

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

**Complexos fosfínicos de Ru(II)/mercaptos contendo ligantes N,N-
heterocíclicos: atividade citotóxica e mecanismo de ação**

Leticia Pires de Oliveira*

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

Orientador: 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 Letícia Pires de Oliveira, realizada em 16/12/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (UNICAMP)

Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri (UNIARA)

Prof. Dr. Luciano Moraes Lião (UFG)

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues Correia (ULisboa)

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

O conhecimento era melhor do que o ouro e a prata,
encantava mais que diamante e pérolas.

Augusto Cury

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida família,
pelo amor e apoio a todo momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e todas as oportunidades que tem colocado em meu caminho. Agradeço à minha família, em especial a meus pais, Irene Ferreira e Gildo Dias, por todo apoio à minha formação desde sempre, e aos meus irmãos, Priscila Pires e Felipe Pires, pela amizade e por saber que sempre posso contar com eles, mesmo à distância. Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por seu empenho na ciência, e por ter aceito me orientar no doutorado. Agradeço por ter disponibilizado a melhor estrutura possível para realização deste trabalho, e por sempre procurar estabelecer parcerias que pudessem contribuir da melhor forma. Agradeço o empenho e confiança!

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, da Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto, pelo uso do microscópio confocal, e à Msc. Luiza Araújo Gusmão, pela leitura das lâminas no microscópio.

À Prof^a. Dra. Márcia Regina Cominetti, do Departamento de Gerontologia-UFSCar, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e equipamentos, para os ensaios de citometria, e à Bacharel Marina Mantellatto, por toda ajuda no uso dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, do Instituto de Química, da UNESP de Araraquara, por ter doado a linhagem celular A2780*cis*.

Às Dra. Angélica Ellen Graminha, Dra. Kátia Mara de Oliveira, Dra. Tamires Donizeth de Oliveira, Dra. Adriana Pereira Mundim Guedes e Dra. Celisnolia Moraes Leite, por ensinamentos com relação aos experimentos biológicos.

Aos Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano, Prof. Dr. Javier Ellena, e Dr. João Honorato, pelas coletas e refinamento referente às medidas cristalográficas, e à Prof^a. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Msc. Carlos André Ferreira, pelos resultados de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha por ter cedido o kit necessário ao experimento com a enzima topoisomerase II α , bem como estrutura do seu laboratório e ao Msc. Mauro Almeida Lima, pela ajuda com o protocolo.

Ao Departamento de Química da UFSCar, em especial aos servidores Luciana Vizotto e Ademir Sartori, pelas análises e vidrarias, além das conversas. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar e UFU, por todo ensinamento e contribuição para minha formação, especialmente às secretárias Ariane, Cristina e Luciani, por toda ajuda, e sempre nos manterem cientes dos prazos.

Aos colegas do laboratório LERCI e “agregados”, que proporcionaram ambiente de grande aprendizado e períodos de intervalo, com bastante café e conversa. Em especial agradeço ao Dr. Gabriel Henrique Ribeiro, por toda ajuda quando iniciei o doutorado, e durante todo esse processo, e Msc. Analu Rocha Costa, que sempre me auxiliou nos experimentos, principalmente nos ensaios biológicos.

Agradeço aos meus amigos de Uberlândia e São Carlos, Luiza, Lorena, Eduardo Marson, Drielly, Gabriel, Darlon, Analu, Ane, e Eduardo Arizono, que tanto me apoiaram, estando presentes nos momentos bons e ruins, tornando todo o caminho mais fácil de trilhar.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1-Comprimentos e ângulos de ligação selecionados do composto pyphen.	59
TABELA 4.2-Dados de análise elementar e condutividade (DMSO) dos complexos.....	68
TABELA 4.3- Principais ângulos e comprimentos de ligação em torno do centro metálico das estruturas	74
TABELA 4.4-Dados de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos das Séries 1 e 2.....	79
TABELA 4.5-Dados espectroscópicos na região do ultravioleta-visível para os complexos das Séries 1 e 2 em dimetilsulfóxido.	92
TABELA 4.6-Principais modos vibracionais observados na região do infravermelho para alguns dos complexos das Séries 1 e 2. ^{56,121,122,124-126}	95
TABELA 4.7-Dados eletroquímicos obtidos para os complexos das Séries 1 e 2.	100
TABELA 4.8-Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) frente a distintas linhagens tumorais e não tumorais, obtidos após 48 h de incubação com os complexos das Séries 1 ou 2.	106
TABELA 4.9-Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) frente a distintas linhagens tumorais e não tumorais, e índices de seletividade (IS) [*] , após 48 h de incubação com complexos fosfínicos de rutênio(II) contendo ligantes mercaptos, relatados no grupo LERCI.	107
TABELA 4.10-Índices de seletividade considerando linhagens tumorais e não tumorais, após 48 h de incubação com os complexos das Séries 1 e 2, espécies precursoras e composto padrão.	110
TABELA 4.11-Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) frente a linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis) e linhagem não tumoral fibroblástica MRC-5, e índices de seletividade (IS) considerando estas linhagens, após 72 h de incubação com quatro complexos da Série 1.	112
TABELA 4.12-Valores de Log P obtidos para os complexos das Séries 1 e 2.	114

TABELA 4.13-Dados quantitativos adquiridos a partir da supressão de fluorescência do DNA-Hoechst pelos compostos das Séries 1 e 2, que são: constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de associação (k_a), parâmetros entálpico (ΔH), entrópico (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG).....	124
TABELA 4.14-Valores das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de velocidade bimolecular de supressão (k_q), constantes de associação (K_a), números de sítio de ligação(n), e parâmetros termodinâmicos associados a supressão de fluorescência da HSA por diferentes concentrações dos compostos das Séries 1 e 2.	133

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1-A) Estimativas de incidência de câncer no mundo por países, no ano 2020, incluso todas as idades* B) Projeções quanto a novos casos de câncer até o ano 2040, no mundo**	3
Figura 1.2-Estimativas das taxas de incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer no Brasil, no ano 2020, na população masculina e feminina.....	4
FIGURA 1.3-A) Aprovação e uso clínico de compostos de platina(II) na quimioterapia. B) Composto de paládio(II) aprovado pela agência EMA.	7
FIGURA 1.4-Compostos de rutênio que se destacaram e progrediram em estudos clínicos. ^{23,25}	9
FIGURA 1.5-Complexos de rutênio (II) contendo ligantes mercapto relatados pelo LERCI, e respectivos valores de citotoxicidade (tempo de incubação 48h) em linhagem MDA-MB-231 e A549, com valores de seletividade (IS) relacionados a linhagens não tumorais. ^{41,42,51,60,61}	15
FIGURA 1.6-Representação da estrutura dos complexos [Ru(pySm)(dppm) ₂] ₂ PF ₆ e [Ru(2mq)(dppe) ₂] ₂ PF ₆ , dados de citotoxicidade e índice de seletividade (IS) relacionados. ^{53,63}	16
FIGURA 1.7-Representação estrutural do ligante pyphen (centro) e compostos que o contém em sua esfera de coordenação, onde N,N equivale à coordenação deste ligante, e resultados de citotoxicidade em determinadas linhagens. ^{68,70}	18
FIGURA 1.8-Representação dos precursores e ligantes utilizados neste trabalho, e a divisão nas duas séries de compostos a serem comparados.	19
Figura 1.9- Estruturas dos complexos de ambas as séries, com os respectivos códigos e fórmulas, de acordo com os ligantes.....	20
FIGURA 4.1-Estrutura cristalográfica do ligante pyphen, com elipsoides a 30% de probabilidade; B) Interação intermolecular por meio de ligação de hidrogênio.....	58

FIGURA 4.2-Espectro de RMN ^1H obtido para o ligante pyphen em DMSO- d_6 , numeração da estrutura, e alguns deslocamentos atribuídos com relação ao RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	60
FIGURA 4.3-Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ da espécie CPP.	62
FIGURA 4.4-Voltamogramas cíclicos de CPP (1 mmol L^{-1}), em solução de CH_2Cl_2 , $0, 1\text{ mol L}^{-1}$ de PTBA, 100 mV s^{-1} . A) Varredura de $0,0$ a $1,2\text{ V}$; B) Varredura de $0,0$ a $1,5\text{ V}$	63
FIGURA 4.5-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ da espécie CPP em diferentes solventes, na região de alta frequência dos espectros.	64
FIGURA 4.6-Estruturas cristalinas dos complexos A1 (Série 1) e A8 (Série 2), com elipsoides a 30% de probabilidade, e omissão do contra-íon PF_6^- na estrutura do complexo A8 . Ampliação das regiões com interação π -stacking de maior prevalência nos sistemas.	70
FIGURA 4.7-Estrutura cristalina do complexo A4 (Série 1), com elipsoides a 30% de probabilidade, exibindo os dois contra-íons que compõem a unidade assimétrica, sendo o Cl^- representado pelo elipsoide em verde.	71
FIGURA 4.8-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para precursor e complexos da Série 1, em metanol.	77
FIGURA 4.9-Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da Série 2.....	78
FIGURA 4.10-Espectro de RMN de ^1H do complexo A6 em DMSO- d_6 , com ampliação da região aromática.	81
FIGURA 4.11-Espectro de RMN ^1H do complexo A10 em DMSO- d_6 , com ampliação da região aromática.	82
FIGURA 4.12-Espectro de RMN ^1H do ligante 2-mercaptopirimidina (pySm) em DMSO- d_6	83
FIGURA 4.13-Mapas de contorno de RMN COSY (^1H - ^1H) obtido para o complexo A6 em DMSO- d_6	85

FIGURA 4.14-Mapa de contorno de NOESY ^1H - ^1H do complexo A8 em DMSO- d_6 , e numeração da estrutura de acordo.....	87
FIGURA 4.15-(A) Espectro de RMN de ^1H na região aromática do complexo A8 ; (B) Espectro de NOESY ^1H - ^1H do complexo A8 , com frequência de irradiação de 4028 Hz (O1p 6.72 ppm).....	88
FIGURA 4.16- Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível dos complexos A6 (Série 1) e A10 (Série 2) em DMSO, em diferentes concentrações.	91
FIGURA 4.17-Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos complexos A6 (Série 1) e A10 (Série 2)	96
FIGURA 4.18-Voltamogramas cíclicos de soluções (A) Complexo A6 (Série 1); B) Complexo A10 (Série 2) em 1 mmol L^{-1} de PTBA em CH_2Cl_2 a 100 mV s^{-1}	97
FIGURA 4.19-Representação das estruturas dos compostos das Séries 1 e 2, em acordo com as estruturas propostas e com os resultados obtidos com as técnicas de caracterização.	101
FIGURA 4.20-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para estudo da estabilidade dos complexos A1-A3 (Série 1) em dimetilsulfóxido/DMEM, acompanhado com o tempo.....	103
FIGURA 4.21-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para estudo da estabilidade dos complexos A8-A10 (Série 2) em dimetilsulfóxido/DMEM, acompanhado com o tempo.....	103
FIGURA 4. 22-A) Isoformas do DNA de acordo com tamanho e conformação; B) Resultados da mobilidade eletroforética do DNA sob influência dos compostos das Séries 1 e 2.....	118
FIGURA 4.23-Gráficos de viscosidade relativa do DNA sob adição de diferentes concentrações dos compostos, na parte superior, e espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst, acompanhado de acordo com	

acréscimos na concentração dos compostos, na parte inferior A) Complexos da Série 1 e, B) Complexos da Série 2.....	123
FIGURA 4.24-Fotodocumentos dos géis obtidos na investigação da inibição da atividade catalítica da enzima Topoisomerase II α sob influência dos compostos A) Série 1 e B) Série 2.	128
FIGURA 4.25-Espectros de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença de diferentes concentrações do complexo A6 (Série 1; b-g) e complexo A10 (Série 2; b-i), com [HSA]= 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ constante em todo o experimento.*	131
FIGURA 4.26-Espectros de emissão do sistema HSA-Varfarina, à esquerda, sob influência de diferentes concentrações dos complexos A6 -Série 1 e A10 -Série 2, e à direita, representação da interação de varfarina no Sítio Sudlow I da HSA.	137
FIGURA 4.27-Ensaio morfológico na linhagem A2780cis sob tratamento com diferentes concentrações do complexo A6 (Série 1).....	140
FIGURA 4.28-Ampliação das imagens obtidas no ensaio morfológico na linhagem MDA-MB-231, sob tratamento com diferentes concentrações do complexo A9 (Série 2).	141
FIGURA 4.29-Imagens micrográficas do ensaio morfológico na linhagem MCF10A sob tratamento com diferentes concentrações do complexo A9 (Série 2), acompanhado com o tempo.	141
FIGURA 4.30-Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem A2780cis, sob diferentes concentrações do complexo A6 (Série 1), considerando 72 h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.	144
FIGURA 4.31-Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem MDA-MB-231, sob diferentes concentrações dos complexos A9 (A) e A8 (B), (Série 2), considerando 48h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.....	145

FIGURA 4. 32-Efeito do complexo A9 (Série 2) na migração celular de células MDA-MB-231 A) Imagens micrográficas obtidas na objetiva de 4x, de acordo com o tempo; B) porcentagem de cicatrização da ferida com relação ao tempo de análise (comparativo de área entre 0 e 24 h).....	147
FIGURA 4.33-Efeito do complexo A6 (Série 1) na migração celular de células A2780cis A) Imagens micrográficas obtidas na objetiva de 4x, de acordo com o tempo; B) porcentagem de cicatrização da ferida com relação ao tempo de análise (comparativo de área entre 0 e 48 h).....	148
FIGURA 4. 34-Ensaio de citoesqueleto com marcação de faloidina e DAPI, na linhagem A2780cis, após 24 h de tratamento com 1,5 e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo A7 (Série 1); 0,25 e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo A9 (Série 2); 0,5% de DMSO (controle negativo); e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatina.....	150
FIGURA 4.35-Ensaio de citoesqueleto com marcação de faloidina e DAPI, na linhagem MDA-MB-231, após 24 h de tratamento com 0,20 e 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo A9 (Série 2); 0,5% de DMSO (controle negativo).....	151
FIGURA 4.36-Representação esquemática do ciclo celular mitótico.	154
FIGURA 4.37-Distribuição do ciclo celular de células A2780cis após tratamento por 72 h com o complexo A6 (A), nas concentrações de 2,7; 5,5 e 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e após 48 h de tratamento com complexo A7 (B), nas concentrações de 2,8; 5,5 e 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	156
FIGURA 4.38-A) Distribuição do ciclo celular de células A2780cis após tratamento por 48 h com o complexo A9 , nas concentrações de 0,07; 0,14 e 0,28 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e B) Distribuição do ciclo celular de células MDA-MB-231 após 48 h de tratamento com complexo A9 , nas concentrações de 0,05; 0,10 e 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	158
FIGURA 4.39-Determinação de células em apoptose da linhagem A2780cis após tratamento com o complexo A6 (Série 1). A) Dot plots PE-Anexina vs. 7AAD, onde C- é referente ao tratamento com 0,5% de DMSO e C+ ao	

tratamento com camptotecina ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$); B) Representação da estrutura do complexo A6 e gráfico referente à taxa de células apoptóticas.	161
FIGURA 4.40-Determinação de células em apoptose da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com o complexo A9 (Série 2). A) Dot plots PE-Anexina vs. 7AAD, onde C- é referente ao tratamento com 0,5% de DMSO e C+ ao tratamento com camptotecina ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$); B) Representação da estrutura do complexo e gráfico referente à taxa de células apoptóticas.	162
FIGURA 4.41-Determinação de células em apoptose da linhagem A2780cis após tratamento com o complexo A9 (Série 2). A) Dot plots PE-Anexina vs. 7AAD, onde C- é referente ao tratamento com 0,5% de DMSO e C+ ao tratamento com camptotecina ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$); B) Representação da estrutura do complexo A9 e gráfico referente à taxa de células apoptóticas.	163

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1-A) Esquema de reação para obtenção do ligante pyphen; B)	
Proposta de mecanismo reacional.	57
ESQUEMA 4.2-Esquema reacional para obtenção do cis-	
[RuCl ₂ (dppb)(pyphen)].	61
ESQUEMA 4.3-Esquema de síntese para obtenção dos complexos da Série 1.	66
ESQUEMA 4.4-Esquema de síntese para obtenção dos complexos da Série 2.	67

RESUMO

COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE RUTÊNIO(II)/MERCAPTOS CONTENDO LIGANTES N,N-HETEROCÍCLICOS: ATIVIDADE CITOTÓXICA E MECANISMO DE AÇÃO. O trabalho aqui apresentado teve por principais objetivos a síntese, caracterização e estudo biológico de duas séries de complexos fosfínicos de rutênio(II) contendo diferentes ligantes mercaptos, e diferindo nos ligantes N,N-heterocíclicos na esfera de coordenação. A série de compostos designada como Série 1, foi constituída de sete complexos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{Cl}$ (**A1-A3**) e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{PF}_6$ (**A4-A7**), onde $\text{dppb} = 1,4'$ -bis(difenilfosfina)butano; $\text{pyphen} = 1$ -(piren-2-il)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10-fenantrolina]; $\text{NS} = 2$ -mercaptopiridina (pyS , **A1** e **A4**), 2-mercaptotiazolina (tzdt , **A2** e **A5**), 2-mercaptopirimidina (pySm , **A3** e **A6**), e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp , **A7**). Já a série designada como Série 2 foi composta de três complexos, de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$ (**A8-A10**), onde $\text{phen} = 1,10$ -fenantrolina e NS os ligantes mercaptos pyS , tzdt e pySm , já detalhados. O composto precursor da Série 1, $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$, foi caracterizado e os resultados mostraram a possibilidade de que apresente isomeria conformacional, que não é constatada no ligante livre ou nos complexos finais. Os complexos de ambas as séries foram analisados por técnicas usuais de caracterização, tais como análise elementar e condutimétrica, espectroscopia na região do ultravioleta/visível e infravermelho, voltametria cíclica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, e difração de raios X de monocristais, quando possível. A avaliação da citotoxicidade dos complexos foi realizada frente à linhagens tumorais histologicamente distintas, MDA-MB-231 e MCF-7 (linhagens tumorais de mama), A549 (linhagem tumoral de adenocarcinoma pulmonar), A2780 e A2780*cis* (linhagens tumorais de ovário), e frente à linhagens não tumorais, MCF-10A (linhagem celular de mama) e MRC-5 (linhagem celular fibroblástica de pulmão). Essa avaliação permitiu inferir que a modificação no ligante N,N-heterocíclico resultou em menor potencial

citotóxico para os complexos da Série 1, com relação aos compostos da Série 2. Por sua vez, os complexos da Série 2 exibiram valores de IC_{50} significativos com relação ao precursor e o padrão (cisplatina). Apesar disso, os complexos da Série 1 exibiram citotoxicidade avaliável nas linhagens tumorais de ovário, apresentando seletividade a este tipo celular dentre as linhagens tumorais, e índice de seletividade de pelo menos 2 com relação à linhagem MRC-5. Os complexos da Série 2 exibiram citotoxicidade similar nas linhagens avaliadas, com maior potencial frente às linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*, com destaque para o complexo **A9**, devido aos maiores índices de seletividade. Após análise do potencial citotóxico, os compostos foram avaliados quanto à possível interação com alvos biológicos, que podem atuar como o estímulo que desencadeia o processo de morte celular ou na farmacocinética dos compostos. Todos os complexos avaliados apresentaram interações reversíveis e fracas com o DNA, majoritariamente ocorrendo pelo sulco menor da biomolécula. Os complexos não alteraram as estruturas secundária e terciária do DNA, levando à conclusão de que possivelmente o DNA não seja o alvo determinante para a citotoxicidade dos compostos. Os complexos da Série 2 demonstraram parcial inibição da atividade catalítica da enzima Topo II α , enquanto os complexos da Série 1 não mostraram nenhuma inibição da atividade desta enzima, sendo um provável caminho para explicar o diferencial na citotoxicidade. Por último, a interação com HSA demonstrou que esta proteína pode estar associada à farmacocinética dos compostos, podendo carregá-los a sítio de ação biológica, com interação ocorrendo pelo sítio Sudlow I da proteína albumina de soro humana. Estudos com os complexos **A6** e **A7** da Série 1, e **A9** da Série 2, demonstraram que os complexos induziram alterações morfológicas indicativas de morte celular, que exibem efeitos citostáticos e citotóxicos nas linhagens analisadas, interferem em estruturas necessárias à cascata metastática, e por fim, exibem apoptose como mecanismo de morte celular.

ABSTRACT

RUTHENIUM(II) PHOSPHINE/MERCAPTO COMPLEXES CONTAINING N,N-HETEROCYCLIC LIGANDS: CYTOTOXIC ACTIVITY AND ACTION MECHANISM. The main objectives of this study were the synthesis, characterization and biological studies of two series of ruthenium phosphine compounds containing different mercapto ligands, and contrasting in N,N-heterocyclic ligands in the coordination sphere. The series of compounds designated as series 1, consisted of seven compounds with general formula $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{Cl}$ (**A1-A3**) and $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{PF}_6$ (**A4-A7**), where dppb= 1,4'-bis(diphenylphosphine)butane; pyphen= 2-(pyren-1-yl)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10]phenanthroline; NS= 2-mercaptopyridine (pyS, **A1** and **A4**), 2-mercaptothiazoline (tzdt, **A2** and **A5**), 2-mercaptopyrimidine (pySm, **A3** and **A6**), and 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidine (damp, **A7**). The series 2, comprise three compounds, of general formula $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$ (**A8-A10**), where phen= 1,10-phenanthroline and NS (mercapto ligands)= pyS, tzdt and pySm. The precursor compound of Series 1, $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$, was characterized, and the results show that the compound probably presents conformational isomerism that is not verified on the free ligand or final complexes. The compounds of both series were analyzed by usual characterization techniques, such as elemental analyses, conductimetry, spectroscopic in the ultraviolet/visible and infrared, cyclic voltammetry, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ nuclear magnetic resonance spectroscopy, and X-ray diffraction. The cytotoxic potential of compounds was evaluated against histologically distinct tumor lineages, MDA-MB-231 and MCF-7 (breast tumor lineages), A549 (lung adenocarcinoma tumor lineage), A2780 and A2780*cis* (ovarian tumor lineages), and against non-tumor lineages, MCF-10A (breast cell lineage) and MRC-5 (lung fibroblast cell line). This evaluation allows us to infer that the modification on the N,N-heterocyclic ligand resulted in smaller cytotoxic potential to compounds of series 1 than series 2. Despite this, the compounds of series 1 presented significant cytotoxicity in

ovarian tumor cell lineages, exhibiting selectivity to this cell type, and a selectivity index of at least 2 with respect A2780*cis* and MRC-5 lines. The compounds of series 2 exhibited IC₅₀ values significant, compared to the precursor and cisplatin, with similar activities between compounds to cell lines evaluated. Greater cytotoxic potential was displayed against MDA-MB-231 and A2780*cis* cell lineages, mainly complex **A9** due its higher selectivity index. After analyzing the cytotoxic activity, the compounds were analyzed for possible interaction with biological targets, that can act how the stimulus triggers the cell death process or in the pharmacokinetics of compounds. All the complexes present reversible and weak interactions with DNA, mostly occurring in the minor groove of the biomolecule. The complexes were not capable alter the secondary and tertiary structure of DNA, therefore the interaction occurs weak and DNA is possibly not the determinant target to the compounds' cytotoxicity. The compounds of Series 2 showed partial inhibition of the catalytic activity of the enzyme Topo II α , while in the compounds of Serie 1 no inhibition of activity from this enzyme, which could be a way to justify the differential in cytotoxicity. Finally, the interaction with HSA showed that this protein can be associated with pharmacokinetics to the compounds, carrying them until the biological action site, with interaction through the Sudlow I site of human serum albumin protein. Studies with compounds **A6** and **A7** of Series 1, and **A9** of Series 2, demonstrated the compounds could induce morphological changes that indicates cell death, the compounds exhibit cytostatic and cytotoxic effects on the cell lines analyzed, affect structures necessary for the metastatic cascade, and finally, exhibit apoptosis as cell death mechanism.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Câncer	2
1.2- Compostos inorgânicos na Química Medicinal	5
1.3- Compostos de rutênio(II) investigados no LERCI	11
1.4- Enunciado da hipótese do presente trabalho	16
2- OBJETIVOS	21
2.1- Objetivo Geral	22
2.2- Objetivos Específicos	22
3- MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1- Obtenção da atmosfera inerte	26
3.2- Solventes	26
3.3- Reagentes Químicos	26
3.4- SÍNTESES	28
3.4.1- SÍNTESE DO LIGANTE	28
3.4.1.1-Síntese do ligante 1-(piren-2-il)-1H-imidazo[4,5-f][1,10-fenantrolina] (pyphen)	28
3.4.2- SÍNTESE DOS COMPLEXOS PRECURSORES	28
3.4.2.1-Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$	28
3.4.2.2-Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{PPh}_3)]$	28
3.4.2.3-Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})_2(\mu\text{-dppb})]$	29
3.4.2.4-Síntese do complexo cis- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$ (CPP)	29

3.4.2.5-Síntese do complexo cis-[RuCl ₂ (dppb)(phen)] (cis-phen).....	30
3.4.3- Síntese dos complexos das Séries 1 e 2	30
3.4.3.1- Síntese dos complexos [Ru(NS)(dppb)(pyphen)]X, X=Cl ⁻ ou PF ₆ ⁻ (SÉRIE 1).....	30
3.4.3.2- Síntese dos complexos [Ru(NS)(dppb)(phen)]PF ₆ (SÉRIE 2).....	31
3.5- Instrumentação empregada nos experimentos	32
3.5.1- Análise Elementar.....	32
3.5.2- Condutimetria	32
3.5.3- Difração de Raios X.....	32
3.5.4- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	33
3.5.5- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	34
3.5.6- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	34
3.5.7- Estudo eletroquímico	34
3.5.8- Medidas de fluorescência	35
3.5.9- Espectrometria de Massas	35
3.6. ENSAIOS REFERENTES À ESTABILIDADE, COEFICIENTE DE PARTIÇÃO, INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS E ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	36
3.6.1- Análise da Estabilidade	36
3.6.2- Estudos de interação com biomoléculas.....	36
3.6.2.1-Interação com DNA.....	36
3.6.2.2-Ensaio de inibição da atividade enzimática da topoisomerase IIα... 42	
3.6.2.3-Estudo de interação com albumina de soro humana (HSA)	43
3.6.3- Determinação do coeficiente de partição	47
3.6.4- Ensaios Biológicos	48
3.6.4.1-Cultura de células	48
3.6.4.2-Ensaio de Viabilidade Celular.....	49
3.6.4.3-Ensaio morfológico	50

3.6.4.4-Ensaio de formação de colônias	50
3.6.4.5-Ensaio relativo à possível influência na cascata metastática	51
3.6.4.6-Ensaio relacionado a apoptose	52
3.6.4.7-Análise Estatística	54
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1- Ligante 1-(piren-2-il)-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>][1,10-fenantrolina], pyphen	56
4.2- Precursor [RuCl ₂ (dppb)(pyphen)], (CPP).....	60
4.3- Complexos de fórmula geral [Ru(NS)(dppb)(pyphen)]X (Série 1) e [Ru(NS)(dppb)(phen)]PF ₆ (Série 2).....	66
4.3.1- SEÇÃO 1- Caracterização dos complexos	66
4.3.1.1-Conduímetria, Análise Elemental e Espectrometria de massas	67
4.3.1.2-Difração de Raios X	69
4.3.1.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	75
4.3.1.4-Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível e de fluorescência	89
4.3.1.5-Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	93
4.3.1.6- Estudo eletroquímico	97
4.3.1.7- Estudo de Estabilidade.....	102
4.3.2- SEÇÃO 2- Viabilidade Celular e Coeficiente de Partição	104
4.3.3- SEÇÃO 3- Ensaio de interação com biomoléculas	114
4.3.3.1-INTERAÇÃO COM DNA	114
4.3.3.2-INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA TOPOISOMERASE II α	126
4.3.3.3-INTERAÇÃO COM PROTEÍNA ALBUMINA DE SORO HUMANA (HSA) E COMPETIÇÃO PELO SÍTIO I DA HSA	129
4.3.4- SEÇÃO 4- Ensaio Biológicos	139
4.3.4.1-Ensaio de Morfologia Celular	139

4.3.4.2-Ensaio de Formação de Colônias	142
4.3.4.3-Ensaio relacionados à cascata metastática.....	145
4.3.4.4-Ensaio relacionados à apoptose	152
5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	165
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
APÊNDICE	189

1- INTRODUÇÃO

A parte introdutória relata sobre alguns tópicos que julgamos importantes para entendimento do que foi realizado neste trabalho, iniciando com a temática relacionada à aplicação biológica de interesse, e finalizando com a hipótese investigada.

1.1- Câncer

O câncer é uma das maiores causas de mortalidade no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Esta doença se tornou uma temática ainda mais preocupante devido à pandemia da COVID-19 que fez com que os diagnósticos e/ou tratamentos fossem postergados, resultando em falso declínio em sua incidência, seguido de cenário posterior no qual a doença já é diagnosticada em estágio avançado, o que por sua vez, reflete em uma maior mortalidade.^{1,2}

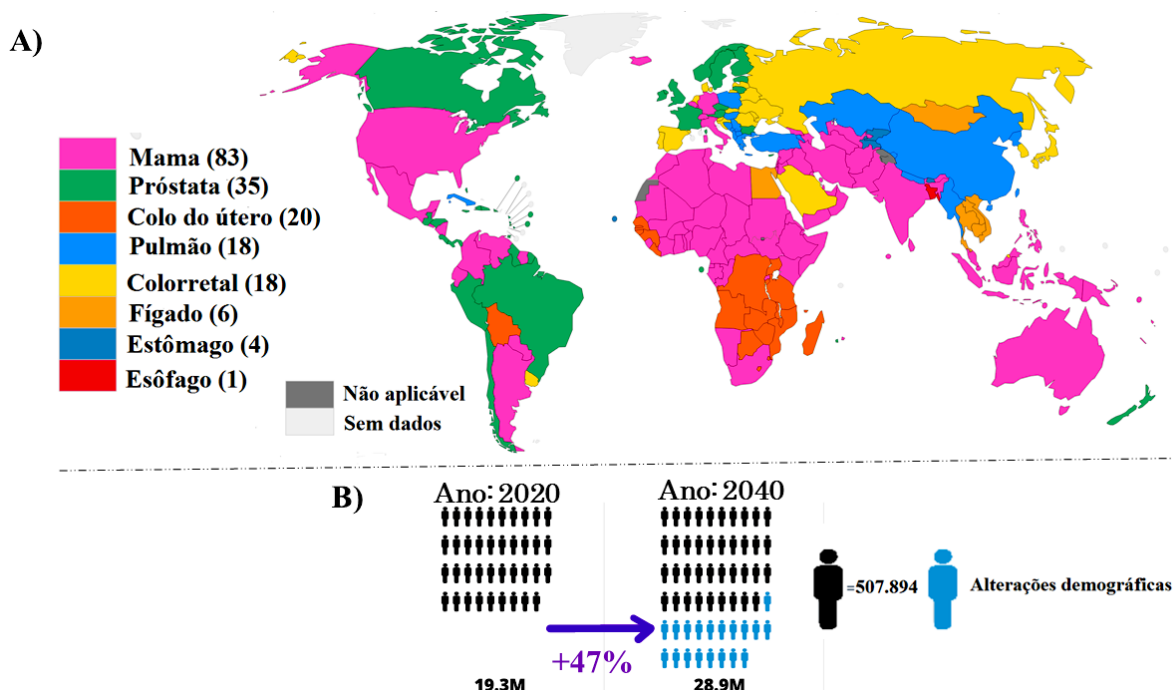
No mundo, somente no ano de 2020 a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO) estimou 19,3 milhões de novos casos de câncer, dentre os quais 10 milhões resultaram em óbitos, o que representa mais de 50% do total de casos. Na população feminina o câncer de mama é o mais incidente e o que causa maior mortalidade, seguido pelos tumores colorretais e pulmonares. Na população masculina o câncer de pulmão e próstata quase se igualam em nível de incidência, mas o câncer de pulmão causa maior mortalidade.³

As causas do câncer variam desde hábitos inadequados de vida, até a fatores genéticos (herança genética), estes últimos com o menor número de casos associados. A maior incidência da doença está relacionada a erros aleatórios durante a divisão celular, os quais a maquinaria celular não consegue reparar.⁴ No mapa da Figura 1 representa-se a incidência de novos casos de câncer no ano de 2020 em todo o mundo, considerando todos os sexos e idades (Figura 1.1-A), assim como estimativa de novos casos nos próximos anos (Figura 1.1-B).

No cenário brasileiro, as taxas de incidência modificam-se um pouco em relação ao panorama mundial, uma vez que na população feminina estimativas de 2020 indicam maiores taxas com relação aos cânceres de mama, colorretal e tireoidiano, nesta ordem (Figura 1.2), e na população masculina o câncer de próstata foi estabelecido como o mais incidente e responsável pela maior mortalidade dos homens acometidos pela enfermidade, seguido por maior incidência de câncer colorretal e de pulmão.³

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), é previsto no Brasil a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022, sendo o câncer de próstata o mais incidente (29,2%) na população masculina, e na população feminina, o câncer de mama (29,7%), não se considerando os casos de câncer de pele não melanoma.⁵

FIGURA 1.1-A) Estimativas de incidência de câncer no mundo por países, no ano 2020, incluso todas as idades* B) Projeções quanto a novos casos de câncer até o ano 2040, no mundo**

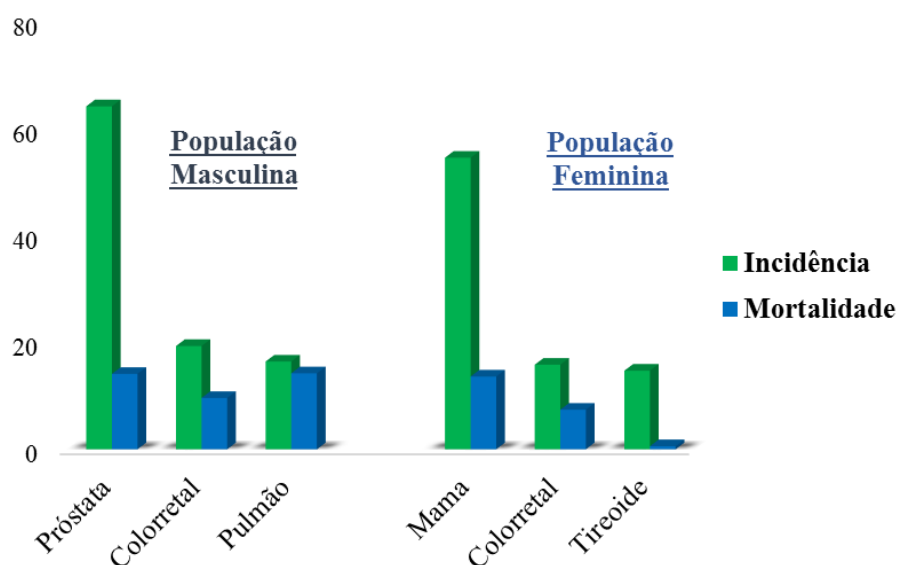


Adaptado de Global Cancer Observatory. *Os números entre parênteses indicam a quantidade em países onde o tipo de câncer é o mais incidente. **Representação do aumento em número de casos em 47% do

ano 2020 para 2040, em que cada “figura” em preto representa 507.894 habitantes e em azul a mesma quantidade, representando ainda a alteração no aumento da incidência de câncer.

Estes altos níveis de ocorrência e mortalidade associadas ao câncer, tornam imprescindíveis pesquisas relacionadas a novos tratamentos e/ou evolução de tratamentos pré-existent. Devido à alta heterogeneidade associada ao câncer, uma vez que pode ser originado em diferentes órgãos e possuem características histomorfológicas distintas, vários tratamentos podem ser empregados. Neste contexto, grandes avanços têm sido realizados em tratamentos que empregam terapia direcionada (consideradas específicas para diferentes tipos de câncer), e terapia de genes (inserção de cópia de gene no genoma que possua alguma irregularidade específica), entre outros procedimentos.^{6,7}

Figura 1.2-Estimativas das taxas de incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer no Brasil, no ano 2020, na população masculina e feminina



Fonte: Adaptado de Global Cancer Observatory

Apesar desta evolução, até mesmo na implementação destas novas intervenções médicas, terapias clássicas, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, ainda são muito utilizadas. As novas terapias possuem ação bem específica, o que as tornam eficazes para tipos seletos de câncer, não sendo eficientes em vários casos. Por exemplo, a terapia direcionada pode ser utilizada

no tratamento de alguns subtipos de câncer de mama, que possuem receptores hormonais e/ou amplificação de fator de crescimento, e assim pode-se interferir na produção e/ou ação de hormônios e proteínas. Isso não ocorre, por exemplo, no câncer de mama, classificado como triplo negativo, que não expressa receptor hormonal e/ou amplificação de fator de crescimento HER-2, e por isso, neste caso a quimioterapia se torna mais efetiva com relação a uma terapia direcionada.⁸⁻¹⁰

Especificamente a quimioterapia se baseia na morte de células tumorais por ação de medicamentos que atuem de forma sistêmica, que tenham sua ação preferencialmente nas células tumorais com relação às células saudáveis. Há uma variedade de compostos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para uso como agentes quimioterápicos, dentre os quais muitos são compostos orgânicos, destacando-se produtos naturais, uma vez que aproximadamente 60% dos medicamentos utilizados provêm de tais espécies ou são derivados sintéticos destes.^{11,12} Contudo, apesar da pequena quantidade de compostos inorgânicos aprovados para uso como quimioterápicos, estes se encontram associados a uma parcela significativa de tratamentos, contra diversos tipos de tumores. Este fato tem impulsionado pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos compostos inorgânicos como potenciais metalofármacos.¹³

1.2- Compostos inorgânicos na Química Medicinal

Três compostos de platina foram aprovados para uso como quimioterápicos, pela FDA [cisplatina, carboplatina e oxaliplatina], e três outros complexos com este mesmo centro metálico, aprovados em determinados países, sendo estes relacionados na Figura 1.3.^{14,15} Além destes compostos de platina há relatos, ainda que pouco mencionado na literatura, de outro composto antitumoral de platina(II). Este complexo contém o ligante miristato, utilizado de forma a modular a lipofilicidade deste complexo. Esse composto denominado como

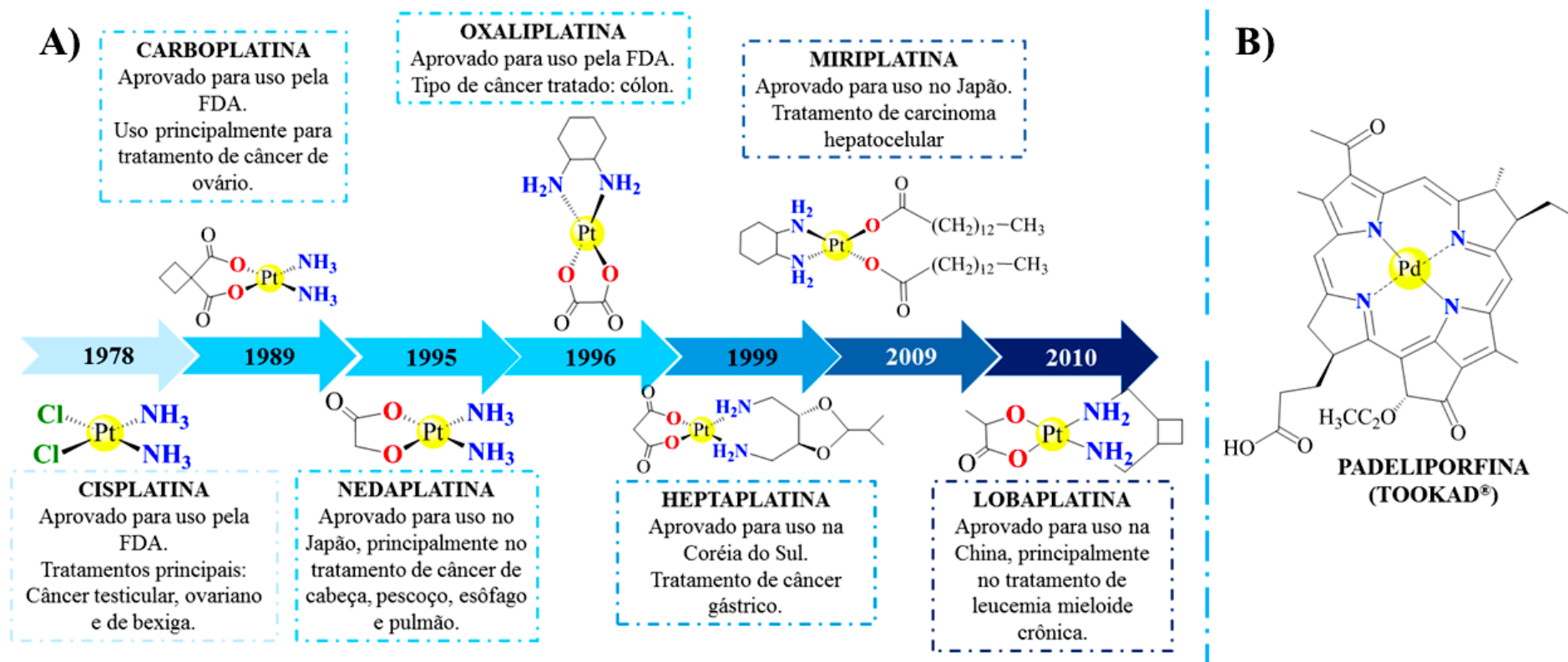
miriplatina foi aprovado para uso no Japão em 2009, para tratamento de carcinoma hepatocelular.^{16,17}

É válido mencionar que recentemente, o composto de paládio, denominado TOOKAD[®], foi aprovado pela agência europeia de medicamentos para uso em terapia fotodinâmica com alvo vascular (VTP), em pacientes com câncer de próstata de baixo risco,¹⁸ único com centro metálico distinto de platina(II).

O mecanismo de ação da cisplatina está relacionado principalmente à sua ação sobre o DNA como alvo biológico. Devido a este mesmo fator e à interação com outras espécies existentes no organismo, como proteínas ricas em enxofre, a cisplatina apresenta toxicidade que se traduz em diversos efeitos adversos, como nefrotoxicidade, ototoxicidade, entre outros.¹⁴ Outros problemas associados à cisplatina são sua baixa solubilidade em meio biológico, contornada com aplicação intravenosa em solução salina, e resistência no tratamento de longo prazo, que pode ser tanto intrínseca como adquirida, em função de vários fatores, como seu efluxo mediado por transportadores de cobre ATP7A e ATP7B.¹⁹

Como uma alternativa à resistência de medicamentos utilizados como quimioterápicos e para minimizar os efeitos colaterais provenientes da administração destes, pode-se empregar algumas estratégias. Uma possibilidade é investir em alterações estruturais de forma a obter novos potenciais fármacos, bem como novos mecanismos de ação, ou promover interações farmacológicas diferenciadas que contribuam para a atividade citotóxica até mesmo em células resistentes. Essas modificações podem ser realizadas mantendo parte do arcabouço molecular de complexos já relatados na literatura e aprovados para uso, a fim de obter espectro de atividade similar, com menos problemáticas associadas.^{14,17,20}

FIGURA 1.3-A) Aprovação e uso clínico de compostos de platina(II) na quimioterapia. B) Composto de paládio(II) aprovado pela agência EMA.



Fonte: Adaptado de Wheate, N.J.; Walker, S.; Craig, G. E., 2010; Sharma, R.; Singh, V.J.; Chawla, P.A., 2021; Tanaka, K. *et al.*, 2011.¹⁴⁻¹⁶

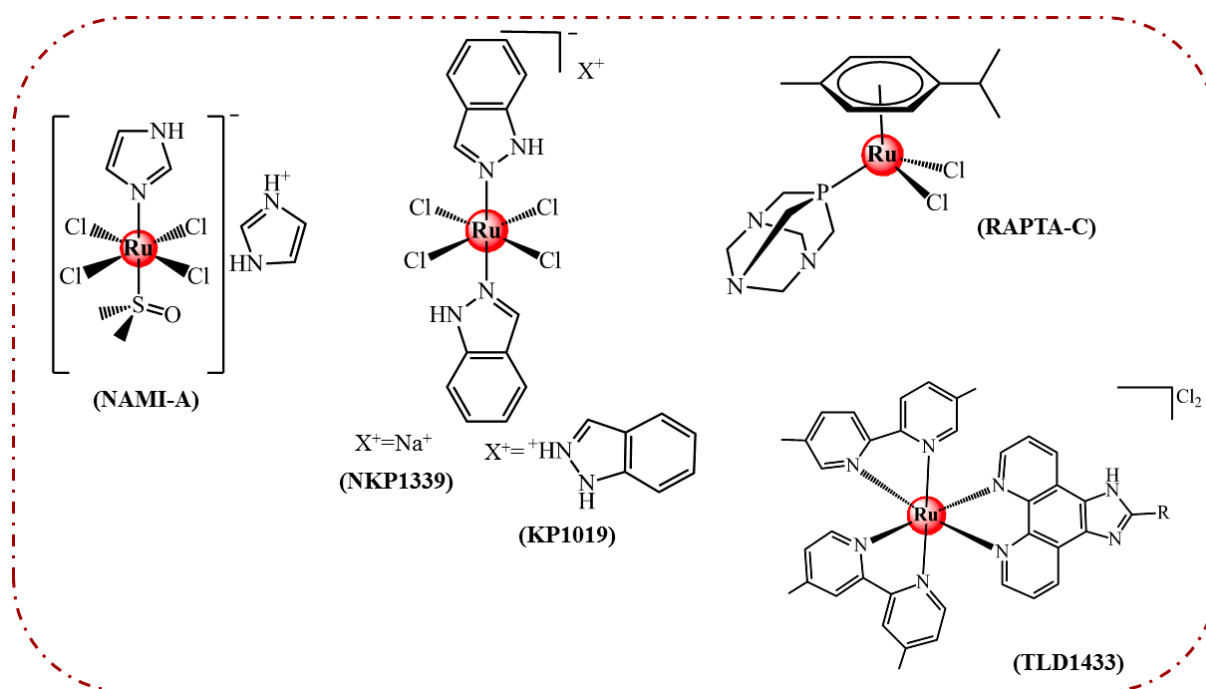
Além disso, outra possibilidade é alterar a estrutura dos compostos, de forma mais radical, com modificação do centro metálico, possibilitando resultados variados e muitas vezes promissores, como já relatado na literatura para complexos de ouro(III), paládio(II), ródio(III), ferro(III), cobalto(II), rutênio(II), entre outros. Dentre estes, os complexos de rutênio(II) são os mais explorados e que têm despertado maior interesse, devido às publicações que demonstram promissores resultados para determinadas classes de compostos com este íon metálico, em virtude de características intrínsecas destes. Dentre estas características relata-se toxicidade moderada e efeitos colaterais reduzidos, maior seletividade a células/tecidos tumorais com relação às não tumorais, diferentes tipos de coordenação e possibilidade de estados de oxidação, que influenciam nos mecanismos de ação destes compostos.^{17,21}

O primeiro composto de rutênio a ser testado em seres humanos, como possível espécie antitumoral, foi o {[ImH][*trans*-RuCl₄(dmsO)(Im)]}, em que Im= imidazol e ImH= íon imidazolium, usualmente nomeado como NAMI-A. Em seguida relata-se o complexo {[IndH][*trans*-RuCl₄(Ind)₂]} em que Ind= indazol e IndH= íon indazolium, comumente conhecido como KP1019, representado na Figura 1.4. Estes compostos são similares estruturalmente, apresentando Ru(III) como centro metálico e ligantes azólicos em sua esfera de coordenação, entretanto, as diferenças estruturais que podem ser ditas pequenas mostraram afetar a reatividade destes compostos, e conseqüentemente, resultou em diferentes perfis biológicos. Como exemplo, ao confrontar-se os perfis farmacológicos do KP1019 com o NAMI-A, observa-se efeitos distintos. Enquanto, o KP1019 gera algum efeito citotóxico, a administração do NAMI-A resulta principalmente em efeitos antimetastáticos.^{22,23}

Apesar da eficácia destes compostos de rutênio, pioneiros (NAMI-A e KP1019), que apresentaram alguma eficácia clínica, devido a efeitos colaterais graves, e no caso do KP1019 também à sua baixa solubilidade no meio biológico, os estudos clínicos foram descontinuados. Na tentativa de obter melhores

resultados, modificou-se o contra-íon do complexo KP1019, inserindo um íon Na^+ , para adquirir melhor solubilidade, tendo gerado o complexo NKP1339, $\{[\text{Na}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$, que até onde se tem conhecimento continua em fase de testes clínicos.²⁴

FIGURA 1.4-Compostos de rutênio que se destacaram e progrediram em estudos clínicos.^{23,25}



Fonte: Adaptado de Thota, S. *et al*, 2018; Alessio, E., 2017.

Além destes compostos elaborados por Alessio (NAMI-A)^{23,26} e Keppler (KP1019/1339)^{27,28}, alguns outros complexos de rutênio também se destacaram, como é o caso daqueles que constituem os grupos **RAPTA** e **RAED**, em que o centro metálico é estabilizado por um ligante areno coordenado, que traz um outro viés para compostos de coordenação, relevantes quanto à aplicação biológica.²⁹

Os compostos pertencentes à família **RAED**, possuem fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{en})\text{Cl}]^+$, em que en= etilenodiamina, e mostraram-se citotóxicos em diversas linhagens tumorais²⁹, e aqueles pertencentes ao grupo **RAPTA**

apresentam fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$, nos quais PTA= 1,3,5-triaza-7-fosfadamantano, exibindo propriedades antimetastáticas e baixa toxicidade comparado a resultados obtidos para o NAMI-A. Dentro deste grupo de compostos pode-se citar o RAPTA-C, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (Figura 1.4), que exibiu resultados expressivos em modelo animal, com redução no crescimento metastático pulmonar quando administrado em camundongos portadores de carcinoma mamário. Em associação com erlotinibe exibiu efetiva ação antitumoral, com redução do crescimento tumoral.^{25,30}

Ainda a respeito de complexos contendo rutênio(II) como centro metálico, é relevante mencionar os complexos polipiridínicos, os quais são extensivamente estudados para diversas finalidades, investigando-se características fotoquímicas, fotofísicas e mais recentemente fotobiológicas. Um exemplo, é o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})]^{3+}$, no qual bpy= bipyridina, amplamente estudado quanto a estas características, assim como seus derivados, sendo de grande interesse pois a alteração dos ligantes piridínicos na esfera de coordenação do metal, pode ser realizada de forma a se obter complexos com grande variedade de estados excitados. Um composto desse subgrupo de complexos de rutênio(II) que foi integrado a testes clínicos, é conhecido como TLD1433 (Figura 1.4) e possui em sua esfera de coordenação um ligante imidazo[4,5-f][1,10]-fenantrolina anexado a um α -tertienil (3T) e dois ligantes 4,4'-dimetil-2,2'-bipyridina, e é o primeiro complexo fotossensibilizador de rutênio a avançar para testes clínicos com humanos, até onde se tem conhecimento. Este apresenta grande eficácia para o tratamento de câncer de bexiga utilizando terapia fotodinâmica, e atualmente encontra-se em fase de testes clínicos II.³¹

Essa possibilidade de diversificar estruturalmente estes compostos, obtendo respostas biológicas variadas para os complexos de rutênio, impulsionam pesquisas cada vez mais abrangentes a esse respeito, e dentre estas tem-se uma das vertentes exploradas no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), alocado no Departamento de Química da Universidade

Federal de São Carlos. Em linhas gerais, essa linha de pesquisa se propõe ao estudo da relação estrutura-atividade de complexos de coordenação, principalmente complexos fosfínicos de rutênio(II), os quais têm exibido resultados promissores, e que serão melhor detalhados no próximo tópico deste trabalho.

1.3- Compostos de rutênio(II) investigados no LERCI

Na linha de pesquisa referente a complexos de rutênio (II), emprega-se em geral, ligantes fosfínicos e piridínicos na esfera de coordenação, variando-se um e/ou outro destes ligantes, o que confere a possibilidade de estruturas diversas. Além destes utiliza-se ainda ligantes bioativos, de forma a verificar a influência na atividade biológica pré-existente destas espécies orgânicas após coordenação, como por exemplo, utilizando-se ligantes 1,4-naftoquinonas, aciltioureas, mercaptos, entre outros.

O trabalho acerca de complexos de rutênio no LERCI, vem sendo realizado há mais de duas décadas, primariamente em um âmbito estrutural, explorando a riqueza obtida com as diferentes possibilidades estruturais, analisando características eletroquímicas e espectroscópicas destas espécies, o que permitiu consolidar caminhos reacionais como base para sínteses posteriores. Em um cenário mais recente, além de continuar diversificando-se estruturalmente os compostos de interesse, propôs-se como aplicação, avaliação da citotoxicidade *in vitro* em algumas linhagens tumorais histologicamente distintas, assim como em linhagens não tumorais, e em um panorama geral, os complexos têm mostrado relevante citotoxicidade quando comparado a outros compostos na literatura.^{32,33}

O cerne estrutural desses compostos contém, em geral, um ligante mono e/ou difosfínico, utilizado devido a algumas características inerentes a estas espécies. São ligantes neutros, e exibem propriedades de ligação σ doadora e π receptora, o que lhes confere capacidade de estabilizar baixos estados de oxidação, assim como estados de oxidação mais altos dos metais de transição, tornando-os versáteis. É possível modular as propriedades eletrônicas e estéricas

destas espécies, que resultam em ajuste destas propriedades nos complexos finais. Em uma análise inicial é possível verificar que o orbital d do átomo de fósforo tem simetria acessível para uma sobreposição efetiva com orbitais t_{2g} do metal. Além disso, considerando-se a ligação do átomo de fósforo com seus substituintes, em uma ligação P-R, há formação de orbital molecular σ , e também de um orbital σ^* (antiligante), este último também com simetria adequada a sobreposição com orbital do metal, propiciando consequente retrodoação.³⁴⁻³⁷

Os diferentes substituintes que podem ser ligados aos átomos de fósforo moldam a capacidade retrodoativa dos ligantes fosfínicos, uma vez que a maior ou menor eletronegatividade destes substituintes irá gerar uma ligação P-R, com maior ou menor estabilidade, que irá acarretar diferença energética nos orbitais moleculares originados. Quanto maior a estabilidade da ligação P-R, maior instabilidade é obtida no orbital σ^* , causando aumento no lóbulo orbital que está na direção do orbital do centro metálico, favorecendo a retrodoação. Como resultado deste efeito, é possível observar encurtamento no comprimento da ligação P-R, devido a menor repulsão entre o par de elétrons do átomo de fósforo, e o par de elétrons ligado ao substituinte R.^{36,38}

Embasando-se nestes aspectos, o uso de diferentes ligantes fosfínicos torna-se justificável, junto a outras propriedades, como por exemplo, obtenção de compostos mais lipofílicos. A lipofilicidade é um dos parâmetros utilizados na previsão da atividade biológica de um determinado composto, uma vez que, geralmente, uma maior lipofilicidade resulta em maior internalização do composto nas células, considerando a composição lipoproteica da membrana plasmática das células.^{39,40} Os complexos obtidos no grupo LERCI, em geral, exibem $\log P > 0$ (em muitos compostos próximo a um), indicando maior afinidade à fase orgânica com relação à fase aquosa. Isto os difere de complexos classicamente relatados na literatura, como a cisplatina, que apresenta maior hidrofiliabilidade, o que pode ser um diferencial quanto a atividade biológica e/ou mecanismo de ação.⁴¹⁻⁴³

Além dessa observação, realizada ao longo dos anos, é possível ponderar sobre a importância destes ligantes fosfinicos na atividade biológica dos complexos, dos quais fazem parte. Analisando os trabalhos do grupo LERCI, especificamente quanto aos complexos de rutênio, é razoável concluir que as diferentes espécies fosfinicas exercem importante papel na atividade biológica. Por exemplo, ao comparar-se o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Lap})]\text{PF}_6$,⁴⁴ em que bipy= 2,2'-bipiridina e Lap= lapachol, com o complexo $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$,⁴⁵ no qual dppe= 1,2-bis-difenilfosfina(etano), nota-se uma significativa discrepância quanto a citotoxicidade destes compostos na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, em que o primeiro apresenta $\text{IC}_{50(24\text{h})}$ igual a $17,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$, e o segundo $\text{IC}_{50(24\text{h})}$ igual a $1,65 \pm 0,15 \mu\text{M}$, com alteração do ligante bipiridínico por uma difosfina na esfera de coordenação.

Somado aos ligantes fosfinicos, promove-se também coordenação de ligantes N,N-heterocíclicos, que são extensamente utilizados na química bioinorgânica. Da mesma forma que as fosfinas, estes ligantes conferem modulação de várias propriedades dos complexos, como propriedades físico-químicas, fotoquímicas e biológicas, e também auxiliam na maior estabilização estrutural devido a possibilidade de retrodoação dos orbitais do metal para o orbital π^* dos ligantes polipiridínicos. A união destes dois tipos de ligantes (fosfina e bipiridina) permite ampliar as estruturas de complexos de rutênio(II), possibilitando diversas aplicações, dentre estas, potencial biológico.^{46,47}

Por fim, a esfera de coordenação do centro metálico em estudo no LERCI, geralmente é satisfeita com a adição de um ligante reconhecidamente bioativo, conforme já mencionado, e assim torna-se possível um comparativo com a atividade biológica após a coordenação. Dessa forma, alguns cernes estruturais descrevem os compostos estudados no LERCI, sendo estes: $[\text{Ru}(\text{L})(\text{N},\text{N})(\text{P},\text{P})]\text{PF}_6$ ⁴⁸⁻⁵¹; $[\text{Ru}(\text{L})(\text{N},\text{N})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$ ⁴⁹; $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P},\text{P})_2]\text{PF}_6$ ^{52,53}; $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{P},\text{P})]^{53}$ e $[\text{Ru}(\text{L})(\eta^6\text{-areno})(\text{PPh}_3)]^{54}$, nos quais L= ligante aniônico ambidentado (no geral), N,N= ligante polipiridínico; e P,P= ligante difosfínico.

Além destes há outras potenciais estruturas estudadas no grupo, mas de forma minoritária, como por exemplo, compostos do tipo $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{PPh}_3)_2]^{55}$, $[\text{Ru}(\text{L})(\text{P},\text{N})(\text{P},\text{P})]\text{PF}_6^{41}$ e $[\text{Ru}(\text{L})(\text{N},\text{N})_2]\text{PF}_6^{44}$, onde L= ligante aniônico; N,N= ligante bipyridínico; P,N= ligante 2-(difenilfosfina)-piridina; P,P= ligante difosfínico.

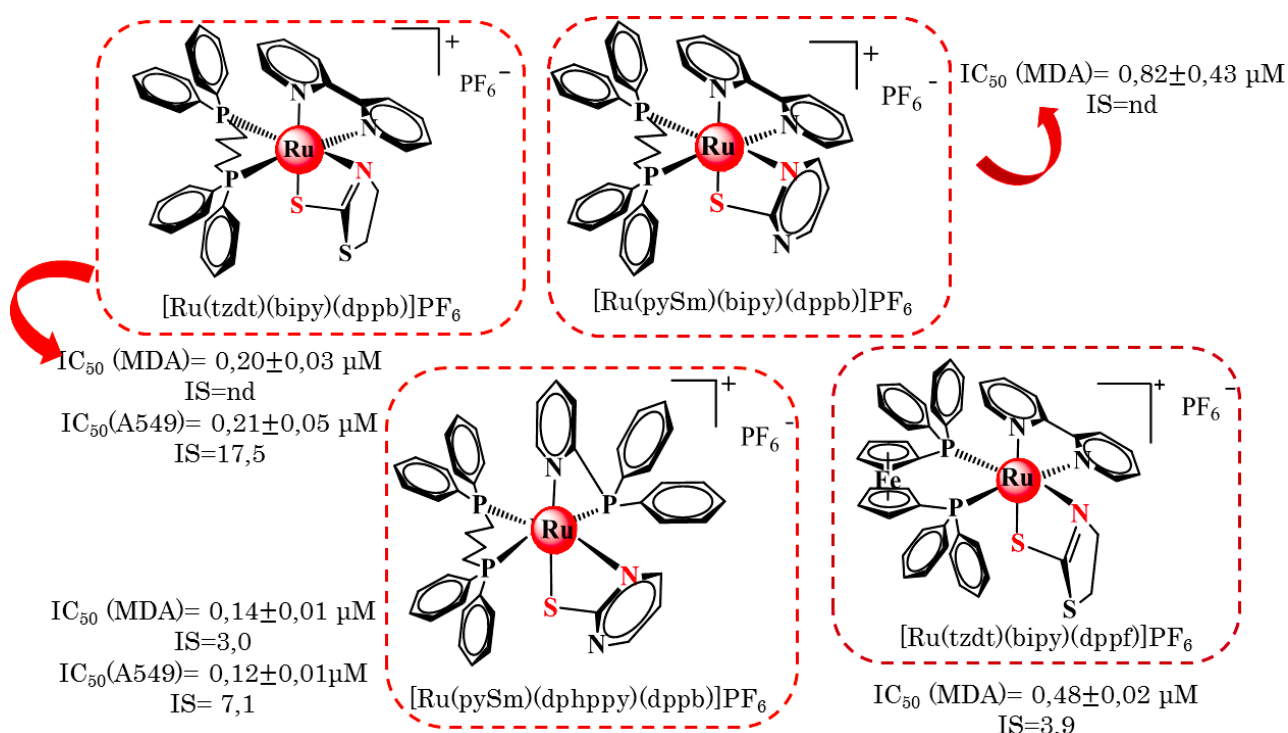
Dentre as possibilidades já estudadas no grupo LERCI, uma das classes de ligantes bioativos mais utilizada foi a de ligantes mercaptos, que podem existir em um equilíbrio ceto-enólico (formas tautoméricas tiol e tiona), ou ainda em forma aniônica. Estes ligantes são de relevante interesse quanto à química de coordenação, principalmente quando se considera a polarizabilidade dos átomos coordenantes, sendo o átomo de enxofre um centro mole, e o átomo de nitrogênio um centro duro, que permite a ligação a íons metálicos mais ou menos polarizáveis.^{34,56}

Além disso, na literatura tanto estes ligantes quanto espécies correlatas, resultam em compostos metálicos que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, entre outras.⁵⁷⁻⁵⁹ Estes ligantes apresentam versatilidade com relação aos possíveis modos de coordenação⁵⁹, entretanto, nos complexos obtidos no LERCI, nas estruturas gerais do tipo $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{N},\text{N})(\text{P},\text{P})]\text{PF}_6^{50,51}$, $[\text{Ru}(\text{NS})_2(\text{P},\text{P})]$, $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{P},\text{P})_2]\text{PF}_6^{53}$, $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{P},\text{N})(\text{P},\text{P})]\text{PF}_6^{41}$, esses ligantes se coordenam preferencialmente de forma bidentada via átomos de nitrogênio e enxofre, na forma aniônica. Esse modo de coordenação pode ser observado nos complexos apresentados na Figura 1.5, com alguns valores de citotoxicidade também relatados.

Ao comparar-se o complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ com o $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ é possível observar a influência do ligante mercapto nas propriedades dos compostos, e comparando com o complexo $[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ a influência do ligante fosfínico. Apesar de ser observada alguma diferença, todos são bem citotóxicos. Contrastando o complexo $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e o $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dpophpy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, com alteração

do ligante piridínico por um ligante que se assemelha tanto a uma monofosfina, quanto a ligante piridínico, avalia-se que a modificação resultou em valor de IC_{50} baixo, apesar de ambos serem significativamente citotóxicos.

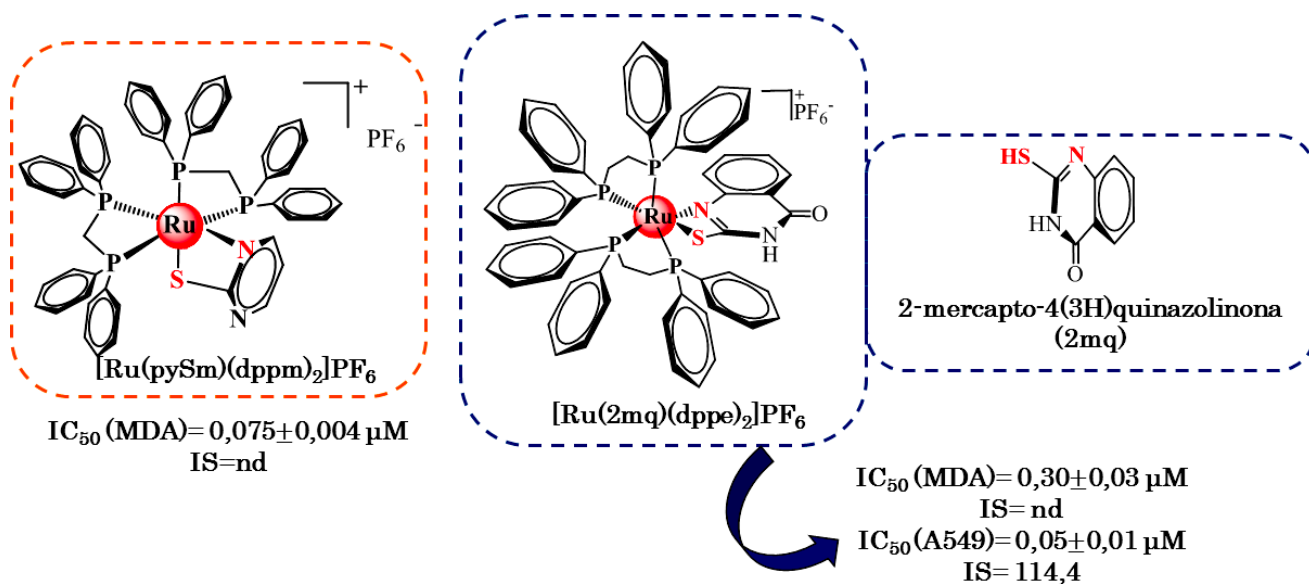
FIGURA 1.5-Complexos de rutênio (II) contendo ligantes mercapto relatados pelo LERCI, e respectivos valores de citotoxicidade (tempo de incubação 48h) em linhagem MDA-MB-231 e A549, com valores de seletividade (IS) relacionados a linhagens não tumorais.^{41,42,51,60,61}



Fonte: Adaptado de teses e artigos publicados pelo LERCI.

Por fim, o complexo contendo dois ligantes difosfínicos, $[Ru(pySm)(dppm)_2]PF_6$, mostrou maior citotoxicidade, como também observado para o complexo $[Ru(2mq)(dppe)_2]PF_6$, representados na Figura 1.6, este último exibindo grande seletividade ($IS=114,4$) frente à linhagem tumoral de pulmão A549. Enfatiza-se em ambos os casos, o potencial biológico obtido com a coordenação de ligantes fosfínicos, ligantes este que apresentam citotoxicidade relevante, mas em menores níveis com relação aos compostos de coordenação resultantes.⁶²

FIGURA 1.6-Representação da estrutura dos complexos $[\text{Ru}(\text{pySm})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{2mq})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, dados de citotoxicidade e índice de seletividade (IS) relacionados.^{53,63}



Fonte: Adaptado de Da Silva, Monize M. *et al.*, 2021; Velozo-Sá, V. S. *et al.*, 2019.

Desse modo, no presente trabalho propôs-se ao estudo em um primeiro momento, da modificação do ligante polipiridínico, e posteriormente, estruturas muito similares àquelas já relatadas no grupo, para fins de comparação, como será relatado no próximo tópico, no qual se apresenta de forma mais detalhada o assunto em pauta.

1.4- Enunciado da hipótese do presente trabalho

Em acordo com uma das linhas de pesquisa empregada no LERCI, o presente trabalho teve como principal proposta avaliar a influência de ligantes N,N-heterocíclicos no cerne estrutural de complexos fosfínicos de Ru(II). Assim utilizou-se o ligante 1,10-fenantrolina que é empregado em compostos do grupo, bem como a inserção do ligante 1-(piren-2-il)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10-fenantrolina], com nomenclatura abreviada neste trabalho como pyphen, cuja estrutura está representada na Figura 1.7. Este último, apresenta uma porção fenantrolina (que é frequentemente utilizada em compostos polipiridínicos), e

uma porção pireno, ligados por um anel imidazol. O uso desse ligante na literatura, se baseia no fato de compostos derivados de fenantrolina apresentarem significativa citotoxicidade em determinadas linhagens celulares.

Além disso, relata-se que a inserção destes ligantes na esfera de coordenação de íons metálicos, resulta em compostos promissores como potenciais metalofármacos, obtendo-se em alguns casos, maior citotoxicidade com relação às espécies orgânicas isoladamente.⁶⁴⁻⁶⁶

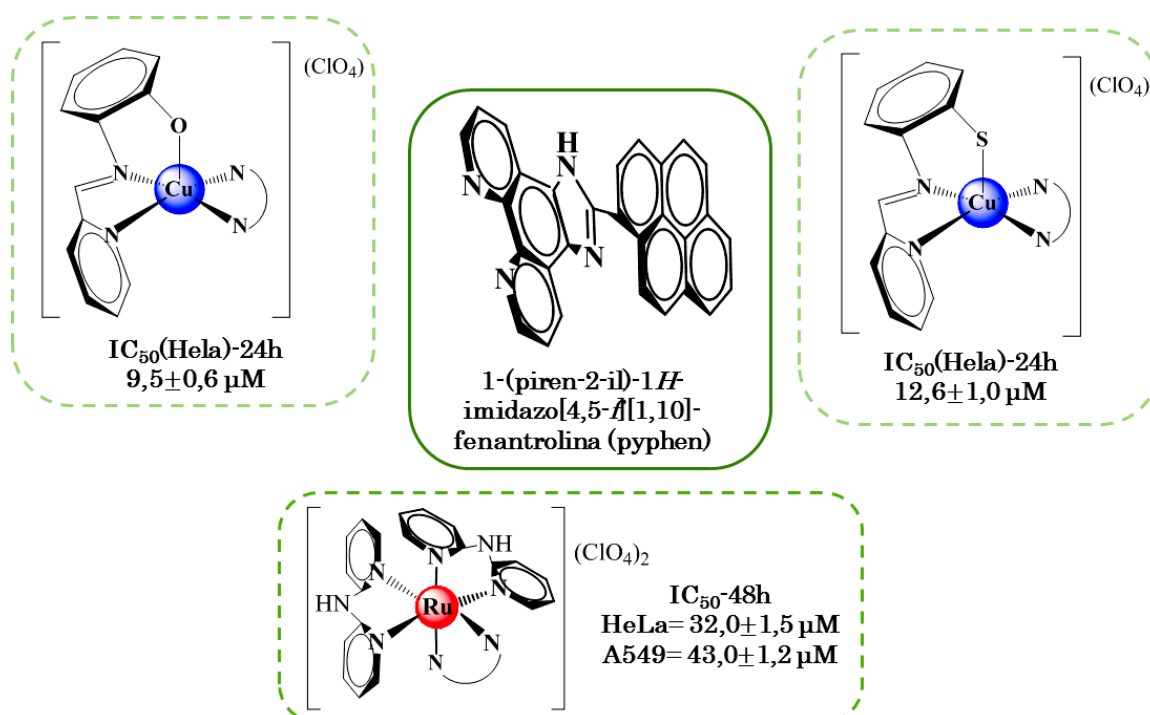
A espécie pyphen contém em sua estrutura porções que são exploradas de forma a se obter compostos promissores quanto à atividade biológica, no âmbito da química bioinorgânica. A porção fenantrolina é utilizada buscando beneficiar-se do potencial biológico, assim como, das características de ligantes polipiridínicos citadas na parte introdutória.⁶⁷ A porção pireno, ligada à fenantrolina, tem sido investigada em diversos trabalhos quanto às suas propriedades fotobiológicas, em que a irradiação em determinados comprimentos de onda resultaram em maior citotoxicidade dos compostos, propiciando alternativa de aplicação em uma terapia fotodinâmica, além de que compostos derivados de pireno possuem versátil potencial biológico.^{68,69}

Como exemplo de compostos promissores contendo o ligante pyphen, cita-se os relatados por Musib e colaboradores, complexos de cobre cujas estruturas estão representadas na Figura 1.7, e por Devi e colaboradores, que estudaram complexo de rutênio. Com relação aos complexos de cobre, os autores relatam melhora na atividade após fotoexposição.

Além disso, há o fato de que a coordenação deste ligante poderia acarretar distinta interação com biomoléculas, principalmente, ao considerar-se o DNA. Essa hipótese se baseia em dados já reportados na literatura, de forte interação com essa biomolécula, mas em sistemas em que o centro metálico tem ligantes polipiridínicos em toda sua esfera de coordenação. Como o sistema deve ser considerado em toda sua compleição, torna-se interessante verificar se essa interação se daria da mesma forma no novo sistema proposto, contendo o ligante

pyphen (que propiciaria determinada planaridade), um ligante fosfinico, e ligantes mercaptos. Dessa forma, a questão inicialmente colocada foi, como a inserção desta espécie fenantrolina modificada poderia gerar diferentes resultados tanto na caracterização estrutural destes complexos frente a estruturas similares do próprio grupo, bem como na interação com biomoléculas e ainda, com relação ao potencial biológico.

FIGURA 1.7-Representação estrutural do ligante pyphen (centro) e compostos que o contém em sua esfera de coordenação, onde N,N equivale à coordenação deste ligante, e resultados de citotoxicidade em determinadas linhagens.^{68,70}



Fonte: Adaptado de Musib, D. *et al.*, 2018; Devi, C.S. *et al.*, 2014.

A fim de ter um comparativo das atividades citotóxicas de compostos similares aos propostos com o ligante pyphen, como supracitado, empregou-se o ligante 1,10-fenantrolina, para aquisição de compostos análogos (em que a diferença reside na porção pireno do ligante pyphen). Adicionalmente, um perfil comparativo com os complexos estruturalmente similares já avaliados pelo grupo também foi realizado.

Pretendeu-se também avaliar diferentes ligantes mercaptos, com heteroátomos distintos e substituintes ligados aos anéis. Por fim, este conjunto de dados, possibilitará avaliar a relevância do grupo polipiridínico, com algumas alterações mais drásticas, em complexos de cerne Ru/difosfina/mercapto. Para melhor exemplificar os compostos pretendidos, estes se encontram esquematizados na Figura 1.8, aqueles pretendidos com a fenantrolina modificada constituindo a Série 1, e com a 1,10-fenantrolina, configurando a Série 2, de forma a mostrar as espécies precursoras e suas diferenças. Na Figura 1.9, detalha-se as espécies constituintes de cada série de complexos, que serão enunciadas nos tópicos posteriores de acordo com os códigos que constam nesta figura.

FIGURA 1.8-Representação dos precursores e ligantes utilizados neste trabalho, e a divisão nas duas séries de compostos a serem comparados.

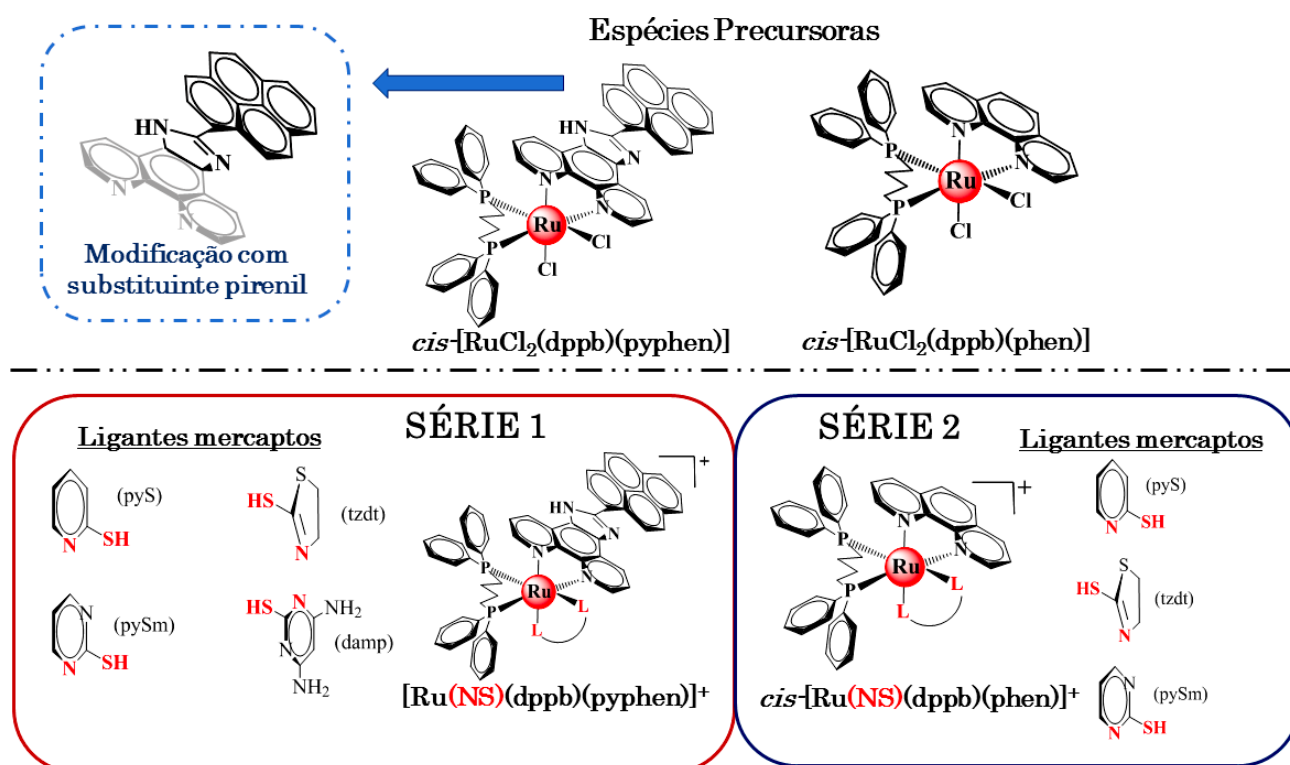
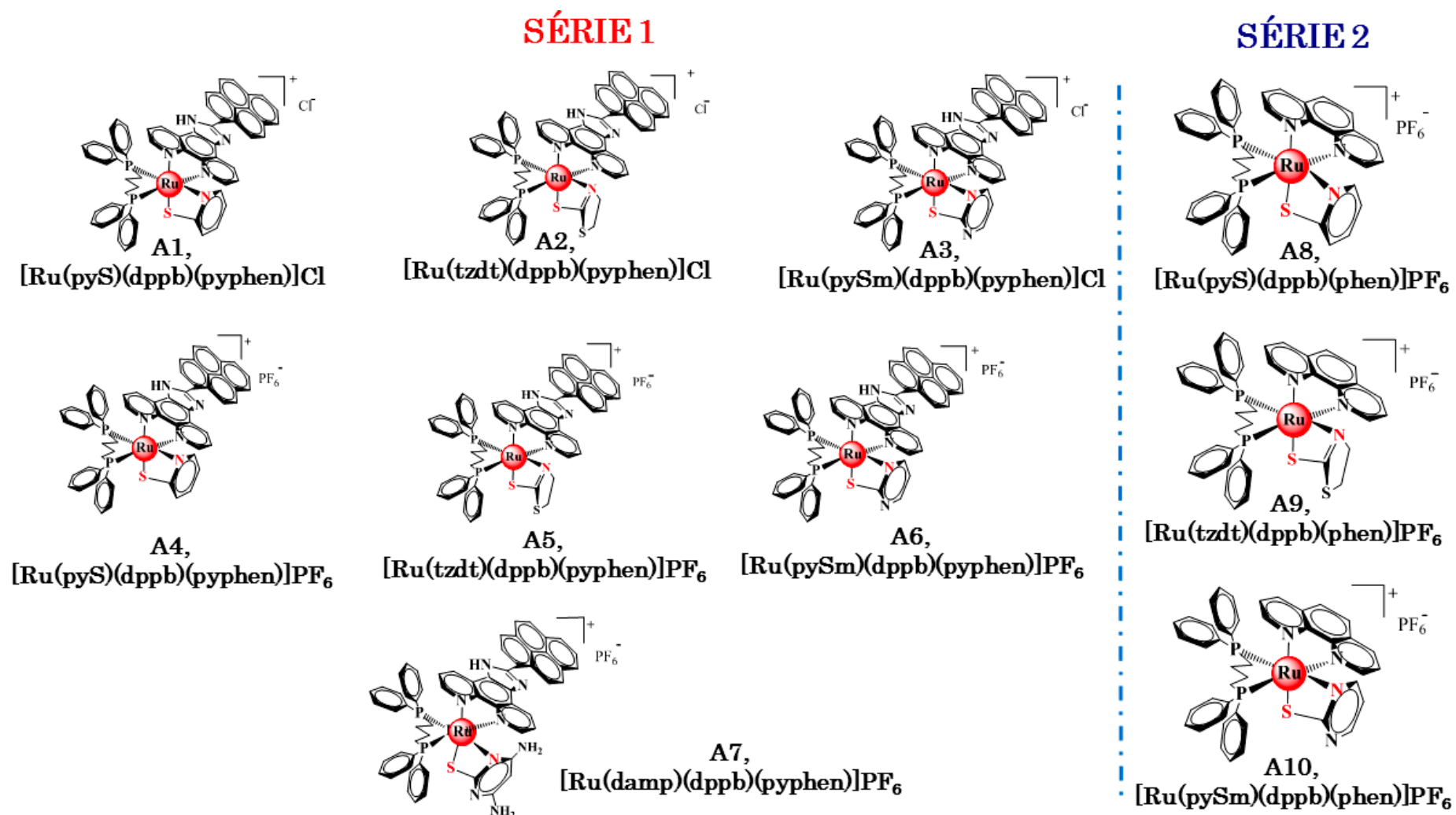


Figura 1.9- Estruturas dos complexos de ambas as séries, com os respectivos códigos e fórmulas, de acordo com os ligantes



2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Em concordância com a hipótese explicitada no tópico anterior, no presente trabalho pretendeu-se a síntese e caracterização de complexos fosfinicos de rutênio(II), contendo o ligante 1,4'-*bis*-difenilfosfina(butano) e ligantes mercaptos. Como diferencial entre as duas séries de compostos, propôs-se o uso do ligante fenantrolina ou fenantrolina modificada (pyphen), e ainda avaliação da atividade citotóxica *in vitro* de ambas as séries. Para investigação de possíveis alvos biomoleculares, se planejou estudos de interação com biomoléculas, como forma de responder a possíveis mecanismos que se traduzem na morte celular. Para alcançar estes objetivos, pontuou-se alguns objetivos específicos, que são descritos a seguir.

2.2- Objetivos Específicos

- ❖ Sintetizar e caracterizar os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{X}$ e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$, nos quais $\text{X} = \text{Cl}^-$ ou PF_6^- ; NS= ligantes mercaptos; dppb= 1,4'-*bis*-difenilfosfina(butano); pyphen= 1-(piren-2-il)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10-fenantrolina]; e phen= 1,10-fenantrolina;
- ❖ Analisar a possibilidade de interação dos complexos com biomoléculas, sendo estas, o ácido desoxirribonucleico (DNA), enzima topoisomerase II α e proteína albumina sérica humana (HSA);
- ❖ Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos complexos de ambas as séries frente à diferentes linhagens celulares, linhagens de tecido epitelial mamário (linhagem tumoral de mama triplo-negativo MDA-MB-231, linhagem tumoral de mama MCF-7 estrogênio positivo, linhagem não tumoral de mama MCF-10A), linhagens referentes a tecido pulmonar (linhagem de carcinoma pulmonar A549, e linhagem celular fibroblástica de pulmão MRC-5), e por fim, linhagens de tecido epitelial de ovário

(linhagem tumoral de ovário A2780, e linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780*cis*);

- ❖ Avaliar a influência de compostos selecionados dentre os sintetizados, na morfologia celular das linhagens MDA-MB-231, MCF-10A e A2780*cis*, o efeito na formação de colônias e na distribuição do ciclo celular das linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*;
- ❖ Avaliar efeito de complexos escolhidos na cascata metastática, por meio de ensaios relacionados à migração celular, nas linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*; e
- ❖ Avaliar a possibilidade de via de morte celular ser induzida por apoptose, por ensaio de citometria de fluxo, em linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Obtenção da atmosfera inerte

As sínteses foram realizadas sob atmosfera de argônio, após passagem do gás, de procedência Praxair, através de um sistema de colunas constituídas por sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador BTS-R-3-11 (Fluka Chemika) aquecido a 60 °C (para constante ativação do catalisador), para exclusão de oxigênio e/ou água que pudessem constituir o gás comercial.

3.2- Solventes

Foram utilizados alguns solventes, dentre os quais: acetona (Synth P.A.), diclorometano (Synth P.A. e Neon P.A.), éter dietílico (Synth P.A. e Qhemis P.A.), tolueno (Synth P.A. e Neon), hexano (Synth P.A.), metanol (Synth P.A.), ácido acético (Synth P.A.), etanol (Synth P.A.) e dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich P.A. e Êxodo Científica). Como solvente deuterado foi utilizado DMSO- d_6 de procedência Sigma-Aldrich.

