

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

**“Citotoxicidade e Mecanismo de Ação de Complexos Ru(II)/2-  
mercapto-4(3H)quinazolinona em Células de Câncer de  
Pele”**

**Nádjia Natalice Paixão da Silva\***

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

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

**\* Bolsista (CNPq)**

**São Carlos - SP**  
**2023**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Nádjia Natalice Paixão da Silva, realizada em 28/02/2023.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa (UFOP)

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

*"É preciso ter esperança, mas ter esperança do verbo esperar; porque tem gente que tem esperança do verbo esperar. E esperança do verbo esperar não é esperança, é espera. Esperançar é se levantar, esperançar é ir atrás, esperançar é construir, esperançar é não desistir! Esperançar é levar adiante, esperançar é juntar-se com outros para fazer de outro modo..."*

**Paulo Freire**

*Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim,  
que foram incentivo, que tornaram essa jornada menos  
pesada, que compartilharam seus conhecimentos comigo  
com muito respeito.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conceder-me as capacidades necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, Rita de Cássia e Josenilton Henrique, pela compreensão e apoio durante esta etapa.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo pela orientação, por proporcionar as condições necessárias e mediar parcerias importantes para a realização da pesquisa.

Ao Dr. Marcos Palmeira pela amizade, ajuda e também orientação desde o início do mestrado.

Ao Dr. João Honorato pela resolução das estruturas cristalográficas e pela amizade.

Ao MSc. Carlos André pela realização dos experimentos de espectrometria de massas.

A Dra. Kátia Mara, MSc. Matheus Reis, Dra. Nathália Acésio e Dra. Denise Crispim pela realização dos ensaios biológicos.

Aos colegas e amigos do LERCI, LaBMed e CCQM: Jocely, Marcos, João, Alex, Letícia, Analu, Caio, Milena, George, Tamara e Josias, pela amizade, momentos de descontração, auxílio em diversos momentos. Especialmente a Jocely, Tamara e Marcos pela parceria nos “merecimentos”, e ao George pelo companheirismo, apoio e auxílio dentro e fora da pesquisa.

Ao Departamento de Química da UFSCar, e ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização da pesquisa.

---

---

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1.1 - Estatísticas para o câncer de pele melanoma e não melanoma.....	3
TABELA 4.1 - Valores de constante de acoplamento ${}^2J_{P-P}$ para os complexos Ru1, Ru2, Ru3, Ru5.....	43
TABELA 4.2 - Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para os complexos Ru1-Ru5.....	47
TABELA 4.3 - Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos em DMSO.....	49
TABELA 4.4 - Atribuições tentativas das principais bandas do infravermelho para os complexos e para o ligante H2mq livre.....	51
TABELA 4.5 - Dados de voltametria cíclica para os complexos Ru1-Ru5 e seus respectivos precursores (100 mV s <sup>-1</sup> , Ag/AgCl).....	53
TABELA 4.6 - Atribuições tentativas para as bandas dos espectros eletrônicos dos complexos Ru1-Ru5.....	58
TABELA 4.7 - Valores teóricos e experimentais referentes ao pico [M] <sup>+</sup> .....	60
TABELA 4.8 - Deslocamento químicos dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos do ligante H2mq.....	61
TABELA 4.9 - Dados de quantitativos da interação dos complexos com HSA. ....	77
TABELA 4.10 - Valores de IC <sub>50</sub> (µM) e Índices de Seletividade (IS) para os complexos de rutênio e cisplatina, frente as linhagens celulares HaCat, A-375 e B16-F10.....	80
TABELA 5.1 - Valores de IC <sub>50</sub> (µM) e IS para os complexos, frente as linhagens celulares A549 e MRC-5 .....	88

---



---

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Causas do câncer. Adaptada do Instituto Nacional do Câncer (INCA) <sup>1</sup> . .....	1
FIGURA 1.2– Representação das interações Pt-bases nitrogenadas do DNA. Adaptada de Fontes, César e Beraldo <sup>12</sup> . .....	5
FIGURA 1.3 - Complexos de rutênio como possíveis quimioterápicos.....	6
FIGURA 1.4 - Complexos desenvolvidos no LERCI e seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> e IS obtidos após 48 h. ....	7
FIGURA 1.5 – Representação da ligação $\sigma$ e $\pi$ entre o metal e os ligantes fosfínicos. ....	8
FIGURA 1.6 – Tautomerismo do grupo tioamida, e a forma tiolato.....	10
FIGURA 1.7 – Estrutura do ligante 2-mercapto-4(3H)quinazolinona e tautomerismo do grupo tioamida.....	11
FIGURA 4.1 - Esquemas de rotas sintéticas para obtenção dos complexos propostos neste projeto, em que N-S e S = H <sub>2</sub> m <sub>q</sub> ; P-P = dppe, dppm, dppen; e N-N = bipy.....	35
FIGURA 4.2 - Estruturas dos complexos sintetizados (Ru1-Ru5).....	36
FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H} do complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ] em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /D <sub>2</sub> O, em que P-P = dppm. ....	37
FIGURA 4.4 - Diagrama de árvores para um sistema com quatro átomos de fósforos química e magneticamente não equivalentes na posição <i>cis</i> . ....	38
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H} do complexo Ru5, em metanol/D <sub>2</sub> O. ....	40
FIGURA 4.6 - Sugestão de isômeros presentes em solução para o complexo Ru5.	40
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de <sup>31</sup> P{ <sup>1</sup> H} do complexo Ru1 em acetona/D <sub>2</sub> O.	42

---

---

FIGURA 4.8 - Estruturas cristalinas dos complexos Ru1, Ru2, Ru4 e Ru5 (o íon $\text{PF}_6^-$ foi omitido em Ru2 e Ru5).....	44
FIGURA 4.9 - Estrutura cristalina do complexo Ru5.....	46
FIGURA 4.10 - Principais comprimentos de ligação do ligante mercapto livre e coordenado. ....	48
FIGURA 4.11 - Espectros de IV dos complexos sintetizados e do ligante livre.....	50
FIGURA 4.12 - Voltamograma cíclico do complexo Ru1 obtido em $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0,1M PTBA, $100 \text{ mV s}^{-1}$ ).....	52
FIGURA 4.13 - Gráfico do potencial de oxidação do $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ nos complexos Ru1, Ru2, Ru3 e Ru5 em função do valor de pKa do ligante bifosfínico. ....	56
FIGURA 4.14 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo Ru5, em DMSO.....	57
FIGURA 4.15 - Espectro do complexo Ru5 após a deconvolução.....	58
FIGURA 4.16 - Espectro de massa do complexo Ru5. ....	60
FIGURA 4.17 - Estrutura do ligante H2mq: 2-mercapto-4(3H)quinazolinona com a identificação do átomos de carbono e hidrogênio.....	61
FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o complexo Ru1 em Acetona- $\text{d}_6$ . ...	62
FIGURA 4.19 - Mapa de contorno de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) do complexo Ru1 em Acetona- $\text{d}_6$ . ....	63
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo Ru1 Acetona- $\text{d}_6$ . 64	
FIGURA 4.21 - Mapa de contorno de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru1 Acetona- $\text{d}_6$ . ....	65
FIGURA 4.22 - Mapa de contorno de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru1 Acetona- $\text{d}_6$ . ....	66



---

---

FIGURA 4.23 - Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo Ru1 em acetona/ $\text{D}_2\text{O}$ e em DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$ , e espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo precursor cis-[ $\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2$ ] em DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$ .....	67
FIGURA 4.24 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo Ru1 em acetona/ $\text{D}_2\text{O}$ , acetona/DMEM. Espectro do complexo Ru5 em metanol/ $\text{D}_2\text{O}$ . ....	69
FIGURA 4.25 - Gráfico de viscosidade para complexos Ru2-Ru5, cisplatina e tiazol laranja. ....	70
FIGURA 4.26 - Espectro de OCD CT-DNA na ausência e presença do complexo Ru5, em razões [Complexo]/[DNA] iguais a 0, 0.6, 0.125, 0.25.....	72
FIGURA 4.27 - Espectro de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença do complexo Ru5.....	73
FIGURA 4.28 - Gel de eletroforese em que MPM = marcador de peso molecular; DNA = plasmídeo pBR322 (30 $\mu\text{M}$ ) contendo 10% de DMSO; Ri= Razão molar complexo/DNA para os complexos Ru3-Ru5.....	74
FIGURA 4.29 - Supressão da fluorescência da HSA na ausência e presença do complexo Ru5 em diferentes concentrações. ....	75
FIGURA 4.30 - Efeito do complexo Ru3, em diferentes concentrações, na morfologia das células de melanoma humano, A-375, após 0 e 24 h de tratamento. ....	81
FIGURA 4.31 - (A) Efeito do complexo Ru3 na formação de colônias das não tumorais HaCat e tumorais A-375 e Representação gráfica do número de colônias em células (A) A-375 e (B) HaCat, em função da concentração. (* $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ ).....	83
FIGURA 4.32 - (A) Imagens representativas do efeito do complexo Ru3 na migração das células de melanoma A-375 (Aumento de 10x na objetiva). (B)	

Representação gráfica da porcentagem de migração após 24 h de tratamento.  
<sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo controle.....85

---

---

## RESUMO

“CITOTOXIDADE E MECANISMO DE AÇÃO DE COMPLEXOS Ru(II)/2-MERCAPTO-4(3H)QUINAZOLINONA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PELE”. Complexos bifosfínicos de rutênio combinados a ligantes mercapto tem apresentado baixos valores de IC<sub>50</sub> e bons índices de seletividade (IS) em diferentes linhagens tumorais estudadas, o que tem motivado o desenvolvimento de compostos de rutênio com esses ligantes. Diante disso, neste trabalho foram sintetizados cinco complexos: [RuCl(H2mq)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (Ru1), [Ru(2mq)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (Ru2), [Ru(2mq)(dppen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (Ru3), [Ru(2mq)(bipy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (Ru4) e [Ru(2mq)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (Ru5) (dppe: 1,2'- bis(difenilfosfina)etano; dppm: 1,1'- bis(difenilfosfina)metano; dppen: 1,2'- bis(difenilfosfina)eteno; bipy: 2,2'- bipyridina; H2mq ou 2mq: 2-mercapto-4(3H)quinazolinona). Os complexos foram caracterizados pelas técnicas de ressonância magnética nuclear 1D e 2D, condutância molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), voltametria cíclica, espectrometria de massa e difração de raios X de monocristal. A interação dos complexos com o DNA foi avaliada por meio das técnicas de viscosidade, dicroísmo circular, ensaio de competição com Hoechst e CT-DNA, e eletroforese em gel de agarose. Os complexos apresentaram interação fraca com esta biomolécula, sendo possivelmente pelos sulcos e eletrostática. Avaliou-se também a interação dos complexos com HSA, utilizando a técnica espectroscopia de fluorescência, que permitiu verificar que a interação dos complexos com esta biomolécula é moderada ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). A atividade citotóxica dos complexos foi avaliada nas linhagens tumorais B16-F10 (murino), A-375 (melanona humano) e linhagem não tumoral HaCat (queratinócitos humano). Os complexos foram

---

---

citotóxicos nas linhagens estudadas e apresentaram valores de  $IC_{50}$  inferiores aos obtidos para cisplatina (A-375:  $6,95 \pm 0,03$ ; B16-F10:  $148,11 \pm 5,96$ ). Devido ao maior valor de índice de seletividade obtido para o complexo Ru3 ( $IS_{A-375}$ : 4,61;  $IS_{B16-F10}$ : 2,66) este foi selecionado para dar continuidade à investigação quanto ao possível modo de ação. O complexo Ru3 foi capaz inibir a formação de colônias nas linhagens HaCat e A-375, com efeito mais acentuado na linhagem e A-375, além de modificar a morfologia desta célula após 24h em concentrações acima dos valores de  $IC_{50}$ . No ensaio de *Wound Healing*, foi observado que Ru3 é capaz de inibir a migração celular nas concentrações de 0,2 e 0,4  $\mu$ M.

---

---

**ABSTRACT**

"CYTOTOXICITY AND MECHANISM OF ACTION OF Ru(II)/2-MERCAPTO-4(3H)QUINAZOLINONE COMPLEXES IN SKIN CANCER CELLS". Ruthenium biphosphonic complexes combined with mercapto ligands have shown low IC<sub>50</sub> values and good selectivity indexes (SI) in different tumor lines studied, which has motivated the development of ruthenium compounds with these ligands. Therefore, in this work, five complexes were synthesized: [RuCl(H<sub>2</sub>mq)(dppm)<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>] (Ru1), [Ru(2mq)(dppe)<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>] (Ru2), [Ru(2mq)(dppen)<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>] (Ru3), [Ru(2mq)(bipy)<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>] (Ru4) e [Ru(2mq)(dppm)<sub>2</sub>PF<sub>6</sub>] (Ru5) (dppe: bis(diphenylphosphine)ethane; dppm: 1,1'-bis(diphenylphosphine)methane; dppen: 1,2'-bis(diphenylphosphine)ethene; bipy: 2,2'-bipyridine; H<sub>2</sub>mq or 2mq: 2-mercapto-4(3H)quinazolinone). The complexes were characterized by 1D and 2D nuclear magnetic resonance techniques, molar conductance, elemental analysis, absorption spectroscopy in the infrared region and ultraviolet-visible (UV-Vis) region, cyclic voltametry, mass spectrometry and single-crystal X-ray diffraction. The interaction of the complexes with DNA was evaluated by viscosity techniques, circular dichroism, competition assay with Hoechst and CT-DNA, and electrophoresis in agarose gel. The complexes showed weak interaction with this biomolecule, possibly by the grooves and electrostatic. The interaction of the complexes with HSA was also evaluated, using the fluorescence spectroscopy technique, which allowed to verify that the interaction of the complexes with this biomolecule is moderate ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). The cytotoxic activity of the complexes was evaluated in tumor lines B16-F10 (murine), A-375 (human melanone) and HaCat non-tumoral (human keratinocytes). The complexes were cytotoxic in the studied lines and presented lower IC<sub>50</sub> values than those cisplatin

---

---

(A-375:  $6.95 \pm 0.03$ ; B16-F10:  $148.11 \pm 5.96$ ). Because of the higher selectivity index value obtained for the Ru3 complex ( $SI_{A-375}$ : 4,61;  $SI_{B16-F10}$ : 2,66), it was selected to continue the investigation of the possible mode of action. The Ru3 complex inhibited the formation of colonies in the HaCat and A-375 cell lines, with more pronounced effect in A-375 and modified the morphology of this cell after 24 h at concentrations above the values  $IC_{50}$ . In the *Wound Healing* assay, it was observed that Ru3 inhibited cell migration at concentrations of 0,2 and 0,4  $\mu$ M.

---



---

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Câncer .....	1
1.2 - Câncer de Pele.....	2
1.3 - Compostos Inorgânicos na Terapia do Câncer .....	4
1.4 - Ligante Fosfínicos e Bipyridínicos .....	8
1.5 - Ligantes Mercapto.....	9
2 - OBJETIVOS.....	13
2.1 - Objetivo Geral.....	13
2.2 - Objetivos Específicos.....	13
3 - MATERIAS E MÉTODOS.....	15
3.1 - Sínteses dos Complexos Precursores .....	15
3.1.1 - Síntese do Complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ .....	15
3.1.2 - Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$ .....	15
3.1.3 - Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$ .....	16
3.1.4 - Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$ .....	16
3.1.5 - Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppen})_2]$ .....	17
3.1.6 - Síntese do Complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]$ .....	17
3.2 - Sínteses dos Complexos Contendo H <sub>2</sub> mq .....	18
3.2.1 - Síntese do Complexo $[\text{RuCl}(\text{H}_2\text{mq})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (Ru1) .....	18
3.2.2 - Síntese do Complexo $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ (Ru2) .....	18
3.2.3 - Síntese do Complexo $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppen})_2]\text{PF}_6$ (Ru3) .....	19
3.2.4 - Síntese do Complexo $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$ (Ru4).....	19
3.2.5 - Síntese do Complexo $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (Ru5).....	20
3.3 - Instrumentação .....	20
3.3.1 - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV) ....	20
3.3.2 - Condutância Molar .....	20

---

---

3.3.3 - Análise Elementar.....	21
3.3.4 - Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível (UV-Vis) 21	
3.3.5 - Eletroquímica.....	21
3.3.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	22
3.3.7 - Difração de raios X.....	22
3.3.8 - Espectrometria de massa.....	23
3.3.9 - Determinação da lipofilicidade (log <i>P</i> ).....	23
3.4 - Estudo de Estabilidade dos Complexos em Solução .....	24
3.5 - Interação dos Complexos com DNA .....	25
3.5.1 - Determinação da Concentração do DNA .....	25
3.5.2 - Medidas de viscosidade .....	25
3.5.3 - Ensaio de deslocamento do Hoechst.....	26
3.5.4 - Dicroísmo Óptico Circular (OCD) .....	27
3.5.5 - Eletroforese em gel de agarose .....	28
3.6 - Estudo de interação com HSA .....	29
3.7 - Ensaio Biológicos.....	31
3.7.1 - Linhagens e cultivo celular .....	31
3.7.2 - Análise da viabilidade celular.....	32
3.7.3 - Avaliação antiproliferativa .....	33
3.7.4 - Avaliação da Morfologia Celular .....	33
3.7.5 - Ensaio de Migração Celular.....	34
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 - Síntese e Caracterização dos complexos.....	35
4.1.1 - Sínteses dos complexos .....	35
4.1.2 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	37
4.1.3 - Difração de raios X.....	43
4.1.4 - Condutância Molar e Microanálise.....	49



---

---

4.1.5 - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho .....	50
4.1.6 - Eletroquímica .....	52
4.1.7 - Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível (UV-Vis) .....	56
4.1.8 - Espectrometria de Massa .....	59
4.1.9 - RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante (H2mq) e complexos .....	61
4.2 - Estudo de Estabilidade dos Complexos em Solução .....	66
4.3 - Estudo de Interação dos Complexos com DNA .....	69
4.3.1 - Viscosidade .....	69
4.3.2 - Dicroísmo Óptico Circular.....	71
4.3.3 - Ensaio de Deslocamento do Hoechst.....	72
4.3.4 - Eletroforese em gel de agarose .....	73
4.4 - Estudo de Interação com HSA .....	75
4.5 - Ensaio Biológicos .....	79
4.5.1 - Viabilidade celular e lipofilicidade.....	79
4.5.2 - Ensaio de Morfologia Celular.....	80
4.5.3 - Avaliação Antiproliferativa .....	82
4.5.4 - Avaliação da Migração Celular .....	84
5 - CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE.....	97

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Câncer

O câncer é uma doença de causa multifatorial. Estima-se que cerca de 80-90% dos fatores que desencadeiam o câncer são provenientes de causas externas, onde inclui-se a má alimentação, o consumo de bebidas alcoólicas, a exposição solar sem a devida proteção, tabagismo, a obesidade, e apenas 10-20% das causas de câncer tem a sua origem em fatores internos (Figura 1.1) como fatores genéticos, hereditários, familiares<sup>1</sup>.

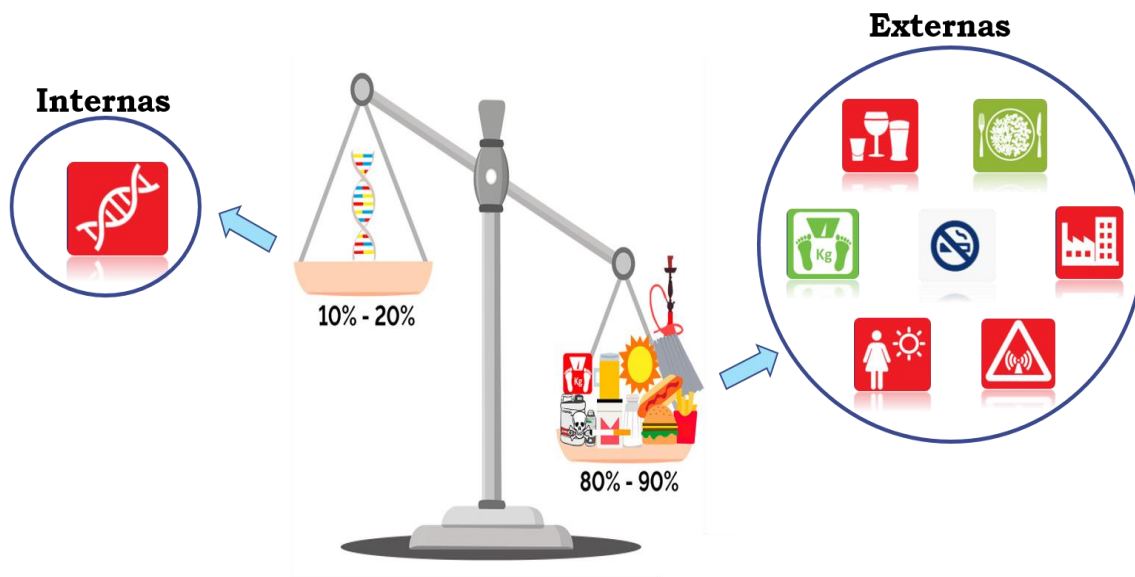


FIGURA 1.1- Causas do câncer. Adaptada do Instituto Nacional do Câncer (INCA)<sup>1</sup>.

O termo “câncer” é utilizado para designar um grupo de doenças que tem em comum o crescimento desordenado das células, capaz de invadir qualquer

parte do corpo<sup>2</sup>. O crescimento das células no organismo é seguido pela divisão celular, para que novas células sejam formadas, e posterior morte, quando envelhecidas, para dar lugar a novas células, mas pode ocorrer um erro neste processo, dando origem a células anormais, que não deveriam existir, capazes de formar tumores, benignos ou malignos<sup>3</sup>. As células anormais, que formam os tumores, são células que sofreram uma alteração no seu DNA e começaram a receber instruções incorretas para as suas atividades<sup>1</sup>.

O diagnóstico precoce dessa doença aumenta a possibilidade de melhor resposta ao tratamento, que pode resultar em maior probabilidade de sobrevida<sup>2</sup>. O tratamento para o paciente com câncer depende do tipo de tumor, da localização e estágio da doença. Esse tratamento pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea, sendo necessário, em muitos casos, a combinação de mais de um tipo de tratamento<sup>1</sup>.

## **1.2 - Câncer de Pele**

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no mundo, sendo mais frequente em pessoas de pele branca e menos frequente em pessoas de pele negra<sup>4</sup>. Há alguns fatores que aumentam o risco para o desenvolvimento desta doença, como o histórico familiar ou pessoal de câncer de pele e ter pele clara com cabelos loiros ou ruivos<sup>5</sup>.

O câncer de pele é causado, principalmente, por excessiva exposição solar (raios ultravioletas - UV), especialmente na infância e adolescência<sup>6</sup>. A radiação UV é subdividida em UVA (320-400nm), UVB (230-320nm) e UVC (100-290 nm)<sup>7</sup>. A radiação UVC é a mais danosa a pele, mas não atravessa a camada de ozônio, a UVA, que tem maior comprimento de onda e menor energia,

provoca ressecamento e o envelhecimento precoce da pele, enquanto a radiação UVB, apresenta menor comprimento de onda e maior energia que os raios UVA, além desses danos já mencionados, causa também o câncer de pele<sup>8</sup>.

Esse tipo de câncer se desenvolve na epiderme, sendo classificado em melanoma, quando originado nas células que produzem melanina, ou não melanoma, quando surge em células basais ou células escamosas<sup>9,5</sup>.

A estimativa para o ano de 2022, no Brasil, foi de 220.490 novos casos de câncer de pele não melanoma e 8.980 novos casos para o tipo melanoma. O número de mortes por câncer de pele correspondeu a 2.653 para pacientes com o tipo não melanoma e 1.923 para melanoma em 2020, de acordo com dados apresentados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA)<sup>10,6</sup>. Os dados estatísticos foram divididos por sexo e estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1.1 - Estatísticas para o câncer de pele melanoma e não melanoma.

		Homens	Mulheres
Melanoma	Estimativa de novos casos	4.640	4.340
	Números de morte	1.120	803
Não melanoma	Estimativa de novos casos	101.920	118.570
	Números de morte	1.534	1.119

O câncer de pele corresponde a cerca de 30% dos tumores malignos no Brasil, e cerca de 3% é atribuído ao melanoma<sup>9</sup>. Apesar de mais raro, o melanoma é o tipo mais grave dessa doença, devido a possibilidade do desenvolvimento de metástase, é um câncer que pode matar, mas tem cura, se detectado precocemente<sup>10</sup>.

Os principais sintomas do câncer de pele são manifestados em forma de manchas que coçam, descamam ou sagram; pintas ou sinais que mudam de tamanho, forma e cor; e feridas que demoram a cicatrizar<sup>11</sup>. No estágio inicial da doença o tratamento mais indicado é a retirada da lesão por meio da cirurgia, e em estágios mais avançados também podem ser indicados outros tipos de tratamento, como quimioterapia e radioterapia<sup>7</sup>.

### 1.3 - Compostos Inorgânicos na Terapia do Câncer

A descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], foi um marco para a Química Medicinal e impulsionou o estudo dos complexos metálicos na terapia contra o câncer, visto que até então as pesquisas eram voltadas apenas a moléculas orgânicas e produtos naturais<sup>12</sup>.

De acordo com estudos sobre o mecanismo de ação da cisplatina, para que sua atividade citotóxica seja observada, este complexo passa por reação de hidrólise no meio intracelular, onde a concentração de íons cloreto é ~ 4 mmol/L, cerca de vinte vezes menor do que no meio extracelular, e em seguida liga-se covalentemente a dupla hélice do DNA por meio dos átomos de nitrogênio da guanina ou adenina<sup>13</sup> (Figura 1.2). Esse complexo liga-se ao DNA, preferencialmente, por meio da guanina, pois a possibilidade de ligação de hidrogênio entre o grupo NH<sub>3</sub> com o oxigênio desta base nitrogenada, torna essa interação mais estável<sup>11</sup>. Ao ligar-se à fita de DNA, a cisplatina distorce a dupla hélice desta biomolécula, comprometendo os processos de transcrição e replicação, e conseqüentemente o desenvolvimento das células tumorais<sup>14</sup>.

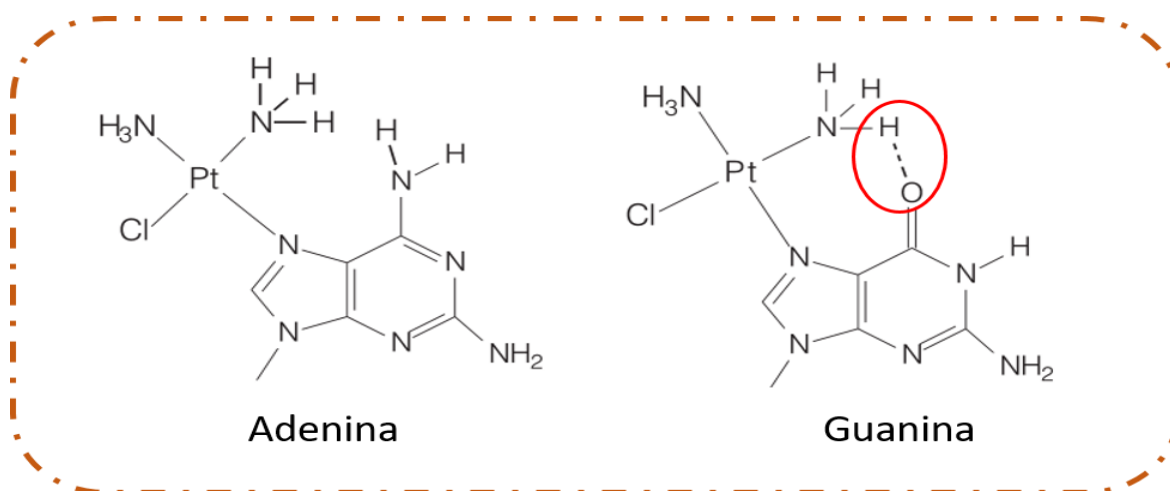


FIGURA 1.2– Representação das interações Pt-bases nitrogenadas do DNA. Adaptada de Fontes, César e Beraldo<sup>12</sup>.

A atividade anticancerígena da cisplatina é bem estabelecida para vários tipos de câncer. Contudo, alguns obstáculos foram observados com o uso da cisplatina, principalmente, relacionados à efeitos colaterais, dentre eles podemos mencionar: neurotoxicidade, nefrotoxicidade, toxicidade renal, toxicidade ao trato intestinal<sup>12</sup>. Foram desenvolvidos análogos à cisplatina com o objetivo de minimizar esses efeitos colaterais, porém muitos deles se mantiveram<sup>15</sup>. Iniciou-se então uma busca por novos complexos de coordenação ou organometálicos como alternativas de fármacos ao uso da cisplatina<sup>14</sup>.

Dentre os complexos descritos na literatura, destacam-se os de rutênio como possíveis alternativas ao uso da cisplatina. Na classe de compostos de rutênio (III) estão o (ImH)*trans*-[Ru(Cl)<sub>4</sub>(S-DMSO)(Im)], (NAMI-A), (ImH)*trans*-[Ru(Cl)<sub>4</sub>(Im)<sub>2</sub>] (KP418), (InH)*trans*-[Ru(Cl)<sub>4</sub>(In)<sub>2</sub>] (KP1019), Na[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>] (NKP1339)<sup>14,16,17,18</sup> (Figura 1.3).

A atividade antitumoral do complexo KP418 foi observada, quando avaliada em camundongos, contra leucemia P388 e melanoma B16, além da redução de tumores de câncer colorretal<sup>16</sup>. O seu análogo, KP1019, menos tóxico, apresentou um resultado melhor do que KP418, com inibição superior a 90% do crescimento tumoral, e posteriormente esse complexo ganhou uma versão mais solúvel, o NKP1339<sup>17,16</sup>. O NAMI-A, estruturalmente similar ao KP418, apesar de não apresentar efeito citotóxico *in vitro*, foi um complexo que apresentou altas propriedades antimetastáticas<sup>18</sup>. O NKP1339, também conhecido como BOLD-100, está atualmente na fase de testes clínicos<sup>19</sup>.

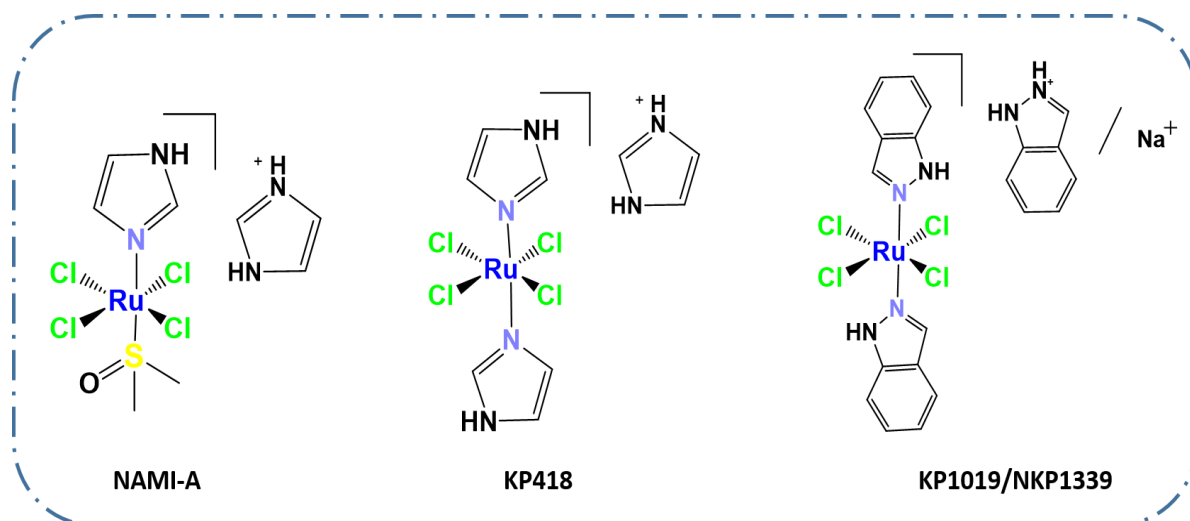


FIGURA 1.3 - Complexos de rutênio como possíveis quimioterápicos.

Outros complexos de rutênio que tem ganhado destaque são os complexos em que há uma combinação deste centro metálico com bifosfinas e ligantes como as mercaptos, por exemplo. Muitos destes desenvolvidos no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), situado no Departamento de Química da UFSCar, sob coordenação do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. De modo geral, são complexos citotóxicos, *in vitro*, em diferentes linhagens estudadas, com baixos valores de IC<sub>50</sub> (concentração capaz de

inibir 50% da viabilidade celular) e bons índices de seletividade (IS) (Figura 1.4)<sup>20,21</sup> que os tornam promissores. Avalia-se também a interação dos complexos com biomoléculas e são realizados ensaios para verificar as propriedades biológicas destes complexos nas linhagens de interesse<sup>22</sup>.

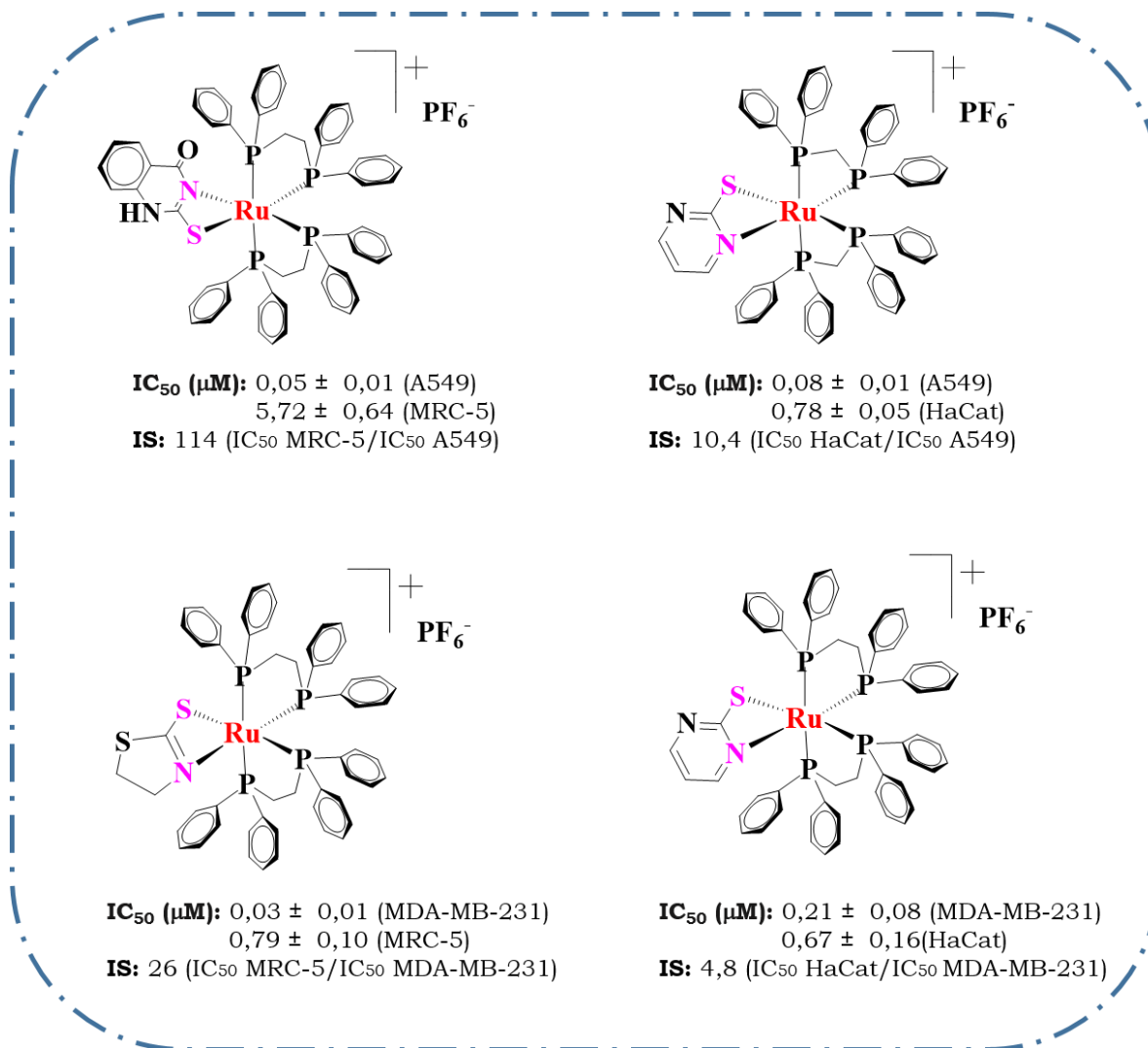


FIGURA 1.4 - Complexos desenvolvidos no LERCI e seus respectivos valores de IC<sub>50</sub> e IS obtidos após 48 h.



## 1.4 - Ligante Fosfínicos e Bipiridínicos

As fosfinas são ligantes neutros que possuem um par de elétrons isolado sobre o átomo de fósforo que pode ser usado para realizar ligação  $\sigma$  com o metal, atuando como uma base de Lewis<sup>23, 24</sup>, mas também possuem orbitais vazios ( $3p\sigma^*d\pi$ ) que podem interagir com orbitais  $d$  preenchidos do centro metálico por meio de uma ligação  $\pi$ , recebendo densidade eletrônica retrodoada do metal<sup>25</sup> (Figura 1.5). Portanto, são ligantes  $\sigma$  doadores  $\pi$  e aceptores.

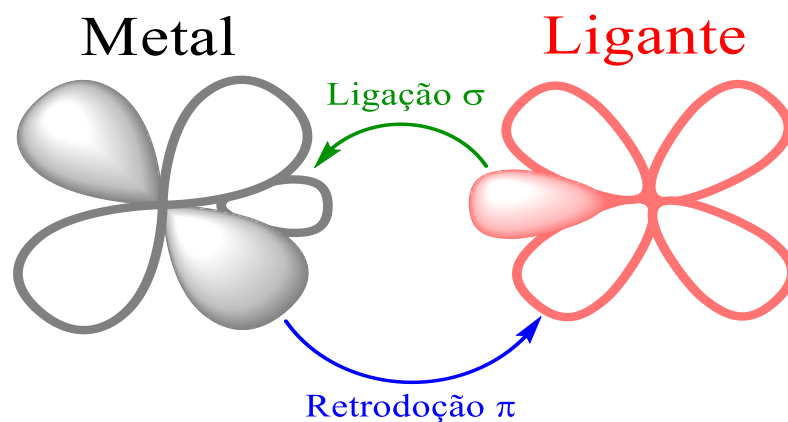


FIGURA 1.5 – Representação da ligação  $\sigma$  e  $\pi$  entre o metal e os ligantes fosfínicos.

A habilidade doadora dos ligantes fosfínicos pode variar de acordo com os grupos substituintes. Substituintes como flúor ou cloro, retiram densidade eletrônica do átomo de fósforo tornando-o pobre em carga negativa e conseqüentemente o seu par de elétrons é menos prontamente doado<sup>23</sup>. Substituintes menos eletronegativos, como o hidrogênio, tornam o átomo de

---

---

fósforo um doador  $\sigma$  mais forte<sup>24</sup>, por isso  $\text{PF}_3$  é uma base de Lewis mais fraca que  $\text{PH}_3$ <sup>23</sup>.

Na literatura<sup>26</sup> são mencionadas algumas características interessantes dos ligantes fosfínicos, dentre elas estão: (a) a habilidade de estabilizar centros metálicos em diferentes estados de oxidação; (b) o efeito *trans* labilizante, que pode gerar sítios vagos para a coordenação e ser interessante na atividade citotóxica; (c) o aumento da lipofilicidade, que pode contribuir na permeabilidade da membrana celular.

Na classe de ligantes bipyridínicos, destaca-se a 2,2'-bipyridina com habilidade também  $\pi$  aceptor, pois possui orbitais  $\pi^*$  vacantes capazes de receber densidade eletrônica retrodoada do centro metálico, e possuem um par de elétrons isolados sobre cada átomo de nitrogênio que pode ser utilizado para realização da ligação  $\sigma$  metal-ligante, é também um ligante  $\sigma$  doador e  $\pi$  aceptor<sup>23</sup>.

## 1.5 - Ligantes Mercapto

A classe de ligantes mercapto, por apresentar um átomo duro (N) e um átomo mole (S), tem a possibilidade de se coordenar a centros metálicos duros e moles<sup>27</sup>. São ligantes que exibem um tautomerismo associado ao grupo tioamida ( $-\text{N}-\text{C}=\text{S}$ ), quando neutro nas formas de tiol e tiona, quando aniônicos, por meio da desprotonação, na forma de tiolatos<sup>28, 27</sup> (Figura 1.6).

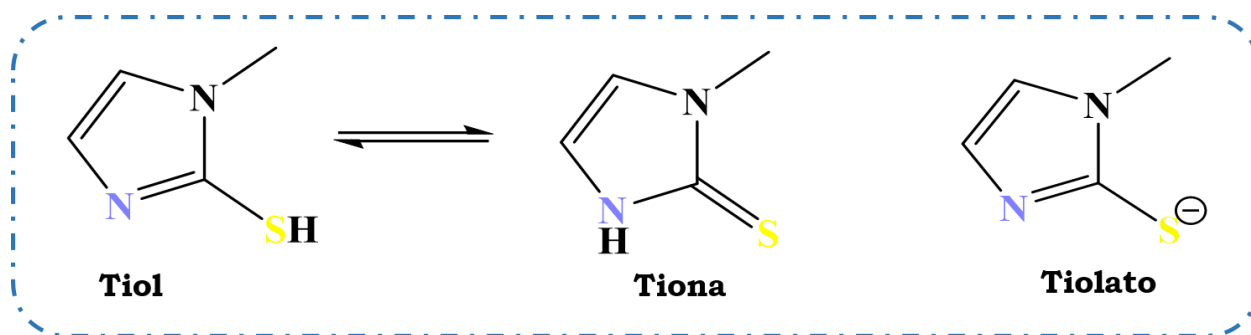


FIGURA 1.6 – Tautomerismo do grupo tioamida, e a forma tiolato.

As aplicações clínicas das tioamidas, como antituberculose, antitumoral, antibacteriana, despertam o interesse pela pesquisa nesse grupo de compostos<sup>29</sup>. A 2-mercapto-4(3H)quinazolinona dissubstituída, por exemplo, tem sido relatada na literatura por apresentar potente atividade anti-inflamatória e analgésica<sup>30</sup>. Complexos de prata com a presença desta mercapto (2-mercapto-4(3H)quinazolinona), apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas<sup>31</sup>.

Uma série de complexos de rutênio contendo duas bifosfinas, neste caso a 1,2-*bis*(difenilfosfina)etano (dppe), com ligantes mercapto foram sintetizados por Silva *et al.*<sup>21</sup> Todos os complexos foram citotóxicos nas linhagens avaliadas, com baixos valores de IC<sub>50</sub> e altos índices de seletividade (IS), especialmente na linhagem de câncer de pulmão (A549). O complexo com a 2-mercapto-4(3H)quinazolinona (Figura 1.7) foi o que apresentou o maior IS (>100) dentro da série, por isso foi escolhido para utilização neste projeto, em combinação com duas dppe, ou outras duas bifosfinas, ou duas bipyridinas, para avaliar se o complexo já relatado por Silva *et al.*<sup>21</sup> e os novos compostos serão citotóxicos e seletivos em linhagens de câncer de pele: B16-F10 (murino), A-375 (melanona humano).

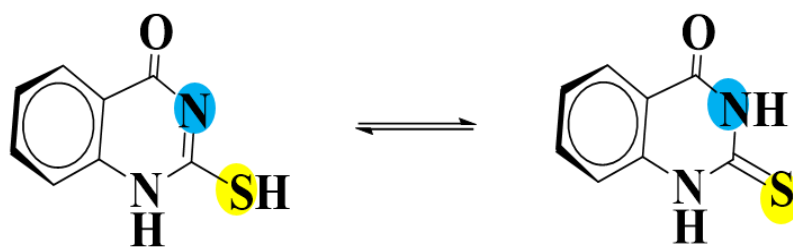


FIGURA 1.7 – Estrutura do ligante 2-mercapto-4(3H)quinazolinona e tautomerismo do grupo tioamida.

Esse ligante (2-mercapto-4(3H)quinazolinona), no complexo, apresenta átomos não coordenados ao metal, que podem interagir com biomoléculas presentes no meio biológico, por meio de ligações de hidrogênio, por exemplo, e auxiliar na atividade citotóxica dos complexos.



---

---

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar complexos de rutênio (II) contendo na esfera de coordenação duas bifosfinas ou duas bipyridinas e o ligante 2-mercapto-4(3H)quinazolinona, e investigar a atividade anticancerígena dos complexos em linhagens de câncer de pele.

### 2.2 - Objetivos Específicos

(a) Sintetizar complexos de Rutênio (II), com fórmula geral  $[\text{Ru}(\text{N-S})(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$ ,  $[\text{RuCl}(\text{S})(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{N-S})(\text{N-N})_2]\text{PF}_6$  ((em que N-S ou S= H2mq: 2-mercapto-4(3H)quinazolinona; Cl = cloreto; P-P = dppe: 1,2'-bis(difenilfosfina)etano; dppm: 1,1'-bis(difenilfosfina)metano; dppen: 1,2'-bis(difenilfosfina)eteno; N-N = 2,2'-bipyridina)).

