

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“NITROSILO COMPLEXOS DE RUTÊNIO: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUAS POTENCIALIDADES
CITOTÓXICAS”**

Camilla Calemi Golfeto*

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 CNPq

São Carlos - SP
2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G625nc

Golfeto, Camilla Calemi.

Nitrosilo complexos de rutênio : síntese, caracterização e avaliação de suas potencialidades citotóxicas / Camilla Calemi Golfeto. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
91 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3. Óxido nítrico. 4. Bifosfina. 5. Câncer. I. Título.

CDD: 546 (20^a)

Ao meu querido pai Luiz (in memoriam), por seu amor, apoio e confiança. À minha mãe Helena por todo esforço e luta para que eu chegasse até aqui. Ao meu marido Fábio por toda ajuda, por todo seu companheirismo, paciência, amizade e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista pela amizade, pela confiança, pela orientação durante esta caminhada e pela estrutura de trabalho oferecida. Agradeço principalmente pela oportunidade, pois com certeza foi uma das principais pessoas que contribuíram tanto para meu crescimento profissional quanto pessoal durante o tempo em que passamos juntos.

Às Profas. Rose Maria Carlos e Wânia da Conceição Moreira pelas sugestões no seminário geral do Departamento de Química.

Aos Profs. Dr. Eduardo Ernesto Castelano e Dr. Javier Ellena pela atenção e pelo competente trabalho na resolução das estruturas cristalográficas. Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho e Gezimar Donizetti de Souza pela realização dos experimentos de massas. Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira pelos ensinamentos de RMN e pela amizade.

Aos técnicos e amigos do Departamento de Química da UFSCar Luciana Vizotto, Paulo Lambertucci e Ademir Sartori pela amizade, desabafos e por serem sempre prestativos e eficientes em todos os momentos.

Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani, por serem sempre atenciosas e prestativas a nos atender.

Aos amigos e colegas do Laboratório: André, Angélica, Augusto, Claudia, Edjane, Fábio, Giovanna, Gustavo, Inara, Leonardo, Lucas, Márcio, Mariana e Marília pela amizade e pelo agradável ambiente de trabalho estando sempre dispostos em colaborar. Agradeço em especial aos amigos André, Fábio e Gustavo por todo apoio e dedicação nas discussões científicas.

Aos amigos e companheiros que são como irmãos Angélica M. Rodrigues, Fábio B. Rodrigues e Ana Paula B. Lambertucci, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, me apoiando nos momentos de dificuldade e saudade, causada pela distância de familiares e amigos.

À minha mãe que com orgulho e incentivo, me mostrando sempre o melhor caminho, me ajudou a seguir e chegar até aqui. À minha grande e querida família, pela amizade e confiança que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as decisões.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela oportunidade de aprendizado e ao CNPq, pela bolsa concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ϕ	grupo fenil
Λ	medidas de condutividade molar
Δ	variação
δ	Deslocamento químico (ppm) em RMN / vibração de deformação (IV)
ϵ	Coefficiente de extinção molar
β	Vibração de deformação no plano (IV)
γ	Vibração de deformação fora do plano (IV)
ν	Vibração de estiramento (IV) ou frequência (cm^{-1})
\sphericalangle	Ângulo
ΔG^0	Variação da energia livre de Gibbs
ΔS^0	entropia
[°]	grau
4-aminopy	4-aminopiridina
4-Mepy	4- metilpiridina
4-Phpy	4-fenilpiridina
4-tbupy	4- <i>terc</i> -butilpiridina
4-Vnpy	4-vivilpiridina
Å	Angstrom, 10^{-8} centímetros
azpy	2-(fenilazo)piridina
bipy	2,2'-bipiridina
BPA	HBPA=2-hidroxibenzil-2-piridilmetil)amino
Cd(Hg)	amálgama de cádmio
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
cGMP	guanilato monofosfato cíclico
CH₂Cl₂	diclorometano
CHN	Teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio
Cl-bipy	4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina
cNOS	Óxido nítrico sintetase constitutiva

cyclam	1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano
D₂O	Água deuterada
diop	2S,3S-O-isopropilideno-2,3-dihidroxi-1,4-bis(difenilfosfino)butano
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dppb	1,4-bis(difenilfosfina)butano
dppe	1,2-bis(difenilfosfina)etano
dppf	1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno
dppm	Bis(difenilfosfina)metano
dppp	1,3-bis(difenilfosfina)propano
dtc	dimetilditiocarbamato e outros ditiocarbamatos
E	potencial
EDRF (FRED)	Fator relaxante endotélio dependente
edta	etilenodiaminotetraacético
eNOS	óxido nítrico sintetase endotelial
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
f	Banda de intensidade fraca no IV
F	Banda de intensidade forte no IV
fac	Isômero facial
fen	1,10-fenantrolina
GTP	guanosina trifosfato
Hedta	ácido etilenodiaminotetraacético
HPz	pirazol
Hz	Hertz, ciclos por segundo
IC₅₀	Concentração da droga requerida para redução de 50% do crescimento celular em relação ao controle
IL	Transições inter e intraligantes
Im (Him)	imidazol
ImH	imidazol protonado
iNOS	óxido nítrico sintetase induzida

IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento, em Hz (RMN)
L	Representa um ligante genérico
λ	Comprimento de onda (nm)
LD₅₀	Dose letal da droga requerida para a morte de 50% dos animais
I_{irr}	Intensidade de irradiação
m	Banda de intensidade média no IV
M	Átomo de metal central em um complexo
Me-bipy	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
MeO-bipy	4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina
mer	Isômero meridional
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NH₃	amônia
nm	nanômetro
N-N	Ligante N-heterocíclico bidentado genérico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NPs	Nitroforinas
P	Fósforo
PD	Pulso diferencial
Ph	Grupo fenil, C ₆ H ₅
Phen	1,10-fenantrolina
P-P	Fosfina diterciária, bifosfina
PPh₃	Trifenilfosfina
py	Piridina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SFB	Soro fetal bovino
sGC	Guanilato ciclase solúvel

sh	ombro
SNP	Nitroprussiato de sódio
tacn	1,4,7-triazaciclononano
TCLL	Transferência de carga ligante - ligante
TCLM	Transferência de carga ligante - metal
TCML	transferência de carga metal - ligante
terpy	2,2':6',2"-terpiridina
TMS	tetrametilsilano
ttha	trietilenotetraminahexaacetato
UV/vis	Ultravioleta / visível
VC	Voltametria Cíclica
vs	versus
η^6	Representa um ligante hexadentado
en	Etilenodiamina
N7	Nitrogênio 7
TPyP	5,10,15,20 - tetra(4-piridil) - 21H, 23H - porfirina
ESI-MS	Espectro de massa obtido por ionização por eletrospray
<i>m/z</i>	Relação massa / carga
P.M.	Peso Molecular
(CD₃)₂CO	Acetona deuterada
P(OEt)₃	trietilfosfito
¹H{³¹P}	Hidrogênio-1 desacoplado de fósforo (RMN)
³¹P{¹H}	Fósforo-31 desacoplado de hidrogênio (RMN)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Valores de IC ₅₀ para o <i>cis</i> -(Cl,Cl)-[RuCl ₂ (terpy)(NO)]Cl e compostos similares contra linhagem de células A2780 e A2780 <i>cisR</i> obtidos em soluções de DMSO.....	10
TABELA 3.2: Ligantes N-heterocíclicos utilizados.....	27
TABELA 4.3: Valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para a série <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆	42
TABELA 4.4: Freqüências correspondentes às principais bandas e atribuições tentativas dos espectros de IV (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992; DZIEGIELEWSKI <i>et al.</i> , 1986; NAKAMOTO, 1997; WHIFFEN, 1956; SILVERSTEIN <i>et al.</i> , 1987; COLTHUP <i>et al.</i> , 1990; VON POELHSITZ, 2005)...	46
TABELA 4.5: Dados micro analíticos dos compostos sintetizados.....	47
TABELA 4.6: Valores de potenciais dos principais processos eletroquímicos da voltametria cíclica para a série <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppp)(NO)(L)]PF ₆	52
TABELA 4.7: Resultados obtidos do espectro UV/Vis para a série <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆	59
TABELA 4.8: Principais valores de distâncias [Å] e ângulos [°].....	61
TABELA 4.9: Dados cristalográficos de refinamento das estruturas dos compostos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆	62
TABELA 4.10: Comprimentos de ligações [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para os compostos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆	63
TABELA 4.11: Valores de IC ₅₀ na linhagem celular MDA-MB-231 de nitrosil complexos de rutênio, cisplatina, e ligantes dppp e dppf, medidos em solução de DMSO.....	66
TABELA 4.12: Valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para a série <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO ₄) ₂ e valores de pKa para as bipyridinas livres.....	73
TABELA 4.13: Principais modos vibracionais para a série <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO ₄) ₂	82
TABELA 4.14: Valores de condutividade molar para os compostos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO ₄) ₂	84
TABELA 4.15: Dados micro analíticos dos compostos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO ₄) ₂	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Estrutura de Lewis para a molécula de NO.....	1
FIGURA 1.2: Diagrama de orbital molecular para o NO.....	2
FIGURA 1.3: Formas possíveis de coordenação do NO a um centro metálico..	3
FIGURA 1.4: Representação da ligação de valência na ligação metal-nitrosil (a) envolvendo NO ⁺ e (b) envolvendo NO ⁻ (McCLEVERTY, 2004).....	3
FIGURA 1.5: Ilustração da retrodoação na ligação entre o centro metálico e o NO (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).....	4
FIGURA 1.6: Possíveis configurações eletrônicas na ligação metal-NO.....	5
FIGURA 1.7: Representação da síntese do NO <i>in vivo</i> (IGNARRO, 2000).....	5
FIGURA 1.8: Ativação do relaxamento da musculatura vascular pela acetilcolina com o NO atuando como molécula mensageira (BUTLER & NICHOLSON, 2003).....	6
FIGURA 1.9: Exemplos de complexos capturadores de NO.....	7
FIGURA 1.10: Representação esquemática da formação do composto [Ru(NH ₃) ₄ (L)(H ₂ O)] ³⁺ através da dissociação do NO (CARLOS <i>et al.</i> , 2004).....	8
FIGURA 1.11: Nitrosação de uma proteína-tiol por NO coordenado a metal (FONTECAVE & PIERRE, 1994).....	8
FIGURA 1.12: Estrutura da NP1 mostrando os grupos His-59, heme e o NO bem como as cadeias laterais das proteínas vizinhas (DING <i>et al.</i> , 1999).....	9
FIGURA 1.13: Fórmulas estruturais de alguns compostos de platina: cisplatina (a); Carboplatina (b); Oxaliplatina (c); Nedaplatina (d); Lobaplatina (e); e Heptaplatina (f) (GRIFFITH <i>et al.</i> , 2007).....	13
FIGURA 1.14: Fórmulas químicas do ICR e KP1019.....	15
FIGURA 1.15: Fórmulas químicas dos compostos NAMI e NAMI-A.....	15
FIGURA 1.16: Representação das interações M-L: 1 = ligação σ ; 2 = retrodoação π	18
FIGURA 3.17: Fórmulas estruturais das bifosfinas dppp(a) e dppb(b).....	27
FIGURA 3.18: Sistema de geração de monóxido de nitrogênio.....	29
FIGURA 4.19: Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ em CH ₂ Cl ₂ . (a) L = py; (b) L = 4-Phpy; (c) L = 4-Mepy.....	43

FIGURA 4.20: Espectros de IV dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ em pastilha de KBr. (a) L = py; (b) L = 4-Mepy.....	44
FIGURA 4.21: Espectro de IV de <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-Phpy)]PF ₆ em pastilha de KBr.....	45
FIGURA 4.22: Voltamogramas cíclicos dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ . Eletrólito: PTBA 0,1 mol.L ⁻¹ ; solvente: CH ₂ Cl ₂ ; referência:Ag/AgCl; velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . (a) L = py; (b) L = 4-Mepy; (c) L = 4-Phpy.....	49
FIGURA 4.23: Voltamogramas cíclicos dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ . Eletrólito: PTBA 0,1 mol.L ⁻¹ ; solvente: CH ₂ Cl ₂ ; referência:Ag/AgCl; velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . (a) L = py; (b) L = 4-Mepy; (c) L = 4-Phpy.....	50
FIGURA 4.24: Voltamogramas de pulso diferencial dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppp)(NO)(L)]PF ₆ . Solvente: CH ₂ Cl ₂ (0,1 mol.L ⁻¹ PTBA); velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . (a) L = py; (b) L = 4-Mepy; (c) L = 4-Phpy.....	51
FIGURA 4.25: Voltamograma cíclico do <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃ NO] ³⁺ , em solução aquosa. Eletrodo referência: calomelano (LOPES, 1997).....	53
FIGURA 4.26: Voltamograma cíclico do <i>trans</i> -[RuCl(cyclam)NO] ²⁺ em CH ₃ CN. Eletrodo referência: Ag/AgCl (LANG & DAVIS, 2000).....	54
FIGURA 4.27: Correlação entre potencial de redução do NO ⁺ e o estiramento do NO em CH ₂ Cl ₂ para a série <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)].....	54
FIGURA 4.28: Espectros de absorção UV/Vis dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ em CH ₂ Cl ₂ . (a) L = py; (b) L = 4-Mepy; (c) L = 4-Phpy.....	56
FIGURA 4.29: Espectros eletrônicos do <i>trans</i> -[RuCl(NO)(dppe) ₂] ²⁺ em CH ₂ Cl ₂ . (A) amostra com sinal RPE (NO ⁰); (B) amostra sem sinal no RPE (NO ⁺) (VON POELHSITZ, 2005).....	58
FIGURA 4.30: Estruturas ORTEP dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ . Elipsóides térmicas com 50% de probabilidade. (a) L = py; (b) L = 4-Mepy; (c) L = 4-Vnpy.....	61
FIGURA 4.31: Representação simplificada de orbitais para complexos contendo o ligante nitrosil linear com ligante <i>trans</i> σ e π doador Cl ⁻ (COE & GLENWRIGHT, 2000).....	64
FIGURA 4.32: Estrutura dos complexos <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(BPA)] (a) (LANZNASTER <i>et al.</i> , 2004; HEINRICH <i>et al.</i> , 2007) e <i>fac</i> -[RuCl ₃ NO(dpff)] (b) (VON POELHSITZ <i>et al.</i> , 2007a).....	65

FIGURA 4.33: Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT. (a) $\text{RuCl}_3(\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; (b) dppf livre; (c) <i>fac</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppf})]$; (d) cisplatina. Linhagem celular MDA-MB-231.....	67
FIGURA 4.34: Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT para o complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{BPA})]$ na linhagem celular MDA-MB-231.....	68
FIGURA 4.35: Viabilidade celular vs. concentração do complexo [2] , com barras de erros representando 95% do limite de confiança.....	68
FIGURA 4.36: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})](\text{ClO}_4)_2$ em CH_2Cl_2 . (a) N-N = bipy; (b) N-N = Me-bipy; (c) N-N = Meo-bipy; (d) N-N = Cl-bipy; (e) N-N = fen.....	71
FIGURA 4.37: Possíveis isômeros de fórmula molecular <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})]^{2+}$	71
FIGURA 4.38: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(^{15}\text{NO})(\text{dppb})(\text{bipy})](\text{ClO}_4)_2$ em CH_2Cl_2	72
FIGURA 4.39: Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do <i>mer</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO}(\text{diop}))]$ em CDCl_3 a 25 e -27°C	74
FIGURA 4.40: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos vs. deslocamento químico do P_B para os complexos de [4] a [7]	74
FIGURA 4.41: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o composto <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{Me-bipy})(\text{py})](\text{ClO}_4)_2$ em CH_2Cl_2	76
FIGURA 4.42: Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ com variação de temperatura do complexo <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{bipy})(4\text{-Me-py})]\text{PF}_6$ em CD_2Cl_2 (a) e em CDCl_3 (b)...	77
FIGURA 4.43: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{bipy})(\text{py})](\text{ClO}_4)_3$ em CH_2Cl_2	78
FIGURA 4.44: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{bipy})(\text{TPyP})](\text{ClO}_4)_3$ em CH_2Cl_2	79
FIGURA 4.45: Espectros no IV dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})](\text{ClO}_4)_2$ em pastilhas de KBr. (a) N-N = bipy; (b) N-N = Me-bipy; (c) N-N = MeO-bipy; (d) N-N = Cl-bipy; (e) N-N = fen.....	81
FIGURA 4.46: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos vs. νNO para os complexos de [4] a [7]	83
FIGURA 4.47: Espectro de massas do <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^{2+}$ em CH_2Cl_2 . $m/z = 727$ a 800	85

FIGURA 4.48: Espectros de massas simulados. (a) $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^+$; (b) $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^{2+}$. $m/z = 727$ a 800	86
FIGURA 4.49: Espectro de massas do $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^{2+}$ em CH_2Cl_2 . $m/z = 769$ a 825	86
FIGURA 4.50: Espectro de massas do $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^{2+}$ em CH_2Cl_2 . $m/z = 350$ a 900	87
FIGURA 4.51: Espectros de massas simulados. (a) $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^+$; (b) $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^{2+}$. $m/z = 769$ a 825	88

RESUMO

“NITROSILO COMPLEXOS DE RUTÊNIO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUAS POTENCIALIDADES CITOTÓXICAS”

O comportamento do óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos está sob intensa investigação nos últimos anos devido a seu papel possivelmente crucial em uma variedade de processos fisiológicos. Grande progresso nesta área foi alcançado estudando-se nitrosilo complexos de metais de transição. Neste sentido, complexos de rutênio são sem dúvida os mais estudados e sua relação com óxido nítrico, ação como drogas potenciais, é bem explorado na literatura. Deve ser apontado que compostos de rutênio normalmente exibem menos problemas de toxicidades gerais que outras metalo-drogas como mostrado através de testes clínicos com uma variedade de complexos de rutênio, incluindo alguns contendo óxido nítrico coordenado. Especificamente para uso como agentes anti-câncer, complexos de rutênio são muito promissores, mostrando atividade contra tumores que desenvolveram resistência a cisplatina ou em que a cisplatina é inativa. Atualmente duas drogas anti-câncer baseadas em rutênio, NAMI-A - $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$ e KP1019 - $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})_2]$ (Im = imidazol), completaram com sucesso testes clínicos fase I e estão programados para entrar em testes fase II em breve. Além disso, a síntese e avaliação das propriedades biológicas dos complexos de rutênio com ligantes de importância biológica têm chamado bastante à atenção de pesquisadores da área de bioinorgânica, pois o efeito sinérgico do ligante e do metal residual pode ser esperado, uma vez que compostos de coordenação administrados dissociam-se dentro do corpo. Mais adiante efeitos benéficos podem vir de princípios farmacêuticos baseado em moléculas de coordenação, por exemplo, proteção exercida pela ligação metal-ligante contra degradação enzimática do ligante ativo, modulação de hidrofobicidade/hidrofilicidade da molécula da droga, e com isto otimização da permeabilidade das membranas. Assim estes assuntos têm sido estudados em nosso laboratório, e nosso grupo de pesquisa está interessado em nitrosilos complexos de rutênio que contêm fosfinas como ligantes, primeiramente para explorar as propriedades estrutural, espectroscópica e eletroquímica de tais espécies com foco no efeito do tipo de isômero e co-ligantes nas características eletrônicas do NO^+ . Mais recentemente

foram testadas alguns dos compostos em ensaios de citotoxicidade com uma linhagem celular de tumor humano, para avaliar seus potenciais antitumorais. Resultados preliminares foram muito promissores e nos estimulam a explorar este potencial em outros derivados de nitrosilos rutênio. Neste trabalho relatamos a síntese e caracterização de nitrosilo complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆, onde L é piridina (py) **[1]**, 4-Metilpiridina (4-Mepy) **[2]** ou 4-Fenilpiridina (4-Phpy) **[3]**, e dppp = 1,3-bis(difenilfosfina)propano, obtidos do precursor *fac*-[RuCl₃(NO)(dppp)], e de nitrosilo complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂, onde N-N é 2,2'-bipiridina (bipy) **[4]**, 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me-bipy) **[5]**, 4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina (MeO-bipy) **[6]**, 4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina (Cl-bipy) **[7]**, e 1,10-fenantrolina (fen) **[8]**, e dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano. As atividades citotóxicas preliminares contra a linhagem celular tumoral MDA-MB-231 (câncer de mama humano) foram avaliadas para os compostos **[1]-[3]** e *cis*-[RuCl₂(NO)(BPA)] (HBPA=2-hidroxibenzil-2-piridilmetil)amina, *fac*-[RuCl₃NO(dppf)], RuCl₃(NO).2H₂O, os ligantes dppp e dppf livres e cisplatina, esta última para comparação com os novos compostos derivados. Viabilidade celular foi analisada através de redução por MTT e as curvas de dose-sobrevivência obtidas após 24 horas de tratamento com a droga, mostraram uma boa atividade com valores de IC₅₀ de 21 ± 15; 7,4 ± 3,7; 7,1 ± 2,6; 87 ± 23 e 10 ± 3 μM para os complexos **[1]**, **[2]** e **[3]**, respectivamente e *cis*-[RuCl₂(NO)(BPA)] e *fac*-[RuCl₃NO(dppf)].

ABSTRACT

“NITROSYL RUTHENIUM COMPLEXES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ITS CYTOTOXIC POTENTIALITIES”

The behavior of nitric oxide (NO) in biological systems has been under intense investigation in recent years in view of its possibly crucial role in a variety of physiological processes. Great progress in this area has been achieved by studying nitrosyl transition metal complexes. In this sense ruthenium complexes are by far the most studied and their relation to nitric oxide, acting as potential drugs, has been well explored in the literature. It should be pointed out that ruthenium compounds normally exhibit fewer general toxicity problems than other metal-based drugs as shown by clinical experiments with a variety of ruthenium complexes, including some containing coordinated nitric oxide. Specifically for use as anticancer agents, ruthenium complexes are very promising, showing activity against tumors that have developed resistance to cisplatin or in which cisplatin is inactive. Nowadays two ruthenium-based anticancer drugs, NAMI-A – $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$ and KP1019 – $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})_2]$ (Im = imidazole), have successfully completed phase I clinical trials and are scheduled to enter phase II trials in the near future. Also, the synthesis and evaluation of biological properties of ruthenium complexes with ligands of biological importance has attracted much attention of researchers of the bioinorganic area because the synergic effect from the ligand and metal residue can be expected once the administered coordination compound dissociates inside the body. Further beneficial effects can come from pharmaceutical principles based on coordination molecules, for example protection exerted by the metal-ligand bond against enzymatic degradation of the active ligand, modulation of hydrophobicity/hydrophilicity of the drug molecule and through this optimization of permeability of membranes. Thus these subjects have been performed in our laboratory and our research group has been interested in nitrosyl ruthenium complexes containing phosphine ligands, first to explore the structural, spectroscopic and electrochemical properties of such species with a focus on the effect of the type of isomer and co-ligands on the NO^+ electronic characteristics. More recently was tested some of the compounds in cytotoxicity assays with a human tumor cell line, in order to evaluate their antitumor potential. Preliminary results were very promising

and stimulate us to explore this potential in other nitrosyl ruthenium derivatives. In this work we report the preparation and characterization of nitrosyl complexes with the general formula $cis\text{-[RuCl}_2\text{(NO)(dppp)(L)]PF}_6$, where L is pyridine (py) **[1]**, 4-Methylpyridine (4-Mepy) **[2]** or 4-Phenylpyridine (4-Phpy) **[3]** and dppp = 1,3-bis(diphenylphosphino)propane, obtained from the $fac\text{-[RuCl}_3\text{(NO)(dppp)]}$ precursor, and of nitrosyl complexes with the general formula $cis\text{-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO}_4)_2$, where N-N is 2,2'-bipyridine (bipy) **[4]**, 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (Me-bipy) **[5]**, 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine (MeO-bipy) **[6]**, 4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine (Cl-bipy) **[7]**, e 1,10-phenantroline (fen) **[8]**, and dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane. The preliminary cytotoxicity activities against the MDA-MB-231 tumor cell line (human breast carcinoma) were tested for the compounds **[1]-[3]** and $cis\text{-[RuCl}_2\text{(NO)(BPA)]}$ (HBPA=2-hydroxybenzyl-2-pyridylmethyl)amine, $fac\text{-[RuCl}_3\text{NO(dppf)]}$, $\text{RuCl}_3\text{(NO).2H}_2\text{O}$, the free ligands dppp and dppf and cisplatin, this last one for comparison with the new derived compounds. Cell viability was assayed by MTT reduction and the dose-survival curves obtained after 24 h drug treatment, showed a good activity with IC_{50} values of 21 ± 15 ; $7,4 \pm 3,7$; $7,1 \pm 2,6$; 87 ± 23 and $10 \pm 3 \mu\text{M}$ for the complexes **[1]**, **[2]**, **[3]**, respectively and $cis\text{-[RuCl}_2\text{(NO)(BPA)]}$ and $fac\text{-[RuCl}_3\text{NO(dppf)]}$.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais do óxido nítrico (NO).....	1
1.2 Nitrosilo complexos metálicos.....	2
1.3 Envolvimento fisiológico do óxido nítrico.....	5
1.4 Nitrosilo complexos como Quimioterápicos.....	9
1.5 Química Inorgânica no Tratamento do Câncer.....	12
1.5.1 Química de Coordenação e Quimioterápicos – considerações gerais.....	14
1.5.2 Complexos de Rutênio como Quimioterápicos.....	14
1.5.3 Os Ligantes Fosfínicos e Aplicações na Medicina.....	17
1.5.3.1 Propriedades Gerais das Fosfinas.....	17
1.5.3.2 Atividade Antitumoral de Complexos Fosfínicos de Metais de Transição.....	19
1.6 Os Ligantes N-heterocíclicos.....	21
1.7 Ensaio de Citotoxicidade – considerações gerais.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Atmosfera inerte, solventes, reagentes, ligantes e óxido nítrico.....	26
3.1.1 Obtenção da atmosfera de Argônio.....	26
3.1.2 Solventes.....	26
3.1.3 Reagentes e produtos químicos em geral.....	26
3.1.4 Ligantes.....	27
3.1.5 Monóxido de nitrogênio.....	28
3.2 Síntese dos complexos precursores.....	29
3.2.1 tricloronitrosilrutênio(II) - $[\text{RuCl}_3\text{NO}]$	29
3.2.2 <i>fac</i> - $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppp})]$	30
3.2.3 Síntese dos precursores fosfínicos de rutênio.....	30
3.2.3.1 $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$	30

3.2.3.2	[RuCl ₂ (dppb)(PPh ₃)]	31
3.2.3.3	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(N-N)], N-N = bipy, Me-bipy, MeO-bipy, Cl-bipy e fen	31
3.3	Síntese dos novos nitrosilos complexos	32
3.3.1	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(py)]PF ₆ – [1]	32
3.3.2	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-Mepy)] PF ₆ – [2]	32
3.3.3	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-Phpy)] PF ₆ – [3]	32
3.3.4	<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO ₄) ₂ – [4]	33
3.3.5	<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)](ClO ₄) ₂ – [5]	33
3.3.6	<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(MeO-bipy)](ClO ₄) ₂ – [6]	34
3.3.7	<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(Cl-bipy)](ClO ₄) ₂ – [7]	34
3.3.8	<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(fen)](ClO ₄) ₂ – [8]	34
3.3.9	<i>cis</i> -[RuCl(¹⁵ NO)(dppb)(bipy)](ClO ₄) ₂ – [9]	35
3.4	Instrumentação	35
3.4.1	Absorção na região do infravermelho	35
3.4.2	Espectroscopia Eletrônica (UV/vis)	36
3.4.3	Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Pulso Diferencial)	36
3.4.4	Medidas de Condutividade	36
3.4.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ³¹ P{ ¹ H}	36
3.4.6	Análise Elementar	37
3.4.7	Difração de Raios-X	37
3.4.8	Espectrometria de Massas	37
3.4.9	Linhagem de células e testes de citotoxicidade	38
3.4.9.1	Linhagem de células, condições de cultura e incubação com as metalodrogas:	38
3.4.9.2	Ensaio de MTT	39
3.4.9.3	Preparação dos compostos para os ensaios	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1	Complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆ , L = py, 4-Mepy e 4-Phpy.....	41
4.1.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
4.1.2	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	44
4.1.3	Medidas de Condutividade Molar.....	47
4.1.4	Análise Elementar.....	47
4.1.5	Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Pulso Diferencial).....	47
4.1.6	Espectroscopia Eletrônica (UV/vis).....	55
4.1.7	Difração de Raios-X.....	59
4.1.8	Ensaio de Citotoxicidade – Atividade Antitumoral.....	64
4.2	COMPLEXOS DE FÓRMULA GERAL <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO ₄) ₂ , N-N = bipy, Me-bipy, MeO-bipy, Cl-bipy e fen.....	70
4.2.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	70
4.2.1.1	Reatividade do complexo <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)](ClO ₄) ₂ : Labilidade do grupo NO ⁺	75
4.2.1.2	Reatividade do complexo <i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO ₄) ₂ : Labilidade do Cl.....	78
4.2.2	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	80
4.2.3	Medidas de Condutividade Molar.....	83
4.2.4	Análise Elementar.....	84
4.2.5	Espectrometria de Massas (ESI-MS).....	85
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo o NO (óxido nítrico) foi conhecido apenas como uma substância tóxica que em grandes concentrações causava danos à natureza (PANDEY, 1983). A partir de 1987, com a descoberta de sua atuação no corpo humano como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*) (PALMER *et al*, 1987; IGNARRO *et al*, 1987), ocorreu um ressurgimento do interesse por esta molécula resultando na publicação de milhares de artigos anualmente envolvendo-o. Este desenvolvimento culminou na escolha do NO como a molécula do ano pela revista Science em 1992 (CULOTTA & KOSHLAND, 1992) e na entrega do Prêmio Nobel de medicina em 1998 para Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad por suas descobertas relativas à atuação do NO como molécula sinalizadora no sistema cardiovascular.

1.1 Aspectos gerais do óxido nítrico (NO)

O NO é um gás incolor (P.E. = -151,7°C), termodinamicamente instável ($\Delta G^0 = 86,57 \text{ KJ.mol}^{-1}$, $\Delta S^0 = 217,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), que se decompõe em N_2 e O_2 em altas temperaturas. A máxima solubilidade em água do NO (25°C e 1 atm) é aproximadamente 2 mM, pouco maior do que a observada para o O_2 . Devido a possuir certa característica lipofílica a solubilidade do NO em solventes apolares é aumentada de 6 a 8 vezes em relação à água. Desta maneira as velocidades de reações do NO em ambientes hidrofóbicos são aumentadas sobre as observadas em água (IGNARRO, 2000).

O NO possui a configuração eletrônica da camada de valência $(\sigma 2s)^2 (\sigma 2s^*)^2 (\sigma 2pz)^2 (\pi 2p)^4 (\pi 2p^*)^1$ e torna-se evidente pela sua estrutura de Lewis que tem um elétron desemparelhado, e desta forma é formalmente uma espécie radical livre (FONTECAVE & PIERRE, 1994; IGNARRO, 2000), como mostra a FIGURA 1.1.

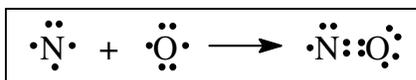


FIGURA 1.1: Estrutura de Lewis para a molécula de NO.

Embora seja uma molécula paramagnética, pois possui um elétron desemparelhado no orbital $\pi 2p^*$, não é detectado por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) já que em solução ou no estado sólido ocorre formação de dímero

(FONTECAVE & PIERRE, 1994; CLARKE & GAUL, 1993). A combinação dos orbitais atômicos do nitrogênio e oxigênio, para formar o NO, fornece o seguinte conjunto de orbitais moleculares (FIGURA 1.2).

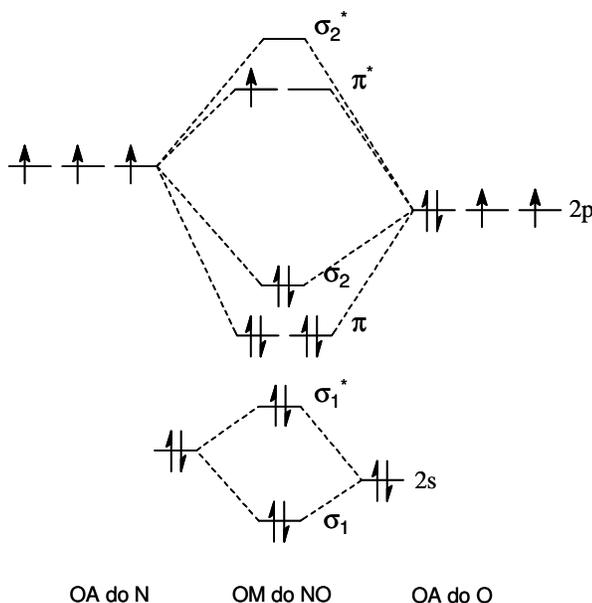


FIGURA 1.2: Diagrama de orbital molecular para o NO.

Desde que o número total de elétrons de valência do NO é 11, os orbitais σ ligante e antiligante de menor energia junto com os orbitais ligantes π e σ estão todos preenchidos. Entretanto o último elétron deve ocupar um orbital π^* antiligante. Na terminologia de orbital molecular, a estrutura eletrônica do NO é: $KK(\sigma_s^b)^2(\sigma_s^*)^2(\pi_{xy}^b)^4(\sigma_z^b)^2(\pi_{xy}^*)^1$. Assim a ordem de ligação líquida no NO é 2,5 já que um elétron ocupa orbital π^* antiligante (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

1.2 Nitrosilo complexos metálicos

O estudo da coordenação do NO a um centro metálico é uma área de grande interesse na química inorgânica. A molécula de NO pode ligar-se ao centro metálico via nitrogênio formando nitrosilos complexos (M – NO) ou via oxigênio, formando isonitrosilos complexos (M – ON) (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992). Na prática a ligação da molécula de NO com centros metálicos é dominada pela primeira forma, sendo a forma isonitrosil observada apenas como um estado meta-estável (MS-I) em alguns nitrosilos. O NO coordenado pode adotar duas diferentes

geometrias de ligação (linear ou angular) refletindo as diferentes interações da ligação metal-NO (FIGURA 1.3).

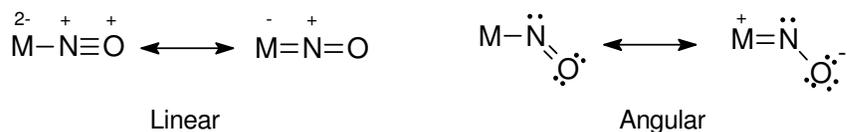


FIGURA 1.3: Formas possíveis de coordenação do NO a um centro metálico.

A forma linear é caracterizada por comprimentos de ligação M-N curtos ($\cong 1,60\text{-}1,75 \text{ \AA}$), alta frequência de estiramento do NO ($\nu_{\text{NO}}: 1650\text{-}1985 \text{ cm}^{-1}$) e reatividade eletrofílica. O oposto disto é observado na forma angular, caracterizada por maiores comprimentos das ligações M-N ($\cong 1,80\text{-}1,95 \text{ \AA}$), menores frequências vibracionais do NO ($\nu_{\text{NO}} 1525\text{-}1590 \text{ cm}^{-1}$) e reatividade nucleofílica (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

A ligação é linear quando é observada uma configuração formalmente equivalente a NO^+ ou NO^0 com uma hibridização aproximadamente sp do átomo de nitrogênio, na qual os orbitais π^* total ou parcialmente vazios estão propícios a receber densidade eletrônica do metal. A ligação angular é observada quando a coordenação se dá com um centro metálico rico em elétrons. Assim o NO tem sua densidade eletrônica π^* aumentada comportando-se formalmente como NO^- com uma hibridização aproximadamente sp^2 do átomo de nitrogênio (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992) (FIGURA 1.4).

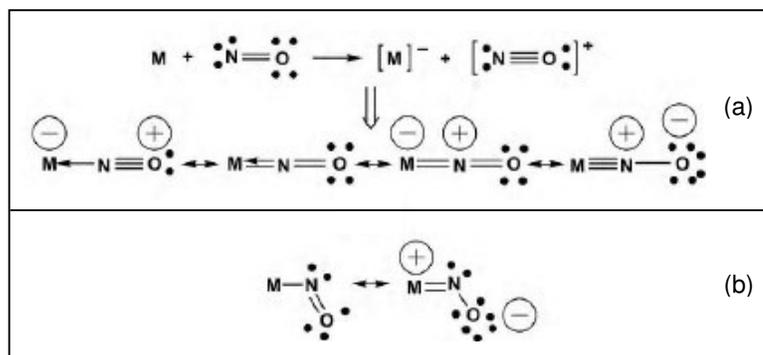


FIGURA 1.4: Representação da ligação de valência na ligação metal-nitrosil.(a) envolvendo NO^+ e (b) envolvendo NO^- (McCLEVERTY, 2004).