3.3- Reagentes Químicos

Os reagentes serão citados conforme a etapa do trabalho em que foram utilizados, sendo empregados sem purificação prévia, avaliando-se a pureza, quando possível, por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

- ✚ Síntese do ligante pyphen: 1,10-fenantrolina (Sigma-Aldrich), brometo de potássio (Neon P.A.), ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich P.A.), ácido nítrico (Sigma Aldrich), carbonato de sódio anidro (Êxodo científica P.A.), 1-pireno-carboxaldeído (Sigma-Aldrich), acetato de amônio (Sigma-Aldrich), e hidróxido de amônio (Synth P.A.);
- ✚ Síntese dos complexos: Tricloreto de rutênio $RuCl_3 \cdot nH_2O$ (Sigma-Aldrich), trifenilfosfina (Sigma-Aldrich), 1,4-*bis*-difenilfosfina(butano) (Sigma-Aldrich), ligantes 2-mercaptopiridina (pyS), 2-mercaptopirimidina (pySm),

2-mercaptotiazolina (tzdt) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina(damp) de procedência Sigma-Aldrich;

- ✚ Caracterização dos compostos: Brometo de potássio (Merck, P.A.) e perclorato de tetrabutylamônio (PTBA, Fluka Chemical).
- ✚ Ensaios com biomoléculas *in vitro*: ácido desoxirribonucleico do timo de bezerro (CT-DNA), DNA plasmidial pBR322, Bis-benzimida Hoechst 33258, albumina sérica humana (HSA), trizma-base, trizma-HCl e brometo de etídio, todos de procedência Sigma-Aldrich; e
- ✚ Ensaios biológicos: Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM e DMEM-F12, Vitrocell), meio de cultura Instituto Memorial do parque Roswell (RPMI-1640, Vitrocell), soro de cavalo (HS, Vitrocell), Insulina de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich), fator de crescimento epidérmico (EGF, Thermo Fisher Scientific), Hidrocortisona (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina (Vitrocell), tripsina (Vitrocell), soro fetal bovino (FBS,Vitrocell), tampão fosfato (constituição NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄-Sigma Aldrich), azul de tripano(Sigma-Aldrich), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich), Mitomicina C (Sigma-Aldrich), Paraformaldeído (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (GBiosciences), Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific), albumina de soro bovina (Sigma-Aldrich), cristal violeta (Synth P.A.), corante panótico (Newprov), RNase A (Sigma-Aldrich), iodeto de propídio (BD Biosciences), Kit-Anexina V (BD Biosciences), 7-aminoactinomicina D (7-AAD-Invitrogen™ -Thermo Fisher Scientific).

3.4- SÍNTESES

3.4.1- SÍNTESE DO LIGANTE

3.4.1.1- Síntese do ligante 1-(piren-2-il)-1H-imidazo[4,5-f][1,10-fenantrolina] (pyphen)

A síntese do ligante pyphen foi realizada a partir de procedimento descrito na literatura.⁶⁸ Uma mistura de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (0,300 g; 1,4 mmol), 1-pirenocarboxaldeído (0,394 g; 1,7 mmol), acetato de amônio (1,98 g; 0,026 mol), e ácido acético (8,58 mL; 0,15 mol) foi mantida em refluxo por 5 horas. Após o arrefecimento do sistema, promoveu-se a diluição da mistura reacional em aproximadamente 40 mL de água destilada, obtendo-se precipitado amarelo. Posteriormente, adicionou-se solução concentrada de hidróxido de amônio, até que houvesse a neutralização, e maior precipitação. Realizou-se a filtração, e lavou-se com água. A purificação foi feita utilizando sistema éter/água, com três lavagens, e após a secagem obteve-se um sólido amarelo. Rendimento quantitativo: 0,410 g; 68,3%.

3.4.2- SÍNTESE DOS COMPLEXOS PRECURSORES

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

A síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ foi realizada conforme descrito por Wilkinson e Stephenson.⁷¹ Em 100 mL de metanol previamente desaerado, foi adicionado o sal $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (0,50 g; 2,4 mmol), e o sistema permaneceu sob refluxo por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se o ligante trifenilfosfina (PPh_3) (2,87 g, 10,85 mmol) à solução, sendo o sistema mantido sob aquecimento (refluxo) por 3 horas. O sólido marrom escuro obtido foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com metanol quente e desaerado, seco a vácuo. Rendimento: 90%; 2,1 g.

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

O complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{PPh}_3)]$ foi sintetizado conforme procedimento relatado por Jung e colaboradores.⁷² O complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ (1,10 g; 1,15

mmol) foi adicionado a um balão contendo diclorometano (30 mL) previamente desaerado, estando o sistema sob agitação magnética. Em seguida, iniciou-se a adição da difosfina dppb (0,49 g; 1,15 mmol), que foi realizada de forma lenta para não resultar na formação de precipitado durante a reação, que é evidência da formação do complexo binuclear $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2(\mu\text{-dppb})$. Após a adição da difosfina, o sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos, e posteriormente, foi realizada uma filtração para separação de possível precipitado gerado. Após redução da solução resultante, precipitou-se o complexo com etanol previamente desaerado, sendo o sólido obtido, filtrado e lavado com etanol e hexano quentes, desaerados. Rendimento: 70%; 0,69 g.

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

O complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\mu\text{-dppb})]$ foi preparado a partir da espécie $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ (0,5 g; 0,52 mmol), o qual foi adicionado em balão contendo 200 mL de hexano previamente desaerado, e posteriormente, adicionou-se o ligante 1,4-*bis*-(difenilfosfina)butano (0,67 g; 1,57 mmol). O sistema foi mantido sob refluxo por seis horas, e após este tempo desligou-se o aquecimento, promovendo-se filtração a quente, lavando-se o sólido verde com hexano quente desaerado, e secando o sólido sob vácuo. Essa síntese foi realizada de acordo com procedimento descrito por Bressan e Rigo.⁷³ Rendimento: 90%; 0,770 g.

3.4.2.4- Síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$ (CPP)

A síntese do complexo denominado abreviadamente como CPP foi realizada seguindo procedimento experimental relatado por Queiroz *et al.*, com algumas modificações.⁷⁴ Aproximadamente 60 mL de tolueno foram desaerados overnight em um Schlenk, e posteriormente adicionou-se o complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{PPh}_3)]$ e o ligante pyphen, obtendo-se inicialmente uma coloração verde. Após algum tempo sob agitação e aquecimento (refluxo), a coloração mudou de verde para marrom e posteriormente para vermelho. Após 48 horas

promoveu-se uma filtração (sendo obtido um sólido diferente daquele de interesse). O filtrado foi recuperado e o solvente reduzido, e com aproximadamente 8 mL de solvente foi realizada a precipitação com éter etílico, previamente desaerado. Este segundo sólido obtido, de coloração laranja, é o produto pretendido na síntese, e foi lavado com éter e hexano quente, respectivamente, e previamente desaerados. Rendimento quantitativo: 80,6%; 0,570 g;

3.4.2.5- Síntese do complexo $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(\text{phen})]$ (cis-phen)

A síntese da espécie $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{phen})]$ foi executada em conformidade com procedimento já descrito na literatura.⁷⁴ Brevemente, desaerou-se 100 mL de tolueno overnight em um Schlenk, no qual foi adicionado o composto $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\mu\text{-dppb})]$ (0,5 g; 0,31 mmol) e 2,1 equivalentes do ligante fenantrolina (0,117 g; 0,65 mmol). O sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 48 horas, e posteriormente filtrou-se o precipitado com o sistema ainda aquecido. O sólido de coloração vermelha obtido foi lavado com tolueno a quente e éter etílico previamente desaerados, e posteriormente seco sob vácuo. Rendimento quantitativo: 81,0%; 0,391 g.

3.4.3- Síntese dos complexos das Séries 1 e 2

3.4.3.1- Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{X}$, $\text{X}=\text{Cl}^-$ ou PF_6^- (SÉRIE 1)

Adicionou-se os respectivos ligantes mercaptos [2-mercaptopiridina (pyS), 2-mercaptotiazolina (tzdt), 2-mercaptopirimidina (pySm) e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp)] (0,094 mmol) em uma mistura de diclorometano/metanol (30 mL, v/v 1:1), seguido da adição do precursor *cis*-CPP (80 mg; 0,078 mmol), com exceção das reações com o ligante tzdt e damp, para as quais anterior à adição do precursor, foi acrescentado trietilamina em

quantidade equimolar ao ligante (0,094 mmol; 13 μ L). Nas reações que resultariam em espécies contendo o íon PF_6^- como contra-íon, adicionou-se o sal KPF_6 após adição da espécie precursora, de forma a obter-se dois equivalentes molares com relação à espécie CPP (0,16 mmol; 29,4 mg). Na obtenção de todos os complexos, os sistemas foram mantidos sob agitação e refluxo por 24 horas, e após arrefecimento, promoveu-se redução dos solventes, reduzindo até a secagem no caso dos complexos contendo contra-íon cloreto, com posterior adição de pequena quantidade de diclorometano, onde os complexos permaneceram em grande parte na forma sólida, permitindo a filtração. Os complexos contendo contra-íon hexafluorofosfato precipitaram na pequena quantidade de metanol restante após redução do solvente (aproximadamente 3 mL). Obtendo-se precipitação dos complexos, foi realizada filtração e lavagem, com 3×15 mL de água destilada quente e aproximadamente 5 mL de éter dietílico, previamente desaerado, com secagem dos sólidos sob vácuo. Rendimentos: **A1**, **[Ru(pyS)(dppb)(pyphen)]Cl**: 43% (37 mg); **A2**, **[Ru(tzdt)(dppb)(pyphen)]Cl**: 40% (34 mg); **A3**, **[Ru(pySm)(dppb)(pyphen)]Cl**: 42% (36 mg); **A4**, **[Ru(pyS)(dppb)(pyphen)]PF₆**: 53% (50 mg); **A5**, **[Ru(tzdt)(dppb)(pyphen)]PF₆**: 68% (65 mg); **A6**, **[Ru(pySm)(dppb)(pyphen)]PF₆**: 69% (65 mg); **A7**, **[Ru(damp)(dppb)(pyphen)]PF₆**: 70% (68 mg).

3.4.3.2- Síntese dos complexos **[Ru(NS)(dppb)(phen)]PF₆** (SÉRIE 2)

Os ligante mercaptos [2-mercaptopiridina (pyS) e 2-mercaptopirimidina (pySm)], foram adicionados em uma solução contendo diclorometano/metanol (30 mL; v/v 1:1) previamente desaerado, e o ligante 2-mercaptotiazolina (tzdt) em metanol (20 mL) desaerado, em quantidade igual a 1,2 equivalente molar considerando o precursor (0,16 mmol), e com relação ao ligante tzdt foi adicionado trietilamina em quantidade equimolar a esse (0,16

mmol; 22 μ L). Seguiu-se com adição do complexo precursor *cis*-phen (100 mg; 0,13 mmol) e sal KPF_6 (48 mg, 0,16 mmol), e o sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 24 horas para os ligantes pyS e pySm e por 2 horas para o ligante tzdt, além de acondicionado sob atmosfera de argônio sendo realizado em balões de fundo redondo de duas juntas. Subsequentemente, o solvente foi reduzido até aproximadamente 3 mL, observando-se precipitação de sólidos com colorações variando de amarelo a laranja. Procedeu-se com a filtração, e lavagem com 3 $\times$ 15 mL de água destilada quente, e aproximadamente 5 mL de éter dietílico desaerado, secando os sólidos finais sob vácuo. Rendimentos: **A8**; **[Ru(pyS)(dppb)(phen)]PF₆**: 65% (81 mg); **A9**; **[Ru(tzdt)(dppb)(phen)]PF₆**: 69% (86 mg); **A10**; **[Ru(pySm)(dppb)(phen)]PF₆**: 74% (92 mg).

3.5- Instrumentação empregada nos experimentos

3.5.1- Análise Elementar

Foi empregado um analisador CHNS modelo EA 1108 da FISIONS, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química da UFSCar, para determinação das composições elementares referentes a carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre.

3.5.2- Condutimetria

Foi utilizado um condutivímetro micronal, modelo B-330, com célula de Pt. As medidas foram realizadas a partir de soluções 1 mmol L⁻¹ dos complexos, em dimetilsulfóxido, e os resultados obtidos foram comparados com valores da literatura a fim de avaliar o tipo de eletrólito gerado pelos complexos em solução.

3.5.3- Difração de Raios X

As coletas de difração de raio X de todos os complexos metálicos descritos nesta tese foram realizadas em temperatura ambiente (298 K) empregando um difratômetro Rigaku XtaLAB mini, com radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda =$

0,71073 Å), equipado com detector de área do tipo CCD. Os dados de difração obtidos para o ligante pyphen foram obtidos em um difratômetro Rigaku Synergy-S, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54184$), equipado com detector de área HyPix-6000HE, em baixa temperatura (100 K). Os cálculos dos parâmetros iniciais da célula unitária, planejamento das coletas, integração e redução dos dados foram realizados usando o software CrysAlisPro.⁷⁵ As representações das moléculas e tabelas de dados cristalográficos foram geradas utilizando os programas OLEX² e MERCURY.^{76,77} As estruturas foram resolvidas com o programa SHELXT⁷⁸ usando métodos diretos, sucessivos mapas de Diferença de Fourier, que permitiram a localização dos átomos não hidrogênicos. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados considerando o efeito de anisotropia. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL.⁷⁹ As medidas foram realizadas nos difratômetros supracitados, no Instituto de Física de São Carlos, na Universidade de São Paulo (IFSC-USP São Carlos), mediante colaboração dos Prof. Dr. Eduardo Castellano, Prof. Dr. Javier Ellena e Dr. João Honorato.

3.5.4- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para obtenção dos espectros de ressonância foi utilizado o equipamento Bruker 9,4 Tesla modelo NanoBay, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). Foram obtidos espectros 1D (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) e 2D (COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C e NOESY ^1H - ^1H) à temperatura ambiente, utilizando DMSO- d_6 como solvente deuterado. Para aquisição dos espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, os compostos foram solubilizados em metanol ou diclorometano, com uso de tubo capilar contendo D_2O .

3.5.5- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Um espectrofotômetro HEWLETT PACKARD DIODE ARRAY-8452A, que opera de 190 a 800 nm, foi empregado para aquisição dos espectros na região do ultravioleta-visível. As análises foram realizadas utilizando dimetilsulfóxido, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Avaliou-se uma faixa de concentrações para cada complexo, que permitiu elaboração de curvas analíticas, a partir das quais pode-se mensurar a absortividade molar associada a cada banda dos espectros.

3.5.6- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Utilizou-se os espectrofotômetros Bomem modelo MB-Séries e FT-IR Shimadzu modelo IR-Prestige21, com resolução de 4 cm^{-1} , para obtenção de espectros de absorção na região do infravermelho para a Série 1 ($[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{X}$) e Série 2 ($[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$), respectivamente. Os espectros foram adquiridos na região entre 4000 e 380 cm^{-1} , tendo sido as análises realizadas com as amostras sólidas, em forma de pastilhas, diluídas em KBr (1:140 m/m).

3.5.7- Estudo eletroquímico

Um potenciostato/galvanostato EGeG Princeton Applied Research Model 262A foi utilizado para aquisição dos voltamogramas cíclicos dos complexos de rutênio estudados. Uma célula eletroquímica com sistema de três eletrodos foi empregada, um eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de referência, eletrodos de platina como contra-eletrodo e eletrodo de trabalho. As análises foram realizadas em solução de $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutylamônio (PTBA, eletrólito suporte) em diclorometano, considerando soluções de concentração 1 mmol L^{-1} dos complexos. A faixa de varredura variou de 0 a 1,6 V, no geral, com velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} .

3.5.8- Medidas de fluorescência

Para os experimentos em que empregou-se medidas de fluorescência (ensaio de interação com albumina de soro humana e interação com DNA por deslocamento de Hoechst), foi utilizado o equipamento Hybrid Multi-Mode Microplate Reader Synergy™ H1 da Biotek®, que permitiu leituras em placas de 96 poços, da absorbância e fluorescência das soluções nas diferentes concentrações utilizadas, como será mencionado adiante.

Para os experimentos de determinação se os compostos possuem algum potencial de fluorescência, utilizou-se fluorímetro Fluorolog 3-HORIBA, modelo FL3-P, do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto.

3.5.9- Espectrometria de Massas

As análises foram realizadas em um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com interface electrospray (ESI), alocado no laboratório de produtos naturais do Departamento de Química da UFSCar, operado no modo positivo. Os parâmetros empregados para ionização podem ser analisados no Apêndice-Parte V, na parte referente aos Materiais e Métodos.

Para análise dos compostos, preparou-se uma solução de 1 mg de cada complexo analisado, em 1000 µL de acetonitrila (grau LC-MS), e posteriormente, diluiu-se para 5 ppm. A fase móvel foi constituída de acetonitrila (grau LC-MS, e 0,1% de ácido fórmico) e H₂O ultrapura (0,1% de ácido fórmico), em modo isocrático de eluição 95:05 (acetonitrila:H₂O). A vazão utilizada foi de 0,300 mL min⁻¹, volume de injeção igual a 3 µL e taxa de varredura de 3 espectros/s. Os dados foram processados no software MassHunter Workstation versão B.08.00, Agilent. O erro foi calculado considerando a massa teórica e razão massa/carga adquirida dos respectivos espectros MS, monitorando-se uma faixa entre 120 a 1500 Da.

3.6. ENSAIOS REFERENTES À ESTABILIDADE, COEFICIENTE DE PARTIÇÃO, INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS E ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.6.1- Análise da Estabilidade

A estabilidade dos complexos em meio aquoso foi avaliada por meio da técnica de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ utilizando os seguintes sistemas: DMSO; DMSO/Tampão Trisma-HCl, DMSO/meio de cultura DMEM e DMSO/Meio de cultura RPMI. Para maior consonância com os experimentos em que estes resultados serão utilizados (estudos de interação com biomoléculas e ensaios biológicos), os espectros foram registrados em 0 e 24 h para o sistema DMSO/Tampão Trisma, e em 0, 24 e 48 h e/ou 72 h para as outras configurações.

Para ambas as séries de compostos a concentração utilizada foi de aproximadamente 8 mmol L^{-1} em todas as configurações de solventes mencionadas. Para os compostos da Série 1 o percentual do respectivo meio aquoso utilizado variou de 8-15%, enquanto para a Série 2 foi possível utilizar esse percentual em aproximadamente 33%, e todos os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram coletados com 2K de scans (2048 ns).

3.6.2- Estudos de interação com biomoléculas

3.6.2.1- Interação com DNA

Para estudo de interação com DNA, utilizou-se três técnicas distintas e complementares: eletroforese em gel de agarose, viscosidade e deslocamento do Hoechst 33258. Com relação à primeira técnica foi utilizado DNA plasmidial pBR322, cuja concentração foi determinada em equipamento Nanodrop e a devida diluição para obtenção da concentração de interesse foi realizada com adição de água ultrapura. As análises referentes a viscosidade e deslocamento da sonda Hoechst 33258 empregaram o ácido desoxirribonucleico do timo de bezerro CT-DNA, dissolvido em tampão trisma-HCl ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Tris base, $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Tris-HCl e 50 mmol L^{-1} de NaCl, pH 7,4). Soluções estoques de DNA foram

preparadas para cada série de complexos, obtendo-se a concentração dessas soluções por meio de leitura espectrofotométrica, utilizando o valor de absorvância do DNA em 260 nm, sabendo que $\epsilon = 6600 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, nesse comprimento de onda.

3.6.2.1.1-Eletroforese em gel de agarose

A partir da concentração da solução estoque de DNA plasmidial, procedeu-se com a diluição para obtenção da concentração de interesse. Foram preparadas soluções de DNA plasmidial de concentração $57,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Série 1) e $321,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Série 2), de forma que ao pipetar-se determinada quantidade dessas soluções fossem obtidas as seguintes concentrações em $10 \mu\text{L}$ de solução (solução adicionada ao poço): $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Série 1) e $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Série 2). Foram preparadas soluções estoques dos compostos de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ em dimetilsulfóxido, a partir das quais foram preparadas três outras soluções, também em dimetilsulfóxido, de forma que ao pipetar-se $1 \mu\text{L}$ de cada solução fossem obtidas as concentrações de interesse, considerando volume final de $10 \mu\text{L}$, perfazendo uma porcentagem de 10% de DMSO, na realização deste experimento. Completou-se o volume para $10 \mu\text{L}$ com solução de tampão Trisma-HCl, ressaltando-se que no poço onde não há adição de composto (controle negativo), foi adicionado $1 \mu\text{L}$ de DMSO. Todos os volumes para preparo destas soluções estão dispostos no Apêndice na seção referente a Parte Experimental.

Após preparo das soluções, estas foram mantidas em thermo-shaker, sob as seguintes condições: 200 rpm, 37°C por 18 horas. Após incubação, as amostras foram submetidas a centrifugação a 500 rpm por 2 minutos, e posteriormente, foi adicionado a cada uma, $1 \mu\text{L}$ de tampão de amostra (constituído de sacarose, glicerol e azul de bromofenol). Este tampão foi adicionado para aumentar a densidade das amostras, facilitando com que estas permaneçam nos poços do gel, assim como facilitar a visualização, já que o azul de bromofenol acrescenta cor ao tampão, e conseqüentemente à amostra,

propiciando melhor visualização na adição ao poço, bem como durante a corrida eletroforética.

Para a corrida eletroforética preparou-se um gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (0,45 mol L⁻¹ Tris-HCl; 0,45 mol L⁻¹ ácido acético; 10 mmol L⁻¹ de EDTA; pH 8,0). A um dos poços dos géis foi adicionado um marcador de massa molecular (*ladder*), que permite estimar visualmente o tamanho dos fragmentos do DNA, uma vez que é constituído por uma mistura de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. As amostras foram adicionadas aos outros poços dos géis, e então foi realizada a corrida eletroforética a 50 V por aproximadamente 2 horas, em uma cuba de eletroforese horizontal (com capacidade para 12 poços) em tampão TAE (pH 8,0). Com o término da corrida, o gel foi retirado da cuba e corado por 15 minutos em solução aquosa de brometo de etídio (1 µmol L⁻¹), e então revelado em fotodocumentador Gel Doc™ EZ Bio-Rad. As imagens obtidas foram analisadas com uso do Software Image Lab™ 6.0.0.

3.6.2.1.2-Medidas de Viscosidade

Primeiramente realizou-se testes a fim de verificar qual a melhor condição com relação à porcentagem de DMSO e concentrações dos compostos a ser utilizada, de forma a se obter R_i 's razoáveis e evitar a precipitação dos compostos. Como melhor condição dentre aquelas analisadas se auferiu $[DNA] = 80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e quantidade de DMSO igual a 20% do volume total. Com relação aos R_i 's utilizados ($R_i = [Composto]/[DNA]$), utilizou-se os seguintes para ambas as séries: 0,0; 0,06; 0,12; 0,19; 0,25; 0,31 e 0,38, portanto, a máxima concentração utilizada dos compostos foi $30 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Determinadas essas razões, procedeu-se o preparo das soluções em tubos de ensaio, a partir de soluções estoques dos compostos de concentração $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$, adicionando-se alíquotas dessa solução de forma a obter as concentrações de interesse em volume final de 4 mL. Para padronizar a porcentagem de DMSO em todas as soluções adicionou-se esse solvente de forma

a completar 800 μL , considerando a soma dos volumes da solução de composto e DMSO. Posteriormente, a partir de uma solução estoque de CT-DNA de concentração conhecida (Para a Série 1 aproximadamente 5000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e Série 2 aproximadamente 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$), calculou-se a quantidade necessária para se obter a concentração desejada. Anterior a adição dessa alíquota da solução de DNA, foi adicionado tampão trisma-HCl, de forma a obter o volume final pretendido de 4 mL, com posterior adição do volume da solução de DNA já mensurado. É válido ressaltar que anterior à análise de cada complexo a concentração da solução estoque de DNA foi novamente avaliada (o que causou pequena variação nos volumes de solução de DNA e tampão para cada complexo), bem como avaliação da possibilidade de contaminação por proteína quanto a taxa de absorção 260/280 nm. Na seção do apêndice referente à Parte Experimental se encontra os valores utilizados para preparo das soluções.

Para cada complexo utilizou-se seis diferentes concentrações, e cada solução foi preparada pelo menos 25 minutos antes da leitura. Ao preparar-se a solução de uma determinada concentração, essa foi adicionada a um viscosímetro de Ostwald, que por sua vez, foi posicionado em banho termostatizado, de forma a manter uma posição e temperatura constantes durante as leituras, neste caso $25 \pm 0,2$ °C. Procedeu-se as leituras do tempo de escoamento, com auxílio de um cronômetro digital, efetuando-se as leituras em quintuplicata, a fim de avaliar a reprodutibilidade dos valores obtidos. Para aquisição da viscosidade relativa do DNA, tanto avaliado isoladamente quanto com as diferentes concentrações dos compostos, utilizou-se os valores médios das leituras e a Equação 1.^{80,81}

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{(t_{DNA} - t_0)} \quad \text{Equação 1}$$

Na qual t refere-se ao tempo de escoamento da solução contendo complexo e DNA, t_0 é o tempo de escoamento da solução tampão trisma-HCl e DMSO (20%), e t_{DNA} é o tempo de escoamento da solução de CT-DNA na presença de 20% de DMSO. Os dados são apresentados como viscosidade relativa

considerando η como viscosidade do DNA na presença dos complexos, e η_0 a viscosidade do DNA na ausência de outras espécies, e plotados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. [complexo]/[CT-DNA].

3.6.2.1.3- Ensaio de deslocamento do Hoechst 33258

O ensaio de deslocamento do Hoechst foi realizado mediante acompanhamento da supressão da fluorescência do conjugado DNA-Hoechst. Primeiramente foram preparadas as soluções dos compostos, uma solução estoque de concentração $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a Série 1 e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a Série 2, a partir das quais preparou-se as soluções para a leitura. Para tanto, transferiu-se alíquotas dessas soluções para microtubos distintos, a fim de obter, diferentes concentrações considerando volume final de $1000 \mu\text{L}$, sendo estas: 3,3; 6,7; 10,0; 13,3; 16,7 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Série 1) e 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 e $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Série 2). A fim de padronizar a porcentagem de DMSO a 10% em todas as soluções, o máximo volume a ser pipetado seria $100 \mu\text{L}$, mas para algumas concentrações como esse volume foi menor, adicionou-se DMSO para completar $100 \mu\text{L}$, considerando solução de complexo e dimetilsulfóxido. Os compostos padrão tiazol e cisplatina, foram utilizados como espécies que interagem de forma intercalativa e covalente, respectivamente. Os dados referentes ao preparo destas soluções estão dispostos no Apêndice na seção referente à Parte Experimental.

A partir de uma solução estoque de CT-DNA, de concentração determinada conforme item 3.6.2.1., fez-se uma diluição em tampão trisma-HCl para concentração igual a $125 \mu\text{mol L}^{-1}$, de volume total 60 mL (Série 1) e 25 mL (Série 2). Com relação ao Hoechst 33258, foi dissolvido uma pequena quantidade em dois mL de água ultrapura, e a concentração foi determinada espectrofotometricamente, considerando a absorvidade molar do Hoechst ($\epsilon = 46000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ em água), sendo essa a solução estoque. A partir desta solução foi retirada uma alíquota de $561 \mu\text{L}$ (Série 1) e $302 \mu\text{L}$ (Série 2), e adicionada às respectivas soluções de DNA já preparadas, obtendo-se soluções do conjugado DNA-Hoechst. Dessa solução adicionou-se $900 \mu\text{L}$ em cada microtubo que já

continha 100 µL das soluções dos complexos e DMSO, perfazendo um total de 1000 µL, totalizando concentração de DNA 112,5 µmol L⁻¹ e Hoechst 5,0 µmol L⁻¹.

Essas soluções finais foram incubadas a 25 °C por 30 minutos em thermo-shaker, e depois transferidas para placas de 96 poços black/clear polystyrene microplates (Corning®), 200 µL de cada solução para três poços distintos (200 µL/poço), a fim de mensurar a repetibilidade dos dados. Fez-se leitura das soluções nas placas, em fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador, tanto de fluorescência quanto de absorbância. No caso da fluorescência, os espectros de emissão foram adquiridos na região de 370 a 670 nm, com comprimento de onda de excitação 345 nm, e os espectros de absorção foram registrados de 320 a 670 nm. As medidas foram realizadas a 25, 30 e 37 °C para ambas as séries.

Os espectros de absorbância foram adquiridos para posterior correção da intensidade de fluorescência devido ao efeito de filtro interno. Para tanto, esses espectros foram registrados em região que compreendesse os comprimentos de onda de excitação e emissão, haja vista que para essa correção se utiliza a Equação 2.^{82,83}

$$F_{corr.} = F_{obs.} \times \text{antilog} \frac{(A_{ex.} + A_{em.})}{2} \quad \text{Equação 2}$$

$F_{corr.}$ se refere à intensidade de fluorescência corrigida, $F_{obs.}$ é a fluorescência observada (valores obtidos no experimento), $A_{ex.}$ é a absorbância no comprimento de onda de excitação e a absorbância no comprimento de onda de emissão é representado por $A_{em.}$.

A plotagem dos dados como gráficos de intensidade de fluorescência vs. comprimento de onda, considerando a influência dos complexos, permite concluir qualitativamente, a respeito do possível deslocamento do Hoechst da estrutura da biomolécula em análise. Entretanto, informações quantitativas podem ser obtidas com relação a valores relacionados a supressão, como mecanismo

associado à supressão da fluorescência e constante de associação à biomolécula. Para esta análise quantitativa, foram utilizados alguns dos parâmetros que serão relatados no tópico relacionado à interação com a proteína albumina de soro humana, que não serão relatados neste momento para evitar repetição, uma vez que neste outro tópico deverá ser mencionado mais detalhadamente.

3.6.2.2- Ensaio de inibição da atividade enzimática da topoisomerase II α

Esse experimento também considera a mobilidade eletroforética do DNA em gel, considerando a diferente mobilidade sob atuação da enzima topoisomerase. Este ensaio foi realizado com kit de relaxação do DNA, cedido pelo professor Dr. Fillipe Vieira Rocha, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Para aquisição das amostras, foi preparado em microtubos distintos, uma solução denominada MIX, constituída de 3 μL de tampão de ensaio, 1 μL de adenosina trifosfato (ATP) e 1 μL da solução estoque de DNA pBR322 superenovelado (0,5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). Posteriormente, adicionou-se 24 μL de água ultrapura ao microtubo referente ao controle negativo, e 23 μL de água ultrapura aos microtubos do controle positivo e dos complexos. Nos microtubos referentes aos complexos, foram adicionados 1 μL de soluções estoques dos complexos, de concentrações 1800, 360 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a Série 1 (complexos A5, A6 e A7), e 1800, 150 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a Série 2. Nos microtubos dos controles positivo e negativo, adicionou-se 1 μL de DMSO, e por fim, nos microtubos em que havia sido adicionado soluções dos compostos e do controle positivo, adicionou-se 1 μL da solução estoque de topoisomerase II α (4,0 nmol L^{-1}), e imediatamente todas as amostras foram colocadas em banho com temperatura constante de 37 °C por 45 minutos.

Subsequentemente, foi adicionado 8 μL de STEB (40 % m/v de sacarose, 100 mmol L^{-1} de Tris-HCl, 1 mmol L^{-1} de ácido etilenodiamino tetra-

acético (EDTA), 0,5 mg mL⁻¹ de azul de bromofenol, pH 7,5), e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm. As amostras foram adicionadas ao gel já polimerizado, sendo gel de agarose 1% em TAE, e a corrida eletroforética foi realizada em cuba de eletroforese horizontal, com adição de tampão TAE, a 50 V por aproximadamente duas horas.

Em seguida, procedeu-se com mesmo procedimento relatado no item 3.6.2.1.1., e a influência na atividade da enzima foi avaliada por comparativo com os controles positivo e negativo.

3.6.2.3- Estudo de interação com albumina de soro humana (HSA)

3.6.2.3.1- Supressão da intensidade de fluorescência da HSA

Similarmente ao ensaio de deslocamento do Hoechst, esse experimento foi conduzido avaliando-se a supressão da fluorescência da HSA, devido a perturbação do sistema, causado pela adição de diferentes concentrações dos complexos. As soluções dos compostos foram preparadas de forma a se obter como concentrações finais: 3,3; 6,7; 10,0; 13,3; 16,7 e 20,0 µmol L⁻¹ (Série 1), e 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 e 80,0 µmol L⁻¹ (Série 2), considerando volume final de 2000 µL e porcentagem de 5% de dimetilsulfóxido. Para a Série 1 preparou-se soluções estoques de concentrações 500 e 200 µmol L⁻¹, e para a Série 2 soluções estoque de concentrações 2000 e 1000 µmol L⁻¹, adicionando-se aos microtubos as alíquotas necessárias para aquisição das concentrações de interesse, com adição de alíquotas de DMSO variando de 0-67,0 µL (Série 1) e 0-80,0 µL (Série 2), de forma a completar os 100 µL, padronizando 5% de DMSO.

Com relação a solução da proteína, foi preparada uma solução estoque de 2,1 µmol L⁻¹, sendo a concentração dessa solução mensurada por meio de absorção na região do UV-Vis, utilizando valor de absortividade molar em 280 nm ($\epsilon = 36500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$). Adicionou-se 1900 µL dessa solução estoque de HSA a cada microtubo de solução de complexo preparada anteriormente (que já continha 100 µL de solução, considerando solução dos complexos e

dimetilsulfóxido para completar esse volume), e as amostras permaneceram incubando a 25 °C por 30 minutos. Dessa forma, a concentração final de HSA foi de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Após a incubação as soluções de cada microtubo foram transferidas para placas de 96 poços black/clear polystyrene microplates (Corning®), cada poço contendo 200 μL de solução, e cada solução foi pipetada em três poços distintos. Como este é um ensaio que mensura a supressão da fluorescência, foi adquirido também a leitura da intensidade de fluorescência sem influência de nenhuma espécie supressora, ou seja, apenas a HSA (5% DMSO). Para verificar se os complexos apresentariam fluorescência nas condições em que o experimento foi realizado (o que seria um interferente no experimento), soluções nas máximas concentrações dos complexos foram também adicionadas à placa, mantendo-se todo o preparo anterior, com exceção da adição de solução de HSA, completando o volume apenas com tampão trisma-HCl.

Foi obtida a leitura de espectros de emissão na região de 300 a 500 nm, com excitação em 270 nm, e espectros de absorção na região de 270-500 nm, em fluorímetro Synergy/H1-Biotek equipado com monocromador. Da mesma forma que no item 3.6.2.1.3. fez-se registros de espectros de absorbância das mesmas soluções para as quais se obteve os espectros de emissão, para correção da intensidade de fluorescência devido ao efeito de filtro interno, empregando-se a Equação 2 para essa correção. As leituras de fluorescência foram obtidas em três temperaturas distintas: 25, 30 e 37 °C.

O mecanismo de supressão de fluorescência de Stern-Volmer pode ser empregado para análise dos dados obtidos neste experimento (e no ensaio de deslocamento do Hoechst 33258), supressão esta causada pela adição de um agente supressor (Q), que neste caso seriam os complexos de rutênio. Esta análise permite obter alguns parâmetros que caracterizam o sistema, parâmetros estes decorrentes da colisão entre a espécie supressora e molécula da proteína. A intensidade de fluorescência da proteína no estado excitado pode ser relacionada

com a redução dessa intensidade provocada pelo supressor, com a Equação 3, onde se verifica essa correlação por meio de uma constante, mais especificamente a constante de supressão de fluorescência de Stern-Volmer.^{83,84}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad \text{Equação 3}$$

Na qual F_0 é a intensidade de fluorescência da solução de HSA (5% de DMSO) e F a intensidade de fluorescência na presença da espécie supressora, K_{SV} é a constante de supressão de fluorescência de Stern-Volmer, que é igual ao produto de K_q (constante de velocidade de supressão bimolecular) por τ_0 (tempo de vida médio das biomoléculas na ausência da espécie supressora).

Ao aplicar essa equação ao ensaio de deslocamento de Hoechst, avaliou-se apenas a constante de supressão de fluorescência, não promovendo-se cálculos referentes a K_q e τ_0 .

O tipo de mecanismo de interação a ocorrer entre a proteína e molécula supressora pode ser avaliado de acordo com o aumento ou diminuição do K_{SV} com a temperatura. Definido esse mecanismo, o nível de interação dos complexos analisados com a biomolécula pode ser avaliado. É possível então gerar informação de grande interesse, a partir da constante de associação e o número de sítios da HSA com o(s) qual(is) há interação. Estas informações podem ser obtidas conforme Equação 4.^{83,85}

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_a + n \log [Q] \quad \text{Equação 4}$$

Onde K_a é a constante de associação entre biomolécula e supressor, n é o número de sítios da biomolécula em que ocorre interação, e $[Q]$ é a concentração da espécie supressora. Nos ensaios de deslocamento do Hoechst, apesar de ser avaliada a constante de associação entre biomolécula e supressor, não se investigou valores de n .

Nestas interações algumas forças intermoleculares estão envolvidas, e os parâmetros termodinâmicos podem ser empregados na identificação da

natureza dessas forças atuantes. Esses parâmetros foram calculados usando equações termodinâmicas de Van't Hoff, aqui nomeadas como Equações 5 e 6.

$$\ln \left[\frac{K_{a_2}}{K_{a_1}} \right] = \frac{1}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \Delta H \quad \text{Equação 5}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \quad \text{Equação 6}$$

Nas quais K_a é a constante de associação relacionada a uma determinada temperatura, R é a constante dos gases ideais (8,314 KJ mol⁻¹), ΔH é a variação da entalpia, ΔG se refere a variação da energia livre de Gibbs; e ΔS a variação entrópica no sistema. As Equações 5 e 6, foram também utilizadas integralmente no ensaio de deslocamento do Hoechst para a mesma finalidade.^{84,86,87}

3.6.2.3.2- Competição pelo sítio I da HSA

Para avaliar se a interação dos compostos analisados como espécies supressoras ocorre no sítio I da HSA, foi utilizado como sonda fluorescente a varfarina, que assim como azaprazona interage pelo sítio I dessa biomolécula.⁸⁸ Para realização deste ensaio preparou-se uma solução de HSA de concentração 5,3 µmol L⁻¹, partindo de uma solução estoque de concentração determinada conforme item 3.6.2.3.1. A esta solução adicionou-se uma alíquota de solução estoque de varfarina (2000 µmol L⁻¹), a fim de obter concentração de varfarina igual a 5,3 µmol L⁻¹.

As soluções dos compostos foram preparadas igualmente ao experimento de avaliação da interação com HSA. A solução de HSA e varfarina, de concentração 5,3 µmol L⁻¹ de cada espécie, foi assim preparada para que ao adicionar-se a cada microtubo 1900 µL, contendo as soluções dos complexos, a concentração de HSA e varfarina fosse 5,0 µmol L⁻¹. Após o preparo das soluções finais, estas foram incubadas a 25 °C por 30 minutos, e depois plaqueadas em placas de 96 poços black/clear polystyrene microplates (Corning), 200 µL/poço, sendo cada solução adicionada a três poços distintos.

Conforme os experimentos anteriores envolvendo medidas de fluorescência, obteve-se espectros de emissão e de absorção. Com relação aos primeiros foi utilizado comprimento de onda de excitação igual a 310 nm, registrando-se os espectros de 340 a 650 nm, e em relação aos espectros de absorção fez-se leitura compreendendo a região de 300 a 650 nm. Essas leituras foram realizadas a 37 °C, e após correção das intensidades de fluorescência devido ao efeito de filtro interno, pode-se avaliar o deslocamento da varfarina qualitativamente mediante supressão da fluorescência do sistema HSA-varfarina.

3.6.3- Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição foi calculado utilizando o método shake-flask, empregando o sistema água e n-octanol (Sigma-Aldrich). Foram preparadas soluções estoques dos compostos em dimetilsulfóxido, de forma que destas soluções foram retiradas alíquotas de 100 µL para a Série 1 e 50 µL para a Série 2. Completou-se o volume com 950 µL de água e 950 µL de n-octanol nas soluções dos compostos da Série 1, e com 975 µL de água e 975 µL de n-octanol nas soluções dos compostos da Série 2, perfazendo volume total de 2000 µL em ambos os casos, com 5,0% de DMSO (Série 1) e 2,5% de DMSO (Série 2). Essas amostras foram preparadas em triplicata para cada composto avaliado, e incubadas por 18 horas a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos, e a fase orgânica foi coletada, e submetida a leitura de absorção na região do ultravioleta-visível. Como o experimento foi realizado em triplicata, cada solução de cada composto gerou uma absorbância no comprimento de onda analisado (372 nm, Série 1 e 272 nm, Série 2), a partir do qual pode ser calculado uma concentração, e consequentemente um valor de Log P, e então o coeficiente de partição final foi determinado como média desses valores.

As concentrações nas fases orgânicas coletadas foram determinadas por curva de calibração, obtida para cada composto, no mesmo solvente (n-

octanol), com adições sucessivas de concentração dos compostos, partindo da mesma solução estoque utilizada para preparo das amostras.

Com base nas concentrações avaliadas na fase orgânica, foi possível calcular as concentrações na fase aquosa, e então o coeficiente de partição pode ser calculado a partir da Equação 7.

$$\text{Log } P = \log \frac{C_{org.}}{C_{aq.}} \quad \text{Equação 7}$$

$C_{org.}$ é a concentração dos complexos na fase orgânica e $C_{aq.}$ é a concentração destes mesmos complexos na fase aquosa.

3.6.4- Ensaios Biológicos

3.6.4.1- Cultura de células

As linhagens tumorais humanas de mama triplo negativa MDA-MB-231 (RE-, RP-, HER2-), de adenocarcinoma epitelial de pulmão A549, e não tumoral de pulmão fibroblástica MRC-5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino). As linhagens tumorais de tecido epitelial de mama MCF-7 (RE+), de tecido epitelial de ovário A2780 e A2780*cis* foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de FBS. Por fim, a linhagem não tumoral MCF-10A de tecido epitelial de mama humano foi cultivada em meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium F12*), suplementado com 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidérmico 3,3 nmol L⁻¹ (EGF), hidrocortisona 1,4 mmol L⁻¹, insulina 1,7 mmol L⁻¹ e penicilina/estreptomicina 1%(v/v). As linhagens não tumorais foram avaliadas para determinar a seletividade. Todas as linhagens foram mantidas em incubadora úmida a 37 °C e atmosfera de dióxido de carbono (5%).

É válido mencionar que em todos os experimentos utilizou-se quantidade de DMSO máxima igual 0,5% nos poços. Como outro adendo, com relação à linhagem A2780*cis*, foi recebida como linhagem resistente à cisplatina, gentilmente doada pelo Prof. Adelino Vieira de Godoy Netto, mas para

manutenção dessa resistência, adicionou-se alíquotas de solução $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatina (solubilizada em PBS) a cada cinco passagens, aproximadamente. A citotoxicidade da cisplatina frente a essa linhagem foi constantemente avaliada, para verificar se o nível da resistência estaria se mantendo.

3.6.4.2- Ensaio de Viabilidade Celular

Como ensaio inicial, avaliou-se a capacidade dos complexos em interferir na viabilidade celular, por meio do ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium),⁸⁹ que se baseia na redução da espécie original a cristais de formazan, e resumidamente, a quantidade de formazan gerado é proporcional a quantidade de células viáveis no meio.

As células, $1,5 \times 10^4$ células/150 μL para os experimentos de 48 horas e $1,0 \times 10^4$ células/150 μL para os experimentos de 72 horas, foram semeadas em placas de 96 poços estéreis, nos meios de cultura adequados, conforme mencionado anteriormente. Essas placas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas, para aderência das células. Após este tempo, os compostos foram adicionados em oito diferentes concentrações para cada composto, e em nove poços para cada concentração, observando-se a quantidade de DMSO adicionada (0,5%), bem como restringindo o uso de concentrações dos compostos anterior à precipitação nos poços.

As placas foram incubadas por 48 horas, e após este tempo adicionou-se 50 μL de MTT/poço, mantendo-se a placa na ausência de luz dentro da incubadora, por aproximadamente três horas. Posteriormente, todo o conteúdo da placa foi removido, e os cristais de formazan gerados foram solubilizados com 150 μL /poço de álcool isopropílico, e a leitura da absorbância foi realizada em leitora de placa ELISA, em comprimento de onda 540 nm. A viabilidade das células foi obtida com relação a um controle negativo (células apenas com meio de cultura e solvente utilizado para solubilização dos complexos, DMSO-0,5%), que seria a máxima viabilidade sem interferência dos compostos em análise. O valor de IC_{50} (concentração necessária para induzir 50% de morte celular) para

cada um dos compostos em cada linhagem avaliada, foi determinado com auxílio do *Software* GraphPad®, e o índice de seletividade foi mensurado a partir da relação da Equação 8.

$$IS = \frac{IC_{50}(\text{linhagem não tumoral})}{IC_{50}(\text{linhagem tumoral})} \quad \text{Equação 8}$$

3.6.4.3- Ensaio morfológico

As linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis* foram submetidas a este experimento, plaqueando-se densidade celular de $1,0 \times 10^5$ células/poço, e para a linhagem MCF-10A, densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço, em placas de 12 poços estéreis, nos meios adequados. As placas permaneceram 24 horas em incubadora, e após este tempo, adicionou-se soluções dos complexos, de forma a obter determinadas concentrações nos poços. Imagens foram capturadas anterior a adição dos compostos, como imagens de zero horas e para posterior comparativo, e conforme passava o tempo de incubação com estes compostos, foram registradas imagens de 24 e 48 horas para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A, e 24, 48 e/ou 72 horas para a linhagem A2780*cis*. As imagens foram registradas com auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio invertido.

3.6.4.4- Ensaio de formação de colônias

Este experimento foi realizado com as linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*, sendo semeadas $3,0 \times 10^2$ e $6,0 \times 10^2$ células/poço, respectivamente, em 2000 µL de meios apropriados, em placas de 6 poços estéreis, que foram então incubadas a 37 °C e 5% de CO₂, por 24 horas. Em seguida, os complexos foram adicionados a partir de soluções estoque em DMSO, e o tratamento foi mantido por 48 e/ou 72 horas. Na sequência, o meio foi removido, as células lavadas delicadamente com tampão fosfato salino (PBS), e adicionou-se novo meio de cultura. As placas foram mantidas na incubadora por dez dias, e após este tempo o sobrenadante foi descartado. Fez-se nova lavagem com PBS, e as células foram fixadas com solução de metanol/ácido acético (3:1, v/v) para MDA-MB-231 e paraformaldeído 4% para A2780*cis* por aproximadamente 10 minutos, e coradas

com corante panótico e solução de cristal violeta 5% em água, para as linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*, respectivamente. Após secagem das placas, obteve-se imagens das mesmas em fotodocumentador CL1500, e o tratamento dos dados com relação à área de colônia foi efetuado com auxílio do *Software Image J*, empregando o plugin *Colony Area*, e tratamento estatístico realizado com auxílio do *Software Graph Pad Prism*, com as frações de sobrevivência (FS) calculadas por meio da equação 9.

$$FS = \frac{\text{área de colônia após tratamento}}{\text{área de colônia do controle negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

3.6.4.5- Ensaios relativos à possível influência na cascata metastática

3.6.4.5.1- Ensaio de Migração-*Wound Healing*

Esse ensaio foi conduzido com as linhagens A2780*cis* (complexo A6-Série 1) e MDA-MB-231 (complexo A9- Série 2), semeando $4,0 \times 10^5$ células/poço e $2,0 \times 10^5$ células/poço, respectivamente, em placas de 12 poços estéreis. As placas permaneceram na incubadora, a 37 °C e 5% de CO₂ até atingir confluência próxima a 100%, e posteriormente, no caso do experimento com a linhagem MDA-MB-231 foi adicionado mitomicina C ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ /poço), por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma “ferida” em cada poço com auxílio de uma ponteira de 200 μL , o meio de cultura foi descartado, e cada poço lavado com tampão fosfato salino para retirada das células desaderidas. Novo meio de cultura foi adicionado em cada poço e imagens foram registradas com auxílio de câmera acoplada a microscópio invertido, como tempo de zero horas. Foram obtidas ainda imagens de 18 e 24 horas na linhagem MDA-MB-231, e de 24 e 48 h na linhagem A2780*cis*, após tratamento com os compostos, e estas foram analisadas por meio do *Software Image J*, e a porcentagem de inibição de fechamento da risca foi obtida mediante uso da Equação 10.

$$\% \text{ área fechada} = \left[\frac{A_{0h} - A_t}{A_{0h}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

3.6.4.5.2- Ensaio de marcação do citoesqueleto com faloidina

Este ensaio foi realizado com as linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*, semeando-se $4,0 \times 10^4$ células/poço, em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro em cada poço. Foi utilizado volume igual a 500 µL/poço, considerando-se o meio apropriado para essa linhagem, e as placas permaneceram 24 horas em incubadora para aderência. As células já aderidas foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (Complexo A7-Série 1 e Complexo A9-Série 2, na linhagem A2780*cis*, e Complexo A9 na linhagem MDA-MB-231) por 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com *para*-formaldeído 4% em PBS por 30 minutos, e permeabilizadas com Triton-X 100 a 0,1% (v/v) em PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, promoveu-se bloqueio com BSA 2% (m/v) durante 30 minutos, e após novas lavagens com PBS, fez-se marcação do citoesqueleto com adição de Alexa Fluor 488 Phalloidin por 20 minutos. Após retirada dessa solução e lavagem com PBS, promoveu-se marcação com corante 4',6-diamino-2-fenilindole (DAPI, Sigma Aldrich) por 5 minutos, lavando-se posteriormente três vezes com PBS. As lamínulas foram retiradas dos poços, e colocadas em lâminas de microscopia com auxílio do reagente Fluoromount-G™ Invitrogen™, e imagens foram obtidas em microscópio confocal SP8 Leica do Laboratório Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual-CNET, da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto-SP, sob supervisão do Prof. Dr. Antônio Tedesco.

3.6.4.6- Ensaios relacionados a apoptose

3.6.4.6.1- Ensaio de ciclo celular

A fim de averiguar se os complexos selecionados para este estudo induzem a parada do ciclo celular em alguma das fases que o constituem, e/ou se promovem fragmentação do DNA, células MDA-MB-231 e A2780*cis* foram semeadas em placas de 12 poços, em densidade celular igual a $2,0 \times 10^5$ células/poço e 1000 µL/poço. Após aderência das células, fez-se tratamento com diferentes concentrações dos complexos, mantendo-se incubado com estes por 48

horas. Utilizou-se camptotecina como controle positivo. As células foram então coletadas com uso de um *scraper*, centrifugadas, e então o meio foi descartado. O pellet celular foi lavado duas vezes com PBS, e ressuspensionado em 300 µL de etanol 70% gelado, e as amostras foram mantidas a -20 °C por 24 horas. Após este tempo, foi adicionado 1000 µL de PBS gelado a cada microtubo, que foram centrifugados, e o pellet foi ressuspensionado em solução de RNase A (0,02 mg mL⁻¹) e solução de iodeto de propídio (PI, 10 µg mL⁻¹), incubando por aproximadamente uma hora. Por fim, o teor de DNA foi avaliado por citometria de fluxo no citômetro Accuri C6 e a devida quantificação foi determinada com auxílio do *Software* BD Accuri C6. Todos os ensaios envolvendo citometria de fluxo foram realizados no LABEN (Laboratório de Biologia do Envelhecimento) sob coordenação da Prof. Dr. Márcia Regina Cominetti, alocado no Departamento de Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos.

3.6.4.6.2- Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

A possibilidade de os compostos induzirem a morte celular por via apoptótica foi estudada por citometria de fluxo com uso de *kit* PE Annexin V Apoptosis Detection (BD Biosciences), tanto na linhagem MDA-MB-231 quanto A2780cis. Plaqueou-se $1,2 \times 10^5$ células/poço em placas de 12 poços estéreis, mantidas em incubadora por 24 horas, seguido da adição dos compostos nas concentrações de interesse, sendo o tratamento mantido por 48 ou 72 horas. Como controle negativo foi utilizado DMSO, e controle positivo, a camptotecina. Retirou-se o meio de cultura de cada poço, transferindo para microtubos que foram centrifugados para aquisição das células já desaderidas. Cada poço foi lavado com tampão fosfato, e o conteúdo da lavagem foi recolhido nos respectivos microtubos anteriores, submetendo-os novamente à centrifugação, e ressuspensionando em tampão de ligação. A cada poço foi adicionado 2 µL de 7-amino-actinomicina D (7AAD) e 2 µL de Anexina V-PE, transferindo-se o conteúdo dos microtubos de volta às placas, mantendo a placa ao abrigo da luz por 15 minutos. Completou-se o volume de cada poço para 300 µL, e as células

foram removidas com auxílio de um *scraper* e transferidas para tubos de citometria. A análise foi realizada em citômetro BD Accuri C6 e a quantificação realizada por meio do *Software* BD Accuri C6. A porcentagem de apoptose foi determinada como a soma entre células marcadas como em apoptose inicial e apoptose tardia.

3.6.4.7- Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e de forma independente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism, por meio do cálculo de média e desvio padrão, seguido de análise de variância (ONE WAY e TWO WAY ANOVA), e pós-teste de Bonferroni ou Dunett para comparativo de todos os grupos com os controles, e determinação de diferença estatística.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de facilitar o entendimento dos resultados pelo leitor, o ligante pyphen e o precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$ serão discutidos primeiramente, e os complexos divididos em duas séries serão retratados em seguida. Nas duas séries a difosfina utilizada é a 1,4'-*bis*-difenilfosfina(butano), dppb, e além disto, contêm ligantes mercapto em comum, mas diferem no ligante N,N-heterocíclico, culminando na Série 1 com o ligante pyphen, e Série 2 com o ligante 1,10-fenantrolina.

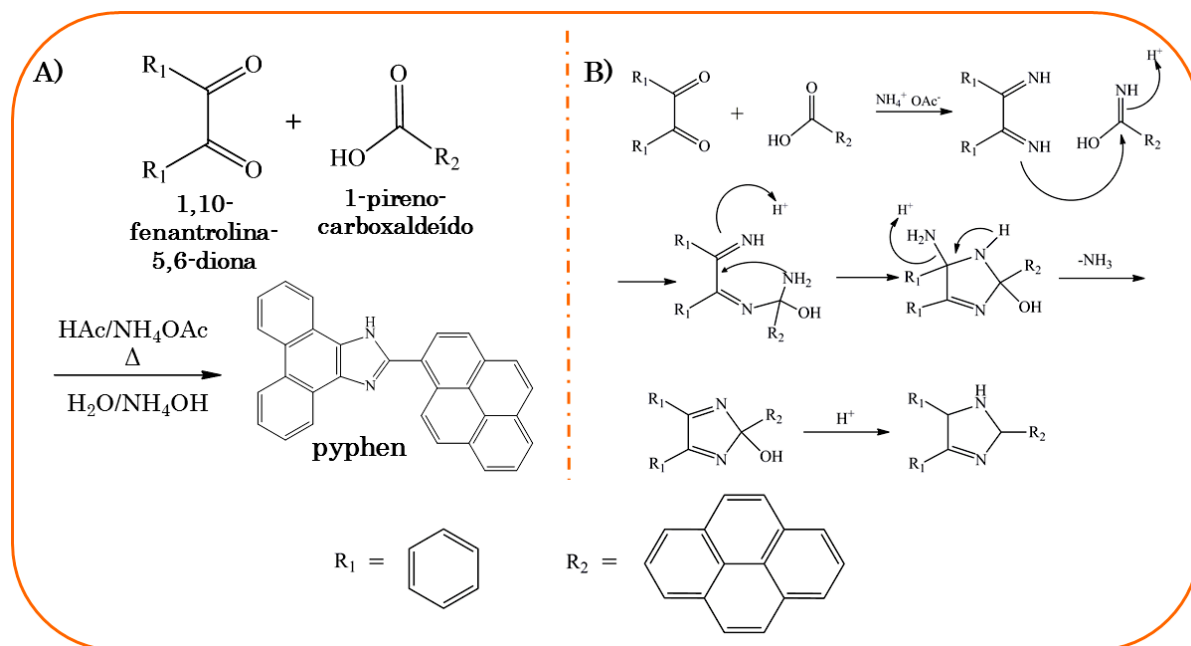
4.1- Ligante 1-(piren-2-il)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10-fenantrolina], pyphen

O ligante utilizado nos compostos da Série 1 deste trabalho, como N,N-heterocíclico modificado com subsituente pirenil, apesar de já ser relatado na literatura, inclusive coordenado a centros metálicos, será aqui brevemente abordado, a fim de apresentar a caracterização realizada para o mesmo.

A síntese deste ligante foi realizada conforme detalhado na seção Materiais e Métodos, na parte referente às sínteses, e conforme Esquema 4.1, onde também relata-se uma proposta de mecanismo para a obtenção desse composto, segundo reação de Debus-Radziszewski para síntese de imidazóis.

O produto foi obtido como um sólido amarelo, insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, apresentando boa solubilidade em dimetilsulfóxido, sendo este o solvente utilizado para as caracterizações espectroscópicas do composto. Foi realizada a caracterização essencialmente por ressonância magnética nuclear e difração de raios X, sendo válido mencionar que até onde se sabe, a estrutura cristalográfica para este composto ainda não havia sido determinada. Na literatura geralmente reporta-se estruturas otimizadas por meio de cálculos, para espécies correlatas.

ESQUEMA 4.1-A) Esquema de reação para obtenção do ligante pyphen; B) Proposta de mecanismo reacional.



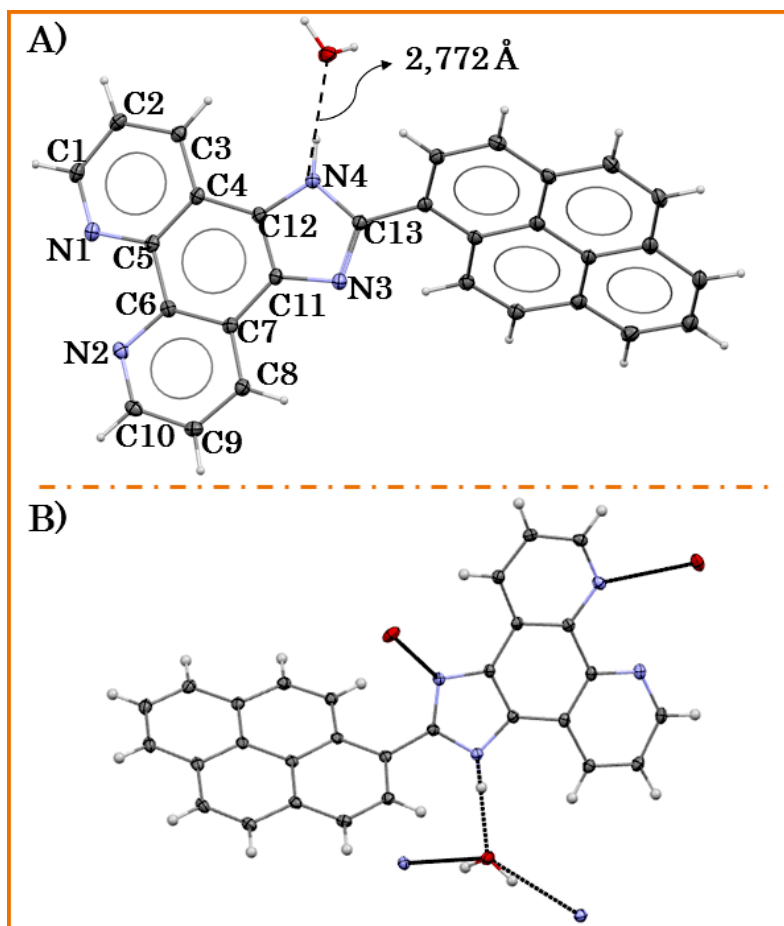
(Proposta de mecanismo baseada em reação de Debus-Radziszewski⁹⁰)

O cristal adequado para o uso da técnica de difração de raios X foi obtido em solução de dimetilsulfóxido, e a cristalização ocorreu em um sistema ortorrômbico, grupo espacial P2₁2₁2₁. A estrutura obtida encontra-se na Figura 4.1, onde também se apresenta interações intermoleculares existentes no cristal. A molécula de água que se apresenta na rede cristalina, contribui para a estabilização do sistema, interagindo por meio de ligação de hidrogênio com o anel imidazol, em que a ligação N(4)--H(4)...O apresenta distância de ligação igual a 2,722 Å.

Este átomo de oxigênio, participa de outras duas interações, com moléculas vizinhas, mais especificamente com o outro átomo de nitrogênio do mesmo anel imidazol (N3) e átomo de nitrogênio da porção fenantrolina do ligante (N2). Essas interações, provavelmente contribuem para que não sejam observadas interações intermoleculares π - π stacking, que seriam favorecidas entre os anéis do substituinte pirenil.

Na Tabela 4.1 são mostrados alguns dos comprimentos de ligação, preferencialmente aqueles que poderiam sofrer modificações devido à coordenação ao centro metálico, e aqueles relacionados ao anel imidazol.

FIGURA 4.1-Estrutura cristalográfica do ligante pyphen, com elipsoides a 30% de probabilidade; B) Interação intermolecular por meio de ligação de hidrogênio.



Fonte: Dados da Pesquisa.

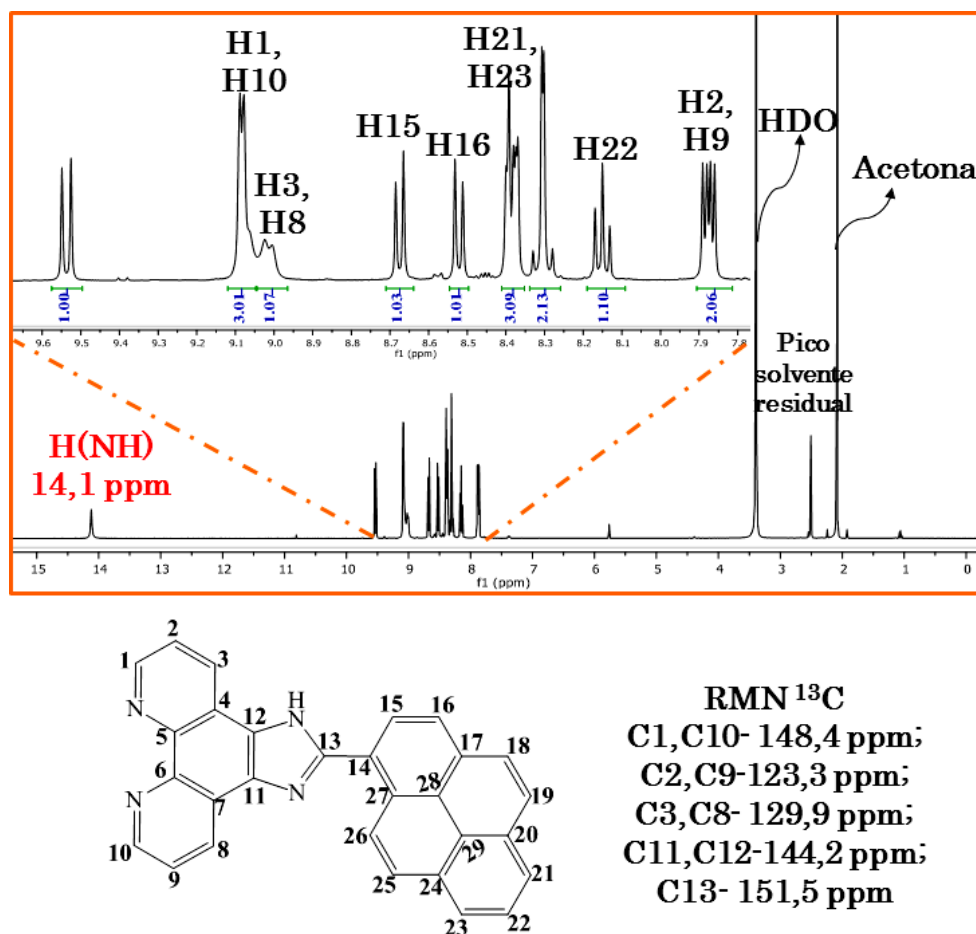
TABELA 4.1-Comprimentos e ângulos de ligação selecionados do composto pyphen.

Ligação	Comprimento de ligação (Å)
N1-C1	1,324 (3)
N1-C5	1,360 (2)
N2-C6	1,359 (3)
N2-C10	1,322 (3)
N3-C11	1,380 (2)
N3-C13	1,331 (3)
N4-C12	1,375 (2)
N4-C13	1,366 (2)
C1-C2	1,400 (3)
C2-C3	1,379 (3)
C5-C6	1,465 (3)
C9-C10	1,402 (3)
	Ângulo de ligação (Å)
C1-N1-C5	117,24 (17)
C10-N2-C6	117,65 (17)
C13-N13-C11	104,50 (16)
C13-N4-C12	106,35 (15)
N1-C1-C2	124,53 (18)
N2-C10-C9	124,36 (19)

Fonte: Dados da Pesquisa.

Com relação à caracterização por RMN, na Figura 4.2 apresenta-se o espectro de RMN ^1H para o ligante, bem como a atribuição, referente aos deslocamentos nos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, sendo este último espectro disposto no Apêndice-Parte I. As atribuições foram realizadas com auxílio de espectros 2D. O espectro obtido encontra-se em conformidade com espectro de RMN ^1H já relatado na literatura.⁶⁸

FIGURA 4.2-Espectro de RMN ^1H obtido para o ligante pyphen em DMSO- d_6 , numeração da estrutura, e alguns deslocamentos atribuídos com relação ao RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$.



Fonte: Dados da Pesquisa.

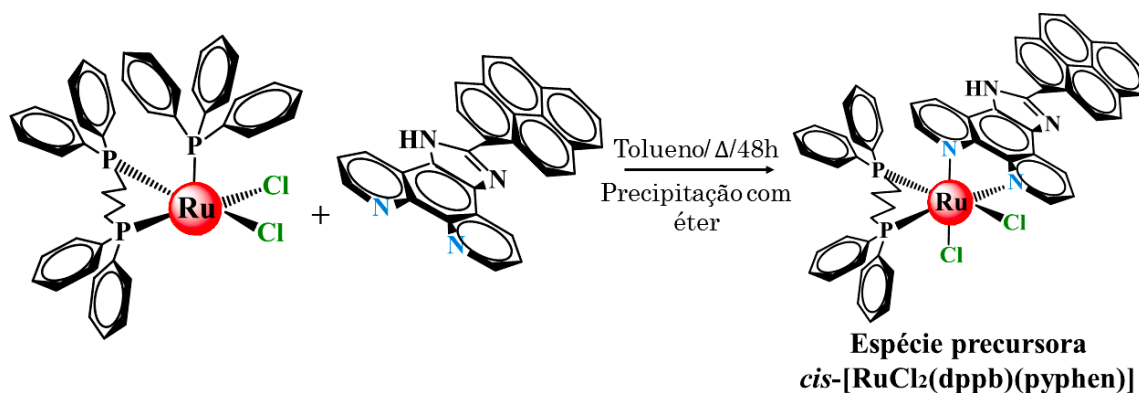
Outras caracterizações foram realizadas (Análise Elementar, espectroscopia na região do ultravioleta-visível e do infravermelho, voltametria cíclica) e podem ser encontradas no Apêndice-Parte I. Estes resultados juntamente com os aqui mencionados corroboram para conclusão de que o ligante foi obtido de forma eficaz e com grau de pureza significativo.

4.2- Precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$, (CPP)

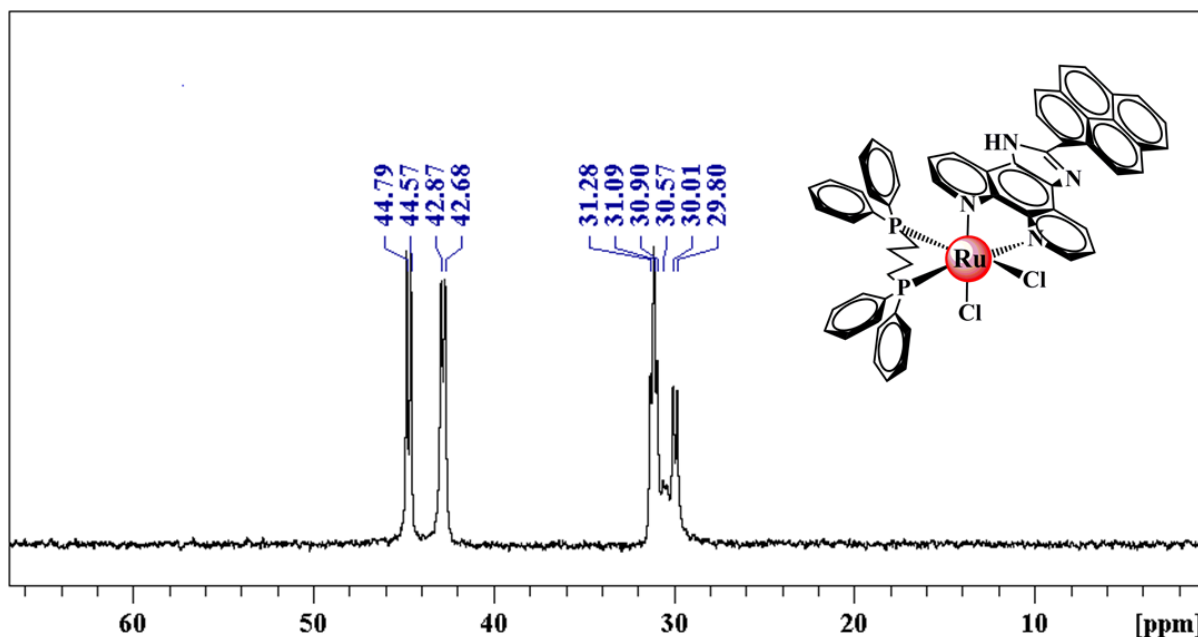
A síntese da espécie precursora $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$, CPP, foi realizada conforme já relatado para precursores similares, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$ e

[RuCl₂(dppb)(phen)], e Esquema 4.2, utilizando-se o ligante 1-(piren-2-il)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10-fenantrolina].

ESQUEMA 4.2-Esquema reacional para obtenção do *cis*-[RuCl₂(dppb)(pyphen)].



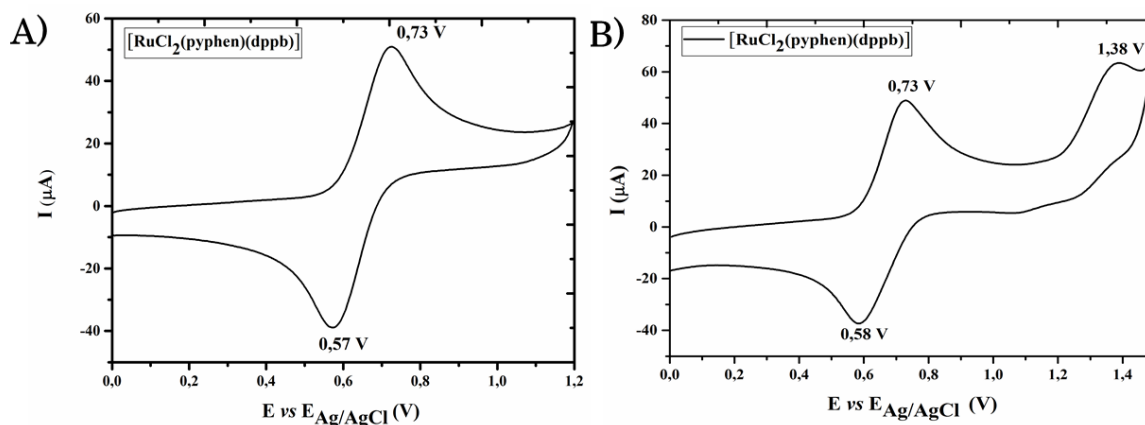
A caracterização inicial do composto foi realizada por meio da análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ³¹P{¹H}, que em diclorometano resultou em um conjunto de sinais diferente dos dois dupletos previstos, conforme se verifica na Figura 4.3. Estes dois sinais esperados seriam referentes aos dois átomos de fósforo constituintes da difosfina, de acordo com o que se observa para espécies similares, tais como [RuCl₂(bipy)(dppb)] e [RuCl₂(dppb)(phen)], para as quais relata-se que os deslocamentos químicos em CH₂Cl₂ são δ 43,1/31,5 ppm e δ 45,1/29,6 ppm, respectivamente.³⁴

FIGURA 4.3-Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ da espécie CPP.

Tal resultado sugere duas possibilidades: A primeira que não se tenha, em solução, apenas a espécie de interesse, e a segunda que se tenha isômeros. Para elucidar o observado, foram utilizadas outras técnicas de caracterização, principalmente a voltametria cíclica e a espectrometria de massas de alta resolução, que podem fornecer informações suficientes e precisas com relação a existência de mais de uma espécie em solução, como impurezas ou indicativo de isômeros.

Na voltametria cíclica, que foi obtida em solução de diclorometano, mesmo solvente utilizado para o espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, obteve-se apenas um processo referente ao par redox $\text{Ru(II)}/\text{Ru(III)}$, que apresenta $E_{\text{pa}} = 0,73 \text{ V}$ e $E_{\text{pc}} = 0,57 \text{ V}$, Figura 4.4A. O outro processo observado na figura 4.4B, em maior potencial, se refere à oxidação do ligante pyphen.⁹¹

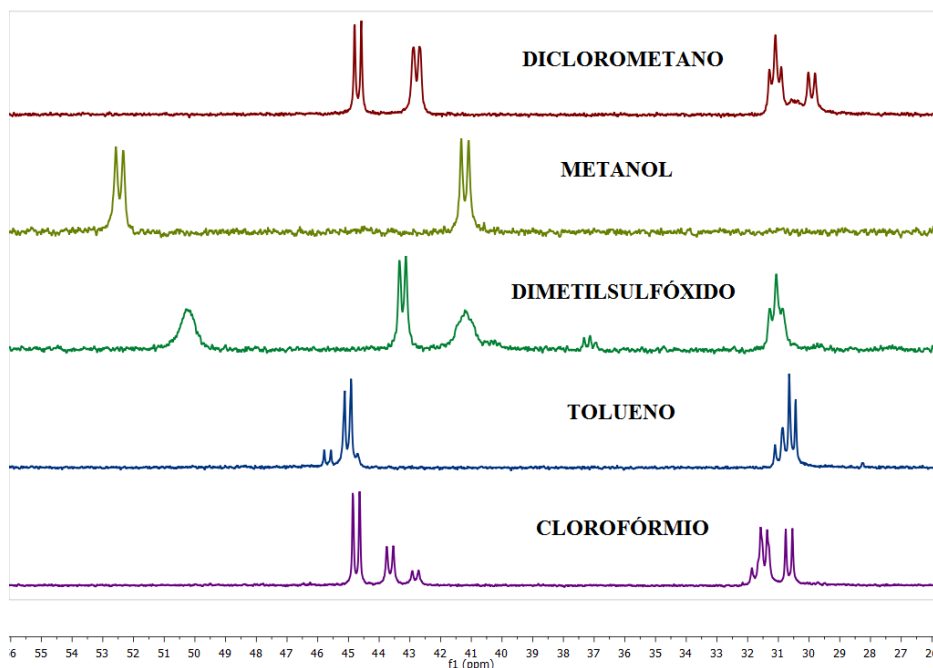
FIGURA 4.4-Voltamogramas cíclicos de CPP (1 mmol L⁻¹), em solução de CH₂Cl₂, 0, 1 mol L⁻¹ de PTBA, 100 mV s⁻¹. A) Varredura de 0,0 a 1,2 V; B) Varredura de 0,0 a 1,5 V.



No espectro de massas do composto, que é mostrado no Apêndice-Parte I, são mostrados dois sinais majoritários no espectro obtido, referentes à espécie catiônica $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{pyphen})]^+$, com razão m/z teórico igual a 983,1768 e m/z acurado igual a 983,1779, resultando em um erro de 1,12 ppm, e à espécie $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{pyphen})]^{2+}$, sendo a relação m/z teórico igual a 474,1037 e m/z acurado igual a 474,1038, com erro de 0,21 ppm. Estes resultados indicam que não há outra espécie além do composto de interesse, no sólido obtido no processo de síntese do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$.

Tais dados apontam para o fato de que o conjunto de sinais denotados anteriormente no espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ não são devido à existência de outra espécie diferente daquela de interesse. Sendo assim, na investigação da possibilidade de isomerismo, neste caso, mais especificamente existência de conformêros, promoveu-se análises de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em outros solventes, obtendo-se os conjuntos de sinais dispostos na Figura 4.5. Em cada solvente utilizado se observa diferentes conjuntos de sinais, e apenas em metanol se tem os dois dupletos que seriam esperados inicialmente, indicando que neste ambiente há completa conversão para uma única espécie. Nos outros solventes há diferentes conformações, influenciadas pela solvatação, constante dielétrica, polaridade, entre outras características do meio.

FIGURA 4.5-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ da espécie CPP em diferentes solventes, na região de alta frequência dos espectros.



Em solventes coordenantes, tal como metanol, espera-se a geração de espécies em que esse solvente substitua um dos ligantes Cl na estrutura, gerando a espécie $[\text{RuCl}(\text{MeOH})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{Cl}$, conforme relatado em trabalhos anteriores do grupo LERCI para o composto similar $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$, que na presença desse solvente gera a espécie $[\text{RuCl}(\text{MeOH})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{Cl}$. É um resultado que também justifica a condutividade obtida para o complexo CPP em metanol, igual a $63,9 \pm 0,09 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, classificando a espécie em solução como eletrólito 1:1, bem como concorda com o deslocamento químico observado no espectro de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Na espécie original os átomos de fósforo estão posicionados *trans* a ligante clorido e átomo de nitrogênio piridínico, e na espécie gerada em metanol, o ligante Cl é labilizado e há coordenação do metanol, ocorrendo deslocamento dos sinais na região de 31 ppm ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$) para região de 53 ppm ($\text{MeOH}/\text{D}_2\text{O}$).^{92,93} Dessa forma, essa nova espécie gerada, que apresentou sinais em δ 52,45 ppm (d, $J = 39,2 \text{ Hz}$) e δ 41,21 ppm (d, $J = 39,2 \text{ Hz}$), pode justificar a diferença observada para esse solvente em comparação aos demais.

Considerando esse raciocínio, esperar-se-ia resultado similar para o sistema contendo dimetilsulfóxido, já que este solvente também possui características coordenantes. Entretanto, o que se observa nesse caso, é a definição de um conjunto de sinais, e outro conjunto de multiplicidade indefinida, com os seguintes deslocamentos químicos: [δ /ppm (multiplicidade, J/Hz)] 50,23 (m); 43,23 (d; J= 34,3); 41,20 (m); 37,13 (m); 31,07 (t, J= 33,9). A condutividade do composto CPP em dimetilsulfóxido, igual a $21,63 \pm 0,07 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ indica que há geração de espécies eletrólito 1:1, $[\text{RuCl}(\text{DMSO})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{Cl}$, mas neste caso, o sistema ainda favorece a isomeria conformacional, ainda que em menor grau com relação aos solventes não coordenantes.

Nos demais solventes, ditos não coordenantes, distintos deslocamentos químicos foram observados, sendo possível observar que, as integrais relativas concordam com pelo menos duas espécies em cada sistema. Obteve-se os seguintes deslocamentos, descritos como [δ /ppm (multiplicidade, J/Hz)], em diclorometano 44,69 (d; 34,7); 42,79 (d; 35,1); 31,10 (t; 31,3); 30,4 (s); 29,91 (d; 35,5), em clorofórmio 44,65 (d; 35,1); 43,58 (d; 34,0), em tolueno 45,67 (d; 34,9); 45,02 (d; 34,1); 30,98 (d; 39,2); 30,54 (d; 33,8).

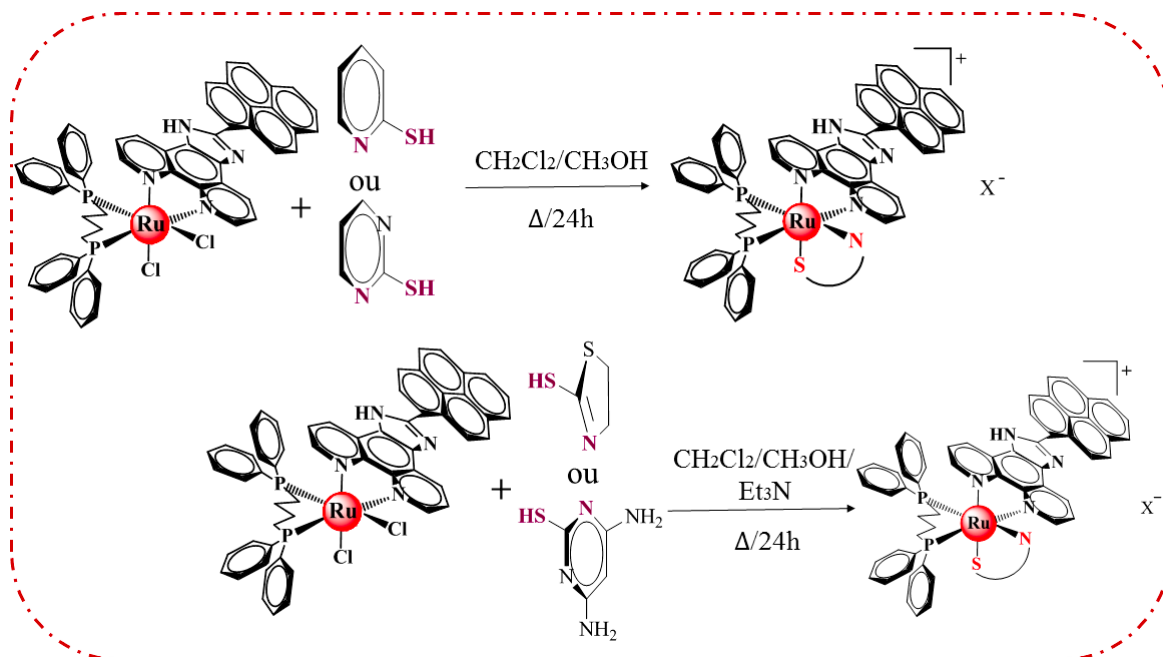
Estes resultados corroboram para a existência de rotâmeros desta molécula, que podem ocorrer devido a existência de uma ligação simples entre sistemas biarilas, com carbonos $\text{sp}^2\text{-sp}^2$, e esta conformacionalidade provoca alterações no ambiente químico como um todo, de forma que pode ser observada no núcleo do átomo de fósforo. Este tipo de estereoisomerismo, em ligações como a que aqui se apresenta, ocorrem em atropoisômeros, em que há impedimento de rotação de uma ligação simples, geralmente ocorrendo entre carbonos hibridizados em $\text{sp}^2\text{-sp}^2$, e devido a esta restrição, se torna possível identificar mais de uma espécie. Dessa forma, não se torna necessária a existência de um carbono estereogênico, uma vez que a isomeria se encontra definida pelo eixo de ligação, que neste caso seria a ligação entre o anel imidazol e substituinte pirenil.^{94,95}

4.3- Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{X}$

(Série 1) e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$ (Série 2)

4.3.1- SEÇÃO 1- Caracterização dos complexos

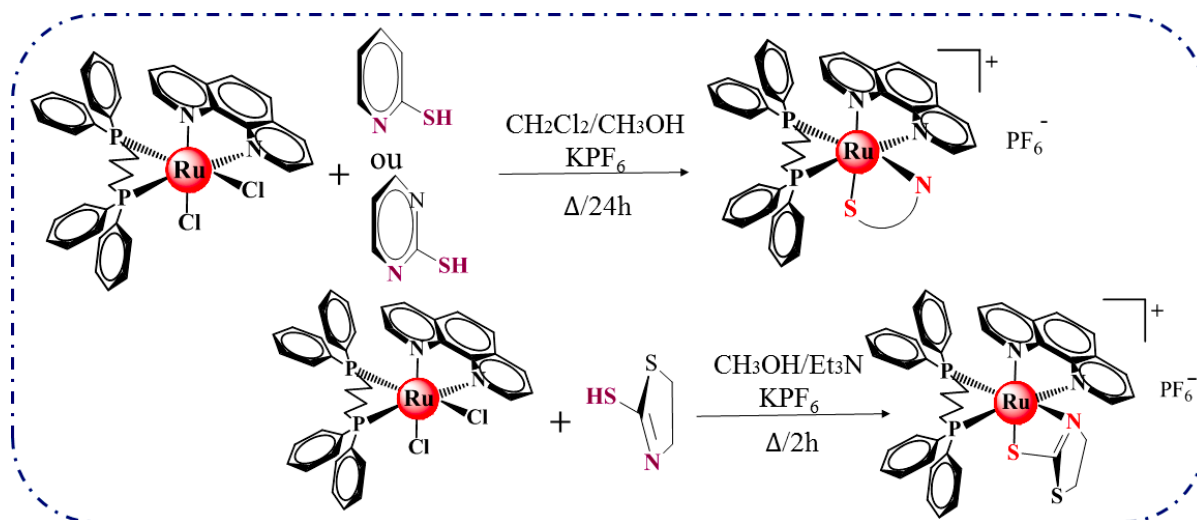
Os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{X}$ (**A1-A3** e **A4-A7**), onde dppb= 1,4'-bis(difenilfosfina)butano; pyphen= 2-(1-pirenil)-1*H*-imidazo[4,5*f*][1,10]fenantrolina; X= Cl^- (no caso de **A1-A3**) ou PF_6^- (para **A4-A7**); NS= 2-mercaptopiridina (pyS, **A1** e **A4**), 2-mercaptotiazolina (tzdt, **A2** e **A5**), 2-mercaptopirimidina (pySm, **A3** e **A6**), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp, **A7**), foram sintetizados a partir da inserção dos ligantes NS, substituindo os ligantes cloridos do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$, conforme Esquema 4.3. ESQUEMA 4.3-Esquema de síntese para obtenção dos complexos da Série 1.



