

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

**“INFLUÊNCIA DO GRUPO CARBOXÍLICO NA ATIVIDADE
CITOTÓXICA E NA INTERAÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS
DE RUTÊNIO COM DNA E HSA”**

João Honorato de Araujo Neto*

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

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

*** bolsista CAPES**

São Carlos - SP
2016

“Tudo o que não é eterno, é eternamente inútil.”

C. S. Lewis



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato João Honorato de Araujo Neto, realizada em 25/02/2016:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
UFSCar

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri
UNIARA

Ao único e eterno Deus, criador dos céus e da terra. Ao meu querido pai Sebastião Honorato Filho a minha mãe Maria Celeste de Araujo Honorato (in memorian), a minha avó Luiza Maria de Araujo e meu irmão Matheus Araujo Honorato por todo amor confiança e orações realizadas para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pela saúde e sabedoria para realizar mais este trabalho.

Aos meus pais Sebastião Honorato e Maria Celeste (*in memoriam*) por serem meus exemplos de esforço e humildade, nunca medindo esforços para que eu chegasse até aqui.

A minha avó Luiza Maria, pelo amor, carinho e orações incessantes.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por todo apoio, incentivo, discussões científicas e convivência durante este tempo, contribuindo no meu crescimento profissional. Muito obrigado!

A Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti (Gerontologia-UFSCar) pela disposição de seu laboratório para a execução dos testes biológicos. A Msc. Legna Colina A. Vegas, pela realização dos ensaios com células tumorais.

Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP) pela disponibilização de seu laboratório para a execução dos testes anti-*Mycobacterium tuberculosis*. Ao Dr. Marcelo Miyata, pela realização dos ensaios com as bactérias.

Aos Professores Dr. Rodrigo Correa (UFOP), Dr. Javier Elena (IFSC-USP), e Dr. Victor Deflon (IQSC-USP) pela resolução das estruturas cristalográficas.

Aos amigos do laboratório: Adriana, Angélica, Claudia, Legna, Katia, Wilmer, Rodrigo, Gabriel, Monize, Anislay, Jocely, Mariana, Majo, Luciano, Celis, Taise, Tamires, Gregory, Rafael e Beatriz. Obrigada pelos momentos de descontração e todas as parcerias científicas.

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

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

A CAPES, pela bolsa concedida.

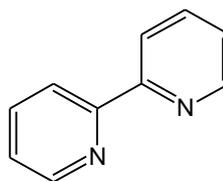
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
LERCI	Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos
N-N	Ligantes N-heterocíclicos
P-P	Bifosfinas
N-O	Ligantes dicarboxipiridínicos
ATCC	Coleção Americana de Culturas (American Type Culture Collection)
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
MCF7	Adenocarcinoma de mama
A549	Carcinoma de pulmão
V79	Fibroblasto de hamster chinês
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's)
RPMI	Meios Roswell Park Memorial Institute
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HSA	Albumina sérica humana (Human Serum Albumin)
CDCl ₃ -d	Clorofórmio deuterado
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
CD ₃ OD-d ₄	Metanol deuterado
DRX	Difração de raios X
E _{1/2}	Potencial de meia onda
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
PTBA	Perclorato de tetrabutylamônio
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante
IC ₅₀	Concentração inibição do crescimento celular em 50 %
Et ₃ N	Trietilamina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
ppm	Partes por milhão
RMN ³¹ P(¹ H)	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo Desacoplado do ¹ H

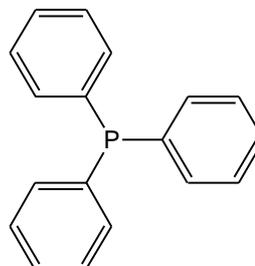
RMN $^{13}\text{C}(^1\text{H})$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Desacoplado do ^1H
COSY ^1H	Correlação espectroscópica de hidrogênio
HSQC	Correlação heteronuclear de ligação simples
IV	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho
UV-vis	Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta e Visível
<i>trans</i>	Isômero de posição <i>trans</i> de um composto inorgânico ou orgânico
<i>cis</i>	Isômero de posição <i>cis</i> de um composto inorgânico ou orgânico
Δ	Deslocamento químico nos espectros de RMN
E	Coefficiente de extinção molar ou absorvidade molar
Λ	Comprimento de onda
M	Mili (10^{-3})
μ	Micro (10^{-6})
nm	Nanômetro (10^{-9} m)
Å	Angstrom (10^{-10} m)
D	Dupleto
T	Tripleto
m	Multiplete
J	Constante de acoplamento
Da	Dalton, unidade de massa
ν	Frequência de estiramento
F	Intensidade forte da transmitância da banda no I.V.
f	Intensidade fraca da transmitância da banda no I.V.
m	Intensidade média da transmitância da banda no I.V.
γ	Vibrações de deformação angular fora do plano
ν_{sim}	Vibrações de estiramento simétrico
ν_{ass}	Vibrações de estiramento assimétrico
δ	Vibrações de deformação angular no plano
cm^{-1}	Frequência vibracional em centímetros inversos
Hz	Unidade de frequência em Hertz
π	Ligação PI

σ Ligação sigma

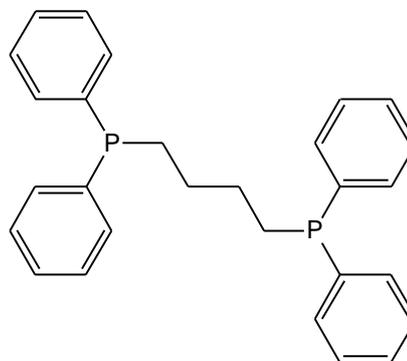
bipy 2,2'-bipiridina



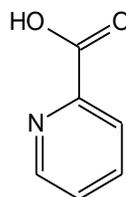
PPh₃ Trifenilfosfina



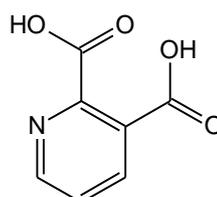
dppb 1,4-bis(difenilfosfina)butano



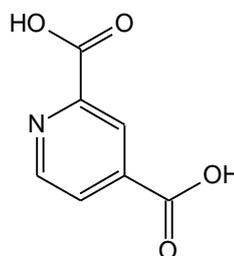
pic Ácido picolínico



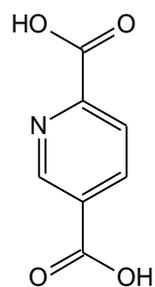
2,3 Ácido 2,3-dicarboxipiridínico



2,4 Ácido 2,4-dicarboxipiridínico



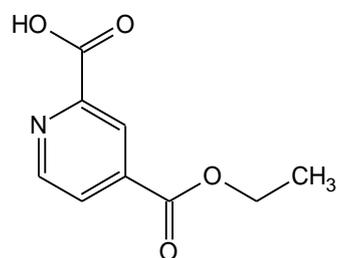
2,5

Ácido 2,5-
dicarboxipiridínico

2,6

Ácido 2,6-
dicarboxipiridínico

2,4e

Ácido 2-carboxi-4-
etoxicarbonilpiridínico

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Valores de IC ₅₀ (μM) na linhagem MDA-MB-231 para alguns complexos de rutênio sintetizados no LERCI.....	16
TABELA 1.2 – Valores de CIM para complexos de rutênio desenvolvidos pelo LERCI.....	20
TABELA 3.1 – Volumes utilizados na preparação das amostras de viscosidade	36
TABELA 4.1 – Dados de condutância molar para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos	47
TABELA 4.2 – Dados de análise elementar para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos	48
TABELA 4.3 – Atribuições das frequências vibracionais (cm ⁻¹) correspondente ao grupo carboxilato no ligante livre e coordenado.....	50
TABELA 4.4 – Atribuições das frequências vibracionais (cm ⁻¹) dos complexos de rutênio contendo os ligantes dicarboxipiridínicos ^{58,59}	52
TABELA 4.5 – Dados dos espectros eletrônicos dos complexos; solvente metanol. (ε/ mol ⁻¹ .cm ⁻¹ .L) λ/nm.....	54
TABELA 4.6- Valores de deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento para os complexos de rutênio contendo os ligantes dicarboxipiridínicos, em CH ₃ OH / D ₂ O.....	57
TABELA 4.7 – Deslocamento químico para os sinais referentes aos hidrogênios dos ligantes dicarboxipiridínicos livres, em DMSO-d ₆	60
TABELA 4.8 – Deslocamento químico para os sinais referentes aos carbonos dos ligantes dicarboxipiridínicos livres, em DMSO-d ₆	64
TABELA 4.9 – Dados de voltametria cíclica para os complexos de rutênio (100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl)	70
TABELA 4.10 – Distância de ligação (Å) das estruturas cristalinas obtidas.	74

TABELA 4.11 – Dados obtidos pela equação de Stern-Volmer para a interação dos complexos com HSA (DP = desvio padrão).....	92
TABELA 4.12 – Parâmetros de ligação obtidos pela equação de Stern-Volmer para HSA com os complexos (DP = desvio padrão).....	93
TABELA 4.13 – Parâmetros termodinâmicos calculados para os complexos estudados neste trabalho.....	95
TABELA 4.14 – Dados de absorvidade molar (ϵ) e lipofilicidade (Log P) dos complexos de Ru(II) com ligantes dicarboxipiridínicos	97
TABELA 4.15 – Valores de IC_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os complexos e ligantes avaliados nas linhagens tumorais e sadias	98
TABELA 4.16 – Índice de seletividade calculado através da divisão dos valores de IC_{50} das células sadias pelas células tumorais.....	99
TABELA 4.17 – Dados de índice de seletividade e concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para os complexos frente Mycobacterium tuberculosis	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Etapas envolvidas no processo de P&D de fármacos (adaptado de Guido, et. al. ⁶),* ADME = absorção, distribuição, mecanismo e excreção.....	2
FIGURA 1.2 – Aplicações de metais em medicina (adaptado De FARRER & SADLER ⁸).....	3
FIGURA 1.3 – Arsfenamina, estruturas propostas por Paul Erlich (A) e por Lloyd, et. al. (B e C) ⁹	4
FIGURA 1.4 – Taxas brutas estimadas para 2016 da incidência dos tipos de câncer em homens e mulheres (adaptado de INCA ¹⁰).....	6
FIGURA 1.5 – Estágios de crescimento tumoral (*linfonodos são estruturas do sistema linfático que filtram a linfa antes de ser devolvida para o sistema sanguíneo).	7
FIGURA 1.6 – Representação esquemática do modo de ação do cisplatina (adaptado de BENEDETTI ¹³).	10
FIGURA 1.7 – Estrutura cristalina da molécula formada com coordenação do cisplatina ao DNA (adaptado de TODD ¹⁴).	11
FIGURA 1.8 – Estruturas dos complexos de platina utilizados no tratamento do câncer.....	12
FIGURA 1.9 – Complexos de rutênio sintetizados pelo grupo de B. K. Keppler ¹⁶	13
FIGURA 1.10 – Ligantes tioureia utilizados na síntese de complexos de rutênio do tipo trans-[Ru(L)(PPh ₃) ₂ (bipy)]PF ₆ (Adaptado de CORREA ²⁴).....	16
FIGURA 1.11 – Estimativa da incidência de tuberculose por país (adaptado de WHO ³¹).....	17
FIGURA 1.12 – Fármacos de primeira e segunda linha, utilizados no tratamento da tuberculose.....	19

FIGURA 1.13 – Estrutura molecular e de raios X do Complexo binuclear de níquel (II) contendo o ligante (benzoil-hidrazonato)2,6-diacetilpiridina (adaptado de BOTTARI ³⁴).	20
FIGURA 1.14 – Estrutura dos nucleotídeos formadores da estrutura do DNA (adaptado de SLETTEN ³⁹).	22
FIGURA 1.15 – Complexos formados da coordenação do cobre a nucleotídeos (guanossina-5´monofosfato), (adaptado de SLETTEN ³⁹).	23
FIGURA 1.16 – Estrutura de raios X do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})]^{2+}$ intercalado ao d(ATGCAT) ₂ de DNA (adaptado de PAGES ⁴²).	24
FIGURA 1.17 – Estrutura cristalográfica da albumina do soro humano (HSA) (adaptado de PENG ⁴⁴).	26
FIGURA 1.18 – Estruturas moleculares dos ácidos dicarboxipiridínicos.	26
FIGURA 1.19 – Via metabólica do triptofano (via dos kinurênicos), contendo o ácido 2,3-dicarboxipiridínico como um de seus componentes (adaptado de STONE ⁵¹).	27
FIGURA 4.1 – Complexos de rutênio contendo os ligantes 2,5-dicarboxipiridínico e 2,6-dicarboxipiridínico. A - $[\text{Ru}(2,5)_2(\text{PPh}_3)_2]$ ^{50,57} B - $[\text{RuCl}(2,6)(\text{PPh}_3)_2]$ ⁴⁹ .	43
FIGURA 4.2 – Modos de coordenação previstos para o ligante 2,4-dicarboxipiridínico.	44
FIGURA 4.3 – Espectros vibracionais na região do infravermelho para o ácido 2,6-dicarboxipiridínico e complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.	49
FIGURA 4.4 – Espectro vibracional na região do infravermelho para os complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.	51
FIGURA 4.5 – Espectros de absorção na região do UV-vis para os complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ respectivamente (metanol).	54
FIGURA 4.6 – Espectro de RMN ³¹ P(¹ H) do complexo do cis- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$, em CH ₃ OH / D ₂ O.	56

FIGURA 4.7 – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}(^1\text{H})$ do complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CH}_3\text{OH} / \text{D}_2\text{O}$	57
FIGURA 4.8 – Comparação de dos espectros de RMN $^{31}\text{P}(^1\text{H})$ obtidos para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos, em $\text{CH}_3\text{OH} / \text{D}_2\text{O}$	58
FIGURA 4.9 – Espectros obtidos durante a reação de esterificação do complexo contendo o ligante 2,4-dicarboxipiridínico, em $\text{EtOH} / \text{D}_2\text{O}$	59
FIGURA 4.10 – Estrutura dos ligantes dicarboxipiridínicos indicando os átomos de hidrogênio.....	60
FIGURA 4.11 – Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo contendo o ligante 2,6-dicarboxipiridínico, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$	61
FIGURA 4.12 – Espectro de RMN - COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$	62
FIGURA 4.13 – Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em DMSO-d_6	63
FIGURA 4.14 – Espectro de RMN - COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em DMSO-d_6	63
FIGURA 4.15 – Estrutura dos ligantes dicarboxipiridínicos indicando os átomos de carbono.	64
FIGURA 4.16 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C} (^1\text{H})$ obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$	65
FIGURA 4.17 – Espectro de RMN - HSQC do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$	66
FIGURA 4.18 – Espectros de DEPT - 135 e RMN - $^{13}\text{C} (^1\text{H})$ do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$	67
FIGURA 4.19 – Espectros de DEPT - 135 e RMN - $^{13}\text{C} (^1\text{H})$ do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em DMSO-d_6	68
FIGURA 4.20 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, obtidos em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).....	69

FIGURA 4.21 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆ , obtidos em CH ₂ Cl ₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s ⁻¹ , Ag/AgCl), com 30% de elipsoide.	70
FIGURA 4.22 – Estruturas cristalinas do complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆ (A)	71
FIGURA 4.23 – Estruturas cristalinas dos complexos [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆ (B) e [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆ (C), elipsoides com 30% de probabilidade.....	72
FIGURA 4.24 – Estruturas cristalinas dos complexos [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆ (A), [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆ (B) e [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆ (C).	76
FIGURA 4.25 – Mapa de interação dos complexos [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆ (A), [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆ (B) e [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆ (C), fornecido pelo programa Mercury.....	78
FIGURA 4.26 - Estrutura cristalina do complexo do tipo [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆ descrito por PAVAN, et.al ³⁵	80
FIGURA 4.27 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.	81
FIGURA 4.28 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.	82
FIGURA 4.29 – Gráfico de viscosidade para complexos.....	84
FIGURA 4.30 – Voltametria de onda quadrada para os complexos [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆ e [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆ respectivamente em diferentes quantidades de ct-DNA.	86
FIGURA 4.31 – Estrutura cristalina do complexo do tipo [RuCl(car-bipy)(PPh ₃) ₂ (CO)] descrito por KAMATCHI, et.al. ⁶² (car-bipy = 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina).	88
FIGURA 4.32 – Supressão da fluorescência da HSA frente a diferentes concentrações do complexo [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	90

FIGURA 4.33 – Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexo] para HSA na presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, excitação = 280 nm, $[\text{HSA}] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	91
FIGURA 4.34 – Gráficos de Stern-Volmer de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações do complexo	93

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 – Rota sintética de obtenção dos complexos sintetizados a partir do precursor cis-[RuCl ₂ (bipy)(dppb)].	45
ESQUEMA 4.2 – Rota sintética simplificada para a esterificação do complexo contendo o ligante 2,4-dicarboxipiridínico.	46
ESQUEMA 4.3 – Reação de dissociação dos complexos contendo carboxila livre em tampão 7,4 (Trisma-HCl).	87

RESUMO

“INFLUÊNCIA DO GRUPO CARBOXÍLICO NA ATIVIDADE CITOTÓXICA E NA INTERAÇÃO DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM DNA E HSA”

A proposta deste trabalho foi avaliar como a presença do grupo carboxílico livre pode afetar a interação com o DNA e HSA, e o perfil citotóxico frente a células tumorais, normais e *Mycobacterium tuberculosis*, de um conjunto de complexos de rutênio (II) contendo ligantes dicarboxipiridínicos. Mostramos a síntese, caracterização e avaliação de propriedades biológicas de cinco novos compostos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, onde: N-O = ácido 2,3-dicarboxipiridínico (2,3); ácido 2,4-dicarboxipiridínico (2,4); ácido 2,5-dicarboxipiridínico (2,5); ácido 2,6-dicarboxipiridínico (2,6) e ácido 2-carboxi-4-etoxicarbonil-piridínico (2,4e); dppb = 1,4-bis-difenilfosfinabutano e bipy = 2,2'-bipiridina. O complexo que contém o ligante 2,4e foi sintetizado através da esterificação do complexo contendo o ligante 2,4; o composto $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (pic = ácido picolínico) foi sintetizado para ser usado como controle na comparação dos ensaios biológicos. Todos os compostos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (1D - ^{31}P (^1H), ^1H , ^{13}C (^1H) e 2D - DEPT-135, COSY e HSQC), voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, análise elementar, condutância molar, UV-VIS, infravermelho e espectroscopia de difração de raios X. Os Estudos de interação com o DNA foram realizados por meio de medições de viscosidade, titulações espectrofotométricas e voltametria de onda quadrada, onde os compostos contendo os ligantes 2,3; 2,4; 2,5 e 2,6 não interagiram com o DNA. Atribuímos isso à repulsão entre os grupos carboxílicos livres (íon carboxilato no pH de trabalho) e os grupos fosfato do DNA. Em contraste, os compostos que contêm os ligantes pic e 2,4e interagiram

com o DNA, exibindo constantes de interação da ordem de 10^3 nas titulações espectrofotométricas; não alterando a viscosidade do DNA e diminuindo o potencial do par redox Ru (II) / Ru (III), comportamento característico de interações do tipo eletrostáticas. Nos estudos de interação com HSA, através de titulações fluorimétricas, os compostos contendo os ligantes 2,3; 2,4; 2,5 e 2,6 apresentam constantes de interação (K_b) na ordem de 10^4 - 10^6 , enquanto os compostos com os ligantes pic e 2,4e exibiram interações fracas (aprox. 10^3). Para todos os casos, o mecanismo de interação é estático e estão envolvidas forças hidrofóbicas. A citotoxicidade foi avaliada em duas linhagens celulares de tumores de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF7), uma de câncer de pulmão (A549) e uma de células normais de fibroblastos de hamster chinês (V79). Os complexos contendo carboxila livre não apresentam citotoxicidade frente as células testadas, enquanto os complexos contendo os ligantes pic ou 2,4e se mostraram ativos, exibindo valores de IC_{50} na ordem de $5,1 \mu M$ e seletividade de 3,4 (MCF7), uma valor significativamente menor, em comparação com a cisplatina. Nos testes anti-*Mycobacterium tuberculosis*, apenas os compostos contendo os ligantes pic e 2,4e foram ativos, exibindo valores de CIM menores que o do etambutol, fármaco de primeira linha utilizado no tratamento da tuberculose. Os coeficientes de partição mostraram uma baixa lipofilicidade para todos os compostos contendo o grupo carboxílico livre, comportamento que pode explicar os perfis citotóxicos obtidos.

ABSTRACT**"INFLUENCE OF CARBOXYLIC GROUP IN CYTOTOXICITY AND INTERACTION OF NEW RUTHENIUM COMPLEXES WITH DNA AND HSA"**

The purpose of this work is evaluate how the position of a free carboxyl group can affect the interaction with DNA and HSA, and the cytotoxic profile against tumor and normal cells and *Mycobacterium tuberculosis*, for a set of complexes of ruthenium (II) derived for the 2,3; 2,4; 2,5, and 2,6-pyridinedicarboxylic acids. We show the synthesis, characterization and evaluation of biological properties of five new compounds with general formula $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, where: N-O = 2,3-pyridinedicarboxylic acid (2,3); 2,4-pyridinedicarboxylic (2,4); 2,5-pyridinedicarboxylic acid (2,5); 2,6-pyridinedicarboxylic acid (2,6) and 2-carboxy-4-ethoxycarbonyl-pyridine acid (2,4e); dppb = 1,4-bis-diphenylphosphinobutane and bipy = 2,2'-bipyridine. The complex containing the ligand 2,4e was synthesized through esterification from the complex containing the ligand 2,4 and the complex $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (pic = picolinic acid) was synthesized to compare the biological results. All compounds were characterized by nuclear magnetic resonance (1D - $^{31}\text{P}(\text{H})$, ^1H , $^{13}\text{C}(\text{H})$ and 2D - DEPT-135, COSY and HSQC) cyclic voltammetry and differential pulse, elemental analysis, molar conductance, UV-vis and infrared spectroscopy and X-ray diffraction. DNA interaction studies carried by viscosity measurements, spectrophotometric titration and square-wave voltammetry do not evidence interactions between the compounds containing the ligands 2,3; 2,4; 2,5 and 2,6 and the DNA. We attribute this to the repulsion among the carboxyl free groups (as carboxylate groups at the working pH) and the DNA phosphate groups. In contrast, the compounds containing the ligands pic and 2,4e interacted with DNA showing interaction constants around 10^3 from the spectrophotometric titration; do not changing the DNA viscosity and decreasing the current and

potential of the redox couple Ru(II)/Ru(III), characteristic responses of electrostatic interactions. In the interaction studies with HSA, through fluorometric titrations, the compounds containing the ligands 2,3; 2,4; 2,5 and 2,6 exhibit interaction constants (K_b) in the order of 10^4 - 10^6 , while the compounds with pic and 2,4e ligands showed weaker interactions (aprox. 10^3). For all cases, the interaction mechanism is static and are involved hydrophobic forces. Cytotoxicity was availed in two tumor cell lines from breast cancer (MDA-MB-231 and MCF7), one tumor cell line from lung cancer (A549) and one healthy cell line from normal chinese hamster fibroblast (V79). The complex containing free carboxyl do not show cytotoxicity against any of the tested cells, since the complex containing the pic or 2,4e ligands were active, displaying IC_{50} values in the order of 5,1 μ M and 3,4 of selectivity index (MCF7), a significant lower value in contrast to cisplatin. In tests anti-*Mycobacterium tuberculosis*, only compounds containing ligands pic and 2,4 were active, showing MIC values lower than ethambutol, first-line drug used to treat tuberculosis. Partition coefficients denote a low lipophilicity for all the compounds containing the free carboxylic group, behavior that can explain the cytotoxic profiles obtained.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – O desenvolvimento de novos fármacos	1
1.2 – A química inorgânica medicinal	3
1.3 – O Câncer.....	5
1.3.1 – Metalofármacos no tratamento do câncer.....	8
1.4 – A tuberculose pulmonar	17
1.4.1 – Busca por metalofármacos no tratamento da tuberculose .	19
1.5 – O estudo da interação com alvos moleculares biológicos	21
1.5.1 – DNA	21
1.5.2 – Albumina.....	25
1.6 – Os Ligantes dicarboxipiridínicos	26
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	29
2.1 – Objetivo geral.....	29
2.2 – Objetivos específicos	29
CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 – Materiais.....	31
3.1.1 – Obtenção da atmosfera de Argônio	31
3.1.2 – Solventes	31
3.1.3 – Reagentes químicos em geral.....	31

3.2 – Técnicas experimentais	32
3.2.1 – Condutância Molar.....	32
3.2.2 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho....	32
3.2.3 – Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....	32
3.2.4 – Análise elementar (C, H, N e S)	33
3.2.5 – Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial	33
3.2.6 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	33
3.2.7 – Difração de raios X	34
3.2.8 – Determinação do coeficiente de partição (logP).....	34
3.2.9 – Titulações Espectroscópicas com o DNA.....	35
3.2.10 – Estudo de interação com DNA por viscosidade	35
3.2.11 – Estudo de interação com DNA por voltametria de onda quadrada	36
3.2.12 – Titulação Espectrofluorimétrica com a HSA.....	37
3.2.13 – Testes de citotoxicidade	37
3.2.14 - Ensaio de atividade <i>in vitro</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	38
3.3 – Síntese dos complexos	40
3.3.1 – Síntese dos precursores	40
3.3.1.1 – Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$	40
3.3.1.2 – Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{dppb})]$	40

3.3.1.3 – Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$	41
3.3.2 – Sínteses com os ácidos dicarboxipiridínicos	41
3.3.2.1 – Síntese dos complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	41
3.3.2.2 – Síntese dos complexos do tipo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]$	42
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 – Ácido dicarboxipiridínicos como ligantes na química de coordenação	43
4.2 – Síntese dos complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$	45
4.3 – Caracterização dos complexos	47
4.3.1 – Condutância molar e análise elementar	47
4.3.2 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho....	48
4.3.3 – Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível	53
4.3.4 – Ressonância Magnética Nuclear	55
4.3.4.1 – Ressonância Magnética Nuclear de fósforo - $^{31}\text{P}(^1\text{H})$.	55
4.3.4.2 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e COSY ^1H	59
4.3.4.3 – Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN - ^{13}C), HSQC e DEPT-135.....	64
4.3.5 – Estudo eletroquímico	69

4.3.6	– Difração de raios X	71
4.4	– Avaliação do Potencial Biológico dos Complexos de Rutênio .	79
4.4.1	– Avaliação da Interação dos Complexos com DNA	79
4.4.1.1	– Titulação Espectroscópica com DNA.....	80
4.4.1.2	– Viscosidade	83
4.4.1.3	– Eletroquímica.....	84
4.4.2	– Avaliação da interação dos complexos com HSA	88
4.4.3	– Coeficiente de Partição (Log P).....	96
4.4.4	– Ensaio de Citotoxicidade.....	98
4.4.5	– Ensaio Anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	101
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES		103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		106
APÊNDICE		116
ANEXO.....		151

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1– O desenvolvimento de novos fármacos

A busca por novos medicamentos vem crescendo, tanto no Brasil, como no mundo inteiro, de modo que vemos este tema constantemente presente nas agendas governamentais. O aumento do interesse em P&D (pesquisa e desenvolvimento) de fármacos deve-se a uma série de fatores, dentre eles o crescimento populacional, o aumento da ineficácia de muitos fármacos comerciais e o expressivo desenvolvimento tecnológico ao redor mundo ^{1,2}.

Visando regulamentar a segurança e a efetividade de novos medicamentos foi criado nos Estados Unidos o FDA (*Food and drug administration*) com a competência de estabelecer critérios de análises para a aprovação e posterior comercialização de novos fármacos, isto de forma a evitar que os mesmos fossem oferecidos para consumo humano sem os devidos estudos ^{3,4}. Desta forma foi estabelecido um rigoroso sistema de estudos pré-clínicos (*in vivo e in vitro*) e clínicos (humanos), sendo a fase clínica dividida em fase I, II, III e IV cujas especificações de cada etapa consta na Figura 1.1. Todo este trabalho, desde a concepção do projeto até a liberação do fármaco para a comercialização dura por volta de 15 anos.

Porém, existe um consenso geral entre os pesquisadores, a descoberta de novos medicamentos é algo extremamente difícil por ser caro, demorado, complexo e por exigir a cooperação de várias áreas do conhecimento, de forma que de cada 30.000 moléculas novas sintetizadas 20.000 (66,7%) entram em fase de estudo pré-clínicos, 200 (0,67%) entram na fase I de estudos clínicos, 40 (0,13%) passam para fase II, 12 (0,04%) para a fase III e apenas 9 (0,027%) são aprovadas pelos órgãos regulatórios. Além disso apenas 1 (0,003%) medicamento passa pela fase IV, satisfazendo o mercado e proporcionando retorno para a indústria que investiu um seu desenvolvimento ^{1,3}.

Mesmo não sendo estes números tão otimistas a quantidade de novas drogas aprovadas pelo FDA (*Food and drug administration*) teve um crescimento expressivo passando de 27 em 2013 para 41 novos fármacos aprovados em 2014 representando um crescimento de aproximadamente 50% de um ano para outro e de 30% levando em conta média dos últimos 5 anos ⁵.

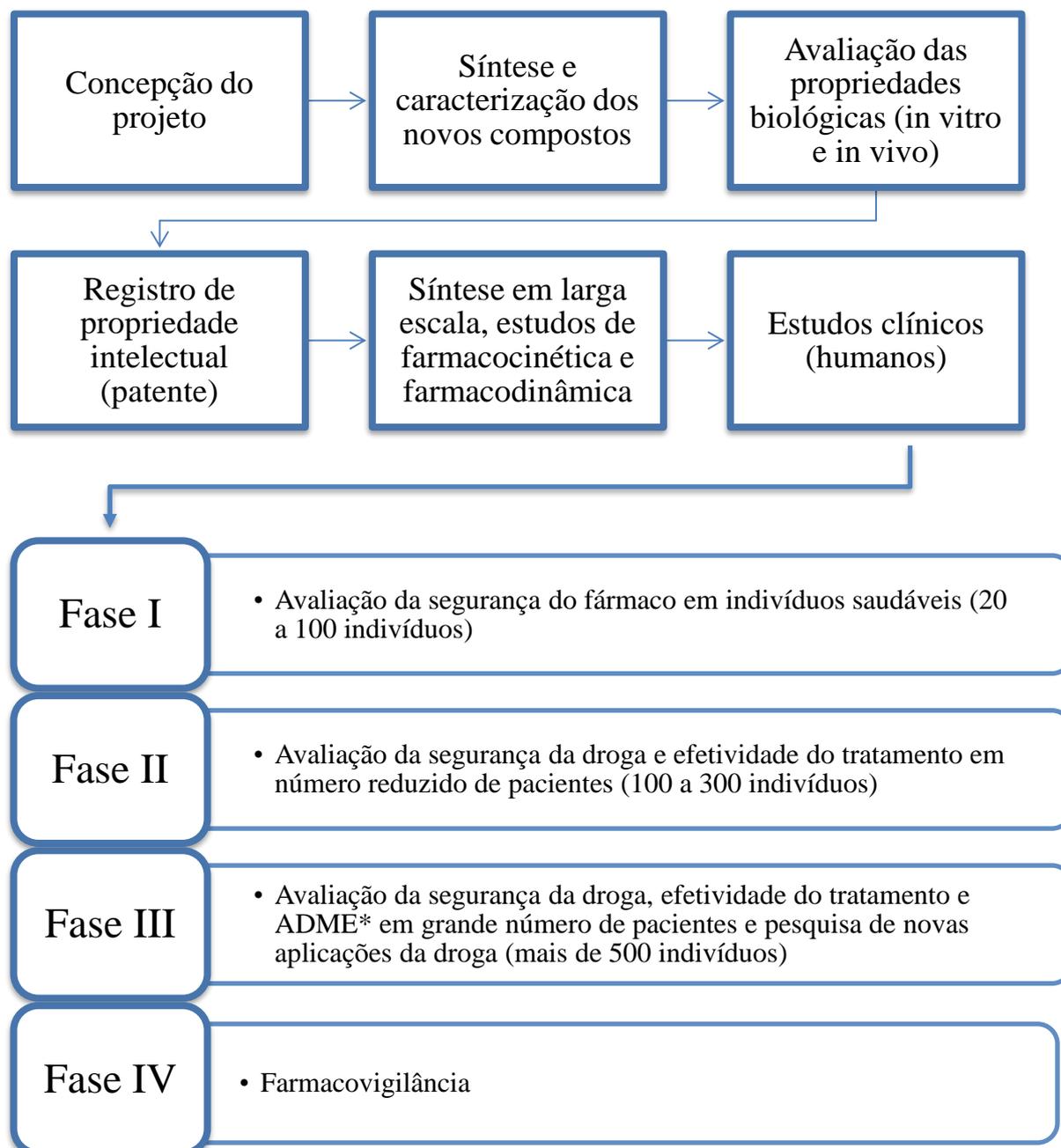


FIGURA 1.1 – Etapas envolvidas no processo de P&D de fármacos (adaptado de Guido, *et. al.* ⁶),* ADME = absorção, distribuição, mecanismo e excreção.

Dentro deste contexto, todo o trabalho exigido para a obtenção de um fármaco está intimamente ligado à química medicinal que tem como objetivo estudar compostos orgânicos ou inorgânicos desde a síntese e caracterização destes materiais até a avaliação da interação com alvos moleculares, de forma a se compreender o mecanismo de ação destes compostos ⁶. Deste modo vemos que este trabalho exige a constante comunicação entre as ciências químicas, físicas, farmacêuticas, médicas e biológicas que são fundamentais para o progresso do mesmo.

1.2 – A química inorgânica medicinal

A química inorgânica medicinal é um campo de pesquisa promissor e desafiador, que oferece uma grande diversidade de compostos com diferentes estruturas e reatividades, exercendo uma inquestionável contribuição na descoberta de novos fármacos para o tratamento e diagnóstico de doenças. Os relatos do uso de metais em medicina constam nos mais antigos registros da história humana, de forma que estas aplicações se expandiram até o dia de hoje de modo que os complexos metálicos estão presentes em grande parte dos tratamentos clínicos ministrados na medicina moderna (Figura 1.2) ^{7,8}.

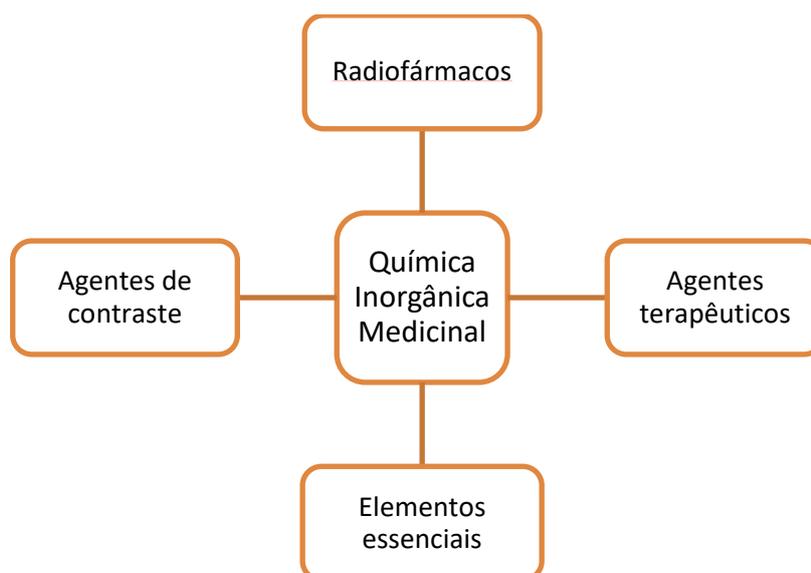


FIGURA 1.2 – Aplicações de metais em medicina (adaptado De FARRER & SADLER ⁸).

O reconhecimento da eficiência dos complexos metálicos em medicina tem sido um processo lento, isto devido a ligação de metais a sua toxicidade, levando a comunidade científica a pouco se interessar pelo desenvolvimento de fármacos provenientes de complexos inorgânicos. Em 1910, nos primórdios da medicina moderna, a química inorgânica demonstrou seu papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, isto quando Paul Erlich desenvolveu uma gama de compostos de arsênio visando o tratamento da sífilis. Através da alteração dos ligantes da esfera de coordenação do arsênio, Erlich notou que a reatividade e a toxicidade dos compostos mudavam, permitindo assim direcionar o estudo para a obtenção de uma molécula específica, a arsfenamina, transformando um metal cujos complexos exibiam alta toxicidade em um fármaco eficiente no tratamento da sífilis ^{7,9}.

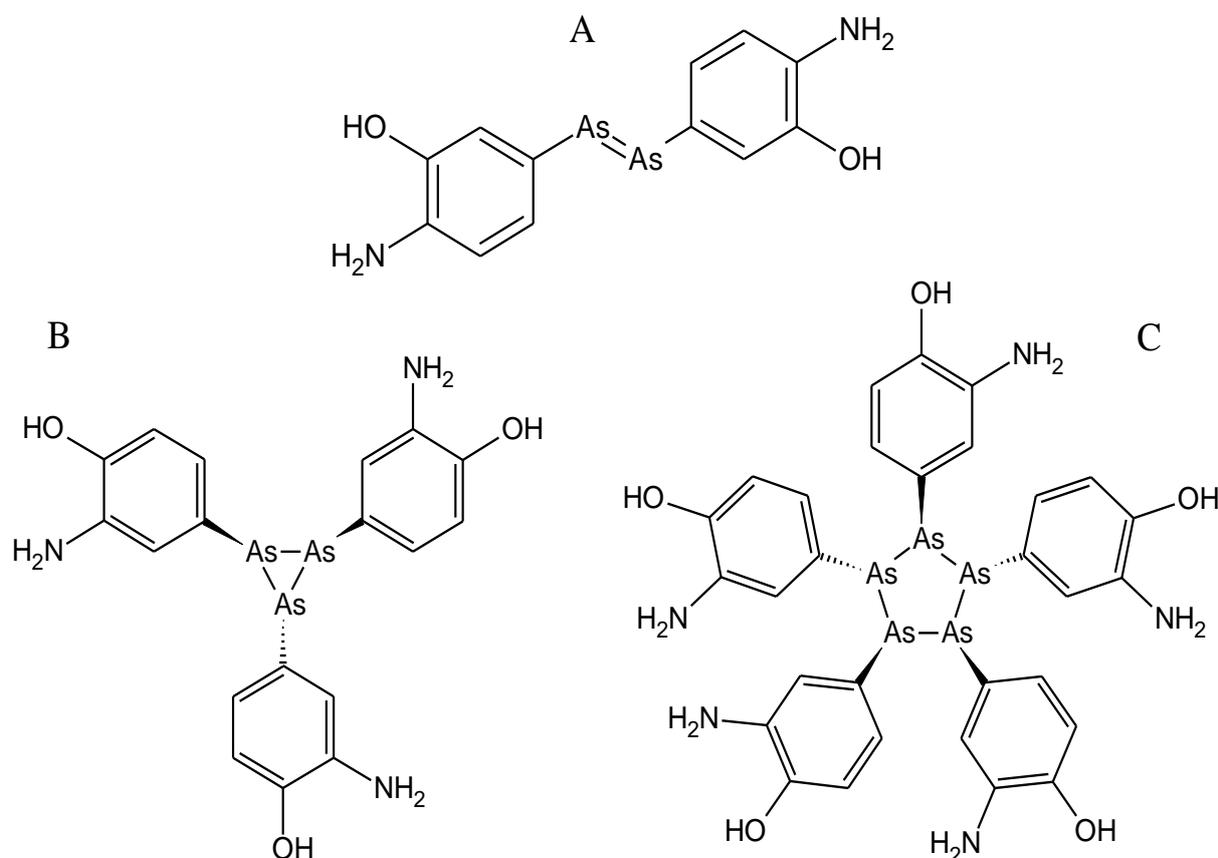


FIGURA 1.3 – Arsfenamina, estruturas propostas por Paul Erlich (A) e por Lloyd, *et. al.* (B e C) ⁹.

É a estrutura da arsfenamina, inicialmente proposta por Erlich, foi definida como uma molécula bimetálica, onde os dois átomos de arsênio se encontravam ligados por uma dupla ligação, conforme a estrutura A da Figura 1.3. Por quase 100 anos a real estrutura deste complexo foi debatida, devido uma série de inconsistências dos dados obtidos nas diversas caracterizações feitas para este complexo, surgindo várias propostas estruturais tanto na forma polimérica quanto na policíclica, porém nenhuma consistente com todas as técnicas de caracterização. Somente em 2005, com o avanço das técnicas de espectroscopia de massa com ionização por “electrospray”, foi obtida uma estrutura final para o composto, sendo definida como uma mistura de moléculas cíclicas com anéis de arsênio de três e cinco membros ⁹, conforme descrito nas estruturas B e C da Figura 1.3.

A arsfenamina foi o composto padrão no tratamento da sífilis por 30 anos, sendo substituído somente após o advento da penicilina. A abordagem feita por Paul Erlich foi um dos principais legados de seu trabalho, pois mostrou que a química inorgânica possui uma diversidade química valiosa para o desenvolvimento de novas drogas ^{7,9}.

A literatura traz inúmeros relatos que confirmam a eficácia de compostos de coordenação em diferentes aplicações médicas como: anticâncer (Ru, Ga, Pt, In, Ti, Au, Sn), antimicrobianos (As, Cu, Zn, Ag, Bi, Hg), antiartrite (Au), antipsicótico (Li), antiúlcera (Bi), antiácidos (Ca, Mg, Na, Al), anti-hipertensivo (Fe, Zn), miméticos de enzimas (Fe, Cu, Mn), radiofármacos (Re, Y, Pb, Tc) e agentes quelantes ⁷.

1.3 – O Câncer

O câncer é um problema de saúde pública mundial que vem a cada ano ganhando maiores dimensões. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incidência de câncer no mundo cresceu cerca de 20% na última década. A OMS prevê também que no ano de 2030, 27 milhões de novos casos serão

diagnosticados, 17 milhões de mortes serão provocadas por câncer e 75 milhões de pessoas serão portadoras de câncer, porém não serão diagnosticadas ¹⁰.

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostram que somente no Brasil estão previstos para 2016 cerca de 596 mil novos casos de câncer, dentro dos variados tipos do mesmo. Os tipos de câncer mais incidentes no sexo feminino são os de mama, cólon, reto e colo do útero, e para o sexo masculino próstata, pulmão, traqueia e brônquio(Figura 1.4) ¹⁰.



FIGURA 1.4 – Taxas brutas estimadas para 2016 da incidência dos tipos de câncer em homens e mulheres (adaptado de INCA ¹⁰).

Câncer é o termo usado para designar um conjunto de mais de cem doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células que levam a formação de um tumor. Geralmente o câncer provêm de uma única célula que sofre mutação, que se multiplica gerando células herdeiras que com o passar do tempo vão acumulando outras mutações, dando origem a uma célula tumoral. Quando este crescimento é formado por células normais que se multiplicam vagarosamente, este tumor é classificado como benigno, porém quando este crescimento é rápido e resistente aos mecanismos de morte celular, o tumor é denominado de maligno, podendo migrar para outras regiões do corpo, invadindo

órgãos distantes e dando origem a novos tumores (metástase) ¹¹. Os casos de câncer mais comuns passam por quatro estágios de crescimento, como pode ser visto na Figura 1.5.

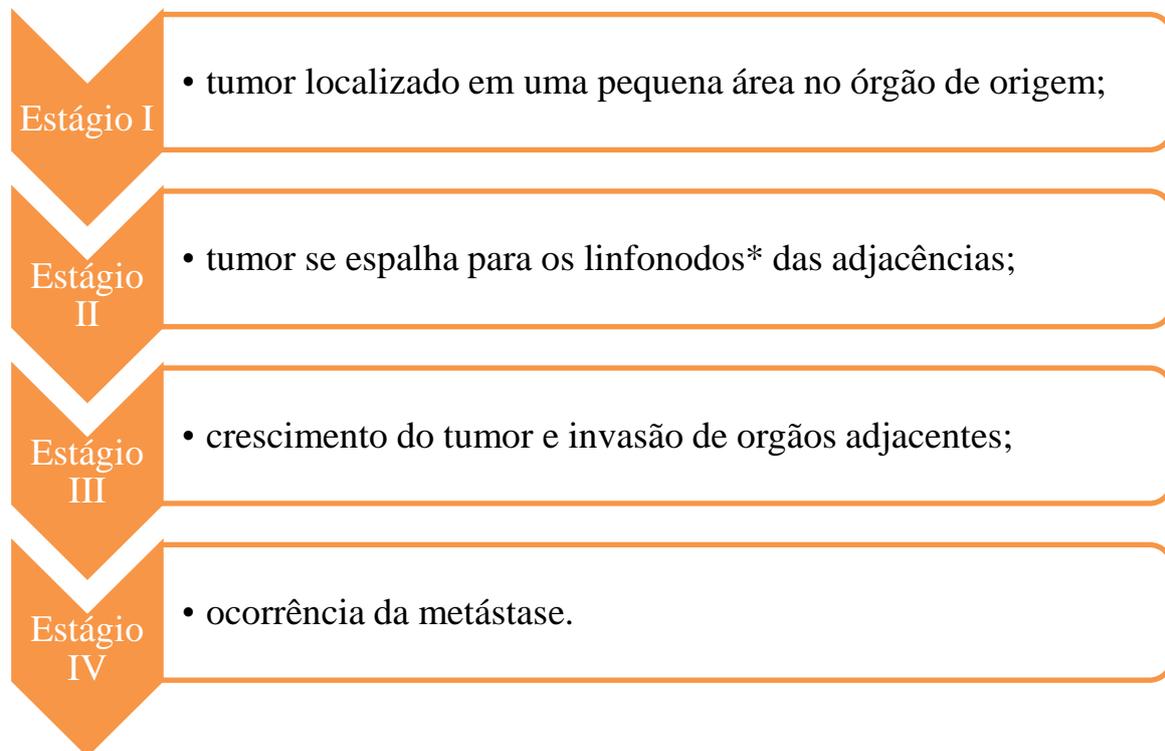


FIGURA 1.5 – Estágios de crescimento tumoral (*linfonodos são estruturas do sistema linfático que filtram a linfa antes de ser devolvida para o sistema sanguíneo).

Os fatores que levam ao surgimento do câncer são variados, podendo ser classificados como ambientais, que são os causadores de cerca de 80% dos casos diagnosticados, ou hereditários, que se refere aos outros 20%. O uso de tabaco, alcoolismo, dieta não saudável, e o sedentarismo são os fatores de risco mais comuns em todo o mundo, porém existem vários outros, impossibilitando a determinação de uma causa comum a todos os casos de câncer relatados.

Tradicionalmente, os procedimentos utilizados para a terapia do câncer são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia tem sido efetiva em

casos onde o tumor se encontra no primeiro estágio de crescimento, porém quando o tumor já se encontra em estágios mais avançados, a utilização dos tratamentos adjuvantes, como a radioterapia e a quimioterapia, se faz necessária ¹¹.

A radioterapia pode levar a uma diminuição drástica do tumor, isto porque os feixes de radiação ionizantes interagem com os tecidos, dando origem a elétrons que ionizam o meio, causando danos nas estruturas das células, ocasionando a ruptura das cadeias do DNA. Os danos causados podem levar à incapacidade de reprodução das células e à inativação de alguns sistemas vitais, porém a radiação utilizada pode, da mesma forma, causar danos às células normais ocasionando uma série de efeitos indesejáveis.

Para a maioria dos tipos de câncer, a quimioterapia é o tratamento com maior efetividade, neste tratamento um fármaco é administrado ao paciente visando o transporte do mesmo pelo sistema circulatório proporcionando a distribuição do medicamento por todo o organismo. Entretanto, em decorrência da distribuição da droga por todo o organismo, os quimioterápicos podem atuar de maneira não específica, ocasionando lesões tanto em células cancerosas como em sadias, originando também uma série de efeitos colaterais ¹⁰.

Além disso, existem relatos de vários casos de tumores resistentes à fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer. Assim, estímulo ao desenvolvimento de diferentes agentes quimioterápicos é de grande importância, fazendo da busca por drogas com ação antitumoral comprovada e efeitos colaterais minimizados, um desafio a todos os químicos medicinais.

1.3.1 – Metalofármacos no tratamento do câncer

A descoberta do composto antitumoral chamado cisplatina (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]) foi o grande impulsionador da pesquisa na área de metalofármacos, cujo sucesso no tratamento do câncer despertou o interesse no desenvolvimento de novos complexos metálicos com atividades biológicas. A importante atividade biológica deste complexo foi descoberta por acaso, quando

Barnett Rosenberg desenvolvia um estudo sobre a influência da corrente elétrica no crescimento da bactéria *Escheriqhia coli*, utilizando eletrodos de platina no sistema de geração de corrente. Ao concluir o trabalho Rosemberg notou que a inibição do crescimento da bactéria não ocorria devido à corrente elétrica fornecida, mas sim por causa do produto da oxidação do eletrodo, que reagia com a amônia presente no meio de cultura, proveniente do tampão amônia, gerando compostos de platina do tipo *cis*-[Pt(NH₃)_nCl_{6-n}] ^{12,13}.

Após a realização dos testes pré-clínicos o cisplatina foi encaminhada para os testes clínicos, devido à obtenção de resultados promissores, de modo que em 1971 foi feito o primeiro experimento em pacientes portadores de câncer, conseguindo liberação do FDA para comercialização em 1978. O cisplatina é utilizada no tratamento do câncer ovariano, bexiga, cervical, pulmonar e testicular, além de ser administrada também em conjunto com outras drogas, sendo o principal medicamento no tratamento do câncer de testículos até os dias de hoje ¹².

O sucesso do cisplatina foi marcante, de modo que antes da utilização da mesma na oncologia, 90% dos pacientes com câncer testicular morriam, e após a liberação da comercialização do cisplatina, apenas 10% dos casos não eram curados, por causa da ocorrência de metástase, enquanto que os outros 90% obtiveram diagnóstico de cura da doença ^{12,13}.

Existe um consenso geral de que o provável mecanismo de ação do cisplatina é a interação com o DNA, uma vez que o fármaco está na corrente sanguínea, no meio extracelular, onde a concentração de cloreto é da ordem de 100 mM, inviabilizando a hidrólise do composto mantendo o complexo com sua estrutura original. Porém, o cisplatina é um composto com alta lipofilicidade, permeando com facilidade a membrana celular. Uma vez no interior da célula, a concentração de cloreto é de 3 a 4 mM, o que viabiliza a labilização do cloreto e consequente hidrólise do complexo, substituindo os átomos de cloro por moléculas de água ^{7,13}, conforme pode-se ver na Figura 1.6.

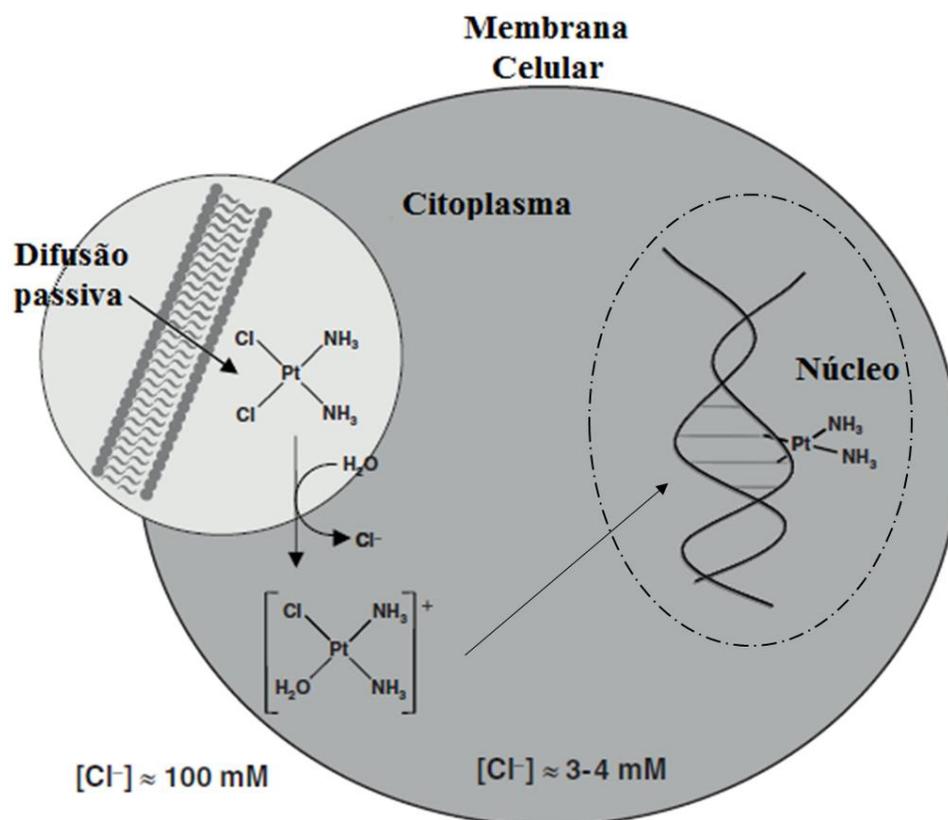


FIGURA 1.6 – Representação esquemática do modo de ação do cisplatina (adaptado de BENEDETTI ¹³).

O complexo formado a partir da labilização dos cloretos e coordenação das moléculas de água pode interagir com vários alvos moleculares no interior da célula, como carbonatos, sulfatos, nitrogênios ou enxofres de proteínas, porém estruturas de raios X vem demonstrando a possibilidade da coordenação do aquo-complexo as bases nitrogenadas, principalmente ao nitrogênio da posição 7 da guanina ¹⁴. Neste caso o modo de interação complexo/DNA é do tipo covalente, pois o complexo liga-se diretamente à cadeia do DNA modificando a estrutura (Figura 1.7), levando à parada da reprodução celular, podendo até desencadear mecanismos de morte celular, isto quando os danos causados não forem passíveis de reparo ¹⁴.

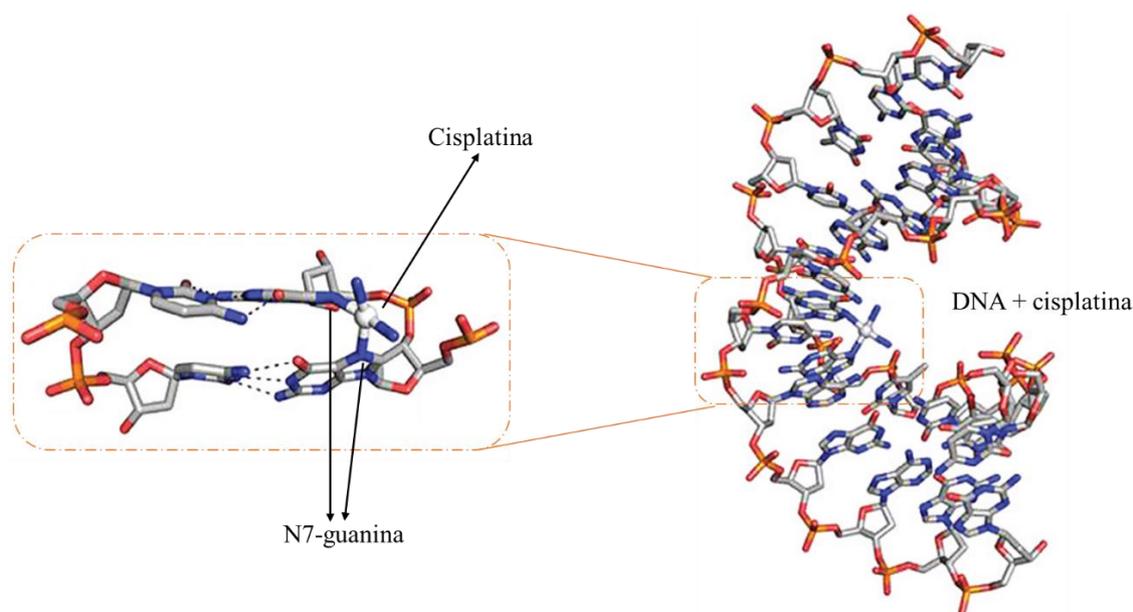


FIGURA 1.7 – Estrutura cristalina da molécula formada com coordenação do cisplatina ao DNA (adaptado de TODD ¹⁴).

Porém, os pacientes tratados com o cisplatina também estão sujeitos à efeitos colaterais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, diarreia, náuseas e vômito. Devido a estas e outras limitações que foram surgindo com o tempo, complexos similares ao cisplatina foram desenvolvidos, buscando a diminuição da toxicidade e manutenção ou melhora da atividade antitumoral do mesmo. A partir daí surgiram vários outros compostos similares ao cisplatina, que atualmente são amplamente empregados na oncologia por todo mundo. Na Figura 1.8 são mostradas algumas estruturas dos complexos de platina disponíveis para o tratamento do câncer.

As modificações estruturais realizadas levaram à alterações que influenciaram diretamente na atividade biológica, principalmente quanto a velocidade da reação de hidrólise, que produz o aquo-complexo que irá interagir com as biomoléculas. Um exemplo disto é a comparação da atividade biológica dos complexos *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] e *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂], onde apenas o cisplatina é bem ativo, sendo o complexo *trans* pouco ativo, isto devido a maior estabilidade do mesmo, conferindo resistência à reação de hidrólise ¹².

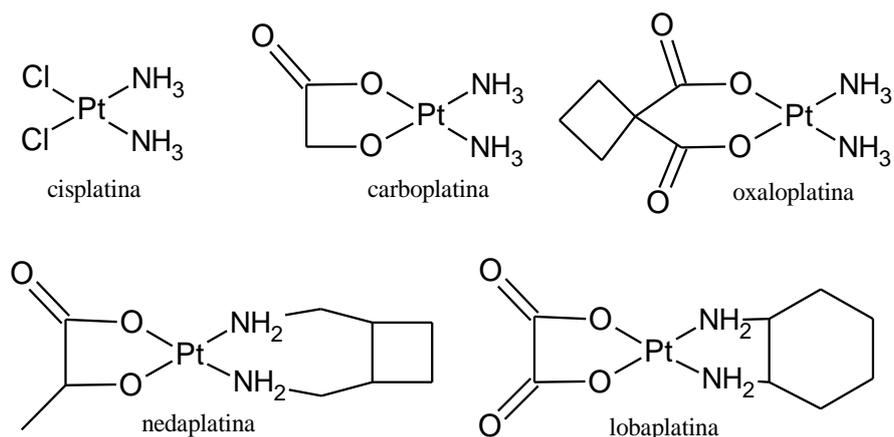


FIGURA 1.8 – Estruturas dos complexos de platina utilizados no tratamento do câncer.

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm demonstrando a versatilidade de vários complexos, não só de platina, mas também de outros metais de transição, como agentes antitumorais. Sempre visando desenvolver novos constituintes ativos com alta citotoxicidade frente à células tumorais, e com menor citotoxicidade às células normais, minimizando os efeitos colaterais.

Um dos principais destaques da literatura são os complexos de rutênio, que nos últimos 20 anos tem sido bastante explorados, tanto no aspecto químico dos complexos formados, quanto em suas aplicações em diversas áreas, como na química de materiais, catálise e química medicinal. Uma das vantagens de se utilizar metais diferentes da platina é a possibilidade de se trabalhar com elementos com diferentes números de coordenação, estados de oxidação variados, e cinéticas de troca de ligantes diferentes, isto quando possível a labilização de um ligante ¹⁵.

Os complexos de rutênio vêm apresentando vantagens em comparação aos fármacos de platina, mostrando maior seletividade às células cancerígenas, levando à redução dos efeitos colaterais e também tem exibido atividade citotóxica contra células resistentes ao cisplatina. Estudos recentes mostram que alguns complexos de rutênio marcados com isótopos radioativos possuem a capacidade de se acumular em tecidos tumorais, podendo assim não só

exercer a atividade antitumoral como também permitir a visualização do tumor através de técnicas cintilográficas ¹⁵.

Outro destaque é o uso de complexos de rutênio contendo ligantes nitrogenados e fármacos com atividades antitumorais coordenados a ele. Estes complexos têm exibido a capacidade de interagir com ácidos nucleicos e em sítios específicos da superfície de proteínas alterando suas atividades. Estas interações com biomoléculas podem levar a perda da atividade das mesmas, fazendo com que o complexo exerça maior efeito citotóxico, influenciando diretamente no efeito terapêutico do composto.

O grupo de pesquisa do professor Bernhard K. Keppler tem sintetizado uma série de complexos de rutênio com atividade antitumoral, sendo grande parte destes, complexos aniônicos, contendo quatro cloretos ligados ao metal e cátions imidazol ou sódio como contra íon. Nesta família de complexos, destacam-se três, o NAMI-A (*New Metastatic Anti-tumor Metastasis Inhibitor*), KP1019 e NKP1339 (Figura 1.9), estando todos em testes clínicos.

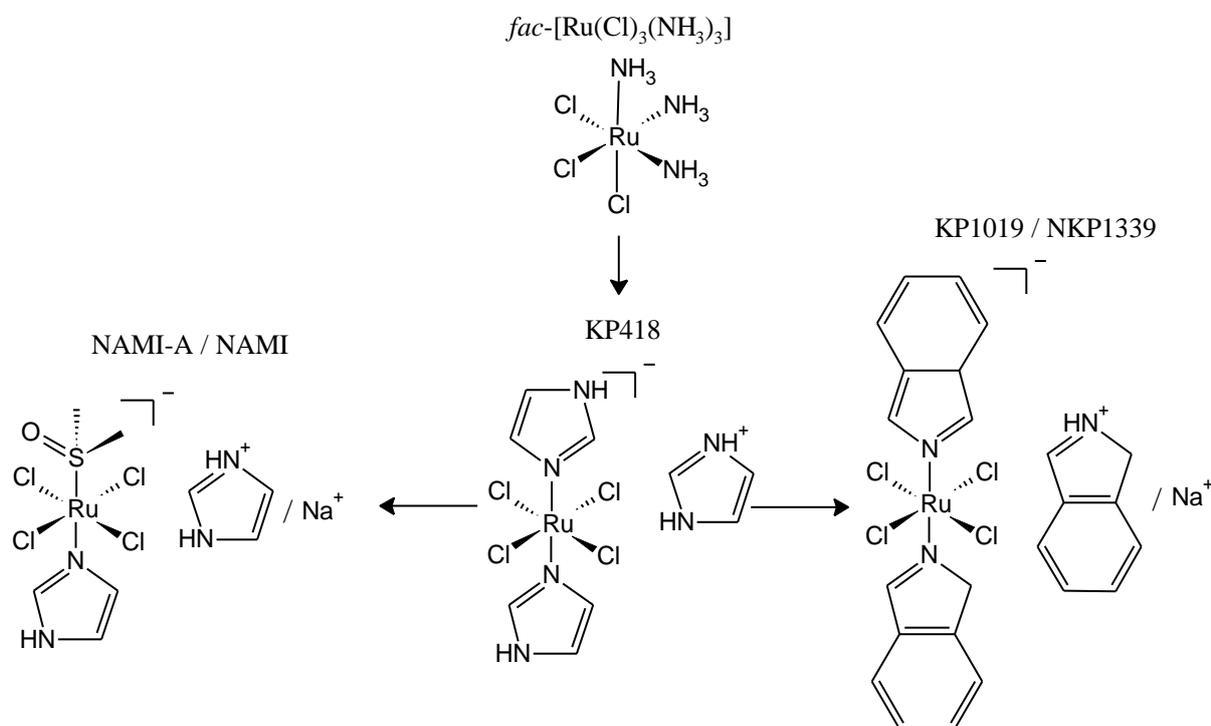


FIGURA 1.9 – Complexos de rutênio sintetizados pelo grupo de B. K. Keppler ¹⁶.

O NAMI-A é ativo contra carcinomas mamários (Mca), pulmonares (Lewis) e melanoma (B16), inibindo o crescimento destes tumores, aumentando a espessura da membrana que envolve tumores primários e conseqüentemente impedindo a vascularização do mesmo. Em decorrência destes efeitos o tumor é impedido de invadir tecidos vizinhos ou cair na corrente sanguínea, diferindo assim do cisplatina por exibir efeito antimetastático ¹⁵.

Nos testes clínicos realizados com o NAMI-A, na fase I, os pacientes exibiram tolerância moderada ao complexo. Na fase II, o estudo foi realizado em pacientes com câncer de pulmão, já tratados com gencitabina, fármaco orgânico utilizado no tratamento do câncer de pulmão (*Non-Small Cell Lung Cancer - NSCLC*), e o tratamento foi feito em combinação com esta droga. Nesta fase, os resultados mostraram que os pacientes exibiram tolerância ao complexo similar aos pacientes da fase I. Dos 27 pacientes tratados, 15 apresentaram diminuição crescimento tumoral, dentre estes pacientes, 10 apresentaram parada total do crescimento e em um paciente houve a regressão do tumor (diminuição de 4% do volume) ¹⁷.

O KP1019 mostrou-se ativo contra tumores colorretais no estágio I, e estudos mostram que atividade do mesmo pode ser explicada através do transporte pelo ciclo da transferrina, e o complexo torna-se ativo no meio intracelular após a redução de rutênio III para II ¹⁶. Os estudos clínicos na fase I mostraram que os pacientes exibiram maior tolerância ao complexo em comparação ao NAMI-A, entretanto, nos estudos de farmacocinética, observou-se que a biodisponibilidade é consideravelmente baixa (1%), devido à alta afinidade do complexo pelas proteínas do plasma sanguíneo. Desde 2008, vários trabalhos vem relatando que o KP1019 encontra-se na fase II, porém até o presente momento, nenhum resultado referente ao mesmo foi divulgado ^{16,18-22}.

A principal limitação relatada para o KP1019 é a baixa solubilidade, que provavelmente, é um dos fatores que dificultam a realização dos testes clínicos ¹⁹. Visando solucionar este problema, foi sintetizado outro complexo

similar ao KP1019, contendo no lugar do contra íon imidazol, o íon sódio, conferindo maior solubilidade, gerando um novo complexo, chamado de NKP1339. Nos estudos da fase I, o NKP1339, exibiu efeitos colaterais menos intensos que em seu análogo, devido a maior tolerância dos pacientes ao tratamento ²³. Desta forma, os resultados dos testes clínicos na fase I têm demonstrado que uma das principais vantagens destes complexos de rutênio é a presença efeitos secundários bastante limitados, comparando com os fármacos atualmente utilizados no tratamento do câncer ²³.

Nos últimos anos o Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) tem se dedicado à síntese, caracterização e estudo das atividades citotóxicas exibidas pelos complexos de rutênio sintetizados pelo grupo, os quais têm se mostrado bastante promissores. Uma das estratégias do grupo é a coordenação de ligantes que já possuem atividade biológica, ou ligantes contendo a presença de grupamentos orgânicos específicos, visando a determinação de uma correlação entre estrutura e atividade dos compostos, sempre visando a melhora da atividade citotóxica frente as células tumorais, e diminuição da citotoxicidade frente as células sadias.

A tabela 1.1 mostra alguns valores de IC₅₀ (concentração mínima de complexo capaz de inibir o crescimento de 50% das células) na linhagem de adenocarcinoma de mama humana (MDA-MB-231), onde vemos valores consideravelmente menores que a cisplatina e doxorubicina, mostrando a relevância da atividade citotóxica dos complexos obtidos no laboratório. Outro exemplo são os complexos contendo tioureias como ligantes. Neste trabalho pode-se observar a influência dos grupos furoil, benzil e fenil nos ligantes tiourea (Figura 1.10), resultando em complexos com IC₅₀ da ordem de aproximadamente 0,3 µM ²⁴. Os substituintes do ligante tiourea influenciaram também nas interações com DNA, onde os complexos contendo o furoil como substituinte exibiram maiores constantes de interação com a biomolécula, isto em comparação com os ligantes contendo benzil e fenil ²⁴.