A geometria linear é mais comum e consiste de doação eletrônica do orbital σ do NO para o metal e doação de densidade eletrônica dos orbitais $n\pi$ ocupados do metal para os orbitais π^* do NO, caracterizando a retrodoação (FIGURA 1.5). Na geometria angular o metal doa um elétron para o NO formando o NO^- , que então se liga ao metal por uma interação σ deixando um par de elétrons localizado em um orbital sp^2 do nitrogênio.

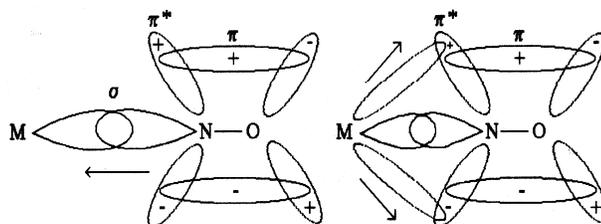


FIGURA 1.5: Ilustração da retrodoação na ligação entre o centro metálico e o NO (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

Para propósito de contagem de elétrons o ligante nitrosilo nos complexos de ligação linear é considerado ser o íon nitrosônio, NO^+ , e nos complexos angulares nitroxil, NO^- . Em outras palavras, na ligação linear o NO doa um elétron para o metal anteriormente a sua ligação (portanto NO^+), enquanto na ligação angular o metal doa um elétron para o NO (formando NO^-) que então se liga ao metal. Então o NO é considerado como sendo um doador de três elétrons na ligação linear (um elétron para o metal formando NO^+ e dois elétrons para formar a ligação M-NO), e doador de um elétron na ligação angular (dois elétrons para formar a ligação M-NO menos um doado do metal para o NO) (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992). Deve ser percebido que estas atribuições são meramente formalismos para a contagem de elétrons nestes complexos e nem sempre refletem as propriedades do ligante NO (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

Durante a coordenação ao íon metálico uma transferência interna de elétrons entre o metal e o NO pode ocorrer. A configuração eletrônica resultante da ligação metal-NO pode ser descrita predominantemente por uma das três formas ilustradas a seguir (FIGURA 1.6) dependendo do caráter do metal e dos demais ligantes (FONTECAVE & PIERRE, 1994).

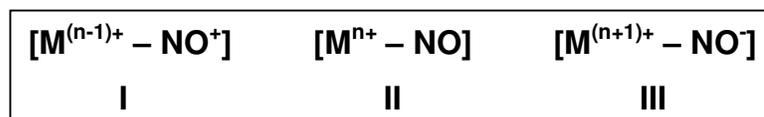


FIGURA 1.6: Possíveis configurações eletrônicas na ligação metal-NO.

1.3 Envolvimento fisiológico do óxido nítrico

O óxido nítrico é continuamente sintetizado em todo o corpo humano e mamíferos em geral, pela enzima cNOS (óxido nítrico sintetase constitutiva), possuindo expressivo número de funções regulatórias e sinalizadoras essenciais para uma boa saúde. A síntese do NO *in vivo* ocorre pela oxidação do aminoácido L-arginina que passa a citrulina, catalisada pela enzima NO sintetase (NOS) utilizando NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e O₂ como co-substratos, segundo reação abaixo (FIGURA 1.7) (IGNARRO, 2000).

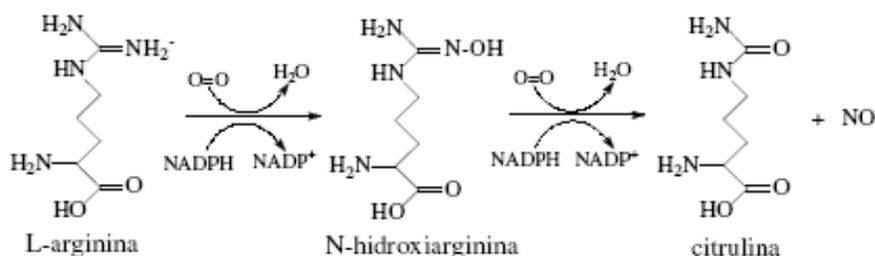


FIGURA 1.7: Representação da síntese do NO *in vivo* (IGNARRO, 2000).

São expressivas as evidências de que o NO é importante em uma grande variedade de processos fisiológicos dos mamíferos, incluindo regulação de genes, citostase, apoptose, função plaquetária, vasodilatação, controle da pressão sanguínea, sistema imunológico; atua como um mensageiro secundário no sistema nervoso periférico e no cérebro, nos processos de memória e aprendizagem (IGNARRO, 2000).

É relevante mencionar mais detalhadamente a participação do NO como mensageiro celular causando a vasodilatação. A FIGURA 1.8 ilustra este processo, onde se observa que mensageiros químicos como a acetilcolina ativam a enzima eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial) ligando-se a receptores apropriados na membrana da célula endotelial. Estas ligações provocam a abertura de canais que permitem que o Ca²⁺ penetre na célula, levando a um aumento na concentração de Ca²⁺ dentro da célula e ativando a enzima eNOS. O NO produzido (mecanismo

representado na FIGURA 1.7), difunde-se da célula endotelial para a célula muscular, onde ativa a enzima sGC (guanilato ciclase solúvel) que participa da conversão do GTP (guanosina trifosfato) a cGMP (guanilato monofosfato cíclico), que será detalhado mais adiante. O aumento da concentração de cGMP ativa a parte final do mecanismo causando relaxamento muscular e aumento do fluxo sanguíneo (BUTLER & NICHOLSON, 2003).

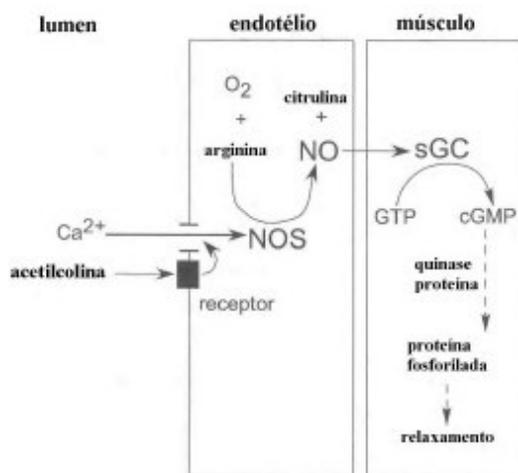


FIGURA 1.8: Ativação do relaxamento da musculatura vascular pela acetilcolina com o NO atuando como molécula mensageira (BUTLER & NICHOLSON, 2003).

Devido ao grande envolvimento do NO em funções fisiológicas importantes não é de se estranhar que alterações no seu metabolismo levem a distúrbios, que estão relacionados a baixos ou altos níveis de NO circulando no sangue. O primeiro caso ocorre, por exemplo, quando a enzima cNOS (óxido nítrico sintetase constitutiva) tem sua atividade enfraquecida levando à hipertensão essencial. Por outro lado a superprodução é um fator importante em doenças como diabetes, artrite, epilepsia e choque séptico. A produção excessiva de NO ocorre, por exemplo, quando o nível de bactérias circulando no sangue está alto. Isto estimula a enzima i-NOS (óxido nítrico sintetase induzida) a produzir NO (FRICKER, 1995).

Muito tem sido feito na procura por drogas que atuem junto ao NO. Para o caso de produção excessiva de NO ainda não existem drogas disponíveis comercialmente, mas terapias alternativas têm se concentrado no desenvolvimento de inibidores da enzima iNOS. Outra possibilidade consiste em remover o NO pelo uso de um capturador específico, com alta afinidade pelo NO e não tóxico, e para este fim complexos de Ru têm se mostrado bastante promissores (CZAP *et al.*,

2004; CZAP & van ELDIK, 2003). Recentemente foram relatados resultados de testes utilizando os complexos de rutênio $K[Ru(Hedta)Cl]$ (FRICKER, 1995; FRICKER *et al.*, 1997) (Hedta = ácido etilenodiaminotetraacético), $[Ru(edta)(H_2O)]^-$ (WANAT *et al.*, 2002), $[Ru_2(ttha)(H_2O)_2]^{2-}$ (CHEN & SHEPHERD, 1997) (ttha = trietilenotetraminahexaacetato), e $[Ru(tacn)(h^2-dtc)(h^1-dtc)]PF_6$ (CAMERON *et al.*, 2003) (tacn = 1,4,7-triazaciclono-nano) como potenciais e eficientes capturantes de NO em sistemas biológicos. Na FIGURA 1.9 estão ilustrados duas estruturas desses complexos.

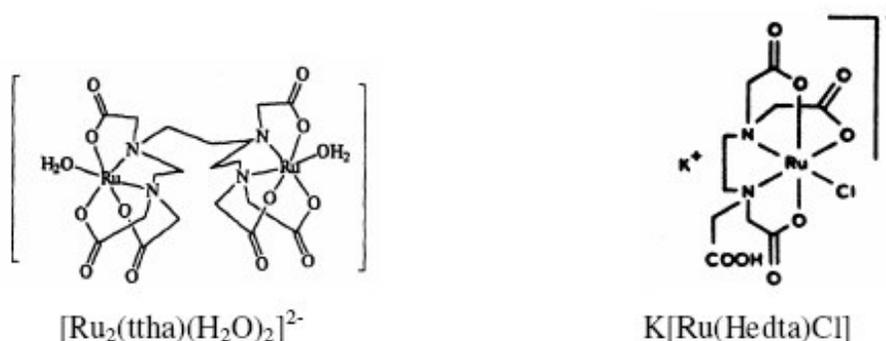


FIGURA 1.9: Exemplos de complexos capturadores de NO (VON POELHSITZ, 2005).

As drogas vasodilatadoras já são conhecidas há muito tempo sendo as mais utilizadas o trinitrato de glicerina e o complexo de ferro nitroprussiato de sódio que, entretanto, apresentam efeitos colaterais sérios. Este fato tem estimulado a busca por novos compostos com atividade vasodilatadora, e compostos bastante promissores para este fim são os nitrosotióis (WILLIAMS, 1998) e os nitrosilo complexos metálicos.

Muitos trabalhos têm apresentado estratégias para a liberação controlada de NO de uma ampla variedade de nitrosilo complexos envolvendo alguns metais, principalmente rutênio. Nitrosilos de rutênio têm se mostrado termicamente estáveis, porém fotolábeis, liberando NO quando expostos à irradiação ultravioleta e em alguns casos, irradiação visível. Um exemplo de complexos de rutênio que atuam como precursores foto-sensíveis de NO é a série *trans*- $[Ru(NH_3)_4(L)(NO)]^{3+}$ (L = $P(OEt)_3$, piridina, 4-metil-piridina e outros N-heterocíclicos), que em solução aquosa com irradiação no ultravioleta (300-370 nm) resulta em dissociação do NO formando *trans*- $[Ru(NH_3)_4(L)(H_2O)]^{3+}$ com rendimentos quânticos variando de 0,03 a 0,30 dependendo de L, I_{irr} e pH (CARLOS *et al.*, 2004) (FIGURA 1.10).

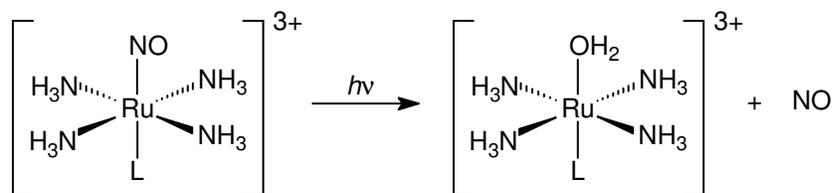


FIGURA 1.10: Representação esquemática da formação do composto $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$ através da dissociação do NO (CARLOS *et al.*, 2004).

O NO produzido no organismo age como um agente sinalizador ativando várias enzimas que possuem uma característica em comum: a presença de um metal, usualmente ferro, mas também cobre ou zinco. Neste sentido, muitas das atividades biológicas do NO podem ser atribuídas à formação de nitrosilo complexos com as enzimas.

Alguns autores têm sugerido que, sob condições fisiológicas, complexos metálicos de massa molecular baixa ou metaloproteínas são agentes chaves em reações de nitrosação induzidas por NO já que o NO livre não é uma espécie nitrosante. O íon metálico, então, desempenharia o papel de ativador do NO (FONTECAVE & PIERRE, 1994). A FIGURA 1.11 ilustra a nitrosação do grupo tiol de uma proteína formando um nitrosotiol.

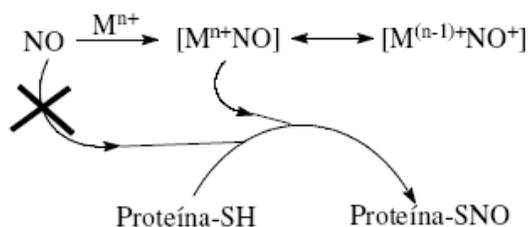


FIGURA 1.11: Nitrosação de uma proteína-tiol por NO coordenado a metal (FONTECAVE & PIERRE, 1994).

Um exemplo de como a química de coordenação participa ativamente dos processos biológicos do NO, refere-se a uma classe de heme proteínas, encontradas na saliva de certos insetos que se alimentam de sangue, conhecida como nitroforinas (NPs). Estas substâncias apresentam como função armazenar NO na glândula salivar do inseto e transportá-lo e liberá-lo no tecido da vítima, onde induz vasodilatação e inibe a coagulação do sangue. *Rhodnius prolixus*, que carrega o tripanossomo responsável pela Doença de Chagas na América do Sul, possui seis destas proteínas nomeadas NP1-6 (DING *et al.*, 1999).

As nitroforinas do *Rhodnius* são heme proteínas férricas que ligam o NO mais fortemente no pH da saliva do inseto ($\text{pH} \cong 5$), onde podem ser armazenados por um longo período sem reduzir o heme ou reagir com oxigênio. Elas ajudam a alimentação do inseto pela liberação de NO no tecido hospedeiro, que ocorre pela diluição e aumento do pH, induzindo uma vasodilatação local. As nitroforinas também seqüestram a histamina que é liberada pela vítima em resposta ao dano provocado pelo inseto. Estas moléculas têm sido bem caracterizadas por estudos bioquímicos, cinéticos, espectroscópicos e cristalográficos buscando-se entender o mecanismo pelo qual o NO é transportado, protegido e liberado no hospedeiro. A FIGURA 1.12 representa a estrutura de uma das NPs (DING *et al.*, 1999).

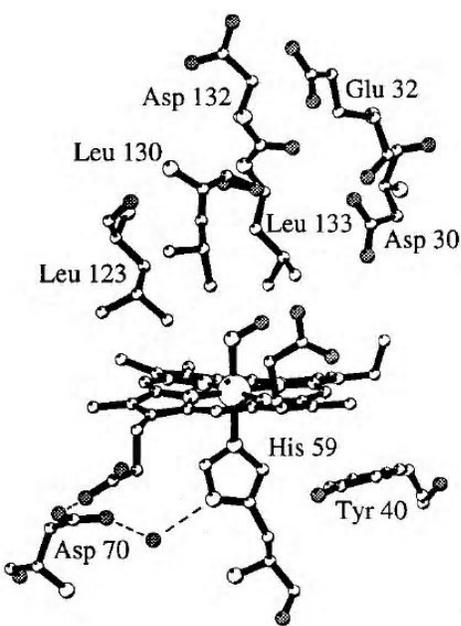


FIGURA 1.12: Estrutura da NP1 mostrando os grupos His-59, heme e o NO bem como as cadeias laterais das proteínas vizinhas (DING *et al.*, 1999).

1.4 Nitrosilo complexos como Quimioterápicos

Complexos Ru-NO também são investigados como potenciais agentes antitumorais uma vez que se a liberação do citotóxico NO puder ser induzida dentro das células tumorais, a morte celular pode ocorrer. Por exemplo, o *cis*-(Cl,Cl)[Ru^{II}Cl₂(NO⁺)(terpy)]Cl foi avaliado frente a linhagem de células tumorais A2780 (carcinoma de ovário humano) e A2780*cis*R, a correspondente linhagem celular pouco ativa na cisplatina, apresentando resultados promissores neste sentido

(KARIDI *et al.*, 2005). Os resultados para este e outros complexos são apresentados na TABELA 1.1

TABELA 1.1: Valores de IC₅₀ para o *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl₂(terpy)(NO)]Cl e compostos similares contra linhagem de células A2780 e A2780*cisR* obtidos em soluções de DMSO.

Composto	IC ₅₀ em A2780 / μM	IC ₅₀ em A2780 <i>cisR</i> / μM
<i>cis</i> -(Cl,Cl)-[RuCl ₂ (terpy)(NO)]Cl	0,49	0,64
[RuCl ₃ (terpy)]	11	32,5
α-[RuCl ₂ (azpy) ₂]Cl	0,86	0,98
Cisplatina	1,45	2,6
Carboplatina	9,4	42,8

Foi visto que o nitrosilo complexo apresentou atividade muito melhor que o *mer*-[RuCl₃(terpy)]. É possível que esta melhora de atividade se deva a presença do grupo nitrosilo no *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl₂(terpy)(NO)]Cl, entretanto uma base molecular detalhada precisa ser estudada e outros fatores, tais como a solubilidade ou razões estruturais podem ser responsáveis. O complexo α-[RuCl₂(azpy)₂]Cl foi considerado como um dos mais ativos, possuindo IC₅₀ próximo, mas não melhor que o complexo contendo NO, *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl₂(terpy)(NO)]Cl. Este complexo mostrou uma maior atividade que a cisplatina e a carboplatina na linhagem celular A2780 e na linhagem celular resistente A2780*cisR*, confirmando que a atividade do complexo *cis*-(Cl,Cl)-[RuCl₂(terpy)(NO)]Cl não é influenciada pelos mecanismos de resistência dessas células.

Um outro exemplo é o *trans*-Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃. Este é um composto muito promissor entre outros compostos sintetizados, pois o seu E⁰ (NO⁺/NO⁰), igual a -0,10 V vs. SCE, é acessível a redutores biológicos e, após a transferência de um elétron para o íon *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺, NO⁺ é reduzido a NO⁰, liberando assim o NO (TORSONI *et al.*, 2002).

Foram comparados os efeitos hipotensivos e a toxicidade do *trans*-Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃ e do Na₂[Fe(CN)₅NO] (SNP) em ratos machos adultos. A dose letal aproximada para o *trans*-Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃ foi 257,5 mol.Kg⁻¹,

dose esta que corresponde a LD₅₀ (dose letal da droga requerida para a morte de 50% dos animais) de 30% da maioria das substâncias químicas utilizadas (TORSONI *et al.*, 2002). Baseado no IC₅₀ (> 2,0 mM) e LD₅₀ (257,5 mol.Kg⁻¹), o *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ foi significativamente menos tóxico que o SNP (IC₅₀ = 0,06 mM e LD₅₀ = 15 mol.Kg⁻¹). A LD₅₀ do *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ foi comparada a LD₅₀ de outros nitrosilos compostos como o [Ru(NH₃)₅(NO)]Cl₃, K₂[RuCl₅(NO)], e Na₂[Ru(CN)₅(NO)], que produzem paralisia de membros, dificuldade respiratória e morte por insuficiência respiratória em ratos. A LD₅₀ para estes complexos está entre 27 e 443 mol.Kg⁻¹ (TORSONI *et al.*, 2002).

O papel do NO na biologia do tumor é complexo, uma vez que possui tanto papel facilitador, quanto inibidor dos processos celulares, dependendo das condições, tais como combinação genética das células, a concentração local de NO e a presença de outros reguladores, como os capturadores de NO (LALA, 1998). Se produzido de maneira sustentável e em baixas concentrações, o NO pode ajudar no crescimento e metástases de tumores devido à potenciação da angiogênese (ZICHE *et al.*, 1997). Ele também é capaz de proteger as células tumorais da apoptose induzida por outros estimuladores pró-apoptóticos (CHATTOPADHYA, 1999; MELINO *et al.*, 2000).

Entretanto, o NO produzido em maiores quantidades, por macrófagos que se infiltram nos tumores ou pelo próprio tumor, eficientemente destrói tumores. Por exemplo, uma possibilidade para explicar a atividade do (H₂im)[*trans*-RuCl₄(Him)(dmsu)] (NAMI-A) é que ele interfere no metabolismo do NO *in vivo* (SERLI *et al.*, 2002). Existem muitos dados mostrando que a prevenção da síntese do NO em macrófagos co-cultivados com células tumorais *in vitro* previne a ação antitumoral do macrófago (MILJKOVIC *et al.*, 2002; HARHAJI *et al.*, 2004). Existem dados também sugerindo que algumas drogas reconhecidamente antitumorais reduzem a geração de NO em macrófagos e/ou células tumorais, o que poderia explicar a incompleta efetividade dos mesmos como quimioterápicos (MILJKOVIC *et al.*, 2004).

Recentes pesquisas no caminho fisiológico do NO estimularam interesse em sua química e bioquímica, embora estudos estivessem limitados, principalmente devido a seu curto tempo de meia-vida. Uma dificuldade em entender alguns aspectos da biologia do NO está relacionada à ausência de agentes doadores de NO que possam produzi-lo por estimulação externa, que poderia ser superada

desenvolvendo novos agentes doadores de NO, como os nitrosilo complexos metálicos (LUNARDI *et al*, 2006).

Então, não é surpresa que a procura por metalonitrosilo complexos para serem usados como agentes potencialmente capazes de libertar NO *in vivo* se tornou uma área de pesquisa muito ativa recentemente. Uma estratégia seria empregar um precursor que exibisse reatividade térmica relativamente baixa, mas que fosse fotoquimicamente ativo para ceder NO quando sujeito à excitação eletrônica. Deste modo, nitrosilo complexos de rutênio parecem ser candidatos muito bons devido estes exibirem alta estabilidade em solução aquosa, podendo ser um agente entregador de NO quando sujeito à redução eletroquímica ou irradiação por luz. O possível uso deste tipo de sistema em terapia clínica dirigiu os estudos para uma melhor compreensão de suas propriedades químicas e biológicas (LUNARDI *et al*, 2006).

Até agora, um grande número de complexos de rutênio foram sintetizados e testados como potenciais terapêuticos. Foram feitos estudos de seus modos de ação, e relações de estrutura–atividade foram sugeridas. Porém, muitos detalhes ainda são desconhecidos, e sua clarificação permanece como uma tarefa desafiadora para a pesquisa interdisciplinar.

1.5 Química Inorgânica no Tratamento do Câncer

Embora os metais de transição ocupem muitas posições-chave em processos biológicos, drogas baseadas em metal são tradicionalmente subestimadas pela indústria farmacêutica, que é dominada pela química orgânica. Contudo, vários compostos de coordenação foram aplicados na terapia de várias doenças (por exemplo, complexos de ouro contra artrite, compostos de bismuto como drogas anti-úlceras, ou compostos de platina contra câncer) (HARTINGER *et al*, 2006).

Quimioterapia com complexos de Pt é um dos principais pilares no tratamento de câncer atualmente. De milhares de complexos de Pt^{II} sintetizados e avaliados, somente três – cisplatina (*cis*-diaminadichloroplatina (II)) (FIGURA 1.13(a)), carboplatina (diamina(ciclobutano-1,1-dicarboxilato) platina (II)) (FIGURA 1.13(b)) e oxaliplatina ((*trans*-L-diaminaciclohexano)oxalatoplatina (II)) (FIGURA 1.13(c)) – foram aprovados para prática clínica mundial (em 1978, 1993 e 2002, respectivamente), enquanto a nedaplatina (*cis*-diamina-glicolatoplatina (II))

(FIGURA 1.13(d)), a lobaplatina (1,2-diaminometilciclobutano-platina (II)) (FIGURA 1.13(e)) e a heptaplatina (*cis*-malonatol {(4R,5R)-4,5-bis(aminometil)-2-isopropil-1,3-dioxolano} platina (II)) (FIGURA 1.13(f)) só foram aprovadas como agentes anti-câncer no Japão, China e Coréia do Sul, respectivamente (GRIFFITH *et al.*, 2007). As fórmulas estruturais dos compostos de platina citados acima estão representadas na FIGURA 1.13 (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Atualmente fármacos inorgânicos, tais como a cisplatina e compostos relacionados, são utilizados com sucesso no tratamento de vários tipos de câncer com alta incidência na sociedade, como ovariano e testicular (ANG & DYSON, 2006). Entretanto, existem problemas associados aos seus usos; em particular, a cisplatina é altamente tóxica, levando à efeitos colaterais e limitando a dosagem que pode ser administrada (ANG & DYSON, 2006). Novos desenvolvimentos no desenho de fármacos à base de platina têm procurado alguma maneira de reduzir a toxicidade destes compostos bem como expandir a faixa de uso para outros tipos de câncer (SCOLARO *et al.*, 2005).

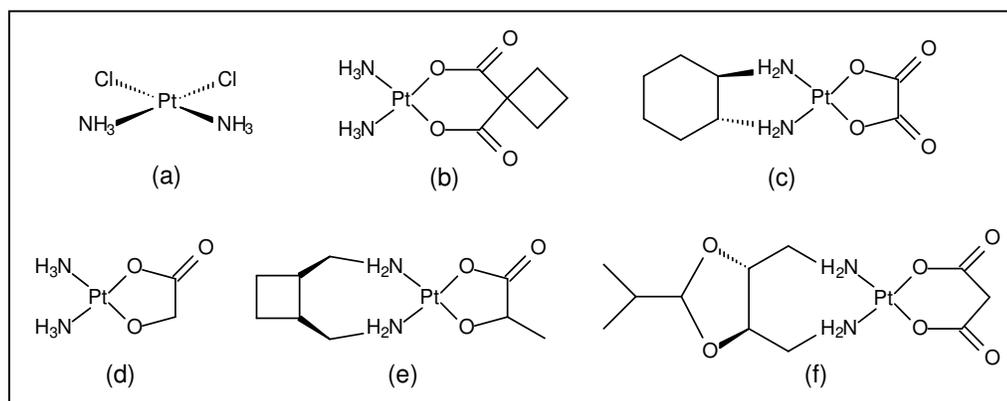


FIGURA 1.13: Fórmulas estruturais de alguns compostos de platina: Cisplatina (a); Carboplatina (b); Oxaliplatina (c); Nedaplatina (d); Lobaplatina (e); e Heptaplatina (f) (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Muitos cientistas têm direcionado suas pesquisas para a obtenção de complexos que apresentem eficientes atividades antitumorais com outros metais de transição (CLARKE *et al.*, 1999), trazendo possíveis vantagens em relação à platina, tais como a presença de sítios de coordenação adicionais (complexos octaédricos), alterações na afinidade do ligante pelo metal e da cinética de substituição, mudanças no estado de oxidação e a possibilidade de utilização da terapia fotodinâmica (MALINA *et al.*, 2001).

1.5.1 Química de Coordenação e Quimioterápicos - Considerações Gerais

Utilizando a suposição de que a atividade antitumoral requer um complexo de labilidade química intermediária, a química fundamental de coordenação pode ajudar a postular os sistemas que possuem boas possibilidades de sucesso, podendo assim, se estudar complexos relativamente simples dos metais de transição que possuam as principais propriedades cinéticas e termodinâmicas da cisplatina (DREHER, 2004), ou que sejam adequadas para serem utilizadas como quimioterápicos.

1.5.2 Complexos de Rutênio como Quimioterápicos

A química sintética do rutênio é bem desenvolvida, particularmente com ligantes aminas e iminas, e provê muitas aproximações para novos e inovadores metalofarmacêuticos. Devido a forte estabilização de campo ligante, os estados de oxidação mais comuns [Ru(II), Ru(III), e Ru(IV)] em solução aquosa são normalmente octaédricos e são freqüentemente bastante inertes a substituição de ligantes. As vantagens de utilizar complexos de rutênio-amina no desenvolvimento de drogas incluem: (1) métodos seguros de sintetizar complexos estáveis com estruturas previsíveis; (2) habilidade para ajustar a afinidade dos ligantes, transferência de elétrons e velocidades de substituição, e potenciais de redução; e (3) conhecimento crescente dos efeitos biológicos de complexos de rutênio (CLARKE, 2002).

As primeiras investigações sistemáticas de complexos de rutênio e suas propriedades antitumorais foram feitas nos anos 80 com os compostos *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] e *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, precedida pela descoberta feita nos anos 70 que rutênio possui propriedades antitumorais (VON POELHSITZ, 2005). Em 1987, Keppler relatou a síntese e caracterização estrutural do [ImH][*trans*-RuCl₄(Im)₂], o ICR, que apresenta interessantes propriedades antitumorais em modelos animais e inspirou a síntese de compostos relacionados, como o [indH][*trans*-RuCl₄(ind)₂] (KP1019 ou FFC14A; ind = indazol) que recentemente entrou em testes clínicos fase I (KEPPLER *et al.*, 1990; KUNG *et al.*, 2001; RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, 2004) (FIGURA 1.14).

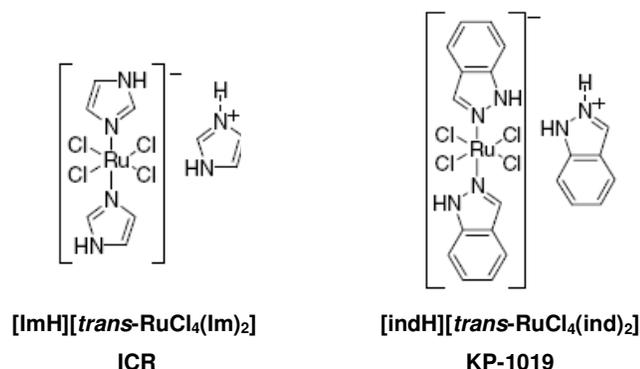


FIGURA 1.14: Fórmulas químicas do ICR e KP1019.

Mais adiante realizações sintéticas conduziram ao desenvolvimento do $(\text{Na})[\textit{trans}\text{-RuCl}_4(\text{Him})(\text{dmsO})]$ (Him = imidazol). Este composto conhecido por NAMI (acrônimo para **New Anti-tumor Metastasis Inhibitor**), é ativo contra carcinoma de Lewis de pulmão, melanoma B16 e carcinoma mamário MCa, possuindo um efeito antimetastático não apresentado pela cisplatina. O NAMI-A é derivado do NAMI pela substituição do Na^+ por ImH^+ , sendo as primeiras drogas anti-câncer de rutênio a entrar em testes clínicos (SAVA *et al.*, 1999; SAVA & BERGAMO, 2000; BERGAMO *et al.*, 2002; HARTINGER *et al.*, 2006) (FIGURA 1.15).

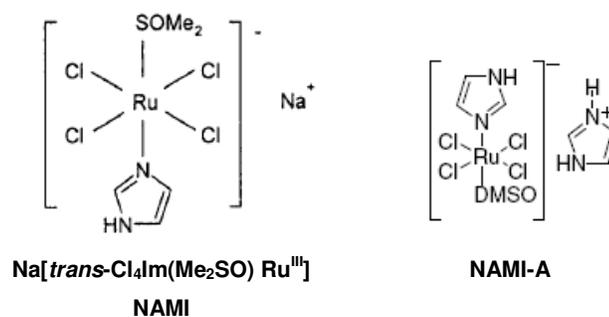


FIGURA 1.15: Fórmulas químicas dos compostos NAMI e NAMI-A.

Devido sua estrutura octaédrica, oposta a geometria quadrado planar dos complexos de Pt(II), complexos de Ru(II) e Ru(III) provavelmente funcionam de maneira diferente da cisplatina, que através de quebras de ligações se liga a guaninas adjacentes do DNA, com conseqüente ativação dos mecanismos de reparo que levam a morte celular (apoptose) (CLARKE, 2002).

Um dos principais mecanismos que tem sido atribuído à ação dos complexos de Ru(III) tem sido a hipótese de ativação por redução. A idéia de explorar o baixo

nível de O₂ em muitos tumores sólidos pela seletiva ativação por redução de drogas biorredutivas, foi uma vantagem terapêutica emergida nos anos 70 pelo desenho de citotoxinas baseadas em quininas orgânicas. Investigações em drogas com metais, ativadas por redução, foram iniciadas alguns anos depois, com complexos de Ru(III) e Pt(IV). Desde então, a estratégia tornou-se crescentemente popular, pois vários complexos metálicos existem em estados de oxidação altos bastante inertes em solução aquosa (por exemplo, Ru(III), Pt(IV), Co(III)), e são mais lábeis em estados de oxidação reduzidos (por exemplo, Ru(II), Pt(II), Co(II)) (REISNER *et al.*, 2008). Neste sentido os complexos de metais de transição podem servir como pró-drogas que são ativadas por redução *in vivo* e podem se coordenar rapidamente a biomoléculas.

Outra possibilidade tem sido a ligação covalente desses complexos às moléculas de DNA. Em revisão publicada em 2002, Clarke relata que apesar de anteriormente se ter encontrado apenas resultados modestos de citotoxicidade para complexos de Ru(II), mais recentemente atividade significativa tem sido notada para complexos com ligantes heteroaromáticos como o *cis*-[RuCl₂(azpy)₂] (CLARKE, 2002). Possíveis razões apontadas pelo autor para estes bons resultados são: (1) diminuição na velocidade de aquação dos cloretos devido ao efeito π -receptor dos ligantes iminas aumentarem a carga efetiva no metal, de forma que a velocidade de hidrólise é da mesma magnitude da cisplatina; (2) aumento hidrofóbico ou interações intercaladas com o DNA, as quais podem facilitar ligações covalentes; (3) efeito geométrico exercido pelos ligantes, os quais podem facilitar (ou inibir) ligações com proteínas de ácidos nucleicos (CLARKE, 2002).

Outros complexos de Ru(II) estudados recentemente com importantes resultados em testes com células tumorais, são organometálicos contendo ligantes arenos. Ligantes arenos estabilizam o Ru(II) e provê uma face hidrofóbica que pode aumentar o reconhecimento e transporte por membranas celulares (CLARKE, 2002).

Estes complexos apresentam-se citotóxicos para células cancerígenas, incluindo células resistentes à cisplatina. Em adutos de nucleotídeos, $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$ exibem alta seletividade para o N7 da guanina e, em contraste com a cisplatina, mostra pequena interação com a adenina. Reações destes complexos cloro-Ru(II)-areno com nucleotídeos parecem envolver uma aquação inicial, e ligações Ru-OH₂ parecem ser mais reativas que ligações Ru-OH, um

comportamento parecido ao de complexos anticancerígenos diamina-Pt(II) (WANG *et al*, 2005).

1.5.3 Os Ligantes Fosfínicos e Aplicações na Medicina

Um grande número de estudos de compostos de coordenação vem se multiplicado devido à síntese de complexos com mistura de ligantes em sua esfera de coordenação, ou seja, ligantes que estejam coordenados ao rutênio (II) através de outros átomos que não o nitrogênio (C, P, O, S, halogêneos, etc) (KLASSEN & DELPUP, 2002). A versatilidade dos ligantes fosfínicos está em suas propriedades estéricas e eletrônicas que exercem grande influência na geometria desses complexos, e desta forma, a combinação desses fatores determinam a reatividade e estabilidade na esfera de coordenação do centro metálico (LENERO *et al*, 2003).

Apesar da toxicidade de algumas fosfinas, muitos dos seus complexos com metais de transição funcionam como agentes antitumorais, porém o processo de morte celular deve ser o mais seletivo possível, o que não é propriamente o caso de algumas fosfinas, as quais são letais para as células, indistintamente. Seguramente, a forma de atuação de um determinado agente químico no organismo é o que distingue um agente quimioterápico de um farmacológico, pois enquanto o primeiro é radical em sua ação, o segundo age de forma mais amena, modificando a resposta biológica do organismo hospedeiro ou alterando a sua reversibilidade bioquímica, sem, contudo, necessariamente, matar as células (QUEIROZ & BATISTA, 1996).

1.5.3.1 Propriedades Gerais das Fosfinas

As fosfinas possuem um par de elétrons capaz de formar ligações σ estáveis e orbitais híbridos, do tipo $3p\sigma^*d\pi$ vazios, capazes de receber elétrons (MARYNICK, 1984; ORPEN & CONNELLY, 1985; PACCHIONI & BAGUS, 1992). Assim são adequados à retrodoação. Neste tipo de ligação química a densidade eletrônica é sinergisticamente compartilhada entre o ligante e o metal, originando ligações mais estáveis (FIGURA 1.16).

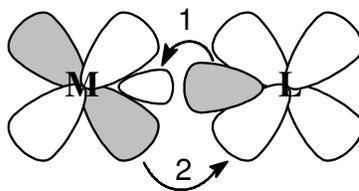


FIGURA 1.16: Representação das interações M–L: 1 = ligação σ ; 2 = retrodoação π .

As fosfinas conseguem combinar as propriedades da ligação σ doadora forte como as aminas, com as ligações π receptoras, semelhantes ao monóxido de carbono, tornando-se ligantes muito versáteis, capazes de estabilizar as valências mais altas e as mais baixas de metais de transição, além de exercerem alterações fundamentais sobre a reatividade do centro metálico e apresentarem um acentuado efeito *trans* labilizante (DEKOCK & GRAY, 1989; MCAULIFFE & MACKIE, 1994; HUHEEY *et al*, 1993; BATISTA & QUEIROZ, 2006).

O efeito *trans* razoavelmente acentuado, aliado aos efeitos estéricos, usualmente leva à formação de complexos facilmente dissociáveis, capazes de gerar um sítio vago de coordenação, condição esta indispensável em catalisadores homogêneos (pelo envolvimento de reações de transferência de elétrons ou aproveitando a força do ligante para estabilizar o complexo) e também de interesse na citotoxicidade de complexos fosfínicos (BOSNICH, 1994; QUEIROZ & BATISTA, 1996).

