

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

“Produtos naturais e derivados, complexação com o rutênio visando aumento da atividade citotóxica”

Angelica Ellen Graminha*

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

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

*Bolsista: CNPq

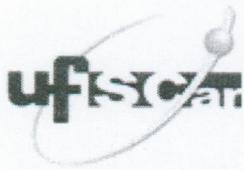
SÃO CARLOS
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G745pn Graminha, Angelica Ellen
Produtos naturais e derivados, complexação com o rutênio visando aumento da atividade citotóxica / Angelica Ellen Graminha. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
153 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Complexos de rutênio. 2. Câncer. 3. Produtos naturais. 4. Atividade citotóxicas. 5. Interação com BSA. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Angelica Ellen Graminha, realizada em 26/02/2015:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
UFSCar

Prof. Dr. Gustavo Von Poelhsitz
UFU

Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra
FIOCRUZ

Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto
USP

Prof. Dr. Iouri Evgenievitch Borissevitch
FFCLRP/USP

Dedico este trabalho a minha pequena grande família, Alice, Helena e Veroni, pelas alegrias infinitas e amor dedicado. Agradeço a Deus por ter escolhido estas pessoas para fazerem parte da minha vida.

"Solte-se e você será muito mais do que jamais sonhou."

(Janis Joplin)

"Tudo vale a pena quando a alma não é pequena".

Fernando Pessoa

Agradecimento

Agradeço primeiramente a DEUS, pela saúde e sabedoria para realizar mais este trabalho. Continue guiando o meu caminho Senhor.

Agradeço a Deus também, pelos dois presentinhos da minha vida, Alice e Helena. Amor maior não há!!

A você, Veroni, por sempre me apoiar, aconselhar, pelo carinho e cuidado que você tem com a nossa família. Obrigado pelo AMOR que estamos construindo a cada dia. TE AMO!!!

Aos meus pais João Graminha e Maria Donizeti da Silva Graminha por serem meus exemplos de humildade e força.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por todo apoio, incentivo, discussões científicas e convivência durante estes onze anos que contribuíram muito no meu crescimento profissional. Muito Obrigada!

Aos meus irmãos João Francisco e Ana Carolina, pela amizade, as diversões, travessuras e principalmente o carinho e ajuda que sempre tiveram comigo. Amo vocês.

A Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti (Gerontologia-UFSCar) pela disposição de seu laboratório para a execução dos testes biológicos.

A Amanda Blanque Becceneri, aluna da Profa Dra. Marcia Regina Cominetti, por toda ajuda e pela amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Vieira (DQ-UFSCar) pela disposição do aparelho de fluorescência de seu laboratório para a execução das análises com a BSA.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Menezes (UEG) pelos ligantes cedidos.

Ao aluno Rodrigo Correa e ao Prof. Dr. Javier Elena (IFSC-USP) pela resolução das estruturas cristalográficas.

A Legna, Katia e Wilmer, por toda preocupação e disposição em me ajudar. Muito obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório: Claudia, Legna, Katia, Wilmer, Rodrigo, João Paulo, João Honorato, Gabriel, Monize, Lucas Pozzi, Andréa, Anislay, Jocely, Juliana, Mariana, Murillo, Raul e Regina. Obrigada pelos momentos de descontração e todas as parcerias científicas.

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

Aos técnicos Ademir Sartori, Luciana Vizotto e Paulo Lambertucci pela disponibilidade e ajuda;

A CAPES, FAPESP e CNPq pela bolsa concedida.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano
bipy	2,2'-bipiridina
PPh ₃	Trifenilfosfina
dppb	1,4- <i>bis</i> (difenilfosfina)butano
dppe	1,2- <i>bis</i> (difenilfosfina)etano
N-N	Ligantes N-heterocíclicos
P-P	Bifosfinas
ATCC	Coleção Americana de Culturas (American Type Culture Collection)
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
A549	Carcinoma de pulmão
V79	Fibroblasto de hamster chinês
L929	Célula normal de fibroblasto de camundongo
SFB	Soro Fetal Bovino
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
RPMI	Meios Roswell Park Memorial Institute
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
HSA	Albumina sérica humana (Human Serum Albumin)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazina,
QSAR	Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica
CDCl ₃ -d ₆	Clorofórmio deuterado
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DRX	Difração de raios X
E _{1/2}	Potencial de meia onda
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
PTBA	Perclorato de tetrabutylamônio
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante
IL	Transição eletrônica intraligante
IC ₅₀	Concentração inibição do crescimento celular em 50 %

Et ₃ N	Trietilamina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ppm	Partes por milhão
RMN ³¹ P{ ¹ H}	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo Desacoplado do ¹ H
IV	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho
UV-vis	Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta e Visível
<i>trans</i>	Isômero de posição <i>trans</i> de um composto inorgânico ou orgânico
<i>cis</i>	Isômero de posição <i>cis</i> de um composto inorgânico ou orgânico
δ	Deslocamento químico nos espectros de RMN
ε	Coefficiente de extinção molar ou absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
m	Mili (10 ⁻³)
μ	Micro (10 ⁻⁶)
nm	Nanômetro (10 ⁻⁹ m)
Å	Angstrom (10 ⁻¹⁰ m)
d	Dupleto
t	Tripleto
m	Multiplete
J	Constante de acoplamento
Da	Dalton, unidade de massa
ν	Frequência de estiramento
F	Intensidade forte da transmitância da banda no I.V.
f	Intensidade fraca da transmitância da banda no I.V.
m	Intensidade média da transmitância da banda no I.V.
γ	Vibrações de deformação angular fora do plano
ν _{sim}	Vibrações de estiramento simétrico
ν _{ass}	Vibrações de estiramento assimétrico
δ	Vibrações de deformação angular no plano
cm ⁻¹	Frequência vibracional em centímetros inversos
Hz	Unidade de frequência em Hertz
π	Ligação PI
σ	Ligação sigma
m/z	Relação massa / carga

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) de alguns complexos de rutênio contra a linhagem tumoral MDA-MB-231.	52
TABELA 2: Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer ⁶¹	55
TABELA 3: Dados percentuais para os teores de C, H e N, teóricos e experimentais dos complexos de rutênio com ácido gálico e derivados	41
TABELA 4: Dados de condutividade molar (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹) para os complexos de rutênio com ácido gálico e derivados.	41
TABELA 5: Atribuições das frequências vibracionais (cm ⁻¹) dos ligantes ABz, AG e AGM.44	
TABELA 6: Atribuições das frequências vibracionais (cm ⁻¹) correspondente ao íon carboxilato no ligante livre (AG, ABz e AGM) e coordenado.	45
TABELA 7: Atribuições das frequências vibracionais (cm ⁻¹) dos ligantes ABz, AG e AGM e seus complexos de rutênio(II)	47
TABELA 8: Dados dos espectros eletrônicos dos complexos; solvente n-octanol. λ/nm	49
TABELA 9: Dados de ε e Log P _{ow} dos complexos de Ru(II) com ligantes AG, ABz e AGM em n-octanol.	50
TABELA 10: Valores de deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento para os complexos de rutênio com AG, ABz e AGM (CH ₂ Cl ₂).....	53
TABELA 11: Principais distâncias de ligação [Å] para o complexo [Ru(L)(dppb)(bipy)]PF ₆ e para o complexo precursor <i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppb)].	56
TABELA 12: Principais distâncias de ligação [Å] para o complexo [Ru(O-O)(dppe) ₂]PF ₆ ... 56	
TABELA 13: Dados de voltametria cíclica (V) para os complexos de rutênio [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(O-O)(dppe) ₂]PF ₆ onde O-O = AG, ABz e AGM.....	60
TABELA 14: Teste de IC ₅₀ para atividade sequestradora de radicais livres	63
TABELA 15: % de inibição de radicais livres DPPH (%S.R.L.) do ligante AG e os complexos após 30 minutos de reação.	64
TABELA 16: Constante de supressão de Stern-Volmer (K _{sv}) e constante supressão bimolecular (k _q) dos ligantes e dos complexos com a BSA	70
TABELA 17: Parâmetros de ligação para BSA com os complexo e os ligantes livres.	73

TABELA 18: Parâmetros de formação e termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) para a interação dos complexos de Ru(II) e os ligantes (AG, AGM, ABz) com a albumina (BSA).....	76
TABELA 19: Valores de IC_{50} dos ligantes e complexos de Ru(II) nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e L929.....	81
TABELA 20: Número de colônias formadas durante a incubação com os complexos $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$, <i>cis</i> - $[RuCl_2(dppb)(bipy)]$, cisplatina e doxorubicina.....	87
TABELA 21: Dados percentuais para os teores de C, H e N, teóricos e experimentais dos complexos de rutênio com derivados de ácido cinâmicos.	90
TABELA 22: Dados de condutividade molar ($ohm^{-1} cm^2 mol^{-1}$) para os complexos de rutênio com derivados de ácido cinâmico.	91
TABELA 23: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos ligantes cinâmicos.....	92
TABELA 24: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) correspondente ao grupo carboxila do ligante livre e coordenado dos derivados de ácido cinâmico.	93
TABELA 25: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos ligantes cinâmicos e seus complexos de rutênio(II)	94
TABELA 26: Valores de deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento para os complexos de rutênio com derivados de ácido cinâmico (CH_2Cl_2).	96
TABELA 27: Dados de voltametria cíclica (V) para os complexos de rutênio $[Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF_6$ onde O-O = derivados de ác. cinâmico ($100 mV.s^{-1}$, Ag/AgCl).	98
TABELA 28: Teste de IC_{50} para atividade sequestradora de radicais dos compostos 3,4-dihidroxcn e $[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF_6$	100
TABELA 29: % de inibição de radicais livres DPPH (%S.R.L.) dos compostos 3,4-dihidroxcn e $[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF_6$, após 30 minutos de reação.	101
TABELA 30: Constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante supressão bimolecular (k_q) dos ligantes cinâmicos e dos complexos com a BSA (solução $2,5 \mu mol L^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4)	104
TABELA 31: Parâmetros de ligação da BSA com os ligantes cinâmicos e seus complexos (solução $2,0 \mu mol L^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4.).....	107
TABELA 32: Parâmetros termodinâmicos para os ligantes cinâmicos e seus complexos. ...	110
TABELA 33: Valores de IC_{50} dos ligantes cinâmicos e seus complexos de Ru(II) nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e L929.	113

TABELA 34: Dados de condutividade molar ($\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) para os complexos de rutênio com derivados do ácido salicílico.	115
TABELA 35: Dados percentuais para os teores de C, H e N, teóricos e experimentais dos complexos de rutênio com derivados de ácido salicílico.	115
TABELA 36: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) do ácido salicílico e derivados..	116
TABELA 37: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) correspondente ao grupo carboxila do ligante livre e coordenado.	117
TABELA 38: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos ligantes salicílicos e seus complexos de rutênio(II)	118
TABELA 39: Dados dos espectros eletrônicos do ácido salicílico e derivados e seus complexos de rutênio; solvente n-octanol. λ/nm	122
TABELA 40: Dados de ϵ e $\text{Log } P_{\text{ow}}$ do ácido salicílico e derivados e seus complexos de rutênio em n-octanol.....	123
TABELA 41: Principais distâncias de ligação [\AA] para o complexo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. 124	
TABELA 42: Valores de deslocamentos químicos (δ), constante de acoplamento e condutividade para os complexos de rutênio (CH_2Cl_2).....	128
TABELA 43: Dados de voltametria cíclica (V) para os complexos de rutênio com ASal, AmSal e ADiSal (100 mV.s^{-1} , Ag/AgCl).....	130
TABELA 44: Constante de ligação de Stern-Volmer (K_{sv}) e valores de supressão bimolecular (k_q) para os complexo rutênio e os ligantes ASal, AmSal e ADiSal	133
TABELA 45: Parâmetros de ligação para BSA com os complexo rutênio e os ligantes ASal, AmSal e ADiSal (solução $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4.).....	135
TABELA 46: Parâmetros termodinâmicos para os complexos da série do ácido salicílico e derivados.	137
TABELA 47: Valores de IC_{50} dos ligantes ASal, AmSal e ADiSal e seus complexos de Ru(II) nas linhagens A549, MCF-7 e V79.....	140

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema representativo da evolução do câncer (adaptado de Richard Béliveau e Denis Gingras).....	42
FIGURA 2: Estruturas dos compostos de platina(II) mais comercializados no mundo que são cisplatina (1), carboplatina (2); oxaliplatina (3); nedaplatina (4); lobaplatina (5); e heptaplatina (6).....	44
FIGURA 3: Hidrólise do cisplatina e adutos intrafita e interfitas entre cisplatina e as bases do DNA ¹³	45
FIGURA 4: Alguns compostos com metais utilizados na terapia e diagnóstico de doenças humanas ²⁴	46
FIGURA 5: Vias de redução de compostos de Ru(III), dentro e fora da célula ³⁵	48
FIGURA 6: Estruturas químicas representativas de alguns complexos de rutênio que apresentam atividade antitumoral ³³	49
FIGURA 7: Estrutura química de RM175 e RAPTA-T ³³	50
FIGURA 8: (a) Estrutura de estaurosporina destacando a parte ativa da molécula na inibição de proteínas quinases. (b) Complexos modelos de rutênio areno, que podem variar de acordo com o grupo <i>R</i> . (c) Estrutura cristalográfica mostrando o complexo de rutênio ligado à proteína quinase tipo Pim-141.....	51
FIGURA 9: Esquema da reação da mangiferina com o aqua complexo [RuCl ₃ (dppb)H ₂ O]. .	53
FIGURA 10: Gráfico de % células vivas em função da concentração do complexo <i>trans</i> -[RuCl ₂ (dppb)(mang)] e da mangiferina livre.	54
FIGURA 11: Estrutura molecular representativa das séries do ácido gálico, ácidos cinâmicos e ácido salicílico, respectivamente.....	61
FIGURA 12: Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons.	57
FIGURA 13: Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas (ER) ⁶⁸	59
FIGURA 14: Representação do teste de citotoxicidade.....	35
FIGURA 15: Esquema representativo da rota sintética simplificada, dos complexos de Ru(II) com ácido gálico e derivados.	40
FIGURA 16: Espectro de massa MALDI-TOF, do complexo [Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	42
FIGURA 17: Espectro teórico do pico do íon monocarregado [M-PF ₆] ⁺ do complexo [Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	43

FIGURA 18: Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆ em n-octanol.....	48
FIGURA 19: Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ em n-octanol.....	48
FIGURA 20: Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} dos complexos precursores <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)] e <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppe) ₂], em CH ₂ Cl ₂	51
FIGURA 21: Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} do complexo [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆ , em CH ₂ Cl ₂	52
FIGURA 22: Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} do complexo [Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆ , em CH ₂ Cl ₂	52
FIGURA 23: Estrutura cristalográfica do complexo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)] ⁷⁷	54
FIGURA 24: Estrutura cristalográfica dos complexos (A) [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆ e (B) [Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	55
FIGURA 25: Estruturas cristalográficas dos complexos (A) [Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆ e (B) [Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	57
FIGURA 26: Voltamograma cíclico do complexo (A) [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ do ligante (B) AG obtidos em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).....	59
FIGURA 27: Voltamograma cíclico do complexo [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ obtido em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).....	59
FIGURA 28: Mecanismo de oxidação de fenóis <i>p</i> - substituídos.....	59
FIGURA 29: Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆ obtidos em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).....	60
FIGURA 30: Esquema representativo do teste de sequestro de radicais livres DPPH.....	61
FIGURA 31: Gráfico de barras de IC ₅₀ para o ácido gálico e seus respectivos complexos por tempo.....	63
FIGURA 32: Gráfico de barras de %S.R.L. do ligante AG e os complexos Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ após 30 minutos de reação.....	64
FIGURA 33: Estrutura em 3D da HSA e BSA com os resíduos de triptofanos em verde (doi:10.1371/journal.pone.0036723.g001).....	65
FIGURA 34: Representação da capacidade de ligação de diferentes moléculas a HSA (modificado de Curry, 2005).....	66

FIGURA 35: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações dos complexos (A) [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e (B) [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ . Concentração da BSA = 2,0 μmolL ⁻¹ , λ _{ex.} = 280 nm, pH = 7,4 e T = 310 K.	68
FIGURA 36: Gráficos de Stern-Volmer de (Fo/F)-1 vs [Q] para BSA na presença de diferentes concentrações (A) [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e (B) [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	69
FIGURA 37: Gráficos da equação logarítmica de log(Fo-F)/F vs log[Q] para BSA na presença de diferentes concentrações (A) [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e (B) [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	72
FIGURA 38: Gráficos de van't Hoff para os complexos A) [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e (B) [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.	74
FIGURA 39: Gráfico de viabilidade celular dos complexos [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆ por tempo na linhagem MDA-MB-231. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido pela análise post-hoc Tukey. * p< 0,05, ** p<0,01 e p< 0,001	78
FIGURA 40: Gráfico de viabilidade celular dos complexos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF ₆ (O-O = AG, ABz e AGM) após 72 de incubação na linhagem L929. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido pela análise post-hoc Tukey. * p< 0,05, ** p<0,01 e p< 0,001	80
FIGURA 41: Morfologia de células MDA-MB-231 expostas aos complexos [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ , [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ por um período de 10, 24, 48 e 72 horas.....	84
FIGURA 42: Quantificação do número de colônias para os compostos, <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)], [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ , cisplatina e doxorubicina na linhagem MDA-MB-231. Dados representados em ± SD de diferentes experimentos em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * p< 0,05, ** p<0,01 e p< 0,001, comparado com o controle.....	86
FIGURA 43: Quantificação do número de colônias para os compostos, <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)], [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ , cisplatina e doxorubicina na linhagem L929. Dados representados em ± SD de diferentes experimentos em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * p< 0,05, comparado com o controle.	86
FIGURA 44: Eficiencia de plaqueamento dos compostos, <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)], [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ , cisplatina e doxorubicina na linhagem L929. . Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * p< 0,05, comparado com o controle.	87

FIGURA 45: Eficiencia de plaqueamento dos compostos, <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)], [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ , cisplatina e doxorubicina na linhagem MDA-MB-231. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * p < 0,05, comparado com o controle.	88
FIGURA 46: Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.....	89
FIGURA 47: Esquema representativo da rota sintética dos complexos <i>cis</i> -[Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF ₆	90
FIGURA 48: Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} do complexo [Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ , em CH ₂ Cl ₂	95
FIGURA 49: Ângulo de cone de Tolman para PR ₃	96
FIGURA 50: Voltamograma cíclico do complexo [Ru(α-metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ obtidos em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).	97
FIGURA 51: Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ obtidos em CH ₃ CN (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).	97
FIGURA 52: Voltamograma cíclico do ácido <i>p</i> -coumárico obtidos em diferentes velocidade de varredura de 25, 50, 100, 200, 400 and 500 mVs ⁻¹ . ¹⁰⁶	98
FIGURA 53: Gráfico de barras de IC ₅₀ do consumo de DPPH na presença do ácido caféico (3,4-dihidroxcn) e seu complexo [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ por tempo.	99
FIGURA 54: Gráfico de barras de %S.R.L. do ligante 3,4-dihidroxcn e o complexo Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ após 30 minutos de reação.	101
FIGURA 55: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ . Concentração da BSA = 2,0 μmolL ⁻¹ , λ _{exc.} = 280 nm, pH = 7,4 e T = 310 K.	102
FIGURA 56: Gráficos de Stern-Volmer de (Fo/F)-1 vs [Q] para BSA na presença de diferentes concentrações [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	102
FIGURA 57: Gráfico da equação de log(Fo-F)/F vs log[Q] para BSA na presença de diferentes concentrações [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	106
FIGURA 58: Gráficos de van't Hoff para os complexos [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.....	109
FIGURA 59: Esquema representativo da síntese dos complexos [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF ₆	114

FIGURA 60: Espectro de massa MALDI-TOF, do complexo [Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	120
FIGURA 61: Espectro teórico do pico base [M-PF ₆] ⁺ do complexo [Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆ .	120
FIGURA 62: Espectro de absorção na região do UV-vis para os ligantes do ácido salicílico e derivados em n-octanol.	121
FIGURA 63: Espectro de absorção na região do UV-vis para os complexos [Ru(ASal)(bipy)(dppb)]PF ₆ e [Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆ em n-octanol.....	122
FIGURA 64: Estrutura cristalográfica para os complexos (A) [Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆ e (B) [Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	125
FIGURA 65: Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} do complexo [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆ , em CH ₂ Cl ₂	126
FIGURA 66: Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} dos complexos [Ru(O-O)(dppe) ₂]PF ₆ , O-O = (A) ASal, (B)AmSal e (C) ADiSal, em CH ₂ Cl ₂	127
FIGURA 67: Voltamograma cíclico dos ligantes AmSal e ADiSal , respectivamente (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).....	128
FIGURA 68: Representação da oxidação eletroquímica de compostos fenólicos ¹⁰⁶	129
FIGURA 69: Voltamogramas cíclico dos complexos [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆ , respectivamente, obtidos em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).....	129
FIGURA 70: Voltamograma cíclico do complexo [Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆ , respectivamente, obtidos em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl).	130
FIGURA 71: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆ . Concentração da BSA = 2,0 μmolL ⁻¹ , λ _{exc.} = 280 nm, pH = 7,4 e T = 310 K.	131
FIGURA 72: Gráfico de Stern-Volmer de (Fo/F)-1 vs [Q] para BSA na presença de diferentes concentrações de [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. {[BSA] = 2,0 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	132
FIGURA 73: Gráfico da equação de log(Fo-F)/F vs log[Q] para BSA na presença de diferentes concentrações [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. [BSA] = 2,0 x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	134
FIGURA 74: Gráficos de van't Hoff para os complexos [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆ nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.	136
FIGURA 75: Gráfico de viabilidade celular dos complexos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(O-O)(dppe) ₂]PF ₆ (O-O = ASal, AmSal e ADiSal) após 48 de incubação na linhagem	

A549. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido pela análise post-hoc Tukey. *
p< 0,05, ** p<0,01 e p< 0,001 139

FIGURA 76: Estruturas dos ligantes *N,N*-disubstituidos-*N'*-acil tioureas. **Erro! Indicador não definido.**

RESUMO

“Produtos naturais e derivados, complexação com o rutênio visando aumento da atividade citotóxica.”

Este trabalho envolve a síntese e caracterização de três novas séries de complexos de rutênio contendo ácido gálico e derivados, ácidos cinâmicos e ácido salicílico e derivados, uma vez que estes ligantes apresentam propriedades biológicas interessantes. Todos os ligantes são produtos naturais sintéticos e podem ser encontrados diariamente na dieta alimentar. O interesse em estudar estas três séries de ligantes é devido ao poder antioxidante que alguns destes produtos naturais apresentam. Assim, complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ onde O-O = ácido gálico e derivados, ácidos cinâmicos e ácido salicílico e derivados (bipy = 2,2'-bipiridina, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e dppe = 1,2-bis(difenilfosfina)etano). Todos os complexos sintetizados foram caracterizados por condutividade molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de absorção na região do UV-visível, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, voltametria cíclica e de pulso diferencial, e para alguns complexos, raios X de monocristal. A avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com as diferentes séries dos ligantes foram avaliados: o coeficiente de partição, a atividade antioxidante, estudo morfológico, ensaio clonogênico nas linhagens MDA-MB-231 e L929, a atividade citotóxica nas linhagens tumorais MDA-MB-231, MCF-7 e A549, e nas linhagens não-tumorais de camundongo e hamster L929 e V79, respectivamente. Os ensaios de viabilidade celular apresentam resultados promissores, indicando uma maior citotoxicidade dos complexos na linhagem MDA-MB-231 em relação às outras linhagens tumorais. Além disso, os complexos sintetizados com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, apresentam os menores valores de IC_{50} em relação aos complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em todas as linhagens celular estudadas. Os estudos da

interação dos complexos, com a albumina sérica bovina (BSA), foram realizados, e os compostos apresentam interação de moderada a forte com a proteína, sendo que os complexos contendo duas bifosfinas dppe apresentam valores de constante menores em relação a serie de complexos derivados $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

ABSTRACT

“Natural products and derivatives, complexation with ruthenium targeting increased cytotoxicity activity”

This work involves the synthesis and characterization of three new series of ruthenium complexes containing gallic acid and derivatives cinnamic acid and salicylic acid and derivatives, as these ligands exhibit interesting biological properties. All ligands are synthetic and natural products can be found in the daily diet. The interest in studying these three ligands series is due to the antioxidant power that some of these natural products present. Thus, complexes of formula $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ and $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, where O-O = gallic acid and derivatives, cinnamic acid and salicylic acid and derivatives (bipy = 2,2'-bipyridine, dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane and dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane). All the synthesized compounds were characterized by molar conductivity, elemental analysis, absorption spectra in the infrared, absorption spectroscopy in the UV-visible region, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance ^{31}P $\{^1\text{H}\}$, cyclic voltammetry and differential pulse, and for some complexes, X-ray crystallography. The evaluation of the biological potential of ruthenium complexes with different series of ligands were evaluated: the partition coefficient, the antioxidant activity, morphological study, clonogenic assay in MDA-MB-231 and L929, cytotoxic activity in tumor cell lines MDA MB-231, MCF-7 and A549, and non-tumor cell lines of mouse and hamster V79 and L929, respectively. Cell viability assays show promising results, indicating a greater cytotoxicity of the complexes in MDA-MB-231 line with respect to the other tumor cell line. Furthermore, the complexes of general formula $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ exhibit the values lowest of IC_{50} in compared on the complexes of the general formula $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ in all the cell line studied. Studies of the interaction of the complexes with bovine serum albumin (BSA), were performed, and

compounds have moderate to strong interaction with the protein, and the complexes containing two dppe biphosphinas have smaller constant values in relation the complexes of the series $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	41
1.1. Câncer	41
1.2. Cisplatina	43
1.3. Complexos metálicos na medicina	45
1.4. Rutênio	47
1.5. Produtos Naturais	54
1.6. Agentes antioxidantes	56
2. OBJETIVOS	23
3. PARTE EXPERIMENTAL	25
3.1. Procedimento Experimental	25
Materiais e Métodos	29
Técnicas Experimentais	30
- SÍNTESE DOS PRECURSORES	25
- SÍNTESES COM ÁCIDO GÁLICO E DERIVADOS	26
- SÍNTESES COM ÁCIDOS CINÂMICOS	27
- SÍNTESES COM ÁCIDO SALICÍLICO E DERIVADOS	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, onde O-O = AG, ABz e AGM	39
4.1.1 Ácido Gálico	39
4.1.2 Condutividade molar e análise elementar	40
4.1.3 Espectrometria de massa	41
4.1.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	43

4.1.5	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível.....	47
4.1.6	Ensaio de coeficiente de partição.....	49
4.1.7	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	50
4.1.8	Difração de raios X.....	53
4.1.9	Estudo Eletroquímico	58
4.1.10	Avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com ácido gálico e derivados.....	61
4.2.	Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, onde O-O = ácidos cinâmicos e derivados.....	89
4.2.1.	Ácidos cinâmicos	89
4.2.2	Condutividade molar e análise elementar	90
4.2.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	91
4.2.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	95
4.2.5	Estudo Eletroquímico	97
4.2.6	Avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com ácido cinâmicos e derivados.	99
4.3	Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, onde O-O = derivados de ácido salicílico.	114
4.3.1	Ácido Salicílico	114
4.3.2	Condutividade molar e análise elementar.....	115
4.3.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	116
4.3.4	Espectrometria de massa	119
4.3.5	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível.....	120
4.3.6	Ensaio de coeficiente de partição.....	122
4.3.7	Difração de raios X.....	123
4.3.8	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	125

4.3.9	Estudo Eletroquímico	128
4.3.10	Avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com ácido salicílico e derivados	130
5	CONCLUSÕES.....	142
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
7	APENDICE.....	156

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As mudanças demográficas que o Brasil e o mundo vêm sofrendo são consequências do desenvolvimento na urbanização populacional, na industrialização e na ciência e tecnologia. Estas características, juntamente com o novo estilo de vida leva a sociedade à exposição, ainda mais intensa, a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo¹. Todos estes fatores, mudança demográfica e transformação da qualidade de vida da sociedade, geram uma nova perspectiva no perfil de mortalidade no país. Atualmente as doenças infectocontagiosas, que na década de 60 se encontravam como a principal causa de morte no país, perdem em importância para as doenças crônicas degenerativas. Dentre as doenças crônicas degenerativas que mais matam encontram-se em primeiro lugar as doenças cardiovasculares seguidas pelo câncer¹. Estimativas mundiais apontam que houve 16,6 milhões de novos casos de câncer no mundo no ano de 2014². As estimativas também preveem que o câncer continuará crescendo nos países em desenvolvimento e principalmente em países desenvolvidos, caso medidas preventivas não forem aplicadas. Acredita-se que em 2030, haverá 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento^{1, 3, 4}.

1.1. Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que se caracteriza por uma população de células que cresce e se divide sem respeitar os limites normais crescimento, devido à perda do controle da proliferação celular. O crescimento celular não contido pode invadir e destruir tecidos adjacentes, podendo se espalhar para lugares distantes no corpo, através de um processo chamado metástase. O câncer afeta pessoas de todas as idades, mas o maior risco de câncer aumenta com o acréscimo da idade⁵.

Geralmente o câncer surge de uma única célula (somática ou germinativa) que sofre mutação, multiplica-se e suas descendentes acumulam outras mutações, que somadas dão origem a uma célula tumoral⁶ (FIGURA 1).

As células tumorais diferem das células normais por um conjunto de características fenotípicas tais como: autossuficiência em sinais de crescimento, resistência a sinais inibitórios de crescimento, resistência à morte celular, permitindo a imortalidade replicativa e a indução de angiogênese⁷ Essas características permitem o crescimento tumoral e são comuns tanto a tumores benignos quanto malignos. No entanto, somente os tumores malignos possuem a capacidade de invadir tecidos e órgãos distantes, levando à metástase⁸.

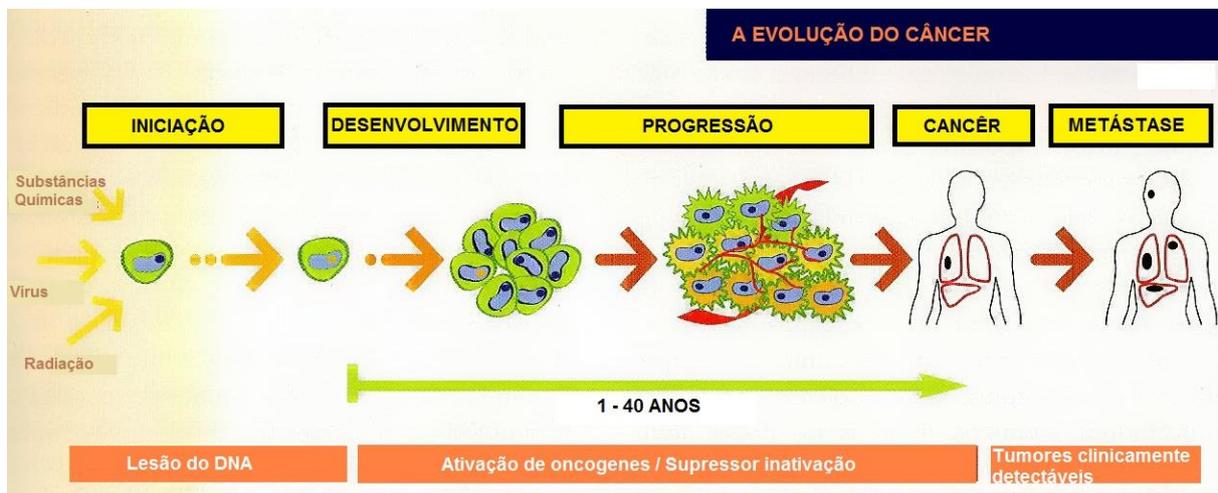


FIGURA 1: Esquema representativo da evolução do câncer (adaptado de Richard Béliveau e Denis Gingras)

Por décadas, agentes quimioterápicos e radiação ionizante tem sido os tratamentos mais utilizados na eliminação do câncer primário. Apesar de estas terapias oferecerem substancial benefício e algumas curas, a incidente recorrência tumoral é um problema resultante do desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos, por parte das células tumorais. Quando existe a possibilidade de retirada do tumor, a cirurgia é o tratamento mais adequado.

Portanto, a busca de compostos capazes de tratar e eliminar as células tumorais resistentes deve ser reforçada⁹. Normalmente os agentes quimioterápicos antineoplásicos atuam de forma não-específica, lesando tanto

células malignas, quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade a infecções¹⁰.

O *cis*-[diamindicloroplatina(II)], *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], denominado como cisplatina, foi o primeiro composto inorgânico utilizado na clínica no tratamento do câncer. Antes da descoberta do cisplatina, o envolvimento de compostos inorgânicos contendo metais na medicina, era muito limitada, pois sempre estavam associados à intoxicações. Aproximadamente há quatro décadas este perfil vem sendo modificado em relação ao câncer, principalmente após a descoberta das propriedades anticancerígenas do cisplatina, por Rosenberg¹¹ e sua equipe no final dos anos 60¹² e seu uso clínico iniciado em 1978¹³.

1.2. Cisplatina

O composto *cis*-[Pt(NH₃)₂(Cl)₂] foi sintetizado pela primeira vez por Michele Peyrone, em 1845 e ficou conhecido como sal de Peyrone¹⁴. A estrutura deste composto foi deduzida por Alfred Werner em 1893 e em 1965, Barnett Rosenberg, da Universidade do estado de Michigan, descobriu acidentalmente o efeito do cisplatina sobre o crescimento da *Escherichia coli* durante um experimento utilizando um campo elétrico¹⁵. Seu interesse foi despertado para algo que não estava relacionado aos objetivos do seu experimento, quando observou que as bactérias apresentavam crescimento totalmente irregular e filamentosos, de forma inesperada, e paravam de se dividir, ou seja, a divisão celular da *E. coli* foi inibida. Após extensivas análises e várias tentativas de explicar o fenômeno, Rosenberg e colaboradores identificaram que a causa da inibição da divisão bacteriana estava associada a um composto contendo grupos amina, e platina. Os eletrodos usados para gerar o campo elétrico eram de platina, e o meio de cultura continha cloreto de amônio. Durante as experiências uma parte dos eletrodos de platina dissolvia-se no meio de cultura formando o cisplatina¹⁶.

Hoje, quase 40 anos após sua aprovação pela agência norte americana, *Food and Drug Administration* (FDA), como um quimioterápico antineoplásico, o cisplatina é ainda um dos melhores medicamentos para o tratamento de câncer, no mundo¹⁶. Ele é responsável por cerca de 90% de casos de cura do câncer testicular em homens e desempenha um papel importante no tratamento contra alguns tipos de câncer, como o de cabeça, de ovário, o câncer cervical, de bexiga, colo do útero, melanoma e linfomas¹⁶. Estima-se que 50-70% dos pacientes com câncer no mundo são tratados com o cisplatina¹⁷ e os compostos derivados da platina, são usados para tratar de 40 a 80% dos pacientes com câncer, confirmando a importância destes compostos para o tratamento da doença, além de encorajar a busca por novos fármacos mais eficientes¹⁸. Estes derivados da platina surgiram da necessidade de compostos menos tóxicos, com menor efeito colateral. Assim, os análogos ao cisplatina que deram origem a uma nova geração de metalofármacos são a carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina e suas estruturas químicas estão representadas na FIGURA 2. Todos estes são complexos de platina(II), e são os metalofármacos mais difundidos mundialmente para o tratamento do câncer^{16, 19, 20}.

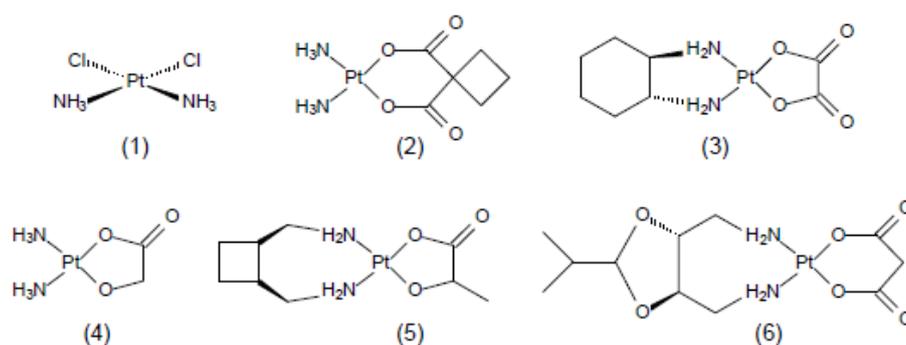


FIGURA 2: Estruturas dos compostos de platina(II) mais comercializados no mundo que são cisplatina (1), carboplatina (2); oxaliplatina (3); nedaplatina (4); lobaplatina (5); e heptaplatina (6).

O mecanismo de ação proposto para o cisplatina se dá através da interação com o DNA⁵. Estudos mostram que os cloretos presentes na esfera de coordenação do metal sofrem hidrólise quando este se encontra dentro da célula onde a concentração de íons cloreto (4 mmol/L) é 25 vezes menor que na

corrente sanguínea (100 mmol/L)²¹. Este aquo-composto dentro da célula pode reagir com carbonatos e fosfatos, de maneira mono ou bidentada, com nitrogênios ou enxofres presentes em proteínas e também com as bases nitrogenadas do DNA (FIGURA 3)²².

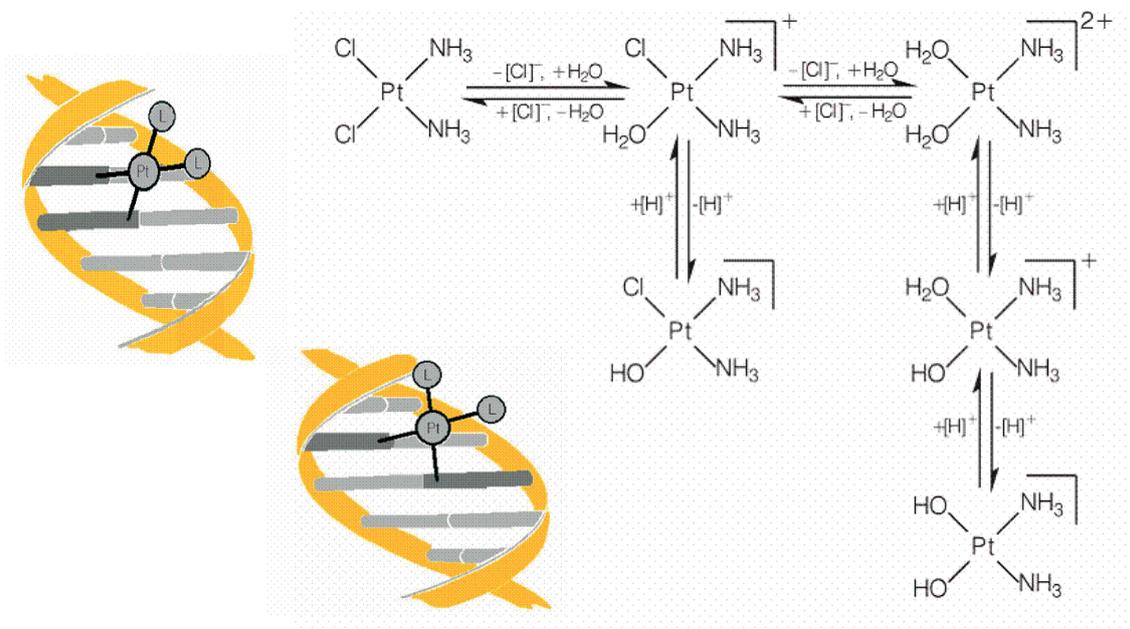


FIGURA 3: Hidrólise do cisplatina e adutos intrafita e interfita entre cisplatina e as bases do DNA¹³.

1.3. Complexos metálicos na medicina

Todo o sucesso do uso do cisplatina e seus análogos como antitumorais desempenhou um papel importante no estabelecimento no campo da química inorgânica, na busca, descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos²³. Isto tem despertado grande interesse no desenvolvimento de novos complexos metálicos para diagnosticar e/ou tratar doenças, incluindo diabetes, Alzheimer e câncer²⁴. A FIGURA 4 é a ilustração de alguns dos compostos inorgânicos desenvolvidos e utilizados com sucesso no tratamento e diagnósticos de algumas doenças, sendo que muitos outros compostos inorgânicos são utilizados para o tratamento das mais variadas enfermidades²⁵.

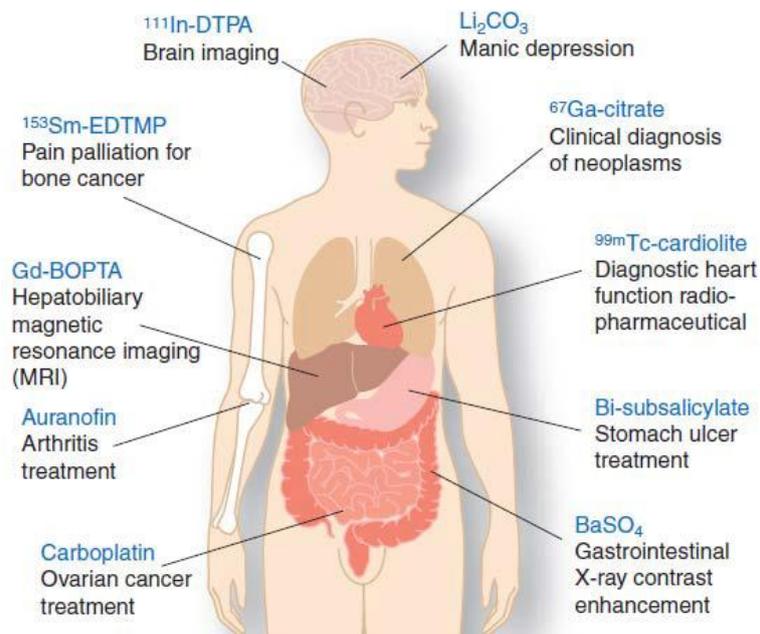


FIGURA 4: Alguns compostos com metais utilizados na terapia e diagnóstico de doenças humanas²⁴.

Os antineoplásicos, orgânicos e/ou inorgânicos, utilizados atualmente na clínica, apesar da eficiência no tratamento, também possuem algumas desvantagens. Este é o caso do cisplatina, que apresenta alta eficiência no tratamento de diversos tumores, mas efeitos colaterais como ototoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e mielosupressão, que representam uma limitação à sua utilização, além de resistência adquirida à droga após determinado tempo de administração²⁶. Assim, diversos pesquisadores têm direcionado suas pesquisas para a obtenção de compostos orgânicos e inorgânicos mais ativos e com menor efeito colateral, que os disponíveis no mercado. Os compostos inorgânicos apresentam algumas vantagens em relação aos orgânicos devido à facilidade na arquitetura da molécula e na síntese dos compostos. Uma das alternativas para a obtenção de compostos inorgânicos mais eficazes que os derivados da platina, é a modificação dos ligantes ao redor do metal, como por exemplo, ocorreu com a nova geração dos compostos da própria platina. Outra possibilidade que vem sendo utilizada é a troca do centro metálico, podendo trazer possíveis vantagens em relação aos compostos de platina, tais como: presença de sítios de coordenação adicionais; alterações na afinidade do ligante pelo metal e da cinética de substituição; mudanças no

estado de oxidação; possibilidade de utilização na terapia fotodinâmica que é característica por apresentar baixos, ou de nenhum efeito tóxico^{27, 28}.

Muitos metais tem sido investigados no desenho de novas moléculas como candidatos a fármacos, tais como Au(III), Ti(IV), Ga(III), Cu(II), Rh(III), Ru(III/II), etc, sendo que alguns destes entraram ou já terminaram as fases de ensaios clínicos iniciais. Contudo, os complexos mais promissores como agente antitumorais, candidatos a quimioterápicos em testes clínicos são os complexos de Ru(III)²⁹. Complexos de rutênio possuem várias vantagens em relação a outros metais. Os benefícios da sua utilização como um potencial fármaco incluem: a geometria de coordenação octaédrica, em contraste com a geometria quadrado-planar de complexos platina (II), implicando uma reatividade e modo de atuação diferentes do cisplatina; versátil troca de ligante com uma cinética de substituição comparável ao da platina; fácil acesso aos estados de oxidações 2+, 3+ e 4+ em condições fisiológicas e a capacidade do rutênio de imitar ferro na ligação com biomoléculas (moléculas presentes no soro humano como albumina, transferrina e outras proteínas), o que torna os agentes baseados no rutênio menos tóxico do que os fármacos de platina^{30, 31}.

1.4.Rutênio

Complexos de rutênio apresentam atualmente uma nova perspectiva no tratamento do câncer. Alguns apresentam atividade antitumoral superior ao cisplatina, assim como uma menor toxicidade³². Entre eles encontra-se o composto conhecido como ICR - [ImH][*trans*-RuCl₄(Im)₂] (Im = imidazol). O ICR apresenta interessantes propriedades antitumorais em modelos animais, inspirando assim a síntese de novos compostos similares a ele, como é o caso do KP1019 [indH][*trans*-RuCl₄(ind)₂] (ind = indazol) que está em fase I de testes clínicos³³.

Estudos pré-clínicos com o KP1019 apresentaram atividade promissora contra células de tumores coloretal *in vitro* e *in vivo* em carcinoma

de colo MAC5A, que é resistente aos quimioterápicos³⁴. O KP1019 é considerado uma pró-droga, porque inibe o desenvolvimento do tumor após a sua redução para Ru(II), dada as condições hipóxicas (ausência de oxigênio) dentro das células tumorais³⁵.

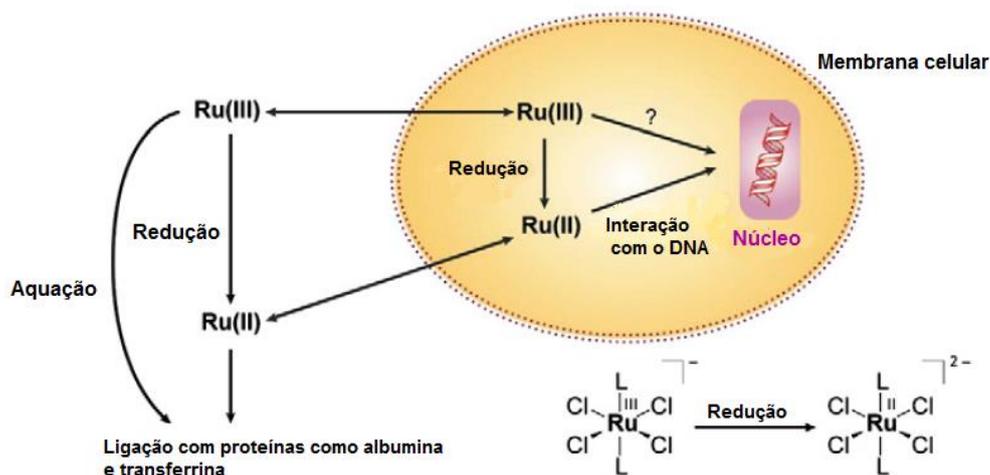


FIGURA 5: Vias de redução de compostos de Ru(III), dentro e fora da célula³⁵.

Estudos mostraram que este composto sofre hidrólise em solução aquosa semelhante ao cisplatina, de modo que o DNA tem sido considerado como um dos alvos biológicos do KP1019^{35, 36}. Investigando suas interações com o DNA, foi observado que o mesmo interage de maneira semelhante ao cisplatina, mas com uma intensidade menor em termos de ligações cruzadas, na ordem de 15 vezes menos que as interações com cisplatina³³.

Também análogo ao ICR, outro complexo que está sendo estudado é o complexo Na[*trans*- RuCl₄(imH)(dmsO)] (imH = imidazol) conhecido como NAMI (acrônimo para *New Anti-tumor Metastasis Inhibitor*). O NAMI é ativo contra carcinoma de Lewis pulmão, melanoma B16 e carcinoma mamário MCA e possui um efeito anti-metastático não apresentado pelo cisplatina^{37,38}.

O primeiro complexo de rutênio a entrar em ensaios clínicos foi o NAMI-A, [ImH]{*trans*-[RuCl₄(ImH)(DMSO)]}^{29,37}. NAMI-A é um derivado do NAMI, e a diferença entre eles é a substituição do íon sódio (Na⁺) pelo imidazol (ImH⁺). Estes complexos apresentam uma baixa toxicidade, não mostrando

atividade na inibição do crescimento de tumores primários, ou seja, não exibem citotoxicidade contra células tumorais *in vitro*, mas sim *in vivo*. Além disso, estes complexos apresentam efeitos antimetastáticos *in vitro* afetando a mobilidade das células tumorais^{29,37,38}. O NAMI-A completou a fase II dos testes clínicos no Instituto de Câncer da Holanda^{33,39}.

Igualmente ao KP1019, estudos de estrutura/atividade demonstram que a atividade biológica do NAMI-A, está relacionada com liberação progressiva de um ou mais íons cloretos. Ainda não está comprovada se o centro de Ru(III) sofre redução³⁵ mas observa-se um aumento da atividade antimetastática do NAMI-A na presença de redutores biológicos⁴⁰. Também não está esclarecido se estes compostos exercem sua ação por interação direta com o DNA, mas sabe-se que a alta toxicidade do mesmo está relacionada com extenso dano ao DNA⁴¹. A FIGURA 6 representa as estruturas químicas dos principais complexos de rutênio que já passaram ou estão em ensaios clínicos e pré-clínicos.

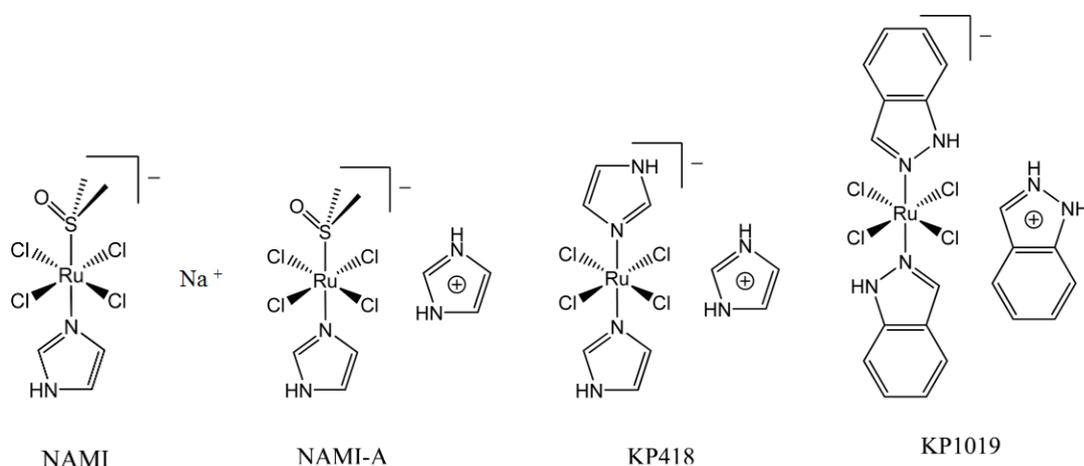


FIGURA 6: Estruturas químicas representativas de alguns complexos de rutênio que apresentam atividade antitumoral³³.

Do mesmo modo que complexos de rutênio(III), complexos de rutênio(II) também tem apresentado potencial como metalofármacos. Os compostos de Ru(II) possuem maior habilidade de troca de ligantes abandonadores (*i.e.* cloretos), sugerindo a contribuição para sua maior atividade em testes *in vitro*, quando comparado aos complexos de rutênio(III).

Estudos recentes com complexos de rutênio(II) com arenos vem ganhando destaque³³ uma vez que os ligantes areno estabilizam o rutênio no estado de oxidação (II) e conferem a este um caráter hidrofóbico diferente do observado para os compostos de Ru(III). O RAPTA-T e RM175 (FIGURA 7) são dois exemplos de areno-complexos utilizados como agentes anticâncer e que se encontram em estágios pré-clínicos.

O RAPTA-T, que foi desenvolvido por Dyson e Lausanne, é um organometálico do tipo “*piano stool*”, com a presença do ligante PTA (1,3,5-triaza-7-fosfadamantano). O ligante PTA confere características biológicas ao complexo RAPTA-T para ser ativado em ambiente hipóxico em tumores sólidos⁴². O complexo possui baixa citotoxicidade, mas apresenta uma maior citotoxicidade em células tumorais do que em células saudáveis. Mas o interessante é que estudos preliminares sugerem que este complexo tem a habilidade de modular o citoesqueleto celular diminuindo a capacidade das células tumorais nos processos de migração e metástase^{43, 33}.

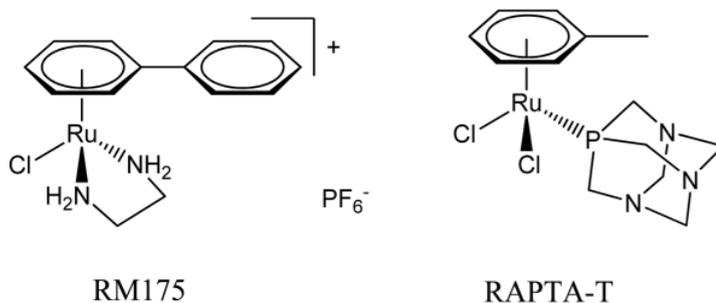


FIGURA 7: Estrutura química de RM175 e RAPTA-T³³.

Nos últimos anos alguns pesquisadores vêm iniciando uma nova vertente na pesquisa de complexos metálicos, no desenho racional de metalofármacos como agentes anticâncer.

O grupo do professor Eric Megger utiliza o metal na “arquitetura” de novas drogas. Meggers utiliza a classe de alcalóides indolocarbazol (por exemplo, estaurosporina – inibidor natural de proteínas quinase) para inibir seletivamente a proteína quinase de células tumorais⁴⁴. A proposta central do

trabalho é utilizar como composto modelo a molécula orgânica estaurosporina uma vez que muitas proteínas do tipo quinase estão relacionadas com processos de metástase e apoptose. Assim os complexos de rutênio sintetizados por Meggers mostraram que a região bioativa da molécula apresenta poucas alterações estruturais em relação à molécula de estaurosporina. Alguns compostos sintetizados apresentaram maior atividade que a molécula de estaurosporina e o mecanismo de ação destes complexos foram estudados juntamente com a elucidação estrutural dos mesmos, por difração de raios X, indicando que o complexo de rutênio se liga ao sítio ativo da enzima quinase Pim-1⁴⁵. O mecanismo de ação proposto para os complexos deste tipo é a inibição da atividade enzimática da proteína quinase Pim-1, está relacionada a vários tipos de câncer, como por exemplo, o de próstata^{45, 46}.

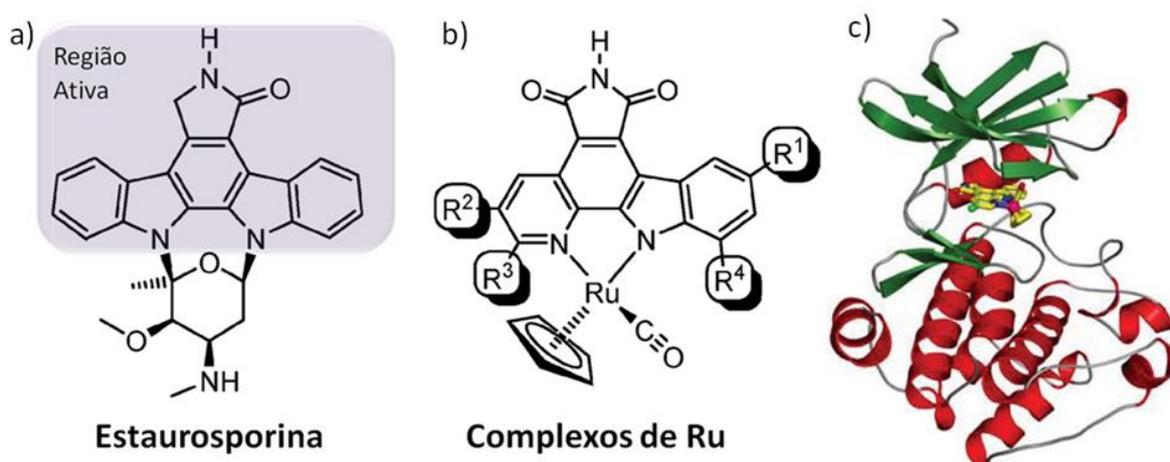


FIGURA 8: (a) Estrutura de estaurosporina destacando a parte ativa da molécula na inibição de proteínas quinases. (b) Complexos modelos de rutênio areno, que podem variar de acordo com o grupo *R*. (c) Estrutura cristalográfica mostrando o complexo de rutênio ligado à proteína quinase tipo Pim-141.

Na última década o nosso grupo de pesquisa (LERCI), vem investindo no desenvolvimento racional de novos candidatos a metalofármacos, principalmente à base do íon metálico rutênio. Foram sintetizados diversos complexos variando-se diferentes ligantes fosfínicos, bipyridínicos e outros ligantes de interesse biológico gerando uma gama de trabalhos com resultados bastante satisfatórios^{47, 48;49,50}.

Os dados de IC₅₀ da TABELA 1 apresentam os resultados de alguns destes complexos, no qual é possível observar uma melhora significativa na atividade citotóxica quando comparado aos fármacos de referência, cisplatina (inorgânico) e doxorubicina (orgânico). Pode-se observar também que quando se substitui um ou mais íons cloretos nos complexos precursores *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)], *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppp)] e *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppe)], por ligantes que possuem alguma atividade biológica, há um aumento significativo da citotoxicidade.

TABELA 1: Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) de alguns complexos de rutênio contra a linhagem tumoral MDA-MB-231.

complexos	IC₅₀	complexos	IC₅₀
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppb)]	31,30	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppp)]	14,4
[Ru(dmpm)(bipy)(dppb)]PF ₆ ⁴⁸	0,52	[Ru(pyS)(dppp)(bipy)]PF ₆ ⁴⁸	0,62
<i>cc</i> -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF ₆ ⁵¹	1,90	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppe)]	15,8
[RuCl(Im)(dppb)(bipy)]PF ₆ ⁵⁰	1,56	<i>cis</i> -[Ru(dmpm)(bipy)(dppe)] ⁴⁸	0,14
[RuCl ₂ (alo) ₂ (PPh ₃) ₂] ⁵⁰	<0,78	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dcpe)]PF ₆ ⁵¹	0,25
cisplatina	2,44	[RuCl(AcPyBz)(dppb)] ⁴⁹	0,40
Doxorubicina	3,67	[RuCl(AcPyBzNO ₂)(dppb)] ⁴⁹	0,80

Onde: bipy = 2,2'-bipiridina, fen = 1,10-fenntrolina, dppb = 1,4-*bis*(difetilfosfina)butano, dppf = 1,1'-*bis*(difetilfosfina)ferroceno, dppe = 1,2'-*bis*(difetilfosfina)etano, dcpe = 1,2-*bis*(diciclohexilfosfina)etano, dmpm = 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina, Im = imidazole, alo = allopurinol, pyS = 2-mercatopiridina, AcPyBz = S-benzil-N-(2-acetilpiridina) ditiocarbazato; AcPyBzNO₂ = S-p-nitrobenzil-N-(2-acetilpiridina)ditiocarbazato.

Um trabalho publicado pelo grupo em 2011 apresenta a síntese e caracterização de um complexo de rutênio contendo o produto natural mangiferina, que é o principal componente da formulação farmacêutica com nome fantasia de Vimang®⁵¹. A mangiferina (FIGURA 9) é extraída da *Mangifera indica* (manga comum) e encontra-se descrito na literatura que Vimang® apresenta atividades imunoestimulante, anti-inflamatória, antioxidante e antineoplásica⁵². Estudo realizado com o extrato aquoso das cascas da *Mangifera indica*, demonstraram que este é um poderoso seqüestrador de radicais hidroxil e ácido hipocloroso, exerce efeito inibitório sobre a peroxidação de fosfolípidios em cérebro de ratos e inibição de danos no DNA.

Além destas características, apresenta propriedades de proteção contra a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo mais ativo que as vitaminas C e E e β - caroteno⁵².