TABELA 1.1 – Valores de IC₅₀ (μM) na linhagem MDA-MB-231 para alguns complexos de rutênio sintetizados no LERCI

Complexos	IC ₅₀	Complexos	IC ₅₀
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppb)]	31,3	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppp)]	14,4
[Ru(dmpm)(bipy)(dppb)]PF ₆	0,52 ²⁵	[Ru(pyS)(dppp)(bipy)]PF ₆	0,62 ²⁵
<i>cc</i> -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,9 ²⁶	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppe)]	15,8
[RuCl(Im)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,56 ²⁷	[Ru(dmpm)(bipy)(dppe)]	0,14 ²⁵
[RuCl ₂ (alo) ₂ (PPh ₃) ₂]	<0,78 ²⁷	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dcpe)]PF ₆	0,25 ²⁶
[Ru(AG)(dppe) ₂]PF ₆	0,73 ²⁸	[Ru(ABz)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,48 ²⁸
Cisplatina	2,44	[RuCl(AcPyBz)(dppb)]	0,4 ²⁹
Doxorrubicina	3,67	[RuCl(AcPyBzNO ₂)(dppb)]	0,8 ²⁹

dppb = 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano; dppe = 1,2-*bis*(difenilfosfina)etano; dppp = 1,3-*bis*(difenilfosfina)propano; bipy = 2,2'-bipiridina; Im = imidazol; alo = alopurinol; AG = ácido gálico; dmpm = 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina; pyS = 2-mercaptopiridina; ABz = ácido benzoico; AcPyBz = S-benzil-N-(2-acetilpiridina)ditiocarbazato; AcPyBzNO₂ = S-p-nitrobenzil-N-(2-acetilpiridina)ditiocarbazato

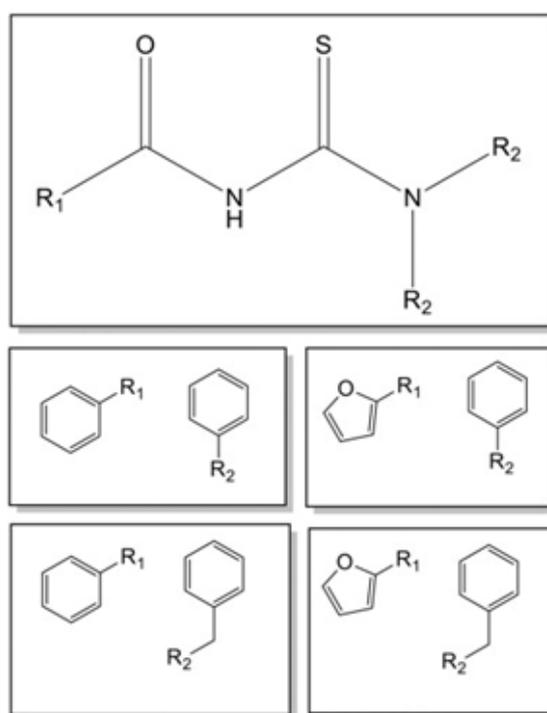


FIGURA 1.10 – Ligantes tioureia utilizados na síntese de complexos de rutênio do tipo *trans*-[Ru(L)(PPh₃)₂(bipy)]PF₆ (Adaptado de CORREA²⁴).

1.4 – A tuberculose pulmonar

A *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose pulmonar, doença caracterizada pela inflamação, caseificação e necrose pulmonar, características que podem levar o paciente a óbito. Os bacilos da bactéria alojados no pulmão podem ser difundidos pelas vias aéreas do paciente contaminado, possibilitando a infecção de outros indivíduos ³⁰. A tuberculose também progride rapidamente em pacientes com imunidade baixa, como portadores do vírus HIV ou pacientes em tratamento com algum medicamento imunossupressor. Estes fatos fazem da tuberculose um problema mundial de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que em 2014, 9.6 milhões de pessoas desenvolveram a doença (Figura 1.11), sendo 12% (1.2 milhões) portadores do vírus HIV, gerando um total de 1.5 milhões de mortes ocasionadas pela tuberculose em 2014, quantidade considerada extremamente alta ³¹.

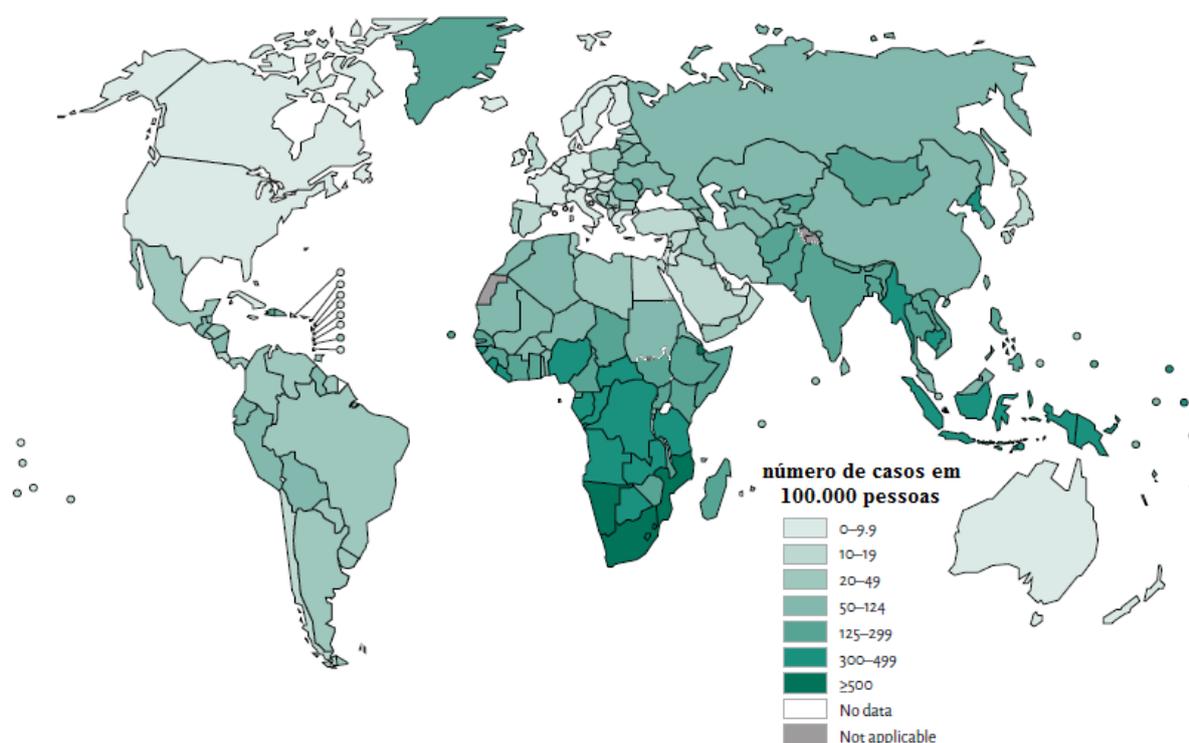


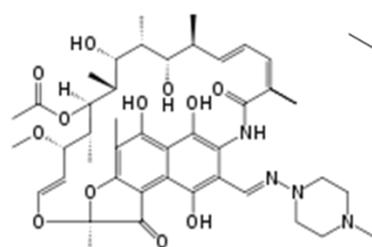
FIGURA 1.11 – Estimativa da incidência de tuberculose por país (adaptado de WHO ³¹).

Cerca de 22 países concentram 80% dos casos de TB do mundo, ocupando o Brasil o 13º lugar no ranking. No Brasil cerca de 50 milhões de pessoas são infectadas anualmente com a bactéria causadora da tuberculose, onde apenas 1 milhão de pessoas dentre as infectadas desenvolvem a doença. A cada ano surgem cerca de 111 mil novos casos e ocorrem 6 mil mortes ³².

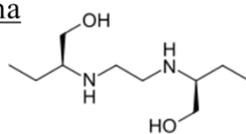
Por muito anos a tuberculose foi considerada uma doença negligenciada, não despertando o interesse das multinacionais ou dos grandes centros de pesquisa pelo desenvolvimento de novos medicamentos. Porém, com o advento do vírus HIV e com o surgimento de bacilos multirresistentes, a tuberculose passou a ser um problema de países desenvolvidos, atraindo mais recursos para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos³².

O tratamento tradicional da tuberculose é caro, longo (6 a 12 meses), e em alguns casos ineficiente, além de apresentar uma série de efeitos colaterais como, icterícia, náuseas, vômito, perda do equilíbrio, asma, alterações visuais, diminuição da audição e cegueira, o que leva muitos pacientes a abandonarem o tratamento. A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos deve-se principalmente pela existência de bactérias multirresistentes, que surgiram devido o abandono do tratamento pelo paciente e pela utilização dos mesmos fármacos por muitos anos, levando ao surgimento de bacilos que não possuem resposta frente às drogas convencionais ^{32,33}.

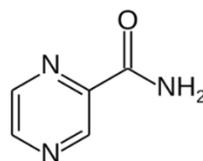
No tratamento dá-se preferência a quatro medicamentos que possuem maior atividade e efeitos colaterais mínimos. Estes compostos são chamados de fármacos de primeira linha (Figura 1.12), sendo alguns deles disponíveis para o tratamento da tuberculose há mais de 50 anos. Caso estes fármacos não exerçam efeito, entram em ação os fármacos de segunda linha (Figura 1.12), que também são utilizados no tratamento da tuberculose há vários anos ³³.

Fármacos de Primeira Linha

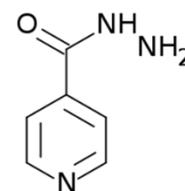
rifampicina



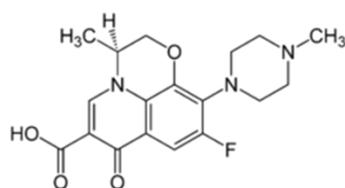
etambutol



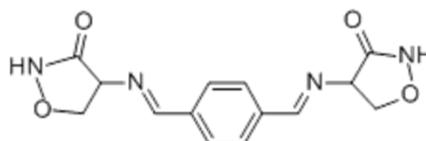
pirazinamida



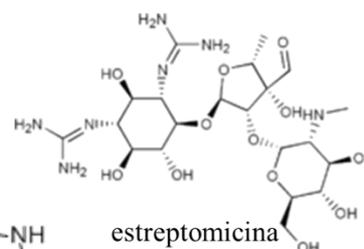
isoniazida

Fármacos de Segunda Linha

levofloxacina



terizidona



estreptomicina

FIGURA 1.12 – Fármacos de primeira e segunda linha, utilizados no tratamento da tuberculose.

1.4.1 – Busca por metalofármacos no tratamento da tuberculose

Complexos metálicos estão se mostrando promissores, obtendo destaque na tentativa de obtenção de novos fármacos no tratamento da tuberculose. O complexo binuclear de níquel (II) contendo o ligante (benzoil-hidrazonato)2,6-diacetilpiridina (Figura 1.13), possui potente atividade contra a tuberculose, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando assim atividade similar à rifampicina. No caso deste complexos de níquel, foi demonstrado que a presença do metal é de essencial para a atividade do composto, aumentando o valor do coeficiente de partição, o que confere a molécula maior lipofilicidade, uma vez que o ligante utilizado não exibiu atividade frente à bactéria ³⁴.

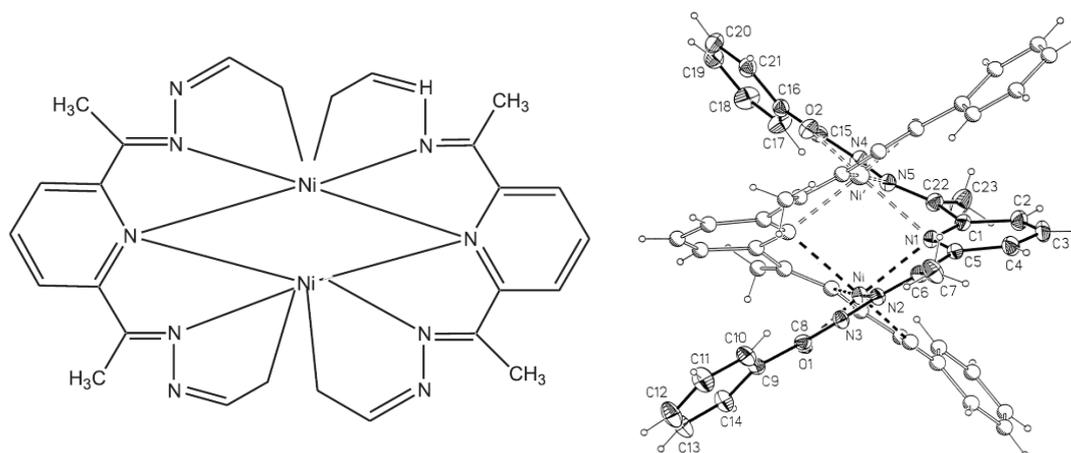


FIGURA 1.13 – Estrutura molecular e de raios X do Complexo binuclear de níquel (II) contendo o ligante (benzoil-hidrazonato)2,6-diacetilpiridina (adaptado de BOTTARI ³⁴).

TABELA 1.2 – Valores de CIM para complexos de rutênio desenvolvidos pelo LERCI

Complexo	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	1,20 ³⁵
[Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF ₆	0,49 ³⁵
[Ru(pic)(dppb)(Cl-bipy)]PF ₆	0,78 ³⁵
[Ru(pic)(dppb)(phen)]PF ₆	0,63 ³⁵
[Ru(pic)(dppe) ₂]PF ₆	0,26 ³⁵
[Ru(2-OH-NIC)(dppb)(bipy)]PF ₆	3,90 ³⁶
[Ru(6-OH-NIC)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,36 ³⁶
[Ru(3-OH-PIC)(dppb)(bipy)]PF ₆	6,30 ³⁶
[Ru(Spym)(bipy)(dppe)]PF ₆	4,12 ³⁷
[Ru(Spym)(bipy)(dppp)]PF ₆	1,56 ³⁷
[Ru(Spym)(bipy)(dppf)]PF ₆	3,12 ³⁷
[Ru(SpymMe ₂)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,78 ³⁸
[Ru(SpymMe ₂)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,78 ³⁸
Etambutol	20,7
Rifampicina	0,015
Isoniazida	0,03

dppb = 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano; dppe = 1,2-*bis*(difenilfosfina)etano; dppp = 1,3-*bis*(difenilfosfina)propano; dppf = 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno; bipy = 2,2'-bipiridina; Cl-bipy = 4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina; Me-bipy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina; phen = 1,10-fenantrolina; pic = ácido picolínico; 2-OH-NIC = ácido 2-hidroxinicotínico; 6-OH-NIC = ácido 6-hidroxinicotínico; 3-OH-PIC = ácido 3-hidroxipicolínico; Spym = 2-tiolatopirimidina e SpymMe₂ = 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina

O Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) também tem se empenhado na procura por novos fármacos no tratamento da tuberculose, buscando avaliar principalmente a atividade anti-*Mycobacterim tuberculosis* de complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos e piridínicos. A tabela 1.2 traz alguns dos resultados obtidos pelo grupo.

1.5 – O estudo da interação com alvos moleculares biológicos

Novos parâmetros têm norteado o desenvolvimento de drogas no tratamento do câncer e da tuberculose. Com o desenvolvimento da bioquímica, passou-se a conhecer uma infinidade de moléculas presentes nos sistemas biológicos, sendo algumas delas essenciais para o crescimento e replicação celular, como o DNA, moléculas que atuam no transporte de substâncias (albumina, transferrina e outras proteínas), moléculas que atuam na replicação do DNA (topoisomerase I e II, helicase, e outras moléculas), moléculas que atuam no ciclo celular (ciclina A, D, E, B e outras moléculas) e moléculas que atuam nos mecanismos de morte celular (caspases e outras moléculas). Deste modo, passou-se a desenhar moléculas a base de metais, visando a interação das mesmas com biomoléculas como proteínas e DNA, de modo a potencializar a ação da droga frente ao câncer ou a tuberculose.

1.5.1 – DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma substância polimérica que contém as informações genéticas de cada indivíduo, e é constituído de subunidades chamadas de nucleotídeos, que são formados por um grupo fosfato, uma pentose (2-desoxirribose) e uma base nitrogenada purínica (guanina e adenina) ou pirimidínica (timina e citosina) (Figura 1.14). Os nucleotídeos ligam-se entre si, formando uma longa cadeia polimérica de desoxinucleotídeos, esta cadeia polimérica interage por ligações de hidrogênio com outra cadeia

correspondente, formando uma dupla fita de DNA que se enrola em torno do eixo comum (Figura 1.14) ³⁹.

As ligações de hidrogênio entre as fitas do DNA são formadas apenas por duas combinações possíveis de interação entre as bases nitrogenadas, adenina-timina e citosina-guanina, onde este emparelhamento entre os pares de base confere ao DNA a sua forma de dupla hélice, conforme mostrado na Figura 1.14.

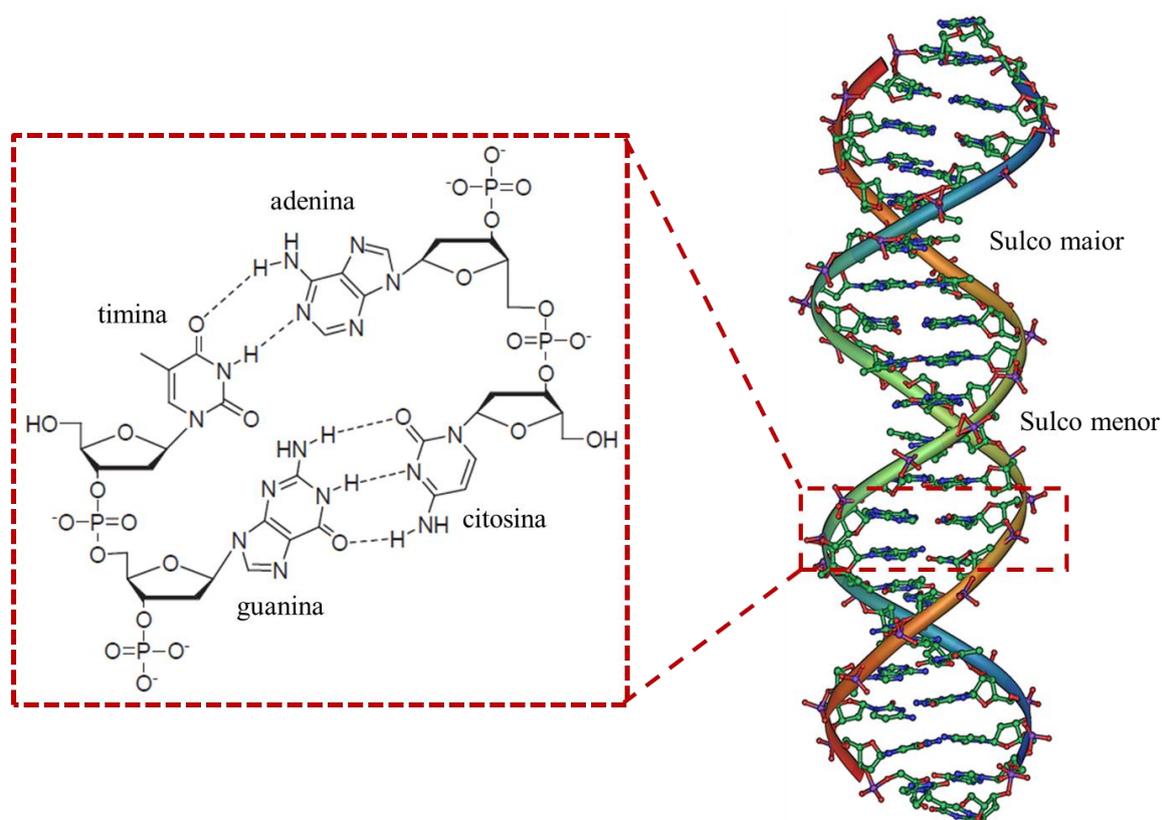


FIGURA 1.14 – Estrutura dos nucleotídeos formadores da estrutura do DNA (adaptado de SLETTEN ³⁹).

Desde que o DNA foi descoberto e sua importância reconhecida, a procura por moléculas que interajam em sítios específicos do DNA tem aumentado, e nesta procura se destacam os complexos de metais de transição, principalmente após a proposição da interação com o DNA como o principal mecanismo de ação do cisplatina e seus derivados. A interação de complexos com

o DNA pode levar ao colapso da estrutura, impedindo a duplicação do DNA e consequentemente impedindo a duplicação da célula, podendo até desencadear mecanismos de morte celular ^{13,39,40}.

A literatura traz três tipos possíveis de interação entre moléculas e DNA, sendo elas intercalação, eletrostática e covalente. As interações covalentes são as que mais danos causam ao DNA, sendo estes danos, na maioria das vezes irreversíveis, por levar a fragmentação das fitas de DNA, e caracteriza-se pela labilização de um dos ligantes do complexo e posterior coordenação do sítio vacante às bases nitrogenadas, grupos fosfatos ou nas hidroxilas das pentoses ⁴¹, como pode-se ver na Figura 1.15, onde temos um exemplo de um complexo formado com a coordenação do cobre a um grupo fosfato e a guanina de um nucleotídeo ³⁹.

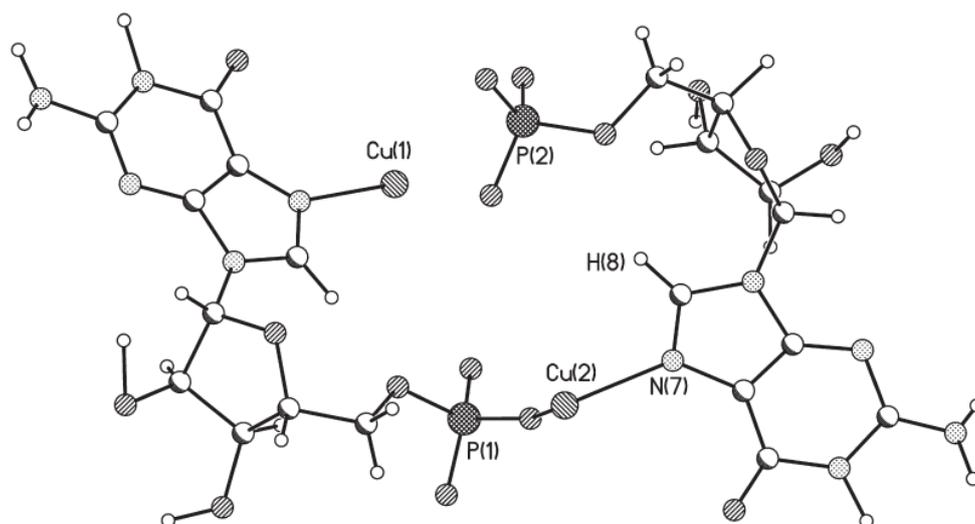


FIGURA 1.15 – Complexos formados da coordenação do cobre a nucleotídeos (guanosina-5' monofosfato), (adaptado de SLETTEN ³⁹).

O principal exemplo de interação covalente é com o cisplatina, onde a obtenção de estruturas de raios X tem comprovado a coordenação do complexo ao DNA, conforme já mostrado na Figura 1.7.

Outra interação bastante explorada entre complexos metálicos e DNA, são as interações intercalativas, onde ligantes que possuem planaridade são alocados entre os pares de base do DNA, formando interações do tipo de Van der Waals e π -stacking. Estas interações levam ao aumento do volume do DNA, ocasionando a desnaturação do mesmo e consequente perda da função. Complexos de rutênio contendo bipyridinas estendidas tem chamado a atenção, de forma que várias publicações tem explorado as interações intercalativas entre as bipyridinas e o DNA ⁴². A Figura 1.16 mostra a estrutura cristalina do aduto formado entre um complexo de rutênio intercalado a um fragmento de DNA.

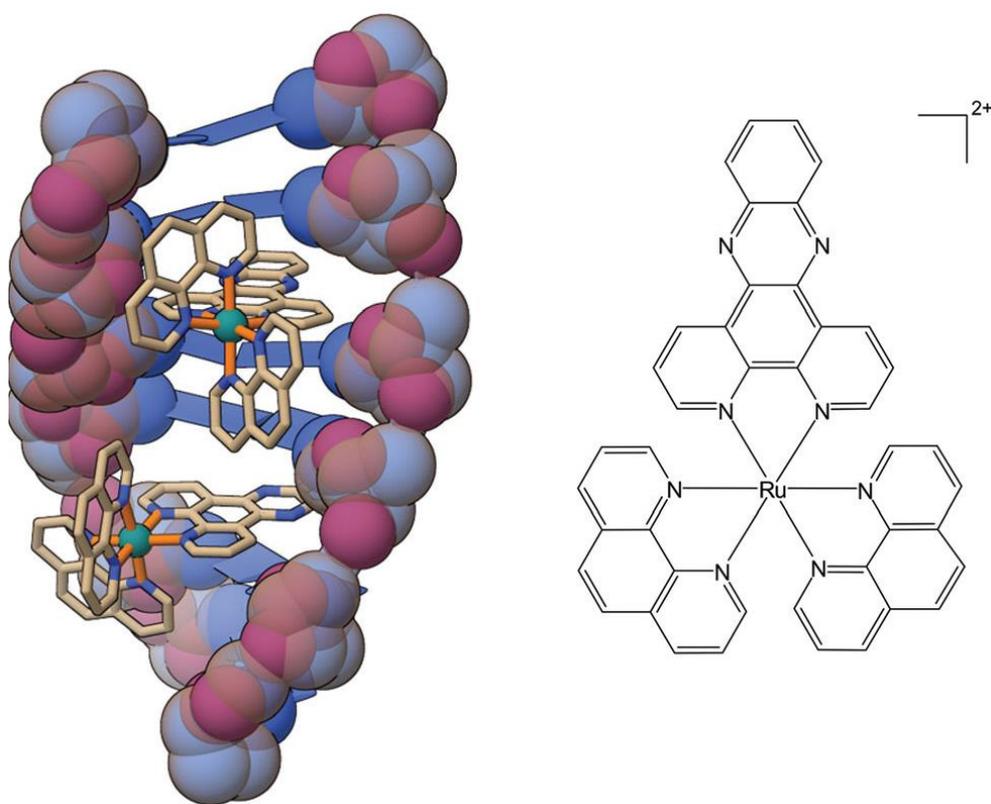


FIGURA 1.16 – Estrutura de raios X do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppx})]^{2+}$ intercalado ao $\text{d}(\text{ATGCAT})_2$ de DNA (adaptado de PAGES ⁴²).

Interações puramente eletrostáticas também ocorrem entre complexos e DNA, não havendo a presença de ligantes intercalantes ou ligantes lábeis, complexos podem interagir com o DNA de interações eletrostáticas com

os grupos fosfato externos à estrutura da biomolécula, ou com as bases nitrogenadas através dos sulcos maiores e menores do DNA (Figura 1.14). Estas interações, em geral, são mais fracas, porém podem da mesma forma levar à perda da função da biomolécula. Com o auxílio de técnicas espectroscópicas, como espectroscopia de absorção na região do UV-Visível, ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular, dentre outras, pode-se determinar esses tipos de interações. Outras técnicas são também amplamente empregadas, como as técnicas eletroquímicas, eletroforese em gel e viscosidade ⁴².

1.5.2 – Albumina

A albumina é uma proteína essencial na maioria dos mamíferos, possuindo o papel de realizar o transporte de ácidos graxos, onde cada molécula de albumina do soro humano (HSA) pode carregar até sete moléculas de ácidos graxos, que se ligam às fendas da proteína. A HSA também atua como sequestradora de radicais livres de oxigênio, inativando vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina ⁴³.

A albumina é a proteína mais abundante no sangue e também possui a capacidade de transportar fármacos e outras moléculas insolúveis em água levando ao aumento ou diminuição da atividade biológica destas drogas. A HSA é composta uma sequência de 585 aminoácidos, dentre os quais, 17 grupos são de tirosina e um de triptofano, que está localizado na posição 214 e no subdomínio IIA do arcabouço proteico ⁴⁴, conforme representado na Figura 1.17.

Estes fatos fazem desta um alvo de estudo dos cientistas, principalmente no desenho de fármacos que interajam reversivelmente com a HSA ^{45,46}. Dentre estas novas drogas estudadas destacam-se os complexos metálicos, onde tem-se demonstrado que a albumina possui papel importante na atividade biológica de alguns complexos como o NAMI-A e o KP1019 ^{43,47}.

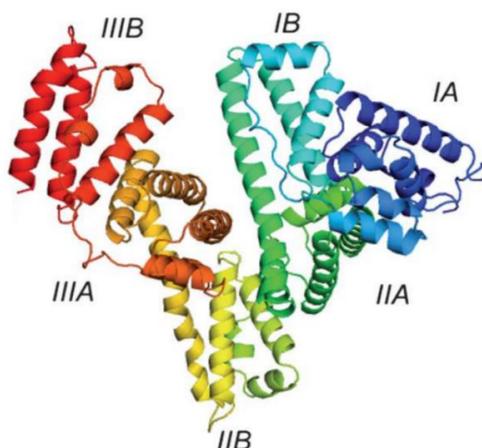


FIGURA 1.17 – Estrutura cristalográfica da albumina do soro humano (HSA) (adaptado de PENG ⁴⁴).

1.6 – Os Ligantes dicarboxipiridínicos

Os ácidos dicarboxipiridínicos (Figura 1.18) são de grande interesse na química de coordenação, isto por se coordenarem a metais na forma bidentada ou tridentada através dos átomos de nitrogênio (piridina) e oxigênio (carboxila), além de formarem um grande número de complexos com metais dos blocos p, d e f. Há relatos na literatura de alguns complexos de rutênio contendo ácidos dicarboxipiridínicos, dentre eles se destacam os complexos arenos e os complexos contendo monofosfinas, onde em todos os exemplos o ácido carboxipiridínico se encontra coordenado de forma bidentada pelos átomos de oxigênio (carboxila) e nitrogênio (piridina) ⁴⁸.

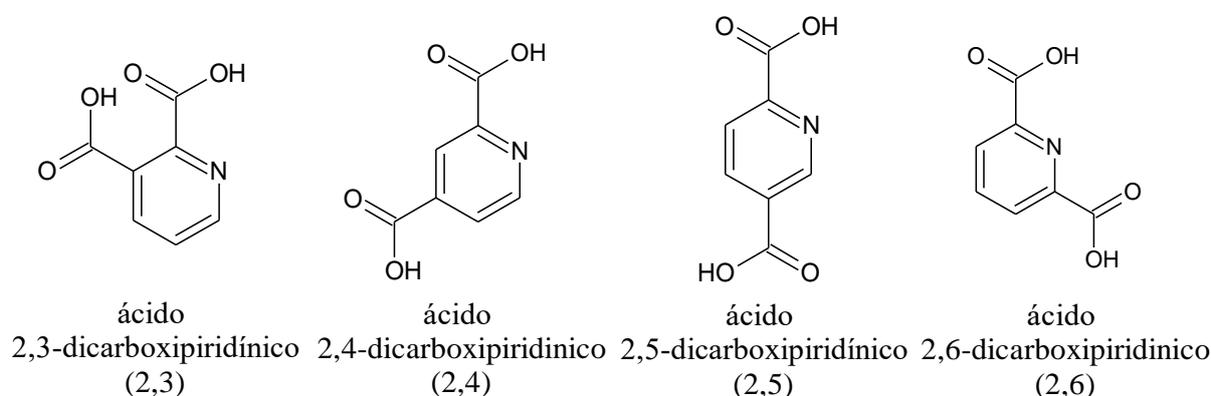


FIGURA 1.18 – Estruturas moleculares dos ácidos dicarboxipiridínicos.

O ácido 2,4-dicarboxipiridínico (Figura 1.18) possui relevantes propriedades imuno-supressores e fibro-supressiva, além de ser capaz de proteger certas enzimas de inativação térmica. O ácido 2,6-dicarboxipiridínico é conhecido por ativar algumas metaloenzimas, e complexos de ferro III, contendo o mesmo como ligante, desempenham um papel importante na transferência de elétrons em alguns sistemas biológicos, conferindo a ele reconhecimento como uma ferramenta importante na clivagem molecular do DNA ^{49,50}.

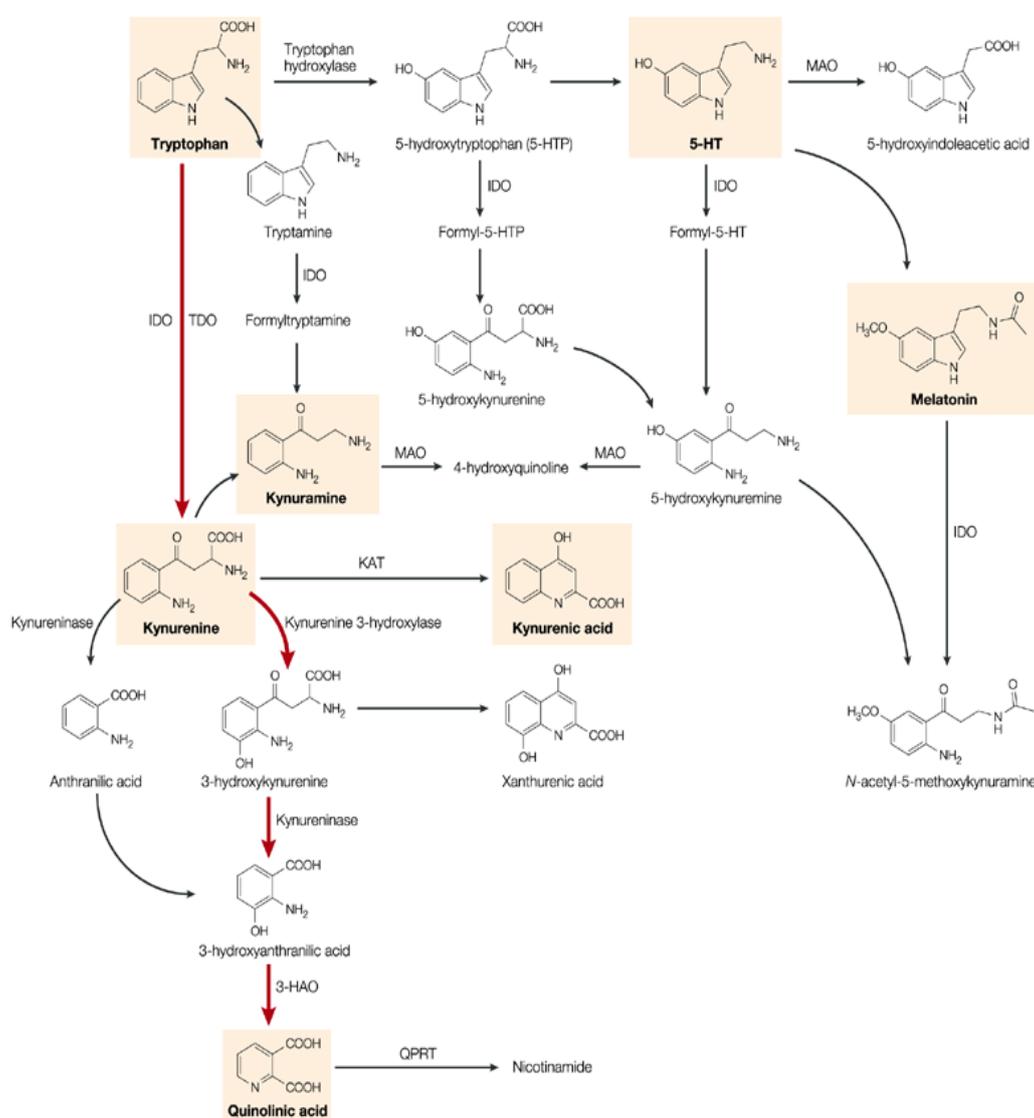


FIGURA 1.19 – Via metabólica do triptofano (via dos kinurênicos), contendo o ácido 2,3-dicarboxipiridínico como um de seus componentes (adaptado de STONE ⁵¹).

O ácido 2,3-dicarboxipiridínico está presente no organismo humano como um derivado da via dos kinurênicos, que é a principal via para o metabolismo do triptofano (Figura 1.19). A via dos kinurênicos gera compostos que podem modular a atividade dos receptores de glutamato, receptores nicotínicos e alguns receptores ainda não identificados. Esta via metabólica é a única que regula o metabolismo do triptofano, gerando compostos neuroativos, influenciando na comunicação entre os sistemas nervoso e imunológico e também exercendo papéis importantes na regulação da proliferação celular. Conseqüentemente, as substâncias derivadas desta via apresentam uma relevante potencialidade para a descoberta de novas drogas ⁵¹.

Uma vez que o papel dos ácidos dicarboxipiridínicos nestes processos não é bem compreendido, o estudo da sua química de coordenação, aliado a estudos biológicos, é uma ferramenta de grande importância para se desvendar a ação destes compostos em meio biológico ⁵¹.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto foi sintetizar e caracterizar complexos de fórmula geral do tipo $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ onde (N-O = ácido 2,3-dicarboxipiridínico (2,3), ácido 2,4-dicarboxipiridínico (2,4), ácido 2,5-dicarboxipiridínico (2,5), ácido 2,6-dicarboxipiridínico (2,6), ácido 2-carboxi-4-etoxicarbonilpiridínico (2,4e), dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e bipy = 2,2'-bipiridina), como possíveis candidatos à metalofármacos. Procurar-se-á determinar a influência do grupo carboxílico livre na atividade biológica dos complexos.

2.2 – Objetivos específicos

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

- Sintetizar os complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$,
- Esterificar a carboxila livre do complexo contendo o ligante 2,4-dicarboxipiridínico gerando o ligante 2-carboxi-4-etoxicarbonilpiridínico (2,4e);
- Caracterizar os complexos obtidos por ressonância magnética nuclear (1D - $^{31}\text{P}(\text{H})$, ^1H , $^{13}\text{C}(\text{H})$) e 2D DEPT-135, COSY e HSQC), voltametria cíclica e de pulso diferencial, análise elementar, condutância molar, espectroscopia de absorção na região do UV-Visível, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e difração de raios X de monocristal;
- Realizar testes de interação dos complexos de rutênio com *calif thymus* - DNA utilizando técnicas de viscosidade, titulação espectrofotométrica e voltametria de onda quadrada;
- Avaliar a interação dos complexos com HSA (albumina do soro humano);

- Avaliar a citotoxicidade dos complexos de rutênio frente a linhagens de células tumorais (A-549, DU-145 e MDA-MB-231) e sadia (V-79);
- Avaliar a atividade inibitória dos complexos frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

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

3.1 – Materiais

3.1.1 – Obtenção da atmosfera de Argônio

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

3.1.2 – Solventes

Os solventes orgânicos utilizados neste trabalho foram submetidos à purificação prévia, segundo os métodos usuais. O DMSO deuterado (Mallincrodt) foi utilizado como fornecido, assim como os demais solventes deuterados (clorofórmio e metanol) (Aldrich).

3.1.3 – Reagentes químicos em geral

Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), de procedência Fluka, foi utilizado na preparação de soluções 0,1 mol.L⁻¹ em diclorometano, com a finalidade de ser usado como eletrólito suporte para os procedimentos de estudo eletroquímico. Os ligantes trifenilfosfina (PPh₃), 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), 2,2'-bipiridina, ácidos 2,3-dicarboxipiridínico, 2,4-dicarboxipiridínico, 2,5-dicarboxipiridínico, e 2,6-dicarboxipiridínico, assim como, RuCl₃.xH₂O são de procedência Aldrich.

3.2 – Técnicas experimentais

3.2.1 – Condutância Molar

As medidas de condutância foram feitas utilizando um aparelho Meter Lab., modelo CDM230. As soluções foram preparadas em diclorometano, dimetilsulfóxido ou acetona na concentração de 10^{-3} mol L⁻¹. As faixas de valores foram previamente tabeladas por VELHO ⁵².

3.2.2 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

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

3.2.3 – Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard, modelo 8452A ou Cary 500 de duplo feixe, Varian. Os espectros foram obtidos em soluções de *n*-octanol e em várias diluições, partindo de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹. Utilizou-se celas de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 4 mL de capacidade (250-800 nm).

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

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

Onde, A = absorvância, c = concentração (mol L⁻¹) e b = caminho ótico da cubeta (cm).

3.2.4 – Análise elementar (C, H, N e S)

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

3.2.5 – Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial

As medidas de eletroquímica (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) foram feitas utilizando-se o potenciostato / galvanostato Electrochemical Analyzer, modelo BAS 100B. Foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro com capacidade de 10 mL para registro dos voltamogramas. Utilizou-se eletrodos de trabalho e auxiliar de Pt e Ag/AgCl como eletrodo de referência. Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) foi usado como eletrólito suporte (10^{-3} mol.L⁻¹ em CH₂Cl₂, DMSO ou DMF). Os voltamogramas foram registrados na região entre -1,5 e 1,5 V. Os potenciais anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) foram determinados diretamente dos voltamogramas sendo o potencial redox (E^{1/2}) obtido pela média aritmética dos potenciais (E_{pa} e E_{pc}).

3.2.6 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear foram executadas em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz (100 MHz para ¹³C, 40 MHz para ¹H; 162 MHz para ³¹P) pertencentes ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para elucidação das estruturas dos compostos foram utilizados experimentos de RMN de ³¹P(¹H), ¹H, ¹³C(¹H), DEPT-135, COSY e HSQC.

3.2.7 – Difração de raios X

As estruturas cristalinas foram resolvidas pelo Msc. Juan Carlos Clavijo Tenorio do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) pelo professor Dr. Rodrigo de Souza Correa, docente do departamento de química da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Para a resolução das estruturas cristalinas foram utilizados dois difratômetros diferentes, um pertencente grupo de cristalografia do IFSC-USP do tipo automático NONIUS KAPPA CCD sob responsabilidade do Professor Dr. Javier Ellena e o outro pertencente ao Instituto de Química, São Carlos (IQSC-USP) da marca Bruker APEX DUO, ambos utilizando radiação da linha $K\alpha$ do molibdênio (0,71070 Å).

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

3.2.8 – Determinação do coeficiente de partição (logP)

Os ensaios foram realizados utilizando um sistema octanol como fase orgânica e água na fase aquosa e o logP foi determinado pelo método *shake flash*⁵³. Os complexos foram solubilizados em 90 μL de DMSO, que foi particionado em três tubos “*eppendorf*” contendo 30 μL cada, em cada *eppendorf* foram adicionados 750 μL de n-octanol e 750 μL de água, e permaneceram em agitação em 1000 rpm por 24 horas a 27°C. As fases foram separadas e a concentração do complexo foi determinada na fase orgânica por UV-Vis em cada um dos 3 tubos “*eppendorf*”, utilizando uma curva de calibração preparada para o composto em n-octanol. O valor do logP foi calculado pela Equação 3.2.

$$\log P = \log (C_o / C_a) \quad (3.2)$$

Onde, C_o e C_a são as concentrações molares do complexo na fase orgânica e aquosa, respectivamente, sendo C_a encontrada através da subtração da concentração inicial pela concentração na fase orgânica (C_o).

3.2.9 – Titulações Espectroscópicas com o DNA

Inicialmente preparou-se uma solução de DNA pela adição de aproximadamente 40 mg de *ct*-DNA (DNA calf thymus, procedente da Aldrich) em 20 mL de tampão trizma-HCl (4,5 mM de Trizma HCl, 0,5 mM de Trizma base e 50 mM NaCl) num pH de 7,4. A concentração exata do DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis, onde em uma cubeta contendo o tampão (2000 μ L) foram adicionados 50 μ L da solução de DNA e realizada a medida. Sabe-se que a absorvidade molar do DNAct em 260 nm é 6600 L mol⁻¹ cm⁻¹. Assim, conhecendo-se a absorbância e a absorvidade molar em 260 nm, e o caminho óptico ($b = 1$ cm), determinou-se a concentração do DNA por meio da lei de Lambert Beer (3.3).

As titulações foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1 foram adicionados 1800 μ L de tampão trizma e 200 μ L de DMSO, correspondendo ao branco, enquanto na cubeta 2 foi adicionado 1800 μ L de tampão trizma e 200 μ L da solução de complexo (1M) em DMSO. Logo após, foram realizadas sucessivas adições de 15 μ L de *ct*-DNA em ambas cubetas, onde a cada adição as soluções foram homogeneizadas por cerca de 1 minuto, seguido da obtenção dos espectros da cubeta 1(branco) e cubeta 2 (amostra).

3.2.10 – Estudo de interação com DNA por viscosidade

Preparou-se oito soluções, em tubos de ensaio, descritas na Tabela 3.1, com a concentração do composto analisado em 1×10^{-3} mol L⁻¹ solubilizado em DMSO, e utilizou-se o tampão trizma-HCl idêntico ao utilizado no experimento de titulação espectrofotométrica.

TABELA 3.1 – Volumes utilizados na preparação das amostras de viscosidade

Tubos	V complexo (μL)	V DNA (μL)	V DMSO (μL)	V tampão (μL)
1	0	0	0	4000
2	0	0	402	3598
3	0	400	402	3198
4	67	400	402	3131
5	134	400	402	3064
6	201	400	402	2997
7	268	400	402	2930

As medidas foram feitas em um viscosímetro de Oswald de procedência Aldrich, mergulhado a um banho a uma temperatura de 25°C e com auxílio de um cronometro para aferir o tempo de escoamento. Os experimentos foram feitos em duplicata.

3.2.11 – Estudo de interação com DNA por voltametria de onda quadrada

O estudo de interação entre o DNA e o complexo é feito pela técnica de voltametria de onda quadrada, utilizando um eletrodo de carbono vítreo. Primeiramente, é registrado a resposta eletroquímica de uma solução 0,5 mmol L⁻¹ do complexo em 50 mmol L⁻¹ de tampão TRIS-HCl com 20% de DMSO. Em seguida, é adicionado alíquotas de DNA e a resposta eletroquímica da solução é novamente registrada. Caso o complexo apresente interação com o DNA, o perfil voltamétrico do complexo irá alterar na presença da biomolécula, onde o processo redox pode se deslocar para potenciais mais positivos ou mais negativos.

3.2.12 – Titulação Espectrofluorimétrica com a HSA

O estudo de interação dos complexos sintetizados com a HSA foi realizado por meio da medida de supressão da fluorescência dos resíduos triptofano. Para isso foi empregado uma solução $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HSA e tampão trizma-HCl (idem tampão da titulação espectrofotométrica) em pH 7,4. A extinção da intensidade de emissão dos resíduos de triptofano em 305 nm (comprimento de onda de excitação 270 nm) foi monitorada utilizando os complexos como supressores em diferentes concentrações ($1,56\text{-}200 \mu\text{mol L}^{-1}$), solubilizados em DMSO.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 180 μL de HSA e 20 μL de solução do complexo. As medidas foram efetuadas em um fluorímetro Synergy H1 BioTek nas seguintes temperaturas de 27 e 37°C.

3.2.13 – Testes de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram feitos no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) da professora Márcia Regina Cominetti, no Departamento de Gerontologia da UFSCar, pela aluna Msc. Legna Colina Andreina Vegas. Utilizou-se quatro linhagens celulares, sendo três de células tumorais A549 (adenocarcinoma de pulmão humano, ATCC CCL-185), MCF7 (adenocarcinoma de mama humana, ATCC CCL-93) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humana, ATCC HTB-26) e uma sadia V79 (fibroblasto de pulmão de hamster chinês, ATCC CCL-93).

Conforme o protocolo utilizado, as células foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio DMEM ou RPMI, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10%. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração de células. Em seguida, aplicou-se as células em placas de cultura de 96 poços (estéris)

(densidade de células $1,5 \times 10^4$). As placas foram armazenadas em estufa ($37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$) por 24 h para a adesão celular. Após este tempo os complexos em diferentes concentrações, solubilizados em DMSO, foram adicionados à placa e a mesma foi novamente mantida na estufa por 48 horas.

Após este período, retirou-se todo o meio de cultura das placas e lavou-se duas vezes com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9,1 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,4) e, em seguida, adicionou-se 50 μL de MTT (0,5 mg mL^{-1}). As mesmas foram deixadas em estufa por um período de 3-4 horas e adicionou-se isopropanol para solubilizar os cristais formados e mediu-se espectrofotometricamente. A densidade óptica (absorbância dos poços) foi medida em um leitor de microplacas a 540 nm. Para verificar o efeito do solvente DMSO, controles adicionais receberam 0,5% deste solvente.

Os dados coletados foram tratados em planilha no Excel e no programa GraphPad Prism 5, e assim foi possível calcular o IC_{50} (concentração inibitória de 50% das células).

3.2.14 - Ensaios de atividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv

Determina-se inicialmente a concentração inibitória mínima (MIC) de cada composto, que é definida como a concentração mínima de composto necessária para inibir o crescimento de 90 % de crescimento, frente ao *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 2729 utilizando “Rezasurin Microtiter Assay” (REMA). Compostos com atividade biológica igual ou inferior a 7,80 $\mu\text{g/mL}$ seguem para a etapa seguinte, que consiste na avaliação da citotoxicidade (IC_{50}) por meio da determinação da concentração de composto capaz de permitir a viabilidade de 50% das células frente a culturas de macrófagos da linhagem J774. Então, o índice de seletividade (IS) é determinado pela razão entre IC_{50} e MIC. Um valor de IS igual ou superior a 10 indica que o composto em análise pode ser aplicado na concentração maior ou igual a 10 vezes acima do valor de MIC sem apresentar citotoxicidade. Para aqueles compostos que apresentam valores de IS

maior ou igual a 10 a próxima etapa consiste na avaliação da capacidade do composto de exercer atividade sobre *M. tuberculosis* internalizado em macrófagos. Como fármaco de referência foi utilizada solução estoque de isoniazida (Sigma) na concentração de 10 mg/mL em água.

Nas colunas 1 e 12 de uma microplaca estéril de 96 orifícios foram depositados 200 µL de água destilada estéril para evitar a desidratação do meio de cultura no ensaio durante a incubação na estufa. Os complexos foram diluídos em DMSO, obtendo-se solução estoque de 10 mg/mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas destas soluções na própria microplaca, de maneira a se obter concentrações variadas de isoniazida (1 a 0,03 µg/mL) e dos demais compostos (250 a 0,10 µg/mL). O primeiro orifício da microplaca contendo cada composto a ser analisado foi utilizado para controle de contaminação do composto. Neste orifício foi adicionado apenas o meio de cultura e a amostra na diluição 1:4, onde esperava-se não haver crescimento de espécie bacteriana. A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv congelada foi utilizada no início do ensaio na concentração de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL para que no final do experimento fosse obtido população de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. 100 µL da diluição de 10^5 UFC/mL foi inoculada em cada um dos orifícios contendo os compostos em análise e a isoniazida. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37 °C. Após 6 dias de incubação foi adicionado no orifício de controle de cepa microbacteriana e no orifício de controle de meio um volume de 30 µL da resazurina 0,01 % diluída em água estéril. A microplaca foi reincubada a 37 °C por 24 h, após isso foi realizada a leitura visual. Obtendo-se o desenvolvimento de cor rósea no orifício controle de cepa bacteriana, foram adicionados 30 µL da solução da resazurina nos demais orifícios, sendo as microplacas reincubadas a 37 °C por 24 h. Em caso de não haver mudança para cor rósea, a placa era incubada por mais 24 h. Após este período, foi realizada leitura final baseada na interpretação da fluorescência no

leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN®), onde utilizou-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente.

A porcentagem de inibição da multiplicação bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula:

$$(1 - b/a) \times 100 = \% \text{ de inibição da multiplicação bacteriana};$$

Onde: a = média da leitura dos orifícios controle-positivo (orifício apenas com bactéria e meio de cultura) e b = resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado.

3.3 – Síntese dos complexos

3.3.1 – Síntese dos precursores

3.3.1.1 – Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$

O complexo foi sintetizado segundo descrito por HALLMAN, STEPHESON & WILKINSON⁵⁴. Em um balão de duas bocas contendo 100 mL metanol previamente deaerado foram dissolvidos 1,00 g (3,50 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ onde a solução resultante foi refluxada por 15 minutos sob atmosfera de argônio. Logo após a solução foi então resfriada e 5,75 g (21,70 mmol) de trifenilfosfina (PPh_3) foram adicionados. A mistura reacional foi novamente refluxada por 3 horas. Após o resfriamento um sólido marrom cristalino foi obtido, o qual foi separado por filtração e lavado com metanol e seco a vácuo. Rendimento = 3,38 g (92%).

3.3.1.2 – Síntese de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{dppb})]$

O complexo foi preparado segundo procedimento descrito por BRESSAN & RIGO⁵⁵. Em um balão de duas bocas contendo 100 mL de diclorometano desaerado foi dissolvido 1,000 g (1,16 mmol) de $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$,

em seguida adicionou-se vagarosamente durante 30 minutos 0,495 g (1,16 mmol) de 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano (dppb). Após a adição a reação permaneceu sob agitação por 30 minutos. Em seguida filtrou-se o precipitado binuclear formado e precipitou-se a solução obtida com a adição de etanol. O pó obtido foi lavado com etanol e éter (previamente desaerados). Rendimento = 88,5% (0,79 g).

3.3.1.3 – Síntese de [RuCl₂(dppb)(bipy)]

O complexo será sintetizado conforme o procedimento descrito por QUEIROZ, *et. al.* ⁵⁶. Em um balão de duas bocas contendo 80mL de tolueno desaerado foram dissolvidos 1,100 g de [RuCl₂(PPh₃)(dppb)] (1,28 mmol) e 0,260 g de 2,2'-bipiridina (1,66 mmol). Estes permaneceram sob refluxo em atmosfera inerte por 48 horas. Em seguida o precipitado vermelho formado foi filtrado, utilizando-se um funil de placa sinterizada, lavado com tolueno, hexano para a retirada de excesso de fosfina (PPh₃) e bipiridina livres e seco à vácuo. Rendimento: 0,962 g (92 %)

3.3.2 – Sínteses com os ácidos dicarboxipiridínicos

3.3.2.1 – Síntese dos complexos do tipo [Ru(N-O)(dppb)(bipy)]PF₆

Em um balão de duas bocas contendo 15 mL de CH₂Cl₂/MeOH (70/30%) foram dissolvidos 0,066 mmol do ligante dicarboxipiridínico (N-O) com 0,132 mmol de Et₃N. Em seguida adicionou-se 0,05 g (0,066 mmol) de [RuCl₂(dppb)(bipy)] e após 20 minutos 0,012 g (0,066 mmol) de KPF₆. Após 3 horas de reação todo o solvente foi evaporado e novamente solubilizado em CH₂Cl₂. O precipitado formado (Et₃N.HCl, KCl) foi filtrado em funil de placa sinterizada e a solução seca foi solubilizada em metanol e precipitada com solução de HCl (0,1M). O composto foi filtrado, lavado com água e seco a vácuo. Rendimento: [Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF₆ = 0,055 g (84%);

$[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 = 0,050 \text{ g (76\%)}; [\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 = 0,060 \text{ g (92\%)}; [\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 = 0,058 \text{ g (89 \%)}.$

3.3.2.2 – Síntese dos complexos do tipo $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]$

Em um balão de duas bocas contendo 25 mL de etanol foram dissolvidos 0,013 g (0,066 mmol) do ácido 2,4-dicarboxipiridínico com 0,66 mmol de Et_3N e 0,05 g (0,066 mmol) de $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$. Após 50 minutos de reação foram adicionados 3 ml de H_2SO_4 e a solução foi refluxada por 24 horas, com o resfriamento da reação 0,012 g (0,066 mmol) de KPF_6 foi adicionado o volume da solução foi reduzido a aproximadamente 5 mL e a precipitação foi realizada adicionando água destilada. O precipitado formado foi filtrado em funil de placa sinterizada e lavado com água destilada, hexano e seco a vácuo. Rendimento: $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 = 0,051 \text{ g (76\%)}.$

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ácido dicarboxipiridínicos como ligantes na química de coordenação

Os ácidos dicarboxipiridínicos são de interesse na química de coordenação devido os variados modos de coordenação que os mesmos exibem. Na literatura predominam duas principais formas de coordenação para os mesmos, que são as bidentadas para os ácidos 2,3-dicarboxipiridínico, 2,4-dicarboxipiridínico e 2,5-dicarboxipiridínicos (FIGURA 4.1 - A) ^{50,57} e na forma tridentada para o ácido 2,6-dicarboxipiridínico (FIGURA 4.1 - B) ⁴⁹.

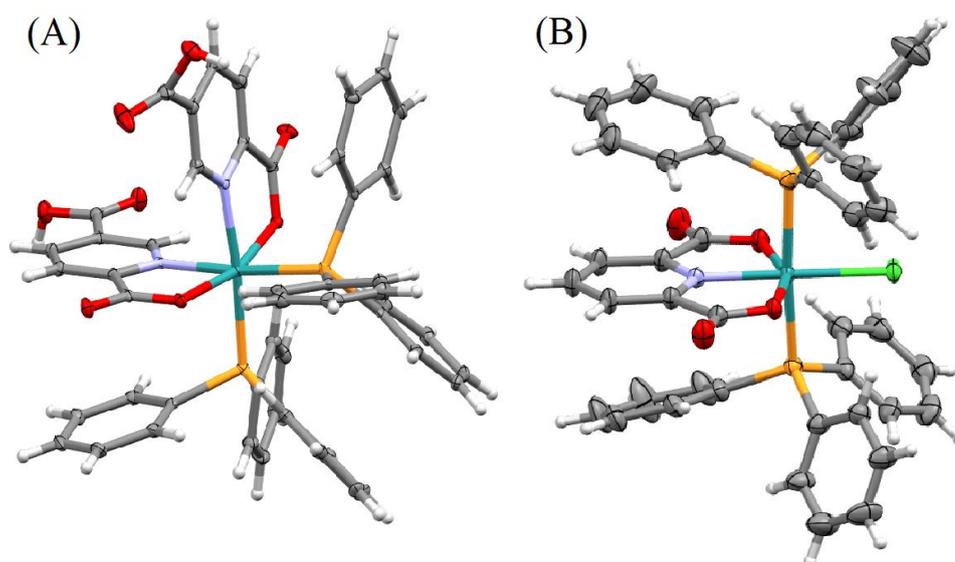


FIGURA 4.1 – Complexos de rutênio contendo os ligantes 2,5-dicarboxipiridínico e 2,6-dicarboxipiridínico. A - $[\text{Ru}(2,5)_2(\text{PPh}_3)_2]$ ^{50,57} B - $[\text{RuCl}(2,6)(\text{PPh}_3)_2]$ ⁴⁹.

A predominância da forma de coordenação bidentada pelos átomos de oxigênio e nitrogênio (Figura 4.2 - a) é justificada pelo efeito quelato e pela formação de um anel de cinco membros (mais estável), sendo que a coordenação bidentada pelo íon carboxilato (Figura 4.2 - b,c) não ocorre no caso destes ligantes, por formarem um anel de quatro membros (menos estável).

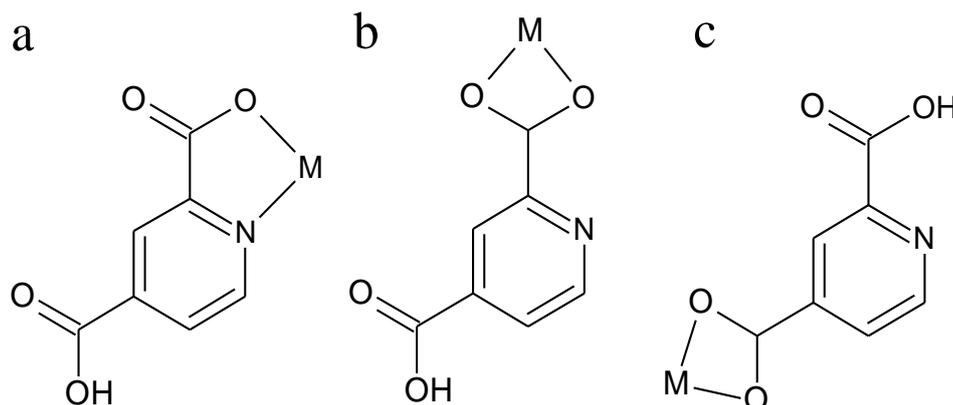


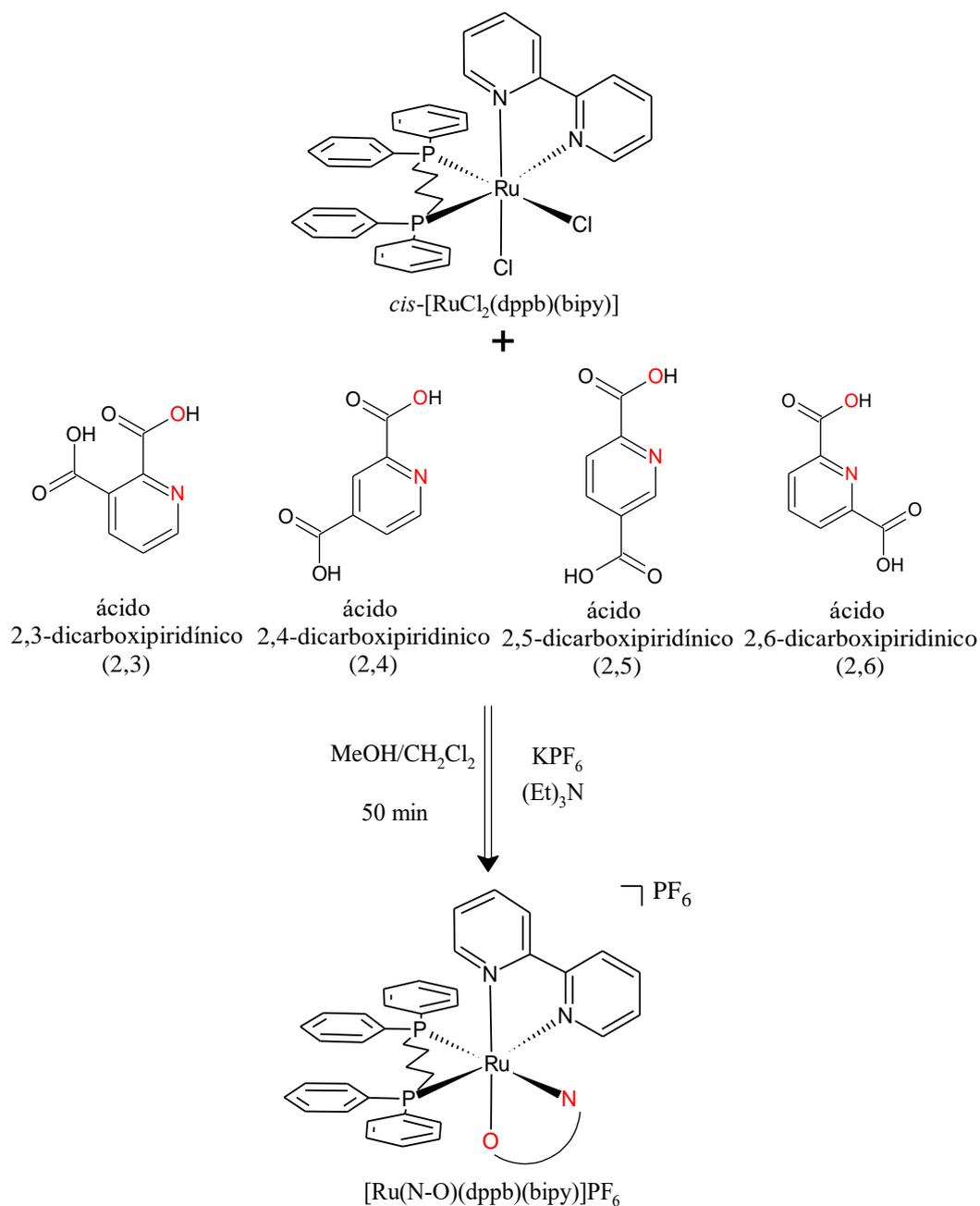
FIGURA 4.2 – Modos de coordenação previstos para o ligante 2,4-dicarboxipiridínico.

Outro fator que favorece a coordenação bidentada pelos átomos de oxigênio e nitrogênio está baseado no conceito de acidez e basicidade de Pearson, que define ácidos e bases como duros, moles e intermediários baseando-se na polarizabilidade dos mesmos. O íon metálico Ru^{2+} (ácido intermediário) possui afinidade por bases intermediárias, o íon carboxilato é considerado uma base dura e nitrogênios piridínicos são considerados bases intermediárias. Com isso a coordenação do Ru^{2+} ao nitrogênio piridínico é favorecida levando a ligação no modo bidentado (nitrogênio piridínico e oxigênio da carboxila adjacente), uma vez que a ligação é favorecida entre semelhantes (duro-duro ou mole-mole).

Neste trabalho buscou-se avaliar o potencial de ação dos ligantes dicarboxipiridínicos após a sua coordenação ao centro metálico (rutênio), uma vez que através da coordenação bidentada pelo nitrogênio e oxigênio da carboxila adjacente o grupo carboxílico livre do ligante estará livre para atuar. Para isso foram sintetizados cinco novos complexos com os ácidos 2,3-dicarboxipiridínico, 2,4-dicarboxipiridínico, 2,5-dicarboxipiridínico, 2,6-dicarboxipiridínico e 4-etoxicarbonil-2-carboxipiridínico sendo os quatro primeiros bastante similares alterando apenas a posição da carboxila no anel, enquanto o último possui a carboxila (não adjacente ao nitrogênio) esterificada.

4.2 – Síntese dos complexos de fórmula geral [Ru(N-O)(bipy)(dppb)]PF₆

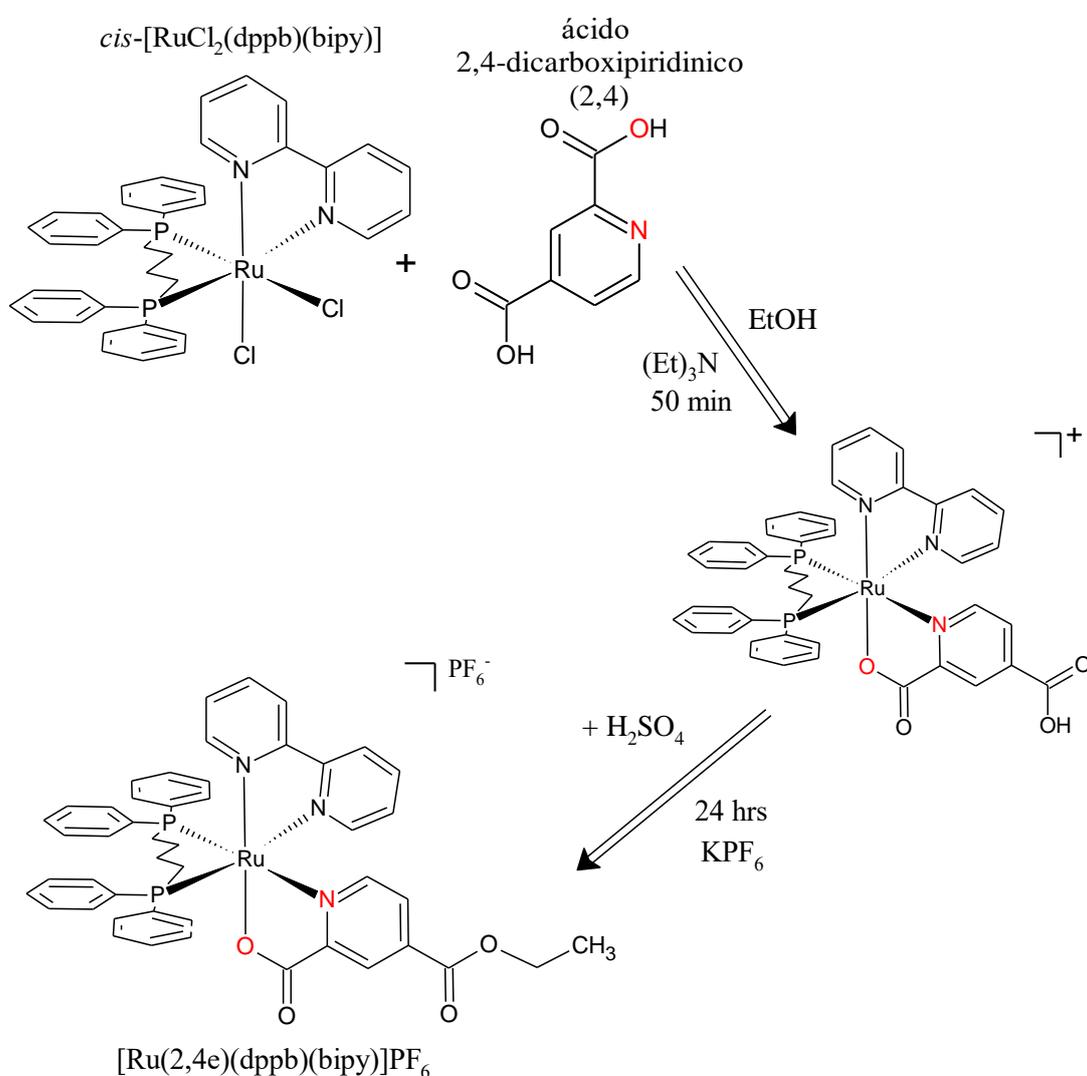
Os complexos do tipo [Ru(N-O)(bipy)(dppb)]PF₆ foram sintetizados a partir do precursor de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)], através da substituição dos átomos de cloro pelos ligantes dicarboxipiridínicos conforme consta no Esquema 4.1.



ESQUEMA 4.1 – Rota sintética de obtenção dos complexos sintetizados a partir do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)].

A adição de trietilamina se faz necessária para facilitar o desprotonamento da carboxila adjacente ao nitrogênio (mais ácida) favorecendo a coordenação do ligante. Com a saída do cloro o trietilamônio formado precipita em diclorometano na forma do sal cloreto de trietilamônio, que é facilmente retirado da solução por filtração.