(b) Caracterizar os complexos pelas técnicas de ressonância magnética nuclear 1D e 2D, condutância molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), voltametria cíclica, espectrometria de massa e difração de raios X de monocristal.

(c) Avaliar a interação dos complexos com o DNA por meio técnicas de viscosidade, dicroísmo circular, ensaio de competição com Hoechst e CT-DNA, e eletroforese em gel de agarose.

**(d)** Avaliar a interação dos complexos a albumina (HSA) via supressão de fluorescência;

**(e)** Avaliar a citotoxicidade dos complexos frente as linhagens tumorais B16-F10 (murino), A-375 (melanona humano) e linhagem não tumoral HaCat (linhagem não tumoral de queratinócitos humano).

**(f)** Avaliar o efeito dos complexos na morfologia e migração celular, e na formação de colônias.

---

---

## 3 - MATERIAS E MÉTODOS

### 3.1 - Sínteses dos Complexos Precursores

#### 3.1.1 - Síntese do Complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$

Para a síntese do complexo  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ <sup>32</sup>, adicionou-se 1,00 g (4,82 mmol) de  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  em um balão de duas bocas contendo em 200 mL de metanol previamente desaerado. A reação foi mantida em agitação, refluxo e sob atmosfera inerte por 15 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada e adicionou-se 5,75g (21,92 mmol) de trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ). O sistema foi mantido sob as mesmas condições por mais 3 horas. Um sólido marrom foi obtido, filtrado, lavado com metanol e seco à vácuo. Rendimento: 3,30g (3,44 mmol, 72%).

#### 3.1.2 - Síntese do Complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$

Conforme procedimento descrito na literatura<sup>33</sup>, o complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$  foi sintetizado a partir do  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Em um balão de duas bocas adicionou-se 0,50 g (2,41 mmol) de  $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  em 5 mL de dimetilsulfóxido que foi mantido sob agitação e refluxo por 15 minutos. Em seguida, o sistema foi resfriado a temperatura ambiente e adicionou-se 20 mL de acetona. Um precipitado amarelo foi formado que foi lavado com acetona e éter etílico. Rendimento: 0,75 g (1,55 mmol, 64%).



---

---

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

Conforme metodologia descrita na literatura<sup>34</sup>, foi obtido o complexo *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] a partir de 0,50 g (2,41 mmol) de RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O e 1,91 g (4,99 mmol) de dppm em 30 mL de etanol previamente desaerado. A reação foi mantida em agitação, refluxo e atmosfera inerte por 3 horas. Obteve-se um precipitado amarelo, que foi separado por filtração e lavado com etanol e éter etílico desaerados. Para obter o complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] adicionou-se 0,50 g (0,53 mmol) do *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] em 30 mL de dicloroetano previamente desaerado. O sistema foi mantido em agitação, refluxo e atmosfera inerte por aproximadamente 10 horas. Em seguida, o volume foi reduzido e adicionou-se 30 mL de hexano. Rendimento: 0,47 g (0,50 mmol, 95%).

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

A síntese do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppe)<sub>2</sub>] foi realizada a partir do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>], conforme procedimento descrito na literatura<sup>35</sup>. Adicionou-se 1,0 g (2,06 mmol) de *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] e 1,72 g (4,32 mmol) de 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) em um balão de duas bocas contendo 30 mL de diclorometano desaerado. A reação permaneceu em agitação e atmosfera inerte durante 5 horas à temperatura ambiente, em seguida o volume foi reduzido a aproximadamente 2 mL e adicionou-se hexano para a precipitação de um sólido amarelo. O precipitado foi filtrado, lavado com hexano e em seguida solubilizado em uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : hexano (1:6) e mantido a -5°C para a cristalização.

---

---

Após 48 horas, os cristais foram filtrados e secos à vácuo. Rendimento: 1,32 g (1,36 mmol, 68%).

### 3.1.5 - Síntese do Complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppen)<sub>2</sub>]

O complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppen)<sub>2</sub>] foi obtido a partir do precursor [RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] conforme descrito na literatura<sup>36</sup>. Em um balão de duas bocas adicionou-se 1,0 g (1,04 mmol) de [RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] e 1,1 g (2,61 mmol) de 1,2'-bis(difenilfosfina)eteno (dppen) em etanol previamente desaerado. A reação foi mantida sob agitação, refluxo e atmosfera inerte por 3h. Após esse período, foi obtido um sólido amarelo que foi separado por filtração, lavado com etanol a quente e éter etílico desaerados. Esse sólido amarelo é uma mistura dos isômeros *cis* e *trans*, que foi separada por diferença de solubilidade em CHCl<sub>3</sub> e posterior filtração, onde o isômero *cis* é retido no filtro. Rendimento do isômero *cis*: 0,35 g (0,36 mmol, 34%).

### 3.1.6 - Síntese do Complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub>]

O complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub>] foi obtido segundo procedimento descrito na literatura<sup>37</sup>. Em um balão de duas bocas adicionou-se 1,95 g (7,45 mmol) de RuCl<sub>3</sub>.nH<sub>2</sub>O, 2,34 g (15 mmol) de bipyridina e 2,1 g (0,5 mmol) de LiCl em 12,5 mL de dimetilformamida. A reação foi mantida em agitação e refluxo por 8h. Após esse período, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e adicionou-se 62,5 mL de acetona e essa solução foi resfriada a 0 °C. A solução vermelho-violeta foi filtrada, observou-se um sólido verde escuro que foi lavado 3x com 6,25

---

---

mL de água destilada e 3x com 6,25 mL de éter etílico e seco à vácuo. Rendimento: 2,350g (4,85 mmol, 65%).

## 3.2 - Sínteses dos Complexos Contendo H2mq

### 3.2.1 - Síntese do Complexo $[\text{RuCl}(\text{H2mq})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (Ru1)

Adicionou-se 0,018 g (0,10 mmol) do ligante em um tubo Schlenk contendo uma mistura metanol/diclorometano desaerada (5:1, 24 mL). O sistema foi mantido em agitação e refluxo. Após completa solubilização do ligante, foram adicionados 0,100 g (0,10 mmol) do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$  e 0,019 g (0,10 mmol) de  $\text{KPF}_6$ . O sistema foi mantido sob as mesmas condições por mais 1h, em seguida o volume foi reduzido à aproximadamente 2 mL. Adicionou-se éter para a precipitação de um pó amarelo, que foi filtrado e lavado com água destilada, éter etílico, e seco sob vácuo. Rendimento: 0,098 g (0,080 mmol, 76%).

### 3.2.2 - Síntese do Complexo $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ (Ru2)

A síntese deste complexo está relatada na literatura e foi realizada conforme descrição de Silva<sup>38</sup>. Adicionou-se 0,022 g (0,12 mmol) do ligante e 32  $\mu\text{L}$  de trietilamina em um tubo Schlenk contendo uma mistura metanol/diclorometano desaerada (1:1, 30 mL). Após 10 minutos, foram adicionados 0,100 g (0,10 mmol) do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$  e 0,024 g (0,13 mmol) de  $\text{KPF}_6$ . O sistema foi mantido em agitação e refluxo durante 12 horas, em seguida o volume foi reduzido a aproximadamente 2 mL. Adicionou-se éter para a

---

---

precipitação de um pó amarelo, que foi filtrado e lavado com água destilada, éter etílico, e seco sob vácuo. Rendimento: 0,094 g (0,077 mmol, 75%).

### 3.2.3 - Síntese do Complexo [Ru(2mq)(dppen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (Ru3)

Adicionou-se 0,014 g (0,14 mmol) do ligante e 32 µL de trietilamina em um tubo Schlenk contendo uma mistura metanol/diclorometano desaerada (1:1, 30 mL). Após 10 minutos, foram adicionados 0,100 g (0,10 mmol) do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppen)<sub>2</sub>] e 0,028 g (0,15 mmol) de KPF<sub>6</sub>. O sistema foi mantido em agitação e refluxo por 12 horas, em seguida o volume foi reduzido a aproximadamente 2 mL. Adicionou-se água destilada para a precipitação de um pó amarelo, que foi filtrado e lavado com água destilada, éter etílico, e seco sob vácuo. Rendimento: 0,095 g (0,078 mmol, 76%).

### 3.2.4 - Síntese do Complexo [Ru(2mq)(bipy)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> (Ru4)

Adicionou-se 0,044 g (0,24 mmol) do ligante em um balão de duas bocas contendo uma mistura etanol/água (1:1, 32mL). O sistema foi mantido sob agitação e refluxo até a completa solubilização do ligante. Em seguida, foram adicionados 0,100 g (0,20 mmol) do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub>] e 0,114 g (0,61 mmol) de KPF<sub>6</sub>. O sistema foi mantido sob as mesmas condições até a precipitação de um sólido vermelho que foi separado por filtração. O complexo foi lavado com 3 mL de água destilada e 3 mL de éter etílico, e seco sob vácuo. Rendimento: 0,135 g (0,184 mmol, 89%).

---

---

### 3.2.5 - Síntese do Complexo $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (Ru5)

Em um tubo Schlenk, contendo 20 mL de metanol desaerado adicionou-se 0,022 g (0,12 mmol) do ligante e 0,011 g (0,13 mmol) de bicarbonato de sódio. O sistema foi mantido em agitação e refluxo por 1h, em seguida foram adicionados 0,100 g (0,10 mmol) do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$  e 0,023 g (0,12 mmol) de  $\text{KPF}_6$ . Manteve-se o sistema sob as mesmas condições por mais 24h. Após esse período, o volume foi reduzido a aproximadamente 2 mL e adicionou-se água destilada para a precipitação de um sólido amarelo. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 0,100 g (0,083 mmol, 79%).

## 3.3 - Instrumentação

### 3.3.1 - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

As amostras sólidas foram diluídas em KBr e as pastilhas preparadas foram analisadas em espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB - 102 na região compreendida entre 4000 e 300  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.2 - Condutância Molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas utilizando-se um condutivímetro MICRONAL, modelo B-330, equipado com célula de Pt. As

soluções com concentrações de 1mM dos complexos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) ou diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

### **3.3.3 - Análise Elementar**

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram determinados em um analisador CHNS modelo EA 1108 da FISONs, na Central Analítica do Departamento de Química da UFSCar.

### **3.3.4 - Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram obtidos em DMSO ou diclorometano utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e um espectrofotômetro HEWLETT PACKARD DIODE ARRAY-8452A, na região compreendida entre 200 e 800 nm. A deconvolução das bandas foi realizada utilizando o *software* MatLab.

### **3.3.5 - Eletroquímica**

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em potenciostato/galvanostato EGeG Princeton Applied Research Model 273A, em uma célula eletroquímica de vidro com sistema de três eletrodos: um eletrodo de Ag/AgCl (eletrodo de referência), um eletrodo de platina (contra-eletrodo) e um

---

---

eletrodo de trabalho, imersos em uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA, Fluka Chemica) em diclorometano.

### 3.3.6 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos no equipamento Bruker 9,4 Tesla modelo NanoBay, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. Na obtenção dos espectros de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} utilizou-se um solvente não deuterado na presença de um tubo capilar com água deuterada (D<sub>2</sub>O). Os experimentos de RMN de 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}) e 2D (COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HSQC e HMBC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C)) foram realizados utilizando acetona ou DMSO deuterados.

### 3.3.7 - Difração de raios X

Foram obtidos os cristais dos complexos por evaporação lenta dos seguintes solventes: Ru1 em acetona, Ru2 em diclorometano/metanol, Ru4 em acetona/metanol, Ru5 em metanol, com razão 2:1 (v/v) para as misturas.

As medidas de difração de raios X de monocristais foram realizadas pelo Dr. João Honorato e Dr. Javier Ellena no Instituto de Física de São Carlos. Os dados foram coletados em um difratômetro Rigaku XtaLAB Mini (ROW) ou difratômetro XtaLAB Synergy, Dualflex, HyPix, com radiação MoK $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073$ ). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos com o programa SHELXT<sup>39</sup>, e o refinamento foi realizado através do programa SHELXL<sup>40</sup> feito

---

---

pelo método dos mínimos quadrados. Os dados cristalográficos e as estruturas dos complexos foram geradas pelo programa OLEX<sup>41</sup>.

### 3.3.8 - Espectrometria de massa

Para esta técnica foi separado 1mg de cada complexo. A amostra foi solubilizada em 1000  $\mu\text{L}$  de acetonitrila (ACN, grau LC-MS), posteriormente diluída para a concentração de 5 ppm. Foi realizada uma infusão direta, utilizando como fase móvel Água (solvente A, 0,1 % de ácido fórmico) e ACN (solvente C com 0,1 % de ácido fórmico), no modo isocrático e na proporção de 10:90 v/v respectivamente. A vazão da fase móvel foi de 0.300 mL  $\text{min}^{-1}$  e o volume de injeção foi de 3  $\mu\text{L}$ .

A análise qualitativa foi realizada usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo, sendo empregado os seguintes parâmetros para a ionização: O erro (em ppm) foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS, com uma taxa de varredura 3 espectros  $\text{s}^{-1}$  e processados pelo software Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00.

Todos os experimentos de espectrometria de massas foram realizados pelo MSc. Carlos André no Departamento de Química da UFSCar.

### 3.3.9 - Determinação da lipofilicidade ( $\log P$ )



---

---

A lipofilicidade dos compostos foi determinada por meio do método *shake-flash*<sup>42</sup>. Inicialmente, os compostos foram solubilizados em 50  $\mu\text{L}$  de DMSO, adicionou-se 975  $\mu\text{L}$  de n-octanol e 975  $\mu\text{L}$  de água. As amostras foram incubadas a 1000 rpm por 18 horas à 37°C. Em seguida, foram centrifugadas a 500 rpm por 5 minutos. Ocorreu então a separação das fases (aquosa e orgânica), e a concentração dos complexos em cada fase foi determinada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível. O valor do  $\log P$  foi calculado utilizando a equação:

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

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

### 3.4 - Estudo de Estabilidade dos Complexos em Solução

Os estudos de estabilidade dos complexos foram realizados em DMSO ou acetona, e em DMSO/meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) ou acetona/DMEM, numa proporção de 90% do solvente utilizado e 10% de DMEM, pelo acompanhamento dos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  nos tempos de 0h, 24h e 48h.

Para o complexo Ru4, em que não há fosfinas na esfera de coordenação, foram registrados espectros de  $^1\text{H}$  em DMSO nos mesmos tempos. O estudo de estabilidade para este complexo em DMSO/meio de cultura celular RPMI sem fenol (*Roswell Park Memorial Institute*) foi realizado por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) nos tempos de 0h, 24h e 48h.

---

---

## 3.5 - Interação dos Complexos com DNA

### 3.5.1 - Determinação da Concentração do DNA

A solução de DNA (ácido desoxirribonucleico) foi preparada pela dissolução de 20mg de CT-DNA (*DeoxyriboNucleic Acid sodium salt from Calf Thymus*, Sigma-Aldrich®) em 10mL de tampão Trisma-HCl (0,5 mM Tris-base, 4,5 mM de Tris-HCl e 50 mM NaCl, pH 7,4). A concentração foi determinada por UV-Vis, empregando o valor da absorbância e da absortividade molar do DNA em 260nm ( $\epsilon = 6600 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ) e do caminho óptico ( $b = 1\text{cm}$ ), conforme a lei a Lambert-Beer:  $A_{260} = \epsilon_{260} \times b \times C$ .

### 3.5.2 - Medidas de viscosidade

As soluções para as medidas de viscosidade foram preparadas inicialmente na ausência dos complexos utilizando 1600  $\mu\text{L}$  de DMSO (40%) e 2400  $\mu\text{L}$  de tampão Trisma-HCl. Foi preparada também uma solução contendo DNA (80  $\mu\text{M}$ ), o mesmo volume de DMSO (1600  $\mu\text{L}$ ) e tampão Trisma-HCl, perfazendo um volume total de 4000  $\mu\text{L}$ .

As soluções na presença dos complexos (ou tiazol) foram preparadas variando de forma crescente a concentração dos compostos em DMSO de 5  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$  (20  $\mu\text{L}$  a 160  $\mu\text{L}$ ), seguida pela adição de DMSO, até atingir um volume de 1600  $\mu\text{L}$  deste solvente. Manteve-se fixa a concentração do DNA (80  $\mu\text{M}$ ) e adicionou-se tampão Trisma-HCl até completar o volume final de 4000  $\mu\text{L}$ . O

---

---

tiazol foi utilizado como padrão de intercalação e a cisplatina como padrão de interação covalente com o DNA.

As medidas foram realizadas em banho termostático a 25,0 °C ( $\pm 0,3$  °C), em um viscosímetro de Ostwald acoplado. O tempo de escoamento de cada solução foi medido em quintuplicata em cronômetro digital. Utilizou-se a média das quintuplicatas para realizar o cálculo da viscosidade do DNA, na ausência e presença dos compostos. Os dados são apresentados como [composto]/[DNA] vs  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ , e os cálculos para a obtenção dos valores de  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  foram realizados conforme equação:

$$\eta/\eta_0 = (t - t_0) / (t_{\text{DNA}} - t_0)$$

onde,

$\eta$  = representa a viscosidade do DNA na presença do composto;

$\eta_0$  = representa a viscosidade DNA na ausência do composto;

$t$  = o tempo de escoamento da solução do DNA na presença do complexo em DMSO (40%) e Tampão Trisma-HCl;

$t_0$  = o tempo de escoamento da solução tampão Trisma-HCl e DMSO;

$t_{\text{DNA}}$  = o tempo de escoamento da solução do DNA em Trisma-HCl e DMSO na ausência dos complexos<sup>43</sup>.

### 3.5.3 - Ensaio de deslocamento do Hoechst

Determinou-se a concentração do Hoechst 33258 e do DNA por UV-Vis. O cálculo da concentração do Hoechst foi realizado empregando o valor da absorbância e da absorvidade molar do Hoechst em 344nm ( $\epsilon = 46000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

---

---

L) e do caminho óptico ( $b = 1\text{cm}$ ), conforme a lei a Lambert-Beer:  $A_{344} = \epsilon_{344} \times b \times C$ . Posteriormente, preparou-se 10 mL de uma solução estoque DNA-Hoechst em Trisma-HCl com concentrações de 100  $\mu\text{M}$  de DNA e 5,0  $\mu\text{M}$  de Hoechst.

Em diferentes microtubos de 1500 $\mu\text{L}$  foram adicionadas alíquotas crescentes (5-40 $\mu\text{L}$ ) dos complexos em DMSO, o volume de DMSO foi completado até atingir 100 $\mu\text{L}$  (10%). Em seguida, 900 $\mu\text{L}$  da solução estoque DNA-Hoechst foram transferidos para cada microtubo perfazendo um volume total de 1000  $\mu\text{L}$ . Em um dos microtubos adicionou-se apenas DMSO na ausência dos complexos e a solução estoque DNA-Hoechst. As soluções foram incubadas a 25°C por 30 min.

Três alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada microtubo foram transferidas para três poços de uma placa opaca de 96 poços, realizou-se então as medidas em triplicata. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador, a 25°C, realizando a excitação em 340nm e registrados na região de 370 a 700 nm.

### **3.5.4 - Dicroísmo Óptico Circular (OCD)**

Foram preparadas soluções estoque dos complexos em DMSO com concentração de 1000 $\mu\text{M}$ . Alíquotas de 12-62 $\mu\text{L}$  dessas soluções foram transferidas para microtubos de 2000 $\mu\text{L}$ . Em seguida, adicionou-se DMSO suficiente para completar um volume de 200 $\mu\text{L}$  (10%) deste solvente. Alíquotas da solução de DNA foram adicionadas aos microtubos para que a concentração final desta biomolécula no microtubo fosse 100 $\mu\text{M}$ . Posteriormente, adicionou-se tampão Trisma-HCl até atingir um volume final de 2000 $\mu\text{L}$ . As relações molares

---

---

[DNA]/[Complexo] foram: 0,06, 0,125 e 0,25. Preparou-se também as soluções na ausência do DNA e dos complexos, e na presença do DNA e ausência dos complexos. As soluções foram incubadas por 18h à 37°C.

Os espectros foram registrados pelo Dr. Marcos Vinícius Palmeira de Mello utilizando um espectropolarímetro JASCO J-815 acoplado a um computador, pertencente ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFSC-USP). As varreduras foram realizadas de 240 a 400 nm com velocidade de 200 nm/min e 5 acumulações a cada medida.

### 3.5.5 - Eletroforese em gel de agarose

Em diferentes microtubos de 1500  $\mu\text{L}$  foram adicionadas alíquotas de 7  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial pBR322, 1  $\mu\text{L}$  da solução do complexo em DMSO em diferentes concentrações e 2  $\mu\text{L}$  de Trisma-HCl, perfazendo um total de 10  $\mu\text{L}$ . De forma que a concentração final de DNA nos microtubos foi igual a 30  $\mu\text{M}$ , enquanto as concentrações dos complexos foram iguais a 7,5  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$ . As razões molares [Complexo]/[DNA] = 0,25 e 0,50. Também foi preparada uma solução de DNA adicionando 1  $\mu\text{L}$  de DMSO na ausência dos complexos, que é o controle negativo. As amostras foram incubadas a 37° por 18 h.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 1 min a 500 rpm. Em seguida, adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida (Gel-loading buffer) em cada microtubo contendo as soluções, posteriormente transferiu-se alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  para o gel de agarose 1% em tampão TAE (0,45 M TrisHCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM de EDTA, pH 7,4). Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (*ladder*) também foi transferida para um dos poços do

---

---

gel de agarose. Após a transferência de todas as amostras para o gel, estas foram submetidas a uma corrida eletroforética, realizada em uma cuba de eletroforese com tampão TAE a 40mV por 2h30min. Ao final da corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 20min, e em seguida revelado em fotodocumentador Gel Doc<sup>TM</sup> EZ Bio-Rad. O tratamento das imagens foi realizado empregando *software* ImageLab<sup>TM</sup> 6.0.0.

### 3.6 - Estudo de interação com HSA

Inicialmente, determinou-se a concentração da proteína albumina de soro humano (HSA) por UV-Vis empregando o valor da absorbância e da absortividade molar da HSA em 280nm ( $\epsilon = 36500 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ) e do caminho óptico ( $b = 1\text{cm}$ ), de acordo com a lei a Lambert-Beer:  $A_{280} = \epsilon_{280} \times b \times C$ . Preparou-se então 10 mL de uma solução estoque de HSA (5,0 $\mu\text{M}$ ) em Trisma-HCl.

Em microtubos de 1000 $\mu\text{L}$  foram adicionadas alíquotas crescentes (5-40 $\mu\text{L}$ ) dos complexos em DMSO, o volume de DMSO foi completado até atingir 50 $\mu\text{L}$  (5%). Aos microtubos, adicionou-se 950 $\mu\text{L}$  da solução estoque de HSA até completar um volume final de 1000 $\mu\text{L}$ . Em um dos microtubos adicionou-se apenas a solução estoque de HSA e DMSO na ausência dos complexos. As soluções foram incubadas a 25°C por 30 min.

Três alíquotas de 200 $\mu\text{L}$  de cada microtubo foram transferidas para três poços de uma placa opaca de 96 poços, as medidas foram realizadas em triplicata. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em fluorímetro

---

---

Synergy/H1-Biotek monocromador, à 25°C, 30 °C e 37 °C, realizando a excitação em 270nm e registrados na região de 260 a 500 nm.

A análise quantitativa do processo de supressão da fluorescência foi realizada utilizando a equação de Stern-Volmer<sup>44</sup>:

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

onde,

$F_0$  = intensidade de fluorescência na ausência do complexo;

$F$  = intensidade de fluorescência na presença do complexo;

$K_{sv}$  = constante de supressão de fluorescência de Stern-Volmer;

$K_q$  = constante de supressão bimolecular;

$\tau_0$  = tempo de vida médio da fluorescência (6,2 ns);

$[Q]$  = concentração do complexo.

A constante de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação ( $n$ ) foram obtidos por meio da seguinte equação:

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

Os parâmetros termodinâmicos de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), variação de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e variação de entropia ( $\Delta S^\circ$ ) foram calculados para avaliar o tipo de interação dos complexos com a HSA por meio das equações:

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

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

onde,

$K_{b1}$  e  $K_{b2}$  = constantes de ligação nas temperaturas  $T_1$  e  $T_2$ ;

$R$  = constante dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ).

### 3.7 - Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados pela Dra. Kátia Mara, MSc. Matheus Reis, Dra. Nathália Acésio e Dra. Denise Crispim na Universidade de Franca (UNIFRAN).

#### 3.7.1 - Linhagens e cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram as linhagens de melanoma humano (A-375) e murino (B16-F10), gentilmente cedidas por S. S. Maria-Engler, Universidade de São Paulo, São Paulo. Utilizou-se também uma linhagem não tumoral de queratinócitos humanos (HaCat), a qual foi gentilmente cedida pelo P. F. Oliveira, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais. Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient* – Sigma Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino, antibióticos (0,001 mg/mL de estreptomicina e 0,005 mg/mL de penicilina – Sigma Aldrich) e 2,38 mg/mL de HEPES (Sigma



---

---

Aldrich). As células foram cultivadas em monocamadas utilizando frascos descartáveis de 25 cm<sup>2</sup> de área a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.7.2 - Análise da viabilidade celular

A citotoxicidade dos complexos foi determinada empregando-se o ensaio colorimétrico do XTT (Cell proliferation kit II – Roche Diagnostics, Basel, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. Esse ensaio preconiza que a viabilidade celular é proporcional à formação do formazan, que é formado durante a redução do XTT.

As células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração de células e se meadas em placas de 96 poços (1 × 10<sup>4</sup> células/poço), as quais foram armazenadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h para a adesão celular. Posteriormente, os complexos foram adicionados em diferentes concentrações (100 a 0,78 μM) e as placas foram mantidas na estufa por 24 h. Células tratadas com 1% de DMSO foram utilizadas como controle. Após 24 h de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 μL de PBS (*Phosphate Buffered Saline* – Tampão Fosfato Salino). Então, 75 μL de XTT solubilizado em meio de cultura HAM-F10 sem vermelho de fenol (Sigma Aldrich) foram adicionados aos poços e incubados por 17 h. A absorbância dos poços foi registrada empregando-se um leitor de microplacas (ELISA-Asys-UVM 340/microwin 2000) em um comprimento de onda de 450 nm. A partir dos valores de absorbância, determinou-se os valores de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular).

---

---

### 3.7.3 - Avaliação antiproliferativa

A atividade antiproliferativa dos complexos de rutênio foi investigada utilizando o ensaio de eficiência clonogênica, de acordo com Franken *et al.*<sup>45</sup>. Para isso, as linhagens celulares HaCat, A-375 e B16-F10 foram semeadas (300 células/poço) em placas de 6 poços e incubadas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C por 2 h. Após este tempo, adicionou-se meio de cultura contendo os complexos em diferentes concentrações, as quais foram determinadas com base nos resultados de viabilidade celular, e as placas foram mantidas em estufa por 24 h. O meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS e meio de cultura novo foi adicionado. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, as colônias fixadas com uma solução de metanol: ácido acético: água destilada (1:1:8) e coradas com Giemsa (tampão fosfato 1:20, pH 7), por 20 minutos. O número de colônias foi contado utilizando o *software* Image J.

### 3.7.4 - Avaliação da Morfologia Celular

Para avaliação do efeito do complexo de rutênio na morfologia celular, as células A-375 foram semeadas em placas de 24 poços ( $0,6 \times 10^5$  células/poços) e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para aderência. As células foram tratadas com o complexo em diferentes concentrações (0,625 – 20 µM) e imagens foram registradas logo após o tratamento e depois de 24 h, utilizando um microscópio invertido acoplado a uma câmera. O ensaio foi realizado em triplicata.

---

---

### 3.7.5 - Ensaio de Migração Celular

A capacidade do complexo de rutênio inibir a migração celular foi analisada a partir do ensaio de *Wound Healing*<sup>46</sup>. As células A-375 foram semeadas ( $1,3 \times 10^5$  células/poços) em placas de 24 poços, e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para aderência. Posteriormente, utilizando uma ponteira estéril, foi realizada uma risca na monocamada aderente de células e o meio de cultura contendo os restos celulares foi removido. Meio de cultura contendo 1% de FBS e os complexos em diferentes concentrações foram adicionados aos poços. As células controle receberam 1% de DMSO. Imagens das células foram registradas em 0 e 24 h após o tratamento. As distâncias entre as margens das riscas foram medidas empregando o *software ImageJ* e a porcentagem de fechamento foi determinada a partir da seguinte equação:

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

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Síntese e Caracterização dos complexos

#### 4.1.1 - Sínteses dos complexos

Os complexos foram obtidos pela substituição de um ou dois ligantes cloridos na esfera de coordenação do rutênio, pela 2-mercapto-4(3H)quinazolinona, conforme Figura 4.1.

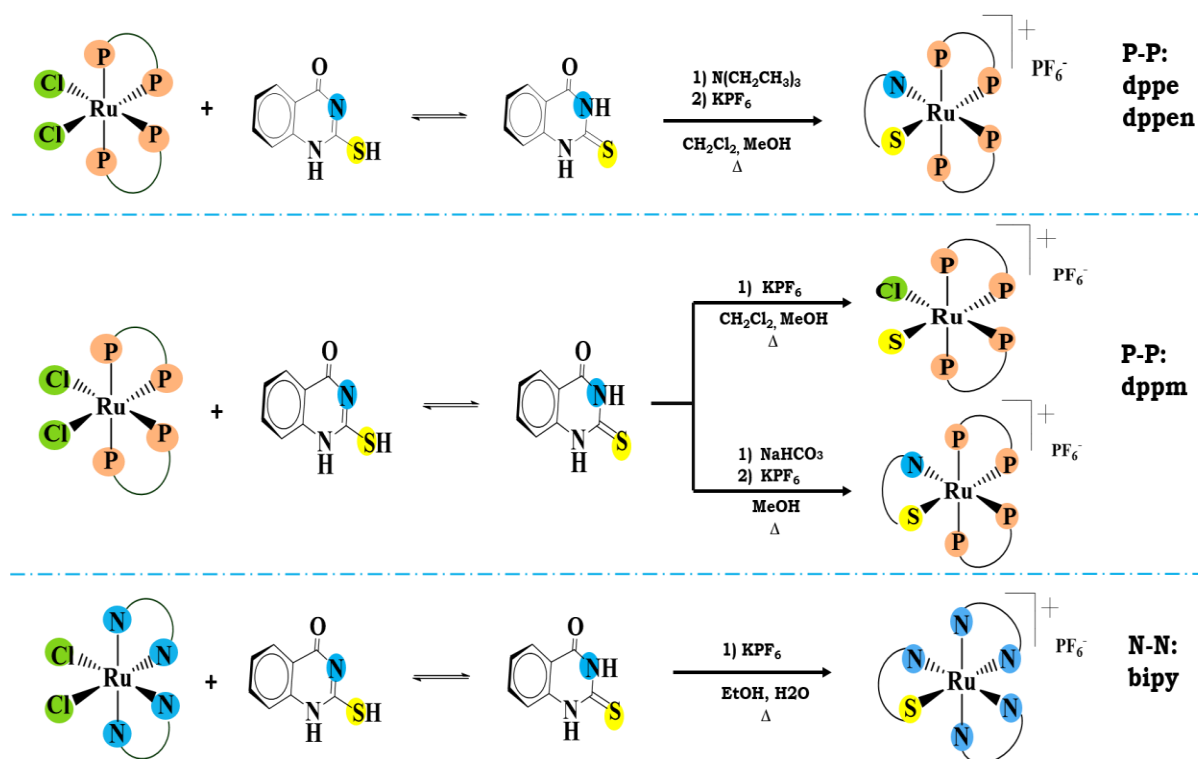


FIGURA 4.1 - Esquemas de rotas sintéticas para obtenção dos complexos propostos neste projeto, em que N-S e S = H2mq; P-P = dppe, dppm, dppen; e N-N = bipy.

O ligante (H2mq) foi desprotonado pela adição de trietilamina ( $N(CH_2CH_3)_3$ ), ou bicarbonato de ( $NaHCO_3$ ), ou pela própria mistura de solventes e coordenou-se ao centro metálico de forma bidentada nos complexos Ru2, Ru3, Ru4 e Ru5 (Figura 4.2).

Para os complexos Ru1 e Ru4 onde não houve a utilização de base durante a síntese, mas o ligante coordenou-se de forma diferente ao centro metálico nestes dois complexos, verificou-se que o pH da mistura  $CH_2Cl_2$ :Metanol (5:1) utilizada na síntese do complexo Ru1 é de 5,5, enquanto o pH da mistura Etanol:H<sub>2</sub>O (1:1) utilizada para a obtenção do complexo Ru4 é de 7,6. O meio ácido utilizado na síntese do complexo Ru1 não favoreceu a desprotonação da mercapto, por isso coordenou-se de forma monodentada, enquanto no complexo Ru4 a mercapto coordenou-se de forma bidentada (Figura 4.2).

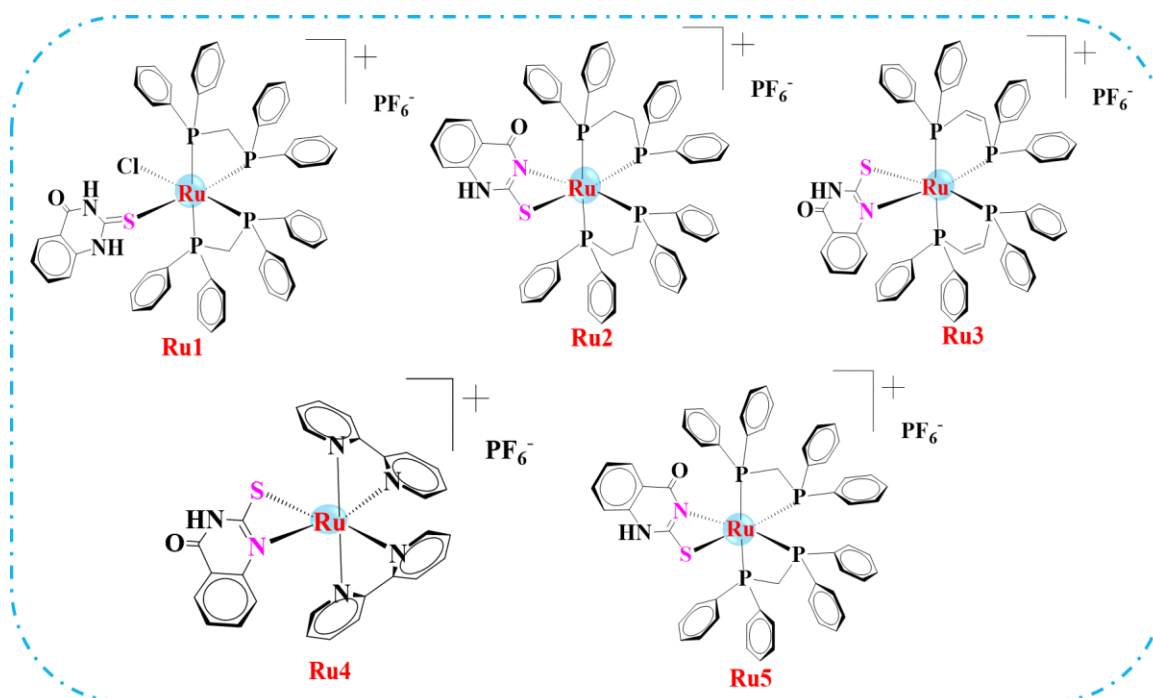


FIGURA 4.2 - Estruturas dos complexos sintetizados (Ru1-Ru5).

Os complexos Ru1 e Ru5 foram obtidos partir do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] em que o ligante coordenou-se de forma monodentada (Ru1), quando não houve a utilização de bicarbonato de sódio, ou bidentada (Ru5) quando houve a utilização deste sal.

#### 4.1.2 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Nos espectros de RMN de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} dos complexos precursores são observados apenas dois tripletos devido a equivalência química e magnética dos dois tipos de átomos de fósforos: P1 (dois átomos fósforos *trans* a fósforo) e P2 (dois átomos de fósforos *trans* a cloro), como pode ser observado na Figura 4.3.

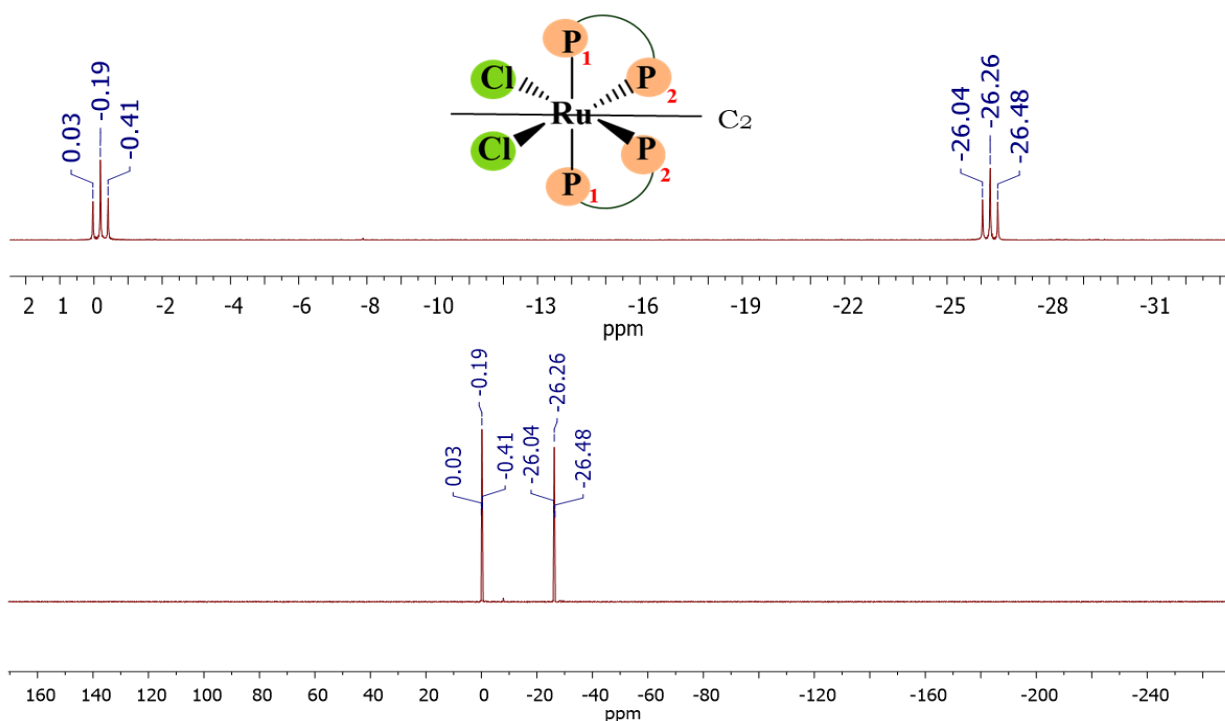


FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} do complexo precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>O, em que P-P = dppm.

Os precursores *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(P-P)<sub>2</sub>] (P-P: dppm, dppe, dppen) possuem um eixo de simetria C<sub>2</sub> que passa pelo rutênio na posição equatorial e faz com que um lado do complexo seja simétrico ao outro, por isso há equivalência química dos fósforos P1 e também dos fósforos P2, esses fósforos quimicamente equivalentes apresentam o mesmo deslocamento químico, por isso são também magneticamente equivalentes. A substituição dos ligantes cloridos por átomos diferentes na esfera de coordenação provoca uma quebra de simetria e mudança no ambiente químico desses fósforos, desse modo os átomos de fósforos passam a ser magnética e quimicamente não equivalentes. O padrão de sinais esperado para esse sistema, como quatro fósforos não equivalentes, é de duplo duplo dubleto (ddd), gerando quatro sinais com oito linhas, devido ao acoplamento dos quatro átomos fósforos. O de fósforo P1 acopla com o átomo fósforo P2 gerando um dubleto, em seguida cada linha é desdobrada em dois dubletos devido ao acoplamento de P1 com P3, e o acoplamento de P1 com P4 faz com que cada uma das quatro linhas geradas se desdobrem em dubletos (Figura 4.4), e o mesmo ocorre para os demais fósforos do sistema.

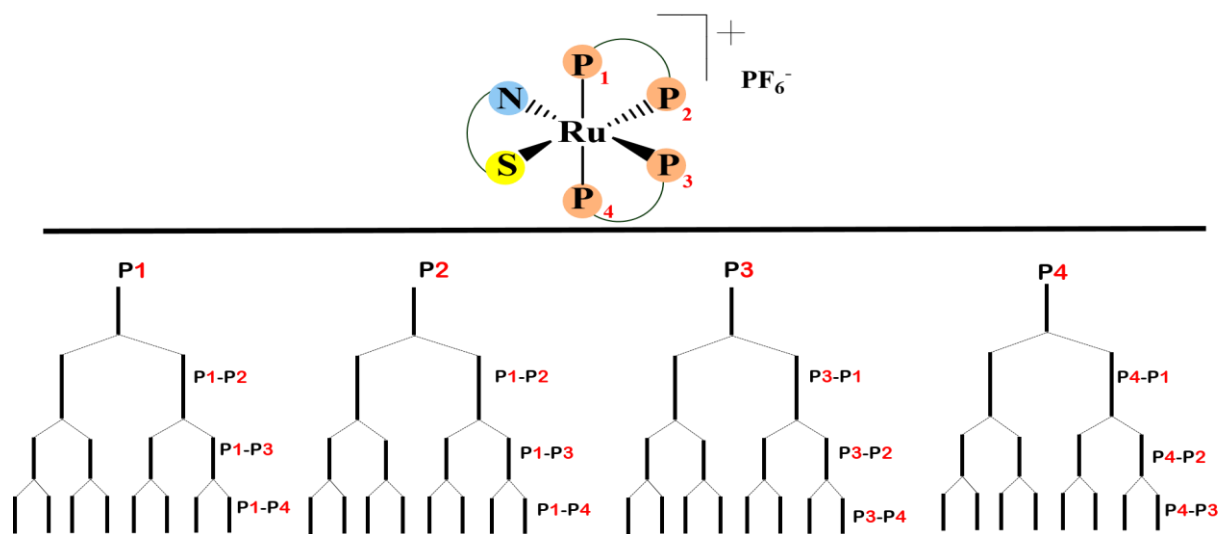


FIGURA 4.4 - Diagrama de árvores para um sistema com quatro átomos de fósforos química e magneticamente não equivalentes na posição *cis*.

---

---

O átomo de fósforo *trans* a nitrogênio (N), o elemento mais eletronegativo dos átomos coordenados ao rutênio (II) deste sistema, é mais desblindada e apresenta maior deslocamento químico, seguido pelo fósforo *trans* a enxofre (S), e os fósforos *trans* a fósforo são os mais blindados, por isso os sinais apresentam menor deslocamento químico. Em alguns casos nem todas as oito linhas são observadas, pois, devido a uma menor constante de acoplamento as linhas ficam muito próximas e se sobrepõem, assim são observadas apenas seis ou cinco linhas. Os fósforos *trans* a fósforos possuem maior constante de acoplamento<sup>47</sup> (Tabela 4.1) e os sinais referentes a esses átomos podem sofrer um desdobramento em dois conjuntos de quatro linhas, como pode ser observado na Figura 4.5.

O solvente escolhido para registrar os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  foi o DMSO, por ser utilizado nos testes biológicos, porém os sinais para o complexo Ru3 são melhores visualizados quando é utilizado o solvente acetonitrila, pois em DMSO muitos sinais se sobrepõem, por isso nas Figuras A2 - A3 (apêndice) estão os espectros nos dois solventes.

No espectro do complexo Ru5 os sinais referentes aos quatro átomos de fósforos estão duplicados (Figura 4.5), comportamento também observado pra o complexo Ru3. Uma forma de tentar explicar esta observação é sugerir a formação de isômeros em solução<sup>48</sup>, em que o ligante pode estar coordenado pelo nitrogênio adjacente à carbonila, ou pelo nitrogênio na posição oposta à carbonila (Figura 4.6), sendo que o isômero 1 está presente em maior proporção, enquanto o 2 está presente numa porcentagem de 13%. A atribuição da porcentagem dos isômeros foi feita com base no cristal obtido, onde obteve-se o complexo Ru5 com a mercapto coordenada ao rutênio pelo nitrogênio do grupo amida (seção 4.1.3) e o espectro do RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  desse cristal (Figura A4, apêndice) registrado em DMSO indicou a



presença de um produto majoritário, atribuído a isômero 1, e um produto minoritário, atribuído ao isômero 2.

