

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

**“SÍNTESE DE COMPLEXOS SEMI-SANDUÍCHE η^6 -*p*-cimeno-Ru(II)
CONTENDO LIGANTES BINITROGENADOS, INTERAÇÃO COM O
DNA E POTENCIAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS”**

Legna Andreina Colina Vegas*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

*** Bolsista CAPES**

São Carlos - SP

2013

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

C696s Colina Vegas, Legna Andreina
Síntese de complexos semi-sanduíche n6-p-cimeno-
Ru(II) contendo ligantes binitrogenados, interação
com o DNA e potenciais atividades farmacológicas /
Legna Andreina Colina Vegas. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
81 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2013.

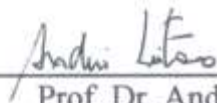
1. Rutênio. 2. Citotoxicidade. I. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Legna Andreina Colina Vegas**, realizada em 26 de março de 2013:*



Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista



Prof. Dr. Andrei Leitão



Prof. Dr. André Luiz Barboza Formiga

Em memória do meu pai Ángel

*Dedico essa Dissertação a minha mãe Gladys
por todo o carinho e apoio em todo o tempo.*

A todos meus irmãos e sobrinhos.

A mí.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, pelo apoio e por acreditar no trabalho, pela orientação amizade e cuidado.

A Profa. Dra. Maribel Navarro pelas discussões interessantes para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Deflon (IQSC-USP), pela resolução das estruturas cristalográficas.


Ao corpo técnico, administrativo e aos professores do Programa de Pós-graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar.

A os técnicos do DQ-UFSCar: Ademir Sartori, Luciana Vizoto e Paulo Lambertucci. Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, assim como ao Clayton Rodrigues pelos experimentos de RMN.

Aos amigos do Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos- LERCI: Jocely, João Paulo, Rodrigo, Murillo, Katia Mara, Marília, Monize, Fabio e Marcio pela amizade e apoio.

Aos amigos Angélica, Veroni e á pequena Alice, pelo apoio e por tudo o tempo juntos... Muito Obrigada!

Aos queridos Claudia, Lucas, Fernando e Maria Amélia por tudo o apoio e companheirismo e pelos momentos de distração.

A toda minha família pelo apoio tão longe de casa... Todos vocês são de mais! A minha Mãe por sempre acreditar em mim, além de minhas irmãs Lady, Isis e Maria Estela. A Meu Irmão Alfredo pelo Apoio, a meus sobrinhos: Germán Alfredo, Camila Lucia e José Alfredo. 

A Wilmer por tudo, obrigada pelo apoio, companhia e por todos os momentos juntos. A seus pais e irmãos.

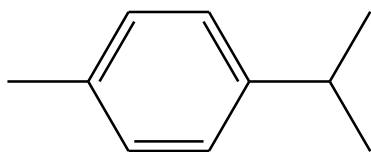
A Capes pela bolsa concedida.

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

μ	Micro
σ	Ligação sigma
π	Ligação pi
ν	Estiramento
δ	Deslocamento químico
s	Singleto
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
t	Tripleto
hept	Hepteto
m	Multipleteo
sept	Septeto
Λ_M	Condutividade Molar
dms _o -d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
η^6	Formação de três ligações envolvendo 6 átomos de carbono
ϵ	Coefficiente de Absortividade Molar
<i>p</i> -cym	<i>para</i> -cimeno

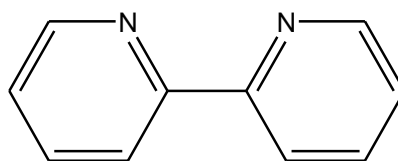
bipy	2,2'-bipiridina
fen	1,10'-fenantrolina
fenil-fen	4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina
mebipy	5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina
metobipy	4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina
t-butil-bipy	4,4'-di- <i>t</i> -butil-2,2'-bipiridina
DNAtc	Ácido desoxirribonucleico de timo de carneiro
COSY	Correlação espectroscópica
HMQC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações
HSQC	Correlação heteronuclear de ligação simples
OMS	Organização Mundial da Saúde
INCA	Instituto Nacional do Câncer
en	etilenodiamina
G	guanina
A	adenina
PTBA	Perclorato de tetrabutílamónio

ESTRUTURA E MASSA MOLECULAR DOS LIGANTES



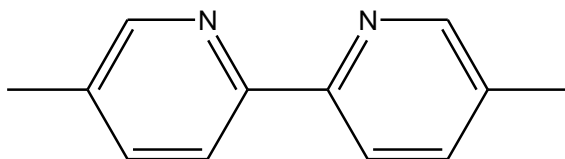
p-cym

MM: 134 g.mol⁻¹



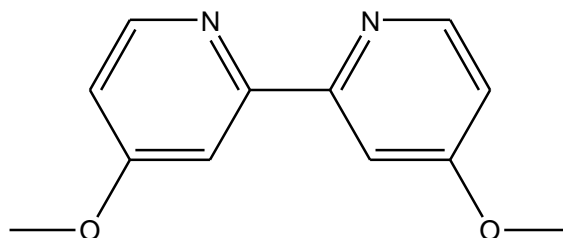
Bipy

MM: 156 g.mol⁻¹



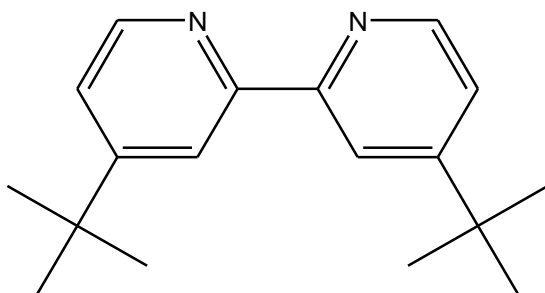
Mebipy

MM: 184 g.mol⁻¹



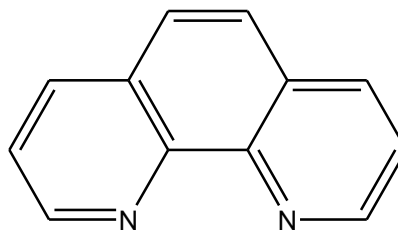
Meobipy

MM: 216 g.mol⁻¹



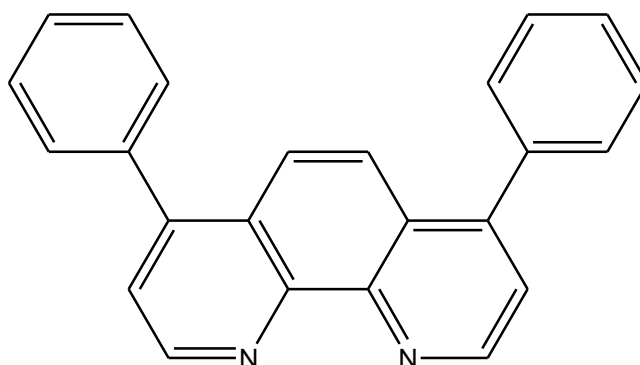
t-butylbipy

MM: 268 g.mol⁻¹



Fen

MM: 180 g.mol⁻¹



Fenilfen

MM: 332 g.mol⁻¹

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.1: Diagrama de Bertrand, mostrando os efeitos fisiológicos em função da dose e funções biológicas mais importantes de alguns elementos inorgânicos [3] 3
- Figura 1.2: Exemplo de complexos metálicos com propriedades farmacológicas 4
- Figura 1.3: Representação da mutação celular que da origem ao Câncer 5
- Figura 1.4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, estimados para 2012, por sexo, exceto pele não melanoma. 6
- Figura 1.5: Estrutura química de agentes anticancerígenos de Pt; a esquerda para direita: carboplatina, oxaliplatina e satraplatina 7
- Figura 1.6: Estrutura química de complexos metálicos pesquisados por seu potencial como agentes anticancerígenos: tetrafenilporfirina de ouro(III), diclorotitanoceno(IV) e malonato de gálio (III)..... 7
- Figura 1.7: Estrutura dos complexos de Ru(III), KP1019 e NAMI-A com propriedades antimetastática 8
- Figura 1.8: Estrutura geral dos complexos Ru(II)-areno do tipo semi-sanduíche, onde X e Y podem ser ligantes monodentados, XY representa um ligante quelato; Z é um grupo lábil. 9
- Figura 1.9: (A) Estrutura cristalina de raios x do complexo catiônico, anticancerígeno, $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-bifenil})(\text{en})]\text{PF}_6$. (B) Comprimentos de ligação C-C e Ru-C típicas para um complexo “piano stool” 9
- Figura 1.10: Complexos de Ru-areno (a) $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$ (b) RAPTA-C e (c) KP1558..... 10
- Figura 1.11: Interação π - π areno-purina. (A) Ligação do Ru(II) do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-DHA})(\text{en})(9\text{EtG-N7})]$ ao N7 e O6 da 9EtG. (B) Estrutura terciária B-DNA mostrando a coordenação do areno mediante intercalação entre os pares de bases G. 12

Figura 1.12: Interação entre adutos de guanina (G) e adenina (A) com um complexo anticancerígeno de Ru-areno	13
Figura 1.13: (a) Representação da dupla hélice do DNA (b) Tipos de interação complexo metálico-DNA	14
Figura 1.14: Espectro de absorvância na região do UV-Vis onde se observam os deslocamentos batocrômicos e hipocromico pela interação do [Au(Cloroquina)(PPh ₃)]PF ₆ com o DNA	15

Capítulo III

Figura 3.1: Esquema simplificado da sínteses dos complexos semi-sanduiche Ru(II)- η^6 - <i>p</i> -cym.....	19
---	----

Capítulo IV

Figura 4.1: Espectros de UV-Vis em CH ₂ Cl ₂ e IV do complexo precursor [Ru(η^6 - <i>p</i> -cym)(Cl) ₂] ₂	32
Figura 4.2: Espectro de RMN- ¹ H do [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymeno)(Cl) ₂] ₂ em dms _o -d ₆	33
Figura 4.3: Espectro de IV do complexo 6 em KBr	36
Figura 4.4: Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo 6 em CH ₂ Cl ₂	38
Figura 4.5: Espectro de RMN- ¹ H do complexo 6 em dms _o -d ₆	40
Figura 4.6: Espectro de RMN- ³¹ P{ ¹ H} do complexo 6, em dms _o -d ₆	41
Figura 4.7: Espectro de RMN- ¹³ C{ ¹ H} do complexo 6, em dms _o -d ₆	42
Figura 4.8: Espectro de RMN COSY{ ¹ H- ¹ H} do complexo 6 em dms _o -d ₆	43
Figura 4.9: Espectro de HSQC{ ¹ H- ¹³ C} do complexo 6 em dms _o -d ₆	44
Figura 4.10: Espectro de HMBC{ ¹ H- ¹³ C} do complexo 6 em dms _o -d ₆	44
Figura 4.11: Voltamograma cíclico em eletrodo de disco Pt, velocidade de varredura 100 mV/s, do complexo [Ru(<i>p</i> -cym)(mebipy)Cl], representando o comportamento eletroquímico desta família de compostos, feito em a) solução de diclorometano b) adicionando 200 μ L de acetonitrila e c) solução de acetonitrila.....	47

Figura 4.12: Voltamograma cíclico em eletrodo de disco de Pt, 100 mV/s de velocidade de scan, do complexo [Ru(p-cym)(mebipy)Cl]PF ₆ representando o comportamento eletroquímico desta família de compostos, feito em soluções de acetonitrila de: a) 5 mM b) 8 mM e c) 10 mM.	48
Figura 4.13: Estrutura ORTEP dos complexos 1-6 com elipsoide de 50% de probabilidade. As moléculas de solvente, o anion PF ₆ ⁻ e os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor claridade	51
Figura 4.14: Representação da estrutura molecular do complexo 2, incluindo os átomos numerados e mostrando o posição desordenada do ligante p-cym (77,58 % na linha solida e 22.42 % para a não continua)	52
Figura 4.15: Espectros eletrônicos das titulações dos complexos 1-6 com DNAtc. [DNAtc]= 3,0 x 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ , [Complexos]= ~1,0 x 10 ⁻³ mol.L ⁻¹	55
Figura 4.16: Gráfico de viabilidade celular dos complexos 6 e 2 na linhagem MDA-MB231.....	58
Figura 4.17: Estudo morfológico sob um microscópio invertido (100×) de células MDA-MB-231, 0,5% DMSO (controle-C) e células tratadas com as concentrações IC ₅₀ dos complexos 2 e 6. Em todos os painéis, as imagens são representativas de muitas fotos tiradas em n = 3 experimentos.....	59

LISTA DE TABELAS

Capítulo IV

Tabela 4.1: Dados de microanálise obtidos dos complexos sintetizados	34
Tabela 4.2: Valores encontrados de Condutividade molar (Λ_M , $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)	34
Tabela 4.3: Atribuição das principais vibrações dos complexos 1-6.....	37
Tabela 4.4: Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm) e coeficientes de absorvidade molar (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) dos complexos 1-6 em soluções de $\sim 40 \mu\text{M}$ em CH_2Cl_2	38
Tabela 4.5: Deslocamento químico de RMN- ^1H em dmsO-d_6	41
Tabela 4.6: Potenciais electroquímicos para todos os complexos em acetonitrilo, entre parêntesis encontra-se os processos referentes à Figura 4.11	48
Tabela 4.7: Comprimentos de ligação (\AA) e ângulos selecionados ($^\circ$) em $[\text{Ru}(\text{p-cym})(\text{butbipy})\text{Cl}]\cdot\text{PF}_6\cdot 0.5\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (6)	50
Tabela 4.8: Resumo dos dados obtidos nas titulações espectroscópicas dos complexos 1-6 com o DNAtc.....	56
Tabela 4.9: Viabilidade celular complexos após 48h de incubação com as linhagens celulares	58

RESUMO

A síntese, caracterização espectroscópica, as estruturas cristalinas e electroquímica de complexos “*piano stool*” π -arenos de rutênio (II) com bipyridina ou seus derivados como ligantes doadores são descritos. Uma série de seis compostos organometálicos de fórmula $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cymeno})(\text{N}\cap\text{N})]\text{PF}_6$ [$\text{N}\cap\text{N}$ = 1,10'-fenantrolina (fen), 4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina (fenilfen), 2,2'-bipyridina (bipy), 5,5'-dimetil-2,2'-bipyridina (mebipy), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipyridina (meobipy) e 4,4'-di-*t*-butil-2,2'-bipyridina (butbipy)] foram sintetizados e caracterizados. As estruturas no estado sólido de seis complexos foram determinadas por cristalografia de raios X e a sua caracterização foi completada por espectroscopia de absorção na região do IV, condutividade molar e espectroscopia de RMN (^1H e ^{13}C). Experimentos electroquímicos foram realizados por voltametria cíclica para estimar o potencial redox do par Ru(II)/Ru(III), o qual não varia significativamente entre os complexos. Adicionalmente, foram feitas titulações espectroscópicas dos complexos com o DNA, para estimar constantes de interação entre os complexos metálicos e esta macromolécula, encontrando-se constantes de interação com valores que estão no intervalo para complexos metálicos já reportados na literatura com interações reversíveis.

ABSTRACT

The synthesis, spectroscopic characterization, crystal structures and electrochemistry of π -arene piano-stool ruthenium (II) complexes with pyridine or derivatives as nitrogen donor ligands are described. A series of six organometallic compounds of formulae $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{N}\cap\text{N})]\text{PF}_6$ [$\text{N}\cap\text{N}$ = 1,10'-phenantroline (phen), 4,7'-diphenyl-1,10'-phenantroline (phphen), 2,2'-bipyridine (bipy), 5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine (mebipy), 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine (meobipy) and 4,4'-di-*t*-butyl-2,2'-bipyridine (butbipy)] were synthesized and fully characterized. The solid state structures of the six complexes were determined by X-ray crystallography and their characterization was completed by FT-IR spectroscopy, molar conductivity and NMR studies (^1H and ^{13}C). Electrochemical experiments were performed by cyclic voltammetry to estimate the redox potential of the Ru(II)/Ru(III) couple and this potential does not vary significantly between the complexes. Additionally, spectroscopic titration with DNAct were done, to estimate interaction constants between the metal complex and this macromolecule. The values of the constants indicate a reversible interaction with DNA, which is in concordance with the literature.

SUMÁRIO

Capitulo I. Fundamentos Teóricos	1
1.- Introdução	2
1.1.- Química Bioinorgânica	2
1.2.- Câncer	4
1.2.1.- Métodos no tratamento do câncer.....	6
1.3.- Complexos metálicos como agentes quimioterapeúticos	7
1.3.1.- Complexos Organometálicos de Rutênio	8
1.3.1.1 Atividades e alvos biológicos dos complexos organometálicos de rutênio.....	11
1.4.- Ligantes nitrogenados	13
1.5.- Interações dos complexos metálicos com o DNA	13
Capitulo II. Objetivos.....	16
2.- Objetivo Geral.....	17
2.1.- Objetivos específicos	17
Capitulo III. Parte Experimental	18
3.- Parte Experimental.....	19
3.1.- Materiais e métodos	19
3.1.1.- Obtenção da atmosfera inerte	19
3.1.2.- Solventes e Reagentes.....	20
3.2.- Técnicas experimentais e Instrumentação	20
3.2.1.- Balança analítica	20
3.2.2.- Análise elementar	20
3.2.3.- Condutividade molar.....	21
3.2.4.- Espectroscopia vibracional na região de infravermelho.....	21

3.2.5.- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	21
3.2.6.- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	21
3.2.7.- Medidas de eletroquímica.....	22
3.2.8.- Difração de raios X.....	22
3.3.- Reações de sínteses.....	22
3.3.1.- Síntese de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{Cl})_2]_2$	22
3.3.2.- Síntese geral de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{N}\cap\text{N})(\text{Cl})]\text{PF}_6$	23
3.3.2.1.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cym})(1,10'\text{-fenantrolina})]\text{PF}_6$ (1).....	23
3.3.2.2.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cym})(4,7'\text{-difenil-1,10'\text{-fenantrolina}})]\text{PF}_6$ (2).....	23
3.3.2.3.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cym})(2,2'\text{-bipiridina})]\text{PF}_6$ (3).....	24
3.3.2.4.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cym})(5,5'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina}})]\text{PF}_6$ (4).....	24
3.3.2.5.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cym})(4,4'\text{-dimetoxi-2,2'\text{-bipiridina}})]\text{PF}_6$ (5).....	25
3.3.2.6.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-p-cym})(4,4'\text{-t-dibutil-2,2'\text{-bipiridina}})]\text{PF}_6$ (6).....	25
3.4.- Técnicas para o estudo da interação complexo/DNA.....	26
3.4.1.- Preparação da solução de DNAtc.....	26
3.4.2.- Titulações espectroscópicas.....	26
3.4.3.- Medidas de viscosidade.....	27
3.5.- Determinação do coeficiente de partição.....	27
3.6.- Ensaio de citotoxicidade.....	27
3.6.1.- Linhagem de células e condições de cultura.....	28
3.6.2.- Ensaio citotóxico.....	29
Capítulo IV. Resultados e Discussão.....	30
4.- Resultados e discussão.....	31
4.1.- Síntese e Caracterização.....	31
4.2.- Sínteses dos compostos de forma geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{N}\cap\text{N})(\text{Cl})]\text{PF}_6$	33
4.2.1.- Análise elementar.....	33
4.2.2.- Condutividade Molar.....	34

4.2.3.- Espectroscopia vibracional na região de infravermelho.....	35
4.2.4.- Espectroscopia de absorção na região UV-Vis.....	37
4.2.5- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	39
4.2.5.1.- RMN 1D: ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	39
4.2.5.2.- RMN 2D: COSY, HMBC e HSQC	42
4.2.6.- Medidas eletroquímicas	45
4.2.7.- Difração de raios X.....	49
4.3.- Avaliação da interação dos complexos com o DNA: Titulações espectroscópicas	53
4.4.- Testes Biológicos	58
Ensaio de Citotoxicidade	58
Capítulo V. Conclusões.....	60
5.- Conclusões	61
Capítulo VI. Bibliografia.....	62
Apêndices.....	71

Capítulo I. Fundamentos Teóricos

1.- Introdução

Esta dissertação está relacionada com a síntese e caracterização de complexos de Ru(II)-areno contendo ligantes binitrogenados e suas potenciais aplicações como agentes anticancerígenos. Um foco deste trabalho envolve investigar e compreender as propriedades dos complexos, com vista à obtenção de um conhecimento mais profundo de tais sistemas. Este capítulo discute brevemente o campo dos complexos organometálicos de Ru(II) e trabalhos anteriores na área de complexos metálicos na química bioinorgânica.

1.1.- Química Bioinorgânica

O fato de que nos seres vivos dominarem basicamente os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, que são os "clássicos" elementos de química orgânica, criou a ideia errada de que apenas os compostos orgânicos são essenciais para os seres vivos, e os elementos e compostos inorgânicos não tinham nenhum papel nos processos da vida. Essa ideia começou a se fragmentar quando Friedrich Wöhler sintetizou (em 1828) um produto orgânico, como ureia a partir de um reagente puramente inorgânico, como o cianeto de amônio. A química bioinorgânica tenta correlacionar a atividade biológica de um sistema inorgânico com as suas características estruturais e eletrônicas. S. Lippard [1] define as grandes prioridades da Química Bioinorgânica como:

- ◆ Estudo do papel de biometais e seus mecanismos de ação.
- ◆ Síntese de modelos simples para reproduzir o comportamento de sistemas mais complexos (por exemplo: o estudo de centros ativos de enzimas dependentes de íons metálicos).
- ◆ Adição de íons metálicos ou compostos de coordenação em sistemas biológicos como prova de estrutura e funções.

Íons metálicos são geralmente classificados como "tóxicos" ou "não tóxicos", mas sua atividade biológica depende grandemente das ligações, que

podem ser controladas, permitindo que os metais "tóxicos" possam ter propriedades terapêuticas [2]. É verdade que a toxicidade depende da concentração, e os elementos considerados essenciais, os quais apresentam várias funções importantes em nosso organismo, podem ser tóxicos em doses elevadas (Figura 1.1). Portanto, é muito importante investigar e compreender os efeitos da variação dos números de oxidação, geometria, ligantes coordenados e as propriedades biológicas dos complexos metálicos, para planejar fármacos com propriedades terapêuticas pretendidas com sucesso [3].

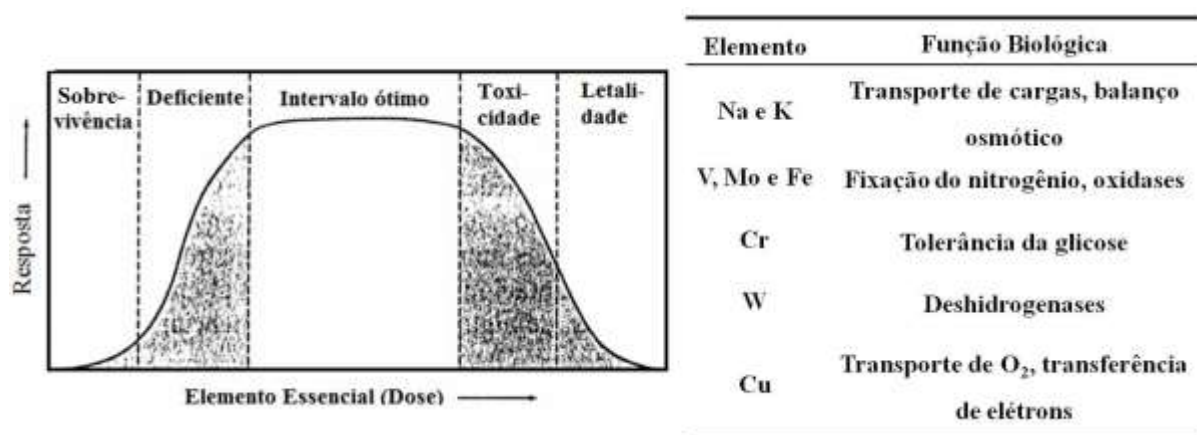


Figura 1.1: Diagrama de Bertrand, mostrando os efeitos fisiológicos em função da dose e funções biológicas mais importantes de alguns elementos inorgânicos [3]

Além das contribuições na compreensão de muitos sistemas biológicos, a química bioinorgânica proporcionou enormes avanços na medicina, graças às sínteses de novos fármacos, que apresentam íons metálicos em suas estruturas. Como exemplo, são especialmente importantes os fármacos anticancerígenos de Pt(II), que tem o DNA como alvo biológico, os compostos antiartríticos de Au(I) e os radiofármacos que contém Tc(V), assim como os compostos com atividade anticancerígena de Ru(III) e Ru(II), entre outros (Figura 1.2). Neste sentido, na bibliografia encontra-se que a incorporação de um metal na estrutura de um fármaco orgânico pode modificar

significativamente sua atividade, mecanismos de ação, características farmacocinéticas, seletividade, citotoxicidade, etc.

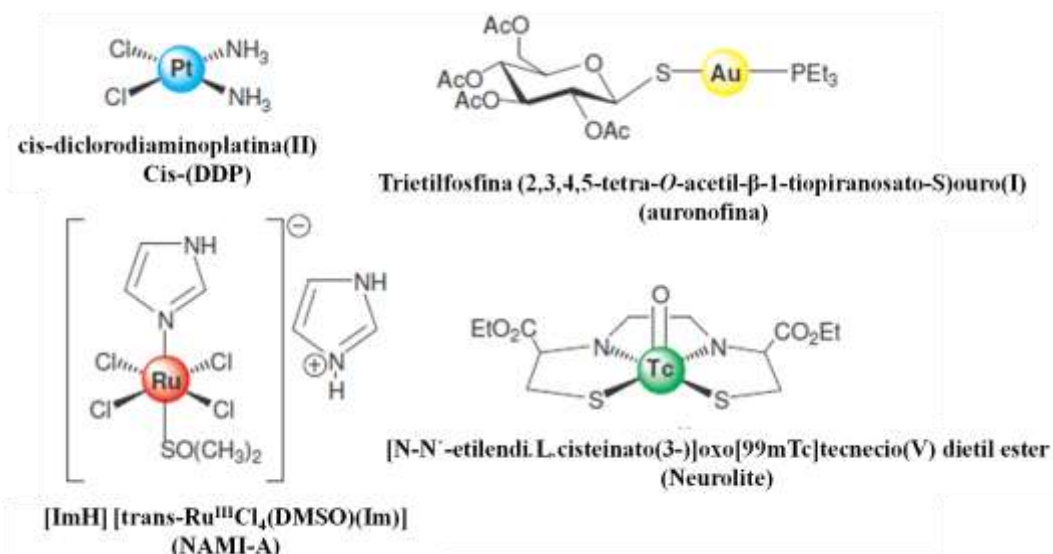


Figura 1.2: Exemplo de complexos metálicos com propriedades farmacológicas

1.2.- Câncer

O termo câncer é usado como denominação geral para um grupo de mais de cem doenças nas quais as células de uma parte do corpo começam a crescer fora de controle [4]. Existem muitos tipos de câncer, mas todos eles começam por causa do crescimento descontrolado de células anormais. Em vez de morrer, as células cancerosas continuam a crescer e a multiplicação leva a novas células anormais. Além disso, as células cancerosas podem invadir outros tecidos, algo que as células normais não podem fazer (Figura 1.3). Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, teremos 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas [4].

