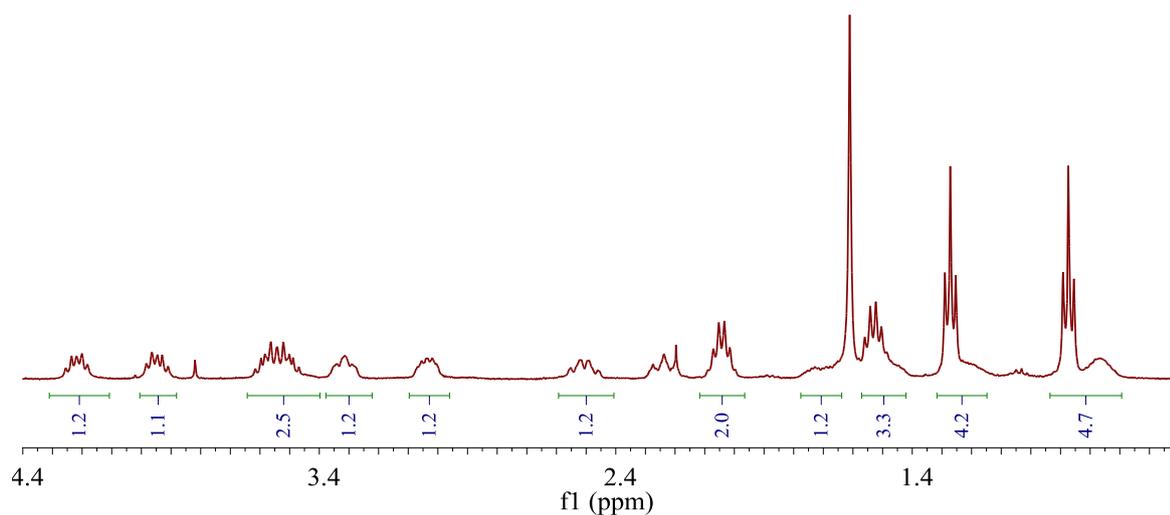


FIGURA A53- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dpth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM4) em CDCl₃.

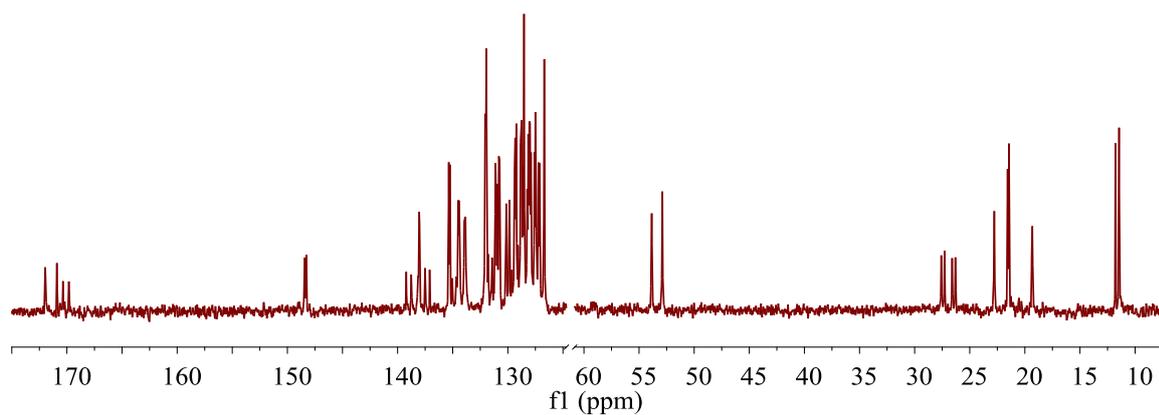


FIGURA A54- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dpth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM4**) em CDCl_3 .

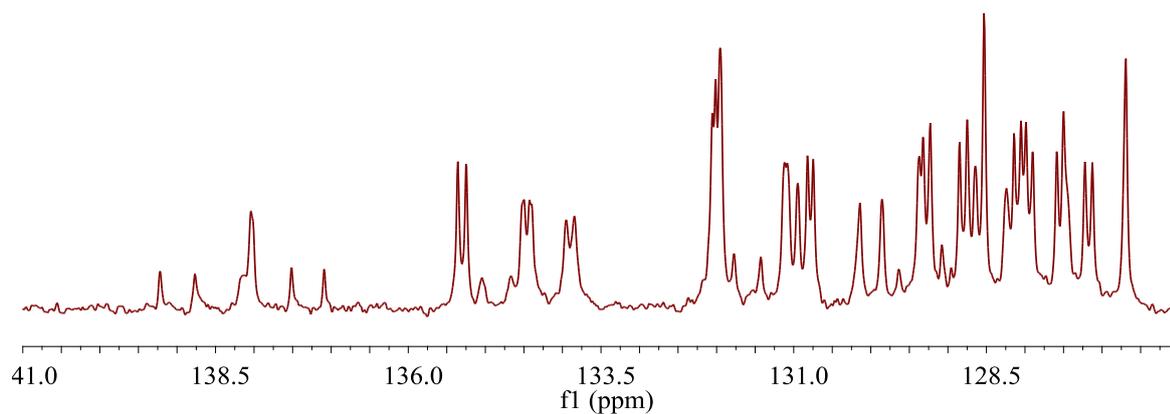


FIGURA A55- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dpth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM4**) em CDCl_3 .

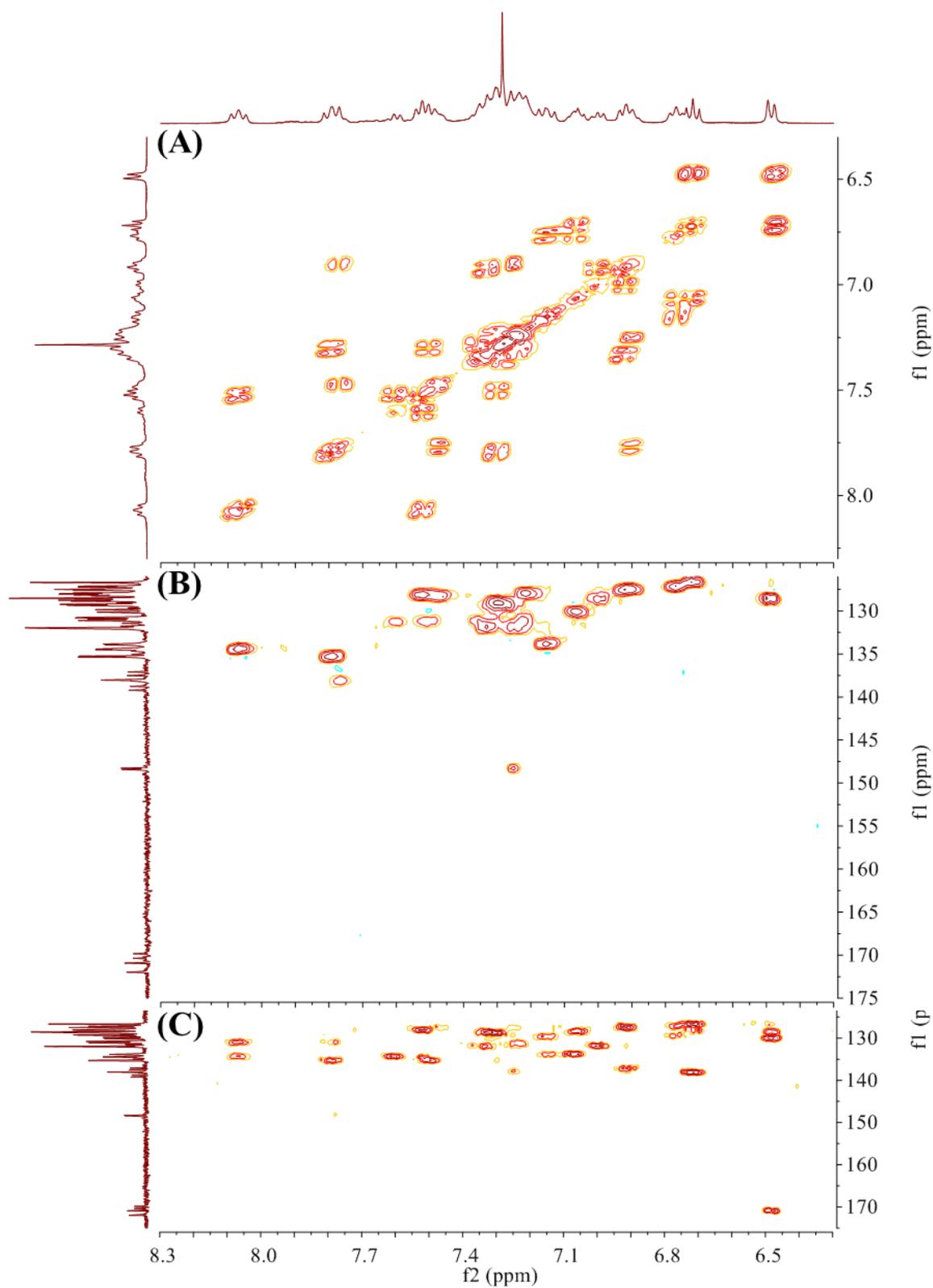
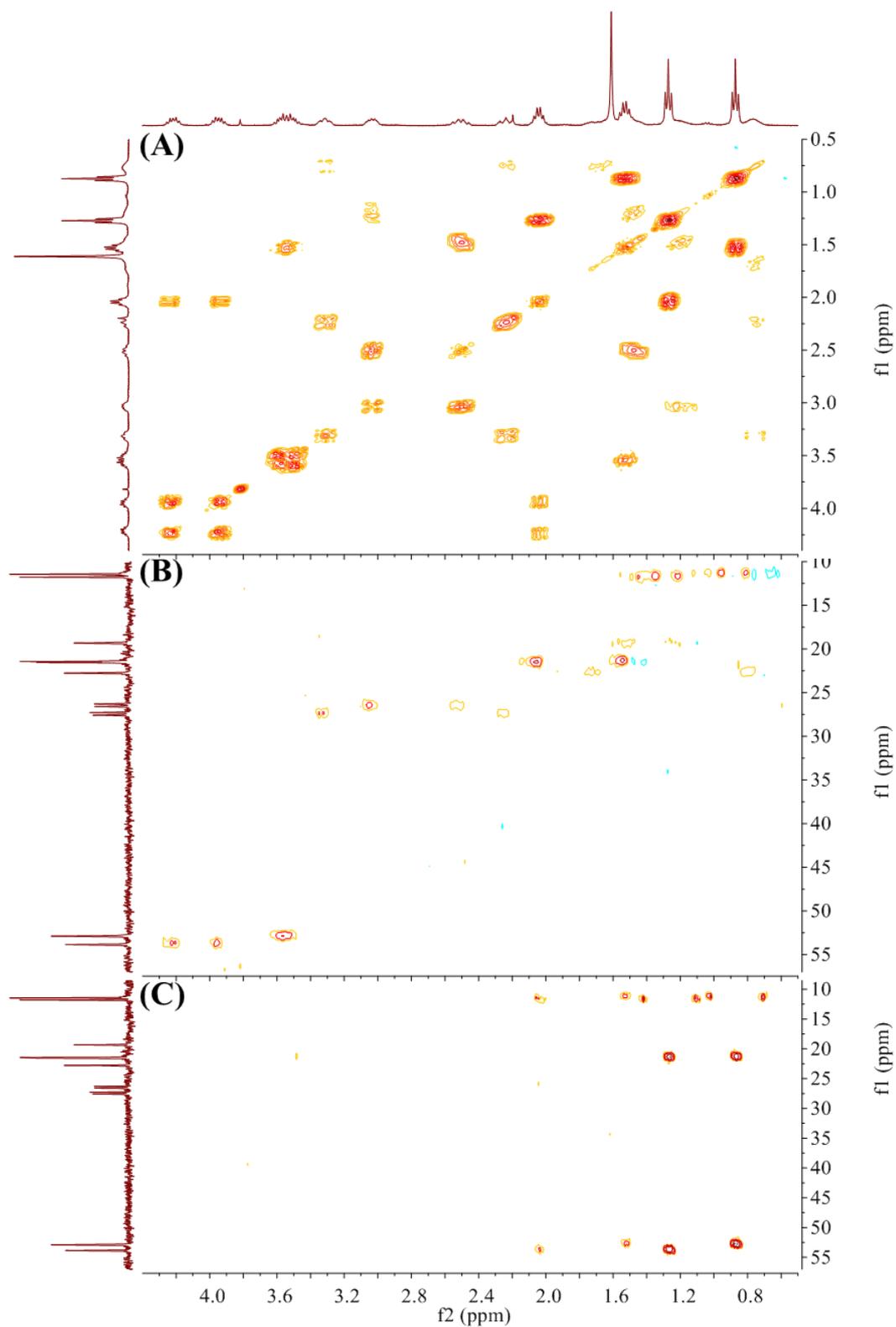


FIGURA A56- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{dph})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM4**) em CDCl_3 .