No caso dos complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$, onde dppb= 1,4'-bis(difenilfosfina)butano; phen= fenantrolina; e NS= 2-mercaptopiridina (pyS, **A8**); 2-mercaptotiazolina (tzdt, **A9**); 2-mercaptopirimidina (pySm, **A13**), as sínteses foram realizadas de forma similar aos complexos da Série 1, com exceção do complexo **A10** para o qual se fez modificações na rota sintética para evitar a formação de isômeros de ligação. Todos os complexos foram gerados a partir da substituição de ligantes cloridos do

precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{phen})]$, *cis*-phen, pelos ligantes mercaptos, conforme se observa no Esquema 4.4.

ESQUEMA 4.4-Esquema de síntese para obtenção dos complexos da Série 2.



4.3.1.1- Condutimetria, Análise Elementar e Espectrometria de massas

Com exceção dos ligantes 2-mercaptotiazolina e 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, o metanol presente no sistema foi suficiente para promover a desprotonação necessária à coordenação dos ligantes mercaptos, resultando em espécies catiônicas, com carga contrabalaneada por um íon cloreto ou hexafluorofosfato. Os dados de condutividade molar que se encontram na faixa de espécies eletrólito 1:1 em dimetilsulfóxido ($20 - 62 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)⁹², bem como os dados de análise elementar corroboram com as estruturas propostas, como se observa na Tabela 4.2. Os valores de m/z acurado obtidos por espectrometria de massas para alguns destes complexos, também concordam com as estruturas, relatados no Apêndice-Parte II.

TABELA 4.2-Dados de análise elementar e condutividade (DMSO) dos complexos.

SÉRIE 1					
Composto	%C	%H	%N	%S	Λ (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹)
[Ru(pyS)(pyphen)(dppb)]Cl	68,09	4,42	6,40	2,93	27,3 ± 0,1
A1	68,34*	3,91*	6,63*	3,77*	
[Ru(tzdt)(pyphen)(dppb)]Cl	65,41	4,39	6,36	5,82	24,3 ± 0,2
A2	64,75*	3,68*	6,29*	6,85*	
[Ru(pySm)(pyphen)(dppb)]Cl	66,93	4,33	7,68	2,93	27,1 ± 0,2
A3	66,62*	4,34*	7,69*	2,93*	
[Ru(pyS)(pyphen)(dppb)]PF ₆	61,89	4,02	5,82	2,67	25,8 ± 0,5
A4	61,38*	4,23*	4,81*	3,08*	
[Ru(tzdt)(pyphen)(dppb)]PF ₆	59,50	3,99	5,78	5,29	23,6 ± 0,2
A5	59,76*	3,79*	5,83*	6,06*	
[Ru(pySm)(pyphen)(dppb)]PF ₆	60,85	3,93	6,98	2,66	27,4±0,3
A6	59,99*	3,97*	7,18*	3,34*	
[Ru(dampyS)(pyphen)(dppb)]PF ₆	59,37	4,00	9,08	2,60	29,7±0,5
A7	59,33*	4,13	9,09*	2,73*	
SÉRIE 2					
[Ru(pyS)(phen)(dppb)]PF ₆	56,13	4,19	4,46	3,33	34,5±0,3
A8	56,23*	4,44*	4,36*	3,91*	
[Ru(tzdt)(phen)(dppb)]PF ₆	53,19	4,15	4,33	6,61	30,0±0,3
A9	53,09*	4,06*	4,27*	7,10*	
[Ru(pySm)(phen)(dppb)]PF ₆	54,83	4,08	5,81	3,33	30,4±0,2
A10	54,90*	4,13*	5,85*	3,46*	

*Valores obtidos experimentalmente.

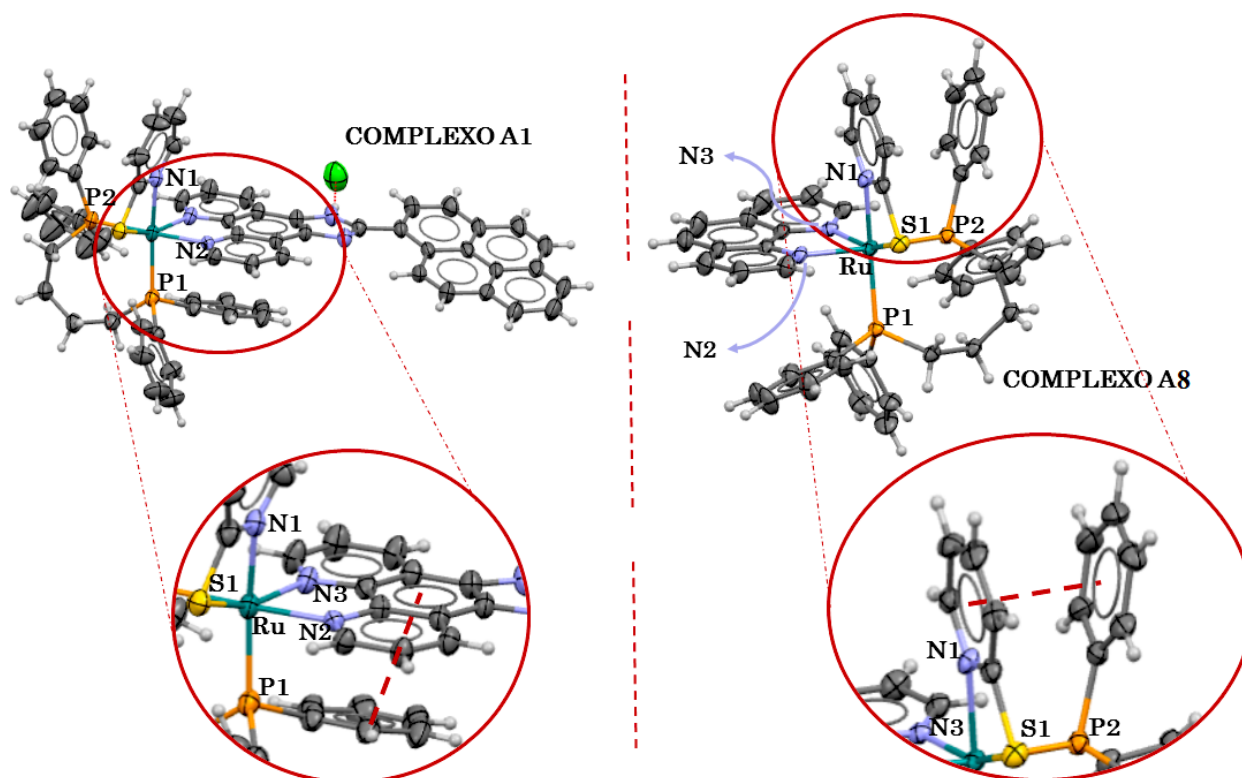
4.3.1.2- Difração de Raios X

Dentre os sete complexos abordados na Série 1, foi possível obter monocristais adequados para a técnica de difração de raios X apenas para os complexos **A1**, **A2** e **A4**, e entre os complexos da Série 2, se obteve monocristais adequados para os três compostos. Estes foram obtidos por meio de evaporação lenta de soluções dos compostos, em diclorometano/etanol (razão 1:1 v/v), cujos compostos **A1** e **A2** (Série 1) e os compostos **A8** e **A10** (Série 2) cristalizaram-se em um sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$, o composto **A9** (Série 2) no mesmo sistema, mas no grupo espacial $I2/a$, e por fim, o composto **A4** (Série 1), que cristalizou em um sistema triclinico e grupo espacial $P-1$.

As estruturas cristalográficas obtidas após refinamento dos dados, estão dispostas na Figura 4.6 para os complexos **A1** (Série 1) e **A8** (Série 2), e as outras estruturas cristalográficas dispostas no Apêndice-Parte II. Analisando as estruturas se observa que todos os ligantes se coordenam de forma bidentada, em que o átomo de nitrogênio N1 dos ligantes mercaptos se encontra em posição *trans* com relação ao átomo de fósforo P1 do ligante dppb, e o átomo de enxofre S1 *trans* ao átomo de nitrogênio N2 do ligante pyphen ou phen. As estruturas cristalográficas destes complexos estão em concordância com complexos do tipo $[Ru(NS)(bipy)(P-P)]PF_6$, em que P-P se refere a vários ligantes difosfínicos e NS a ligantes mercaptos já relatados na literatura.^{41,42,49,96-98}

Apesar da coordenação dos ligantes mercapto ocorrer com a formação de um anel quelato de quatro membros, que poderia incorrer em instabilidade do sistema, devido a tensão provocada, os compostos são estáveis. A estabilidade dos complexos é promovida pelos anéis quelatos formados tanto pela difosfina quanto pela fenantrolina.

FIGURA 4.6-Estruturas cristalinas dos complexos **A1** (Série 1) e **A8** (Série 2), com elipsoides a 30% de probabilidade, e omissão do contra-íon PF_6^- na estrutura do complexo **A8**. Ampliação das regiões com interação π -stacking de maior prevalência nos sistemas.



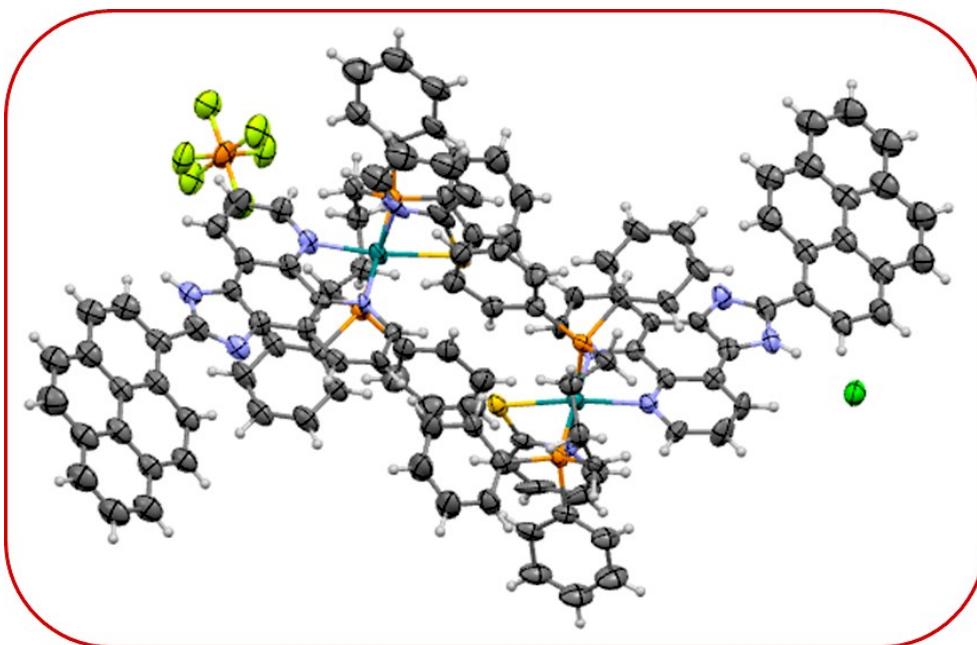
Fonte: Dados da Pesquisa.

Além da estabilidade proporcionada pela formação de anéis quelatos, outros fatores se associam à estabilização da(s) molécula(s), para a geração da unidade assimétrica, e do empacotamento cristalino. Pode-se citar interações intra e intermoleculares, entre as quais, as mais preponderantes são aquelas referentes a ligação de hidrogênio, interações π -stacking e $\text{CH}-\pi$.⁹⁹ Com relação às primeiras é possível observar ligações de hidrogênio nos complexos da Série 1, ocorrendo entre o grupamento NH do anel imidazol e o contra-íon Cl^- , obtendo-se distância do contato $\text{N}-\text{H}\cdots\text{Cl}$ igual a 3,226 Å para o complexo **A1** e 3,085 Å para o complexo **A2**.^{100,101} Esse mesmo tipo de interação pode ser observado no caso do complexo **A4**, mesmo que neste caso seja proposto o PF_6^- como contra-íon. Para este complexo é observada uma distância do contato $\text{N}-\text{H}\cdots\text{Cl}$ igual a 3,071 Å, e

a existência desta interação pode ser a justificativa deste composto ter se cristalizado diferentemente dos compostos similares.

O complexo **A4** apresenta duas moléculas em sua unidade assimétrica, contendo os contra-íons cloreto e hexafluorofosfato, conforme se verifica na Figura 4.7. Assim, a forte interação existente entre Cl^- e átomo de hidrogênio imidazólico, pode ter dificultado a total troca entre os contra-íons. Além dessa interação com átomo de hidrogênio do anel imidazol, o cloreto atuante como contra-íon também interage com átomo de hidrogênio da porção fenantrolina e da porção pireno do ligante pyphen, o que além de explicar a permanência deste contra-íon, pode justificar o fato de que nas espécies contendo ligantes mercapto não há isômeros conformacionais, como observado para a espécie precursora CPP.

FIGURA 4.7-Estrutura cristalina do complexo **A4** (Série 1), com elipsoides a 30% de probabilidade, exibindo os dois contra-íons que compõem a unidade assimétrica, sendo o Cl^- representado pelo elipsoide em verde.



Fonte Dados da Pesquisa.

Com relação às interações do tipo $\text{C-H}\cdots\pi$, no complexo **A1** (Série 1) ocorre uma interação intermolecular entre uma ligação C-H de um dos anéis

fenílicos com a porção pireno de outra molécula, que se diferencia dos complexos da Série 2, nos quais esta interação intermolecular ocorre entre ligação C-H de um dos anéis fenílicos da difosfina, com um anel da fenantrolina de outra molécula.

É possível observar ainda interações intramoleculares do tipo π - π , paralelo deslocado ou “face a face deslocada” que ocorrem entre anel fenílico da difosfina e porção fenantrolina do ligante pyphen, nos complexos da Série 1, como mostrado na Figura 4.6 para o complexo **A1**. O mesmo pode ser observado no complexo **A9**, da Série 2, em que há este tipo de interação entre anel do ligante fenantrolina e anel fenila da difosfina dppb, diferenciando-se dos demais complexos da mesma série, que têm essa interação mais pronunciada entre anel do ligante mercapto e anel fenílico da difosfina, como pode ser observado para o complexo **A8** na Figura 4.6.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Para os compostos da Série 2 foram ainda observadas interações intermoleculares do tipo C-H...S, que assim como em compostos similares relatados,³⁵ ocorrem entre o átomo de enxofre como aceptor de hidrogênio, dos ligantes mercaptos, nos complexos **A8** e **A10**, com um dos grupos metileno (-CH₂) existente na cadeia alifática da dppb, atuando como doador de hidrogênio, com uma distância de contato entre 2,8 e 2,9 Å. Entretanto, apesar dessa interação intermolecular também ser observada no complexo **A9**, ocorre entre S-mercapto e C-H do anel aromático da fenantrolina.³⁵

Todos os compostos apresentam geometria octaédrica distorcida em torno do centro metálico, dado os ângulos de ligação. Analisando os dados de comprimento de ligação e comparando-se com espécies similares, aqueles relacionados às ligações mais próximas ao centro metálico se encontram de acordo com o já relatado.^{34,105,106} Como os ligantes mercaptos têm caráter σ -doador e π -receptor, enquanto os ligantes cloridos apresentam apenas caráter doador, espera-se que ocorra mudanças nos comprimentos de ligação após a substituição destes cloridos na espécie precursora. Apesar de não ser possível essa

comparação com relação aos complexos da Série 1, é possível verificar que há alterações do complexo *cis*-phen para os complexos da Série 2. Os comprimentos e ângulos de ligação estão dispostos na Tabela 4.3.

Os comprimentos de ligação referentes a Ru-S1 e Ru-N1 são menores com relação ao que se observa para Ru-Cl na espécie precursora, de forma mais pronunciada na troca do ligante clorido por N-mercaptop, devido aos raios atômicos de cada átomo envolvido. É observado um padrão com relação a ligação Ru-P1, onde há um aumento no comprimento dessa ligação após a coordenação dos ligantes mercaptos, devido às propriedades π -aceptoras dos ligantes mercapto, já mencionadas. De forma indireta, como os dados entre as séries converge, é possível concluir um mesmo comportamento para todos os complexos, séries 1 e 2.

TABELA 4.3- Principais ângulos e comprimentos de ligação em torno do centro metálico das estruturas

Comprimento de ligação (Å)							
SÉRIE 1				SÉRIE 2			
LIGAÇÃO	A1	A2	A4	<i>cis</i> -phen	A8	A9	A10
Ru1-S1	2,4338(15)	2,4578(12)	2,413(3)	-	2,406(2)	2,4211(10)	2,4049(10)
Ru1-P1	2,3180(16)	2,3073(11)	2,299(3)	2,2861(11)	2,300(2)	2,2980(10)	2,3090(11)
Ru1-P2	2,3153(14)	2,3043(12)	2,328(3)	2,3225(11)	2,327(2)	2,3151(10)	2,3348(10)
Ru1-N1	2,110(5)	2,130(3)	2,122(9)	-	2,124(6)	2,175(3)	2,123(3)
Ru1-N2	2,134(4)	2,103(4)	2,152(8)	2,117(4)	2,134(6)	2,137(2)	2,135(3)
Ru1-N3	2,105(4)	2,123(4)	2,121(9)	2,092(3)	2,096(6)	2,110(2)	2,116(3)
S1-C1	1,725(6)	1,712(5)	1,734(14)	-	1,739(8)	1,713(4)	1,733(4)
N1-C1	1,351(7)	1,300(5)	1,353(14)	-	1,345(9)	1,294(4)	1,357(4)
Ru-Cl1	-	-	-	2,4911(11)	-	-	-
Ru1-Cl2	-	-	-	2,4171(12)	-	-	-
Ângulo de ligação (°)							
P1-Ru-P2	94,62(5)	94,24(4)	94,34(12)	93,89(4)	92,97(8)	95,48(4)	93,11(4)
N1-Ru-S1	67,43(12)	66,84(10)	67,4(3)	-	67,74(17)	67,06(7)	67,76(8)
N2-Ru-N3	77,42(16)	77,51(13)	78,7(3)	78,17(15)	77,9(2)	78,14(9)	78,05(11)
N1-Ru-P1	168,55(13)	169,23(10)	174,4(2)	-	163,40(18)	168,72(8)	162,70(8)

4.3.1.3- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os complexos de ambas as séries foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN), com experimentos unidimensionais (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$), e bidimensionais (COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C), a partir dos quais foi possível obter informações estruturais acerca dos compostos.

Com relação às análises dos compostos, por experimentos de ressonância magnética do núcleo de fósforo, esta pode ser utilizada para auxiliar tanto no acompanhamento da síntese destas espécies, quanto na caracterização dos produtos. Diferentes ambientes químicos em que o átomo de fósforo se encontra, se refletem em diferentes deslocamentos químicos, e esse aspecto junto às constantes de acoplamento entre os átomos de fósforo, podem caracterizar o sistema.

Considerando a técnica de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, toda a análise se volta à difosfina 1,4-*bis*-difenilfosfina(butano), que se encontra na esfera de coordenação de todos os compostos estudados neste trabalho. Quando se avalia esta difosfina livre, há equivalência magnética entre os átomos de fósforo, uma vez que não há perturbação que provoque mudanças no ambiente químico em torno destes átomos, e por isto se observa um simpleto com deslocamento em aproximadamente -16 ppm, em diclorometano. Quando este mesmo ligante fosfinico é analisado na esfera de coordenação dos complexos metálicos, aqui primeiramente nas espécies precursoras, de fórmulas $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$ e $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{phen})]$, verifica-se um novo padrão, resultando em dois dupletos, devido a não equivalência magnética entre os átomos de fósforo, uma vez que nesta configuração um dos átomos de fósforo se encontra *trans* ao átomo de nitrogênio pirídínico, e o outro átomo de fósforo *trans* ao ligante clorido.

A técnica de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ pode ser utilizada no acompanhamento das sínteses, pois com a troca dos ligantes na espécie precursora, espera-se deslocamentos dos sinais nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos

resultantes, devido a um novo ambiente químico gerado em torno dos átomos de fósforo. Portanto, em tempo real é possível avaliar se há geração ou não de uma espécie diferente da inicial.

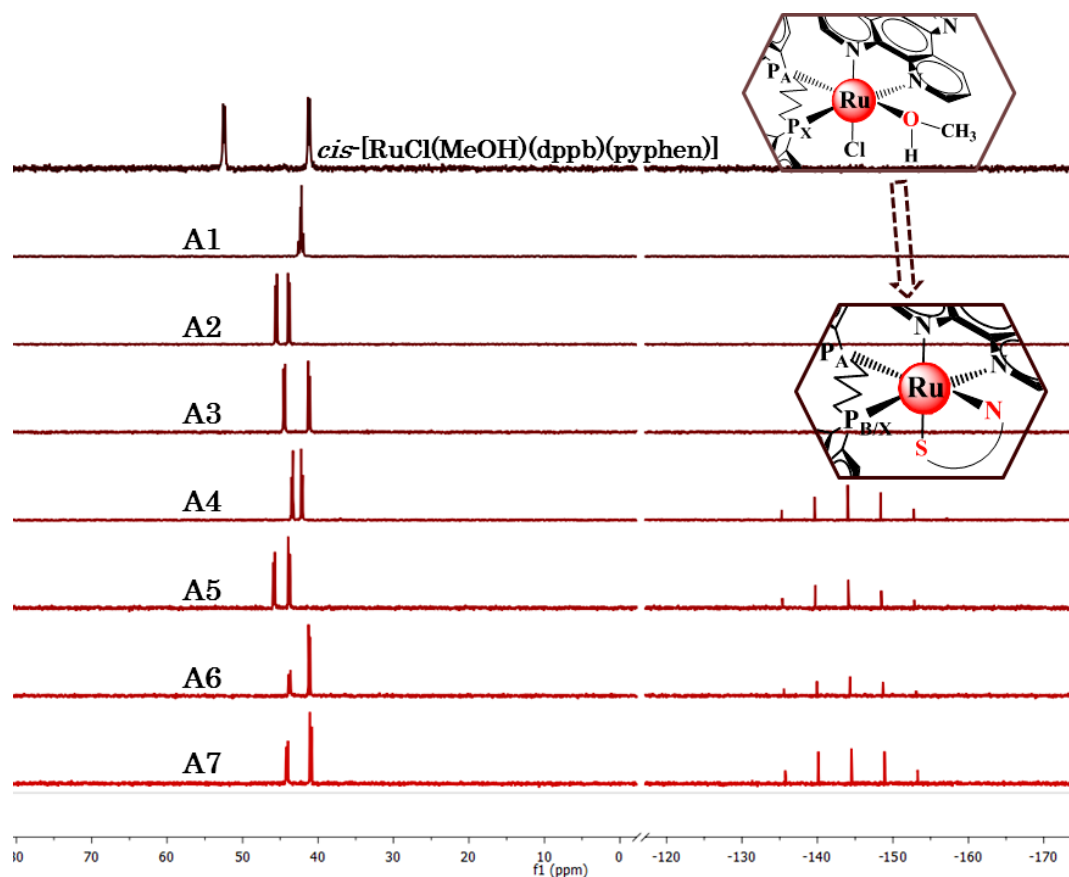
Com relação ao uso da técnica como caracterização espectroscópica dos compostos, além de ser avaliado os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, os sistemas de acoplamento para um ligante difosfínico em sua esfera de coordenação, podem ser classificados como A₂, AB e AX dependendo da diferença da frequência ressonante entre os sinais referentes aos átomos de fósforo. Como no trabalho em questão, todos os compostos contêm o mesmo ligante difosfina, dppb, o fator “ângulo de mordida (bite angle)” não afeta o deslocamento de um composto em relação a outro, bem como a classificação de separação de spins, sendo então relativos às mudanças nos ligantes mercaptos.^{35,36,107,108}

Primeiramente, comparando-se os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos compostos sintetizados e os precursores, verifica-se deslocamentos dos sinais que indicam a formação das novas espécies. Os precursores e complexos sintetizados (A2, A3, A5, A6, A7 da Série 1, e A9, A10 da Série 2) são classificados em um sistema AX dos núcleos de fósforos, enquanto os complexos contendo o ligante mercaptopiridina, de ambas as séries, são classificados como AB. Dentre os ligantes mercaptos, é observado que o 2-mercaptopiridina (pyS) não contém heteroátomos que não estejam coordenados ao centro metálico, diferentemente dos outros ligantes utilizados, provocando menor alteração no sistema, e além disso, é mais similar ao anel pirídínico com relação aos demais, o que explica a diferente classificação para os complexos que o contém.

O precursor CPP e complexos da Série 1, foram avaliados em metanol, e neste caso, o precursor tem esse solvente coordenado, conforme Figura 4.8, o qual juntamente ao ligante clorido é labilizado para coordenação dos ligantes mercaptos. Em cenário geral, o que se observa é uma grande variação no deslocamento químico referente ao átomo de fósforo (P_A) que se encontra *trans*

ao átomo de oxigênio no precursor, devido à troca para o átomo de nitrogênio do ligante mercapto. Inversamente, se observa uma pequena variação no deslocamento químico referente ao outro átomo de fósforo ($P_{B/X}$), que permanece *trans* ao átomo de nitrogênio piridínico. Devido aos dois átomos de fósforo se encontrarem em posição *trans* a átomos de nitrogênio, os deslocamentos químicos dos núcleos são próximos, conforme se observa na Tabela 4.4.

FIGURA 4.8-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para precursor e complexos da Série 1, em metanol.



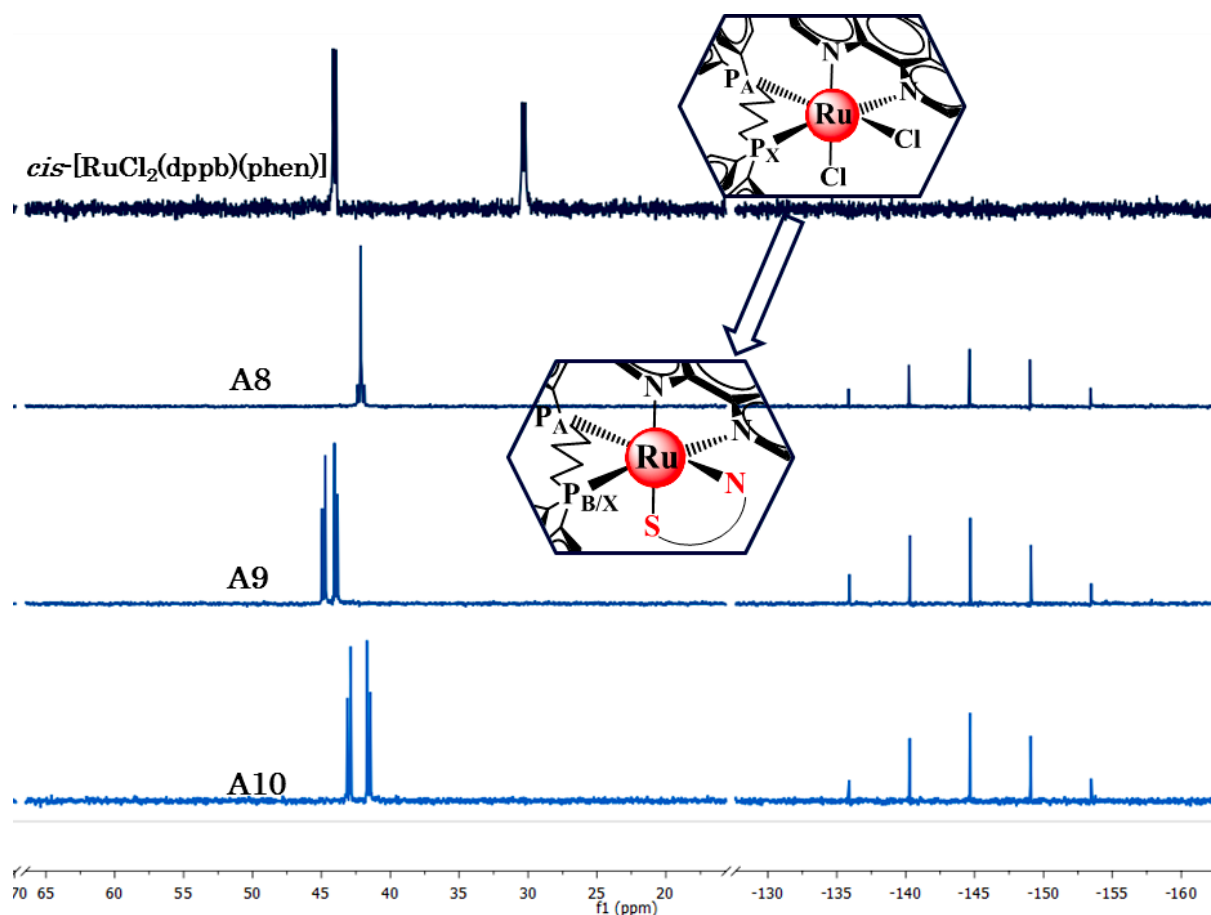
Fonte: Dados da Pesquisa.

Para os complexos da Série 2, os experimentos foram realizados em diclorometano. Assim, o que se observa com a troca dos dois ligantes cloridos da espécie precursora (Figura 4.9) pelos ligantes mercaptos, é maior deslocamento com relação ao sinal do átomo de fósforo (nomeado como P_A) no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, para o qual há troca do ligante clorido pelo átomo de nitrogênio

do ligante mercapto. Menor variação é observada no deslocamento químico referente ao outro átomo de fósforo ($P_{B/X}$), pois permanece em posição *trans* ao ligante pirídínico, com menor alteração do ambiente químico em seu entorno.

Para os complexos A4-A7 (Série 1), e os complexos da Série 2, observou-se ainda um hepteto referente ao átomo de fósforo do contra-íon hexafluorofosfato.

FIGURA 4.9-Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da Série 2.



Fonte: Dados da Pesquisa.

TABELA 4.4-Dados de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos das Séries 1 e 2.

SÉRIE 1					
COMPOSTO	$\delta\text{P}_\text{A}(\text{ppm})$	$\delta\text{P}_\text{B/X}(\text{ppm})$	$\text{J}_{\text{AB/AX}}(\text{Hz})$	$\delta\text{P}_{\text{PF}_6^-}(\text{ppm})$	$\text{J}_{\text{PF}_6^-}(\text{Hz})$
CPP	52,4	41,2	39,4	-	-
A1	42,5	42,1	35,5	-	-
A2	45,6	43,9	34,8	-	-
A3	44,5	41,2	36,2	-	-
A4	42,9	41,6	36,7	-144,5	703
A5	45,4	43,4	35,4	-144,5	708
A6	43,6	41,0	36,8	-144,5	710
A7	45,4	39,4	37,1	-144,5	711
SÉRIE 2					
cis-phen	30,3	44,0	33,6	-	-
A8	42,4	42,1	36,8	-144,5	711
A9	45,0	44,1	35,1	-144,5	711
A10	43,2	41,8	36,9	-144,5	711

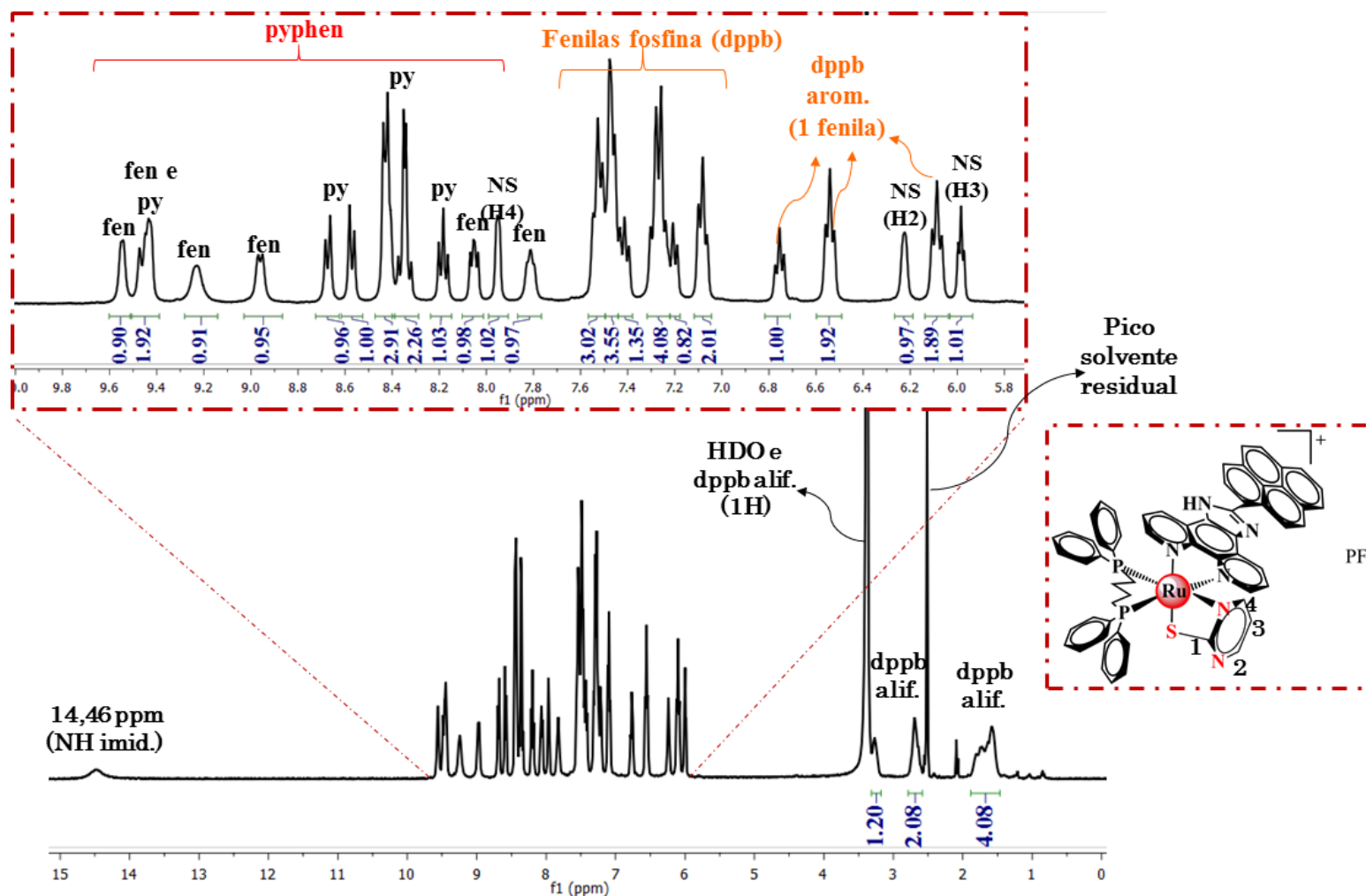
Além da ressonância magnética do núcleo de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, os espectros de RMN ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram registrados, bem como os experimentos 2D, que permitiram a atribuição dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio e carbono dos complexos em estudo. É fato que em compostos Ru/difosfina, como aqueles relatados pelo grupo LERCI, a sobreposição dos sinais dificulta a atribuição referente a cada hidrogênio. Portanto, a partir dos experimentos 1D e 2D, usualmente realiza-se uma análise que permite identificar os sinais referentes aos hidrogênios das fenilas da difosfina, anéis do ligante piridínico e dos demais ligantes.^{35,105,109}

Com relação aos complexos da Série 1, a atribuição dos espectros de RMN de ^1H foi realizada conforme se observa na Figura 4.10. Para os complexos da Série 2, uma melhor atribuição foi possível para os sinais referentes aos

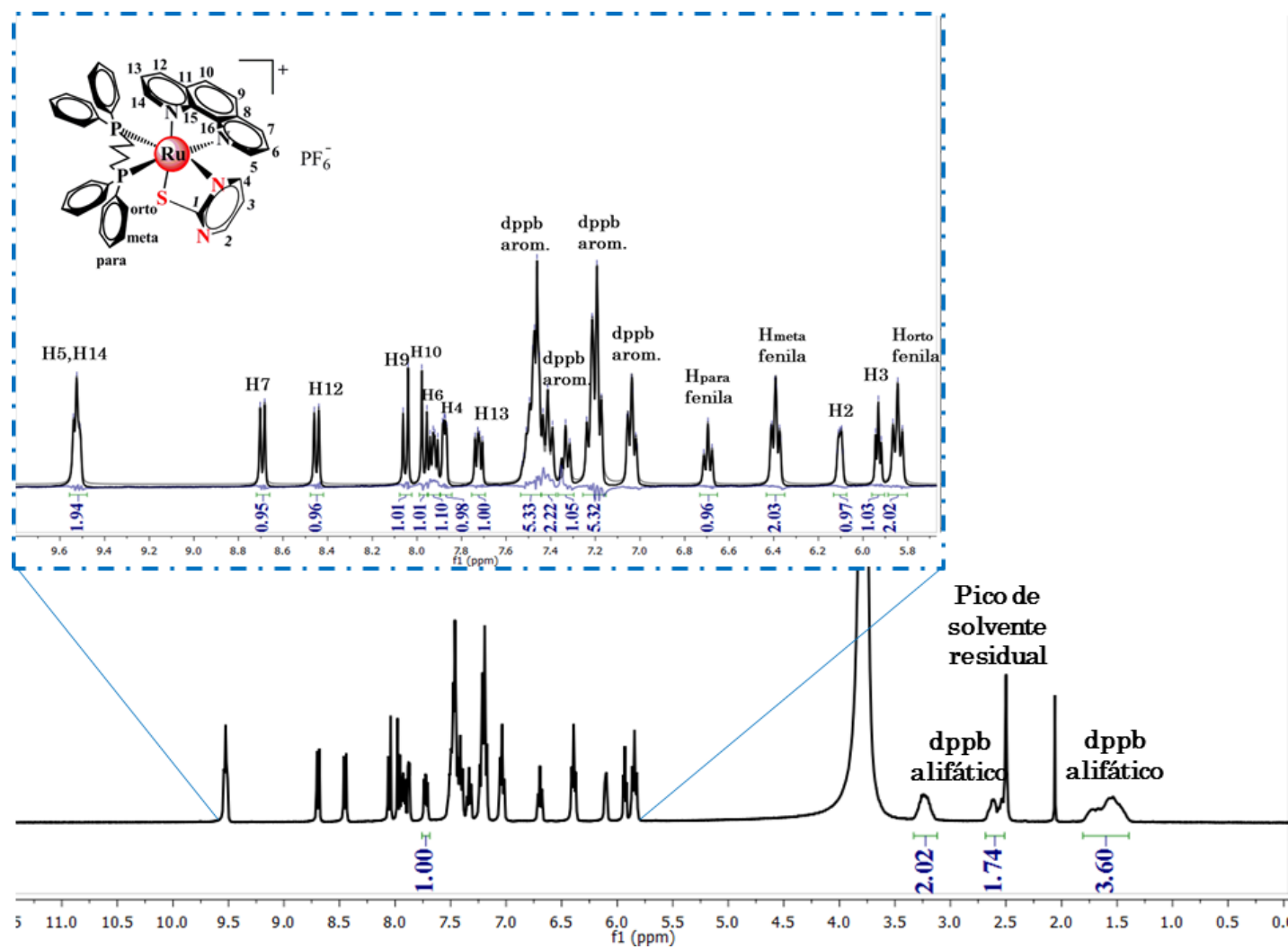
hidrogênios dos anéis piridínicos e dos ligantes mercaptos (Figura 4.11), devido a melhor separação dos mesmos e à menor quantidade de sinais referentes a hidrogênios aromáticos em relação à Série 1, condizentes com as estruturas propostas. Os espectros dos demais complexos são apresentados no Apêndice-Parte II, em que há um mesmo perfil entre compostos de mesma série, com especificidade relativa aos sinais dos ligantes mercapto.

No caso de todos os complexos as integrais relativas estão condizentes com a quantidade de átomos de hidrogênio nas estruturas propostas. É possível avaliar em alguns casos que na região alifática, o sinal referente a um dos átomos de hidrogênio, do grupamento CH_2 da difosfina, se encontra junto ao sinal referente a água, como é o caso do complexo **A6**, espectro disposto na Figura 4.10.

Com relação aos sinais atribuídos aos hidrogênios das fenilas do ligante difosfínico, verifica-se sobreposição parcial dos sinais, provocada pela coordenação e efeitos anisotrópicos que causaram a não equivalência magnética destes hidrogênios fenílicos.

FIGURA 4.10-Espectro de RMN de ^1H do complexo A6 em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática.

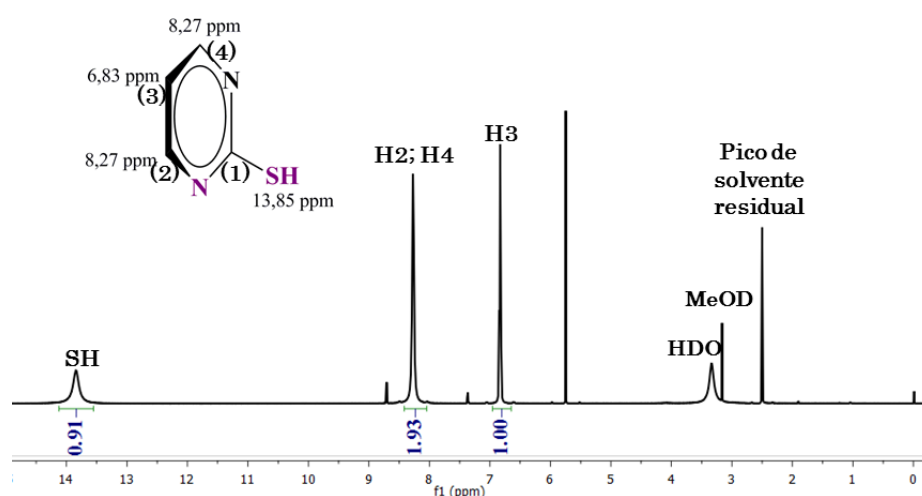
Fonte: Dados da Pesquisa.

FIGURA 4.11-Espectro de RMN ^1H do complexo **A10** em DMSO- d_6 , com ampliação da região aromática.

Fonte: Dados da Pesquisa

Escolheu-se os complexos contendo o ligante 2-mercaptopirimidina, **A6** (Série 1) e **A10** (Série 2), para exemplificar os espectros dos complexos de ambas as séries. Os compostos mercapto podem apresentar formas tautoméricas, tiol e tiona, e no espectro de RMN de ^1H do ligante 2-mercaptopirimidina (Figura 4.12), observa-se majoritariamente na sua forma tiol. Neste caso, o sinal referente ao hidrogênio do grupamento $-\text{SH}$ ocorre em 13,9 ppm, enquanto os sinais atribuídos aos hidrogênios 2 e 4 exibiram deslocamento químico em 8,27 ppm (simpleto largo, 2H), e ao hidrogênio 3 em 6,83 ppm (triplete, 1H).¹¹⁰ Nos espectros dos complexos, não há sinal referente ao grupo $-\text{SH}$ devido à desprotonação para consequente coordenação, e todos os outros sinais referentes aos hidrogênios mercaptos não foram equivalentes magneticamente, ocorrendo em região mais blindada com relação aos seus respectivos sinais no ligante livre. Especificamente, no complexo **A6** esses sinais são atribuídos em: δ 7,95 ppm (d, 1H), H4; δ 6,22 ppm (d, 1H), H2; e δ 5,98 ppm (t, 1H), H3. Para o complexo **A10** estes mesmos sinais ocorrem em: δ 7,88 ppm (d, 1H), H4; δ 6,10 ppm (d, 1H), H2; e δ 5,93 ppm (t, 1H), H3.

FIGURA 4.12-Espectro de RMN ^1H do ligante 2-mercaptopirimidina (pySm) em DMSO-d_6 .



Para os complexos da Série 1, por terem em sua esfera de coordenação o ligante fenantrolina modificada (pyphen), pode-se fazer um comparativo, onde se verifica deslocamento com relação ao sinal referente ao hidrogênio do anel imidazólico para região mais desblindada do espectro. Tal fato, ocorre mais notavelmente naqueles complexos que tem o Cl⁻ como contra-íon, que pode ser explicado como consequência da ligação de hidrogênio entre o hidrogênio imidazólico e este contra-íon, denotada nas estruturas cristalinas supracitadas.^{111,112}

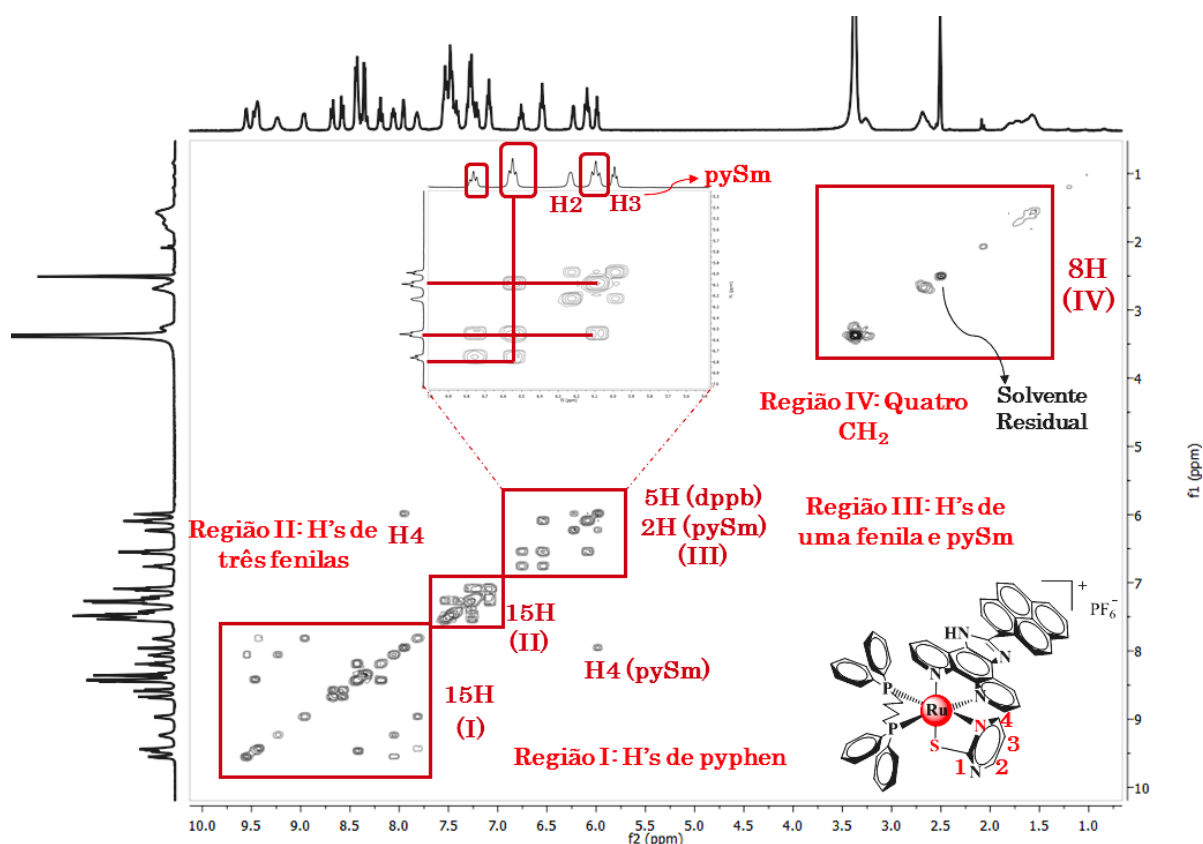
Nos espectros de RMN de ¹H de todos os complexos observa-se que os deslocamentos referentes a uma das fenilas da difosfina dppb ocorre em região mais blindada com relação às demais, e para entender porque isso acontece é necessário aliar estes resultados de ressonância àqueles de difração de raios X, além de dados já observados e discutidos na literatura.^{109,113}

É relatado na literatura, que compostos contendo os ligantes 1,4-*bis*-difenilfosfina(butano)-dppb, e diimina com geometrias octaédricas, podem exibir interações π -stacking, cujos efeitos podem ser geralmente observados no RMN ¹H, com algumas exceções, por exemplo, em interação π -stacking face-off. Esta interação π -stacking face-off ocorre, por exemplo, na espécie [RuCl₂(bipy)(dppb)], colaborando para estabilização conformacional do sistema, entretanto não promove blindagem dos hidrogênios envolvidos na interação.¹¹⁴ Já nos compostos do tipo [Ru(dppb)(bipy)₂](ClO₄)₂, relatados por Silveira, R.G., uma interação π -stacking do tipo “parallel-offset” promove blindagem dos hidrogênios das fenilas fosfínicas que estão sob efeito da corrente de anel exercida pelos ligantes diimínicos, que difere da espécie precursora pela maior sobreposição de interação com os ligantes bipyridínicos.¹⁰⁹ Nos espectros de ¹H, este efeito gera uma divisão clara dos hidrogênios fosfínicos envolvidos na interação em comparação aos demais hidrogênios fosfínicos dos complexos.

No caso dos complexos em estudo neste trabalho, interações π - π stacking ocorrem nas duas séries de compostos, mas de formas distintas. Nos

espectros de RMN de ^1H dos complexos de ambas as séries, é possível observar quatro grupos de hidrogênios com deslocamentos químicos distintos. Nos mapas de contorno COSY (^1H - ^1H), é possível visualizar tais grupos de hidrogênios, exemplificado na Figura 4.13 para o complexo **A6** (Série 1), a partir dos quais destaca-se principalmente os deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes às fenilas da difosfina, que seriam as regiões II e III. A região II contendo 15H, relacionado à três fenilas que apresentam deslocamentos químicos similares entre os respectivos hidrogênios, e a região III com 5H, referente à uma das fenilas, que para o complexo **A6**, estão em deslocamentos muito próximos aos sinais referentes ao ligante pySm. Os hidrogênios da fenila, que constituem a região III, são mais blindados quando comparados aos hidrogênios das fenilas na região II.

FIGURA 4.13-Mapas de contorno de RMN COSY (^1H - ^1H) obtido para o complexo **A6** em DMSO-d_6 .



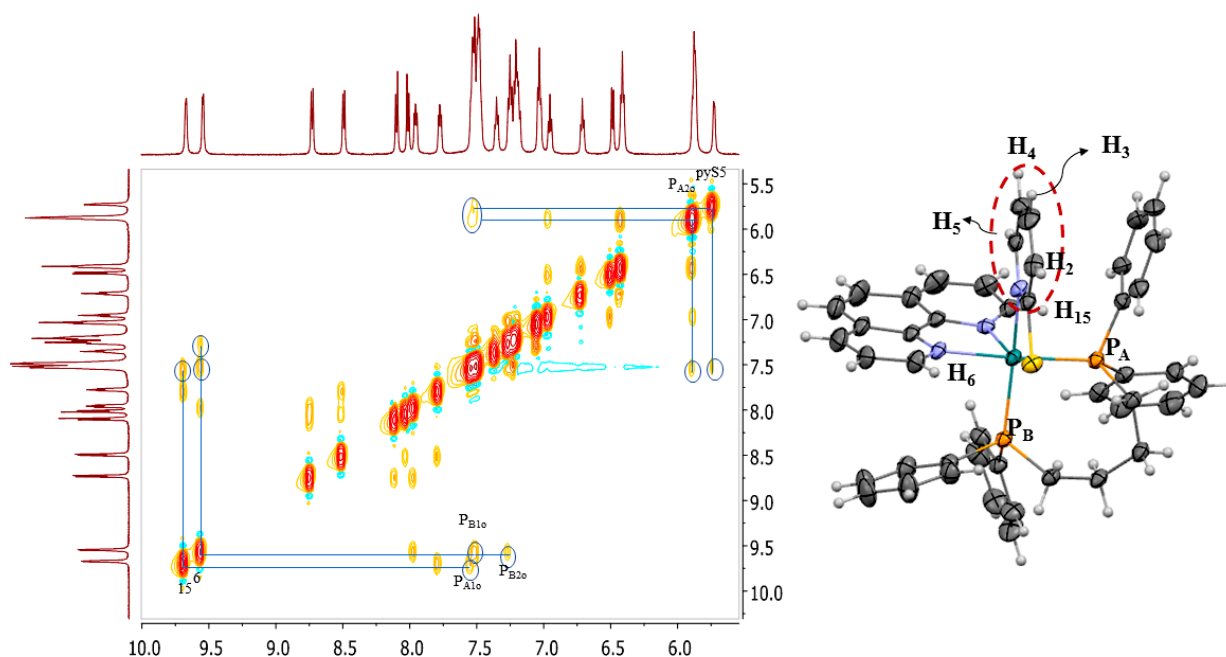
Fonte: Dados da Pesquisa.

Os hidrogênios fenílicos dos complexos da Série 1 apresentam esse perfil nos espectros de RMN de ^1H devido à interação de uma das fenilas com a porção fenantrolina do ligante pyphen, que ocorre em uma interação paralelo deslocado. Com relação aos complexos da Série 2, nos complexos **A8** e **A10** torna-se mais factível que a diferenciação (blindagem) de uma das fenilas ocorra devido a interação com os ligantes mercaptos. No complexo **A9**, onde não se tem essa interação com o respectivo ligante mercapto, a interação da fenila com o ligante fenantrolina ocorre de forma efetiva, divergindo dos outros complexos da mesma série, em uma interação π -stacking paralelo deslocado. Estes resultados evidenciam como os diferentes ligantes mercaptos podem influenciar em diferenças estruturais, neste caso, nas interações intramoleculares.^{103,109}

Para avaliar essas possíveis interações $\pi \dots \pi$ stacking nos complexos **A8** e **A10** da Série 2, fez-se análise NOESY ^1H - ^1H para o complexo **A8**, que resumidamente, permite observar a correlação espacial entre hidrogênios. Na Figura 4.14 observa-se o mapa de correlação NOESY 2D, onde se verifica acoplamento espacial do H6 da fenantrolina com os hidrogênios em posição orto das fenilas do fósforo P_B , enquanto o H15 acopla com hidrogênio orto de uma das fenilas ligadas ao P_A . Ainda que seja observada interação do ligante mercapto com alguma fenila na região de 7,58-7,65 ppm, é difícil diferenciar a fenila com a qual ocorre essa interação, devido a sobreposição de sinais.

Contudo, a partir da estrutura cristalográfica, a possibilidade de interação efetiva do ligante mercapto é com uma das fenilas ligada ao fósforo P_A . Além disso, apesar de ocorrer interação de hidrogênio da fenantrolina com fenila deste mesmo fósforo, não há possibilidade de interação do tipo π -stacking entre essas duas porções da molécula, quando se analisa a estrutura tridimensional, obtida por meio de difração de raios X.

FIGURA 4.14-Mapa de contorno de NOESY ^1H - ^1H do complexo **A8** em DMSO-d_6 , e numeração da estrutura de acordo.

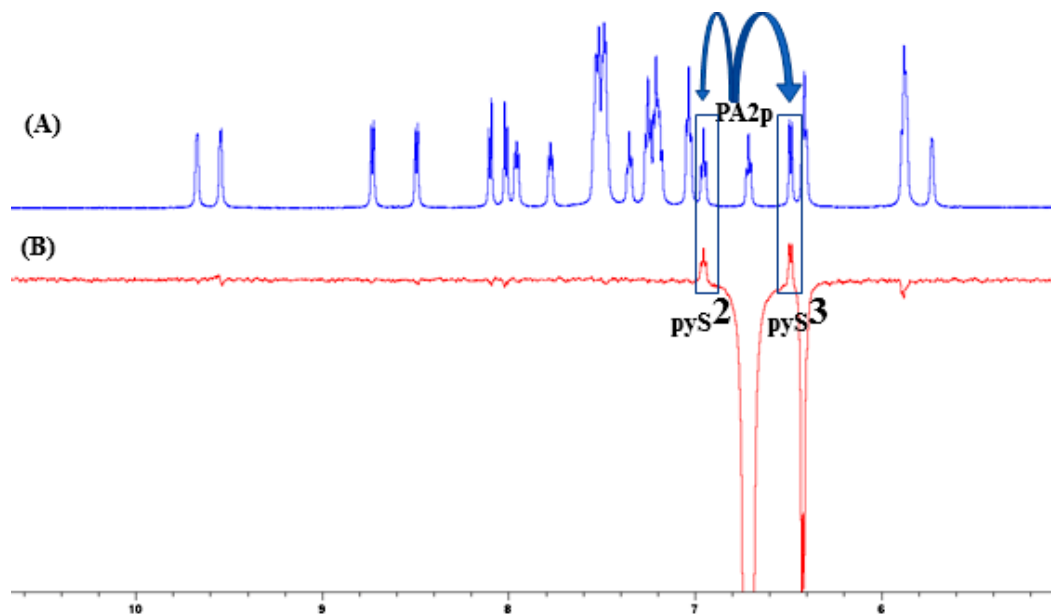


Fonte: Dados da Pesquisa.

No espectro NOESY 1D (Figura 4.15-B), observa-se sinais de baixa intensidade referente aos hidrogênios do ligante 2-mercaptopiridina, mais especificamente os hidrogênios H_2 e H_3 , respectivamente, ao irradiar-se o hidrogênio *para* do anel fenílico ligado ao átomo de fósforo P_A . Este resultado indica acoplamento espacial entre esses hidrogênios, mas não foi observado acoplamento dos demais hidrogênios desta fenila com os hidrogênios do ligante mercapto.

Apesar de mais investigações serem necessárias, como por exemplo, proceder mesma análise com o complexo **A10**, que não possui sobreposição de sinais referentes aos átomos de hidrogênio do ligante mercapto e fenilas da difosfina, os resultados obtidos indicam que a interação entre o ligante mercapto e fenila da difosfina ocorre de tal forma que pode influenciar na blindagem, corroborando com resultado supracitado na difração de raios X.

FIGURA 4.15-(A) Espectro de RMN de ^1H na região aromática do complexo **A8**; (B) Espectro de NOESY ^1H - ^1H do complexo **A8**, com frequência de irradiação de 4028 Hz (O1p 6.72 ppm).



Fonte: Dados da Pesquisa.

Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, o sinal mais desblindado é atribuído ao carbono quaternário (C1) dos ligantes mercaptos. No ligante 2-mercaptopirimidina esse carbono tem sinal atribuído em 181,4 ppm, que se encontra em região mais desblindada nos espectros dos complexos **A6** e **A10** (além do complexo **A3**), correspondentes aos deslocamentos em 185,7 e 186,0 ppm, respectivamente, tendo sido realizada atribuição com base nos acoplamentos nos experimentos bidimensionais, e resultados da literatura. A coordenação dos ligantes mercaptos, que ocorre via átomos de nitrogênio e enxofre afetam o comprimento de ligação do C1 com estes átomos, concordando com os resultados obtidos na difração de raios X, uma vez que essa maior desblindagem ocorre devido a efeitos anisotrópicos.^{35,106}

Uma exceção pode ser observada nos complexos que contêm o ligante 2-mercaptotiazolina em sua esfera de coordenação (complexos **A2** e **A5-Série 1**, e complexo **A9-Série 2**), onde se observa blindagem do sinal referente ao

carbono C1, com relação ao ligante livre. Apesar disso, as distâncias de ligação observadas na difração de raios X, ao comparar-se dentre os complexos da Série 2, por exemplo, mostra que há perda do caráter de dupla ligação C-S, com valores muito similares entre os três complexos. Maior alteração é observada com relação à ligação C-N, pois no complexo **A12** esse comprimento de ligação é menor que nos demais, se assemelhando mais ao comprimento de dupla ligação com relação aos outros complexos, o que pode justificar a blindagem do sinal referente ao C1, nos complexos contendo o ligante tzdt. Mesmo comparativo pode ser efetuado entre os complexos da Série 1, obtendo-se efeitos similares.

4.3.1.4- Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível e de fluorescência

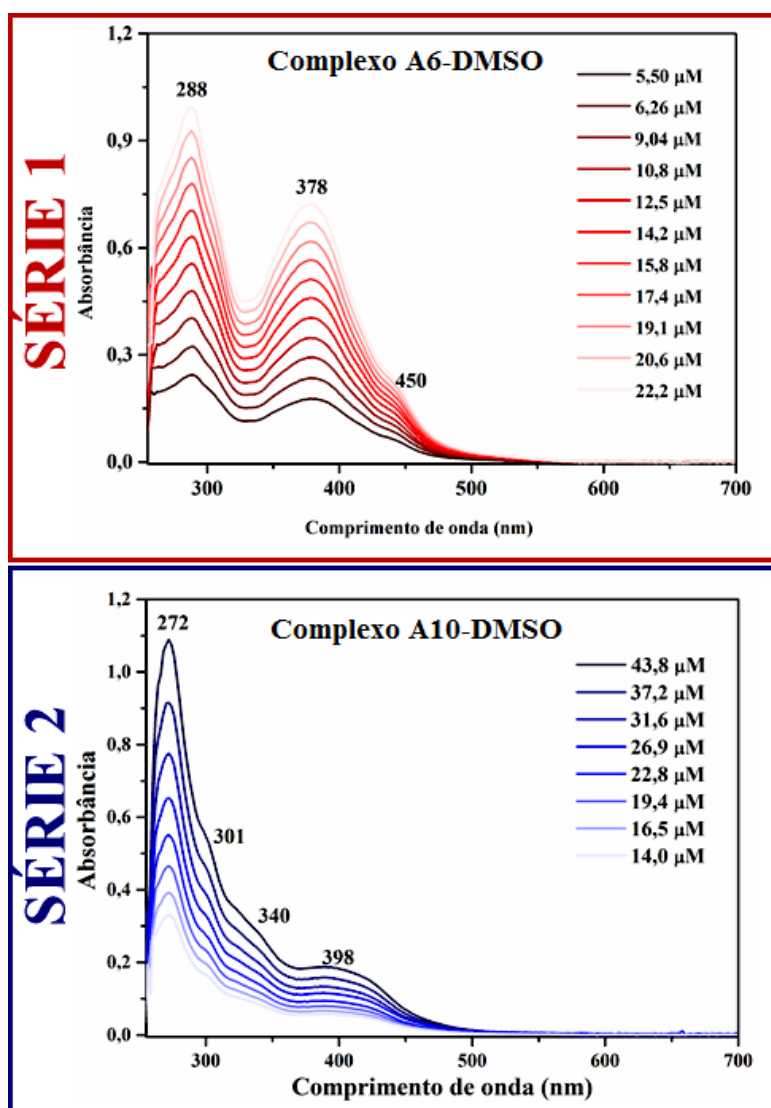
Como todos os compostos apresentam grupos cromóforos, faz-se importante sua análise espectroscópica, na região do ultravioleta-visível, uma vez que possibilita calcular parâmetros intrínsecos aos sistemas, assim como possibilita comparação com os ligantes livres. Sendo assim, todos os compostos foram analisados, utilizando soluções preparadas em dimetilsulfóxido em diferentes concentrações, a fim de possibilitar o cálculo da absorvidade molar, obtendo-se os dados expostos na Tabela 4.5, e espectros da Figura 4.16 (complexos **A6** e **A10**). Os demais espectros podem ser observados no Apêndice-Parte II.

Os compostos apresentam bandas em comprimentos de onda muito próximos, quando não iguais, justificável pela similaridade estrutural entre todos eles, e pelo fato de que os ligantes mercapto que diferenciam um composto do outro também apresentam grande similaridade espectroscópica, com maior diferença para o ligante tzdt que apresenta apenas uma banda. O ligante pyphen apresenta transições em mesma região que os demais, no entanto, contribui para banda de menor energia nos complexos da Série 1, por volta de 450 nm.

As bandas em aproximadamente 290 e 380 nm dos compostos podem ser atribuídas às transições intraligantes devido a excitação envolvendo orbitais $\pi-\pi^*$, de todos os ligantes quelatos que compõem a esfera de coordenação do centro metálico. Já a banda que se encontra entre 440-450 nm, que se apresenta como um ombro nos espectros da Série 1, pode ser atribuída como transferência de carga do metal para o ligante, ocorrendo em maior energia para os complexos da Série 2, provavelmente afetado pela diferença estrutural entre os compostos das Séries. Esta transferência ocorre com contribuição de transições do tipo $d\pi\text{Ru} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi$ (dppb), e de orbitais d do centro metálico para orbitais π^* de simetria apropriada dos ligantes bipyridínico e mercapto, conforme já observado na literatura para compostos inorgânicos semelhantes.^{97,115-119}

Esta atribuição está de acordo com atribuições já realizadas na literatura, para complexos contendo o ligante pyphen, como por exemplo, os complexos $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pyip})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{Hdpa})(\text{pyip})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde phen se refere a fenantrolina, pyip ao ligante 2-(1-pirenil)-1*H*-imidazo[4,5*f*][1,10]fenantrolina e Hdpa é a 2,2'-dipiridilamina, e com compostos correlatos do tipo $[\text{Ru}(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$.^{91,105,120}

FIGURA 4.16- Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível dos complexos A6 (Série 1) e A10 (Série 2) em DMSO, em diferentes concentrações.



Fonte: Dados da Pesquisa.

TABELA 4.5-Dados espectroscópicos na região do ultravioleta-visível para os complexos das Séries 1 e 2 em dimetilsulfóxido.

SÉRIE 1			
ESPÉCIE	λ (nm)	ϵ ($10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1}$)	Transição*
pyphen	286	$47,8 \pm 0,2$	$\pi-\pi^*$
	378	$36,4 \pm 0,2$	$\pi-\pi^*$
pySH	294	$22,9 \pm 0,3$	$\pi-\pi^*$
	374	$9,2 \pm 0,02$	$\pi-\pi^*$
pySm	294	$25,9 \pm 0,2$	$\pi-\pi^*$
	376	$2,9 \pm 0,01$	$\pi-\pi^*$
tzdt	280	$19,2 \pm 0,5$	$\pi-\pi^*$
A1	289	$53,3 \pm 0,2$	$\pi-\pi^*$
	380	$37,6 \pm 0,7$	$\pi-\pi^*$
	445	$10,9 \pm 0,4$	TCML
A2	290	$43,6 \pm 0,3$	$\pi-\pi^*$
	380	$30,8 \pm 0,2$	$\pi-\pi^*$
	450	$8,3 \pm 0,2$	TCML
A3	290	$50,0 \pm 0,1$	$\pi-\pi^*$
	380	$36,8 \pm 0,1$	$\pi-\pi^*$
	442	$11,7 \pm 0,1$	TCML
A4	288	$43,8 \pm 0,08$	$\pi-\pi^*$
	380	$31,5 \pm 0,07$	$\pi-\pi^*$
	444	$7,0 \pm 0,08$	TCML
A5	288	$49,3 \pm 0,9$	$\pi-\pi^*$
	380	$34,4 \pm 0,6$	$\pi-\pi^*$
	446	$11,7 \pm 0,2$	TCML
A6	288	$44,4 \pm 0,5$	$\pi-\pi^*$
	378	$32,1 \pm 0,4$	$\pi-\pi^*$
	450	$8,0 \pm 0,1$	TCML
A7	284	$57,0 \pm 0,1$	$\pi-\pi^*$

	378	37,3±0,08	π - π^*
	442	12,2±0,09	TCML
SÉRIE 2			
A8	273	41,0±0,22	π - π^*
	298	24,4±0,18	π - π^*
	398	7,08±0,10	TCML
A9	275	33,3±0,25	π - π^*
	305	15,3±0,10	π - π^*
	418	5,25±0,03	TCML
A10	272	25,4±0,08	π - π^*
	300	12,8±0,05	π - π^*
	340	6,59±46,4	π - π^*
	398	4,35±0,07	TCML

Fonte: Dados da Pesquisa. *Atribuição de acordo com a literatura. TCML se refere à transição de transferência de carga metal-ligante.

Devido a coordenação do ligante pyphen nos compostos da Série 1, foi realizada análise do potencial fluorescente destes complexos, haja vista a espécie pyphen isoladamente, como outros derivados do pireno, apresentar fluorescência com emissão na região do azul.

Assim, os complexos **A2**, **A5**, **A6** e **A7**, foram avaliados em dimetilsulfóxido, com excitação na região de 380 nm, e emissão na faixa de 390-550 nm. Todos apresentaram fluorescência em maior ou menor grau, comparando-se entre os complexos e com dados relatados para a espécie pyphen na literatura. Os espectros referentes à essa técnica de caracterização para os referidos compostos, se encontram dispostos no Apêndice-Parte II.

4.3.1.5- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Da mesma forma que se faz importante a avaliação espectroscópica na região do ultravioleta-visível, também faz parte da caracterização do sistema avaliar os possíveis modos vibracionais, a partir da absorção na região do

infravermelho, especificamente $4000\text{--}380\text{ cm}^{-1}$. Esses modos vibracionais podem evidenciar a coordenação do ligante com o metal, uma vez que as vibrações das moléculas livres e coordenadas ocorrem em frequências distintas. Na Tabela 4.6 são apresentados os principais modos vibracionais denotados para os complexos, apresentados no texto para parte dos complexos, os quais são aqui discutidos, e os demais são descritos no Apêndice-Parte II. Os espectros são apresentados para os complexos **A6** (Série 1) e **A10** (Série 2) na Figura 4.17, e dos demais complexos no Apêndice.

Por meio da análise dos principais modos vibracionais, observa-se que todos os complexos da Série 1 apresentam bandas de absorção na região de $3360\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento da ligação N-H do anel imidazólico (ligante pyphen), em maior energia com relação a estiramento dessa ligação no ligante livre. Esta variação ocorre provavelmente devido a contribuição de ligação de hidrogênio envolvendo o grupamento NH, que ao menos nos complexos **A1-A3** ocorre com o contra-íon cloreto, conforme mencionado no tópico Difração de Raios X. No caso do complexo **A7**, as bandas nessa região são também atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo NH_2 , do ligante mercapto damp.^{121,122}

O fato de existir bandas nessa região impede a correlação da coordenação dos ligantes mercaptos via átomo de nitrogênio, já que a ausência de bandas atribuídas como referentes a NH podem induzir à conclusão de que não há o ligante em sua forma tiona, muito provavelmente devido à coordenação. Apesar disso, não há dúvidas da coordenação via este átomo dos ligantes, devido às caracterizações anteriormente discutidas. A ausência de banda nessa região, nos complexos da Série 2, no entanto, fornece indício da coordenação por átomo de nitrogênio, e por serem estruturalmente similares aos complexos da Série 1, podem fornecer este indicativo de modo indireto.^{35,56,106,123}

Embora com relação ao estiramento das ligações NH nos complexos da Série 1, não se possa ter conclusões acerca da coordenação dos ligantes

mercaptos por IV, o contrário se aplica ao estiramento da ligação S-H (forma tiol). A ausência de bandas de absorção na região de estiramentos S—H ($2400\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$), é indicativo de que o ligante esteja coordenado via átomo de enxofre. Tal fato se torna ainda mais factível com o deslocamento do estiramento da ligação C-S, que nos ligantes livres ocorre por volta de 1285 cm^{-1} , e nos complexos na região de $1230\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ com fraca intensidade, e em menor energia devido a perda de caráter de dupla ligação entre carbono e enxofre, após a coordenação.^{35,106,124}

Nos espectros de IV dos complexos **A5-A7** (Série 1) e **A8-A10** (Série 2) há bandas de absorção referentes a estiramento e deformação angular das ligações P-F do contra-íon PF_6 , que também caracterizam estes sistemas. Estas bandas seriam esperadas no complexo **A4**, e apesar de se observar uma banda em aproximadamente 840 cm^{-1} que pode ser atribuída como contendo contribuição do estiramento da ligação P-F, não há banda referente à deformação angular. Considerando a estrutura cristalina para este complexo, a existência de metade do contra-íon por molécula da unidade assimétrica, pode ter influenciado nessas bandas, uma vez que ambas as técnicas permitem análise do composto no estado sólido, sendo possível tal correlação.

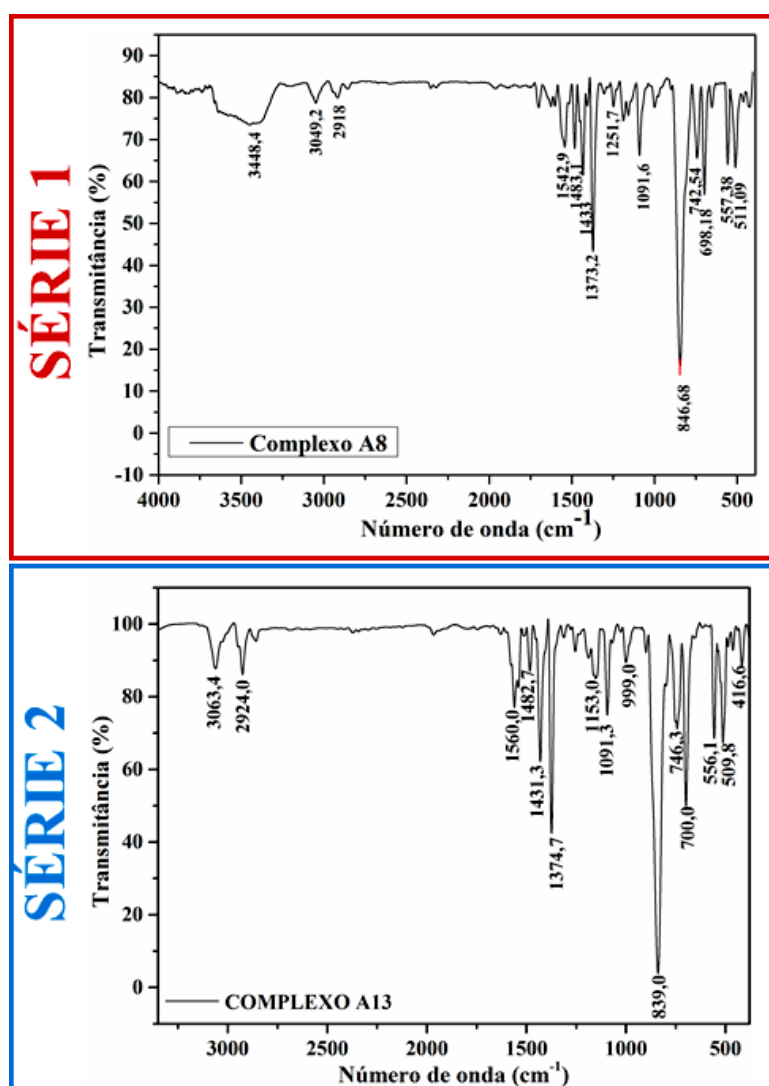
TABELA 4.6-Principais modos vibracionais observados na região do infravermelho para alguns dos complexos das Séries 1 e 2.^{56,121,122,124-126}

Modo vibracional	Frequência vibracional (cm^{-1})			
	SÉRIE 1		SÉRIE 2	
	A1	A6	A8	A10
$\nu\text{NH e/ou NH}_2$	3414	3448	-	-
$\nu\text{CH}_s(\text{arom.})$	3043;	3049; 2918	3059; 2922	3063;
$\nu\text{CH}_{as}(\text{arom.})$	2924			2924
$\nu\text{C}=\text{C}$	1578	1543	1580	1560
$\nu\text{C}=\text{N}$	1433	1433	1429	1431

vC-S	1248	1241	1262	1256
β C-H(arom.)	1136	1161	1134	1153
v anel	993	998	998	999
v PF ₆	-	847	839	839
δ PF ₆	-	557	557	556
v P- ϕ e q	1090	1092	1097	1091
v P-C (alif.)	741	742	732	746

v-vibração de estiramento; CH_s-estiramento C-H simétrico; CH_{ass}-estiramento C-H assimétrico; β -vibração deformacional no plano; δ -deformação angular; ϕ = anel fenílico; e q= estiramentos referentes aos átomos de carbono e hidrogênio, com contribuição dos P-fenil.

FIGURA 4.17-Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos complexos **A6** (Série 1) e **A10** (Série 2)

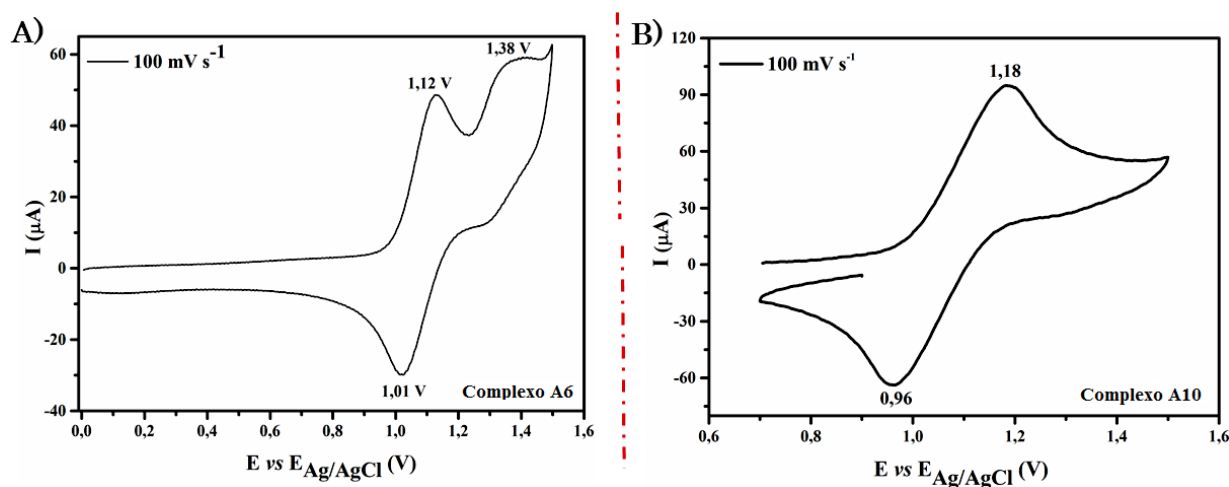


4.3.1.6- Estudo eletroquímico

O comportamento eletroquímico dos complexos foi estudado por meio de voltametria cíclica, empregando-se um sistema de três eletrodos, um eletrodo de referência Ag/AgCl, um contra-eletrodo e um eletrodo de trabalho, ambos de platina. Apenas um processo referente ao par redox Ru(II)/Ru(III) foi observado nos voltamogramas dos complexos da Série 2, e o processo referente a esse par redox pode ser observado na faixa de 0 a 1,2 V para os complexos da Série 1, conforme exemplo da Figura 4.18, onde apresenta-se os voltamogramas dos complexos **A6** (Série 1) e **A10** (Série 2). Os demais voltamogramas são apresentados no Apêndice-Parte II.

É válido ressaltar que nos complexos da Série 1, além deste processo referente ao par redox do centro metálico, em uma faixa mais ampla é possível observar um outro processo anódico em maior potencial, que assim como no precursor CPP, cuja caracterização foi anteriormente relatada, pode ser atribuída ao ligante pyphen, como observado no voltamograma do ligante livre relatado no Apêndice-Parte I.

FIGURA 4.18-Voltamogramas cíclicos de soluções (A) Complexo **A6** (Série 1); B) Complexo **A10** (Série 2) em 1 mmol L⁻¹ de PTBA em CH₂Cl₂ a 100 mV s⁻¹.



Comparando-se os dados voltamétricos obtidos para os complexos sintetizados com os das espécies precursoras, Tabela 4.7, os compostos finais apresentam maior potencial com relação ao processo anódico referente à oxidação de Ru(II) para Ru(III), bem como referente ao processo inverso, relativo à redução das espécies anteriormente geradas. Tal fato pode ser explicado devido a maior estabilização com a troca dos ligantes cloridos por ligantes mercapto, pois como já mencionado, enquanto os ligantes de interesse possuem características tanto doadoras quanto aceptoras, os ligantes cloridos apresentam apenas caráter doador, sendo assim torna-se mais difícil a retirada de elétron do sistema contendo os ligantes mercapto.¹²⁷

É possível avaliar a reversibilidade destes sistemas, analisando-se os parâmetros de diferença de potencial (ΔE_p) e a razão das correntes de pico (I_{pa}/I_{pc}), uma vez que é bem estabelecido, ao menos no caso de sistemas orgânicos, que em sistemas eletroquímicos reversíveis a diferença de potencial é da ordem de 100 mV, e além disto a razão I_{pa}/I_{pc} é igual ou próximo a unidade. Considerando estes dois fatores, no caso dos complexos contendo o contra-íon hexafluorofosfato, os complexos **A4** e **A6** possuem ΔE_p e I_{pa}/I_{pc} diferentes do correspondente a sistemas reversíveis, mas o complexo **A5** apesar de ter um ΔE_p igual a 100 mV, não apresenta I_{pa}/I_{pc} próximo a unidade. Com relação ao complexo **A7**, ainda que a razão I_{pa}/I_{pc} seja muito próxima a unidade, a diferença entre os potenciais indica distinção de sistema reversível. Nos complexos da Série 2, os dois fatores indicam sistemas de processos quasi reversíveis.^{35,128}

No caso dos complexos contendo o contra-íon cloreto, os dois parâmetros analisados não são satisfeitos, apresentando ΔE_p variando de 120-210 mV, e razão entre correntes de pico maior que a unidade, como o apresentado pelos complexos **A4-A6**. Portanto, conclui-se que para todos os complexos se tem um sistema quasi-reversível, assim como na espécie precursora, uma vez que também não podem ser classificados como irreversíveis por terem um processo catódico envolvido.

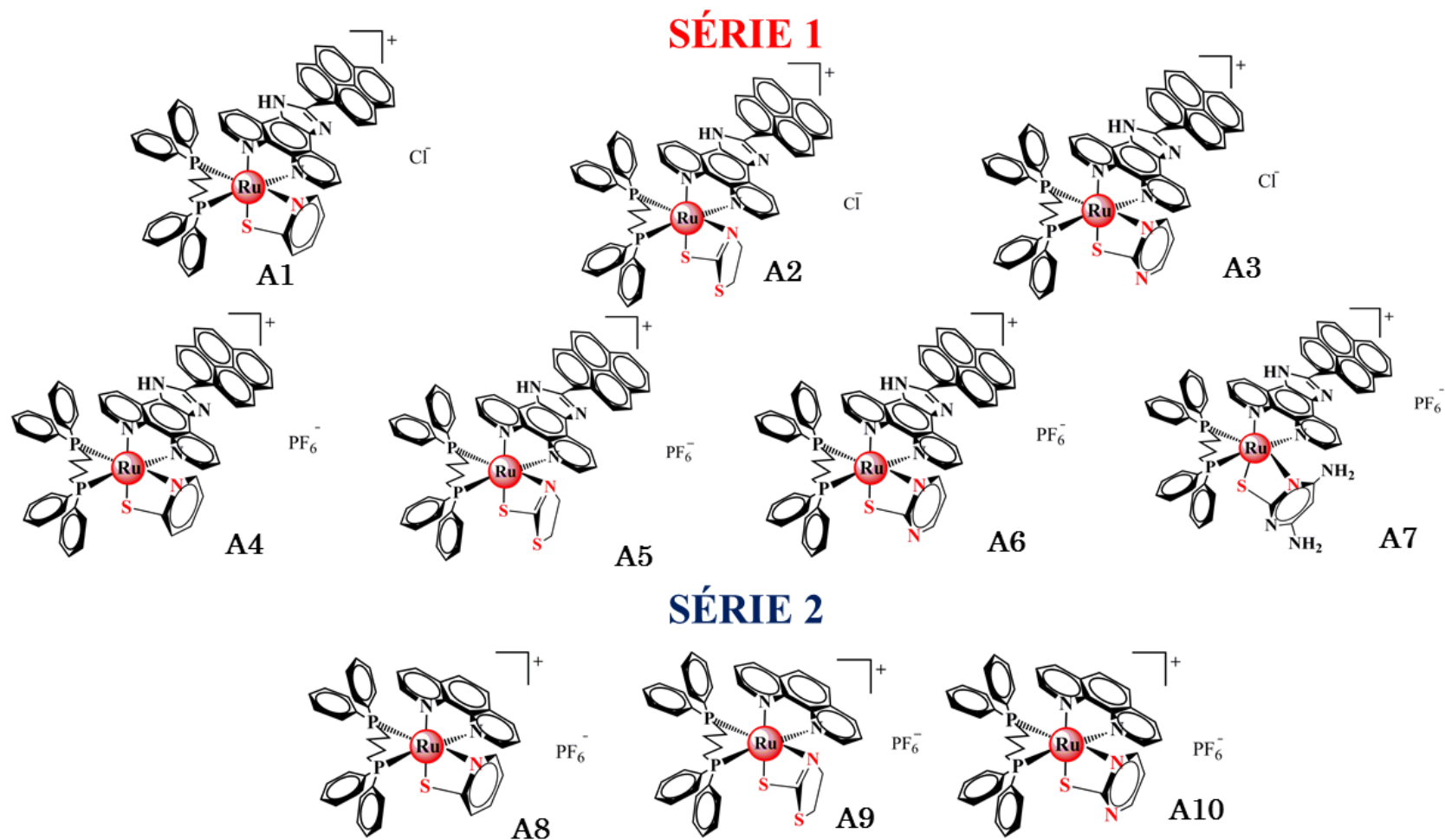
Os resultados aqui dispostos podem ser comparados a espécies similares já relatadas pelo grupo LERCI, do tipo $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$. Assim como em todos estes sistemas há maior estabilização nos complexos com relação às espécies precursoras, devido a entrada de ligantes com características aceptoras. Alterações mais drásticas foram observadas no caso dos compostos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (E_{pa} 1,25-1,51 V/ E_{pc} 1,25-1,35 V), o que torna esse sistema o mais distinto daqueles aqui apresentados. Os potenciais catódicos e anódicos dos compostos das Séries 1 e 2, têm no geral, valores menores com relação às espécies $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dphppy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (E_{pa} 1,09-1,39 V/ E_{pc} 0,98-1,27 V), apresentando valores mais similares aos complexos $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ (E_{pa} 0,96-1,14 V/ E_{pc} 0,87-1,01 V), o que já seria esperado dado a maior similaridade estrutural.^{35,105,106}

TABELA 4.7-Dados eletroquímicos obtidos para os complexos das Séries 1 e 2.