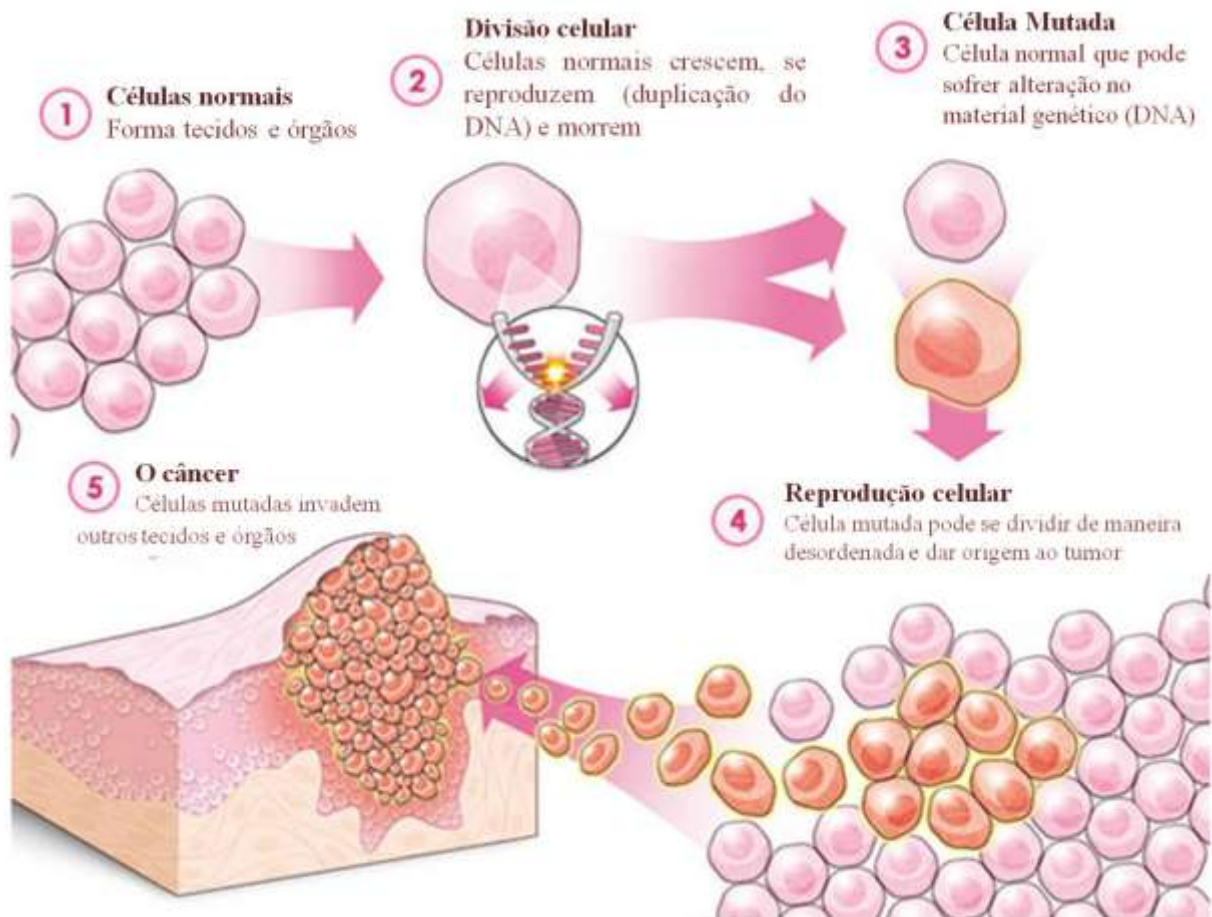


Figura 1.3: Representação da mutação celular que dá origem ao câncer [5]

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude desta patologia no país. Os tipos mais incidentes de câncer podem ser observados na Figura 1.4.



Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual		
Próstata	60.180	30,8%	Homens		Mama Feminina	52.680	27,9%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Mulheres		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto		15.960	8,4%	
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide		10.590	5,6%	
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão		10.110	5,3%	
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago		7.420	3,9%	
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário		6.190	3,3%	
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero		4.520	2,4%	
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central		4.450	2,4%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Linfoma não Hodgkin		4.450	2,4%	

Figura 1.4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, estimados para 2012, por sexo, exceto pele não melanoma [4]

1.2.1.- Métodos no tratamento do câncer

Nas últimas décadas, vários métodos foram desenvolvidos para o tratamento desta doença, estes diferem dependendo da classe, do estado e da localização do tumor. Os tratamentos mais comuns são os seguintes:

- ◆ **Cirurgia:** este método é só aplicável para tumores primários e com metástase localizada.
- ◆ **Radioterapia:** este método emprega radiações de alta energia para matar as células cancerígenas; pode ser usado para tumores sólidos e com metástase localizada; apresenta vários efeitos secundários, tais como: danos da superfície do epitélio, e o inchamento como consequência de inflamação.
- ◆ **Quimioterapia:** é baseada no uso de fármacos conhecidos como agentes anti-neoplásicos; que atuam destruindo as células com divisão rápida; uma das principais propriedades da maioria das células cancerosas. Isso significa que também atuam nas células com divisão rápida em condições normais: as células da medula óssea, o trato gastrointestinal e os folículos pilosos, dando lugar aos efeitos secundários mais comuns da quimioterapia.

Em muitos casos o câncer é tratado mediante a combinação dos métodos anteriores, para aumentar a probabilidade de cura.

1.3.- Complexos metálicos como agentes quimioterapêuticos

A quimioterapia é um termo geral para o tratamento de doenças mediante o uso de compostos farmacêuticos por várias vias, dentre elas via oral ou intravenosa, mas em geral, usado para substâncias ativas no tratamento do câncer. Desde a descoberta da atividade antineoplásica da cisplatina, por Barnnet Rosenberg, a quimioterapia baseada em complexos de platina é um campo de intensa pesquisa há mais de 40 anos. Destacam-se os complexos da Figura 1.5 [6].

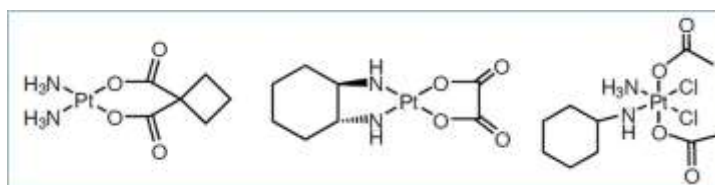


Figura 1.5: Estrutura química de agentes anticancerígenos de Pt; da esquerda para direita: carboplatina, oxaliplatina e satraplatina

Estes apresentam efeitos secundários severos, frequentemente náuseas, vômitos, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros, assim como resistência natural, ou adquirida. Como consequência, atualmente os esforços não só estão centrados no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais de Pt(II), mas também na busca baseada em outros metais, entre os quais destaca-se complexos de Au, Ti e Ga.

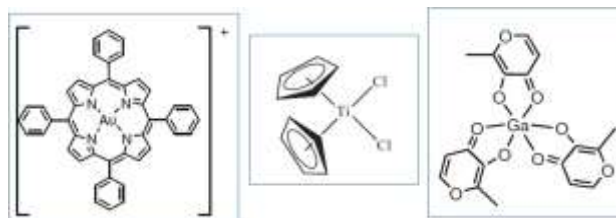


Figura 1.6: Estrutura química de complexos metálicos pesquisados por seu potencial como agentes anticancerígenos: tetrafenilporfirina de ouro(III), diclorotitanoceno(IV) e maltolato de gálio (III)

A atividade biológica de diversos complexos de rutênio se destaca pela capacidade de ter ação *in vitro* e *in vivo*, contra diversas linhagens de células tumorais, assim como menor citotoxicidade, em comparação com os complexos de platina. Alguns dos mais bem-sucedidos complexos de rutênio podem ser observados na Figura 1.7. Destaca-se o complexo *trans*-tetracloro(dimetilsulfoxido)(imidazol)rutenato(III) conhecido como NAMI-A, que se encontra em fase II de testes clínicos, apresentando atividades antimetastáticas [7]. Outro composto é *trans*-tetraclorobis(1H-indazol)rutenato(III) ou KP1019, o qual finalizou a fase I dos ensaios clínicos, e mostrou-se eficaz *in vitro* contra linhagens celulares resistentes à cisplatina [8].

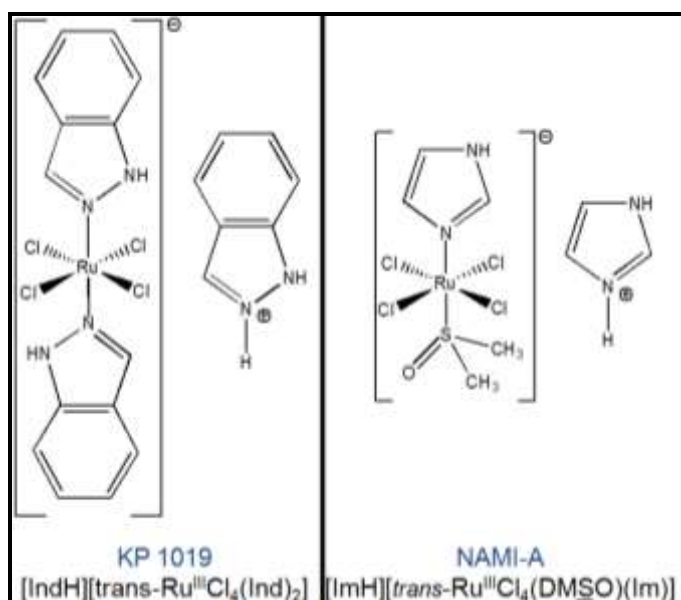


Figura 1.7: Estrutura dos complexos de Ru(III), KP1019 e NAMI-A com propriedades antimetastáticas

1.3.1.- Complexos Organometálicos de Rutênio

O uso de complexos de Ru(II)- areno como potenciais agentes anticancerígenos tem sido explorado, uma vez que eles geralmente possuem propriedades adequadas, tais como: estabilidade, solubilidade em água e baixa toxicidade. Porém, a estabilização do centro metálico pode também ser facilmente alcançada em complexos formados por ligações na forma η^6 com

ligantes aromáticos, o que leva a complexos conhecidos como semi-sanduíche ou “*piano-stool*” (cadeira de piano) [9]. A típica estrutura de complexos deste tipo é mostrada na Figura 1.8.

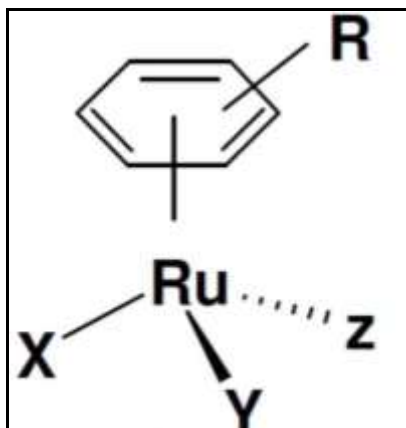


Figura 1.8: Estrutura geral dos complexos Ru(II)-areno do tipo semi-sanduíche, onde X e Y podem ser ligantes monodentados, XY representa um ligante quelato; Z é um grupo lábil

Estes complexos exibem as características normais dos complexos monoareno-Ru(II), como pode-se observar na Figura 1.9: uma alteração no comprimento de ligação C-C, na parte do areno coordenado, e um comprimento irregular na ligação Ru-C, onde a mais longa é 2,244 Å (comparada com a mais curta 2,137 Å).

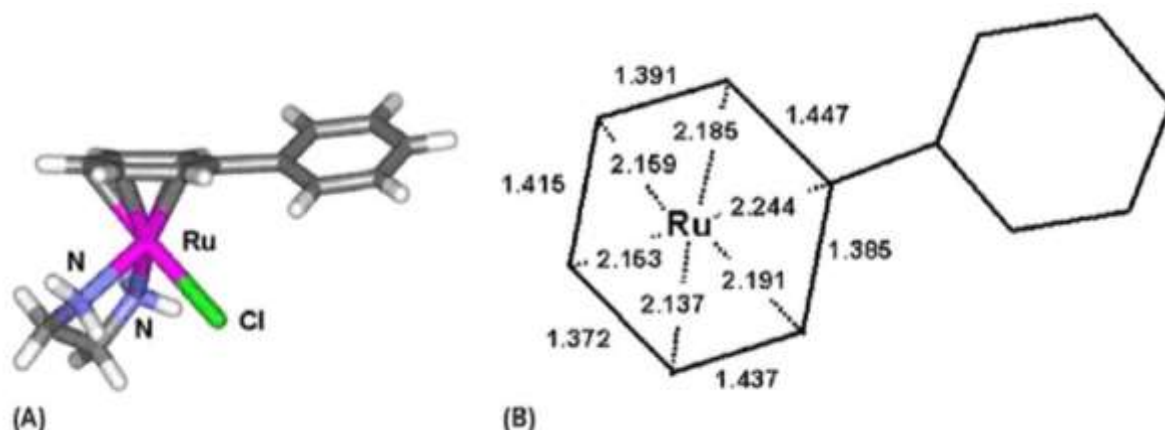


Figura 1.9: (A) Estrutura cristalina de raios x do complexo catiônico, anticancerígeno, $[RuCl(\eta^6\text{-bifenil})(en)]PF_6$. (B) Comprimentos de ligação C-C e Ru-C típicos para um complexo “*piano stool*”

A presença da ligação π areno-Ru(II) tem uma influência notável sobre a reatividade química dos compostos deste tipo [10]. Existe um equilíbrio delicado entre a ligação σ , formada pela interação dos orbitais moleculares $p\pi$ ligantes cheios, do areno, com o orbital σ aceitador, vazio, do Ru. A retrodoação π da ligação envolve a interação de um orbital $4d^6$ do metal com a orbital $p\pi^*$, vazio, do areno. Esta classe de compostos organometálicos de rutênio tem sido investigada há mais de vinte anos. Um dos primeiros complexos desta classe foi o $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$ (Figura 1.10a) [11], o qual apresenta uma forte inibição da topoisomerase II, essencial durante o processo da replicação celular. A coordenação do PTA (PTA=1,3,5-triaza-7-fosfo-adamanteno), em vez de DMSO, produz os chamados complexos RAPTA (Figura 1.10b). Dyson e col. demonstraram que, esta troca de ligante aumenta a solubilidade dos compostos em meio aquoso, obtendo interessantes atividades antimetastática, com elevada seletividade ao lado de uma baixa toxicidade geral [12]. Substituído o PTA, pelo ligante 3,5,6-ciclofosfato- α -D-glucopiranosíde, é formado o complexo de rutênio KP1558 (Figura 1.10c), o qual mostrou, entre os derivados testados, a maior atividade citotóxica para diferentes células de câncer [13].

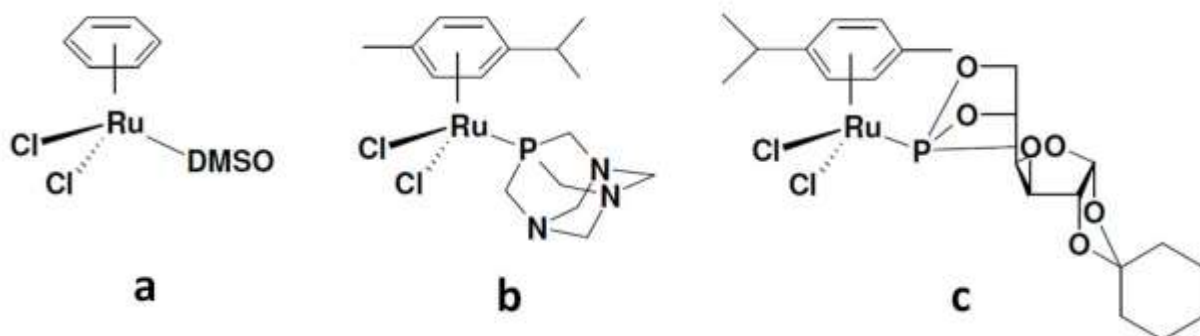


Figura 1.10: Complexos de Ru-areno (a) $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_6)(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$ (b) RAPTA-C e (c) KP1558

Nos últimos anos, vem se destacando os complexos contendo ligantes bidentados, pois tendem a ser mais ativos do que aqueles que são apenas

monodentados. O tipo de ligante quelante desempenha um papel importante e tem uma forte influência sobre as propriedades químicas, físicas e biológicas destes compostos [14]. Quando XY (Figura 1.8) é alterada de etilendiamina (en) para o acetilacetonato (acac) são obtidos complexos neutros, que têm uma maior densidade de elétrons no centro metálico; a velocidade de hidrólise do grupo de partida (Z) é consideravelmente aumentada, assim como também a seletividade na ligação com as nucleobases do DNA [15].

1.3.1.1 Atividades e alvos biológicos dos complexos organometálicos de rutênio

O campo de complexos de Ru(II)-areno com propriedades antitumoral e antimetastática foi iniciado por Paul Dyson e Peter Sadler [16-17], após a noção de usar compostos de Ru(II)-areno como agentes anticancerígenos, introduzidos por Tocher em 1992, que observou um aumento da citotoxicidade, mediante a coordenação do agente anticancerígeno metronidazol [1-b-(hidroxietil)-2-metil-5-nitro-imidazol] num fragmento rutênio-benzeno-dicloro [18]. Inicialmente, os protótipos de Ru(II)-areno avaliados, para propriedades anticancerígenas em 2001, foram os de tipo RAPTA (discutidos anteriormente), assim como o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{Ph})(\text{en})\text{Cl}]^+$ e alguns análogos do laboratório de Sadler, os quais parecem ter um amplo espectro de citotoxicidade para as células cancerosas, ativos não somente em células tumorais humanas de ovário A2780, mas também em células de câncer de cólon HT29, pancreáticas Panc-1 e pulmão NX02, com valores de IC_{50} num intervalo entre 1-13 μM [9]. Outra classe interessante de compostos de rutênio contendo ligantes arilazopiridina (azpy) mostra promissora atividade citotóxica, 30 vezes maior do que a cisplatina em células de câncer de mama [19].

O uso de modelos capazes de reproduzir o comportamento químico das interações metal-biomolécula é uma das aproximações mais utilizadas, que

tenta não só reproduzir a atividade biológica, mas também explicar como é produzida a interação entre o metal e uma molécula orgânica. Desta forma é possível desenvolver novas gerações de complexos mais eficientes e menos tóxicos para o paciente.

Um grande número de investigadores examinou a ligação de compostos Ru(II)-areno com o DNA, considerando que os compostos se ligam ao DNA mediante o N7 da Guanina. Estudos realizados mediante difração de raios X (Figura 1.11) com a 9-etilguanina (9EtG) e o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-DHA})(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (DHA= dihidroantraceno), indicaram uma forte interação π - π entre o areno e a nucleobase [9].

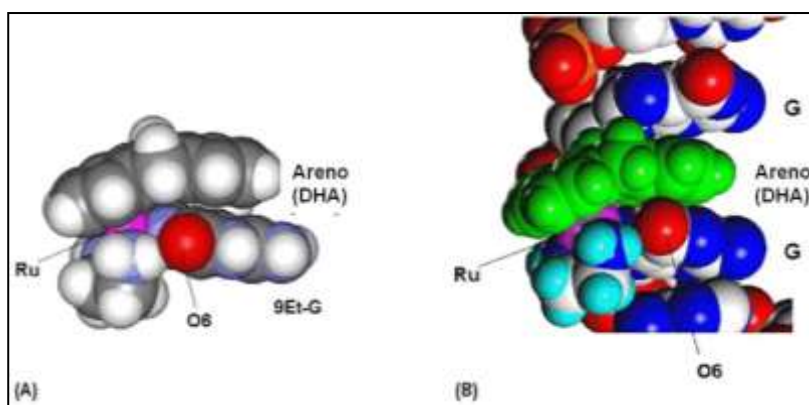


Figura 1.11: Interação π - π areno-purina. (A) Ligação do Ru(II) do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-DHA})(\text{en})(9\text{EtG-N7})]$ ao N7 e O6 da 9EtG. (B) Estrutura terciária B-DNA mostrando a coordenação do areno mediante intercalação entre os pares de bases G [9]

A interação de complexos do tipo $[\text{RuCl}(\text{areno})(\text{en})]^+$ também foi estudada com as bases nitrogenadas em solução aquosa. A reatividade de vários sítios de ligação das nucleobases em pH neutro, apresentou o comportamento: $\text{G}(\text{N7}) > \text{T}(\text{N3}) > \text{C}(\text{N3}) > \text{A}(\text{N7})$ [20]. Esta seletividade aparentemente está relacionada com os hidrogênios presentes no ligante etilendiamina (Figura 1.12),

pois é capaz de formar ligações de hidrogênio com os oxigênios exocíclicos (C6O da G), mas apresentam repulsões eletrostáticas com os grupos amino exocíclicos das nucleobases (C6NH₂ da A).

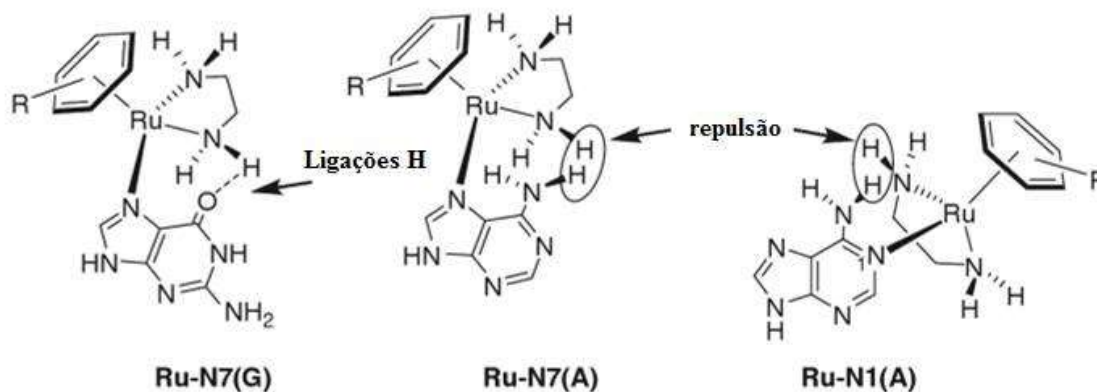


Figura 1.12: Interação entre adutos de guanina (G) e adenina (A) com um complexo anticancerígeno de Ru-areno

1.4.- Ligantes nitrogenados

A presença de um ligante do tipo quelato proporciona estabilidade adicional na estrutura do complexo. Ligantes 2,2'-bipiridina, 1,10'-fenantrolina e seus derivados, além de serem fortes aceitadores π , possibilitam a formação de estruturas supramoleculares mediante o estabelecimento de interações não covalentes do tipo π - π as quais são ligeiramente direcionais e mais fracas que as ligações de hidrogênio, podendo aumentar a estabilidade dos complexos metálicos tanto em solução, como em estado sólido. Por essas razões foram escolhidos estes tipos de ligantes para o desenvolvimento deste trabalho.

1.5.- Interações dos complexos metálicos com o DNA

Desde a descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA, à avaliação de moléculas pequenas, que reconhecem e reagem com sítios específicos desta macromolécula tem sido uma área de grande interesse. A estrutura primária do DNA é definida como a ordem, ou sequência de

desoxinucleótidos, os quais têm três componentes: uma base nitrogenada, uma pentose, e um grupo fosfato. A superfície da molécula de DNA se caracteriza pela existência de dois sulcos de tamanho diferente, como mostrado na Figura 1.13a [21].

Os complexos metálicos exibem uma variedade de interações com o DNA (Figura 1.13b), os quais são classificados em dois tipos: covalente e não covalente. Interações covalentes são de maior magnitude e na maioria dos casos irreversíveis, destacando-se as ligações entre os complexos metálicos e o átomo N(7) das bases nitrogenadas: guanina e adenina. As interações não covalentes são interações fracas e menos energéticas, em comparação com as ligações covalentes, encontrando-se na literatura intercalação, interações por formação de pontes de hidrogênio e eletrostáticas.