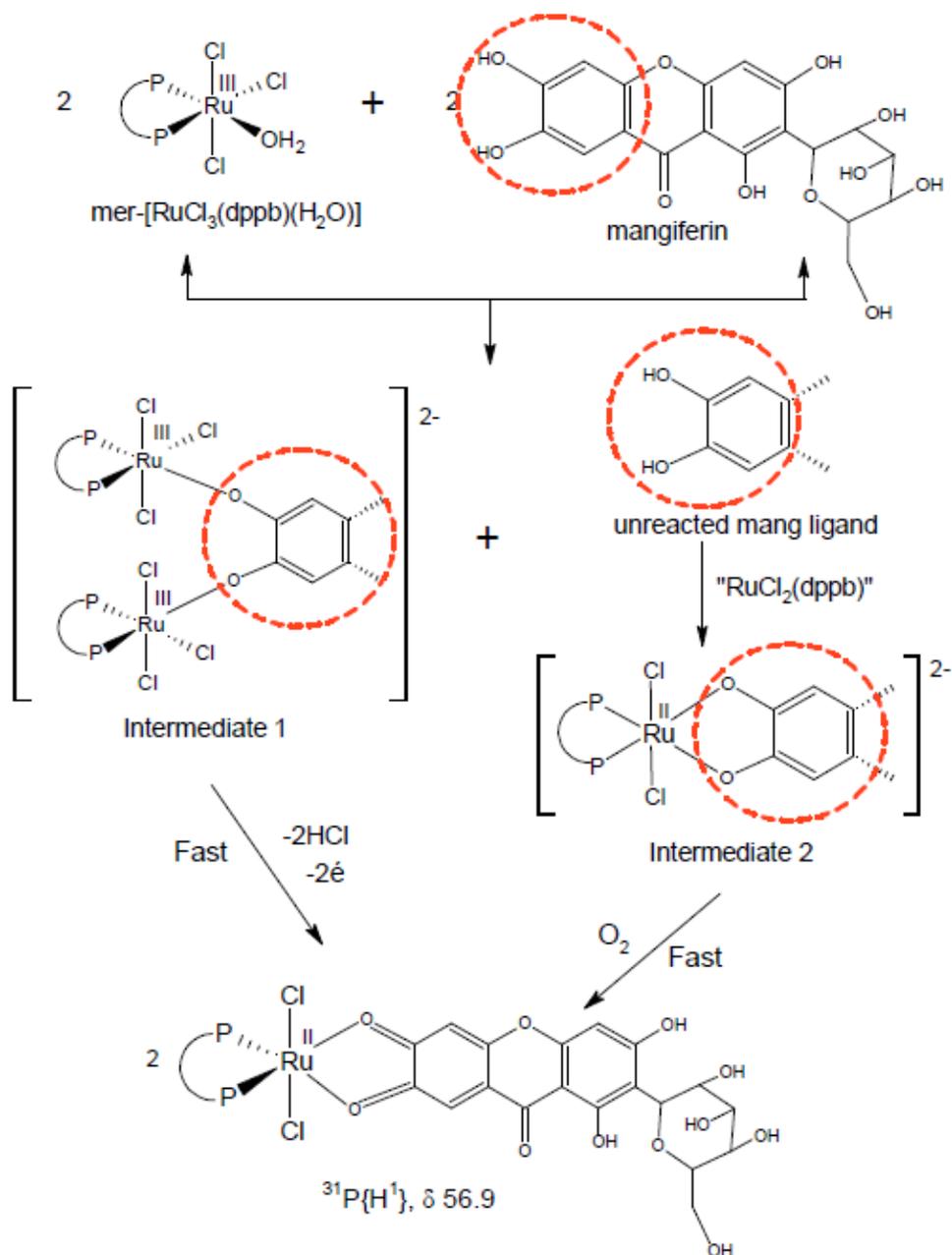


FIGURA 9: Esquema da reação da mangiferina com o aqua complexo $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{H}_2\text{O}]$.

Ensaio preliminares da viabilidade celular contra células de câncer de mama MDA-MB-231 do complexo com mangiferina, *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{mang})]$, e da mangiferina livre foram realizados. Os dados mostram que a mangiferina até $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentou atividade citotóxica contra a linhagem de câncer de mama, enquanto que o complexo apresentou um

IC₅₀ em torno de 6 μmol L⁻¹, como pode ser observado no gráfico da FIGURA 10.

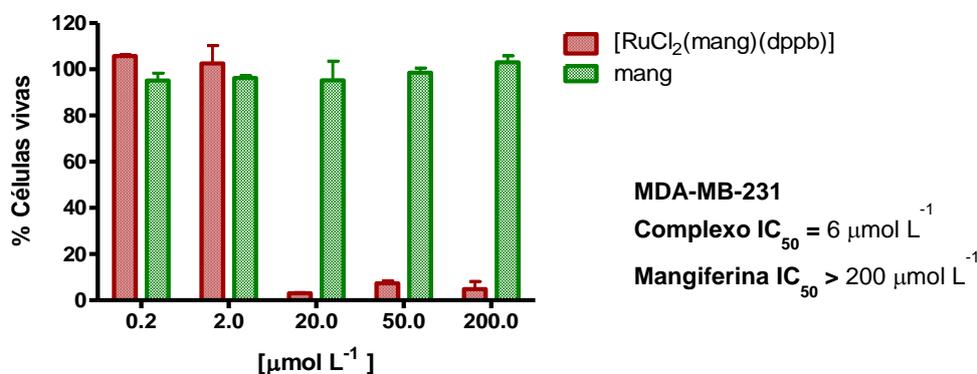


FIGURA 10: Gráfico de % células vivas em função da concentração do complexo *trans*-[RuCl₂(dppb)(mang)] e da mangiferina livre.

Deste modo, acredita-se que os produtos naturais, assim como seus complexos metálicos, mostram boas perspectivas para a obtenção de potenciais fármacos com atividades antitumorais. A possibilidade de modificações estruturais através de reações planejadas pode favorecer a formação de complexos estáveis, e mais ativos que o produto natural livre.

1.5. Produtos Naturais

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo⁵³. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers⁵⁴, e estes conhecimentos veem se aprimorando e se propagando desde nossos antepassados, quando o homem procurava pela cura de doenças através do consumo de ervas, bagas, raízes e cascas de árvores⁵⁵.

O Brasil possui uma farmacopeia popular muito variada baseada em plantas medicinais, resultados de uma miscigenação cultural, envolvendo africanos, europeus e indígenas com introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e escravos. Além disso, o país possui uma grande diversidade vegetal, aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores⁵⁶.

Assim, a fitoterapia é a maneira de utilização de plantas para o tratamento e prevenção de doenças. Estas plantas sintetizam, através de seu metabolismo primário, diversos nutrientes e metabolitos ativos, e, por meio do metabolismo secundário, substâncias com ação farmacológica denominadas de princípios ativos. As plantas adquirem fundamental importância na medicina popular devido às suas propriedades terapêuticas⁵⁷. A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos é incontestável. A descoberta das atividades biológicas destas substâncias não representou apenas o surgimento de novos grupos de medicamentos, mas possibilitou também a identificação de novas intervenções terapêuticas⁵⁸.

No último século houve um grande avanço na pesquisa de produtos naturais, principalmente no campo da oncologia, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Nas últimas décadas, 60% dos fármacos antineoplásicos utilizados na quimioterapia do câncer tem sua origem nos produtos naturais⁵⁹⁻⁶⁰, como pode ser observado na TABELA 2. Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares⁶¹.

TABELA 2: Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer⁶¹.

Fármaco	Fonte	Alvo Molecular	Indicação terapêutica
Vimblastina (1), vincristina (2), vindesina (3) e vinorelbina (4)	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Paclitaxel (5) e docetaxel (6)	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina (7) Etoposídeo (8) e teniposídeo (9)	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda;
Camptotecina (10) Topotecano (11) e irinotecano (12)	<i>Camptotheca acuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon

Portanto, produtos naturais vêm apresentando novas oportunidades no desenvolvimento de medicamentos contra o câncer, sendo que algumas destas moléculas interferem nas vias apoptóticas, que frequentemente estão bloqueadas ou alteradas em células tumorais. Sendo assim, é crescente o interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos compostos derivados de produtos naturais⁶¹.

1.6. Agentes antioxidantes

Um agente **antioxidante** é uma molécula capaz de inibir a oxidação de outra molécula, ou seja, durante uma reação química de oxidação o agente antioxidante (reduzidor) transfere elétrons ou hidrogênio, a um agente oxidante⁶². E qual a importância de um agente antioxidante?

Nos últimos anos, estudos vêm demonstrando a importância de uma dieta rica em vegetais e frutas na prevenção de doenças crônicas e degenerativas. Tais doenças como mal de Parkinson, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, redução do sistema imune e cânceres, podem estar associados a um aumento de radicais livres gerados durante uma disfunção nos processos metabólicos⁶³.

Os radicais livres podem ser definidos, então, como moléculas ou fragmentos moleculares, que contém um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital atômico ou molecular⁶⁴. Este elétron não emparelhado confere um grau de reatividade para o radical livre. Entre os radicais livres, os derivados de oxigênio representam a classe mais importante das espécies reativas geradas em sistemas vivos⁶⁴ e a mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres por meio da cadeia transportadora de elétrons. Em condições fisiológicas, cerca de 85 a 90% do oxigênio (O₂) é consumido na mitocôndria pela cadeia transportadora de elétrons, os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases⁶⁵.

Com a redução univalente do O_2 catalisado por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre são gerados os radicais superóxido ($O_2\cdot$), hidroxila ($OH\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FIGURA 11). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo, pois participa da reação de geração do radical $OH\cdot$. Este possui uma forte ação deletéria, constituindo um dos radicais livres mais reativos, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Além disso, o $O_2\cdot$ pode reagir com o radical livre óxido nítrico ($NO\cdot$), gerando a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito ($ONOO$), também potencialmente reativa (FIGURA 11).

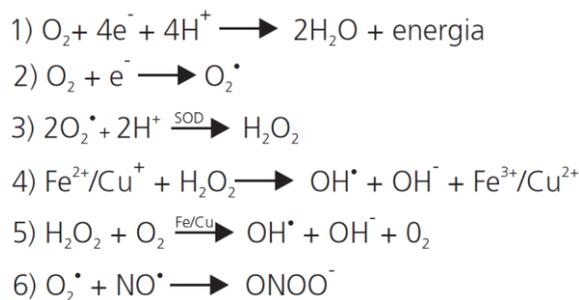


FIGURA 11: Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons.

Assim, além das espécies reativas de oxigênio (o ânion radical superóxido ($O_2\cdot^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete ($^1O_2^*$), o radical hidroxila ($HO\cdot$) e os radicais peroxila ($RO_2\cdot$) e alcoxila ($RO\cdot$)), outras espécies reativas do sistema biológico são estudadas como: espécies reativas de nitrogênio (o óxido nítrico ($NO\cdot$), dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$), cloreto de nitrila (NO_2Cl) e o peroxinitrito ($ONOO^-$)), os radicais derivados de tióis ($RS\cdot$), as espécies reativas de cloro, de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr⁶⁶.

No organismo, os radicais livres exercem diferentes papéis, atuando como mediadores da transferência de elétrons em vários processos bioquímicos, como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes⁶².

Entretanto, um descontrole na produção destas espécies no organismo apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas doenças⁶⁷.

Para eliminar o excesso de radicais livres o organismo possui sistemas enzimáticos e não enzimáticos de defesas, que são capazes de regenerar, ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante. Além destes, substâncias com habilidade de sequestrar radicais livres podem ser obtidas de fontes externas, como alimentos e bebidas. Quando os antioxidantes produzidos pelo corpo são insuficientes para combater os radicais livres produzidos pelo organismo, este sofre ações degenerativas através do distúrbio conhecido como estresse oxidativo.

A formação de radicais livres no organismo ocorre via endógena, pela ação catalítica de enzimas nos processos de transferência de elétrons durante o metabolismo celular (mitocôndrias, peroxissomas, NADPH oxidase, etc), ou por exposição a fatores exógenos, como radiação gama e ultravioleta, ozônio, quimioterápicos e xenobióticos⁶⁸ (FIGURA 12).

Alguns produtos naturais, tais como tiois, ácido ascórbico e polifenóis são conhecidos por serem potentes antioxidantes. Estas moléculas interrompem as reações em cadeia, eliminando os radicais livres intermediários e inibindo outras reações de oxidação.

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas.

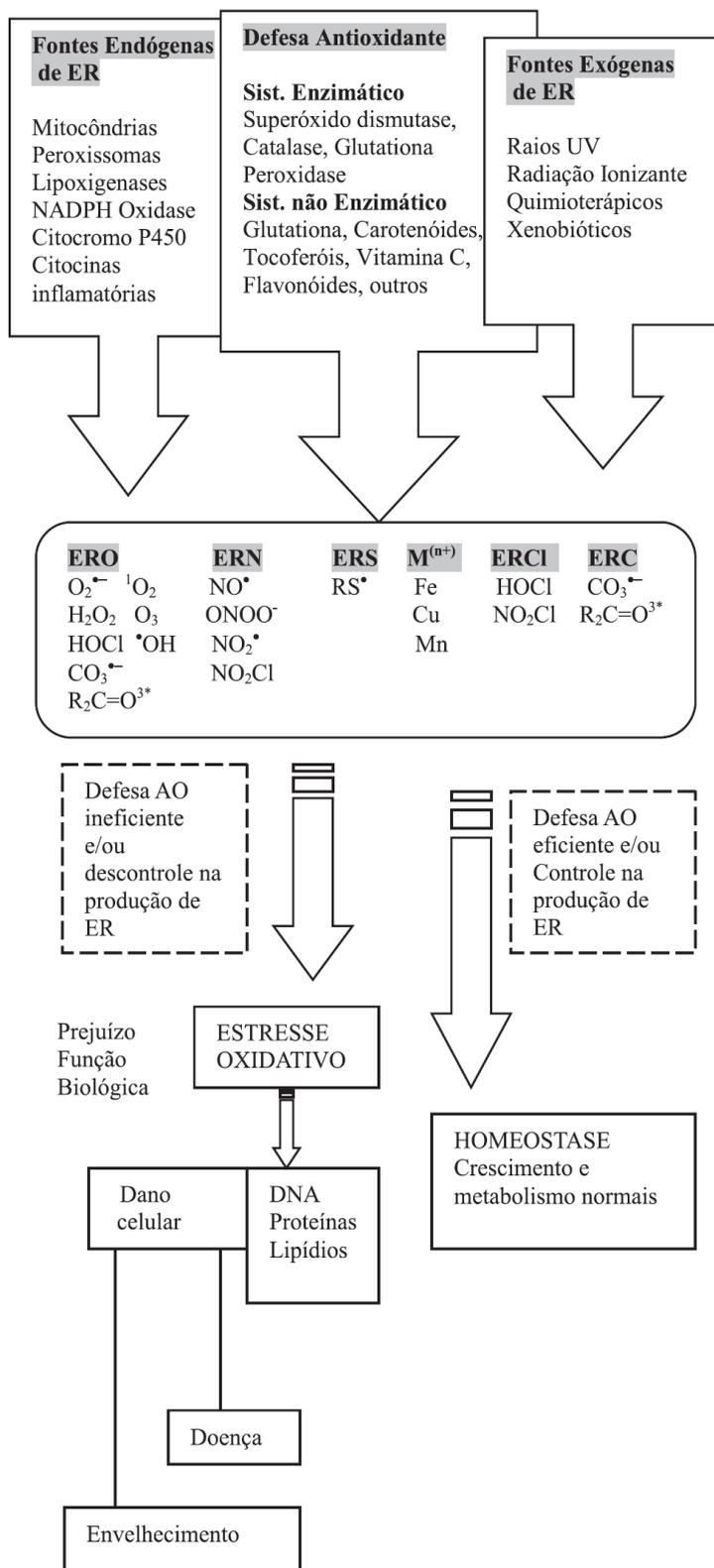


FIGURA 12: Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas (ER)⁶⁸.

Assim comparando os antioxidantes naturais com as biomoléculas que protegem o sistema biológico do estresse oxidativo, acredita-se que estas

moléculas podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo. A sua relação com a prevenção de diversas doenças tem despertado grande interesse pela comunidade científica⁶⁷.

Estudos realizados com diversos compostos contendo ligantes antioxidantes coordenados a diferentes ions metálicos vêm possibilitando a construção de protetores mais eficazes ao stress oxidativo⁶⁹. Com a coordenação é possível arquitetar compostos capazes de interagir com regiões mais hidrofílicas e / ou hidrofóbicas específicas dos componentes celulares, além de interagir com os diferentes tipos de radicais livres, implicando na aplicação de complexos de metálicos na prevenção do processo de carcinogénese. Testes antioxidantes preliminares com complexos metálicos indicam que eles podem facilitar a eliminação do excesso de ROS, e, assim, restaurar o equilíbrio redox nas células e órgãos danificados^{69,70}.

Sendo assim, a junção da capacidade redox ativa, tanto do ion metálico como do ligante orgânico, em um complexo, é uma abordagem promissora na busca de agentes terapêuticos capazes de interagir com as espécies reactivas tóxicas do meio biológico através de diferentes mecanismos⁷¹.

Neste trabalho foram estudados produtos naturais sintéticos derivados do ácido gálico, ácidos cinâmicos e ácido salicílico (FIGURA 13). Estes ligantes foram escolhidos, pois algumas destas moléculas apresentam em comum a capacidade de inibir a formação de radicais livres, ou seja, são agentes antioxidantes, devido à presença de grupos fenóis disponíveis na molécula. Sendo assim estes compostos poderiam atuar como um quimiopreventivo além de um quimioterápico.

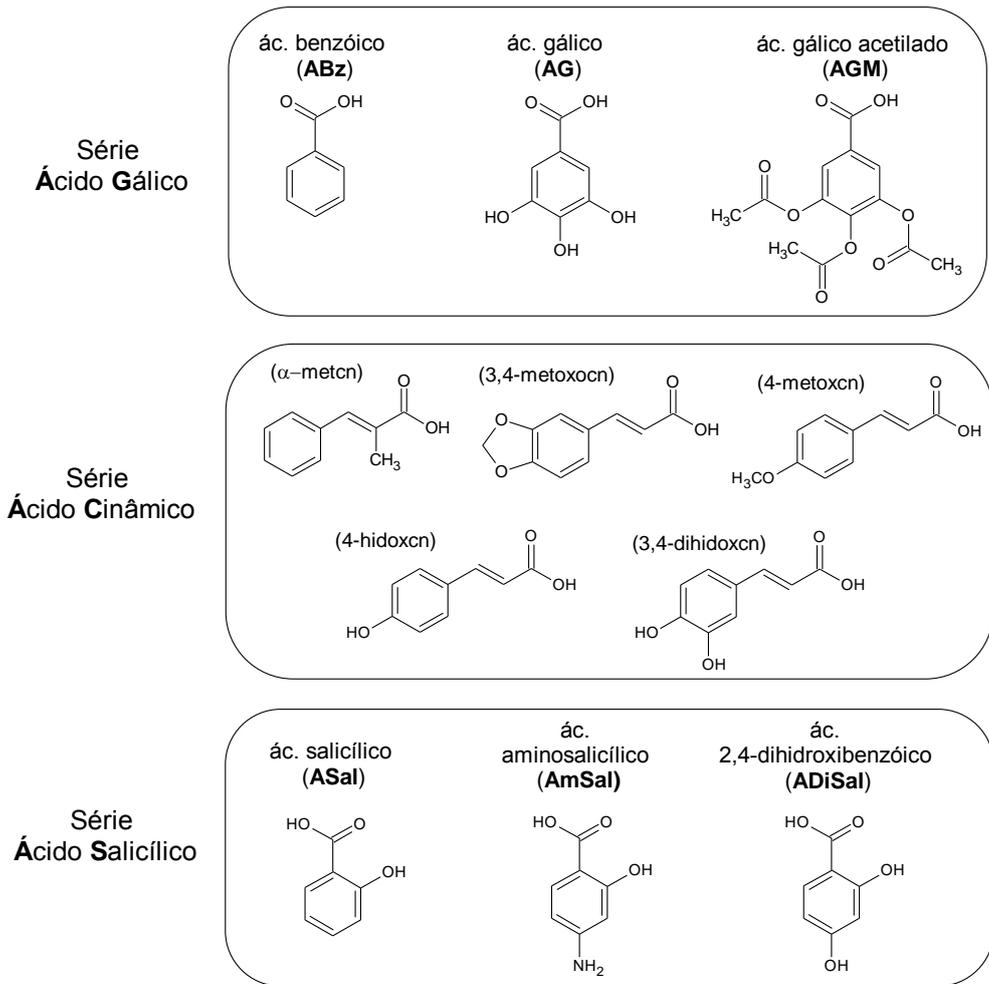


FIGURA 13: Estrutura molecular representativa das séries do ácido gálico, ácidos cinâmicos e ácido salicílico, respectivamente.

Capítulo 2

OBJETIVO

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral: O projeto teve como objetivo principal sintetizar e caracterizar complexos formados entre os produtos naturais, ácido gálico, ácido cinâmico e ácido salicílico, com íon metálico de rutênio, os quais foram estudados quanto às suas atividades citotóxica.

Para alcançar o objetivo geral, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Síntese e caracterização dos complexos de rutênio com produtos naturais comerciais ou modificados;
- 2) Estudo do efeito da interação dos complexos e seus ligantes com a proteína sérica bovina, BSA;
- 3) Avaliação do efeito antioxidante dos complexos e seus ligantes;
- 4) Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células tumorais de mama humano (MDA-MB231, MCF-7), tumorais de pulmão humano (A549) e células de fibroblasto de camundongo (L929) e hamster chinês (V79) dos produtos naturais livres e dos respectivos complexos de rutênio;
- 5) Ensaio clonogênico de alguns compostos nas linhagens MDA-MB231 e L929.

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procedimento Experimental

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados, as sínteses e caracterizações dos compostos de rutênio com ligantes sintéticos e naturais. Além disso, os procedimentos dos ensaios biológicos realizados com os mesmos.

- SÍNTESE DOS PRECURSORES

- Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ ⁷²

O complexo foi sintetizado segundo descrito por WILKINSON e STEPHESON⁷². Em um balão de duas bocas contendo 100 mL de metanol previamente deaerado foram dissolvidos 0,50 g (1,75 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. A solução resultante foi refluxada por 15 minutos sob atmosfera de argônio. A solução foi então resfriada e 2,87 g (10,85 mmol) de trifetilfosfina (PPh_3) foram adicionados. A mistura reacional foi novamente refluxada por 3 horas e após o resfriamento um sólido marrom cristalino foi obtido, o qual foi separado por filtração e lavado com metanol e seco a vácuo. Rendimento = 1,83 g (100%).

- Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu_2\text{-dppb})$ ⁷³

O complexo foi preparado segundo procedimento descrito por BRESSAN e RIGO⁷³. Em um balão de duas bocas, contendo 130 mL de hexano deaerado foi dissolvido 0,70 g (1,07 mmol) de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$. Em seguida, adicionou-se 0,60 g (1,40 mmol) de 1,4bis-(difetilfosfino)butano (dppb). A reação permaneceu sob agitação, refluxo e atmosfera de argônio por 6 horas. Em seguida, filtrou-se o precipitado verde formado e lavou-se o mesmo com hexano e este foi seco sob vácuo. Rendimento = 95% (0,85 g).

- Síntese de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ ⁷⁴

Em um balão de duas bocas contendo 100 mL de tolueno deaerado foram dissolvidos 1,50 g de $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu_2\text{-dppb})$ (0,92 mmol) e 0,29 g de

bipy (1,85 mmol). Estes permaneceram sob refluxo em atmosfera inerte por 48 horas. Em seguida, o precipitado vermelho formado foi filtrado, utilizando-se um funil de placa porosa, lavado com tolueno para a retirada de excesso de fosfina livre (dppb) e hexano e seco a vácuo. Rendimento: 0,60 g (86 %)

- Síntese de *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄]⁷⁵

O complexo foi sintetizado segundo procedimento descrito por WILKINSON *et al*⁷⁵. Em um balão de duas bocas, adicionou-se 1,00g (3,52 mmol) de RuCl₃.nH₂O em dimetilsufóxido (5mL) e a mistura foi refluxada por 15 minutos. O volume foi reduzido pela metade e em temperatura ambiente adicionou-se 20 mL de acetona, formando um precipitado amarelo. O precipitado foi filtrado e lavado com acetona e éter etílico (3 x 5 mL cada solvente) e seco a vácuo. Rendimento: 0,6 g (60 %).

- Síntese de *cis*-[RuCl₂(dppe)₂]⁷⁶

O complexo foi sintetizado segundo procedimento descrito por BAUTISTA *et al*.⁷⁶ . Em um balão de duas bocas misturou-se 0,50 g (1,03 mmol) de *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] com 0,86g (2,16 mmol) de 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) em 15 mL de diclorometano deaerado. A reação foi mantida em agitação por 5 horas em temperatura ambiente e em seguida o volume foi reduzido e adicionou-se hexano para precipitar. O precipitado foi lavado com hexano (3 x 5 mL) e cristalizado em uma mistura de CH₂Cl₂ : hexano (1:6) após 12 horas a -5°C. Rendimento: 0,35 g (70 %)

- SÍNTESES COM ÁCIDO GÁLICO E DERIVADOS

- Síntese do [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ onde O-O = ácido gálico e derivados

Em um balão de duas bocas contendo 15 mL de CH₂Cl₂/MeOH (70/30%), foram dissolvidos 0,66 mmol do ligante com 0,66 mmol de Et₃N. Em seguida, adicionou-se 0,05 g (0,07 mmol) de [RuCl₂(dppb)(bipy)] e após 20 minutos 0,012 g (0,66 mmol) de KPF₆. Após 3 horas de reação o CH₂Cl₂ foi

evaporado ocorrendo a precipitação do composto. Para melhorar o rendimento, 1 mL de H₂O foi adicionado. O composto foi filtrado, lavado com água e hexano e seco a vácuo. Rendimento: [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,059 g (94%); [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,061 g (92 %); [Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,067 g (89%).

- Síntese do [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆ onde O-O = ácido gálico e derivados

Em um balão de duas bocas, contendo 5mL de metanol e 25 mL de CH₂Cl₂, foram dissolvidos 0,52 mmol do ligante com 0,52 mmol de Et₃N. Em seguida, 0,05 g (0,52 mmol) de *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] e 0,095 g (0,52 mmol) de KPF₆. Após 8h de reação o CH₂Cl₂ foi evaporado ocorrendo a precipitação do composto. Para melhorar o rendimento, 1 mL de H₂O foi adicionado. O composto foi filtrado, lavado com água e hexano e seco a vácuo. Rendimento: [Ru(ABz)(dppe)₂]PF₆ = 0,056 g (93 %); [Ru(AG)(dppe)₂]PF₆ = 0,058 g (92 %); [Ru(AGM)(dppe)₂]PF₆ = 0,061 g (88 %).

- SÍNTESES COM ÁCIDOS CINÂMICOS

- Síntese de [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ onde O-O = ácidos cinâmicos

Reação no escuro: Em um balão de duas bocas contendo 15 mL de metanol foram dissolvidos (0,95 mmol) do ligante com 0,070g (0,93 mmol) de [RuCl₂(dppb)(bipy)] e 0,017g (0,93 mmol) de KPF₆. Em seguida, 0,038g (1,86 mmol) de AgClO₄ foi adicionado. Após 10 minutos todo o solvente da reação foi seco e o composto foi solubilizado em CH₂Cl₂. O precipitado formado (AgCl, KClO₄) foi filtrado em celite e a solução filtrada foi reduzida e em seguida adicionou-se hexano. Deixou-se por uma hora na geladeira e o precipitado formado foi filtrado e lavado com água e hexano gelado. Os composto foram seco a vácuo. Rendimento: [Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,055g (62 %); [Ru(4-metoxicn)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,059g (63 %); [Ru(3,4-

metoxocn)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,068g (72 %); [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,049g (94 %); [Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,047g (90 %).

- SÍNTESES COM ÁCIDO SALICÍLICO E DERIVADOS

- Síntese do [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ onde O-O = ácido salicílico e derivados.

Em um balão de duas bocas contendo 30 mL de EtOH/CH₂Cl₂ (70/30%), foram dissolvidos 0,104 mmol do ligante com 0,090 mmol de Et₃N. Em seguida, adicionou-se 0,10 g (0,104 mmol) de [RuCl₂(dppb)(bipy)] e após 20 minutos 0,012 g (0,66 mmol) de KPF₆. Após 6 horas de reação, o CH₂Cl₂ foi evaporado ocorrendo a precipitação do composto em EtOH. Para melhorar o rendimento, 1 mL de H₂O foi adicionado. O composto foi filtrado, lavado com água e hexano e seco a vácuo. Rendimento: [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,070 g (89%); [Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,071 g (92 %); [Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,080 g (82%).

- Síntese do [Ru(O-O)(dppe)₂]]PF₆ onde O-O = ácido salicílico e derivados

Em um balão de duas bocas contendo 50 mL de EtOH/CH₂Cl₂ (70/30%) foram dissolvidos 0,104 mmol do ligante com 0,090 mmol de Et₃N. Em seguida, adicionou-se 0,10 g (0,104 mmol) de *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] e após 20 minutos 0,012 g (0,66 mmol) de KPF₆. Após 20 minutos de reação, o CH₂Cl₂ foi evaporado ocorrendo a precipitação do composto em EtOH. Para melhorar o rendimento, 1 mL de H₂O foi adicionado. O composto foi filtrado, lavado com água e hexano e seco a vácuo. Após seco, o complexo foi solubilizado em CH₂Cl₂ e filtrado em celite. A solução filtrada foi reduzida e em seguida adicionou-se hexano para formação do precipitado. Deixou-se por uma hora na geladeira e o precipitado formado foi filtrado e lavado com água e hexano gelado Rendimento: [Ru(ASal)(dppe)₂]]PF₆ = 0,105 g (87%);

$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6 = 0,099 \text{ g (80\%)}$, $[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 = 0,111 \text{ g (90\%)}$.

Materiais e Métodos

- Obtenção da atmosfera de Argônio

Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob atmosfera de argônio, de procedência AGA, para evitar a presença de oxigênio e umidade. O gás é conduzido por uma coluna com sílica gel e em seguida por uma coluna com catalisador BTS – R – 3 – 11 (Fluka Chemika), aquecida a 60°C, para eliminação de oxigênio.

- Solventes

Os solventes orgânicos utilizados neste trabalho foram submetidos à purificação prévia, segundo os métodos usuais⁷⁷. O DMSO deuterado (Mallincrodt) foi utilizado como fornecido, assim como o solvente deuterado CDCl_3 (Aldrich).

- Reagentes químicos em geral

Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), de procedência Fluka, foi utilizado na preparação de soluções $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em diclorometano, com a finalidade de ser usado como eletrólito suporte para os procedimentos de estudo eletroquímico. Os ligantes trifenilfosfina (PPh_3), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe), ácido gálico, ácido benzóico, ácido salicílico e derivados, ácido *p*-coumárico (4-hidroxcn) e ácido caféico (3,4-dihidroxcn) assim como, $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ são de procedência Aldrich; O ligante ácido gálico acetilado (AGM) foi sintetizado e cedido pelo professor Antônio Carlos Severo Menezes da Universidade Estadual de Goiás (UEG), assim como os ligantes ácido gálico e ácidos cinâmicos.

Técnicas Experimentais

- **Análise Elementar (C, H e N)**

A determinação do teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, para todos os compostos sintetizados foram realizados em um analisador CHN modelo EA 1108 da FISON, no laboratório de análise elementar do departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

- **Condutividade Molar**

As medidas de condutividade foram feitas utilizando um aparelho Meter Lab., modelo CDM230. As soluções foram preparadas em diclorometano, dimetilsulfóxido ou acetona na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

- **Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho**

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro BOMEM MICHELSON FT MB-102, na região compreendida entre 4000 e 240 cm^{-1} . As amostras sólidas foram diluídas com KBr (Brometo de Potássio mantidos em estufa a 120°C) e preparadas minutos antes das análises.

- **Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis**

Os espectros na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard, modelo 8452A ou Cary 500 de duplo feixe, Varian. Os espectros foram obtidos em soluções de *n*-octanol e em várias diluições, partindo de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Utilizou-se celas de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 4 mL de capacidade.

Para determinar o valor de $\text{Log } P$, os valores do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) foram obtidos em *n*-octanol através do gráfico de Absorbância vs concentração dos complexos, seguindo a Lei de Beer, como descrita na equação 3.1.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1)$$

Onde:

- A = absorvância;
- c = concentração (mol L^{-1});
- b = caminho ótico da cubeta (cm).

- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram executadas em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz (400,13 MHz para ^1H ; 161,98 MHz para ^{31}P pertencentes ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos).

- Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial

As medidas de eletroquímica (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) foram feitas utilizando-se o potenciostato/ galvanostato Electrochemical Analyzer, modelo BAS 100B. Foi utilizado uma célula eletroquímica de vidro, com capacidade de 10 mL para registro dos voltamogramas. Utilizou-se eletrodos de trabalho e auxiliar de Pt e Ag/AgCl como eletrodo de referencia. Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) foi usado como eletrólito suporte ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 , DMSO ou DMF). Os voltamogramas foram registrados na região entre -1,5 e 1,5 V. Os potenciais anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) foram determinados diretamente dos voltamogramas sendo o potencial redox ($E^{1/2}$) obtido pela média aritmética dos potenciais (E_{pa} e E_{pc}).

- Difração de Raios-X

Todas as estruturas foram resolvidas no Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos/USP pelos professores doutores Eduardo Ernesto Castellano e Javier Ellena.

Para a resolução das estruturas cristalinas foi utilizado um difratômetro automático NONIUS KAPPA CCD utilizando radiação da linha $K\alpha$ do molibdênio ($0,71070 \text{ \AA}$). As estruturas foram resolvidas com o programa

SHELXS 97 (SHELDRICK, 1997) usando métodos diretos, sucessivos mapas de Fourier-Diferença permitiram a localização dos átomos não hidrogênicos. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL 97 (SHELDRICK, 1997). Detalhes específicos sobre coleta de dados e os parâmetros para cada complexo são fornecidos nos apêndices apropriados.

- Espectrometria de massa - Análises MALDI-TOF

As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker) utilizando o protocolo interno de preparação de amostra para análise⁷⁸. As amostras foram preparadas utilizando a matriz: ácido sinapínico. O protocolo consiste na mistura de 1 µL de uma solução saturada da respectiva matriz MeOH/H₂O (50:50) + 0,1%TFA com 1 µL da solução da amostra em acetonitrila. 0,5 µL foi aplicado na placa AnchorChip para ser analisada.

A aquisição dos dados foi realizada no modo reflectron com os seguintes parâmetros:

Ion Source 1 - 19.00 kV; Ion Source 2 - 16.80 kV; Lens - 7.9 kV; Reflector - 21kV; Reflector 2 – 9.35kV ; Pulsed Ion Extraction - 130ns; Mass Range - 500 - 2500Da; Laser Frequency - 500Hz; Detector Gain 5.6x.

Ainda para a aquisição, utilizamos os padrões de calibração Peptide Calibration Standard (Bruker).

- Determinação da atividade antioxidante através do método de seqüestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos compostos antioxidantes presentes nas amostras em seqüestrar o radical estável DPPH•⁷⁹. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• a 0,04 mg mL⁻¹, de forma a apresentar absorvância em 517 nm. Os experimentos foram realizados

em triplicata em uma microplaca opaca de 96 poços. Em cada cavidade da placa foi adicionado 190 μL da solução de DPPH e 10 μL da solução do composto em DMSO. O controle foi feito com 190 μL de DPPH e 10 μL de DMSO. Para comparação foi utilizado o ácido gálico como solução padrão. As soluções estoques do complexo ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram diluídas até a concentração final de $1,56 \mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas de absorvância referente a redução do radical do DPPH foram realizadas através do fluorímetro SpectraMax M3 em diferentes tempos (3, 6, 10, 20 e 30 min) a 25°C .

- Determinação da Lipofilicidade ($\log P$)

Lipofilicidade é a tendência de um composto em interagir com membranas biológicas (parte lipofílica da membrana) ou permanecer em fase aquosa (região hidrofílica). Estes parâmetros são calculados através do $\log P$ ou coeficiente de partição, que é um parâmetro físico-químico que estima o comportamento de uma substância em meio biológico.

Para mimetizar a interface membrana lipídica e citosol dos sistemas vivos o sistema imiscível octanol/água é o mais utilizado, pois apresenta uma boa aproximação do particionamento membrana/citosol. Sendo assim, o valor de $\log P$ é definido como a razão entre a concentração do composto na fase orgânica (octanol) e sua concentração na fase aquosa, em um sistema em equilíbrio⁸⁰.

Os ensaios foram realizados utilizando um sistema octanol como fase orgânica e água na fase aquosa e o $\log P$ foi determinado pelo método *shake flash*⁸¹. Os ligantes e seus respectivos complexos foram solubilizados em 750 μL de n-octanol e 750 μL de água, e permaneceram em agitação em 1000 rpm por 24 horas a 27°C . Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 500 rpm. As fases foram separadas e a concentração do complexo foi determinada na fase orgânica e aquosa por UV-Vis. Os experimentos foram

realizados em triplicata e o valor do Log P foi calculado pela Equação 3.2 a seguir:

$$\mathbf{Log\ } P = \mathbf{log\ } (C_o / C_a) \quad (3.2)$$

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

- Avaliação da Citotoxicidade

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as linhagens de células tumorais de adenocarcinoma humano de mama MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) e MCF-7 (ATCC HTB-22), carcinoma de pulmão A549 (ATCC CCL-185) e Flibroblasto de camundongo L929 (ATCC CCL-1) e de pulmão de Hamster Chinês V79 (ATCC CCL-93), gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Michel Crépin (INSERM U553, França) e pelas Prof. Dra. Elisangela Lacerda (UFG- Goiânia) e Profa. Dra. Denise Crespin (UNIFRAN - Franca).

As células foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio DMEM, ou RPMI, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%. Penicilina e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) usados como antibióticos e fungizona. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 .

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração de células. Em seguida semeou-se as células em placas de cultura de 96 poços (estéril) (densidade de células $1,5 \times 10^4$). As placas foram armazenadas em estufa (37°C / 5% CO_2) por 24 h para a adesão celular. Após este tempo, os complexos em diferentes concentrações foram adicionados à placa, e a mesma foi novamente mantida na estufa por 24, 48 e/ou 72 horas.

Após este período retirou-se todo o meio de cultura das placas e lavou-se cuidadosamente duas vezes com PBS (estéril) e em seguida adicionou-se 50 μL de MTT (0,5 mg/mL). As placas foram mantidas em estufa por um

período de 3-4 horas e em seguida adicionou-se isopropanol para solubilizar os cristais formados. Neste período de incubação, o MTT é reduzido pela desidrogenase mitocondrial e assume que a viabilidade celular (correspondente à atividade redutiva) é proporcional à produção de cristais de formazan (violeta) que, após solubilizado, é medido espectrofotometricamente. A densidade óptica (absorbância dos poços) foi medido em um leitor de microplacas a 540 nm. Para verificar o efeito do solvente DMSO, controles adicionais receberam 0,5% deste solvente.

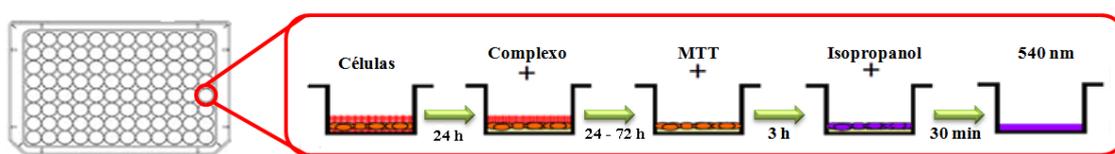


FIGURA 14: Representação do ensaio de proliferação.

- Estudos de interação com a BSA

O estudo de interação dos complexos sintetizados com a BSA foi realizado por meio da medida de supressão da fluorescência dos resíduos triptofano. Para isso foi empregado uma solução $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7,4. A extinção da intensidade de emissão dos resíduos de triptofano em 340 nm (comprimento de onda de excitação 280 nm) foi monitorada utilizando os complexos como supressores em diferentes concentrações ($2-100 \mu\text{mol L}^{-1}$), solubilizados em DMSO.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 180 μL de BSA e 20 μL de solução do complexo de 200 a $0,78 \mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas foram efetuadas em um fluorímetro SpectraMax M3 nas seguintes temperaturas: 22, 27, 32 e 37°C . Como não existe na literatura experimentos de interação com a BSA utilizando placas foram realizados dois ensaios para a validação do mesmo. O primeiro ensaio foi utilizando uma mesma placa onde se manteve a concentração da BSA e variou-se a concentração dos compostos. Esta placa foi

avaliada nas diferentes temperaturas 22, 27, 32 e 37 °C. O segundo experimento foi preparando a placa para cada temperatura de análise, sendo que os compostos e BSA encontravam-se na temperatura desejada antes de adicioná-los na placa e feito a leitura (igual a uma titulação). As duas formas mostram que ambos os experimentos não apresentam diferenças significativas nos valores das constantes obtidas e possuem o mesmo comportamento. Além disso, observa-se que o primeiro experimento onde se mantém a mesma placa e varia-se a temperatura apresentam valores de erros baixos. Os dados desta validação encontram-se no apêndice.

-Morfologia celular

Para a realização dos ensaios as células tumorais MDA-MB-231 e células não tumorais de camundongo L929 foram mantidas em crescimento e preparadas contadas e semeadas em placas de culturas de 12 poços (1×10^5 células / poço). As células foram mantidas em estufa a 37 ° C em 5% de CO₂ durante 24 horas para a adesão celular e em seguida, tratada ou não (controle) com 1, 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos compostos em estudo em um período de até 72 horas. A morfologia celular foi examinada sob um microscópio invertido com amplificação da objetiva 40 x.

- Ensaios clonogênicos

Inicialmente as células MDA-MB-231 e L929 foram cultivadas, contadas e plaqueadas em placas de petri de 6 cm em triplicata com densidade de 300 células por placa. As células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h, para adesão celular. As células foram tratadas com os compostos de interesse assim como os fármacos de referencia em três diferentes concentrações (1, 10 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) no período de 48 h. Após este tempo o meio de cultura foi retirado e um novo meio de cultura foi adicionado (6 mL). As células permaneceram incubadas em 5% de CO₂, a 37 ° C, por mais 8 dias, totalizando 10 dias após o início do tratamento.

Após os 10 dias de experimento as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol/ácido acético durante 5 minutos e coradas com violeta cristal a 0,5% durante 15 minutos. A sobrevivência relativa foi calculada a partir do número de células individuais que formaram colônias com mais de 50 células no décimo dia. A eficiência de plaqueamento (PE) foi calculada pela Equação 3.3, de acordo com Franken et al⁸².

$$PE = 100 \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ células semeadas}} \quad (3.3)$$

- Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes, independentemente. Os dados foram analisados utilizando o programa Sigma plot 13.0 e comparados através da análise de variância One-way (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett, que comparou cada experimento com o controle.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, onde O-O = AG, ABz e AGM.

4.1.1 Ácido Gálico

O ácido gálico é um composto polihidroxi fenólico que pode ser encontrado em vários produtos naturais, como no chá verde, casca de carvalho, no morango, uvas, na casca da maçã, em abacaxi, bananas e algumas outras frutas⁸³. Tem sido relatado que o ácido gálico possui diversas atividades biológicas, incluindo atividade antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória, mas o grande interesse em estudar o ácido gálico está relacionado com sua atividade antitumoral⁸⁴.

Os polifenóis são considerados como uma classe promissora na quimioprevenção do câncer. Além disso, muitos compostos fenólicos são conhecidos como agentes antioxidantes devido à presença de grupos fenóis livres na molécula. No entanto, as vias de indução da apoptose pelo ácido gálico está associada com o estresse oxidativo derivado das espécies reativas de oxigênio (ROS), pela disfunção mitocondrial e pelo aumento do nível de cálcio intracelular⁸³.

Nos últimos anos, a atividade citotóxica do ácido gálico tem sido relatada em várias células cancerígenas, tais como leucemia, câncer de próstata, de pulmão, pele, gástrico, mama e colo do útero^{85, 86, 87}. Ácido gálico, assim como seus derivados, apresentaram “seletividade” na atividade citotóxica em algumas células tumorais, quando comparado contra as células normais⁸⁸.

Neste trabalho buscou-se avaliar o potencial de ação do ácido gálico após a sua coordenação ao centro metálico de rutênio, uma vez que os grupos fenóis do ligante estão livres para atuarem. Para isso foram sintetizados seis novos complexos com ácido gálico, ácido benzóico e ácido gálico acetilado, que

possuem a mesma estrutura principal do ácido gálico, mas com modificações dos grupos fenólicos da molécula. Os seis novos complexos de rutênio foram sintetizados a partir dos precursores *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] e *cis*-[RuCl₂(dppe)₂]. A FIGURA 15 mostra o esquema das rotas sintéticas, simplificadas.

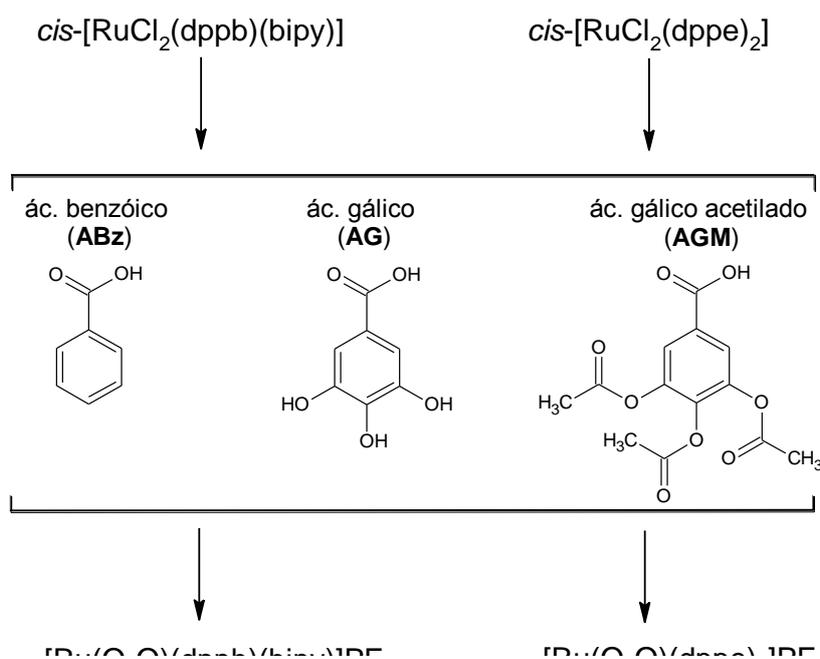


FIGURA 15: Esquema representativo da rota sintética simplificada, dos complexos de Ru(II) com ácido gálico e derivados.

4.1.2 Condutividade molar e análise elementar

Para avaliar a composição dos compostos obtidos foi realizada a análise elementar de carbono, nitrogênio e hidrogênio, que indica a fórmula molecular do composto através de valores experimentais. Os valores experimentais obtidos estão de acordo com os dados teóricos e indicam a formação de complexos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆. As formulações indicam a saída dos dois íons cloretos dos precursores, e a coordenação dos ligantes pelo grupo carboxilato, na forma bidentada (O-O) monoaniônica.

Em todos os complexos observa-se também moléculas de solvatação na estrutura proposta, como pode-se observar nos valores das formulações apresentados na TABELA 3.

TABELA 3: Dados percentuais para os teores de C, H e N, teóricos e experimentais dos complexos de rutênio com ácido gálico e derivados .

Complexos	Análise elementar		
	% C	% H	% N
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆ .½ éter	57,42 (57,20)	4,54 (4,70)	3,30 (2,84)
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆ . H ₂ O	53,22 (53,21)	4,09 (4,27)	2,56 (2,76)
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆ .2H ₂ O	52,75 (52,81)	4,11 (4,43)	2,09 (2,41)
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆ . ² / ₃ CH ₂ Cl ₂	58,52 (58,71)	4,68 (4,49)	-
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆ .½ CH ₂ Cl ₂	56,61 (56,97)	4,19 (4,34)	-
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆ .1½CH ₂ Cl ₂	56,42 (56,40)	4,30 (4,42)	-

(valores teóricos);

As medidas de condutividade dos compostos (TABELA 4) foram realizadas em CH₂Cl₂ e os valores encontrados estão na faixa de eletrólito 1:1 (12 – 77 μS.cm⁻¹ em CH₂Cl₂) segundo a literatura⁸⁹.

TABELA 4: Dados de condutividade molar (ohm⁻¹ cm² mol⁻¹) para os complexos de rutênio com ácido gálico e derivados.

Complexos	Branco	Condutividade
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,024	43,8
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,031	33,5
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,032	49,7
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	0,027	69,8
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	0,042	36,1
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	0,036	58,5

*Concentração dos complexos: 1 x 10⁻³ mol L⁻¹

4.1.3 Espectrometria de massa

A espectrometria de massas foi importante neste trabalho para complementar os dados de análise elementar para os compostos que apresentam

somente carbono e hidrogênio na microanálise como $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.

Os complexos fosfínicos de rutênio apresentam um perfil isotopomérico com sete isótopos do átomo de rutênio, os compostos $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ apresentam o mesmo perfil de fragmentação.

Nos espectros dos complexos observa-se o pico do íon monocarregado $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ referente a perda do contra-íon PF_6 gerando a espécie $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]^+$. Além deste pico observa-se o pico base referente ao íon $[\text{M}-\text{PF}_6-(\text{O}-\text{O})-\text{H}]^+$, gerado pela saída do ligante $\text{O}-\text{O} = \text{AG}$, AGM , ABz e um pico de baixa intensidade, referente à degradação de parte do ligante.

Os espectros de massa, simulado e experimental, desta classe de compostos encontram-se no apêndice. Na FIGURA 16 está representado o espectro experimental do complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e o seu padrão isotopomérico calculado pode ser verificado na FIGURA 17.

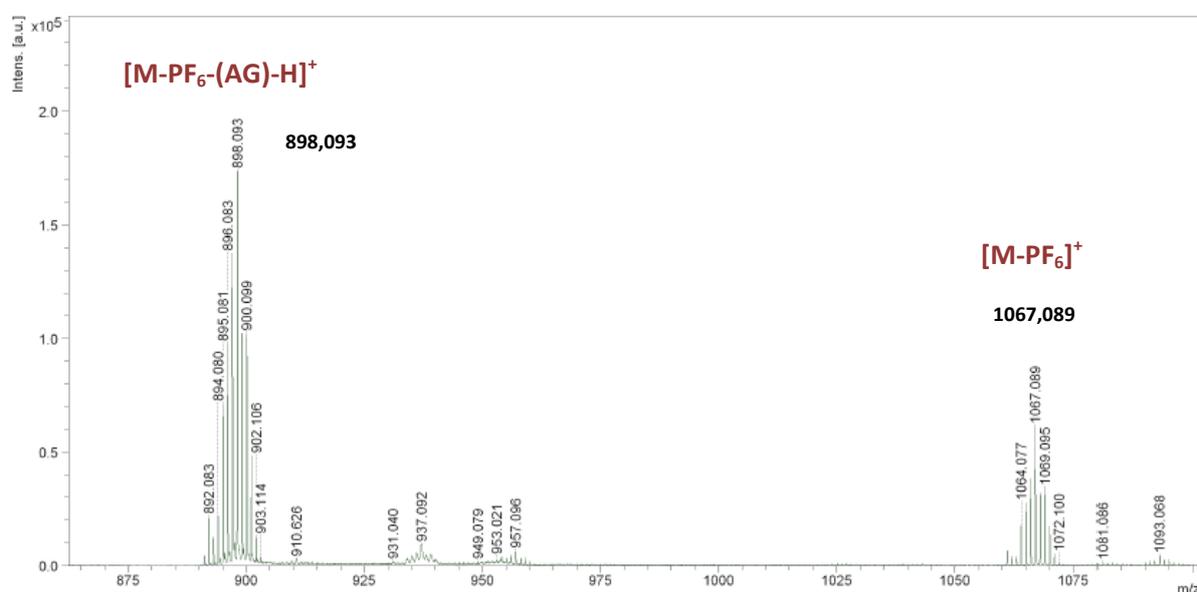


FIGURA 16: Espectro de massa MALDI-TOF, do complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$

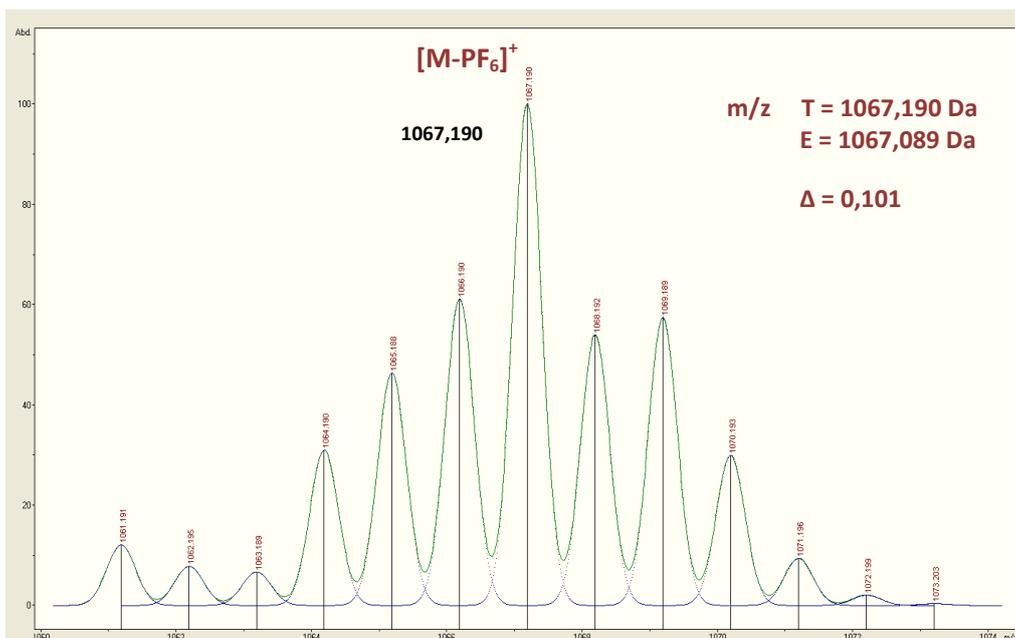


FIGURA 17: Espectro teórico do pico do íon monocarregado $[M-PF_6]^+$ do complexo $[Ru(AG)(dppe)_2]PF_6$.

4.1.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho foi utilizada como uma técnica complementar na caracterização dos complexos. Os modos vibracionais observados entre os ligantes, precursor e complexo final, pode confirmar a coordenação do ligante ao metal e inferir os possíveis pontos de coordenação. Nos espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes ácido benzóico (ABz), ácido gálico (AG) e ácido gálico acetilado (AGM), as bandas características das vibrações $\nu(O-H)$, $\nu_{as}COO^-$, ν_sCOO^- , e $\delta(OH)$ foram observadas em torno de 3495 -3071, 1681, e 1450 e 1420 cm^{-1} , respectivamente. Outras bandas como δOH do grupo fenol do AG, $\nu C(=O)-O$ e $\delta C-H_3$ do grupo acetil do AGM, estão representados na TABELA 5.

TABELA 5: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos ligantes ABz, AG e AGM.

Atribuições	Ligantes (cm^{-1})		
	ABz	AG	AGM
$\nu\text{OH} + \nu\text{C-H}$	3071 – 2564 F	3495 – 3283 F	3086 – 2510 m
$\nu\text{C=O}$ (acetil)	-	-	1790 e 1769 F
$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	1688 F	1666 F	1697 F
$\nu_{\text{as}}\text{C=C}$ (anel)	1618 f	1612 F	1617 f
$\nu\text{C=C}$	1602 m	1542 F	1593 f
$\delta_{\text{as}}\text{C-H}_3$	-	-	1499 m
$\nu\text{C=C}$	1583 m	1484 m	1432 F
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1453 F	1468 m	1432 F
$\nu_{\text{s}}\text{C=C}$ (anel)	1453 F	Encoberta	-
$\nu\text{C-O} + \delta\text{OH}$	1425 F	1426 F	1414 F
$\delta_{\text{s}}\text{C-H}_3$	-	-	1374 m
δOH (fenol)	-	1317 F	-
$\gamma\text{ CO}$	1326 F	1321 F	1320 F
$\gamma\text{ CO}$	1293 F	encoberta	1263 m
$\nu\text{C-O}$ (fenol)	-	1266 F e 1025 F	-
$\nu\text{C=C}$	1274 m	encoberta	1263 m
$\nu_{\text{as}}\text{C(=O)-O}$ (acetil.)	-	-	1210 F
$\nu_{\text{s}}\text{C(=O)-O}$ (acetil.)	-	-	1184 F
γOH	935 F	959 m	965 m
γCH	810 m	799 f	817 f
γCH	708 F	733 F	755 f
$\gamma\text{C=C}$	684 m	687 m	689 f
$\nu\text{C-O}$	553 m	558 m	550 m

F- forte; m- média; f- fraca; sh- ombro; ν – designa uma vibração de estiramento; δ - designa uma vibração de deformação; γ - designa uma vibração de deformação fora do plano.

Nos espectros de IV dos complexos, observa-se um deslocamento, ou a ausência de algumas destas bandas. Com relação ao complexo com ácido benzóico onde o único ponto de coordenação é pelo íon carboxilato observa-se

que as bandas $\nu(\text{O-H})$ e $\delta(\text{OH})$ estão ausentes e as vibrações assimétrica e simétrica do grupo $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, se deslocaram. Para os outros complexos com ácido gálico (AG) e ácido gálico acetilado (AGM) observa-se as mesmas modificações das bandas, indicando que os mesmos estão coordenados pelo íon carboxilato. Outra evidencia para confirmar a coordenação do íon carboxilato na forma bidentada é calcular a diferença entre o estiramento simétrico e assimétrico do νCOO^- (Δcm^{-1})⁹⁰. O íon carboxilato pode coordenar-se ao metal de três maneiras: monodentado, bidentado e bidentado em ponte. O valor de Δcm^{-1} da forma monodentada será sempre maior do que para o ligante livre, enquanto a forma bidentada apresentará um valor de Δcm^{-1} menor que o ligante livre. Além disso, na forma monodentada o valor do estiramento assimétrico da carbonila é deslocado para valores mais altos em comparação com a forma bidentada. Com o deslocamento do estiramento assimétrico da vibração νCOO^- para regiões de menor energia e valores de Δcm^{-1} para os complexos serem menor que os calculados para os ligantes livres (TABELA 6), podemos confirmar a coordenação da forma bidentada do íon carboxilato na esfera de coordenação do rutênio⁹⁰.

TABELA 6: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) correspondente ao íon carboxilato no ligante livre (AG, ABz e AGM) e coordenado.

Compostos	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	Δ (cm^{-1})
ABz	1688 F	1453 F	235
AG	1666 F	1468 m	198
AGM	1697 F	1432 F	265
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	1619 f	1499m	120
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	1622 f	1497 m	125
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	1624 f	1512m	112
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	1620 f	1501 m	119
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	1615 m	1499 m	116
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	1616 f	1512 m	104

Com a coordenação, além das bandas dos ligantes ABz, AG e AGM, pode se observar também bandas vibracionais referentes aos grupos dos outros ligantes da esfera de coordenação. Todos os complexos apresentam duas bandas de vibração $\nu(\text{Ru-P})$, referentes as bandas de estiramento assimétrica e simétrica dos átomos de fósforos da bifosfina que se encontram em *cis*. Para os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ os espectros apresentam bandas na região entre $467 - 418 \text{ cm}^{-1}$, características das vibrações $\nu(\text{Ru-N})$ da bipyridina e $\nu(\text{Ru-O})$ dos ligantes em estudo. Já o complexos com duas bifosfinas na esfera de coordenação do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, além das bandas Ru-P, observa-se uma banda em torno de 485 cm^{-1} , característica da vibração $\nu(\text{Ru-O})$, referente à coordenação do ligante. Todos os complexos apresentam duas novas bandas bem características atribuídas $\nu\text{P-F}$ e $\delta\text{P-F}$ referente ao contra-íon PF_6^- . A TABELA 7 apresenta outras bandas características dos complexos.