O complexo contendo o ligante 2-carboxi-4-etoxicarbonilpiridínico (2,4e) foi sintetizado a partir do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]^+$ onde a adição de ácido sulfúrico em etanol proporciona a esterificação do ácido carboxílico livre. Esta reação orgânica é conhecida como esterificação de Fischer, conforme pode ser visto no Esquema 4.2.



ESQUEMA 4.2 – Rota sintética simplificada para a esterificação do complexo contendo o ligante 2,4-dicarboxipiridínico.

4.3 – Caracterização dos complexos

4.3.1 – Condutância molar e análise elementar

As medidas de condutância molar assim como a análise elementar são técnicas que contribuem para a elucidação da estrutura dos compostos obtidos. A determinação da condutância molar dos complexos foi realizada em metanol. Os resultados obtidos para todos os compostos mostraram que os complexos são eletrólitos 1:1 (faixa de condutância para o metanol 1:1 = 80-115 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)⁵², conforme pode-se ver na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Dados de condutância molar para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos

COMPLEXO	Branco ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Condutância ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,39	81,1
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,44	81,8
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,35	79,7
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,27	86,0
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	0,22	85,6

Baseando-se na estrutura proposta para os compostos os resultados esperados estão de acordo com os encontrados dado a faixa de condutância exibida (1:1) sugerindo a saída dos dois cloretos dos precursores e a coordenação dos ligantes pelo grupo carboxilato e pelo anel piridínico, na forma bidentada (N-O) monoaniônica, gerando complexos monocatiônicos.

Os dados de análise elementar são de grande importância, pois através dos mesmos pode-se saber a pureza dos compostos baseando-se nos dados experimentais obtidos e nos dados teóricos, conforme a estrutura esperada. A análise dos dados obtidos mostram que os teores de carbono, hidrogênio e oxigênio são condizentes com as estruturas propostas, sendo a diferença entre os

valores experimentais e teóricos inferiores a 0,4% confirmando a obtenção de complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, os dados obtidos estão listados na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 – Dados de análise elementar para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos

Composto	C(%)	H(%)	N(%)
$[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	54,44 (54,33)	4,09 (4,05)	4,07 (4,22)
$[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	52,64 (52,43)	4,91 (4,30)	4,23 (4,08)
$[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 \cdot 1/2\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	55,33 (55,06)	4,92 (4,71)	4,30 (3,93)
$[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	54,41 (54,33)	4,47 (4,05)	4,34 (4,22)
$[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	52,97 (53,01)	4,78 (4,61)	4,04 (3,95)

4.3.2 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho é uma técnica que atua de modo complementar as demais técnicas, contribuindo na elucidação da estrutura dos complexos de modo bastante eficiente. Através das evidências observadas nos modos vibracionais dos reagentes utilizados (ligante e complexo de partida) e na estrutura esperada para o produto, pode-se confirmar tanto a presença dos ligantes quanto os possíveis modos de coordenação dos mesmos. Nos espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes, as bandas características das vibrações νCOOH , $\nu_{\text{as}}\text{COO}$ e $\nu_{\text{s}}\text{COO}$ foram observadas em torno de 1700, 1600 e 1400 cm^{-1} , respectivamente como pode-se observar para o ligante 2,6-dicarboxipiridínico (Figura 4.3).

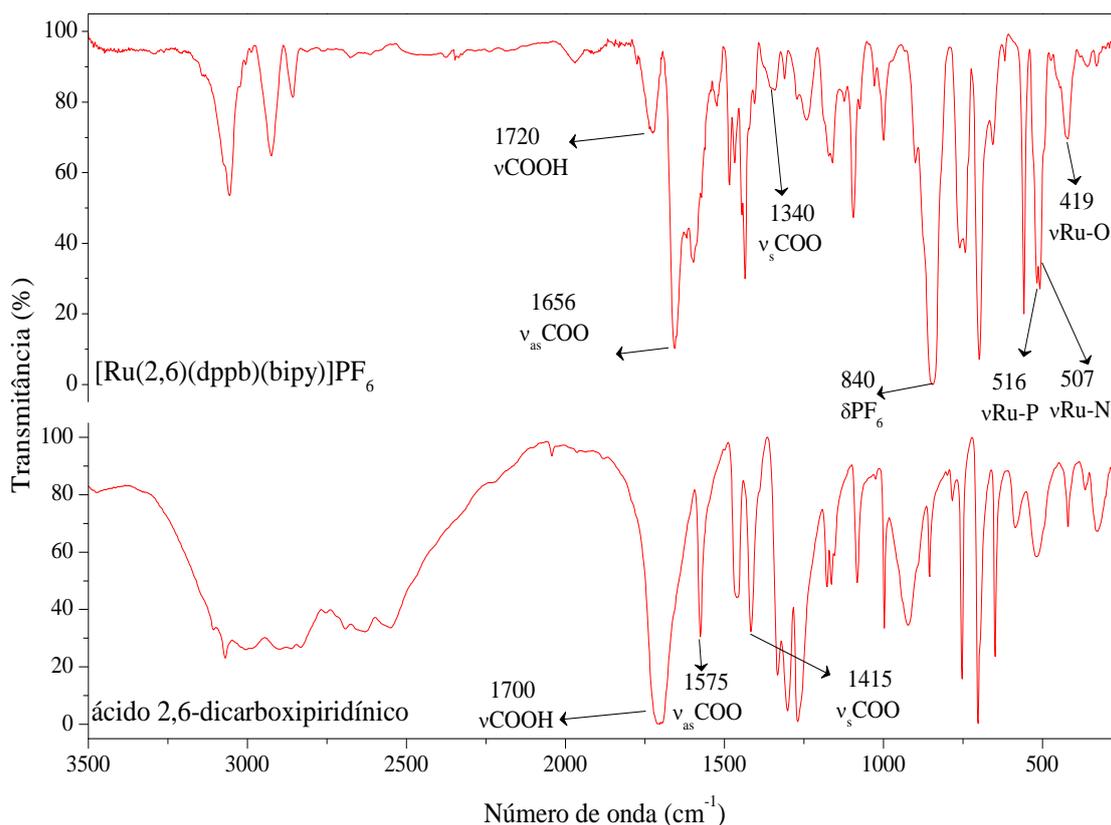


FIGURA 4.3 – Espectros vibracionais na região do infravermelho para o ácido 2,6-dicarboxipiridínico e complexo $[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF_6$.

Nos espectros de IV dos complexos, observa-se o deslocamento de algumas bandas inerentes aos ligantes, sendo que em todos os espectros registrados para os complexos as vibrações assimétrica e simétrica do grupo carboxílico deslocaram, indicando que os mesmos estão coordenados pelo íon carboxilato. Uma evidência notável é a diminuição da intensidade da banda referente ao estiramento C=O da carboxila livre em torno de 1700 cm^{-1} onde observa-se que a mesma possui maior intensidade no espectro do ligante livre que no complexo, isto devido a diferenciação das carboxilas presentes no ligantes onde após a coordenação uma permanece livre e outra coordenada como pode-se observar no exemplo do ligante 2,6-dicarboxipiridínico e seu respectivo complexo conforme apresentado na Figura 4.3.

A principal evidencia que confirma o modo coordenação do íon carboxilato é o cálculo da diferença entre o estiramento simétrico e assimétrico

do νCOO (Δcm^{-1}). O íon carboxilato pode coordenar-se ao metal de três maneiras: monodentado; bidentado; ou bidentado em ponte. O valor de Δcm^{-1} da forma monodentada será sempre maior no complexo do que no ligante livre, enquanto a forma bidentada apresentará um valor de Δcm^{-1} menor que o ligante livre. Além disso, na forma monodentada o valor do estiramento assimétrico da carbonila é deslocado para valores mais altos em comparação com a forma bidentada, devido o aumento do caráter de ligação dupla da carbonila ⁵⁸.

Com o deslocamento do estiramento assimétrico da vibração $\nu_{\text{as}}\text{COO}$ para regiões de maior energia os valores de Δcm^{-1} para os complexos tornam-se maiores que os calculados para os ligantes livres, como pode ser visto na Tabela 4.3, assim pode-se confirmar a coordenação da forma monodentado em relação ao íon carboxilato para todos os complexos sintetizados.

TABELA 4.3 – Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) correspondente ao grupo carboxilato no ligante livre e coordenado

Compostos	$\nu_{\text{as}}\text{COO}$	$\nu_{\text{s}}\text{COO}$	Δ (cm^{-1})
2,3	1622	1365	257
2,4	1609	1415	195
2,5	1596	1407	189
2,6	1575	1414	159
cb2,3	1666	1351	315
cb2,4	1658	1313	345
cb2,5	1656	1323	333
cb2,6	1656	1340	316
cb2,4e	1661	1322	329

Nota-se também no espectro de IV do complexo contendo o ligante 2-carboxi-4-etoxicarbonilpiridínico (2,4e) a presença de bandas $\nu\text{C-O}_{\text{éster}}$

características de éster carboxílico em 1292 e 1117 cm^{-1} , confirmando a esterificação do ácido carboxílico livre (não coordenado) ⁵⁸.

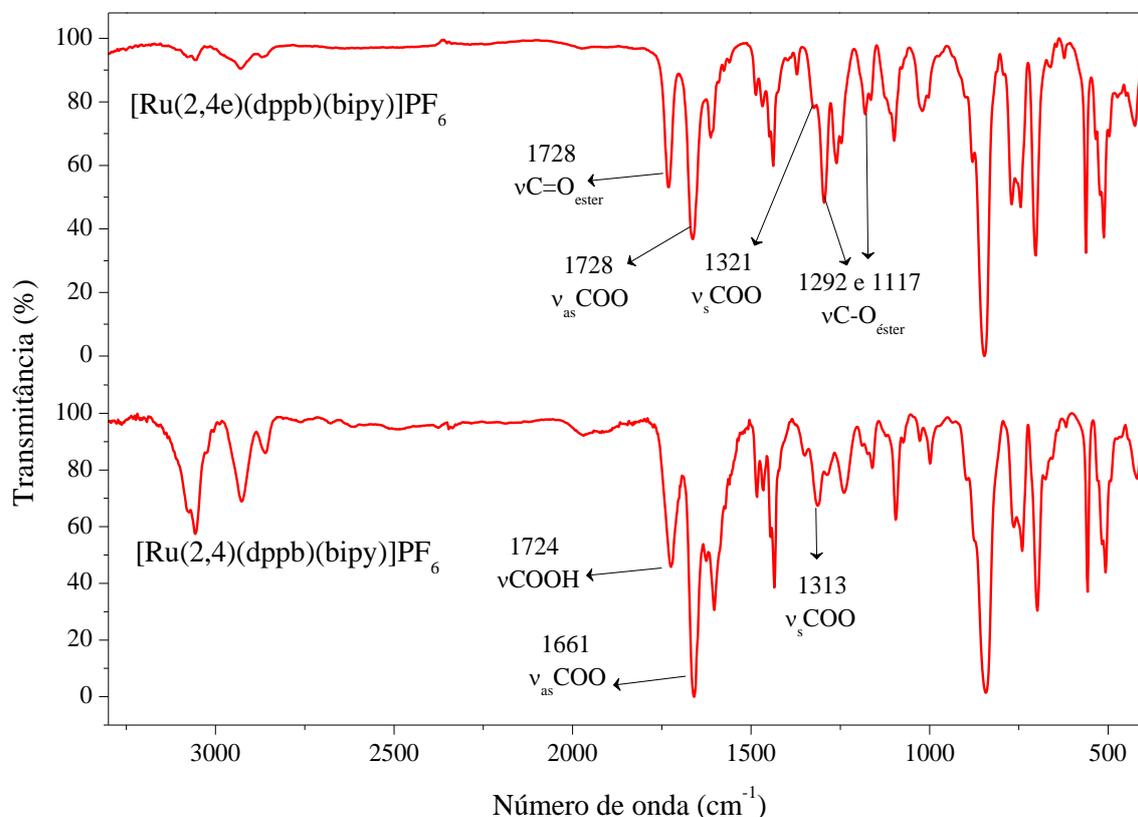


FIGURA 4.4 – Espectro vibracional na região do infravermelho para os complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

Com a coordenação, além das bandas dos ligantes dicarboxipiridínicos, pode se observar também bandas vibracionais referentes aos modos vibracionais metal-ligante. Todos os complexos apresentam duas bandas de vibração $\nu(\text{Ru-P})$, referentes às bandas de estiramento assimétrica e simétrica das ligações fósforo-rutênio da bifosfina que se encontram em *cis* na região de 520 - 507 cm^{-1} . Também foram observadas bandas na região entre 420 - 418 cm^{-1} , características das vibrações $\nu(\text{Ru-N})$ da bipyridina e $\nu(\text{Ru-O})$ dos ligantes em estudo. Todos os complexos apresentam duas novas bandas bem características, atribuídas ao $\nu\text{P-F}$ e $\delta\text{P-F}$ referente ao contra-íon PF_6^- . A Tabela 4.4 apresenta as bandas características dos complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos.

TABELA 4.4 – Atribuições das frequências vibracionais (cm^{-1}) dos complexos de rutênio contendo os ligantes dicarboxipiridínicos ^{58,59}

Atribuição	[Ru(N-O)(dppb)(bipy)]PF ₆ (cm^{-1})				
	2,3	2,4	2,5	2,6	2,4e
$\nu_{\text{CH}} + \nu_{\text{OH}}$	3057 f	3056 m	3065 f	3057 m	3057 f
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$	2933 f	2926 m	2945 f	2923 f	2931 f
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$	2865 f	2860 f	2860 f	2857 f	2864 f
$\nu_{\text{COOH}}_{\text{livre}}$	1714 m	1726 m	1721 f	1720 m	1728 m
$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	1666 m	1658	1656	1656 F	1661 m
$\nu_{\text{C=N}}$	1604 f	1603 m	1601 m	1595 f	1610 f
$\nu_{\text{s}}\text{C=C}_{(\text{anel})} +$	1484 f	1483 f	1481 f	1483 f	1483 f
$\nu_{\text{C=C}}_{(\text{fosf})}$	1465 f	1466 f	1465 f	1466 f	1464 f
$\nu_{\text{C=N}}$	1435 m	1434 m	1435 m	1434	1434 m
$\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$	-	-	-	-	1368 f
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1351 f	1313 f	1323 f	1340 f	1313 m
$\nu_{\text{C-O}}_{(\text{éster})}$	-	-	-	-	1292m
					1177 f
$\nu_{\text{P-CH}}$	1096 m	1094 m	1096 m	1093 m	1095 m
$\nu_{\text{P-CH}_2}$	1072 f	1073 f	1072 f	1073 f	1072 f
$\nu_{\text{P-F}} + \delta_{\text{P-F}}$	844F	842F	843F	851F	842F
	558 m	557 m	558 m	558 m	557 m
γ_{anel}	699 m	698 m	699 m	699 m	699 F
$\nu_{\text{P-CH}}$	650 sh	648 sh	657 f	655 f	651 sh
$\nu_{\text{Ru-P}}$	508m	507m	507 m	511m	507 m
	516 sh	516 m	520 m	519 m	512 m
$\nu_{\text{Ru-O}}$	530 f	530 sh	530 f	528 sh	530 m
$\nu_{\text{Ru-N}}$	419 f	419 f	418 f	419 f	420 f

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

4.3.3 – Espectroscopia de Absorção na Região do UV-Visível

A espectroscopia de absorção na região do UV-visível é um dos métodos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. Além disso, outra aplicação deste método é a possibilidade de se identificar grupos funcionais presentes na molécula, uma vez que estes sejam capazes de absorver energia na faixa de comprimento de onda que compreende as regiões do ultravioleta e visível (200 a 800 nm). Quando moléculas são estimuladas com esse tipo radiação, transições eletrônicas podem ocorrer em decorrência da absorção de energia quantizada gerando um espectro eletrônico de absorção que é o registro gráfico da resposta do sistema ao estímulo.

Os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta e visível dos complexos foram realizados com o objetivo de avaliar os tipos de transições existentes entre os ligantes e o metal nos complexos estudados. Os espectros foram registrados utilizando como solvente metanol, conforme pode-se ver na Figura 4.5 onde consta as curvas obtidas para os complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$, os espectros dos demais complexos encontram-se no apêndice.

Como pode ser observado na Tabela 4.5 todos os espectros eletrônicos dos complexos e as transições são muito semelhantes. As bandas observadas em torno de 256 -320 nm são referentes a transições intraligantes ($\pi \rightarrow \pi^*$) com contribuições dos ligantes (bipy, dppb e ácidos dicarboxipiridínicos). As bandas em torno de 348 – 480 nm são atribuídas como transferência de carga metal-ligante (TCML) dos orbitais $d\pi\text{Ru} \rightarrow 3p\sigma^*d\pi(\text{bifosfina})$ e $d\pi\text{Ru} \rightarrow \pi^*(\text{ligantes bipyridínicos, AG, AGM, ABz})$.

As bandas de maior energia, abaixo de 250 nm, foram atribuídas como sendo bandas de absorção do solvente. As bandas de transição d-d possuem baixos valores de coeficientes de extinção molar e são facilmente encobertas por outras bandas, por isso não foram detectadas nestes complexos.

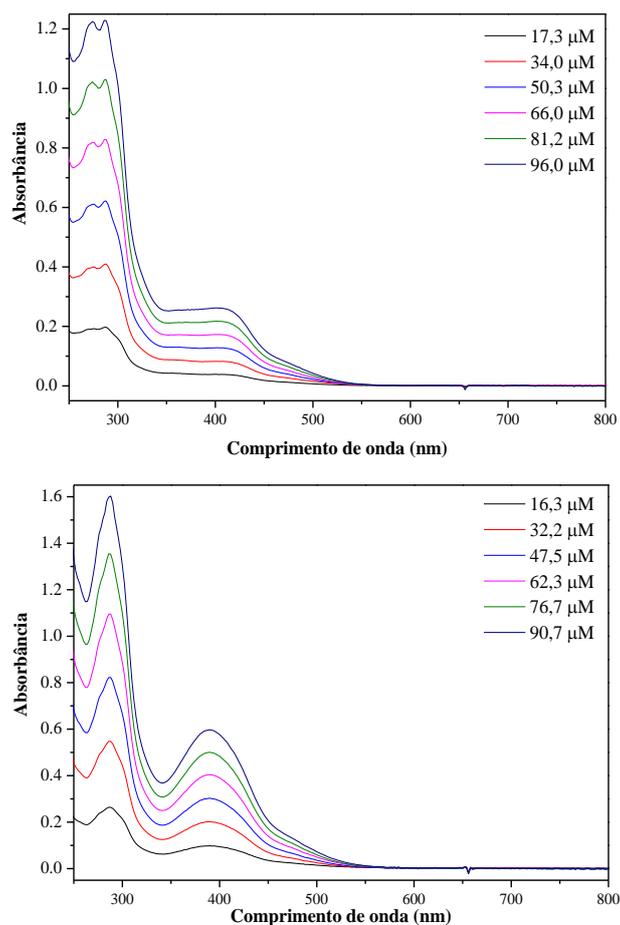


FIGURA 4.5 – Espectros de absorção na região do UV-vis para os complexos [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆ respectivamente (metanol).

TABELA 4.5 – Dados dos espectros eletrônicos dos complexos; solvente metanol. ($\epsilon/ \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$) λ/nm

Complexos	IL	TCML
	($\pi \rightarrow \pi^*$)	$d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow 3p\sigma^* d\pi_{(\text{bifosfina})}$ $d\pi_{\text{Ru}} \rightarrow \pi^*_{(\text{ligantes/ bipy})}$
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	290 (14501)	406 (3333)
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	290 (13898)	402 (3270)
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	292 (16780)	410 (4409)
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	290 (14842)	392 (4539)
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	288 (16628)	388 (6644)

4.3.4 – Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear é um método espectroscópico fundamental para a elucidação estrutural de compostos de coordenação contendo moléculas orgânicas como ligantes, sua versatilidade deve-se a possibilidade de se analisar vários núcleos fornecendo o número de átomos não equivalentes do isótopo estudado. A combinação de dados da ressonância magnética nuclear com a espectroscopia vibracional na região do infravermelho é, na maioria das vezes, eficaz e suficiente na determinação estrutural de moléculas de variados tipos ⁵⁹.

4.3.4.1 – Ressonância Magnética Nuclear de fósforo - ³¹P(¹H)

A ressonância magnética nuclear de fósforo é uma técnica útil tanto na caracterização, quanto no acompanhamento de sínteses que envolvem compostos contendo átomos de fósforo em sua estrutura. Em complexos contendo fosfinas o átomo de fosforo atua como um *probe* no acompanhamento da reação onde pode-se acompanhar a extinção dos sinais dos precursores e o surgimento dos sinais inerentes à nova espécie formada.

Os espectro de RMN ³¹P(¹H) do complexo *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (Figura 4.6), (precursor dos complexos de fórmula geral [Ru(N-O)(dppb)(bipy)]) apresenta dois dubletos, mostrando a não equivalência dos dois átomos de fósforos da bifosfina, sendo eles em δ 42,2 ppm e δ 30,5 ppm (${}^2J_{P-P} = 32,5$), condizente com um sistema AX, corresponde a um sistema de dois spins que é caracterizado pela diferença da frequência ressonante de ambos, que são muito maiores que o acoplamento ($|v_1 - v_2| \gg {}^2J_{P-P}$) permitindo neste caso a visualização de dois sinais distintos ⁶⁰.

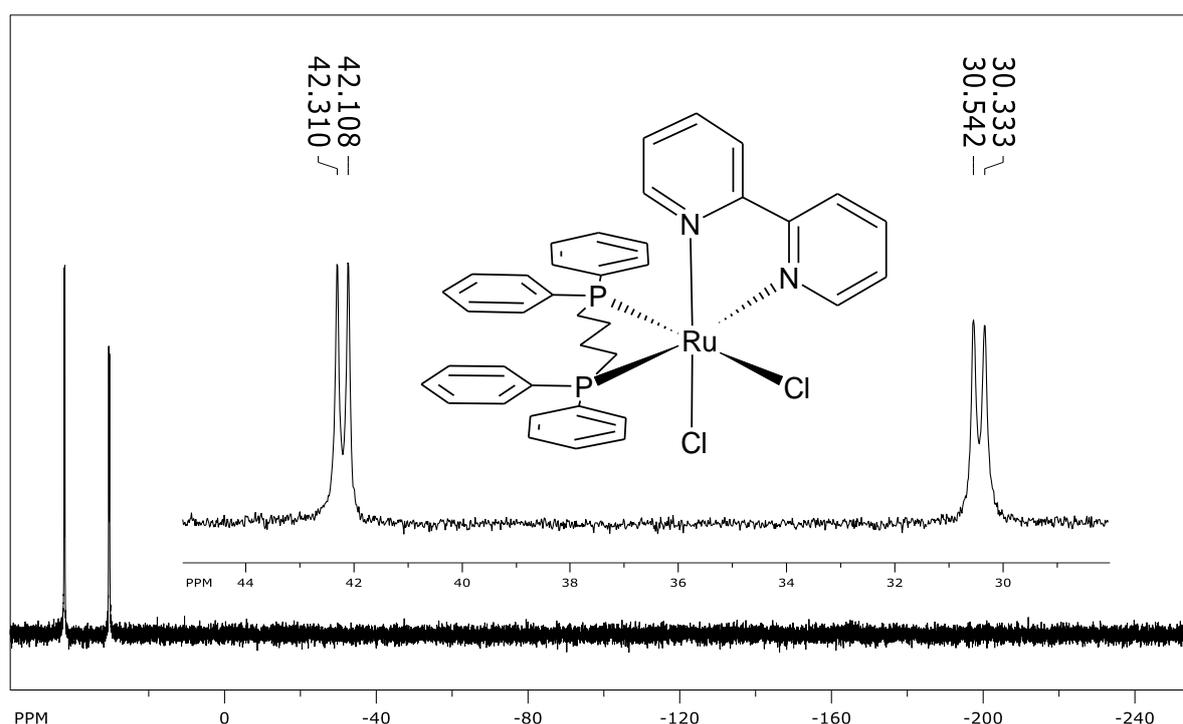


FIGURA 4.6 – Espectro de RMN ^{31}P (^1H) do complexo do *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)], em CH₃OH / D₂O.

Assim, devido a não equivalência entre os átomos de fósforo, sendo o mais protegido *trans* ao ligante melhor doador de elétrons (cloro) com deslocamento químico muito próximo ao singlete da forma *trans* (*trans*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] $\approx \delta$ 33 ppm) e o fósforo menos protegido *trans* ao átomo menos doador de elétrons (nitrogênio) apresentando-se acima de 40 ppm.

Analisando os espectros de RMN ^{31}P (^1H) obtidos para os produtos finais das reações podemos observar dois conjuntos distintos de sinais, o primeiro em δ -143 ppm (multipletto) referente ao contração PF_6^- e o segundo por volta de δ 38 ppm (dois dubletos) referentes aos átomos de fósforos da bifosfina. Comparando o deslocamento dos sinais do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (δ 42,2 (d) e δ 30,5 (d), $^2J_{\text{P-P}} = 32,5$ Hz) com os complexos obtidos (Tabela 4.6) observa-se de modo geral que com a coordenação do ligante ocorre uma

aproximação dos sinais (Figura 4.7), evidenciando a formação de um novo complexo.

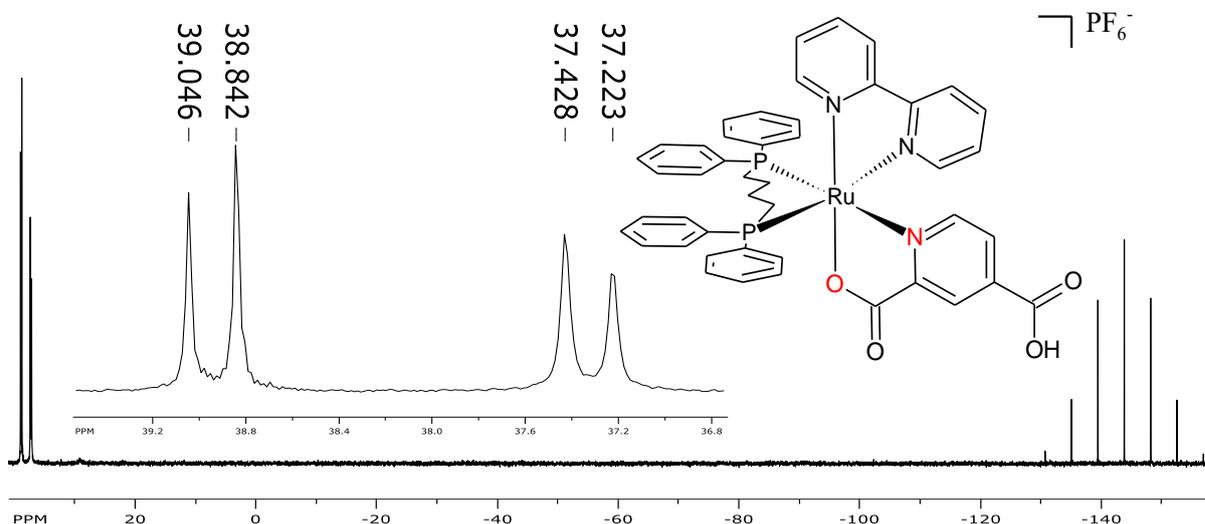


FIGURA 4.7 – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}(^1\text{H})$ do complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CH}_3\text{OH} / \text{D}_2\text{O}$.

TABELA 4.6- Valores de deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento para os complexos de rutênio contendo os ligantes dicarboxipiridínicos, em $\text{CH}_3\text{OH} / \text{D}_2\text{O}$

Composto	$\delta \text{ } ^{31}\text{P}(^1\text{H})$ (ppm)	$^2J_{\text{P-P}}$ (Hz)	$\Delta\delta$ (ppm)
$[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	40,3 e 36,6	34,8	3,7
$[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	38,9 e 37,3	32,7	1,6
$[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	39,7 e 37,5	32,7	2,2
$[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	41,3 e 32,4	34,9	8,9
$[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	38,1 e 37,1	32,6	1,0

Conforme mostrado na Tabela 4.6, o complexo contendo o ligante 2,6-dicarboxipiridínico possui uma diferença de deslocamento dos sinais ($\Delta\delta = 8,9$) maior que os complexos contendo os ligantes 2,3-dicarboxipiridínico, 2,4-

dicarboxipiridínico e 2,5-dicarboxipiridínico ($\Delta\delta = 3,7$; 1,6 e 2,2 ppm respectivamente). Esta diferença exibida pelo complexo contendo o ligante 2,6-dicarboxipiridínico é aproximadamente 4 vezes maior que os demais, como pode ser observado na Figura 4.8.

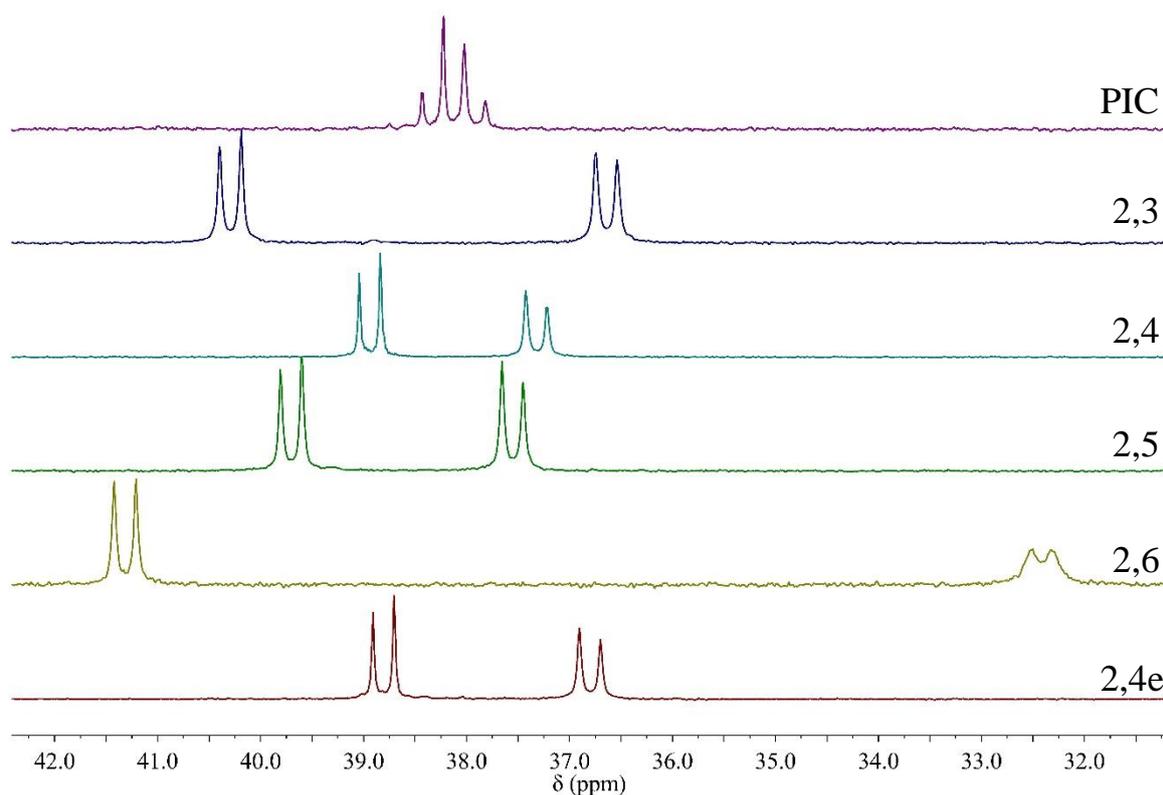


FIGURA 4.8 – Comparação de dos espectros de RMN $^{31}\text{P}(^1\text{H})$ obtidos para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos, em $\text{CH}_3\text{OH} / \text{D}_2\text{O}$.

O sinal referente ao fósforo *trans* ao nitrogênio do ligante dicarboxipiridínico, no complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, exibe um deslocamento para campo alto, indicando que a presença da carboxila livre adjacente ao nitrogênio, aumenta o caráter doador do mesmo, e conseqüentemente torna fósforo *trans* ao átomo de nitrogênio do ligante dicarboxipiridínico mais blindado.

A ressonância magnética nuclear de fósforo foi útil no acompanhamento da reação de esterificação do complexo contendo o ligante 2,4-dicarboxipiridínico, de forma que foi possível obter espectros do meio reacional em etanol. Conforme pode ser visto na Figura 4.9, ficou nítido nos espectros obtidos o consumo do complexo precursor (δ 36,9 e 39,7 ppm) e surgimento do produto (δ 36,4 e 40,0 ppm) com a carboxila esterificada mesmo sendo estes sinais bem próximos. Com três horas de reação temos aproximadamente uma proporção 1:1 de precursor e produto e com 12 horas de reação temos o consumo total do complexo precursor comprovando o término da reação.

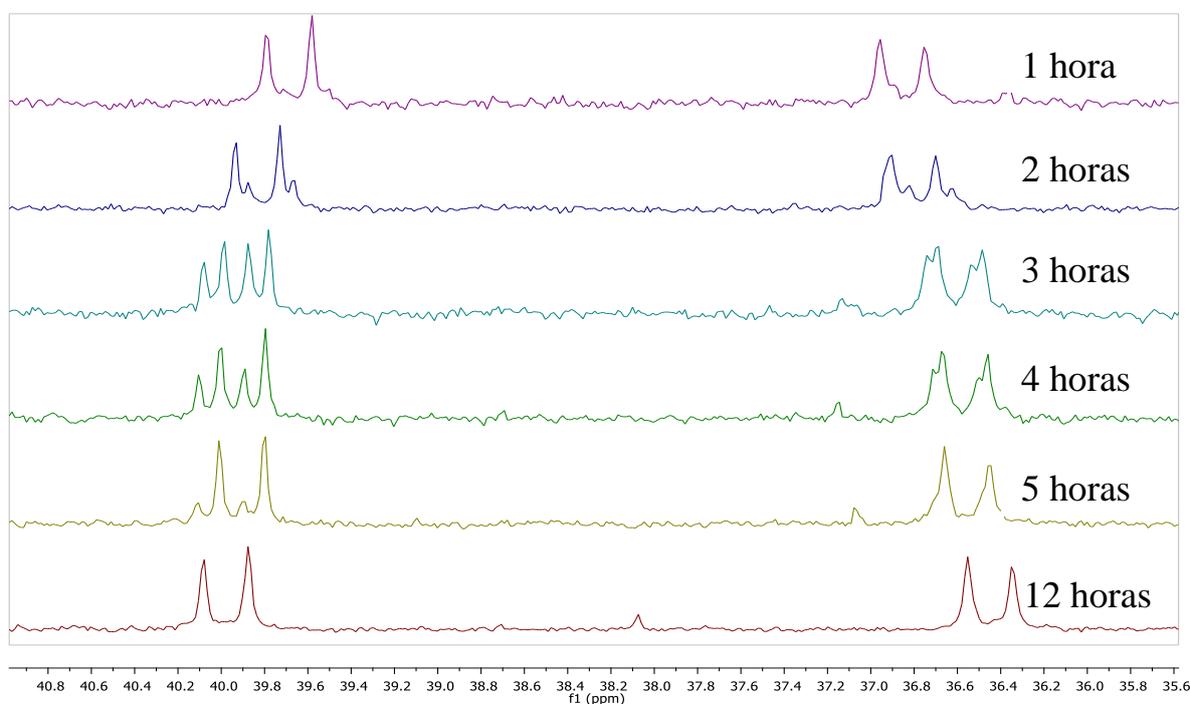


FIGURA 4.9 – Espectros obtidos durante a reação de esterificação do complexo contendo o ligante 2,4-dicarboxipiridínico, em EtOH /D₂O.

4.3.4.2 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e COSY ¹H

Utilizando a técnica de RMN ¹H e COSY pôde-se observar a presença de sinais característicos dos ligantes piridínicos, bifosfínicos e dicarboxipiridínicos presentes nos complexos.

Os sinais referentes aos hidrogênios dos ligantes dicarboxipiridínicos, mostrados na Figura 4.10, estão listados na Tabela 4.7 onde observa-se que os hidrogênios dos grupos carboxílicos são observados por volta de δ 13 ppm, enquanto os demais sinais são bem próximos por serem todos pertencentes a hidrogênios ligados a anéis aromáticos (δ 7,6 – 9,2 ppm). Os espectros obtidos para os ligantes estão no apêndice.

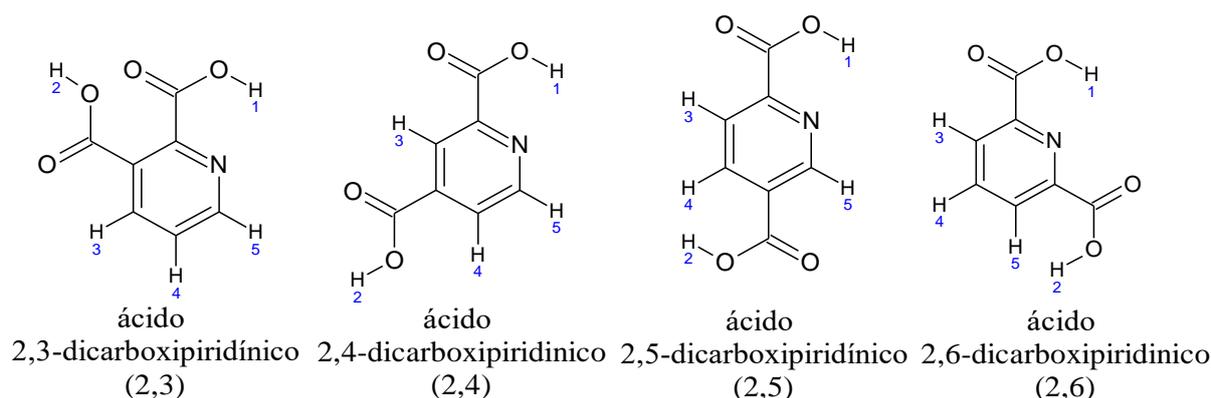


FIGURA 4.10 – Estrutura dos ligantes dicarboxipiridínicos indicando os átomos de hidrogênio.

TABELA 4.7 – Deslocamento químico para os sinais referentes aos hidrogênios dos ligantes dicarboxipiridínicos livres, em DMSO- d_6

Ligante	δ (ppm)			
	H ₁ e H ₂	H ₃	H ₄	H ₅
2,3-dicarboxipiridínico	14,0	8,3	7,6	8,8
2,4-dicarboxipiridínico	13,7	8,4	8,1	8,9
2,5-dicarboxipiridínico	12,9	8,2	8,4	9,2
2,6-dicarboxipiridínico	13,0	8,3	8,2	8,3

No espectro RMN ^1H obtido para os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos é possível observar três conjuntos distintos de sinais, o

primeiro referente aos hidrogênios do butano da bifosfina (1), o segundo referente aos hidrogênios dos anéis aromáticos da bifosfina (2) e o terceiro referente aos hidrogênios da biperidina e do ácido dicarboxipiridínico (3), conforme indicado na Figura 4.11. Estes três grupos de sinais são melhor visualizados quando se analisa o espectro de COSY ^1H , onde podemos ver os acoplamentos dos hidrogênios vizinhos, dentro de cada conjunto (Figura 4.12).

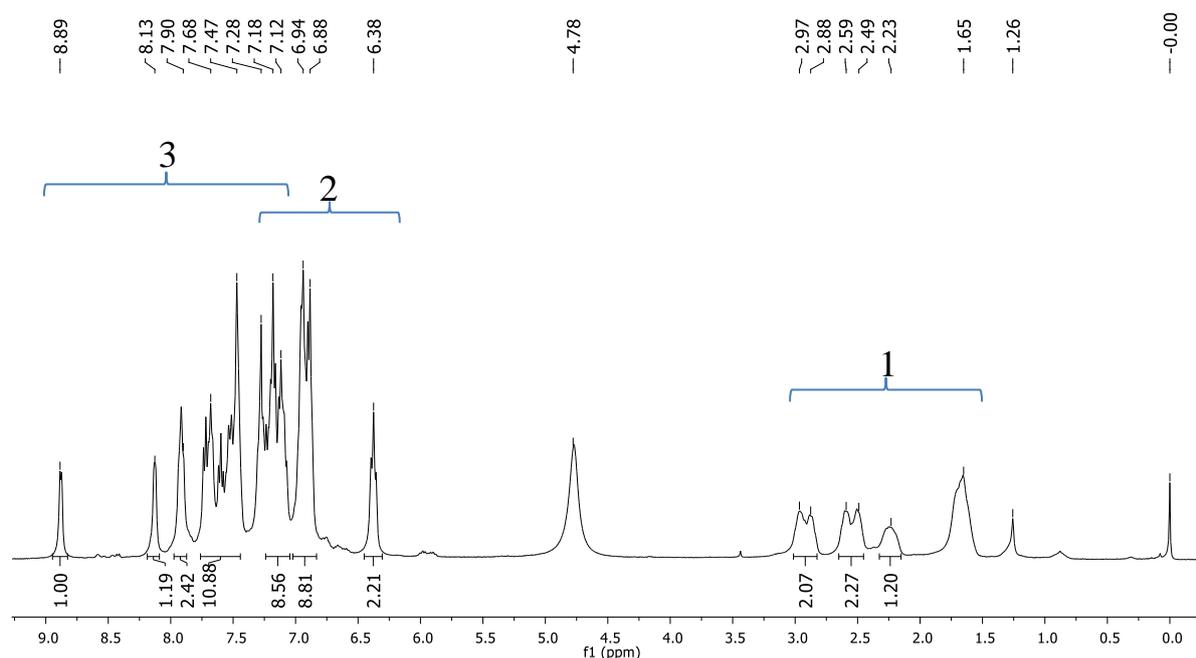


FIGURA 4.11 – Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo contendo o ligante 2,6-dicarboxipiridínico, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$.

Parte dos sinais encontrados não podem ser atribuídos devido à complexidade estrutural dos complexos. Como pode-se observar, grande parte dos átomos de hidrogênios dos compostos sintetizados estão ligados a anéis aromáticos caindo todos numa mesma região do espectro, entretanto em todos os espectros obtidos as integrais dos sinais são equivalentes as estruturas esperadas.

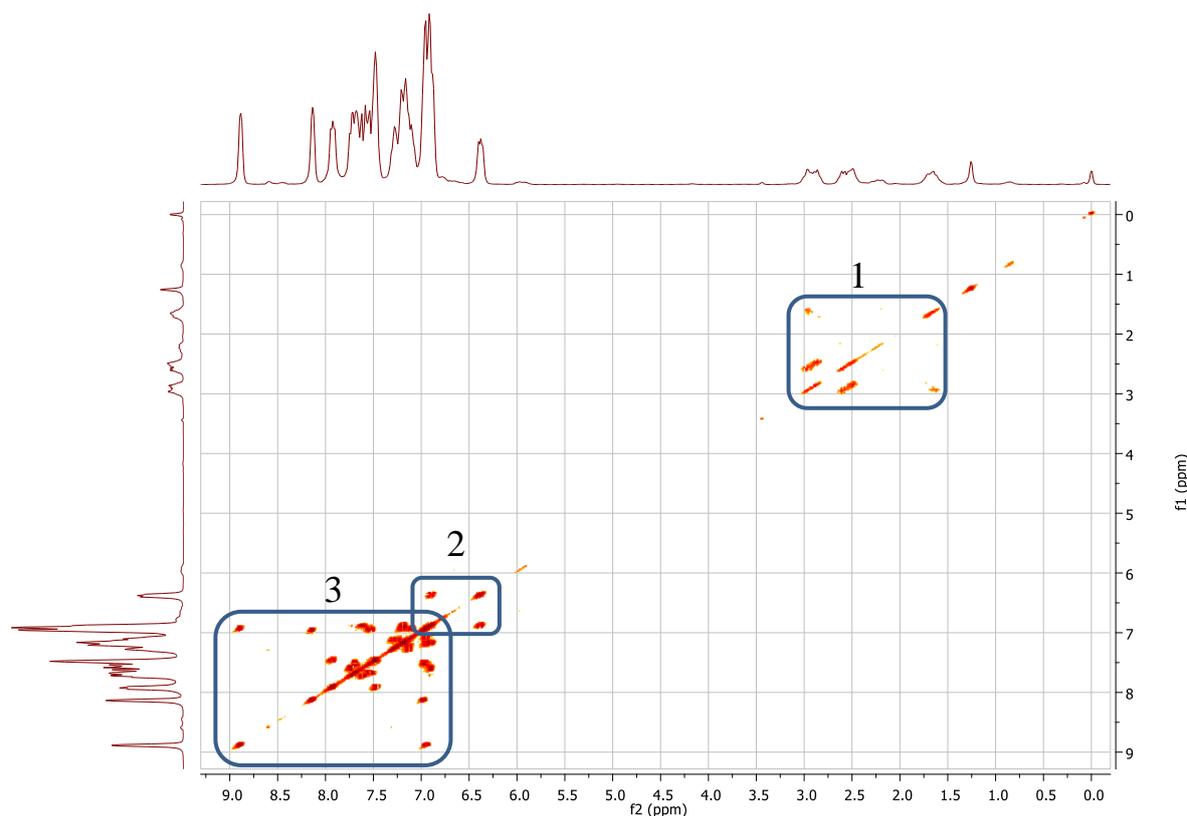


FIGURA 4.12 – Espectro de RMN - COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$.

No espectro obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ observa-se sinais semelhantes aos demais complexos exceto pelos sinais em δ 1,25 e 4,27 ppm (Figura 4.13) referentes ao etil do grupo éster, sendo o sinal em 1,25 integrado para três hidrogênios correspondendo ao CH_3 e o sinal em 4,27 integrado para dois hidrogênios correspondentes ao CH_2 do éster. Este fato também é evidenciado no espectro de COSY ^1H onde observa-se claramente a presença do acoplamento entre os hidrogênios (CH_3 e CH_2) do grupo etil do éster, como pode ser visto na Figura 4.14. Os espectros para os demais complexos estão apresentados no apêndice.

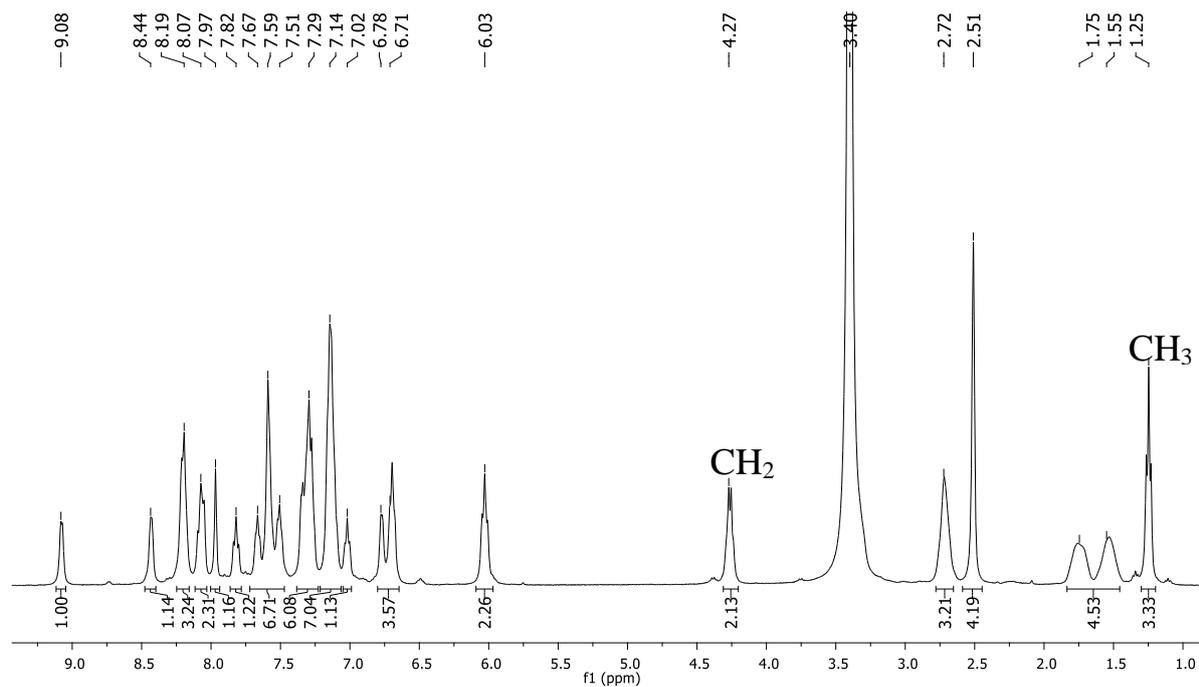


FIGURA 4.13 – Espectro de RMN ¹H obtido para o complexo [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆, em DMSO-d₆.

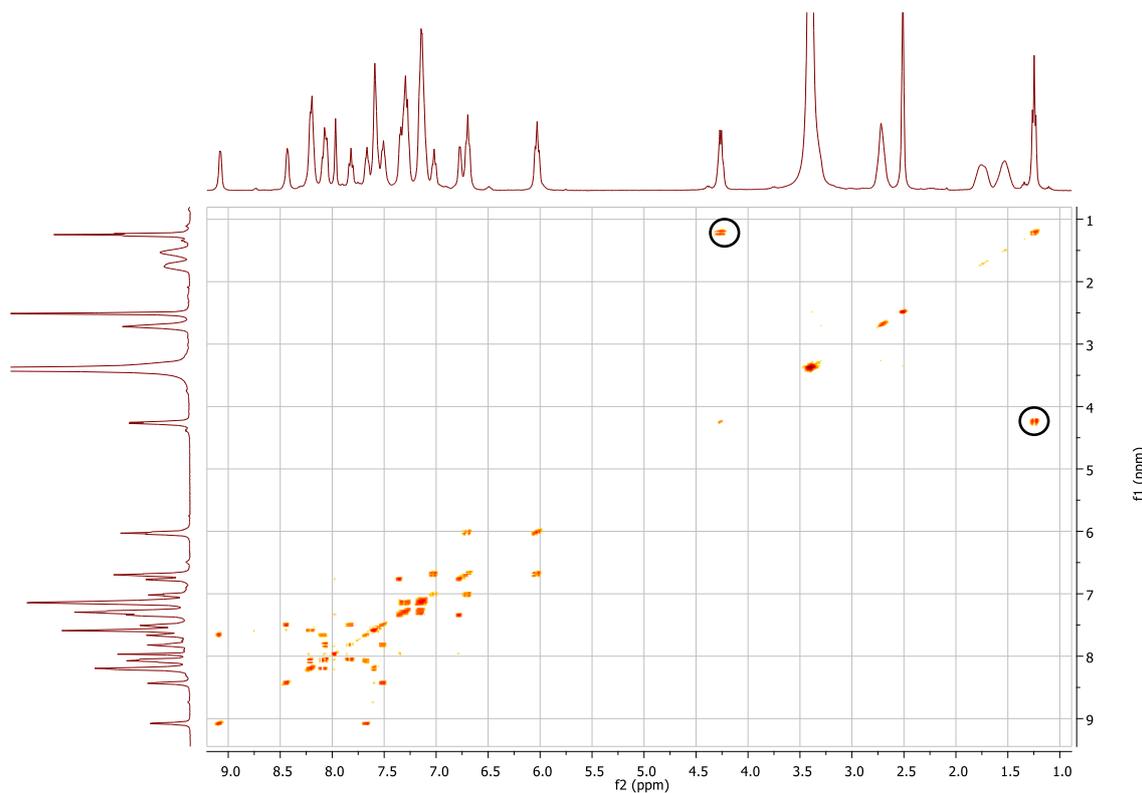


FIGURA 4.14 – Espectro de RMN - COSY ¹H obtido para o complexo [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆, em DMSO-d₆.

4.3.4.3 – Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN - ^{13}C), HSQC e DEPT-135

Os sinais referentes aos carbonos dos ligantes dicarboxipiridínicos, mostrados na Figura 4.15, estão listados na Tabela 4.8 onde observa-se que os carbonos dos grupos carboxílicos encontram-se por volta de δ 165 ppm. Os espectros obtidos para os ligantes estão no apêndice.

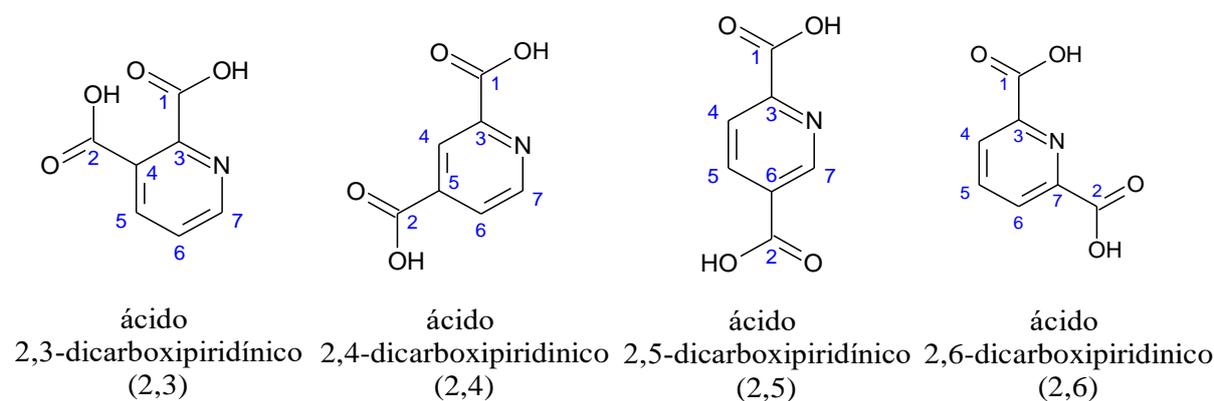


FIGURA 4.15 – Estrutura dos ligantes dicarboxipiridínicos indicando os átomos de carbono.

TABELA 4.8 – Deslocamento químico para os sinais referentes aos carbonos dos ligantes dicarboxipiridínicos livres, em DMSO- d_6

Ligante	δ (ppm)					
	C ₁ e C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
2,3-dicarboxipiridínico	167,7 e 166,3	151,4	137,7	125,5	124,7	152,3
2,4-dicarboxipiridínico	165,6 e 165,5	125,9	149,5	139,6	123,5	150,7
2,5-dicarboxipiridínico	165,6 e 165,5	150,0	128,9	124,5	138,6	151,3
2,6-dicarboxipiridínico	165,4	148,0	127,4	139,2	127,4	148,0

Nos espectros de RMN - ^{13}C (^1H) dos complexos foram observados sinais referentes aos carbonos dos ligantes dicarboxipiridínicos, indicando a coordenação, conforme apresentado na Figura 4.16 que mostra o espectro de RMN - ^{13}C (^1H) para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. A atribuição específica de parte dos sinais não foi realizada devido a complexidade dos dados obtidos em virtude do elevado número de sinais sobrepostos, sendo a grande maioria destes sinais provenientes dos grupos aromáticos presentes nos complexos.

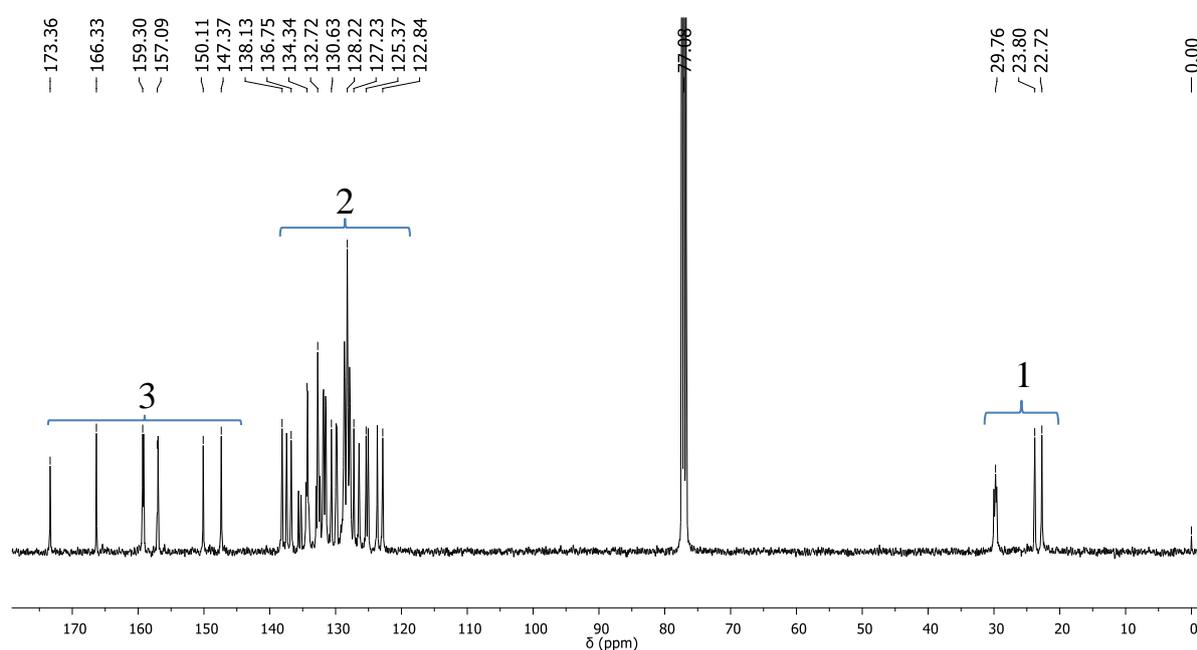


FIGURA 4.16 – Espectro de RMN de ^{13}C (^1H) obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$.

O primeiro conjunto de sinais, δ 22,72 a 29,76 (1) ppm, pertencem ao butano da bifosfina conforme evidenciado nos espectros de RMN HSQC (Figura 4.17) onde observa-se o acoplamento C-H destes sinais com os sinais referentes aos hidrogênios também atribuídos ao grupo butano (δ 1,65 a 2,97 ppm). Outro fato que comprova essa atribuição é a intensidade negativa observada para estes sinais no espectro de DEPT - 135, onde neste experimento apenas

carbonos CH_2 possuem intensidade negativa enquanto CH e CH_3 possuem intensidade positiva.

O segundo conjunto (δ 122,84 a 138,13 ppm) de sinais são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos dos ligantes, sendo este conjunto composto por carbonos quaternários e carbonos ligados a hidrogênios conforme pode ser visto pela correlação direta destes sinais com os picos do espectro de hidrogênio, o que proporciona os acoplamentos C-H (2) observados no espectro de RMN HSQC.

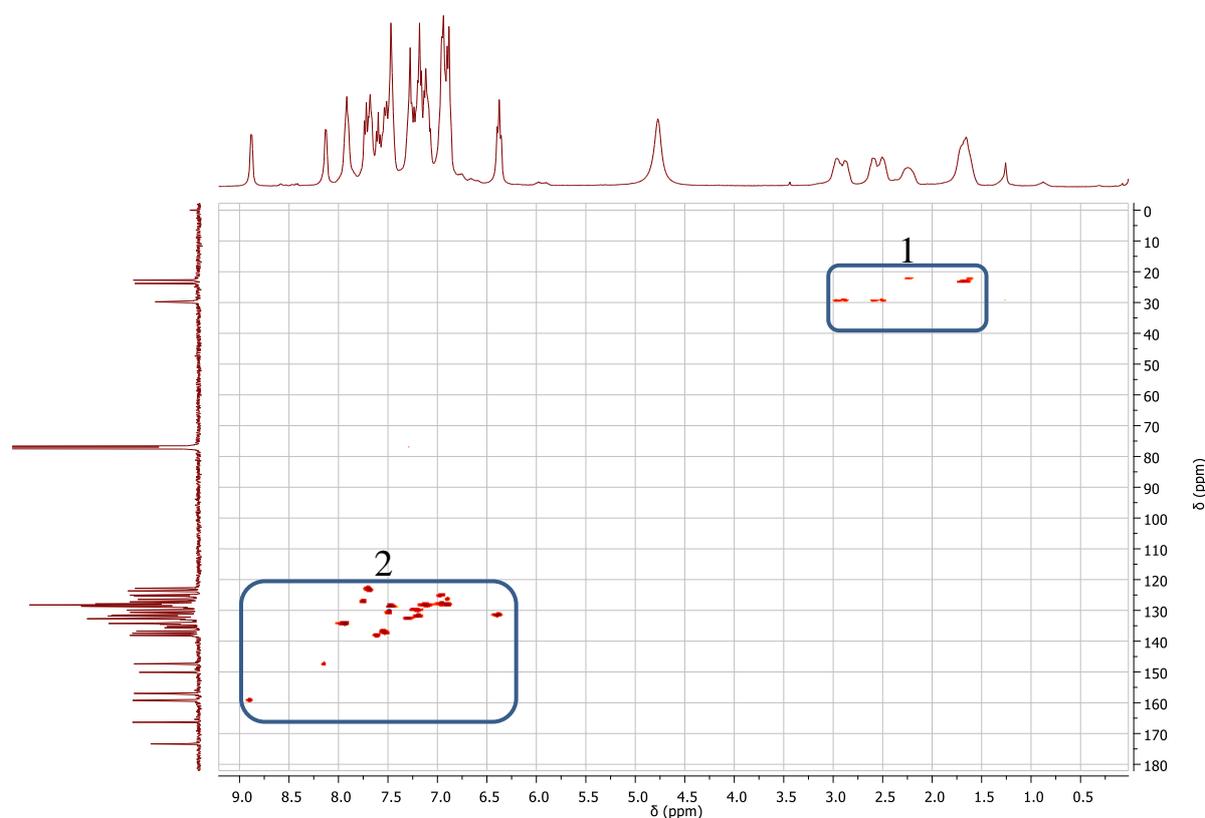


FIGURA 4.17 – Espectro de RMN - HSQC do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$.

O terceiro conjunto de sinais referem-se principalmente a carbonos quaternários. Os carbonos quaternários são evidenciados pela ausência de acoplamentos dos mesmos no espectro de RMN – HSQC e também por não estarem presentes nos espectros de DEPT – 135 como pode-se observar nas Figuras 4.18 e 4.19.

A principal evidência fornecida pelos experimentos de ressonância magnética nuclear de carbono para os complexos sintetizados neste trabalho é o deslocamento do carbono da carboxila coordenada, temos que no ligante livre as carboxilas possuem um deslocamento de δ 165 ppm aproximadamente. Uma vez que a carboxila adjacente ao nitrogênio piridínico se coordena ao íon metálico (Ru^{2+}) temos que esta sofre um deslocamento químico para maiores frequências. Esta desblindagem é devido a coordenação onde ocorre transferência de carga da carboxila para o centro metálico levando à diminuição da densidade eletrônica do carbono da carboxila coordenada.

Deste modo a carboxila livre permanece em δ 165 ppm e a coordenada desloca-se para δ 173 ppm, no caso do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, sendo esta tendência é observada para todos os complexos. Todos os espectros de RMN ^{13}C (^1H), HSQC e DEPT - 135 para os complexos sintetizados encontram-se no apêndice.

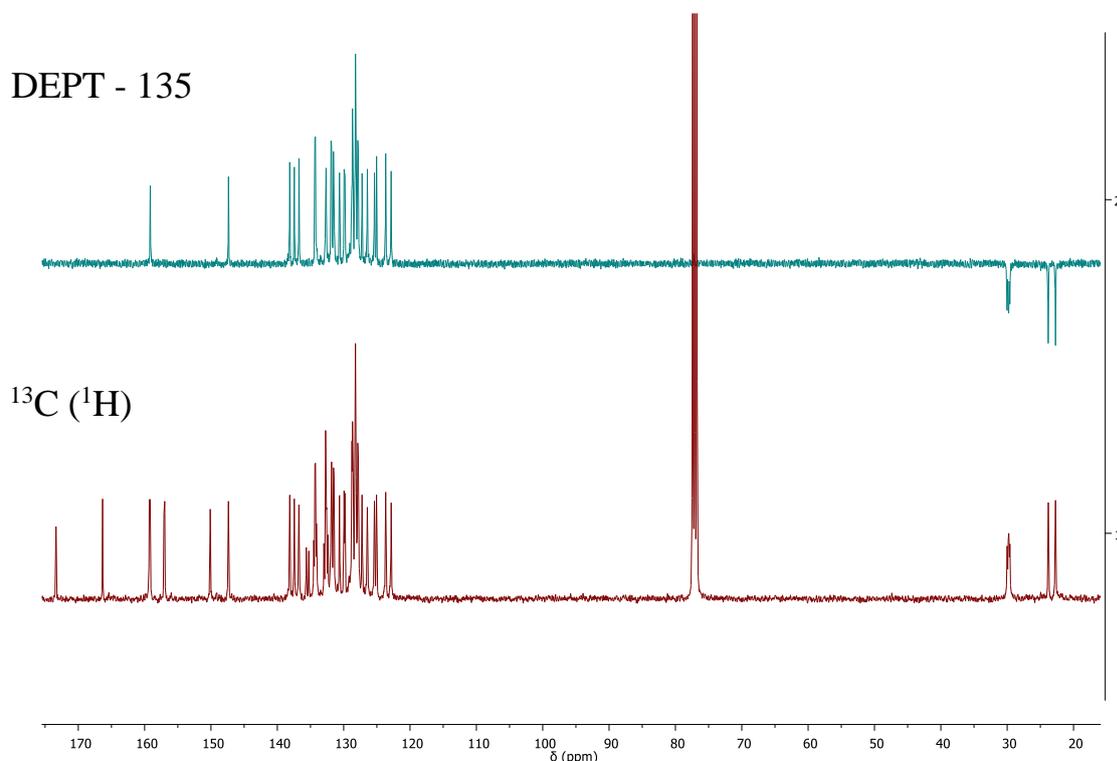


FIGURA 4.18 – Espectros de DEPT - 135 e RMN - ^{13}C (^1H) do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em $\text{CDCl}_3\text{-d}$.

No espectro de RMN ^{13}C (^1H) do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ pode-se observar sinais característicos que comprovam a esterificação do grupo carboxílico livre. Os picos em δ 13,78 e 62,02 ppm são referentes ao carbonos CH_3 e CH_2 , respectivamente. Esta atribuição pode ser confirmada pelo espectro de DEPT – 135 (Figura 4.20) onde vemos que o sinal em δ 13,78 ppm possui intensidade positiva e deslocamento característico metila, enquanto o pico em δ 62,02 ppm possui intensidade negativa confirmando que o mesmo é um CH_2 , ambos pertencentes ao grupo etil do éster carboxílico, confirmando as atribuições realizadas.

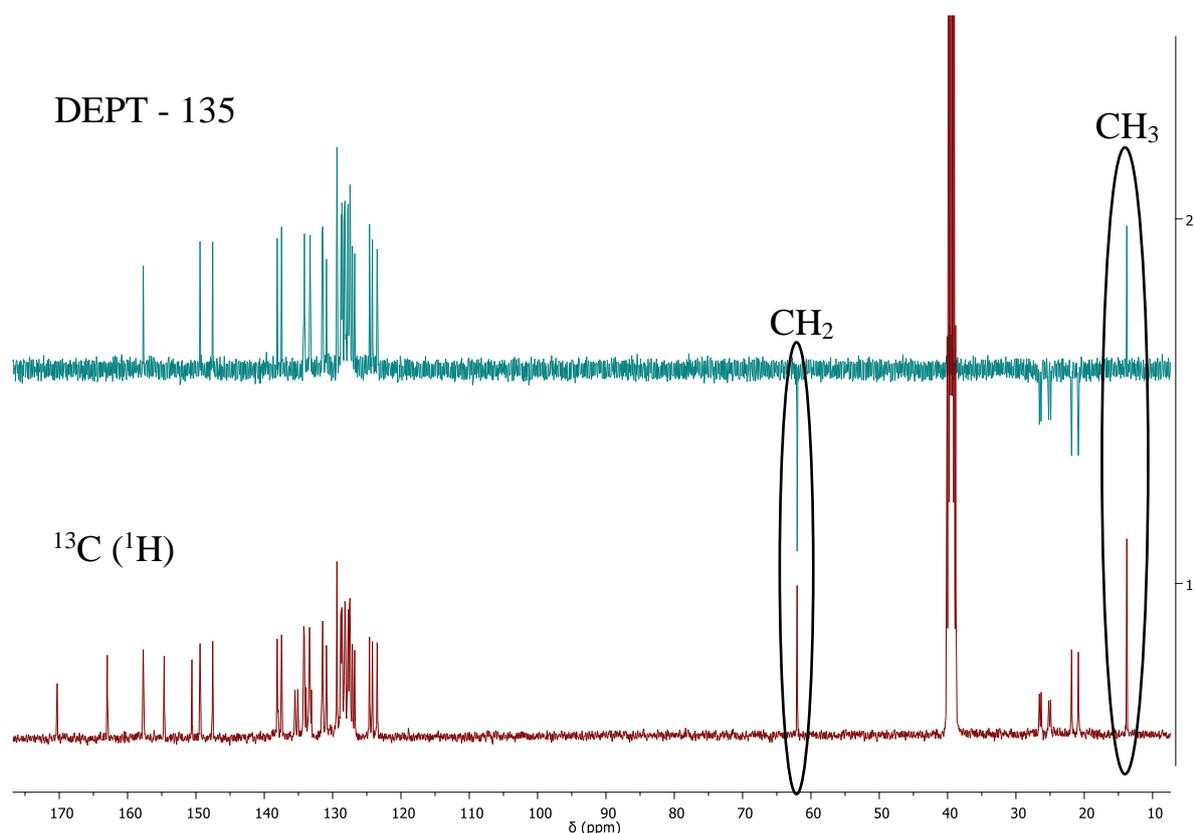


FIGURA 4.19 – Espectros de DEPT - 135 e RMN - ^{13}C (^1H) do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, em DMSO-d_6 .