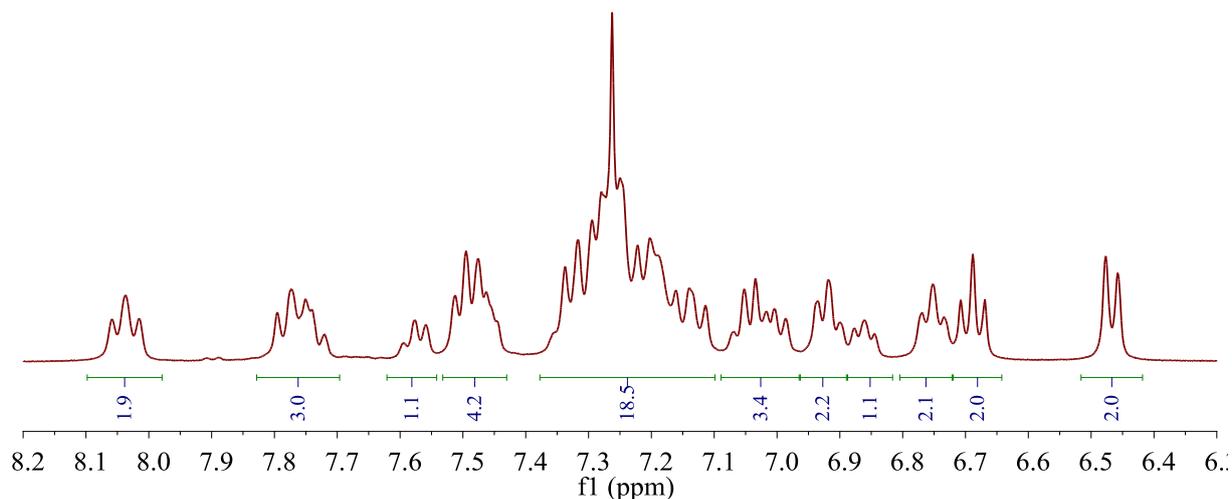
Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(dbth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM5), Figura A58 à Figura A63

FIGURA A58- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dbth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM5) em CDCl₃.

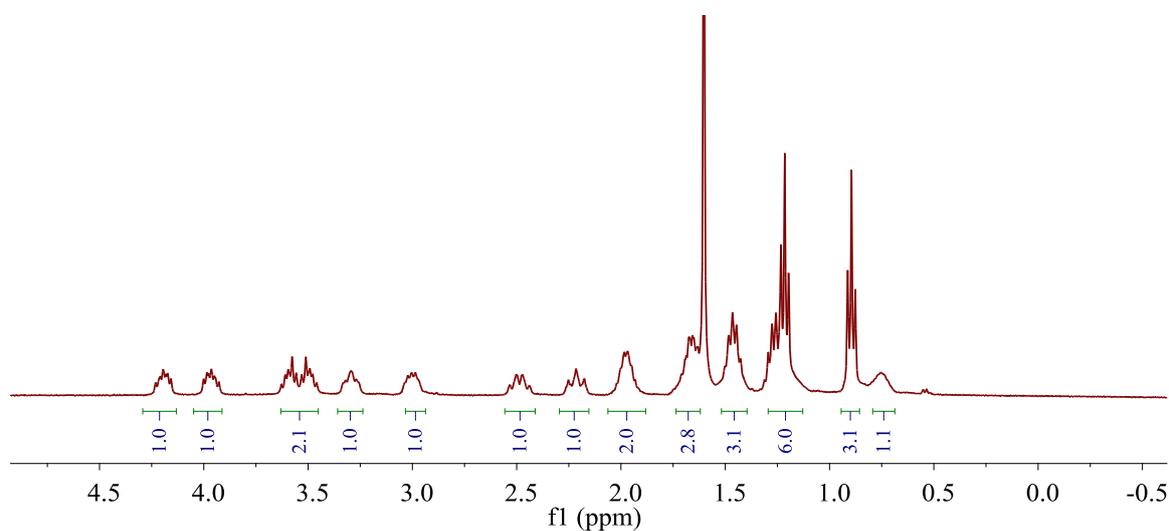


FIGURA A59- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dbth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM5) em CDCl₃.

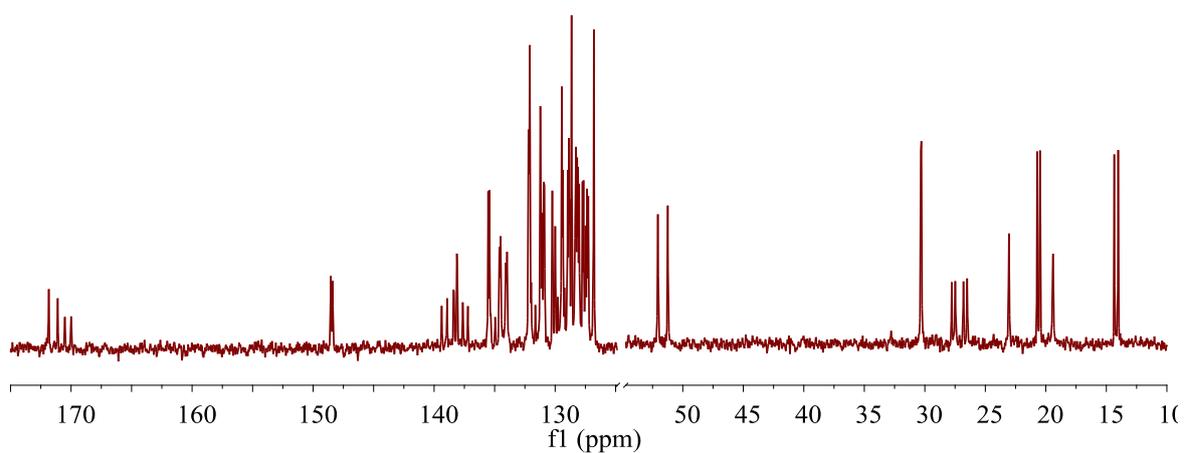


FIGURA A60- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dbth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM5**) em CDCl_3 .

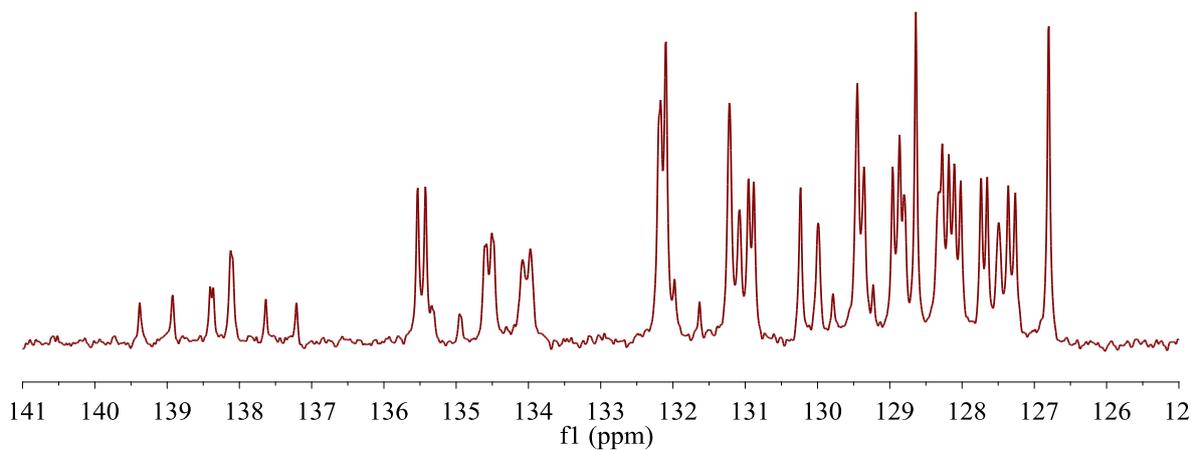


FIGURA A61- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dbth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM5**) em CDCl_3 .

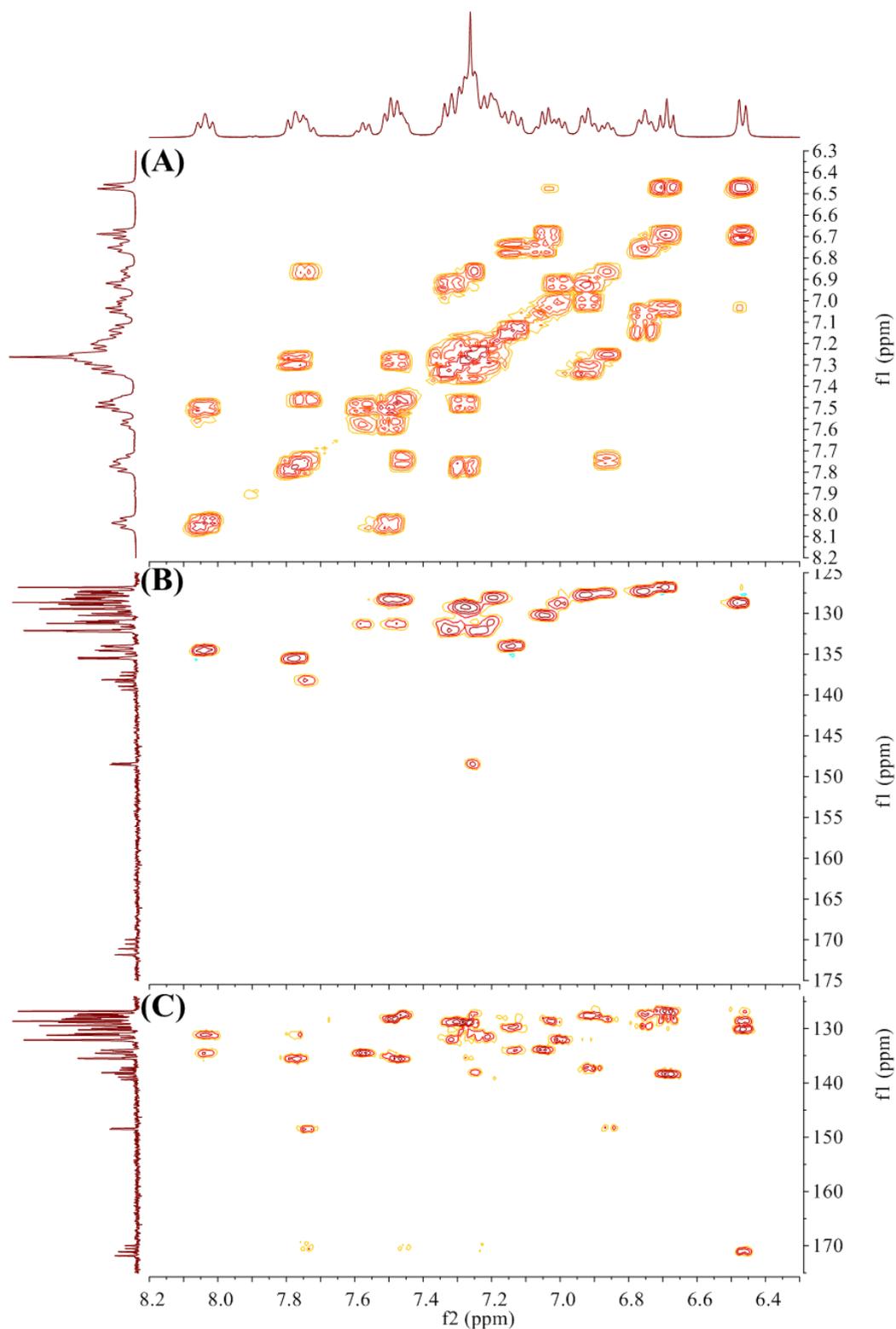


FIGURA A62- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{dbth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM5**) em CDCl_3 .