A possibilidade de variar os grupos substituintes ligados ao átomo de fósforo com grupos doadores ou receptores de densidade eletrônica torna as fosfinas interessantes para o estudo dos efeitos dos ligantes (L) na labilidade da ligação de alguns complexos do tipo P - M - L, bem como na afinidade do centro metálico por tais ligantes. Outro aspecto interessante da versatilidade das fosfinas refere-se ao impedimento estérico. Aumentando-se o tamanho do substituinte R em compostos do tipo $P(OR)_3$ ou PR_3 , é possível aumentar os ângulos R - P - R (ângulo de cone de Tolman (TOLMAN, 1977).

As alterações nos substituintes R, de fosfinas terciárias podem causar mudanças significativas nas propriedades químicas e físicas de seus complexos com metais de transição, incluindo a força da ligação metal-fosfina, tornando-o, por exemplo, mais ou menos solúvel no meio desejado, o que é importante quando se tem em vista processos catalíticos ou biológicos.

O entendimento das propriedades exibidas pelas fosfinas, quando livres ou coordenadas ao metal, é relevante do ponto de vista da bioquímica medicinal, pois pode conduzir a tentativas de modelagens racionais no desenvolvimento de drogas envolvendo estas espécies. Esta racionalidade está estreitamente relacionada com a perfeita compreensão de algumas das características impostas pelas fosfinas aos seus respectivos complexos metálicos, embora o próprio metal exerça um papel importante na atividade antitumoral (QUEIROZ & BATISTA, 1996).

1.5.3.2 Atividade Antitumoral de Complexos Fosfínicos de Metais de Transição

A importância das fosfinas em compostos de coordenação não está restrita ao seu uso apenas em catálise, pois a primeira descoberta do envolvimento de complexos metálicos contendo estes ligantes em atividades antitumorais ocorreu há mais de 40 anos (SIMON *et al*, 1979; QUEIROZ & BATISTA, 1996; BERNERS-PRICE *et al*, 1987a; BERNERS-PRICE *et al*, 1987b). Destaca-se que os ligantes bifosfínicos, quando livres, são também ativos, ainda que em menor extensão (SIMON *et al*, 1979; BERNERS-PRICE *et al*, 1987b; QUEIROZ & BATISTA, 1996).

Um exemplo de complexos com atividade antitumoral são os complexos binucleares de ouro $[\text{Cl-Au-}((\text{Ph})_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{P}(\text{Ph})_2)\text{-Au-Cl}]$, que são ativos em vários tipos de modelos tumorais em ratos, e os ligantes bifosfínicos correspondentes também são ativos embora muito menos potentes do que os complexos de Au(I). A atividade das bifosfinas, dos complexos em ponte ou quelatos contra a linhagem P388 (leucemia) é perdida quando os grupos fenil são substituídos por grupos etil (BERNERS-PRICE *et al*, 1987a), deixando claro que a alta citotoxicidade, e atividade antitumoral são devidas principalmente à presença do ligante fosfina em sua estrutura.

A lipofilicidade introduzida nos complexos de ouro, através da coordenação de um alquil ou fenilfosfina, parece ser responsável por esta maior citotoxicidade dos complexos fosfínicos na medida em que se confere aos mesmos a propriedade necessária para a penetração na membrana celular, que é de natureza lipoprotéica (QUEIROZ & BATISTA, 1996).

Complexos bifosfínicos de cobre(I) também exibiram atividade antitumoral contra a linhagem P388 em ratos, e esta atividade foi comparada com a de complexos bifosfínicos de Au(I). Ambos complexos de Au(I) e Cu(I) $[\text{Cu}(\text{P-P})_2]^+$ e

[Au(P-P)₂]⁺ são pelo menos 20 vezes mais potentes do que os ligantes sozinhos nesta mesma linhagem celular (BERNERS-PRICE *et al*, 1987b; LEWIS *et al.*, 1998).

O complexo [Au(dppe)₂]Cl não perde sua atividade contra a linhagem P388 (leucemia), a qual é resistente à cisplatina, e além disso, [Au(dppe)₂]Cl e cisplatina podem ser administrados concomitantemente as suas respectivas doses máximas toleradas em tumores de ratos, sem letalidade. A combinação é mais efetiva contra leucemia moderadamente avançada P388 do que a cisplatina sozinha. Esses resultados indicam que o mecanismo ou o local de ação do complexo bifosfínico é diferente daquele da cisplatina (JARRETT & SADLER, 1991).

Complexos fosfínicos com outros metais, que não o ouro, foram sintetizados e avaliados contra diversas linhagens de células tumorais apresentando boa atividade. Por exemplo: complexos de Ru-areno-fosfina e organometálicos de Pd(II) contendo dppp, dppb e dppf mostraram atividade *in vitro* e *in vivo* (BINCOLETTO *et al*, 2005).

Contudo, observou-se para alguns casos, que mudanças no substituinte fosfínico conduziram a uma maior ou menor atividade antitumoral *in vivo*. Neste sentido, a relação estrutura química – atividade biológica (aumento na lipofilicidade – aumento na potência citotóxica) pode ser a causa das diferentes atividades observadas a partir da alteração do substituinte fosfínico, indicando distintas capacidades de associação celular de cada complexo.

A baixa reatividade do [Au(dppe)₂]Cl frente a tióis, soro protéico ou dissulfetos, permitiu sugerir que a atividade farmacológica desse complexo é decorrente da liberação da bifosfina dppe, a qual deve ser o próprio agente citotóxico, no alvo biológico apropriado. Assim, a baixa reatividade do [Au(dppe)₂]Cl frente a tióis permite que o Au(I) libere a bifosfina tóxica no alvo crítico, ou seja, no interior da célula cancerosa. Dentro deste contexto, o metal nesse complexo estaria desempenhando um papel importante, protegendo o ligante de oxidação *in vitro* e *in vivo*, antes que o mesmo tenha a oportunidade de interagir com o alvo celular crítico. Esta propriedade é significativa, uma vez que bifosfinas oxidadas normalmente não são citotóxicas (DREHER, 2004).

A diversidade estrutural e a riqueza das fosfinas e de seus complexos podem conduzir a uma aplicação ampla dos mesmos na farmacologia e na medicina. Portanto, as fosfinas formam uma fantástica variedade de complexos, com atividades diversas, tanto em processos catalíticos, como em sistemas biológicos e o

conhecimento da química destes compostos pode permitir uma modelagem racional de novas drogas onde suas solubilidades, seus potenciais redox ou mesmo a labilidade de seus ligantes em sistemas biológicos podem ser determinantes e indicativos da viabilidade ou não do uso das mesmas, como fármacos ou quimioterápicos (QUEIROZ & BATISTA, 1996).

Em vista das características especiais das fosfinas nosso grupo de pesquisas encontra-se, há cerca de duas décadas, envolvido na síntese, caracterização e aplicações de compostos de rutênio contendo uma grande variedade de ligantes contendo fósforo em suas estruturas (VON POELHSITZ *et al*, 2007a; VON POELHSITZ *et al*, 2007b).

A síntese e avaliação de propriedades biológicas de complexos de rutênio com ligantes de importância biológica têm sido estudadas em nosso laboratório e nosso grupo de pesquisa tem tido interesse em nitrosilo complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos, primeiramente para explorar as propriedades estruturais, espectroscópicas e eletroquímicas de tais espécies com foco no efeito do tipo de isômero e co-ligantes sob as características eletrônicas do NO^+ (BATISTA *et al.*, 1997; BATISTA *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1995; VON POELHSITZ *et al.*, 2002; VON POELHSITZ *et al.*, 2007b; VON POELHSITZ *et al.*, 2006a; VON POELHSITZ *et al.*, 2006b).

Mais recentemente aplicamos alguns dos compostos em ensaios de citotoxicidade em uma linha de célula de tumor humano para avaliar suas potencialidades antitumorais (VON POELHSITZ *et al.*, 2007a). Resultados preliminares foram muito promissores e nos estimulou a explorar esta potencialidade em outros nitrosilo rutênio derivados.

1.6 Os Ligantes N-heterocíclicos

Os ligantes N-heterocíclicos são muito versáteis, podendo variar suas propriedades físicas e químicas com suas estruturas: sistemas aromáticos ou não, anéis de diferentes composições, compostos com anéis conjugados ou não, adição de grupos substituintes em diferentes posições, etc. (GERASIMCHUK & BOWMAN-JAMES, 1994). Estes ligantes são adequados à retrodoação, pois estes possuem orbitais π antiligantes vazios e um par de elétrons capaz de formar ligações σ fortes, podendo estabilizar íons metálicos em estado de oxidação baixo.

Um grande número de complexos de rutênio (II) com ligantes N-heterocíclicos tem sido extensivamente estudado (ALLEN & FORD, 1972). Uma das características destes compostos é a possibilidade de mimetizar moléculas biológicas que possuem propriedades particulares no metabolismo geral: ácidos nucléicos, proteínas, enzimas, alcalóides, etc (KAIM & SCHWEDERSKI, 1994). São também muito estudados devido ao seu envolvimento em catálise redox e reações de transferência eletrônica (JURIS *et al*, 1988). Dentre os ligantes N-Heterocíclicos pode-se destacar os ligantes piridínicos e bipyridínicos, em especial o ligante 2,2'-bipyridina e seus derivados.

Devido à estabilidade do ligante 2,2'-bipyridina e à labilidade dos átomos de cloro, o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ tem sido muito utilizado no preparo de uma grande variedade de complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{L}_2]^{n+}$, (L=ligantes diversos, monodentados), com a finalidade de investigar suas habilidades e propriedades redox, fotoquímicas e fotofísicas, modificando o ligante (L) e seus substituintes (HATHCOCK *et al*, 1997; DURHAM *et al*, 1980). Estudos realizados por Birchall *et al* (BIRCHALL *et al*, 1979), mostraram a troca do cloro, em solvólise, a dar o produto $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Cl})(\text{L})]\text{Cl}$ (L = DMSO e py), numa reação de primeira ordem, onde a configuração do produto se mantém igual a do composto de partida (*cis* ou *trans*). Em particular complexos desse tipo, onde se tem L = ligantes polipiridínicos, estão entre os compostos de metais de transição mais intensivamente estudados por praticamente três décadas, devido a uma combinação de estabilidade química e redox, propriedades físicas e fotoquímicas.

Sabe-se que complexos contendo moléculas aromáticas como bipyridinas, fenantrolinas e derivados destes ligantes são particularmente satisfatórios para reações de transferência de elétrons no estado excitado, sendo o complexo mais investigado o $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ por apresentar propriedades potenciais particulares para o estudo do problema da conversão de energia solar (BALZANI *et al*, 1978).

1.7 Ensaios de Citotoxicidade – considerações gerais

Ensaios de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células de tumor humano representam ainda o método padrão para um “*screening*” inicial de agentes antitumorais. Normalmente a primeira análise feita para qualquer composto potencial fármaco é o estudo do efeito do mesmo em cultura de células (WU *et al*, 2003). Este tipo de atividade pode fornecer uma estimativa de como as potenciais drogas se

comportarão *in vivo*. As células normais não crescem em cultura de tecido, mas as modificações genéticas que ocorrem em células cancerosas permitem que elas cresçam *in vitro*.

Deve-se sempre analisar os resultados obtidos de estudos com células, com precaução, uma vez que o ambiente utilizado é bastante diferente de um sistema real. No início do experimento, as condições de crescimento das células são otimizadas, assim, o ambiente se parece mais com aquele das células saudáveis do corpo humano. Entretanto, conforme as células crescem e resíduos de produtos são acumulados, o ambiente é mais representativo de células tumorais hipóxicas. Neste ponto as células começarão a morrer, assim a maioria dos experimentos utilizam células de câncer crescendo sob condições otimizadas, que são incubadas junto com o composto de interesse para observar se ele provoca a morte celular.

Uma das maneiras mais simples de se determinar a morte celular em culturas é usando o ensaio colorimétrico com o corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Em células vivas, MTT é reduzido na mitocôndria para formar cristais de formazan, cuja concentração do mesmo pode ser determinada espectrofotometricamente, após solubilização dos cristais (DMSO ou isopropanol) (MOSMANN, 1983). Se um composto provoca danos às células, ou inibe o crescimento celular, então a atividade mitocondrial é reduzida e esta redução pode ser quantificada espectrofotometricamente, que por sua vez pode ser correlacionada à atividade da droga (ALLARDYCE *et al*, 2005).

A citotoxicidade de um composto traz informações sobre sua aplicação específica, mas não dá qualquer informação sobre o mecanismo molecular de atividade da droga. É muito difícil identificar todas as biomoléculas com as quais uma droga interage, devido à complexidade das células dos mamíferos; cada célula contém pelo menos 10.000 diferentes proteínas, além de muitas outras moléculas pequenas, nucleotídeos e lipídeos (ALLARDYCE *et al*, 2005).

Sem dúvida, um importante alvo biológico para drogas anticâncer contendo metais é o DNA, uma vez que a replicação do DNA é fundamental para a progressão destas doenças (NOVAKOVA *et al*, 1995). Tipicamente as modificações do sistema de controle da célula que ocorrem em células doentes as tornam mais propensas a morrer como resultado em dano ao DNA, do que as células saudáveis (NOVAKOVA *et al*, 2003). Apesar do foco no DNA como alvo para a terapia do câncer seja muito provável sabe-se que este não é o único alvo no mecanismo molecular de atividade

de qualquer droga. Sabe-se, por exemplo, que a enzima topoisomerase II é um alvo comum para várias drogas, incluindo compostos anticâncer, antimalária e antivirais (GOPAL *et al*, 2002). A interação de metalodrogas com proteínas do plasma é também relevante e sabe-se que compostos de platina e rutênio podem se ligar a transferrina e albumina (ALLARDYCE *et al*, 2005; BERGAMO *et al*, 2003), o que pode ter papel importante na atividade antitumoral dos mesmos.

2. OBJETIVOS

A química do NO continua a receber atenção na medida em que novas descobertas do seu envolvimento fisiológico são feitas. Sabe-se que nitrosilo complexos metálicos estão envolvidos na bioquímica do NO e que são possíveis agentes farmacológicos para as patologias associadas ao NO (FRICKER *et al.*, 1997; CHEN & SHEPHERD, 1997; BAKHTIAR & OCHIAI, 1999), fato que nos estimula a buscar novos sistemas com tais habilidades. Dentro deste contexto os nitrosilo complexos desempenham papel fundamental devido às propriedades biológicas e bioquímicas largamente reconhecidas associadas ao NO.

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa em desenvolvimento no nosso grupo que busca compostos de coordenação com potenciais aplicações em sistemas biológicos para fins antitumorais, vasodilatadores e imunológicos, entre outros.

Os objetivos específicos desta dissertação são apresentados abaixo:

Obter complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆, a partir do precursor *fac*-[RuCl₃(NO)(dppp)], onde L são ligantes N-heterocíclicos monodentados, e avaliar suas propriedades por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, bem como avaliar suas potencialidades antitumorais *in vitro*. Os N-heterocíclicos monodentados utilizados no estudo foram piridina, 4-metilpiridina e 4-fenilpiridina.

Obter complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](PF₆)₂, a partir do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)], onde N-N são ligantes N-heterocíclicos bidentados, e avaliar suas propriedades por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, bem como avaliar suas potencialidades antitumorais *in vitro*. Os N-heterocíclicos bidentados utilizados no estudo foram 2,2'-bipiridina (bipy) e seus derivados substituídos 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me-bipy), 4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina (MeO-bipy), 4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina (Cl-bipy), e 1,10-fenantrolina (fen).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Atmosfera inerte, solventes, reagentes, ligantes e óxido nítrico

3.1.1 Obtenção da atmosfera de Argônio

Todas as preparações de complexos foram feitas sob atmosfera inerte. Esta foi obtida pela passagem de fluxo de argônio por uma coluna de purificação composta de camadas alternadas de anéis de vidro (0,5 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura) e catalisador do tipo BTS - R - 3 - 11 (Fluka Chemika), mantida a 60°C para o catalisador permanecer ativado, seguindo então para colunas contendo sílica gel e cloreto de cálcio, respectivamente. A coluna contendo o catalisador foi reativada periodicamente com H₂ à 120°C durante pelo menos 24 horas. Estes procedimentos foram necessários para desoxigenar e secar o gás comercial de procedência White Martins ou Aga.

3.1.2 Solventes

Os seguintes solventes, Synth P.A. ou Merck P.A., passaram por processos de purificação segundo os métodos usuais da literatura (PERRIN *et al.*, 1980): diclorometano, éter etílico, e metanol. O diclorometano grau HPLC foi utilizado como fornecido. Clorofórmio, acetona e água deuterados foram utilizados como recebidos da Fluka Chemika e/ou Aldrich.

3.1.3 Reagentes e produtos químicos em geral

Tricloreto de rutênio hidratado (RuCl₃.3H₂O) de procedência Aldrich, foi utilizado como recebido. Todos os seguintes reagentes também foram utilizados como fornecidos: ácido nítrico (Merck P.A. ou Synth P.A), ácido hexafluorofosfato (Aldrich), NaOH (Synth), Nitrito de Sódio (NaNO₂ - Aldrich), Na¹⁵NO₂ (ISOTEC – mín 98%), Hexafluorofosfato de Amônio (NH₄PF₆ - Aldrich ou Merck), cal sodada (Vetec), Brometo de Potássio (KBr - Merck P.A.) e perclorato de tetrabutílamônio (PTBA – Fluka Chemika).

3.1.4 Ligantes

As bifosfinas 1,3-bis(difenilfosfina)propano e 1,4-bis(difenilfosfina)butano (FIGURA 3.17) de procedência Aldrich, grau de pureza 97%, foram utilizadas como recebidas, sem tratamento prévio.

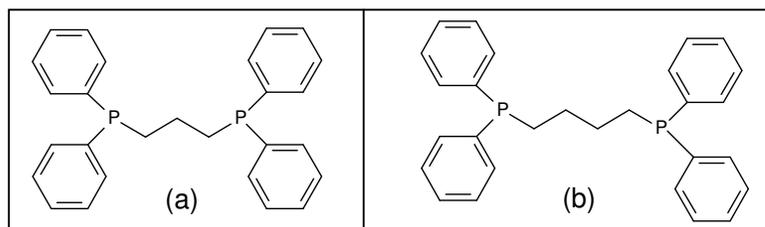


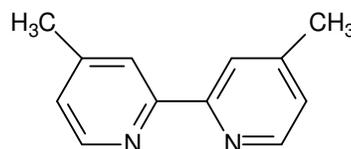
FIGURA 3.17: Fórmulas estruturais das bifosfinas dppp(a) e dppb(b).

Os ligantes N-heterocíclicos piridina, 4-metilpiridina, 4-fenilpiridina, 2,2'-bipiridina, 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, 4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina, 4,4'-cloro-2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina (TABELA 3.2), foram utilizadas como recebidas da Aldrich, sem tratamento prévio.

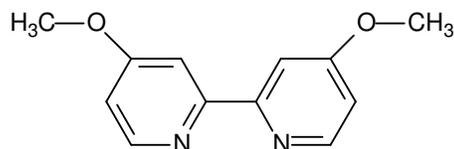
TABELA 3.2: Ligantes N-heterocíclicos utilizados.

Nome do Ligante	Fórmula Estrutural
Piridina (py)	
4- metilpiridina (4-Mepy)	
4-fenilpiridina (4-Phpy)	
2,2'-bipiridina (bipy)	

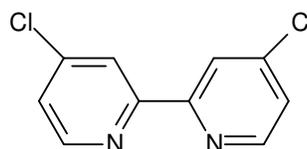
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me-bipy)



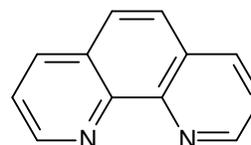
4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina (MeO-bipy)



4,4'-dicloro-2,2'-bipiridina (Cl-bipy)



1,10-fenantrolina (fen)



3.1.5 Monóxido de nitrogênio

a) NO

O gás monóxido de nitrogênio foi gerado em frasco de Kipp pela redução do ácido nítrico 33% por cobre metálico, segundo a reação:



Em seguida passou por frasco lavador contendo solução concentrada de hidróxido de sódio, com o objetivo de retirar possíveis resíduos de ácido nítrico que poderiam estar sendo arrastados pelo fluxo de NO. Após a lavagem em NaOH, o gás passou por um frasco contendo cal sodada, que tem a propriedade de reter todo o NO₂, característico por apresentar uma coloração castanha, eventualmente presente. Este procedimento garantiu que apenas NO chegasse à saída da linha de gás (LEVAGGI *et al*, 1972). Uma representação desse sistema de geração de NO está apresentada na FIGURA 3.18.

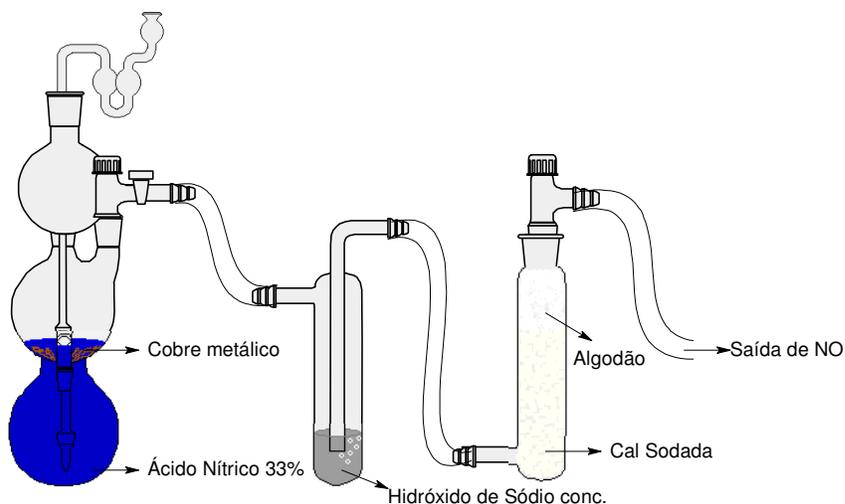


FIGURA 3.18: Sistema de geração de monóxido de nitrogênio.

b) NO⁺

A preparação do NO⁺ envolveu a reação de NaNO₂ com HCl 0,1 M, descrito segundo o equilíbrio abaixo (CAULTON, 1975):



3.2 Síntese dos complexos precursores

Os precursores de Ru foram sintetizados seguindo métodos descritos na literatura. A pureza dos mesmos foi avaliada por técnicas espectroscópicas (RMN ³¹P{¹H}, IV, UV-vis) e eletroquímicas, de acordo com a conveniência, para cada complexo. Os resultados concordaram bem com os da literatura sendo considerados suficientes para indicar a pureza dos compostos, de maneira que não foram realizadas análises elementares para os mesmos.

3.2.1 tricloronitrosilrutênio(II) - [RuCl₃NO]

O [RuCl₃NO] foi obtido por modificação de procedimento descrito na literatura (FAIRY & IRVING, 1966). Em um frasco tipo Schlenk de 100 mL contendo 30 mL de metanol previamente deaerado adicionou-se 0,500 g (1,91 mmol) de RuCl₃.3H₂O. Fluxo lento de NO foi borbulhado na solução, por aproximadamente 1 hora, ao término do qual fez-se vácuo no sistema e injetou-se NO novamente,

mantendo esta atmosfera por cerca de mais 1 hora. Repetiu-se este procedimento algumas vezes (pelo menos 5 vezes), fazendo-se vácuo no sistema e injetando NO. Ao final de aproximadamente 5 horas, a solução resultante foi transferida para um balão com capacidade de 50 mL e roto-evaporada até secura. O balão foi armazenado em dessecador contendo pentóxido de fósforo sob vácuo, aguardando-se no mínimo 48 horas para sua utilização, para que o composto secasse totalmente. Rendimento: (0,50 g) 94,7%.

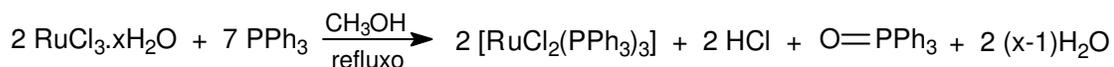
3.2.2 *fac*-[RuCl₃NO(dppp)]

Obteve-se este composto através de procedimento desenvolvido em nosso laboratório (BATISTA *et al*, 1997; BATISTA *et al*, 1999). Em um balão de duas bocas com capacidade para 50 mL contendo cerca de 25 mL de metanol previamente deaerado adicionou-se 0,200 g (0,84 mmol) de [RuCl₃NO] e 0,33 g (0,76 mmol) da bifosfina. Deixou-se a mistura sob refluxo e agitação magnética sob atmosfera inerte por 6 horas. O sólido laranja obtido foi filtrado em funil de placa sinterizada extrafina e lavado com metanol e éter etílico desareados. O composto foi armazenado em dessecador e mantido sob vácuo, aguardando-se no mínimo 24 horas para sua utilização. Rendimento: (0,44 g) 92,6%.

3.2.3 Síntese dos precursores fosfínicos de rutênio

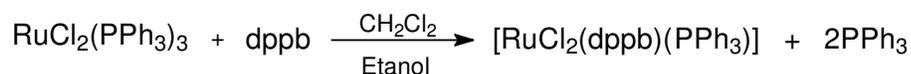
3.2.3.1 [RuCl₂(PPh₃)₃]

O precursor [RuCl₂(PPh₃)₃], foi obtido pela redução do tricloreto de rutênio com trifenilfosfina, a partir de modificações parciais de procedimento descrito na literatura (STEPHENSON & WILKINSON, 1966), onde 1,00 g de RuCl₃.3H₂O (4,80 mmol) foi dissolvido em 200 mL de metanol previamente desaerado, sob refluxo e atmosfera inerte por aproximadamente 15 minutos. Em seguida 5,75 g de PPh₃ (21,9 mmol) foram adicionados. A solução continuou sob refluxo e atmosfera inerte por três horas. O precipitado marrom escuro formado foi filtrado, utilizando um funil de placa porosa, lavado com metanol e hexano desaerados, para a retirada de excesso de fosfina livre (PPh₃), e seco a vácuo. Rendimento: (3,30 g) 90,0%.



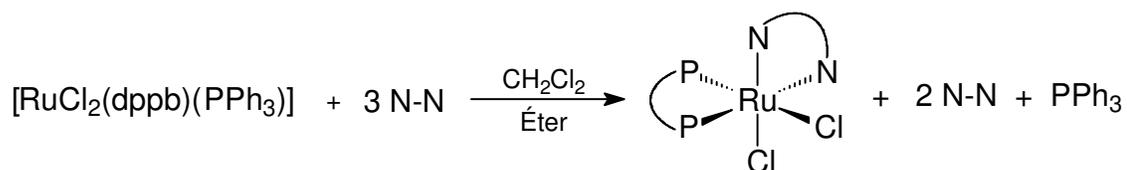
3.2.3.2 [RuCl₂(dppb)(PPh₃)]

O precursor [RuCl₂(dppb)(PPh₃)], foi sintetizado como descrito na literatura (JUNG *et al*, 1984), onde 1,000 g de [RuCl₂(PPh₃)₃] (1,043 mmol) foi dissolvido em 50 mL de CH₂Cl₂ previamente desaerado, e foram adicionados 0,470 g de dppb (1,102 mmol), permanecendo sob agitação e atmosfera inerte por 30 minutos. Em seguida a solução foi filtrada para a retirada do produto binuclear formado e ao filtrado foi adicionado 40 ml de etanol previamente desaerado. O precipitado verde formado foi filtrado utilizando-se um funil de placa porosa, lavado com hexano para a retirada de excesso de bifosfina livre (dppb) e seco a vácuo. Rendimento: (0,85 g) 95%.



3.2.3.3 *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)], N-N = bipy, Me-bipy, MeO-bipy, Cl-bipy e fen

Os complexos *cis*-[RuCl₂(dppb)(N-N)], foram sintetizados como descrito na literatura (QUEIROZ *et al*, 1998), onde 0,500 g de [RuCl₂(dppb)(PPh₃)] (0,581 mmol) foram dissolvidos em 40 mL de CH₂Cl₂ previamente desaerado, e foram adicionados os ligantes N-N na proporção de 1:3 (1,743 mmol). Os compostos permaneceram sob refluxo em atmosfera inerte por 48 horas e presença de luz branca. As soluções foram roto-evaporadas até o volume de aproximadamente 5 mL, e adicionou-se 30 ml de éter-etílico previamente desaerado. Em seguida os precipitados vermelhos formados foram filtrados, utilizando-se um funil de placa porosa, lavado com éter-etílico e seco a vácuo. Rendimento \cong 95%.



3.3 Síntese dos novos nitrosilos complexos

3.3.1 $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{py})]\text{PF}_6$ – [1]

Em um frasco tipo Schlenk de 100 mL contendo cerca de 25 mL de diclorometano previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *fac*- $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppp})]$ (0,154 mmol) e adicionou-se 0,038 mL (0,462 mmol) de piridina (proporção de 1:3). Adicionou-se 0,050 g de NH_4PF_6 (proporção de 1:2), dissolvidos em metanol desarerado. Manteve-se o sistema sob refluxo, agitação magnética e atmosfera inerte por 12 horas. Diminuiu-se o volume da solução até aproximadamente 3 mL e precipitou-se com éter-etílico previamente desaerado. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,098 g) 91,6%.

3.3.2 $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(4\text{-Mepy})]\text{PF}_6$ – [2]

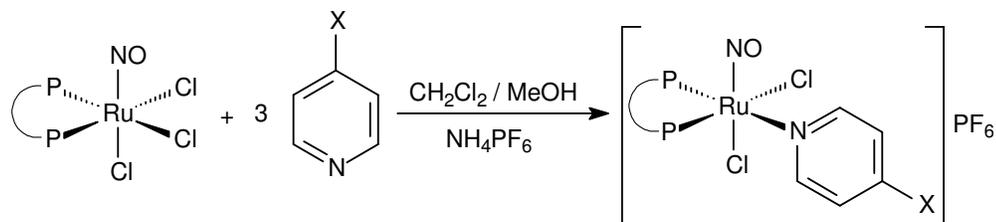
Em um frasco tipo Schlenk de 100 mL contendo cerca de 25 mL de diclorometano previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *fac*- $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppp})]$ (0,154 mmol) e adicionou-se 0,045 mL (0,462 mmol) de 4-metilpiridina (proporção de 1:3). Adicionou-se 0,050 g de NH_4PF_6 (proporção de 1:2), dissolvidos em metanol desarerado. Manteve-se o sistema sob refluxo, agitação magnética e atmosfera inerte por 24 horas. Diminuiu-se o volume da solução até aproximadamente 3 mL e precipitou-se com éter-etílico previamente desaerado. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,101 g) 92,7%.

3.3.3 $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(4\text{-Phpy})]\text{PF}_6$ – [3]

Em um frasco tipo Schlenk de 100 mL contendo cerca de 25 mL de diclorometano previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *fac*- $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppp})]$ (0,154 mmol) e adicionou-se 0,071 g (0,462 mmol) de 4-fenilpiridina (proporção de 1:3). Adicionou-se 0,050 g de NH_4PF_6 (proporção de 1:2), dissolvidos em metanol desarerado. Manteve-se o sistema sob refluxo, agitação

magnética e atmosfera inerte por 24 horas. Diminuiu-se o volume da solução até aproximadamente 3 mL e precipitou-se com éter-etílico previamente deaerado. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,107 g) 90,7%.

O esquema abaixo representa as reações dos compostos de [1] a [3].



3.3.4 *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂ – [4]

Em um balão com capacidade para 50 mL contendo cerca de 20 mL de etanol previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (0,133 mmol) e adicionou-se 0,014 g (0,200 mmol) de NaNO₂ (proporção de 1:1,5). Adicionou-se 2 mL de HClO₄ e manteve-se o sistema sob agitação magnética e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi roto-evaporada até volume aproximado de 3 mL e a adição de água destilada previamente desaerada à solução conduziu à precipitação de um sólido laranja. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,102 g) 81,0%.

3.3.5 *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)](ClO₄)₂ – [5]

Em um balão com capacidade para 50 mL contendo cerca de 20 mL de etanol previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Me-bipy)] (0,128 mmol) e adicionou-se 0,013 g (0,192 mmol) de NaNO₂ (proporção de 1:1,5). Adicionou-se 2 mL de HClO₄ e manteve-se o sistema sob agitação magnética e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi roto-evaporada até volume aproximado de 3 mL e a adição de água destilada previamente desaerada à solução conduziu à precipitação de um sólido laranja. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com

água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,113 g) 90,4%.

3.3.6 *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(MeO-bipy)](ClO₄)₂ – [6]

Em um balão com capacidade para 50 mL contendo cerca de 20 mL de etanol previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(MeO-bipy)] (0,122 mmol) e adicionou-se 0,013 g (0,183 mmol) de NaNO₂ (proporção de 1:1,5). Adicionou-se 2 mL de HClO₄ e manteve-se o sistema sob agitação magnética e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi roto-evaporada até volume aproximado de 3 mL e a adição de água destilada previamente desaerada à solução conduziu à precipitação de um sólido laranja. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,112 g) 90,3%.

3.3.7 *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(Cl-bipy)](ClO₄)₂ – [7]

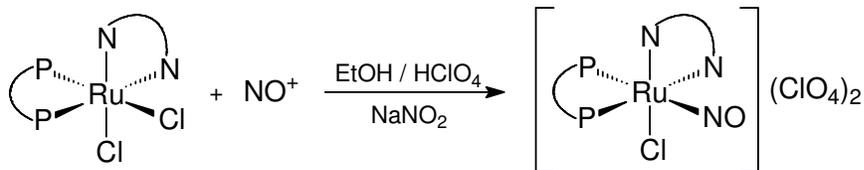
Em um balão com capacidade para 50 mL contendo cerca de 20 mL de etanol previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(Cl-bipy)] (0,121 mmol) e adicionou-se 0,013 g (0,182 mmol) de NaNO₂ (proporção de 1:1,5). Adicionou-se 2 mL de HClO₄ e manteve-se o sistema sob agitação magnética e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi roto-evaporada até volume aproximado de 3 mL e a adição de água destilada previamente desaerada à solução conduziu à precipitação de um sólido laranja. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,113 g) 91,9%.

3.3.8 *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(fen)](ClO₄)₂ – [8]

Em um balão com capacidade para 50 mL contendo cerca de 20 mL de etanol previamente desaerado dissolveu-se 0,100 g do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(fen)] (0,128 mmol) e adicionou-se 0,013 g (0,192 mmol) de NaNO₂ (proporção de 1:1,5). Adicionou-se 2 mL de HClO₄ e manteve-se o sistema sob agitação magnética e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi roto-evaporada até volume aproximado de 3 mL e a adição de água destilada previamente

desaerada à solução conduziu à precipitação de um sólido laranja. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,115) 92,0%.

O esquema abaixo representa as reações dos compostos de [4] a [8].



3.3.9 *cis*-[RuCl(¹⁵NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂ – [9]

Em um balão com capacidade para 25 mL contendo cerca de 15 mL de metanol previamente desaerado dissolveu-se 0,050 g do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (0,133 mmol) e adicionou-se 0,014 g (0,200 mmol) de Na¹⁵NO₂ (proporção de 1:1,5). Adicionou-se 2 mL de HClO₄ e manteve-se o sistema sob agitação magnética e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi roto-evaporada até volume aproximado de 3 mL e a adição de água destilada previamente desaerada à solução conduziu à precipitação de um sólido laranja. Em seguida filtrou-se o sólido laranja obtido em funil de placa porosa, lavou-se com água e éter-etílico e armazenou-se em dessecador para secagem. Rendimento: (0,059 g) 93,7%.

3.4 Instrumentação

Os compostos obtidos foram caracterizados tanto em solução como no estado sólido, pelas técnicas adequadas, da maneira abaixo descrita:

3.4.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON FT MB-102, na região compreendida entre 4000 e 200 cm⁻¹. As amostras sólidas foram diluídas em KBr. Este foi mantido em estufa à 120^o C e previamente triturado antes de ser utilizado.

3.4.2 Espectroscopia de Absorção na Região do UV-vis

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV/vis) foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro HEWLETT PACKARD DIODE ARRAY - 8452A. Os compostos foram dissolvidos em CH_2Cl_2 de modo a se obter soluções de concentração da ordem de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, sendo posteriormente diluídas para concentrações desejadas. As medidas foram feitas utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm na região compreendida entre 190 e 800 nm.

3.4.3 Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial)

As medidas eletroquímicas foram obtidas em um potenciostato Electrochemical Analyzer BAS-100B. Fez-se as medidas em uma célula eletroquímica de vidro, com capacidade para 10 mL. Utilizaram-se três eletrodos: um de referência Ag/AgCl em solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de PTBA no solvente adequado, mantido no interior de um capilar de Luggin-Haber; e os eletrodos de trabalho e auxiliar, de platina. Prepararam-se as soluções eletrolíticas (PTBA - $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) de modo a se obter concentrações dos complexos a serem analisados da ordem de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Os potenciais anódicos (E_{pa}) e catódicos (E_{pc}) foram determinados diretamente dos voltamogramas.