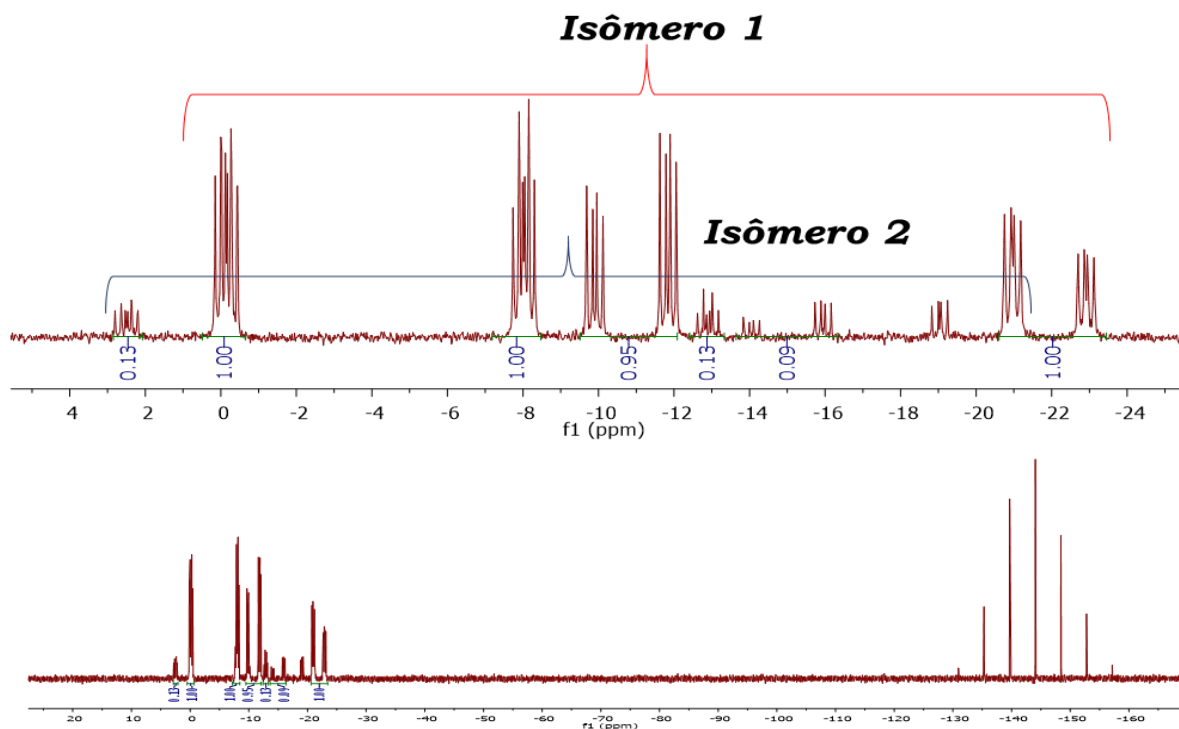


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru5, em metanol/ $\text{D}_2\text{O}$ .

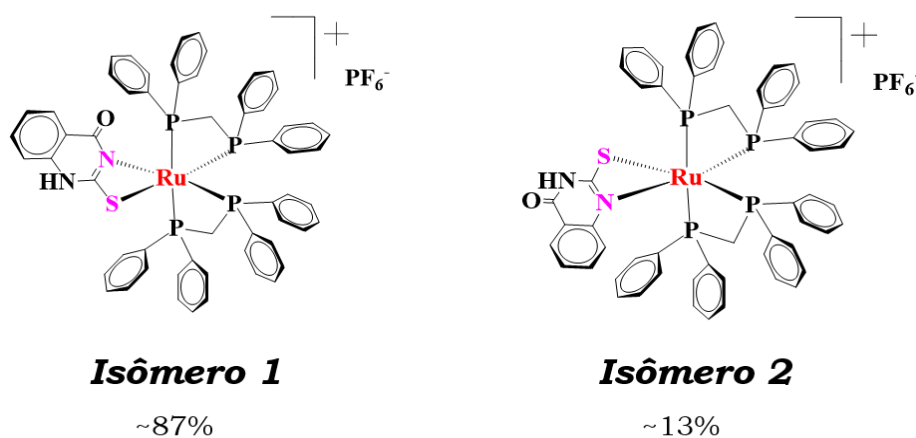


FIGURA 4.6 - Sugestão de isômeros presentes em solução para o complexo Ru5.

---

---

Apesar de, nos dois isômeros, a mercapto coordenar-se ao íon metálico pelos átomos de nitrogênio e enxofre, a densidade eletrônica sobre os dois átomos de nitrogênio é diferente, pois o nitrogênio da amida tem um efeito de doação eletrônica por ressonância sobre a carbonila, e neste caso menos densidade eletrônica é doada para o metal.

Com o objetivo de obter o complexo puro as condições de síntese foram modificadas e foi obtido o complexo Ru1. O espectro do complexo Ru1 apresenta o padrão de sinais esperado, e não apresenta sinais duplicados (Figura 4.6). Contudo, observou-se que alguns sinais apresentam deslocamentos químicos diferentes quando comparado ao complexo Ru5, que sugere que o complexo não é o mesmo, e como foi evidenciado por meio da técnica de difração de raios X (seção 4.1.3), a mercapto não está coordenada ao centro metálico de forma bidentada, como era esperado. Assim, a partir do precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] foram obtidos os complexos Ru1 e isômeros de Ru5. As tentativas de separação dos isômeros do composto Ru5 e também de Ru3 durante ou após a síntese não foram bem sucedidas.

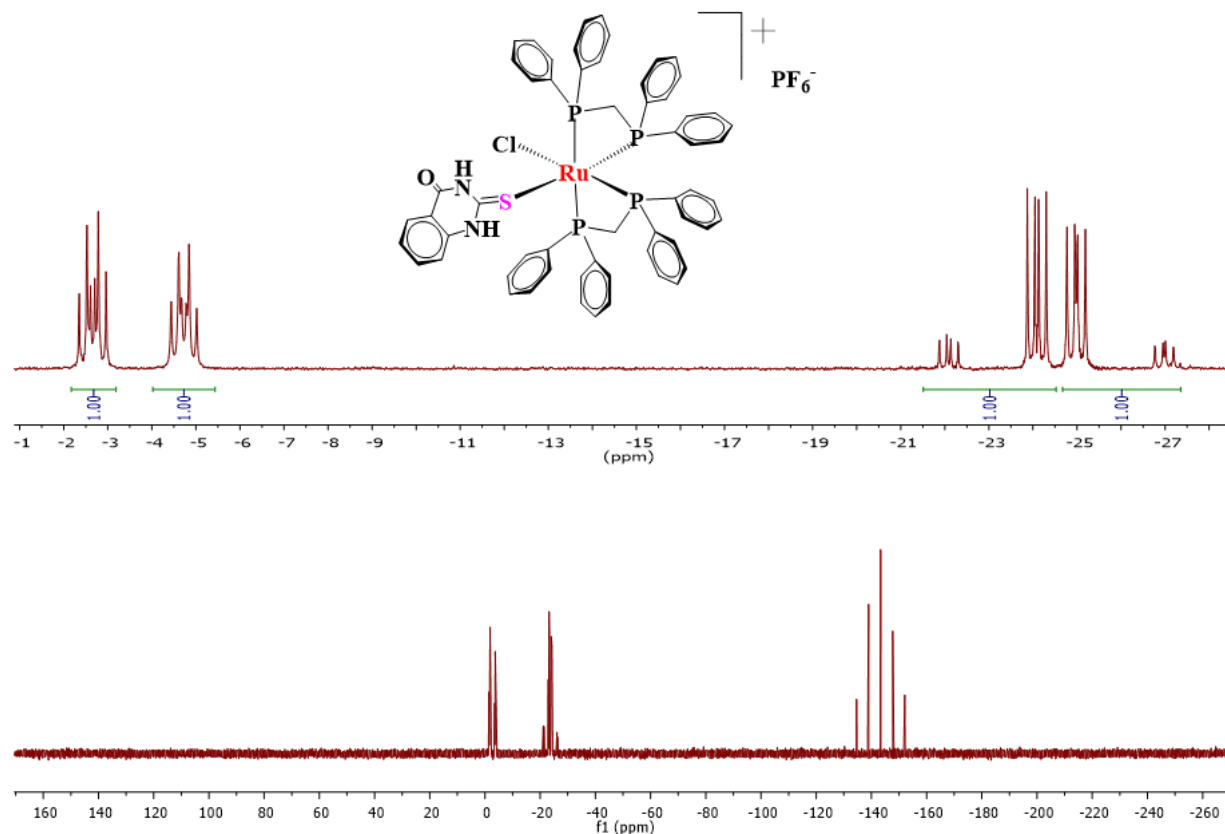


FIGURA 4.7 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru1 em acetona/ $\text{D}_2\text{O}$ .

Na Tabela 5.1 são apresentados os valores de constantes de acoplamentos para os complexos, e os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para os demais complexos estão no apêndice (Figuras A1-A4).

TABELA 4.1 - Valores de constante de acoplamento  ${}^2J_{P-P}$  para os complexos Ru1, Ru2, Ru3, Ru5.

Complexo	Fósforo	$\delta$	${}^2J_{P-P}$
Ru1	P1	-2,66	41,7; 28,5
	P2	-4,73	38,2; 27,9
	P3	-23,09	324,0; 41,8; 27,4
	P4	-25,98	323,8; 38,5; 29,3
Ru2	P1	66,79	23,2
	P2	57,29	291,5; 25,1
	P3	47,97	25,4; 12,4
	P4	42,73	288,6; 22,5; 12,3
Ru3	P1	67,87	m
	P2	59,12	m
	P3	57,15	m
	P4	52,17	m
Ru5	P1	-0,14	43,5; 27,2; 24,0
	P2	-8,02	41,2; 24,9
	P3	-10,87	314,4; 43,5; 26,5
	P4	-21,94	314,5; 41,2; 27,7

### 4.1.3 - Difração de raios X

As estruturas cristalinas dos complexos foram determinadas por difração de raios X de monocristais e foram resolvidas no sistema monoclinico, de

grupo espacial  $P2/c$  (Ru1),  $P2_1/c$  (Ru2),  $C2/c$  (Ru4),  $P2/c$  (Ru5). Os parâmetros cristalográficos de refinamento encontram-se nas Tabelas A1-A2 no apêndice.

O uso da técnica foi essencial para a elucidação estrutural dos complexos, sendo possível confirmar o modo de coordenação bidentado do ligante nos complexos Ru2, Ru4 e Ru5, em que há duas bifosfinas/bipiridinas na posição *cis* e o ligante mercapto completa a esfera de coordenação do metal, coordenado pelos átomos de nitrogênio e enxofre. No complexo Ru1 o ligante está coordenado de forma monodentada pelo átomo de enxofre, e um clorido completa a esfera de coordenação do metal (Figura 4.8).

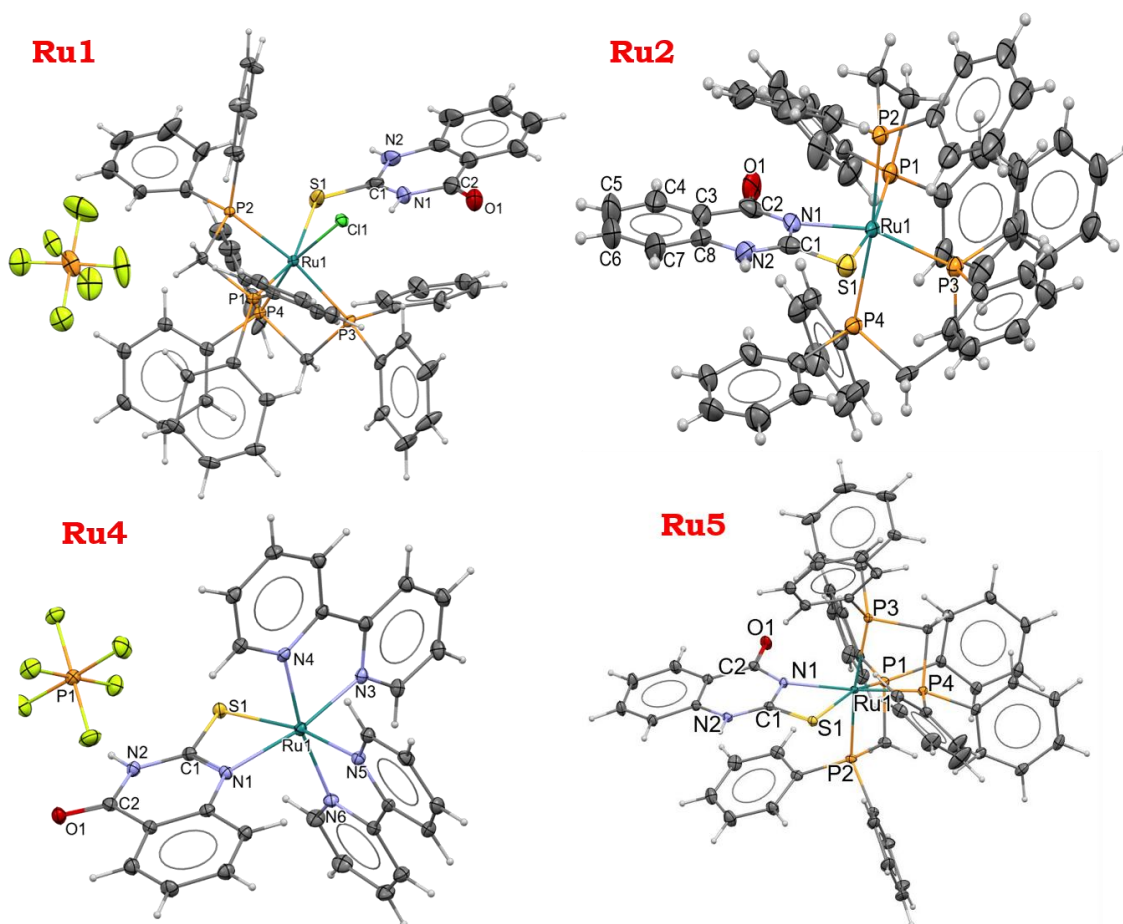


FIGURA 4.8 - Estruturas cristalinas dos complexos Ru1, Ru2, Ru4 e Ru5 (o íon  $PF_6^-$  foi omitido em Ru2 e Ru5).

---

---

Para o complexo Ru5 foi observado que há apenas  $\frac{1}{2}$   $\text{PF}_6^-$  para cada estrutura, foi então feita uma análise mais detalhada da estrutura cristalina e verificou-se que há dois complexos para cada íon  $\text{PF}_6^-$ , isso ocorre devido à desprotonação do segundo nitrogênio, não coordenado ao metal em uma das estruturas, com isso esse complexo isolado fica com carga neutra. O nitrogênio desprotonado interage com a estrutura ao lado por meio de uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio ligado ao nitrogênio (Figura 4.9). O somatório das cargas das duas estruturas que estão interagindo, com exceção do íon  $\text{PF}_6^-$  é igual a +1, por isso há apenas um contra-íon  $\text{PF}_6^-$  para cada duas estruturas, neutralizando a carga positiva. Portanto, a rede cristalina é composta por 50% de estruturas protonadas e 50% de estruturas desprotonadas. Este foi um comportamento observado no cristal, porém pode ser um indício da formação dos isômeros, já mencionados para o complexo Ru5, uma vez que a desprotonação do segundo nitrogênio na mercapto favorece um outro ponto de coordenação para o metal, que pode estar coordenada pelo nitrogênio adjacente a carbonila ou pelo nitrogênio na posição oposta a carbonila.

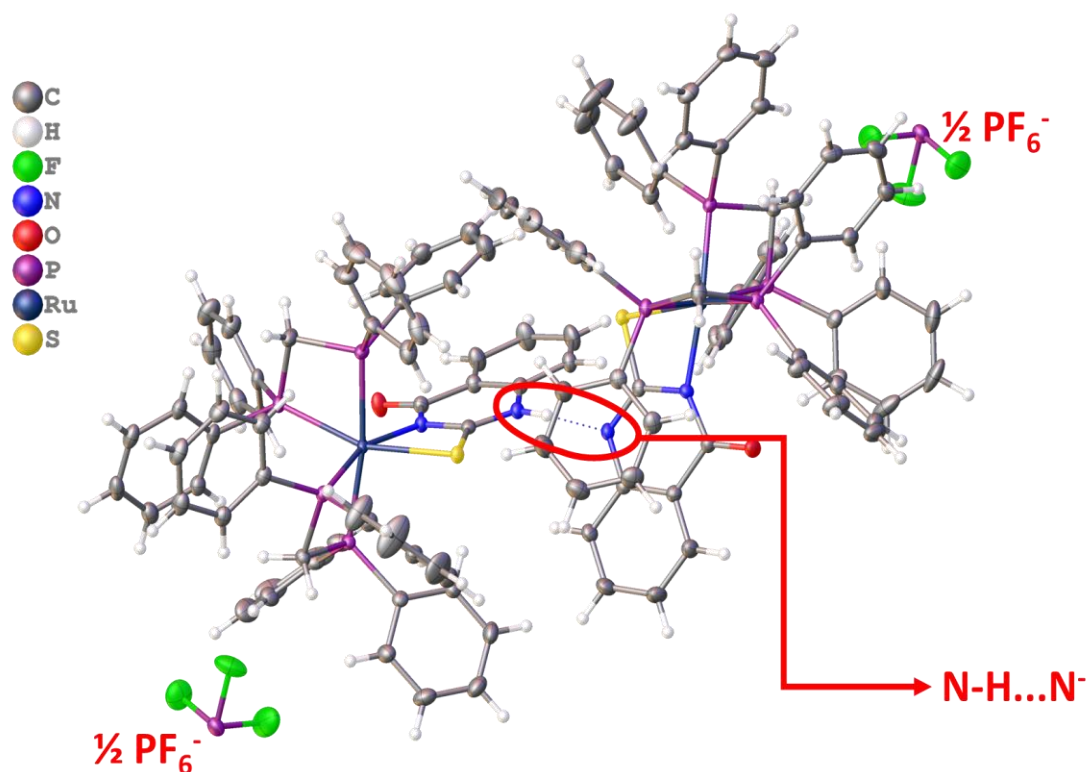


FIGURA 4.9 - Estrutura cristalina do complexo Ru5.

Todos os complexos são hexacoordenados com geometria octaédrica distorcida, em que a ligação Ru-S (2,42 – 2,46 Å) e Ru-P (2,30 – 2,40 Å) tem maior comprimento, devido ao maior raio atômico do fósforo e enxofre, e a ligação Ru-N (2,13 – 2,17 Å) tem menor comprimento. Os ângulos P-Ru-P ou N-Ru-N das fosfinas ou bipyridinas, são maiores do que os ângulos N-Ru-S da mercapto (Tabela 4.2), dados que estão de acordo com valores encontrados em complexos similares<sup>49,38</sup>, e podem ser atribuídos não somente ao anel de quatro membros formado após a coordenação ao centro metálico, pois nos complexos Ru1 e Ru5 também são formados anéis de quatro membros entre a dppm e o rutênio, mas a presença da ligação dupla C=N, que leva a uma menor distância entre os átomos e consequentemente menor ângulo N-Ru-S.

TABELA 4.2 - Principais comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação para os complexos Ru1-Ru5.

	<b>Ligações (Å)</b>			
	<b>Ru1</b>	<b>Ru2</b>	<b>Ru4</b>	<b>Ru5</b>
C1-S1	1.730(5)	1.705(12)	1.712(3)	1.728(18)
C1-N1	1.342(6)	1.329(14)	1.329(3)	1.353(2)
Ru1-P1	2.347(8)	2.401(3)	--	2.368(5)
Ru1-P2	2.340(8)	2.383(3)	--	2.320(5)
Ru1-P3	2.385(8)	2.370(3)	--	2.358(5)
Ru1-P4	2.320(8)	2.394(3)	--	2.301(6)
Ru1-N1	--	2.176(9)	2.137(2)	2.159(14)
Ru1-S1	2.427(9)	2.463(3)	2.439(6)	2.439(5)
Ru1-N3	--	--	--	2.055(2)
Ru1-N4	--	--	--	2.048(2)
Ru1-N5	--	--	--	2.052(2)
Ru1-N6	--	--	--	2.054(2)
Ru1-Cl1	2.461(8)	--	--	--
	<b>Ângulo (°)</b>			
P2 -Ru1-P1	70.74(3)	84.09(11)	--	71.379(18)
P3-Ru1-P4	71.84(3)	83.49(10)	--	71.557(18)
S1-Ru1-N1	--	66.40(3)	67.21(6)	66.70(4)
S1-Ru1-Cl1	89.83(4)	--	--	--
S1-C1-N1	123.5(3)	113.9(8)	113.06(19)	110.38(12)
N5-Ru1-N6	--	--	78.84(9)	--
N3-Ru1-N4	--	--	79.07(9)	--
P2-Ru1-P1	70.74(3)	84.09(11)	--	71.379(18)
P3-Ru1-P4	71.84(3)	83.49(10)	--	71.557(18)



As ligações C-S no ligante livre tem comprimento de ligação de aproximadamente 1,81 Å (tiol) e 1,68 Å (tiona), enquanto a ligação C-N tem comprimento de aproximadamente 1,38 Å<sup>50,51,52</sup>. Nos complexos obtidos, o comprimento das ligações C-S possui valor intermediário entre a ligação dupla e simples, indicativo da deslocalização eletrônica dessas ligações e diminuição do caráter de dupla ligação. As ligações C-N também são mais curtas no complexo quando comparadas ao ligante livre, como pode ser observado na Figura 4.10 e Tabela 4.2.

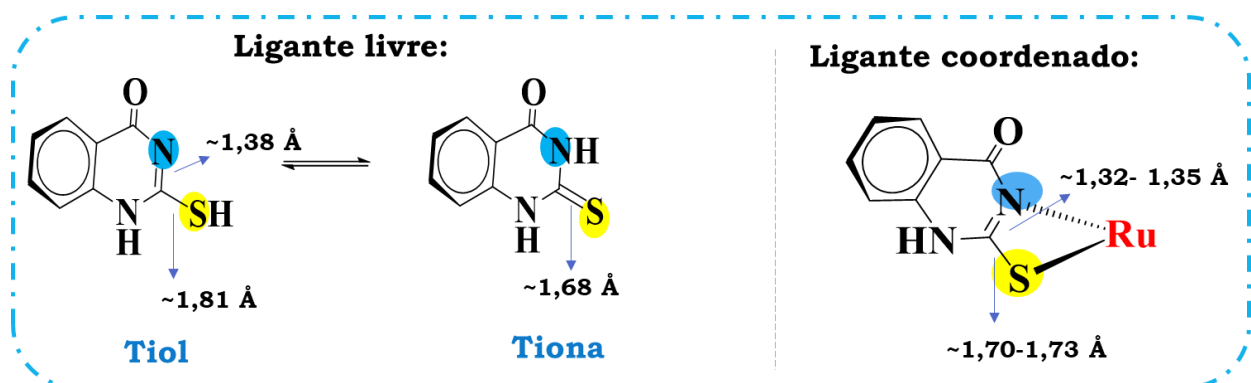


FIGURA 4.10 - Principais comprimentos de ligação do ligante mercapto livre e coordenado.

A ligação C-S, do ligante mercapto, no complexo Ru1 é a que apresenta maior comprimento de ligação (1,73 Å) entre os complexos desta série, apesar de estar coordenado na forma tiona, o que não era esperado, visto há uma ligação dupla. Contudo, para que essa ligação fosse simples, precisaria existir uma ligação dupla C=N, possível se houvesse desprotonação do ligante, o que não ocorre, pois foi evidenciado pela técnica de RMN <sup>1</sup>H (seção 4.1.9) a presença dos hidrogênios ligados aos nitrogênios. Neste caso, a condutância molar também não

estaria dentro da faixa de eletrólitos 1:1, como foi observado (seção 4.1.4), pois o complexo seria neutro.

#### 4.1.4 - Condutância Molar e Microanálise

Os dados de microanálise e as medidas de condutância molar estão de acordo com as estruturas propostas, apresentando eletrólitos 1:1 para os complexos, evidenciando que os mesmos são monocatiônicos e o  $\text{PF}_6^-$  está presente como contra íon. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3 e foram comparados com dados da literatura<sup>53</sup>.

TABELA 4.3 - Dados de análise elementar e condutividade molar dos complexos em DMSO.

Complexos	%C*	%H*	%N*	%S*	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )**
<b>Ru1</b> [RuCl(H2mq)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	56,75 (56,86)	4,02 (3,96)	2,28 (2,44)	2,61 (3,03)	40,00 <sup>a</sup>
<b>Ru2</b> [Ru(2mq)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	59,07 (58,98)	4,42 (4,46)	2,48 (2,49)	2,99 (3,12)	55,83
<b>Ru3</b> [Ru(2mq)(dppen) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	59,26 (59,38)	4,06 (4,15)	2,30 (2,72)	2,64 (2,69)	55,70
<b>Ru4</b> [Ru(2mq)(bipy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	45,72 (45,83)	2,88 (3,03)	11,42 (11,34)	4,36 (4,52)	60,50
<b>Ru5</b> [Ru(2mq)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	58,44 (58,23)	4,14 (4,23)	2,35 (2,32)	2,69 (2,46)	57,23

\*Análise elementar: Teórico (Experimental); \*\*Condutividade molar: Faixa DMSO 1:1= 20-62 $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; <sup>a</sup>Faixa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 1:1= 12-77 $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

#### 4.1.5 - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho também auxiliou no entendimento das estruturas dos compostos. Para isso comparou-se os dados dos complexos obtidos com o ligante livre e dados da literatura.

Foram observadas bandas na região de 3050-3080  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$  dos anéis aromáticos<sup>54</sup>. Bandas na região de 1630-1430  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos das ligações  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}=\text{N}$  dos anéis aromáticos bifosfínicos, bipyridínicos e a mercapto. Bandas de estiramento e dobramento da P-F do íon  $\text{PF}_6^-$  foram observadas na região de 850-550  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.11).

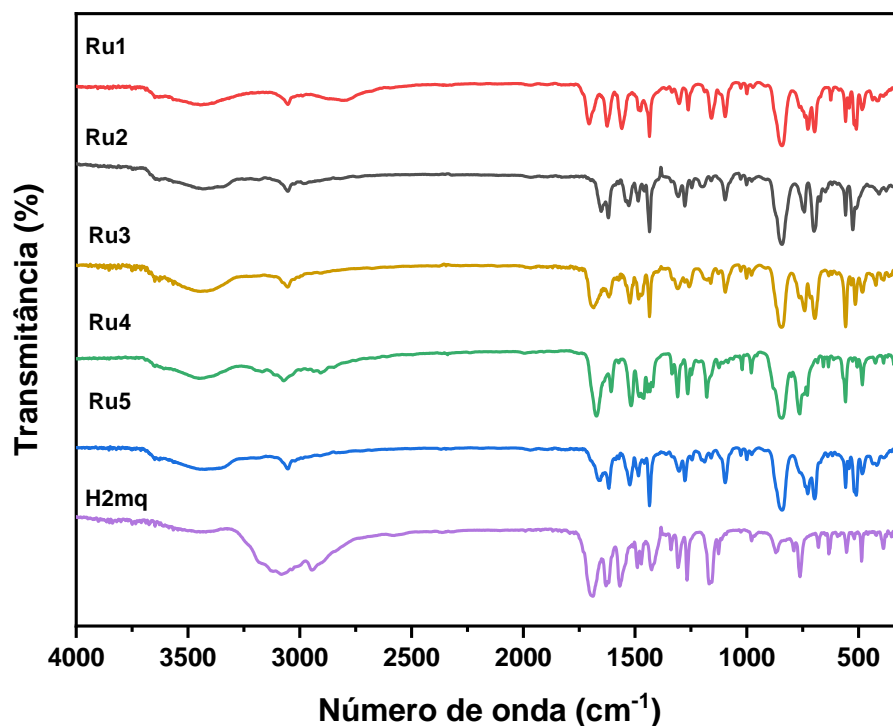


FIGURA 4.11 - Espectros de IV dos complexos sintetizados e do ligante livre.

Após a coordenação do ligante mercapto, as principais bandas observadas estão na faixa de: 1570-1395  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-N}$ ), 1420-1260  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-N}$  e  $\nu\text{C=S}$ )<sup>43</sup>. Na Tabela 4.4 são apresentadas as tentativas de atribuição das principais frequências vibracionais para os complexos.

As bandas C-S e C=N sofreram um deslocamento para regiões de mais baixa frequência após a coordenação ao centro metálico devido a diminuição de densidade eletrônica e caráter de dupla ligação. No complexo Ru1, a ligação C=S sofre menor deslocamento quando comparado aos demais compostos deste estudo, pois como evidenciado pela técnica de difração de raios X, a mercapto coordenou-se de forma neutra monodentada pelo átomo de enxofre (S) na forma de tiona.

TABELA 4.4 - Atribuições tentativas das principais bandas do infravermelho para os complexos e para o ligante H2mq livre.

Atribuições	Ru1	Ru2	Ru3	Ru4	Ru5	H2mq
$\nu\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	3056	3059	3051	3072	3061	3066
$\nu\text{C=N}$	1625	1612	1613	1603	1613	1629
$\nu\text{C=C} + \nu\text{C=N}$	1560	1436	1435	1523	1436	1601
$\nu\text{C-S}$	1261	1247	1250	1245	1244	1268
$\nu\text{P-C}$	1906	1906	1906	-	1906	-
$\nu\text{PF}_6$	836	846	845	844	839	-
$\delta\text{C-H (anel)}$	726	744	740	729	732	760
$\delta\text{PF}_6$	560	560	557	557	561	-
$\nu\text{Ru-S}$	482	506	483	479	484	-
$\nu\text{Ru-N}$	414	410	423	423	418	-

De modo geral, para o complexo Ru1 as bandas C-N, C=S não sofreram deslocamentos significativos como os observados para os demais complexos, que pode ser um indício de que neste complexo o ligante esteja doando menos densidade eletrônica para o centro metálico, por isso essas ligações não são tão enfraquecidas, aliado ao fato de que o nitrogênio não está envolvido na coordenação, assim a ligação C-N não é tão afetada.

#### 4.1.6 - Eletroquímica

Os complexos obtidos apresentaram comportamento eletroquímico semelhante, com par redox atribuído a oxidação de Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> e redução de Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>II</sup> (Figura 4.12). Os voltamogramas para os demais complexos encontram-se no apêndice (Figura A5).

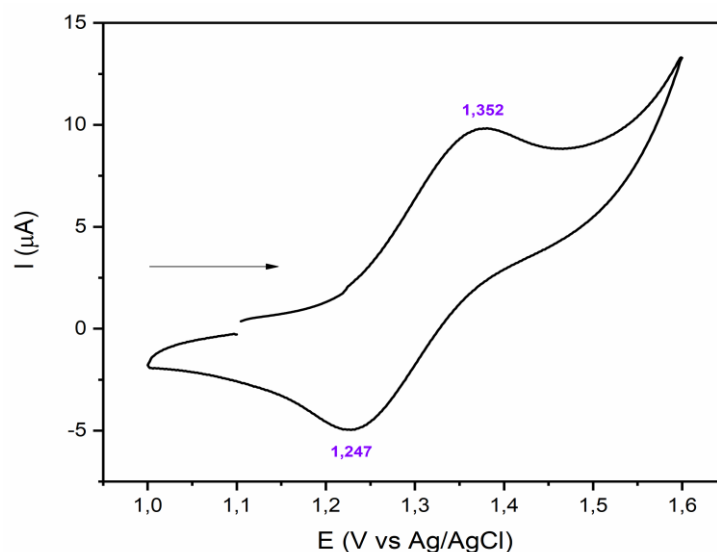


FIGURA 4.12 - Voltamograma cíclico do complexo Ru1 obtido em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,1M PTBA, 100 mV s<sup>-1</sup>).

Os valores de  $\Delta E$  e  $I_{pa}/I_{pc}$  (Tabela 4.5) foram utilizados para classificar a reversibilidade do processo. Para  $\Delta E$  foram obtidos valores entre 110-210mV, superiores a sistemas reversíveis (100mV) em meio orgânico, e para  $I_{pa}/I_{pc}$  os valores obtidos também foram superiores do que para sistemas reversíveis que é igual a 1, indicando que nem todo produto oxidado foi reduzido, neste caso os picos são assimétricos e os sistemas foram classificados em *quasi-reversíveis*<sup>43</sup>.

TABELA 4.5 - Dados de voltametria cíclica para os complexos Ru1-Ru5 e seus respectivos precursores (100 mV s<sup>-1</sup>, Ag/AgCl).

Complexos	$E_{pa}$ (V)*	$E_{pc}$ (V)*	$E_{1/2}$ (V)*	$\Delta E$ *	$I_{pa}/I_{pc}$ *	$pka^a$
<b>Ru1</b> -[RuCl(H2mq)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	1,35	1,24	1,29	0,11	2,09	3,81
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	1,04	0,83	0,94			
<b>Ru2</b> - [Ru(2mq)(dppe) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	1,34	1,20	1,27	0,14	1,62	3,86
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppe) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	0,95	0,51	0,73			
<b>Ru3</b> - [Ru(2mq)(dppen) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	1,53	1,32	1,43	0,21	1,91	2,27
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppen) <sub>2</sub> ]	1,06	0,97	1,02			
<b>Ru4</b> - [Ru(2mq)(bipy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	0,95	0,83	0,87	0,12	1,52	4,5
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (bipy) <sub>2</sub> ]	0,48	0,36	0,42			
<b>Ru5</b> - [Ru(2mq)(dppm) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	1,31	1,19	1,25	0,12	2,01	3,81
<i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppm) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	1,04	0,83	0,94			

\*  $E_{pa}$ : potencial de pico anódico; \* $E_{pc}$ : potencial de pico catódico; \* $E_{1/2}$ : potencial de meia onda; \* $\Delta E$ : diferença entre os potenciais de oxidação e redução; \* $I_{pa}/I_{pc}$ : razão da corrente de pico anódico e catódico; <sup>a</sup>  $pka$  do ligante bifosfínico ou bipyridínico<sup>55,56</sup>; Dados obtidos da literatura<sup>42</sup>.

Os valores de potencias de  $E_{1/2}$  foram maiores para os complexos contendo o ligante mercapto do que para seus respectivos precursores (Tabela 4.5).

Conforme esperado, a substituição de ligantes cloridos, que são  $\sigma$  e  $\pi$  doadores, por um ligante  $\sigma$  doador e  $\pi$  aceptor diminui a densidade eletrônica sobre o centro metálico, devido a retrodoação de densidade eletrônica do metal para o ligante, que conseqüentemente confere maior estabilidade eletroquímica ao rutênio, uma vez que é necessário um maior potencial para que ocorra a oxidação.

São observadas diferenças consideráveis quanto aos valores de  $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$  e  $E_{1/2}$  dos complexos que apresentam duas bifosfinas na esfera de coordenação em relação aos complexos que apresentam duas bipyridinas. Este comportamento é atribuído a melhor habilidade  $\pi$  aceptor dos átomos de fósforo das bifosfinas quando comparada aos átomos de nitrogênio das bipyridinas. Pode-se ainda estabelecer uma relação entre os valores de pKa destes ligantes (Tabela 4.5). A bipyridina possui um valor de pKa mais alto do que as bifosfinas dppm, dppe e dppen, assim maior a sua basicidade e maior o seu caráter doador, que torna o centro metálico mais rico em densidade eletrônica, sendo mais facilmente oxidado.

A dppen possui uma ligação dupla no substituinte R que provoca uma deslocalização de densidade eletrônica dos átomos de fósforo, assim o par de elétrons é menos prontamente doador. O valor de pKa da dppen é o menor entre as bifosfinas, e o complexo com este ligante (Ru3) é o que apresenta maior valor de  $E_{1/2}$ ,  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ , neste complexo o centro metálico é mais estável a oxidação. As bifosfinas dppm e dppe apresentam valores muito próximos de pKa, porém um pouco mais alto para a dppe. Com estes dados esperava-se que o centro metálico no complexo Ru2, com a dppe, apresentasse um maior potencial de oxidação do que no complexo Ru5, mas isso não acontece. Este comportamento foi também observado por Pereira<sup>57</sup> e a hipótese levantada foi de que os três anéis de quatro membros, que são mais tensos do que os anéis de cinco membros formados com a dppe, não permitam uma boa sobreposição dos orbitais, assim menos densidade

---

---

eletrônica é retrodoada para os ligantes fazendo com que o centro metálico seja oxidado mais facilmente

É possível ainda comparar os complexos Ru1 e Ru5, ambos com duas dppm, enquanto em Ru5 a mercapto está coordenada de forma bidentada, em Ru1 a mercapto está coordenada de forma monodentada e um ligante clorido completa a esfera de coordenação. No complexo Ru1, apesar de conter o clorido, ligante  $\sigma$  e  $\pi$  doador, coordenado ao rutênio (II) há apenas dois anéis de quatro membros formados, isso permite uma melhor sobreposição dos orbitais para que os ligantes recebam densidade eletrônica retrodoada do metal, aliado ao fato de que neste complexo a mercapto coordenou-se de forma neutra, então menos densidade eletrônica é doada deste ligante para o rutênio (II), assim no complexo Ru1 o centro metálico apresenta maior potencial de oxidação do que no complexo Ru5. Para ilustrar melhor esse comportamento eletroquímico foi construído um gráfico do potencial de oxidação do  $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$  em função do pKa do ligante bifosfínico, onde é possível observar que com o aumento do pKa ocorre uma diminuição do valor de  $E_{\text{pa}}$  (Figura 4.13). O gráfico foi construído apenas com os complexos contendo bifosfinas.



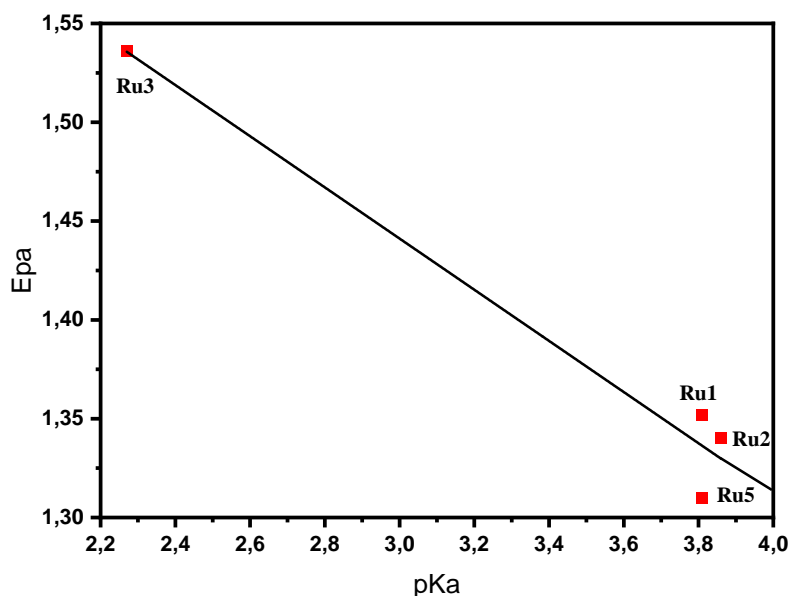


FIGURA 4.13 - Gráfico do potencial de oxidação do Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup> nos complexos Ru1, Ru2, Ru3 e Ru5 em função do valor de pKa do ligante bifosfínico.

#### 4.1.7 - Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-visível (UV-Vis)

Nos espectros eletrônicos de todos os complexos foram observadas absorções mais intensas na região de aproximadamente 260 nm, para os complexos bifosfínicos, e 240 nm, para o complexo com biperidínico, atribuídas a transições intraligante ( $\pi$ - $\pi^*$ ) dos anéis aromáticos das bifosfinas, biperidinas e do ligante mercapto (Figura 4.14).

As absorções na região de 250 a 340 nm, nos complexos bifosfínicos, e 350 a 520 nm, nos complexos biperidínicos, são atribuídas a transferência de carga do metal para o ligante ligante (TCML) do tipo  $d\pi_{Ru} \rightarrow 3p\sigma^* d\pi(\text{bifosfina})$  e  $d\pi_{Ru} \rightarrow \pi^*(\text{biperidina, ligante mercapto})$ . As atribuições tentativas para as bandas observadas nos espectros eletrônicos encontram-se na Tabela 4.6.

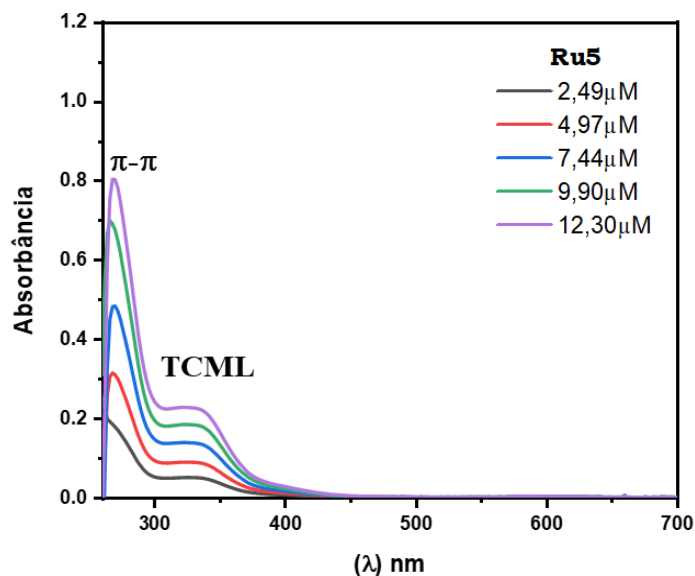


FIGURA 4.14 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo Ru5, em DMSO.

Utilizando o *software* MatLab realizou-se a deconvolução das bandas dos espectros eletrônicos. Após esse processo, foi possível confirmar a presença das duas bandas do tipo  $d\pi_{Ru} \rightarrow 3p\sigma^* d\pi$  (bifosfina) e  $d\pi_{Ru} \rightarrow \pi^*$  (bipridina, ligante mercapto) referente a TCML, que ficam encobertas (Figura 4.15) e dão origem a única banda TCML resultante observada no espectro eletrônico. A banda de transição d-d que possui baixo valor de coeficiente de extinção e foi facilmente encoberta pela banda TCML, foi observada nos espectros após a deconvolução. Os espectros para os demais complexos encontram-se no apêndice (Figuras A6 e A7).

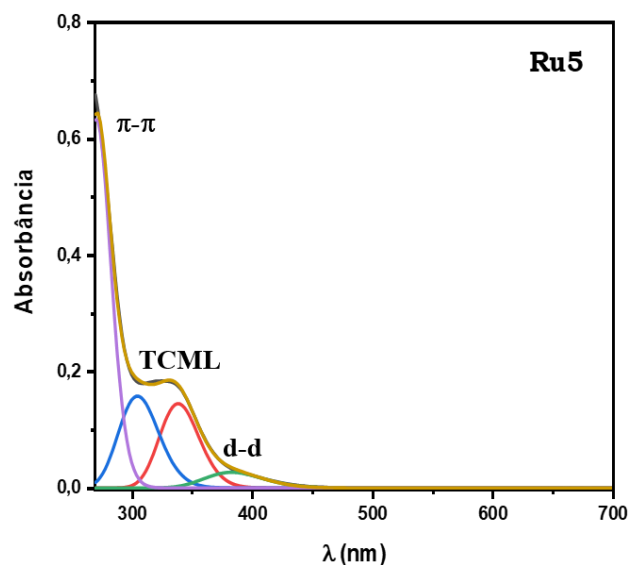


FIGURA 4.15 - Espectro do complexo Ru5 após a deconvolução.

TABELA 4.6 - Atribuições tentativas para as bandas dos espectros eletrônicos dos complexos Ru1-Ru5.