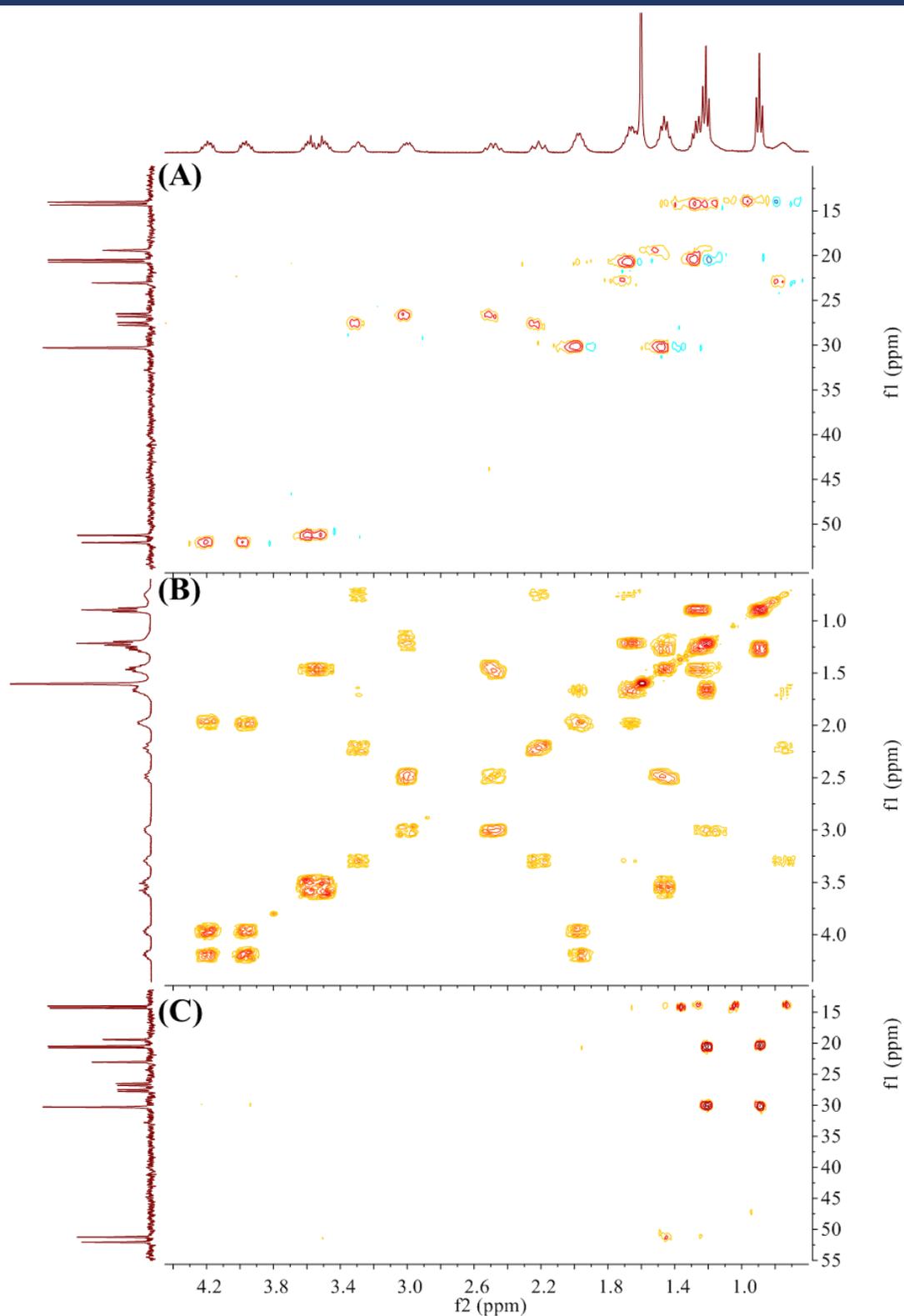


FIGURA A63- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) 1H - 1H COSY, (B) 1H - ^{13}C HSQC e (C) 1H - ^{13}C HMBC do complexo $[Ru(dbth)(dppb)(dphppy)]PF_6$ (SPPM5) em $CDCl_3$.

Espectros e mapas de correlação de RMN 1D e 2D do complexo [Ru(dfth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM6), Figura A64 à Figura A69.

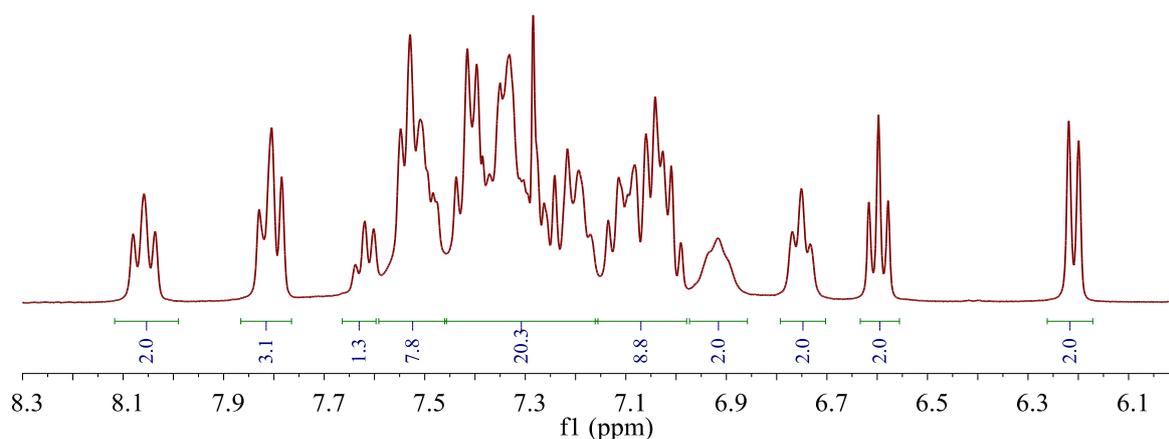


FIGURA A64- Região desblindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dfth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM6).

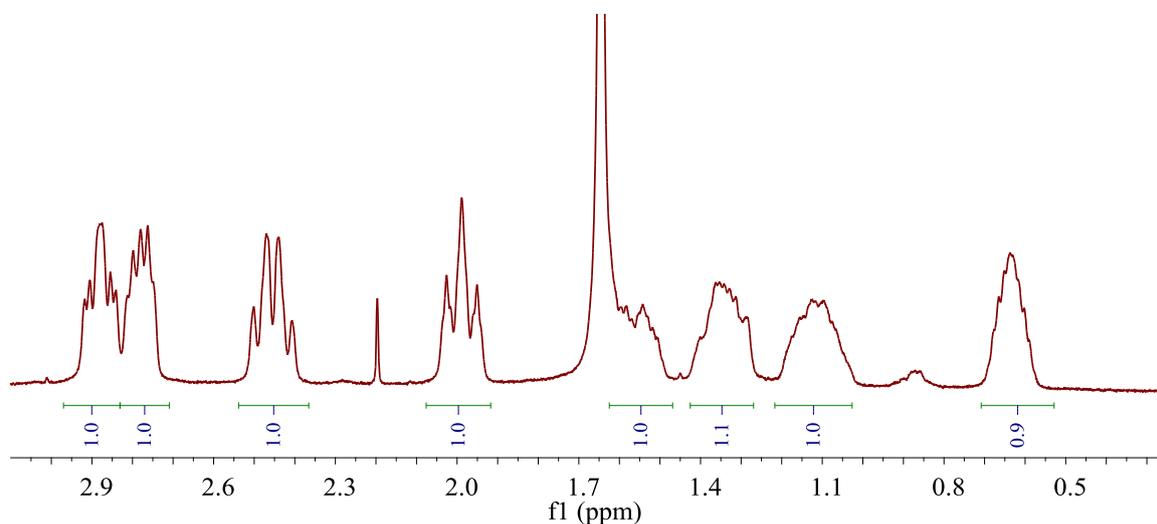


FIGURA A65- Região blindada do espectro de RMN ¹H do complexo [Ru(dfth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM6).

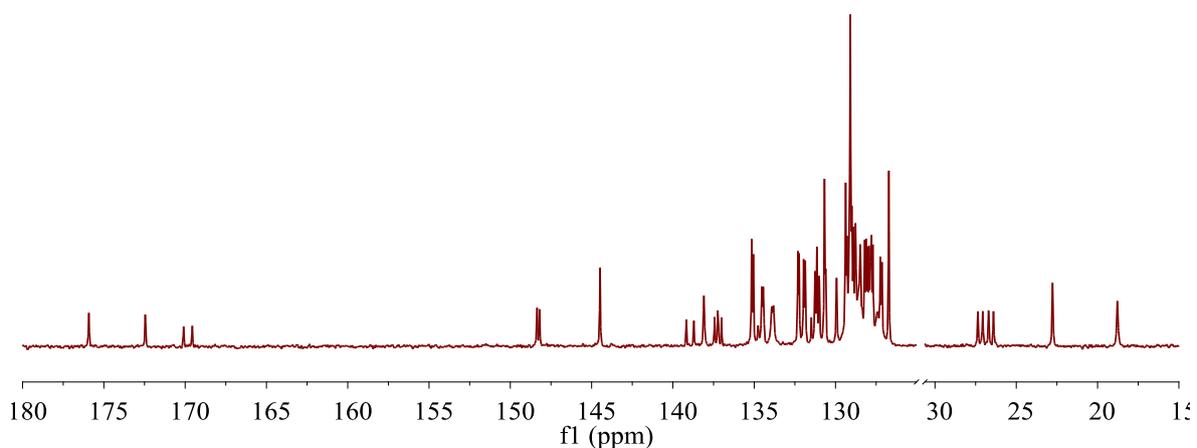


FIGURA A66- Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dfth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM6**).

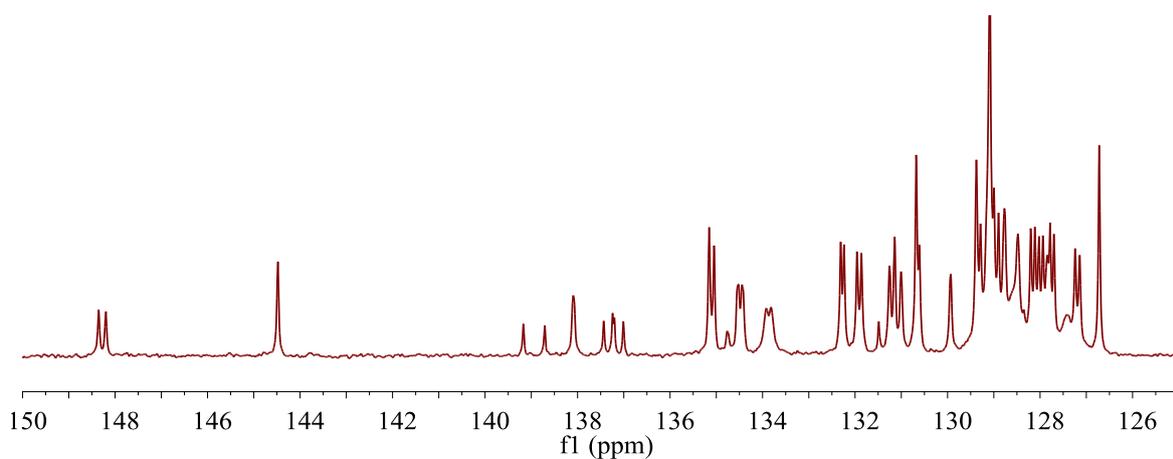


FIGURA A67- Região desblindada do espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{dfth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM6**).

