

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

**“Propriedades citotóxicas e mecanismo de ação de
novos complexos fosfínicos de rutênio(II) contendo
ligantes naftoquinonas”**

Analu Rocha Costa*

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

Orientador(a): Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

*** bolsista CNPq**

São Carlos -SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Analu Rocha Costa, realizada em 15/12/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)

Profa. Dra. Gianella Facchin Muñoz (UDELAR)

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Terra Martins (UFG)

Profa. Dra. Maribel Coromoto Navarro Acosta (UFJF)

Dedicatória

Aos meus pais Gilson e Adalgisa, pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo em minha vida acadêmica.

*“Se estiver se sentindo desmotivados ou sentindo que não é bom o suficiente
incendeie o seu coração. Enxugue as lágrimas e siga em frente.
Mesmo que vocês parem no caminho e se acovardem, lembre-se de que o fluxo
do tempo nunca para. Ele não vai te esperar, enquanto você se afoga em
tristeza”*

Kyojuro Rengoku - Demon Slayer - Kimetsu no Yaiba

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer e me guiar nessa jornada científica.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, pela oportunidade de realização deste trabalho multidisciplinar, pela orientação e os ensinamentos durante o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pela confiança!

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (Departamento de Gerontologia – UFSCar), por autorizar a realização dos ensaios biológicos em seu laboratório e a sua aluna de mestrado Marina Mantellato por sua disponibilidade e ajuda.

À Dra. Adriana P. Mudim Guedes Macedo, Dra. Celisnolia Leite, Dra. Tamires Donizeth de Oliveira, Dra. Katia Mara de Oliveira, Dra. Angélica Graminha, pela amizade e por todos os ensinamentos dos experimentos biológicos.

Ao Prof. Javier Ellena e ao Dr. João Honorato pela resolução das estruturas cristalográficas.

Aos professores, funcionários e estagiários do Programa de Pós-Graduação em Química, especialmente às secretárias Cristina, Ariane e Luciani e aos funcionários Ademir Sartori e Luciana Vizotto, pela disponibilidade e ajuda.

Ao Prof. Dr. André Gustavo, que me ensinou tanto e acreditou no meu potencial. Muito obrigada, aprendi muito durante o período de mestrado.

Ao Prof. Dr. Rafael Gomes Silveira, por me ajudar nas sínteses dos complexos precursores e na interpretação dos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$.

Ao Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha, pela doação da enzima topoisomeraseIIa e ao MSc. Mauro Almeida Lima, pela ajuda no protocolo para realização do experimento.

A MSc. Luiza Araújo Gusmão, do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual - Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina - FFCLRP – USP, pela ajuda e disposição.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar e da UESC que contribuíram para minha formação profissional. Sou muito grata por todo conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Mária de Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela disposição de seu laboratório e ao MSc. Carlos André Moraes, pela realização das análises no ESI-QTOF-MS.

Ao Prof. Dr. Chaquip Daher Netto e ao MSc. Felipe Demidoff, pela síntese do ligante 3-estiril-lausona.

A minha amiga Leticia Pires de Oliveira, por todo carinho, amizade, pelas discussões científicas e por toda ajuda durante o doutorado. Muito obrigada aprendi muito com você.

Aos meus amigos de república Herick Macedo, Ívero Pita e Gabriel, pela convivência e pelas conversas bem-humoradas.

Agradeço aos meus amigos Darlon, Eduardo, Analisse, Glenda Gregory, Tássia, Taíse, Mitchel, Celis, Tamires, Adriana, Gabriela Porto e Gabriel, pelo apoio, amizade e os incríveis momentos de descontração. Obrigada pelo carinho e tantos aprendizados.

Ao meu pai Gilson Santos e a minha mãe Adalgisa, por sempre me apoiar, pelo carinho e por acreditarem em mim. Amo todos vocês!

Aos meus irmãos Marcos José e Leandra, ao meu sobrinho Maycon e minha cunhada Josélia Santos por toda torcida e apoio. Amo vocês!

Aos órgãos de fomento FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Conselho de Desenvolvimento e Científico e Tecnológico - CNPq, (processo nº 142123/2019-6) pela bolsa concedida.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Valores de IC ₅₀ (μM) e os IS (índice de seletividade) para as linhagens MDA-MB-231 (tumoral de mama) e MCF-10A (não tumoral de mama) e o coeficiente de partição (Log P).	14
TABELA 4.1 - Dados de condutividade molar (λ) e análise elementar dos complexos da série 1 (A1-A8) e da série 2 (B1-B4).....	45
TABELA 4.2 - Principais de distância [A] e ângulos [°] de ligação das estruturas cristalinas dos complexos da série 1 e 2.....	50
TABELA 4.3 - Valores teóricos e experimentais referente a razão m/z e seus respectivos erros experimentais para os complexos de rutênio (série 1 e 2).	51
TABELA 4.4 - Atribuição tentativa das principais bandas na região (1700 até 400 cm ⁻¹) nos espectros de infravermelho para os ligantes livre e os complexos de rutênio da série (1) e (2).	54
TABELA 4.5 - Dados dos comprimetno de onda (λ, nm) de absortividade molar (ε, mol ⁻¹ cm ⁻¹ L) e das tentativas de atribuições das bandas dos complexos de rutênio série 1.	58
TABELA 4.6 - Dados dos comprimetno de onda (λ, nm) de absortividade molar (ε, mol ⁻¹ cm ⁻¹ L) e das tentativas de atribuições das bandas dos complexos de rutênio série 2.	59
TABELA 4.7 - Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (Hz) dos complexos da série 1 e 2 obtidos no RMN ³¹ P{ ¹ H} em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.	63
TABELA 4.8 - Valores dos potenciais de oxidação para os complexos de rutênio em diclorometano (PTBA 0,1 mol/L).	70

TABELA 4.9 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) dos complexos da série 1 em diferentes temperaturas. 77

TABELA 4.10 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) dos complexos da série 1 em diferentes temperaturas. (continuação) 78

TABELA 4.11 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) dos complexos da série 2 em diferentes temperaturas. (conclusão). 79

TABELA 4.12 - Dados dos valores de coeficiente de partição, expresseo em Log P dos complexos série 1 (A1 -A8) e série 2 (B1-B2)..... 92

4.13 - Valores de IC_{50} obtidos para os complexos de rutênio(II) sintetizados e o ligante livre NQ1 (3-estiril-lausona), controle positivo cisplatina, frente as linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h. SD = erro padrão da média. 94

Tabela 4.14 - Índices de seletividade dos complexos de rutênio(II) e da cisplatina frente as linhagens tumorais. Calculados em função dos valores de IC_{50} em células não tumorais e tumorais. 97

Tabela 4.15 - Valores de IC_{50} são expressos como média e desvio padrão de três ensaios independente para os complexos de rutênio(II), seus respectivos ligantes no período de incubação de 48 h, nas linhagens tumorais de mama, MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e a não tumoral MCF-10 A..... 112

Tabela 4.16 - Valores de IC_{50} para os complexos de rutênio(II), seus respectivos ligantes no período de incubação de 48 h, na linhagem tumoral de pulmão e a não tumoral MRC-5. 113

Tabela 4.17 - Valores de índice de seletividade (IS) para os complexos B1-B4, nas linhagens celulares de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e na linhagem tumoral de pulmão A549..... 114

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação das características do câncer.....	2
FIGURA 1.2 - Linha do tempo dos complexos de platina aprovados para uso no tratamento do câncer.	4
FIGURA 1.3 - Estruturas de complexos de rutênio que estão, ou estiveram em testes clínicos.....	7
FIGURA 1.4 - Estrutura dos complexos $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$, e os valores de IC_{50} obtidos na linhagem MDA-MB-231.	11
FIGURA 1.5 - Estruturas de compostos derivados de quinonas utilizados no tratamento do câncer.	12
FIGURA 1.6 - Rota sintética do ligante derivado da lausona 3-estiril-lausona.	16
FIGURA 1.7 Fórmulas estruturais dos ligantes naftoquinonas utilizados para o desenvolvimento dos novos complexos de rutênio(II).	17
FIGURA 4.1 - Rota sintética para a obtenção dos compostos da série 1.	43
FIGURA 4.2 - Rota sintética para a obtenção dos compostos da série 2.	44
FIGURA 4.3 - Estruturas cristalinas dos complexos da série 1 (A1, A3, A5, A6, A7 e A8) e da série 2 o complexo (B2). Por motivo de maior clareza o contra-íon PF_6^- foi omitido.....	47
FIGURA 4.4 - Estrutura cristalina dos complexos A3 e A5. Em destaque os dois isômeros 1 e 2. O primeiro isômero corresponde ao átomo de fósforo (P2) trans ao átomo de oxigênio (O2) e o segundo isômero o átomo de fósforo (P2) está trans posicionado ao átomo de oxigênio carbonílico (O1)	48

- FIGURA 4.5 - Espectro vibracional na região do infravermelho dos ligantes naftoquinônicos NQ1 (preto) e série 2, NQ2 (azul) e NQ3 (verde) em pastilha de KBr, na região de $3500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ 52
- FIGURA 4.6 - Espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos da série 1 (A) Complexo A1 e da série 2 (B) Complexo B1, na região de $4000 \text{ a } 400$ e em destaque a região de $1600 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ em pastilhas de KBr. 53
- FIGURA 4.7 - Espectros de absorção na região do ultravioleta visível dos ligantes naftoquinonas em dimetilsulfóxido. 55
- FIGURA 4.8 - Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para os ligantes naftoquinônicos após a adição da base (Et_3N) em, dimetilsulfóxido. ... 56
- FIGURA 4.9 - Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para os complexos série 1 (A1) e série 2 (B2), com seus respectivos ligantes em DMSO. 57
- FIGURA 4.10 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A1 obtido em CH_2Cl_2 com capilar de D_2O 60
- FIGURA 4.11- Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos compostos A2 e A4 em CH_2Cl_2 (D_2O). 62
- FIGURA 4.12 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ 64
- FIGURA 4.13 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A8 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ 65
- FIGURA 4.14 - Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo A1 em acetona- d_6 . Em destaque os conjuntos de sinais exibidos pelo complexo. 66
- FIGURA 4.15 - Mapa de correlação COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) obtido para o complexo A1, em acetona- d_6 . Em destaque os conjuntos de sinais exibidos pelo complexo. .. 67

FIGURA 4.16 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtido para o complexo A1 e ligante NQ1 em acetona- d_6 . Em destaque os conjuntos de sinais exibidos pelo complexo e o ligante NQ1.....	68
FIGURA 4.17 Voltamograma cíclico do complexo A1 (série 1), em CH_2Cl_2 (0,1 mol/L PTBA).....	69
FIGURA 4.18 - Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da série 1 (A1, A3 e A8) e série 2 (B1) em DMSO, no tempo de 0, 24 e 48h.....	71
FIGURA 4.19 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série 1 (A1, A3 e A8) e série 2 (B2) em DMSO/meio de cultura nos tempos 0, 24 e 48 h.	72
FIGURA 4.20 - Estrutura tridimensional da HSA, com seus principais domínios e subdomínios.....	73
FIGURA 4.21 - Espectros de supressão da emissão de fluorescência da $[\text{HSA}] = 2,0 \mu\text{M}$ na presença do complexo A1 a 298 K em tampão trisma, $\text{pH} = 7,4$	74
FIGURA 4.22 - Gráfico Stern-Volmer para o complexo A1 em diferentes concentrações, para as temperaturas 298, 303, 310 K.	76
FIGURA 4.23 - Espectros de supressão da fluorescência do aduto Var-HSA em diferentes concentração do complexo A1 a 25 °C.	82
FIGURA 4.24 - Modos de interações de complexo com DNA.	84
FIGURA 4.25 - Gráficos de viscosidade para os (A) complexos da série 1 (A1 - A8) e (B) complexos da série 2 (B1 - B4).	85
FIGURA 4.26 - As formas principais do DNA plasmidial, superenovelada, circular e linear.	86
FIGURA 4.27 - Efeitos das concentrações do complexo A1 na conformação do DNA plasmidial pBR322 em diferentes R_i ($a = 0,25$; $b = 0,50$ e $c = 1,00$) $\text{M} =$ marcador de peso molecular e DNA = controle negativo com DMSO.	87

- FIGURA 4.28 - Estrutura cristalina do aduto Hoechst 33258 interagindo pelo sulcos menor do DNA. 88
- FIGURA 4.29 - Espectro de emissão do aduto Hoechst-DNA com diferentes concentrações (a = 2,5 μ M; b = 5,0 μ M; c= 7,5 μ M ; d = 10 μ M ; e = 12,5 μ M; f = 15 μ M ; g = 17,5 μ M e h = 20 μ M) dos compostos A1 (A) e B1 (B). 89
- FIGURA 4.30 - Efeitos de diferentes concentrações dos complexos A1 e A3 na atividade enzimática da Topoisomerase II α , a 37°C. C- = somente DNA pBR322 e DMSO), C+ = (DNA e topoisomerase II α). 90
- FIGURA 4.31- Efeitos de diferentes concentrações dos complexos B2 e B4 na atividade enzimática da Topoisomerase II α , a 37°C. O controle negativo = somente DNA pBR322 e DMSO, controle positivo = DNA e topoisomerase II α). 91
- FIGURA 4.32 - Curvas de concentração-resposta nas linhagens MCF-7 e A549, após a incubação de 48 h com os complexos A3 e A7. 95
- FIGURA 4.33 - Efeito do complexo A1 na morfologia das células (A) MDA-MB-231 (tumoral de mama) e (B) MCF-10A (não tumoral de mama). As figuras foram capturadas no aumento de 10x objetiva. 98
- FIGURA 4.34 - Efeito do complexo A6 na morfologia das células (A) MDA-MB-231 (tumoral de mama) e (B) MCF-10A (não tumoral de mama). As figuras foram capturadas no aumento de 10x objetiva. 100
- FIGURA 4.35 - Ensaio clonogênico das células MDA-MB-231, tratadas em diferentes concentrações do complexo A6, após 48 h de exposição. As imagens representativas dos poços são mostradas juntamente com os gráficos de barras da área e intensidade das colônias. (*p < 0,03; ***p < 0,001, ****p < 0,0001). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando a ANOVA e teste Dunnett. 101

FIGURA 4.36 - Ensio de migração dos complexos A1 e A6 na linhagem celular MDA-MB-231, nas concentrações 0,25 , 050 e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. À direita, representação gráfica da porcentag3m de fechamento da risca após o tempo de tratamento de 24 horas. (** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA e teste Dunnett.....	103
FIGURA 4.37 - Representação da progressão das fases do ciclo celular e os pontos de checagem.	104
FIGURA 4.38 - Efeito do complexo A1 na distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231 após 48h de incubação. Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular e o gráfico da porcentagem de células corresponde a cada fase do ciclo celular após o tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações, por 48h. Os valores representam a média \pm desvio padrão, dos experimentos realizados em triplicata. Os dados foram comparados com o controle. Significância no nível de ** $p < 0,005$ usando Two-Way ANOVA seguido pela análise pós-teste de Bonferroni's..	106
FIGURA 4.39 - Efeito do complexo A6 na distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231 após 48h de incubação. Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular e o gráfico da porcentagem de células corresponde a cada fase do ciclo celular após o tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações, por 48h. Os valores representam a média \pm desvio padrão, dos experimentos realizados em triplicata. Os dados foram comparados com o controle. Significância no nível de ** $p < 0,005$ usando Two-Way ANOVA seguido pela análise pós-teste de Bonferroni's..	107
FIGURA 4.40 - Efeitos dos complexos A1 e A6 na indução de apoptose de células MDA-MB-231, após tratamento com diferentes concentrações, incubados por 48 h.	108

- FIGURA 4.41 - Grafico de porcentagens de células apoptoticas, induzida pelos complexos A1 e A6 nas células MDA-MB-231, após 48 h de tratamento. Sigificancia (*p < 0,05; ** p < 0,01 e ***p < 0,01, ****p < 0,001). Os dados representam a média ± desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA..... 109
- FIGURA 4.42 - Efeito do complexo A6 no DNA nas células do câncer de mamda MDA-MB-231. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 24h e marcadas com DAPI. As setas amarelas indicam o dano nuclear e o aparecimento de corpos apoptóticos..... 111
- FIGURA 4.43 - Alterações morfologicas do compplexo B2 nas celulas MDA-MB-231 e MCF-10A. As setas indicam alterações morfológicas. As setas indicam as alterações morfológicas. 115
- FIGURA 4.44 - Alterações morfologicas do compplexo B4 nas celulas MDA-MB-231 e MCF-10A. As setas indicam alterações morfológicas. As setas indicam as alterações morfológicas. 116
- FIGURA 4.45 - Ensaio clonogênico das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do complexo B2 (A) e complexo B4 (B) após 10 dias de tratamento. Os dados representam média, desvio padrão, de três ensaios independentes em triplicata. Dados significativos em **p<0,001, ***p<0,0001 utilizando a ANOVA e pós-teste de Dunnet. 117
- FIGURA 4.46 - Ensio de migração dos complexos B2 e B4 na linhagem celular MDA-MB-231, em diferentes concentrações. À direita, representação gráfica da porcentag3m de fechamento da risca após o tempo de tratamento de 24 horas. (*p < 0,05; ** p < 0,01). Os dados representam a média ± desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA e teste Dunnett..... 119
- FIGURA 4.47 - Efeito de difrentes concentrações do complexos de rutênio B2 e B4 no citoesqueleto das celulas MDA-MB-231. As imagens representa a fixação

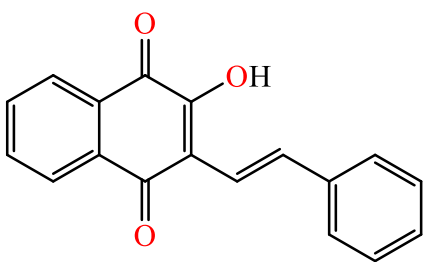
nas células com Alexa Fluor 488. Os quadradinhos em laranja indicam as alterações observadas. 121

FIGURA 4.48 - Efeito dos complexos B2 e B4 na distribuição do ciclo celular na linhagem tumoral MDA-MB-231. Sigificancia (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata. . 122

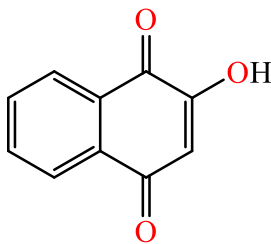
FIGURA 4.49 - Efeitos dos complexos B2 e B4 na indução de apoptose de células MDA-MB-231, após tratamento com diferentes concentrações, incubados por 48 h. Sigificancia (** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA..... 124

FIGURA 4.50 - Efeito do complexo B2 no DNA nas células MDA-MB-231. As células foram marcadas com DAPI. As setas laranja indicam o dano nuclear. 125

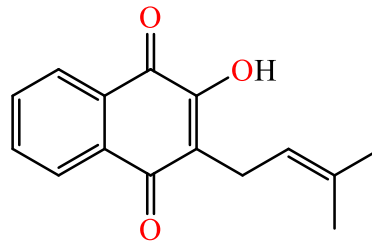
ESTRUTURAS DOS LIGANTES NAFTOQUINONAS



NQ1 = 3-estiril-lausona

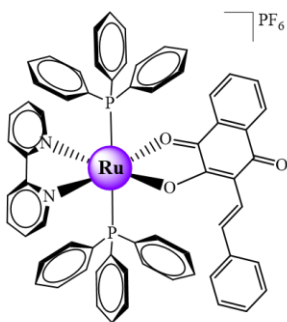


NQ2 = Lausona

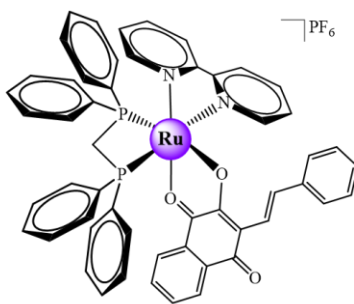


NQ3 = Lapachol

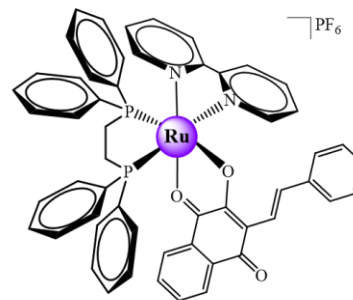
ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO DA SÉRIE 1



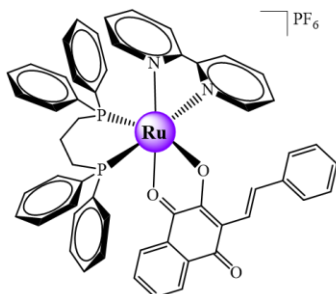
Complexo A1



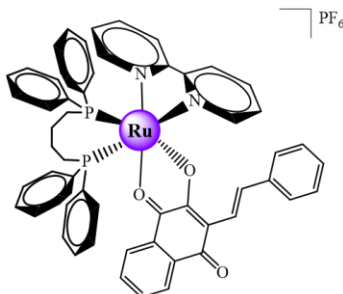
Complexo A2



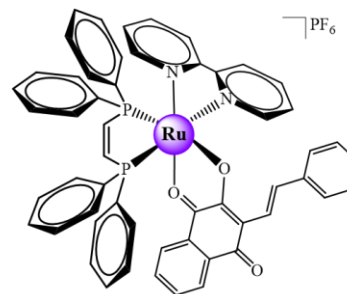
Complexo A3



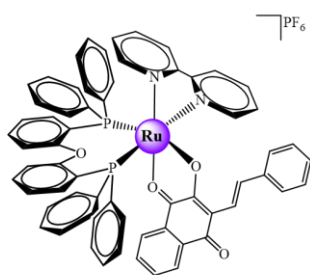
Complexo A4



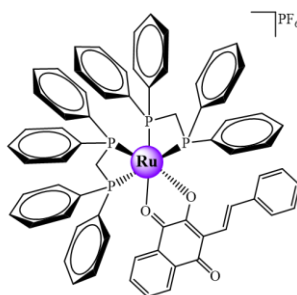
Complexo A5



Complexo A6

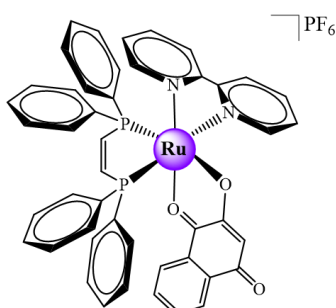


Complexo A7

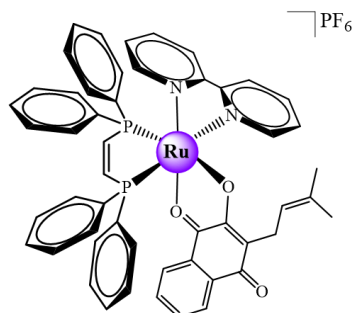


Complexo A8

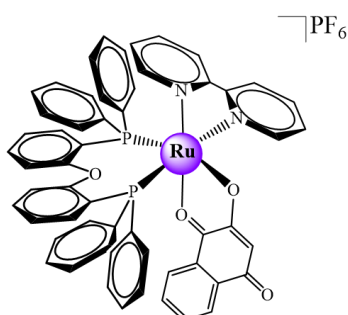
ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO DA SÉRIE 2



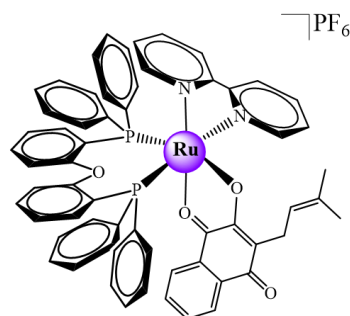
Complexo B1



Complexo B2



Complexo B3



Complexo B4

RESUMO

Neste trabalho, foram sintetizados, caracterizados e investigados com relação a atividade citotóxica de duas séries de complexos fosfínicos contendo ligantes naftoquinona. A primeira série representa os compostos (A1-A8), de fórmula geral: $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$ (A1); $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$ (A2-A7) e $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (A8), onde (NQ1 = 3-estiril-launosna; P-P = bis-(difenilfosfina)metano (dppm), 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe), 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), 1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen) e bis[(2-difenilfosfina)fenil]éter] (DPEphos). A segunda série foi composta por quatro compostos (B1-B4) com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NQn})(\text{bipy}(\text{P-P}))]\text{PF}_6$, onde (NQn = lausona ou lapachol; P-P = cis-1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen) e *bis*-[(1-difenilfosfina)fenil]éter (DPEphos). Os compostos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$), condutividade molar, voltametria cíclica, espectrometria de massas e difração de raios X (monocristal). Os estudos de interação composto/DNA foram realizados por meio de medidas de viscosidade, eletroforese em gel. Ensaio de competição com o Hoechst 33258, demonstraram que os complexos de rutênio da série 1 e 2 interagem *via* sulco menor do DNA. Estudos de interação complexo/HSA, mostraram que os complexos têm capacidade de interagir com esta biomolécula, com constantes de ligação (K_b) da ordem de 10^3 a 10^5 , indicando interações do tipo de fraca a moderada e afinidade pelo sítio I da HSA. A triagem citotóxica dos complexos foi realizada nas linhagens tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 e de pulmão A549 e nas linhagens não tumorais de mama (MCF-10A) e pulmão (MRC-5). Todos os compostos foram citotóxicos nas linhagens testadas, exibindo valores de IC_{50} menores do que os ligantes livres e o fármaco de referência a cisplatina. Os complexos da série 1 (A1 e A6) e (B2 e B4) da série 2, foram os mais ativos e seletivos contra as células tumorais de mama da

linhagem MDA-MB-231. Os ensaios *in vitro* com a linhagem MDA-MB-231, demonstraram que os compostos A1 e A6 alteraram a morfologia celular e inibiram o processo de migração das células a partir do ensaio de *Wound Healing*. O perfil de distribuição do ciclo celular para o complexo A1 indica um acúmulo de células na fase Sub-G0 e fragmentação do DNA que é um indício de morte celular por apoptose, no entanto, não houve modificações significativas nas outras fases do ciclo celular. Os resultados de ensaio de apoptose realizados por citometria de fluxo, mostraram que os complexos induzem a morte por apoptose de maneira dependente da concentração. Em vista disso, os doze complexos de rutênio(II), apresentam um grande potencial como metalofármacos antitumorais.

ABSTRACT

In this study, two series of ruthenium(II)-phosphine complexes containing naphthoquinone ligands were synthesized, characterized, and investigated regarding the cytotoxic activity. The first series represents the compounds (A1-A8), with the general formula: $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$ (A1); $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$ (A2-A7) and $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (A8), where (NQ1 = 3-styryl-lauosne; P-P = bis-(diphenylphosphine) methane (dppm), 1,2-bis(diphenylphosphine)ethane (dppe), 1,3-bis(diphenylphosphine)propane (dppp), 1,4-bis(diphenylphosphine)butane (dppb), 1,2-bis(diphenylphosphine)ethylene (dppen) and bis[(2-diphenylphosphine)phenyl]ether] (DPEphos). The second series consisted of four compounds (B1-B4) with the general formula $[\text{Ru}(\text{NQn})(\text{bipy}(\text{P-P}))]\text{PF}_6$, where (NQn = lawsone or lapachol; P-P = *cis*-1,2-bis(diphenylphosphine)ethylene (dppen) and bis-[(1-diphenylphosphine)phenyl]ether (DPEphos)). The compounds were characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance (^1H NMR, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$), conductivity molar, cyclic voltammetry, mass spectrometry and X-ray diffraction (single crystal). Compound/DNA interaction studies, using viscosity measurements, gel electrophoresis. The competition assay with Hoechst 33258, demonstrated that the ruthenium complexes of series 1 and 2 interact *via* the DNA minor groove. Complex/HSA interaction studies have shown that the complexes have the ability to interact with the biomolecule, with binding constants (K_b) of the order of 10^3 to 10^5 , indicating weak to moderate interactions and affinity for HSA site I. The cytotoxic screening of the complexes was real It was performed on MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 and A549 lung tumor cell lines and on non-tumor breast (MCF-10A) and lung (MRC-5) cell lines. All compounds were cytotoxic in the strains tested, exhibiting lower IC_{50} values than the free ligands and the reference drug cisplatin. The complexes (A1 and A6) from series 1 and (B2 and B4), from

series 2, were the most active and selective against MDA-MB-231 breast tumor cells. The *in vitro* assays with the MDA-MB-231 strain, demonstrated that the compounds A1 and A6 altered the cellular morphology and inhibited the cell migration process from the Wound Healing assay. The cell cycle distribution profile for the A1 complex indicates an accumulation of cells in the Sub-G0 phase and DNA fragmentation that is indicative of cell death by apoptosis. However, there were no significant changes in the other phases of the cell cycle. The results of the apoptosis assay performed by flow cytometry showed that the complexes induce death by apoptosis in a concentration-dependent manner. In view of this study the twelve ruthenium(II) complexes have great potential as antitumor metallopharmaceuticals.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer: conceito e incidência	1
1.2 Complexos de platina no tratamento do câncer	3
1.3 Complexos de rutênio e sua importância biológica	5
1.4 Ligantes fosfínicos bipyridínicos e naftoquinonas	7
1.5 Hipóteses do design estrutural de complexos de rutênio(II).....	14
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 Obtenção da atmosfera inerte.....	20
3.2 Solventes	20
3.3 Reagentes químicos em geral.....	20
3.4 Síntese dos complexos precursores.....	21
3.4.1 Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$	21
3.4.2 Síntese do complexo <i>cis,trans</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]$	21
3.4.3 Síntese do complexo $\{[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})\}$	21
3.4.4 Síntese do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(S\text{-dmsO})_3(O\text{-dmsO})]$	22
3.4.5 Síntese do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{P-P})]$, (P-P) = dppm, dppe, dppp, dppen	22
3.4.6 Síntese do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$	22
3.4.7 Síntese do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{k}^3\text{-P-O-P}(\text{DPEPhos})(\text{dmsO}))]$	23

3.4.8 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(DPEphos)]	23
3.4.9 Síntese do complexo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppm) ₂]	23
3.5 Síntese dos complexos da Série 1 (A1 - A8)	24
3.5.1 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(PPh ₃)]PF ₆ (A1).....	24
3.5.2 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppm)]PF ₆ (A2)	24
3.5.3 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppe)]PF ₆ (A3).....	25
3.5.4 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppp)]PF ₆ (A4)	25
3.5.5 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppb)]PF ₆ (A5)	25
3.5.6 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppen)]PF ₆ (A6).....	26
3.5.7 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(DPEphos)]PF ₆ (A7)	26
3.5.8 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(dppm) ₂]]PF ₆ (A8).....	27
3.6 Síntese dos complexos da Série 2 (B1-B4).....	27
3.6.1 Síntese do complexo [Ru(NQ2)(bipy)(dppen)]PF ₆ (B1).....	27
3.6.2 Síntese do complexo [Ru(NQ3)(bipy)(dppen)]PF ₆ (B2).....	27
3.6.3 Síntese do complexo [Ru(NQ2)(bipy)(DPEphos)]PF ₆ (B3).....	28
3.6.4 Síntese do complexo [Ru(NQ3)(bipy)(DPEphos)]PF ₆ (B4).....	28
3.7 Técnicas experimentais e Instrumentação.....	28
3.7.1 Análise elementar (C, H, N e S)	28
3.7.2 Condutividade molar.....	29
3.7.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	29
3.7.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível	29
3.7.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	29
3.7.6 Difração de raios X	30
3.7.7 Espectrometria de massas	30

3.7.8	Ensaio eletroquímico	30
3.8	Estudos de estabilidade dos complexos	31
3.9	Estudos de interação dos complexos com o DNA	31
3.9.1	Medidas de viscosidade	31
3.9.2	Eletroforese em gel de agarose	32
3.9.3	Estudo de competitividade com Hoechst 33258	32
3.10	Inibição da enzima Topoisomerase IIa	33
3.11	Estudo de interação dos complexos com HSA (Albumina de Soro humano).....	33
3.11.1	Estudos de competição dos compostos pelo sítio I da HSA	34
3.12	Ensaio de fluorescência.....	35
3.13	Determinação do coeficiente de lipofilicidade.....	35
3.14	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	36
3.14.1	Linhagens e cultura celular	36
3.15	Ensaio de viabilidade celular.....	37
3.16	Ensaio de morfologia celular	38
3.17	Ensaio de formação de colônias.....	38
3.18	Ensaio de migração - <i>Wound Healing</i>	38
3.19	Ensaio de marcação do citoesqueleto com a faloidina.....	39
3.20	Ensaio de ciclo celular.....	40
3.21	Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.....	40
3.22	Análises estatísticas	41
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO		42
4.1	Síntese e caracterização dos complexos.....	42

4.2 Estabilidades dos complexos de rutênio	70
4.3 Estudos de interação dos complexos com biomoléculas	72
4.3.1 Estudos de interação dos complexos de rutênio com HSA	72
4.4 Estudos de interação dos complexos com DNA	83
4.4.1 Medidas de Viscosidade	84
4.4.2 Eletroforese em gel de agarose	86
4.4.3 Ensaio de competitividade com Hoechst 33258	88
4.5 Ensaio de inibição da topoisomerase IIa	90
4.6 Determinação do coeficiente de partição (log P)	91
4.7 Ensaio biológicos dos complexos (série 1)	93
4.7.1 Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	93
4.7.2 Ensaio Morfológico	98
4.7.3 Ensaio clonogênico (formação de colônias).....	101
4.7.4 Ensaio de migração celular – Wound Healing	102
4.7.5 Análise do ciclo celular.....	104
4.7.6 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.....	107
4.8 Ensaio biológicos dos complexos (série 2)	111
4.8.1 Determinação da viabilidade celular.....	111
4.8.2 Ensaio morfológico	114
4.8.3 Ensaio clonogênico	117
4.8.4 Ensaio de migração	118
4.8.5 Análise do ciclo celular.....	122
4.8.6 Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.....	123
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	126

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
APÊNDICE	158

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: conceito e incidência

O câncer emergiu como uma das principais causas de morte no mundo, de acordo com os dados epidemiológico da Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*). Em 2020 foram registradas, no mundo aproximadamente 10 milhões de mortes, tendo sido diagnosticado quase 19,3 milhões de novos casos. Ademais, projeções futuras apontam como uns dos piores cenários de incidência e mortalidade, sendo esperado para os próximos 20 anos 30,2 milhões de novos casos e 16,3 milhões de mortes por câncer^{1,2}.

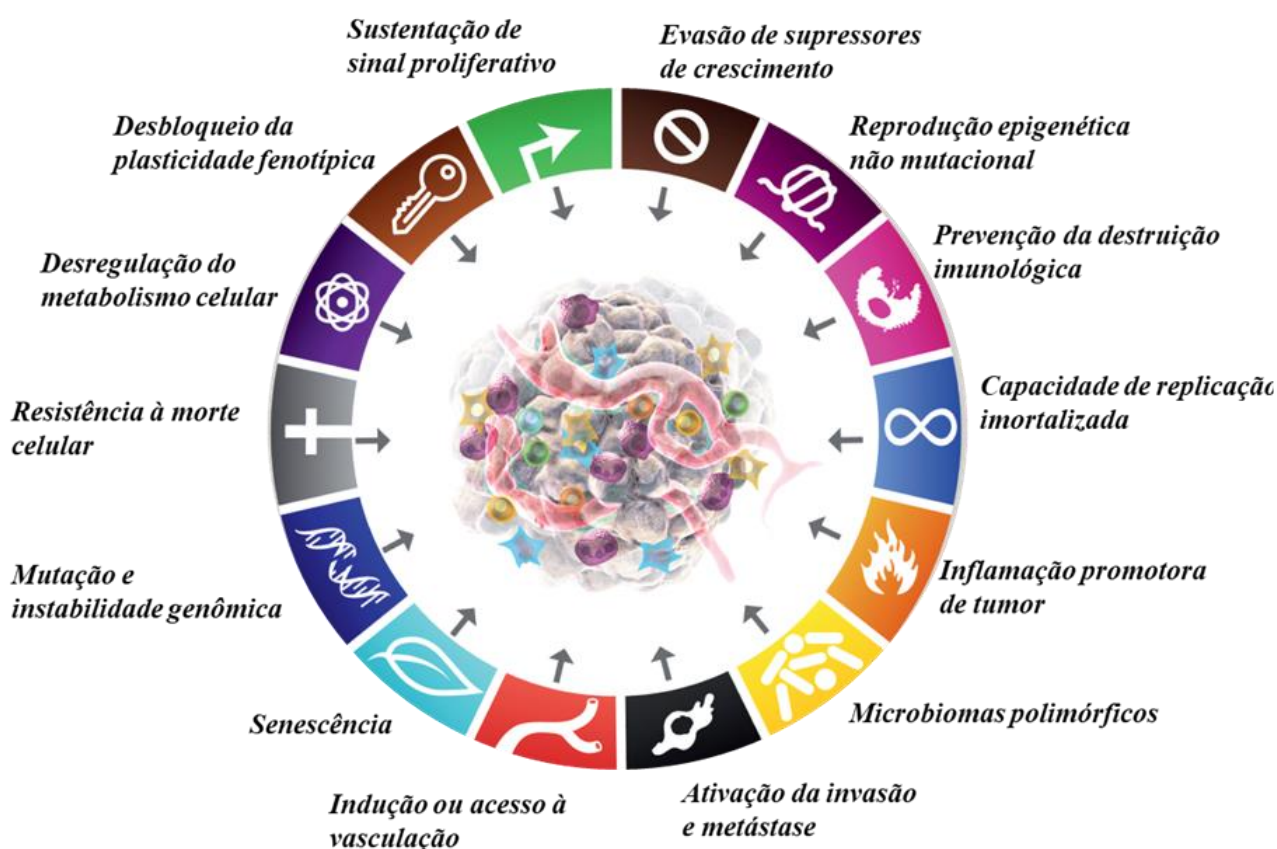
Com relação ao Brasil a incidência e mortalidade estimada de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o triênio 2020-2022, espera-se a ocorrência de 625 mil novos casos por ano. Entre os tipos mais incidentes será o câncer de pele não melanoma com 177 mil casos, seguindo pelos canceres de mama e próstata (ambos com 66 mil casos/ano), cólon e reto (41 mil casos/ano), pulmão 30 mil casos/anos³.

Diante das projeções de incidência e mortalidade, o câncer é considerado uma patologia de alta complexidade, uma vez que abrange um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica o crescimento descontrolado de células, podendo invadir além dos limites normais dos tecidos e metastizar órgãos distantes do corpo humano. A origem desse tipo de anomalia, geralmente é reflexo de combinações de mutações genéticas do DNA celular, bem como hábitos de vida^{4,5}.

Do ponto de vista biológico as células cancerígenas podem adquirir novas características que garantem a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa durante o crescimento tumoral. Estudos recentes propuseram um conjunto de características que permite a compreensão da complexidade dos fenótipos e genótipos do câncer, denominado “Marca do câncer” (do inglês, *Hallmarks of Cancer*). A Figura 1.1 ilustra esses conceitos fundamentais, sendo

eles: a capacidade de manter a sustentação da sinalização proliferativa e evasão de supressores de crescimentos que induzem a angiogênese e disseminar provocando a metástases; desbloqueio da plasticidade fenotípica permite interrupções na diferenciação celular mantendo-se em constante expansão e proliferação; A capacidade de reprogramação epigenética, bem como alterações nos genes que organizam, modulam e mantêm arquitetura da cromática; Os microbiomas polimórficos e a senescência celular tem a função de controlar a proliferação celular que possuem mutações no genoma e as células cancerígenas^{6,7}.

FIGURA 1.1- Representação das características do câncer.



Fonte : Adaptado de Hanahan, 2022.

As marcas da conceitualização do câncer impulsionaram uma melhor compreensão mais detalhada dos mecanismos biológicos do câncer, que

influenciou no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais capazes de atuar de forma mais eficaz no tratamento da enfermidade.

Com relação ao tratamento oncológico as principais terapias baseiam-se na radioterapia⁸, cirurgia⁹ e quimioterapia¹⁰. Atualmente com os avanços da biotecnologia e estudos científicos têm permitido o emprego de novas terapias incluindo: a imunoterapia (motivação: fortalecer o sistema imunológico para atacar as células tumorais)¹¹, terapia direcionada ou terapia hormonal, sendo que em muitos casos, é empregado uma combinação desses tratamentos⁹. Dentre os tratamentos citados, a quimioterapia é a mais usada para administração de medicamentos quimioterápicos visando a destruição das células cancerígenas^{10,12} e, portanto, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos.

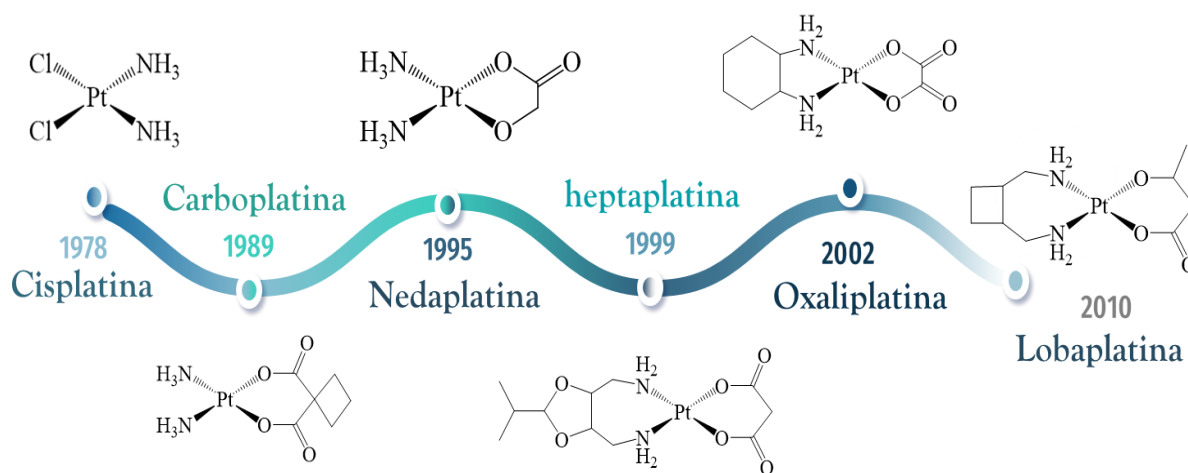
O marco na ascensão da incorporação de novos agentes quimioterápicos no tratamento do câncer, é bem ilustrado com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, a qual é responsável pela cura de mais de 90% dos pacientes com câncer testicular^{13,14}.

1.2 Complexos de platina no tratamento do câncer

O interesse de complexos metálicos na medicina, nos últimos anos, foi incentivado pela descoberta acidental das propriedades anticâncer da cisplatina, por volta de 1960, Barnett Rosenberg estudava a influência do campo elétrico sobre o crescimento das bactérias (*Escherichia Coli*)¹⁵. Curiosamente, descobriu-se que o produto liberado pela eletrólise gerada pelos eletrodos de platina, eram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Estudos posteriores com camundongos portadores de um tumor sarcoma-180, demonstraram que o produto da eletrólise contendo platina, posteriormente identificada como *cis*-diaminodicloridoplatina(II), tinha atividade antitumoral^{13,16,17}. Em 1978, a cisplatina foi aprovada pela FDA (do inglês, Food and Drug Administration), para o uso clínico no tratamento do câncer de próstata, sendo o primeiro agente quimioterápico à base de metal a atuar comercialmente, na terapia oncológica^{13,18}.

Hoje em dia, a cisplatina é usada no tratamento de diversos tipos de cânceres tais como: testicular, ovário, cervical, cabeça, pulmão e mama¹⁸. Na Figura 1.2 é apresentada a linha do tempo dos complexos à base de platina empregados no tratamento do câncer.

FIGURA 1.2 - Linha do tempo dos complexos de platina aprovados para uso no tratamento do câncer.



No que diz respeito ao mecanismo de ação da cisplatina, verifica-se um consenso entre os pesquisadores de que o composto ao ser administrado *via* intravenosa, mantém sua forma neutra e ao permear a membrana celular por difusão passiva, os ligantes cloretos são labilizados pelas moléculas de água. Posteriormente ligando-se covalentemente principalmente às bases nitrogenadas formando um aduto com o DNA. Essa interação provoca danos estruturais na biomolécula, o que interfere nos processos de replicação das células tumorais, desencadeando o mecanismo de morte celular^{19,20}.

Apesar do grande benefício e importância alcançada pelo emprego de medicamentos quimioterápicos, à base de platina, convém pontuar que existem alguns desafios a serem superados, principalmente em relação à resistência celular e às reações adversas como, neurotoxicidade, ototoxicidade, nefrotoxicidade, tornando sua janela terapêutica limitada. Nesse sentido, dado ao interesse

contínuo no planejamento e desenvolvimento de fármacos contendo outros metais de transição, o rutênio tem emergido como forte candidato a metalofármaco anticancerígeno²¹⁻²⁹.

1.3 Complexos de rutênio e sua importância biológica

Compostos contendo rutênio têm sido cada vez mais explorados como potenciais anticancerígenos, pois este metal tem a capacidade de assumir diferentes estados de oxidação em condições fisiológicas, sendo o mais comum Ru^{III} e Ru^{II}. Observa-se também que os compostos de rutênio apresentam geometria octaédrica, o que permite alocar um número maior de ligantes bioativos em sua esfera de coordenação. Além disso, tem exibido maior seletividade as células cancerígenas, quando comparado aos complexos de platina³⁰⁻³². Assim, essas características tornam os complexos de rutênio promissores candidato a fármacos. Nessa perspectiva, estudos realizados por Keppler et al.,³³ demonstraram a atividade antitumoral do complexo KP418 (Figura 1.3), frente a tumores de leucemia P388 e melanoma B16 em camundongos, em que o composto causou uma redução significativa no tumor, do que o fármaco de referência cisplatina. Tais resultados impulsionaram a síntese de complexos análogos ao KP418 e estudos posteriores levaram os complexos de rutênio(III): KP1019, (Ind-[*trans*-RuCl₄(H-ind)₂], ind = indazol), e NAMI-A, ([*trans*-RuCl₄(1H-imidazol)(DMSO-S)]), (Figura 1.3) até aos ensaios clínicos em humanos. Um fato interessante é que esses complexos não passaram pela pré-triagem de citotoxicidade, foram investigados imediatamente em *in vivo*.

O composto KP1019 entrou em estudo clínico I e II, mostrando ação antitumoral contra o câncer de cólon, inibindo cerca de 95% do volume tumoral sem ocasionar significativa toxicidade. Seu mecanismo de ação é pautado na ativação intracelular que ocorre pela redução do Ru^{III} para Ru^{II}. A principal limitação desse composto foi sua baixa solubilidade em água, o que impediu a continuação nos testes avançados. Visando solucionar o problema, o complexo

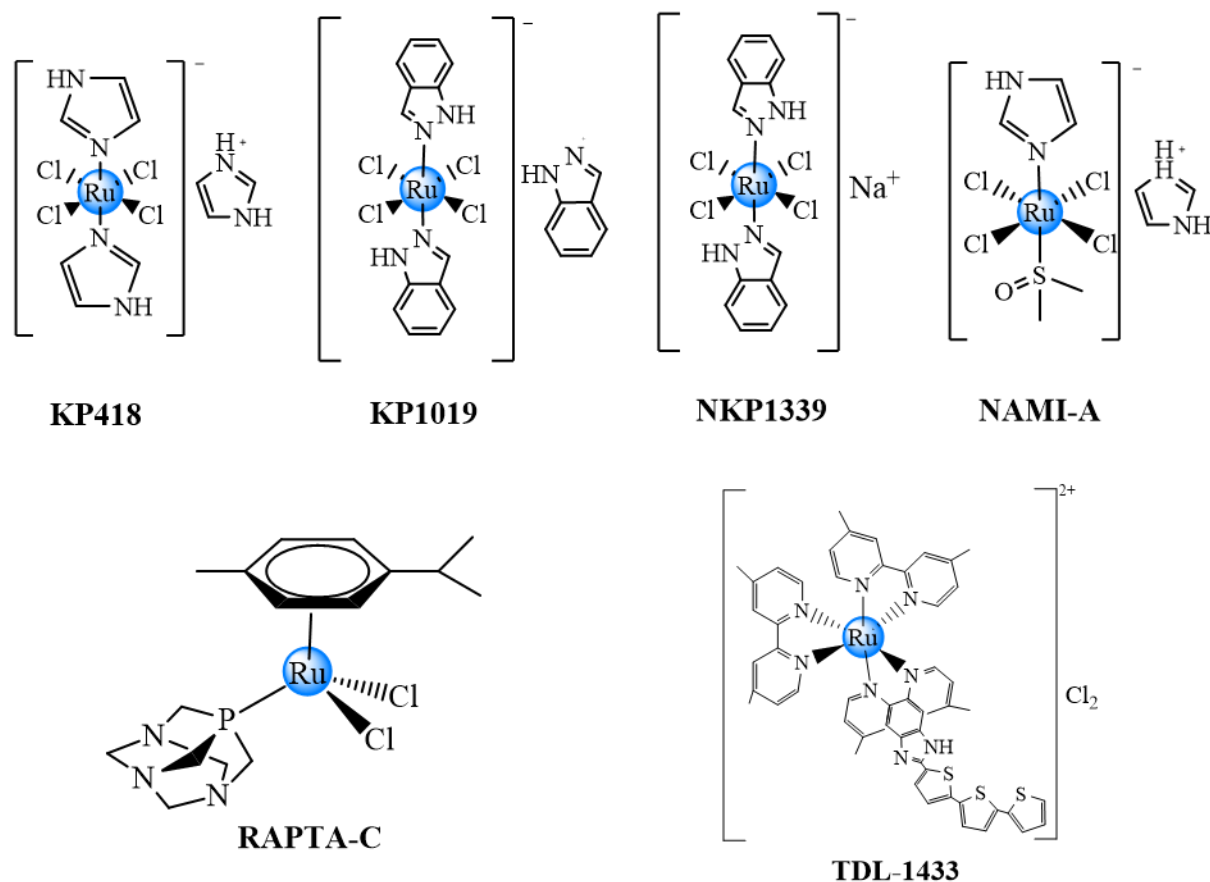
KP1339 foi sintetizado, trocando o contra íon indazol por sódio, o que proporcionou um aumento na solubilidade do composto, e desta forma os estudos foram continuados em ensaios clínicos³⁴⁻³⁶.

Outro composto que foi bem estudado é o NAMI-A, sendo o primeiro potencial metalofármaco de rutênio a ser testado em humanos. Nos experimentos pré-clínicos o NAMI-A apresentou atividade antimetastática em vários tipos de cânceres de pulmão³⁷. Os estudos clínicos de fase II realizados com o complexo NAMI-A associado com o agente quimioterápico gencitabina, um fármaco utilizado em conjunto com a cisplatina no tratamento de câncer de pulmão. A combinação dos compostos não potencializou no aumento da atividade farmacológica e os estudos envolvendo o complexo NAMI-A foram encerrados^{36,38,39}.

No que tange a química organometálica o composto do tipo rutênio-areno, com fórmula estrutural $Ru(\eta^6\text{-p-cimeno})Cl_2(PTA)]$, (RAPT-C, PTA = 1,3,5-triazo-7-fosfoadamantano) (Figura 1.3), nos testes *in vitro* exibiu atividade anticâncer similar ao complexo NAMI-A. Enquanto nos ensaios *in vivo*, foi capaz de inibir o crescimento de carcinoma de ovário e colorretal, bloqueando a angiogênese^{21,40}.

Outro viés, em que os complexos de rutênio estão sendo explorados, é na terapia fotodinâmica. Os estudos de triagem em fases I e II com o complexo TLD-1433 ($rac\text{-}[Ru(dmb)_2(IP\text{-}3T)]Cl_2$), sendo $dmb = 4,4'\text{-dimetil-}2,2'\text{-bipiridina}$, $IP\text{-}TT = 2,2': 5',2'\text{-tertiofeno-}imidazol[4,5\text{-}f][1,10]\text{-fenatrolina}$), mostrou-se adequado para o tratamento de câncer de bexiga não invasivo, sendo o primeiro fotossensibilizador de rutênio a entrar em ensaios clínicos^{41,42}. Contudo, apesar do acima escrito, nenhum complexo de rutênio foi comercializado até o momento.

FIGURA 1.3 - Estruturas de complexos de rutênio que estão, ou estiveram em testes clínicos.



Como descrito acima, fica evidente que os complexos de rutênio apresentam um alto potencial como agentes quimioterápicos e podem contribuir na terapia do câncer. Dessa forma, considerando as perspectivas bem-sucedidas de compostos fosfínicos rutênio, estes vêm se destacando na literatura, por apresentarem relevantes atividades biológicas.

1.4 Ligantes fosfínicos bipyridínicos e naftoquinonas

Complexos de rutênio com ligantes fosfínicos e bipyridínicos, têm sido extensivamente investigados mediante suas potencialidades biológicas. As fosfinas são ligantes neutros e possuem propriedades σ -doadora e π -receptora de densidade eletrônica, o que lhes confere a capacidade de estabilizar as valências dos metais de transição em altos e baixos estados de oxidação. Tal comportamento

observado é devido aos seus orbitais híbridos do tipo $3p\sigma^*d\pi$ vazios que são capazes de receber elétrons π dos ligantes coordenados ao centro metálico. Em outras palavras, a densidade eletrônica é compartilhada entre o ligante e o íon metálico, conferindo ligações metal-ligante estáveis via retrodoação. Neste caso a densidade eletrônica é sinérgicamente compartilhada entre o metal e o ligante^{43,44}.

Os ligantes fosfínicos apresentam a capacidade de modular as propriedades de reatividade e estabilidade do centro metálico mediante a variação dos substituintes ligados ao átomo de fósforo presente nestas moléculas. Quando se tem grupos retiradores de elétrons, o caráter π -receptor dos ligantes fosfínicos tende a aumentar, pois o orbital do tipo π é estabilizado, conseqüentemente favorecendo a retrodoação. Caso o substituinte seja um doador de densidade eletrônica, a capacidade σ -doadora é fortalecida e a retrodoação é menos favorecida⁴⁵⁻⁴⁷. Além disso, a versatilidade das fosfinas está relacionada ao seu efeito estérico, ou seja, aumentando-se o tamanho do substituinte R em compostos do tipo $P(OR)_3$ ou PR_3 , conseqüentemente contribui para aumento no ângulo de cone (conhecido como cone de Tolman). Assim, a partir do ângulo de cone é possível aumentar a distância entre os ligantes associados ao metal (P-M e/ou M-L), levando a uma redução do caráter doador dos pares isolados dos elétrons presentes no átomo de fósforo^{46,48,49}. Essas mudanças provocadas pelos substituintes presentes nas estruturas das fosfinas, podem influenciar no comportamento cinético e na atividade biológica⁵⁰ dos compostos formados sendo esta, uma característica relevante no desenvolvimento de novos candidatos a metalofármacos.

Assim, a utilização de fosfinas no planejamento de complexos metálicos como potencial anticâncer representa um campo em ascensão. O complexo de ouro, por exemplo, conhecido como auronofina $[(Et_3PAuSGlu(Ac)_4)]$, foi o primeiro composto contendo ligante fosfínico, a ser introduzido comercialmente no tratamento de artrite reumatoide^{51,52}. Ademais, o

composto também apresentou ação citotóxica contra leucemia P388. Estudos *in vitro* com o seu análogo, $[\text{Au}(\text{SGlu})(\text{Ac})_4]$, sem a presença da fosfina na esfera de coordenação do metal, mostrou uma diminuição da atividade antitumoral contra linhagem B16. Os resultados obtidos sugerem que a ação citotóxica da auranofina é proveniente, principalmente da fosfina.

Os estudos *in vivo* com o complexo $[\text{Au}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$, contendo a bifosfina 1,2-bis(difenilfosfina)etano, demonstraram atividade antitumoral, frente as linhagens tumorais de leucemia (P388 e L1210), adenocarcinoma de mamário 16/C e melanoma B16. Esta propriedade foi atribuída à presença da fosfina, que confere ao composto uma alta lipofilicidade, o que pode facilitar o transporte do composto pela membrana celular⁵³.

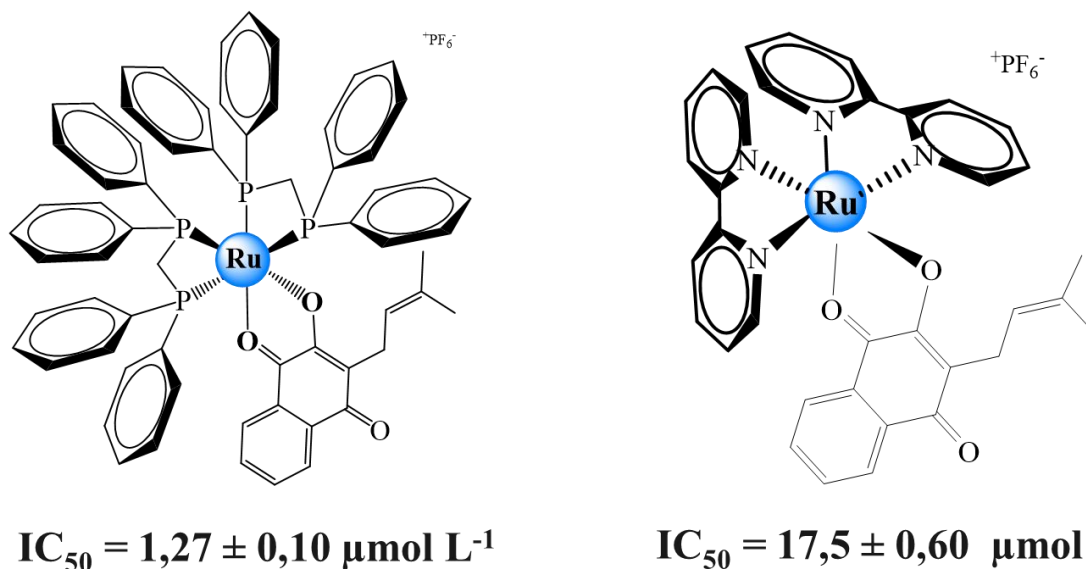
Assim como as fosfinas, os ligantes N-heterocíclicos, especificamente os bipyridínicos são adequados à retrodoação uma vez que possuem orbitais do tipo $p\pi$ antiligante vazios e pares de elétrons capazes de formar ligações σ fortes, conferindo-lhes a habilidade de estabilizar íons metálicos em estado de oxidação baixo. Dentre as várias propriedades físicas e químicas desses ligantes relatadas na literatura destaca-se a capacidade de mimetizar estruturas de biomoléculas, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos⁵⁴.

Karumban et al.,⁵⁵ demonstraram que complexos de cobalto(II) contendo ligantes bipyridínicos, $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L}^1)(\text{bipy})\text{Cl}]\text{PF}_6$ e $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L}^1)(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$, ($\text{L}^1 = \text{N,N}'\text{-bis}(\text{piridín-2-il-metil})\text{anilina}$; bipy = 2,2'-bipyridina e phen = 1-10-fenantrolina), foram capazes de clivar o DNA, além de exibirem uma relevante atividade antitumoral nas linhagens celulares MDA-MB-231 (câncer de mama) e A549 (câncer de pulmão). Outros estudos realizados por Liu et al.,⁵⁶ mostraram que o composto $[\text{RuCl}_2(\text{dmbpy})_2]$, onde (dmbpy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipyridina), induziu parada do ciclo celular na fase G2/M em células tumorais A549 (câncer de pulmão), desencadeando danos no DNA. De modo geral, o complexo sintetizado apresentou um grande potencial anticancerígeno.

Diante da versatilidade dos ligantes fosfínicos e bipyridínicos, uma das principais vertentes de estudo do nosso grupo de pesquisa, o Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), liderado pelo professor Alzir Azevedo Batista, alocado no Departamento de Química na Universidade Federal de São Carlos, consiste na síntese, caracterização e investigação da atividade antitumoral de candidatos a metalofármacos à base de rutênio, o quais aos longos dos anos vêm mostrando resultados bastante promissores.

Uma das estratégias adotadas em nosso grupo no desenho racional de novos candidatos a fármacos é o emprego de ligantes bioativos, ou seja, que já possuem um prévio potencial biológico, uma vez que sua inserção na estrutura dos complexos pode potencializar as atividades terapêuticas dos novos compostos sintetizados. A fim de compreender a atividade citotóxica dos complexos estudados, nosso grupo vem sintetizando e caracterizando uma série de complexos de rutênio contendo como ligantes aminoácidos, acetiltiourea, mercaptos, cloroquina, porfirinas, produtos naturais, entre outros, e explorando suas propriedades citotóxicas e pró-apoptóticas frente a diferentes linhagens tumorais^{23,25,57-63}. Neste contexto, estudos *in vitro* baseado na citotoxicidade se tornam uma opção importante na triagem de candidatos a metalofármacos. Os complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos, bipyridínicos e naftoquinonas, como lapachol (Figura 1.4), foram testados frente à linhagem tumoral de mama triplo negativo (MDA-MB-231), foi demonstrado que os compostos $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$ são mais ativos que o fármaco de referência, a cisplatina, apresentando valores de IC_{50} em torno de 1,27 e 17,5 μmolL^{-1} respectivamente. Entre estes, o complexo contendo a fosfina dppm exibiu maior potencial citotóxico que o seu análogo contendo dois ligantes bipyridínicos. Tal comportamento pode estar relacionado com a presença da bifosfina (dppm), já que dados da literatura têm evidenciado que a fosfina contribui para o aumento da permeabilidade dos compostos através da membrana celular^{25,64}.

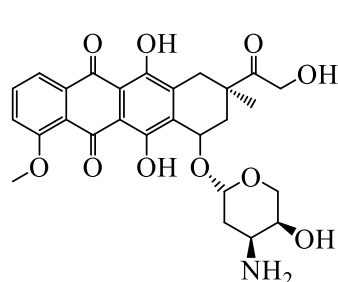
FIGURA 1.4 - Estrutura dos complexos $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6^-$ e $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6^+$, e os valores de IC_{50} obtidos na linhagem MDA-MB-231.



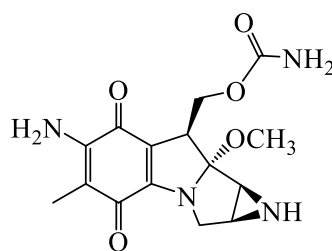
Neste contexto, a classe das naftoquinonas representa uma fonte de moléculas bioativas, sendo empregada para coordenação a centros metálicos, com intuito de melhorar o potencial citotóxico dos complexos. Do ponto de vista estrutural as naftoquinonas apresentam um anel naftalénico no seu sistema aromático e estão inseridas nos grupos das quinonas. Na natureza as naftoquinonas são encontradas em fungos, algas e em plantas e sua importância reside em sua ação farmacológica.

No que se refere à quimioterapia do câncer, os fármacos derivados das naftoquinonas mais utilizados estão a mitomicina C, doxorubicina, mitoxantrona e epirrubicina⁶⁵⁻⁶⁷, conforme mostrado na Figura 1.5. Com relação às naftoquinonas naturais a lausona e lapachol têm se destacado por suas propriedades farmacológicas.

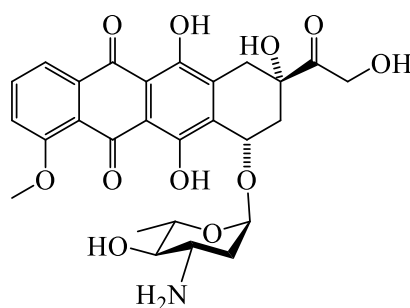
FIGURA 1.5 - Estruturas de compostos derivados de quinonas utilizados no tratamento do câncer.



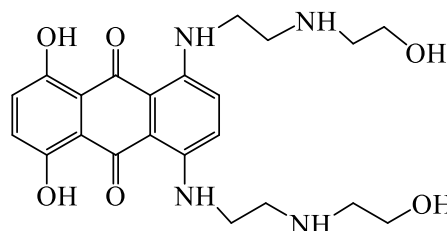
Doxorrubicina



Mitomicina C



Epirubicina



Mitoxantrona

A 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, popularmente conhecida como lausona, representa um composto de origem natural biologicamente ativo. Pode ser extraído das folhas de árvores do gênero *Lawsonia inermis* (henna), sendo encontrada no norte da África e sul da Ásia. Diante do seu potencial farmacológico a lausona se tornou uma molécula de grande interesse científico, devido suas propriedades biológicas que incluem: atividade antitumoral, antimalárica, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória e antifúngica. Na medicina popular o extrato da henna é empregada na cicatrização de feridas, queimaduras, bronquite, artrite, entre outras^{68,69}.

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butil)-1,4-naftoquinona, é conhecido desde 1858, sendo encontrado principalmente em espécies da família das Bignoniaceae, do gênero *Tabebuia* (ipês)⁷⁰. Estudos clínicos realizados pela

CCNSC (do inglês Cancer Chemotherapy National Service Center), em pacientes portadores de sarcoma de Yoshida e carcinoma de Walker 256, que utilizavam o lapachol terapeuticamente, demonstraram uma regressão de aproximadamente 30 % dos tumores. No entanto, durante o tratamento oncológico os pacientes apresentaram expressivos efeitos adversos que contribuíram para o encerramento dos ensaios clínicos^{71,72}. No Brasil, o lapachol foi comercializado na forma de capsulas produzida pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), para o tratamento de carcinoma epidermóide do colo de útero, sarcoma de Yoshida, carcinoma de Walker 256, porém seu uso foi descontinuado em decorrência dos efeitos colaterais^{70,73}.

No que se refere ao mecanismo de ação das naftoquinonas, tem sido associado à inibição das enzimas topoisomerase I e II e da produção de espécies reativas de oxigênio como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO\cdot$). Estas espécies remanescentes causam danos às biomoléculas importantes, como DNA, proteínas, fosfolipídios, culminando na indução do processo de morte celular por apoptose^{66,74-76}.

Estudos recentes Grandis et al.,⁷⁷ sobre a citotoxicidade e mecanismo de ação dos complexos de rutênio contendo ligantes diimina, lapachol e a bis-(difenilfosfina)metano (dppm), frente as células cancerígenas de próstata, (DU-145) mostraram resultados promissores, uma vez que os complexos $[Ru(lap)(bipy)(dppm)]PF_6$ e $[Ru(lap)(phen)(dppm)]PF_6$ foram mais citotóxicos e seletivos às células de câncer de próstata DU-145, do que os fármacos de referência cisplatina e doxorubicina, apresentando valores de IC_{50} e seletividade entre $0,9 \pm 0,2$ (IS = 6,5) e $0,8 \pm 0,1$ μM (IS = 8,5) respectivamente. Neste caso a cisplatina e doxorubicina apresentaram IC_{50} em torno de $24,3 \mu M \pm 1,3$ e $2,3 \pm 0,5 \mu M$ respectivamente. O estudo em cultura celular tridimensional (3D) com os complexos estes também foram mais potentes na indução de citotoxicidade, do que os fármacos de referência, evidenciando a indução de apoptose dependente de caspases 3 e 9 por danos ao DNA. Verificou-se que o mecanismo de sua

atividade anticancerígena está relacionado ao aumento de espécies reativas de oxigênio em células cancerígenas de próstata. Os resultados exibidos corroboram com a estratégia adotada pelo nosso grupo de pesquisa, onde a incorporação de ligantes bioativos geram efeitos citotóxicos promissores contra diferentes linhagens de células cancerígenas, mostrando uma maior seletividade às células cancerosas.

1.5 Hipóteses do design estrutural de complexos de rutênio(II)

No LERCI, temos muitos exemplos de sucesso de compostos modelos para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos, utilizando as naftoquinonas como ligantes. Oliveira et al.,^{78,79} reportaram a síntese, caracterização e efeito citotóxico frente a linhagem MDA-MB-231 (câncer de mama) (Tabela 1.1), de sete complexos de rutênio(II) de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NQ})(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$, (NQ = lausona ou lapachol; bipy = 2,2'-bipiridina e P-P = 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe); 1,4'-bis(difenilfosfina)butano (dppb); 1,1-bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf)), o qual evidenciaram resultados promissores de citotoxicidade *in vitro*. Em particular o complexo $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, foi 40 vezes mais citotóxico do que o fármaco de referência, cisplatina, apresentando um valor de $\text{IC}_{50} = 0,06 \mu\text{M}$. Além disso, a presença das fosfinas aumentou a lipofilicidade dos complexos, o que contribuiu para permeação dos compostos através da membrana celular e conseqüentemente influenciando na citotoxicidade dos compostos.

TABELA 1.1 - Valores de IC_{50} (μM) e o IS (índice de seletividade) para as linhagens MDA-MB-231 (tumoral de mama) e MCF-10A (não tumoral de mama) e o coeficiente de partição (Log P).

Complexos	MDA-MB-231	MCF-10A	IS*	Log P [#]
[Ru(lau)(dppm) ₂]PF ₆	(0,09 ± 0,02)	(0,55 ± 0,07)	6,11	0,63
[Ru(lap)(dppm) ₂]PF ₆	(0,13 ± 0,01)	(2,70 ± 0,50)	20,8	0,32
[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF ₆	(0,11 ± 0,04)	(0,72 ± 0,01)	6,54	0,43
[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF ₆	(0,15 ± 0,01)	(2,76 ± 0,30)	18,4	0,38
[Ru(lap)(dppb)(bipy)]PF ₆	(0,08 ± 0,05)	(0,51 ± 0,03)	6,37	-
[Ru(lau)(dppf)(bipy)]PF ₆	(0,06 ± 0,01)	(0,58 ± 0,02)	9,67	0,30
[Ru(lap)(dppf)(bipy)]PF ₆	(0,07 ± 0,03)	(0,77 ± 0,03)	11	0,30
Cisplatina	(2,43 ± 0,20)	(29,45 ± 0,85)	12	---

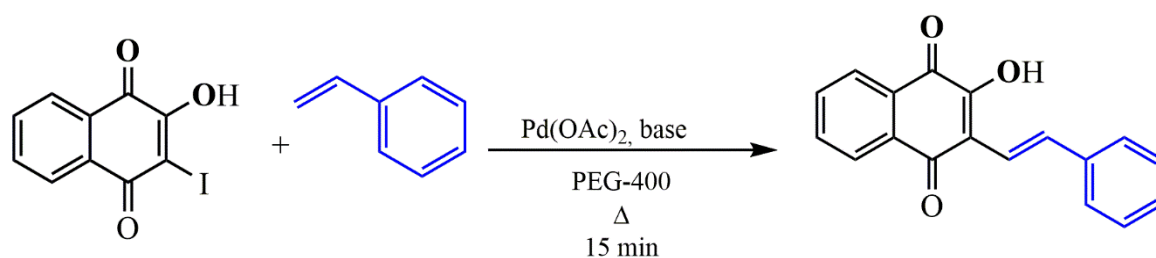
* IS = índice de seletividade (MCF-10A/MDA-MB-231); # dados extraídos da tese de doutorado de Oliveira

Neste caso foi avaliada a influência dos ligantes bifosfínicos e naftoquinonas, nas atividades antiproliferativas dos complexos. Os autores relataram que o complexo [Ru(lap)(dppm)₂]PF₆, apresentou uma maior seletividade, além disso verificou-se que composto é mais citotóxico nas células tumorais, do que nas células não tumorais (MCF-10A), corroborando com a seletividade observada. De modo geral, a presença das fosfinas contribuiu para a atividade antitumoral dos complexos, uma vez que os valores de lipofilicidade (vide Tabela 1.1) são maiores que zero, o que indicam uma preferência pela fase orgânica, o que permite uma melhor permeabilidade na membrana celular. Com base nessa abordagem, a atividade citotóxica dos complexos equivale a um sinergismo dos ligantes que compõe o cerne metálico. Como verificado na literatura em diversos estudos, o ligante desempenha um papel importante para a eficiência da aplicação terapêutica dos compostos de coordenação. Neste âmbito, a proposta do presente trabalho teve como finalidade o estudo da atividade citotóxica de novos complexos de rutênio(II), contendo em seu arcabouço ligantes fosfínicos bipyridínicos e naftoquinonas ou derivados, uma vez que conhecimentos prévios têm demonstrado que esses ligantes têm contribuído para atividade biológica dos complexos.

Neste sentido, foi inserindo no centro metálico o ligante naftoquinona sintética 3-estiril-lausona para os complexos da série 1, visto que até o presente momento, não há relatos na literatura de compostos metálicos de rutênio coordenados a esses ligantes como um todo. No caso dos complexos da série 2 objetivou-se o uso dos ligantes lapachol, lausona e avaliação das bifosfinas bis[2-difenilfosfino)fenil]éter (DPEphos) e a 1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen), por possuírem estruturas químicas distintas e formarem compostos com promissora atividades antitumorais.

Do ponto de vista estrutural as naftoquinonas, destacam-se como ligantes promissores para o planejamento de metalofármacos com propriedades antitumorais. Neste trabalho usamos especialmente os ligantes lapachol e lausona, que têm sido utilizados como precursores promissores na síntese de análogos, por unir características estruturais no que associam à ação biológica dos complexos. Portanto, análogos estruturais, tendo como ponto de partida a lausona têm sido sintetizados e investigados como novos candidatos a fármacos antimicrobacteriano, por Demidoff e colaboradores, no qual o ligante 3-estiril-lausona (Figura 1.6), exibiu atividade anticâncer moderada frente as linhagens de sarcoma no ensaio *in vitro*^{80,81}.

FIGURA 1.6 - Rota sintética do ligante derivado da lausona 3-estiril-lausona.

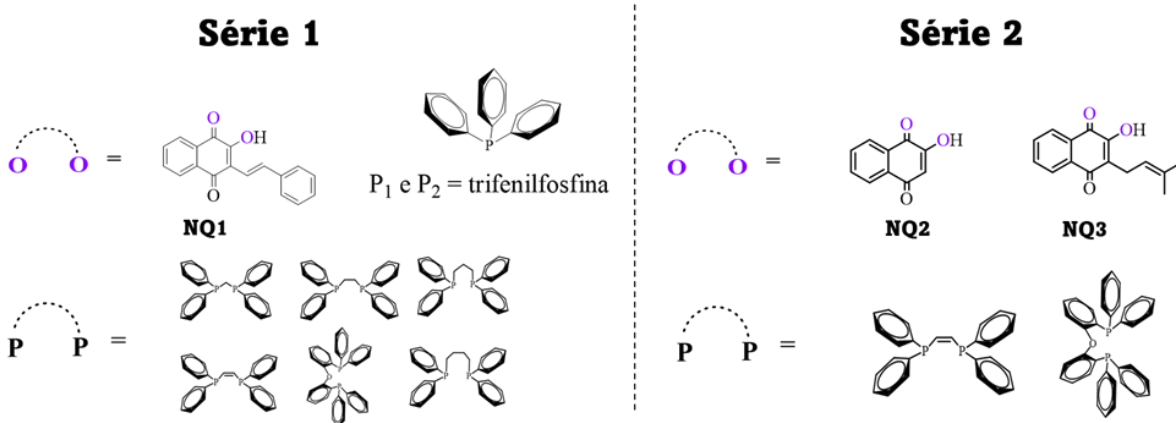
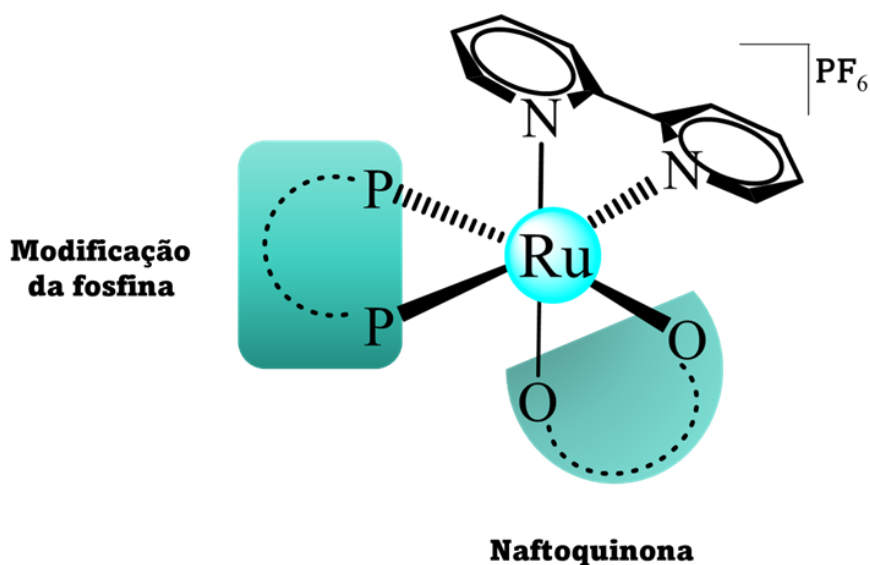


Fonte: Demidoff et al. 2017.

Um estudo realizado com o ligante 3-estiril-lausona, evidenciou seu potencial anticancerígeno frente à linhagem tumoral de sarcoma uterino humano (MES-SA/Dx5 e MES-SA), contudo sua eficiência tumoral foi melhorada pela

complexação com o cobre ([Cu(HBPA)(HL1)Cl], onde HBPA = hidroxibenzil-2-piridilmetilamina; HL1 = 3-estiril-lausona)⁸². Nesse contexto, espera-se que a incorporação dos ligantes naftoquinonas contribua para um melhor entendimento da estrutura e reatividade dos novos complexos sintetizados, bem como seu mecanismo de ação. Na Figura 1.7 estão representadas as estruturas dos complexos planejados nesse trabalho.

FIGURA 1.7 - Fórmulas estruturais dos ligantes naftoquinonas utilizados para o desenvolvimento dos novos complexos de rutênio(II).



CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar novos complexos de rutênio(II) coordenados naftoquinonas ou derivados para uma possível aplicação como metalofármacos com atividade citotóxica e apoptótica em células tumorais.

2.2 Objetivos específicos

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

- **Série 1:** Sintetizar os complexos de fórmula geral: $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{P1-P2})]\text{PF}_6$, onde (P1 e P1) = trifenilfosfina (PPh_3); bis-(difenilfosfina)metano (dppm); 1,2-bis(difenilfosfina)eteno (dppe); 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp); 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb); *cis*-1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen) e DPEphos = (bis-[(1-difenilfosfina)fenil]éter (DPEphos)); $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$; bipy = 2,2'-bipiridina e NQ1 = 3-estiril-laosona.
- **Série 2:** Sintetizar compostos de rutênio contendo os ligantes laosona (NQ2) e lapachol (NQ3), a partir dos precursores *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppen})]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{DPEphos})]$, onde dppen = *cis*-1,2-bis(difenilfosfina)etileno e DPEphos = (bis-[(1-difenilfosfina)fenil]éter).
- Caracterizar os complexos sintetizados a partir de diferentes técnicas instrumentais (RMN 1D e 2D), espectroscopia de absorção na região do

Infravermelho, Análise elementar, Condutividade molar, Voltametria cíclica, espectrometria de massas e Difração de raios X de monocristal;

- Avaliar a estabilidade dos complexos em dimetilsulfóxido e em meio de cultura, no qual são realizados os ensaios biológicos;
- Determinar a lipofilicidade complexos de rutênio;
- Investigar a interação dos compostos com biomoléculas DNA (*calthymus*), HSA e a enzima topoisomerase IIa.
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos de rutênio pelo método do MTT em células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR-3, tumoral de pulmão A549 e nas linhagens não tumorais de mama MCF-10A e de pulmão MRC-5;
- Avaliar os efeitos dos complexos através dos ensaios de morfologia celular, migração celular e formação de colônias;
- Avaliar o efeito dos complexos sob as fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Avaliar tipo de morte celular pelos complexos por citometria de fluxo;

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Obtenção da atmosfera inerte

Todas as sínteses dos complexos e análises eletroquímicas foram realizadas sob atmosfera inerte de argônio, a qual foi obtida pela passagem de fluxo de argônio, ou nitrogênio, por um sistema de colunas contendo: sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador do tipo BTS-R-3-11 (Fluka Chemika), sendo que a última foi mantida a 60 °C, para o catalisador permanecer ativado. Estes procedimentos foram necessários para desoxigenar e secar o gás comercial de procedência da White Martins.