SÉRIE 1					
COMPLEXO	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p(V)	E_{1/2} (V)	I_{pa}/I_{pc}
A1	0,97	0,85	0,12	0,91	1,76
A2	1,21	1,04	0,17	1,12	1,98
A3	1,21	1,00	0,21	1,08	1,87
A4	0,97	0,85	0,12	0,91	1,65
A5	1,12	1,02	0,10	1,07	1,28
A6	1,12	1,01	0,11	1,06	1,35
A7	0,94	0,80	0,14	0,87	1,08
CPP	0,73	0,57	0,16	0,65	1,15
SÉRIE 2					
A8	1,00	0,84	0,16	0,92	1,15
A9	1,16	1,01	0,15	1,08	1,11
A10	1,18	0,96	0,22	1,07	1,15
cis-phen	0,78	0,63	0,15	0,70	1,13

Todas as caracterizações acima mencionadas concordam com as estruturas propostas, que se basearam nos reagentes usados para obtenção dos complexos, bem como na experiência adquirida pelo grupo LERCI. As estruturas dos compostos que constituem as Séries 1 e 2, encontram-se representadas na Figura 4.19.

FIGURA 4.19-Representação das estruturas dos compostos das Séries 1 e 2, em acordo com as estruturas propostas e com os resultados obtidos com as técnicas de caracterização.



4.3.1.7- Estudo de Estabilidade

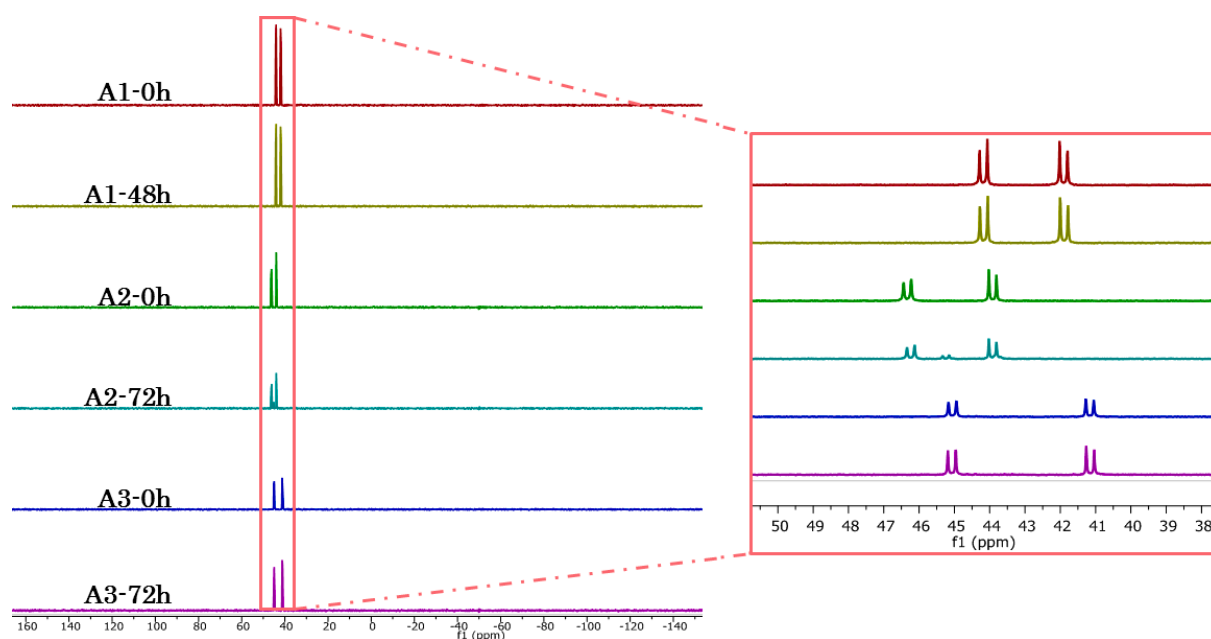
Os complexos foram analisados quanto à possibilidade de gerarem novas espécies, em solução, sob determinadas condições, informações estas importantes para os estudos posteriores, que compreendem interação com biomoléculas e ensaios biológicos. Assim, fez-se análise em DMSO/solução aquosa, utilizando a ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ como ferramenta para acompanhamento da estabilidade dos complexos por 24, 48 e /ou 72 h, uma vez que alterações na esfera de coordenação do centro metálico, afetariam o deslocamento químico dos sinais e/ou no surgimento de novos sinais.

Em todos os casos foram utilizadas soluções de aproximadamente 8 mmol L⁻¹, sendo avaliado em sistema contendo apenas dimetilsulfóxido, dimetilsulfóxido/tampão trisma e dimetilsulfóxido/meio de cultura (DMEM ou RPMI), conforme relatado na seção Materiais e Métodos.

Todos os complexos apresentaram-se estáveis sob as condições e tempo de análise avaliados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas durante todo o tempo de análise, como se verifica nos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ apresentados nas Figuras 4.20 e 4.21, exemplificando essa estabilidade em DMSO/Meio de cultura, e os espectros nos outros sistemas mencionados podem ser encontrados no Apêndice-Parte II.

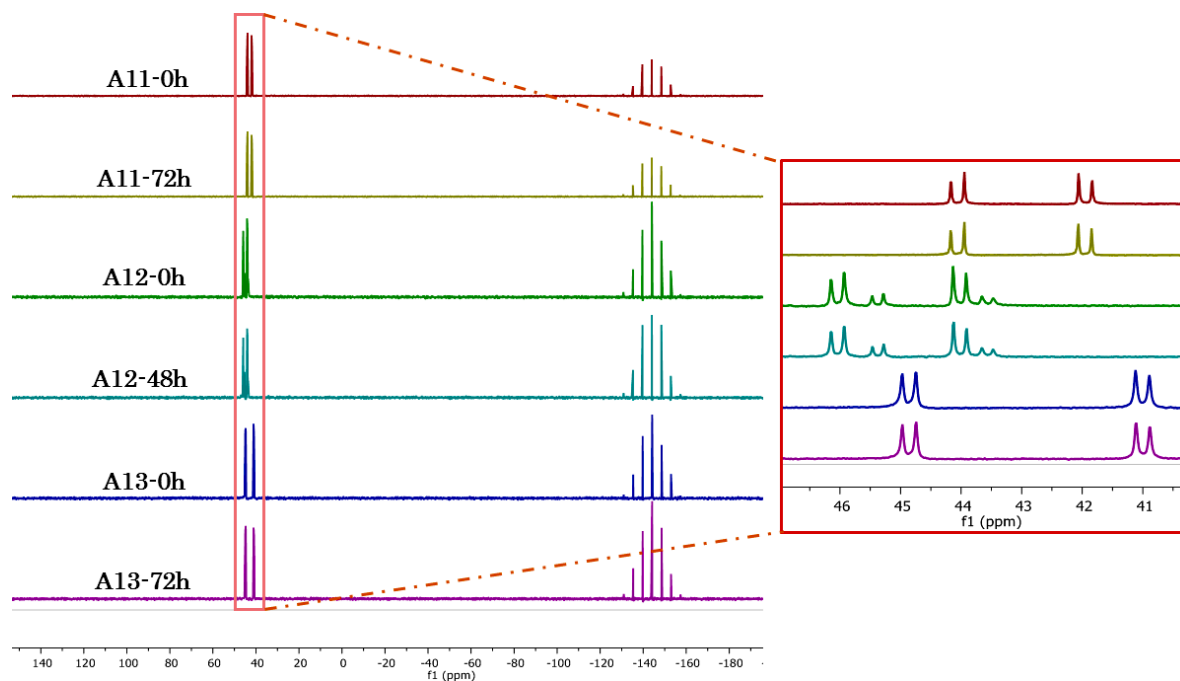
Para os complexos contendo ligante 2-mercaptotiazolina, observou-se dois pares de dupletos além do previsto, especialmente, nas análises envolvendo meio de cultura. No complexo **A2** a análise inicial mostra dois dupletos, com surgimento de dois novos dupletos no tempo de 24 h, e o complexo **A9**, no tempo inicial já exibe dois dupletos. O par de dupletos excedente, pode ser atribuído a isômeros de ligação, que já foram relatados no grupo LERCI, contendo esse mesmo ligante mercapto, e como supracitado, as sínteses foram realizadas de modo a evitar a obtenção desses isômeros, mas estes podem ser facilmente gerados em solução, a depender das características do meio.

FIGURA 4.20-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para estudo da estabilidade dos complexos **A1-A3** (Série 1) em dimetilsulfóxido/DMEM, acompanhado com o tempo.



Fonte: Dados da Pesquisa.

FIGURA 4.21-Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para estudo da estabilidade dos complexos **A8-A10** (Série 2) em dimetilsulfóxido/DMEM, acompanhado com o tempo.



Fonte: Dados de Pesquisa.

4.3.2- SEÇÃO 2- Viabilidade Celular e Coeficiente de Partição

4.3.2.1- Análise da Citotoxicidade

A concentração necessária para inibição de 50% da viabilidade celular, IC_{50} , foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é um reagente reduzido a cristais de formazan por células viáveis, de forma que a quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Ainda que o mecanismo de redução do reagente MTT à formazan não seja totalmente elucidado, supõe-se que este reagente meça a atividade mitocondrial, a partir do envolvimento de reação com NADH (envolvida no processo de fosforilação oxidativa), desidrogenases mitocondriais ou outras moléculas redutoras que podem transferir elétrons para o MTT, promovendo sua redução.^{129,130} É um experimento amplamente relatado na literatura, que envolve análise metabólica, sendo um ensaio que não distingue entre efeitos citotóxicos e citostáticos, por isto dito como experimento para avaliar a viabilidade celular.¹³¹

Dessa forma os compostos em estudo no presente trabalho foram testados frente às linhagens tumorais e não tumorais, conforme descrito em: 2- Objetivos e 3- Materiais e Métodos, nos quais detalha-se as linhagens utilizadas de acordo com o respectivo tecido de origem.

Considerando-se os resultados de citotoxicidade para complexos de Ru(II)/mercapto, anteriormente relatados no grupo LERCI, reconhecidamente a coordenação dos ligantes mercaptos influenciou, de forma geral, na obtenção de compostos mais citotóxicos com relação às respectivas espécies precursoras. Conforme mencionado anteriormente no texto, tanto esses resultados quanto as características intrínsecas aos ligantes mercaptos, também motivaram a síntese das novas estruturas deste trabalho, visando resultados tão significativos ou melhores.^{41,42,51}

Os valores de IC_{50} dos compostos da Série 1 e Série 2 deste trabalho estão dispostos na Tabela 4.8, onde é possível avaliar resultados importantes ao promover um comparativo entre: os compostos de uma mesma Série, os compostos de ambas as Séries, bem como com os compostos da literatura.

Analisando-se as duas séries, conclui-se que os complexos da Série 2 seguem o padrão esperado (comparativamente aos resultados de compostos análogos contendo ligantes mercaptos, descritos na Tabela 4.9), exibindo baixos valores de IC_{50} em todas as linhagens testadas. Entretanto, os complexos da Série 1 exibem resultados bem distintos. A menor citotoxicidade dos complexos da Série 1 em relação aos complexos da Série 2, pode ser justificada estruturalmente, devido à modificação no ligante N,N-heterocíclico. Com exceção dessa alteração, os complexos contêm o mesmo cerne, com os mesmos ligantes na esfera de coordenação.

Ao ponderar-se sobre os dados obtidos para os complexos da Série 2, percebe-se que os valores de IC_{50} entre os compostos nas diferentes linhagens são bem próximos entre si. A distinção entre os valores de citotoxicidade poderia ocorrer devido aos diferentes substituintes nos anéis dos ligantes, comparando-se os ligantes 2-mercaptopiridina, 2-mercaptotiazolina e 2-mercaptopirimidina. Conclui-se que os diferentes ligantes mercaptos empregados, apesar de contribuírem para maior citotoxicidade dos complexos, haja vista estes serem mais ativos que a espécie precursora, não favoreceram maior ou menor atividade citotóxica dentre os complexos finais. O efeito observado está em concordância com resultados obtidos para outros compostos com cerne estrutural correlato, em que não foi observado diferença estatística entre os valores de citotoxicidade, conforme se verifica na Tabela 4.9.

TABELA 4.8-Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) frente a distintas linhagens tumorais e não tumorais, obtidos após 48 h de incubação com os complexos das Séries 1 ou 2.

SÉRIE 1-IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)							
Complexos	Linhagens de mama			Linhagens de pulmão		Linhagens de ovário	
	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A	A549	MRC-5	A2780 _{cis}	A2780
A1	>30	>30	>30	>30	>30	6,83±0,08	>30
A2	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
A3	<30	10,50±0,28	>30	<30	<30	12,31±0,39	8,24±1,26
A4	>30	>30	>30	>30	>30	6,83±0,48	>30
A5	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
A6	<30	9,60±0,68	>30	<30	<30	12,85±0,54	9,61±0,15
A7	>30	NA	>30	NA	>30	3,77±0,54	10,59±0,70
CPP	>30	>30	>30	>30	>30	>30	NA
Cisplatina	24,90±3,40	13,98 ± 2,02*	23,90±0,70*	14,42±1,45*	29,09±0,78*	37,03±5,11	7,61±0,26
SÉRIE 2-IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)							
	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A	A549	MRC-5	A2780 _{cis}	
A8	0,19±0,09	0,76 ± 0,06	1,59±0,05	1,04±0,06	0,72±0,09	0,18±0,03	
A9	0,10±0,01	0,95 ± 0,25	1,68±0,07	0,56±0,03	1,11±0,12	0,14±0,02	
A10	0,24±0,01	1,00 ± 0,20	2,14±0,22	1,18±0,12	1,31±0,05	0,24±0,01	
cis-phen	10,23±1,03	20,00 ± 0,75	11,18±0,35	7,92±0,71	7,33±0,70	13,53±0,24	

Dados são expressos como média ± DP (desvio padrão), com n= 3, com intervalo de confiança de 95%. NA refere-se a experimento não avaliado.

*Valores de IC₅₀ obtidos na literatura. IC₅₀ dos ligantes mercaptos >100 μM.

TABELA 4.9-Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) frente a distintas linhagens tumorais e não tumorais, e índices de seletividade (IS)*, após 48 h de incubação com complexos fosfinicos de rutênio(II) contendo ligantes mercaptos, relatados no grupo LERCI.

		IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						
COMPLEXOS	LINHAGENS							
	MDA-MB-231	$0,20 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
	MCF-10A	NA	NA	$1,86 \pm 0,16$	$1,48 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,01$
	A549	$0,21 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,08$	$2,36 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$
	MRC5	$3,68 \pm 0,08$	$1,23 \pm 0,11$	NA	NA	$0,51 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,11$	$0,88 \pm 0,05$
		Índice de Seletividade (IS)*						
$\frac{IC_{50} \text{ MCF10A}}{IC_{50} \text{ MDA}}$		NA	NA	3,87	4,48	3,5	1,8	3,0
$\frac{IC_{50} \text{ MRC5}}{IC_{50} \text{ A549}}$		17,52	5,59	NA	NA	3,7	4,3	7,1

Os dados foram reportados pelos Doutoras Monize M. da Silva, Adriana Pereira M. G. Macêdo e Dr. Gabriel H. Ribeiro. *IS se refere a relação entre os valores de IC_{50} obtidos para linhagem não tumoral e tumoral.

Apesar da menor citotoxicidade em relação a Série 2, é possível obter maiores conclusões a respeito da Série 1. Ao comparar-se a citotoxicidade dos compostos desta Série entre si, se observa que os complexos **A3** e **A6** (que estruturalmente diferem apenas quanto ao contra-íon), são os que apresentam maior citotoxicidade dentre as linhagens avaliadas (não considerando-se as linhagens tumorais de ovário, que serão mencionadas adiante). Isto pode ser concluído pois demonstraram citotoxicidade avaliável na linhagem tumoral de mama MCF-7, e nas outras linhagens apresentaram IC_{50} menor do que $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (com exceção da linhagem não tumoral de mama MCF-10A). Além disso, pode-se concluir que a modificação do contra-íon nestes complexos não gerou resultados de citotoxicidade distintos, bem como os diferentes ligantes mercaptos utilizados (com diferentes átomos não coordenados), em conformidade com resultados anteriores do LERCI e com a Série 2 deste trabalho.

Nas linhagens tumorais de ovário, verifica-se citotoxicidade avaliável para quase todos os compostos da Série 1, e estes são mais ativos na linhagem tumoral de ovário resistente a cisplatina (A2780*cis*), em comparação à linhagem A2780, excetuando-se os complexos **A3** e **A6**. Na linhagem celular A2780, percebe-se que os valores de citotoxicidade obtidos são bem próximos entre si, e maior alteração se observa na linhagem celular A2780*cis*, cujo composto mais ativo é o **A7**.

Este último resultado se torna interessante, uma vez que, no geral, os complexos da Série 1 exibiram seletividade para as linhagens tumorais de ovário, em comparação às outras linhagens testadas. Ademais, considerando o estudo que relaciona estrutura e atividade em compostos fosfínicos de rutênio(II) contendo ligantes mercapto, realizado no grupo LERCI, tem sido observado até o momento uma menor citotoxicidade para os compostos que contém ligantes mercaptos com menos heteroátomos nos anéis. Entretanto, nos complexos da Série 1, quando se analisa os valores de IC_{50} obtidos na linhagem A2780*cis*, observa-se que o composto mais ativo foi aquele que contém o ligante 4,6-diamino-2-

mercaptopirimidina, que é o único dentre os ligantes utilizados neste trabalho, que possui substituintes ligados ao anel, e não apenas heteroátomos nos anéis mercapto. Isto implica no fato de que, essa diferença estrutural no ligante mercapto utilizado pode ter resultado na maior citotoxicidade associada ao complexo **A7** em comparação aos demais, nessa linhagem em específico.

Ainda com relação à linhagem A2780*cis*, os complexos da Série 1 são mais citotóxicos que o precursor CPP e os ligantes livres, com exceção dos complexos **A2** e **A5**, para os quais conclusões não podem ser definidas. Já os complexos da Série 2 exibem maior citotoxicidade com relação ao precursor *cis*-phen e os ligantes livres, em todas as linhagens testadas, sendo mais expressivo com relação às linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*.

Além disso, os compostos da Série 2 são notoriamente mais citotóxicos que o composto utilizado como padrão, a cisplatina. Por exemplo, o complexo **A9** é 264,5 vezes mais citotóxico na linhagem A2780*cis* e 249 vezes mais citotóxico na linhagem MDA-MB-231, relativamente aos valores relatados para a cisplatina. A maior citotoxicidade na linhagem celular A2780*cis* dos complexos da Série 2, e grande parte dos complexos da Série 1, em comparação ao padrão cisplatina era esperado, pelo fato de ser uma linhagem resistente a tal composto de platina(II), e também embasando-se em compostos de rutênio que exibiram atividade citotóxica significativa nessa linhagem, principalmente compostos da classe Ru/areno.^{17,20}

Como foram utilizadas linhagens tumorais e não-tumorais para avaliação da atividade citotóxica dos compostos em estudo, pode-se obter valores relativos ao índice de seletividade (IS), obtidos a partir da relação da Equação 8 e resultando nos valores da Tabela 4.10.

TABELA 4.10-Índices de seletividade considerando linhagens tumorais e não tumorais, após 48 h de incubação com os complexos das Séries 1 e 2, espécies precursoras e composto padrão.

Índice de Seletividade-Série 1				
Compostos*	$IC_{50}MRC5 / IC_{50} A2780cis$		$IC_{50}MRC5 / IC_{50} A2780$	
A1	4,4		-	
A3	~2,4		~3,6	
A4	4,4		-	
A6	~2,3		~3,1	
A7	8,0		2,8	
cisplatina	0,8		3,8	
Índice de Seletividade-Série 2				
	$IC_{50}MCF10A / IC_{50} MDA$	$IC_{50}MCF10A / IC_{50} MCF7$	$IC_{50}MRC5 / IC_{50} A549$	$IC_{50}MRC5 / IC_{50} A2780cis$
A8	8,4	2,1	0,7	4,0
A9	16,8	1,8	2,0	7,9
A10	8,9	2,1	1,1	5,4
cis-phen	1,1	0,6	0,9	0,5
cisplatina	0,9	1,7	2,0	0,8

*Para os complexos da Série 1 foi avaliado índice de seletividade com relação àqueles compostos que tiveram citotoxicidade avaliável nas linhagens tumorais. Como linhagem não tumoral para comparação com as linhagens tumorais de ovário, foi utilizada a linhagem celular fibroblástica MRC5, pois não havia no banco de células uma linhagem não tumoral de mesmo tecido.

O índice de seletividade pode ser utilizado em uma das primeiras etapas de triagem de possíveis agentes antitumorais, como requisito para avaliação de quão promissor um composto pode vir a ser. Valores de $IS \geq 3$ são assumidos por alguns autores como fator que pode tornar um composto elegível a futuras investigações.¹³²

Considerando esse aspecto, para os compostos da Série 1, o complexo mais promissor é o **A7**, e observa-se outros compostos que também possuem índice de seletividade significativos, sendo todos mais seletivos com relação ao composto padrão na linhagem A2780*cis*, e o contrário se aplica a linhagem A2780, avaliada nesse sentido.

Avaliando os complexos da Série 2, todos são mais seletivos que a espécie precursora e padrão cisplatina, com exceção na linhagem celular A549. A seletividade destes compostos, os tornam promissores nas linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*, particularmente, o complexo **A9**. Comparando aos complexos já reportados de estruturas correlatas, sejam estas, $[Ru(NS)(bipy)(dppb)]PF_6$, $[Ru(NS)(bipy)(dppf)]PF_6$ e $[Ru(NS)(dphppy)(dppb)]PF_6$ (Tabela 4.9), os complexos da Série 2 apresentam seletividade quase duas vezes maior que todos esses complexos com relação a linhagem MDA-MB-231. Outro fato notável é que enquanto os compostos da literatura são mais seletivos quanto à linhagem celular de pulmão, os compostos da Série 2 são pouco ou não seletivos com relação a essa linhagem, considerando-se a linhagem não tumoral MRC-5.^{41,42,51}

A resposta significativa do potencial citotóxico dos complexos da Série 1 na linhagem tumoral de ovário, especialmente na linhagem resistente (A2780*cis*), bem como dos complexos da Série 2 na linhagem tumoral de mama triplo-negativa (MDA-MB-231), torna esse resultado ainda mais expressivo e interessante. Isto porque, os tumores classificados como triplo negativos (como aqueles gerados por células MDA-MB-231) são agressivos e altamente proliferativos, além de resultarem nos piores prognósticos quando se refere a câncer de mama. No caso do câncer de ovário, clinicamente é uma das principais

causas de morte dentre as doenças ginecológicas, principalmente devido a sua recorrência, que quando ocorre tem pior prognóstico, uma vez que, por exemplo, a quimioterapia com compostos de platina, torna-se menos efetiva (resistência a compostos de platina).^{133,134}

Devido a esses resultados os complexos **A7** e **A9** foram selecionados para ensaios biológicos posteriores. Além destes, foi também realizado estes mesmos experimentos com relação ao complexo **A6** da Série 1. Apesar de não ser o mais promissor considerando-se a seletividade após 48 h de incubação, a viabilidade celular foi também avaliada após 72 horas de incubação com alguns compostos da Série 1 na linhagem A2780*cis*, cujos resultados estão cunhados na Tabela 4.11. Observa-se que em alguns casos, como para o complexo **A6**, um maior tempo de tratamento favoreceu uma maior citotoxicidade.

TABELA 4.11-Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) frente a linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780*cis*) e linhagem não tumoral fibroblástica MRC-5, e índices de seletividade (IS) considerando estas linhagens, após 72 h de incubação com quatro complexos da Série 1.

Complexos	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		IS
	A2780 <i>cis</i>	MRC-5	IC ₅₀ MRC5 / IC ₅₀ A2780 <i>cis</i>
A1	5,62±0,24	>30	5,3
A3	5,72±0,28	<30	5,2
A6	5,44±0,19	<30	5,5
A7	1,16±0,18	>30	25,9

Dados expressos como média ± DP, com n=3, e intervalo de confiança de 95%

Com 72 horas de incubação dos compostos, não se verifica alteração na citotoxicidade referente à linhagem não tumoral, observando-se maior citotoxicidade para os complexos **A3**, **A6** e **A7** frente a linhagem A2780*cis*. Como relatado para o tempo de incubação de 48 h, não se obteve diferença relevante entre os complexos **A3** e **A6**, e por isso prosseguiu-se os experimentos apenas com o complexo **A6**. Para o complexo **A1** não foi observada uma alteração tão

significativa, mas o complexo A7 além de exibir maior citotoxicidade, apresenta índice de seletividade bem mais expressivo que anteriormente, reforçando a justificativa de também prosseguir os experimentos biológicos com esse composto.

Antes de dar continuidade aos resultados obtidos nos experimentos biológicos que permitiram maiores informações com relação a citotoxicidade destes compostos, será relatado ensaios referentes a interações com biomoléculas, que podem ser de interesse ao comparar-se com a atividade citotóxica já relatada.

4.3.2.2- Coeficiente de Partição

Como supracitado na parte introdutória deste trabalho, a determinação da lipofilicidade é um parâmetro de importante avaliação, que pode ser associado a atividade biológica. Os compostos do presente trabalho foram avaliados quanto à lipofilicidade, empregando método shake-flask, utilizando n-octanol como porção orgânica e água como meio aquoso.

Os valores obtidos encontram-se dispostos na Tabela 4.12, observando-se primeiramente que todos os complexos exibem maior afinidade à fase orgânica com relação à fase aquosa. Tal panorama em geral é observado nos compostos similares relatados pelo LERCI. Apesar de alguns complexos da Série 1 apresentarem Log P um pouco menor que os demais, a maior parte dos complexos exibem Log P próximo a 1, indicando que ao menos teoricamente, os compostos possuem mesmo potencial de interações hidrofóbicas e/ou internalização via difusão pela membrana plasmática, e não justificam o diferencial observado quanto a citotoxicidade dos complexos da Série 1 com relação aos complexos da Série 2.

TABELA 4.12-Valores de Log P obtidos para os complexos das Séries 1 e 2.

SÉRIE 1	
COMPLEXOS	Log P
A1	0,32±0,08
A2	0,39±0,05
A3	0,84±0,03
A4	0,85±0,01
A5	1,10±0,12
A6	1,07±0,01
SÉRIE 2	
A8	0,97±0,16
A9	0,86±0,19
A10	0,72±0,25

Fonte: Dados da Pesquisa.

4.3.3- SEÇÃO 3- Ensaios de interação com biomoléculas

4.3.3.1- INTERAÇÃO COM DNA

Os ensaios de interação com DNA foram realizados com objetivo de avaliar esta biomolécula como alvo biológico dos complexos aqui investigados. Mesmo que os compostos da Série 1 não tenham exibido atividade citotóxica como os complexos da Série 2, é válido investigar se a modificação do ligante N,N-heterocíclico favorece interação com DNA de forma diferente de complexos fosfínicos de rutênio(II) já reportados.

O ácido desoxirribonucleico, em sua forma integral, é essencial no armazenamento de informação genética, e, portanto, necessário ao processo de replicação celular, e qualquer interferente implica em perturbação nos processos como transcrição e replicação, tornando esta biomolécula como possível alvo para candidatos à metalofármacos.¹³⁵

Para verificar como ocorre essa provável interação, muitos ensaios têm sido avaliados, e há na literatura alguns modelos propostos que se complementam, que permitem determinar como se dá a interação de possíveis

metalofármacos com ácidos nucleicos. Dentre as possibilidades existentes, empregou-se no presente trabalho, medidas de mobilidade eletroforética em gel, medidas de viscosidade, e ensaio de deslocamento de Hoechst 33258.

Estes experimentos permitiram responder em primeiro momento se há interação com o DNA, e posteriormente, de que forma ocorreria. É reportado que alguns compostos biologicamente ativos agem por alquilação dessa biomolécula, em uma interação covalente, como o aduto formado entre cisplatina e DNA. Entretanto, essa é uma opção de baixa probabilidade nos compostos estudados neste trabalho, uma vez que o estudo de estabilidade indicou que não há labilização de nenhum ligante da esfera de coordenação, ao menos nas condições testadas, para que ocorra ligação efetiva com constituintes do DNA.

Outra possibilidade é a interação por intercalação, na qual há inclusão de ligante com determinado grau de planaridade, geralmente aromático, entre os pares de base empilhados no DNA, e dentre os compostos inorgânicos, há relatos deste modo de interação para vários complexos metálicos, como de platina, cobre, rutênio, entre outros.¹³⁶⁻¹³⁸ Essa inserção de uma estrutura externa entre os pares de base do DNA, prevê como requisito que a energia de intercalação compense o gasto energético necessário à reorganização estrutural do DNA. Como os complexos aqui propostos possuem o ligante fenantrolina e pyphen, há possibilidade dessa interação, ainda que parcialmente como já relatado para complexos de Ru(II) contendo ligantes N,N-heterocíclicos e η^6 -areno. Vale ressaltar que todo o sistema deve ser considerado, e a esfera de coordenação do centro metálico como um todo, pode inviabilizar esse tipo de interação.^{135,136,139}

Outras possíveis interações, e de maior possibilidade nos complexos das Séries 1 e 2, são: interação eletrostática, justificado pelos complexos serem catiônicos, enquanto a biomolécula é carregada negativamente devido aos grupos fosfatos que a constituem; e interação pelos sulcos, que pode acontecer por um ou mais modos de interação, como forças de Van der Waals e ligação de hidrogênio. Essas interações são ditas mais prováveis, com base em resultados reportados pelo

grupo LERCI, mas como já mencionado, a associação dos ligantes N,N-heterocíclicos poderiam causar alguma variação.

4.3.3.1.1- Mobilidade Eletroforética em Gel de Agarose

Este ensaio se baseia no fato de que a estrutura do DNA possui carga negativa inerente, e pode migrar em direção ao polo positivo, ao aplicar-se uma diferença de potencial. A taxa de migração irá variar com o tamanho e conformação dos fragmentos do DNA, cujos fragmentos de menor tamanho (ou mais enovelados) migram com maior velocidade nos poros do gel.^{135,140}

O DNA plasmidial geralmente apresenta a forma superenovelada (SC, do inglês supercoiled), em que as fitas que o constituem encontram-se tensionadas, mas a manipulação desse DNA pode favorecer a geração de duas outras isoformas: a forma circular aberta (OC, do inglês open circular) que é gerada quando há uma ou mais quebras em uma das fitas do DNA, provocando relaxamento da primeira forma (pode ser dito como um desenovelamento da forma superenovelada), e forma linear (L, no inglês também linear) que pode ser observada quando ocorre quebras de fita dupla. A taxa de migração dessas isoformas ocorre com maior velocidade associada à forma SC, e menor velocidade relacionada à forma OC, com a forma linear migrando de modo intermediário em comparação a estas duas (Figura 4.22).^{135,141}

A interação entre os compostos e o DNA, de forma a alterar estruturalmente a conformação da biomolécula pode ser avaliada na mobilidade eletroforética das isoformas no gel de agarose.¹⁴²

Dessa forma, a corrida eletroforética foi realizada tanto na ausência quanto na presença dos compostos (e no poço do gel sem adição de composto, controle negativo, foi incorporado a mesma porcentagem de DMSO). Além disso, foi utilizado um padrão, como controle positivo, que reconhecidamente altera a mobilidade eletroforética das isoformas, a cisplatina, que por ser um agente que forma adutos bifuncionais provoca desenovelamento da forma SC, gerando formas menos tensionadas.^{139,143} Na Figura 4.22 expõe-se os resultados obtidos

neste ensaio para alguns dos complexos das Séries 1 e 2. Como todos os complexos resultaram em mesmo efeito na mobilidade eletroforética, os resultados referentes aos outros compostos, se encontram no Apêndice-Parte III.

Observa-se que diferentemente da cisplatina, os compostos analisados não provocam alterações na estrutura do DNA, pois verifica-se migração análoga ao DNA na ausência dos compostos (controle negativo), que apresenta as isoformas SC e OC. O modo de interação intercalativo pode ser avaliado a partir do método utilizado na revelação do gel, que acontece após submersão em solução de brometo de etídio (EtBr), pois ao intercalar-se no DNA, o conjugado formado DNA-EtBr sob luz ultravioleta emite fluorescência de coloração próxima ao laranja, que permite a visualização dos fragmentos de DNA, tal qual se encontra nos géis da Figura 4.22.¹⁴⁴ Caso a espécie que se procura avaliar intercale no DNA, ocorreria exclusão de moléculas de EtBr da biomolécula, diminuindo a proporção do conjugado DNA-EtBr, e consequentemente diminuiria a intensidade referente aos fragmentos do DNA, ou até mesmo provocaria o desaparecimento, resultado não observado para nenhum dos complexos avaliados, indicativo de que não ocorre interação por intercalação.

FIGURA 4. 22-A) Isoformas do DNA de acordo com tamanho e conformação; B) Resultados da mobilidade eletroforética do DNA sob influência dos compostos das Séries 1 e 2.

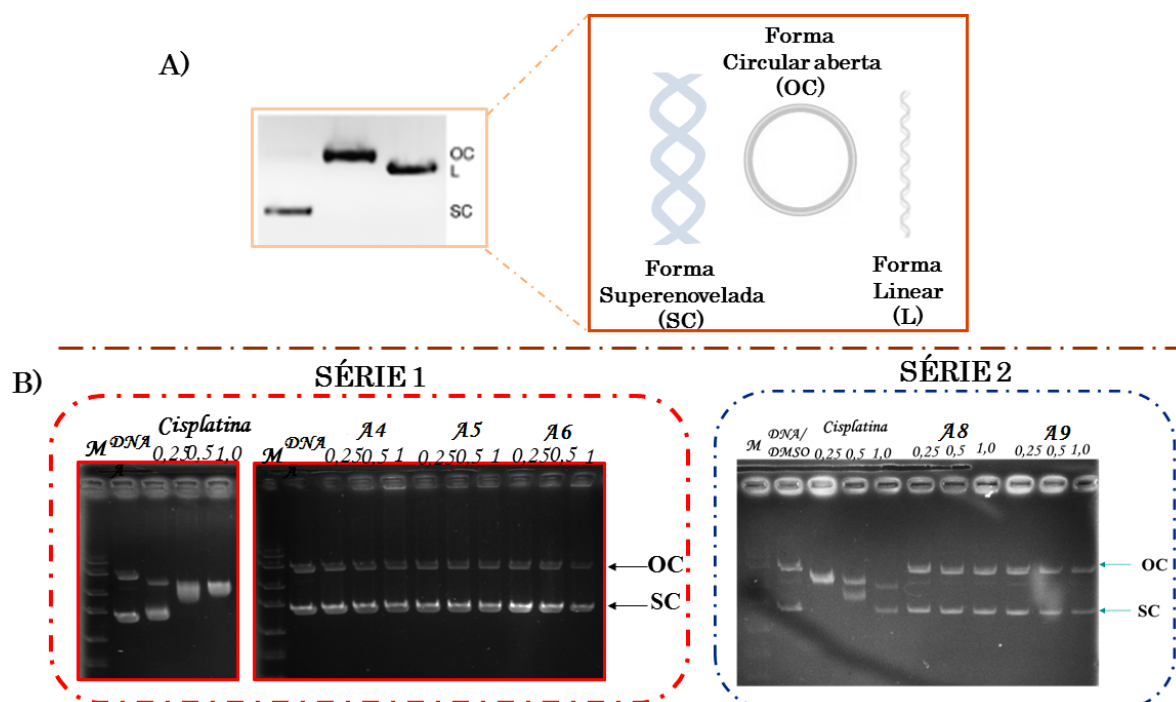


Figura A) Adaptado de Kellet *et al.* 2019. B) M significa o marcador *ladder* e DNA o poço em que foi adicionado apenas DMSO (ausência de composto), como padrão negativo.

Portanto, conclui-se que a análise por meio da mobilidade eletroforética do DNA indica que, se há uma interação com DNA, essa ocorre de forma a induzir pouca ou nenhuma alteração em sua estrutura conformacional, que seria uma interação dita fraca, como o que ocorre nas interações eletrostática ou pelos sulcos.

4.3.3.1.2- Medidas de Viscosidade

O princípio desse ensaio é a variação na hidrodinamicidade do DNA, causada por interações que irão promover reorganização da estrutura dessa biomolécula. Em conformidade com os tipos de interações explicitadas na parte introdutória de interação com DNA, se a interação entre composto e DNA se dá de forma covalente, o resultado obtido no ensaio de viscosidade, à medida em que há aumento da concentração de composto, é uma diminuição da viscosidade relativa do DNA, pois há um menor volume associado à estrutura da biomolécula,

devido a torção gerada. Esse perfil é obtido especialmente para cisplatina (Figura 4.23), que foi utilizada como padrão para esse tipo de interação.^{135,145}

Em caso de interação por intercalação, uma vez que, é necessário que a molécula (ou parte) se insira entre as bases empilhadas do DNA, isso causará alongamento da dupla hélice, e assim espera-se aumento da viscosidade relativa da solução de DNA com aumento da relação [complexo]/[DNA]. Esse comportamento é evidenciado para compostos classicamente intercalantes como EtBr, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e tiazol laranja. Esse último composto é relatado como intercalante de ácidos nucleicos, e foi utilizado como padrão de intercalação nesse experimento, para fins de comparação com o perfil obtido para os compostos em estudo.¹⁴⁶ Por fim, as interações eletrostática e pelos sulcos, não geram modificações expressivas na viscosidade relativa da solução de DNA, por não provocarem distorções significativas.^{135,147}

Considerando estes apontamentos, pode-se analisar os resultados obtidos a partir desse experimento, apresentados na porção superior da Figura 4.23. Inicialmente, observa-se que as espécies utilizadas como padrões de interação covalente e intercalação exibiram os resultados esperados, nas condições em que o experimento foi conduzido (item 3.6.2.1.2.), e ainda que os compostos estudados não seguem o perfil de nenhum deles, corroborando com o resultado anterior de que se há interação, esta não ocorre covalentemente ou por intercalação. Com acréscimo gradual das concentrações dos compostos, não há variações significativas na viscosidade inicial da solução de DNA, indicativo de que ocorra interação eletrostática ou pelos sulcos do DNA.

Portanto, apesar da adição de um ligante na esfera de coordenação dos complexos da Série 2 com alguma planaridade, o ligante fenantrolina, e modificação com subsituente pirenil para maior amplitude dessa planaridade nos complexos da Série 1, não houve indícios de interação por intercalação com DNA em ambas as técnicas utilizadas. Apesar de complexos, até mesmo com centro metálico Ru(II), com estes ligantes ou análogos, serem relatados como exibindo

algum grau de intercalação, estes resultados são observados para sistemas em que todos os ligantes na esfera de coordenação são N,N-heterocíclicos. Tal fator deve ser considerado, pois todo o sistema irá afetar no modo de interação, e como se observa na Figura 4.23, o ligante pyphen individualmente analisado não exibiu interação por intercalação, nas condições analisadas. Além disso, mesmo complexos de rutênio polipiridínicos, algumas vezes, não exibem o modo intercalativo como forma de interação majoritária ao DNA, como relatado para o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, o qual, nas duas formas enantioméricas, interage eficientemente pelo sulco menor do DNA.^{91,120,148}

Em outros sistemas, em que derivados de pireno também foram utilizados, partindo do princípio que o pireno é uma espécie que intercala no DNA, foi possível observar interação com essa biomolécula apenas em altas concentrações ($\sim 300 \mu\text{mol L}^{-1}$), por exemplo, o resultado relatado por Oliveira, C. G., a qual promoveu modificações em tiossemicarbazonas com o pireno, coordenando o ligante modificado a paládio(II) contendo trifenilfosfina na esfera de coordenação.^{149–151} Dessa forma, pode ser que em maiores concentrações um perfil diferente pudesse ser observado para os complexos da Série 1, entretanto, nas condições analisadas, o que se pode inferir é que a interação com o DNA ocorra eletrostaticamente ou via sulcos, assim como para os complexos da Série 2.

Com o intuito de verificar se a interação dos complexos ocorreria pelo sulco menor do DNA, foi realizado experimento de deslocamento da espécie Hoechst 33258.

4.3.3.1.3- Ensaio de Deslocamento Hoechst 33258

Empregou-se diferentes concentrações dos compostos, a fim de avaliar a supressão do conjugado formado entre DNA e Hoechst. As espécies bisbenzimidaz, também denominadas como Hoechst, são ditas corantes devido à fluorescência intrínseca. No entanto, é uma fluorescência de baixo rendimento

quântico, que se torna significativa quando estas espécies estão associadas a ácidos nucleicos, em grande parte devido a supressão de rotação das bisbenzimidazidas livres.¹⁵²

O Hoechst 33258 possui uma alta constante de ligação com o DNA, com maior afinidade pelos pares de base adenina (A)/timina (T), característico de espécies que interagem pelo sulco menor do DNA.^{153,154}

Portanto, a premissa em que se baseia o experimento é que se os compostos em estudo interagem pelo mesmo sítio que a sonda fluorescente, promoverão deslocamento desta, o que irá culminar em supressão da fluorescência, uma vez que, a quantidade de moléculas existentes, de DNA conjugadas a Hoechst será menor. E esse resultado, a supressão da fluorescência, foi obtido para todos os complexos das Séries 1 e 2, em maior ou menor grau, conforme se observa nos gráficos da Figura 4.23, para um composto de cada série, e os espectros referentes aos demais complexos se encontram no Apêndice-Parte III. Isto indica que os compostos aqui estudados interagem pelo sulco menor do DNA, mas não descarta a possibilidade de interação eletrostática em menor grau, ou ainda pelo sulco maior.^{154,155}

Além destas informações, é possível analisar os dados quantitativamente, de forma que esse experimento foi realizado em três temperaturas distintas: 25, 30 e 37 °C, possibilitando avaliar a constante de Stern-Volmer, por meio da equação de supressão dinâmica de fluorescência de Stern-Volmer, e dessa forma analisar o mecanismo associado a essa supressão. É também possível obter parâmetros físico-químicos associados. Todos esses dados obtidos a partir desses experimentos, estão dispostos na Tabela 4.13.

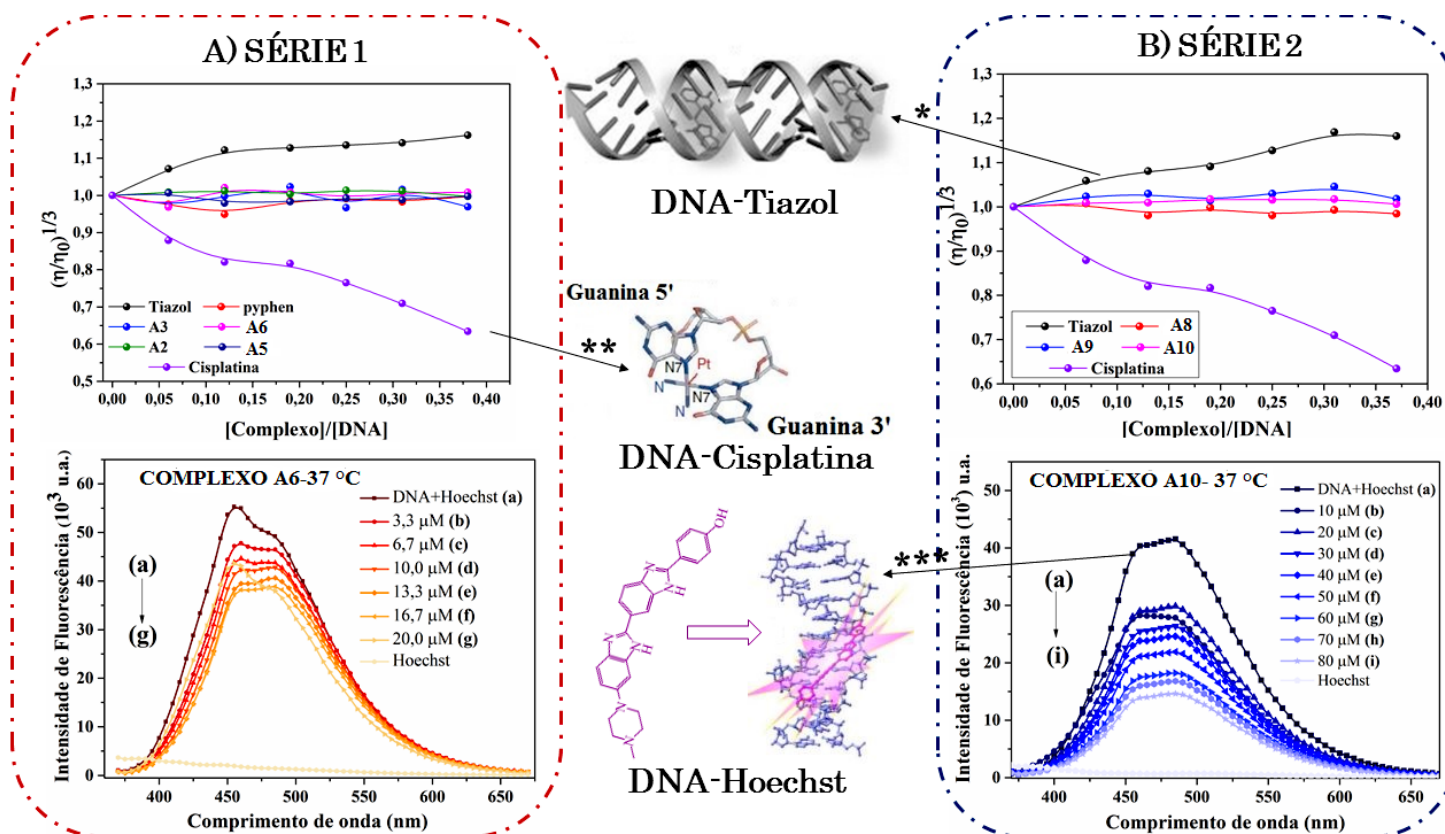
Maiores esclarecimentos a respeito das informações quantitativas serão enunciados em resultado de experimento posterior (especificamente interação com proteína albumina de soro humana), mas com relação à constante de Stern-Volmer relata-se resumidamente, que, conforme eleva-se a temperatura, um aumento no valor dessa constante, está associado a um mecanismo dinâmico,

e um decréscimo em seu valor, relaciona-se a um mecanismo estático. Observa-se as duas correlações nos complexos de ambas as séries, indicando que um ou outro mecanismo ocorre de forma majoritária, mas que ambos ocorrem como mecanismo de supressão da fluorescência.

A constante de associação (K_a), pode ser utilizada como um indicador do grau de afinidade, como o relatado para a sonda Hoechst 33258 na literatura, como sendo da ordem de 10^6 - 10^7 M^{-1} , bem como para outras bisbenzimidazidas derivadas.^{153,156} Comparando-se os resultados obtidos para os complexos do presente estudo (Tabela 4.13), com essas espécies orgânicas, por exemplo, conclui-se que a constante de associação é de mesma ordem, indicando a possibilidade de também interagirem pelo sulco menor da biomolécula avaliada.

Quanto aos parâmetros termodinâmicos que podem ser calculados a partir das constantes de associação nas diferentes temperaturas (equações 5 e 6- Seção Materiais e Métodos), é possível obter conclusões relacionadas à espontaneidade da interação avaliada, bem como os tipos de interação predominantes no sistema. A análise de todos os complexos resultou em variação negativa da energia livre de Gibbs, indicando a espontaneidade de interação em todos os casos.

FIGURA 4.23-Gráficos de viscosidade relativa do DNA sob adição de diferentes concentrações dos compostos, na parte superior, e espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst, acompanhado de acordo com acréscimos na concentração dos compostos, na parte inferior A) Complexos da Série 1 e, B) Complexos da Série 2.



*Representação da interação intercalativa do tiazol com DNA, adaptada de Suss, O. *et al.*, 2021.¹⁵⁷ **Representação da formação de aduto intrafita da cisplatina com DNA, adaptada de Ummat, A. *et al.*, 2012.¹⁵⁸ ***Interação do Hoechst pelo sulco menor do DNA, representação adaptada de Bucevičius, J. *et al.*, 2018.¹⁵²

TABELA 4.13-Dados quantitativos adquiridos a partir da supressão de fluorescência do DNA-Hoechst pelos compostos das Séries 1 e 2, que são: constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de associação (k_a), parâmetros entálpico (ΔH), entrópico (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG)

Ensaio Deslocamento DNA-Hoechst-Série 1							
COMPLEXO	T (K)	$K_{sv} (10^4)$	$K_a (10^6)$	Supressão da Fluoresc. (%)	ΔH° (KJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (KJ mol ⁻¹)
A1	298,15	2,22±0,03	1,3±0,6	28,8	176,1	707,4	-34,8
	303,15	2,48±0,01	5,0±1,0	29,2			-39,0
	310,15	2,56±0,08	20,0±8,0	28,1			-43,3
A2	298,15	1,65±0,02	0,7±0,1	23,2	176,3	702,6	-33,2
	303,15	1,68±0,03	4,0±1,0	22,2			-38,5
	310,15	1,70±0,02	10,0±6,0	20,9			-41,6
A3	298,15	3,18±0,05	0,08±0,01	38,1	203,0	774,3	-27,8
	303,15	2,81±0,06	0,72±0,03	33,6			-34,0
	310,15	2,66±0,05	1,8±0,3	31,9			-37,1
A4	298,15	0,85±0,04	4,0±2,0	23,4	-213,0	-588,3	-37,4
	303,15	0,88±0,06	1,0±0,5	25,9			-35,4
	310,15	0,96±0,01	0,13±0,05	26,6			-30,4
A5	298,15	1,53±0,03	0,20±0,10	22,6	151,6	610,4	-30,4
	303,15	1,61±0,05	1,0±0,5	23,2			-34,8

	310,15	1,71±0,01	2,2±0,9	23,4			-37,7
			Kb(10 ⁴)				
A6	298,15	1,76±0,07	34,0±27,0	24,2			-31,6
	303,15	1,65±0,03	5,0±3,0	22,9	-289,4	-864,8	-27,0
	310,15	1,43±0,07	0,4±0,2	22,8			-21,2
Ensaio Deslocamento DNA-Hoechst-Série 2							
COMPLEXO	T (K)	K_{sv} (10⁴)	K_a (10⁶)	Supressão da Fluoresc. (%)	ΔH° (KJ mol⁻¹)	ΔS° (J mol⁻¹ K⁻¹)	ΔG° (J mol⁻¹ K⁻¹)
A8	298,15	5,49±0,02	10,0±2,0	78,4			-39,8
	303,15	5,60±0,06	11,0±4,0	77,6	31,6	239,6	-40,8
	310,15	5,93±0,12	16,0±2,0	78,3			-42,7
A9	298,15	3,61±0,08	9,0±2,0	70,8			-39,6
	303,15	3,53±0,05	17,0±3,0	70,2	57,9	327,0	-42,0
	310,15	3,11±0,02	22,0±6,0	70,5			-43,5
COMPLEXO	T (K)	K_{sv} (10⁴)	K_a (10⁴)		ΔH° (KJ mol⁻¹)	ΔS° (KJ mol⁻¹)	ΔG° (KJ mol⁻¹)
A10	298,15	3,39±0,04	6,0±4,0	71,5			-27,3
	303,15	3,20±0,07	20,0±4,0	70,6	155,6	613,6	-30,8
	310,15	3,15±0,04	69,0±34,0	69,8			-34,7

Com relação aos parâmetros entálpico e entrópico, se ambos são positivos, indicam que a interação ocorre predominantemente por interações hidrofóbicas, se ambos forem negativos as interações que predominam são as ligações de hidrogênio e/ou forças de Van der Waals, e por fim, estabelece-se o predomínio por atração eletrostática quando $\Delta S < 0$ e $\Delta H > 0$.^{83,159} Para quase todos os compostos da Série 1, e todos os compostos da Série 2, tais parâmetros indicam que a interação com a biomolécula, ocorra por meio de interações hidrofóbicas. Apenas para os complexos **A4** e **A6**, esse resultado se altera, obtendo-se valores negativos, que denotam interações que ocorrem por meio de ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals.

4.3.3.2- INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA TOPOISOMERASE II α

As enzimas DNA-Topoisomerases são investigadas como possível alvo farmacológico em diversos trabalhos, que incluem candidatos a metalofármacos. Este estudo é motivado pela possibilidade de obtenção de compostos mais seletivos, que poderia acarretar menos efeitos adversos associados, por serem enzimas expressas em maior quantidade em células de rápida proliferação.¹⁶⁰

Topoisomerases são enzimas nucleares que participam de processos essenciais em todas as células vivas, tais como, replicação do DNA e segregação cromossômica. Dentre estas enzimas, tem-se as topoisomerases II, que podem relaxar DNA superenovelado, provocando quebras nas duas fitas do DNA, passando o DNA através de hélice intacta, e posteriormente reestabelecendo as fitas. Este mecanismo ocorre de forma dependente de adenosina trifosfato (ATP). Essa topoisomerase apresenta duas isoformas, II α e II β , que se diferenciam por sua expressão em diferentes tempos do ciclo celular em diferentes tipos de célula.^{160,161}

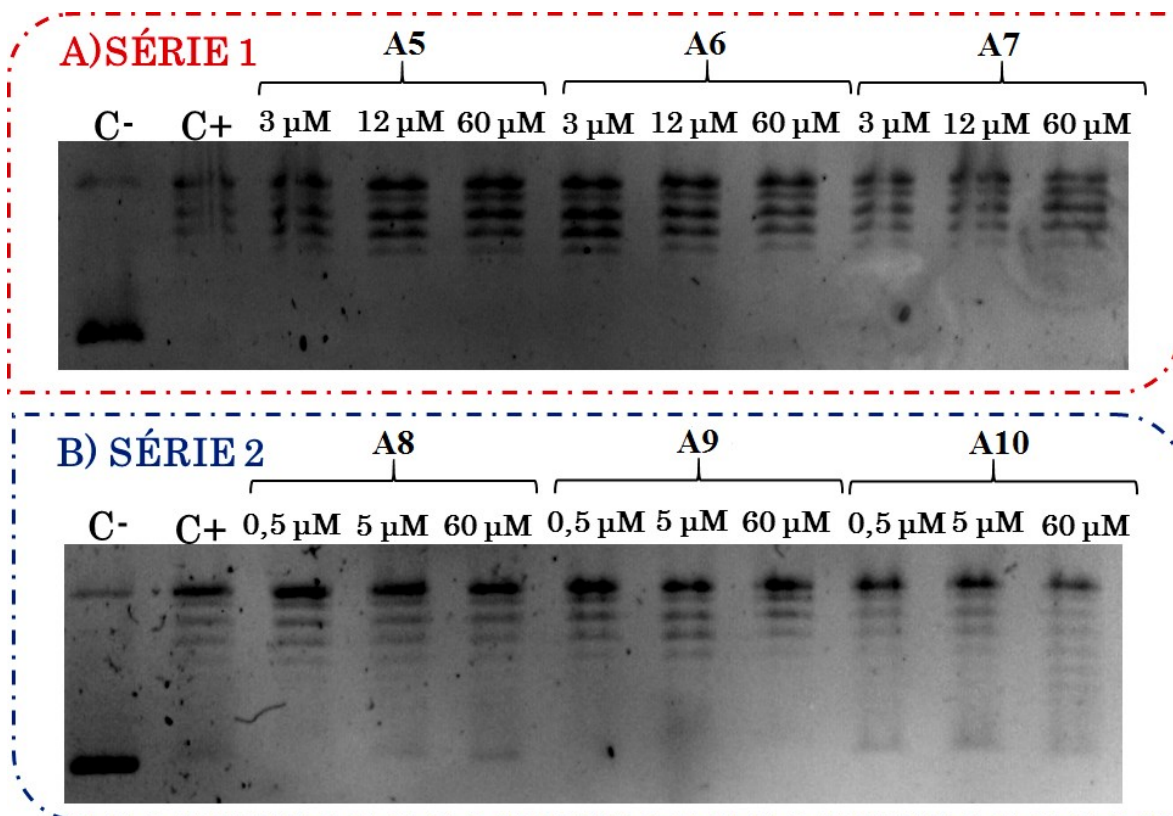
A isoforma II α , que é a de interesse no presente estudo, associa-se principalmente à replicação do DNA e segregação de cromossomos, com máximo de expressão nas fases G2/M do ciclo celular, propiciando associação a resultados de ensaios de ciclo celular.¹⁶¹

Dadas todas essas informações, o ensaio foi conduzido de forma comparativa, analisando-se o DNA sem ação de topoisomerase (controle negativo), o DNA sob ação de topoisomerase (controle positivo), e ação da topoisomerase sob influência de concentrações graduais dos compostos. Os resultados obtidos por eletroforese em gel, são mostrados na Figura 4.24.

Primeiramente, o controle negativo que contém o DNA na ausência de enzima, exibe apenas as isoformas comuns do DNA plasmidial, em forma majoritária do DNA superenovelado, e alguma porção da isoforma circular aberto. Como a topoisomerase promove alterações na topologia do DNA, devido ao relaxamento provocado (essencial em processos vitais às células), e função associada a remoção de torções superhelicoidais do DNA,^{162,163} a ação desta enzima pode ser evidenciada por conformações distintas exibidas pela biomolécula, ou ainda, formação de topoisômeros, como o que se observa para o controle positivo, na Figura 4.24, em que cada linha seria um topoisômero.

Ciente desses efeitos, é possível promover um comparativo com os resultados dos poços dos géis, nos quais adicionou-se composto. Nos complexos da Série 1, é observado padrão muito similar ao poço do controle positivo, indicando que os compostos falharam em inibir a atividade da enzima analisada. Com relação aos complexos da Série 2, verifica-se formação de topoisômeros no controle positivo e nos poços dos compostos, entretanto com alguma quantidade de DNA superenovelado. Por mais que este resultado seja observado também no controle positivo, indicando que a enzima não estava em plena eficiência, qualitativamente, na última concentração dos complexos **A8** e **A10**, o indicativo de DNA superenovelado parece ser mais expressivo, apontando para uma inibição parcial nesses casos.

FIGURA 4.24-Fotodocumentos dos géis obtidos na investigação da inibição da atividade catalítica da enzima Topoisomerase II α sob influência dos compostos A) Série 1 e B) Série 2.



Controle negativo (C-): MIX+água mili-Q+DMSO; Controle positivo (C+): MIX+água mili-Q+DMSO+Topo II α

Outros compostos difosfínicos de rutênio(II)/mercaptos publicados pelo LERCI também foram investigados com relação a capacidade de inibição de topoisomerase, e apresentaram inibição parcial em baixas concentrações, inibindo de forma eficaz em maiores concentrações. Apesar dessa investigação ter sido realizada com enzima topoisomerase, empregou-se especificamente a topoisomerase IB, enquanto no estudo aqui relatado foi utilizada a topoisomerase II α , o que pode ter sido o motivo de se observar resultados distintos.^{41,96}

4.3.3.3- INTERAÇÃO COM PROTEÍNA ALBUMINA DE SORO HUMANA (HSA) E COMPETIÇÃO PELO SÍTIO I DA HSA

A albumina de soro humana é a proteína mais abundante no plasma humano, e tem por função principal, transporte de metabólitos, hormônios, ácidos graxos e uma diversidade de fármacos, exercendo papel essencial na disposição e eficácia de determinados medicamentos.^{159,164}

A ligação de fármacos a esta biomolécula irá influenciar em seus perfis biológicos, uma vez que, por exemplo, esta ligação pode propiciar metabolização mais prolongada do fármaco em questão, induzindo a um maior tempo de ação. Tal ligação ocorre geralmente de forma reversível, existindo um equilíbrio entre moléculas do fármaco que se encontram ligadas à biomolécula e àquelas que estão livres, sendo farmacologicamente ativas apenas as moléculas não ligadas.

Dessa forma, o estudo da interação com essa proteína pode trazer informações importantes relacionadas a farmacocinética de determinados compostos, analisando-se o contato direto entre biomolécula e composto de interesse, em um estudo inicial *in vitro*. Tal interação pode ser estudada a níveis mais avançados, como por exemplo, avaliando-se como pode interferir na citotoxicidade do compostos.^{83,88,159}

Essa interação pode ser investigada por meio da supressão de fluorescência, uma vez que as proteínas, de modo geral, apresentam fluorescência intrínseca devido a três resíduos de aminoácidos, a saber, triptofano, tirosina e fenilalanina. O resíduo de triptofano é geralmente explorado quanto a fluorescência, devido ao baixo rendimento quântico dos outros resíduos mencionados.

Com relação à HSA relata-se apenas um resíduo de triptofano em sua estrutura, e a supressão da fluorescência pode ocorrer mediante vários processos, como reações no estado excitado e/ou no estado fundamental, rearranjos,

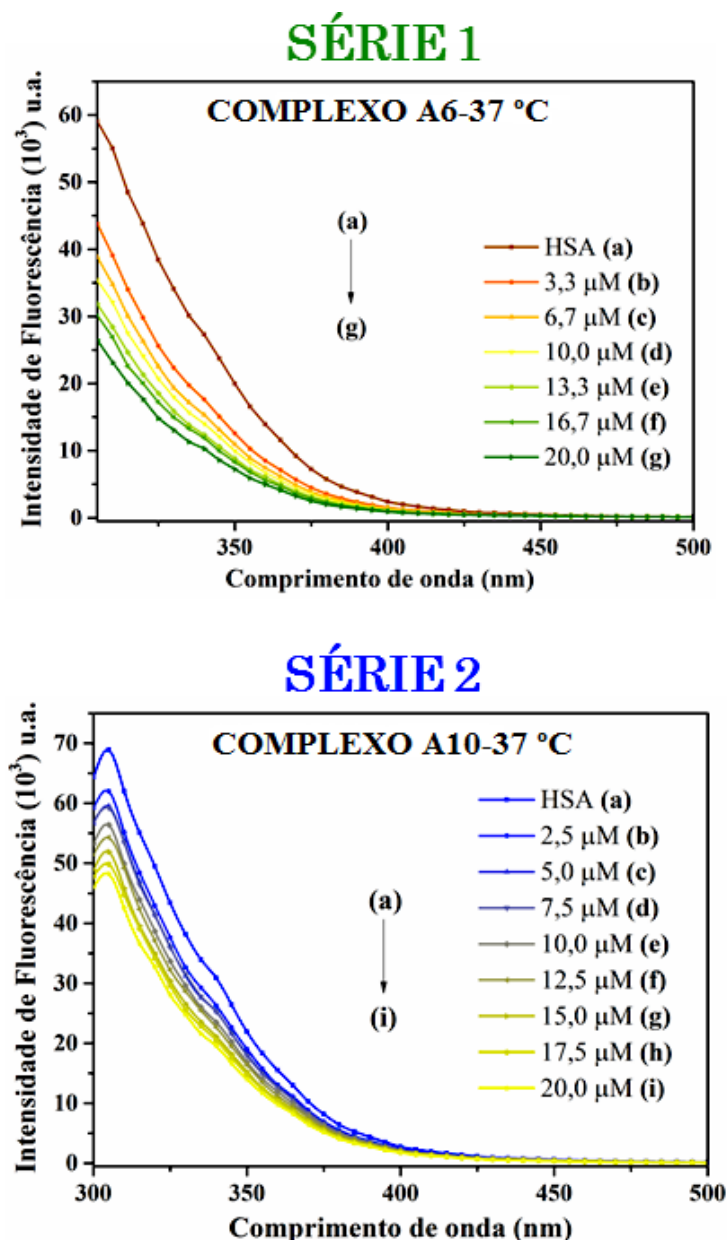
transferência de energia (em que fluoróforo e espécie supressora devem apresentar uma distância mínima entre si), entre outros.^{83,84}

O experimento de determinação da supressão da fluorescência foi realizado conforme seção Materiais e Métodos, e qualitativamente, em um primeiro momento, é possível observar que os complexos em estudo (Séries 1 e 2), provocam supressão da fluorescência intrínseca da proteína. Este resultado pode ser observado nos gráficos dispostos na Figura 4.25 para um complexo de cada série, decorrente da interação com a proteína de forma a causar alteração conformacional no microambiente em que se encontra o resíduo de triptofano (Trp-214). Devido à similaridade entre os compostos, os gráficos para os outros complexos são mostrados no Apêndice-Parte III. Apesar de terem sido obtidos em três temperaturas distintas, escolheu-se mostrar os gráficos referentes às temperaturas 25 e 37 °C.

A literatura relata dois possíveis mecanismos de supressão da fluorescência, que são: mecanismo dinâmico, quando a interação da espécie supressora se dá com a proteína no estado excitado, e mecanismo estático, quando a colisão entre estas espécies ocorre no estado fundamental, gerando um conjugado não fluorescente. Em geral, um mecanismo ocorre majoritariamente.

O mecanismo predominante pode ser estabelecido por meio da equação do mecanismo de supressão de Stern-Volmer, relatada como equação 3 na seção Materiais e Métodos. De acordo com a variação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) com a temperatura, associa-se o mecanismo dinâmico a um aumento de K_{sv} com aumento da temperatura (favorecimento da difusão da espécie supressora até o fluoróforo no estado excitado), e mecanismo estático a uma diminuição de K_{sv} com aumento da temperatura (menor estabilidade do conjugado entre supressor e proteína no estado fundamental)^{84,165}. Essa constante foi calculada nas diferentes temperaturas para todos os compostos em estudo, e os resultados podem ser analisados na Tabela 4.14.

FIGURA 4.25-Espectros de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença de diferentes concentrações do complexo A6 (Série 1; b-g) e complexo A10 (Série 2; b-i), com $[HSA] = 2 \mu\text{mol L}^{-1}$ constante em todo o experimento.*



*Todas as medidas tiveram suas intensidades de fluorescência corrigidas, devido ao efeito de filtro interno.

Considerando os valores de K_{sv} , a primeira observação é que os valores não diferem muito entre si, variando-se a temperatura. Entretanto no geral, há uma diminuição do valor de K_{sv} com aumento da temperatura, indicativo de mecanismo estático, predominantemente. Além deste indício, a constante de velocidade bimolecular de supressão (k_q), pode também ser utilizada como

diferenciação destes mecanismos, considerando que para biopolímeros essa constante assume valor máximo de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em mecanismo de supressão dinâmica, logo valores acima indicam mecanismo estático.³⁵ No caso dos complexos em estudo, todos os valores são da ordem de 10^{12} a $10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, evidenciando novamente o mecanismo estático para todos os complexos, ainda que não exclusivamente.

A interação de um candidato à fármaco ou metalofármaco com a HSA pode ocorrer de forma que se observe uma alta, moderada ou baixa afinidade, e cada um destes graus irá influenciar na distribuição e absorção no organismo. Uma baixa afinidade pode ser problemática quanto à absorção do fármaco, pois considerando que a albumina proporciona maior solubilidade a espécies hidrofóbicas, como poucas moléculas seriam carreadas pela biomolécula, baixa solubilidade seria associada neste caso, com grande possibilidade de formação de agregados. Já o cenário oposto, em que se estabelece uma alta afinidade com a biomolécula, apesar de se associar a uma maior solubilidade do composto em questão, o processo de distribuição no organismo poderia ser afetado, provocando aumento da meia vida biológica e provável ineficácia na excreção. Por fim, o panorama mais favorável seria uma moderada interação com a proteína, possibilitando eficácia tanto no processo de absorção, quanto distribuição e eliminação.¹⁵⁹

Essa afinidade pode ser correlacionada à constante de associação (K_a), e de acordo com o reportado na literatura, constantes em torno de 10^4 - 10^5 M^{-1} são resultantes de interações moderadas com a proteína em questão.¹⁵⁹ Conforme se analisa na Tabela 4.14, as interações dos compostos com HSA podem ser classificadas de fracas a moderadas, observando-se aumento dessa constante com aumento da temperatura.

TABELA 4.14-Valores das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de velocidade bimolecular de supressão (k_q), constantes de associação (K_a), números de sítio de ligação(n), e parâmetros termodinâmicos associados a supressão de fluorescência da HSA por diferentes concentrações dos compostos das Séries 1 e 2.

SÉRIE 1									
COMPLEXO	T (K)	$K_{sv} (10^4)$ (M^{-1})	$K_q (10^{12})$ ($M^{-1} s^{-1}$)	$K_a (10^4)$ (M^{-1})	n^*	Supressão da Fluoresc. (%)	ΔH° ($KJ mol^{-1}$)**	ΔS° ($J mol^{-1} K^{-1}$)	ΔG° ($KJ mol^{-1}$)
A1	298,15	$5,10 \pm 0,08$	$8,23 \pm 0,14$	$0,33 \pm 0,06$	0,91	54,0	113,8	449,1	-20,1
	303,15	$4,36 \pm 0,04$	$7,03 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,23$		40,7			-23,3
	310,15	$4,19 \pm 0,10$	$6,77 \pm 0,21$	$1,95 \pm 0,56$		40,3			-25,5
A2	298,15	$5,69 \pm 0,05$	$9,17 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,02$	0,84	56,2	89,6	363,4	-18,7
	303,15	$4,06 \pm 0,16$	$6,55 \pm 0,25$	$0,38 \pm 0,09$		46,8			-20,8
	310,15	$3,52 \pm 0,06$	$5,68 \pm 0,10$	$0,77 \pm 0,16$		44,4			-23,1
A3	298,15	$8,60 \pm 0,10$	$13,90 \pm 0,16$	$0,84 \pm 0,07$	0,89	64,8	57,8	268,9	-22,4
	303,15	$6,72 \pm 0,06$	$10,80 \pm 0,10$	$1,22 \pm 0,29$		53,7			-23,7
	310,15	$6,30 \pm 0,10$	$10,20 \pm 0,23$	$2,07 \pm 0,70$		51,7			-25,6
A4	298,15	$4,87 \pm 0,14$	$7,86 \pm 0,22$	$0,56 \pm 0,22$	0,91	52,0	85,9	360,0	-21,4
	303,15	$5,17 \pm 0,02$	$8,33 \pm 0,06$	$1,22 \pm 0,43$		52,7			-23,7
	310,15	$5,34 \pm 0,09$	$8,61 \pm 0,15$	$2,14 \pm 0,54$		53,5			-25,7
A5	298,15	$3,75 \pm 0,12$	$6,05 \pm 0,19$	$3,80 \pm 1,14$	0,80	42,8	-138,1	-375,6	-26,1
	303,15	$3,53 \pm 0,02$	$5,70 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,41$		42,2			-23,3

	310,15	3,23±0,07	5,21±0,11	0,44±0,14		42,0			-21,6
A6	298,15	5,36±0,08	8,64±0,12	0,21±0,007		55,2			-19,0
	303,15	5,03±0,06	8,11±0,09	0,26±0,04	0,75	55,1	38,0	191,0	-19,8
	310,15	4,73±0,03	7,62±0,05	0,38±0,07		55,2			-21,3
A7	298,15	5,44±0,06	8,77±0,10	1,19±0,08		56,7			-23,3
	303,15	5,48±0,06	8,84±0,10	1,72±0,38	0,84	56,4	95,7	218,3	-24,6
	310,15	6,53±0,19	10,53±0,31	5,30±0,49		51,0			-28,0
SÉRIE 2									
	298,15	2,56±0,05	4,14±0,09	0,20±0,05		65,8			-18,8
A8	303,15	2,52±0,03	4,07±0,05	0,61±0,03	0,88	62,2	88,8	361,1	-22,0
	310,15	2,09±0,008	3,37±0,01	0,80±0,08		60,7			-23,2
				K_a (10³) (M⁻¹)					
A9	298,15	1,93±0,10	3,12±0,16	0,63±0,11		55,2			-16,0
	303,15	1,64±0,09	2,65±0,14	0,98±0,20	0,72	51,1	55,1	238,3	-17,4
	310,15	1,52±0,06	2,46±0,10	1,49±0,36		46,8			-18,8
A10	298,15	2,25±0,06	3,63±0,10	0,34±0,08	0,91	37,7			-14,4
	303,15	2,14±0,13	3,45±0,22	1,16±0,11		31,4	209,7	751,9	-17,8
	310,15	1,96±0,09	3,16±0,17	8,98±3,51		30,0			-23,5

Todos os dados foram obtidos a partir de cálculos que consideraram as intensidades de fluorescência corrigidas. *Valores calculados na temperatura de 310,15 K; **Valores calculados considerando-se as temperaturas de 298,15 e 310,15 K.

Mais informações podem ser adquiridas, com relação a parâmetros termodinâmicos destes sistemas, que se traduzem no modo que se dá a interação dos complexos com o fluoróforo investigado, e a espontaneidade com que ocorre ou não tal interação, conforme mencionado no ensaio de deslocamento de Hoechst. Assim, se os parâmetros entálpico e entrópico forem positivos, a inserção do composto no arcabouço protéico ocorre predominantemente por interações hidrofóbicas, entretanto, se o resultado obtido for contrário a este (ΔS e $\Delta H < 0$), o processo ocorre por ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals. Além disso, se a entropia resulta em valor negativo e a entalpia em valor positivo, o processo é definido por atrações eletrostáticas. Com relação a espontaneidade ou não, de que ocorra a inserção do composto na proteína, a avaliação se dá por meio da variação da energia livre de Gibbs, um valor negativo indicando essa espontaneidade e $\Delta G > 0$, um processo não-espontâneo.^{83,159}

Mediante essas informações e resultados da Tabela 4.14, conclui-se que no geral, os compostos interagem com a proteína por meio de interações hidrofóbicas, o que se dá com relação a muitos fármacos e explica a importância da HSA na farmacocinética de vários compostos (carreando e impedindo a agregação devido a insolubilidade). Este tipo de interação, é também justificado devido aos ligantes contidos na esfera de coordenação destes compostos, e a lipofilicidade que os fazem ter mais afinidade a um sistema orgânico, com relação ao aquoso. A exceção é para o complexo **A5**, que apresenta interação por ligação de hidrogênio ou forças de Van der Waals. Por fim, todos os processos são espontâneos, dados os valores da variação da energia livre de Gibbs.

A proteína albumina de soro humana possui regiões onde os fármacos se ligam preferencialmente, que são classificadas em três domínios: I, II e III, e cada um destes subdivide-se em subdomínios A e B. Dentre estas regiões, os subdomínios IIA e IIIA, são conhecidos como sítios Sudlow I e II, respectivamente, e são os sítios onde os fármacos geralmente se ligam com alta afinidade. O sítio Sudlow I é também conhecido como sítio varfarina-azaprazona,

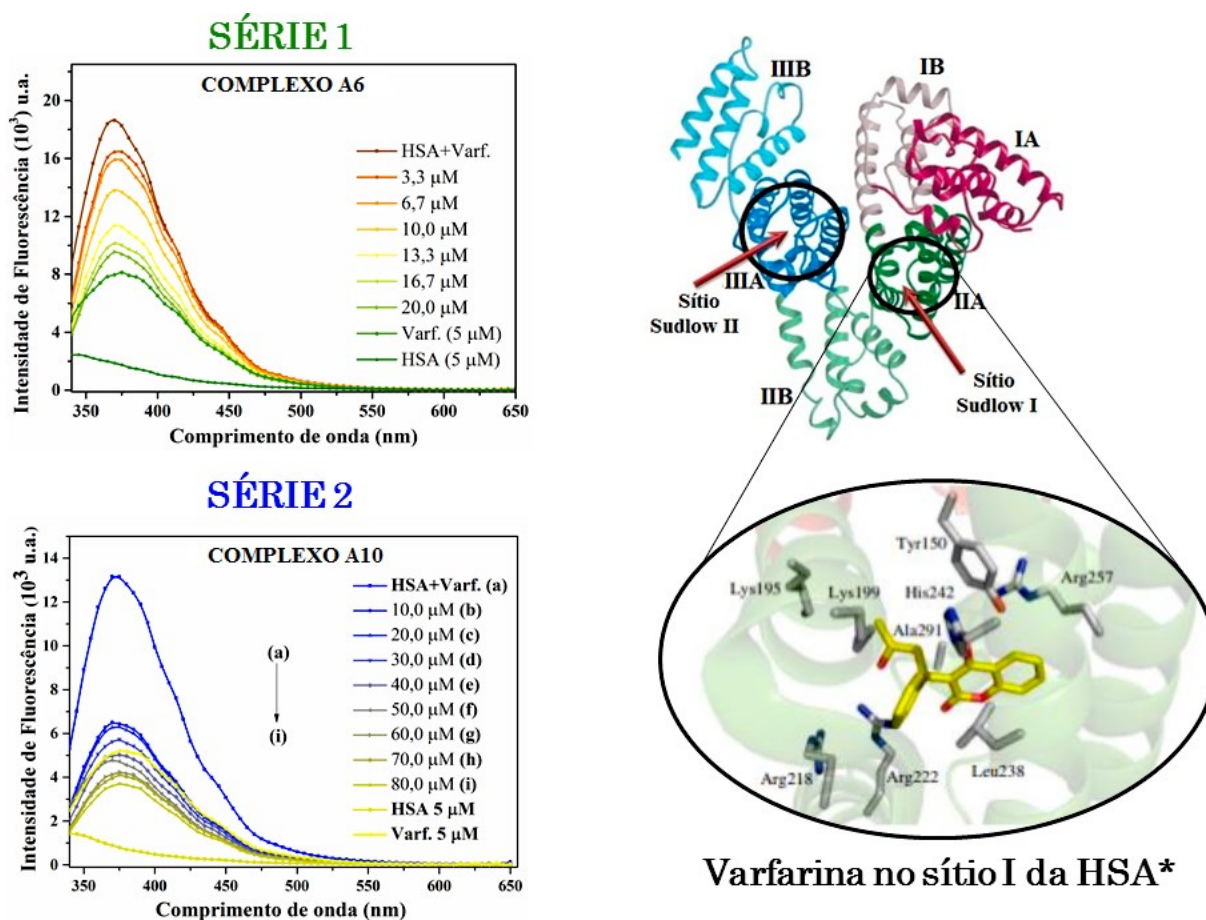
onde estes fármacos se inserem, bem como esperado para espécies afins, e o sítio Sudlow II é nomeado como indol-benzodiazepina.^{83,88,166}

Apesar dessas probabilidades de regiões de interação, alguns fármacos se ligam a mais de um sítio, e outros a nenhum destes. Além disso, a análise de interação de mais de um fármaco à proteína, pode provocar competição por um mesmo sítio de interação, o que vai depender da maior ou menor afinidade entre os fármacos com o sítio de ligação.^{88,166}

Observa-se na Tabela 4.14 que o número de sítios de ligação é aproximadamente 1 em todos os casos. A fim de verificar se o sítio I seria onde ocorre a interação, foi utilizada a premissa anterior de que um composto pode competir com outro pelo mesmo sítio de ligação. O ensaio competitivo foi realizado com a varfarina que reconhecidamente interage por esse sítio da HSA. A varfarina possui fluorescência intrínseca, mas o rendimento quântico dessa fluorescência se torna maior quando conjugada com a HSA, e se alguma outra espécie consegue deslocar a varfarina de seu sítio, a fluorescência será suprimida, uma vez que a concentração do conjugado HSA-varfarina irá diminuir.

Os resultados obtidos indicam que os compostos foram capazes de suprimir a fluorescência do sistema HSA-varfarina (Figura 4.26), em um panorama geral, indicando que os complexos das Séries 1 e 2 possuem afinidade com o Sítio Sudlow I. Este resultado não é excludente de outra possibilidade, embasando-se em exemplos de fármacos e metalofármacos que interagem por mais de um sítio, como o evidenciado para os compostos KP1019 e KP1339, para os quais evidenciou-se afinidade de interação com os sítios I e II.¹⁶⁷ Na Figura 4.26 pode-se observar os espectros de emissão obtidos para o sistema HSA-varfarina sob influência dos complexos **A6** e **A10**, e os demais podem ser averiguados no Apêndice-Parte III. Assim como na análise de interação com HSA, o complexo **A5** foi aquele que se desviou do comportamento geral, não provocando supressão da fluorescência de forma eficaz do sistema HSA-Varfarina.

FIGURA 4.26-Espectros de emissão do sistema HSA-Varfarina, à esquerda, sob influência de diferentes concentrações dos complexos A6-Série 1 e A10-Série 2, e à direita, representação da interação de varfarina no Sítio Sudlow I da HSA.



*Adaptado de Naveenraj, S.; Anandan, S., 2013; Yamasaki, K. *et al.*, 2013.^{159,168}

Considerações finais sobre os ensaios de interação com biomoléculas

Diante dos resultados enunciados nos experimentos referentes às interações com biomoléculas, conclui-se que os compostos interagem fracamente com o DNA, majoritariamente pelo sulco menor desta biomolécula. Devido à carga catiônica dos compostos analisados e carga negativa intrínseca ao DNA, uma interação eletrostática não deve ser excluída, até mesmo contribuindo na interação pelos sulcos.

O fato de os complexos não interagirem de forma a se ligarem irreversivelmente ao DNA, pode levar a um outro vislumbre relacionado a citotoxicidade dos mesmos. Apesar de ser o alvo biológico de fármacos já empregados como quimioterápicos, danos ao DNA podem ser relacionados a uma menor seletividade às células tumorais, e a maiores efeitos adversos. Isto devido a também causarem danos extensos às células não tumorais, ainda que estas consigam se recuperar mais facilmente, devido a mecanismos de reparo em pleno funcionamento. Dessa forma, o DNA não ser o alvo de ação, pode contribuir para a seletividade de determinado candidato a fármaco/metalo-fármaco.

Os compostos da Série 1 não exibiram potencial de inibição da atividade da enzima topoisomerase II α , enquanto os compostos da Série II inibiram parcialmente a atividade catalítica desta enzima nas maiores concentrações. Estudos mais acurados são necessários para maiores conclusões a esse respeito, mas este resultado pode auxiliar em estudo referente ao distinto potencial citotóxico dos compostos das Séries 1 e 2.

Com relação à interação com a proteína de soro albumina humana, os compostos interagem de forma fraca a moderada, em um mecanismo predominantemente estático, ou seja, a supressão da fluorescência observada se dá pela formação de complexo não fluorescente. Além disso, a interação dos compostos com a proteína se dá, no geral, por interações hidrofóbicas. Conclui-se que para a maior parte dos compostos, a proteína de soro albumina pode ser um eficaz carreador.

Conhecidos os sítios de possibilidade de interação de fármacos na HSA, os compostos em estudo neste trabalho foram capazes de deslocar fármaco que, reconhecidamente tem grande afinidade pelo sítio Sudlow I ou subdomínio IIA, indicando que os complexos das Séries 1 e 2 têm afinidade por este mesmo sítio, sem exclusão de que essa interação ocorra também por outro sítio.

4.3.4- SEÇÃO 4- Ensaios Biológicos

Alguns complexos das Séries estudadas foram escolhidos para estudos que buscaram avaliar a potencialidade biológica. Empregou-se experimentos que buscaram explorar os resultados de citotoxicidade, trazendo novos aspectos relativos, por exemplo, ao mecanismo de morte celular, capacidade de inibição da migração celular, parada de ciclo celular, entre outros. Para tanto, conforme mencionado anteriormente, a escolha foi realizada com base na citotoxicidade e índice de seletividade, relatados na Seção II dos Resultados e Discussão. Portanto, decidiu-se por realizar estes experimentos avaliando-se a influência dos complexos **A6** e **A7** da Série 1 na linhagem A2780*cis*, e do complexo **A9** nas linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*.

4.3.4.1- Ensaio de Morfologia Celular

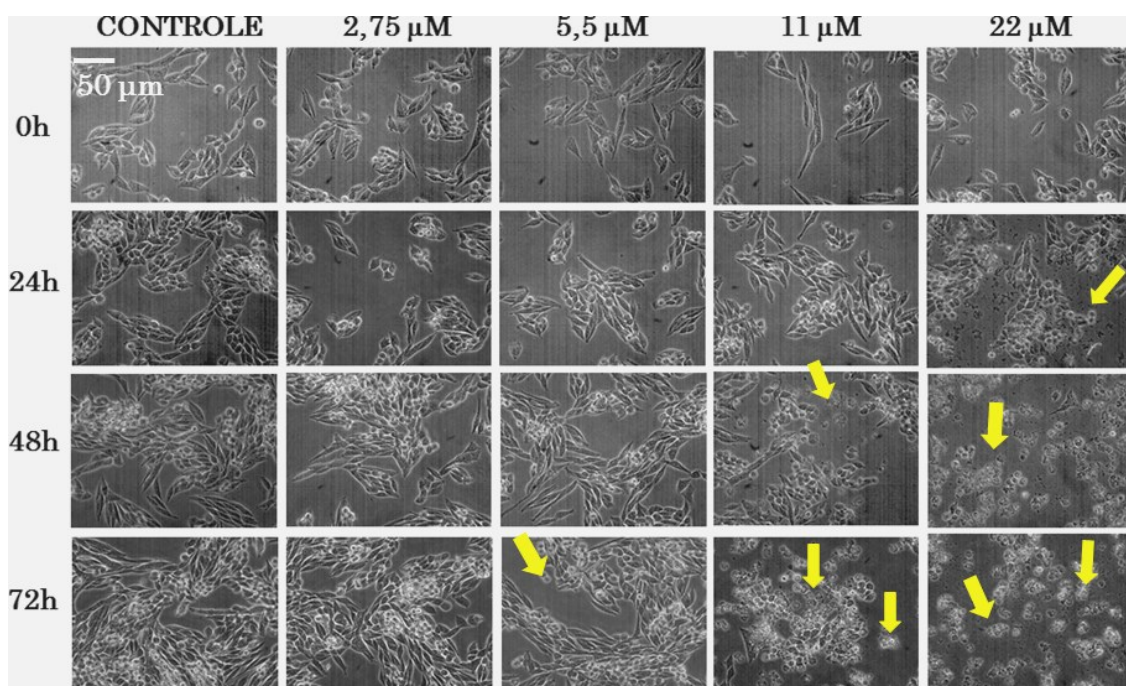
A avaliação morfológica foi realizada submetendo as linhagens celulares a diferentes concentrações dos compostos, baseadas nos valores de IC₅₀ anteriormente relatados. As alterações morfológicas provocadas pelos compostos foram monitoradas com o tempo, e comparativamente a um controle negativo (tratamento apenas com 0,5% de DMSO). Apesar de ter sido relatado que as linhagens de estudo seriam A2780*cis* e MDA-MB-231, exclusivamente neste experimento, foi utilizada a linhagem MCF-10A, ao avaliar-se o complexo **A9**.