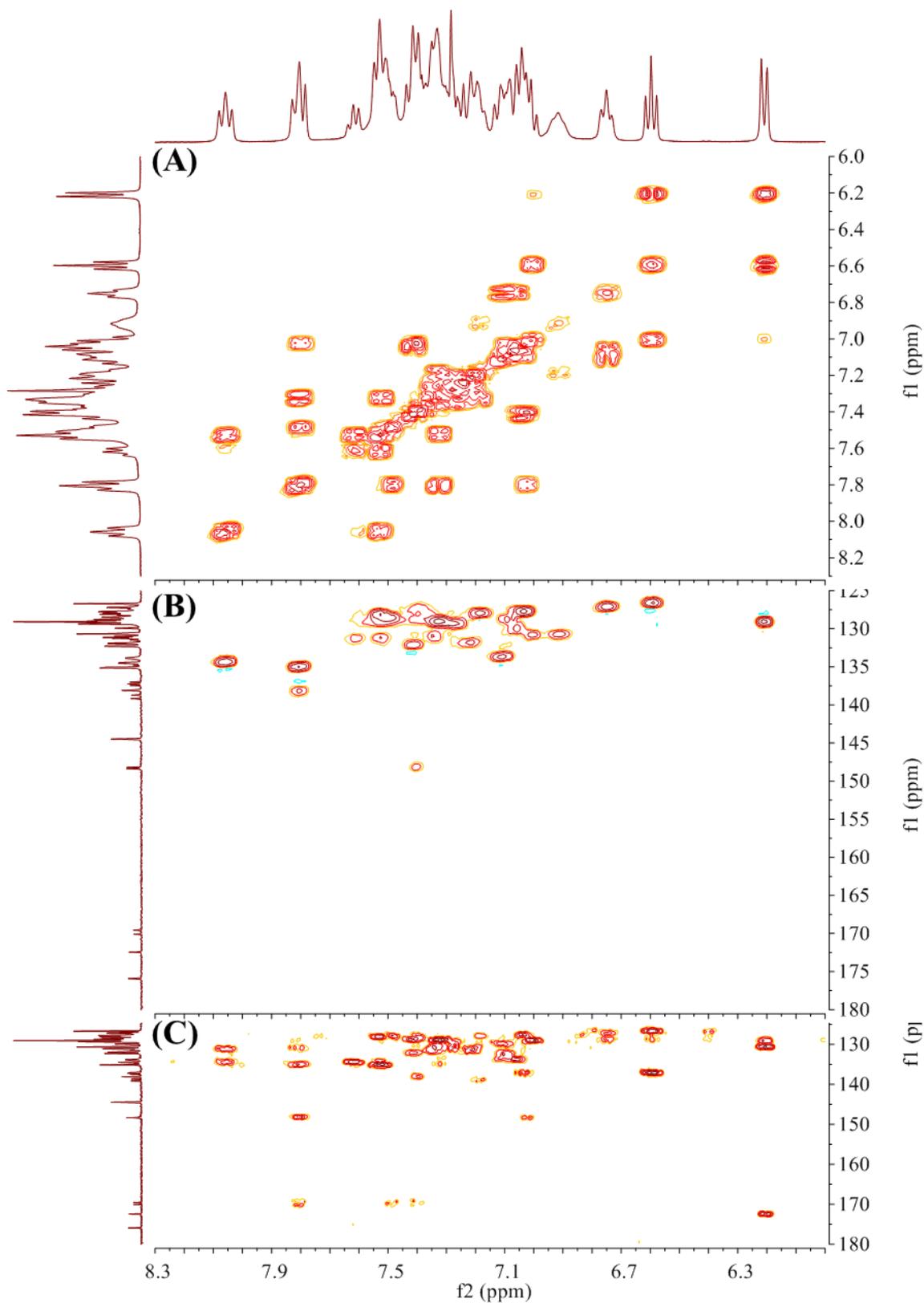


FIGURA A68- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{dfth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (SPPM6).

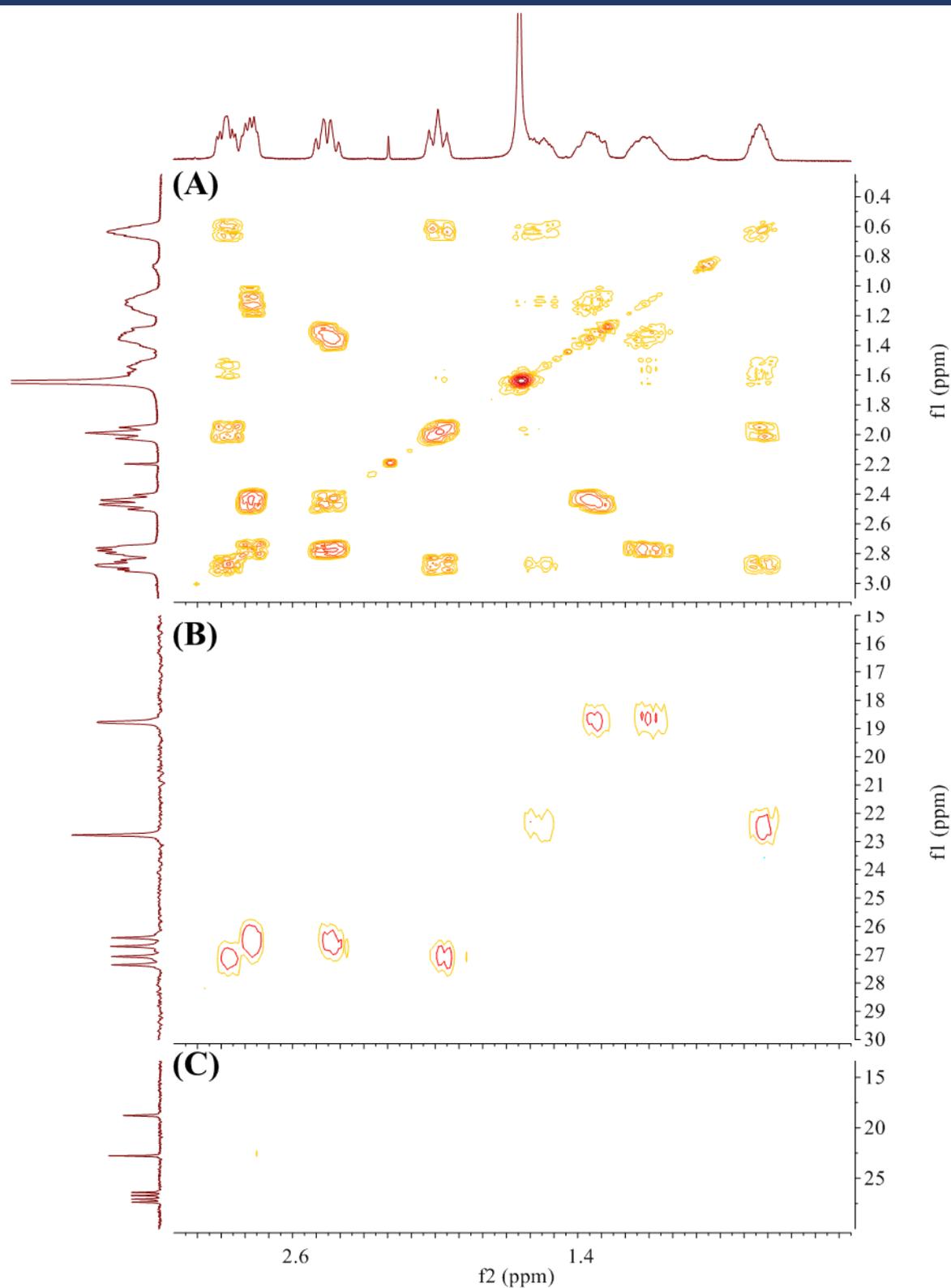


FIGURA A69- Região desblindada dos mapas de correlação de RMN 2D: (A) ^1H - ^1H COSY, (B) ^1H - ^{13}C HSQC e (C) ^1H - ^{13}C HMBC do complexo $[\text{Ru}(\text{dfth})(\text{dppb})(\text{dphppy})]\text{PF}_6$ (**SPPM6**).

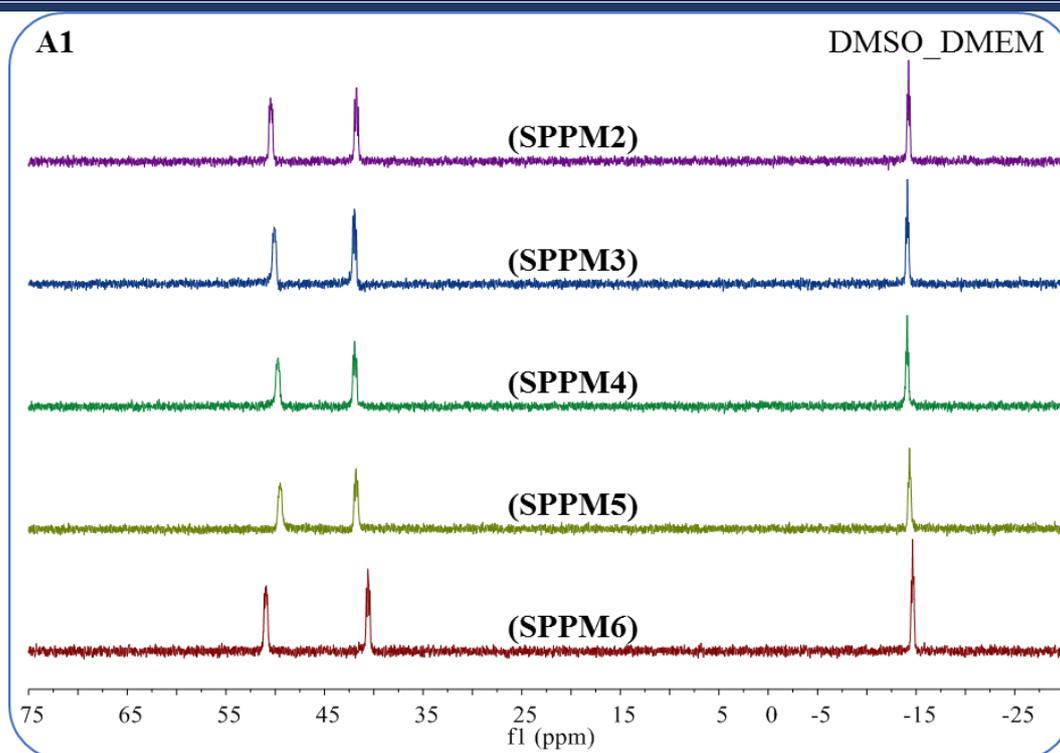


FIGURA A70- Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos SPPM em DMSO/DMEM registrados com 0,5 h.

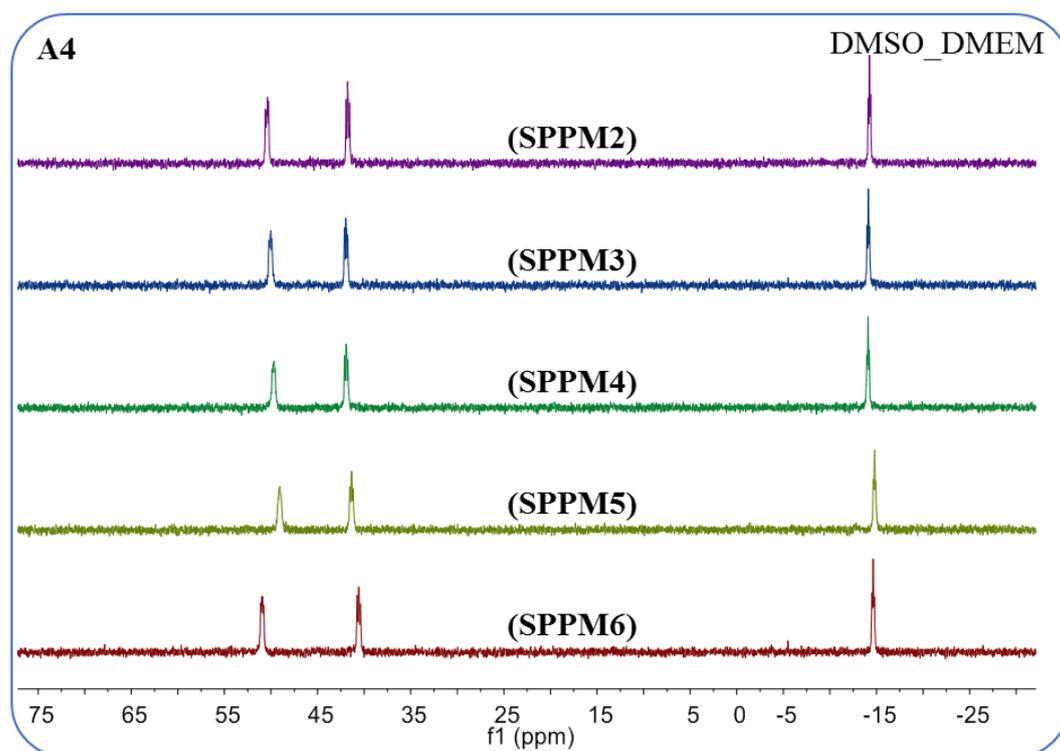


FIGURA A71- Espectros de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ dos complexos SPPM em DMSO/DMEM registrados com 48 h.

Parte VII- Dados cristalográficos dos complexos

TABELA A14- Principais parâmetros cristalográficos para as estruturas obtidas para os complexos [Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM2**), [Ru(dpth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM4**) e [Ru(dfth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM6**).