Complexos	$\lambda/\text{nm}$	$\epsilon$ ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^1 \cdot \text{L}$ )	$\log \epsilon$	Transição
<b>Ru1</b>	240	74728	4,87	IL ( $\pi-\pi^*$ )
	274	43128	4,63	TCML
	334	15692	4,19	TCML
<b>Ru2</b>	263	38134	4,58	IL ( $\pi-\pi^*$ )
	319	9500	3,77	TCML
	340	8441	3,92	TCML
<b>Ru3</b>	262	35715	4,55	IL ( $\pi-\pi^*$ )
	323	12780	4,10	TCML
<b>Ru4</b>	302	78078	4,89	IL ( $\pi-\pi^*$ )
	355	21328	4,33	TCML
	454	8533	3,93	TCML
	514	13584	4,13	TCML
<b>Ru5</b>	265	65630	4,81	IL ( $\pi-\pi^*$ )
	322	17800	4,25	TCML

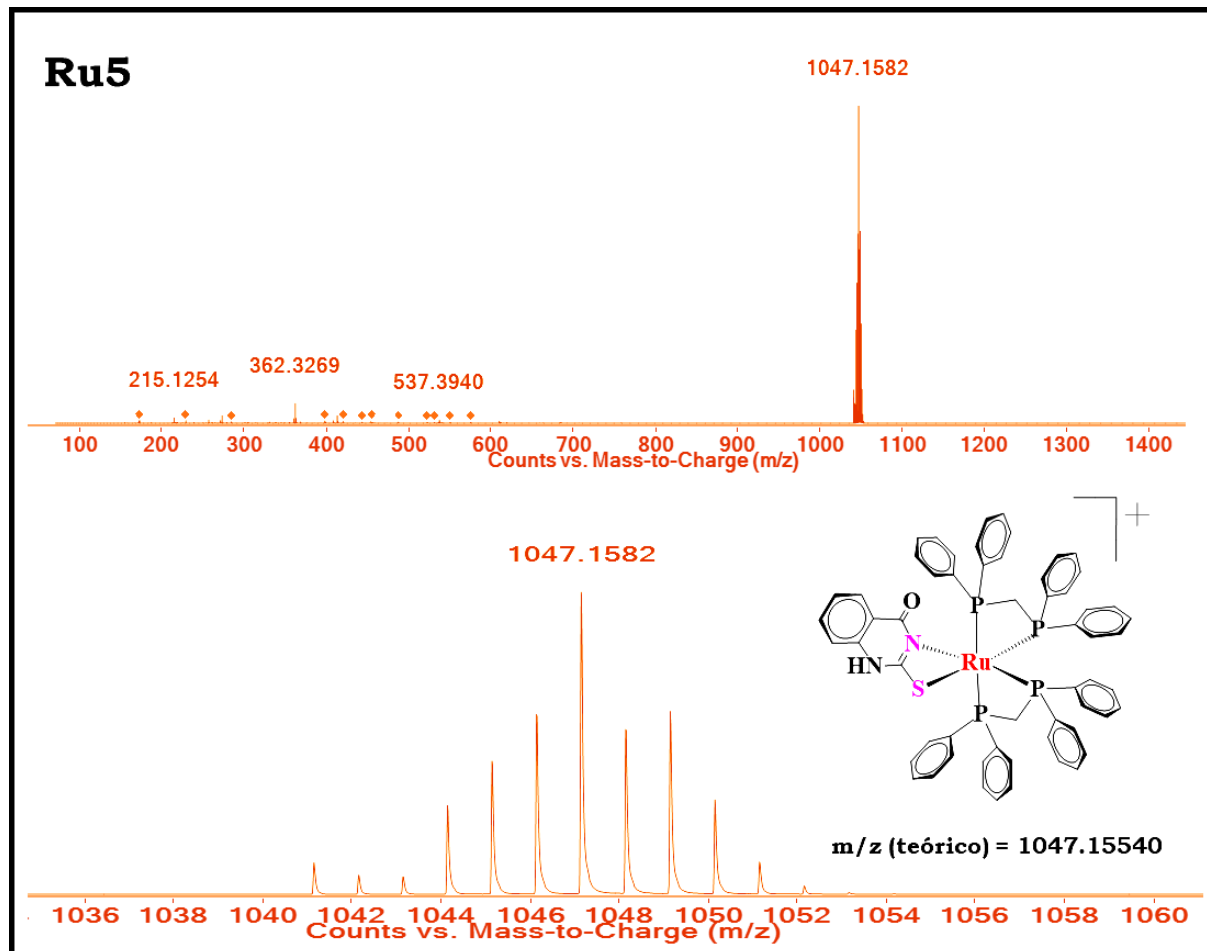
---

---

### 4.1.8 - Espectrometria de Massa

A técnica de espectrometria de massas permitiu encontrar sinais referentes ao cátion complexo para cada composto. Observou-se o padrão isotópico do rutênio (Figura 4.16) e os valores de razão massa/carga ( $m/z$ ) para os cátions complexos estão de acordo com os valores esperados, apresentando erro entre o valor teórico e experimental inferior a 3 ppm, como podem ser observados na Tabela 4.7.

O pico do íon complexo é o mais abundante nos espectros obtidos, que indica que esses cátions complexos são os mais estáveis e não são facilmente fragmentáveis nestas condições, exceto para o complexo Ru1, onde não é possível observar o pico do cátion complexo referente a perda do  $\text{PF}_6^-$ , mas o fragmento  $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppm})_2]^+$  descrito na Tabela 4.7 é devido, possivelmente, a perda HCl. Os espectros de massa dos complexos Ru1-Ru4 encontram-se no apêndice (Figuras A8-A11).



#### 4.1.9 - RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante (H2mq) e complexos

A caracterização deste ligante, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, em  $\text{DMSO-}d_6$ , já está relatada, por isso os valores referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênio e carbonos foram então extraídos da literatura<sup>38</sup> (Tabela 4.8), e a estrutura do ligante com a identificação dos átomos de carbono e hidrogênio está representada na Figura 4.17.

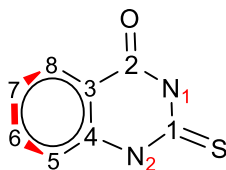


FIGURA 4.17 - Estrutura do ligante H2mq: 2-mercapto-4(3H)quinazolinona com a identificação do átomos de carbono e hidrogênio.

TABELA 4.8 - Deslocamento químicos dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos do ligante H2mq.

		$\delta$ (ppm)						
H2mq	H1	H2	H5	H6	H7	H8		
	12,70	12,47	7,74	7,74	7,34	7,93		
H2mq	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	174,3	159,6	116,2	140,4	115,8	135,4	124,4	126,7

Nos complexos Ru2-Ru5 a mercapto foi desprotonada e coordenou-se de forma bidentada, o que foi evidenciado, além das outras técnicas utilizadas, pelo desaparecimento do sinal referente a H1 ou H2. No complexo Ru1, os sinais

referentes a esses hidrogênios se mantiveram, indicando que o ligante coordenou-se de forma neutra. Contudo, a análise e atribuição dos sinais para os complexos obtidos não é trivial, devido a presença dos oito anéis aromáticos e a mercapto, os sinais dos hidrogênios ou carbonos aromáticos se sobrepõem, dificultando sua atribuição.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o complexo Ru1 é possível distinguir alguns conjuntos de sinais. Na região de mais baixa frequência ( $\delta$  5,7-5,0) estão os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia alifática das bifosfinas (dppm). Os hidrogênios alifáticos apresentam deslocamento químico diferente, indicando que não são equivalentes (Figura 4.18). No COSY, foi observado o acoplamento desses hidrogênios entre si. Na região de mais alta frequência ( $\delta$  8,5-6,70) estão os hidrogênios das cadeias aromáticas (bifosfina dppm e mercapto), neste conjunto foi possível distinguir os hidrogênios H8, H6 e H5 do ligante utilizando os mapas de contorno. Também foi observado o acoplamento de H8 com H6, e acoplamento de H6 com H5 e H8 (Figura 4.19).

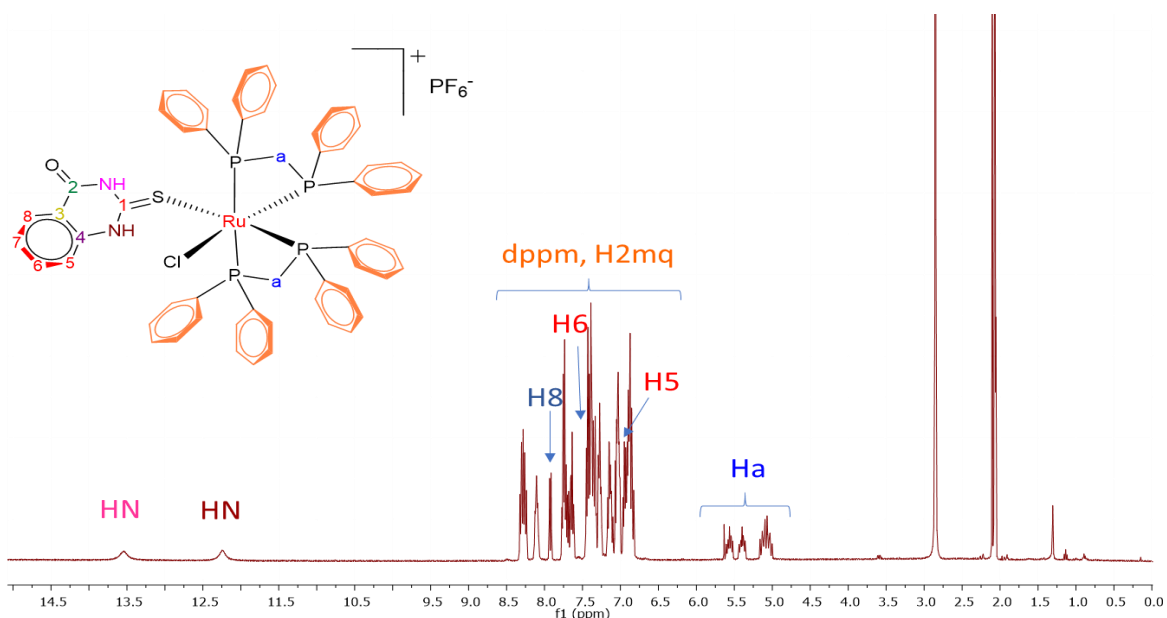


FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o complexo Ru1 em Acetona- $d_6$ .

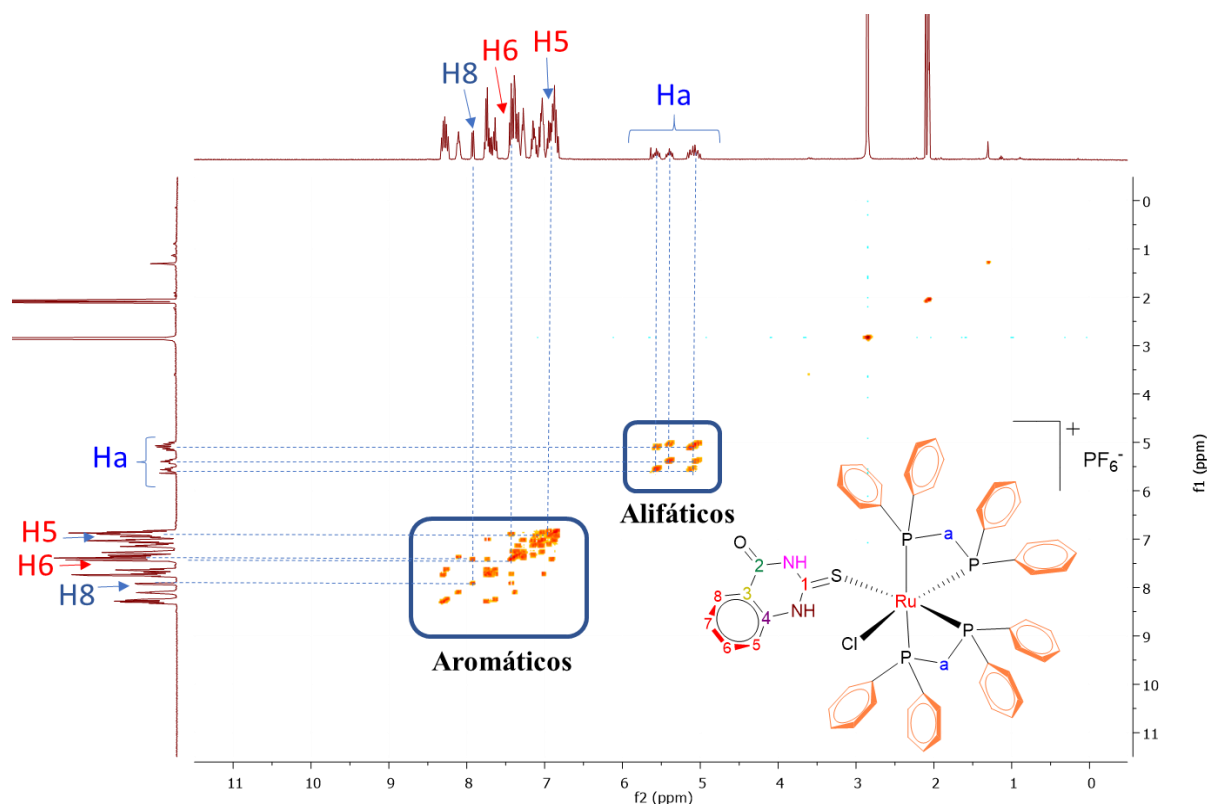


FIGURA 4.19 - Mapa de contorno de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) do complexo Ru1 em Acetona- $\text{d}_6$ .

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (Figura 4.20), também muito complexa devido à sobreposição de muitos sinais, foi feita avaliando os mapas de contorno HSQC e HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (Figuras 4.21 e 4.22). Após essa análise foi possível identificar os átomos de carbonos quaternários C1, C2, ligados átomos mais eletronegativos e por isso são os mais desblindados, e C3, C4. Os carbonos C8, C6 e C5 são terciários e estão ligados a hidrogênios. No HMBC foi possível observar o acoplamento a longa distância dos carbonos C2 e C3 com o hidrogênio H8 ligado ao C8, e C4 e C5 com H6 ligado a C6. Os carbonos da cadeia alifática da bifosfina (Ca) são os mais blindados, apresentam  $\delta$  43,01 e estão



ligados aos hidrogênios alifáticos Ha na região de  $\delta$  5,7-5,0. Os espectros dos complexos Ru2-Ru5 estão no apêndice (Figuras A12-A31).

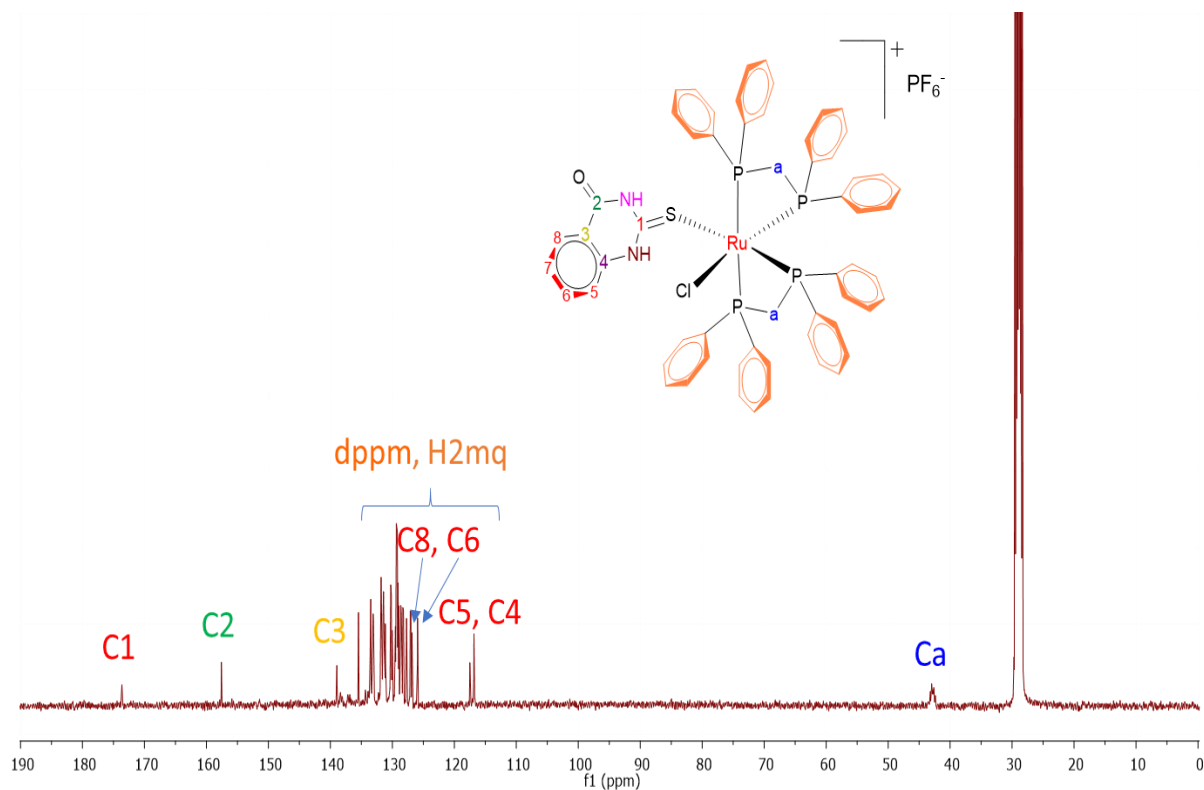


FIGURA 4.20 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  para o complexo Ru1 Acetona- $\text{d}_6$ .

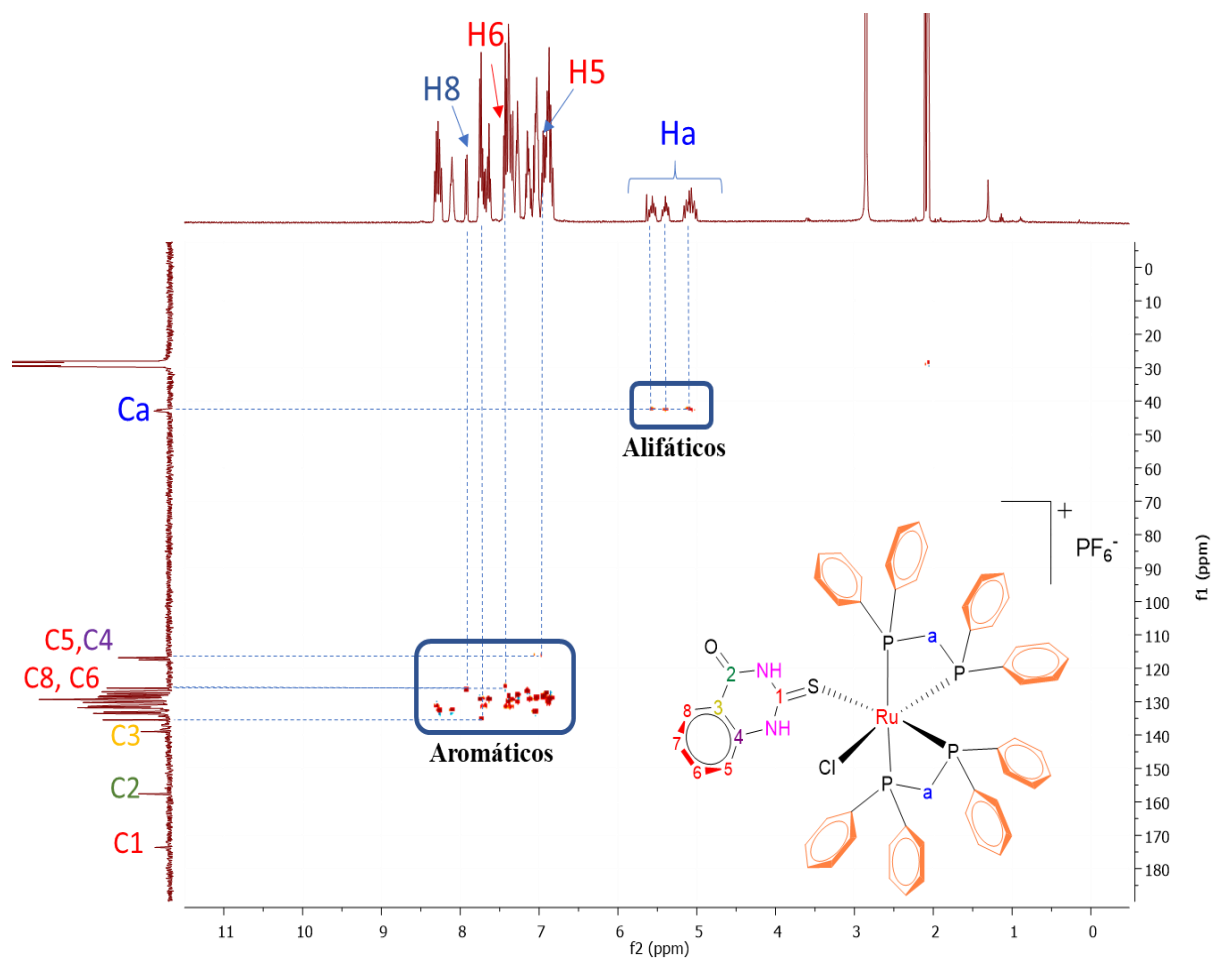


FIGURA 4.21 - Mapa de contorno de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru1 Acetona- $\text{d}_6$ .

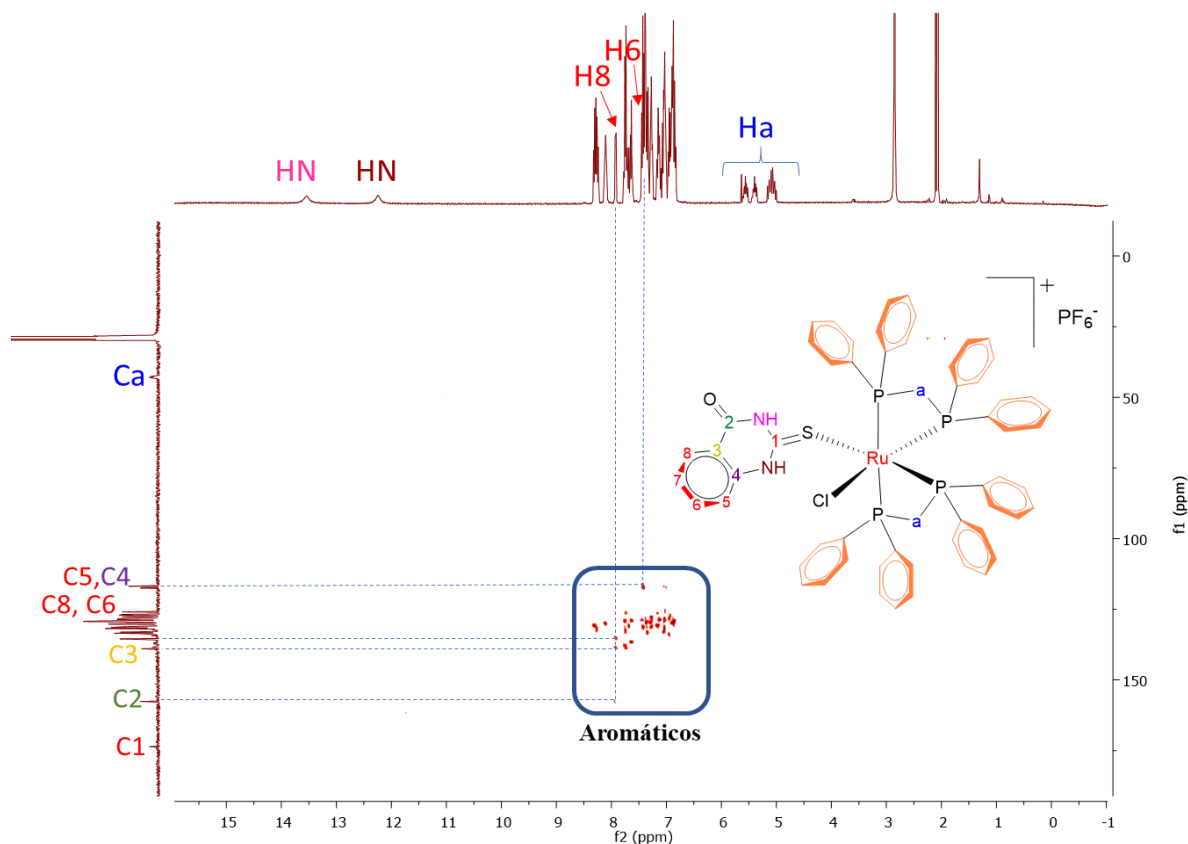


FIGURA 4.22 - Mapa de contorno de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru1 Acetona- $\text{d}_6$ .

## 4.2 - Estudo de Estabilidade dos Complexos em Solução

Os complexos foram avaliados quanto a sua estabilidade em soluções utilizadas nos testes biológicos. Para isso, foram acompanhados os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para os complexos Ru2, Ru3 e Ru5 e  $^1\text{H}$  para o complexo Ru4 nos tempos de 0h, 24h e 48h em DMSO. Os compostos apresentaram-se estáveis neste solvente (Figura A33-A35, Apêndice).

Apenas o complexo Ru1, em que a mercapto coordenou-se de forma monodentada, demonstrou instabilidade em DMSO, onde o padrão de sinais de

duplo duplo dubleto (ddd), observado quando o complexo é solubilizado em acetona, não é observado em DMSO, apresentando apenas dois tripletos (t) já no tempo de 0 h. O espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  desse complexo foi então comparado ao do seu respectivo precursor em DMSO (Figura 4.23) e observou-se que os espectros são muito semelhantes, apresentando dois tripletos com o mesmo deslocamento químico, sugerindo então que o ligante esteja saindo da esfera de coordenação do rutênio. Uma hipótese levantada é de que o DMSO, um solvente coordenante, esteja substituindo a mercapto e o clorido na esfera de coordenação do metal, assim como no precursor.

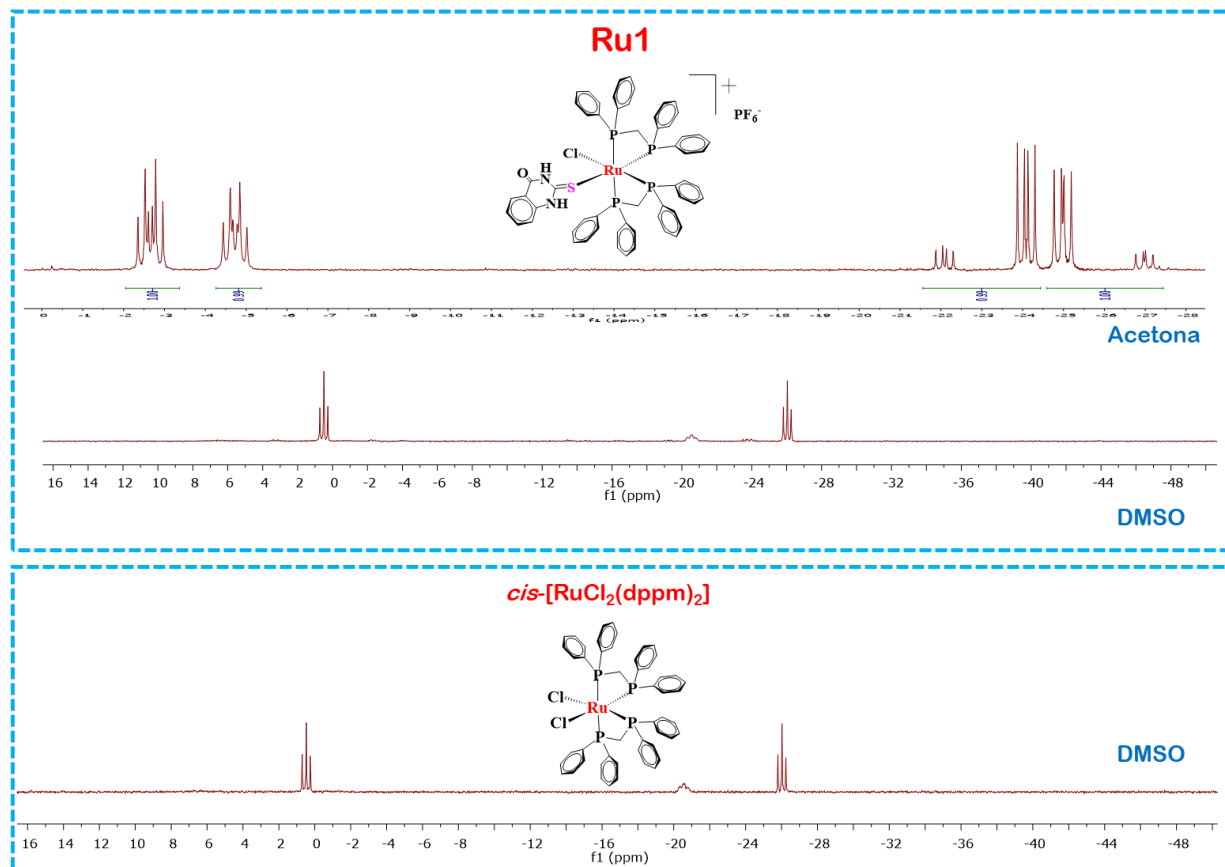


FIGURA 4.23 - Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru1 em acetona/D<sub>2</sub>O e em DMSO/D<sub>2</sub>O, e espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo precursor cis-[RuCl<sub>2</sub>(dppm)<sub>2</sub>] em DMSO/D<sub>2</sub>O.

---

---

A estabilidade do complexo Ru1 foi então avaliada em acetona, e verificou-se que o mesmo é estável nos tempos de 0, 24 e 48h. Diante disso, foi avaliada então a sua estabilidade em Acetona/Meio de cultura (DMEM), e foi observado que no tempo de 24h o espectro do complexo Ru1 apresenta um padrão de sinais similar ao complexo Ru5, em que o ligante está coordenado de forma bidentada (Figura 4.24). A hipótese levantada é de que na solução Acetona/Meio de cultura o ligante seja desprotonado e se coordene de forma bidentada ao centro metálico. É também observada a duplicação dos sinais assim como para o complexo Ru5, como mencionado anteriormente. A hipótese foi confirmada após a obtenção do cristal dessa solução, em que se confirma o modo de coordenação bidentado do ligante, pelos átomos de nitrogênio e enxofre, ao centro metálico. Devido a instabilidade do complexo Ru1 em DMSO e a verificação de que Ru1, em acetona/DMEM, é convertido em Ru5, os estudos de interação com biomoléculas e ensaios biológicos não foram realizados para este complexo.

Os demais complexos foram estáveis na mistura DMSO/Meio de cultura. Para o complexo Ru4, em que não há fósforos na esfera de coordenação, a estabilidade em DMSO/Meio de cultura foi avaliada por UV-Vis, neste caso foi utilizado meio de cultura sem fenol (RPMI) (Figuras A36-A38, apêndice).

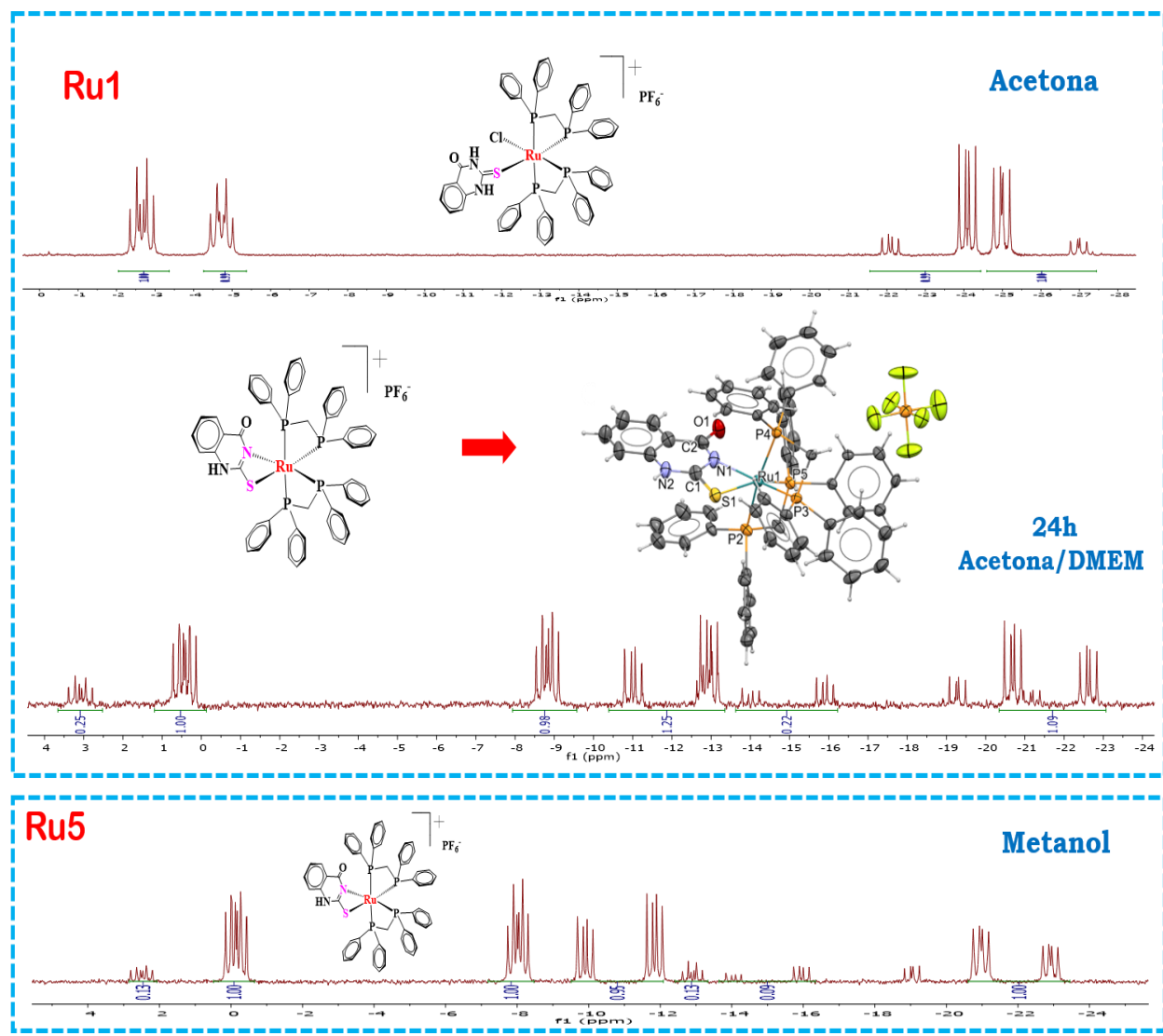


FIGURA 4.24 - Espectros de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru1 em acetona/D<sub>2</sub>O, acetona/DMEM. Espectro do complexo Ru5 em metanol/D<sub>2</sub>O.

## 4.3 - Estudo de Interação dos Complexos com DNA

### 4.3.1 - Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas para avaliar o possível modo de interação dos complexos com o DNA. Variações na viscosidade do DNA

na presença dos complexos concedem informações importantes sobre o tipo de interação complexo-DNA<sup>58</sup>.

Um agente intercalador, como o tiazol laranja, aumenta a distância entre os pares de bases nitrogenadas causando um alongamento da dupla hélice e aumento do volume e viscosidade do DNA<sup>59,60</sup>. Interações do tipo covalente provocam uma diminuição na viscosidade dessa biomolécula, pois diminui o comprimento axial da dupla hélice<sup>61</sup>.

Como pode ser observado na Figura 4.25, a adição crescente de alíquotas do complexo na solução não provocaram variações significativas na viscosidade do DNA, como as provocadas pelo tiazol (agente intercalante) e cisplatina (interage covalentemente), que indica que as interações são eletrostáticas e/ou interações pelos sulcos.

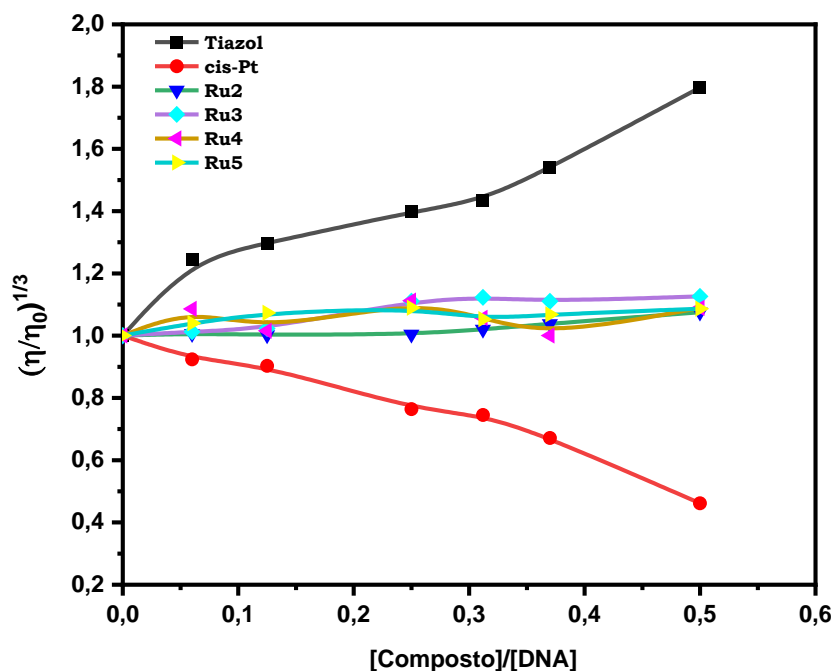


FIGURA 4.25 - Gráfico de viscosidade para complexos Ru2-Ru5, cisplatina e tiazol laranja.

---

---

### 4.3.2 - Dicroísmo Óptico Circular

Uma outra técnica útil na investigação quanto a forma de interação dos complexos com o DNA é o Dicroísmo Óptico Circular (OCD). Nos espectros do DNA (na sua forma B) obtidos por meio dessa técnica são observadas duas bandas: uma banda em aproximadamente 245nm, na região negativa, devido a sua helicidade (torção pra a direita) e uma em aproximadamente 275nm, na região positiva, referente ao empilhamento das bases<sup>62,63</sup>.

Interações do tipo covalente ou por intercalação são capazes de provocar mudanças na estrutura do DNA, que conseqüentemente provocarão mudanças significativas na intensidade e/ou posição das bandas, e as interações pelo sulcos ou eletrostáticas provocarão pequenas alterações<sup>64</sup>.

Na figura 4.26 é apresentado o espectro de OCD para o complexo Ru5, onde não foram observadas mudanças significativas quanto a intensidade e posição das bandas do DNA, que indicam que as interações são fracas sendo eletrostáticas e/ou pelos sulcos. Os demais complexos apresentaram comportamento semelhante ao complexo Ru5 (Figura 39- Apêndice).



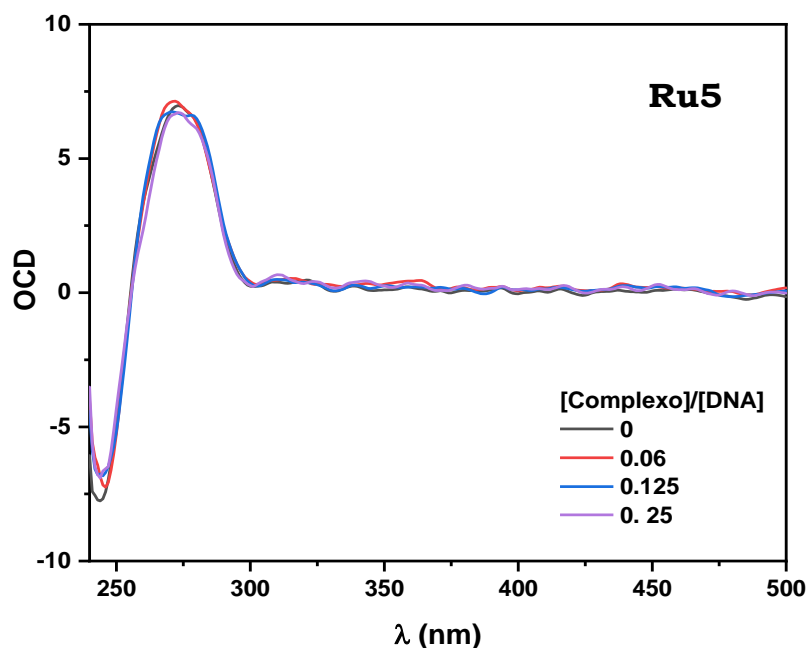


FIGURA 4.26 - Espectro de OCD CT-DNA na ausência e presença do complexo Ru5, em razões [Complexo]/[DNA] iguais a 0, 0.6, 0.125, 0.25.

### 4.3.3 - Ensaio de Deslocamento do Hoechst

Como observado através dos dados obtidos por meio das técnicas de Dicroísmo Óptico Circular e Viscosidade, o possível modo de interação dos complexos com DNA é por meio de interação eletrostática e/ou pelos sulcos.

Uma técnica utilizada para avaliar se a interação ocorre pelo sulco, neste caso o sulco menor, é o ensaio de deslocamento do Hoechst. O Hoechst 33258 é um corante fluorescente que interage com o DNA pelo sulco menor<sup>65</sup>, e o complexo formado DNA-Hoechst emite uma fluorescência em 460 nm quando excitado em 340 nm<sup>66</sup>.

Um decréscimo da intensidade de fluorescência do complexo DNA-Hoechst foi observado conforme houve um aumento da concentração do complexo

Ru5 (Figura 4.27), que indica que o mesmo é capaz de interagir com o DNA via sulco menor deslocando o Hoechst desta região, e provocando a supressão da fluorescência observada. Os demais complexos de rutênio desse estudo apresentaram comportamento semelhante (Figura A40-Apêndice).

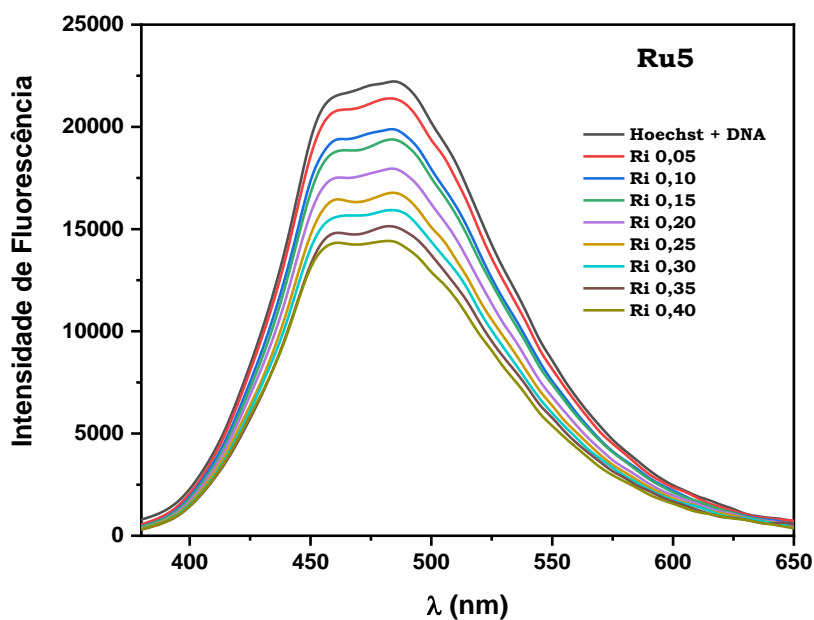


FIGURA 4.27 - Espectro de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença do complexo Ru5.

#### 4.3.4 - Eletroforese em gel de agarose

A técnica de eletroforese em gel de agarose também foi utilizada para avaliar a possível interação dos complexos com o DNA. Nesta técnica avalia-se a velocidade de migração desta biomolécula que, por possuir carga negativa, migra em direção ao polo positivo quando submetida a um campo elétrico. A velocidade dessa migração depende do seu tamanho e formato.

O DNA utilizado neste experimento foi o plasmídeo pBR322, que possui majoritariamente a forma superenovelada (SC) e migra rapidamente, além das formas linear (LC), que possui migração intermediária, e circular (OC), de migração mais lenta quando comparada as anteriores.

Os complexos de rutênio podem provocar mudanças, ou não, na forma do DNA plasmidial pBR322. Se ocorrerem mudanças da estrutura do plasmídeo, estas serão refletidas na velocidade de migração desta biomolécula. Como pode ser observado na Figura 4.28, na presença dos complexos Ru3-Ru5, o DNA não apresentou mudanças significativas quanto à velocidade de migração, apresentando comportamento semelhante ao controle negativo (DNA), que indica que os complexos não induzem mudanças significativas na estrutura desta biomolécula. O estudo de interação do complexo Ru2 com o DNA plasmidial pBR322, por meio da desta técnica, está relatado na literatura<sup>38</sup> e o mesmo apresenta comportamento semelhante aos complexos Ru3-Ru5 deste estudo.

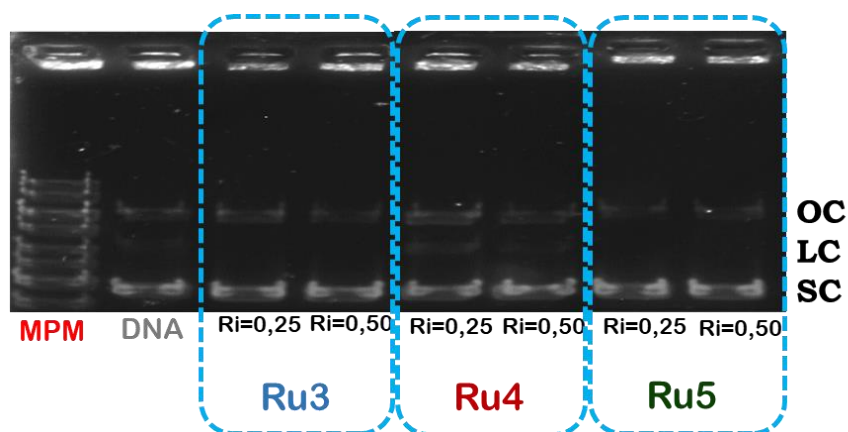


FIGURA 4.28 - Gel de eletroforese em que MPM = marcador de peso molecular; DNA = plasmídeo pBR322 (30  $\mu$ M) contendo 10% de DMSO; Ri= Razão molar complexo/DNA para os complexos Ru3-Ru5.

#### 4.4 - Estudo de Interação com HSA

Avaliar a interação dos complexos com a Albumina de Soro Humano (HSA) é importante, uma vez que a HSA é a proteína mais abundante no sangue e desempenha um papel importante no transporte de substâncias<sup>67</sup>. A interação dos complexos com essa biomolécula é avaliada por meio da supressão da fluorescência, pois essa proteína apresenta uma fluorescência intrínseca, devido a um resíduo de triptofano<sup>68</sup>.

Na Figura 4.29 é apresentado o espectro de fluorescência da HSA em diferentes concentrações do complexo Ru5, onde é possível observar uma diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do complexo, que é um indício de que esteja ocorrendo uma interação do complexo de rutênio com a HSA. Todos os complexos apresentaram comportamento similar (Figura A41- Apêndice).