Nas linhagens tumorais estudadas, é possível observar modificações morfológicas mais expressivas em concentrações acima do IC₅₀, comparando-se ao controle negativo. Na Figura 4.27, se apresenta as imagens obtidas para o complexo **A6** na linhagem A2780*cis* e na Figura 4.28, imagens obtidas para o complexo **A9** na linhagem MDA-MB-231 em duas das concentrações utilizadas, nos tempos inicial e final, sendo todas as imagens nas demais concentrações apresentadas no Apêndice-Parte IV. Nas concentrações mais próximas ao IC₅₀ (**A6**_{72h} A2780*cis*- 5,44±0,19 µmol L⁻¹ e **A9**_{48h} MDA-MB-231- 0,10±0,01 µmol L⁻¹), alguma alteração é observada, mas ainda em pequena extensão, como algum

arredondamento celular e perda de aderência. Nas concentrações acima, esses sinais tornam-se mais evidentes, principalmente na maior concentração, em que com 24 h de tratamento com o composto, observa-se células em formato arredondado, em maior quantidade de acordo com o tempo. Tais evidências são indicativas de morte celular. Os resultados para os complexos **A7** e **A9** na linhagem A2780*cis*, encontram-se dispostos no Apêndice-Parte IV, com indicativos de morte celular tal qual relatado para os complexos **A6** (A2780*cis*) e **A9** (MDA-MB-231).

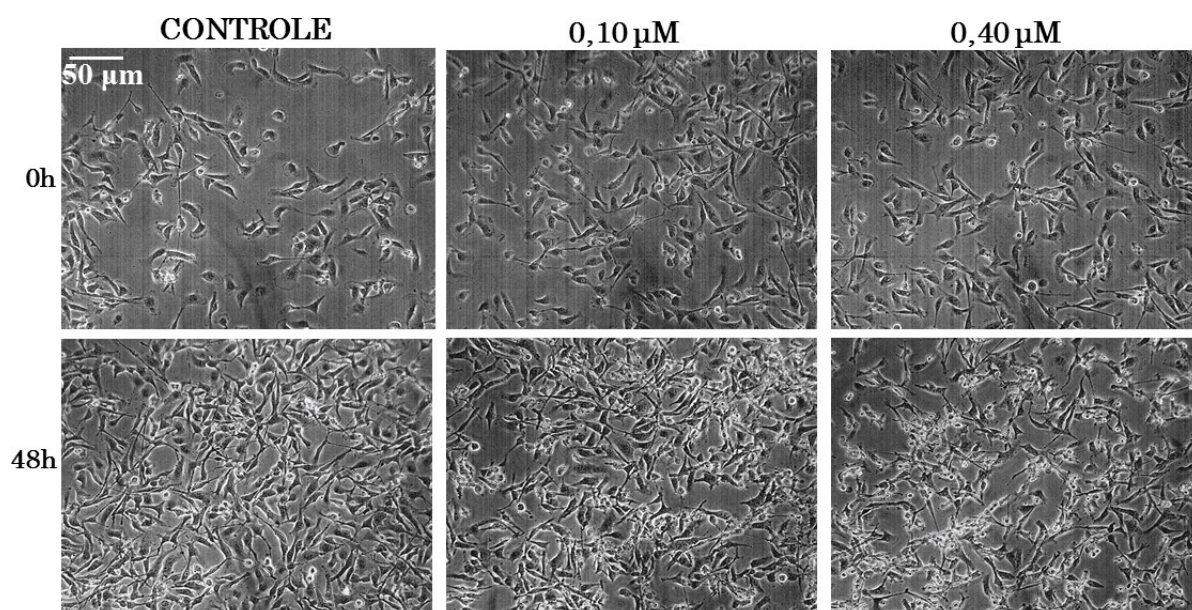
O experimento realizado para o complexo **A9** na linhagem MDA-MB-231, pode ser comparado ao obtido para esse mesmo composto na linhagem MCF-10A, cujas imagens são reportadas na Figura 4.29. Para essa última linhagem foi utilizado concentrações que afetam a morfologia celular da linhagem MDA-MB-231, bem como IC₅₀ e concentração acima, na própria linhagem (MCF-10A).

FIGURA 4.27-Ensaio morfológico na linhagem A2780*cis* sob tratamento com diferentes concentrações do complexo **A6** (Série 1).



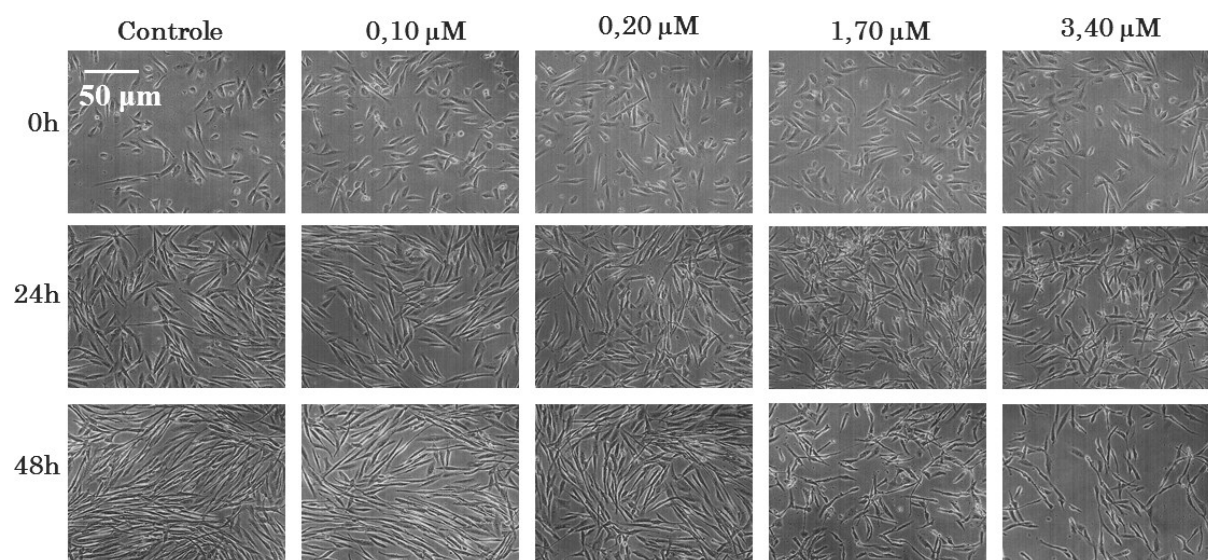
Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das duplicatas.

FIGURA 4.28-Ampliação das imagens obtidas no ensaio morfológico na linhagem MDA-MB-231, sob tratamento com diferentes concentrações do complexo **A9** (Série 2).



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens obtidas representam uma das duplicatas.

FIGURA 4.29-Imagens micrográficas do ensaio morfológico na linhagem MCF10A sob tratamento com diferentes concentrações do complexo **A9** (Série 2), acompanhado com o tempo.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das duplicatas.

O que pode ser observado é que as concentrações mais baixas que causam alteração em células MDA-MB-231, não provocaram alterações

morfológicas na linhagem MCF-10A. Alterações foram constatadas na concentração de $1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 h de incubação, e na concentração igual a $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 24 h de tratamento com o composto. Nessas condições, observa-se células em formato circular, perda de aderência e diminuição da densidade celular (comparativamente ao controle negativo), que como mencionado, são indicativos de morte celular. Este resultado corrobora com a citotoxicidade e seletividade anteriormente relatada para o complexo **A9**, mais citotóxico para a linhagem MDA-MB-231 em detrimento da MCF-10A.

4.3.4.2- Ensaio de Formação de Colônias

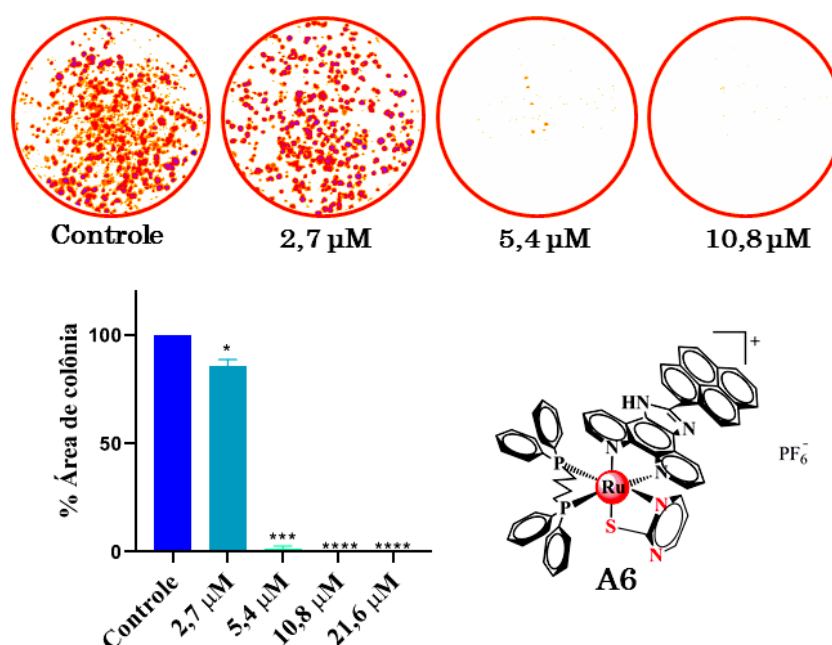
Este ensaio é assim denominado por avaliar a capacidade de uma célula em resistir ao tratamento e crescer em colônia. Em outras palavras, pretende a identificação de células que conservem sua capacidade reprodutiva por meio da detecção de grande número de suas progênes.^{169,170}

Mesmo que uma célula possa reter algumas funções metabólicas, como síntese de proteínas, pode ser que se encontre incapacitada de se dividir e produzir descendentes em grande quantidade, o que determina a morte reprodutiva celular. A prova de que uma célula mantém sua capacidade reprodutiva, é a geração de colônia que possa ser visualizada a olho nu, considerando-se que uma colônia pode ser determinada como um conglomerado com mais de 50 células.¹⁷¹

Nesse ensaio as células podem ser observadas pela marcação com corantes, como aqueles utilizados neste trabalho (cristal violeta e corante panóptico), que se ligam preferencialmente a moléculas polianiónicas, como o DNA, e permitem a contagem dessas colônias. No presente estudo, essa contagem foi realizada mensurando-se a área de colônia, que permite obter informações a respeito de efeitos citotóxicos e efeitos citostáticos (morte reprodutiva celular), comparativamente ao controle negativo.¹⁶⁹

Nesse contexto, fez-se avaliação de sobrevivência clonogênica nas linhagens A2780*cis* e MDA-MB-231. Os complexos avaliados, no geral, mostraram efeitos citostáticos de maneira dependente da concentração, uma vez que se verifica diminuição do número de colônias (visualmente), e da área de colônia (quantitativamente) com aumento da concentração, conforme observa-se nas Figuras 4.30 e 4.31. A Figura 4.30 mostra o resultado obtido para o complexo **A6** na linhagem A2780*cis*, enquanto aquele obtido para o complexo **A7** é exibido no Apêndice-Parte IV, e em ambos os casos nas concentrações próximas ao IC₅₀ (**A6**_{72h}; 5,44±0,19 µmol L⁻¹ e **A7**_{48h}; 3,77±0,54 µmol L⁻¹) há menor capacidade reprodutiva das células, dado o menor número de colônias geradas em comparação ao controle negativo. Tal fato evidencia o efeito citostático em um primeiro momento para estes complexos, e em maiores concentrações, esse fator juntamente ao efeito citotóxico já mencionado, torna-se expressivo. Esse resultado pode ser concluído, a partir da observação dos resultados obtidos nas placas e representados pelas imagens tratadas no software ImageJ, bem como a partir do tratamento estatístico referente a área de colônia, realizado de forma comparativa com o controle negativo, por meio da equação 9.

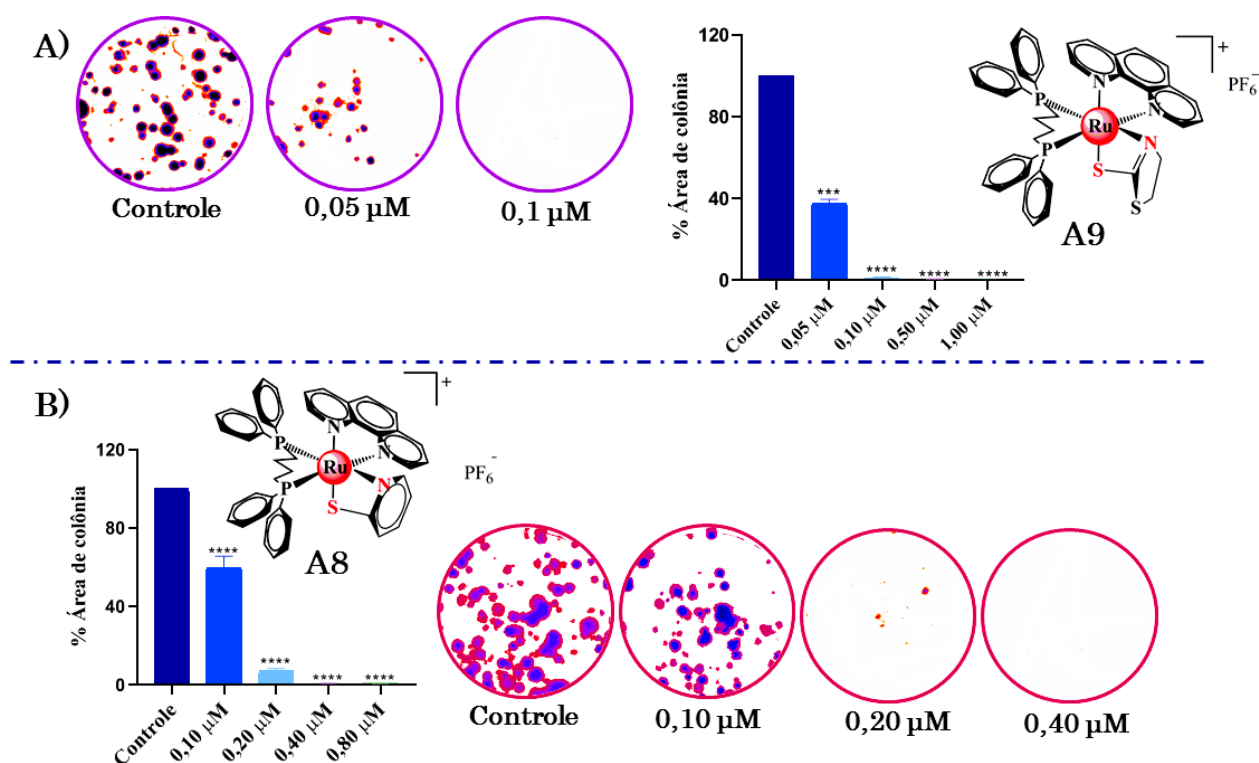
FIGURA 4.30-Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem A2780*cis*, sob diferentes concentrações do complexo **A6** (Série 1), considerando 72 h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das triplicatas e os dados foram gerados a partir das médias de triplicatas individuais ($\pm$ DP), analisados comparativamente ao controle por meio de tratamento *one-way*, e tratamento post-hoc Dunnett. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; e ***** $p < 0,0001$ versus controle negativo.

O mesmo resultado pode ser observado na Figura 4.31, onde se apresenta os dados obtidos para os complexos **A8** e **A9** na linhagem MDA-MB-231. A diferença consiste no fato que o complexo **A9** pode ser dito mais eficiente quanto a sua citotoxicidade, uma vez que na concentração do IC_{50} ($0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$) não se identifica visualmente nenhuma colônia gerada, resultado oposto ao observado para o complexo **A8** na concentração de $0,20 \mu\text{mol L}^{-1}$, condizente com os ensaios de citotoxicidade avaliados por ensaio colorimétrico de MTT, em que o complexo **A9** teve maior destaque frente aos demais. Este comparativo pode também ser realizado com o complexo **A10**, cujo resultado se encontra no Apêndice-Parte IV, obtendo-se mesma conclusão.

FIGURA 4.31-Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem MDA-MB-231, sob diferentes concentrações dos complexos A9 (A) e A8 (B), (Série 2), considerando 48h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das triplicatas e os dados foram gerados a partir das médias de triplicatas individuais ($\pm$ DP), analisados comparativamente ao controle por meio de tratamento *one-way*, e tratamento post-hoc Dunnett. *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$ versus controle negativo.

4.3.4.3- Ensaios relacionados à cascata metastática

A migração celular está intrinsecamente relacionada ao processo de metástase, sendo uma das etapas fundamentais ao processo metastático. As células podem migrar de forma individual ou coletiva, esta última forma ocorrendo, geralmente, como uma migração temporária de forma a responder a estímulos externos, tais como, cicatrização de feridas e processo inflamatório. Essa migração coletiva ocorre em um grupo de células, cujas junções entre estas coordenam a atividade com o citoesqueleto de células vizinhas e tecido ao redor.

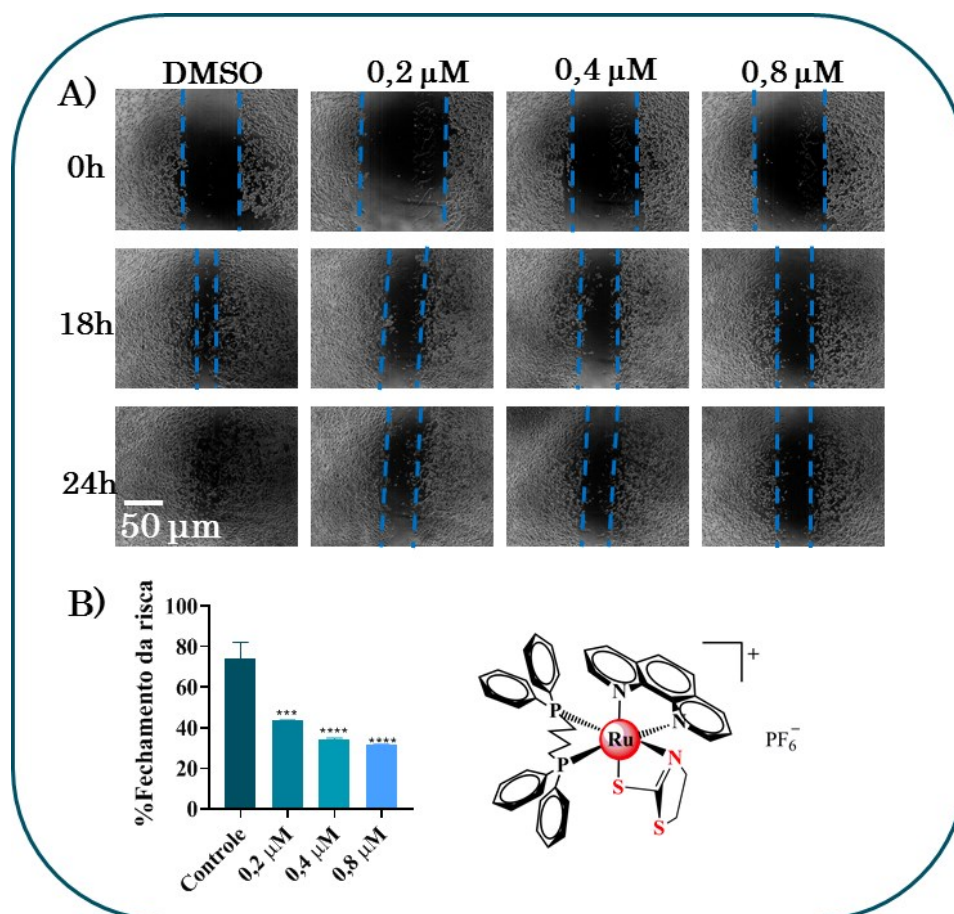
Ocorre alteração morfológica para que se tenha a interação com a matriz extracelular, que irá resultar na locomoção, em que as células sofrem primeiramente alongamento devido a modificação em filamentos de actina, e essa remodelagem, gera tração e força de movimento necessários ao processo de migração.^{172,173}

A migração pode ser avaliada por meio de alguns ensaios, e no trabalho em questão empregou-se o ensaio *Wound Healing*, que é relatado como um método simples e adequado para avaliação da capacidade migratória coletiva. Portanto, este experimento possibilitou analisar a influência de diferentes concentrações dos compostos na cicatrização de feridas, em comparação ao controle negativo (tratamento com 0,5% de DMSO), para o qual espera-se “fechamento” natural da ferida como resposta ao estímulo externo provocado.

Na Figura 4.32 se observa as imagens microscópicas obtidas neste ensaio para o complexo **A9** na linhagem MDA-MB-231, onde foram utilizadas concentrações do complexo que não causariam morte celular, considerando que o IC_{50} (24h) é $1,00 \pm 0,08 \mu M$. Além disso, a mitomicina foi utilizada a fim de proporcionar avaliação da migração excluindo-se a proliferação, que também pode ocasionar cicatrização da ferida. O resultado obtido indica que o complexo consegue influenciar no fechamento da risca realizada, de forma a evitar esse processo, de maneira concentração-dependente. Este resultado é mais bem constatado ao analisar-se o tratamento quantitativo/estatístico com relação à área fechada, no qual nota-se que apesar dos resultados similares entre as concentrações do composto em inibir a migração celular, a maior concentração é mais eficiente nesse quesito.

Complexos de Ru(II) têm se mostrado eficientes no que concerne à inibir as etapas necessárias ao processo metastático. No LERCI esse potencial tem sido mostrado principalmente nas linhagens MDA-MB-231 e A549, para as quais inclusive compostos Ru/difosfina/mercaptop foram testados, e exibiram resultados similares àquele reportado para o complexo **A9**.^{41,42,174}

FIGURA 4. 32-Efeito do complexo **A9** (Série 2) na migração celular de células MDA-MB-231 A) Imagens micrográficas obtidas na objetiva de 4x, de acordo com o tempo; B) porcentagem de cicatrização da ferida com relação ao tempo de análise (comparativo de área entre 0 e 24 h)

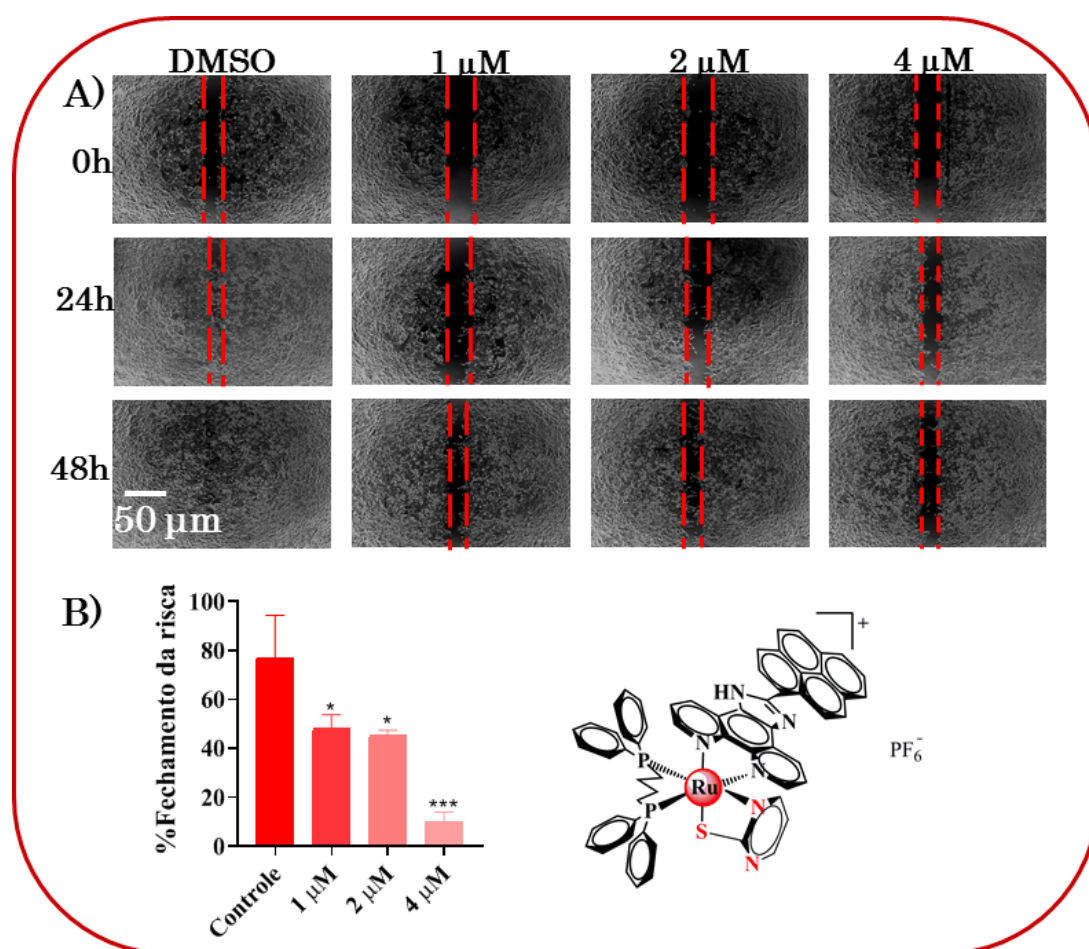


Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens são referentes a uma das triplicatas, e os dados relacionados ao fechamento da risca foram obtidos empregando as médias das triplicatas individuais ($\pm\text{DP}$), e tratamento estatístico *one-way* e análise post hoc Dunnett.*** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ versus controle negativo.

Este mesmo resultado (dependência da concentração), pode ser observado na Figura 4.33 para o complexo **A6** na linhagem A2780*cis*, entretanto em diferente grau, observando-se uma maior discrepância entre as concentrações, quanto a porcentagem de fechamento da risca, mas ainda de forma concentraçã-

dependente. Nesse caso, foi utilizado concentrações próximas ao IC₅₀ obtido com 72 h de incubação com o composto, e o experimento foi acompanhado por 48 h.

FIGURA 4.33-Efeito do complexo **A6** (Série 1) na migração celular de células A2780cis A) Imagens micrográficas obtidas na objetiva de 4x, de acordo com o tempo; B) porcentagem de cicatrização da ferida com relação ao tempo de análise (comparativo de área entre 0 e 48 h).



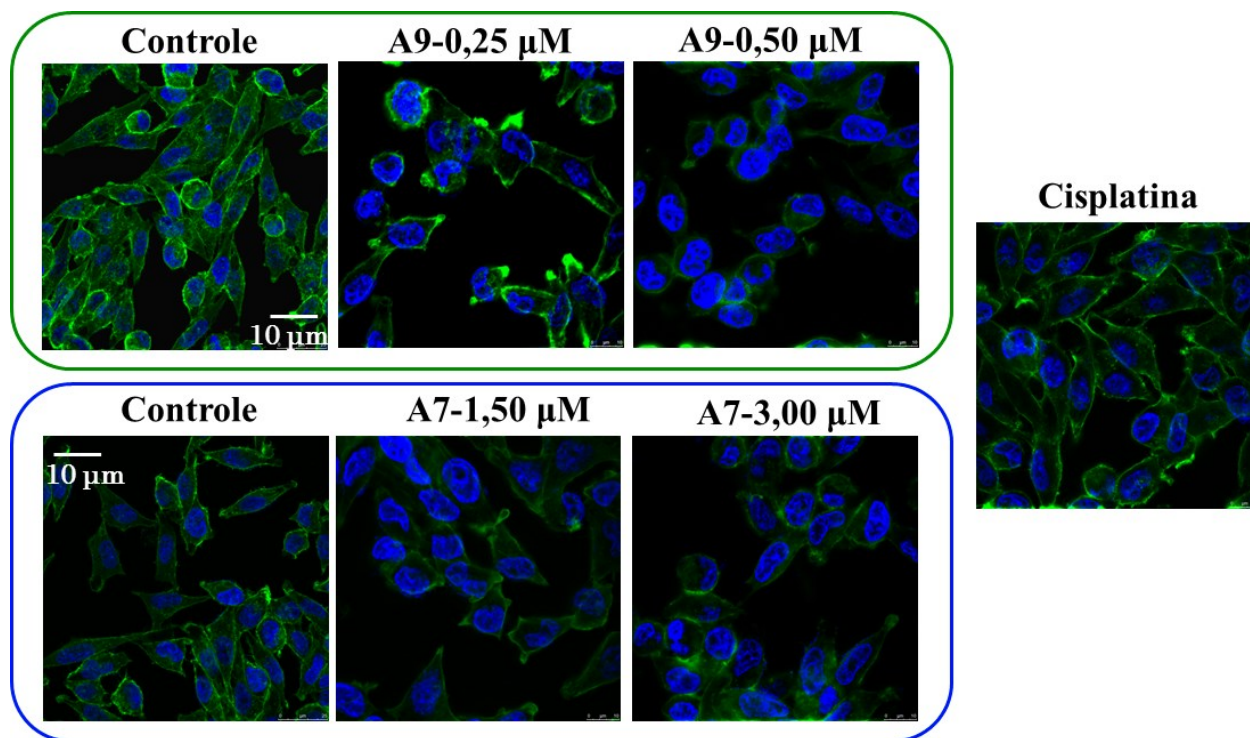
Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens são referentes a uma das triplicatas, e os dados relacionados ao fechamento da risca foram obtidos empregando as médias das triplicatas individuais ($\pm$ DP), e tratamento estatístico *one-way* e análise post hoc Dunnett.* $p < 0,05$, *** $p < 0,005$ versus controle negativo.

Apesar de não ter sido realizado esse ensaio com o complexo **A9** na linhagem A2780cis, empregou-se ensaio de marcação de filamentos de actina com faloidina, tanto para este quanto para o complexo **A7**. Este experimento traz

informações importantes, uma vez que polímeros de actina constituem os microfilamentos, que por sua vez, é um dos filamentos principais que compõem o citoesqueleto das células, e como já mencionado está envolvido no processo de migração. Os filamentos de actina, podem existir em formas monoméricas (G-actina) ou poliméricas (F-actina), e são essenciais em alguns eventos celulares, dentre estes, a motilidade. Portanto, qualquer alteração nestes filamentos afetaria o processo de migração, consequentemente afetando a cascata metastática.¹⁷⁵

O marcador faloidina-488 utilizado neste experimento possui alta seletividade de ligação com F-actina, e por isso foi empregado para essa avaliação, resultando em emissão de luz verde. As imagens micrográficas obtidas em microscópio confocal são mostradas na Figura 4.34, para ambos os compostos mencionados, em que uma análise qualitativa comparativamente ao controle pode ser realizada. No controle negativo, em que o tratamento foi realizado apenas com 0,5% de dimetilsulfóxido, tem-se as estruturas intactas ou com a menor perturbação possível, já que nessa condição, não se espera citotoxicidade avaliável. Ao comparar-se as imagens obtidas para os complexos, se observa que, após 24 h de incubação com os compostos, e posterior marcação com faloidina, há condensação dos filamentos de actina, portanto, promovem alterações estruturais no citoesqueleto celular. Esse resultado é observado para ambos os complexos, de forma que com aumento da concentração essa alteração se torna mais expressiva, sendo mais evidente no caso do complexo **A9**. A cisplatina não apresenta alterações nos filamentos de actina, o que pode ser causado devido a resistência dessa linhagem a este composto, e/ou pela concentração utilizada.

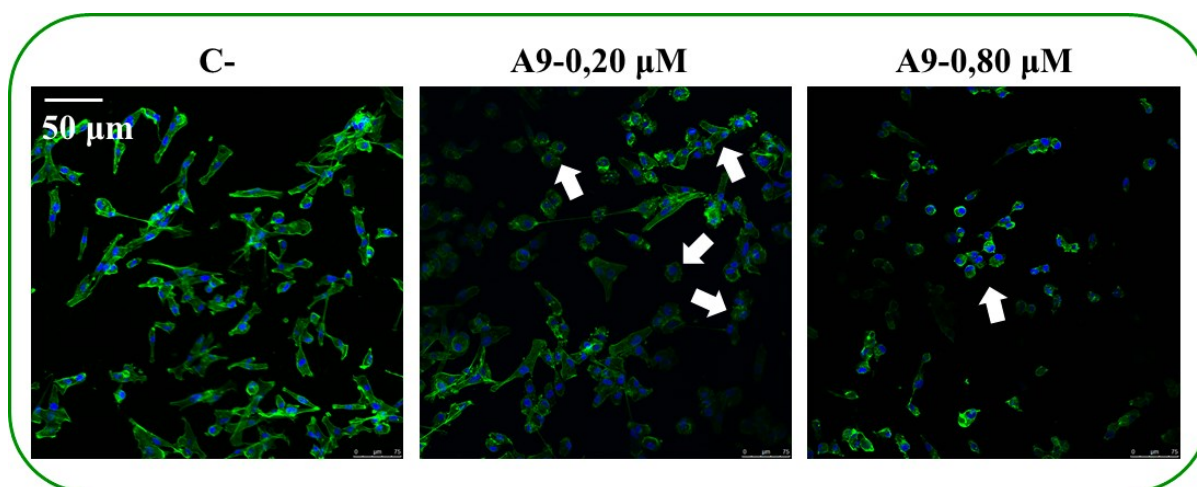
FIGURA 4. 34-Ensaio de citoesqueleto com marcação de faloidina e DAPI, na linhagem A2780cis, após 24 h de tratamento com 1,5 e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo A7 (Série 1); 0,25 e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo A9 (Série 2); 0,5% de DMSO (controle negativo); e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatina.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das duplicatas experimentais, e foram obtidas em microscópio confocal SP8 Leica, na objetiva de 40X.

Esse experimento foi também realizado com o complexo A9 (Série 2), na linhagem MDA-MB-231, obtendo-se as imagens da Figura 4.35, onde as setas brancas indicam alguns pontos onde se verifica condensação dos filamentos de actina em comparação ao controle negativo, tal qual mencionado para a linhagem A2780cis. Este efeito provocado pelo composto, é maior conforme há aumento da concentração, e está de acordo com o resultado apresentado para este complexo, nesta mesma linhagem, no ensaio *Wound Healing*. Na concentração de 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, já se observa alterações significativas no citoesqueleto celular, que se torna mais extenso ao se avaliar a concentração de 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

FIGURA 4.35-Ensaio de citoesqueleto com marcação de faloidina e DAPI, na linhagem MDA-MB-231, após 24 h de tratamento com 0,20 e 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo A9 (Série 2); 0,5% de DMSO (controle negativo).



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das duplicatas experimentais, e foram obtidas em microscópio confocal SP8 Leica, na objetiva de 10X.

Mediante esse resultado, uma interação efetiva dos compostos com o citoesqueleto das células torna-se plausível, o que pode acarretar interferência em diferentes eventos celulares, podendo-se relacionar ao efeito citotóxico destes complexos. Tal hipótese torna-se mais factível ao avaliar-se maior dano, ainda que visualmente, causado por aqueles compostos que resultaram em maior citotoxicidade (Série 2). Entretanto, futuras investigações devem ser realizadas a fim de avaliar, se de fato a interação com constituintes do citoesqueleto ocorre.¹⁷⁶

Além disso, todos os processos envolvidos na cascata metastática são complexos e envolvem uma diversidade de interações, proteínas e sinalizações. Dessa forma, o resultado aqui obtido é um estudo preliminar de que os complexos interferem na etapa de migração celular, mas outros estudos que corroborem com este indicativo inicial devem ser realizados, bem como que estudem outros processos relacionados à metástase, como inibição dos processos de adesão e invasão.¹⁷⁵

4.3.4.4- Ensaios relacionados à apoptose

Uma pequena varredura na literatura permite dizer que atualmente muitos tipos de morte celular são relatadas e investigadas, sendo estas classificadas devido à diversos fatores. Estes tipos de morte podem ser classificados, de acordo com alguns autores, em dois tipos, que seriam: morte celular accidental (necrose), e morte celular programada, como apoptose (intrínseca e extrínseca), ferroptose, necroptose, entre outros, enquanto outros autores propõem outra classificação, ainda que similar.^{177,178}

Apesar disso, a morte celular por apoptose, que classifica-se como morte celular programada continua sendo bem investigada como aquela causada por fármacos e metalofármacos. Isto se deve ao fato de que a morte celular por apoptose é um processo normal ao organismo, quando células passam a desempenhar suas funções erroneamente ou ainda quando entram em senescência. O organismo tende a passar por esse processo de forma a resultar na menor perturbação possível, e sem causar processo inflamatório, portanto, processo de morte preferível à necrose, por exemplo, que por resultar em extravasamento celular ocorre com processo inflamatório.¹⁷⁹

Dentre os ensaios anteriores, os resultados obtidos na morfologia celular são geralmente associados a morte celular por apoptose, e buscando avaliar possibilidade de fragmentação de DNA, que se associa ao processo apoptótico, foi realizado ensaio de ciclo celular. Este ensaio também traz informações relativas à possibilidade dos compostos analisados interferirem em alguma fase do ciclo celular, promovendo parada desse e causando a morte celular.

Além disso, empregou-se análise de apoptose utilizando marcação com kit Anexina-V conjugado a PE e 7-aminoactinomicina D (7AAD), que permite avaliar se a apoptose ocorre como morte celular, após determinado tempo de tratamento com os compostos. Os resultados dessas análises serão expostos a seguir.

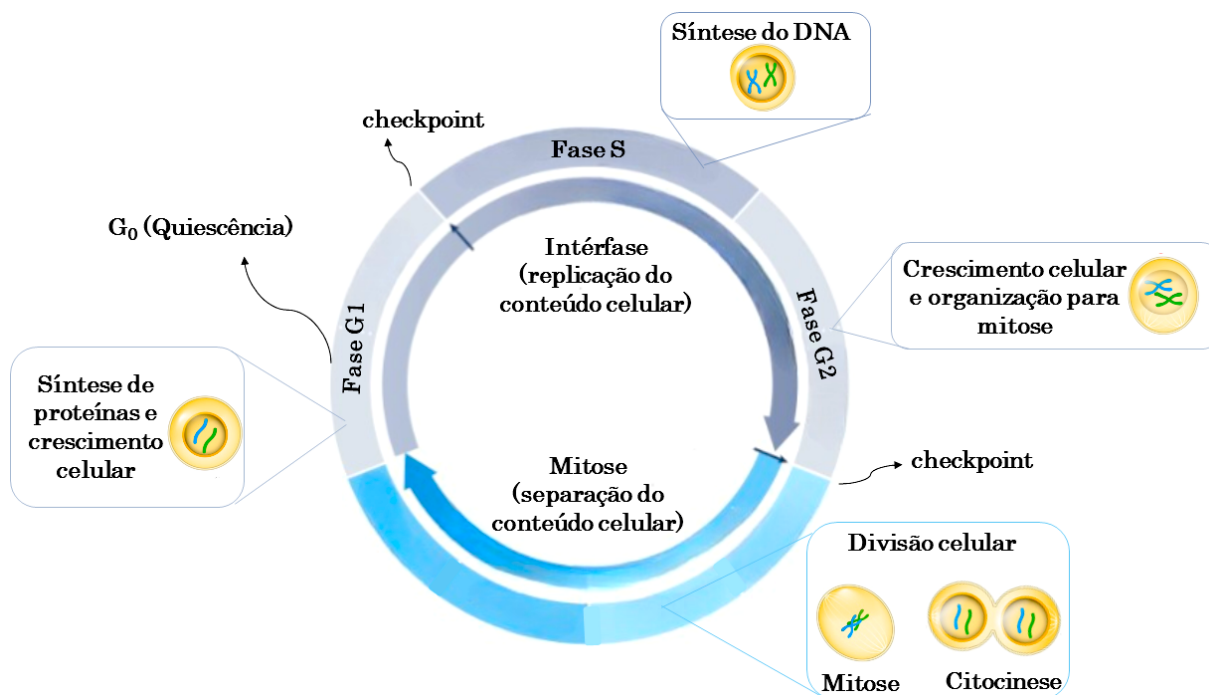
4.3.4.4.1- Ciclo Celular

O ciclo celular mitótico pode ser dividido em duas fases principais: intérfase e mitose, que se subdividem em quatro fases contínuas, que constituem um processo cíclico, pois ao fim da última fase, o processo é reiniciado. A intérfase se divide em fases G1, S e G2, enquanto a mitose trata da fase M, englobando dois processos que seriam a mitose (anáfase, telófase e prófase) e citocinese. Além de existirem dentro do ciclo celular, as células podem permanecer em um estado quiescente, denominado como fase G0.

A fase G1, é aquela onde há preparo para replicação do DNA; a fase S, em que há síntese do DNA e duplicação de todo o genoma; na fase G2, há organização do conteúdo celular em preparo para a mitose; e a fase M, trata da mitose propriamente dita. Dentre os dois processos principais que constituem a fase mitótica, na mitose há duplicação de fato do genoma, e na citocinese, o citoplasma se divide para composição das novas células.

Para pleno funcionamento desse ciclo, e garantia de que as células filhas terão genoma idêntico, há pontos de verificação (checkpoints), ao término de uma fase e início da próxima, e caso alguma anomalia seja identificada o processo cíclico é interrompido para reparo de danos. Caso a maquinaria celular consiga ser eficaz neste processo, é dada continuidade ao ciclo, caso contrário, a célula entra em processo apoptótico de morte. Esse processo cíclico é representado na Figura 4.36, sendo válido ressaltar que várias versões representativas desse processo podem ser observadas na literatura.^{180,181}

FIGURA 4.36-Representação esquemática do ciclo celular mitótico.



Fonte: Adaptado de Matthews, Helen K. *et al.* 2022¹⁸¹ A representação não pretendeu elucidar fidedignamente os tempos envolvidos em cada fase do ciclo.

Considerando esses aspectos, muitos agentes antitumorais têm sido investigados quanto à sua influência no ciclo celular, seja nas fases do ciclo propriamente ditas e/ou nos pontos de checagem, que resulta em efeitos citotóxicos e/ou citostáticos. Dessa forma, foi realizada análise do ciclo celular de células provenientes da linhagem A2780cis, após tratamento com os complexos A6 e A7 da Série 1 e linhagens MDA-MB-231 e A2780cis, e com o composto A9, da Série 2.

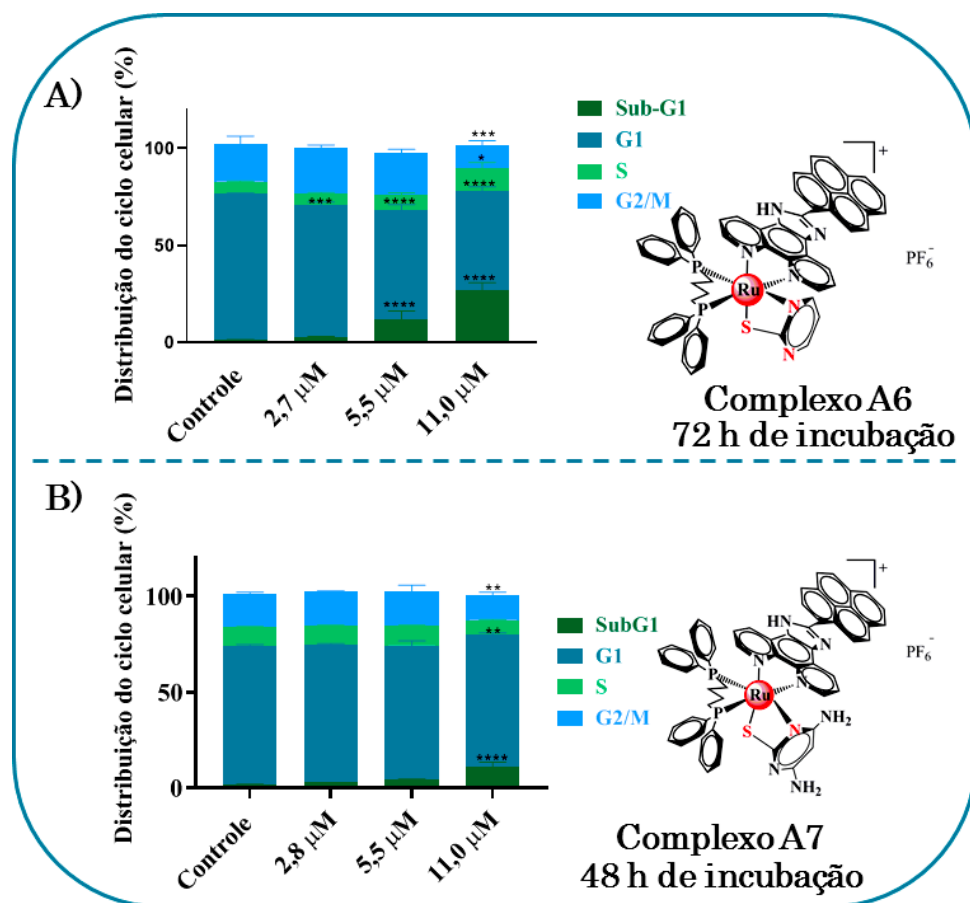
O experimento foi realizado empregando citometria de fluxo, devido ao uso de marcador fluorescente de DNA, mais especificamente iodeto de propídio. A fluorescência resultante possui intensidade diretamente proporcional à quantidade de DNA, e as células em cada fase do ciclo podem ser identificadas pelo conteúdo de DNA, uma vez que esse conteúdo tem aumento gradativo da fase G1 para G2/M. Além disso, se os compostos são capazes de fragmentar o DNA, a fluorescência associada seria de baixa intensidade, indicativo de células apoptóticas.

Os gráficos das Figuras 4.37 e 4.38, foram obtidos a partir do tratamento estatístico dos dados gerados no citômetro, a fim de avaliar como se deu a distribuição celular no ciclo após tratamento com os compostos mencionados, comparativamente ao controle negativo. Os resultados para todos os complexos, independentemente da linhagem analisada, mostram um aumento de células com padrão anormal de conteúdo de DNA, diferente do esperado para as fases do ciclo celular mencionadas, já que as células em G1 são diploides e a partir daí há aumento gradativo do conteúdo de DNA. Essas células ditas em fase sub-G1, podem ser classificadas como células mortas ou que possuem DNA fragmentado, justificando a apresentação de conteúdo menor de DNA, e como o processo de morte por apoptose leva à fragmentação do DNA, este resultado é um indicativo da ocorrência desse processo.

Além disso, é possível observar que os compostos influenciam a progressão do ciclo celular, pois comparando-se ao controle negativo, a distribuição celular entre as fases varia significativamente. Na linhagem A2780cis, o complexo **A6** apresenta a seguinte distribuição celular no controle negativo: sub-G1, 1,25%; G1: 73,50%; S: 5,96%; e G2/M: 19,68%, após tratamento com 5,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$: sub-G1, 11,93%; G1: 58,93%; S: 7,69%; e G2/M: 21,95%, e após tratamento com 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$: sub-G1, 27,07%; G1: 51,07%; S: 11,59%; e G2/M: 11,87%, considerando 72 h de incubação com o complexo. A maior variação ocorre com relação à fase sub-G1, como já mencionado, mas as fases S e G2/M também são afetadas. Mesmo padrão foi obtido com relação ao complexo **A7**, com menor variação com relação ao complexo **A6**, mas com distribuição celular variando com relação ao controle negativo, de forma mais expressiva na fase sub-G1, com alguma interferência nas fases S e G2/M, mas pouca interferência na fase G1.

Essa distinção na população de células em cada fase, em relação ao controle, pode ser devido ao aumento de células em fase sub-G1, ou ainda perturbação do ciclo celular provocada pelos compostos.

FIGURA 4.37-Distribuição do ciclo celular de células A2780cis após tratamento por 72 h com o complexo **A6** (A), nas concentrações de 2,7; 5,5 e 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e após 48 h de tratamento com complexo **A7** (B), nas concentrações de 2,8; 5,5 e 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



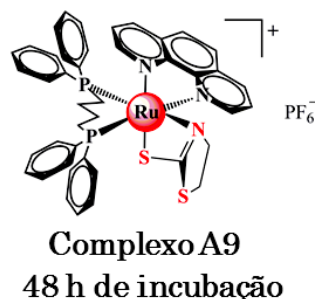
Fonte: Dados da pesquisa. Os dados foram gerados a partir da média de triplicatas individuais ($\pm\text{DP}$), após tratamento *one-way*, e análise post-hoc Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$.

O complexo **A9** tanto na linhagem A2780cis quanto MDA-MB-231, provocou diferença na distribuição celular em todas as fases do ciclo comparativamente ao controle negativo, de forma mais expressiva na fase sub-G1, e entre as duas linhagens mais evidente na A2780cis. Na linhagem MDA-MB-231, a distribuição celular se deu da seguinte forma: Controle negativo, sub-G1: 3,78%; G1: 64,66%; S: 11,89%; e G2/M: 20,96%, após tratamento com 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sub-G1: 4,30%; G1: 73,23%; S: 7,08%; e G2/M: 15,80%, após tratamento com 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sub-G1: 7,06%; G1: 68,19%; S: 9,29%; e G2/M:

16,27%, considerando 48 h de incubação com o complexo, e todas as fases do ciclo são afetadas, com padrão de aumento relacionada à fase sub-G1. Na linhagem A2780cis, a distribuição celular na ausência e presença do complexo teve a seguinte configuração: Controle negativo, sub-G1: 4,64%; G1: 60,36%; S: 12,52%; e G2/M: 22,01%, após tratamento com 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sub-G1: 11,33%; G1: 57,97%; S: 11,09%; e G2/M: 20,70%, após tratamento com 0,28 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sub-G1: 39,19%; G1: 48,33%; S: 6,17%; e G2/M: 6,34%, após 48 h de incubação com o complexo, indicando grande aumento na fase sub-G1, de acordo com aumento da concentração e alteração nas outras fases do ciclo, predominantemente nas fases S e G2/M.

A mesma justificativa utilizada anteriormente com os complexos da Série 1, pode ser também empregada neste caso. A interferência na progressão do ciclo celular pode se dar tanto devido às células detectadas com DNA fragmentado e que então ‘saem’ do ciclo, ou à uma interferência de fato nesse processo cíclico.

1.



4.3.4.4.2- Ensaio de apoptose

158

ser explorados a fim de identificar o processo apoptótico, como o experimento utilizado no presente trabalho, marcação com Anexina V e determinação por citometria de fluxo.

Esse ensaio se baseia no fato de que durante o processo apoptótico, quando há a formação dos corpos apoptóticos, para que estes não causem danos ao organismo, há sinalização para que sejam fagocitados. Essa sinalização ocorre por meio da externalização de fosfatidilserina, que é onde a anexina se liga, e devido a ser utilizada em conjugação a uma molécula fluorescente, pode ser detectada por citometria de fluxo. No presente trabalho essa conjugação se deu com a picroeritrina (PE).

Além da marcação com anexina, empregou-se também o marcador 7AAD, que se liga à bases do DNA e por isso associa-se sua marcação positiva a processo de apoptose tardia e necrose, pois na apoptose tardia apesar de já ocorrer alteração no núcleo há ainda sinalização por externalização de fosfatidilserina, e na necrose a permeabilização se torna facilitada, devido a perda de integridade da membrana plasmática.

O resultado obtido por citometria de fluxo, resultou em marcação de quatro quadrantes, cada um representando um tipo de população, classificadas da seguinte forma:

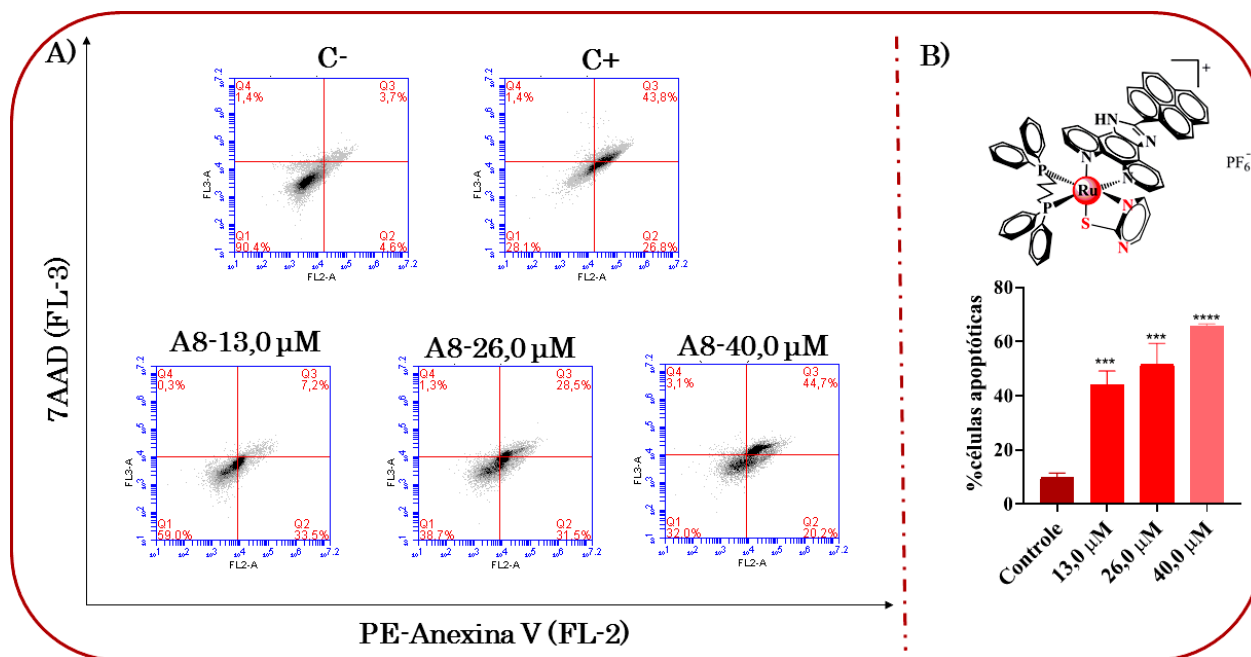
- ❖ Quadrante inferior esquerdo (Q1): Marcação Anexina (-) e 7AAD (-), representando a população de células viáveis;
- ❖ Quadrante inferior direito (Q2): Marcação Anexina (+) e 7AAD (-), classificada como população de células em apoptose inicial;
- ❖ Quadrante superior direito (Q3): Marcação Anexina (+) e 7AAD (+), equivalente a população de células em apoptose tardia;
- ❖ Quadrante superior esquerdo (Q4): Marcação Anexina (-) e 7AAD (+), representação a população celular em necrose.

O experimento foi conduzido com os mesmos compostos utilizados no ensaio de ciclo celular, em concentrações distintas. Conforme mencionado no

experimento morfológico, em determinadas concentrações as células assumiram formato circular indicando processo apoptótico. Dessa forma, para o complexo **A6** na linhagem A2780*cis*, por exemplo, este resultado pode ser observado de forma expressiva a partir do tratamento com $11 \mu\text{mol L}^{-1}$ (48 h), e ao comparar-se concentração similar no ensaio de apoptose, para o qual foi utilizado 48 h como tempo de incubação com o composto, observa-se grande proporção das células em apoptose (considerando-se a soma entre apoptose inicial e tardia).

Na Figura 4.39, expõe-se o resultado na forma dos quadrantes relatados, bem como a porcentagem de células apoptóticas no controle e para as diferentes concentrações do complexo **A6**. Observa-se ainda que há um aumento na porcentagem de células em apoptose com aumento da concentração, e todas possuem significativamente mais células em apoptose com relação ao controle. O controle positivo utilizado, apresentou grande percentual de células em apoptose, conforme esperado, já que reconhecidamente provoca morte celular por este mecanismo. O complexo **A7** apresentou resultado similar, em menores concentrações, e está apresentado no Apêndice-Parte IV.

FIGURA 4.39-Determinação de células em apoptose da linhagem A2780cis após tratamento com o complexo **A6** (Série 1). A) Dot plots PE-Anexina vs. 7AAD, onde C- é referente ao tratamento com 0,5% de DMSO e C+ ao tratamento com camptotecina (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); B) Representação da estrutura do complexo **A6** e gráfico referente à taxa de células apoptóticas.



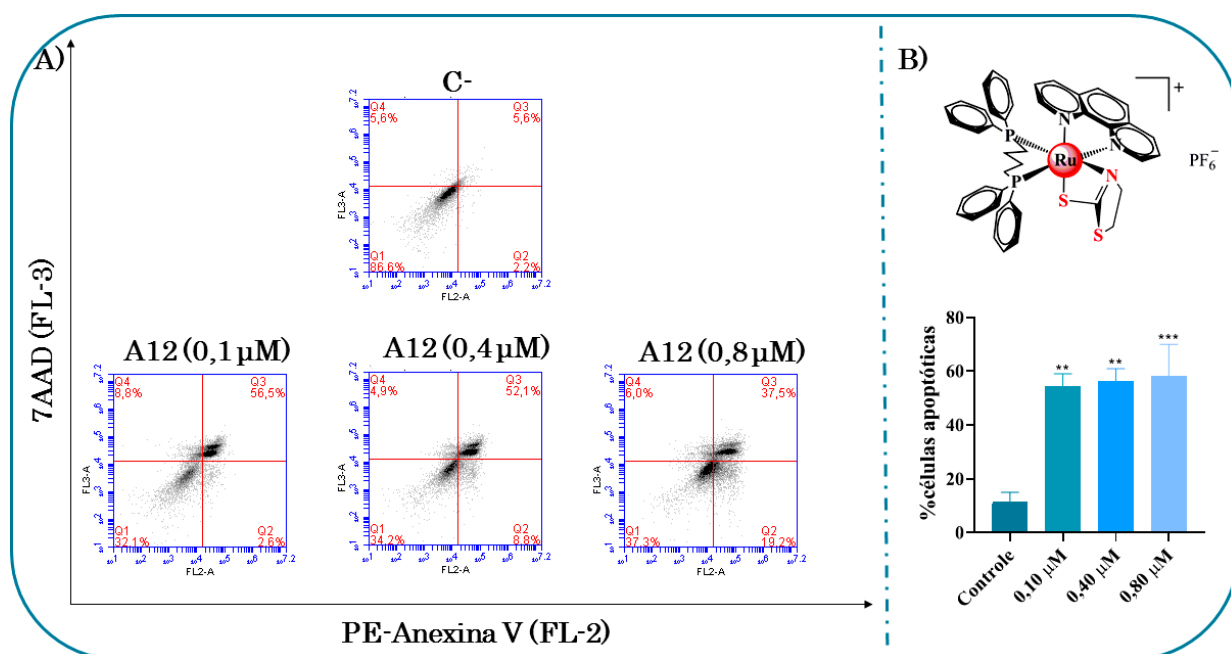
Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens são referentes a uma das triplicatas e os dados representam a média entre três triplicatas independentes ($\pm\text{DP}$). Resultados foram comparados utilizando *one-way*, e análise post-hoc de Dunnet. *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$ versus controle negativo.

Com relação ao complexo **A9**, que foi avaliado nas linhagens MDA-MB-231 e A2780cis, em ambas as linhagens apresentou maior porcentagem de células apoptóticas com relação ao controle, entretanto, esse resultado é mais evidente na linhagem MDA-MB-231, conforme Figura 4.40. Na primeira concentração, relativa ao IC_{50} do composto nessa linhagem, a proporção de células apoptóticas com relação ao controle já é alta, e apesar de haver aumento nessa taxa com aumento da concentração, não é significativo com relação à concentração de 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

No caso da linhagem A2780cis, a concentração de 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não causou alteração significativa com relação ao controle, mas este cenário muda

completamente nas maiores concentrações, exibindo alta porcentagem de células apoptóticas, que pode ser observada em maior nível que aquele analisado para a MDA-MB-231, devido às maiores concentrações utilizadas na linhagem A2780cis (vide Figura 4.41).

FIGURA 4.40-Determinação de células em apoptose da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com o complexo A9 (Série 2). A) Dot plots PE-Anexina vs. 7AAD, onde C- é referente ao tratamento com 0,5% de DMSO e C+ ao tratamento com camptotecina ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$); B) Representação da estrutura do complexo e gráfico referente à taxa de células apoptóticas.

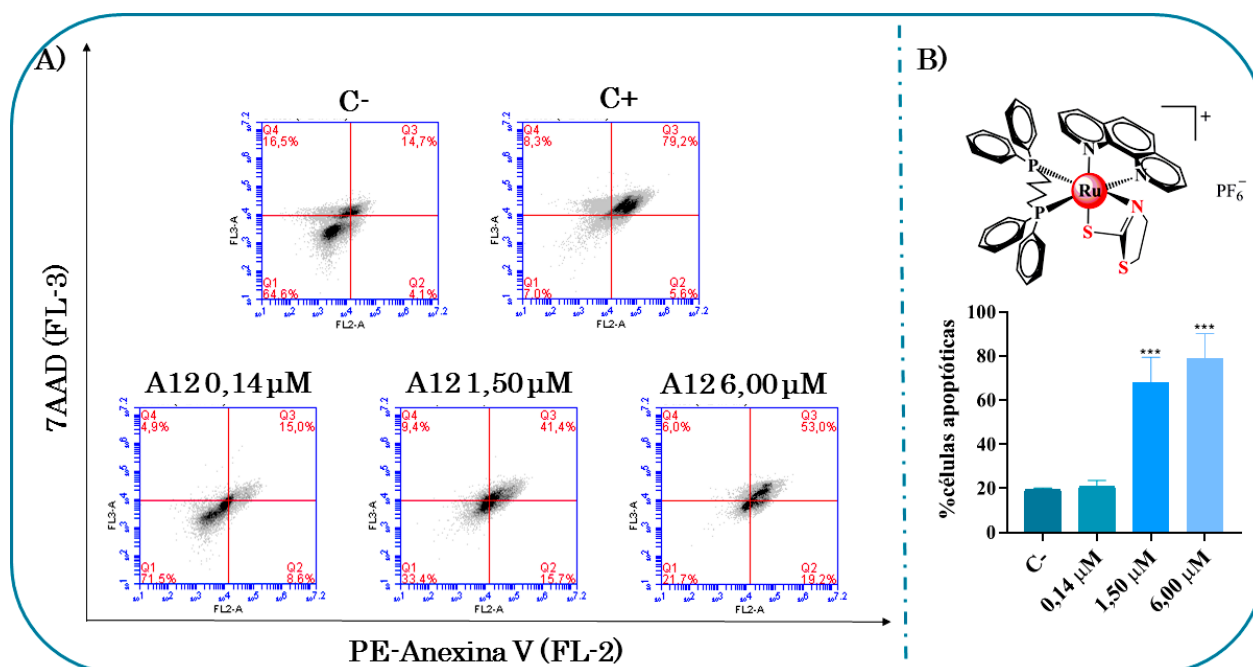


Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens são referentes a uma das triplicatas e os dados representam a média entre três triplicatas independentes ($\pm$ DP). Resultados foram comparados utilizando *one-way*, e análise post-hoc de Dunnet. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ versus controle negativo.

Estes resultados corroboram indícios de experimentos anteriores: arredondamento celular (morfológico), alteração no filamento de F-actina, consequentemente afetando o citoesqueleto, que pode contribuir para que a célula entre em apoptose, uma vez que se encontra relacionado à organização morfológica necessária ao processo apoptótico (marcação com faloidina)^{182,183}, e

DNA fragmentado (ciclo celular), que indicaram processo apoptótico como via de morte celular induzida para os compostos em análise. Apesar de ser observada alguma porcentagem de morte por necrose, essa também é observada nos controles com pouca alteração para as células tratadas com os compostos.

FIGURA 4.41-Determinação de células em apoptose da linhagem A2780cis após tratamento com o complexo **A9** (Série 2). A) Dot plots PE-Anexina vs. 7AAD, onde C- é referente ao tratamento com 0,5% de DMSO e C+ ao tratamento com camptotecina (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); B) Representação da estrutura do complexo **A9** e gráfico referente à taxa de células apoptóticas.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens são referentes a uma das triplicatas e os dados representam a média entre três triplicatas independentes ($\pm\text{DP}$). Resultados foram comparados utilizando *one-way*, e análise post-hoc de Dunnet. *** $p < 0,001$ versus controle negativo.

5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho relatou-se a síntese de 11 novos complexos fosfinicos de rutênio(II), incluindo o composto precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{pyphen})]$, e os compostos contendo ligantes mercaptos subdivididos em duas séries, de fórmulas gerais, $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{pyphen})]\text{X}$ e $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$, correspondentes às Série 1 (A1-A3; A4-A7) e Série 2 (A8-A10), respectivamente. O precursor da Série 1 é similar a compostos da literatura do grupo LERCI, entretanto, a espectroscopia por ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ permitiu a hipótese que este composto apresente atropoisomeria (quiralidade devido a um eixo de ligação), que não é evidenciada no ligante pyphen livre e nos compostos (com ligantes mercaptos coordenados, Série 1).

As estruturas cristalinas dos compostos adquiridas por difração de raios X, mostraram a coordenação bidentada de todos os ligantes, onde também pode-se observar a influência do ligante pyphen, que devido a existência de anel imidazólico na estrutura do mesmo, pode culminar em interações de hidrogênio envolvendo o átomo de hidrogênio imidazólico. Os complexos de ambas as séries apresentaram interações $\pi\cdots\pi$ stacking, como já reportado em compostos de estruturas correlatas, que têm efeitos em suas respectivas caracterizações, como na ressonância magnética nuclear, devido a efeitos anisotrópicos.

Estruturalmente, a alteração do ligante phen para o pyphen, não influenciou em mudanças drásticas nos complexos finais, apenas na espécie precursora, obtendo-se apenas evidências da existência do ligante pyphen nas estruturas, como por exemplo, estiramento da ligação NH no espectro de absorção na região do infravermelho e deslocamento referente ao hidrogênio dessa ligação no RMN ^1H . No composto precursor CPP, a coordenação do ligante pyphen provocou alterações no RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, comparando-se ao precursor da Série 2, resultando na hipótese de isômeros conformacionais ou atropoisômeros.

Com relação ao potencial citotóxico, cenário oposto foi observado, onde o ligante pyphen nas estruturas dos complexos da Série 1, influenciou de forma a obter-se menor citotoxicidade com relação aos complexos da Série 2, em

que comparativamente, é a única modificação que pode justificar esse diferencial. Apesar disso, esta modificação estrutural não provocou alterações significativas na lipofilicidade, que justifique a maior ou menor internalização dos compostos de uma série com relação a outra, na membrana plasmática.

Os complexos da Série 1 apresentaram alguma seletividade com relação a linhagens tumorais de ovário, enquanto os complexos da Série 2, exibiram atividade citotóxica significativa, ao comparar-se com os resultados obtidos para a espécie precursora, ligantes livres e padrão cisplatina. Esta atividade citotóxica foi similar entre os compostos, em todas as linhagens avaliadas, especialmente com relação às linhagens MDA-MB-231 e A2780*cis*, diferindo-os de compostos fosfínicos de rutênio(II)/mercaptos relatados pelo LERCI, que apresentam citotoxicidade e/ou índice de seletividade mais significativos em linhagem tumoral de pulmão.

Além disso, os diferentes ligantes mercaptos utilizados, apesar de coordenarem-se pelos mesmos átomos (nitrogênio e enxofre), apresentam átomos não coordenados distintos, entretanto, em geral esse aspecto não influenciou na atividade citotóxica dos complexos de ambas as Séries. Como exceção a essa observação, cita-se o complexo **A7**, que apresentou a maior citotoxicidade dentre os complexos da Série 1, nas linhagens tumorais de ovário, onde a justificativa possível são os substituintes do ligante mercapto 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp).

Diante destes resultados foi avaliado a possibilidade de interação dos complexos em estudo com diferentes biomoléculas, que pudesse viabilizar uma racionalização quanto ao mecanismo de ação, avaliando-se mais especificamente DNA, Topoisomerase II α e HSA. Os resultados indicaram que a interação de todos os compostos com o DNA ocorre de forma reversível e fraca, majoritariamente interagindo pelos sulcos menores, tornando factível a conclusão de que o DNA não seja o alvo biológico principal a determinar a citotoxicidade dos complexos.

A determinação da inibição da atividade catalítica da enzima topoisomerase II α pelos compostos, resultou em alguma inibição pelos compostos da Série 2, e nenhuma inibição relacionada aos complexos da Série 1. Maiores investigações nesse sentido podem contribuir para explicar o potencial citotóxico distinto, para estes compostos estruturalmente diferentes. Quanto à interação com a proteína albumina de soro humano, que pode contribuir com informações relacionadas à farmacocinética destes compostos, resultou em ligação dos compostos em grau de fraco a moderado, com o nível moderado indicando que a proteína pode estar associada ao carreamento destes compostos, e além disso, a interação pelo sítio Sudlow I da proteína é favorecida.

Considerando os resultados de citotoxicidade, procedeu-se outros estudos biológicos. Os complexos **A6** e **A7** provocaram alterações morfológicas na linhagem A2780*cis*, bem como o complexo **A9** nessa mesma linhagem e linhagem MDA-MB-231, que são indicativos de morte celular e podem ser associadas à morte por apoptose. Estes mesmos compostos apresentaram efeitos citostáticos e citotóxicos, de forma dose-dependente, em que os primeiros foram primariamente evidenciados.

Os compostos mostraram capacidade de interferir em estruturas necessárias à cascata metastática, mais especificamente, afetando a migração celular, propriamente dita, e estruturas que se associam à migração (citoesqueleto) e a outros processos, como adesão e invasão celular.

O ensaio de ciclo celular evidenciou DNA fragmentado após tratamento com os compostos, afetando a progressão do ciclo celular, seja por afetar diretamente alguma fase do ciclo (impedindo funcionamento normal) ou ainda devido às células que “saíram” desse processo cíclico. Esse resultado relaciona-se a morte por apoptose, já que é uma das características deste mecanismo de morte. A morte celular por apoptose foi então determinada como mecanismo de morte celular causada pelos compostos, considerando apoptose inicial e tardia, em detrimento da morte provocada por necrose.

Por fim, menciona-se que os compostos aqui estudados proporcionaram uma análise quanto ao diferencial estrutural, possível interação com determinados alvos biológicos, potencial citotóxico envolvendo efeitos citostáticos e mecanismo de morte celular. Todos os resultados apresentados se somam ao acervo que vem sendo desenvolvido pelo LERCI, e traz características comparáveis a outros compostos já estudados, mas simultaneamente, diferenças pontuais que podem ser ainda exploradas.

Nesse sentido, e analisando as possibilidades a partir dos resultados gerados, propõe-se as seguintes perspectivas futuras a este trabalho:

- (I) Devido ao caráter seletivo dos compostos da Série 1, com relação às linhagens tumorais de ovário, propõe-se estudo por Western Blotting relacionado a proteínas que possam ser expressas em maior grau nestas linhagens em detrimento das demais;
- (II) Apesar do menor potencial citotóxico dos complexos da Série 1, comparado aos compostos da Série 2 e outros relatados no grupo LERCI, pode ser realizada investigação acerca desse potencial sob irradiação em determinado comprimento de onda, indo de encontro a resultados de complexos que contêm o ligante pyphen na esfera de coordenação; e
- (III) Explorar a inibição da atividade de enzimas topoisomerasas, nos complexos da Série 2, que exibiram resposta mais similar a compostos fosfínicos de rutênio(II)/mercapto, e podem trazer uma outra perspectiva que fundamente o diferencial citotóxico dos complexos da Série 1.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **2022**, 72 (1), 7–33.
- (2) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, 71 (3), 209–249.
- (3) Observatory, G. C. <https://gco.iarc.fr/>.
- (4) INCA. Causas e Prevenção. O que causa o câncer ? <https://www.inca.gov.br/en/node/640>.
- (5) Silva, I. N. de C. J. A. G. da. Estimativa 2020: Incidência de Câncer No Brasil. Rio de Janeiro 2019, p 120.
- (6) Debela, D. T.; Muzazu, S. G. Y.; Heraro, K. D.; Ndalama, M. T.; Mesele, B. W.; Haile, D. C.; Kitui, S. K.; Manyazewal, T. New Approaches and Procedures for Cancer Treatment : Current Perspectives. **2021**.
- (7) Zugazagoitia, J.; Guedes, C.; Ponce, S.; Ferrer, I.; Molina-pinelo, S.; Pazares, L. Current Challenges in Cancer Treatment. **2016**, 38 (7), 1551–1566.
- (8) Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* **2017**, 8 (16), 3131–3141.
- (9) Al-thoubaity, F. K. Molecular Classification of Breast Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Ann. Med. Surg.* **2020**, 49 (October 2019), 44–48.
- (10) Kathryn, J. C.; Sireesha V, G.; Stanley, L. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* **2012**, 32, 35–48.
- (11) Huang, M.; Lu, J. J.; Ding, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat. Products Bioprospect.* **2021**, 11 (1), 5–13.
- (12) Cragg, G. M.; Pezzuto, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Med. Princ. Pract.* **2016**, 25 (2), 41–59.
- (13) Anthony, E. J.; Bolitho, E. M.; Bridgewater, H. E.; Carter, O. W. L.; Donnelly, J. M.; Imberti, C.; Lant, E. C.; Lermyte, F.; Needham, R. J.; Palau, M.; Sadler, P. J.; Shi, H.; Wang, F. X.; Zhang, W. Y.; Zhang, Z. Metallodrugs Are Unique: Opportunities and Challenges of Discovery and Development. *Chem. Sci.* **2020**, 11 (48), 12888–12917.
- (14) Sharma, R.; Singh, V. J.; Chawla, P. A. Advancements in the Use of Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2021**, 22 (5), 821–835.
- (15) Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. *Dalt. Trans.* **2010**, 39 (35), 8113–8127.
- (16) Tanaka, K.; Kunimatzu, T.; Shimakura, J.; Hanada, M. Development of Miriplatin , a Novel Antitumor Platinum for Hepatocellular Carcinoma. *Sumitomo Kagaku* **2011**, 1–12.

- (17) Ma, D. L.; Wu, C.; Cheng, S. S.; Lee, F. W.; Han, Q. Bin; Leung, C. H. Development of Natural Product-Conjugated Metal Complexes as Cancer Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (2).
- (18) Azzouzi, A. R.; Barret, E.; Moore, C. M.; Villers, A.; Allen, C.; Scherz, A.; Muir, G.; De Wildt, M.; Barber, N. J.; Lebdaï, S.; Emberton, M. TOOKAD® Soluble Vascular-Targeted Photodynamic (VTP) Therapy: Determination of Optimal Treatment Conditions and Assessment of Effects in Patients with Localised Prostate Cancer. *BJU Int.* **2013**, *112* (6), 766–774.
- (19) Kalayda, G. V; Wagner, C. H.; Buß, I.; Reedijk, J.; Jaehde, U. Altered Localisation of the Copper Efflux Transporters ATP7A and ATP7B Associated with Cisplatin Resistance in Human Ovarian Carcinoma Cells. *BMC Cancer* **2008**, *12*, 1–12.
- (20) Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M. E. Metal Complexes in Cancer Therapy – an Update from Drug Design Perspective. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, 599–616.
- (21) Nayeem, N.; Contel, M. Exploring the Potential of Metallodrugs as Chemotherapeutics for Triple Negative Breast Cancer. *Chem. Eur. J.* **2021**, 8891–8917.
- (22) Alessio, E.; Messori, L. Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules* **2019**, *24*, 1–20.
- (23) Alessio, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds : A Personal. **2017**, *55*, 1549–1560.
- (24) 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.
- (25) Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Crans, D. C.; Barreiro, E. J. Ru (II) Compounds : Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics ? *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (II), 5805–5821.
- (26) Sava, G.; Alessio, E.; Bergamo, A.; Mestroni, G. Sulfoxide Ruthenium Complexes : Non-Toxic Tools for the Selective Treatment of Solid Tumour Metastases. In *Metallopharmaceuticals I. Topics in Biological Inorganic Chemistry*; 1999; pp 143–169.
- (27) Keppler, B. K.; Henn, M.; Juhl, U. M.; Berger, M. R.; Niebl, R.; Wagner, F. E. New Ruthenium Complexes for the Treatment of Cancer. In *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*; 1989; Vol. 10, pp 41–69.
- (28) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, the First Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (8), 2925–2932.
- (29) Murray, B. S.; Babak, M. V; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. The

- Development of RAPTA Compounds for the Treatment of Tumors. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 86–114.
- (30) Rausch, M.; Dyson, P. J.; Nowak-Sliwinska, P. Recent Considerations in the Application of RAPTA-C for Cancer Treatment and Perspectives for Its Combination with Immunotherapies. *Adv. Ther.* **2019**, *2* (9), 1–12.
- (31) Monro, S.; Colón, K. L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R. P.; Lilge, L.; Cameron, C. G.; McFarland, S. A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 797–828.
- (32) Batista, A. A.; Cordeiro, L. A. C.; Oliva, G. Electrochemical Formation and X-Ray Structure of the Five-Coordinated Ruthenium(II) [RuCl(Dppp)₂](PF₆) Complex. *Inorganica Chim. Acta* **1993**, *203*, 185–191.
- (33) Poelhsitz, G. Von; Bogado, A. L.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Selistre-de-arau, H. S. Synthesis, Characterization, X-Ray Structure and Preliminary in Vitro Antitumor Activity of the Nitrosyl Complex. *Polyhedron* **2007**, *26*, 4707–4712.
- (34) Lima, B. A. V. Avaliação Das Atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfínicos de Rutênio (Células Tumerais MDA-MB-231), São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 207 f.
- (35) Ribeiro, G. H. Avaliação da atividade citotóxica de novos complexos de Ru(II) com ligantes mercaptos ou aciltioureias. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2020. Tese de Doutorado, 302 p.
- (36) Francisco, T. dos S. Complexos Fosfínicos de Rutênio: Síntese, Caracterização, Imobilização e Atividade Catalítica. Fortaleza, Programa de Pós Graduação em Química-UFC, 2015. Tese de Doutorado, 146 p.
- (37) Bosque, R.; Sales, J. A QSPR Study of the ³¹P NMR Chemical Shifts of Phosphines. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *20*, 225–232.
- (38) Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*, 6^a.; John Wiley and Sons, I., Ed.; New Jersey, 2014.
- (39) Deo, K. M.; Jennette, S.; Aldrich, J. R.; Gilbert, J.; Zhang, Y. Synthesis, Characterisation and Influence of Lipophilicity on Cellular Accumulation and Cytotoxicity of Unconventional Platinum(IV) Prodrugs as Potent Anticancer Agents. *Dalt. Trans.* **2019**, *48*, 17228–17240.
- (40) Paruch, K.; Biernasiuk, A.; Berecka-Rycerz, A.; Hordyjewska, A.; Popiolek, L. Biological Activity, Lipophilicity and Cytotoxicity of Novel 3-Acetyl-2,5-Disubstituted-1,3,4-Oxadiazolines. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 1–16.
- (41) Ribeiro, G. H.; Batista, A. A.; 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. 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.
- (42) Guedes, A. P. M.; Mello-Andrade, F.; Pires, W. C.; De Sousa, M. A. M.; Da Silva, P. F. F.; De Camargo, M. S.; Gemeiner, H.; Amauri, M. A.; Gomes Cardoso, C.; De Melo Reis, P. R.; Silveira-Lacerda, E. D. P.; Batista, A. A. Heterobimetallic Ru(II)/Fe(II) Complexes as Potent Anticancer Agents against Breast Cancer Cells, Inducing Apoptosis through Multiple Targets. *Metallomics* **2020**, *12* (4), 547–561.
- (43) Buß, I.; Garmann, D.; Galanski, M.; Weber, G.; Kalayda, G. V.; Keppler, B. K.; Jaehde, U. Enhancing Lipophilicity as a Strategy to Overcome Resistance against Platinum Complexes? *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (5), 709–717.
- (44) 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 (May).
- (45) De Oliveira, K. M. Avaliação Das Propriedades Antitumorais de Complexos de Rutênio (II) Contendo os Ligantes Lapachol ou Lausona, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2018. Tese de Doutorado, 158 p.
- (46) Hachey, A. C.; Havrylyuk, D.; Glazer, E. C. Biological Activities of Polypyridyl-Type Ligands: Implications for Bioinorganic Chemistry and Light-Activated Metal Complexes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *61*, 191–202.
- (47) Litke, S. V.; Ershov, A. Y.; Meyer, T. J. Deactivation Pathways for Metal-to-Ligand Charge-Transfer Excited States of Ruthenium Polypyridyl Complexes with Triphenylphosphine as a Ligand. **2011**, 14235–14242.
- (48) 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. *Dalt. Trans.* **2022**, *51* (4), 1489–1501.
- (49) 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.
- (50) Correa, R. S.; Bezerra, D. P.; Bomfim, L. M.; Moreira, D. R. M.; Soares, M. B. P.; Ellena, D. J.; Batista, A. A. Ru(II)-Thymine Complexes: New Metallodrug Candidates against Tumor Cells. *New J. Chem.* **2018**, 6794–6802.
- (51) Da Silva, M. M.; De Camargo, M. S.; Correa, R. S.; Castelli, S.; De

- Grandis, R. A.; Takarada, J. E.; Varanda, E. A.; Castellano, E. E.; Deflon, V. M.; Cominetti, M. R.; Desideri, A.; Batista, A. A. Non-Mutagenic Ru(II) Complexes: Cytotoxicity, Topoisomerase IB Inhibition, DNA and HSA Binding. *Dalt. Trans.* **2019**, 48 (39), 14885–14897.
- (52) 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 (October 2020).
- (53) Velozo-Sá, V. S.; Pereira, L. R.; Lima, A. P.; Mello-Andrade, F.; Rezende, M. R. M.; Goveia, R. M.; Pires, W. C.; Silva, M. M.; Oliveira, K. M.; Ferreira, A. G.; Ellena, J.; Deflon, V. M.; Grisolia, C. K.; Batista, A. A.; Silveira-Lacerda, E. P. In Vitro Cytotoxicity and in Vivo Zebrafish Toxicity Evaluation of Ru(II)/2-Mercaptopyrimidine Complexes. *Dalt. Trans.* **2019**, 48 (18), 6026–6039.
- (54) Hnorato, J.; Oliveira, K. M.; Leite, C. M.; Colina-Vegas, L.; Nóbrega, J. A.; Castellano, E. E.; Ellena, J.; Correa, R. S.; Batista, A. A. “Half-Sandwich”/Ru Anticancer Complexes Containing Triphenylphosphine and p-Substituted Benzoic Acids. *J. Brazilian Chem. Soc.* **2020**, 31 (11), 2237–2249.
- (55) 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.
- (56) Abbehausen, C.; De Paiva, R. E. F.; Formiga, A. L. B.; Corbi, P. P. Studies of the Tautomeric Equilibrium of 1,3-Thiazolidine-2-Thione: Theoretical and Experimental Approaches. *Chem. Phys.* **2012**, 408, 62–68.
- (57) Alaghaz, A. N. M. A.; Zayed, M. E.; Alharbi, S. A. Synthesis, Spectral Characterization, Molecular Modeling, Biological Activity and Potentiometric Studies of 4-Amino-5-Mercapto-3-Methyl-S-Triazole Schiff’s Base Complexes. *J. Mol. Struct.* **2015**, 1083, 430–440.
- (58) Mullice, L. A.; Mottram, H. J.; Hallett, A. J.; Pope, S. J. A. Gold(I) Complexes Incorporating Emissive Mercapto-Pteridine Ligands: Syntheses, X-Ray Structure, Luminescence and Preliminary Cytotoxic Evaluation. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, No. 18, 3054–3060.
- (59) Cini, R.; Tamasi, G.; Defazio, S.; Corsini, M.; Zanello, P.; Messori, L.; Marcon, G.; Piccioli, F.; Orioli, P.; Moro, V. A.; Siena, I.; Lastruccia, V.; Fiorentino, I.-S. Study of Ruthenium (II) Complexes with Anticancer Drugs as Ligands . Design of Metal-Based Phototherapeutic Agents Search on the Cambridge Crystallographic Data Base CCDB. *Inorg. Chem.* **2003**, 42 (24), 8038–8052.
- (60) Camargo, M. S. de; Silva, M. M. da; Correa, R. S.; Vieira, S. D.; Castelli, S.; D’Anessa, I.; De Grandis, R.; Varanda, E.; Deflon, V. M.; Desideri, A.; Batista, A. A. Inhibition of Human DNA Topoisomerase IB by Nonmutagenic Ruthenium(II)-Based Compounds with Antitumoral

- Activity. *Metallomics* **2016**, 179–192.
- (61) 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>.
- (62) Berners-Price, S. J.; Sadler, P. J. Phosphines and Metal Phosphine Complexes: Relationship of Chemistry to Anticancer and Other Biological Activity. In *Bioinorganic Chemistry, Structure Bonding*; Springer, Berlin, H., Ed.; 1988; Vol. 70, pp 103–185.
- (63) Da Silva, M. M.; Ribeiro, G. H.; De Camargo, M. S.; Ferreira, A. G.; Ribeiro, L.; Barbosa, M. I. F.; Deflon, V. M.; Castelli, S.; Desideri, A.; Corrêa, R. S.; Ribeiro, A. B.; Nicolella, H. D.; Ozelin, S. D.; Tavares, D. C.; Batista, A. A. Ruthenium(II) Diphosphine Complexes with Mercapto Ligands That Inhibit Topoisomerase IB and Suppress Tumor Growth in Vivo. *Inorg. Chem.* **2021**, 60 (18), 14174–14189.
- (64) Roy, S.; Hagen, K. D.; Maheswari, P. U.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Reedijk, J.; Van Wezel, G. P. Phenanthroline Derivatives with Improved Selectivity as DNA-Targeting Anticancer or Antimicrobial Drugs. *ChemMedChem* **2008**, 3 (9), 1427–1434.
- (65) Silva-Caldeira, P. P.; Junior, A. C. A. de O.; Pereira-Maia, E. C. Photocytotoxic Activity of Ruthenium(II) Complexes with Phenanthroline-Hydrazone Ligands. *Molecules* **2021**, 26 (7), 2–13.
- (66) Bai, M. J.; Liu, N. Z.; Zhou, Y. L.; Liu, J.; Zou, J.; Tan, W. J.; Huang, X. T.; Mei, W. J. Synthesis of Fluorinated Imidazole[4,5f][1,10]Phenanthroline Derivatives as Potential Inhibitors of Liver Cancer Cell Proliferation by Inducing Apoptosis via DNA Damage. *ChemMedChem* **2022**, 17 (4), 4–9.
- (67) Matos, C. P.; Adiguzel, Z.; Yildizhan, Y.; Cevatemre, B.; Onder, T. B.; Cevik, O.; Nunes, P.; Ferreira, L. P.; Carvalho, M. D.; Campos, D. L.; Pavan, F. R.; Pessoa, J. C.; Garcia, M. H.; Tomaz, A. I.; Correia, I.; Acilan, C. May Iron(III) Complexes Containing Phenanthroline Derivatives as Ligands Be Prospective Anticancer Agents? *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 176, 492–512.
- (68) Musib, D.; Raza, M. K.; Kundu, S.; Roy, M. Modulating In Vitro Photodynamic Activities of Copper(II) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, 2018 (19), 2011–2018.
- (69) Reichardt, C.; Schneider, K. R. A.; Sainuddin, T.; Wächter, M.; McFarland, S. A.; Dietzek, B. Excited State Dynamics of a Photobiologically Active Ru(II) Dyad Are Altered in Biologically Relevant Environments. *J. Phys. Chem. A* **2017**, 121 (30), 5635–5644.
- (70) Devi, C. S.; Nagababu, P.; Natarajan, S.; Deepika, N.; Reddy, P. V.;

- Veerababu, N.; Singh, S. S.; Satyanarayana, S. European Journal of Medicinal Chemistry Cellular Uptake , Cytotoxicity , Apoptosis and DNA-Binding Investigations of Ru (II) Complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 72, 160–169.
- (71) Stephenson, T. A.; Wilkinson, G. New Complexes of Ruthenium(II) and (III) with Triphenylphosphine, Triphenylarsine, Trichlorostannate, Pyridine and Others Ligands. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1966**, 28 (iii).
- (72) Jung, C. W.; Garrou, P. E.; Hoffman, P. R.; Caulton, K. G. Reexamination of the Reactions of $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{NPh}_2$ ($n = 1-4$) with $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$. *Inorg. Chem.* **1984**, 23 (6), 726–729.
- (73) Bressan, M.; Rigo, P. Five-Coordinate Complexes of Ruthenium(II) with Di(Tertiary Phosphines). *Inorg. Chem.* **1975**, 14 (9), 1–3.
- (74) Queiroz, S. L.; Batista, A. A.; Oliva, G.; Gambardella, M. T. do 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- Diphenylphenanthrol. *Inorganica Chim. Acta* **1998**, 267, 209–221.
- (75) Rigaku Oxford Diffraction, (2019), CrysAlisProSoftware System, Version 1.171.40.45a, Rigaku Corporation. 2019.
- (76) 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.
- (77) Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-monge, L.; Taylor, R.; Streek, J. Van De; Wood, P. A. Mercury CSD 2 . 0 – New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, 466–470. <https://doi.org/10.1107/S0021889807067908>.
- (78) Sheldrick, G. M.; IUCr. SHELXT – Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* **2015**, 71 (1), 3–8.
- (79) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, 71 (1), 3–8.
- (80) Satyanarayana, S.; Dabrowiak, J. C.; Chaires, J. B. Neither - nor A-Tris(Phenanthroline)Ruthenium(II) Binds to DNA by Classical Intercalation. *Biochemistry* **1992**, 31 (39).
- (81) Gilroy, E. L.; Hicks, M. R.; Smith, J.; Rodger, A. Viscosity of Aqueous DNA Solutions Determined Using Dynamic Light Scattering. *Analyst* **2011**, 4159–4163.
- (82) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3^a.; Springer, Ed.; 2006.
- (83) Moreira, M. B.; Franciscato, D. S.; Toledo, K. C. F.; Souza, J. R. B. De; Nakatani, H. S. Investigação Da Supressão de Fluorescência de Soro

- Albumina Bovina e Humana Por Complexo de Rutênio. *Quim. Nova* **2015**, 38 (2), 227–232.
- (84) Ali, S.; Takjoo, R.; Hossein, G. HSA-Interaction Studies of Uranyl Complexes of Alkyl Substituted Isothiosemicarbazone. *J. Mol. Struct.* **2019**, 1193, 53–61.
- (85) Poureshghi, F.; Ghandforoushan, P.; Safarnejad, A.; Soltani, S. Interaction of an Antiepileptic Drug, Lamotrigine with Human Serum Albumin (HSA): Application of Spectroscopic Techniques and Molecular Modeling Methods. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2017**, 166, 187–192.
- (86) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions : Forces Contributing to Stability1-. *Biochemistry* **1981**, 3096–3102.
- (87) Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.; Ai, S.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X. Insights into Protein – Ligand Interactions : Mechanisms , Models , and Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, No. i, 1–34.
- (88) Wybranowski, T.; Cyrankiewicz, M.; Ziomkowska, B.; Kruszewski, S. The HSA Affinity of Warfarin and Flurbiprofen Determined by Fluorescence Anisotropy Measurements of Camptothecin. *BioSystems* **2008**, 94 (3), 258–262.
- (89) 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.
- (90) Santos, V. L. dos A. .; Gonsalves, A. de A. .; Araújo, C. R. M. Resgate Da Reação de Debus-Radziszewski: Ensino Prático de Reações Multicomponentes Na Síntese Da Lofina. *Quim. Nova* **2020**, 43 (9), 1344–1349.
- (91) Mariappan, M.; Maiya, B. G. Effects of Anthracene and Pyrene Units on the Interactions of Novel Polypyridylruthenium(II) Mixed-Ligand Complexes with DNA. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, No. 11, 2164–2173. <https://doi.org/10.1002/ejic.200400952>.
- (92) Velho, R. G. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 170 p.
- (93) Souza, L. C. M.; Santos, T. A.; Do Prado, C. R. A.; Lima, B. A. V.; Corrêa, R. S.; Batista, A. A.; Otubo, L.; Ellena, J.; Ueno, L. T.; Dinelli, L. R.; Bogado, A. L. Influence of Gold Nanoparticles Applied to Catalytic Hydrogenation of Acetophenone with Cationic Complexes Containing Ruthenium. *RSC Adv.* **2016**, 6 (58), 53130–53139. <https://doi.org/10.1039/c6ra05616d>.
- (94) Rouge, A.; Pinheiro, A. C.; Carolina, A.; Sodero, R.; Sousa, A.; Padilha, M. C.; Mesquita, P.; Sousa, D.; Paredes, S.; Alberto, C.; Fraga, M. Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. *Quim. Nova* **2007**, 30 (1), 125–135.