TABELA 7: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos ligantes ABz, AG e AGM e seus complexos de rutênio(II)

Atribuição	[Ru(L)(dppb)(bipy)]PF ₆ (cm^{-1})			[Ru(L)(dppe) ₂]PF ₆ (cm^{-1})		
	ABz	AG	AGM	ABz	AG	AGM
vOH	-	3501 f	-	-	3510 f	-
vCH	3057 m	3056 f	3059 f	3056 f	3057 f	3059 f
v _{as} CH ₂	2975 m	2941 f	2934 f	2970 f	2953 f	2932 f
v _s CH ₂	2877 f	2856 f	2852 f	2924 f	2910 f	2849 f
vC=O _(acetil)	-	-	1781 F	-	-	1781 F
v _{as} COO ⁻	1619 sh	1622 sh	1624 sh	1620 sh	1615 m	1616 sh
v _{as} C=C _(anel)	1602 m	1603 m	1603 f	1602 f	encoberta	1616 f
vC=C	1572 f	1573 f	1570 f	1587 f	1587 f	1587 f
δ _{as} C-H ₃	-	-	1485 m	-	-	1485 m
v _s COO ⁻	1499 m	1497 m	1512 m	1501 m	1499 m	1512 m
v _s C=C _(anel) + vC=C _(fosf)	1484 m	1484 m	1485 m	1485 m	1485 m	1485 m
vC=C _(fosf)	1466 m	1463 m	1464 m	1434 F	1434	1433 F
vC=N	1432 F	1434 F	1432 F	1434 F	1434	1433 F
δ _s C-H ₃	-	-	1372 m	-	-	1372 m
δOH _(fenol)	-	1310 m	-	-	1311 m	-
vC=C	1311 f	encoberto	1313 f	1340 f	Encoberta	1321 m
vC-O _(fenol)	-	1269 f	-	-	1280 m	-
v _{as} C(=O)-O _(acetil.)	-	-	1209 F	-	-	1205 F
v _s C(=O)-O _(acetil.)	-	-	1186 F	-	-	1187 F
vP-CH	1096 m	1096 m	1096 m	1098 m	1096	1097 m
vC-O _(fenol)	-	1029 m	-	-	1096 F	-
vP-CH	998 f	998 f	1000 f	1000 f	1000 m	1001 f
v P-F	843 F	845 F	841 F	839 F	844 F	841 F
γ anel	697 F	697 m	698 F	691 m	697 F	697 m
vP-CH	617 f	654 f	661 f	650 f	651 m	652 f
δ P-F	557 F	558 m	558 F	558 m	558 m	557 m
vRu-P	512 m/ 508 F	512 m/ 508 m	515 F/ 507 F	526 m/ 511f	527 F/ 512 m	528 m/ 513 f
vRu-O	459 f	467 f	456 m	479 f	481 m	497 f
vRu-N	418 f	427 f	419 f	-	-	-

F- forte; m- média; f- fraca; sh- ombro; v – designa uma vibração de estiramento; δ - designa uma vibração de deformação; γ - designa uma vibração de deformação fora do plano.

4.1.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível

Os espectros de absorção eletrônica, na região do ultravioleta e visível dos complexos, foram obtidos com o intuito de se avaliar os tipos de

transições existentes entre os ligantes e o metal. Na FIGURA 18 e 19 estão apresentados os espectros obtidos para os complexos $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, os espectros dos outros complexos encontram-se no apêndice.

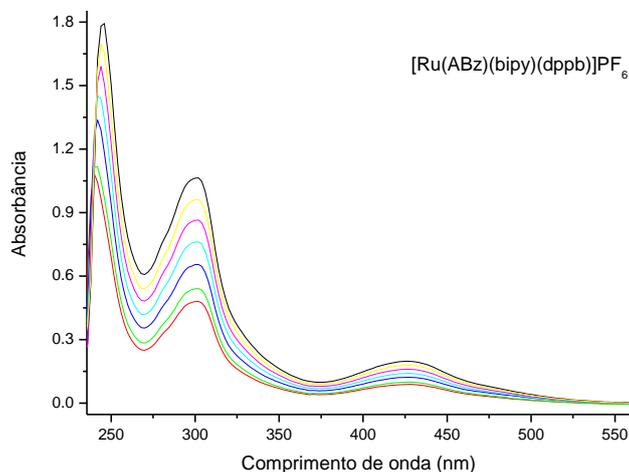


FIGURA 18: Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em n-octanol.

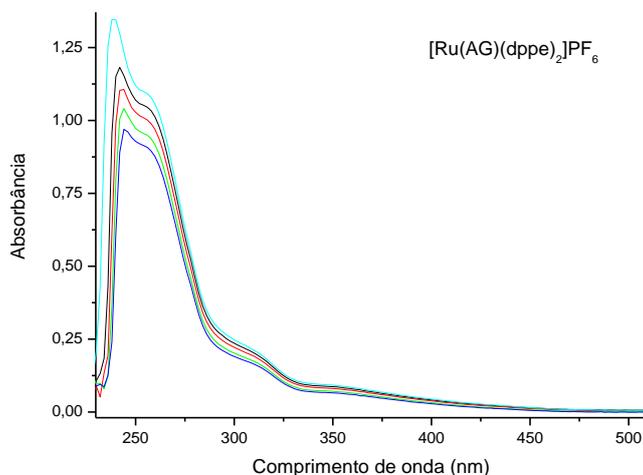


FIGURA 19: Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ em n-octanol.

Como pode ser observado na TABELA 8 todos os espectros eletrônicos dos complexos e as transições são muito semelhantes. As bandas observadas em torno de 256 -302 nm são referentes a transições intraligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ com contribuições dos ligantes (bipy, dppb, dppe, AG, AGM, ABz). As bandas em torno de 346 – 426 nm são atribuídas como transferência de carga metal-ligante (TCML) dos orbitais $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi_{(\text{bifosfina})}$ e $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow \pi^*_{(\text{ligantes bipyridínicos, AG, AGM, ABz})}$.

As bandas de maior energia em torno de 250 nm foram atribuídas como sendo bandas de absorção do solvente.

As bandas de transição *d-d* possuem baixos valores de coeficientes de extinção molar e são facilmente encobertas por outras bandas, por isso não foram detectadas nestes complexos.

TABELA 8: Dados dos espectros eletrônicos dos complexos; solvente n-octanol. λ /nm

Complexos	IL	TCML
	($\pi \rightarrow \pi^*$)	$d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow 3p\sigma^* d\pi_{\text{(bifosfina)}}$ $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow \pi^*_{\text{(ligantes/ bipy)}}$
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	302 (17523)	426 (3241)
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	302 (23895)	426 (4456)
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	302 (20661)	426 (3746)
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	260 (29498)	348 (2211)
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	256 (19585)	346 (1109)
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	260 (22259)	350 (2269)

(ϵ / mol⁻¹.cm⁻¹.L)

4.1.6 Ensaios de coeficiente de partição

A lipofilicidade ou coeficiente de partição (CP) é utilizado em estudos QSAR e no desenvolvimento racional de novas moléculas orgânicas como uma medida de hidrofobia molecular⁸⁰. Esta afeta a absorção de fármacos, sua biodisponibilidade, interações envolvidas na complexação hidrofóbica fármaco-receptor, metabolismo de moléculas e sua toxicidade. É um ensaio no qual se pode quantificar a migração entre uma fase orgânica e uma fase aquosa.

Log P é considerado um parâmetro informativo da tendência de um composto no organismo humano distribuir-se nas estruturas apolares como membranas celulares, ou em soluções aquosas como o plasma sanguíneo, linfa e fluidos intracelulares. Segundo os estudos com diversas substâncias, quanto menor for o valor de log P, mais hidrofóbico é o composto⁹¹. Se log P < 0 logo P < 1 assim o composto tem preferência em dissolver em solução aquosa, no entanto, se log P > 0 então P > 1, a afinidade do composto será maior pela fase

orgânica. Quanto maior o valor de log P mais hidrofóbico será o caráter do composto.

Nesse estudo, foi utilizado água e na fase orgânica o *n*-octanol, por ser o sistema que mais se assemelha com a membrana celular. A partir dos dados de Log P_{ow} na TABELA 9 observamos que os complexos [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF₆ apresenta um caráter hidrofílico, quando comparado com os outros compostos que apresentam um caráter hidrofóbico, ou seja, lipofílico.

TABELA 9: Dados de ϵ e Log P_{ow} dos complexos de Ru(II) com ligantes AG, ABz e AGM em *n*-octanol.

Complexos	ϵ	Log P_{ow}
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	17506 (300 nm)	-0,638 ± 0,031
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	23895 (302 nm)	0,324 ± 0,017
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	20696 (300 nm)	-0,656 ± 0,008
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	39498 (260 nm)	0,542 ± 0,024
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	38491 (256 nm)	0,277 ± 0,004
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	38835 (264 nm)	0,324 ± 0,017

4.1.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN ³¹P {¹H} do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] apresentam dois dupletos, mostrando a não equivalência dos dois átomos de fósforos da bifosfinas. Este complexo apresentam dois dupletos, em δ 42,2 ppm e δ 30,5 ppm ($J = 32,5$) que é condizente com um sistema AX, um clássico sistema de dois spins que é caracterizado pela diferença da frequência ressonante dos dois sinais serem muito maior que o acoplamento ($|v_1 - v_2| \gg ^2J$). Segundo trabalho de Santiago⁹² deslocamentos químicos em espectros de RMN {¹H}³¹P em torno de 40 ppm para átomos de fósforo *trans* a ligantes N-doadores e deslocamento em torno de 30 ppm para fósforo *trans* a átomos de cloro. Assim, podemos inferir que os átomos de fósforos *trans* ao nitrogênio é o de 42,2 ppm e fósforo *trans* a cloro o de 30,5 ppm (FIGURA 20).

Para o precursor *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] observa-se um conjunto de dois tripletos, δ 50,3 e δ 37,3 ppm, que é um padrão típico para bifosfinas *cis* posicionadas a dois ligantes iguais que completam a esfera de coordenação. Este tipo de sistema possui dois tipos de átomos de fósforo (P_A e P_B), cada um deles tendo dois vizinhos quimicamente equivalentes, mas magneticamente diferentes e, portanto, gerando tripletos (FIGURA 20).

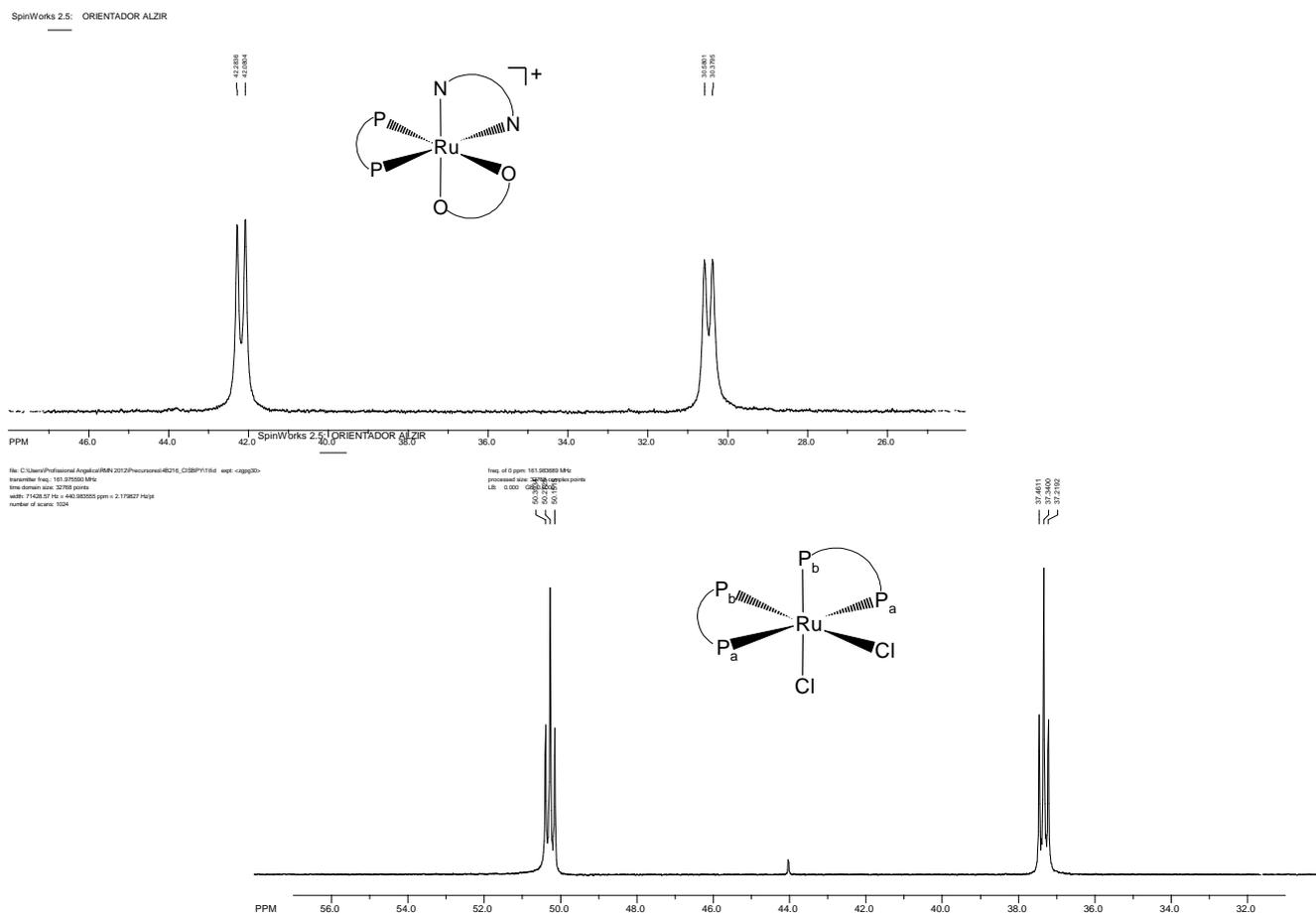


FIGURA 20: Espectros de RMN de ³¹P{¹H} dos complexos precursores *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] e *cis*-[RuCl₂(dppe)₂], em CH₂Cl₂.

Comparando os deslocamento dos sinais dos precursores *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (δ 42,2 (d) e δ 30,5 (d), ²J_{P-P} = 32,5 Hz) e *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] (δ 50,3 (t) e δ 37,3 (t), ³J_{P-P} = 19,6 Hz), com os complexos obtidos observa-se que com a coordenação do ligante ocorre uma aproximação e deslocamento de ambos os sinais para campo mais baixo (FIGURA 21 e 22). Indicando que os fósforos encontram-se menos protegidos, ou seja, os fósforos estão doando mais em σ do que recebendo em π .

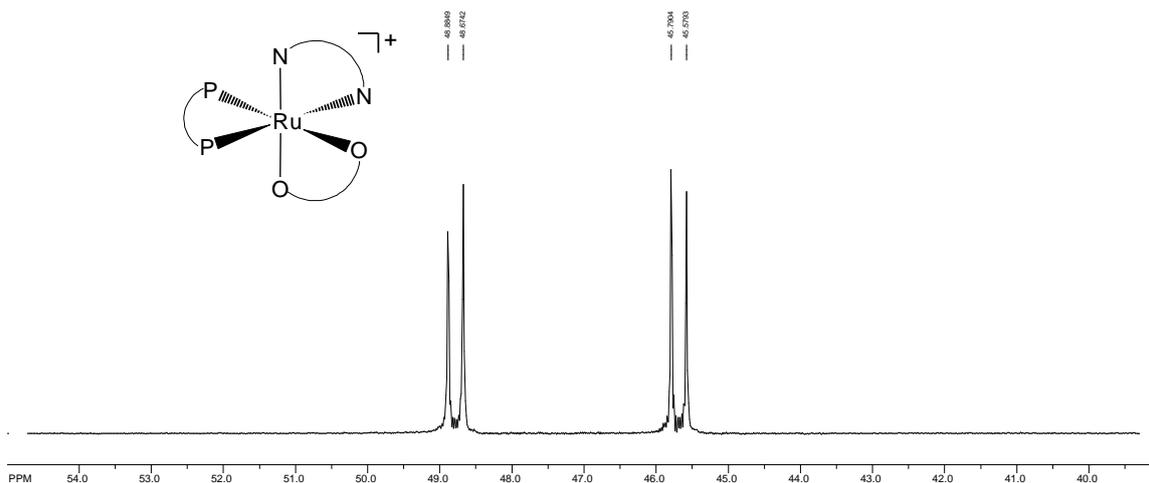


FIGURA 21: Espectro de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ do complexo $[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF_6$, em CH_2Cl_2 .

Os elevados valores de deslocamentos químicos para os complexos contendo a bifosfina dppe podem ser explicado pelo efeito conhecido como “ring contribution”⁹³. A formação de um anel de cinco membros entre P-Ru-P com a bifosfinas dppe, leva a um alto grau de desblindagem dos átomos de fósforo, consequentemente os deslocamentos químicos dos compostos são altos em relação às outras bifosfinas.

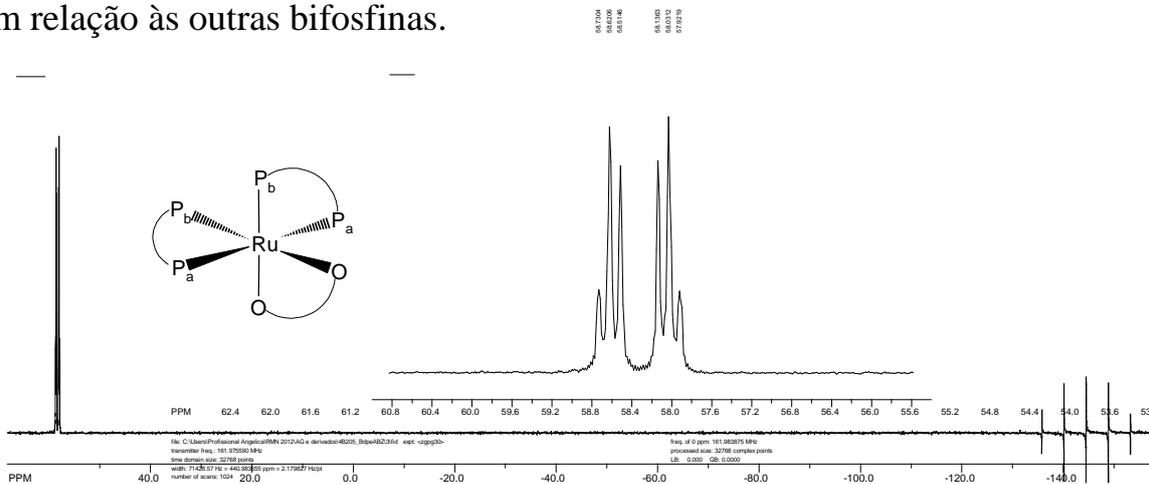


FIGURA 22: Espectro de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ do complexo $[Ru(ABz)(dppe)_2]PF_6$, em CH_2Cl_2 .

TABELA 10: Valores de deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento para os complexos de rutênio com AG, ABz e AGM (CH_2Cl_2).

	$\delta \text{ } ^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^2J_{P-P}$ (Hz)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	42,2 e 30,5	32,5
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,8 e 45,7	34,2
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,3 e 45,5	33,7
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	49,5 e 45,5	33,5
	$\delta \text{ } ^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^3J_{P-P}$ (Hz)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppe) ₂]	50,3 e 37,3	19,6
[Ru(ABz)(dppe) ₂]]PF ₆	58,6 e 58,1	17,8
[Ru(AG)(dppe) ₂]]PF ₆	59,9 e 58,4	16,9
[Ru(AGM)(dppe) ₂]]PF ₆	59,5 e 59,1	16,2

4.1.8 Difração de raios X

Comparando os dados cristalográficos do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] com os do complexo [Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF₆, pode-se observar modificações interessantes nos comprimentos das ligações.

O precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (FIGURA 23) apresenta uma estrutura octaédrica distorcida, onde se tem um átomo de fósforo da bifosfina dppb (1,4-bis(difenilfosfino)butano) *trans* a um átomo de nitrogênio da bipyridina (bipy). O outro átomo de fósforo da dppb está *trans* a um cloro. O composto de partida, *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)], apresenta dois átomos de cloro na esfera de coordenação do centro metálico, potencialmente possíveis de substituição por diversos ligantes e entre eles ligantes carboxilatos.

Observa-se na TABELA 11 que a distância de ligação Ru-Cl *trans* ao átomo de fósforo da dppb é mais longa do que para a ligação Ru-Cl *trans* ao átomo de N da bipyridina, indicando que o cloro que está *trans* ao fósforo tem uma ligação mais fraca e saída mais rápida a devido ao efeito *labilizador* do P.

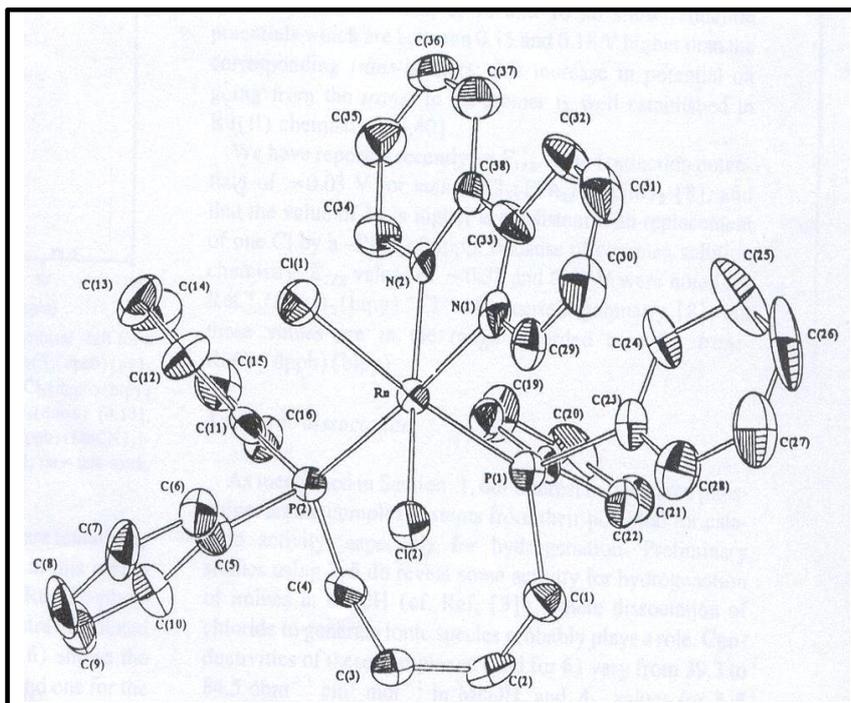


FIGURA 23: Estrutura cristalográfica do complexo *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)]⁷⁴.

Os cristais dos complexos [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF₆ (FIGURA 24) foram obtidos por meio da difusão lenta, no qual os complexos foram solubilizados em CH₂Cl₂ e éter etílico como solvente exterior. Com os dados cristalográficos pode-se comparar as distâncias de ligações destes compostos com o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)]. Nota-se que as distâncias Ru-Cl₁ *trans* P₁ (2,484) e Ru-Cl₁ *trans* N₂ (2,428) com a substituição dos cloretos pelo íon carboxilato bidentado ocorre uma diminuição no comprimento da ligação tanto do Ru-O₂ *trans* P₁ assim como Ru-O₁ *trans* N₁. Esta diminuição nos comprimentos de ligação indicam o efeito menos doador do ligante.

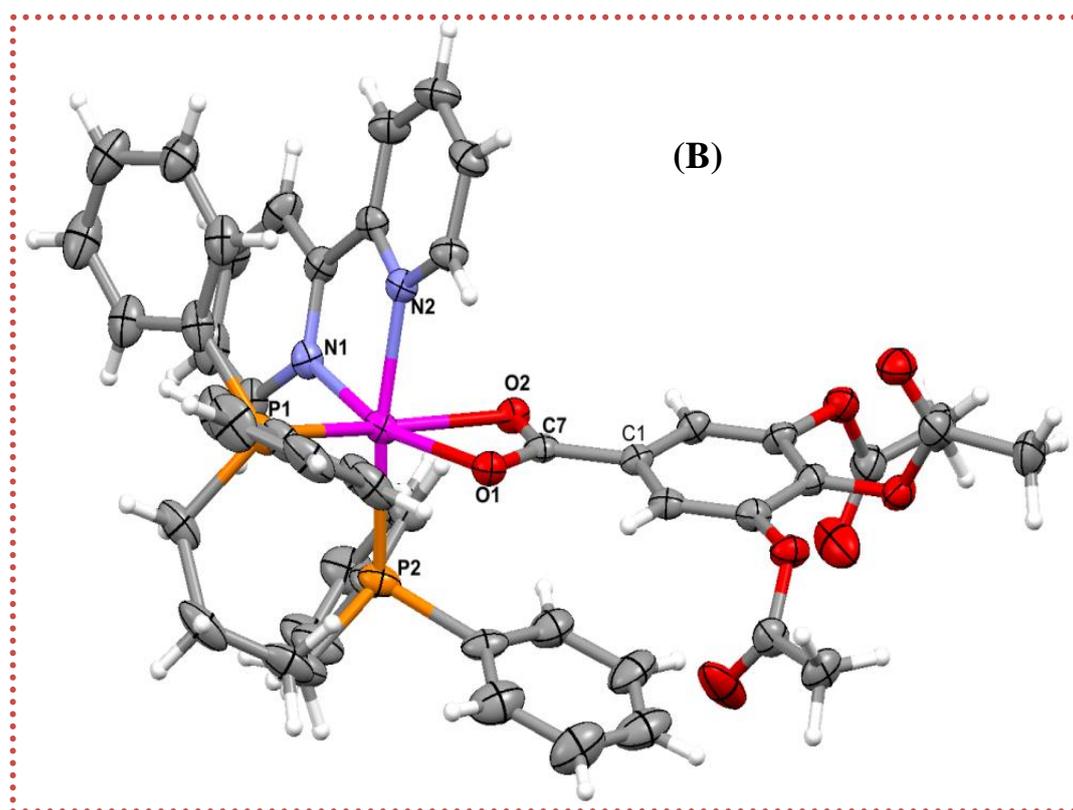
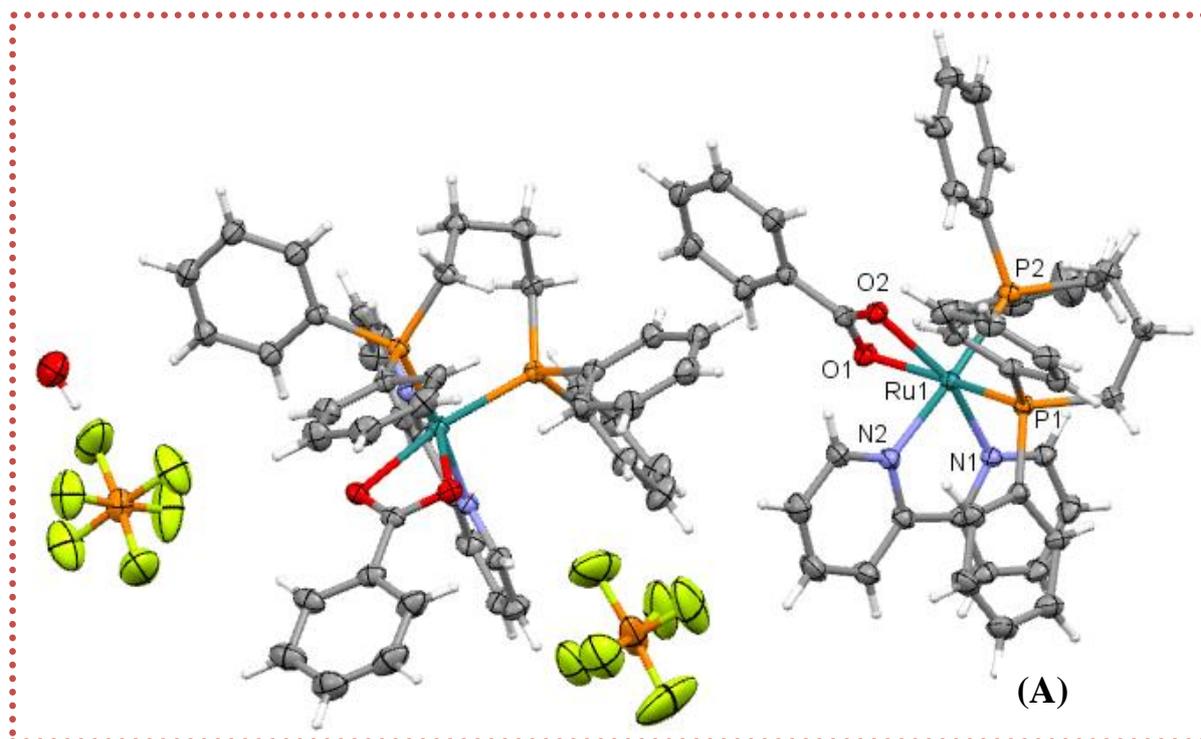


FIGURA 24: Estrutura cristalográfica dos complexos (A) $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e (B) $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

Ambos os complexos apresentam uma estrutura octaédrica distorcida com grupo espacial $P2_1/a$ e os dados de refinamento encontram-se no apêndice.

TABELA 11: Principais distâncias de ligação [Å] para o complexo [Ru(L)(dppb)(bipy)]PF₆ e para o complexo precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)].

	[Ru(L)(dppb)(bipy)]PF₆		<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	
	ABz	AGM		
Ru-O(1) <i>trans</i> N(1)	2,169	2,151	Ru-Cl ₂ <i>trans</i> N ₂	2,428
Ru-O(2) <i>trans</i> P(1)	2,204	2,202	Ru-Cl ₁ <i>trans</i> P ₁	2,484
Ru-N(1)	2,094	2,056	Ru-N ₂ <i>trans</i> Cl ₂	2,097
Ru-N(2) <i>trans</i> P(2)	2,057	2,077	Ru-N ₁ <i>trans</i> P ₂	2,088
Ru-P(1)	2,356	2,277	Ru-P ₁ <i>trans</i> Cl ₁	2,279
Ru-P(2) <i>trans</i> N(2)	2,303	2,337	Ru-P ₂ <i>trans</i> N ₁	2,331
C(7)-O(1) <i>trans</i> N(1)	1,282	1,262		
C(7)-O(2) <i>trans</i> P(1)	1,266	1,277		

Para os complexos [Ru(ABz)(dppe)₂]PF₆ e [Ru(AGM)(dppe)₂]PF₆, observa-se que as distâncias de ligação de Ru-O(1) *trans* P(1) e Ru-O(2) *trans* P(3), não apresentam diferenças no comprimento de ligação para os diferentes ligantes, assim como não há diferença entre os valores do comprimento de ligação do grupo carboxilato coordenado ao metal (TABELA 12). Os comprimentos das ligações C(1)-O(1) *trans* P(1) e C(1)-O(2) *trans* P(3) não apresentam diferenças significativas para sugerir a ordem das ligações.

TABELA 12: Principais distâncias de ligação [Å] para o complexo [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆.

	[Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆	
	ABz	AGM
Ru-O(1) <i>trans</i> P(1)	2,189	2,187
Ru-O(2) <i>trans</i> P(3)	2,183	2,213
Ru-P(2)	2,373	2,372
Ru-P(1) <i>trans</i> O(1)	2,313	2,296
Ru-P(4)	2,372	2,394
Ru-P(3) <i>trans</i> O(2)	2,296	2,311
C(1)-O(1) <i>trans</i> P(1)	1,265	1,271
C(1)-O(2) <i>trans</i> P(3)	1,267	1,264

Ambos os complexos [Ru(ABz)(dppe)₂]PF₆ e [Ru(AGM)(dppe)₂]PF₆ apresentam uma estrutura octaédrica distorcida com

grupo espacial $C2/c$ e $P-1$, respectivamente. Os dados de refinamento encontram-se no apêndice.

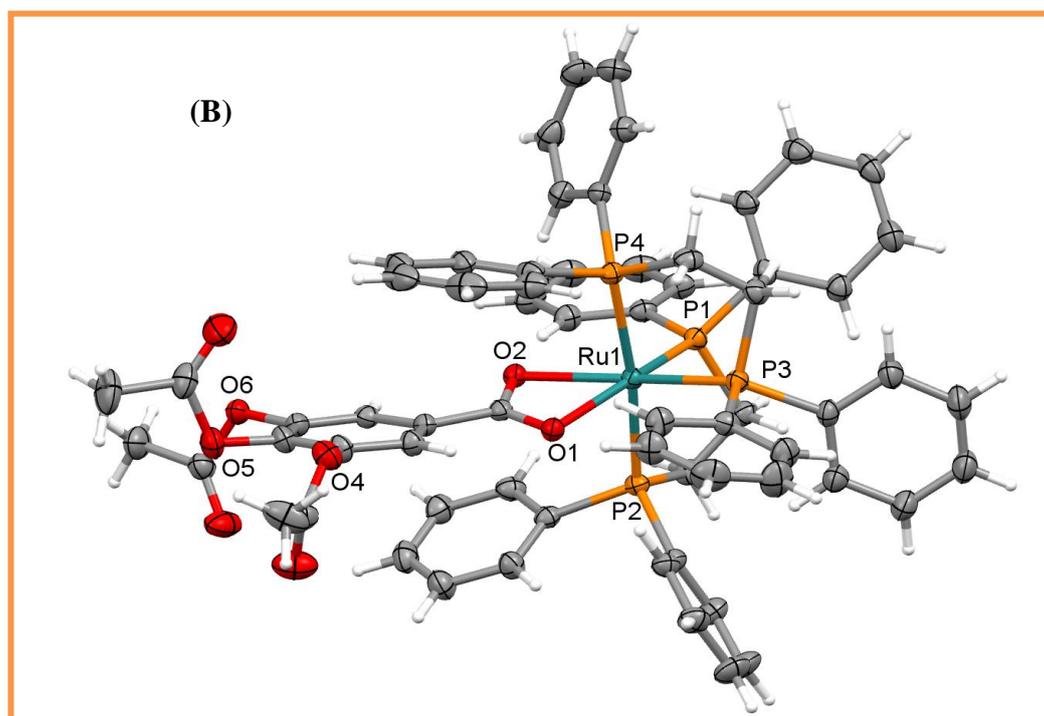
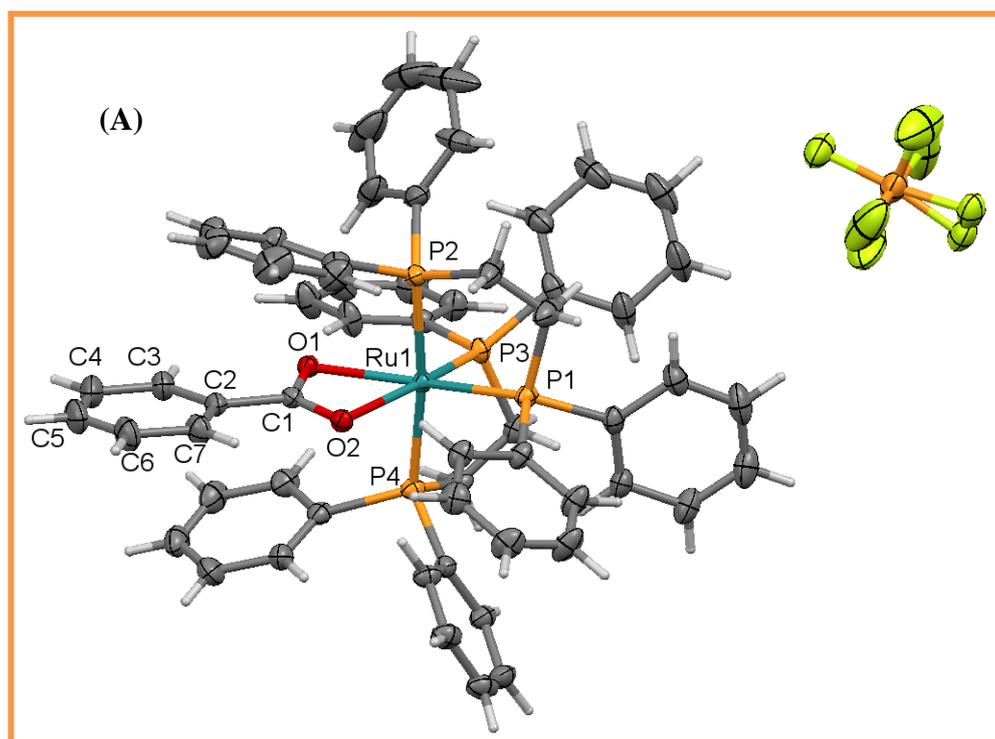


FIGURA 25: Estruturas cristalográficas dos complexos (A) [Ru(ABz)(dppe)₂]PF₆.e (B) [Ru(AGM)(dppe)₂]PF₆.

4.1.9 Estudo Eletroquímico

Com o estudo eletroquímico dos complexos pode-se avaliar o efeito do ligante sobre o metal. A substituição dos cloretos (ligante π e σ doador) por um ligante menos doador de elétrons como o íon carboxilato faz com que o metal apresente um maior potencial de oxidação, evidenciando a menor densidade eletrônica do metal. Os voltamogramas cíclicos dos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ apresentam um processo quase-reversível, cerca de 0,60 à 0,70 V mais alto que o seu precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ ($E_{1/2} = 0,69$ V). Nota-se também que modificações na estrutura do ligante confere ao íon carboxilato uma maior ou menor acidez. Utilizando como exemplo o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (FIGURA 26A), que possui como ligante o ácido gálico (AG), que é um ligante menos ácido que o ácido benzóico (ABz) e ácido gálico acetilado (AGM), apresenta um potencial do par redox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ cerca de 0,60 V menor (TABELA 13). Os voltamogramas dos complexos $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ encontram-se no apêndice.

Além disso, os complexos contendo o ligante ácido gálico, $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, apresentam em seus voltamogramas um processo irreversível, em torno de 1,05 V, ao qual se atribui ao ligante (FIGURA 26 B). Este processo refere-se à oxidação do(s) grupo fenol do anel do ligante AG, como pode ser observado nos voltamogramas cíclicos nas FIGURA 26 e 27.

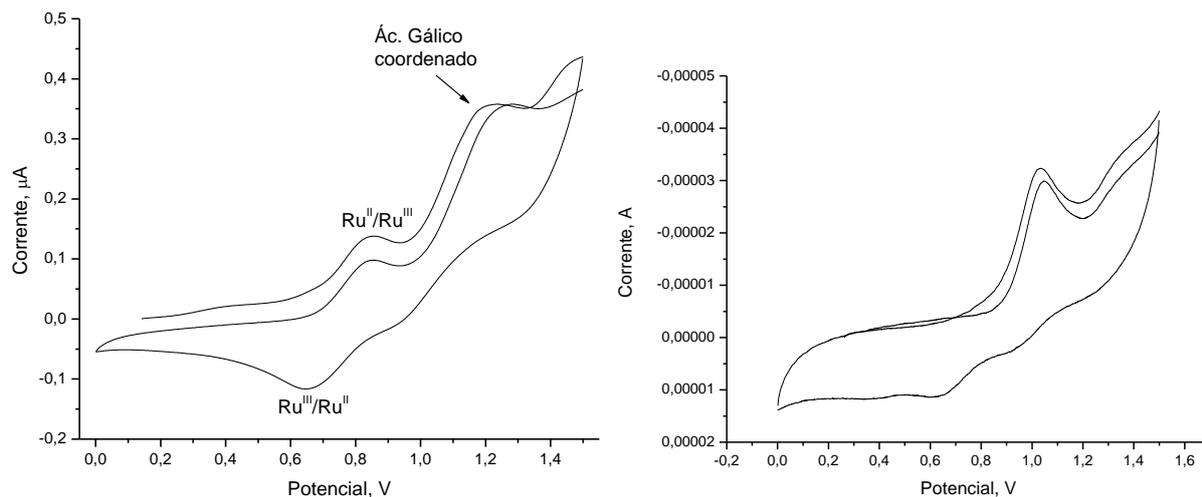


FIGURA 26: Voltamograma cíclico do complexo (A) $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$ do ligante (B) AG obtidos em CH_2Cl_2 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PTBA, 100 mV.s^{-1} , Ag/AgCl).

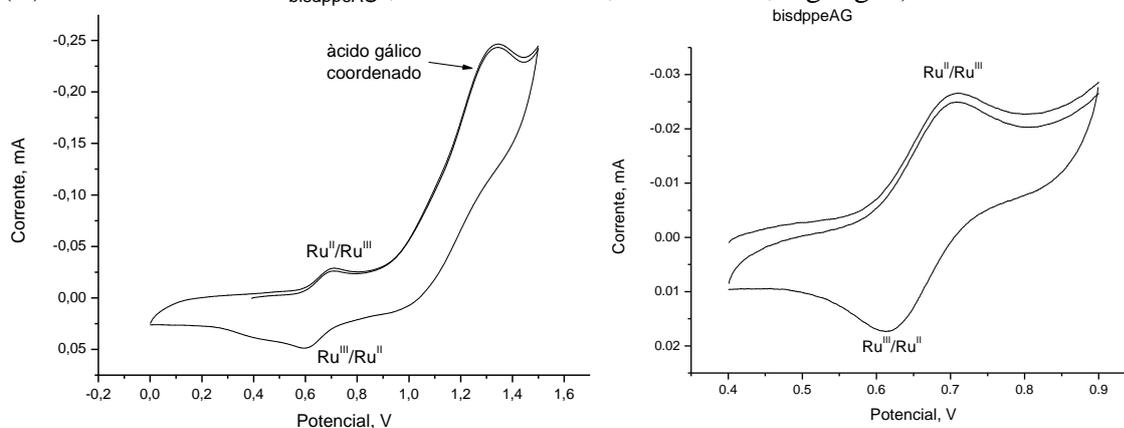


FIGURA 27: Voltamograma cíclico do complexo $[Ru(AG)(dppe)_2]PF_6$ obtido em CH_2Cl_2 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PTBA, 100 mV.s^{-1} , Ag/AgCl).

Segundo a literatura⁹⁴, a oxidação de fenóis e fenóis *p*-substituídos apresentam potenciais de oxidação irreversível em torno de 0,71 V com a formação de um radical fenoxil em solução tampão pH 7,0. Na presença de água este radical se transforma em uma *orto*-quinona e pode ser reduzido a *orto*-fenol e vice-versa. As duas ultimas reduções podem ocorrer na região em torno de 0,3 e 0,4V.

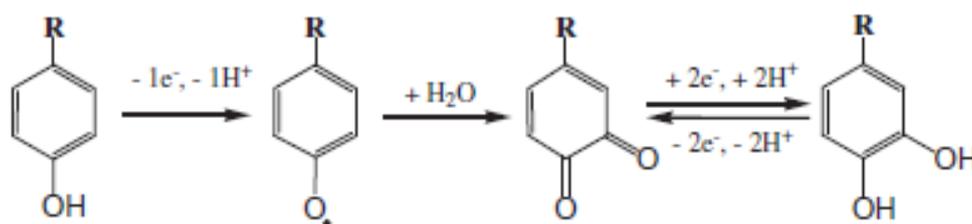


FIGURA 28: Mecanismo de oxidação de fenóis *p*- substituídos.

Para os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ também observa-se a variação do potencial em relação a acidez dos ligantes, mas menos pronunciado que para os complexos com o precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$.

Os valores de potencial dos complexos após a coordenação do ligante ocorrem em regiões mais altas em relação ao seu precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$ ($E_{1/2} = 0,88 \text{ V}$). Pode-se inferir que a presença de duas bifosfinas (fortes π receptores) e mais a presença do novo ligante que é menos doador que os ions cloretos na esfera de coordenação, aumenta a energia necessária para a oxidação do metal. Os espectros de voltametria cíclica e pulso diferencial do complexo $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ assim como do solvente CH_2Cl_2 (em pontilhado) encontram-se na FIGURA 29.



FIGURA 29: Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ obtidos em CH_2Cl_2 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

TABELA 13: Dados de voltametria cíclica (V) para os complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ onde O-O = AG, ABz e AGM.

Complexos	E_{p_a} (V)	E_{p_c} (V)	$E_{1/2}$ (V)	I_{pa}/I_{pc}
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	0,74	0,63	0,68	1,03
$[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,48	1,25	1,36	1,04
$[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	0,85	0,69	0,77	1,11
$[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,45	1,35	1,40	1,08
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$	0,94	0,81	0,87	-
$[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1,84	1,64	1,74	-
$[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1,64	1,55	1,59	-
$[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1,87	1,67	1,77	-

($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl)

4.1.10 Avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com ácido gálico e derivados

4.1.10.1 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

Os ensaios de atividade antioxidante destes compostos foram realizados, uma vez que o ácido gálico é um antioxidante natural e muito utilizado como padrão na determinação e avaliação de novos antioxidantes devido à presença de três grupos fenóis ligados ao anel.

O ensaio da avaliação da atividade sequestrante de radicais livres pelo DPPH é um método muito utilizado. O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre, estável, que na presença de um elétron ou radical de hidrogênio acessível tornar-se uma molécula diamagnética estável. Na forma de radical, o DPPH possui uma coloração purpura e absorção característica em 517 nm, a qual desaparece após a transferência de elétrons do composto antioxidante para o radical livre, o DPPH• ficando com uma coloração amarela (FIGURA 30).

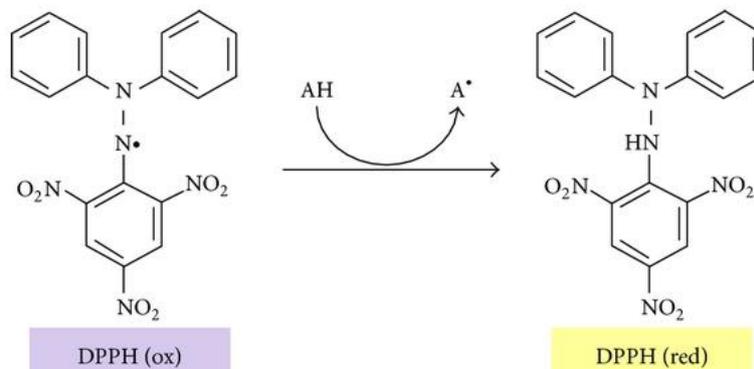


FIGURA 30: Esquema representativo do teste de sequestro de radicais livres DPPH.

O decaimento da absorbância das amostras (A_a) com relação ao decaimento da absorbância do controle (A_c) resulta na atividade antioxidante (% AA), e na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL) como descrita nas Equações 4.1 a seguir:

$$\boxed{\%AA = 100 \times \frac{A_a}{A_c}} \quad \boxed{\%SRL = 100 \times \frac{A_c - A_a}{A_c}} \quad (4.1)$$

Onde:

- %AA = % atividade antioxidante
- % SRL = porcentagem de sequestro de radicais livres
- A_a = Absorbância da amostra
- A_c = Absorbância do controle.

Como era esperado, somente os complexos contendo o ácido gálico coordenado apresentou atividade antioxidante, assim como o ácido gálico livre. A FIGURA 31 apresenta os valores de IC_{50} por tempo, que representa a concentração do composto utilizado para eliminar 50% dos radicais livres. Os valores mostram que a redução do radical DPPH diminui com o tempo em ambos os casos, quando o ligante está livre, e complexado. No entanto, quando se compara o consumo do DPPH por tempo, observa-se que a concentração de DPPH é menor quando o ácido gálico está livre do que quando ele está coordenado. Ou seja, o ácido gálico livre continua sendo melhor antioxidante do que quando está coordenado. Este comportamento pode estar correlacionado com uma maior estabilização eletrônica do anel do ligante com a coordenação.

Observa-se que os prótons dos grupos fenol ficam menos disponíveis, fato este que pode ser comparado com os valores de potencial eletroquímico. Observa-se que após a coordenação aumenta a estabilidade do metal do complexo assim como o ligante. O ácido gálico livre apresenta um potencial de oxidação de 1,05 V, e coordenado este valor fica próximo de 1,2 V (TABELA 14), inferindo que o compartilhamento da densidade eletrônica do metal-ligante estabiliza os grupos fenóis do anel diminuindo a disponibilidade dos íons H^+ em solução.

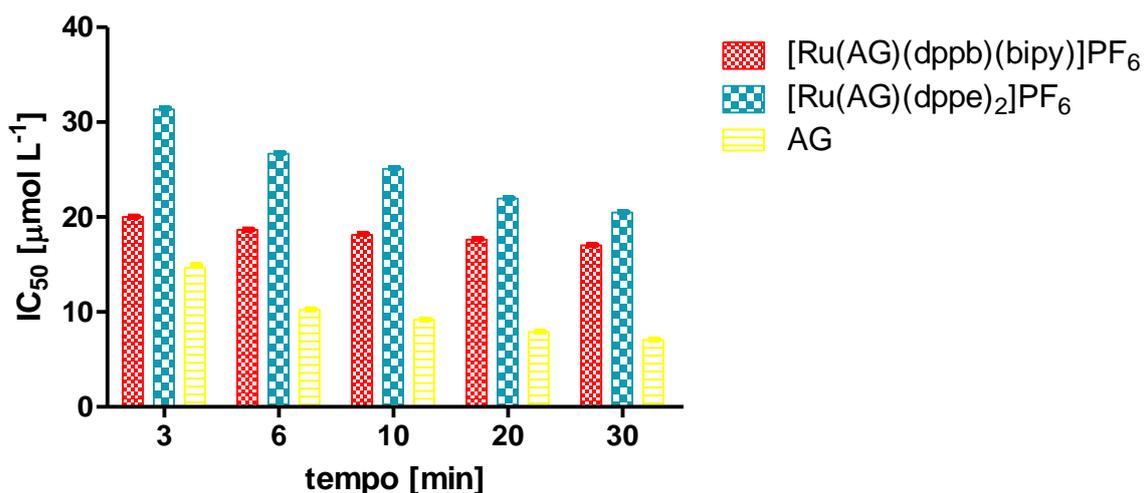


FIGURA 31: Gráfico de barras de IC₅₀ para o ácido gálico e seus respectivos complexos por tempo.

TABELA 14: Teste de IC₅₀ para atividade sequestradora de radicais livres

Tempo (minutos)	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)		
	AG	[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆
3	14,65 ± 0,06	20,03 ± 0,03	31,36 ± 0,10
6	10,24 ± 0,12	18,65 ± 0,04	26,70 ± 0,06
10	9,19 ± 0,27	18,14 ± 0,04	25,09 ± 0,08
20	7,89 ± 0,09	17,63 ± 0,04	21,94 ± 0,04
30	7,06 ± 0,05	17,00 ± 0,04	20,47 ± 0,04

Quando avaliamos a porcentagem de consumo do radical DPPH por concentração após 30 minutos de incubação observamos que o ácido gálico e o complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ apresentam um consumo total das espécies ($\approx 100\%$) na concentração de 200 μmol L⁻¹, enquanto que para o complexo [Ru(AG)(dppe)₂]PF₆ na mesma concentração somente 70% (TABELA 15). Com o decréscimo da concentração observa-se que o consumo do radical livre do DPPH é mais eficiente pelo ligante AG do que para o complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ com o tempo, correspondendo com o comportamento observado no IC₅₀.

TABELA 15: % de inibição de radicais livres DPPH (%S.R.L.) do ligante AG e os complexos após 30 minutos de reação.

[] $\mu\text{mol L}^{-1}$	%S.R.L		
	AG	[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆
200	100,1 ± 0,1	99,0 ± 1,1	70,0 ± 1,0
100	99,9 ± 0,4	109,1 ± 0,5	87,9 ± 0,4
50	98,7 ± 0,5	105,7 ± 0,9	91,9 ± 0,9
25	94,2 ± 0,7	78,6 ± 3,2	67,3 ± 3,1
12,5	78,5 ± 1,6	42,6 ± 1,6	33,6 ± 1,5
6,25	54,0 ± 0,7	24,4 ± 0,6	17,5 ± 0,5
3,125	32,6 ± 0,9	14,6 ± 1,0	8,2 ± 1,0
1,5625	21,5 ± 1,0	16,8 ± 0,8	14,2 ± 4,8

Apesar dos complexos [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(AG)(dppe)₂]PF₆ não apresentarem uma atividade de captação de radicais tão eficiente quanto o AG livre, deve-se considerar que estes apresentam uma atividade significativa (FIGURA 32). Além disso deve-se avaliar a molécula como um todo e avaliar os novos benefícios que a coordenação do ligante com o metal pode trazer ao novo complexo. Precisa-se levar em consideração se a diferença de solubilidade, tamanho, carga etc, entre o ligante livre e ele complexado pode contribuir para um efeito sinérgico positivo. Assim, outros ensaios como viabilidade celular e interação com BSA foram realizados para avaliar o potencial destes complexos como potenciais metalofármacos.

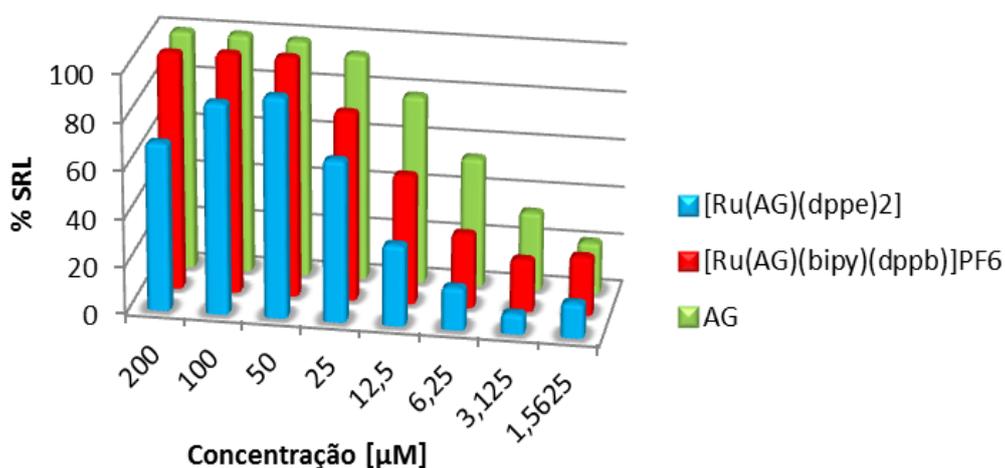


FIGURA 32: Gráfico de barras de %S.R.L. do ligante AG e os complexos Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(AG)(dppe)₂]PF₆ após 30 minutos de reação.

4.1.10.2 Estudos de Interação com Albumina Bovina

A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais estudada em sistemas biomiméticos devido à sua homologia estrutural com a albumina do sérica humana (HSA) apresentando uma identidade de 76% ⁹⁵.

A BSA apresenta dois resíduos de triptofano (Trp-Trp-134 e 212), enquanto que a HSA somente um (Trp 214) (FIGURA 33). Estes resíduos de triptofano tornam a BSA altamente fluorescente em solução com um pico de emissão em 340 nm, quando excitadas a 280 nm ⁹⁵. O resíduo de triptofano Trp-134 está localizado em uma região hidrofílica, próximo à superfície da BSA, enquanto o Trp-212 na BSA e Trp-214 na HSA estão localizados em um ambiente hidrofóbico do subdomínio IIA, dentro da região proteica.

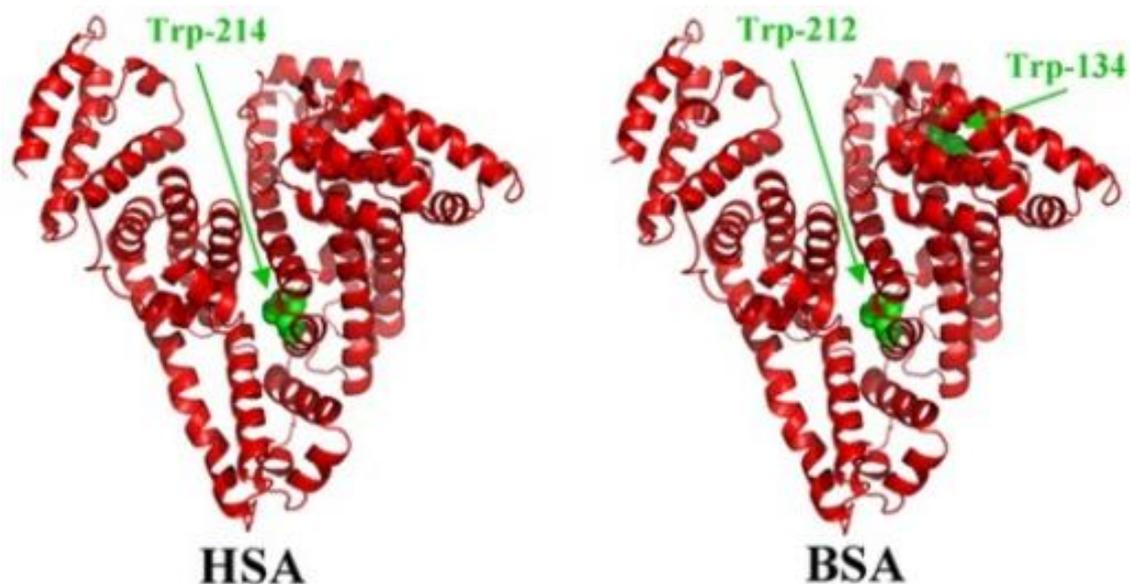


FIGURA 33: Estrutura em 3D da HSA e BSA com os resíduos de triptofanos em verde (doi:10.1371/journal.pone.0036723.g001).

Uma característica interessante da albumina é a sua capacidade de se ligar reversivelmente a uma grande variedade de moléculas. A albumina é a principal transportadora de ácidos graxos, que são insolúveis no plasma sanguíneo. Também atuam como sequestradores de radicais livres de oxigênio e inativam vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina. Além disso, a albumina participa da regulação da pressão colóide osmótica, do transporte de

uma variedade de ligantes endógenos e exógenos, como os fármacos (FIGURA 34), metabolitos, e é responsável pela manutenção do pH do sangue^{96, 97}. Os fármacos quando estão ligados a esta proteína pode conduzir à perda ou aumento das propriedades biológicas do fármaco original⁹⁸.

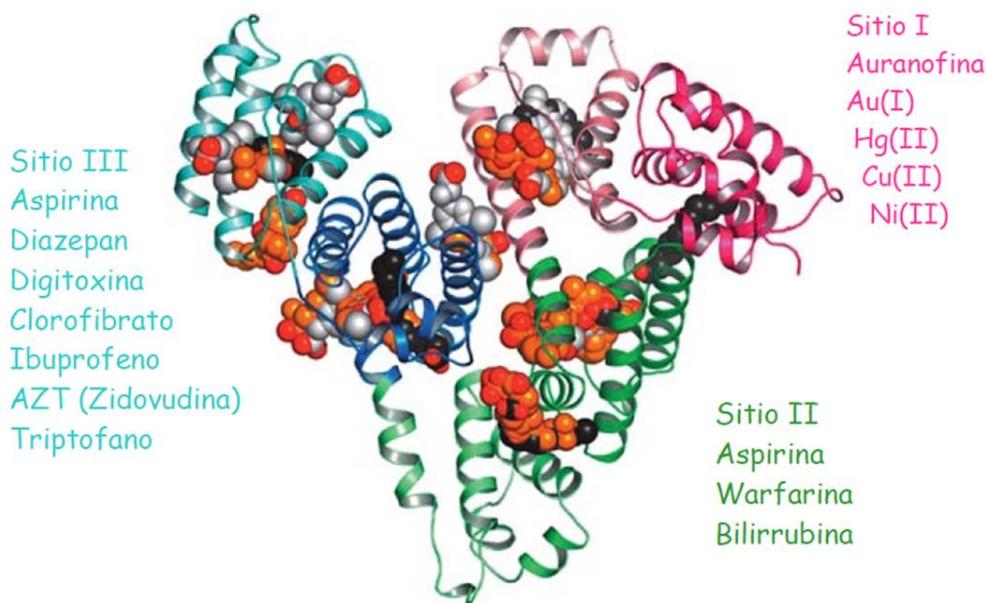


FIGURA 34: Representação da capacidade de ligação de diferentes moléculas a HSA (modificado de Curry, 2005)⁹⁹

As modificações no espectro de emissão da BSA é devido à alteração conformacional na subunidade da proteína, a ligação do substrato ou a sua desnaturação. A adição do complexo em solução de BSA resulta em uma diminuição na intensidade da fluorescência inicial da mesma, devido a possíveis alterações na estrutura secundária da proteína, indicando a ligação do composto à BSA¹⁰⁰.

A TABELA 16 resume os valores obtidos para a constante de interação de Stern-Volmer com BSA (K_{sv}) (Eq. 4.2) a partir do coeficiente angular, assim como as constantes de velocidade de supressão bimolecular (k_q), calculados considerando que o tempo de vida (τ_o) de um triptofano na albumina no estado excitado 10^{-8} s.

$$\frac{F_o}{F} = 1 + k_q \tau_o [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (4.2)$$

onde F_0 , F é a intensidade de fluorescência na ausência e presença de agente supressor, respectivamente, τ_0 é o tempo de vida no estado excitado do fluoróforo, $[Q]$ é a concentração do agente supressor, k_s constante de velocidade de supressão bimolecular e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer.

A supressão da fluorescência ocorre devido à vários processos que diminuem a intensidade de emissão em uma amostra. Essa supressão pode ser classificada como dinâmica ou estática. Uma supressão dinâmica resulta da colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado desativando-o logo após o contato com alguma molécula supressora. Nesse caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante um eventual choque com o supressor e as moléculas não são alteradas quimicamente durante o processo de supressão. A supressão estática, ocorre devido à formação de um aduto (complexo-BSA) em estado de menor energia entre o fluoróforo e o supressor.

Em geral, pode-se distinguir os supressores dinâmicos e estáticos pela dependência da temperatura e da viscosidade. Uma supressão dinâmica depende da difusão, assim altas temperaturas resultam em um coeficiente de difusão alto, e conseqüentemente as constantes de supressão também devem aumentar. Em contrapartida, na supressão estática um aumento na temperatura resulta em valores baixos das constantes de supressão. Dessa forma os espectros de fluorescência da BSA foram realizados em quatro temperaturas (22°, 27°, 32° e 37°C), numa faixa de 300 a 440 nm sobre uma excitação em 280 nm para determinar se o mecanismo de interação é estático ou dinâmico^{101, 102}.