3.2 Solventes

Os solventes utilizados neste trabalho são de procedência da Synth ou NEON foram empregados sem tratamentos prévios. Os principais foram: diclorometano (Synth P. A), metanol (Neon P. A), hexano (Synth P. A), éter etílico (Synth P. A), acetona, dimetilsulfóxido (Neon P. A.), etanol (Synth P. A) e tolueno. A acetona deuterada (Acetona-d₆) foi utilizada como fornecida pela Sigma-Aldrich®.

3.3 Reagentes químicos em geral

Os ligantes trifenilfosfina (PPh₃), bis(difenilfosfina)metano (dppm), 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe), 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), cis-1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen) e bis-[(1-difenilfosfina)fenil]éter, (DPEphos), 2,2-bipiridina (bipy), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lausona), trietilamina e o sal tricloreto de rutênio hidratado (RuCl₃.xH₂O) são de procedência Sigma-Aldrich®, foram utilizados como recebidos. O perclorato de tetrabutílamônio (PTBA), foi empregado para obtenção de eletrólito suporte para os experimentos de eletroquímica e o hexafluorofosfato de potássio (KPF₆) são de procedência Fluka, foi utilizado

como fornecido. O ligante 3-estiril-lausona foi sintetizado pelo grupo do Prof. Dr. Chaquip Daher Netto (UFRJ-Macaé).

3.4 Síntese dos complexos precursores

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

O complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ foi sintetizado conforme o procedimento reportado por Wilkinson e Stephenson⁸³. Em um balão de duas bocas contendo 200 mL de metanol previamente desaerado foi dissolvido 1,00 g (3,8 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e a solução foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte de argônio por aproximadamente 15 minutos. Após esse período, a solução foi resfriada e 6,3 g (24,1 mmol) de trifenilfosfina foi adicionada. A mistura reacional foi novamente refluxada por mais 3h. Um sólido marrom formando durante a reação foi separado por filtração a vácuo, lavado com metanol, hexano à quente e seco sob vácuo. Rendimento 2,87 g (63%).

3.4.2 Síntese do complexo *cis,trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]$

O precursor *cis,trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]$, foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por Batista et al.⁸⁴ Em frasco tipo Schlenk contendo 20 mL de diclorometano previamente desaerado, solubilizou-se 0,50 g (0,52 mmol) do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e adicionou-se 0,10 g (0,57 mmol) do ligante 2,2-bipiridina. A mistura reacional foi mantida sob agitação, durante 2h. Após o volume da solução foi reduzido e o sólido formado durante a reação foi filtrado lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento 0,30 g (68%).

3.4.3 Síntese do complexo $\{[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})\}$

O complexo $\{[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})\}$ foi sintetizado conforme descrito por Bressan e Rigo⁸⁵. Em um balão de duas bocas solubilizou-se 2,00 g (2,1 mmol) do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e 2,2 g (5,2 mmol) do ligante 1,4-bis(difenilfosfina)butano em 200 mL de hexano previamente desaerado. A reação

foi refluxada durante 6h. O sólido verde formado durante a reação foi separado por filtração e lavado com hexano à quente. Rendimento 2,98g (88%).

3.4.4 Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(S-dms_o)₃(O-dms_o)]

O complexo *cis*-[RuCl₂(S-dms_o)₃(O-dms_o)] foi obtido segundo o procedimento descrito por Evans et al.⁸⁶. Solubilizou-se 1,00 g (4,8 mmol) do sal RuCl₃.nH₂O em 5 mL de dimetilsulfóxido e a solução foi refluxada e mantida sob agitação constante por aproximadamente 1h. Posteriormente o volume da solução foi reduzido à metade e a esta solução foi adicionada 20 mL de acetona. O precipitado amarelo foi filtrado, lavado com acetona, éter etílico e seco a vácuo. Rendimento 69% (0,89 g).

3.4.5 Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(P-P)], (P-P) = dp_{pp}, dp_{pe}, dp_{pp}, dp_{pen}

As sínteses dos complexos de fórmula geral [RuCl₂(bipy)(P-P)] foram sintetizados conforme reportado por Batista et al.⁸⁴ com algumas modificações na metodologia. Para a síntese solubilizou-se 0,100 g (0,12 mmol) do precursor *cis,trans*-[RuCl₂(bipy)(PPh₃)] em 30 mL de tolueno previamente desaerado, e em seguida (0,14 mmol) do respectivo ligante fosfínico (P-P = 53 mg de *bis*-(difenilfosfina)metano; 57 mg de 1,2-(difenilfosfina)etano; 58 mg de 1,3-(difenilfosfina)propano e 52 mg de 1,2-(difenilfosfina)etileno, foi adicionado. A reação foi mantida em refluxo por 48h. O sólido formado foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimentos: *cis*-[RuCl₂(bipy)(dp_{pp})] = 75 mg (88%); *cis*-[RuCl₂(bipy)(dp_{pe})] = 62 mg (71%); *cis*-[RuCl₂(bipy)(dp_{pp})] = 59 mg (66%); *cis*-[RuCl₂(bipy)(dp_{pen})] = 65 mg (74%).

3.4.6 Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dp_{pb})]

O complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dp_{pb})] foi sintetizado utilizando-se o procedimento descrito por Queiroz et al.⁸⁷. Em um balão de duas bocas

solubilizou-se 1,00 g (0,92 mmol) do composto $\{[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})\}$ e 0,20 g (0,68 mmol) do ligante 2,2'-bipiridina em 200 mL de tolueno desaerado. A mistura reacional permaneceu sob refluxo e atmosfera de argônio, durante 48h. O sólido vermelho formado durante a reação, foi filtrado lavado com tolueno, hexano à quente e seco a vácuo. Rendimento: 0,61 g (89%).

3.4.7 Síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{k}^3\text{-P-O-P-(DPEPhos)})(\text{dmsO})]$

O complexo *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{k}^3\text{-P-O-P-(DPEPhos)})(\text{dmsO})]$ foi sintetizado conforme o procedimento descrito por Venkateswaran⁸⁸ com modificações. Em um Schlenk foi dissolvido 1,0 g (2,0 mmol) do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_4]$ em 40 mL de diclorometano previamente desaerado. A solução foi mantida em refluxo por aproximadamente 20 minutos. Após adicionou-se 1,3 g (2,4 mmol) do ligante fosfínico bis-[(1-difenilfosfina)fenil]éter. O sistema reacional foi novamente refluxado por 24h. Posteriormente o volume foi reduzido para aproximadamente 3 mL e precipitou-se um sólido amarelo com adição éter etílico. O sólido foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento 1,02 g (65%).

3.4.8 Síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{DPEphos})]$

O complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{DPEPhos})]$ foi sintetizado a partir do complexo *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{k}^3\text{-P-O-P-(DPEPhos)})(\text{dmsO})]$. Em um frasco tipo Schlenk foram adicionados 0,116 g (0,12 mmol) do complexo *fac*- $[\text{RuCl}_2(\text{k}^3\text{-P-O-P-(DPEPhos)})(\text{dmsO})]$ e 0,023 g (0,14 mmol) de 2,2'-bipiridina. A solução foi mantida sob refluxo por 48h sob agitação magnética. O sólido vermelho formado durante o processo reacional foi filtrado, lavado com tolueno à quente, éter etílico e seco a vácuo. Rendimento 1,00 g (88%).

3.4.9 Síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$

O complexo *cis*-[RuCl₂(dppm)₂] foi sintetizado de acordo metodologia descrita por Queiroz et al com modificações. Em um balão de duas bocas adicionou-se 50 mL de tolueno previamente desaerado. Em seguida foi solubilizados 0,100 g (0,10 mmol) do precursor [RuCl₂(PPh₃)₃] e 0,12 g (0,30 mmol) do ligante bis(difenilfosfina)metano. A reação foi mantida em refluxo por 24 horas. Após o tempo reacional, o aquecimento foi desligado e observou-se a formação de sólido amarelo, sendo separado por filtração lavado com éter etílico e seco a vácuo. Rendimento: 0,069 g (73%).

3.5 Síntese dos complexos da Série 1 (A1 - A8)

3.5.1 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(PPh₃)]PF₆ (A1)

Em um balão de duas bocas contendo metanol e diclorometano (2:1 v/v), previamente desaerado foi solubilizado 29 mg (0,10 mmol) do ligante 3-esteril-lausona (NQ1) e 50 µL de trietilamina e manteve a solução sob agitação por aproximadamente 20 min sob atmosfera inerte a temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se a solução resultante 70 mg do precursor *cis,trans*-[RuCl₂(bipy)(PPh₃)₂] e 20 mg (0,16 mmol) do sal KPF₆. A reação foi refluxada sob atmosfera de argônio, durante 24h. Após o volume da solução foi reduzido para 3 mL e a reação mantida sob agitação até a precipitação de um sólido. O precipitado foi filtrado lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 60 mg (61%).

3.5.2 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppm)]PF₆ (A2)

Em balão de duas bocas adicionou-se 20 mL de uma mistura de metanol/diclorometano (2:1 v/v) desaerado. Adicionou-se 40 mg (0,15 mmol) do ligante (NQ1) e 50 µL de trietilamina e manteve sob agitação até solubilizar por completo o ligante. Em seguida foram adicionados 88 mg (0,12 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppm)]PF₆ e 32 mg (0,17 mmol) do sal KPF₆. A reação foi mantida em agitação por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente

reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 3 mL e a precipitação foi realizado com adição de água destilada. O sólido foi filtrado lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 48 mg (71%).

3.5.3 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppe)]PF₆ (A3)

Em um balão de duas bocas contendo 20 mL de metanol/diclorometano (2:1 v/v) previamente desaerado. Dissolveu-se 70 mg (0,09 mmol) do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppe)] e 35 mg (0,19 mmol) do sal KPF₆. A mistura reacional foi mantida sob agitação aproximadamente 20 minutos. Em seguida adicionou-se 34 mg (0,12 mmol) do ligante (NQ1) e 50 µL de trietilamina. A solução foi mantida em agitação por 24h sob atmosfera inerte. Após o volume da solução foi reduzido para 3 mL e novamente mantida em agitação até a precipitação. O sólido formado foi filtrado lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 70 mg (67%).

3.5.4 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppp)]PF₆ (A4)

Em um balão de duas bocas adicionou-se 34 mg (0,12 mmol) do ligante (NQ1) e 50 µL de trietilamina em metanol/diclorometano (2:1 v/v) desaerado. A solução ficou sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. Posteriormente adicionou-se 75 mg (0,10 mmol) do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppp)] e 37 mg (0,20 mmol) do sal KPF₆. A mistura permaneceu sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e adicionou-se água destilada para precipitação. O sólido foi filtrado lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 56 mg (50%).

3.5.5 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppb)]PF₆ (A5)

Em um balão de duas bocas contendo metanol/diclorometano (2:1) desaerados, foram dissolvidos 30 mg (0,11 mmol) do ligante (NQ1) e 50 µL de trietilamina. A solução foi mantida sob agitação por 20 minutos. Em seguida

adicionou-se 70 mg (0,09 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)] e 26 mg (0,14 mmol) de KPF₆. A mistura reacional permaneceu sob agitação por um período de 24h. Posteriormente o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e manteve a solução resultante sob agitação, até a obtenção de um sólido. O precipitado foi filtrado lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 79 mg (77%).

3.5.6 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(dppen)]PF₆ (A6)

Em um balão de duas bocas contendo 20 mL de metanol/diclorometano (2:1 v/v) previamente desaerado. Foram adicionados 70 mg (0,09 mmol) do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppen)] e 35 mg (0,19 mmol) do sal KPF₆, os quais foram mantidos em agitação por aproximadamente 20 minutos. Em seguida adicionou-se 35 mg (0,13 mmol) do ligante NQ1 e 50 µL de trietilamina e a reação novamente foi mantida sob agitação por 24h. Após o tempo reacional o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e a solução resultante foi mantida em agitação até a precipitação de um sólido. O precipitado foi filtrado lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 63 mg (60%).

3.5.7 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(bipy)(DPEphos)]PF₆ (A7)

Em um balão de duas bocas contendo diclorometano/metanol (2:1) desaerados. Adicionou-se 30 mg (0,11 mmol) do ligante (NQ1) e 50 µL de trietilamina. A solução foi mantida sob agitação por 20 min. Em seguida adicionou-se 70 mg (0,08 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(DPEphos)] e 29 mg (0,16 mmol) do sal KPF₆. A mistura reacional foi refluxada por 2h. Após esse período, o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL. A reação foi mantida em agitação até a formação de um sólido. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 69 mg (71%).

3.5.8 Síntese do complexo [Ru(NQ1)(dppm)₂]PF₆ (A8)

Em um Schlenk contendo 20 mL de metanol, foram dissolvidos 25 mg (0,08 mmol) do ligante (NQ1) e 50 µL de trietilamina. A solução ficou sob agitação por aproximadamente 20 min. Após adicionou-se 70 mg (0,07 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(dppm)₂] e 27 mg (0,15 mmol) do sal KPF₆. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 24h. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e realizou-se a precipitação com água destilada. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 59 mg (65%).

3.6 Síntese dos complexos da Série 2 (B1-B4)

3.6.1 Síntese do complexo [Ru(NQ2)(bipy)(dppen)]PF₆ (B1)

Em um balão de duas bocas contendo 20 mL de metanol/diclorometano (2:1) previamente desaerado foram dissolvidos 29 mg do ligante lausona (NQ2) e 50 µL de trietilamina, a solução foi mantida em agitação por 20 min. Em seguida adicionou-se 100 mg (0,13 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppen)] e 38 mg (0,21 mmol) de KPF₆. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24h. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e realizou-se a precipitação com água destilada. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 110 mg (87%).

3.6.2 Síntese do complexo [Ru(NQ3)(bipy)(dppen)]PF₆ (B2)

Em um balão de duas bocas contendo 20 mL de metanol/diclorometano (2:1 v/v) previamente desaerado. Foram adicionados 100 mg (0,13 mmol) do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppen)] e 38 mg (0,20 mmol) do sal KPF₆. A solução reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 43 mg (0,18 mmol) do ligante lapachol (NQ3) e 50 µL

de trietilamina. A reação foi mantida sob agitação por 24h. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 3 mL e novamente a reação foi mantida em agitação até a precipitação de um sólido. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada, éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 63 mg (53%).

3.6.3 Síntese do complexo [Ru(NQ2)(bipy)(DPEphos)]PF₆ (B3)

Em um balão de duas contendo 30 mL de diclorometano/metanol (2:1) previamente desaerado foram dissolvidos 26 mg (0,15 mmol) do ligante lausona (NQ2), 50 µL de trietilamina e 100 mg (0,11 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(DPEphos)] e 30 mg (0,16 mmol) do sal KPF₆. O sistema reacional foi refluxado por 2h. Após esse período reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 3 mL e realizou-se a precipitação com água destilada. O sólido formado foi filtrado, lavado com água destilada e éter etílico. Rendimento: 89 mg (72%).

3.6.4 Síntese do complexo [Ru(NQ3)(bipy)(DPEphos)]PF₆ (B4)

Em um balão de duas contendo 30 mL de diclorometano/metanol (2:1) previamente desaerado foram dissolvidos 35 mg (0,14 mmol) do ligante lapachol (NQ3), 50 µL de trietilamina, 100 mg (0,11 mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(DPEphos)] e 30 mg (0,16 mmol). O sistema reacional foi refluxado durante 2h. Após esse período reduziu-se o volume da solução resultante para aproximadamente 3 mL e realizou-se a precipitação com água destilada. O sólido foi filtrado, lavado com água destilada e éter etílico. Rendimento: 98 mg (73%).

3.7 Técnicas experimentais e Instrumentação

3.7.1 Análise elementar (C, H, N e S)

As porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio dos complexos foram realizadas utilizando um analisador CHN modelo EA 1108 da FISOONS,

localizado na Central Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.7.2 Condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas utilizando um condutivímetro Meter Lab modelo CDM 2300. As soluções dos complexos foram preparadas em diclorometano na concentração de 1 mmol. L⁻¹.

3.7.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB-102. Para todas as amostras os espectros foram obtidos na região de 4000 a 300 cm⁻¹ no modo de transmitância. As amostras foram maceradas com brometo de potássio em almofariz de ágata e analisadas em forma de pastilha.

3.7.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros na região do ultravioleta e visível foram adquiridos em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard, (HP) modelo 8452A. Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido na concentração de 1 mmol.L⁻¹, utilizando cubetas de quartzo com o caminho óptico de 1 cm.

3.7.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz, pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, do Departamento de química da UFSCar. As soluções foram preparadas em acetona deuterada para aquisição dos espectros referente aos experimentos 1D de ¹H, ¹³C{¹H}, ³¹P{¹H} e 2D de COSY (¹H-¹H), HSQC (¹H-¹³C) e HMBC (¹H-¹³C) e para os ensaios de RMN de ³¹P{¹H}, utilizou-se um capilar com solvente deuterado (D₂O) dentro, como referência externa.

3.7.6 Difração de raios X

As medidas de difração de raios X de monocristal foram realizadas no Laboratório de Cristalografia no Instituto de Física da USP de São Carlos, pelo Dr. João Honorato de Araújo Neto, utilizando o difratômetro Rigaku XtaLAB mini II, com radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$), com um detector de área do tipo CCD e o difratômetro Rigaku Synergy-S com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$), utilizando um detector de área HyPix-6000HE. Os cálculos dos parâmetros iniciais da célula unitária, planejamento das coletas, integração e redução dos dados foram realizados usando o software CrysAlisPro.⁸⁹ As estruturas foram resolvidas com programa SHELXT⁹⁰ e os refinamentos utilizando o programa SHELXL⁹¹. Os programas OLEX⁹² e MERCURY^{92,93}, foram utilizados para elaborar os dados cristalográficos e as representações gráficas das moléculas.

3.7.7 Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais no departamento de química, pelo MSc. Carlos André Moraes. As coletas foram realizadas usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo. A amostra foi solubilizada em metanol (grau LC-MS), posteriormente diluída. Para esta análise foi realizada uma infusão direta, utilizando como fase móvel água (solvente A, 0,1 % de ácido fórmico) e metanol (solvente C com 0,1 % de ácido fórmico), no modo isocrático e na proporção de 05:95 v/v respectivamente. O erro (ppm) foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS adquirido monitorando uma faixa entre 100 e 1000 Da, com uma taxa de varredura 3 espectros s^{-1} e processados pelo software Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00.

3.7.8 Estudos eletroquímicos

As medidas eletroquímicas dos compostos sintetizados foram feitas utilizando-se o potenciostato/galvanostato EGeG Princeton Applied Research, model 262A. Foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro, os eletrodos de trabalho e auxiliar de platina, o PTBA foi utilizado como eletrólito suporte (1 mM em diclorometano).

3.8 Estudos de estabilidade dos complexos

A estabilidade dos compostos de rutênio(II) foi avaliada por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em DMSO (100%) e DMSO/DMEM (90:10%), solventes estes utilizados nos experimentos biológicos. Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram registrados nos tempos de 0, 24 e 48h.

3.9 Estudos de interação dos complexos com o DNA

Os estudos de interação com o ctDNA (calf thymus), foram realizados em tampão trisma-HCl (4,5 mM de tris-HCl, 0,5 mM de trisma-base e 50 mM de NaCl). Uma solução estoque de ctDNA foi preparada a partir de 20 mg ctDNA em 20 mL de tampão trisma-HCl. A solução foi mantida na geladeira por 24h para garantir a completa solubilização. O cálculo da concentração do DNA foi determinado por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, considerando a absorvidade molar do DNA em $6600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ para o comprimento de onda máximo em 260 nm.

3.9.1 Medidas de viscosidade

O ensaio de viscosidade dos compostos foi realizado empregando um viscosímetro de Ostwald em um banho termostático à 25 °C. A concentração do DNA em tampão trisma foi fixada em $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ (pH 7,4). As soluções dos complexos foram preparadas em DMSO (10% em todas as medidas). As concentrações dos compostos foram preparadas em diferentes razões molares (complexo/DNA) variando de 5 - $30 \mu\text{mol L}^{-1}$. O tempo de escoamento da solução foi aferido cinco vezes, com auxílio de um cronômetro digital. A partir dos dados

coletados, referente a cada concentração foi plotado um gráfico $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus concentração (complexo/DNA), em que η corresponde a viscosidade do DNA na presença do complexo e η_0 é a viscosidade do DNA^{94,95}.

3.9.2 Eletroforese em gel de agarose

A interação dos compostos com DNA plasmidial (pBR322), foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Os complexos foram incubados com DNA em distintas relações molares (0,25, 0,50 e 1,00) por 18h a 37 °C. Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 500 rpm por 5 minutos. Na sequência as soluções (complexo/DNA) foram aplicadas cuidadosamente no gel de agarose com o tampão de corrida TAE (0,45 M Tris-HCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM de EDTA, em pH 7,4), preparado previamente. Os parâmetros utilizados para corrida foram 40 V durante 2,5 h. O gel foi corado com brometo de etídio e as imagens capturadas através do equipamento *ChemiDoc Imager* (BioRad).

3.9.3 Estudo de competitividade com Hoechst 33258

O ensaio de competitividade com Hoechst 33258 foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Sarwar et al.,⁹⁶. Para obtenção dos espectros de fluorescência dos compostos com a sonda Hoechst, foi preparada uma solução estoque contendo 125 μmolL^{-1} de ctDNA e 5 μmolL^{-1} Hoechst em tampão trisma-HCl, pH = 7,4. A solução foi deixada em repouso sob o abrigo de luz durante 10 min. Os complexos foram preparados em diferentes concentrações (0 - 20 μmolL^{-1}) dissolvidos em DMSO. Em uma placa opaca de 96 poços, adicionou-se 200 μL de solução contendo ct-DNA/Hoechst e os compostos em diferentes concentrações. Posteriormente as amostras foram incubadas e os espectros de fluorescência foram obtidos na região de 370 - 700 nm. As medidas foram realizadas no fluorímetro Synergy/H1-Biotek na temperatura 37 °C. O experimento foi realizado em triplicata.

3.10 Inibição da enzima Topoisomerase IIa

O experimento de inibição da enzima topoisomerase IIa foi realizada com o Kit de relaxação do DNA (Inspiralis Limited), fornecido pelo professor Dr. Fillipe Rocha. Para o ensaio as soluções foram preparadas em microtubos (2,0 mL), onde em cada microtubo adicionou-se 0,5 μL (0,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de DNA superenovelado, 3 μL de tampão de ensaio, 1 μL (1,0 mmol L^{-1}) de ATP e 1 μL do composto em diferentes concentrações, e por fim adicionou 1 μL da topoisomerase, o volume final foi completado para 30 μL de água deionizada. As soluções foram incubadas a 37°C por 40 minutos. Após o tempo de tratamento, foi adicionado 15 μL do tampão de corrida STEB (40% de sacarose, 100 mmol L^{-1} de Tris.HCl, pH = 7,5; 1 mmol L^{-1} de EDTA, 0,5 mg/mL de azul de bromofenol). Posteriormente as amostras foram centrifugas a 5000 rpm por 5 minutos e as soluções foram aplicadas cuidadosamente no gel de agarose com o tampão de corrida TAE (0,45 M Tris-HCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM de EDTA, em pH = 7,4), preparado previamente. Os parâmetros utilizados foram 40 V durante 3,0 h. O gel foi corado com brometo de etídio e as imagens capturadas através do equipamento *ChemiDoc Imager* (BioRad).

3.11 Estudo de interação dos complexos com HSA (Albumina de Soro humano)

O estudo de interação dos compostos com a HSA, foi realizado a partir do monitoramento de supressão de fluorescência da proteína em 305 nm. As amostras foram preparadas em DMSO nas concentrações (2,5 - 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com o volume final de 5% de DMSO. A concentração da HSA foi fixada em 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão trisma-HCl, pH 7,4. Os compostos foram incubados em microtubos antes das medidas de fluorescência. Após a incubação uma alíquota de 200 μL da solução de complexo/HSA foi adicionado em uma placa de 96 poços opaca e na sequência a placa foi cuidadosamente agitada e os espectros de fluorescência foram obtidos em um fluorímetro Synergy/1H-Biotek, no

comprimento de excitação em 270 nm e a varredura de 305 a 500 nm nas temperaturas de 25, 30 e 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata.

A supressão de intensidade de fluorescência foi calculada usando a equação de Stern-Volmer (Ksv), Equação (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{q\tau_0} [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor respectivamente, $[Q]$ é a concentração do supressor, K_q é a constante de velocidade de supressão biomolecular, τ_0 é o tempo de meia vida médio da proteína (HSA), K_{sv} é a constante de Stern-Volmer.

A constante de ligação (K_b) entre os complexos e a proteína, bem como o número de sítios de ligação (n) foi determinada utilizando a equação 2.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação (2)}$$

Para os parâmetros termodinâmicos ΔG° (energia livre de Gibbs), ΔH° (variação de entalpia) e ΔS° (variação de entropia) foram obtidos a partir das seguintes equações (3) e (4):

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H}{R} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde, K_1 e K_2 correspondem as constantes de ligação nas temperaturas T_1 e T_2 , respectivamente; R é a constante dos gases ideais.

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (4)}$$

3.11.1 Estudos de competição dos compostos pelo sítio I da HSA

Para avaliação de competição entre o sítio I da HSA com os complexos, foi utilizado uma sonda fluorescência varfarina. Os experimentos foram realizados por meio da adição de diferentes concentrações dos complexos (2,5 - 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a uma mistura do fármaco varfarina (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e a biomolécula HSA (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão trisma-HCl pH 7,4. As soluções foram adicionadas em triplicata em uma placa opaca de 96 poços e analisadas no fluorímetro Synergy/1H-Biotek, 310 nm para excitação e a varredura de 340 a 650 nm na temperatura de 37 °C.

3.12 Ensaios de fluorescência

Para os ensaios quantitativos a intensidade da fluorescência nos espectros de emissão foi corrigida pela equação (5), devido ao efeito de sobreposição do espectro de reabsorção da fluorescência. A correção fez necessária, pois revela a real intensidade de fluorescência do fluoróforo no meio. Esse fenômeno é conhecido como efeito de filtro^{97,98}.

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{\left[\frac{A_{em} + A_{ex}}{2}\right]} \quad \text{Equação (5)}$$

onde F_{cor} e F_{obs} correspondem respectivamente as intensidades de fluorescência corrigida e observada. A_{em} e A_{ex} são as absorvâncias da solução nos comprimentos de onda de excitação e de emissão.

3.13 Determinação do coeficiente de lipofilicidade

O coeficiente de partição dos complexos foi determinado pelo método “shake flash”⁹⁹. Este método baseia-se no emprego de um sistema bifásico (polar/apolar). Neste caso utilizou-se o sistema *n*-octanol/água. Primeiramente foram preparadas soluções concentradas de cada complexo dissolvidos em dimetilsulfóxido, vale ressaltar que a porcentagem máxima de DMSO utilizada foi de 4%. Uma alíquota (80 μL) de cada composto foi diluída em 960 μL de *n*-

octanol e 960 µL de água destilada, sendo submetidos a agitação magnética a 1000 rpm mantendo-se a temperatura a 37 °C durante 18h. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e a fase orgânica de cada composto foi transferida para uma cubeta de quartzo e a absorbância final foi registrada no intervalo de 190 a 600 nm. As concentrações foram determinadas a partir de curva analítica construída n-octanol/dmsO empregando-se a espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível. O ensaio foi realizado em triplicata e o coeficiente de partição foi determinado a partir da equação 1.

$$\text{Log P} = \log \frac{C_o}{C_a} \quad \text{Equação (5)}$$

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

3.14 Ensaios biológicos *in vitro*

3.14.1 Linhagens e cultura celular

Os ensaios biológicos dos compostos foram realizados em várias linhagens de células tumorais e não tumorais, no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos da UFSCar. Parte destas linhagens foram cedidas pela Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), no Departamento de Gerontologia da UFSCar. A linhagem celular MDA-MB-231 foi adquirida pelo Banco de células do Rio de Janeiro.

As linhagens de células tumorais humana MDA-MB-231 (RE-, RP- e HER2-), A549 (câncer de pulmão) e as células não tumoral de pulmão da linhagem MRC-5 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo estreptomicina (100 mg mL⁻¹), L-glutamina (2 mM),

sulfato de gentamicina (50 mg/L), anfotericina B (25 µg/mL), suplementado com 10 % soro fetal bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*). As células MCF-7 (positiva para RE+) e SK-BR-3 (positiva para expressão HER2) foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), contendo 10 % soro FBS. A linhagem celular não tumoral de mama MCF-10A foi cultivada em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12) suplementado com 5% de soro de cavalo, 20 ng/mL de EGF, 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 1 % de penicilina/estreptomicina e 10 µg/mL de insulina. Todas as linhagens celulares em estudo foram mantidas em uma incubadora com 5 % de dióxido de carbono (CO₂) e a 37°C.

3.15 Ensaio de viabilidade celular

O efeito citotóxico dos complexos de rutênio e dos ligantes frente as linhagens tumorais e não tumorais foi determinado empregando-se o reagente MTT [*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium*]¹⁰⁰. Para isso, $1,5 \times 10^4$ (células/150 µL) foram semeadas em placas de 96 poços estéreis (Greiner) e mantidas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24h. Decorrido este tempo, os compostos em diferentes concentrações (0,003 µmol L⁻¹ a 50 µmol L⁻¹) foram adicionados nos poços e a placa incubada novamente a 37 °C durante o tratamento de 48h. Terminando o tempo de tratamento, foi adicionado ao meio de cultura 50 µL/poço de uma solução de MTT (0,5 mg/mL em PBS). As células foram incubadas durante 3h e após os cristais formados foram solubilizados em 150 µL isopropanol. Em seguida a absorbância foi mensurada em leitor de microplaca (espectrofotômetro Epoch™) no comprimento de onda 520 nm. O valor de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular), foi calculado a partir de uma curva de concentração utilizando o software bioestatístico GraphPad®. O índice de seletividade dos compostos foi quantificado em função da razão entre o IC₅₀ da (célula não tumoral/célula tumoral). O experimento foi realizado em triplicata independente.

3.16 Ensaio de morfologia celular

As linhagens MDA-MB-231 (tumoral) e MCF-10A (não tumoral) foram plaqueadas ($0,8 \times 10^5$ células/1000 μL) em placas de 12 poços estéreis (Corning®) e mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. No dia seguinte as células foram tratadas em diferentes concentrações de $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$, $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$, $1 \times \text{IC}_{50}$, $2 \times \text{IC}_{50}$ e $4 \times \text{IC}_{50}$ dos compostos. As imagens da morfologia celular foram capturadas nos tempos de 0, 24 e 48 h, com auxílio de microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 MP *Live Resolution*).

3.17 Ensaio de formação de colônias

As células MDA-MB-231, foram semeadas na densidade de (3×10^2 /2000 μL) em placa de 6 poços estéreis (Corning®) e incubadas a 5 % de CO_2 e 37°C , por 24h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de $\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$, $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$, $1 \times \text{IC}_{50}$, $2 \times \text{IC}_{50}$ e $4 \times \text{IC}_{50}$ dos compostos e incubadas por 48h. Terminado o tempo de tratamento o meio foi removido cuidadosamente e os poços lavados com PBS (1 mL/poço). Um novo meio foi adicionado e as células foram incubadas novamente a 37°C , durante 10 dias. Posteriormente o sobrenadante foi removido e lavado com PBS (1 mL/poço) e as células foram fixadas com uma solução de metanol/ácido acético (3:1v/v) durante 5 min. Após as colônias foram coradas com o corante panótico (Newprov). O número de colônias foi quantificado utilizando o *plugin Colony Area* para o *software ImageJ*. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.18 Ensaio de migração - *Wound Healing*

As células MDA-MB-231 foram plaqueadas na densidade ($1,5 \times 10^5$ células/1000 μL) em placas de 12 poços estéreis (Corning®) e mantidas na estufa a 37°C e 5 % de CO_2 até atingir a confluência de 80 %. No dia seguinte as células foram tratadas com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mitomicina C (Sigma-Aldrich) por 15 minutos.

Decorrido o tempo o meio foi descartado e os poços lavados delicadamente com PBS 1x. Com auxílio de uma ponteira estéril de 100 µL, foi feita uma risca no sentido vertical de cada poço. Os poços foram lavados cuidadosamente com PBS 1x apenas para retirada de células desaderidas e acrescentado meio de cultura novo suplementado com 10 % FBS contendo os compostos em diferentes concentrações (0,25, 0,50 e 1,00 µmol L⁻¹). Os controles negativos foram utilizados sem adição dos compostos, apenas com 0,5 % DMSO. As imagens da área da risca foram capturadas nos tempos 0, 12 e 24 h, utilizando um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 MP *Live Resolution*). A área de fechamento da risca foi quantificada pelo *software ImageJ* e a porcentagem da ferida foi calculada a partir da equação 6, na qual $A_{t=0h}$: medida da área riscada no tempo de 0 h e $A_{t=\Delta h}$: medida da área riscada no tempo de 24 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ fechamento da risca} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \quad \text{Equação (6)}$$

3.19 Ensaio de marcação do citoesqueleto com a faloidina

Foram plaqueadas 2×10^4 (células /500 µL), da linhagem MDA-MB-231, em placa de 24 poços contendo uma lamínula e mantidas a 37 °C de CO₂ durante 24 horas para aderência. Posteriormente as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos de rutênio e incubadas por 24 horas. Em seguida o meio de cultura foi descartado, os poços lavados com PBS e as células foram fixadas com 3,7 % de paraformaldeído em PBS durante 30 minutos e permeabilizados com 0,1 % de TritonX-100 em PBS durante 5 minutos. Após os poços foram lavados novamente com PBS, seguido da adição de 2% de BSA durante 20 minutos. As células foram incubadas com o marcador Alexa Fluor™ 488 (faloidina), durante 30 minutos, seguindo da incubação por 10 minutos da solução de DAPI (1µg/mL) e lavadas três vezes com PBS. As imagens foram

capturadas com auxílio de um microscópio confocal invertido equipado para observação em campo claro, contraste interferência (DIC) e fluorescência, no Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual - CNET, alocado na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP.

3.20 Ensaio de ciclo celular

Para avaliar o efeito dos complexos nas fases do ciclo celular, as células MDA-MB-231 foram plaqueadas na densidade de (2×10^5 células/1000 μ L) em placas de 12 poços estéreis (Corning[®]) e mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 24 h. Após esse período as células foram tratadas com diferentes concentrações de $\frac{1}{2}$ IC₅₀, 1x IC₅₀, 2x IC₅₀ dos compostos. Terminando o tratamento de 48h, as células foram removidas com auxílio de um scraper e os poços foram lavados 2x com PBS e as células foram fixadas com etanol 70 % gelado e mantidas a -20 °C *overnight*. Em seguida as células foram centrifugas a 1000 rpm, por 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet delicadamente ressuspensionado em uma solução de 0,02 mg/mL de RNase (Sigma-Aldrich) e 10 μ g/mL de iodeto de propídio em PBS e incubadas a 37 °C por 60 min. A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10.000 eventos, no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN).

3.21 Ensaios de apoptose

Para os ensaios de atividade apoptótica dos complexos, foi utilizado o *Kit PE Annexin V Apoptosis Detection* (BD Biosciences), as células MDA-MB-231 foram semeadas na densidade ($1,5 \times 10^5$ célula/1000 μ L) em placas de 12 poços estéreis (Corning[®]). As placas foram incubadas a 37°C e 5 % de CO₂ por 24h. Após esse período as células foram tratadas com soluções dos complexos diferentes em concentrações e incubados por 48 h. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi transferido para microtubos e centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C, após o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS e

suspendidas em 100 μ L tampão de ligação (fornecido pelo kit de apoptose) e retornadas para a placa. Em seguida foi adicionado em cada poço 2,5 μ L de Anexina V-PE e 2,5 μ L de 7-AAD (7-aminoactinomicina) e as células incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após, com auxílio de um *scraper*, as células foram desaderidas e ressuspendidas em 400 μ L tampão de ligação (fornecido pelo Kit de apoptose) e transferidas para tubo de citometria. A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10.000 eventos, no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN).

3.22 Análises estatísticas

O tratamento estatístico foi realizado utilizando o software GraphPad Prism versão 8, empregando análise de variância (ANOVA) e Teste de Dunnett ou Benferroni. Os experimentos foram realizados em triplicata com expressão dos dados em média \pm desvio padrão.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados das caracterizações dos complexos da série 1 e 2. Devido às similaridades dos ligantes e visando melhor exposição dos dados, a seção está dividida em dois tópicos:

- Síntese e caracterização dos complexos da série 1 e 2;
- Estudos biológicos dos complexos contendo ligantes naftoquinonas;

Além disso, os espectros que não foram inseridos no texto estão disponíveis no apêndice, localizado no final da tese.

4.1 Síntese e caracterização dos complexos

A série 1 representa os complexos (**A1-A8**), com fórmula $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$ (**A1**); $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$ (**A2-A7**) e $[\text{Ru}(\text{NQ1})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (**A8**), onde (**NQ1** = 3-estiril-launosna; P-P = bis-(difenilfosfina)metano (dppm), 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe), 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), 1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen) e bis[(2-difenilfosfina)fenil]éter (DPEphos). A série 2 é composta de quatro compostos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NQx})(\text{bipy}(\text{P-P}))]\text{PF}_6$, onde (x = **NQ2**: lausona ou **NQ3**: lapachol; P-P = *cis*-1,2-bis(difenilfosfina)etileno (dppen) e *bis*-[(1-difenilfosfina)fenil]éter (DPEphos).

A síntese dos complexos ocorreu por meio da labilização dos ligantes cloridos presente nos precursores, pelos ligantes naftoquinonas (NQ), em uma mistura de solventes metanol/diclorometano (2:1) e em todas as sínteses, foi necessário a utilização da base trietilamina (Et_3N), para promover a desprotonação da hidroxila, deixando o ligante em sua forma aniônica, favorecendo a complexação ao rutênio. A rota sintética e as identificações dos novos complexos de rutênio (série 1 e 2), são apresentadas nas Figuras 4.1 e 4.2.

FIGURA 4.1 - Rota sintética para a obtenção dos compostos da série 1.

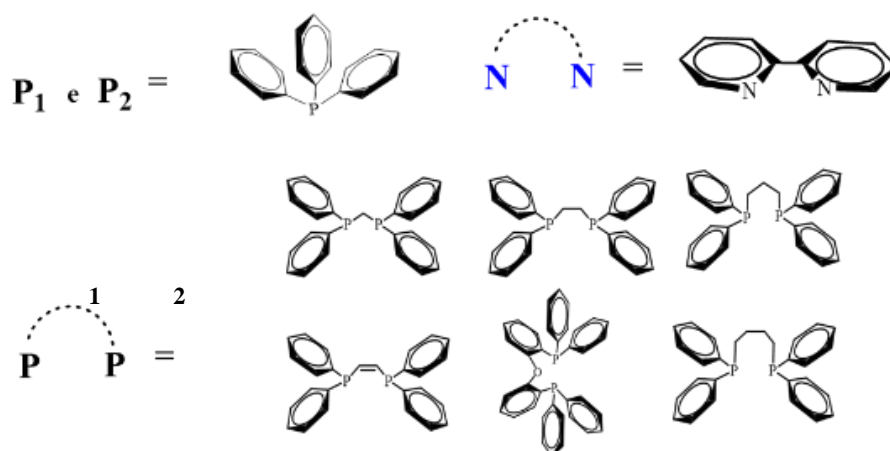
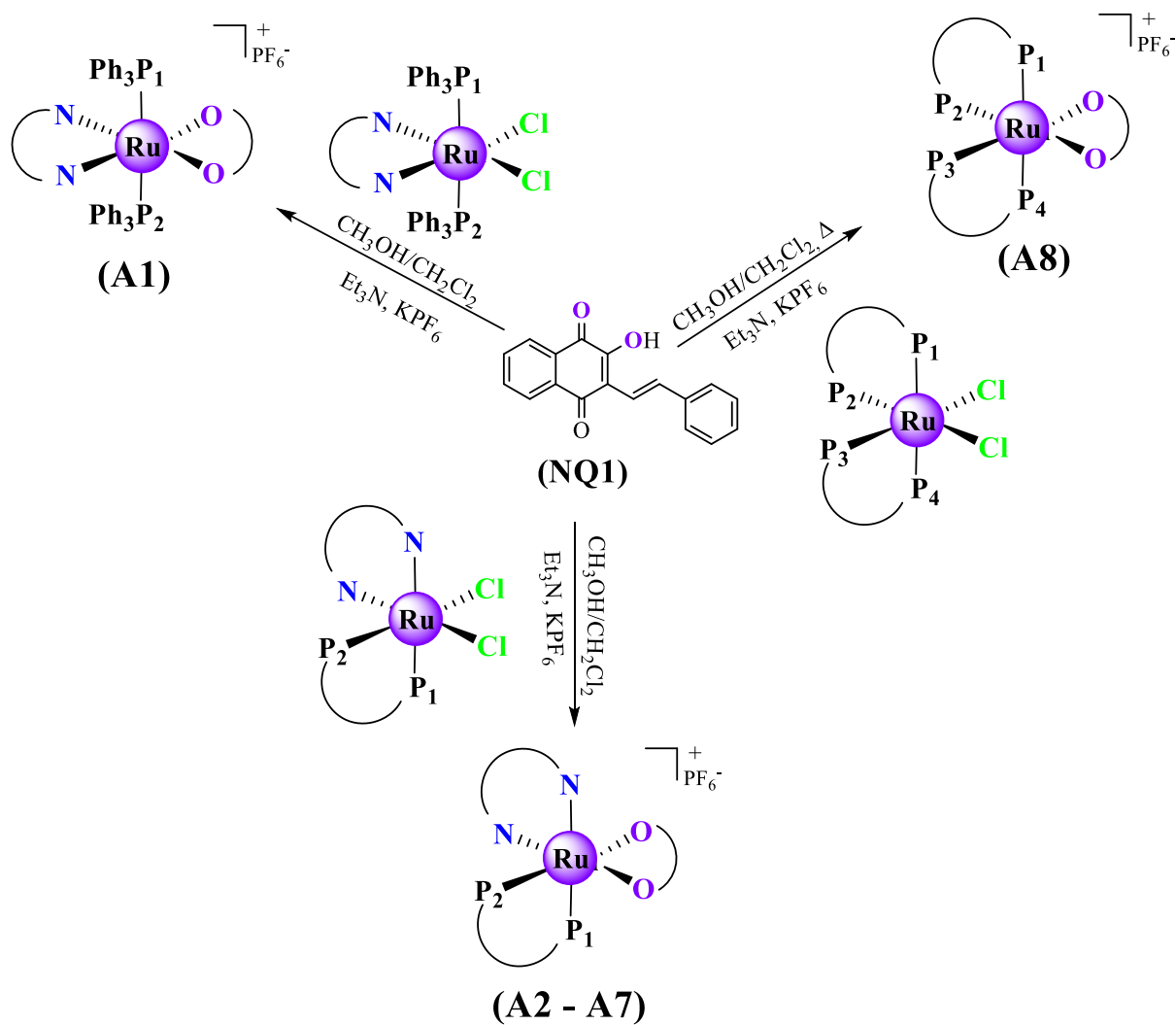
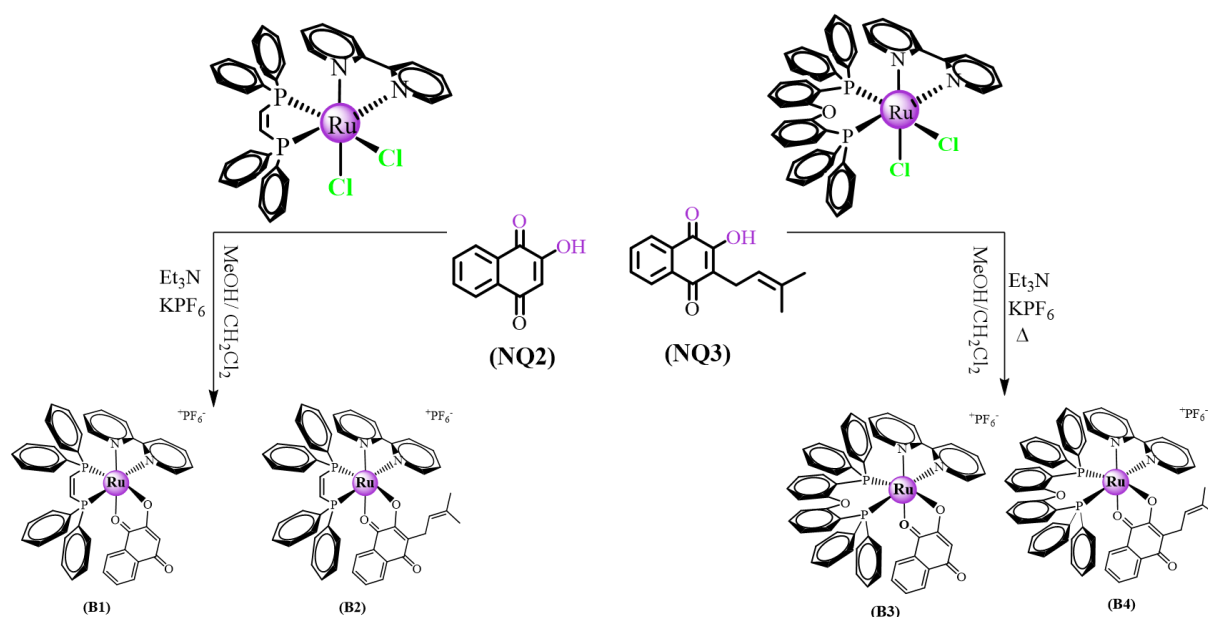


FIGURA 4.2 - Rota sintética para a obtenção dos compostos da série 2.



Com a substituição dos ligantes cloridos a naftoquinona assume preferencialmente o modo de coordenação bidentado, por meio dos átomos de oxigênio (O-O), o que influenciou em uma alteração na carga dos compostos, sendo neutros nos precursores e catiônico nos produtos das reações.

As medidas de condutividade molar confirmam a formação de complexos catiônico uma vez, que os valores obtidos das soluções em diclorometano, caracterizam que são eletrólitos 1:1 (faixa de condutividade para o diclorometano $1:1 \text{ ohm cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)¹⁰¹, indicando a presença dos contra íon PF_6^- na estrutura dos compostos. Os dados de microanálise de carbono, hidrogênio e nitrogênio estão condizentes com as estruturas propostas, bem como os valores de condutividade molar, estão apresentados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 - Dados de condutividade molar (λ) e análise elementar dos complexos da série 1 (A1-A8) e da série 2 (B1-B4).

Complexos	Análise elementar			Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^2\text{ mol}^{-1}$)
	%C	%H	%N	
Série 1				
$\text{C}_{64}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (A1)	64,23 (63,95)	4,61 (4,11)	2,47 (2,33)	30,2
$\text{C}_{53}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (A2)	60,02 (59,95)	3,86 (3,89)	2,72 (2,64)	44,0
$\text{C}_{54}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (A3)	60,46 (60,28)	4,09 (4,03)	2,75 (2,60)	44,9
$\text{C}_{55}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (A4)	60,57 (60,61)	4,29 (4,16)	2,63 (2,57)	42,4
$\text{C}_{56}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (A5)	60,89 (60,93)	4,32 (4,29)	2,56 (2,54)	49,8
$\text{C}_{54}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (A6)	60,84 (60,40)	3,81 (3,85)	2,65 (2,61)	44,3
$\text{C}_{64}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_4\text{P}_3\text{Ru}$ (A7)	63,26 (63,21)	3,94 (3,90)	2,37 (2,30)	56,1
$\text{C}_{68}\text{H}_{55}\text{O}_3\text{P}_5\text{Ru}$ (A8)	63,47 (63,21)	4,63 (4,30)	---	47,0
Complexos				
Série 2				
$\text{C}_{46}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (B1)	56,65 (56,86)	3,90 (3,63)	2,97 (2,88)	50,8
$\text{C}_{51}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ (B2)	58,99 (58,91)	4,19 (4,17)	2,65 (2,69)	57,6
$\text{C}_{56}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_4\text{P}_3\text{Ru}\cdot\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ (B3)	61,10 (60,66)	4,39 (4,33)	2,61 (2,36)	50,6
$\text{C}_{61}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{F}_6\text{O}_4\text{P}_3\text{Ru}$ (B4)	61,43 (61,98)	4,62 (4,18)	2,64 (2,37)	54,2

*valores teóricos entre parênteses

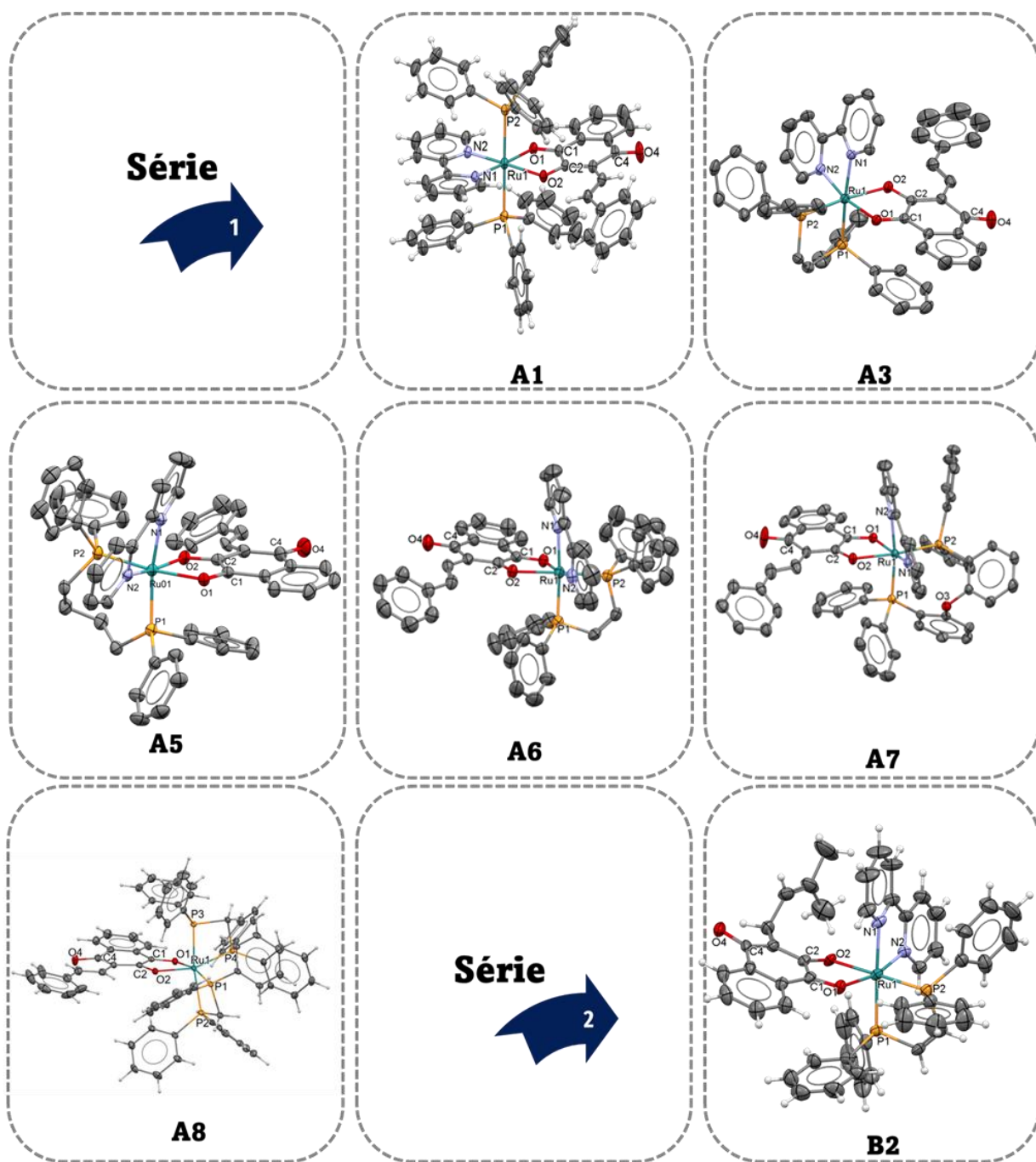
Com auxílio da técnica difração de raios X de monocristal, foi possível confirmar o arranjo estrutural dos átomos, que compõem o cerne metálico de rutênio. Todos os complexos foram cristalizados por evaporação lenta

de solvente a partir de uma mistura metanol/diclorometano e o éter etílico foi utilizado como solvente exterior. Assim foram obtidas seis estruturas cristalinas para os compostos da série 1 (A1, A3, A5, A6, A7 e A8), e uma estrutura cristalina referente ao complexo B2 da série 2, dos 12 complexos sintetizados. Na Figura 4.43 são apresentadas as representações ORTEP, obtidas para os complexos de rutênio. Na Tabela 4.2 estão dispostos os valores das distâncias de ligação e os ângulos. Os dados cristalográficos podem ser visualizados no apêndice.

Os complexos A1 e A3 cristalizaram-se no sistema cristalino triclinico, apresentando grupo espacial P-1. Os compostos A5, A6, A7 e A8 pertencem ao sistema monoclinico P2₁/n. O complexo B2 (série 2), cristalizou-se em um sistema tetragonal, do grupo espacial I-4. Com a formação do quelato os comprimentos de ligação Ru-P para os complexos não apresentaram diferenças significativas entre si, onde os valores encontrados são próximos aos compostos análogos sintetizados no grupo. Por outro lado, observa-se que os comprimentos de ligação Ru-P, com o átomo de fósforo em posição *trans* ao átomo de oxigênio (O2) do ligante naftoquinona, são menores do que aqueles onde o átomo de fósforo está *trans* posicionado ao átomo de nitrogênio da bipy. Isto ocorre, devido ao efeito *trans* que leva ao enfraquecimento da retrodoação provocado pela coordenação, tornando o átomo de fósforo com o caráter de “ligante livre” e, portanto, influenciando diretamente nas distancias de ligações¹⁰²⁻¹⁰⁴.

A partir dos dados cristalográficos o átomo de rutênio(II), encontra-se hexacoordenado apresentando uma geometria octaédrica distorcida, devido aos desvios apresentados entre os ângulos de ligação formados pelos átomos de fósforo, nitrogênio e oxigênio, conforme apresentado na Tabela 4.2.

FIGURA 4.3 - Estruturas cristalinas dos complexos da série 1 (A1, A3, A5, A6, A7 e A8) e da série 2 o complexo (B2). Por motivo de maior clareza o contra-íon PF_6^- foi omitido.

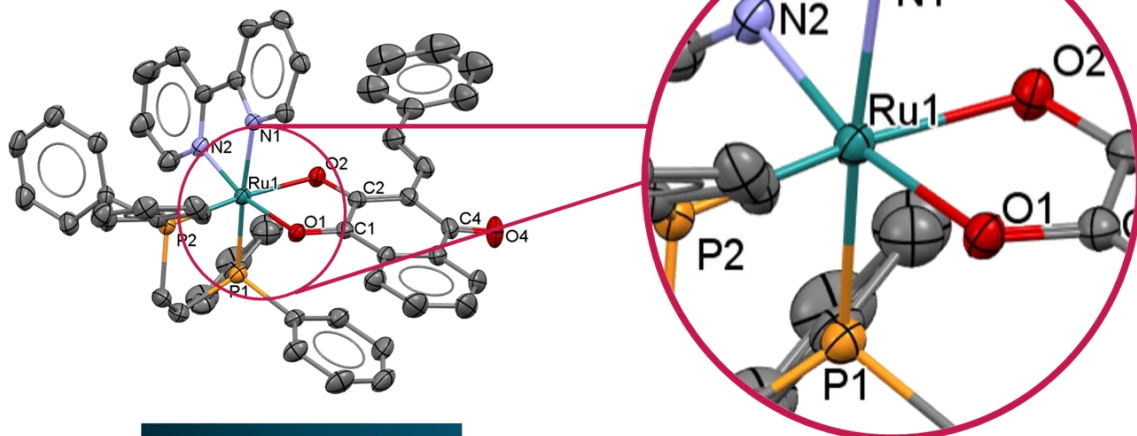


Durante o processo reacional foi observado nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ a formação de isômeros, visto que os sinais referentes aos átomos de fósforos estavam duplicados. Diante das estruturas cristalinas foi possível identificar os dois isômeros. Conforme apresentado na Figura 4.4, o ligante ocupa dois sítios de ligação, formando um quelato *via* átomos de oxigênios (O1 e O2), onde temos o primeiro isômero o átomo de fósforo *trans* posicionado átomo de oxigênio da hidroxila (O2), e o segundo isômero o átomo de fósforo encontra-se *trans* ao átomo de oxigênio da carbonila (O1). Tal comportamento já foi reportado em nosso grupo de pesquisa^{79,105}. Adicionalmente, foi observado após a coordenação um encurtamento na distância da ligação C1=O1 se comparado a ligação C2-O2 (vide Tabela 4.2), sugerindo que a ligação carbono – oxigênio (C1=O1) apresenta um caráter maior de dupla após a coordenação.

Neste caso, tanto na série 1, quanto na série 2, não foi observado efeito de ressonância entre as ligações C1=O1 e C2–O2, devido que nas estruturas dos ligantes naftoquinonas, (NQ1, NQ2, NQ3), exibem uma ligação dupla adjacente a ligação C2–O2^{105–109}.

FIGURA 4.4 - Estrutura cristalina dos complexos A3 e A5. Em destaque os dois isômeros 1 e 2. O primeiro isômero corresponde ao átomo de fósforo da fosfina (P2) encontra-se *trans* ao átomo de oxigênio (O2) e o segundo isômero o átomo de fósforo (P2) está *trans* posicionado ao átomo de oxigênio carbonílico (O1).

Isômero 1



Isômero 2

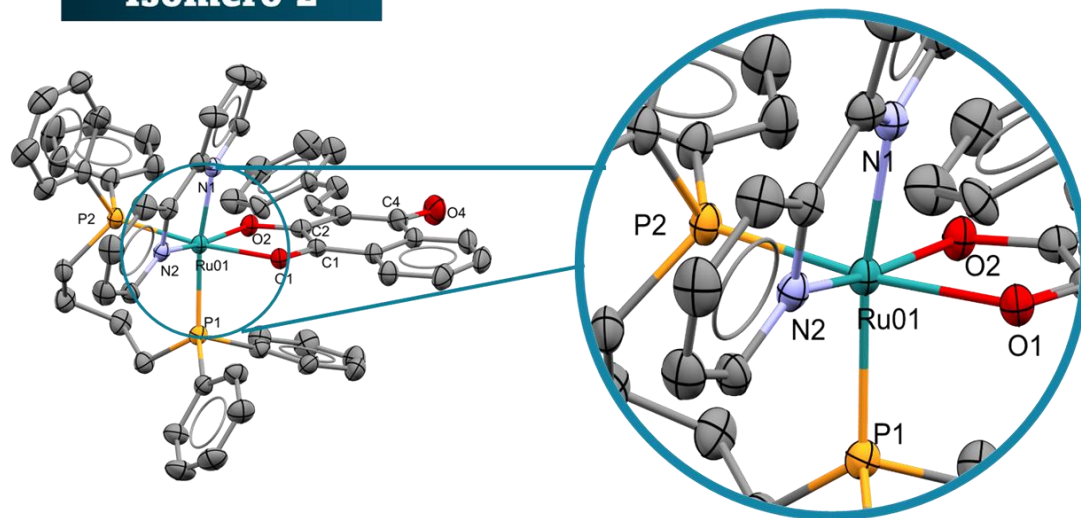


TABELA 4.2 - Principais de distância [Å] e ângulos [°] de ligação das estruturas cristalinas dos complexos da série 1 e 2.

	Comprimento de ligação [Å]						
	A1	A3	A5	A6	A7	A8	B1
Ru1-P1	2,3836(7)	2,2864(8)	2,3314(8)	2,2772(14)	2,2575(12)	2,2897(8)	2,2505(11)
Ru1-P2	2,4115(7)	2,2590(8)	2,2924(8)	2,2575(12)	2,055(3)	2,3677(8)	2,2733(12)
Ru1-P3	-	-	-	-	-	2,3386(8)	-
Ru1-P4	-	-	-	-	-	2,3086(8)	-
Ru1-O1	2,0653(15)	2,0720(19)	2,1323(19)	2,055(3)	2,157(3)	2,118(2)	2,097(3)
Ru1-O2	2,1149(15)	2,119(2)	2,0802(19)	2,157(3)	2,124(4)	2,134(2)	2,121(3)
Ru1-N1	2,0437(18)	2,108(2)	2,078(2)	2,124(4)	2,124(4)	-	2,041(4)
Ru1-N2	2,0311(19)	2,049(2)	2,0311(19)	2,049(2)	2,051(4)	-	2,109(4)
C1=O1	1,250(3)	1,256(4)	1,242(3)	1,247(5)	1,288(5)	1,260(4)	1,249(5)
C2=O2	1,291(3)	1,291(4)	1,291(3)	1,288(5)	1,234(6)	1,310(4)	1,288(6)
C4=O4	1,225(3)	1,220(4)	1,226(4)	1,234(6)	1,318(6)	1,223(4)	1,221(5)
	Ângulo (°)						
P(1)-Ru1-P(2)	179,42(2)	84,56(3)	98,54(3)	84,37(5)	84,37(5)	71,73(3)	83,70(4)
O(1)-Ru1-P(1)	88,86(5)	88,37(6)	87,65(6)	90,25(10)	90,25(10)	167,78(7)	89,87(9)
O(1)-Ru1-P(2)	90,57(5)	97,94(6)	173,42(6)	97,29(9)	97,29(9)	98,09(7)	103,48(9)
O(2)-Ru1-P(1)	87,62(5)	91,62(6)	89,22(6)	91,29(10)	91,29(10)	98,13(6)	95,74(9)
N(1)-Ru1-O(2)	178,09(7)	82,55(8)	82,30(8)	85,09(13)	85,09(13)	-	85,40(14)
N(1)-Ru1-P(1)	90,00(6)	173,99(7)	169,75(7)	100,02(15)	175,83(11)	-	177,93(12)
N(2)-Ru1-P(2)	90,25(6)	91,40(7)	86,12(6)	87,79(12)	87,79(12)	-	88,69(11)
N(2)-Ru1-P(1)	90,00(6)	100,34(7)	99,98(7)	100,02(15)	100,02(15)	-	100,01(11)
P(1)-Ru1-P(3)	-	-	-	-	-	101,11(3)	-
P(1)-Ru1-P(4)	-	-	-	-	-	92,48(3)	-

Os compostos de rutênio foram caracterizados por espectrometria de massas através do método de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo. Os espectros de massa de alta resolução obtidos para os complexos da série 1 e 2 encontram-se no apêndice. Os valores referentes ao íon molecular com razão massa/carga (m/z) estão condizentes com as estruturas catiônicas, conforme apresentando pela Tabela 4.3.

TABELA 4.3 - Valores teóricos e experimentais referente a razão m/z e seus respectivos erros experimentais para os complexos de rutênio (série 1 e 2).

	Compostos série 1	Massa teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	Erro (ppm)
A1	[C ₆₄ H ₄₉ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	1057,2256	1057,2283	2,516
A2	[C ₅₃ H ₄₁ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	917,1630	917,1652	2,355
A3	[C ₅₄ H ₄₃ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	931,17869	931,1806	2,05
A4	[C ₅₅ H ₄₅ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	945,19434	945,1961	1,86
A5	[C ₅₆ H ₄₇ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	959,20999	959,2145	4,70
A6	[C ₅₄ H ₄₁ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	929,16304	929,1656	2,75
A7	[C ₆₄ H ₄₇ N ₂ O ₄ P ₂ Ru] ⁺	1071,20490	1071,2096	4,38
A8	[C ₆₈ H ₅₅ O ₃ P ₄ Ru] ⁺	1145,2139	1145,2181	3,615
	Compostos série 2	Massa teórica (m/z)	Massa experimental (m/z)	Erro (ppm)
B1	[C ₄₆ H ₃₅ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	827,11609	827,1178	2,06
B2	[C ₅₁ H ₄₃ N ₂ O ₃ P ₂ Ru] ⁺	895,17869	895,1827	4,47
B3	[C ₅₆ H ₄₁ N ₂ O ₄ P ₂ Ru] ⁺	969,15795	968,1627	4,90
B4	[C ₆₁ H ₄₉ N ₂ O ₄ P ₂ Ru] ⁺	1037,22055	1037,2242	3,51

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada de forma complementar as demais técnicas contribuindo para caracterização dos complexos, visto que as atribuições das bandas foram realizadas tendo como base

os espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes livre e dados da literatura¹¹⁰. De acordo com os espectros de infravermelho dos ligantes naftoquinonas, observa-se modos vibracionais característicos dos grupos funcionais da molécula, onde na região de alta energia tem uma banda entre 3500 e 3100 cm^{-1} referente as vibrações de estiramento do grupo OH que por sua vez, não aparece nos espectros dos complexos sintetizados, indicando que houve a coordenação via átomo de oxigênio hidroxílico do ligante naftoquinona, no qual encontra-se desprotonado e coordenado, como pode ser visualizado nas Figuras 4.5 e 4.6. Na Tabela 4.4 estão dispostos as atribuições tentativas das principais bandas dos compostos e dos ligantes.

FIGURA 4.5 - Espectro vibracional na região do infravermelho dos ligantes naftoquinonas NQ1 (preto) e da série 2 NQ2 (azul) e NQ3 (verde) em pastilha de KBr, na região de 3500 - 400 cm^{-1} .

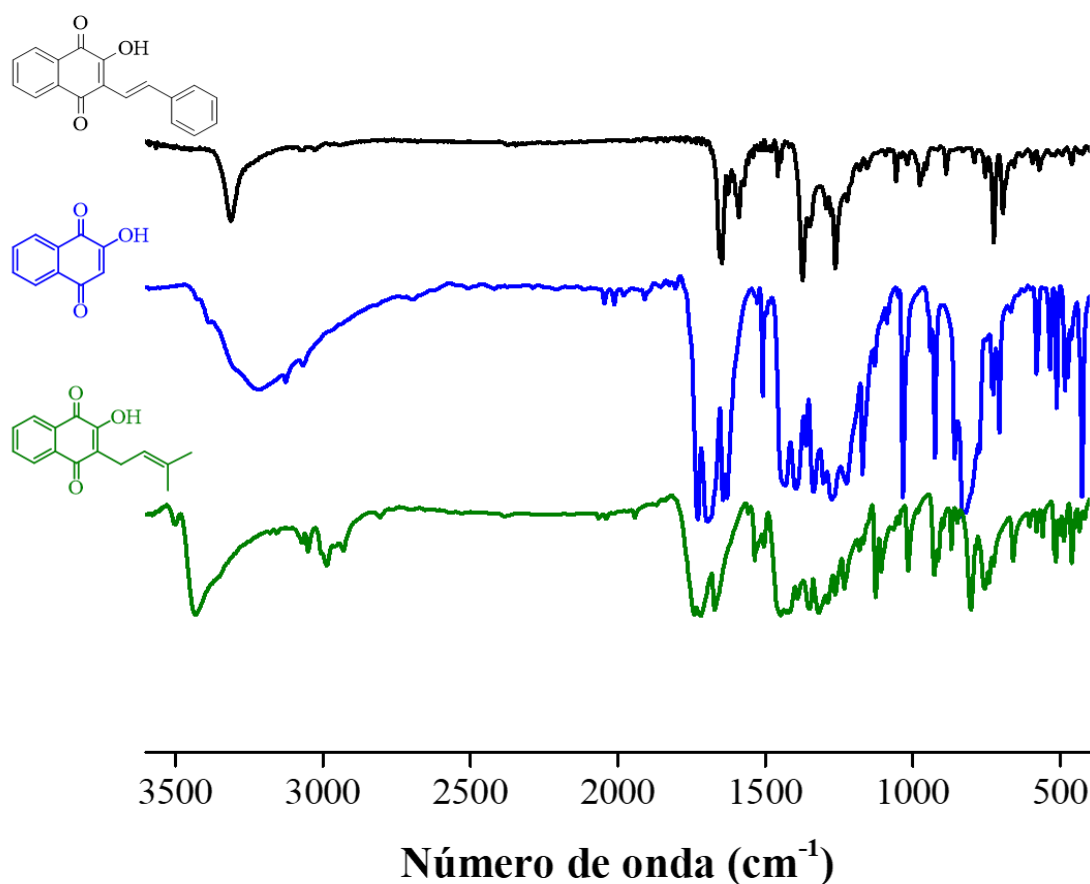
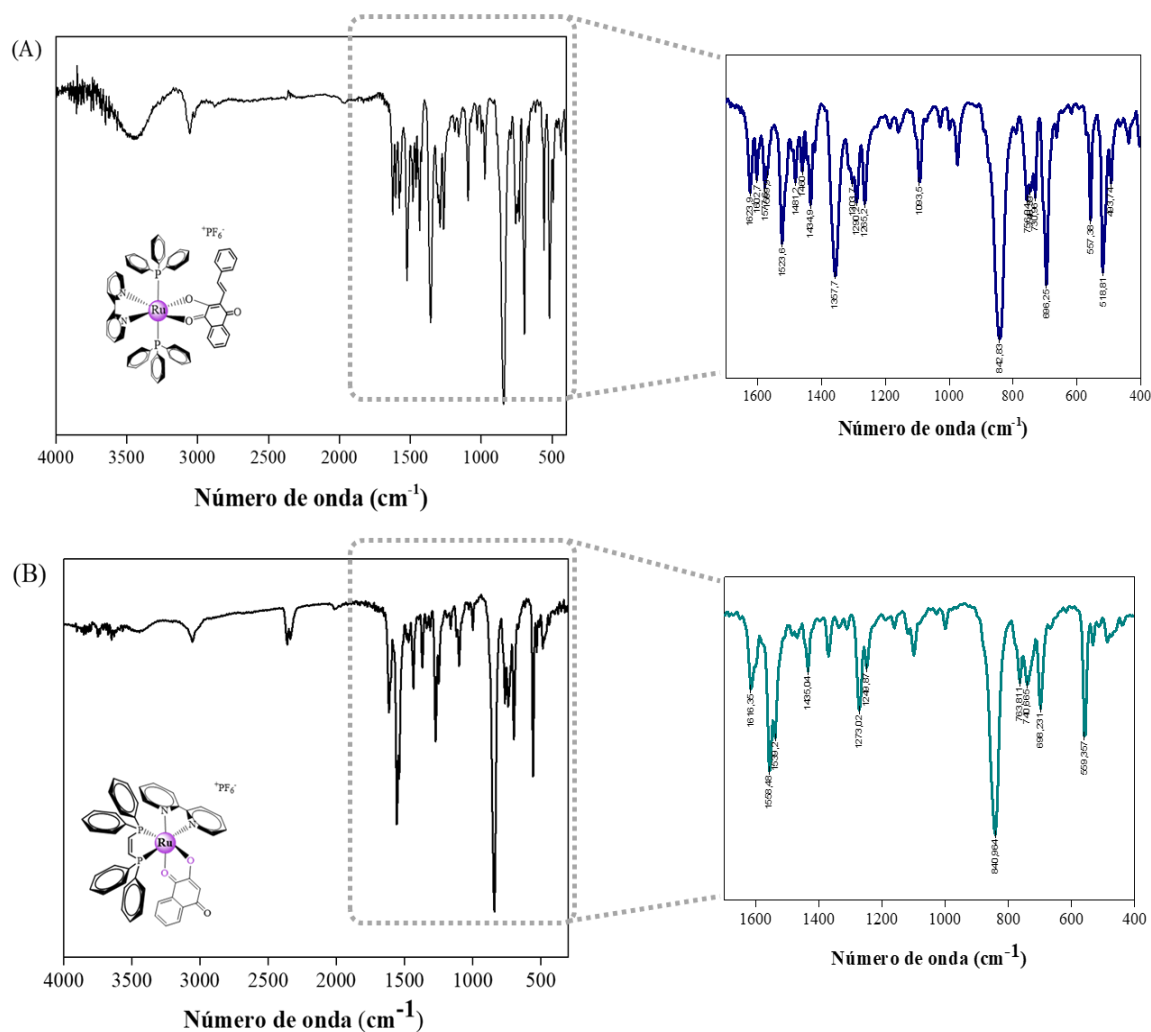


FIGURA 4.6 - Espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho dos complexos da série 1 (A) Complexo A1 e da série 2 (B) Complexo B1, na região de 4000 a 400 cm^{-1} e em destaque a região de 1600 a 400 cm^{-1} em pastilhas de KBr.



Na região espectral entre 3010 e 2700 cm^{-1} são características das deformações simétricas e assimétricas da ligação $\nu(\text{C-H})$, oriundos dos anéis aromáticos dos ligantes fosfínicos, biperidínicos e naftoquinonas. Além disso, as naftoquinonas apresentam modos vibracionais importantes na região entre 1640 e 1670 cm^{-1} , correspondente aos grupos carbonílicos C1=O1 e C4=O4 , respectivamente. Com a formação da nova ligação ao centro metálico, os modos vibracionais referentes as carbonilas C1 e C4 são observadas em números de onda

menores, quando comparados aos ligantes livres. Tal comportamento, é devido à deslocalização da densidade eletrônica provocada pela retrodoação, uma vez que ocorre uma redução do caráter de dupla ligação (carbono-oxigênio), sendo mais pronunciado na carbonila C1=O1, pois está envolvida na coordenação. Com relação à banda atribuída ao estiramento $\nu(\text{C2-O2})$, foi observada em maiores frequências, apresentando um aumento no número de onda de aproximadamente 40 cm^{-1} , indicando que houve um fortalecimento da ligação (metal-ligante). Tal aumento é esperado, uma vez que ocorre uma alteração na densidade eletrônica após a coordenação do ligante naftoquinona ao centro metálico^{105,111,112}.

TABELA 4.4 - Atribuição tentativa das principais bandas na região (1700 até 400 cm^{-1}) nos espectros de infravermelho para os ligantes livre e os complexos de rutênio da série (1) e (2).

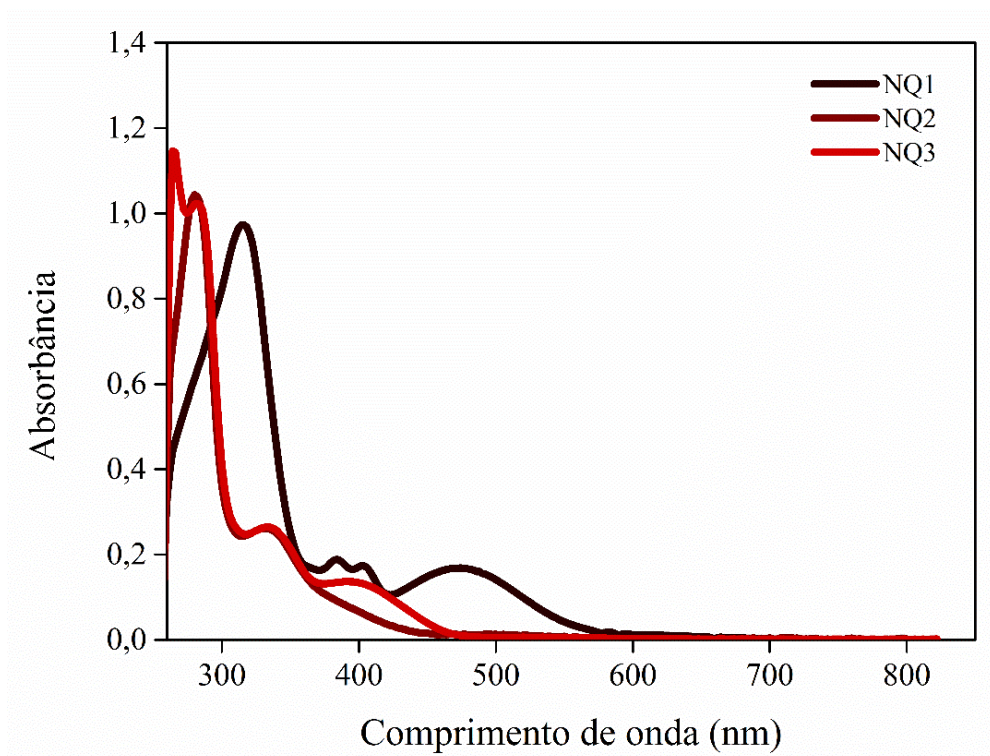
Compostos	$\nu(\text{C1=O1})$	$\nu(\text{C4=O4})$	$\nu(\text{C2-O2})$	$\nu(\text{P-F})$	$\delta(\text{P-F})$
NQ1	1640(F)	1659(F)	1050(m)	-	-
NQ2	1641(F)	1678(F)	985(m)	-	-
NQ3	1639(F)	1660(F)	1047(m)	-	-
A1	1604(f)	1622(f)	1091(f)	840(F)	557(m)
A2	1603(f)	1619(f)	1098(f)	842(F)	558(m)
A3	1600(f)	1621(f)	1098(f)	840(F)	556(m)
A4	1603(f)	1622(f)	1096(f)	841(F)	556(m)
A5	1602(f)	1620(f)	1097(f)	840(F)	556(m)
A6	1601(f)	1618(f)	1099(f)	840(F)	557(m)
A7	1602(f)	1628(f)	1091(f)	843(F)	557(m)
A8	1579(f)	1625(f)	1099(f)	840(F)	556(m)
B1	1557(f)	1615(f)	994(f)	840(F)	554(m)
B2	1541(f)	1606(f)	1099(f)	840(F)	555(m)
B3	1554(f)	1611(f)	1091(f)	840(F)	556(m)
B4	1550(f)	1611(f)	1071(f)	840(F)	557(m)

F = forte; f = fraca; m = média

Na região de 1500 e 1000 cm^{-1} apresentam modos vibracionais, característicos aos estiramentos das ligações $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}-\text{N})$ ¹¹³. As bandas em 840 e 555 cm^{-1} presente em todos os complexos, refere-se aos estiramentos $\nu(\text{P}-\text{F})$ do contra íon PF_6^- . Todos os compostos apresentaram um comportamento semelhante, e os seus espectros estão dispostos no apêndice.