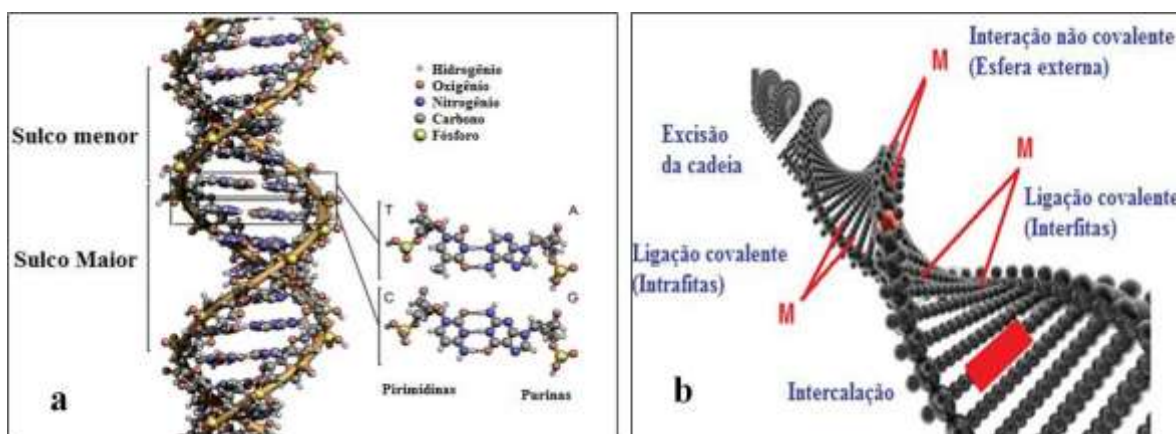


Figura 1.13: (a) Representação da dupla hélice do DNA (b) Tipos de interação complexo metálico-DNA

O DNA é considerado um alvo de ação importante a ser atingido pelos fármacos para curar muitas doenças, especialmente o câncer. Neste trabalho foram realizados estudos da interação dos diversos complexos metálicos sintetizados e o DNA de timo de carneiro (DNAtc). Mediante os resultados obtidos será possível entender o modo e a magnitude da interação. Um dos testes usados para avaliar a interação dos complexos com o DNA

consiste em monitorar a perturbação causada na região de transferência eletrônica presente nos complexos quando são adicionadas alíquotas de um complexo metálico a uma solução de DNA. Este método é geralmente conhecido como titulação espectroscópica, e se existe uma interação entre o complexo e o DNA, é possível observar mudanças no espectro, devido a variação das transições dos elétrons n e π , para o estado π^* . Observa-se, deslocamentos para comprimentos de onda de maior intensidade (deslocamentos batocrômicos) e a diminuição da intensidade da banda (hipocromismo). Exemplos destes comportamentos estão na

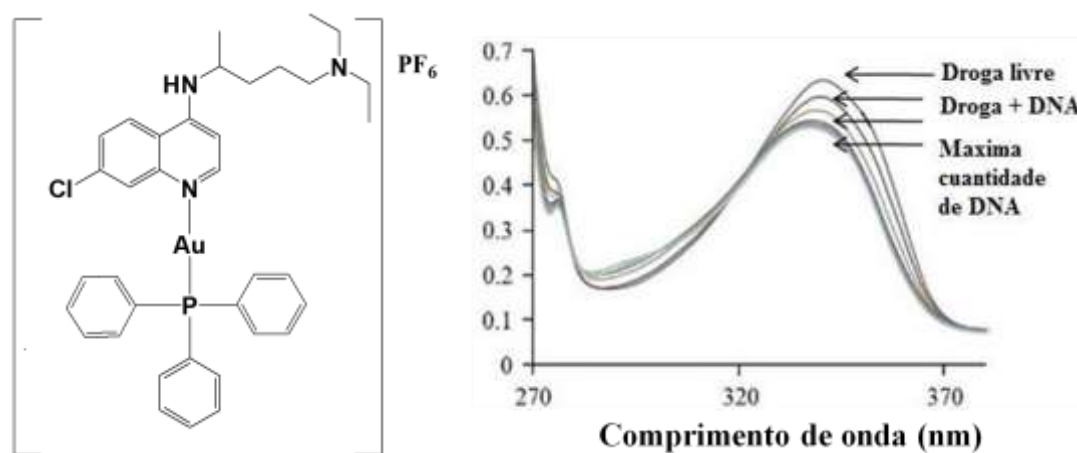


Figura 1.14: Espectro de absorvância na região do UV-Vis onde se observam os deslocamentos batocrômicos e hipocrômico pela interação do $[\text{Au}(\text{Cloroquina})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ com o DNA [22]

Capítulo II. Objetivos

2.- Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é o planejamento racional, síntese e estudo das propriedades químicas de complexos semi-sanduíche, Ru(II)- η^6 -*p*-cym, contendo ligantes dinitrogenados em suas estruturas, estudar suas interações com o DNA e testar suas citotoxicidade frente a células tumorais.

2.1.- Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os complexos de fórmula geral [Ru(η^6 -*p*-cym)(N \cap N)(Cl)]PF₆ (onde N \cap N = 1,10'-fenantrolina (fen), 4,7'-difenil-1,10'-fenantrolina (fenilfen), 2,2'-bipiridina (bipy), 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (mebipy), 5,5'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (meobipy) e 5,5'-di-*t*-butil-2,2'-bipiridina (butbipy)) mediante as diversas técnicas espectroscópicas como: RMN, UV-Vis, IV, análise elementar, condutimetria, voltametria cíclica e de pulso diferencial e difração de raios-X.
- Realizar titulações espectroscópicas complexo metálico/DNA de timo de carneiro (DNA_{tc}) e calcular constantes de interação para a comparação, dos complexos metálicos sintetizados e os reportados na literatura.
- Realizar medidas de viscosidade complexo metálico/DNA_{tc}.
- Realizar medidas de lipofilicidade dos complexos metálicos em *n*-octanol/água e calcular o *log P*.
- Realizar testes em células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), pulmão (A549) e não tumoral (L929) mediante o ensaio do MTT e calcular o valor de IC₅₀.

Capítulo III. Parte Experimental

3.- Parte Experimental

Neste capítulo são descritas as técnicas gerais e a instrumentação usada no desenvolvimento do trabalho. Quando não for especificada a temperatura do experimento, este foi feito a 25 °C. No seguinte esquema é apresentado, de maneira resumida, o método seguido na síntese dos complexos semi-sanduíche Ru(II)- η^6 -*p*-cym.

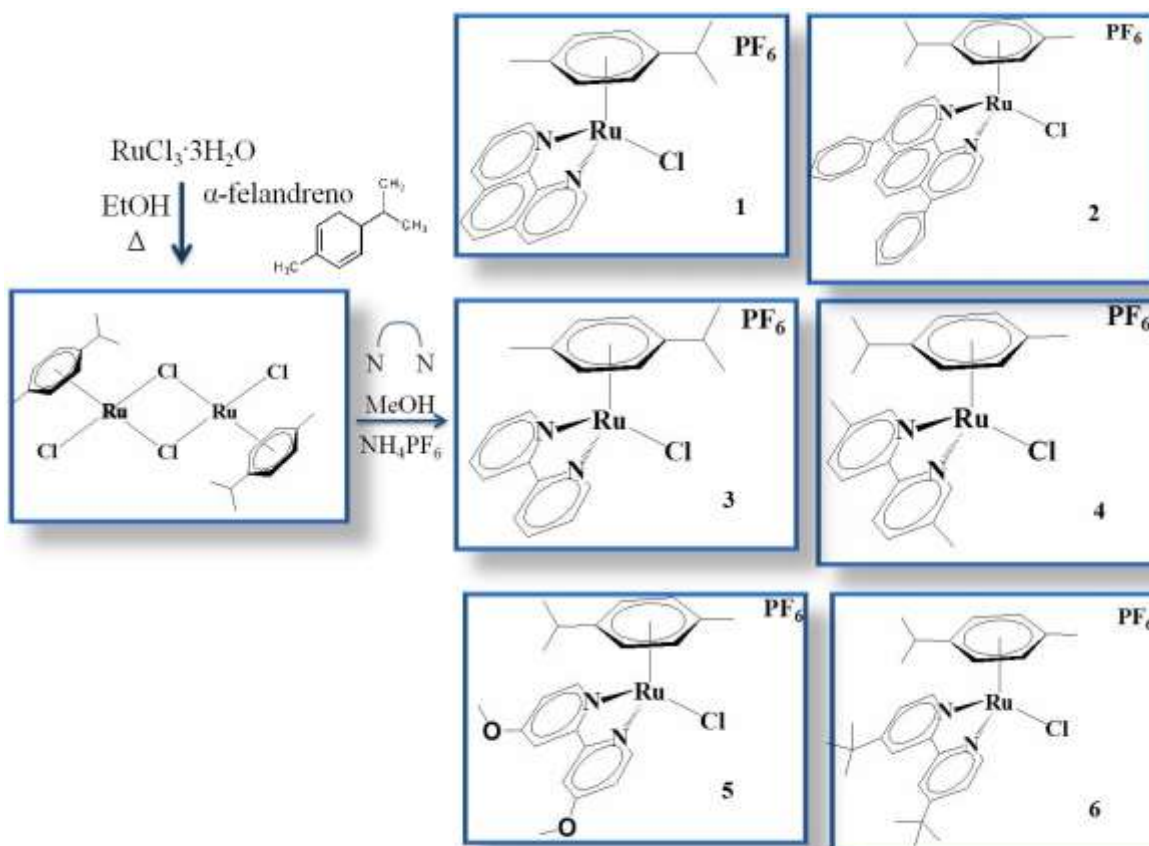


Figura 3.1: Esquema simplificado da sínteses dos complexos semi-sanduíche Ru(II)- η^6 -*p*-cym

3.1.- Materiais e métodos

3.1.1.- Obtenção da atmosfera inerte

As reações de síntese foram feitas empregando técnicas Schlenk, usando nitrogênio ou argônio, provenientes de Aga ou White Martins,

purificados pela passagem de fluxo por uma coluna que contém: CaCl₂/sílica gel/ e catalisador do tipo BTSR311 (Fluka), mantido à 60°C.

3.1.2.- Solventes e Reagentes

Todos os produtos químicos foram de grau reagente ou pureza comparável. Os solventes utilizados, procedentes da Synth P.A. ou Merck P.A., foram purificados por métodos padrões [23]. Os reagentes que foram utilizados sem purificação prévia: tricloreto de rutênio (III) hidratado (Aldrich), Perclorato de tetrabutílamônio (PTBA) (Fluka, 98%) e hexafluorofosfato de amônio (Fluka, 98%), 2,2'-bipiridina (Strem chemicals), 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (Aldrich, 98%), 4,4'-di-t-butil-2,2'-bipiridina (Aldrich, 98%), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (Aldrich, 97%), 1,10'-fenantrolina (Synth), 4,7'-difeníl-1,10'-fenantrolina (Reagents), DNA de timo de carneiro (Sigma), Trizma Base (Sigma, 99,9%), Trizma HCl (Sigma, 99%), e α -felandreno (Sigma) foram usados como recebidos. Entre os solventes empregados estão: etanol (JT Baker, 99,9%) e metanol (JT Baker, 100 %), sem purificação prévia, e os solventes: acetonitrila, éter dietílico, diclorometano, dimetilsulfóxido e acetona foram destilados previamente.

3.2.- Técnicas experimentais e Instrumentação

3.2.1.- Balança analítica

Todos os sólidos foram pesados em uma balança analítica METTLER AE 240.

3.2.2.- Análise elementar

As determinações dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio para todos os compostos sintetizados foram feitas no Departamento de Química

da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, em um analisador de CHNS modelo EA 1108 da FISIONS.

3.2.3.- Condutividade molar

Para as medidas de condutividade elétrica foi empregado um condutivímetro Meter Lab CDM2300, equipado com uma cela de platina com constante igual a 0,089 cm⁻¹, preparando-se uma solução 1x10⁻³ mol.L⁻¹ do complexo no solvente adequado, e introduzindo a ponta de condutivímetro na solução, esperando a leitura se estabilizar do aparelho.

3.2.4.- Espectroscopia vibracional na região de infravermelho

Os espectros de IV foram coletados em um espectrômetro BOMEM MICHELSON FT MB-102 no intervalo entre 4000-200 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹, utilizando o método de pastilha de KBr, empregado como branco uma pastilha de KBr previamente mantida na estufa, à 120 °C.

3.2.5.- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Para os espectros de UV-Vis foi empregado um espectrofotômetro HP-8452A com arranjo de diodos, tendo soluções de concentração conhecida e feita a leitura na região de 200 a 800 nm, em cubetas de quartzo, de 1 cm de espessura.

3.2.6.- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, ³¹P{¹H}, COSY, HMQC e HSQC dos complexos sintetizados, foram feitos em um equipamento BRUKER DRX400, pertencente ao Departamento de Química da UFSCar, no laboratório do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira. Para fazer as análises foi utilizado solvente deuterado: DMSO-d₆.

3.2.7.- Medidas de eletroquímica

As medidas de eletroquímica foram feitas utilizando um potenciostato BAS-100B, com tratamento de dados no software AS 100W, versão 1.0. Uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 3 mL foi utilizada para fazer a análise dos compostos. As amostras foram dissolvidas em solução 1 mM de PTBA, usando como eletrodo de referência Ag/AgCl, eletrodo de Pt como de trabalho e auxiliar.

3.2.8.- Difração de raios X

A execução do experimento de difração de raios X foi realizado no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo-USP, do Prof. Dr. Victor Deflon. As reflexões de Bragg foram coletadas em um difratômetro APEX II duo, usando radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 71,073$ pm) monocromada por grafite e coletados a temperatura ambiente (293 K), seguido das etapas de integração das mesmas, redução dos dados, resolução e refinamento das estruturas.

3.3.- Reações de sínteses

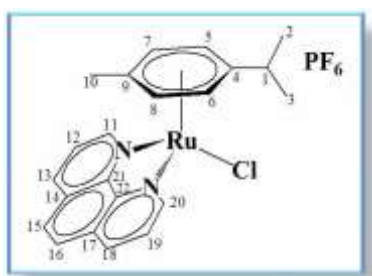
3.3.1.- Síntese de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{Cl})_2]_2$

Dissolveu-se 1,0 g (3,5 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de etanol e adicionou-se 5 mL de α -felandreno (35 mmol). A solução formada foi refluxada por 4 horas sob agitação. Esta solução foi resfriada e concentrada a vácuo, ocorrendo a precipitação de um produto vermelho escuro, que foi filtrado, lavado com etanol, éter dietílico e seco em dessecador, sob vácuo.

3.3.2.- Síntese geral de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{N}\cap\text{N})(\text{Cl})]\text{PF}_6$

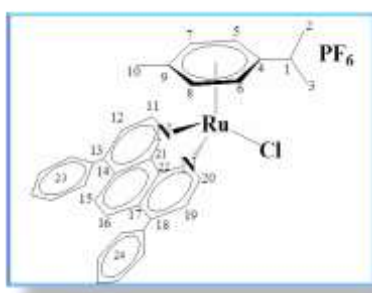
O procedimento geral está reportado [24]. Dissolveu-se 0,3 mmol de $[\text{Ru}(p\text{-cymeno})(\text{Cl})_2]_2$ e 0,7 mmoles do ligante $[\text{N}\cap\text{N}= 2,2'$ -bipiridina (130 mg,); 1,10-fenantrolina (145 mg,), 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina(145 mg) 4,4'-di-*t*-butil-2,2'-bipiridina (210 mg), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (168 mg) e 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (260mg)] em 25 mL de metanol, deixando em agitação por 1 hora. Agregou-se 145 mg de NH_4PF_6 obtendo um precipitado, que foi filtrado, lavado com metanol gelado, éter dietílico e seco em dessecador, sob vácuo.

3.3.2.1.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(1,10'\text{-fenantrolina})]\text{PF}_6$ (1)



Sólido amarelo, rendimento 330 mg (83%). RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) [δ ppm (multiplicidade, m; constante de acoplamento, J; integral, I; atribuição)]: 9,93 (dd, $J = 5,2, 1,1$ Hz, 2H, $\text{H}_{15}\text{-H}_{20}$), 8,93 (dd, $J = 8,2, 1,1$ Hz, 2H, $\text{H}_{14}\text{-H}_{19}$), 8,29 (s, 1H, $\text{H}_{21}\text{-H}_{22}$), 8,17 (dd, $J = 8,2, 5,2$ Hz, 2H, $\text{H}_{13}\text{-H}_{18}$), 6,34 (d, $J = 6,4$, 2H, $\text{H}_6\text{-H}_8$), 6,11 (d, $J = 6,4$, 2H, $\text{H}_5\text{-H}_9$), 2,61 (hept, $J = 6,9$, 1H, H_1), 2,10 (s, 3H, H_{10}), 0,91 (d, $J = 6,9$, 6H, $\text{H}_2\text{-H}_3$). RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6): 155,87 (C_{15} , C_{20}), 145,08 (C_{11} , C_{16}), 138,73 (C_{14} , C_{19}), 130,01 (C_{13} , C_{18}), 127,44 (C_{12} , C_{17}), 126,36 (C_{21} , C_{22}), 104,02 (C_4), 102,56 (C_7), 85,84 (C_6 , C_8), 83,78 (C_5 , C_9), 30,38 (C_1), 21,60 (C_2 , C_3), 18,17 (C_{10}). RMN- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$: -144,50 ppm.

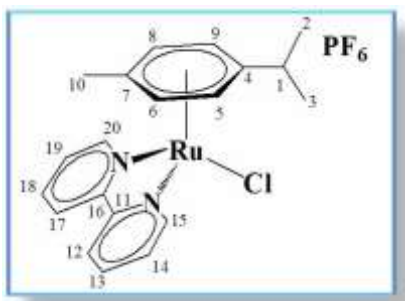
3.3.2.2.- $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(4,7'\text{-difenil-1,10'\text{-fenantrolina})]\text{PF}_6$ (2)



Sólido laranja, rendimento 380 mg (80%). RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ ppm: 10,01 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{H}_{15}\text{-H}_{20}$), 8,15 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{H}_{14}\text{-H}_{19}$), 8,13

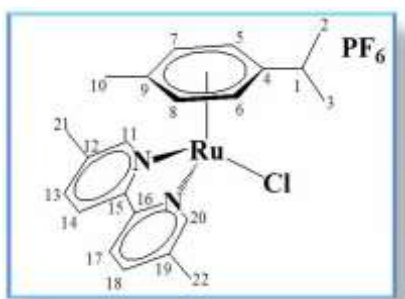
(s, 2H, H₂₁-H₂₂), 7,71 (m, 10, H₂₄-H₃₄, grupo fenil), 6,40 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, H₆-H₈), 6,19 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, H₅-H₉), 2,73 (hept, $J = 6,5$ Hz, 1H, H₁), 2,20 (s, 3H), 1,02 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H, H₂-H₃). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): 155,69 (C15, C20), 149,91 (C13, C18), 145,86 (C11, C16), 134,89 (C23, C29), 129,97-129,20 (C23, C34), 129,20 (C12, 17), 126,33 (C14,C19), 125,49 (C21, C22), 104,77 (C4), 102,19 (C7), 85,88 (C6, C8), 84,47 (C5, C9), 30,50 (C1), 21,75 (C2, C3), 18,16 (C10). RMN-³¹P{¹H}: -144,50 ppm.

3.3.2.3.- [RuCl(η⁶-*p*-cym)(2, 2'-bipiridina)]PF₆ (3)



Sólido amarelo, rendimento 370 mg (97%). RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 9,53 (d, 2H, $J = 7,9$, H₁₅-H₂₀), 8,64 (d, $J = 7,9$, 2H, H₁₂-H₁₇), 8,29 (dd, $J = 7,9$, 7,9 Hz, 2H, H₁₃-H₁₈), 7,80 (dd, $J = 7,9$, 7,9 Hz, 2H, H₁₄-H₁₉), 6,22 (d, $J = 6,3$, 2H, H₆-H₈), 5,98 (d, $J = 6,3$, 2H, H₅-H₉), 2,58 (hept, $J = 6,9$, 1H, H₁), 2,18 (s, 3H, H₁₀), 0,94 (d, $J = 6,9$, 6H, H₂-H₃). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): 155,78 (C15, C20), 154,33 (C11, C16), 139,90 (C13, C18), 127,54 (C14, C19), 123,76 (C12, C17), 103,62 (C4, C7), 86,66 (C6, C8), 83,88 (C5, C9), 30,37 (C1), 21,62 (C2, C3), 18,28 (C10). RMN-³¹P{¹H}: -144,50 ppm.

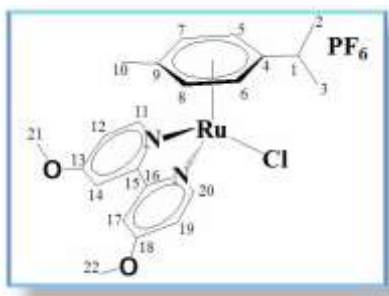
3.3.2.4.- [RuCl(η⁶-*p*-cym)(5, 5'-dimetil-2,2'-bipiridina)]PF₆ (4)



Sólido amarelo, rendimento 350 mg (92%). RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 9,35 (s, 2H, H₁₅-H₂₀), 8,46 (d, $J = 8,4$, 2H, H₁₂-H₁₇), 8,09 (dd, $J = 8,4$, 0,8 Hz, 2H, H₁₃-H₁₈), 6,25 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, H₆-H₈), 5,97 (d, $J = 6,4$, 2H, H₅-H₉), 2,57 (hept, $J = 6,9$, 1H, H₁), 2,52 (s, 6H, H₂₁-H₂₂), 2,21 (s, 3H, H₁₀), 0,91 (d, $J = 6,9$, 6H, H₂-H₃). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): 155,20 (C15, C20), 151,97 (C14, C19), 140,79

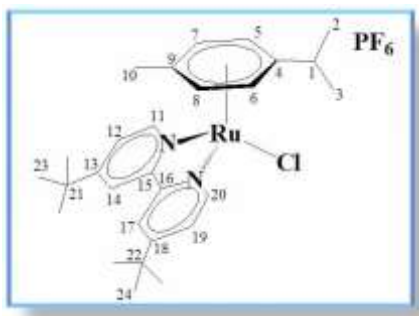
(C13, C18), 137,78 (C11, C16), 122,63 (C12, C17), 104,51 (C4), 102,81 (C7), 86,94 (C6, C8), 83,21 (C5, C9), 30,33 (C1), 21,69 (C2, C3), 18,46 (C10), 17,82 (C21, C22). RMN-³¹P{¹H}: -144,50 ppm.

3.3.2.5.- [RuCl(η⁶-*p*-cym)(4, 4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina)]PF₆ (5)



Sólido amarelo, rendimento 367 mg (91%). RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 9,26 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H, H₁₅-H₂₀), 8,23 (d, *J* = 2,7 Hz, 2H, H₁₂-H₁₇), 7,34 (dd, *J* = 6,6, 2,7 Hz, 2H, H₁₄-H₁₉), 6,13 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H, H₆-H₈), 5,88 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H, H₅-H₉), 4,06 (s, 6H, H₂₁-H₂₂), 2,56 (hept, *J* = 6,9 Hz, 1H, H₁), 2,17 (s, 3H, H₁₀), 0,96 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, H₂-H₃). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): 167,71 (C13, C18), 156,33 (C15, C20), 155,82 (C11, C16), 113,58 (C14, C19), 110,27 (C12, C17), 102,88 (C4), 102,52 (C7), 85,95 (C6, C8), 82,94 (C5, C9), 57,07 (C21, C22), 30,36 (C1), 21,67 (C2, C3), 18,32 (C10). RMN ³¹P{¹H}: -144,50 ppm.

3.3.2.6.- [RuCl(η⁶-*p*-cym)(4, 4'-*t*-dibutil-2,2'-bipiridina)]PF₆ (6)



Sólido laranja, rendimento 340 mg (78%). RMN-¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 9,39 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H, H₁₅-H₂₀), 8,63 (d, *J* = 1,7 Hz, 2H, H₁₄-H₁₇), 7,71 (dd, *J* = 6,0, 1,8 Hz, 2H, H₁₄-H₁₉), 6,16 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H, H₆-H₈), 5,95 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H, H₅-H₉), 2,60 (hept, *J* = 6,8 Hz, 1H, H₁), 2,14 (s, 3H, H₁₀), 1,43 (s, 18H, H₂₂-H₂₈, grupo *t*-butil), 0,97 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, H₂-H₃). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-d₆): 163,97 (C13, C18), 155,35 (C15, C20), 154,28 (C11, C16), 124,23 (C14, C19), 110,27 (C12, C17), 102,88 (C4), 102,52 (C7), 85,95 (C6, C8), 82,94 (C5, C9), 57,07 (C21, C25), 30,36 (C1), 21,67 (C2, C3), 18,32 (C10). RMN-³¹P{¹H}: -144,50 ppm.

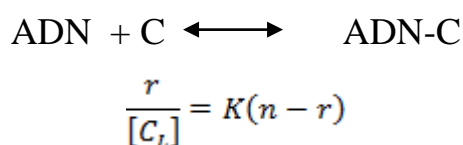
3.4.- Técnicas para o estudo da interação complexo/DNA

3.4.1.- Preparação da solução de DNAtc

O DNAtc foi preparado em tampão trizma (0,5 mM tris base, 4,5 mM de tris HCl e 50 mM NaCl, pH 7.4). A concentração da solução foi calculada mediante UV-vis, utilizando o máximo de absorvância do DNA em 260 nm, que tem uma absorvância molar de $6600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

3.4.2.- Titulações espectroscópicas

As titulações foram feitas pela adição de alíquotas de solução de DNAtc a uma cubeta com o complexo, fazendo a mesma adição na cubeta de referência com a finalidade de subtrair este espectro da amostra sob medida. O cálculo das constantes foi feito empregando-se a equação de *Scatchard*, que é utilizada para interações macromoléculas-ligante com sítios de ligação disponíveis:



Onde: r : é o número de moles do complexo ligado, para 1 mol de DNAtc; n : o número de sítios potencialmente ligados por molécula de complexo; K : é a afinidade do complexo de interagir com as vagas disponíveis do DNA; C_L : é concentração de ligante livre. A concentração de ligante livre e ligado (C_L e C_E) é calculada a partir de $C_L = C(1-\alpha)$. Onde C é a concentração total de complexo, α é a fração molar do complexo ligado, calculado a partir $\alpha = (A_L - A)/(A_L - A_E)$, em que A_L e A_E são as absorvâncias do complexo livre e ligado ao DNA num comprimento de onda específico, e A é a absorvância em qualquer

ponto da titulação. Traçando r/C_L vs r , encontramos a constante de interação a partir da inclinação da curva.

As titulações foram feitas pela adição de alíquotas de solução de trizma a uma cubeta com o complexo, com a finalidade de avaliar o efeito de diluição.

3.4.3.- Medidas de viscosidade

As medições foram realizadas utilizando um viscosímetro Ostwald imerso num banho de água mantido a 25 °C . A concentração de DNA foi mantida constante em todas as amostras, enquanto a concentração de complexo foi aumentada de 0 a 60 μ M. O tempo de fluxo foi medida, pelo menos 5 vezes, com um cronometro digital. Os dados são apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ em função da relação [complexo]/[DNA], onde η e η_0 são as viscosidades específicas de DNA, na presença e ausência do complexo, respectivamente. Os valores de η e η_0 foram calculados utilizando a seguinte fórmula $(t-t_b)/t_b$, em que t é o tempo de escoamento observado e t_b é o tempo de escoamento do tampão.

3.5 Determinação do coeficiente de partição

Os coeficientes de partição água-octanol foram determinados usando o método do shake flask [25]. Uma curva de calibração de UV-visível (UV-VIS) foi preparado na gama de 10-80 μ M em água. A determinação foi levada a cabo a pH 7,4 numa mistura de volumes iguais de água e n-octanol e agitação contínua durante 18 horas à temperatura ambiente. A concentração do complexo em água foi medida por espectrofotometria de forma a determinar os valores de $P = [\text{composto}] (\text{n-octanol})/[\text{composto}] (\text{água})$.