Na FIGURA 35, encontra-se o espectro de fluorescência da BSA na presença do complexo $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$, onde é possível observar a diminuição na intensidade de fluorescência a partir das diferentes concentrações do complexo, indicando interação com a BSA.

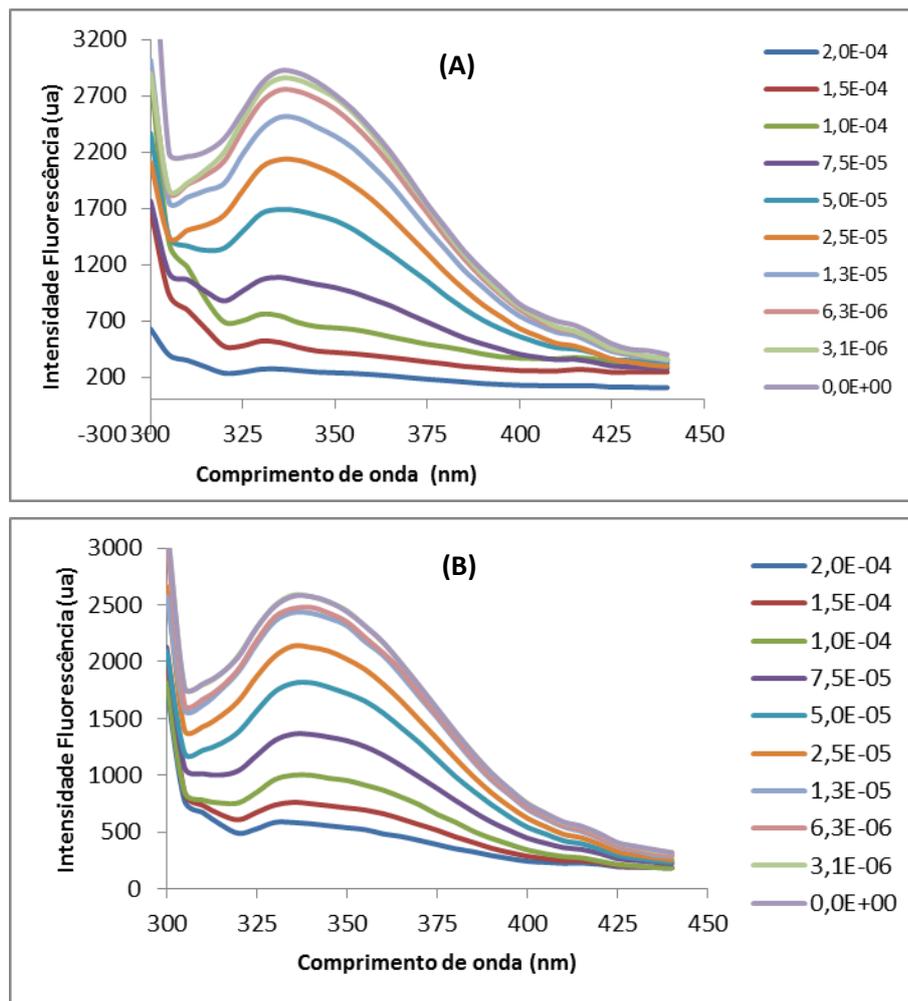


FIGURA 35: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações dos complexos (A) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e (B) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

De acordo com os valores obtidos para K_{sv} e k_{q} na TABELA 16, em geral observa-se uma diminuição das constantes com o aumento da temperatura, o que é observado em casos de mecanismo estático. Já os complexos $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ apresentam um aumento da constante (K_{sv}) com o aumento da temperatura sugerindo um mecanismo dinâmico. Quando analisamos os valores de k_{q} observamos que os valores obtidos são maiores do que o valor máximo possível para o mecanismo dinâmico ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), inferindo que a supressão da BSA não poderia ser puramente por uma colisão dinâmica, assim sugere-se que para estes dois compostos a supressão envolve os dois tipos de interação: dinâmico e estático.

A FIGURA 36 apresenta os gráficos, utilizando a equação de Stern-Volmer, que exibe a relação da supressão da BSA com os complexos $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, em diferentes temperaturas. Em ambos os complexos observam-se comportamentos lineares, no entanto para o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ observa-se que as inclinações não variam com a mudança das temperaturas, no entanto, para o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ a inclinação das retas diminui com o aumento da temperatura. O comportamento de ambos os compostos estão de acordo com os resultados da TABELA 16.

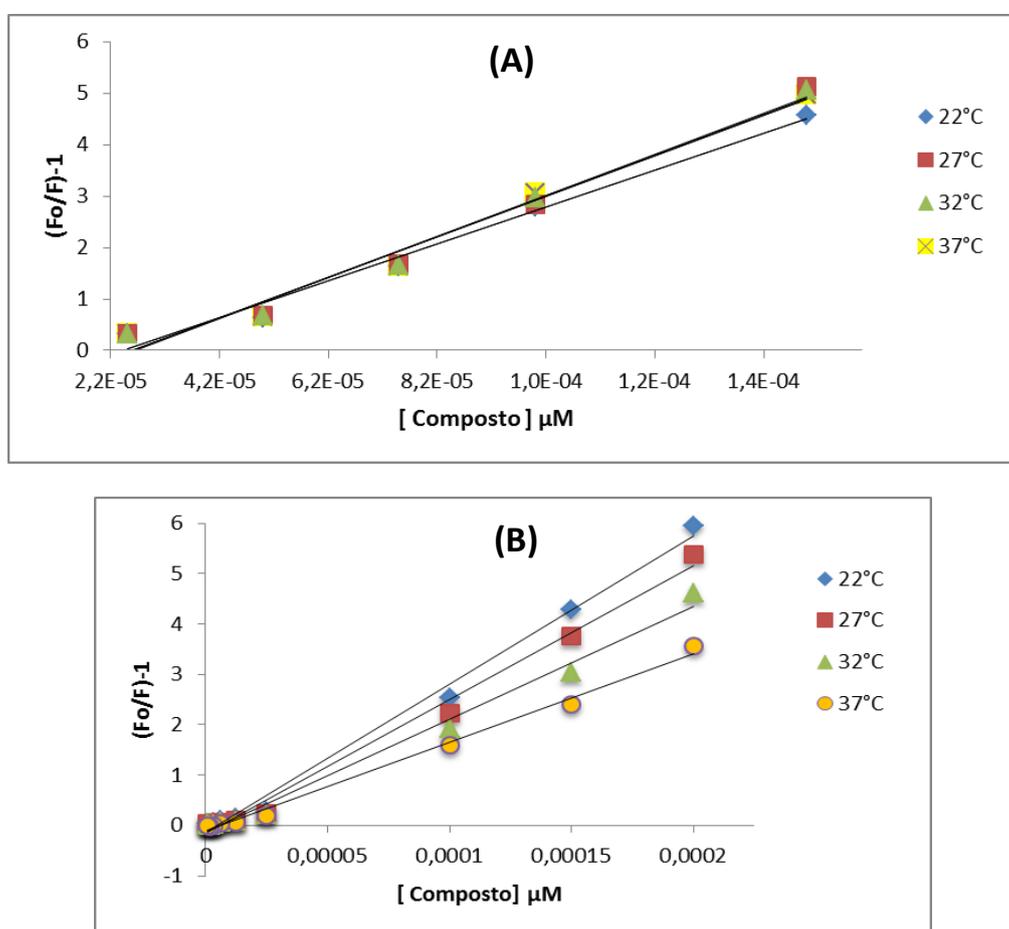


FIGURA 36: Gráficos de Stern-Volmer de $(F_0/F)-1$ vs $[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações (A) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e (B) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\}$.

TABELA 16: Constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante supressão bimolecular (k_q) dos ligantes e dos complexos com a BSA .

Compostos	T (K)	$K_{sv} \pm SD$ (10^4 L mol^{-1})	k_q ($10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	R^2
ABz			Não interage	
	295	(0,15 ± 0,01)	0,23	0,9971
	300	(0,16 ± 0,00)	0,23	0,9978
AG	305	(0,16 ± 0,01)	0,23	0,9912
	310	(0,17 ± 0,01)	0,24	0,9899
AGM			Não interage	
	295	(4,00 ± 0,06)	5,9	0,9975
	300	(4,07 ± 0,12)	5,9	0,9928
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	305	(4,07 ± 0,01)	5,9	0,9923
	310	(3,97 ± 0,51)	5,7	0,9919
	295	(2,43 ± 0,01)	3,5	0,9933
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	300	(2,64 ± 0,08)	3,8	0,9980
	305	(3,01 ± 0,18)	4,4	0,9996
	310	(3,10 ± 0,26)	4,5	0,9981
	295	(1,88 ± 0,05)	2,7	0,9964
	300	(2,27 ± 0,03)	3,3	0,9949
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	305	(2,76 ± 0,09)	4,0	0,9952
	310	(2,95 ± 0,05)	4,3	0,9973
	295	(1,39 ± 0,04)	2,0	0,9935
	300	(1,25 ± 0,06)	1,8	0,9972
[Ru(ABz)(dppe) ₂]]PF ₆	305	(1,09 ± 0,04)	1,6	0,9941
	310	(0,93 ± 0,00)	1,4	0,9976
	295	(2,94 ± 0,02)	4,3	0,9931
	300	(2,68 ± 0,05)	3,9	0,9919
[Ru(AG)(dppe) ₂]]PF ₆	305	(2,29 ± 0,04)	3,3	0,9901
	310	(1,76 ± 0,02)	2,6	0,9976
	295	(0,93 ± 0,01)	1,4	0,9968
	300	(0,89 ± 0,01)	1,3	0,9959
[Ru(AGM)(dppe) ₂]]PF ₆	305	(0,77 ± 0,01)	1,1	0,9958
	310	(0,66 ± 0,02)	0,95	0,9969

Considerando então que a supressão da fluorescência da BSA ocorre pelo modo estático, ou seja, pela formação de uma espécie intermediária, o equilíbrio entre os reagentes (BSA e complexo) e o produto (BSA:complexo) pode ser representado em função da intensidade da fluorescência e desta forma os parâmetros de ligação podem ser determinados pela equação 4.3:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (4.3)$$

onde K_b é a constante de ligação entre o complexo e a BSA, n é o número de sítios de ligação por molécula de BSA. A constante K_b é obtida a partir do coeficiente linear da reta obtida por meio do gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ versus $\log[Q]$. O número de sítios de ligação do complexo (n) também pode ser calculado a partir do coeficiente angular desta mesma equação da reta¹⁰³.

Os dados da K_b indicam uma interação, moderada a forte, dos complexos com a BSA, com o aumento da temperatura. Os complexos com o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] apresentaram maiores valores de constante de ligação quando comparado com os complexos, formados a partir do precursor *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] no qual contém duas bifosfinas, apresentando maior volume, evidenciando que o efeito estérico é um dos responsáveis pelo menor valor de K_b . Os ligantes ABz e AGM não apresenta nenhuma interação com a BSA, no entanto, o ligante ácido gálico AG apresenta uma interação muito fraca com a proteína, inferindo que provavelmente a interação BSA-complexo não ocorre somente pela região do ligante e sim outras partes do complexo podem estar interagindo. Além disso, deve-se levar em consideração o volume do complexo em relação ao seu ligante livre, sendo que o complexo com maior volume apresenta uma maior modificação estrutural da proteína, quando comparado ao ligante livre.

A FIGURA 37 apresenta os gráficos, da equação modificada de Stern-Volmer, da supressão da BSA com os complexos [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(AG)(dppe)₂]PF₆, em diferentes temperaturas.

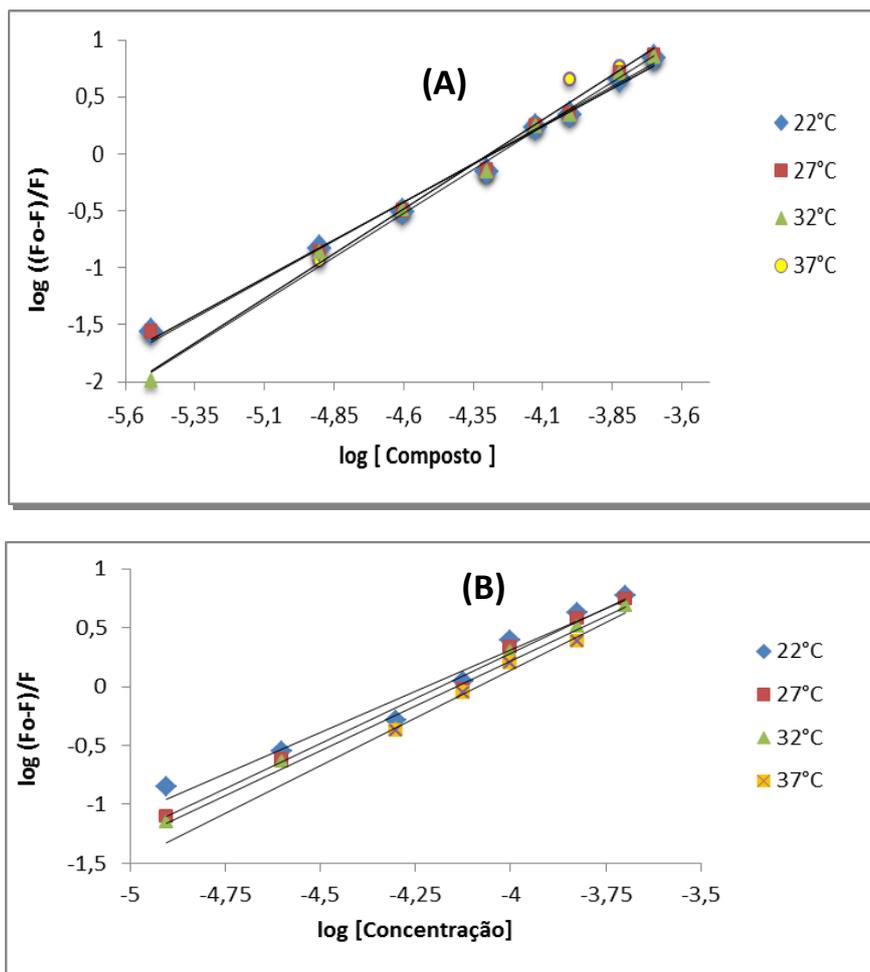


FIGURA 37: Gráficos da equação logarítmica de $\log(F_o-F)/F$ vs $\log[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações (A) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e (B) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. $\{[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\}$.

Na TABELA 17 estão apresentados os valores das constantes de ligação K_b e n em diferentes temperaturas para os complexos sintetizados e seus respectivos ligantes.

TABELA 17: Parâmetros de ligação para BSA com os complexo e os ligantes livres.

Compostos	T (K)	K_b (L mol ⁻¹)	n	R^2
ABz	Não interage			
AG	295	$(5,24 \pm 3,46) 10^3$	1,1	0,9513
	300	$(3,67 \pm 1,63) 10^3$	1,1	0,9973
	305	$(2,12 \pm 1,52) 10^3$	1,0	0,9981
	310	$(1,20 \pm 0,10) 10^3$	0,9	0,9988
AGM	Não interage			
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(1,91 \pm 0,08) 10^6$	1,47	0,9915
	300	$(3,18 \pm 0,22) 10^6$	1,51	0,9874
	305	$(8,32 \pm 0,95) 10^6$	1,62	0,9943
	310	$(1,16 \pm 0,12) 10^7$	1,62	0,9983
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(5,39 \pm 0,91) 10^5$	1,33	0,9991
	300	$(3,24 \pm 0,63) 10^6$	1,51	0,9834
	305	$(5,97 \pm 0,21) 10^6$	1,57	0,9862
	310	$(1,45 \pm 0,05) 10^7$	1,67	0,9829
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(3,91 \pm 0,69) 10^5$	1,35	0,9933
	300	$(5,77 \pm 0,23) 10^5$	1,35	0,9901
	305	$(1,04 \pm 0,20) 10^6$	1,40	0,9803
	310	$(1,65 \pm 0,30) 10^6$	1,44	0,9879
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	295	$(1,08 \pm 0,47) 10^4$	1,00	0,9817
	300	$(3,51 \pm 0,52) 10^4$	1,12	0,9946
	305	$(1,02 \pm 0,12) 10^5$	1,24	0,9968
	310	$(1,54 \pm 0,04) 10^5$	1,30	0,9895
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	295	$(9,20 \pm 0,42) 10^5$	1,40	0,9798
	300	$(1,35 \pm 0,06) 10^6$	1,48	0,9935
	305	$(2,32 \pm 0,01) 10^6$	1,52	0,9892
	310	$(4,41 \pm 0,03) 10^6$	1,62	0,9893
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	295	$(1,01 \pm 0,08) 10^4$	1,01	0,9921
	300	$(1,19 \pm 0,05) 10^4$	1,04	0,9998
	305	$(1,90 \pm 0,19) 10^4$	1,10	0,9949
	310	$(2,90 \pm 0,47) 10^4$	1,18	0,9821

Para avaliar o tipo de interação (interação hidrofóbica, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, entre outras) que atuam entre os complexos e a BSA, vários parâmetros termodinâmicos como energia livre de Gibbs (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°), e variações de entropia

(ΔS°) foram determinados. Estes parâmetros poderam ser determinados com base na equação 4.4.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4.4)$$

Onde R = constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e K é a constante de interação com a BSA (K_b).

Com base na equação de van't Hoff (Eq. 4.5) foi possível obter os valores de ΔH° e ΔS° a partir de um gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$:

$$\ln K_b = \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (4.5)$$

Os parâmetros termodinâmicos para os complexo-BSA foram determinados a partir da equação de van't Hoff utilizando as constantes de ligação K_b . A FIGURA 38 mostra os gráficos de van't Hoff para a interação da BSA com os complexos $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, nas temperaturas 295, 300, 305 e 310 K.

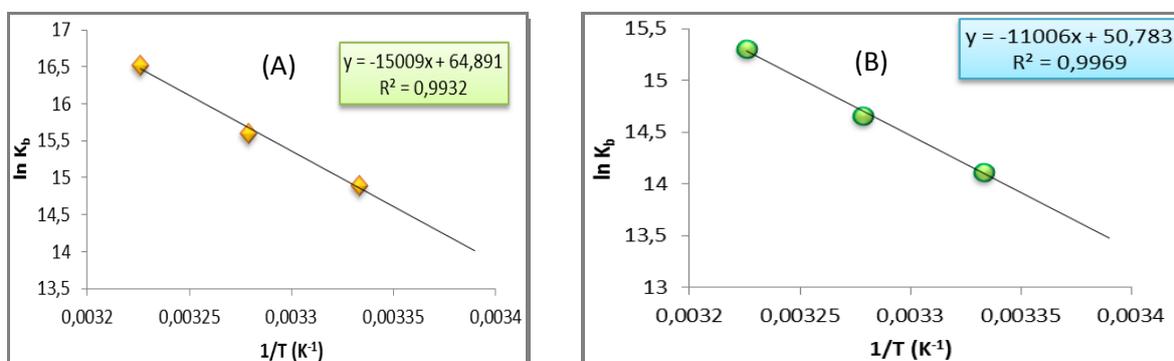


FIGURA 38: Gráficos de van't Hoff para os complexos A) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e B) $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.

Os tipos de interação que atuam entre os complexos e a BSA podem ser indicados a partir do sinal e da magnitude dos parâmetros termodinâmicos¹⁰¹.

- Valores positivos para ΔH° e ΔS° - indicam o envolvimento de forças hidrofóbicas entre o complexo e a BSA;

- Valores negativos para ΔH° e ΔS° - indicam forças de van der Waals e interações por ligações de hidrogênio;

- Valor negativo de ΔH° e positivo para ΔS° - indica interação eletrostática.

De acordo com os dados da TABELA 18 é evidente que a interação dos complexos com a BSA é espontânea, uma vez que os valores de ΔG° são negativos, tanto para o ligante quanto para os complexos. A partir dos valores de ΔG negativos é possível observar que também há uma tendência onde os complexos formados a partir do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] têm sua formação mais favorecida do que os complexo formados com o precursor *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] para cada temperatura. Além disso, nota-se que os valores ΔH° de formação e entropia ΔS seguem uma relação com o volume do complexo, tanto para os compostos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ ou [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆, onde O-O = ABz, AG e AGM. Os complexos contendo o ligante ABz possui o maior valor de ΔH° e ΔS e estes valores decrescem com o tamanho da molécula do ligante coordenado ABz > AG > AGM.

Pode-se dizer ainda que as forças de interação dos complexos com a BSA são forças hidrofóbicas devido aos valores positivos de ΔH° e ΔS° . Segundo Ross e Subramanian¹⁰⁴ as variações de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) positivas ocorrem porque as moléculas de água que estão dispostas de forma ordenada em torno da proteína adquirem uma configuração mais aleatória, como resultado de interações hidrofóbicas com o complexo.

Para o ligante ácido gálico, os parâmetros termodinâmicos ΔH° e ΔS° indicam interações por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, sugerindo assim que o ponto de interação do complexo com AG na proteína BSA não se dá somente pelo ligante e sim com o complexo como todo.

TABELA 18: Parâmetros de formação e termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) para a interação dos complexos de Ru(II) e os ligantes (AG, AGM, ABz) com a albumina (BSA).

Compostos	ΔG° (kJ mol ⁻¹)				ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
	295 K	300 K	305 K	310 K		
AG	-20,99	-20,44	-19,38	-18,46	-71,98	-172,4
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	-34,36	-37,06	-39,76	-42,46	124,78	539,5
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	-35,35	-37,53	-39,70	-41,87	92,89	434,7
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	-31,58	-33,08	-35,15	-36,89	74,67	359,8
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	-22,78	-26,10	-29,26	-32,51	168,30	647,8
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	-33,04	-35,20	-37,17	-39,43	91,50	422,1
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	-21,89	-23,42	-24,96	-26,50	68,73	307,2

4.1.10.3 Ensaios de viabilidade celular dos ligantes e complexos de Ru (II) com ácido gálico e derivados

A citotoxicidade dos compostos de rutênio (II) e de seus ligantes podem ser comparadas por meio dos valores médios de IC_{50} , isto é, a concentração de composto que inibe o crescimento celular em 50% (densidade ótica após ensaio com MTT) de células tratadas em relação às células não tratadas (controles). Estes ensaios foram realizados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB231 (cânceres de mama), e na célula não tumoral de camundongo L929. Vale ressaltar que o sistema de crescimento celular do camundongo difere-se de um sistema humano, porém estes estudos são realizados para termos uma referência de como os nossos compostos poderiam atuar em células humanas.

As células foram expostas com os compostos em um tempo de incubação de 24 a 72 horas. Nos gráficos de viabilidade celular dos ligantes e dos complexos representa um limite de confiança de 95%, obtidos a partir de três experimentos independentes, feitos em triplicata. As concentrações foram 200 a 0,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e nas mesmas condições foram utilizados como referência os medicamentos, cisplatina e doxorrubicina.

Os dados da TABELA 19 mostram que os ligantes apresentaram altos valores de IC_{50} , sendo que em muitos casos estes valores são superiores a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a concentração máxima de composto utilizado nos experimentos).

Os complexos foram mais ativos em relação aos ligantes livres, mostrando que a complexação melhora a atividade biológica dos mesmos. O ácido gálico (AG) é um potente antioxidante natural, e este apresentou melhor resultado após a complexação. Comparando estes resultados de IC_{50} , com os dados de atividade antioxidante dos complexos com ácido gálico, observamos que a capacidade de sequestro de radicais livres do ligante, quando coordenado ao metal diminui, mas a atividade citotóxica do complexo contendo o ligante ácido gálico melhora com a complexação. Isto indica que a atividade citotóxica

destes complexos se dá não somente pela presença do ligante e sua capacidade antioxidante do mesmo, mas sim pela molécula como um todo, evidenciando que não há somente um possível mecanismo de ação atuando na atividade citotóxica destes compostos. Esta suposição converge com os dados obtidos para os compostos com ácido benzóico e ácido gálico acetilado, onde estes não possuem os grupos fenóis, que são os responsáveis pela eliminação dos radicais livres e apresentaram baixos valores de IC_{50} sugerindo assim, outro possível mecanismo de ação.

No geral, observamos que os valores de IC_{50} com incubação de 72 horas são menores que os de 24 horas, evidenciando que as maiorias dos compostos são dependentes do tempo. Esta afirmação não se aplica aos compostos contendo o ácido benzóico, onde sua atividade se dá nas primeiras 24 horas de incubação, como pode ser observado na FIGURA 39.

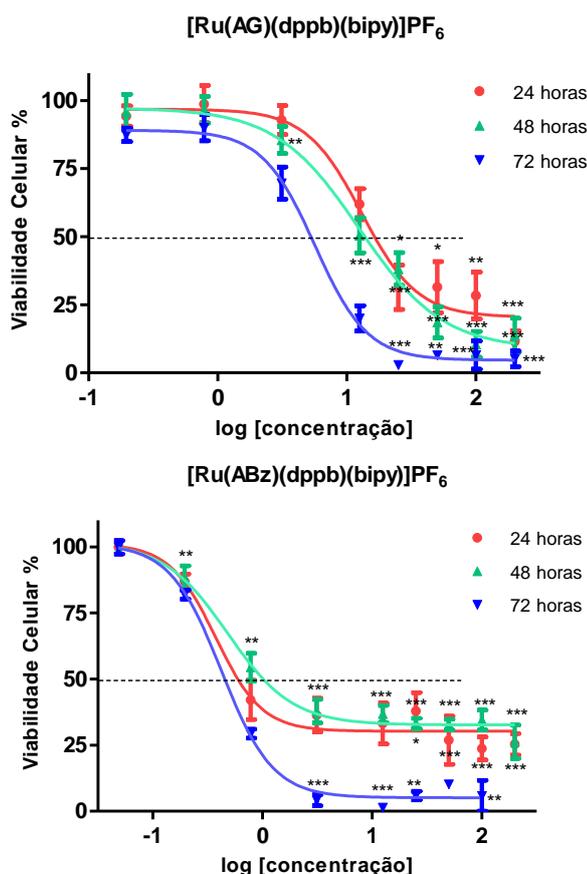


FIGURA 39: Gráfico de viabilidade celular dos complexos $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$ e $[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF_6$ por tempo na linhagem MDA-MB-231. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido pela análise post-hoc Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e $p < 0,001$

Pode-se verificar que pelos valores de IC_{50} os compostos são mais ativos contra o câncer de mama do tipo MDA-MB-231 do que MCF-7. Sabe-se que a linhagem MDA-MB-231 é triplo negativa (RE, RP e HER2) enquanto que a linhagem MCF-7 apresenta receptores de estrogênio, via ER presente no citoplasma celular. Este pode ser uma sugestão de estudo na elucidação do mecanismo de ação.

Comparando os dados de interação com a BSA e os valores de IC_{50} não conseguimos fazer uma correlação direta entre BSA e IC_{50} na série com o mesmo precursor, uma vez que os valores de K_{sv} e K_b dos complexos são próximos, não havendo uma diferença significativa. No entanto quando avaliamos a série dos diferentes precursores $[RuCl_2(dppb)(bipy)]$ com $[Ru(Cl_2)(dppe)_2]$, nota-se que os compostos do tipo $[Ru(O-O)(dppe)_2]PF_6$, que possuem valores de K_b menores que a série $[Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF_6$ possuem valores de IC_{50} mais baixos nas linhagens estudadas.

Os dados de lipofilicidade mostra que os complexos $[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF_6$ e $[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF_6$, são hidrofílicos em relação aos outros complexos da série $[Ru(O-O)(dppe)_2]PF_6$ e do complexo $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$, que são hidrofóbicos (lipofílicos). Comparando os valores de IC_{50} destes compostos observa-se que os complexos hidrofílicos são mais ativos, possuem valores de IC_{50} menores que o complexo lipofílico $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$, nas duas linhagens de câncer de mama estudada, MDA-MB-231 e MCF-7. Já os complexos da série $[Ru(O-O)(dppe)_2]PF_6$, que são lipofílicos, não apresentam o mesmo comportamento nas duas linhagens estudadas.

Os dados de IC_{50} na linhagem L929 (FIGURA 40) mostra que os complexos contendo o ácido gálico possuem os maiores valores de IC_{50} , ou seja, são menos citotóxicos na linhagem não tumoral de camundongo do que os outros complexos com ABz e AGM. Observa-se que os índices de seletividade

destes compostos na L929 em relação a linhagem MDA-MB-231, são melhores para os complexos com o ácido gálico.

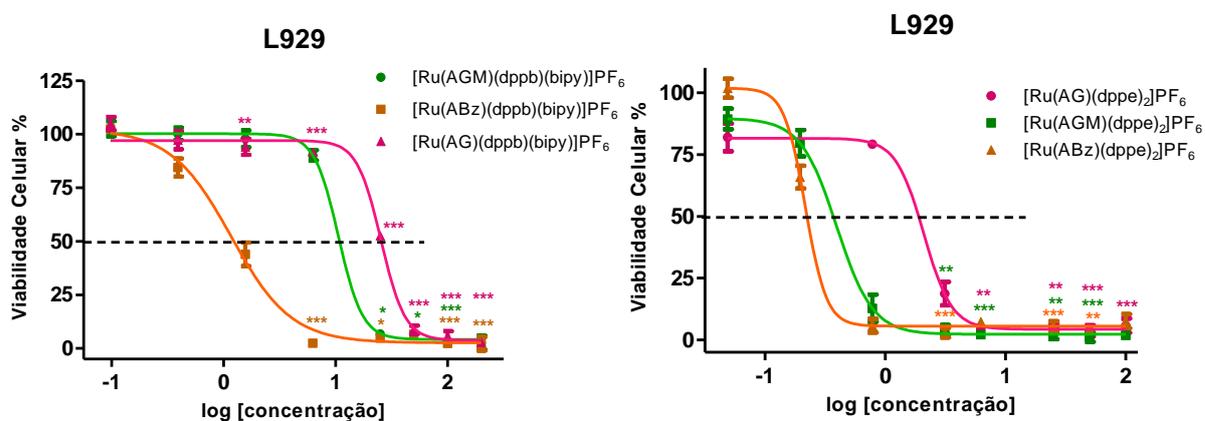


FIGURA 40: Gráfico de viabilidade celular dos complexos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ (O-O = AG, ABz e AGM) após 72 de incubação na linhagem L929. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido pela análise post-hoc Tukey. * p< 0,05, ** p<0,01 e p< 0,001

TABELA 19: Valores de IC₅₀ dos ligantes e complexos de Ru(II) nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e L929.

Compostos	IC₅₀($\mu\text{mol L}^{-1}$)									IS^a
	MDA-MB-231			MCF-7			L929			
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
AG	>200	>200	200-100	>200	>200	>200	>200	>200	>200	-
AGM	>200	>200	200-100	>200	>200	>200	>200	>200	116,52±0,65	-
ABz	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	-
[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF ₆	13,04 ± 1,33	7,31 ± 0,78	5,64 ± 0,68	58,76 ± 3,03	10,65 ± 0,76	9,45 ± 1,04	25,96 ± 0,87	18,22 ± 0,74	25,53 ± 1,01	4,5
[Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF ₆	6,71 ± 0,81	3,63 ± 0,66	3,22 ± 0,51	31,09 ± 2,01	26,64 ± 2,02	27,25 ± 1,89	9,78 ± 0,68	9,38 ± 0,50	10,62 ± 0,72	3,2
[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,37 ± 0,17	0,48 ± 0,23	0,42 ± 0,17	3,41 ± 0,51	6,95 ± 0,56	5,25 ± 1,31	0,92 ± 0,80	0,62 ± 0,55	1,06 ± 0,82	2,5
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	2,72 ± 1,21	0,73 ± 0,56	1,28 ± 0,73	na	0,24 ± 0,10	0,24 ± 0,12	5,53 ± 0,19	2,45 ± 0,39	2,82 ± 1,07	2,2
[Ru(AGM)(dppe) ₂]PF ₆	3,89 ± 0,49	0,96 ± 0,46	4,25 ± 0,76	na	0,09 ± 0,16	0,17 ± 0,11	0,73 ± 0,47	0,44 ± 0,21	0,39 ± 0,16	0,09
[Ru(ABz)(dppe) ₂]PF ₆	0,64 ± 1,47	0,56 ± 0,26	0,96 ± 0,69	na	0,16 ± 0,09	0,26 ± 0,12	0,64 ± 0,42	0,23 ± 0,10	0,21 ± 0,63	0,2
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	na	31,3	na	> 200	37,2 ± 2,48	42,8 ± 3,47	na	na	na	-
cisplatina	3,82 ± 0,25	2,43 ± 0,20	0,98 ± 0,08	4,06 ± 1,38	8,91 ± 2,59	18,58 ± 3,77	26,79 ± 0,27	20,14 ± 0,19	17,40 ± 0,16	17,7
doxorubicina	24,00 ± 1,92	3,67 ± 0,15	4,69 ± 0,19	3,96 ± 0,95	2,28 ± 0,01	2,49 ± 0,41	54,23 ± 0,64	13,40 ± 0,51	5,93 ± 0,31	1,26

na – não avaliado / ^a IS = IC₅₀^{L929} / IC₅₀^{MDA-MB-231}, em 72 horas

4.1.10.4 Estudos Morfológicos

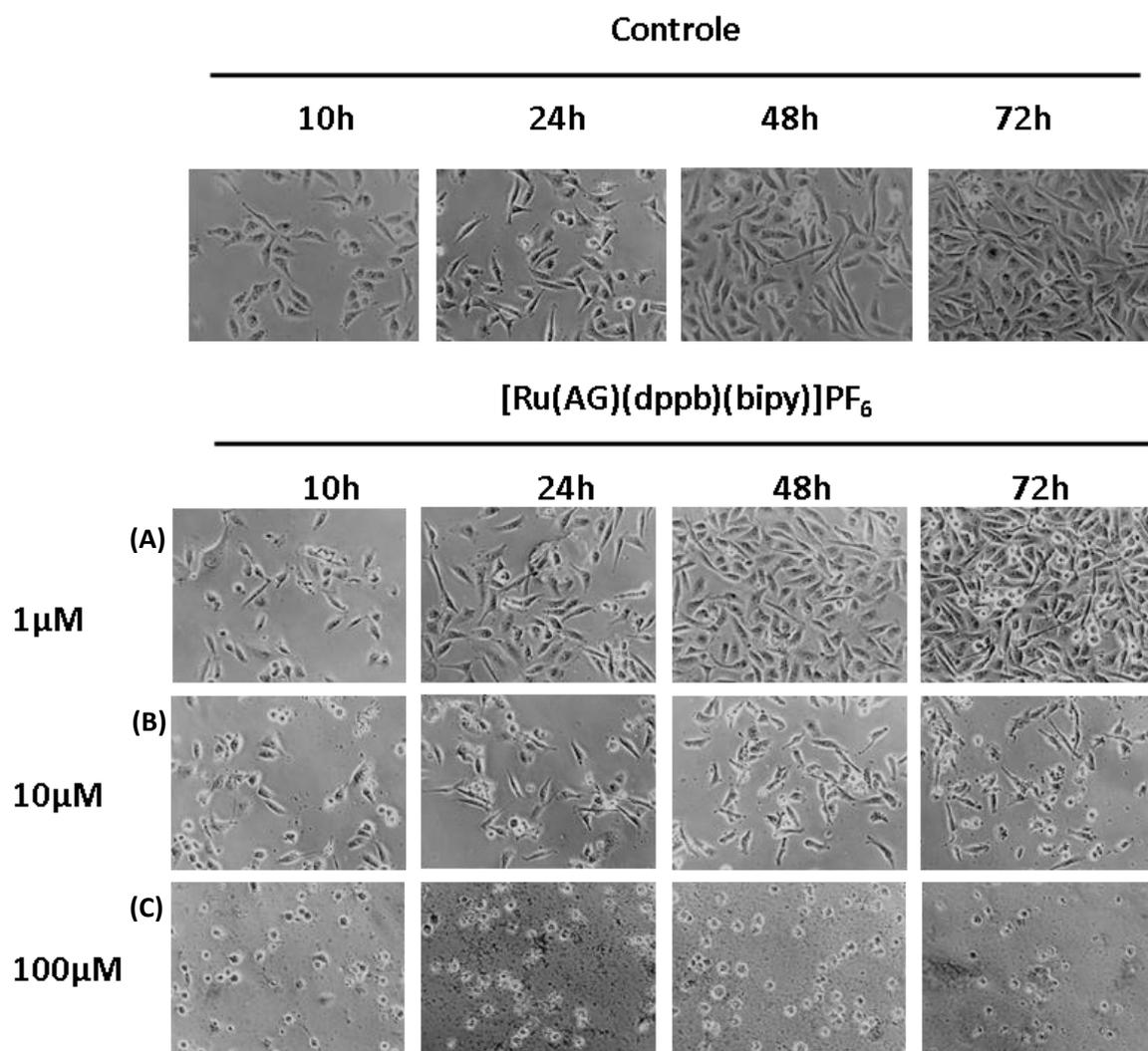
Os estudos morfológicos foram realizados com três complexos $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ na linhagem MDA-MB-231, no período de 72 horas. As alterações morfológicas provocadas pelos complexos estão apresentadas na FIGURA 41. Observa-se que com o aumento gradual da concentração e o tempo, verificou-se claramente o decréscimo do número de células aderidas e o aumento do número de células em suspensão. As células começaram a perder sua forma característica, ficando arredondadas, com tamanho mais reduzido, até se desprender da superfície de crescimento.

O complexo com ácido benzóico $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, apresentou o menor valor de IC_{50} nas primeiras 24 horas e no ensaio morfológico observa-se que o efeito de destacamento das células da superfície de crescimento ocorreu antes das 72 horas de incubação com o complexo, na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 41 D) e antes de 10 horas, na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 41 E). Na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, as células sofreram modificações e descolamento nas primeiras 10 horas de incubação (FIGURA 41 F).

O primeiro efeito de destacamento das células da superfície de crescimento do complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ pode ser observado nas primeiras 10 horas, com concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 41 B). Com o aumento do tempo de exposição ao complexo estes efeitos começaram a ser mais visíveis. Na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 horas de incubação (FIGURA 41 C) praticamente todas as células se apresentavam destacadas da superfície de crescimento.

Quando se compara o efeito dos dois complexos contendo o ligante ácido gálico, observa-se que o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ possui um efeito sobre as células mais rápido do que o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Observa-se que o primeiro sinal do destacamento celular da superfície de

crescimento do complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ ocorre nas primeiras 10 horas na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 41 H). Com o aumento do tempo de exposição dos complexos com as células os efeitos começaram a ser visíveis em concentrações abaixo de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, para as 48 - 72 horas (FIGURA 41 G), respectivamente. A morfologia das células do controle manteve-se inalterada, somente em proliferação durante as 72 horas de tratamento.



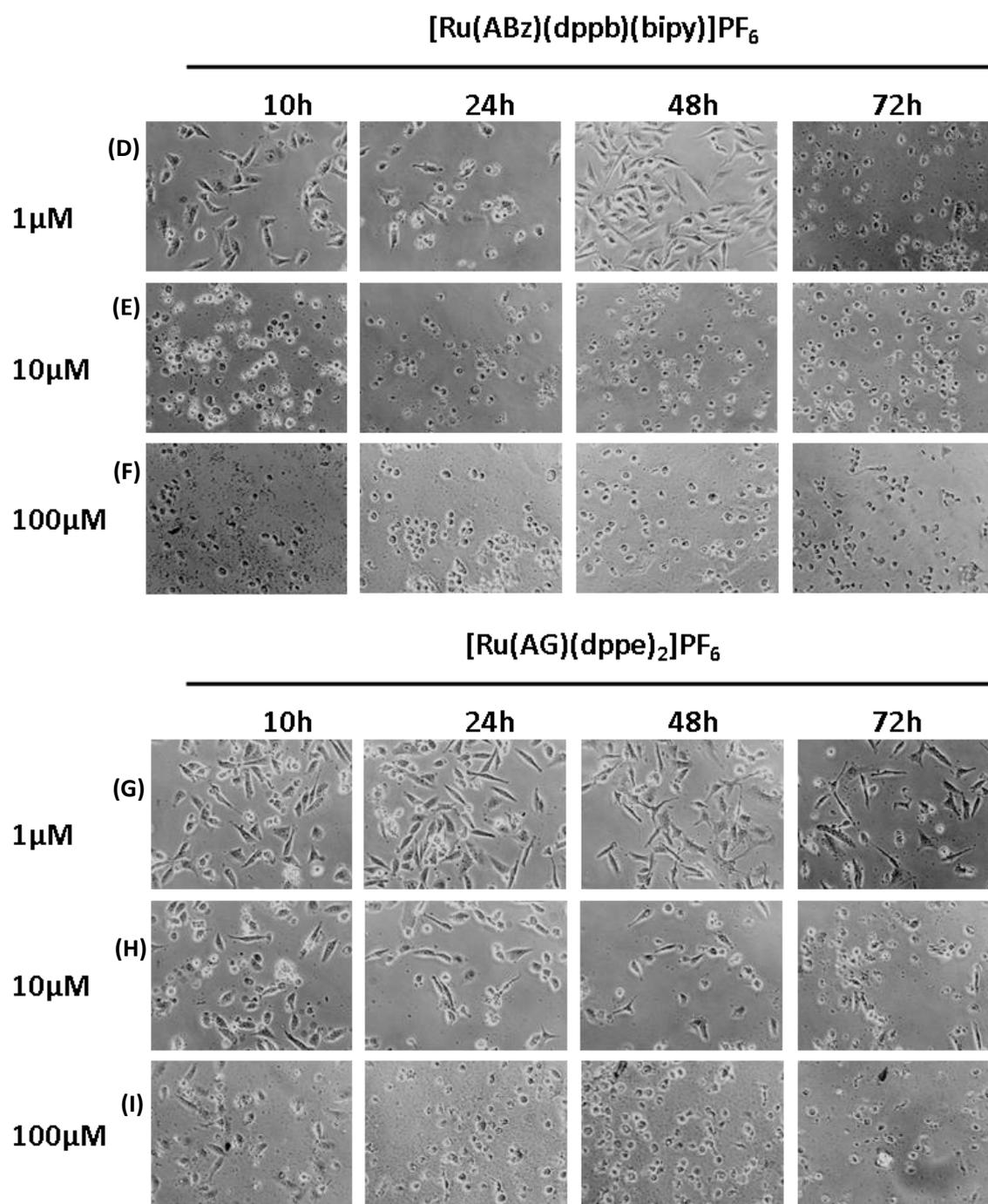


FIGURA 41: Morfologia de células MDA-MB-231 expostas aos complexos [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆, [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(AG)(dppe)₂]PF₆ por um período de 10, 24, 48 e 72 horas.

4.1.10.5 Ensaios clonogênicos

Os ensaios clonogênicos foram realizados com o complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆, o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] e com os fármacos de referência, cisplatina e doxorrubicina. Estes ensaios foram realizados com o complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ uma vez que seus valores

de IC_{50} na linhagem L929, apresentou um aumento do IC_{50} com o tempo (48 – 72 horas). Assim para avaliar o efeito do complexo em diferentes concentrações em um tempo maior (10 dias) foram realizados os ensaios clonogênicos nas linhagens MDA-MB-231 e L929.

A capacidade dos fármacos de referencia cisplatina e doxorrubicina de inibir a formação de colônias de células de tumor MDA-MB-231 e normal L929 nas concentrações 0,1, 1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram diferenças significativas entre as duas linhagens celulares e as células do controle (não tratadas).

Observa-se que os compostos, cisplatina e doxorrubicina, inibem mais eficientemente a formação de colônias nas células MDA-MB-231 do que nas células L929. Por exemplo, a doxorrubicina, quimioterápico utilizado no tratamento de câncer de mama, possui inibição de colônia em 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na linhagem MDA-MB-231, enquanto que na linhagem L929, somente em 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] não inibe a formação de colônias nas concentrações 0,1, 1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e não apresenta diferença significativa entre as duas linhagens celulares e as células de controle. No entanto, com a complexação do ligante AG, observa-se que o novo complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ inibe a formação de colônias na linhagem MDA-MB-231, na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que para a linhagem L929 na mesma concentração não há uma inibição eficiente das colônias.

A FIGURA 42 e 41 apresenta o gráfico do número de colônias vs a concentração dos complexos nas linhagens MDA-MB-231 e L929.

MDAMB231

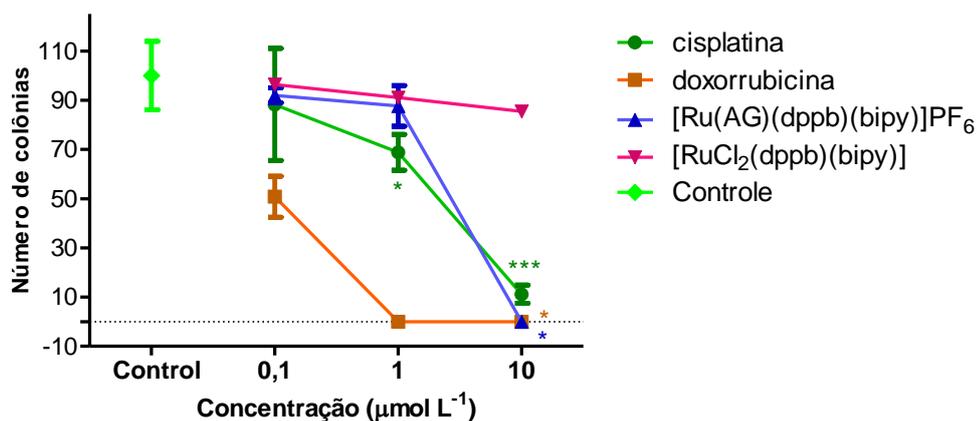


FIGURA 42: Quantificação do número de colônias para os compostos, *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)], [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆, cisplatina e doxorubicina na linhagem MDA-MB-231. Dados representados em ± SD de diferentes experimentos em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * p< 0,05, ** p<0,01 e p< 0,001, comparado com o controle.

L929

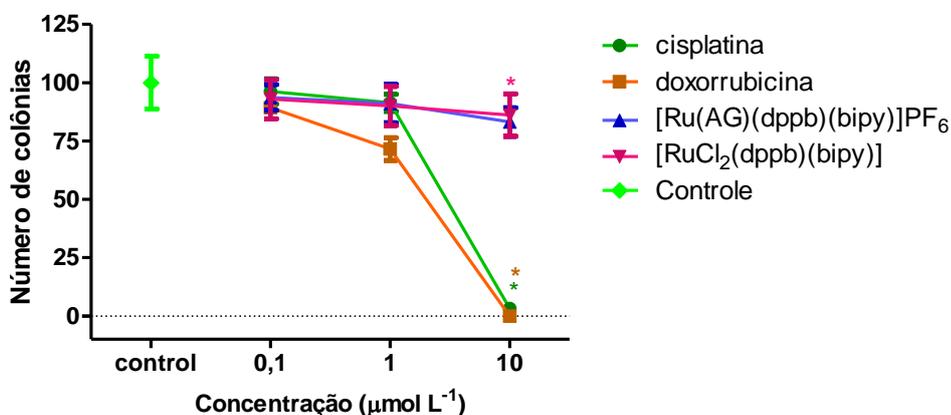


FIGURA 43: Quantificação do número de colônias para os compostos, *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)], [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆, cisplatina e doxorubicina na linhagem L929. Dados representados em ± SD de diferentes experimentos em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * p< 0,05, comparado com o controle.

Ao avaliarmos a diferença de IC₅₀ em 48 horas na linhagem L929 do cisplatina, fármaco inorgânico de referência, e o complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆, nota-se que o cisplatina possui um IC₅₀ de 20 μmol L⁻¹, enquanto o complexo possui IC₅₀ de 18 μmol L⁻¹ (não foi tão eficiente).

TABELA 20). O tempo de incubação dos compostos no ensaio clonogênico é de 48 horas, sendo assim, se esperaria que após 7 dias tanto o cisplatina, quanto o complexo, não inibissem a formação de colônias na concentração máxima de 10 μmol L⁻¹. No entanto, o cisplatina apresentou uma

alta eficiência de inibição de colônias em $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que o complexo, na mesma concentração, não foi tão eficiente.

TABELA 20: Número de colônias formadas durante a incubação com os complexos $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$, cisplatina e doxorubicina

Compostos	Número de colônias		
	0,1	1	10
	L929 [$\mu\text{mol L}^{-1}$] \pm SD		
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	92,9 \pm 8,3	90,0 \pm 8,3	86,1 \pm 9,1
$[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	93,6 \pm 5,5	91,1 \pm 8,1	83,2 \pm 6,1
Cisplatina	96,2 \pm 5,3	91,3 \pm 3,6	3,2 \pm 1,1
doxorubicina	89,2 \pm 0,9	71,5 \pm 4,8	0
	MDA-MB-231 [$\mu\text{mol L}^{-1}$] \pm SD		
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	96,4 \pm 2,1	91,1 \pm 0,2	85,4 \pm 2,1
$[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	91,9 \pm 3,0	87,6 \pm 8,2	0
Cisplatina	88,2 \pm 12,7	68,7 \pm 7,2	11,1 \pm 3,6
doxorubicina	50,8 \pm 8,3	0	0

A eficiência de plaqueamento (EP) dos compostos foi calculada nas duas linhagens estudadas (MDA-MB-231 e L929). Observa-se pelo gráfico da FIGURA 44 que o cisplatina reduziu significativamente a EP nas concentrações 1 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e o precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ não apresentou diferença significativa nas três concentrações.

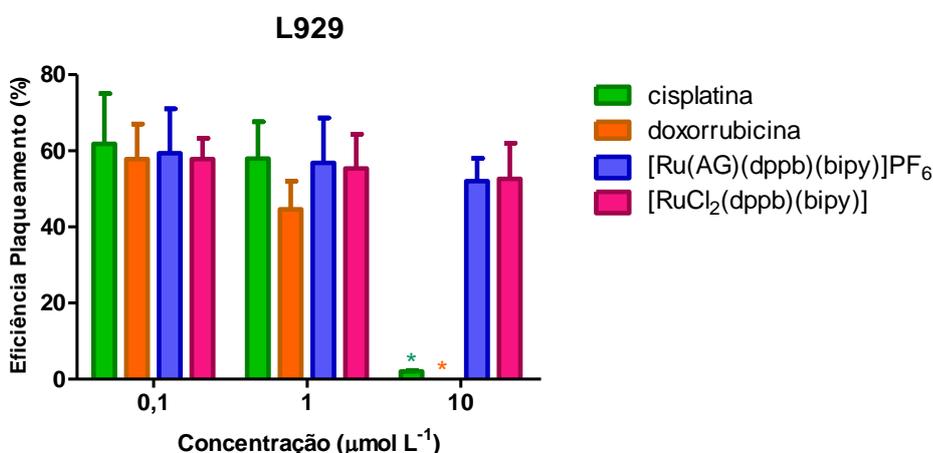


FIGURA 44: Eficiência de plaqueamento dos compostos, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$, $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, cisplatina e doxorubicina na linhagem L929. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * $p < 0,05$, comparado com o controle.

Para a linhagem MDA-MB-231, observa-se que além do cisplatina a doxorubicina e o complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, reduziu significamente a EP nas concentrações 1 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 45). Já o precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$, não apresentou diferença significativa nas três concentrações.

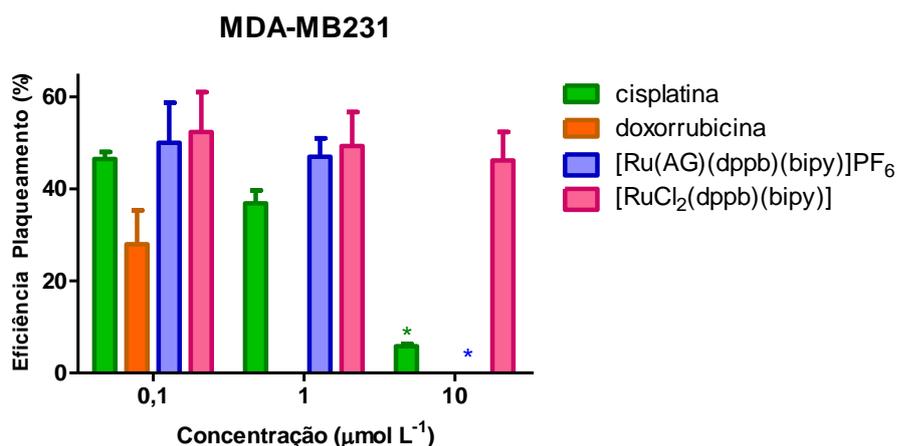


FIGURA 45: Eficiência de plaqueamento dos compostos, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$, $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, cisplatina e doxorubicina na linhagem MDA-MB-231. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA seguido pela análise post-hot Tukey. * $p < 0,05$, comparado com o controle.

4.2. Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, onde $\text{O}-\text{O}$ = ácidos cinâmicos e derivados.

4.2.1. Ácidos cinâmicos

Como já mencionado anteriormente existe um grande interesse no estudo de plantas que contenha compostos fenólicos, devido às propriedades farmacológicas destas moléculas. Substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos quanto para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção de diversas doenças⁸⁴. Estas moléculas estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas¹⁰⁵.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos: ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e as cumarinas. Os ácidos cinâmicos possuem nove átomos de carbono (C6 -C3), e são seis os ácidos cinâmicos mais comumente encontrados no reino vegetal (FIGURA 46).

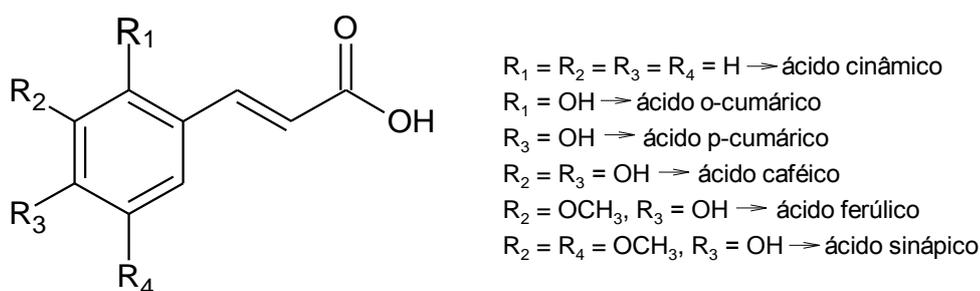


FIGURA 46: Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos são encontrados em diversos produtos de origem vegetal como café, maçãs, frutos cítricos cereais entre outros. Na literatura, encontram-se poucos estudos com as moléculas de ácidos cinâmicos, porém estudos realizados com ácidos cinâmicos e derivados fenólicos mostraram um efeito citotóxico significativo contra várias linhagens de células tumorais¹⁰⁶.

Os complexos de rutênio II com ácidos cinâmicos e derivados foram sintetizados a partir do *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (

FIGURA 47) onde a reação ocorre através da substituição dos átomos de cloro pela coordenação do íon carboxilato do ligante ao metal.

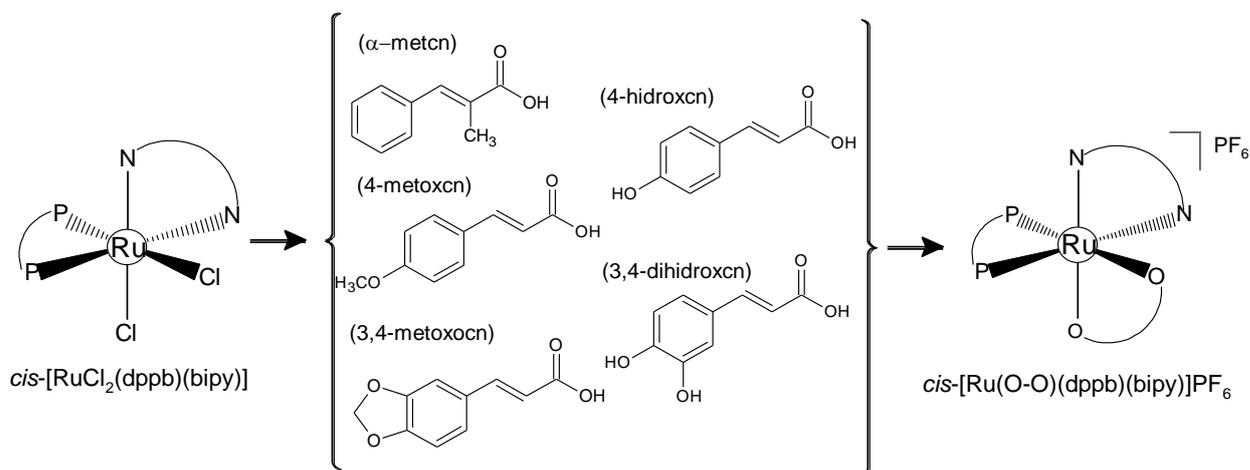


FIGURA 47: Esquema representativo da rota sintética dos complexos *cis*-[Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆

4.2.2 Condutividade molar e análise elementar

Os dados de análise elementar dos complexos com ácidos cinâmicos (TABELA 21) indicam a saída dos dois íons cloretos do precursor e a coordenação dos ligantes cinâmicos pelo grupo carboxilato na forma bidentada e monoaniônica.

TABELA 21: Dados percentuais para os teores de C, H e N, teóricos e experimentais dos complexos de rutênio com derivados de ácido cinâmicos.

Complexos	Análise elementar		
	% C	% H	% N
[Ru(α-metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ . ¾CH ₂ Cl ₂	55,12 (55,58)	4,20 (4,45)	2,73 (2,66)
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ . ⅔H ₂ O	56,67 (56,64)	4,77 (4,59)	2,96 (2,75)
[Ru(3,4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ . H ₂ O	55,44 (55,55)	4,31 (4,37)	2,84 (2,70)
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆ . ¼CH ₂ Cl ₂	55,08 (55,15)	4,26 (4,26)	3,01 (2,72)
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	57,01 (56,91)	4,50 (4,37)	2,89 (2,82)

* (Valores teóricos)

As medidas de condutividade (TABELA 22) confirmam a formação de complexos iônicos (1:1) ⁸⁹. Estes dados indicam a presença de uma molécula catiônica referente ao complexo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]^+$ e um contra-íon aniônico, o PF_6^- .

TABELA 22: Dados de condutividade molar ($\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) para os complexos de rutênio com derivados de ácido cinâmico.

Complexos	Branco	Condutividade
$[\text{Ru}(\alpha\text{-metcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	0,045	54,9
$[\text{Ru}(4\text{-metoxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	0,056	56,4
$[\text{Ru}(3,4\text{-metoxocn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	0,021	57,2
$[\text{Ru}(4\text{-hidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	0,061	34,8
$[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	0,036	40,8

4.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de IV dos ligantes cinâmicos apresentam diversas bandas vibracionais características. Destaca-se a banda alargada em torno de $3080 - 2512 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento do grupo νOH e C-H e para o ligante 4-metoxocn também observa-se duas fortes bandas do estiramento $\nu\text{-C-H}$ do grupo metoxi em 2938 e 2843 cm^{-1} .

Em torno de 1685 e 1446 cm^{-1} observa duas bandas fortes referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo COO^- do íon carboxilato. Além disso, bandas referentes às modificações dos ligantes também foram observadas como pode ser visto na TABELA 23.

TABELA 23: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos ligantes cinâmicos.

Atribuições	Ligantes (cm^{-1})				
	α -meten	4-metoxcn	3,4-metoxcn	4-hidroxcn	3,4-dihidroxcn
$\nu\text{OH} + \nu\text{C-H}$	3058–2512 m	3043–2493F	3080 – 2512 m	3025-2572 m	3025–2576 m
$\nu\text{C-H}_{(\text{metoxi})}$	-	2938 /2843 F	-	-	-
$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	1667 F	1687 F	1693 F	1655 F	1672 F
$\nu\text{C}=\text{C}_{(\text{alif.})}$	1615 F	1623 F	1626 F	1619 F	1627 F
$\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{C}_{(\text{anel})}$	1575 m	1598 F	1604 F	1600 F	1590 F
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1448 F	1444 F	1449 F	1450 F <i>larga</i>	1449 F
$\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{C}_{(\text{anel})}$	1492 m	1512 F	1493 F	encoberta	1511 F
$\nu\text{C-O} + \delta\text{OH}$	1414 F	1430 m	1422 F		1422 m
$\gamma\ \text{CO}$	1313 m	1315 F	1318 F	1326 F	1313 F
$\gamma\ \text{CO}$	1287 F	1289 m	1296 m	1296 F	1283 m
$\nu\text{C}=\text{C}$	1269 F	1255 F	1267 F	1280 F	1244 F
$\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}_{(\text{metoxi})}$	-	1218 F	-	-	-
$\nu\text{C-C}(=\text{O})\text{O}$	1208 m	1192 F	1195 m	1175 F	1172 F
$\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}_{(\text{metoxi})}$	-	1029 m	-	-	-
γOH	934 m	944 m	945 f	935 f	939 m
$\nu\text{C-O}_{(\text{anel})}$	-	-	1038 F	-	-
$\nu\text{C-O}_{(\text{anel})}$	-	-	927 F	-	-
γCH	803 f	-	808 F	817 m	797 m
γCH	769 F	-	-	-	-
γCH	735 f	774 m	736 f	737 f	741 f
$\gamma\text{C}=\text{C}$	688 F	687 f	695 m	699 f	691 m

F- forte; m- média; f- fraca; ν – designa uma vibração de estiramento; δ - designa uma vibração de deformação; γ - designa uma vibração de deformação fora do plano

Com a coordenação, ligante-metal, observa-se o deslocamento ou desaparecimento de algumas dessas bandas. Nos espectros de infravermelho dos ligantes as principais bandas características das vibrações $\nu(\text{O-H})$, $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$, $\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$ e $\delta(\text{OH})$ foram observadas em torno de 3080, 1685, e 1446 e 1424 cm^{-1} , respectivamente. Nos espectros dos complexos, observa-se um deslocamento das bandas $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$ e $\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$ para menores frequências e a ausência das bandas $\nu(\text{O-H})$ e $\delta(\text{OH})$, indicando a desprotonação do grupo OH do íon

carboxilato e sugerindo a coordenação pelo mesmo. Outra evidência já mencionada para confirmar a coordenação do íon carboxilato na forma bidentada é calcular a diferença entre o estiramento simétrico e assimétrico do $\nu\text{-COO}^{-90}$ (Δcm^{-1}). De acordo com os valores de Δcm^{-1} calculados para os ligantes e seus respectivos complexos (TABELA 24), assim como o deslocamento do $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ para menores comprimento de onda, podemos confirmar a coordenação da forma bidentada do íon carboxilato.