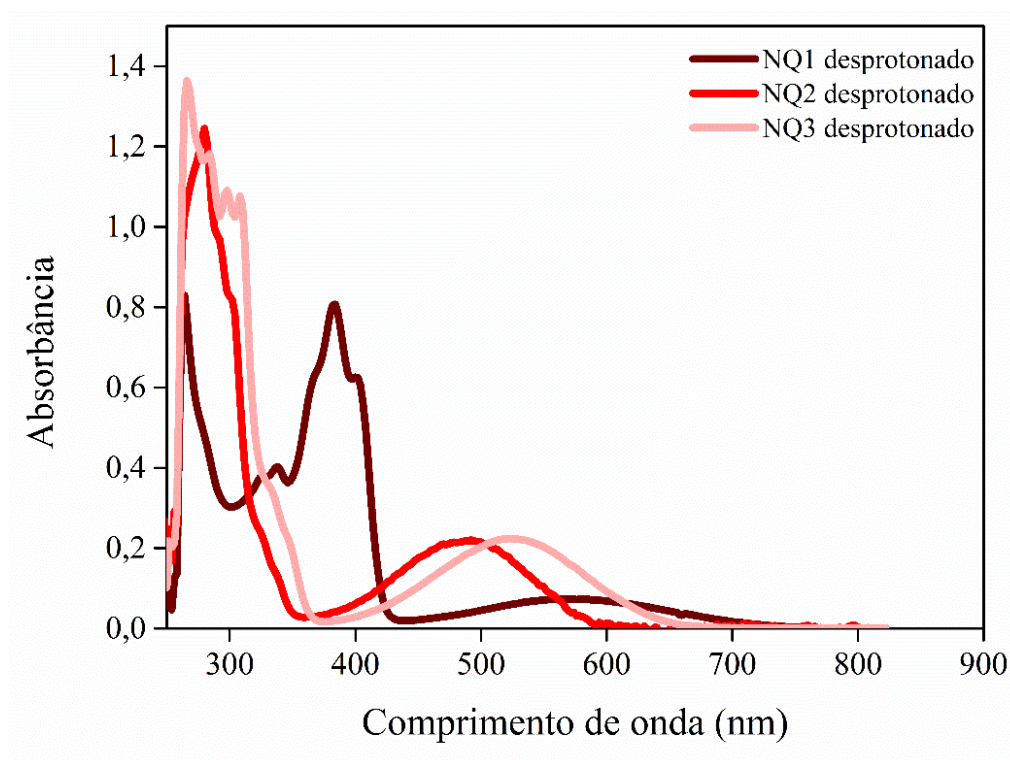
A fim de investigar as transições eletrônicas dos novos complexos e dos ligantes os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta visível foram registrados a partir de soluções em dimetilsulfóxido. Na Figura 4.7 pode-se observar os espectros dos ligantes naftoquinonas, onde são observadas bandas intensas centradas na região de (260-300 nm) que pode ser atribuída às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos das naftoquinonas e do grupo estiril (NQ1). As bandas atribuídas às transições $n \rightarrow \pi^*$, são observadas na região entre (300-500 nm), atribuída a transferência de carga intramolecular (ICT, do inglês Intramolecular Charge Transfer)¹¹³⁻¹¹⁵.

FIGURA 4.7 - Espectros de absorção na região do ultravioleta visível dos ligantes naftoquinonas em dimetilsulfóxido.



Os espectros de absorção UV-vis dos ligantes foram registrados após a adição da base trietilamina (Et_3N), e as mudanças espectrais são apresentadas na Figura 4.8. Nota-se que houve uma alteração no perfil dos espectros com a desprotonação dos ligantes, onde observa-se o surgimento de uma banda larga em torno de 574 nm (NQ1, $\epsilon = 1460 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$), 490 nm (NQ2, $\epsilon = 4340 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$) e 526 nm (NQ3, $\epsilon = 4475 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$), atribuído as transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos carbonílicos das quinonas. Tal efeito observado é presumivelmente da intensificação da transferência de carga intramolecular no ligante, que contribuiu para o surgimento dessa banda¹¹⁵⁻¹¹⁷.

FIGURA 4.8 - Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para os ligantes naftoquinonas após a adição da base (Et_3N) em, dimetilsulfóxido.



Após a coordenação do ligante os espectros de UV-vis dos complexos apresentam absorções na região de alta energia, que são atribuídas as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ referente aos anéis aromáticos presentes nos ligantes fosfínicos, bipyridínicos e dos ligantes naftoquinonas, que contribuem para o aumento da intensidade da banda. As bandas de transferência metal ligante

(MLCT), correspondem às transições dos orbitais $d\pi_{Ru} \rightarrow 3p\sigma^*$ da fosfina e $d\pi_{Ru} \rightarrow p\sigma^*$ do ligante bipyridínico aparecem sobrepostas com as bandas de transferência de carga intramolecular dos ligantes. E por fim as transições $d-d$ são encobertas pela transferência de carga metal ligante, sendo observadas na região de menor energia^{25,78,105}. Devido à semelhança dos complexos da série 1 e 2 na Figura 4.9 são apresentados os espectros eletrônicos de UV-vis para o complexo A1 (série 1) e complexo B1 (série 2) e na Tabela 4.5 e 4.6 estão exibidos os valores de absorvidade molar para os complexos da série 1 e da série 2.

FIGURA 4.9 - Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para os complexos série 1 (A1) e série 2 (B2), com seus respectivos ligantes em DMSO.

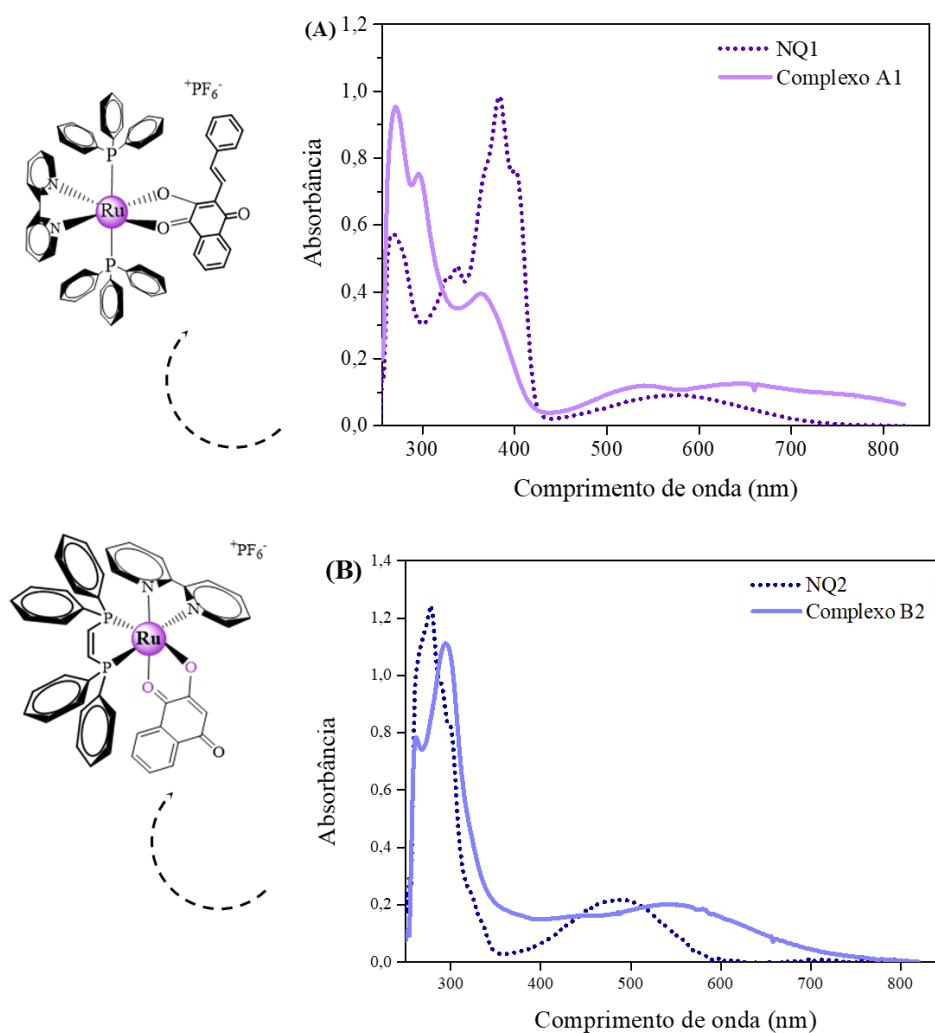


TABELA 4.5 - Dados dos comprimento de onda (λ , nm) de absorvidade molar (ϵ , mol⁻¹ cm⁻¹ L) e das tentativas de atribuições das bandas dos complexos de rutênio série 1.

Compostos Série 1	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L)	Transição
NQ1	314	5,01 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	380	8,23 x 10 ³	ICT
	402	8,18 x 10 ³	ICT
	472	9,82 x 10 ³	$n \rightarrow \pi^*$
A1	270	5,28 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	298	4,23 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	364	1,26 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	540	6,88 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	658	6,05 x 10 ³	MLTC, $d-d$
A2	298	7,51 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	360	4,15 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	516	1,01 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	717	1,05 x 10 ³	MLTC, $d-d$
A3	298	4,04 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	356	2,42 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	520	5,44x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	706	6,17 x 10 ³	MLTC e $d-d$
A4	300	4,92 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	362	2,88 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	528	6,80 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	716	7,03 x 10 ³	MLTC e $d-d$
A5	300	4,53 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	360	2,77 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	538	6,37 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	716	6,50 x 10 ³	MLTC e $d-d$
A6	300	4,28 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	356	2,95 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	510	6,37 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	700	7,43 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi$, $d-d$
A7	298	4,21 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	358	2,47 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	542	5,54 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	698	6,57 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi$, $d-d$
A8	268	5,42 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	362	3,20 x 10 ⁴	ICT, $n \rightarrow \pi^*$
	472	4,68 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$ e MLTC
	700	6,75 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi$, $d-d$

TABELA 4.6 - Dados dos comprimentos de onda (λ , nm) de absorvidade molar (ϵ , mol⁻¹ cm⁻¹ L) e das tentativas de atribuições das bandas dos complexos de rutênio série 2.

Compostos Série 1	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L)	Transição
B1	260	3,34 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	296	4,69 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	544	8,55 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$, MLTC, <i>d-d</i>
B2	300	3,68 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	444	5,46 x 10 ⁴	ICT, $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi$
	560	6,67 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$, MLTC, <i>d-d</i>
B3	260	2,59 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	296	3,80 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	550	5,58 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$, MLTC, <i>d-d</i>
B4	298	3,70 x 10 ⁴	$\pi \rightarrow \pi^*$
	434	4,55 x 10 ⁴	ICT, $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi$
	572	5,31 x 10 ³	ICT, $n \rightarrow \pi^*$, MLTC, <i>d-d</i>

Os complexos de rutênio(II) sintetizados neste trabalho foram caracterizados pela técnica de ressonância magnética nuclear 1D e 2D de ³¹P{¹H}, ¹H, ¹³C{¹H}, COSY¹H-¹H, HSQC ¹³C-¹H e HMBC ¹³C¹-¹H.

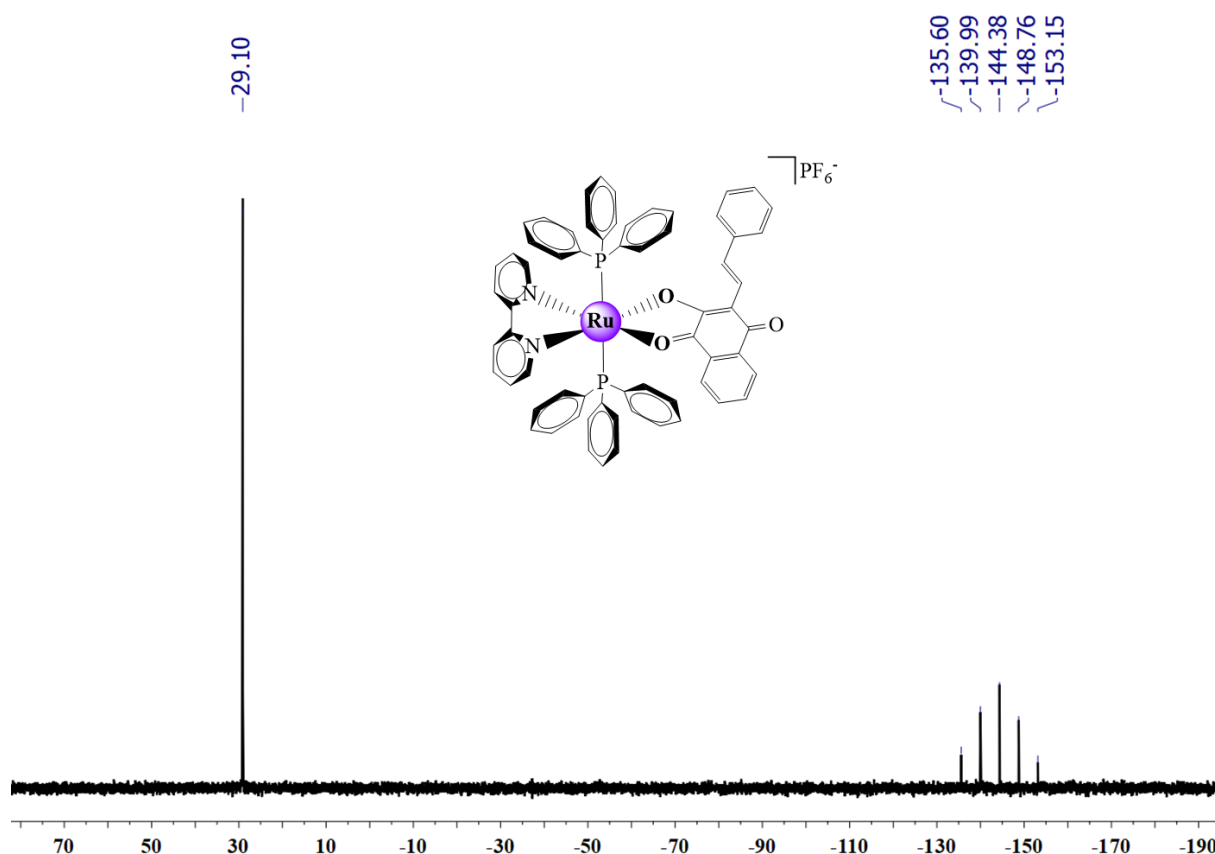
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ³¹P{¹H} é uma ferramenta essencial no estudo de elucidação estrutural de compostos contendo ligantes fosfínicos, uma vez que a partir dos dados de deslocamentos químicos e constante de acoplamento é possível elucidar o arranjo estereoquímico dos ligantes na esfera de coordenação do metal em estudo.

As reações aqui apresentadas para os complexos da série 1 e 2, foram acompanhadas por RMN de ³¹P{¹H}. De modo geral, após a coordenação dos ligantes naftoquinonas, os sinais referentes aos átomos de fósforos foram deslocados para regiões mais desblindadas em comparação com os respectivos precursores. Isto se deve, pela substituição dos ligantes cloridos que são σ e π

doador, pelos átomos de oxigênio que tem o caráter π -doador. Todos os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos sintetizados encontra-se no apêndice.

O espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A1, exibiu um singlete em torno de 29,00 ppm, evidenciando que os átomos de fósforos são equivalentes entre si, ou seja, os ligantes fosfínicos da trifenilfosfina (P1 e P2) encontram-se *trans* posicionado entre si. Isto ocorre devido aproximação entre os dois átomos de fósforos, acarretando a sobreposição dos sinais sendo observado apenas um único sinal e o deslocamento químico em -144 ppm correspondem aos átomos de fósforo do contra íon PF_6^- , conforme mostrado na Figura 4.10.

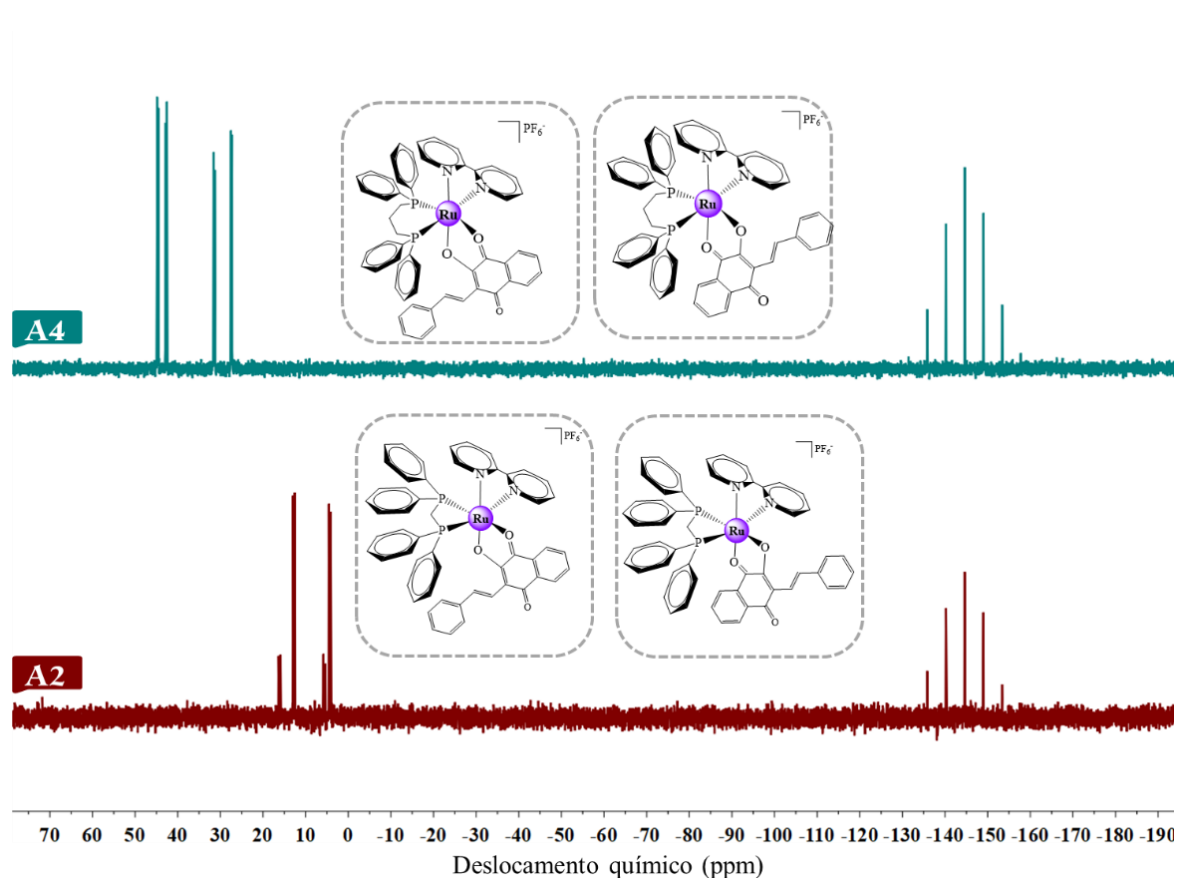
FIGURA 4.10 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A1 obtido em CH_2Cl_2 com capilar de D_2O .



No caso dos complexos sintetizados a partir do precursor do tipo *cis*-[RuCl₂(P-P)(bipy)], esperava-se a formação de dois dubletos, onde o átomo de fósforo encontra-se *trans* ao nitrogênio da bipyridina e outro átomo de fósforo *trans* posicionado ao átomo de oxigênio. No entanto, o produto da reação exibiu quatros dubletos, conforme apresentado na Figura 4.11.

Tais observações podem ser explicadas admitindo-se a formação de dois isômeros, no qual temos uma espécie coordenado via átomo de oxigênio da hidroxila *trans* ao átomo fósforo da fosfina, e o outra espécie isomerizando para o oxigênio da carbonila da naftoquinona *trans* ao átomo de fósforo. Tal comportamento é decorrente da diferenciação do ambiente químico dos átomos de fósforos, uma vez que os átomos de oxigênios coordenados são quimicamente diferentes, resultando na obtenção de quatros dupletos no espectro de RMN ³¹P{¹H}. Comportamento semelhante foi observado em nosso grupo de pesquisa, nos quais complexos similares Ru(Lap)(dppe)(bipy)]PF₆ e [Ru(Lap)(dppb)(bipy)]PF₆, onde, dppe = 1,2-bis(difenilfosfina)etano e dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano também apresentaram este tipo isômeros. Contudo, foi possível isolar apenas um dos isômeros por diferença de solubilidade existente entre eles. Além disso, a partir da estrutura cristalina obtida por difração de raios X e pelos deslocamentos químicos de RMN ³¹P{¹H}, de tais compostos foi possível comprovar que o isômero formado mais estável, é qual encontra-se com o átomo de oxigênio da hidroxila *trans* ao átomo de fósforo da bifosfina, o que corrobora com a elucidação estrutural dos complexos sintetizados.

FIGURA 4.11 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos compostos A2 e A4 em CH_2Cl_2 (D_2O).



Na Tabela 4.7 estão sumarizados os valores de deslocamentos químicos e constante de acoplamento dos complexos da série 1 e 2, os dubletos nas regiões mais blindadas correspondem aos átomos de fósforos que estão *trans* posicionado aos átomos de nitrogênio da bipyridina e os dubletos com maior deslocamento químico correspondem ao fósforo *trans* aos átomos de oxigênio da hidroxila dos ligantes naftoquinonas. O mesmo comportamento foi observado para os compostos da série 2.

TABELA 4.7 - Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (Hz) dos complexos da série 1 e 2 obtidos no RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

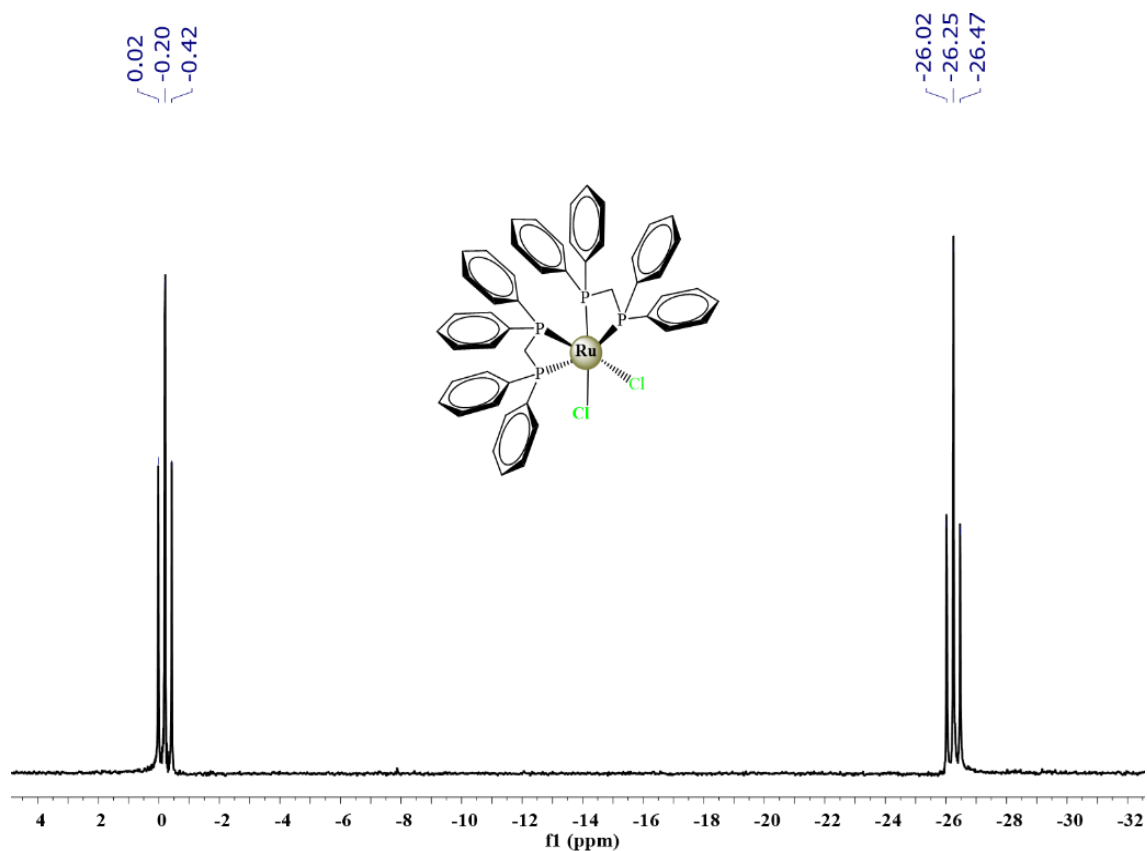
Complexos Série 1	(δ) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^2\text{J}_{\text{P-P}}$ (Hz)
A1	29,10 (s)	--
A2	16,36 (d) e 5,61(d)	73,6
A3	12,95 (d) e 4,54 (d)	64,7
A4	76,86 (d) e 72,48 (d)	15,0
A5	44,85 (d) e 31,58 (d)	45,6
A6	42,80 (d) e 27,53 (d)	41,1
A7	48,17 (d) e 44,06 (d)	33,1
A6	78,53 (d) e 76,59 (d)	9,0
A7	44,79 (d) e 32,37 (d)	32,5
Complexos Série 1	(δ) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^2\text{J}_{\text{P-P}}$ (Hz)
B1	82,52 (d) e 81,02 (d)	13,5
B2	78,80 (d) e 76,50 (d)	9,7
B3	78,38 (d) e 77,01(d)	9,2
B4	48,35 (d) e 35,53 (d)	36,8
B5	44,72(d) e 2,20 (d)	31,5
B6	48,37 (d) e 35,41 (d)	35,6
B7	44,64 (d) e (32,73 (d)	32,6

De acordo com os valores de deslocamento químicos disposto na Tabela 4.7, o complexo A2 apresenta o menor deslocamento químico. Isso ocorre devido o anel de quatro membro formado entre o metal e a bifosfina (P-Ru-P), confirmando o efeito de cone que direciona o deslocamento químico para compostos contendo fosfinas como ligantes. Como existe apenas um átomo de carbono entres os fósforos e pelo menor ângulo de mordida (do inglês *bite angle*), consequentemente deixando os átomos de fósforos mais protegidos. Os elevados valores de deslocamentos químicos para os complexos A3 e A6, é devido a fosfina

e o rutênio formar um anel de cinco membros, influenciando em um alto grau de desblindagem dos átomos devido ao efeito anisotrópico.

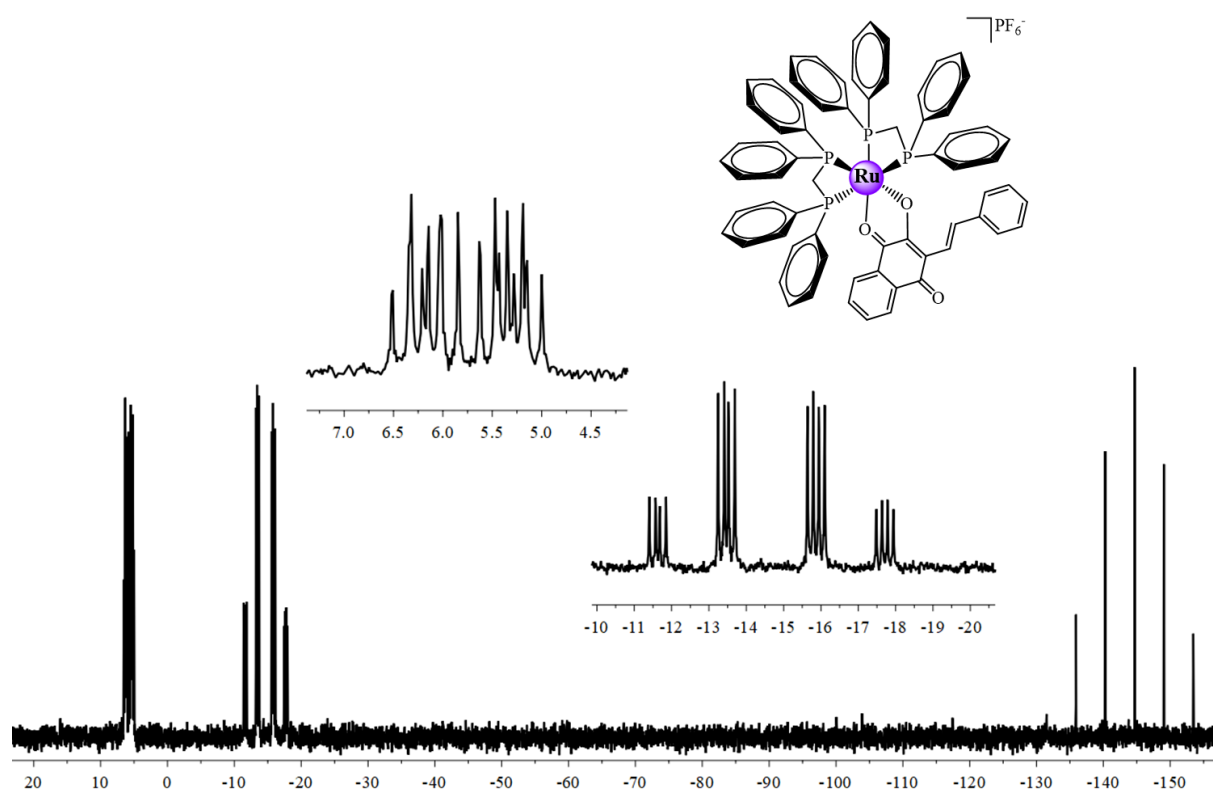
O espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A8, apresenta um grau de complexidade maior que os espectros dos complexos descrito anteriormente. No caso do espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$, apresentam dois tripletos em (-0,15 e -26,14 ppm, $^3J_{\text{P-P}} = 36,5$ Hz) o que é um padrão típico de bifosfinas na posição *cis* a dois ligantes iguais na esfera de coordenação. Como os átomos de fósforos P_1 e P_2 estão em um ambiente quimicamente e magneticamente iguais, gerando assim dois tripletos (Figura 4.12).

FIGURA 4.12 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.



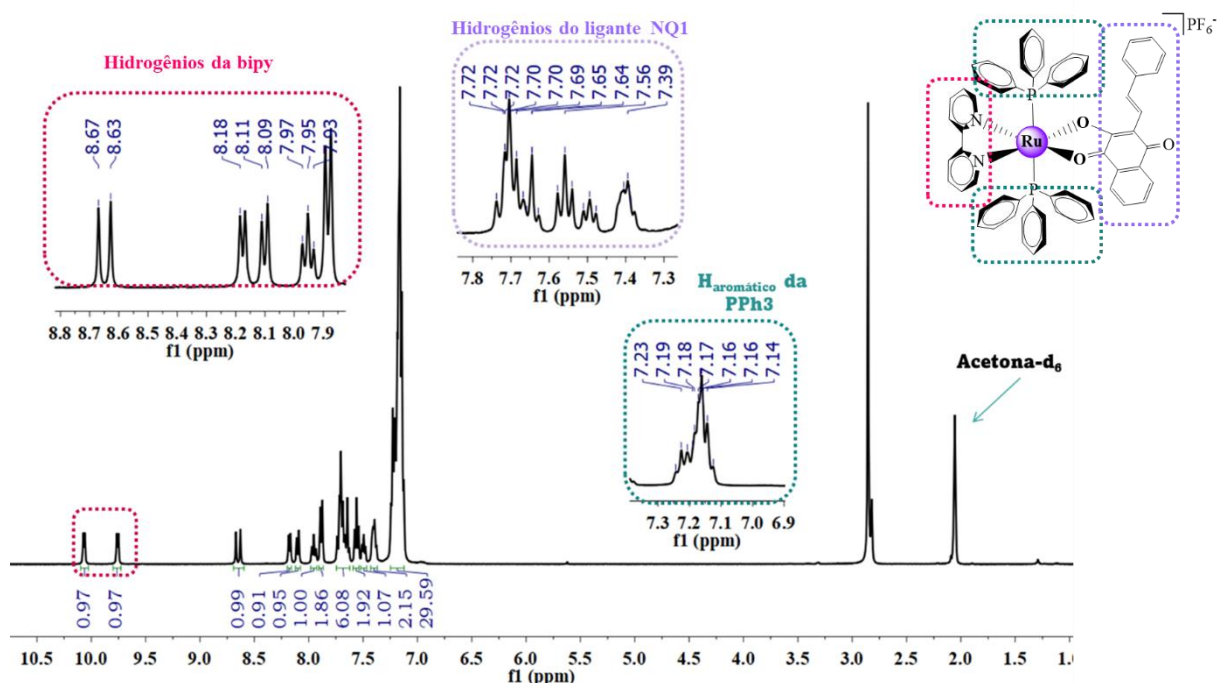
Com a coordenação do ligante NQ1 houve um desdobramento dos sinais referentes aos átomos de fósforo, neste caso os átomos identificados como P_A , P_B , P_M , P_X estão em um ambiente magneticamente e quimicamente diferentes, originando um sistema de duplo duplo dubleto (ddd), devido ao acoplamento dos átomos de fósforo, por exemplo, o fósforo P_A acopla com fósforo vizinho P_B gerando um sinal que se desdobra em dois, e assim sucessivamente, como observado nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (Figura 4.13).

FIGURA 4.13 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A8 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.



Os espectros de RMN ^1H e RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos foram obtidos em Acetona- d_6 e as análises das integrais relativa mostraram concordâncias com as estruturas propostas. Na Figura 4.14 é ilustrado o espectro de RMN ^1H do complexo A1.

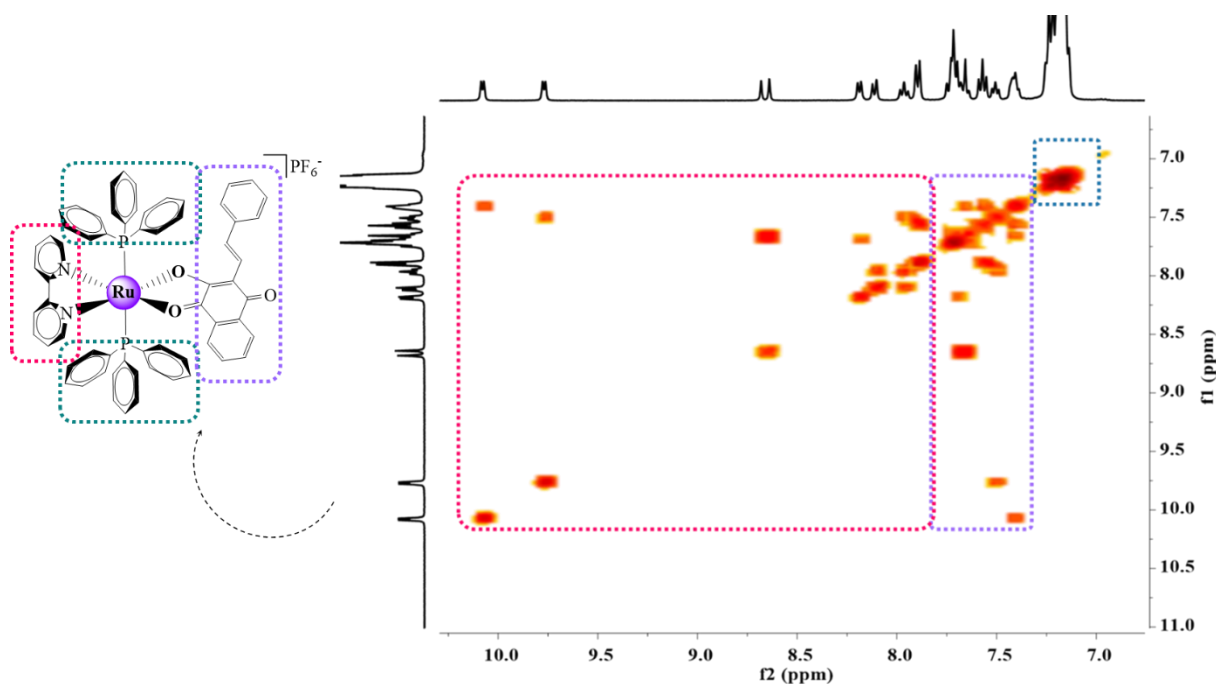
FIGURA 4.14 - Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo A1 em acetona- d_6 . Em destaque os conjuntos de sinais exibidos pelo complexo.



Os espectros dos demais complexos (série 1 e 2) podem ser observados na seção apêndice. Com a coordenação, observou-se a ausência do sinal do hidrogênio referente ao grupo funcional da hidroxila em todos os espectros dos compostos sintetizados, sendo que no ligante livre aparece em torno de 10,07 ppm, indicativo que o ligante encontra-se desprotonado observação essa, já confirmada por outras técnicas descritas anteriormente.

A análise dos espectros de RMN ^1H dos complexos sintetizados não permitiu atribuição para cada hidrogênio específico, visto que apresentavam vários sinais sobrepostos, sendo assim as atribuições foram divididas em regiões dos átomos hidrogênios aromáticos da bipyridina e os hidrogênios dos anéis aromáticos das fosfinas e do ligante, que são visualizados no mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (Figura 4.15).

FIGURA 4.15 - Mapa de correlação COSY (^1H - ^1H) obtido para o complexo A1, em acetona- d_6 . Em destaque os conjuntos de sinais exibidos pelo complexo.

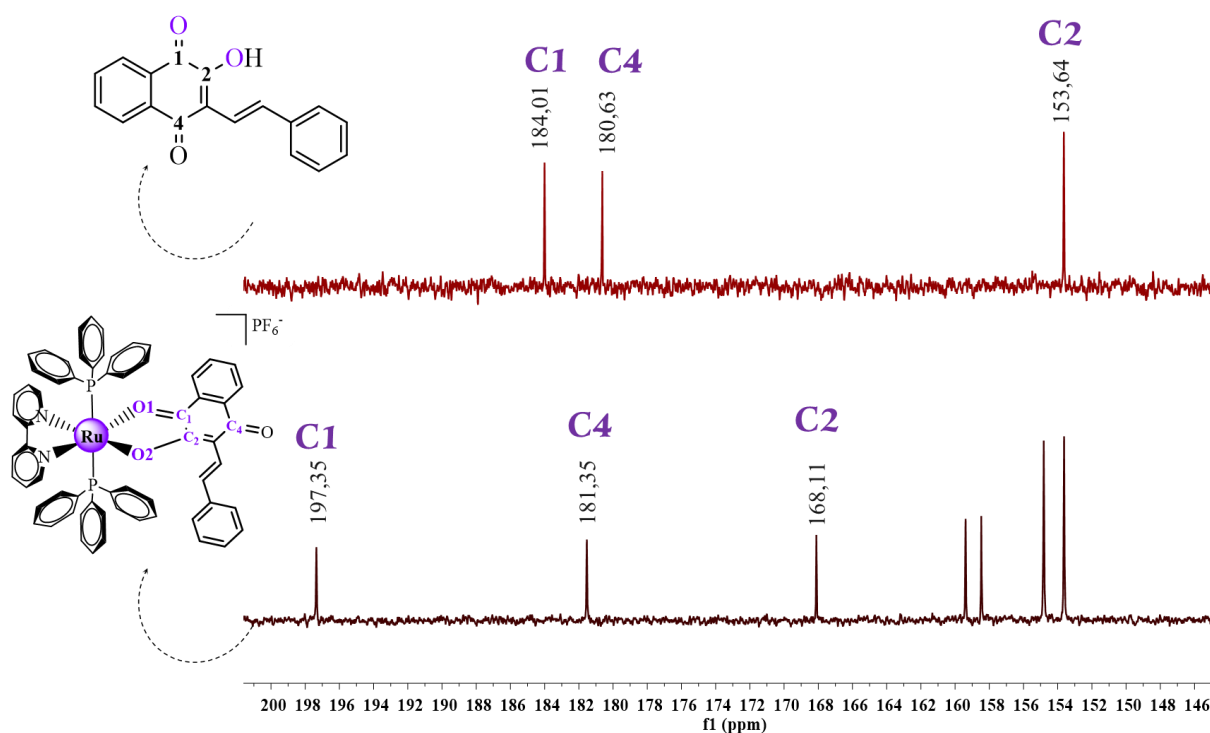


O valor das integrais estão de acordo com a estruturas esperadas, onde os sinais mais desblindados na região de 8,67 - 7,93 ppm são atribuídos aos hidrogênios aromáticos da bipyridina, o conjunto de sinais na região 7,72 - 7,39 ppm refere-se aos hidrogênios aromáticos e vinílico do ligante NQ1. Os hidrogênios dos grupos fenilas da trifenilfosfina acoplam entre si, sendo observados na região de 7,23 - 7,11 ppm. Ressaltando que não foi possível atribuir individualmente os hidrogênios devido a sobreposição dos sinais.

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos novos complexos também apresentaram regiões com sinais sobrepostos o que dificulta a atribuição individual. No entanto, os deslocamentos químicos referente aos carbonos das carbonilas C1=O1 e C4=O4, bem como o grupo C2-O2, fornece mais informação a respeito da coordenação do ligante, ao centro metálico. Neste caso, avaliou-se os deslocamentos químicos antes e após a coordenação. Como mostrado na Figura 4.16, observa-se que os carbonos quaternários C1 e C2 encontram-se em uma região de maior frequência, quando comparados com o ligante livre. Essa

diferença é decorrente da diminuição de densidade eletrônica com a coordenação, uma vez que C1 e C2 estão ligados aos oxigênios O1 e O2 que participam ativamente na coordenação, enquanto, que para C4 não houve um deslocamento tão pronunciado visto que não participa diretamente na coordenação ao centro metálico. Os resultados obtidos corroboram com outros complexos similares descrito na literatura^{60,78,79,118}. Todos os espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ referentes aos complexos série 1 e 2 estão apresentados no apêndice.

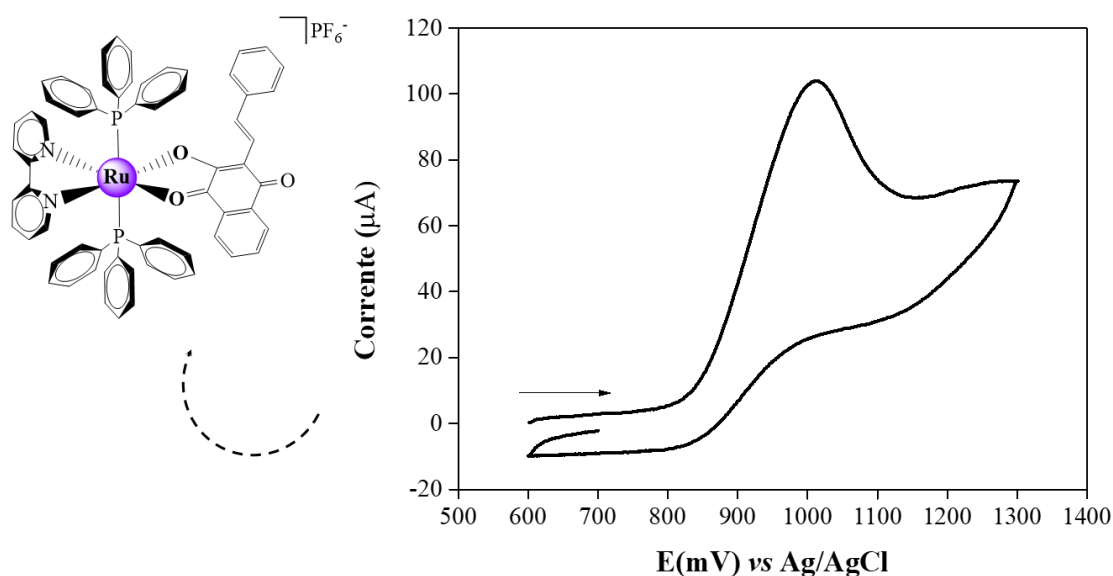
FIGURA 4.16 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtido para o complexo A1 e ligante NQ1 em acetona- d_6 . Em destaque os conjuntos de sinais exibidos pelo complexo e o ligante NQ1.



O comportamento eletroquímico dos compostos sintetizados, foram avaliados empregando a técnica de voltametria cíclica (VC), que forneceu informações a respeito da mudança da densidade eletrônica do rutênio após a coordenação com os respectivos ligantes e além de fornecer características das propriedades receptores e doadoras dos ligantes. Na Figura 4.17 é mostrado o

voltamograma do composto A1 em solução de diclorometano (0,1 mol/L de PTBA). Os valores de potenciais de oxidação dos complexos da série 1 e 2 são apresentados na Tabela 4.8. Os voltamogramas para cada complexo de rutênio podem ser encontrados no apêndice.

FIGURA 4.17 Voltamograma cíclico do complexo A1 (série 1), em CH_2Cl_2 (0,1 mol L^{-1} PTBA).



Como observado na Tabela 4.8, os valores de potencial de oxidação dos novos complexos foram observados em regiões mais positivas, quando comparado aos precursores fosfínicos⁸⁷. Isto resulta em uma maior estabilidade acrescida da coordenação dos ligantes ao cerne metálico, visto que os ligantes apresentam propriedades doadoras fracas, quando comparados com os ligantes cloridos que são bons doadores σ e π , fazendo com que ocorra uma diminuição da densidade eletrônica do rutênio tornando mais difícil sua oxidação¹¹⁹. Todos os complexos apresentam processo irreversível, exceto os complexos B3 e B4 que observa um processo *quasi*-irreversível, atribuído ao par redox $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$. Tais processos já foram relatados por Oliveira et al⁷⁸.

TABELA 4.8 Valores dos potenciais de oxidação para os complexos de rutênio em diclorometano (PTBA 0,1 mol/L).

Complexos	E _{ox} (mV)	Complexos	E _{ox} (mV)	E _{red} (mV)
A1	1016	A7	1170	-
A2	1104	A8	1233	-
A3	1118	B1	1279	-
A4	1159	B2	1361	-
A5	1159	B3	1322	1127
A6	1137	B4	1276	1204

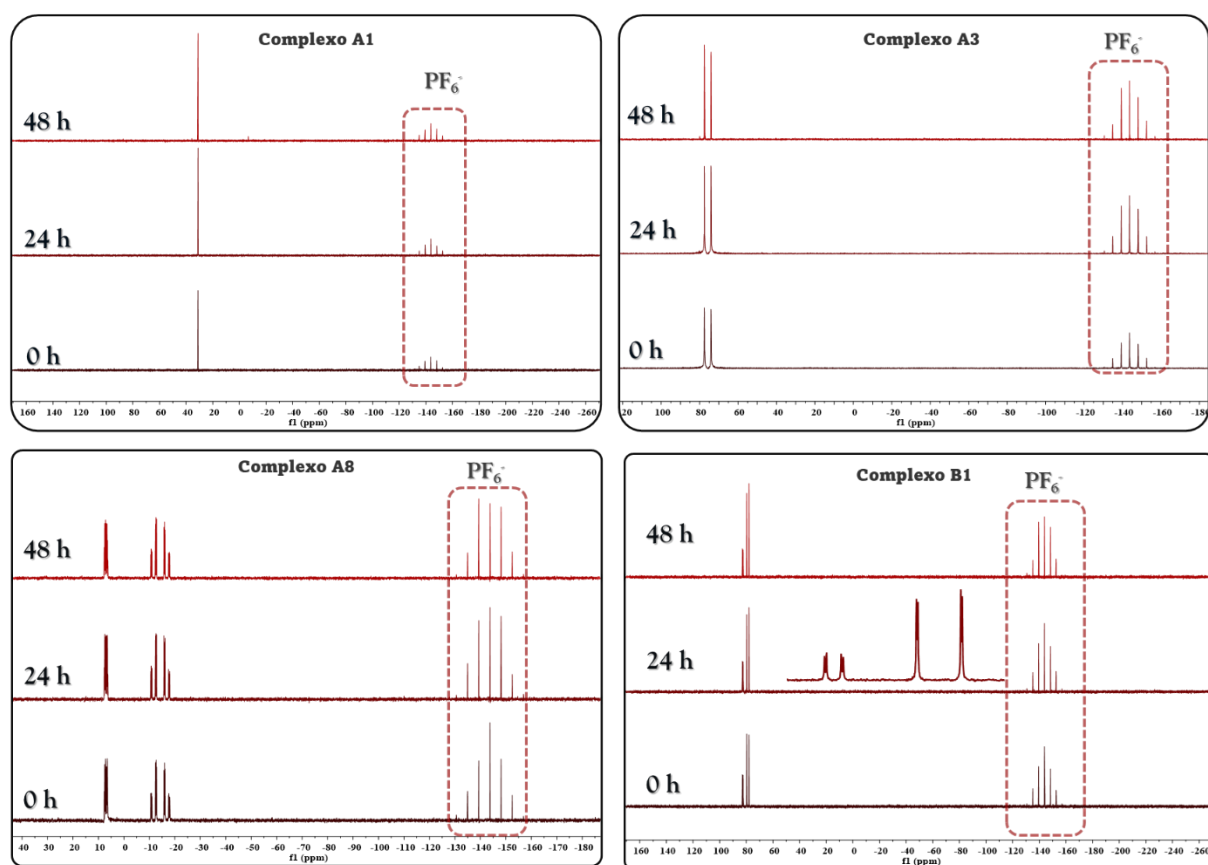
O composto com trifenilfosfina (complexo A1), é o que apresenta o menor valor de potencial de oxidação. Neste caso, há uma competição pela densidade eletrônica do centro metálico decorrente do efeito *trans*, que dificulta as interações de retrodoação, deixando o rutênio mais rico de elétrons. Por outro lado, o complexo A8 apresenta duas bifosfinas que um forte ligante π -aceptor, fazendo com que o rutênio fique mais deficiente de elétrons, necessitando de uma maior energia para a oxidação do centro metálico^{23,78,120,121}.

4.2 Estabilidades dos complexos de rutênio

A estabilidade é um fator importante para qualquer candidato a fármaco, uma vez que a instabilidade dos compostos pode influenciar na perda de atividade, aumento da toxicidade e alterações na biodisponibilidade. Neste sentido faz-se necessário ter conhecimento da estabilidade dos novos candidatos a metalofármacos. Assim a técnica de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foi utilizada para acompanhar a estabilidade dos novos complexos de rutênio(II), em solução de dimetilsulfóxido e meio de cultura DMEM (do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium). Como DMSO é solvente coordenante, fez necessário investigar a possibilidade labilização do ligante coordenado e posterior coordenação do solvente ao centro metálico de rutênio. O estudo de estabilidade dos compostos

foi avaliado nos tempos de 0, 24 e 48 h, pois o tempo de tratamento nos ensaios biológicos *in vitro* são em 48 horas. Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo A1, A3 e A8 (série 1) e B2 (série 2), em dmsO são apresentados na Figura 4.18.

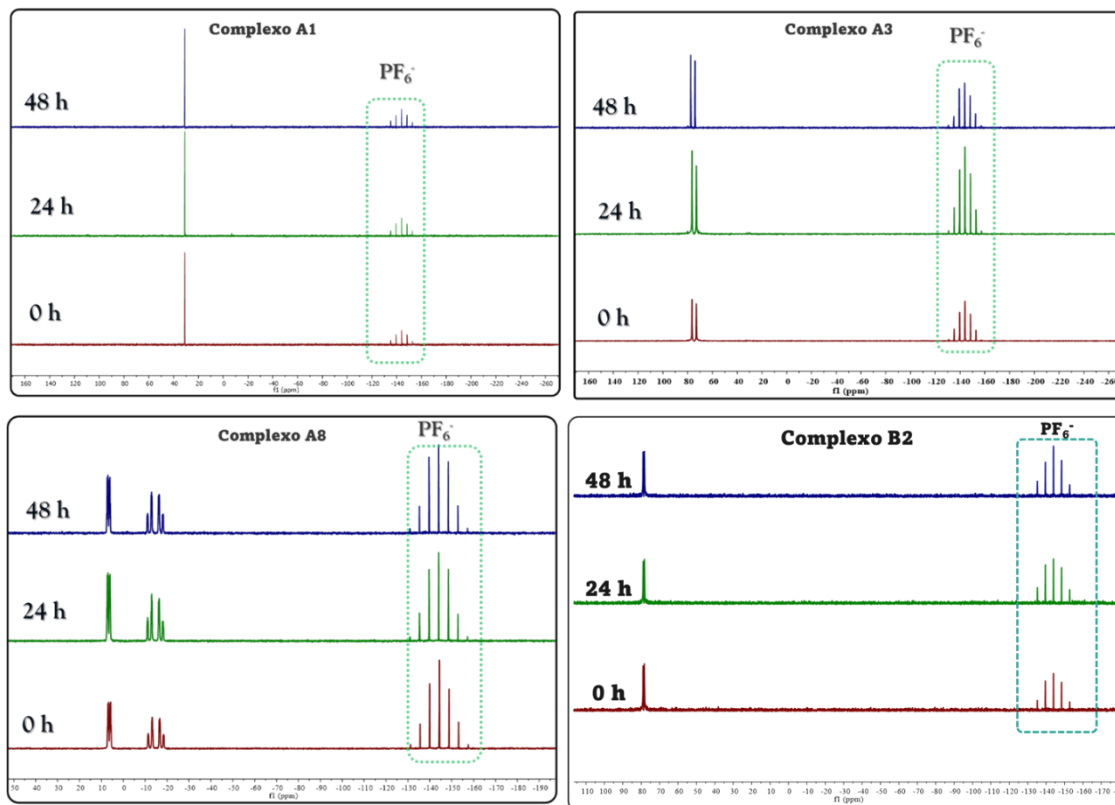
FIGURA 4.18 - Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da série 1 (A1, A3 e A8) e série 2 (B1) em DMSO, no tempo de 0, 24 e 48h.



Os complexos com os ligantes naftoquinonas se mantiveram estáveis em DMSO, sendo observado o mesmo padrão de deslocamento químico nos tempos registrados. Quando avaliamos os compostos em solução de DMSO/meio de cultura, também mostraram estáveis no intervalo de tempo, conforme apresentado na Figura 4.19. Conhecendo-se a estabilidade dos compostos iniciou-se a determinação da atividade citotóxica e interação com biomoléculas dos

complexos. Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série 1 e 2, em DMSO e DMSO/meio de cultura estão dispostos no apêndice.

FIGURA 4.19 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série 1 (A1, A3 e A8) e série 2 (B2) em DMSO/meio de cultura nos tempos 0, 24 e 48 h.



4.3 Estudos de interação dos complexos com biomoléculas

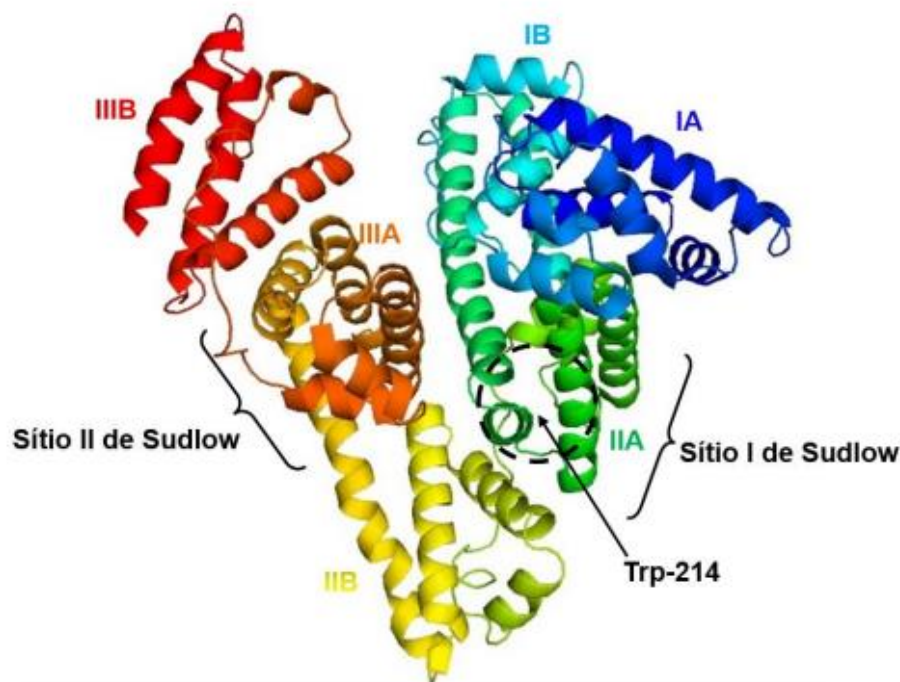
4.3.1 Estudos de interação dos complexos de rutênio com HSA

A HSA (Albumina do Soro Humano), é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, e em um indivíduo saudável encontra-se na concentração da ordem de aproximadamente 40 mg/mL. A HSA desempenha várias funções importantes no organismo como, aumentar a solubilidade de diversas drogas hidrofóbicas, controle da pressão osmótica do plasma e regulação do pH, entre outras. Atua também na captação e no carreamento de diferentes fármacos ao

organismo, sendo assim um modelo biomimético para diversos estudos de interações de moléculas no meio biológicos¹²²⁻¹²⁴.

Estruturalmente a biomolécula HSA é uma cadeia polipeptídica composta por 585 resíduos de aminoácidos, sendo 17 grupos de tirosina (Tyr), 6 resíduos de metionina, 59 resíduos de lisina e um único resíduo de triptofano (Trp-214), localizado no subdomínio IIA (sítio I), na qual é responsável pela fluorescência intrínseca da proteína. Do ponto de vista tridimensional é dividida em três regiões idênticas, denominada subdomínio I, II e III, que por sua vez, está dividido em dois domínios A e B^{125,126} (Figura 4.20). Os subdomínios se diferem em tamanho, flexibilidade e na afinidade de ligação. O primeiro sítio de Sudlow localizado no subdomínio IIA, possui grandes afinidades por ânions heterocíclicos volumosos, enquanto o segundo sítio de Sudlow, tem preferência por ácidos carboxilatos, heterocíclicos e aromáticos.

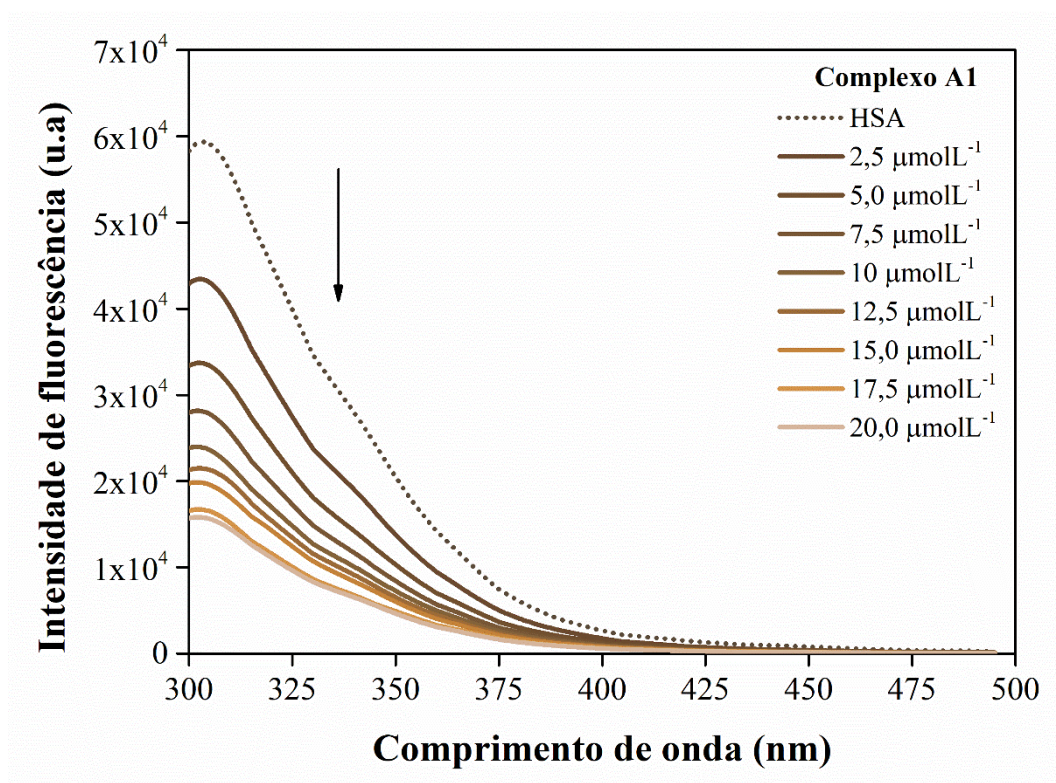
FIGURA 4.20 - Estrutura tridimensional da HSA com seus principais domínios e subdomínios.



Em vista de suas propriedades físico-químicas e funções desempenhadas dentro do organismo é importante investigar e compreender a capacidade de interação com diferentes fármacos, visto que a droga a ser administrada pode apresentar algum tipo de afinidade com a proteína HSA, e conseqüentemente essa interação fármaco-proteína pode contribuir para um melhor planejamento de metalofármacos como agente terapêutico. Além de obter informações acerca do mecanismo de ligação e o grau de interação do composto-biomolécula.

Neste sentido um dos métodos para monitorar as interações moleculares proteína-ligante é a espectroscopia de fluorescência, ferramenta útil para obter informações a respeito da estequiometria de ligação, sítios de ligações e parâmetros termodinâmicos, uma vez que quando ocorre a interação HSA com o composto, espera-se uma mudança conformacional, devido à perturbação aos seus subdomínios. Assim, fez-se necessários o estudo de interação entre os complexos de rutênio e a biomolécula HSA, com a finalidade de identificar possíveis interações a partir do monitoramento do decaimento de fluorescência do triptofano em diferentes temperaturas de 25°, 30° e 27 °C. Na Figura 4.21 mostra os espectros obtidos de supressão de fluorescência da proteína HSA na faixa (300-500 nm), com excitação em 270 nm na presença do complexo em diferentes concentrações.

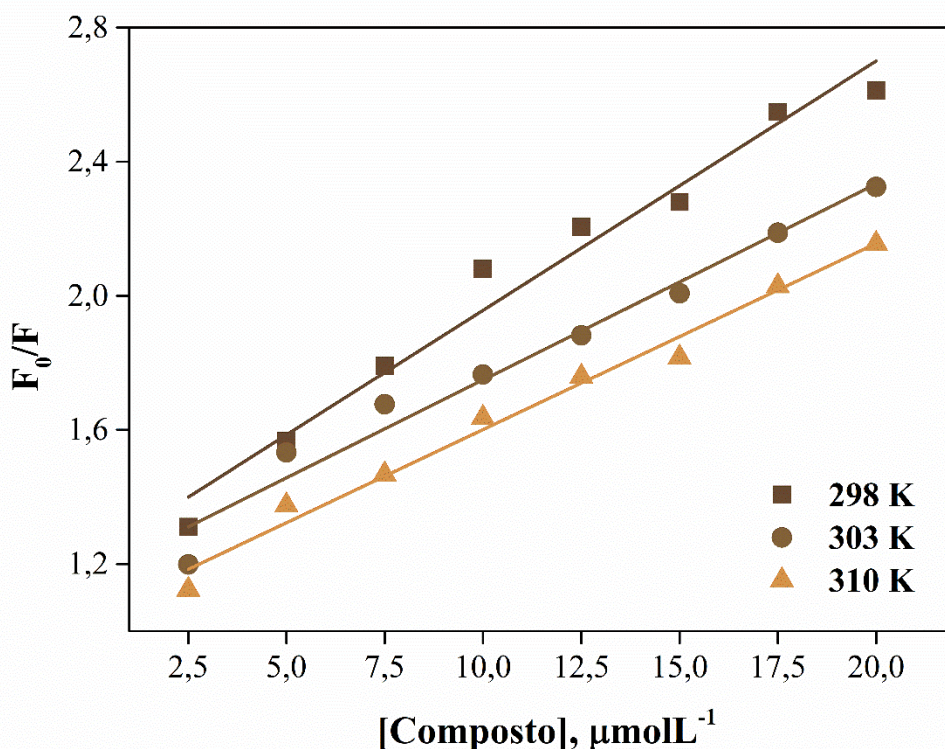
FIGURA 4.21 - Espectros de supressão da emissão de fluorescência da [HSA] = 2,0 µM na presença do complexo A1 à 298K em tampão trisma, pH = 7,4.



Observa-se que o aumento da concentração do complexo provoca um decréscimo gradativo na fluorescência da HSA, evidenciando que o composto age como um supressor devido a interação com biomolécula. Os resultados de supressão são indicativos que houve uma mudança no ambiente do fluoróforo, neste caso o triptofano.

Tendo em vista que os compostos de rutênio suprimiram a intensidade de fluorescência da HSA, foi possível realizar uma análise quantitativa a partir dos dados experimentais, em que o gráfico em função da intensidade de fluorescência *vs* concentração do supressor, apresentou um perfil linear ajustando-se à equação de Stern-Volmer (K_{sv}), conforme mostrado na Figura 4.22.

FIGURA 4.22 - Gráfico Stern-Volmer para o complexo A1 em diferentes concentrações, para as temperaturas 298, 303, 310 K.



A partir dos valores das constantes K_{SV} e o K_q (constante bimolecular de supressão), foi possível determinar por qual mecanismo o efeito de supressão de fluorescência da HSA ocorre, via mecanismo dinâmico ou estático. Levando em consideração o tempo de vida no estado de excitação da HSA, ($\tau_0= 6,2 \times 10^{-9}$ s). Na Tabela 4.9, 4.10 e 4.11, estão dispostos os valores de constantes obtidos para os complexos da série 1 e da série 2 nas temperaturas de 25°, 30° e 37° C.

TABELA 4.9 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) dos complexos da série 1 em diferentes temperaturas.

Compostos	T (°C)	$K_{sv} \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹)	$K_q \cdot 10^{12}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	$K_b \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹)	n	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
A1	298	7,40 ± 0,12	11,9 ± 0,05	0,967 ± 0,34	0,80	95,85	397,7	- 22,68
	300	5,93 ± 0,17	9,56 ± 0,12	2,06 ± 0,53	0,86			- 25,02
	310	5,54 ± 0,13	8,93 ± 0,04	4,24 ± 0,35	0,92			- 27,45
A2	298	3,27 ± 0,45	5,27 ± 0,72	1,01 ± 0,85	0,89	129,4	434,8	- 34,58
	300	3,56 ± 0,14	5,74 ± 0,23	1,16 ± 0,25	0,88			- 23,33
	310	4,47 ± 0,39	7,21 ± 0,63	7,63 ± 0,82	1,04			- 37,60
A3	298	4,29 ± 0,09	6,91 ± 0,15	4,06 ± 0,41	0,96	51,03	177,9	- 26,28
	300	4,32 ± 0,09	6,96 ± 0,17	4,86 ± 0,19	0,97			- 38,91
	310	5,00 ± 0,98	7,09 ± 0,06	9,00 ± 0,80	1,14			- 41,24
A4	298	5,48 ± 0,98	8,84 ± 0,98	3,79 ± 0,48	0,93	187,6	619,9	- 26,12
	300	5,32 ± 0,49	5,31 ± 0,79	6,93 ± 0,20	1,02			- 39,72
	310	5,24 ± 0,28	8,45 ± 0,46	71,1 ± 0,72	1,14			- 45,53

TABELA 4.10 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) dos complexos da série 1 em diferentes temperaturas. (continuação)

Compostos	T (°C)	$K_{sv} \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹)	$K_q \cdot 10^{12}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	$K_b \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹)	n	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
A5	298	4,71 ± 0,12	7,59 ± 0,19	0,45 ± 0,04	0,82	121,4	476,7	- 20,69
	300	5,61 ± 0,32	9,00 ± 0,51	2,23 ± 0,08	0,89			- 25,22
	310	5,74 ± 0,43	9,36 ± 0,45	2,83 ± 0,49	0,93			- 26,42
A6	298	4,40 ± 0,15	7,09 ± 0,81	2,10 ± 0,68	0,88	160,1	619,7	-24,54
	300	4,65 ± 0,13	7,49 ± 0,62	3,60 ± 0,25	1,02			- 26,43
	310	4,80 ± 0,15	7,79 ± 0,24	24,5 ± 1,0	1,15			- 31,98
A7	298	3,63 ± 0,23	5,59 ± 0,37	17,2 ± 2,8	0,99	32,79	210,2	- 29,87
	300	3,81 ± 0,50	5,94 ± 0,81	22,2 ± 3,4	1,02			-31,01
	310	4,46 ± 0,29	7,19 ± 0,47	28,8 ± 2,3	1,10			- 32,39
A8	298	5,17 ± 0,44	8,34 ± 0,72	0,11 ± 0,09	0,68	20,77	128,3	-17,48
	300	4,40 ± 0,50	7,09 ± 0,81	0,12 ± 0,01	0,68			-17,86
	310	4,16 ± 0,32	6,55 ± 0,50	0,16 ± 0,07	0,66			-19,02

TABELA 4.11 - Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) dos complexos da série 2 em diferentes temperaturas. (conclusão).

Compostos	T (k)	$K_{sv} \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹)	$K_q \cdot 10^{12}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	$K_b \cdot 10^4$ (L mol ⁻¹)	n	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
B1	298	4,30 ± 0,10	6,93 ± 0,15	2,89 ± 0,59	0,96	144,3	477,9	- 25,44
	300	4,41 ± 0,17	7,10 ± 0,11	3,62 ± 0,83	1,14			- 26,17
	310	4,48 ± 0,03	7,11 ± 0,06	27,6 ± 1,36	1,17			- 38,53
B2	298	3,87 ± 0,24	6,24 ± 0,36	4,08 ± 0,95	0,97	143,2	568,9	- 26,30
	300	7,98 ± 0,08	12,8 ± 0,01	8,60 ± 0,61	0,97			- 28,62
	310	8,26 ± 0,13	13,3 ± 0,02	38,2 ± 0,90	0,98			- 33,12
B3	298	4,81 ± 0,12	9,62 ± 0,24	6,29 ± 0,35	0,99	143,7	477,9	- 27,44
	300	4,27 ± 0,04	6,78 ± 0,06	23,4 ± 0,84	1,18			- 30,83
	310	4,14 ± 0,14	6,47 ± 0,18	61,2 ± 0,48	1,28			- 40,98
B4	298	9,98 ± 0,14	1,60 ± 0,07	6,22 ± 0,28	0,94	112,5	469,4	-27,34
	300	9,26 ± 0,35	1,49 ± 0,05	31,9 ± 0,84	1,11			- 31,92
	310	9,09 ± 0,16	1,46 ± 0,03	36,1 ± 0,99	1,12			-32,98

Uma forma para se diferenciar qualitativamente o mecanismo dinâmico ou estático, é através da supressão de fluorescência em diferentes temperaturas. Neste caso, a supressão dinâmica surge da colisão entre fluoróforo e o supressor com aumento da temperatura e conseqüentemente, os valores de constante de supressão diminuem. Enquanto o processo estático favorece a formação de adutos entre o supressor e fluoróforo no estado fundamental, sendo observado um decréscimo da constante de supressão com o aumento da temperatura. Em alguns casos pode acontecer ambos os processos, estático e dinâmico^{127,128}.

De acordo com os dados da constante de Stern-Volmer, observa-se que os valores de K_{sv} , crescem com o aumento da temperatura, exceto para os complexos A1, A4, A8 (série 1) e os compostos da série 2 (B2 e B3) onde, observa-se uma diminuição dos valores de K_{sv} com aumento da temperatura. Diante dessas informações podemos inferir que a eficiência de supressão está associada ao aumento dos valores de Stern-Volmer, uma vez que em temperaturas altas favorece uma maior interação do complexo com proteína HSA. Além disso, os valores da constante bimolecular encontrado para os compostos foram da ordem de $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo maior do que o valor permitido para o mecanismo dinâmico que é de $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Logo o estudo em questão pode-se inferir que esteja ocorrendo o mecanismo estático para os complexos da série 1 e 2. Esses dados estão em concordância com compostos similares da literatura^{78,118,129-131}.

Conhecendo-se o mecanismo de supressão da HSA-complexos, faz necessário estudar o grau de afinidade dos compostos de rutênio com a proteína, pois permite racionalizar metalofármacos mais eficientes, uma vez que a eficácia depende do grau de interação dos complexos com a biomolécula. A constante de ligação (K_b) e número de sítios foi determinada a partir da equação 2 (seção 3.11). Os dados obtidos estão exibidos nas Tabelas 4.9, 4.10 e 4.11.

Em todos os casos a constante de ligação (K_b) aumentou com a temperatura, apresentando uma interação da ordem de 10^3 a 10^5 L mol^{-1} ,

evidenciando ligações fracas a moderadas entre a proteína e o complexo^{132,133}. Observa-se que o aumento da temperatura favorece uma estabilização do sistema formado entre o complexo e a proteína^{134,135}. Por fim, o número de sítio de ligação é aproximadamente 1 evidenciando assim, que a estequiometria de ligação corresponde 1:1, ou seja, o complexo de rutênio está inserido a um sítio da HSA^{25,79,136}.

Visando identificar quais os tipos de forças estão responsáveis pelo processo de interação entre a HSA e os complexos, empregou-se as equações 3 e 4 (Seção 3.11), para calcular os parâmetros termodinâmicos de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs e a partir dos valores adquiridos para cada magnitude física, podemos concluir que o tipo de interação está associado os seguintes sinais:

- i. $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$: indicam interação hidrofóbicas;
- ii. $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$: indicam forças de Van der Waals e interação de hidrogênio;
- iii. $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$: correspondem interações eletrostáticas;

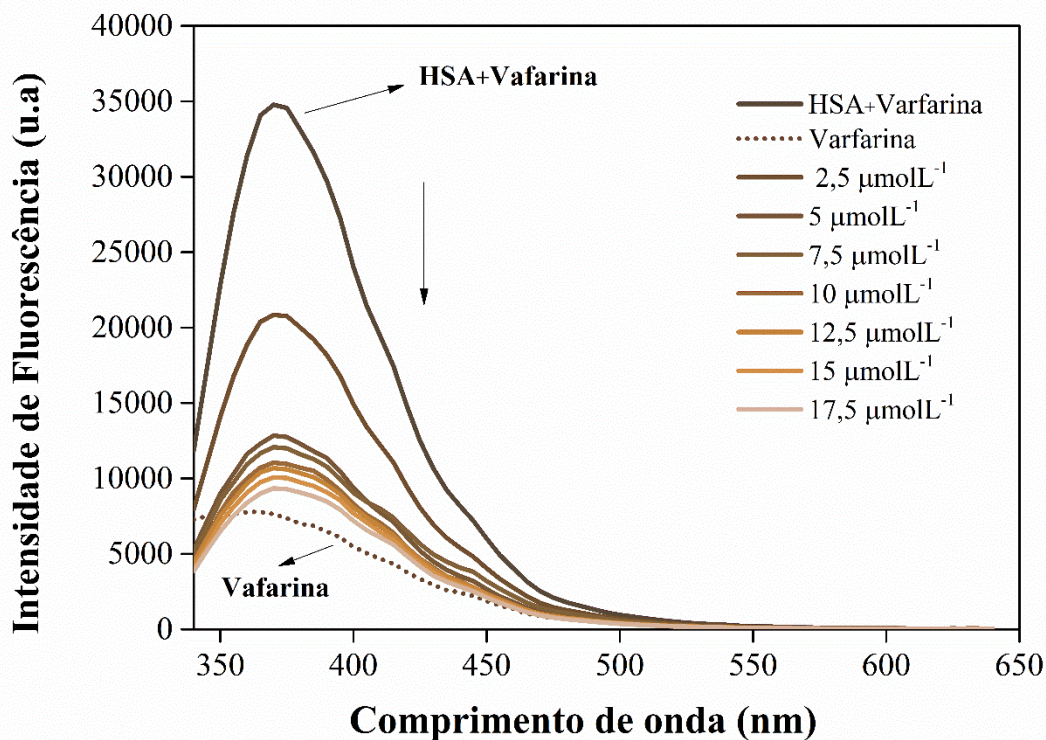
Conforme apresentado nas Tabelas 4.9, 4.10 e 4.11 os valores negativos encontrados para a energia livre de Gibbs indicam que o processo de interação é reversível e espontâneo e as forças de interação envolvidas são hidrofóbicas entre a composto-HSA¹³³.

Com esses resultados, podemos verificar que os complexos de rutênio(II), interagem com a biomolécula HSA e como essa proteína atua no carregamento de fármacos, podendo conhecer em qual sítio de ligação da HSA os complexos têm maior afinidade. Estudos cristalográficos mostraram que existem dois principais sítios de ligação, o sítio I e o sítio II, que estão localizados dentro da cavidade da HSA, nos subdomínios IIA e IIIA¹³⁷. Nesse sentido, foi investigado a interação dos complexos de rutênio com o sítio I da proteína, utilizando uma sonda fluorescente varfarina (Var), uma vez que, é reportado na literatura que os adutos formado entre varfarina e HSA, aumenta a intensidade de

fluorescência da varfarina quando comparado a varfarina livre que tem baixa fluorescência¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Os espectros de competição dos complexos com HSA-varfarina são apresentados na Figura 4.23, a 25 °C com o comprimento de onda de excitação de 310 nm. Como pode ser visto houve uma supressão da intensidade de fluorescência com aumento da concentração do complexo. Esses resultados sugerem que os complexos têm uma maior afinidade ao sítio I da HSA^{23,140,141}.

FIGURA 4.23 - Espectros de supressão da fluorescência do aduto Var-HSA em diferentes concentração do complexo A1 a 25 °C.

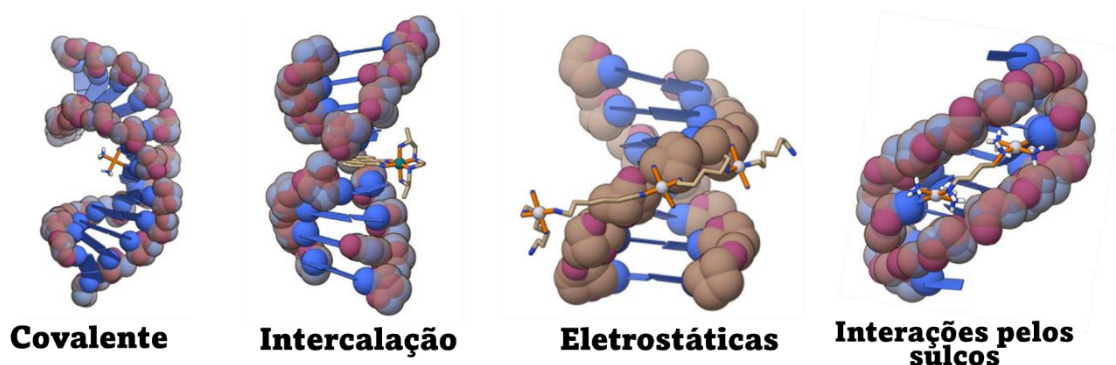


4.4 Estudos de interação dos complexos com DNA

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é um importante alvo terapêutico para muitos fármacos antineoplásicos que estão em uso clínico, sendo na maioria dos casos estudados, a biomolécula responsável, pelos seus efeitos farmacológicos. Desta forma inúmeros trabalhos têm sido publicados demonstrando os progressos na compreensão dos possíveis modos de interação da ligação DNA-metalofármacos^{142,143}. Do ponto de vista químico e estrutural a biomolécula de DNA, expõem vários sítios possíveis de ligação com o fármaco. Em geral, as interações dos compostos com o DNA podem se dar de dois modos principais: irreversíveis ou reversíveis, conforme apresentado na Figura 4.24. As interações irreversíveis, acontecem por meio de ligações covalentes que gera uma alteração permanente no DNA, alterando sua função de replicação e transcrição, por exemplo, a cisplatina que é conhecido por interagir covalentemente com as bases nitrogenadas do DNA. Além da cisplatina, outros compostos metálicos, como NAMI-A, também podem ser ligar irreversivelmente ao DNA. As interações reversíveis, complexo-DNA são subdivididas em ligação eletrostática, intercalação e ligação aos sulcos menor ou maior¹⁴⁴⁻¹⁴⁸.