3.4.4 Medidas de Condutividade

As medidas de condutividade foram feitas em um condutivímetro MICRONAL modelo B-330, equipado com cela de platina com constante igual a $0,089 \text{ cm}^{-1}$, utilizando-se concentrações da ordem de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Os equipamentos acima citados estão disponíveis em nosso laboratório.

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

Os espectros de RMN de ^1H e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz (400,13 MHz para ^1H ; 161,98 MHz para ^{31}P) ou em um ARX 200 MHz (81,02 MHz para ^{31}P). Para os espectros de RMN de ^1H foram utilizados os

solventes deuterados adequados (CDCl_3 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ou D_2O) e os deslocamentos químicos foram determinados em relação ao tetrametilsilano (TMS). As amostras para a RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram solubilizadas nos solventes comuns adequados e um capilar contendo D_2O foi introduzido no interior do tubo de RMN, e teve a finalidade de ser a referência externa para a frequência do deutério. Os deslocamentos químicos na RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram reportados relativos ao H_3PO_4 85% (aq).

3.4.6 Análise Elementar

As determinações dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram realizadas em um analisador CHN modelo EA 1108 da FISONs.

Os espectrômetros de RMN e o analisador CHN estão disponíveis para uso no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

3.4.7 Difração de Raios X

As estruturas cristalinas dos cristais obtidos foram resolvidas pela técnica de difração de raios X, utilizando-se um difratômetro ENRAF-NONIUS CAD-4. As estruturas foram resolvidas com o programa SHELXS 97 (SHELDRICK, 1997a) usando métodos diretos, sucessivos mapas de Fourier-Diferença permitiram a localização dos átomos não hidrogênios. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL 97 (SHELDRICK, 1997b). Detalhes específicos sobre coleta de dados e os parâmetros para cada complexo são fornecidos nos apêndices apropriados.

As estruturas foram resolvidas pelo grupo de cristalografia chefiado pelo Prof.Dr. Eduardo E. Castellano do Instituto de Física da USP - São Carlos, em colaboração principalmente com o Prof. Dr. Javier Ellena.

3.4.8 Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram feitas no laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química da UFSCar, utilizando-se um espectrômetro QuattroLC-MICROMASS. Foi utilizada a ionização por eletrospray

(ESI) com inserção direta das amostras (faixa de concentração utilizada: 1.10^{-4} – 1.10^{-5} mol.L⁻¹), solubilizadas em CH₂Cl₂, e detecção no modo positivo.

3.4.9 Linhagem de células e testes de citotoxicidade

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade sobre culturas de células tumorais é o método padrão para a busca de agentes antitumorais (CINI *et al*, 2003). Os ensaios foram realizados pelo Prof. Dr. Gustavo Von Poelhsitz como parte de seu projeto de pós-doutorado, utilizando a estrutura disponibilizada pela Profa. Dra. Heloísa S. Selistre-de-Araújo no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

Os novos compostos de rutênio foram avaliados pela capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de células tumorais para uma linhagem de célula de tumor mamário humano MDA-MB-231 (CORREA *et al*, 2005). Os procedimentos necessários para realizar os ensaios de citotoxicidade são resumidamente descritos nos próximos itens.

3.4.9.1 Linhagem de células, condições de cultura e incubação com as metalodrogas

As células tumorais são mantidas em vials congelados em nitrogênio líquido. A partir deles as células foram obtidas (descongeladas à 37°C, por cerca de 90 segundos) e subculturadas serialmente para posterior uso nos experimentos. As células foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%. As culturas foram mantidas à 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade tripsinizou-se a cultura celular crescendo exponencialmente. Fez-se a contagem e ajuste da concentração de células e aplicou-as em uma placa para microcultura de 96 poços estéril (em nosso caso a densidade de células foi 5×10^4 para MDA-MB-231). Armazenou-se a placa em estufa (37°C / 5% CO₂) por 24 horas para permitir a adesão celular. Após este tempo o meio de cultura foi removido, lavou-se cada poço, uma vez com 200 µL de PBS e adicionou-se 200 µL de meio de cultura DMEM sem soro. Posteriormente as potenciais drogas nas várias concentrações foram adicionadas à placa e a mesma foi novamente mantida na estufa pelo tempo de incubação escolhido (24 h ou 48 h).

3.4.9.2 Ensaio de MTT

Os complexos de rutênio foram avaliados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos usando o ensaio com MTT (MOSMANN, 1983), que consiste em uma determinação colorimétrica de viabilidade celular durante tratamento *in vitro* com a droga. Este ensaio colorimétrico de microcultura, desenvolvido como um estágio inicial para o “screening” de drogas, mede a quantidade de MTT reduzido pela dehidrogenase mitocondrial e assume que a viabilidade celular (correspondente à atividade redutiva) é proporcional à produção de cristais de formazan (violeta) que, após solubilizado, é medido espectrofotometricamente. A densidade óptica (absorbância dos poços) foi medida em um leitor de micro placas a 570 nm. Para verificar o efeito do solvente DMSO, controles adicionais receberam 1% deste solvente.

Um baixo IC₅₀ é desejado e implica citotoxicidade ou antiproliferação às baixas concentrações da droga (WU *et al*, 2003). Neste trabalho o valor de IC₅₀ representa a concentração da droga que reduz a absorbância média a 570 nm em 50% daquelas dos controles não tratado (MARZANO *et al*, 2006). A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{O}_D \text{ teste} / \text{O}_D \text{ controle}) \times 100$$

onde:

O_D teste = densidade ótica do composto testado

O_D controle = densidade ótica do controle

3.4.9.3 Preparação dos compostos para os ensaios

Os complexos de rutênio tiveram suas atividades biológicas avaliadas em soluções de DMSO. As soluções estoques foram preparadas no momento de seu uso e usadas diretamente para as diluições. Como controle positivo foi utilizada a cisplatina e como controle negativo células não tratadas das respectivas linhagens.

Todas as manipulações envolvendo células e preparações de compostos para ensaios biológicos foram feitas em capela de fluxo laminar. As células foram semeadas em placas estéreis de 96 poços e os compostos nas suas diferentes concentrações (a faixa de concentrações no poço ficou entre 0,1 e 1000 µM) foram incubados juntamente com as células por períodos de 24 e 48 horas.

Para o “screening” inicial os complexos foram dissolvidos em DMSO estéril (solução estoque com concentração máxima de 2 mM) e diluídos a 1,5; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,02 mM. Considerando que a concentração final de DMSO junto às células não deve ultrapassar 1 % e que o volume de meio de cultura em cada poço é 200 μ L, tomou-se uma alíquota de 2 μ L de cada concentração de complexo e adicionou-se aos poços. Desta maneira as concentrações finais dos complexos foram 150; 100; 50; 20; 10; 0,50 e 0,20 μ M. As soluções dos complexos foram preparadas em fluxo laminar utilizando-se materiais estéreis (DMSO e frascos de armazenagem) (VON POELHSITZ *et al*, 2007a).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os dois tipos de complexos estudados neste trabalho optou-se por apresentar os resultados e discussão em duas partes (4.1 e 4.2) de acordo com a semelhança entre os compostos. Os compostos sintetizados foram caracterizados tanto em solução, como no estado sólido, por técnicas adequadas.

4.1 Complexos de fórmula geral $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$, L = py, 4-Mepy e 4-Phpy

4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear de fósforo é uma poderosa ferramenta para a caracterização de complexos fosfínicos (VERKADE & QUIN, 1987). O arranjo estereoquímico dos ligantes na esfera de coordenação do metal pode ser elucidado pela interpretação dos dados de deslocamentos químicos e de constantes de acoplamentos entre os átomos de fósforo ou entre o fósforo e outros elementos, eventualmente com o próprio metal.

Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos sintetizados apresentaram padrão AX, o clássico sistema de dois spins, que é caracterizado pela diferença de frequência ressonante dos dois sinais serem muito maior que o acoplamento ($|v_1 - v_2| \gg J_{12}$), o que corresponde à observação de dois dubletos no espectro (GUNTHER, 1996). Os valores de deslocamentos químicos para esta série estão apresentados na TABELA 4.3. Todos os espectros apresentaram o sinal do PF_6^- com deslocamento químico próximo de -144 ppm.

TABELA 4.3: Valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para a série *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆.

<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆	δ P (ppm)		² J _{P-P} (Hz)
L = py	20,9	17,7	30,8
L = 4-Mepy	20,8	17,2	30,8
L = 4-Phpy	21,1	17,4	30,0

Como se observa nos dados da TABELA 4.3, os novos complexos possuem átomos de fósforo magneticamente não equivalentes após a troca de um átomo de cloro do complexo precursor *fac*-[RuCl₃(NO)(dppp)] pelos ligantes piridínicos. Os novos complexos derivados apresentaram dois dubletos no espectro de RMN de ³¹P{¹H}, diferentemente do complexo precursor que apresenta um singlete em 15,0 ppm (BATISTA *et al*, 1997). A não equivalência dos fósforos condiz com uma geometria onde um dos átomos de P está *trans* a um átomo de Cl e o outro átomo de P está *trans* a L. Os espectros obtidos são mostrados na FIGURA 4.19.

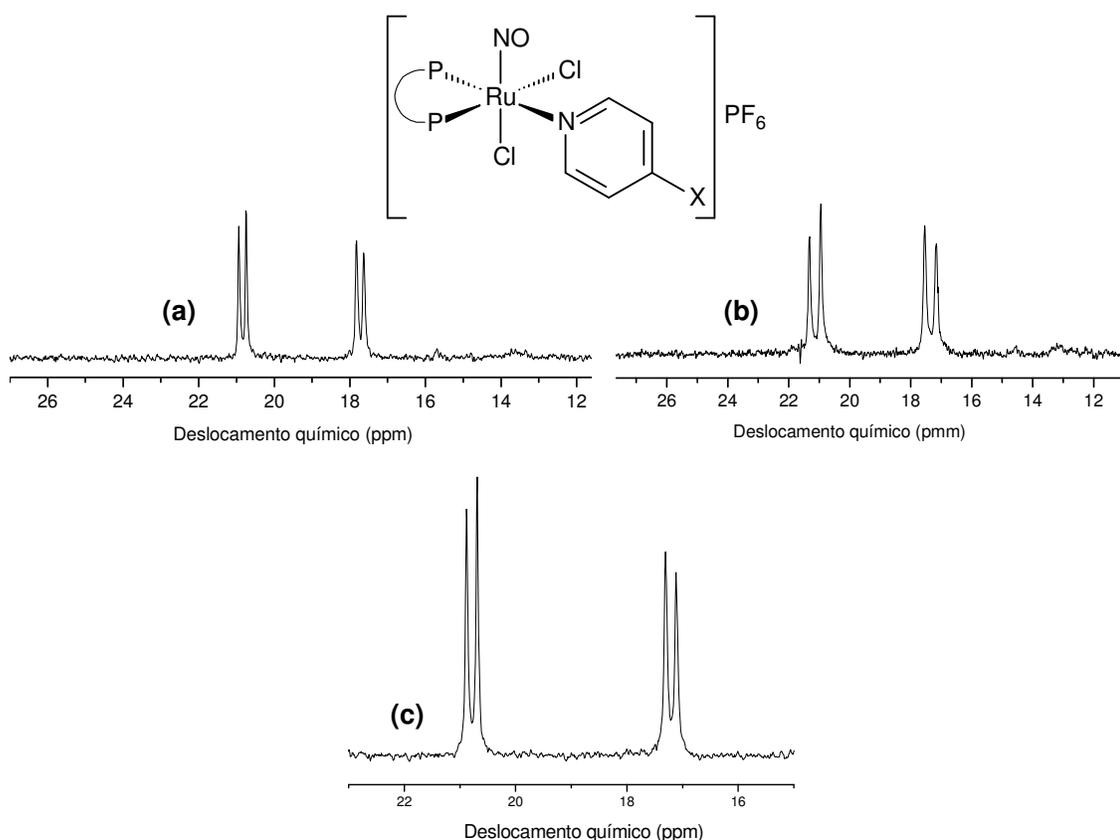


FIGURA 4.19: Espectros de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ dos complexos de fórmula geral *cis*- $[RuCl_2(NO)(dppp)(L)]PF_6$ em CH_2Cl_2 . **(a)** L = py; **(b)** L = 4-Phpy; **(c)** L = 4-Mepy.

Pode-se justificar a desproteção dos átomos de fósforos dos complexos de fórmula geral *cis*- $[RuCl_2(NO)(dppp)(L)]PF_6$ em relação ao singlete do precursor, considerando que o efeito eletrônico seja predominante, devido a menor habilidade doadora dos ligantes N-heterocíclicos em relação aos cloretos do precursor, levando assim à diminuição da densidade eletrônica sobre os fósforos e conseqüentemente desprotegendo-os. Sugere-se que o sinal menos protegido refere-se ao fósforo *trans* ao nitrogênio das piridinas, e o sinal mais protegido, refere-se ao fósforo *trans* ao Cl, que possui deslocamento químico mais próximo ao observado para o precursor (átomos de cloro *trans* a átomos de fósforos).

4.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do IV dos complexos sintetizados apresentaram modos vibracionais consistentes com as estruturas propostas, e foram obtidos na região entre 4000 - 200 cm^{-1} . As atribuições foram feitas em comparação com os espectros do precursor, da bifosfina livre e de outros complexos descritos na literatura. A maioria dos modos vibracionais dos compostos em estudo surge dos anéis aromáticos das bifosfinas.

Os espectros de IV (em pastilhas de KBr) dos complexos sintetizados apresentaram-se bastante semelhantes entre si e são mostrados na FIGURA 4.20. Para melhor visualização o espectro é apresentado na região de 2000-200 cm^{-1} , já que acima de 2000 cm^{-1} aparecem apenas bandas referentes aos estiramentos dos grupos CH aromáticos e alifáticos e CH_2 .

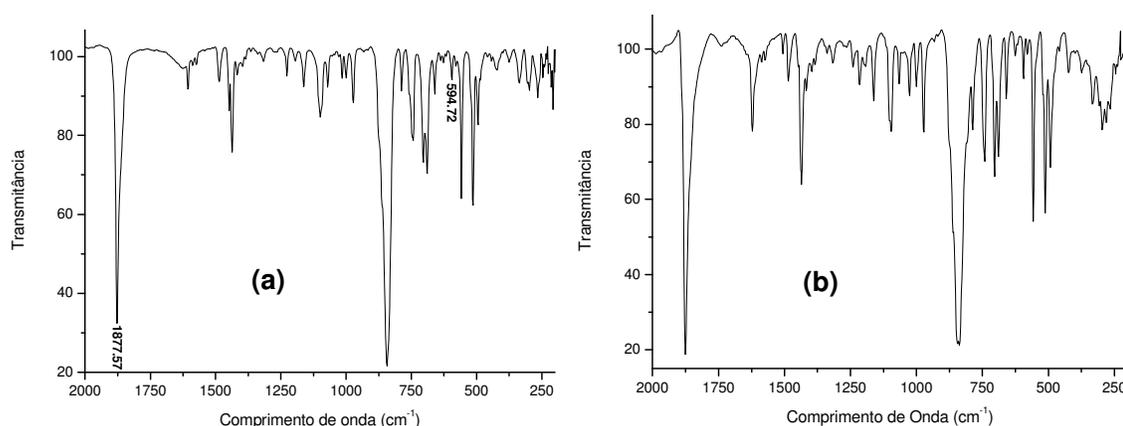


FIGURA 4.20: Espectros de IV dos complexos de fórmula geral $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$ em pastilha de KBr. (a) L = py; (b) L = 4-Mepy.

A presença do grupo NO coordenado ao rutênio deveria levar ao surgimento de três bandas. Em maior energia uma banda de estiramento do grupo NO, uma de estiramento Ru-N e outra envolvendo a deformação angular Ru-NO. A primeira referente ao νNO , é observada em uma região limpa dos espectros, sendo a banda mais intensa, surgindo em 1877, 1875 e 1867 cm^{-1} , respectivamente para [1], [2] e [3]. Esses valores são muito próximos ao observado para o precursor $fac\text{-}[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppp})]$, que apresenta a banda referente ao νNO em 1870 cm^{-1} , sendo

típico de NO^+ . A ligação Ru-NO nestes casos é considerada linear, pois é caracterizada por alta frequência de estiramento do NO^+ (νNO^+ : $1650\text{-}1985\text{ cm}^{-1}$) (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

A banda de fraca intensidade em 594 cm^{-1} atribuiu-se ao $\nu\text{Ru-N}$, por estar ausente nos espectros da bifosfina e das piridinas e presente nos espectros dos complexos. A deformação angular Ru-NO não se define em alguns casos, fato comum na medida em que pode ocorrer acoplamento ao $\nu\text{Ru-N}$ devido à proximidade das frequências destes modos vibracionais (NAKAMOTO, 1997).

Tanto as bandas referentes à deformação axial C-N e C-C dos anéis piridínicos quanto as deformações assimétrica e simétrica do grupo CH_3 da 4-metilpiridina encontram-se na mesma região das bandas características dos estiramentos C-C dos anéis fenílicos (região de $1630\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$). Devido à presença do anel fenílico da 4-fenilpiridina, tanto a banda atribuída à deformação angular fora do plano de CH quanto as de estiramento C-C (ϕ) para este composto apresentam-se com maior intensidade comparadas com as mesmas bandas para [1] e [2], como pode ser observado na FIGURA 4.21.

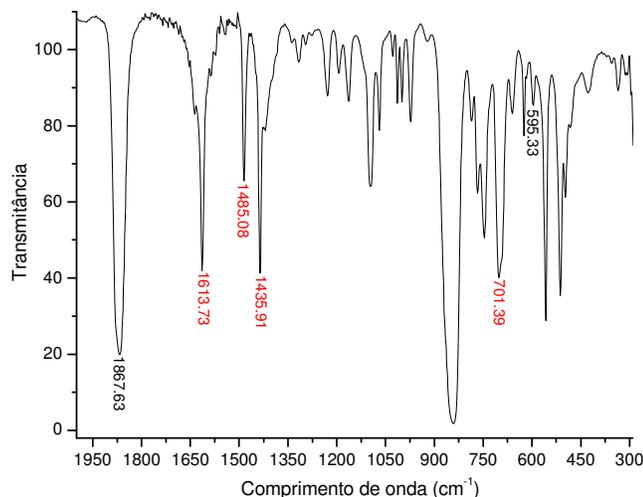


FIGURA 4.21: Espectro de IV do $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(4\text{-Phpy})]\text{PF}_6$, em pastilha de KBr.

Outras bandas envolvem as ligações Ru-P e Ru-Cl, mas a atribuição do $\nu\text{Ru-P}$ não é simples de se fazer, pois as bifosfinas apresentam muitas bandas na região de baixa energia. Outra dificuldade nesta atribuição está relacionada aos efeitos de ligação π e σ que influenciam na constante de força M-P fazendo com que

este estiramento e deformações ocupem uma larga faixa do espectro (NAKAMOTO, 1997). Quanto ao $\nu_{\text{Ru-Cl}}$, são observadas duas bandas (NAKAMOTO, 1997) em torno de 330 e 290 cm^{-1} , região de baixa energia, típica para complexos de rutênio.

Na TABELA 4.4 são apresentadas às freqüências de absorção correspondentes às principais bandas, bem como as atribuições tentativas dos espectros de IV para os complexos sintetizados.

TABELA 4.4: Freqüências correspondentes às principais bandas e atribuições tentativas dos espectros de IV (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992; DZIEGIELEWSKI *et al.*, 1986; NAKAMOTO, 1997; WHIFFEN, 1956; SILVERSTEIN *et al.*, 1987; COLTHUP *et al.*, 1990; VON POELHSITZ, 2005).

Atribuições (Intensidades)	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆		
	L = py	L = 4-Mepy	L = 4-Phpy
$\nu_{\text{CH}}(\phi)$ (f)	3085 – 3000	3085 - 3000	3085 - 3000
$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ (f)	3002	3002	3002
$\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ (f)	2904	2904	2904
ν_{NO} (F)	1877	1875	1867
$\nu_{\text{C-C}}(\phi)$ (m)	1605; 1573; 1486; 1436	1622; 1506; 1485; 1434	1613; 1543; 1485; 1435
CH_2 wag (f)	1316	1316	1312
$\beta_{\text{C-H}}$ (f)	1194; 1162; 1160; 1015	1192; 1162; 1160; 1026	1194; 1163; 1160; 1013
$\nu_{\text{P-C}}(\phi)$ (m)	1098; 421	1095; 423	1096; 421
ν anel (m)	999	1000	999
δ_{CH_2} (m)	787; 743	787; 741	784; 746
$\gamma_{\text{CH}}(\phi)$ (m)	704	704	701
$\nu_{\text{P-C}}_{\text{alif}}$ (m)	não observado	não observado	não observado
γ anel (m)	689	689	não observado
$\nu_{\text{Ru-N}}$ (f)	594	594	595
$\delta_{\text{P-C}}(\phi)$ (m)	513; 494	512; 492	512; 494
$\nu_{\text{Ru-Cl}}$ (f)	336; 297	332; 296	333; 308

F = muito forte; **m** = média; **f** = fraca; **v** - designa uma vibração de estiramento; **δ** - designa uma vibração de deformação; **γ** - designa uma vibração de deformação fora do plano; **β** - designa uma vibração de deformação no plano.

4.1.3 Medidas de Condutividade Molar

As medidas de condutividade molar (Λ) foram efetuadas utilizando-se concentrações da ordem de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, em diclorometano, à 25° C, onde registrou-se $44,1 \mu\text{S.cm}^{-1}$, $40,4 \mu\text{S.cm}^{-1}$ e $43,4 \mu\text{S.cm}^{-1}$, respectivamente para os complexos [1], [2] e [3]. A faixa aceita para eletrólitos 1:1 em diclorometano à 25°C é $12 - 77 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (GEARY, 1971), de acordo com tabela de intervalo de condutâncias molares de eletrólitos estudada por VELHO, R. G. em trabalho de mestrado, orientado pelo Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. Esses valores indicam que houve a troca de um átomo de cloro por um ligante piridínico, o que é consistente com as estruturas propostas.

4.1.4 Análise Elementar

Os resultados das análises dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos compostos sintetizados, mostrados na TABELA 4.5, fornecem uma indicação de suas fórmulas moleculares, que por sua vez são condizentes com as estruturas propostas.

TABELA 4.5: Dados microanalíticos dos compostos sintetizados.

<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(L)]PF ₆	%C (calc)	%H (calc)	%N (calc)
L = py	45,51 (45,82)	3,55 (3,73)	3,56 (3,34)
L = 4-Mepy	46,02 (46,48)	4,09 (3,90)	3,55 (3,29)
L = 4-Phpy	49,48 (49,89)	3,65 (3,86)	3,32 (3,06)

4.1.5 Medidas Eletroquímicas (Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial)

As técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial) permitem a avaliação da energia necessária para efetuar a oxidação ou redução de determinada espécie química. Para compostos de coordenação esta energia, em forma de potencial, fornece entendimentos adicionais aos estudos de propriedades receptoras e doadoras dos ligantes, devido ao fato de estarem

intimamente ligadas à densidade eletrônica nas camadas de valência do metal (FAULKNER, 1983).

O comportamento eletroquímico dos compostos sintetizados foi estudado pelo uso das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. As medidas foram realizadas utilizando o método de arranjo convencional contendo três eletrodos, consistindo de um eletrodo de platina como eletrodo de trabalho, um auxiliar de platina e um de referência de Ag/AgCl. Os voltamogramas foram obtidos em solução de CH_2Cl_2 utilizando PTBA ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito suporte e velocidade de varredura igual a 100 mV.s^{-1} .

Comportamentos variados foram observados nos estudos eletroquímicos de nitrosilos complexos de rutênio do tipo $\{\text{RuNO}\}^6$, sendo estes largamente estudados. Baseando-se nos resultados da literatura foram feitas atribuições e discussões envolvendo eletroquímica dos nitrosilos precursores e de seus derivados.

Cabe ressaltar que não existe consenso na literatura quanto à atribuição de alguns processos envolvendo o NO, principalmente em relação à sua redução irreversível, e os produtos gerados. Baseados nestes e em outros resultados da literatura, que serão citados mais adiante, foram feitas as atribuições e discussões envolvendo eletroquímica dos nitrosilos precursores e de seus derivados.

Os voltamogramas para os complexos **[1]**, **[2]** e **[3]** apresentaram-se bastante semelhantes entre si, e são mostrados na FIGURA 4.22. Na primeira varredura não se observa nenhum processo anódico. Continuando a varredura para potencial catódico surgem dois processos bem definidos. O primeiro, variando entre -200 e -300 mV, é atribuído à redução do NO^+ a NO^0 , e o segundo, que varia entre -650 e -850 mV, é atribuído à redução do NO^0 a NO^- .

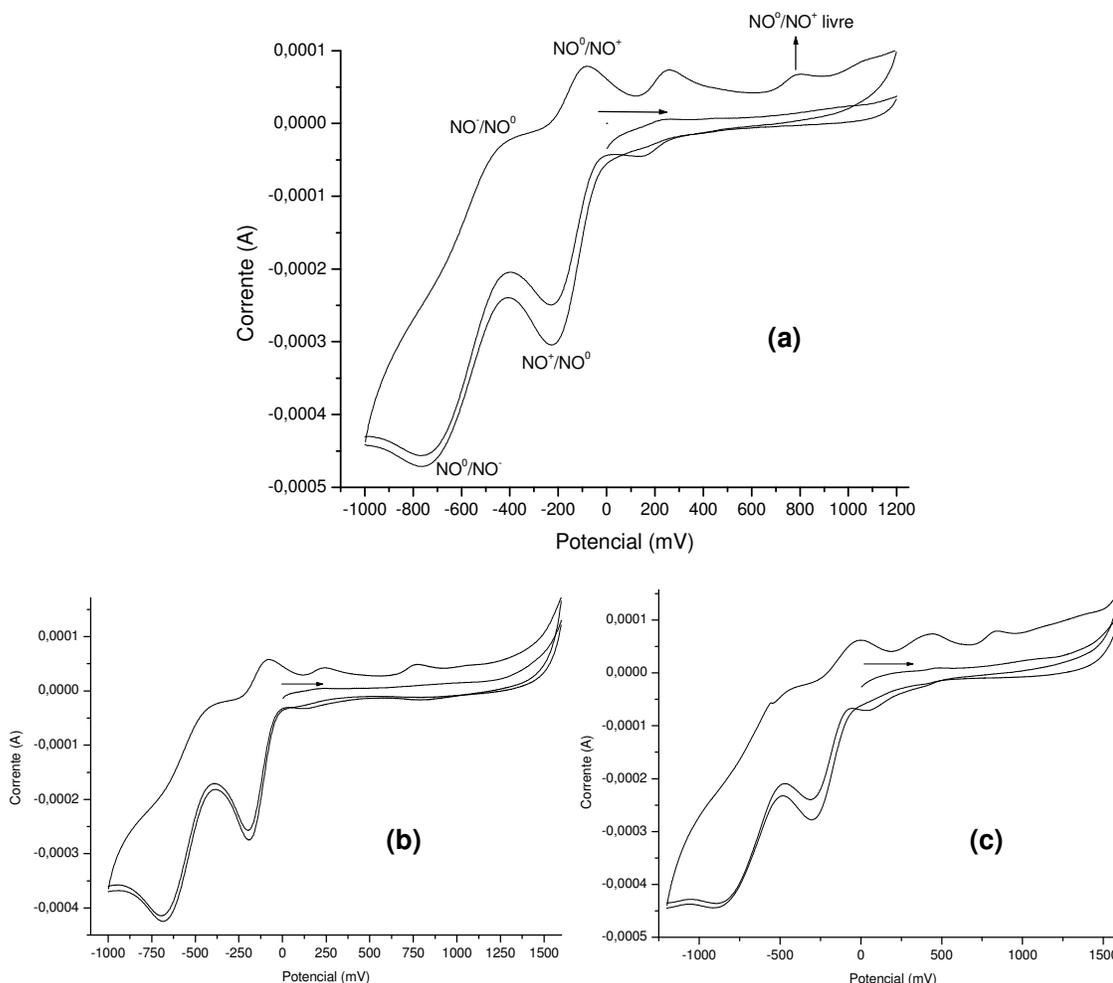


FIGURA 4.22: Voltamogramas cíclicos dos complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆. Eletrólito: PTBA 0,1 mol.L⁻¹; solvente: CH₂Cl₂; referência:Ag/AgCl; velocidade de varredura: 100 mV.s⁻¹. **(a)** L = py; **(b)** L = 4-Mepy; **(c)** L = 4-Phpy.

Após as reduções surgem três processos anódicos, sendo que o primeiro, que varia de -70 a -95 mV, atribuímos a oxidação do NO⁰ (coordenado) a NO⁺ gerando a espécie de partida. A saída do NO gerando novos complexos e a própria presença de NO livre em solução devem ser responsáveis pelo segundo processo anódico, que varia de 230 a 350 mV. O terceiro processo, entre 760 e 810 mV, atribui-se à oxidação do NO⁰ livre (LOPES, 1997; BEDIQUI *et al.*, 1994).

Fazendo-se nova varredura para potencial catódico, ocorre o surgimento de uma redução que varia entre 135 e 155 mV, sendo provavelmente o par do processo anódico na região de 300 mV. Para verificar se esse par é dependente da primeira

ou da segunda redução do NO, efetuou-se novas varreduras que foram até o potencial da primeira redução do NO (NO^+ a NO^0) como mostra a FIGURA 4.23, indicando sua dependência deste processo.

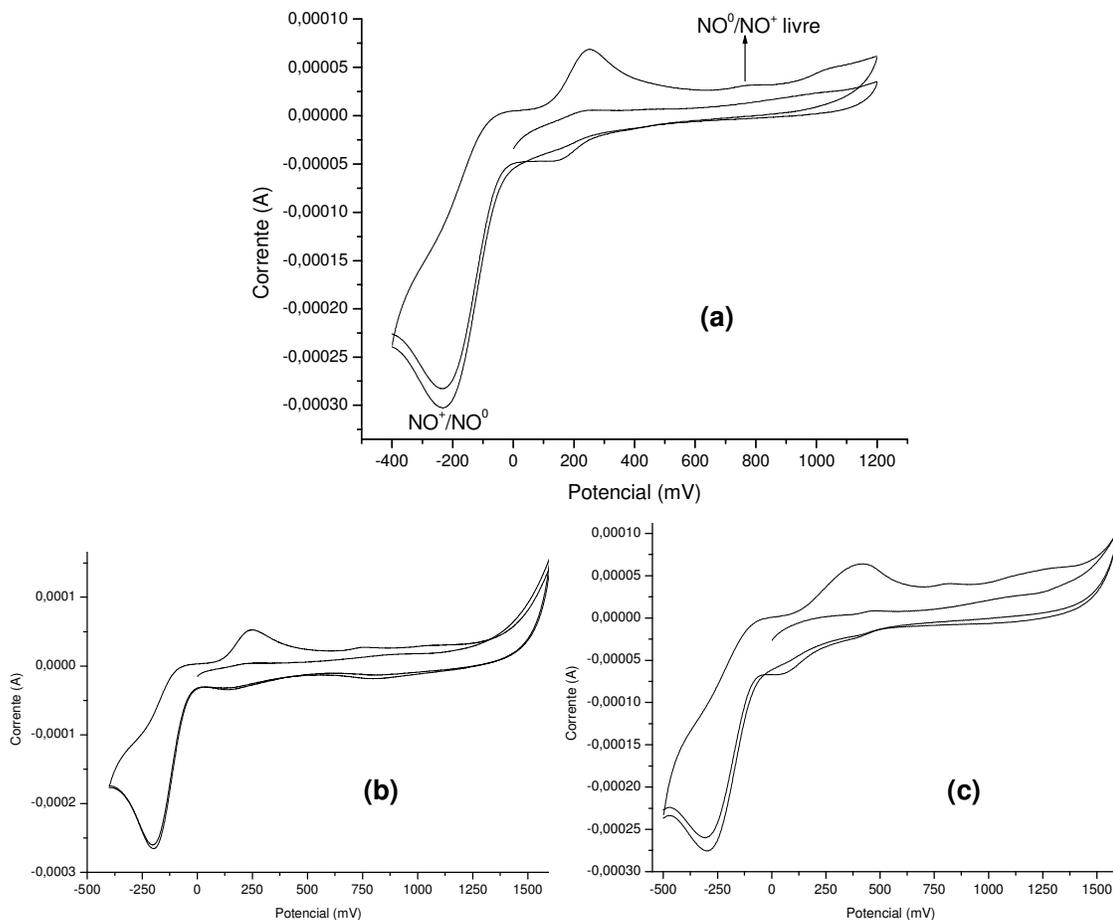


FIGURA 4.23: Voltamogramas cíclicos dos complexos de fórmula geral *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$. Eletrólito: PTBA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; solvente: CH_2Cl_2 ; referência: Ag/AgCl ; velocidade de varredura: 100 mV.s^{-1} . **(a)** $\text{L} = \text{py}$; **(b)** $\text{L} = 4\text{-Mepy}$; **(c)** $\text{L} = 4\text{-Phpy}$.

Para a melhor observação dos processos e para fins de comparação foram feitas voltametrias de pulso diferencial. Os voltamogramas de pulso diferencial para os complexos **[1]**, **[2]** e **[3]** apresentaram-se bastante semelhantes entre si, e um exemplo representativo é mostrado na FIGURA 4.24.

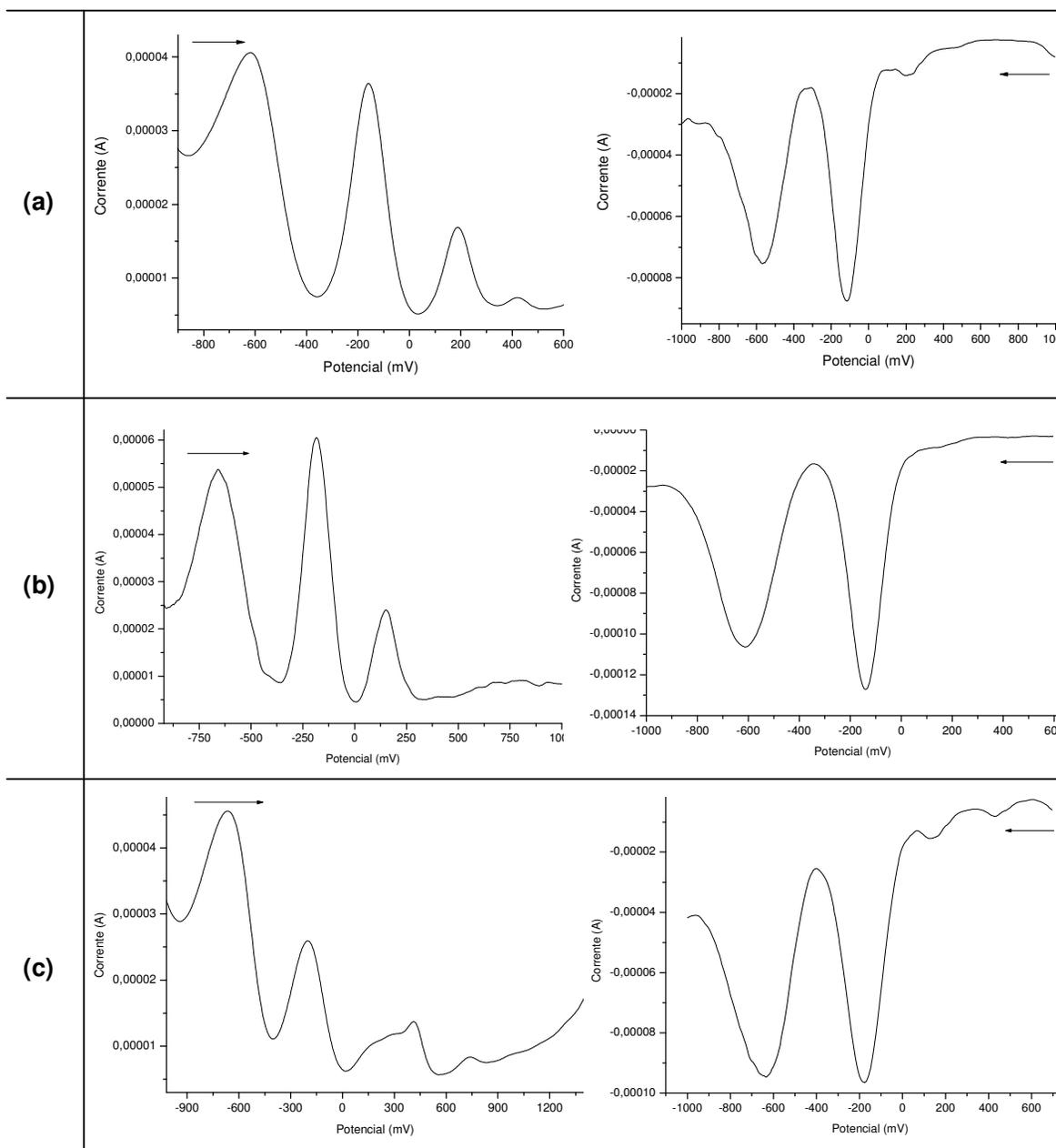


FIGURA 4.24: Voltamogramas de pulso diferencial dos complexos de fórmula geral $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppp})(\text{NO})(\text{L})]\text{PF}_6$. Solvente: CH_2Cl_2 ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTBA); velocidade de varredura: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. **(a)** $\text{L} = \text{py}$; **(b)** $\text{L} = 4\text{-Mepy}$; **(c)** $\text{L} = 4\text{-Phpy}$.