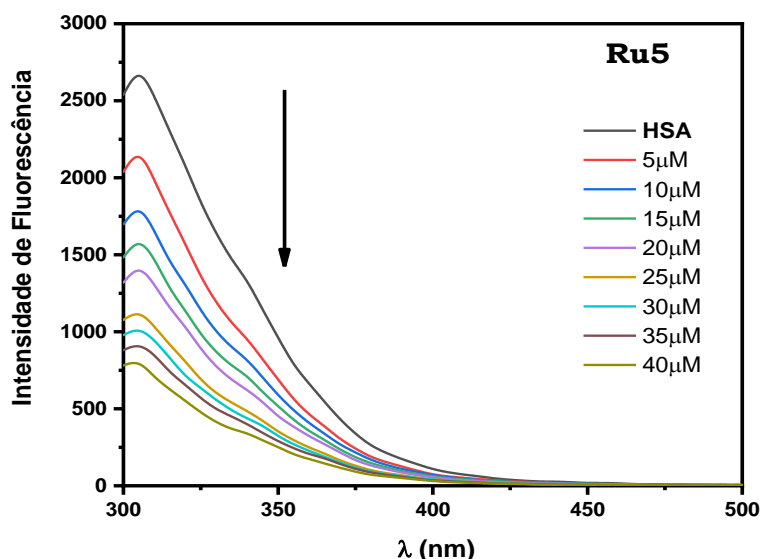


FIGURA 4.29 - Supressão da fluorescência da HSA na ausência e presença do complexo Ru5 em diferentes concentrações.

---

---

Foi realizada a análise quantitativa do processo de supressão da fluorescência e os dados estão apresentados na Tabela 4.9. Essa supressão pode ocorrer por mecanismo estático ou dinâmico. Por meio dos dados obtidos, observa-se que com o aumento da temperatura há uma diminuição dos valores da constante de supressão ( $K_{sv}$ ) para os complexos Ru2, Ru3 e Ru5 que indicam que a supressão da fluorescência ocorre por um mecanismo estático. Neste mecanismo ocorre a formação de um complexo entre a proteína (HSA) e o supressor (complexo de rutênio) no estado fundamental, e com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição da estabilidade deste complexo formado, por isso é observado um decréscimo nos valores de  $K_{sv}$  conforme a temperatura é aumentada<sup>69</sup>.

Para o complexo Ru4 ocorre um aumento da constante  $K_{sv}$  com o aumento da temperatura que indica um mecanismo dinâmico, neste caso ocorre uma colisão entre a proteína (HSA) no estado excitado e o supressor (complexo de rutênio), que retorna ao seu estado fundamental sem emitir a fluorescência, e o aumento da temperatura induz a ocorrência de mais colisões, por isso é observado que ao elevar a temperatura há um aumento nos valores de  $K_{sv}$ <sup>70</sup>. Contudo os valores de  $K_q$  (constante de velocidade de supressão bimolecular) obtidos para o complexo Ru4 são da ordem de  $10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , sendo superiores ao valor máximo para um mecanismo dinâmico ( $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>70</sup>, além de apresentar aumento do valor de  $K_q$  com o aumento da temperatura, o que sugere que o mecanismo para este complexo ocorra de forma dinâmica e estática.

TABELA 4.9 - Dados de quantitativos da interação dos complexos com HSA.

Complexo	T (K)	$K_{SV}$ ( $\times 10^4 M^{-1}$ )	$K_q$ ( $\times 10^{14} M^{-1} s^{-1}$ )	$K_b$ ( $\times 10^4 M^{-1}$ )	n	$\Delta H^\circ$ (kJ mol $^{-1}$ )	$\Delta S^\circ$ (J mol $^{-1}$ K)	$\Delta G^\circ$ (kJ mol $^{-1}$ )
Ru2	298	(5,68 $\pm$ 0,20)	2,84	(4,57 $\pm$ 0,05)	0,79	-4,4	74,5	-26,6
	303	(5,33 $\pm$ 0,03)	2,67	(4,44 $\pm$ 0,06)	0,76		74,5	-27,0
	310	(5,09 $\pm$ 0,01)	2,54	(4,38 $\pm$ 0,02)	0,73		74,8	-27,5
Ru3	298	(4,17 $\pm$ 0,23)	2,09	(3,66 $\pm$ 0,60)	0,92	-12,4	80,1	-26,8
	303	(3,73 $\pm$ 0,11)	1,87	(3,37 $\pm$ 0,50)	0,91		80,1	-27,2
	310	(3,53 $\pm$ 0,15)	1,77	(3,26 $\pm$ 0,43)	0,85		79,7	-27,6
Ru4	298	(3,36 $\pm$ 0,11)	1,68	(3,19 $\pm$ 0,05)	0,80	8,7	45,9	-26,0
	303	(3,61 $\pm$ 0,08)	1,80	(3,38 $\pm$ 0,02)	0,86		45,9	-26,3
	310	(3,72 $\pm$ 0,11)	1,86	(3,52 $\pm$ 0,04)	0,89		45,5	-26,8
Ru5	298	(5,59 $\pm$ 0,36)	2,79	(4,93 $\pm$ 0,27)	0,90	-2,9	115,3	-25,7
	303	(5,48 $\pm$ 0,49)	2,74	(4,84 $\pm$ 0,30)	0,89		115,3	-26,3
	310	(5,19 $\pm$ 0,55)	2,59	(4,49 $\pm$ 0,32)	0,86		115,0	-27,0

---

---

Para avaliar a magnitude da interação complexo-HSA calculou-se os valores de constante de ligação ( $K_b$ ). Com os valores de  $K_b$  obtidos, inferiu-se que essa interação é do tipo moderada, uma vez que os valores encontrados são da ordem de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . O número de sítios de ligação é de aproximadamente 1, que sugere que os complexos ligam-se a HSA numa estequiometria de 1:1.

Os parâmetros termodinâmicos foram avaliados com o objetivo de investigar o tipo de interação dos complexos com a HSA. Os valores de  $\Delta G$  indicam que as interações ocorrem de forma espontânea nas temperaturas estudadas. Valores negativos de  $\Delta H$  e positivos para  $\Delta S$ , como observados para os complexos Ru2, Ru3 e Ru5, indicam que as interações são eletrostáticas, enquanto valores positivos para  $\Delta H$  e  $\Delta S$ , como observados para o complexo Ru4, indicam que as interações complexo-HSA são hidrofóbicas<sup>71</sup>.

Os complexos que são estruturalmente similares (Ru2, Ru3 e Ru5), com duas bifosfinas, interagem com a HSA de forma semelhante, apresentando o mesmo tipo de mecanismo e interação. Enquanto o complexo com duas bipyridinas (Ru4) apresenta mecanismo e interação diferentes. Essa característica pode estar relacionada a presença dos anéis bipyridínicos que se acomodam de forma mais organizada ao redor do centro metálico, quando comparados as bifosfinas, e podem facilitar a interação dos anéis com regiões hidrofóbicas da proteína.

Observa-se que os valores obtidos após a análise quantitativa do processo de supressão da fluorescência por Silva, *et al*<sup>38</sup> para o complexo Ru2 são diferentes dos obtidos neste trabalho, isso pode estar relacionado as diferentes faixas de concentrações utilizadas.

---

---

## 4.5 - Ensaio Biológicos

### 4.5.1 - Viabilidade celular e lipofilicidade

A determinação da atividade citotóxica dos complexos foi realizada frente as linhagens tumorais B16-F10 (murino), A-375 (melanona humano) e linhagem não tumoral HaCat (linhagem não tumoral de queratinócitos humano). Os valores de  $IC_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular) em 24h e índices de seletividade (IS) estão apresentados na Tabela 4.10.

Os complexos Ru2, Ru3 e Ru5 foram citotóxicos nas linhagens estudadas e apresentaram valores de  $IC_{50}$  inferiores ao obtido para a cisplatina. Apesar de não serem observados índices de seletividade tão altos como o obtido por Silva *et al.*<sup>38</sup> para o complexo  $[Ru(2mq)(dppe)_2]PF_6$  na linhagem A549, pois são linhagens diferentes, este mesmo complexo (Ru2) e o  $[Ru(2mq)(dppen)_2]PF_6$  (Ru3) apresentaram bons IS nas linhagens avaliadas neste estudo. O complexo  $[Ru(2mq)(bipy)_2]PF_6$  (Ru4) não foi citotóxico em concentração igual ou inferior a 200  $\mu M$ . Observa-se que não somente a presença da mercapto, mas a presença das duas bifosfinas na esfera de coordenação tem uma influência positiva na atividade citotóxica dos complexos.

A lipofilicidade de um composto está relacionada aos processos de distribuição, absorção, metabolismo e excreção<sup>48</sup>. Contudo, não é possível estabelecer uma relação direta com os valores de lipofilicidade e citotoxicidade para os complexos desta série, uma vez que os complexos Ru3 e Ru4 são os mais lipofílicos, enquanto o Ru3 apresenta melhor atividade citotóxica, o Ru4 não é citotóxico dentro das concentrações avaliadas. Porém, dentre os complexos



bifosfínicos (Ru2, Ru3 e Ru5), o complexo Ru3 foi o mais lipofílico e também mais citotóxico.

TABELA 4.10 - Valores de IC<sub>50</sub> (μM) e Índices de Seletividade (IS) para os complexos de rutênio e cisplatina, frente as linhagens celulares HaCat, A-375 e B16-F10.

Complexos	IC <sub>50</sub> (μM) – 24 h			IS <sup>1</sup>	IS <sup>2</sup>	log P
	HaCat	A-375	B16-F10			
Ru2	12,06 ± 4,76	4,68 ± 0,40	3,90 ± 0,30	2,57	3,09	0,36 ± 0,10*
Ru3	16,32 ± 0,88	3,54 ± 0,34	6,14 ± 0,21	4,61	2,66	0,77 ± 0,07
Ru4	> 200	> 200	> 200	--	--	0,64 ± 0,06
Ru5	10,70 ± 1,60	2,80 ± 1,30	20,10 ± 1,40	3,82	0,53	0,21 ± 0,01
Cisplatina	67,34 ± 1,18	6,95 ± 0,03	148,11 ± 5,96	9,69	0,45	--

IS<sup>1</sup> = IC<sub>50</sub> HaCat/IC<sub>50</sub> A-375 e IS<sup>2</sup> = IC<sub>50</sub> HaCat/IC<sub>50</sub> B16-F10; \* Conforme relatado por Silva *et al.*<sup>19</sup>

Devido ao maior valor de índice de seletividade (IS) obtido para o complexo Ru3 este foi selecionado para dar continuidade à investigação quanto ao possível modo de ação frente a linhagem A-375.

#### 4.5.2 - Ensaio de Morfologia Celular

A morfologia celular foi avaliada na linhagem A-375, em diferentes concentrações do complexo Ru3 (0,625 μM – 20 μM). As imagens foram registradas nos tempos de 0h e 24h (Figura 4.30).

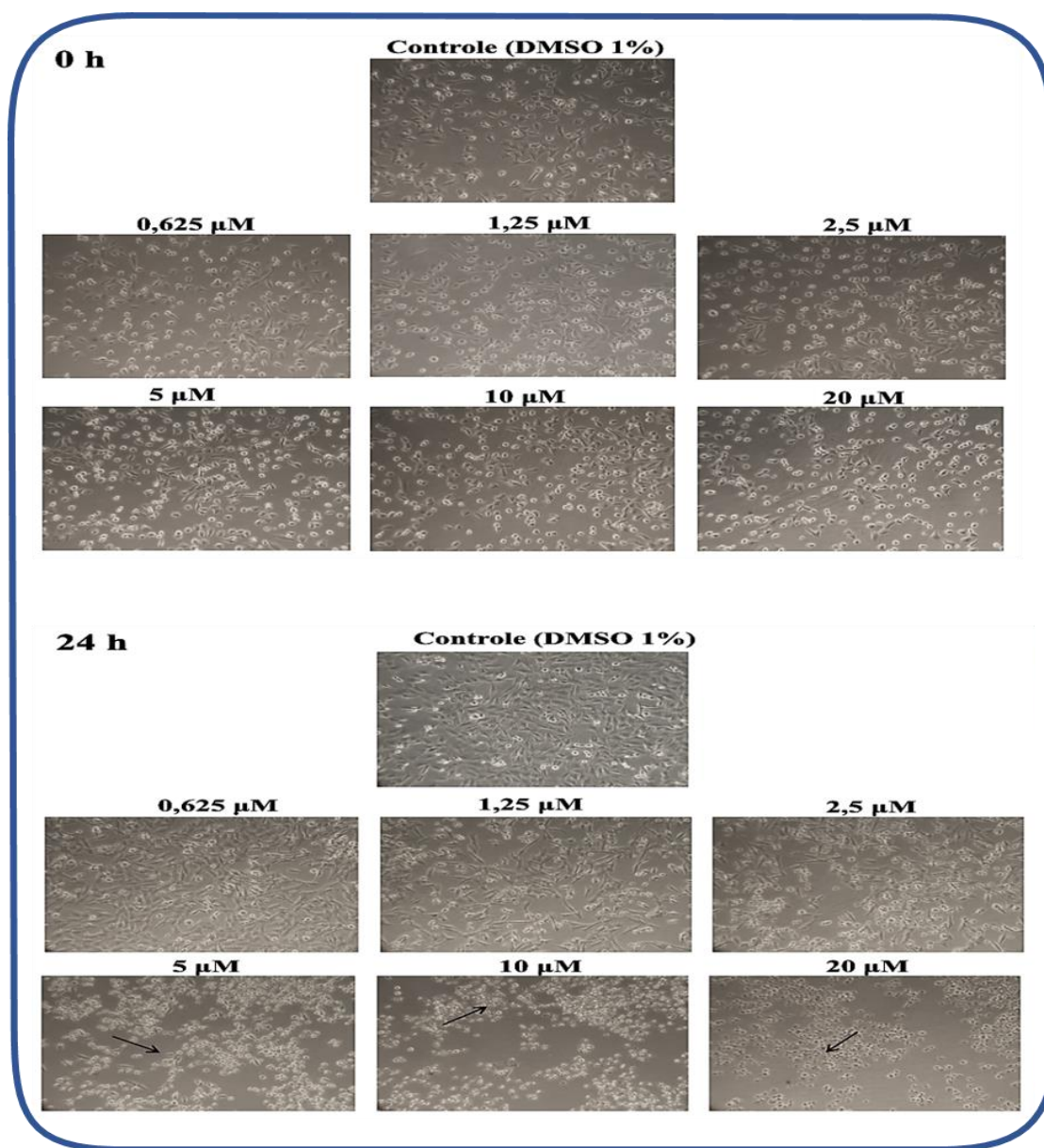


FIGURA 4.30 - Efeito do complexo Ru<sub>3</sub>, em diferentes concentrações, na morfologia das células de melanoma humano, A-375, após 0 e 24 h de tratamento.

Observa-se que o complexo Ru<sub>3</sub> provocou mudanças significativas na morfologia das células, principalmente nas concentrações de 5-20 μM. As

---

---

alterações foram observadas no formato das células, que após 24h apresentaram um formato circular, diminuição da densidade celular e perda da aderência, quando comparadas ao controle (células não tratadas com o complexo). Os resultados obtidos confirmam a atividade citotóxica do complexo Ru3 sobre as células da linhagem A-375.

### **4.5.3 - Avaliação Antiproliferativa**

No ensaio de sobrevivência clonogênica avaliou-se a capacidade de sobrevivência das células e de formação de colônias na presença e ausência do complexo Ru3. Para isso, as células tumorais (A-375) e não tumorais (HaCat) foram tratadas com diferentes concentrações do complexo de rutênio por 24h, exceto o controle, e a capacidade antiproliferativa foi avaliada após 10 dias.

Após análise dos dados, observou-se que o complexo Ru3 foi capaz de inibir a formação de colônias, quando comparado ao controle. Este efeito foi mais acentuado para a linhagem tumoral A-375, como pode ser observado na Figura 4.31 (A) e nos gráficos (B) e (C). Assim, pode-se inferir que o complexo Ru3 além de atuar como agente citotóxico, destruindo as células tumorais, atua como citostático, pois é capaz de inibir o crescimento celular.

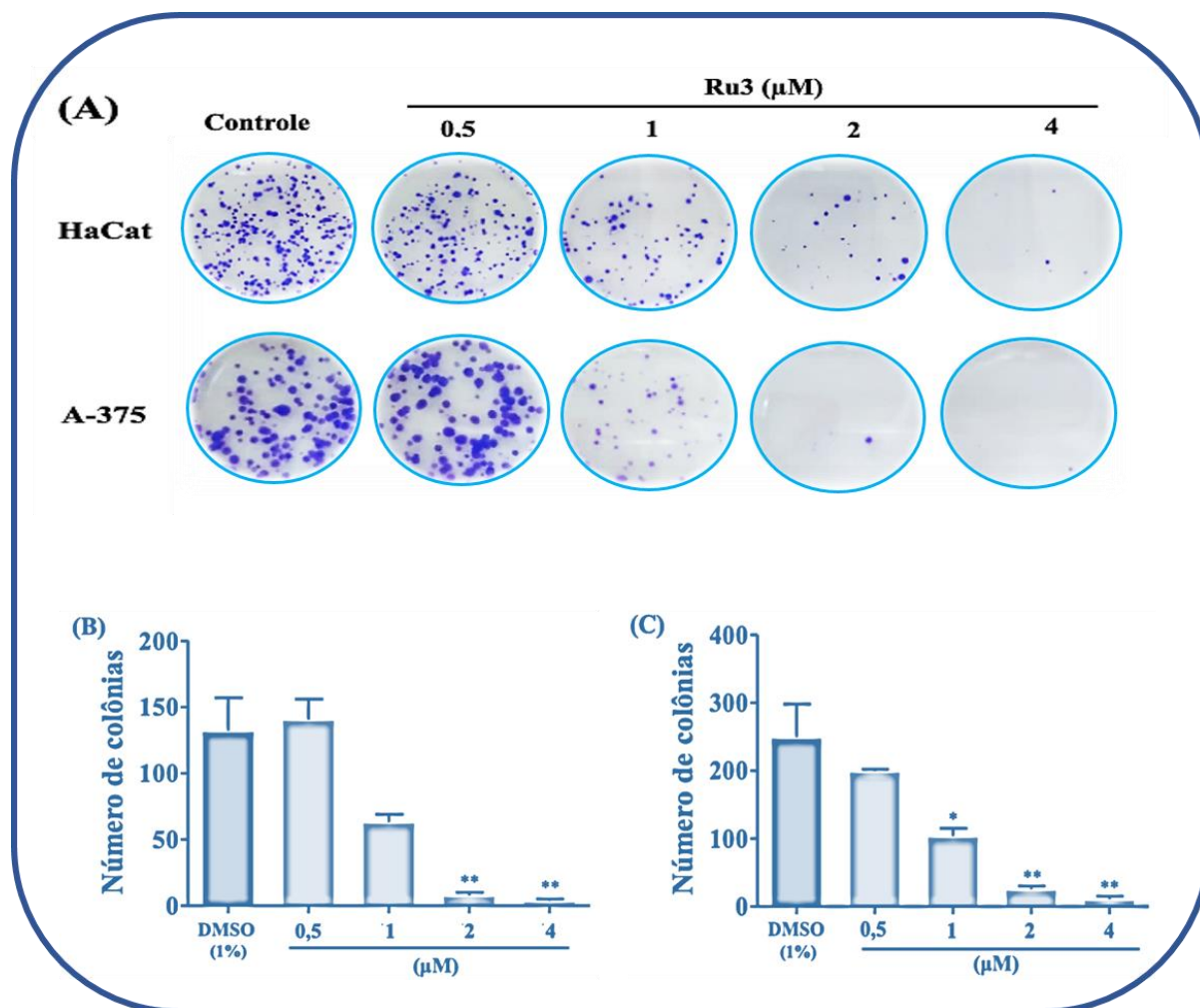


FIGURA 4.31 - (A) Efeito do complexo Ru3 na formação de colônias das não tumorais HaCat e tumorais A-375 e Representação gráfica do número de colônias em células (A) A-375 e (B) HaCat, em função da concentração. (\* $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,05$ ).

---

---

#### 4.5.4 - Avaliação da Migração Celular

A metástase é um processo onde ocorre a disseminação das células cancerosas do tumor primário para outros órgãos, mesmo distantes, sendo a causa mais frequente de morte por câncer<sup>71</sup>.

No ensaio de *Wound Healing* busca-se a avaliar a capacidade dos complexos de inibir a migração das células, uma vez que a migração está diretamente relacionado ao processo de metástase. Para isso, foi feita uma risca na monocamada aderente de células e adicionou-se o complexo Ru3 em diferentes concentrações (0,1  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$  e 0,4  $\mu\text{M}$ ). A linhagem utilizada para avaliar a migração foi a de melanona humano (A-375).

O fechamento da risca foi monitorado e após 24 h verificou-se que o complexo Ru3 foi capaz de inibir a migração das células nas concentrações utilizadas, visto que não houve completo fechamento da risca com a adição do complexo, quando comparado ao controle (Figura 4.32). Este efeito foi melhor observado nas concentrações de 0,2  $\mu\text{M}$  e 0,4  $\mu\text{M}$  do complexo, onde houve inibição de aproximadamente 40% e 60% da migração. As concentrações utilizadas foram todas menores que o valor de  $\text{IC}_{50}$ , pois não é esperado observar um efeito citotóxico, apenas o efeito inibidor da migração.

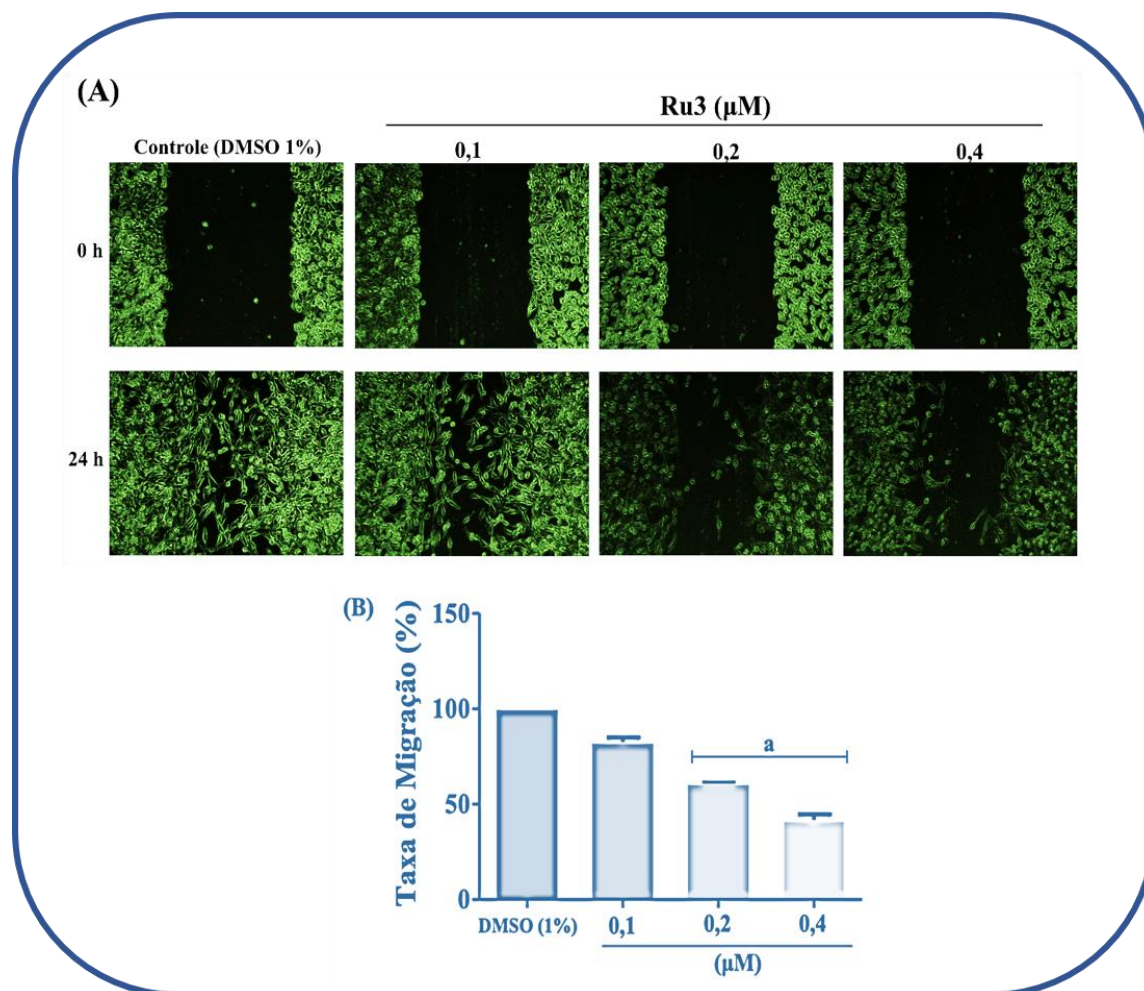


FIGURA 4.32 - (A) Imagens representativas do efeito do complexo Ru3 na migração das células de melanoma A-375 (Aumento de 10x na objetiva). (B) Representação gráfica da porcentagem de migração após 24 h de tratamento. <sup>a</sup>Significativamente diferente do grupo controle.

---

---

## 5 - CONCLUSÕES

Conforme proposto nos objetivos deste trabalho, foram sintetizados cinco complexos (Ru1-Ru5) de rutênio (II) contendo na esfera de coordenação dois ligantes bifosfínicos ou bipyridínicos e a mercapto-4(3H)quinazolinona (H2mq), e para o complexo Ru1, em que o ligante mercapto coordenou-se de forma monodentada, há também a presença de um ligante clorido. Essa identificação foi possível por meio das técnicas utilizadas para caracterização. Especialmente, a técnica de RMN  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , muito útil não somente para a caracterização, mas também no acompanhamento das reações. Com os espectros obtidos verificou-se mudanças no padrão dos sinais após a adição do ligante mercapto, que passa de dois tripletos (t), para um padrão de duplo duplo dubleto (ddd), indicando que aconteceram mudanças na esfera de coordenação. Por meio dessa técnica também foi possível a identificação dos isômeros em solução, pela duplicação dos sinais.

Por meio da técnica de difração de raios X, foi confirmada a presença da mercapto na esfera de coordenação do rutênio. A coordenação deste ligante não aconteceu de forma semelhante para todos os complexos, sendo monodentada para o complexo Ru1 e bidentada para os complexos (Ru2-Ru5). Uma relação entre a estrutura e estabilidade dos complexos pôde ser estabelecida, pois o complexo Ru1 na presença de um solvente coordenante como o DMSO, não é estável, enquanto os complexos Ru2-Ru5 são estáveis neste solvente no tempo de 0h-48h, pois formam quelatos que são mais difíceis de serem removidos da esfera de coordenação.

O estudo de interação com biomoléculas permitiu verificar que os complexos interagem com o DNA e que essa interação é fraca, sendo pelo sulco menor, verificada no ensaio de deslocamento do Hoechst, e possivelmente eletrostática, visto que os complexos são catiônicos e podem interagir com os

---

---

grupos fosfatos do DNA que são carregados negativamente. Enquanto a interação com a HSA, monitorada pela supressão da fluorescência, é moderada.

Nos ensaios biológicos, verificou-se que as fosfinas na esfera de coordenação são importantes para a atividade citotóxica, pois os complexos Ru2, Ru3 e Ru5 são citotóxicos e têm bons índices de seletividade nas linhagens tumorais A-375 e B16-F10, com melhor resultado para o complexo Ru3 em ambas as linhagens, enquanto o complexo Ru4 não apresentou citotoxicidade. O composto Ru3 possui efeito citotóxico e citostático, pois consegue diminuir o tamanho e inibir a formação de colônias. Além de atuar como inibidor da migração das células A-375 e alterar a morfologia. O complexo Ru4 não foi citotóxico mesmo em concentrações iguais a 200 $\mu$ M.

Os resultados obtidos através deste estudo permitem ampliar a pesquisa na área de complexos de rutênio como possíveis metalofármacos, especialmente em linhagens de câncer de pele.

Adicionalmente, os complexos também estão sendo testados nas linhagens de câncer de pulmão (A549) e não tumoral (MRC-5). Os resultados obtidos até o momento foram organizados na Tabela 5.1. Espera-se finalizar os ensaios para os complexos sintetizados e para os precursores ainda não testados que foram utilizados neste trabalho.



TABELA 5.1 - Valores de IC<sub>50</sub> (μM) e IS para os complexos, frente as linhagens celulares A549 e MRC-5 .

<b>Complexos</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM) – 48h</b>		<b>IS<sup>1</sup></b>
	<b>A549</b>	<b>MRC-5</b>	
Ru2	0,05 ± 0,01*	5,72 ± 0,64*	114*
Ru3	0,14 ± 0,01	3,28 ± 0,18	23,4
Ru4	> 30	> 30	--
Ru5	0,12 ± 0,008	nr	--

IS<sup>1</sup> = IC<sub>50</sub> (MRC-5)/IC<sub>50</sub> (A549); \*Dados extraídos da literatura<sup>21</sup>; nr = não realizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- <sup>1</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. O que causa câncer? Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/o-que-causa-o-cancer/>>. Acesso em: 17 de dez. de 2022.
- <sup>2</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 18 de dez. de 2022.
- <sup>3</sup> NCI - National Cancer Institute. Understanding Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 18 de dez. de 2022.
- <sup>4</sup> EID, R. T.; ALCHORNE, M. M. A. Câncer na pele negra. Ver. Bras. Clin. Med., 9 (6): 418, 2011.
- <sup>5</sup> NCI - National Cancer Institute. Skin Cancer Treatment (PDQ®) – Patient Version. Disponível em: <[https://www.cancer.gov/types/skin/patient/skin-treatment-pdq#\\_1](https://www.cancer.gov/types/skin/patient/skin-treatment-pdq#_1) >. Acesso em: 20 de dez. de 2022.
- <sup>6</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer de pele melanoma. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>. Acesso em: 17 de dez. de 2022.
- <sup>7</sup> BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. An. Bras. Dermatol., 86 (4): 732, 2011.
- <sup>8</sup> SGARDI, F. C.; DO CARMO, E. D.; ROSA, L. F. B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. Rev. de Ciênc. Méd., 16 (4-6): 245, 2007.
- <sup>9</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer de pele. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer-de-pele>>. Acesso em: 17 de dez. de 2022.
- <sup>10</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer de pele não melanoma. Disponível em:

---

<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-nao-melanoma>>. Acesso em: 17 de dez. de 2022.

<sup>11</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer de pele: Vamos falar sobre isso? Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/folhetos/cancer-de-pele-vamos-falar-sobre-isso>>. Acesso em: 17 de dez. de 2022.

<sup>12</sup> FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, **6**: 13, 2005.

<sup>13</sup> NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. *Rev. Virtual Quím.*, 3 (3): 196, 2011.

<sup>14</sup> NIKOLAOU, S.; DA SILVA, C. F.N. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio. *Quím. Nova*, **41**: 833, 2018.

<sup>15</sup> OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; & WHEATE, N. J. "The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists." *Dalton Trans.*, 47 (19): 6645, 2018.

<sup>16</sup> ALESSIO, E.; MESSORI, L. "NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry". *Molecules*, 24 (10): 1995, 2019.

<sup>17</sup> TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W.; KEPPLER, B. K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application". *Chem. Sci.*, 5 (8): 2925, 2014.

<sup>18</sup> HUDEJ, R.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M.; TODOROVIC, V.; SERSA, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G.; MARTINCIC, A.; SCANCAR, J.; KEPPLER, B. K.; & TUREL, I. "Modulation of activity of known cytotoxic ruthenium(III) compound (KP418) with hampered transmembrane transport in electrochemotherapy in vitro and in vivo." *J. Membr. Biol.*, 247 (12): 1239, 2014.

<sup>19</sup> BOLD-100 in Combination With FOLFOX for the Treatment of Advanced, Solid Tumours - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Disponível: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04421820>>. Acesso em: 28 de dez. de 2022.

- 
- <sup>20</sup> 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.; BATISTA, A. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. "In vitro cytotoxicity and in vivo zebrafish toxicity evaluation of Ru(II)/2-mercaptopyrimidine complexes". *Dalt. Trans.*, 48 (18): 6026, 2019.
- <sup>21</sup> DA SILVA, M. M.; RIBEIRO, G. H.; DE CAMARGO, M. S.; FERREIRA, A. G.; RIBEIRO, L.; BARBOSA, M. I. F.; DEFLON, V. M.; CASTELLI, S.; DESIDERI, A.; CORRÊA, R. S.; RIBEIRO, A. B.; NICOLELLA, H. D.; OZELIN, S. D.; TAVARES, D. C.; BATISTA, A. A. Ruthenium(II) diphosphine complexes with mercapto ligands that inhibit topoisomerase *ib* and suppress tumor growth in vivo. *Inorg. Chem.*, 60(18): 14174, 2021.
- <sup>22</sup> OLIVEIRA, K. M.; PETERSON, E. J.; CARROCCIA, M. C.; COMINETTI, M. R.; DEFLON, V. M.; FARRELL, N. P.; BATISTA, A. A.; & CORREA, R. S. "Ru(II)-naphthoquinone complexes with high selectivity for triple-negative breast cancer." *Dalton Trans.*, 49 (45): 16193, 2020.
- <sup>23</sup> MIESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D.A. *Química Inorgânica*. Gary L. 5a ed. São Paulo, Pearson Education do Brasil, 2014, p. 191.
- <sup>24</sup> SHRIVER, D.F.; ATKINS, P. W. *Química Inorgânica*. 3a ed. Porto Alegre: BOOKMAN, 2003, p. 203.
- <sup>25</sup> VALLE, E. M. A.; NASCIMENTO, F. B.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.; MONTEIRO, M. C. R.; MACHADO, S. P.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; AZEVEDO, E. R. Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  em complexos difosfínicos de rutênio. *Quim. Nova*, 31, (4): 807, 2008.
- <sup>26</sup> QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. "Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina". *Quím. Nova*, **19**: 651, 1996.
- <sup>27</sup> RAPER, E. S. "Complexes of heterocyclic thionates part 2: Complexes of bridging ligands". *Coord. Chem. Rev.*, **165**: 475, 1997.
- <sup>28</sup> AKRIVOS, P. D. Recent studies in the coordination chemistry of heterocyclic thiones and thionates. *Coord. Chem. Rev.*, 213(1):181, 2001.

- 
- <sup>29</sup> APPELT, P.; FAGUNDES, F. D.; FACCHIN, G.; KRAMER, M. G.; BACK, D. F.; CUNHA, M. A. A.; SANDRINO, B.; WOHNATH, K.; DE ARAUJO, M. P. "Ruthenium (II) complexes containing 2-mercaptothiazolines as ligands and evaluation of their antimicrobial activity". *Inorg. Chim. Acta*, **436**: 152, 2015.
- <sup>30</sup> ABDEL-AZIZ, A. A.-M.; ABOU-ZEID, L. A.; ELTAHIR, K. E. H.; AYYAD, R. R.; EL-SAYED, M.-A.; EL-AZAB, A. S. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, COX-1/2 inhibitory activities and molecular docking studies of substituted 2-mercapto-4 (3H)-quinazolinones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **121**: 410, 2016.
- <sup>31</sup> VARNA, D.; KAPETANAKI, E.; KOUTSARI, A.; HATZIDIMITRIOU, A. G.; PSOMAS, G.; ANGARIDIS, P.; PAPI, R.; PANTAZAKI, A. A.; ASLANIDIS, P. Heterocyclic thioamide/phosphine mixed-ligand silver (I) complexes: synthesis, molecular structures, DNA-binding properties and antibacterial activity. *Polyhedron*, **151**: 131, 2018.
- <sup>32</sup> STEPHSON, T. A.; WILKINSON, G. New complexes of ruthenium(II) and ruthenium(III) with diphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **28**: 945, 1966.
- <sup>33</sup> EVANS, I. P.; SPENCER, A.; WILKINSON, G. "Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes". *Dalt. Trans.*, (2): 204, 1971.
- <sup>34</sup> SULLIVAN, B. P.; MEYER, T. J. "Comparisons of the physical and chemical properties of isomeric pairs. 2. photochemical, thermal, and electrochemical cis-trans isomerizations of  $M(\text{Ph}_2\text{PCH}_2\text{PPh}_2)_2\text{Cl}_2$  ( $M = \text{RuII}, \text{OsII}$ )". *Inorg. Chem.*, **21** (3): 1037, 1982.
- <sup>35</sup> BAUTISTA, M. T.; CAPPELLANI, E. P.; DROUIN, S. D.; MORRIS, R. H.; SCHWEITZER, C. T.; SELLA, A.; ZUBKOWSKI, J. "Preparation and spectroscopic properties of the 2-dihydrogen complexes  $[\text{MH}(\text{H}_2)(\text{PR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{PR}_2)_2]^+$  ( $M = \text{Fe}, \text{Ru}$ ;  $R = \text{Ph}, \text{Et}$ ) and trends in properties down the iron group triad". *J. Am. Chem. Soc.*, **113** (13): 4876, 1991.
- <sup>36</sup> CORDEIRO, L. A. C. Estudo Eletroquímico de Complexos Fosfínicos Mono e Binucleares de Rutênio. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 1994. Tese de doutorado, 129 p.

- 
- <sup>37</sup> SULLIVAN, B. P.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. Mixed phosphine 2, 2' bipyridine complexes of ruthenium. *Inorg. Chem.*, 17 (12): 3334, 1978.
- <sup>38</sup> SILVA, M. M. "Busca por Complexos de Rutênio (II) com Propriedades Quimioterapêuticas: Avaliação da Atividade Antitumoral, Potencial Mutagênico e Inibição da Enzima Topoisomerase IB". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2017. Tese de doutorado, 258 p.
- <sup>39</sup> SHELDRICK, G. M. "SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination." *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.*, 71 (1): 3, 2015.
- <sup>40</sup> SHELDRICK, G. M. "Crystal Structure Refinement with SHELXL." *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, 71 (1): 3, 2015.
- <sup>41</sup> DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.; & PUSCHMANN, H. "OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program." *J. Appl. Crystallogr.*, 42 (2): 339, 2009.
- <sup>42</sup> BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2): 335, 2008.
- <sup>43</sup> RIBEIRO, G. H. Avaliação da Atividade Citotóxica de Novos Complexos Fosfínicos de Ru(II) com Ligantes Mercaptos ou Aciltioureas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2020. Tese de Doutorado, 326 p.
- <sup>44</sup> NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. "Binding of serum albumins with bioactive substances – nanoparticles to drugs". *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 14: 53, 2013.
- <sup>45</sup> FRANKEN, N.A.P.; RODERMOND, H.M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. V. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5): 2315, 2006.
- <sup>46</sup> YARROW, J. C.; PERLMAN, Z. E.; WESTWOOD, N. J.; MITCHISON, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology*, 4: 1, 2004.
- <sup>47</sup> KÜHL, O. Phosphorus-31 NMR Spectroscopy: A Concise Introduction for the Synthetic Organic and Organometallic Chemist. 1a ed. Springer, 2008. p. 22.

- 
- <sup>48</sup> OLIVEIRA, K. M. Avaliação das Propriedades Antitumorais de Complexos de Rutênio (II) Contendo os Ligantes Lapachol ou Lausona. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2018. Tese de doutorado, 183 p.
- <sup>49</sup> PIRES, W.C.; LIMA, B. A. V.; DE CASTRO PEREIRA, F.; LIMA, P. A.; MELLO-ANDRADE, F.; SILVA, H. D.; SILVA, M. M.; COLINA-VEGAS, L.; ELLENA, J.; BATISTA, A. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. 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.
- <sup>50</sup> DO NASCIMENTO, F. B.; POELHSITZ, G. V.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q. F.; ARAÚJO, H. S. S. DE; 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 (9): 1783, 2008.
- <sup>51</sup> LIMA, B. A. V. Avaliação Das Atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfínicos de Rutênio (Células Tumorais MDA-MB 231). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de mestrado, 207 p.
- <sup>52</sup> 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. "Ruthenium(II) Complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: cytotoxicity against tumor cells and anti-trypanosoma cruzi activity enhanced upon combination with benzimidazole". *J. Inorg. Biochem.* **156**: 153, 2016.
- <sup>53</sup> VELHO, R. G. “Medidas de Condutividade na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 60 p.
- <sup>54</sup> PAVIA, D. L. LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4a ed. São Paulo: Cengage, Learning, 2010. p. 150.

- 
- <sup>55</sup> POELHSITZ, G. V. Nitrosilo Complexos de Rutênio com Ligantes Bifosfínicos: Espectroscopia, Eletroquímica, Estudo de Reatividade e Liberação de NO. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 284 p.
- <sup>56</sup> BERNERS-PRICE, S. J.; NORMAN, R. E.; SADLER, P. J. The autoxidation and proton dissociation constants of tertiary diphosphines: relevance to biological activity. *J. Inorg. Biochem.*, 31(3): 197, 1987.
- <sup>57</sup> PEREIRA, L. R. Influência da fosfina na estrutura e na citotoxicidade de complexos de rutênio (II) com a 2-mercaptopirimidina. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2016. Dissertação de Mestrado, 117 p.
- <sup>58</sup> SIRAJUDDIN, M.; ALI, S. & BADSHAH, A. "Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry". *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **124**: 1, 2013.
- <sup>59</sup> WEI, Y.; GUO, L. H. "Binding interaction between polycyclic aromatic compounds and DNA by fluorescence displacement method". *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (5): 940, 2009.
- <sup>60</sup> 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 (40): 13309, 2010.
- <sup>61</sup> 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 (24): 11709, 2015.
- <sup>62</sup> DASH, S. P.; PANDA, A. K.; PASAYAT, S.; DINDA, R.; BISWAS, A.; TIEKINK, E. R. T.; PATIL, Y. P.; NETHAJI, M.; KAMINSKY, W.; MUKHOPADHYAY, S.; BHUTIA, S. K. "Syntheses and structural investigation of some alkali metal ion-mediated LVVO<sub>2</sub> - (L<sub>2</sub><sup>-</sup> = tridentate ONO ligands) species: DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxic activities". *Dalt. Trans.*, 43 (26): 10139, 2014.



- 
- <sup>63</sup> MELLO, M. V. P. Estudo de Novos Compostos de Coordenação como Possíveis Agentes Antitumorais: Uma Visão da Química Inorgânica Medicinal. Niterói, Programa de Pós-graduação em Química – UFF, 2020. Tese de Doutorado, 214 p.
- <sup>64</sup> MARTIN, S.R.; SCHILSTRA, M.J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Method Cell Biol.*, **84**: 263, 2008.
- <sup>65</sup> SILVA, E. F.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S. "DNA interaction with Hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes". *J. Phys. Chem. B.* 117 (24): 7292, 2013.
- <sup>66</sup> CHEN, J. C.; JOCKUSCH, R. A. "Protomers of DNA-binding dye fluoresce different colours: intrinsic photophysics of Hoechst 33258". *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 21 (30): 16848, 2019.
- <sup>67</sup> SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P. B.; MANJUNATHA, D. H. & ASHOKA, S. "Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin". *Dyes and Pigments*, 74(3): 665, 2007.
- <sup>68</sup> 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 (1): 38, 2005.
- <sup>69</sup> MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. "Investigação da supressão da fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio". *Quím. Nova*, **38**: 227, 2015.
- <sup>70</sup> GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M. A.; PALANIANDAVAR, M. "New ruthenium(II) arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity". *Dalton Trans.*, 43 (3): 1203, 2014.
- <sup>71</sup> YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. "Cell migration in tumors". *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (5): 559, 2005.

## APÊNDICE

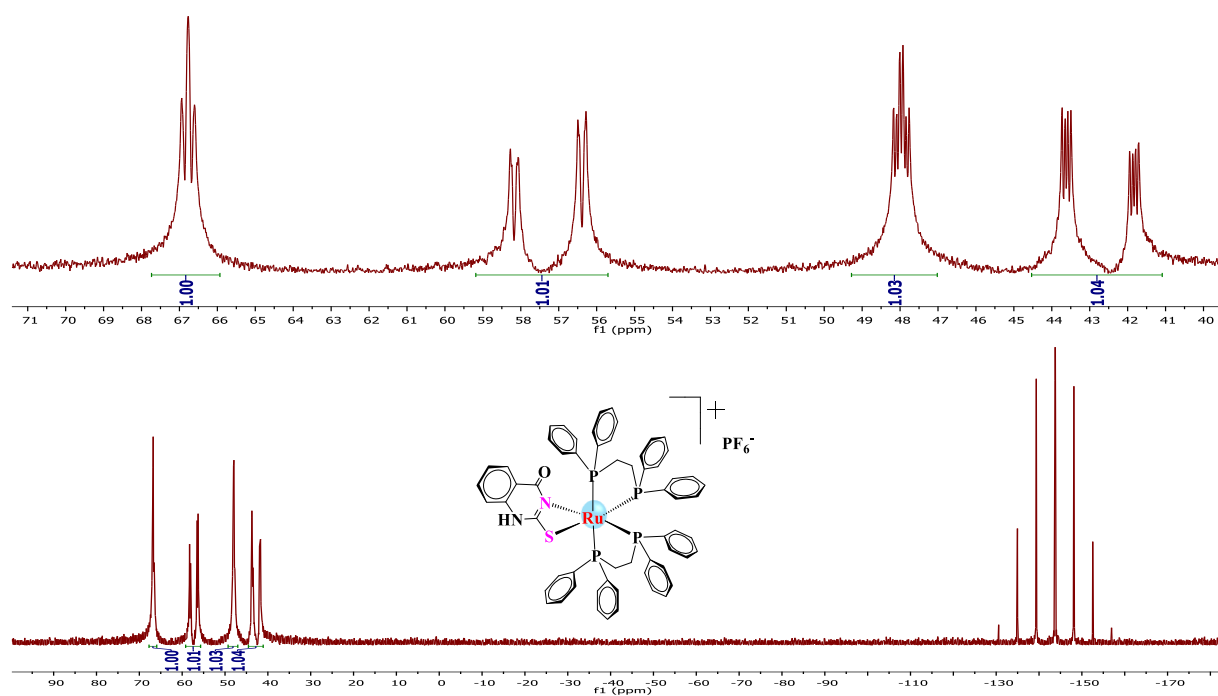


FIGURA A1 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru2 em DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$ .