A importância em conhecer e compreender os possíveis modos de interação metalofármacos-DNA, permite projetar novos compostos com diferentes perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos e assim contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos. Como o DNA é um dos principais alvos dos agentes quimioterápicos, é de nosso interesse investigar se os compostos sintetizados neste presente trabalho, reconhece a biomacromolécula como possível alvo. Desta forma, o estudo de interação foi realizado empregando as seguintes técnicas de viscosidade, eletroforese em gel e ensaio de competição com Hoechst.

FIGURA 4.24 - Modos de interações de complexo com DNA.



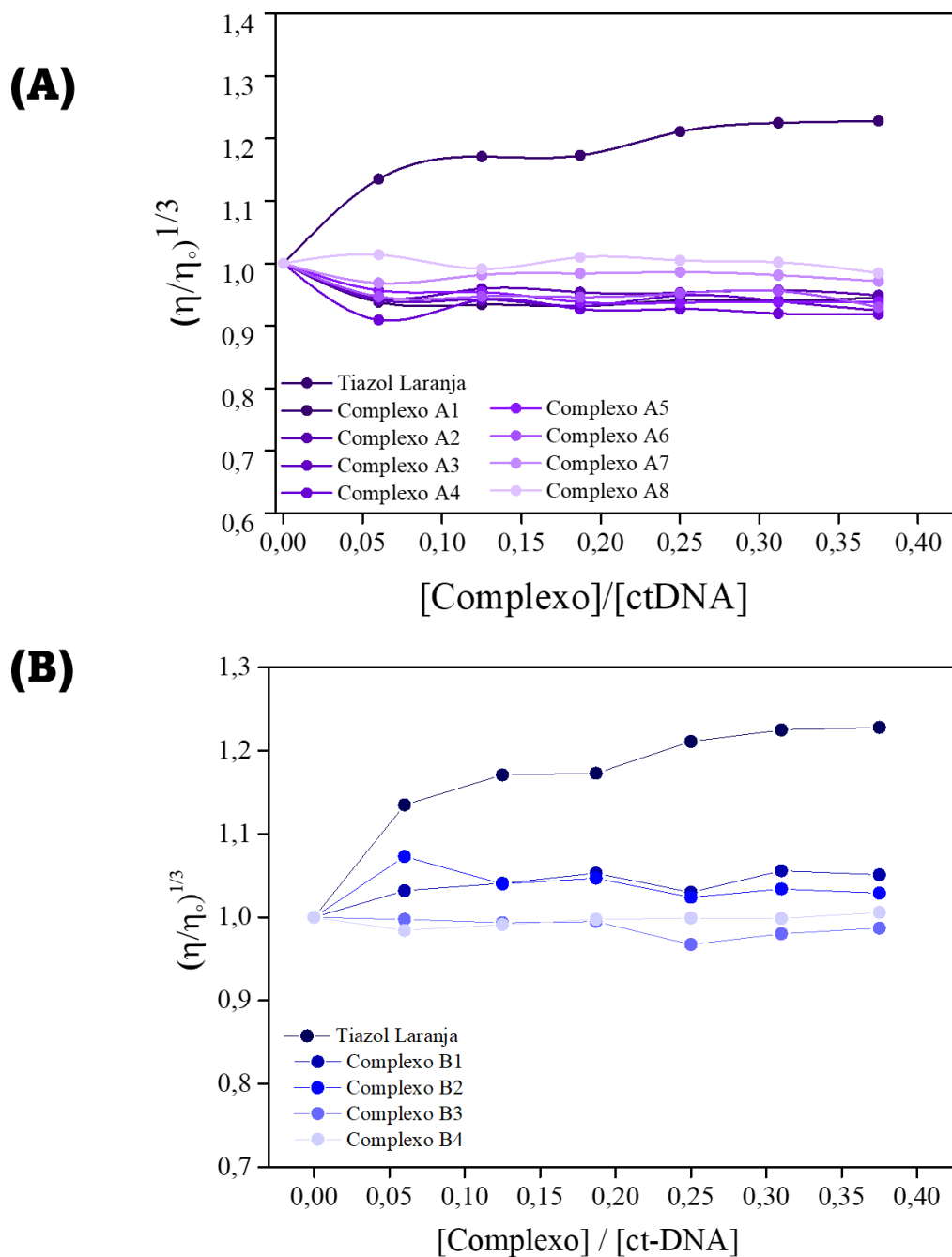
Fonte: Pages et al. 2015.

4.4.1 Medidas de Viscosidade

A viscosidade é a medida da resistência de um fluido ao escoamento a uma determinada temperatura. Em um capilar o líquido move-se em diferentes velocidades. Assim, quanto maior for a viscosidade, menor será a velocidade com que o líquido se movimenta. Compostos que interagem por intercalação causa um aumento na viscosidade, devido a ocorrência do alongamento dos pares de bases na estrutura do DNA. Interações covalentes provocam uma diminuição da viscosidade em razão da distorção gerada na estrutura do DNA. Por outro lado, interações eletrostáticas e pelos sulcos do DNA, não alteram significativamente a viscosidade¹⁴⁴. Assim, os ensaios de interação dos complexos de rutênio na presença do ctDNA, foi avaliada pela propriedade física da viscosidade, onde a partir deste experimento é possível distinguir o tipo de ligação com a biomolécula.

Na Figura 4.25 são mostrados os efeitos dos complexos de rutênio da série 1 (A1 – A8) e da série 2 (B1 a B4), na presença do ctDNA em função da razão [complexo]/[DNA]. O Tiazol laranja foi utilizado como um padrão do modo de interação intercalativo.

FIGURA 4.25 - Gráficos de viscosidade para os (A) complexos da série 1 (A1 - A8) e (B) complexos da série 2 (B1 - B4).



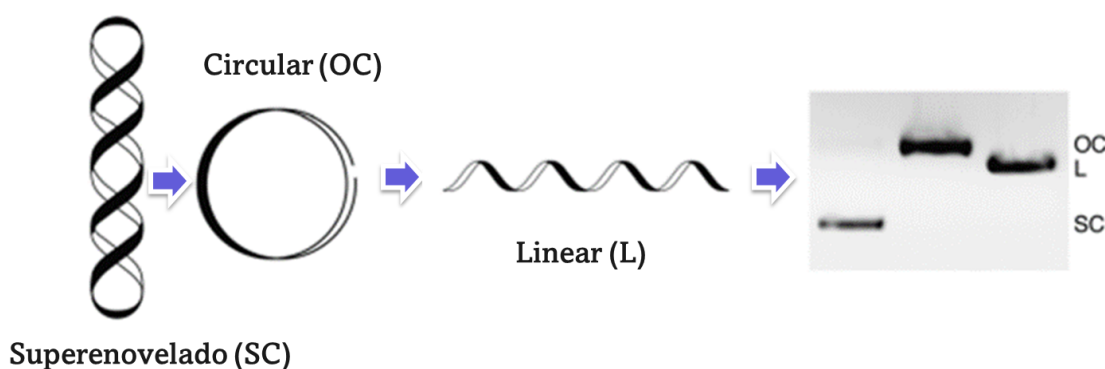
De acordo com o perfil dos gráficos obtidos para os complexos da série 1 e da série 2, observa-se um aumento na viscosidade do DNA na presença de Tiazol Laranja, o que é consistente com a intercalação tiazol-DNA. Comparando o padrão com as medidas de viscosidade dos complexos pode-se

concluir que não houve alterações significativas entre estas espécies, indicando que os compostos apresentam baixa afinidade de ligação ao DNA^{23,25,149}.

4.4.2 Eletroforese em gel de agarose

O ensaio de mobilidade eletroforética é utilizada na separação de várias moléculas e partículas, a partir da migração das mesmas durante a aplicação de campo elétrico. Assim a separação se dar devido a carga negativa presente no DNA, que quando submetido ao campo elétrico ocorre sua migração para o polo positivo. Neste experimento foi utilizado o DNA plasmidial, que apresenta basicamente três formas, a superenovelada (SC, do inglês supercoiled), a forma circular, (OC, do inglês open circular) e a linear (L), como mostrado na Figura 4.26. Alterações na migração do plasmídeo no gel na presença dos compostos pode ser indicativo de interação com o DNA.

FIGURA 4.26 - As formas principais do DNA plasmidial, superenovelada, circular e linear.

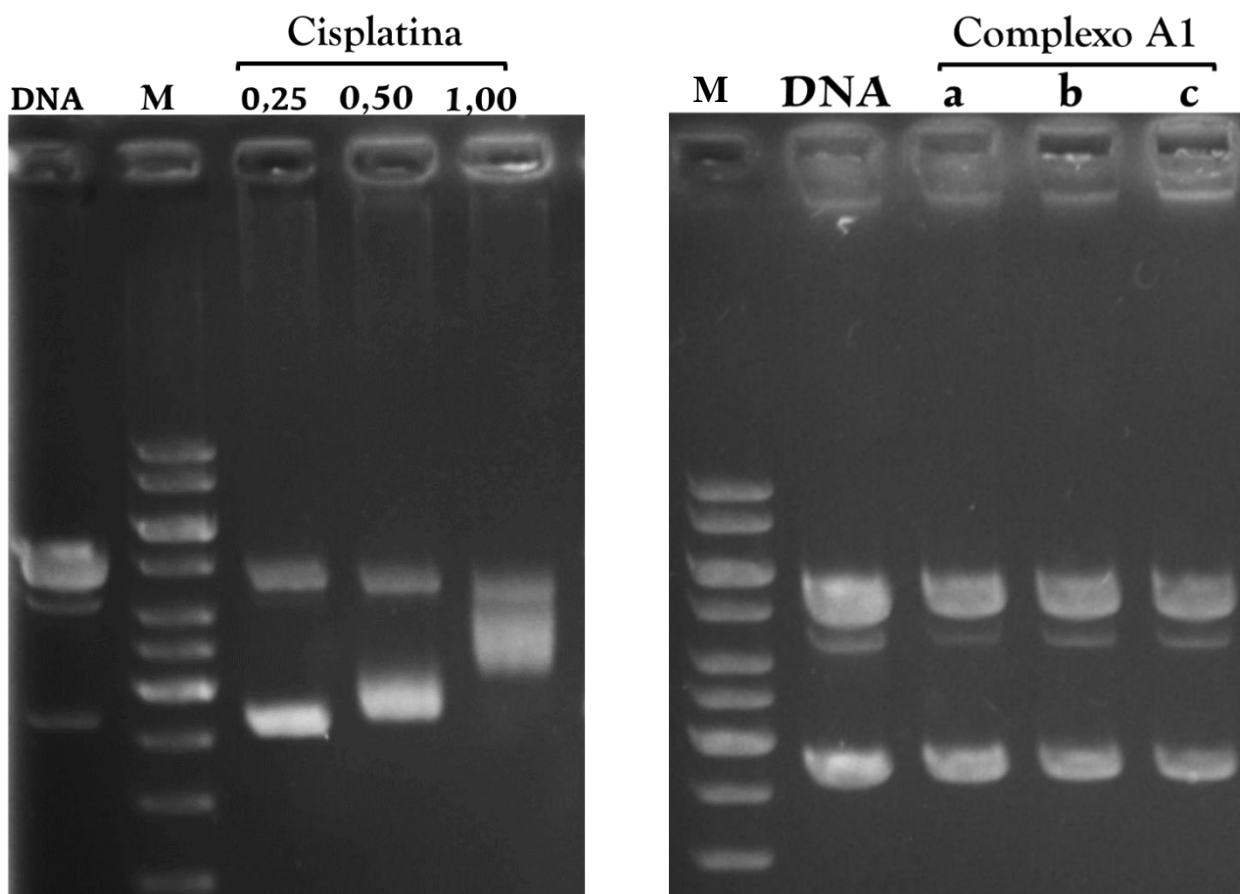


Fonte: Kellett et al. 2019¹⁵⁰.

Para realização dos ensaios de eletroforese em gel, os compostos e a cisplatina foram pré-incubados por 18 h à 37 °C. Na Figura 4.27 pode-se observar o gel de agarose obtido para cisplatina e o complexo A1 em diferentes razões molares. Neste caso, foi utilizado a cisplatina como controle positivo uma vez

que, sua interação com DNA leva a fragmentação, indicando interações do tipo covalentes. Comparando o controle negativo e o positivo com o complexo A1, observar-se que não houve mudanças significativas na intensidade ou na migração das bandas do DNA plasmidial com o aumento da concentração, o que sugere que o composto não apresenta interações covalentes ou intercalativas, como já observado em outros experimentos. Tal comportamento sugere que possa estar ocorrendo uma interação via sulcos do DNA ou eletrostática^{25,151}. A fim de verificar uma das possibilidades de interação via sulcos foi realizado o ensaio de competição com o corante fluorescente Hoechst 33258.

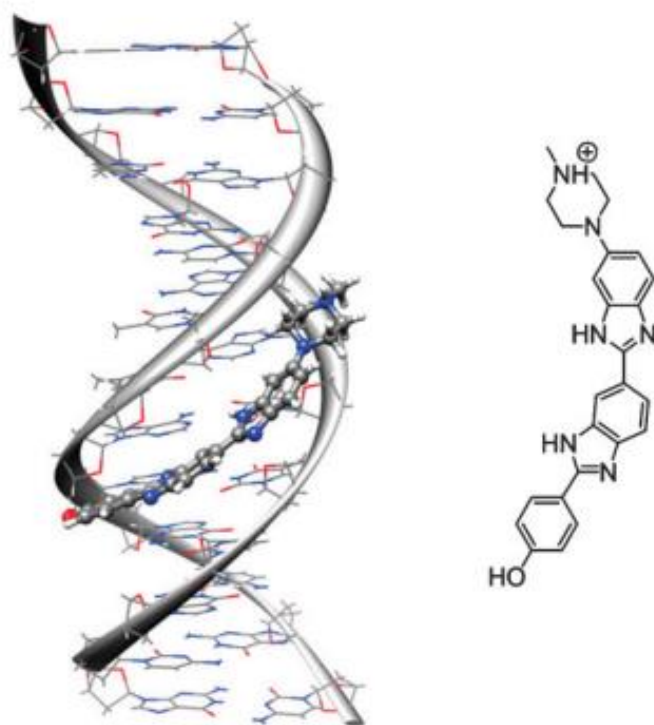
FIGURA 4.27 - Efeitos das concentrações do complexo A1 na conformação do DNA plasmidial pBR322 em diferentes Ri (a= 0,25; b= 0,50 e c = 1,00) M = marcador de peso molecular e DNA = controle negativo com DMSO.



4.4.3 Ensaio de competitividade com Hoechst 33258

O corante Hoechst 33258 é um fluoróforo que faz parte da classe das bisbenzimidaz, sendo utilizados como sondas fluorescentes para investigar o tipo de ligação existente entre o composto e o ctDNA. De acordo com dados da literatura Hoechst é conhecido por interagir pelo sulco menor, seletivamente nas regiões rica em adenina-Timina (Figura 4.28). Ao efetuar essa ligação ao DNA a um aumento no rendimento quântico de fluorescência do Hoechst^{96,152}.

FIGURA 4.28 - Estrutura cristalina do aduto Hoechst 33258 interagindo pelo sulcos menor do DNA.

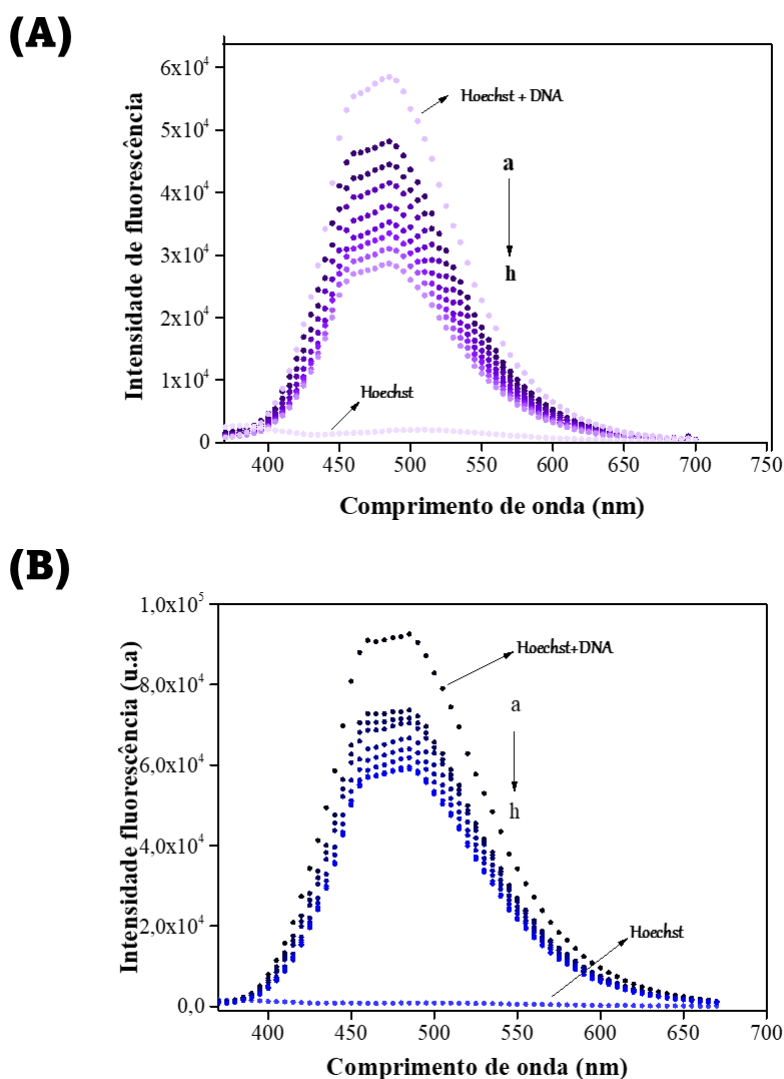


Fonte: Wang et al. 2009¹⁵³.

Para obter informações adicionais sobre as interações entre o DNA e os complexos de rutênio, foram realizados experimentos competitivos com o corante Hoechst, a partir de crescentes adições dos compostos em solução tampão trisma em $\text{pH} = 7,4$. Neste contexto, complexos que apresentam a afinidade de interação via sulcos menor, pode deslocar o Hoechst e conseqüentemente

provocar uma supressão da fluorescência. Como pode ser observado na Figura 4.29, os espectros de fluorescência dos adutos Hoechst-DNA na presença dos compostos, com o aumento da concentração dos complexos provocou uma diminuição na intensidade da fluorescência^{23,25,78,79,105}. Isto de fato poderia indicar uma interação pelo sulco menor do DNA. Todos os complexos apresentaram comportamento semelhante, evidenciando sua capacidade de expulsar o corante Hoechst.

FIGURA 4.29 - Espectro de emissão do aduto Hoechst-DNA com diferentes concentrações (a = 2,5 μ M; b = 5,0 μ M; c= 7,5 μ M ; d = 10 μ M ; e = 12,5 μ M; f = 15 μ M ; g = 17,5 μ M e h = 20 μ M) dos compostos A1 (A) e B1 (B).



4.5 Ensaio de inibição da topoisomerase II α

As topoisomerase são enzimas importantes que regulam a topologia do DNA, e, portanto, estão envolvidas na proliferação celular. Normalmente as topoisomerase do tipo I e II são superexpressas em células cancerígenas¹⁵⁴. A topo I cliva uma fita de DNA e forma o sistema Topo I-DNA e a Topo II precisa de ATP para promover a clivagem de duas fitas de DNA¹⁵⁵. A capacidade de interferir na atividade das topoisomerase é uma estratégia eficaz para o tratamento do câncer e por isso, tem se mostrado um alvo bastante atrativo.

Os estudos de inibição enzimática da topoisomerase II α , foi conduzido pelo ensaio de relaxamento por eletroforese em gel, a partir da incubação dos complexos com DNA em sua forma superenovelada com a enzima, a 37 °C. Os resultados do ensaio de inibição da Topo II α , nas concentrações de 0,50, 5,0 e 10 μ M dos compostos são apresentados na Figura 4.30 e 4.31, onde alterações na mobilidade dessas bandas indicam possível inibição da atividade enzimática.

FIGURA 4.30 - Efeitos de diferentes concentrações dos complexos A1 e A3 na atividade enzimática da Topoisomerase II α , a 37°C. C- = somente DNA pBR322 e DMSO), C+ = (DNA e topoisomerase II α).

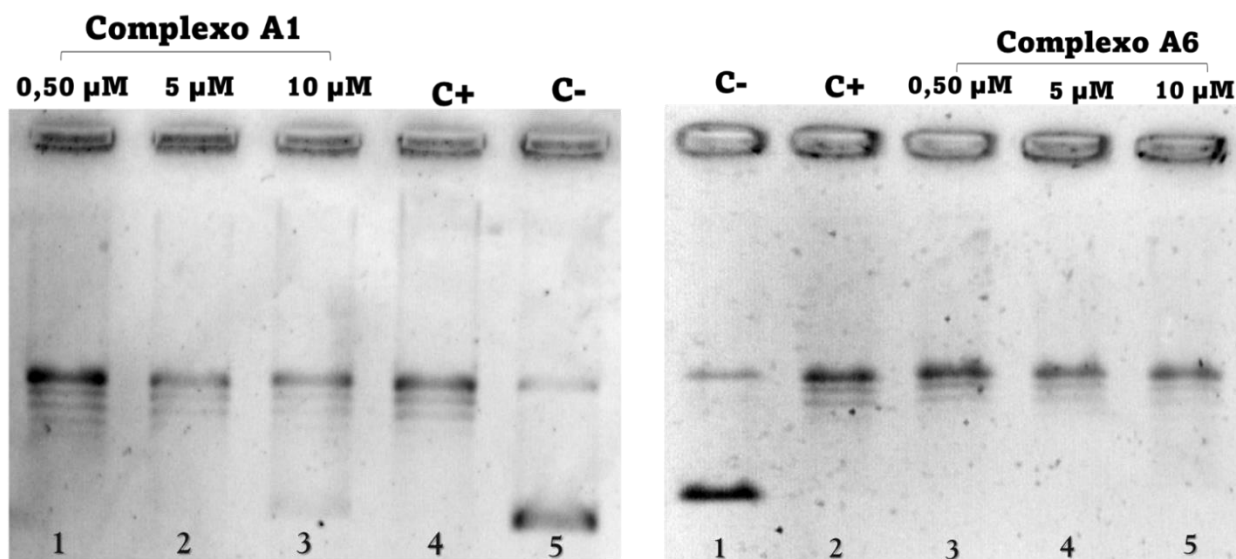
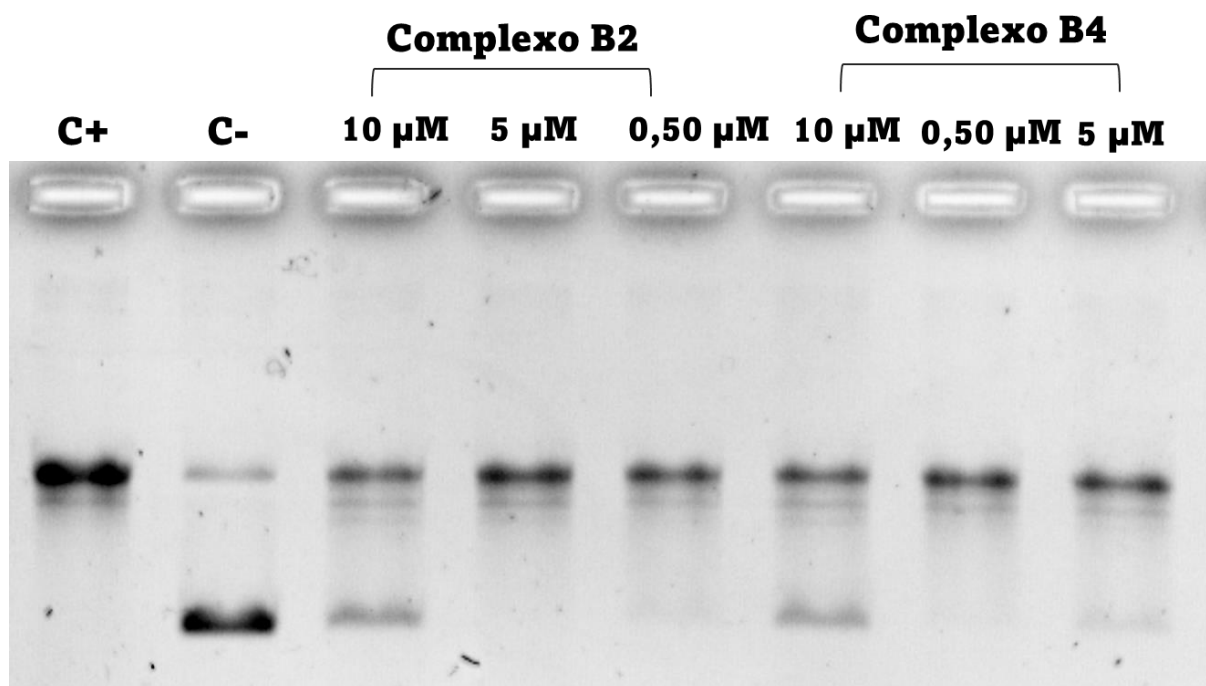


FIGURA 4.31 - Efeitos de diferentes concentrações dos complexos B2 e B4 na atividade enzimática da Topoisomerase II α , a 37°C. O controle negativo = somente DNA pBR322 e DMSO, controle positivo = DNA e topoisomerase II α).



Diante dos resultados apresentados na Figura 4.30, o complexo A1 foi capaz de inibir parcialmente a atividade enzimática da topoisomerase II α , na concentração 10 μ M. Em contraste, não foi observado nenhuma inibição significativa da enzima para o complexo A6. No caso dos complexos B2 e B4 foram capazes de inibirem a capacidade da topoisomerase relaxar o DNA na concentração de 10 μ M, uma vez que a eficácia da inibição é dependente da concentração.

4.6 Determinação do coeficiente de partição (log P)

O coeficiente de partição é um parâmetro físico-químico muito utilizado para avaliar a farmacodinâmica e farmacocinética do fármaco. A determinação de tal parâmetro fornece informações da lipofilicidade e, portanto, da permeabilidade dos fármacos através da membrana celular¹⁵³. Desta forma,

para alcançar uma melhor viabilidade de transporte, deve-se ter um valor de logP moderado, segundo a literatura entre $0 < \text{Log P} < 3$. A lipofilicidade dos complexos de rutênio(II), foi determinada pelo método *shape-flash*, em um sistema n-octanol/água, no qual os compostos foram solubilizados em n-octanol, contendo 4 % de dmsO. Os valores dos coeficientes de partição obtidos para os complexos encontram-se na Tabela 4.12.

TABELA 4.12 - Dados dos valores de coeficiente de partição, expresseo em Log P dos complexos série 1 (A1 -A8) e série 2 (B1-B2).

Complexos	Log P	Complexos	Log P
A1	0,34	A7	0,49
A2	0,36	A8	0,52
A3	0,54	B1	0,21
A4	0,34	B2	0,33
A5	0,46	B3	0,68
A6	0,50	B4	0,38

Baseado nos valores de *Log P* obtidos para os compostos indicam uma preferência pela fase orgânica. Além disso, todos os complexos apresentaram lipofilicidade semelhantes.

4.7 Ensaios biológicos dos complexos (série 1)

4.7.1 Determinação da citotoxicidade *in vitro*

O efeito citotóxico dos complexos de rutênio e do ligante foi determinada frente às linhagens tumorais humanas de mama MDA-MB-231, MCF-7, SKBR-3, e pulmão A549 e nas linhagens não tumorais MRC-5 (não tumoral de pulmão) e MCF-10A (não tumoral de mama), pelo método do MTT, o qual é reduzido para cristais de formazan de coloração roxa pelas redutases mitocôndrias por células metabolicamente viáveis^{156,157}. Assim, um aumento ou diminuição de células viáveis o número pode ser detectado medindo a absorbância e determinar os valores de IC₅₀ através de curvas de concentração-resposta obtidas por regressão não linear, empregando o programa GradPrisma®, após um período de tratamento de 48 horas dos complexos com as células.

A cisplatina foi utilizada como controle positivo. Devido à baixa solubilidade dos complexos de rutênio sintetizados em água, foram dissolvidos em 0,5 % de DMSO em meio de cultura, para garantir que as células não estão sendo afetadas pelo solvente. Na Tabela 4.13 são apresentados resultados expressos como valores de IC₅₀ para os complexos A1 - A8 e do ligante NQ1.

TABELA 4.13 Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) obtidos para os complexos de rutênio(II) sintetizados e o ligante livre NQ1 (3-estiril-lausona), controle positivo cisplatina, frente as linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h. SD = erro padrão da média.

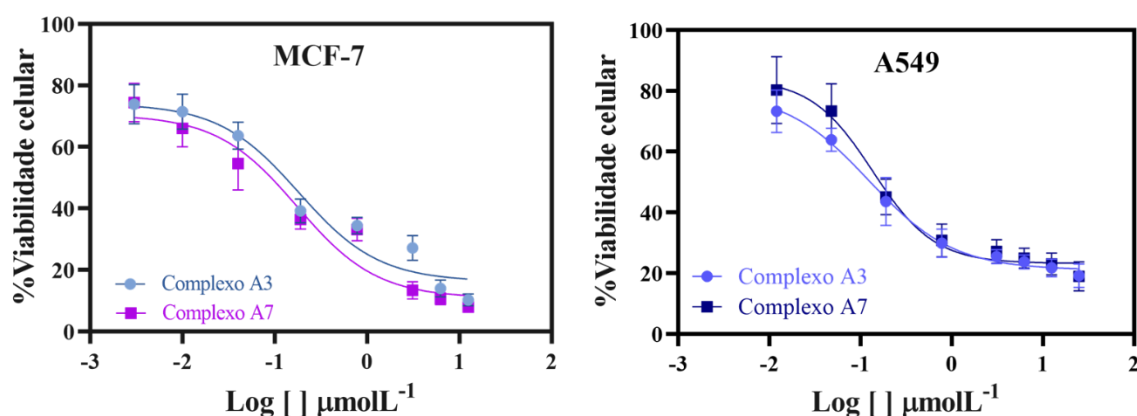
Compostos	Citotoxicidade após 48 h de incubação IC ₅₀ (μmol L ⁻¹ ± SD)					
	Linhagem celular de mama			Linhagem celular de pulmão		
	MCF-7	SK-BR-3	MDA-MB-231	MCF-10A	A549	MRC-5
A1	1,33 ± 0,37	0,28 ± 0,06	0,16 ± 0,01	4,95 ± 0,29	0,17 ± 0,01	1,51 ± 0,19
A2	0,93 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,20 ± 0,02	1,13 ± 0,28	1,42 ± 0,10	1,60 ± 0,19
A3	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,06	0,10 ± 0,01	1,23 ± 0,02	0,12 ± 0,01	1,97 ± 0,30
A4	0,43 ± 0,11	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,01	1,89 ± 0,27	0,85 ± 0,07	0,98 ± 0,14
A5	0,73 ± 0,16	0,24 ± 0,07	0,20 ± 0,01	4,55 ± 0,87	0,19 ± 0,02	2,75 ± 0,21
A6	0,25 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,01	3,11 ± 0,61	0,27 ± 0,02	0,84 ± 0,22
A7	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,05	1,53 ± 0,09	0,13 ± 0,01	1,68 ± 0,13
A8	0,72 ± 0,12	0,36 ± 0,01	0,11 ± 0,06	1,05 ± 0,01	0,30 ± 0,09	1,43 ± 0,24
NQ1	>100	>100	>100	>100	>100	>100
*Cisplatina	13,98 ± 2,02	10,20 ± 2,02	24,90 ± 3,40	23,90 ± 0,70	14,42 ± 1,45	29,09 ± 0,78

* A cisplatina foi solubilizada em dimetilformamida (DMF).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.13 todos os compostos apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens celulares testadas, obtendo valores de IC₅₀ menores do que o ligante livre e o fármaco de referência cisplatina. O ligante livre não apresentou atividade citotóxica na concentração máxima avaliada (100 μmol L⁻¹). A coordenação do ligante naftoquinona ao rutênio contribuiu para o aumento da atividade citotóxica dos compostos, evidenciando uma contribuição de ambos os ligantes na esfera de coordenação.

Com relação as células tumorais das linhagens MCF-7 e A549 os complexos A3 e A7, são os mais citotóxicos, apresentando valores de IC₅₀ de 0,18 μmol L⁻¹ e 0,16 μmol L⁻¹ para linhagem MCF-7 e 0,12 μmol L⁻¹ e 0,13 μmol L⁻¹, para a linhagem tumoral de pulmão A549. Os efeitos sobre as células foram de maneira dependente da concentração, como demonstrado na Figura 4.32. Em geral, a ordem dos complexos referente sua ação citotóxica para MCF-7 foi (A7, A3, A6, A4, A8, A2 e A1) e para A549 (A3, A7, A1, A5, A6, A4, A8 e A2).

FIGURA 4.32 - Curvas de concentração-resposta nas linhagens MCF-7 e A549, após a incubação de 48 h com os complexos A3 e A7.



Comparando os valores IC₅₀ encontrados para o complexo A7 na linhagem A549 com compostos análogos, onde é alterado apenas o ligante, nota-se uma similaridade nos valores encontrados, evidenciando que a presença da

bifosfina DPEphos contribuiu para atividade biológica do composto²³. Por outro lado, quando comparamos os valores de IC_{50} nas mesmas linhagens estudadas (MCF-7 e A549), para os complexos $[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF_6$ (0,87 e 0,58 $\mu\text{mol L}^{-1}$) $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$, (2,40 e 0,53 $\mu\text{mol L}^{-1}$), já sintetizados em nosso grupo LERCI, observa-se que o complexo A3 $[Ru(NQ1)(dppe)(bipy)]PF_6$, foi mais citotóxico do que seus análogos. O que nos permitiu inferir que a coordenação do ligante NQ1, favoreceu uma melhora na citotoxicidade do composto. Neste caso, pode-se concluir também que o aumento da lipofilicidade influenciou na atividade citotóxica dos compostos, frente as células tumorais. De modo geral, o complexo A3 ($\text{Log P} = 0,54$) apresenta o maior valor de Log P , do que os complexos $[Ru(lau)(dppe)(bipy)]PF_6$ ($\text{LogP} = 0,48$) e $[Ru(lap)(dppe)(bipy)]PF_6$ ($\text{LogP} = 0,38$), favorecendo sua permeabilidade através da membrana celular e, portanto, sua ação biológica.

Para as linhagens SK-BR-3 e MDA-MB-231, os compostos A1-A8 não apresentaram diferenças significativas nos valores de IC_{50} entre si, o que impossibilitou realizar uma correlação estrutura-atividade. Com relação a lipofilicidade exibido na Tabela 4.12, não observamos uma relação entre os valores de Log P e os dados de IC_{50} .

Diante dos resultados foi possível calcular a relação entre os valores de IC_{50} nas linhagens tumorais e a IC_{50} nas linhagens não tumorais, os quais são mostrados na Tabela 4.14. A partir dessa relação foi possível determinar o índice de seletividade (IS) dos novos complexos de rutênio, uma vez que o resultado indica o potencial uso destes metalofármacos em testes clínicos. Para que um candidato à fármaco seja considerado seletivo, foi considerando que compostos apresentem o $IS \geq 2^{158}$.

TABELA 4.14 - Índices de seletividade dos complexos de rutênio(II) e da cisplatina frente as linhagens tumorais. Calculados em função dos valores de IC₅₀ em células não tumorais e tumorais.

Índice de Seletividade				
	MCF-10A / MCF-7	MCF-10A / SK-BR-3	MCF-10A / MDA-MB-231	MRC-5 / A549
A1	3,7	17,6	30,9	8,8
A2	1,2	3,0	5,6	1,1
A3	6,8	6,4	12,3	16,4
A4	4,3	8,2	9,9	1,1
A5	6,2	18,9	22,7	14,4
A6	12,4	22,2	31,1	3,1
A7	9,56	11,7	8,5	12,9
A8	1,4	2,9	9,5	4,7
Cisplatina	1,7	0,96	2,3	2,0

Mesmo apresentando potencial citotóxico em todas as linhagens testadas na triagem *in vitro*. Os complexos se sobressaíram em relação ao índice de seletividade na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. Vale a pena ressaltar que tumores que o carcinoma mamário triplo-negativo (MDA-MB-231) apresentam um pior prognóstico e maior risco de recorrência, sendo considerada um câncer agressivo e com altos índices metastáticos. Além disso, a MDA-MB-231 é caracterizada pela ausência de receptores específicos, o que torna o tratamento um grande desafio, uma vez que tumores triplo-negativo conta com agentes terapêuticos limitados¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

De acordo com exposto na Tabela 4.14 os complexos A1, A5 e A6 apresentaram melhores índices de seletividade em células tumorais. Ademais, os compostos demonstraram um IS maior do que o exibido pelo fármaco de referência cisplatina. Dentre a série o complexo A6 foi o mais seletivo, apresentando seletividade de 31, sendo ainda 249 vezes mais seletivo do que a

cisplatina. Por ter sobressaído nos ensaios de viabilidade celular, os complexos A1 e A6 foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos biológicos na linhagem celular MDA-MB-231.

4.7.2 Ensaios Morfológico

As alterações morfológicas induzidas pelos complexos, foram realizadas empregando as células tumorais MDA-MB-231 e a linhagem não tumoral de mama MCF-10A, no qual as concentrações utilizadas foram 1x IC₅₀, 2x IC₅₀, e 10x IC₅₀. As imagens foram registradas nos intervalos de tempo de 0, 24, e 48 horas de tratamento com os compostos. Os efeitos dos complexos na morfologia celular estão ilustrados nas Figuras 4.33 e 4.34.

Os compostos avaliados A1 e A6 no tempo de 24 h na linhagem MDA-MB-231 apresentam comportamento similar, onde observa-se alterações na morfologia celular como: diminuição da densidade celular, células no formato de circular e parcialmente desaderidas, além de formação de debris, sendo mais pronunciados em altas concentrações. Como verificado na literatura, tal comportamento é indicativo de morte celular¹⁶². Na linhagem não tumoral de mama MCF-10A, também ocorre uma pequena alteração na morfologia celular, porém em concentrações do que o IC₅₀, corroborando com os valores de citotoxicidade, demonstrando que os compostos são mais seletivos sobre as células tumorais de mama, do que a linhagem tumoral de mama, MCF-10A.

FIGURA 4.33 - Efeito do complexo A1 na morfologia das células (A) MDA-MB-231(tumoral de mama) e (B) MCF-10A (não tumoral de mama). As figuras foram capturadas no aumento de 10x da objetiva.

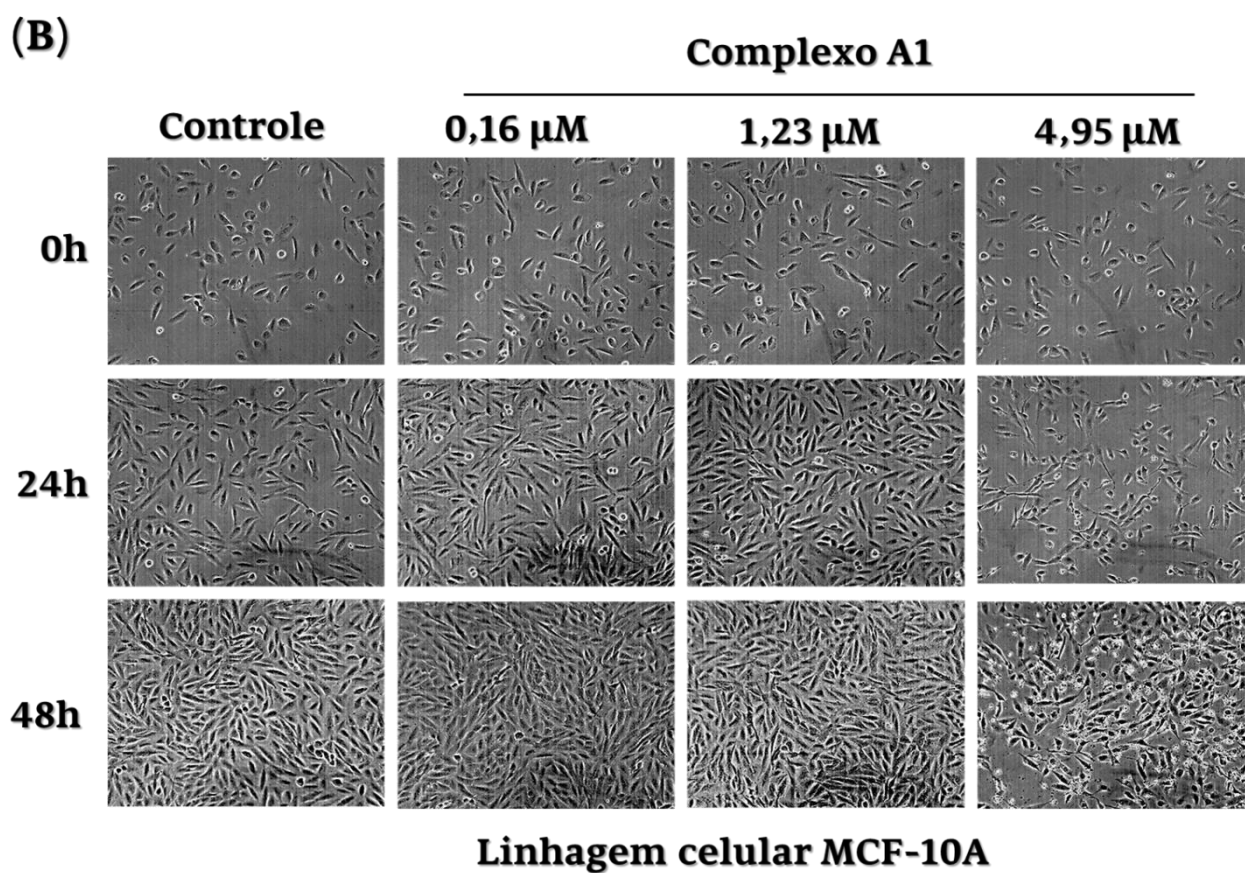
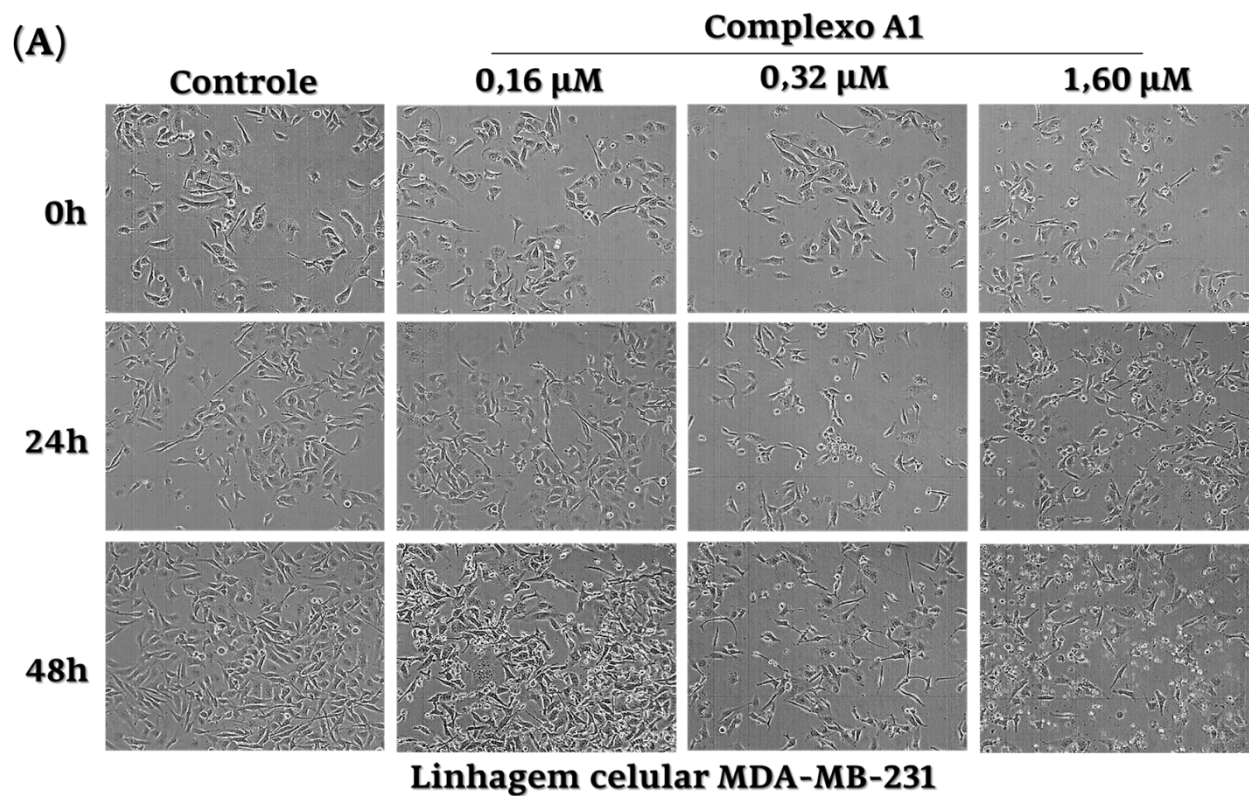
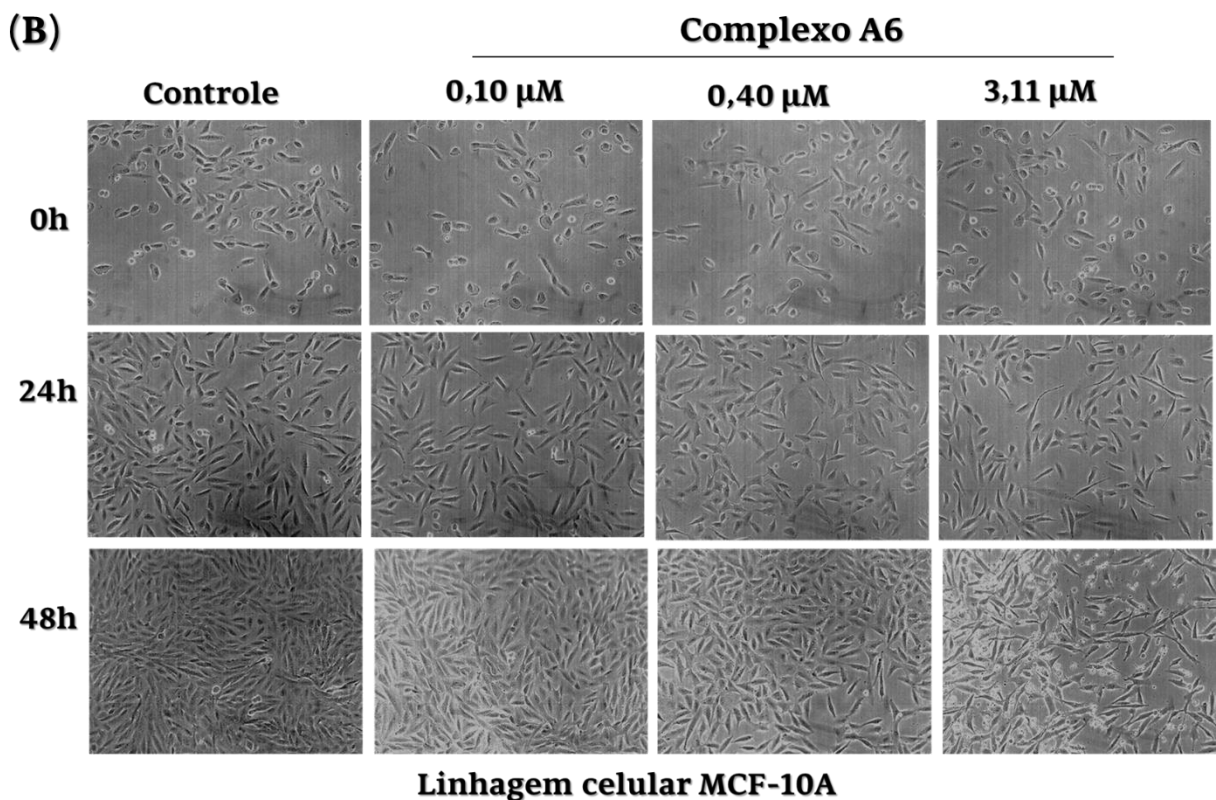
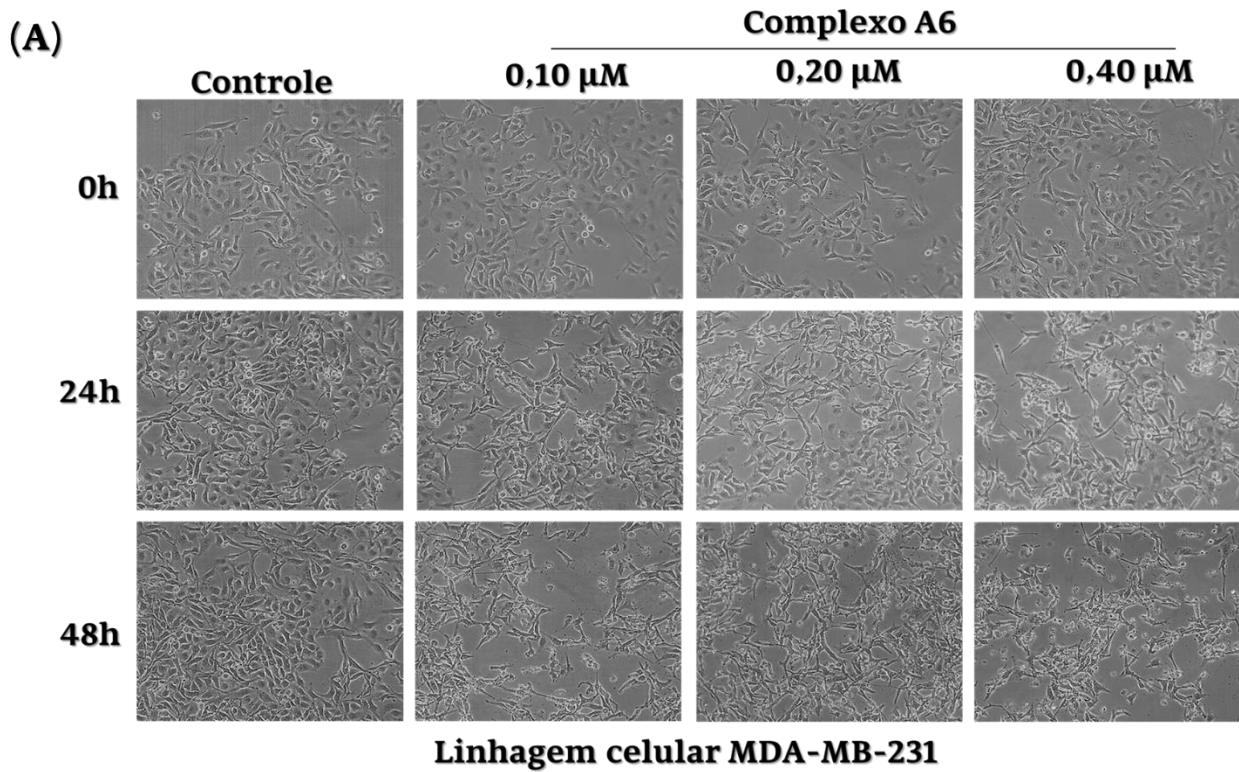


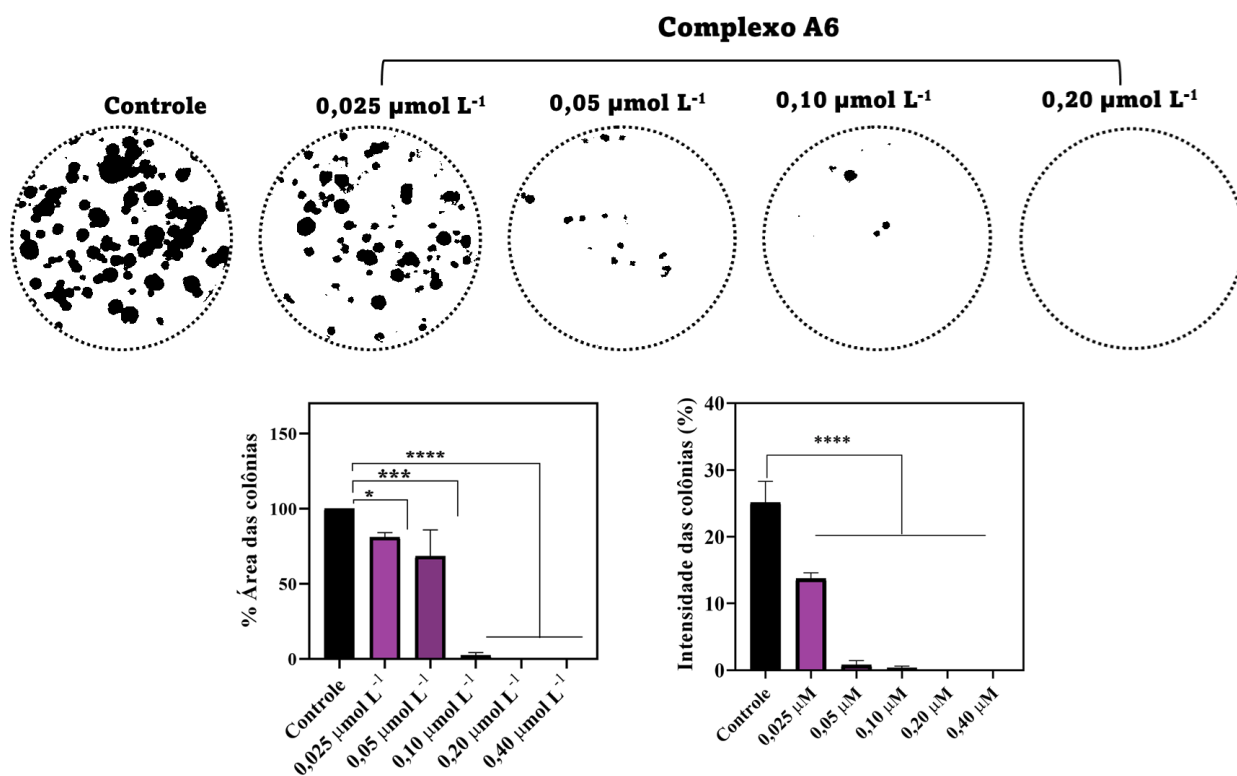
FIGURA 4.34 - Efeito do complexo A6 na morfolgia das células (A) MDA-MB-231(tumoral de mama) e (B) MCF-10A (não tumoral de mama). As figuras foram registradas no aumento de 10x da objetiva.



4.7.3 Ensaios clonogênico (formação de colônias)

O ensaio clonogênico é um experimento *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula proliferar e formar colônias, e é empregado para investigar a capacidade de crescimento e reprodução das células após a exposição de agentes citotóxicos¹⁶³. Os resultados mostraram que após os 10 dias de cultivo, o complexo A6 inibiu significativamente a formação de colônia das células MDA-MB-231, quando comparado com controle sem tratamento, de forma concentração-dependente, como ilustrado na Figura 4.35.

FIGURA 4.35 - Ensaio clonogênico das células MDA-MB-231 tratadas em diferentes concentrações do complexo A6, após 48 h de exposição. As imagens representativas dos poços são mostradas juntamente com os gráficos de barras da área e intensidade das colônias (* $p < 0,03$; e *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata. Os resultados foram comparados utilizando ANOVA e o teste Dunnett.



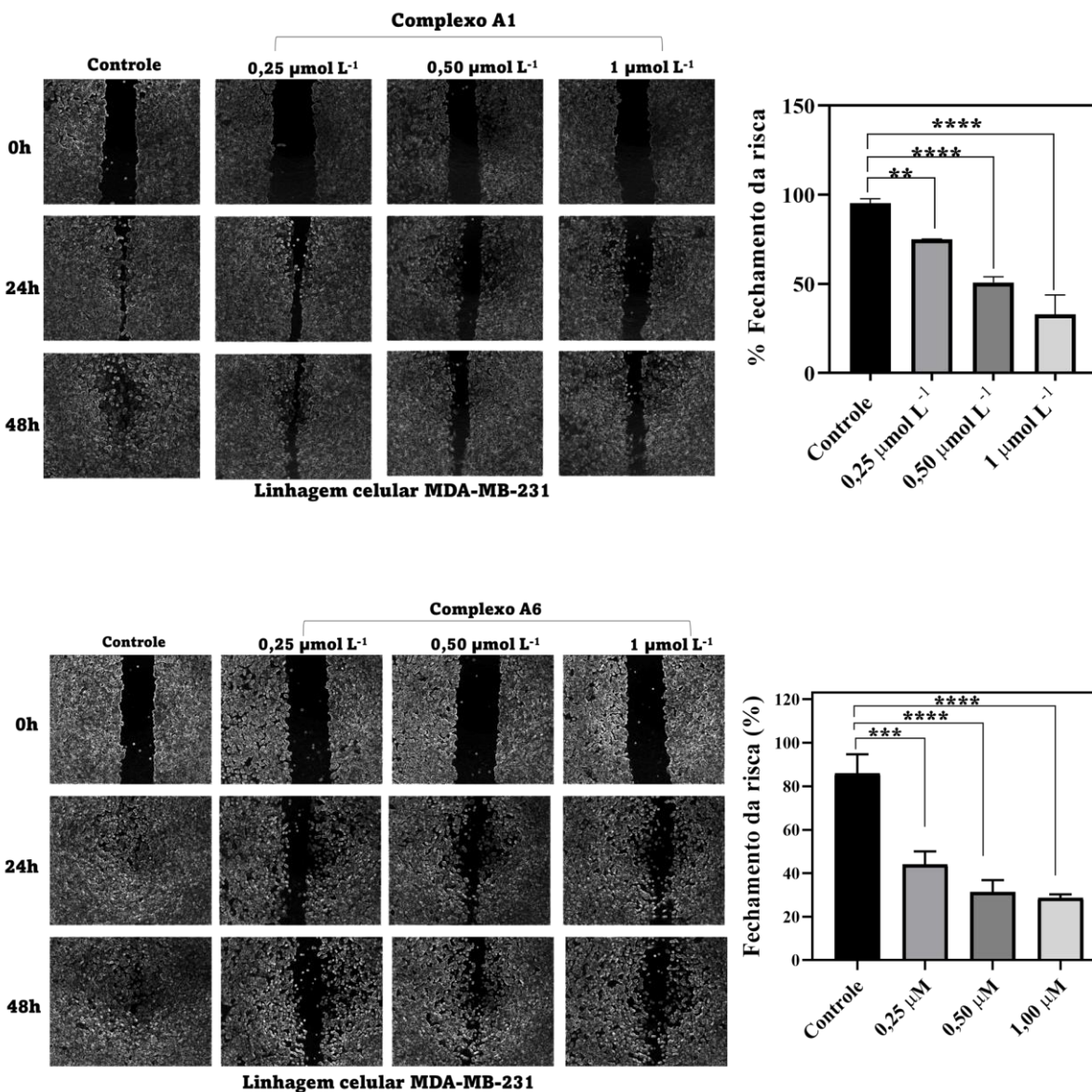
De acordo com a Figura 4.35, a área e a intensidade das colônias formadas diminuíram proporcionalmente com o aumento da concentração do complexo A6, indicando que o composto é citostático, uma vez que induz a perda da clonogenicidade das células MDA-MB-231, bem como sua capacidade de formar e desenvolver colônias¹⁶⁴. Essas informações estão de acordo com o ensaio de viabilidade celular, indicando a citotoxicidade do complexo avaliado, tal comportamento já foi observado para outros compostos de rutênio contendo ligantes fosfínicos e naftoquinonas⁷⁸.

4.7.4 Ensaios de migração celular – *Wound Healing*

A migração celular está diretamente envolvida no processo de metástase, pois ela surge após as células tumorais migrarem do tumor primário por meio do sistema circulatório e fixar-se em novo local. A progressão da metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer, tornando um ponto muito importante para o desenvolvimento de compostos que sejam capazes de agir na migração celular¹⁶⁵. Com essa finalidade, empregou-se o ensaio *Wound Healing*, para avaliar o efeito dos complexos A1 e A6 sobre processo migratório na linhagem celular MDA-MB-231. Foi realizado uma risca sobre superfície celular e o fechamento da risca e as imagens do processo foi monitorado até 24 horas. Na Figura 4.36 é possível observar que os complexos promoveram a diminuição da migração celular nas concentrações avaliadas, quando comparado com controle, no qual houve o fechamento da risca.

O complexo A1 inibiu 67 % da área da risca na concentração 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto o composto A6, foi capaz de inibir eficazmente o processo migratório, mostrando uma inibição de 72 % na mesma concentração. Ademais foi utilizado nos experimento a Mitomicina C, com a finalidade de evitar a proliferação celular.

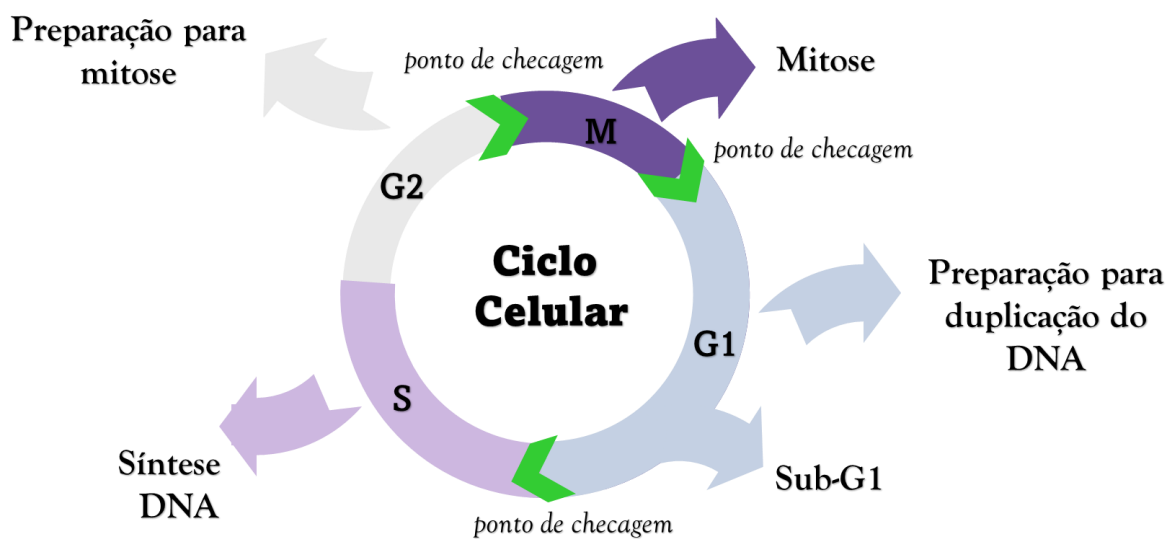
FIGURA 4.36 - Ensio de migração dos complexos A1 e A6 na linhagem celular MDA-MB-231, nas concentrações 0,25, 0,50 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. À direita, representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após o tempo de tratamento de 24 horas. (** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando ANOVA e teste Dunnett.



4.7.5 Análise do ciclo celular

O ciclo celular se caracteriza por um conjunto organizado de eventos que proporciona o crescimento e a divisão celular. Conforme mostrado na Figura 4.37 a progressão do ciclo celular é composta por duas fases importantes: intérfase e mitose. Na intérfase as células se dividem através de quatro fases G1, S, G2 e M. A fase G1 é responsável pelo crescimento e a síntese de biomoléculas, como proteínas e lipídios, que serão utilizadas na fase posterior, a fase S é considerada uma das mais importante, pois ocorrerá a síntese de DNA. A próxima fase G2, também ocorre o crescimento e preparação de proteínas específicas que serão usadas na etapa de duplicação celular, na fase M. O segundo período é a mitose, também conhecida como fase M, onde as células dividem o material genético e ocorre a citocinese¹⁶⁶. E por fim, a fase G0 ou sub-G1, a célula está em um estágio quiescente ou repouso, isto significa que as células encontram momentânea ou definitivamente fora do ciclo¹⁶⁷.

FIGURA 4.37 - Representação da progressão das fases do ciclo celular e os pontos de checagem.



A progressão no ciclo celular é indicada pelos reguladores de ciclo ou pontos de checagem, isto é, para que este estágio ocorra de forma segura, existe um controle que visa manter as informações genéticas seguras, ou seja, somente continuam no ciclo celular as células que estão livres de erros, sem danos em seu DNA, caso o dano não seja reparado, a célula entra em processo de apoptose^{167,168}. Além disso, a inativação dos pontos de checagem no ciclo celular leva a proliferação desordenada e podem resultar no desenvolvimento de células cancerígenas¹⁶⁹ e, assim, demonstram a necessidade de agentes quimioterápicos que são capazes de atuar diretamente no ciclo celular interrompendo o processo de divisão celular. Neste ensaio, avaliou-se a capacidade dos complexos de rutênio de causar alteração na distribuição no ciclo celular da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, coradas com iodeto de propídio, conduzido pela técnica de citometria de fluxo. Nas Figuras 4.38 e 4.39 são apresentados os gráficos que descrevem a distribuição percentual de células nas fases do ciclo celular, para os complexos A1 e A6.

Como se pode observar a partir dos resultados de citometria de fluxo, os complexos A1 e A6 apresentaram um baixo percentual de células com o DNA fragmentado (sub-G1) e estatisticamente não houve diferenças significativas em comparação com o controle em sub-G1. Uma característica da fragmentação do DNA é o indício de morte celular por apoptose^{170,171}. Em relação ao complexo A6, pode-se observar uma diminuição acentuada de maneira dependente da concentração na proporção de células na fase G1, em comparação com as células não tratadas (controle). O complexo A1 promoveu uma diminuição nas células na fase S de maneira concentração-dependente para o complexo A1. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos *in vitro* demonstraram que os complexos de rutênio(II) podem causar danos no ciclo celular em G1 e principalmente em S em várias linhagens tumorais, por exemplo em adenocarcinoma de mama, câncer de pulmão e fígado^{23,105,172-176}

FIGURA 4.38 - Efeito do complexo A1 na distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231 após 48h de incubação. Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular e o gráfico da porcentagem de células corresponde a cada fase do ciclo celular após o tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações, por 48h. Os valores representam a média \pm desvio padrão, dos experimentos realizados em triplicata. Os dados foram comparados com o controle. Significância no nível de ** $p < 0,005$ usando Two-Way ANOVA seguido pela análise pós-teste de Bonferroni's.

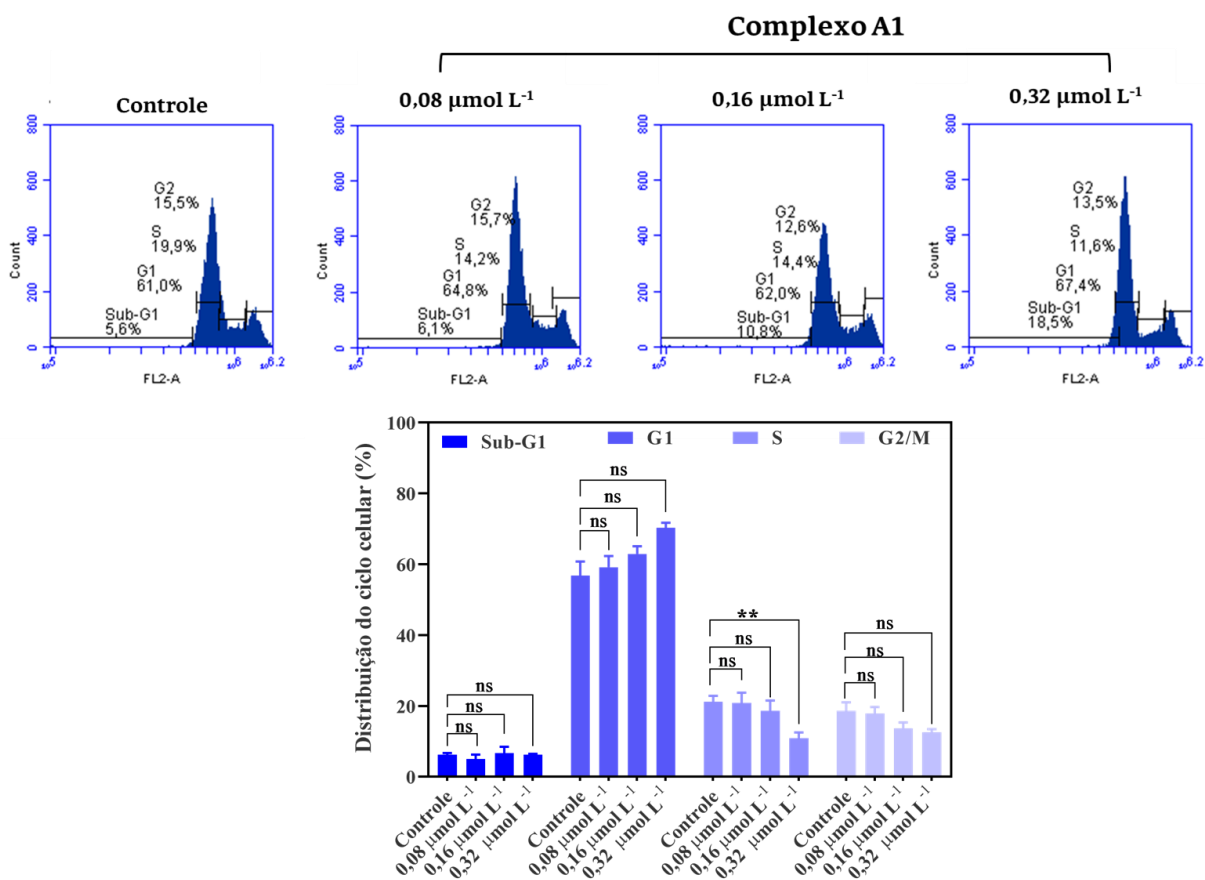
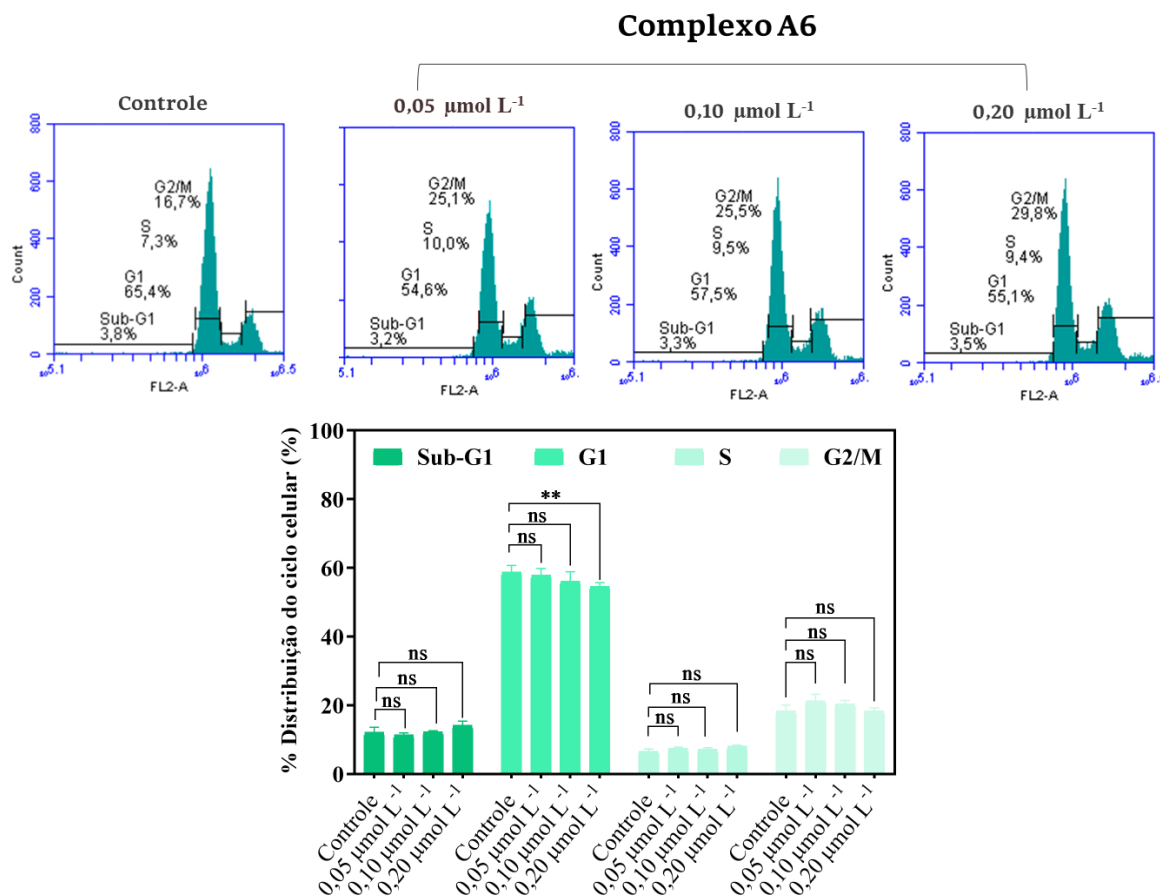


FIGURA 4.39 - Efeito do complexo A6 na distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231 após 48h de incubação. Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular e o gráfico da porcentagem de células corresponde a cada fase do ciclo celular após o tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações, por 48h. Os valores representam a média \pm desvio padrão, dos experimentos realizados em triplicata. Os dados foram comparados com o controle.

Significância no nível de ** $p < 0,005$ usando Two-Way ANOVA seguido pela análise pós-teste de Bonferroni's.



4.7.6 Ensaio de apoptose

Para investigar se os complexos de rutênio, induzem morte por apoptose, realizou-se o experimento empregando o Kit Anexina V-PE, que permite diferenciar as células apoptóticas de células necróticas. Os mecanismos de morte se diferenciam por meio de múltiplos sinais morfológicos e vias bioquímicas. No caso de morte via apoptose ocorre o encolhimento celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos. No mecanismo via necrose ocorre aumento do volume celular, que leva a uma ruptura da membrana celular e liberação do conteúdo celular, causando um processo inflamatório^{177,178}.

Neste sentido a pesquisa sobre o processo de morte trouxe um campo extremamente importante para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais,

uma vez que o desejado é que os quimioterápicos possam induzir a morte celular por apoptose. Diante disso, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram tratadas por 48h, com os complexos A1 e A6 e após foram utilizados os marcadores: 7-AAD (7-aminoactinomicina), que têm capacidade de permear a membrana celular comprometida e se intercalar ao DNA, emitindo um sinal fluorescente que permite quantificar as células em necrose por citometria de fluxo¹⁷⁹. O outro composto é Anexina V-PE uma proteína que se liga com alta afinidade as superfícies fosfolipídicas externalizadas e marca as células em apoptose inicial¹⁸⁰.

Na Figura 4.40 e 4.41 são apresentados os resultados que mostraram o efeito dos compostos A1 e A6 nas células tumorais de mama MDA-MB-231, em que as células estão divididas em quatro quadrantes: o inferior esquerdo representa as células viáveis, inferior direito e superior direito as células em apoptose inicial e tardia e o último quadrante superior esquerdo as células em necrose.

FIGURA 4.40 - Efeitos dos complexos A1 e A6 na indução de apoptose em células tumorais de mama MDA-MB-231, após tratamento com diferentes concentrações, incubados por 48 h.