3.6.- Ensaio de citotoxicidade

Os compostos analisados foram avaliados pela capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de células tumorais usando linhagens de célula derivada de tumor humano de mama MDA-MB-231 (ATCC No. HTB-26) e MCF-7

(ATCC No. HTB-22), pulmão A549 (ATCC N ° CCL-185), e a célula tumoral de camundongo L929 (ATCC N ° CCL-1). A série de procedimentos e materiais necessários para realizar os ensaios será descrito a seguir.

3.6.1.- Linhagem de células e condições de cultura:

As células MDA-MB-231, MCF-7, A549 e L929, disponíveis no laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar, foram mantidas em viales congelados em nitrogênio líquido. A partir deles, as células foram obtidas (descongeladas a 37°C por cerca de 90 s) e subcultivadas serialmente para posterior uso nos experimentos. As células MDA-MDB231 e MCF-7 foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e as células A549 e L929 em cultura de suspensão em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Durante o crescimento das células o meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias para o melhor desenvolvimento destas. O crescimento das células foi acompanhado dia-a-dia com o auxílio de um microscópio. Quando a garrafa continha uma boa quantidade de células realizava-se a contagem das células e devido à aderência fez-se um procedimento conhecido por tripsinização que é a remoção das células para uso nos experimentos. A contagem das células foi feita ajustando o volume para que cada 200 µL contenha a quantidade desejada de células ($1,5 \times 10^4$ células). Após a aplicação das células em placa para microcultura de 96 poços (estéril) com densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço (em 200 µL) armazenou-se a placa em estufa (37°C / 5% CO₂) por 24 horas para que ocorresse a adesão celular. Finalmente, os compostos em diferentes concentrações foram adicionados em triplicata, sendo o tempo de incubação de 48 h.

3.6.2.- Ensaio citotóxico:

Os compostos foram avaliados usando o ensaio com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolio - MOSMAN, 1983), que consiste em uma determinação colorimétrica de viabilidade celular durante tratamento *in vitro*. Este ensaio colorimétrico de microcultura, desenvolvido como um estágio inicial para o “screening”, mede a quantidade de MTT 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.

Um baixo IC_{50} é desejado e implica citotoxicidade ou antiproliferação a baixas concentrações da droga. O valor de IC_{50} representa a concentração da droga que é necessária para reduzir 50% o crescimento celular.

Foram preparadas 8 concentrações de cada complexo (20 mM a 0,48 mM) utilizando-se DMSO para solubilizar os mesmos. Considerando que a concentração final de DMSO junto às células não deve ultrapassar 1 % e que o volume de meio de cultura em cada poço é 200 μ L, tomou-se uma alíquota de 1 μ L (0,5 %) de cada concentração de complexo e adicionou-se ao poço. Desta maneira as concentrações finais dos complexos foram 200 μ M a 0,048 μ M. As soluções dos compostos são preparadas no fluxo laminar utilizando-se materiais estéreis (DMSO e frascos de armazenagem). Após 48 h de exposição aos compostos, o MTT foi adicionado às células 30 μ l (1 mg/ml) e incubou-se durante 3-4 h, em seguida, o meio de cultura foi removido e os cristais violetas de formazan foram dissolvidos em isopropanol. A densidade óptica de cada poço (placas de 96 poços) foi quantificada a 540 nm utilizando um leitor de placas multi-poços e a percentagem de células sobreviventes foi calculada a partir da razão de absorbância entre as células tratadas e não tratadas.

Capítulo IV. Resultados e Discussão

4.- Resultados e discussão

Os compostos sintetizados neste trabalho foram caracterizados por técnicas adequadas: UV-Vis, IV, análise elementar, condutividade molar, eletroquímica, RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, COSY, HMBC e HSQC e difração de raios-x. Para maior clareza, facilidade de leitura e comparação, os resultados foram agrupados segundo as técnicas de caracterização. Além disso, poucos espectros são mostrados neste capítulo, apenas alguns deles, todos os espectros estão presentes nos apêndices, localizados no final desta dissertação.

4.1.- Síntese e Caracterização

O método mais geral e utilizado na síntese de complexos de Ru(II)-areno está baseado na desidrogenação de cicloexadienos por soluções etanoicas de $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ [26]. O primeiro passo na síntese dos complexos de interesse foi a obtenção do complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{Cl})_2]_2$, foi obtido com um rendimento de 95% mediante a reação entre tricloreto de rutênio e α -felandreno em uma relação 1:10, obtendo-se um sólido vermelho, que é solúvel em diclorometano, acetona, DMSO, água e insolúvel em éter dietílico, sendo estável na luz e ao ar. O complexo foi caracterizado pelas seguintes técnicas: UV-Vis, IV, RMN- ^1H e condutividade molar.

A condutividade molar em acetona foi $15,0 \pm 1,0 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, valor que indica um complexo neutro. No espectro de UV-visível, foram observados máximos de absorbância em 258, 314 e 406 nm atribuídos as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligante do p -cym e transferência de carga MLCT Ru- p -cym respectivamente [27]. No espectro de IV são apresentadas as bandas características dos estiramentos das ligações: $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1471 cm^{-1} $\delta(\text{C}-\text{H}$ de um grupo isopropílico) 1386 cm^{-1} devido ao acoplamento com o grupo metil, $\nu(\text{Ru}-$

Cl) 291cm^{-1} os quais correspondem às ligações apresentadas pelo complexo precursor.

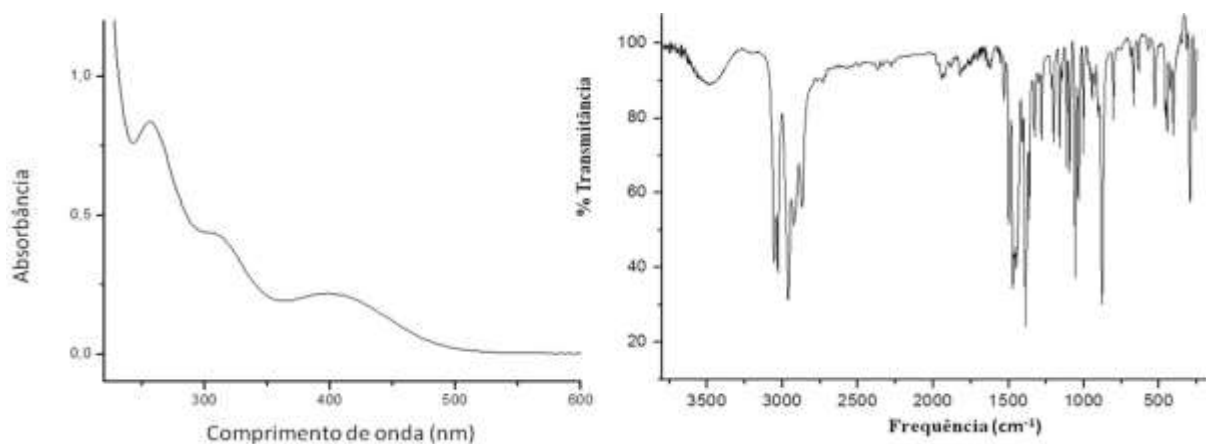


Figura 4.1: Espectros de UV-Vis em CH_2Cl_2 e IV do complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{Cl})_2]_2$

No espectro de RMN- ^1H da Figura 4.2 é observado, em 1,21 ppm, um tripleto que integra para 6 prótons, atribuídos às metilas H_2 e H_3 ; um singlete em 2,09 ppm, que integra para 3 prótons da metila H_{10} ; um multipletto que integra para 1 próton, referente ao próton isopropílico H_1 . Em campo mais baixo aparecem dois dubletos, que integram para 2 prótons cada, atribuídos aos prótons do anel aromático $\text{H}_5\text{-H}_9$ e $\text{H}_5\text{-H}_8$.

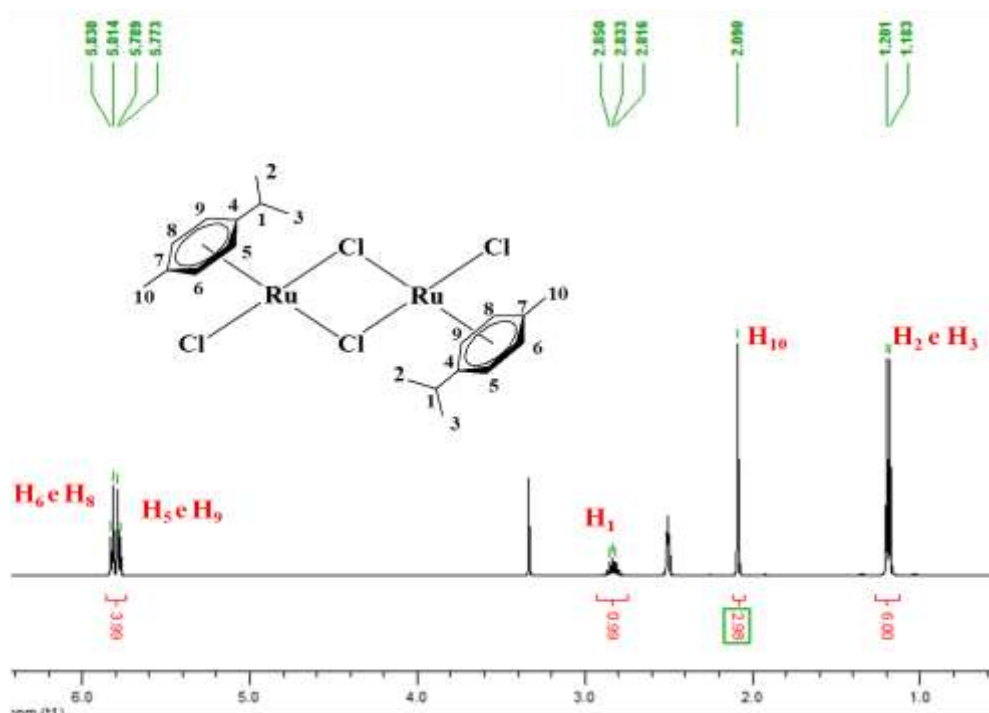
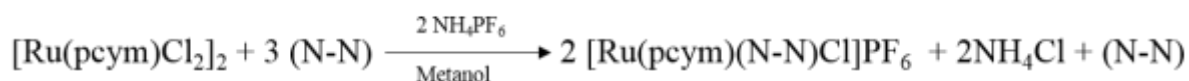


Figura 4.2: Espectro de RMN-¹H do [Ru(η⁶-*p*-cymeno)(Cl)₂]₂ em dmsd₆

4.2.- Sínteses dos compostos de forma geral [Ru(η⁶-*p*-cym)(N∩N)(Cl)]PF₆

Os complexos de formula geral [Ru(η⁶-*p*-cym)(N∩N)(Cl)]PF₆ foram sintetizados mediante a reação entre o [Ru(η⁶-*p*-cym)(Cl)₂]₂ e o ligante N∩N, em uma relação 1:3, obtendo sólidos amarelos ou laranjas, mediante a seguinte reação:



Estes foram caracterizados mediante: UV-Vis, IV, RMN, condutividade molar, análise elementar e difração de raios x.

4.2.1.- Análise elementar

Os valores das análises elementares dos compostos estão dispostos na Tabela 4.1. Os valores encontrados são condizentes com os esperados e o composto 1 apresentou uma molécula de H₂O. Os dados obtidos de análise

elementar confirmam a formação dos complexos do tipo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-cym})(\text{N}\cap\text{N})(\text{Cl})]\text{PF}_6$.

Tabela 4.1: Dados de microanálise obtidos dos complexos sintetizados

Complexo	% C Exp (T)	% H Exp (T)	% N Exp (T)
1·H ₂ O	43,37 (43,04)	3,96 (3,94)	4,17 (4,56)
2	53,90 (54,30)	4,12 (4,21)	4,16 (3,70)
3	42,00 (42,00)	4,22 (3,90)	5,40 (4,90)
4	43,90 (44,05)	4,45 (4,35)	5,10 (4,70)
5	41,87 (41,81)	4,25 (4,15)	4,71 (4,43)
6	49,93 (49,82)	5,54 (5,90)	4,41 (4,01)

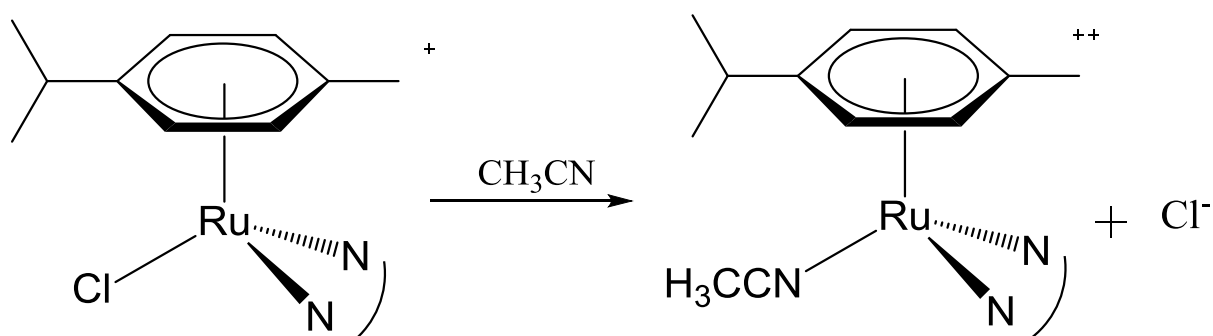
4.2.2.- Condutividade Molar

As medidas de condutividade dos compostos foram feitas em acetona à concentração é 1 mM, os valores estão dispostos na Tabela 4.2. Segundo a literatura, os valores de condutividade molar em acetona estão no intervalo de eletrólito 1:1, correspondente com a presença do contra-íon PF_6^- em solução, conforme com as estruturas propostas para os compostos.

Tabela 4.2: Valores encontrados de Condutividade molar (Λ_M , $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)

Complexo	Λ_M em Acetona	Λ_M em Acetonitrila
1	$133,5 \pm 0,2$	$213,5 \pm 0,1$
2	$134,2 \pm 0,2$	$234,2 \pm 0,3$
3	$135,3 \pm 3,0$	$225,3 \pm 2,0$
4	$123,0 \pm 0,6$	$223,0 \pm 0,7$
5	$126,5 \pm 0,3$	$216,5 \pm 0,5$
6	$135,3 \pm 1,6$	$240,3 \pm 1,2$

Adicionalmente, foram feitas as medidas de condutividade empregando um solvente coordenante. Os valores de condutividade molar em acetonitrila estão no intervalo de eletrólito 1:2, sugerindo a presença de dois íons em solução, o que indica que o composto pode aceitar uma molécula de solvente dentro da sua esfera de coordenação, trocando o ligante Cl^- pela CH_3CN , segundo a reação seguinte, assim como já foi reportado para esta classe de compostos:



4.2.3.- Espectroscopia vibracional na região de infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr e as atribuições baseadas em comparações com os espectros dos ligantes, complexos precursores e dados da literatura. Os espectros de IV dos complexos **1-6** são muito semelhantes, por está razão só será colocado na Figura 4.3 o espectro do complexo **6** como representação desta família de compostos, os demais espectros estão no Apêndice I.

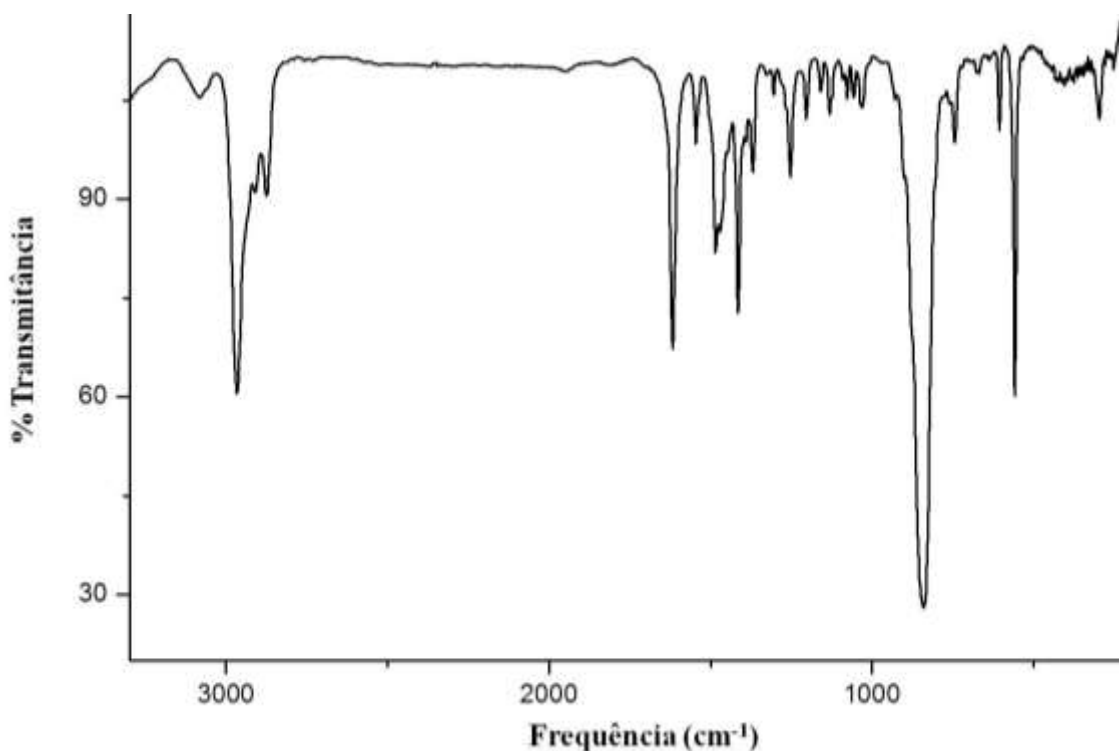


Figura 4.3: Espectro de IV do complexo **6** em KBr

Os espectros dos complexos apresentam as bandas esperadas, correspondentes ao contra-íon PF_6^- , C=C, C=N, C-H, Ru-Cl, que indicam a formação dos complexos desejados. Bandas de alta intensidade em torno de 846 e 557 cm^{-1} revelam a presença do contra-íon PF_6^- , na faixa de 3070- 3080 cm^{-1} estão as bandas relativas à $\nu(\text{C-H}$ de um grupo aromático), 2966- 2975 cm^{-1} $\nu(\text{C-H}$ de um grupo metil), 1367-1390 cm^{-1} $\delta(\text{C-H}$ de um grupo isopropílico) devido ao acoplamento com o grupo metil, 1384-1413 cm^{-1} $\nu(\text{C=C})$, 1506-1540 cm^{-1} $\nu(\text{C=N})$ e 295-302 cm^{-1} $\nu(\text{Ru-Cl})$.

Tabela 4.3: Atribuição das principais vibrações dos complexos **1-6**

Atribuição	Complexos					
	1	2	3	4	5	6
ν C-H (aromático)	3070	3070	3080	3080	3080	3080
ν C-H (metil)	2974	2970	2970	2975	2970	2966
ν C=C	1519	1519	1498	1506	1521	1508
δ C-H (isopropila)	1384	1390	1388	1390	1388	1367
ν C=N	1470	1475	1469	1477	1473	1477
ν Ru-Cl	297	302	302	295	300	295

4.2.4.- Espectroscopia de absorção na região UV-Vis

Os espectros eletrônicos dos complexos foram feitos em diclorometano, fazendo diluições dos mesmos para o cálculo da absorvidade molar (ϵ). Na Figura 4.4 encontra-se o espectro representativo para esta família de compostos e os outros espectros estão no Apêndice 2. Todos eles estão caracterizados pela presença de uma banda de alta energia centrada em 300 nm, que foi atribuída à transições π - π^* , apresentando como maior contribuição às bandas intraligantes da bipyridina, fenantrolina e derivados. Todos os complexos exibem bandas de alta energia localizadas no intervalo de 340-400 nm que podem ser atribuídas às bandas de Transferência de Carga Metal-ligante (TCML) do Ru($d\pi$)-ligante (π^*). Estes valores estão em concordância com complexos do tipo: $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(2\text{-PC})\text{Cl}]\text{PF}_6$ [28], assim como complexos binucleares de Ru(II)- η^6 -areno e naftoquinonas [29].

Tabela 4.4: Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm) e coeficientes de absorvidade molar (ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dos complexos 1-6 em soluções de $\sim 40 \mu\text{M}$ em CH_2Cl_2

Complexo	λ (ϵ)
1	278 (26,556)
	342 (7,864)
	402 (3,006)
2	294 (39,143)
	348 (13,970)
	402 (5,084)
3	300 (20,292)
	354 (4,518)
	408 (2,238)
4	302 (10,347)
	354 (2,018)
	404 (772)
5	302 (30,558)
	350 (13,643)
	404 (5,292)
6	302 (16,618)
	346 (4,791)
	406 (2,023)

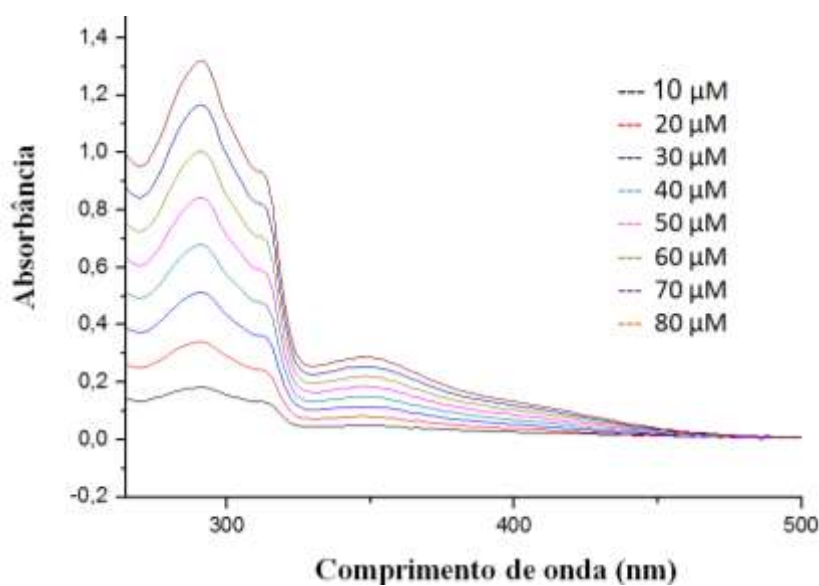


Figura 4.4: Espectro de absorção na região do UV-Vis do complexo **6** em CH_2Cl_2

4.2.5- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As técnicas de ressonância magnética nuclear em uma dimensão (1D: ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) e duas dimensões (2D: COSY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$, HSQC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ e HMBC $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$) permitem-nos a atribuição inequívoca dos ^1H e ^{13}C presentes na estrutura dos complexos. São apresentados abaixo os resultados obtidos, os quais foram divididos em dois grupos, no primeiro serão discutidos os espectros 1D, no segundo os espectros 2D. Para maior clareza na discussão, só serão mostrados os espectros do complexo **6**, os restantes encontram-se no Apêndice 3.

4.2.5.1.- RMN 1D: ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

O espectro de RMN- ^1H do complexo **6** (Figura 4.5), apresenta em campo alto um triplete em 0,98 ppm que integra para 6 prótons, atribuído para os prótons H₂-H₃ das duas metilas do ligante *p*-cym, em seguida são observados dois singletes: o primeiro em 1,43 ppm que integra para 18 prótons pertencentes ao grupo *t*-butílico substituinte do anel da bipyridina, o segundo, em 2,14 ppm que integra para 3 prótons, correspondente a H₁₀ do ligante *p*-cym, posteriormente se encontra um hepteto, centrado em 2,60 ppm, que integra para 1 próton, característico do grupo isopropílico H₁, localizado no ligante *p*-cym. Em campo baixo são observados dois dubletes, localizados em 5,95 e 6,16 ppm, os quais integram para 2 prótons cada, atribuídos á H₅-H₉ e H₆-H₈ do anel *p*-cym, seguidamente é observado um dublete de dublete em 7,71 ppm com $J = 6,0, 1,8$ Hz dos prótons H₁₄-H₁₉ o qual explica o desdobramento do sinal. Finalmente são observados dois dubletes em 8,63 ppm com $J = 1,7$ Hz, e 9,39 ppm com $J = 6,0$ Hz os quais integram para 2 prótons cada, característicos dos prótons H₁₅-H₂₀ e H₁₄-H₁₉. Todos os sinais foram corroborados mediante a técnica de COSY que será discutida em breve.