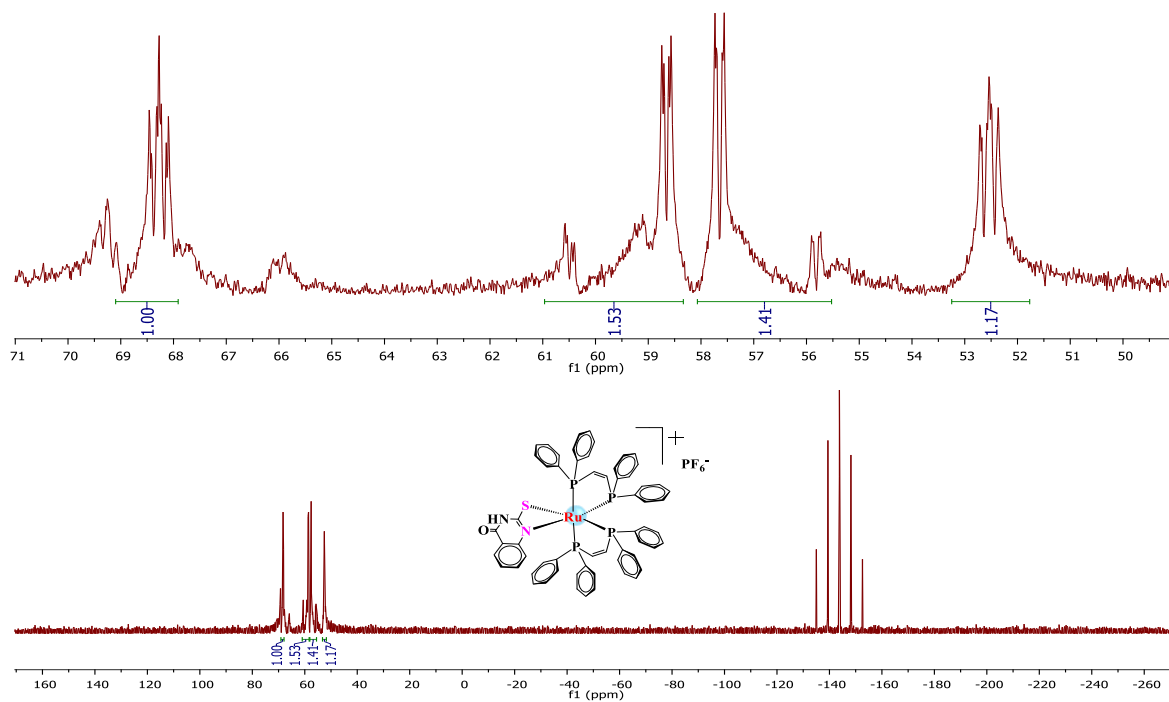


FIGURA A2 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru3 em DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$ .

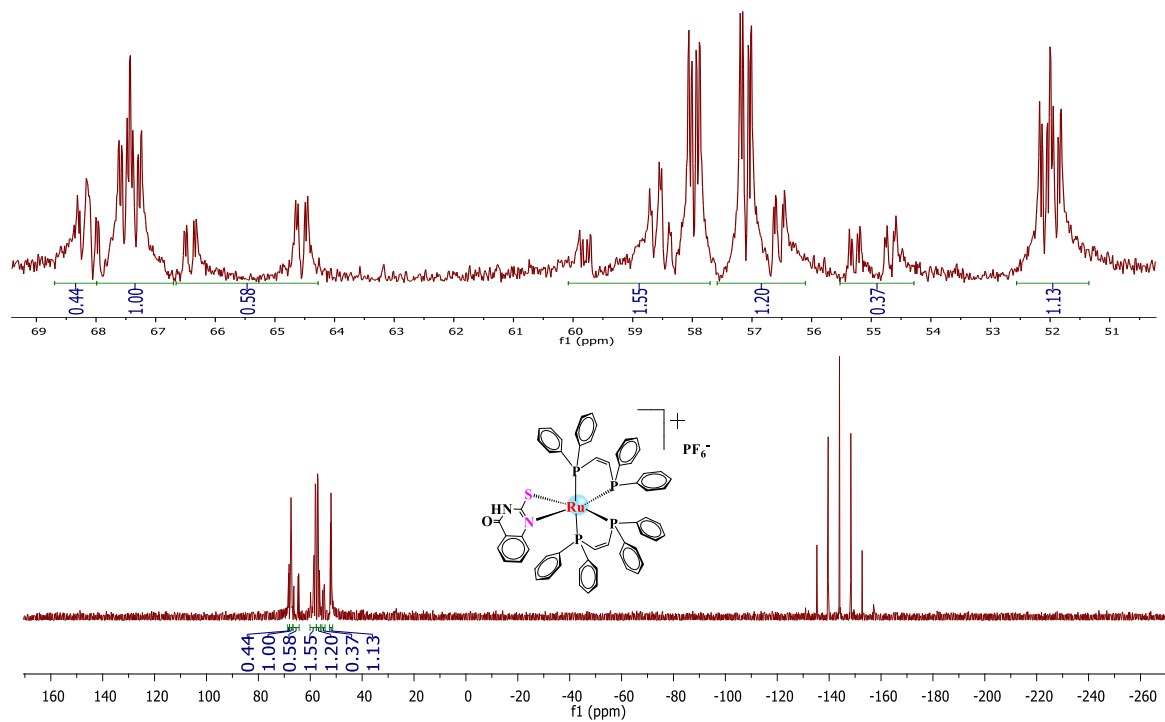


FIGURA A3 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru<sub>3</sub> em Acetonitrila/D<sub>2</sub>O.

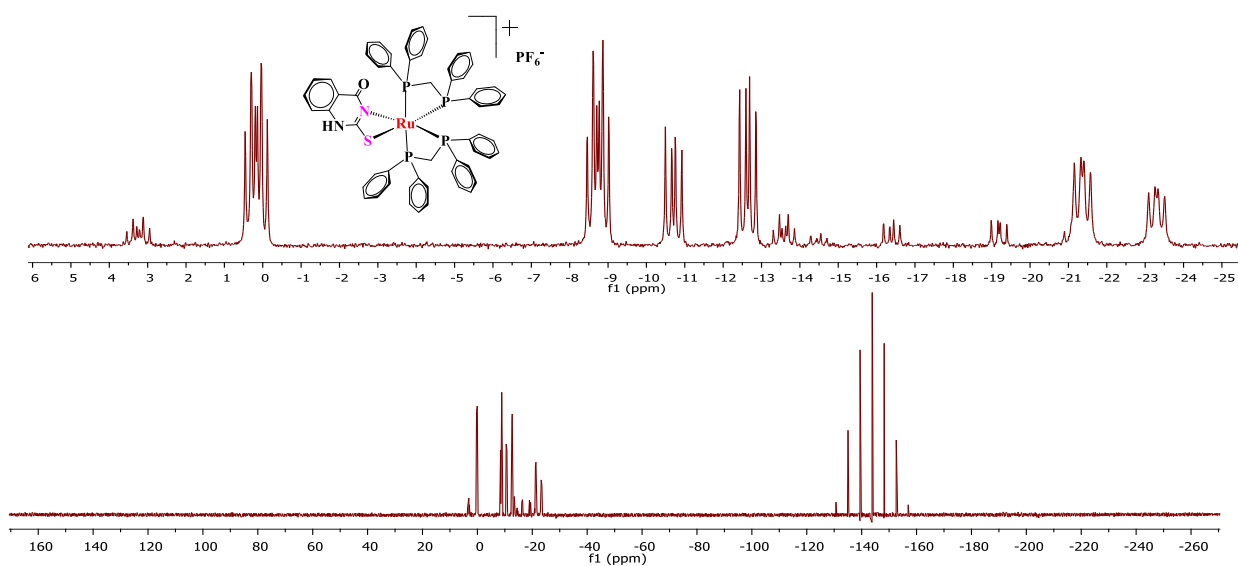


FIGURA A4 - Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  do cristal do complexo Ru5 solubilizado em DMSO/ $\text{D}_2\text{O}$ .

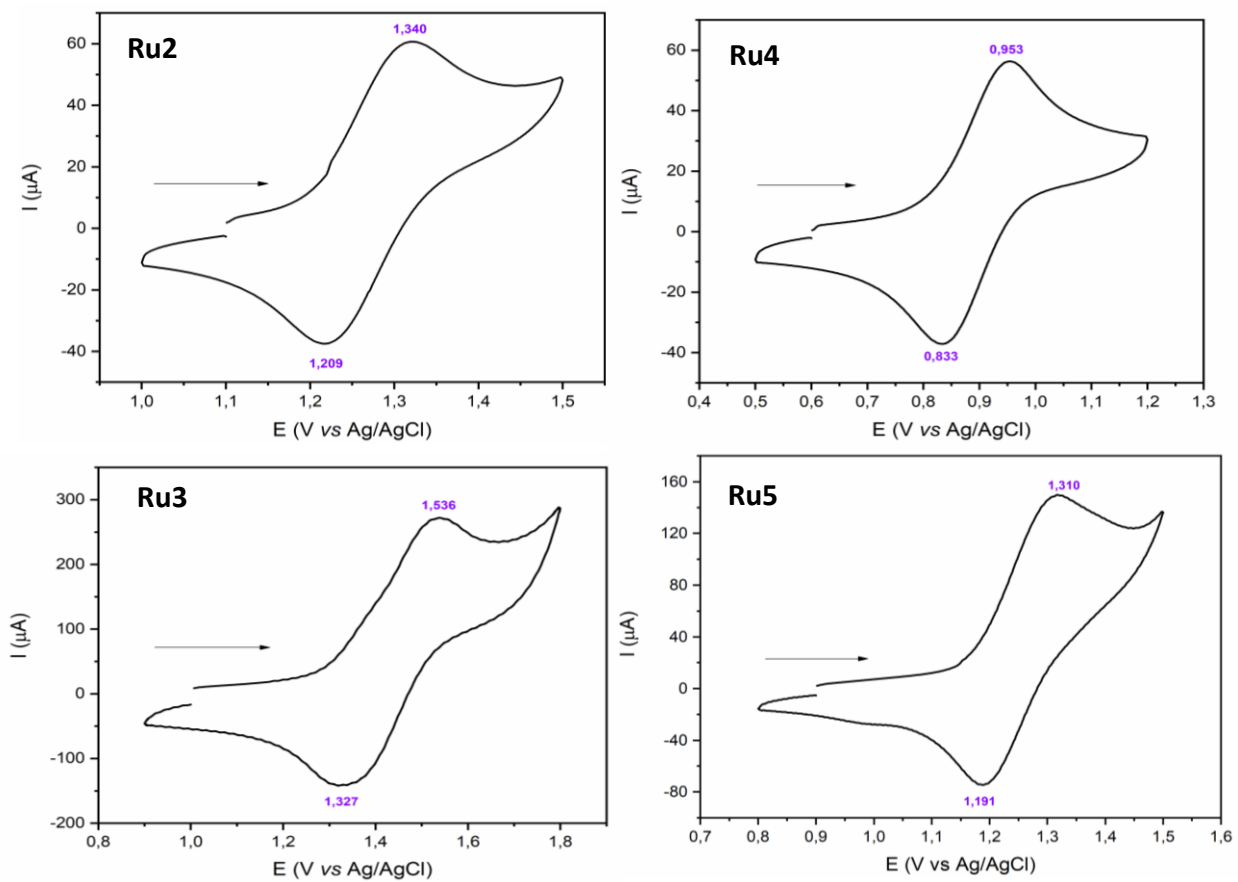


FIGURA A5 – Voltamogramas cíclicos dos complexos Ru2-Ru5 obtidos em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,1 M PTBA,  $100 \text{ mVs}^{-1}$ ).

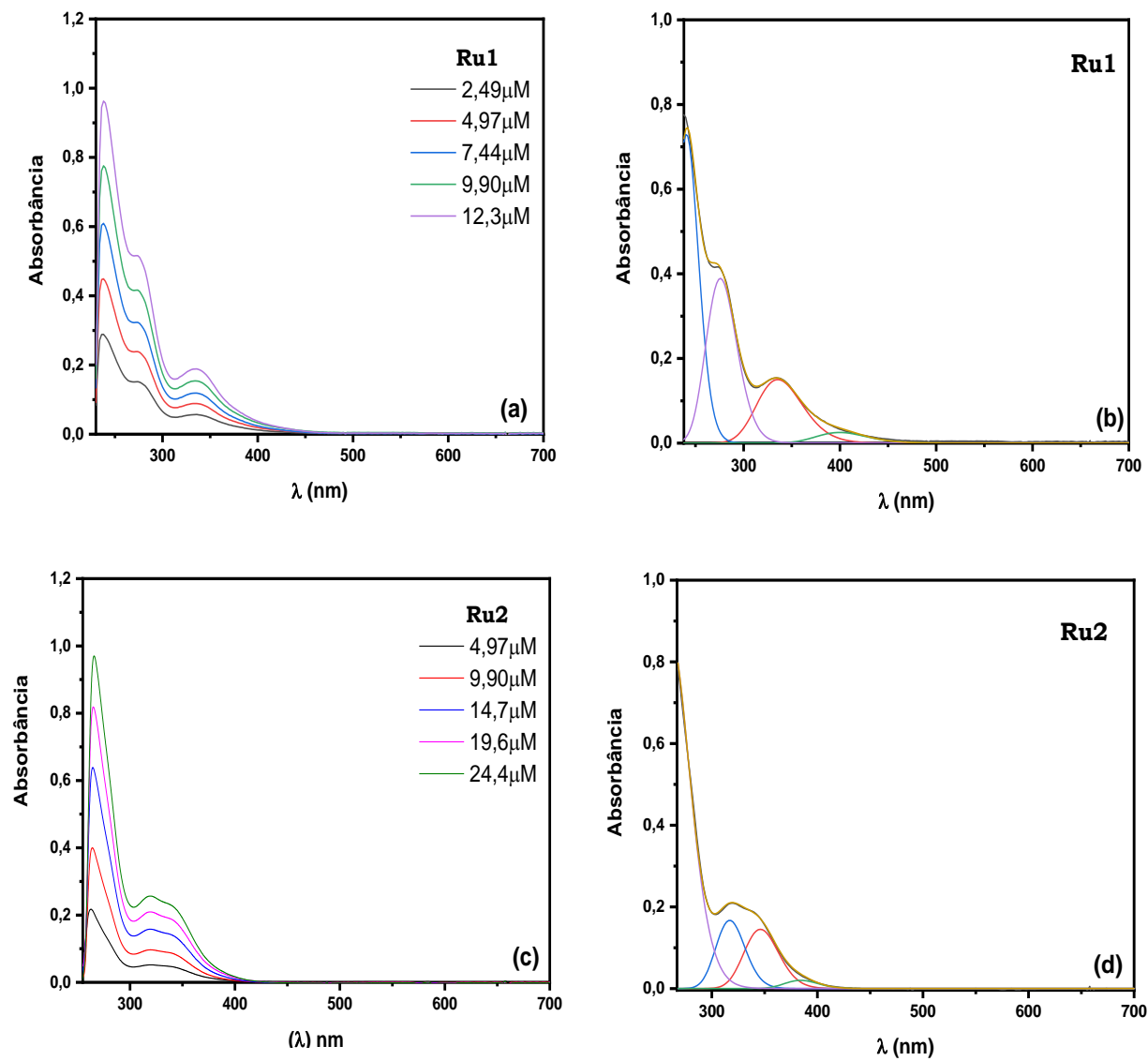


FIGURA A6 – Espectros eletrônicos obtidos em DMSO e espectros deconvoluídos dos complexos Ru1 e Ru2.

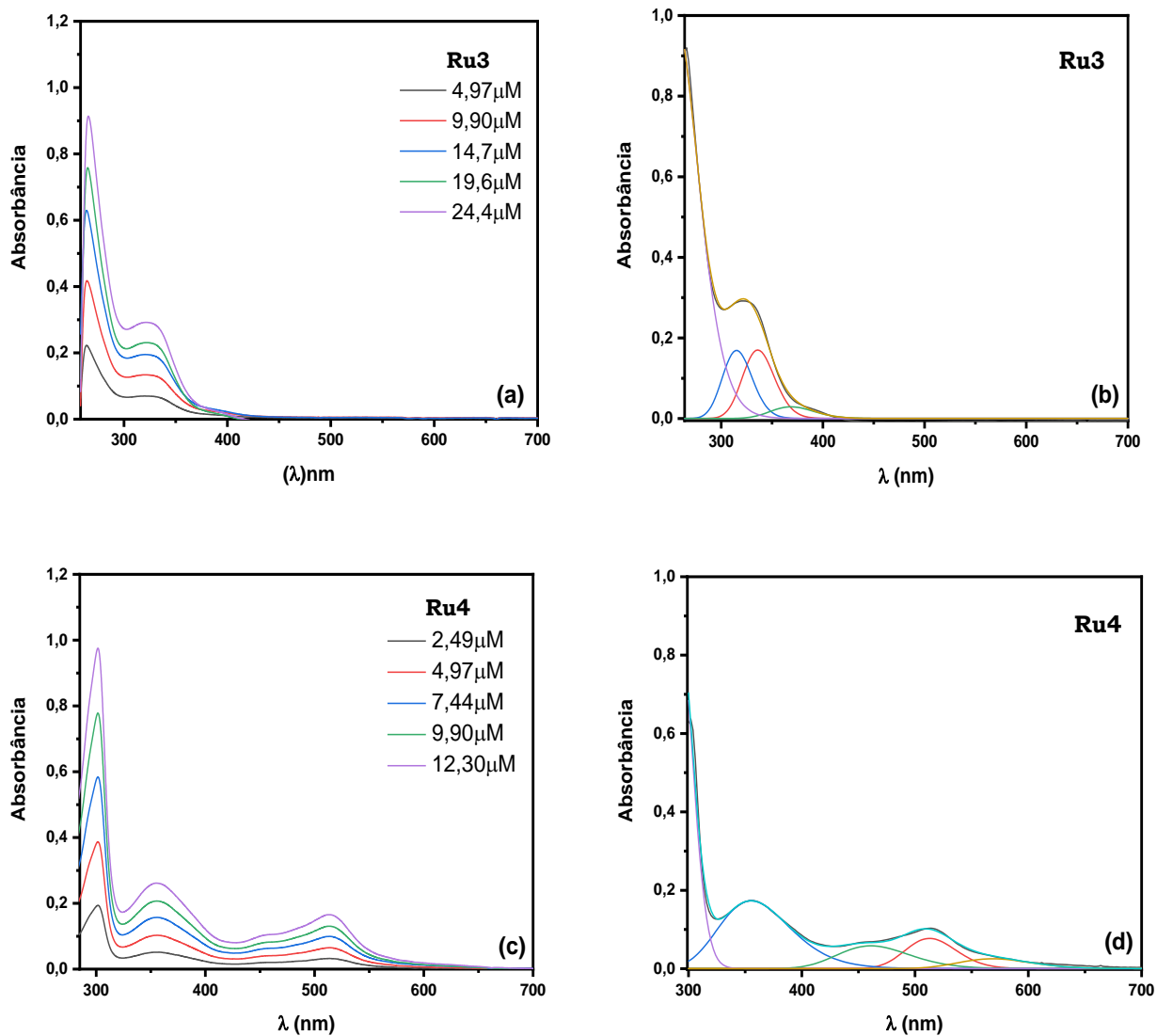


FIGURA A7 – Espectros eletrônicos obtidos em DMSO e espectros deconvoluídos dos complexos Ru1 e Ru2.



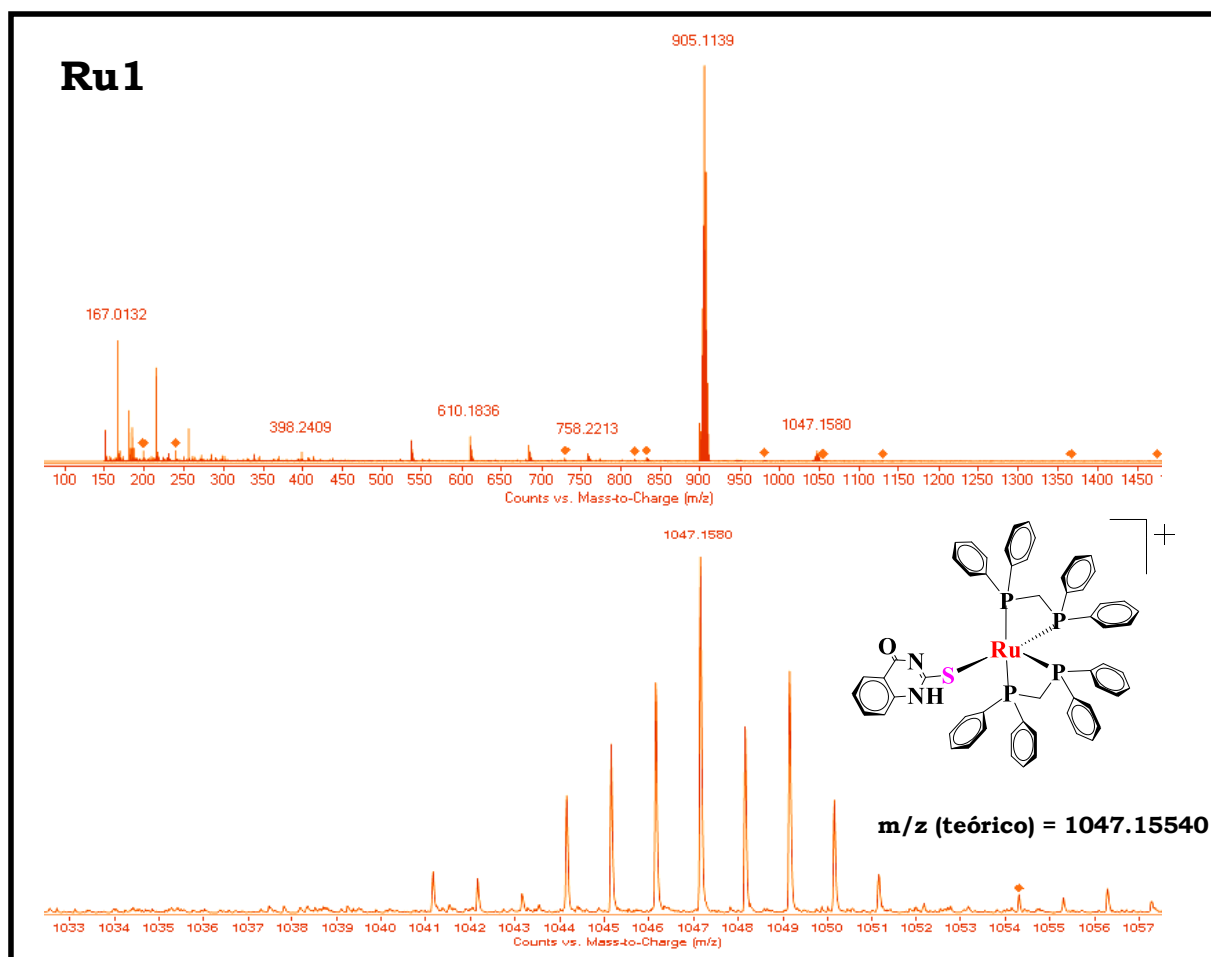


FIGURA A8 – Espectro de massa do complexo Ru1.

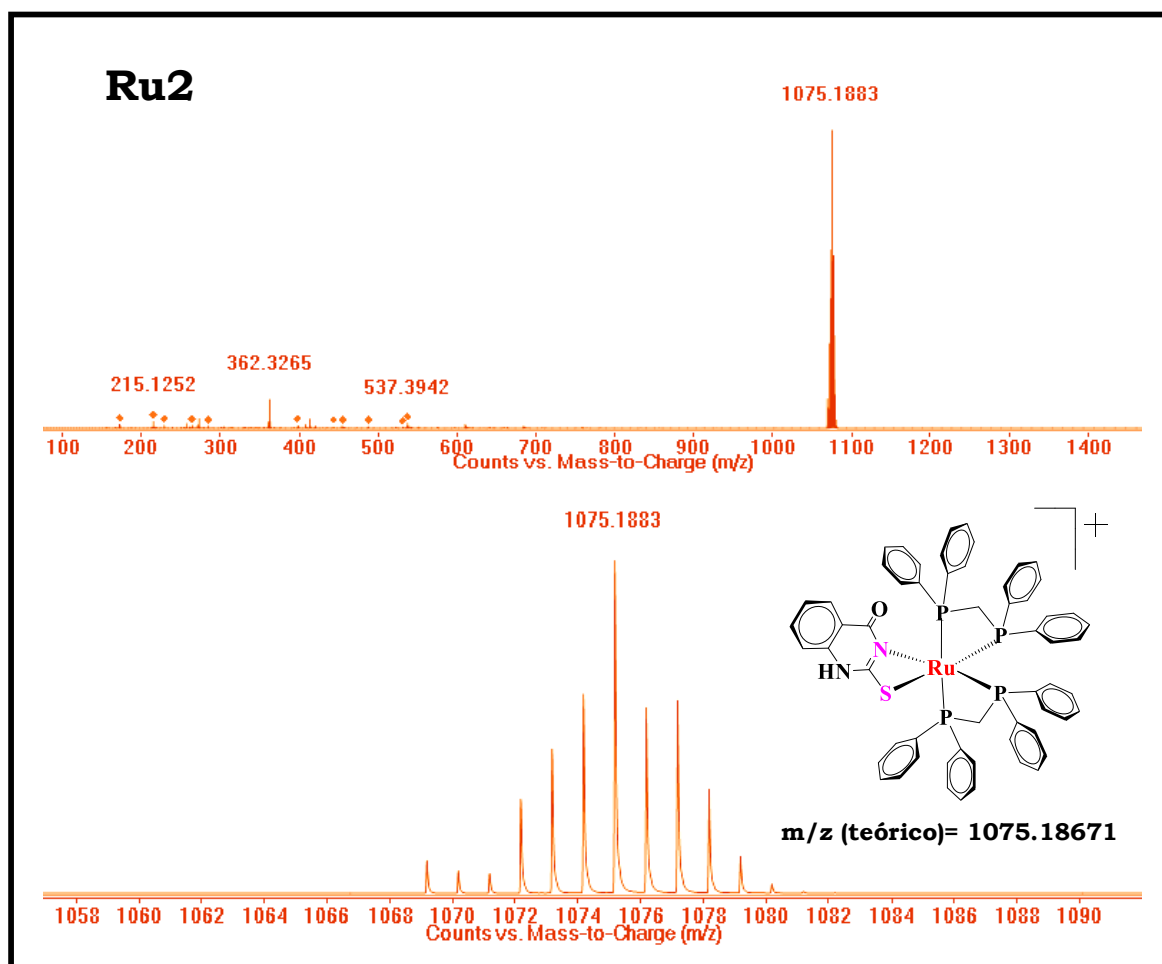


FIGURA A9 – Espectro de massa do complexo Ru2.

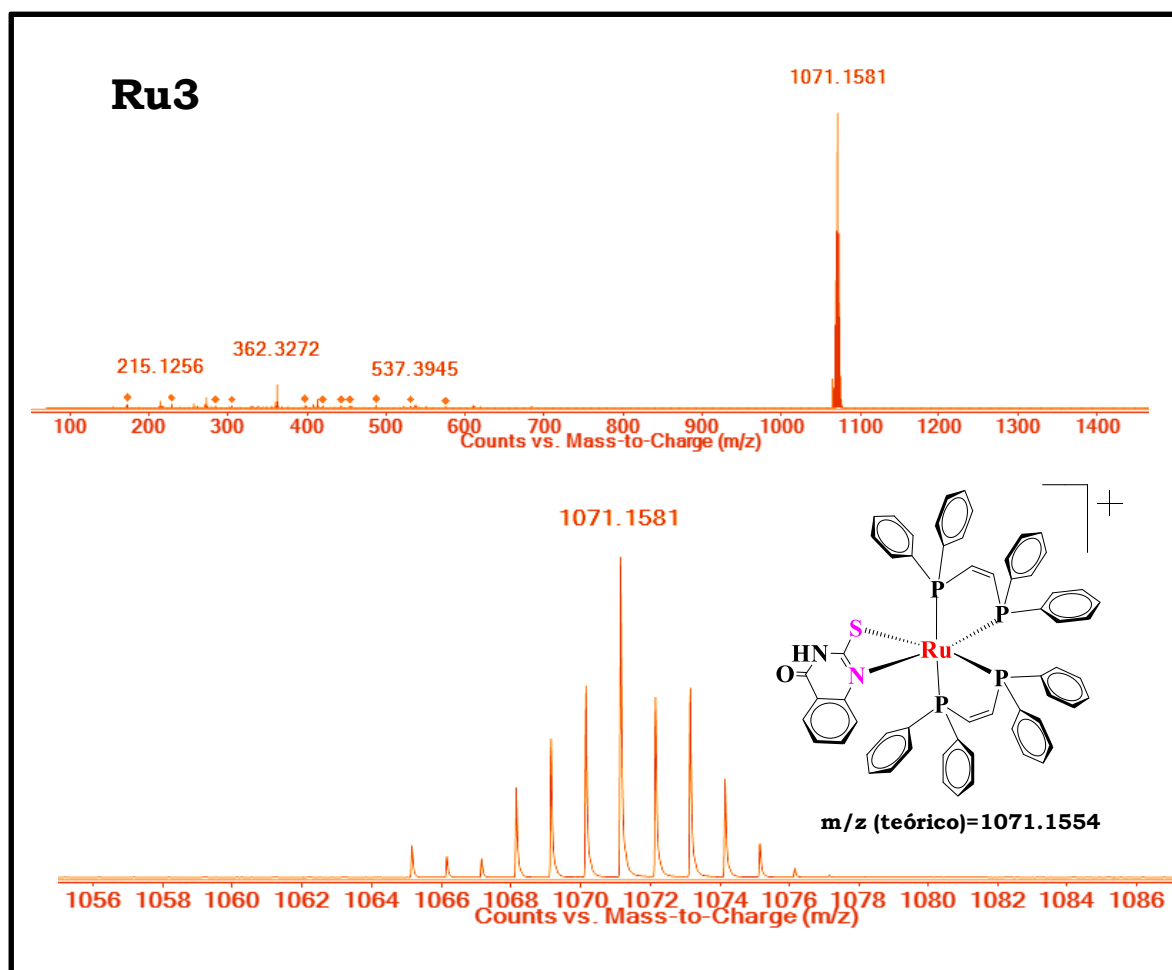


FIGURA A10 – Espectro de massa do complexo Ru3.

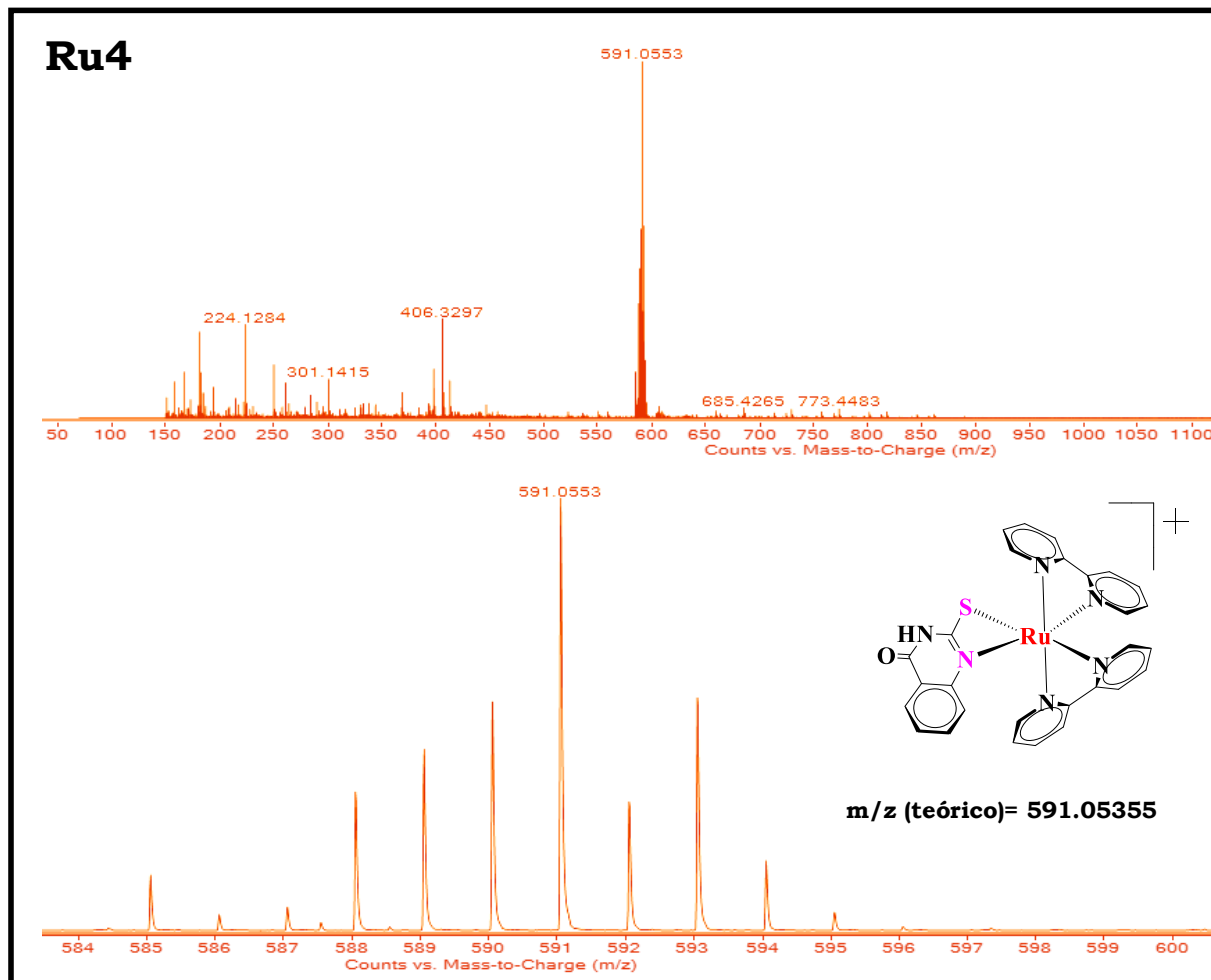


FIGURA A11 – Espectro de massa do complexo Ru4.

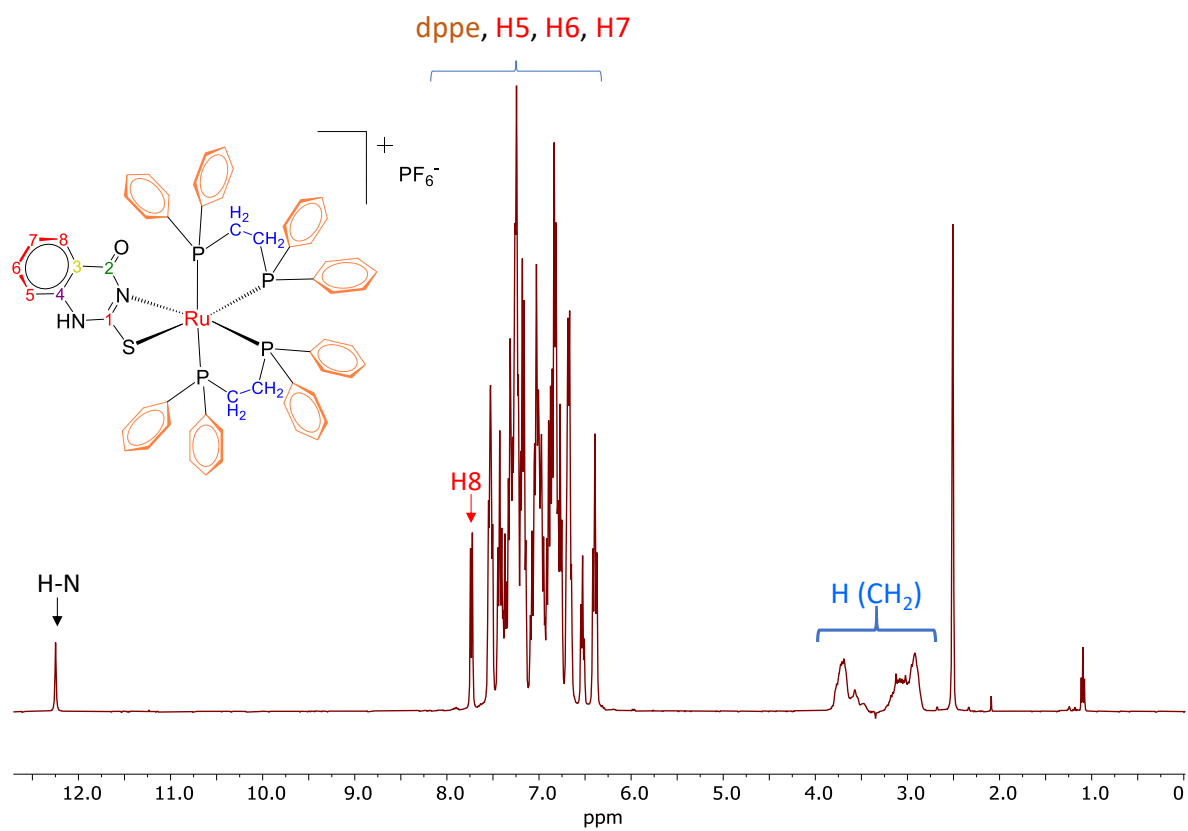


FIGURA A12- Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o complexo Ru2 em DMSO-d<sub>6</sub>.

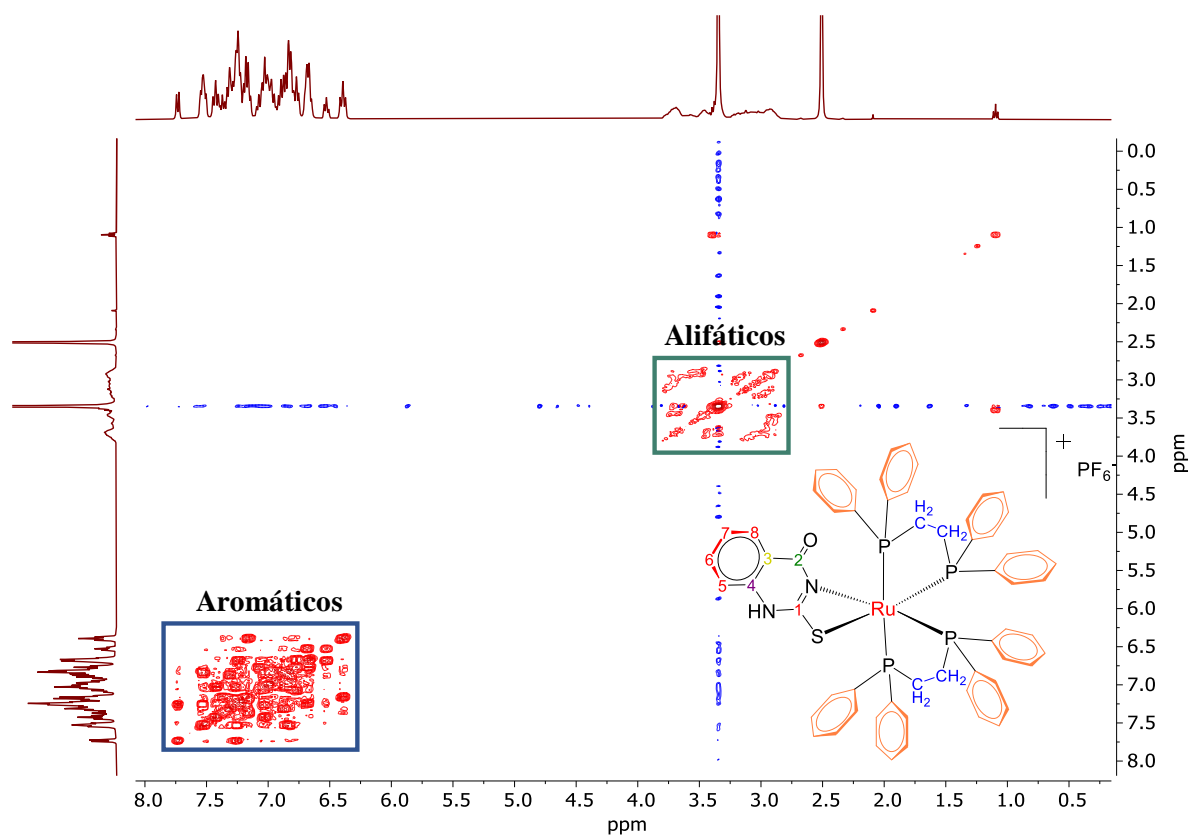


FIGURA A13 - Mapa de contorno de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) do complexo Ru2 em DMSO- $\text{d}_6$ .

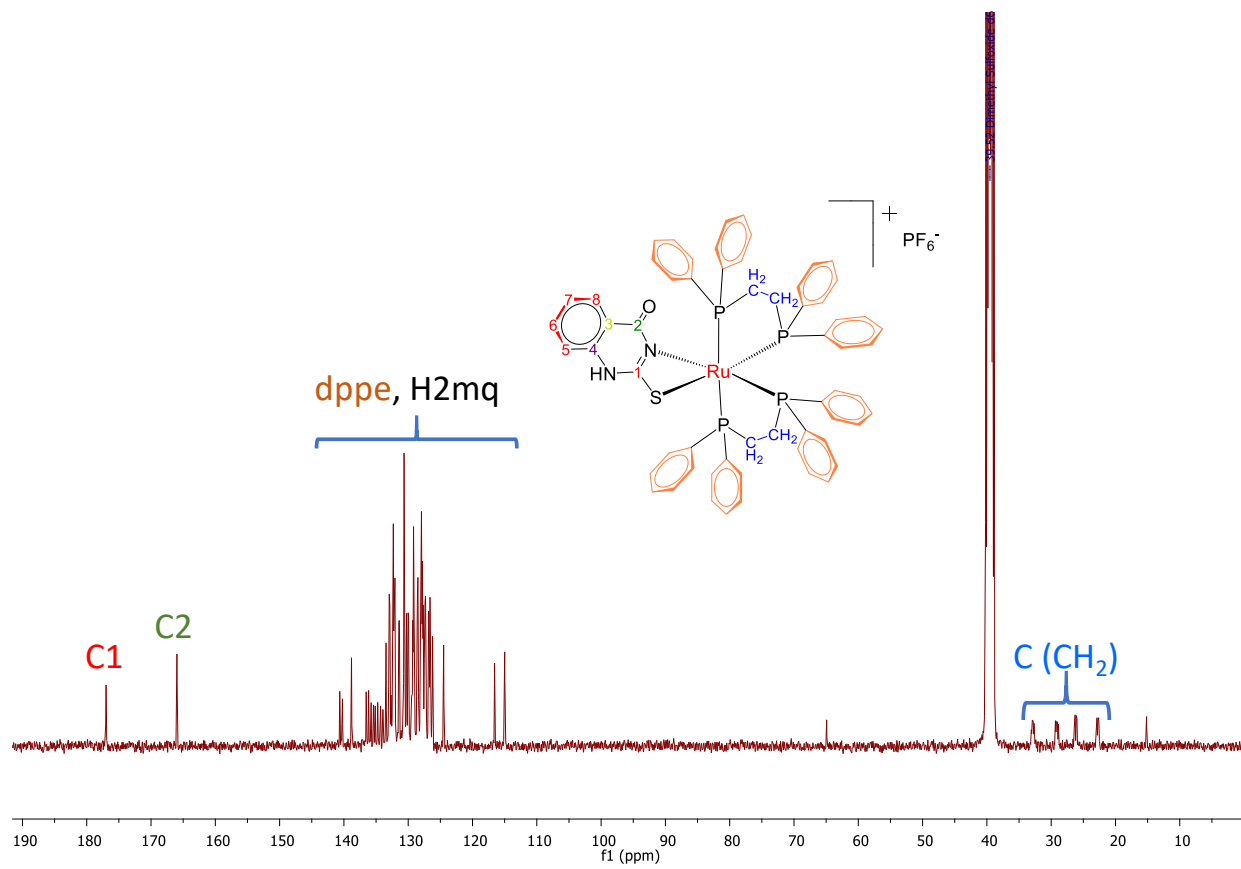


FIGURA A14- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo  $\text{Ru}_2$   $\text{DMSO-d}_6$ .