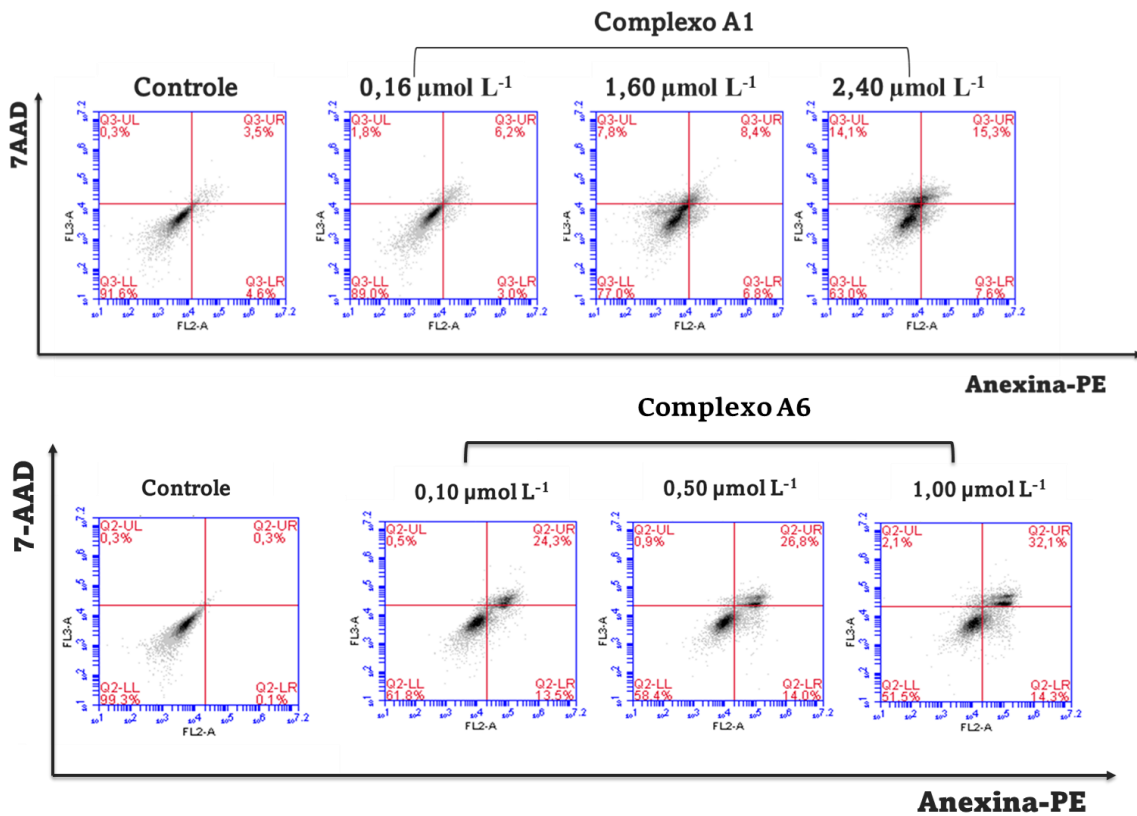
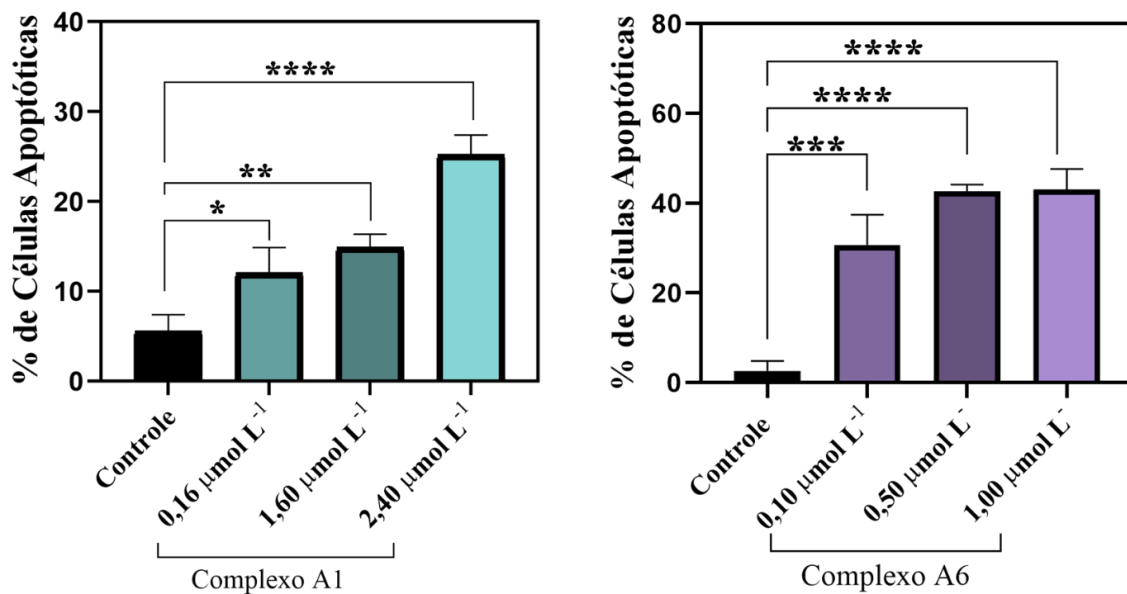


FIGURA 4.41 - Graficos da porcentagem de células apoptóticas após tratamento com os compostos A1 e A6 em diferentes concentrações nas células MDA-MB-231. Significancia (*p < 0,05; ** p < 0,01 e ***p < 0,01, ****p < 0,001). Os dados representam a média ± desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA.



De acordo com as figuras 4.40 e 4.41 os complexos foram capazes de aumentar as populações de células apoptóticas tanto em inicial, quanto tardia na linhagem MDA-MB-231, após 48 h de tratamento. O tratamento com o complexo A6 aumentou significativamente as células em apoptose tardia, em comparação com o controle. Além disso, foi observado uma relação entre a concentração e a proporção de células em apoptose. Analisando os dois complexos observa-se que o complexo A6 demonstra uma maior capacidade de induzir a morte das células na linhagem MDA-MB-231 por apoptose do que o complexo A1.

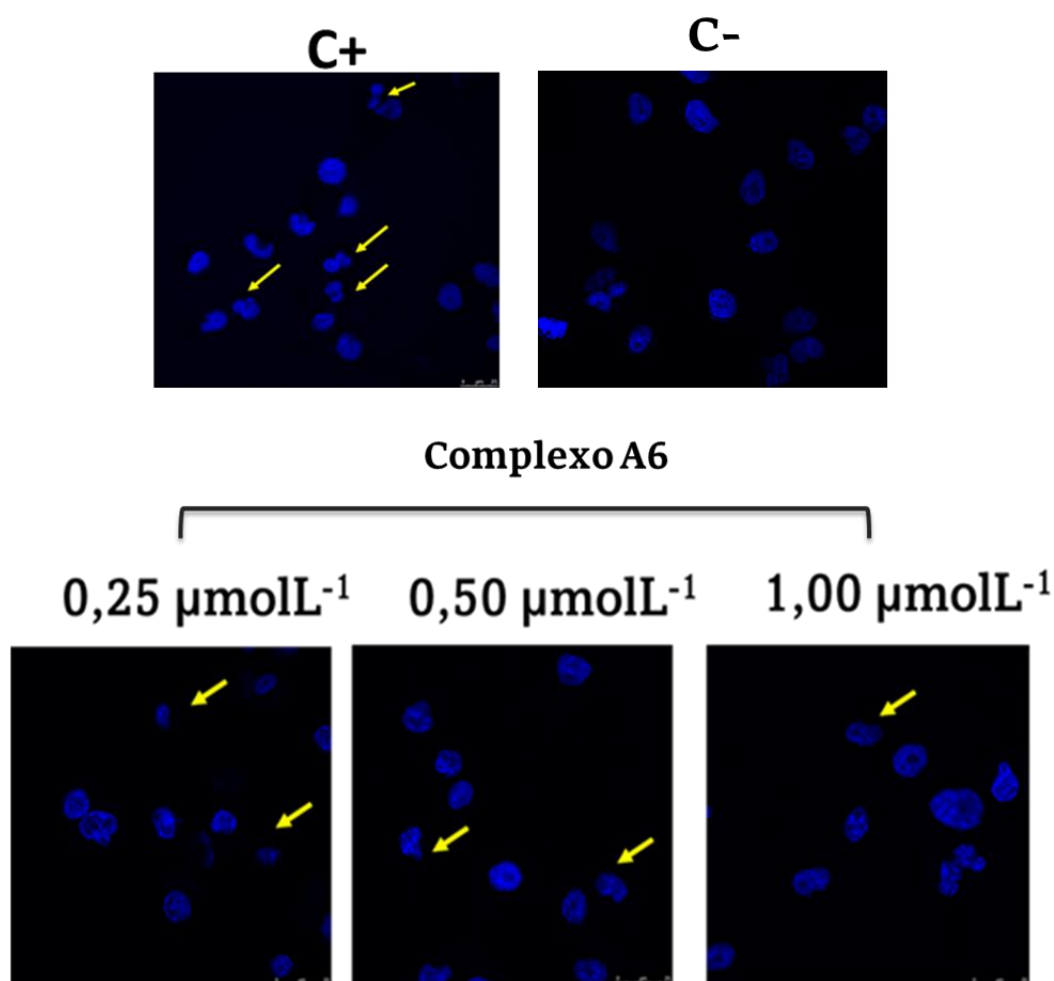
Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, entre inúmeros complexos de rutênio(II), têm demonstrado que são promotores de morte por apoptose. Estudos *in vitro* realizados por Jiang et al.,¹⁸¹ indicaram que os complexos de polipiridil de rutênio do tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{CFPIP})](\text{ClO}_4)_2$ (bpy = 2,2'-bipiridina, CFTIP = (E)-2-(4-fluorestiril)-1H-imidazol[4,5-f][1,10-fenantrolina, Ru(II)-1(b); $[\text{Ru}(\text{fen})_2(\text{CFPIP})](\text{ClO}_4)_2$, Ru(II)-2(c) e $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{CFIP})](\text{ClO}_4)_2$, onde dmb = 4,41-dimetil-2,2'-bipiridina, RuII-3(d), na linhagem HepG-2, induziram a morte celular por apoptose através das vias mitocondrial mediada por espécies reativas e oxigênio.

Outro estudo realizado por Grandis et al.,⁷⁷ também evidenciou o mecanismo de ação do complexo fosfínico de rutênio $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$, (Lap = lapachol, dppm = bis-difenil(fosfino)metano) e phen = 1,10-fenantrolina), no qual induziu apoptose dependente de caspase através de danos ao DNA conduzidos por espécies reativas de oxigênio em células do câncer de próstata (DU-145).

Uma característica importante na indução de morte por apoptose é a fragmentação nuclear¹⁸², portanto realizou-se o ensaio de marcação nuclear empregando o corante conhecido como 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) que emite fluorescência ao se ligar as regiões ricas em adenina-timina do DNA. Como observado na Figura 4.42 o complexo A6 promoveu alterações indicativas de

apoptose nas concentrações avaliadas, como condensação da cromatina e o surgimento de corpos apoptóticos¹⁸³.

FIGURA 4.42 - Efeito do complexo A6 no DNA nas células do câncer de mama MDA-MB-231. As células foram tratada em diferentes concentrações por 24 h e marcadas com DAPI. As setas amarelas indicam o dano nuclear e o aparecimento de corpos apoptóticos.



4.8 Ensaios biológicos dos complexos (série 2)

4.8.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular dos complexos de rutênio sintetizados e dos ligantes foi avaliada utilizando o método colorimétrico de microcultura, em que é possível determinar os números de células viáveis através da redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial à cristais de formazan. Os valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios em células ajudam a direcionar o design de metalofármacos para possível aplicação. O *screening* dos complexos foi realizado frente às linhagens tumorais MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231, A549 e as linhagens não tumorais MRC-5 e MCF-10A, a fim de investigar qual composto apresenta melhor resposta frente às linhagens cancerígenas. Os resultados de citotoxicidade para os complexos de rutênio(II) estão dispostos nas Tabelas 4.15 e 4.16.

TABELA 4.15 - Valores de IC₅₀ são expressos como média e desvio padrão de três ensaios independentes para os complexos de rutênio(II), seus respectivos ligantes no período de incubação de 48 h, nas linhagens tumorais de mama, MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e a não tumoral MCF-10 A.

Citotoxicidade após 48h de incubação IC₅₀ (µM ± SD)				
Complexos	MDA-MB-231	MCF-7	SKBR-3	MCF-10A
B1	0,40 ± 0,01	0,90 ± 0,14	0,06 ± 0,01	0,92 ± 0,17
B2	0,21 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,58 ± 0,05	2,18 ± 0,14
B3	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	1,15 ± 0,10
B4	0,10 ± 0,01	0,30 ± 0,08	0,18 ± 0,05	2,55 ± 0,60
NQ2	>100	>100	>100	>100
NQ3	>100	>100	>100	>100
Cisplatina	24,90 ± 3,40	13,99 ± 2,02	10,20 ± 0,90	23,90 ± 0,70

TABELA 4.16 - Valores de IC₅₀ para os complexos de rutênio(II), seus respectivos ligantes no período de incubação de 48 h, na linhagem tumoral de pulmão (A549) e a não tumoral de pulmão (MRC-5).

Citotoxicidade após 48h de incubação IC₅₀ (µM ± SD)		
Complexos	A549	MRC-5
B1	1,93 ± 0,54	2,77 ± 0,73
B2	1,87 ± 0,44	3,16 ± 0,18
B3	0,34 ± 0,06	1,22 ± 0,18
B4	1,55 ± 0,28	1,33 ± 0,11
NQ2	>100	>100
NQ3	>100	>100
Cisplatina	11,54 ± 1,19	29,07 ± 0,78

Os valores de IC₅₀ dos ligantes naftoquinonas NQ2 e NQ3 corroboram com os trabalhos reportados na literatura, apresentando altos valores de citotoxicidade, quando testados na concentração máxima de 100 µmol L⁻¹ ^{160,64,77,78,118}. De acordo com os resultados expostos nas tabelas 4.14 e 4.15, os compostos apresentaram maior atividade inibitória do que os valores exibidos pelo fármaco de referência cisplatina (controle positivo). Além disso, após a complexação dos ligantes ao centro metálico de rutênio, promove um aumento da atividade biológica em todas as linhagens celulares avaliadas. Curiosamente, os complexos tiveram maior potência e afinidade para as linhagens do câncer de mama. O composto B3 foi o mais citotóxico dentro da faixa de IC₅₀ apresentado na Tabela 4.16 o que é consistente com o valor de lipofilicidade (Log P = 0,68).

O complexo B3 apresentou os melhores valores de IC₅₀, tendo uma atividade citotóxica cerca de 331 vezes maior nas células tumorais de mama triplo negativo, quando comparado com o fármaco cisplatina. Esses dados demonstraram o potencial antitumoral do composto para as células do câncer de mama MDA-MB-231.

A partir dos resultados de IC_{50} , pode-se calcular índice de seletividade (IS) referente a cada complexo, no qual considerou-se a relação dos valores de IC_{50} encontrados em células não tumorais e tumorais, como pode ser visto na Tabela 4.17.

TABELA 4.17 - Valores de índice de seletividade (IS) para os complexos B1-B4, nas linhagens celulares de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e na linhagem tumoral de pulmão A549.

Índice de seletividade (IS)				
Complexos	MDA-MB-231	MCF-7	SKBR-3	A549
B1	2,3	1,0	15	1,5
B2	10	3,8	3,7	2,2
B3	14	11	16	3,8
B4	25	8,5	14	0,91
Cisplatina	0,95	1,7	2,3	2,0

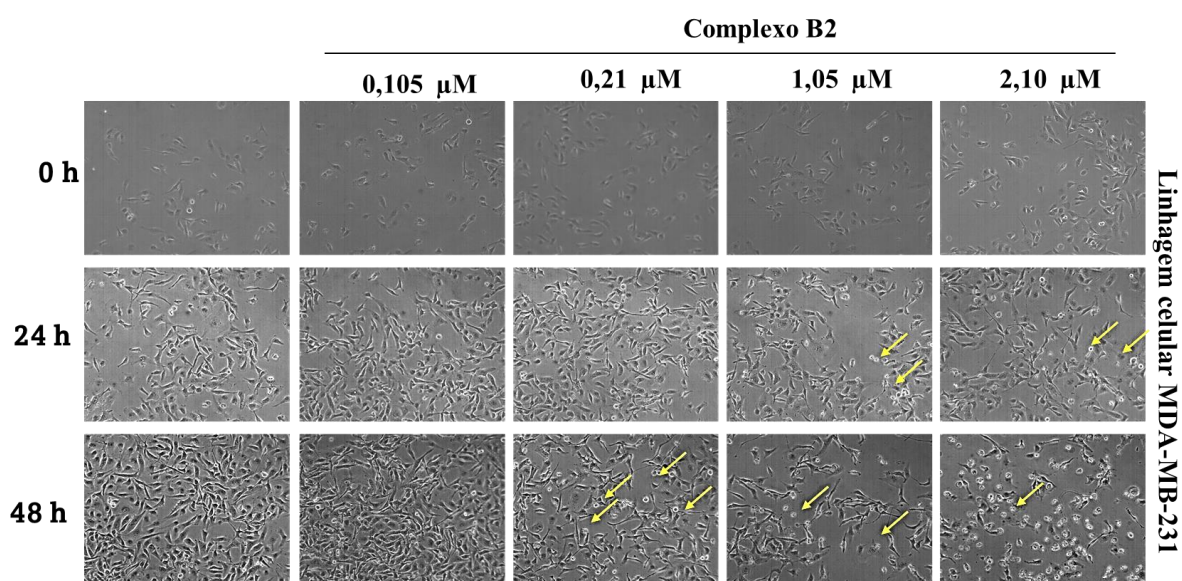
O complexo B4, foi o mais seletivo na linhagem tumorais de mama MDA-MB-231. Em concordância com os nossos resultados, estudos com os complexos de rutênio Ru(II)-naftoquinona contendo ligantes fosfínicos e bipyridínicos, demonstraram que após 48 h de incubação os compostos foram capazes de inibir a proliferação das células MDA-MB-231, apresentando seletividade de 20 vezes maior do que a cisplatina⁷⁹. De acordo com os valores de seletividade os compostos B2 e B4 foram escolhidos para dar continuidade aos ensaios biológicos na linhagem triplo negativo MDA-MB-231.

4.8.2 Ensaio morfológico

Com intuito de avaliar os efeitos dos complexos B2 e B4 sobre a morfologia das células MDA-MB-231 e a não tumoral MCF-10A, as células foram expostas com diferentes concentrações e as imagens capturadas no intervalo de 0 h , 24 h e 48 h. Conforme mostrado nas Figura 4.43 e 4.44, observa-se alterações morfológicas com a concentração no IC₅₀ 0,21 μmol L⁻¹ (B2) e 0,10 μmol L⁻¹ (B4), no tempo de 48 h. Nas concentrações acima do IC₅₀ dos compostos avaliado, percebe-se uma diminuição da densidade celular, aparecimento de células em formato circular e desaderência celular. Por outro lado, nas concentrações mais baixas não foram observadas alterações morfológicas.

Para as células da linhagem MCF-10A quando tratadas com os complexos B2 e B4 em altas concentrações no tempo de incubação de 48 horas, tiveram sua morfologia levemente alterada, onde podemos observar células parcialmente desaderidas e em formato circular. As alterações encontradas indicam que os complexos demonstram uma maior seletividade citotóxica pelas células tumorais.

FIGURA 4.43 - Alterações morfológicas do complexo B2 nas células MDA-MB-231 e MCF-10A. As setas indicam alterações morfológicas. As setas indicam as alterações morfológicas.



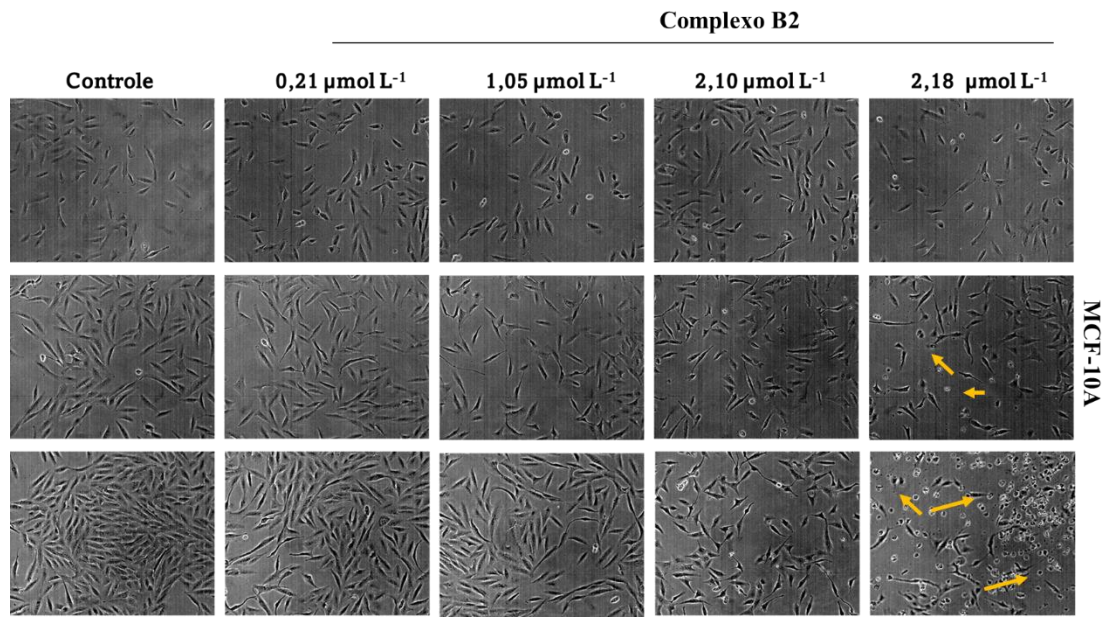
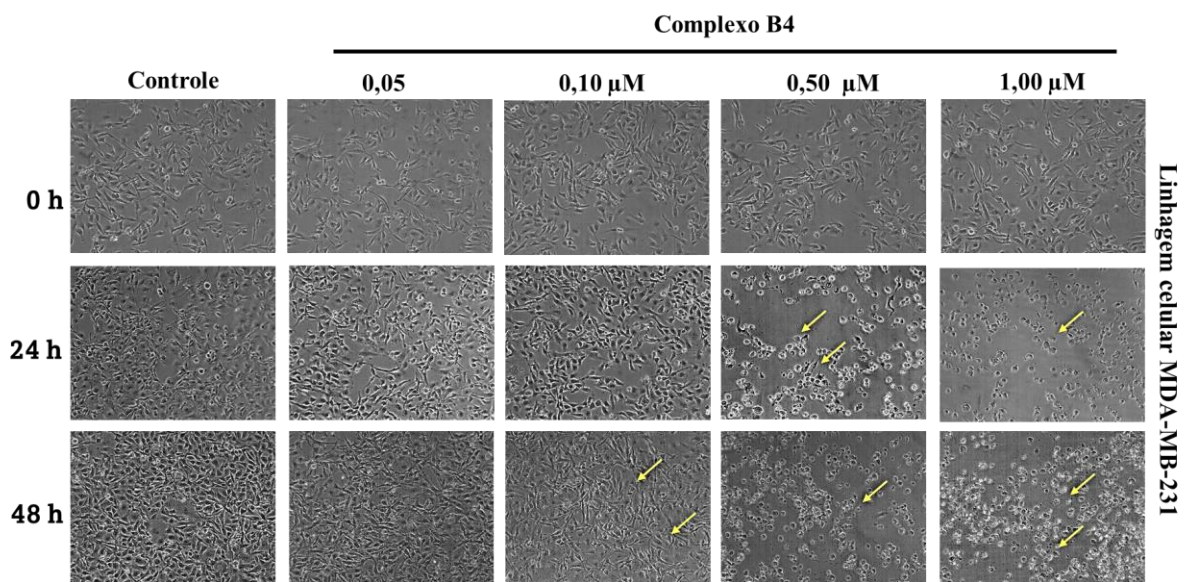
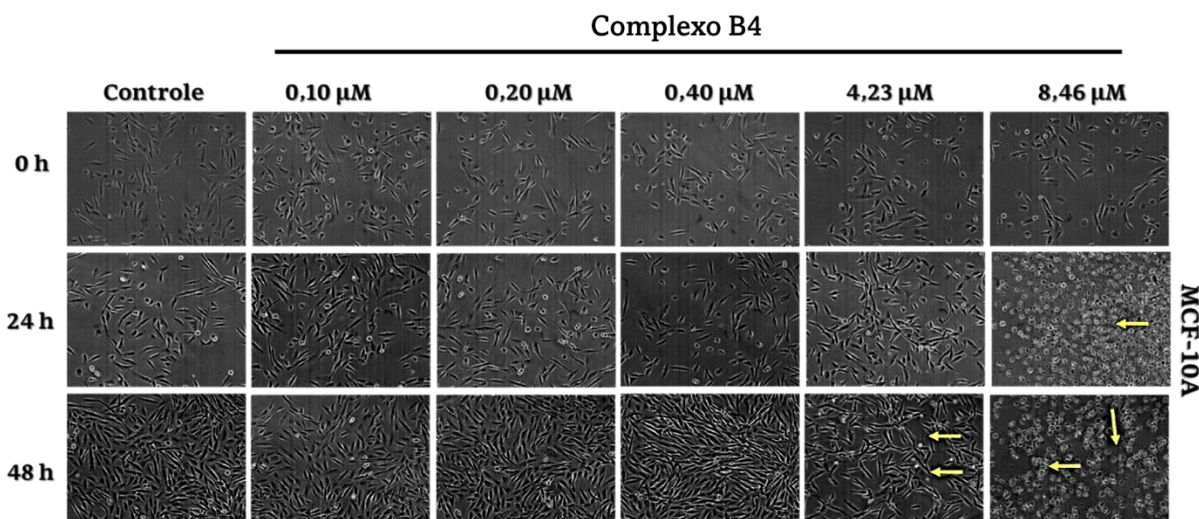


FIGURA 4.44 - Alterações morfológicas do complexo B4 nas células MDA-MB-231 e MCF-10A. As setas indicam alterações morfológicas. As setas indicam as alterações morfológicas.





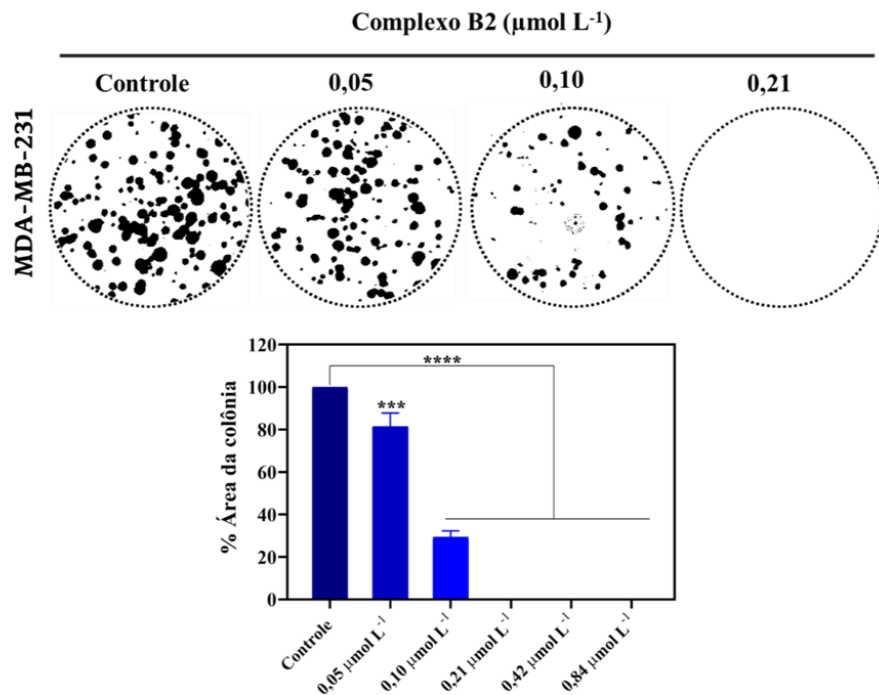
4.8.3 Ensaio clonogênico

Com o experimento clonogênico, buscou avaliar a capacidade de uma única célula proliferar, crescer e formar colônias. Assim, as células MDA-MB-231, foram expostas aos compostos em diferentes concentrações e os resultados estão apresentados nas Figuras 4.45 e 4.46. A inibição da formação de colônia é proporcional ao aumento da concentração dos complexos, bem como a diminuição da área da colônia.

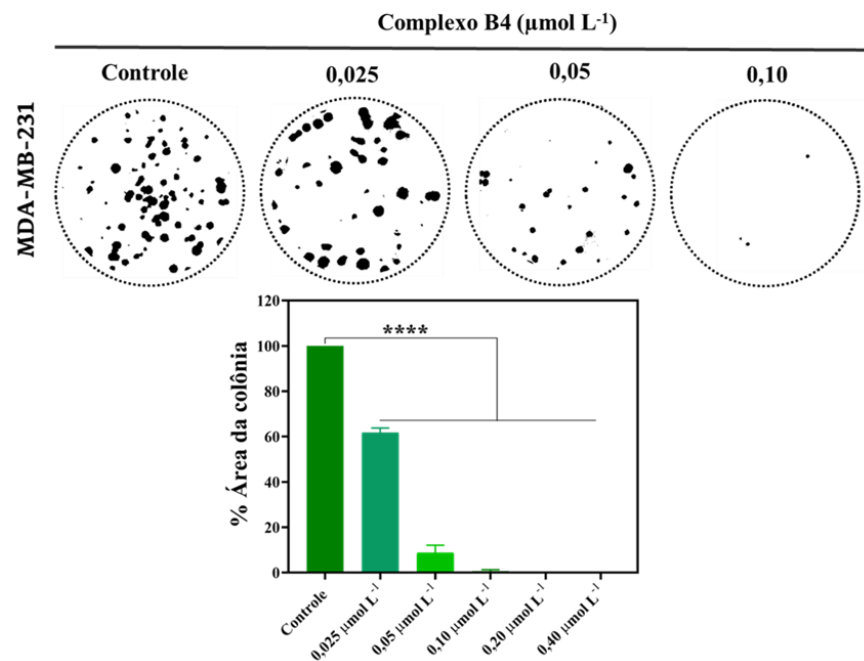
No caso do complexo B2 a partir do valor percentual referente área de colônia, na concentração do IC_{50} , houve completamente a inibição de colônias, enquanto para o complexo B4, na concentração $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$, não houve inibição total das colônias. No geral, os complexos foram capazes de inibir significativamente as colônias de células de mama, evidenciando os efeitos citotóxicos e citostático.

FIGURA 4.45 - Ensaio clonogênico das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do complexo B2 (A) e complexo B4 (B) após 10 dias de tratamento. Os dados representam média, desvio padrão, de três ensaios independentes em triplicata. Dados significativos em $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$ utilizando a ANOVA e pós-teste Dunnet.

(A)



(B)



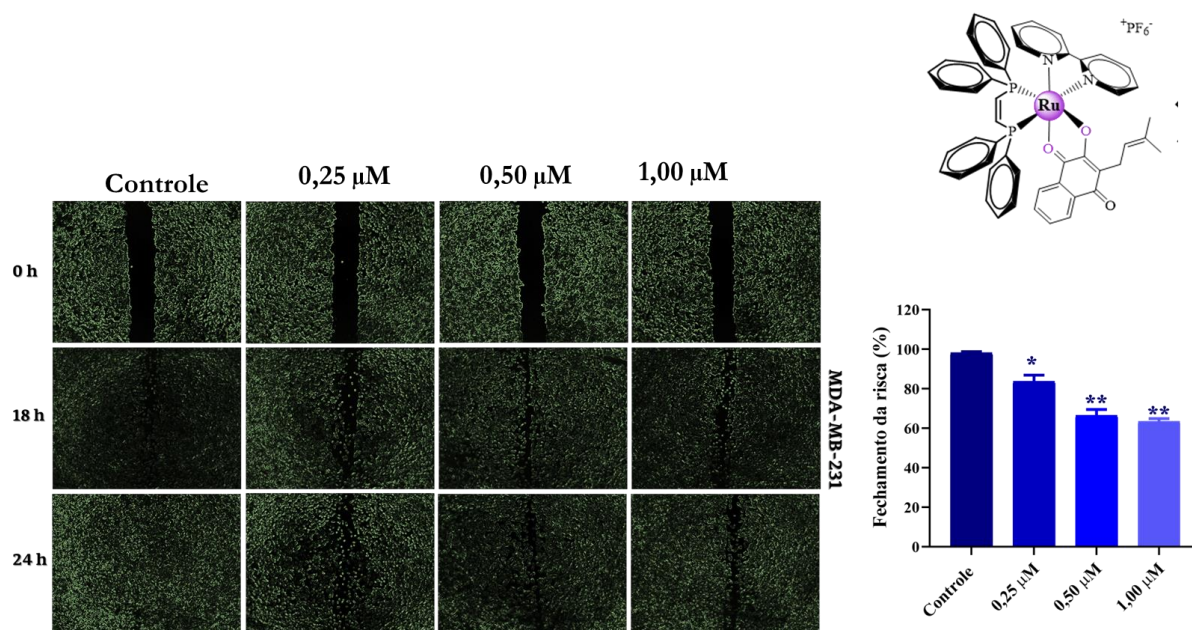
4.8.4 Ensaio de migração

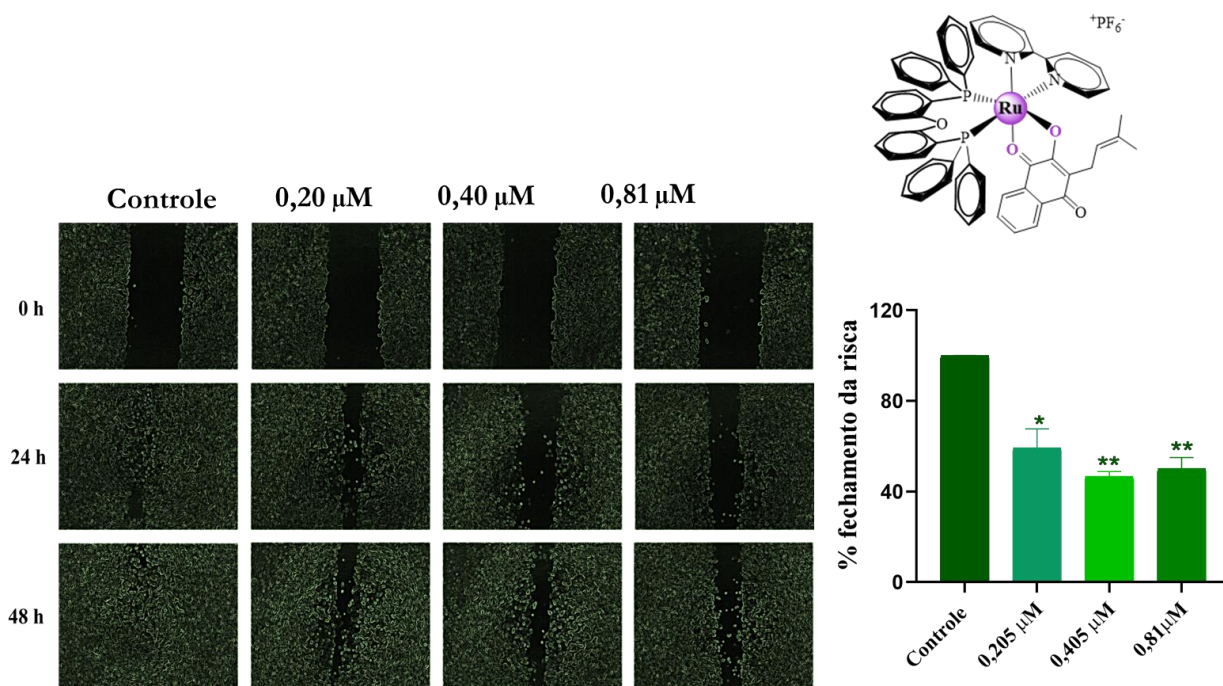
A migração celular está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos. No caso do câncer, a migração encontra-se presente no processo de metástase. O ensaio de migração foi empregado para avaliar as propriedades antimetastático dos complexos nas células de MDA-MB-23. A quantificação da

área de fechamento da ferida, foi calculado, medido o fechamento da área do controle e dos compostos mediante o tempo de avaliação.

Na Figura 4.46, observar-se que os complexos foram capazes de impedir a migração celular em todas as concentrações testadas. Comparando as informações dos complexos B2 e B4 com o controle, observa-se que o complexo B2 foi mais eficiente no processo de migração, na concentração de 1,00 μM ocorre uma inibição de 89,3 % de migração celular. Enquanto para o complexo B4 o processo migratório na maior concentração não foi tão eficiente.

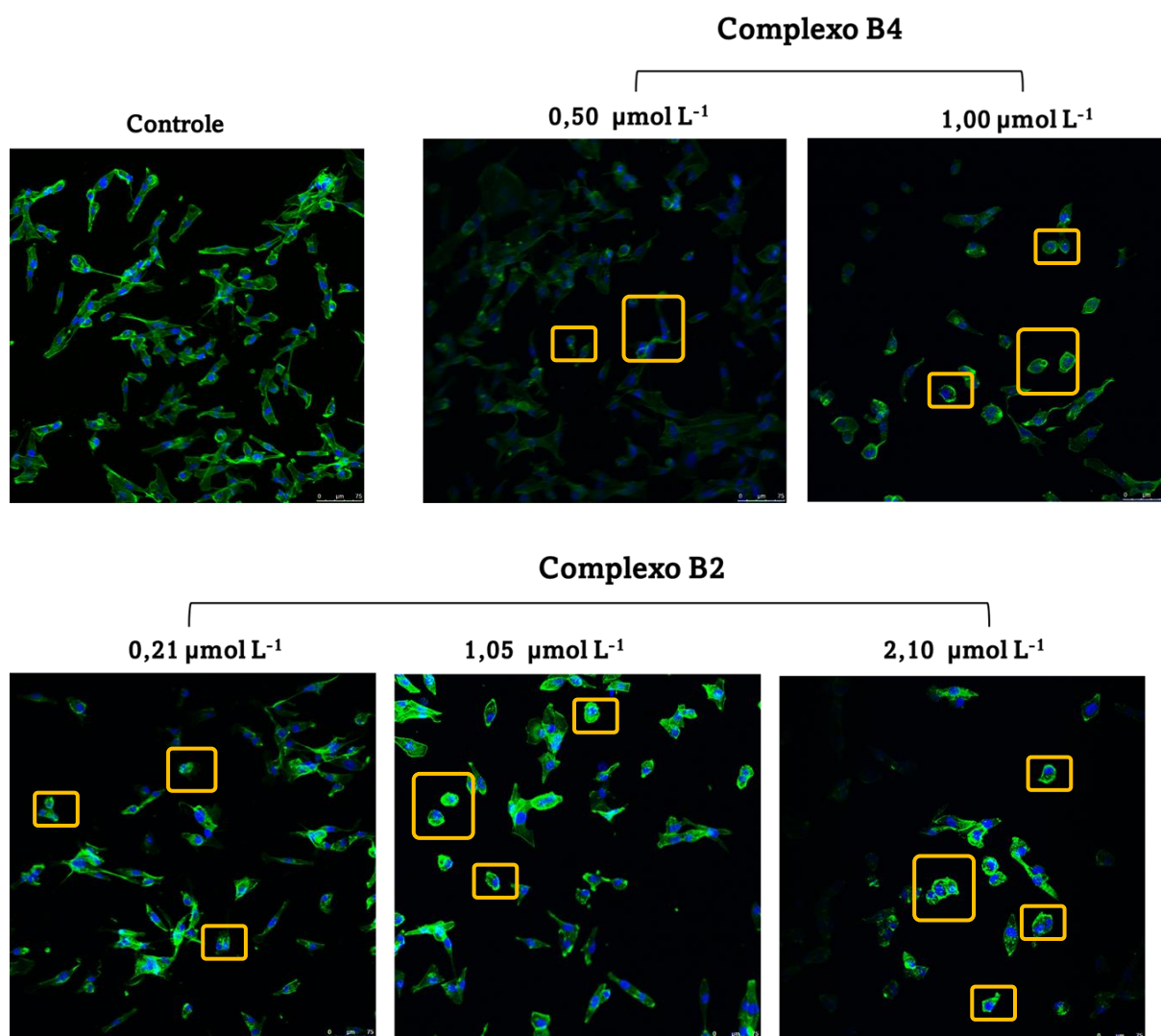
FIGURA 4.46 - Ensio de migração dos complexos B2 e B4 na linhagem celular MDA-MB-231, em diferentes concentrações. À direita, representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após o tempo de tratamento de 24 horas. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA e teste Dunnett.





Para avaliar se os complexos B2 e B4 são capazes de alterar o citoesqueleto das células tumorais, uma vez que eles foram capazes de inibir a migração celular, realizou-se qualitativamente o ensaio de imunocoloração onde as células MDA-MB-231 foi marcada com faloidina (Alexa flour488), após 24 h de incubação com os compostos em diferentes concentrações. Os resultados apresentados na Figura 4.47 indicam que houve uma alteração no citoesqueleto celular, como diminuição da densidade das fibras de actina em todas as concentrações testadas. Além disso, a ruptura no citoesqueleto é um ponto importante durante a apoptose, devido que as fibras de actina afetam os sinais que levam à apoptose¹⁸⁴.

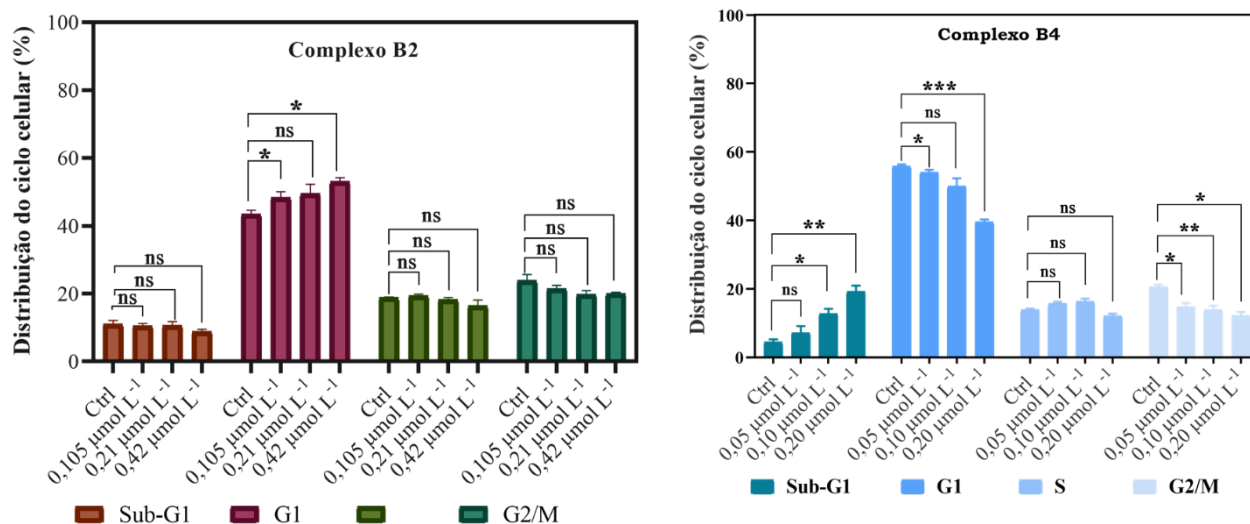
FIGURA 4.47 - Efeito de diferentes concentrações do complexos de rutênio B4 e B2 no citoesqueleto das células MDA-MB-231. As imagens representam a fixação das células com Alexa Fluor 488. Os quadradinhos em laranja indicam as alterações observadas.



4.8.5 Análise do ciclo celular

A atividade citotóxica dos complexos frente as linhagens tumorais, pode estar associado a parada do ciclo celular ou indução de apoptose. Buscando investigar o efeito dos complexos de rutênio no ciclo celular, as células MDA-MB-231 foram tratadas nas concentrações $\frac{1}{2} IC_{50}$, $1xIC_{50}$ e $2xIC_{50}$ e incubadas por 48 horas e subsequente as células foram coradas com iodeto de propídeo e conduzida por citometria de fluxo. Na Figura 4.48 estão apresentados os gráficos de porcentagem de distribuição do ciclo celular em diferentes concentrações dos compostos B2 e B4.

FIGURA 4.48 - Efeito dos complexos B2 e B4 na distribuição do ciclo celular na linhagem tumoral MDA-MB-231. Significancia (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata.



Apesar da similaridade estrutural entre os complexos B2 e B4, os dados do ciclo celular indicam comportamento diferente no processo de parada das fases do ciclo. Para o complexo B4 houve um aumento na proporção celular em sub-G1, onde podemos observar que a quantidade de células aumenta em maiores concentrações, sendo o efeito de maneira concentração dependente. Tal

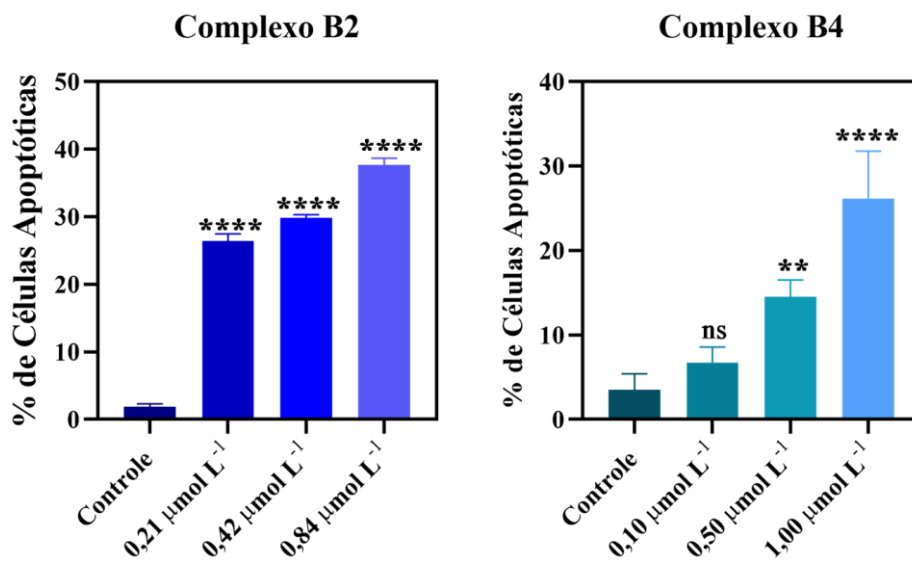
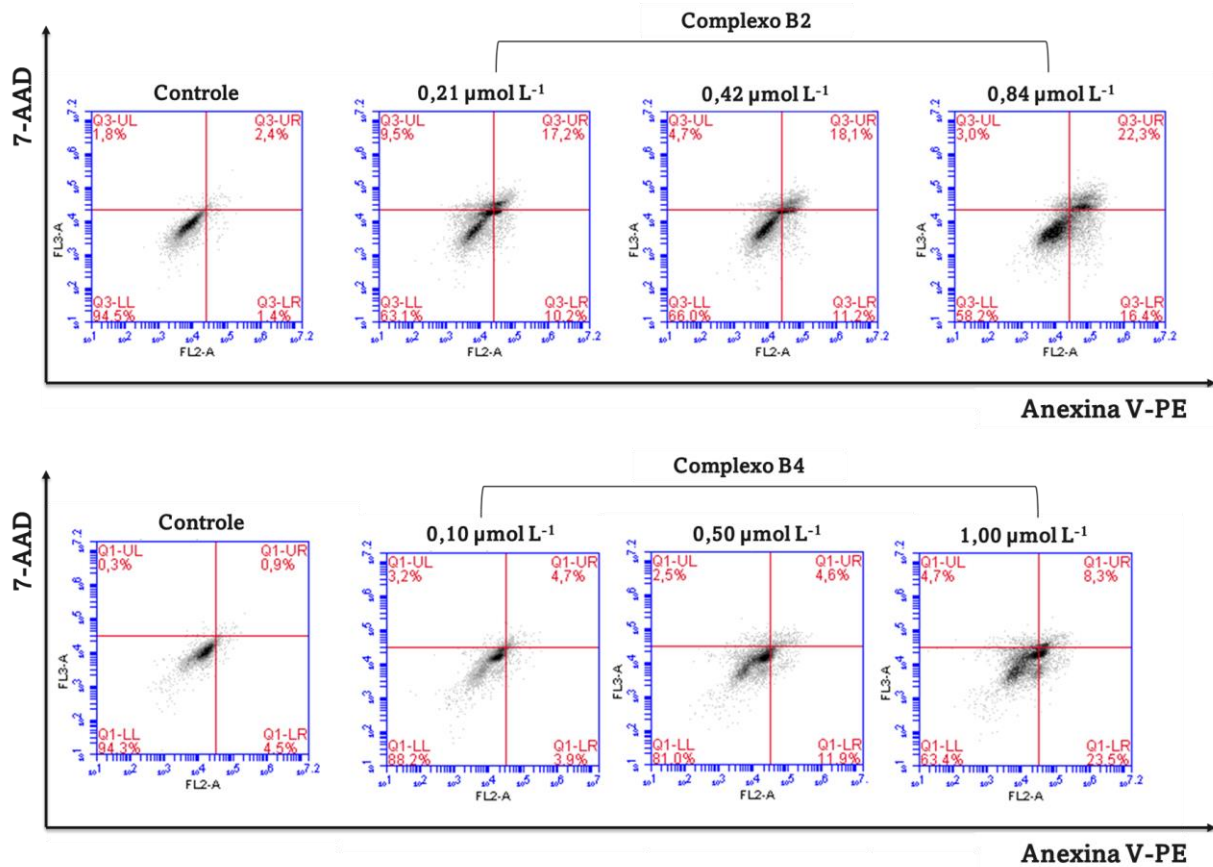
comportamento em sub-G1 corresponde a fragmentação do DNA, que leva a morte por apoptose^{182,183}. Além disso, houve um decréscimo da população de células em fases G1 e G2/M, quando comparado com o controle. Os resultados obtidos sugerem que o composto B4, pode provocar alteração nas fases G1 e G2/M do ciclo celular em função da concentração e do tempo de exposição deste complexo. Enquanto o complexo B2 não houve nenhuma alteração significativa nas fases de distribuição no ciclo celular, exceto nas concentrações 0,105 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em que observou um discreto aumento na porcentagem de células na fase G1.

4.8.6 Ensaio de apoptose

Para avaliação da influência dos complexos B2 e B4 na indução de morte por apoptose da linhagem tumoral MDA-MB-23, foi realizado ensaio a partir da incubação dos compostos em diferentes concentrações por um período de 48 horas. Posteriormente as células foram marcadas com os corantes fluorescentes anexina V-PE e o 7-AAD e quantificado por citometria de fluxo. Os resultados obtidos para os complexos B2 e B4 na indução de apoptose estão apresentados na Figura 4.49.

Inicialmente foi observado um aumento do percentual de células apoptóticas, sendo referente aos valores de 25,4 % (0,21 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 29,8 % (0,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 37,7 % (0,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$), para o composto B2, esses valores correspondem a somatória das células em apoptose inicial e tardia. No caso do complexo B4 nas concentrações 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a proporção de células apoptóticas foram de 6,75 %, 14,5 % e 26,1 % respectivamente. Diante dos resultados os compostos induzem a morte por apoptose de maneira dependente da concentração. Na literatura os complexos de rutênio são conhecidos por promover morte por apoptose em diferentes linhagens tumorais.

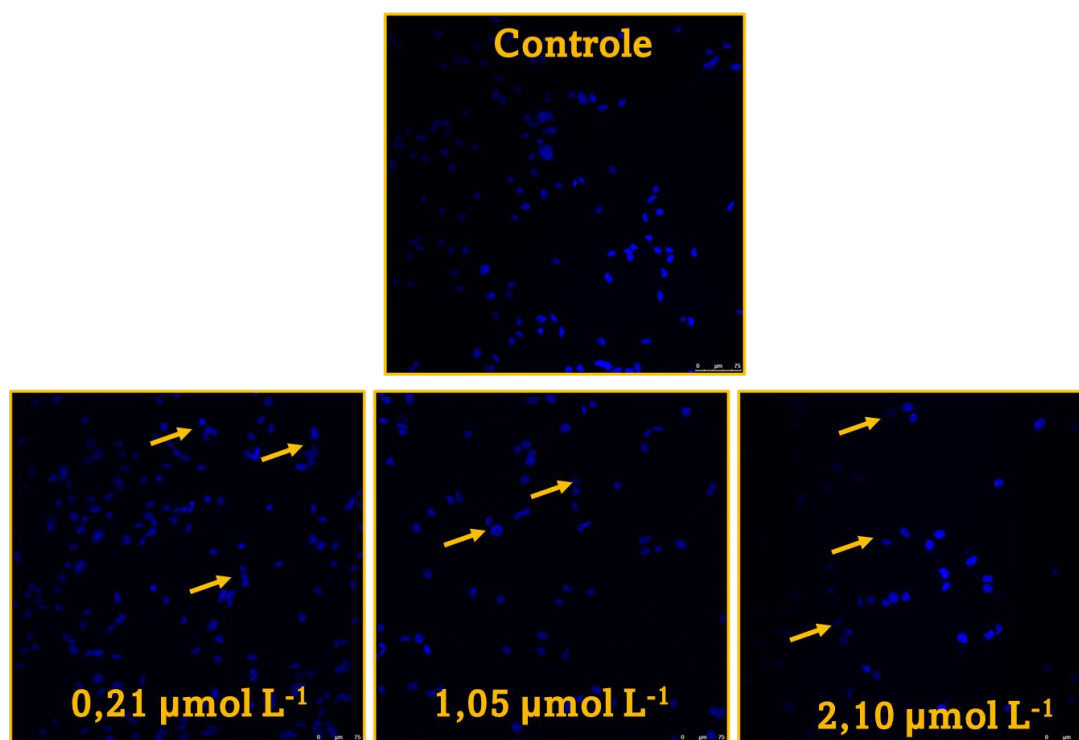
FIGURA 4.49 - Efeitos dos complexos B2 e B4 na indução de apoptose de células MDA-MB-231, após tratamento com diferentes concentrações, incubados por 48 h.. Sigificancia (** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$). Os dados representam a média \pm desvio padrão dos experimentos em triplicata, utilizando a ANOVA.



Zeng et al.,¹⁸⁵ relataram o mecanismo de ação de complexo de polipiridil de rutênio(II), do tipo $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{dhbn})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dhbn})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{dhbn})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{dhbn})]^{2+}$, onde dmb = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina; bpy = 2,2'-bipiridina; dmp = 2,9-dimetil-1,10-fenatrolina e phen = 1,10-fenatrolina, onde os resultados demonstraram que os compostos induzem apoptose em células tumorais HepG-2, por meio da via mitocondrial mediada por ROS.

A fragmentação do DNA é uma marca registra da morte por apoptose, sendo assim o dano ao núcleo, foi investigado pelo de ensaio de coloração com DAPI, conforme visualizado na Figura 4.50, os resultados indicam que o composto promove condensação da cromatina do DNA, que é mais uma evidência de apoptose.

FIGURA 4.50 - Efeito do complexo B2 no DNA nas células MDA-MB-231. As células com foram marcadas com DAPI. As setas laranja indicam o dano nuclear.



CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados doze novos complexos de rutênio(II), contendo ligantes naftoquinonas, bipyridínicos e fosfínicos, divididos em duas séries. A primeira série foi formada por oito complexos contendo o ligante 3-estiril-lausona (NQ1) e na segunda série foi composta de quatro compostos contendo os ligantes lausona (NQ2) e lapachol (NQ3).

As caracterizações realizadas pelo uso de diversas técnicas espectroscópicas, espectrométricas, análise elementar e condutividade molar permitiram confirmar as estruturas propostas para os compostos. O modo de coordenação metal-ligante ocorreu de forma de bidentada, via átomos de oxigênio (O1 e O2). Em relação as das estruturas cristalinas obtidas pela difração de raios X, foi possível identificar os dois isômeros obtidos no meio reacional, onde temos o átomo de oxigênio da carbonila dos ligantes naftoquinonas *trans* posicionado ao átomo de fósforo da fosfina, e a outra espécie apresenta o átomo de oxigênio da hidroxila *trans* ao átomo de fósforo.

A técnica de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ também corroborou com a estrutura, onde os espectros obtidos mostraram informações significativas devido a presença das carbonilas e hidroxilas, serem deslocadas para regiões mais desblindadas devido formação do novo composto.

No ensaio de interação com a biomolécula DNA, empregando a viscosidade, eletroforese em gel e titulação espectroscópica (competição com a sonda Hoechst), os estudos demonstraram que os complexos de rutênio(II) não interagem de forma covalente ou intercalativa com DNA. Na eletroforese não se observou alterações significativas na mobilidade do DNA plasmidial com os compostos. O ensaio de competitivo com o Hoechst 33258, evidenciou que os complexos foram capazes de deslocar o corante da estrutura do DNA, sugerindo que os compostos interagem *via* sulco menor do DNA. Os resultados obtidos para as séries 1 e 2 estão em concordância entre si. Com os ensaios de inibição

enzimática da topoisomerase II α , observou-se que os complexos A1, B2 e B4 são capazes de inibir parcialmente a atividade da enzima.

Os estudos de interação dos compostos de rutênio(II) com a HSA, demonstraram que os complexos interagem pelo sítio I da proteína. As constantes de ligação compreendem a ordem de 10^3 a 10^5 indicando interações de fraca a moderada. Os parâmetros termodinâmicos calculados indicam forças hidrofóbicas. Além disso, valores negativos de energia de Gibbs contribuem para processo de interação espontâneo e reversível, sendo entropicamente e entalpicamente favorável.

Os 12 complexos sintetizados foram avaliados frente as linhagens tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-2 e a tumoral de pulmão A549 e as linhagens não tumoral MCF-10A e MRC-5. Os resultados de viabilidade celular demonstram que os complexos de rutênio são mais citotóxicos do que os ligantes livres e o fármaco de referência cisplatina. Os valores de seletividade dos compostos sobressaíram na linhagem tumoral de mama triplo negativo MDA-MB-231.

Os complexos de modo geral causaram alterações morfológicas nas células MDA-MB-231 e MCF-10A, sendo mais pronunciado na linhagem tumoral. Ademais, os compostos foram capazes de inibir a formação de colônias e modificar o citoesqueleto celular das células MDA-MB-231. Quando avaliados no ensaio do ciclo celular os complexos A6 e B4 induziram um acúmulo de células na fase sub-G1, nas concentrações acima do IC₅₀. Além disso, os complexos induziram a morte celular por apoptose.

Diante de todos os resultados apresentados nesta tese, os 12 complexos de rutênio contendo ligantes naftoquinonas demonstram grande potencial antitumoral e promissores metalofármacos para o tratamento do câncer. Neste sentido, há necessidade de aprofundar os estudos em relação aos seus efeitos *in vivo*, em particular no tratamento do câncer de mama, com intuito de avaliar a toxicidade dos complexos através do modelo de animais.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) World Health Organization. *CANCER*. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en> (accessed 2022-09-28).
- (2) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int J Cancer* **2021**, *149* (4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.
- (3) Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)*. <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>.
- (4) Stratton, M. R.; Campbell, P. J.; Futreal, P. A. The Cancer Genome. *Nature* **2009**, *458* (7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>.
- (5) van de Haar, J.; Canisius, S.; Yu, M. K.; Voest, E. E.; Wessels, L. F. A.; Ideker, T. Identifying Epistasis in Cancer Genomes: A Delicate Affair. *Cell*. Cell Press May 30, 2019, pp 1375–1383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.005>.
- (6) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc. January 1, 2022, pp 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (7) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*. March 4, 2011, pp 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (8) Falk, S. Principles of Cancer Treatment by Radiotherapy. *Surgery (Oxford)* **2009**, *27* (4), 169–172. <https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2009.01.008>.
- (9) Miller, K. D.; Nogueira, L.; Devasia, T.; Mariotto, A. B.; Yabroff, K. R.; Jemal, A.; Kramer, J.; Siegel, R. L. Cancer Treatment and Survivorship

- Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* **2022**, 72 (5), 409–436.
<https://doi.org/10.3322/caac.21731>.
- (10) Dickens, E.; Ahmed, S. Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery (Oxford)* **2018**, 36 (3), 134–138.
<https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2017.12.002>.
- (11) Taylor, T.; Al-Mossawi, H. The Principles of Neoplasia and Oncology. *Surgery (Oxford)* **2018**, 36 (3), 99–105.
<https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2017.12.007>.
- (12) Jones, R.; Ocen, J. Cytotoxic Chemotherapy: Clinical Aspects. *Medicine* **2020**, 48 (2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2019.11.006>.
- (13) Chen, D.; Milacic, V.; Frezza, M.; Dou, Q. P. *Metal Complexes, Their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy*; 2009; Vol. 15.
- (14) CADERNOS TEMÁTICOS DE QUÍMICA NOVA NA ESCOLA N° 6- JULHO 2005 A Química Inorgânica Na Terapia Do Câncer.
- (15) ROSENBERG, B.; van CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, 205 (4972), 698–699.
<https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- (16) Neves, A. P.; Vargas, M. D. Platinum(II) Complexes in Cancer Therapy. *Revista Virtual de Química* **2011**, 3 (3), 196–209.
<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110023>.
- (17) Ali, I.; A. Wani, W.; Saleem, K.; Haque, A. Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem* **2013**, 13 (2), 296–306. <https://doi.org/10.2174/1871520611313020016>.
- (18) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **2007**, 7 (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.

- (19) Siddik, Z. H. Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene* **2003**, 22 (47), 7265–7279.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
- (20) Mônica, S.; de Almeida, V.; Freitas De Alcantara, F.; Xavier De Brito, C. G.; Alves De Souza, G. C.; Lafayette, E. A.; Barros, V.; da Silva, R.; Dos, M.; Carvalho, S.; Do, M.; Alves De Lima, C. Compostos Coordenados Híbridos de Platina No Tratamento Do Câncer. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl* **2014**, 35 (3), 337–345.
- (21) Nowak-Sliwinska, P.; Clavel, C. M.; Pă, E.; te Winkel, M. T.; Griffioen, A. W.; Dyson, P. J. Antiangiogenic and Anticancer Properties of Bifunctional Ruthenium(II)-p-Cymene Complexes: Influence of Pendant Perfluorous Chains. **2015**.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00417>.
- (22) Rinaldi-Neto, F.; Ribeiro, A. B.; Ferreira, N. H.; Squarisi, I. S.; Oliveira, K. M.; Orenha, R. P.; Parreira, R. L. T.; Batista, A. A.; Tavares, D. C. Anti-Melanoma Effect of Ruthenium(II)-Diphosphine Complexes Containing Naphthoquinone Ligand. *J Inorg Biochem* **2021**, 222.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111497>.
- (23) Grawe, G. F.; Oliveira, K. M.; Leite, C. M.; de Oliveira, T. D.; Honorato, J.; Ferreira, A. G.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Correa, R. S.; Batista, A. A. Ruthenium(II)-Diphosphine Complexes Containing Acylthiourea Ligands Are Effective against Lung and Breast Cancers. *Dalton Transactions* **2022**, 51 (4), 1489–1501.
<https://doi.org/10.1039/d1dt02851k>.
- (24) Antonarakis, E. S.; Emadi, A. Ruthenium-Based Chemotherapeutics: Are They Ready for Prime Time? *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, 66, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1293-1>.

- (25) Oliveira, K. M.; Honorato, J.; Demidoff, F. C.; Schultz, M. S.; Netto, C. D.; Cominetti, M. R.; Correa, R. S.; Batista, A. A. Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug. *J Inorg Biochem* **2021**, 214.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111289>.
- (26) Bruijninx, P. C. A.; Sadler, P. J. Controlling Platinum, Ruthenium, and Osmium Reactivity for Anticancer Drug Design. *Advances in Inorganic Chemistry*. 2009. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(09\)00201-3](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(09)00201-3).
- (27) Fong, J.; Kasimova, K.; Arenas, Y.; Kaspler, P.; Lazic, S.; Mandel, A.; Lilge, L. A Novel Class of Ruthenium-Based Photosensitizers Effectively Kills in Vitro Cancer Cells and in Vivo. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2015**, 14, 2014–2023.
<https://doi.org/10.1039/c4pp00438h>.
- (28) Riccardi, C.; Musumeci, D.; Trifuoggi, M.; Irace, C.; Paduano, L.; Montesarchio, D. Anticancer Ruthenium(III) Complexes and Ru(III)-Containing Nanoformulations: An Update on the Mechanism of Action and Biological Activity. *Pharmaceuticals* **2019**, 12 (4).
<https://doi.org/10.3390/ph12040146>.
- (29) Gill, M. R.; Jarman, P. J.; Hearnden, V.; Fairbanks, S. D.; Bassetto, M.; Maib, H.; Palmer, J.; Ayscough, K. R.; Thomas, J. A.; Smythe, C. A Ruthenium(II) Polypyridyl Complex Disrupts Actin Cytoskeleton Assembly and Blocks Cytokinesis. **2022**.
<https://doi.org/10.1002/anie.202117449>.
- (30) Pal, M.; Nandi, U.; Mukherjee, D. Detailed Account on Activation Mechanisms of Ruthenium Coordination Complexes and Their Role as Antineoplastic Agents. *Eur J Med Chem* **2018**, 150, 419–445.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.03.015>.

- (31) Praggi, Kundu, B. K.; Mukhopadhyay, S. Target Based Chemotherapeutic Advancement of Ruthenium Complexes. *Coord Chem Rev* **2021**, *448*, 214169. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2021.214169>.
- (32) Naves, M. A.; Graminha, A. E.; Vegas, L. C.; Luna-Dulcey, L.; Honorato, J.; Menezes, A. C. S.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(Dppe)₂]PF₆ into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors. *Mol Pharm* **2019**, *16* (3), 1167–1183. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.8B01154>.
- (33) Keppler, B. K.; Rupp, W. *Antitumor Activity of Imidazolium-Bisimidazole-Tetrachlororuthenate (III) A Representative of a New Class of Inorganic Antitumor Agents**; 1986; Vol. 111.
- (34) Stevens, S. K.; Strehle, A. P.; Miller, R. L.; Gammons, S. H.; Hoffman, K. J.; McCarty, J. T.; Miller, M. E.; Stultz, L. K.; Hanson, P. K. The Anticancer Ruthenium Complex KP1019 Induces DNA Damage, Leading to Cell Cycle Delay and Cell Death in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol Pharmacol* **2013**, *83* (1), 225–234. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079657>.
- (35) 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* **2015**, *33* (1), 201–214. <https://doi.org/10.1007/S10637-014-0179-1/FIGURES/3>.
- (36) Alessio, E.; Messori, L. Molecules NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules* **2019**, *24*. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>.

- (37) Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G. Approaching Tumour Therapy beyond Platinum Drugs: Status of the Art and Perspectives of Ruthenium Drug Candidates. *J Inorg Biochem* **2012**, *106* (1), 90–99. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2011.09.030>.
- (38) Alessio, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur J Inorg Chem* **2017**, *2017* (12), 1549–1560. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600986>.
- (39) Bergamo, A.; Gagliardi, R.; Scarcia, V.; Furlani, A.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Sava, G. In Vitro Cell Cycle Arrest, in Vivo Action on Solid Metastasizing Tumors, and Host Toxicity of the Antimetastatic Drug NAMI-A and Cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *289* (1), 559–564.
- (40) Swaminathan, S.; Haribabu, J.; Balakrishnan, N.; Vasanthakumar, P.; Karvembu, R. Piano Stool Ru(II)-Arene Complexes Having Three Monodentate Legs: A Comprehensive Review on Their Development as Anticancer Therapeutics over the Past Decade. *Coord Chem Rev* **2022**, *459*, 214403. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2021.214403>.
- (41) Jakubaszek, M.; Goud, B.; Ferrari, S.; Gasser, G. Mechanisms of Action of Ru(II) Polypyridyl Complexes in Living Cells upon Light Irradiation. *Chemical Communications* **2018**, *54* (93), 13040–13059. <https://doi.org/10.1039/c8cc05928d>.
- (42) Papish, E. T.; Oladipupo, O. E. Factors That Influence Singlet Oxygen Formation vs. Ligand Substitution for Light-Activated Ruthenium Anticancer Compounds. *Curr Opin Chem Biol* **2022**, *68*, 102143. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2022.102143>.

- (43) Kitagawa, T.; Azuma, T.; Hamaguchi, K. *Accepting Abilities of Phosphines in Transition-Metal*; 1984; Vol. 106.
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- (44) Kégl, T. R.; Pálinkás, N.; Kollár, L.; Kégl, T. Molecules Computational Characterization of Bidentate P-Donor Ligands: Direct Comparison to Tolman's Electronic Parameters.
<https://doi.org/10.3390/molecules23123176>.
- (45) Lima, V. A. B. Avaliação Das Atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfinícos de Rutênio (Células Tumorais MDA-MB-231) . 2010, pp 1–207.
- (46) Tolman, C. A. *Steric Effects of Phosphorus Ligands in Organometallic Chemistry and Homogeneous Catalysis*[^].
<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- (47) Aguirrechu-Comerón, A.; Hernández-Molina, R.; González-Platas, J. Structure of Two New Compounds of Copper(I) Iodide with N-Donor and P-Donor Ligands. *Journal of Structural Chemistry* **2018**, 59 (4), 943–948.
<https://doi.org/10.1134/S0022476618040285>.
- (48) Vogler, A.; Kunkely, H. *Excited State Properties of Transition Metal Phosphine Complexes*; 2002; Vol. 230. www.elsevier.com/locate/ccr.
- (49) Dierkes, P.; van Leeuwen, P. W. N. M. *The Bite Angle Makes the Difference: A Practical Ligand Parameter for Diphosphine Ligands*; 1999.
- (50) Berners-Price, S. J.; Sadler, P. J. Phosphines and Metal Phosphine Complexes: Relationship of Chemistry to Anticancer and Other Biological Activity; 1988; pp 27–102. https://doi.org/10.1007/3-540-50130-4_2.
- (51) Sánchez Delgado, G. Y.; Condé, C. A. S. R.; dos Santos, H. F.; Navarro, m. Gold chemotherapeutic compounds: an overview of anticancer au(i/iii)-

- complexes in relation to the structure of the ligand. *Quim Nova* **2020**, *43* (8). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170566>.
- (52) Abdalbari, F. H.; Carlos, .; Telleria, M. Discover Oncology The Gold Complex Auranofin: New Perspectives for Cancer Therapy. *Discover Oncology* **123AD**, *12*, 42. <https://doi.org/10.1007/s12672-021-00439-0>.
- (53) Keter, F. K.; Guzei, I. A.; Nell, M.; van Zyl, W. E.; Darkwa, J. Phosphinogold(I) Dithiocarbamate Complexes: Effect of the Nature of Phosphine Ligand on Anticancer Properties. *Inorg. Chem* **2014**, *53*, 40. <https://doi.org/10.1021/ic4025926>.
- (54) Oliveira Santiago, M. Universidade federal de São Carlos "Síntese, caracterização e estudos cinéticos da isomerização de compostos de Ru(II) contendo LIGANTES (X-Bipy), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - São Pauço, 2004.
- (55) Karumban, K. S.; Raut, R.; Gupta, P.; Muley, A.; Giri, B.; Kumbhakar, S.; Misra, A.; Maji, S. Mononuclear Cobalt(II) Complexes with Polypyridyl Ligands: Synthesis, Characterization, DNA Interactions and in Vitro Cytotoxicity towards Human Cancer Cells. *J Inorg Biochem* **2022**, *233*, 111866. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2022.111866>.
- (56) Liu, R.; Yuan, C.; Feng, Y.; Qian, J.; Huang, X.; Chen, Q.; Zhou, S.; Ding, Y.; Zhai, B.; Mei, W.; Yao, L. Microwave-Assisted Synthesis of Ruthenium(II) Complexes Containing Levofloxacin-Induced G2/M Phase Arrest by Triggering DNA Damage †. **2021**. <https://doi.org/10.1039/d0ra09418h>.
- (57) Corrêa, R. S.; da Silva, M. M.; Graminha, A. E.; Meira, C. S.; dos Santos, J. A. F.; Moreira, D. R. M.; Soares, M. B. P.; von Poelhsitz, G.; Castellano, E. E.; Bloch, C.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Ruthenium(II) Complexes of 1,3-Thiazolidine-2-Thione: Cytotoxicity

- against Tumor Cells and Anti-Trypanosoma Cruzi Activity Enhanced upon Combination with Benznidazole. *J Inorg Biochem* **2016**, *156*, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.12.024>.
- (58) da Silva, M. M.; de Camargo, M. S.; Correa, R. S.; Castelli, S.; de Grandis, R. A.; Takarada, J. E.; Varanda, E. A.; Castellano, E. E.; Deflon, V. M.; Cominetti, M. R.; Desideri, A.; Batista, A. A. Non-Mutagenic Ru(II) Complexes: Cytotoxicity, Topoisomerase IB Inhibition, DNA and HSA Binding. *Dalton Transactions* **2019**, *48* (39), 14885–14897. <https://doi.org/10.1039/C9DT01905G>.
- (59) de Oliveira, T. D.; Ribeiro, G. H.; Honorato, J.; Leite, C. M.; Santos, A. C. da S.; Silva, E. D.; Pereira, V. R. A.; Plutín, A. M.; Cominetti, M. R.; Castellano, E. E.; Batista, A. A. Cytotoxic and Antiparasitic Activities of Diphosphine-Metal Complexes of Group 10 Containing Acylthiourea as Ligands. *J Inorg Biochem* **2022**, *234*, 111906. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2022.111906>.
- (60) Oliveira, K. M.; Liany, L. D.; Corrêa, R. S.; Deflon, V. M.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Selective Ru(II)/Lawsonia Complexes Inhibiting Tumor Cell Growth by Apoptosis. *J Inorg Biochem* **2017**, *176*, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.019>.
- (61) Colina-Vegas, L.; Luna-Dulcey, L.; Plutín, A. M.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Half Sandwich Ru(II)-Acylthiourea Complexes: DNA/HSA-Binding, Anti-Migration and Cell Death in a Human Breast Tumor Cell Line. *Dalton Transactions* **2017**, *46* (38), 12865–12875. <https://doi.org/10.1039/c7dt01801k>.
- (62) Colina-Vegas, L.; Villarreal, W.; Navarro, M.; de Oliveira, C. R.; Graminha, A. E.; Maia, P. I. D. S.; Deflon, V. M.; Ferreira, A. G.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Cytotoxicity of Ru(II) Piano–Stool Complexes with Chloroquine and Chelating Ligands against Breast and

- Lung Tumor Cells: Interactions with DNA and BSA. *J Inorg Biochem* **2015**, *153*, 150–161. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2015.07.016>.
- (63) Leite, T. H. O.; Grawe, G.; Honorato, J.; Cunha, B. N.; Nascimento, O. R.; de Vargas, P. S.; Donatoni, C.; Oliveira, K. T.; Lopes, J. M. S.; Barbosa Neto, N. M.; Moreira, W. C.; Dinelli, L. R.; Batista, A. A. Remarkable Electronic Effect on the Meso-Tetra(Thienyl)Porphyrins. *Inorg Chem* **2019**, *58* (2), 1030–1039. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01032>.
- (64) de Grandis, R. A.; Costa, A. R.; Moraes, C. A. F.; Sampaio, N. Z.; Cerqueira, I. H.; Marques, W. G.; Guedes, A. P. M.; de Araujo-Neto, J. H.; Pavan, F. R.; Demidoff, F. C.; Netto, C. D.; Batista, A. A.; Resende, F. A. Novel Ru(II)-Bipyridine/Phenanthroline-Lapachol Complexes as Potential Anti-Cancer Agents. *J Inorg Biochem* **2022**, *237*. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112005>.
- (65) Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Introduction. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* **2008**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52824-7.00001-9>.
- (66) Silva, M. N. da; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V. de. Um Panorama Atual Da Química e Da Farmacologia de Naftoquinonas, Com Ênfase Na Beta-Lapachona e Derivados. *Quim Nova* **2003**, *26* (3), 407–416. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300019>.
- (67) Oliveira, M. S.; Mussi, S. v.; Gomes, D. A.; Yoshida, M. I.; Frezard, F.; Carregal, V. M.; Ferreira, L. A. M. α -Tocopherol Succinate Improves Encapsulation and Anticancer Activity of Doxorubicin Loaded in Solid Lipid Nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2016**, *140*, 246–253. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.12.019>.

- (68) Wellington, K. W. Understanding Cancer and the Anticancer Activities of Naphthoquinones – a Review. *RSC Adv* **2015**, 5 (26), 20309–20338. <https://doi.org/10.1039/C4RA13547D>.
- (69) Muhammad, H. S.; Muhammad, S. The Use of Lawsonia Inermis Linn. (Henna) in the Management of Burn Wound Infections. *Afr J Biotechnol* **2005**, 4 (9), 934–937.
- (70) Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V. U.; Miana, G. A.; Green, I. R. Lapachol: An Overview. *Arkivoc* **2007**, 2007 (2), 145–171. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.204>.
- (71) PIMENTA, V. D. S. C. Propriedades Citotóxicas Da β -Lapachona Em Células de Osteossarcoma Canino in Vitro., Universidade Federal de Goiás, 2015.
- (72) Rao, K. v; McBride, T. J.; Oleson, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent^{1,2}. *Cancer Res* **1968**, 28 (10), 1952–1954.
- (73) Morrison, R. K.; Brown, D. E.; Oleson, J. J.; Cooney, D. A. Oral Toxicology Studies with Lapachol. *Toxicol Appl Pharmacol* **1970**, 17 (1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(70\)90126-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(70)90126-2).
- (74) Pereyra, C. E.; Dantas, R. F.; Ferreira, S. B.; Gomes, L. P.; Silva-Jr, F. P. The Diverse Mechanisms and Anticancer Potential of Naphthoquinones. *Cancer Cell Int* **2019**, 19 (1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0925-8>.
- (75) Song, G. Y.; Kim, Y.; Zheng, X. G.; You, Y. J.; Cho, H.; Chung, J. H.; Sok, D. E.; Ahn, B. Z. Naphthazarin Derivatives (IV): Synthesis, Inhibition of DNA Topoisomerase I and Cytotoxicity of 2- or 6-Acyl-5,8-Dimethoxy-1, 4-Naphthoquinones. *Eur J Med Chem* **2000**, 35 (3), 291–298. [https://doi.org/10.1016/s0223-5234\(00\)00129-x](https://doi.org/10.1016/s0223-5234(00)00129-x).