Partindo-se de potenciais anódicos e varrendo até a região negativa observam-se os dois processos de redução do NO, conforme observado na voltametria cíclica, mas com potenciais mais anódicos. Partindo-se de potenciais catódicos observam-se quatro processos de oxidação. O primeiro associado à $\text{NO}^- \rightarrow \text{NO}^0$ deslocado para potenciais mais negativos em comparação com a voltametria

cíclica, e melhor definido. O segundo referente à $\text{NO}^0 \rightarrow \text{NO}^+$, também deslocados para potenciais mais negativos. Seguindo-se a varredura são observados mais dois processos, um referente a um produto desconhecido e outro a oxidação do NO^0 livre, ambos em potenciais menos positivos quando comparados com a voltametria cíclica.

Não se observa em nenhum dos casos processos referentes à oxidação do metal, no solvente utilizado. Tem sido sugerido por alguns autores que o rutênio, em nitrosilos complexos, só é eletroativo em potenciais superiores a +1,4 V. Esse potencial alto é justificado pelo domínio que a acidez π do NO (forte π receptor) impõe em seus complexos, que pela retrodoação leva à diminuição da densidade eletrônica sobre o metal, conseqüente estabilizando-o. A TABELA 4.6 resume os valores de potenciais para os complexos da série $[\text{RuCl}_2(\text{dppp})(\text{NO})(\text{L})]\text{PF}_6$.

TABELA 4.6: Valores de potenciais dos principais processos eletroquímicos da voltametria cíclica para a série *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppp})(\text{NO})(\text{L})]\text{PF}_6$.

Composto	Potenciais (mV)			
	E_{pc} $\text{NO}^+ \rightarrow \text{NO}^0$	E_{pc} $\text{NO}^0 \rightarrow \text{NO}^-$	E_{pa} $\text{NO}^0 \rightarrow \text{NO}^+$	$\text{NO}^0 \rightarrow \text{NO}^+$ livre
L = py	-205	-753	-87	+806
L = 4-Mepy	-210	-688	-89	+768
L = 4-Phpy	-295	-828	-19	+828

Para o precursor *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppp})]$ observa-se apenas a primeira redução do NO ($\text{NO}^+ \rightarrow \text{NO}^0$) em -850 mV, não sendo observada a segunda redução ($\text{NO}^0 \rightarrow \text{NO}^-$). Isto já era esperado devido o fato de o precursor possuir um cloro a mais do que os compostos em questão. Desta maneira, como o cloro é melhor doador (σ e π) que os ligantes piridínicos, o centro metálico no precursor apresenta-se com mais densidade eletrônica, o que torna bem mais difícil a adição de um elétron sobre o NO^+ , levando assim os dois processos de redução do NO para potenciais mais catódicos que aqueles observados para os compostos acima citados. Resumindo, após a troca de um átomo de cloro pelo N-heterocíclico, o centro metálico fica mais deficiente em elétrons em relação ao precursor, tornando o potencial do NO^+ mais acessível.

Uma comparação como esta também pode ser feita com compostos do tipo $trans\text{-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppe})_2]^{2+}$, que apresenta processo eletroquímico do NO^+ reversível a +100mV (vs Ag/AgCl) (ZAMPIERI *et al.*, 2002). Este potencial mais positivo é resultado da presença dos ligantes fósforos (π -receptores / σ -doadores), o que deixa o centro metálico com menos densidade eletrônica e conseqüentemente se torna mais fácil adicionar um elétron sobre o NO^+ .

Comportamento análogo à série $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$ foi observado para complexos do tipo $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}]^{3+}$ (LOPES, 1997) com variados substituintes no ligante fosfito, onde o processo redox envolvendo o NO^+ coordenado não é bem definido, e observam-se dois processos adicionais, o par redox associado à espécie sem NO gerada em solução e, em torno de 800 mV, um processo irreversível atribuído à oxidação do NO livre (BEDIOUI *et al.*, 1994), como representado pela FIGURA 4.25.

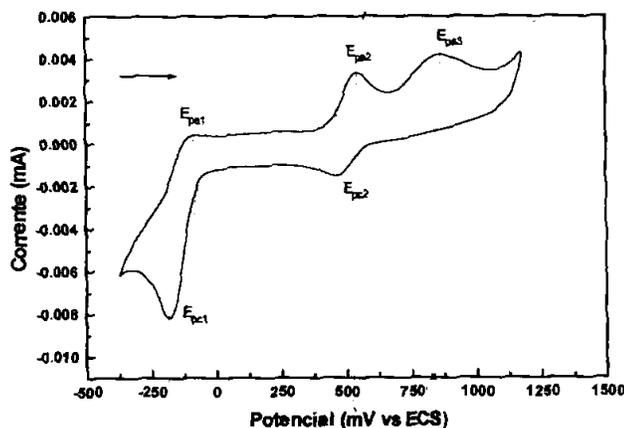


FIGURA 4.25: Voltamograma cíclico do $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3\text{NO}]^{3+}$, em solução aquosa. Eletrodo referência: calomelano (LOPES, 1997).

Complexos do tipo $trans\text{-}[\text{RuCl}(\text{cyclam})\text{NO}]^{2+}$ e $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{NO})]^{3+}$, L = N-heterocíclicos apresentam somente um par redox envolvendo o ligante nitrosilo, sugerindo que o centro de rutênio seja eletroativo apenas em potenciais mais anódicos (BORGES *et al.*, 1998). Seguindo-se a varredura para potenciais mais catódicos observa-se processo irreversível atribuído à redução do NO^0 a NO^- , e conseqüente perda deste último. A FIGURA 4.26 apresenta o voltamograma do $trans\text{-}[\text{RuCl}(\text{cyclam})\text{NO}]^{2+}$ (LANG & DAVIS, 2000).

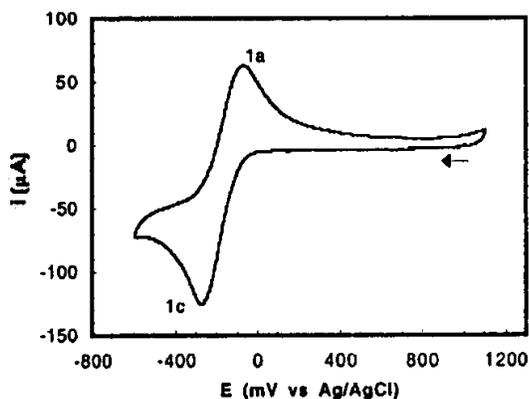


FIGURA 4.26: Voltamograma cíclico do $trans\text{-}[\text{RuCl}(\text{cyclam})\text{NO}]^{2+}$ em CH_3CN . Eletrodo referência: Ag/AgCl (LANG & DAVIS, 2000).

A densidade eletrônica sobre o ligante NO^+ pode ser relacionada com os dados de νNO bem como pelos valores de potencial na voltametria (PIPES & MEYER, 1984). Neste trabalho tal correlação entre νNO em CH_2Cl_2 e o E_{pc} para a primeira redução do NO^+ no mesmo solvente está apresentada na FIGURA 4.27.

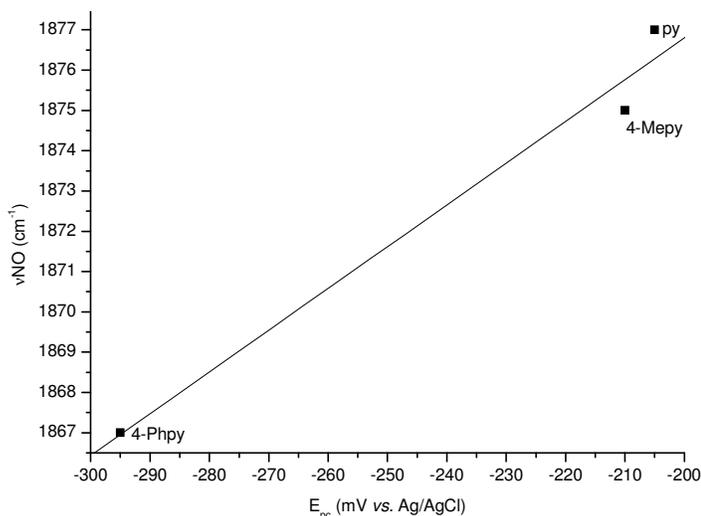


FIGURA 4.27: Correlação entre potencial de redução do NO^+ em CH_2Cl_2 e o estiramento do NO para a série $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$.

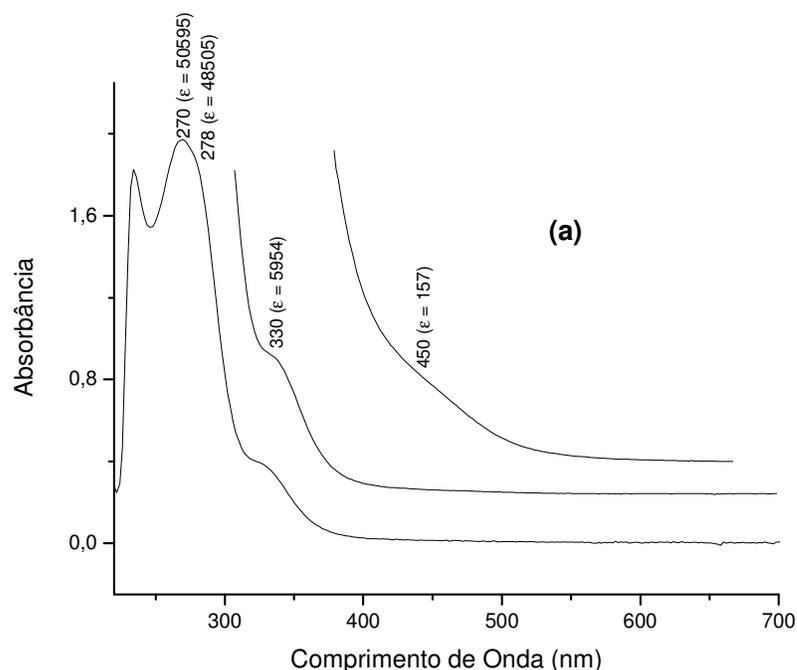
Analisando a FIGURA 4.27, pode-se dizer que a força oxidante do NO (seu caráter NO^+) está relacionada à extensão da interação $d\pi \rightarrow \pi^*$ (NO) que é afetada pelo outros ligantes do sistema. Assim, a troca de ligantes *trans* ou *cis* ao NO

promove modificações nesta interação e altera os valores de E_{pc} do NO bem como νNO .

Na literatura algumas boas correlações entre estes dois parâmetros são encontradas (de SOUZA *et al.*, 2003; DOVLETOGLOU *et al.*, 1996). É possível observar uma boa linearidade dos dados, onde o complexo com νNO menos energético, possui maior densidade eletrônica sobre o NO^+ e conseqüentemente a redução ocorre em potencial mais negativo (é mais difícil adicionar elétrons onde existe maior densidade eletrônica).

4.1.6 Espectroscopia Eletrônica (UV/vis)

Os espectros eletrônicos dos complexos da série *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$ foram registrados em solução de diclorometano e apresentaram absorções na região do visível e ultravioleta. As atribuições das bandas observadas nos espectros eletrônicos foram feitas por comparação com os espectros das bifosfinas livres, com o precursor *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppp})]$ e com complexos da literatura que tiveram suas estruturas eletrônicas calculadas, como o $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{PPh}_3)(\text{HPz})]$ (MALECKI *et al.*, 2005). Os espectros apresentaram-se bastante semelhantes entre si, e estão apresentados na FIGURA 4.28.



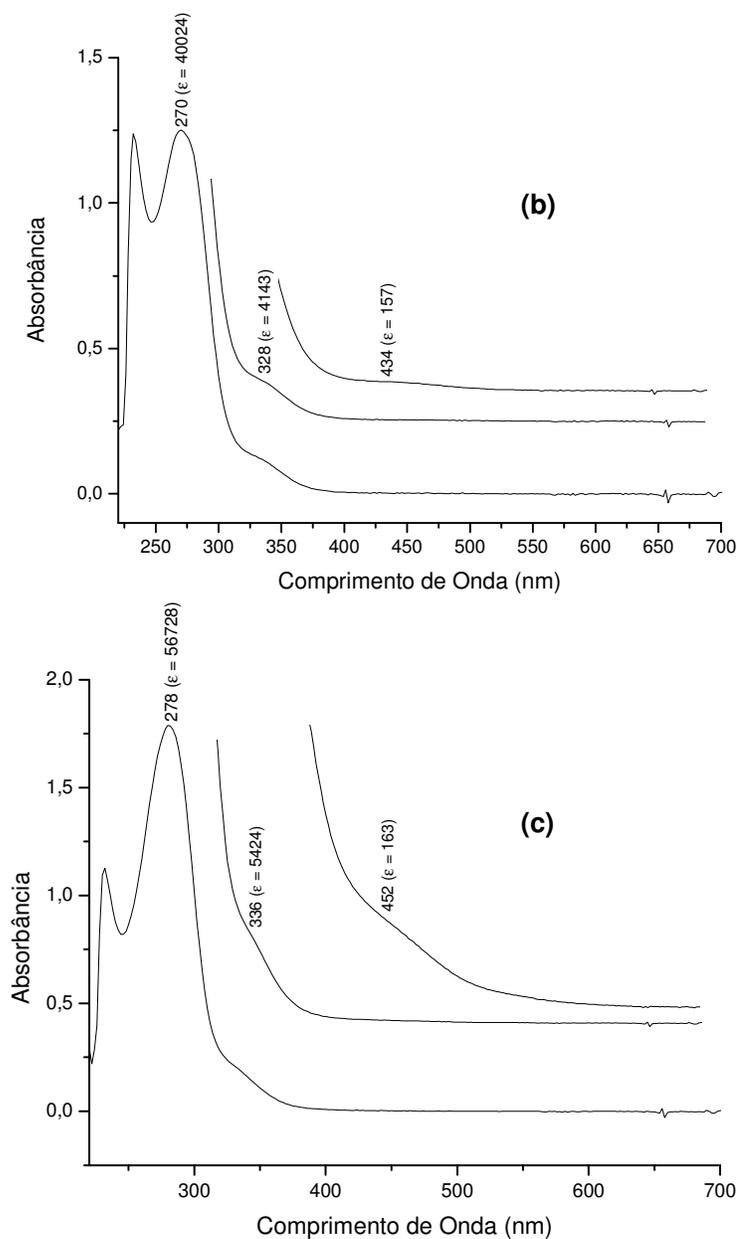


FIGURA 4.28: Espectros de absorção UV/Vis dos complexos de fórmula geral $cis-[RuCl_2(NO)(dppp)(L)]PF_6$ em CH_2Cl_2 . **(a)** L = py; **(b)** L = 4-Mepy; **(c)** L = 4-Phpy.

Observou-se na região do ultravioleta uma banda e um ombro em energias muito próximas e com altos valores de ϵ ($\sim 50000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A banda em maior energia, já presente na bifosfina livre e no ligante piridina, é do tipo IL (transições de carga interligante), correspondendo a transições intraligantes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos da molécula. O ombro encoberto na transição intraligante da

fosfina e da piridina, observado também no complexo precursor, considerando o alto valor de ϵ e comparação com complexos da literatura (MALECKI *et al*, 2005), é na realidade uma mistura de transições, mas foi atribuído principalmente a transferência de carga dos orbitais dos ligantes para o orbital d do metal (TCLM) ($\pi_{Cl} \rightarrow d_{Ru} / \pi_{Ph} \rightarrow d_{Ru} / \pi_L \rightarrow d_{Ru} / \pi_{Cl} + \pi_{Ph} + \pi_L \rightarrow d_{Ru}$) e transições interligantes.

Na região próxima ao visível foram observadas bandas com valores de ϵ entre 4800 e 5600 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Considerando o valor relativamente alto de ϵ tais bandas são atribuídas a transições do tipo TCLM ($\pi_{Cl} \rightarrow d / \pi_{Ph} \rightarrow d / \pi_L \rightarrow d / \pi_{Cl} + \pi_{Ph} + \pi_L \rightarrow d / (d + \pi_{Cl} + \pi_{Ph} + \pi_L) \rightarrow d$) e transições interligantes ($(\pi_{Cl} + \pi_{Ph} + \pi_L) \rightarrow \pi^*NO / \pi_{Cl} \rightarrow \pi^*NO$) (MALECKI *et al*, 2005).

Um forte indício que esta transição possui envolvimento do orbital π^* do NO pode ser observado para compostos do tipo *trans*-[RuCl(NO)(dppe)₂]²⁺, estudado anteriormente em nosso laboratório em trabalho de doutorado de VON POELHSITZ, em 2005. Foi feita uma redução do composto *trans*-[RuCl(NO)(dppe)₂]²⁺ com amálgama de Cd, e o espectro eletrônico para este composto, após a redução, deu origem a uma banda em 267 nm além da banda em 315 nm. Pode-se entender tal variação e o surgimento desta banda em 267 nm, considerando que o NO⁰ é menos receptor π que o NO⁺ e, portanto, o centro metálico está mais rico em elétrons nesta condição e conseqüentemente as transições TCLM se tornam mais energéticas. Outra conseqüência é que a ocupação do orbital π^* do NO⁰ elimina a transição para este orbital, também justificando o grande deslocamento observado. Os espectros eletrônicos que apresentam diferenças entre a espécie com NO⁰ e com NO⁺ são apresentados na FIGURA 4.29.

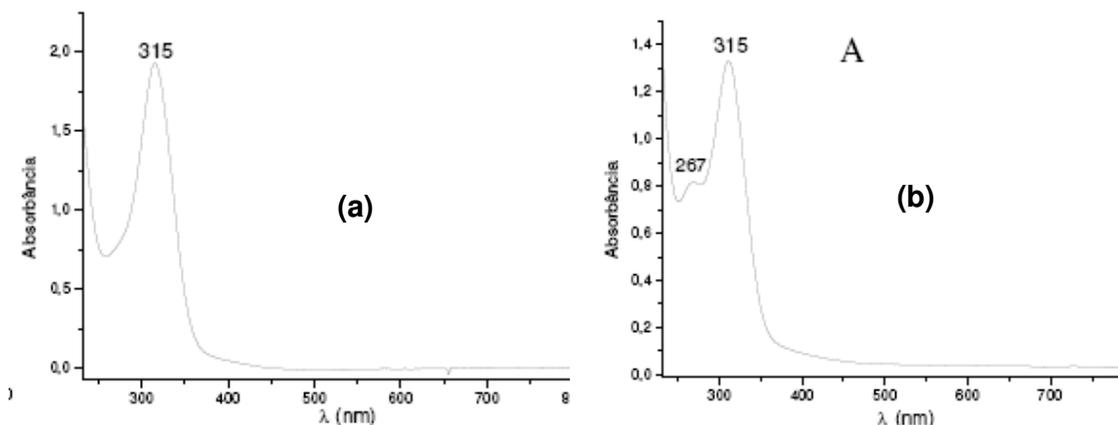


FIGURA 4.29: Espectros eletrônicos do $trans\text{-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppe})_2]^{2+}$ em CH_2Cl_2 . **(a)** amostra sem sinal no RPE (NO^+); **(b)** amostra com sinal RPE (NO^0) (VON POELHSITZ, 2005).

Essa banda em torno de 330 nm não é observada no precursor *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppp})]$, ficando encoberta pelos processos intraligantes. Uma possível explicação baseia-se na baixa capacidade de deslocalização eletrônica da *dppp* coordenada. Entretanto, após a troca de um cloro do precursor pelos N-heterocíclicos, os orbitais dos fósforos na *dppp* apresentam-se menos ocupados, tornando a transição de TCLM menos energética comparada com o precursor (fósforos *trans* a átomos de cloro).

Na TABELA 4.7 são apresentados os comprimentos de onda em que as bandas aparecem com suas respectivas absorvidades molares (ϵ), as concentrações em que foram calculadas e as possíveis transições responsáveis pelas bandas.

TABELA 4.7: Resultados obtidos do espectro UV/Vis para a série *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆

Complexo	$\lambda_{\text{max.}} \text{ (nm)} (\epsilon \text{ (L.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}))$ concentração (mol.L ⁻¹)			
	A	B	C	D
L = py	270 (50595) 3,9x10 ⁻⁵	278 sh (48505) 3,9x10 ⁻⁵	328 (5568) 1,56x10 ⁻⁴	450 (157) 5,0x10 ⁻³
L = 4-Mepy	270 (40024) 3,125x10 ⁻⁵	278 sh (38420) 3,125x10 ⁻⁵	326 (4833) 6,25x10 ⁻⁵	434 (157) 5,0x10 ⁻⁴
L = 4-Phpy	268 (48183) 3,125x10 ⁻⁵	278 sh (56728) 3,125x10 ⁻⁵	336 (5120) 1,25x10 ⁻⁴	452 (163) 5,0x10 ⁻³

sh = ombro

A - TCLL (transições interligantes) / $\pi \rightarrow \pi^*$ (intra-ligante fosfínico)**B** - TCLM ($\pi_{\text{Cl}} \rightarrow d_{\text{Ru}} / \pi_{\text{Ph}} \rightarrow d_{\text{Ru}} / \pi_{\text{L}} \rightarrow d_{\text{Ru}} / \pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}} \rightarrow d_{\text{Ru}}$)**C** - TCLM ($\pi_{\text{Cl}} \rightarrow d / \pi_{\text{Ph}} \rightarrow d / \pi_{\text{L}} \rightarrow d / \pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}} \rightarrow d / (d + \pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}}) \rightarrow d$) e TCLL (transições interligantes) ($(\pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}}) \rightarrow \pi^*\text{NO} / \pi_{\text{Cl}} \rightarrow \pi^*\text{NO}$)**D** - TCLL (transições interligantes) ($(\pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}}) \rightarrow \pi^*\text{NO} / \pi_{\text{Cl}} \rightarrow \pi^*\text{NO}$) / $(d + \pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}}) \rightarrow \pi^*\text{NO} / d \rightarrow \pi^*\text{NO}$ e transição de campo ligante (d-d)

Utilizando-se concentrações em torno de $3,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ foi possível observar uma banda bastante larga na região do visível, em torno de 440 nm com valores de $\epsilon < 200$ L.mol⁻¹.cm⁻¹, também presente no precursor. Essas bandas na região de menor energia correspondem a transições de campo-ligante (d-d) do rutênio, responsável pela cor laranja do complexo, e são caracterizadas pelo baixo coeficiente de absorção molar (ϵ) por serem proibidas pelas regras de seleção. São atribuídas às transições entre os diferentes níveis de energia correspondentes à redistribuição de elétrons em orbitas *d* parcialmente preenchidos (transições de campo ligante (d-d)) além de transições interligantes (TCLL) ($(\pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}}) \rightarrow \pi^*\text{NO} / \pi_{\text{Cl}} \rightarrow \pi^*\text{NO}$) / $(d + \pi_{\text{Cl}} + \pi_{\text{Ph}} + \pi_{\text{L}}) \rightarrow \pi^*\text{NO}$ e TCML ($d \rightarrow \pi^*\text{NO}$) (MALECKI *et al*, 2005).

4.1.7 Difração de Raios X

A técnica de difração de raios X aplicada a cristais crescidos adequadamente é uma das mais poderosas técnicas para a determinação da estrutura de um composto no estado sólido (LADD & PALMER, 1994).

Os cristais dos complexos sintetizados neste trabalho foram obtidos por evaporação lenta de solução do composto em diclorometano e éter etílico à temperatura ambiente, e suas estruturas foram determinadas. Os complexos **[1]**, **[2]** e *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(4-Vnpy)]PF₆ (não caracterizado neste trabalho) cristalizaram-se no sistema cristalino ortorrômbico, pertencendo ambos ao grupo espacial P2₁2₁2₁, e apresentaram coordenação essencialmente octaédrica em torno do centro metálico.

Os parâmetros cristalográficos de refinamento das estruturas estão apresentados na TABELA 4.9 e os valores de distâncias [Å] e ângulos [°] estão apresentadas na TABELA 4.10. A sugestão de *P trans* Cl e *P trans* L para ambos os complexos é suportada pelos dados das estruturas de raios X (FIGURA 4.30), e os comprimentos de ligações interatômicas mais importantes estão listados na TABELA 4.8. Até o momento não foi possível obter cristais do complexo com L = Phpy, mas estamos trabalhando para a sua obtenção a partir de diferentes técnicas.

O ligante nitrosilo é praticamente linear, apresentando ∠Ru-N-O igual a 177.8(4)^o, 177.7(4)^o e 178.0(5)^o para **[1]**, **[2]** e *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(4-Vnpy)]PF₆ respectivamente. Esse fato em conjunto com os comprimentos das ligações Ru-N e N-O, bem como a frequência de estiramento do NO em torno de 1876 cm⁻¹ confirmam o NO coordenado na forma NO⁺, sendo muito similar com o observado para outros nitrosilos rutênio complexos (VON POELHSITZ *et al*, 2006a).

A importância da interação d_{xz}, d_{yz} (Ru) + π* (NO) para a ligação nos complexos {RuNO}⁶ é ilustrada pelos dados de distância de ligação Ru-L, *cis* e *trans* ao NO. Analisando-se os dados da FIGURAS 4.30 pode-se observar que a distância Ru-Cl (Cl *trans* NO) é menor do que a observada para o cloro *trans* P, de modo geral em torno de 2,35 Å para Ru-Cl *trans* NO e 2,40 Å para Ru-Cl *trans* P. Este efeito pode ser justificado com base na aproximação orbital molecular, que enfatiza o papel extremamente importante do orbital π* (NO) na transferência de carga do Ru para o NO e, portanto, seu papel na ligação metal-ligante. Os orbitais π do NO são agora polarizados tal que existe um aumento de densidade eletrônica especialmente sobre o átomo de O (BOTTOMLEY, 1978).

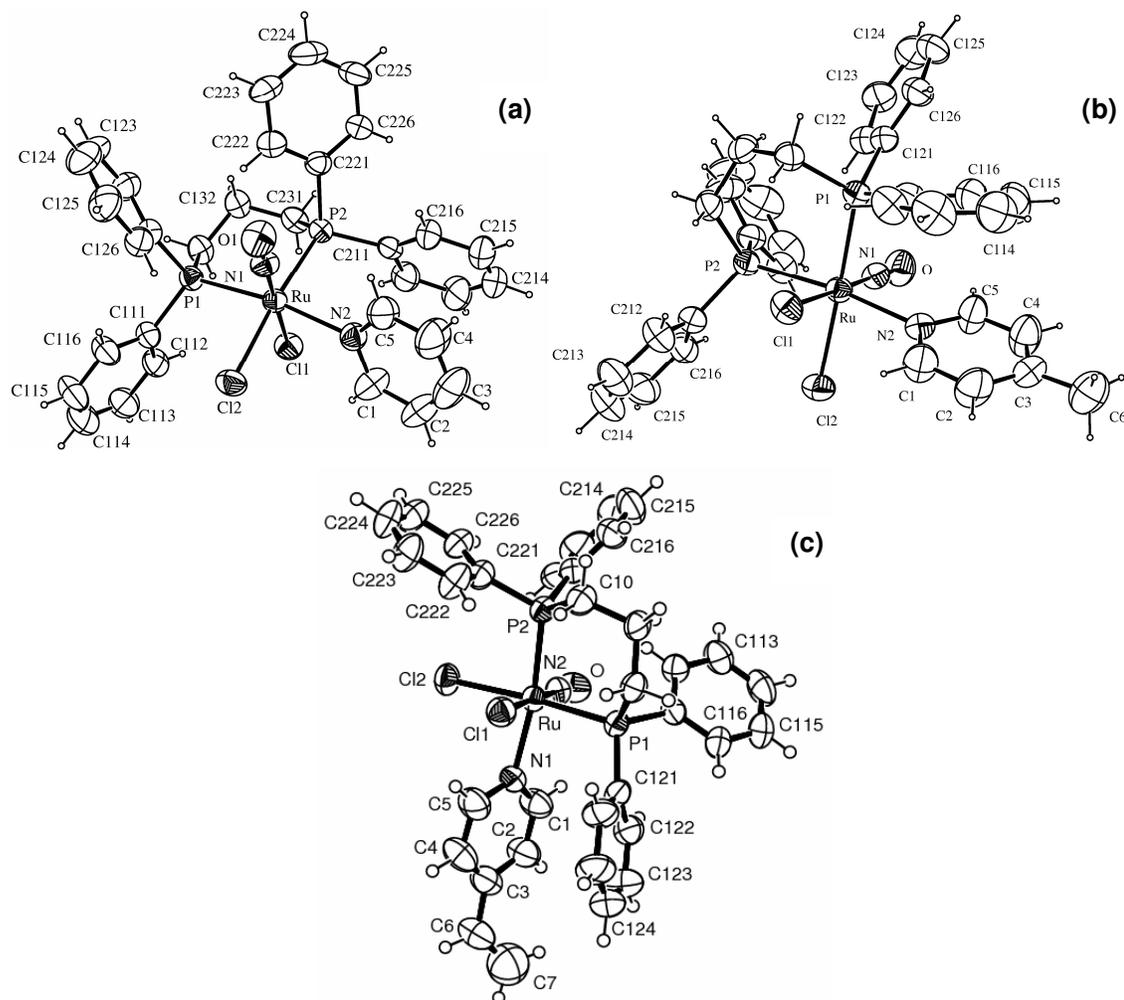


FIGURA 4.30: Estruturas ORTEP dos complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆. Elipsóides térmicas com 50% de probabilidade. **(a)** L = py; **(b)** L = 4-Mepy; **(c)** L = 4-Vnpy.

TABELA 4.8: Principais valores de distâncias [Å] e ângulos [°].

Composto	d(Ru-Cl) ^a	d(Ru-Cl) ^b	d(Ru-NO)	d(N-O)	∠Ru-N-O
L = py	2,3509(11)	2,4082(12)	1,722(4)	1,158(5)	177,8(4)
L = 4-Mepy	2,3442(11)	2,4014(11)	1,736(4)	1,128(4)	177,7(4)
L = 4-Vnpy	2,3475(16)	2,4050(14)	1,722(5)	1,155(6)	178,0(5)

^a *trans* ao NO.

^b *trans* ao P.

TABELA 4.9: Dados cristalográficos de refinamento das estruturas dos compostos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆.

	L = py	L = 4-Mepy	L = 4-Vnpy
Fórmula Empírica	C ₃₂ H ₃₁ Cl ₂ F ₆ N ₂ OP ₃ Ru	C ₃₃ H ₃₃ Cl ₂ F ₆ N ₂ OP ₃ Ru	C ₃₄ H ₃₃ Cl ₂ F ₆ N ₂ OP ₃ Ru
Peso Molecular	838.47	852.49	864.51
Temperatura	293(2) K	293(2) K	293(2) K
Comprimento de Onda	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	Ortorrômbico	Ortorrômbico
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensões da Cella Unitária	a = 11.4810(4) Å b = 14.6080(5) Å c = 20.5270(6) Å	a = 11.5839(3) Å b = 14.5187(3) Å c = 20.7537(6) Å	a = 11.7770(4) Å b = 14.5970(4) Å c = 20.8470(9) Å
Volume	3442.7(2) Å ³	3490.42(15) Å ³	3583.8(2) Å ³
Z	4	4	4
Densidade (calculada)	1.618 Mg/m ³	1.622 Mg/m ³	1.604 Mg/m ³
Coefficiente de Absorção	0.813 mm ⁻¹	0.803 mm ⁻¹	0.783 mm ⁻¹
F(000)	1688	1720	1748
Tamanho do Cristal	0.30 x 0.22 x 0.03 mm ³	0.14 x 0.10 x 0.02 mm ³	0.06 x 0.33 x 0.20 mm ³
Ângulo Teta para aquisição	3.29 a 25.04°	3.26 a 27.51°	2.96 a 25.68°
Faixa de Índices	-13 ≤ h ≤ 13, -17 ≤ k ≤ 17, -24 ≤ l ≤ 24	-14 ≤ h ≤ 14, -18 ≤ h ≤ 18, -26 ≤ h ≤ 26	-13 ≤ h ≤ 14, -17 ≤ k ≤ 16, -25 ≤ l ≤ 24
Reflexões coletadas	17987	20380	16873
Reflexões Independentes	6073 [R(int) = 0.0940]	7975 [R(int) = 0.0475]	6767 [R(int) = 0.0476]
Coleta até teta = 25.04° e 27.51°	99.4 %	99.6 %	99.5 %
Correção de Absorção	Gaussiano	Semi-empírico de equivalente	Gaussiano
Max. e min. de transmissão	0.976 e 0.832	0.902 e 0.882	0.951 e 0.830
Método de Refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Índices R Final [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0402, wR2 = 0.0868	R1 = 0.0411, wR2 = 0.0917	R1 = 0.0412, wR2 = 0.1113
Índices R (todos os dados)	R1 = 0.0516, wR2 = 0.0925	R1 = 0.0668, wR2 = 0.1023	R1 = 0.0610, wR2 = 0.1225
Parâmetro de Estrutura Absoluta	0.02(3)	-0.05(3)	-0.03(4)
Residual máx., mín.	0.531 e -0.648 e.Å ⁻³	0.422 e -0.656 e.Å ⁻³	0.930 e -0.907 e.Å ⁻³

TABELA 4.10: Comprimentos de ligações [Å] e valores de ângulos [°] selecionados para os compostos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆.

L = py		L = 4-Mepy		L = Vnpy	
Ru-N(1)	1.722(4)	Ru-N(1)	1.736(4)	Ru-N(2)	1.722(5)
Ru-N(2)	2.216(4)	Ru-N(2)	2.204(3)	Ru-N(1)	2.195(5)
Ru-Cl(1)	2.3509(11)	Ru-Cl(1)	2.3442(11)	Ru-Cl(1)	2.3475(16)
Ru-P(1)	2.3884(11)	Ru-P(2)	2.3858(11)	Ru-P(2)	2.3848(16)
Ru-P(2)	2.3957(12)	Ru-P(1)	2.3989(10)	Ru-P(1)	2.4008(13)
Ru-Cl(2)	2.4082(12)	Ru-Cl(2)	2.4014(11)	Ru-Cl(2)	2.4050(14)
O(1)-N(1)	1.158(5)	N(1)-O	1.128(4)	O-N(2)	1.155(6)
N(1)-Ru-N(2)	90.59(15)	N(1)-Ru-N(2)	90.68(15)	N(2)-Ru-N(1)	90.4(2)
N(1)-Ru-Cl(1)	178.66(13)	N(1)-Ru-Cl(1)	178.36(12)	N(2)-Ru-Cl(1)	177.53(16)
N(2)-Ru-Cl(1)	89.59(11)	N(2)-Ru-Cl(1)	89.58(10)	N(1)-Ru-Cl(1)	88.85(13)
N(1)-Ru-P(1)	96.95(12)	N(1)-Ru-P(2)	96.52(12)	N(2)-Ru-P(2)	97.09(16)
N(2)-Ru-P(1)	170.52(11)	N(2)-Ru-P(2)	171.32(10)	N(1)-Ru-P(2)	170.47(13)
Cl(1)-Ru-P(1)	83.01(4)	Cl(1)-Ru-P(2)	83.36(4)	Cl(1)-Ru-P(2)	83.89(5)
N(1)-Ru-P(2)	95.22(13)	N(1)-Ru-P(1)	94.67(12)	N(2)-Ru-P(1)	94.23(15)
N(2)-Ru-P(2)	92.64(10)	N(2)-Ru-P(1)	91.88(9)	N(1)-Ru-P(1)	92.81(13)
Cl(1)-Ru-P(2)	83.44(4)	Cl(1)-Ru-P(1)	83.70(4)	Cl(1)-Ru-P(1)	83.44(5)
P(1)-Ru-P(2)	92.39(4)	P(2)-Ru-P(1)	92.36(4)	P(2)-Ru-P(1)	92.48(5)
N(1)-Ru-Cl(2)	92.26(13)	N(1)-Ru-Cl(2)	92.79(12)	N(2)-Ru-Cl(2)	93.35(16)
N(2)-Ru-Cl(2)	85.16(10)	N(2)-Ru-Cl(2)	85.79(9)	N(1)-Ru-Cl(2)	84.74(13)
Cl(1)-Ru-Cl(2)	89.08(4)	Cl(1)-Ru-Cl(2)	88.84(4)	Cl(1)-Ru-Cl(2)	88.93(5)
P(1)-Ru-Cl(2)	88.80(4)	P(2)-Ru-Cl(2)	89.01(4)	P(2)-Ru-Cl(2)	88.95(6)
P(2)-Ru-Cl(2)	172.23(4)	P(1)-Ru-Cl(2)	172.21(4)	P(1)-Ru-Cl(2)	172.05(5)
C(121)-P(1)-Ru	111.99(15)	C(111)-P(1)-Ru	110.29(14)	C(121)-P(1)-Ru	110.89(19)
C(131)-P(1)-Ru	114.04(15)	C(121)-P(1)-Ru	117.11(13)	C(111)-P(1)-Ru	116.91(18)
C(111)-P(1)-Ru	114.52(16)	C(131)-P(1)-Ru	113.85(14)	C(8)-P(1)-Ru	112.94(8)
C(211)-P(2)-Ru	109.48(15)	C(221)-P(2)-Ru	112.40(16)	C(211)-P(2)-Ru	112.9(2)
C(231)-P(2)-Ru	114.01(15)	C(231)-P(2)-Ru	113.85(15)	C(221)-P(2)-Ru	115.3(2)
C(221)-P(2)-Ru	116.82(15)	C(211)-P(2)-Ru	115.39(15)	C(10)-P(2)-Ru	113.42(8)
O(1)-N(1)-Ru	177.8(4)	O-N(1)-Ru	177.7(4)	O-N(2)-Ru	178.0(5)
C(1)-N(2)-Ru	121.0(3)	C(1)-N(2)-Ru	122.9(3)	C(5)-N(1)-Ru	121.3(3)
C(5)-N(2)-Ru	121.5(4)	C(5)-N(2)-Ru	121.3(3)	C(1)-N(1)-Ru	121.2(4)

A natureza π -aceptora do NO^+ aumenta a doação π através do ligante cloro *trans*, e de acordo com o efeito estrutural *trans* a distância Ru-Cl *trans* NO é mais curta comparada às outras distâncias Ru-Cl (MALECKI *et al.*, 2005). O efeito *trans* do ligante NO no complexo é representado na FIGURA 4.31.