TABELA 24: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) correspondente ao grupo carboxila do ligante livre e coordenado dos derivados de ácido cinâmico.

Compostos	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	Δ (cm^{-1})
α -metcn	1667 F	1448 F	219
4-metoxcn	1687 F	1444 F	243
3,4-metoxocn	1693 F	1449 F	244
4-hidroxcn	1655 F	1450 F	205
3,4-dihidroxcn	1672 F	1449 F	223
[Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	1637 f	1445 m	192
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	1633 m	1433 F	200
Ru(3,4-metoxocn)(dppb)(bipy)]PF ₆	1634 m	1447 m	187
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	1633 m	1444 m	189
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	1633 m	1445 F	188

Os espectros dos complexos apresentam duas bandas de vibração $\nu(\text{Ru-P})$ em torno de 516 e 509 cm^{-1} , referentes as bandas de vibração simétrica e assimétrica dos átomos de fósforos que se encontram em *cis*, além de novas bandas que surgem pela coordenação na região entre 493 – 416 cm^{-1} , características das vibrações $\nu(\text{Ru-N})$ e $\nu(\text{Ru-O})$. Duas novas bandas $\nu_{\text{as}}\text{P-F}$ e $\nu_{\text{s}}\text{P-F}$ referente ao contra-íon PF₆⁻, surgem na região de 840 e 557 cm^{-1} , respectivamente. A TABELA 25 apresenta as outras bandas características dos complexos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆.

TABELA 25: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos complexos de rutênio contendo os ligantes cinâmicos.

Atribuições	[Ru(L)(dppb)(bipy)]PF ₆				
	α -metcn	4-metoxcn	3,4-metoxcn	4-hidroxcn	3,4-dihidroxcn
$\nu\text{CH}_{(\text{arom})}$	3057 f	3055 f	3057 m	3056 f	3057 f
$\nu_{\text{as}}\text{CH}$	2925 f	2932 f	2924 m	2928 f	2935 f
$\nu_{\text{s}}\text{CH}$	2859 f	2859 f	2863 f	2862 f	2858 f
$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	1637 f	1633 m	1634 m	1633 m	1633 m
$\nu_{\text{as}}\text{C=N}$	1603 f	1603 m	1604 m	1603 m	1605 F
$\nu_{\text{s}}\text{C=N} + \nu\text{C=C}$	1572 f	1574 f	1571 f	-	1586 f
$\nu\text{C=C}_{(\text{anel})}$	encoberta	1513 m	1503 m	1515 f	1515 m
$\nu\text{C=C}_{(\text{bifos.})}$	1482m/ 1464m	1480m/ 1464m	1489m/ 1462m	1482m/ 1464m	1480m/ 1463m
$\nu\text{C=C} + \nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1434F/ 1445m	1433 F	1434 F/ 1447m	1434F/ 1444m	1434F/ 1445F
γCO	1311 f	1306 f	1309 f	1307 f	1311 f
γCO	1272 f	1293 f	1297 f	1283 m	1277 f
$\nu\text{C-O-C}_{(\text{anel})}$	-	-	1254 m	-	-
$\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}_{(\text{metoxi})}$	-	1246 m	-	-	-
$\nu\text{P-C}$	1096 m	1096 m	1097 m	1096 m	1097 m
$\nu\text{C-O}_{(\text{anel})}$	-	-	1037 m	-	-
$\nu_{\text{s}}\text{C-O-C}_{(\text{metoxi})}$	-	1028 f	-	-	-
νanel	994 f	987 f	998 f	996 f	986 f
$\nu\text{C-O}_{(\text{anel})}$	-	-	928 f	-	-
$\nu\text{P-C}$	901 f	901 f	898 f	901 f	901 f
$\nu_{\text{as}}\text{P-F}$	841 F	842 F	842 F	842 F	843 F
γCH	766 f	764 f	765 f	763 m	763 m
γCH	742 f	742 m	744 f	741 m	741 m
γanel	697 m	698 m	698 m	698 F	698 F
$\nu\text{P-CH}_2$	623 f	654 f	623 f	623 f	623 f
$\nu_{\text{s}}\text{P-F}$	557 m	558 m	558 m	558 m	558 m
$\nu\text{Ru-P}$	515m/ 509m	516m/ 508m	516m / 509 m	517m/ 5 08m	515m/ 509m
$\nu\text{Ru-O}$	493 f	492 f	492 f	491 f	492 f
$\nu\text{Ru-N}$	418 f	418 f	429 f	416 f	420 f

F- forte; m- média; f- fraca; ν - designa uma vibração de estiramento; δ - designa uma vibração de deformação; γ - designa uma vibração de deformação fora do plano

4.2.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos $[\text{Ru}(\text{O}(\text{dppb})(\text{bipy}))\text{PF}_6]$ apresentam dois dupletos, em torno de δ 48 ppm e δ 46 ppm (FIGURA 46). Em relação ao espectro do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ onde os dupletos aparecem em δ 42,2 ppm e δ 30,5 ppm, observa-se que com a coordenação do ligante ocorre um deslocamento para campo baixo assim como uma aproximação entre os sinais.

SpinWorks 2.5: ORIENTADOR ALZIR

SpinWorks 2.5: ORIENTADOR ALZIR A FIGURA 48 apresenta o espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(4\text{-metoxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

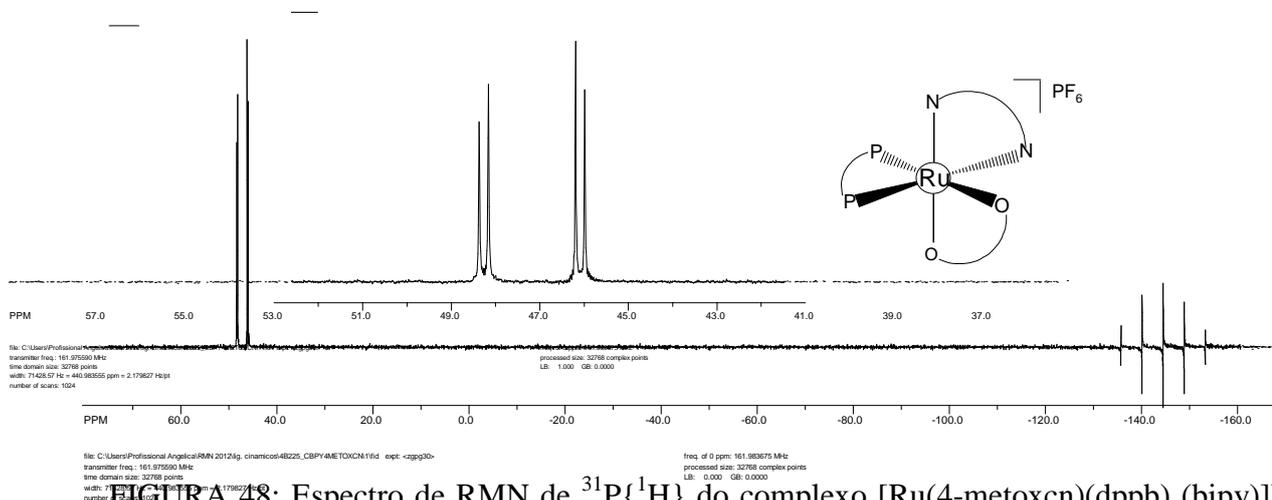


FIGURA 48: Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(4\text{-metoxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em CH_2Cl_2 .

Existem duas possíveis contribuições para explicar este comportamento. Uma contribuição vem do ângulo de cone das fosfinas, que são modificadas após a complexação do ligante ao metal. Segundo Tolman¹⁰⁷, o ângulo de cone é o menor ângulo formado por um cone imaginário convenientemente posicionado tangenciando externamente o átomo principal (P) e os substituintes (FIGURA 49). Assim a inserção de uma estrutura geral contendo o ácido carboxílico e uma cadeia insaturada de carbonos faz com que o ângulo de cone se modifique igualmente para os cinco tipos de ligantes estudados.

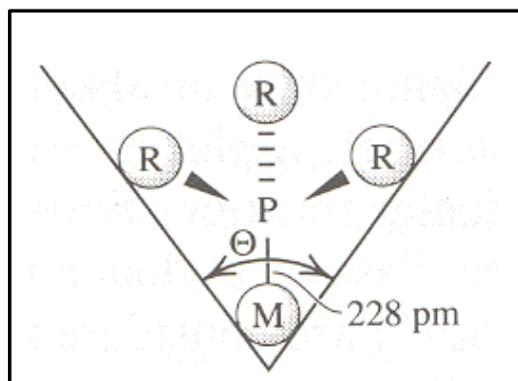


FIGURA 49: Ângulo de cone de Tolman para PR_3 ¹⁰⁸.

Outra contribuição está relacionada ao caráter menos doador dos ligantes em relação aos ligantes cloro que são bons doadores σ e π . Com a coordenação, os ligantes cinâmicos deixam os átomos de fósforo mais desblindados.

Resumindo, estas contribuições deslocam os dupletos para regiões de maior frequência em relação ao precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (TABELA 26), pois os ligantes (O-O) cinâmicos usados desblindam os átomos de fósforo mais eficientemente que os cloretos presentes no complexo precursor. Estes dupletos aparecem em regiões mais desprotegidas que as bifosfinas livres, mostrando que a coordenação ao rutênio leva à desproteção dos átomos de fósforos.

TABELA 26: Valores de deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento para os complexos de rutênio com derivados de ácido cinâmico (CH_2Cl_2).

	$\delta^{31}P\{^1H\}$ (ppm)	$^2J_{P-P}$ (Hz)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	42,2 e 30,5	32,5
[Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,5 e 46,2	33,5
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,3 e 46,0	33,3
[Ru(3,4-metoxocn)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,3 e 46,1	33,4
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,7 e 47,5	33,4
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	48,2 e 45,9	33,3

4.2.5 Estudo Eletroquímico

O voltamograma cíclico do complexo [Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF₆ (FIGURA 50) apresenta um processo quasi-reversível atribuído ao par redox Ru^{III}/ Ru^{II} ($E_{1/2} = 1,31$ V). Já para os complexos com os ligantes 4-metoxcn, 3,4-metoxcn e 3,4-dihidroxcn observa-se uma tendência a irreversibilidade.

FIGURA 50: Voltamograma cíclico do complexo [Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF₆ obtidos em CH₂Cl₂ (0,1 mol L⁻¹ PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

Para o complexo contendo o ligante 4-hidroxcn, [Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆, observa-se no voltamograma cíclico um processo irreversível em torno de 1,31 V (FIGURA 51). O voltamograma de pulso diferencial apresenta dois processos sendo que o majoritário ocorre em 1,52 V, sugerindo que este processo mais anódico seja referente a oxidação de Ru^{II/III} enquanto o ombro em 1,30 V refere-se a oxidação do grupo OH (fenol) do ligante.

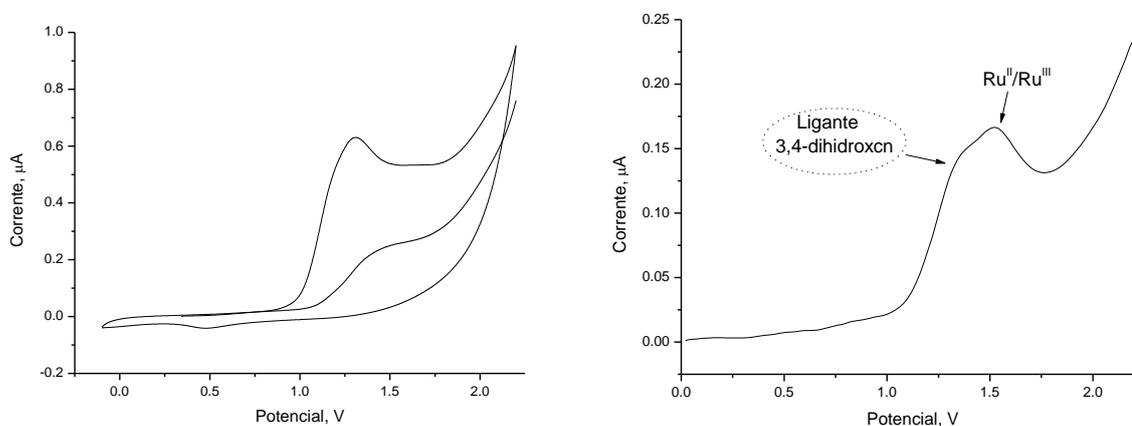


FIGURA 51: Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆ obtidos em CH₃CN (0,1 mol L⁻¹ PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

O voltamograma cíclico do ligante *p*-coumárico (1 mmol L^{-1} contendo 5 % (v/v) etanol em tampão fosfato (pH 7.0) com $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ como eletrólito suporte) apresenta um processo irreversível em torno de 0,67 V referente a oxidação do fenol (FIGURA 52)¹⁰⁹. Em geral a oxidação do fenol leva à formação de um íon fenolato, que pode ser oxidado facilmente a um radical fenoxil. Este radical pode ser submetido a reações químicas posteriores, tais como acoplamento (polímeros), a perda de prótons, ou ataque nucleofílico estabilizando o elétron e dificultando a reversibilidade da molécula¹¹⁰.

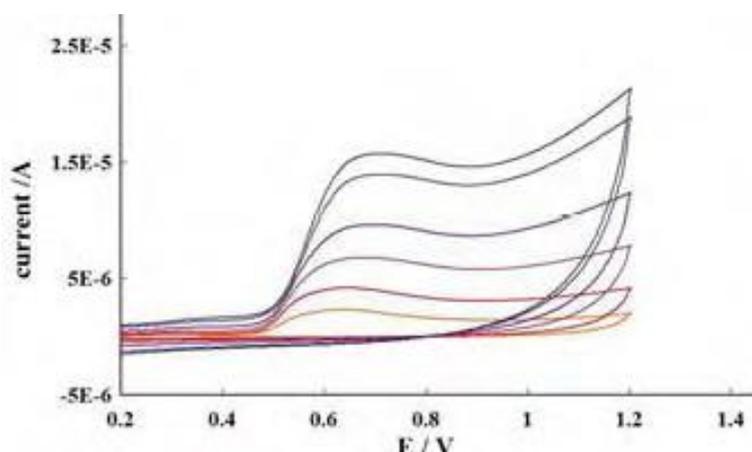


FIGURA 52: Voltamograma cíclico do ácido *p*-coumárico obtidos em diferentes velocidade de varredura de 25, 50, 100, 200, 400 and 500 mVs^{-1} .¹⁰⁹

TABELA 27: Dados de voltametria cíclica (V) para os complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ onde O-O = derivados de ác. cinâmico (100 mV.s^{-1} , Ag/AgCl).

Complexos	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$ (V)	I_{pa}/I_{pc}	ΔE_p
$[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	0,74	0,63	0,68	1,03	0,11
$[\text{Ru}(\alpha\text{-metcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,35	1,27	1,31	1,02	0,07
$[\text{Ru}(4\text{-metoxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,40	1,20	1,30	1,52	0,20
$[\text{Ru}(3,4\text{-metoxocn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,41	1,21	1,31	1,86	0,20
$[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,89	1,75	1,82	1,54	0,13
$[\text{Ru}(4\text{-hidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,52	-	-	-	-

4.2.6 Avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com ácido cinâmicos e derivados.

4.2.6.1 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

Os ensaios de atividade antioxidante destes compostos foram realizados uma vez que os derivados de ácidos cinâmicos, ácido caféico e ácido *p*-coumárico, são antioxidantes naturais encontrados em diversas verduras e frutas. Estes dois ligantes cinâmicos diferem dos demais ligantes da série devido a presença de grupos fenóis.

Como mencionado anteriormente, o ensaio da atividade antioxidante dos ácidos cinâmicos e seus complexos metálicos, foram realizados pelo sequestro de radicais livres pelo DPPH.

Era esperado que os ligantes ácido caféico e ácido *p*-coumárico apresentassem atividade antioxidante, entretanto somente o ligante ácido caféico (3,4-dihidroxcn) apresentou atividade, assim como o seu respectivo complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

A FIGURA 53 apresenta um gráfico de barras dos valores de IC_{50} por tempo, do consumo de radicais livres pelo DPPH na presença dos complexos $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e do ligante 3,4-dihidroxcn (ácido caféico).

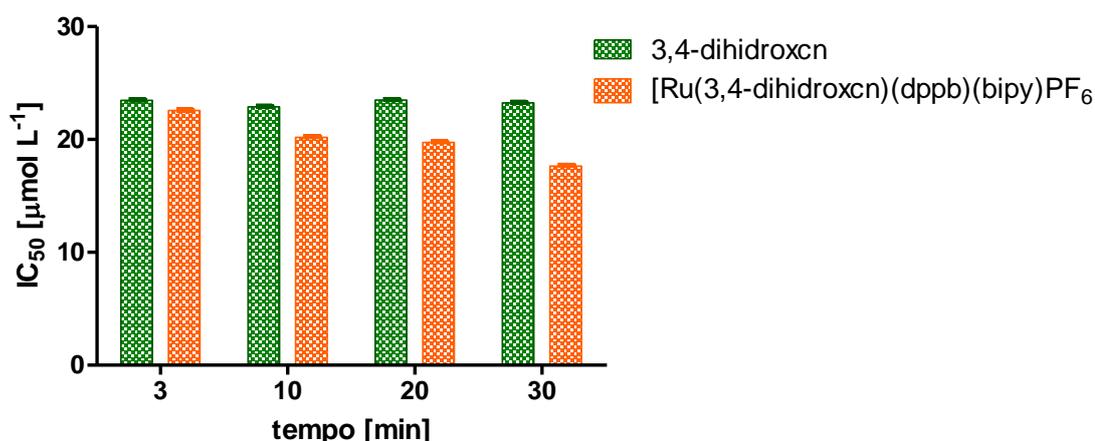


FIGURA 53: Gráfico de barras de IC_{50} do consumo de DPPH na presença do ácido caféico (3,4-dihidroxcn) e seu complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ por tempo.

Quando se compara os valores de IC_{50} por tempo (FIGURA 53), do complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ com o ligante (3,4-dihidroxcn),

observa-se que o ligante livre não varia a concentração do radical DPPH com o tempo, diferentemente do observado para o complexo que apresenta uma redução do radical DPPH com o tempo, além de apresentar um valor de IC₅₀ menor que o ligante (IC_{50 comp.} < IC_{50 lig.}), como pode ser observado na TABELA 28.

Diferentemente do observado para o complexo com o AG, a coordenação favoreceu o sequestro de radicais livres pelo ligante. A perda do íon H⁺ ficou favorecida pela coordenação, ou seja, a capacidade antioxidante do ligante melhorou após a complexação.

TABELA 28: Teste de IC₅₀ para atividade sequestradora de radicais dos compostos 3,4-dihidroxcn e [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆.

Tempo	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	
	3,4-dihidroxcn	[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆
3	23,47± 0,04	22,63± 0,09
10	22,89± 0,05	20,19 ± 0,08
20	23,48 ± 0,05	19,73 ± 0,09
30	23,24 ± 0,05	17,63± 0,09

Quando avalia-se a porcentagem de consumo do radical DPPH por concentração após 30 minutos de incubação (FIGURA 54) observamos que o ligante 3,4-dihidroxcn apresenta um consumo total das espécies (≈100 %) na concentração de 100 μmol L⁻¹ enquanto que para o complexo [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆ na mesma concentração somente 80% (TABELA 28), divergindo do comportamento observado no IC₅₀. No entanto, com o decréscimo da concentração observa-se que o consumo do radical livre do DPPH é mais eficiente pelo complexo do que o ligante 3,4-dihidroxcn.

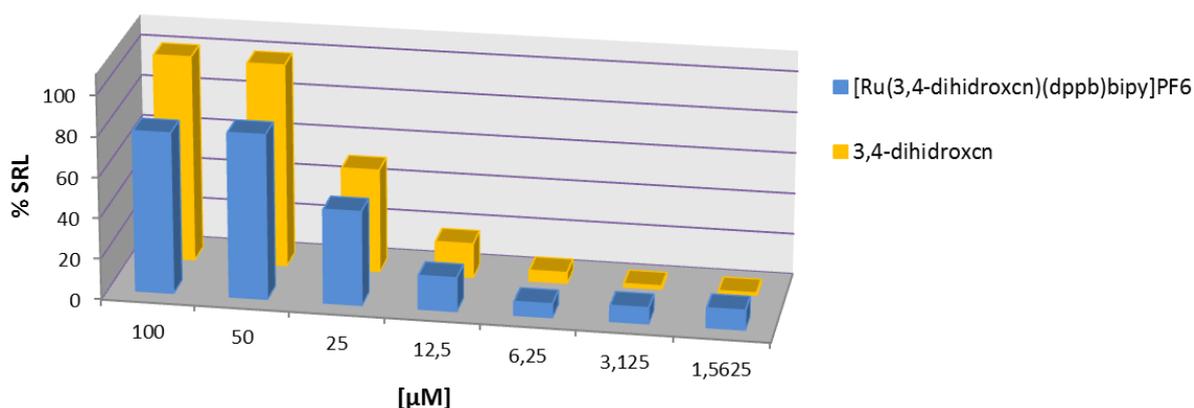


FIGURA 54: Gráfico de barras de %S.R.L. do ligante 3,4-dihidroxcn e o complexo $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)bipy]PF_6$ após 30 minutos de reação.

TABELA 29: % de inibição de radicais livres DPPH (%S.R.L.) dos compostos 3,4-dihidroxcn e $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$, após 30 minutos de reação.

[] $\mu\text{mol L}^{-1}$	%S.R.L	
	3,4dihidroxcn	$[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$
200	99,6 ± 1,5	60,2 ± 2,4
100	100,8 ± 0,2	78,7 ± 1,9
50	99,4 ± 0,2	80,6 ± 1,5
25	50,4 ± 0,7	46,1 ± 3,8
12,5	16,7 ± 0,7	16,5 ± 0,9
6,25	5,4 ± 1,4	6,8 ± 2,4
3,125	1,7 ± 1,9	7,8 ± 0,5
1,5625	1,2 ± 1,0	9,6 ± 2,9

4.2.6.2 Estudos de Interação com albumina bovina

Assim como no ensaio anterior, o estudo foi realizado em diferentes temperaturas (22°, 27°, 32° e 37°C), para avaliar o tipo de interação, força e os parâmetros termodinâmicos, na faixa de 300 a 440 nm sobre uma excitação em 280 nm.

Na FIGURA 55 encontra-se o espectro de fluorescência da BSA na presença do complexo $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$, onde é possível observar a diminuição na intensidade de fluorescência a partir das diferentes concentrações do complexo, indicando interação com a BSA.

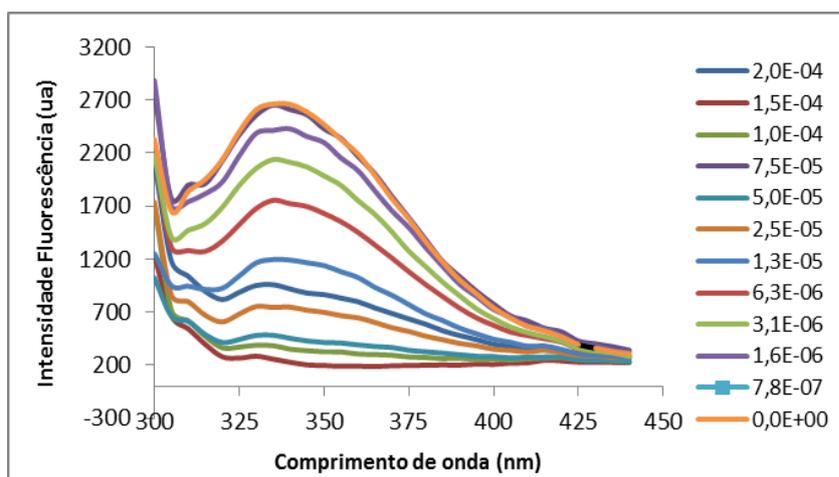


FIGURA 55: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{ex.} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

De acordo com os valores obtidos para K_{sv} na TABELA 30 observa-se que no geral com o aumento de temperatura, não há uma variação significativa nos valores das constantes. Porém, quando se analisa os resultados de k_q observa-se que estes são maiores do que o valor máximo possível para o mecanismo dinâmico ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), podendo sugerir desta forma que a supressão da BSA ocorre pela formação de uma espécie intermediária¹⁰².

A FIGURA 56 apresenta como exemplo o gráfico, que exhibe a relação da supressão da BSA com o complexo $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$, em diferentes temperaturas. Os gráficos dos outros complexos e ligantes encontram-se no apêndice.

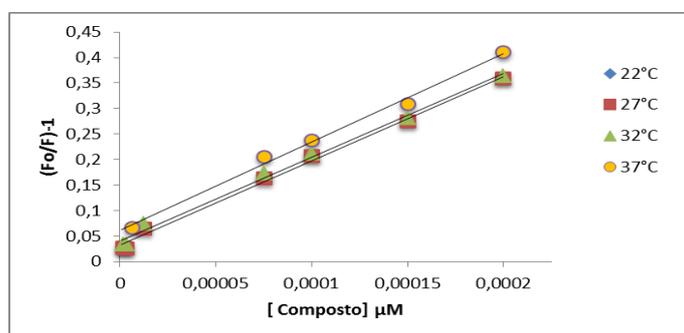


FIGURA 56: Gráficos de Stern-Volmer de $(F_0/F)-1$ vs $[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm . $\{[BSA] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\}$.

A TABELA 30 resume os valores de K_{sv} e k_q , dos complexos sintetizados e dos ligantes, calculados considerando que o tempo de vida (τ_o) de um triptofano na albumina no estado excitado é cerca de 10^{-8} s.

TABELA 30: Constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante supressão bimolecular (k_q) dos ligantes cinâmicos e dos complexos com a BSA (solução 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4)

Compostos	T (K)	$K_{sv} \pm SD$ (10^4 L mol^{-1})	k_q ($10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	R^2
α -metcn	295	(1,38 \pm 0,03)	2,00	0,9984
	300	(1,37 \pm 0,02)	1,98	0,9978
	305	(1,38 \pm 0,02)	1,99	0,9977
	310	(1,37 \pm 0,02)	1,99	0,9978
4-metoxcn	295	(4,55 \pm 0,04)	6,59	0,9967
	300	(4,61 \pm 0,02)	6,68	0,9965
	305	(4,59 \pm 0,06)	6,66	0,9965
	310	(4,56 \pm 0,01)	6,62	0,9963
3,4-metoxocn	295	(4,21 \pm 0,06)	6,11	0,9969
	300	(4,25 \pm 0,00)	6,16	0,9966
	305	(4,29 \pm 0,06)	6,22	0,9955
	310	(4,25 \pm 0,01)	6,17	0,9965
4-hidroxcn	295	(2,13 \pm 0,01)	3,10	0,9934
	300	(2,19 \pm 0,01)	3,18	0,9848
	305	(2,16 \pm 0,02)	3,13	0,9862
	310	(2,16 \pm 0,02)	3,14	0,9863
3,4-dihidroxcn	295	(0,96 \pm 0,01)	1,40	0,9978
	300	(0,99 \pm 0,01)	1,43	0,9976
	305	(0,99 \pm 0,01)	1,44	0,9975
	310	(0,98 \pm 0,00)	1,43	0,9980
[Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(3,11 \pm 0,14)	4,5	0,9993
	300	(3,32 \pm 0,14)	4,8	0,9970
	305	(3,21 \pm 0,06)	4,6	0,9942
	310	(3,15 \pm 0,05)	4,6	0,9932
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(4,74 \pm 0,08)	6,9	0,9986
	300	(6,25 \pm 0,19)	9,1	0,9982
	305	(7,16 \pm 0,22)	10,0	0,9977
	310	(7,21 \pm 0,05)	10,0	0,9955
[Ru(3,4-metoxocn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(11,0 \pm 0,29)	16,0	0,9929
	300	(12,2 \pm 0,36)	17,8	0,960
	305	(12,3 \pm 0,28)	17,9	0,9975
	310	(12,4 \pm 0,14)	18,1	0,9979
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(1,86 \pm 0,09)	2,7	0,9972
	300	(2,40 \pm 0,06)	3,5	0,9973
	305	(2,94 \pm 0,06)	4,3	0,9952
	310	(3,17 \pm 0,06)	4,6	0,9973
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(0,15 \pm 0,01)	0,23	0,9970
	300	(0,16 \pm 0,00)	0,24	0,9961
	305	(0,16 \pm 0,00)	0,24	0,9950
	310	(0,17 \pm 0,00)	0,25	0,9977

Analisando-se os valores das constantes de ligação K_b observamos que para os ligantes α -metcn, 3,4-metoxocn, 4-hidroxcn e 3,4-dihidroxcn ocorre um aumento da constante com o aumento da temperatura, sugerindo uma supressão dinâmica. Já o ligante 4-metoxcn apresentou um pequeno decréscimo dos valores de constante K_b com o aumento da temperatura.

Quando analisa-se as constantes de ligação K_b dos complexos com os respectivos ligantes observa-se um novo comportamento para alguns compostos. Os complexos $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ com os ligantes $\text{L} = \alpha$ -metcn, 4-metoxcn e 3,4-dihidroxcn apresentam um decréscimo da constante K_b com o aumento da temperatura, indicando um comportamento por supressão estática. Este comportamento é diferente do observado para os ligantes livres indicando que o modo e local de interação são modificados com a complexação. Enquanto que para os complexos com os ligantes $\text{L} = 3,4$ -metoxocn e 4-hidroxcn mantém o comportamento observado para o ligante livre, com o aumento da temperatura ocorre um aumento da constante K_b . Os valores de K_b são menores nos complexos em relação aos seus respectivos ligantes livres, sugerindo que o modo de interação possa ser o mesmo, ou seja pelo ligante, mas o impedimento estérico devido o volume do complexo possa prejudicar esta interação.

Além disso, todos os compostos apresentam valores de K_b que indicam força de interações moderadas entre complexo e BSA. A FIGURA 57 mostra o gráfico da equação modificada de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da BSA com o complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ nas temperaturas, 295, 300, 305 e 310 K.

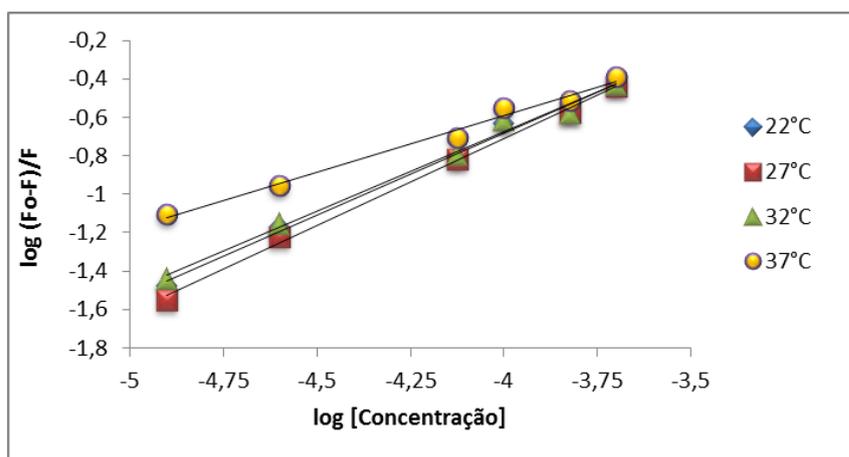


FIGURA 57: Gráfico da equação de $\log(F_0-F)/F$ vs $\log[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. $[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Na TABELA 31 estão apresentados os valores das constantes de ligação K_b e n em diferentes temperaturas para os complexos sintetizados e seus respectivos ligantes.

TABELA 31: Parâmetros de ligação da BSA com os ligantes cinâmicos e seus complexos (solução 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4.)

Compostos	T (K)	$K_b \pm SD$	n	R
α -metcn	295	$(5,14 \pm 1,18) \times 10^4$	1,15	0,9993
	300	$(6,29 \pm 0,42) \times 10^4$	1,16	0,9994
	305	$(7,07 \pm 1,09) \times 10^4$	1,17	0,9996
	310	$(7,43 \pm 0,16) \times 10^4$	1,16	0,9988
4-metoxcn	295	$(6,44 \pm 0,32) \times 10^4$	1,05	0,9974
	300	$(6,39 \pm 0,60) \times 10^4$	1,05	0,9973
	305	$(6,06 \pm 0,75) \times 10^4$	1,03	0,9977
	310	$(5,12 \pm 0,01) \times 10^4$	1,02	0,9978
3,4-metoxocn	295	$(1,69 \pm 0,09) \times 10^3$	0,66	0,9795
	300	$(2,23 \pm 0,08) \times 10^3$	0,68	0,9710
	305	$(2,98 \pm 0,11) \times 10^3$	0,71	0,9767
	310	$(3,93 \pm 1,10) \times 10^3$	0,73	0,9888
4-hidroxcn	295	$(1,05 \pm 0,08) \times 10^5$	1,20	0,9918
	300	$(2,65 \pm 0,07) \times 10^5$	1,33	0,9996
	305	$(7,64 \pm 0,38) \times 10^5$	1,39	0,9995
	310	$(2,36 \pm 1,18) \times 10^6$	1,50	0,9984
3,4-dihidroxcn	295	$(2,26 \pm 0,32) \times 10^2$	0,57	0,9965
	300	$(3,07 \pm 0,23) \times 10^2$	0,61	0,9977
	305	$(3,10 \pm 0,01) \times 10^2$	0,61	0,9970
	310	$(4,78 \pm 1,03) \times 10^2$	0,64	0,9959
[Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(4,64 \pm 0,30) \times 10^4$	1,05	0,9979
	300	$(2,36 \pm 0,14) \times 10^4$	0,95	0,9990
	305	$(1,81 \pm 0,38) \times 10^4$	0,92	0,9981
	310	$(1,32 \pm 0,17) \times 10^4$	0,89	0,9981
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(1,02 \pm 0,28) \times 10^5$	1,00	0,9969
	300	$(5,23 \pm 0,26) \times 10^4$	0,97	0,9870
	305	$(2,90 \pm 0,24) \times 10^4$	0,91	0,9984
	310	$(2,17 \pm 0,17) \times 10^4$	0,88	0,9940
[Ru(3,4-metoxocn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(3,77 \pm 0,19) \times 10^4$	0,90	0,9847
	300	$(5,25 \pm 0,16) \times 10^4$	0,92	0,9935
	305	$(5,30 \pm 0,14) \times 10^4$	0,92	0,9937
	310	$(6,64 \pm 0,09) \times 10^4$	0,95	0,9949
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(9,01 \pm 0,14) \times 10^4$	1,17	0,9976
	300	$(9,22 \pm 0,15) \times 10^4$	1,14	0,9907
	305	$(1,15 \pm 0,00) \times 10^5$	1,15	0,9855
	310	$(1,22 \pm 0,04) \times 10^5$	1,14	0,9939
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(8,74 \pm 0,24) \times 10^2$	0,89	0,9979
	300	$(6,42 \pm 0,20) \times 10^2$	0,89	0,9994
	305	$(3,11 \pm 0,60) \times 10^2$	0,80	0,9997
	310	$(4,71 \pm 0,06) \times 10$	0,56	0,9933

Os estudos termodinâmicos estão apresentados na TABELA 32 e observa-se que todos os compostos apresentam interação espontânea com a BSA, uma vez que os valores de ΔG° são negativos. No entanto, os valores de ΔG° diminuem com o aumento da temperatura para os complexos com os ligantes α -metcn, 4-metoxcn e 3,4-dihidroxcn, indicando que o aumento da temperatura desfavorece o processo de formação. Isto pode ser comprovado pelos valores entropia ΔS (organização do sistema), somente estes três compostos apresentam valores negativos de ΔS , sugerindo que o sistema tende a desordem, assim também, vale lembrar que os valores das constantes de ligação K_b também diminuem com o aumento da temperatura.

Em resumo, pode-se concluir que os complexos com os ligantes α -metcn, 4-metoxcn e 3,4-dihidroxcn possui uma supressão estática e segundo a literatura os valores negativos de ΔH° e ΔS° corresponde a forças de van der Waals e ligações de hidrogênio.

Os outros dois complexos com os ligantes 3,4-metoxocn e 4-hidroxcn apresentam um comportamento inverso. Os valores de ΔG° são negativos e há um aumento na energia livre com o aumento da temperatura, indicando maior estabilização na formação complexo-BSA. Os valores de ΔH° e ΔS° são positivos indicando que a interação complexo-BSA são forças de interação hidrofóbicas.

Os parâmetros termodinâmicos para os complexo-BSA foram determinados a partir da equação de van't Hoff utilizando as constantes de ligação K_b (TABELA 32). A FIGURA 58 mostra o gráfico de $\ln K_b$ vs $1/T$ para a interação da BSA com o complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

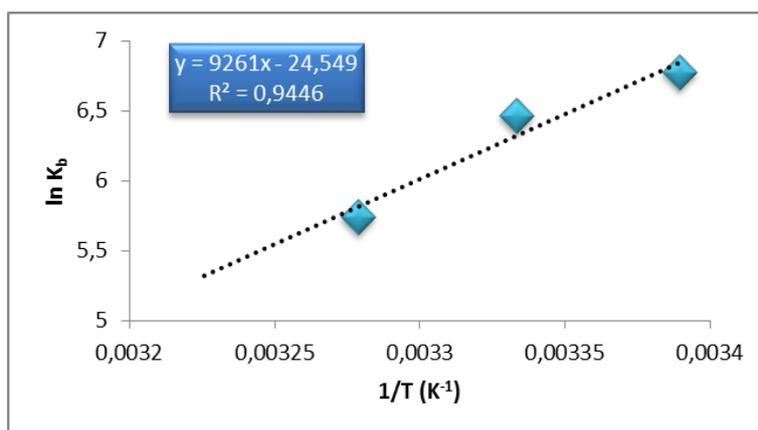


FIGURA 58: Gráficos de van't Hoff para os complexos $[Ru(3,4\text{-dihidroxcn})(dppb)(bipy)]PF_6$ nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.

TABELA 32: Parâmetros termodinâmicos para os ligantes cinâmicos e seus complexos.

Complexos	ΔG° (kJ mol ⁻¹)				ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
	295 K	300 K	305 K	310 K		
α -metcn	-26,85	-27,45	-28,04	-28,70	9,21	122,2
4-metoxcn	-27,07	-27,39	-27,62	-27,95	-9,80	58,6
3,4-metoxocn	-17,44	-19,00	-20,33	-21,76	66,58	285,0
4-hidroxcn	-28,37	-31,15	-34,35	-37,82	157,67	630,0
3,4-dihidroxcn	-13,08	-14,19	-14,54	-15,65	36,41	167,6
[Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	-25,73	-25,12	-24,73	-24,30	-53,21	-93,36
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	-28,29	-27,16	-26,13	-25,74	-79,60	-174,4
[Ru(3,4-metoxocn)(dppb)(bipy)]PF ₆	-25,91	-27,03	-27,61	-28,39	23,05	166,0
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	-27,98	-28,51	-29,55	-30,19	17,40	153,5
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	-16,61	-16,12	-14,55	-9,93	-143,39	-426,6

4.2.6.3 Ensaio de viabilidade celular dos ligantes e complexos de Ru (II) com ácido cinâmicos e derivados.

Os complexos sintetizados, os ligantes livres, a cisplatina e a doxorubicina, tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas contra as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e L929. Os valores de IC_{50} foram calculados após a exposição das células com os compostos durante um período de 48 e 72 horas.

Os dados de IC_{50} (TABELA 33) para os compostos mostram que os complexos apresentaram baixos valores de IC_{50} em relação aos ligantes livres. Em geral os ligantes livres não apresentaram atividade contra nenhuma linhagem celular estudada, apresentando $IC_{50} > 200 \mu\text{mol L}^{-1}$. E mais uma vez os complexos foram muito mais ativos em câncer de mama MDA-MB-231 do que em MCF-7. Na TABELA 33 observa-se que os valores de IC_{50} de alguns complexos na linhagem MDA-MB-231 no período de 48 horas apresentam concentração da ordem de nanomolar. Além disso, comparando os valores de concentração (IC_{50}) na linhagem MDA-MB-231 com a linhagem de referência L929 (normal de camundongo) observa-se que os complexos apresentam índice de seletividade bem considerável em alguns casos. Observa-se que a maioria dos compostos apresentam um índice de seletividade na mesma ordem de grandeza que os fármacos de referência, cisplatina e doxorubicina, sendo que o complexo $[\text{Ru}(4\text{-hidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ apresenta um IS de 10, ou seja, este complexo é mais seletivo que a cisplatina que possui um $IS = 8,3$. Além disso, como foi observado para a série do ácido gálico e derivados, os complexos contendo grupo fenóis livres, $[\text{Ru}(4\text{-hidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, são os que apresentam maiores valores de IC_{50} na linhagem L929, ou seja, são menos citotóxicos, apresentando maiores valores de IS, 10,3 e 6,1, respectivamente.

Vale ressaltar que esta relação de IS da linhagem MDA-MB-231 com a linhagem normal de camundongo (L929) é utilizado como uma possível referência do poder antitumoral do complexo, não podendo ser considerado um resultado final e sim uma perspectiva de um potencial fármaco.

Em muitos casos, a ligação dos complexos as proteínas séricas, tais como transferrina e albumina têm sido apontadas como os responsáveis pela atividade antitumoral de complexos de rutênio. Ensaio realizado com a BSA mostram que os complexos apresentam ligações com BSA, sugerindo um possível mecanismo de entrada dos complexos intracelularmente. Segundo os dados de interação dos complexos com a BSA e o comportamento dos complexos *in vitro* nos ensaios de viabilidade celular não apresentam nenhuma relação, mas isso não descarta a possibilidade da interação do complexo com a BSA. Estes resultados indicam que o meio de ação dos compostos não está atrelado somente à interação destes com a proteína do sangue a BSA.

A princípio, os ensaios de viabilidade realizados em dois diferentes tempos com a linhagem MCF-7, não mostraram mudança significativa nos valores de IC_{50} , podendo inferir que o efeito dos complexos sobre as células ocorrem num período de 48h. Além disso, os complexos foram mais ativos que o precursor $cis-[RuCl_2(dppb)bipy]$ e comparando com a cisplatina (fármaco de referência) os complexos $[Ru(O-O)(bipy)(dppb)]PF_6$ apresentaram melhor atividade citotóxica, demonstrando o seu potencial como agente antitumoral.

TABELA 33: Valores de IC₅₀ dos ligantes cinâmicos e seus complexos de Ru(II) nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e L929.

Composto	MCF-7		MDA-MB-231		L929	IS ^a
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	
α-metcn	> 200	> 200	> 200	na	> 200	-
4-metoxcn	> 200	> 200	> 200	na	> 200	-
3,4-metoxocn	> 200	> 200	> 200	na	> 200	-
4-hidroxcn	> 200	> 200	> 200	na	> 200	-
3,4-dihidroxcn	> 200	> 200	> 200	na	> 200	-
[Ru(α-metcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	3,42 ± 1,04	2,53 ± 0,15	0,31 ± 0,04	na	1,29 ± 0,25	4,2
[Ru(4-metoxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	3,99 ± 0,87	2,49 ± 1,30	0,23 ± 0,02	na	0,72 ± 0,06	3,1
[Ru(3,4-metoxocn)(dppb)(bipy)]PF ₆	5,58 ± 1,14	4,16 ± 0,87	0,33 ± 0,05	na	1,18 ± 0,14	3,6
[Ru(4-hidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	10,67 ± 0,49	7,88 ± 0,37	≈ 0,26	na	2,69 ± 0,36	10,3
[Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF ₆	7,51 ± 0,34	5,87 ± 0,20	1,97 ± 0,34	na	11,94 ± 0,80	6,1
Cisplatina	8,91 ± 2,59	18,58 ± 3,77	2,43 ± 0,20	0,98 ± 0,08	20,14 ± 0,19	8,3
Doxorubicina	2,29 ± 0,01	2,49 ± 0,41	3,67 ± 0,15	4,69 ± 0,19	13,40 ± 0,51	3,7

na- não avaliado / ^a índice de seletividade IS = IC₅₀^{L929} / IC₅₀^{MDA-MB-231} nas 48 horas

4.3 Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, onde O-O = derivados de ácido salicílico.

4.3.1 Ácido Salicílico

O ácido salicílico é um dos ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. Compostos desta série são derivados de ácidos benzóico, possuindo sete átomos de carbono (C6-C1)¹⁰⁵. Estas características conferem propriedades antioxidantes para esta série de compostos e seus derivados⁸⁴.

O ácido salicílico foi descoberto devido às suas propriedades antipirética e analgésica. Em 1827, foi isolado da casca do salgueiro o seu princípio ativo, a salicilina. Dele se extrai o álcool salicílico, que é oxidado para ácido salicílico¹¹¹.

Os complexos de rutênio II com ácido salicílico, aminosalicílico e 2,4-dihidroxibenzóico foram sintetizados a partir do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$ (FIGURA 59) no qual a reação ocorre pela substituição dos íons cloretos pela coordenação do íon carboxilato do ligante. As estruturas propostas foram baseadas nas diversas técnicas utilizadas para a caracterização dos mesmos.

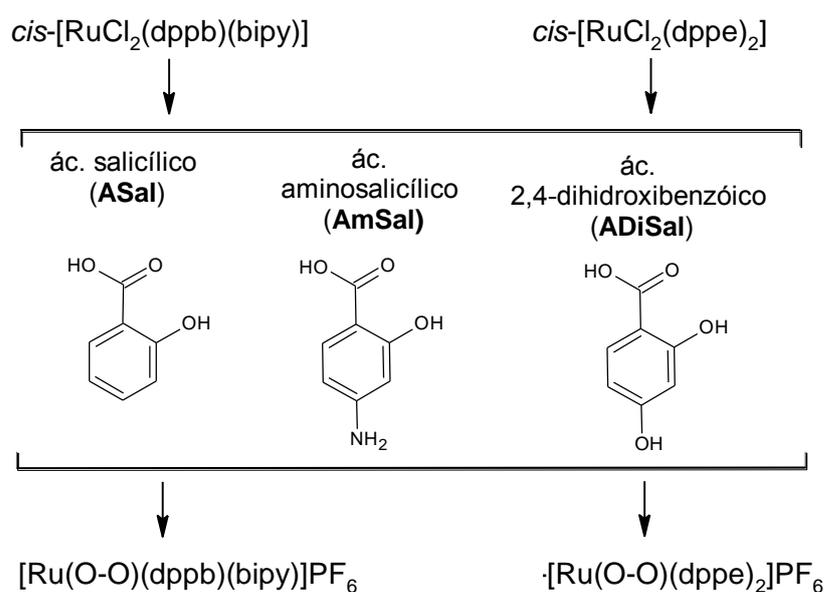


FIGURA 59: Esquema representativo da síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.

4.3.2 Condutividade molar e análise elementar

Segundo os dados da literatura⁸⁹ os valores indicam a formação de complexos iônicos (1:1). As formulações propostas na TABELA 34 estão de acordo com análises de CHN, IV e RMN ³¹P {¹H} que serão discutidas posteriormente.

TABELA 34: Dados de condutividade molar ($\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) para os complexos de rutênio com derivados do ácido salicílico.

Complexos	Condutividade	
	Branco	Complexo
[Ru(Asal)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,019	54,5
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,023	41,9
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,020	51,2
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	0,038	82,0
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	0,067	63,1
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆	0,059	71,0

Os dados de análise elementar dos complexos com derivados do ácido salicílico indicam a coordenação dos ligantes pelo grupo carboxilato na forma bidentada e monoaniônica, como nos outros casos anteriores. Os valores e as formulações propostas estão representados na TABELA 35.

TABELA 35: Dados percentuais para os teores de C, H e N, teóricos e experimentais dos complexos de rutênio com derivados de ácido salicílico.

Complexos	Análise elementar		
	C (%)	H (%)	N (%)
[Ru(Asal)(dppb)(bipy)]PF ₆ . ¹ / ₂ C ₆ H ₁₂	57,21 (57,14)	4,52 (4,80)	2,65 (2,78)
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆ . ³ / ₂ CH ₂ Cl ₂	46,76 (46,66)	3,72 (3,92)	3,09 (3,40)
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆ . ² / ₃ C ₆ H ₁₂	56,83 (56,63)	5,00 (4,88)	2,39 (2,70)
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆ . ³ / ₂ C ₆ H ₁₂	62,95 (62,38)	4,76 (5,70)	-
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆ . ¹ / ₂ C ₆ H ₁₂	60,44 (60,15)	3,66 (4,97)	1,15 (1,13)
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆ . ³ / ₄ C ₆ H ₁₂	60,99 (60,50)	4,89 (5,08)	-

(valores teóricos)

4.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho dos ligantes, apresentam uma banda alargada em torno de 3052 – 2529 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo νOH e C-H. Para o complexo com o ligante 4-aminosalicílico observa-se em 3495 e 3387 cm^{-1} , bandas intensas do estiramento assimétrico e simétrico do grupo NH_2 . Em torno de 1670 e 1470 cm^{-1} observa duas bandas media/forte referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo COO^- do grupo carboxilato. Além disso, bandas referentes às modificações dos ligantes também foram observadas. Todas as atribuições vibracionais dos ligantes encontram-se na TABELA 36.

TABELA 36: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) do ácido salicílico e derivados.

Atribuições	Ligantes (cm^{-1})		
	ASal	AmSal	ADisal
$\nu\text{OH} + \nu\text{C-H}$	3050 – 2529 f	3052 – 2535 m	3050F - 2558 m
$\nu_{\text{ass}}\text{N-H}$	-	3495 F	-
$\nu_{\text{s}}\text{N-H}$	-	3387 F	-
$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	1680 m	1665 F	1679 F
$\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{C}_{(\text{anel})}$	1611 f	encoberta	1648 F
N-H	-	encoberta	-
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1446 F	1445 m	1434 m
$\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{C}_{(\text{anel})}$	1466 F	1469 F	1476 F
γ OH	1325 m	Encoberta	1351 F
γ CO	1298 F	1297 F	1302 m
$\nu\text{C}=\text{C}$	1248 m	1229 F	1255 m
$\nu\text{C-C(=O)O}$	1210 m	1200 F	1225 m
$\nu\text{C-N}$	-	1297F/ 1169 F	-
γOH	965 f	970 m	1072 m
wagN-H	-	884 m	-
γCH	805 f	-	818 m
γCH	784 F	797 f	798 m
γCH	759 F	769 F	745 m
$\gamma\text{C}=\text{C}$	697 F	687F	687 m

F- forte; m- média; f- fraca; ν – designa uma vibração de estiramento; δ - designa uma vibração de deformação; γ - designa uma vibração de deformação fora do plano

As bandas características das vibrações $\nu(\text{O-H})$, $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$ e $\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$ dos ligantes foram observadas em torno de 3240, 1670 e 1470 cm^{-1} , respectivamente. Nos espectros dos complexos, observa-se um deslocamento das bandas $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$, $\nu_{\text{s}}(\text{C=O})$ e a ausência das bandas $\nu(\text{O-H})$ e $\delta(\text{OH})$, indicando a desprotonação do grupo OH do ácido carboxílico e sugerindo a coordenação pelo mesmo. De acordo com os valores de Δcm^{-1} do estiramento νCOO^- calculados para os ligantes e seus respectivos complexos (TABELA 36), podemos confirmar a coordenação na forma bidentada pelo íon carboxilato.

TABELA 37: Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) correspondente ao grupo carboxila do ligante livre e coordenado.

Compostos	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	Δ (cm^{-1})
ASal	1680 m	1446 F	234
AmSal	1665 F	1445 m	220
ADisal	1679 F	1434 m	245
[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆	1623 F	1435 F	188
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	1633 m	1435 m	198
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	1627 f	1434 f	193
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	1623 m	1435 m	188
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	1633 m	1435 m	198
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆	1630 m	1435 m	195

Os complexos apresentam duas bandas de vibração $\nu(\text{Ru-P})$ em torno de 527 e 508 cm^{-1} , referentes as bandas de vibração simétrica e assimétrica dos átomos de fósforos que se encontram em *cis*. Novas bandas surgem pela coordenação na região entre 497 – 417 cm^{-1} , características das vibrações $\nu(\text{Ru-N})$ e $\nu(\text{Ru-O})$, assim como, duas novas bandas de $\nu_{\text{as}}\text{P-F}$ e $\nu_{\text{s}}\text{P-F}$ referente ao contra-íon PF₆⁻. A TABELA 38 apresenta as bandas características dos complexos [Ru(L)(dppb)(bipy)]PF₆.

TABELA 38: Atribuições das frequências vibracionais (cm⁻¹) dos ligantes salicílicos e seus complexos de rutênio(II)

Atribuições	[Ru(L)(dppb)(bipy)]PF ₆			[Ru(L)(dppe) ₂]PF ₆		
	ASal	AmSal	AdiSal	ASal	AmSal	ADiSal
v _{ass} N-H	-	3483 m	-	-	3483 f	-
v _s N-H	-	3399 m	-	-	3396 m	-
v CH _(arom)	3055 m	3057 f	3058 f	3055 f	3058 f	3054 f
v _{as} CH	2926 f	2926 f	2926 f	2932 f	2930 f	2931 f
v _s CH	2859 f	2860 f	2857 f	2851 f	2850 f	2850 f
v _{as} COO ⁻	1623 F	1633 m	1627 f	1627 m	1633 m	1630 f
v _{as} C=N	1592 f	1603 f	1603 f	encoberta	encoberta	1587 f
v _s C=N + vC=C	1552 f	1579 f	1572 f	1592 f	1578 f	1572 f
vC=C _(anel)	1522 m	1507 f	1532 m	1522 f	1507 f	1532 m
vC=C _(bifos.)	1487m/ 1466 F	1484f/ 1455m	1485/ 1465 f	1487m/ 1466 F	1485 f/ 1456 m	1491 m/ 1462 f
v _s COO ⁻	1435 m	1435 m	1434 m	1435 m	1435 m	1435 m
vC=C	1398 F	1385 m	1410 m	1398 m	1385 m	1411 m
vO-H	1314 m	1303 f	encoberta	1314 f	1306 f	1315 f
γ CO	1249 m	1227 f	1262 f	1250 m	1227 f	1266 m
vP-C	1098 F	1096 m	1096 f	1098 F	1096 m	1098 m
γ CO	1028 f	1025 f	1028 f	1028 f	1027 f	1027 f
vP-C	1000 f	1001 f	998 f	1000 f	1000 f	1000 m
v _{as} P-F	843 F	843 F	842 F	839 F	842 F	840 F
γCH	746 F	741 m	742 m	746 m	747 m	746 m
γ anel	697 F	698 m	698 m	698 F	697 F	697 F
vP-CH ₂	672 m	641 m	642 f	672 m	674 f	646 f
v _s P-F	557 m	558 m	558 m	557 m	558 m	558 m
vRu-P	527F/ 511 m	515m/ 508m	515m/ 508 m	527 F/ 511m	527 F/ 513m	527 m/ 510f
vRu-O	496 m	489 f	492 f	496 m	496 m	497 f
vRu-N	417 f	425 f	431 f	417 f	419 f	420 f

F- forte; m- média; f- fraca; v – designa uma vibração de estiramento; δ - designa uma vibração de deformação; γ - designa uma vibração de deformação fora do plano

4.3.4 Espectrometria de massa

Nesta série com ácido salicílico e derivados, a espectrometria de massa complementou os dados de análise elementar para o composto $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ que apresenta somente carbono e hidrogênio na microanálise.

O perfil isotopomérico com sete isótopos do átomo de rutênio foi apresentado para o composto $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.

No espectro da FIGURA 60 observa-se o pico base do íon monocarregado $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ em m/z 1035,585 Da (experimental m/z 1035,200 Da) referente a perda do contra-íon PF_6 gerando a espécie $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]^+$. Além disso, observa-se o pico de alta intensidade referente ao íon $[\text{M}-\text{PF}_6^-(\text{ASal})-\text{H}]^+$ m/z 898,511 (experimental m/z 897,901 Da) gerado pela saída do ligante ASal.

Nos espectros de massa dos complexos com ácido gálico e derivados (AG, ABz e AGM) já discutidos anteriormente, observamos a formação de um pico referente a perda de parte do ligante. Neste caso também pode-se observar o mesmo comportamento. Na FIGURA 60, nota-se a presença de um pico de baixa intensidade com m/z 929,907, o qual infere ser referente à espécie $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{OH})(\text{dppe})_2]^+$ (experimental m/z 929,942 Da).

Na FIGURA 60 encontra-se o espectro de massa simulado do complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. O espectro teórico do padrão isotopomérico do pico base $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ pode ser verificado na FIGURA 61.

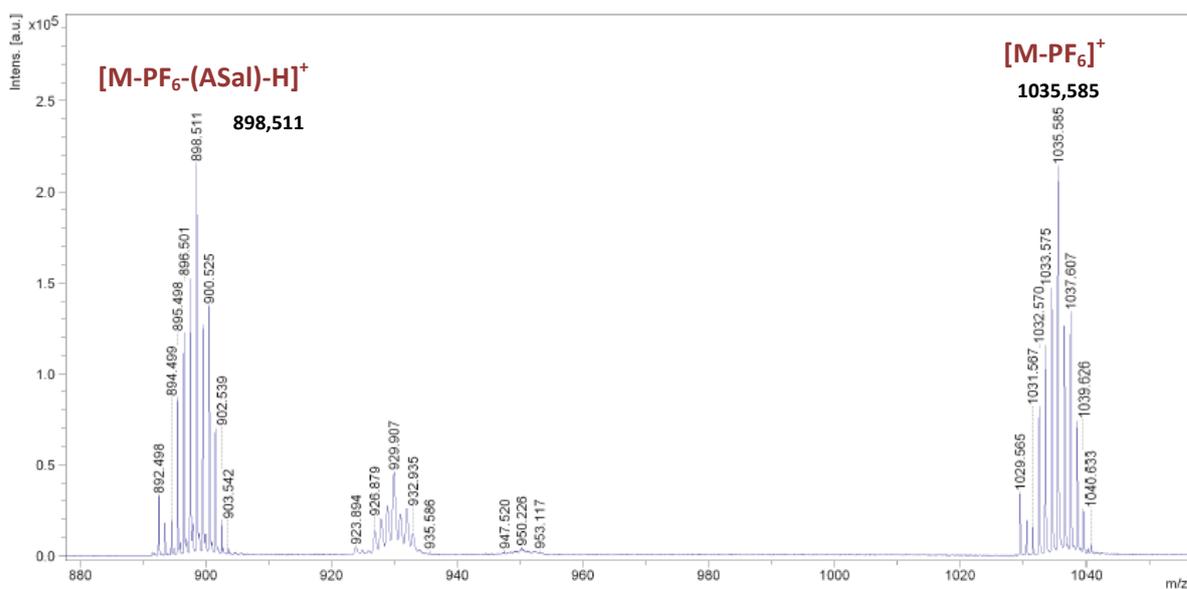


FIGURA 60: Espectro de massa MALDI-TOF, do complexo $[Ru(ASal)(dppe)_2]PF_6$.