- (76) Chae, G.-H.; Song, G.-Y.; Kim, Y.; Cho, H.; Sok, D.-E.; Ahn, B.-Z. 2- or 6-(1-Azidoalkyl)-5,8-Dimethoxy-1,4-Naphthoquinone: Synthesis, Evaluation of Cytotoxic Activity; Antitumor Activity and Inhibitory Effect on DNA Topoisomerase-I. *Arch Pharm Res* **1999**, 22 (5), 507–514. <https://doi.org/10.1007/BF02979161>.
- (77) de Grandis, R. A.; Oliveira, K. M.; Guedes, A. P. M.; dos Santos, P. W. S.; Aissa, A. F.; Batista, A. A.; Pavan, F. R. A Novel Ruthenium(II) Complex With Lapachol Induces G2/M Phase Arrest Through Aurora-B Kinase Down-Regulation and ROS-Mediated Apoptosis in Human Prostate Adenocarcinoma Cells. *Front Oncol* **2021**, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682968>.
- (78) Oliveira, K. M.; Honorato, J.; Demidoff, F. C.; Schultz, M. S.; Netto, C. D.; Cominetti, M. R.; Correa, R. S.; Batista, A. A. Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug. *J Inorg Biochem* **2021**, 214, 111289. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111289>.
- (79) Oliveira, K. M.; Peterson, E. J.; Carroccia, M. C.; Cominetti, M. R.; Deflon, V. M.; Farrell, N. P.; Batista, A. A.; Correa, R. S. Ru(II)-Naphthoquinone Complexes with High Selectivity for Triple-Negative Breast Cancer. *Dalton Transactions* **2020**, 1–3. <https://doi.org/10.1039/d0dt01091j>.
- (80) Demidoff, F. C.; de Souza, F. P.; Netto, C. D. Synthesis of Stilbene-Quinone Hybrids through Heck Reactions in PEG-400. *Synthesis (Germany)* **2017**, 49 (23), 5217–5223. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1589095>.
- (81) Demidoff, F. C. Planejamento, síntese e avaliação *in silico* de híbridos estilbenoquinona: substâncias com potencial atividade antimicrobacteriana,

- Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé, Macaé - Rio de Janeiro, 2019.
- (82) Azeredo, N. F. B.; Souza, F. P.; Demidoff, F. C.; Netto, C. D.; Resende, J. A. L. C.; Franco, R. W. A.; Colepicolo, P.; Ferreira, A. M. C.; Fernandes, C. New Strategies for the Synthesis of Naphthoquinones Employing Cu(II) Complexes: Crystal Structures and Cytotoxicity. *J Mol Struct* **2018**, *1152*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2017.08.066>.
- (83) Stephenson, T. A.; Wilkinson, G. New Complexes of Ruthenium (II) and (III) with Triphenylphosphine, Triphenylarsine, Trichlorostannate, Pyridine and Other Ligands. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1966**, *28* (4), 945–956. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(66\)80191-4](https://doi.org/10.1016/0022-1902(66)80191-4).
- (84) Batista, A. A.; Santiago, M. O.; Donnici, C. L.; Moreira, I. S.; Healy, P. C.; Berners-Price, S. J.; Queiroz, S. L. Electrochemical and Spectroscopic Studies on RuCl₂(PPh₃)₂(N)₂ and RuCl₂(PPh₃)₂(N-N) Complexes (N = Pyridine Derivatives and N-N = Phenanthroline or Bipyridine Derivatives). X-Ray Structure of RuCl₂(PPh₃)₂(Phen). *Polyhedron* **2001**, *20* (17), 2123–2128. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(01\)00744-6](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(01)00744-6).
- (85) Bressan, M.; Rigo, P. Five-Coordinate Complexes of Ruthenium(II) with Di(Tertiary Phosphines). *Inorg Chem* **1975**, *14* (9), 2286–2288. <https://doi.org/10.1021/ic50151a060>.
- (86) Evans, I. P.; Spencer, A.; Wilkinson, G. Dichlorotetrakis(Dimethyl Sulphoxide)Ruthenium(II) Complexes. *Journal Chemical Society Dalton* **1971**, *2* (204), 204–209. <https://doi.org/10.1039/DT9730000200>.
- (87) Queiroz, S. L.; Batista, A. A.; Oliva, G.; Teresa, M.; Gambardella ~', P.; Santos, R. H. A.; Macfarlane ', K. S.; Rettig ', S. J.; James “:,” B. R. *The Reactivity of Five-Coordinate Ru (II) (1,4-Bis (Diphenylphosphino) Butane) Complexes with the N-Donor Ligands: Ammonia, Pyridine, 4-*

- Substituted Pyridines, 2,2'-Bipyridine, Bis(o-Pyridyl)Amine, 1,10-Phenanthroline, 4,7-Diphenylphenanthroline and Ethylenediamine*; 1998; Vol. 267.
- (88) Venkateswaran, R.; Mague, J. T.; Balakrishna, M. S. Ruthenium(II) Complexes Containing Bis(2-(Diphenylphosphino)Phenyl) Ether and Their Catalytic Activity in Hydrogenation Reactions. *Inorg Chem* **2007**, *46* (3), 809–817. <https://doi.org/10.1021/ic061782l>.
- (89) Rigaku Oxford Diffraction. CrysAlisPro Software System. Yarnto, England 2019.
- (90) Sheldrick, G. M. *SHELXT* – Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination. *Acta Crystallogr A Found Adv* **2015**, *71* (1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
- (91) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with *SHELXL*. *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2015**, *71* (1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- (92) Dolomanov, O. v.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *OLEX2* : A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J Appl Crystallogr* **2009**, *42* (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (93) Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P. A. *Mercury CSD 2.0* – New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. *J Appl Crystallogr* **2008**, *41* (2), 466–470. <https://doi.org/10.1107/S0021889807067908>.
- (94) Sakthikumar, K.; Solomon, R. V.; Raja, J. D. Spectro-Electrochemical Assessments of DNA/BSA Interactions, Cytotoxicity, Radical Scavenging and Pharmacological Implications of Biosensitive and Biologically Active

- Morpholine-Based Metal(II) Complexes: A Combined Experimental and Computational Investigation. *RSC Adv* **2019**, *9* (25), 14220–14241. <https://doi.org/10.1039/C8RA09218D>.
- (95) Ibrahim, S.; Gavisiddegowda, P.; Deepakumari, H. N.; Kollur, S. P.; Naik, N. Newly Synthesized Benzothiazole Derived Ligand and Its Co(III) and Ru(III) Complexes as Biological Potent Molecules: Chemical Preparation, Structure, Antimicrobial, in Vitro and in Vivo Cytotoxicity Studies. **2022**, *12* (6), 7817–7844. <https://doi.org/10.33263/BRIAC126.78177844>.
- (96) Sarwar, T.; Husain, M. A.; Rehman, S. U.; Ishqi, H. M.; Tabish, M. Multi-Spectroscopic and Molecular Modelling Studies on the Interaction of Esculetin with Calf Thymus DNA. *Mol Biosyst* **2015**, *11* (2), 522–531. <https://doi.org/10.1039/C4MB00636D>.
- (97) LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, . 3^a ed.; Joseph R. Lakowicz, Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (98) Santos, R. L. S. R.; Sanches, R. N. F.; de Oliveira Silva, D. Spectroscopic Studies on Interactions of the Tetrakis(Acetato)Chloridodiruthenium(II,III) Complex and the Ru 2(II,III)-NSAID-Derived Metallodrugs of Ibuprofen and Ketoprofen with Human Serum Albumin. *J Coord Chem* **2015**, *68* (17–18), 3209–3228. <https://doi.org/10.1080/00958972.2015.1074684>.
- (99) S. Bharate, S.; Kumar, V.; A. Vishwakarma, R. Determining Partition Coefficient (Log P), Distribution Coefficient (Log D) and Ionization Constant (PKa) in Early Drug Discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* **2016**, *19* (6), 461–469. <https://doi.org/10.2174/1386207319666160502123917>.

- (100) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* **1983**, 65 (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (101) Geary, W. J. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds. *Coord Chem Rev* **1971**, 7 (1), 81–122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).
- (102) Pinheiro, S. O.; de Sousa, J. R.; Santiago, M. O.; Carvalho, I. M. M.; Silva, A. L. R.; Batista, A. A.; Castellano, E. E.; Ellena, J.; Moreira, Í. S.; Diógenes, I. C. N. Synthesis, Characterization and Structure of Ruthenium(II) Phosphine Complexes with N-Heterocyclic Thiolate Ligands. *Inorganica Chim Acta* **2006**, 359 (2), 391–400. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2005.05.042>.
- (103) Valle, E. M. A.; Lima, B. A. V.; Ferreira, A. G.; do Nascimento, F. B.; Deflon, V. M.; Diógenes, I. C. N.; Abram, U.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Batista, A. A. Driving Forces in Substitution Reactions of Octahedral Complexes: The Influence of the Competitive Effect. *Polyhedron* **2009**, 28 (16), 3473–3478. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2009.07.029>.
- (104) Macfarlane, K. S.; Joshi, A. M.; Rettig, S. J.; James, B. R. *Characterization of Five-Coordinate Ruthenium(II) Phosphine Complexes by X-Ray Diffraction and Solid-State ^{31}P CP/MAS NMR Studies and Their Reactivity with Sulfoxides and Thioethers*; 1996.
- (105) Oliveira, K. M. Avaliação Das Propriedades Antitumorais de Complexos de Rutênio(II) Contendo Os Ligantes Lapachol Ou Lausona, 2018. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/10528>.
- (106) Ribeiro, M. A.; Oliveira, W. X. C.; Stumpf, H. O.; Pinheiro, C. B. The Structure of the 1H-Imidazol-3-Ium Lawsonate Salt Aided by Ab Initio

- Gas-Phase Calculations. *Acta Crystallogr C* **2013**, 69 (4), 403–406.
<https://doi.org/10.1107/S0108270113005106>.
- (107) Ribeiro, M. A. Estudo de Compostos de Coordenação de Cobalto e Labilidade Eletrônica, Belo Horizonte, 2013.
- (108) Leite, C. M. Propriedades Citotóxicas de Complexos de Cu(I)-Trifenilfosfina Com Ligantes Aciltioureas Ou Naftoquinonas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.
- (109) Ribeiro, M. A.; Lanznaster, M.; Silva, M. M. P.; Resende, J. A. L. C.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K.; Stumpf, H. O.; Pinheiro, C. B. Cobalt Lawsons Complexes: Searching for New Valence Tautomers. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (15), 5462. <https://doi.org/10.1039/c3dt32968b>.
- (110) Donald L. Pavia; Gary M. Lampman; George S. Kriz; James R. Vyvyan. *Introdução à Espectroscopia*, Tradução da 4ª ed.; Cengage Learning, Ed.; 2010.
- (111) Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*; John Wiley & Sons, Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014. <https://doi.org/10.1002/9781118788301>.
- (112) Caruso, F.; Martínez, M. A.; Rossi, M.; Goldberg, A.; Villalba, M. E. C.; Aymonino, P. J. Crystal and Molecular Structure of Manganese(II) Lapacholate, a Novel Polymeric Species Undergoing Temperature-Reversible Metal to Ligand Electron Transfer. *Inorg Chem* **2009**, 48 (8), 3529–3534. <https://doi.org/10.1021/ic8015194>.
- (113) Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*; Springer Berlin Heidelberg, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1>.

- (114) Lucas, N. C. de; Ferreira, A. B. B.; Netto-Ferreira, J. C. Photochemistry of Naphthoquinones. *Revista Virtual de Química* **2015**, 7 (1).
<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150020>.
- (115) Saini, R.; Kaur, N.; Kumar, S. Quinones Based Molecular Receptors for Recognition of Anions and Metal Ions. *Tetrahedron* **2014**, 70 (29), 4285–4307. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.04.058>.
- (116) Hijji, Y. M.; Barare, B.; Zhang, Y. Lawsone (2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone) as a Sensitive Cyanide and Acetate Sensor. *Sens Actuators B Chem* **2012**, 169, 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.067>.
- (117) Idriss, K. A.; Sedaira, H.; Hashem, E. Y.; Saleh, M. S.; Soliman, S. A. The Visible Absorbance Maximum of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone as a Novel Probe for the Hydrogen Bond Donor Abilities of Solvents and Solvent Mixtures. *Monatshefte für Chemie Chemical Monthly* **1996**, 127 (1), 29–42. <https://doi.org/10.1007/BF00807406>.
- (118) Oliveira, K. M.; Corrêa, R. S.; Barbosa, M. I. F.; Ellena, J.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Ruthenium(II)/Triphenylphosphine Complexes: An Effective Way to Improve the Cytotoxicity of Lapachol. *Polyhedron* **2017**, 130, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.04.005>.
- (119) João Paulo, B. R. Complexos de Rutênio(II) Com Potenciais Atividades Antitumorais: Síntese, Caracterização e Ensaios Biológicos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- (120) von Poelhsitz, G.; Bogado, A. L.; Lião, L. M.; Ferreira, A. G.; Castellano, E. E.; Ellena, J.; Batista, A. A. Dependence of the Product on the P–P Ligand in Reactions of [RuCl₃(NO)(P–P)] Complexes (P–P = Aromatic Diphosphines) with 2-Mercaptopyridine. *Polyhedron* **2010**, 29 (1), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2009.09.004>.

- (121) do Nascimento, F. B.; von Poelhsitz, G.; Pavan, F. R.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Deflon, V. M.; Batista, A. A. Synthesis, Characterization, X-Ray Structure and in Vitro Antimycobacterial and Antitumoral Activities of Ru(II) Phosphine/Diimine Complexes Containing the “SpymMe2” Ligand, SpymMe2=4,6-Dimethyl-2-Mercaptopyrimidine. *J Inorg Biochem* **2008**, *102* (9), 1783–1789. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.05.009>.
- (122) Shahabadi, N.; Khorshidi, A.; Moghadam, N. H. Study on the Interaction of the Epilepsy Drug, Zonisamide with Human Serum Albumin (HSA) by Spectroscopic and Molecular Docking Techniques. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2013**, *114*, 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.05.092>.
- (123) Shahabadi, N.; Hadidi, S.; Kalar, Z. M. Biophysical Studies on the Interaction of Platinum(II) Complex Containing Antiviral Drug Ribavirin with Human Serum Albumin. *J Photochem Photobiol B* **2016**, *160*, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.006>.
- (124) Abou-Zied, O. Understanding the Physical and Chemical Nature of the Warfarin Drug Binding Site in Human Serum Albumin: Experimental and Theoretical Studies. *Curr Pharm Des* **2015**, *21* (14), 1800–1816. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150304163447>.
- (125) Peters, T. Serum Albumin; 1985; pp 161–245. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60065-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60065-0).
- (126) Rabbani, G.; Ahn, S. N. Structure, Enzymatic Activities, Glycation and Therapeutic Potential of Human Serum Albumin: A Natural Cargo. *Int J Biol Macromol* **2019**, *123*, 979–990. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053>.

- (127) Moradinia, E.; Mansournia, M.; Aramesh-Boroujeni, Z.; Bordbar, A. New Transition Metal Complexes of 9,10-phenanthrenequinone P-toluyyl Hydrazone Schiff Base: Synthesis, Spectroscopy, DNA and HSA Interactions, Antimicrobial, DFT and Docking Studies. *Appl Organomet Chem* **2019**, *33* (5), e4893. <https://doi.org/10.1002/aoc.4893>.
- (128) Alanazi, R. L. B.; Zaki, M.; Bawazir, W. A. Synthesis and Characterization of New Metal Complexes Containing Triazino[5,6-b]Indole Moiety: In Vitro DNA and HSA Binding Studies. *J Mol Struct* **2021**, *1246*, 131203. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131203>.
- (129) Velozo-Sa, V. S.; Oliveira, R. M. M.; Leite, C. M.; Cominetti, M. R.; Barbosa, I. M. M.; Silva, F. L. S.; Martins Feitosa, N.; Schultz, M. S.; Batista, A. A. Scavenging Capacity and Cytotoxicity of New Ru(II)-Diphosphine/ α -Amino Acid Complexes. *Polyhedron* **2021**, *201*, 115169. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115169>.
- (130) Masnikosa, R.; Milutinović, M. M.; Crnolatac, I.; Tot, A.; Veličković, S.; Bojić-Trbojević, Ž.; Rilak-Simović, A. Anti-Adhesive Action of Novel Ruthenium(II) Chlorophenyl Terpyridine Complexes with a High Affinity for Double-Stranded DNA: In Vitro and in Silico. *J Inorg Biochem* **2020**, *208*, 111090. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111090>.
- (131) de Oliveira, T. D.; Plutín, A. M.; Luna-Dulcey, L.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Cytotoxicity of Ruthenium-N,N-Disubstituted-N'-Acylthioureas Complexes. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *115*, 111106. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111106>.
- (132) da Silva, M. M.; de Camargo, M. S.; Correa, R. S.; Castelli, S.; de Grandis, R. A.; Takarada, J. E.; Varanda, E. A.; Castellano, E. E.; Deflon, V. M.; Cominetti, M. R.; Desideri, A.; Batista, A. A. Non-Mutagenic Ru(II) Complexes: Cytotoxicity, Topoisomerase IB Inhibition, DNA and

- HSA Binding. *Dalton Transactions* **2019**, 48, 14885.
<https://doi.org/10.1039/c9dt01905g>.
- (133) Luiz, G.; Neto, B.; Alexandre, E.; Baptista, M.; Hideki, G.; Becca, S.; Nakatani A E Vagner, H. S.; de Souza, R. Interações competitivas de complexos de rutênio contendo dimetilsulfóxido e ligantes n-heterocíclicos com albumina de soro humano. *Quim. Nova* **2020**, 43 (3), 261–270.
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170488>.
- (134) Demoro, B.; Bento-Oliveira, A.; Marques, F.; Pessoa, J. C.; Otero, L.; Gambino, D.; de Almeida, R. F. M.; Tomaz, A. I. Molecules Interaction with Blood Proteins of a Ruthenium(II) Nitrofuryl Semicarbazone Complex: Effect on the Antitumoral Activity.
<https://doi.org/10.3390/molecules24162861>.
- (135) Rilak Simović, A.; Masnikosa, R.; Bratsos, I.; Alessio, E. Chemistry and Reactivity of Ruthenium(II) Complexes: DNA/Protein Binding Mode and Anticancer Activity Are Related to the Complex Structure. *Coord Chem Rev* **2019**, 398, 113011. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.07.008>.
- (136) Vukic, M. D.; Vukovic, N. L.; Obradovic, A.; Matic, M.; Djukic, M.; Avdovic, E. REDOX STATUS, DNA AND HSA BINDING STUDY OF NATURALLY OCCURRING NAPHTHOQUINONE DERIVATIVES. *EXCLI J* **2020**, 19, 48–70. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1859>.
- (137) Zhang, G.; Zhao, N.; Wang, L. Fluorescence Spectrometric Studies on the Binding of Puerarin to Human Serum Albumin Using Warfarin, Ibuprofen and Digitoxin as Site Markers with the Aid of Chemometrics. *J Lumin* **2011**, 131 (12), 2716–2724. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.07.011>.
- (138) Haghaei, H.; Norouzi, S.; Zakariazadeh, M.; Soltani, S. Investigation of Atorvastatin Interaction with Human Serum Albumin: Evaluation of PH

- Effect and Competitive Binding with Warfarin. **2022**.
<https://doi.org/10.29228/jrp.232>.
- (139) Yang, S.; Zhang, W.; Liu, Z.; Zhai, Z.; Hou, X.; Wang, P.; Ge, G.; Wang, F. Lysine Reactivity Profiling Reveals Molecular Insights into Human Serum Albumin-Small-Molecule Drug Interactions.
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03700-1/Published>.
- (140) Abou-Zied, O. Understanding the Physical and Chemical Nature of the Warfarin Drug Binding Site in Human Serum Albumin: Experimental and Theoretical Studies. *Curr Pharm Des* **2015**, *21* (14), 1800–1816.
<https://doi.org/10.2174/1381612821666150304163447>.
- (141) Huang, S.; Peng, S.; Zhu, F.; Lei, X.; Xiao, Q.; Su, W.; Liu, Y.; Huang, C.; Zhang, L. Multispectroscopic Investigation of the Interaction Between Two Ruthenium(II) Arene Complexes of Curcumin Analogs and Human Serum Albumin. *Biol Trace Elem Res* **2016**, *169* (2), 189–203.
<https://doi.org/10.1007/s12011-015-0416-2>.
- (142) McConnell, J. R.; Rananaware, D. P.; Ramsey, D. M.; Buys, K. N.; Cole, M. L.; McAlpine, S. R. A Potential Rhodium Cancer Therapy: Studies of a Cytotoxic Organorhodium(I) Complex That Binds DNA. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23* (9), 2527–2531.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.016>.
- (143) Chiniadis, L.; Giastas, P.; Bratsos, I.; Papakyriakou, A. Insights into the Protein Ruthenation Mechanism by Antimetastatic Metallodrugs: High-Resolution X-Ray Structures of the Adduct Formed between Hen Egg-White Lysozyme and **NAMI-A** at Various Time Points. *Inorg Chem* **2021**, *60* (14), 10729–10737. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01441>.

- (144) Fantoni, N. Z.; Brown, T.; Kellett, A. DNA-Targeted Metallodrugs: An Untapped Source of Artificial Gene Editing Technology. *ChemBioChem* **2021**, 22 (13), 2184–2205. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000838>.
- (145) de Sousa, A. P.; Gondim, A. C. S.; Sousa, E. H. S.; de Vasconcelos, M. A.; Teixeira, E. H.; Bezerra, B. P.; Ayala, A. P.; Martins, P. H. R.; Lopes, L. G. de F.; Holanda, A. K. M. An Unusual Bidentate Methionine Ruthenium(II) Complex: Photo-Uncaging and Antimicrobial Activity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2020**, 25 (3), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01772-5>.
- (146) Figueroa-DePaz, Y.; Resendiz-Acevedo, K.; Dávila-Manzanilla, S. G.; García-Ramos, J. C.; Ortiz-Frade, L.; Serment-Guerrero, J.; Ruiz-Azuara, L. DNA, a Target of Mixed Chelate Copper(II) Compounds (Casiopeinas®) Studied by Electrophoresis, UV–Vis and Circular Dichroism Techniques. *J Inorg Biochem* **2022**, 231, 111772. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111772>.
- (147) Hoeschele, J. D.; Kasparikova, J.; Kosthunova, H.; Novakova, O.; Pracharova, J.; Pineau, P.; Brabec, V. Synthesis, Antiproliferative Activity in Cancer Cells and DNA Interaction Studies of [Pt(Cis-1,3-Diaminocycloalkane)Cl₂] Analogs. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2020**, 25 (6), 913–924. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01809-9>.
- (148) Pages, B. J.; Ang, D. L.; Wright, E. P.; Aldrich-Wright, J. R. Metal Complex Interactions with DNA. *Dalton Transactions* **2015**, 44 (8), 3505–3526. <https://doi.org/10.1039/C4DT02700K>.
- (149) Bhat, S. S.; Revankar, V. K.; Pinjari, R. v.; Kumbar, V.; Bhat, K.; Kawade, V. A. Synthesis, Characterization and Biological Properties of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Containing 2(1H)-Quinolinone-

- 3(1H-Imidazo[4,5f][1,10]Phenanthroline-2-Yl. *Inorg Chem Commun* **2022**, 138, 109260. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109260>.
- (150) Kellett, A.; Molphy, Z.; Slator, C.; McKee, V.; Farrell, N. P. Molecular Methods for Assessment of Non-Covalent Metallodrug–DNA Interactions. *Chem Soc Rev* **2019**, 48 (4), 971–988. <https://doi.org/10.1039/C8CS00157J>.
- (151) de Grandis, R. A.; Oliveira, K. M.; Guedes, A. P. M.; dos Santos, P. W. S.; Aissa, A. F.; Batista, A. A.; Pavan, F. R. A Novel Ruthenium(II) Complex With Lapachol Induces G2/M Phase Arrest Through Aurora-B Kinase Down-Regulation and ROS-Mediated Apoptosis in Human Prostate Adenocarcinoma Cells. *Front Oncol* **2021**, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682968>.
- (152) Ponkarpagam, S.; Vennila, K. N.; Elango, K. P. Molecular Spectroscopic and Molecular Simulation Studies on the Interaction of Oral Contraceptive Drug Ormeloxifene with CT–DNA. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2022**, 278, 121351. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121351>.
- (153) Wang, H.; Laughton, C. A. Evaluation of Molecular Modelling Methods to Predict the Sequence-Selectivity of DNA Minor Groove Binding Ligands. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, 11 (45), 10722. <https://doi.org/10.1039/b911702d>.
- (154) Xiong, K.; Qian, C.; Yuan, Y.; Wei, L.; Liao, X.; He, L.; Rees, T. W.; Chen, Y.; Wan, J.; Ji, L.; Chao, H. Necroptosis Induced by Ruthenium(II) Complexes as Dual Catalytic Inhibitors of Topoisomerase I/II. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, 59 (38), 16631–16637. <https://doi.org/10.1002/anie.202006089>.
- (155) Kaur, M.; Loveleen; Kumar, R. Inhibition of Histone Deacetylases, Topoisomerases and Epidermal Growth Factor Receptor by Metal-Based

- Anticancer Agents: Design & Synthetic Strategies and Their Medicinal Attributes. *Bioorg Chem* **2020**, *105*, 104396.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104396>.
- (156) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (157) van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay; 2011; pp 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- (158) Rashidi, M.; Seghatoleslam, A.; Namavari, M.; Amiri, A.; Fahmidehkar, M. A.; Ramezani, A.; Eftekhar, E.; Hosseini, A.; Erfani, N.; Fakher, S. Selective Cytotoxicity and Apoptosis-Induction of Cyrtopodion Scabrum Extract Against Digestive Cancer Cell Lines. *Int J Cancer Manag* **2017**, *10* (5). <https://doi.org/10.5812/ijcm.8633>.
- (159) Ensenyat-Mendez, M.; Llinàs-Arias, P.; Orozco, J. I. J.; Íñiguez-Muñoz, S.; Salomon, M. P.; Sesé, B.; DiNome, M. L.; Marzese, D. M. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. *Front Oncol* **2021**, *11*.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.681476>.
- (160) Borri, F.; Granaglia, A. Pathology of Triple Negative Breast Cancer. *Semin Cancer Biol* **2021**, *72*, 136–145.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.005>.
- (161) Diana, A.; Carlino, F.; Franzese, E.; Oikonomidou, O.; Criscitiello, C.; de Vita, F.; Ciardiello, F.; Orditura, M. Early Triple Negative Breast Cancer: Conventional Treatment and Emerging Therapeutic Landscapes. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (4), 819. <https://doi.org/10.3390/cancers12040819>.

- (162) Graminha, A. E.; Honorato, J.; Correa, R. S.; Cominetti, M. R.; Menezes, A. C. S.; Batista, A. A. A Novel Ruthenium(II) Gallic Acid Complex Disrupts the Actin Cytoskeleton and Inhibits Migration, Invasion and Adhesion of Triple Negative Breast Tumor Cells. *Dalton Transactions* **2021**, 50 (1), 323–335. <https://doi.org/10.1039/D0DT03490H>.
- (163) Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic Assay of Cells in Vitro. *Nat Protoc* **2006**, 1 (5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- (164) Galluzzi, L.; Aaronson, S. A.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Andrews, D. W.; Baehrecke, E. H.; Bazan, N. G.; Blagosklonny, M. v; Blomgren, K.; Borner, C.; Bredesen, D. E.; Brenner, C.; Castedo, M.; Cidlowski, J. A.; Ciechanover, A.; Cohen, G. M.; de Laurenzi, V.; de Maria, R.; Deshmukh, M.; Dynlacht, B. D.; El-Deiry, W. S.; Flavell, R. A.; Fulda, S.; Garrido, C.; Golstein, P.; Gougeon, M.-L.; Green, D. R.; Gronemeyer, H.; Hajnóczky, G.; Hardwick, J. M.; Hengartner, M. O.; Ichijo, H.; Jäättelä, M.; Kepp, O.; Kimchi, A.; Klionsky, D. J.; Knight, R. A.; Kornbluth, S.; Kumar, S.; Levine, B.; Lipton, S. A.; Lugli, E.; Madeo, F.; Malomi, W.; Marine, J.-C. W.; Martin, S. J.; Medema, J. P.; Mehlen, P.; Melino, G.; Moll, U. M.; Morselli, E.; Nagata, S.; Nicholson, D. W.; Nicotera, P.; Nuñez, G.; Oren, M.; Penninger, J.; Pervaiz, S.; Peter, M. E.; Piacentini, M.; Prehn, J. H. M.; Puthalakath, H.; Rabinovich, G. A.; Rizzuto, R.; Rodrigues, C. M. P.; Rubinsztein, D. C.; Rudel, T.; Scorrano, L.; Simon, H.-U.; Steller, H.; Tschopp, J.; Tsujimoto, Y.; Vandenabeele, P.; Vitale, I.; Vousden, K. H.; Youle, R. J.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Kroemer, G. Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Cell Death in Higher Eukaryotes. *Cell Death Differ* **2009**, 16 (8), 1093–1107. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>.

- (165) Justus, C. R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L. v. In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments* **2014**, No. 88. <https://doi.org/10.3791/51046>.
- (166) Leal-Esteban, L. C.; Fajas, L. Cell Cycle Regulators in Cancer Cell Metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V. May 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165715>.
- (167) Ford, H. L.; Pardee, A. B. Cancer and the Cell Cycle. *J Cell Biochem* **1999**, 76 (SUPPL. 32/33), 166–172. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(1999\)75:32+<166::aid-jcb20>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(1999)75:32+<166::aid-jcb20>3.0.co;2-j).
- (168) Bernard, D.; Mondesert, O.; Gomes, A.; Duthen, Y.; Lobjois, V.; Cussat-Blanc, S.; Ducommun, B. A Checkpoint-Oriented Cell Cycle Simulation Model. *Cell Cycle* **2019**, 18 (8), 795–808. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1591125>.
- (169) Tessema, M.; Lehmann, U.; Kreipe, H. Cell Cycle and No End. *Virchows Archiv* **2004**, 444 (4), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0971-3>.
- (170) Pucci, B.; Kasten, M.; Giordano, A. Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia* **2000**, 2 (4), 291. <https://doi.org/10.1038/SJ.NEO.7900101>.
- (171) Ormerod, M. G. Investigating the Relationship between the Cell Cycle and Apoptosis Using Flow Cytometry. *J Immunol Methods* **2002**, 265 (1–2), 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00071-6).
- (172) Tadić, A.; Poljarević, J.; Krstić, M.; Kajzerberger, M.; Arandelović, S.; Radulović, S.; Kakoulidou, C.; Papadopoulos, A. N.; Psomas, G.; Grgurić-Šipka, S. Ruthenium–Arene Complexes with NSAIDs: Synthesis, Characterization and Bioactivity. *New Journal of Chemistry* **2018**, 42 (4), 3001–3019. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04416J>.

- (173) Liu, S. H.; Zhao, J. H.; Deng, K. K.; Wu, Y.; Zhu, J. W.; Liu, Q. H.; Xu, H. H.; Wu, H. F.; Li, X. Y.; Wang, J. W.; Guo, Q. F. Effect of Radiation on Cytotoxicity, Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Human Osteosarcoma MG-63 Induced by a Ruthenium(II) Complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2015**, *140*, 202–209.
<https://doi.org/10.1016/J.SAA.2014.12.068>.
- (174) Candido, C. C.; Silva, H. V. R.; Zavan, B.; Ionta, M.; Barbosa, M. I. F.; Doriguetto, A. C. Synthesis, Characterization and in Vitro Cytotoxicity of Ruthenium(II) Metronidazole Complexes: Cell Cycle Arrest at G1/S Transition and Apoptosis Induction in MCF-7 Cells. *J Inorg Biochem* **2022**, *237*. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112022>.
- (175) Ribeiro, G. H.; Guedes, A. P. M.; de Oliveira, T. D.; de Correia, C. R. S. T. b.; Colina-Vegas, L.; Lima, M. A.; Nóbrega, J. A.; Cominetti, M. R.; Rocha, F. v.; Ferreira, A. G.; Castellano, E. E.; Teixeira, F. R.; Batista, A. A. Ruthenium(II) Phosphine/Mercapto Complexes: Their in Vitro Cytotoxicity Evaluation and Actions as Inhibitors of Topoisomerase and Proteasome Acting as Possible Triggers of Cell Death Induction. *Inorg Chem* **2020**, *59* (20), 15004–15018.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01835>.
- (176) de Carvalho, N. C.; Neves, S. P.; Dias, R. B.; Valverde, L. de F.; Sales, C. B. S.; Rocha, C. A. G.; Soares, M. B. P.; dos Santos, E. R.; Oliveira, R. M. M.; Carlos, R. M.; Nogueira, P. C. L.; Bezerra, D. P. A Novel Ruthenium Complex with Xanthoxylin Induces S-Phase Arrest and Causes ERK1/2-Mediated Apoptosis in HepG2 Cells through a P53-Independent Pathway. *Cell Death Dis* **2018**, *9* (2), 79. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0104-6>.
- (177) Kanduc, D.; Mittelman, A.; Serpico, R.; Sinigaglia, E.; Sinha, A.; Natale, C.; Santacroce, R.; di Corcia, M.; Lucchese, A.; Dini, L.; Pani, P.;

- Santacroce, S.; Simone, S.; Bucci, R.; Farber, E. Cell Death: Apoptosis versus Necrosis (Review). *Int J Oncol* **2002**.
<https://doi.org/10.3892/ijo.21.1.165>.
- (178) Chen, Q.; Kang, J.; Fu, C. The Independence of and Associations among Apoptosis, Autophagy, and Necrosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2018**, *3* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0018-5>.
- (179) Zembruski, N. C. L.; Stache, V.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. 7-Aminoactinomycin D for Apoptosis Staining in Flow Cytometry. *Anal Biochem* **2012**, *429* (1), 79–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>.
- (180) Reutelingsperger, C. P. M.; Dumont, E.; Thimister, P. W.; van Genderen, H.; Kenis, H.; van de Eijnde, S.; Heidendal, G.; Hofstra, L. Visualization of Cell Death in Vivo with the Annexin A5 Imaging Protocol. *J Immunol Methods* **2002**, *265* (1–2), 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00075-3).
- (181) Jiang, G.-B.; Zhang, W.-Y.; He, M.; Gu, Y.-Y.; Bai, L.; Wang, Y.-J.; Yi, Q.-Y.; Du, F. Systematic Evaluation of the Antitumor Activity of Three Ruthenium Polypyridyl Complexes. *J Inorg Biochem* **2021**, *225*, 111616. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111616>.
- (182) Pawlowski, J.; Kraft, A. S. Bax-Induced Apoptotic Cell Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (2), 529–531. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.529>.
- (183) Pistritto, G.; Trisciuglio, D.; Ceci, C.; Alessia Garufi; D’Orazi, G. Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8* (4), 603. <https://doi.org/10.18632/AGING.100934>.

- (184) Pawlak, G.; Helfman, D. M. Cytoskeletal Changes in Cell Transformation and Tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* **2001**, *11* (1), 41–47.
[https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00154-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00154-4).
- (185) Zeng, C.-C.; Lai, S.-H.; Yao, J.-H.; Zhang, C.; Yin, H.; Li, W.; Han, B.-J.; Liu, Y.-J. The Induction of Apoptosis in HepG-2 Cells by Ruthenium(II) Complexes through an Intrinsic ROS-Mediated Mitochondrial Dysfunction Pathway. *Eur J Med Chem* **2016**, *122*, 118–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.020>.

APÊNDICE

Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos e do ligante 3-estiril-lausona (NQ1) da Série 1 (A1 a A8).

FIGURA A1 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante NQ1 (preto) e o complexo A2 (roxo) em pastilha de KBr.

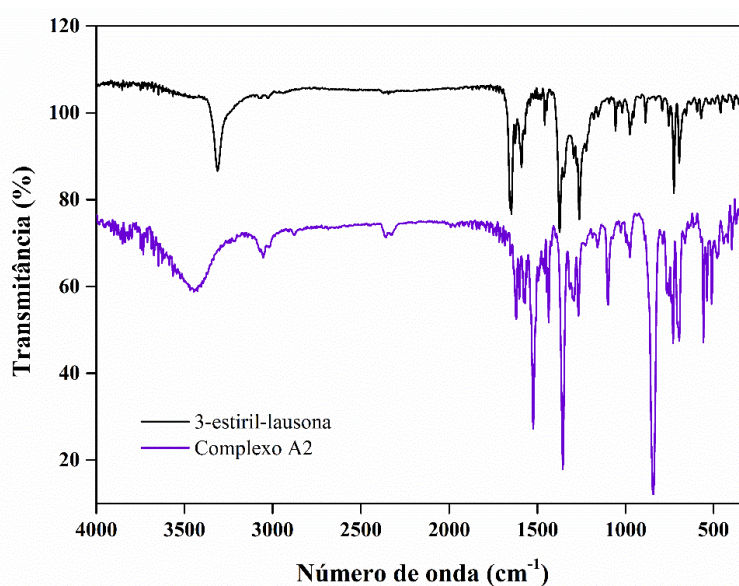


FIGURA A2 - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante NQ1 (—) e o complexo A3 (—) em pastilha de KBr.

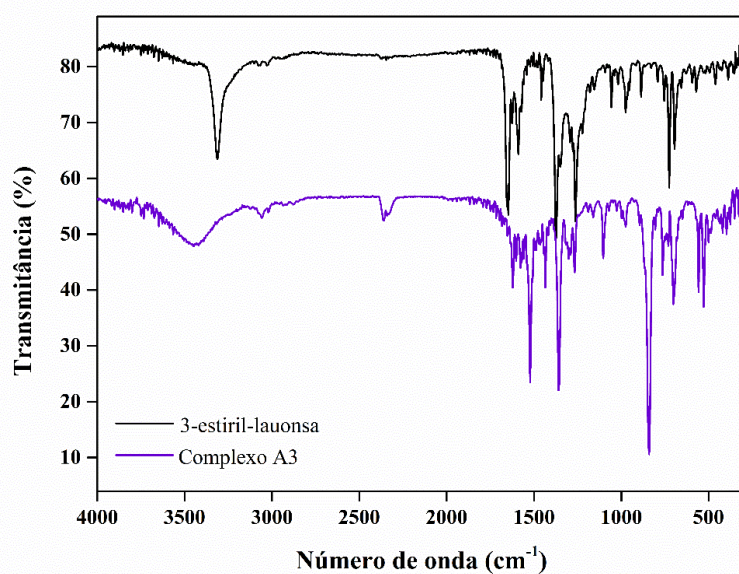


FIGURA A3 - Espectro de absorção na região do infravermelho para NQ1 (-) e o complexo A4 (-) em pastilha de KBr.

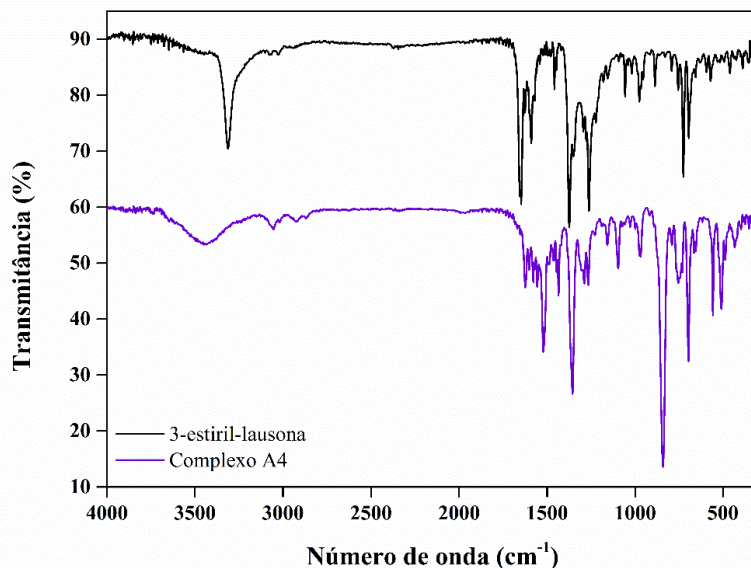


FIGURA A4 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante NQ1 (-) e o complexo A5 (-) em pastilha de KBr.

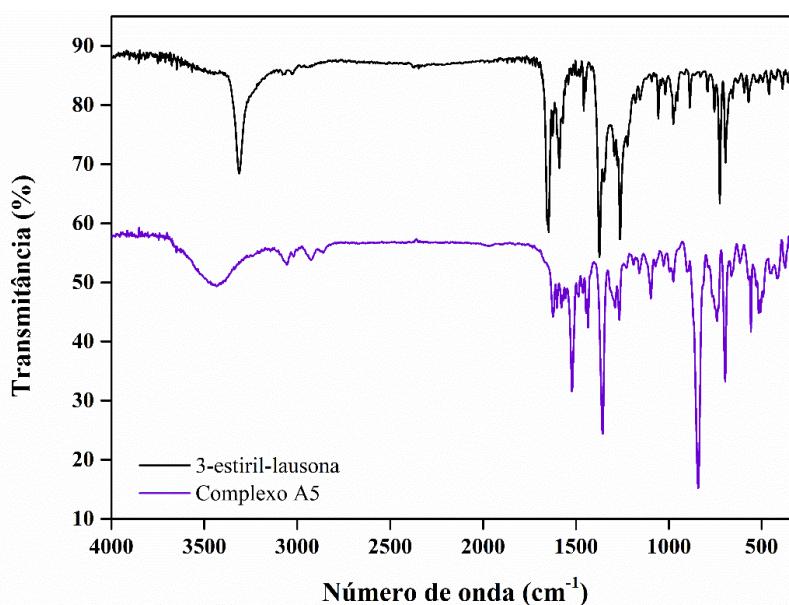


FIGURA A5 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante NQ1 (–) e o complexo **A6** (–) em pastilha de KBr.

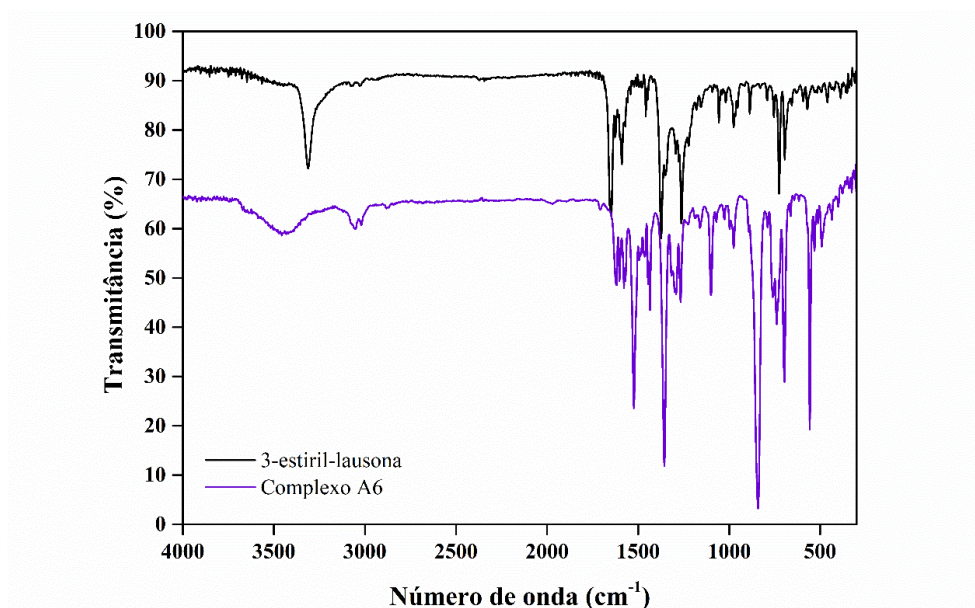


FIGURA A6 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante NQ1 (–) e o complexo **A7** (–) em pastilha de KBr.

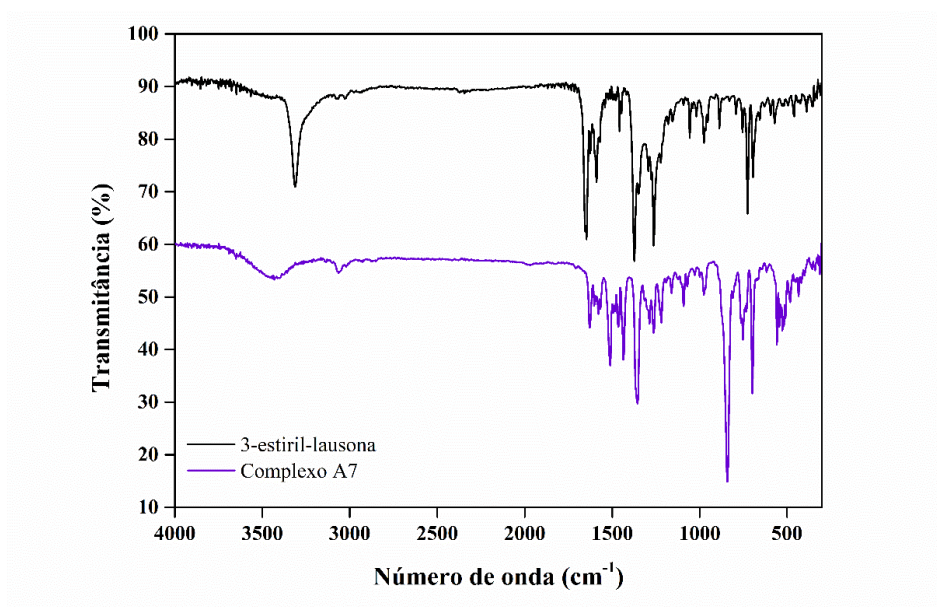
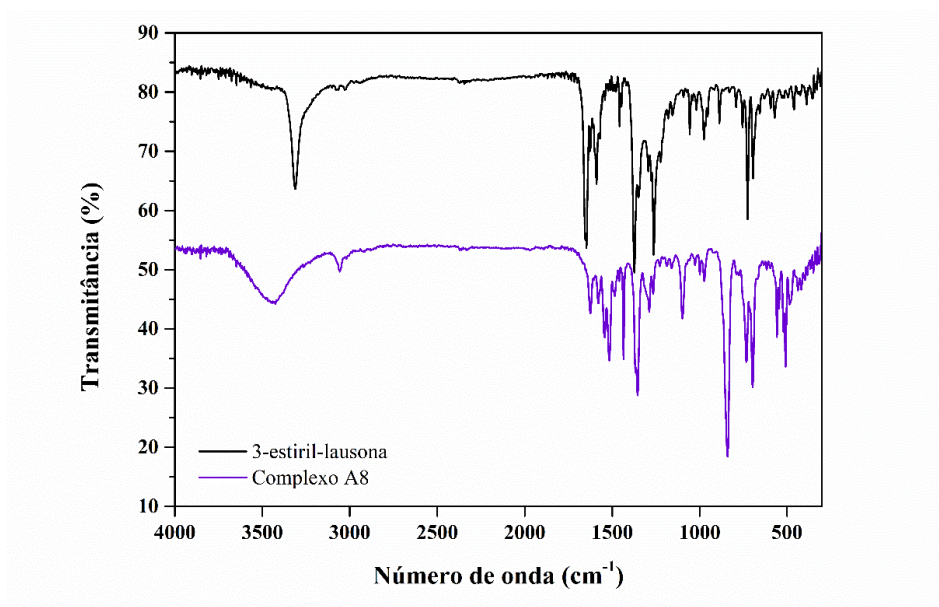


FIGURA A7 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante NQ1 (-) e o complexo A8 (-) em pastilha de KBr.



Espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível em dmsso, para os complexos da série 1

FIGURA A8 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo A2 e A3 em dmsso

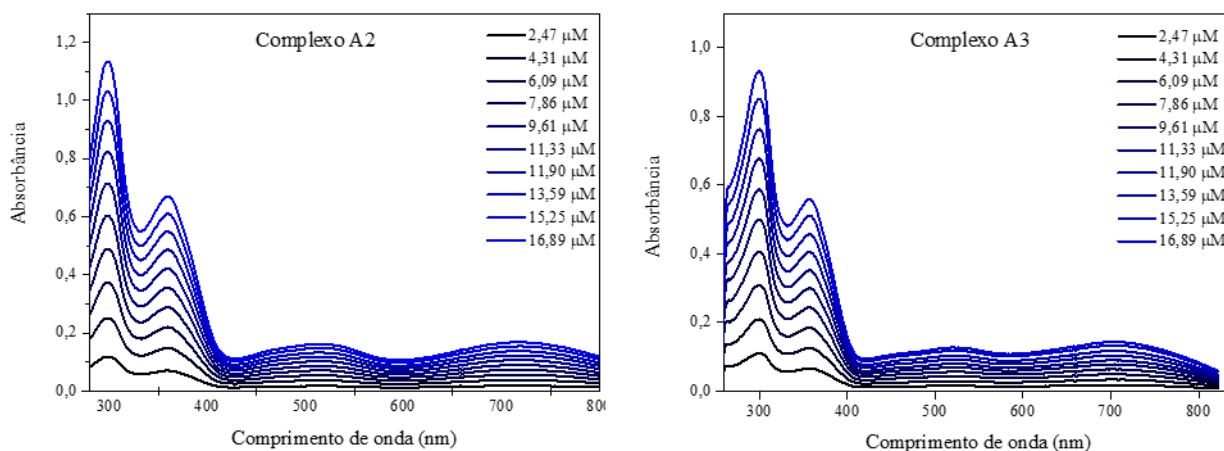


FIGURA A9 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo A4 e A5 em dms0

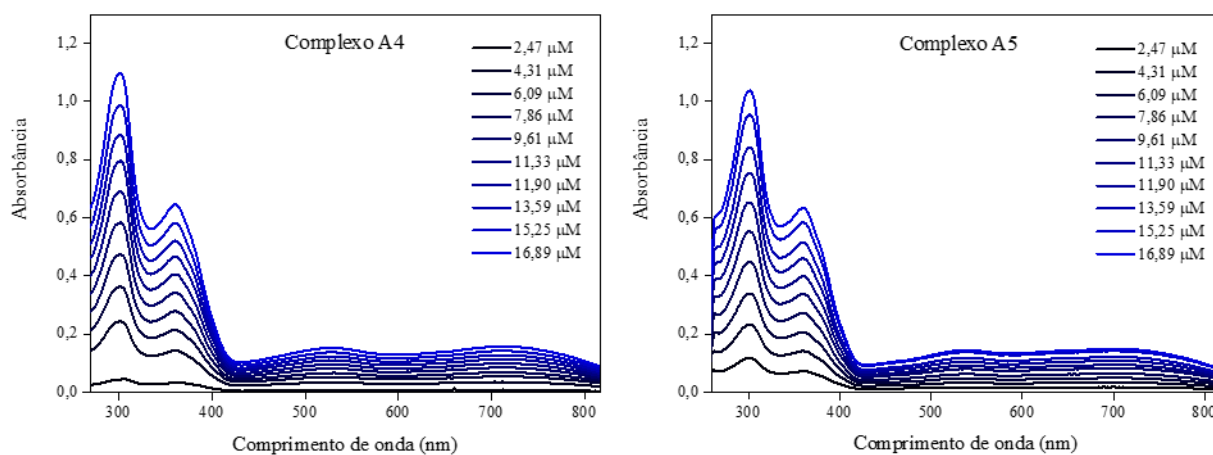
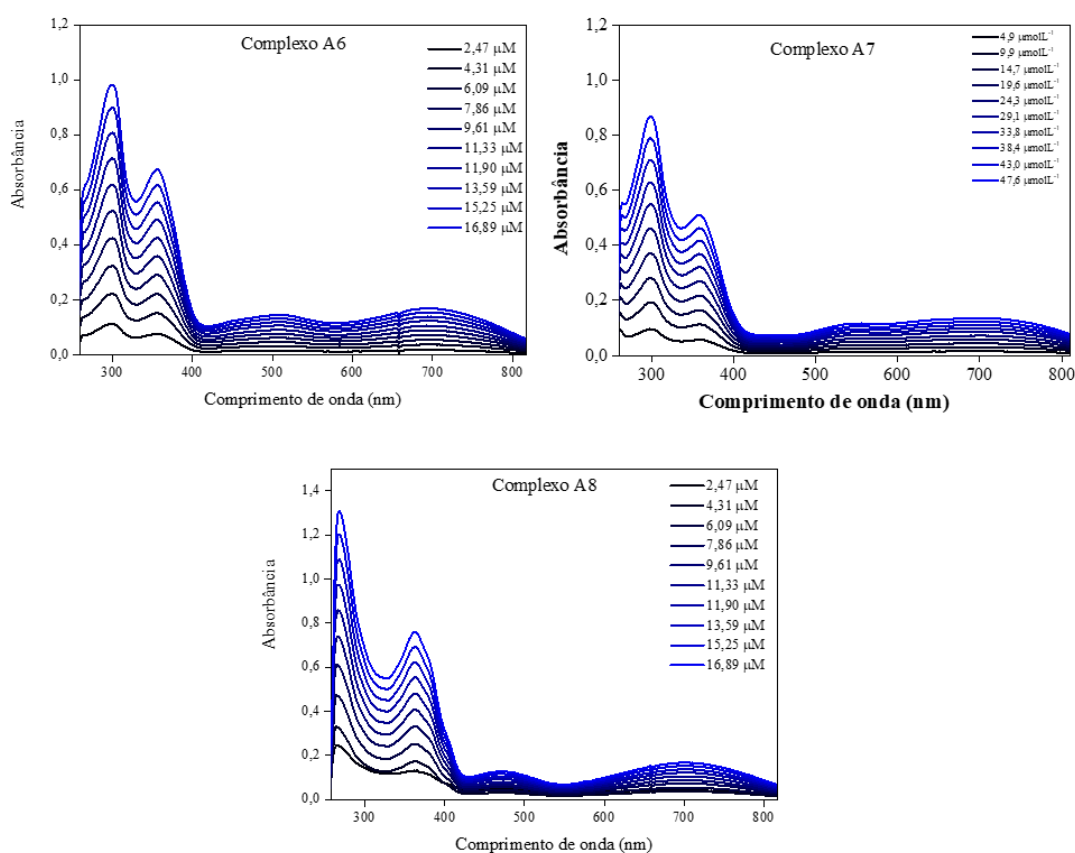


FIGURA A10 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo A6, A7 e A8 em dms0



Voltamograma cíclico em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

FIGURA A11 - Voltamogramas cíclicos dos complexos **A2** e **A3** em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

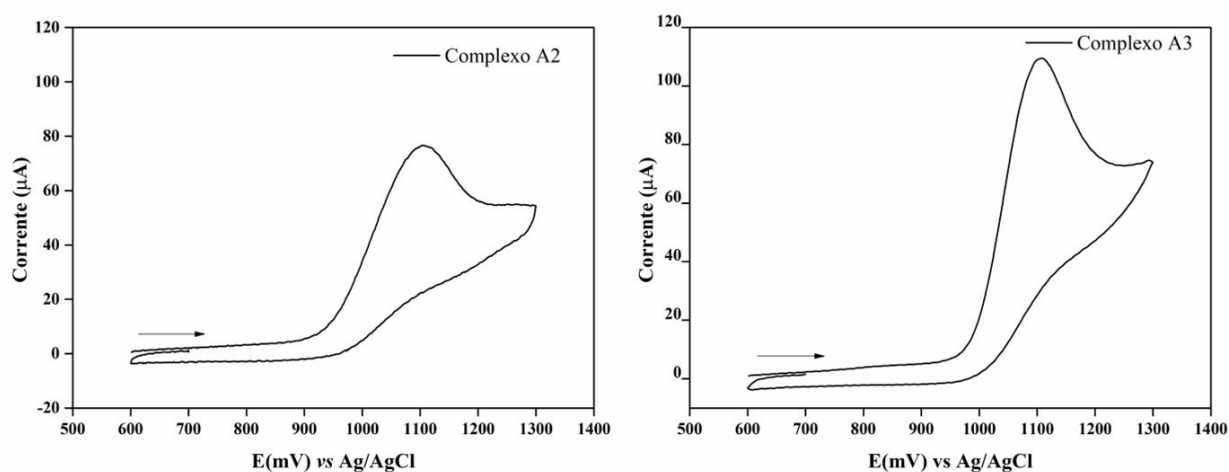


FIGURA A12 - Voltamogramas cíclicos dos complexos **A4** e **A5** em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

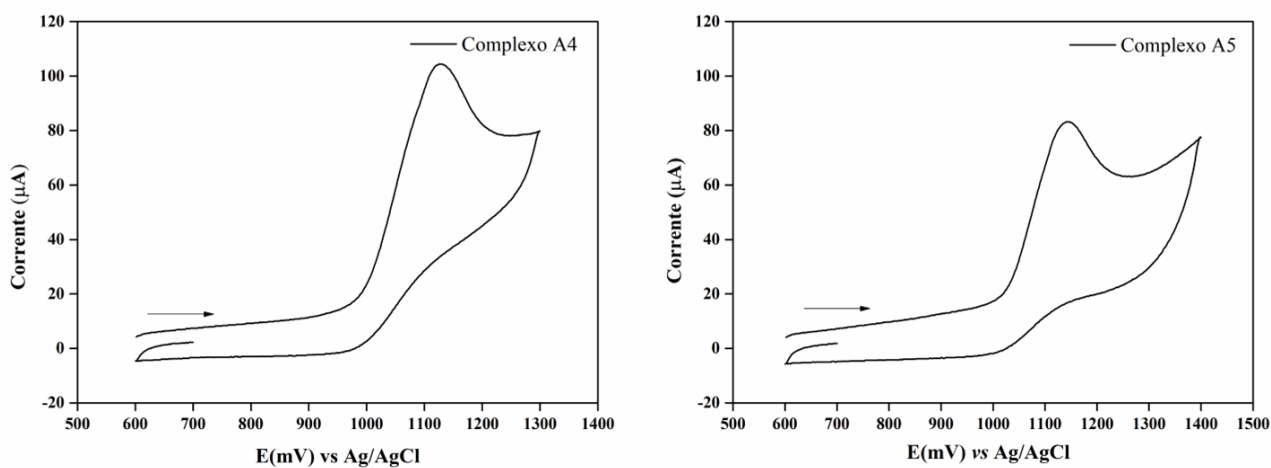


FIGURA A13 - Voltamogramas cíclicos dos complexos **A6**, **A7** e **A8** em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

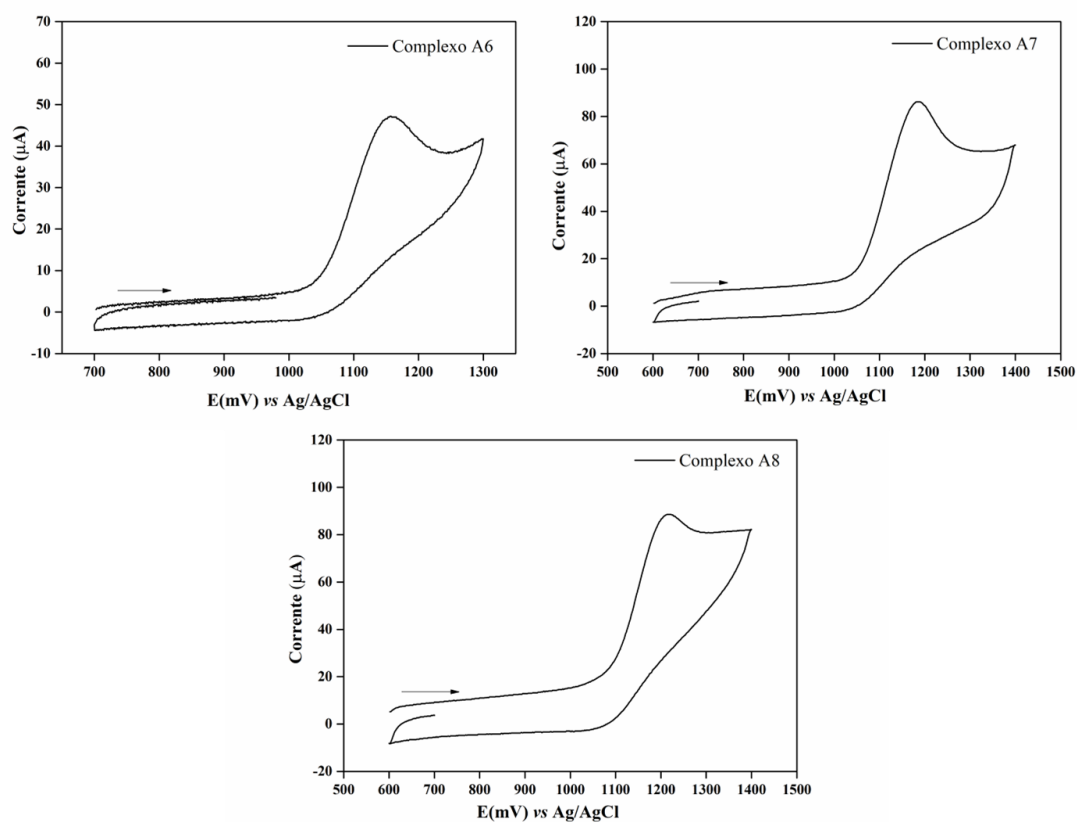


FIGURA A14 - Espectros de massas para o complexo **A1** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

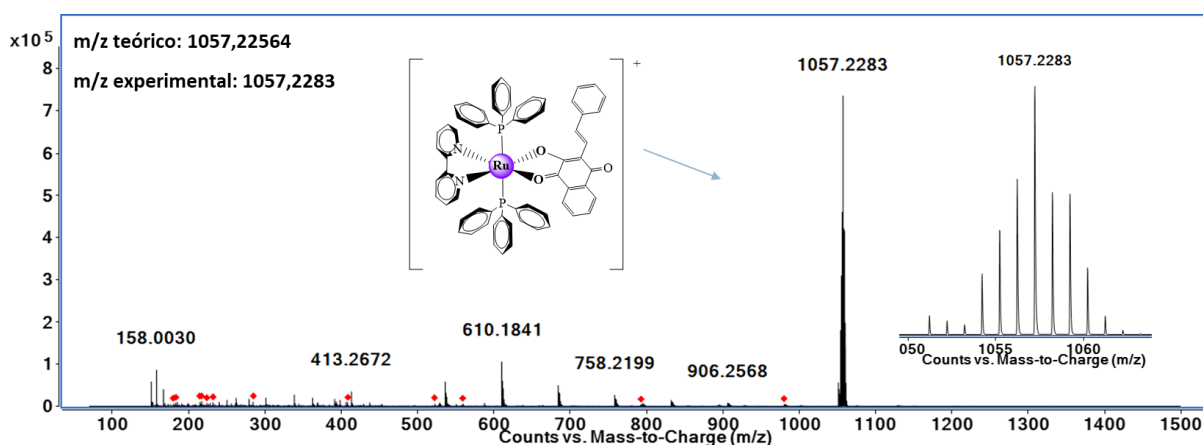


FIGURA A14 - Espectros de massas para o complexo **A2** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

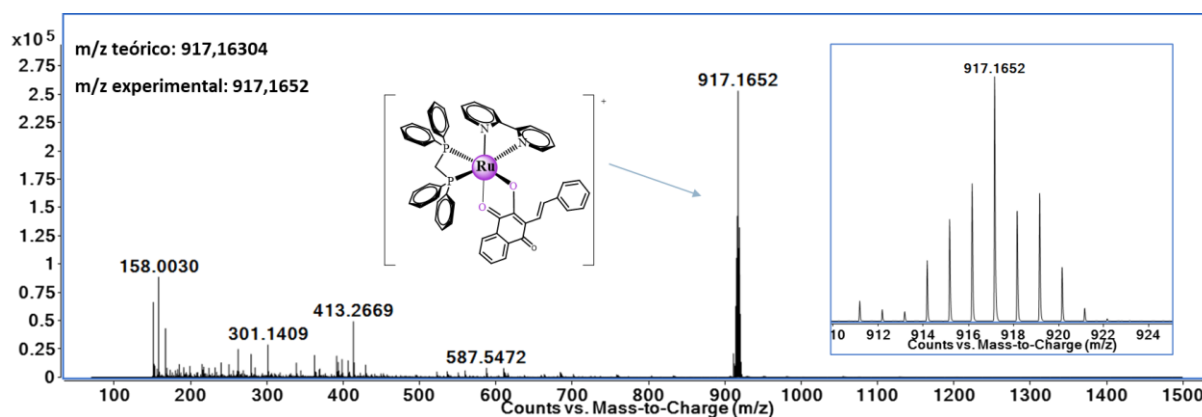


FIGURA A15 - Espectros de massas para o complexo **A3** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

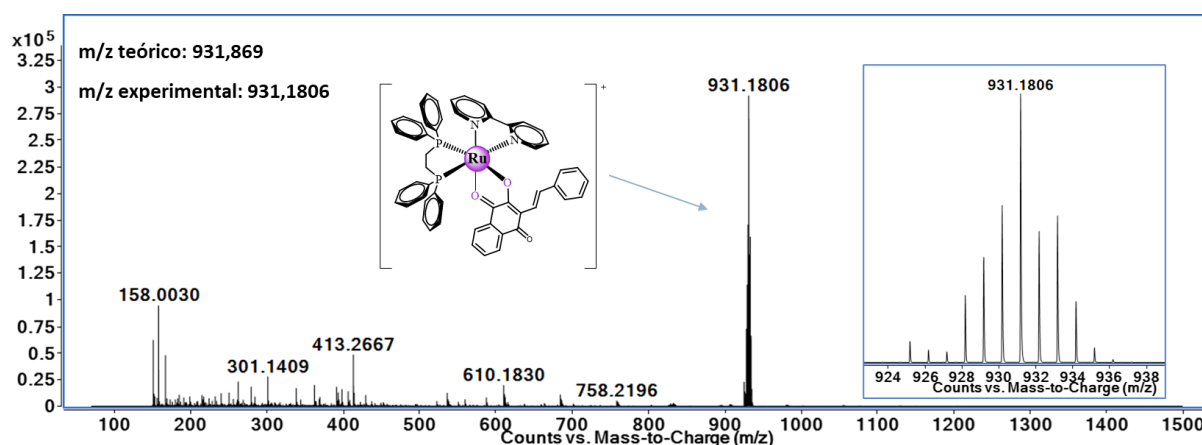


FIGURA A16 - Espectros de massas para o complexo **A4** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

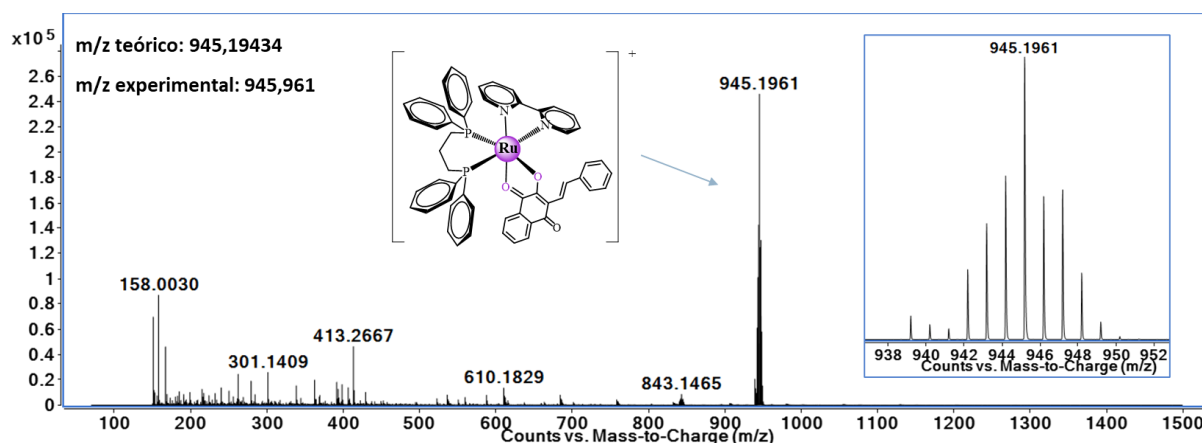


FIGURA A17 - Espectros de massas para o complexo **A5** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

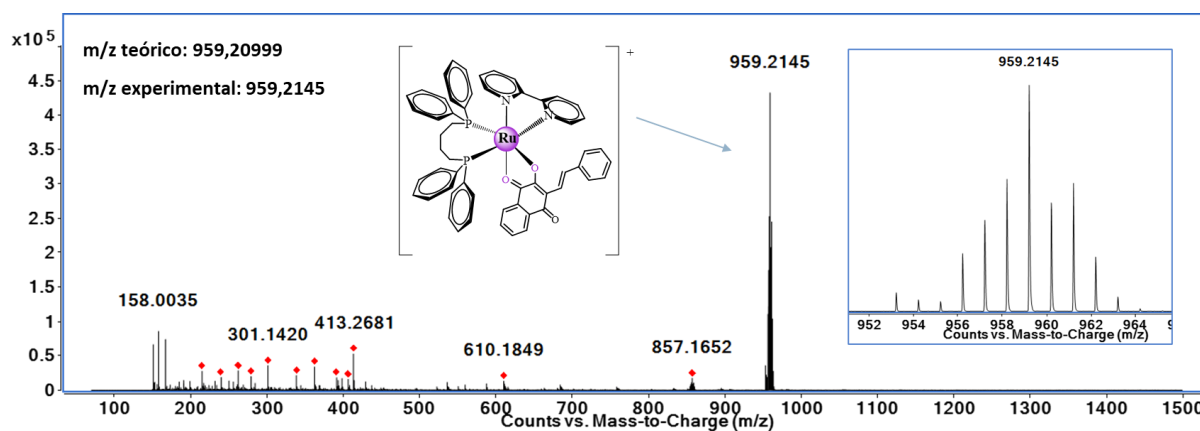


FIGURA A18 - Espectros de massas para o complexo **A6** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

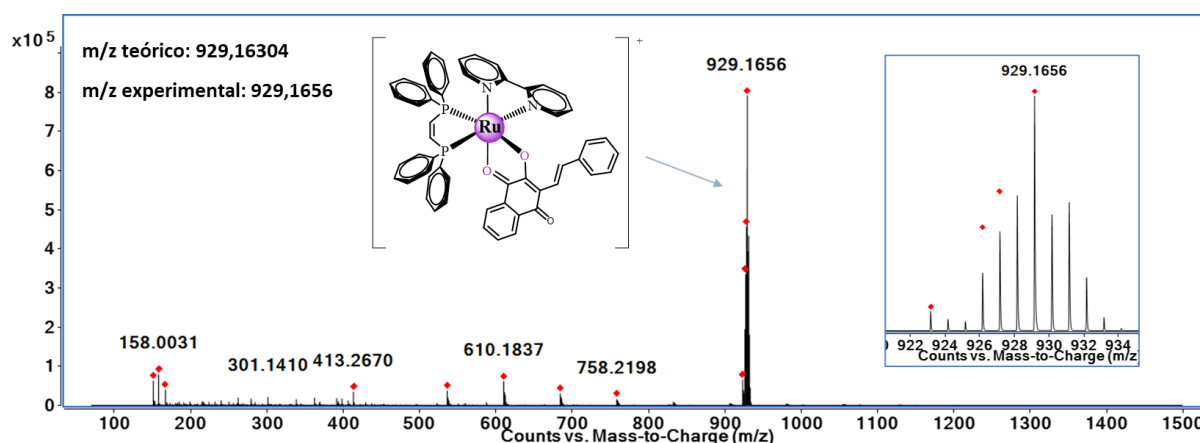


FIGURA A19 - Espectros de massas para o complexo **A7** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

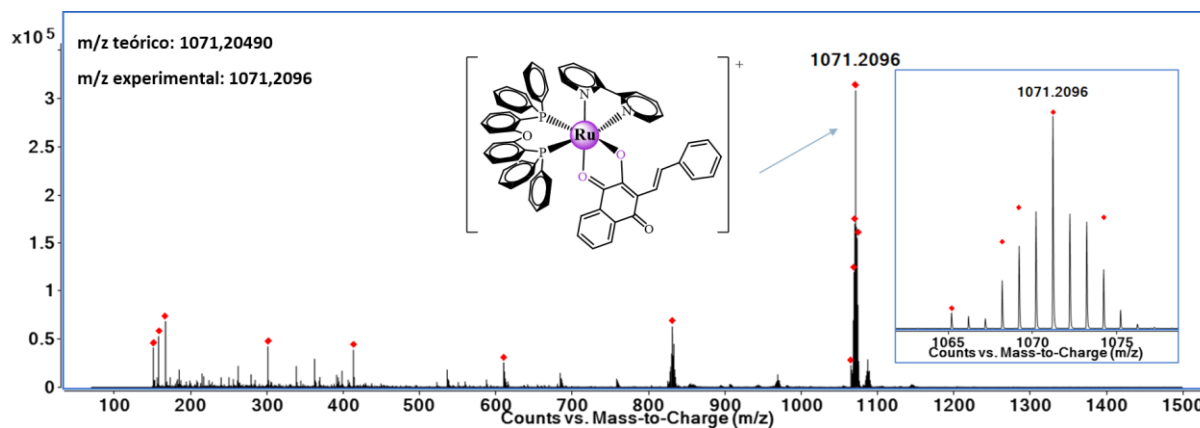
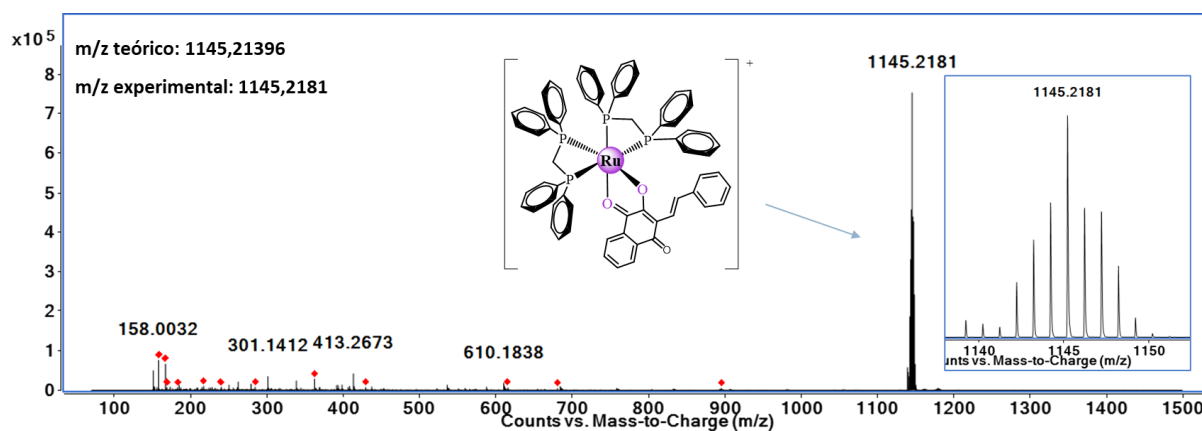


FIGURA A20 - Espectros de massas para o complexo **A8** e a estrutura química referente ao íon fragmento.



Espectros de RMN de ¹H, ¹³C{¹H} e ³¹P{¹H}

FIGURA A20 - Espectro de RMN ¹H do ligante **NQ1** (3-estiril-lausona) em Acetona-d₆.

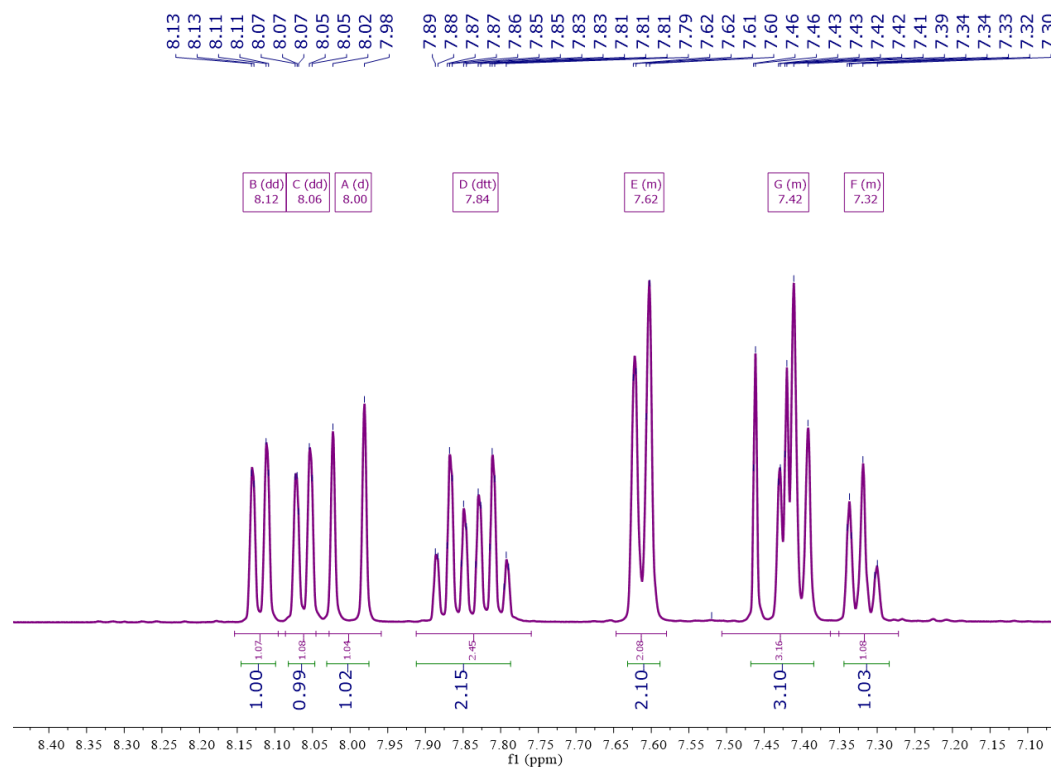


FIGURA A21 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante **NQ1** (3-estiril-lausona) em Acetona- d_6 .

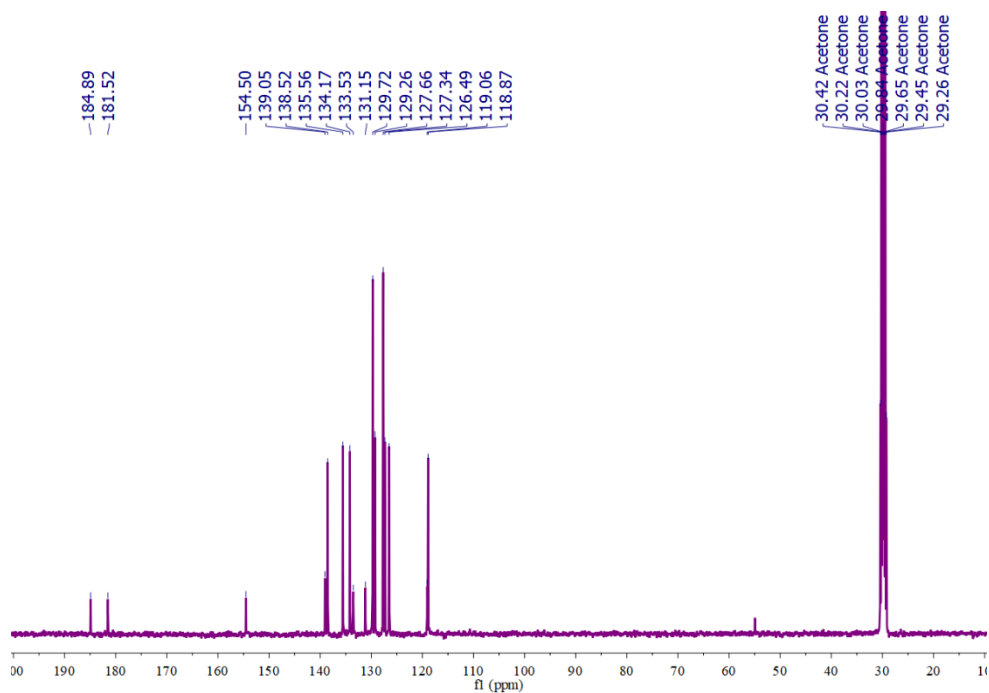


FIGURA A22 - Espectro de RMN ^1H do complexo **A2** em Acetona- d_6 .

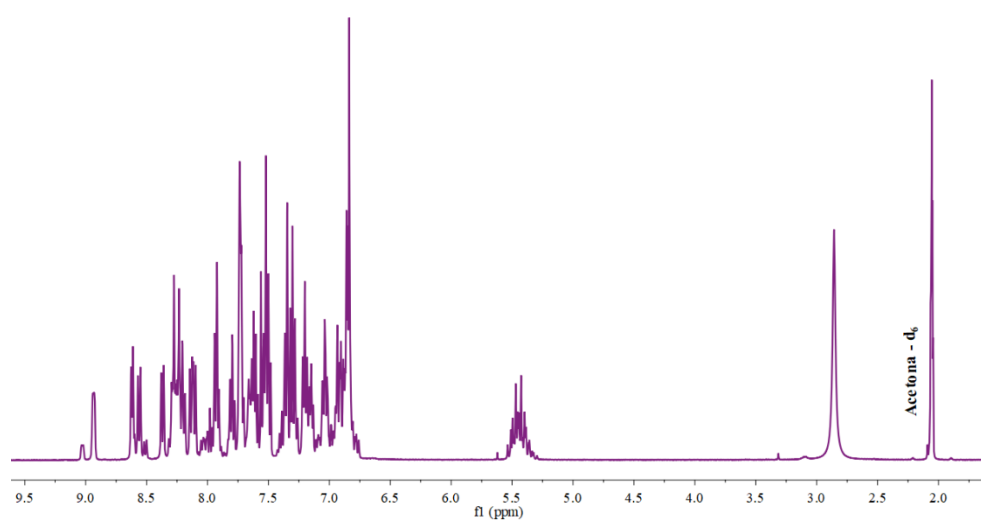


FIGURA A23 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A2** em Acetona-d₆.