4.3.5 – Estudo eletroquímico

Com o estudo eletroquímico dos complexos pode-se avaliar o efeito do ligante sobre o metal, baseando-se no deslocamento do potencial de oxidação $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$. A substituição dos dois cloros (π e σ doador) por um ligante piridínico (σ doador e π receptor), como o íon picolinato, acarretará na diminuição da densidade eletrônica do metal e conseqüente aumento do potencial de oxidação referente ao mesmo.

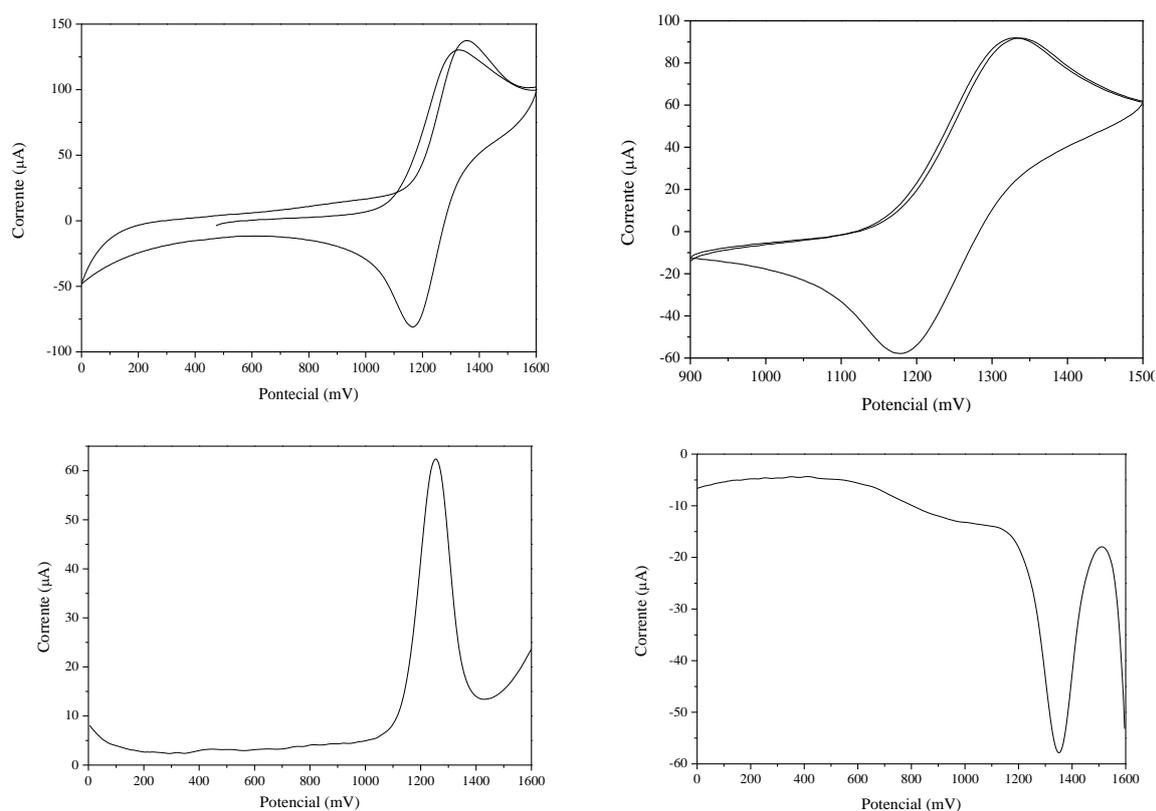


FIGURA 4.20 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, obtidos em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

Os voltamogramas cíclicos dos complexos foram obtidos em solução de diclorometano ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio - PTBA) e apresentam um processo quasi-reversível como pode ser visto no exemplo do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (Figura 4.20). Como esperado, os valores de $E_{1/2}$ encontrados (Tabela 4.9) foram mais altos que o valor descrito na literatura

para o precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]^{36}$, aproximadamente 0,6 V de diferença, o que indica que o centro metálico é mais estável nos novos complexos sintetizados que no complexo precursor.

TABELA 4.9 – Dados de voltametria cíclica para os complexos de rutênio (100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl)

COMPLEXOS	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}$	ΔE_{p}
$[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})] \text{PF}_6$	1,31	1,15	1,28	0,06
$[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})] \text{PF}_6$	1,30	1,23	1,26	0,07
$[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})] \text{PF}_6$	1,27	1,18	1,23	0,09
$[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})] \text{PF}_6$	1,31	-	-	-
$[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})] \text{PF}_6$	1,41	1,25	1,33	0,16

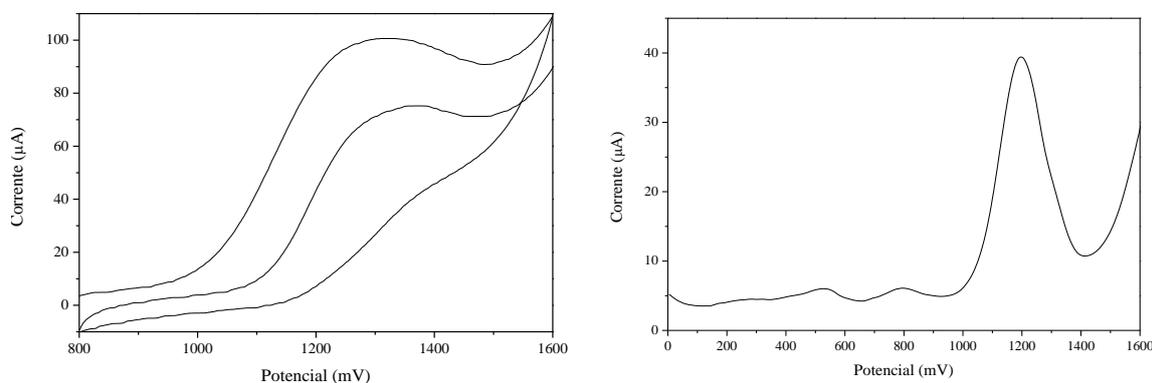


FIGURA 4.21 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})] \text{PF}_6$, obtidos em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl), com 30% de elipsoide.

Apenas o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]$ difere dos demais por apresentar um par redox de baixa reversibilidade, provavelmente devido a repulsão gerada pela carboxila livre, que deve levar a labilização do ligante dicarboxipiridínico após a aplicação do potencial, conforme pode-se ver na Figura 4.21. A baixa reversibilidade causa o surgimento de processos em 0,55 e 0,80V

resultantes das novas espécies geradas devido à instabilidade eletroquímica do complexo.

4.3.6 – Difração de raios X

A difração de raios X é uma ferramenta de grande importância para a elucidação estrutural de compostos inorgânicos. Neste trabalho foram obtidas as estruturas cristalinas para os complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, conforme mostrado nas Figuras 4.22 e 4.23, onde temos a confirmação dos modos de coordenação propostos para o sistema.

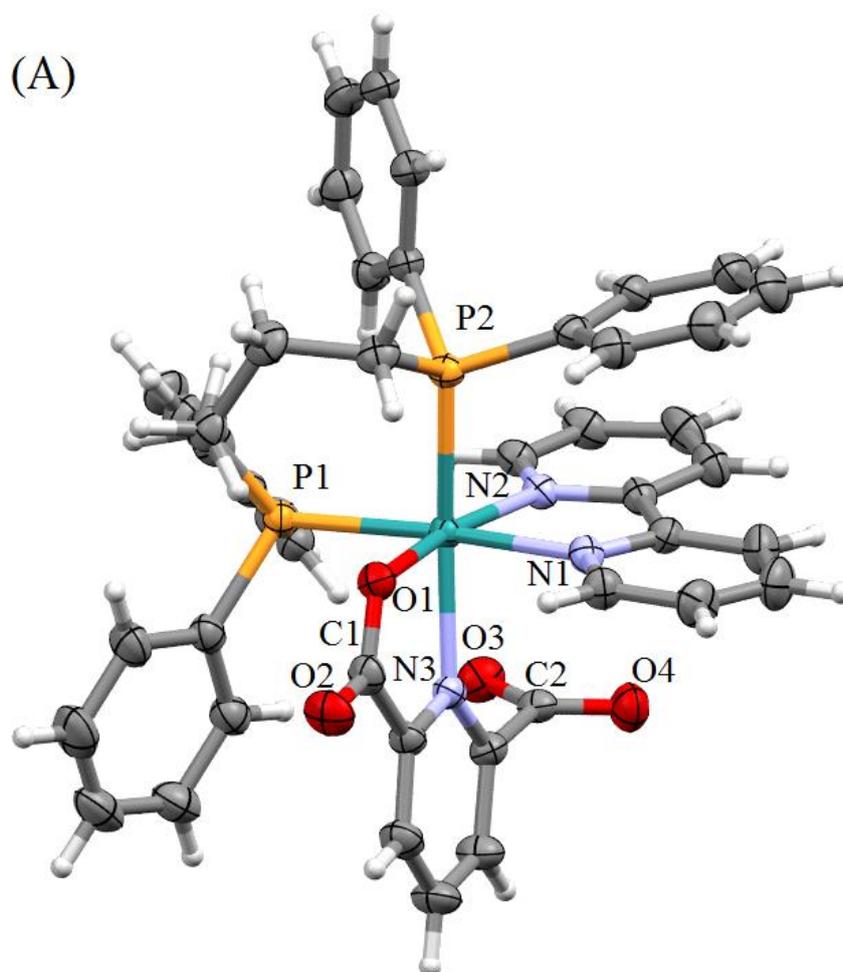


FIGURA 4.22 – Estruturas cristalinas do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

(A)

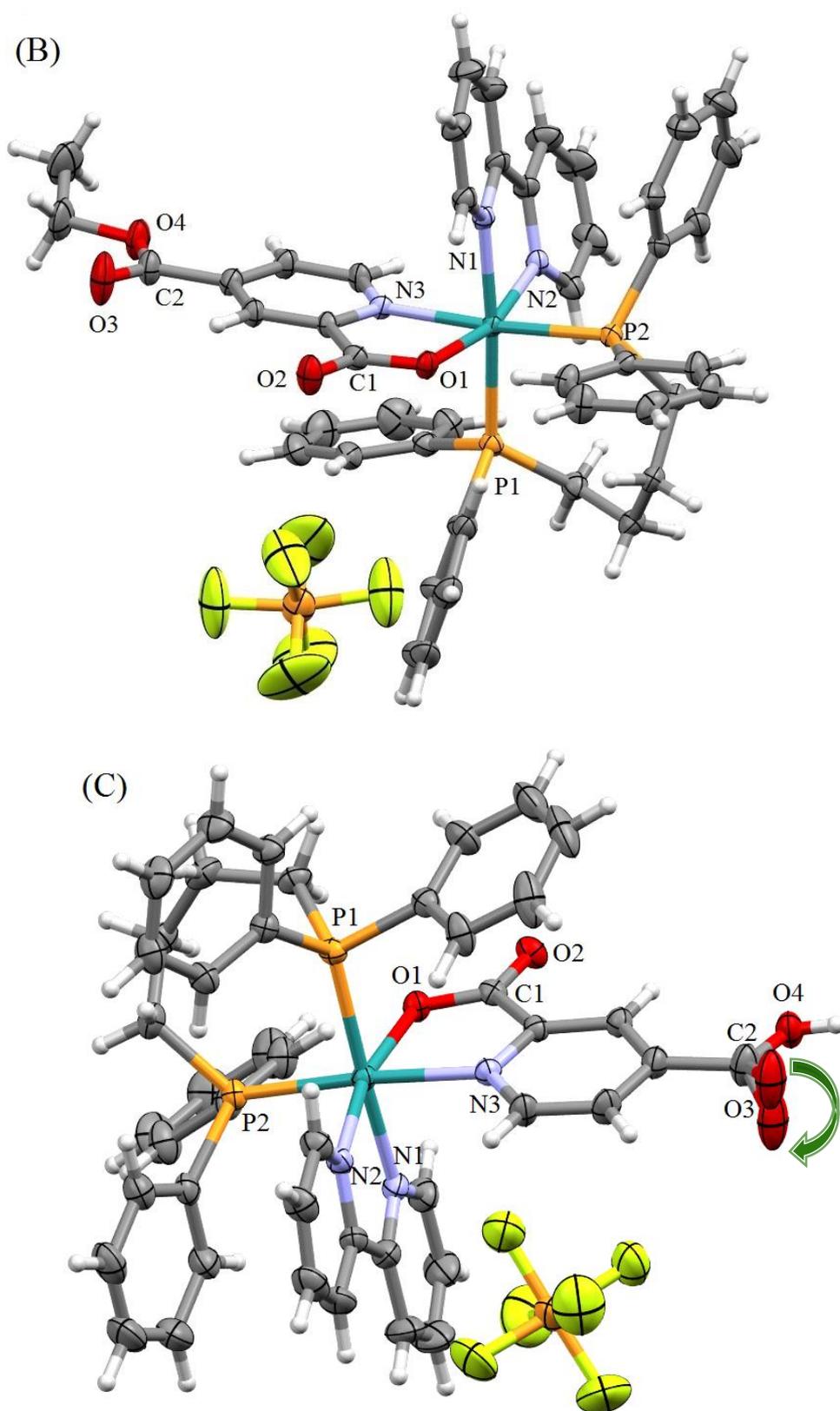


FIGURA 4.23 – Estruturas cristalinas dos complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (B) e $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (C), elipsoides com 30% de probabilidade.

Todos os complexos sintetizados são monocatiônicos, necessitando assim do ânion PF_6^- como contra íon para o balanço de carga. O contra íon PF_6^- foi identificado em todos os complexos sintetizados tanto pela espectroscopia de absorção na região do infravermelho ($\nu_{\text{P-F}} = 840 \text{ cm}^{-1}$) como no experimento de RMN ^{31}P (^1H) ($\delta -143 \text{ ppm}$), porém o mesmo consta no empacotamento cristalino apenas para os complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ não sendo observado no complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

O balanço de carga da estrutura cristalina no complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ ocorreu através do desprotonamento da carboxila livre (não coordenada) o que acarretou na neutralização do complexo. Como o pK_a do grupo carboxílico no ligante livre é 2,16 temos que no sistema onde ocorreu o surgimento dos monocristais (água, metanol e diclorometano) a carboxila livre está desprotonada o que ocasionou a formação do empacotamento cristalino sem o contra íon PF_6^- .

Sabendo disso o sistema de cristalização do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ foi montado utilizando no lugar de água uma solução de ácido clorídrico (1,0 M), assim temos que o equilíbrio ácido-base da carboxila livre foi deslocado para a formação do mesmo na forma monocatiônica (protonado) o que levou ao surgimento de monocristais apresentando empacotamento cristalino contendo o contra íon PF_6^- .

No complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ os comprimentos das ligações C-O na carboxila livre são praticamente iguais (1,236 e 1,238 Å) devido o desprotonamento e consequente ressonância do par de elétrons através das ligações O-C-O conferindo comprimento de ligação intermediário em relação aos comprimentos normais de uma ligação C-O simples e dupla, enquanto no complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ onde a carboxila encontra-se protonada as ligações C-O da carboxila livre possuem comprimentos diferentes (1,231 e 1,296 Å) sendo a menor uma ligação dupla e a maior uma ligação simples, conforme pode-se ver na Tabela 4.10.

TABELA 4.10 – Distância de ligação (Å) das estruturas cristalinas obtidas.

Ligação (Å)	cb26	cb24	cb2,4e	Cisbipy ⁵⁶
Ru-N1	2,099	2,095	2,095	2,097
Ru-N2	2,089	2,064	2,077	2,088
Ru-N3	2,182	2,114	2,126	-
Ru-P1	2,362	2,325	2,370	2,279
Ru-P2	2,313	2,320	2,328	2,331
Ru-O	2,087	2,118	2,101	-
Ru-Cl1	-	-	-	2,484
Ru-Cl2	-	-	-	2,428
C-O1	1,286	1,269	1,284	-
C-O2	1,216	1,238	1,228	-
C-O3	1,236	1,231	1,180	-
C-O4	1,238	1,296	1,326	-

No complexo [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆ o oxigênio da ligação C=O da carboxila possui uma desordem, cristalizando em duas posições com ocupação de 50% cada, conforme apresentado na Figura 4.23 (C).

As ligações Ru-P são maiores que as ligações Ru-O e Ru-N, isto devido o maior raio atômico do átomo de fósforo (1,10 Å) em relação aos átomos de nitrogênio (0,74 Å) e oxigênio (0,66 Å) o que proporciona maior comprimento de ligação. Nota-se que em todos os complexos as ligações Ru-N3 (N3 = nitrogênio do complexo dicarboxipiridínico) e Ru-N1 (N1 = nitrogênio bipyridínico *trans* a fósforo) são ligeiramente maiores que as ligações Ru-N2 (N2 = nitrogênio *trans* a oxigênio). Sugere-se que os maiores comprimentos de ligação observados para Ru-N3 e Ru-N1 quando comparado com Ru-N2 deve-se ao efeito *trans* realizado pelos átomos de fósforo da fosfina que leva ao aumento do comprimento de ligação.

De semelhante modo a ligação Ru–P1 é ligeiramente maior nos complexos sintetizados neste trabalho (2,36 Å) que no precursor [Ru(Cl₂)(dppb)(bipy)] (2,27 Å)⁵⁶. Este fato pode estar ligado a maior influência *trans* exercida pelos ligantes N-heterociclos (ácidos dicarboxipiridínicos) em relação aos ligantes cloretos que foram substituídos.

Nota-se também, que o comprimento da ligação Ru–N3 é maior no complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF₆ em relação aos demais, exibindo uma diferença de até 0,06 Å. Esta observação pode ser justificada pelo efeito estérico causado pela carboxila livre que está adjacente ao nitrogênio que se coordena, enfraquecendo a ligação Ru–N3. Este fato também foi visto na voltametria, onde o processo referente ao par redox do rutênio é irreversível, irreversibilidade que pode ser facilitada pelo enfraquecimento da ligação Ru–N3, conforme visto nos dados acima.

Na Figura 4.24 pode-se observar as principais ligações de hidrogênio existentes no empacotamento cristalino dos complexos, sendo estas as principais responsáveis pela estabilização do mesmo. Nos complexos [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆ as moléculas do complexo interagem entre si por interações clássicas do tipo O–H...O e não clássicas do tipo C–H...F entre os hidrogênios dos anéis da bifosfina e o contra-íon PF₆⁻.

O empacotamento cristalino do complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF₆ exhibe interações não clássicas do tipo C–O...H onde um os átomos de oxigênio da carboxila livre atua de forma bifurcada interagindo com os prótons da água, diclorometano ou dos anéis da bifosfina. Outra interação intermolecular observada para este complexo foi do tipo C=O...H, onde o oxigênio da ligação C=O da carboxila coordenada interage com um dos hidrogênios do diclorometano presente no empacotamento cristalino. Em todos os complexos sintetizados as moléculas se organizaram de forma que em todas os empacotamentos cristalinos as carboxilas participem de interações intermoleculares levando ao arranjo molecular de menor energia dentro do sistema utilizado.

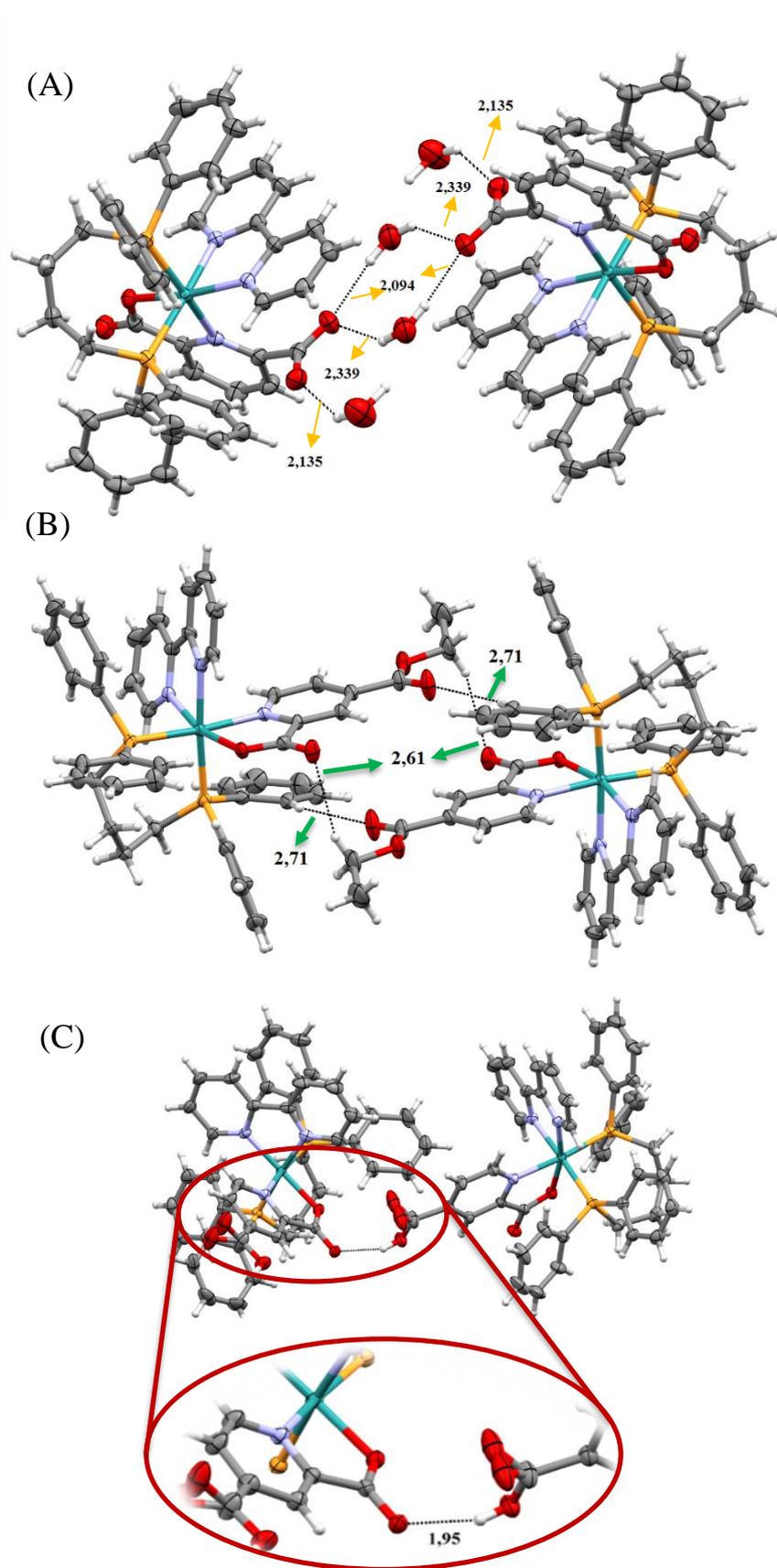


FIGURA 4.24 – Estruturas cristalinas dos complexos $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (A), $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (B) e $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (C).

Uma nova ferramenta que pode ser utilizada para se explorar as interações intermoleculares dos complexos em estado sólido é a *Full interaction Mapping* do programa Mercury®, que se baseia em uma biblioteca de interações moleculares de grupos orgânicos derivada das milhares de estruturas cristalinas depositadas no banco de dados *Cambridge Structural Database* (CSD). O programa mapeia o espaço em torno da superfície de uma estrutura cristalina mostrando as regiões preferidas para interação com grupos orgânicos específicos e isto levando em conta outros fatores como impedimento estérico ⁶¹.

Desta forma o programa delinea regiões do complexo capazes de realizar ligações de hidrogênio, tanto doando como recebendo o próton, e também mostra os grupos hidrofóbicos presentes. As regiões doadoras de ligação de hidrogênio são marcadas de vermelho e em azul temos as regiões propícias a receberem uma ligação de hidrogênio.

Na Figura 4.25 temos os mapas de interação gerados sobre a superfície dos complexos onde vemos que as regiões delineadas com as cores mais intensas correspondem as regiões onde descrevemos as interações intermoleculares anteriormente. Em uma análise visual temos que os oxigênios das carboxilas são os principais pontos aceptores de ligação de hidrogênio das moléculas, enquanto os hidrogênios aromáticos são os principais doadores de ligação de hidrogênio.

Nota-se quando comparamos os complexos quanto a carboxila livre, vemos que no complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ ela está protonada fornecendo um intenso ponto de doação de ligação de hidrogênio, enquanto que nos complexos $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ ela está esterificada no primeiro e desprotonada no segundo, perdendo assim a capacidade de doar um próton em uma ligação de hidrogênio.

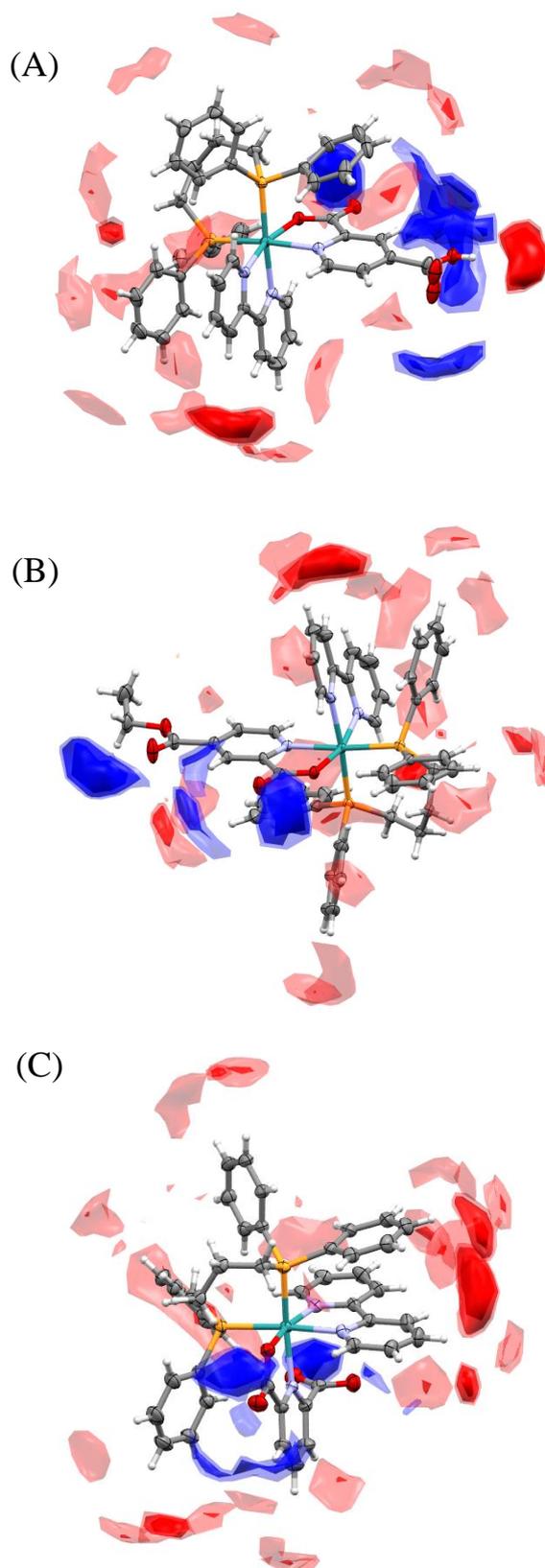


FIGURA 4.25 – Mapa de interação dos complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (A), $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (B) e $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (C), fornecido pelo programa Mercury.

4.4 – Avaliação do Potencial Biológico dos Complexos de Rutênio

4.4.1 – Avaliação da Interação dos Complexos com DNA

Atualmente a maioria dos trabalhos científicos envolvendo complexos de rutênio no desenvolvimento de substâncias com ação antitumoral utilizam como alvo biológico o DNA, sendo este um dos principais mecanismos de ação proposto para estes tipos de moléculas. Este tipo de estudo foi impulsionado principalmente após a divulgação do mesmo como possível mecanismo de ação da cisplatina através da interação covalente coordenando-se as bases nitrogenadas do DNA e conseqüentemente impedindo o mesmo de se replicar.

Sabendo disso, um dos objetivos deste trabalho é avaliar o comportamento dos complexos frente *ct*-DNA (*calf thymus*-DNA) utilizando de variadas técnicas que permitem direcionar o estudo para um tipo de interação específica.

Buscando avaliar a influência da carboxila livre nos compostos deste trabalho, foi sintetizado o complexo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (pic = ácido picolínico) já descrito na literatura como um complexo que possui modo de interação eletrostático com o DNA³⁵, confirmado tanto pelas técnicas realizadas neste trabalho, como também pelas técnicas de dicroísmo circular e microscopia de força atômica (AFM). Através desta comparação, espera-se avaliar a influência da carboxila livre presente nos complexos, uma vez que o ácido picolínico possui apenas uma carboxila, que no complexo encontra-se coordenada, conforme apresentado na Figura 4.26.

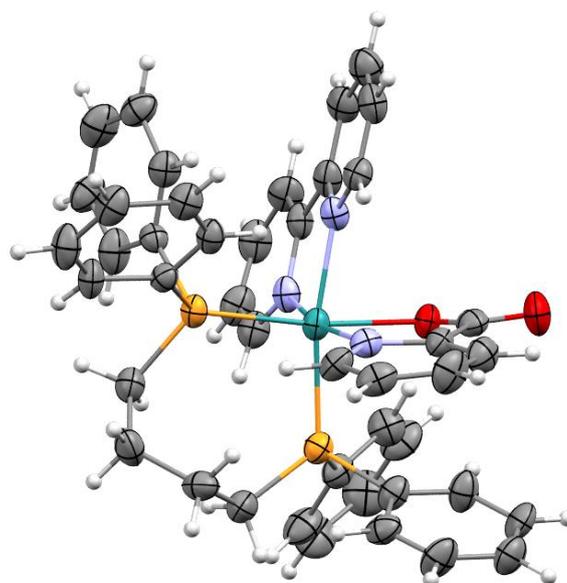


FIGURA 4.26 - Estrutura cristalina do complexo do tipo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ descrito por PAVAN, *et.al*³⁵.

4.4.1.1 – Titulação Espectroscópica com DNA

A titulação espectroscópica é uma técnica amplamente utilizada na avaliação da interação entre moléculas e DNA, onde baseando-se na espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível pode-se monitorar bandas específicas do composto quanto a diminuição da intensidade (hipocromismo) ou deslocamento (batocromismo), isto a medida que se adiciona alíquotas de DNA. Por meio desta técnica pode-se determinar a afinidade entre complexo e DNA por meio do cálculo da constante de ligação (K_b) que se baseia nos máximos de absorção em um determinado comprimento de onda para cada complexo, isto utilizando a equação de *Neighbor-Exclusion*:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (4.1)$$

Onde: $[\text{DNA}]$ é a concentração do DNA em pares de bases, ϵ_a é o coeficiente de extinção aparente calculado como $A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$, ϵ_f corresponde

ao coeficiente de extinção do complexo na sua forma livre e ϵ_b refere-se o coeficiente de extinção do complexo na forma ligada. Cada conjunto de dados, quando montado na equação acima, oferece uma reta com uma inclinação de $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ e uma interceptação y - de $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$, onde K_b é determinado a partir da razão entre a inclinação e a interceptação.

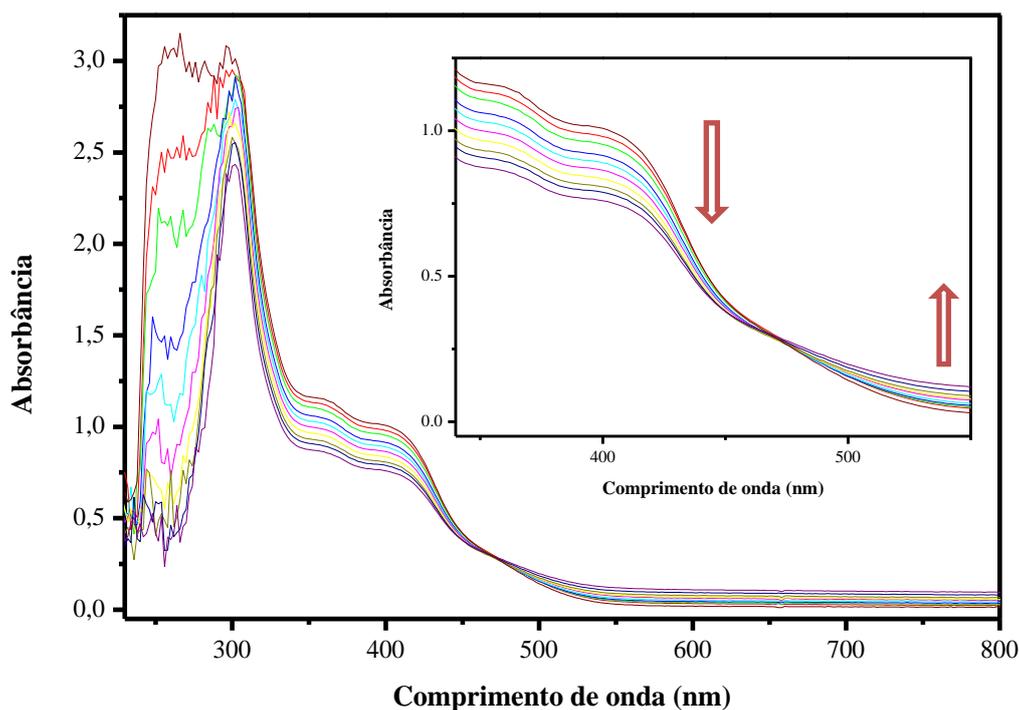


FIGURA 4.27 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.

Como pode-se ver na Figura 4.27, a medida que se incrementa alíquotas de DNA a uma solução contendo o complexo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ observa-se uma diminuição da intensidade de absorção (efeito hipocromico) das bandas de transferência de carga entre o metal e o ligante (TCLM) e também das bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes, esta diminuição da intensidade de absorção é devida a variações na energia da transição eletrônica ocasionando mudança na intensidade de absorção devido às interações entre o complexo e o DNA e devido o efeito de diluição. Além disso há um ponto isosbético em torno de 460nm,

indicando que existem duas formas de complexo espectrofotometricamente diferentes no meio, e estas formas possuem a mesma absorção no comprimento de onda em que se observa o ponto, sendo, provavelmente, uma destas formas o complexo e outra o complexo interagindo com o DNA. Estas e outras observações podem ser uma evidência de interações entre complexos metálicos e DNA ⁴⁰.

O valor obtido no cálculo da constante de interação (K_b) para o complexo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ foi de $4,8 \cdot 10^3 \pm 1,3 \cdot 10^3$ com um hipocromismo (%) de $12,7 \pm 0,7$; para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, a constante de interação (K_b) foi de $1,7 \cdot 10^3 \pm 1,1 \cdot 10^3$ e hipocromismo (%) de $9,7\% \pm 0,9$; estes valores são característicos de interações fracas entre complexo e DNA, sendo estas do tipo eletrostáticas e ligações de hidrogênio sendo que para o complexo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ esta observação já era prevista na literatura . Os espectros obtidos para a interação do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ podem ser vistos na Figura 4.28.

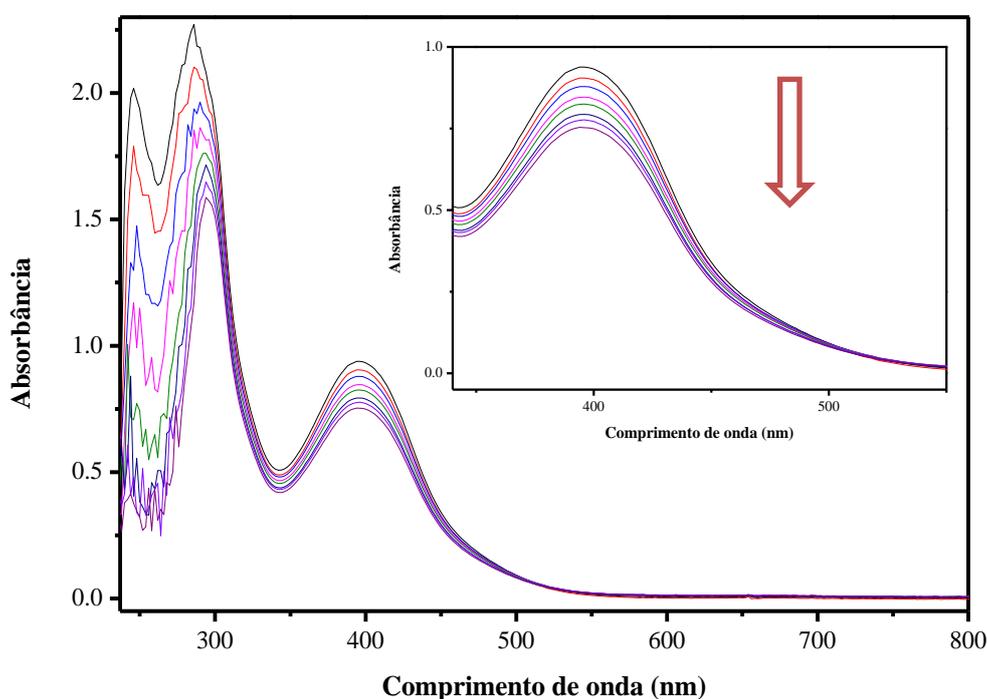


FIGURA 4.28 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.

Para os demais complexos não foi possível calcular um valor de constante, pois o hipocromismo encontrado com a adição da solução de DNA foi igual ao encontrado quando se adiciona tampão a uma solução de mesma concentração dos complexos indicando assim a ausência de interação com o DNA para estes complexos que possuem carboxila livre.

4.4.1.2 – Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento a uma dada temperatura, de forma que quanto maior for a viscosidade, menor será a velocidade que o fluido se movimenta. Desta forma, quando se possui uma solução com uma concentração fixa de DNA e se varia a concentração de complexo, temos a possibilidade da variação da viscosidade em uma solução de DNA oferecendo uma evidência confiável do modo de interação complexo / DNA ⁴⁰.

Construindo-se um gráfico de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ (onde η e η_0 são as viscosidades específicas da solução de ct-DNA, na presença e ausência dos complexos, respectivamente) vs. $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$ obtém-se uma curva característica do tipo de interação existente. É sabido que interações intercalativas e pelos sulcos do DNA ocasionam o aumento da viscosidade da solução, pois a intercalação aumenta as distâncias entre os pares de bases ocasionando o aumento do volume do DNA que leva a maior resistência da solução ao escoamento.

Interações do tipo covalente levam a fragmentação do DNA, com a ligação do complexo ao grupo fosfato ou aos pares de base temos o rompimento das interações entre as fitas e das ligações entre os nucleosídeos levando a diminuição da viscosidade da solução. As interações eletrostáticas não ocasionam alteração no perfil de viscosidade da solução de DNA pois estes tipos de interação ocorrem na superfície do DNA não levando a alteração significativa da estrutura do DNA e da viscosidade da solução.

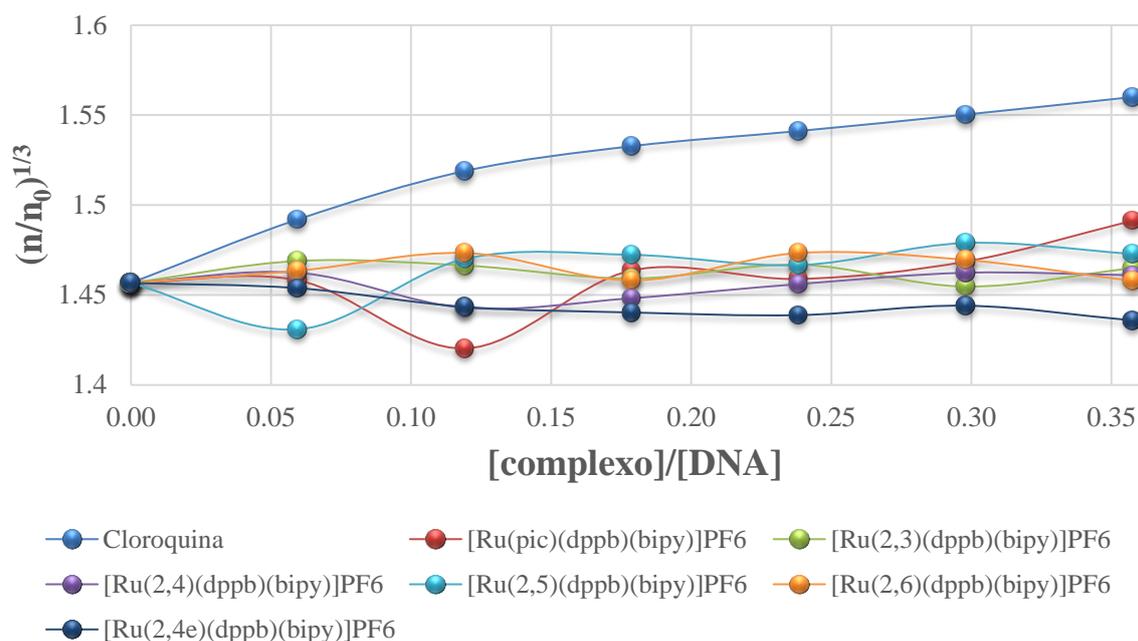


FIGURA 4.29 – Gráfico de viscosidade para complexos.

No gráfico obtido para os complexos sintetizados neste trabalho (Figura 4.29) observou-se uma tendência de viscosidade constante para a solução de DNA em todos os complexos. Esta tendência deve-se ao modo de interação dos complexos com o DNA, onde interações fracas como ligações de hidrogênio e eletrostáticas ou até mesmo a ausência de interação não ocasionam mudança significativa na viscosidade das soluções justificando a tendência geral os valores de viscosidade encontradas para nos experimentos com os complexos. A cloroquina foi empregada como padrão de intercalação, onde como observado na figura acima, leva ao aumento da viscosidade da solução.

4.4.1.3 – Eletroquímica

Métodos eletroquímicos como voltametria cíclica ou de pulso diferencial também podem ser empregados na avaliação da interação de complexos metálicos com biomoléculas. Baseando-se nos valores de corrente,

potencial de oxidação e redução dos complexos pode-se descobrir o modo de interação complexo/DNA.

Em uma solução contendo quantidades fixas de complexo pode-se avaliar a alteração do perfil voltamétrico à medida que se adiciona alíquotas de *ct*-DNA. Complexos que interagem covalentemente com o DNA levam a formação de novas espécies produzindo novos processos redox, complexos que interagem pelo modo intercalativo provocam o deslocamento do potencial para valores mais positivos e complexos que interagem de forma eletrostática o potencial se desloca para valores negativos devido a transferência de elétrons do DNA para o complexo ⁴⁰.

Nos experimentos realizados com os complexos [Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF₆, [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF₆, conforme pode-se ver na Figura 4.30, houve um decréscimo muito pequeno na corrente devido ao efeito de diluição que ocorre com a adição das alíquotas de DNA levando a diminuição do coeficiente de difusão da espécie eletroativa na superfície do eletrodo. Não se observou alteração do potencial redox com a adição de DNA a solução, o que implica que os complexos que contém carboxila livre não interagem com o DNA, ocasionando a ausência alteração do potencial de oxidação do complexo, conforme mostrado nas técnicas de interação descritas nos tópicos anteriores.

Os complexos [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆ apresentaram mudanças significativas nos voltamogramas, o valor da corrente de pico decresceu a medida que se adicionava DNA indicando que além do efeito de diluição a interação complexo – DNA levou ao decréscimo do coeficiente de difusão devido a indisponibilização da espécie eletroativa devido a interação. Outra mudança foi o decréscimo no valor do potencial redox com a adição de DNA indicativo da transferência de carga do DNA para o complexo tornando-o mais rico em elétrons e conseqüentemente diminuindo o potencial redox. Todos estes efeitos observados são característicos

de interação eletrostática conforme previsto nas demais técnicas de determinação do tipo de interação.

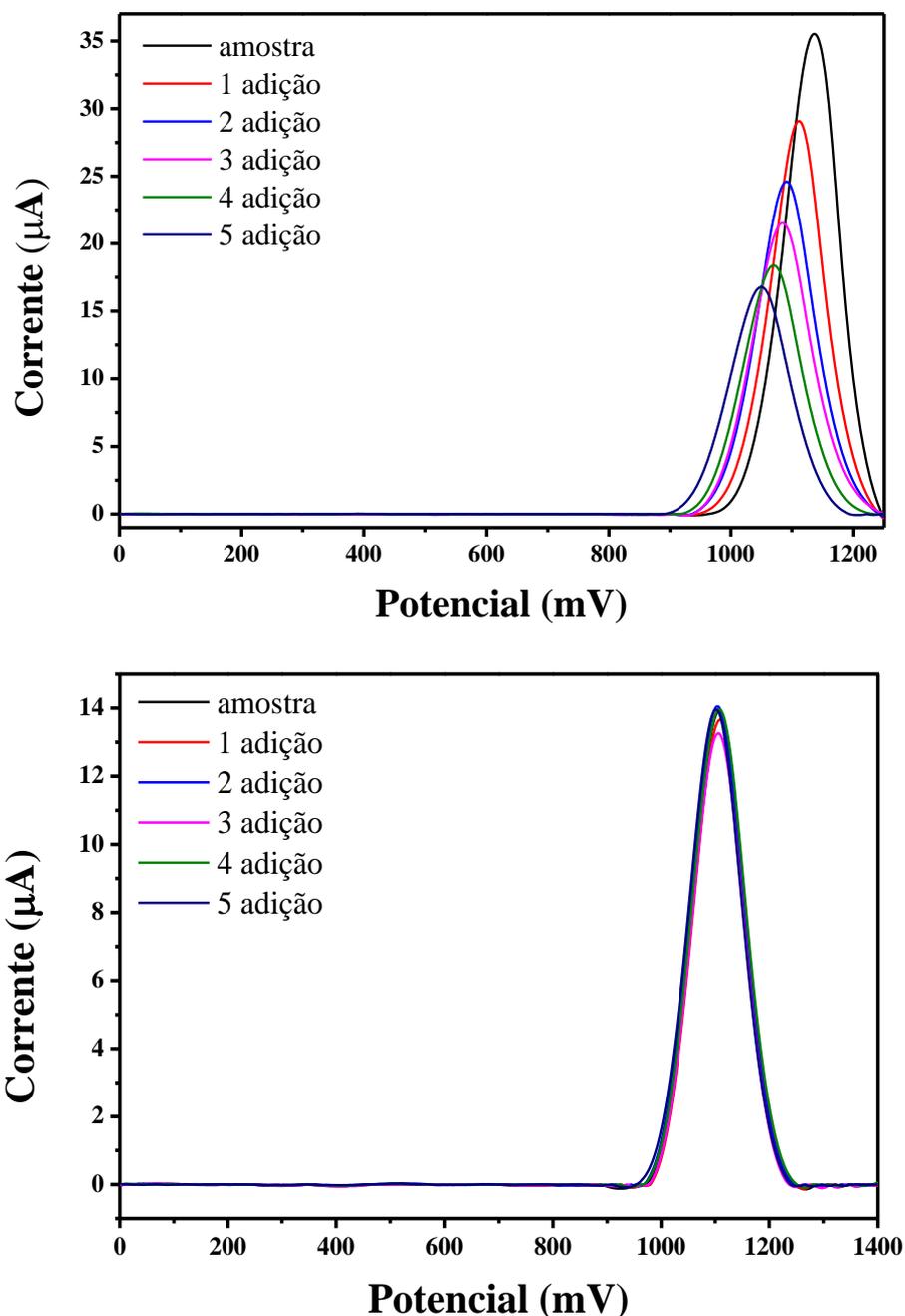
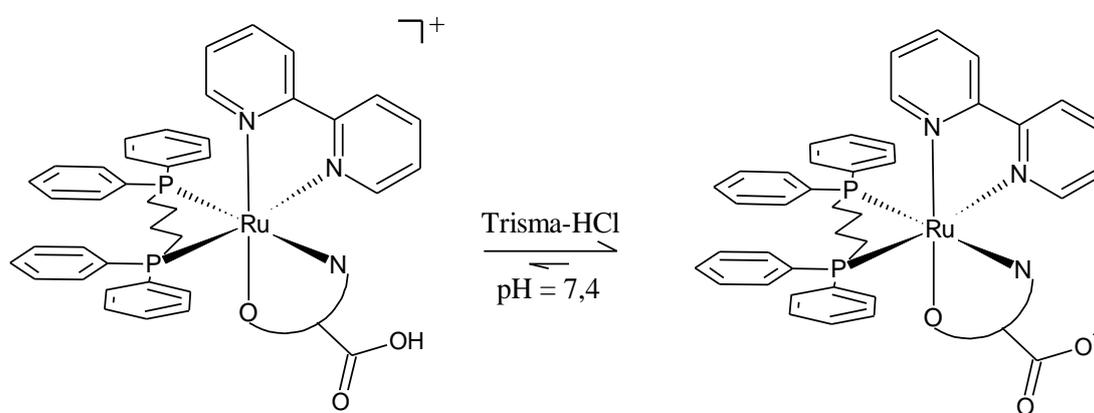


FIGURA 4.30 – Voltametria de onda quadrada para os complexos $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ respectivamente em diferentes quantidades de *ct*-DNA.

Desta forma, com o auxílio de todas as técnicas utilizadas concluimos que os complexos $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e

[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆ interagem com o DNA de modo eletrostático enquanto os complexos [Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF₆, [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆, [Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF₆ não interagem com o DNA. Em todos os experimentos, solução tampão (Trisma - HCl) com pH = 7,4 (pH sanguíneo) foi utilizada, onde provavelmente grande parte das carboxilas livres estarão desprotonadas formando íons carboxilato, conforme pode-se ver no Esquema 4.3.



ESQUEMA 4.3 – Reação de dissociação dos complexos contendo carboxila livre em tampão 7,4 (Trisma-HCl).

Complexos do tipo [RuCl(car-bipy)(PPh₃)₂(CO)] (car-bipy = 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina) (Figura 4.31) já descritos na literatura quanto ao seu modo de interação⁶², comportam-se de modo semelhante aos complexos descritos neste trabalho, de modo que complexos contendo ligante tipo 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina (duas carboxilas livres ligadas a bipiridina) possuem uma menor constante de interação (1,1.10²). Complexos do mesmo tipo coordenados à 2,2'-bipiridina (sem carboxila livre) interagem com o DNA com maiores constantes de interação (4,1.10³), fato também atribuído devido à repulsão existente entre o íon carboxilato e os grupos fosfato do DNA ⁶².

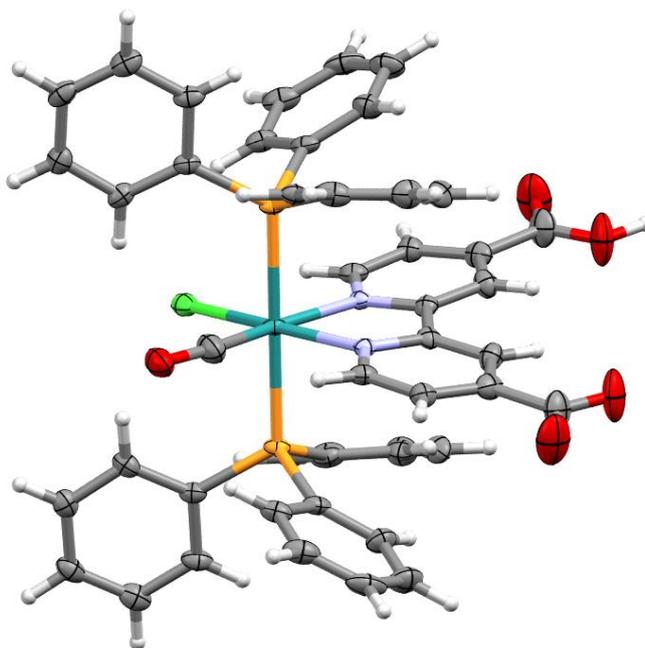


FIGURA 4.31 – Estrutura cristalina do complexo do tipo $[\text{RuCl}(\text{car-bipy})(\text{PPh}_3)_2(\text{CO})]$ descrito por KAMATCHI, *et.al.*⁶² (car-bipy = 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina).

O fato da existência da repulsão entre o íon carboxilato e o DNA é comprovado quando observa-se a ocorrência de interação eletrostática do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e DNA conforme visto no experimentos realizados. Como neste complexo a carboxila foi transformada em um éster carboxílico, temos que não existe mais carga negativa para que haja repulsão, possibilitando assim a interação complexo / DNA.

4.4.2 – Avaliação da interação dos complexos com HSA

Diversos estudos têm sido realizados buscando-se analisar as interações de diferentes complexos metálicos com HSA (albumina de soro humano), devido a capacidade desta proteína de se ligar reversivelmente a uma série de moléculas, possibilitando o carregamento de substâncias do meio extracelular para o intracelular⁶³.

O melhor modo de se avaliar a ocorrência e o tipos desta interação entre moléculas e HSA é através da supressão da fluorescência da proteína ocasionada por vários processos que diminuem a intensidade da mesma sendo essa supressão classificada como dinâmica ou estática, onde uma supressão dinâmica resulta da colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado enquanto a supressão estática ocorre devido à formação do complexo com estado de menor energia entre o fluoróforo e o supressor, não estando este no estado excitado ocasionando a formação de um aduto entre o complexo e a HSA. Os processos de supressão ocorrem devido à alteração conformacional nas subunidades da proteína, ligação do substrato ou desnaturação proteica, isto em decorrência da interação com a molécula em questão ⁴⁵.

Em geral, podem-se distinguir os supressores dinâmicos e estáticos pela dependência da temperatura e viscosidade. Uma supressão dinâmica depende da difusão, assim altas temperaturas resultam em um coeficiente de difusão alto, e conseqüentemente as constantes de supressão devem aumentar com o aumento da temperatura. Em contrapartida, na supressão estática um aumento da temperatura resulta decréscimo dos valores das constantes de supressão ⁴⁶.

A maior parte da fluorescência da HSA quando excitada a 280 nm é proveniente do resíduo de triptofano e de outros resíduos de aminoácidos⁶⁴. Deste modo o acompanhamento da supressão da fluorescência da HSA é um meio valioso de se avaliar as interações existentes entre a proteína e complexos metálicos.

Os experimentos foram realizados seguindo o decréscimo da intensidade da fluorescência em concentrações diferentes do composto em duas temperaturas distintas (298 e 310K), onde acompanhou-se o decréscimo da banda que ocorre na faixa de 300 a 380 nm sobre uma excitação em 280 nm. Conforme pode ser visto na Figura 4.32, a intensidade de fluorescência sofre um decréscimo a medida que se aumenta a concentração do complexo [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆ o que é um indício que ocorre a interação do complexo com a HSA

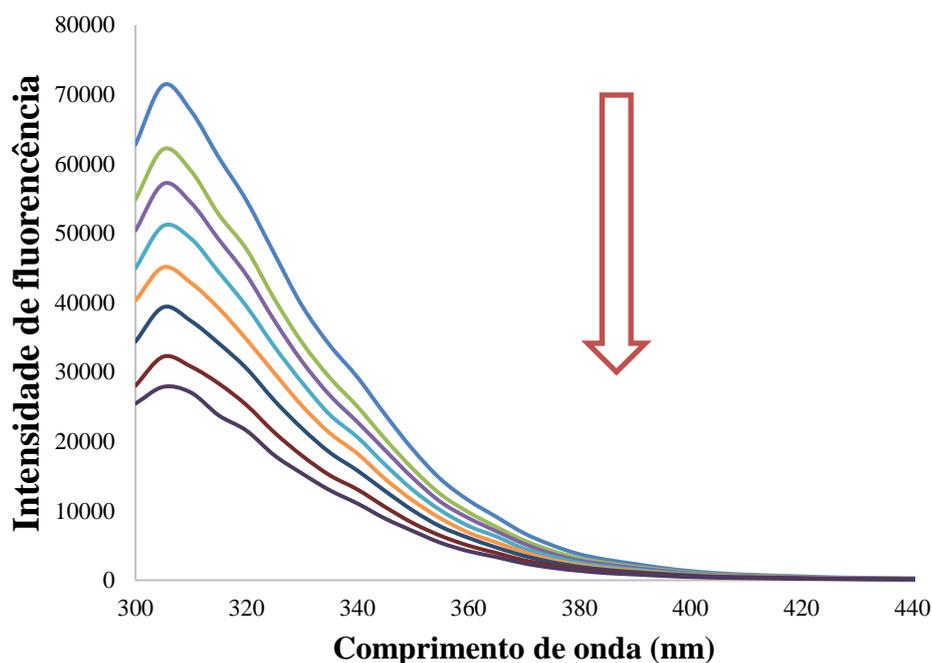


FIGURA 4.32 – Supressão da fluorescência da HSA frente a diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

A análise quantitativa do processo de supressão de fluorescência pode ser feito através da equação de Stern-Volmer (Equação 4.2) ⁶⁴:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot [\text{complexo}] = 1 + k_q \cdot t_0 \cdot [\text{complexo}] \quad (4.2)$$

Onde F_0 é a taxa de fluorescência sem o agente de extinção, F é a taxa de fluorescência com o agente de extinção e $[\text{complexo}]$ é a concentração do agente de extinção, que no caso são os complexos contendo os ligantes dicarboxipiridínicos, K_q é a constante de velocidade de supressão biomolecular e t_0 é o tempo de meia-vida médio da HSA na ausência de supressor. Para obter a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi plotado um gráfico de F_0/F versus $[\text{complexo}]$, sendo K_{sv} o coeficiente angular da equação da reta obtida no gráfico (Figura 4.33).

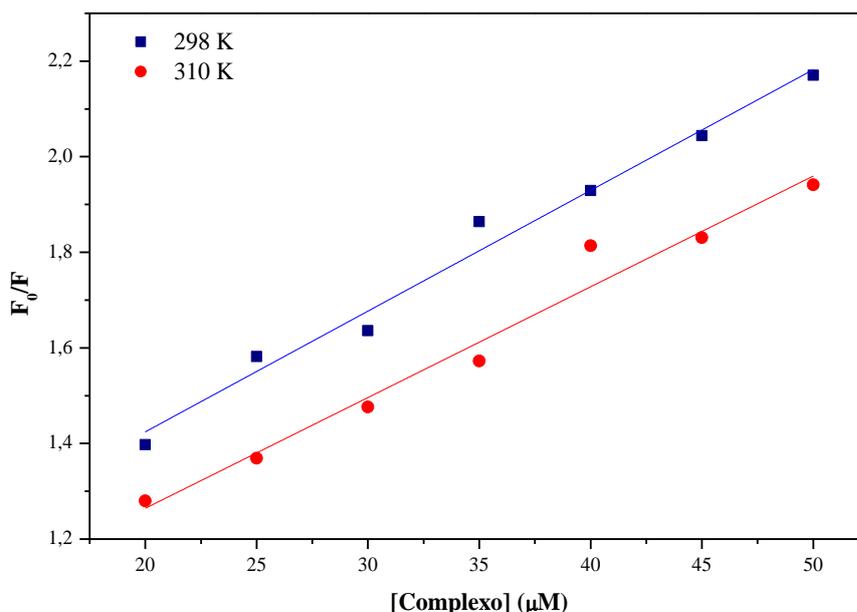


FIGURA 4.33 – Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexo] para HSA na presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, excitação = 280 nm, $[\text{HSA}] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Tabela 4.11 são apresentados os valores da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de velocidade de supressão biomolecular (K_q) sendo K_q calculada considerando como tempo de meia vida do estado excitado da HSA ($6,2 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)⁶⁵. Vemos que os valores obtidos para o coeficiente de determinação (R^2) são analiticamente aceitáveis devido sua proximidade a 100% de correlação.

Analisando os valores obtidos para K_{sv} e K_q vemos que os mesmos são iguais (dentro da faixa de desvio padrão) ou diminuem a com o aumento da temperatura, este acontecimento é atribuído a ocorrência de mecanismo do tipo estática. Outro parâmetro que confirma a ocorrência do mecanismo estático é a magnitude de K_q , onde quando a colisão entre complexo e HSA é dinâmica a magnitude da constante é menos que 10^{10} , porém os dados encontrados possuem magnitude de 10^{12} , indicando a formação de espécie intermediária o que é característico de mecanismo estático.

TABELA 4.11 – Dados obtidos pela equação de Stern-Volmer para a interação dos complexos com HSA (DP = desvio padrão)

Complexo	Temperatura (K)	K _{sv} + DP (10 ⁴)	K _q (10 ¹²)	R ²
[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	1,69±0,15	2,73	0,9854
	310	1,61±0,21	2,60	0,9908
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	2,17±0,08	3,50	0,9971
	310	2,01±0,03	3,24	0,9844
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	2,39±0,07	3,85	0,9896
	310	2,41±0,03	3,89	0,9985
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	2,25±0,01	3,63	0,9710
	310	2,15±0,06	3,47	0,9843
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	5,31±0,08	8,56	0,9857
	310	5,10±0,08	8,23	0,9744
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	1,82±0,17	2,94	0,9705
	310	1,68±0,16	2,71	0,9545

Uma vez que o mecanismo que ocorre majoritariamente é o estático devido a formação de um aduto (espécie intermediária), podemos representar o equilíbrio desta reação utilizando os valores de intensidade de fluorescência encontrados nos experimentos realizados. Através da Equação 4.3 a seguir representada podemos calcular outros parâmetros de ligação:

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

Onde K_b é a constante de ligação entre a HSA e o supressor e n é o número de sítios de ligação por molécula de HSA. Estes parâmetros de ligação podem ser encontrados através da confecção de um gráfico de log(F₀ - F)/F versus log[complexo], onde o valor de K_b e n são encontrados através dos dados obtidos na regressão dos pontos do gráfico plotado, conforme pode-se conferir na Figura 4.34.

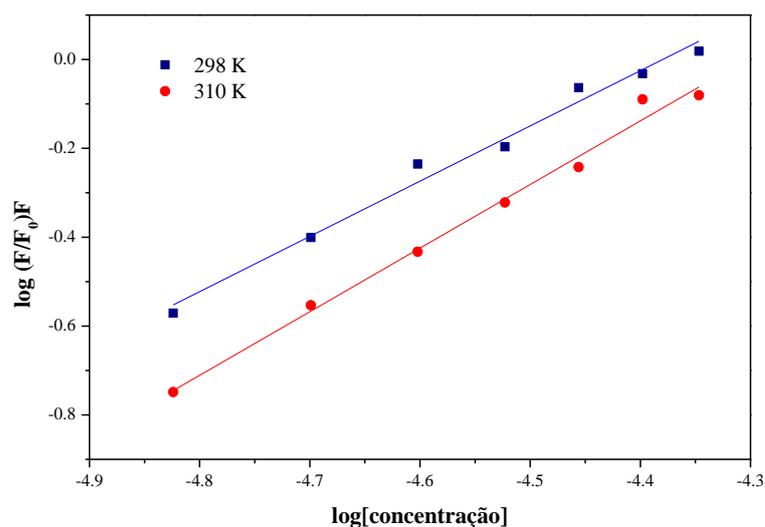


FIGURA 4.34 – Gráficos de Stern-Volmer de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, excitação = 280 nm, $[\text{HSA}] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

TABELA 4.12 – Parâmetros de ligação obtidos pela equação de Stern-Volmer para HSA com os complexos (DP = desvio padrão)

Complexo	Temperatura (K)	$K_b \pm \text{DP}$	$N \pm \text{DP}$	R^2
$[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298	$8,42 \cdot 10^2 \pm 4,49$	$1,07 \pm 0,02$	0,9889
	310	$1,16 \cdot 10^4 \pm 0,7$	$0,97 \pm 0,01$	0,9912
$[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298	$2,12 \cdot 10^4 \pm 1,28$	$0,97 \pm 0,02$	0,9942
	310	$7,04 \cdot 10^4 \pm 5,09$	$0,97 \pm 0,02$	0,9877
$[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298	$3,13 \cdot 10^4 \pm 1,52$	$0,95 \pm 0,01$	0,9740
	310	$2,26 \cdot 10^5 \pm 1,34$	$0,89 \pm 0,01$	0,9958
$[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298	$1,23 \cdot 10^5 \pm 1,51$	$0,88 \pm 0,02$	0,9850
	310	$1,07 \cdot 10^6 \pm 0,94$	$0,84 \pm 0,02$	0,9939
$[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298	$2,40 \cdot 10^5 \pm 0,41$	$0,74 \pm 0,03$	0,9925
	310	$4,02 \cdot 10^6 \pm 0,50$	$0,70 \pm 0,03$	0,9855
$[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	298	$7,27 \cdot 10^3 \pm 0,12$	$0,98 \pm 0,01$	0,9605
	310	$1,57 \cdot 10^4 \pm 0,22$	$0,94 \pm 0,01$	0,9678

Pode-se observar nos valores de K_b obtidos para os complexos, listados na Tabela 4.12, são da ordem de $10^2 - 10^6$ o que indica que o complexo interage com a albumina, sendo o maior valor (10^6) considerado uma interação forte, valores por volta de 10^4 considerados interação de força moderada e valores da ordem 10^2 considerados como interações fracas, esses tipos de interação são desejadas (fracas a moderadas – 10^2-10^4) devido a possibilidade de a biomolécula carrear o complexo para o interior da célula e uma vez no interior da célula liberar o mesmo. Complexos com constantes de interação na ordem de 10^6 interagem fortemente com a albumina de forma que não ocorre a liberação do complexo no interior da célula o que pode acarretar na diminuição da biodisponibilidade do complexo ⁴⁶.

Os valores encontrados para K_b nos complexos que a contém carboxila não coordenada aumentam consideravelmente, passando de 10^2 no complexo $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ para 10^5 no complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (298 K). Pode-se então afirmar que, assim como no experimento de interação com DNA, os complexos contendo carboxila livre estão desprotonados no meio em que é avaliada a interação conforme visto no Esquema 4.3, e de modo contrário ao DNA a presença do íon carboxilato aumenta a constante de interação (K_b) dos complexos com a HSA. O complexos $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ apresentaram as menores constantes de interação provavelmente devido à ausência da carga negativa do íon carboxilato.

Com o intuito de avaliar o tipo de interação que ocorre entre complexo e HSA calculou-se os parâmetros termodinâmicos (energia livre de Gibbs - ΔG° , variação de entropia - ΔS° e entalpia - ΔH°) para os experimentos realizados. Estes parâmetros são baseados na Equação 4.4 e fornecem informação do tipo de interação como interação eletrostática, hidrofóbica, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, dentre outras.

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

Onde K_b é a constante de interação com a HSA, T é a temperatura em que foi realizado o experimento (298 e 310 K) e R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$). Através do rearranjo desta equação pode se plotar um gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$, conforme descrito na Equação 4.5 ⁴⁶. Na Tabela 4.13 estão representados os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos.

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

TABELA 4.13 – Parâmetros termodinâmicos calculados para os complexos estudados neste trabalho

Complexo	Temperatura (K)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹)
[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	167,8	-16,70	619,3
	310		-24,10	
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	76,81	-24,70	340,6
	310		-28,80	
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	126,5	-25,60	510,6
	310		-31,80	
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	138,4	-29,03	562,0
	310		-35,78	
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	180,4	-30,69	708,3
	310		-39,19	
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	298	49,28	-22,03	239,3
	310		-24,90	

Para se analisar os dados da Tabela 4.13 é necessário saber a relação entre os tipos de interação e o sinal dos parâmetros termodinâmicos que são indicativos dos tipos de interação que podem estar atuando conforme pode-se ver a seguir:

- Valores positivos para ΔH° e ΔS° , indicam o envolvimento de forças hidrofóbicas entre o complexo e albumina;
- Valores negativos para ΔH° e ΔS° - indicam forças de van der Waals e interações por ligações de hidrogênio;
- Valor negativo de ΔH° e positivo para ΔS° - indica interação eletrostática entre o complexo e a albumina.

Assim, pode-se concluir que as forças de interação dos complexos com a HSA são forças hidrofóbicas devido aos valores positivos de ΔH° e ΔS° . Variações de entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°) positivas ocorrem devido à presença de moléculas de água posicionadas de forma ordenada em torno dos aminoácidos externos a proteína, onde com a ocorrência da interação passa a adquirir uma configuração desordenada, como resultado de interações hidrofóbicas com o complexo⁶⁶. Os valores negativos encontrados para a variação da energia livre de Gibbs mostram que, além de ocorrer a interação entre o complexo e a proteína, esta interação é espontânea.