Esse resultado é encontrado somente para o NO, sendo que nenhum ligante análogo (N_2 , CO, RN_2) apresenta o encurtamento *trans*. Os resultados podem ser explicados simplificadaamente considerando que o NO age como bom π receptor e pobre σ doador e que preferencialmente sobre a competição entre NO e o ligante L *trans* pelos mesmos orbitais existe mútuo fortalecimento quando L é um bom σ doador e não π receptor, como no caso o Cl (BOTTOMLEY, 1978). As distâncias Ru-NO e Ru-*trans*-Cl ficam mais curtas, o que tem sido descrito na literatura como efeito *trans* inverso (COE & GLENWRIGHT, 2000).

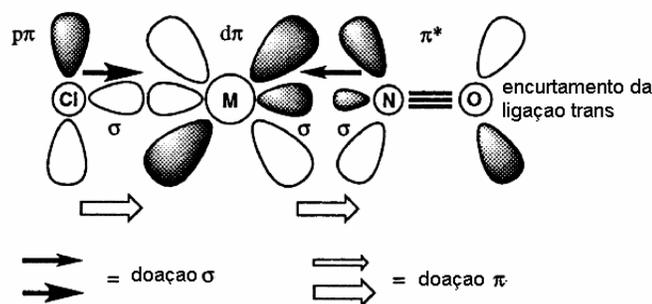


FIGURA 4.31: Representação simplificada de orbitais para complexos contendo o ligante nitrosil linear com ligante *trans* σ e π doador Cl^- (COE & GLENWRIGHT, 2000).

4.1.8 Ensaios de Citotoxicidade – Atividade Antitumoral

Para propósito de comparação, outros compostos também foram avaliados na linhagem celular MDA-MB-231 (*cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{BPA})]$ (HBPA = 2-hidroxibenzil-2-piridilmetil)amina (LANZMASTER *et al.*, 2004; HEINRICH *et al.*, 2007), *fac*- $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppf})]$ (VON POELHSITZ *et al.*, 2007a), $\text{RuCl}_3\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e *dppf* e *dppp* livres), e também foram dissolvidos em DMSO estéril. As estruturas dos complexos *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{BPA})]$ e *fac*- $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppf})]$ estão representadas na FIGURA 4.32. As células foram expostas ao complexo por um período de 24 ou 48 horas. Solução de MTT ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi adicionada às culturas de células e incubadas por um

período de 3 horas. Depois disso, 100 μL de isopropanol foi adicionado para dissolver os cristais formados.

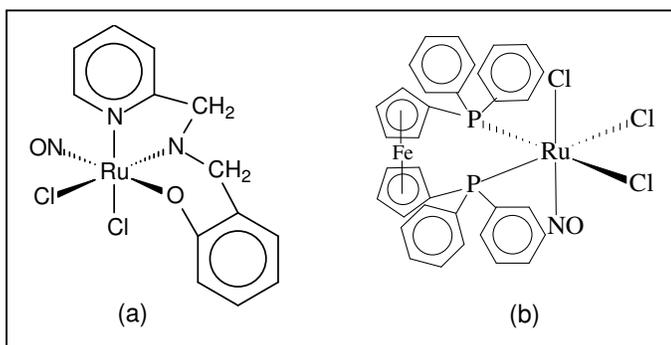


FIGURA 4.32: Estrutura dos complexos *cis*-[RuCl₂(NO)(BPA)] (a) (LANZMASTER *et al.*, 2004; HEINRICH *et al.*, 2007) e *fac*-[RuCl₃NO(dppf)] (b) (VON POELHSITZ *et al.*, 2007a).

A escolha da linhagem MDA-MB-231 deveu-se a baixa atividade da cisplatina neste tipo de câncer, assim buscamos compostos que possam ser ativos nos tipos de câncer nos quais a cisplatina é pouco útil como quimioterápico.

As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas dividindo a absorbância média das células tratadas com o complexo de rutênio por aquela do controle; % de viabilidade celular vs concentração da droga (escala logarítmica) foi plotada para determinar o IC₅₀ (concentração de droga à qual 50% das células são viáveis relativas ao controle), com seu erro derivado calculado da média de três experimentos.

As células foram expostas aos novos compostos por um período de 24 ou 48 horas para permitir que o composto pudesse alcançar o DNA ou outro objetivo biológico desconhecido. Os complexos de **[1]-[3]**, *cis*-[RuCl₂(NO)(BPA)] (HBPA=2-hidroxibenzil-2-piridilmetil)amina e *fac*-[RuCl₃NO(dppf)] foram testados, e para propósito de comparação, a citotoxicidade da cisplatina foi avaliada sob as mesmas condições experimentais. Os valores de IC₅₀, calculados das curvas de dose-sobrevivência obtidas após 24 ou 48 horas de tratamento com droga de ensaio MTT, são mostrados na TABELA 4.11.

TABELA 4.11: Valores de IC₅₀ na linhagem celular MDA-MB-231 de nitrosil complexos de rutênio, cisplatina, e ligantes dppp e dppf, medidos em solução de DMSO.

Complex	IC ₅₀ (μM)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(py)]PF ₆ ^a	21 ± 15 [*]
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-Mepy)]PF ₆ ^a	7,4 ± 3,7 [*]
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-Phpy)]PF ₆ ^a	7,1 ± 2,6 [*]
<i>fac</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppf)] ^b	10 ± 3 [#]
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(BPA)] ^b	87 ± 23 [#]
RuCl ₃ NO.2H ₂ O ^{b,c}	> 200 [#]
dppp ^c	> 200 [#]
dppf ^b	97 ± 8 [#]
Cisplatina	63 ± 5 [#]

^a este trabalho; ^b VON POELHSITZ *et al*, 2007a; ^c concentração máxima utilizada = 200 μM.

^{*} 24 horas; [#] 48 horas.

O RuCl₃NO.2H₂O mostrou-se inativo na linhagem celular utilizada (IC₅₀ > 200 μM). Entretanto, o ligante dppf apresentou alguma atividade, ainda que baixa. O valor de IC₅₀ encontrado foi de 97 ± 8 μM, aproximadamente dez vezes maior que o encontrado para o complexo *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)]. Comparado com a cisplatina, fármaco de referência, o complexo *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] é cerca de seis vezes mais ativo, indicando sua potencialidade como agente antitumoral. A FIGURA 4.33 apresenta os gráficos representativos de viabilidade celular para esses complexos.

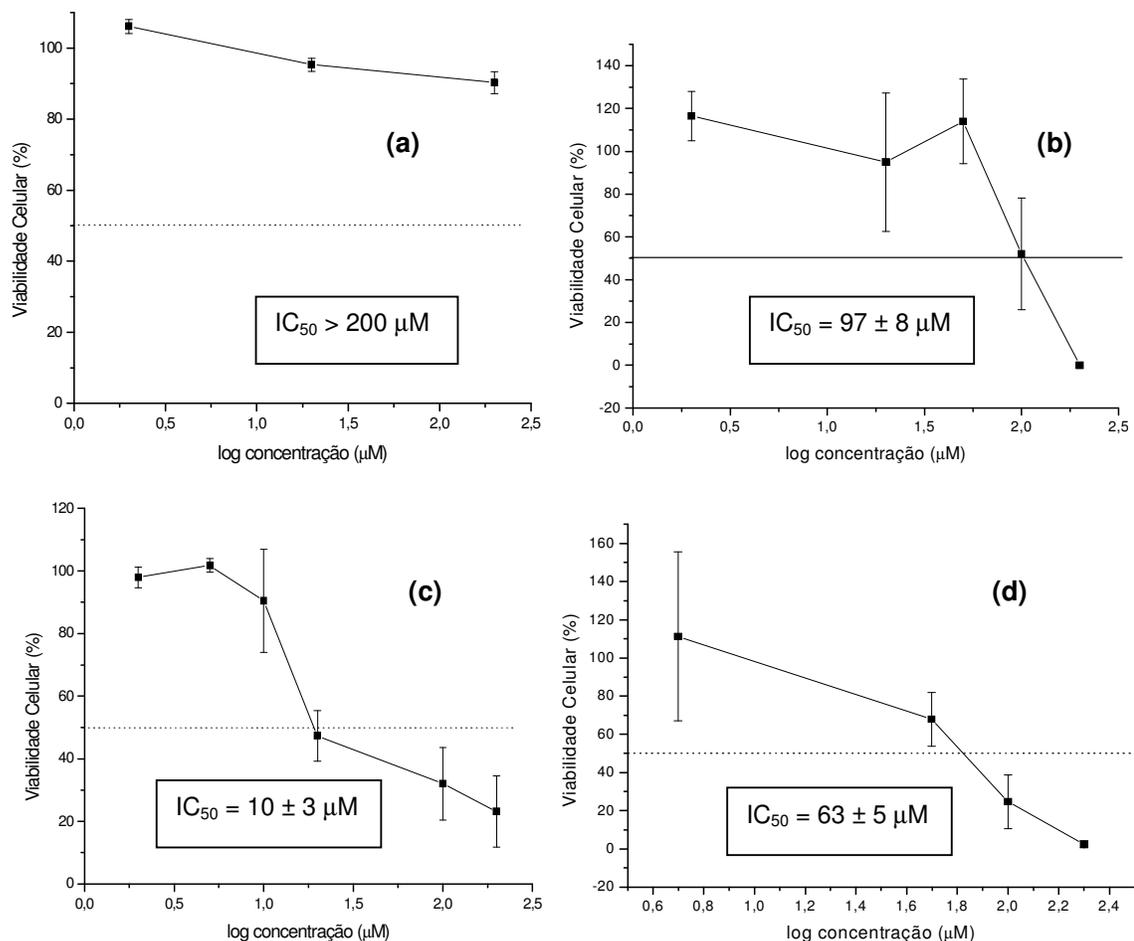


FIGURA 4.33: Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT. **(a)** $\text{RuCl}_3(\text{NO}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; **(b)** dppf livre; **(c)** $\text{fac}[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppf})]$; **(d)** cisplatina. Linhagem celular MDA-MB-231.

Considerando a falta de atividade do precursor $\text{RuCl}_3\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ parece razoável sugerir que a atividade deste complexo se deve à presença da dppf em sua estrutura, sendo esta o real agente citotóxico e tendo a atividade aumentada quando coordenada à unidade “ RuCl_3NO ”. O complexo $\text{cis}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{BPA})]$ apresentou uma atividade moderada (FIGURA 4.34). Nota-se para este composto que uma atividade significativa é observada acima de $50 \mu\text{M}$ e o IC_{50} estimado fica em $87 \pm 23 \mu\text{M}$. Como o complexo precursor $\text{RuCl}_3\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não apresentou atividade até $200 \mu\text{M}$, sugerimos que a atividade citotóxica observada possa estar relacionada à presença do ligante BPA.

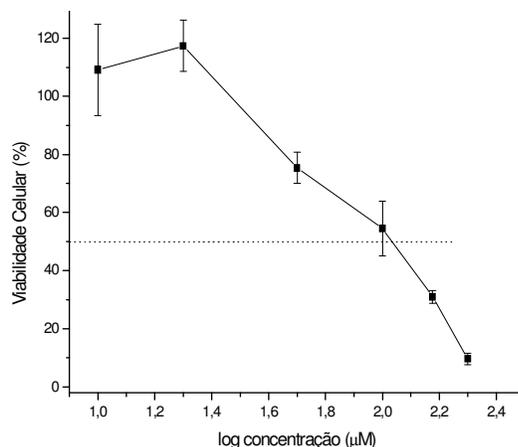


FIGURA 4.34: Viabilidade celular determinada pelo ensaio de MTT para o complexo *cis*-[RuCl₂(NO)(BPA)] na linhagem celular MDA-MB-231.

Os novos complexos **[1]**-**[3]** mostraram uma boa atividade contra a linhagem celular testada, e os valores de IC₅₀ encontrados, próximos a 7 μM, são semelhantes entre si, quando considerado o erro da medida envolvida no complexo em que L = py. A FIGURA 4.35 mostra a viabilidade celular vs. concentração plotada para complexo **[2]**.

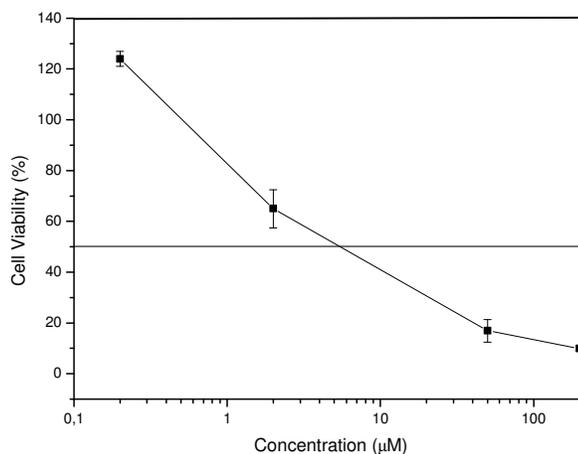


FIGURA 4.35. Viabilidade celular vs. concentração do complexo **[2]**, com barras de erros representando 95% do limite de confiança.

Interessantemente, estes valores de IC₅₀ estão perto dos observados para o complexo *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] (IC₅₀ = 10 ± 3 μM) e muito menor que o valor de IC₅₀ encontrado para o *cis*-[RuCl₂(NO)(BPA)] (87 ± 23 μM) recentemente estudado em nosso grupo (BATISTA *et al*, 1997). Comparado com a cisplatina (metalodroga de

referência) os nitrosilos complexos contendo fosfinas são de três a nove vezes mais ativos na linhagem celular MDA-MB-231, indicando sua potencialidade como um agente antitumoral. Vale mencionar que o *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] que contém o ligante dppf em sua estrutura também é mais ativo que o complexo com o ligante BPA sem fosfina.

A dppp livre mostrou baixa atividade na linhagem celular MDA-MB-231. O complexo *fac*-[RuCl₃(NO)(dppp)], do qual os novos derivados **[1]**-**[3]** foram obtidos, mostrou problemas de solubilidade durante os ensaios biológicos de maneira que não foi possível a estimativa do valor de IC₅₀. Porém o complexo semelhante *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] mostrou um valor de IC₅₀ de 10 ± 3 μM na mesma linha celular em um período de 48 horas. Comparando este valor com aquele determinado para os novos complexos, encontramos valores bem similares. Esse fato, de um modo geral, indica que os novos complexos catiônicos, formados após a substituição de cloreto do precursor, podem possuir um mecanismo diferente de ação comparado com o mecanismo do precursor, já que os valores de IC₅₀ continuam baixos. Esta informação também pode sugerir que os ligantes fosfínicos (no caso a dppp e a dppf) podem realmente ser as espécies citotóxicas efetivas.

Vários trabalhos acerca dos mecanismos de ação dos complexos metálicos têm sido realizados, pois através desses conhecimentos novos complexos com específicas configurações, que podem ser ativos em determinadas linhagens celulares, podem ser sintetizados. Entre estes trabalhos destacam-se os estudos relativos à estrutura-atividade de alguns complexos (GROESSL *et al*, 2007; HOTZE *et al*, 2004; WANG *et al*, 2005).

Já é conhecido que ligantes fosfínicos apresentam boas atividades em algumas linhagens de células tumorais e que sua complexação a metais de transição aumenta sua atividade (BERNERS-PRICE, 1987a; BERNERS-PRICE, 1987b). Como já discutido em alguns trabalhos, e apontado por Queiroz em uma revisão publicada em 1996, a presença de grupos fenil substituídos na fosfina aumenta sua lipofilicidade, o que parece ser responsável pela maior citotoxicidade de complexos fosfínicos na medida em que confere aos mesmos a condição necessária para a penetração na membrana celular, que é de natureza lipoprotéica (QUEIROZ & BATISTA, 1996).

Além da presença da fosfina em nossos complexos, o NO pode ter também um papel importante, pois através de sua redução em meio biológico o mesmo pode

sair da esfera de coordenação do metal gerando um sítio vago através do qual o complexo pode se ligar a proteínas, por exemplo, albumina ou transferrina que estão presentes no sangue e, no caso da transferrina, pode ser responsável pelo transporte e entrada do complexo nas células (CLARKE, 2002). Neste sentido o papel do rutênio seria o de carreador da fosfina até a célula tumoral e sua labilidade intracelular seria responsável pela atividade antitumoral de nossos complexos.

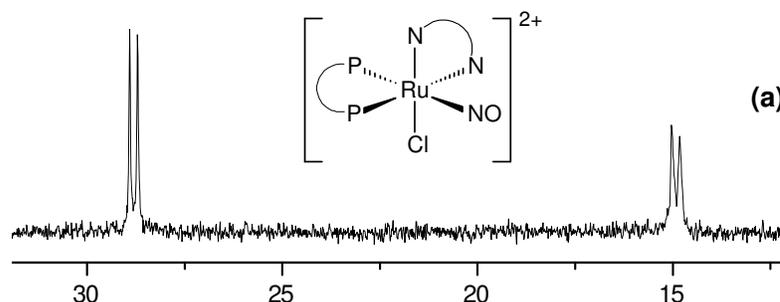
Os resultados encontrados para estes novos compostos de **[1]-[3]** são muito promissores, uma vez que esse sistema apresenta possibilidade de troca de ligantes L na posição *trans* ao P em busca da otimização dos resultados de citotoxicidade.

4.2 COMPLEXOS DE FÓRMULA GERAL [RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂, N-N = bipy, Me-bipy, MeO-bipy, Cl-bipy e fen

4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ³¹P{¹H} dos complexos sintetizados também apresentaram padrão AX ($|v_1 - v_2| \gg J_{12}$), correspondendo à observação de dois dubletos no espectro (GUNTHER, 1996), indicando a não equivalência dos átomos de fósforos, sendo os deslocamentos químicos praticamente insensíveis à variação dos ligantes N-heterocíclicos. Os espectros obtidos são mostrados na FIGURA 4.36.

O complexo precursor [RuCl₂(dppb)(bipy)], apresenta na RMN de ³¹P{¹H} dois dubletos em 42.0 e 31.0 ppm (QUEIROZ *et al.*, 1998). Comparando-se os valores de deslocamento químico dos novos complexos com o valor do precursor, observa-se uma maior proteção dos átomos de fósforo.



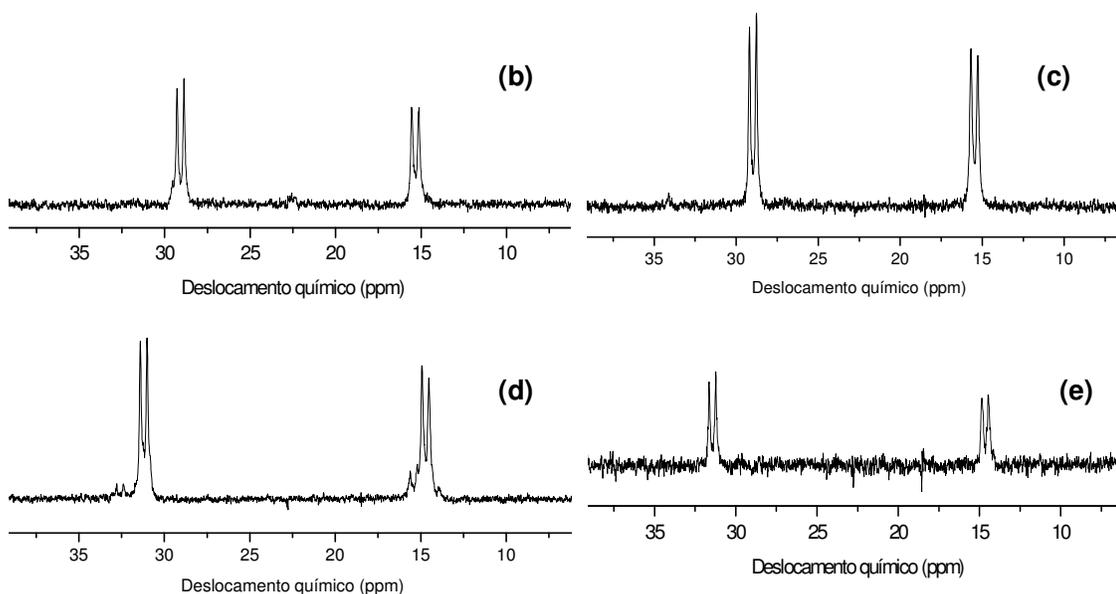


FIGURA 4.36: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos de fórmula geral *cis*- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})](\text{ClO}_4)_2$ em CH_2Cl_2 . **(a)** N-N = bipy; **(b)** N-N = Me-bipy; **(c)** N-N = Meo-bipy; **(d)** N-N = Cl-bipy; **(e)** N-N = fen.

Pode-se justificar a proteção dos átomos de fósforo dos complexos de fórmula geral *cis*- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})](\text{ClO}_4)_2$ em relação aos dubletos do precursor, considerando que o efeito eletrônico seja predominante, devido a maior habilidade aceptora do grupo NO em relação ao cloreto do precursor. Isso ocorre, pois após a troca de um cloreto pelo grupo NO, o metal diminui a retrodoação com o fósforo *trans* a NO, devido o fato deste grupo ser forte acceptor π e competir com o fósforo pelos elétrons do Ru. Isto leva à diminuição da densidade eletrônica sobre o fósforo, deixando-o mais protegido.

Contudo, são possíveis dois isômeros dos complexos **[4]-[8]** para fósforos não equivalentes, conforme FIGURA 4.37.

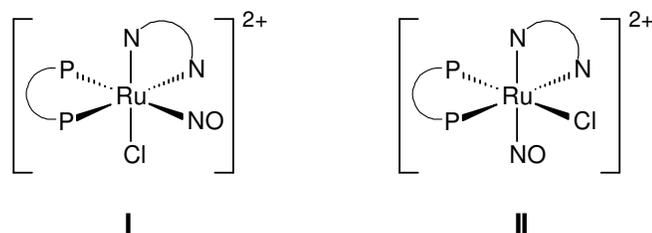


FIGURA 4.37: Possíveis isômeros de fórmula molecular *cis*- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})]^{2+}$.

Para determinar qual dos isômeros (**I** ou **II**) corresponde aos complexos sintetizados, e para uma atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos, o composto *cis*-[RuCl(¹⁵NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂ foi isolado. O mesmo procedimento foi feito em nosso laboratório para a atribuição dos fósforos do composto *cis*-[RuCl(NO)(dcpe)(bipy)](PF₆)₂. O espectro obtido é mostrado na FIGURA 4.38.

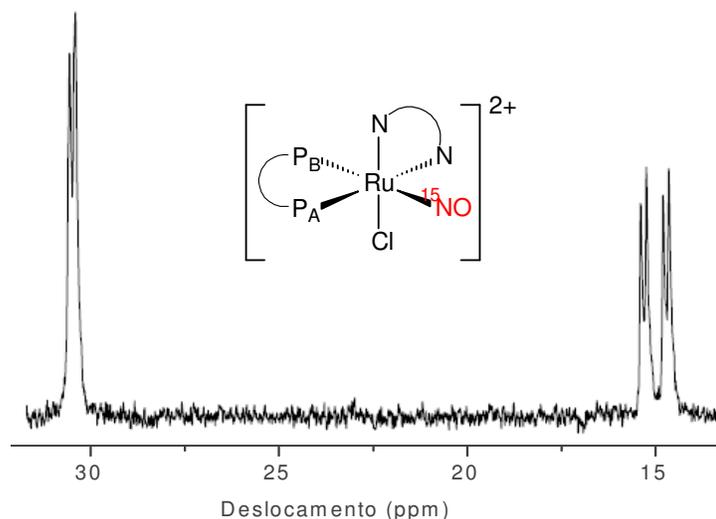


FIGURA 4.38: Espectro de RMN ³¹P{¹H} do complexo *cis*-[RuCl(¹⁵NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂ em CH₂Cl₂.

O complexo com a geometria **I** apresenta o NO *trans* ao P o que levaria a uma alteração da multiplicidade do sinal, que passaria a um duplo dubleto devido ao acoplamento de um fósforo com o outro e com o ¹⁵N. Na estrutura **II** ambos os fósforos estão *cis* ao NO, de tal maneira que ambos sentiriam o mesmo efeito deste ligante, porém devido ao pequeno valor da constante de acoplamento *cis*, existe a possibilidade de não serem observadas alterações na multiplicidade.

Pode-se observar que apenas o sinal mais protegido teve a multiplicidade alterada passando de dubleto para duplo dubleto, mostrando que o ¹⁵NO está posicionado *trans* ao P, o que confirma a geometria **I** como a correta. O valor da constante de acoplamento ²J_{31P-15N} foi determinado como sendo 64.8 Hz, um valor típico para acoplamento de fósforo *trans* posicionado a nitrogênio (CARLTON & WEBER, 1996). Os valores de deslocamentos químicos para esta série estão apresentados na TABELA 4.10.

TABELA 4.12: Valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para a série *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂ e valores de pKa para as bipyridinas livres.

<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(N-N)] ²⁺	δP_A (ppm)	δP_B (ppm)	² J _{P-P} (Hz)	pKa dos ligantes N-N livres
N-N = bipy	28.8	14.9	32.4	4,44
N-N = Me-bipy	29.1	15.3	34.8	4,92
N-N = MeO-bipy	28.9	15.5	34.0	5,74
N-N = Cl-bipy	31.2	14.7	33.2	2,61
N-N = fen	31.4	14.6	33.2	4,86

É interessante comparar os deslocamentos químicos dos fósforos nos complexos desta série com o encontrado para o *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (13,6 e 10,1 ppm) que também apresenta NO *trans* ao P (VON POELHSITZ, 2005). A primeira observação é que ambos os dubletos são mais protegidos no *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] o que, novamente, deve ser reflexo de uma esfera de coordenação mais doadora neste complexo e por conseqüência os fósforos doam menos densidade eletrônica ficando mais protegidos.

Este fato torna-se mais evidente ao se verificar que o P_B *trans* NO se apresenta cerca de 5,0 ppm deslocado para campo alto (protegido) no *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] do que nos compostos da série *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)]²⁺, uma vez que a acidez π do NO pode ser satisfeita com a densidade eletrônica do Ru, devido aos três átomos de Cl, enquanto no caso do *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)]²⁺ o fósforo acaba doando densidade eletrônica para compensar a acidez do NO, se aproximando mais do Ru, tornando-se menos protegido (VON POELHSITZ, 2005).

Observando-se os espectros de RMN ³¹P{¹H} das FIGURA 4.36 e FIGURA 4.38 nota-se claramente uma diferença de intensidade e da largura da linha de base entre os dubletos. Os sinais do P *trans* NO são para todos os casos menos intensos e mais largos que os P *trans* N das bipyridinas. Esta característica deve estar relacionada à maior mobilidade do ligante NO em relação ao N das bipyridinas que leva a uma variação da densidade eletrônica sobre o P aumentando a faixa de deslocamento químico do mesmo (diminuição de intensidade e alargamento do

sinal). Evidências para isto foram obtidas por DE ARAÚJO (2002) para o composto *mer*-[RuCl₃(NO)(diop)], cujo espectro é semelhante aos dos compostos desta série. Realizando-se experimentos à baixa temperatura (até -27°C), observou-se aumento da intensidade do duplete correspondente ao fósforo *trans* NO, chegando a se igualar ao sinal do fósforo *trans* N das bipyridinas (FIGURA 4.39), ou seja, a temperatura mais baixa mantém o NO mais fixo levando ao estreitamento do sinal.

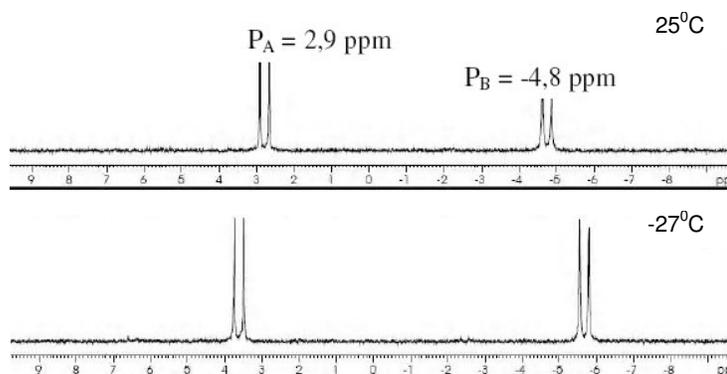


FIGURA 4.39: Espectros de RMN ³¹P{¹H} do *mer*-[RuCl₃(NO)(diop)] em CDCl₃ a 25 e -27°C (DE ARAÚJO, 2002).

Para estes complexos tentou-se correlacionar os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos com os deslocamentos químicos de ³¹P{¹H} do átomo de fósforo *trans* ao nitrogênio das bipyridinas (P_B), como mostra a FIGURA 4.40. Os valores de pKa's dos ligantes bipyridínicos utilizados encontram-se na TABELA 4.10.

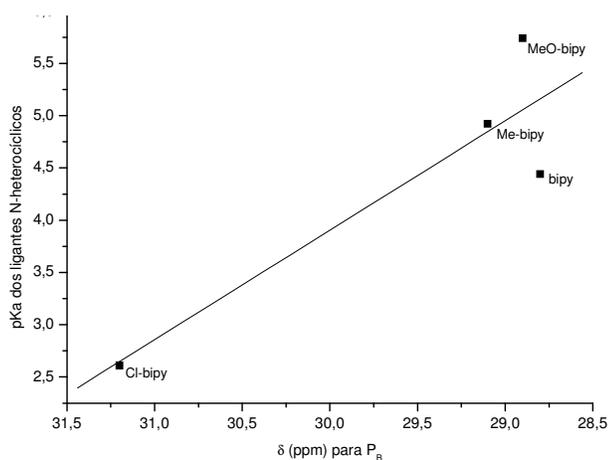


FIGURA 4.40: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos vs. deslocamento químico do P_B para os complexos de [4] a [7].

Através da FIGURA 4.40 pode ser observada certa variação no deslocamento químico de acordo com a variação da basicidade dos ligantes bipyridínicos, ou seja, quanto mais básico o ligante N-heterocíclico (mais doador) o deslocamento químico do fósforo *trans* a ele encontra-se em campo mais alto (átomo de fósforo mais blindado). Isto explica novamente o fato de haver uma esfera de coordenação mais doadora no complexo com o ligante mais básico e por conseqüência o fósforo doa menos densidade eletrônica ficando mais protegidos. O complexo com o ligante 1,10-fenantrolina não foi mencionado porque sua estrutura se difere das correlacionadas, não podendo-se fazer uma relação direta com os outros complexos.

4.2.1.1 Reatividade do complexo *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)](ClO₄)₂: Labilidade do grupo NO⁺.

Considerando que o óxido nítrico é essencial em muitos processos fisiológicos, sua natureza radicalar e alta reatividade podem levar à formação de vários derivativos em meio biológico, por isto o estudo mecanístico da formação e quebra da ligação M-NO são importantes na elucidação da química *in vivo* do NO. A reatividade do complexo *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)](ClO₄)₂ foi então avaliada frente ao ligante piridina, em metanol, sendo isolado o composto correspondente *cis*-[RuCl(dppb)(Me-bipy)(py)]ClO₄.

Solubilizou-se o composto [5] em metanol previamente deaerado e adicionou-se excesso de piridina. A solução mudou de cor instantaneamente, passando de amarela para laranja. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ³¹P{¹H} que anteriormente apresentavam-se em 29,1 e 15,3 ppm (²J_{P-P} = 34,8 Hz) passaram para 39,1 e 38,3 ppm (²J_{P-P} 35,6 Hz) após a adição da piridina, como mostra a FIGURA 4.41.

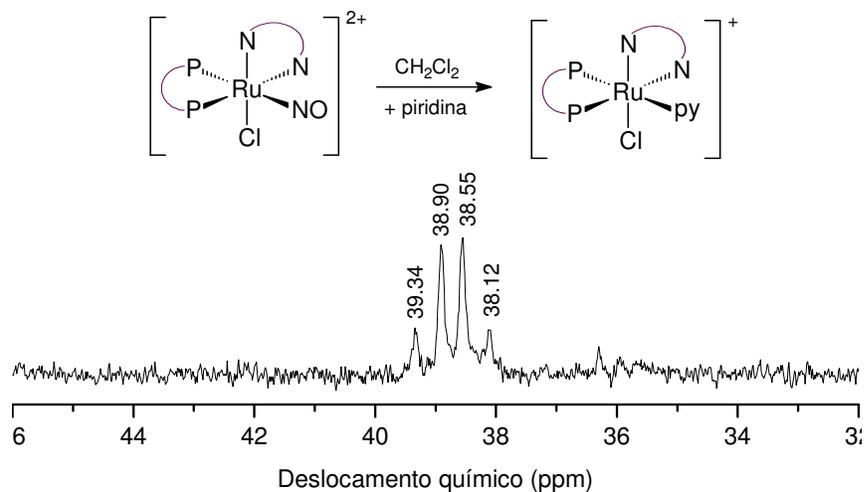


FIGURA 4.41: Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o composto *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{Me-bipy})(\text{py})]\text{ClO}_4$ em CH_2Cl_2 .

Em alguns sistemas, mais especificamente onde dois átomos de fósforo estão *trans* a ligantes diferentes, porém similares, um singlete pode ser observado nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, o que se descreve na literatura como resultado de uma “degenerescência acidental” (JAMES *et al.*, 2001; VALLE *et al.*, 2008).

O tempo de relaxação de spin de compostos de fósforo varia amplamente e podem ser fortemente dependentes dos solventes (efeito de solvatação ou viscosidade destes) e da temperatura. A constante de acoplamento spin-spin de fosfinas pode também variar com a temperatura, usualmente devido a alterações no efeito rotacional sobre a ligação do fósforo. Vários fatores estão relacionados à multiplicidade em um espectro de fósforo como a temperatura, ângulo diedro, ângulo de cone, solvente, etc. (VERKADE & QUIN, 1987; VALLE *et al.*, 2008).

Muitas espécies organometálicas apresentam menos sinais de ressonâncias na RMN do que seria predito para suas estruturas estáticas. Isto normalmente ocorre porque as moléculas não são rígidas, e os núcleos envolvidos são trocados a uma taxa mais rápida que a escala de tempo da RMN (CRABTREE, 2005).

Às vezes a troca acontece a uma taxa que é comparável com a escala de tempo da RMN. Quando isto acontece, normalmente podemos reduzir a velocidade da troca esfriando a amostra, até que vemos o espectro estático; isto é chamado de *limite de baixa-temperatura*. Por outro lado, se aquecermos a amostra, a taxa de troca pode subir à extensão que o espectro médio é completamente observado,

chamado de *limite de alta-temperatura*. Entre estes dois extremos, são vistos normalmente como sinais de ressonâncias alargados (CRABTREE, 2005).

Por exemplo, se aquecermos a amostra, os sinais se tornam cada vez mais alargados, e aumentam até que os dois picos se fundem (coalescem). Isto acontece porque a troca é agora muito mais rápida que a escala de tempo da RMN e só uma ressonância média é vista. Ao resfriar a amostra, as mesmas mudanças ocorrem ao contrário, um processo conhecido como decoalescência (CRABTREE, 2005; VALLE *et al.*, 2008).

Observações similares foram feitas por VALLE, em 2005, em trabalho de mestrado em nosso grupo, onde foi feita a troca de um cloreto do composto *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] por diferentes ligantes L, gerando os compostos da série *cis*-[RuCl(dppb)(bipy)(L)]PF₆, onde L = py, 4-Mepy, 4-Phpy, 4-Vnpy, 4-aminopy ou 4-tbupy (VALLE *et al.*, 2008). Alguns destes compostos também apresentaram uma coalescência dos dubletos em temperatura ambiente e/ou solventes diferentes.