- (95) Kumarasamy, E.; Raghunathan, R.; Sibi, M. P.; Sivaguru, J. Nonbiaryl and Heterobiaryl Atropisomers : Molecular Templates with Promise for Atropselective Chemical Transformations. **2015**.
- (96) De Camargo, M. S.; Da Silva, M. M.; Correa, R. S.; Vieira, S. D.; Castelli, S.; D'Anessa, I.; De Grandis, R.; Varanda, E.; Deflon, V. M.; Desideri, A.; Batista, A. A. Inhibition of Human DNA Topoisomerase IB by Nonmutagenic Ruthenium(II)-Based Compounds with Antitumoral Activity. *Metallomics* **2016**, 8 (2), 179–192.
- (97) Lima, B. A. V.; Corrêa, R. S.; Graminha, A. E.; Kuznetsov, A.; Ellena, J.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Batista, A. A. Anti-Mycobacterium Tuberculosis and Cytotoxicity Activities of Ruthenium(II)/Bipyridine/Diphosphine/Pyrimidine-2-Thiolate Complexes: The Role of the Non-Coordinated n-Atom. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 27 (1), 30–40.
- (98) Barolli Reis, J. P. Complexos de Rutênio(II) Com Potenciais Atividades Antitumorais: Síntese, Caracterização e Ensaio Biológicos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 234 p.
- (99) Cabaleiro-Lago, E. M.; Rodríguez-Otero, J. On the Nature of σ - σ , σ - π , and π - π Stacking in Extended Systems. *ACS Omega* **2018**, 3 (8), 9348–9359.
- (100) Raja, N.; Devika, N.; Gupta, G.; Nayak, V. L.; Kamal, A.; Nagesh, N.; Therrien, B. Biological Activities of Pyrenyl-Derived Thiosemicarbazone Half-Sandwich Complexes. *J. Organomet. Chem.* **2015**, 794, 104–114.
- (101) Meyer, A. R. Interações Intermoleculares E Topologia Molecular No Empacotamento Cristalino Amino-4-Halo-5-Metilisoxazóis, Santa Maria, RS, 2013.
- (102) Sun, Y. M.; Dong, F. Y.; Wang, D. Q.; Li, Y. T. Crystal Structure, Supramolecular Self-Assembly and Interaction with DNA of a Mixed Ligand Manganese(II) Complex. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22 (6), 1089–1095.
- (103) Carter-Fenk, K.; Herbert, J. M. Reinterpreting π -Stacking. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, 22 (43), 24870–24886.
- (104) TIAGO, F. D. S. Estudo Químico-Quântico Do Empilhamento π Entre Uma Quinazolina Livre e o Complexo Cis-[Ru(Bpy)₂(Qui)NO](PF₆)₃ e Sua Influência Sobre a Fotoquímica e Fotosfísica Desse Composto. Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química-UFU, 2011. Dissertação de Mestrado, 148 p.
- (105) Silva, M. Busca Por Complexos de Rutênio (II) Com Propriedades Quimioterapêuticas: Avaliação da Atividade Antitumoral, Potencial Mutagênico e Inibição da Enzima Topoisomerase IB. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2017. Tese de Doutorado, 231 p.
- (106) Macêdo, A. P. M. Desenvolvimento de Potenciais Metalofármacos de Rutênio Contendo 1,1'-Bis(Difenilfosfino)Ferroceno e Ligantes Mercapto.

- São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2019. Tese de Doutorado, 200 p.
- (107) Dierkes, P.; van Leeuwen, P. N. M. The Bite Angle Makes the Difference: A Practical Ligand Parameter for Diphosphine Ligands. *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* **1999**, 1519–1529.
- (108) Nelson, M. R. M. Synthesis, Properties, and Coordination Chemistry of t - Bu-Xantphos Ligands, Universidade Victoria de Wellington, 2015.
- (109) Silveira, R. G. da. Sobre a Influência de Fosfinas e do Ligante Isocianida de P-Toluenosulfonilmetila na Citotoxicidade de Compostos de Ru(II). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2018. Tese de Doutorado, 225 p.
- (110) Abbehausen, C.; Castro, J. F.; Spera, M. B. M.; Heinrich, T. A.; Costa-Neto, C. M.; Lustri, W. R.; Formiga, A. L. B.; Corbi, P. P. Synthesis, Spectroscopic Characterization, DFT Studies and Biological Assays of a Novel Gold(I) Complex with 2-Mercaptothiazoline. *Polyhedron* **2011**, *30* (13), 2354–2359.
- (111) Charisiadis, P.; Kontogianni, V. G.; Tsiafoulis, C. G.; Tzakos, A. G.; Siskos, M.; Gerothanassis, I. P. ¹H-NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. *Molecules* **2014**, *19* (9), 13643–13682.
- (112) Zarycz, M. N. C.; Fonseca, C. G. NMR ¹H-Shielding Constants of Hydrogen-Bond Donor Reflect Manifestation of the Pauli Principle. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (13), 3720–3724.
- (113) Lin, C.; Skufca, J.; Partch, R. E. New Insights into Prediction of Weak π - π Complex Association through Proton-Nuclear Magnetic Resonance Analysis. *BMC Chem.* **2020**, *14* (1), 1–10.
- (114) Lenis-Rojas, O. A.; Fernandes, A. R.; Roma-Rodrigues, C.; Baptista, P. V.; Marques, F.; Pérez-Fernández, D.; Guerra-Varela, J.; Sánchez, L.; Vázquez-García, D.; Torres, M. L.; Fernández, A.; Fernández, J. J. Heteroleptic Mononuclear Compounds of Ruthenium(II): Synthesis, Structural Analyses, In Vitro Antitumor Activity and in Vivo Toxicity on Zebrafish Embryos. *Dalt. Trans.* **2016**, *45* (47), 19127–19140.
- (115) Martirez, J. M. P.; Carter, E. A. Metal-to-Ligand Charge-Transfer Spectrum of a Ru-Bipyridine-Sensitized TiO₂ Cluster from Embedded Multiconfigurational Excited-State Theory. *J. Phys. Chem. A* **2021**, *125* (23), 4998–5013.
- (116) Bojan, R. V.; Czerwieniec, R.; Laguna, A.; Lasanta, T.; López-De-Luzuriaga, J. M.; Monge, M.; Olmos, M. E.; Yersin, H. Luminescent Gold-Silver Complexes Derived from Neutral Bis(Perfluoroaryl) Diphosphine Gold(I) Precursors. *Dalt. Trans.* **2013**, *42* (12), 4267–4277.
- (117) Li, Z. X.; Kuang, X. N.; Wang, G.; Zhu, N.; Sun, Z. Z.; Han, H. L.; Yang, Y. P.; Li, Z. F.; Xin, X. L.; Jin, Q. H.; Ren, Z. G. A Series of Luminescent Cu(I) Complexes Based on the Diphosphine Ligand and Diimine Ligand:

- Weak Intermolecular Interactions, Terahertz Spectroscopy and Photoproperties. *CrystEngComm* **2021**, 23 (47), 8323–8333.
- (118) Vogler, A.; Kunkely, H. Excited State Properties of Transition Metal Phosphine Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 230 (1–2), 243–251.
- (119) 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 (May), 66–76.
- (120) Shobha Devi, C.; Nagababu, P.; Natarajan, S.; Deepika, N.; Venkat Reddy, P.; Veerababu, N.; Singh, S. S.; Satyanarayana, S. Cellular Uptake, Cytotoxicity, Apoptosis and DNA-Binding Investigations of Ru(II) Complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 72, 160–169.
- (121) Kapp, L. E.; Schutte-Smith, M.; Twigge, L.; Visser, H. G. Synthesis, Characterization and DNA Binding of Four Imidazo[4,5-f]1,10-Phenanthroline Derivatives. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1247, 131235.
- (122) Obalı, A. Y.; Akçaalan, S.; Arslan, E.; Obalı, İ. Antibacterial Activities and DNA-Cleavage Properties of Novel Fluorescent Imidazo-Phenanthroline Derivatives. *Bioorg. Chem.* **2020**, 100 (May).
- (123) Zhang, Y. A.; Monga, V.; Orvig, C.; Wang, Y. A. Theoretical Studies of the Tautomers of Pyridinethiones. *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112 (14), 3231–3238.
- (124) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 6ª edição.; John Wiley e Sons, I., Ed.; Nova Jersey, 2009.
- (125) Gerasimova, T. P.; Katsyuba, S. A. Bipyridine and Phenanthroline IR-Spectral Bands as Indicators of Metal Spin State in Hexacoordinated Complexes of Fe(II), Ni(II) and Co(II). *Dalt. Trans.* **2013**, 42 (5), 1787–1797.
- (126) Knupp, V. F.; Nicesio, I. C.; Queiroz, F. de M.; Matos, R. M.; Passos, B. de F. T. Síntese e Caracterização Estrutural de Complexos Mono e Bimetálicos de Paládio e Platina Com Ligantes Contendo Nitrogênio e Enxofre. *Quim. Nova* **1997**, 20 (4), 382–387.
- (127) Saragi, R. T.; Juanes, M.; Pinacho, R.; Rubio, J. E.; Fernández, J. A.; Lesarri, A. Molecular Recognition, Transient Chirality and Sulfur Hydrogen Bonding in the Benzyl Mercaptan Dimer. *Symmetry (Basel)*. **2021**, 13 (11), 1–13.
- (128) Pacheco, W. F.; Semaan, F. S.; De Almeida, V. G. K.; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q. Voltammetry: A Brief Review about Concepts. *Rev. Virtual Quim.* **2013**, 5 (4), 516–537.
- (129) Rai, Y.; Pathak, R.; Kumari, N.; Sah, D. K.; Pandey, S.; Kalra, N.; Soni, R.; Dwarakanath, B. S.; Bhatt, A. N. Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 1–15.
- (130) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.;

- Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* **2004**, No. Md, 1–25.
- (131) Sumantran, V. N. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview. In *Methods in Molecular Biology*; 2011; Vol. 731, pp 219–236. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5_19.
- (132) Indrayanto, G.; Putra, G. S.; Suhud, F. *Validation of In-Vitro Bioassay Methods: Application in Herbal Drug Research*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2021; Vol. 46.
- (133) Zagami, P.; Carey, L. A. Triple Negative Breast Cancer: Pitfalls and Progress. *npj Breast Cancer* **2022**, 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>.
- (134) Michalak, M.; Lach, M. S.; Antoszczak, M.; Huczynski, A.; Suchorska, W. M. Overcoming Resistance to Platinum-Based Drugs in Ovarian Cancer by Salinomycin and Its Derivatives—an in Vitro Study. *Molecules* **2020**, 25 (3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25030537>.
- (135) 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.
- (136) Komor, A. C.; Barton, J. K. The Path for Metal Complexes to a DNA Target. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (35), 3617–3630.
- (137) Pages, B. J.; Garbutcheon-Singh, K. B.; Aldrich-Wright, J. R. Platinum Intercalators of DNA as Anticancer Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017 (12), 1613–1624. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601204>.
- (138) Pages, B. J.; Ang, D. L.; Wright, E. P.; Aldrich-Wright, J. R. Metal Complex Interactions with DNA. *Dalt. Trans.* **2015**, 44 (8), 3505–3526. <https://doi.org/10.1039/c4dt02700k>.
- (139) Baruah, H.; Rector, C. L.; Monnier, S. M.; Bierbach, U. Mechanism of Action of Non-Cisplatin Type DNA-Targeted Platinum Anticancer Agents : DNA Interactions of Novel Acridinylthioureas and Their Platinum Conjugates. **2002**, 64.
- (140) Martins, P. H. R. Avaliação de Interação e Clivagem de DNA Por Complexos de Rutênio. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Química-UFC, 2014. Tese de Doutorado, 107 p.
- (141) Shahabadi, N.; Kashanian, S.; Mahdavi, M.; Sourinejad, N. DNA Interaction and DNA Cleavage Studies of a New Platinum(II) Complex Containing Aliphatic and Aromatic Dinitrogen Ligands. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2011**, 2011.
- (142) Villarreal, W.; Colina-Vegas, L.; Visbal, G.; Corona, O.; Corrêa, R. S.; Ellena, J.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A.; Navarro, M.; Sa, C. E. P. Copper(I) – Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. *Inorg. Chem.* **2017**, No. I.
- (143) Mantri, Y.; Lippard, S. J.; Baik, M. H. Bifunctional Binding of Cisplatin to DNA: Why Does Cisplatin Form 1,2-Intrastrand Cross-Links with AG

- but Not with GA? *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (16), 5023–5030.
- (144) Galindo-murillo, R.; Cheatham, T. E. Ethidium Bromide Interactions with DNA : An Exploration of a Classic DNA – Ligand Complex with Unbiased Molecular Dynamics Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (7), 3735–3747.
- (145) Villarreal, W.; Colina-Vegas, L.; Rodrigues De Oliveira, C.; Tenorio, J. C.; Ellena, J.; Gozzo, F. C.; Cominetti, M. R.; Ferreira, A. G.; Ferreira, M. A. B.; Navarro, M.; Batista, A. A. Chiral Platinum(II) Complexes Featuring Phosphine and Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (24), 11709–11720.
- (146) Biancardi, A.; Biver, T.; Marini, A.; Mennucci, B.; Secco, F. Thiazole Orange (TO) as a Light-Switch Probe: A Combined Quantum-Mechanical and Spectroscopic Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (27), 12595–12602.
- (147) Ribeiro, G. H.; Colina-vegas, L.; Clavijo, J. C. T.; Ellena, J. Ru (II)/ N-N / PPh 3 Complexes as Potential Anticancer Agents against MDA- MB-231 Cancer Cells (N-N = Diimine or Diamine). *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *193* (January), 70–83.
- (148) Brabec, V.; Kasparkova, J. Ruthenium Coordination Compounds of Biological and Biomedical Significance. DNA Binding Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *376*, 75–94.
- (149) Avirah, R. R.; Schuster, G. B. Fluorescence Quenching by Intercalation of a Pyrene Group Tethered to an N 4 -Modi Fi Ed Cytosine in Duplex DNA. **2013**, 332–335.
- (150) Gonçalves, C.; Oliveira, C. G.; Maia, P. I. S.; Sadler, P. J. Novel Tetranuclear PdII and PtII Anticancer Com- Plexes Derived from Pyrene Thiosemicarbazones. *Dalt. Trans.* **2020**, *49* (July).
- (151) Oliveira, C. G. Síntese, Caracterização e Estudo de Mecanismo de Ação de Complexos de Paládio e Platina com Ligantes Tiossemicarbazonas Derivados do Pireno Visando a Obtenção de Novos Quimioterápicos Anticâncer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-USP, 2017. Tese de Doutorado, 194 p.
- (152) Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaitis, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* **2018**.
- (153) Kubota, Y. The Interaction of DNA with Hoechst 33258 Studied by Fluorescence Spectroscopy. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1990, pp 758–764.
- (154) Amirbekyan, K. Y.; Shahinyan, G. A.; Ghazoyan, H. H.; Sargsyan, H. R.; Markarian, S. A. Fluorescence Anisotropy Studies on the Hoechst 33258-DNA Interaction: The Solvent Effect. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *39* (13), 4902–4906.
- (155) Cunha, B. N.; Colina-Vegas, L.; Plutín, A. M.; Silveira, R. G.; Honorato, J.; Oliveira, K. M.; Cominetti, M. R.; Ferreira, A. G.; Castellano, E. E.;

- Batista, A. A. Hydrolysis Reaction Promotes Changes in Coordination Mode of Ru(II)/Acylthiourea Organometallic Complexes with Cytotoxicity against Human Lung Tumor Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, 186 (March), 147–156.
- (156) Amirbekyan, K.; Duchemin, N.; Benedetti, E.; Joseph, R.; Colon, A.; Markarian, S. A.; Bethge, L.; Vonhoff, S.; Klusmann, S.; Cossy, J.; Vasseur, J. J.; Arseniyadis, S.; Smietana, M. Design, Synthesis, and Binding Affinity Evaluation of Hoechst 33258 Derivatives for the Development of Sequence-Specific DNA-Based Asymmetric Catalysts. *ACS Catal.* **2016**, 6 (5), 3096–3105.
<https://doi.org/10.1021/acscatal.6b00495>.
- (157) Suss, O.; Motiei, L.; Margulies, D. Broad Applications of Thiazole Orange in Fluorescent Sensing of Biomolecules and Ions. *Molecules* **2021**, 26 (9).
- (158) Ummat, A.; Rechkoblit, O.; Jain, R.; Choudhury, J. R.; Johnson, R. E.; Silverstein, T. D.; Buku, A.; Lone, S.; Prakash, L.; Prakash, S.; Aggarwal, A. K. Structural Basis for Cisplatin DNA Damage Tolerance by Human Polymerase η during Cancer Chemotherapy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19 (6), 628–633.
- (159) Naveenraj, S.; Anandan, S. Binding of Serum Albumins with Bioactive Substances - Nanoparticles to Drugs. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2013**, 14 (1), 53–71.
- (160) Vieira Rocha, F. Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio(II) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina. Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Química-UNESP, 2013. Tese de Doutorado, 145 p.
- (161) Bush, N. G.; Evans-roberts, K.; Maxwell, A. Macromolecules DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* **2015**, 6 (2), 1–34.
- (162) Champoux, J. J. DNA T OPOISOMERASES : Structure , Function , and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem* **2001**, 369–413.
- (163) McClendon, A. K.; Osheroff, N. DNA Topoisomerase II, Genotoxicity, and Cancer. *Mutat. Res.* **2009**, 623, 83–97.
- (164) Ali, M. S.; Al-Lohedan, H. A. Spectroscopic and Computational Evaluation on the Binding of Safranal with Human Serum Albumin: Role of Inner Filter Effect in Fluorescence Spectral Correction. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, 203, 434–442.
- (165) Neto, G. L. B.; Baptista, E. A. M.; Becca, G. H. S.; Nakatani, H. S.; de Souza, V. 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.
- (166) Wanke, R.; Harjivan, S. G.; Pereira, S. A.; Marques, M. M.; Antunes, A. M. M. The Role of Competitive Binding to Human Serum Albumin on Efavirenz-Warfarin Interaction: A Nuclear Magnetic Resonance Study. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2013**, 42 (5), 443–446.

- (167) Dömötör, O.; Hartinger, C. G.; Bytze, A. K.; Kiss, T.; Keppler, B. K.; Enyedy, E. A. Characterization of the Binding Sites of the Anticancer Ruthenium(III) Complexes KP1019 and KP1339 on Human Serum Albumin via Competition Studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18* (1), 9–17.
- (168) Yamasaki, K.; Chuang, V. T. G.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Albumin-Drug Interaction and Its Clinical Implication. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (12), 5435–5443.
- (169) Guzmán, C.; Bagga, M.; Kaur, A.; Westermarck, J.; Abankwa, D. ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. *PLoS One* **2014**, *9* (3), 14–17.
- (170) 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.
- (171) Munshi, A.; Hobbs, M.; Meyn, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. In *Methods in Molecular Medicine*; Blumenthal, R. D., Ed.; Humana, 2005.
- (172) Popolin, C. P. Avaliação Da Atividade Antitumoral *in vitro* e *in vivo* de novos Complexos de Rutênio Contendo Ácido Salicílico e Derivados. São Carlos, Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas-UFSCar/UNESP, 2021. Tese de Doutorado, 104 p.
- (173) Pijuan, J.; Barceló, C.; Moreno, D. F.; Maiques, O.; Sisó, P. In Vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. **2019**, *7* (June), 1–16.
- (174) Popolin, C. P.; Cominetti, M. R. A Review of Ruthenium Complexes Activities on Breast Cancer Cells. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2017**, *17* (15), 1435–1441.
- (175) Fife, C. M.; McCarroll, J. A.; Kavallaris, M. Movers and Shakers: Cell Cytoskeleton in Cancer Metastasis. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (24), 5507–5523.
- (176) 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. *Dalt. Trans.* **2021**, *50* (1), 323–335.
- (177) Hu, X.; Li, Z.; Lin, R.; Shan, J.; Yu, Q.; Wang, R.; Liao, L.; Yan, W.; Wang, Z.; Shang, L.; Huang, Y.; Zhang, Q.; Xiong, K. Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9* (March), 1–28.
- (178) Liu, X.; Yang, W.; Guan, Z.; Yu, W.; Fan, B.; Xu, N.; Liao, D. J. There Are Only Four Basic Modes of Cell Death, Although There Are Many Ad Hoc Variants Adapted to Different Situations. *Cell Biosci.* **2018**, 1–12.
- (179) Pucci, B.; Kasten, M.; Giordano, A. Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia* **2000**, *2* (4), 291–299.
- (180) Owa, T.; Yoshino, H.; Yoshimatsu, K.; Nagasu, T. Cell Cycle Regulation in the G1 Phase: A Promising Target for the Development of New

- Chemotherapeutic Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *1*, 1487–1503.
- (181) Matthews, H. K.; Bertoli, C.; Bruin, R. A. M. Cell Cycle Control in Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23* (January).
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.
- (182) Kulms, D.; Düßmann, H.; Pöppelmann, B.; Ständer, S.; Schwarz, A.; Schwarz, T. Apoptosis Induced by Disruption of the Actin Cytoskeleton Is Mediated via Activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death Differ.* **2002**, *9* (6), 598–608.
- (183) Doncel, J. P.; Ojeda, P. de la C.; OropesaÁvila, M.; Paz, M. V.; Laveria, I. De; Mata, M. D. La; Córdoba, M. Á.; Hidalgo, R. L.; Rivero, J. M. S.; Cotán, D.; Sánchez-Alcázar, J. A. Cytoskeleton Rearrangements during the Execution Phase of Apoptosis. In *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*; Jimenez-Lopez, J. C., Ed.; 2017.
<https://doi.org/10.5772/66865>.

APÊNDICE

PARTE I- Caracterizações do ligante pyphen e precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(pyphen)], CPP

LIGANTE PYPHEN

Rendimento: 68,3%. Análise Elementar (%) Calc. para C₂₉H₁₆N₄.H₂O: C 79,44; H 4,14; N 12,78; Experimental C 78,39; H 4,61; N 12,77. RMN ¹H (DMSO-d₆) [δ/ppm (multiplicidade, integral, atribuição)] 14,1 (s, 1H, NH); 9,54; 9,06 (d, 4H, H1, H3, H8 e H10); 8,67 (d, 1H, H15); 8,51 (d, 1H, H16); 8,37 (m, 3H, H21 e H23); 8,29; 8,14 (t, 1H, H22); 7,87 (dd, 2H, H2 e H9)]. RMN ¹³C {¹H} [δ/ppm (atribuição); 151,5 (C13); 148,4 (C1,C10); 144,2 (C11,C12); 129,9 (C3,C8); 123,3 (C2, C9)]. UV/Vis [DMSO; λ_{máx}/nm (ε; cm⁻¹ mol⁻¹ L)]: 286 (37,8×10³); 380 (29,5×10³).

TABELA A1- Principais parâmetros cristalográficos da estrutura obtida para o ligante pyphen

Composto	pyphen
Fórmula Empírica	C ₂₉ H ₁₈ N ₄ O
Fórmula Molecular	438,47
Temperatura/K	100,00
Comprimento de onda	1.54184 Å
Sistema Cristalino	ortorrômbico
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensões célula unitária	a= 7.51750(10) Å α= 90° b= 16.2806(2) Å β= 90° c= 16.6416(2) Å γ= 90°
Volume	2036.76(4) Å ³
Z	4
Densidade (Calculada)	1,430 g/cm ³
Coefficiente de absorção	0,710 mm ⁻¹
F(000)	912,0
Tamanho do cristal	0,284×0,03×0,014 mm ³
Faixa Theta para coleta de dados	7.596 a 160.496
Intervalo de índice	-8≤h≤9, -20≤k≤20, -20≤l≤21
Reflexões coletadas	17833
Reflexões independentes	4309 [Rint= 0,0397, Rsigma= 0,0340]
Dados/restrições/parâmetros	4309/0/311
Goodness-of-fit on F2	1,048
Índices R Final [I>2sigma(I)]	R1=0,0315, wR2= 0,0767
Índices R(todos os dados)	R1= 0,0349, wR2= 0,0784
Largest diff. Peak/ hole Å-3	0,24/-0,17

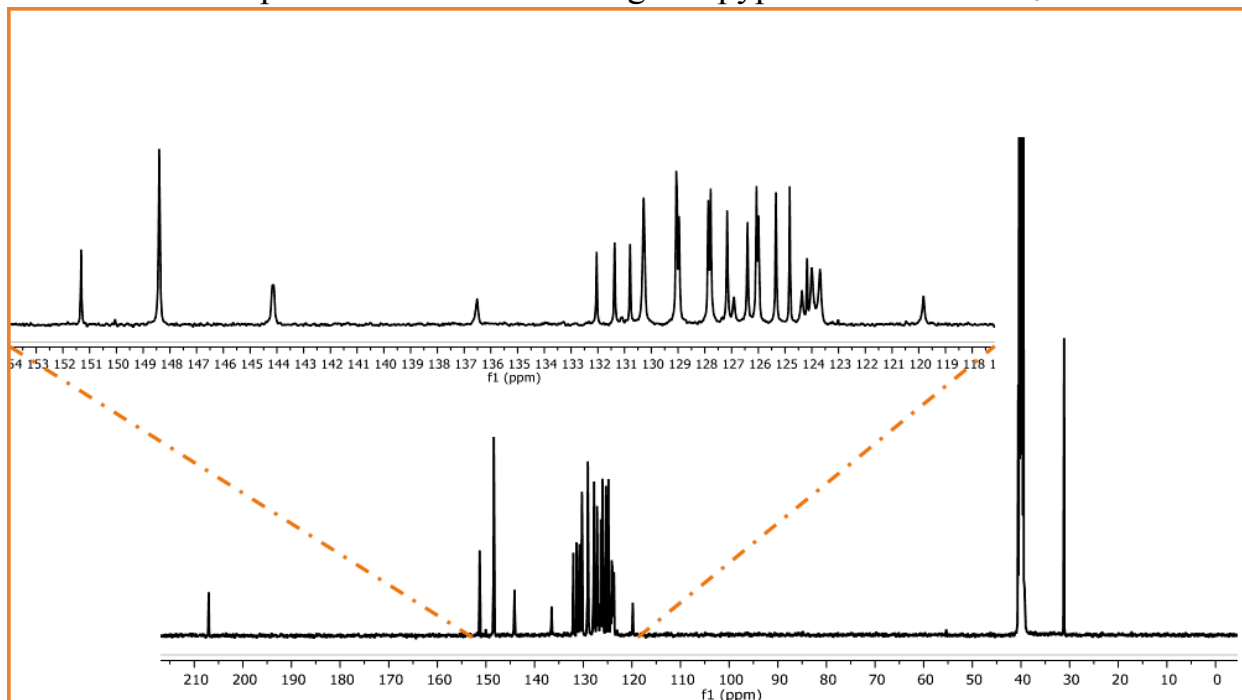
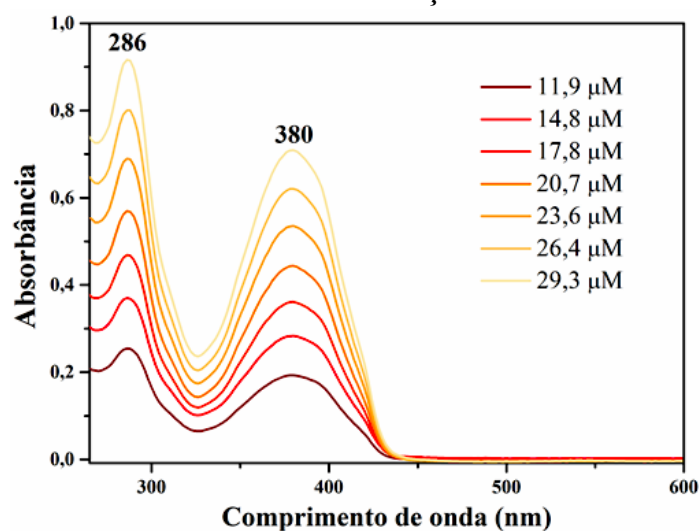
FIGURA A1- Espectro de RMN ^{13}C do ligante pyphen em DMSO- d_6 

FIGURA A2- Espectro UV-Vis do ligante pyphen em DMSO, atribuição das transições e absorptividade molar destas transições



ϵ das transições π - π^*

286 nm: $37,8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$

380 nm: $29,5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$

FIGURA A3- Espectro infravermelho do composto pyphen, obtido em pastilha de KBr, com diluição de 1:100 (composto: KBr)

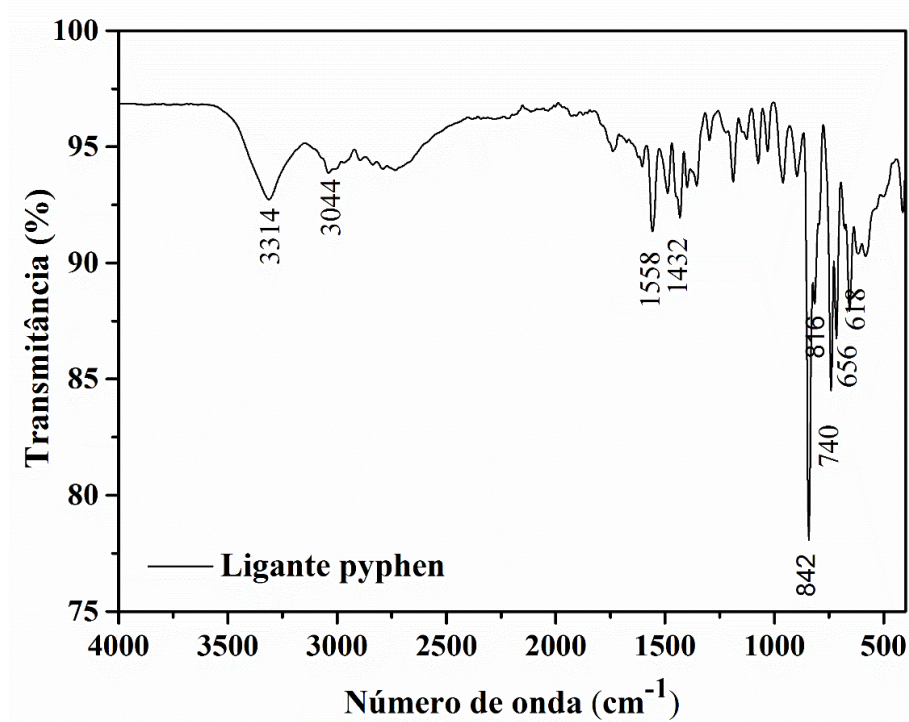
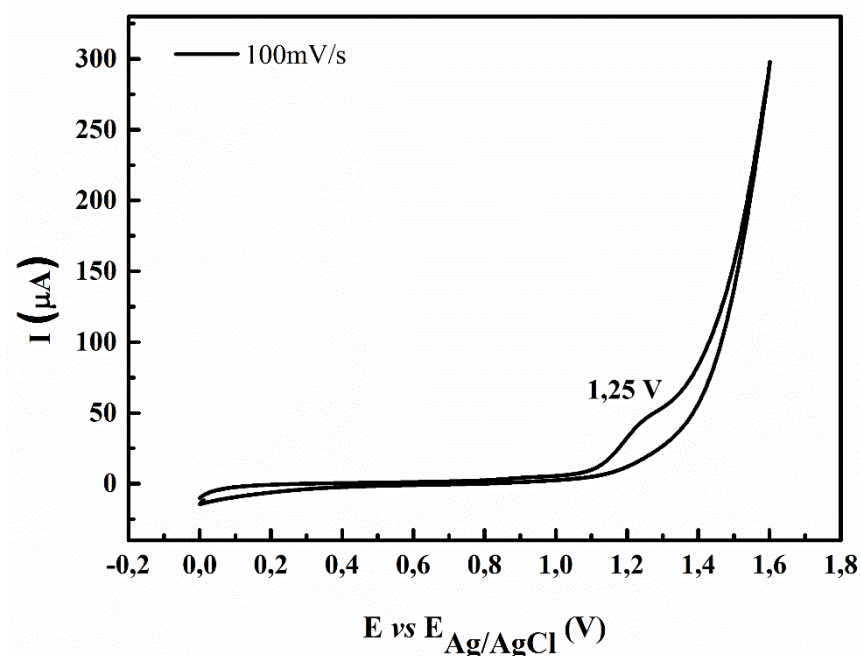
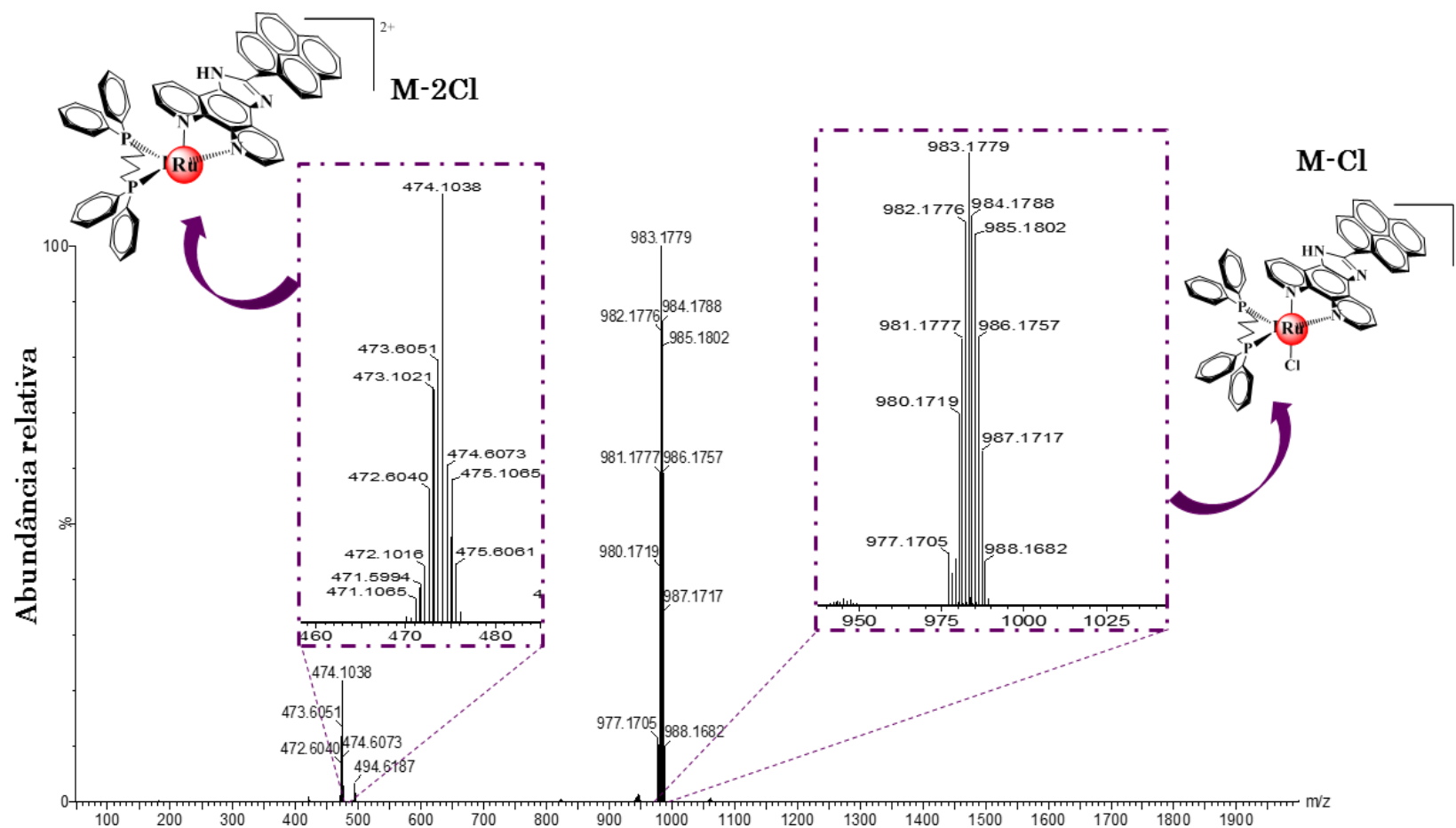


FIGURA A4- Voltamograma cíclico obtido em dimetilsulfóxido para o ligante pyphen, utilizando PTBA como eletrólito suporte



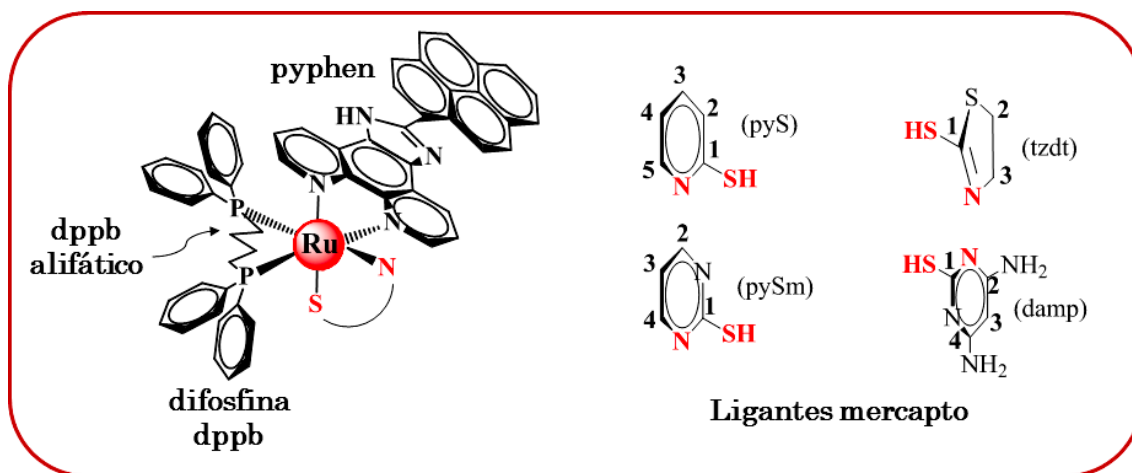
Precursor *cis*--[RuCl₂(dppb)(pyphen)]**Espectrometria de massas de alta resolução**

FIGURA A5-Espectro de massas de alta resolução do complexo CPP (solubilizado em MeOH)



PARTE II- Caracterizações SÉRIES DE COMPOSTOS 1 e 2

ESQUEMA A1- Numeração e designação nas estruturas dos compostos da Série 1, para atribuição dos espectros de ressonância magnética nuclear



Complexo **A1**: Rendimento 37 mg (43%). Análise Elementar (%) Calc. para $C_{62}H_{48}N_5P_2RuSCl$: C 68,09; H 4,42; N 6,40; S 2,93 Encontrado C 68,34; H 3,91; N 6,63, S 3,77. Condutividade Molar ($S\ cm^2\ mol^{-1}$, DMSO) 27,3. RMN $^{31}P\{^1H\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm , multiplicidade, atribuição, J/Hz)] 43,6 (d, P trans a N_{pyS} , 35,9), 41,9 (d, P trans a N_{pyphen} , 35,9). RMN 1H (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, integral, J/Hz)] sinais referentes ao ligante pyphen 9,63 (d, 1H, 9,3); 9,54 (dd, 2H, 13,1 e 5,1); 9,30 (s, 2H,); 8,92 (s, 1H); 8,53 (d, 1H, 8,1); 8,42 (d, 3H, 7,5); 8,33 (dd, 2H, 10,9 e 8,8); 8,17 (t, 1H, 7,6); 8,03 (dd, 1H, 8,2 e 5,2); 7,79 (dd, 1H, 8,1 e 5,1); sinais referentes a três fenilas da difosfina 7,51 (m, 7H); 7,39 (t, 1H, 7,6); 7,22 (tt, 5H, 16,3 e 7,9); 7,04 (t, 2H, 7,4); sinais referentes ao ligante pyS 6,98 (t, 1H, 8,3, H2); 6,51 (q, 1H, 7,6, H3); 5,88 (t, 1H, 6,5, H4); 5,82 (d, 1H, 5,5, H5) sinais referentes à fenila blindada 6,71 (t, 1H, 7,4); 6,51 (q, 2H, 7,6); 6,07 (t, 2H, 8,3). Sinais atribuídos no RMN $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, atribuição)] 179,7 (s, C1); 145,2 (s, C5); 134,6 (s, C2); 124,9 (d, C3); 116,6 (s, C4); 29,1 (d, dppb alifático); 28,2 (d, dppb alifático); 23,9 (s, dppb

alifático); 20,9 (s, dppb alifático). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 289 (53263), 380 (37567), 445 (10880).

Complexo A2: Rendimento 34 mg (40%). Análise Elementar (%) Calc. para $\text{C}_{60}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{P}_2\text{RuS}_2\text{Cl}$: C 65,41; H 4,39; N 6,36; S 5,82 Encontrado C 64,75; H 3,68; N 6,29; S 6,85. Condutividade Molar ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, DMSO) 24,3. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm , multiplicidade, atribuição, J/Hz)] 45,6 (d, P trans a N_{tzdt} , 34,9), 44,1 (d, P trans a N_{pyphen} , 34,9). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, integral, J/Hz)] sinais referentes ao ligante pyphen 9,65 (d, 1H, 9,4); 9,47 (s, 1H); 9,32 s (1H); 8,93 (d, 1H, 7,9); 8,54 (d, 1H, 8,0); 8,42 (d, 3H, 8,0); 8,35 (t, 2H, 10,3); 8,18 (t, 1H, 7,6); 7,94 (dd, 1H, 8,2 e 5,4); 7,88 (dd, 1H, 8,2 e 5,3); 7,66 (t, 2H, 8,4) sinais referentes a três fenilas da difosfina 7,42 (m, 13H); 7,24 (t, 2H, 7,5) sinais referentes à fenila mais blindada 6,62 (t, 1H, 7,5); 6,41 (t, 2H, 7,4); 5,96 (t, 2H, 8,3) sinais referentes ao ligante tzdt 2,60 (m, 2H); 2,44 (s, 1H); 1,43 (s, 1H) sinais referentes a parte alifática da difosfina 3,3 (2H, junto ao sinal da água); 3,13 (s, 1H); 2,60 (m, 1H); 1,71 (m, 4H). Sinais atribuídos no RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, atribuição)] 182,7 (s, C1); 55,8 (s, C2); 31,0 (s, C3); 28,9 (d, dppb alifático); 27,9 (d, dppb alifático); 23,4 (s, dppb alifático); 21,8 (dppb alifático). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 290 (43586), 380 (30793), 450 (8332).

Complexo A3: Rendimento 36 mg (42%). Análise Elementar (%) Calc. para $\text{C}_{61}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{P}_2\text{RuS}\text{Cl}$: C 66,93; H 4,33; N 7,68; S 2,93 Encontrado C 66,62; H 4,34; N 7,69; S 2,93. Condutividade Molar ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, DMSO) 27,1. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm , multiplicidade, atribuição, J/Hz)] 44,5 (d, P trans a N_{pySm} , 36,0), 41,4 (d, P trans a N_{pyphen} , 36,0). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, integral, J/Hz)] sinais referentes ao ligante pyphen 15,13 (s, 1H, NH); 9,55 (t, 2H, 8,0); 9,48 (d, 1H, 8,2); 9,41 (d, 1H, 3,7); 9,17

(d, 1H, 8,1); 8,88 (d, 1H, 8,0); 8,54 (d, 1H, 8,1); 8,42 (dd, 3H, 8,6/4,5); 8,33 (q, 2H, 12,0/9,1); 8,18 (t, 1H, 7,6); 8,05 (dd, 1H, 8,2/5,2); 7,80 (dd, 1H, 8,2/5,4) sinais referentes ao ligante pySm 7,95 (dd, 1H, 4,9/2,3, H4); 6,23 (m, 1H); 5,98 (t, 1H, 5,1) sinais referentes a três fenilas da difosfina 7,50 (m, 6H); 7,40 (m, 2H); 7,24 (m, 5H); 7,08 (t, 2H, 6,7); sinais referentes à fenila mais blindada 6,75 (t, 1H, 7,4); 6,54 (t, 2H, 6,8); 6,09 (t, 2H, 8,4); sinais da parte alifática da difosfina 3,22 (s, 2H); 2,65 (m, 2H); 1,70 (m, 4H). Sinais atribuídos no RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade, atribuição)] 186,1 (s, C1); 156,2 (s, C4); 153,5 (s, C2); 115,0 (s, C3) 29,5 (d, dppb alifático); 28,8 (d, dppb alifático); 24,4 (s, dppb alifático); 21,2 (dppb alifático). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}$ /nm (ϵ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 290 (50020), 380 (36759), 442 (11725).

Complexo A4: Rendimento 50 mg (53%). Análise Elementar (%) Calc. para $\text{C}_{62}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{RuSP}_3\text{F}_6$: C 61,89; H 4,02; N 5,82; S 2,67 Encontrado C 61,38; H 4,23; N 4,81; S 3,08. Condutividade Molar ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$, DMSO) 25,8. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ /ppm, multiplicidade, atribuição, J/Hz)] 43,5 (d, P trans a N_{pyS} , 35,3), 41,9 (d, P trans a N_{pyphen} , 35,3). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz) sinais referentes ao ligante pyphen 9,58 (d, 1H, 4,5); 9,54 (d, 1H, 5,3); 9,50 (d, 1H, 9,4); 9,29 (d, 1H, 8,2); 9,01 (d, 1H, 8,1); 8,74 (d, 1H, 8,0); 8,57 (d, 1H, 8,1); 8,43 (m, 3H); 8,35 (dd, 2H, 22,2/8,9); 8,19 (t, 1H, 7,6); 8,04 (dd, 1H, 8,2/5,2); 7,82 (dd, 1H, 8,3/5,2) sinais referentes a três fenilas da difosfina 7,55 (q, 3H, 6,3); 7,49 (dt, 4H, 9,0/4,9); 7,40 (t, 1H, 7,4); 7,24 (ddd, 5H, 23,8/17,3/7,9); 7,05 (t, 2H, 7,0) sinais referentes ao ligante pySm 6,98 (t, 1H, 7,8, H2); 6,52 (td, 1H, 8,2/2,6, H3); 5,90 (t, 1H, 6,5, H4); 5,82 (d, 1H, 5,6, H5) sinais da fenila mais blindada 6,73 (t, 1H, 7,5); 6,52 (td, 2H, 8,2/2,6); 6,07 (t, 2H, 8,3). Sinais atribuídos no RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade, atribuição)] 180,2 (s, C1); 145,8 (s, C5); 135,2 (s, C2); 127,4 (s, C3); 117,1 (s, C4); 29,6 (d, dppb

alifático); 28,7 (d, dppb alifático); 24,4 (s, dppb alifático); 21,3 (s, dppb alifático). HR-ESI-MS (ACN/H₂O, 95:5) m/z 1058,2169 (Calc. para [C₆₂H₄₈N₅P₂RuS]⁺ m/z 1058,2144; Δ 2,40 ppm). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; λ_{máx}/nm (ε M⁻¹ cm⁻¹): 288 (43817), 380 (31524), 444 (7033).

Complexo **A5**: Rendimento 65 mg (68%). Análise Elementar (%) Calc. para C₆₀H₄₈N₅RuS₂P₃F₆: C 59,50; H 3,99; N 5,78; S 5,29 Encontrado C 59,76; H 3,79; N 5,83; S 6,06. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO) 23,6. RMN ³¹P{¹H} (DMSO-d₆) [δ/ppm, multiplicidade, atribuição, J/Hz] 45,7 (d, P trans a N_{tzdt}, 34,2), 44,0 (d, P trans a N_{pyphen}, 34,2). RMN ¹H (DMSO-d₆) [δ/ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz)] 9,72 (d, 1H, 9,4); 9,41 (d, 1H, 4,2); 9,29 (d, 2H, 5,3); 9,19 (d, 1H, 8,0); 8,91 (d, 1H, 8,1); 8,51 (d, 1H, 8,1); 8,39 (d, 3H, 7,5); 8,31 (t, 2H, 9,6); 8,15 (t, 1H, 7,6); 7,90 (dd, 1H, 8,1/5,3); 7,84 (dd, 1H, 8,1/5,3) sinais referentes a três das fenilas da difosfina 7,64 (t, 2H, 8,4); 7,49 (m, 6H); 7,38 (m, 4H); 7,32 (t, 1H, 7,3); 7,23 (t, 2H, 7,5) sinais referentes à fenila mais blindada 6,62 (t, 1H, 7,5); 6,41 (t, 2H, 7,6); 5,96 (t, 2H, 8,3); sinais referentes ao ligante tzdt 2,57 (m, 2H, H3a/H3b); 2,43 (m, 1H, H2a); 1,67 (m, 1H, H2b) sinais da parte alifática da difosfina 3,33 (m, 1 ou 2H, junto ao sinal da água); 3,13 (s, 1H); 2,57 (m, 1H); 1,67 (m, 3H); 1,40 (s, 1H). Sinais atribuídos no RMN ¹³C{¹H} (DMSO-d₆) [δ/ppm (multiplicidade, atribuição)] 182,6 (s, C1); 55,8 (s, C2); 30,9 (s, C3); 30,0 (d, dppb alifático); 28,0 (d, dppb alifático); 23,5 (s, dppb alifático); 21,7 (s, dppb alifático). HR-ESI-MS (ACN/H₂O, 95:5) m/z 1066,1866 (Calc. para [C₆₀H₄₈N₅P₂RuS₂]⁺ m/z 1066,1864; Δ 0,19 ppm). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; λ_{máx}/nm (ε M⁻¹ cm⁻¹): 288 (49347), 380 (34420), 446 (11715).

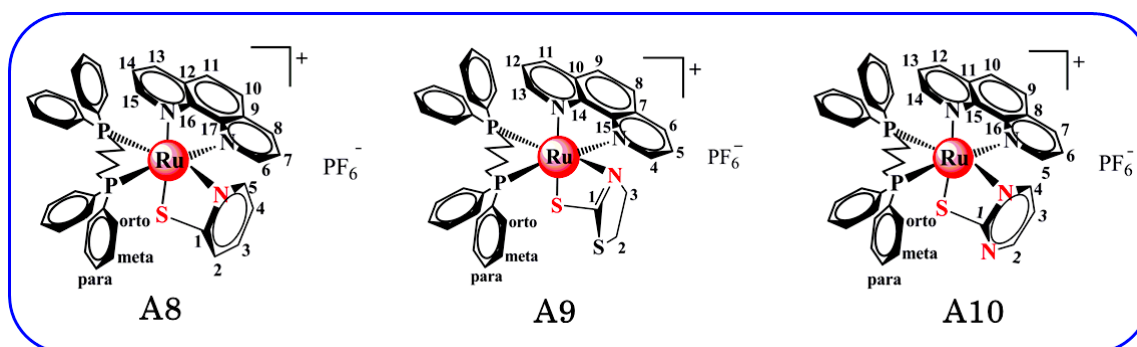
Complexo **A6**: Rendimento 65 mg (69%). Análise Elementar (%) Calc. para C₆₁H₄₇N₆RuSP₃F₆: C 60,85; H 3,93; N 6,98; S 2,66 Encontrado C 59,99; H

3,97; N 7,18; S 3,34. Condutividade Molar ($S\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$, DMSO) 27,4. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm , multiplicidade, atribuição, J/Hz] 44,5 (d, P trans a N_{pySm} , 36,0), 41,3 (d, P trans a N_{pyphen} , 36,0). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz)] sinais referentes ao ligante pyphen 9,55 (d, 1H, 5,2); 9,45 (dd, 2H, 13,0/7,3); 9,23 (s, 1H); 8,96 (d, 1H, 8,1); 8,67 (d, 1H, 8,1); 8,57 (d, 1H, 8,1); 8,43 (d, 3H, 7,3); 8,36 (t, 2H, 6,6); 8,18 (t, 1H, 7,6); 8,05 (dd, 1H, 8,2/5,3); 7,81 (t, 1H, 6,7) sinais referentes a três fenilas da difosfina 7,53 (t, 3H, 8,1); 7,47 (m, 4H); 7,41 (t, 1H, 7,6); 7,27 (q, 4H, 8,8/8,2); 7,20 (d, 1H, 7,4); 7,08 (t, 2H, 7,6) sinais referentes ao ligante pySm 7,95 (d, 1H, 2,6); 6,23 (s, 1H); 5,98 (t, 1H, 5,2) sinais referentes à fenila mais blindada 6,76 (t, 1H, 7,5); 6,54 (t, 2H, 7,6); 6,09 (t, 2H, 8,4) sinais referentes à parte alifática da difosfina 3,37 (1H, junto ao sinal da água); 3,26 (s, 1H); 2,65 (s, 2H); 1,69 (m, 4H). Sinais atribuídos no RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, atribuição)] 185,7 (s, C1); 155,8 (s, C4); 153,1 (s, C2); 114,6 (s, C3); 29,1 (d, dppb alifático); 28,4 (d, dppb alifático); 24,0 (s, dppb alifático); 20,8 (s, dppb alifático). HR-ESI-MS (ACN/ H_2O , 95:5) m/z 1059,2118 (Calc. para $[\text{C}_{61}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{P}_2\text{RuS}]^+$ m/z 1059,2096; Δ 2,08 ppm). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)] 288 (44358), 378 (32182), 450 (7967).

Complexo A7: Rendimento 68 mg (70%). Análise Elementar (%) Calc. para $\text{C}_{61}\text{H}_{49}\text{N}_8\text{RuSP}_3\text{F}_6$: C 59,37; H 4,00; N 9,08; S 2,60 Encontrado C 59,33; H 4,13; N 9,09; S 2,73. Condutividade Molar ($S\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$, DMSO) 29,7. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm , multiplicidade, atribuição, J/Hz] 44,9 (d, P trans a N_{damp} , 36,6), 41,4 (d, P trans a N_{pyphen} , 36,6). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz)] sinais referentes ao ligante pyphen 14,6 (1H, NH); 9,73 (d, 1H, 5,2); 9,64 (d, 1H, 5,2); 9,51 (d, 1H, 9,4); 9,25 (d, 1H, 8,1); 9,03 (d, 1H, 8,1); 8,73 (d, 1H, 8,1); 8,55 (d, 1H, 8,1); 8,42 (d, 2H, 7,6); 8,33 (q, 2H, 12,0/9,3); 8,18 (t, 1H, 7,6); 8,03 (dd, 1H,

8,2/5,2); 7,90 (dd, 1H, 8,2/5,3) sinais referentes a três fenilas da difosfina 7,65 (t, 2H, 8,4); 7,42 (m, 8H); 7,29 (t, 2H, 7,4); 7,24 (d, 1H, 7,4); 7,13 (t, 2H, 6,8); sinais da fenila mais blindada 6,73 (t, 1H, 7,4); 6,51 (t, 2H, 6,8); 6,03 (t, 2H, 8,3) sinais referentes ao ligante damp 5,94 (s, NH₂); 4,25 (s, 1H, H3) sinais referentes à parte alifática da difosfina 3,35 (1H, junto ao sinal da água); 3,23 (s, 1H); 2,60 (m, 2H); 1,67 (m, 4H). Sinais atribuídos no RMN ¹³C{¹H} (DMSO-d₆) [δ/ppm (multiplicidade, atribuição)] 182,6 (s, C1); 78,8 (s, C3); 29,1 (d, dppb alifático); 28,3 (d, dppb alifático); 23,8 (s, dppb alifático); 20,7 (s, dppb alifático). HR-ESI-MS (ACN/H₂O, 95:5) m/z 1089,2335 (Calc. para [C₆₁H₄₉N₈P₂RuS]⁺ m/z 1089,2314; Δ 1,93 ppm). Espectroscopia UV-Visível [DMSO; λ_{máx}/nm (ε M⁻¹ cm⁻¹): 284 (56991), 378 (37303), 442 (12169).

ESQUEMA A2- Numeração e designação nas estruturas dos compostos da Série 2, para atribuição dos espectros de ressonância magnética nuclear



Complexo **A8**: Rendimento 81 mg (65%). Análise Elementar (%) Calc. para C₄₅H₄₀F₆N₃P₃RuS: C 56,13; H 4,19; N 4,36; S 3,33 Encontrado C 56,23; H 4,44; N 4,46; S 3,91. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO) 34,5. RMN ³¹P{¹H} (DMSO-d₆) [δ/ppm, multiplicidade, atribuição, J/Hz] 43,6 (d, P trans a N_{py}S, 35,0), 42,3 (d, P trans a N_{phen}, 35,0). RMN ¹H (DMSO-d₆) [δ/ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz) 9,67 (d, 1H, H15, 3,9), 9,54 (d, 1H, H6, 5,3), 8,72 (d, 1H, H8, 8,1), 8,49 (d, 1H, H13, 8,1), 8,09 (d, 1H, H10, 8,8), 8,00 (d, 1H, H11, 8,8), 7,95 (dd, 1H, H7, 8,2 e 5,3), 7,77 (dd, 1H, H14,

8,1 and 5,4), 7,50 (m, 7H, dppb), 7,34 (t, 1H, dppb, 7,5), 7,21 (m, 5H, dppb), 7,02 (t, 2H, dppb, 7,6), 6,95 (t, 1H, H2, 7,8), 6,70 (t, 1H, dppb, 7,5), 6,48 (d, 1H, H3, 8,2), 6,40 (t, 2H, dppb, 7,6), 5,86 (t, 1H, H4, 8,3), 5,86 (t, 2H, dppb, 8,3), 5,72 (d, 1H, H5, 5,5)]. Sinais atribuídos no RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade/atribuição)] 179,7 (s, C1), 157,3 (s, C6), 151,4 (s, C15), 147,8 (s, C16), 145,8 (s, C17), 145,2 (s, C5), 137,1 (d, C8), 136,7 (s, C13), 134,3 (s, C2), 128,5 (t, dppb), 128,0 (d, dppb), 127,5 (d, C11), 127,1 (d, C10), 126,7 (d, dppb), 125,4 (s, C7), 125,0 (s, C14), 124,8 (s, C3), 116,6 (s, C4), 64,9 (s, éter), 29,0 (d, dppb alifático), 27,9 (d, dppb alifático), 23,8 (s, dppb alifático), 20,9 (s, dppb alifático), 15,2 (s, éter). Espectro UV/visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 274 (41058), 298 (24382), 400 (7055).

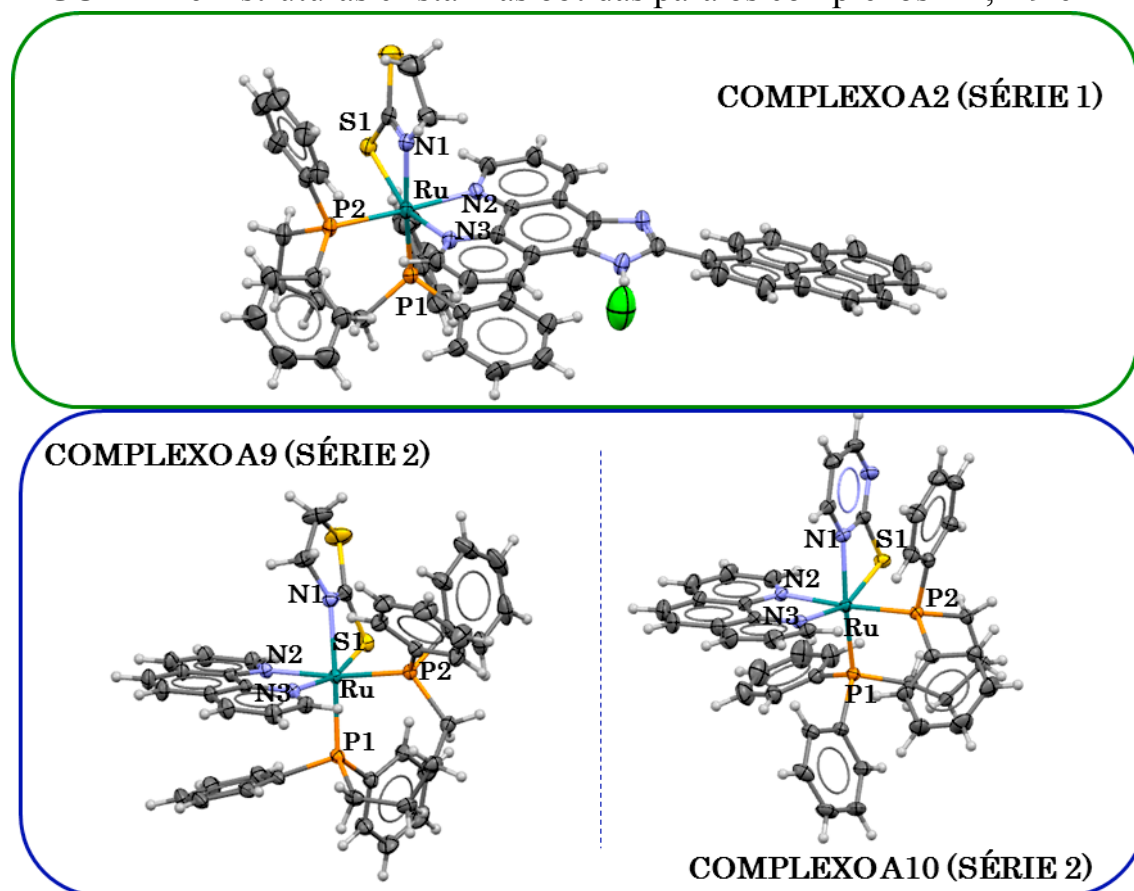
Complexo **A9**: Rendimento 86 mg (69%). Análise elementar (%) Calc. para $\text{C}_{43}\text{H}_{40}\text{F}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{RuS}_2$: C 53,19; H 4,15; N 4,33; S 6,61 Encontrado C 53,09; H 4,06; N 4,27; S 7,10. Condutividade Molar ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, DMSO) 30,0. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade, atribuição, J/Hz)] 45,5 (d, P trans a N_{tzdt} , 34,8), 44,5 (d, P trans a N_{phen} , 33,3). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz)] 9,58 (s, 1H, phen), 9,33 (d, 1H, phen, 5,3), 8,67 (d, 1H, phen, 8,1), 8,61 (d, 1H, phen, 8,2), 8,07 (q, 2H, phen, 8,72 e 8,62), 7,95-7,86 (m, 1H, phen), 7,80 (dd, 1H, phen, 8,3 e 5,1), 7,63 (t, 2H, dppb, 8,4), 7,51 (t, 6H, dppb, 7,1), 7,37 (ddd, 5H, dppb, 29,2 e 13,4 e 7,0), 7,23 (d, 2H, dppb, 7,1), 6,63 (t, 1H, dppb, 7,4), 6,34 (d, 2H, dppb, 7,8), 5,78 (t, 2H, dppb, 8,3), 2,57 (dd, 2H, H3, 19,9; 12,6), 2,46 (1H, H2a), 1,56 (dd, 1H, H2b, 10,7; 9,9). Sinais atribuídos no RMN ^{13}C (DMSO- d_6) [δ /ppm (multiplicidade/atribuição)] 183,0 (s, C1), 158,1 (s, C4), 151,0 (s, C13), 147,9 (s, C14), 146,0 (s, C15), 137,0 (s, C11), 136,8 (s, C16), 125,3 (s, C12), 125,0 (s, C5), 56,0 (s, C2), 30,7 (s, C3), 28,9 (d, dppb alifático), 27,8 (d, dppb alifático), 23,4 (s, dppb alifático), 21,9 (s, dppb

alifático). Espectro UV/visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 275 (33300), 305 (15300), 418 (5250).

Complexo **A10**: Rendimento 92 mg (74%). Análise Elementar (%) Calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{39}\text{F}_6\text{N}_4\text{P}_3\text{RuS}$: C 54,83; H 4,08; N 5,81; S 3,33 Encontrado C 54,90; H 4,13; N 5,85; S 3,46. Condutividade Molar ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, DMSO) 30,4. RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, atribuição, J/Hz)] 44,5 (d, P trans a N_{pySm} , 36,9), 41,4 (d, P trans a N_{phen} , 36,9). RMN ^1H (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade, integral, atribuição, J/Hz)] 9,53 (triplete aparente, 2H, H5/H14, 5,2), 8,69 (d, 1H, H7, 8,2), 8,45 (d, 1H, H12, 8,1), 8,05/7,97 (d/d, 1H/1H, H9/H10, 8,8/8,9), 7,92 (dd, 1H, H6, 8,2 e 5,3), 7,88 (dd, 1H, H4, 4,9 e 2,3), 7,72 (dd, 1H, H13, 8,1 e 5,3), 7,47 (m, 5H, dppb), 7,41 (t, 2H, dppb, 8,6), 7,32 (t, 1H, dppb, 7,5), 7,20 (m, 5H, dppb), 7,04 (t, 2H, dppb, 6,7), 6,70 (t, 1H, dppb, 7,5), 6,39 (t, 2H, dppb, 6,8), 6,10 (m, 1H, H2), 5,93 (t, 1H, H3, 5,2), 5,84 (t, 2H, dppb, 8,4), 3,23 (m, 2H, dppb alifático), 2,62 (d, 2H, dppb alifático, 7,7), 1,59 (m, 4H, dppb alifático). Sinais atribuídos no RMN ^{13}C (DMSO- d_6) [δ/ppm (multiplicidade/atribuição)] 186,0 (s, C1), 157,6 (s, C5), 156,2 (s, C4), 153,5 (s, C2), 152,0 (s, C14), 148,2 (s, C16), 146,1 (s, C15), 137,7 (s, C7), 137,3 (s, C12), 133,1 (d, dppb), 132,6 (d, dppb), 130,9 (s, dppb), 130,4 (s, dppb), 130,1 (s, dppb), 129,5 (s, dppb), 129,0 (m, dppb), 128,7 (d, dppb), 128,0-127,8 (m, C9/C10), 127,3 (s, dppb), 127,2 (s, dppb), 125,9 (s, C6), 125,5 (s, C13), 115,0 (s, C3), 29,3 (d, dppb alifático), 28,2 (d, dppb alifático), 24,1 (s, dppb alifático), 21,1 (s, dppb alifático). Espectro UV/Visível [DMSO; $\lambda_{\text{máx}}/\text{nm}$ ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 272 (25417), 300 (12811), 340 (6587), 398 (4350).