Identification code	SPPM2	SPPM4	SPPM6
Empirical formula	C _{27.48} H _{26.48} F ₃ N _{1.5} O _{0.5} P ₂ Ru _{0.5} S _{0.5}	C _{29.5} H _{30.27} F ₃ N _{1.5} O _{0.5} P ₂ Ru _{0.5} S _{0.5}	C ₆₅ H ₅₇ F ₆ N ₃ OP ₄ RuS
Formula weight	571.28	599.33	1267.14
Temperature/K	293(2)	293(2)	293(2)
Crystal system	triclinic	triclinic	triclinic
Space group (Å)	P-1	P-1	P-1
	a= 11.8098(4) Å; α= 80.038(3)°	a= 10.3975(6) Å; α= 87.764(4)°	a= 12.2429(3) Å; α= 92.996(2)°
	b= 13.9780(5) Å; β= 80.311(3)°	b= 16.6850(8) Å; β= 84.493(4)°	b= 14.4851(4) Å; β= 108.144(2)°
	c= 16.8008(5) Å; γ= 86.976(3)°	c= 17.1629(8) Å; γ= 81.443(4)°	c= 17.2230(4) Å; γ= 95.926(2)°
Volume/Å ³	2691.85(16)	2929.8(3)	2875.40(13)
Z	4	4	2
ρ _{calc} /cm ³	1.410	1.359	1.464
μ/mm ⁻¹	0.511	0.473	0.487
F(000)	1172.0	1235.0	1300.0
Crystal size/mm ³	0.827 × 0.679 × 0.476	0.746 × 0.157 × 0.06	0.582 × 0.359 × 0.113
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)	MoKα (λ = 0.71073)	MoKα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	5.36 to 53.998	5.174 to 51.998	5.348 to 53.998
Index ranges	-15 ≤ h ≤ 15, -17 ≤ k ≤ 17, -21 ≤ l ≤ 21	-12 ≤ h ≤ 12, -18 ≤ k ≤ 20, -21 ≤ l ≤ 21	-15 ≤ h ≤ 15, -18 ≤ k ≤ 18, -22 ≤ l ≤ 22
Reflections collected	47905	26864	63497
Independent reflections	11724 [R _{int} = 0.0284, R _{sigma} = 0.0224]	11514 [R _{int} = 0.0363, R _{sigma} = 0.0530]	12540 [R _{int} = 0.0301, R _{sigma} = 0.0205]
Data/restraints/parameters	11724/0/679	11514/2/671	12540/0/766
Goodness-of-fit on F ²	1.159	1.054	1.166
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R ₁ = 0.0398, wR ₂ = 0.0840	R ₁ = 0.0465, wR ₂ = 0.1040	R ₁ = 0.0324, wR ₂ = 0.0788
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0572, wR ₂ = 0.1024	R ₁ = 0.0733, wR ₂ = 0.1229	R ₁ = 0.0430, wR ₂ = 0.0898
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	1.09/-0.47	0.57/-0.54	0.43/-0.61

Parte VIII- Dados de voltametria dos complexos.

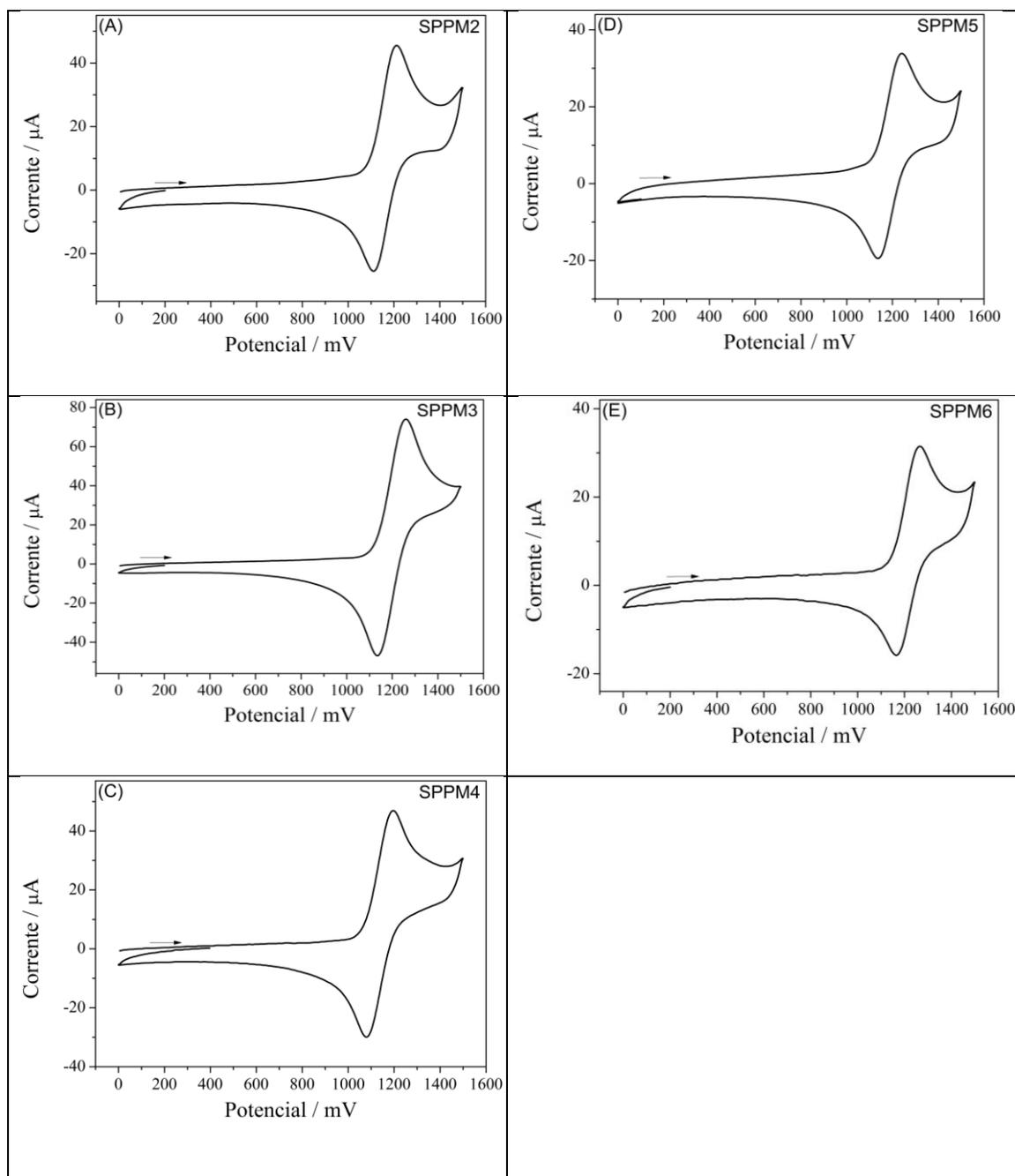


FIGURA A72- Voltamogramas cíclico registrado em presença dos complexos (A) SPPM2, (B) SPPM3, (C) SPPM4, (D) SPPM5 e (E) SPPM6 em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em diclorometano à 100 mV s^{-1} .

Parte IX- Dados de análise elementar, condutividade e espectroscopia de absorção na região do infravermelho e UV/visível dos complexos

[Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM2). Rendimento 99 mg (79%). Análise elementar (%) Calc. para C₅₈H₆₁F₆N₃OP₄RuS: C 57.79; H 3.68; N 4.67; S 2.81; Encontrado: C 57.93; H 4.34; N 4.39; S 5.47. Bandas selecionadas IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{C—H})$ 3060, 2932, 2852; $\nu_s(\text{C=N})$ 1584; $\nu(\text{C=O})$ 1501; $\nu(\text{C} = \text{C}_{\text{py}})$ 1480; $\nu(\text{C=N} + \nu\text{C=C})$ 1421; $\delta(\text{CH}_3)$ 1360; CH_2_{wag} 1306; $\nu(\text{C—S})$ 1287; $\beta(\text{C—H}(\phi))$ 1160; $\nu(\text{C—S})$ 1132; $\nu(\text{C—P})$ 1095; $\beta(\text{C—H}(\phi))$ 1026; ν_{anel} 1000; $\nu(\text{PF}_6)$ 839; $\gamma(\text{CH}(\phi))$ 739; $\gamma(\text{C—S})$ 696; $\nu(\text{PF}_6)$ 557; $\nu(\text{Ru—P})$ 525; ν 506; $\nu(\text{Ru—S})$ 438; $\nu(\text{Ru—N})$ 420; $\nu(\text{Ru—O})$ 352. UV/vis [CH₂Cl₂; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 258 (51856 ± 650), 304 (14505 ± 156), 356 (694 ± 84). Condutividade molar ($\mu\text{S/cm}$, CH₂Cl₂) 44.3.

Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM3). Rendimento 104 mg (81%). Análise elementar (%) Calc. para C₆₀H₆₄F₆N₃OP₄RuS: C 58.46; H 4.98; N 4.91; S 2.74 Encontrado: C 58.08; H 4.88; N 4.20; S 4.99. Bandas selecionadas IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{C—H})$ 3060, 2930, 2866; $\nu_s(\text{C=N})$ 1582; $\nu(\text{C=O})$ 1500; $\nu(\text{C=C}_{\text{py}})$; $\nu(\text{C=N} + \nu\text{C=C})$ 1417; $\delta(\text{CH}_3)$ 1373; CH_2_{wag} 1302; $\nu(\text{C—S})$ 1252; $\beta(\text{C—H}(\phi))$ 1160; $\nu(\text{C—S})$ 1132; $\nu(\text{C—P})$ 1094; $\beta(\text{C—H}(\phi))$ 1022; ν_{anel} 1000; $\nu(\text{PF}_6)$ 838; $\gamma(\text{CH}(\phi))$ 740; $\gamma(\text{C—S})$ 695; $\nu(\text{PF}_6)$ 556; $\nu(\text{Ru—P})$ 524; ν 507; $\nu(\text{Ru—S})$ 443; $\nu(\text{Ru—N})$ 420; $\nu(\text{Ru—O})$ 352. UV/vis [CH₂Cl₂; λ max, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 256 (54376 ± 684), 302 (16571 ± 223), 358 (8106 ± 122). Molar conductance ($\mu\text{S/cm}$, CH₂Cl₂) 41.6.

[Ru(dpth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM4). Rendimento 117 mg (89%). Análise elementar (%) Calc. para C₆₂H₆₈F₆N₃OP₄RuS: C 49.09; H 5.13; N 3.50; S 2.67 Encontrado: C 56.70; H 4.99; N 3.95; S 4.33. Bandas selecionadas IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{C—H})$ 3058, 2933, 2871; $\nu_s(\text{C=N})$ 1583; $\nu(\text{C=O})$ 1497;

$\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{py}})$; $\nu(\text{C}=\text{N} + \nu\text{C}=\text{C})$ 1417; $\delta(\text{CH}_3)$ 1364; $\text{CH}_{2\text{wag}}$ 1306; $\nu(\text{C}-\text{S})$ 1282; $\beta(\text{C}-\text{H} (\phi))$ 1159; $\nu(\text{C}-\text{S})$ 1136; $\nu(\text{C}-\text{P})$ 1095; $\beta(\text{C}-\text{H} (\phi))$ 1023; ν_{anel} 998; $\nu(\text{PF}_6)$ 842; $\gamma(\text{CH} (\phi))$ 743; $\gamma(\text{C}-\text{S})$ 695; $\nu(\text{PF}_6)$ 558; $\nu(\text{Ru}-\text{P})$ 527; ν 508; $\nu(\text{Ru}-\text{S})$ 445; $\nu(\text{Ru}-\text{N})$ 419; $\nu(\text{Ru}-\text{O})$ 356. UV/vis [CH_2Cl_2 ; λ max, nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 256 (48964 ± 523), 304 (15637 ± 182), 356 (8060 ± 86). Condutividade molar ($\mu\text{S}/\text{cm}$, CH_2Cl_2) 45.4.

[Ru(dbth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM5). Rendimento 113 mg (84%). Análise elementar (%) Calc. para $\text{C}_{64}\text{H}_{72}\text{F}_6\text{N}_3\text{OP}_4\text{RuS}$: C 59.70; H 5.34; N 3.42; S 2.61 Encontrado: C 56.63; H 5.20; N 3.85; S 4.35. Bandas selecionadas IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{C}-\text{H})$ 3056, 2930, 2861; $\nu_s(\text{C}=\text{N})$ 1585; $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1506; $\nu(\text{C} = \text{C}_{\text{py}})$ 1485; $\nu(\text{C}=\text{N} + \nu\text{C}=\text{C})$ 1418; $\delta(\text{CH}_3)$ 1365; $\text{CH}_{2\text{wag}}$ 1306; $\nu(\text{C}-\text{S})$ 1274; $\beta(\text{C}-\text{H} (\phi))$ 1159; $\nu(\text{C}-\text{S})$ 1136; $\nu(\text{C}-\text{P})$ 1093; $\beta(\text{C}-\text{H} (\phi))$ 1022; ν_{anel} 999; $\nu(\text{PF}_6)$ 840; $\gamma(\text{CH} (\phi))$ 739; $\gamma(\text{C}-\text{S})$ 695; $\nu(\text{PF}_6)$ 557; $\nu(\text{Ru}-\text{P})$ 528; ν 506; $\nu(\text{Ru}-\text{S})$ 440; $\nu(\text{Ru}-\text{N})$ 413; $\nu(\text{Ru}-\text{O})$. UV/vis [CH_2Cl_2 ; λ max, nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 256 (57058 ± 903), 304 (18579 ± 307), 356 (9378 ± 149). Condutividade molar ($\mu\text{S}/\text{cm}$, CH_2Cl_2) 42.8.