Neste sentido experimentos de RMN a diferentes temperaturas e diferentes solventes foram efetuados, onde o composto *cis*-[RuCl(dppb)(bipy)(4-Mepy)]PF₆ em CH₂Cl₂ apresentou um singleto a 20°C e com variação da temperatura para 0, 10, 30 e 35°C este singleto se desdobrou em 2 dubletos (FIGURA 4.42(a)). Esse mesmo composto a 20°C, mas em CDCl₃ apresentou 2 dubletos no espectro de RMN ³¹P{¹H}, que coalesceram ao diminuir a temperatura a 10°C (FIGURA 4.42(b)) (VALLE *et al.*, 2008)

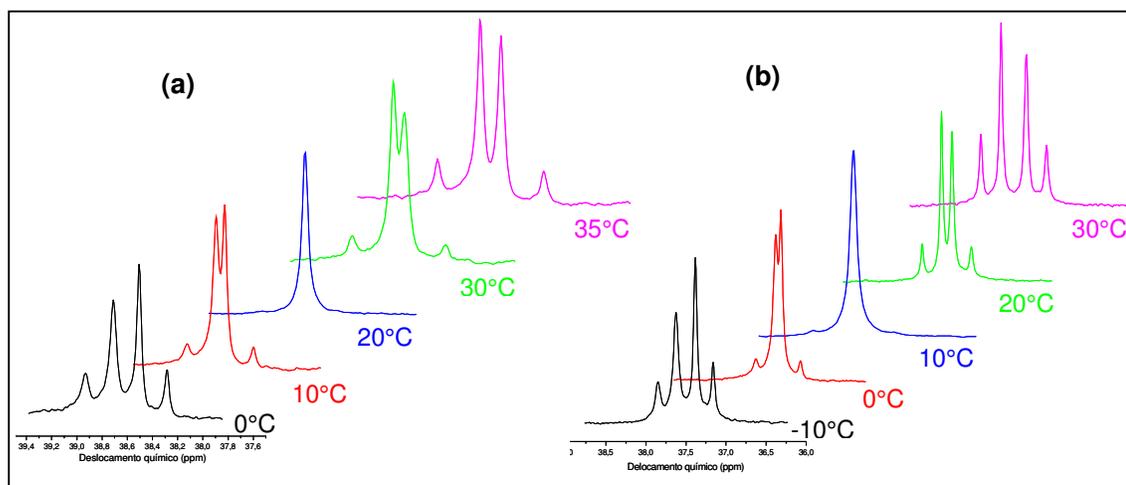


FIGURA 4.42: Espectros de RMN ³¹P{¹H} com variação de temperatura do complexo *cis*-[RuCl(dppb)(bipy)(4-Me-py)]PF₆ em CD₂Cl₂ (a) e em CDCl₃ (b) (VALLE *et al.*, 2008).

4.2.1.2 Reatividade do complexo *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂: Labilidade do Cl.

Considerando que compostos contendo em suas estruturas bifosfina, NO, bipyridina e porfirina seriam muito interessantes, tentou-se fazer a troca do átomo de cloro do complexo *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂ pela porfirina, sendo que esta última encontra-se na janela terapêutica, o que possibilitaria a utilização destes compostos em terapia fotodinâmica.

A labilidade do átomo de Cl do complexo *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO₄)₂ foi avaliada primeiramente frente ao ligante piridina, que é muito semelhante aos anéis piridínicos da porfirina, em metanol utilizando-se AgClO₄, sendo isolado o composto correspondente *cis*-[RuCl(dppb)(bipy)(py)]ClO₄.

No escuro, solubilizou-se o composto **[4]** em metanol previamente deaerado e adicionou-se AgClO₄ em quantidade estequiométrica. Após aproximadamente 1 hora, adicionou-se quantidade estequiométrica de piridina. Os deslocamentos químicos no RMN de ³¹P{¹H} que anteriormente apresentavam-se em 28,8 e 14,9 ppm passaram para 27,3 e 19,1 ppm após a adição da piridina, como mostra a FIGURA 4.43.

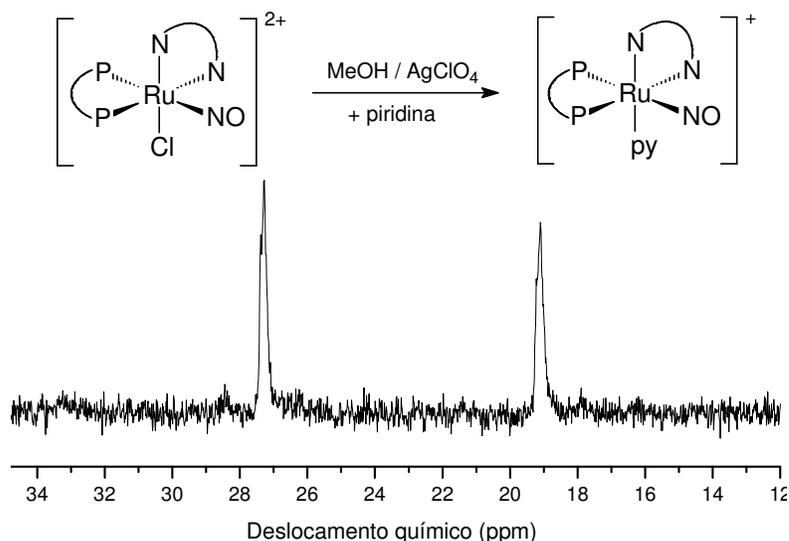


FIGURA 4.43: Espectro de RMN ³¹P{¹H} do complexo *cis*-[Ru(NO)(dppb)(bipy)(py)](ClO₄)₃ em CH₂Cl₂.

Após a troca do átomo de Cl por piridina, tentou-se fazer o mesmo com porfirina, utilizando-se o mesmo procedimento. O espectro obtido está representado na FIGURA 4.44.

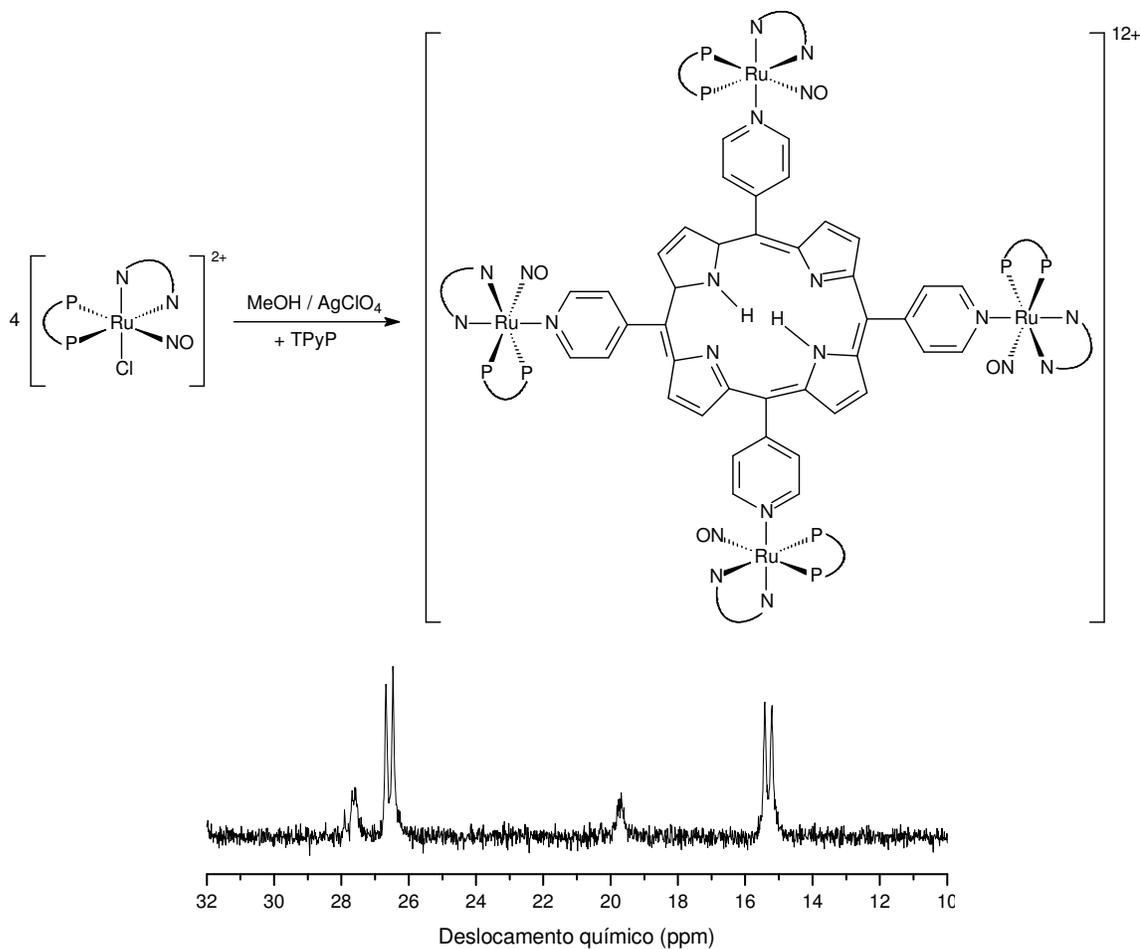


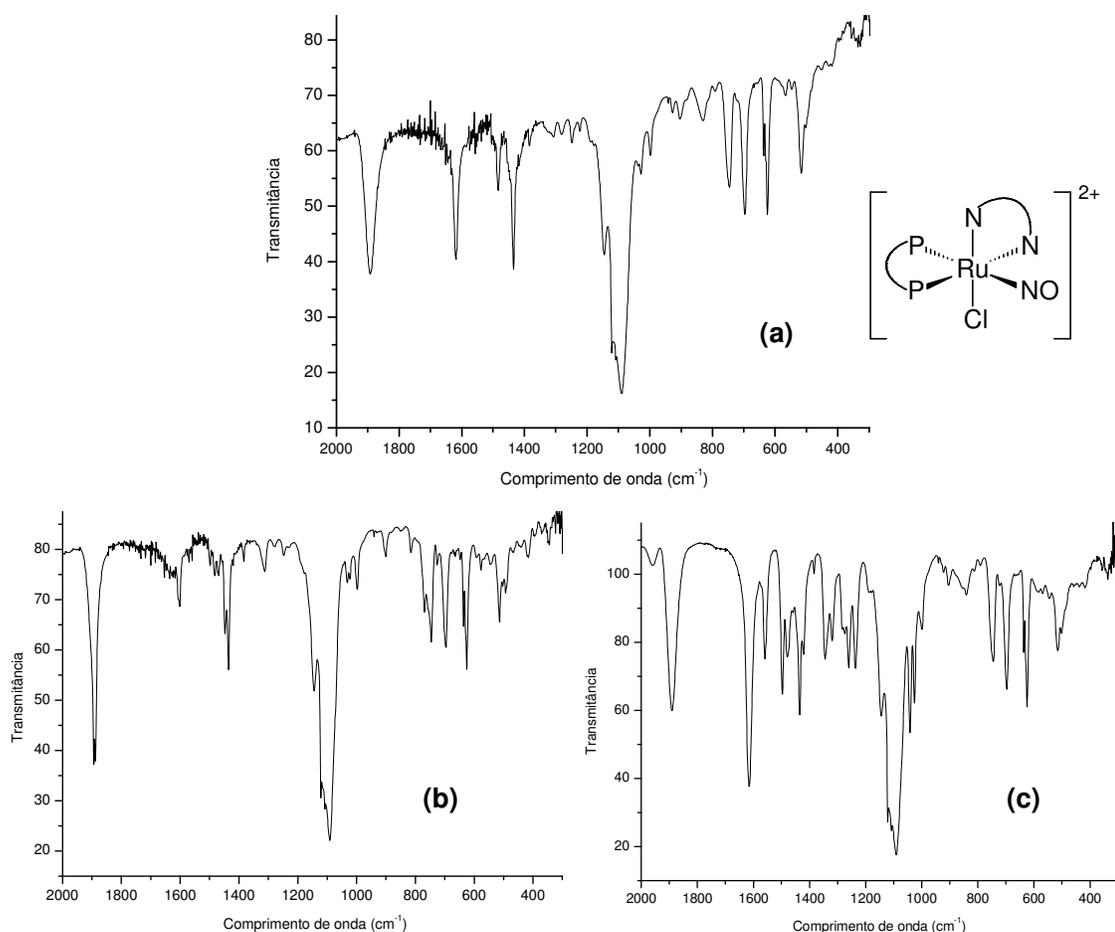
FIGURA 4.44: Espectro de RMN $^{31}P\{^1H\}$ do complexo $[Ru(NO)(dppb)(bipy)(TPyP)](ClO_4)_3$ em CH_2Cl_2 .

Os espectros indicam a troca do átomo de Cl pela piridina e pela porfirina, sendo que os compostos necessitam de uma purificação, bem como melhoramento da rota sintética.

4.2.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do IV dos complexos sintetizados apresentaram modos vibracionais consistentes com as estruturas propostas, e foram obtidos na região entre $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$. A maioria dos modos vibracionais dos compostos em estudo surge dos anéis aromáticos das bifosfinas (WHIFFEN, 1956; NAKAMOTO, 1997; VON POELHSITZ, 2005).

Os espectros (em pastilhas de KBr) dos complexos sintetizados apresentaram-se bastante semelhantes entre si (FIGURA 4.45). Para melhor visualização o espectro é apresentado na região de $2000-200 \text{ cm}^{-1}$, já que acima de 2000 cm^{-1} aparecem apenas bandas referentes aos estiramentos dos grupos CH aromáticos e alifáticos e CH_2 .



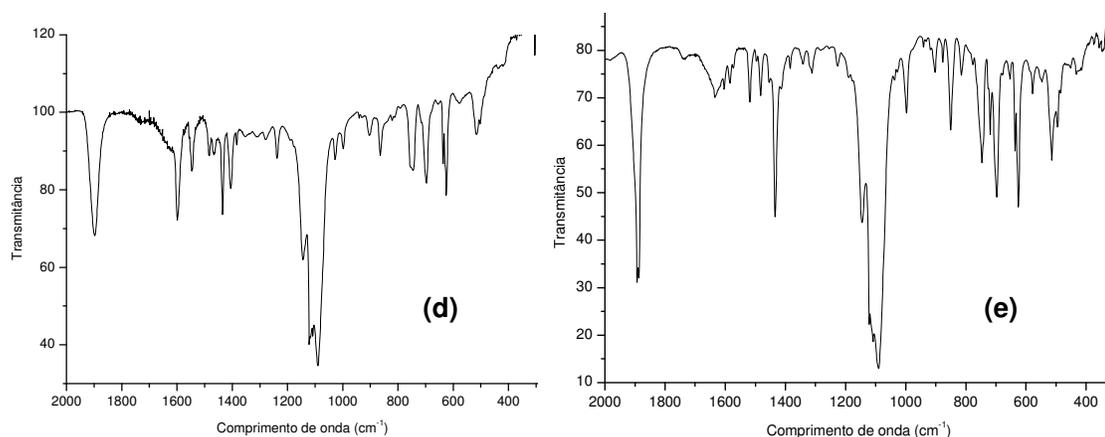


FIGURA 4.45: Espectros no IV dos complexos de fórmula geral *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂ em pastilhas de KBr. **(a)** N-N = bipy; **(b)** N-N = Me-bipy; **(c)** N-N = Meo-bipy; **(d)** N-N = Cl-bipy; **(e)** N-N = fen.

A presença do grupo NO coordenado ao rutênio foi confirmada pela observação de uma banda de intensidade forte em torno de 1892 cm⁻¹. É interessante destacar que no *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)], que apresenta o NO *trans* ao P, o valor de ν_{NO} é 1868 cm⁻¹ (VON POELHSITZ, 2005). Para entender esta significativa diferença é necessário considerar os outros ligantes da esfera de coordenação. No caso do *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] em relação aos complexos da série *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)]²⁺, a presença de dois cloretos adicionais é o principal fator para a baixa frequência do ν_{NO} . Os cloretos adicionais do composto *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] deixam o Ru mais rico em elétrons, fazendo então maior retrodoação para o NO, o que diminui a frequência de ν_{NO} . Outro fator colabora para a maior frequência de ν_{NO} nos complexos *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)]²⁺, como a acidez π dos ligantes N-heterocíclicos (VON POELHSITZ, 2005).

Com exceção de frequências características, como de alguns grupos substituintes (NO), as atribuições são aproximadas e muitas vezes complicadas de se fazer. Isto ocorre devido os modos vibracionais não serem puros, mas tratarem de uma mistura de estiramentos e deformações. Na TABELA 4.11 são apresentadas os principais modos vibracionais dos espectros de IV para os complexos de [4] a [8] (COOK *et al.*, 1984; PAVIA *et al.*, 1996; SILVERSTEIN *et al.*, 1987; COLTHUP *et al.*, 1990).

TABELA 4.13: Principais modos vibracionais para a série *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂.

Modos vibracionais	bipy	Me-bipy	MeO-bipy	Cl-bipy	fen
ν_s (C-H) _{ar} (f)	3055	3053	3052	3051	3055
ν_s (C-H) _{al} (f)	2925	2924	2926	2924	2925
ν NO (F)	1892	1892	1890	1898	1892
ν C=N (f)	1600	1618	1615	1599	1630
ν_{as} (C = C) (m)	1435	1434	1435	1434	1434
ν P-C; ν ClO ₄ (wag)	1090	1089	1090	1089	1090
δ (C-H) _{ar} (m)	745	745	744	744	746
δ (C-H) (m)	696	696	696	697	697
δ P-C(ϕ) (m)	513	516	510	515	513
ν Ru-Cl (f)	304	297	308	304	307

F = muito 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; **β** - designa uma vibração de deformação no plano.

Para os complexos de [4] a [7], onde foi feita a variação dos ligantes bipyridínicos, fez-se uma correlação dos valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos vs. ν NO (FIGURA 4.46), com o intuito de avaliar a influência destes ligantes mesmo não estando *trans* ao NO.

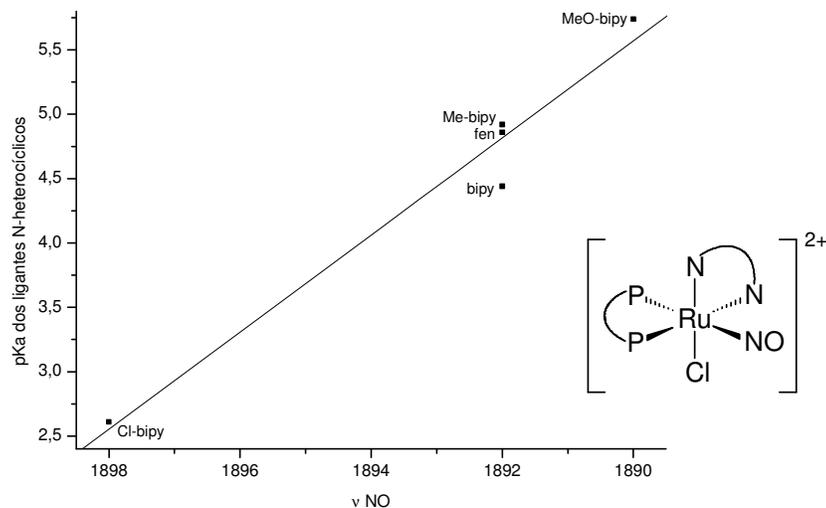


FIGURA 4.46: Correlação entre os valores de pKa dos ligantes N-heterocíclicos vs. ν NO para os complexos de [4] a [7].

A FIGURA 4.46 mostra que com o aumento da basicidade do ligante N-heterocíclico há uma diminuição da energia de estiramento do NO, pois quanto mais doador (mais básico) é o ligante, mais rico em elétrons fica o centro metálico, e conseqüentemente maior densidade eletrônica no grupo NO⁺. Este comportamento é esperado devido à habilidade do rutênio, através da retrodoação, de enfraquecer a ligação N-O, mesmo este estando *cis* ao ligante N-heterocíclico.

4.2.3 Medidas de Condutividade Molar

As medidas de condutividade molar (Λ) foram efetuadas utilizando-se concentrações da ordem de $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, em acetona, à 25° C, e os valores estão apresentados na TABELA 4.12. Estes valores indicam que houve dissociação de um cloreto dos complexos, gerando espécie iônica, na proporção de 1:2 da esfera de coordenação e do contra íon ClO₄ para as soluções dos compostos em questão. A faixa aceita para eletrólitos 1:2 em acetona à 25°C é 122 – 335 μ S.cm⁻¹ (GEARY, 1971), de acordo com tabela de intervalo de condutâncias molares de eletrólitos estudada por VELHO, R. G. em trabalho de mestrado, orientado pelo Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. Esses valores indicam que houve a troca de dois átomos de cloro, o que é consistente com as estruturas propostas.

TABELA 4.14: Valores de condutividade molar para os compostos de fórmula geral *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂.

Composto	Λ ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(bipy)](ClO ₄) ₂	149,7
<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)](ClO ₄) ₂	122,6
<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(MeO-bipy)](ClO ₄) ₂	153,2
<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(Cl-bipy)](ClO ₄) ₂	160,1
<i>cis</i> -[RuCl(NO)(dppb)(fen)](ClO ₄) ₂	164,7

4.2.4 Análise Elementar

Os resultados das análises dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos compostos de [4] a [8], mostrados na TABELA 4.15, fornecem uma indicação de suas fórmulas moleculares.

TABELA 4.15: Dados micro analíticos dos compostos de fórmula geral *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)](ClO₄)₂.

Composto	%C (calc)	%H (calc)	%N (calc)
[4] - C ₃₈ H ₃₆ N ₃ Cl ₃ O ₉ P ₂ Ru.½CH ₃ CN. ½C ₆ H ₁₄	50,97 (49,86)	4,40 (4,43)	4,83 (4,85)
[5] - C ₄₀ H ₄₀ N ₃ Cl ₃ O ₉ P ₂ Ru.½CH ₃ CN. ½C ₆ H ₁₄	53,88 (50,83)	4,96 (4,70)	4,50 (4,71)
[6] - C ₄₀ H ₄₀ N ₃ Cl ₃ O ₁₁ P ₂ Ru.½CH ₃ CN. ½C ₆ H ₁₄	50,95 (49,31)	4,62 (4,56)	4,56 (4,57)
[7] - C ₃₈ H ₃₄ N ₃ Cl ₅ O ₉ P ₂ Ru.½CH ₃ CN. ½C ₆ H ₁₄	48,24 (46,68)	4,29 (3,96)	5,07 (4,54)
[8] - C ₄₀ H ₃₆ N ₃ Cl ₃ O ₉ P ₂ Ru.½CH ₃ CN. ½C ₆ H ₁₄	53,15 (51,03)	4,42 (4,33)	4,64 (4,73)

Como se observa através dos dados da TABELA 4.15, todos os compostos apresentam aproximadamente a mesma porcentagem de erro, sendo que todos parecem ser mais “leves” (menor peso molecular) do que as fórmulas propostas.

Na tentativa de se averiguar o motivo desse erro, novas conformações foram propostas adicionando moléculas de solventes, supondo que o composto poderia estar solvatado. Os novos valores encontram-se mais próximos dos obtidos experimentalmente, indicando então a possibilidade da presença de solventes solvatando a molécula.

4.2.5 Espectrometria de Massas (ESI-MS)

A espectrometria de massas (ESI-MS – modo positivo) foi uma importante ferramenta para a confirmação da composição da esfera de coordenação. Os espectros de massas obtidos apresentam como característica o pico do íon molecular, que carrega a “impressão digital” do Ru devido aos vários picos m/z adjacentes correspondentes à distribuição isotópica deste metal (VON POELHSITZ, 2005).

O espectro de massas do complexo *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)]²⁺ - [5], mostrado na FIGURA 4.47, apresenta o pico base com $m/z = 747,9$, propondo-se a estrutura correspondente à espécie sem NO [Ru^{II}Cl(dppb)(Me-bipy)]⁺ (P.M. teórico = 747,24 g.mol⁻¹). Nas condições experimentais utilizadas não se observaram fragmentações significativas para este complexo.

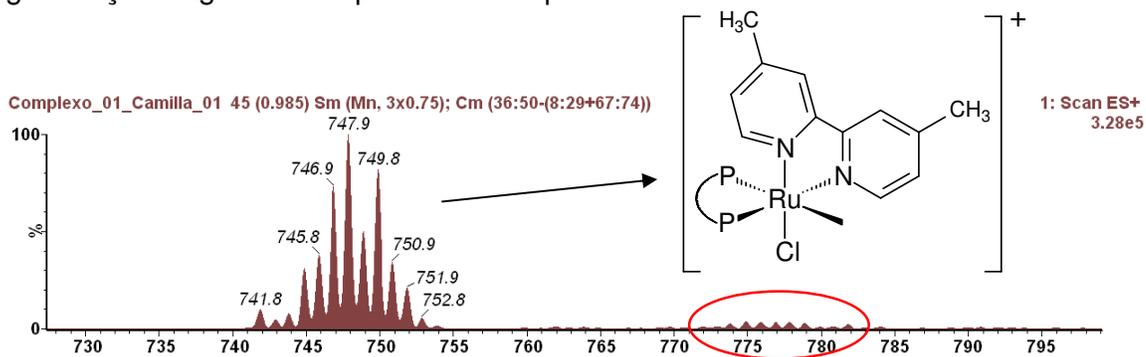


FIGURA 4.47: Espectro de massas do *cis*-[RuCl(NO)(dppb)(Me-bipy)]²⁺ em CH₂Cl₂. $m/z = 727$ a 800 .

A distribuição isotópica experimental foi comparada com a teórica, fazendo-se então os espectros simulados sem e com o grupo NO (FIGURA 4.48). O espectro simulado sem o grupo NO apresenta o pico base com $m/z = 747,1$, apresentando grande semelhança com o espectro experimental ($m/z = 747,9$), confirmando a

estrutura proposta correspondente à espécie $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^+$ (P.M. teórico = $747,24 \text{ g.mol}^{-1}$). O espectro simulado com o grupo NO apresenta o pico base com $m/z = 777,1$, confirmando a estrutura proposta do $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^{2+}$ (P.M. teórico = $777,25 \text{ g.mol}^{-1}$). Pode-se observar também que essas linhas aparecem no espectro experimental, mesmo que com baixa intensidade, como demarcado através de um círculo vermelho na FIGURA 4.47.

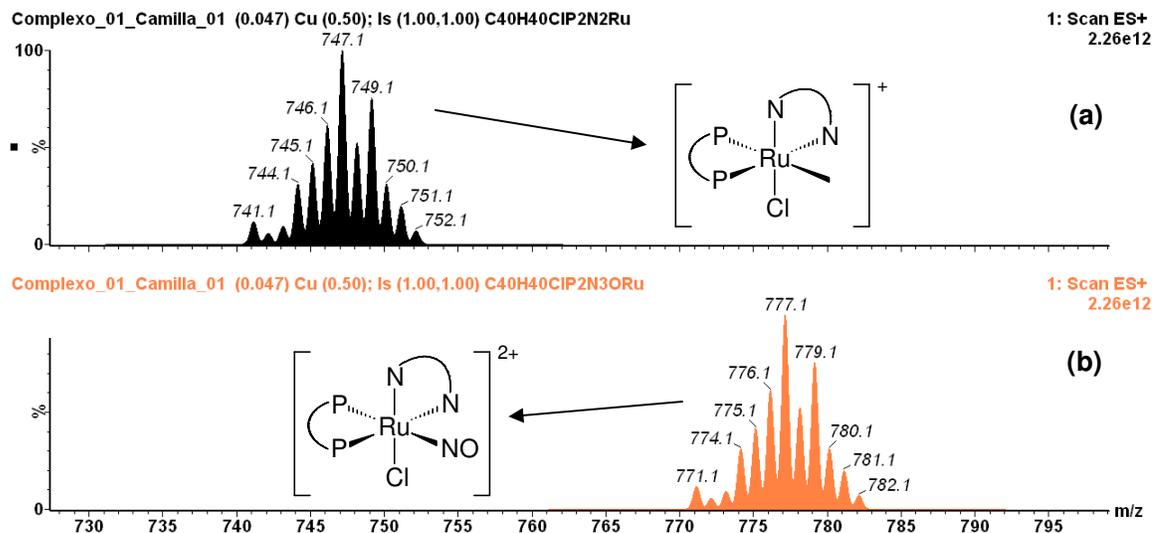


FIGURA 4.48: Espectros de massas simulados. (a) $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^+$; (b) $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{Me-bipy})]^{2+}$. $m/z = 727$ a 800 .

O espectro de massas do complexo $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^{2+}$ - [6], mostrado na FIGURA 4.49, apresenta o pico base com $m/z = 779,9$, propondo-se também a estrutura correspondente à espécie sem NO $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^+$ (P.M. teórico = $779,24 \text{ g.mol}^{-1}$). Entretanto, para este complexo, nas condições experimentais utilizadas, além do pico base, foi observado o pico iônico com $m/z = 405,1$ (FIGURA 4.50). É possível ver este pico principalmente porque esta molécula já é um íon com duas cargas positivas, correspondendo ao complexo bicarregado $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^{2+}$ (P.M. = $809,25 \text{ g.mol}^{-1}$) (VON POELHSITZ, 2005).

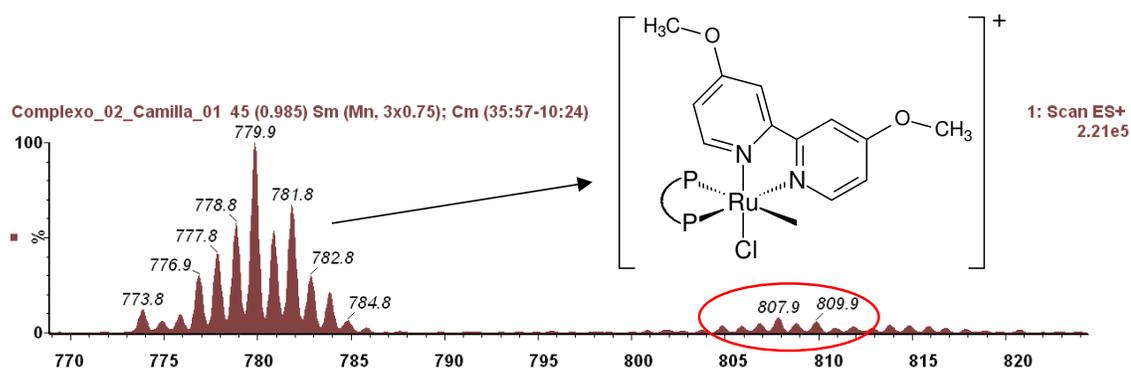


FIGURA 4.49: Espectro de massas do cis -[RuCl(NO)(dppb)(MeO-bipy)]²⁺ em CH₂Cl₂.
 $m/z = 769$ a 825 .

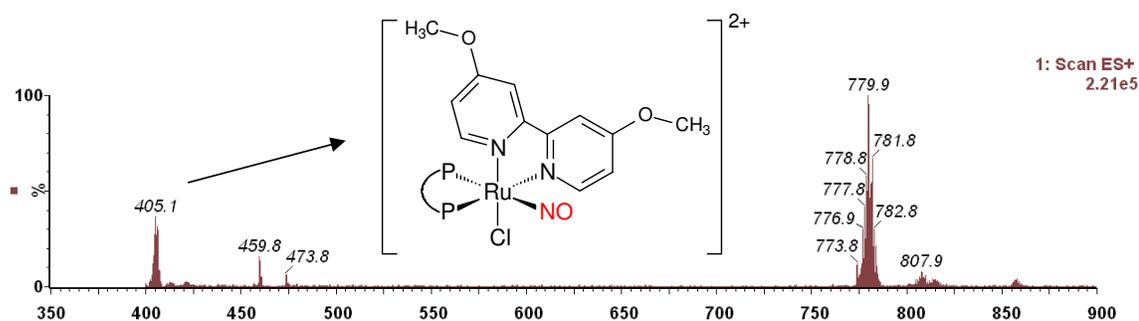


FIGURA 4.50: Espectro de massas do cis -[RuCl(NO)(dppb)(MeO-bipy)]²⁺ em CH₂Cl₂.
 $m/z = 350$ a 900 .

Novamente a distribuição isotópica experimental foi comparada com a teórica, fazendo-se o espectro simulado sem e com o grupo NO (FIGURA 4.51). O espectro simulado sem o grupo NO apresenta o pico base com $m/z = 779,1$, apresentando grande semelhança com o espectro experimental ($m/z = 779,9$), confirmando a estrutura proposta correspondente à espécie sem NO [Ru^{II}Cl(dppb)(MeO-bipy)]⁺ (P.M. teórico = 779,24 g.mol⁻¹). O espectro simulado com o grupo NO apresenta o pico base com $m/z = 809,1$, confirmando a estrutura proposta do cis -[RuCl(NO)(dppb)(MeO-bipy)]²⁺ (P.M. teórico = 809,25 g.mol⁻¹). Pode-se observar novamente que essas linhas aparecem no espectro experimental, ainda com baixa intensidade, como demarcado através de um círculo vermelho na FIGURA 4.49.

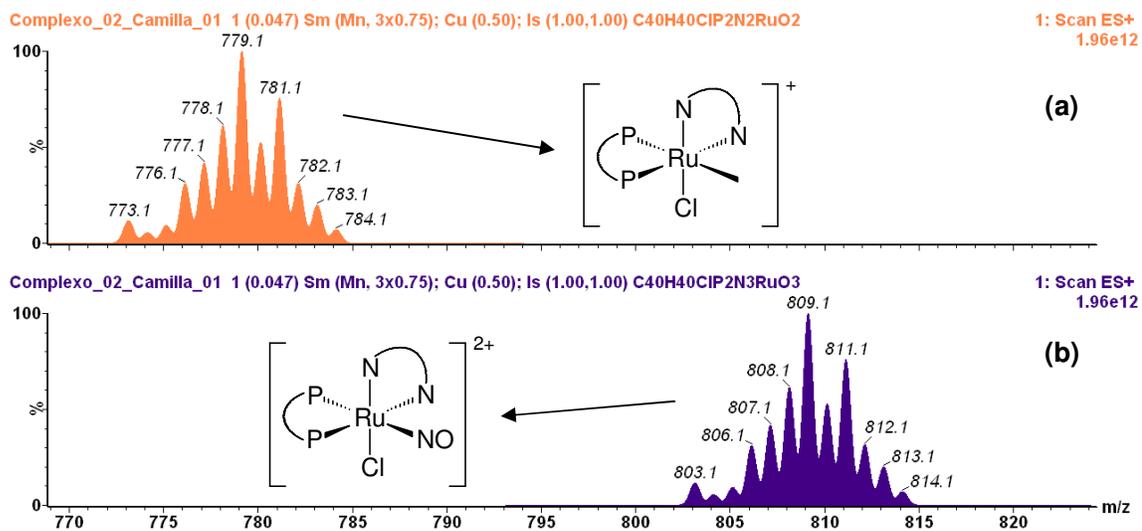


FIGURA 4.51: Espectros de massas simulados. (a) $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^+$; (b) $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{MeO-bipy})]^{2+}$. $m/z = 769$ a 825 .

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os complexos das séries $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]^+$ e $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})]^{2+}$ mostraram-se estáveis tanto no estado sólido quanto em solução e a formação de complexos catiônicos é uma abordagem interessante para melhorar a solubilidade em solventes polares dos nitrosilos complexos fosfínicos.

A característica marcante destes complexos é a presença de dois dubletos no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Para a série $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]^+$ o espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ passa de um singlete do precursor $fac\text{-}[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppp})]$ para dois dubletos, comprovando a não equivalência dos átomos de fósforos. A substituição do cloreto no precursor $fac\text{-}[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppp})]$ merece ser explorada utilizando-se outros ligantes, no sentido de modificar as características eletrônicas do composto, que pode influenciar na saída do NO.

Para a série $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{N-N})]^{2+}$, os dois dubletos no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ estão mais protegidos comparados com os dubletos do precursor, devido a habilidade aceptora do NO, o que diminui a retrodoação do metal com o P, diminuindo assim a densidade eletrônica sobre o mesmo. Para assinalar qual dubleto corresponde a cada fósforo foi obtido o complexo $cis\text{-}[\text{RuCl}(^{15}\text{NO})(\text{dppb})(\text{bipy})](\text{PF}_6)_2$. A presença do ^{15}NO fez com que o dubleto em campo mais alto se desdobrasse em um duplo dubleto, demonstrando que o sinal em campo mais alto corresponde ao fósforo *trans* ao NO.

Considerando que o óxido nítrico é essencial em muitos processos fisiológicos e que devido a sua natureza radicalar e alta reatividade podem levar a formação de vários derivativos em meio biológico, se fez necessário a verificação da quebra da ligação M-NO, que é importante na elucidação da química *in vivo* do NO, podendo ser avaliados futuramente os efeitos do meio na formação e quebra da ligação M-NO e sua subsequente substituição. Após a adição de piridina ao composto $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{dppb})(\text{Me-bipy})](\text{ClO}_4)_2$ houve a troca do NO por piridina, comprovada por mudança no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$.