Difração de Raios X

FIGURA A6-Estruturas cristalinas obtidas para os complexos A2, A9 e A10



Dados Cristalográficos

TABELA A2- Principais parâmetros cristalográficos das estruturas obtidas para os complexos [Ru(pyS)(dppb)(pyphen)]Cl (**A1**), [Ru(tzdt)(dppb)(pyphen)]Cl (**A2**), e [Ru(pyS)(dppb)(pyphen)]₂(PF₆)(Cl) (**A4**)

Composto	A1	A2	A4
Fórmula Empírica	C ₆₂ H ₄₈ ClN ₅ P ₂ RuS	C ₆₀ H ₄₈ ClN ₅ P ₂ RuS ₂	C ₆₂ H ₄₈ Cl _{0,5} F ₃ N ₅ P _{2,5} RuS
Massa Molecular relacionada	1093,637	1101,61	1148,393
Temperatura/K	298	293(2)	N/A
Comprimento de onda	0,71073 Å	0,71073 Å	0,71073 Å
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n	P-1
Dimensões célula unitária	a= 13,1045(9) Å α= 90° b= 20,3919(15) Å β= 96,486(7)° c= 20,9762(17) Å γ= 90°	a= 12,5576(4) Å α= 90° b= 21,9105(9) Å β= 93,797(3)° c= 20,3760(8) Å γ= 90°	a= 15,6852(16) Å α= 87,782(7)° b= 16,2497(14) Å β= 82,607(8)° c= 27,340(3) Å γ= 66,489(9)°
Volume	5569,5(7) Å ³	5594,0(4) Å ³	6336,3(11)
Z	4	4	4
Densidade (Calculada)	1,304 g/cm ³	1,308 g/cm ³	1,204 g/cm ³
Coefficiente de absorção	0,468 mm ⁻¹	0,502 mm ⁻¹	0,412 mm ⁻¹
F(000)	2245,7	2264,0	2349,8
Tamanho do cristal	0,221×0,112×0,01 mm ³	0,218×0,139×0,131 mm ³	0,355×0,264×0,125
Faixa Theta para coleta de dados	5,12 a 51,5°	4,94 a 51,36°	5,02 a 51,5
Intervalo de índice	-20≤h≤19, -30≤k≤29, -33≤l≤28	-15≤h≤15, -26≤k≤26, -24≤l≤24	-22≤h≤23, -21≤k≤24, -43≤l≤41
Reflexões coletadas	74410	51636	78429
Reflexões independentes	10634 [R _{int} = 0,1373, R _{sigma} = 0,2246]	10613 [R _{int} = 0,0595, R _{sigma} = 0,0437]	24171 [R _{int} = 0,1920, R _{sigma} = 0,4682]
Dados/restrições/parâmetros	10634/0/649	10613/0/649	24171/1382/1363
Goodness-of-fit on F ²	1,046	1,055	1,092
Índices R Final [I>2sigma(I)]	R ₁ =0,0627, wR ₂ = 0,1365	R ₁ =0,0542, wR ₂ = 0,1260	R ₁ =0,1284, wR ₂ = 0,3021
Índices R(todos os dados)	R ₁ = 0,1154, wR ₂ = 0,1757	R ₁ = 0,0800, wR ₂ = 0,1478	R ₁ = 0,2485, wR ₂ = 0,4176
Largest diff. Peak/ hole Å ⁻³	1,08/-0,83	0,71/-0,70	4,99/-2,05

TABELA A3- Principais parâmetros cristalográficos das estruturas obtidas para os complexos [Ru(pyS)(dppb)(phen)]PF₆ (**A8**), [Ru(tzdt)(dppb)(phen)]PF₆ (**A9**), e [Ru(pySm)(dppb)(phen)]PF₆ (**A10**)

Composto	A8	A9	A10
Fórmula Empírica	C ₄₅ H ₄₀ N ₃ P ₂ RuS	C ₄₃ H ₄₀ F ₆ N ₃ P ₃ RuS ₂	C ₄₄ H ₃₉ F ₆ N ₄ P ₃ RuS
Massa Molecular relacionada	817,918	970,926	963,870
Temperatura/K	298	298	298
Comprimento de onda	0,71073 Å	0,71073 Å	0,71073 Å
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	I2/a	P2 ₁ /n
Dimensões célula unitária	a= 14,7179(13) Å α= 90° b= 15,0205(12) Å β= 104,243(8)° c= 19,6236(15) Å γ= 90°	a= 21,9940(13) Å α= 90° b= 13,6832(7) Å β= 93,847(3)° c= 28,5408(17) Å γ= 90°	a= 14,5615(7) Å α= 90° b= 15,3286(6) Å β= 103,173(5)° c= 19,2869(10) Å γ= 90°
Volume	4204,8(6) Å ³	8570,0(8) Å ³	4191,7(4)
Z	4	8	4
Densidade (Calculada)	1,292 g/cm ³	1,505 g/cm ³	1,527 g/cm ³
Coeficiente de absorção	0,532 mm ⁻¹	0,637 mm ⁻¹	0,603 mm ⁻¹
F(000)	1680,9	3948,3	2349,8
Tamanho do cristal	0,135×0,095×0,76 mm ³	0,242×0,178×0,045 mm ³	0,237×0,144×0,139
Faixa Theta para coleta de dados	5,06 a 51,5°	4,84 a 51,5°	5,08 a 54
Intervalo de índice	-23≤h≤21, -21≤k≤23, -26≤l≤31	-34≤h≤33, -21≤k≤21, -45≤l≤44	-23≤h≤9, -22≤k≤23, -29≤l≤26
Reflexões coletadas	65542	109573	36366
Reflexões independentes	8025 [R _{int} = 0,2046, R _{sigma} = 0,2782]	8193 [R _{int} = 0,1010, R _{sigma} = 0,0976]	9068 [R _{int} = 0,0491, R _{sigma} = 0,0940]
Dados/restrições/parâmetros	8025/0/494	8193/0/548	9068/0/557
Goodness-of-fit on F ²	1,114	1,053	1,070
Índices R Final [I>2sigma(I)]	R ₁ =0,0662, wR ₂ = 0,1529	R ₁ =0,0359, wR ₂ = 0,0798	R ₁ =0,0430, wR ₂ = 0,0931
Índices R(todos os dados)	R ₁ = 0,1307, wR ₂ = 0,2160	R ₁ = 0,0559, wR ₂ = 0,0930	R ₁ = 0,0672, wR ₂ = 0,1121
Coeficiente de extinção			
Largest diff. Peak/ hole Å ⁻³	2,16/-1,19	0,91/-0,47	0,92/-0,57

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

FIGURA A7- Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C do ligante 2-mercaptopiridina (pyS) em DMSO-d_6

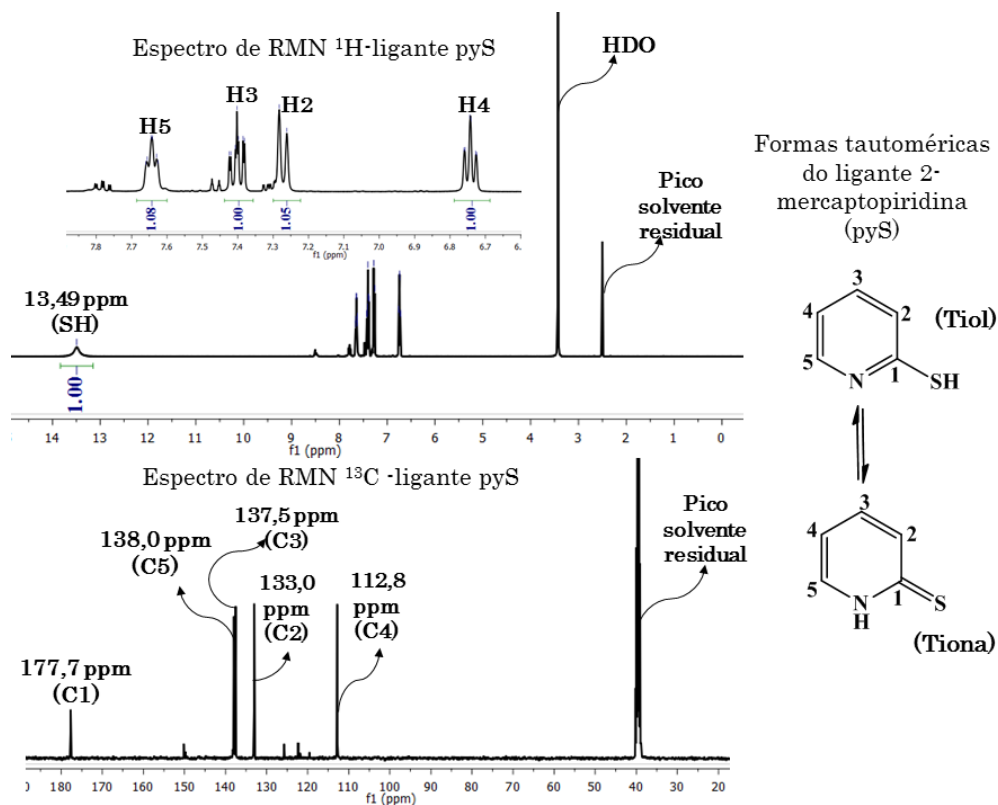


FIGURA A8- Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C do ligante 2-mercaptotiazolina (tzdt) em DMSO-d_6

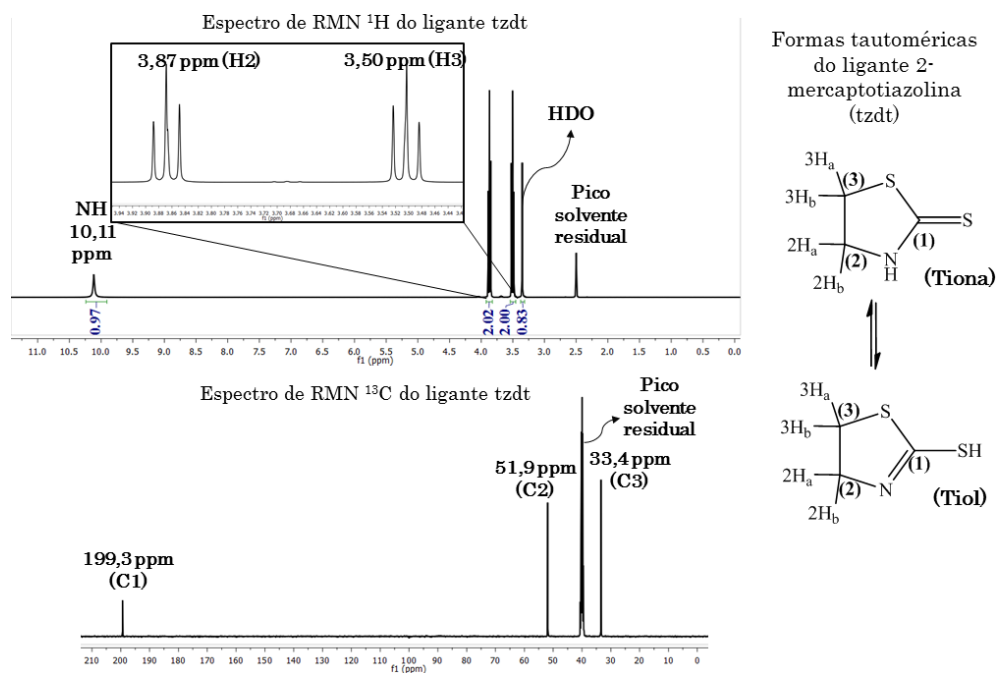


FIGURA A9- Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C do ligante 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (damp) em DMSO-d_6

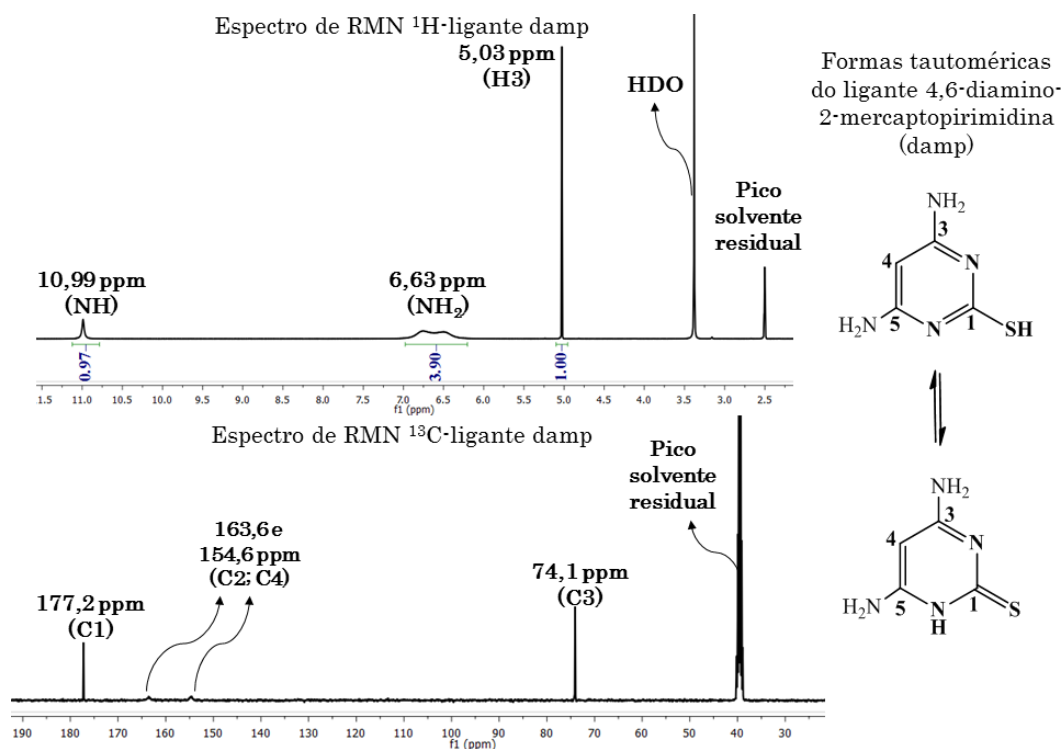


FIGURA A10- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo A1 em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática

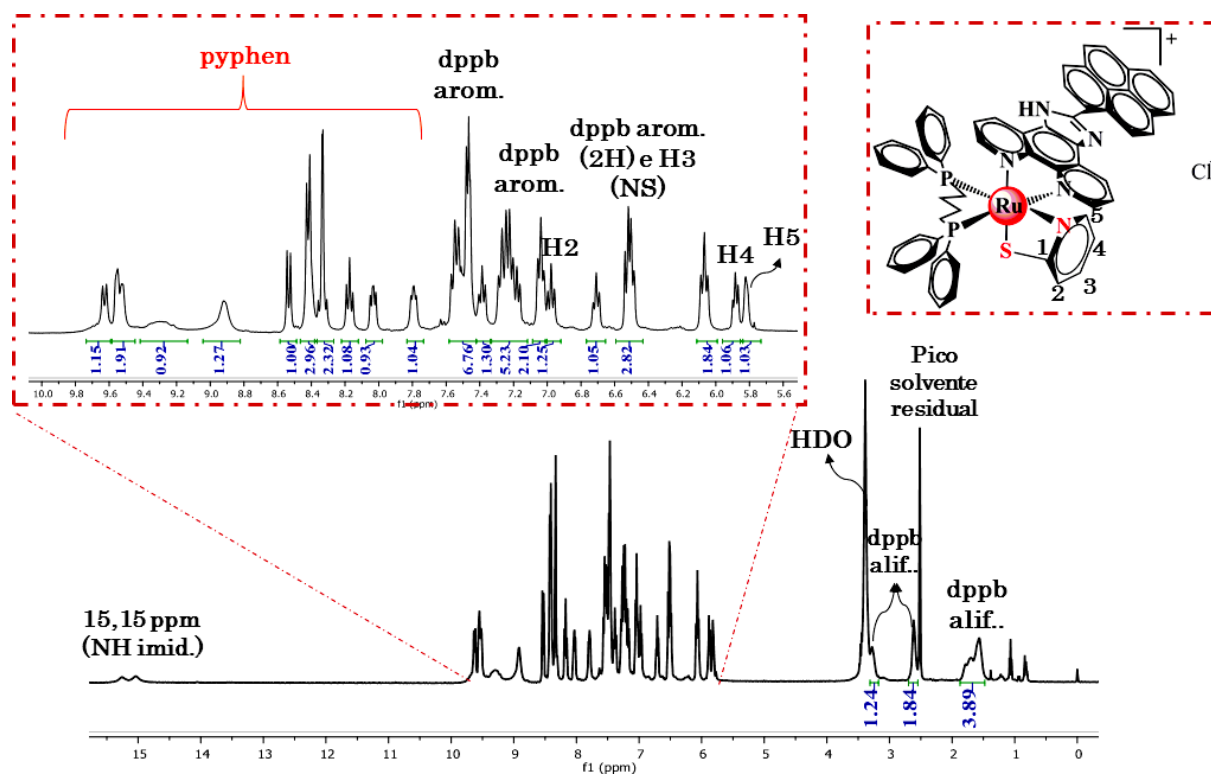


FIGURA A11- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A1** em DMSO-d_6

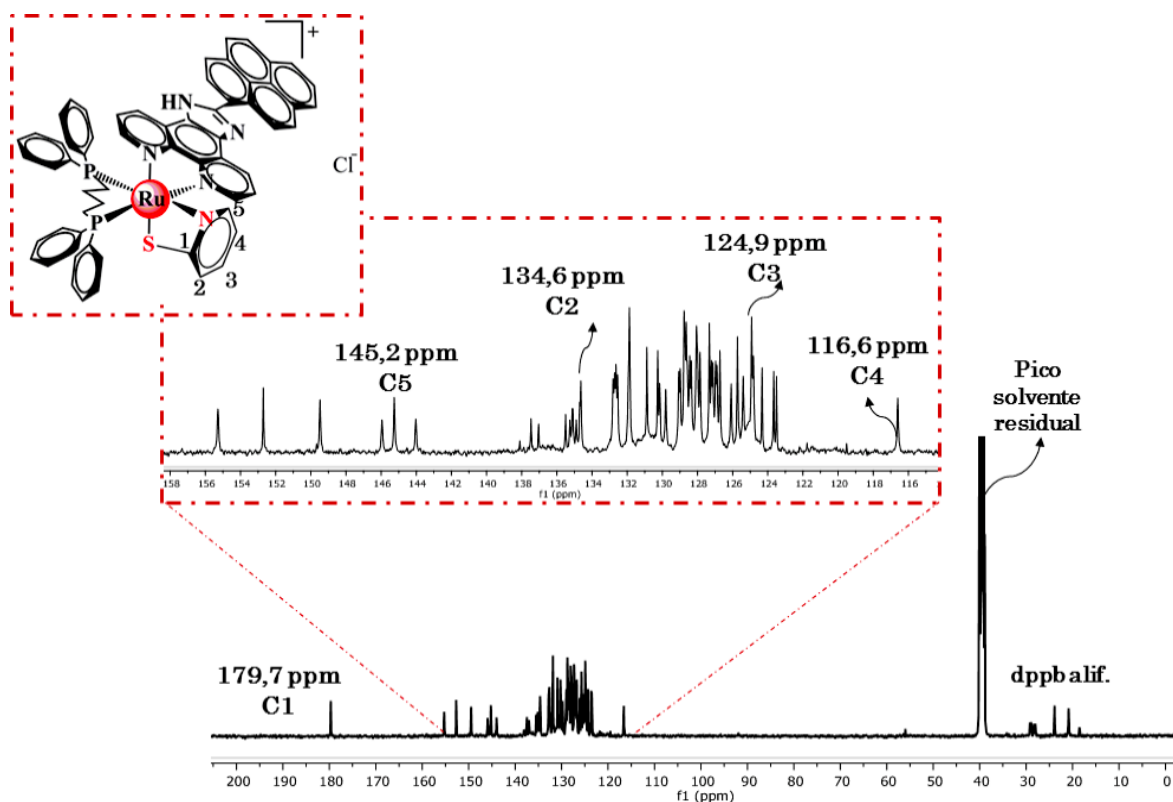


FIGURA A12- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo **A2** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática e alifática

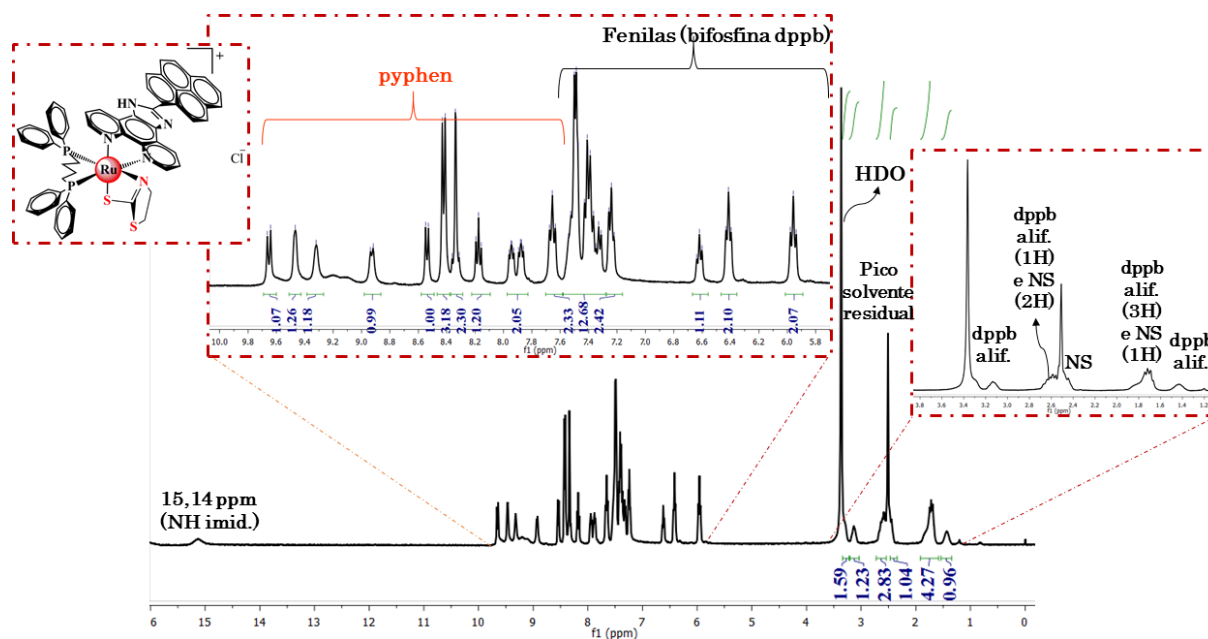


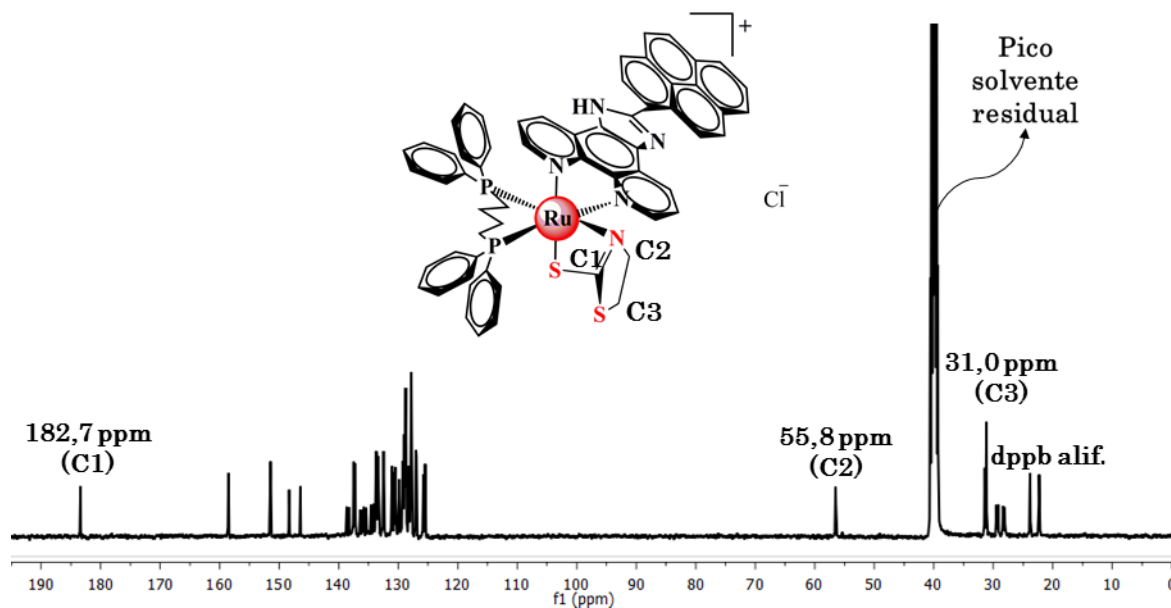
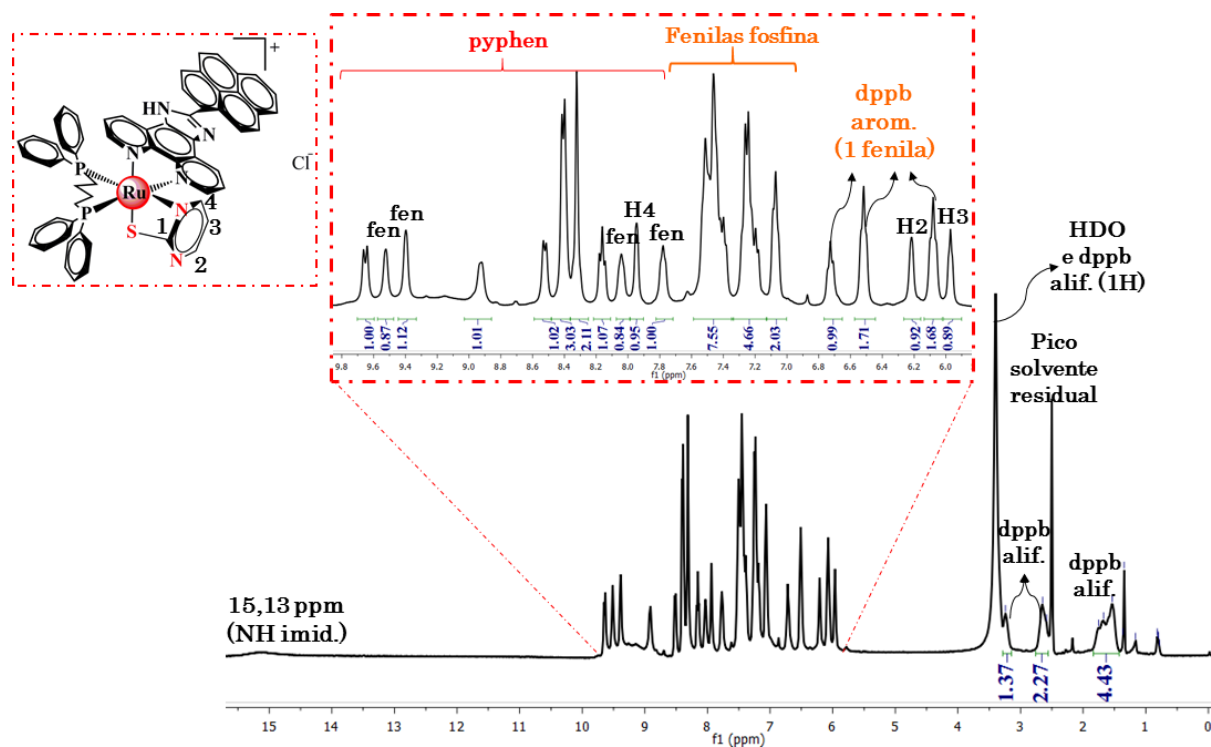
FIGURA A13- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A2** em DMSO-d_6 FIGURA A14- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo **A3** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática

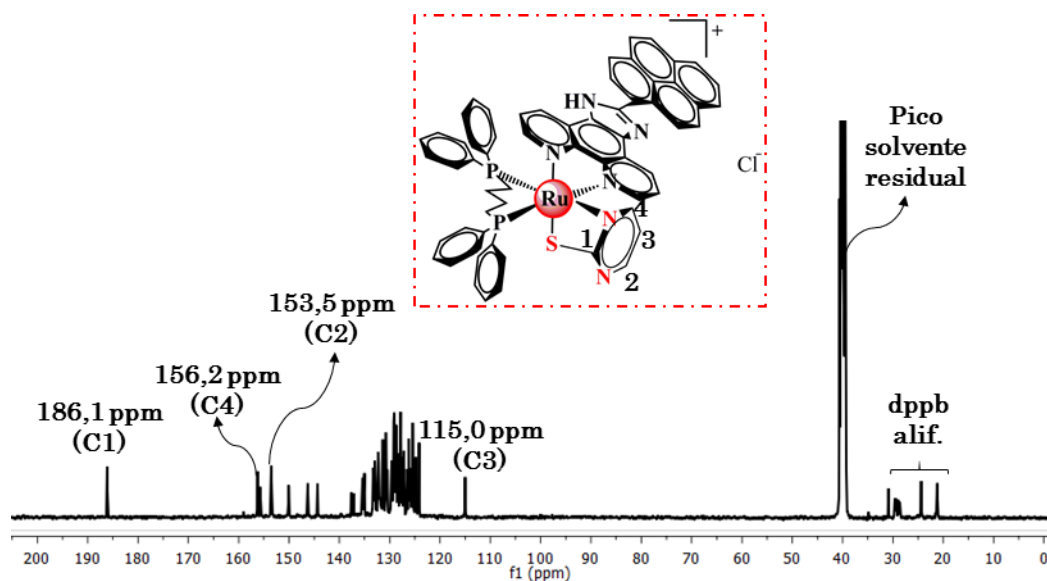
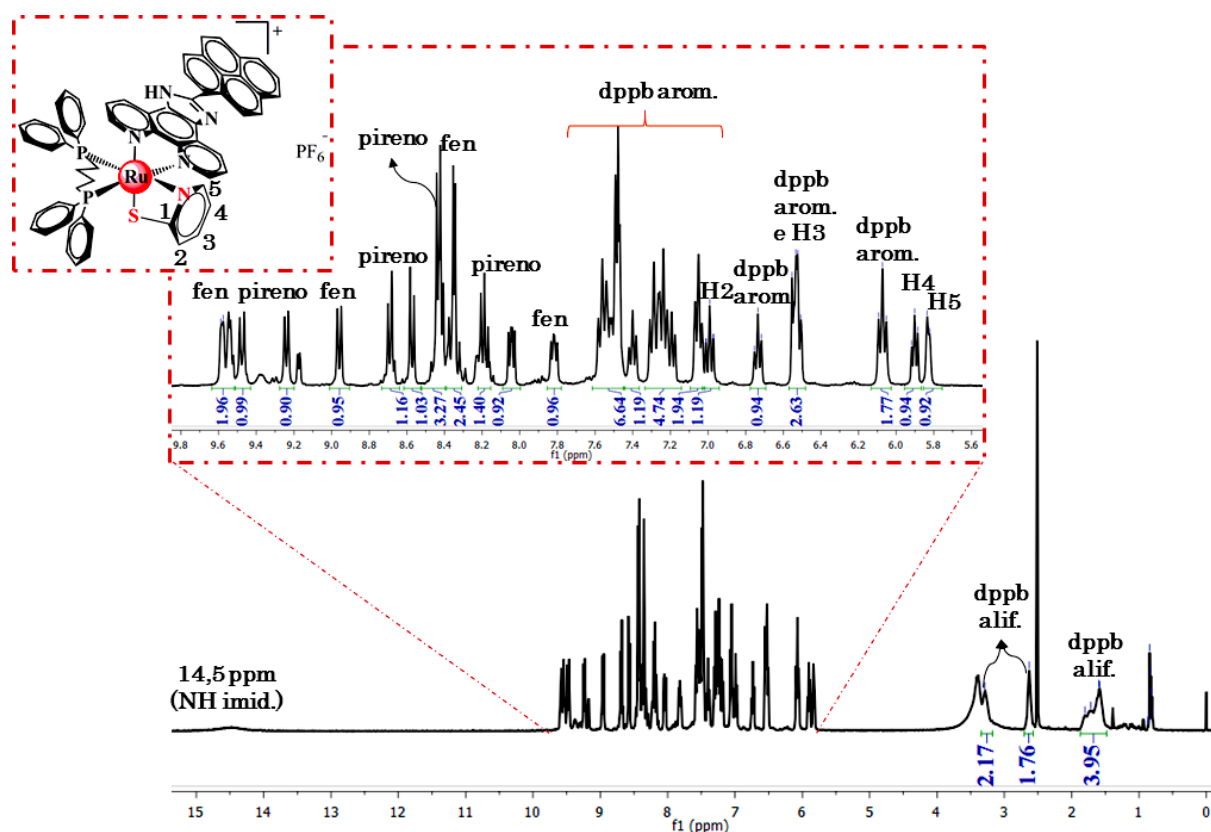
FIGURA A15- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A3** em DMSO-d_6 FIGURA A16- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo **A4** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática

FIGURA A17- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A4** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática

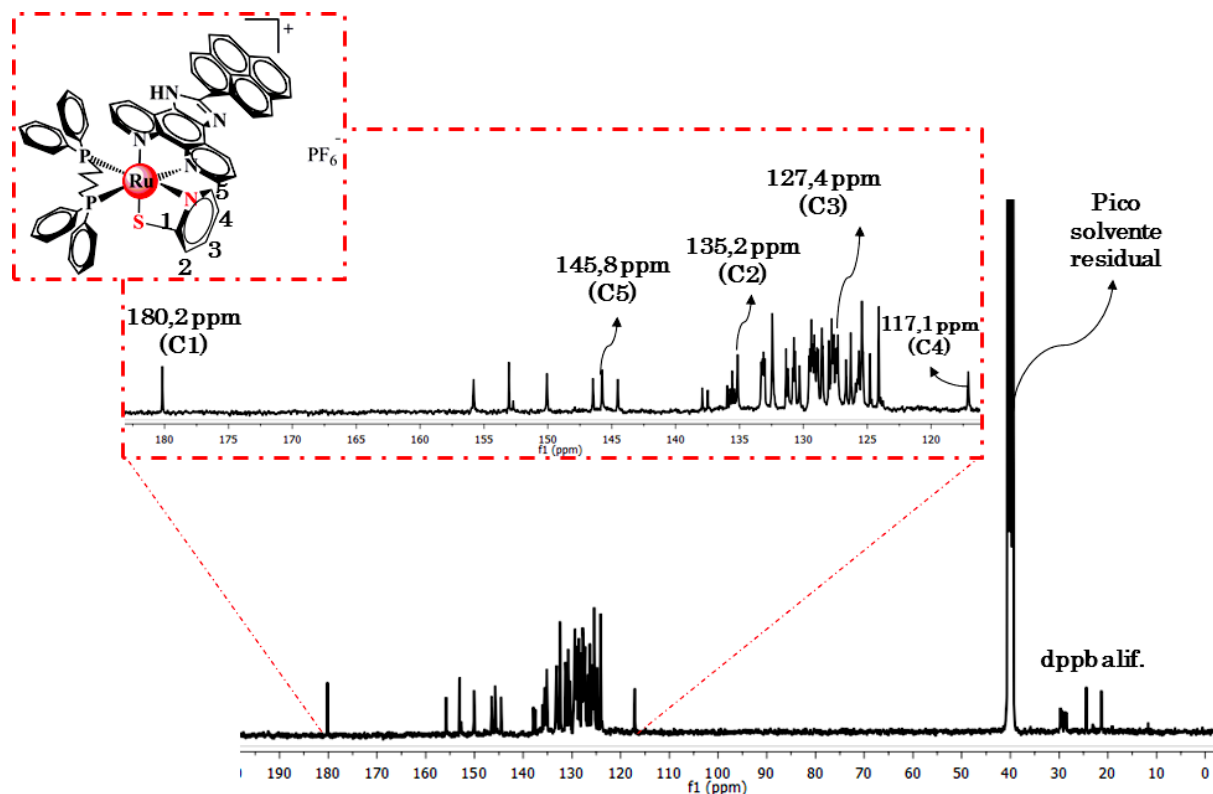


FIGURA A18- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo **A5** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática e alifática

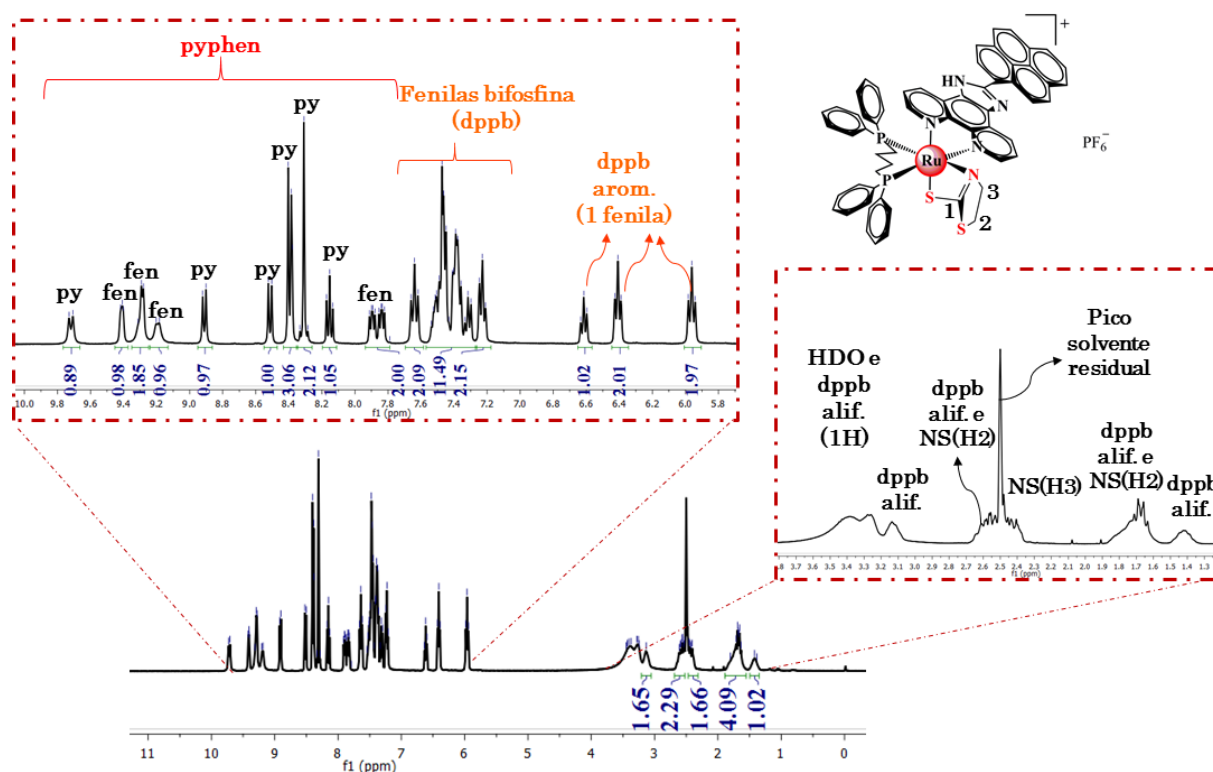


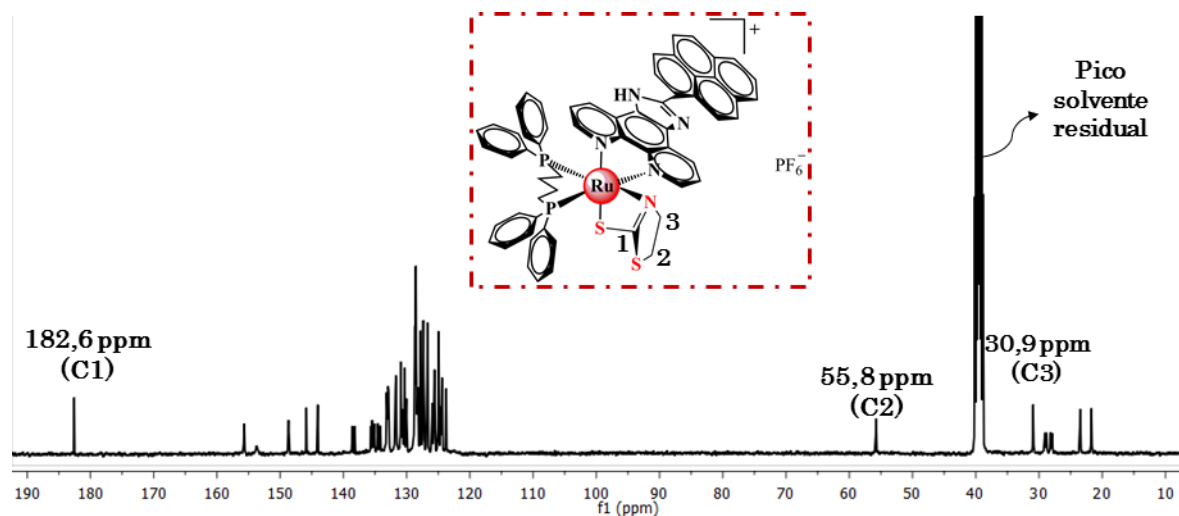
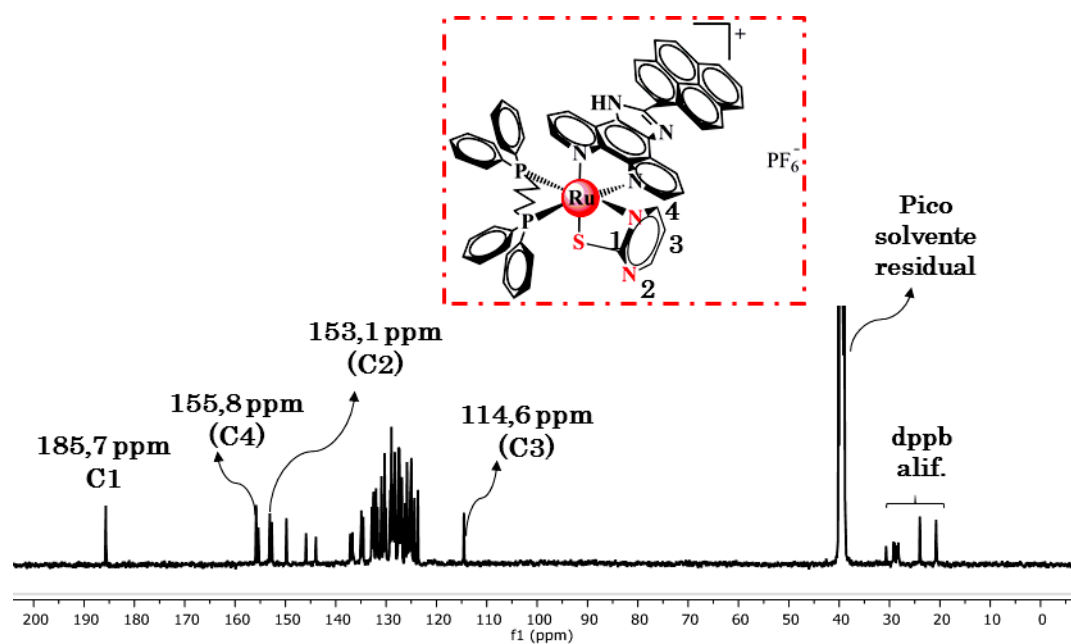
FIGURA A19- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A5** em DMSO-d_6 FIGURA A20- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A6** em DMSO-d_6 

FIGURA A21- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo A7 em DMSO- d_6 , com ampliação da região aromática

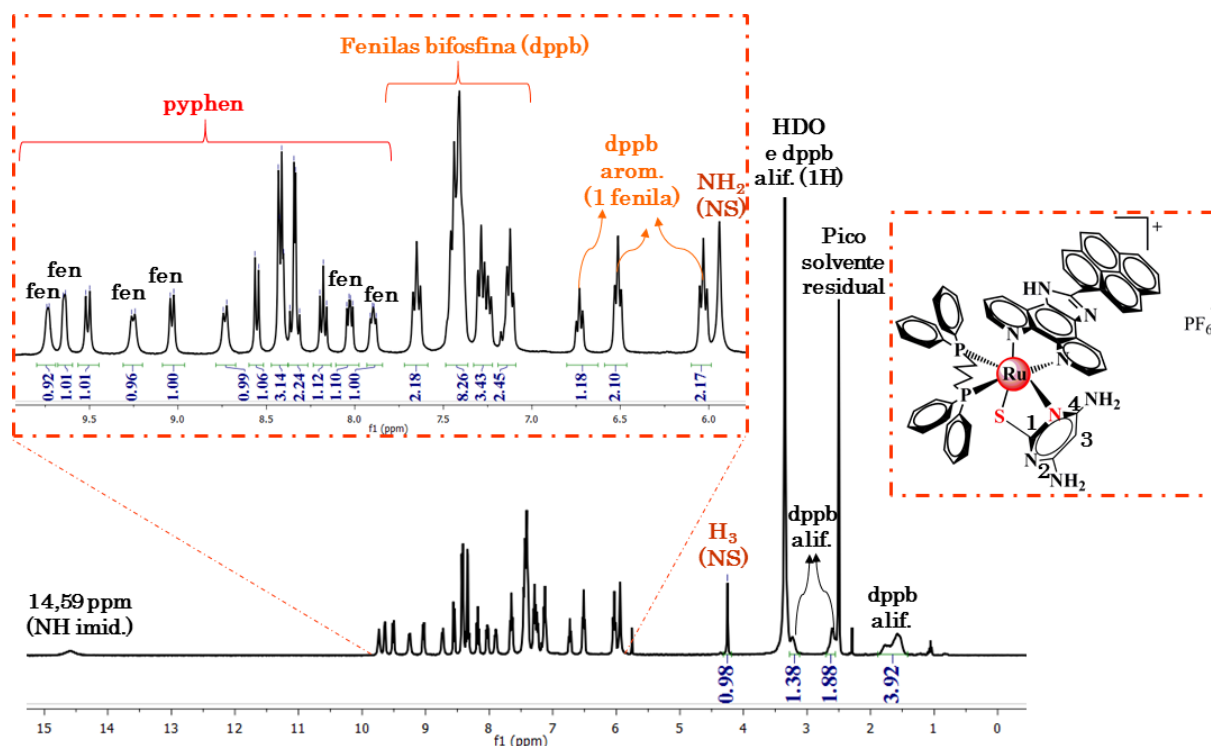


FIGURA A22- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo A7 em DMSO- d_6

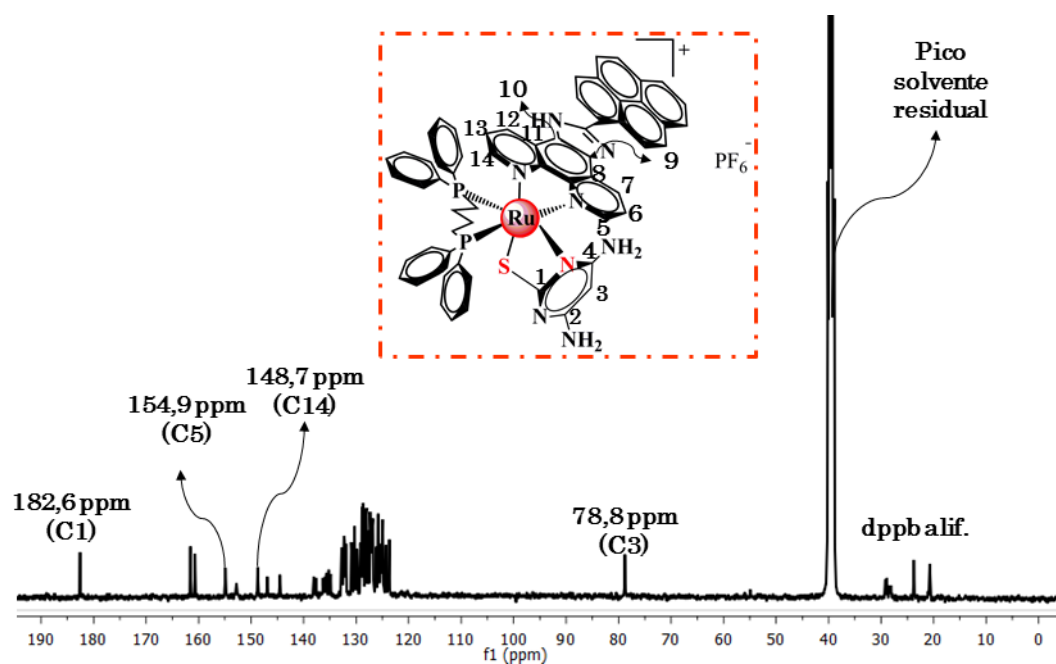


FIGURA A23- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo **A8** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática

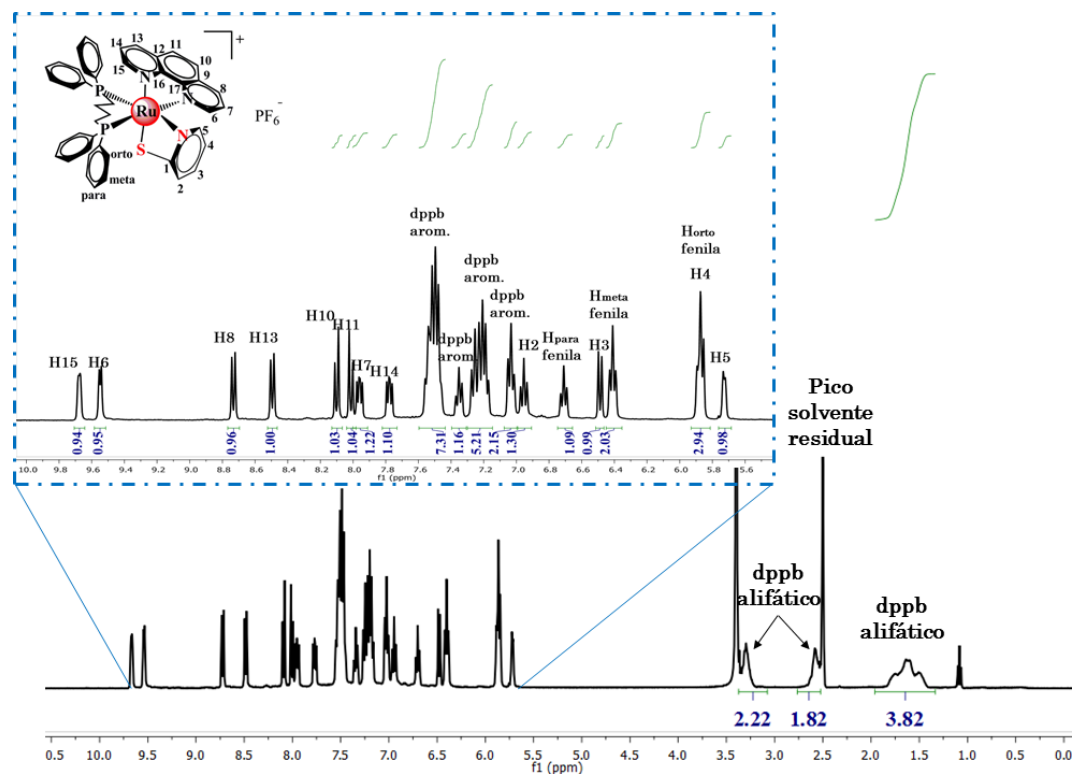


FIGURA A24- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A8** em DMSO-d_6 , com ampliação

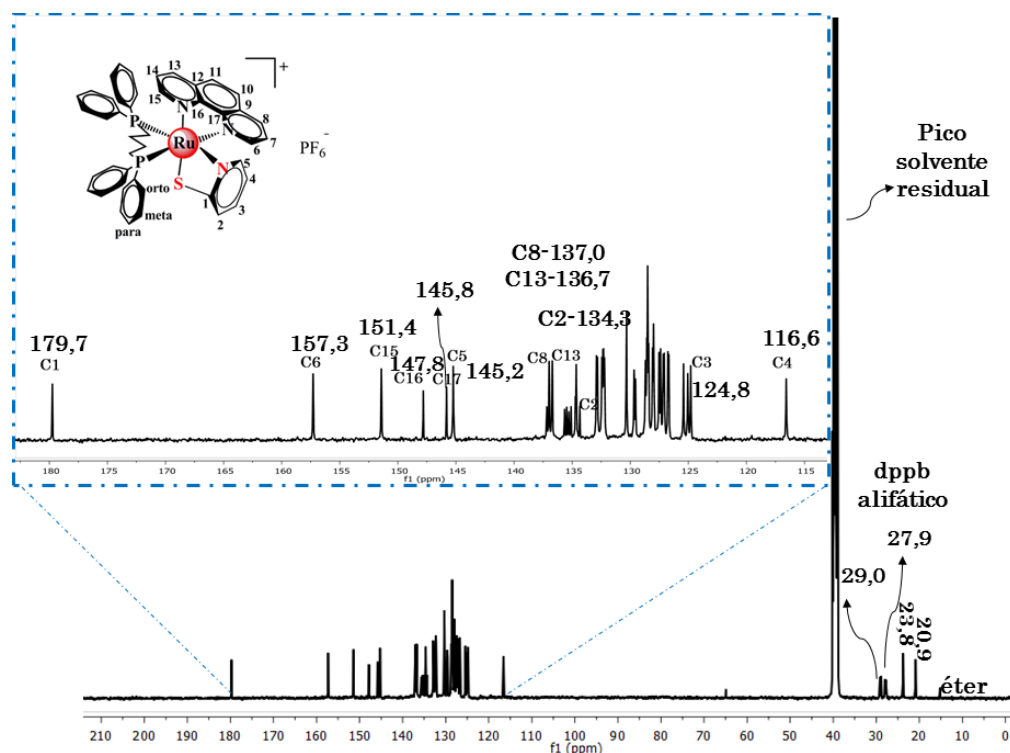


FIGURA A25- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do complexo **A9** em DMSO-d_6 , com ampliação da região aromática

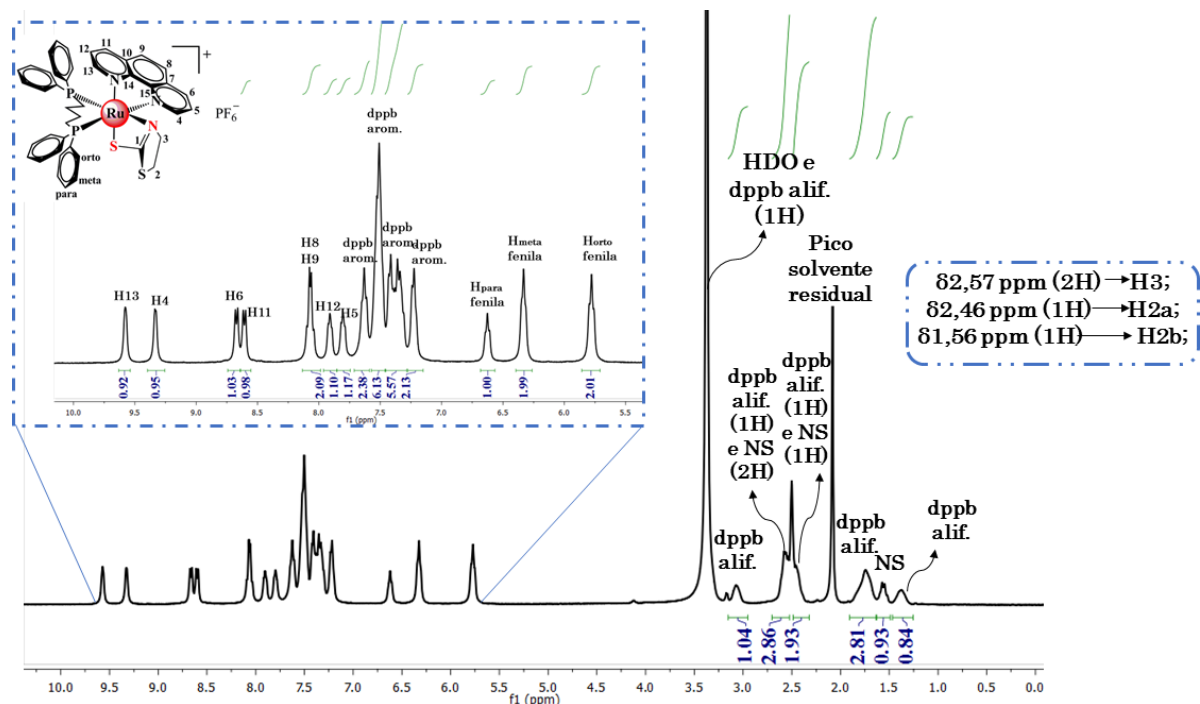


FIGURA A26- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A9** em DMSO-d_6 , com ampliação

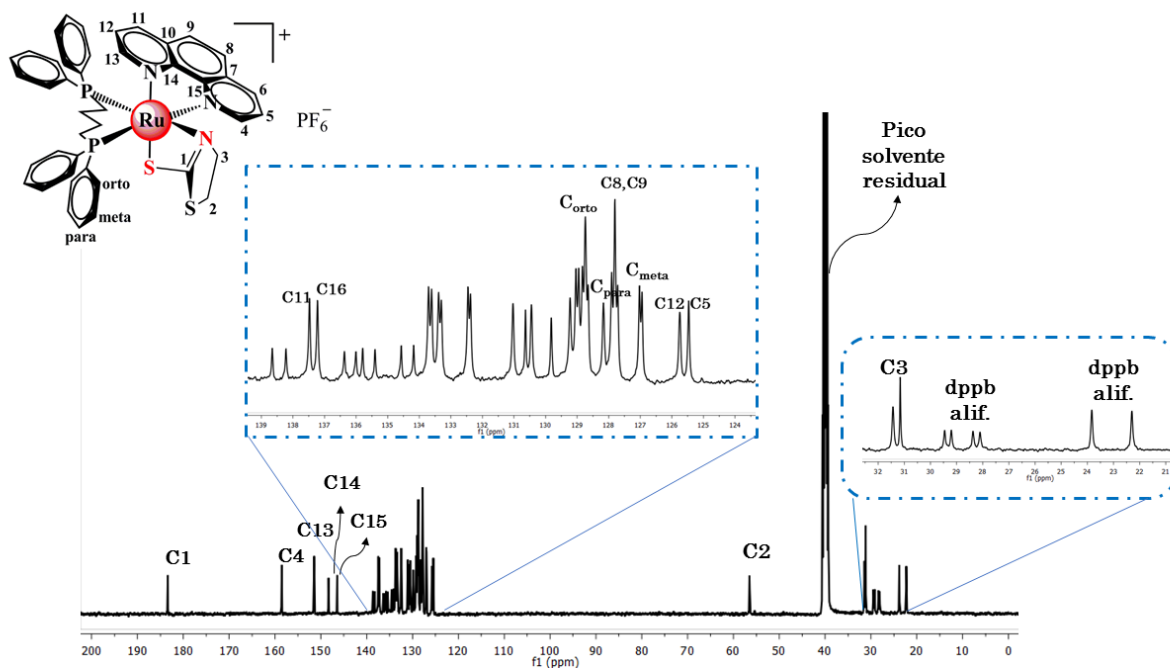
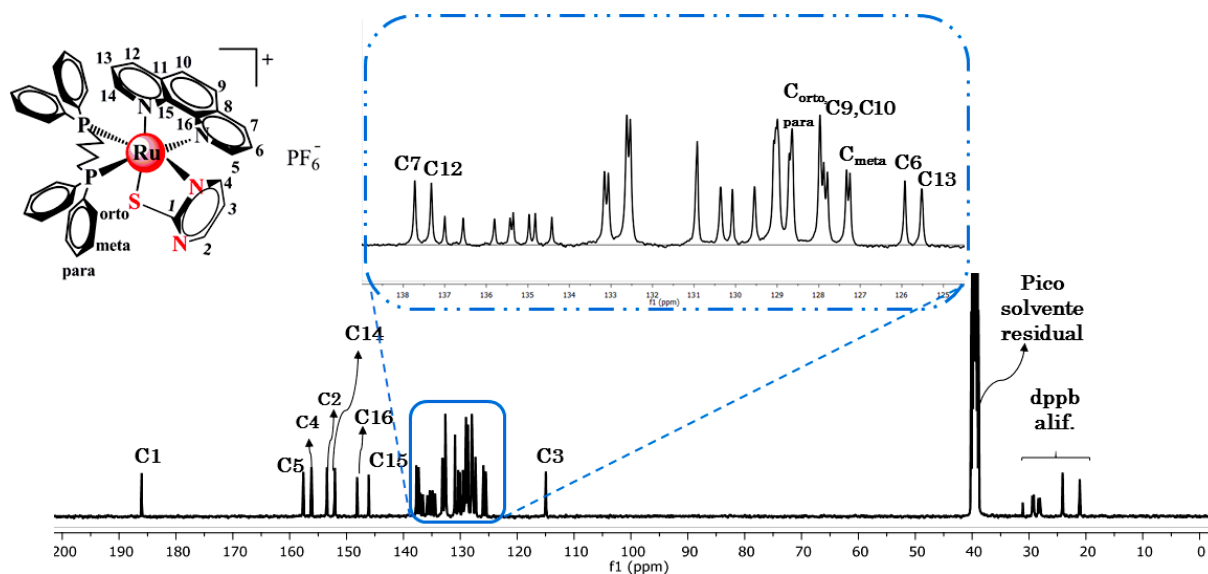


FIGURA A27- Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do complexo **A10** em DMSO-d_6 , com ampliação



Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

FIGURA A28- Espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível para os complexos da Série 2, em dimetilsulfóxido

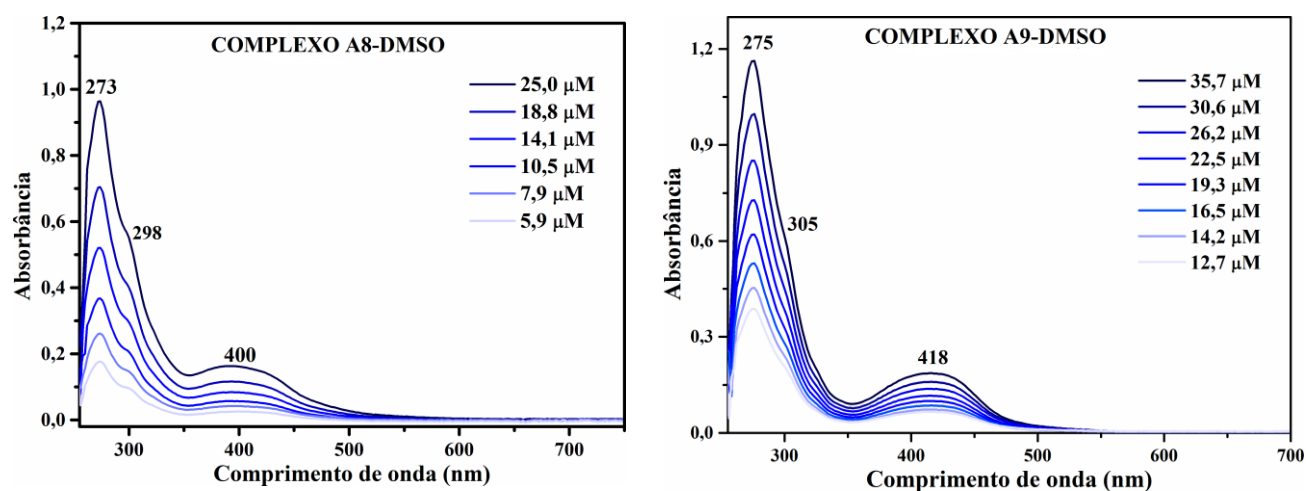


FIGURA A29- Espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível para os complexos da Série 1, em dimetilsulfóxido

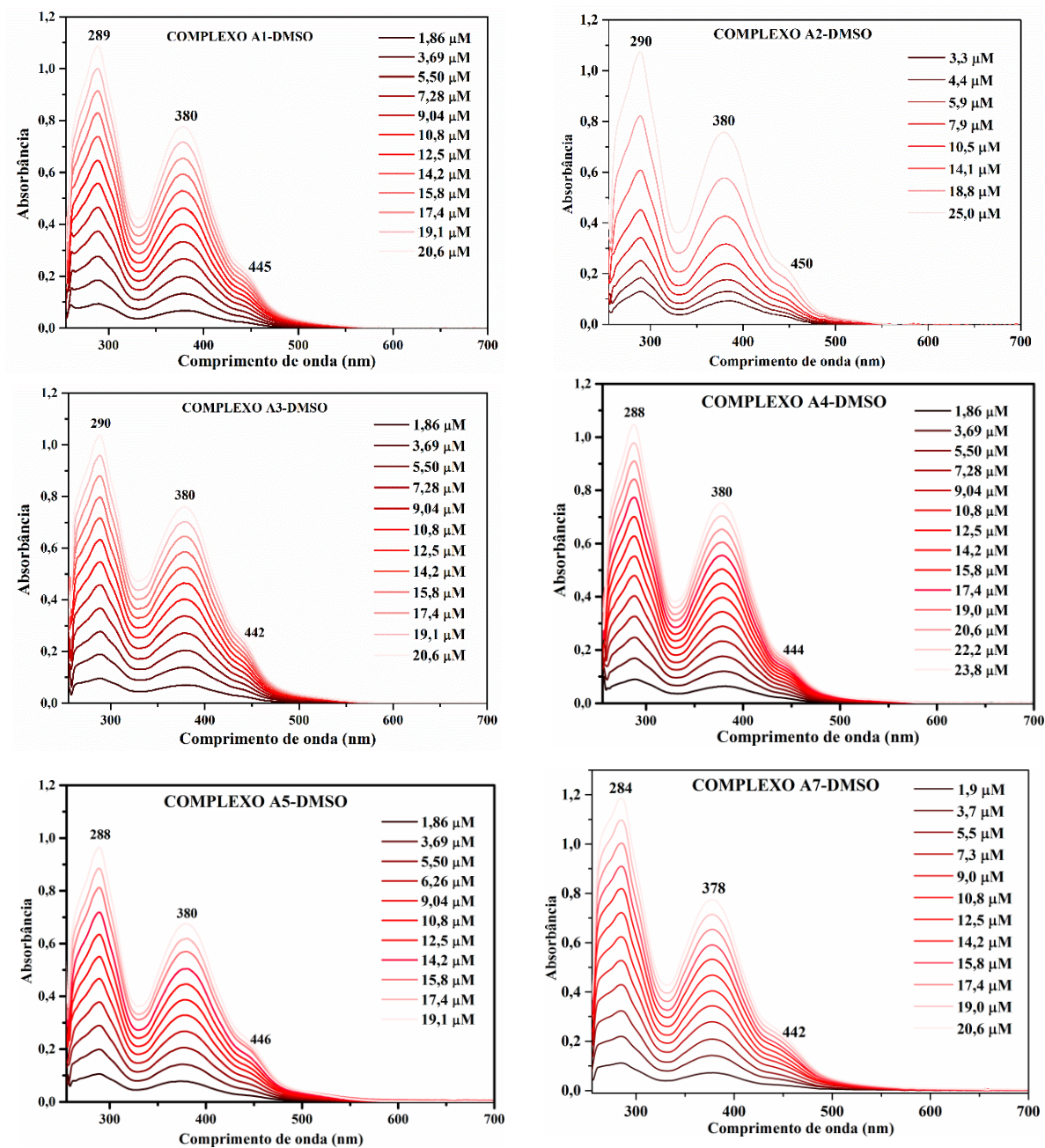
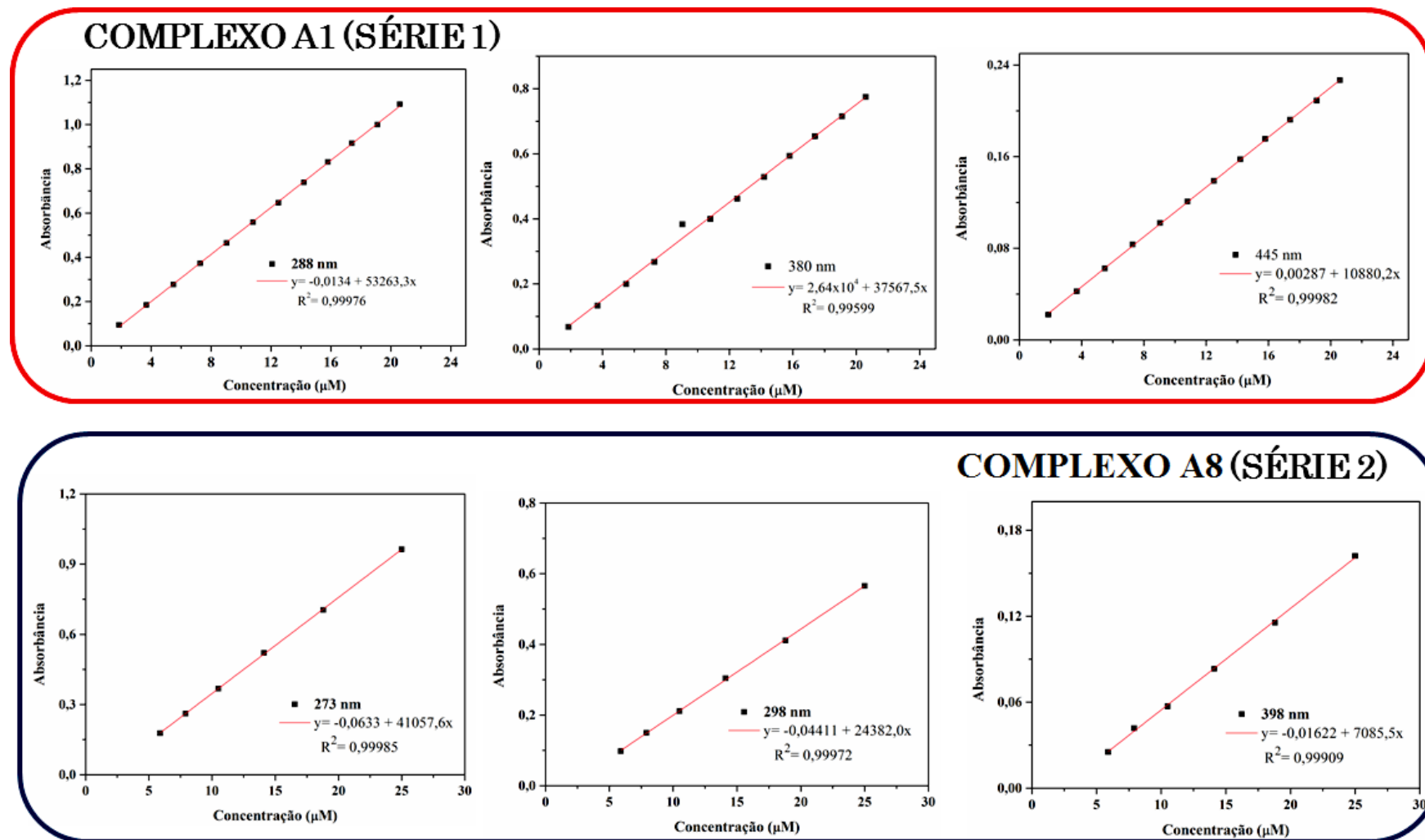


FIGURA A30- Curvas de Regressão Linear obtidos a partir da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, nos três comprimentos de onda de máxima absorção para os complexos A1 (Série 1) e A8 (Série 2)



Espectroscopia de fluorescência

FIGURA A31- Espectro de emissão na região de 390-550 nm do complexo **A2**, em dimetilsulfóxido

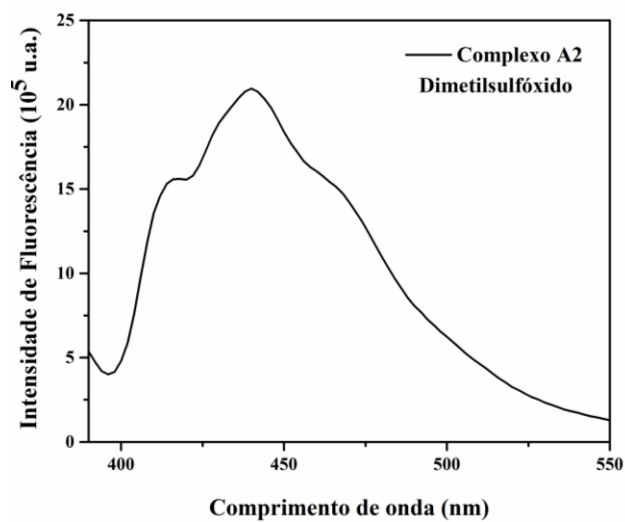


FIGURA A32- Espectro de emissão na região de 390-550 nm do complexo **A5**, em dimetilsulfóxido

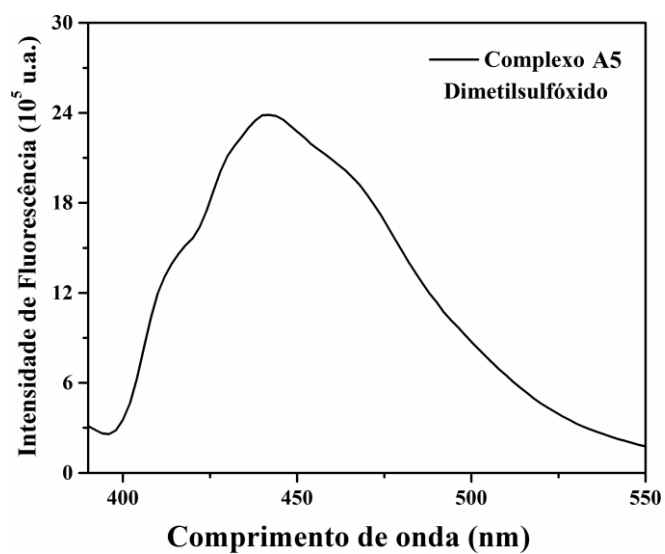


FIGURA A33- Espectro de emissão na região de 390-550 nm do complexo **A6**, em dimetilsulfóxido

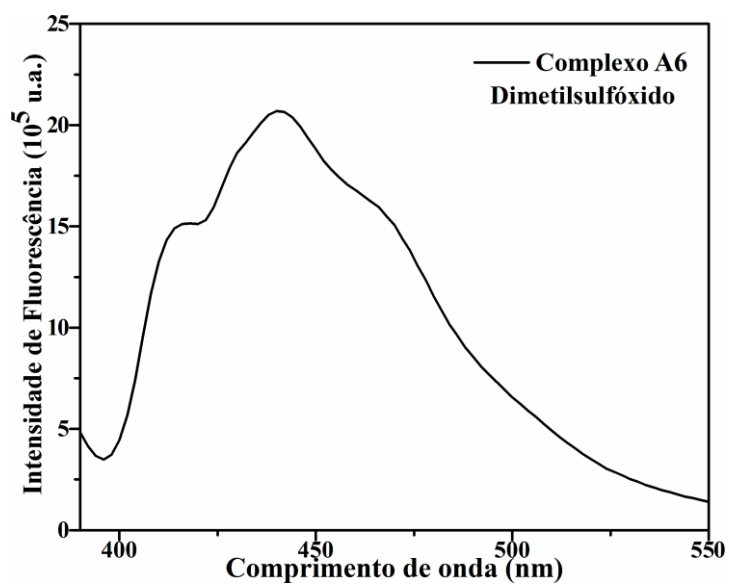
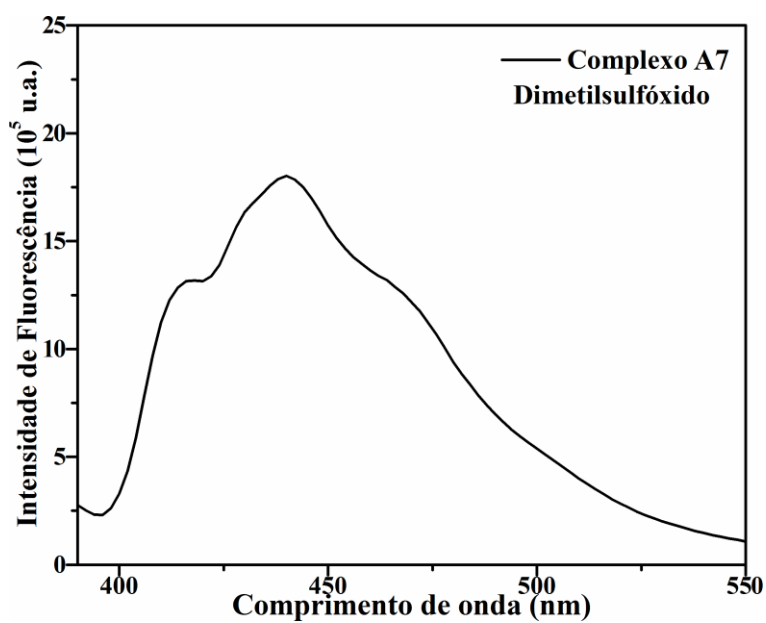


FIGURA A34- Espectro de emissão na região de 390-550 nm do complexo **A7**, em dimetilsulfóxido



Espectroscopia de absorção na região do infravermelho**SÉRIE 1**

FIGURA A35- Espectro de absorção na região do IV do complexo A1

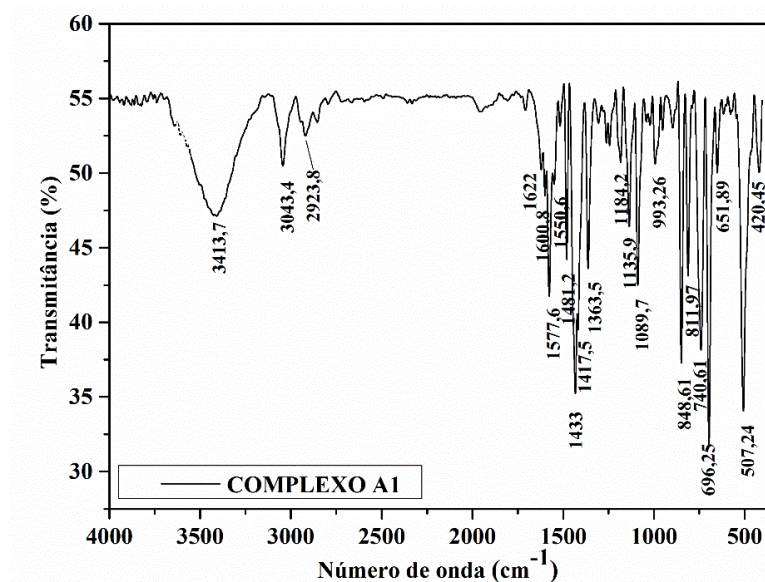


FIGURA A36- Espectro de absorção na região do IV para o complexo A2

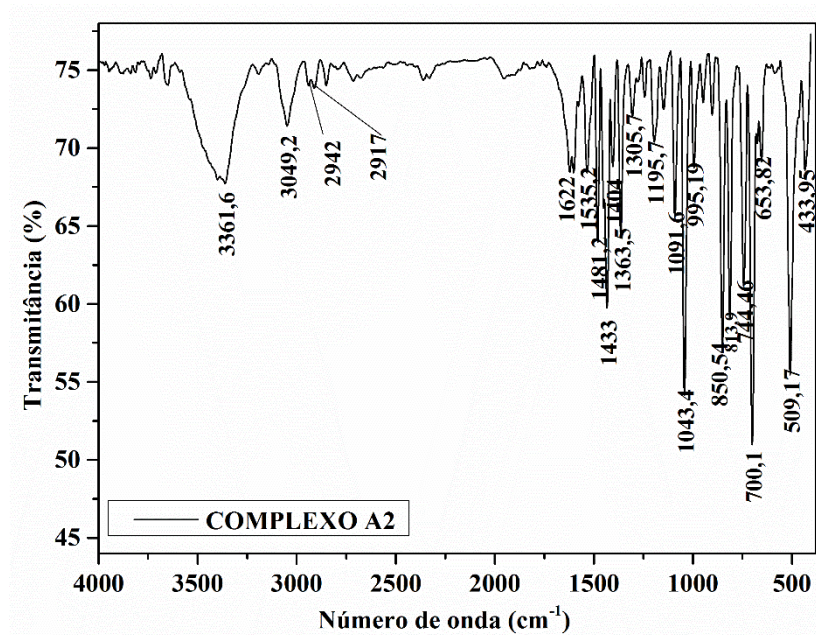


FIGURA A37- Espectro de absorção na região do IV para o complexo A3

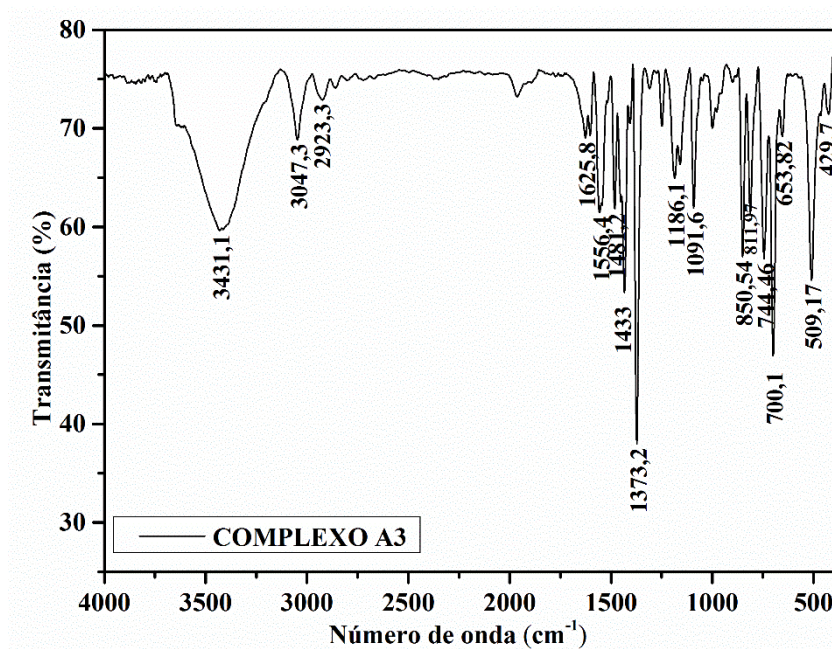


FIGURA A38- Espectro de absorção na região do IV para o complexo A4

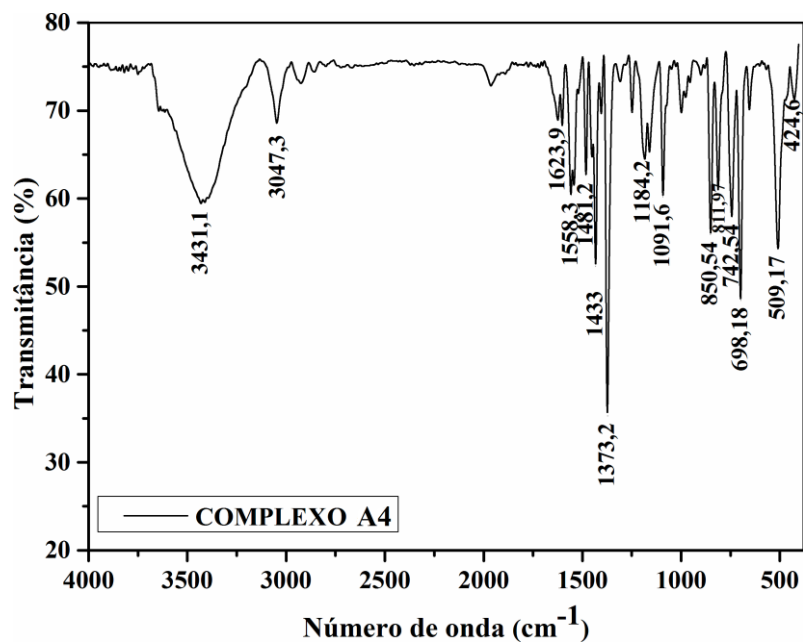


FIGURA A39- Espectro de absorção na região do IV para o complexo A5

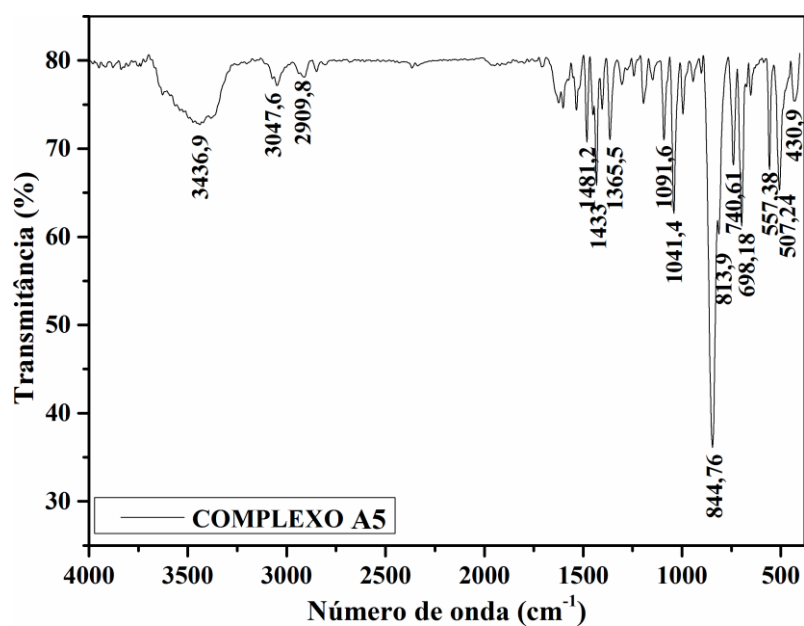
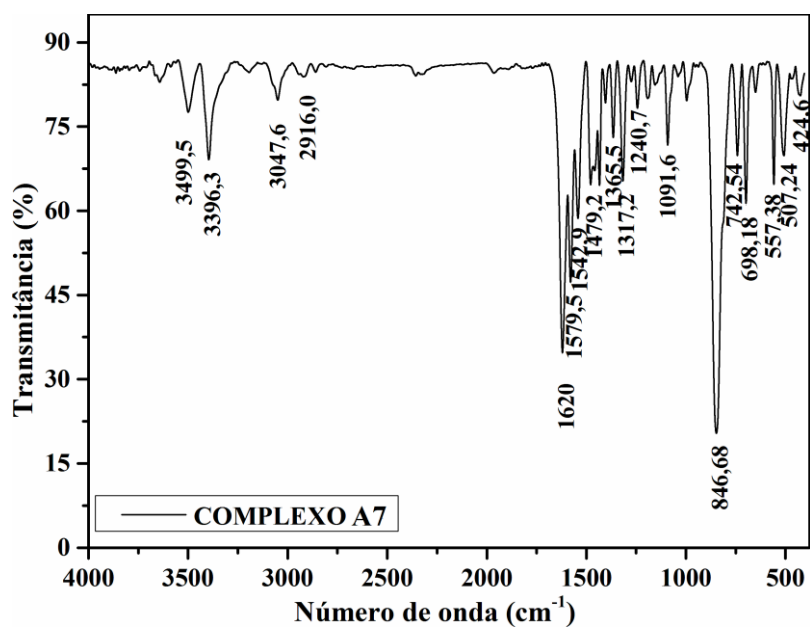


FIGURA A40- Espectro de absorção na região do IV para o complexo A7



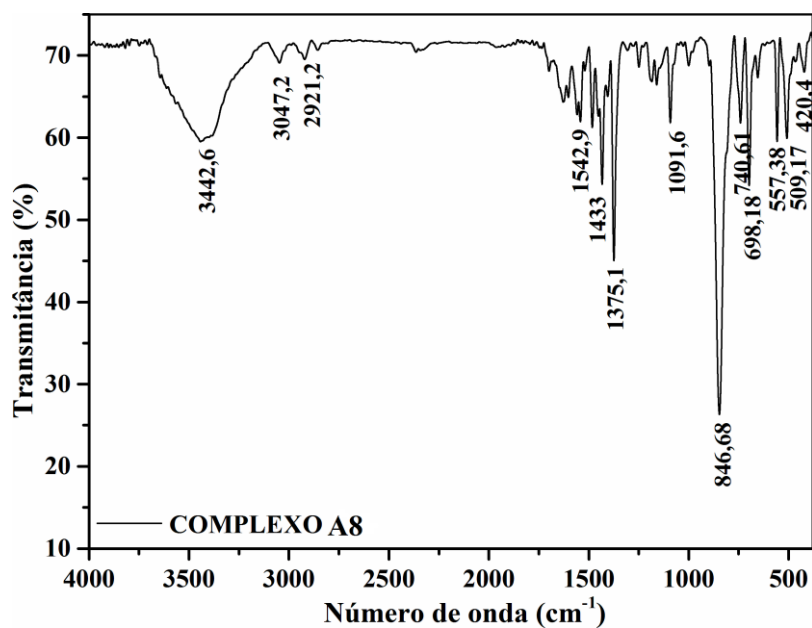
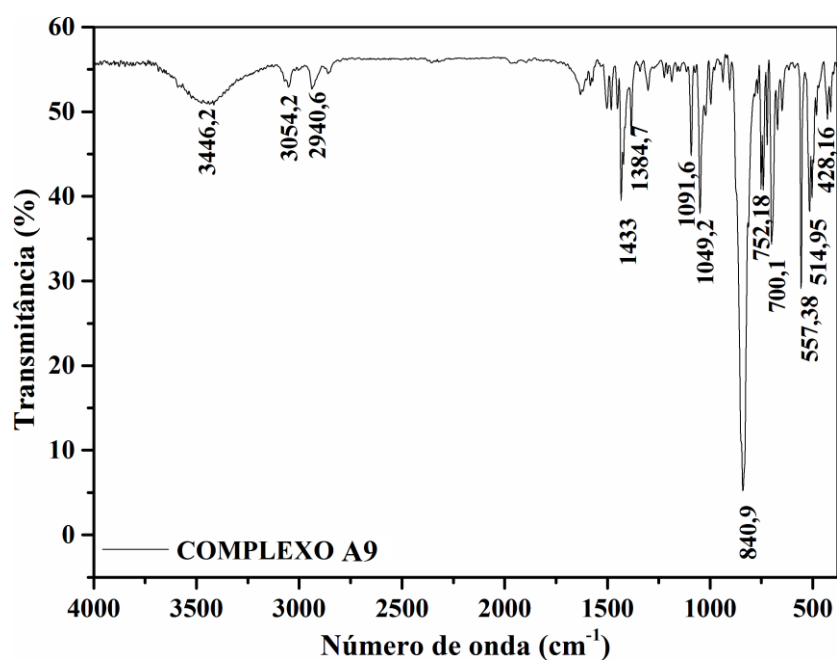
SÉRIE 2FIGURA A41- Espectro de absorção na região do IV para o complexo **A8**FIGURA A42- Espectro de absorção na região do IV para o complexo **A9**

TABELA A4- Principais modos de vibração para complexos das Séries 1 e 2

Modo vibracional	Frequência vibracional (cm ⁻¹)					
	SÉRIE 1					SÉRIE 2
	A2	A3	A4	A5	A7	A9
ν NH e/ou NH ₂	3362	3431	3431	3437	3500; 3396	-
ν CH _s (arom.)	3049;	3047;	3047;	3048;	3048;	3052;
ν CH _{as} (arom.)	2942; 2917	2923	2928	2918	2916	2934
ν C=C(pir.)	1600	1556	1558	1599	1543	1582
ν C=N	1433	1433	1433	1433	1435	1430
ν C-S	1242	1248	1247	1247	1241	1224
β C-H(arom.)	1148	1161	1159	1147	1147	1149
ν anel	995	998	1003	996	996	992
ν PF ₆	-	-	850	845	847	835
δ PF ₆	-	-	557	557	557	554
ν P- ϕ e q	1092	1092	1092	1092	1092	1095
ν P-C (alif.)	744	744	742	741	742	743

Voltametria Cíclica

Voltamogramas obtidos em solução 0,1 mmol L⁻¹ de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) em diclorometano, a 100 mV s⁻¹.

SÉRIE 1

FIGURA A43- Voltamogramas cíclicos para o complexo **A1** de 0,5 a 1,3 V (à esquerda) e complexo **A2** de 0,8 a 1,7 V (à direita).

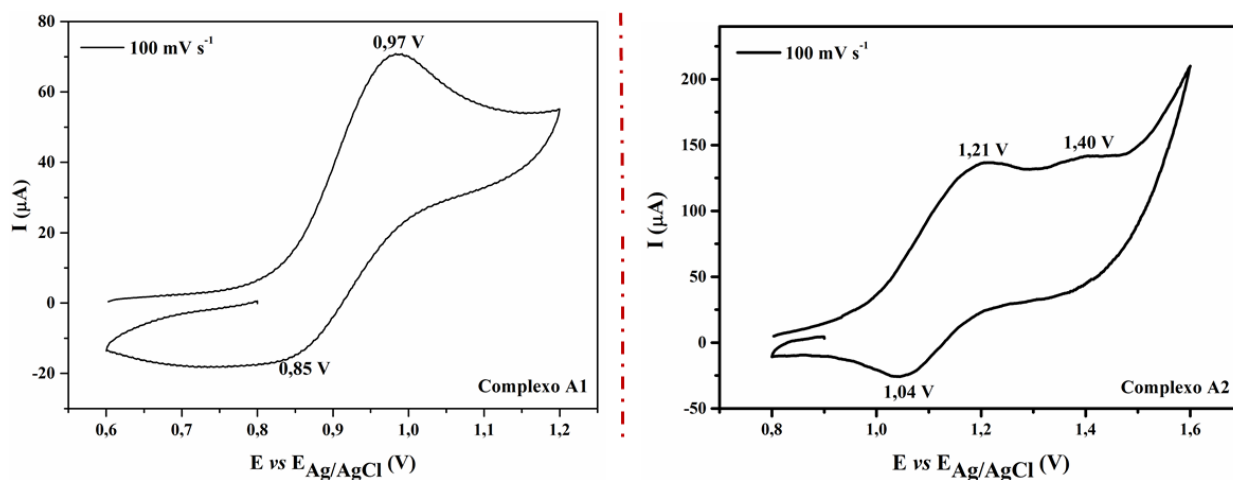


FIGURA A44- Voltamograma cíclico para o complexo **A3** de 0,8 a 1,3 V

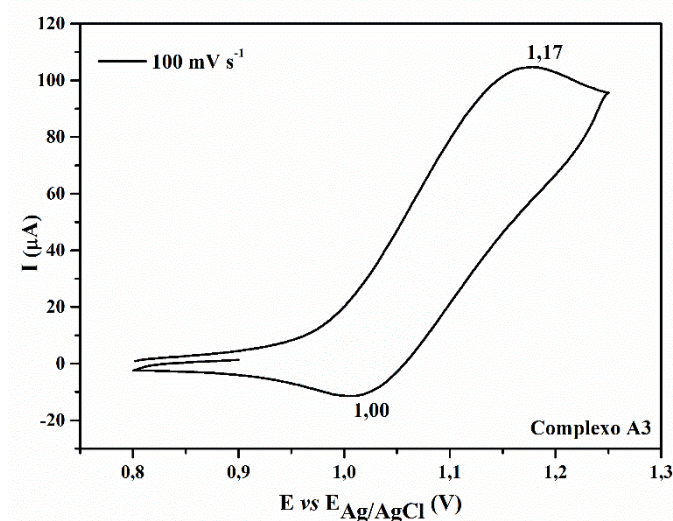


FIGURA A45- Voltamogramas cíclicos para o complexo **A4** de 0,0 a 1,6 V (à esquerda) e complexo **A5** de 0,8 à 1,3 V (à direita).