[Ru(dfth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM6). Rendimento 122 mg (85%). Análise elementar (%) Calc. para $\text{C}_{68}\text{H}_{64}\text{F}_6\text{N}_3\text{OP}_4\text{RuS}$: C 61.61; H 4.35; N 3.32; S 2.82; Encontrado: C 61.37; H 4.81; N 4.40; S 6.59. Bandas selecionadas IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{C}-\text{H})$ 3057, 2922, 2860; $\nu_s(\text{C}=\text{N})$ 1586; $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1495; $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{py}})$; $\nu(\text{C}=\text{N} + \nu\text{C}=\text{C})$ 1423; $\delta(\text{CH}_3)$ 1360; $\text{CH}_{2\text{wag}}$ 1305; $\nu(\text{C}-\text{S})$ 1289; $\beta(\text{C}-\text{H} (\phi))$ 1156 $\nu(\text{C}-\text{S})$; $\nu(\text{C}-\text{P})$ 1094; $\beta(\text{C}-\text{H} (\phi))$ 1024; ν_{anel} 999; $\nu(\text{PF}_6)$ 843; $\gamma(\text{CH} (\phi))$ 744; $\gamma(\text{C}-\text{S})$ 679; $\nu(\text{PF}_6)$ 559; $\nu(\text{Ru}-\text{P})$ 522; ν 508; $\nu(\text{Ru}-\text{S})$ 443; $\nu(\text{Ru}-\text{N})$ 420; $\nu(\text{Ru}-\text{O})$ 351. UV/vis [CH_2Cl_2 ; λ max, nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 258 (58940 ± 405), 328 (16851 ± 129), 376 (10392 ± 92). Condutividade molar ($\mu\text{S}/\text{cm}$, CH_2Cl_2) 45.9.

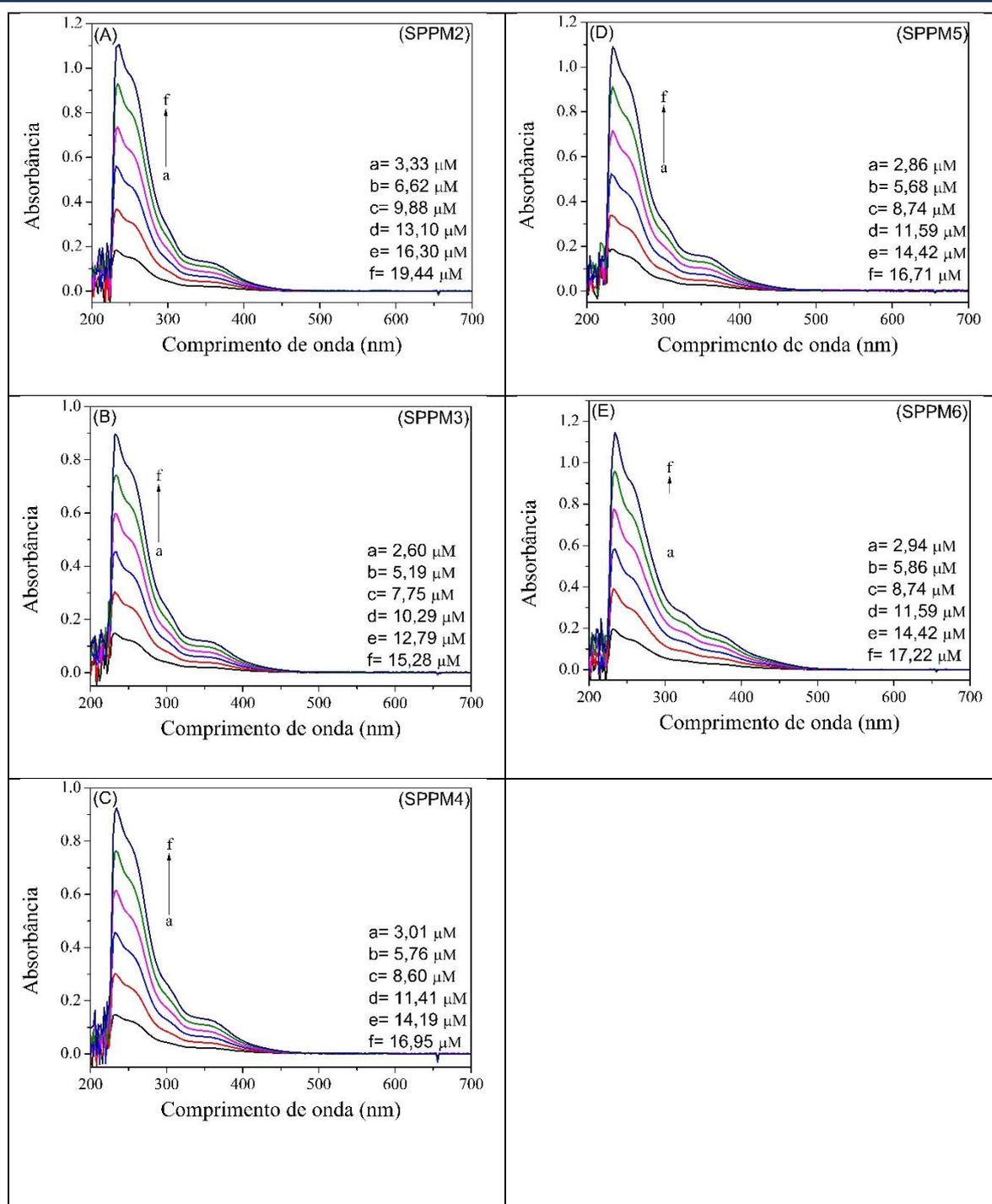


FIGURA A73- Espectros de absorção na região do UV/Vis para (A) SPPM2, (B) SPPM3, (C) SPPM4, (D) SPPM5 e (E) SPPM6 em diclorometano.

TABELA A15 - Dados dos espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos em diclorometano.

Complexo	λ (nm)	Absortividade molar (ϵ) ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$)
SPPM2	258	51856 ± 650
	304	14505 ± 156
	356	6943 ± 84
SPPM3	256	54376 ± 684
	302	16571 ± 223
	358	8106 ± 122
SPPM4	256	48964 ± 523
	304	15637 ± 182
	356	8060 ± 86
SPPM5	256	57058 ± 903
	304	18579 ± 307
	356	9378 ± 149
SPPM6	258	58940 ± 405
	328	16850 ± 129
	376	10391 ± 92

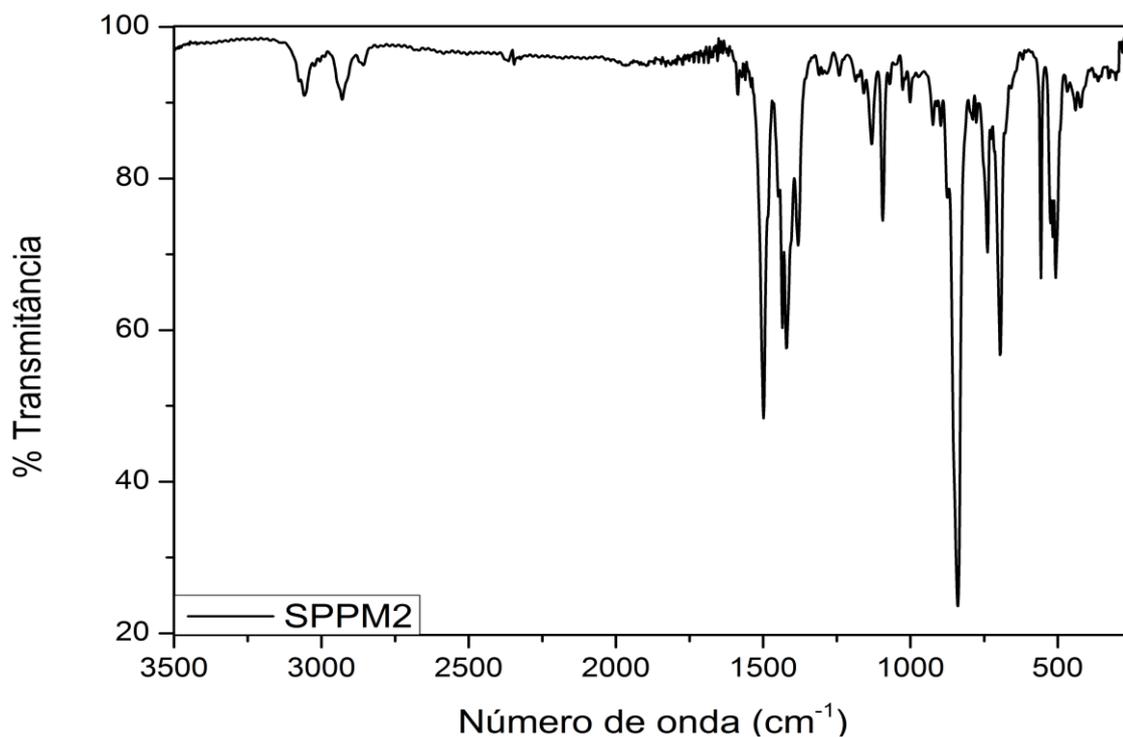


FIGURA A74- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo **SPPM2**.

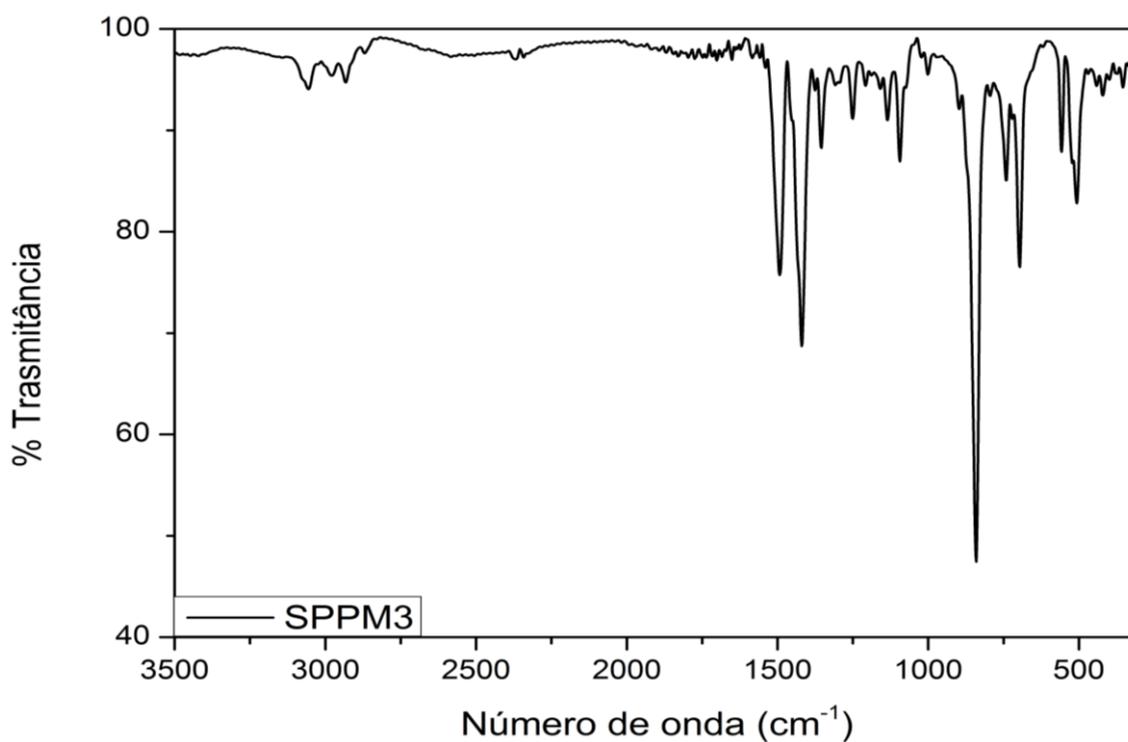


FIGURA A75- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo **SPPM3**.