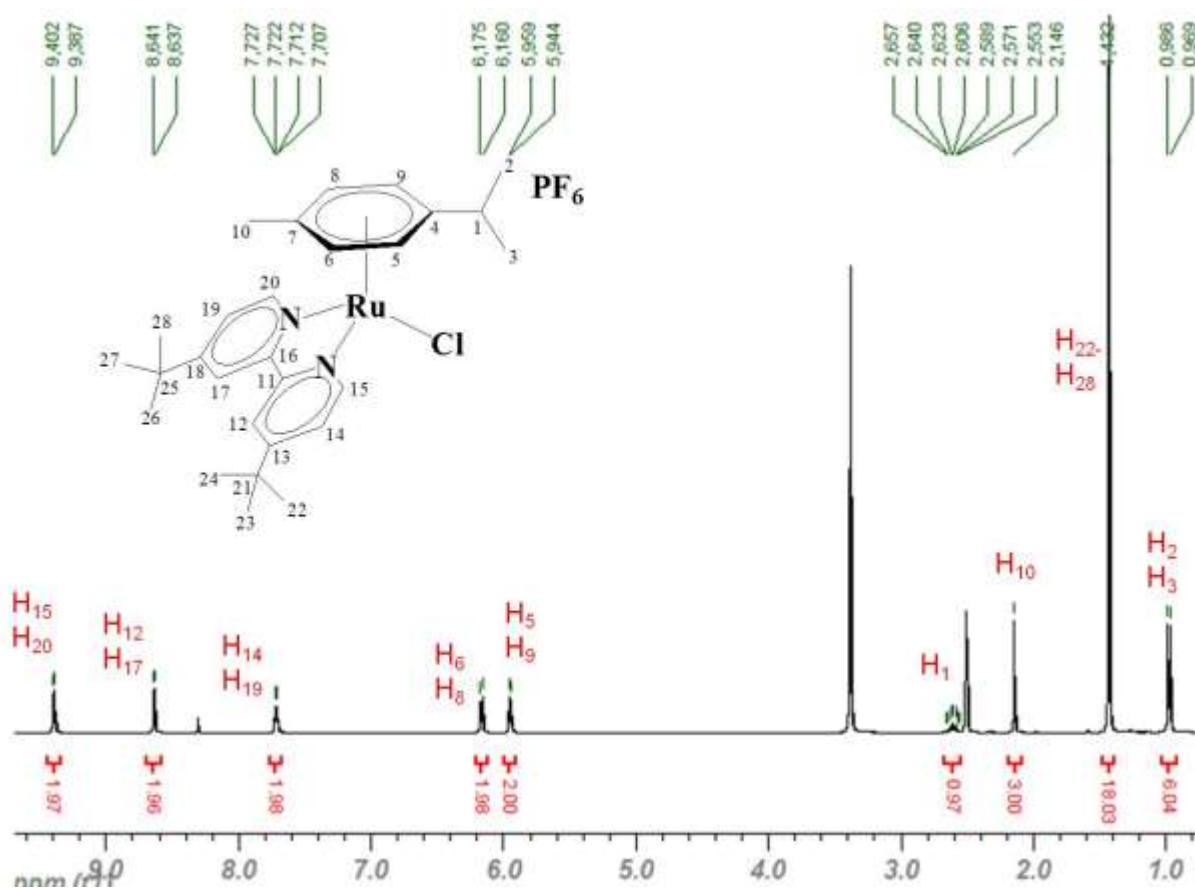


Figura 4.5: Espectro de RMN-¹H do complexo **6** em dms0-d₆

O espectro de RMN-¹H dos demais complexos apresentam as ressonâncias características do ligante *p*-cym e do ligante N \wedge N, em questão. Todos os sinais são consistentes com os deslocamentos químicos, integrais, multiplicidade e constantes de acoplamento (ver seção 3.3.2) para estes ligantes clássicos. Após a coordenação dos ligantes N \wedge N, a característica mais marcante do ligante areno são os deslocamentos químicos dos prótons aromáticos (Tabela 4.5). Os sinais dos prótons H₅ até H₈ são os deslocados significativamente para campo mais baixo devido à influência do ligante quelato, os quais são fortes receptores π que removem a densidade eletrônica do areno, causando tais deslocamentos. Na região aromática dos espectros de RMN-¹H pode-se observar os sinais dos ligantes 2,2'-bipiridina, 1,10'-fenantrolina e seus derivados. O complexo **2** tem um multiplete centrado em 7,71 ppm que integra para 10

prótons associados com o grupo fenil da 1,10'-fenantrolina. Os complexos de **4** e **5** mostram um singlete encontrado em 2,52 e 4,06 ppm, respectivamente, que integram para 6 prótons cada, correspondentes aos grupos metilo e metoxila.

Tabela 4.5: Deslocamento químico de RMN-¹H em dms_o-d₆

Complexo	RMN- ¹ H (ppm)	
	H ₅ e H ₉	H ₆ e H ₈
[RuCl ₂ (p-cym)] ₂	5,77	6,25
1	6,11	6,34
2	6,19	6,40
3	5,98	6,22
4	5,97	6,25
5	5,88	6,13
6	5,95	6,16

Todos os espectros de RMN-³¹P{¹H} (Figura 4.6) apresentam um septeto centrado em -144,50 ppm, característico do sinal do íon hexafluorofosfato, corroborando a presença deste contra-íon nos complexos.

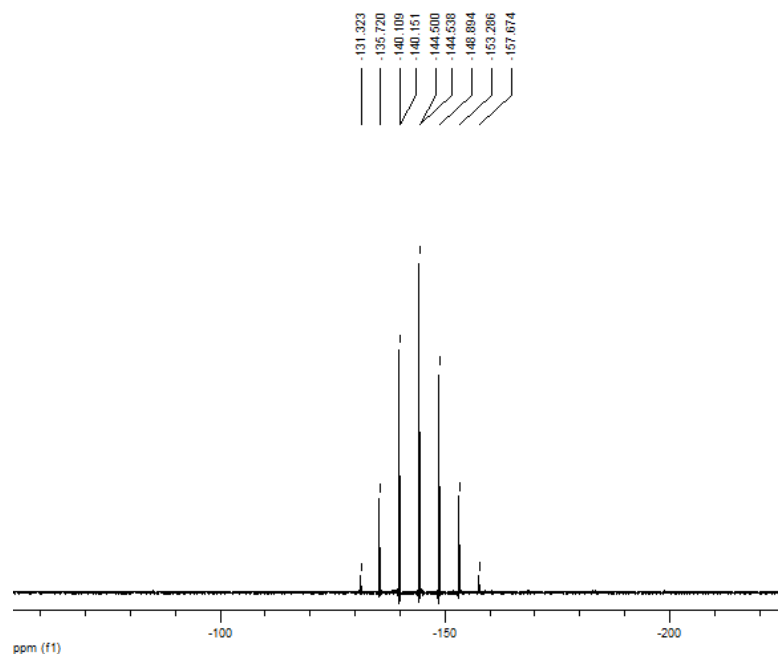


Figura 4.6: Espectro de RMN-³¹P{¹H} do complexo **6**, em dms_o-d₆

Os espectros de RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ mostram os sinais característicos para esta classe de compostos. Todos os carbonos, incluídos os quaternários, foram determinados por sua correlação com os prótons do complexo pelas técnicas de ressonância HMBC e HSQC. A baixo se observa o espectro de RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **6** (Figura 4.7).

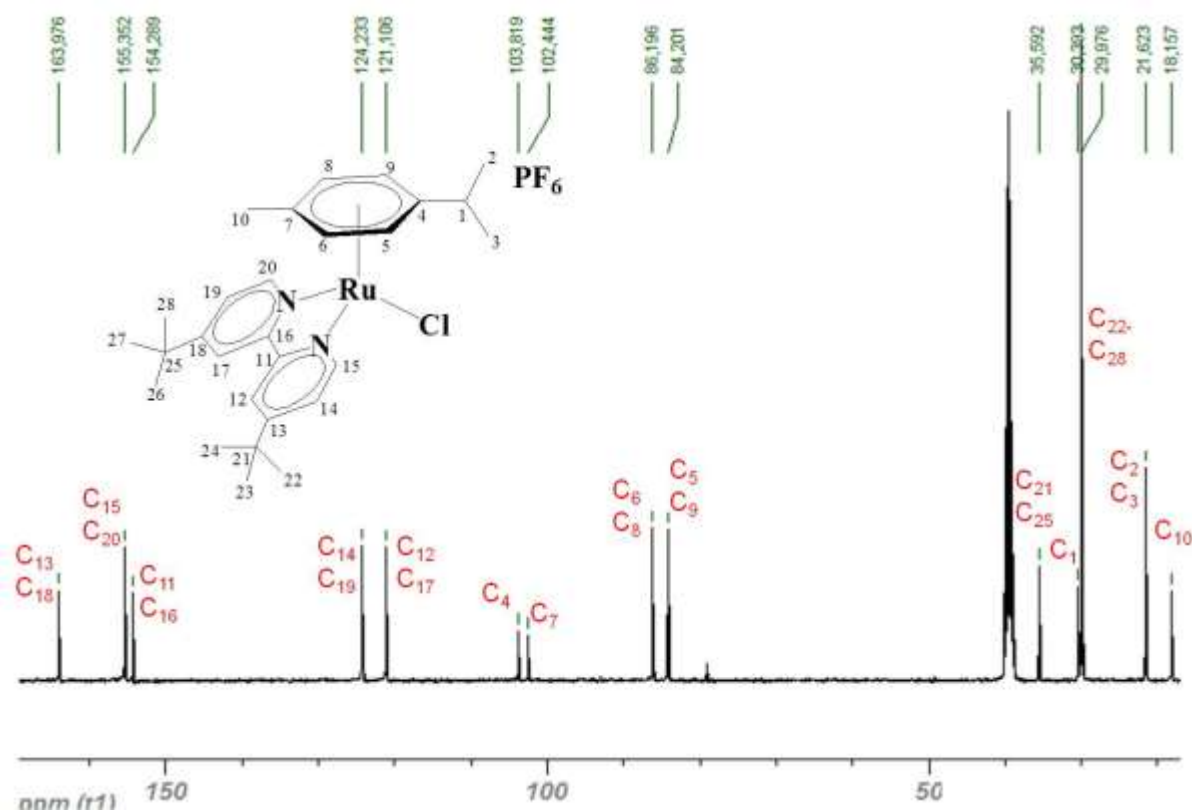


Figura 4.7: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **6**, em dms0-d₆

4.2.5.2.- RMN 2D: COSY, HMBC e HSQC

Os sinais dos prótons foram corroborados mediante o experimento de ressonância por COSY. Na seguinte Figura 4.8 pode-se observar as correlações dos prótons do complexo **6**, os quais estão em relação com a atribuição feita.

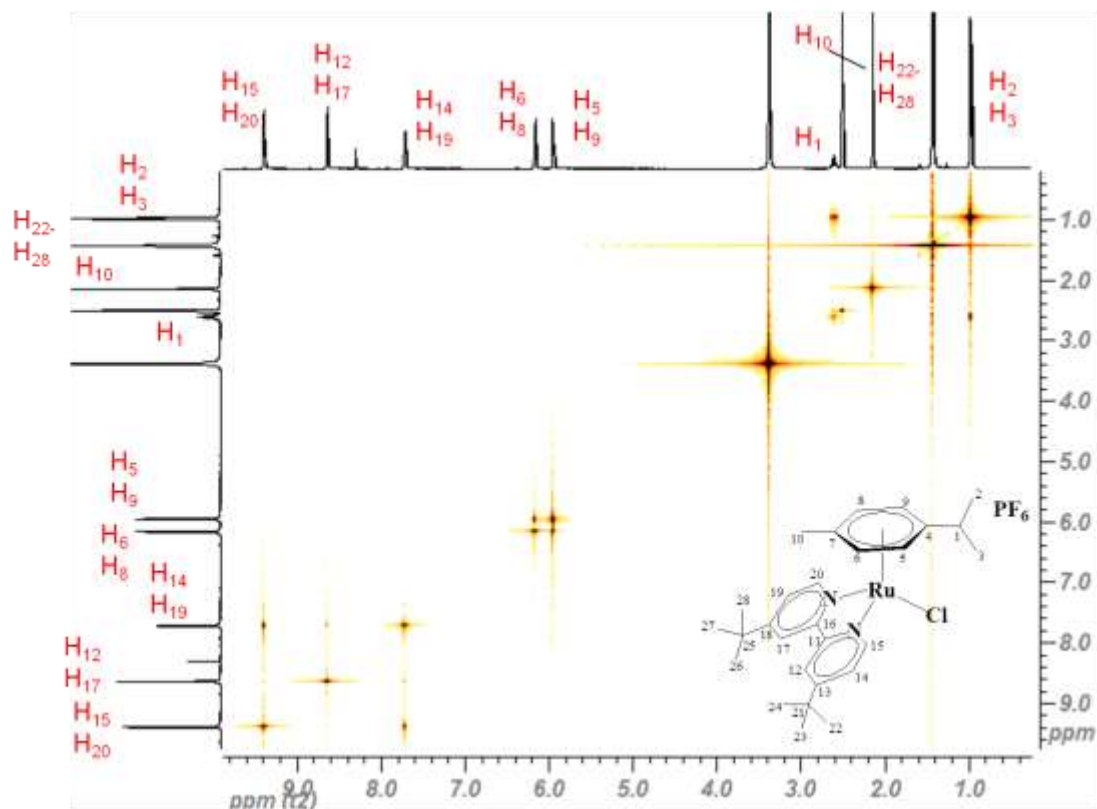


Figura 4.8: Espectro de RMN COSY $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ do complexo **6** em dms0-d_6

Os sinais dos carbonos primários, secundários e terciários (C15, C20, C14, C19, C12, C17, C6, C8, C5, C9, C1, C2, C22, C28, C3 e C10) foram identificados baseados nas correlações dos carbonos mediante a técnica de HSQC, o experimento feito para o complexo **6** está na Figura 4.9; os carbonos quaternários (C1, C4, C7, C11, C16, C13, C18, C21 e C25) foram identificados mediante a correlação com os prótons mediante a técnica de HMBC, o experimento feito para o complexo **6** está na Figura 4.10.

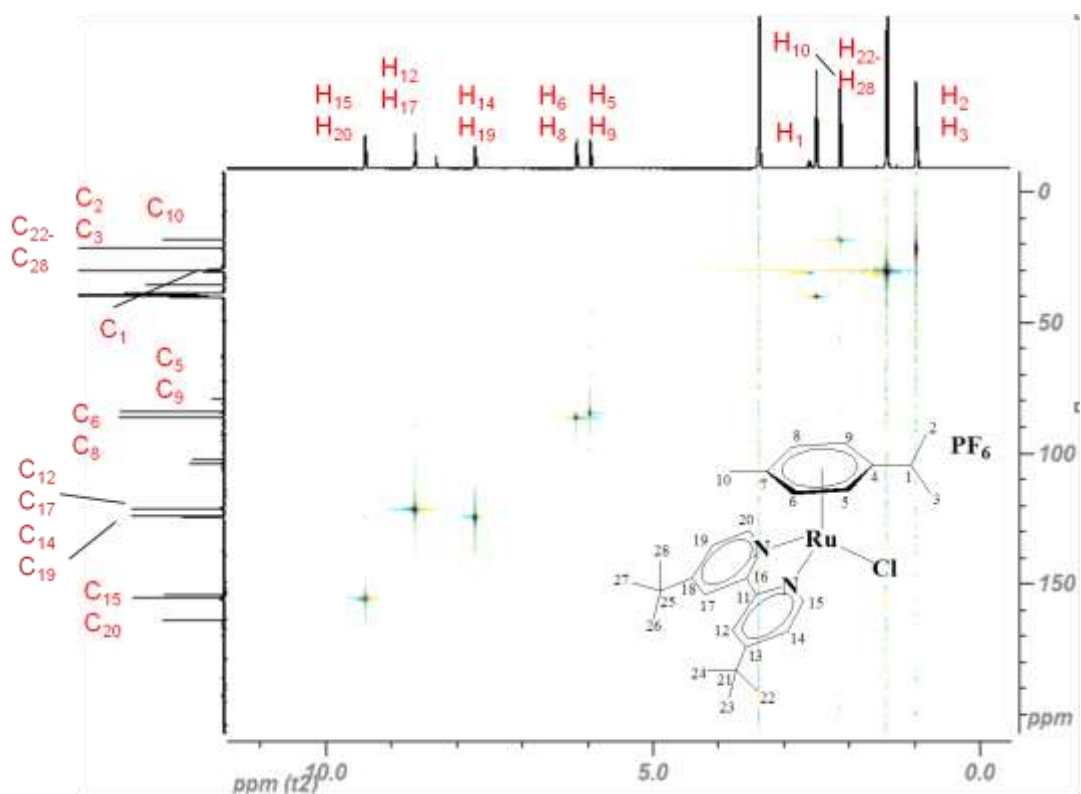


Figura 4.9: Espectro de HSQC{ ^1H - ^{13}C } do complexo 6 em dms0-d₆

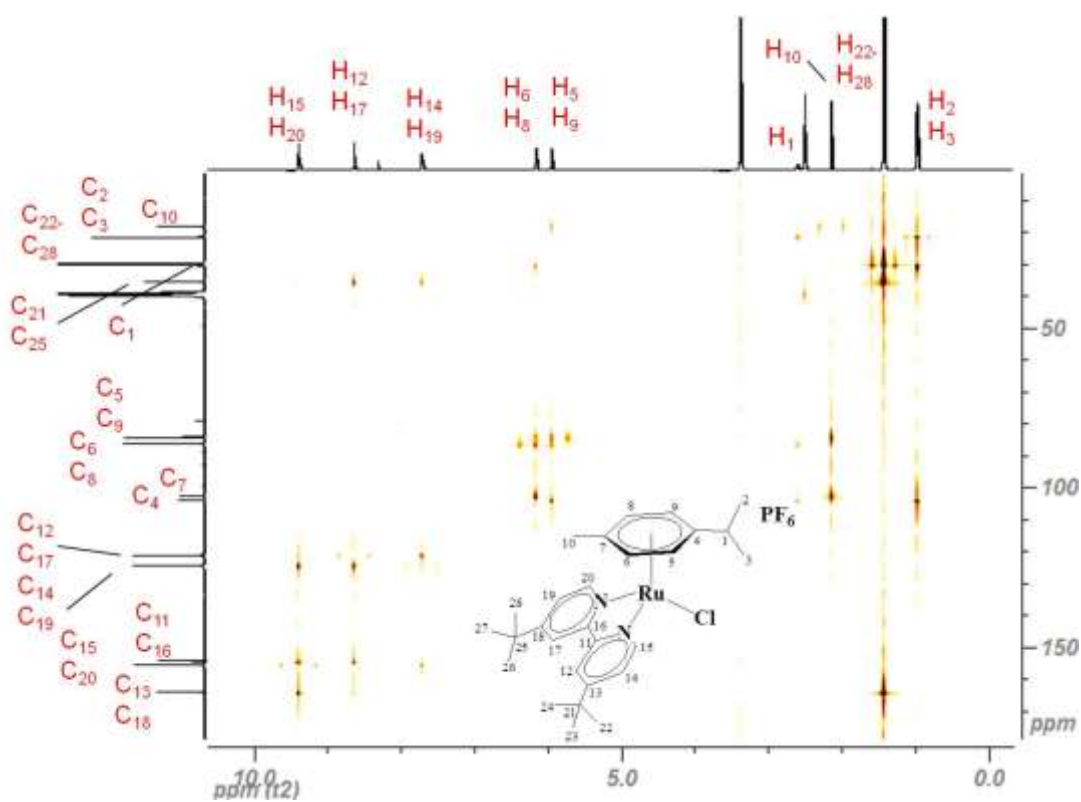


Figura 4.10: Espectro de HMBC{ ^1H - ^{13}C } do complexo 6 em dms0-d₆

4.2.6.- Medidas eletroquímicas

Os complexos foram também estudados usando voltametria cíclica em disco de eletrodo de platina, as medidas foram feitas usando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Bu}_4\text{N}][\text{ClO}_4]$ como eletrólito de suporte, em soluções de diclorometano ou acetonitrila. Foi observado que todos os complexos mostram comparáveis comportamentos nestes solventes. Será apresentado o voltamograma cíclico do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{bipy})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (Figura 4.11) como representação do comportamento eletroquímico para esta família de compostos. Os dados para os voltamogramas cíclicos dos complexos estão na Tabela 4.6.

Quando o experimento é feito em diclorometano (Figura 4.11a) pode-se notar que os compostos não apresentam o processo III e IV (Figura 4.11c) reversível com potenciais no intervalo entre 0,90 e 1,10 mV. Este comportamento só é observado depois da adição de acetonitrila (Figura 4.11b). Estes resultados estão em concordância com os perfis de condutividade molar obtidos para os complexos em acetonitrila, que indicavam o intercâmbio entre o Cl^- pelo ligante CH_3CN , isso pode ser explicado, pois o cloreto é um ligante σ e π doador, enquanto a acetonitrila é σ -doador e π -receptor, de forma que sua entrada, no lugar do cloreto, centraliza a densidade eletrônica no centro metálico de Ru(II) diminuindo o seu potencial de oxidação, pelo efeito competitivo entre o anel do *p*-cym e o ligante.

Na Figura 4.11c pode-se observar que os complexos exibem processos de oxidação (I) e redução (II) em potenciais negativos. Este processo refere-se ao fragmento Ru-*p*-cym como foi descrito para complexos reportados com $\eta^6\text{-}[2_2](1,4)\text{ciclofano}$ [30] e tiosemicarbazonas [31]. Partindo do potencial de repouso para potenciais positivos é observado um processo de oxidação irreversível (V) ao redor de +1,50 V, assim como reportado para o ligante areno. Estudos desenvolvidos pelo grupo de Bernhard Gollas [24], indicam que o processo de oxidação irreversível ao redor do potencial +1,25 V, é devido ao

ligante areno e dependente dos grupos substituintes, os quais podem incrementar ou diminuir o potencial de oxidação deste ligante[12].

Os complexos metálicos mostram um processo quase reversível III e IV com $E_{1/2}$ entre 0,91 – 1,01 V, o qual se pode observar na Figura 4.11, considerada baseada no processo do centro metálico RuII/III, o que está em concordância com o intervalo para complexos de Ru(II)-areno com ligantes fosfínicos [23], pirazolil [14] e N∩N heterocíclicos [24].

Também foram feitas as medidas eletroquímicas destes complexos aumentando sua concentração em solução de acetonitrila (Figura 4.12), no voltamograma cíclico obtido para o complexo $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{mebipy})\text{Cl}]\text{PF}_6$ está o perfil apresentado para esta família de complexos. Observando-se, como esperado, o aumento da intensidade da corrente no potencial de oxidação e de redução 1,08 V e 1,02 V do processo $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$, porque é diretamente proporcional à concentração da espécie em solução, o que demonstra que este processo realmente refere-se ao $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ do complexo formado com acetonitrila.

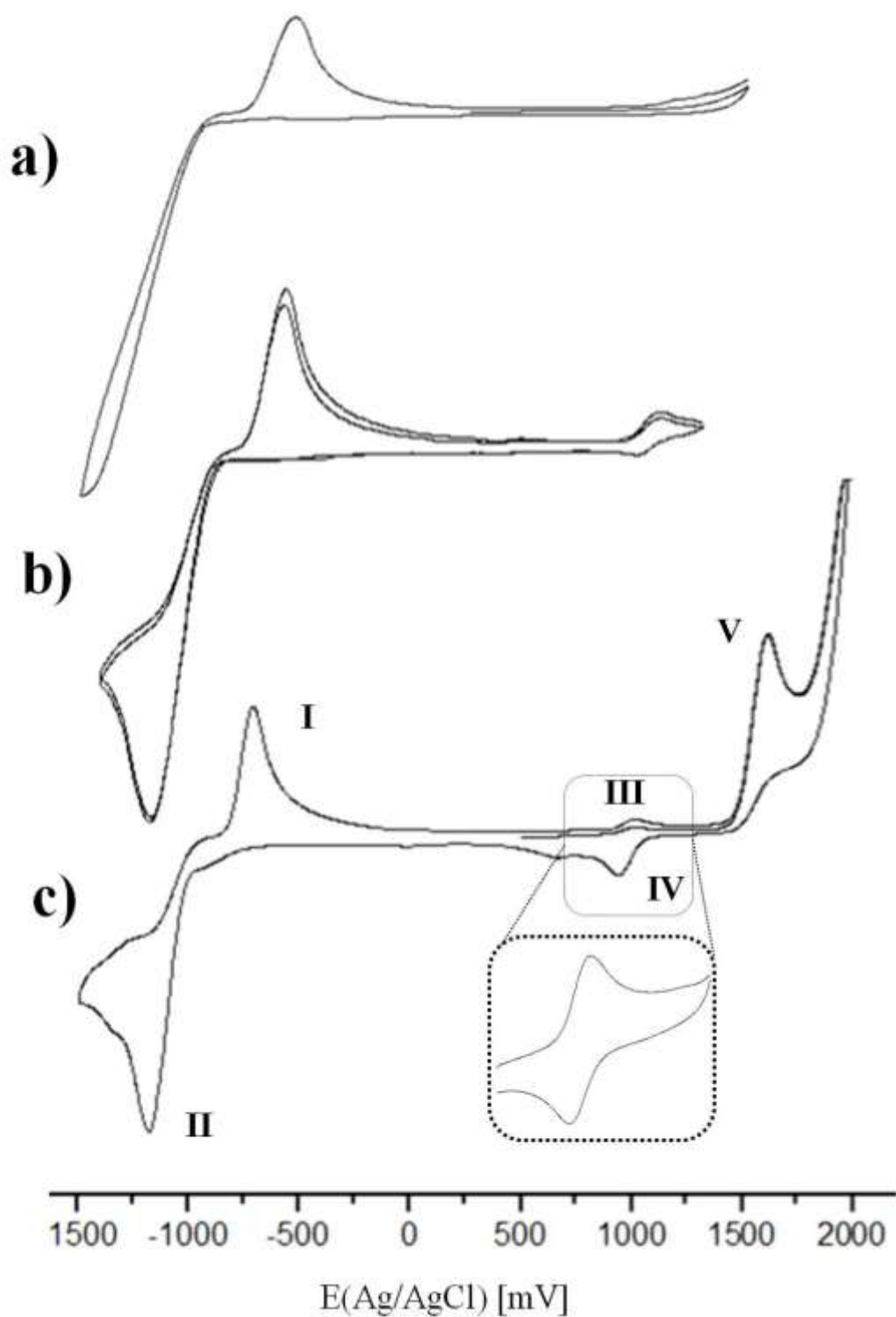


Figura 4.11: Voltamograma cíclico em eletrodo de disco Pt, velocidade de varredura 100 mV/s, do complexo $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{mebipy})\text{Cl}]$, representando o comportamento eletroquímico desta família de compostos, feito em a) solução de diclorometano b) adicionando 200 μL de acetonitrila e c) solução de acetonitrila.