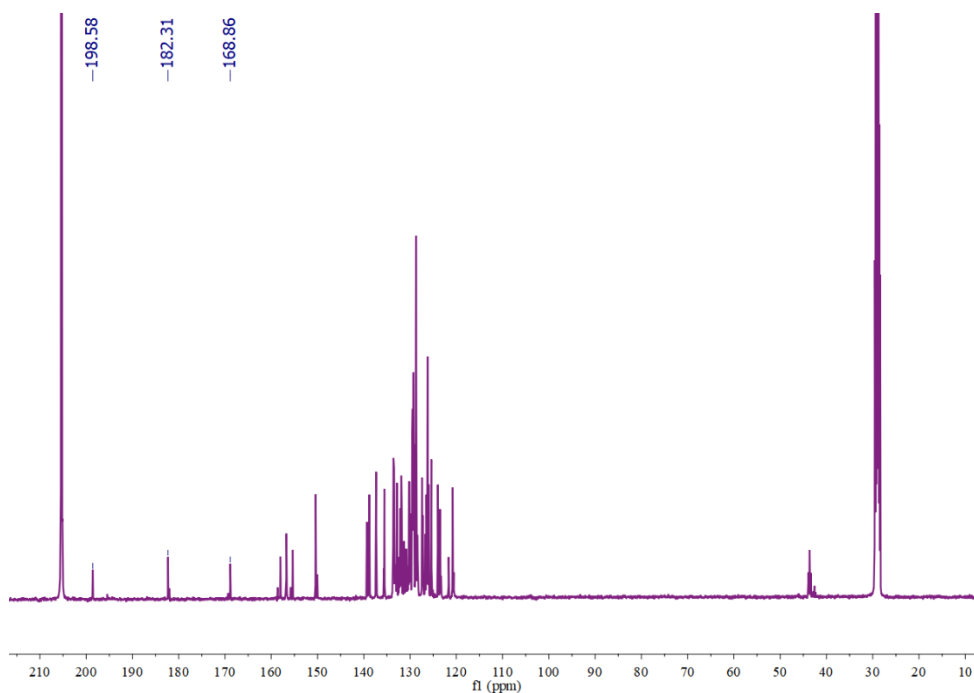


FIGURA A24 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A2** em Acetona-d₆.

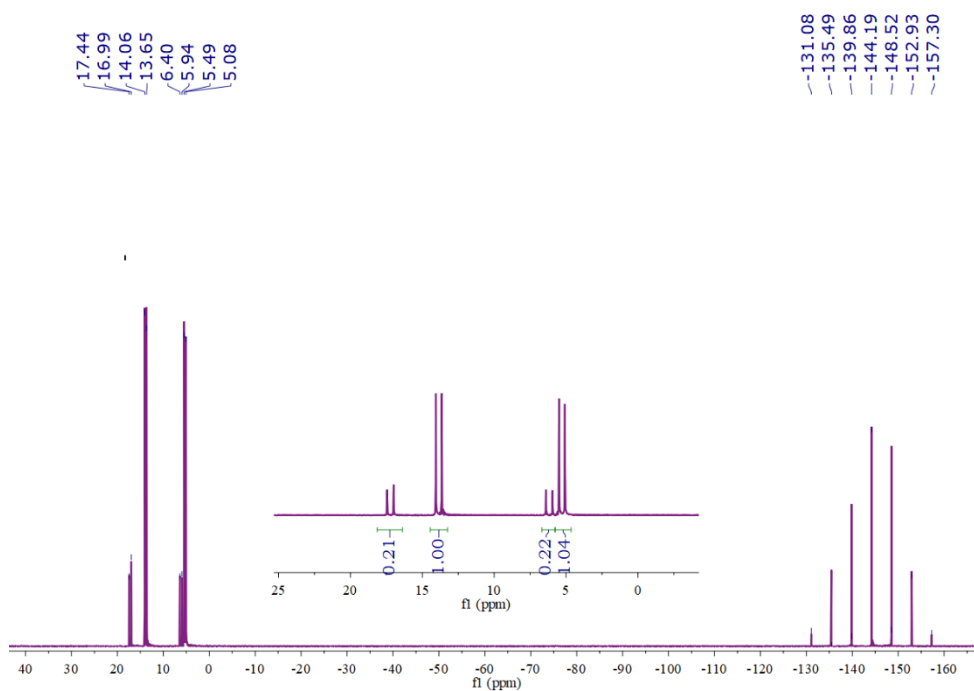


FIGURA A25 - Espectro de RMN ^1H do complexo **A3** em Acetona- d_6 .

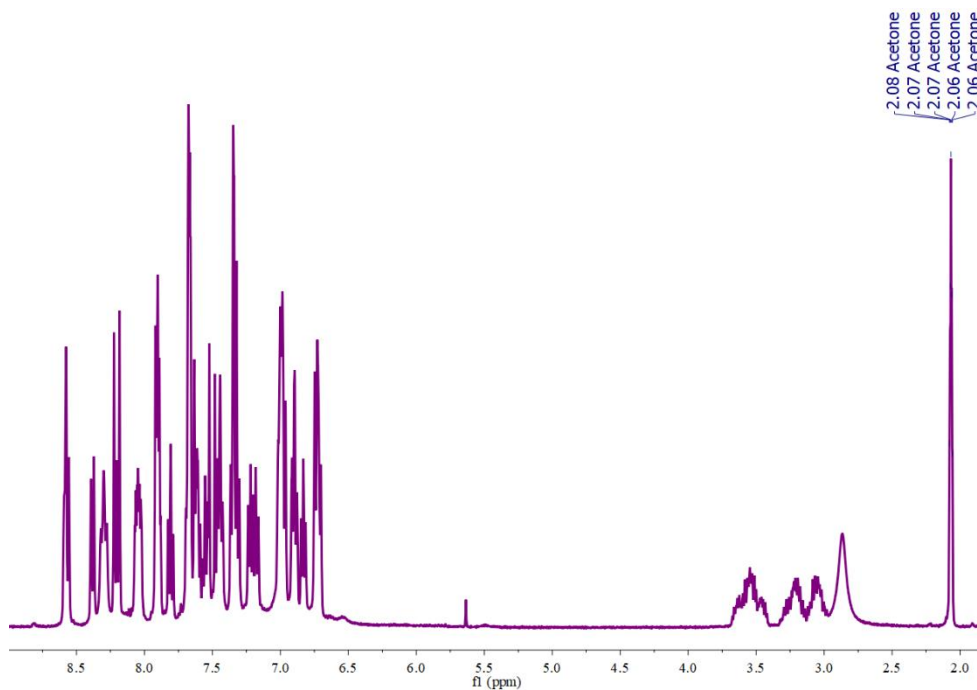


FIGURA A26 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A3** em Acetona- d_6 .

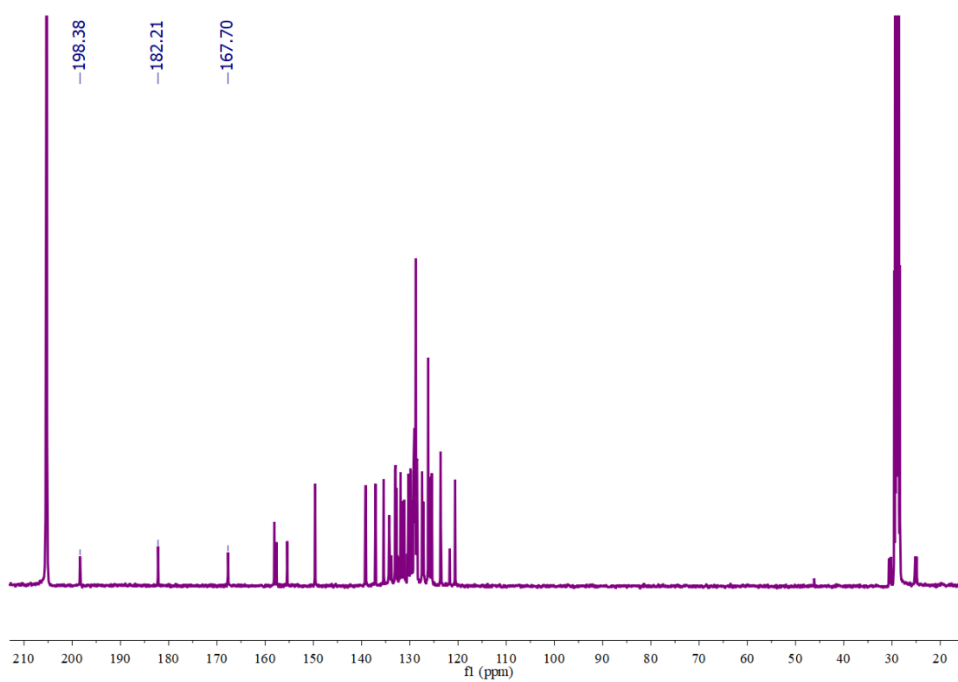


FIGURA A27 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A3** em Acetona- d_6 .

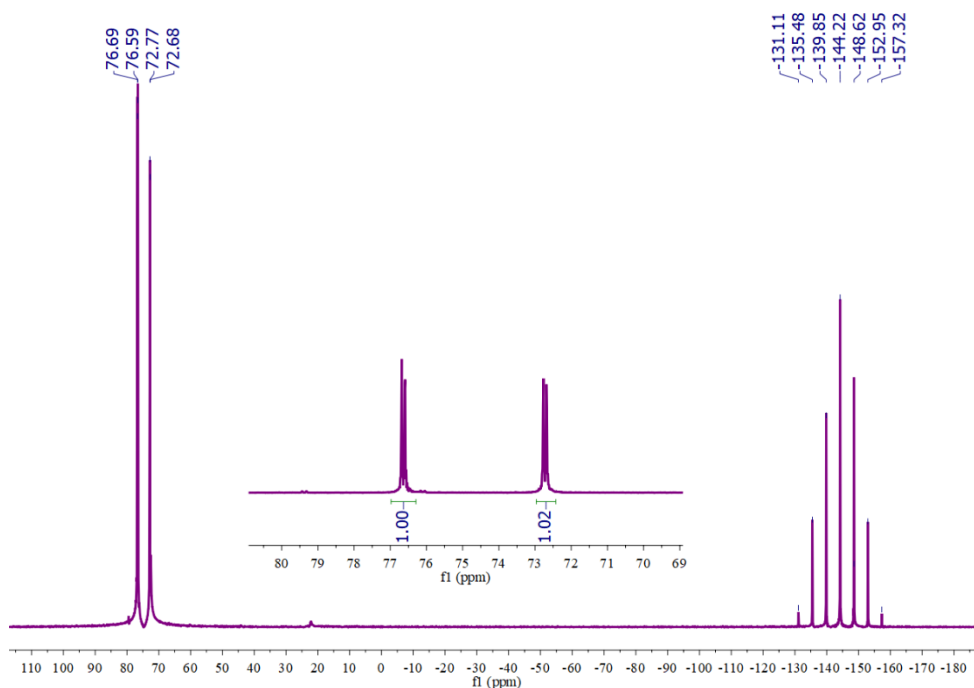


FIGURA A28 - Espectro de RMN ^1H do complexo **A4** em Acetona- d_6 .

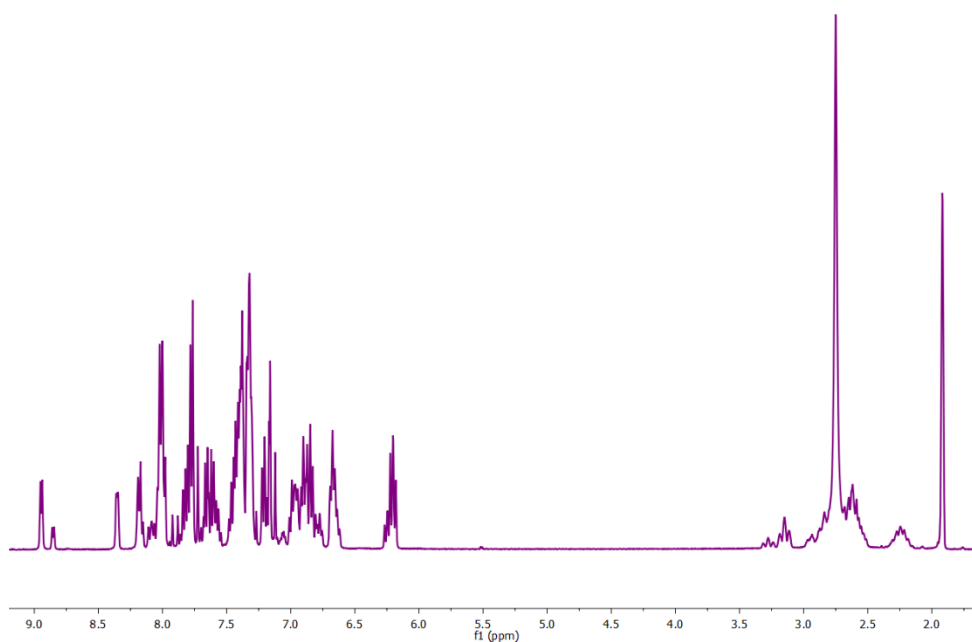


FIGURA A29 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A4** em Acetona-d₆.

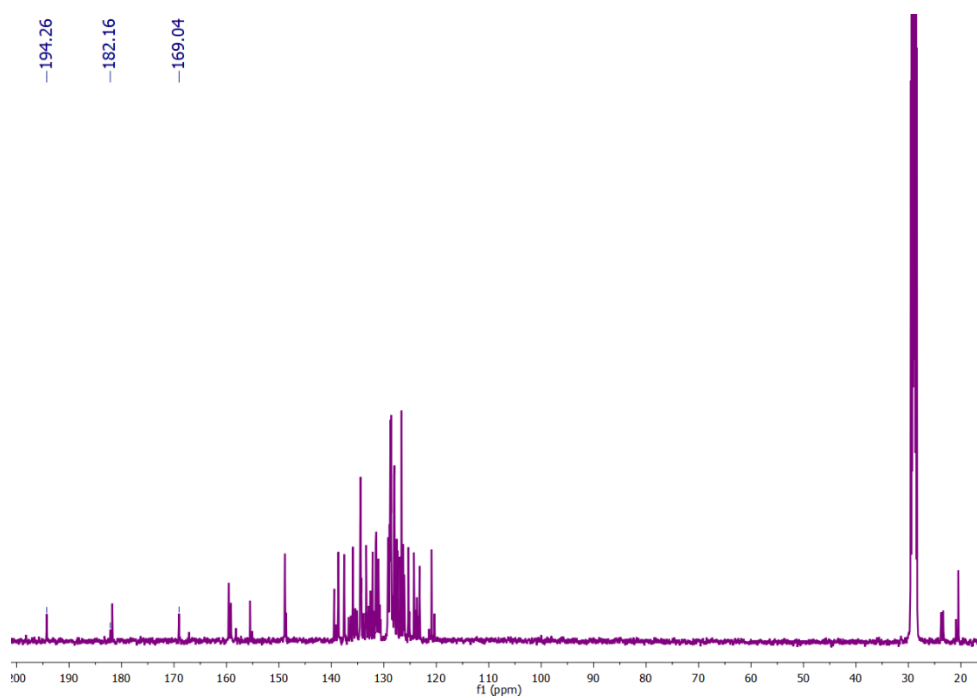


FIGURA A30 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A4** em Acetona-d₆.

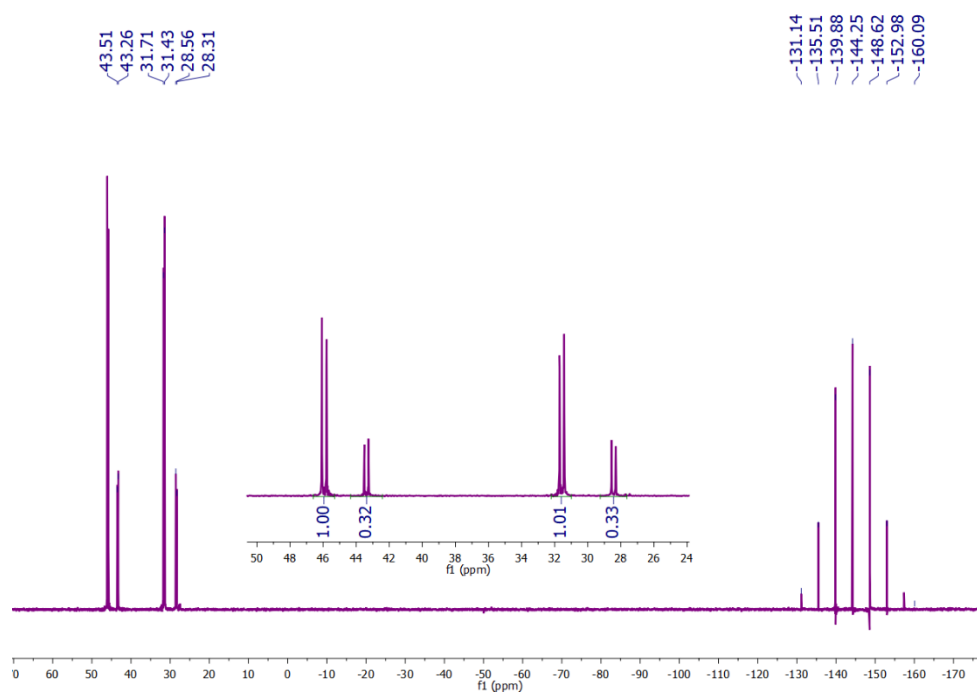


FIGURA A31 - Espectro de RMN ^1H do complexo **A5** em Acetona- d_6 .

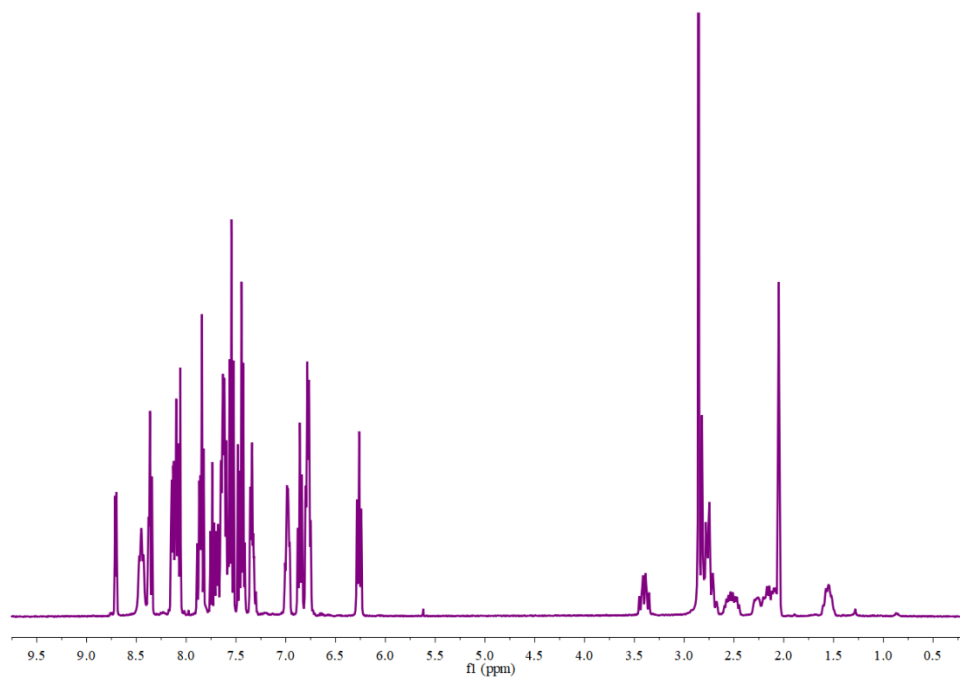


FIGURA A32 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A5** em Acetona- d_6 .

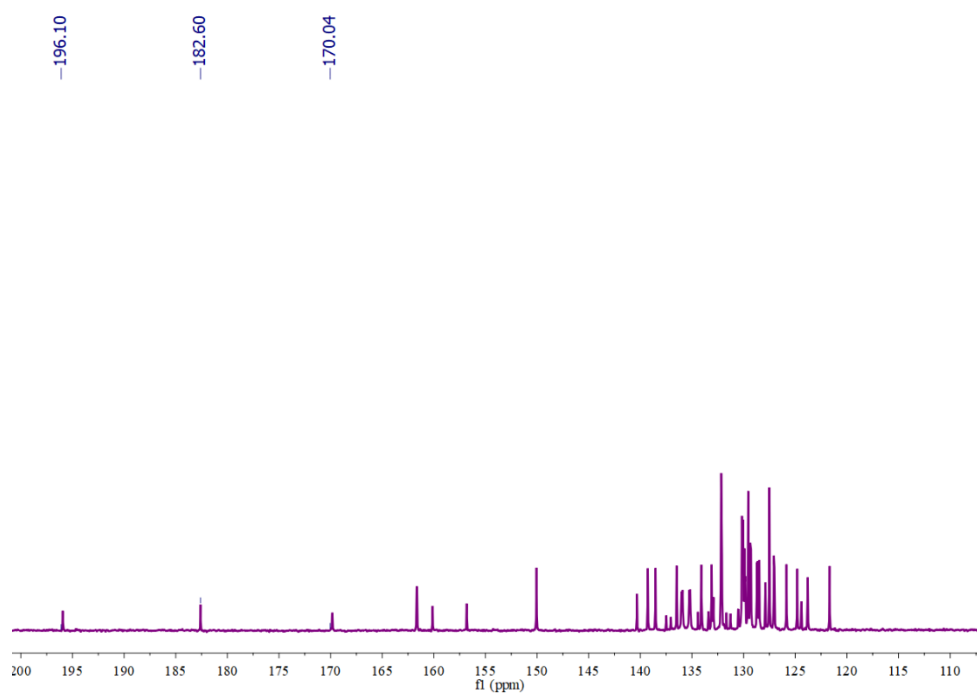


FIGURA A33 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A5** em Acetona- d_6 .

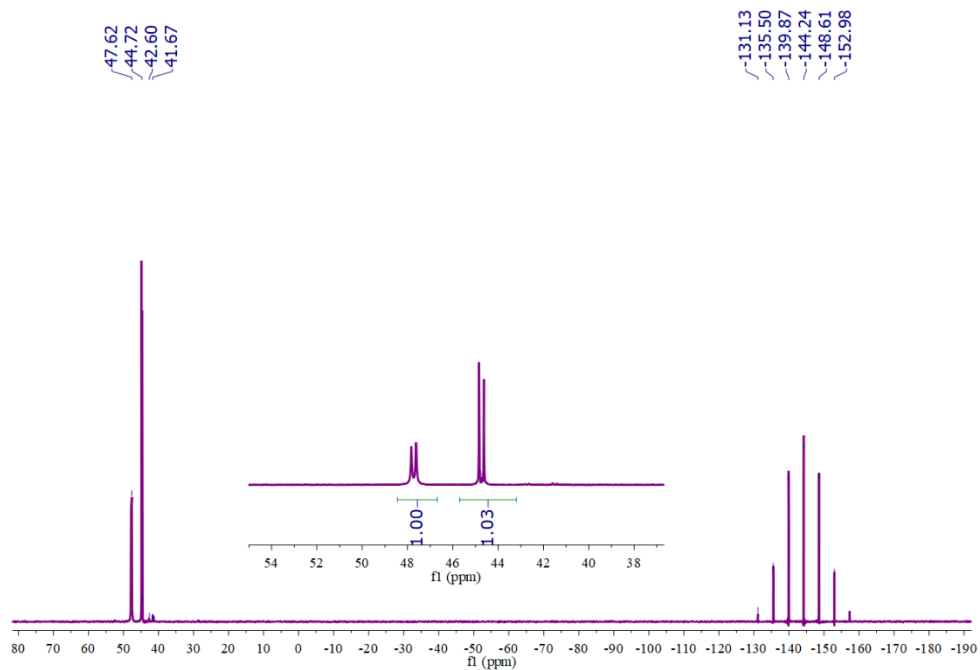


FIGURA A34- Espectro de RMN ^1H do complexo **A6** em Acetona- d_6 .

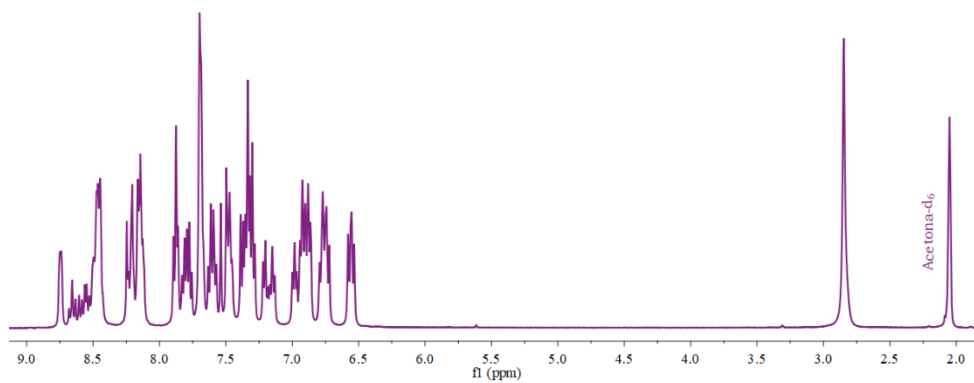


FIGURA A35 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A6** em Acetona- d_6 .

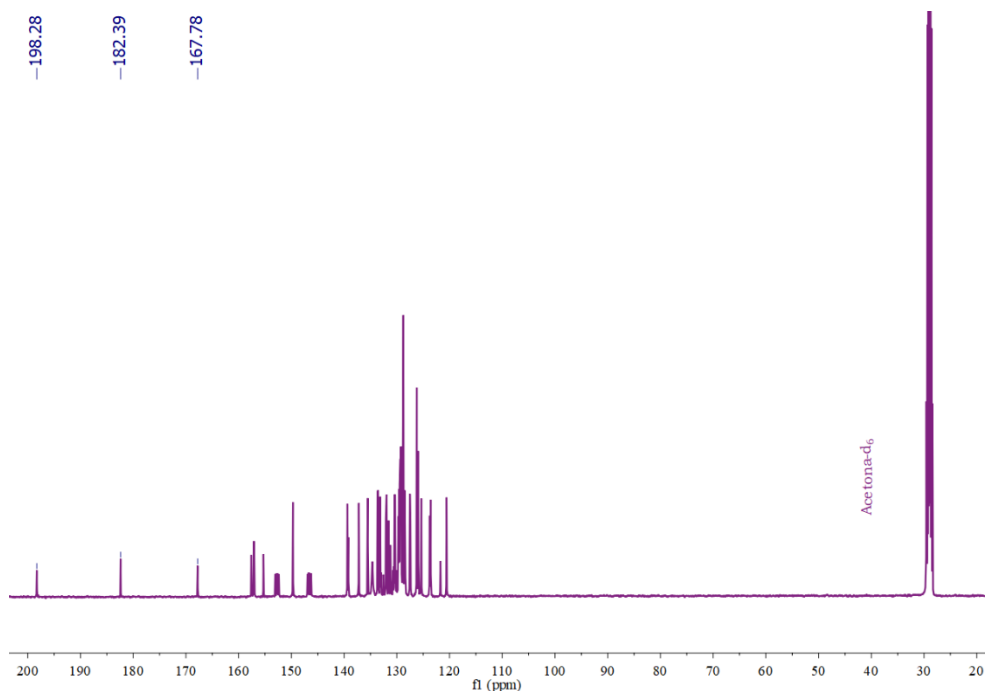


FIGURA A36 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A6** em Acetona- d_6 .

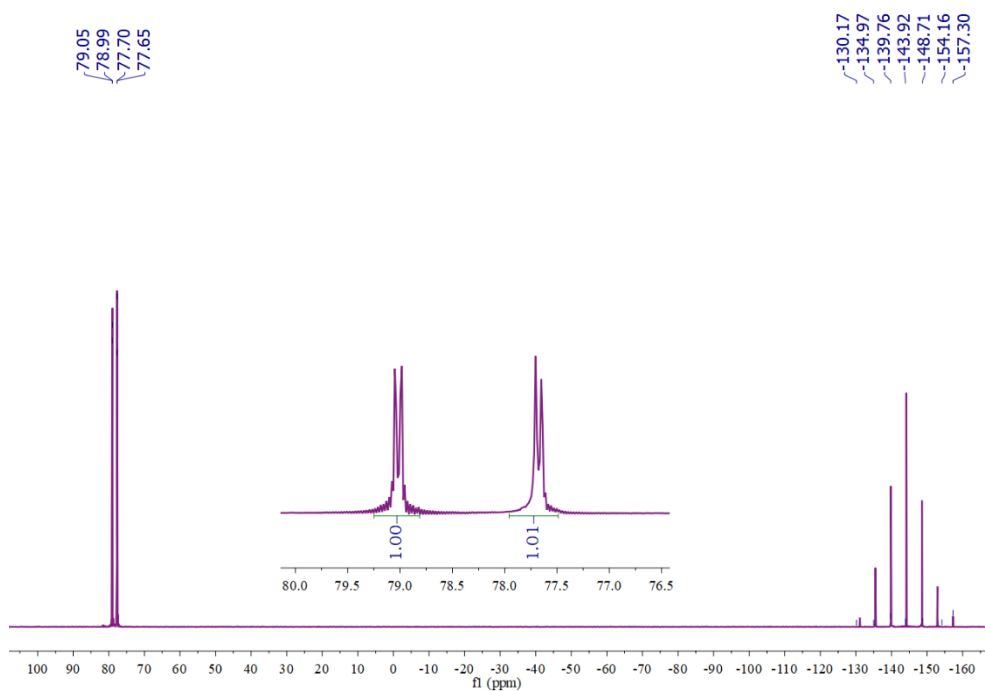


FIGURA A37 - Espectro de RMN ^1H do complexo **A7** em Acetona- d_6 .

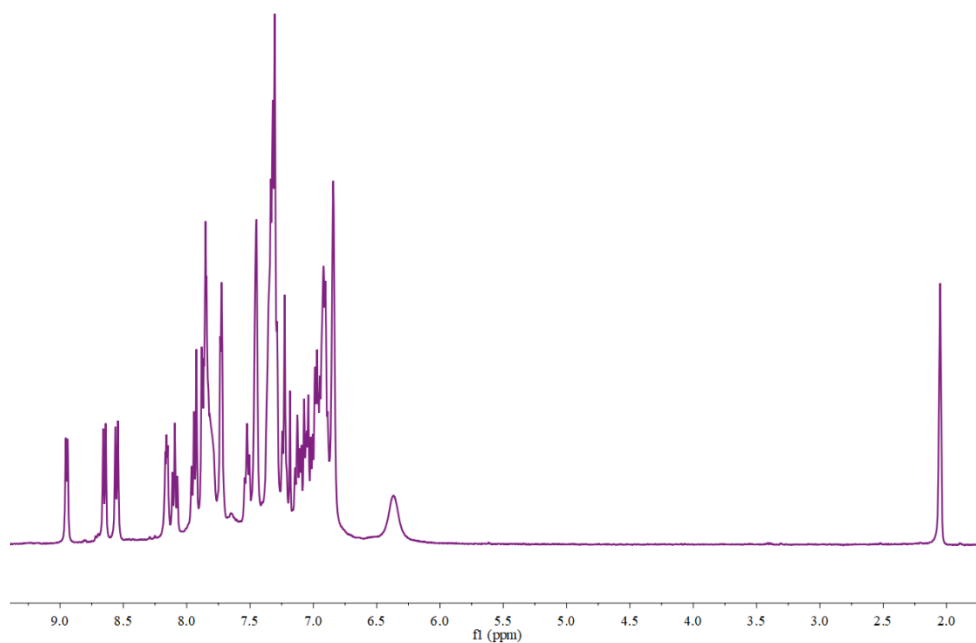


FIGURA A38 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A7** em Acetona- d_6 .

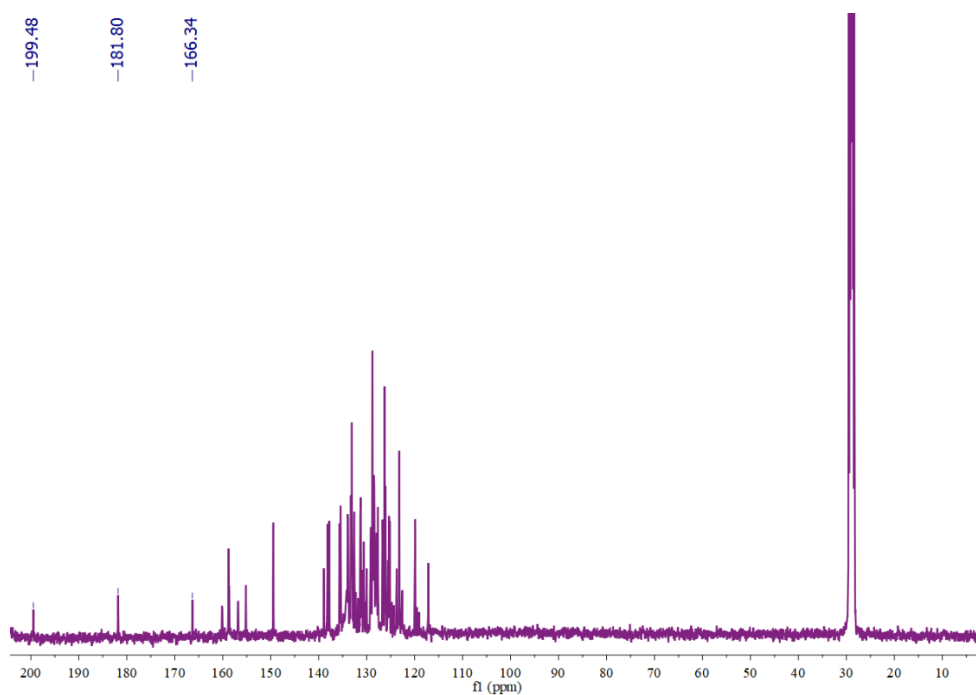


FIGURA A39 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A7** em Acetona- d_6 .

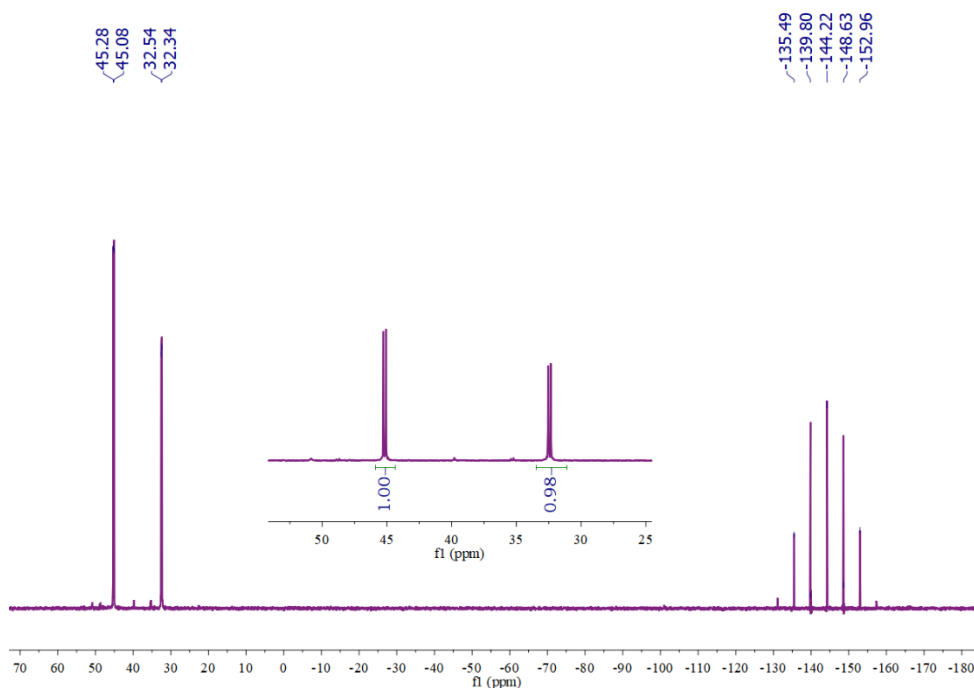


FIGURA A40 - Espectro de RMN ^1H do complexo **A8** em Acetona- d_6 .

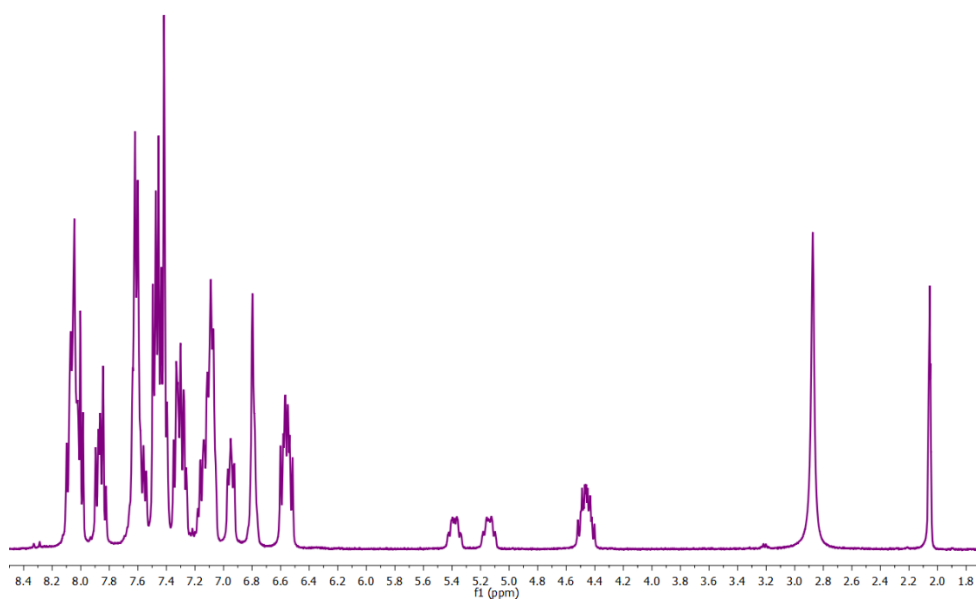


FIGURA A41 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A8** em Acetona- d_6 .

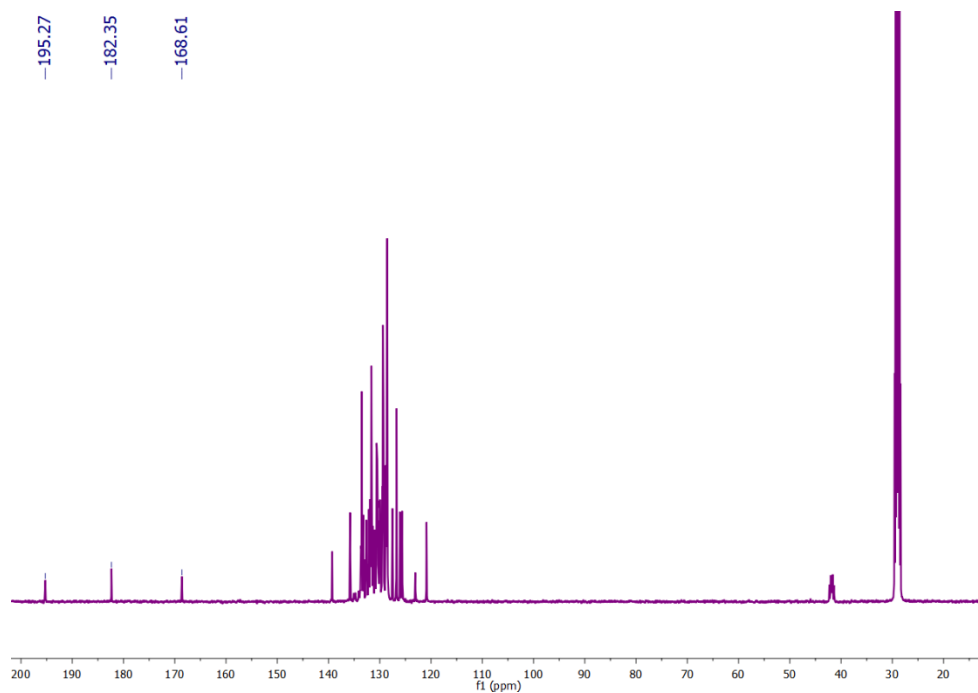
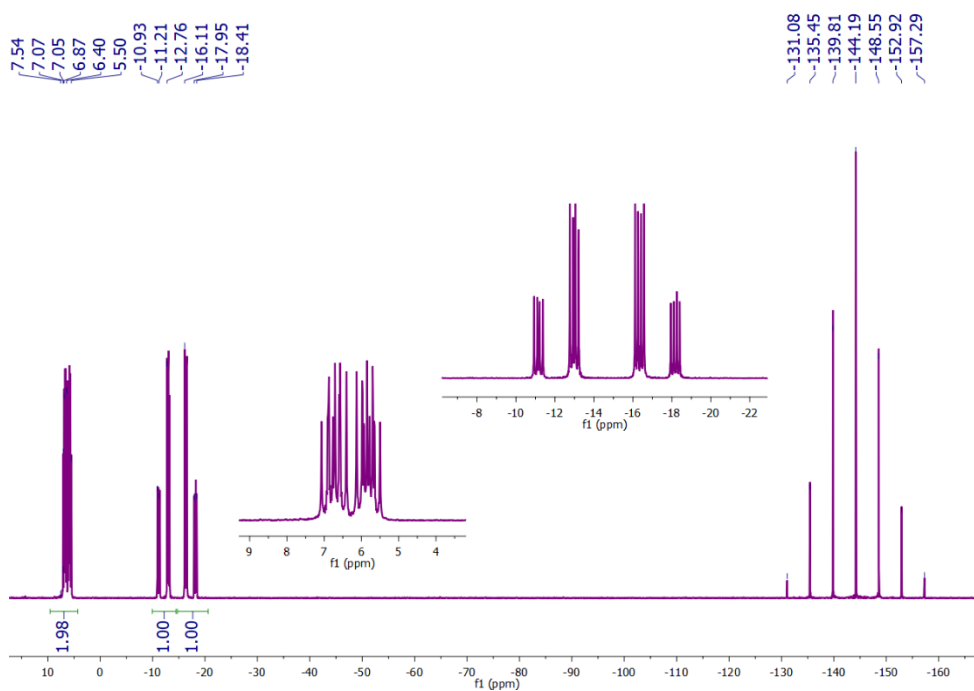


FIGURA A42 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A8** em Acetona- d_6 .



Estabilidade em dmsO e dmsO/meio de cultura dos complexos Série 1

FIGURA A43 Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A4** em DMSO/meio de cultura, no período de 0, 24, e 48h.

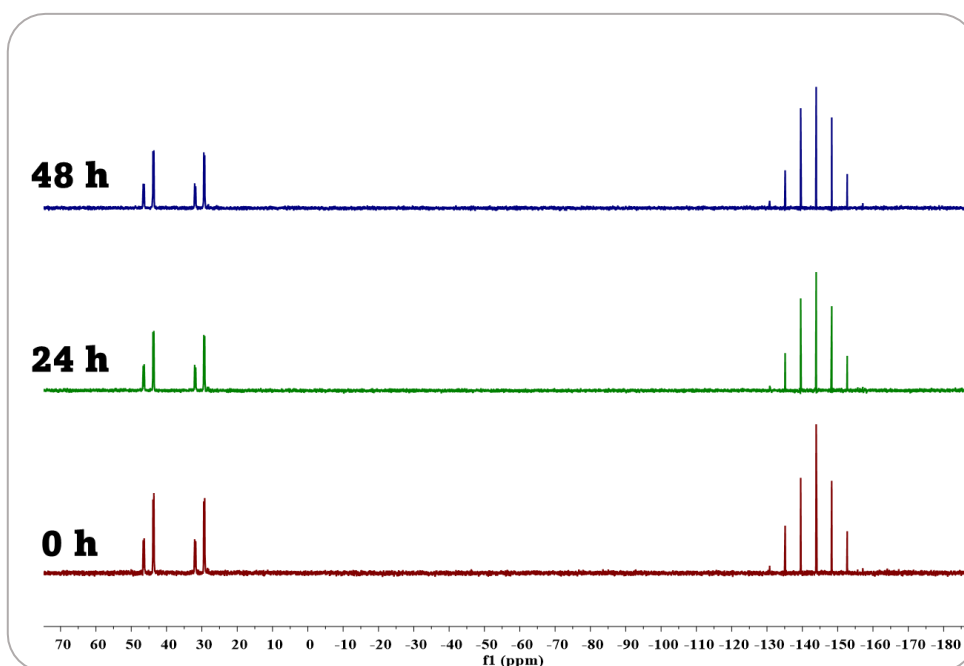


FIGURA A44 Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A5** em DMSO/meio de cultura, no período de 0, 24, e 48h.

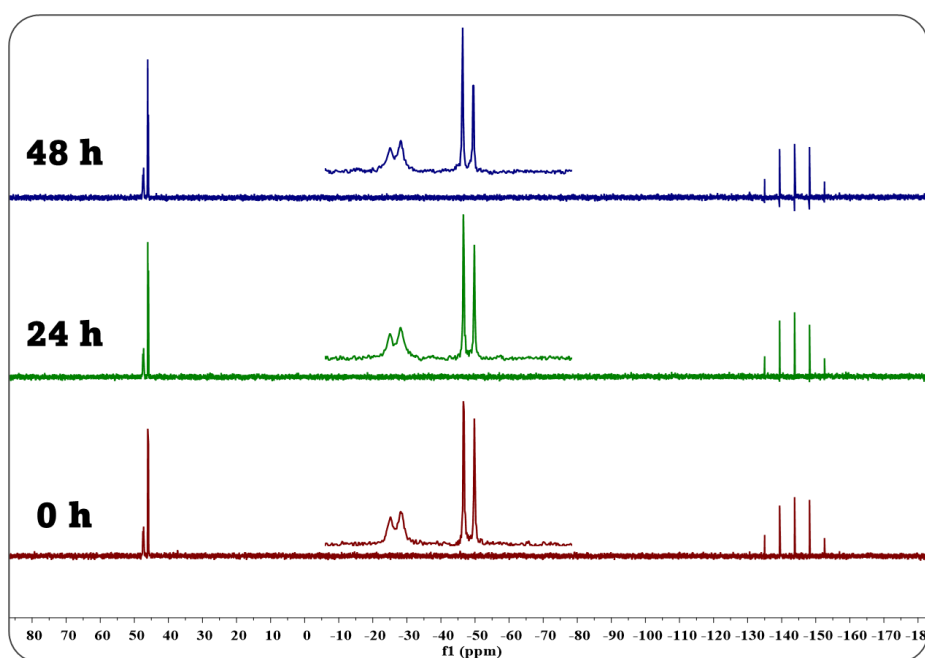


FIGURA A45 Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A6** em DMSO/meio de cultura, no período de 0, 24, e 48h.

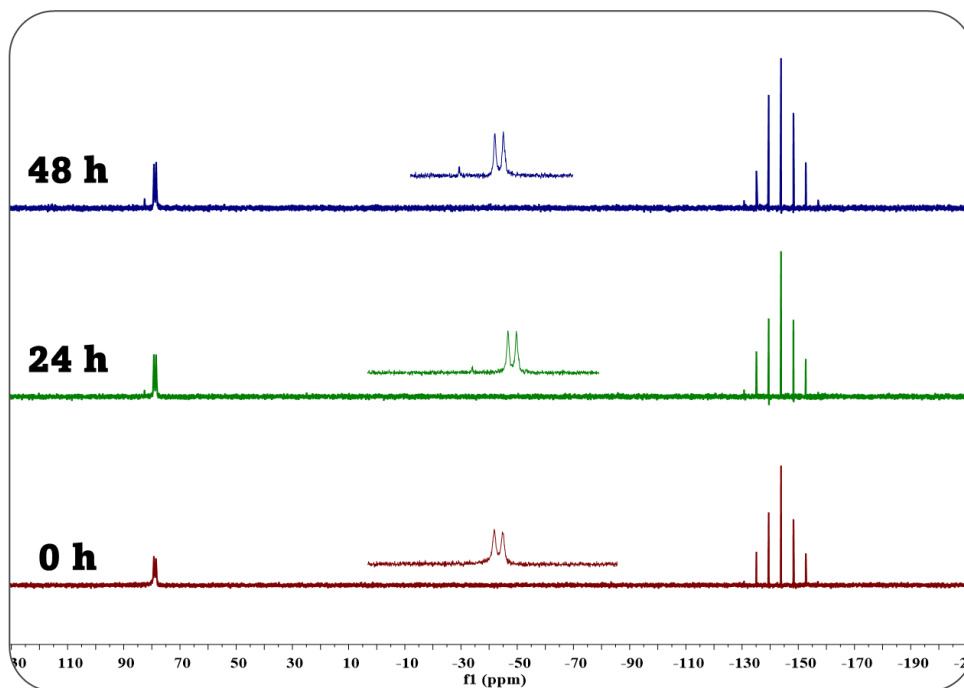


FIGURA A46 Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **A7** em DMSO/meio de cultura, no período de 0, 24, e 48h.

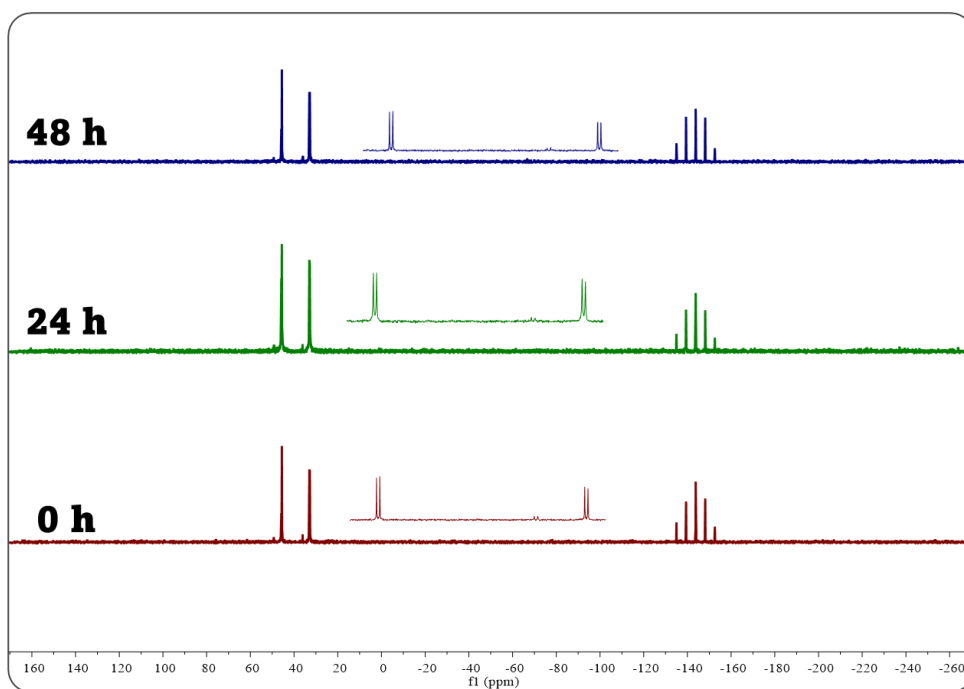


FIGURA A47 Espectro da supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações dos complexos (2,5 -20 μM) da série 1 à 37°C.

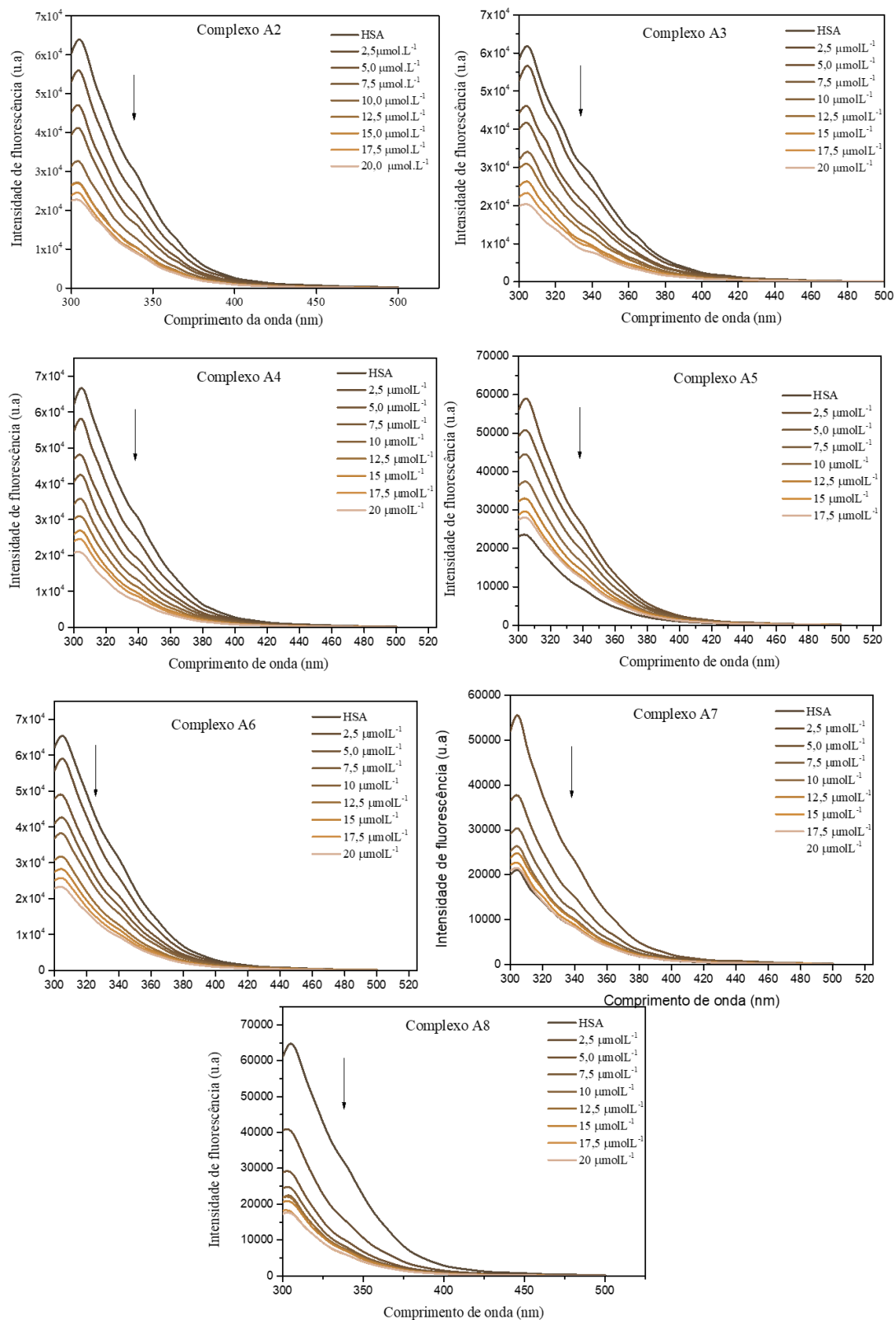


FIGURA A48 Espectro da supressão da fluorescência da HSA-Varfarina em diferentes concentrações dos complexos (2,5 -20 μ M) da série 1 à 37°C.

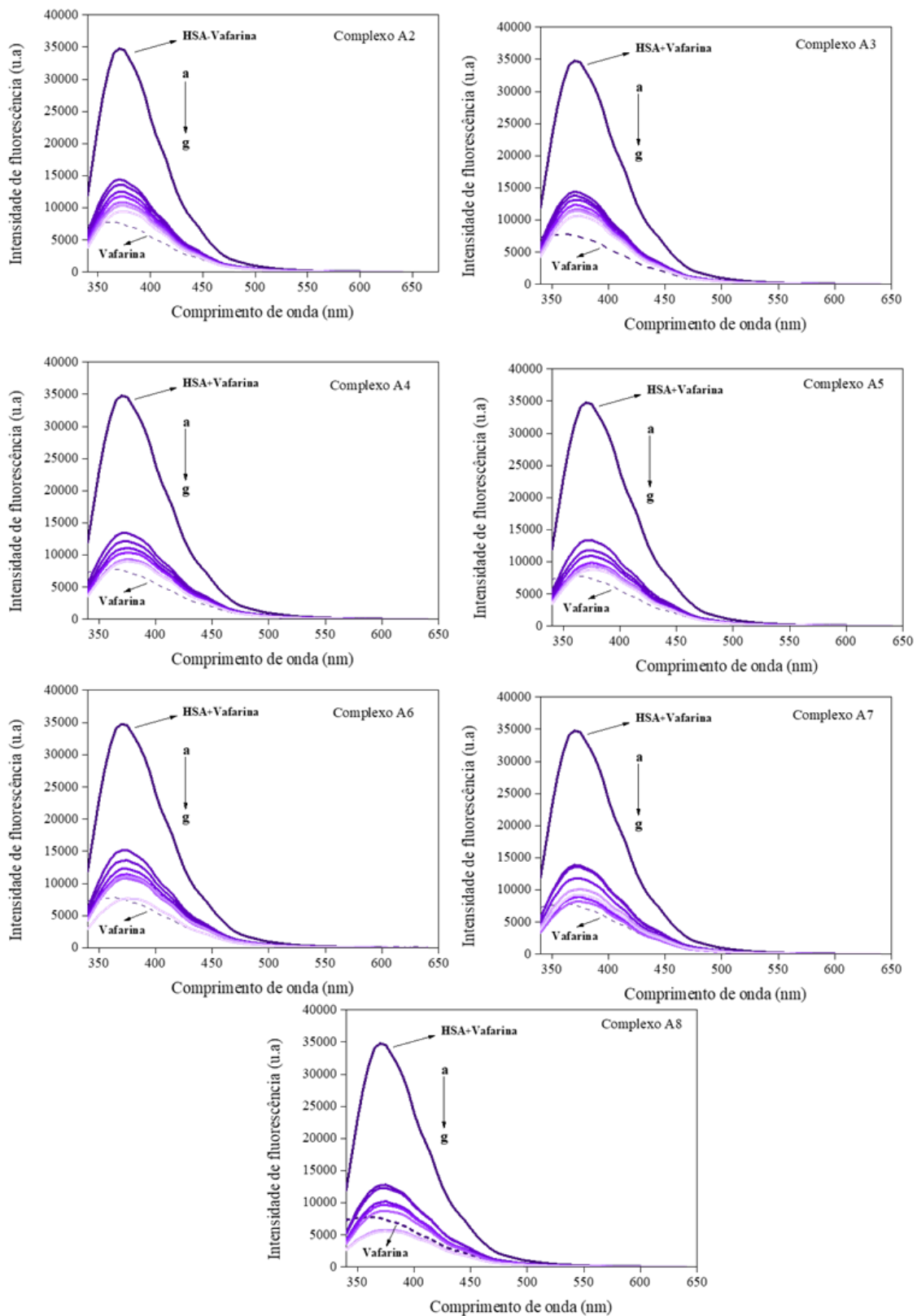
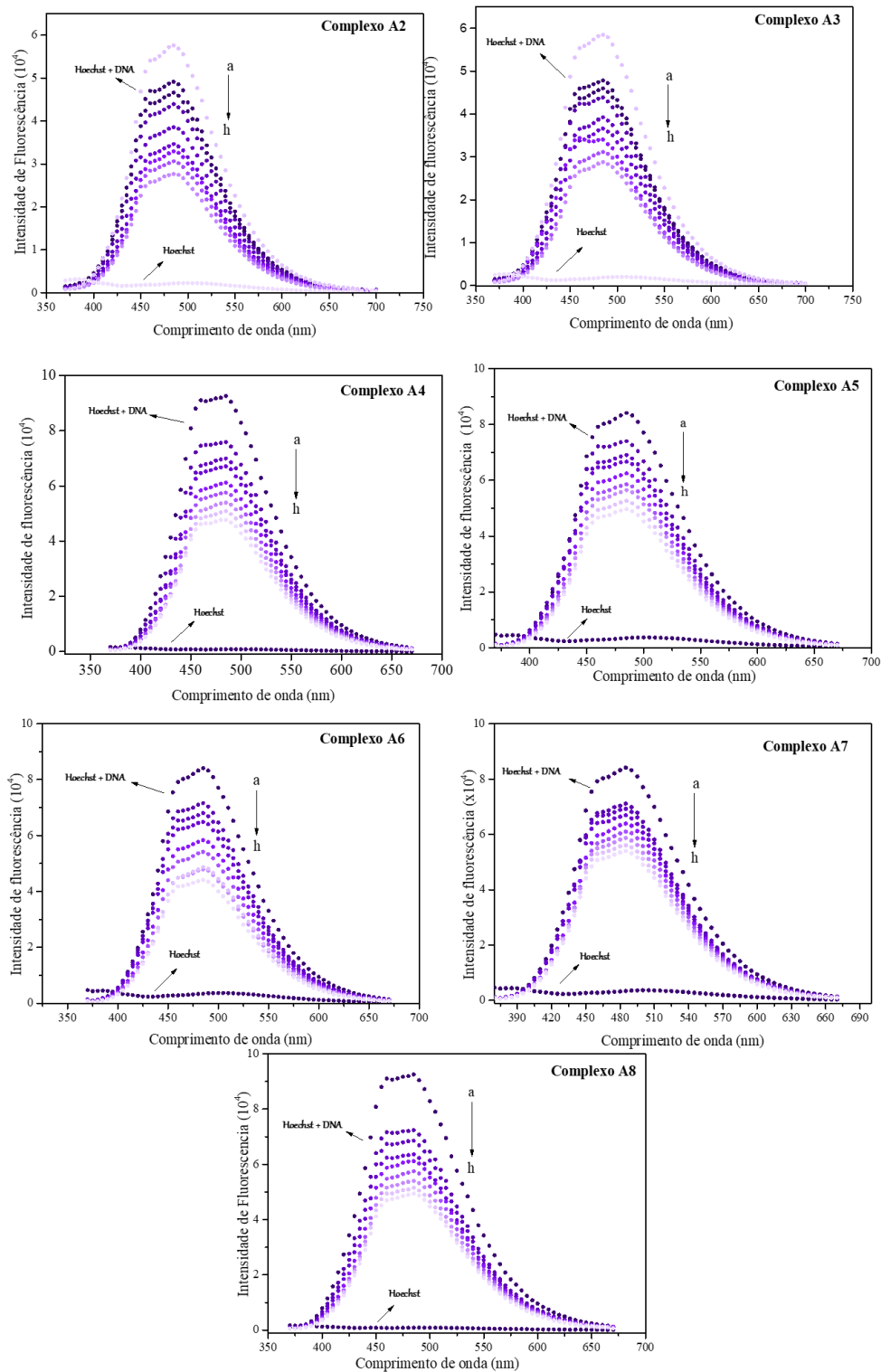


FIGURA A49 Espectro da supressão da fluorescência da DNA-Hoechst em diferentes concentrações dos complexos (2,5 -20 μ M) da série 1 à 37°C.



Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos e do ligantes (NQ2 = lausona e NQ3 = lapachol) e da Série 2 (B1 a B4).

FIGURA A50 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante NQ2 e NQ3 em pastilha de KBr.

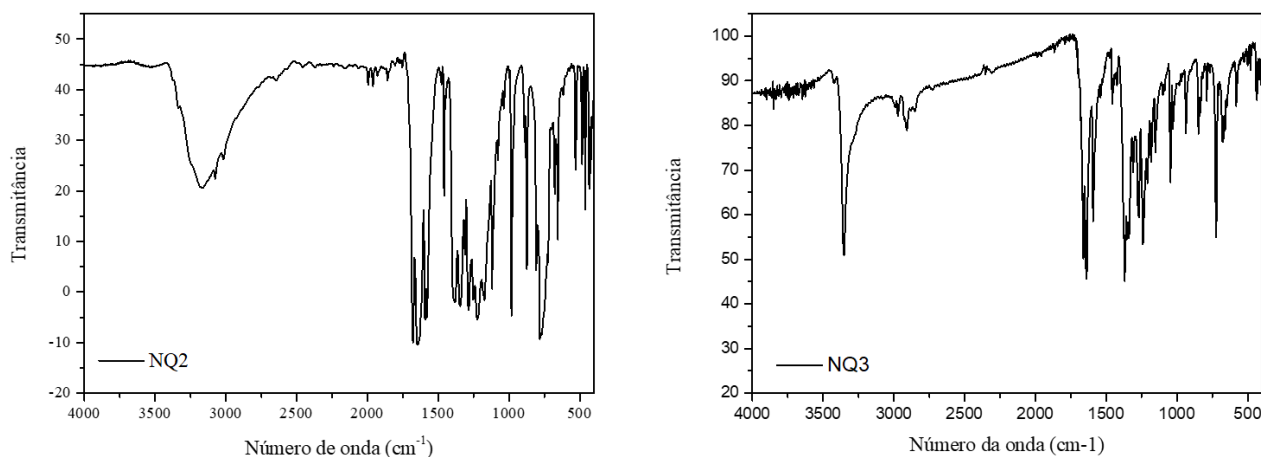


FIGURA A51 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo **B1** em pastilha de KBr.

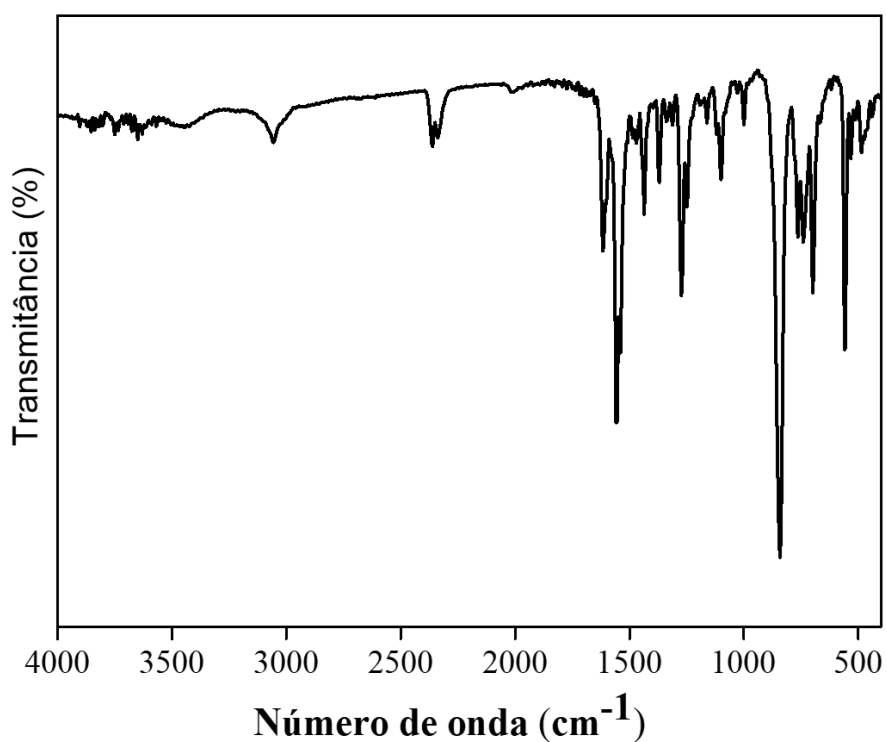


FIGURA A52 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo **B2** em pastilha de KBr.

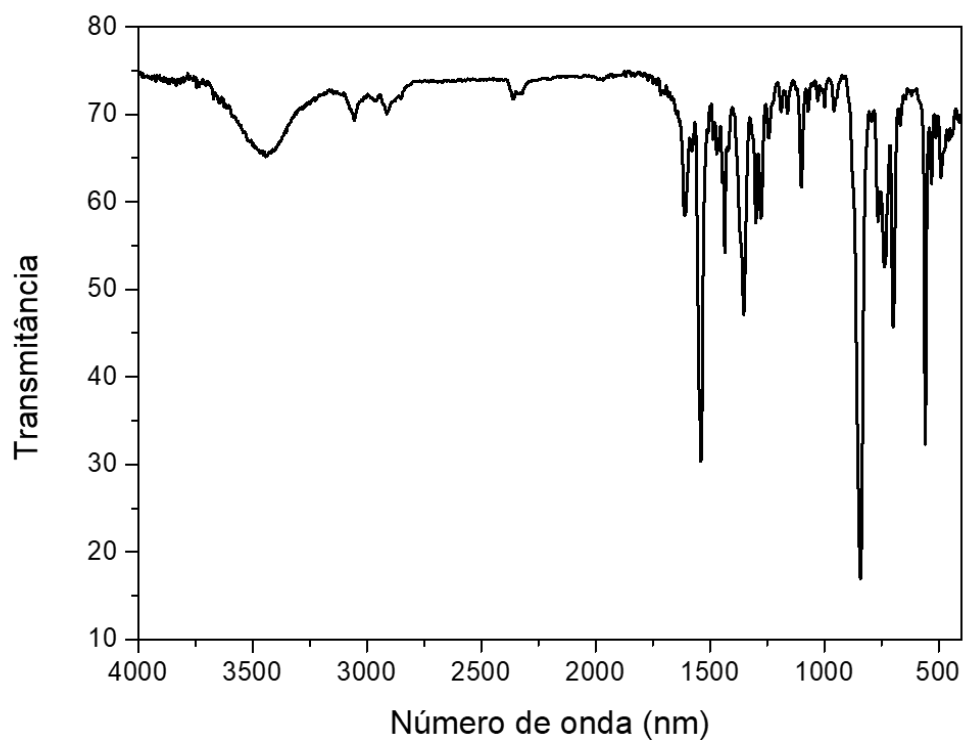


FIGURA A53 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo **B3** em pastilha de KBr.

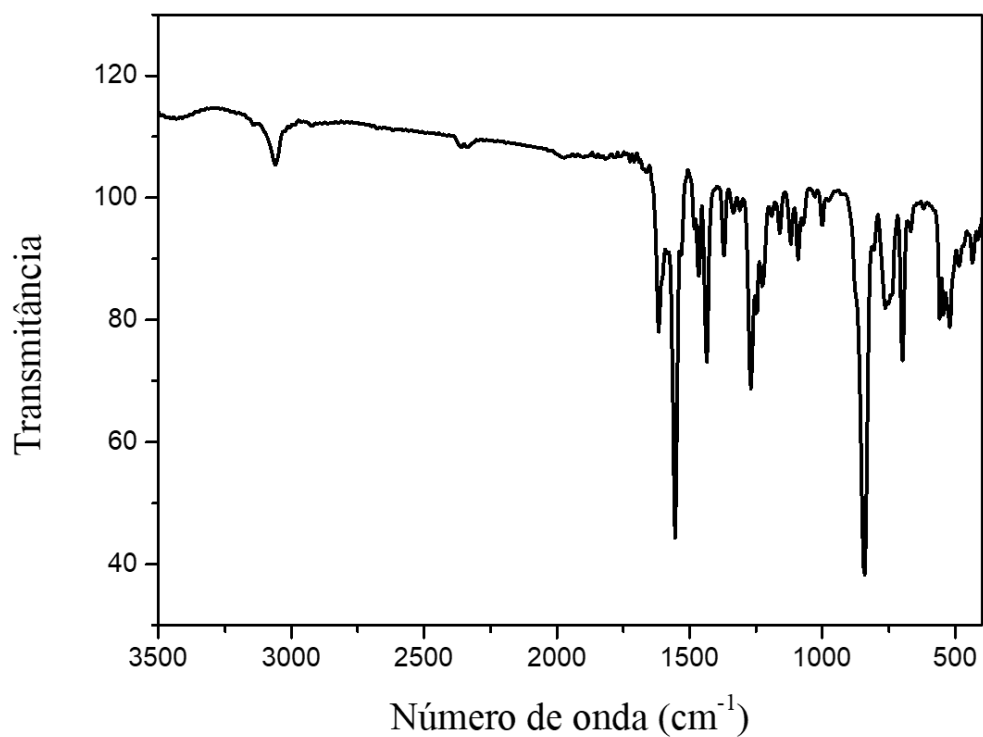
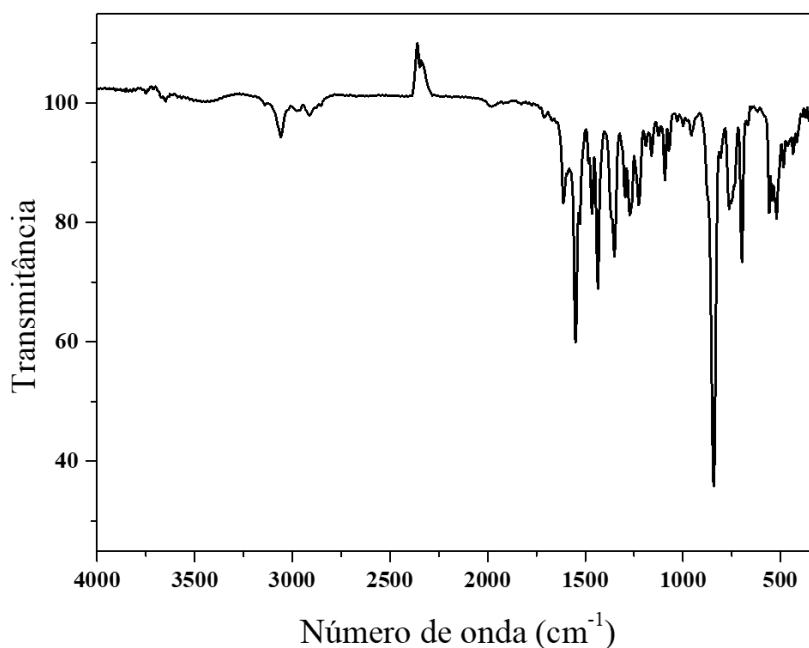


FIGURA A54 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo **B4** em pastilha de KBr.



Espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível em dmsu, para os complexos da série 2

FIGURA 55 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo **NQ2** em dmsu.

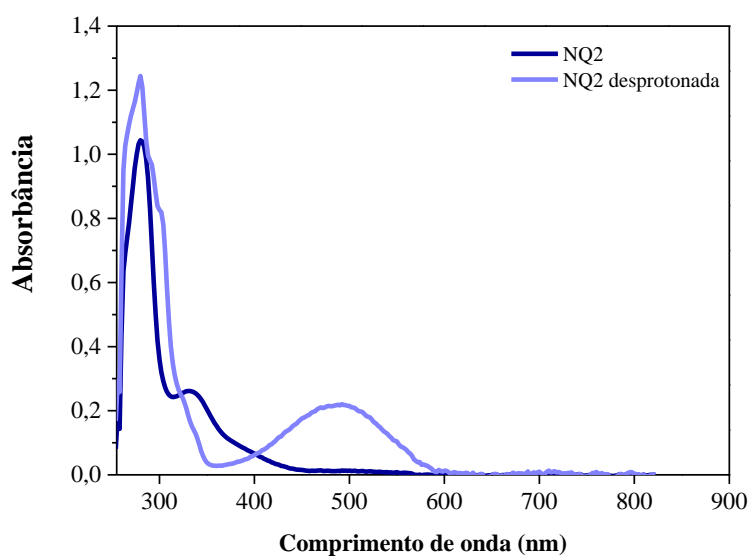


FIGURA 56 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo **NQ3** protonado e desprotonado em dmsso.

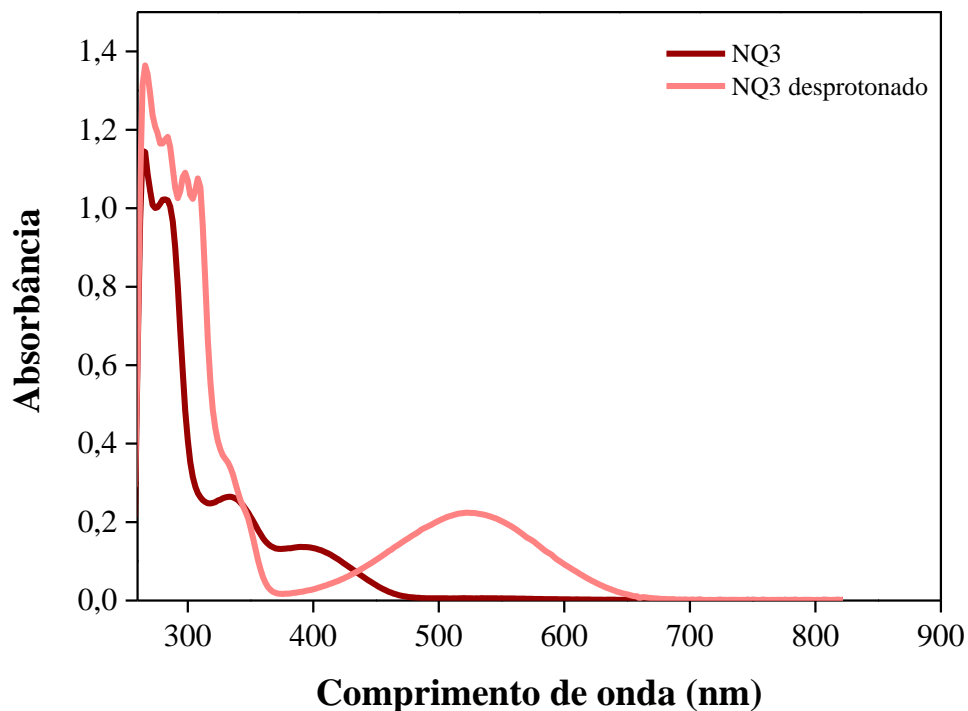


FIGURA 57 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo **B1** em dmsso.

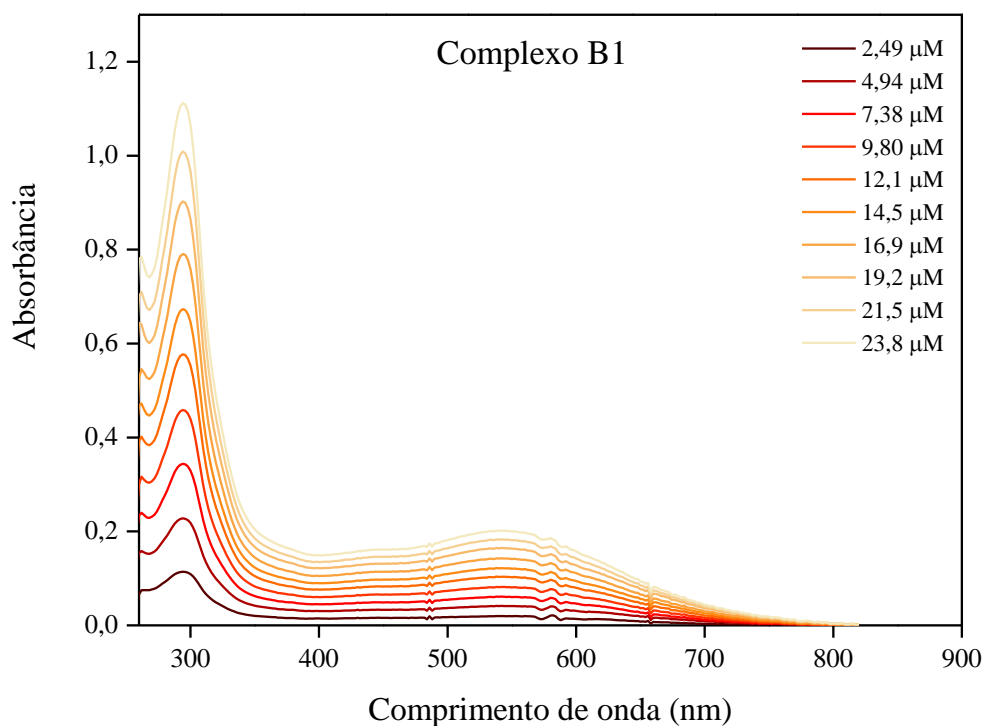


FIGURA 58 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo **B2** em dmso.