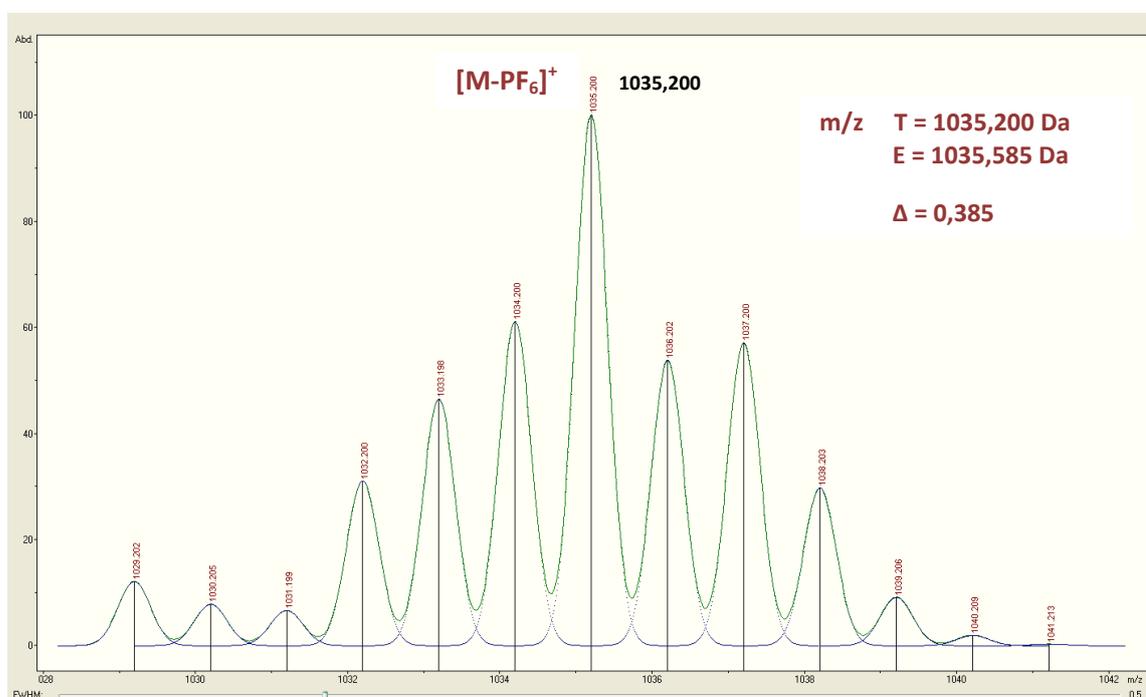


FIGURA 61: Espectro teórico do pico base $[M-PF_6]^+$ do complexo $[Ru(ASal)(dppe)_2]PF_6$.

4.3.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível

Os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível dos ligantes ácido salicílico e ácido 2,4-dihidroxibenzoico apresenta somente uma banda em torno de 306 e 320 nm, respectivamente, enquanto que para o ligante ácido *p*-aminosalicílico observa-se duas bandas em 282 e 306 nm.

Todas estas bandas são referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligante. Na FIGURA 62 estão apresentados os espectros dos ligantes.

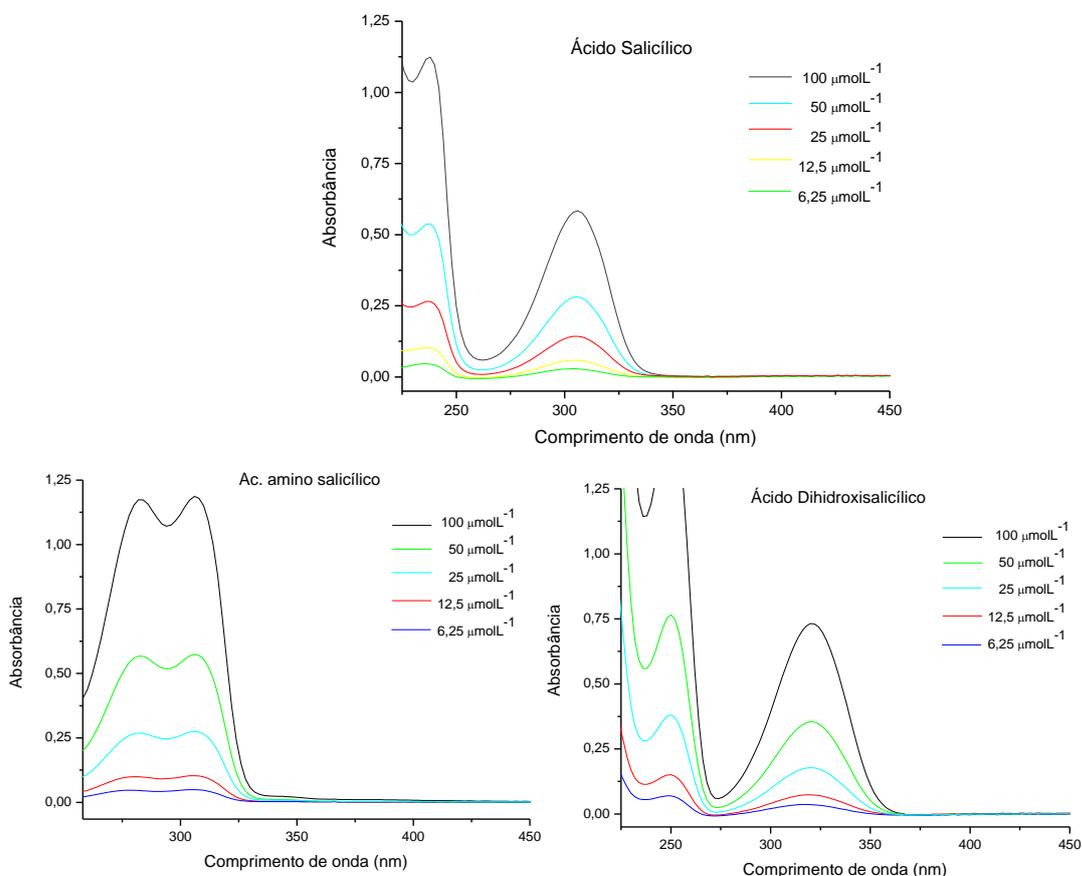


FIGURA 62: Espectro de absorção na região do UV-vis para os ligantes do ácido salicílico e derivados em n-octanol.

Analisando-se os dados da TABELA 39 observa-se que todos os espectros eletrônicos dos complexos e suas transições são muito semelhantes. As bandas observadas em torno de 264 -302 nm são referentes às transições intraligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ com contribuições dos ligantes (bipy, dppb, dppe, ASal, AmSal e ADiSal). As bandas em torno de 346 – 426 nm são atribuídas como transferência de carga metal-ligante (TCML) dos orbitais $d\pi_{Ru} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi_{(bifosfina)}$ e $d\pi_{Ru} \rightarrow \pi^*_{(ligantes)}$.

As bandas de maior energia em torno de 250 nm foram atribuídas como sendo bandas de absorção do solvente.

As bandas de transições *d-d* possuem baixos valores de coeficientes de extinção molar e são facilmente encobertas por outras bandas, por isso não foram detectadas nestes complexos.

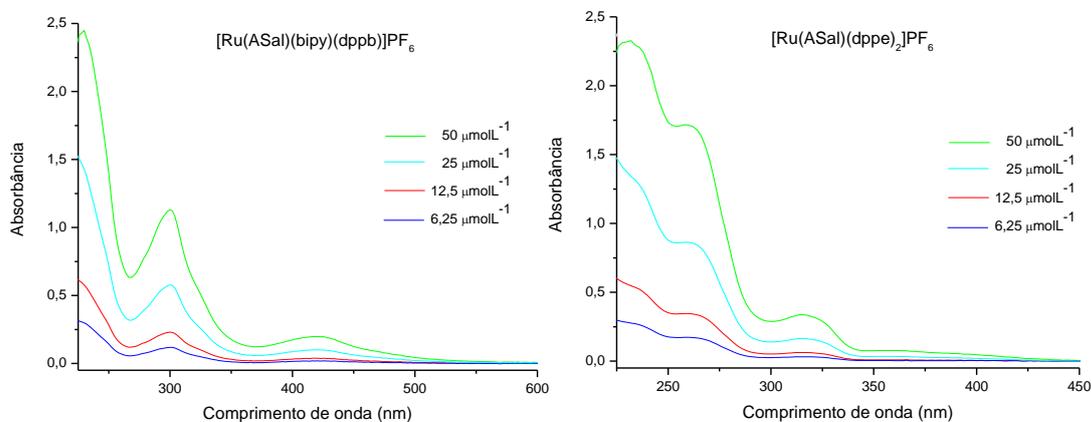


FIGURA 63: Espectro de absorção na região do UV-vis para os complexos $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ em *n*-octanol.

TABELA 39: Dados dos espectros eletrônicos do ácido salicílico e derivados e seus complexos de rutênio; solvente *n*-octanol.

Complexos	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)	TCML
		$d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow 3p\sigma^* d\pi_{(\text{bifosfina})}$ $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow \pi^*_{(\text{ligantes/ bipy})}$
ASal	306 (5729)	-
AmSal	282 (10602) / 306 (11429)	-
ADisal	320 (6726)	-
$[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	300 (23376)	420 (3940)
$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	302 (27100)	430 (3716)
$[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298 (17068)	416 (3366)
$[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	258 (34452) / 316 (6845)	-
$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	292 (11146) / 322 (18255)	-
$[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	264 (24189) / 328 (2578)	-

($\epsilon / \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$)

4.3.6 Ensaios de coeficiente de partição

Neste sistema, também foi utilizado água e na fase orgânica, o *n*-octanol. A partir dos dados de Log P_{OW} na TABELA 40, observamos que a maioria dos compostos, ligante e complexo, possui um caráter hidrofóbico, sendo que o ligante AmSal apresenta um caráter hidrofílico.

No geral, os valores de $\log P$ dos ligantes são mais próximo de zero, ou seja, apresentam o menor valor de $\log P$ quando comparado com os complexos que apresentam um caráter mais hidrofóbicos que os ligantes. Além disso, podemos inferir que os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ contendo uma bipyridina e uma bifosfinas coordenada apresentam uma caráter mais hidrofóbico que os complexos contendo duas bifosfinas dppe, $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$

TABELA 40: Dados de ϵ e $\text{Log } P_{\text{ow}}$ do ácido salicílico e derivados e seus complexos de rutênio em n-octanol.

Complexos	ϵ	$\text{Log } P_{\text{ow}}$
ASal	5729 ± 101 (306 nm)	$0,347 \pm 0,035$
AmSal	11429 ± 720 (306 nm)	$-0,223 \pm 0,038$
AdiSal	6726 ± 655 (320 nm)	$0,065 \pm 0,005$
$[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	23376 ± 634 (300 nm)	$1,241 \pm 0,360$
$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	27100 ± 2097 (302 nm)	$0,674 \pm 0,001$
$[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	17068 ± 828 (298 nm)	$0,935 \pm 0,014$
$[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	6845 ± 475 (316 nm)	$0,296 \pm 0,031$
$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	18255 ± 678 (322 nm)	$0,777 \pm 0,004$
$[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	24189 ± 238 (264 nm)	$0,488 \pm 0,032$

4.3.7 Difração de raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ foram determinadas e os dados cristalográficos destes complexos foram comparados observando modificações nos comprimentos das ligações (TABELA 41). Ambos os complexos apresentam uma estrutura octaédrica distorcida com grupo espacial $C2/c$ e os dados de refinamento encontram-se no apêndice.

A maioria dos comprimentos de ligação dos dois complexos apresentam um aumento em torno $0,07 \text{ \AA}$ nas ligações do complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ para o $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, no entanto quando

avaliamos os comprimentos de ligação do diferentes ligantes ASal e AmSal coordenados, a variação é maior e assim algumas observações podem ser feitas.

A diferença estrutural dos dois complexos $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, se dá pela diferença nos ligantes salicilatos, onde o ligante AmSal difere do ASal pelo grupo amino (NH_2) na posição *para* no anel.

Quando se compara o grupo carboxilato coordenado ao metal dos dois complexos nota-se que a ligação C(1)-O(1) ou C(1)-O(2) apresentam maior comprimento de ligação para o complexo com o ligante AmSal. Assim também observamos que o grupo fenol C(3)-O(3) do AmSal apresenta maior comprimento de ligação do que o ASal.

Em ambos os casos, a estrutura de raios X destes complexos foram obtidos os isômeros de ligação, onde os ligantes ASal e AmSal encontram-se com o grupo fenol em diferentes posições. Isto pode ser explicado pela livre rotação da molécula na ligação C(1)-C(2) dos ligantes. As estruturas dos complexos com a desordem do anel encontra-se no apêndice

TABELA 41: Principais distâncias de ligação [\AA] para o complexo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.

	$[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	
	ASal	AmSal
Ru-O(1) <i>trans</i> P	2,190	2,219
Ru-O(2) <i>trans</i> P	2,212	2,190
Ru-P(2)	2,381	2,369
Ru-P <i>trans</i> O(1)	2,308	2,302
Ru-P(4)	2,371	2,388
Ru-P <i>trans</i> O(2)	2,295	2,301
C(1)-O(1) <i>trans</i> P	1,260	1,271
C(1)-O(2) <i>trans</i> P	1,285	1,293
C(3)-O(3)	1,298	1,344

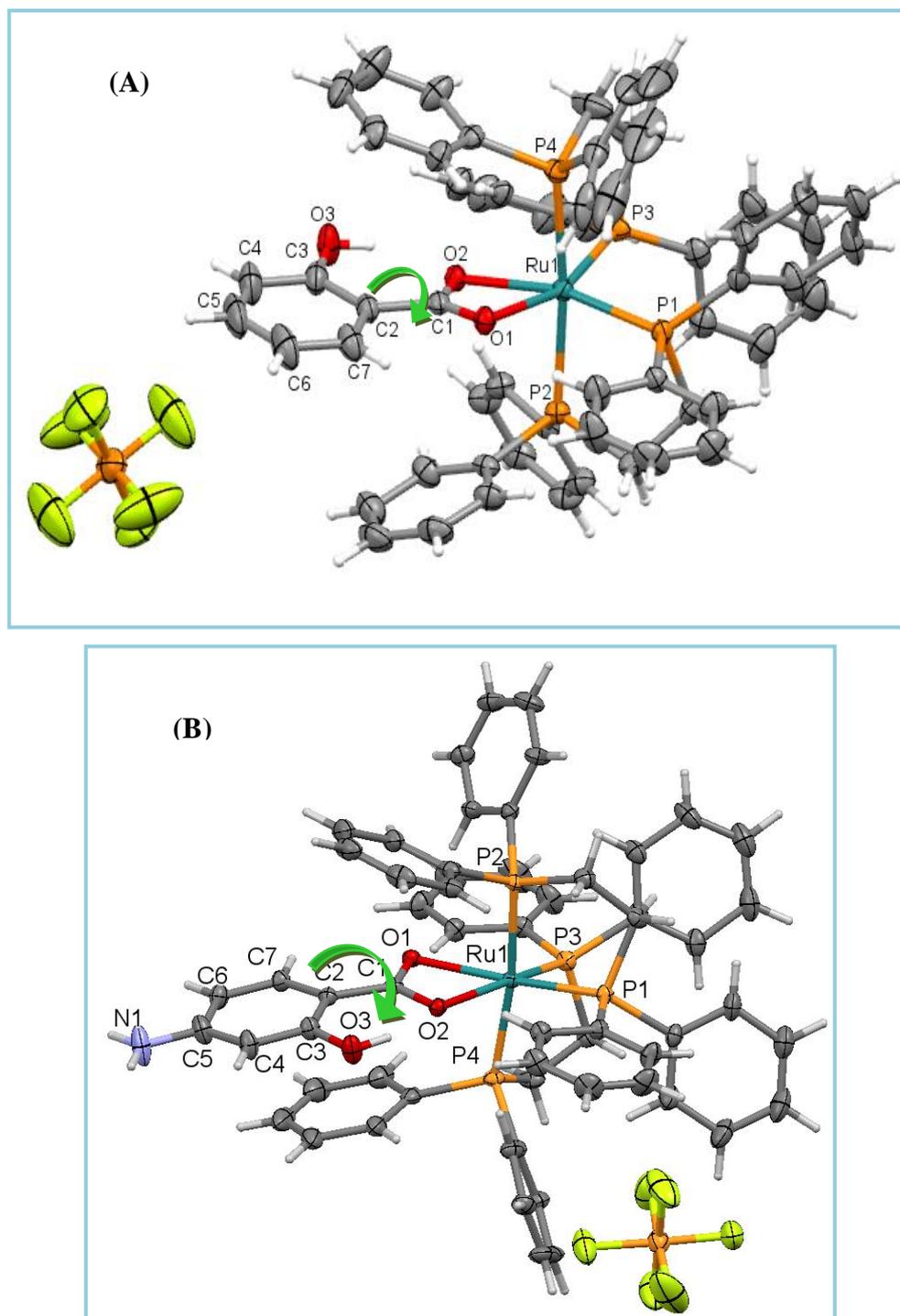


FIGURA 64: Estrutura cristalográfica para os complexos (A) $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e (B) $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.

4.3.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ^{31}P dos complexos $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ onde $\text{O}-\text{O} = \text{ASal}$, AmSal e ADiSal , apresentam dois dupletos em torno de δ 49 ppm e δ 44 ppm (FIGURA 65). Em relação ao

espectro do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)], onde os dupletos aparecem em δ 42,2 ppm e δ 30,5 ppm, observa-se que com a coordenação do ligante um deslocamento para campo baixo assim como uma aproximação entre os sinais ocorre. Os espectros dos demais complexos encontram-se no apêndice.

SpinWorks 2.5: ORIENTADOR ALZIR

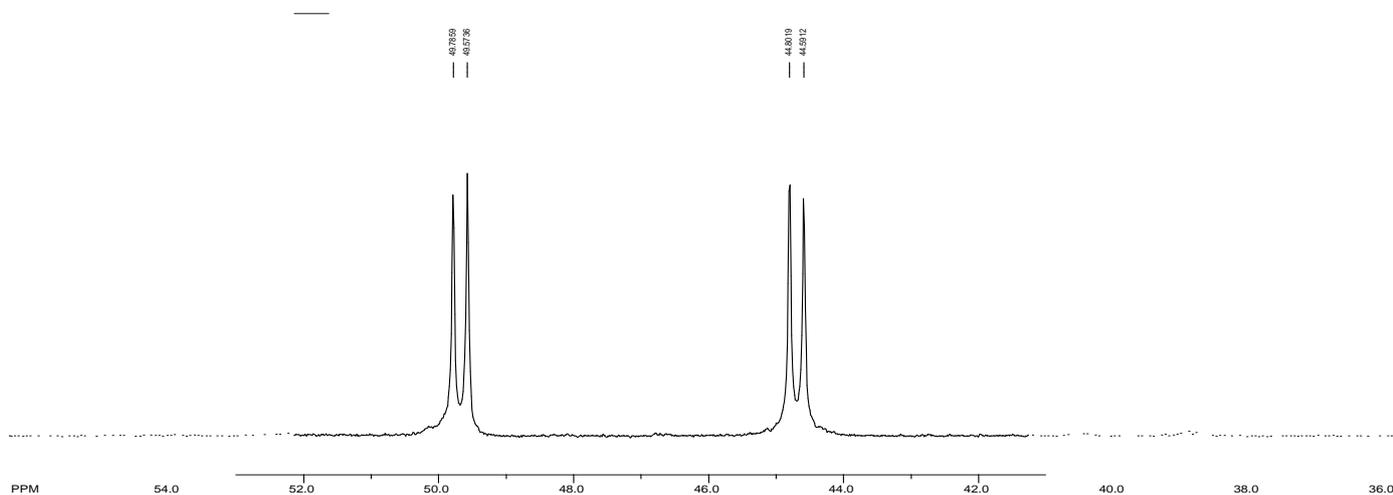


FIGURA 65: Espectro de RMN de ³¹P{¹H} do complexo [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF₆, em CH₂Cl₂.

Como já discutido na série do ácido gálico, o espectro de RMN de fósforo do precursor *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] apresenta um conjunto de dois tripletos δ 50,3 e δ 37,3 ppm que é um padrão típico para bifosfinas *cis* posicionadas a dois ligantes iguais que completam a esfera de coordenação. Os átomos de fósforo estão *trans* a elementos quimicamente equivalentes, mas magneticamente diferentes, justificando a presença de um par de tripletos (FIGURA 20). Nos espectros dos complexos formados deste precursor com os ligantes O-O = ASal, AmSal e ADiSal de fórmula [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆, esperaria a presença de dois tripletos pois o ambiente químico ainda é equivalente, mas o que foi observado em alguns casos a formações de sinais alargados e mal definidos.

De acordo com a estrutura cristalográfica dos complexos [Ru(ASal)(dppe)₂]PF₆ e [Ru(AmSal)(dppe)₂]PF₆, observamos que o ligante apresenta um giro do anel na ligação C(1)-C(2), a rotação da molécula que é assimétrica devido a presença do grupo fenol na posição *orto*, modifica o

ambiente magnético da molécula, duplicando os sinais, ou seja, a formação de dois pares de tripletos. Dependendo do ligante este desdobramento dos sinais é mais sentido do que para outros, como pode ser observado nos espectros dos complexos na FIGURA 66.

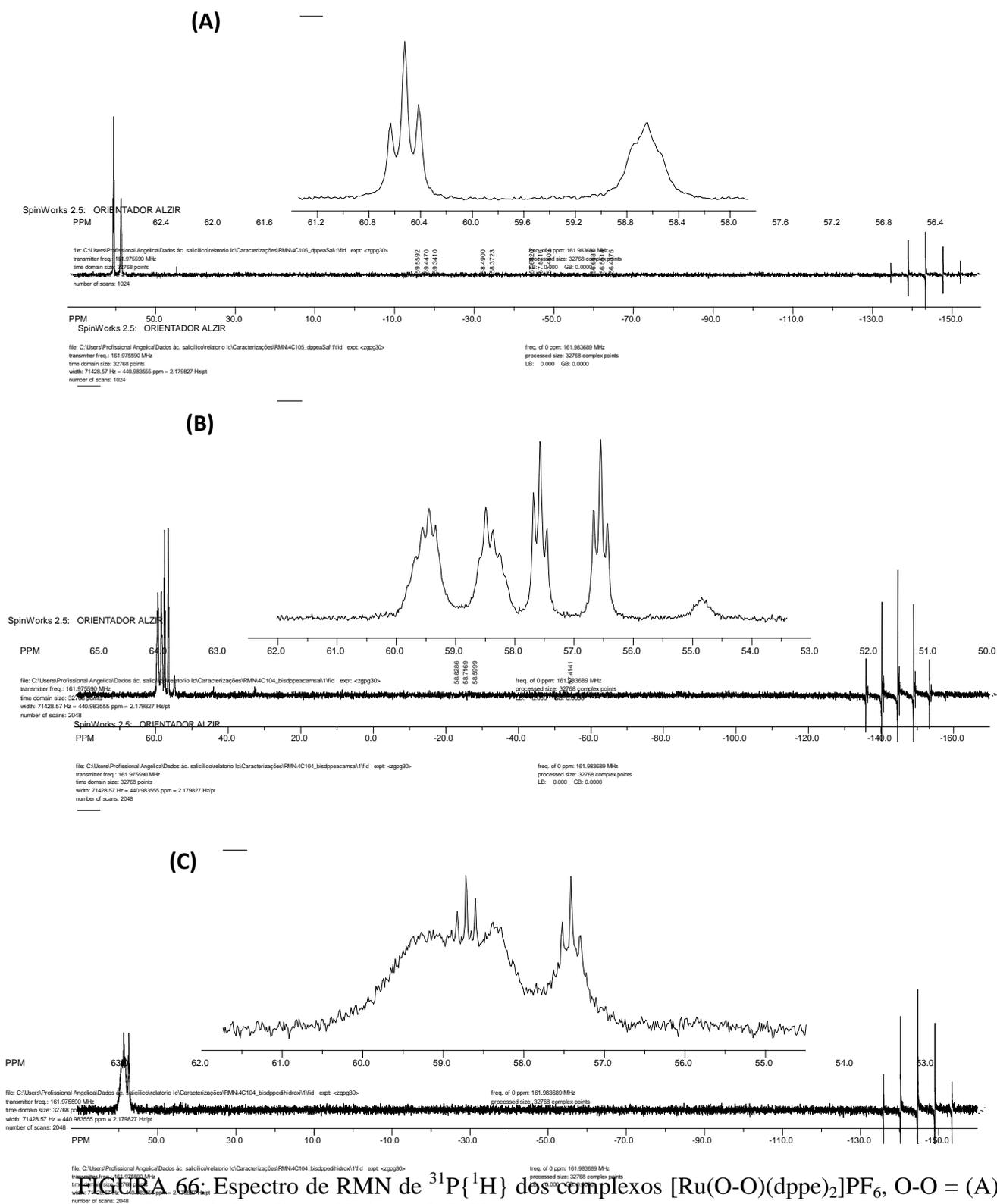


FIGURA 66: Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, O-O = (A) ASal, (B) AmSal e (C) ADiSal, em CH_2Cl_2 .

TABELA 42: Valores de deslocamentos químicos (δ), constante de acoplamento para os complexos de rutênio (CH_2Cl_2).

	$\delta^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^2J_{\text{P-P}}$ (Hz)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	42,2 e 30,5	32,5
[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆	49,6 e 44,6	34,4
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	49,8 e 44,7	34,1
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	50,8 e 46,2	33,4
	$\delta^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^3J_{\text{P-P}}$ (Hz)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppe) ₂]	50,3 e 37,3	19,6
[Ru(ASal)(dppe) ₂]]PF ₆	60,5 e 58,6 (t)	-
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]]PF ₆	58,9 (m) /57,7 e 56,5(t)	-
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]]PF ₆	58,7 e 57,4 (m)	-

4.3.9 Estudo Eletroquímico

Nos voltamogramas cíclicos dos ligantes observa-se processo de oxidação irreversível (FIGURA 67), exceto para o ligante ASal (ácido salicílico), que não apresenta processo eletroquímico na região estudada. Como mencionado anteriormente este processo refere-se a oxidação do fenol¹⁰⁹. Em geral a oxidação do fenol leva à formação de um íon fenolato, que pode ser oxidado facilmente a um radical fenoxil. Este radical pode ser submetido a reações químicas posteriores, tais como acoplamento (polímeros), a perda de prótons, ou ataque nucleofílico estabilizando o elétron e dificultando a reversibilidade da molécula¹¹⁰.

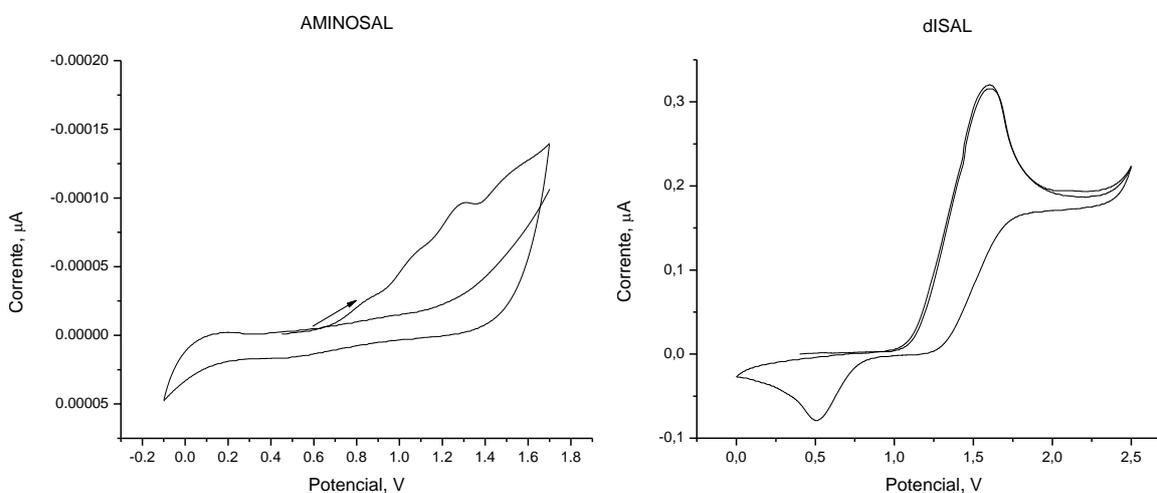


FIGURA 67: Voltamograma cíclico dos ligantes AmSal e ADiSal, respectivamente (0,1 mol L⁻¹ PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl)

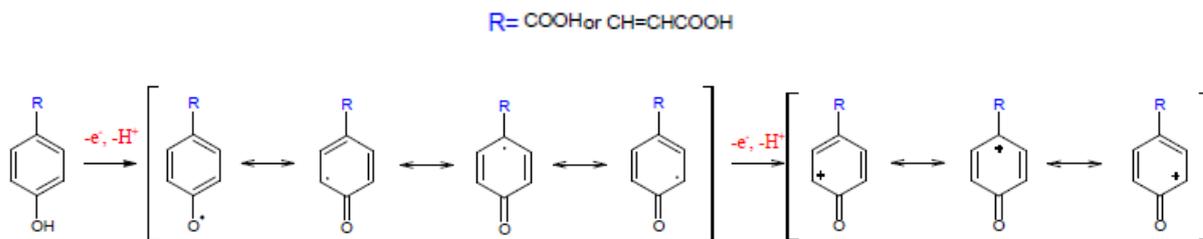


FIGURA 68: Representação da oxidação eletroquímica de compostos fenólicos¹⁰⁹.

Os voltamogramas cíclicos dos complexos do tipo [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆, com os ligantes ASal e AmSal (apêndice), apresentam um processo quase-reversível atribuído ao par redox Ru^{III}/ Ru^{II} (TABELA 43). O complexo com o ligante ADiSal apresenta um processo de oxidação irreversível, como pode ser visto na FIGURA 69.

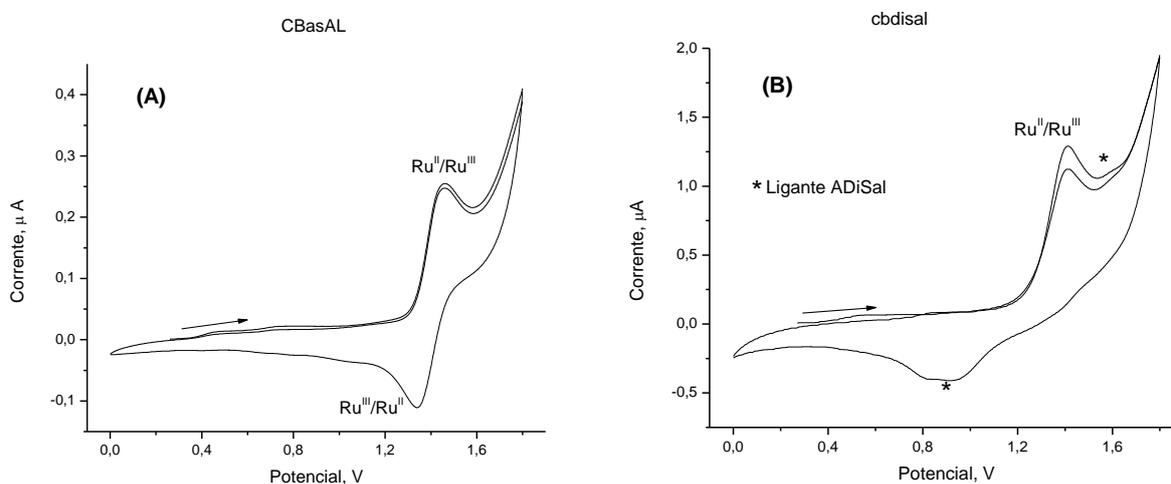


FIGURA 69: Voltamogramas cíclico dos complexos [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF₆, respectivamente, obtidos em CH₂Cl₂ (0,1 µ mol L⁻¹ PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

Os voltamogramas dos complexos com o precursor [RuCl₂(dppe)₂] apresentam outro comportamento eletroquímico. Os complexos com os ligantes ASal e AmSal apresentam processo de oxidação irreversível, enquanto que o complexo com o ligante ADiSal (FIGURA 70) possui um processo quase-reversível referente ao par redox Ru^{II}/Ru^{III}. Os outros processos observados são referentes a processo do ligante e do solvente.

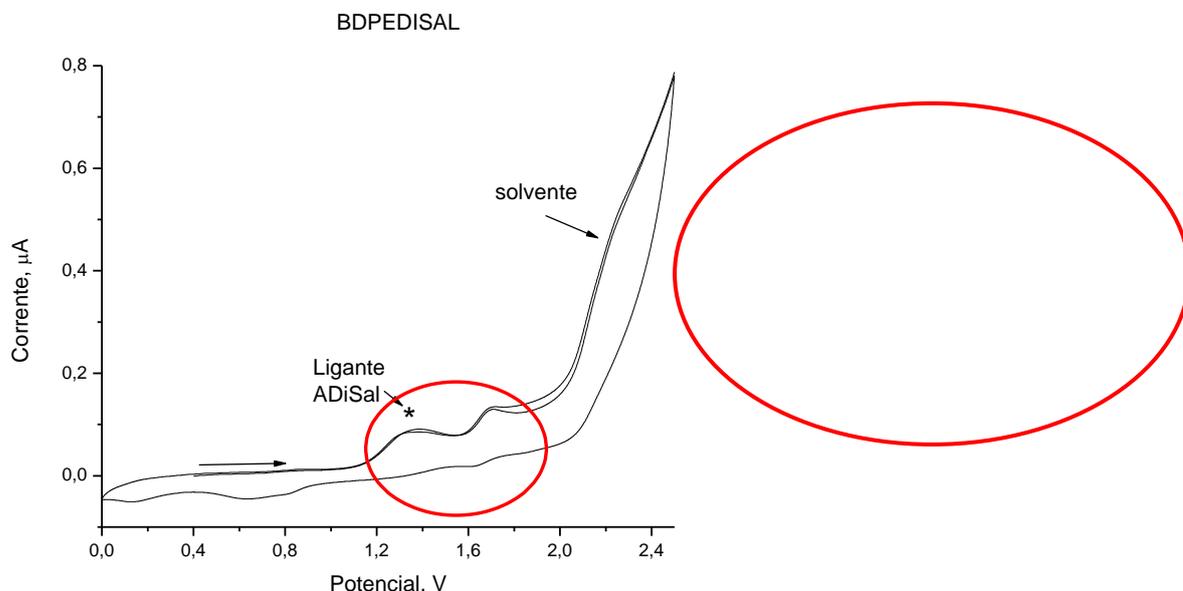


FIGURA 70: Voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, respectivamente, obtidos em CH_2Cl_2 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

Na TABELA 43 encontram-se os dados eletroquímicos dos complexos precursores e dos novos complexos de Ru(II) com ácido salicílico e seus derivados.

TABELA 43: Dados de voltametria cíclica (V) para os complexos de rutênio com ASal, AmSal e ADiSal ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

Complexos	E_{p_a} (V)	E_{p_c} (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE_p
$[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	0,74	0,63	0,68	0,11
$[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,45	1,34	1,40	0,11
$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,44	1,33	1,38	0,11
$[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,40	-	-	-
$\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$	0,94	0,81	0,87	-
$[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1,69	-	-	-
$[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1,94	-	-	-
$[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$	1,72	1,61	1,66	0,12

4.3.10 Avaliação do potencial biológico dos complexos de rutênio com ácido salicílico e derivados

4.3.10.1 Estudos de Interação com albumina bovina

A FIGURA 71 apresenta o espectro de fluorescência da BSA na presença do complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, onde é possível observar a diminuição na

intensidade de fluorescência a partir das diferentes concentrações do complexo, indicando interação com a BSA. Para os complexos com Asal e AmSal (apêndice) observa-se que com o aumento da concentração do complexo ocorre a formação de uma nova banda em torno de 420 nm. Esta nova banda é referente a fluorescência de emissão do complexo quando excitado em 280nm.

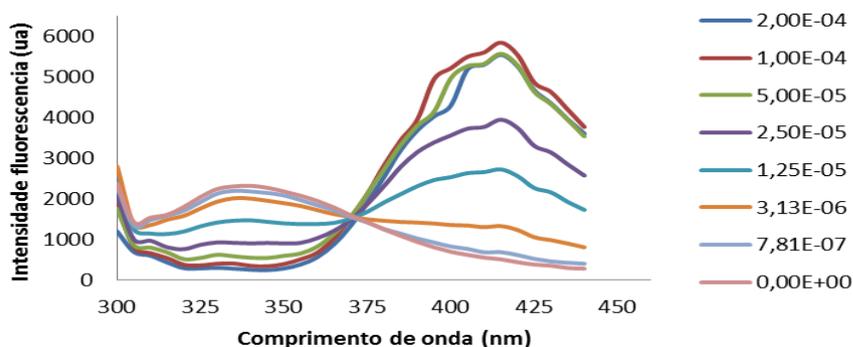


FIGURA 71: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

De acordo com os valores obtidos para K_{sv} na TABELA 44 observa-se para os ligantes não houve variação da constante de supressão K_{sv} com o aumento de temperatura. Porém, os valores de k_q são maiores do que o valor máximo possível para o mecanismo dinâmico ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Quando se avalia os ligantes coordenados, observa-se que para os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (onde O-O = ASal, AmSal, ADiSal) com o aumento de temperatura ocorre um aumento no valor da constante K_{sv} porém os valores de k_q são maiores do que o valor máximo $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. No entanto quando analisamos os dados para os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ (onde O-O = ASal, AmSal, ADiSal) observamos que os valores da constante K_{sv} diminui com o aumento da temperatura, condizendo com os valores de k_q para um processo de interação estático.

A FIGURA 72 apresenta como exemplo o gráfico, que exhibe a relação da supressão da BSA com o complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em diferentes temperaturas. Os gráficos dos outros complexos e ligantes encontram-se no apêndice.

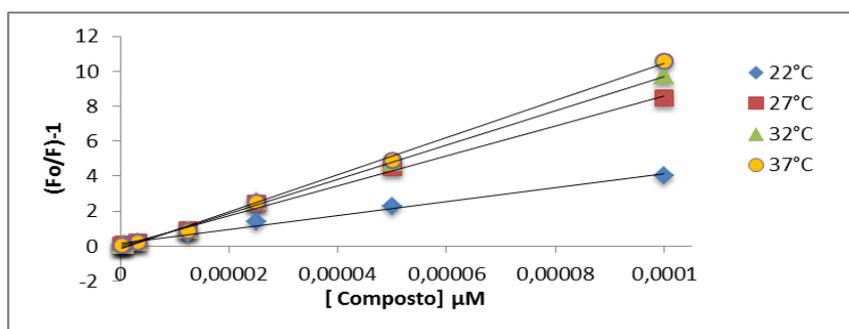


FIGURA 72: Gráfico de Stern-Volmer de $(F_0/F)-1$ vs $[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações de $[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF_6$ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. $\{[BSA] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\}$.

A TABELA 44 resume os valores obtidos a constante de Stern-Volmer K_{sv} , constante velocidade de supressão biomolecular (k_q), calculados considerando que o tempo de vida (τ_0) de um triptofano na albumina no estado excitado é cerca de 10^{-8} s.

Analisando os valores das constantes de ligação K_b (TABELA 44) para os ligantes, observamos que somente o ASal apresenta uma redução dos valores de K_b com o aumento da temperatura indicando um processo de supressão estático, todos os outros complexos e ligantes apresentaram um aumento da constante K_b com o elevação da temperatura sugerindo as supressões dinâmica e estática.

Os complexos do tipo $[Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF_6$ são os que apresentaram os maiores valores de constante de K_b em relação aos complexos de fórmula geral $[Ru(O-O)(dppe)_2]PF_6$, (onde O-O = ASal, AmSal, ADiSal), indicando força de interação fraca á moderada entre complexo e BSA.

TABELA 44: Constante de ligação de Stern-Volmer (K_{sv}) e valores de supressão bimolecular (k_q) para os complexo rutênio e os ligantes ASal, AmSal e ADiSal

Compostos	T (K)	K_{sv} (10^4 L mol^{-1})	k_q ($10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	R^2
ASal	295	(0,97 ± 10)	1,4	0,9994
	300	(1,02 ± 19)	1,5	0,9996
	305	(1,03 ± 200)	1,5	0,9995
	310	(1,06 ± 339)	1,5	0,9996
AmSal	295	(0,24 ± 91)	0,36	0,9992
	300	(0,26 ± 101)	0,38	0,9996
	305	(0,26 ± 119)	0,39	0,9996
	310	(0,26 ± 53)	0,38	0,9998
ADiSal	295	(0,45 ± 0,03)	0,66	0,9970
	300	(0,46 ± 0,03)	0,67	0,9972
	305	(0,47 ± 0,01)	0,69	0,9966
	310	(0,46 ± 0,01)	0,67	0,9992
[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(3,93 ± 0,05)	5,7	0,9995
	300	(8,78 ± 0,22)	13,0	0,9982
	305	(9,73 ± 0,13)	14,0	0,9986
	310	(10,66 ± 0,16)	15,0	0,9977
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(2,39 ± 0,16)	3,5	0,9993
	300	(4,48 ± 0,22)	6,5	0,9995
	305	(4,78 ± 0,21)	6,9	0,9996
	310	(4,86 ± 0,10)	7,0	0,9996
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	(4,38 ± 0,09)	6,4	0,9983
	300	(11,58 ± 0,16)	17,0	0,9945
	305	(13,41 ± 0,27)	19,0	0,9953
	310	(14,53 ± 0,75)	21,0	0,9834
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	295	(1,86 ± 0,08)	2,7	0,9994
	300	(1,79 ± 0,03)	2,4	0,9996
	305	(1,73 ± 0,22)	2,5	0,9995
	310	(1,78 ± 0,18)	2,6	0,9970
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	295	(1,89 ± 0,07)	2,7	0,9974
	300	(1,74 ± 0,10)	2,5	0,9958
	305	(1,67 ± 0,07)	2,4	0,9969
	310	(1,57 ± 0,02)	2,3	0,9942
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆	295	(1,90 ± 0,08)	2,8	0,9983
	300	(1,78 ± 0,07)	2,6	0,9986
	305	(1,79 ± 0,05)	2,6	0,9984
	310	(1,66 ± 0,22)	2,4	0,9972

A FIGURA 73 mostra o gráfico da equação modificada de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da BSA com o complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ nas temperaturas, 295, 300, 305 e 310 K.

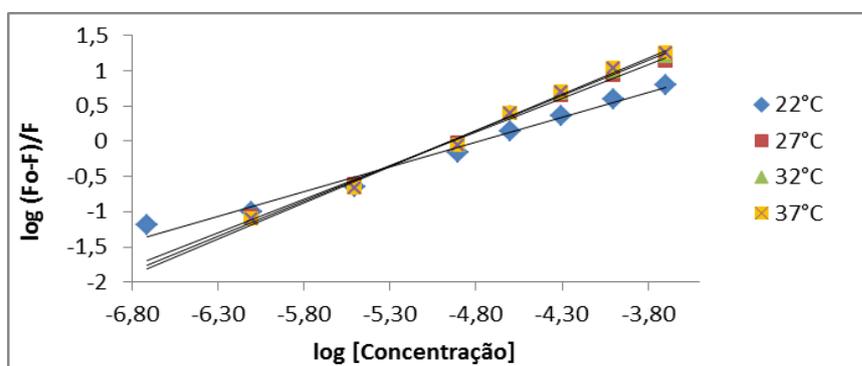


FIGURA 73: Gráfico da equação de $\log(\text{Fo}-\text{F})/\text{F}$ vs $\log[\text{Q}]$ para BSA na presença de diferentes concentrações $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ para diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. $[\text{BSA}] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Na TABELA 45 estão apresentados os valores das constantes de ligação K_b e n em diferentes temperaturas para os complexos sintetizados e seus respectivos ligantes.

TABELA 45: Parâmetros de ligação para BSA com os complexo rutênio e os ligantes ASal, AmSal e ADiSal (solução 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4.)

Compostos	T (K)	K_b (L mol^{-1})	n	R^2
ASal	295	$(2,55 \pm 10,46) \times 10^2$	0,58	0,9972
	300	$(8,34 \pm 0,27) \times 10$	0,50	0,9967
	305	$(6,96 \pm 0,10) \times 10$	0,50	0,9991
	310	$(5,93 \pm 0,23) \times 10$	0,48	0,9969
AmSal	295	$(5,32 \pm 0,06)$	0,29	0,9899
	300	$(7,20 \pm 0,85)$	0,32	0,9998
	305	$(9,18 \pm 1,73)$	0,36	0,9998
	310	$(10,24 \pm 0,94)$	0,34	0,9728
ADiSal	295	$(5,73 \pm 0,27) 10^2$	0,76	0,9976
	300	$(6,98 \pm 0,24) 10^2$	0,79	0,9960
	305	$(8,75 \pm 0,33) 10^2$	0,83	0,9982
	310	$(9,86 \pm 1,03) 10^2$	0,81	0,9977
[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(2,01 \pm 0,22) 10^3$	0,69	0,9832
	300	$(5,38 \pm 0,19) 10^4$	0,96	0,9971
	305	$(7,96 \pm 0,22) 10^4$	0,98	0,9938
	310	$(1,41 \pm 0,25) 10^5$	1,04	0,9999
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(8,51 \pm 0,27) 10^3$	0,89	0,9976
	300	$(9,14 \pm 0,65) 10^3$	0,81	0,9978
	305	$(1,13 \pm 0,04) 10^4$	0,84	0,9977
	310	$(1,22 \pm 0,03) 10^4$	0,85	0,9934
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	295	$(7,17 \pm 0,73) 10^3$	0,80	0,9977
	300	$(8,04 \pm 0,69) 10^4$	1,00	0,9926
	305	$(1,19 \pm 0,03) 10^5$	1,01	0,9919
	310	$(4,10 \pm 0,54) 10^5$	1,13	0,9914
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	295	$(2,08 \pm 0,14) 10^2$	0,54	0,9933
	300	$(6,86 \pm 0,31) 10^2$	0,70	0,9957
	305	$(1,79 \pm 0,03) 10^3$	0,76	0,9988
	310	$(2,46 \pm 0,10) 10^3$	0,78	0,9990
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	295	$(1,58 \pm 0,01) 10^3$	0,72	0,9967
	300	$(2,69 \pm 0,01) 10^3$	0,82	0,9995
	305	$(4,57 \pm 0,51) 10^3$	0,85	0,9992
	310	$(5,73 \pm 0,28) 10^3$	0,84	0,9994
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆	295	$(7,76 \pm 0,66) 10^2$	0,65	0,9989
	300	$(2,98 \pm 0,12) 10^3$	0,80	0,9978
	305	$(5,24 \pm 0,85) 10^3$	0,87	0,9960
	310	$(7,54 \pm 0,11) 10^3$	0,80	0,9988

Os parâmetros termodinâmicos para os complexo-BSA foram determinados a partir da equação de van't Hoff utilizando as constantes de ligação K_b . A FIGURA 74 mostra o gráfico de $\ln K_b$ vs $1/T$ para a interação da BSA com o complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

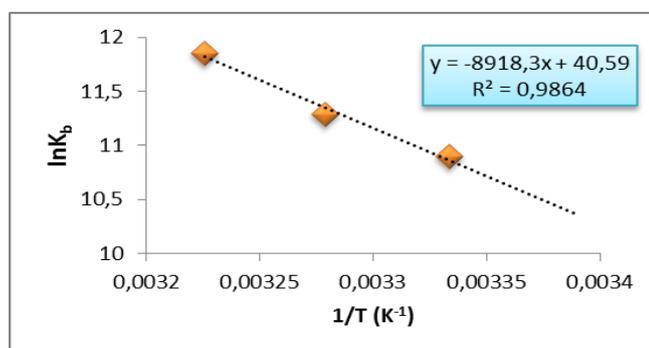


FIGURA 74: Gráficos de van't Hoff para os complexos $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.

Os estudos termodinâmicos destes compostos estão apresentados na TABELA 46 e observa-se que todos os compostos apresentam interação espontânea com a BSA, uma vez que os valores de ΔG° são negativos. Os valores de ΔG° dos compostos são mais altos com a elevação da temperatura, indicando um aumento na estabilidade da interação complexo-proteína.

Em resumo, pode-se concluir que os complexos e os ligantes AmSal e ADiSal possuem contribuições de supressão estática e dinâmica uma vez que apresentam comportamento ambíguos na relação das constantes K_{sv} e K_b . Os valores de ΔH° e ΔS° para estes compostos são positivos indicando que a interação do complexo e BSA são forças de interação hidrofóbicas.

Já o ligante ASal apresenta valores negativos de ΔH° e ΔS° e segundo a literatura este perfil corresponde a forças de van der Waals e ligações de hidrogênio entre a BSA-ligante.

TABELA 46: Parâmetros termodinâmicos para os complexos da série do ácido salicílico e derivados.

Complexos	ΔG° (kJ mol ⁻¹)				ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
	295 K	300 K	305 K	310 K		
ASal	-11,28	-11,03	-10,76	-10,52	-26,3	-51,1
AmSal	-4,10	-4,80	-5,42	-6,04	32,4	124,0
AdiSal	-15,58	-16,33	-17,07	-17,81	28,2	148,4
[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆	-25,40	-27,09	-28,78	-30,46	74,14	337,4
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	-22,21	-22,91	-23,61	-24,31	18,98	139,6
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	-21,81	-25,67	-29,53	-33,39	205,93	772,0
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	-13,14	-15,82	-18,21	-20,60	127,53	477,8
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	-18,12	-19,67	-21,23	-22,78	73,37	310,2
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆	-18,34	-19,96	-21,57	-23,19	76,98	323,2

4.3.10.2 Ensaio de viabilidade celular dos ligantes e complexos de Ru (II) com ácido salicílico e derivados.

A atividade citotóxica dos complexos sintetizados, bem como os ligantes livres do ácido salicílico e derivados e o fármaco de referência cisplatina, tiveram a sua atividade avaliada contra as linhagem celulares MCF-7 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão) e V79 (fibroblasto de pulmão Hamster chinês). Os valores de IC_{50} foram calculados após a exposição das células com os compostos durante um período de 24 e 48 horas.

Os ligantes livres não apresentaram atividade contra nenhuma linhagem celular estudada até a concentração máxima utilizada, apresentando $IC_{50} > 200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os dados de IC_{50} (TABELA 47) para os complexos mostram que com a coordenação dos ligantes apresentaram baixos valores de concentração (IC_{50}) em relação aos ligantes livres.

Nesta série foram avaliados complexos em duas linhagens diferentes de células tumorais, MCF-7 e A549. Diferentemente do que acontece nas outras séries, onde os compostos mostram-se mais ativos no câncer de mama MDA-MB-231 do que MCF-7, neste caso os complexos não apresentaram nenhuma seletividade entre as linhagens A549 e MCF-7.

Assim como acontece na série do ácido gálico, os complexos com ácido salicílico e seus derivados, apresentam diferenças nos valores de IC_{50} com os diferentes precursores. E quando se compara os valores de IC_{50} com a lipofilicidade nota-se que os complexos contendo duas bifosfinas dppe coordenadas, $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, possuem menores valores de IC_{50} e apresentam baixos valores de $\log P$ evidenciando um caráter mais hidrofílico quando comparado com os respectivos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, que possuem caráter mais hidrofóbico e altos valores de IC_{50} , como pode ser observado na FIGURA 75.

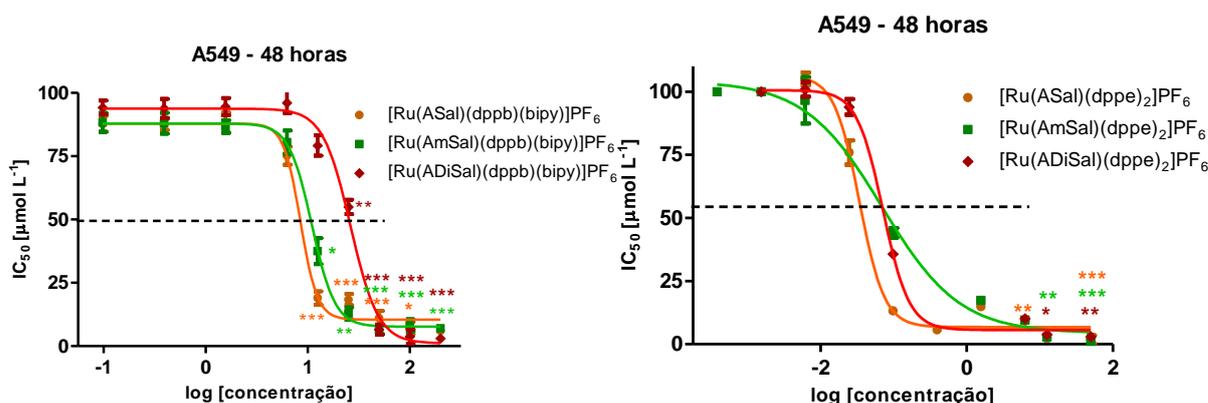


FIGURA 75: Gráfico de viabilidade celular dos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ (O-O = ASal, AmSal e ADiSal) após 48 de incubação na linhagem A549. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido pela análise post-hoc Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Além disso, comparando os valores de concentração (IC_{50}) na linhagem A549 ou MCF-7 com a linhagem normal V79 observa-se que os complexos apresentam índice de seletividade consideráveis em alguns casos. Para os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ observa-se que os maiores valores de IS acontecem com 48 horas, por exemplo, o complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ onde apresenta um IS de 3,7 em 24 horas para 10,3 em 48 horas. Já os complexos com bipy e dppb, $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, os valores de IS diminuem com o tempo.

Estas informações estão condizentes aos dados de interação com a BSA. Os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ que possuem interação fraca á moderada com a proteína (BSA) apresentam o menores valores de IC_{50} e os melhores índice de seletividade (IS) quando comparados com os complexos de formula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ que possuem interações de moderada á forte, maiores valores de IC_{50} e baixo valores de IS com o tempo. Força de ligação moderadas são interações reversíveis, evidenciando a capacidade da molécula em transportar estes complexos e libera-los com facilidade no meio celular.

TABELA 47: Valores de IC₅₀ dos ligantes ASal, AmSal e ADiSal e seus complexos de Ru(II) nas linhagens A549, MCF-7 e V79.

Compostos Tempo	A549		V79		MCF-7		IS ^a		IS ^b	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
ASal	>200	>200	>200	>200	>200	>200	-	-	-	-
AmSal	>200	>200	>200	>200	>200	>200	-	-	-	-
AdiSal	>200	>200	>200	>200	>200	>200	-	-	-	-
[Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF ₆	7,25 ± 0,45	8,33 ± 0,39	19,03 ± 0,30	5,06 ± 0,19	9,86 ± 0,18	7,55 ± 0,16	2,6	0,6	1,9	0,6
[Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	10,92 ± 0,41	10,98 ± 0,49	66,36 ± 0,29	6,35 ± 0,17	15,36 ± 0,26	14,19 ± 0,31	6,1	0,5	4,3	0,4
[Ru(ADiSal)(dppb)(bipy)]PF ₆	25,9 ± 1,12	26,60 ± 1,10	>100	15,64 ± 1,51	27,96 ± 0,58	29,00 ± 0,62	3,8	0,5	3,5	0,5
[Ru(ASal)(dppe) ₂]PF ₆	0,18 ± 0,17	0,03 ± 0,09	0,68 ± 1,09	0,31 ± 0,22	5,78 ± 0,69	0,11 ± 0,09	3,7	10,3	0,11	2,8
[Ru(AmSal)(dppe) ₂]PF ₆	0,44 ± 0,20	0,05 ± 0,16	0,25 ± 0,15	0,29 ± 0,17	0,12 ± 0,18	0,07 ± 0,12	1,7	5,8	2,08	4,1
[Ru(ADiSal)(dppe) ₂]PF ₆	2,17 ± 0,36	0,06 ± 0,14	0,36 ± 0,21	0,20 ± 0,15	0,06 ± 0,19	0,08 ± 0,09	0,2	3,3	6	2,5
cisplatina	na	14,42 ± 6,63	na	na	4,06 ± 1,38	8,91 ± 2,59	-	-	-	-

na – não avaliado / ^a índice de seletividade $IS = IC_{50}^{V79} / IC_{50}^{A549}$ / ^b índice de seletividade $IS = IC_{50}^{V79} / IC_{50}^{MCF-7}$

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentadas as sínteses e caracterizações de três séries de complexos de rutênio (17 compostos), com produtos naturais derivados do ácido gálico, ácidos cinâmicos e ácido salicílico. Ademais, os compostos contêm em suas estruturas, ligantes fosfínicos (dppb e dppe) e a 2,2'-bipiridina. Aspectos químicos e estruturais dos complexos foram discutidos e comparados entre si, e com a literatura. Além disso, o potencial antitumoral destes compostos foi avaliado em diferentes linhagens tumorais (MDA-MB-231, MCF-7, A549, L929 ou V79), assim como suas capacidades antioxidantes e interação com a proteína BSA.

O modo de coordenação dos ligantes, nas três séries, são semelhantes, todos se coordenam ao metal pelo grupo carboxilato na forma aniônica, produzindo complexos iônicos (eletrólitos 1:1), como foi mostrado pelos dados de condutividade molar.

Com os dados de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, análise elementar e espectrometria de massa pode-se confirmar a formulação proposta, do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, para os diferentes precursores, com as três séries dos ligantes. Além disso, com os cálculos de Δcm^{-1} do estiramento νCOO^- dos complexos e dos ligantes permitiu confirmar a coordenação dos ligantes de forma bidentada pelo carboxilato ao metal. Estes dados foram confirmados pelas estruturas cristalográficas obtidas de alguns complexos.

Os estudos eletroquímicos mostram o aumento da estabilidade dos complexos com a coordenação dos novos ligantes, assim como, mostra que o comportamento reversível ou irreversível dos complexos está atrelada às características eletroquímicas do ligante. O comportamento eletroquímico do ligante varia de acordo com o grupo substituinte no anel e a estabilidade do mesmo.

Os complexos da série do ácido gálico e ácidos cinâmicos foram avaliados quanto à capacidade sequestrante de radicais livres. Os ensaios com DPPH mostraram que com a coordenação a capacidade antioxidante do ácido gálico diminui, em relação ao ligante livre. No entanto, o ligante 3,4-dihidroxi ou ácido caféico, apresentou uma melhora na inibição de radicais livres com a complexação.

Os valores das constantes de interação complexo-BSA indicam que no geral os complexos apresentam um mecanismo de supressão estático, sendo que em alguns casos o processo de supressão por difusão está presente. Os ensaios mostraram que os complexos da série do ácido gálico apresentam os maiores valores de constante de ligação com a BSA, na ordem de 10^7 (interação moderada à forte), enquanto para as outras duas séries os valores variam de 10^3 à 10^5 , forças de interação fraca à moderada. Além disso, todos os complexos com formulação geral $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, independente da série dos ligantes, apresentaram valores de interação menores que seus respectivos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Este fato pode estar atrelado ao tamanho e volume destes tipos de complexos, efeitos que diminuem a eficiência da interação dos complexos com a BSA.

Estes dados vem ao encontro com os baixos valores de IC_{50} nas diferentes linhagens celulares estudadas para os mesmos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Pode-se concluir que nestes complexos, as interações complexo-BSA apresenta um comportamento mais favorável de transporte e entrega destes em relação aos seus respectivos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, que apresentam constantes de interações mais fortes e valores de IC_{50} maiores.

