

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

**“COMPOSTOS CARBONÍLICOS HETEROBIMETÁLICOS DE
Ru(II)/Fe(II): PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E ESTUDO DA
INTERAÇÃO COM BSA E DNA”**

María José Dávila Rodríguez*

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

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

***Bolsista CAPES**

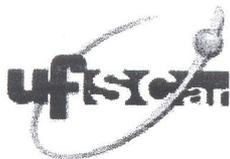
**São Carlos - SP
2016**

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

D259c Dávila Rodríguez, María José
Compostos carbonílicos heterobimetálicos de
Ru(II)/Fe(II) : propriedades citotóxicas e estudo da
interação com BSA e DNA / María José Dávila Rodríguez.
-- São Carlos : UFSCar, 2016.
95 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Rutênio. 2. Complexo carbonílico. 3. Dppf. 4.
Citotoxicidade. 5. BSA/DNA. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Maria Jose Davila Rodriguez, realizada em 30/03/2016:

Prof. Dr. Afzir Azevedo Batista
UFSCar

Profa. Dra. Eliana Maira Agostini Valle
UNIFESP

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira
UFSCar

À minha mãe Esperanza Rodríguez, ao meu tio Ernesto Rodríguez, à minha avó Carlina Olaya e à minha irmã Carlina Dávila. Graças a seu amor, esforços e apoio hoje consigo alcançar mais uma meta.

“Character cannot be developed in ease and quiet. Only through experience of trial and suffering can the soul be strengthened, vision cleared, ambition inspired, and success achieved.”– **Helen Keller**

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, pela orientação e lições de vida ensinadas.

Ao Dr. João Paulo Barolli Reis, pela ajuda no desenvolvimento da proposta do projeto e apoio no início deste trabalho.

Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, em especial às secretarias Ariane, Cristina e Luciani e aos técnicos Ademir Sartori, Luciana Vizotto e Paulo Lambertucci por toda a disponibilidade e ajuda.

Ao prof. Dr. Fábio da Silva Miranda (IQ – UFF), por disponibilizar os ligantes dpq, dppz e dppQX empregados neste trabalho.

Ao prof. Dr. Tiago Venâncio (DQ – UFSCar), pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos profs. Drs. Eduardo Castellano (IFSC – USP) e Victor Deflon (IQSC-UPS) e ao Dr. Richard D'vries, pela obtenção e resolução das estruturas cristalográficas apresentadas neste trabalho.

Ao prof. Dr. Otaciro Nascimeto (IFSC – USP) por disponibilizar o espectropolarímetro para a aquisição de espectros de dicroísmo circular.

As M.Sc.s. Katia Mara de Oliveira e Legna Colina Vega, pela realização dos estudos de viabilidade celular.

Aos meus colegas do LERCI Any, Ana, Tamires, Raul, Katia, João Honorato, Monize, Mariana, Legna, Wilmer, Beatriz, Rafael, Rodrigo, Angelica, Claudia, Taíse, Gabriel, Fábio, Adriana, Marília e Andrea, em especial a Celis, ao Luciano e Gregory, pela sua ajuda, momentos de aprendizado, convivência e amizade.

Ao pessoal do grupo de pesquisa Labbes (DQ – UFSCar), em especial ao Tiago Almeida, Elson Fava e Gisela Ibañez por toda sua ajuda.

A minha família e ao David Palomino Salcedo. Obrigada por seu incondicional apoio e amor.

Aos meus amigos que me acompanharam durante este período, especialmente a Gisela Ibañez e ao Daniel Maggi por todo seu carinho.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPESP e CNPq.

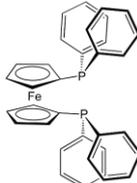
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abreviaturas dos compostos carbonílicos e precursores desenvolvidos neste trabalho

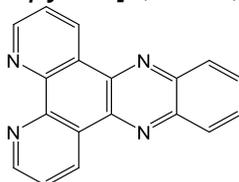
1	ct -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF ₆
2	ct -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF ₆
3	ct -[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF ₆
4	ct -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF ₆
P1	cis -[RuCl ₂ (fen)(dppf)]
P2	cis -[RuCl ₂ (dpq)(dppf)]
P3	cis -[RuCl ₂ (dppz)(dppf)]
P4	cis -[RuCl ₂ (dpqQX)(dppf)]