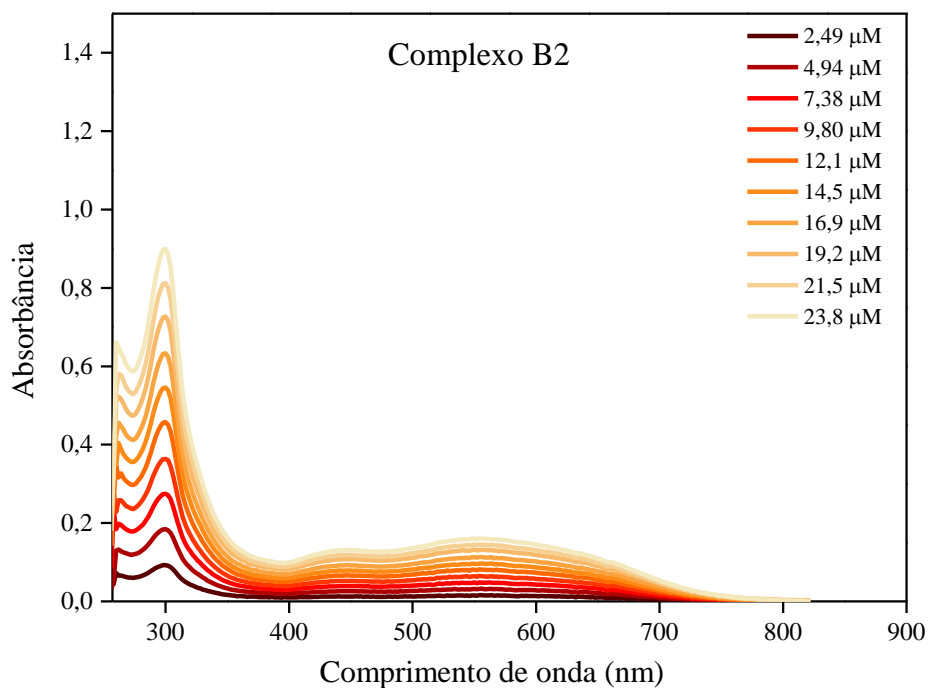


FIGURA 59 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo **B3** em dmso.

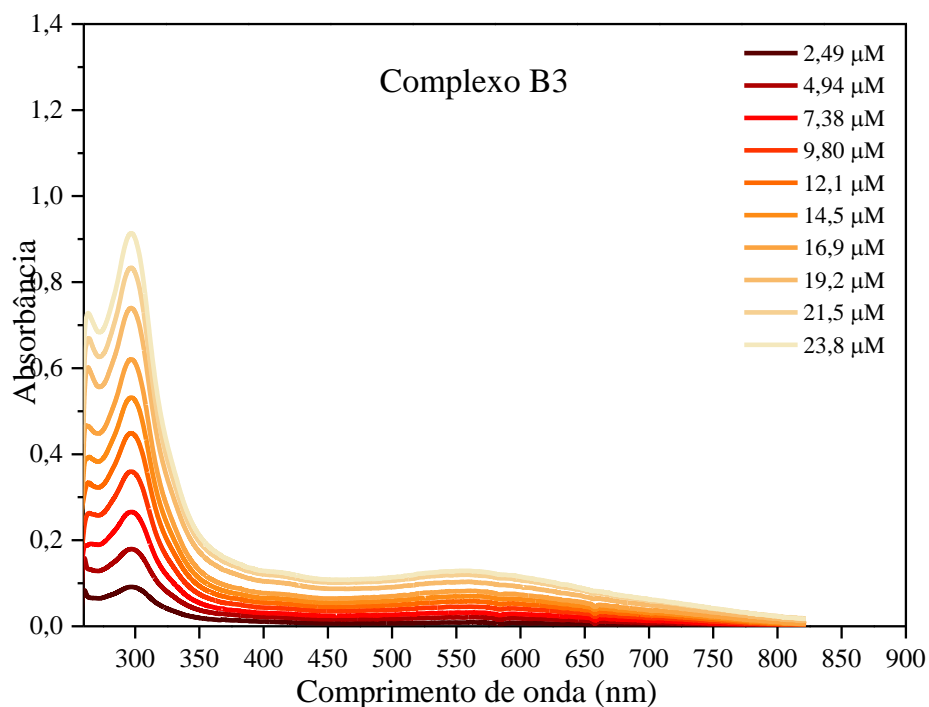
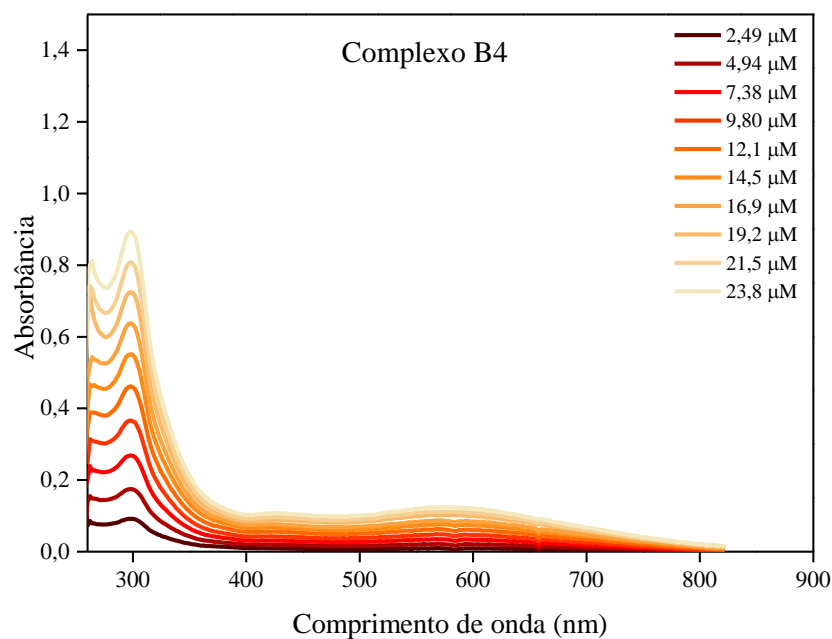


FIGURA 60 - Espectro de absorção no UV-visível para o complexo **B4** em dmso.



Voltamograma cíclico em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

FIGURA A61 - Voltamogramas cíclicos dos complexos **B1** e **B2** em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

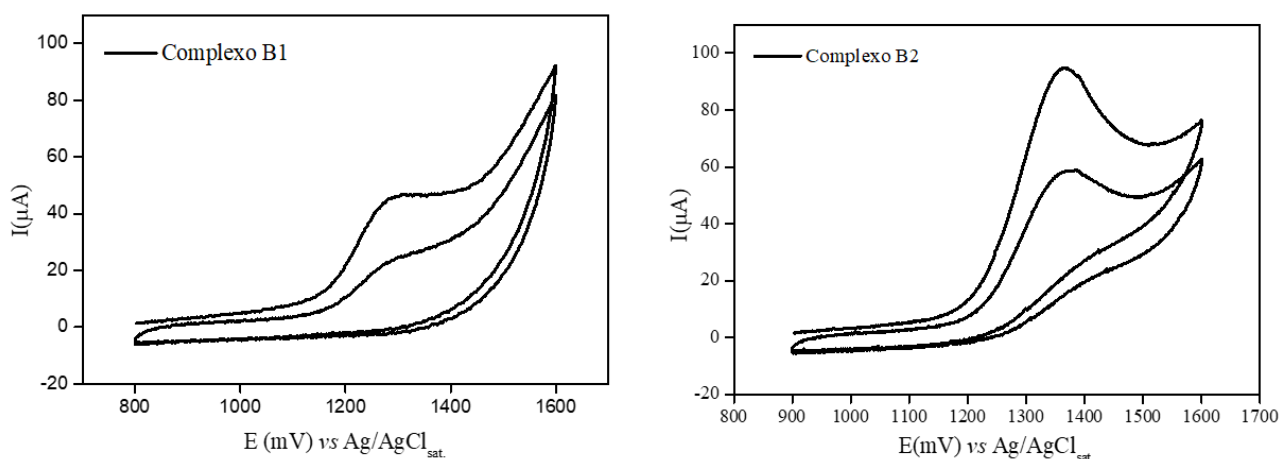


FIGURA A62 - Voltamogramas cíclicos dos complexos **B3** e **B4** em solução 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em diclorometano a 100 mV/s.

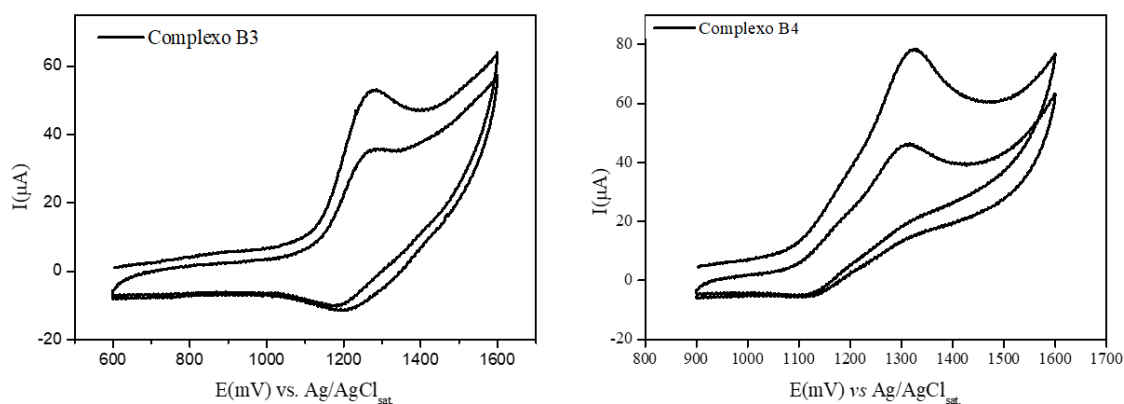


FIGURA A63- Espectros de massas para o complexo **B1** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

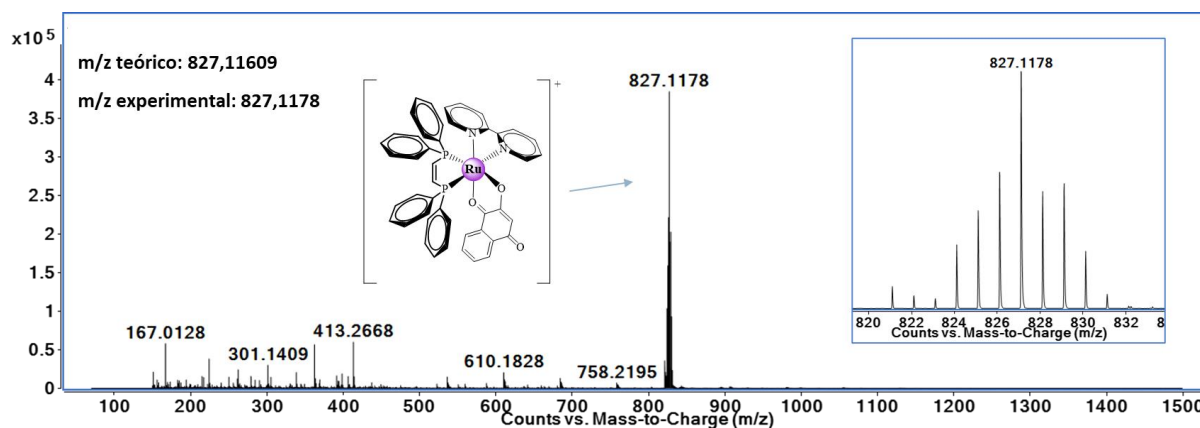


FIGURA A64- Espectros de massas para o complexo **B2** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

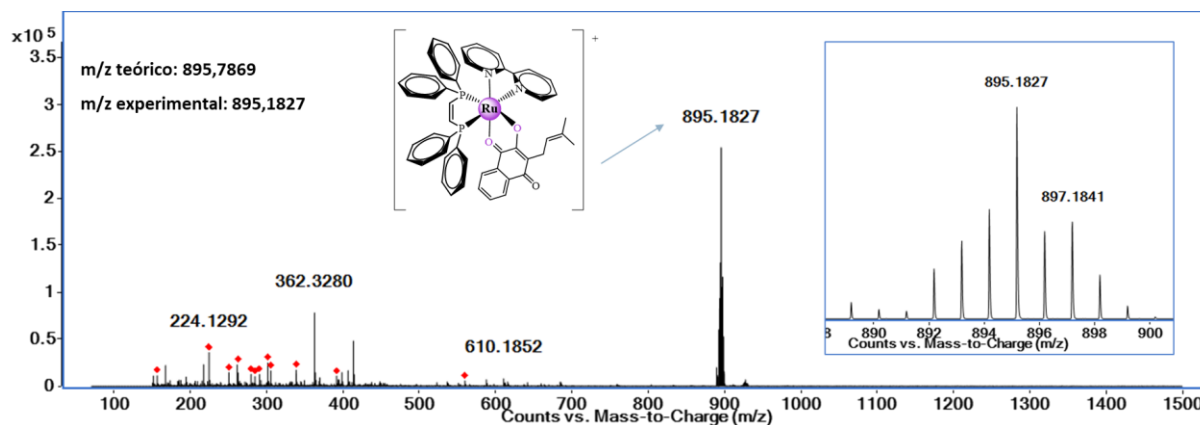


FIGURA A65- Espectros de massas para o complexo **B3** e a estrutura química referente ao íon fragmento.

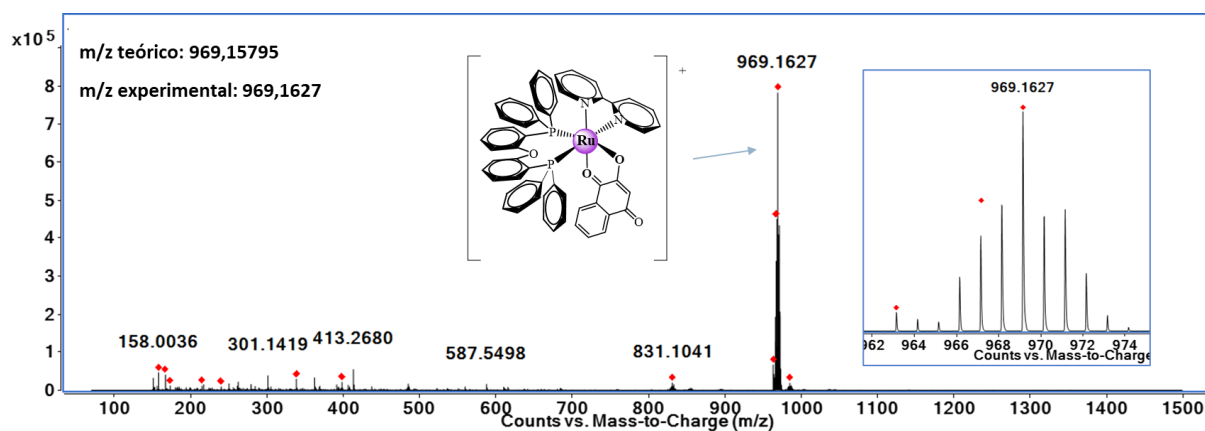
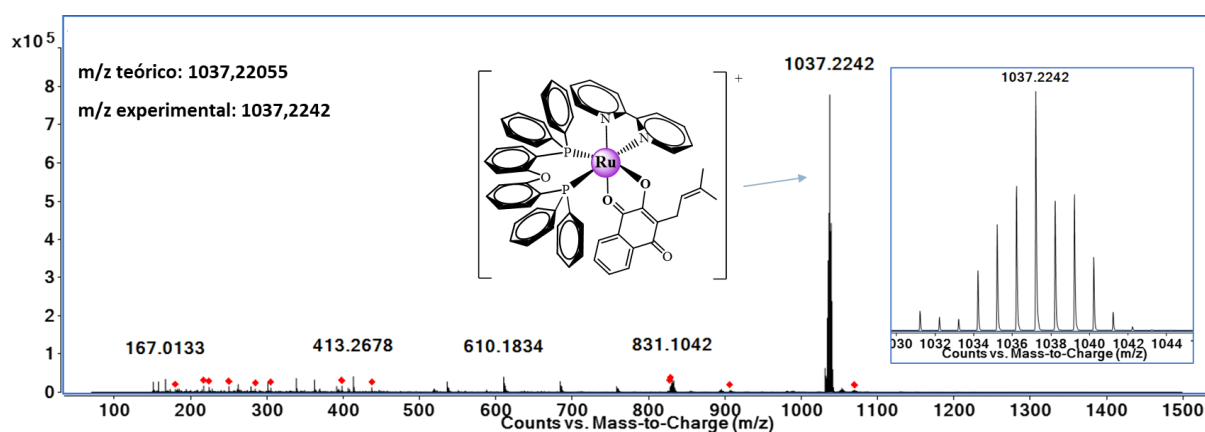


FIGURA A66 - Espectros de massas para o complexo **B4** e a estrutura química referente ao íon fragmento.



Espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série 2

FIGURA A67 - Espectro de RMN ^1H do ligante **NQ2** (lausona) e **NQ3** (lapachol) em Acetona- d_6 .

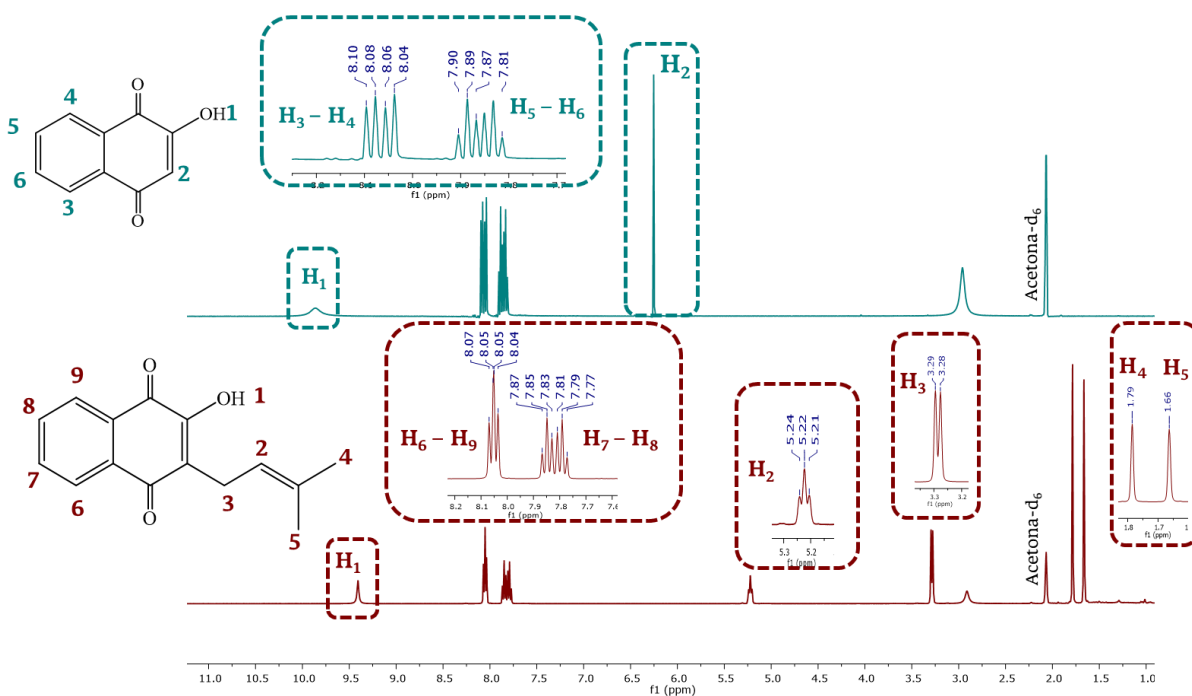


FIGURA A68 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante **NQ2** (lausona) em Acetona- d_6 .

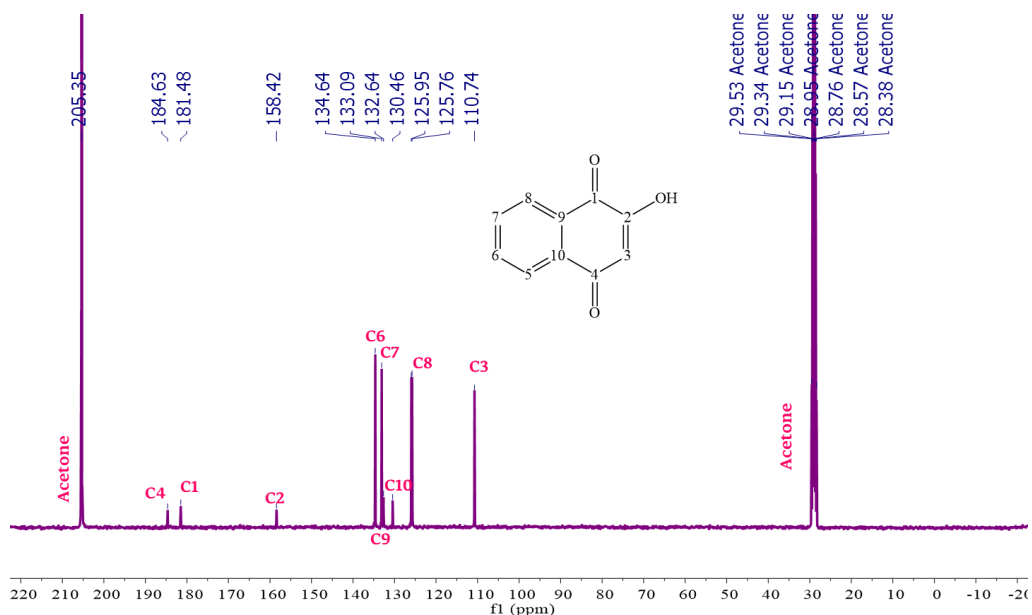


FIGURA A69 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante **NQ2** (lapachol) em Acetona-d₆.

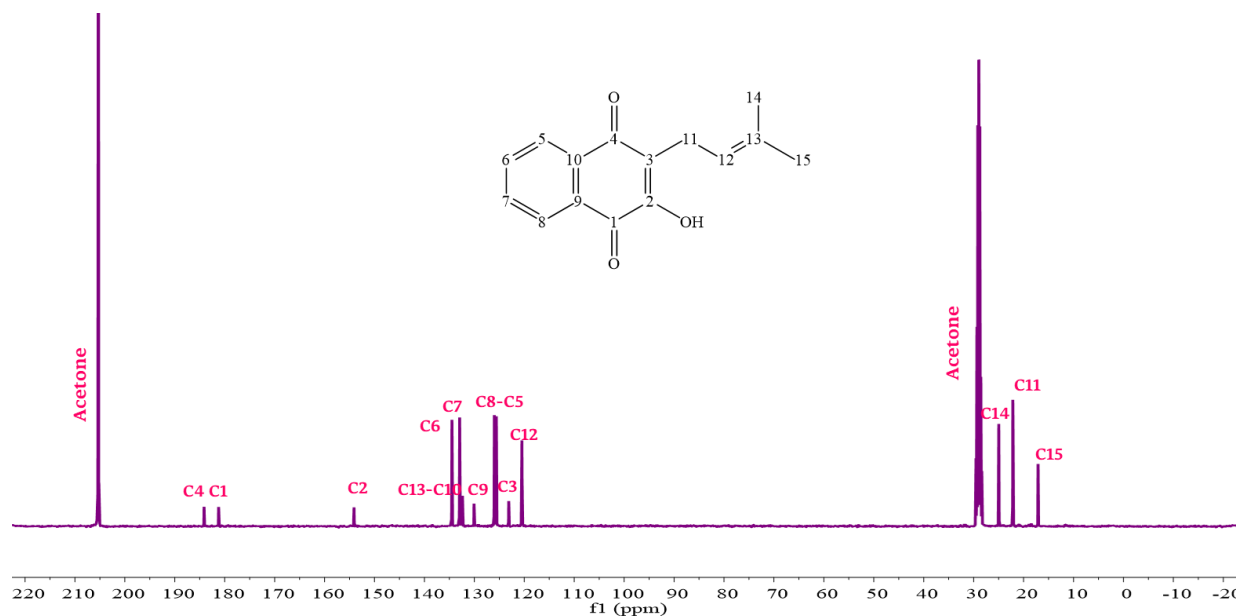


FIGURA A70 - Espectro de RMN ^1H Complexo **B1** em Acetona-d₆.

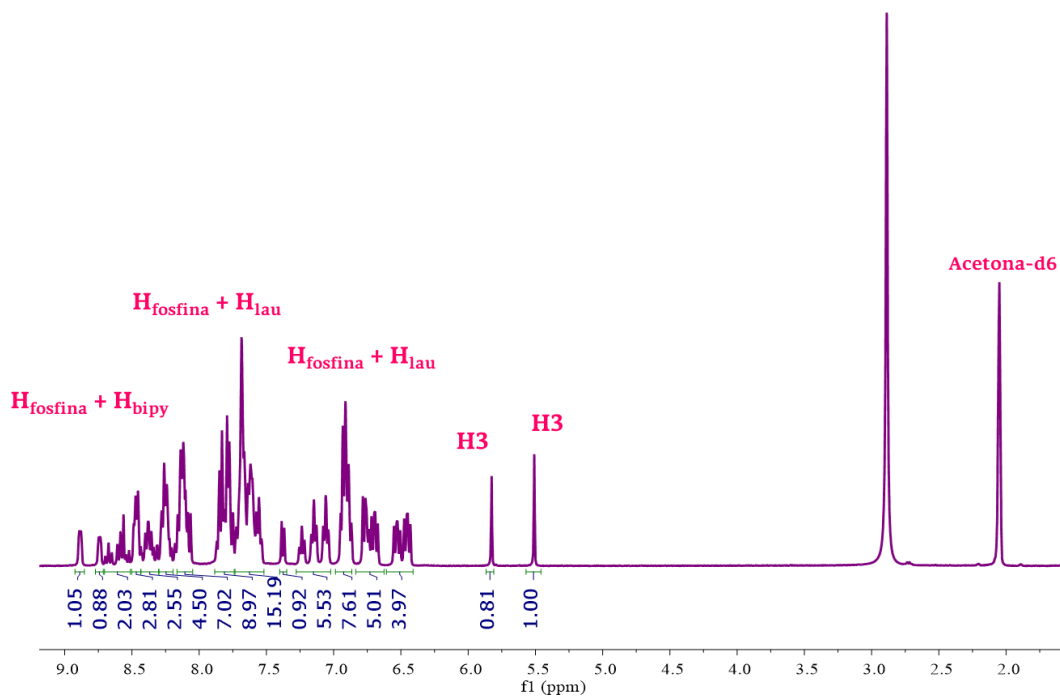


FIGURA A71 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B1** em Acetona-d6.

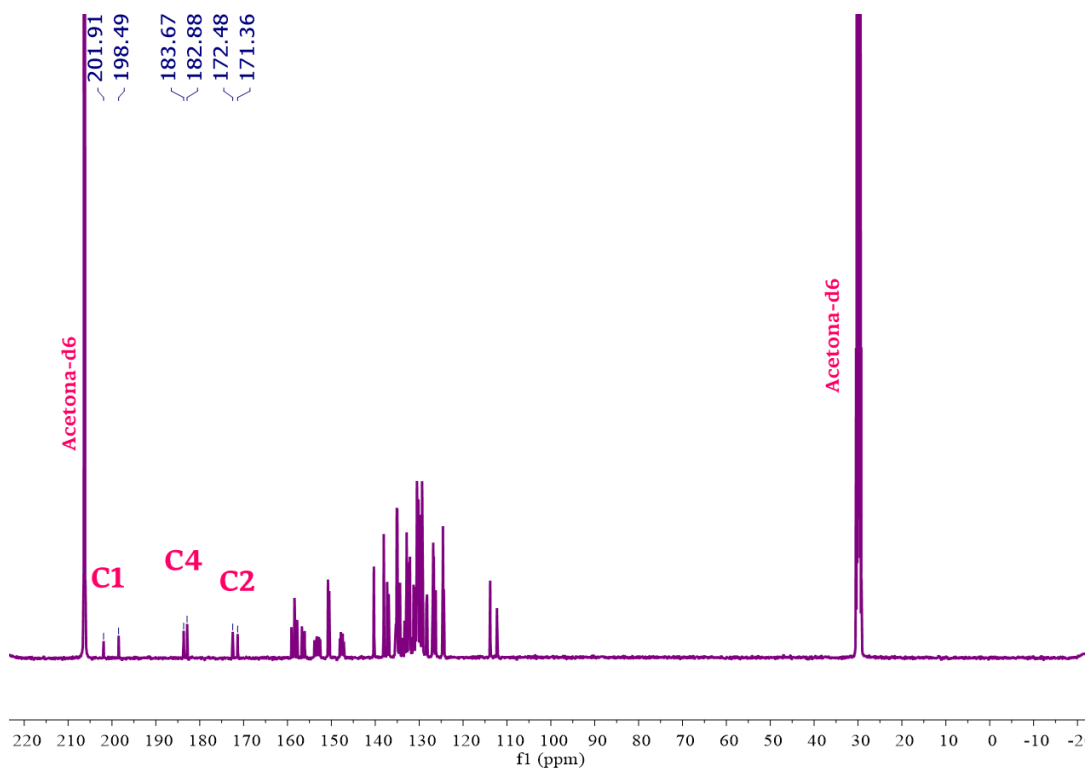


FIGURA A72 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B1** em Acetona-d6.

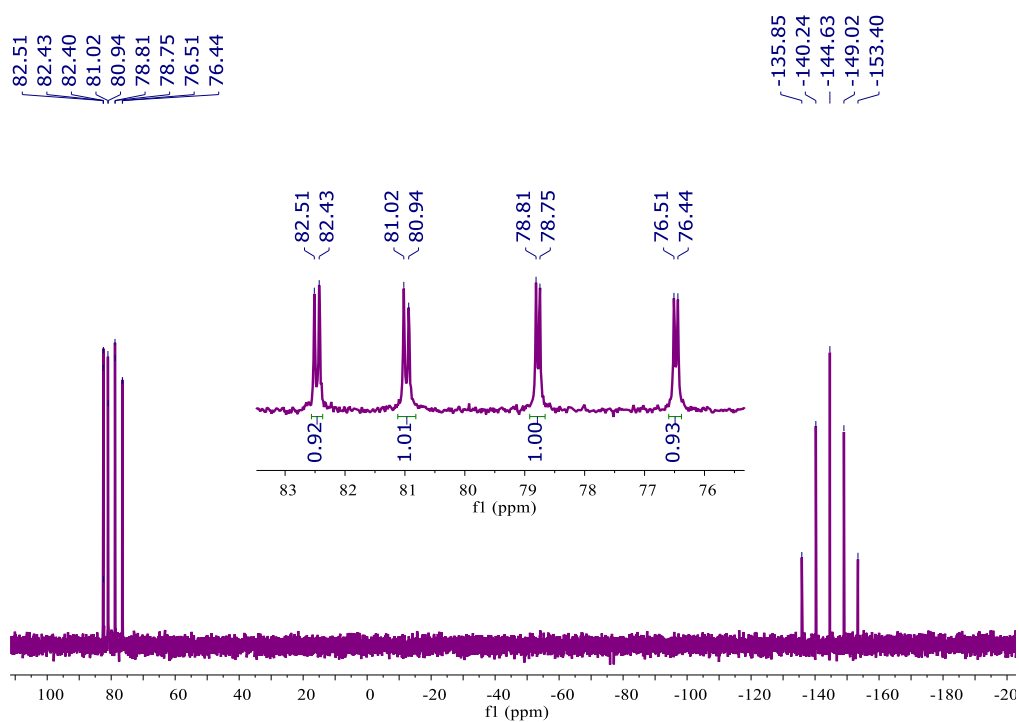


FIGURA A73 - Espectro de RMN ^1H Complexo **B2** em Acetona- d_6 .

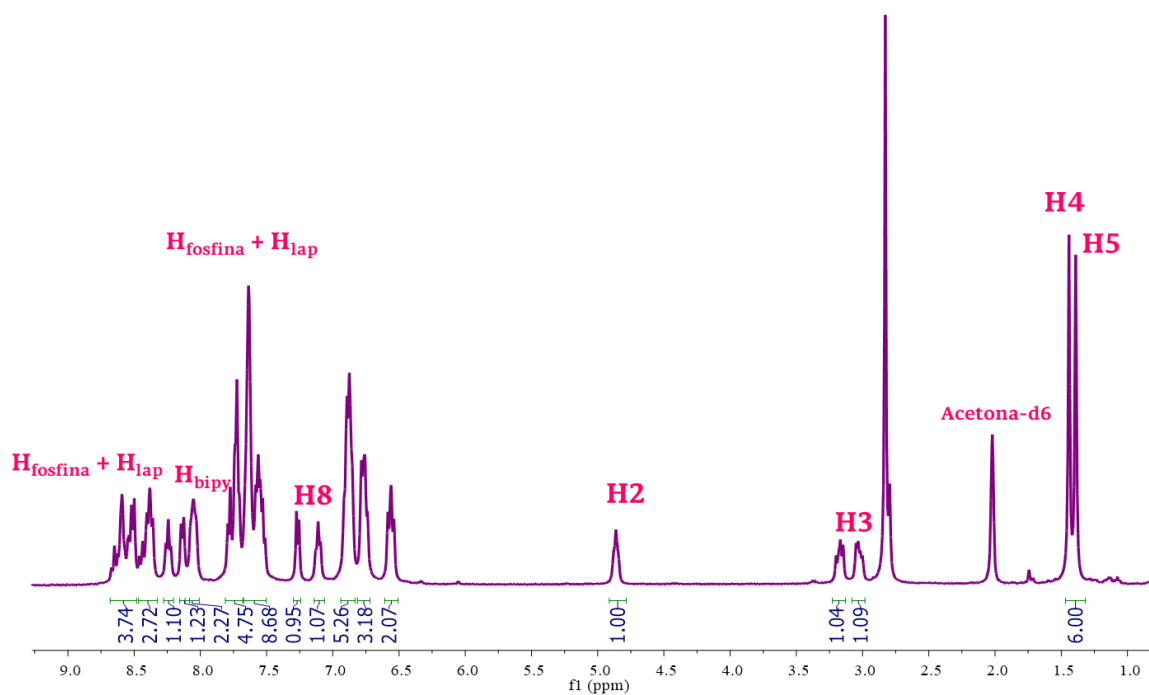


FIGURA A74 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B2** em Acetona- d_6 .

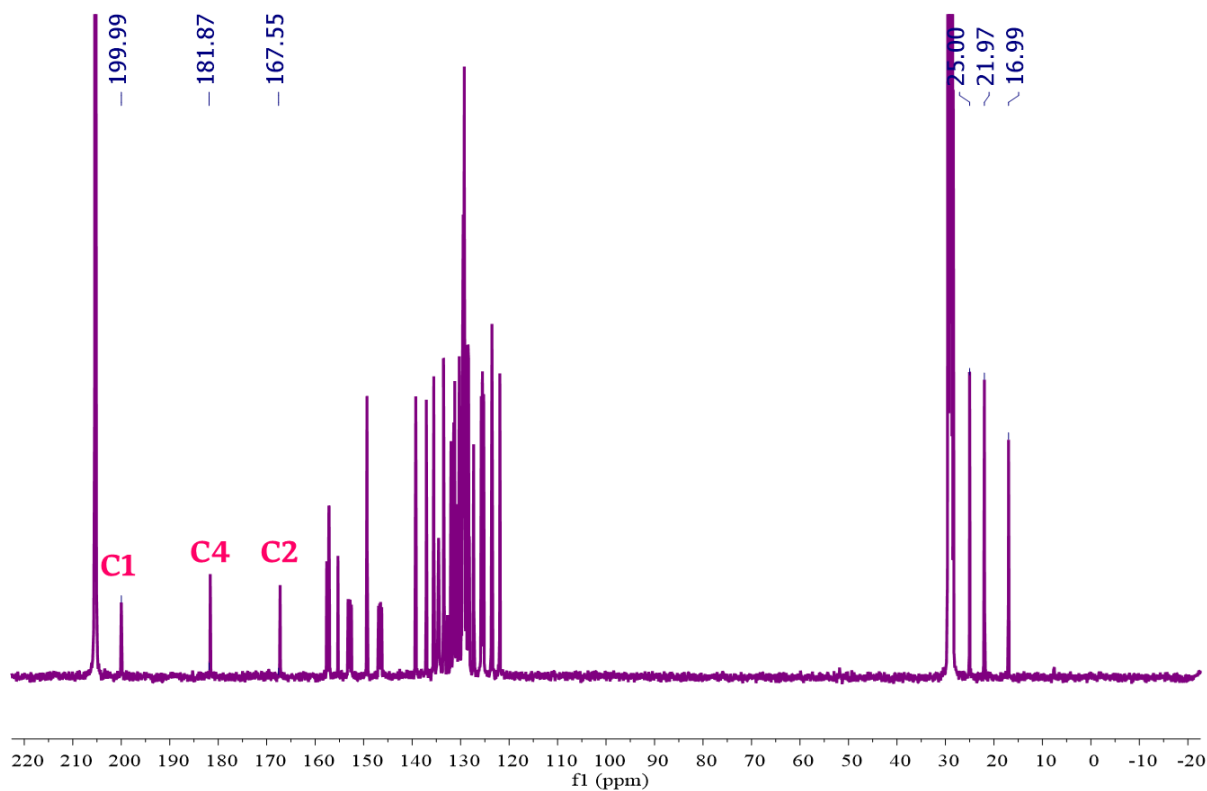


FIGURA A75 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B2** em Acetona-d₆.

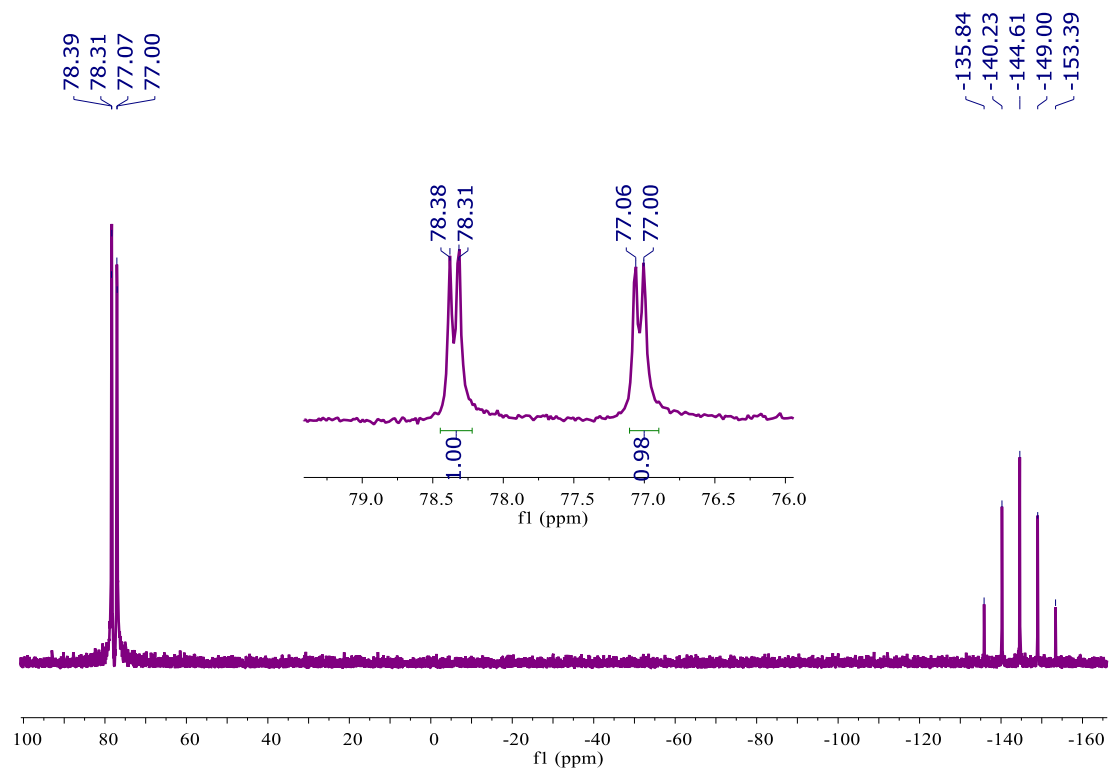


FIGURA A76 - Espectro de RMN ^1H Complexo **B3** em Acetona-d₆.

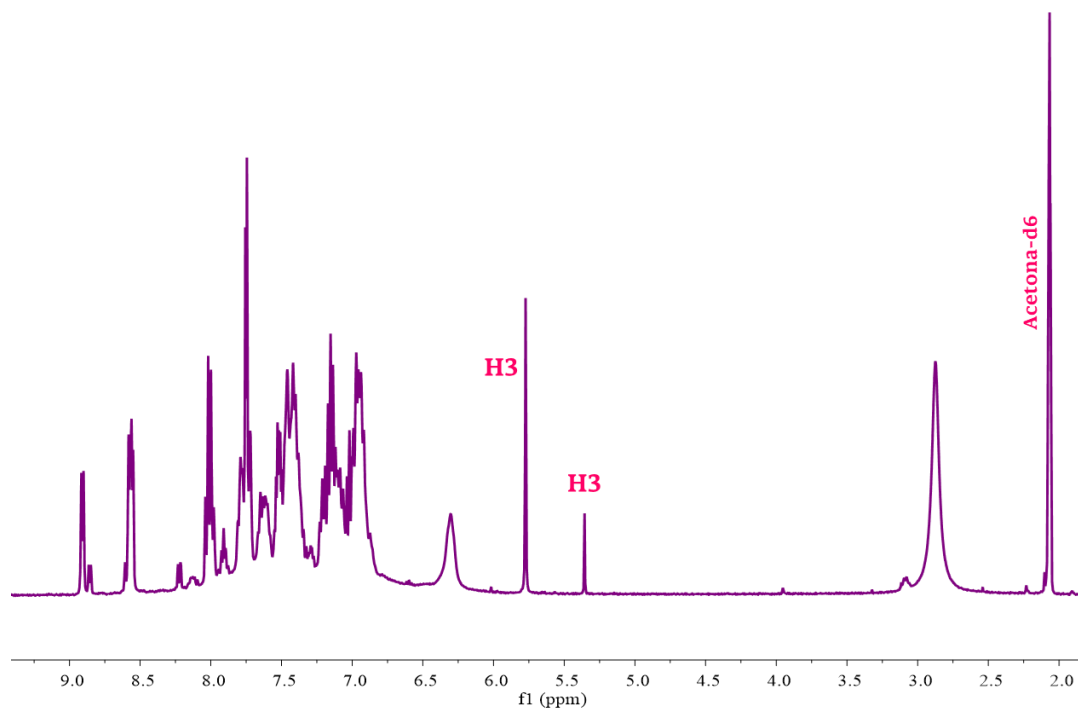


FIGURA A77 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B3** em Acetona-d6.

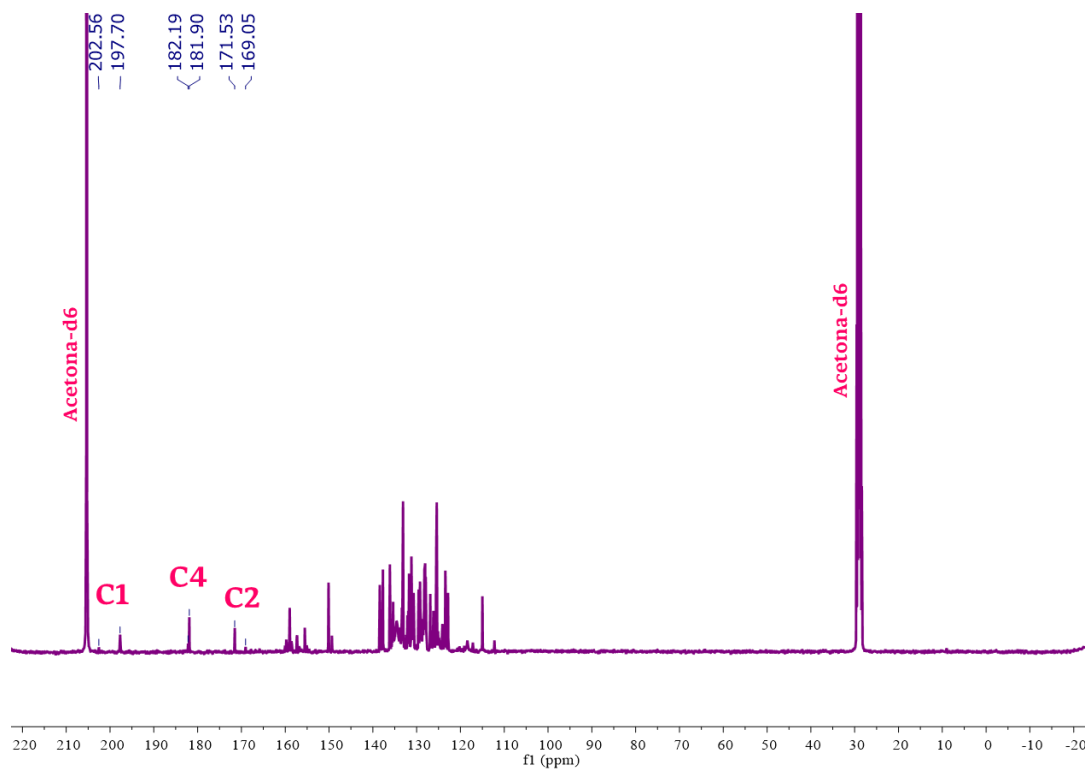


FIGURA A78 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B3** em Acetona-d6.

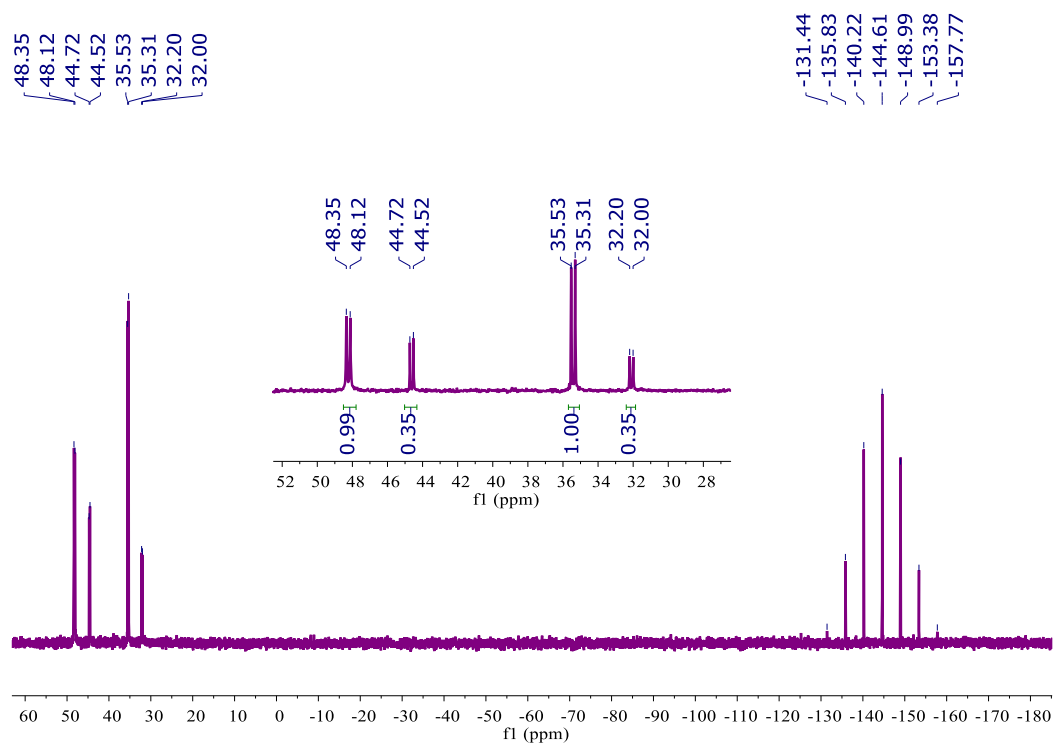


FIGURA A79 - Espectro de RMN ^1H Complexo **B4** em Acetona- d_6 .

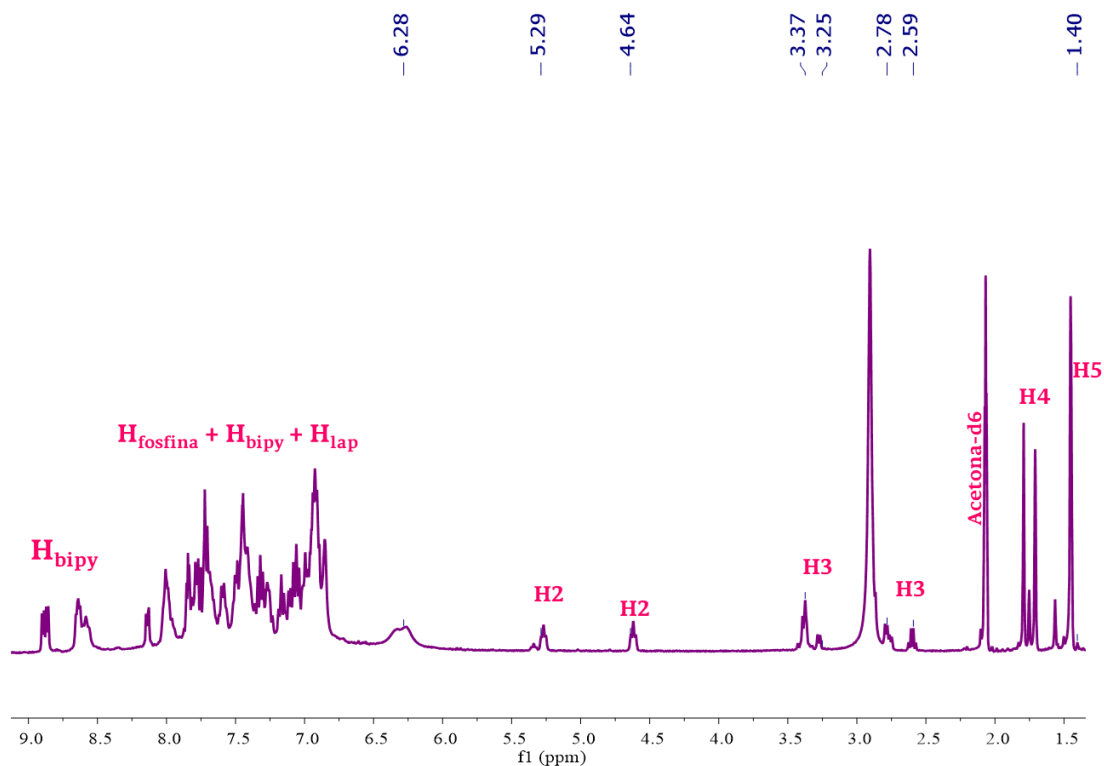


FIGURA A80 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B4** em Acetona- d_6 .

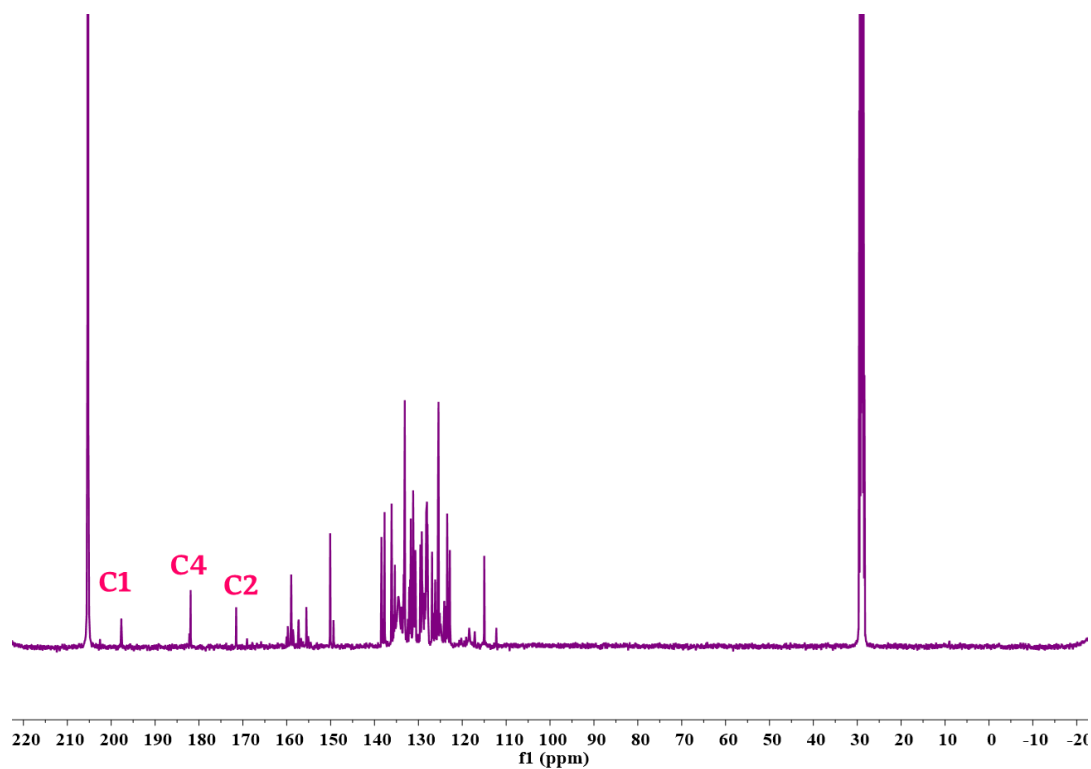


FIGURA A81 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ Complexo **B4** em Acetona- d_6 .

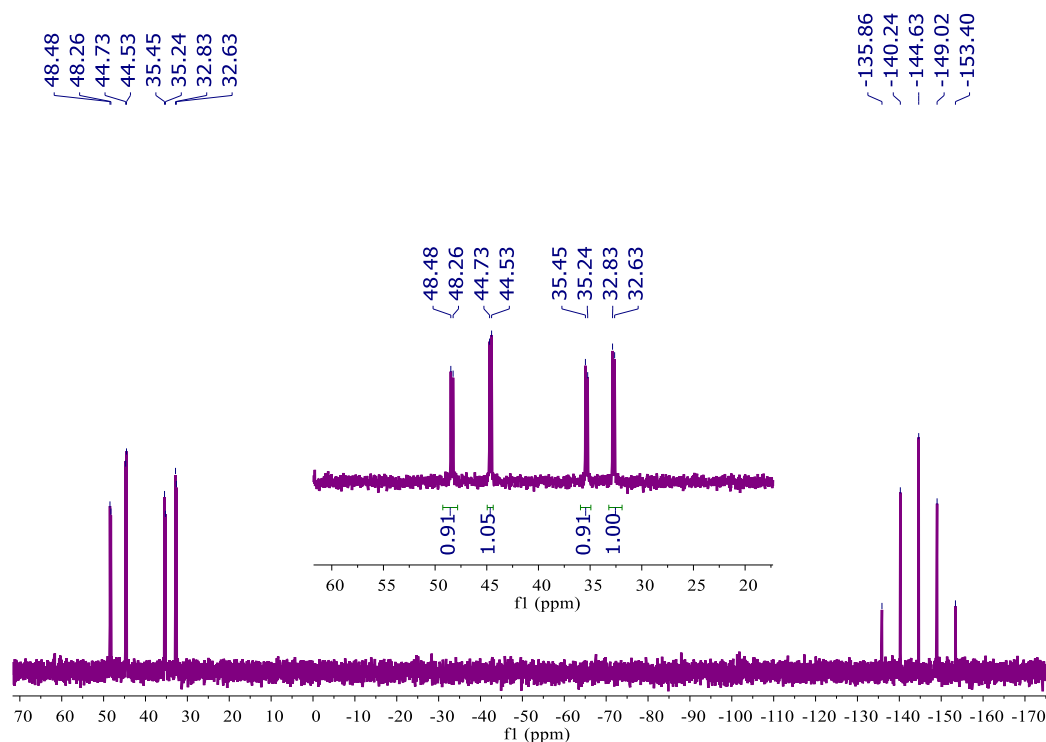


FIGURA A82 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **B3** em DMSO/meio de cultura, no período de 0, 24, 48 e 72h.

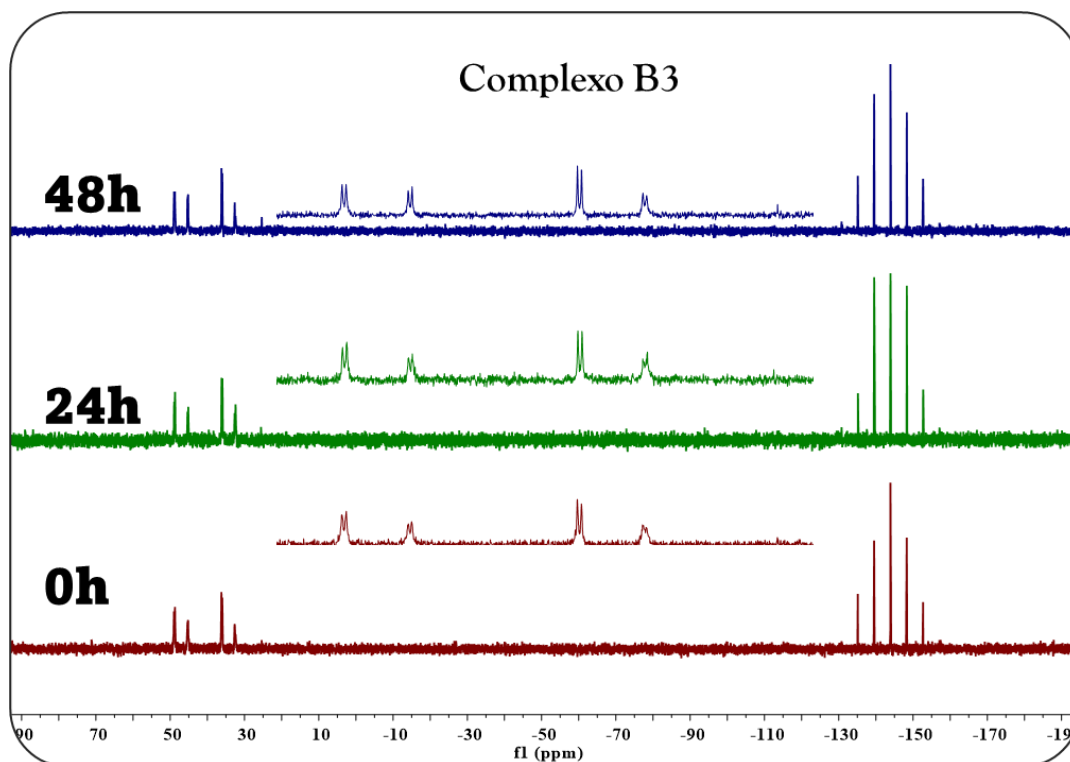


FIGURA A83 Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **B4** em DMSO/meio de cultura, no período de 0, 24, 48 e 72h.

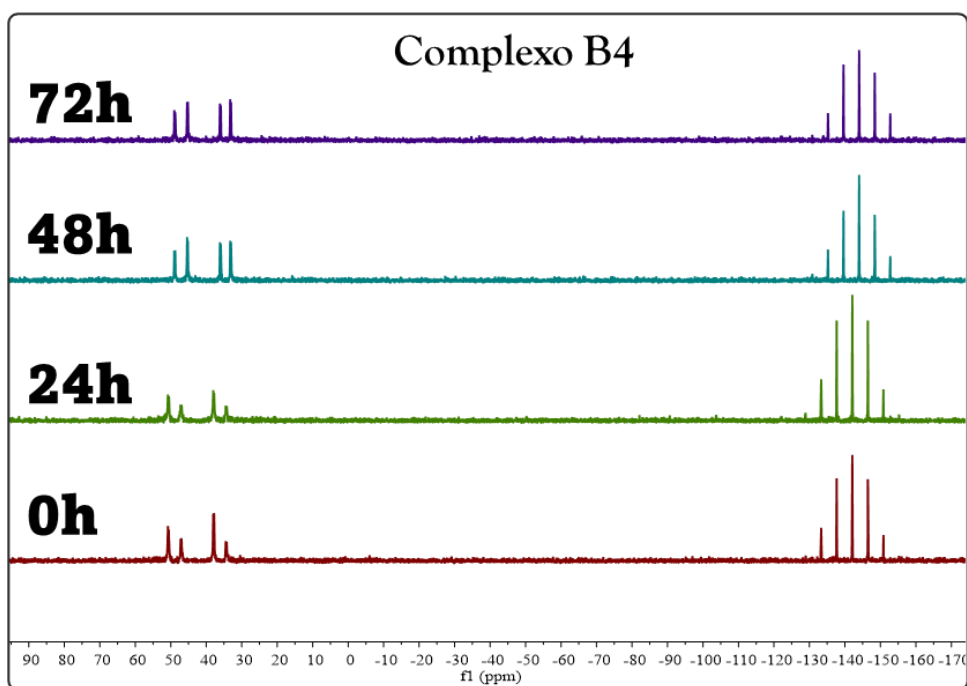


FIGURA A84 - Espectro da supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações dos complexos **B1-B4** (2,5 -20 μM) da série 2 a 25 °C.

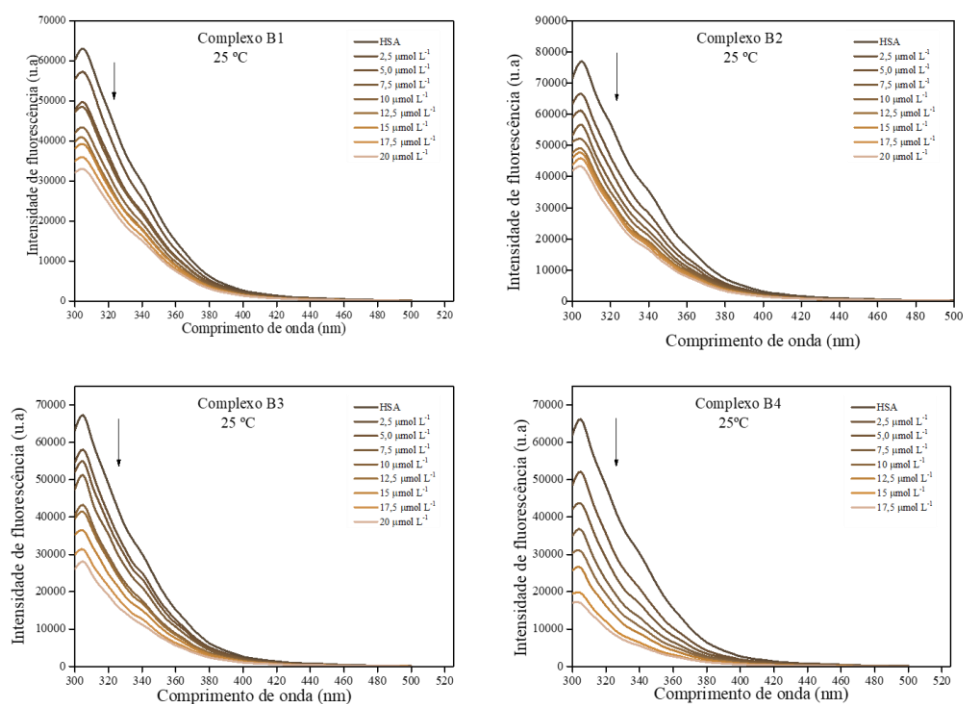


FIGURA A85 - Espectro da supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações dos complexos **B1 – B4** (2,5 -20 μM) da série 2 a 30 °C.

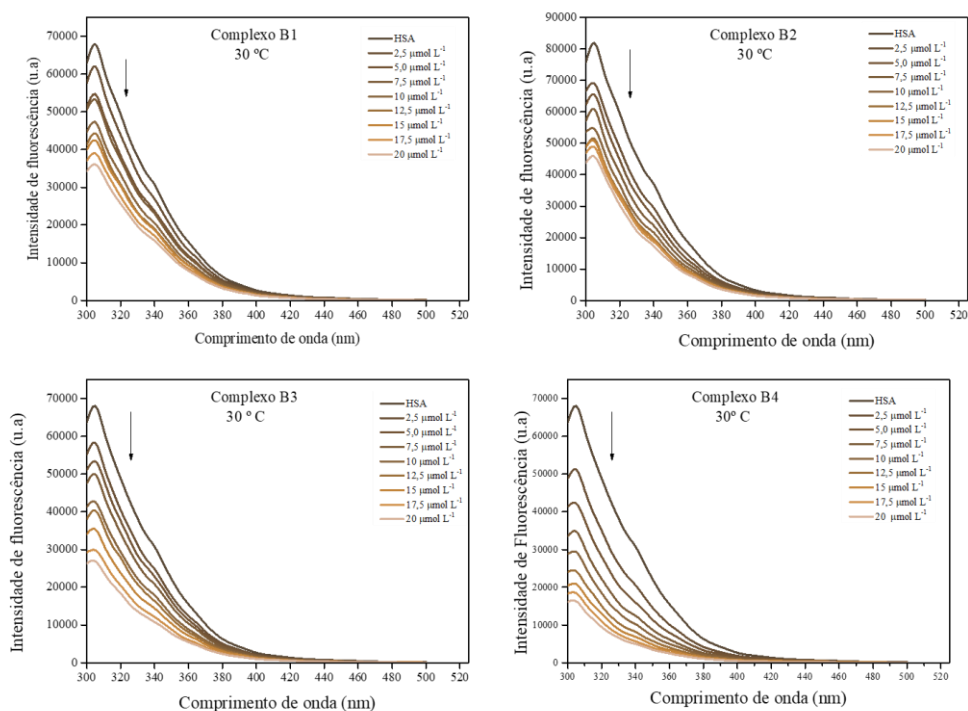


FIGURA A86 - Espectro da supressão da fluorescência da HSA em diferentes concentrações dos complexos **B1-B4** (2,5 -20 μM) da série 2 a 37 °C.

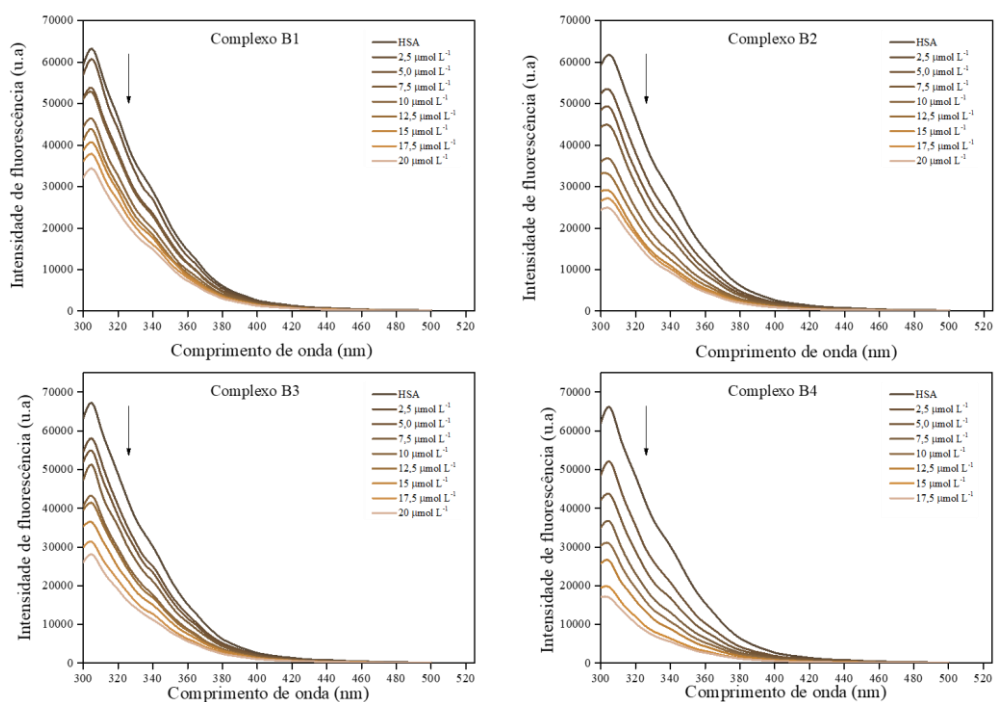


FIGURA A87 - Espectro da supressão da fluorescência da Hoechst-DNA em diferentes concentrações dos complexos **B1-B4** (2,5 -20 μ M) a 37 $^{\circ}$ C.

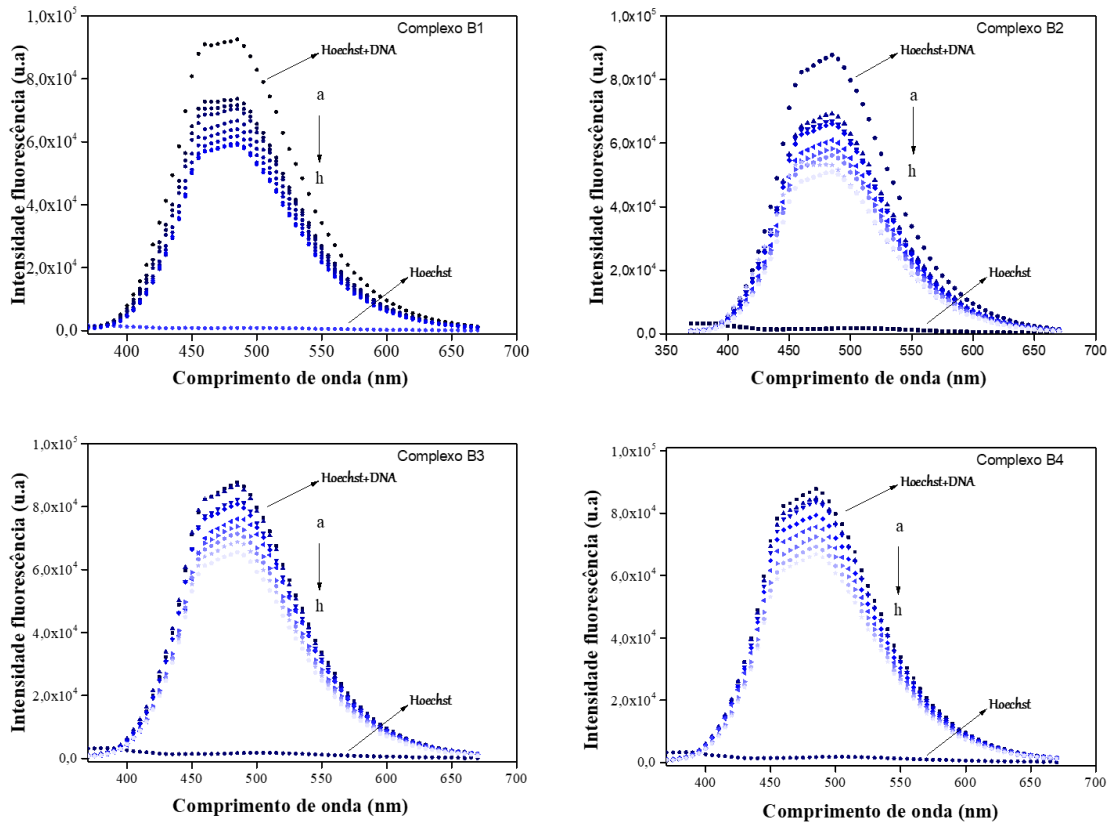


TABELA A1- Dados cristalográficos dos complexos da série 1.

	Complexo A3	Complexo A6	Complexo A5
Fórmula Molecular	$C_{54}H_{43}F_6N_2O_3P_3Ru$	$C_{54}H_{41}F_6N_2O_3P_3Ru$	$C_{56}H_{47}F_6N_2O_3P_3Ru$
Massa Molar (g/mol)	1075,931	1073.87	1103.93
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	$P2_1/c$	$P2_1/n$
Dimensões da cela unitária	a = 10,8597(5) Å/ α = 80,503(3)° b = 14,8589(5) Å/ β = 71,702(4)° c = 16.0976(6) Å/ γ = 84,252(3)°	a = 16.4046(12) Å/ α = 90° b = 16.4556(11) Å/ β = 107.140(7) c = 20.9320(14)Å/ γ = 90°	a = 19.6318(6) Å/ α = 90° b = 12.8066(4) Å/ β = 106.289(4)° c = 20.4536(8) Å/ γ = 90°
Volume (Å ³)	2429,17(18)	5399.6(7)	4936.0(3)
Z	2	4	4
Densidade (calculada) g/cm ³	1,471	1,321	1.486
Coefficiente de absorção (μ/mm^{-1})		0.442	0.485
F(000)	1094,1	2184,0	2256.0
Tamanho do cristal	0,283 x 0,195 x 0,122	0,464 × 0,313 × 0,189	0.375 × 0.201 × 0.176
Alcance de θ para coleta	5,24 para 52°	5,198 para 51,49	5.228 para 53.998
Alcances dos índices	- 16 ≤ h ≤ 17, -23 ≤ k ≤ 23, -25 ≤ l ≤ 25	-15 ≤ h ≤ 20, -18 ≤ k ≤ 19, -24 ≤ l ≤ 25	-25 ≤ h ≤ 25, -15 ≤ k ≤ 16, -26 ≤ l ≤ 26
Reflexões coletas	49443	17020	30699
Reflexões independentes	9541 [R_{int} = 0,0523, R_{sigma} = 0,0664]	10283 [R_{int} = 0,0298, R_{sigma} = 0,0507]	10690 [R_{int} = 0.0283, R_{sigma} = 0.0343]
Índices R final [$I \geq 2\sigma(I)$]	R_1 = 0,0410, wR_2 = 0,1068	R_1 = 0,0597, wR_2 = 0,1543	R_1 = 0.0397, wR_2 = 0.0832
Índices R (todos)	R_1 = 0,0536, wR_2 = 0,1237	R_1 = 0,0910, wR_2 = 0,1872	R_1 = 0.0645, wR_2 = 0.1032

TABELA A2 - Dados cristalográficos dos complexos da série 1.

	Complexo A7	Complexo A1	Complexo A8
Fórmula Molecular	$C_{64}H_{47}F_6N_2O_4P_3Ru$	$C_{64}H_{49}F_6N_2O_3P_3Ru$	$C_{68}H_{55}O_3P_4Ru$
Massa Molar (g/mol)	1216,01	1202,03	1145,07
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/n$	$P-1$	$P2_1/n$
Dimensões da cela unitária	$a = 16,8565(5) \text{ \AA} / \alpha = 90^\circ$ $b = 16,4571(4) \text{ \AA} / \beta = 101,814(3)^\circ$ $c = 19,7391(5) \text{ \AA} / \gamma = 90^\circ$	$a = 11,7481(5) \text{ \AA} / \alpha = 84,349(3)^\circ$ $b = 13,3597(5) \text{ \AA} / \beta = 89,166(3)^\circ$ $c = 19,6459(8) \text{ \AA} / \gamma = 71,694(4)^\circ$	$a = 22,43074(16) \text{ \AA} / \alpha = 90^\circ$ $b = 11,30424(9) \text{ \AA} / \beta = 106,4690(8)$ $c = 25,6271(2) \text{ \AA} / \gamma = 90$
Volume (\AA^3)	5359,8(3)	2912,7(2)	6231,47(9)
Z	4	2	4
Densidade (calculada) g/cm^3	1,507	1,371	1,221
Coeficiente de absorção (μ/mm^{-1})	0,456	0,418	3,343
F(000)	2480,0	1228,0	2364,0
Tamanho do cristal	$0,444 \times 0,214 \times 0,15$	$0,373 \times 0,251 \times 0,158$	$0,442 \times 0,058 \times 0,033$
Alcance de θ para coleta	5,38 a 54	5,012 a 69,076	9,092 a 149,008
Alcances dos índices	$-21 \leq h \leq 21, -21 \leq k \leq 21, -25 \leq l \leq 25$	$-18 \leq h \leq 18, -20 \leq k \leq 21, -31 \leq l \leq 31$	$-27 \leq h \leq 28, -13 \leq k \leq 14, -32 \leq l \leq 31$
Reflexões coletas	60187	68790	76204
Reflexões independentes	11689 [$R_{\text{int}} = 0,0306, R_{\text{sigma}} = 0,0216$]	23210 [$R_{\text{int}} = 0,0379, R_{\text{sigma}} = 0,0567$]	12688 [$R_{\text{int}} = 0,0738, R_{\text{sigma}} = 0,0482$]
Método de refinamento	1,146	1,006	1,129
Índices R final [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0470, wR_2 = 0,1196$	$R_1 = 0,0527, wR_2 = 0,1332$	$R_1 = 0,0452, wR_2 = 0,1215$
Índices R (todos)	$R_1 = 0,0669, wR_2 = 0,1457$	$R_1 = 0,1001, wR_2 = 0,1636$	$R_1 = 0,0512, wR_2 = 0,1245$

TABELA A2 - Dados cristalográficos do complexo B2.

	Complexo B2
Fórmula Molecular	$C_{51}H_{43}F_6N_2O_3P_3Ru$
Massa Molar (g/mol)	1039.85
Sistema cristalino	Tetragonal
Grupo espacial	I-4
Dimensões da cela unitária	$a = 28.5058(5) \text{ \AA} / \alpha = 90^\circ$ $b = 28.5058(5) \text{ \AA} / \beta = 90^\circ$ $c = 12.9705(4) \text{ \AA} / \gamma = 90^\circ$
Volume (\AA^3)	10539.6(5)
Z	8
Densidade (calculada) g/cm^3	1.311
Coefficiente de absorção (μ/mm^{-1})	0.450
F(000)	4240.0
Tamanho do cristal	$0.475 \times 0.202 \times 0.192$
Alcance de θ para coleta	5.314 a 53.992
Alcances dos índices	$-36 \leq h \leq 36, -36 \leq k \leq 36, -16 \leq l \leq 16$
Reflexões coletas	57421
Reflexões independentes	11478 [$R_{\text{int}} = 0.0380, R_{\text{sigma}} = 0.0267$]
Método de refinamento	1.071
Índices R final [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0439, wR_2 = 0.0909$
Índices R (todos)	$R_1 = 0.0344, wR_2 = 0.0822$