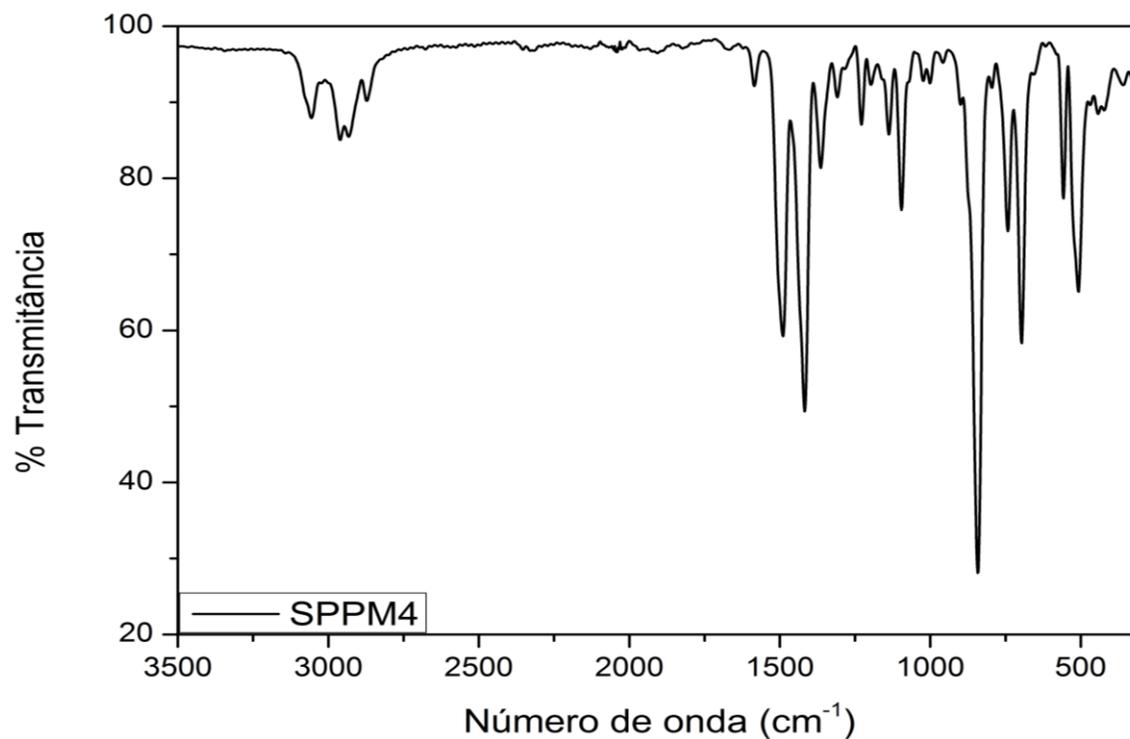


FIGURA A76- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo SPPM4.

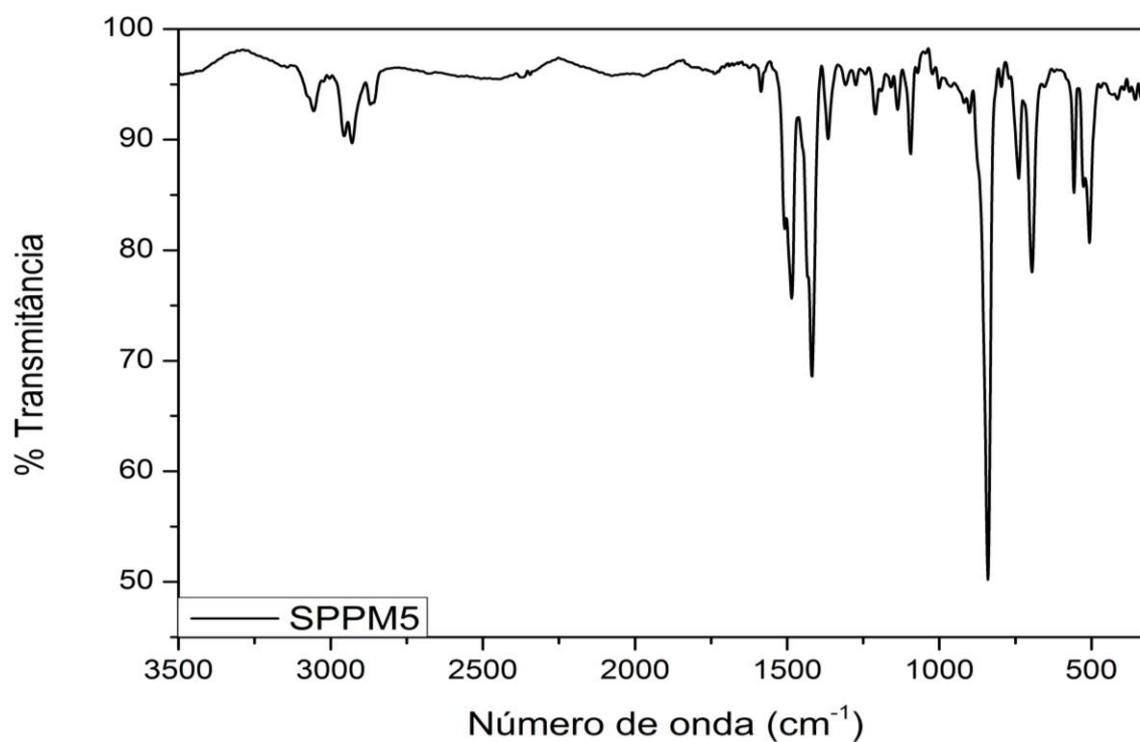


FIGURA A77- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo SPPM5.

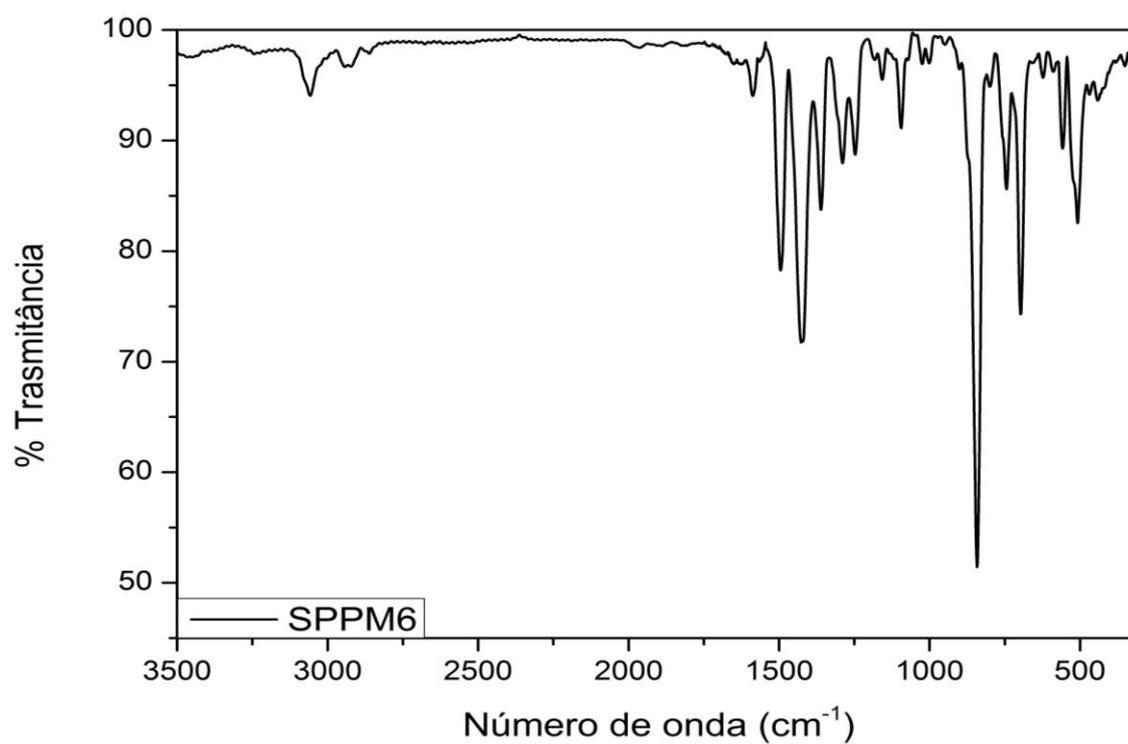


FIGURA A78- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo **SPPM6**.

Parte X- Espectros do ensaio do DNA-Hoechst para a série SPPM

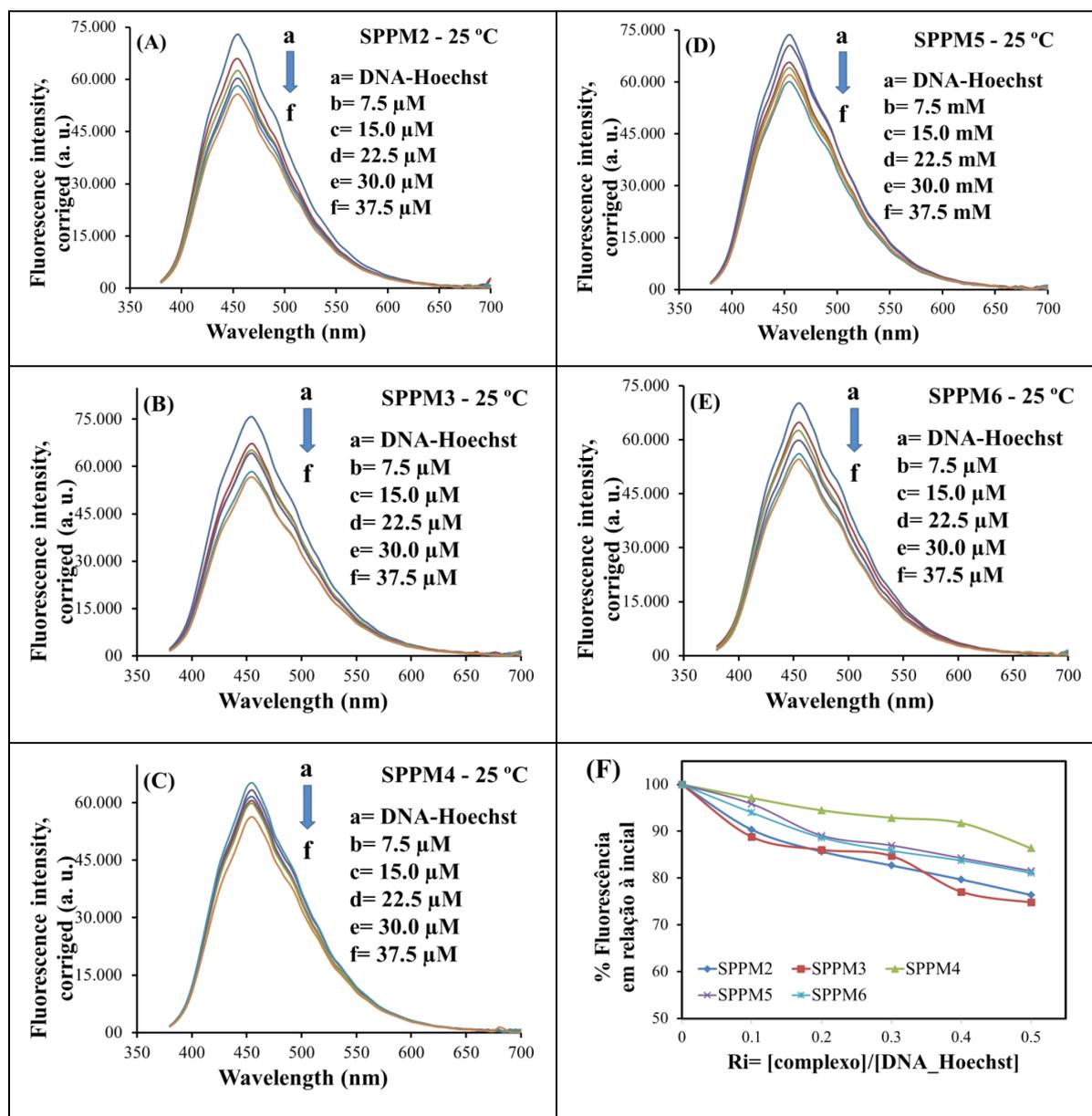


FIGURA A79- Espectros de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[DNA-Hoechst] (a= 0; b= 1; c= 2; d= 3; e= 4 e f= 5), com comprimento de onda de excitação, a 25 °C em tampão Trisma-HCl: (A) [Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM2), (B) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM3), (C) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM4), (D) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM5) e (E) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (SPPM6); (F) Gráfico de decaimento da intensidade da fluorescência em função das diferentes razões [composto]/[DNA-Hoechst].