Capítulo 6

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa - 2014: Incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>> Acessado em: 05 de agosto de 2014.
2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014. Disponível em : <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf> > acessado em 10 de agosto de 2014.
3. FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M., “Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”. *Int J Cancer*, 127(12): 2893-917, 2010.
4. SAWADOGO, W. R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M.H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M., “Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy.”, *Biochem Pharmacol*, 84(10): 1225-1240, 2012.
5. FONTES, A.P.S.; ELOI, T.C.; BERALDO, H., “A Química Inorgânica na Terapia do Câncer”, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, **6**: 13-18, 2005.
6. WEINSTEIN, B.; JOE, A., “Oncogene Addiction.”, *Cancer Research*, **68**: 3077-3080, 2008
7. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. “Hallmarks of Cancer.”, *Cell*, **100**: 1, 2000.
8. LAZEBNIK, Y. “What are the hallmarks of cancer?”, *Nat. Rev. Cancer*, **10**: 232-233, 2010.
9. BORGHAEI, H.; SMITH, M. R.; CAMPBELL, K. S., “Immunotherapy of cancer.”, *Eur J Pharmacol.*, **625**: 41-54, 2009.
10. ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L., “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução.”, *Quim. Nova*, 28(1): 118-129, 2005.
11. ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. “Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.”, *Nature*, **205**: 698-699, 1965.
12. FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, S.G.; NADER, L.A., “Compostos de Platina em Quimioterapia do Câncer.”, *Quím. Nova*, 20(4): 398-404, 1997.
13. BERALDO H., “Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal.”, *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, **6**: 4-6, 2005.
14. PEYRONE, M. "Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür.", *Ann Chemie Pharm.*, 51(1): 1–29, 1844.
15. DASARI, S; TCHOUNWOU, P.B.; “Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action.”, *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364–378, 2014

-
16. PIZARRO, A.M.; SADLER, P.J., "Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes.", *Biochimie*, **91**: 1198-1211, 2009.
17. VACCARO, M.; DEL LITTO, R.; MANGIAPIA, G.; CARNERUP, A. M.; D'ERRICO, G.; RUFFO, F.; PADUANO, L., "Lipid based nanovectors containing ruthenium complexes: a potential route in cancer therapy.", *Chem. Commun.*, 21(11): 1404-1406, 2009.
18. NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. "Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer.", *Rev. Virtual Quim.*, 3(3): 19 -209, 2011.
19. ABU-SURRAH, A. S.; KETTUNEN, M. "Platinum group antitumor chemistry: Design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin.", *Curr. Med. Chem.*, 13(11): 1337-1357, 2006.
20. ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J.E.; MANSOUR, V.H., "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.", *Nature*, **222**: 385-386, 1969.
21. JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. "Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts.", *Chem. Rev.*, 99(9): 2467-2498, 1999.
22. JUNG, Y. W.; LIPPARD, S. J. "Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage.", *Chem. Rev.*, 107(5): 1387-1407, 2007.
23. LIPPERT, B., *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. VCHA & Wiley-VCH, Zurich, 1999, 341p.
24. RONCONI, L.; SADLER, P.J., "Using coordination chemistry to design new medicines.", *Coord. Chem. Rev.*, **251**: 1633-1648, 2007.
25. GAMBINO, D.; MORENO, V.; NAVARRO, M., *Aplicaciones de los compuestos metálicos em medicina: Uma visão bioinorgânica*, 1ª Edition, Alemanha, Editora acasemica espanhola, 2012.
26. RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents.", *Cancer Treat. Rev.*, 33(1): 9-23, 2007.
27. MALINA, J.; NOVAKOVA, O.; KEPPLER, B. K.; ALESSIO, E.; BRABEC, V. "Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media.", *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6(4): 434-445, 2001.
28. CLARKE, M. J.; ZHU, F.; FRASCA, D. R. "Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals.", *Chem. Rev.*, 99(9): 2511-, 1999.
29. SIJA, E.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K.; KISS, T.; ENYEDY, E.A. "Solution equilibrium studies of anticancer ruthenium(II)- η^6 -p-cymene complexes of pyridinecarboxylic acids.", *Polyhedron*, **67**: 51-58, 2014.
30. JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; ARION, V.B.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K., "Antitumour metal compounds: more than theme and variations.", *Dalton Trans.*, 14(2): 183-194, 2008

-
31. ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J., "Ruthenium in Medicine: Current Clinical uses and Future Prospects.", *Platinum Metals Rev.*, 45(2): 62- 69, 2001.
32. BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O., "DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity.", *Drug Resist. Update*, **9**: 111–122, 2006.
33. BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H.; SAVA, G. "Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidat". *J. Inorg. Biochem.*, 106(1): 90-99, 2012.
34. HARTINGER, C.G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M.A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B.K. "From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans[tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A).", *J. Inor. Biochem.*, 100(5): 891-904, 2006.
35. GRAF, N.; LIPPARD, S.J. "Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery.", *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 64(11): 993-1004, 2012.
36. KAPITZA, S.; PONGRATZ, M.; JAKUPEC, M.A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; LACKINGER, L.; KEPPLER, B.K.; MARIAN, B.; "Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells". *J. Cancer Res. Clinical Oncology.*, 131(2): 101-110, 2005.
37. SAVA, G.; BERGAMO, A. "Ruthenium-based compounds and tumour growth control (Review).", *Int. J. Oncol.*, 17(2): 353-365, 2000.
38. BERGAMO, A.; MASI, A.; JAKUPEC, M.A.; KEPPLER, B.K.; SAVA, G. "Inhibitory Effects of the Ruthenium Complex KP1019 in Models of Mammary Cancer Cell Migration and Invasion.", *Metal-Based Drugs.*, 2009(1): 681270, 2009.
39. RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; VAN DER BONGARD, D.; PLUIM D.; BENIJNEN J. H.; SCHELLENS, L. H. "A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSOimidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent.", *Clinic. Cancer Res.*, 10(11): 3717-3727, 2004.
40. CLARKE, M. J. "Ruthenium Metallopharmaceuticals.", *Coord. Chem. Rev.*, 236(1): 207-231, 2003.
41. MURA, P.; CAMALLI, M.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ZANELLO, P.; CORSINI, M. "Synthesis, structural characterization, solution chemistry, and preliminary biological studies of the ruthenium(III) complexes [TzH][*trans*-RuCl₄(Tz)₂] and [TzH][*trans*- RuCl₄(DMSO) (Tz)].(DMSO), the Thiazole Analogues of Antitumor ICR and NAMI-A.", *Inorg. Chem.*, 43(13): 3863-3870, 2004.
42. YAN, Y. K.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P. J. "Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes.", *Chem. Commun.*, **38**: 4764-4776, 2005.
43. SÜSS-FINK, G. "Arene ruthenium complexes as anticancer agents". *Dalton Trans.*, 39(7): 1673-1688, 2010.

-
44. a) MEGGERS E. "Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**: 287-292, 2007. b) MEGGERS, E. "Targeting proteins with metal complexes." *Chem. Commun.*, **7**(9): 1001-1010, 2009.
45. PAGANO, N.; MAKSIMOSKA, J.; BREGMAN, H.; WILLIAMS, D. S.; WEBSTER, R. D.; XUE, F.; MEGGERS, E. "Ruthenium half-sandwich complexes as protein kinase inhibitors: derivatization of the pyridocarbazole pharmacophore ligand." *Org. Biomol. Chem.*, **5**: 1218- 1227, 2007.
46. MERKEL, A.L.; MEGGERS, E.; OCKER, M. "PIM1 kinase as a target for cancer therapy.", *Expert. Opin. Inv. Drug.*, **21**(4): 425-436, 2012
47. BARBOSA, M. I. F. Complexos carbonílicos de rutênio. De um gás tóxico a uma droga com potencial agente citotóxico. 2007. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
48. LIMA, B. A. V. Avaliação das atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfínicos de Rutênio (Células Tumerais MDA-MB 231). 2010. 207 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
49. GRAMINHA, A. E. Complexos de Ru e Pd com bases de schiff de ditiocarbazatos com interesse bioinorgânico e quimioterápico. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
50. CORREA, R. S. "Complexos de Rutênio com Ligantes de Interesse Biológico Aspectos Químicos, Estruturais e Avaliação de Suas Atividades Biológicas". 2013. 269 f. Tese (Doutorado em Ciências – área de Química Inorgânica), Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos
51. BARBOSA, M.I.F.; SANTOS, E.R.D.; GRAMINHA, A.E.; BOGADO, A.L.; TEIXEIRA, L.R.; BERALDO, H.; TREVISAN, M.T.S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E.E.; RODRIGUES, B.L.; ARAÚJO, M.P.; BATISTA, A.A., "The *mer*-[RuCl₃(dppb)(H₂O)] complex: A versatile tool for synthesis of Ru^{II} compounds.", *Polyhedron* , **30**: 41 - 46, 2011.
52. CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., "Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae.", *Quím. Nova* , **29**(6): 1287-1300, 2006.
53. ARAUJO, C. A. C.; LEON L. L., "Biological activities of *Curcuma longa* L.", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**: 723-728, 2001
54. VILELA, J. D., "[Mummification and medicine in ancient Egypt].", *Rev. Paul. Med.*, **89**: 115-124, 1977
55. CASSILETH, B.; YEUNG, K.S.; GUBILI, J. "Herbs and Other Botanicals in Cancer Patient Care.", *Curr Treat Options Oncol.*, **9**: 109-116, 2008.
56. ENGELKE, F. "Fitoterápicos e Legislação.", *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, **1**: 10-15, 2003.
57. VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G., Gênero *Baccharis* (*Asteraceae*): "Aspectos químicos, econômicos e biológicos.", *Quím. Nova*, **28**: 85-94, 2005.

-
58. BRUNETON, J. "Pharmacognosy", Phytochemistry and Medicinal Plants. Paris, 4th ed Ed. Lavosier, p. 622, 1999.
59. NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M., "Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years.", J. Nat. Prod., **70**: 461-477, 2007.
60. BUTLER, M. S., "Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials.", Nat. Prod. Rep., **25**(3): 475-516, 2008.
61. COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O., "A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.", Rev. Virtual Quim., **2**(1): 47-58, 2010.
62. ALVES, CLAYTON Q. DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIAL, M.V.; AGUIAR, R.M., "Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos.", Quím. Nova, **33**(10): 2202-2210, 2010.
63. BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A., "Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin.", PLoS One, **6**(10): 1-7, 2011.
64. MARIAN VALKO, DIETER LEIBFRITZ, MONCOLA JAN, MARK TD CRONIN, MILAN MAZURA, JOSHUA TELSER. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.", Int. J. Biochem. Cell Biol., **39**:44-84, 2007.
65. BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J., "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.", Rev. Nutr., Campinas, **23**(4):629-643, 2010
66. OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S., "Fontes vegetais naturais de antioxidantes.", Quím. Nova, **32**(3):689-702, 2009.
67. SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR. V.G.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H., "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.", Quím. Nova, **30**(2): 351-355, 2007.
68. VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.A; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T., "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.", Química Nova, **30**(5):1323-1338, 2007.
69. MILAEVA, E.R., "Metal-Based Antioxidants - Potential Therapeutic Candidates for Prevention the Oxidative Stress - Related Carcinogenesis: Mini-Review.", Current Topics in Medicinal Chemistry, **11**: 2703-2713, 2011.
70. BATINIC-HABERLE, I; REBOUCAS, J.S.; SPASOJEVIC, I., "Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential.", Antioxid. Redox Signal., **13**: 877-918, 2010.

-
71. KOSTOVA, I.; BALKANSKY, S., "Metal Complexes of Biologically Active Ligands as Potential Antioxidants", *Curr. Med. Chem.*, 20(36): 4508-4539, 2013.
72. STEPHENSON, T. A.; WILKINSON, G. A., "New complexes of ruthenium (II) and (III) with triphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands.", *J. Inorg. Nuc. Chem.* **28**: 945-956, 1966.
73. BRESSAN, M.; RIGO, P., "Five-coordinate complexes of ruthenium(II) with ditertiary phosphine.", *Inorg. Chem.*, **14**: 2286- 2290, 1975.
74. QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A.; OLIVA, G.; GAMBARDELLA, M.T.P.; SANTOS, R.H.A.; MACFARLANE, K. S.; RETTIG, S.J.; JAMES, B.R. "The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenediamine.", *Inorg. Chim. Acta*, **267**: 209-221, 1998.
75. EVANS, I.P.; SPENCER, A.; WILKINSON, G., "Dichlorotetrakis(dimethylsulphoxide) ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes.", *J.C. Soc. Dalton*, **2**: 204-209, 1973.
76. BAUTISTA, M.T.; CAPPELLANI, E.P.; DROUIN, S.D.; MORREIS, R.H.; SCHWEITZER, C.T.; SELLA, A. & ZUBKOWSKI, J., "Preparation and spectroscopic properties of η^2 -dihydrogen complexes $[MH(\eta^2-H_2)(PR_2CH_2CH_2PR_2)_2]^+$ (M = Fe, Ru; R = Ph, Et) and trends in properties down the iron group triad.", *J. Am. Chem. Soc.*, **113**: 4876-4887, 1991.
77. PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.E.; PERRIN, D.R. *Purification of Laboratory Chemicals*. 2^a Edition, New York, Pergamon Press, 1980.
78. HUNSUCKER, S.W.; WATSON, R.C.; TISSUE, B.M, "Characterization of inorganic coordination complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.", *Rapid commun. Mass Spectrom.*, **15**: 1334-1340, 2001.
79. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.", *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**: 25-30, 1995.
80. DEARDEN, J.C, "Partitioning and lipophilicity in quantitative structure-activity relationships.", *Environ. Health Perspect.*, **61**: 203-228, 1985.
81. BAKA, E.; COMER, J.E.A.; TAKÁCS-NOVÁK, K., "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flash method using hydrochlorothiazide as model compound.", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 335-341, 2008.
82. FRANKEN, N.A.; RODERMOND, H.M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C.; "Clonogenic assay of cells in vitro.", *Nat Protoc.*, **1**: 2315-2319, 2006.
83. SHARMA, A.; GAUTAM, S.P.; GUPTA, A.K., "Surface modified dendrimers: Synthesis and characterization for cancer targeted drug delivery.", *Bioorg. Med. Chem.*, **19**: 3341-3346, 2011.

-
84. SOUSA, C.M.M., “Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.”, Quím. Nova, 30(2):351-355, 2007.
85. KIM, S. H.; JUN, C. D.; SUK, K.; CHOI, B. J.; LIM, H.; PARK, S.; LEE, S. H.; SHIN, H. Y.; KIM, D. K.; SHIN, T. Y., “Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells.”, Toxicol. Sci., 91(1): 123-131, 2006.
86. AGARWAL, C.; TYAGI, A.; AGARWAL, R., “Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells.”, Mol. Cancer Ther., 5(12): 3294-3302, 2006.
87. KIM, Y.-O.; “Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid.”, Biol. Pharm. Bull., 30(6):1052-1055, 2007.
88. PELLEGRINA, C. D.; PADOVANI, G.; MAINENTE, F.; ZOCCATELLI, G.; BISSOLI, G., “Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*.”, Cancer Lett., 226(1): 17-25, 2005.
89. VELHO, R.G. de. *Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico*, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado em Química Inorgânica, 60p.
90. NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 6ª edição, Editora Wiley Inter-Science, 2009, 419p.
91. AMARAL, A.T.D.O.; OLIVEIRA, A. C.; NEIDLEIN, R.; GALLACCI, M.; CAPRARA, L.; MIYAZAKI, Y., “Physicochemical parameters involved in the lethal toxicity of *N,N*-[(dimethylamino)ethyl]-4-substituted benzoate hydrochlorides: a QSAR study.”, Eur. J. Med. Chem., **32**: 433-443, 1997.
92. SANTIAGO, M.O.; ARAUJO, M.P.; DONNICI, C.L.; MOREIRA, I.S.; CASTELLANO, E.E.; ELLENA, J.; SANTOS-JR, S.; QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. “³¹P{¹H} NMR as a Tool for Identification of Ruthenium Isomers Containig PPh₃ or 1,4-bis(diphenylphosphino) butane Ligands. X-Ray Structures of the *cis*-{RuCl₂(PPh₃)₂[4,4'-(-X)2-2,2'-bipy]} Complexes [X = -H, -Me, -SMe and (-Cl, -Me)].”, J. Trans. Meta Chem., 30(2): 170-175, 2005.
93. GARROU, P. E. “Ring contributions to the phosphorus-31 chemical shift of transition metal-phosphorus chelate complexes.”, Inorg. Chem., **14**: 1435- 1439, 1975
94. ENACHE, T.A.; OLIVEIRA-BRETT, A.M., “Phenol and *para*-substituted phenols electrochemical oxidation pathways.”, J. Electroanal. Chem., 655(1):9-16, 2011.
95. KANDAGAL, P.B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S.M.T.; JADEGOUD, Y.; IJARE, O.B., “Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach.”, J. Pharma. Biomed. Analysis, **41**: 393-399, 2006.
96. SHAIKH, S.M.T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P.B.; ASHOKA, S., “Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin.”, Journal of Molecular Structure, **786**: 46-52, 2006.

-
97. 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**: 665-671, 2007.
98. TAN, C.; LIU, J.; LI, H.; ZHENG, W.; SHI, S.; CHEN, L.; JI, L., "Differences in structure, physiological stability, electrochemistry, cytotoxicity, DNA and protein binding properties between two Ru(III) complexes.", *J. Inorg. Biochem.*, **102**(2): 347-358, 2008.
99. GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P.A.; PETITPAS, E.; BHATTACHARYA, A.A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S., "Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin.", *J. Mol. Biol.*, **353**: 38-52, 2005.
100. RAJENDIRAN, V.; KARTHIK,R.; PALANIANDAVAR,M.; STOECKLI-EVANS, H.; PERIASAMY, V.S.; AKBARSHA, M.A.; SRINAG, B.S.; KRISHNAMURTHY, H., "Mixed-ligand copper(II)-phenolate complexes: effect of coligand on enhanced DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity.", *Inorg. Chem.*, **46**: 8208–8221, 2007.
101. GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHAD, M. A.; PALANIANDAVAR, M. "New ruthenium(II) arene complexes of anthracenylappended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity.", *Dalton Trans.*, **43**: 1203-1219, 2014.
102. SANTOS, R,L,S,R ., *Metalofármacos de dirutênio(II,III): Síntese, caracterização e interações com biomoléculas e ciclodextrina*. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Química - USP, 2012. Tese de doutorado, 202 p.
103. TABASSUM, S.; AL-ASBAHY, W. M.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. "Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and molecular docking investigations.", *J. Photochem. Photobiol. B.*, **114**:132-139, 2012
104. ROSS, P.D. e SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability.", *Biochemistry*, **20**: 3096-3102, 1981.
105. SOARES, S.E. "Ácidos fenólicos como antioxidantes", *Rev. Nutr.*, Campinas, **15**(1):71-81, 2002.
106. NIERO, E.L.O.; MACHADO-SANTELLI, G.M., "Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells.", *J. Exp. Clin. Canc. Res.*, **32**(31): 1-14, 2013.
107. TOLMAN, C. A. "Steric effects of phosphorus ligands in organometallic chemistry and homogeneous catalysis.", *Chem. Rev.*, **77**: 313, 1977.
108. McDANIEL, D.; DOUGLAS, B.; ALEXANDER, J. *Concepts and Models of Inorganic Chemistry*. 3^a ed. Ed. John Wiley & Sons, Canadá, 1994.
109. SIMIĆ, A.; MANOJLOVIĆ, D.; ŠEGAN, D.; TODOROVIĆ, M., "Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics.", *Molecules*, **12**(10): 2327–2340, 2007.

110. TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E.M.; GARRIDO, J.; BORGES, F., “Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview.”, *Biomed Res Int.* **2013**: 1-11, 2013.

111. VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J., “Os produtos naturais e a química medicinal moderna.”, *Quím. Nova*, 29(2): 326-337, 2006.

Capítulo 7

APENDICE

7. APENDICE

Complexos com ácido gálico e derivados

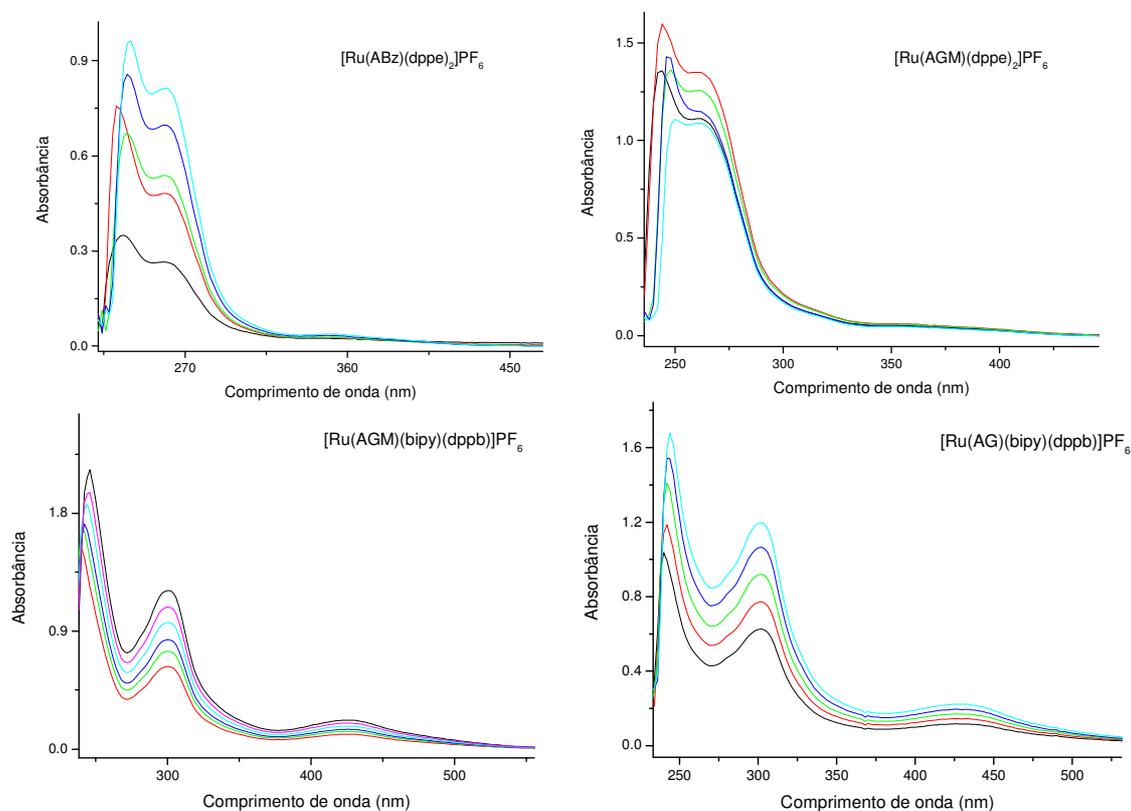


FIGURA A 1: Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os complexos com AG e derivados em n-octanol.

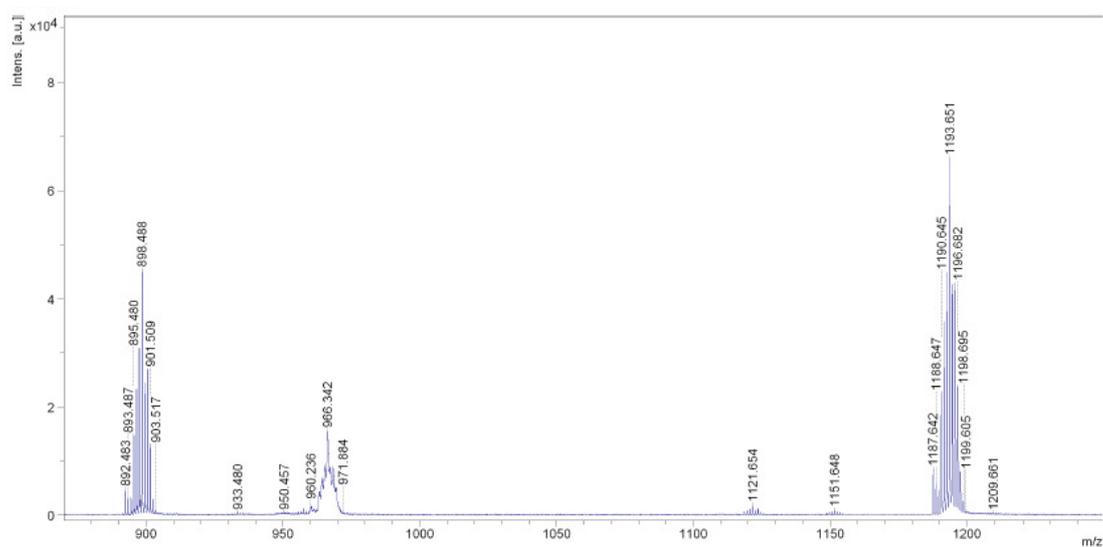


FIGURA A 2: Espectro de massa MALDI-TOF, do complexo $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$

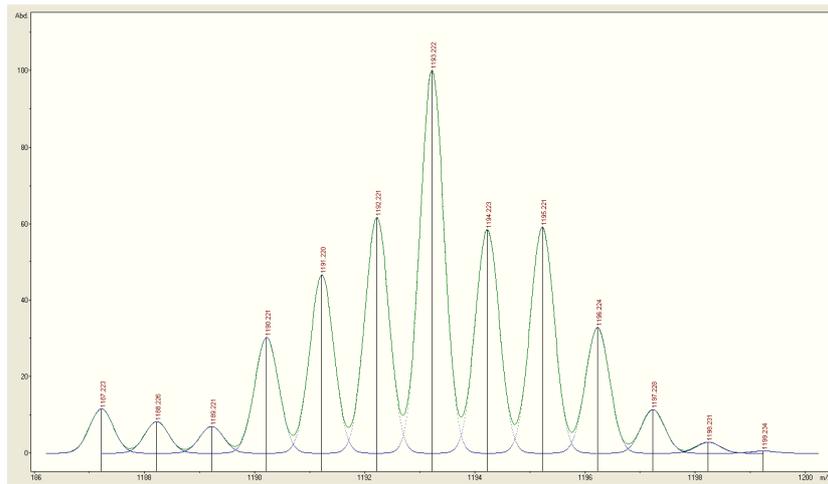


FIGURA A 3: Espectro teórico do pico do íon monocarregado $[M-PF_6]^+$ do complexo $[Ru(AGM)(dppe)_2]PF_6$.

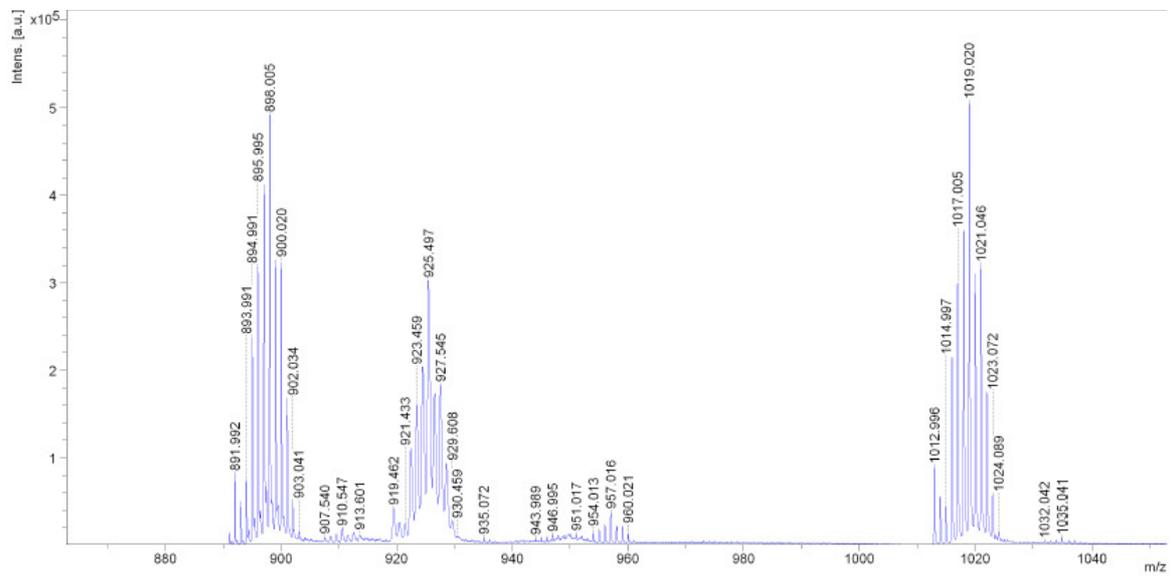


FIGURA A 4: Espectro de massa MALDI-TOF, do complexo $[Ru(ABz)(dppe)_2]PF_6$

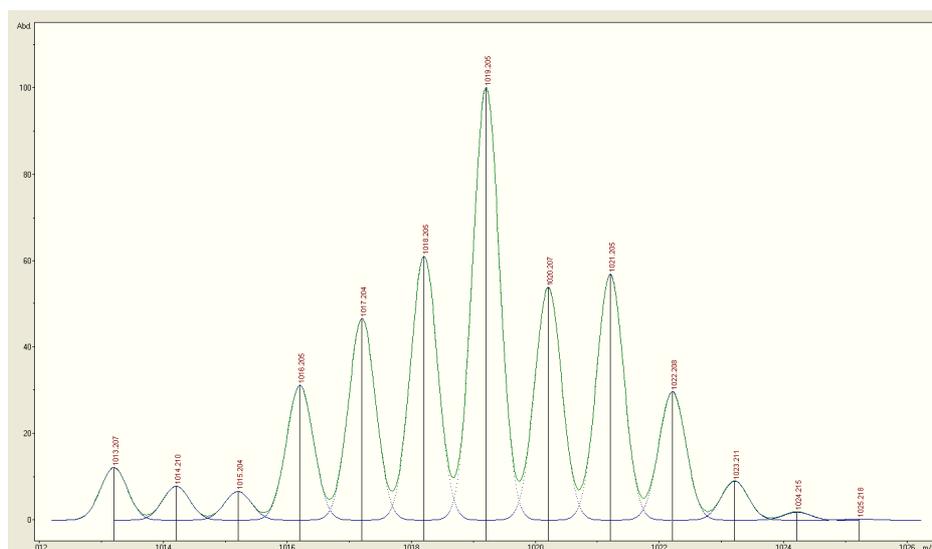


FIGURA A 5: Espectro teórico do pico do íon monocarregado $[M-PF_6]^+$ do complexo $[Ru(ABz)(dppe)_2]PF_6$.

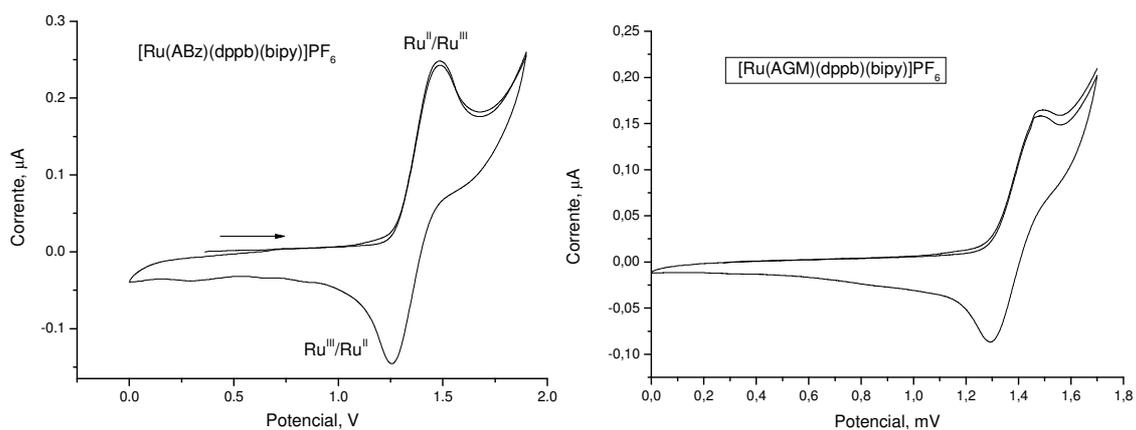


FIGURA A 6: Voltamograma cíclico dos complexos obtidos em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

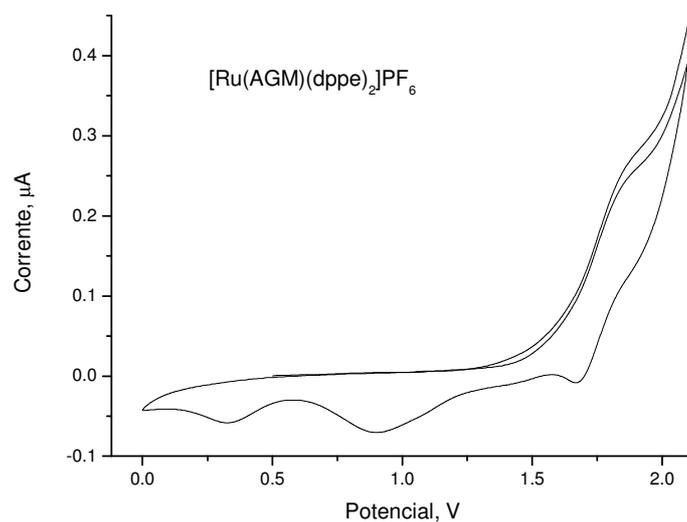


FIGURA A 7: Voltamograma cíclico do complexo obtido em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

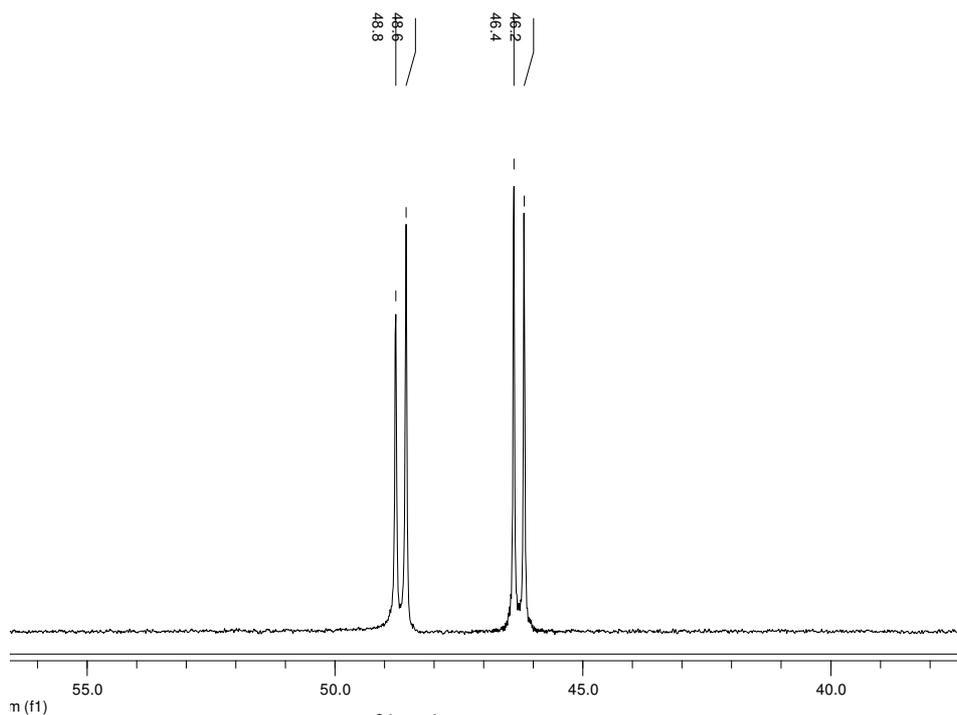


FIGURA A 8: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

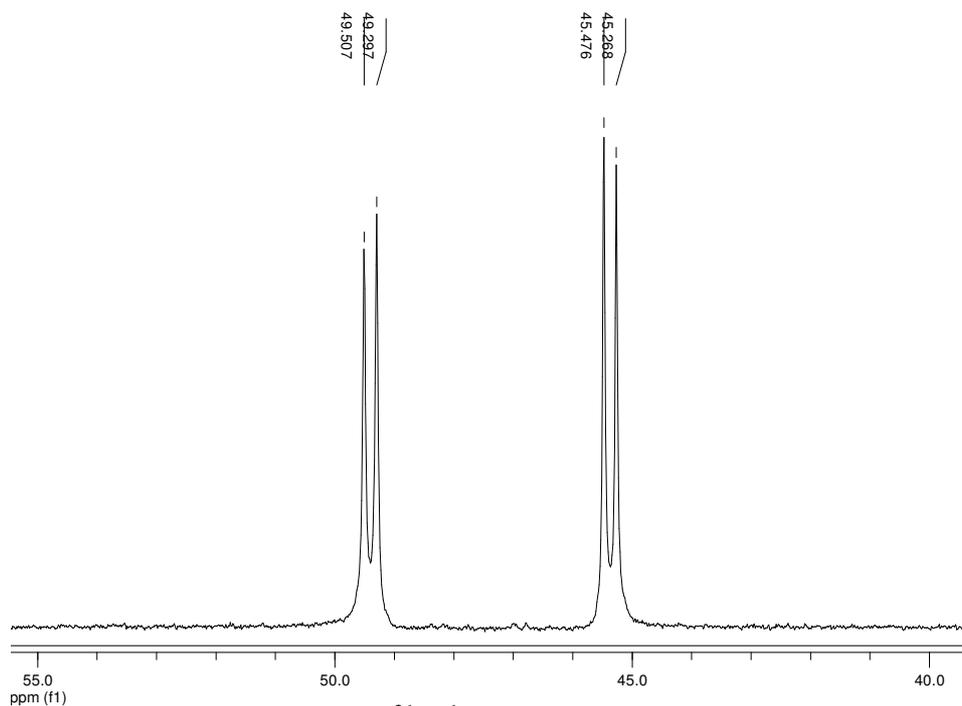


FIGURA A 9: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

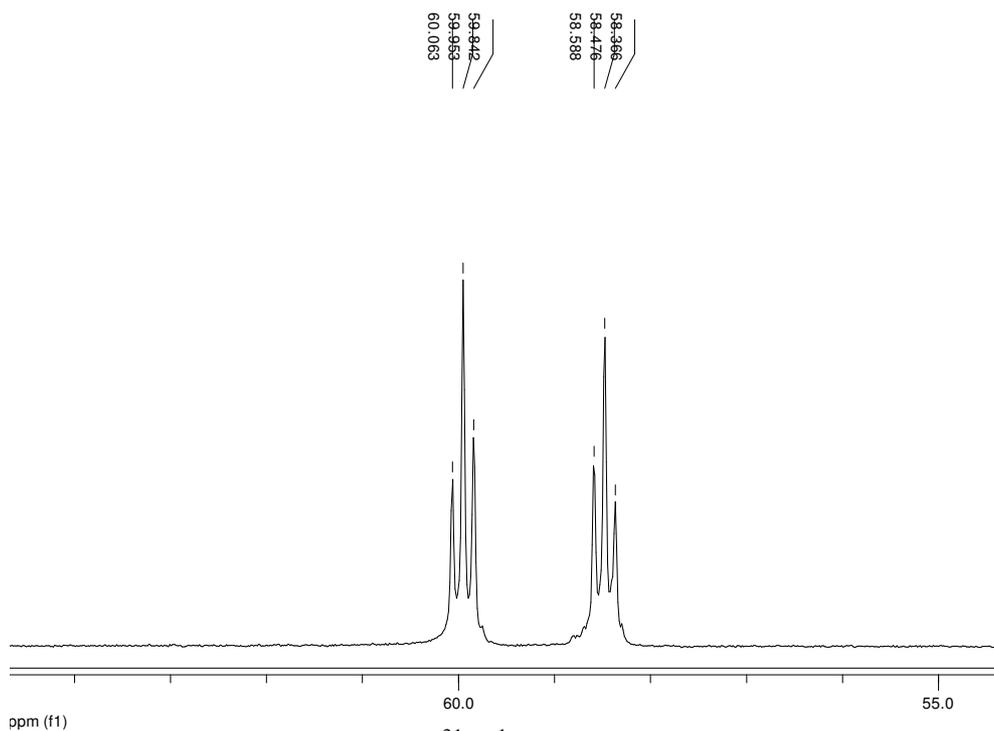


FIGURA A 10: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{AG})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

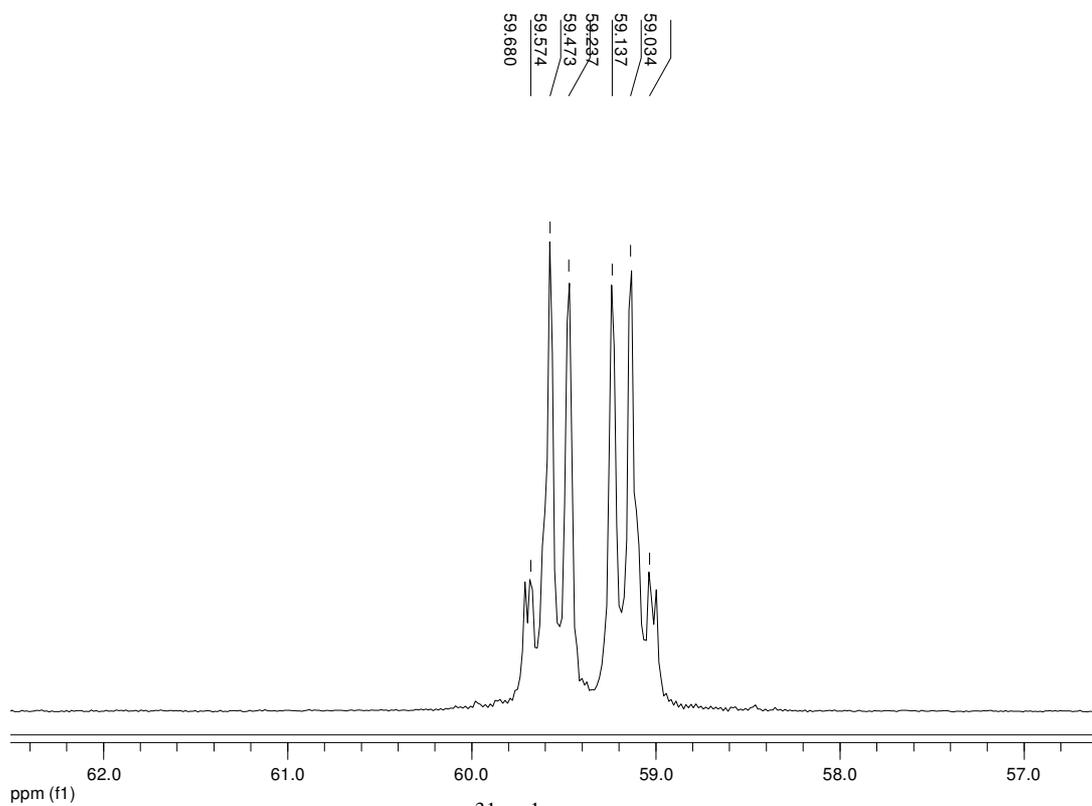


FIGURA A 11: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

TABELA A1. Dados das estruturas de raios X dos complexos **(1)** [Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF₆, **(2)** [Ru(AGM)(dppb)(bipy)]PF₆, **(3)** [Ru(ABz)(dppe)₂]PF₆ e **(4)** [Ru(AGM)(dppe)₂]PF₆.

Complexo	(1)	(2)	(3)	(4)
Empirical formula	C ₉₀ H ₈₃ F ₁₂ N ₄ O _{4.50} P ₆ Ru ₂	C ₅₁ H ₄₈ F ₆ N ₂ O _{8.50} P ₃ Ru	C ₆₀ H ₅₅ Cl ₂ F ₆ O ₂ P ₅ Ru	C ₁₃₁ H ₁₂₀ Cl ₂ F ₁₂ O ₁₆ P ₁₀ Ru ₂
Formula weight	1908.56	1132.89	1248.86	2761.00
Temperature	293(2) K	293(2) K	293(2) K	293(2) K
Wavelength	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic	triclinic	Monoclinic	Triclinic
Space group	P -1	P21/n	C2/c	P -1
Unit cell dimensions	a = 11.7551(2) Å α = 110.1960(10)° b = 17.4930(4) Å β = 97.4780(10)° c = 22.9633(4) Å γ = 99.2730(10)°	a = 18.6440(6) Å α = 90° b = 31.0250(8) Å β = 110.1340(10)° c = 19.4890(7) Å γ = 90°	a = 24.7700(9) Å α = 90° b = 12.3340(5) Å β = 103.383(2)° c = 37.6860(12) Å γ = 90°	a = 15.0328(2) Å α = 95.421(1)° b = 18.7457(2) Å β = 94.326(1)° c = 23.1954(3) Å γ = 94.114(1)°
Volume	4284.88(15) Å ³	10584.1(6) Å ³	11200.9(7) Å ³	6468.19(14) Å ³
Z	2	8	8	2
Density (calculated)	1.479 Mg/m ³	1.422 Mg/m ³	1.481 Mg/m ³	1.418 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.545 mm ⁻¹	0.462 mm ⁻¹	0.582 mm ⁻¹	0.478 mm ⁻¹
F(000)	1946	4632	5104	2828
Crystal size	0.20 x 0.40 x 40 mm ³	0.12 x 0.13 x 0.34 mm ³	0.29 x 0.30 x 0.45 mm ³	0.10 x 0.32 x 0.40 mm ³
Theta range for data collection	3.040 to 26.093°	1.29 to 25.60°	3.01 to 26.37°	2.916 to 26.751°
Index ranges	-14 ≤ h ≤ 14, -21 ≤ k ≤ 21, -28 ≤ l ≤ 28	-17 ≤ h ≤ 22, -37 ≤ k ≤ 35, -23 ≤ l ≤ 15	-30 ≤ h ≤ 30, -13 ≤ k ≤ 15, -47 ≤ l ≤ 45	-19 ≤ h ≤ 19, -23 ≤ k ≤ 23, -29 ≤ l ≤ 29
Reflections collected	30863	45840	36139	52378
Independent reflections	16804 [R(int) = 0.0518]	18735 [R(int) = 0.0638]	11285 [R(int) = 0.0579]	27323 [R(int) = 0.0329]
Completeness to theta	(25.242) 98.8 %	(25.60°) 94.0 %	(26.37°) 98.4 %	(25.242°) 99.5 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	16804 / 0 / 1072	18735 / 0 / 1295	11285 / 0 / 692	27323 / 0 / 1564
Goodness-of-fit on F ²	0.954	0.956	1.035	0.997
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0582, wR2 = 0.1479	R1 = 0.0637, wR2 = 0.1515	R1 = 0.0607, wR2 = 0.1642	R1 = 0.0533, wR2 = 0.1479
R indices (all data)	R1 = 0.0945, wR2 = 0.1650	R1 = 0.1507, wR2 = 0.1844	R1 = 0.0889, wR2 = 0.1828	R1 = 0.0817, wR2 = 0.1627
Largest diff. peak and hole	0.988 and -0.775 e.Å ⁻³	0.998 and -0.425 e.Å ⁻³	0.809 and -0.627 e.Å ⁻³	1.404 and -0.679 e.Å ⁻³

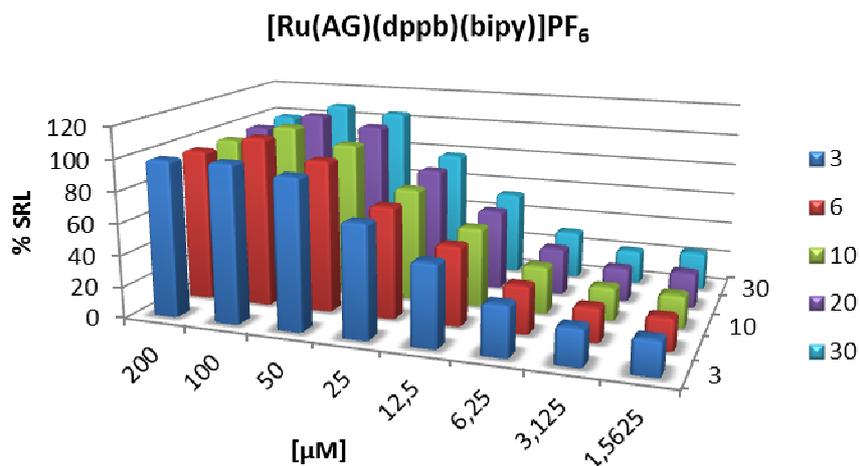


FIGURA A 12: Gráfico de barras de %S.R.L. do complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ por tempo de reação.

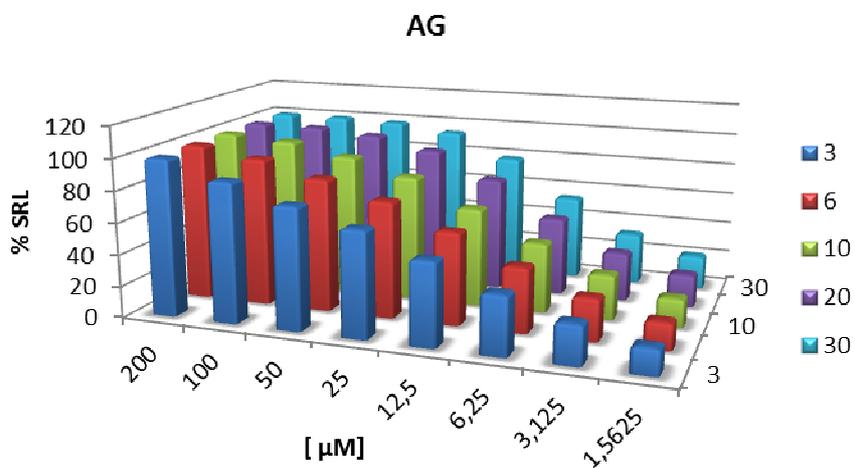
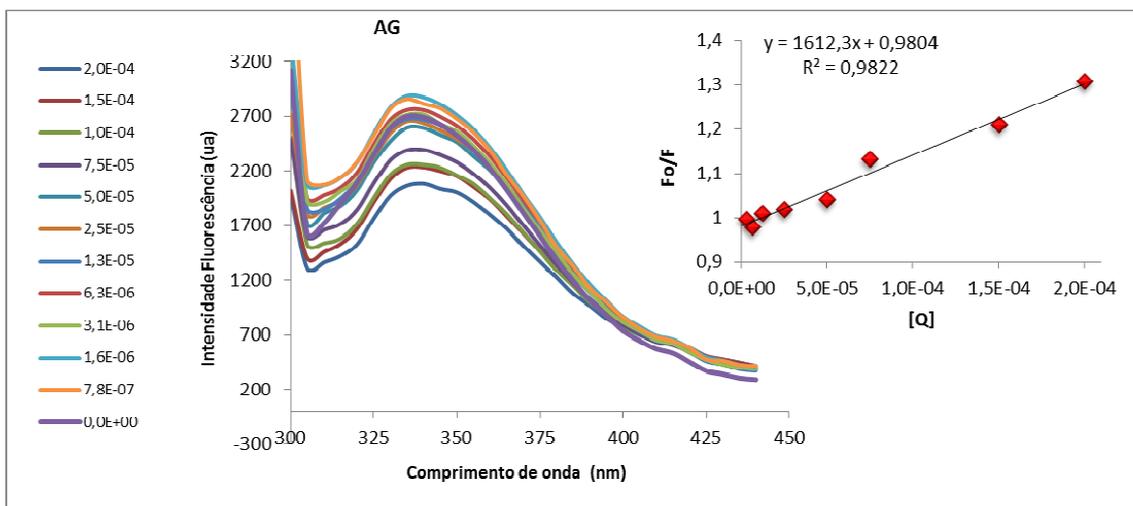


FIGURA A 13: Gráfico de barras de %S.R.L. do ligante ácido gálico (AG) por tempo de reação.



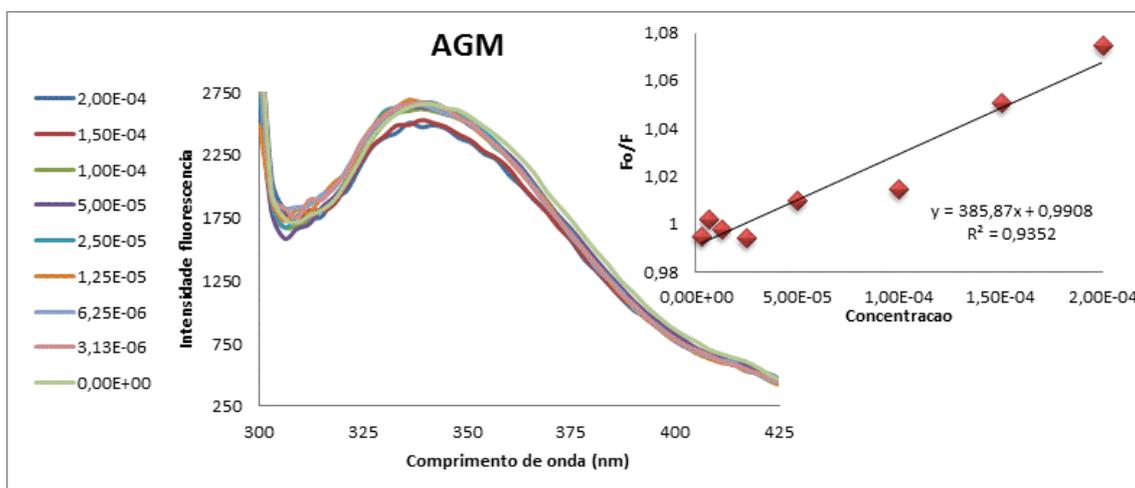
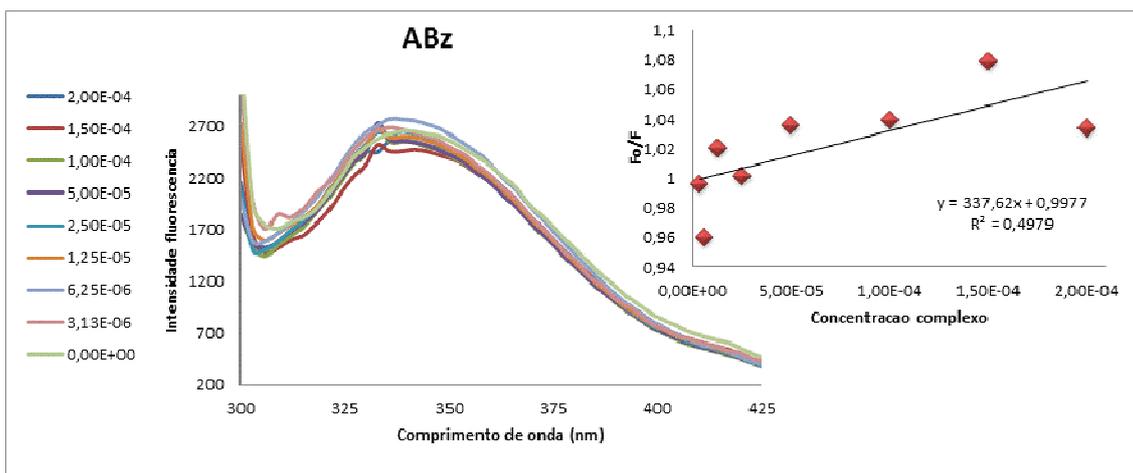


FIGURA A 14:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações dos ligantes ácido gálico e derivados. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

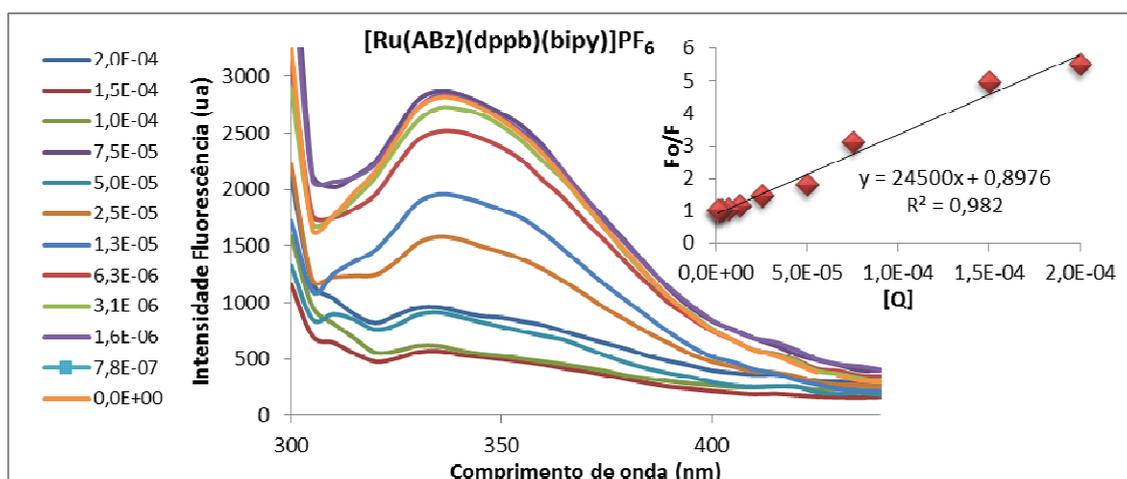


FIGURA A 15:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

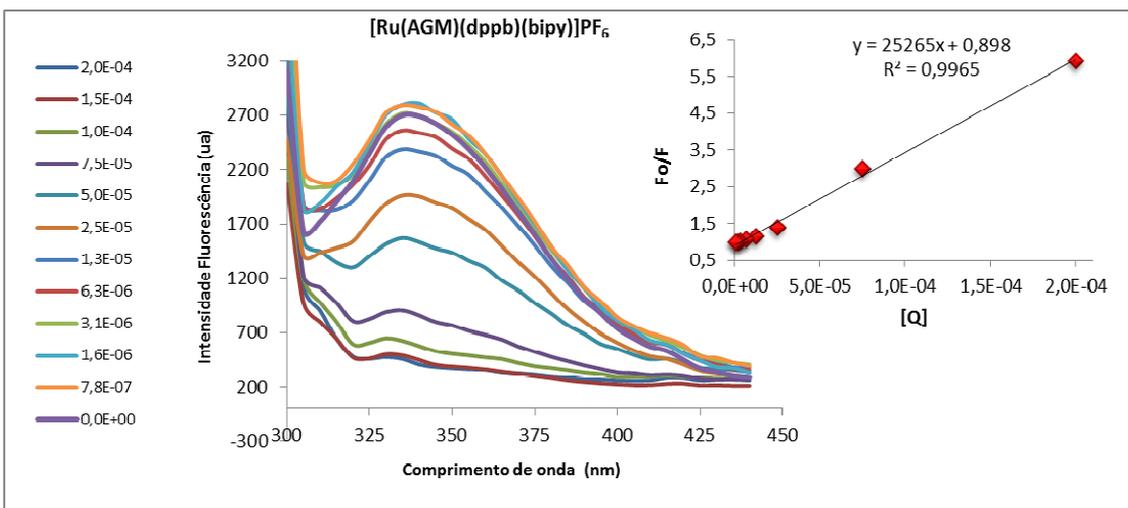


FIGURA A 16:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

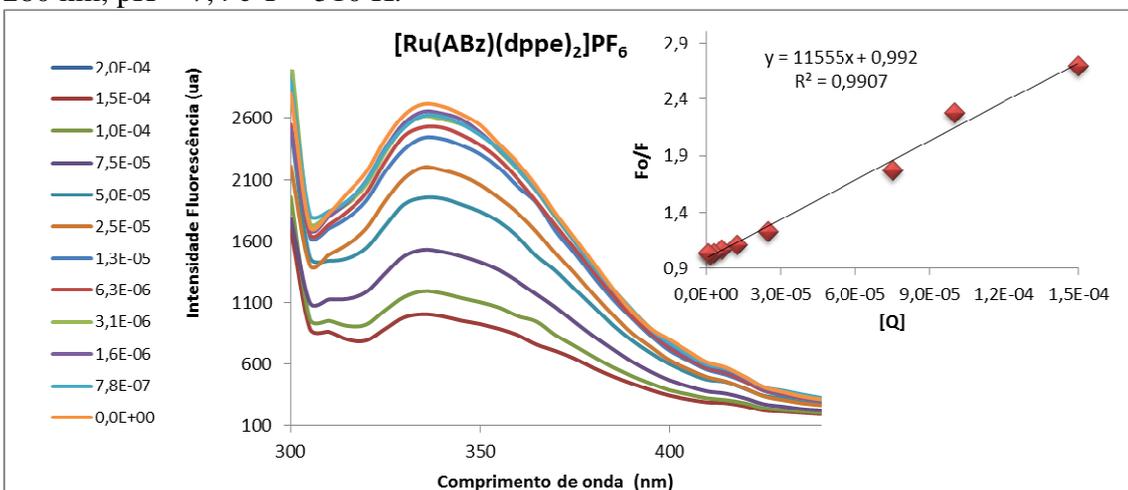


FIGURA A 17:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{ABz})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

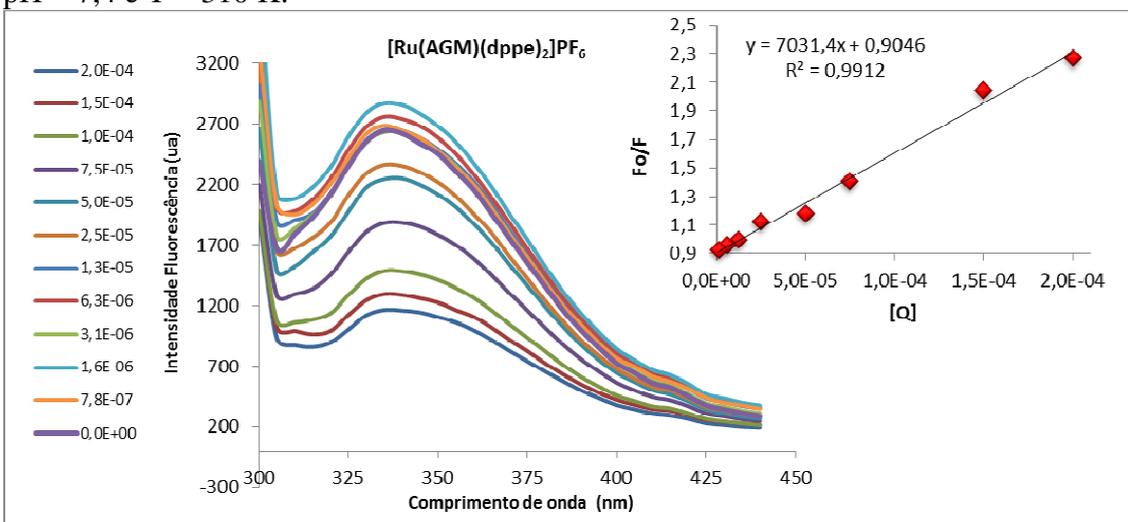


FIGURA A 18:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações dos complexos $[\text{Ru}(\text{AGM})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

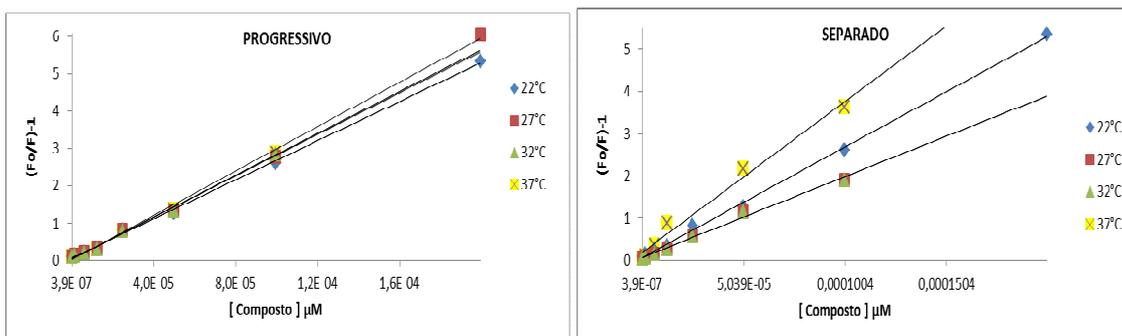


FIGURA A 19: Gráficos de Stern-Volmer de $(F_0/F)-1$ vs $[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações do complexo $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$ no modo progressivo e separado para diferentes temperaturas.