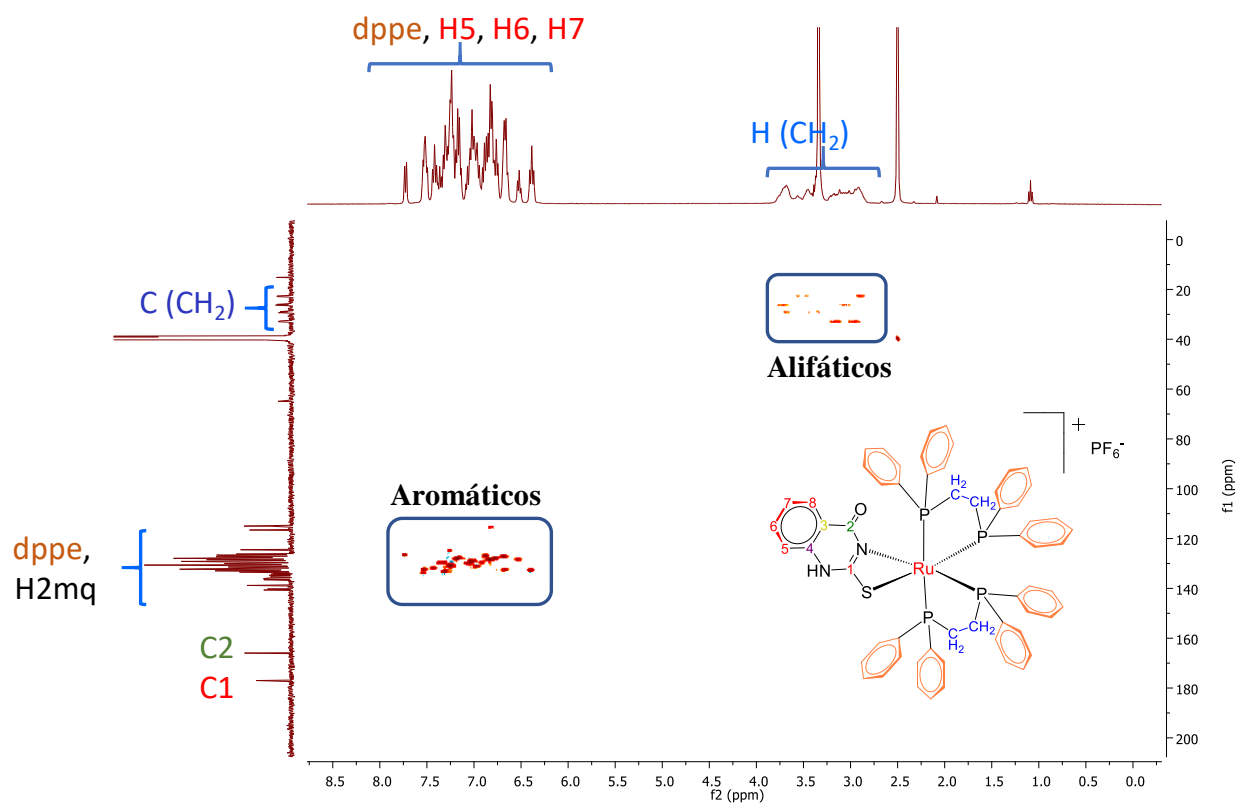


FIGURA A15 - Mapa de contorno de HSQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) para o complexo Ru<sub>2</sub> DMSO-d<sub>6</sub>.



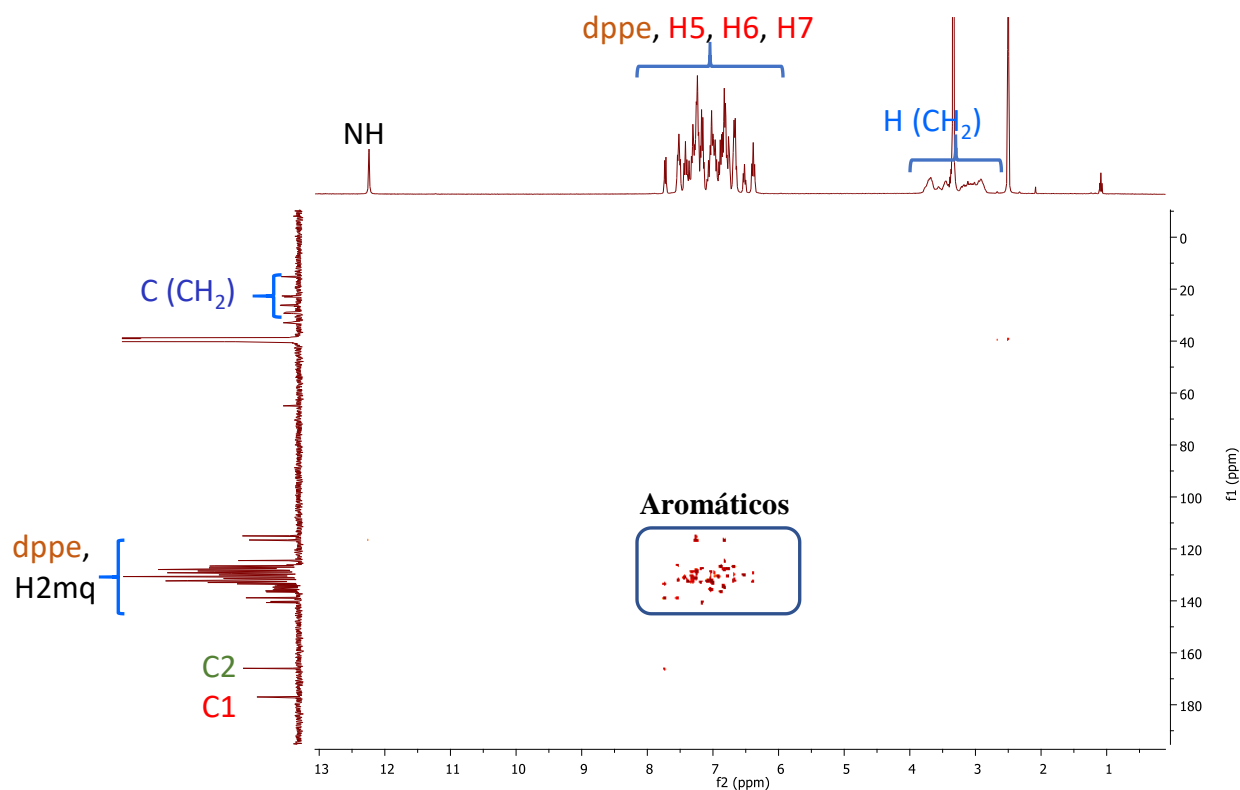


FIGURA A16 - Mapa de contorno de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru2 DMSO- $\text{d}_6$ .

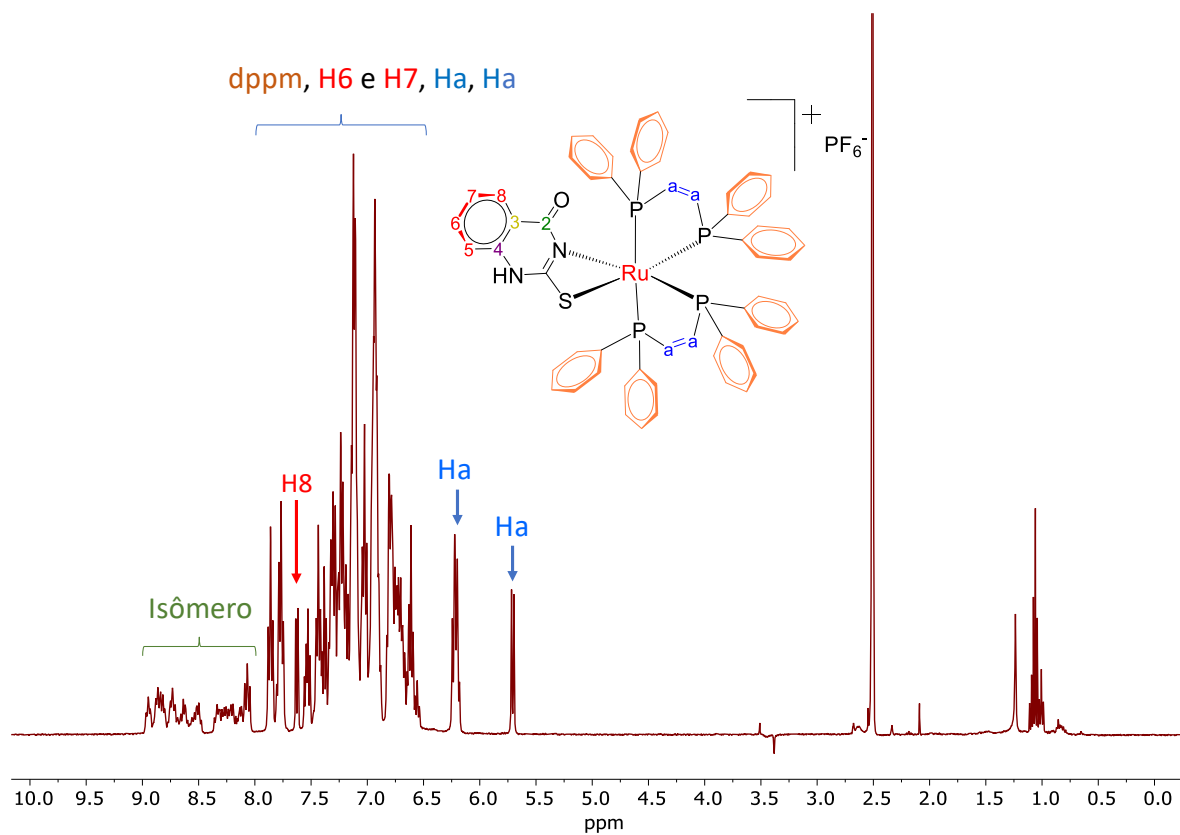


FIGURA A17- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o complexo Ru3 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

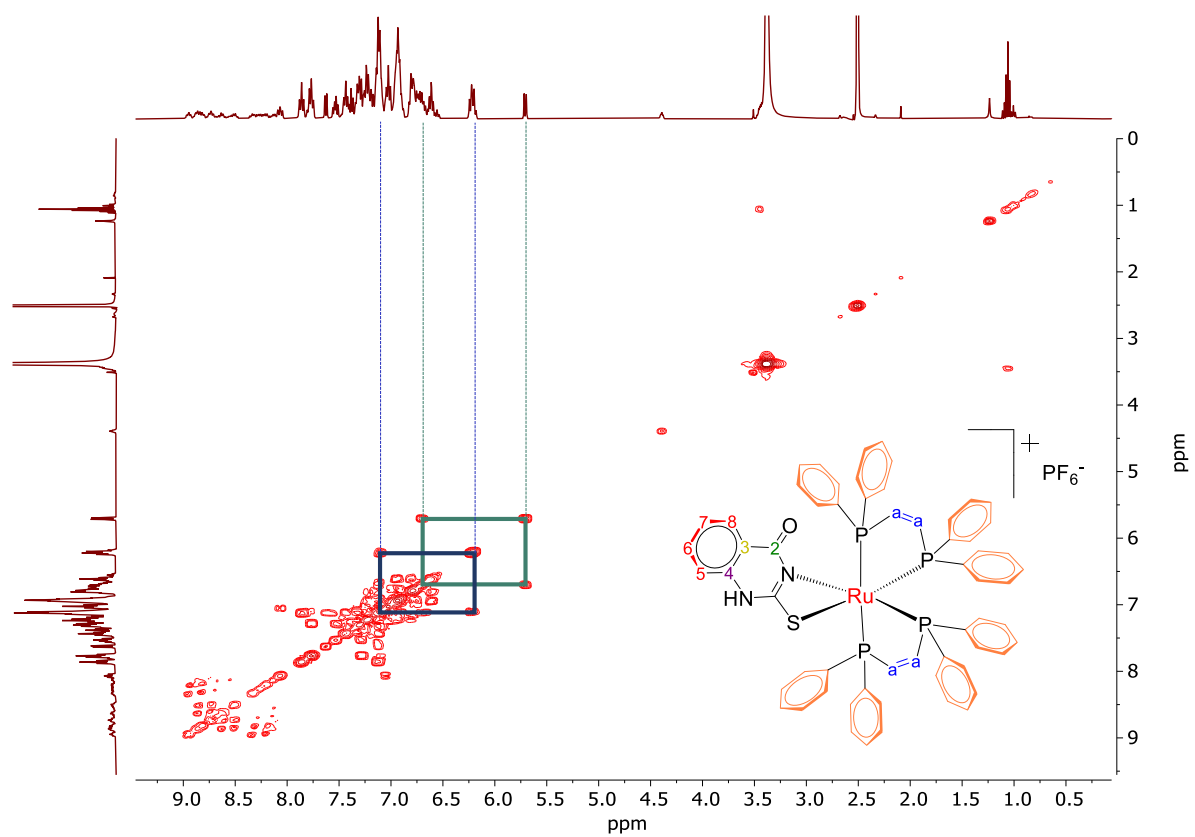


FIGURA A18 - Mapa de contorno de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) do complexo Ru3 em DMSO- $\text{d}_6$ .

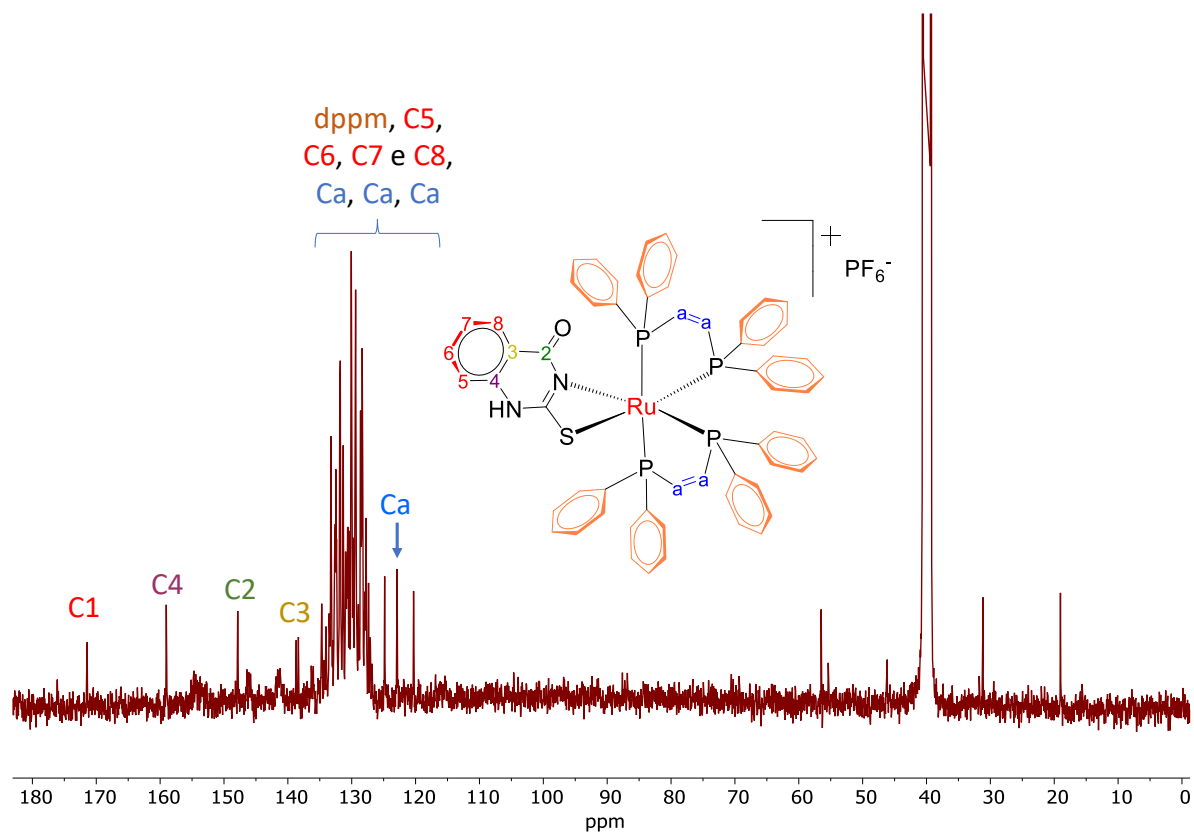


FIGURA A19- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru<sub>3</sub> DMSO-d<sub>6</sub>.

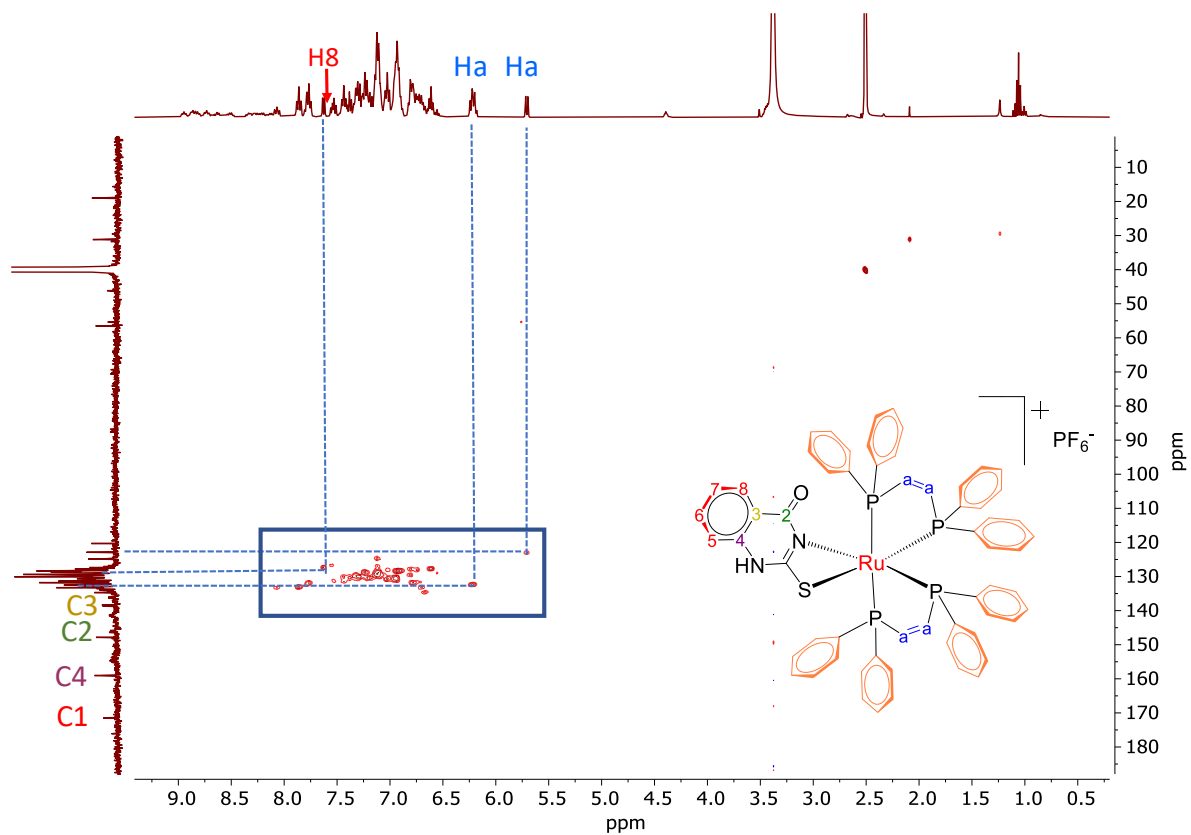


FIGURA A20- Mapa de contorno de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru<sub>3</sub> DMSO-d<sub>6</sub>.

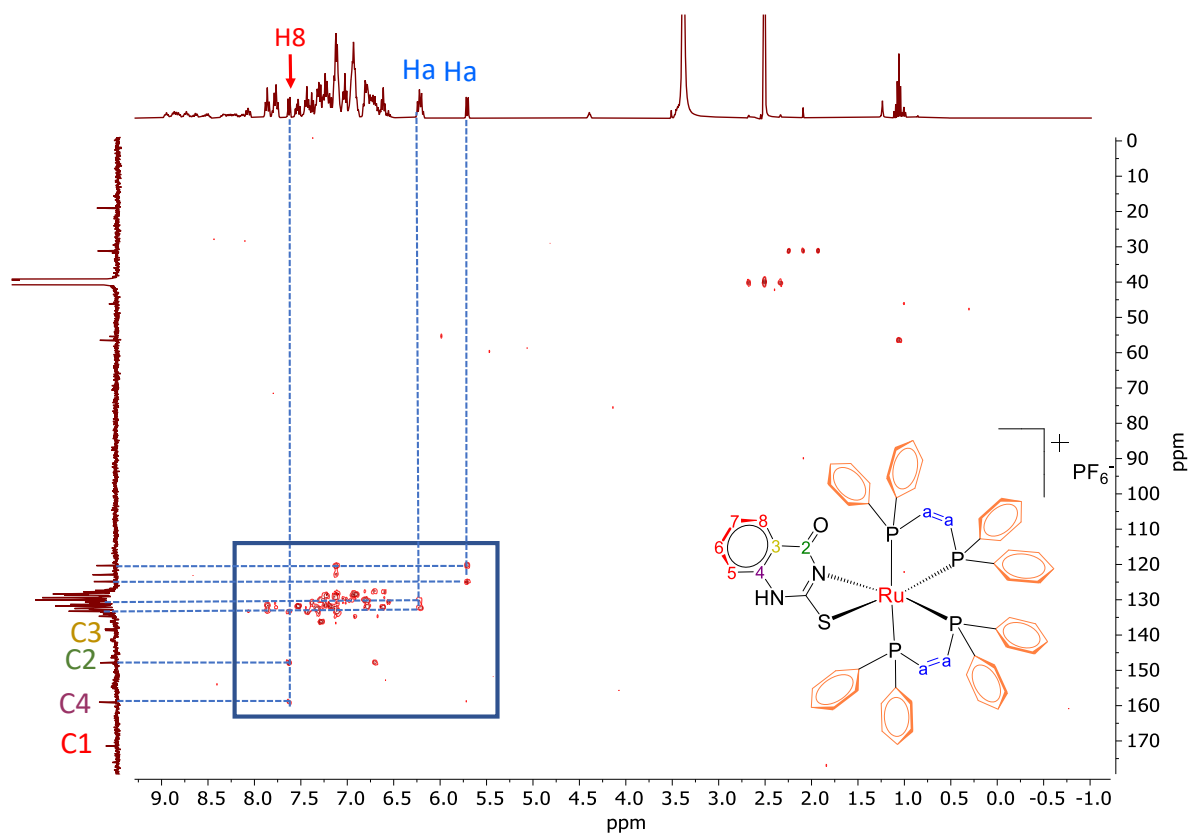


FIGURA A21- Mapa de contorno de HMBC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) para o complexo Ru3 DMSO-d<sub>6</sub>.

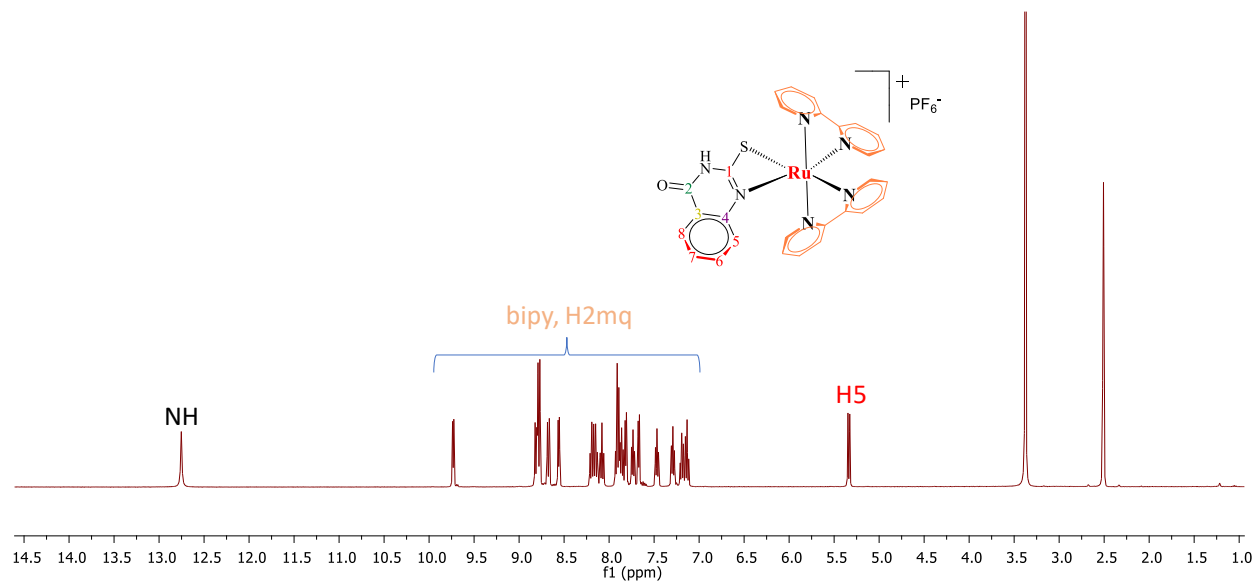


FIGURA A22 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o complexo Ru4 em  $\text{DMSO-d}_6$ .

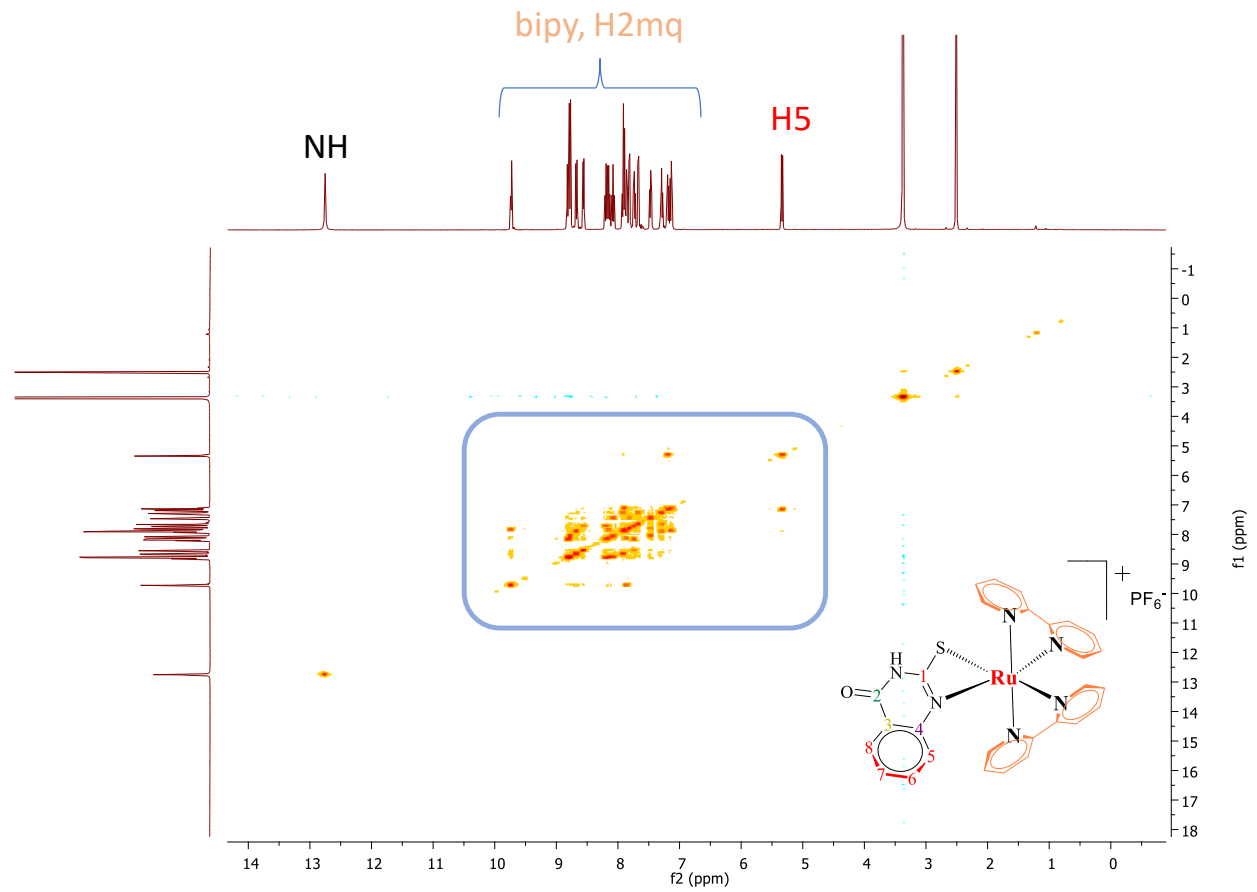


FIGURA A23 - Mapa de contorno de COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) do complexo Ru4 em DMSO-d<sub>6</sub>.



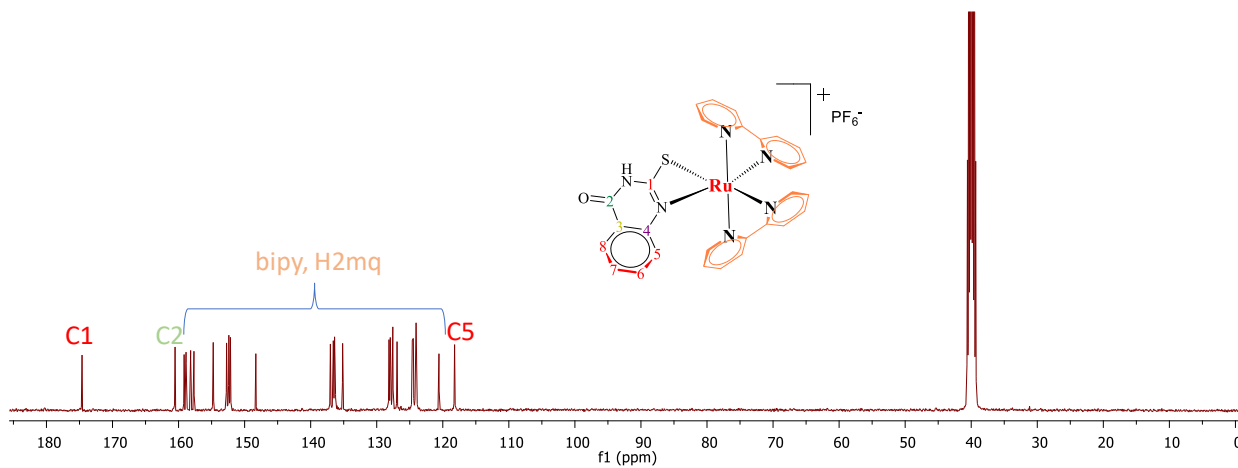


FIGURA A24- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru4 DMSO- $\text{d}_6$ .

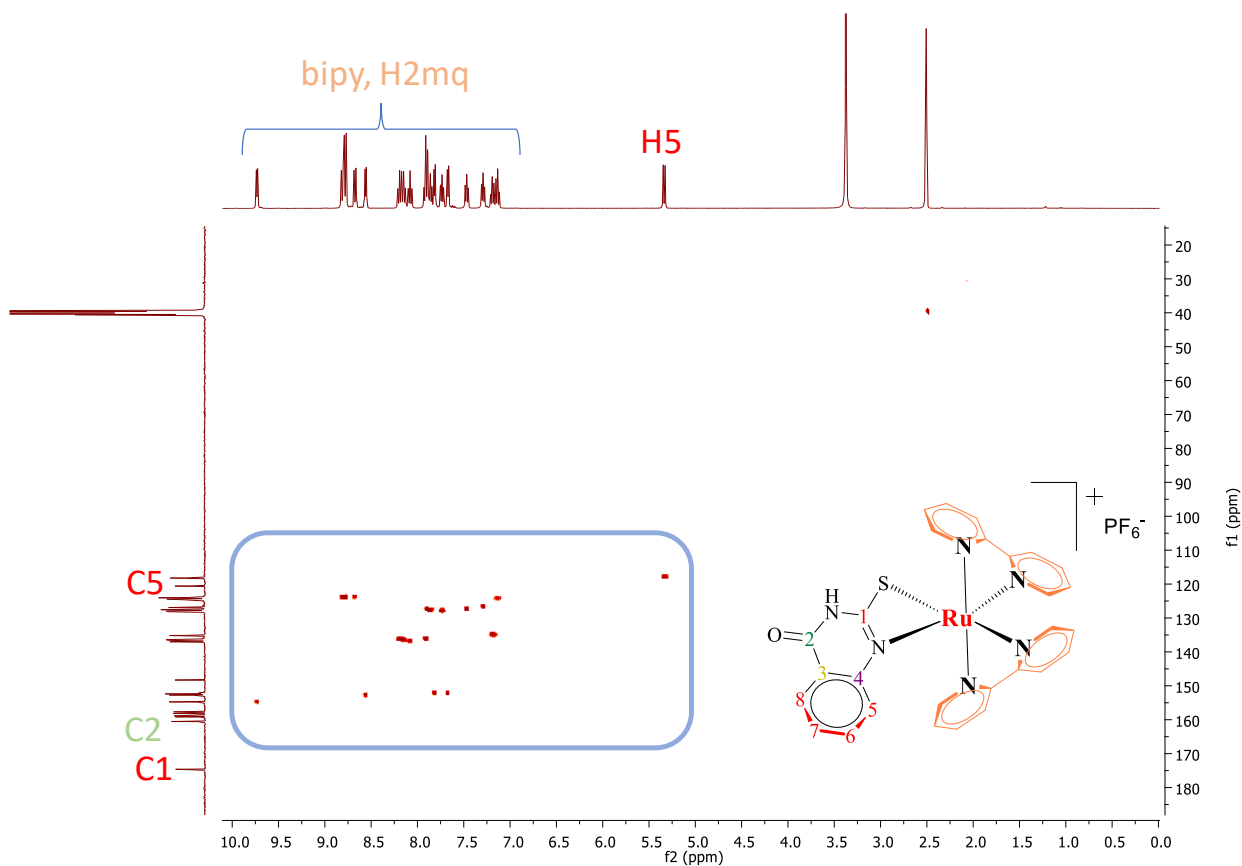


FIGURA A25- Mapa de contorno de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru4 DMSO- $\text{d}_6$ .

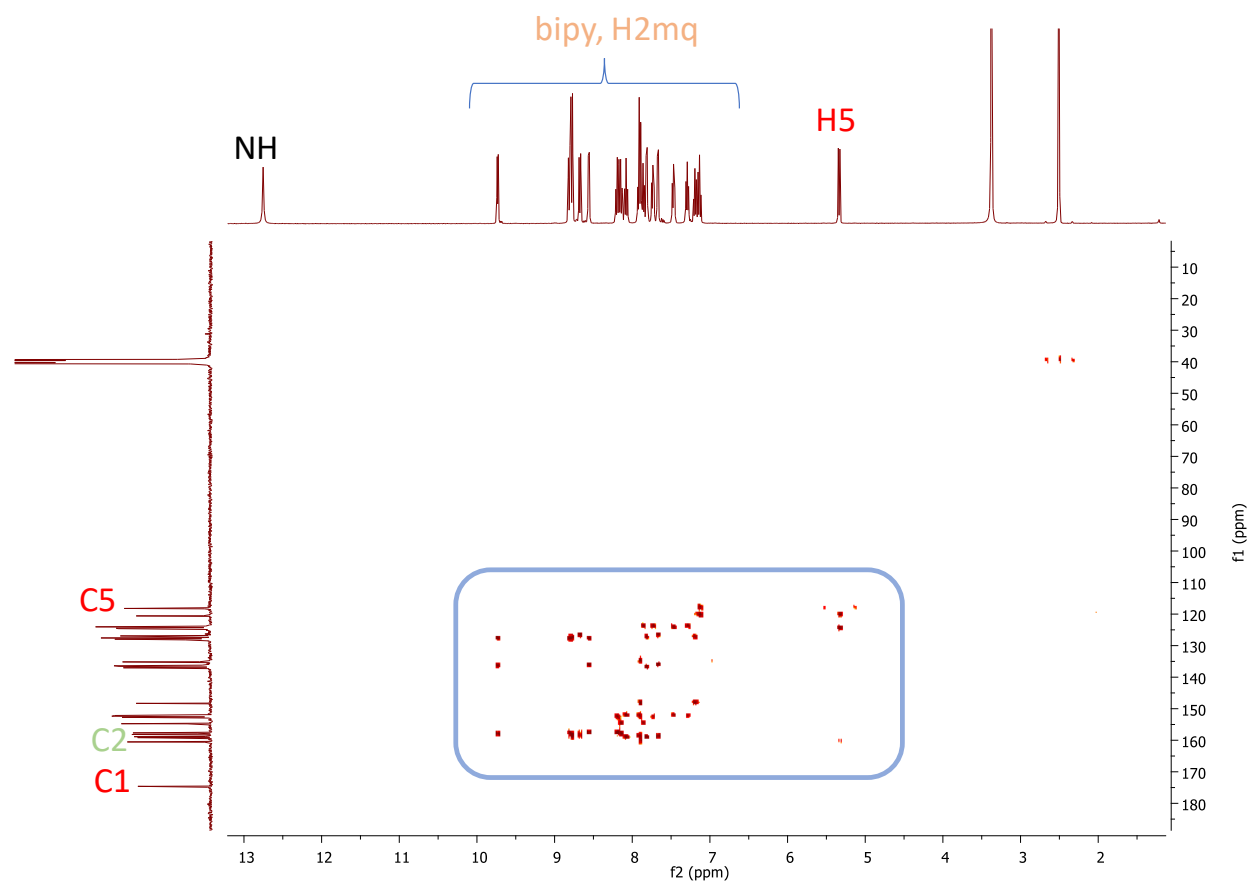


FIGURA A26 - Mapa de contorno de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru4 DMSO- $\text{d}_6$ .

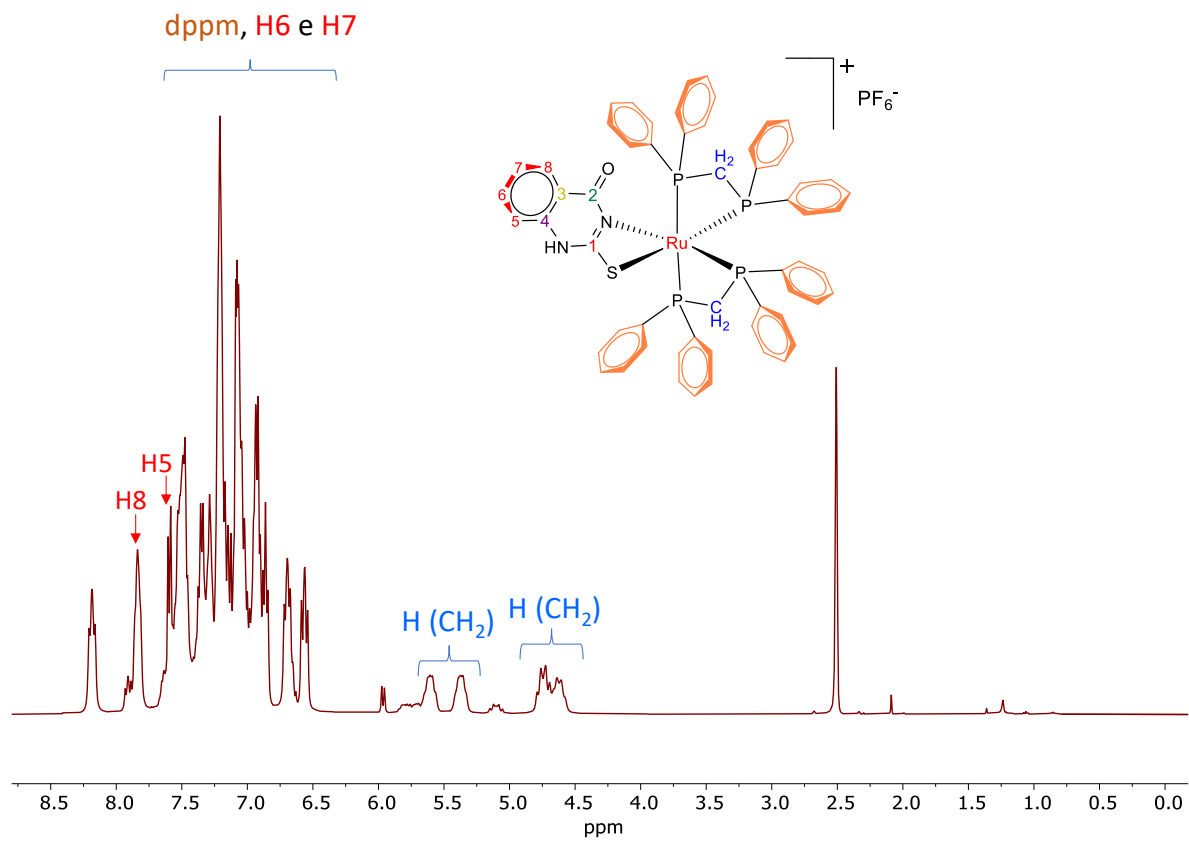


FIGURA A27 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o complexo Ru5 em DMSO-d<sub>6</sub>.

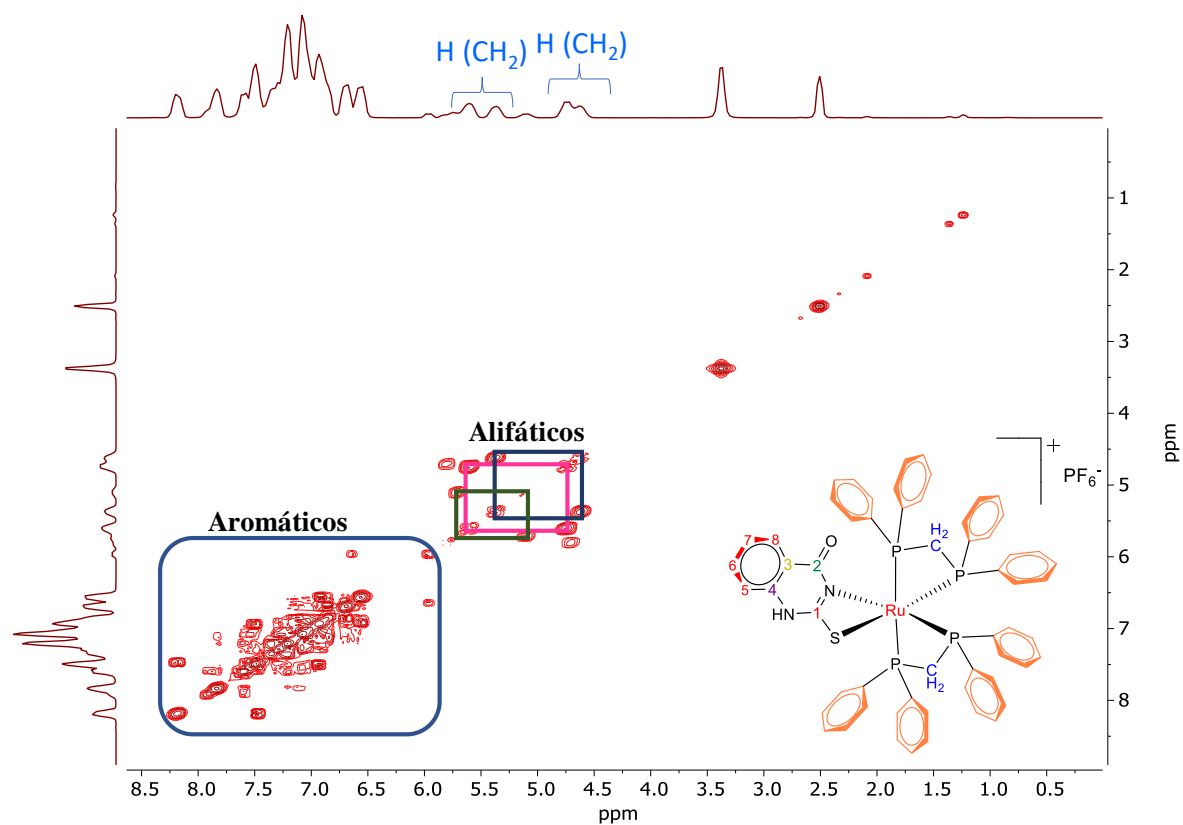


FIGURA A28- Mapa de contorno de COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) do complexo Ru5 em DMSO-d<sub>6</sub>.