4.4.3 – Coeficiente de Partição (Log P)

O coeficiente de partição ou lipofilicidade (logP) é um parâmetro que mostra a tendência de distribuição de um composto no organismo humano quanto a difusão por estruturas apolares como membranas celulares ou soluções biológicas como o plasma sanguíneo, fluidos intracelulares e linfa. Estudos de farmacocinética mostram que a hidrofobicidade de um composto aumenta quando o valor de logP diminui, e de modo semelhante quanto maior o valor de logP maior será a lipofilicidade de um composto.

Deste modo, quanto maior a lipofilicidade de um composto maior será sua afinidade pela fase orgânica, e quando maior a hidrofobicidade maior a afinidade pela fase aquosa. A lipofilicidade dos complexos sintetizados neste trabalho foi estudada pelo método QSAR onde determinou-se o coeficiente de

partição em um sistema água/n-octanol, sendo este o sistema que mais se assemelha com a membrana celular.

Quanto maior o valor de logP, maior é a afinidade do composto pela estrutura lipídica da membrana plasmática o que pode levar a maior taxa de absorção por células. Valores de logP menores que -3 e maiores que 3 levam a uma absorção muito baixa, valores entre 0 e 0,5 levam a uma absorção em torno de 20% enquanto valores entre 1 e 1,5 estão relacionados a moléculas com aproximadamente 100% de absorção pelas células ⁶⁷.

TABELA 4.14 – Dados de absortividade molar (ϵ) e lipofilicidade (Log P) dos complexos de Ru(II) com ligantes dicarboxipiridínicos

Complexos	ϵ	Log P
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	406 (3333)	0,44
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	402 (3270)	0,09
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	410 (4409)	0,42
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	392 (4539)	-0,20
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	388 (6644)	1,34
[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	408 (3190)	1,36

Com base nos dados experimentais obtidos (Tabela 4.14) concluímos que os complexos contendo o grupo carboxílico livre possuem baixa lipofilicidade o que pode ocasionar baixa absorção celular, enquanto os complexos [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆ possuem elevados valores de lipofilicidade. Deste modo vemos que a ausência do grupo carboxilato ou a esterificação do mesmo eleva consideravelmente a lipofilicidade do complexo e levando a patamares em que se tem a possibilidade de 100% de permeabilidade por membranas lipídicas⁶⁸.

4.4.4 – Ensaios de Citotoxicidade

Os complexos sintetizados neste trabalho foram estudados quanto às suas citotoxicidades frente a três linhagens de células tumorais e uma linhagem sadia, sendo duas linhagens tumorais provenientes de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF7) e a outra de câncer de pulmão (A549), a linhagem sadia empregada foi a normal de fibroblasto de hamster chinês (V79). A fim de comparação em todas as células foi testado também o fármaco inorgânico cisplatina, todos os dados obtidos para os complexos e ligantes constam na Tabela 4.15.

TABELA 4.15 – Valores de IC_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os complexos e ligantes avaliados nas linhagens tumorais e sadias

Complexos	IC_{50} (μM)			
	A549	MCF7	MDA-MB-231	V79
[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆	22,2 ± 1,7	3,6 ± 0,2	4,2 ± 1,5	33,1 ± 4,9
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	>100	>100	>100	>100
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	>100	>100	>100	>100
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	>100	>100	>100	>100
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	>100	>100	47,4 ± 10,8	>100
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	13,4 ± 2,4	5,1 ± 0,5	2,4 ± 0,4	17,1 ± 0,4
Ácido picolínico	>100	>100	>100	>100
Ácido 2,3-dicarboxipiridínico	>100	>100	>100	>100
Ácido 2,4-dicarboxipiridínico	>100	>100	>100	>100
Ácido 2,5-dicarboxipiridínico	>100	>100	>100	>100
Ácido 2,6-dicarboxipiridínico	>100	>100	>100	>100
Cisplatina	14,4 ± 1,4	13,9 ± 2,0	2,4 ± 0,2	21,6 ± 1,2

O valor de IC_{50} representa a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células sendo encontrado através da densidade ótica após a adição de MTT tanto nas células tratadas com os complexos de rutênio quanto

no controle positivo (cisplatina) e negativo (células sem tratamento). A leitura das placas foi realizada 48 horas após a adição dos complexos e controles, o que forneceu gráficos de viabilidade celular com 95% de confiança.

Os testes foram realizados em triplicatas independentes em concentrações que variaram de 100 a 0,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todos os ensaios realizados. Conforme apresentado na Tabela 4.15, os ácidos dicarboxipiridínicos e picolínico não foram ativos frente as linhagens celulares utilizadas, de modo similar os complexos $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ também não foram citotóxicos nas concentrações testadas frente as linhagens celulares utilizadas.

Já os compostos $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ mostraram-se mais ativos que os ligantes e demais complexos exibindo valores de IC_{50} promissores sendo alguns até menores que o encontrado para a cisplatina. Observa-se claramente a influência da esterificação da carboxila livre quando comparamos os dados dos complexos $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ onde vemos que a esterificação conferiu uma elevada citotoxicidade ao complexo frente as células tumorais e sadias, sendo mais ativos frente as tumorais que as sadias exibindo maior índice de seletividade para a linhagem MCF7 que a cisplatina (Tabela 4.16).

TABELA 4.16 – Índice de seletividade calculado através da divisão dos valores de IC_{50} das células sadias pelas células tumorais

Complexos	Índice de seletividade		
	A549	MCF7	MDA-MB-231
$[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,5	9,2	7,9
$[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	1,3	3,4	7,1
Cisplatina	1,5	1,9	9,0

Comparando os dados de interação com a HSA e os valores de IC_{50} pode-se observar que em geral os complexos que contêm carboxila livre interagiram fortemente com a proteína não exibiram atividade citotóxica frente as linhagens celulares utilizadas. Estes fatos podem estar correlacionados devido ao alto valor de K_b encontrado para estes complexos indicando menor reversibilidade da interação com albumina diminuindo a disponibilidade do complexo no meio em que é realizado os ensaios de citotoxicidade, uma vez que este meio possui consideráveis quantidades da proteína.

Já nos complexos que exibiram atividade frente as linhagens testadas observamos um efeito contrário, onde os baixos valores de interação com HSA indicam a presença de interações reversíveis. Nestes casos a proteína pode atuar como transportadora do meio extracelular para o meio intracelular aumentando a disponibilidade do complexo e conseqüentemente permitindo que o mesmo atue no interior da célula desencadeando os mecanismos de morte celular levando aos baixos valores de IC_{50} encontrados.

Quando comparamos os dados de IC_{50} com os valores de coeficiente de partição também podemos tirar valiosas informações para a compreensão da citotoxicidade dos complexos. Vemos que os complexos que possuem carboxila livre possuem menor lipofilicidade que os demais complexos e também não foram citotóxicos frente as linhagens testadas, enquanto os complexos $[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF_6$ e $[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF_6$ exibiram maior lipofilicidade e foram os mais citotóxicos.

Deste modo temos que os complexos contendo carboxila livre provavelmente possuem menor habilidade de difusão através da membrana lipídica das células, em comparação com demais complexos que possuem maior lipofilicidade e conseqüentemente podem permear a membrana celular com maior facilidade, exibindo assim maior citotoxicidade conforme observado nos valores de IC_{50} .

4.4.5 – Ensaio Anti-*Mycobacterium tuberculosis*

Todos os complexos e ligantes foram avaliados frente a *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv ATCC 27294) utilizando a técnica de *Rezasurin Microtiter Assay* (REMA) isto visando a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O índice de seletividade foi determinado através da divisão dos valores de IC₅₀ para a célula normal de fibroblasto de hamster chinês (V79) pelos valores de CIM encontrados. Os valores obtidos nestes experimentos encontram-se na Tabela 4.17.

TABELA 4.17 – Dados de índice de seletividade e concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para os complexos frente *Mycobacterium tuberculosis*

Complexo	CIM (µg L ⁻¹)	CIM (µM)	IC ₅₀ (µM)	SI
[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF ₆ ³⁵	0,91	0,95	33,1 ± 4,9	36,4
[Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF ₆	> 25	> 25	>100	-
[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	> 25	> 25	>100	-
[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF ₆	> 25	> 25	>100	-
[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	> 25	> 25	>100	-
[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆	7,02 ± 1,62	6,87 ± 1,12	17,1±0,37	2,5
Ácido picolínico	> 25	> 25	>100	-
Ácido 2,3-dicarboxipiridínico	> 25	> 25	>100	-
Ácido 2,4-dicarboxipiridínico	> 25	> 25	>100	-
Ácido 2,5-dicarboxipiridínico	> 25	> 25	>100	-
Ácido 2,6-dicarboxipiridínico	> 25	> 25	>100	-
Isoniazida ³⁶	0,03	0,4	-	-
Etambutol ³⁶	20,7	5,6	-	-

Analisando os dados da Tabela 4.17 podemos ver que os complexos atuaram frente as bactérias de modo similar ao observado nos testes de citotoxicidade, onde apenas os complexos $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ foram ativos. Os ligantes e os complexos contendo carboxila livre não exibiram atividade frente os complexos contendo carboxila livre.

Sabe-se que a bactéria causadora da tuberculose depende da albumina para a obtenção de ácidos graxos essenciais para o crescimento da mesma⁶⁹, de modo que o teste REMA é realizado em um meio contendo 4% de albumina de soro bovino. Assim vemos que os complexos que exibem forte interação com a albumina (complexos contendo carboxila livre) não exibiram atividade frente a bactéria, enquanto os complexos $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ que possuem constantes de interação fracas com a HSA, foram os que exibiram atividade contra a bactéria devido a maior disponibilidade dos mesmos devido a maior reversibilidade da interação com a proteína.

Os dados de coeficiente de partição também se correlacionam com os dados de MIC conforme pode ser visto em alguns relatos na literatura⁷⁰, de modo que em grande parte delas o aumento da lipofilicidade de alguns complexos ocasiona no aumento da eficácia contra a tuberculose. De modo similar os compostos com maior lipofilicidade foram os que exibiram atividade contra a bactéria enquanto os compostos com baixa lipofilicidade não foram ativos nas concentrações testadas.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentadas a síntese, caracterização, e atividade biológica de cinco novos complexos de rutênio contendo os ligantes dicarboxipiridínicos, discutindo os aspectos químicos e estruturais, visando estabelecer a influência da carboxila livre (não coordenada) na interação com biomoléculas (DNA e HSA), na atividade citotóxica frente linhagens celulares e frente a *Mycobacterim tuberculosis*.

As composições dos complexos foram confirmadas através das caracterizações realizadas como ressonância magnética nuclear (1D - ^{31}P (^1H), ^1H , ^{13}C (^1H) e 2D DEPT-135, COSY e HSQC), voltametria cíclica e de pulso diferencial, análise elementar, condutância molar, espectroscopia de absorção na região do UV-Visível, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e difração de raios X de monocristal. Todas as técnicas estruturais propostas confirmaram a estrutura proposta para os complexos, mostrando que os ligantes dicarboxipiridínico se coordena ao precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ na forma quelata pelos átomos de nitrogênio e oxigênio. O complexo contendo o ligante 2,4e foi sintetizado a partir do complexo contendo o ligante 2,4, isto através da reação de esterificação de Fischer.

Nos ensaios de interação com o DNA foi observado que a presença do grupo carboxílico livre (não coordenado) interfere diretamente na interação, levando a ausência da mesma, enquanto os complexos contendo os ligantes pic e 2,4e interagiram via eletrostática. A ausência da interação nos complexos contendo carboxila livre foi atribuída à repulsão entre o grupo carboxílico (que se encontra desprotonado no meio em que o teste é realizado) e o grupo fosfato do DNA, isto por serem ambos carregados negativamente.

No estudo de interação com a HSA, conclui-se que a presença da carboxila livre leva ao aumento da força de interação entre complexo e proteína, isto devido os maiores valores de constante de interação ($K_b = 10^5\text{-}10^6$) dos complexos contendo carboxila livre em comparação com os complexos contendo

os ligantes pic e 2,4e ($K_b = 10^3$). Interações muito fortes, como as observadas para os complexos contendo carboxila livre, não são desejáveis, uma vez que o interesse da interação com a HSA é o transporte do complexo para o interior da célula, e altas constantes de Interação indicam menor reversibilidade da interação, diminuindo a biodisponibilidade do complexo.

Os complexos tiveram suas atividades testadas, *in vitro*, contra as células tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF7), pulmão (A549) e células sadias de fibroblasto de hamster chinês (V79). Os complexos contendo carboxila livre não foram citotóxicos a nenhuma das linhagens testadas, enquanto os complexos contendo os ligantes pic e 24e foram ativos, exibindo o complexo contendo o ligante 2,4e IC_{50} da ordem de 5,1 μM e seletividade de 5,4 na linhagem MCF7, resultados melhores que do cisplatina.

Nos testes anti-*Mycobacterium tuberculosis*, de modo similar aos ensaios de citotoxicidade, apenas os complexos contendo os ligantes pic e 2,4e foram ativos (0,91 e 7,20 $\mu g mL^{-1}$ aproximadamente), não sendo observada atividade para os complexos contendo carboxila livre.

Para o estudo da lipofilicidade dos complexos foi determinado o coeficiente de partição dos complexos, onde os complexos contendo carboxila livre foram menos lipossolúveis que os demais. É sabido que para que um composto atravesse a membrana de uma célula por difusão o mesmo precisa ter um caráter lipofílico devido as características da membrana celular. Assim vimos que a presença da carboxila livre diminui a lipofilicidade dos complexos, diminuindo a biodisponibilidade dos complexos para a célula.

Assim, observa-se que todos os resultados dos testes de interação com biomoléculas e coeficiente de partição, indicaram que a presença do grupo carboxílico livre leva a ausência da atividade biológica dos complexos, desencadeando na ausência de citotoxicidade frente as células tumorais e *Mycobacterium tuberculosis*. Outro fato interessante observado foi a restituição da atividade biológica do complexo após a reação de esterificação.

Como etapa futura, pretende-se esterificar os demais complexos contendo carboxila livre, e sintetizar outros complexos contendo diferentes grupos orgânicos (-F, -Cl, -Br, -NO₂, C≡N e outros) substituídos no anel piridínico do ácido picolínico, isto visando determinar a influência destes substituintes nas atividades biológicas dos complexos. Parte deste trabalho foi publicado na forma de artigo na revista “*Inorganic Chemistry Frontiers*”⁷¹ e encontra-se disponibilizado em anexo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M. E. & BERMUDEZ, J. "A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral". *Cad. Saúde Pública*, **22** (11): 2379, 2006.
2. VIEIRA, V. M. M. "Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D". *Rev. Econ. e Gest.*, **6** (13) 2006.
3. CALIXTO, J. B. & SIQUEIRA JR., J. M. "Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios". *Gazeta Médica da Bahia*, **78** (1): 98, 2008.
4. ORLOFF, J.; DOUGLAS, F.; PINHEIRO, J.; LEVINSON, S.; BRANSON, M.; CHATURVEDI, P.; ETTE, E.; GALLO, P.; HIRSCH, G.; MEHTA, C.; PATEL, N.; SABIR, S.; SPRINGS, S.; STANSKI, D.; EVERS, M. R.; FLEMING, E.; SINGH, N.; T., T. & H., G. "The future of drug development: advancing clinical trial design". *Nat. Rev. Drug. Disc.*, **8**: 949, 2009.
5. MULLARD, A. "2014 FDA drug approvals". *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **14** (2): 77, 2015.
6. GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. & G., O. "Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases". *Estudos Avançados*, **24** (70): 81, 2010.
7. KOZARICH, J. W., "Medicinal Inorganic Chemistry: Promises and Challenges". IN: *Medicinal Inorganic Chemistry*, SESSLER, J.L.; DOCTROW, S.R.; MCMURRY, T.J. & LIPPARD, S.J. (Eds.). Washington, American Chemical Society, 2005. p. 4.
8. FARRER, N. J. & SADLER, P. J., "Medicinal Inorganic Chemistry: State of the Art, New Trends, and a Vision of the Future". IN: *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, ALESSIO, E. (Eds.). Weinheim, WILEY-VCH, 2011. p. 1.
9. LLOYD, N. C.; MORGAN, H. W.; NICHOLSON, B. K. & RONIMUS, R. S. "The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century-old debate". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44** (6): 941, 2005.

10. INCA - Instituto Nacional do Câncer - Estimativa 2016, Incidência de câncer no Brasil - INCA, 2015. p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>, acessado em 18/12/15.
11. KELVIN., J. F. & TYSON., L. B., 100 Questions and Answers About Cancer Symptoms and Cancer Treatment Side Effects. 2a ed., Sudbury, Jones and Bartlett Publishers, 2011. p. 2.
12. ROSENBERG, B., "Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On". IN: Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, LIPPERT, B. (Eds.). Zürich, 1999. p. 3.
13. M. BENEDETTI; C. DUCANI; D. MIGONI; D. ANTONUCCI; V.M. VECCHIO; A.ROMANO; T. VERRI & FANIZZI, F. P., "Possible Incorporation of Free N7-Platinated Guanines in DNA by DNA Polymerases, Relevance for the Cisplatin Mechanism of Action". IN: Cancer Drug Discovery and Development: Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemother, BONETTI, A.; MUGGIA, F.M.; LEONE, R. & HOWELL, S.B. (Eds.). New York, Humana Press, 2009. p. 125.
14. TODD, R. C. & LIPPARD, S. J., "PoX-ray Crystal Structure of a Monofunctional Platinum–DNA Adduct, cis-{Pt(NH3)2-(Pyridine)}2+ Bound to Deoxyguanosine in a Dodecamer Duplex". IN: Cancer Drug Discovery and Development: Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemother, BONETTI, A.; MUGGIA, F.M.; LEONE, R. & HOWELL, S.B. (Eds.). New York, Humana Press, 2009. p. 67.
15. ALESSIO, E.; ATTIA, W. M.; BERGER, M. R.; BRABEC, V.; BUTOUR, J.-L.; CASAZZA, A. M.; CALLIGARIS, M.; CAUCI, S.; CLARKE, M. J.; DEFAIS, M.; DOLZANI, L.; FLECHTNER, H.; FARRELL, N.; HEIM, M. E.; HENN, M.; JOHNSON, N. P.; JUHL, U. M.; KEPPLER, B. K.; KOPF-MAIER, P.; LONG, B. H.; MARZILLI, L. G.; MAUSNER, L. F.; MEINEMA, H. A.; MESTRONI, G.; MONTI-BRAGADIN, C.; NIEBL, R.; PACOR, S.; PIERSON,

- V.; QUADRIFOGLIO, F.; SAVA, G.; SCHURIG, J. E.; SCOTT, E. V.; SRIVASTAVA, S. C.; TAMARO, M.; TIMMER, K.; VILLANI, G.; WAGNER, F. E.; WIMMER, F. L.; ZON, G. & ZORZET, S., "Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy". IN: Progress in clinical biochemistry and medicine, (Eds.). Berlim, Springer-Verlag, 1989. p. 227.
16. ANTONARAKIS, E. S. & EMADI, A. "Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **66** (1): 1, 2010.
17. LEIJEN, S.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN WERKHOVEN, E.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J. H. & SCHELLENS, J. H. "Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy". *Invest. New Drugs*, **33** (1): 201, 2014.
18. BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. & SAVA, G. "Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates". *J. Inorg. Biochem.*, **106** (1): 90, 2012.
19. AITKEN, J. B.; ANTONY, S.; WEEKLEY, C. M.; LAI, B.; SPICCIA, L. & HARRIS, H. H. "Distinct cellular fates for KP1019 and NAMI-A determined by X-ray fluorescence imaging of single cells". *Metallomics : integrated biometal science*, **4** (10): 1051, 2012.
20. MJOS, K. D. & ORVIG, C. "Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry". *Chem. Rev.*, **114** (8): 4540, 2014.
21. HARTINGER, C. G.; JAKUPECA, M. A.; ZORBAS-SEIFRIEDA, S.; GROESSLA, M.; EGGERA, A.; BERGERD, W.; ZORBASC, H.; DYSONB, P. J. & KEPLER, B. K. "KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients". *Chem. Biod.*, **5**: 2140, 2008.

22. TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; JAKUPEC, M. A.; BERGER, W. & KEPPLER, B. K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application". *Chem. Sci.*, **5** (8): 2925, 2014.
23. KUHN, P. S.; PICHLER, V.; ROLLER, A.; HEJL, M.; JAKUPEC, M. A.; KANDIOLLER, W. & KEPPLER, B. K. "Improved reaction conditions for the synthesis of new NKP-1339 derivatives and preliminary investigations on their anticancer potential". *Dalton Trans.*, **44** (2): 659, 2014.
24. CORREA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; DE LOLO, F. G.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; PLUTIN, A. M.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E. & BATISTA, A. A. "Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'-(disubstituted)thiourea ligands: Synthesis, characterization, BSA- and DNA-binding studies of new cytotoxic agents against lung and prostate tumour cells". *J. Inorg. Biochem.*, **150**: 63, 2015.
25. LIMA, B. A. V., Avaliação das Atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfínicos de Rutênio (Células Tumorais MDA-MB 231). Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 207 p.
26. BARBOSA, M. I. F., Complexos Carbonílicos de Rutênio. De um Gás Tóxico a Uma Droga com Potencial Agente Citotóxico. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado, 127 p.
27. CORREA, R. S., Complexos de Rutênio com Ligantes de Interesse Biológico Aspectos Químicos, Estruturais e Avaliação de Suas Atividades Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 127 p.
28. GRAMINHA, A. E., Produtos Naturais e Derivados, Complexação com o Rutênio Visando Aumento da Atividade Citotóxica. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2015. Tese de Doutorado, 180 p.
29. GRAMINHA, A. E., Complexos de Ru e Pd com Bases de Schiff de Ditiocarbazatos com Interesse Bioinorgânico e Quimioterápico. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 144 p.

30. SOUZA, M. V. N. D. & VASCONCELOS, T. R. A. "Fármacos no combate à tuberculose: Passado, presente e futuro". *Quim. Nova*, **28** (4): 678, 2005.
31. WHO - World Health Organization - Global report tuberculosis 2015 - Geneva: WHO, 2015. 204 p. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>, acessado em 21/12/15.
32. SOUZA, M. V. N. & VASCONCELOS, T. R. A. "Fármacos no combate à tuberculose: Passado, presente e futuro". *Quim. Nova*, **28** (4): 678, 2005.
33. BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C. & BOECHAT, N. "The Medicinal Chemistry of Novel Molecules in Clinical Trials for Tuberculosis Treatment". *Rev. Virt. Quím.*, **4** (3) 2012.
34. B. BOTTARI; R. MACCARI; F. MONFORTE; R. OTTANA; M. G. VIGORITA; G. BRUNO; F. NICOLO; ROTONDOB, A. & ROTONDOB, E. "Nickel(II) 2,6-Diacetylpyridine Bis(isonicotinoylhydrazonate) and Bis(benzoylhydrazonate) Complexes: Structure and Antimycobacterial Evaluation. Part XI". *Bioorgan. Med. Chem.*, **9**: 2203, 2001.
35. PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; BARBOSA, M. I.; LEITE, S. R.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S. G.; MORENO, V.; GAMBINO, D. & LEITE, C. Q. "Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis". *Eur. J. Med. Chem.*, **46** (10): 5099, 2011.
36. BARBOSA, M. I. F.; CORRÊA, R. S.; POZZI, L. V.; LOPES, É. D. O.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; ELLENA, J.; MACHADO, S. D. P.; POELHSITZ, G. V. & BATISTA, A. A. "Ruthenium(II) complexes with hydroxypyridinecarboxylates: Screening potential metallodrugs against *Mycobacterium tuberculosis*". *Polyhedron*, **85**: 376, 2015.
37. LIMA, B. A. V.; ELLENA, J.; CORRÊA, R. S.; PAVAN, F. R.; GRAMINHA, A. E.; LEITE, C. Q. F.; KUZNETSOV, A. & 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.*, **in press** 2015.
38. DO NASCIMENTO, F. B.; VON POELHSITZ, G.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q.; 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.*, **102** (9): 1783, 2008.
39. SLETTEN, E. & FRØYSTEIN, N. A., "Sequence - Selective Binding of Transition Metal Complexes to DNA". IN: *Metal Complex-DNA Interactions*, SLETTEN, E. & HADJILIADIS, N. (Eds.). Chichester, John Wiley & Sons, 2009. p. 3.
40. SIRAJUDDIN, M.; ALI, S. & BADSHAH, A. "Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry". *J. Photochem. Photobiol. B*, **124**: 1, 2013.
41. SUBBARAJ, P.; RAMU, A.; RAMAN, N. & DHARMARAJA, J. "Synthesis, characterization, DNA interaction and pharmacological studies of substituted benzophenone derived Schiff base metal(II) complexes". *J. Saudi Chem. Soc.*, **19** (2): 207, 2015.
42. PAGES, B. J.; ANG, D. L.; WRIGHT, E. P. & ALDRICH-WRIGHT, J. R. "Metal complex interactions with DNA". *Dalton Trans.*, **44** (8): 3505, 2015.
43. DOMOTOR, O.; HARTINGER, C. G.; BYTZEK, 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.*, **18** (1): 9, 2013.
44. PENG, W.; DING, F.; JIANG, Y. T.; SUN, Y. & PENG, Y. K. "Evaluation of the biointeraction of colorant flavazin with human serum albumin: insights

from multiple spectroscopic studies, in silico docking and molecular dynamics simulation". *Food Funct.*, **5** (6): 1203, 2014.

45. GUO, Q.; YUAN, J. & ZENG, J. "Binding of dihydromyricetin and its metal ion complexes with bovine serum albumin". *Biotechnol. Biotech. Eq.*, **28** (2): 333, 2014.

46. GANESHPANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M. A. & PALANIANDAVAR, M. "New ruthenium(II) arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity". *Dalton Trans.*, **43** (3): 1203, 2014.

47. NOVOHRADSKY, V.; BERGAMO, A.; COCCHIETTO, M.; ZAJAC, J.; BRABEC, V.; MESTRONI, G. & SAVA, G. "Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity". *Dalton Trans.*, **44** (4): 1905, 2015.

48. GRGURIC-SIPKA, S.; IVANOVIC, I.; RAKIC, G.; TODOROVIC, N.; GLIGORIJEVIC, N.; RADULOVIC, S.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K. & TESIC, Z. "Ruthenium(II)-arene complexes with functionalized pyridines: synthesis, characterization and cytotoxic activity". *Eur. J. Med. Chem.*, **45** (3): 1051, 2010.

49. TRIVEDI, M.; NAGARAJAN, R.; KUMAR, A.; SINGH, N. K. & RATH, N. P. "Synthesis, structure, catalytic and calculated non-linear optical properties of cis- and trans-, mer-chlorobis(triphenyl phosphine/triphenyl arsine)-dipicolinato ruthenium(III) complexes". *J. Mol. Struct.*, **994** (1-3): 29, 2011.

50. MAŁECKI, J. G. "Synthesis, characterization, and molecular structure of Ru(II) complex containing 2,5-pyridinedicarboxylic acid". *Struct. Chem.*, **23** (1): 71, 2011.

51. STONE, T. W. & DARLINGTON, L. G. "Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development". *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **1** (8): 609, 2002.

52. VELHO, R. G., Medidas de Condutividade na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 60 p.
53. BAKA, E.; COMER, J. E. & TAKACS-NOVAK, K. "Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46** (2): 335, 2008.
54. P. S. HALLMAN; T. A. STEPHENSON & WILKINSON, G., "Tetrakis(triphenylphosphine)dichloro-ruthenium(II) and Tris(triphenylphosphine)-dichlororuthenium (II)". IN: *Inorganic Syntheses*, PARRY, R.W. (Eds.). Nova York, McGraw-Hill, 1970. p. 237.
55. BRESSAN, M. & RIGO, P. "Five-Coordinate Complexes of Ruthenium(II) with Di(tertiary phosphines)". *Inorg. Chem.*, **14** (9): 2286, 1975.
56. QUEIROZ, S. L., BATISTA, A.A., OLIVA, G., GAMBARDELLA, M.T.P., SANTOS, R.H.A., MACFARLANE, K. S., RETTIG, S.J., & JAMES, B.R. "The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-piridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenodiamine". *Inorg. Chim. Acta.*, **267** 1998.
57. SENGUPTA, P.; DINDA, R.; GHOSH, S. & SHELDRIK, W. S. "Synthesis and characterisation of some ruthenium(II) complexes of α -N-heterocyclic carboxylic acids — X-ray structures of cis-[Ru(PPh₃)₂(L1)₂].2CH₃OH and cis-[Ru(PPh₃)₂(L3H)₂] (L1H=pyridine 2-carboxylic acid and L3H₂=imidazole 4,5-dicarboxylic acid)". *Polyhedron*, **20** (28): 3349, 2001.
58. NAKAMOTO, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*. 6a ed., New Jerzey, John Wiley & Sons, 2009. p. 416.

59. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. & VYVYAN, J. R., INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA. 4a ed., Washington, Cengage Learning, 2010. p. 716.
60. SANTIAGO, M. O.; BATISTA, A. A.; ARAÚJO, M. P. D.; DONNICI, C. L.; MOREIRA, I. D. S.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J.; JR, S. D. S. & QUEIROZ, S. L. "³¹P{¹H}-n.m.r. as a tool for identification of ruthenium isomers containing PPh₃ or 1,4-bis(diphenylphosphino)butane ligands. X-ray structures of the cis-{RuCl₂(PPh₃)₂ [4,4'-(-X)₂-2,2'-bipy]} complexes [X=-H, -Me, -SMe and (-Cl, -Me)]". *Transit. Metal Chem.*, **30** (2): 170, 2005.
61. WOOD, P. A.; OLSSON, T. S. G.; COLE, J. C.; COTTRELL, S. J.; FEEDER, N.; GALEK, P. T. A.; GROOM, C. R. & PIDCOCK, E. "Evaluation of molecular crystal structures using Full Interaction Maps". *CrystEngComm*, **15** (1): 65, 2013.
62. SATHIYA, K. T.; CHITRAPRIYA, N.; KIM, S. K.; FRONCZEK, F. R. & NATARAJAN, K. "Influence of carboxylic acid functionalities in ruthenium (II) polypyridyl complexes on DNA binding, cytotoxicity and antioxidant activity: synthesis, structure and in vitro anticancer activity". *Eur. J. Med. Chem.*, **59**: 253, 2013.
63. SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAGAL, P. B.; MANJUNATHA, D. H. & ASHOKA, S. "Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin". *Dyes Pigments*, **74** (3): 665, 2007.
64. HU, Y. J.; LIU, Y.; ZHANG, L. X.; ZHAO, R. M. & QU, S. S. "Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method". *J. Mol. Struct.*, **750** (1-3): 174, 2005.
65. HELMS, M. K.; PETERSEN, C. E.; BHAGAVAN, N. V. & JAMESON, D. M. "Time-resolved fluorescence studies on site-directed mutants of human serum albumin". *FEBS Lett.*, **408** (1): 67, 1997.
66. ROSS, P. D. & SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability". *Biochem.*, **20**: 3096, 1981.

67. KANSY M.; SENNER F. & K., G. "Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes". *J. Med. Chem.*, **41** (7): 1007, 1998.
68. PLISKA, V.; TESTA, B. & WATERBEEMD, H. V., *Lipophilicity in drug action and toxicology*. 1a ed., Weinheim, VCH, 1996. p. 463.
69. LYNN, M.; WILSON, A. R. & SOLOTOROVSKY, M. "Role of Bovine Serum Albumin in the Nutrition of *Mycobacterium tuberculosis*". *Appl. Environ. Microb.*, **38** (5): 806, 1979.
70. BOTTARI, B.; MACCARI, R.; MONFORTE, F.; OTTANA, R.; VIGORITA, M. G.; BRUNO, G.; NICOLO, F.; ROTONDOB, A. & ROTONDOB, E. "Nickel(II) 2,6-Diacetylpyridine Bis(isonicotinoylhydrazonate) and Bis(benzoylhydrazonate) Complexes: Structure and Antimycobacterial Evaluation. Part XI". *Bioorgan. Med. Chem.*, **9**: 2203, 2001.
71. HONORATO, J.; COLINA-VEGAS, L.; CORRÊA, R. S.; GUEDES, A. P. M.; MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; ELLENA, J. A. and Batista, A. A. *Inorg. Chem. Front.*, 2018, DOI: 10.1039/C8QI00941D.

APÊNDICE

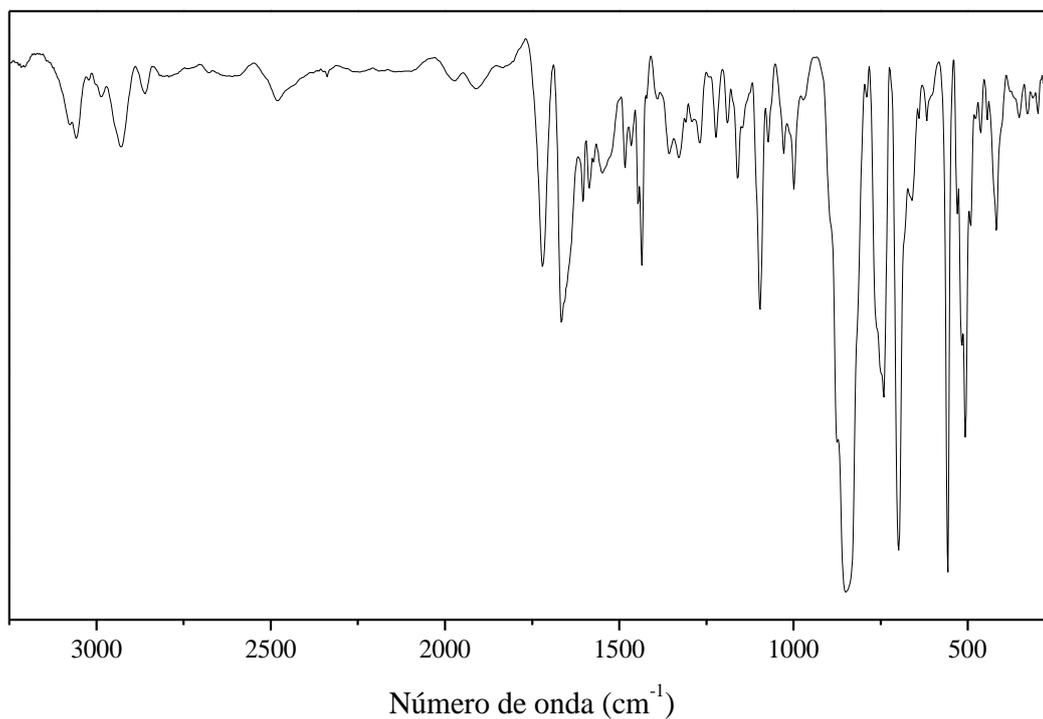


FIGURA A1 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

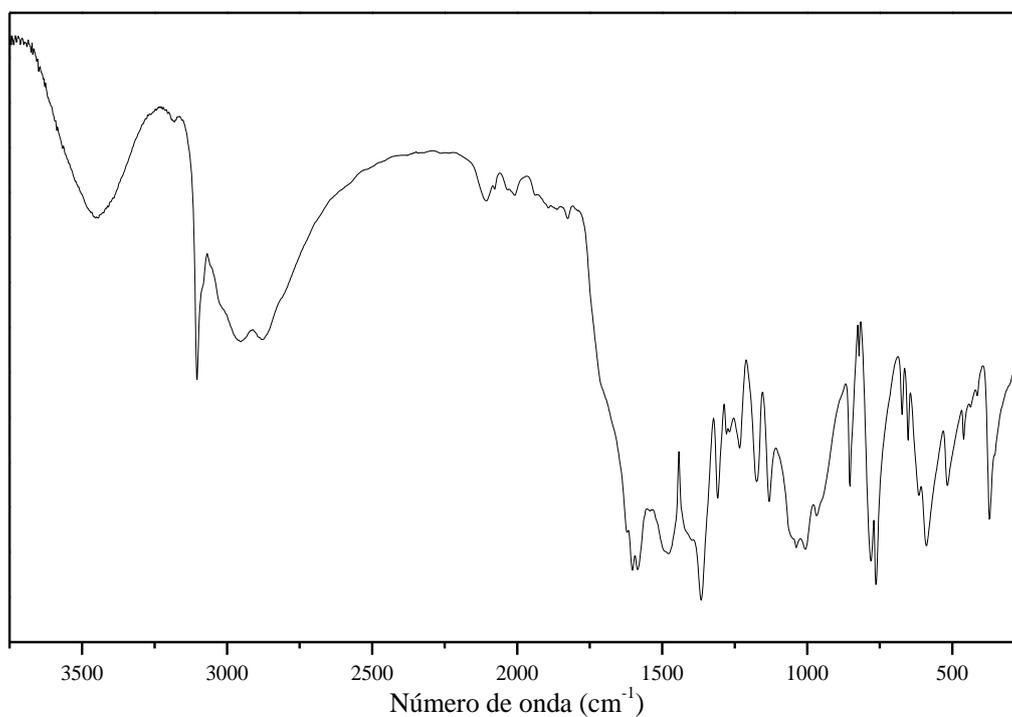


FIGURA A2 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do ácido 2,3-dicarboxipiridínico.

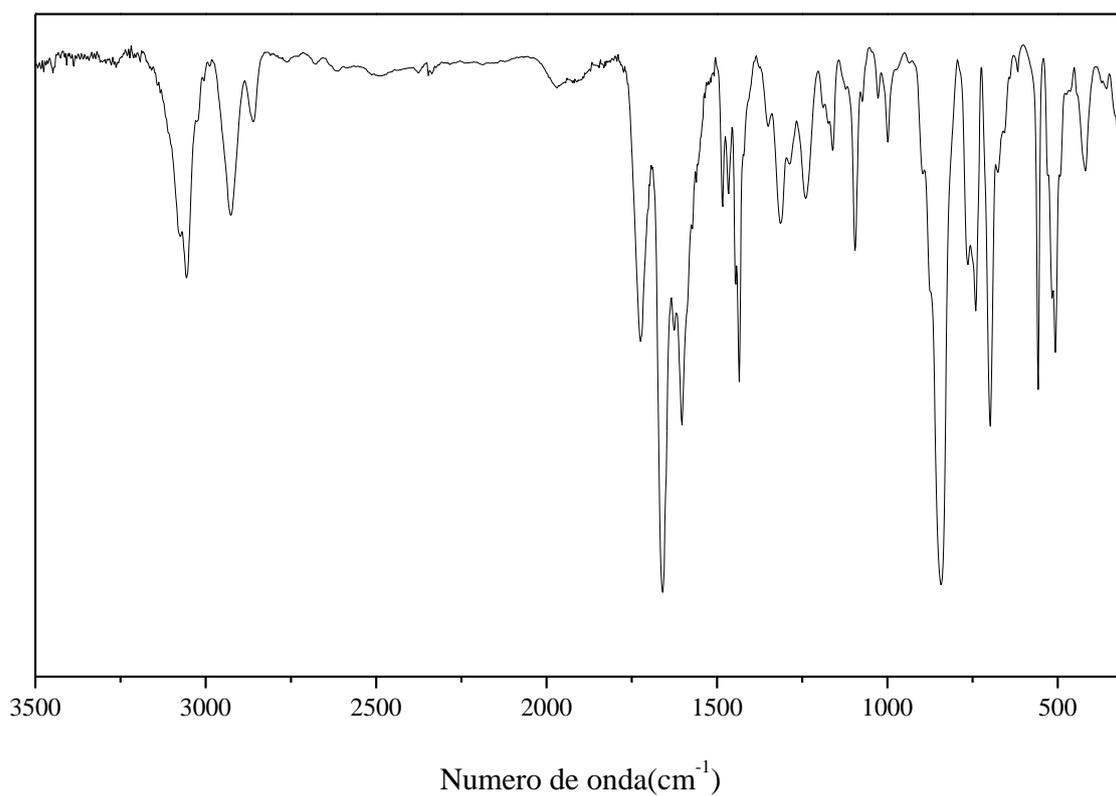


FIGURA A3 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

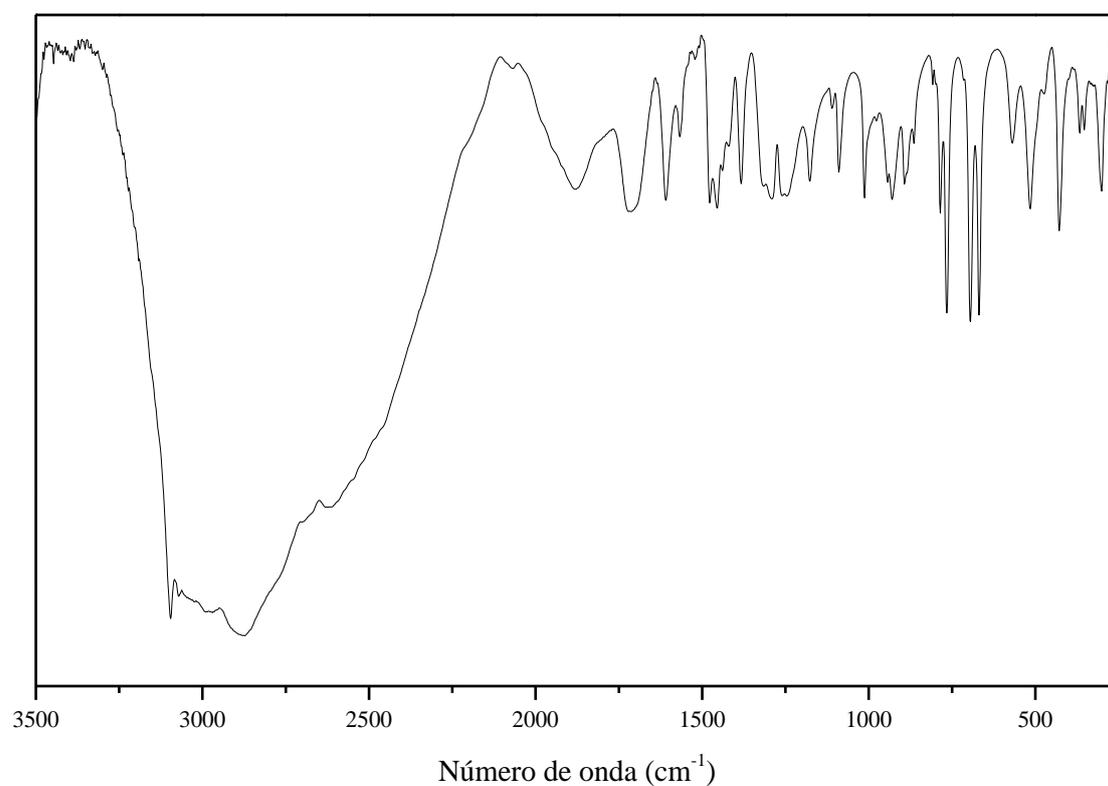


FIGURA A4 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do ácido 2,4-dicarboxipiridínico.

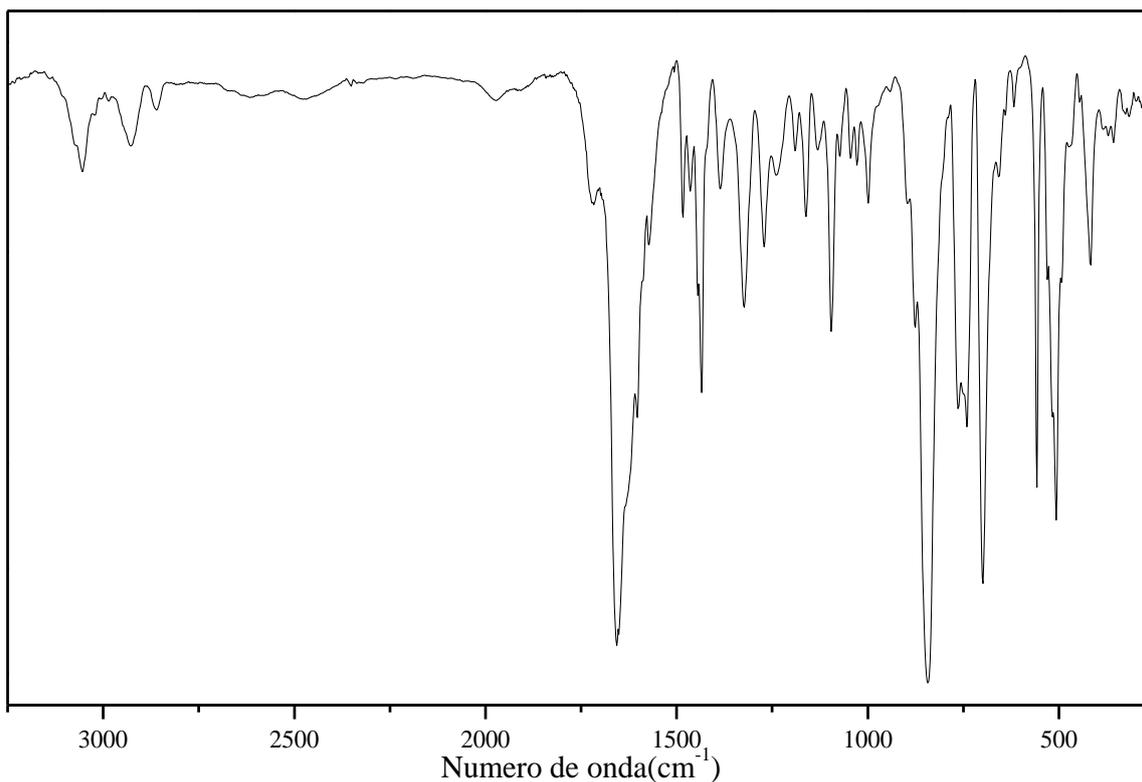


FIGURA A5 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do complexo $[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF_6$.

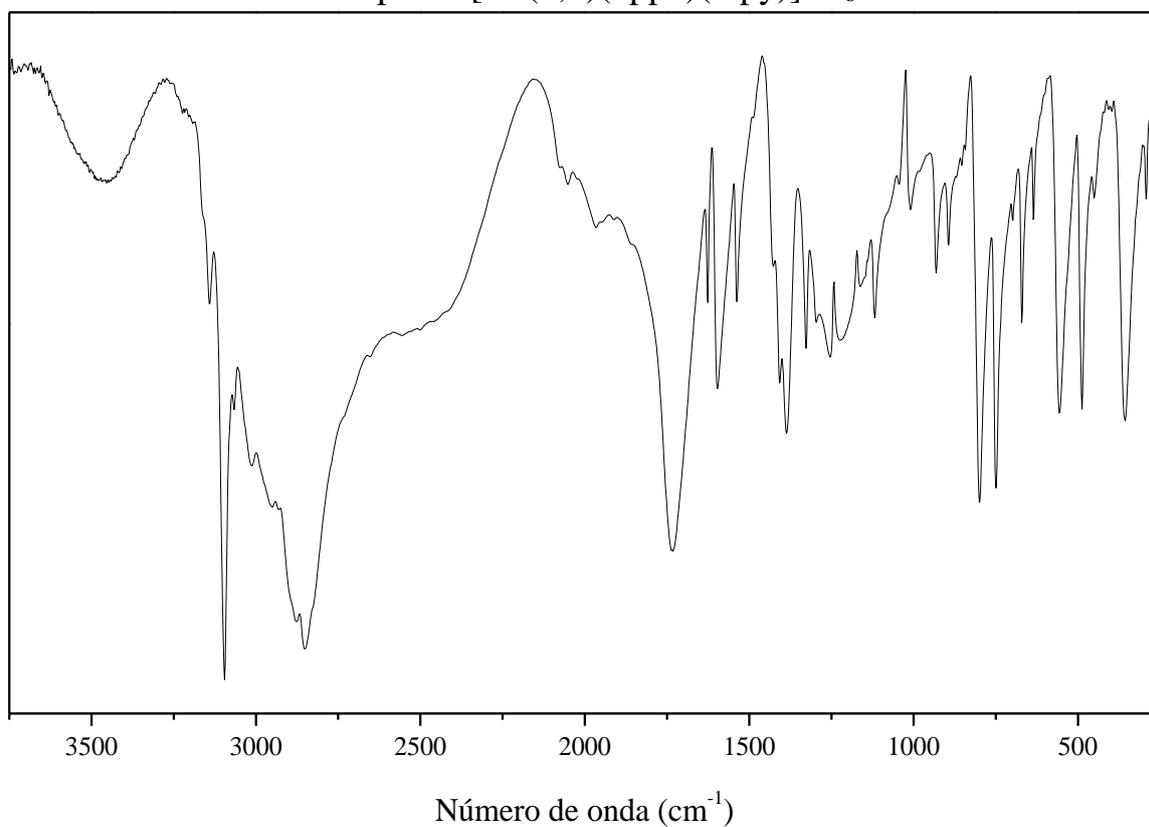


FIGURA A6 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do ácido 2,5-dicarboxipiridínico.

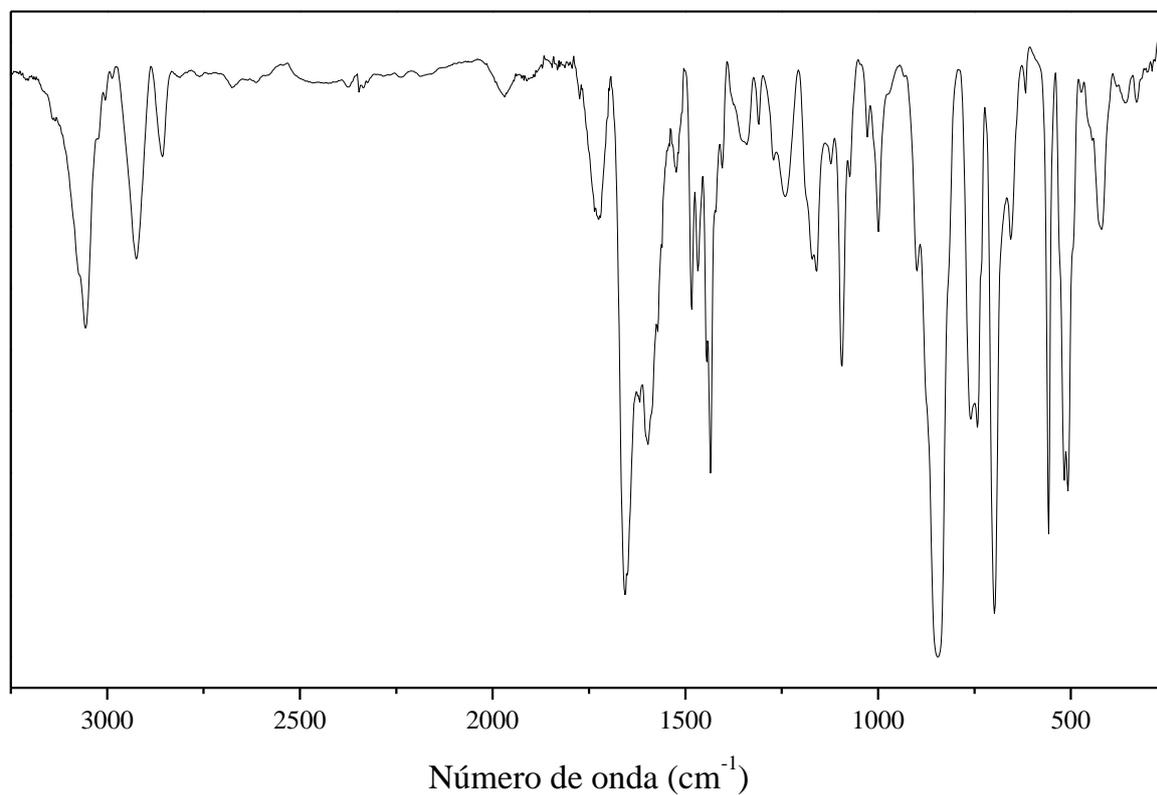


FIGURA A7 - Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$.

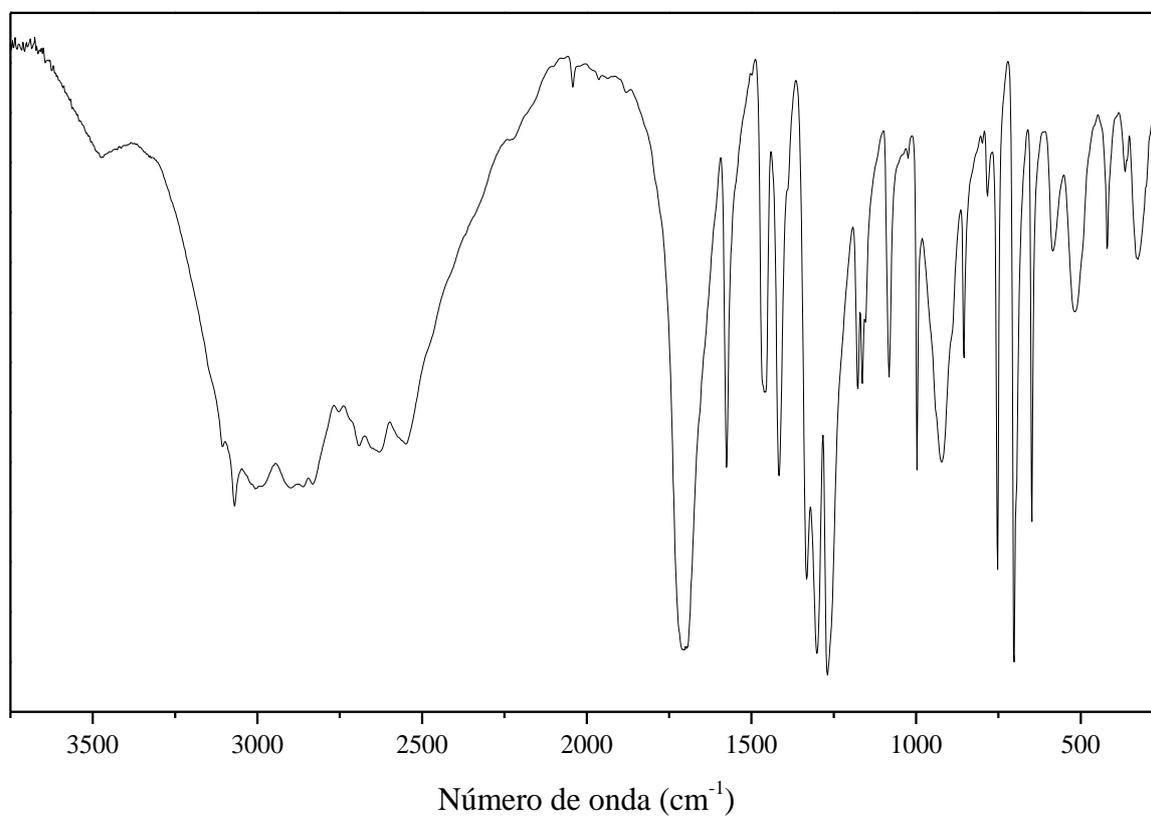


FIGURA A8 – Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do ácido 2,6-dicarboxipiridínico.

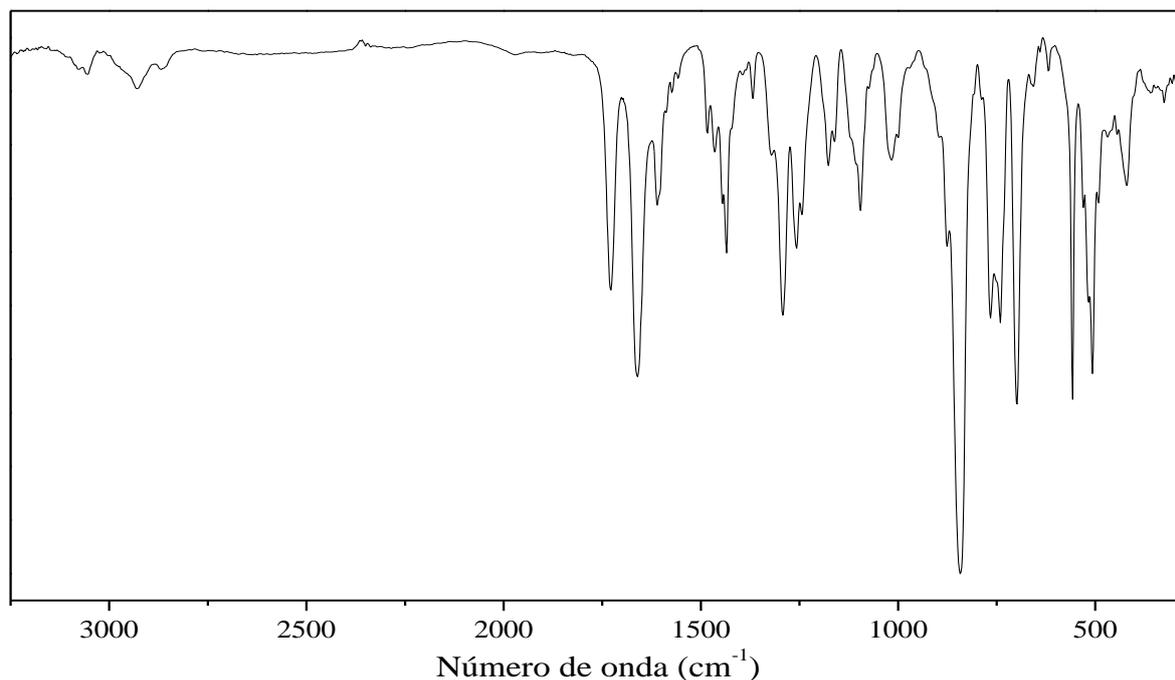


FIGURA A9 - Espectro vibracional de absorção na região do infravermelho do complexo $[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF_6$.

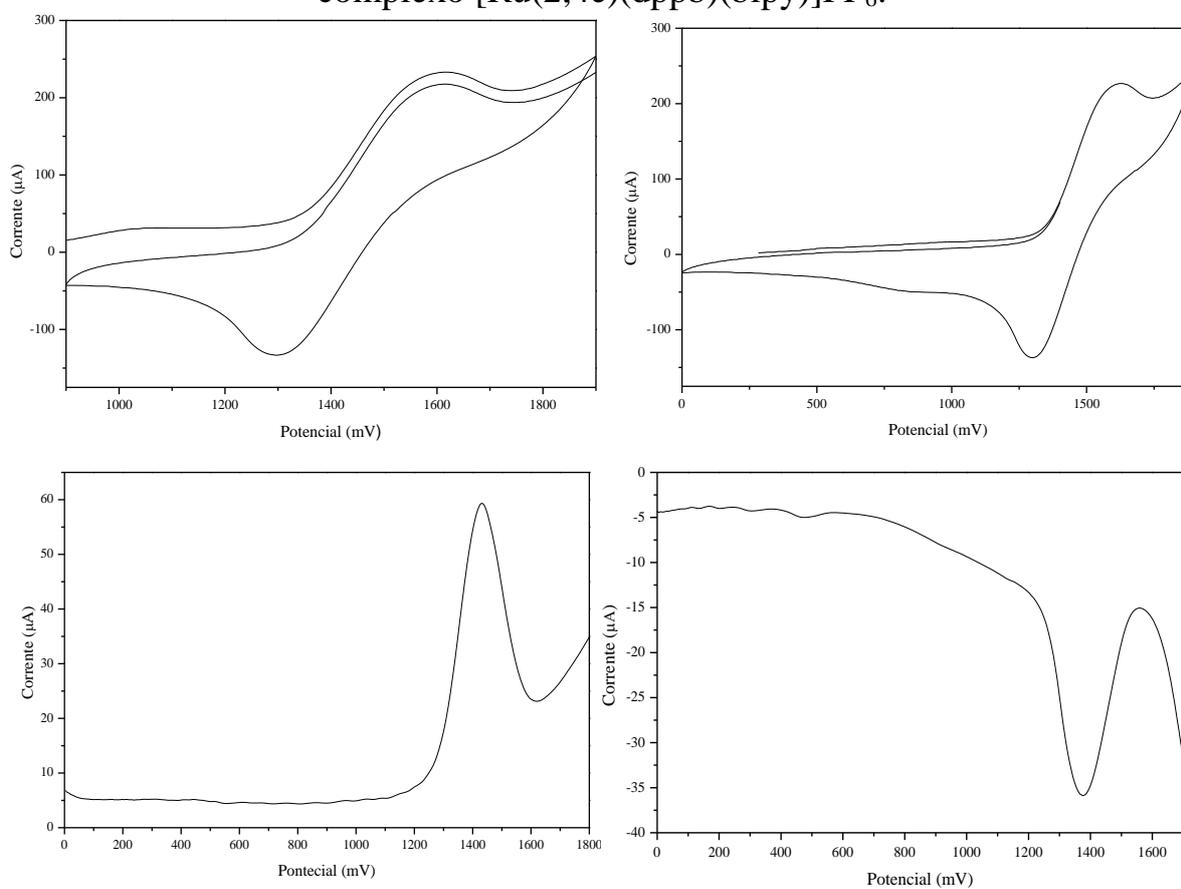


FIGURA A10 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF₆, obtidos em CH₂Cl₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

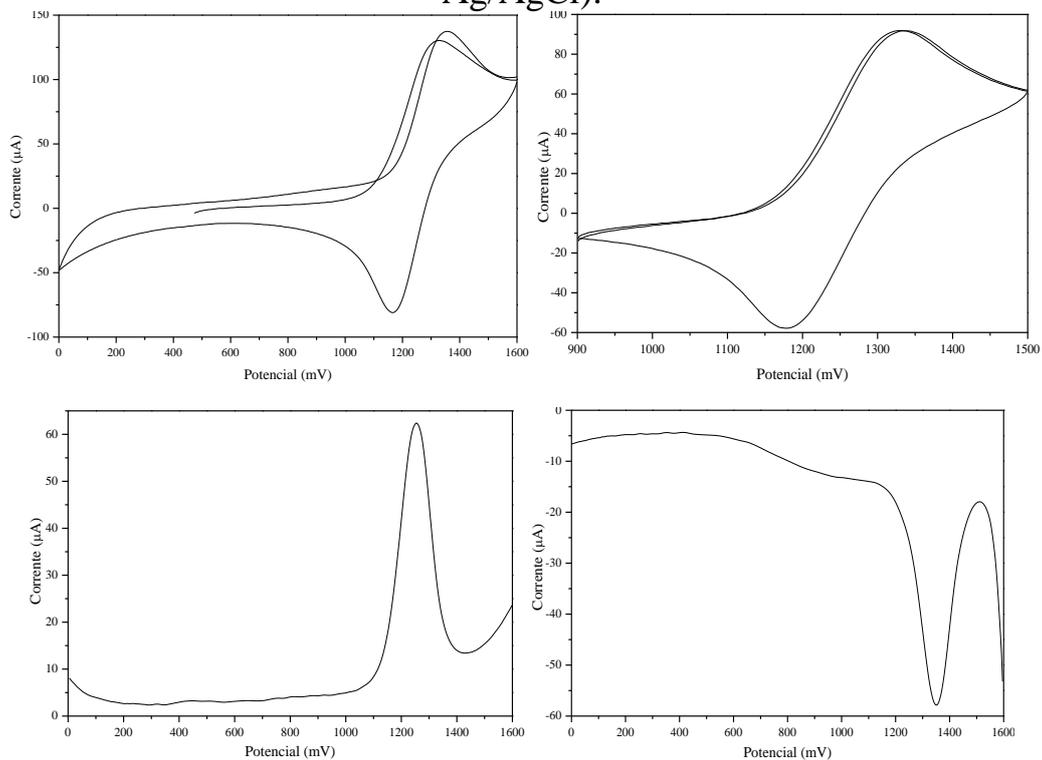


FIGURA A11 - Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆, obtidos em CH₂Cl₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

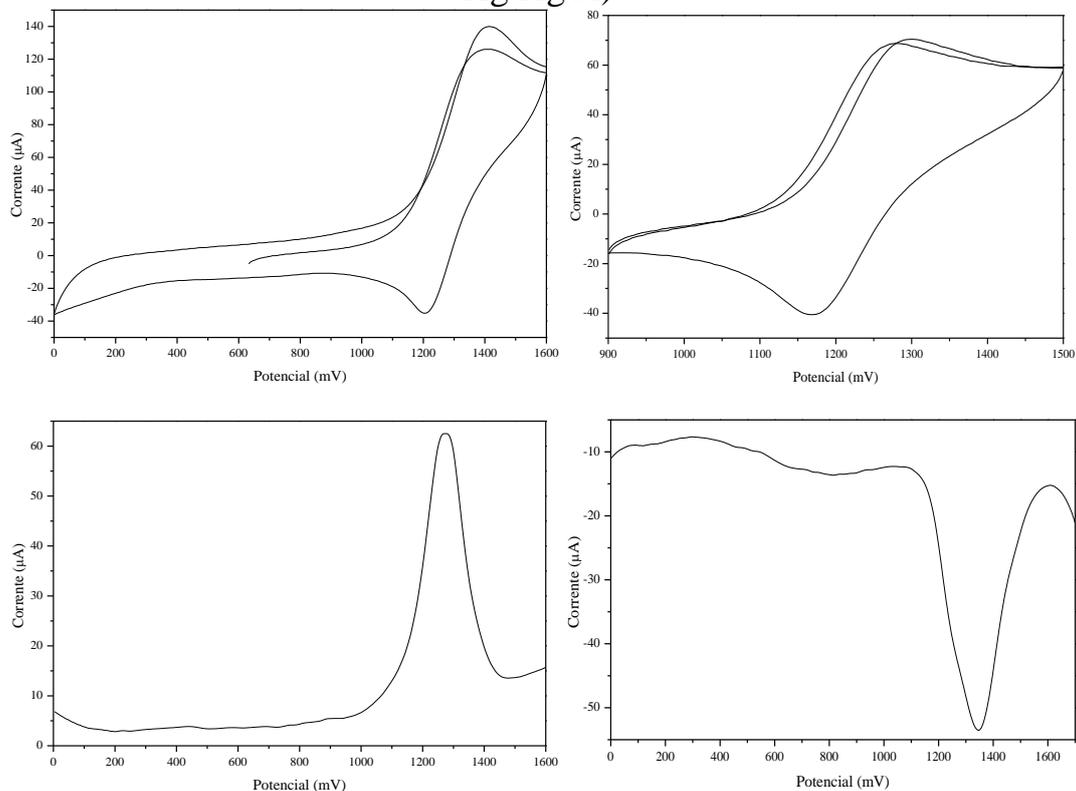


FIGURA A12 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF₆, obtidos em CH₂Cl₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

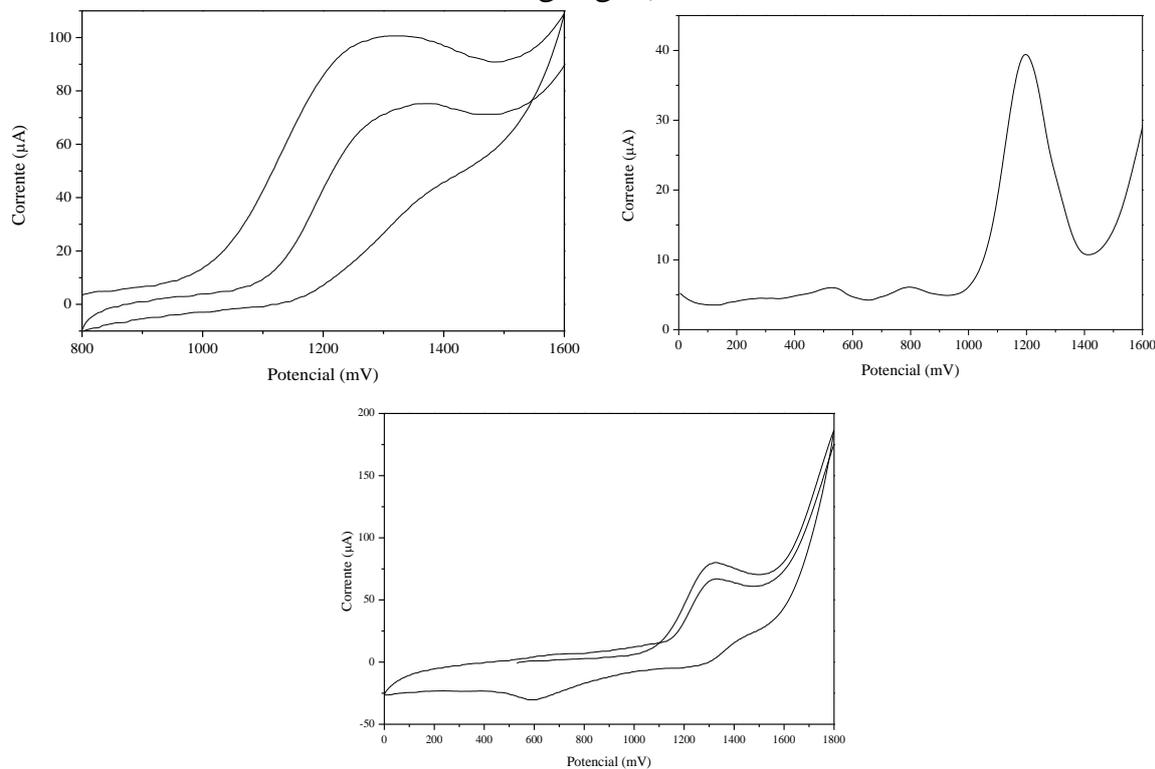


FIGURA A13 – Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF₆, obtidos em CH₂Cl₂ (0,1M PTBA, 100 mV.s⁻¹, Ag/AgCl).