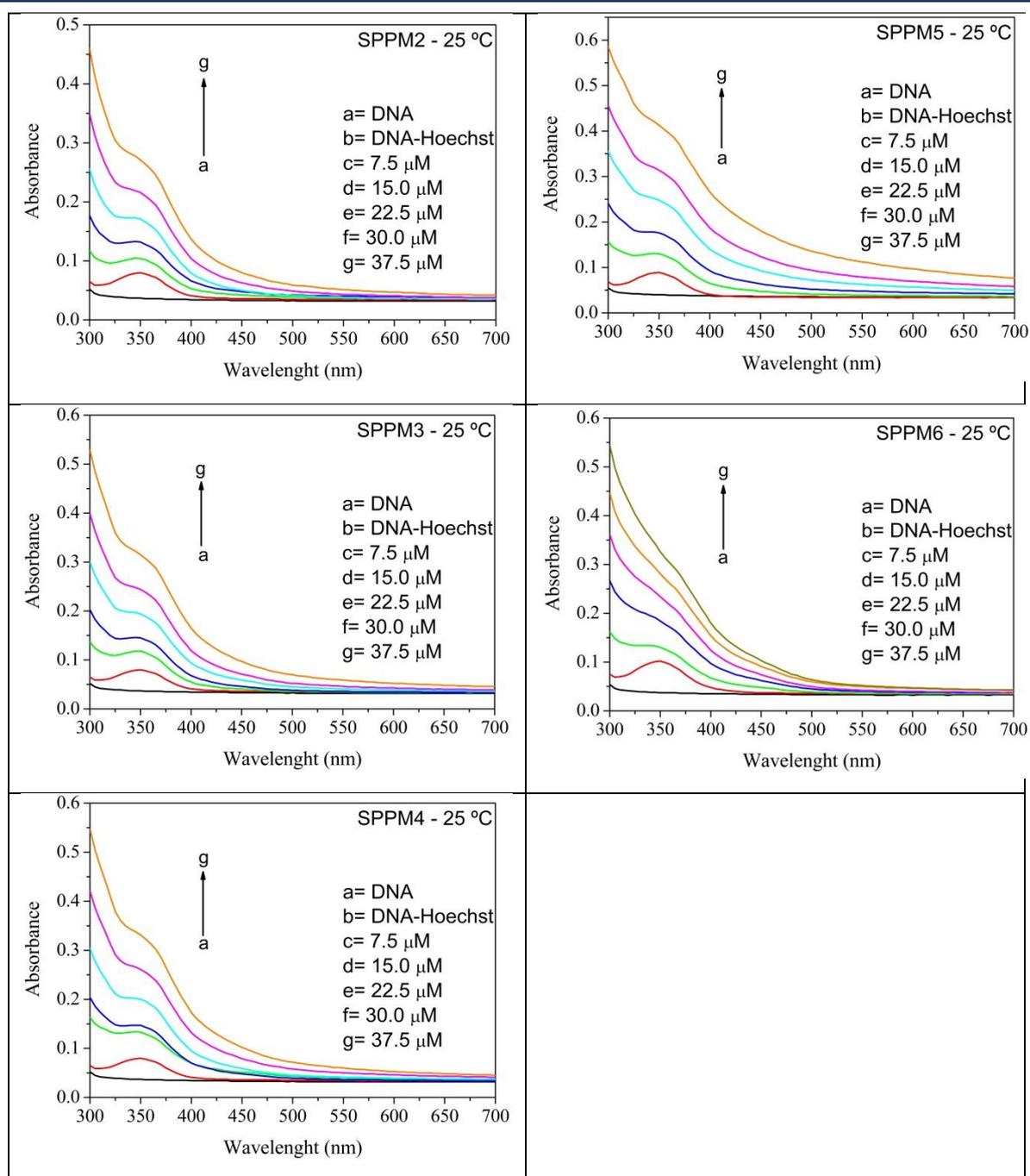


FIGURA A80- Espectros de absorção na região do UV/Vis das soluções de DNA-Hoechst na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[DNA-Hoechst] ($b=0$; $c=1$; $d=2$; $e=3$; $f=4$ e $g=5$) a 25 °C em tampão Tris-HCl: [Ru(dmth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM2**), (**B**) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM3**), (**C**) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM4**), (**D**) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM5**) e (**E**) [Ru(deth)(dppb)(dphppy)]PF₆ (**SPPM6**). OBS.: Referentes às soluções que foram registrados os espectros de fluorescência.

Parte XI- Preparo das soluções para os estudos de interação com biomoléculas DNA e HSA

Estudo de interação com DNA

- Mobilidade eletroforética em gel de agarose

TABELA A16- Preparo das soluções de plasmídeo pBR322 e complexos AMP para o ensaio de mobilidade eletroforética. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série AMP, solução estoque de DNA, e DMSO.

Ri	Concentração* (µM)		Volumes de solução estoque (µL)			
	[DNA]	[C]	Adição pré-incubação			Pós-incubação
			Composto*	DMSO	DNA ^d	
0,00	46	0	0 µL	1 µL	9 µL	2 µL
0,25	46	11,5	1 µL ^a	0 µL	9 µL	2 µL
0,50	46	23,0	1 µL ^b	0 µL	9 µL	2 µL
1,00	46	46,0	1 µL ^c	0 µL	9 µL	2 µL

*Concentrações das espécies nas soluções para a corrida eletroforética;
 ** Concentração das soluções estoque dos complexo em DMSO: ^a115 µM; ^b230 µM e ^c460 µM; ^dConcentração da solução estoque de DNA em Tampão Trisma-HCl à 51 µM; Solvente DMSO.

TABELA A17- Preparo das soluções de plasmídeo pUC18 e complexos SPPM para o ensaio de mobilidade eletroforética. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série AMP, solução estoque de DNA, e DMSO.

Ri	Concentração* (µM)		Volumes de solução estoque (µL)			
	[DNA]	[C]	Adição pré-incubação			Pós-incubação
			Composto*	DMSO	DNA ^c	
0,00	58	0	0 µL	1 µL	9 µL	2 µL
0,50	58	29,0	1 µL ^a	0 µL	9 µL	2 µL
1,00	58	58,0	1 µL ^b	0 µL	9 µL	2 µL

*Concentrações das espécies nas soluções para a corrida eletroforética;
 **Concentração das soluções estoque dos complexo em DMSO: ^a290 µM e ^b580 µM; ^cConcentração da solução estoque de DNA em Tampão Trisma-HCl à 64 µM; Solvente DMSO.

TABELA A18- Preparo das soluções de CT-DNA e complexos **AMP** para o aferimento da viscosidade do DNA. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série **AMP**, solução estoque de DNA, tampão e DMSO.

Ri*	Concentração** (μM)		Volumes de solução estoque (μL)***			
	[DNA]	[C]	Composto ^a	DMSO	Trisma-HCl	DNA ^{b,c}
-	0	0	0	400	3600	0
-	200	0	0	0	3400	600
0,00	200	0	0	400	3000	600
0,05	200	10	67	333	3000	600
0,10	200	20	133	267	3000	600
0,15	200	30	200	200	3000	600
0,20	200	40	267	133	3000	600
0,25	200	50	333	67	3000	600
0,30	200	60	400	0	3000	600

*Ri é igual a razão [Complexo]/[DNA]; **Concentrações das espécies nas soluções de aferimento da viscosidade DNA; *** ^aConcentração da solução estoque dos complexo em DMSO à 0,6 mM; ^bConcentração da solução estoque de DNA em Tampão Trisma-HCl à 1,34 mM; Solvente DMSO; ^cA concentração da solução estoque DNA foi verificada antes do preparo das soluções. Solução tampão de Trisma-HCl.

TABELA A19- Preparo das soluções de CT-DNA e complexos **SPPM** para o aferimento da viscosidade do DNA. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série **SPPM**, solução estoque de DNA, tampão e DMSO.

Ri*	Concentração** (μM)		Volumes de solução estoque (μL)***			
	[DNA]	[C]	Composto ^a	DMSO	Trisma-HCl	DNA ^{b,c}
-	0	0	0	400	3600	0
-	150	0	0	0	3400	600
0,00	150	0	0	400	3000	600
0,05	150	7,5	50	350	3000	600
0,10	150	15,0	100	300	3000	600
0,20	150	30,0	200	200	3000	600
0,30	150	45,0	300	100	3000	600
0,40	150	60,0	400	0	3000	600

*Ri é igual a razão [Complexo]/[DNA]; **Concentrações das espécies nas soluções de aferimento da viscosidade DNA; *** ^aConcentração da solução estoque dos complexo em DMSO à 0,6 mM; ^bConcentração da solução estoque de DNA em Tampão Trisma-HCl à 1,00 mM; ^cA concentração da solução estoque DNA foi verificada antes do preparo das soluções Solvente DMSO; Solução tampão de Trisma-HCl.

- Deslocamento do Hoechst do composto DNA-Hoechst

TABELA A20- Preparo das soluções de DNA-Hoechst e complexos AMP para o ensaio de deslocamento do Hoechst do DNA. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série AMP, solução estoque de DNA, tampão Trisma-HCl e DMSO.

Ri*	Concentração** (μM)		Volumes de solução estoque*** (μL)			
	[DNA-Hoechst]	[C]	Composto ^a	DMSO	DNA-Hoechst ^b	Trisma-HCl
-	75/ 0	0	0	100	900* ^c	0
-	0/ 2,5	0	0	100	900* ^d	0
0,0	7,5/ 2,5	0	0	100	900	0
0,1	75/ 2,5	7,5	10	90	900	0
0,2	75/ 2,5	15,0	20	80	900	0
0,3	75/ 2,5	22,5	30	70	900	0
0,4	75/ 2,5	30,0	40	60	900	0
0,5	75/ 2,5	37,5	50	50	900	0
0,6	75/ 2,5	45,0	60	40	900	0
0,7	75/ 2,5	52,5	70	30	900	0
0,8	75/ 2,5	60,0	80	20	900	0
0,9	75/ 2,5	67,5	90	10	900	0
1,0	75/ 2,5	75,0	100	0	900	0
-	0	75	100	0	0	900

*Ri é igual a razão [Complexo]/[DNA-Hoechst]; **Concentrações das espécies nas soluções de registro dos espectros de fluorescência para o ensaio, bem como dos espectros de absorção na região do UV-Vis; ***^aConcentração da solução estoque dos complexo em DMSO à 0,75 mM; ^bConcentração da solução estoque de CT-DNA e Hoechst em Tampão Trisma-HCl à 84 e 2,8 μM , respectivamente; Solvente DMSO; Tampão Trisma-HCl; *^c Empregada a solução estoque de CT-DNA; *^d Empregada a solução estoque de Hoechst.

TABELA A21- Preparo das soluções de DNA-Hoechst e complexos **SPPM** para o ensaio de deslocamento do Hoechst do DNA. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série **SPPM**, solução estoque de DNA, tampão Trisma-HCl e DMSO.

Ri*	Concentração** (μM)		Volumes de solução estoque*** (μL)			
	[DNA-Hoechst]	[C]	Composto ^a	DMSO	DNA-Hoechst ^b	Trisma-HCl
-	75/ 0	0	0	100	900* ^c	0
-	0/ 2,5	0	0	100	900* ^d	0
0,0	7,5/ 2,5	0	0	100	900	0
0,1	75/ 2,5	7,5	20	80	900	0
0,2	75/ 2,5	15,0	40	60	900	0
0,3	75/ 2,5	22,5	60	40	900	0
0,4	75/ 2,5	30,0	80	20	900	0
0,5	75/ 2,5	37,5	100	0	900	0
-	0	37,5	100	0	0	900

*Ri é igual a razão [Complexo]/[DNA-Hoechst]; **Concentrações das espécies nas soluções de registro dos espectros de fluorescência para o ensaio, bem como dos espectros de absorção na região do UV-Vis; *** ^aConcentração da solução estoque dos complexo em DMSO à 0,37 mM; ^bConcentração da solução estoque de CT-DNA e Hoechst em Tampão Trisma-HCl à 84 e 2,8 μM , respectivamente; Solvente DMSO; Tampão Trisma-HCl; *^c Empregada a solução estoque de CT-DNA; *^d Empregada a solução estoque de Hoechst.

Estudo de interação com HSA

TABELA A22- Preparo das soluções de HSA e complexos **AMP** para o ensaio de supressão da fluorescência da HSA. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos das séries **AMP**, solução estoque de HSA e solvente DMSO.

Ri*	Concentração** (μM)		Volumes de solução estoque*** (μL)			
	[HSA]	[C]	Composto ^a	DMSO	HSA ^b	Trisma-HCl
-	5,0	0	0	0	950	50
0,0	5,0	0	0	50	950	0
0,1	5,0	5,0	5	45	950	0
0,2	5,0	10,0	10	40	950	0
0,3	5,0	15,0	15	35	950	0
0,4	5,0	20,0	20	30	950	0
0,5	5,0	25,0	25	25	950	0
0,6	5,0	30,0	30	20	950	0
-	0	50,0	30	20	0	950

*Ri é igual a razão [Complexo]/[HSA]; **Concentrações das espécies nas soluções de registro dos espectros de fluorescência para o ensaio; *** ^aConcentração da solução estoque dos complexo em DMSO à 1,00 mM; ^bConcentração da solução estoque de HSA em Tampão Trisma-HCl à 5,25 μM , respectivamente; Solvente DMSO; Tampão Trisma-HCl.