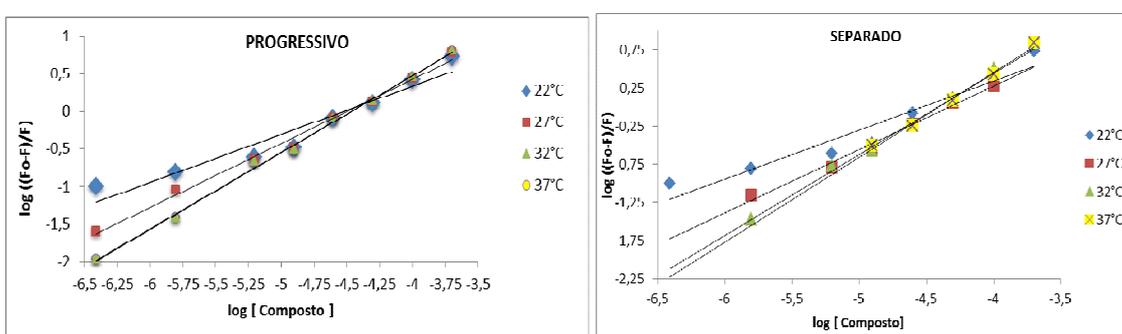


FIGURA A 20: Gráficos da equação logarítmica de $\log(F_0-F)/F$ vs $\log[Q]$ para BSA na presença de diferentes concentrações de $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$ no modo progressivo e separado em diferentes temperaturas, excitação = 280 nm. $\{[BSA] = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}\}$.

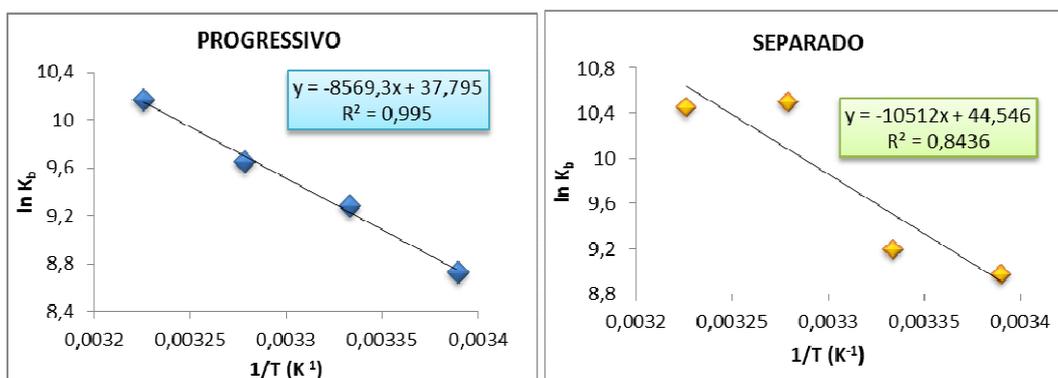


FIGURA A 21: Gráficos de van't Hoff para o complexo $[Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF_6$ no modo progressivo e separado nas temperaturas de 295, 300 e 305 e 310 K.

TABELA A2. Constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante supressão bimolecular (k_q) e parâmetros de ligação e termodinâmicos para o complexo [Ru(AG)(dppb)(bipy)]PF₆ com a BSA no modo progressivo e separado (solução 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA em tampão trizma pH 7.4.)

	PROGRESSIVO				SEPARADO			
T (K)	295	300	305	310	295	300	305	310
$K_{sv} \pm SD$ (10^4 L mol^{-1})	2,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	2,7 \pm 0,06	2,7 \pm 0,06	2,4 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	3,5 \pm
k_q ($10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	3,4	3,9	3,9	4,0	3,4	3,0	4,6	5,2
$K_b \pm SD$ (L mol^{-1})	(6,2 \pm 0,04) 10^4	(1,1 \pm 0,1) 10^5	(1,5 \pm 0,1) 10^6	(2,6 \pm 0,7) 10^6	(7,9 \pm 3,1) 10^4	(9,8 \pm 8,4) 10^4	(3,6 \pm 1,8) 10^5	(3,4 \pm 1,8) 10^6
n	0,87	0,92	0,96	0,97	0,87	0,89	1,04	1,05
ΔG° (kJ mol^{-1})	-21,4	-23,1	-24,4	-26,2	-22,0	-22,9	-26,6	-26,9
ΔH° (kJ mol^{-1})	71,2				77,9			
ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	314,2				337,9			

Complexos com ácido cinâmicos.

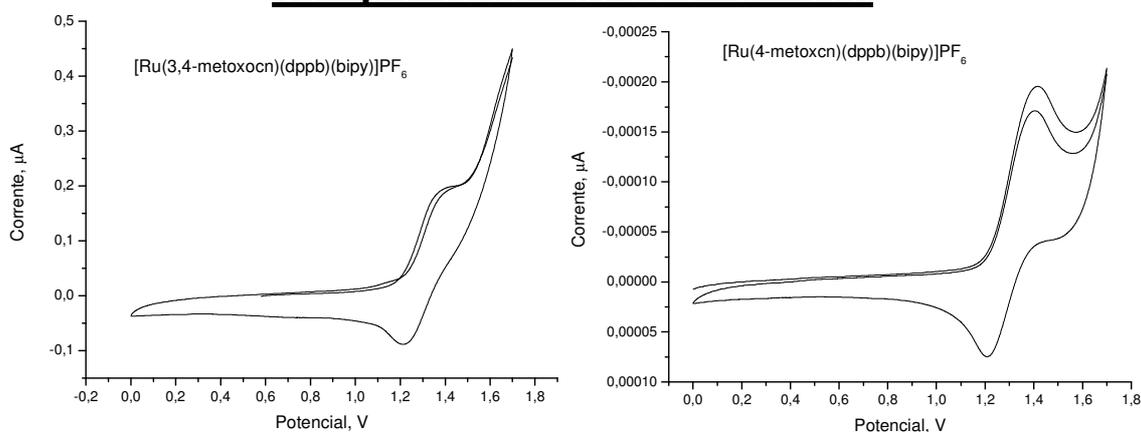


FIGURA A 22: Voltamogramas cíclicos dos complexos com ácido cinâmicos obtidos em CH₂Cl₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

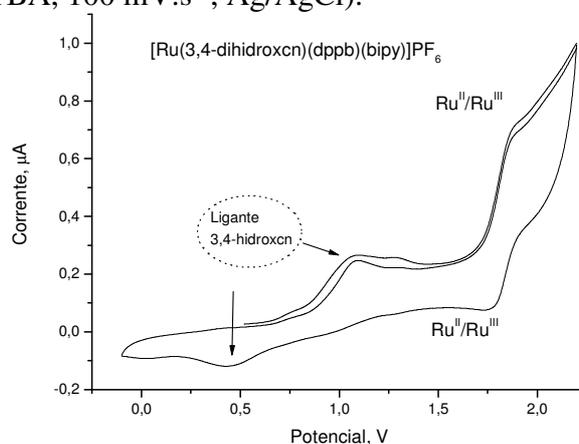


FIGURA A 23: Voltamogramas cíclicos dos complexos com ácido cinâmicos obtidos em CH₂Cl₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

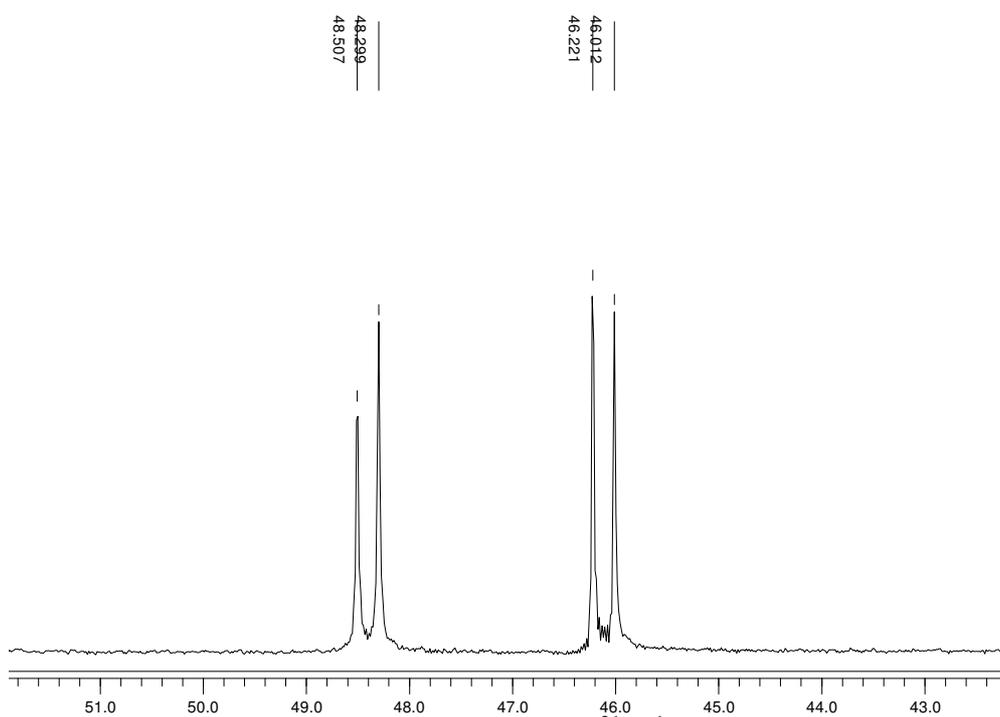


FIGURA A 24: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\alpha\text{-metcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

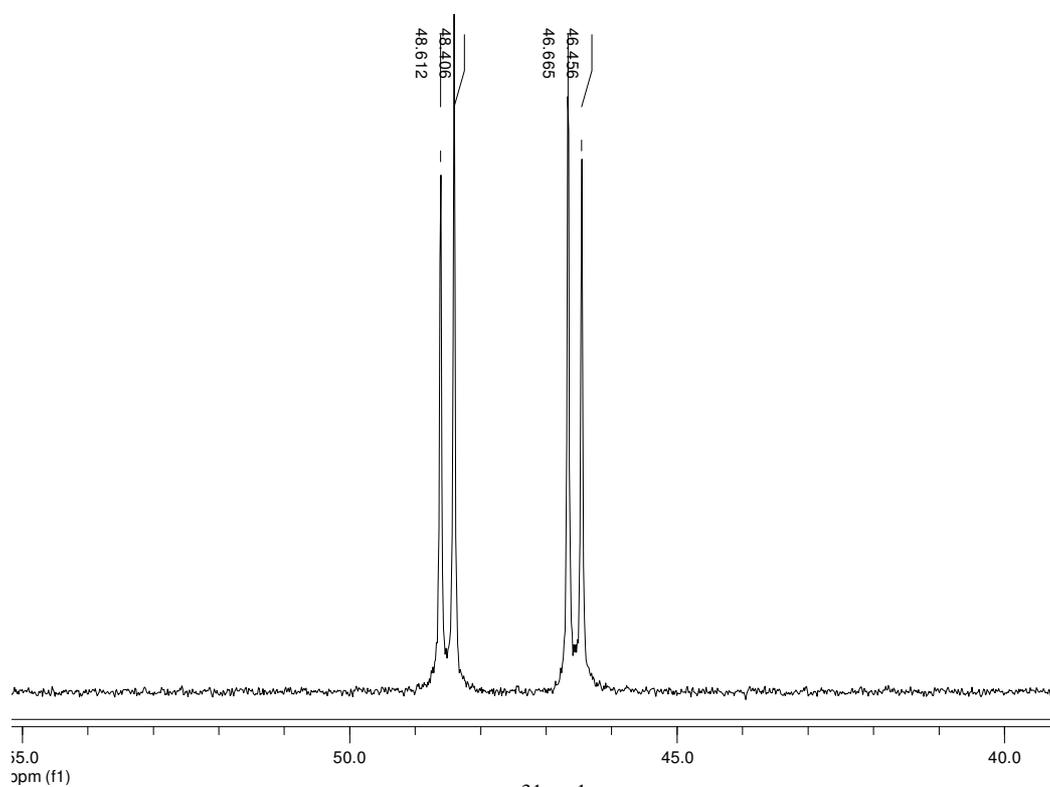


FIGURA A 25: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-metoxocn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

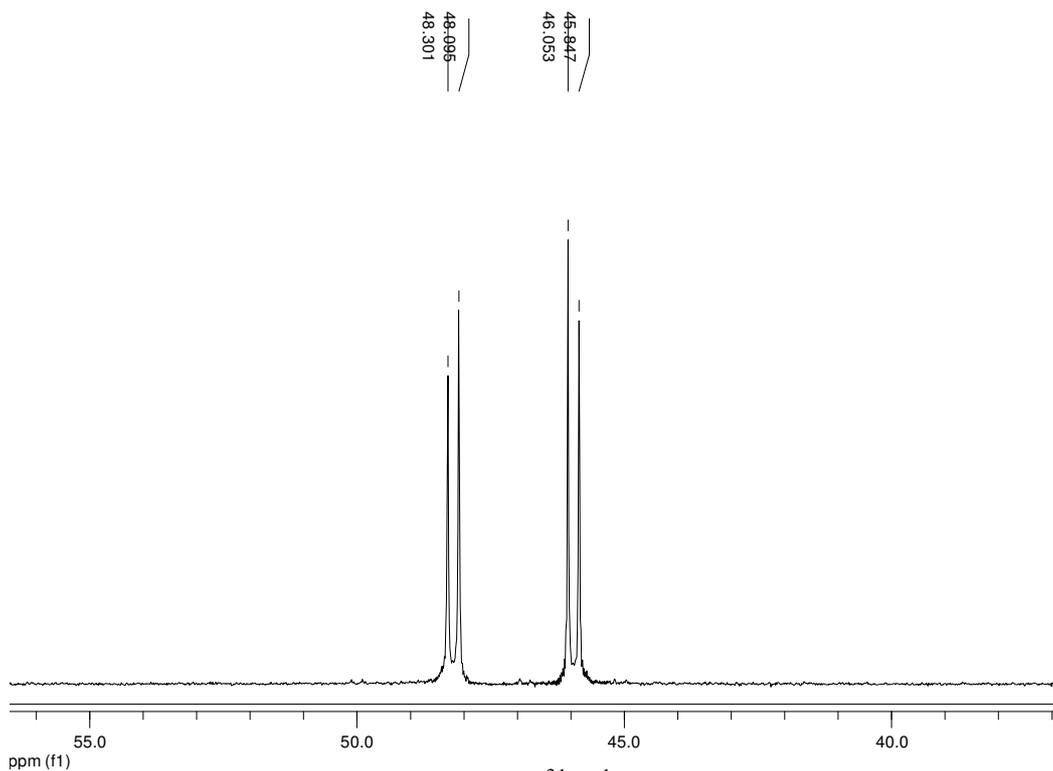


FIGURA A 26: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(4\text{-hidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

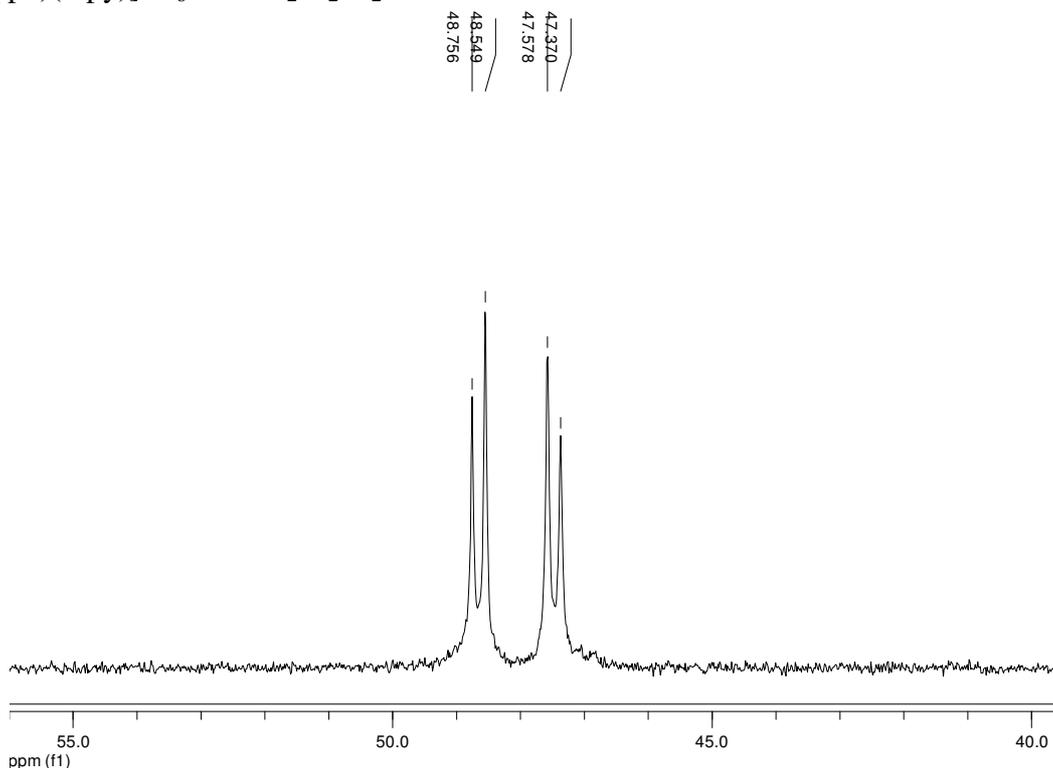


FIGURA A 27: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(3,4\text{-dihidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

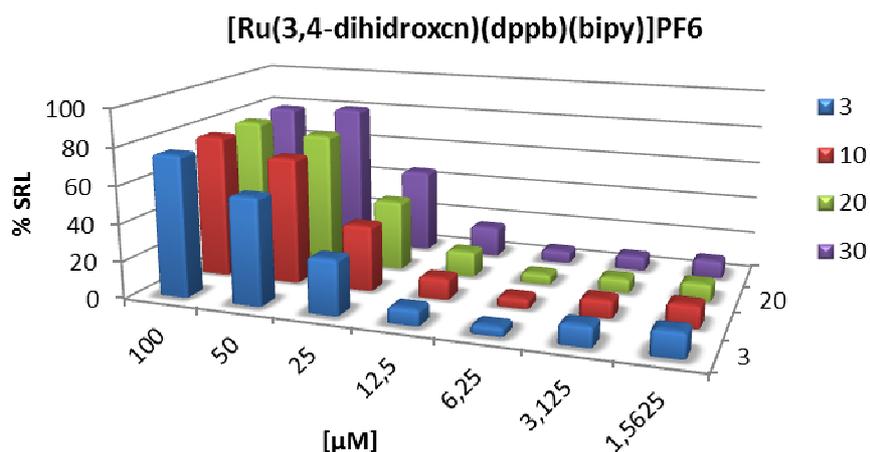


FIGURA A 28: Gráfico de barras de %S.R.L. do complexo [Ru(3,4-dihidroxcn)(dppb)(bipy)]PF₆ por tempo de reação.
3,4-dihidroxcn

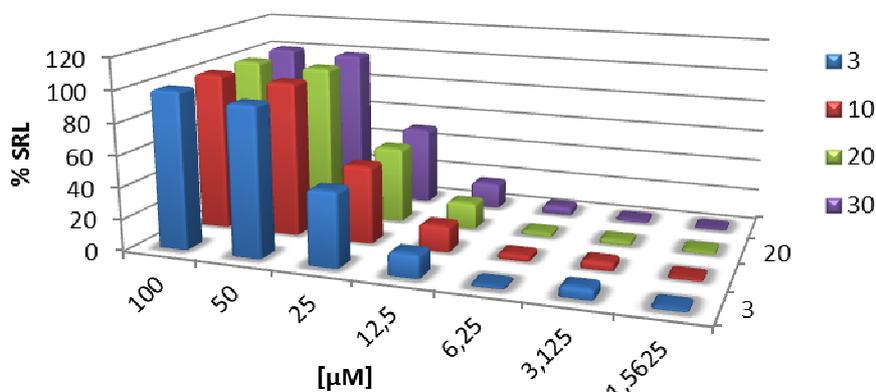
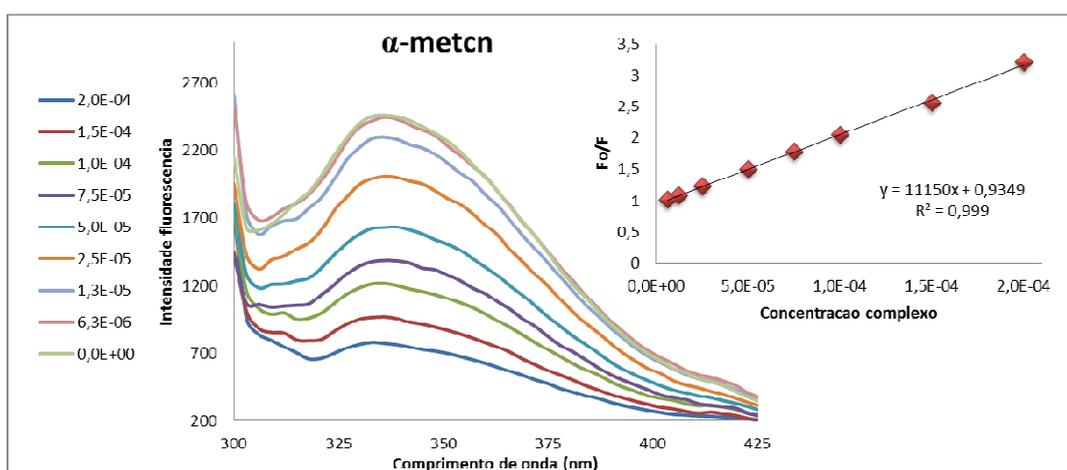


FIGURA A 29: Gráfico de barras de %S.R.L. do ligante 3,4-dihidroxcn por tempo de reação.



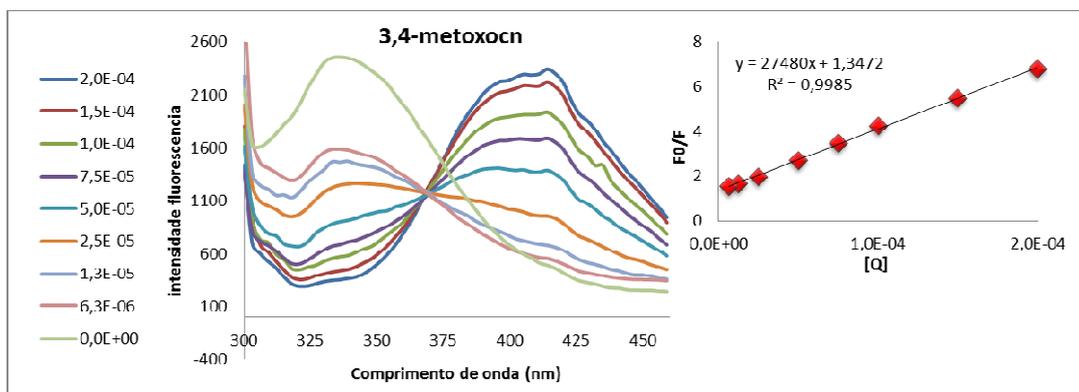
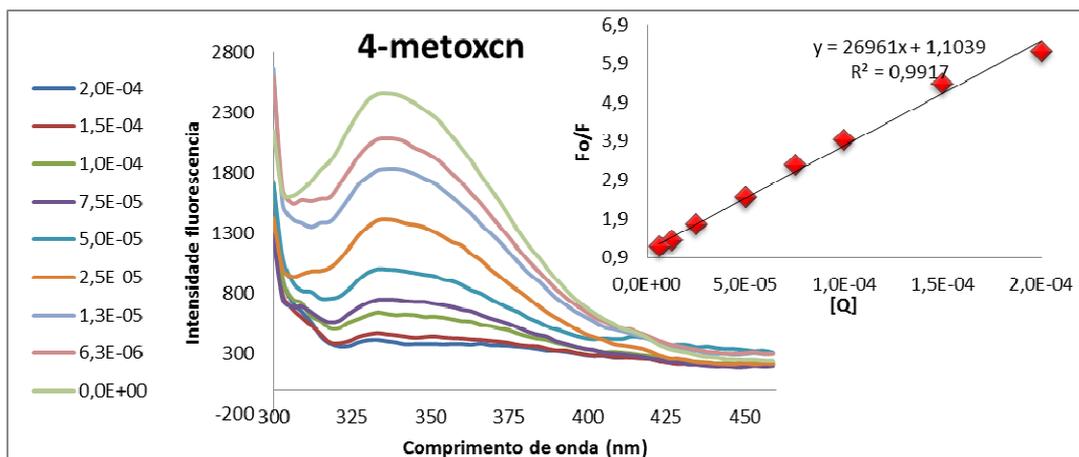


FIGURA A 30: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações dos ligantes derivados de ácido cinâmicos. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

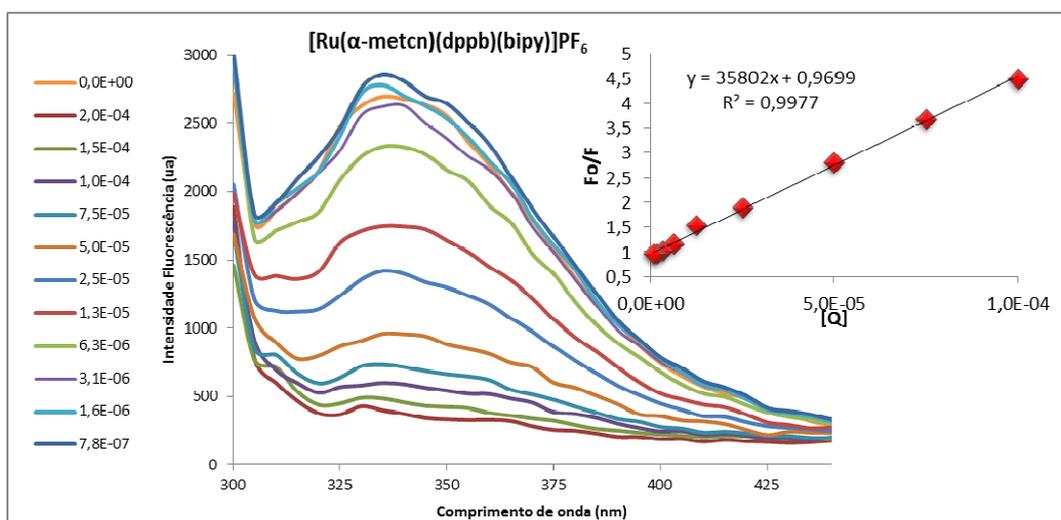


FIGURA A 31: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo [Ru(α -metcn)(dppb)(bipy)]PF₆. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

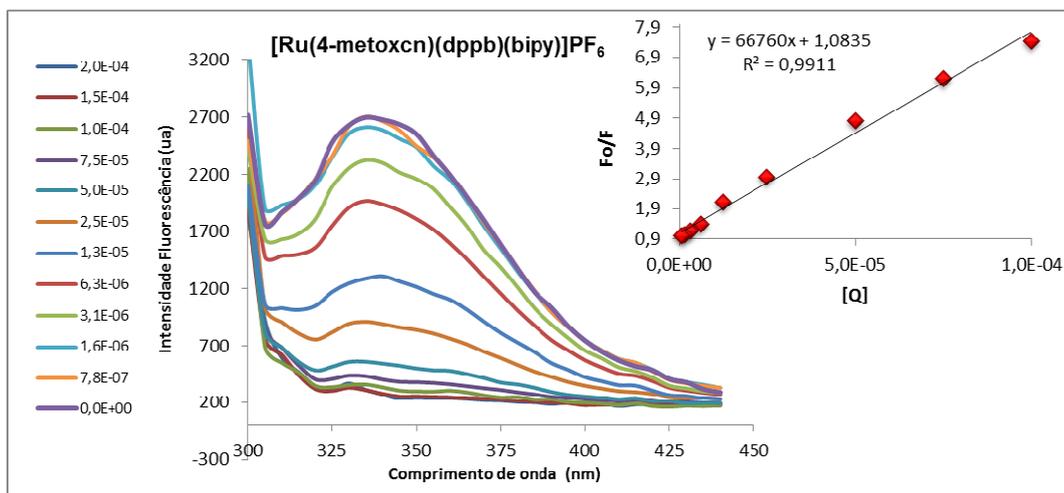


FIGURA A 32: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(4\text{-metoxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm, pH = 7,4 e T = 310 K.

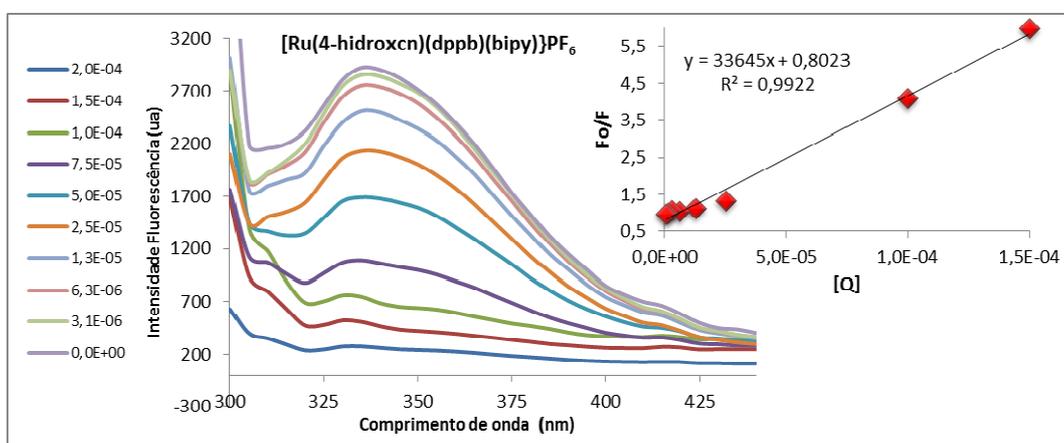
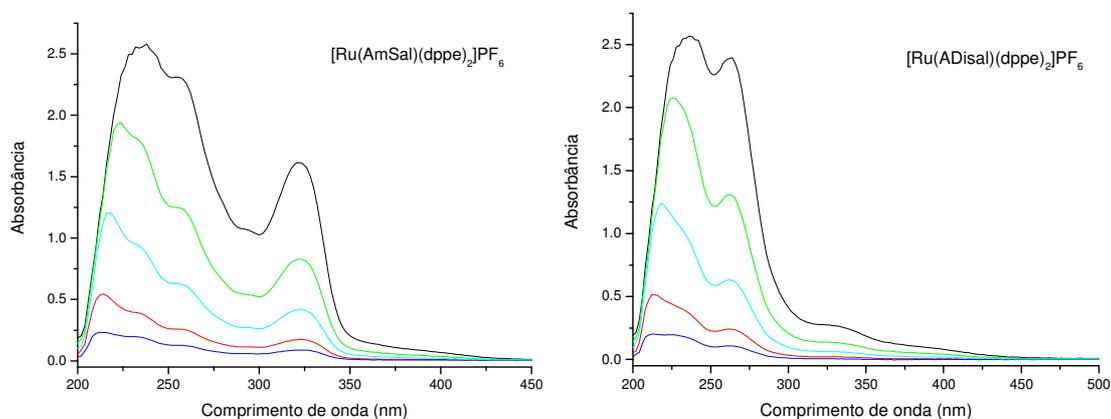


FIGURA A 33: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(4\text{-hidroxcn})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, λ_{exc} = 280 nm, pH = 7,4 e T = 310 K.

Complexos com ácido salicílico e derivados



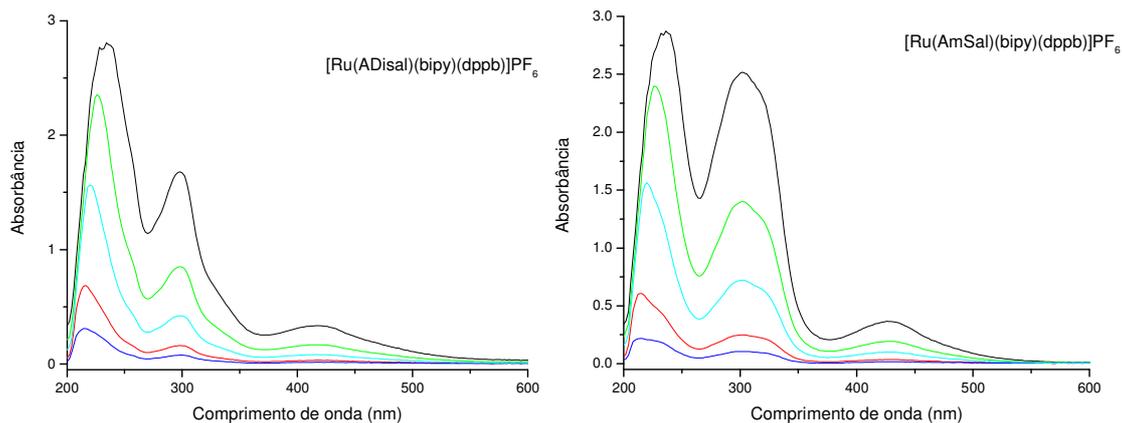


FIGURA A 34: Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os complexos com ASal e derivados em *n*-octanol.

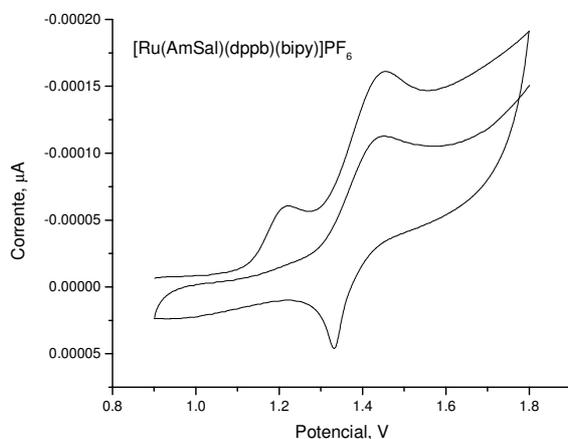


FIGURA A 35: Voltamogramas cíclico do complexo com ácido 4-aminosalicílico obtidos em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

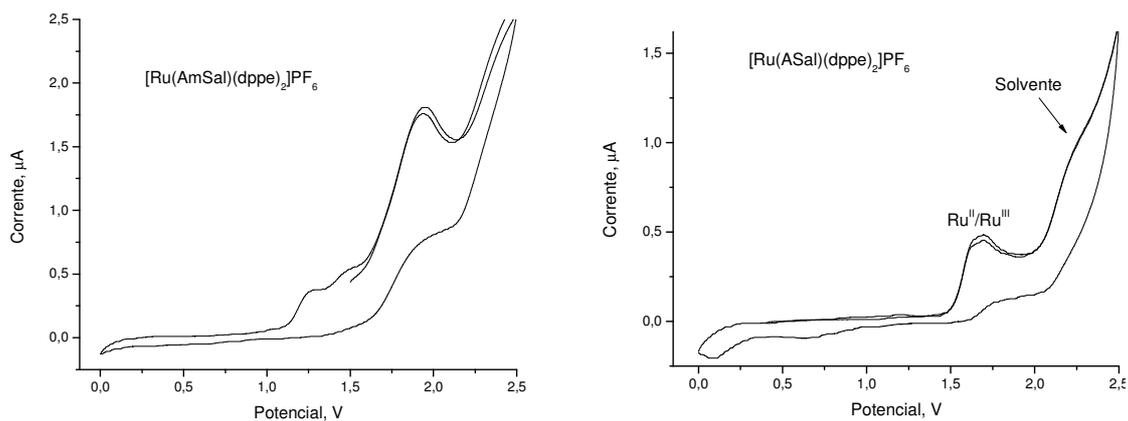


FIGURA A 36: Voltamogramas cíclicos dos complexos com ácido salicílico e derivados obtidos em CH_3CN (0,1M PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

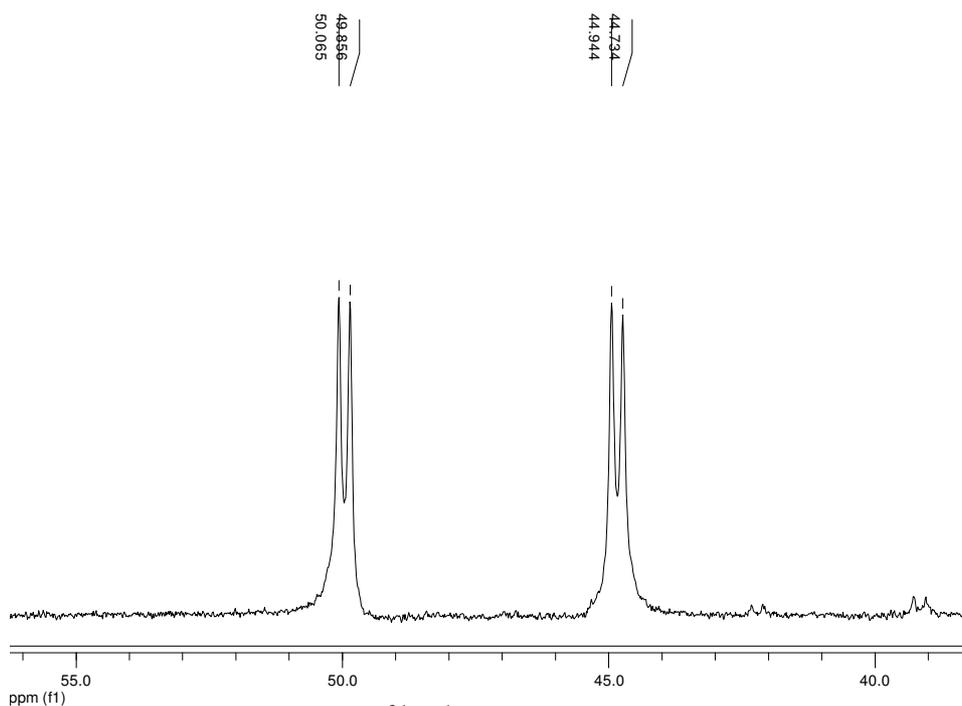


FIGURA A 37: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

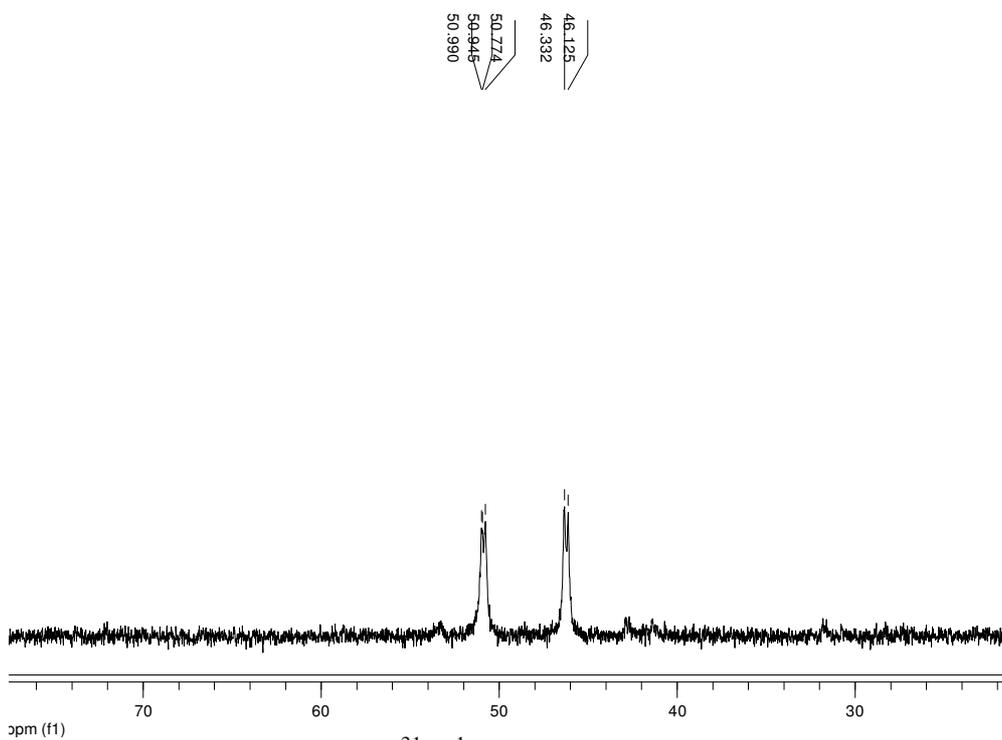


FIGURA A 38: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

TABELA A2. Dados das estruturas de raios X dos complexos **(1)** [Ru(ASal)(dppe)₂]PF₆ **(2)** [Ru(AmSal)(dppe)₂]PF₆.

Complexo	(1)	(2)
Empirical formula	C ₁₁₈ H ₁₀₆ F ₁₂ O ₆ P ₁₀ Ru ₂	C ₁₂₀ H ₁₁₀ Cl ₆ F ₁₂ N ₂ O ₆ P ₁₀ Ru ₂
Formula weight	2359.86	2628.63
Temperature	293(2) K	293(2) K
Wavelength	0.71073 Å	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	C2/c	Cc
Unit cell dimensions	a = 24.914(5) Å α = 90.000(5)° b = 12.407(5) Å β = 102.956(5)° c = 37.561(5) Å γ = 90.000(5)°	a = 18.312(5) Å α = 90.000(5)° b = 18.841(5) Å β = 103.666(5)° c = 17.607(5) Å γ = 90.000(5)°
Volume	11315(5) Å ³	5903(3) Å ³
Z	4	2
Density (calculated)	1.385 Mg/m ³	1.479 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.481 mm ⁻¹	0.601 mm ⁻¹
F(000)	4832	2680
Crystal size	0.15 x 0.35 x 0.40 mm ³	0.04 x 0.11 x 0.42 mm ³
Theta range for data collection	3.002 to 26.375°.	3.072 to 26.371°.
Index ranges	-31 ≤ h ≤ 31, -13 ≤ k ≤ 15, -46 ≤ l ≤ 46	-22 ≤ h ≤ 22, -23 ≤ k ≤ 23, -21 ≤ l ≤ 21
Reflections collected	36621	20975
Independent reflections	11475 [R(int) = 0.0694]	11999 [R(int) = 0.0288]
Completeness to theta	(25.242°) 99.1 %	(25.242°) 99.5 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	11475 / 1 / 680	11999 / 2 / 721
Goodness-of-fit on F ²	0.946	1.011
Final R indices [I > 2σ(I)]	1 = 0.0599, wR2 = 0.1580	R1 = 0.0450, wR2 = 0.1156
R indices (all data)	R1 = 0.0985, wR2 = 0.1742	R1 = 0.0561, wR2 = 0.1218
Largest diff. peak and hole	0.983 and -0.523 e.Å	0.897 and -0.586 e.Å ⁻³

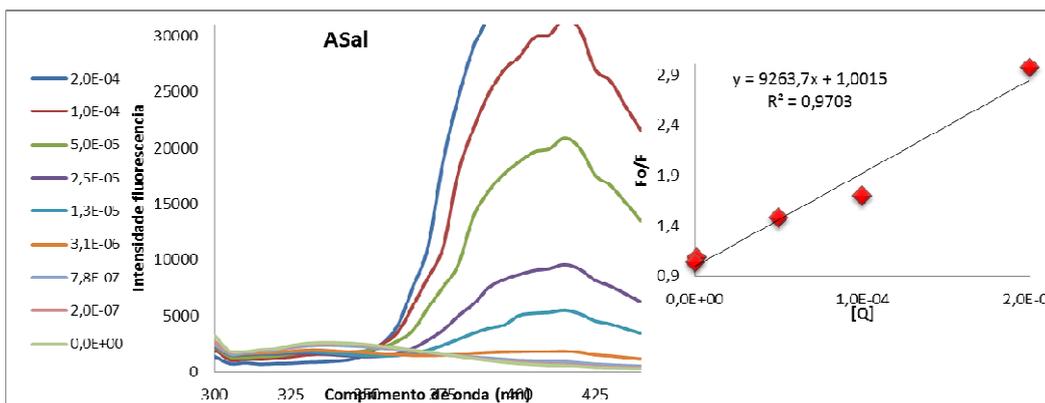


FIGURA A 39:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do ligante, ácido salicílico (ASal). Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

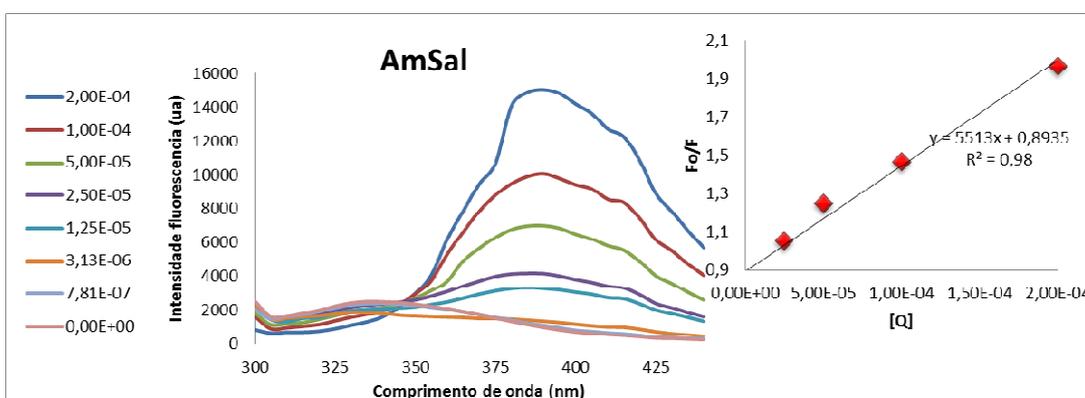


FIGURA A 40:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do ligante ácido 4-aminosalicílico (AmSal). Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

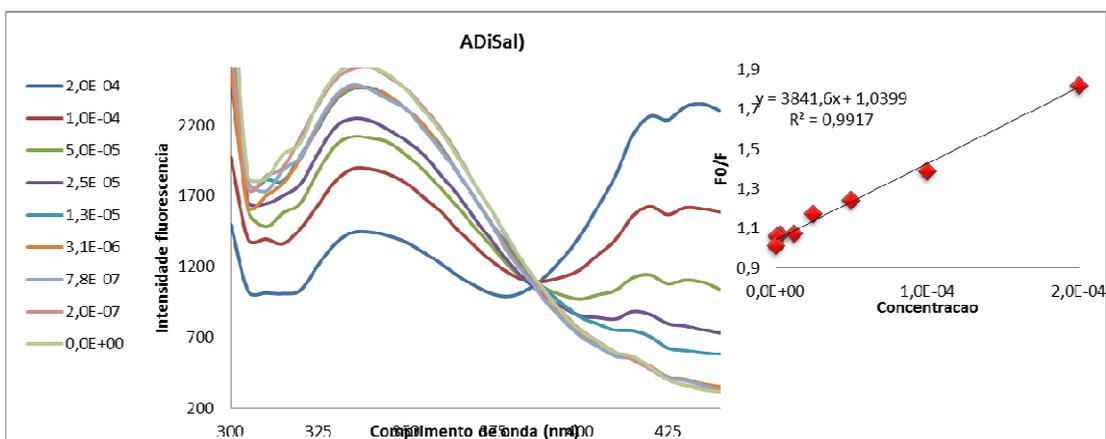


FIGURA A 41:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do ligante, ácido 2,4-dihidroxibenzoico e derivados. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

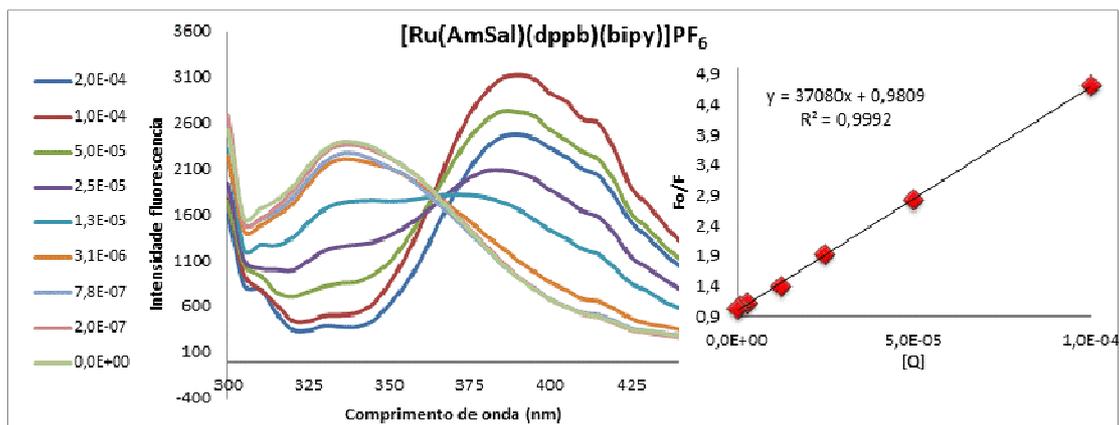


FIGURA A 42:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

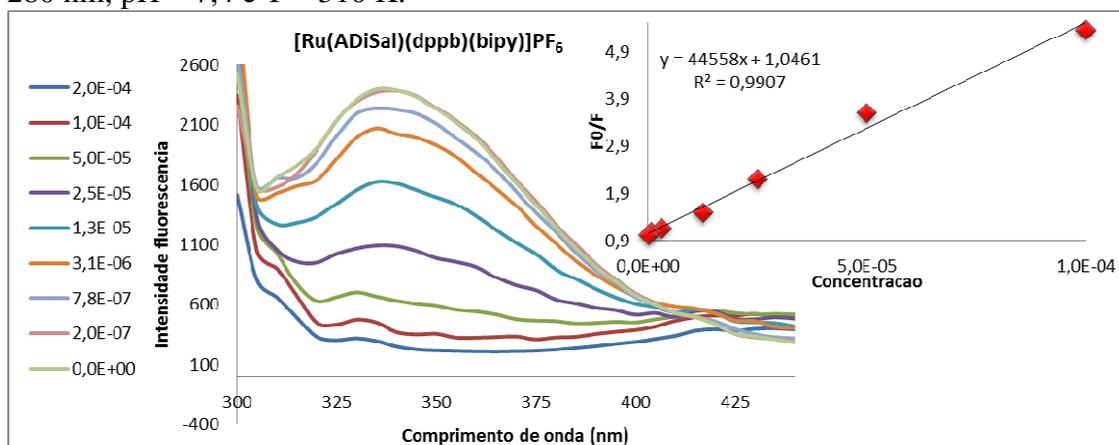


FIGURA A 43:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

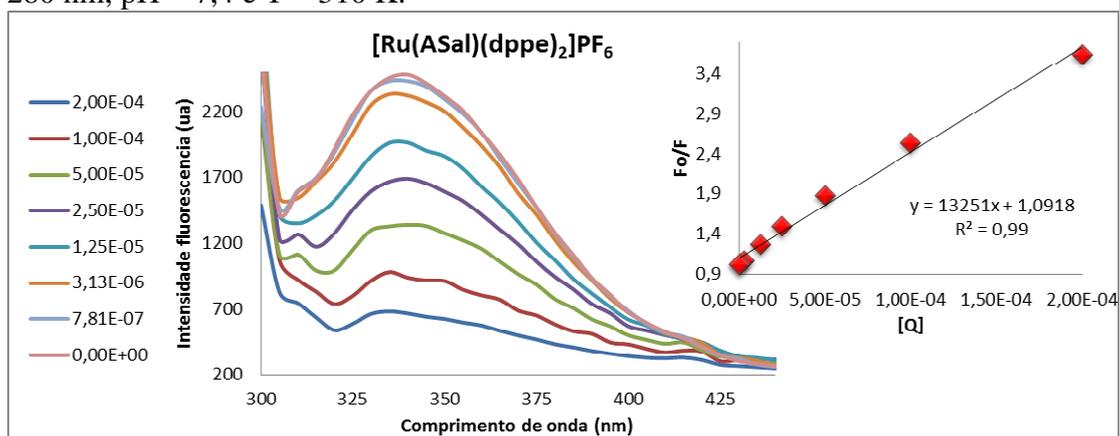


FIGURA A 44:Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

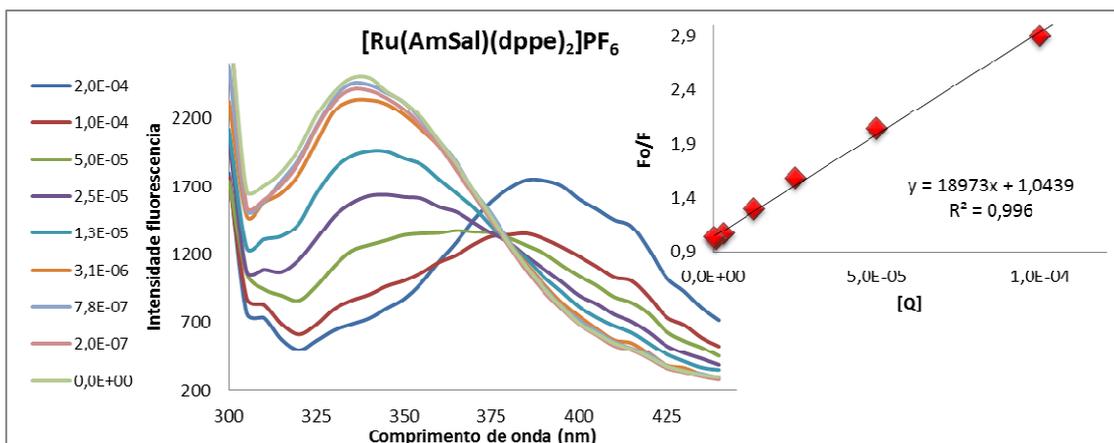


FIGURA A 45: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

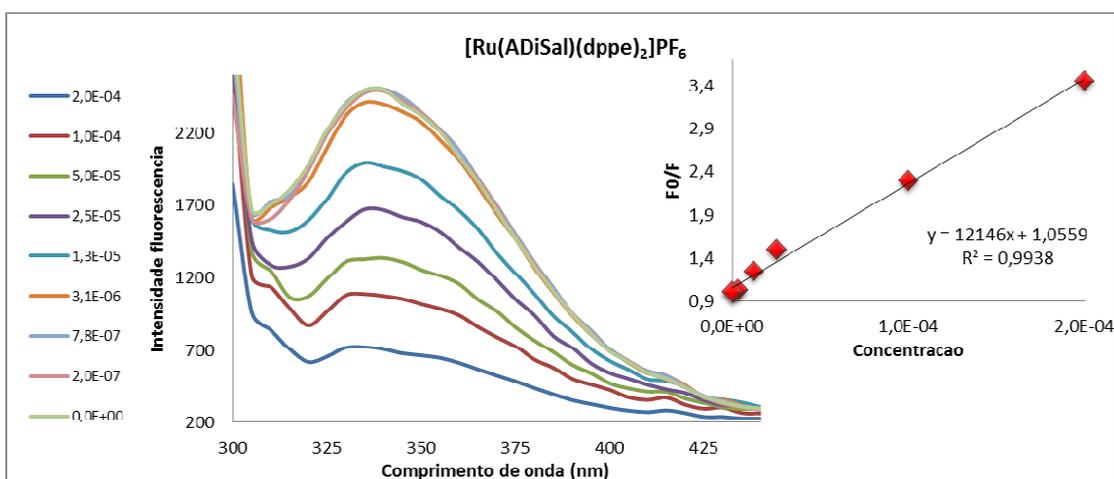


FIGURA A 46: Espectro de emissão da BSA com diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(\text{ADiSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$. Concentração da BSA = $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,4$ e $T = 310 \text{ K}$.

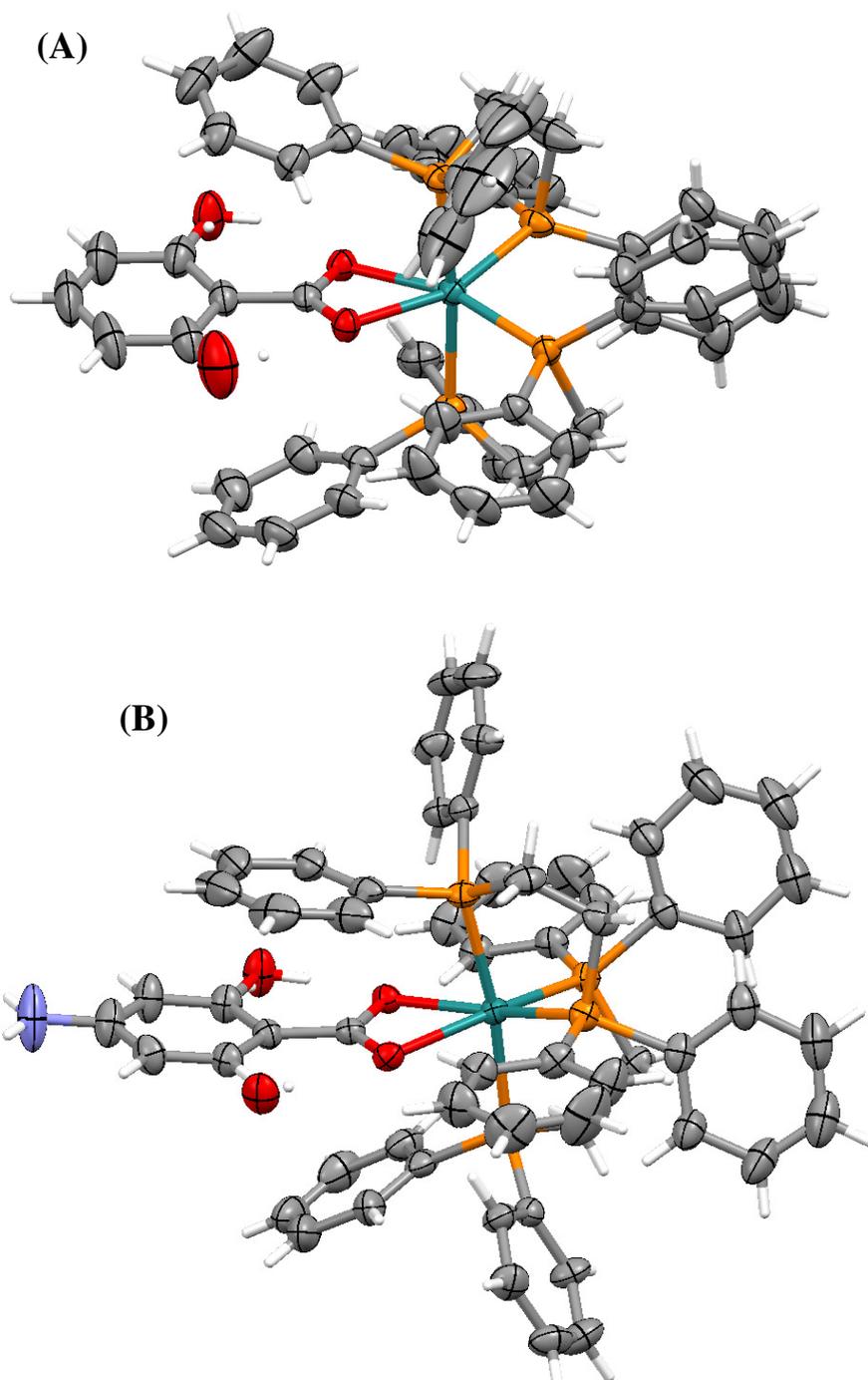


FIGURA A 47: Representação da desordem das estruturas cristalográficas para os complexos (A) $[\text{Ru}(\text{ASal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ e (B) $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$.