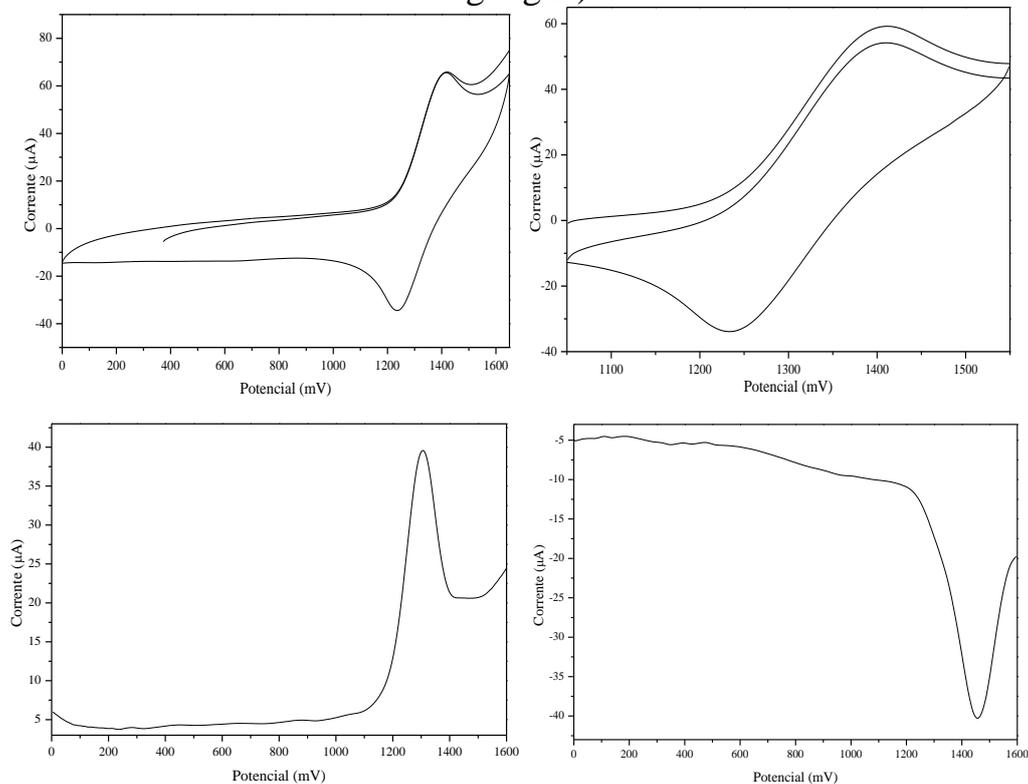


FIGURA A14 - Voltamograma cíclico e de pulso diferencial do complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, obtidos em CH_2Cl_2 (0,1M PTBA, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, Ag/AgCl).

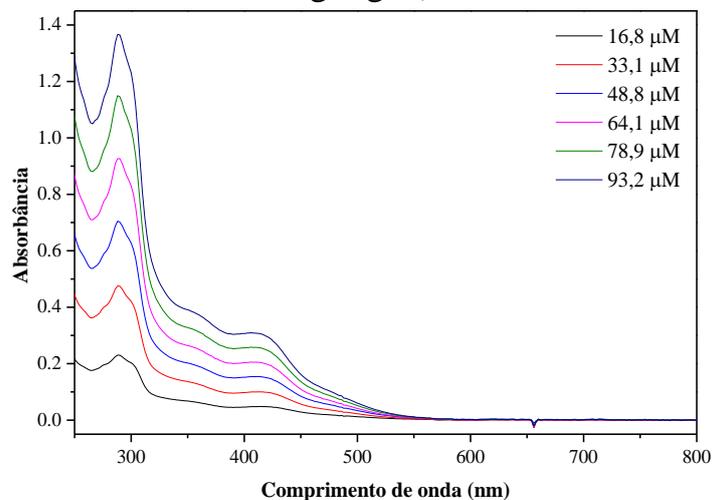


FIGURA A15 – Espectros de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (metanol).

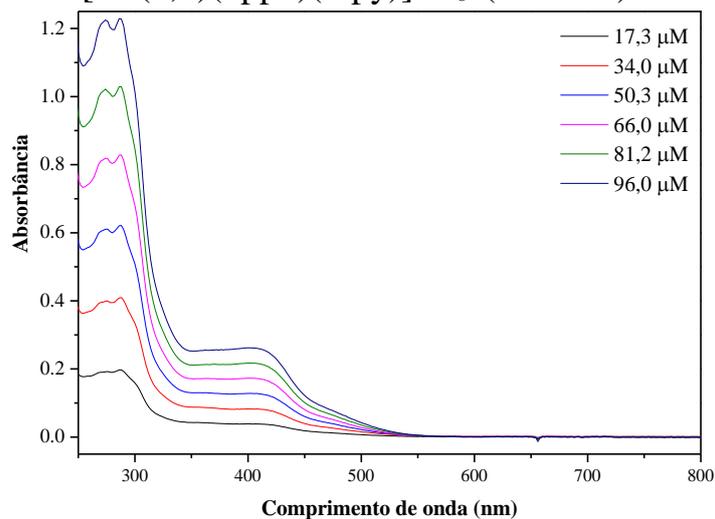


FIGURA A16 – Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (metanol).

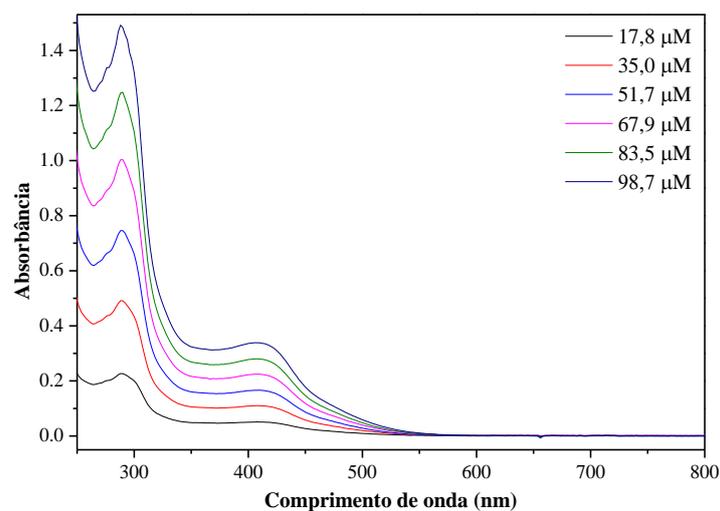


FIGURA A17 - Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (metanol).

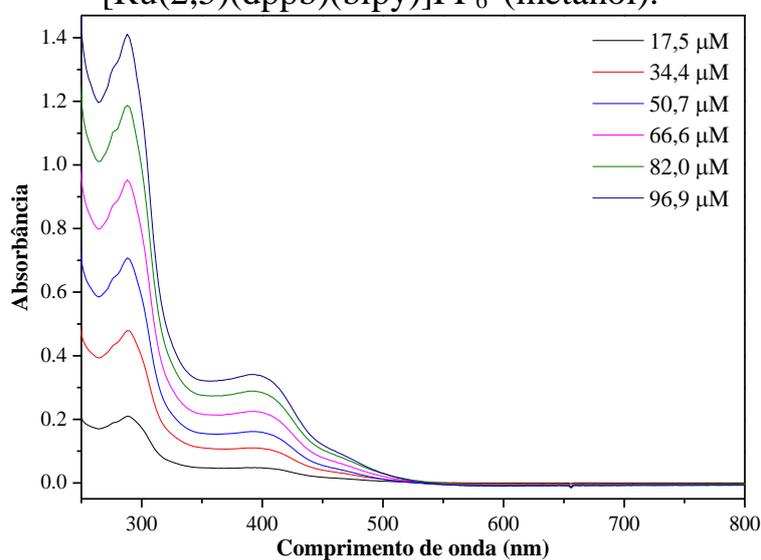


FIGURA A18 – Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (metanol).

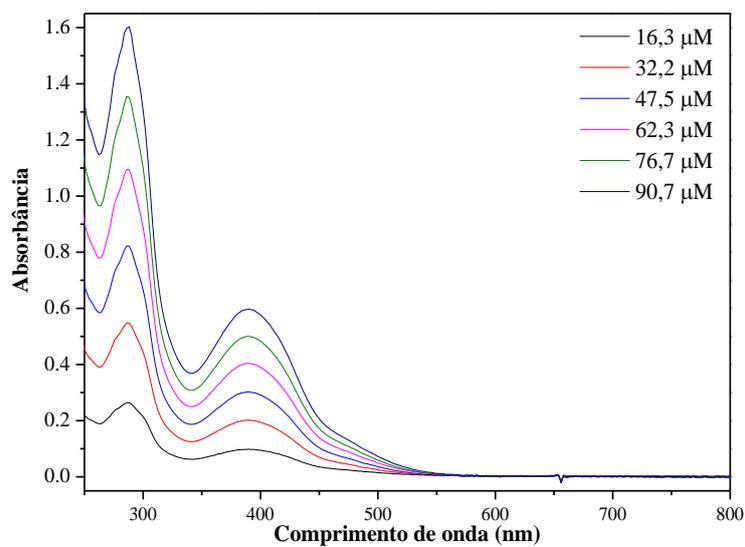


FIGURA A19 – Espectro de absorção na região do UV-vis para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (metanol).

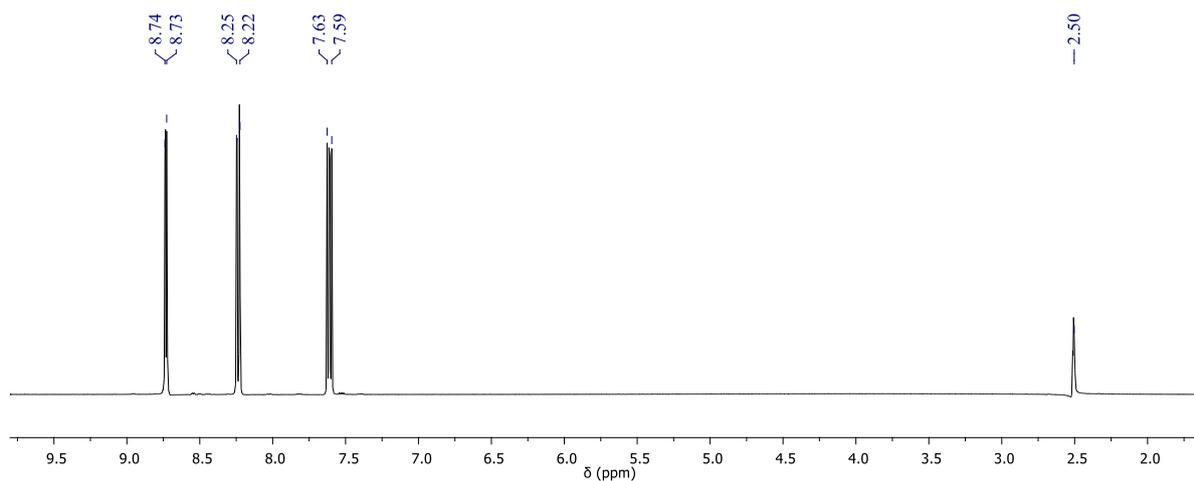


FIGURA A20 – Espectro de RMN ^1H obtido para ácido 2,3-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

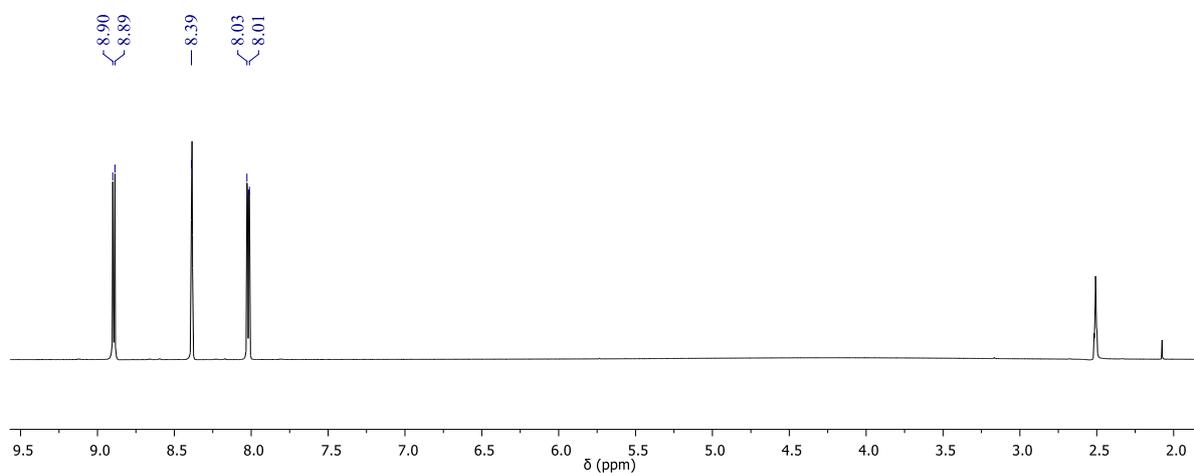


FIGURA A21 – Espectro de RMN ^1H obtido para ácido 2,4-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

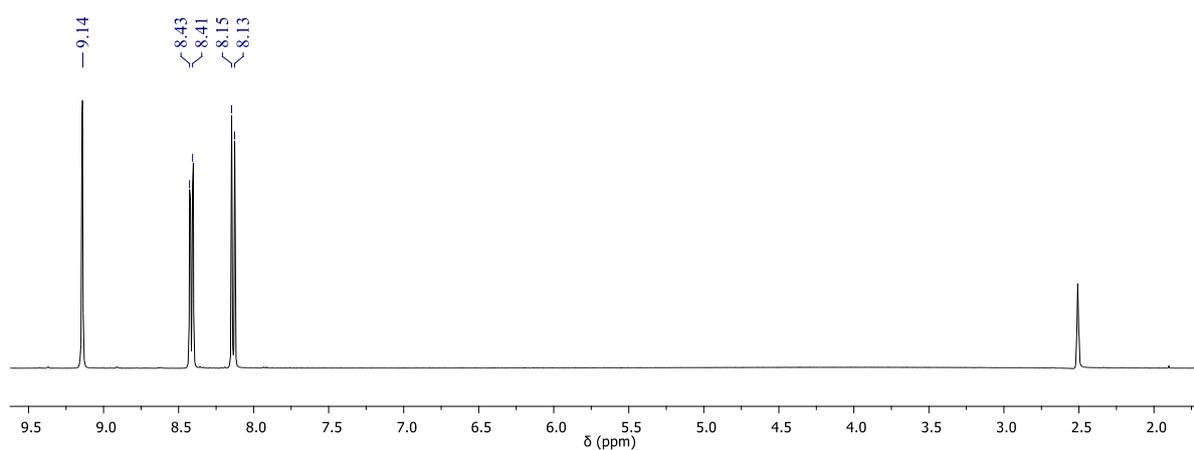


FIGURA A22 – Espectro de RMN ^1H obtido para ácido 2,5-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

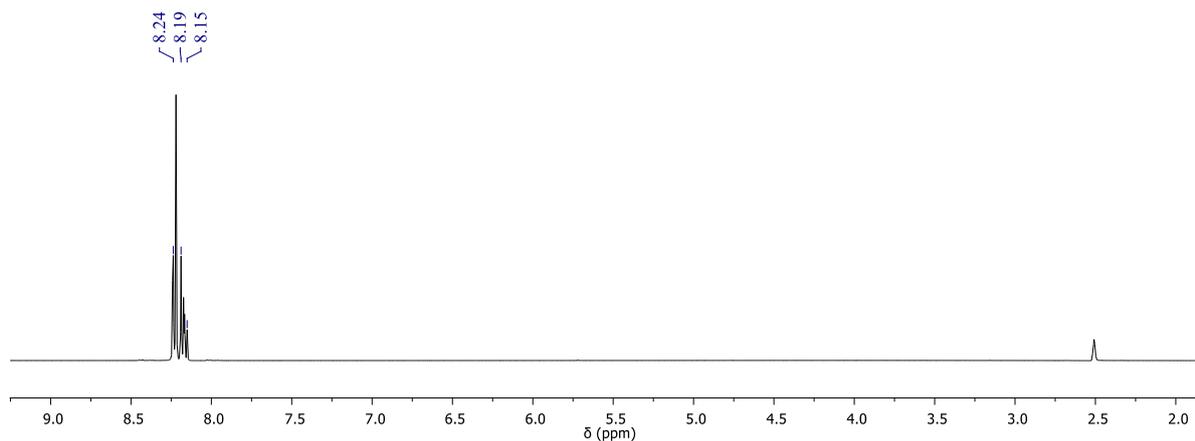


FIGURA A23 – Espectro de RMN ^1H obtido para ácido 2,6-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

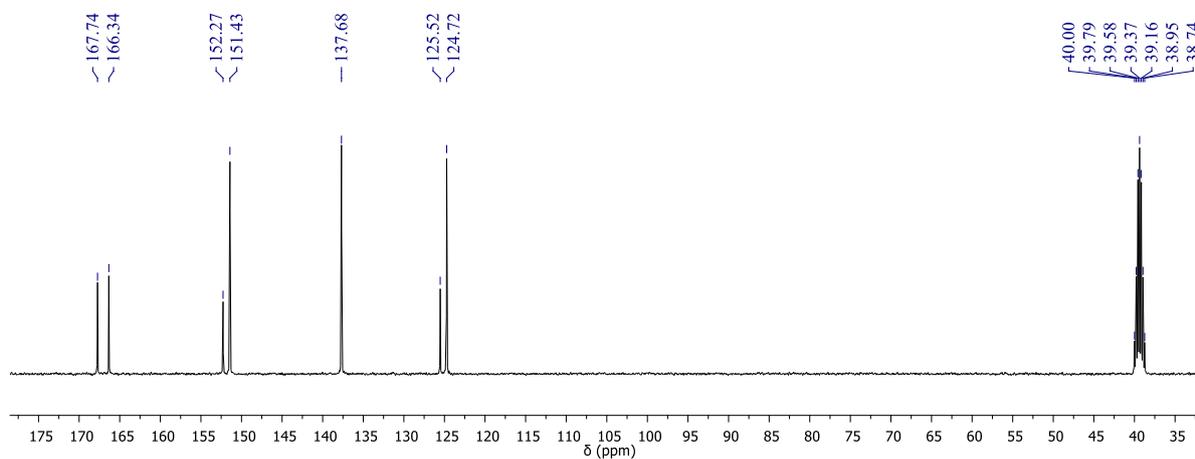


FIGURA A24 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ obtido para ácido 2,3-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

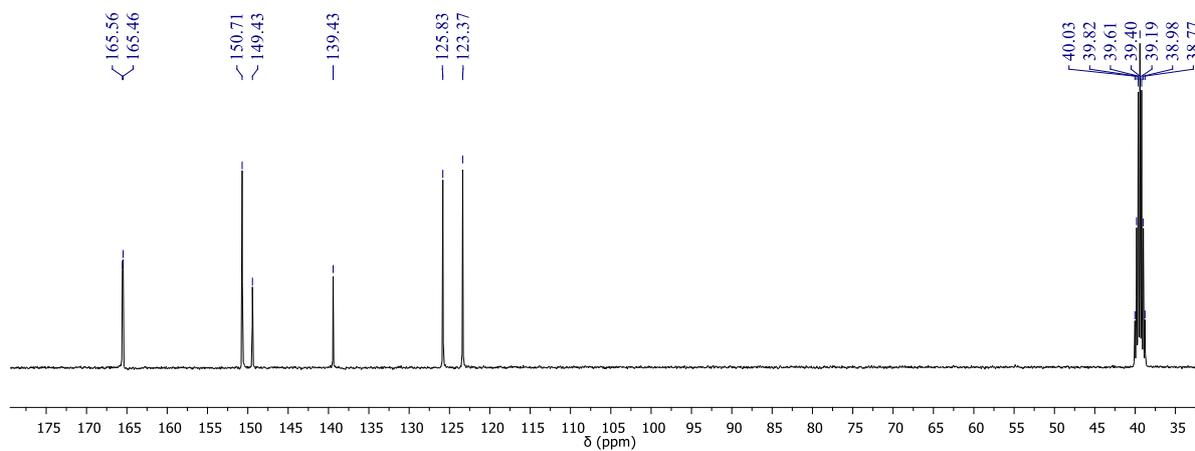


FIGURA A25 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ obtido para ácido 2,4-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

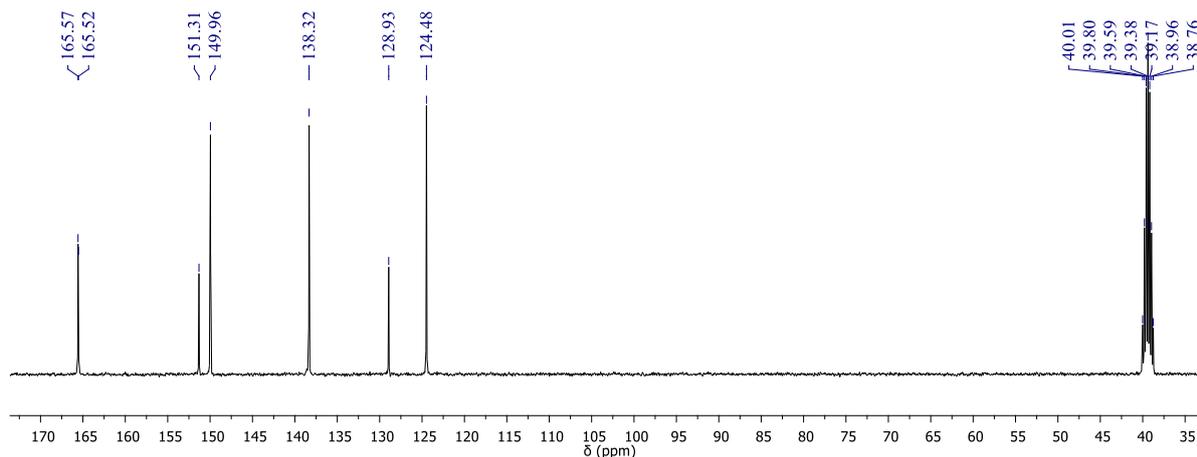


FIGURA A26 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ obtido para ácido 2,5-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

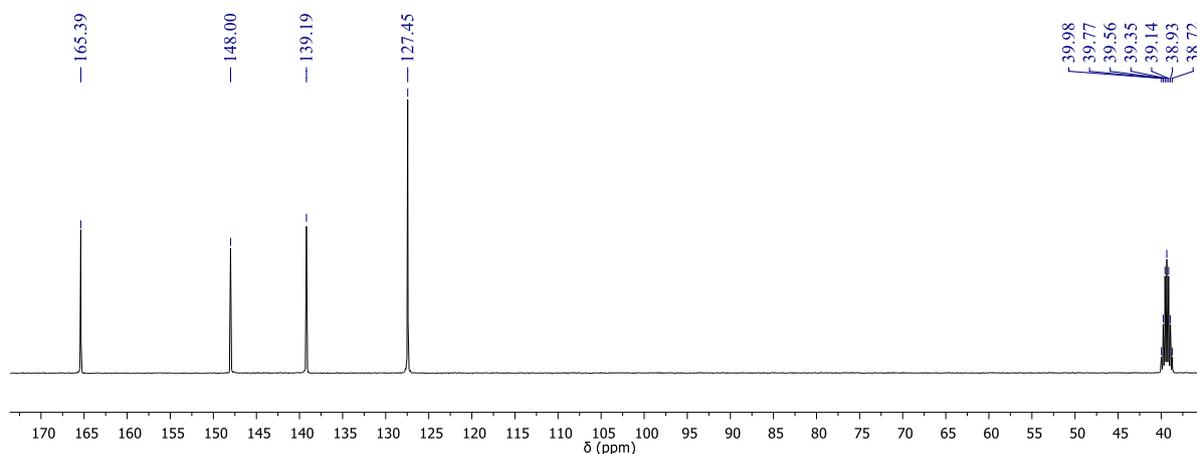


FIGURA A27 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ obtido para ácido 2,6-dicarboxipiridínico em DMSO-d_6 .

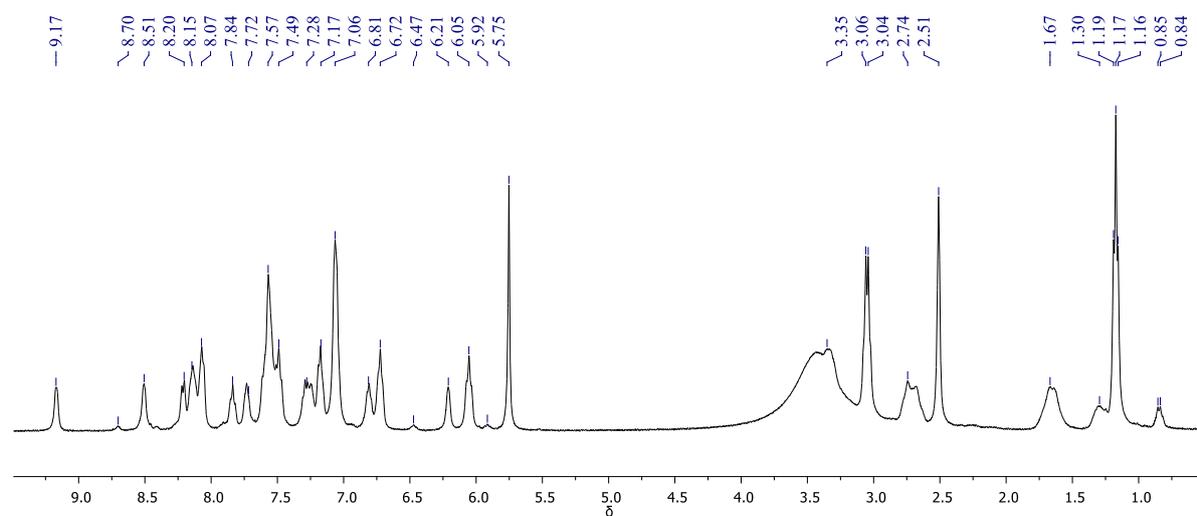


FIGURA A28 – Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

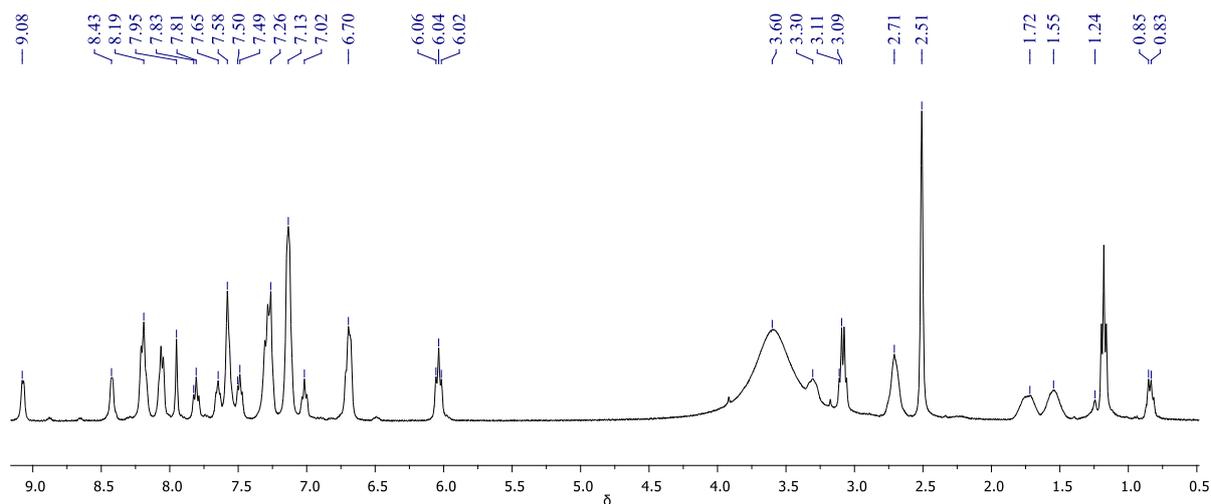


FIGURA A29 – Espectro de RMN ¹H obtido para o complexo [Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF₆ em DMSO-d₆.

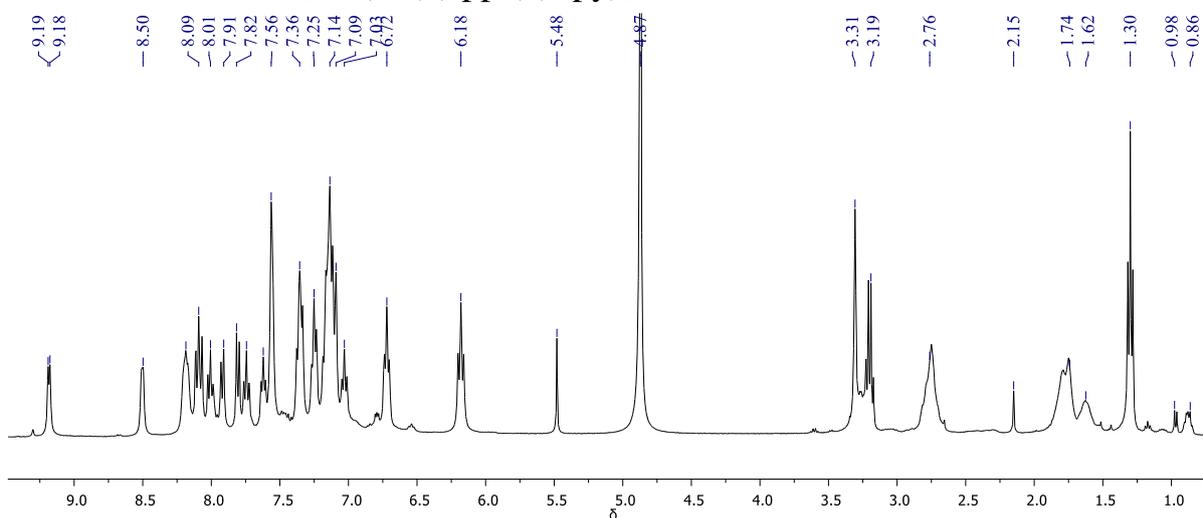


FIGURA A30 – Espectro de RMN ¹H obtido para o complexo [Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF₆ em CD₃OD-d₄.

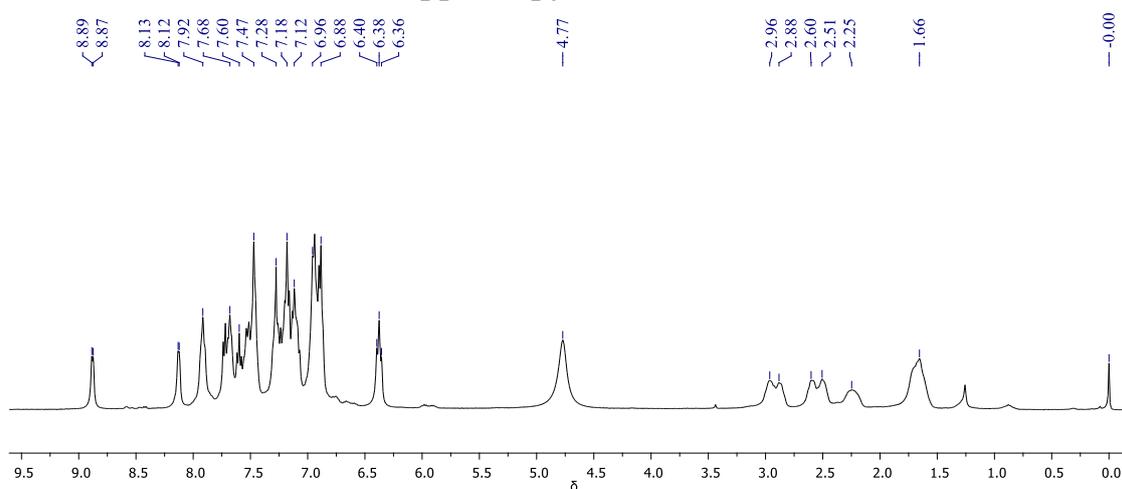


FIGURA A31 – Espectro de RMN ¹H obtido para o complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF₆ em CDCl₃-d.

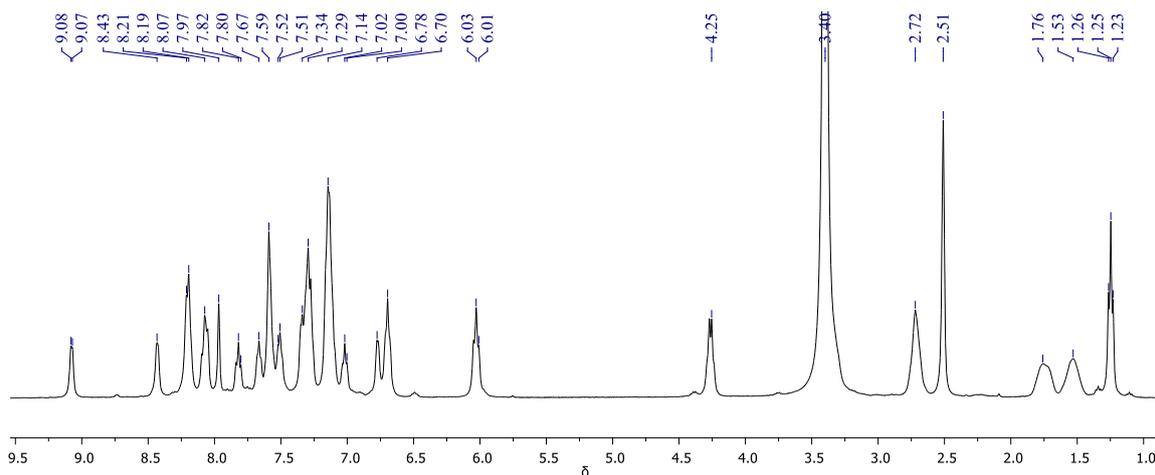


FIGURA A32 – Espectro de RMN ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

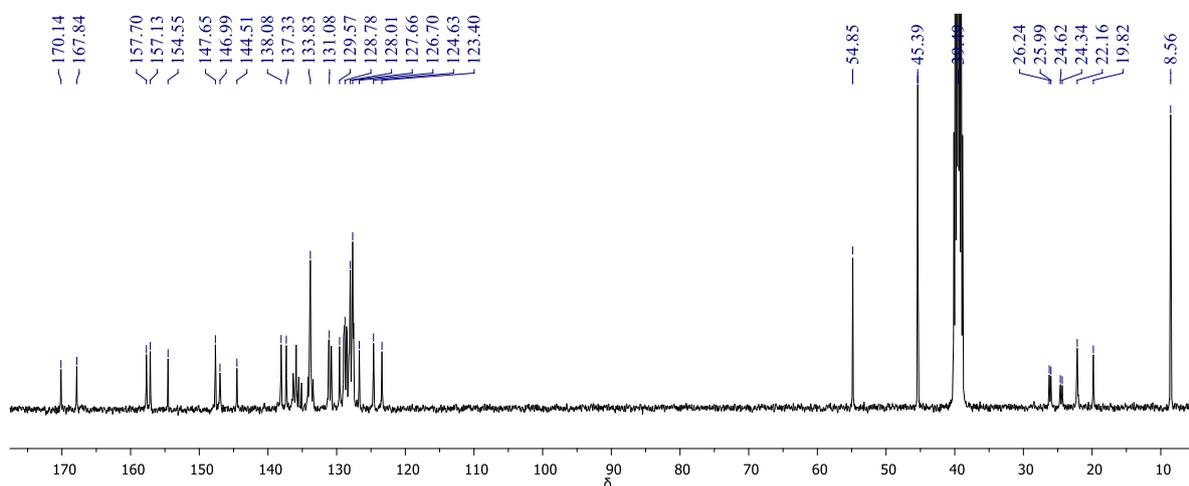


FIGURA A33 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

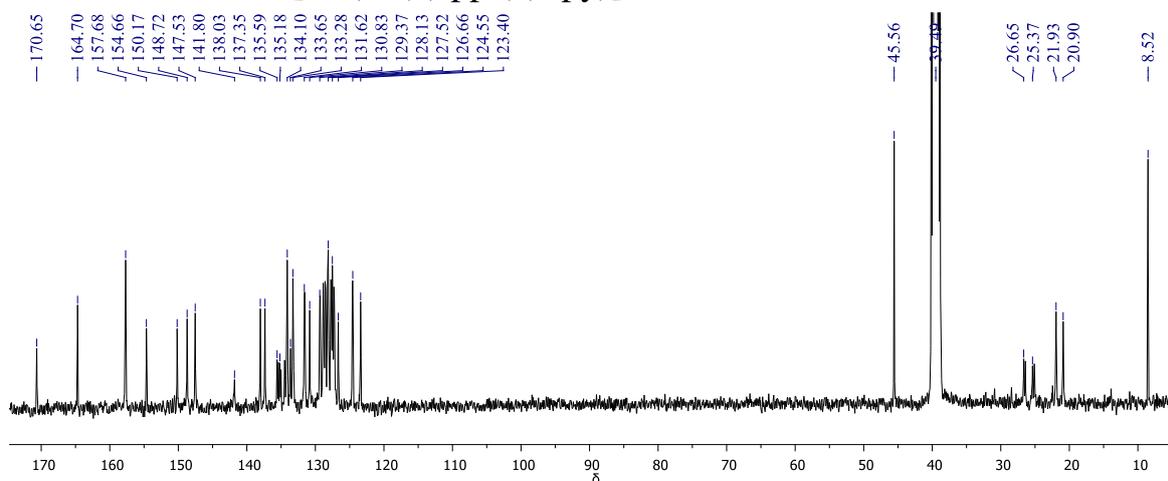


FIGURA A34 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

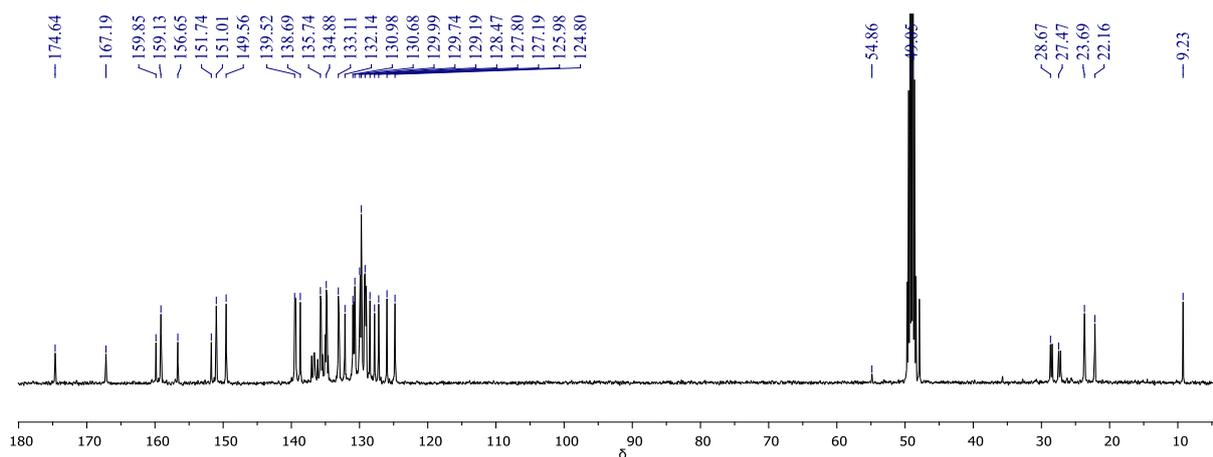


FIGURA A35 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$.

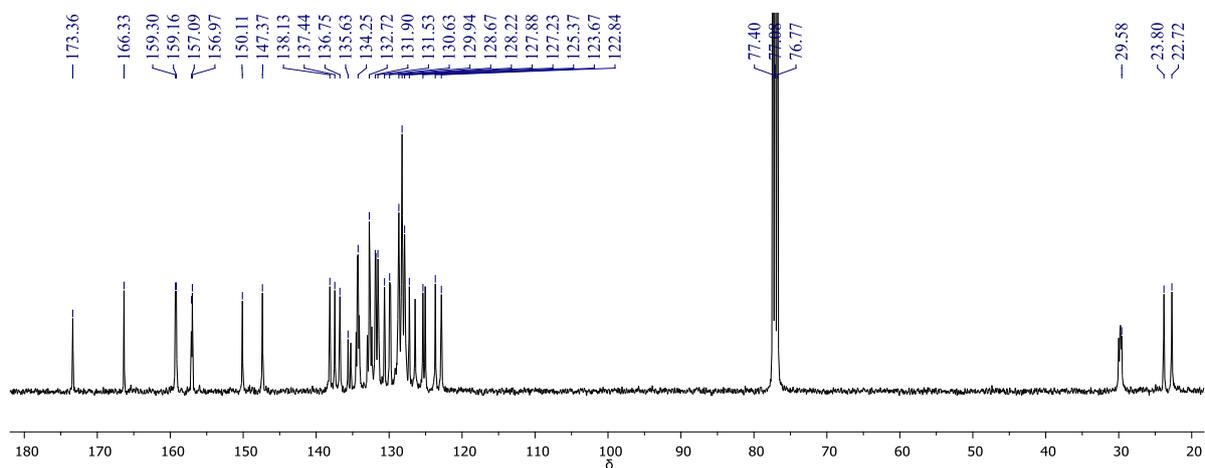


FIGURA A36 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em CDCl_3-d .

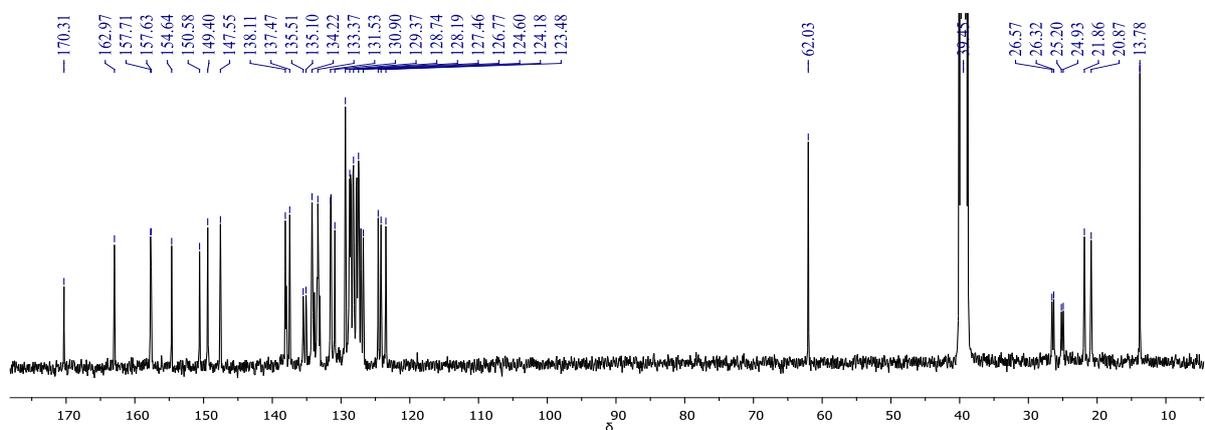


FIGURA A37 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4e)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{DMSO}-d_6$.

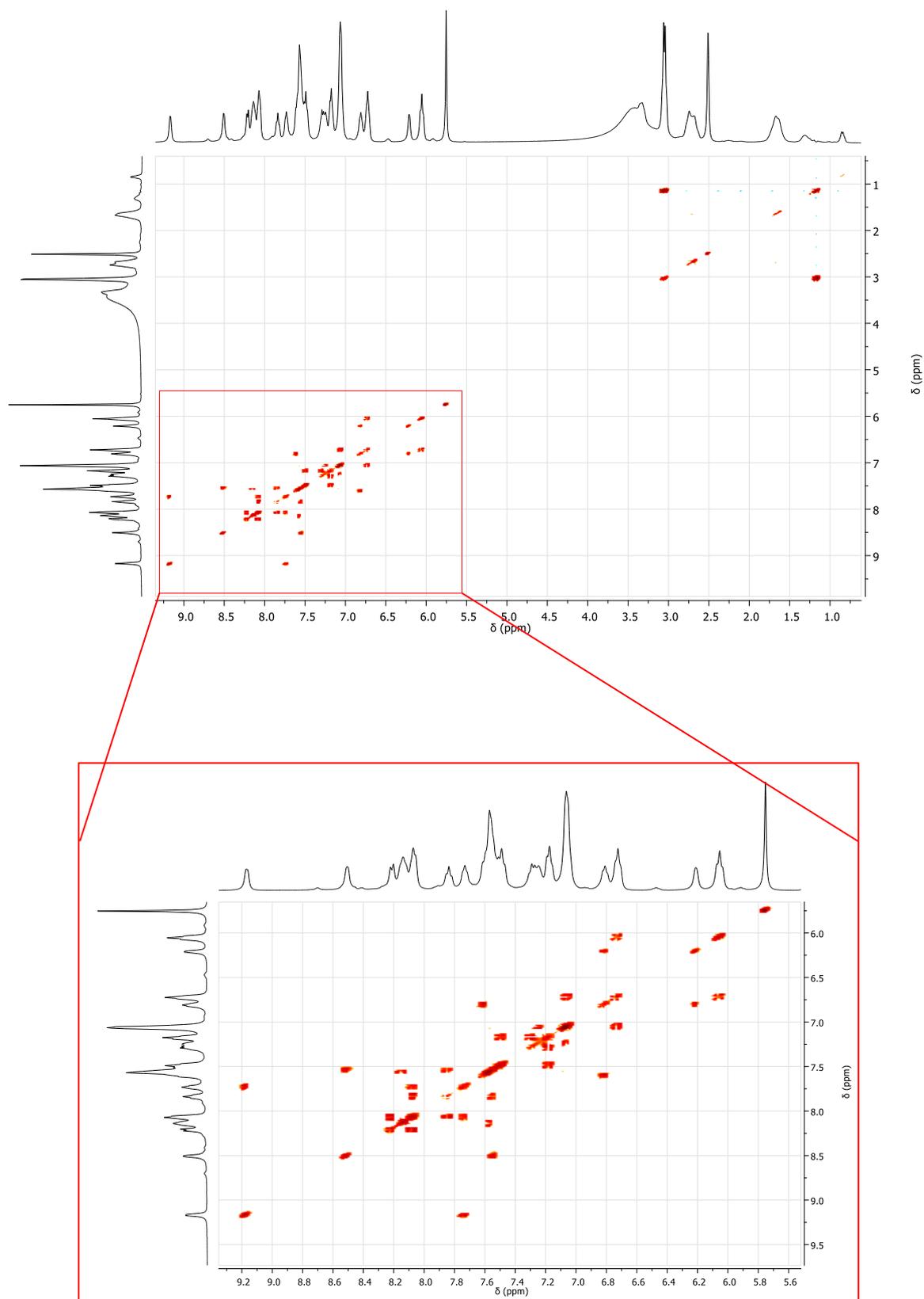


FIGURA A38 – Espectro de RMN de COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

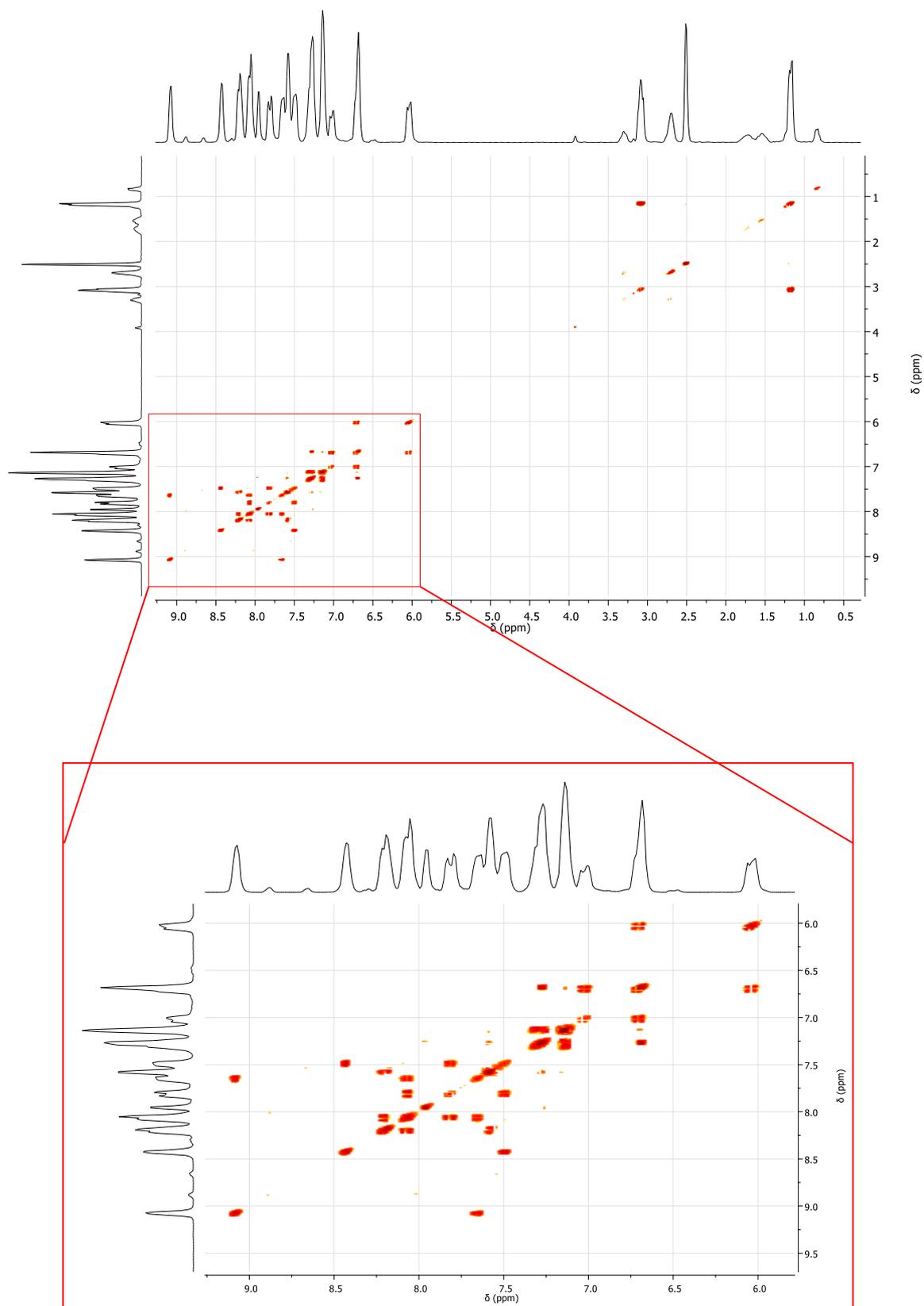


FIGURA A39 – Espectro de RMN de COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

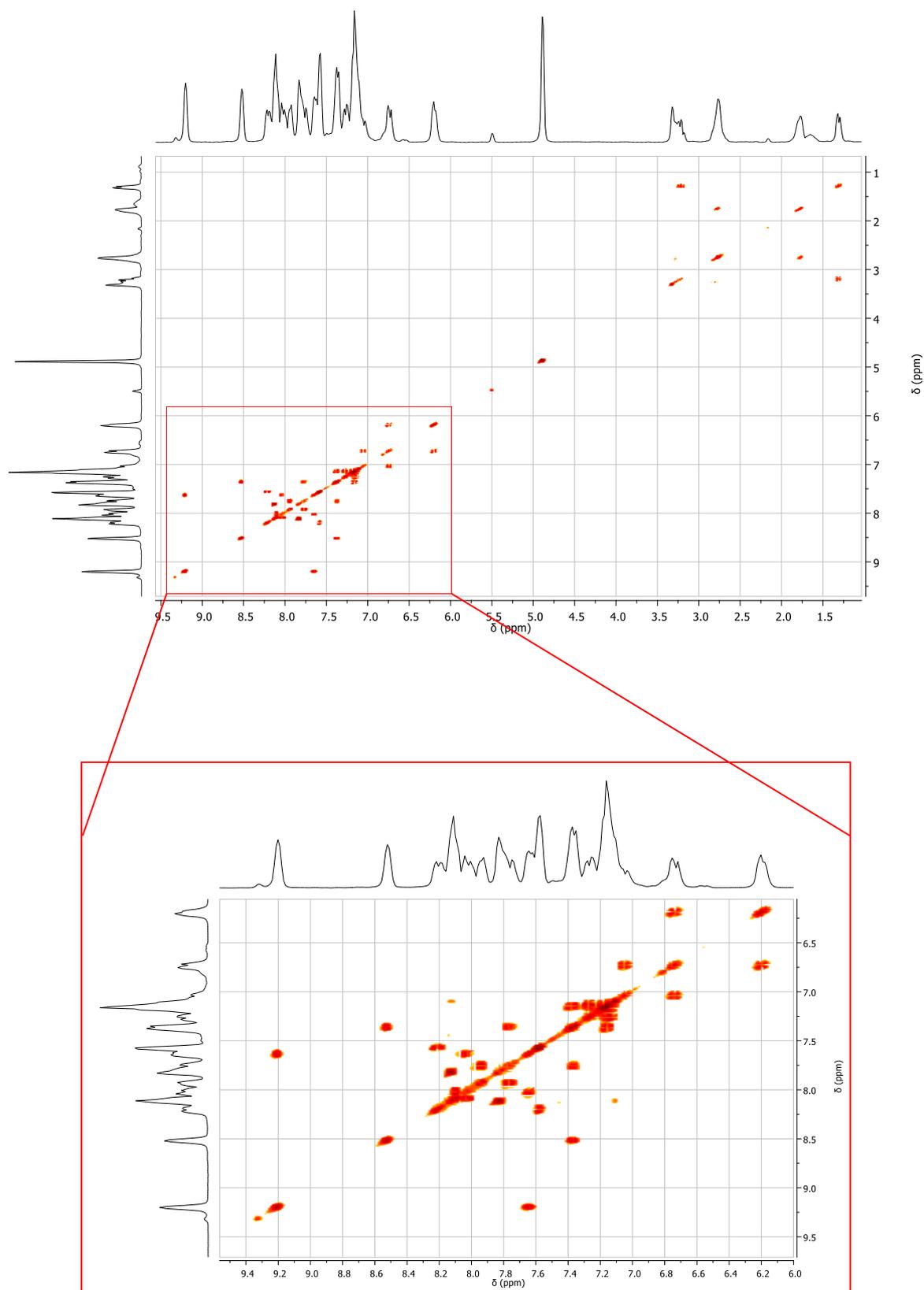


FIGURA A40 – Espectro de RMN de COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$.

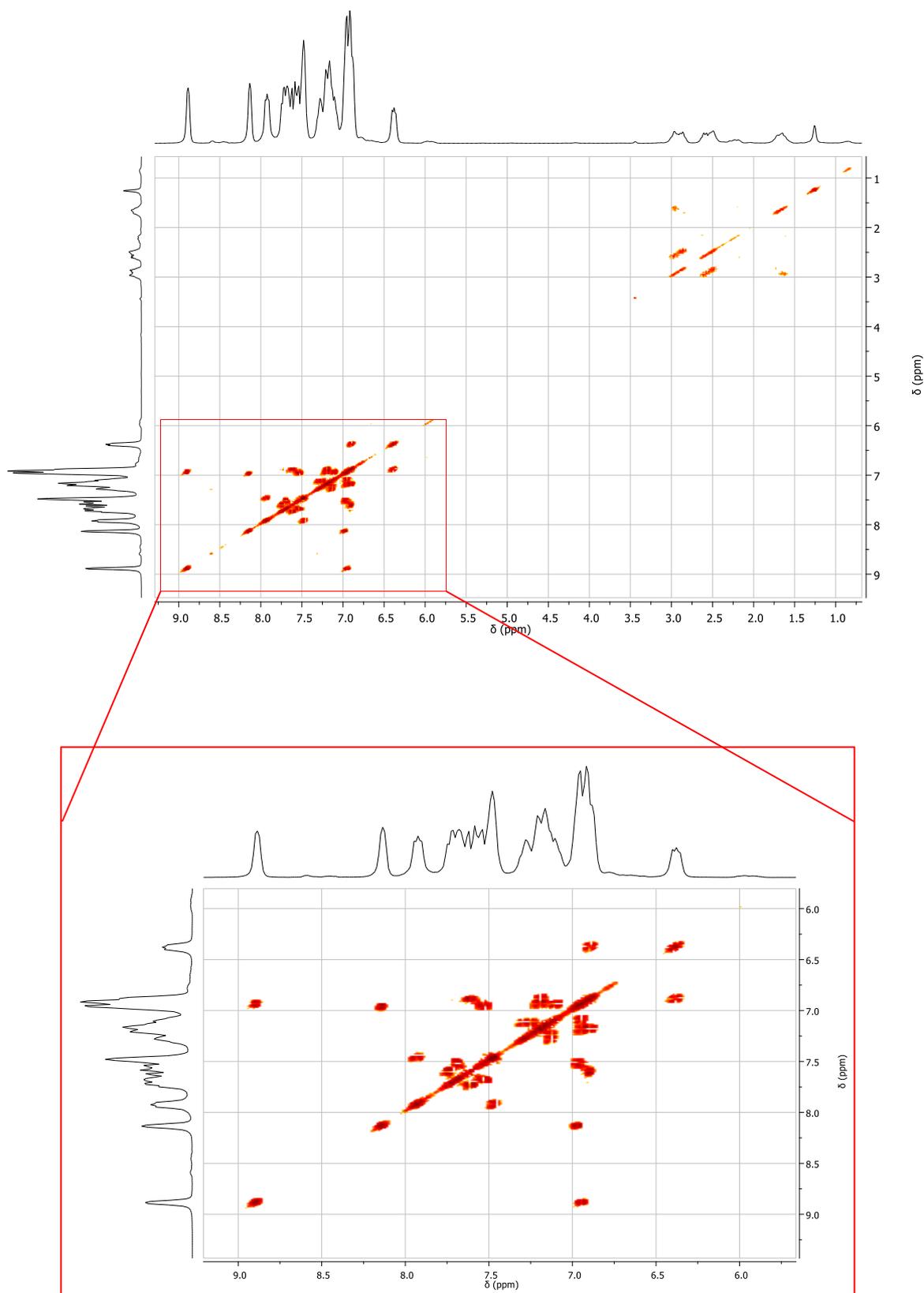


FIGURA A41 – Espectro de RMN de COSY ^1H obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CDCl}_3\text{-d}$.

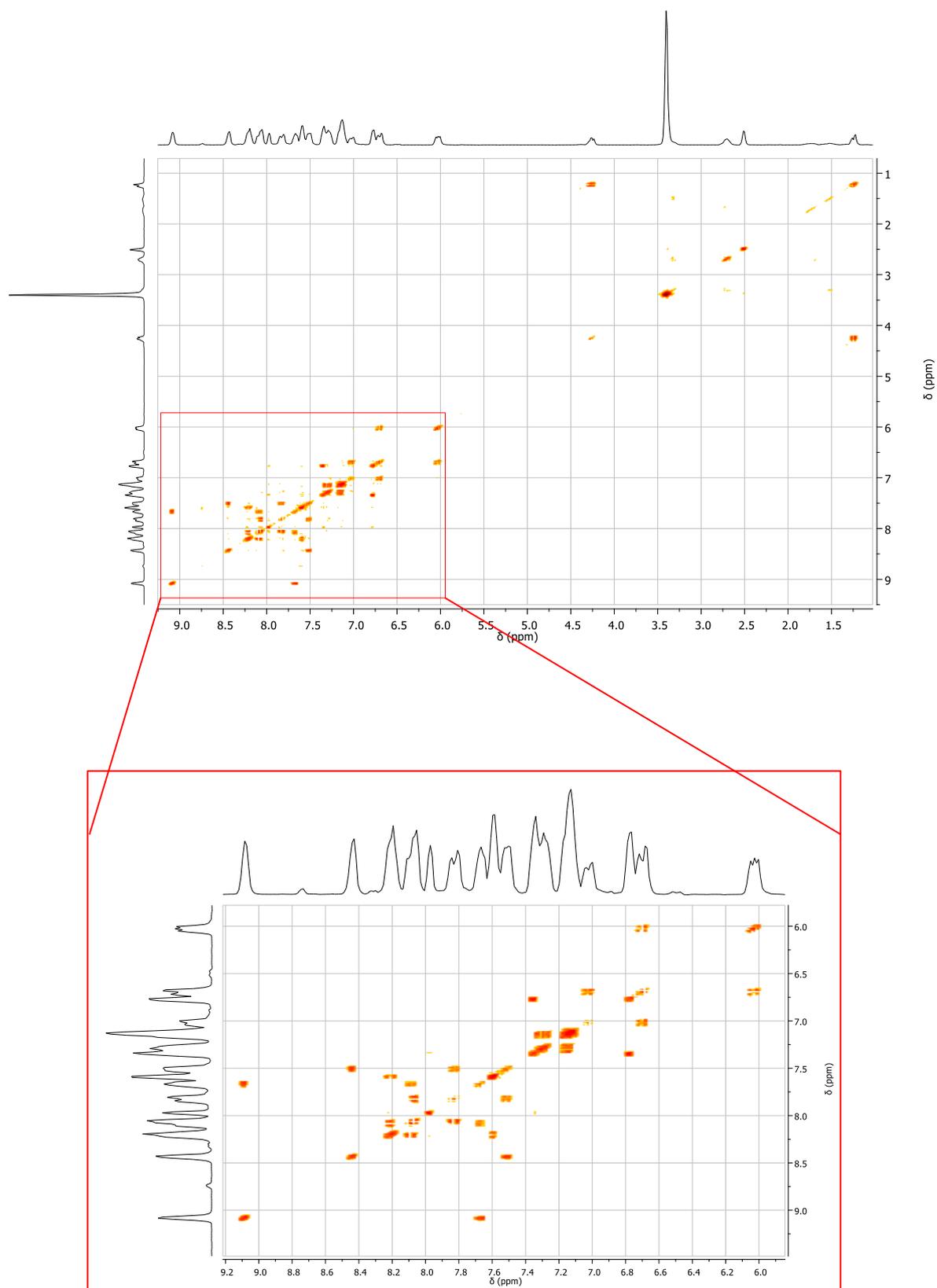


FIGURA A42 – Espectro de RMN de COSY ¹H obtido para o complexo [Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF₆ em DMSO-d₆.

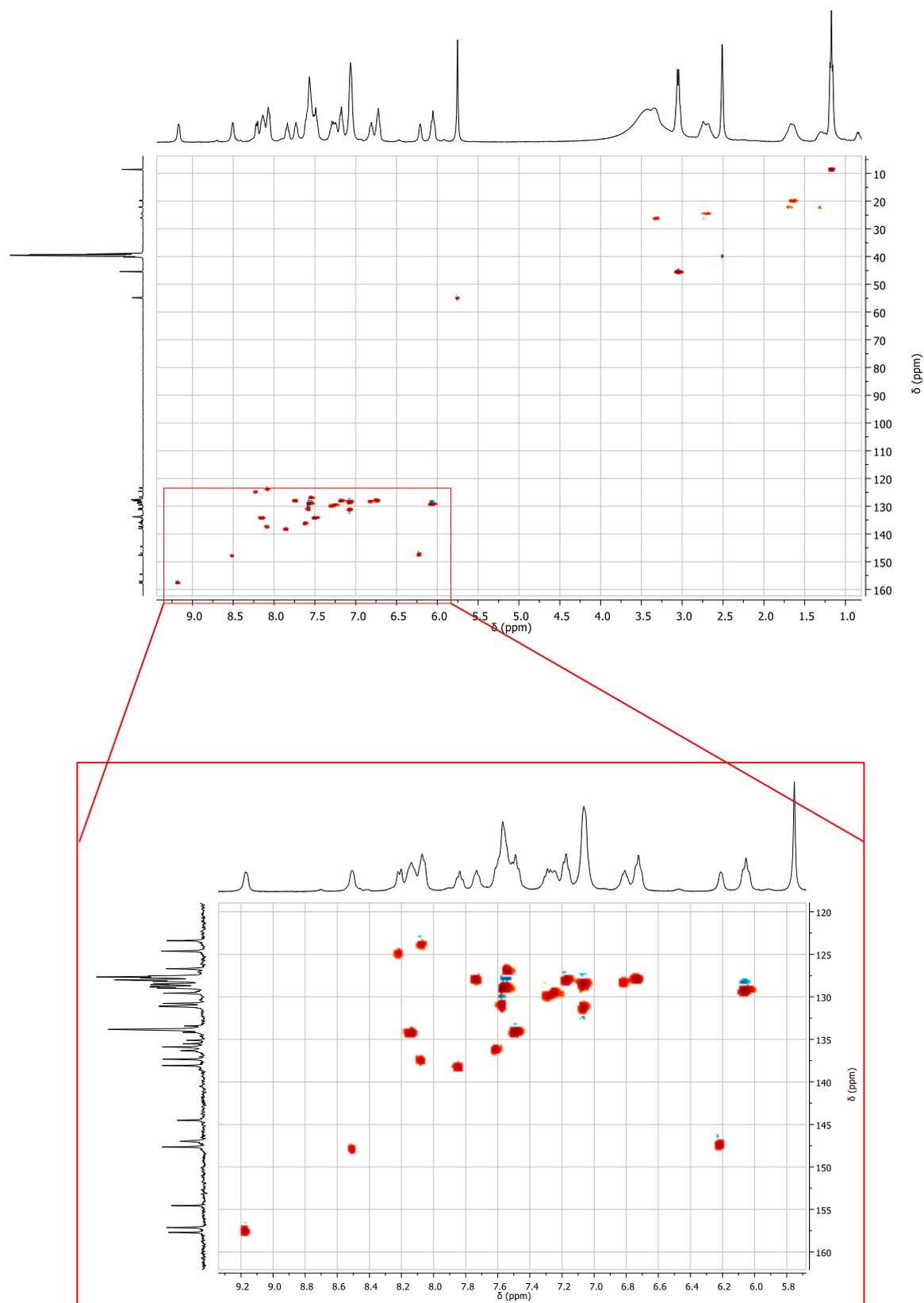


FIGURA A43 – Espectro de RMN - HSQC obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

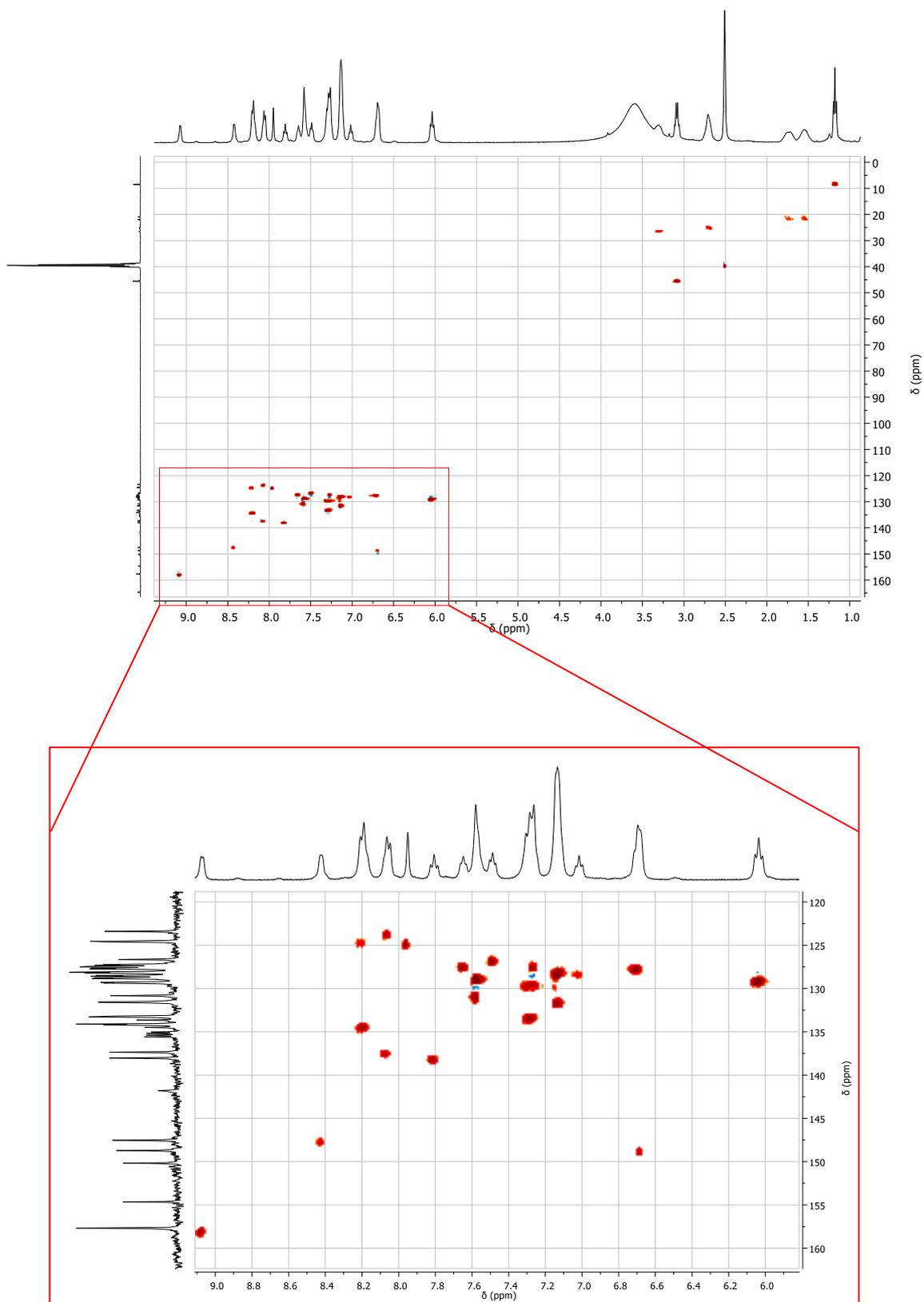


FIGURA A44 – Espectro de RMN - HSQC obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

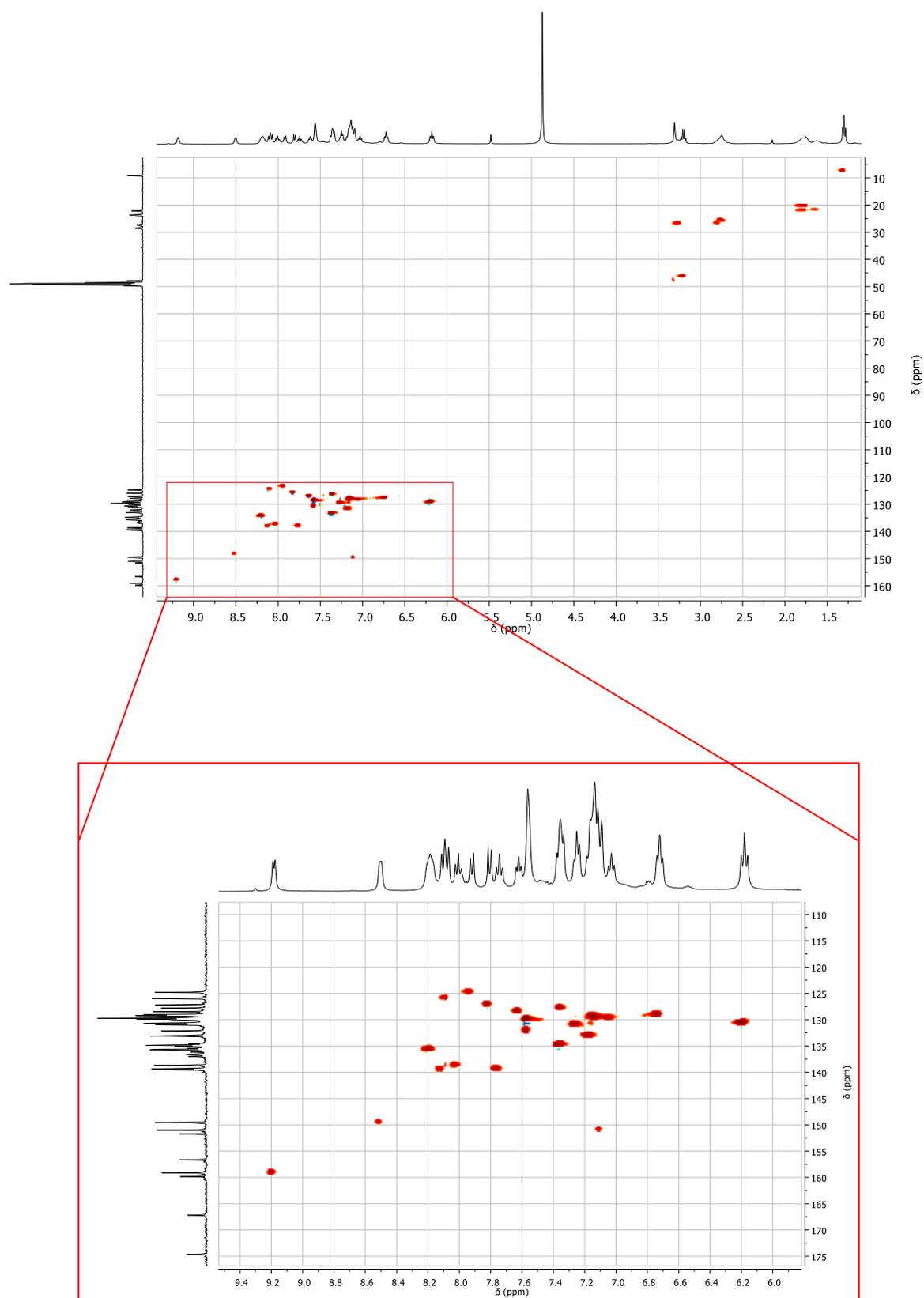


FIGURA A45 – Espectro de RMN - HSQC obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$.