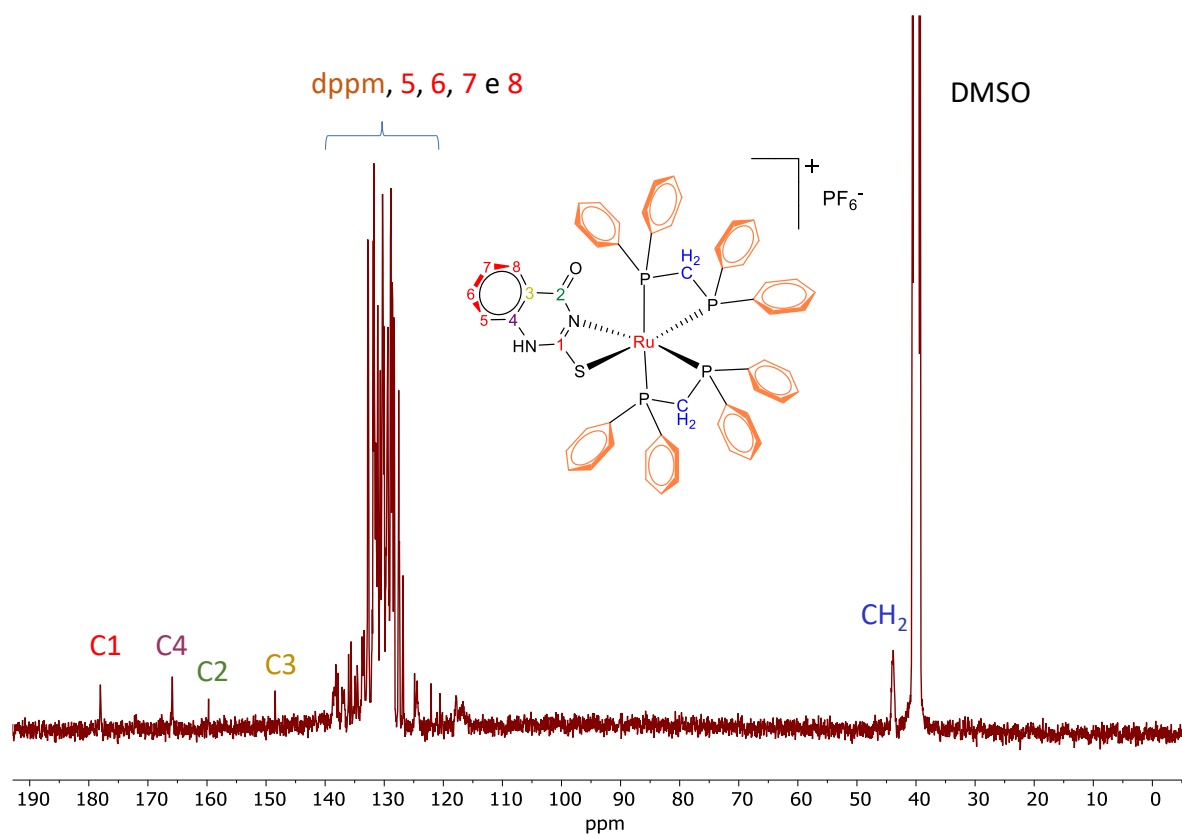


FIGURA A29- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  do complexo Ru5  $\text{DMSO-d}_6$ .

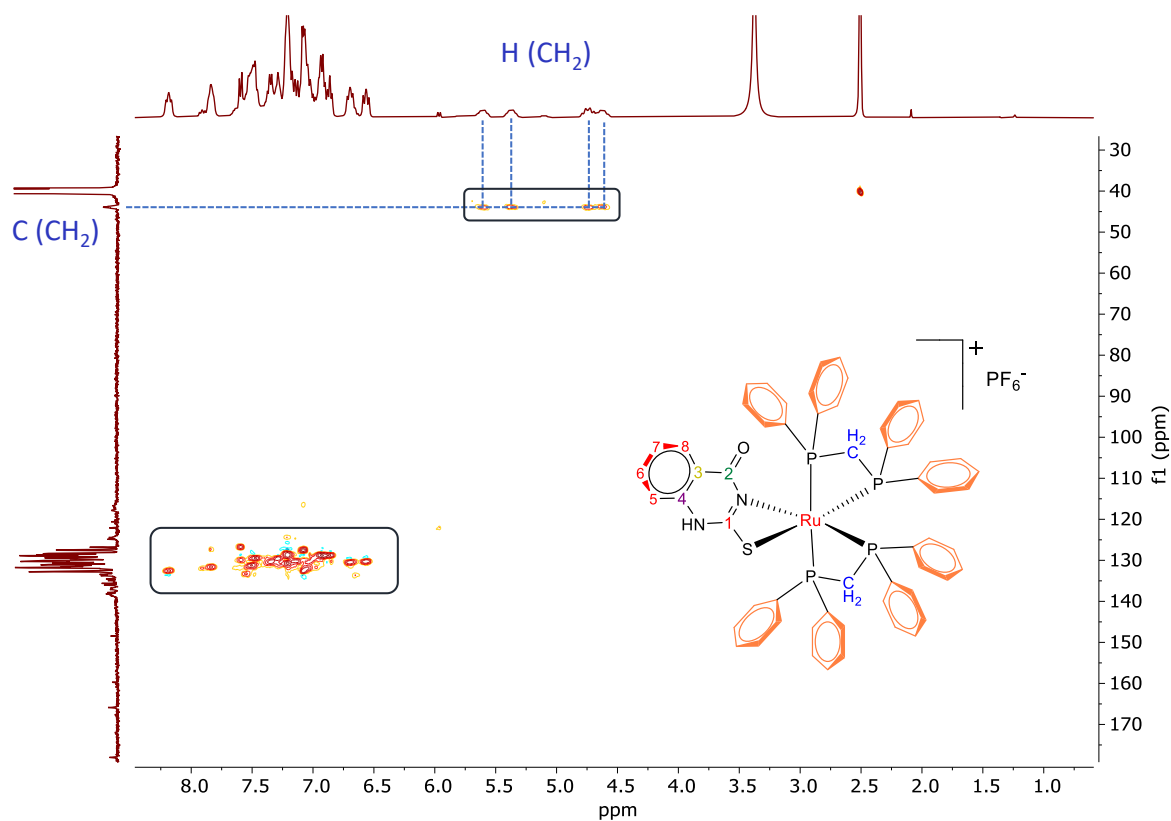


FIGURA A30- Mapa de contorno de HSQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) para o complexo Ru<sub>5</sub> DMSO-d<sub>6</sub>.

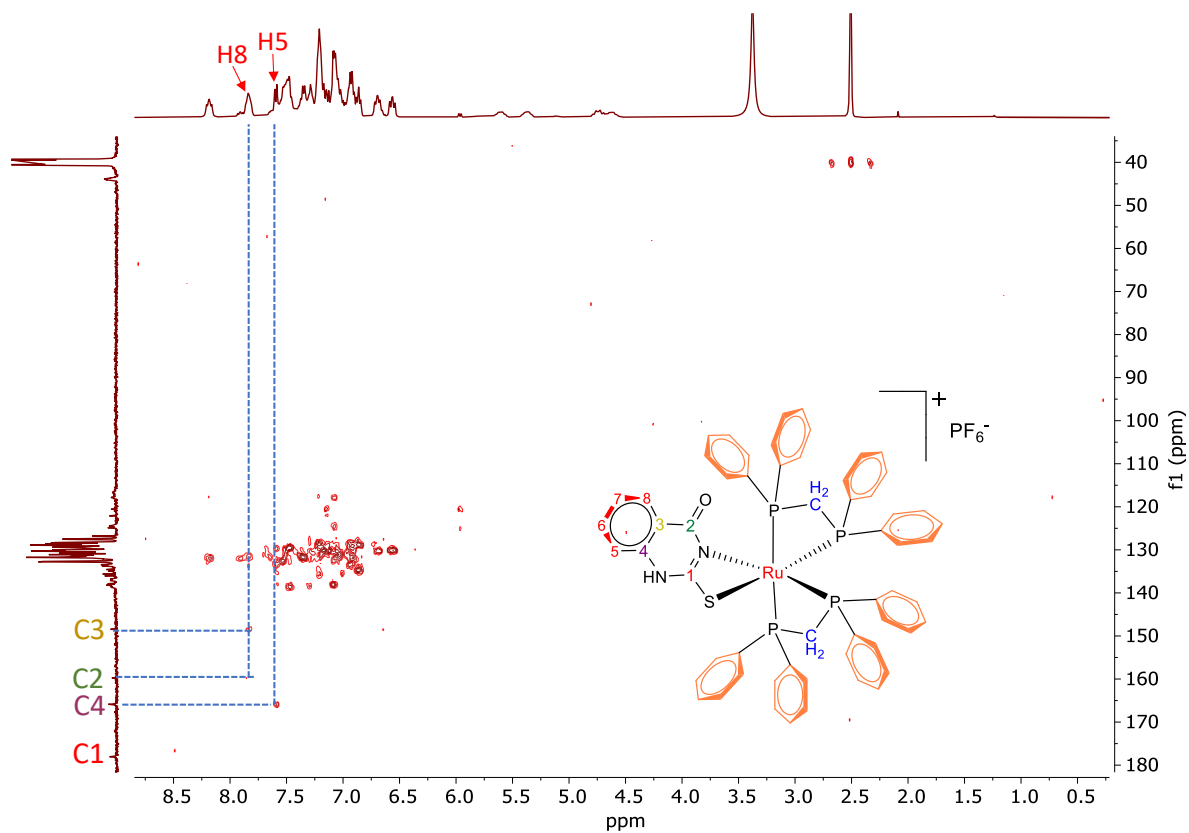


FIGURA A31- Mapa de contorno de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para o complexo Ru5 DMSO- $\text{d}_6$ .

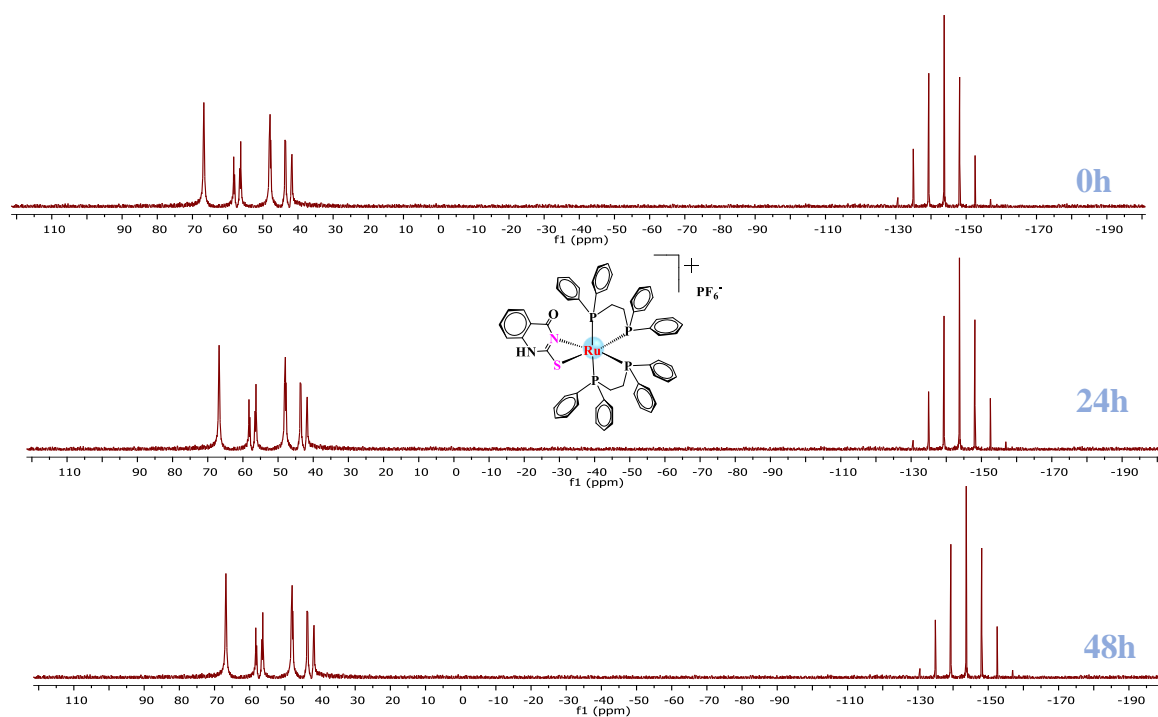


FIGURA A32 – Estudo de estabilidade do complexo Ru<sub>2</sub> em DMSO.



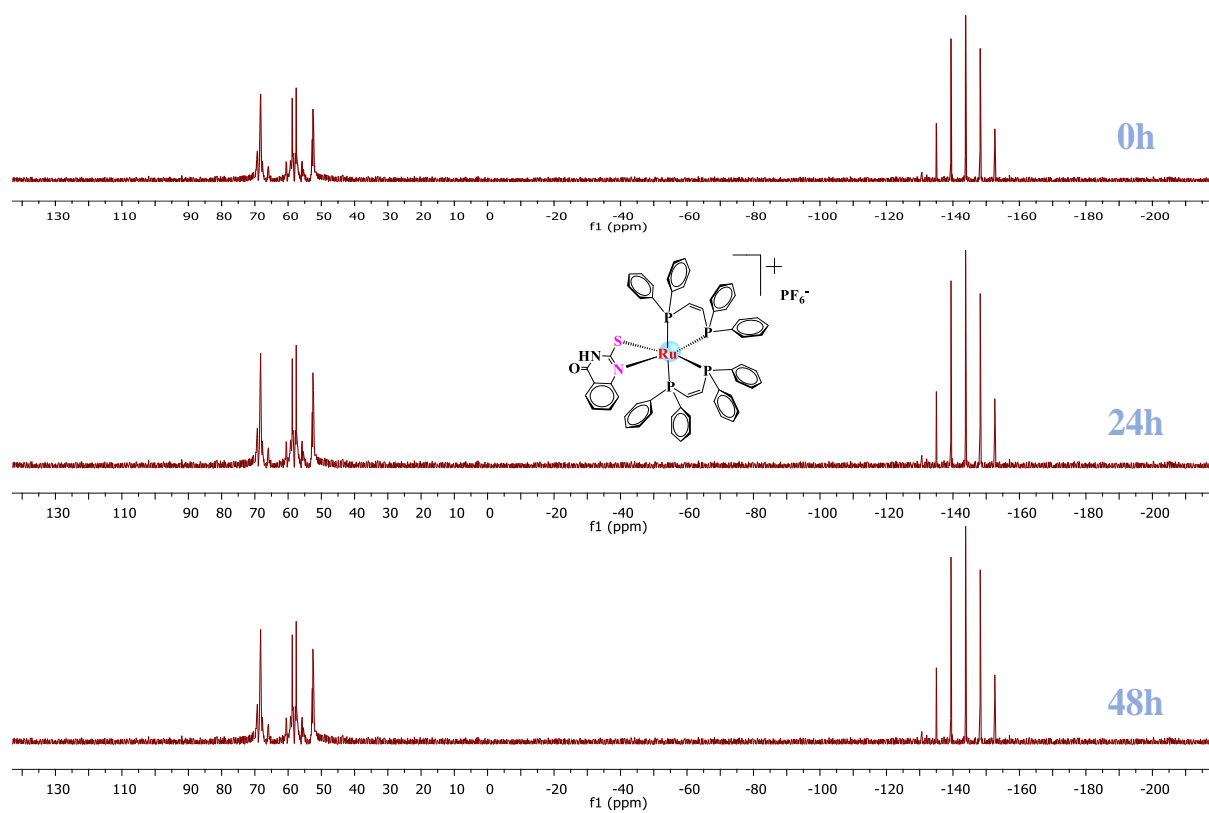


FIGURA A33 – Estudo de estabilidade do complexo Ru3 em DMSO.

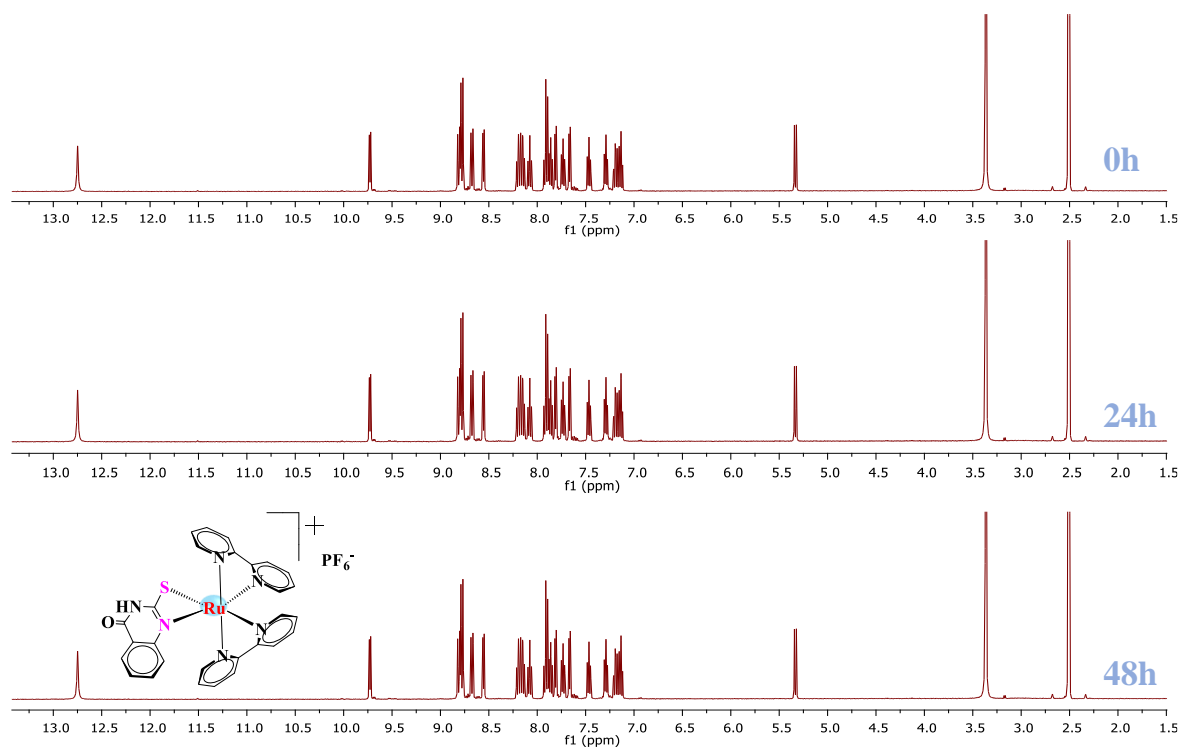


FIGURA A34 – Estudo de estabilidade do complexo Ru4 em DMSO.

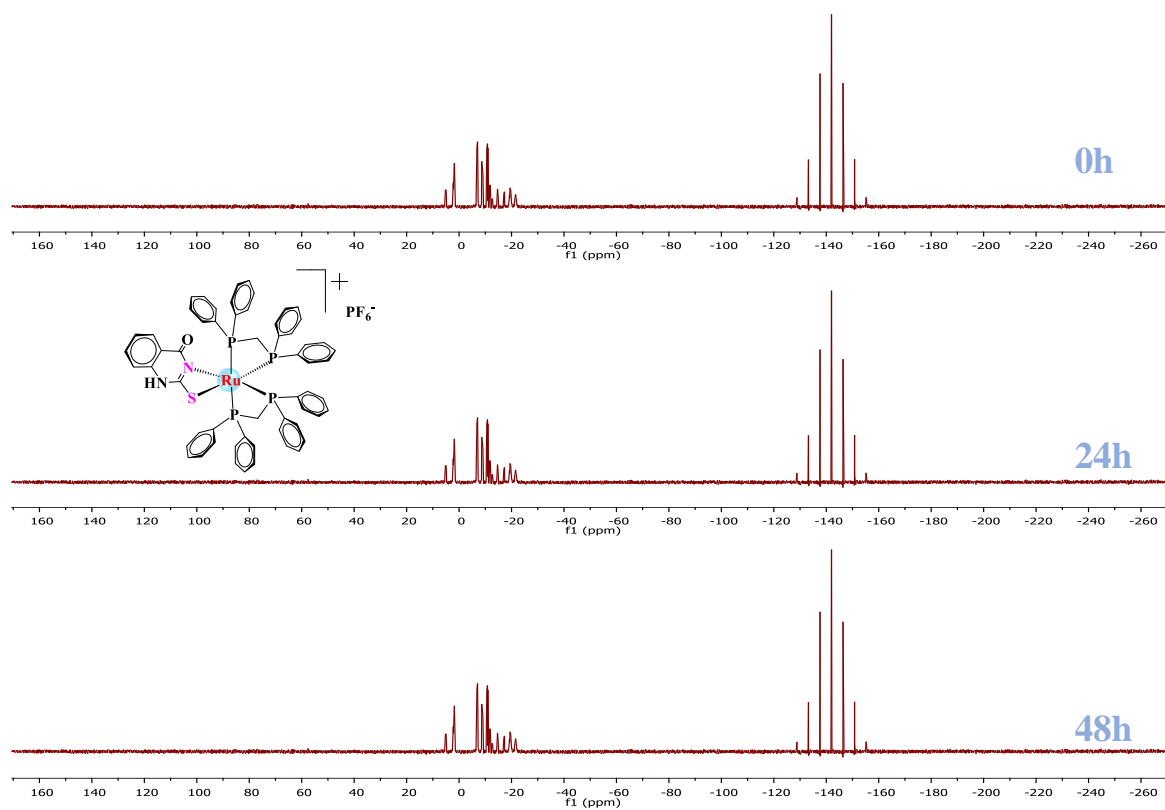


FIGURA A35 – Estudo de estabilidade do complexo Ru5 em DMSO.

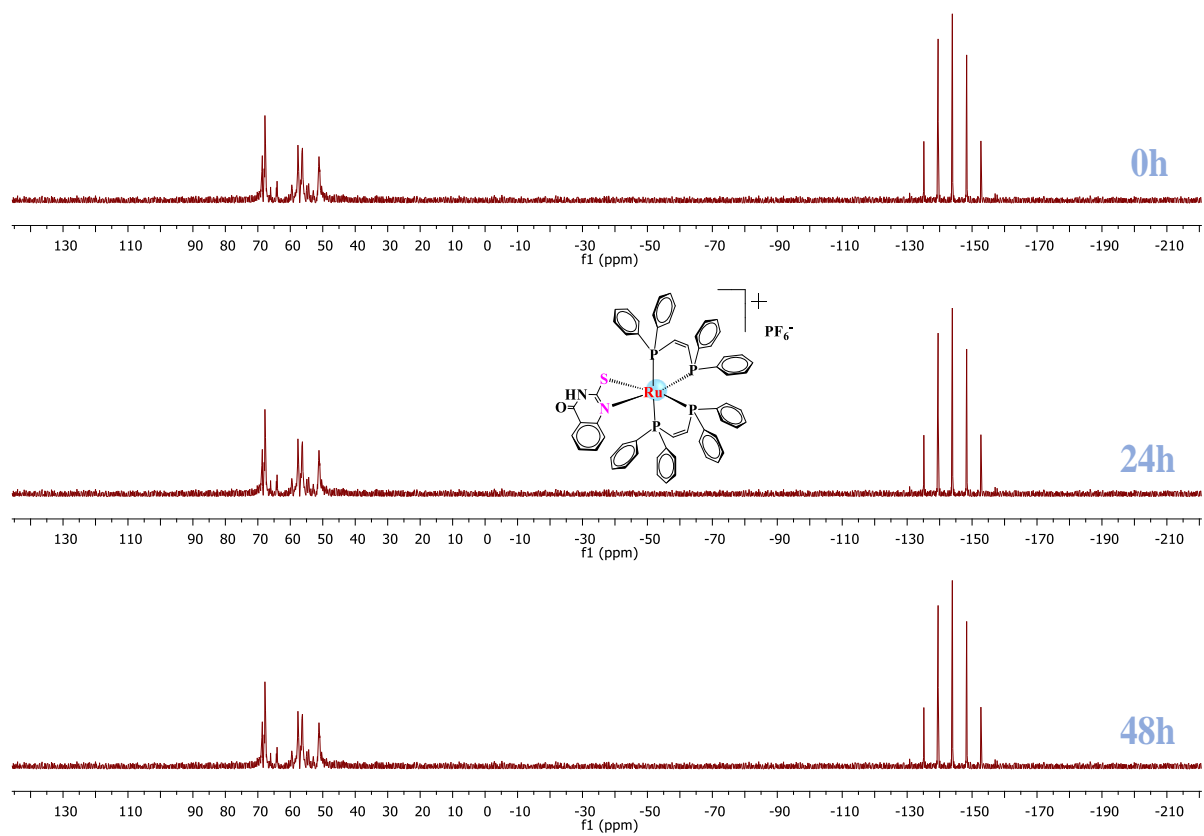


FIGURA A36 – Estudo de estabilidade do complexo Ru3 em DMSO/DMEM.

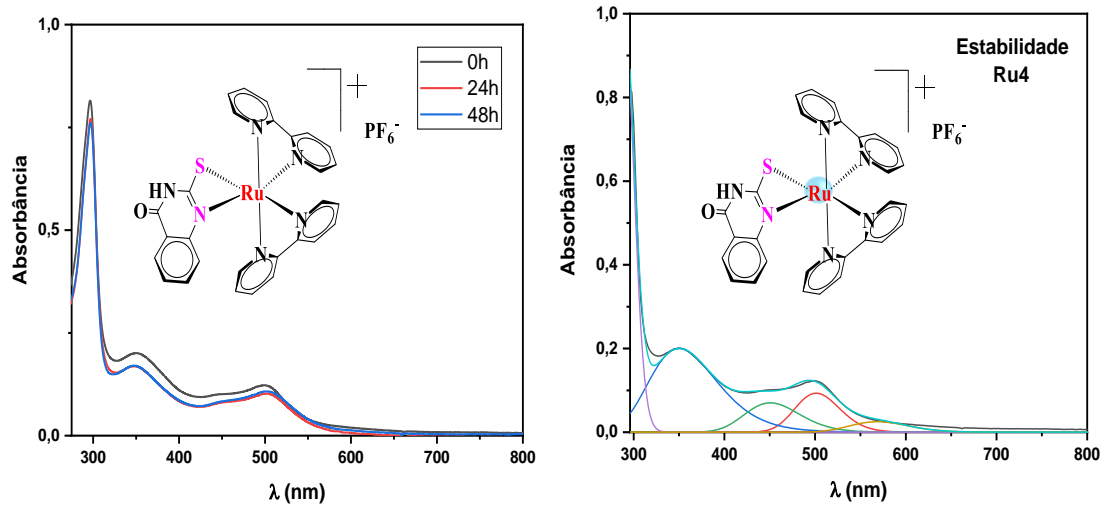


FIGURA A37 – Estudo de estabilidade do complexo Ru4 em DMSO/RPMI.

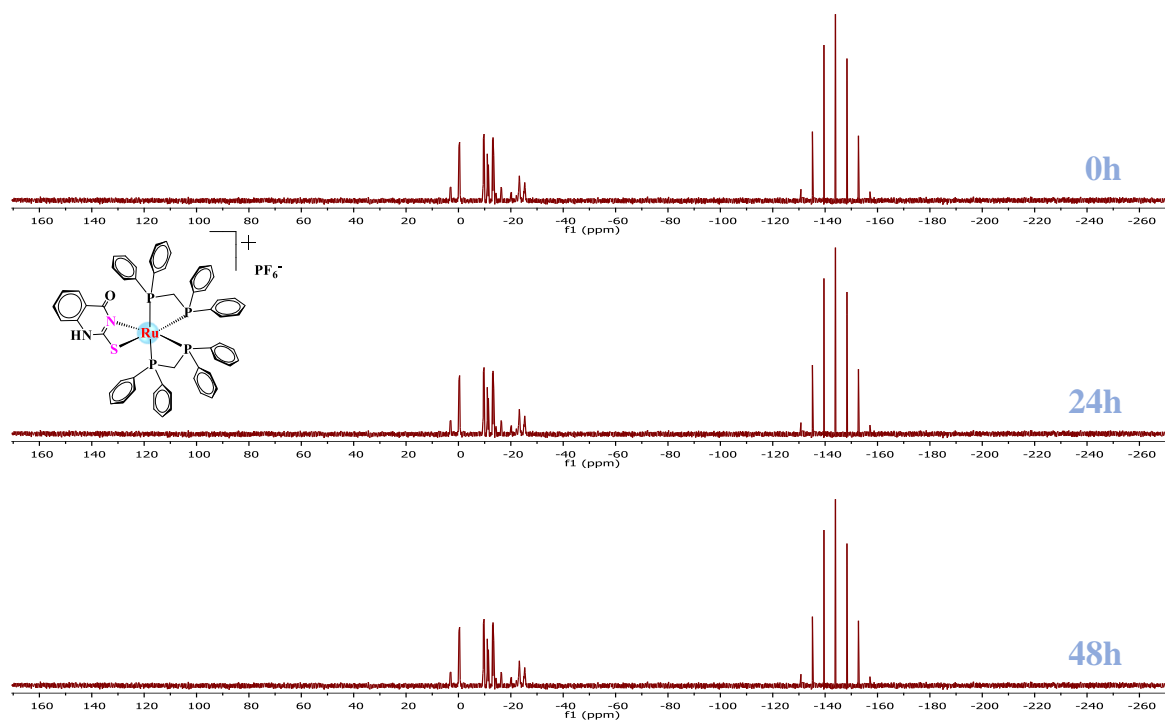


FIGURA A38 – Estudo de estabilidade do complexo Ru5 em DMSO/DMEM.

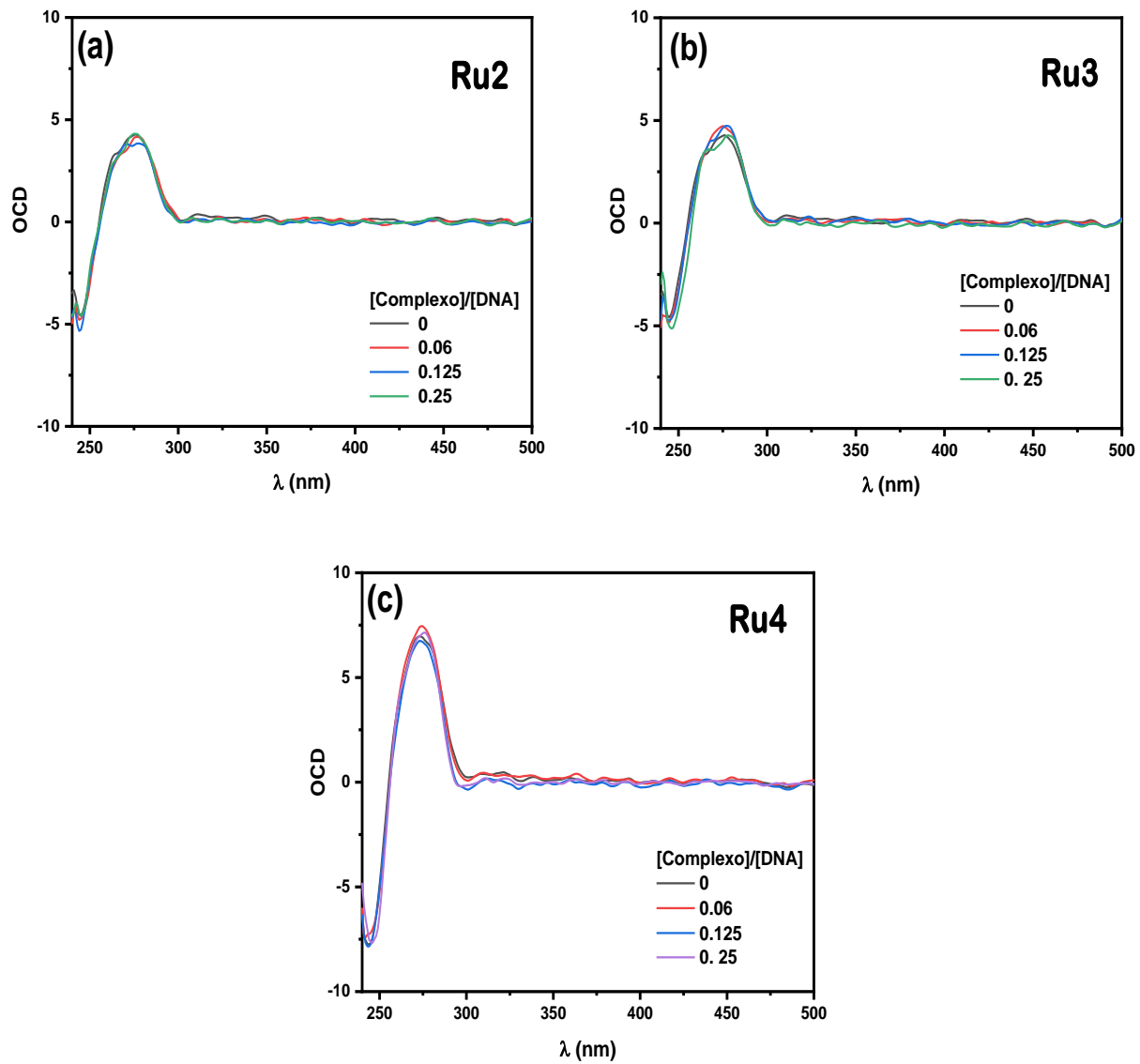


FIGURA A39 - Espectro de OCD CT-DNA na ausência e presença dos complexos Ru2-Ru4, em razões  $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}]$  iguais a 0, 0.6, 0.125, 0.25.

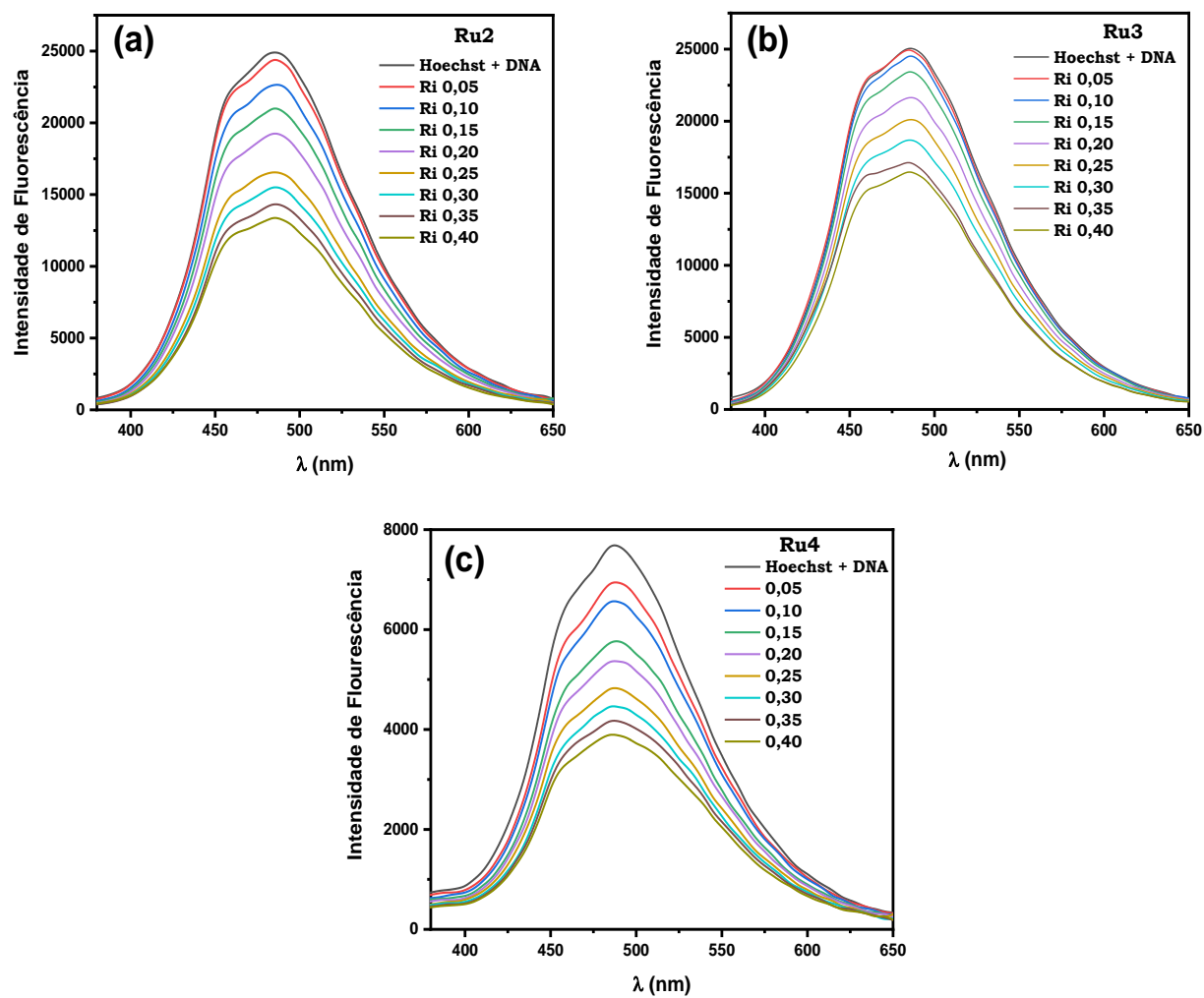


FIGURA A40 - Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença dos complexos Ru2-Ru4.

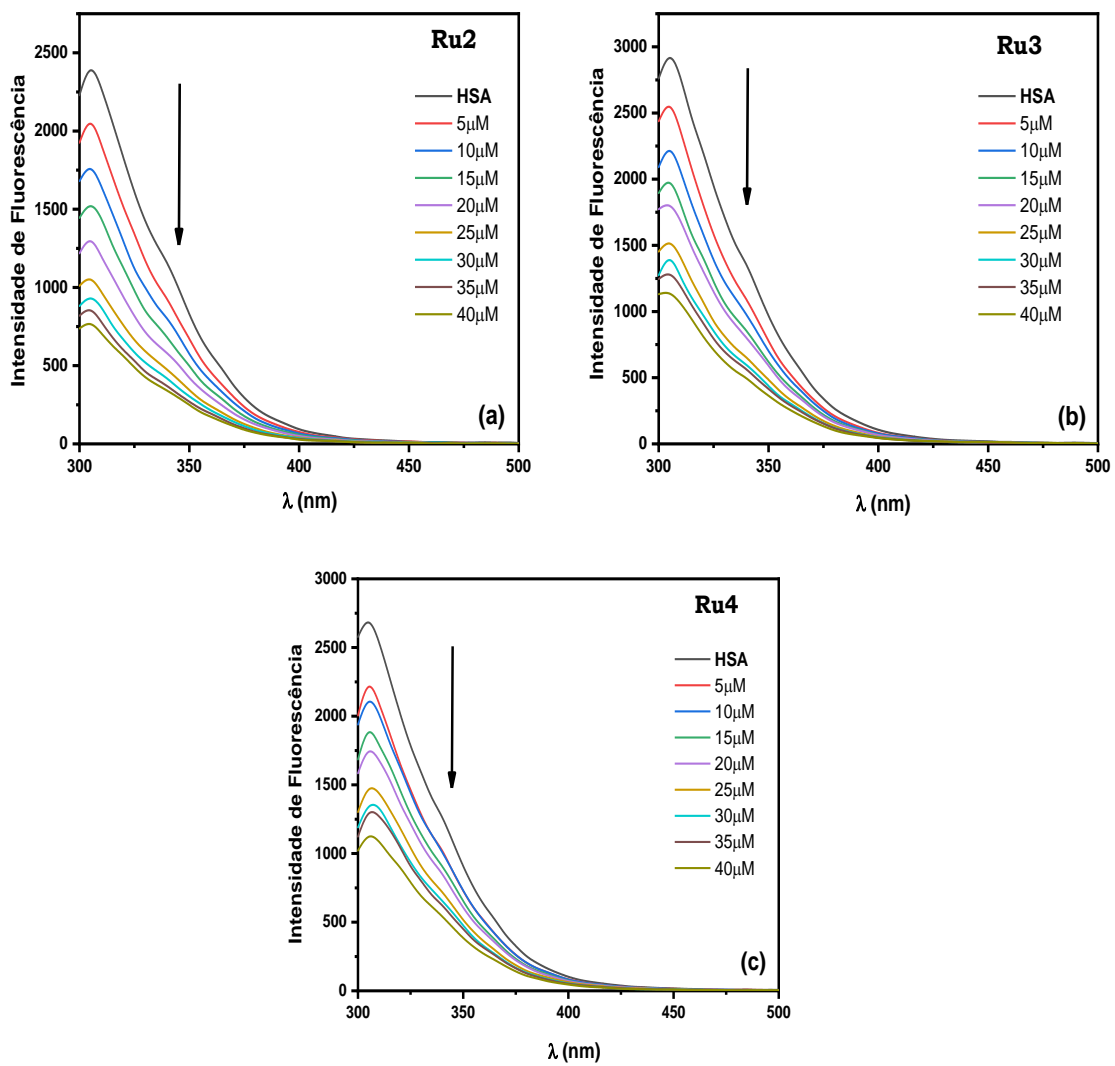


FIGURA A34 - Supressão da fluorescência da HSA na ausência e presença dos complexos Ru2-Ru4 em diferentes concentrações.



TABELA A1 – Parâmetros cristalográficos dos complexos Ru1, Ru2 e Ru4.

Complexo	Ru1	Ru2	Ru4
Fórmula Empírica	C <sub>58</sub> H <sub>50</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OP <sub>5</sub> RuS	C <sub>63</sub> F <sub>6</sub> H <sub>59</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P <sub>5</sub> RuS	C <sub>28</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> OPRuS
Massa molecular	1228.43	1342.171	735.61
Temperatura/K	293(2)	293(2)	100
Sistema Cristalino	monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2/c	P2 <sub>1</sub> /c	C2/c
a/Å	17.7150(2)	12.1801(12)	21.8405(3)
b/Å	11.48250(12)	18.972(2)	13.02075(15)
c/Å	28.1918(3)	27.058(3)	21.5213(3)
α/°	90	90	90
β/°	99.3892(12)	94.211(11)	108.6637(13)
γ/°	90	90	90
Volume/Å <sup>3</sup>	5657.75(12)	6235.8(12)	5798.37(13)
Z	4	4	8
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1.442	1.430	1.685
μ/mm <sup>-1</sup>	0.564	0.483	6.238
F(000)	2504.0	2751.3	2944.0
Tamanho do cristal/mm <sup>3</sup>	0.128 × 0.119 × 0.05	0.334 × 0.178 × 0.079	0.251 × 0.192 × 0.075
Radiação	Mo Kα (λ = 0.71073)	Mo Kα (λ = 0.71073)	Cu Kα (λ = 1.54184)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	3.838 to 51.5	5.14 to 51.36	8.022 to 158.868
Intervalos de índice	-19 ≤ h ≤ 21, -13 ≤ k ≤ 14, -34 ≤ l ≤ 34	-19 ≤ h ≤ 19, -16 ≤ k ≤ 30, -32 ≤ l ≤ 41	-27 ≤ h ≤ 27, -16 ≤ k ≤ 16, -26 ≤ l ≤ 27
Refleções coletadas	43832	63213	33080
Reflexões independentes	10730 [R <sub>int</sub> = 0.0361, R <sub>sigma</sub> = 0.0234]	11829 [R <sub>int</sub> = 0.1419, R <sub>sigma</sub> = 0.2090]	6203 [R <sub>int</sub> = 0.0537, R <sub>sigma</sub> = 0.0390]
Dados/restrições/parametros	10730/948/811	11829/72/614	6203/0/397
Melhor ajuste de F <sup>2</sup>	1.112	1.078	1.079
Índices R finais [I] ≥ 2σ (I)	R <sub>1</sub> = 0.0432, wR <sub>2</sub> = 0.1010	R <sub>1</sub> = 0.1172, wR <sub>2</sub> = 0.2813	R <sub>1</sub> = 0.0358, wR <sub>2</sub> = 0.0893
Índices R finais [todos os dados]	R <sub>1</sub> = 0.0484, wR <sub>2</sub> = 0.1049	R <sub>1</sub> = 0.1575, wR <sub>2</sub> = 0.3187	R <sub>1</sub> = 0.0374, wR <sub>2</sub> = 0.0903
Maior diferença pico/vale / e Å <sup>-3</sup>	0.85/-0.59	1.67/-2.16	0.69/-0.99

TABELA A2 – Parâmetros cristalográficos dos complexos Ru5 e Ru1 (acetona/DMEM).

Complexo	Ru5	Estabilidade: Ru1-Acetona/DMEM
Fórmula Empírica	C <sub>61</sub> H <sub>54.5</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P <sub>4.5</sub> RuS	C <sub>61</sub> H <sub>55</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P <sub>5</sub> RuS
Massa molecular	1177.133	1250.05
Temperatura/K	100.01(10)	100(1)
Sistema Cristalino	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2/c	Pn
a/Å	22.2224(2)	15.2901(3)
b/Å	11.2344(1)	11.7629(2)
c/Å	23.8721(3)	16.7691(2)
α/°	90	90
β/°	112.632(1)	94.0725(16)
γ/°	90	90
Volume/Å <sup>3</sup>	5500.87(11)	3008.41(10)
Z	4	2
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	1.421	1.380
μ/mm <sup>-1</sup>	4.356	4.210
F(000)	2434.0	1280.0
Tamanho do cristal/mm <sup>3</sup>	0.138 × 0.086 × 0.032	0.149 × 0.127 × 0.069
Radiação	Cu Kα (λ = 1.54184)	Cu Kα (λ = 1.54184)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	7.5 to 160.7	9.192 to 142.094
Intervalos de índice	-28 ≤ h ≤ 28, -14 ≤ k ≤ 11, -30 ≤ l ≤ 30	-18 ≤ h ≤ 18, -14 ≤ k ≤ 14, -18 ≤ l ≤ 20
Refleções coletadas	76561	68420
Reflexões independentes	11916 [R <sub>int</sub> = 0.0325, R <sub>sigma</sub> = 0.0244]	9961 [R <sub>int</sub> = 0.0889, R <sub>sigma</sub> = 0.0763]
Dados/restrições/parâmetros	11916/0/699	9961/269/699
Melhor ajuste de F2	1.028	1.036
Índices R finais [I ≥ 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0282, wR <sub>2</sub> = 0.0717	R <sub>1</sub> = 0.0609, wR <sub>2</sub> = 0.1492
Índices R finais [todos os dados]	R <sub>1</sub> = 0.0316, wR <sub>2</sub> = 0.0739	R <sub>1</sub> = 0.0639, wR <sub>2</sub> = 0.1518
Maior diferença pico/vale / e Å <sup>-3</sup>	0.77/-0.45	1.52/-0.55