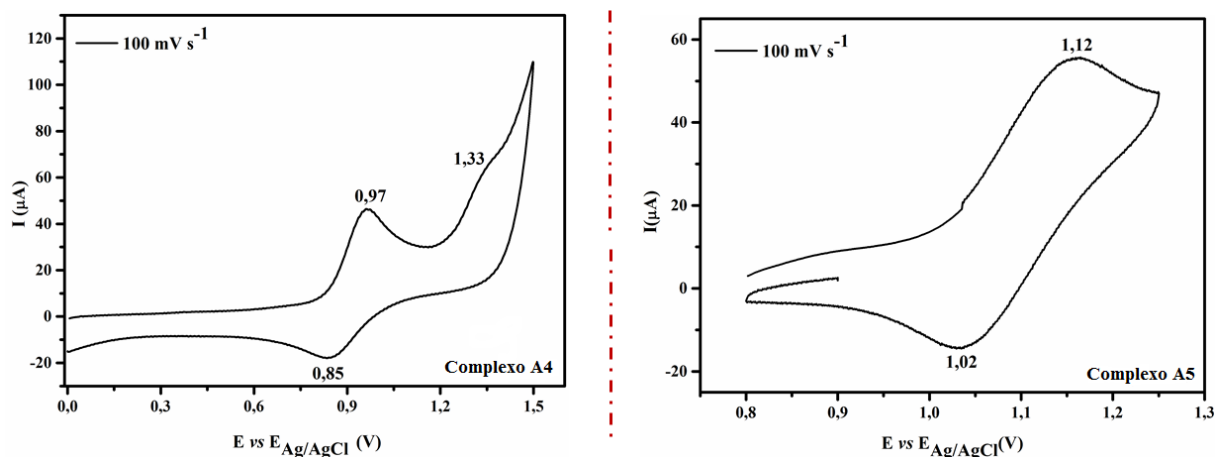
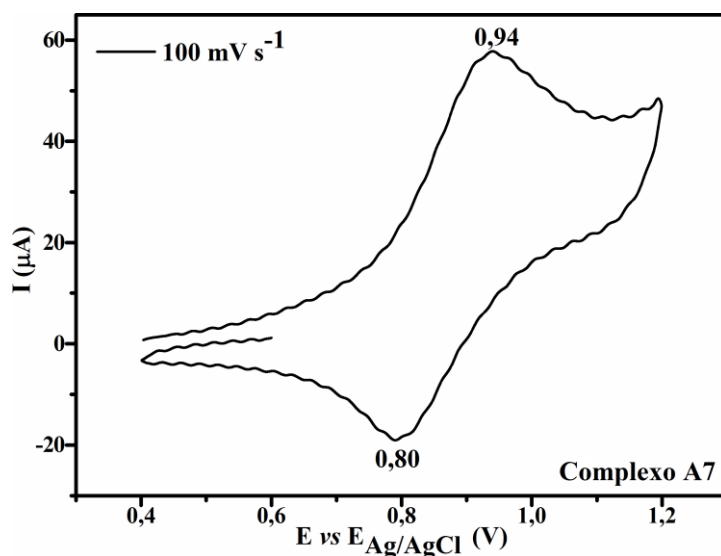
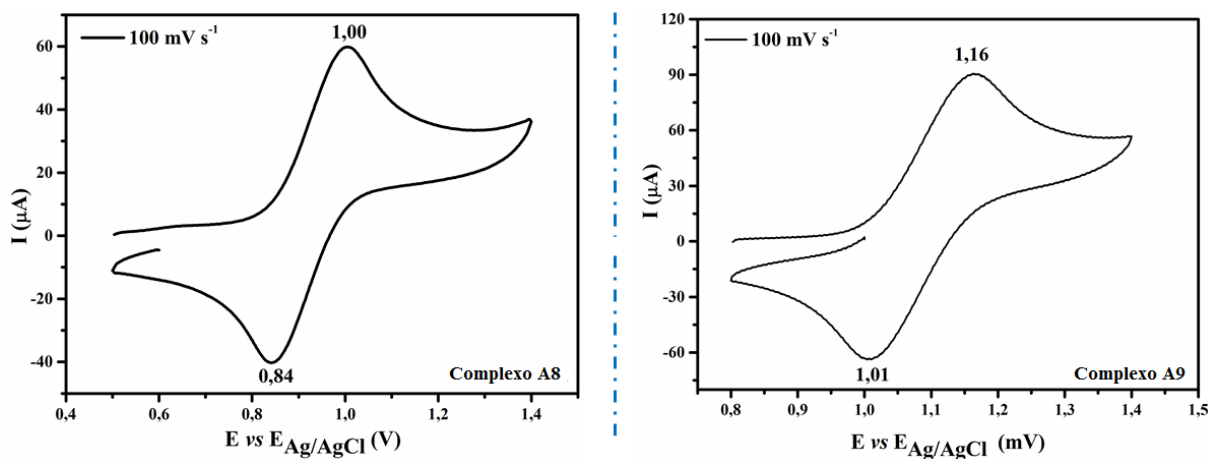


FIGURA A46- Voltamograma cíclico para o complexo **A7** de 0,4 a 1,3 V



SÉRIE 2

FIGURA A47- Voltamogramas cíclicos para o complexo **A8** de 0,5 a 1,3 V (à esquerda) e complexo **A9** de 0,8 a 1,7 V (à direita).



ESTABILIDADE❖ **em Dimetilsulfóxido**

FIGURA A48- Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos **A1-A3**(Série 1) em dimetilsulfóxido, acompanhado com o tempo

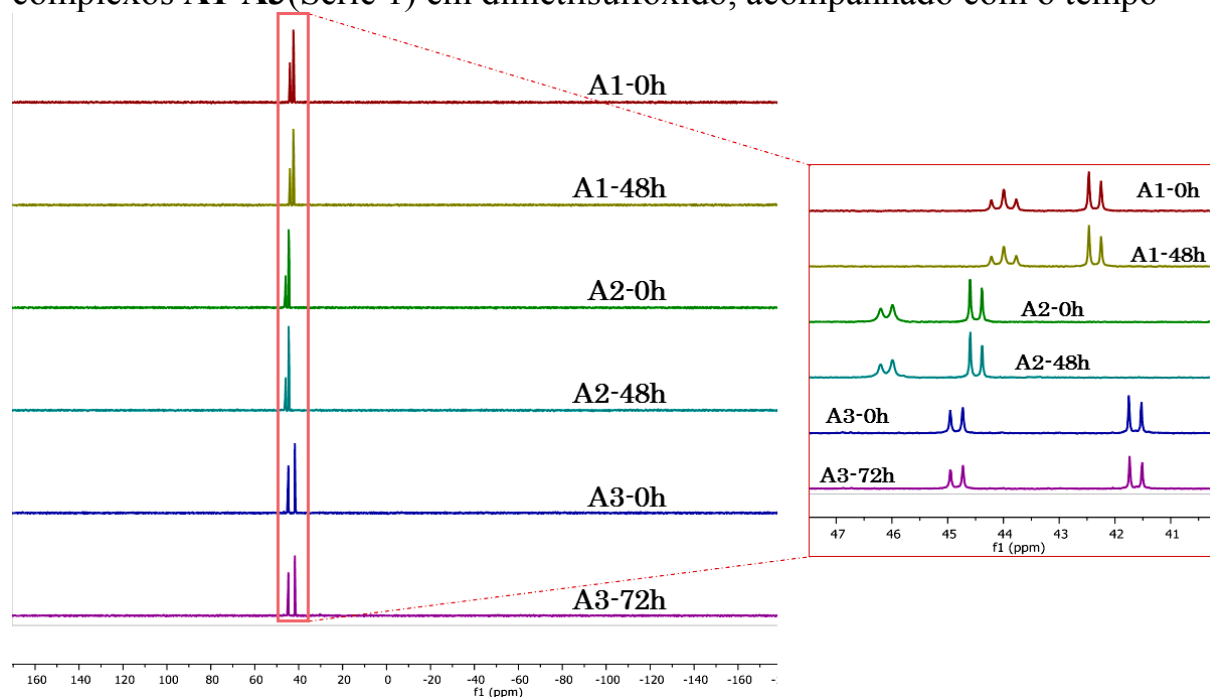


FIGURA A49- Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos **A5 e A6** (Série 1) em dimetilsulfóxido, acompanhado com o tempo

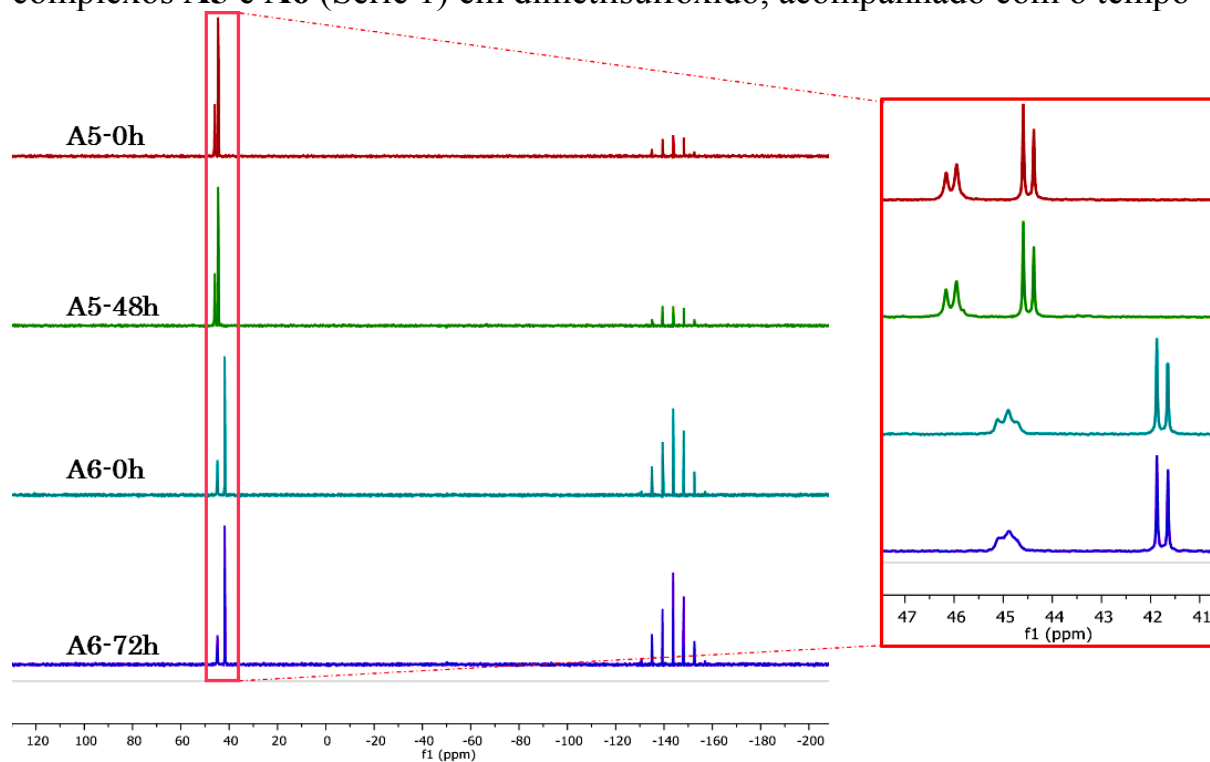
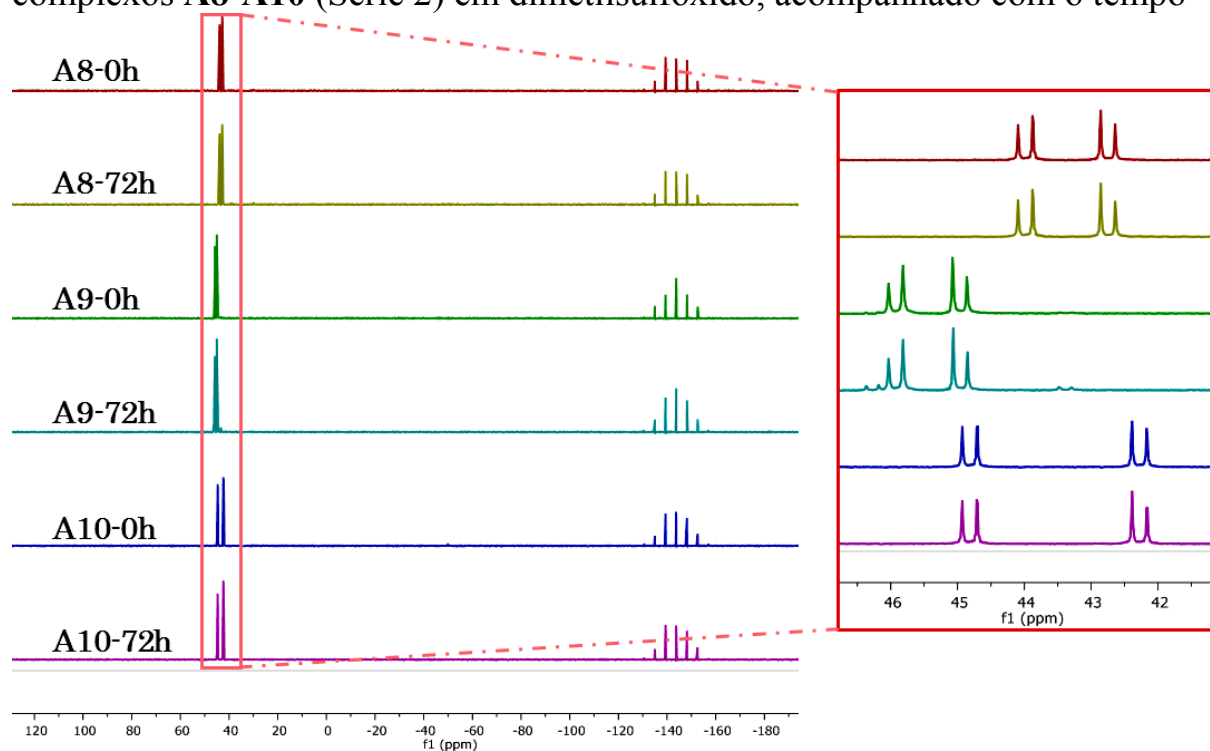


FIGURA A50- Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos A8-A10 (Série 2) em dimetilsulfóxido, acompanhado com o tempo



❖ em Dimetilsulfóxido/Meio de Cultura

FIGURA A51- Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos A4-A7 (Série 1) em dimetilsulfóxido/DMEM, acompanhado com o tempo

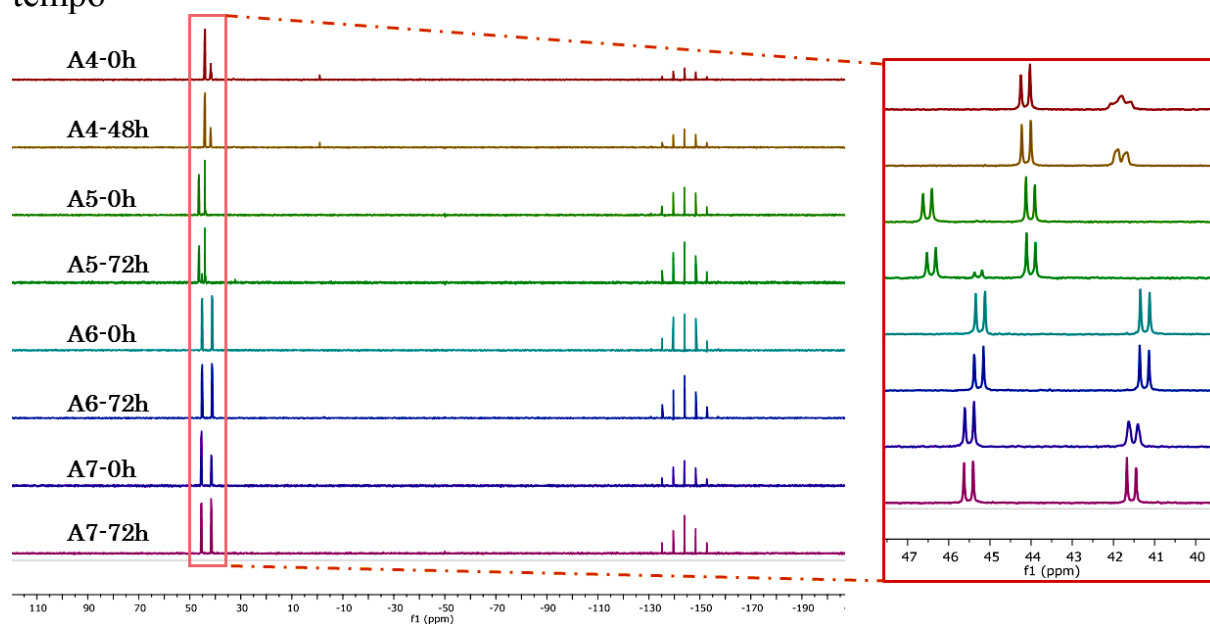
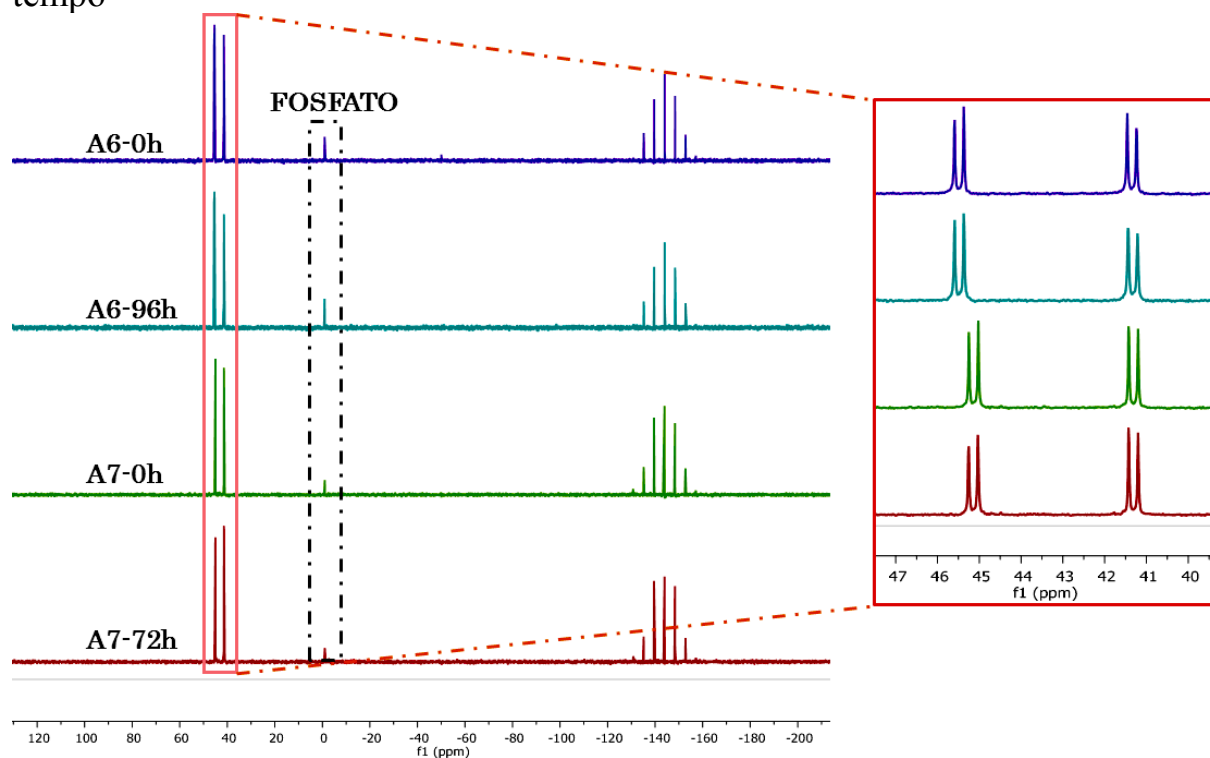
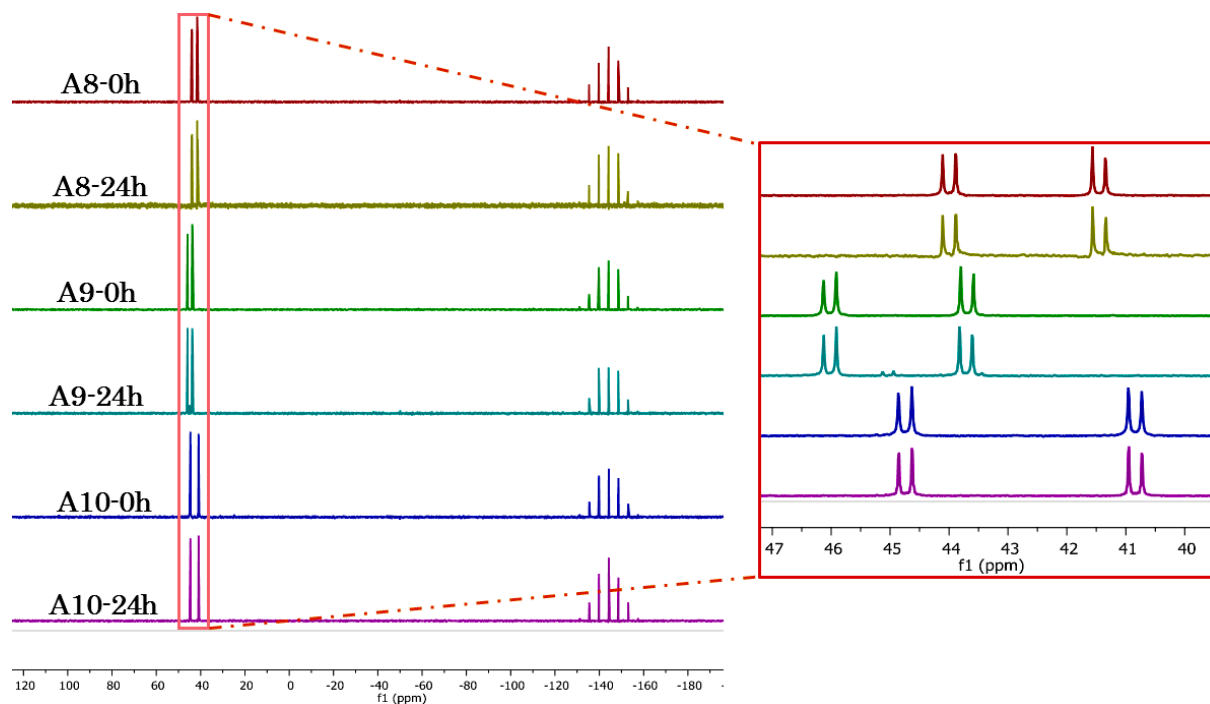


FIGURA A52- Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos **A6** e **A7** (Série 1) em dimetilsulfóxido/RPMI, acompanhado com o tempo



❖ em Dimetilsulfóxido/Tampão Trisma

FIGURA A53- Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos **A8-A10** (Série 2) em dimetilsulfóxido/tampão trisma, acompanhado com o tempo



PARTE III- INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

INTERAÇÃO COM DNA

Mobilidade Eletroforética em Gel de Agarose

FIGURA A54- Mobilidade eletroforética do DNA pBR322 sob influência dos complexos da **A1-A3** (Série 1) e padrão cisplatina

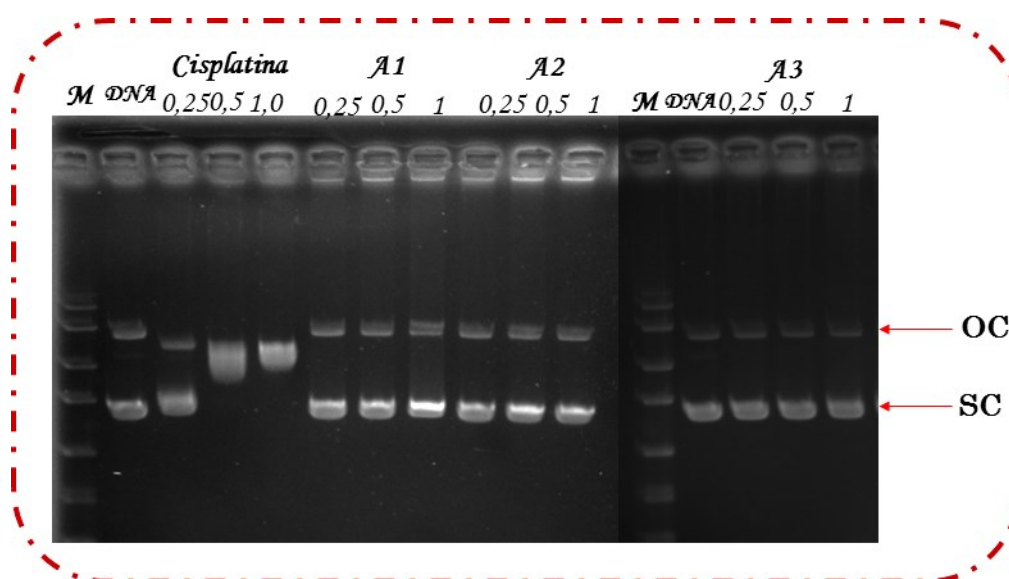
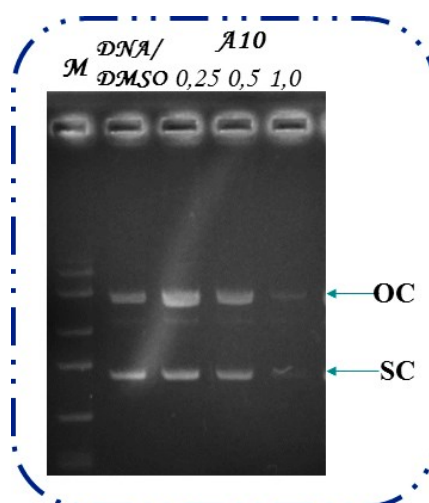


FIGURA A55- Mobilidade eletroforética do DNA pBR322 sob influência do complexo **A10** (Série 2), comparativamente a mobilidade eletroforética do DNA plasmidial



Ensaio de Deslocamento de Hoechst 33258

FIGURA A56- Espectros de supressão da fluorescência do conjugado DNA-Hoechst sob influência de concentrações graduais dos complexos **A1** e **A2**, a 25 e 37 °C

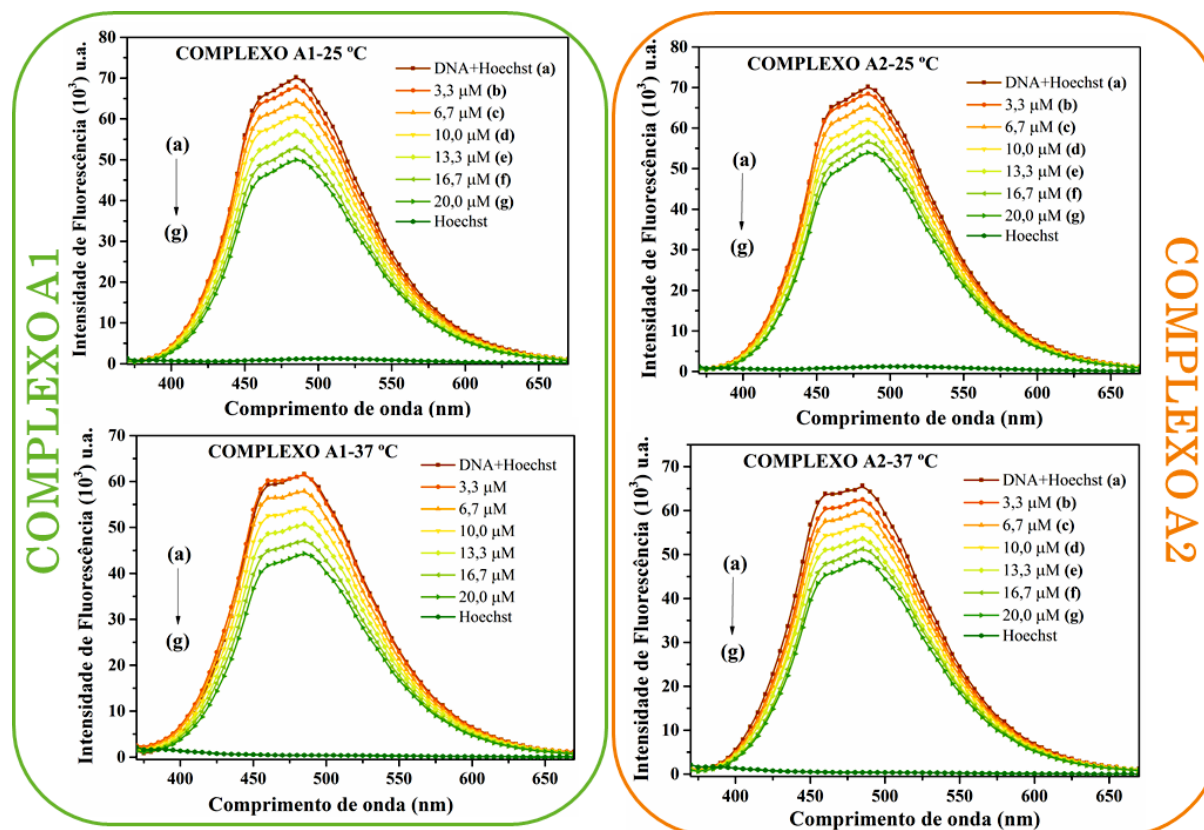


FIGURA A57- Espectros de supressão da fluorescência do conjugado DNA-Hoechst sob influência de concentrações graduais dos complexos A3 e A4, a 25 e 37 °C

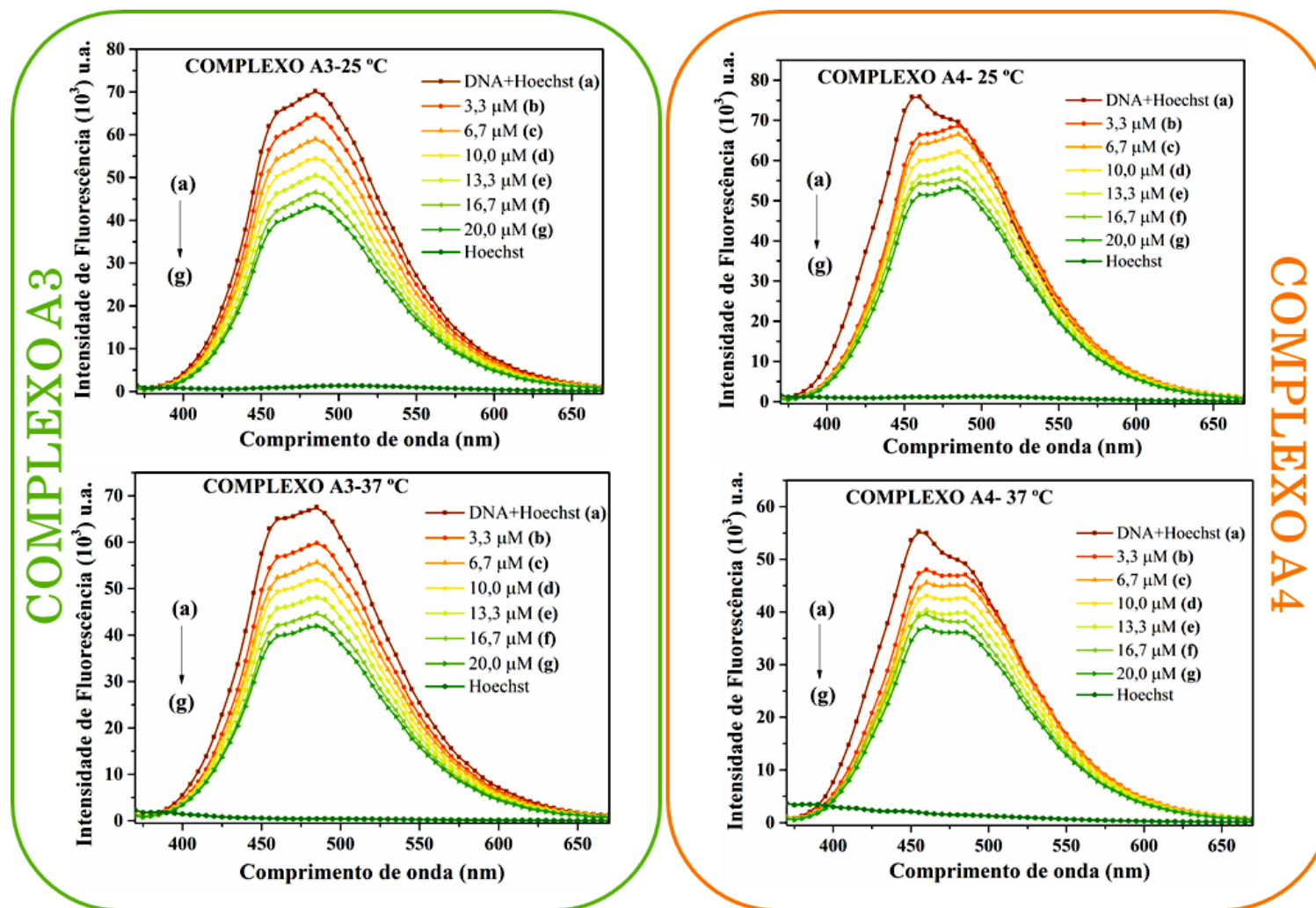


FIGURA A58- Espectros de supressão da fluorescência do conjugado DNA-Hoechst sob influência de concentrações graduais dos complexos A5, 25 e 37 °C e A6, 25 °C

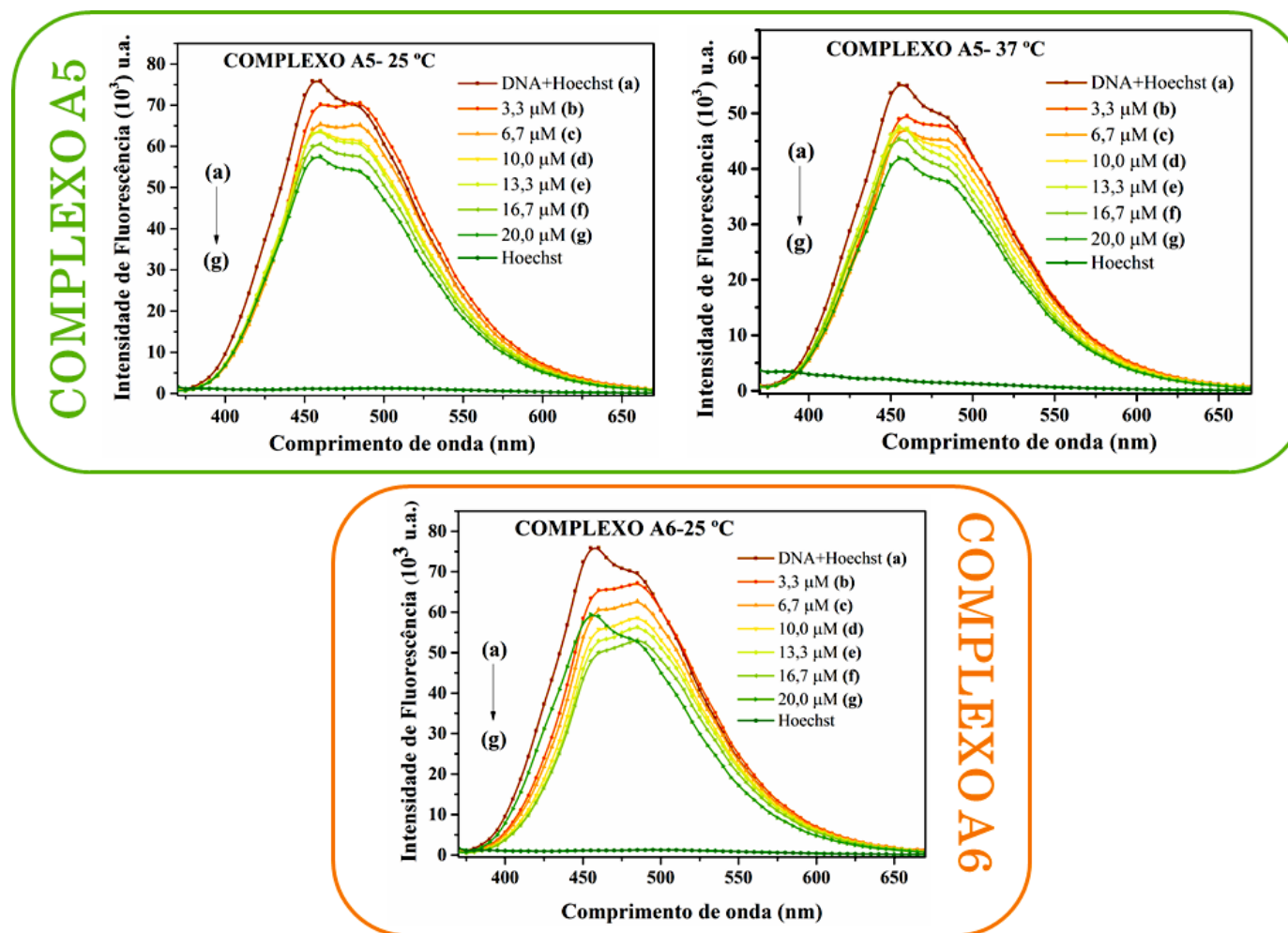
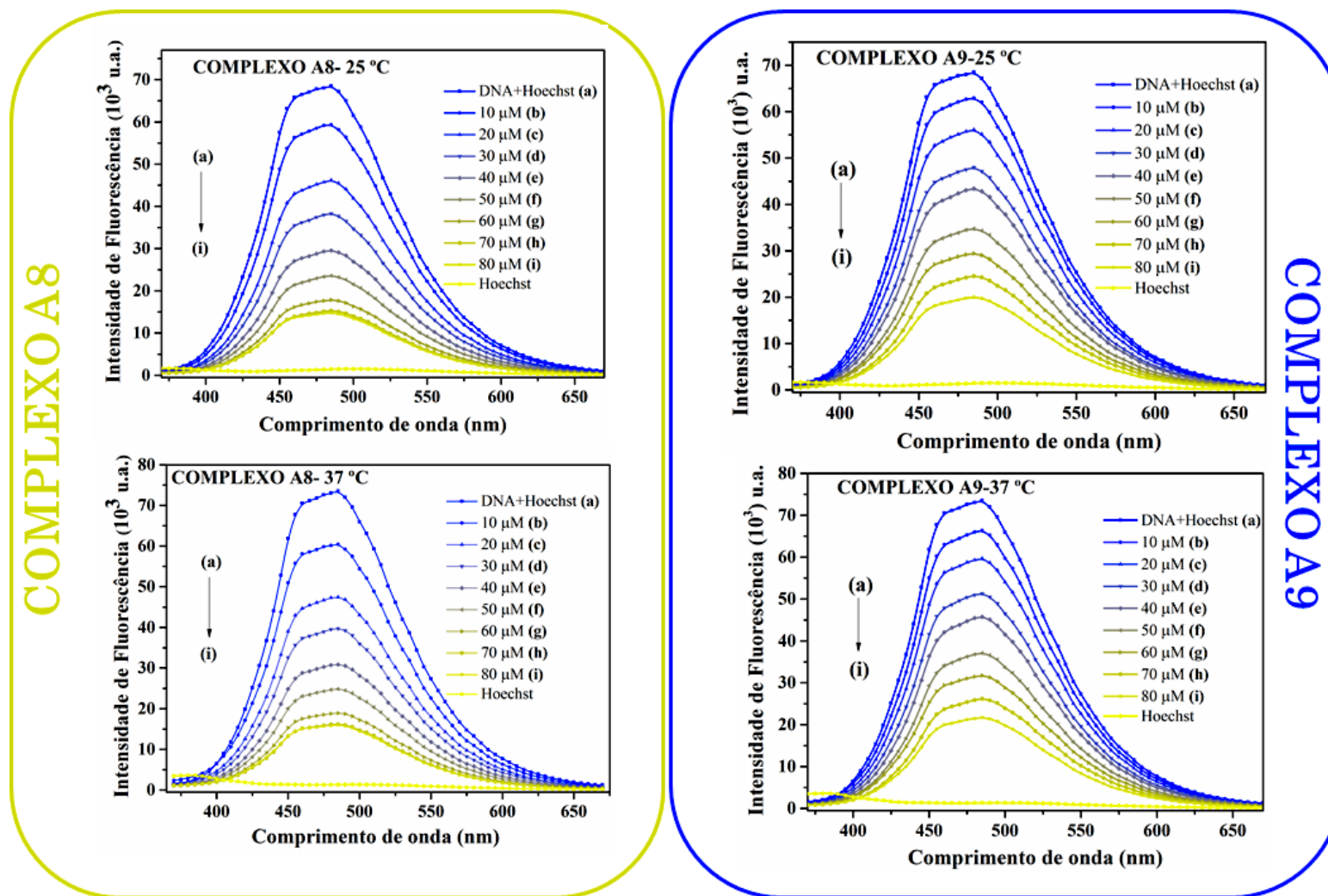


FIGURA A59- Espectros de supressão da fluorescência do conjugado DNA-Hoechst sob influência de concentrações graduais dos complexos **A8** e **A9**, 25 e 37 °C



INTERAÇÃO COM HSA

FIGURA A60- Espectros de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença de diferentes concentrações dos compostos da Série 1 (b-g) (A1 e A2), com $[HSA] = 2 \mu M$, constante em todo o experimento.

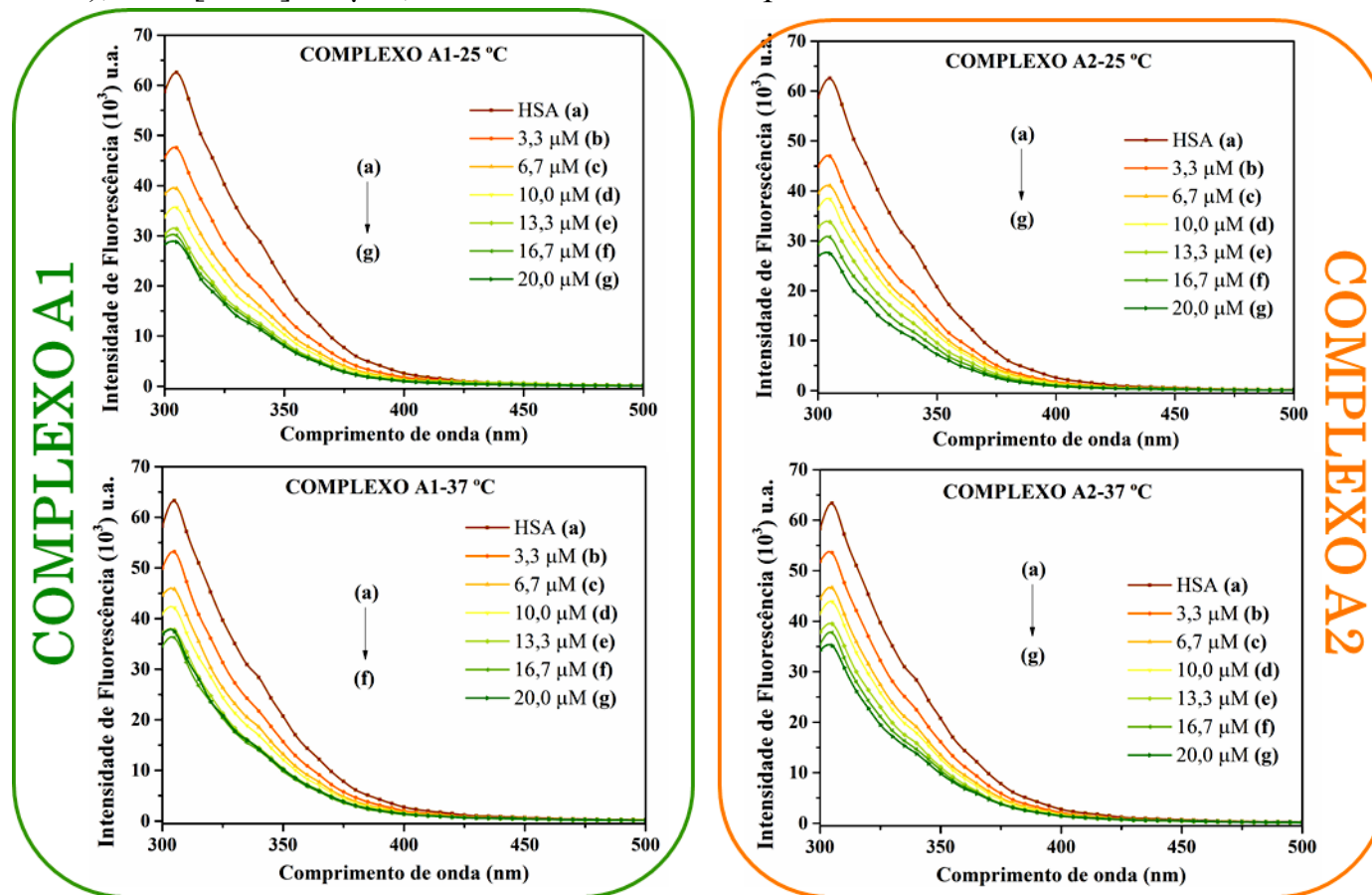


FIGURA A61- Espectros de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença de diferentes concentrações dos compostos da Série 1 (b-g) (A3 e A4), com $[HSA] = 2 \mu M$, constante em todo o experimento.

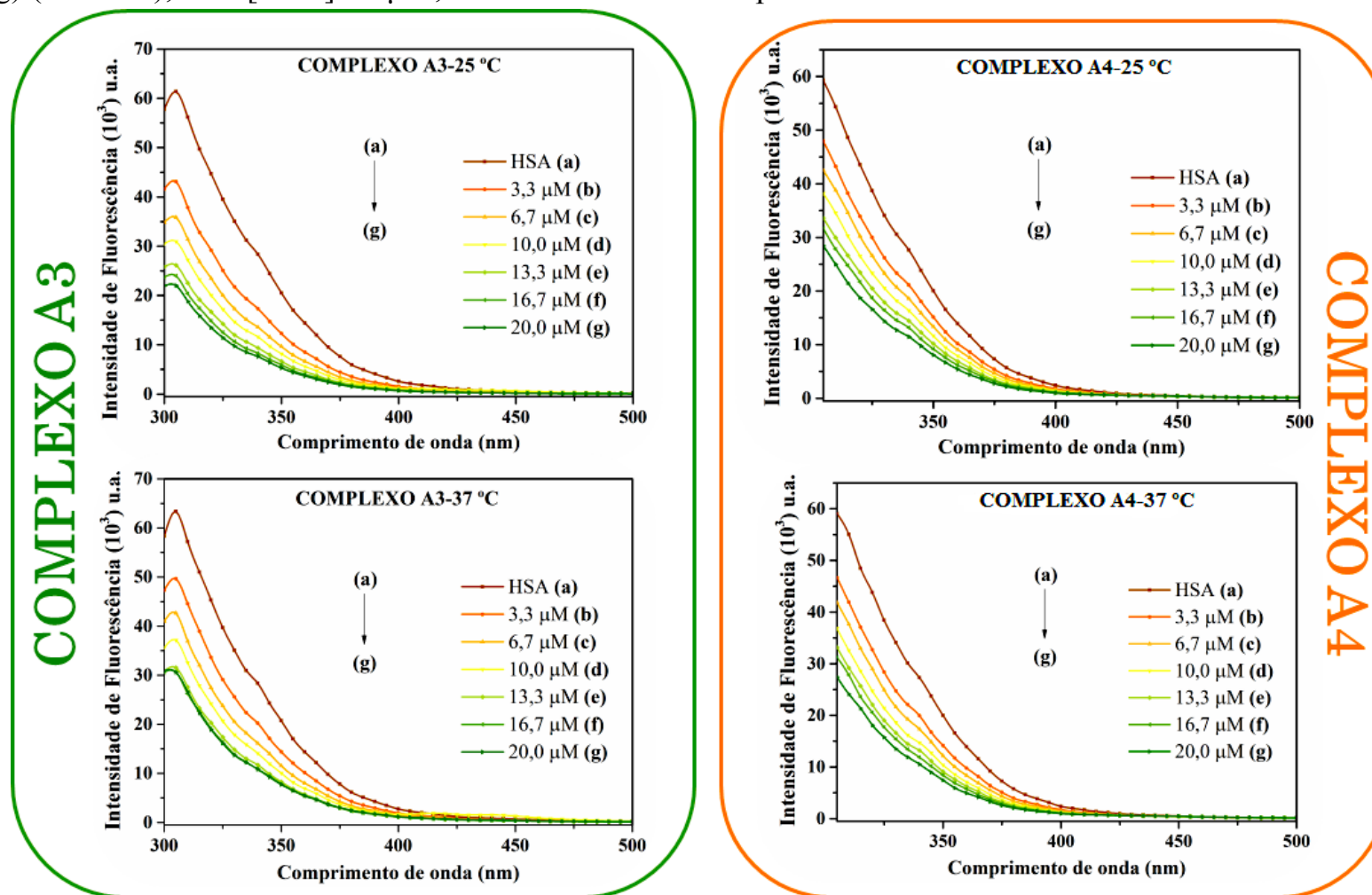


FIGURA A62- Espectros de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença de diferentes concentrações dos compostos da Série 1 (b-g) (A5 e A7), com $[HSA] = 2 \mu M$, constante em todo o experimento.

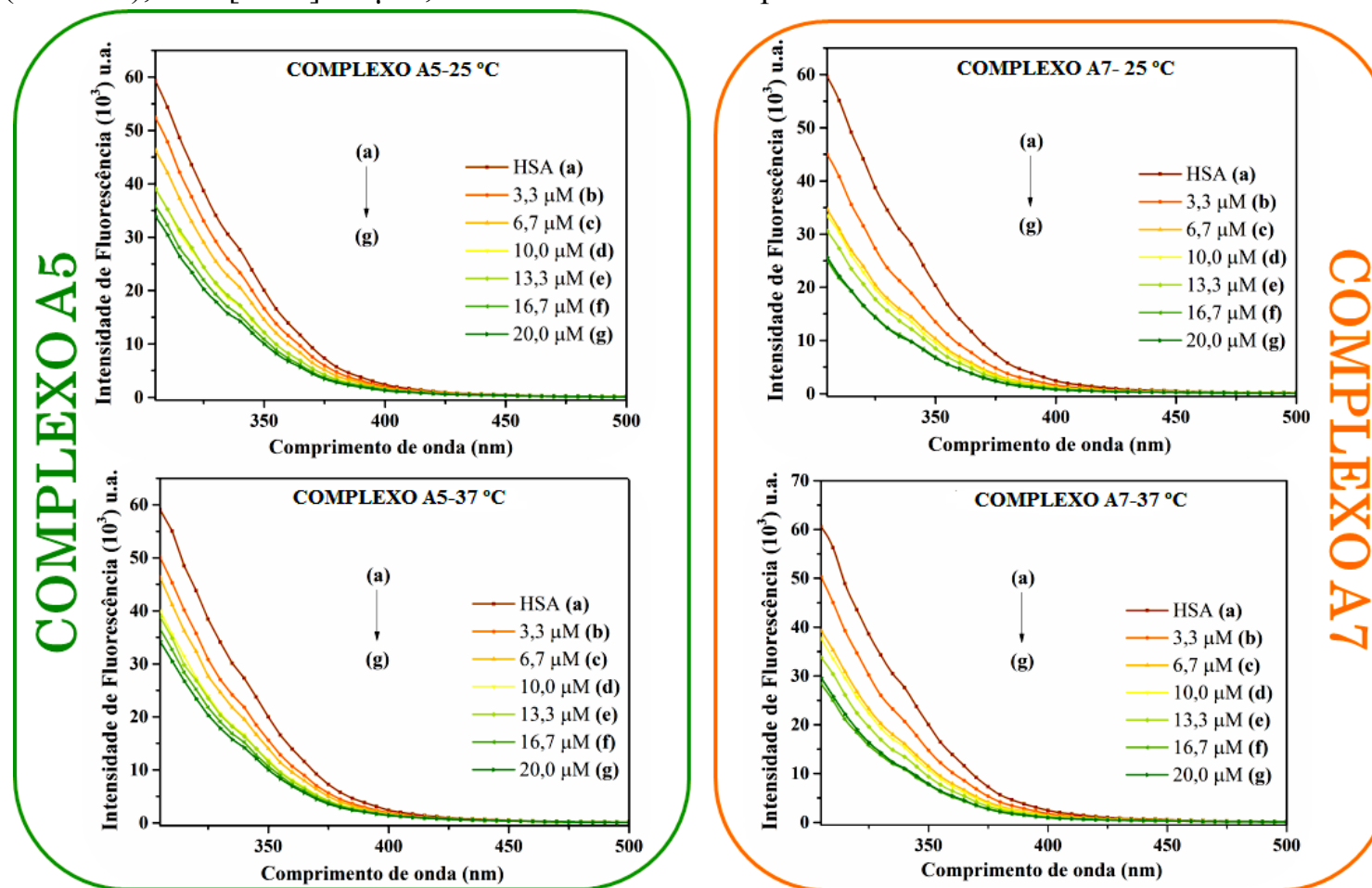
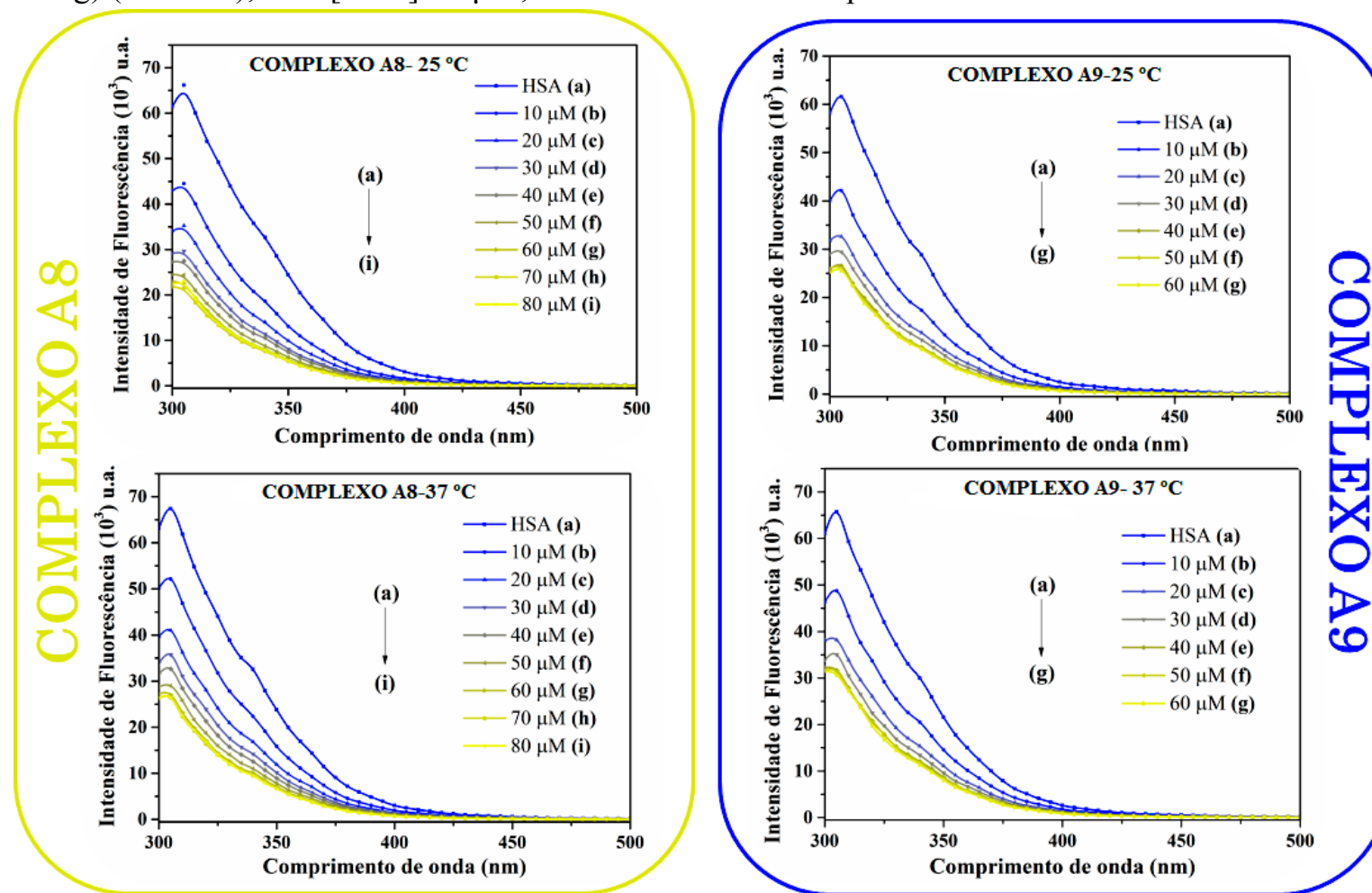


FIGURA A63- Espectros de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença de diferentes concentrações dos compostos da Série 2 (b-i ou b-g) (A8 e A9), com $[HSA] = 2 \mu M$, constante em todo o experimento.



INTERAÇÃO COM HSA-VARFARINA

FIGURA A64- Espectros de fluorescência do conjugado HSA-Varfarina na ausência (a) e presença de diferentes concentrações dos compostos da Série 1 (b-g) (A1, A2, A3 e A4), com $[HSA]$ e $[Varfarina] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$, constante em todo o experimento.

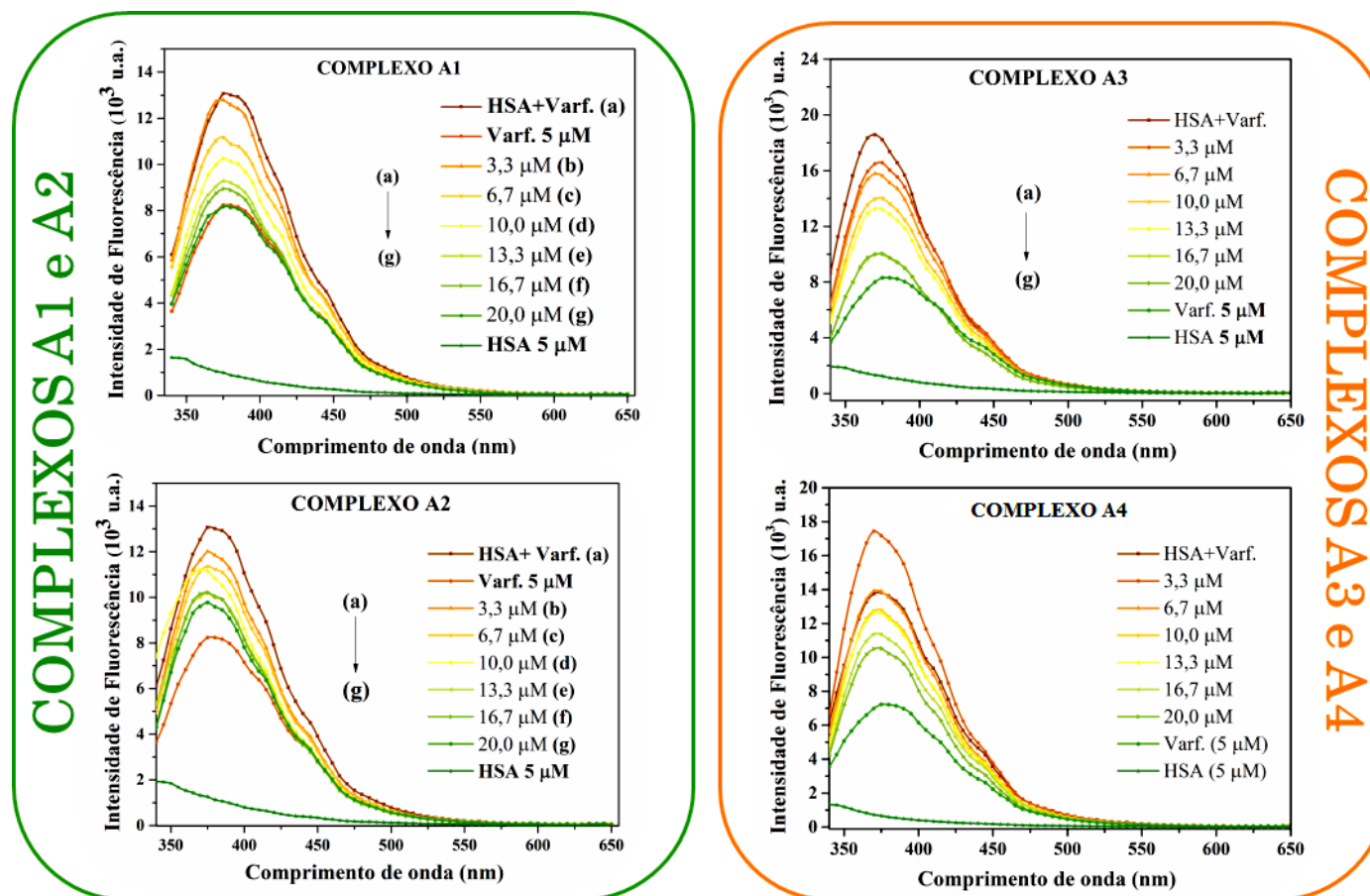
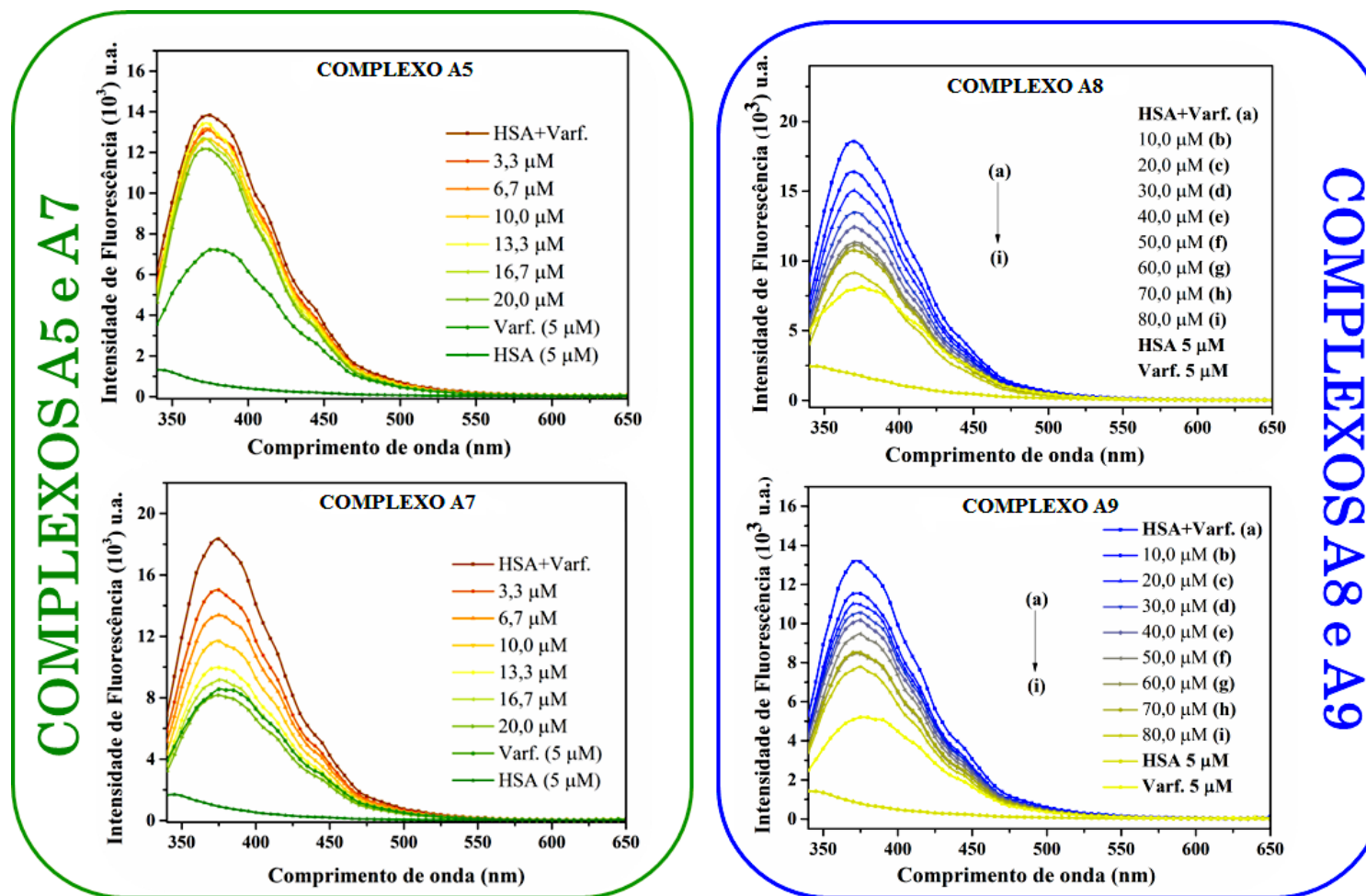


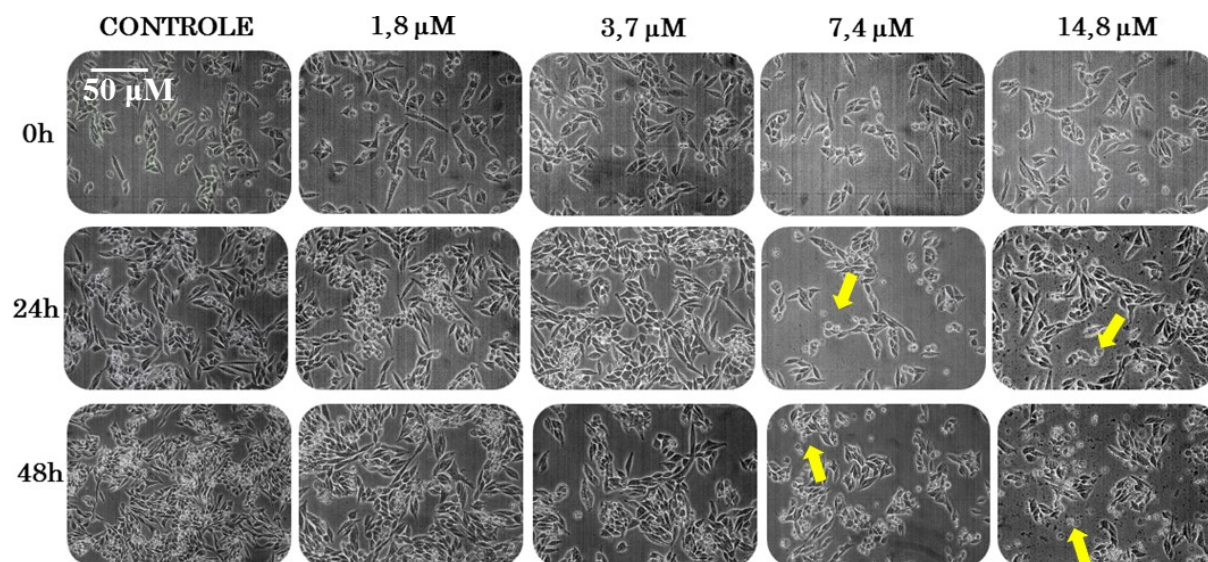
FIGURA A65- Espectros de fluorescência do conjugado HSA-Varfarina na ausência (a) e presença de diferentes concentrações dos compostos da Série 1 (b-g) (**A5** e **A7**), e Série 2 (b-i) (**A8** e **A9**), com $[HSA]$ e $[Varfarina] = 5 \mu\text{mol L}^{-1}$, constante em todo o experimento.



PARTE IV- ENSAIOS BIOLÓGICOS

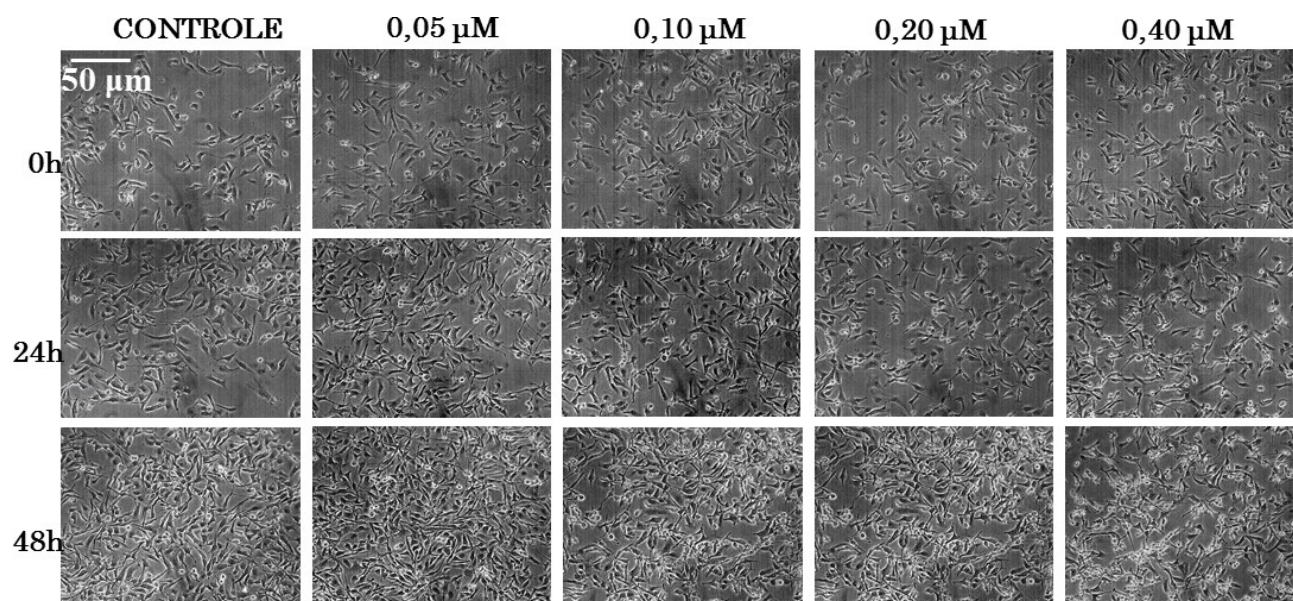
Ensaio Morfológico

FIGURA A66- Imagens micrográficas em diferentes tempos, do ensaio morfológico com linhagem A2780cis, sob tratamento com diferentes concentrações do complexo A7 (Série 1)



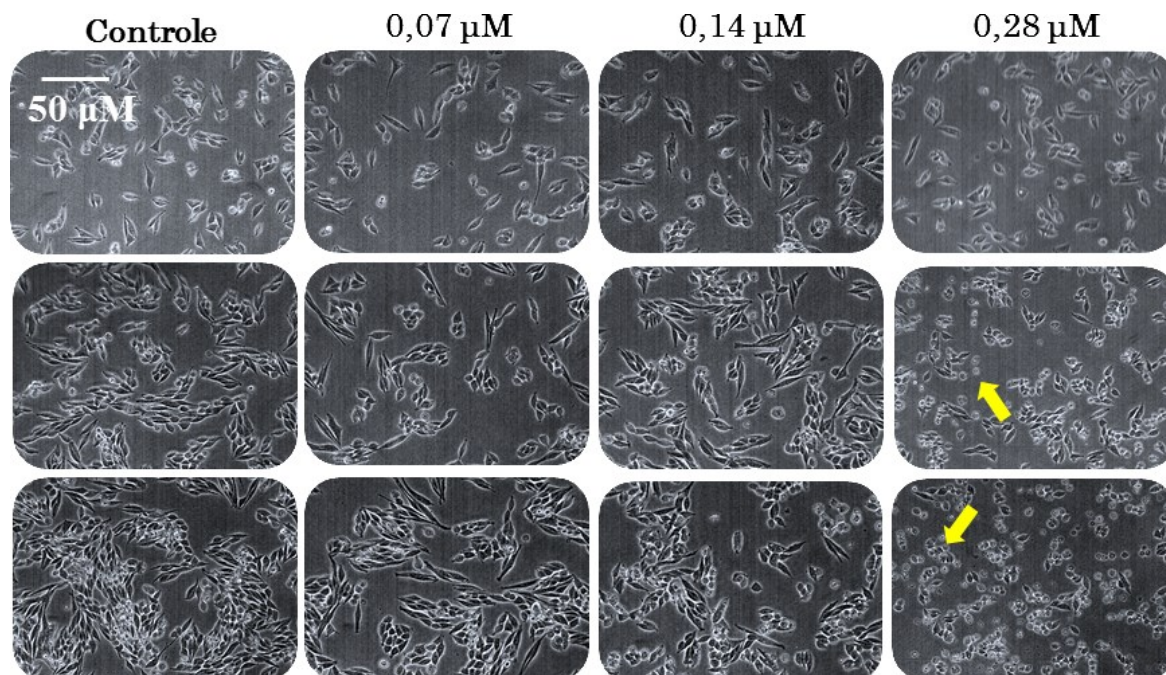
As imagens correspondem a uma das duplicatas realizadas.

FIGURA A67- Imagens micrográficas em diferentes tempos, do ensaio morfológico com linhagem MDA-MB-231, sob tratamento com diferentes concentrações do complexo A9 (Série 2)



As imagens correspondem a uma das duplicatas realizadas.

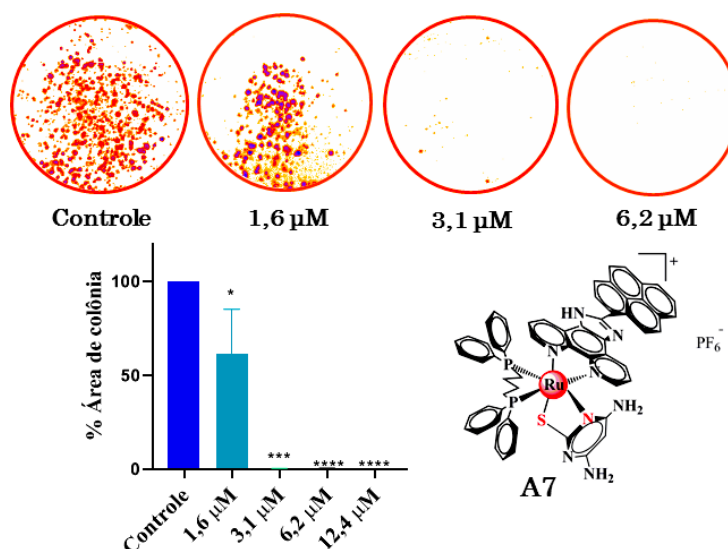
FIGURA A68- Imagens micrográficas em diferentes tempos, do ensaio morfológico com linhagem A2780*cis*, sob tratamento com diferentes concentrações do complexo A9 (Série 2)



As imagens correspondem a uma das duplicatas realizadas.

Ensaio de Formação de Colônias

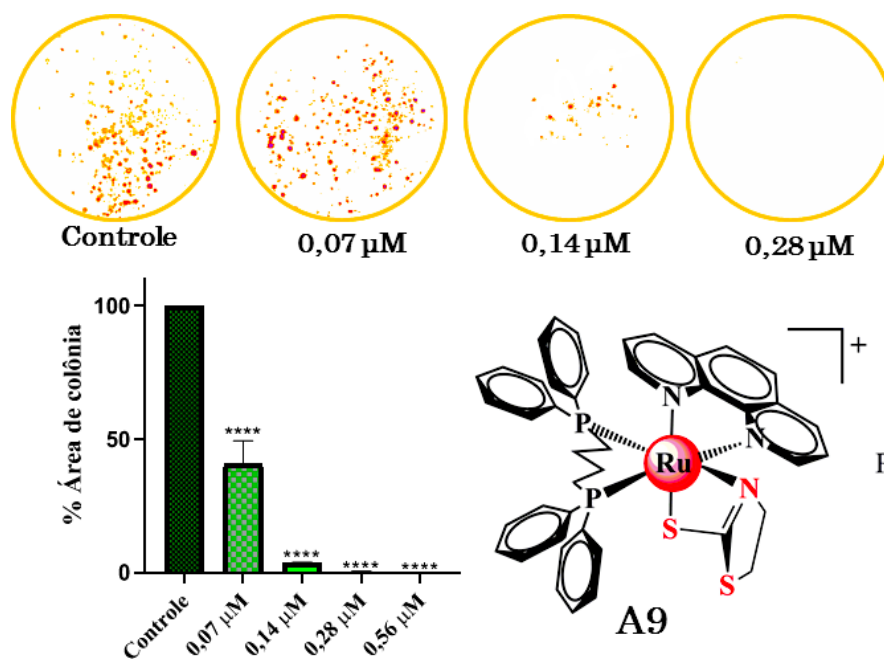
FIGURA A69- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem A2780*cis*, sob diferentes concentrações do complexo A7 (Série 1), considerando 48 h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das triplicatas e os dados foram gerados a partir das médias de triplicatas individuais ($\pm\text{DP}$), analisados comparativamente ao

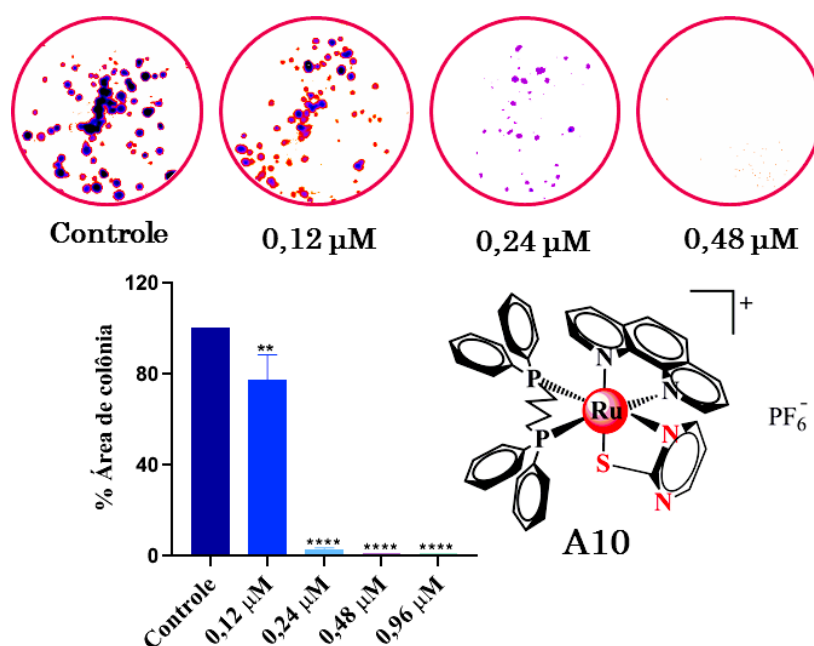
controle por meio de tratamento *one-way*, e tratamento post-hoc Dunnett. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; e **** $p < 0,0001$ *versus* controle negativo.

FIGURA A70- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem A2780*cis*, sob diferentes concentrações do complexo A9 (Série 2), considerando 48 h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das triplicatas e os dados foram gerados a partir das médias de triplicatas individuais ($\pm\text{DP}$), analisados comparativamente ao controle por meio de tratamento *one-way*, e tratamento post-hoc Dunnett. **** $p < 0,0001$ *versus* controle negativo.

FIGURA A71- Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem MDA-MB-231, sob diferentes concentrações do complexo **A10** (Série 2), considerando 48 h de tratamento, e avaliação da área de colônia comparativamente ao controle negativo.



Fonte: Dados da Pesquisa. As imagens representam uma das triplicatas e os dados foram gerados a partir das médias de triplicatas individuais ($\pm$ DP), analisados comparativamente ao controle por meio de tratamento *one-way*, e tratamento post-hoc Dunnett. ** $p < 0,002$ **** $p < 0,0001$ versus controle negativo.

PARTE V- MATERIAIS E MÉTODOS

Espectrometria de Massas

TABELA A5- Condições utilizadas no experimento de espectrometria de massas

Condições do Q-TOF	
Parâmetros	Valores
Tipo de ionização	ESI+
Gás Temp. (°C)	300
Gás Flow (L.min ⁻¹)	10
Nebulizer (Psi)	26
Sheath Gás Temp.	280
Sheath Gás Flow	10
VCap	2800
Nozee Voltage (V)	400
Fragmentor	110
Skimmer	65
OctopoleRFPeak	650

Preparo das soluções para os ensaios de interação com DNA

❖ Eletroforese em Gel de Agarose

TABELA A6- Concentrações e volumes utilizados para o ensaio de mobilidade eletroforética para os complexos da Série 1.

Ri	Concentrações soluções compostos (no poço, µM)	Adição pré-incubação			
		Volumes das soluções estoques		Vol. DMSO	Vol. Trisma
		Composto*	DNA**		
0	0,0	0 µL	7 µL	1 µL	2 µL
0,25	10,0	1 µL	7 µL	0 µL	2 µL
0,50	20,0	1 µL	7 µL	0 µL	2 µL
1,00	40,0	1 µL	7 µL	0 µL	2 µL

Concentração de DNA no poço= 40 µM. *Concentrações das soluções estoques para obtenção das respectivas concentrações no poço foram: 100, 200 e 400 µM. **Solução estoque de DNA de concentração igual a 57,1 µM.

TABELA A7- Concentrações e volumes utilizados para o ensaio de mobilidade eletroforética para os complexos da Série 2.

Ri	Concentrações soluções compostos (no poço, μM)	Adição pré-incubação			
		Volumes das soluções estoques		Vol. DMSO	Vol. Trisma
		Composto*	DNA**		
0	0,0	0 μL	1,4 μL	1 μL	7,6 μL
0,25	11,2	1 μL	1,4 μL	0 μL	7,6 μL
0,50	22,5	1 μL	1,4 μL	0 μL	7,6 μL
1,00	45,0	1 μL	1,4 μL	0 μL	7,6 μL

Concentração de DNA no poço= 45 μM . *Concentrações das soluções estoques para obtenção das respectivas concentrações no poço foram: 113, 225 e 450 μM . **Solução estoque de DNA de concentração igual a 321 μM .

❖ Medidas de Viscosidade

TABELA A8- Concentrações e volumes das soluções utilizadas para aferimento da viscosidade relativa do DNA, sob influência de concentrações contínuas dos compostos da Série 1.

Ri*	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)**		Volumes Utilizados (μL)			
	DNA	Compostos	Composto	DMSO	Tampão Trisma- HCl	DNA
-	0	0	0	800	3200	0
-	80	0	0	0	3936	64
0,0	80	0	0	800	3136	64
0,06	80	5,0	20	780	3136	64
0,12	80	10,0	40	760	3136	64
0,19	80	15,0	60	740	3136	64
0,25	80	20,0	80	720	3136	64
0,31	80	25,0	100	700	3136	64
0,38	80	30,0	120	680	3136	64

*Ri se refere a razão [complexo]/[DNA]; **Concentrações obtidas a partir de solução estoque de DNA de concentração aproximada 5000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e dos compostos de concentração 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

OBSERVAÇÃO: As soluções para o experimento com os compostos da Série 2, foram preparadas da mesma forma, com exceção da concentração de DNA, que neste caso foi de 2010 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

❖ **Ensaio de Deslocamento do Hoechst 33258**

TABELA A9- Volumes utilizados para preparo das soluções dos complexos da Série 1 no ensaio de deslocamento de Hoechst 33258

Volumes Utilizados		Concentrações finais (μM)*
DMSO (μL)	Soluções estoques complexos (μL)**	
83,5	16,5	3,3
66,5	33,5	6,7
50,0	50,0	10,0
33,5	66,5	13,3
16,5	83,5	16,7
0,0	100,0	20,0

*Concentrações após adição de 900 μL da solução do conjugado DNA-Hoechst. **Volumes das soluções estoques dos complexos de concentração 200 μM .

TABELA A10- Volumes utilizados para preparo das soluções dos complexos da Série 2 no ensaio de deslocamento de Hoechst 33258

Volumes utilizados		Concentrações finais (μM)*
DMSO (μL)	Soluções estoques dos complexos (μL)**	
90,0	10,0	10,0
80,0	20,0	20,0
70,0	30,0	30,0
60,0	40,0	40,0
50,0	50,0	50,0
40,0	60,0	60,0
30,0	70,0	70,0
20,0	80,0	80,0

* Concentrações após adição de 900 μL da solução do conjugado DNA-Hoechst. **Volumes das soluções estoques dos complexos de concentração 1000 μM .

❖ Preparo das soluções para o ensaio de inibição enzimática da Topoisomerase II α

TABELA A11- Concentrações e volumes utilizados para preparo das soluções dos compostos da Série 1, submetidas ao ensaio de inibição da Topoisomerase II α

Soluções adicionadas ao gel ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Volumes MIX (μL)							Concentração soluções estoque ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
	Tampão de ensaio	ATP	DNA**	DMSO	água	Soluções comp.	Topo II α	
C+	3	1	1	1	23	1	1	-
C-	3	1	1	1	24	1	0	-
3,0*	3	1	1	0	23	1	1	90
12,0*	3	1	1	0	23	1	1	360
60,0*	3	1	1	0	23	1	1	1800

C+= Controle positivo; C- = Controle negativo; MIX- Solução utilizada em todas as amostras
 *Concentrações referentes às soluções dos complexos; **DNA pBR322 superenovelado de concentração 0,5 ng μL^{-1}

TABELA A12- Concentrações e volumes utilizados para preparo das soluções dos compostos da Série 2, submetidas ao ensaio de inibição da Topoisomerase II α

Soluções adicionadas ao gel ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Volumes MIX (μL)							Concentração soluções estoque ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
	Tampão de ensaio	ATP	DNA**	DMSO	água	Soluções comp.	Topo II α	
C+	3	1	1	1	23	1	1	-
C-	3	1	1	1	24	1	0	-
0,5*	3	1	1	0	23	1	1	15
5,0*	3	1	1	0	23	1	1	150
60,0*	3	1	1	0	23	1	1	1800

C+= Controle positivo; C- = Controle negativo; MIX- Solução utilizada em todas as amostras
 *Concentrações referentes às soluções dos complexos; **DNA pBR322 superenovelado de concentração 0,5 ng μL^{-1}

Preparo das soluções para os ensaios de interação com HSA

❖ Interação com Albumina de Soro Humana (HSA)

TABELA A13- Dados utilizados para preparo das soluções dos complexos da Série 1, para ensaio de interação com HSA

Concentração solução estoque utilizada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Volumes para preparo das soluções		Concentrações Finais ($\mu\text{mol L}^{-1}$)*
	DMSO	Solução composto	
200	67,0	33,0	3,3
200	33,0	67,0	6,7
200	Zero	100,0	10,0
500	47,0	53,0	13,3
500	33,0	67,0	16,7
500	20,0	80,0	20,0

*Concentrações após adição de 1900 μL de solução de $[\text{HSA}] = 2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$

TABELA A14- Dados utilizados para preparo das soluções dos complexos da Série 2, para ensaio de interação com HSA

Concentração solução estoque utilizada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Volumes para preparo das soluções		Concentrações Finais ($\mu\text{mol L}^{-1}$)*
	DMSO	Solução composto	
1000	80,0	20,0	10,0
1000	60,0	40,0	20,0
1000	40,0	60,0	30,0
1000	20,0	80,0	40,0
1000	zero	100,0	50,0
2000	40,0	60,0	60,0
2000	30,0	70,0	70,0
2000	20,0	80,0	80,0

*Concentrações após adição de 900 μL de solução de $[\text{HSA}] = 2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$