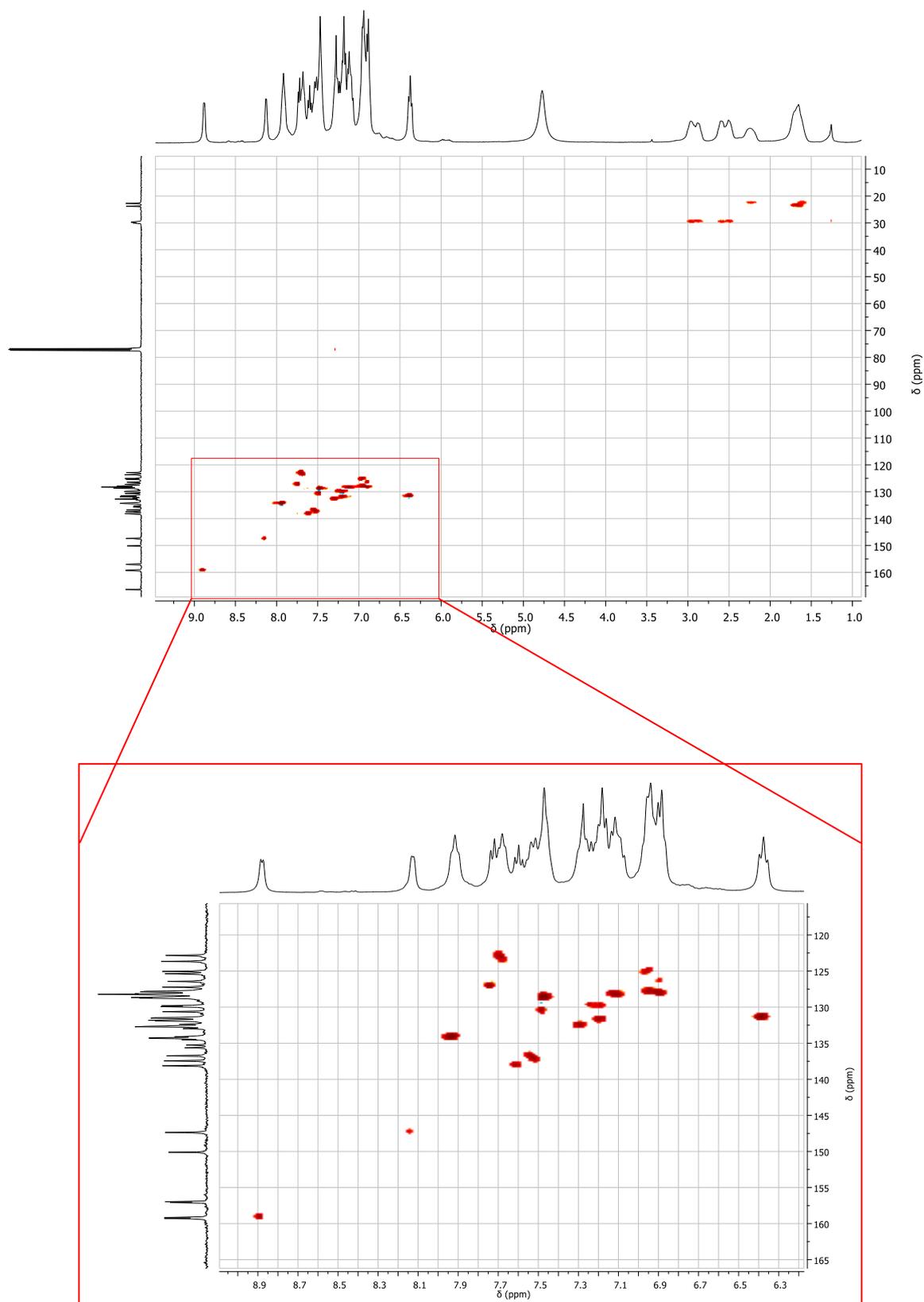


FIGURA A46 – Espectro de RMN - HSQC obtido para o complexo $[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF_6$ em $CDCl_3-d$.

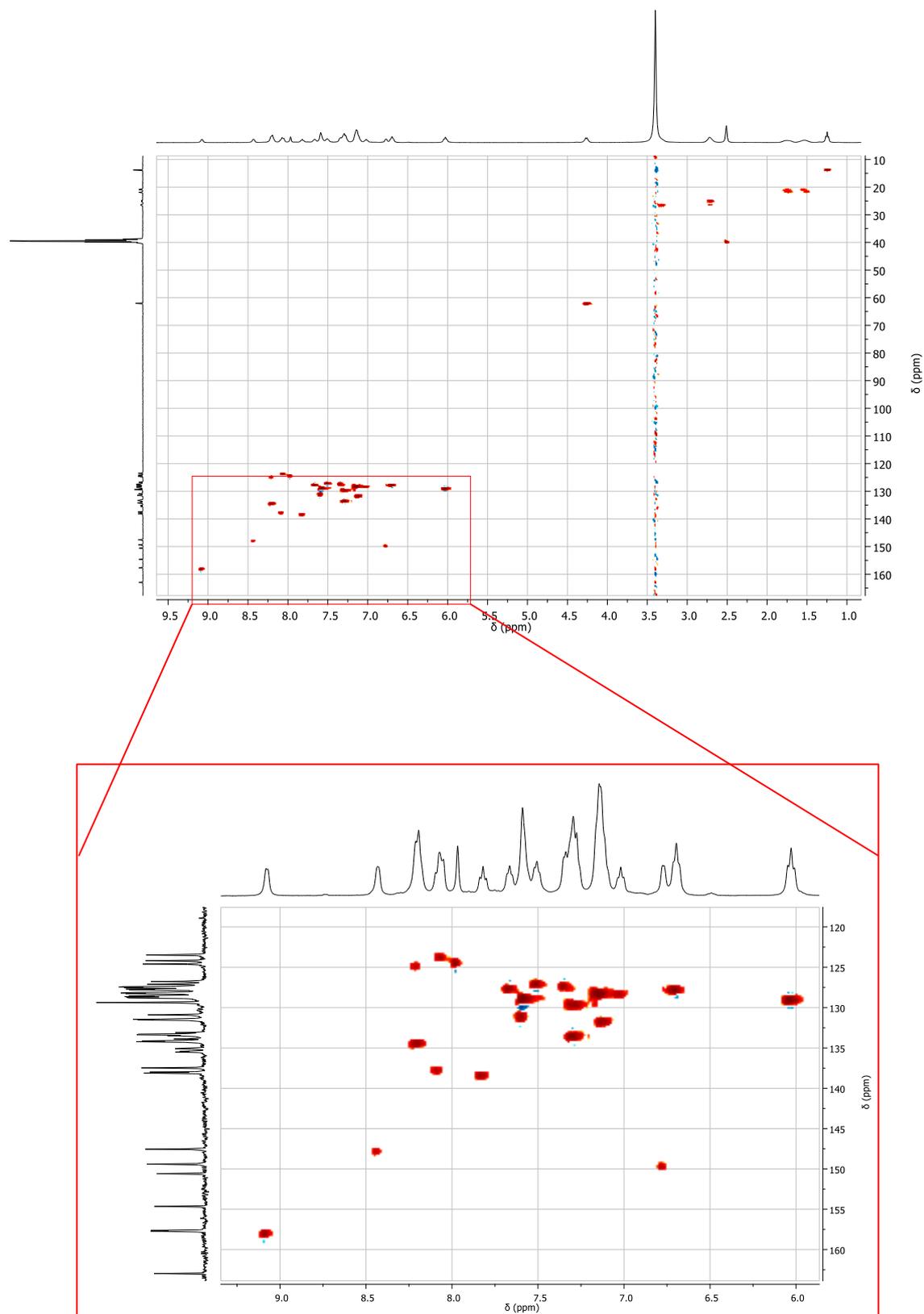


FIGURA A47 – Espectro de RMN - HSQC obtido para o complexo [Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF₆ em DMSO-d₆.

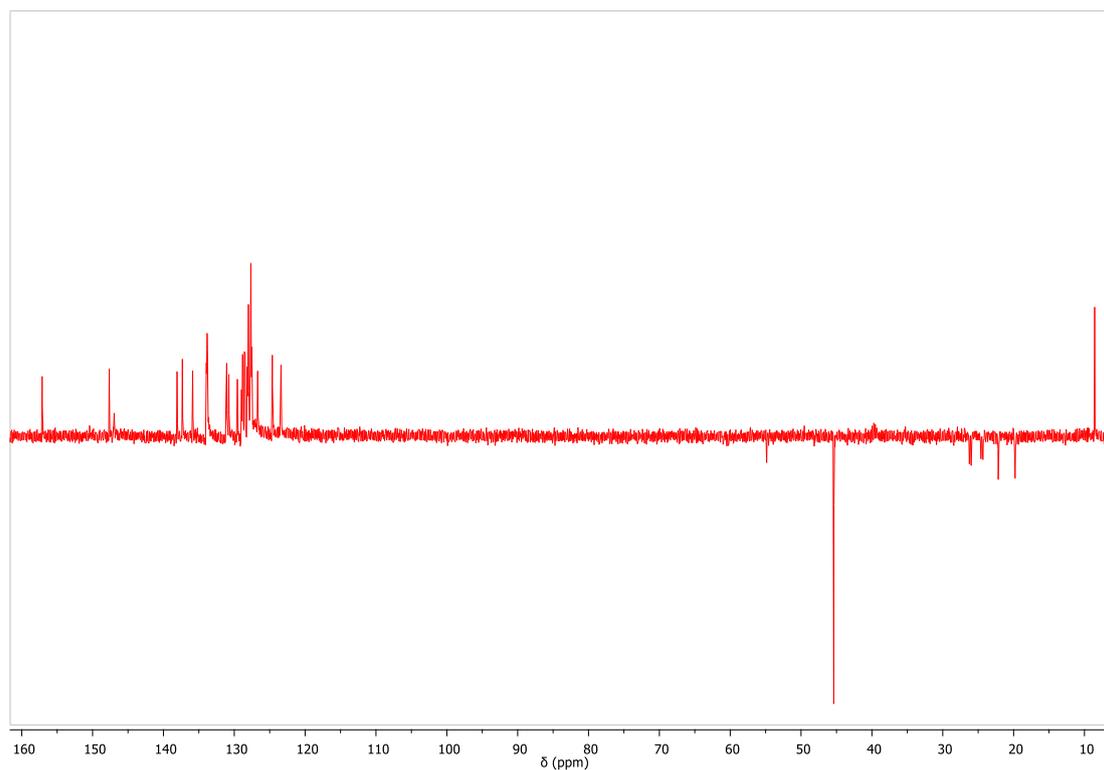


FIGURA A48 – Espectro de RMN – DEPT – 135 obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,3)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

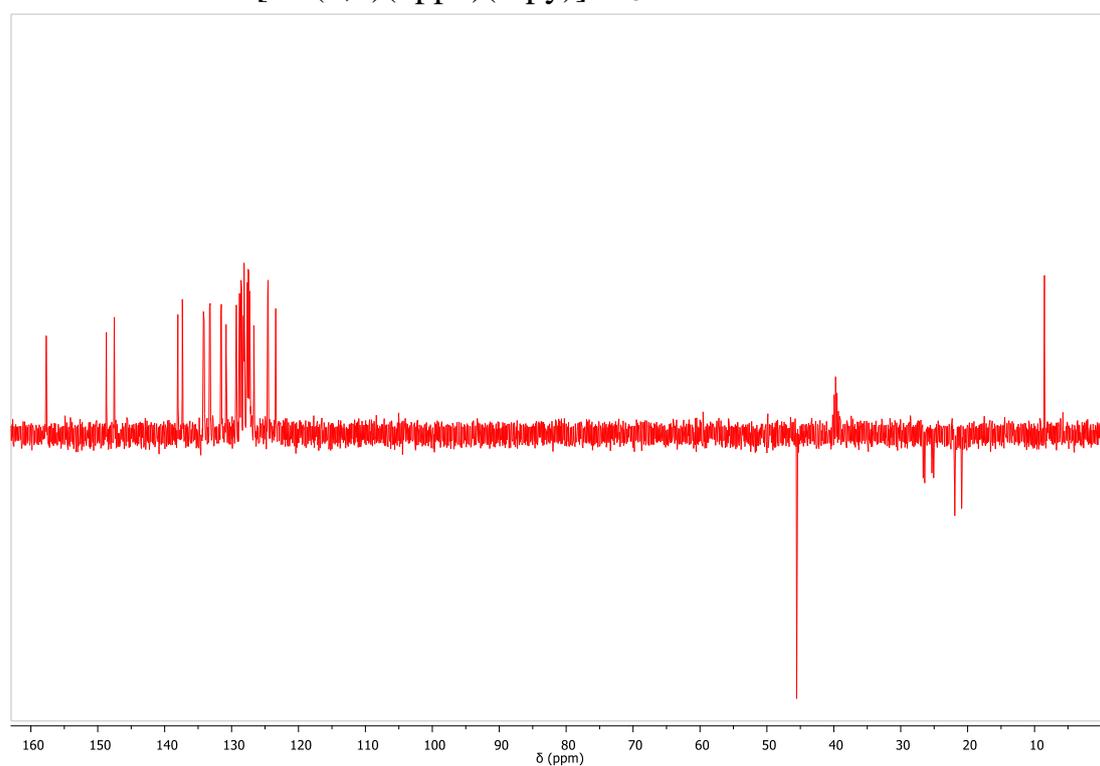


FIGURA A49 – Espectro de RMN – DEPT – 135 obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

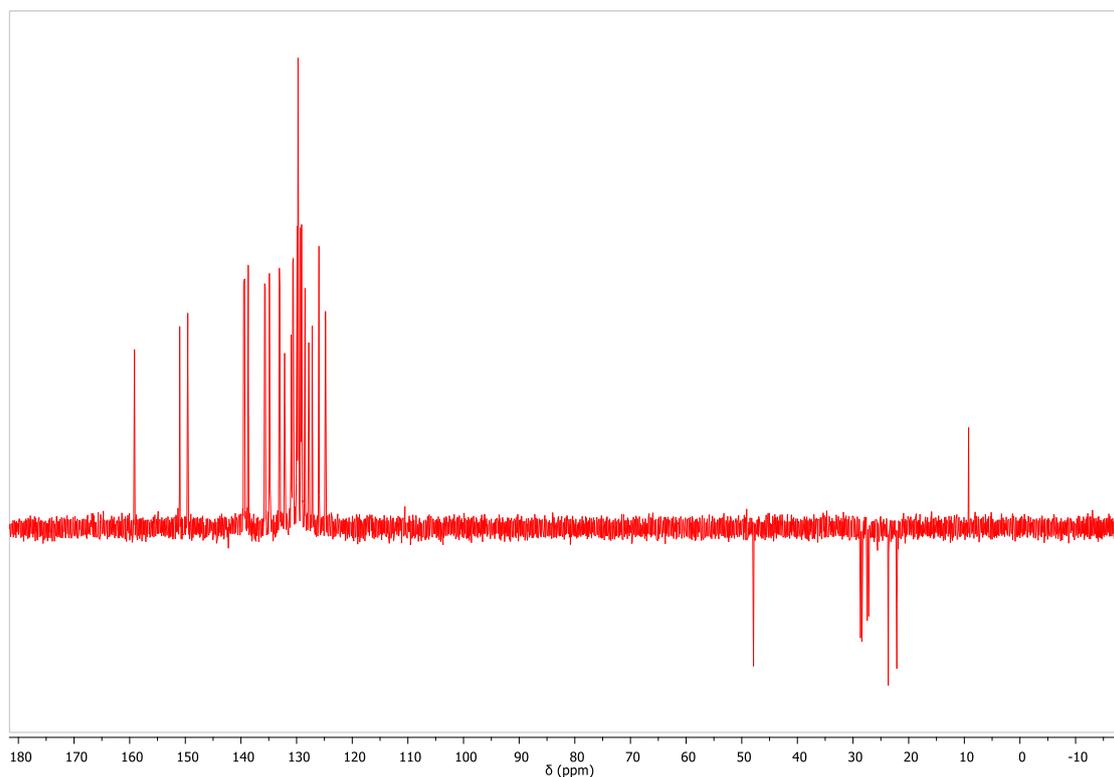


FIGURA A50 – Espectro de RMN – DEPT – 135 obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,5)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$.

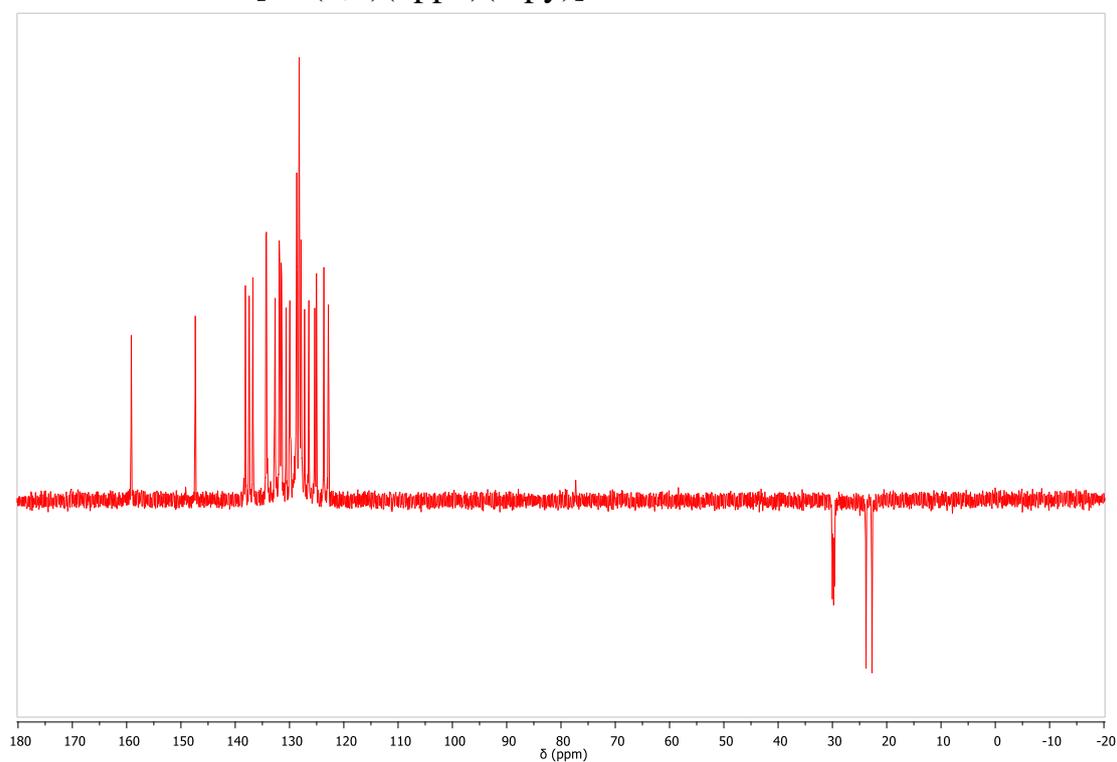


FIGURA A51 – Espectro de RMN – DEPT – 135 obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,6)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em CDCl_3-d .

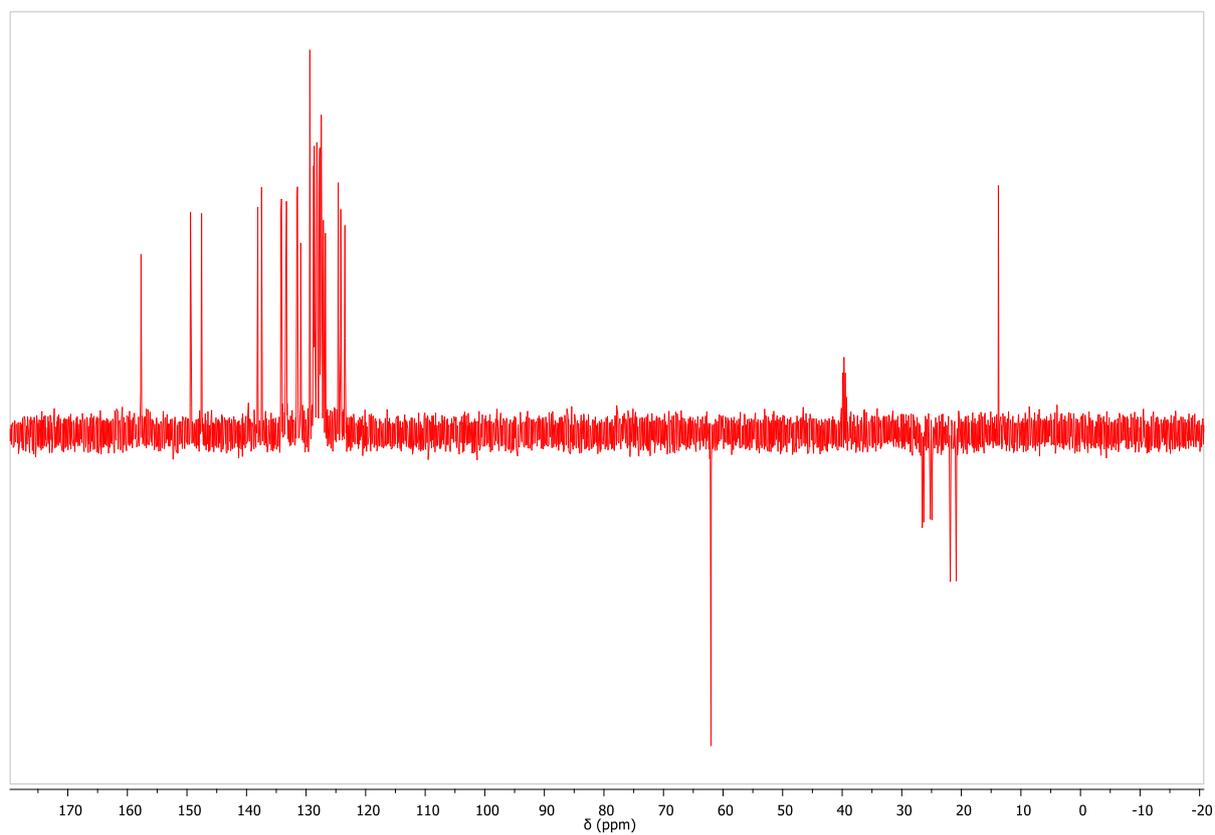


FIGURA A52 – Espectro de RMN - DEPT – 135 obtido para o complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO-d_6 .

TABELA A1 – Parâmetros cristalográficos obtidos para as estruturas de raios X

Complex	[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF ₆	[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF ₆	[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF ₆
Empirical formula	C45 H40 F6 N2 O2 P3 Ru	C47 H47 Cl4 N3 O6 P2 Ru	C47 H44 F6 N3 O4 P3 Ru
Formula weight	948.77	1054.68	1022.83
Temperature (K)	293(2)	293(2)	296(2)
Wavelength (Å)	0.71075	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
Space group	C2/c	P 21/n	P 21/n
a (Å)	40.71(2)	17.737	13.5648(3)
b (Å)	15.001(9)	12.587	12.9392(4)
c (Å)	14.658(9)	20.703	28.2343(8)
a (°)	90	90	90
b (°)	95.496(7)	90.89	100.559(10)
g (°)	90	90	90
Volume (Å ³)	8910(9)	4621.5	4871.7(2)
Z	8	4	4
Density (calculated) (Mg/m ³)	1.415	1.516	1.395
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.523	0.692	0.487
F(000)	3864	2160	2088
Crystal size (mm ³)	0.260 x 0.260 x 0.200	? x ? x ?	0.210 x 0.100 x 0.090
Theta range for data collection	1.977 to 27.485°	2.965 to 26.359°	1.811 to 25°
Index ranges	-52<=h<=52, -19<=k<=19, -18<=l<=18	?<=h<=?, ?<=k<=?, ?<=l<=?	-12<=h<=14, -14<=k<=14, -31<=l<=31
Reflections collected	39930	?	73392
Independent reflections	10192 [R(int) = 0.0614]	9425 [R(int) = ?]	6755 [R(int) = 0.0700]
Completeness to theta = 25°	100.0 %	99.8 %	99.7 %
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	10192 / 0 / 563	9425 / 0 / 568	6755 / 0 / 632
Goodness-of-fit on F ²	1.140	1.043	1.070
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0563, wR2 = 0.1403	R1 = 0.0519, wR2 = 0.1359	R1 = 0.0396, wR2 = 0.1084
R indices (all data)	R1 = 0.0744, wR2 = 0.1610	R1 = 0.0629, wR2 = 0.1450	R1 = 0.0582, wR2 = 0.1217
Extinction coefficient	0.00268(15)	n/a	0.00068(13)
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.848 and -0.938	2.234 and -0.584	0.814 and -0.263

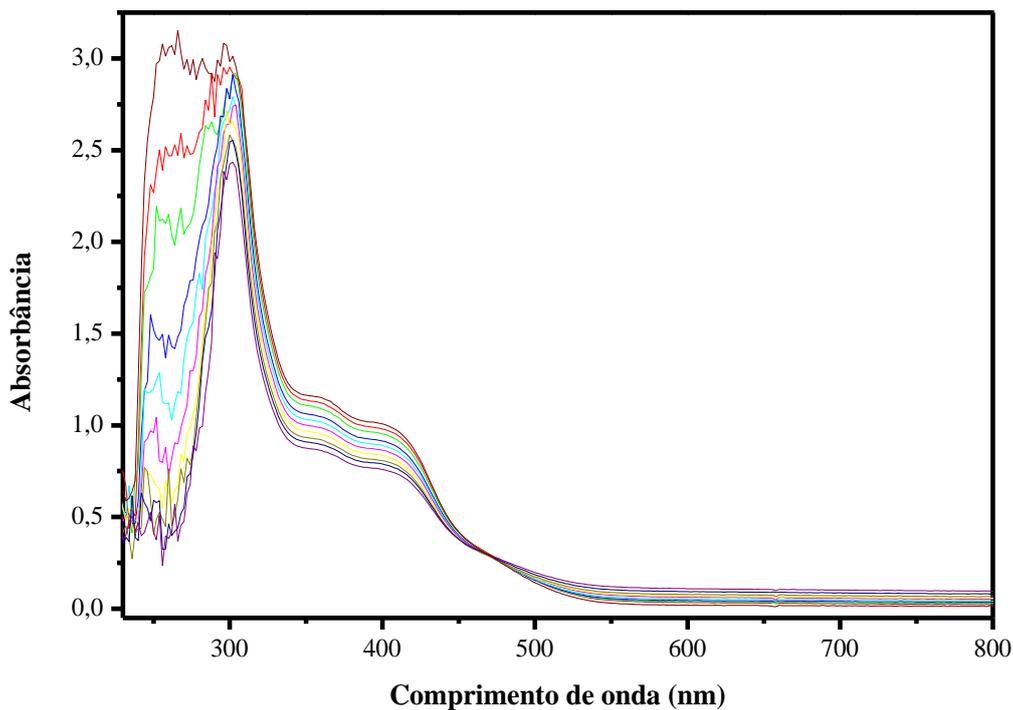


FIGURA A 53 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo $[Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF_6$ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.

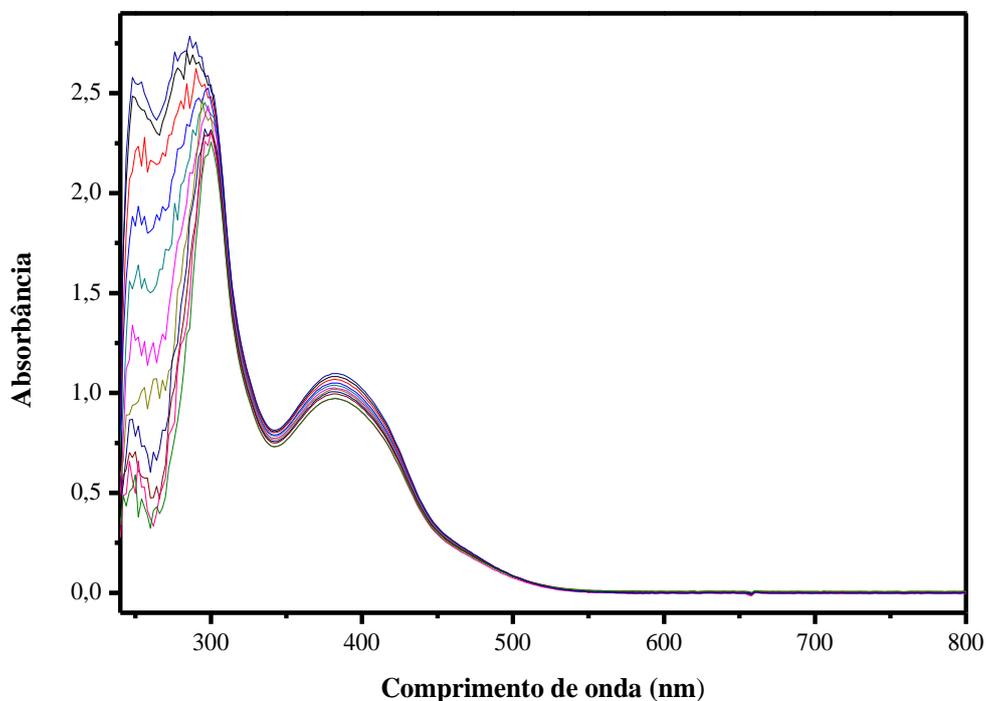


FIGURA A54 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo $[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF_6$ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.

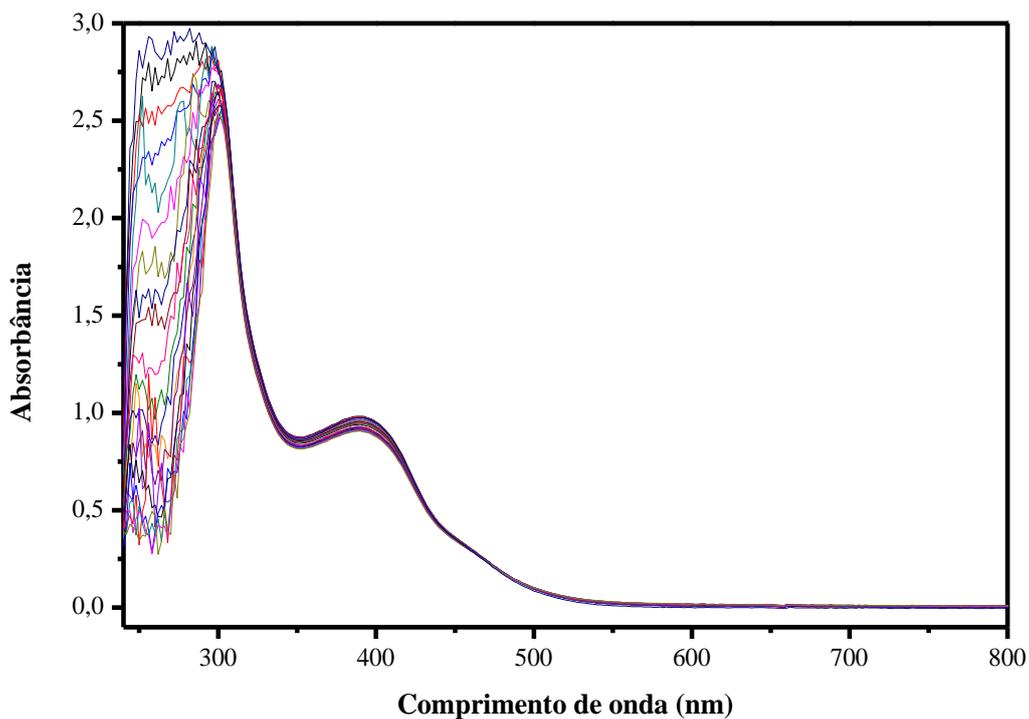


FIGURA A55 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo $[Ru(2,6)(dppb)(bipy)]PF_6$ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.

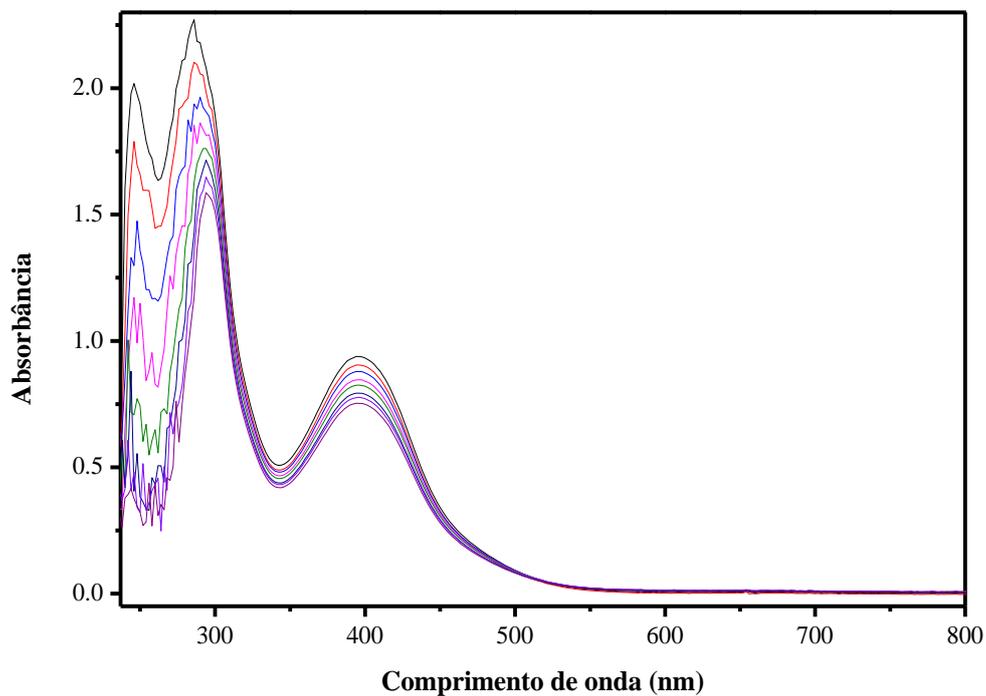


FIGURA A56 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do complexo $[Ru(2,4e)(dppb)(bipy)]PF_6$ com a adição de sucessivas alíquotas de DNA.

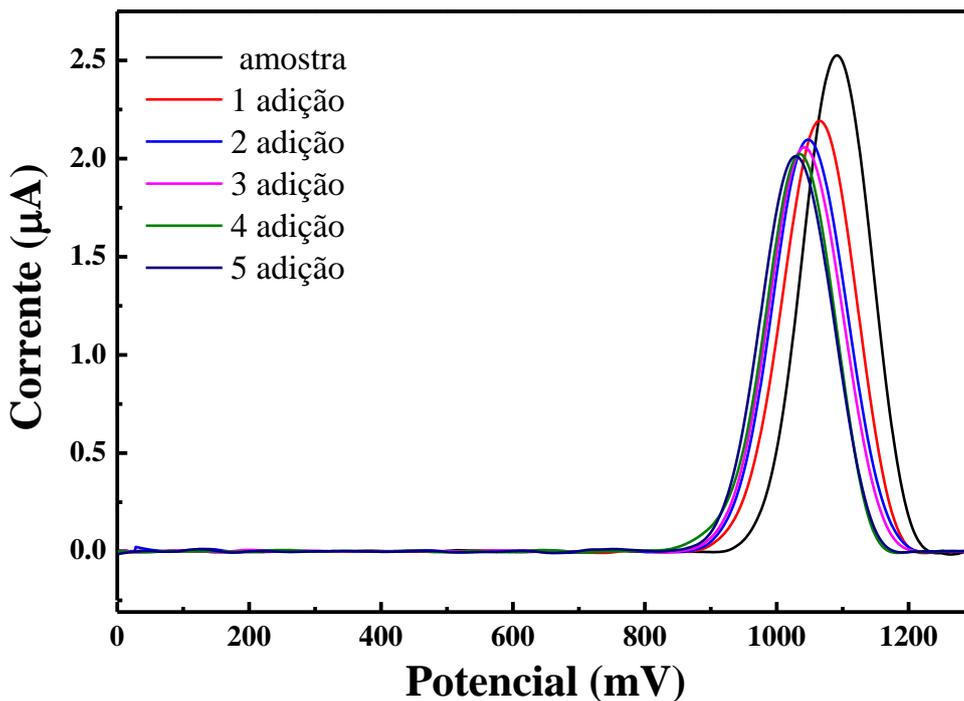


FIGURA A57 – Voltametria de onda quadrada do complexo [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ em diferentes quantidades de *ct*-DNA.

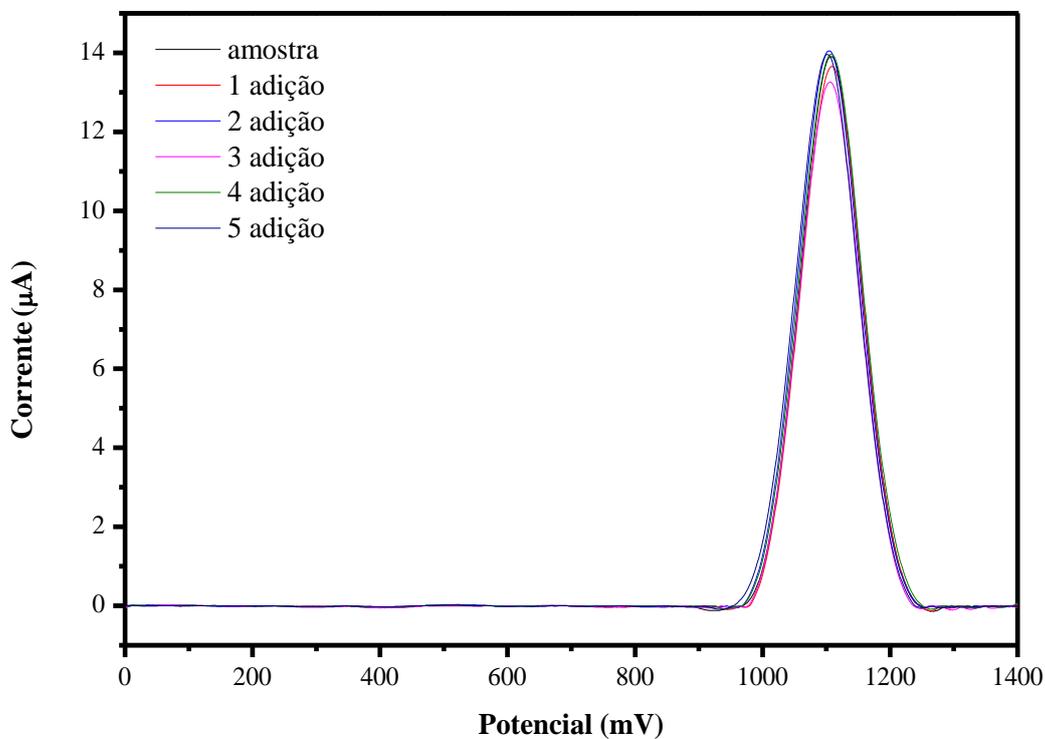


FIGURA A58 – Voltametria de onda quadrada do complexo [Ru(2,3)(dppb)(bipy)]PF₆ em diferentes quantidades de *ct*-DNA.

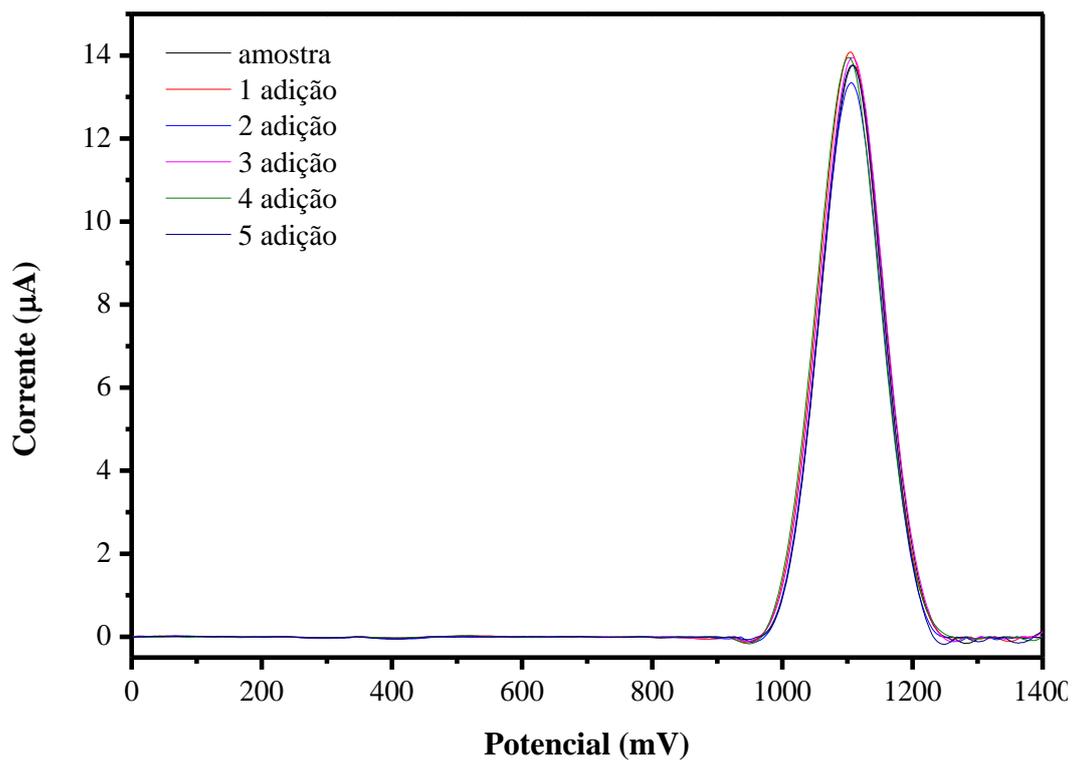


FIGURA A59 – Voltametria de onda quadrada do complexo $[Ru(2,4)(dppb)(bipy)]PF_6$ em diferentes quantidades de *ct*-DNA.

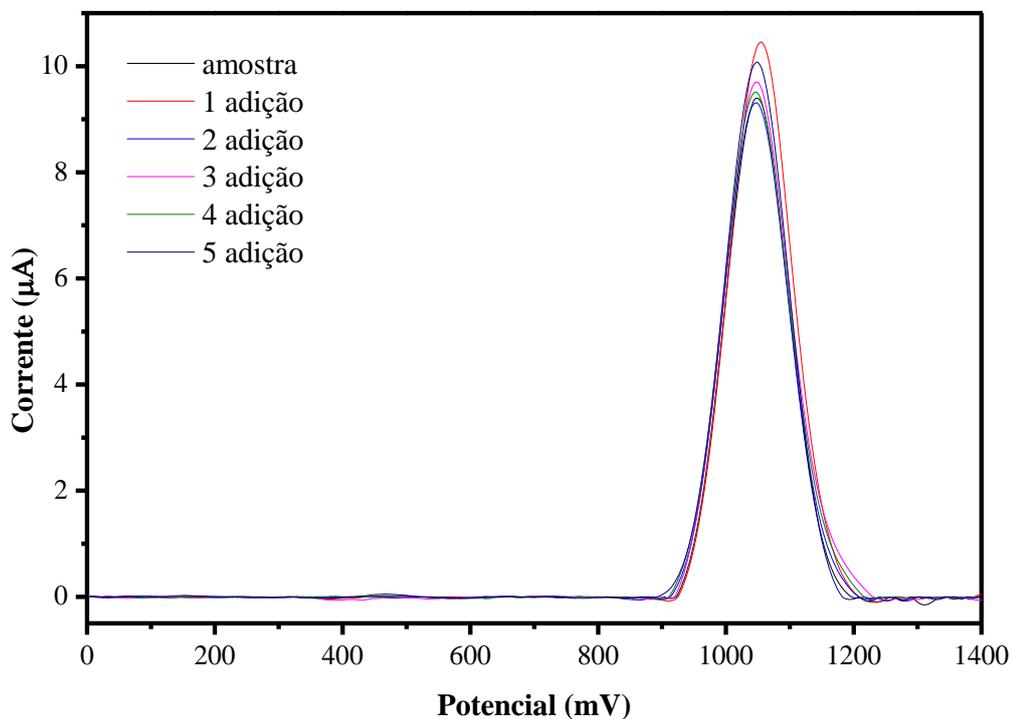


FIGURA A60 – Voltametria de onda quadrada do complexo $[Ru(2,5)(dppb)(bipy)]PF_6$ em diferentes quantidades de *ct*-DNA.

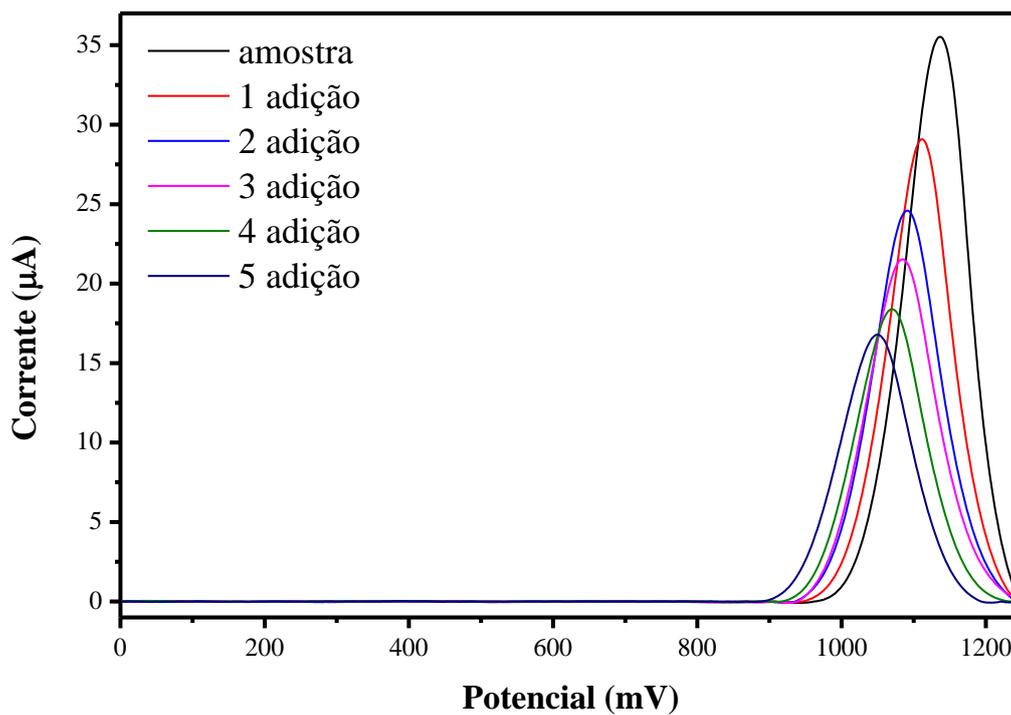


FIGURA A61 – Voltametria de onda quadrada do complexo $[\text{Ru}(2,4\text{e})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em diferentes quantidades de *ct*-DNA.

ANEXO

Parte deste trabalho foi publicado na revista *Inorganic Chemistry Frontiers*, e pode ser consultado no arquivo a seguir.⁷¹

RESEARCH ARTICLE

Esterification of the free carboxylic group from the lutidinic acid ligand as a tool to improve the cytotoxicity of Ru(II) complexes†

Cite this: DOI: 10.1039/c8qi00941d

João Honorato,^{Q2} ^{ID}*^a Legna C. A. Vegas,^{ID}^a Rodrigo S. Correa,^b Adriana P. M. Guedes,^b Marcelo Miyata,^c Fernando R. Pavan,^c Javier Ellena^{ID}^e and Alzir A. Batista^{*a,f}

In this study, we report on the selective esterification of the carboxyl group in a coordinated ligand based on the Fischer reaction. The new [Ru(N–O)(bipy)(dppb)]PF₆ complex **1** was used as a precursor to obtain the ester derivative [Ru(N–Oet)(bipy)(dppb)]PF₆ (**2**), and in order to establish the influence of either the free carboxyl group or the ethoxycarbonyl group on biological properties, the [Ru(pic)(bipy)(dppb)]PF₆ complex (**3**) was synthesized for comparison (dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane, bipy = 2,2'-bipyridine, N–O = mono-deprotonated 2,4-pyridinedicarboxylic acid, N–O_{et} = 4-ethoxycarbonyl-2-pyridinedicarboxylic acid). All three complexes interact weakly with human serum albumin (HSA) with *K_b* values ranging from 10¹–10⁴ M⁻¹, suggesting a spontaneous interaction with this protein by electrostatic (**1–2**) or van der Waals interactions (**3**). Moreover, complex/DNA-binding experiments indicate that complexes **2** and **3** interact weakly with DNA, while no interaction is observed between complex **1** and DNA, probably due to the repulsion involving the free carboxylate group/DNA-phosphate. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) activity and cytotoxicity assays against one normal cell line V79 (hamster fibroblast) and three human cancer cell lines A549 (lung), MCF7 and MDA-MB-231 (breast) revealed that complexes **2** and **3** exhibit good activity against MTB and tumor cells, presenting high cytotoxicity (low IC₅₀). On the other hand, complex **1** is practically inactive. Therefore, the best biological results found for complex **2** can be attributed to its esterification, improving the lipophilicity and cellular uptake, in order to facilitate its passive permeation through the tumor cell membranes allowing for cell death, as well as DNA and HSA interactions, when compared with complex **1**.

Received 4th September 2018,
Accepted 25th October 2018

DOI: 10.1039/c8qi00941d

rsc.li/frontiers-inorganic

Introduction

One of the biggest challenges of the scientific community is to develop new drugs to treat diseases that affect humanity. In

2017, the FDA (*Food and Drug Administration*) approved only 46 new drugs.¹ Almost half of them are used in oncology (24%) and for infectious diseases (14%), areas increasingly requiring new drugs due to the constant development of drug resistance of these diseases or the side effects of many current commercial drugs.² Recently, one specific group of compounds, known as metallodrugs, has been developed aiming to treat cancer, mainly after the success of cisplatin, stimulating the search for other metal compounds that could be effective in cancer treatment, with low or without toxicity.^{3–6}

In this scenario, ruthenium-based complexes have been one of the main protagonists, because some of them show great potential as anticancer agents,^{5,7–13} with effectiveness against metastasis and with high cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*, against a wide range of tumors, also showing good activity against infectious diseases,¹⁴ such as tuberculosis,^{15–19} malaria,^{20–23} Chagas-disease^{24–27} and leishmaniasis.^{27–29} An advantage of ruthenium complexes is that they display properties that can benefit their biological activity, such as the

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, CP 676, CEP 13561-901 São Carlos, SP, Brazil

^bDepartamento de Química, ICEB, Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, CEP 35400-000 Ouro Preto MG, Brazil

^cFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^dDepartamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, CP 676, CEP 13561-901 São Carlos, SP, Brazil

^eInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, CP 369, CEP 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^fInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás – UFG, CEP 74690-900, Goiânia, Goiás, GO, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1584793 (**1**) and 1584809 (**2**). For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format, see DOI: 10.1039/c8qi00941d

interaction with transporter blood proteins (albumin and transferrin),^{30,31} and different DNA-binding types, among other properties, which may make them a promising class of metallodrugs.^{32–38} Many reports involving ruthenium complexes have been published describing their interactions with blood proteins, precisely because this interaction facilitates the complex transportation, increasing their solubility in blood plasma, providing protection to complexes against premature degradation or elimination and leading to the initiation of cell death mechanisms.^{3,39,40}

When designing new potential drugs, the exchange of functional groups may directly interfere with the biological activity of the compounds. Based on the models described in the literature, the biochemical behavior of metal complexes can be optimized by knowing the structural characteristics of drugs with proven pharmaceutical efficacy.⁴¹ Mimicking the structure of natural products using metal complexes has been a good strategy to improve the biological profile, such as antitumor activity. For instance, Megger's research group has used staurosporine as a lead structure to obtain potent organometallic inhibitors for GSK-3, Pim-1, MSK-1, PAK-1 and PI3K kinases.^{42,43} The rational design and optimization of new molecules not only intend to reproduce the biological activity, but also enable us to study how these structural changes can interfere with the properties of the compounds (solubility, biomolecule binding, lipophilicity and others) and establish new biomolecular targets.⁴⁴ In recent years, our research group has studied the chemical and biological properties of ruthenium complexes containing phosphines and diimines as ligands (Fig. 1), investigating their applications in the medicinal chemistry areas, such as oncology and neglected diseases. Previous papers published by us have described the efficacy of ruthenium complexes with diimine, phosphine and picolinate ligands against cancer cells and *Mycobacterium tuberculosis*, where they showed strong *in vitro* and *in vivo* activities against tuberculosis, including multidrug-resistant bacteria,^{17,18,45,46}

and they are the compounds cited in the Global Tuberculosis Report 2017.⁴⁷

As part of our ongoing efforts to obtain new ruthenium complexes endowed with biological activity and attempting to understand the influence of functional groups on the activity of this kind of complex, such as carboxyl and ester, substituted with the picolinate ligand, this paper reports on the reactivity of lutidinic acid (2,4-pyridinedicarboxylic acid) with Ru(II)/phosphine/diimine precursor (Fig. 1). To the best of our knowledge, this is the first time that esterification of the free carboxyl group of a coordinated lutidinic acid molecule has been reported in the literature. The complexes were characterized by FT-IR, multinuclear NMR spectroscopy, cyclic voltammetry and X-ray diffraction experiments. Afterwards, we study the interaction of new complexes with DNA, by viscosity measurements, and electrochemical and spectroscopy titration, and their interaction with HSA by fluorescence quenching. Moreover, the cytotoxicity of the complexes against four cell lines (V79, MCF-7, MDA-MB231 and A549), the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and the influence of lipophilicity on the complexes were evaluated, regarding their biological results.

Results and discussion

Synthesis

The complex $[\text{Ru}(\text{N}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**1**) [$\text{N}-\text{O}$ = 2,4-pyridinedicarboxylic acid; dppb = 1,4-bis(diphenylphosphine)butane] was synthesized from the precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$,⁴⁸ by substituting the chlorido ligands with lutidinic acid, as indicated in Scheme 1. The addition of triethylamine to the solution was needed to facilitate the deprotonation of the carboxyl group adjacent to the nitrogen (more acidic), favoring the ligand coordination to the metal center. The triethylammonium chloride formed precipitates in dichloromethane solution, which are easily removed from the solution by filtration. The complex $[\text{Ru}(\text{N}-\text{O}_{\text{Et}})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (**2**) ($\text{N}-\text{O}_{\text{Et}}$ = 2,4-pyridinedicarboxylic acid esterificated) was synthesized from complex **1** by Fischer esterification by adding sulfuric acid to an ethanolic solution, leading to the esterification of free carboxylic acid. In this esterification process, ethanol acts as a solvent and an esterifying agent (see Scheme 1). It should be highlighted that, even in the presence of sulfuric acid (strong acid), the reaction proceeds without labilization of any ligand or change in the stereochemistry of the complex, or change in the oxidation state of the ruthenium center, obtaining 100% of esterification of the free carboxyl group after 12 hours. The compound $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (pic = picolinic acid) (**3**), which is already described in the literature,¹⁷ was also synthesized. In light of the structures of the obtained complexes, it is expected that it will be possible to evaluate the influence of the free carboxyl group (**1**), its esterification (**2**) and the absence of substituents on the ring of the ligand (**3**) on the chemical and biological properties of this kind of complex.

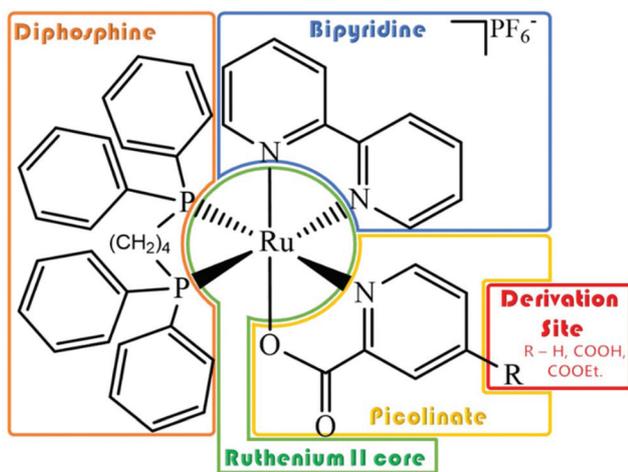
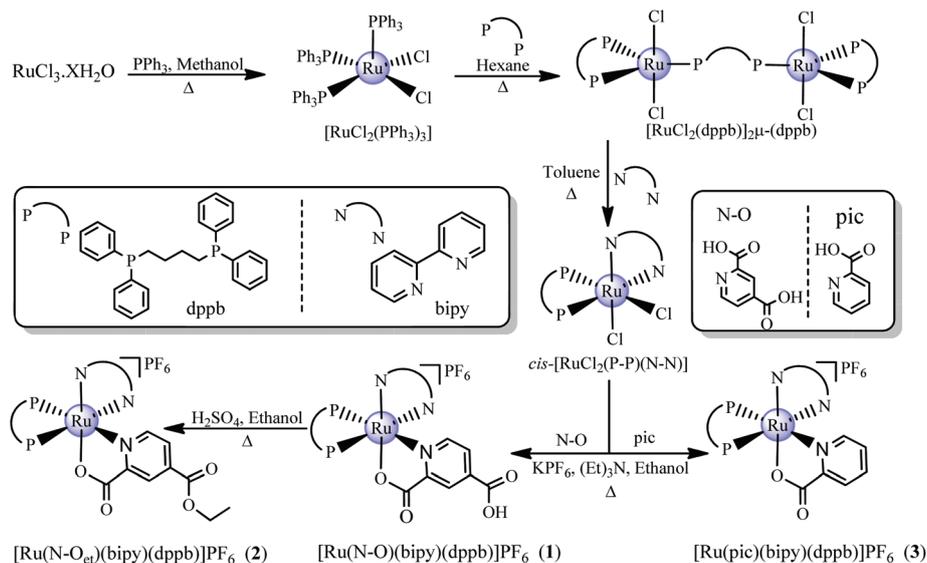


Fig. 1 Design of Ru(II) complexes with diimine, diphosphine and picolinate ligands.



Scheme 1 Reaction path to obtain the complexes from ruthenium salt until the final products.

Characterization

Infrared spectroscopy. IR spectra of the free ligands were compared with those of the obtained complexes to confirm not only the ligand coordination, but also their coordination mode to the metal center. The displacement of some bands of lutidinic acid, including the asymmetric and symmetric vibrations of the carboxylic group, is good evidence of the ligand coordination by the carboxylate group. Comparing the intensity of the $\nu(COOH)$ (1700 cm^{-1}) stretching vibration of the free lutidinic acid and after its coordination to the metal center, it can be observed that the intensity of this band decreases due to the differentiation of carboxyl groups found in the lutidinic acid, where one is free and another one is coordinated to the ruthenium center.

Considering the shift in the asymmetric stretching of $\nu_{as}(COO^-)$ vibrations, moving to higher energy regions, the $\Delta\text{ cm}^{-1}$ values for the complexes become higher than those calculated for the free ligands, as seen in Table 1. Thus, the coordination of the ligands' carboxyl group to the ruthenium metal in monodentate mode could be confirmed from the IR spectra in relation to the $\Delta\text{ cm}^{-1}$ of the free carboxylate ion, for the synthesized complexes. The presence of $\nu(C=O_{ester})$ bands relative to the carboxylic ester (1292 and 1117 cm^{-1} , respect-

ively) is also observed in the IR spectrum of complex 2, confirming the esterification of the free (uncoordinated) carboxylic acid. All complexes show two bands of the $\nu(Ru-P)$ vibration concerning the asymmetrical and symmetrical stretching of phosphorus–ruthenium bands around $520\text{--}507\text{ cm}^{-1}$. Other bands were observed in the region from $420\text{--}418\text{ cm}^{-1}$, characteristic of the vibration $\nu(Ru-N)$ of bipyridine and $\nu(Ru-O)$ of the lutidinic acid. Both complexes display characteristic bands attributed to $\nu(P-F)$ and $\delta(P-F)$ for the counter-ion PF_6^- .⁴⁹

Electrochemical study. The electrochemical behavior of the complexes was studied based on the oxidation potential shift $Ru(II)/Ru(III)$ upon substitution of the two chlorido (good σ and π -donor) by a pyridine derivative ligand (σ/π donor and π -acceptor), such as lutidinic acid. As a result, the oxidation potential of the new complexes increases, when compared with the precursor, as shown in Table 1. Cyclic voltammograms of the complexes exhibit a quasi-reversible process assigned to the $Ru(II)/Ru(III)$ one-electron couple, with E_{pa} ranging from 1.30 to 1.41 V (Table 1). As expected, the $E_{1/2}$ values found, for the new complexes, are higher than those reported in the literature for the $cis-[RuCl_2(dppb)(bipy)]$ precursor, at approximately 0.6 V , indicating that the metal center is more stable in the new complexes than in the precursor.¹⁷

Table 1 Vibrational frequencies (cm^{-1}) of the carboxylate group in the free and coordinated ligand, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ shift NMR and electrochemical data (dichloromethane – 1.0 mM of PTBA)

Compound	$\nu_{as}(COO^-)$ (cm^{-1})	$\nu_s(COO)$ (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	$\delta\text{ }^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^2J_{P-P}$ (Hz)	E_{pa} (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE_p (V)
N-O $[RuCl_2(dppb)(bipy)]^a$	1609	1415	195	—	—	—	—	—
1	1658	1313	345	42.2; 30.5	32.6	0.74	0.68	0.12
2	1661	1322	329	38.9; 37.3	32.7	1.30	1.26	0.07
				38.1; 37.1	32.6	1.41	1.33	0.16

^a Taken from ref. 48.

NMR spectroscopy. The ^1H NMR spectra of complexes **1** and **2** show characteristic doublets at 9.2 and 8.5 ppm, respectively, corresponding to the *ortho* hydrogen atoms of the bipyridine ligand. Furthermore, other signals related to aromatic hydrogens occur in the range of 6.0–8.4 ppm, which are attributed to the other protons present in the disphosphine, bipyridine and lutidinic acid. The aliphatic hydrogens of disphosphine display multiplets in the range of 1.5–3.0 ppm. Complex **2** presents two distinct signals, at 4.25 and 1.25 ppm, which can be attributed to the hydrogen atoms of the ethyl group of the carboxylic ester, which was confirmed by the ^1H COSY experiment, showing the vicinal coupling of this chemical group.

The ^{13}C NMR spectra of complexes **1** and **2** show two signals around 170 and 163 ppm, which are assigned to the carbon of the coordinated and free carboxyl group, respectively. The signal assigned to the free carboxyl group is close to the one observed in the free ligand (165 ppm) and the other is attributed to the coordinated carboxylate. This displacement may be attributed to the deshielding effect, showing evidence of the metal coordination to the ligands through the carboxyl group. In complex **2**, the signals around 62.0 and 13.8 are assigned to the carbon atoms of the CH_3 and CH_2 , respectively, of the ester formed after the esterification. In the spectra of complexes **1** and **2**, the aromatic carbon atoms were also identified in the range of 162–123 ppm, while the signals in the range of 20.9–22.6 ppm belong to the carbon atoms of the CH_2 of the butane group in the disphosphine ligand.