Tabela 4.6: Potenciais eletroquímicos em V para todos os complexos em acetonitrila, entre parêntesis encontra-se os processos referentes à Figura 4.11

Complexo	$E_{pa}(I)$	$E_{pc}(II)$	$E_{pa}(V)$	$E_{pa}(III)$	$E_{pc}(IV)$	I_{pa}/I_{pc}	$E_{1/2}$
$[RuCl_2(p-cym)]_2$	--	--	1,447	1,033	0,980	---	1,00
1	-0,641	-1,084	1,667	1,057	0,991	1,30	1,01
2	-0,632	-1,042	1,627	1,048	0,948	1,45	0,99
3	-0,623	-1,089	1,648	1,051	0,971	1,53	1,01
4	-0,709	-1,185	1,619	1,044	0,935	1,32	0,98
5	-0,815	-1,187	1,577	0,943	0,889	1,30	0,91
6	-0,700	-1,189	1,614	1,029	0,948	1,38	0,98

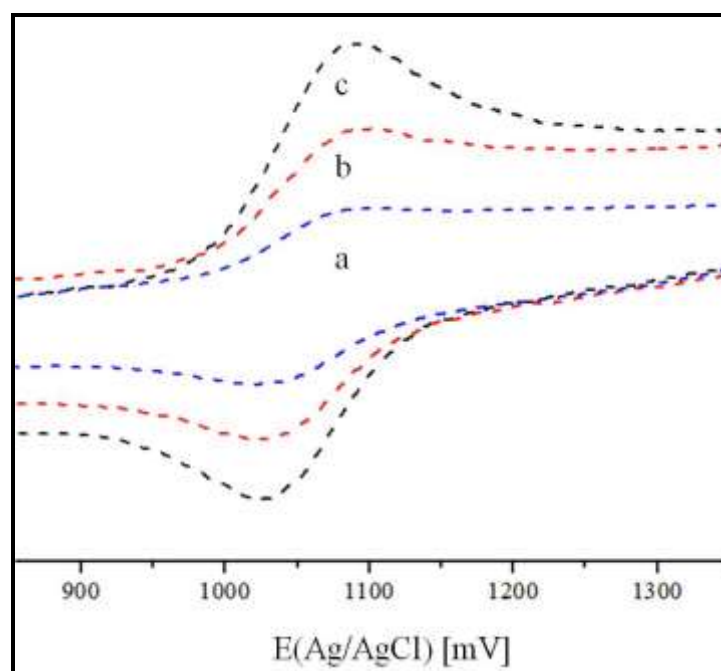


Figura 4.12: Voltamograma cíclico em eletrodo de disco de Pt, 100 mV/s de velocidade de scan, do complexo $[Ru(p-cym)(mebipy)Cl]PF_6$ representando o comportamento eletroquímico desta família de compostos, feito em soluções de acetonitrila de: a) 5 mM b) 8 mM e c) 10 mM.

4.2.7.- Difração de raios X

Cristais dos compostos 1-6 foram obtidos por difusão lenta de éter etílico, de uma solução concentrada dos complexos em diclorometano ou acetona, obtendo-se cristais de cor amarela, ou laranja, que foram investigados por cristalografia de raios X. Todos os complexos adotam a forma familiar semi-sanduíche ou “*piano stool*”. A esfera de coordenação ao redor do Ru(II) consiste em dois átomos de nitrogênio, do ligante N∩N heterocíclico, e o ligante cloreto, que representam as pernas da cadeira, e os seis átomos de carbono do ligante η^6 -*p*-cym forma o assento. A Figura 4.13 mostra as estruturas dos complexos no estado sólido e as distâncias interatômicas mais importantes e ângulos de ligação do complexo 6 estão coletados na Tabela 4.7. Os dados para os outros complexos encontram-se no Apêndice 8.

As distâncias nas ligações entre o Ru(II) e o ligante *p*-cym não variam significativamente entre todos os derivados, apresentando valores num intervalo de [2,139 (14) a 2,153 (10) Å]. Os comprimentos de ligação Ru-Cl nos complexos são quase os mesmos (\sim 2,400 Å), semelhante ao comprimento de ligação Ru-Cl observado em $[\text{Ru}(\eta^6\text{-tetralina})(\text{en})\text{Cl}]^+$ [32], $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cym})\text{Cl}(\text{mimid})_2]^+$ e $[\text{Ru}(\text{p-}\eta^6\text{-cym})\text{Cl}(\text{bimid})_2]^+$ [33]. Os comprimentos de ligação Ru(1)-N(1) e Ru(1)-N(2) destes complexos são \sim 2,08 Å. Os ângulos de ligação N(1)-Ru(1)-N(2) nos complexos não diferem significativamente entre si. Uma característica interessante que pode ser observada a partir da estrutura cristalina dos complexos é que, dependendo do ligante N∩N heterocíclico quelante utilizado o complexo pode adotar configurações diferentes. Na primeira configuração, adotado em **1** e **3**, a parte isopropílica do ligante *p*-cym está no mesmo lado do ligante cloreto, enquanto que na segunda configuração (adotada para os outros complexos) a isopropíla está invertida, ocupando um lado oposto ao ligante cloreto. Este fato é facilmente observado pelo ângulo C(4)-Ru(1)-Cl(1), que está próxima de 90° para **1** e **3**, e as alterações no intervalo 158-170

para os outros complexos. No estado cristalino, de **3**, o areno adota duas orientações diferentes, apresentando duas diferentes moléculas na unidade assimétrica.

No caso da estrutura cristalina do complexo **2** o grupo p-cym é desordenado em duas posições, a distorção da estrutura é mostrada na Figura 4.14. Neste complexo o p-cym pode adotar duas posições diferentes, contudo os comprimentos de ligação Ru-C são muito semelhantes para as duas posições.

Tabela 4.7: Comprimentos de ligação (Å) e ângulos selecionados (°) em [Ru(p-cym)(butbipy)Cl]·PF₆·0.5CH₂Cl₂ (**6**)

Complexo 6	
Distancias de ligação	
Ru(1)–Cl(1)	2,3955(12)
Ru(1)–N(1)	2,073(3)
Ru(1)–N(2)	2,076(3)
Ru(1)–C(4)	2,199(5)
Ru(1)–C(5)	2,147(5)
Ru(1)–C(6)	2,192(5)
Ru(1)–C(7)	2,225(5)
Ru(1)–C(8)	2,201(5)
Ru(1)–C(9)	2,169(4)
Ângulos de ligação (°)	
N(2)–Ru(1)–N(1)	76,57(12)
N(2)–Ru(1)–Cl(1)	84,02(10)
N(1)–Ru(1)–Cl(1)	84,75(10)
C(4)–Ru(1)–C(5)	37,98(17)
C(4)–Ru(1)–C(7)	80,8(2)
C(4)–Ru(1)–C(8)	67,63(19)
C(4)–Ru(1)–Cl(1)	170,33(13)
C(2)–C(1)–C(3)	110,3(5)

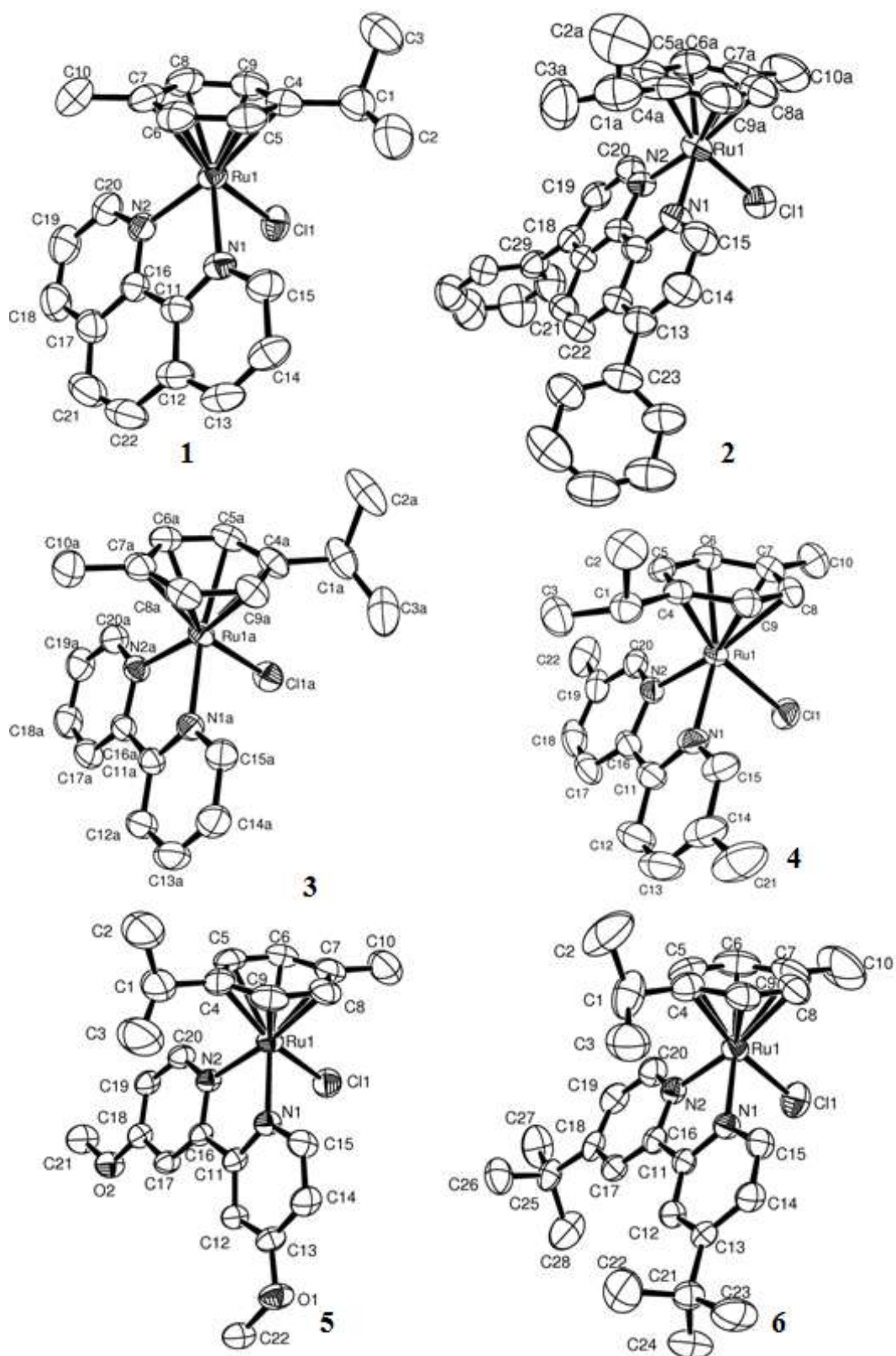


Figura 4.13: Estrutura ORTEP dos complexos 1-6 com elipsoide de 50% de probabilidade. As moléculas de solvente, o anion PF_6^- e os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor clareza

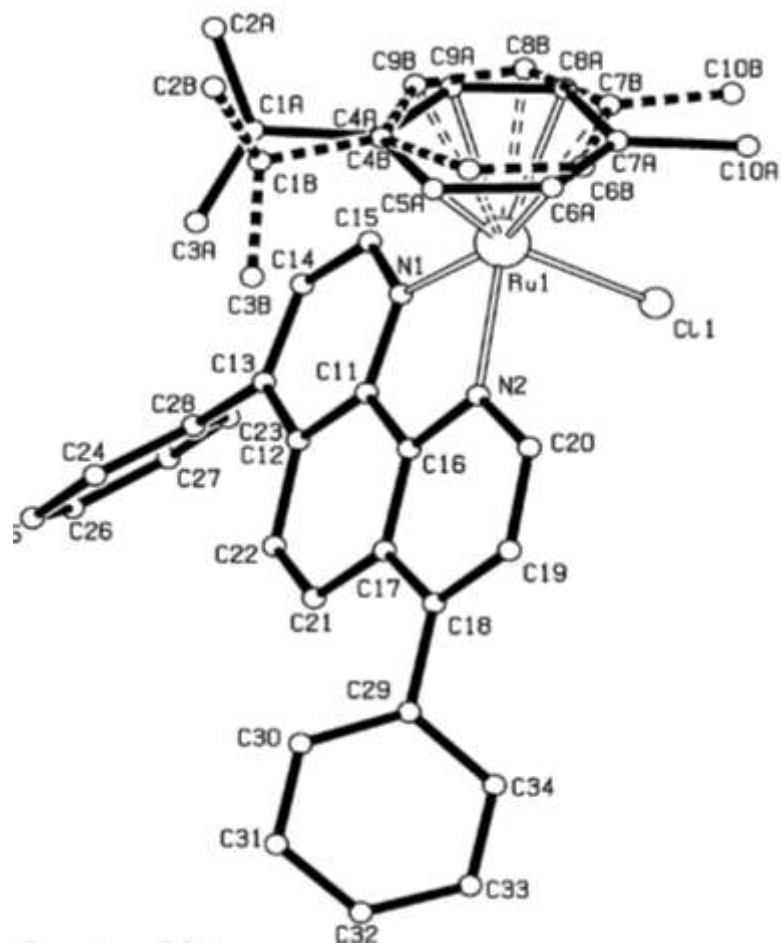


Figura 4.14: Representação da estrutura molecular do complexo **2**, incluindo os átomos numerados e mostrando a posição desordenada do ligante p-cym (77,58 % na linha sólida e 22,42 % para a linha não contínua)

4.3.- Avaliação da interação dos complexos com o DNA: Titulações espectroscópicas e viscosidade

O papel fundamental do DNA na replicação celular torna esta biomolécula um dos alvos mais interessantes da quimioterapia. Os complexos de Pt devem sua atividade antitumoral a sua ligação covalente com as bases nitrogenadas do DNA [34]. O agente anti-metastático NAMI-A, contendo como centro metálico o Ru, foi inicialmente pensado por agir mediante interações com o DNA, mas atualmente é aceito que sua atividade é devida a uma combinação do controle da angiogênese [35,36] e a suas propriedades anti-invasivas contra vasos sanguíneos de células tumorais. Entre tanto, o DNA tem sido mostrado como o alvo principal para outros complexos de Ru(II) e Ru(III), tais como: penta-amina(purina)rutênio (III) [37], *cis* e *trans*-RuCl₂(DMSO)₄ [38, 39] ou KP1019 [40]. Complexos do tipo [Ru(η^6 -areno)(X)(Y-Z)] são ativos pela troca do ligante mono aniônico X, por água, seguido por um ataque nucleofílico das bases nitrogenadas do DNA para formar adutos covalentes [41]. Os grupos fosfatos dos nucleotídeos atuam como sítios de interação inicial, prévio à coordenação do rutênio ao N7 da guanina [42]. Os complexos contendo arenos policíclicos apresentam intercalação, e interação com o sulco menor, contribuindo com a ligação destes complexos de Ru(II) com a dupla hélice do DNA [43].

Com a finalidade de conhecer a interação que os compostos sintetizados neste trabalho podem apresentar, com o alvo biológico DNA, foi utilizada a técnica de titulação espectroscópica, método que está amplamente reportado na literatura [44]. Os espectros eletrônicos dos complexos avaliados neste trabalho (seção 4.2.3) apresentam dois máximos de absorção entre 300 e 400 nm, característicos das energias requeridas para as transições eletrônicas π - π^* , e TCML, como discutido anteriormente. A medida que foi incrementada a

concentração do DNA, mediante adições das alíquotas, foi observado um efeito hipocrômico na intensidade da absorção, como se pode observar na Figura 4.15. Esta diminuição na intensidade da absorção é causada pelas variações nas energias das transições eletrônicas, assim como, a alteração na intensidade da absorção devido às interações entre os complexos metálicos e o DNA. Estas variações representam uma clara evidência de interações reversíveis dos complexos metálicos com o DNA.

A magnitude da interação dos complexos metálicos com o DNATc, foi calculada a partir de Scatchard [45], comumente utilizado na literatura para esse tipo de sistemas, que permitem a comparação dos resultados obtidos por outros pesquisadores na área de complexos metálicos semelhantes. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 4.8.

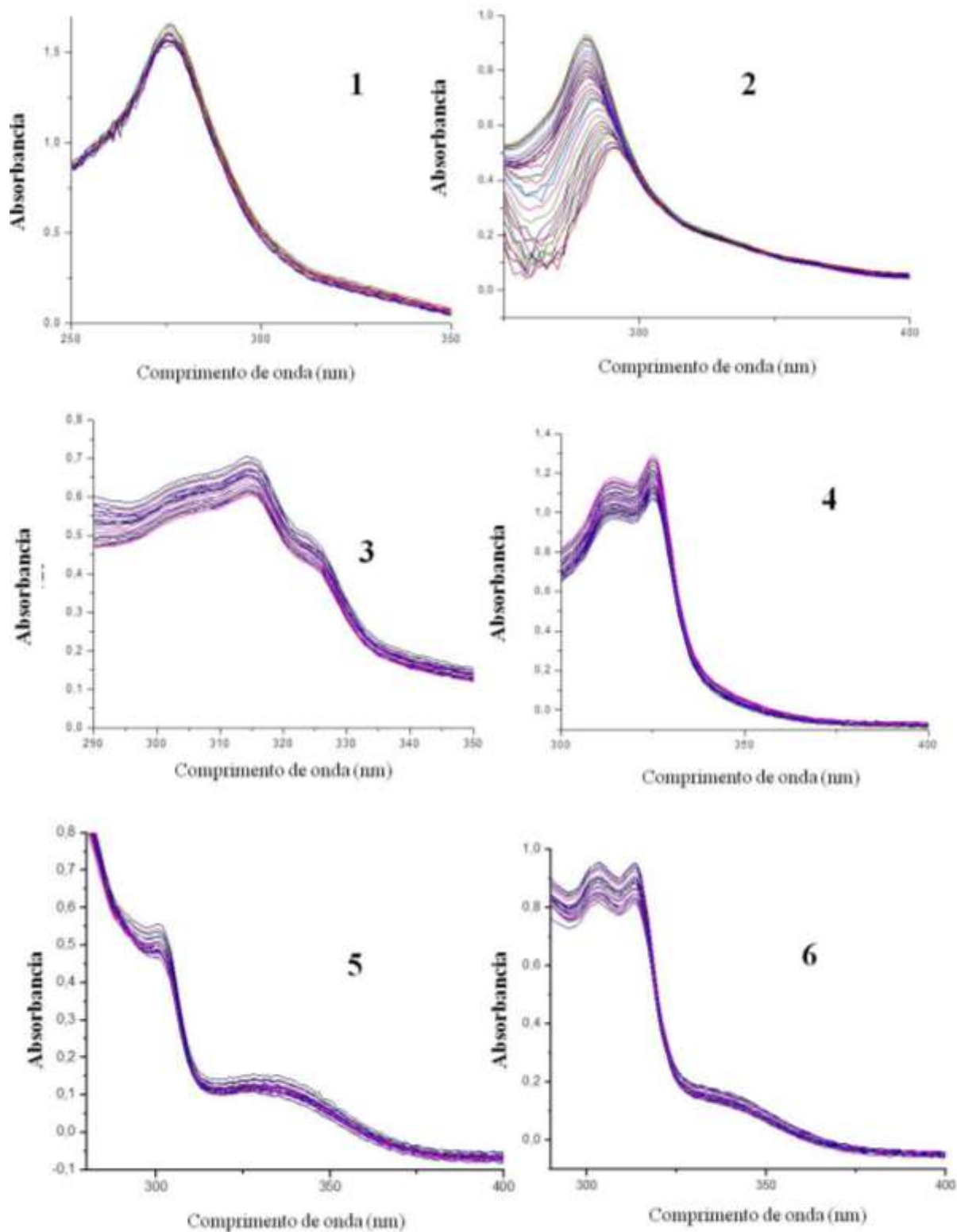


Figura 4.15: Espectros eletrônicos das titulações dos complexos **1-6** com DNAtc. $[DNAtc]= 3,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[Complexos]= \sim 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Tabela 4.8: Dados obtidos nas titulações espectroscópicas dos complexos **1-6** com o DNAtc

	λ (nm)	Desloc. Vermelho	% H*	Scatchard	
				Kb ₁ (10 ⁶ M ⁻¹)	Kb ₂ (10 ⁴ M ⁻¹)
1	280	--	1,8 %	0,06 ± 0,02	0,67 ± 0,03
2	280	10	50,1%	0,10 ± 0,01	1,91 ± 0,32
3	315	--	2,3%	0,07 ± 0,03	0,84 ± 0,14
4	326	--	2,7%	0,08 ± 0,06	1,06 ± 0,25
5	302	--	3,6%	7,42 ± 2,25	2,21 ± 1,18
6	313	--	4,9%	1,39 ± 0,15	1,62 ± 0,05

* Porcentagem de hipocrômismo.

Os valores para as constantes de interação obtido pelo método de "Scatchard" são da ordem de 10⁶ M⁻¹ para Kb₁ e na ordem de 10⁴ M⁻¹ para Kb₂, resultados semelhantes aos relatados para complexos com atividade anticancerígena [Ru(η^6 -*p*-cym)(CQ)(H₂O)₂](BF₄)₂, onde CQ é cloroquina, para o qual as seguintes constantes foram relatadas Kb₁ 1,3 x10⁶ M⁻¹ e Kb₂ 3,8 x10⁴ M⁻¹, que mostrou como principal mecanismo de morte celular á apoptose [46].

As medições de viscosidade têm sido usadas com sucesso para determinar modos de ligação de intercalação ou não-intercalação de complexos metálicos e o DNA. Os experimentos de viscosidade são uma técnica de baixo custo que permite distinguir três dois dos principais modos de interação frente ao DNA. Isto porque a intercalação de uma molécula no DNA resulta no alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice, aumentando a viscosidade da solução. Para os compostos que formam ligações covalentes coordenadas frente ao DNA, como a cisplatina, observa-se um decréscimo na viscosidade da solução de DNA, pois distorcem a dupla hélice e reduz-se o comprimento de ponta-a-ponta da molécula do DNA. Os compostos que atuam nos sulcos do DNA não modificam o comprimento da molécula, logo a

viscosidade da solução não sofre alteração significativa. Assim os complexos sintetizados neste trabalho não apresentaram modificações no perfil da viscosidade do DNA, que indica uma possível interação pelos sulcos do DNA [47].

4.4.- Testes Biológicos

Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos de rutênio (II) pode ser comparada através dos valores médios de IC₅₀, isto é, 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 MDA-MB231 (célula tumoral de mama, ATCC HTB-26), MCF-7 (célula tumoral de mama, ATCC HTB-22), A549 (célula tumoral de pulmão, ATCC CCL-185) e L929 (célula não tumoral de fibroblasto de camundongo, ATCC CCL-1).

As células foram expostas para cada composto em um tempo de incubação de 48 horas. Nos gráficos de viabilidade celular (Figura 4.16) dos complexos a barra de erro representa um limite de confiança de 95%, obtidos a partir de três experimentos independentes feitos em triplicata. As concentrações foram da ordem de 200, 100, 50, 12,5, 3,125, 0,2 e 0,04 μM e nas mesmas condições foram utilizados, como referência padrão, os medicamentos aplicados no uso clínico: cisplatina e doxorrubicina. Os resultados obtidos utilizando este ensaio estão listados na Tabela 4.9. Apenas os complexos 2 e 6 mostram efeitos citostáticos em doses significativamente mais baixas em comparação com cisplatina e doxorrubicina sob as mesmas condições, já os demais complexos não foram citotóxicos até 200 μM (Tabela 4.9).

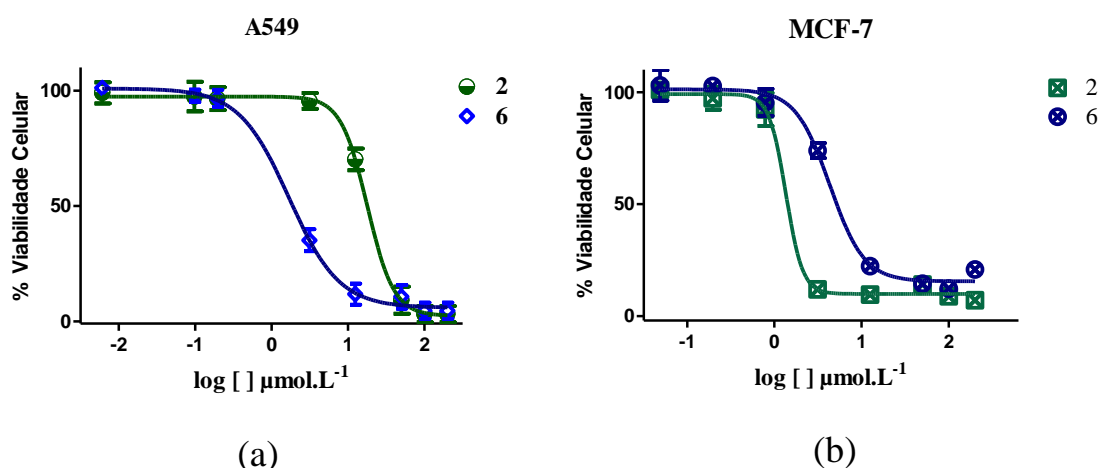


Figura 4.16: Gráfico de viabilidade celular dos complexos 2 e 6 na linhagem (a) A549 e (b) MCF-7.

Tabela 4.9: Viabilidade celular complexos após 48h de incubação com as linhagens celulares

Complexo	IC ₅₀ (μmol/L ⁻¹)			
	A549	MDA-MB-231	MCF-7	L929
1	>100	>100	>100	>100
2	1,70 ± 0,22	0,40 ± 0,10	1,35 ± 0,22	4,27 ± 0,56
3	> 100	> 100	> 100	> 100
4	> 100	> 100	> 100	> 100
5	> 100	> 100	> 100	> 100
6	18,00 ± 0,57	6,80 ± 1,46	4,33 ± 0,48	89,50 ± 14,01
Cisplatina	17,48 ± 4,46	2,44 ± 0,20	8,91 ± 11,62	16,53 ± 2,38
Doxorrubicina	ND	3,67 ± 0,15	ND	ND

ND: não determinado

Sob um microscópio invertido, a forma da célula e alterações na mesma pode ser observado claramente. Como mostrado na Figura 4.17, as células tumorais de mama MDA-MB-231 aparecem fenotipicamente como fusiformes no grupo controle e no tempo 0h há muito poucas células redondas. Células expostas aos compostos 2 e 6 mostraram mudanças morfológicas após as primeiras 6 h; células tratadas durante 48 h mostraram, além de alterações

morfológicas, uma perda de aderência, da forma fusiforme e da confluência, e houve uma tendência clara de concentração- resposta, indicando a possibilidade de apoptose.