Nos espectros de IV para ambas as séries, o νNO ocorre entre 1867 e 1898 cm^{-1} , mostrando que os complexos são do tipo $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+\}$. Este fato, junto com as distâncias N-O e o ângulo aproximadamente linear Ru-N-O observados nas estruturas cristalinas resolvidas mostram que os complexos são mesmo do tipo $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+\}$.

Os voltamogramas cíclicos da série $cis-[RuCl_2(NO)(dppp)(L)]^+$ são caracterizados por duas ondas irreversíveis entre -0.190 e -0.295 V e entre -0.688 e -0.828 V respectivamente para às reduções $NO^+ \rightarrow NO^0$ e $NO^0 \rightarrow NO^-$. Com relação ao precursor $fac-[RuCl_3(NO)(dppp)]$ é de nosso interesse utilizar ligantes ambidentados, como por exemplo a pirazina, para se obter complexos binucleares.

A fim de verificar a influência da basicidade da bifosfina nas propriedades do NO, para ambas as séries pode-se sintetizá-las variando-se as bifosfínas, para verificação da influência desses ligantes na química do NO. Espera-se que o aumento da basicidade da bifosfina resulte na diminuição da energia do estiramento NO e que os potenciais de redução tornem-se mais negativos, pois o NO^+ estaria mais rico em elétrons.

Para a série $cis-[RuCl_2(NO)(dppp)(L)]^+$ também pode-se sintetizar compostos utilizando ligantes piridínicos com diferentes pKa's, como por exemplo a 4-aminopiridina. Isso permitirá obter uma boa correlação entre o ν_{NO} e os potenciais de redução do NO. Pode-se ainda efetuar uma eletrólise dos complexos da série 1 e fazer um RMN $^{31}P\{^1H\}$, para verificar a formação de produtos sem o grupo NO, como proposto ocorrer através da análise dos voltamogramas cíclicos.

Os compostos da série $cis-[RuCl(NO)(dppb)(N-N)]^{2+}$ precisam ser purificados e caracterizados ainda por voltametria cíclica, pulso diferencial, UV-vis, e RMN de 1H e ^{13}C , bem como atividade antitumoral.

Neste trabalho também foram avaliadas as potencialidades como agentes antitumorais os complexos **[1]** a **[3]**, os quais mostraram uma boa atividade contra a linhagem celular testada, e os valores de IC_{50} encontrados, próximos a 7 μM , são semelhantes entre si. Comparado com a cisplatina (metalodroga de referência) os nitrosilos complexos contendo fosfinas são de três a nove vezes mais ativos na linhagem celular MDA-MB-231, indicando sua potencialidade como um agente antitumoral.

Os valores de IC_{50} do composto $fac-[RuCl_3(NO)(dppf)]$ e dos complexos de **[1]** a **[3]** são bem similares. Esse fato, de um modo geral, indica que os novos complexos catiônicos, formados após a substituição de cloreto do precursor, podem possuir um mecanismo diferente de ação comparado com o mecanismo do precursor, já que os valores de IC_{50} continuam baixos. Esta informação também sugere que os ligantes fosfínicos (no caso a dppp e a dppf) podem realmente ser as

espécies citotóxicas efetivas, como proposto anteriormente (BERNERS-PRICE *et al.*, 1987a; BERNERS-PRICE *et al.*, 1987b) e seus complexos são usados somente para carregar estas moléculas aos objetivos biológicos. Mas os resultados encontrados para estes novos compostos são muito promissores, uma vez que esse sistema apresenta possibilidade de troca de ligantes L na posição *trans* ao P em busca da otimização dos resultados de citotoxicidade. Pode-se também efetuar os testes de citotoxicidade com os ligantes N-heterocíclicos livres, além de calcular a LD₅₀ para os novos complexos obtidos. Esse cálculo seria muito interessante já que, mesmo com valores de IC₅₀ satisfatórios, se a LD₅₀ for alta, os compostos podem ser agentes antitumorais muito promissores.

Como sugestão para trabalhos futuros pode-se utilizar os compostos de ambas as séries para a troca de Cl por porfirina. Esses compostos seriam muito interessantes por conterem em suas estruturas bifosfina, NO, dependendo da série bipyridina, e porfirina, sendo que esta última encontra-se na janela terapêutica, o que possibilitaria a utilização destes compostos em terapia fotodinâmica. Já foram feitos alguns testes com rotas experimentais utilizando-se AgClO₄ que necessitam de melhoramentos, mas que indicaram a formação do produto.

Um melhor planejamento para a preparação de novos complexos também se faz necessário, levando-se em conta a possibilidade de saída do NO. Além do mais pôde-se perceber que a química do NO ainda apresenta interessantes desafios e precisa ser explorada na busca por compostos com atividades farmacológicas.

Em resumo, este trabalho permitiu explorar diversos aspectos da química dos nitrosilo complexos bifosfínicos de rutênio, dentre eles: síntese, estrutura, reatividade, espectroscopia, correlações entre propriedades do complexo e do NO e comportamento eletroquímico. Neste sentido acreditamos ter contribuído para um melhor entendimento da química desta classe de compostos que poderá ser de grande utilidade na eventualidade de algum composto apresentar atividade anti-tumoral promissora.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARDYCE, C. S.; DORCIER, A.; SCOLARO, C. & DYSON, P. J. "Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals". *Applied Organometallic Chemistry*, **19**(1): 1, 2005.
- ALLEN, R. J. & FORD, P. "Kinetics of ruthenium(II) substitution reactions. reaction of aquopentaammineruthenium(II) with various pyridines and organonitriles". *Inorganic Chemistry*, **11**(4): 679, 1972.
- ANG, W. H. & DYSON, P. J. "Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy". *European Journal of Inorganic Chemistry*, **20**: 4003, 2006.
- BAKHTIAR, R. & OCHIAI, R. E. I. "Pharmacological applications of inorganic complexes". *General Pharmacology*, **32**(5): 525, 1999.
- BALZANI, V.; BOLLETTA, F.; GANDOLFI, M. T. & MAESTRI, M. "Bimolecular electron transfer reactions of the excited states of transition metal complexes". *Organic Chemistry and Theory - Topics in Current Chemistry*. Springer-Verlag, New York, 1978. Vol. 75, p. 1-64.
- BATISTA, A. A. & QUEIROZ, S. L. "*Cis-trans isomerization in biochemistry*, Ed. Christophe Dugave, Wiley-VHC, 2006.
- BATISTA, A. A.; PEREIRA, C.; QUEIROZ, S. L.; OLIVEIRA, L. A. A.; SANTOS, R. H. A. & GAMBARDELLA, M. T. P. "Nitrosyl ruthenium complexes with general formula $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{P-P})]$ (P-P = $\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}$, n = 1-3 and $\{\text{PPh}_2\text{-CH=CH-PPh}_2\}$). X-ray structure of $[\text{RuCl}_3(\text{NO})\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2\}]$ ". *Polyhedron*, **16**(6): 927, 1997.
- BATISTA, A. A.; PEREIRA, C.; WOHNATH, K.; QUEIROZ, S. L.; SANTOS, R. H. A. & GAMBARDELLA, M. T. P. "Synthesis and characterization of the *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$ isomer. X-ray structures of the: *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppm})]$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$ and *mer*- $[\text{RuCl}_3\text{NO}(\text{dppb})]$ [dppm = 1,2-bis(diphenylphosphino)methane and dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane]". *Polyhedron*, **18**(15): 2079, 1999.
- BEDIOUI, F.; TRÉVIN, S. & DEVYNCK, J. "The use of gold electrodes in the electrochemical detection of nitric-oxide in aqueous-solution". *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **377**(1-2): 295, 1994.
- BERGAMO, A.; GAVA, B.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; SERLI, B.; COCCHIETTO, M.; ZORZET, S. & SAVA, G. "Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity". *International Journal of Oncology*. **21**(6): 1331, 2002.
- BERGAMO, A.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; COCCHIETTO, M. & SAVA, G. "Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin". *Investigational New Drugs*, **21**(4): 401, 2003.

BERNERS-PRICE, S. J.; NORMAN, R. E. & SADLER, P. J. "The autoxidation and proton dissociation constants of tertiary diphosphines: relevance to biological activity". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **31**: 197, 1987a.

BERNERS-PRICE, S. J.; JOHNSON, R. K.; MIRABELLI, C. K.; FAUCETTE, L. F.; McCABE, F. L. & SADLER, P. J. "Copper(I) Complexes with Bidentate Tertiary Phosphine Ligands: Solution Chemistry and Antitumor Activity". *Inorganic Chemistry*, **26**: 3383, 1987b.

BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I. L. S.; OLIVEIRA, C. R.; DREHER, S.; FAUSTO, D. M.; SOUFEN, M. A.; NASCIMENTO, F. D. & CAIRES, A. C. F. "Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**(8): 3047, 2005.

BIRCHALL, J. D.; O'DONOGHUE, D. T. & WOOD, J. R. "The nature of Ru(bipy)₂Cl₂ in dimethylsulfoxide solutions". *Inorganica Chimica Acta*, **37**(1): L461, 1979.

BORGES, S. D. S.; DAVANZO, C. U.; CASTELLANO, E. E.; Z-SCHPECTOR, J., SILVA, S. C. & FRANCO, D. W. "Ruthenium nitrosyl complexes with N-heterocyclic ligands". *Inorganic Chemistry*, **37**(11): 2670, 1998.

BOSNICH, B. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. New York, Wiley Interscience, 1994. pp. 219 – 236.

BOTTOMLEY, F. "Nitrosyl complexes of ruthenium", *Coordination Chemistry Reviews*. **26**(1): 7, 1978.

BUTLER, A. R. & NICHOLSON, R. *Life, death, and nitric oxide*. 1^a ed. London, Royal Society of Chemistry, 2003. 140 p.

CALLAHAN, R. W. & MEYER, T. J. "Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes". *Inorganic Chemistry*, **16**(3): 574, 1977.

CAMERON, B. R.; DARKES, M. C.; YEE, H.; OLSEN, M.; FRICKER, S. P.; SKERLJ, R. T.; BRIDGER, G. J.; DAVIES, N. A.; WILSON, M. T.; ROSA, D. J. & ZUBIETA, J. "Ruthenium(III) polyaminocarboxylate complexes: efficient and effective nitric oxide scavengers". *Inorganic Chemistry*, **42**(6): 1868, 2003.

CARLOS, R. M.; FERRO, A. A.; SILVA, H. A. S.; GOMES, M. G.; BORGES, S. S. S.; FORD, P. C.; TFOUNI, E. & FRANCO, D. W. "Photochemical reactions of *trans*-[Ru(NH₃)₄L(NO)]³⁺ complexes". *Inorganica Chimica Acta*, **357**(5): 1381, 2004.

CARLTON, L. & WEBER, R. "Triphenylcyanoborate complexes of Rhodium. A Nitrogen-15 NMR study of [Rh(NCBPh₃)(PPh₃)₃] and [Rh(CNBPh₃)(PPh₃)₃] and their derivatives". *Inorg. Chem.* **35**(20): 5843, 1996.

CAULTON, K. G. "Synthetic methods in transition metal nitrosyl chemistry". *Coordination Chemistry Reviews*, **14**(4): 317, 1975.

CHEN, Y. & SHEPHERD, E.; “[Ru^{II}(ttha)(H₂O)]²⁺ is a rapid NO scavenger (ttha⁶⁻ = triethylenetetraminehexaacetate)”. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **68**(3): 183, 1997.

CINI, R.; TAMASI, G.; DEFAZIO, S.; CORSINI, M.; ZANELLO, P.; MESSORI, L.; MARCON, G.; PICCIOLI, F. & ORIOL, P. “Study of ruthenium(II) complexes with anticancer drugs as ligands. Design of metal-based phototherapeutic agents”. *Inorganic Chemistry*, **42**(24): 8038, 2003.

CLARKE, M. J. & GAUL, J. B. “Chemistry relevant to the biological effects of nitric oxide and metallonitrosyls”. *Structure and Bonding*, **81**: 147, 1993.

CLARKE, M. J. “Ruthenium metallopharmaceuticals”. *Coordination Chemical Reviews*, **232**(1-2): 69, 2002.

CLARKE, M. J.; ZHU, F. & FRASCA, D. R. “Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals”. *Chemical Reviews*, **99**(9): 2511, 1999.

COE, B. J. & GLENWRIGHT, S. J. “Trans-effects in octahedral transition metal complexes”. *Coordination Chemical Reviews*, **203**(1): 5, 2000.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H. & WIBERLEY S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3^a ed. Academic Press Inc., 1990. 547 p.

COOK, M. J.; LEWIS, A. P.; MCAULIFFE, G. S. G.; SKARDA, V.; THOMSON, A. J.; GLASPER, J. L. & ROBBINS, D. J. “Luminescent metal-complexes .1. tris-chelates of substituted 2,2' -bipyridyls with ruthenium(II) as dyes for luminescent solar collectors”. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions II*, **8**: 1293, 1984.

CORREA, M.; MACHADO, J.; CARNEIRO, C. R. W.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; TRAVASSOS, L. R.; CHAMMAS, R. & JASIULIONIS, M. G. “Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth”. *International Journal of Cancer*, **114**(3): 356, 2005.

CRABTREE, R. H. *The organometallic chemistry of the transition metals*. 4^a ed. New Jersey, Wiley-Interscience, 2005. 546 p.

CULOTTA, E. & KOSHLAND, Jr de; “NO news is good news”. *Science*, **258**(5090): 1862, 1992.

CZAP, A. & van ELDIK, R. “The unusually fast reactions between ruthenium(III)-amine complexes and NO revisited”. *Dalton Transactions*, **4**: 665, 2003.

CZAP, A.; HEINEMANN, F. W. & van ELDIK, R. “Influence of terpyridine as π -acceptor ligand on the kinetics and mechanism of the reaction of NO with ruthenium(III) complexes”. *Inorganic Chemistry*, **43**(24): 7832, 2004.

de SOUZA, V. R.; FERREIRA, A. M. D. & TOMA, H. E., “Synthesis, characterization and reactivity of *trans*-[RuCl(NO)(bpydip)]²⁺ {bpydip = N,N-bis(7-methyl-2-pyridylmethylene)-1,3-diiminopropane}: a novel nitrosil ruthenium complex displaying high electronic delocalization”. *Dalton Transactions*, **3**: 458, 2003.

DEKOCK, R. L. & GRAY, H. B.; *Chemical structure and bonding*. Menlo Park, Benjamin, University Science Books, 2^a ed., 1989, 491 p.

DING, X. D.; WEICHSEL, A.; ANDERSEN, J. F.; SHOKHIREVA, T. K.; BALFOUR, C.; PIERIK, A. J.; AVERILL, B. A.; MONTFORT, W. R. & WALKER, F. A. "Nitric oxide binding to the ferri- and ferroheme states of nitrophorin 1, a reversible NO-binding heme protein from the saliva of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*". *Journal of the American Chemical Society*, **121**(1): 128, 1999.

DOVLETOGLOU, A.; ADEYEMI, S. A. & MEYER, T. J. "Coordination and redox chemistry of substituted polypyridyl complexes of ruthenium". *Inorganic Chemistry*, **35**(14): 4120, 1996.

DREHER, S. *Síntese e Aplicação de Paladaciclos Contendo o Ligante 1,2-Bis(difenilfosfina)etano como Agentes Antitumorais*. Mogi das Cruzes, Biotecnologia – UMC, 2004. Dissertação de mestrado, 160 p.

DURHAM, B.; WALSH, J. L.; CARTER, C. L. & MEYER, T. J. "Synthetic applications of photosubstitution reactions of poly(pyridyl) complexes of ruthenium (II)". *Inorganic Chemistry*, **19**(4): 860, 1980.

DZIEGIELEWSKI, J.O.; JEZOWSKA-TRZEBIATOWSKA. B.; GIL-BORTNOWSKA, R. & GRZYBEK, R. "Radiation-chemical processes as disclosure of electronic states in a bis(dinitrogen)molybdenum complex". *Polyhedron*, **5**(3): 833, 1986.

FAIRY, M. B. & IRVING, R. J. "Complexes of ruthenium nitrosyl trihalides". *Journal of the Chemical Society A - Inorganic Physical Theoretical*, **5**: 475, 1966.

FAULKNER, L. R. "Understanding electrochemistry: some distinctive concepts". *Journal of Chemical Education*, **60**(4): 262, 1983.

FONTECAVE, M. & PIERRE, J. L. "The basic chemistry of nitric oxide and its possible biological reactions". *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **131**(6): 620, 1994.

FRICKER, S. D; SLADE, E.; POWELL, N. A; VAUGHAN, O. J.; HENDERSON, G. R; MURRER, B. A.; MEGSON, S. L.; BISLAND, S. K. & FLITNEY, F. W.; "Ruthenium complexes as nitric oxide scavenger: a potential therapeutic approach to nitric oxide-mediated diseases". *British Journal of Pharmacology*, **122**(7): 1441, 1997.

FRICKER, S. P. "Ruthenium, nitric oxide and disease a novel inorganic chemistry approach to drug design". *Platinum Metals Review*. **39**(4): 150, 1995.

GEARY, W. J. "Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterization of Coordination Compounds". *Coordination Chemistry Reviews*, **7**(1): 81, 1971.

GERASIMCHUK, N. N. & BOWMAN-JAMES, K. "Mixed-donor ligands" IN: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. KING, R. B. (Ed.). New York, Wiley Interscience, 1994. p. 2254.

GOPAL, Y. N. V.; KONURU, N. & KONDAPI, A. K. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401: 53, 2002.

GRIFFITH, D.; BERGAMO, A.; PIN, S.; VADORI, M.; MÜLLER-BUNZ, H.; SAVA, G. & MARMION, C. J. "Novel platinum pyridinehydroxamic acid complexes: Synthesis, characterisation, X-ray crystallographic study and nitric oxide related properties". *Polyhedron*, **26**(16): 4697, 2007.

GROESSL, M.; REISNER, E.; HARTINGER, C. G.; EICHINGER, R.; SEMENOVA, O.; TIMERBAEV, A. R.; JAKUPEC, M. A.; ARION, V. B. & KEPPLER, B. K. "Structure-Activity Relationships for NAMI-A-type Complexes (HL)[*trans*-RuCl₄L(S-dmso)ruthenate(III)] (L = Imidazole, Indazole, 1,2,4-Triazole, 4-Amino-1,2,4-triazol, and 1-Methyl-1,2,4-triazole): Aquation, Redox Properties, Protein Binding, and Antiproliferative Activity". *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**(9): 2185, 2007.

GUNTHER, H. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1996. 602 p.

HARHAJI, L.; VUCKOVIC, O.; MILJKOVIC, D.; STOSIC-GRUJICIC, S. & TRAJKOVIC, V. "Iron down-regulates macrophage anti-tumour activity by blocking nitric oxide production *Clinical and Experimental Immunology*. **137**(1): 109, 2004.

HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H. & KEPPLER, B. K. "From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100**(5-6): 891, 2006.

HATHCOCK, D.; MORRIS, J.; MADDEN, J. & SLATTERY, S. J. "Ligands substituent effects on ruthenium (III/II) redox properties: an advanced inorganic laboratory experiment". *The Chemical Educator*. **2**(3): 1, 1997.

HEINRICH, T. A.; VON POELHSITZ, G.; BATISTA, A. A.; COSTA-NETO, C. M. "NOVEL RUTHENIUM COMPLEXES WITH CYTOTOXIC AND ANTITUMOR PROPERTIES". *6th International Congress of Pharmaceutical Sciences: Ribeirão Preto, SP - Brazil, 2007*; p. QM 008

HOTZE, A. C. G.; CASPERS, S. E.; de VOS, D.; KOOIJMAN, H.; SPEK, A. L.; FLAMIGNI, A.; BACAC, M.; SAVA, G.; HAASNOOT, J. G. & REEDIJK, J. "Structure-dependent *in vitro* cytotoxicity of the isomeric complexes [Ru(L)₂Cl₂] (L = *o*-tolylazopyridine and 4-methyl-2-phenylazopyridine) in comparison to [Ru(azpy)₂Cl₂]" *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **9**(3): 354, 2004.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A. & RICHARD, L. K. *Inorganic Chemistry, Principles of Structure and Reactivity*. 4th ed., Prentice Hall, 1993. 964 p.

IGNARRO, L. J. *Nitric oxide: Biology and Pathobiology*. 1st ed. San Diego, Academic Press, 2000. 1017 p.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. & BYRNS, R. E. "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary-artery and vein possesses pharmacological and

chemical-properties identical to those of nitric-oxide radical". *Circulation Research*, **61**(6): 866, 1987.

JARRETT, P. S. & SADLER, P. J. "Nickel(II) Bis(phosphine) Complexes". *Inorganic Chemistry*, **30**(9): 2098, 1991.

JUNG, C. W.; GARROU, P. E.; HOFFMAN, P. R. & CAULTON, K.G. "Reexamination of the Reactions of $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2$ ($n = 1-4$) with $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ ". *Inorganic Chemistry*, **23**(6): 726, 1984.

JURIS, A.; BALZANI, V.; BARIGELLETI, F.; CAMPAGNA, S.; BELSER, P. & VON ZELEWSKY, A. "Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence". *Coordination Chemistry Review*, **84**: 85, 1988.

KAIM, W. & SCHWEDERSKI, B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*. Portland, John Wiley, 1994. 414 p.

KARIDI, K.; GAROUFIS, A.; TSIPIS, A.; HADJILIADIS, N.; DEN DULK, H. & REEDIJK, J. "Synthesis, characterization, *in vitro* antitumor activity, DNA-binding properties and electronic structure (DFT) of the new complex *cis*-(Cl,Cl)[Ru^{II}Cl₂(NO⁺)(terpy)]Cl". *Dalton Transactions*, **7**: 1176, 2005.

KEPPLER, B. K.; BERGER, M. R. & HEIM, M. E. "NEW TUMOR-INHIBITING METAL-COMPLEXES". *Cancer Treatment Reviews*. **17**(2-3): 261, 1990.

KLASSEN, D. M. & DELPUP, R. V. "Excited state properties of mixed phosphine 2-(2'-pyridyl)quinoline complexes of ruthenium(II)". *Inorganic Chemistry*. **41**(12): 3155, 2002.

KUNG, A.; PIEPER, T.; WISSIACK, R.; ROSENBERG, E. & KEPPLER, B. K. "Hydrolysis of the tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes HIm trans-[RuCl₄(im)(2)] and HInd trans-[RuCl₄(ind)(2)] investigated by means of HPCE and HPLC-MS *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **6**(3): 292, 2001.

LADD, M. F. C. & PALMER, R. A. *Structure determination by X-ray crystallography*. 3^a ed. New York, Plenum Press, 1994.

LALA, P. K. & CHAKRABORTY, C. "Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression". *The Lancet Oncology*, **2**(3): 149, 2001.

LALA, P. K. "Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy". *Cancer and Metastasis Reviews*. **17**(1): 1, 1998.

LANG, D. R., DAVIS, J. A., LOPES, L. G. F.; FERRO, A. A.; VASCONCELLOS, L. C. G.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; WIERASZKO, A. & CLARKE, M. J. "A controlled NO-releasing compound: synthesis, molecular structure, spectroscopy, electrochemistry, and chemical reactivity of R,R,S,S-*trans*-[RuCl(NO)(cyclam)]²⁺ (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane). *Inorganic Chemistry*, **39**(11): 2294, 2000.

LANZMASTER, M.; CARLOS, R. M.; VON POELHSITZ, G.; NEUMANN, M. G. & BATISTA, A. A. "PHOTOREDOX REACTIVITY OF THE CIS-[RUCL₂(NO)(BPA)]

COMPLEX TOWARD NITRIC OXIDE RELEASE". *VIII Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología*, La Plata, 2004; p. P069.

LENERO, K. A.; KRANENBURG, M.; GUARI, Y.; KAMER, P. C. J.; VAN LEEUWEN, P. W. N. M.; SABO-ETIENNE, S. & CHAUDRET, B. "Ruthenium dihydrogen complexes with wide bite angle diphosphines". *Inorganic Chemistry*, **42**(9): 2859, 2003.

LEVAGGI, D. A.; SIU, W. & FELDSTEIN, M. "Quantitative separation of nitric oxide from nitrogen dioxide at atmospheric concentration". *Environmental Science & Technology*, **6**(3): 250, 1972.

LEWIS, J. S.; ZWEIT, J. & BLOWER, P. J. "Effect of ligand and solvent on chloride ion coordination in anti-tumour copper(I) diphosphine complexes: synthesis of [Cu(dppe)₂]Cl and analogous complexes (dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane)". *Polyhedron*, **14**(4): 513, 1998.

LOPES, L. G. F. *Controle da reatividade do NO no trans-nitrosiltriethylfosfitotetraminrutênio(II)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - IQSC - USP, 1997. Tese de doutorado, 95 p.

LUNARDI, C. N., CACCIARI, A. L., SILVA, R. S. & BENDHACK, L. M. "Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells". *Nitric Oxide*, **15**(3): 252, 2006.

MALECKI, J. G.; JAWORSKA, M. & KRUSZYNSKI, R. "Synthesis, molecular, crystal and electronic structure of [RuCl₃(NO)(PPh₃)(HPz)]". *Polyhedron*, **24**(2): 359, 2005.

MALINA, J.; NOVAKOVA, O.; KEPPLER, B. K.; ALESSIO, E. & BRABEC, V. J. "Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media". *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **6**(4): 434, 2001.

MARYNICK, D. S.; "π-accepting abilities of phosphines in transition-metal complexes". *Journal of the American Chemical Society*, **106**(14): 4064, 1984.

MARZANO, C.; PELLEI, M.; ALIDORI, S.; BROSSA, A.; LOBBIA, G. G.; TISATO, F. & SANTINI, C. "New copper(I) phosphane complexes of dihydridobis(3-nitro-1,2,4-triazolyl)borate ligand showing cytotoxic activity". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100**(2): 299, 2006.

MCAULIFFE, C. A. & MACKIE, A. G. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. King, R. B. (Ed.). New York, Wiley Interscience, 1994, p. 2989.

McCLEVERTY, J. A. "Chemistry of nitric oxide relevant to biology". *Chemical Reviews*, **104**(2): 403, 2004.

MELINO, G.; BERNASSOLA, F.; CATANI, M. V.; ROSSI, A.; CORAZZARI, M.; SABATINI, S.; VILBOIS, F. & GREEN, D. R. "Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation". *Cancer Research*. **60**(9): 2377, 2000.

MILJKOVIC, D.; MARKOVIC, M.; BOGDANOVIC, N.; STOJKOVIC, M. M. & TRAJKOVIC, V. "Necrotic tumor cells oppositely affect nitric oxide production in tumor cell lines and macrophages". *Cellular Immunology*, **215**(1): 72, 2002.

MILJKOVIC, D.; CVETKOVIC, I.; SAJIC, M.; VUCKOVIC, O.; HARHAJI, L.; MARKOVIC, M. & TRAJKOVIC, V. "5-Aza-2'-deoxycytidine and paclitaxel inhibit inducible nitric oxide synthase activation in fibrosarcoma cells *European Journal of Pharmacology*, **485**(1-3): 81, 2004.

MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, **65**(1-2): 55, 1983.

NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 5^a ed. Parte B, New York, Wiley-Interscience, 1997, 384 p.

NOVAKOVA, O.; CHEN, H. M.; VRANA, O.; RODGER, A.; SADLER, P. J. & BRABEC, V. "DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media". *Biochemistry*, **42**(39): 11544, 2003.

NOVAKOVA, O.; KASPARKOVA, J.; VRANA, O.; VANVLIET, P. M.; REEDIJK, J. & BRABEC, V. "CORRELATION BETWEEN CYTOTOXICITY AND DNA-BINDING OF POLYPYRIDYL RUTHENIUM COMPLEXES". *Biochemistry*, **34**(38): 12369, 1995.

ORPEN, A. G. & CONNELLY, N. G. "Structural evidence for the participation of P-X σ^* orbitals in metal-PX₃ bonding". *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, **19**: 1310, 1985.

PACCHIONI, G. & BAGUS, P. S. "Metal phosphine bonding revisited - σ -basicity, π -acidity, and the role of phosphorus-d orbitals in zerovalent metal phosphine complexes". *Inorganic Chemistry*, **31**(21): 4391, 1992.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. "Nitric-oxide release accounts for the biological-activity of endothelium-derived relaxing factor". *Nature*, **327**(6122): 524, 1987.

PANDEY, K. K. "Transition metal nitrosyls in organic synthesis and in pollution control". *Coordination Chemistry Reviews*, **51**(1): 69, 1983.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to Spectroscopy*. 2^a ed. New York, Harcourt Brace College Publishers, 1996.

PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F. & PERRIN, D. R. *Purification of laboratory chemicals*. 2^a ed. New York, Pergamon Press, 1980. 391 p.

PIPES, D. W. & MEYER, T. J. "Comparisons between polypyridyl nitrosyl complexes of osmium (II) and ruthenium (II)". *Inorganic Chemistry*, **23**(16): 2466, 1984.

QUEIROZ, S. L. & BATISTA A. A.; "Complexos Fosfínicos e suas Aplicações na Medicina". *Química Nova*, **19**(6): 651, 1996.

- QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A.; OLIVA, G.; GAMBARDELLA, M. T. P.; SANTOS, R. H. A.; MacFARLANE, K. S.; RETTIG, S. J. & JAMES, B. R. "The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenodiamine". *Inorganica Chimica Acta*, **267**(2): 209, 1998.
- RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; VAN DEN BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J. H. & SCHELLENS, J. H. M. "A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent" *Clinical Cancer Research*. **10**(11): 3717, 2004.
- REISNER, E.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K.; POMBEIRO, A. J. L. "Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs". *Inorganica Chimica Acta*, **361**(6): 1569, 2008.
- RICHTER-ADDO, G. B. & LEGZDINS, P. *Metal Nitrosyls*. New York, Oxford University Press, 1992. 383 p.
- SAVA, G. & BERGAMO, A. "Ruthenium-based compounds and tumour growth control (Review)". *International Journal of Oncology*. **17**(2): 353, 2000.
- SAVA, G.; CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCCHIETTO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. & PERBELLINI, A. "Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors". *Anti-Cancer Drugs*. **10**(1): 129, 1999.
- SCOLARO, C.; BERGAMO, A.; BRESCACIN, L.; DELFINO, R.; COCCHIETTO, M.; LAURENCZY, G.; GELDBACH, T. J.; SAVA, G. & DYSON, P. J. "In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes". *Journal of Medicinal Chemistry*, **48**(12): 4161, 2005.
- SERLI, B.; ZANGRANDO, E.; IENGO, E.; MESTRONI, G.; YELLOWLEES, L. & ALESSIO, E. "Synthesis and structural, spectroscopic, and electrochemical characterization of new ruthenium dimethyl sulfoxide nitrosyls". *Inorganic Chemistry*. **41**(15): 4033, 2002.
- SHELDRICK, G. M. *SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution*. University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997a.
- SHELDRICK, G. M.; *SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis*. University of Göttingen, Göttingen, Germany, 1997b.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. & MORRIL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 3^o ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1987. 299 p.
- SIMON, T. M.; KUNISHIMA, D. H.; VIBERT, G. J. & LORBER, A. "Inhibitory effects of a new oral gold compound on hela cells". *Cancer*, **44**: 1965, 1979.
- SOUZA, D. H. F.; OLIVA, G.; TEIXEIRA, A. & BATISTA, A. A. "The structure of the nitrosyl [RuCl₃(NO)(AsPh₃)₂] complex". *Polyhedron*, **14**(8): 1031, 1995.

- STEPHENSON, T. A. & WILKINSON, G. "New complexes of ruthenium (2) and (3) with triphenylphosphine triphenylarsine trichlorostannate pyridine and other ligands". *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry*, **28**(4): 945, 1966.
- TOLMAN, C. A. "Steric effects of phosphorus ligands in organometallic chemistry and homogeneous catalysis". *Chemical Reviews*, **77**(03): 313, 1977.
- TORSONI, A. S.; DE BARROS, B. F.; TOLEDO JR., J. C.; HAUN, M.; KRIEGER, M. H.; TFOUNI, E. & FRANCO, D. W. "Hypotensive Properties and Acute Toxicity of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃, a New Nitric Oxide Donor". *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, **6**(3): 247, 2002.
- VALLE, E. M. A.; DO NASCIMENTO, F. B.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.; MONTEIRO, M. C. R.; MACHADO, S. de P.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E. & de AZEVEDO, E. R. "Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de ³¹P{¹H} em complexos difosfínicos de Rutênio". *Química. Nova*, **31**(4): 807, 2008.
- VERKADE, J. G. & QUIN, L. D. *Phosphorus – ³¹NMR Spectroscopy in Stereochemical Analysis – Organic Compounds and Metal Complexes*. 1^a ed. VCH Publishers, Deerfield Beach, 1987. 717 p.
- VON POELHSITZ, G.; de ARAUJO, M. P.; de OLIVEIRA, L. A. A.; QUEIROZ, S. L.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; FERREIRA, A. G. & BATISTA, A. A. "*fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (I) and *mer*-[RuCl₃(NO)(diop)] (II) complexes: syntheses, characterization and X-ray structures". *Polyhedron*, **21**(22): 2221, 2002.
- VON POELHSITZ, G. *Nitrosilo Complexos de Rutênio com Ligantes Bifosfínicos: Espectroscopia, Eletroquímica, Estudo da Reatividade e Liberação de NO*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 284 p.
- VON POELHSITZ, G.; LIMA, R. C.; CARLOS, R. M.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.; DE ARAÚJO, A. S.; ELLENA, J. & CASTELLANO, E. E. "Influence of ligands on the *fac* (hv)reversible arrow *mer* isomerization in [RuCl₃(NO)(P-P)] complexes, [P-P (Delta)= R₂P(CH₂)_(n)PR₂ (n=1-3) and R₂P(CH₂)POR₂, PR₂-CH=CH-PR₂, R=Ph and (C₆H₁₁)₍₂₎P-(CH₂)₍₂₎-P(C₆H₁₁)₍₂₎"]". *Inorganica Chimica Acta.*, **359**(9): 2896, 2006a.
- VON POELHSITZ, G.; BATISTA, A. A.; CASTELLANO, E. E. & ELLENA, J. "On a ruthenium nitrosyl and monocoordinated biphosphine monoxide complex: synthesis, characterization and X-ray structure of [Ru(pyS)₂(NO)(dppmO-P)]Cl.½H₂O, *Inorganic Chemistry Communications*, **9**(8): 773, 2006b.
- VON POELHSITZ, G.; BOGADO, A. L.; de ARAUJO, M. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E. & BATISTA, A. A. "Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary *in vitro* antitumor activity of the nitrosyl complex *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)], dppf = 1,1 - bis(diphenylphosphine)ferrocene". *Polyhedron*, **26**(16): 4707, 2007a.
- VON POELHSITZ, G.; BOGADO, A. L.; de SOUZA, G. D.; RODRIGUES, E.; BATISTA, A. A. & de ARAUJO, M. P. "New nitrosyl ruthenium complex

[RuCl(NO)(dcype)(bipy)](PF₆)₂: synthesis, electrochemistry, NMR and ESI-MS/MS studies". *Inorganic Chemistry Communications*, **10**(2): 133, 2007b.

WANAT, A.; SCHNEPPENSIEPER, T.; KAROCKI, A.; STOCHEL, G. & ELDIK, R. "Thermodynamics and kinetics of RuIII(edta) as an efficient scavenger for nitric oxide in aqueous solution". *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, **6**: 941, 2002.

WANG, F.; HABTEMARIAM, A.; VAN DER GEER, E. P. L.; FENÁNDEZ, R.; MELCHART, M.; DEETH, R. J.; AIRD, R.; GUICHARD, S.; FABBIANI, F. P. A.; LOZANO-CASAL, P.; OSWALD, I. D. H.; JODRELL, D. I.; PARSONS, S. & SADLER, P. J. "Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cell cytotoxicity". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(51): 18269, 2005.

WHIFFEN, D. H. "Vibrational frequencies and thermodynamic properties of fluoro-, chloro-, bromo-, and iodo-benzene". *Journal of the Chemical Society*, **JUN**: 1350, 1956.

WILLIAMS, D. L. H. *Nitrosation*, 1^a ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1998. 224 p.

WU, A.; KENNEDY, D. C.; PATRICK, B. O. & JAMES, B. R. *Inorganic Chemistry*, **42**: 7579, 2003.

XIE, K. P. & FIDLER, I. J. "Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase". *Cancer and Metastasis Reviews*, **17**(1): 55, 1998.

ZAMPIERI, R. C. L.; VON POELHSITZ, G.; BATISTA, A. A.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J. & NASCIMENTO, O. R. "Syntheses, characterization and X-ray structures of the *fac*-[RuCl₃(NO)(dppe)] and the *trans*-[RuCl(NO)(dppe)₂]²⁺ species." *Journal of Inorganic Biochemistry*, **92**(1): 82, 2002.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; CHOUDHURI, R.; ZHANG, H. T.; DONNINI, S.; GRANGER, H. J. & BICKNELL, R. "Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis". *Journal of Clinical Investigation*. **99**(11): 2625, 1997.