The $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ experiments show the presence of two doublet signals (AX spin systems) for coordinated phosphorus of each complex around 39 and 37 ppm, due to the magnetic non-equivalence of the two phosphorus atoms in the *cis* configuration, corresponding to the P *trans* N of bipyridine and P *trans* N of lutidinic acid. The chemical shifts and coupling constants ($^2J_{\text{P-P}}$) are shown in Table 1. All $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ spectra of complexes display septet signals of the PF_6^- anion at around –144 ppm, confirming the presence of the counter-ion in the compounds. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectroscopy was helpful to monitor the synthesis of complex **2** (Fig. 2) from **1**, where the consumption of

the precursor (δ 36.9 and 39.7 ppm) and the appearance of the product (δ 36.4 and 40.0 ppm) are clearly shown. After three hours of the reaction, the ratio of precursor/product was approximately 1 : 1. Within 12 hours, the full esterification of the free carboxyl group could be observed. The stability of the compounds was checked by $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR experiments using a mixture of trizma-HCl buffer [tris(hydroxymethyl)amino-methane hydrochloride] or RPMI medium, with DMSO (30%). As a result, no changes were observed in the spectra of complexes after 3 days of incubation at room temperature.

Mass spectroscopy. The MALDI-TOF/MS spectrum for complex **1** (see Fig. S15 in the ESI †) showed a signal corresponding to the loss of the hexafluorophosphate ion $[\text{M} - \text{PF}_6]^+$ (850.15 m/z , 100%) and its fragmentation, consecutively generating ions corresponding to the loss of lutidinic acid and the coordination to the calibrant (dihydroxibenzoic acid). For complex **2**, the loss of the hexafluorophosphate ion $[\text{M} - \text{PF}_6]^+$ generates the signal at 878.195 m/z (100%) and its fragmentation generates the product ion corresponding to the loss of the ethyl group of the ester, resulting in the corresponding fragmentations for complex **1**.

X-ray structure. The X-ray studies confirm the proposed structures for complexes **1** and **2**, showing the presence of lutidinic acid, 2,2'-bipyridine and bisphosphine ligands coordinated to the central metal, forming slightly distorted octahedral geometries. Crystallographic data revealed that both complexes crystallized in the monoclinic space groups $C2/c$ and $P2_1/n$, respectively, in the presence of the anionic counterion hexafluorophosphate in the asymmetric unit. The lutidinic acid coordinated to the ruthenium in a bidentate mono-anionic form, *via* nitrogen and oxygen of the adjacent carboxylic group, forming a five membered chelate ring $\text{N}_3\text{-Ru-O}_1$. Another important role of the X-ray experiments is to confirm esterification of lutidinic acid. The Ru–P, Ru–O and Ru–N bond lengths are shown in Table 2. The Ru– N_3 bond lengths (N_3 = nitrogen of lutidinic acid) and Ru– N_1 (N_1 = nitrogen bipyridine *trans* phosphorus) are slightly larger than the Ru– N_2 bonds (N_2 = *trans* nitrogen oxygen), due to the *trans* effect, caused by the phosphorus atom of the phosphine ligand. The molecular structures of both complexes with the numbering schemes are shown in Fig. 3. The crystallographic data are summarized in Table S1 of the ESI † .

A useful tool used to explore the intermolecular interactions of complexes in the solid state is the Full Interaction Map in

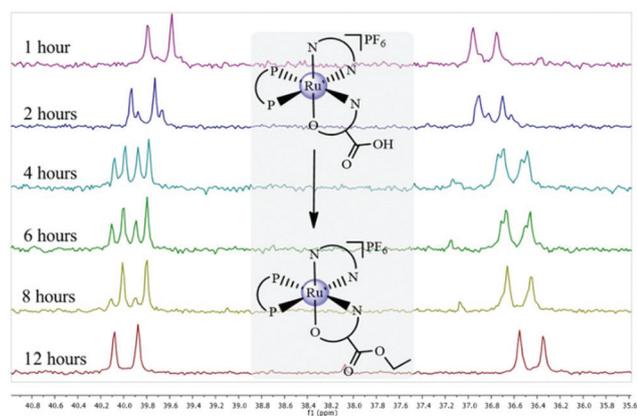


Fig. 2 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ spectra of the esterification reaction of complex **1** (D_2O capillary).

Table 2 Bond lengths for complexes **1** and **2** and precursor $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{bipy})\text{Cl}_2]$

Bond length (Å)	1	2	Precursor ^a
Ru– N_1	2.095	2.095	2.097
Ru– N_2	2.064	2.077	2.088
Ru– N_3	2.114	2.126	—
Ru– P_1	2.325	2.370	2.331
Ru– P_2	2.320	2.328	2.279
Ru– O_1	2.118	2.101	—

^a Taken from ref. 48.

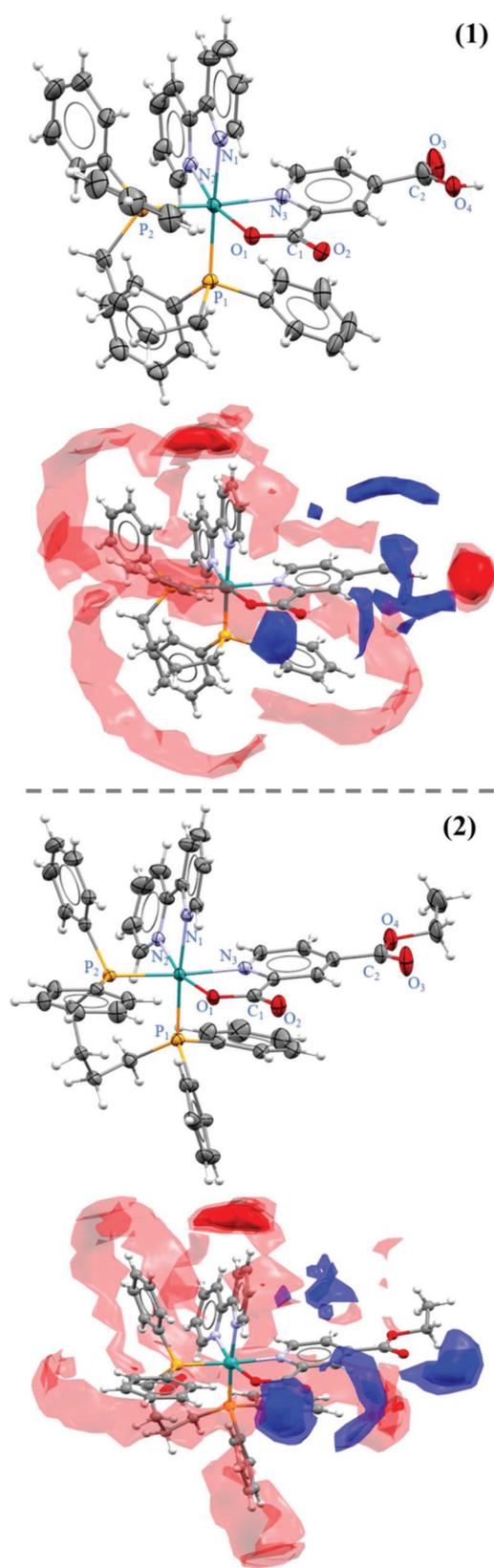


Fig. 3 Crystal structure and full interaction maps of 1 and 2, with labeled selected atoms. The counter-ion PF_6^- was omitted and the ellipsoids are represented at 30% of probability.

the Mercury program,⁵⁰ which is based on a library of molecular interactions of organic groups derived from thousands of crystal structures deposited in the Data Cambridge Structural Database (CSD).⁵¹ The program maps the space around the surface of the crystalline structure showing the regions preferred for interaction with specific organic groups, considering factors such as steric hindrance.⁵² Thus, the program describes the areas of complexes capable of making hydrogen bonds donate or receive, and showing the hydrophobic groups present. The hydrogen bond acceptor regions are marked in red while the blue regions act as hydrogen bonding donors and the maps were created using carbonyl/oxygen and uncharged (NH) nitrogen probes.

In Fig. 3, the intermolecular interaction maps show the oxygen atoms of the carboxyl group acting as a hydrogen bond donor, while the aromatic hydrogens are primarily hydrogen bond acceptors. Comparing the complexes, the free unprotonated carboxylic group of complex 1 provides more intense hydrogen bonding donor points than complex 2, mainly because the esterification invalidates the ability of the carboxyl group to act as a hydrogen bond donor. The existence of these points in molecules plays an important role showing us the presence of regions in the complexes capable of performing interactions with other molecules, directly influencing the physical and biological properties of the complex such as solubility, affinity with cell membranes and interactions with biomolecules.

Biological evaluation

DNA interaction

UV-Visible spectroscopy titration. As can be seen in Fig. 4A and B, adding ct-DNA (calf thymus DNA) aliquots to a solution containing the complexes shows the decrease in the intensity of the absorption bands (hypochromic effect) attributed to the metal-to-ligand charge-transfer (MLCT) and $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligand bands. The absorption intensity decreases due to changes in the electronic transition energy, caused by the interactions between the complex/DNA. Furthermore, for complex 3, the presence of the isosbestic point around 460 nm is observed. This point is characterized by the same light absorption for different forms of the compound in solution. In the case of DNA/complex interactions, there is an equilibrium between the two forms (free complex and bound complex) in the indicated region of variations in the concentration.^{53–55} These observations confirm the interaction between complex 3 and DNA.

The value obtained in the calculations of the binding constant (K_b) of complex 3 is $4.8 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ with a hypochromism of $12.7 \pm 0.7 \text{ (}\%)$; complex 2 shows a binding constant of $1.7 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ and a hypochromism of $9.7 \pm 0.9 \text{ (}\%)$. These values are characteristic of weak interactions between the complex and DNA, which are of the electrostatic type. This observation was already provided in the literature for complex 3.¹⁷ The spectra obtained for the interaction of complex 2 can be seen in Fig. 4A. Complex 1 does not interact with DNA nor has a very weak electrostatic interaction,

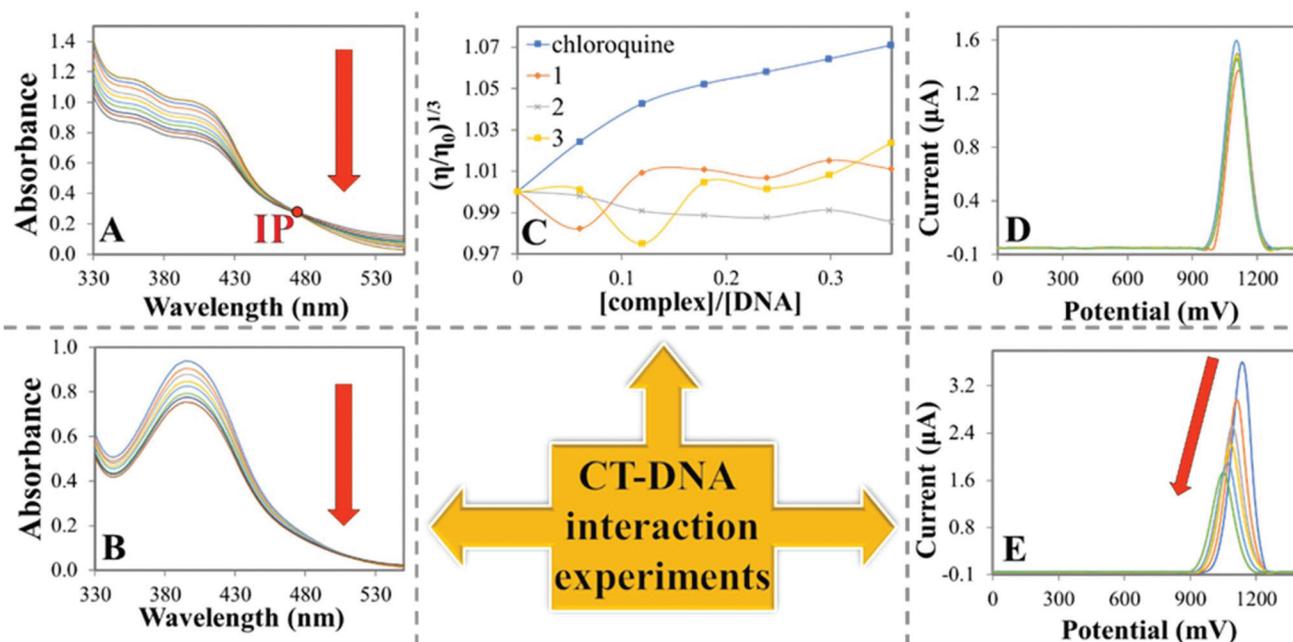


Fig. 4 (A) Spectrophotometric titration spectra of complex **3** (0.1 mM) with ct-DNA (3.0 mM), IP = isosbestic point; (B) spectrophotometric titration spectra of complex **2** (0.1 mM) with ct-DNA (3.0 mM); (C) effect of the increasing concentration of complexes **1–3** and chloroquine on the relative viscosity of ct-DNA (0.28 mM), at 25 °C; (D) square-wave voltammograms of complex **1** (0.5 mM) and (E) square-wave voltammograms of complex **2** (0.5 mM) in Tris-HCl buffer (pH 7.4), 30% DMSO was used as a supporting electrolyte, ct-DNA (4.2 mM). Reference electrode: Ag/AgCl; working electrode: Pt.

because of the low hypochromism obtained from adding ct-DNA, making it impossible to calculate a binding constant for **1**.

Viscosity measurements. The interactions between complexes **1–3** with ct-DNA were studied by viscosity measurements. The plot $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. $[\text{complex}]/[\text{DNA}]$ provided a characteristic curve of the relative viscosity (Fig. 4C). It is known that intercalation and DNA groove interactions lead to an increase in the viscosity of the solution, however the covalent bonds with the DNA contribute to the decrease in the viscosity of the solution.^{56,57} In the viscosity graph of the complexes (Fig. 4C), a constant profile is observed for all ratios of complexes/DNA. This trend is due to the presence of weak interactions, such as electrostatic interactions, or even the absence of interactions between complexes and DNA that do not cause significant changes in the DNA viscosity. For the sake of comparison, chloroquine, an intercalator agent of DNA, was analyzed, showing an enhancement in the ct-DNA relative viscosity. Therefore, the viscosity measurements corroborate with the previous information afforded by UV-Vis spectroscopic titration, confirming the absence of covalent or intercalative binding modes of the complexes **1–3** to the DNA molecule.

Electrochemical titration. Electrochemistry can also be used to provide information on the possible interaction of metal complexes with DNA. Thus, a solution containing a complex can show changes in the voltammetric profile by adding ct-DNA aliquots to the solution. Complexes that interact covalently with the DNA lead to the formation of new species in solution, producing new redox processes, while complexes

interacting with DNA in an intercalative way can shift the redox potentials to a more positive region, while for an electrostatic mode of interaction of complex/DNA, the potential shifts to more anodic values due to the charge transfer of DNA (negative moiety) to the complex (positive or neutral moiety).⁵⁸

In the square-wave voltammetry experiments with compound **1**, there was a very small decrease in the current of the solution, which is due to the dilution effect that occurs by adding the DNA and due to the increase in the diffusion coefficient of the solutions (see Fig. 4D and E). Furthermore, no change in the redox potential was observed when DNA solution was added, indicating that the free carboxyl group containing complex does not interact with the DNA, probably because the complex was negatively charged in the buffer. On the other hand, complexes **2** and **3** showed a significant decrease in their ruthenium redox potentials with the addition of ct-DNA, mainly after the 5th addition (the potentials decreased by about 90 mV for both complexes). This happens due to the charge transfer from the DNA to the complex, increasing the ruthenium electron density and consequently reducing the redox potential of the complexes, which is typical of the electrostatic interaction between complex/DNA. In all experiments, at pH = 7.4 (Trizma buffer), the free carboxyl groups are deprotonated, forming carboxylate ions. It is known that DNA is negatively charged due to the phosphate group in its structure and this fact directly influences the interaction of this molecule with negatively charged compounds because of the repulsion between these species.⁵⁷ Although **1** is cationic

in the solid state, in solution it will provide a negative charge of the carboxyl group, causing repulsion with the sugar-phosphate backbones that are on the outside of the DNA structure, showing the absence of interactions between complex/DNA according to the experimental data. Therefore, complex 3, which does not have a free carboxyl group, showed an electrostatic interaction with the DNA, while the absence of the carboxyl negative charge in 2 (neutralized after the esterification) also allowed the electrostatic interactions, confirming that the presence of negative charge on the complexes weakens their interaction with the DNA molecule.

HSA quenching. In order to study the albumin quenching, the most abundant protein in human plasma, with complexes 1–3, human serum albumin (HSA) was used as a model, and all experiments were performed in triplicate, at three temperatures (298, 303 and 310 K), obtaining the interaction parameters (Table 3). Protein quenching mechanisms normally occur by two different modes, known as the dynamic or static mechanism.

HSA solutions, when excited at 280 nm, exhibit fluorescence emission with a peak at 330 nm, which is provided mainly by a single residue of tryptophan (Trp-214), located on one side of the binding pocket in the second α -helix of the subdomain IIA. Complexes 1–3 are albumin quenchers as shown in Fig. S14,[†] where the HSA fluorescence emission decreased when complex concentrations are increased, remembering that the compounds do not show intrinsic fluorescence. The maximum scatter collision-quenching constant values (k_q) occur at around $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for all of the studied complexes, as shown in Table 3, which is higher than the maximum con-

stant value for dynamic quenching ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), indicating the prevalence of the static quenching mechanism.

The analysis of the thermodynamic parameters of a system is useful to evaluate the intermolecular forces involved in the complex/HSA interaction. As shown in the interaction maps, in the solid state, the compounds synthesized in this work may present many intermolecular interactions, acting as donors/acceptors of hydrogen bonds, performing electrostatic or van der Waals interactions. The interaction forces of complexes 1 and 2 with HSA are electrostatic forces due to the negative values of ΔH° and positive values of ΔS° . For complex 3, the predominating force is the van der Waals interactions (negative for ΔH° and ΔS°). The negative values found for the Gibbs free energy variation (ΔG°) indicate that the interactions of complex/HSA are spontaneous.

The HSA-binding constant (K_b) magnitude for complexes 1–3 (Table 3), calculated from Stern–Volmer plots (Fig. S14[†]), is similar to those of other metal complexes reported,^{31,59} suggesting a weak to moderate interaction between the complexes and HSA molecule. As observed in the crystallographic interaction maps (Fig. 3), the deprotonated complex 1 has a larger region likely to act as a donor in electrostatic interactions and this factor can be correlated with the higher interaction constant (K_b), since albumin has several acceptor groups for electrostatic interactions.⁶⁰ High K_b values can lead to a lower bioavailability of the complex due the less reversibility of the protein/complex reaction^{19,61} since albumin acts as a carrier of substances such as fatty acids and drugs.

Partition coefficient. As shown in Table 4, the partition coefficients for complexes 2 and 3 were considerably larger

Table 3 Stern–Volmer quenching constant (K_{sv} , L mol^{-1}); biomolecular quenching rate constant (K_q , $\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$); binding constant (K_b , M^{-1}); number of binding sites (n), ΔG° (KJ mol^{-1}), ΔH° (KJ mol^{-1}) and ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}$) values for the complex–HSA system at different temperatures

	Temp.	K_{sv} (10^4)	K_q (10^{12})	K_b	n	ΔH°	ΔG°	ΔS°
1	298	2.15 ± 0.18	3.47	$1.95 \pm 0.28 \times 10^4$	1.02 ± 0.04	-11.98	-24.60	42.33
	303	2.14 ± 0.18	3.45	$1.70 \pm 0.55 \times 10^4$	1.02 ± 0.05		-25.17	
	310	2.09 ± 0.14	3.37	$2.05 \pm 0.26 \times 10^4$	1.03 ± 0.04		-25.10	
2	298	0.99 ± 0.12	1.59	$9.19 \pm 0.69 \times 10^1$	1.33 ± 0.03	-10.96	-11.60	2.14
	303	0.95 ± 0.10	1.53	$8.65 \pm 0.21 \times 10^1$	1.29 ± 0.02		-11.29	
	310	0.98 ± 0.05	1.58	$1.08 \pm 0.07 \times 10^2$	1.31 ± 0.01		-11.62	
3	298	1.26 ± 0.01	2.03	$3.57 \pm 0.21 \times 10^4$	0.97 ± 0.01	-31.61	-27.19	-14.81
	303	1.27 ± 0.04	2.05	$3.57 \pm 0.08 \times 10^4$	0.99 ± 0.02		-26.58	
	310	1.26 ± 0.03	2.03	$5.85 \pm 0.84 \times 10^4$	0.98 ± 0.03		-27.01	

Table 4 *In vitro* cytotoxicity values (IC_{50}) and selective index (SI) of complexes and binders against tumor (A549, MCF7 and MDA-MB-231) and non-tumor (V79) cell lines

	IC_{50} (μM)				Selectivity index			
	A549	MCF7	MDA-MB-231	V79	A549	MCF7	MDA-MB-231	Log P
1	>100	>100	>100	>100	—	—	—	0.2 ± 0.1
2	13.4 ± 2.4	5.1 ± 0.5	2.4 ± 0.4	17.1 ± 0.4	1.3	3.4	7.1	1.3 ± 0.4
3	22.2 ± 1.7	3.6 ± 0.2	4.2 ± 1.5	33.1 ± 4.9	1.5	9.2	7.9	1.3 ± 0.7
N-O	>100	>100	>100	>100	—	—	—	—
Pic	>100	>100	>100	>100	—	—	—	—
Cisplatin	14.4 ± 1.4	13.9 ± 2.0	2.4 ± 0.2	21.6 ± 1.2	1.5	1.9	9.0	—

than that for complex 1, and consequently complexes 2 and 3 present higher lipophilicity. The negatively charged free carboxylic group of complex 1 leads to greater affinity for the aqueous medium, mainly due to the hydrogen bonds between water and the carboxylate group. The absence of the carboxylic group (complex 3) or its esterification (complex 2) makes these compounds more hydrophobic, which may enhance their permeability in cell membranes.⁶²

Cytotoxicity assay. The antitumor activity of the new ruthenium(II) complexes was observed in three human tumor cell lines (MDA-MB-231, MCF7 – breast cancer, and A549 – lung cancer) and one normal cell line (Chinese hamster fibroblasts – V79). The tests were carried out in triplicate and at concentrations ranging from 100 to 0.78 μM . The cell viability after treating the cancer cells with different concentrations of complexes 2 and 3 and the positive control (cisplatin) after 48 h of incubation indicates that the cell growth was significantly reduced after the treatment. Complex 1, negative control, and lutidinic and picolinic acids did not present any cytostatic effects at the tested concentrations (Table 4). It is interesting to note that complex 2 exhibited similar or better activity than cisplatin in all of the tested cells, including the selectivity index being higher in MCF7 cells than for the control drug. With these lower IC_{50} values, complexes 2 and 3 indicate their potential to inhibit cancer cell growth even at lower concentrations, when compared to cisplatin.

Other important information relates to the comparison of the IC_{50} data with $\log P$. Thus, complex 1 has the lowest lipophilicity, among the three complexes and it is not cytotoxic against the tested cell lines, while complexes 2 and 3 show higher lipophilicity and exhibit prominently IC_{50} values.

Therefore, it may be suggested that the free carboxyl-containing complex (1) has reduced diffusion by the cell membrane lipid, compared to the considerably more lipophilic complexes 2 and 3, which can permeate the cell membrane more easily and exhibit, therefore, increased cytotoxicity.

Thus, complexes 2 and 3 present higher bioavailability, benefiting from membrane diffusion facilitated by lipophilicity and transport by albumin. In addition, once in the intracellular environment, the complexes also benefit from the possibility of interacting with DNA, triggering mechanisms of cell death.

Cellular uptake experiments. The cellular uptake of complexes 2 and 3 and cisplatin was determined in MDA-MB-231 cells, with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS), after 3 h of treatment with 250 μM of complex concentration.^{63–65}

Cells without treatment were used as the negative control (untreated). Cisplatin was used as the positive control, and platinum cellular uptake was determined. Five cells were analyzed in each treatment. Fig. 5 shows the metal content in the cells treated with 1, 2 and cisplatin, which was considerably higher than the negative control, showing that all the complexes can be accumulated in the MDA-MB-231 cells. These results indicate that the cells treated with the esterified complex (2) display a ruthenium content (medium values) approximately 35% higher than 1. This fact corroborates with the high lipophilicity observed for complex 2, which may con-

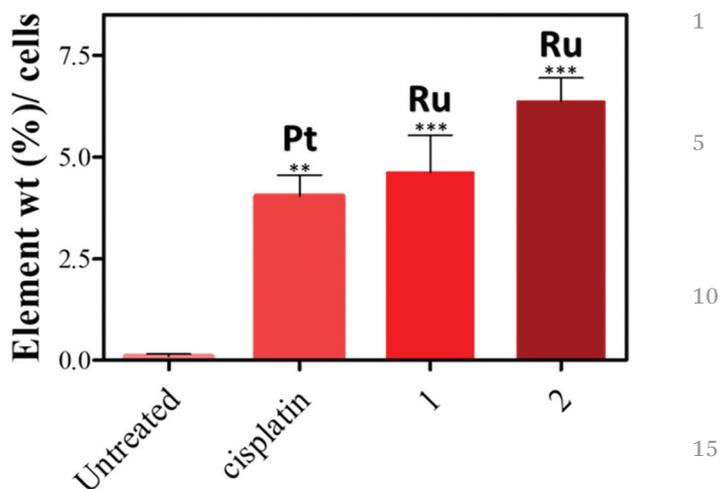


Fig. 5 Total intracellular accumulation of ruthenium/platinum in MDA-MB-231 cells after 3 h of treatment with 250 μM concentration of cisplatin (positive control) complexes 1 and 2 by using an energy dispersive X-ray spectrometer. All measurements were performed in five cells and presented with the corresponding standard deviations (SDs).

tribute to a greater cellular uptake for this complex, as previously discussed.

Clonogenic and morphological observations. The MDA-MB-231 cells treated with complex 2 showed morphological changes after the first 48 h at the IC_{50} concentration (2.5 μM), displaying a spindle shaped form and confluence, morphological changes and a loss of adhesion (Fig. 6A). This is evidence of the dose-dependence apoptotic cell death mechanism, which is an important property of potential anti-proliferative agents. The clonogenic survival assay is an *in vitro* experiment based on the skill of a single cell to develop into a colony and it is a good method for evaluating cell growth inhibition. This experiment provides information about the intensity of cell damage caused by the complexes and the ability of these cells to recover after treatment with the complexes. To evaluate the ability of 2 to curb the colony formation of MDA-MB-231, the cells were treated with increasing concentrations of 2, and the resulting colonies were counted and photographed (Fig. 6B). The number of colony cells and their sizes were reduced substantially in a concentration–response tendency, as shown in Fig. 6C and D.

No colony was observed at 2.5, 5.0 and 7.5 μM suggesting that complex 2 suppresses the proliferation of MDA-MB-231 cells at dosages higher than the IC_{50} value, which is consistent with the result of the MTT assay, proving the inability of the cells to recover from damage caused by the complex at the IC_{50} concentration.

Anti-*Mycobacterium tuberculosis* assay

All ligands and complexes were evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv ATCC 27294) using the Resazurin Microtiter Assay (REMA) technique that determines the minimum inhibitory concentration (MIC). It can be seen

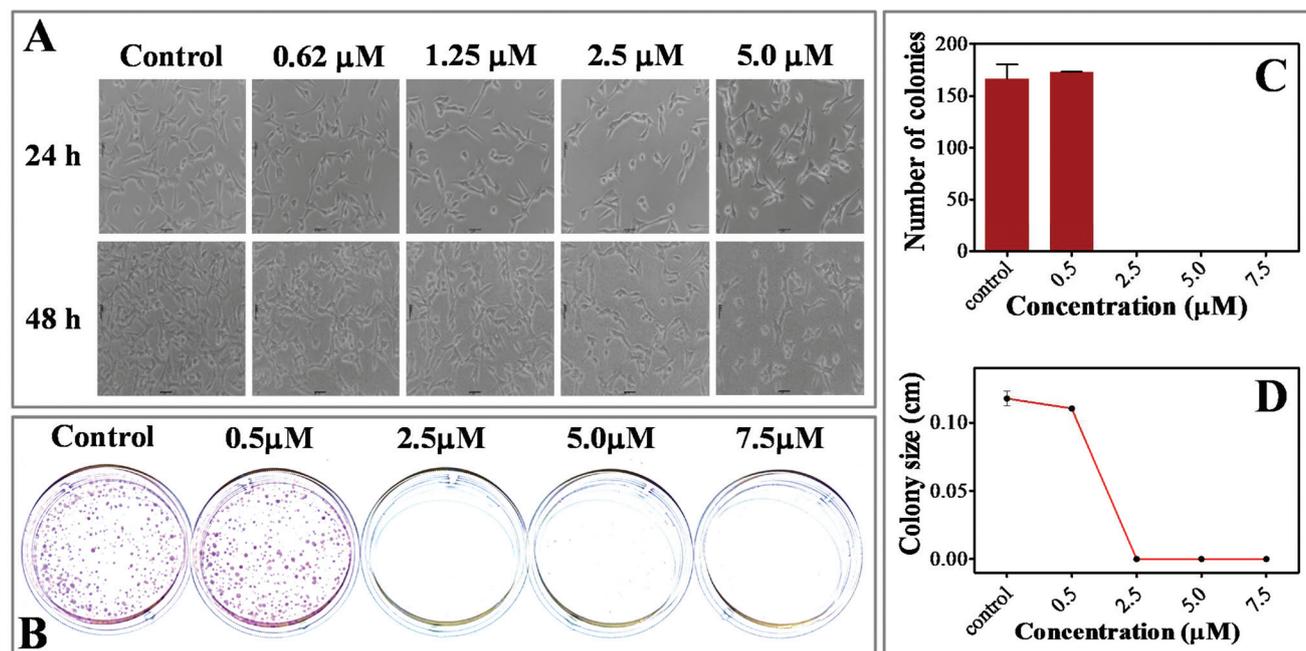


Fig. 6 Morphological study under an inverted microscope (100×) of MDA-MB-231 with different concentrations of **2** (A), clonogenic survivor assay of MDA-MB-231 with different concentrations of **2** (B), graph of colony number in each concentration of the clonogenic assay (C) and graph of the medium colony size in each concentration of the clonogenic assay (D).

Table 5 *In vitro* minimum inhibitory concentration (MIC) values to *Mycobacterium tuberculosis*

	MIC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	MIC (μM)
1	>25	>25
2	7.02 ± 1.62	6.87 ± 1.12
3	0.91^a	0.95^a
N-O	>25	>25
Pic	>25	>25
Cisplatin	—	—
Isoniazid	0.03	0.4
Ethambutol	20.7	5.6

^aTaken from ref. 17 and 18.

from Table 5 that the complexes acted against the bacteria in a similar way to that observed in the cytotoxicity assays, where only complexes **2** and **3** were active. The ligands and complex **1** did not exhibit activity against the bacteria. Partition coefficient data also correlate with the MIC data, as can be observed in some reports in the literature,⁶⁶ and the greater lipophilicity of complexes **2** and **3** causes an increase in efficacy against tuberculosis due to the facilitation of transport through membrane diffusion as observed for cancer cells.

Conclusions

In this work, we report on the synthesis of two new [Ru(N-O)(bipy)(dppb)]PF₆ (**1**) and [Ru(N-O_{ec})(bipy)(dppb)]PF₆ (**2**) com-

plexes. Complex **2** was synthesized by esterification of the free carboxylic group present in the picolinate ligand of complex **1**. These complexes were fully characterized by analytical and spectral methods (IR, voltammetry, ³¹P NMR, ¹³C NMR, and ¹H NMR), and by X-ray crystallography, confirming the selective esterification of the free carboxyl group in complex **1**. The [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆ complex **3** was synthesized in order to establish the influence of the presence of the free carboxyl group and its esterification on the activity of complexes **2** and **3**. All complexes are stable in the solutions used for the biological tests. Complexes **2** and **3** interact with DNA in electrostatic mode, while complex **1** showed no interaction with the DNA, due to the repulsion between the free carboxylic group and the phosphate moieties of DNA. The albumin quenching studies indicated that all ruthenium complexes display weak/moderate affinity with the protein. Complexes **1** and **3** present the highest binding constant value (K_b), among the three complexes, and the intrinsic fluorescence of the HSA was quenched through a static quenching mechanism for all complexes. The thermodynamic parameters (positive for ΔS° and negative for ΔH° and ΔG°) indicate that the interactions between the complexes and the protein are electrostatic for **1** and **2**, while complex **3** interacts with HSA by van der Waals interactions (negative for ΔH° , ΔS° and ΔG°). Complexes **2** and **3** showed greater lipophilicity and poor interaction with DNA, which are desirable biological properties for growth inhibition of tumor cells and *Mycobacterium tuberculosis*, as observed in the low IC₅₀/MIC values obtained and complex **2** displays a good cellular uptake, showing promising results.

Experimental

Materials, measurements and methods

The synthesis of the final complexes (1–3) was performed based on a series of classical coordination reactions, starting from the primary $\text{RuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ salt. Firstly, the reflux of a mixture of ruthenium(III) chloride with an excess of triphenylphosphine, in methanol, provides us with a neutral complex $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$, an analogue of the Wilkinson catalyst. In this reaction, triphenylphosphine acts as the reducing agent, resulting in a pseudo-octahedral complex of ruthenium(II).⁶⁷ As presented in Scheme 1, $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ reacts with bidentate phosphine and bipyridine ligand in a sequence of substitution reactions to give the precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppb})]$.

$\text{RuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,4-bis(triphenylphosphine)butane (dppb), triphenylphosphine (PPh_3), 2,2'-bipyridine (bipy) and 2,4-pyridinedicarboxylic acid (N–O) were purchased from Sigma-Aldrich. The precursors $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$,⁶⁸ $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})]_2[\mu\text{-}(\text{dppb})]$ ⁶⁹ and $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ ⁴⁸ were prepared according to the published procedures. All procedures involving the solutions of the complexes (precursor and products) were performed under an inert atmosphere (argon). The solvents used in the manipulations were purified by standard methods. The vibrational spectrum in the infrared region was recorded on an FT-IR Bomem Michelson 102 spectrometer in the 4000–250 cm^{-1} region using KBr pellets. The solutions used in ultraviolet-visible absorption spectroscopy were prepared in CH_3OH and recorded on a Hewlett-Packard (HP) diode array-8452A. Conductance data, using 1 mM solutions of complexes at room temperature, were obtained in CH_3OH , using a Micronal model B-330 connected to a platinum electrode, with a 0.089 cm^{-1} constant cell, showing the results in $S \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Elemental analysis was performed with an EA 1108 CHNS microanalyzer (Fisons Instruments). Electrochemical experiments (cyclic and pulse voltammetry) were carried out at room temperature, in CH_2Cl_2 , with 0.10 M Bu_4NClO_4 (TBAP), using a Bioanalytical Systems Inc electrochemical analyzer, model BAS-100B/W. The working and auxiliary electrodes were stationary platinum; a system of Ag/AgCl in Luggin capillary probe was used as a reference electrode. Under these conditions, the ferrocene couple (Fc^+/Fc) oxidized at 430 mV. MALDI-TOF/MS experiments were performed by adopting the MALDI Bruker Daltonics Ultraflex extreme equipment, using dihydroxibezoic acid as a calibrator. NMR experiments (^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC and DEPT-135) were performed on a Bruker DRX 400 Ultrashield™ (400.132 MHz for hydrogen frequency, 100.623 MHz for carbon frequency and 161.976 MHz for phosphorus frequency), referenced with TMS (tetramethylsilane). In the ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC and DEPT-135 experiments, 25 mg samples of 2,4-pyridinedicarboxylic acid or final metal complexes were dissolved in deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d_6 , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ experiments are reported in relation to H_3PO_4 (85% v/v) and performed in CH_3OH or reaction medium, using a capillary containing D_2O .

Synthesis

$[\text{Ru}(\text{N-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (1). In a Schlenk flask containing 25 mL of $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, the ligand 2,4-pyridinedicarboxylic acid (N–O) (0.066 mmol, 11 mg) and $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ (0.132 mmol, 19 μL) were added. After the complete solubilization of the ligand, 0.066 mmol (50 mg) of $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ was dissolved and after 20 minutes 0.012 g (0.066 mmol) of KPF_6 was added. The solution was kept under reflux, under an inert atmosphere and was stirred for 3 h. Next, the solution was evaporated and 10 mL of CH_2Cl_2 was added; a white powder was formed, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N-HCl}$ and KCl was filtered off using a sintered filter plate. For each reaction, the final solution was evaporated until dry and dissolved in 3 mL of methanol and reprecipitated with 10 mL of HCl solution (0.1 mol L^{-1}). The orange powder was filtered off, washed with water and dried under vacuum. Yield: 55 mg (83%). Anal. calc. for $[\text{C}_{45}\text{F}_6\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}_3\text{Ru}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: exp. (calc) C, 52.64 (52.43); H, 4.41 (4.30); N, 4.23 (4.08)%. Molar conductance ($S \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, CH_3OH) 81.8. IR (cm^{-1}): ($\nu_{\text{CH}} + \nu_{\text{OH}}$) 3056, (ν_{CH}) 2926–2860; ($\nu_{\text{COOH}}^{\text{free}}$) 1726; (ν_{asCOO^-}) 1658; ($\nu_{\text{C=N}}$) 1603; ($\nu_{\text{C=C}}$ and $\nu_{\text{C=N}}$) 1483, 1466, 1434 and 1313 (ν_{sCOO^-}); ($\nu_{\text{P-CH}}$) 1094; ($\nu_{\text{P-CH}_2}$) 1073; ($\nu_{\text{P-F}}$) 842; (ν_{ring}) 698; ($\nu_{\text{P-CH}}$) 648; ($\delta_{\text{P-F}}$) 557; ($\nu_{\text{Ru-P}}$) 516 and 507; ($\nu_{\text{Ru-O}}$) 530; ($\nu_{\text{Ru-N}}$) 419. MALDI-TOF/MS ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{DHB}$) $[\text{M} - \text{PF}_6]^+$: 850.151 m/z , $[\text{M} - (\text{N-O}) + (\text{DHB})]^+$: 837.151 m/z . $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.976 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) δ (ppm): 37.12 (d) and 39.16 (d); $^2J_{\text{P-P}} = 32.72 \text{ Hz}$. ^1H NMR (400.132 MHz, DMSO-d_6 , 298 K) δ (ppm): 9.08 (1H, d, bipy) and 8.42 (1H, br. s, bipy) both C–H of bipy adjacent to the coordinated nitrogen atoms; 8.19 (3H, m, 1bipy and 1lig); 8.06 (2H, m, bipy and lig); 7.95 (1H, s, lig); 7.81 (1H, t, bipy); 7.65–7.49 (6H, m, 3bipy + 3dppb); 7.28–7.02 (12H, m, dppb); 6.69 (3H, m, dppb); 6.04 (2H, t, dppb); 3.59 (br. H_2O); 3.30–2.71 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-P}$ dppb); 1.72–1.55 (4H, m, CH_2 dppb). ^{13}C NMR (100.62 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 170.65 ($\text{C}=\text{O}_{\text{coord}}$ of lig); 164.70 ($\text{C}=\text{O}_{\text{free}}$ of lig); 157.68 (CH of bipy); 154.66 (C of bipy); 150.17 (C of lig); 148.72 (CH of dppb); 147.53 (CH of bipy); 141.80 (CH of lig); 138.03–126.66 (C of dppb, C of lig and C bipy); 124.60 (CH of lig); 124.55 (CH of lig); 123.40 (CH_3 of bipy); 39.45 (DMSO); 26.65–25.10 (P-CH_2 of dppb); 21.93–20.90 (CH_2 of dppb). UV-Vis (CH_3OH , 10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 290 nm (13 898) and 402 nm (3270).

$[\text{Ru}(\text{N-O}_{\text{e}})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (2). In a Schlenk flask containing 25 mL of $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, the ligand 2,4-pyridinedicarboxylic acid (N–O) (0.066 mmol, 11 mg) and $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ (0.132 mmol, 19 μL) were added. After the complete solubilization of the ligand, 0.066 mmol (50 mg) of $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ was dissolved in the reaction solution. The solution was kept under reflux and was stirred for 3 h. After this time, 500 μL of H_2SO_4 was added, and the solution was kept under reflux and stirred again for 24 h. For each reaction, the solution was evaporated and 10 mL of CH_2Cl_2 was added. The formed white powder ($\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N-HCl}$ and KCl was filtered off using a sintered filter plate. Next, the solution was evaporated, solubilized in 3 mL of methanol and 0.012 g (0.066 mmol) of KPF_6 and 10 mL of HCl solution (0.1 mol L^{-1}) were added. The

orange powder was filtered off, washed with water and dried under vacuum. Yield: 51 mg (76%). Anal. calc. for $[C_{47}F_6H_{44}N_3O_4P_3Ru]PF_6 \cdot 2.3H_2O$: exp. (calc) C, 52.97 (53.01); H, 4.78 (4.61); N, 4.03 (3.95)%. Molar conductance ($S\text{ cm}^2\text{ mol}^{-1}$, CH_3OH) 85.6. IR (cm^{-1}): ($\nu_{CH} + \nu_{OH}$) 3057, (ν_{CH}) 2931–2864; ($\nu_{COO_{ester}}$) 1728; (ν_{asCOO^-}) 1661; ($\nu_{C=N}$) 1610; ($\nu_{C=C}$ and $\nu_{C=N}$) 1483, 1464 and 1434; ($\delta_s\text{ CH}_3$) 1368; (ν_sCOO^-) 1313; (ν_{P-CH}) 1095; (ν_{P-CH_2}) 1072; (ν_{P-F}) 842; (ν_{ring}) 699; (ν_{P-CH}) 651; (δ_{P-F}) 557; (ν_{Ru-P}) 512 and 507; (ν_{Ru-O}) 530; (ν_{Ru-N}) 420. MALDI-TOF/MS (CH_3OH/DHB) $[M - PF_6]^+$: 878.195 m/z , $[M - (CH_2CH_3)]^+$: 850.151 m/z , $[M - (N-O) + (DHB)]^+$: 837.151 m/z . ^{31}P (1H) NMR (161.97 MHz, $DMSO-d_6$, 298 K) δ (ppm): 37.12 (d) and 39.16 (d); $^2J_{P-P} = 32.65$ Hz. 1H NMR (400.132 MHz, $DMSO-d_6$, 298 K) δ (ppm): 9.08 (1H, d, bipy) and 8.44 (1H, br. s, bipy) both C–H of bipy adjacent to the coordinated nitrogen atoms; 8.19 (3H, m, 1bipy and 1lig); 8.07 (2H, m, bipy and lig); 7.97 (1H, s, lig); 7.82 (1H, t, bipy); 7.67–7.51 (6H, m, 3bipy + 3dppb); 7.29–7.02 (12H, m, dppb); 6.78–6.71 (3H, m, dppb); 6.03 (2H, t, dppb); 4.27 (2H, m, CH_2 lig); 3.40 (br, H_2O); 2.72 (4H, m, CH_2-P dppb); 1.75–1.55 (4H, m, CH_2 dppb); 1.25 (3H, t, CH_3 lig). ^{13}C NMR (100.62 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 170.31 ($C=O_{coord}$ of lig); 162.97 ($C=O_{free}$ of lig); 157.71 (CH of bipy); 157.63 (C of bipy); 154.64 (C of bipy); 150.58 (C of lig); 149.40 (CH of dppb); 147.55 (CH of bipy); 138.11–126.77 (C of dppb, C of lig and C bipy); 124.60 (CH of lig); 124.18 (CH of lig); 123.48 (CH_3 of bipy); 62.03 (CH_3 of lig); 39.45 ($DMSO$); 26.57–24.93 ($P-CH_2$ of dppb); 21.86–20.87 (CH_2 of dppb); 13.78 (CH_2 of lig). UV-Vis (CH_3OH , 10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/M^{-1}\text{ cm}^{-1}$): 288 nm (16 628) and 388 nm (6644).

X-ray structure determination

Single-crystals of complex 1 (red) and complex 2 (orange) were grown from slow evaporation of methanol/dichloromethane/water (1 : 1 : 0.3) complex solution at room temperature. X-ray diffraction experiments were carried out at 298 K using an appropriate single-crystal assembled on a glass fiber. Intensity data from complex 1 were collected on a Rigaku XtalLAB Mini diffractometer with an X-ray generator operating at 50 kV and 12 mA, using $MoK\alpha$ radiation of wavelength 0.71073 Å. The structures were solved with SHELXS-97⁷⁰ using direct methods, and all non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters with SHELXL-97.⁷¹ The hydrogen atoms were calculated at idealized positions using the riding model option of SHELXL-97. Tables and structure representations were generated using Olex2⁷² and MERCURY,^{50,73} respectively. The main crystal data collections and structure refinement parameters for 1 and 2 are summarized in Table 1.

Human serum albumin (HSA) binding experiments

Interaction of the ruthenium complex with HSA was investigated using fluorimetric titration at three temperatures (298, 303 and 310 K), with a solution of 7.5 μM HSA, trizma buffer – pH 7.4 (4.5 mM Trizma-HCl, 0.5 mM Trizma-Base [tris(hydroxymethyl)aminomethane] and 50 mM NaCl), and the complex solubilized in DMSO. The experiment was performed in triplicate using an opaque 96-well plate; in each well, the concen-

tration of HSA (5.0 μM) and DMSO (5%) was maintained, varying the complex concentration (0–50 μM) obeying the $[complex]/[HSA]$ molar ratio of 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10, respectively. The fluorescence quenching was followed by the extinction of the emission intensity of the tryptophan residue at 330 nm (wavelength 280 nm excitation). The measurements were performed on a fluorimeter BioTek Synergy H1. Data were analysed using the Stern–Volmer eqn (1):^{31,74,75}

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of the quencher, respectively, $[Q]$ is the quencher concentration, and K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant. This equation can be written as $K_q = K_{SV}/\tau_0$, where K_q is the biomolecular quenching rate constant and τ_0 is the average lifetime of the fluorophore in the absence of the quencher (6.2×10^{-9} s). K_{SV} is calculated by performing the linear regression of a plot of F_0/F vs. $[Q]$. The binding constant (K_b) can also be calculated using the fluorescence quenching data using eqn (2):

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

where n is the number of binding sites (in the HSA molecule). The thermodynamic parameters were calculated from eqn (3) (Van't Hoff) and (4):

$$\ln k_b = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

where R is the gas constant, ΔH° is the standard enthalpy variation, ΔS° is the standard entropy variation, ΔG° is the standard free Gibbs energy (calculated using eqn (4)) and T is the temperature. The enthalpy and entropy variation of the reaction can be determined from the linear relationship between $\ln K_b$ and the reciprocal absolute temperature ($1/T$).^{24,64}

DNA interaction experiments

All manipulations involving DNA were performed using ct-DNA (calf thymus DNA) solution, prepared by the addition of approximately 40 mg of ct-DNA in 20 mL of Trizma buffer (4.5 mM trizma-HCl, 0.5 mM trizma-base and 50 mM of NaCl) at pH 7.4. The exact DNA concentration was determined by UV-vis spectroscopy, measuring the absorption intensity at 260 nm, using the molar absorption coefficient value of $6600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. The ct-DNA solution is protein-free, where the ratio of UV absorbance at 260 and 280 nm is about 1.8 : 1.

Spectroscopic titration

UV-Visible spectroscopic titration is a technique widely used to evaluate the interaction between complexes and DNA. This technique can determine the affinity of a complex and ct-DNA by calculating the intrinsic binding constant (K_b), based on

the maximum absorption at a given wavelength for each complex, using the neighbor-exclusion eqn (5).

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (5)$$

where [DNA] is the ct-DNA concentration in base pairs, ϵ_a is the apparent extinction coefficient, ϵ_f corresponds to the complex extinction coefficient in free form and ϵ_b refers to the coefficient of dissolution of the complex in bound form. Each set of data, using the above equation, provides a line with a slope of $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ and a y -intercept of $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$, where K_b is determined from the ratio between the slope and intercept.

Titration was performed using two quartz cells (1 cm). In cell 1 (white), 1800 μL of trizma buffer and 200 μL of DMSO were added, in cell 2 (complex) 1800 μL of trizma buffer and 200 μL of complex solution (1 mM) in DMSO were added. After that, 15 μL of ct-DNA was successively added to both cells; after each addition, the solutions were homogenized for about 1 minute, followed by obtaining the spectra of 1 and 2 on a Hewlett Packard (HP) diode array-8452A.

Viscosity

Viscosity evaluation was performed using an Ostwald viscometer (purchased from Sigma-Aldrich) in a water bath (296 K). In this experiment, the ct-DNA concentration in trizma buffer (pH = 7.4) was kept constant (0.28 mM) in all samples, while the complex concentration was increased from 0 to 0.28 mM, fixing the DMSO percentage at 10%. The flow times were measured with an automated timer at least 5 times and the experiments were performed in duplicate. The data are presented as $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus the [complex]/[DNA] ratio, where η and η_0 are the specific viscosities of DNA in the presence of the complex and in the absence of the complex, respectively. The values of η and η_0 were calculated using the expression $(t - t_0)/t_0$, where t is the observed flow time and t_0 is the flow time of buffer alone. The relative viscosities of DNA were calculated as η/η_0 .

Electrochemical titration

The electrochemical study of the interaction between the DNA and the complexes 1–3 was carried out by the square wave voltammetry (SWV) technique. Firstly, the electrochemical response was recorded of a solution of 0.5 mM of the complex in trizma buffer [tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, pH = 7.4] with 30% of DMSO. Aliquots of ct-DNA (30 μL –4.2 mM) were added to the solution, and after each addition the SWV was recorded. In SWV, a three-electrode system was used, in which glassy carbon was used as the working electrode (CG), the auxiliary electrode was stationary platinum foil, and as the reference electrode a system of Ag/AgCl in a Luggin capillary probe was used. The SWV was recorded with a Bioanalytical Systems Inc electrochemical analyzer, model BAS-100B/W.

Partition coefficient (log P)

The log P value was determined by the “shake flash” method,⁷⁶ using octanol as the organic phase and water as the aqueous

phase. The compounds were solubilized to 90 μL , partitioned into three tubes containing 30 μL each. After this, 750 μL of n -octanol and 750 μL of water were added and kept under stirring at 1000 rpm for 24 h at 296 K. The phases were separated and the concentration of the complex in the organic phase was determined by UV-Vis spectroscopy, using a calibration curve previously prepared for the compounds, in n -octanol. The log P value was calculated by eqn (6):

$$\log P = \log \frac{C_o}{C_a} \quad (6)$$

where C_o and C_a are the molar concentrations of the complex in the organic and aqueous phase, respectively, in which C_a can be found by subtracting the initial concentration in the organic phase from the concentration (C_o).

Cell culture assay

In vitro cytotoxicity assays on cultured human tumor cell lines still represent the standard method for the initial screening of antitumor agents. Thus, as the first step to assess its pharmacological properties, the ruthenium complexes were evaluated against the human lung tumor line A549 (ATCC No. CCL-185), the human prostate tumor line DU-145 (ATCC No. HTB-81), two human breast tumor lines MCF-7 (ATCC No. HTB-22) and MDA-MB-231 (ATCC No. HTB-26), and the normal cell line V79 (ATCC No. CCL-76). The cells were routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium or RPMI 1640 supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For the cytotoxicity assay, 1.5×10^4 cells per well were seeded in 200 μL of complete medium in 96-well plates (Corning Costar). Each complex was dissolved in sterile dimethylsulfoxide (DMSO) from 40 to 0.01 mM; one microliter of each complex sample was added to 200 μL medium. The cells were exposed to the complex for a 48 h period. The conversion of 4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan by metabolically viable cells was monitored by using an automated microplate reader at 540 nm.

Cellular uptake experiments

The analysis of the subcellular distribution of ruthenium in MDA-MB-231 cells was performed by EDS (energy-dispersive X-ray spectroscopy).^{65,77} Briefly, cells were fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde for at least 2 h. After washing, the cells were dehydrated in an acetone series and embedded in Polybed epoxy resin (Polysciences; Warrington, PA). Ultrathin sections were examined under a JEM-1230 TEM integrated with an EDS microanalytics system (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, USA).

Morphology

The MDA-MB-231 cells in 24-well plates were observed by employing a microscope (Nikon, T5100, 40 \times), with a Motic Moticam 1000 camera. The cells were seeded at 1×10^5 cells per well and allowed to grow at 37 °C in 5% CO₂ overnight

thereafter, treated or not (control) with different concentrations of the complexes for 24 and 48 h.

Clonogenic assay

MDA-MB-231 tumor cells were harvested, counted, and seeded (300 cells) in Petri dishes. Cells were allowed to grow overnight and then treated with different concentrations of complexes for 48 h. The medium was changed for a new one without any compounds. After incubation for an additional 10 days, the cells were rinsed with PBS, fixed with a solution of methanol : acetic acid (3 : 1) for 5 min and stained with 0.5% crystal violet for 25 min. The relative survival rate was calculated from the number of single cells that formed colonies of >50 cells. The size and number of the colonies were calculated using the *Image J* software.

Anti-*Mycobacterium tuberculosis* assay

The anti-*M. tuberculosis* activity for the ligands and ruthenium complexes was determined using the REMA (Resazurin Microtiter Assay) method.⁷⁸ Stock solutions of the compounds were prepared in DMSO and diluted in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) so that the final drug concentration ranging from 0.1 to 25 g mL⁻¹ could be obtained. The serial dilutions were performed on a Precision XS Microplate Sample Processor (Biotek™). Rifampicin was dissolved in distilled water, and used as a standard drug. A suspension of the MTB H₃₇Rv ATCC 27294 was cultured in Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC and 0.05% tween 80. The culture was frozen at 80 °C in aliquots. After two days, CFU mL⁻¹ of an aliquot was calculated. The concentration was adjusted to 5 × 10⁵ CFU mL⁻¹ and 100 μL of the inoculum was added to each well of a 96-well microtiter plate together with 100 μL of the compounds. Samples were setup in triplicate. The plate was incubated for 7 days at 37 °C. After 24 h, 30 μL of 0.01% resazurin (solubilized in water) was added. The fluorescence of the wells was recorded after 24 h by using a TECAN Spectrafluor. The MIC was defined as the lowest concentration resulting in 90% inhibition of the growth of MTB.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, CNPq and FAPESP. We would like to thank Dr Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira of IGM-FIOCRUZ who performed the cellular uptake experiments.

References

- 1 U.S. Food and Drug Administration, Novel Drug Approvals for 2017, <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm537040.htm>.
- 2 B. Hirschler, New drug approvals fall to six-year low in 2016 | Daily Mail Online, <http://www.dailymail.co.uk/wires/reuters/article-4081200/New-drug-approvals-fall-six-year-low-2016.html>.
- 3 K. D. Mjos and C. Orvig, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 4540–4563.
- 4 M. Wehbe, A. W. Y. Leung, M. J. Abrams, C. Orvig and M. B. Bally, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 10758–10773.
- 5 J. Wang, J. Kou, X. Hou, Z. Zhao and H. Chao, *Inorg. Chim. Acta*, 2017, **454**, 176–183.
- 6 S. G. Davila-Manzanilla, Y. Figueroa-de-Paz, C. Mejia and L. Ruiz-Azuara, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **129**, 266–274.
- 7 R. G. Teixeira, A. R. Brás, L. Côrte-Real, R. Tatikonda, A. Sanches, M. P. Robalo, F. Avecilla, T. Moreira, M. H. Garcia, M. Haukka, A. Preto and A. Valente, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **143**, 503–514.
- 8 L. Colina-Vegas, W. Villarreal, M. Navarro, C. R. De Oliveira, A. E. Graminha, P. I. D. S. Maia, V. M. Deflon, A. G. Ferreira, M. R. Cominetti and A. A. Batista, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **153**, 150–161.
- 9 R. S. Corrêa, M. M. Da Silva, A. E. Graminha, C. S. Meira, J. A. F. Dos Santos, D. R. M. Moreira, M. B. P. Soares, G. Von Poelhsitz, E. E. Castellano, C. Bloch, M. R. Cominetti and A. A. Batista, *J. Inorg. Biochem.*, 2016, **156**, 153–163.
- 10 G. N. Kaluderović, T. Krajnović, M. Momcilovic, S. Stosic-Grujicic, S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić and E. Hey-Hawkins, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **153**, 315–321.
- 11 M. Kubanik, W. Kandioller, K. Kim, R. F. Anderson, E. Klapproth, M. A. Jakupec, A. Roller, T. Söhnel, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 13091–13103.
- 12 M. K. M. Subarkhan and R. Ramesh, *Inorg. Chem. Front.*, 2016, **3**, 1245–1255.
- 13 Z. Xu, D. Kong, X. He, L. Guo, X. Ge, X. Liu, H. Zhang, J. Li, Y. Yang and Z. Liu, *Inorg. Chem. Front.*, DOI: 10.1039/C8QI00476E.
- 14 Y. Toledano-Magaña, J. C. García-Ramos, C. Torres-Gutiérrez, C. Vázquez-Gasser, J. M. Esquivel-Sánchez, M. Flores-Alamo, L. Ortiz-Frade, R. Galindo-Murillo, M. Nequiz, M. Gudiño-Zayas, J. P. Laclette, J. C. Carrero and L. Ruiz-Azuara, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 899–912.
- 15 M. I. F. Barbosa, R. S. Corrêa, L. V. Pozzi, É. D. O. Lopes, F. R. Pavan, C. Q. F. Leite, J. Ellena, S. D. P. Machado, G. Von Poelhsitz and A. A. Batista, *Polyhedron*, 2015, **85**, 376–382.
- 16 I. De Aguiar, A. Tavares, A. C. Roveda, A. C. H. Da Silva, L. B. Marino, É. O. Lopes, F. R. Pavan, L. G. F. Lopes and D. W. Franco, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2015, **70**, 45–54.
- 17 F. R. Pavan, G. V. Poelhsitz, M. I. F. Barbosa, S. R. A. Leite, A. A. Batista, J. Ellena, L. S. Sato, S. G. Franzblau,

- 1 V. Moreno, D. Gambino and C. Q. F. Leite, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 5099–5107.
- 18 F. R. Pavan, G. Von Poelhsitz, F. B. do Nascimento, S. R. A. Leite, A. A. Batista, V. M. Deflon, D. N. Sato, S. G. Franzblau and C. Q. F. Leite, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 598–601.
- 5 19 I. Correia, S. Borovic, I. Cavaco, C. P. Matos, S. Roy, H. M. Santos, L. Fernandes, J. L. Capelo, L. Ruiz-Azuara and J. C. Pessoa, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **175**, 284–297.
- 10 20 E. Ekengard, L. Glans, I. Cassells, T. Fogeron, P. Govender, T. Stringer, P. Chellan, G. C. Lisensky, W. H. Hersh, I. Doverbratt, S. Lidin, C. De Kock, P. J. Smith, G. S. Smith and E. Nordlander, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 19314–19329.
- 15 21 L. Glans, A. Ehnbohm, C. De Kock, A. Martínez, J. Estrada, P. J. Smith, M. Haukka, R. A. Sánchez-Delgado and E. Nordlander, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 2764–2773.
- 20 22 M. Hanif, M. A. H. Nawaz, M. V. Babak, J. Iqbal, A. Roller, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, *Molecules*, 2014, **19**, 8080–8092.
- 23 R. A. Sánchez-Delgado, M. Navarro, H. Pérez and J. A. Urbina, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1095–1099.
- 24 J. J. N. Silva, A. L. Osakabe, W. R. Pavanelli, J. S. Silva and D. W. Franco, *Br. J. Pharmacol.*, 2007, **152**, 112–121.
- 25 25 J. J. N. Silva, W. R. Pavanelli, J. C. M. Pereira, J. S. Silva and D. W. Franco, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 4414–4421.
- 26 R. Sesti-Costa, Z. A. Carneiro, M. C. Silva, M. Santos, G. K. Silva, C. Milanezi, R. S. da Silva and J. S. Silva, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2014, **8**, e3207.
- 30 27 M. Navarro, C. Gabbiani, L. Messori and D. Gambino, *Drug Discovery Today*, 2010, **15**, 1070–1078.
- 28 D. Gambino and L. Otero, *Inorg. Chim. Acta*, 2012, **393**, 103–114.
- 35 29 E. Iniguez, A. Sánchez, M. A. Vasquez, A. Martínez, J. Olivas, A. Sattler, R. A. Sánchez-Delgado and R. A. Maldonado, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, **18**, 779–790.
- 30 B. S. Murray, M. V. Babak, C. G. Hartinger and P. J. Dyson, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **306**, 86–114.
- 40 31 J. Sun, Y. Huang, C. Zheng, Y. Zhou, Y. Liu and J. Liu, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2015, **163**, 266–274.
- 32 C. S. Allardyce and P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 3201–3209.
- 45 33 E. S. Antonarakis and A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010, **66**, 1–9.
- 34 W. Streciwilk, A. Terenzi, X. Cheng, L. Hager, Y. Dabiri, P. Prochnow, J. E. Bandow, S. Wölfl, B. K. Keppler and I. Ott, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **156**, 148–161.
- 50 35 S. Zou, G. Li, T. W. Rees, C. Jin, J. Huang, Y. Chen, L. Ji and H. Chao, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 690–698.
- 36 J.-Q. Wang, J.-F. Kou, Z.-Z. Zhao, K.-Q. Qiu and H. Chao, *Inorg. Chem. Front.*, 2017, **4**, 1003–1012.
- 55 37 L. F. Hernández-Ayala, M. Flores-Álamo, S. Escalante-Tovar, R. Galindo-Murillo, J. C. García-Ramos, J. García-Valdés, V. Gómez-Vidales, K. Reséndiz-Acevedo, Y. Toledano-Magaña and L. Ruiz-Azuara, *Inorg. Chim. Acta*, 2018, **470**, 187–196.
- 38 Q. Cao, Y. Li, E. Freisinger, P. Z. Qin, R. K. O. Sigel and Z.-W. Mao, *Inorg. Chem. Front.*, 2017, **4**, 10–32.
- 39 A. Levina, A. Mitra and P. A. Lay, *Metallomics*, 2009, **1**, 458–470.
- 40 C. O. D'Sousa, J. H. Araujo, I. R. S. Baliza, R. B. Dias, F. Valverde, M. T. A. Vidal, C. B. S. Sales, C. A. G. Rocha, D. R. M. Moreira, M. B. P. Soares, A. A. Batista and D. P. Bezerra, *Oncotarget*, DOI: 10.18632/oncotarget.22248.
- 41 L. Biancalana, L. K. Batchelor, A. De Palo, S. Zacchini, G. Pampaloni, P. J. Dyson and F. Marchetti, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 12001–12004.
- 42 T. Völker and E. Meggers, *ChemBioChem*, 2017, **18**, 1083–1086.
- 43 B. Shannan, A. Watters, Q. Chen, S. Mollin, M. Dörr, E. Meggers, X. Xu, P. A. Gimotty, M. Perego, L. Li, J. Benci, C. Krepler, P. Brafford, J. Zhang, Z. Wei, G. Zhang, Q. Liu, X. Yin, K. L. Nathanson, M. Herlyn, A. Vultur, B. Shannan, A. Watters, Q. Chen, S. Mollin, M. Dörr, E. Meggers, X. Xu, P. A. Gimotty, M. Perego, L. Li, J. Benci, C. Krepler, P. Brafford, J. Zhang, Z. Wei, G. Zhang, Q. Liu, X. Yin, K. L. Nathanson, M. Herlyn and A. Vultur, *Oncotarget*, 2016, **7**, 54897–54912.
- 44 T. Storr, *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 1st edn, 2014, vol. 9781118488.
- 45 E. S. De Freitas, P. B. Da Silva, M. Chorilli, A. A. Batista, É. De Oliveira Lopes, M. M. Da Silva, C. Q. F. Leite and F. R. Pavan, *Molecules*, 2014, **19**, 5999–6008.
- 46 F. R. Pavan, G. V. Poelhsitz, L. V. P. da Cunha, M. I. F. Barbosa, S. R. A. Leite, A. A. Batista, S. H. Cho, S. G. Franzblau, M. S. de Camargo, F. A. Resende, E. A. Varanda and C. Q. F. Leite, *PLoS One*, 2013, **8**, e64242.
- 47 World Health Organization, *Global Tuberculosis Report 2016*, World Health Organization, 2016.
- 48 S. L. Queiroz, A. A. Batista, G. Oliva, M. T. do Pi. Gambardella, R. H. A. Santos, K. S. MacFarlane, S. J. Rettig and B. R. James, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **267**, 209–221.
- 49 K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, New Jersey, 6th edn, 2008.
- 50 C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler and J. Van De Streek, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**, 453–457.
- 51 J. Van de Streek, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, 2006, **62**, 567–579.
- 52 P. A. Wood, T. S. G. Olsson, J. C. Cole, S. J. Cottrell, N. Feeder, P. T. A. Galek, C. R. Groom and E. Pidcock, *CrystEngComm*, 2013, **15**, 65–72.
- 53 P. O. Vardevanyan, V. L. Élbakyan, M. A. Shahinyan, M. V. Minasyants, M. A. Parsadanyan and N. S. Sahakyan, *J. Appl. Spectrosc.*, 2015, **81**, 1060–1063.
- 54 T. Afrati, A. A. Pantazaki, C. Dendrinou-Samara, C. Raptopoulou, A. Terzis and D. P. Kessissoglou, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 765–775.

- 1 55 T. S. Kamatchi, N. Chitrapriya, H. Lee, C. F. Fronczek, F. R. Fronczek and K. Natarajan, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 2066–2077.
- 5 56 J. H. Shi, J. Chen, J. Wang and Y. Y. Zhu, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2015, **136**, 443–450.
- 57 T. Sathiya Kamatchi, N. Chitrapriya, S. K. Kim, F. R. Fronczek and K. Natarajan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **59**, 253–264.
- 10 58 Y. Moriyama, D. Ohta, K. Hachiya, Y. Mitsui and K. Takeda, *J. Protein Chem.*, 1996, **15**, 265–272.
- 59 S. Jovanović, K. Obrenčević, Ž. D. Bugarčić, I. Popović, J. Žakula and B. Petrović, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 12444–12457.
- 15 60 M. Petukhov, G. Rychkov, L. Firsov and L. Serrano, *Protein Sci.*, 2004, **13**, 2120–2129.
- 61 E. Alessio, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, **2017**, 1549–1560.
- 20 62 V. Pliška, B. Testa and H. van de Waterbeemd, *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2008, vol. 4.
- 63 C. Gramaccioni, A. Procopio, G. Farruggia, E. Malucelli, S. Iotti, A. Notargiacomo, M. Fratini, Y. Yang, A. Pacureanu, P. Cloetens, S. Bohic, L. Massimi, A. Cutone, P. Valenti, L. Rosa, F. Berlutti and S. Lagomarsino, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2017, **849**, 012008.
- 25 64 R. A. Colvin, Q. Jin, B. Lai and L. Kiedrowski, *PLoS One*, 2016, **11**, e0159582.
- 30 65 M. J. Pushie, I. J. Pickering, M. Korbas, M. J. Hackett and G. N. George, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 8499–8541.
- 66 J. P. Sarathy, F. Zuccotto, H. Hsinpin, L. Sandberg, L. E. Via, G. A. Marriner, T. Masquelin, P. Wyatt, P. Ray and V. Dartois, *ACS Infect. Dis.*, 2016, **2**, 552–563.
- 67 P. S. Hallman, T. A. Stephenson and G. Wilkinson, *Inorg. Synth.*, 2006, **12**, 237–240.
- 5 68 R. W. Parry, *Inorganic syntheses: Volume XII*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006, vol. 12.
- 69 M. Bressan and P. Rigo, *Inorg. Chem.*, 1975, **14**, 2286–2288.
- 10 70 G. M. Sheldrick, SHELXS-2013, *Progr. Solut. Cryst. Struct.*, 2013, **64**, 112–122.
- 71 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 1997, **64**, 112–122.
- 72 O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard and H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.*, 2009, **42**, 339–341.
- 15 73 C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. Van De Streek and P. A. Wood, *J. Appl. Crystallogr.*, 2008, **41**, 466–470.
- 20 74 P. Kalaivani, R. Prabhakaran, E. Vaishnavi, T. Rueffer, H. Lang, P. Poornima, R. Renganathan, V. Vijaya Padma and K. Natarajan, *Inorg. Chem. Front.*, 2014, **1**, 311–324.
- 75 M. Teresa Montero, J. Hernández and J. Estelrich, *Biochem. Educ.*, 1990, **18**, 99–101.
- 25 76 E. Baka, J. E. A. Comer and K. Takács-Novák, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **46**, 335–341.
- 77 R. G. Kirk, M. E. Gates, C. S. Chang and P. Lee, *J. Microsc.*, 1996, **183**, 181–186.
- 30 78 J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings and F. Portaels, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**, 2720–2722.