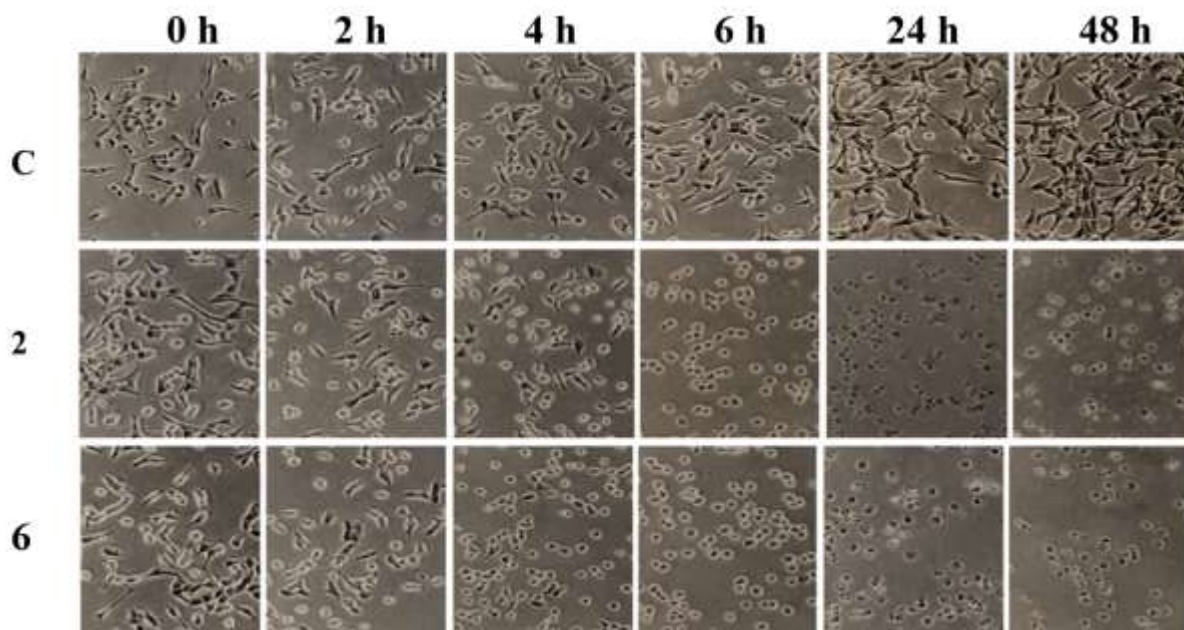
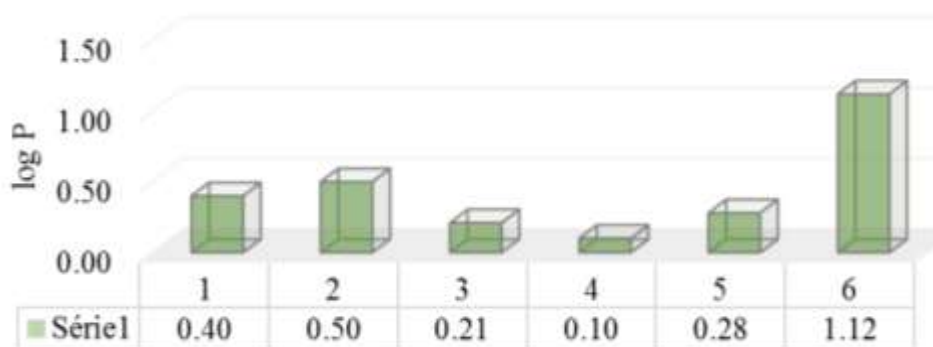


Figura 4.17: Estudo morfológico sob um microscópio invertido (100×) de células MDA-MB-231, 0,5% DMSO (controle-C) e células tratadas com as concentrações IC_{50} dos complexos 2 e 6. Em todos os painéis, as imagens são representativas de muitas fotos tiradas em $n = 3$ experimentos.

O coeficiente de partição entre a água/tampão e n-octanol é a medida mais amplamente utilizada para determinar a lipofilicidade de um composto químico, que é um fator estrutural que regula tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica de compostos, porque até um certo limite, compostos com maior lipofilicidade têm maior permeação através de membranas biológicas (menor solubilidade aquosa). Em termos gerais, para que uma droga anticâncer seja eficaz para iniciar a morte celular, deve penetrar nas células do tumor, e ser mantida numa concentração suficiente e numa relevante escala de tempo. Os valores do coeficiente de partição (Figura 4.18) para complexos 1-6 está na gama de 0,10-1,12, que não têm necessariamente que correlacionar-se com a

citotoxicidade, e pode ser observado que, em geral, os substituintes nos ligantes bipyridina e fenantrolina, aumentam a lipofilicidade dos complexos de rutênio.



Os complexos de 2 e 6 não só mostraram maior lipofilicidade, mas também apresentaram as maiores constantes de maior interação com DNA (Kb_1), em comparação com aqueles obtidos para os complexos 1, 3-5. Estas propriedades biológicas desejáveis são refletidas na atividade antiproliferativas mostradas pelos complexos 2 e 6 em concentrações mais baixas.

Capítulo V. Conclusões

5.- Conclusões

1.- Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados os complexos de fórmula: $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cym})(\text{N}\cap\text{N})(\text{Cl})]\text{PF}_6$ (onde $\text{N}\cap\text{N}$ = 1,10'-fenantrolina (fen), 4,7'-difetil-1,10'-fenantrolina (fenilfen), 2,2'-bipiridina (bipy), 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (mebipy), 5,5'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (meobipy) e 5,5'-di-*t*-butil-2,2'-bipiridina (butbipy)), a partir do complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymeno})(\text{Cl})_2]_2$.

2.- Após a coordenação dos ligantes $\text{N}\cap\text{N}$, a característica mais marcante do ligante areno são os desvios químicos dos prótons aromáticos H_5 - H_8 os quais são deslocados significativamente para campo mais baixo devido à influência do ligante quelato, os quais são fortes aceitadores π que removem a densidade eletrônica do areno.

3.- As medidas eletroquímicas dos compostos em diclorometano não apresentam o processo reversível III e IV, só é observado depois da adição de acetonitrila, que indicou a troca entre o Cl^- pelo ligante CH_3CN .

4.- As estruturas cristalográficas dos compostos mostram uma geometria octaédrica distorcida, do tipo semi-sanduíche, em todos eles os comprimentos e ângulos de ligação não variam significativamente, fato que indica que os substituintes dos ligantes bipiridina e fenantrolina não afeitam de forma marcada as posições na estrutura no estado sólido.

5.- Para o estudo da interação complexo metálico e o DNA foram feitas titulações espectroscópicas, às quais permitiram o cálculo das constantes de interação por dois métodos de cálculo bem reportados. Os valores das constantes indicam uma interação reversível com o DNA.

6.- Nos ensaios de citotoxicidade os complexos 2 e 6 foram os que apresentaram melhor valor de IC_{50} , isto está relacionado com seus valores de lipofilicidade.

Capítulo VI. Bibliografía

-
- [1] LIPPARD, S. J.; BERG, J.M. Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, Mill Valley, 1994. p. 17.
- [2] VAN RIJT, S.; SADLER, P. "Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs". Drug Discovery Today, **14**: 1089, 2009.
- [3] BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. "Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design. Advances in Inorganic Chemistry". J. Curr. Opin. Chem. Bio., **12**: 197, 2008.
- [4] <http://www.inca.com.br>. Acesso: 08 de fevereiro de 2013.
- [5] Adaptação da página: <http://revistaescola.abril.com.br/ensino-medio/se-liga-voce-pode-ajudar-evitar-cancer-630044.shtml>. Acesso: 08 de fevereiro de 2013.
- [6] REEDIJK, J. "Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes". Plat. Met. Rev., **52**: 2, 2008.
- [7] LEIJEN, S.; BURGERS, S.A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN WERKHOVEN, E.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. "Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy". Invest. New Drugs, **33**: 201, 2015.
- [8] LENTZ, F.; DRESCHER, A.; LINDAUER, A.; HENKE, M.; HILGER, R. A.; HARTINGER, C. G.; SCHEULEN, M. E.; DITTRICH, C.; KEPPLER, B. K.; JAEHDE, U.; Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV. "Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study". AntiCancer Drugs, **20**: 97, 2009.
- [9] JAOUEN, G. Bioorganometallics, Wiley-VCH, p. 45.
- [10] CLARKE, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". Coord. Chem. Rev., **236**: 209, 2003.

-
- [11] GOPAL, Y.N.V.; JAYARAJU, D.; KONDAPI, A.K. "Inhibition of topoisomerase II catalytic activity by two ruthenium compounds: a ligand-dependent mode of action". *Biochem.*, **38**: 4382, 1999.
- [12] SCOLARO, C.; BERGAMO, A.; BRESCACIN, L.; DELFINO, R.; COCCHIETTO, M.; LAURENCZY, G.; GELDBACH, T. J.; SAVA, G.; DYSON, P. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA Complexes". *J. Med. Chem.*, **48**: 4161, 2005.
- [13] DYSON, P. J.; KEPPLER B. K. "Organometallic complexes that interconvert between trimeric and monomeric structures as a function of pH and their effect on human cancer and fibroblast cells". *Chem. Eur. J.*, **14**: 9046, 2008.
- [14] AIRD, R. E.; CUMMINGS, J.; RITCHIE, A. A.; MUIR, M.; MORRIS, R. E.; CHEN, H.; MURDOCH, P. S.; SADLER, P. J.; JODRELL, D. "In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer". *J. Cancer*, **86**: 1652, 2002.
- [15] FERNANDEZ, R.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; PARSONS, S.; SADLER, P. "Use of Chelating Ligands to Tune the Reactive Site of Half-Sandwich Ruthenium(II)-Arene Anticancer Complexes". *Chem. Eur. J.*, **10**: 5173, 2004.
- [16] DYSON, P. J. "Systematic Design of a Targeted Organometallic Antitumour Drug in Pre-clinical Development". *Chimia*, **61**: 698, 2007.
- [17] DOUGAN, S. J.; SADLER, P. J. "The Design of Organometallic Ruthenium Arene Anticancer Agents". *Chimia*, **61**: 704, 2007.
- [18] DALE, L.D.; TOCHER, J. H.; DYSON, T. M.; EDWARDS, D. I.; TOCHER, D. A. "Studies on DNA damage and induction of SOS repair by

novel multifunctional bio-reducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound”. *Anti-Cancer Drug Design*, **7**: 3, 1992.

[19] HOTZE, A. C.; CASPERS, S. E.; KOOIJMAN, H.; SPEK, A. L.; FLAMIGNI, A.; BACAC, M.; SAVA, G.; HAASNOOT, J. G.; REEDIJK, J. “Structure-dependent in vitro cytotoxicity of the isomeric complexes [Ru(L)₂Cl₂] (L= o-tolylazopyridine and 4-methyl-2-phenylazopyridine) in comparison to [Ru(azpy)₂Cl₂]”. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**: 354, 2004.

[20] ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P.J. “The interactions of low oxidation state transition metal clusters with DNA: potential applications in cancer therapy”. *J. Clust. Sci.*, **12**: 563, 2001.

[21] MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. A ciência do DNA. Trad. Ana Leonor Chies Santiago-Santos et al. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 575.

[22] NAVARRO, M.; CASTRO, W.; MARTÍNEZ, A.; SANCHEZ, R. “The mechanism of antimalarial action of [Au(CQ)(PPh₃)]PF₆: structural effects and increased drug lipophilicity enhance heme aggregation inhibition at lipid/water interfaces”. *J. Inorg. Biochem.*, **105**: 276, 2011.

[23] ERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. E.; PERRIN, D. R. Purification of Laboratory Chemicals. 2a ed. New York, Pergamin Press, 1980.

[24] ROBERTSON, D. R.; ROBERTSON, W.; STEPHENSON, T. A. J. “Ruthenium complexes containing group vb donor ligands ix. Cationic η⁶-arene and η⁵-cyclohexadienyl complexes of ruthenium containing nitrogen and phosphorus donor ligands”. *Organomet. Chem.*, **202**: 309, 1980.

[25] BAKA, E.; COMER, J. E.A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. “Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**: 335-341, 2008.

-
- [26] BENNETT, M. A.; SMITH, A. K. J. "Arene Ruthenium(II) Complexes formed by Dehydrogenation of Cyclohexadienes with Ruthenium(III) Trichloride". *J. Chem. Soc. Dalton*, **233**, 1973.
- [27] BETANZOS-LARA, S.; SALASSA, L.; HABTEMARIAM, A.; NOVAKOVA, O.; PIZARRO, A.M.; CLARKSON, G.J.; LISKOVA, B.; BRABEC, V.; SADLER, P.J. "Photoactivatable Organometallic Pyridyl Ruthenium(II) Arene Complexes". *Organometallics*, **31**: 3466, 2012.
- [28] LALREMPUIA, R.; KOLLIPARA, M. R.; CARROLL, P. "Syntheses and characterization of arene ruthenium (II) complexes containing N,N'-donor Schiff base ligands. Crystal and molecular structure of $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{C}_5\text{H}_4\text{N-2-CH=N-/C}_6\text{H}_4\text{-p-NO}_2)]\text{PF}_6$ ". *Polyhedron*, **22**: 605, 2003.
- [29] BARRY, N.; FURRER, J.; THERRIEN, B. "In and Out-of-Cavity Interactions by Modulating the Size of Ruthenium Metallarectangles". *Helvetica Chim. Acta.*, **93**: 1313, 2010.
- [30] DEMORO, B.; SARNIGUET, C.; SÁNCHEZ-DELGADO, R.; ROSSI, M.; LIEBOWITZ, D.; CARUSO, F.; OLEA-AZAR, C.; MORENO, V.; MEDEIROS, A.; COMINI, M. A.; OTERO, L.; GAMBINO, D. "New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents". *Dalton Trans.*, **41**: 1534, 2012.
- [31] GOLLAS, B.; SPEISER, B.; ZAGOS, I.; MAICHLE-MÖSSMER, C. "Electrochemistry of Ruthenium Metallocenes. 1. Synthesis, NMR, and Anodic Electrochemical Behavior of Vinyl-Substituted Ruthenium Cyclophane Complexes". *J. Organomet. Chem.*, **602**: 75, 2000.
- [32] HABTEMARIAM, A.; MELCHART, M.; FERNÁNDEZ, R.; PARSONS, S.; OSWALD, I. D. H.; PARKIN, A.; FABBIANI, F. P. A.; DAVIDSON, J. E.; DAWSON, A.; AIRD, R. E.; JODRELL, D. I.; SADLER, P. J. "Structure-Activity Relationships for Cytotoxic Ruthenium(II) Arene Complexes

Containing N,N-, N,O-, and O,O-Chelating Ligands". *J. Med. Chem.*, **49**: 6858, 2006.

[33] VOCK, C. A.; SCOLARO, C.; PHILLIPS, A. D.; SCOPELLITI, R.; SAVA, G.; DYSON, P. J. "Chemical, Electrochemical, and Structural Aspects of the Ruthenium Complexes Ru(arene)Cl₂(P) (Where Arene Benzene, Paracyclophane and Triphenylphosphine, Prac-Paracyclophanylphosphine)". *J. Med. Chem.*, **49**: 5552, 2006.

[34] JUNG, Y.; LIPPARD, S. "Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage". *Chem. Rev.*, **107**: 1387, 2007.

[35] MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; FILIPPI, S.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ORIOLI, P.; SAVA, G.; ZICHE, M. "Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers". *Br. J. Cancer*, **88**: 1484, 2003.

[36] VACCA, A.; BRUNO, M.; BOCCARELLI, A.; COLUCCIA, M.; RIBATTI, D.; BERGAMO, A.; GARBISA, S.; SARTOR, L.; SAVA, G. "Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A". *Br. J. Cancer*, **86**: 993, 2002.

[37] KELMAN, A.D.; CLARKE, M.J.; EDMONS, H. J.; PERESIE, H. J. "Biological activity of ruthenium purine complexes". *J. Clin. Hematol. Oncol.*, **7**: 274, 1977.

[38] MESTRONI, G.; ALESSIO, E.; CALLIGRAS, M.; ATTIA, W.M.; QUADRIFOGLIO, F.; CAUCI, S.; SAVA, G.; ZORZET, S.; PACOR, S.; MONTI-BRAGADIN, C.; TAMARO, M.; DOLZANI, L. "Chemical, biological and antitumor properties of ruthenium(II) complexes with dimethylsulfoxide". *Prog. Clin. Biochem. Med.*, **10**: 71, 1989.

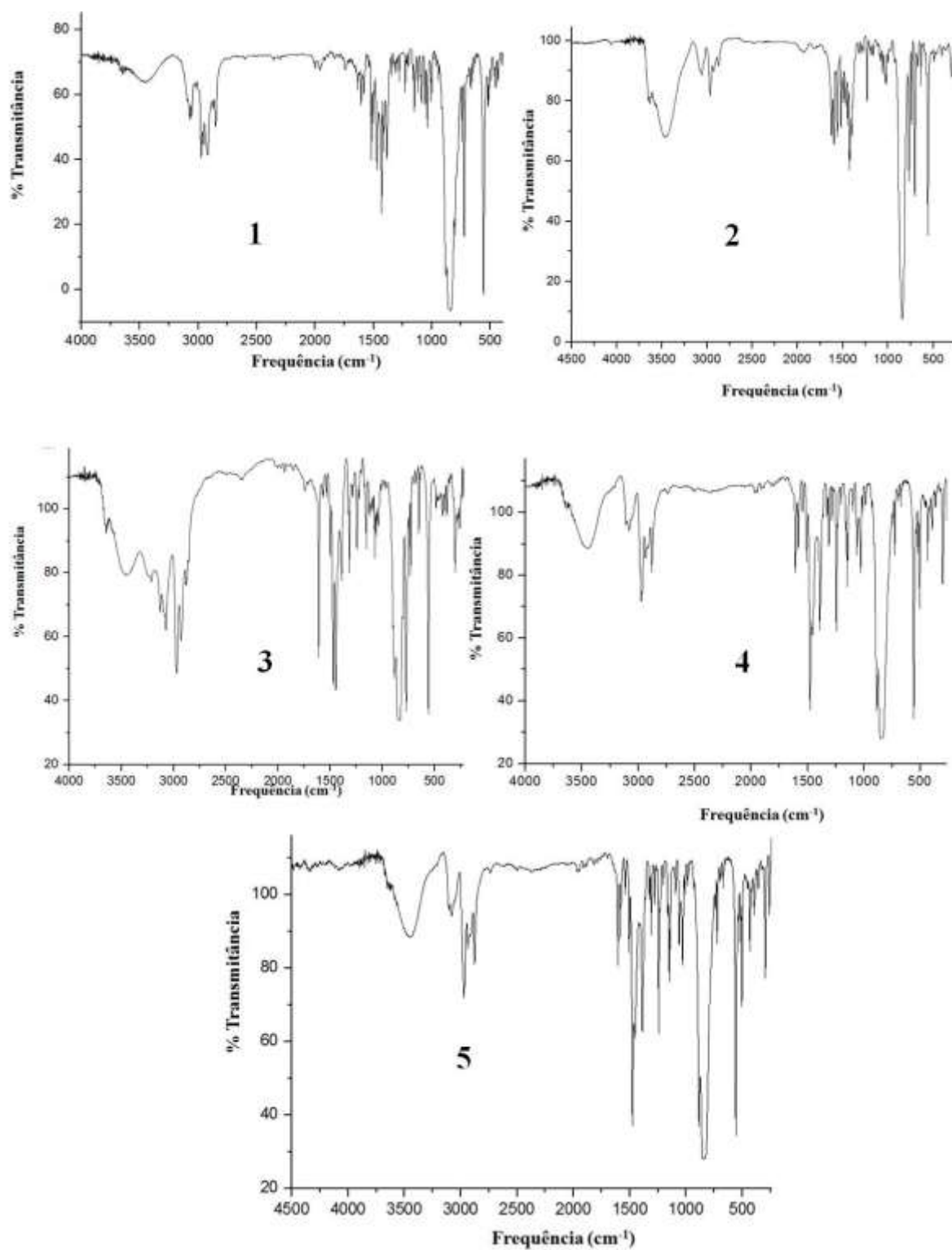
-
- [39] GALLORI, E.; VETTORI, C.; ALESSIO, E.; GONZÁLEZ-VILCHEZ, F.; VILAPLANA, R.; ORIOLI, P.; CASINI, A.; MESSORI, L. “DNA as a possible target for antitumor ruthenium(III) complexes”. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**: 156, 2000.
- [40] KAPITZA, S.; PONGRATZ, M.; JAKUPEC, M.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; LACKINGER, L.; KEPPLER, B.K.; MARIAN, B. “Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells”. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **131**: 101, 2005.
- [41] MARINI, V.; CHRISTOFIS, P.; NOVAKOVA, O.; KASPARKOVA, J.; FARRELL, N.; BRABEC, V. “Conformation, protein recognition and repair of DNA interstrand and intrastrand cross-links of antitumor trans-[PtCl₂(NH₃)(thiazole)]”. *Nucleic Acids Res.*, **33**: 5819, 2005.
- [42] CHEN, H.; PARKINSON, J. A.; MORRIS, R. E.; SADLER, P.J. “Highly Selective Binding of Organometallic Ruthenium Ethylenediamine Complexes to Nucleic Acids: Novel Recognition Mechanisms”. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 173, 2003.
- [43] CHEN, H.; PARKINSON, J. A.; NOVAKOVA, O.; BELLA, J.; WANG, F.; DAWSON, A.; GOULD, R.; PARSONS, S.; BRABEC, V.; SADLER, P.J. “Induced-fit recognition of DNA by organometallic complexes with dynamic stereogenic centers”. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**: 14623, 2003.
- [44] KELLY, J. M.; TOSSI, A. B.; MCCONNELL, D. J.; UIGIN, C. O. “A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation”. *Nucl. Acids Res.*, **13**: 6017, 1985.
- [45] SCATCHARD, G. “The importance of binding constants: theory, models, and discussion”. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**: 660, 1949.

[46] MARTÍNEZ, A.; RAJAPAKSE, C.S.K.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; VARELA-RAMIREZ, A.; LEMA, C.; AGUILERA, R. J. “Arene–Ru(II)–chloroquine complexes interact with DNA, induce apoptosis on human lymphoid cell lines and display low toxicity to normal mammalian cells”. *J. Inorg. Biochem.*, **104**: 967, 2010.

[47] BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. “Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores”. *Rev. Virtual Quim.*, **7**: 1998, 2015.

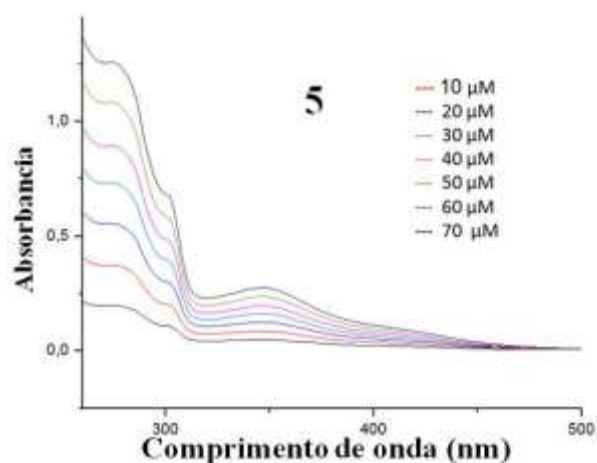
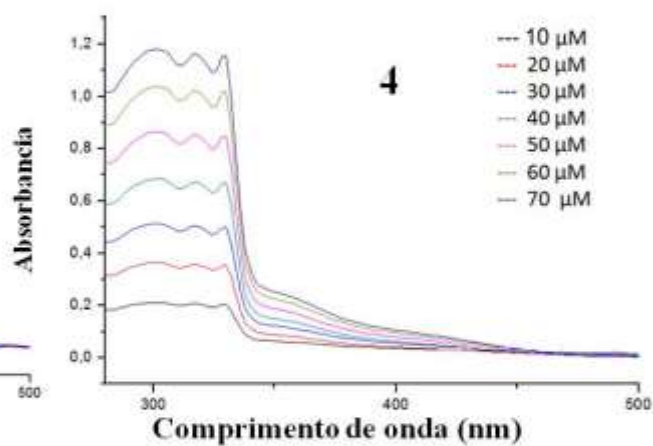
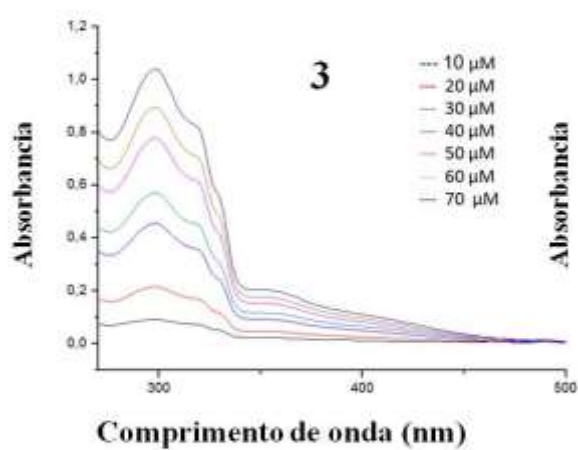
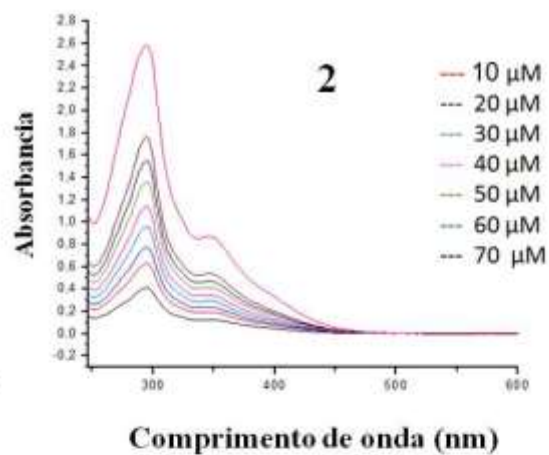
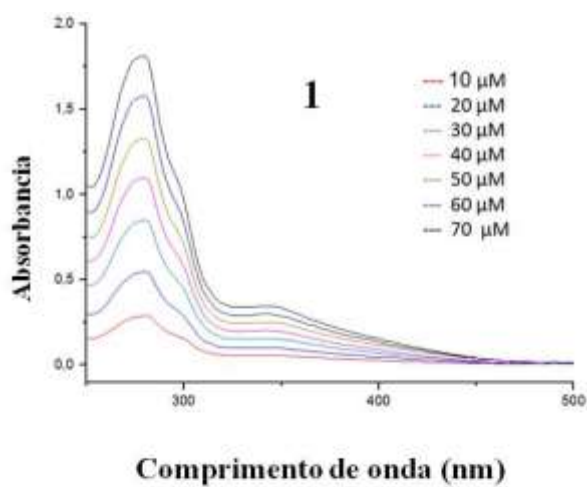
Apêndices

APENDICE 1: Espectroscopia vibracional na região do IV



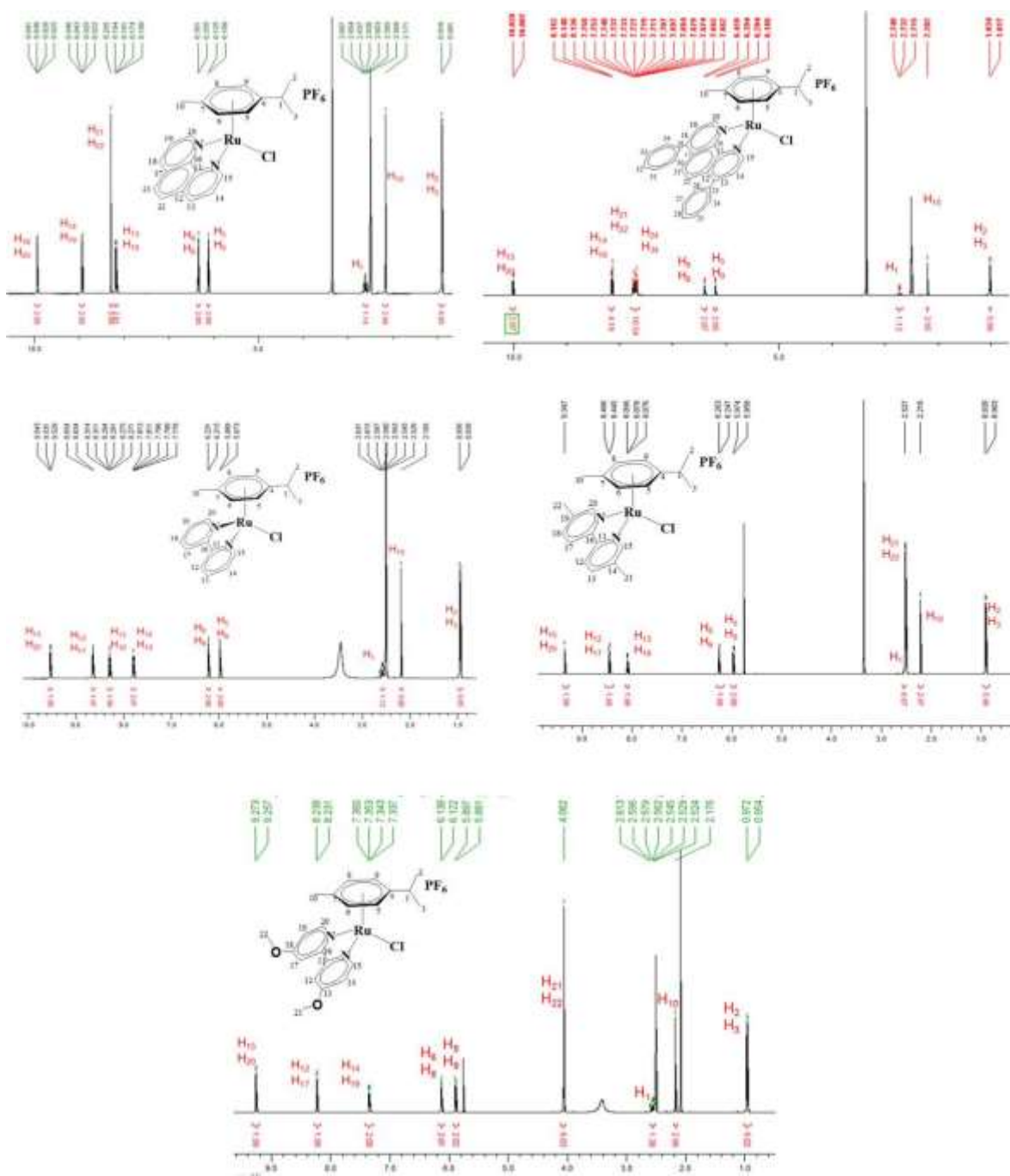
Espectros de IV dos complexos em KBr

APENDICE 2: Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis



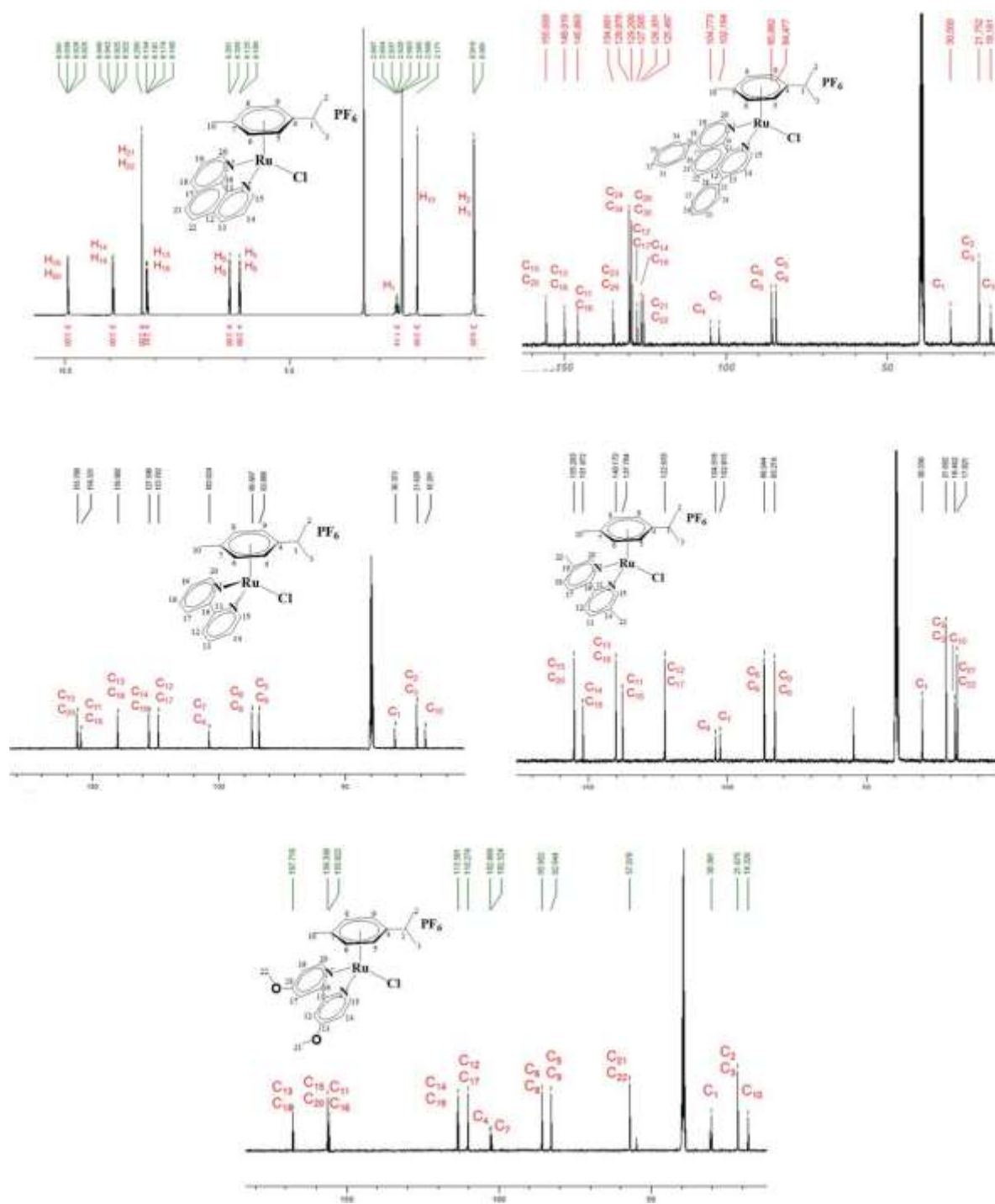
Espectros de UV-Vis dos complexos em CH_2Cl_2

APENDICE 3: Espectroscopia de RMN-¹H



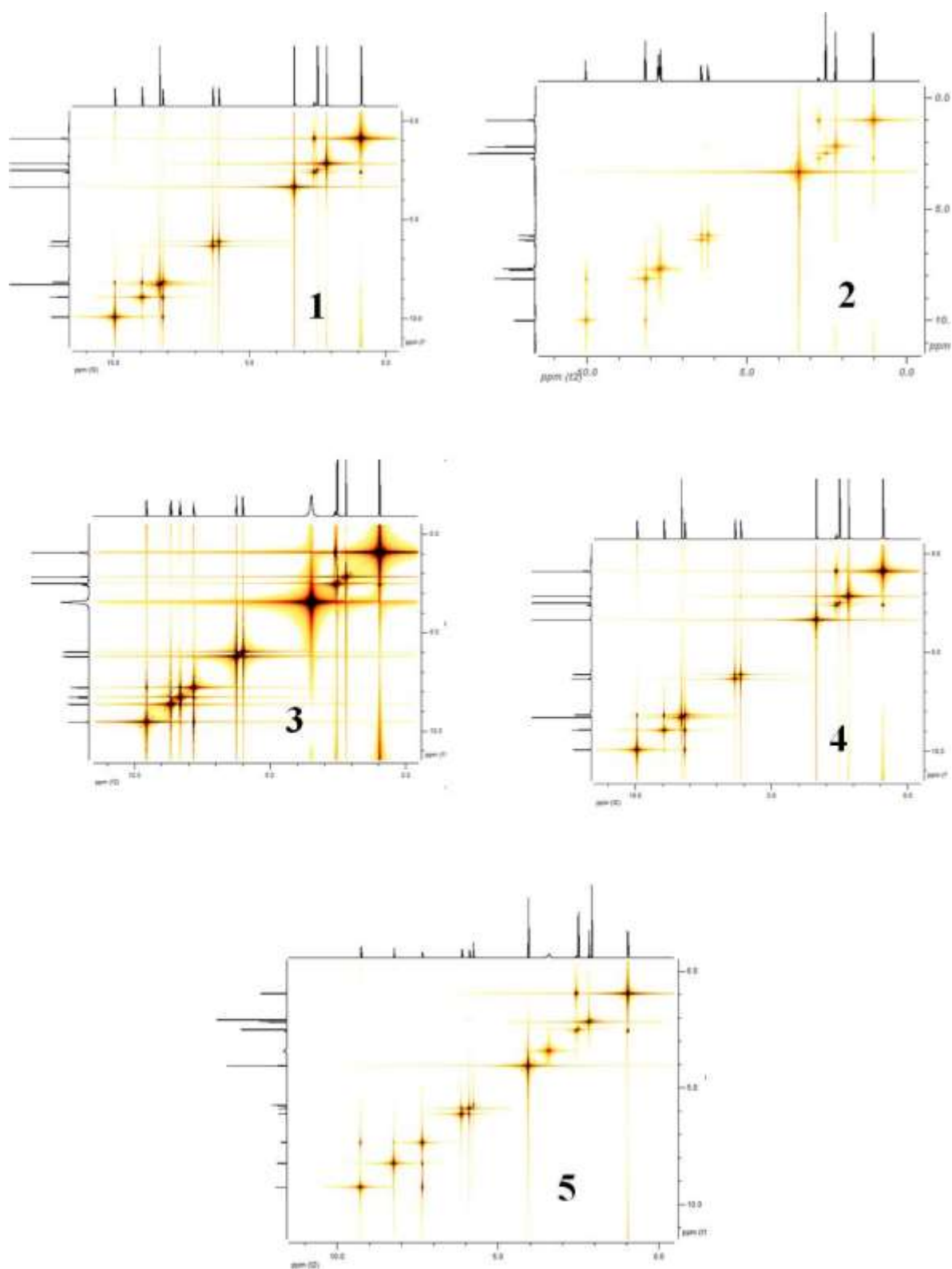
Espectros de RMN-¹H dos complexos em dmsO-d₆

APENDICE 4: Espectroscopia de RMN-¹³C



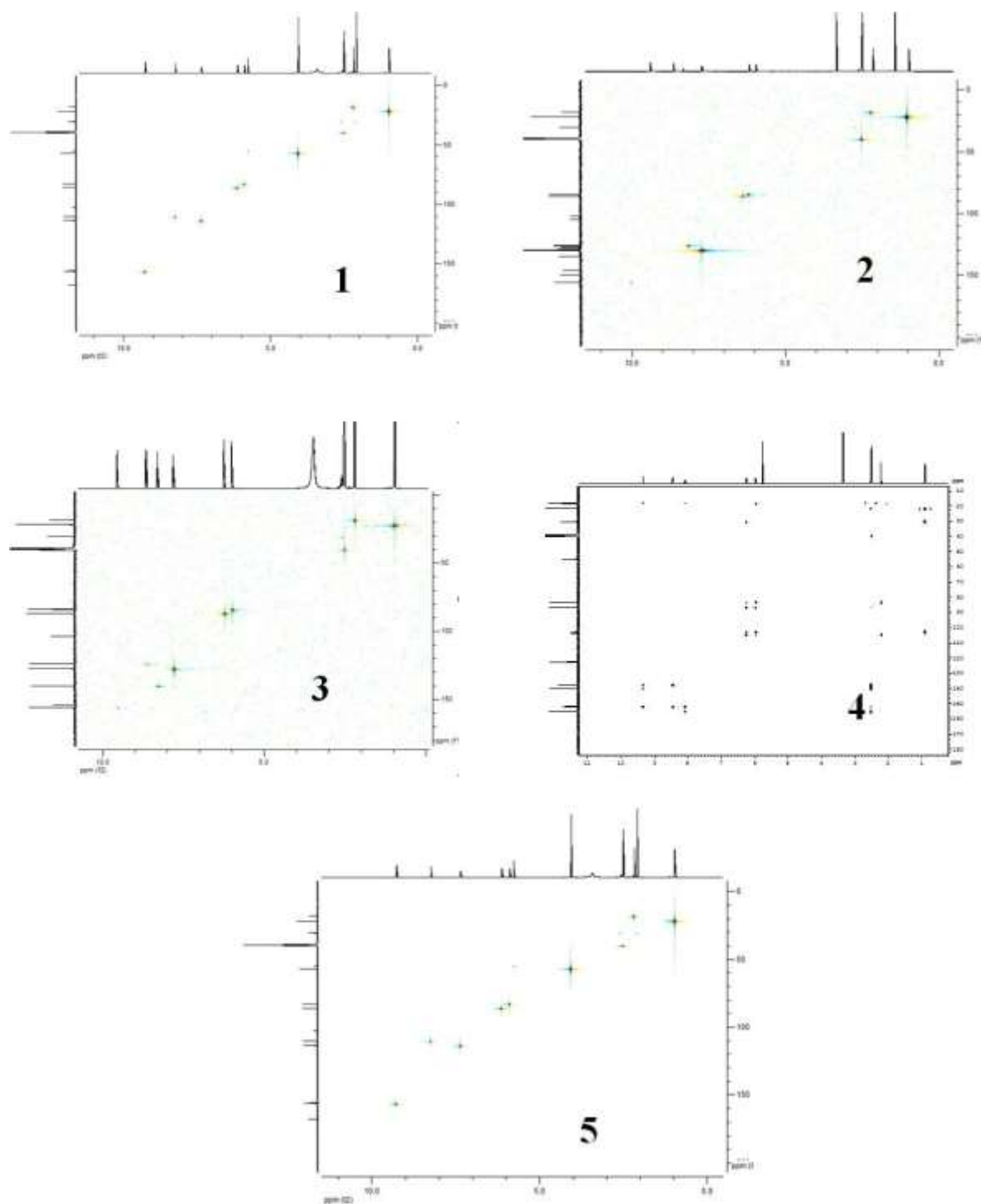
Espectros de RMN-³¹C dos complexos em dmsol-d₆

APENDICE 5: Espectroscopia de RMN-COSY



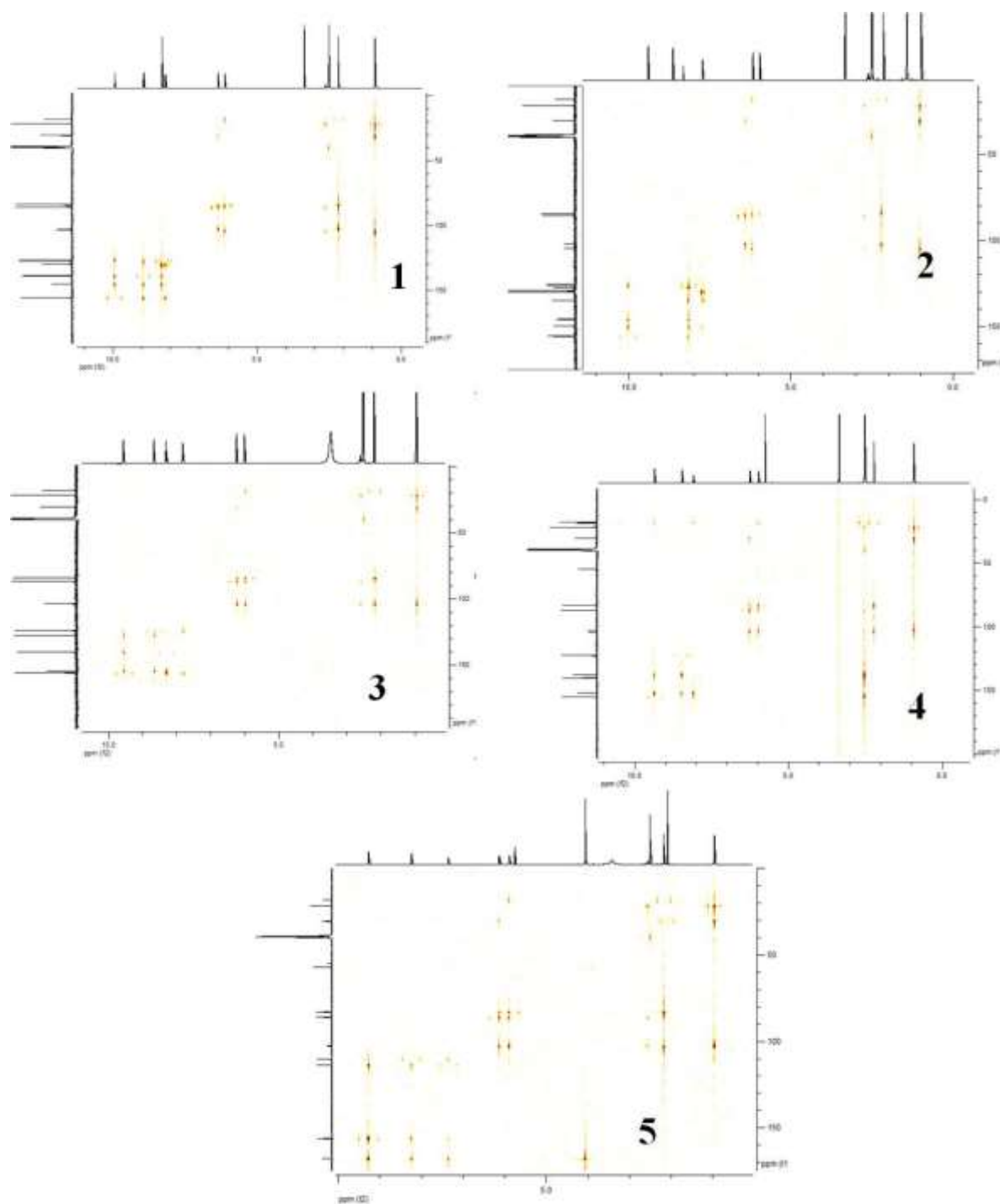
Espectros de RMN-COSY dos complexos em dms_o-d₆

APENDICE 6: Espectroscopia de RMN-HSQC



Espectros de RMN-HSQC dos complexos em dms o -d $_6$

APENDICE 7: Espectroscopia de RMN-HMBC



Espectros de RMN-HMBC dos complexos em dms0-d_6

APENDICE 8: Difração de raios-X

Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação selecionados (°) em [Ru(p-cym)(fen)Cl]·PF₆ (**1**), [Ru(p-cym)(fenilfen)Cl]·PF₆·CH₃CH₂OCH₂CH₃ (**2**), [Ru(p-cym)(bipy)Cl]·PF₆ (**3**, duas moléculas na unidade assimétrica), [Ru(p-cym)(mebipy)Cl]·PF₆ (**4**), e [Ru(p-cym)(meobipy)Cl]·PF₆ (**5**)

COMPLEXO	1	2a	3A/3B*	4	5
Comprimentos de ligação					
Ru(1)–Cl(1)	2.3992(9)	2.3795(19)	2.4004(9)/ 2.4000(9)	2.3990(9)	2.3986(10)
Ru(1)–N(1)	2.095(3)	2.085(5)	2.087(3)/ 2.092(3)	2.088(3)	2.101(3)
Ru(1)–N(2)	2.096(3)	2.087(5)	2.091(3)/ 2.101(3)	2.088(3)	2.089(3)
Ru(1)–C(4)	2.232(4)	2.179(12)	2.233(3)/ 2.239(3)	2.196(3)	2.206(4)
Ru(1)–C(5)	2.189(4)	2.182(12)	2.207(3)/ 2.193(3)	2.170(3)	2.180(4)
Ru(1)–C(6)	2.176(4)	2.253(10)	2.195(3)/ 2.203(3)	2.204(3)	2.200(4)
Ru(1)–C(7)	2.210(4)	2.208(11)	2.209(3)/ 2.211(3)	2.234(3)	2.230(4)
Ru(1)–C(8)	2.198(4)	2.153(14)	2.163(3)/ 2.178(3)	2.195(3)	2.209(4)
Ru(1)–C(9)	2.178(3)	2.139(14)	2.202(3)/ 2.190(3)	2.191(3)	2.159(4)
Ângulos de ligação					
N(2)–Ru(1)–N(1)	77.84(11)	77.19(19)	77.08(11)/ 76.73(12)	77.17(11)	75.98(10)
N(2)–Ru(1)–Cl(1)	84.41(8)	84.94(14)	83.34(8)/ 84.90(8)	85.41(7)	83.69(8)
N(1)–Ru(1)–Cl(1)	84.22(8)	85.97(16)	85.17(8)/ 85.76(8)	83.81(8)	83.36(8)
C(4)–Ru(1)–C(5)	36.89(14)	38.4(4)	37.39(13)/ 37.57(13)	37.81(13)	37.90(17)
C(4)–Ru(1)–C(7)	80.80(15)	80.6(5)	80.53(13)/ 80.57(13)	81.06(12)	81.03(16)
C(4)–Ru(1)–C(8)	67.70(15)	67.6(6)	67.63(13)/ 67.94(13)	68.22(12)	68.52(16)
C(4)–Ru(1)–Cl(1)	96.14(10)	158.6(5)	90.61(10)/ 94.77(9)	158.20(9)	166.28(12)
C(2)–C(1)–C(3)	110.0(4)	114.8(15)	111.6(4)/ 111.4(4)	111.2(3)	115.5(6)

DADOS CRISTALOGRÁFICOS E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

Compound	1	2	3
Formula	C ₂₂ H ₂₂ ClF ₆ N ₂ PRu	C ₃₈ H ₄₀ ClF ₆ N ₂ OPRu	C ₂₀ H ₂₂ ClF ₆ N ₂ PRu
Fw	595.91	822.21	571.89
Crystal system	Orthorhombic	Monoclinic	Triclinic
Space group	Pbca	C2/c	P $\bar{1}$
<i>a</i> (Å)	13.0019(2)	31.2442(17)	11.9718(3)
<i>b</i> (Å)	13.4105(2)	15.0663(8)	13.3184(4)
<i>c</i> (Å)	26.8546(5)	22.350(2)	16.2788(4)
α (°)	90		103.6250(10)
β (°)	90	133.000(2)	107.3150(10)
γ (°)	90		107.1220(10)
<i>V</i> (Å ³)	4682.42(13)	7694.3(9)	2214.57(10)
<i>Z</i>	8	8	4
ρ_{calcd} (Mg·m ⁻³)	1.691	1.420	1.715
μ (mm ⁻¹)	0.913	0.579	0.961
θ Range for data collection (°)	2.18 to 25.05	1.62 to 25.06	1.40 to 25.14
Index ranges	-15 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -15 ≤ <i>k</i> ≤ 15, -30 ≤ <i>l</i> ≤ 31	-37 ≤ <i>h</i> ≤ 31, -16 ≤ <i>k</i> ≤ 17, -24 ≤ <i>l</i> ≤ 26	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -15 ≤ <i>k</i> ≤ 15, -19 ≤ <i>l</i> ≤ 19
Reflections collected	16546	22443	24667
Reflections unique/ <i>R</i> _{int}	4136/0.0218	6780/0.0419	7868 / 0.0154
Data/restraints/param.	4136 / 0 / 302	6780 / 153 / 528	7868 / 36 / 565
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	Semi-empirical equivalents	from Semi-empirical from equivalents
Max/min. transmission	0.6788 0.3247	and 0.8589 and 0.4241	0.8934 and 0.6249
<i>R</i> ₁ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.0370	0.0694	0.0336
<i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.1005	0.1780	0.0912
GOF on <i>F</i> ² , <i>S</i>	1.005	1.098	1.047
Extinction coefficient	0.0054(3)	0.00123(14)	not refined

DADOS CRISTALOGRÁFICOS E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

Compound	4	5
Formula	C ₂₂ H ₂₆ ClF ₆ N ₂ PRu	C ₂₂ H ₂₆ ClF ₆ N ₂ O ₂ PRu
Fw	599.94	631.94
Crystal system	Orthorhombic	Triclinic
Space group	Pbca	P $\bar{1}$
<i>a</i> (Å)	15.3548(2)	8.4058(5)
<i>b</i> (Å)	15.2998(2)	10.6195(7)
<i>c</i> (Å)	20.3467(3)	14.9446(9)
α (°)	90	102.376(3)
β (°)	90	90.848(3)
γ (°)	90	109.062(2)
<i>V</i> (Å ³)	4779.96(11)	1226.38(13)
<i>Z</i>	8	2
ρ_{calcd} (Mg·m ⁻³)	1.667	1.709
μ (mm ⁻¹)	0.895	0.882
θ Range for data collection (°)	2.13 to 25.11	2.09 to 25.10
Index ranges	-18 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -18 ≤ <i>k</i> ≤ 17, -24 ≤ <i>l</i> ≤ 19	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 10, -12 ≤ <i>k</i> ≤ 12, -17 ≤ <i>l</i> ≤ 17
Reflections collected	17408	12315
Reflections unique/ <i>R</i> _{int}	4256/0.0210	4323/0.0505
Data/restraints/param.	4256 / 0 / 304	4323 / 0 / 321
Absorption correction	Semi-empirical equivalents	from Semi-empirical equivalents
Max/min. transmission	0.7452/0.6750	0.8798 and 0.3367
<i>R</i> ₁ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.0331	0.0393
w <i>R</i> ₂ [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.0851	0.1038
GOF on <i>F</i> ² , <i>S</i>	1.027	1.092
Extinction coefficient	0.00291(16)	not refined