Abreviaturas dos ligantes empregados neste trabalho

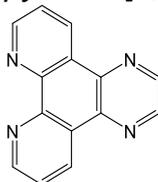
dppf 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (do inglês, *1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene*)



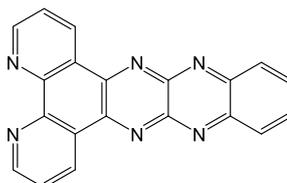
dppz dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (do inglês, *dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine*)



dpq dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina (do inglês, *pyrazino[2,3-*f*][1,10]phenanthroline*)

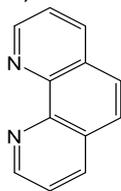


dpqQX dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalino[2,3-*b*]quinoxalina (do inglês, *quinoxalino[2',3':5,6]pyrazino[2,3-*f*][1,10]phenanthroline*)



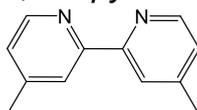
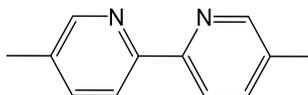
fen

1,10-fenantrolina

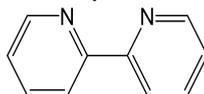


Outras abreviaturas e símbolos

Å

ångström (10^{-10} m)4,4'-Me₂bipy4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (do inglês, *4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine*)5,5'-Me₂bipy5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (do inglês, *5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine*)

bipy

2,2'-bipiridina (do inglês, *2,2'-bipyridine*)

BSA

albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

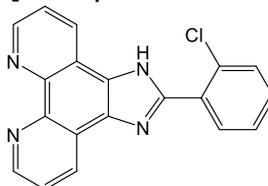
CD

dicroísmo circular (do inglês, *circular dichroism*)CDCl₃

clorofórmio-D (solvente deuterado)

(CD₃)₂COacetona-D₆ (solvente deuterado)

CIP

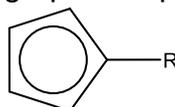
2-(2-clorofenil)-1H-imidazo[4,5-f]1,10-fenantrolina (do inglês, *2-(2-chlorophenyl)-1H-imidazo[4,5-f]1,10-phenanthroline*)

COSY

espectroscopia de correlação (do inglês, *correlation spectroscopy*)

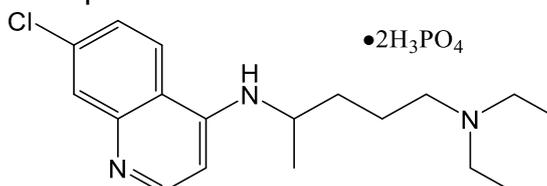
Cp

grupo ciclopentadienila

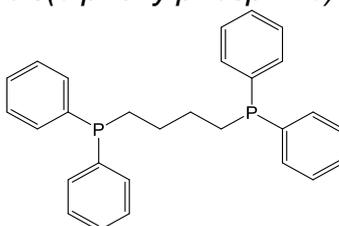


CQ

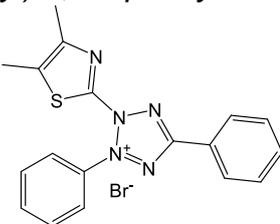
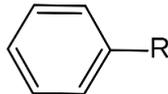
cloroquina difosfato



CT-DNA	ácido desoxirribonucleico de timo de bezerro (do inglês, <i>calf thymus – deoxyribonucleic acid</i>)
CV	voltametria cíclica (do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>)
δ	deslocamento químico de RMN em ppm
DCM	diclorometano
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dppb	1,4-bis(difenilfosfino)butano (do inglês, <i>1,4-bis(diphenylphosphino)butane</i>)



DQ-UFSCar	Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos
ϵ	absortividade molar ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)
E	potencial (V)
$E_{1/2}$	potencial de meia onda (V)
E_{pa}	potencial de pico anódico (V)
E_{pc}	potencial de pico catódico (V)
FBS	soro fetal bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i>)
Fc/Fc^+	ferroceno/ferrocênio
FDA	agência americana para o controle de alimentos e medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
h	horas
HOMO	orbital molecular mais alto preenchido (do inglês, <i>highest occupied molecular orbital</i>)
I	corrente (A)
I_{pa}	corrente de pico anódico (A)
I_{pc}	corrente de pico catódica (A)
IC_{50}	metade da concentração máxima inibitória
IFSC – USP	Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo
IL	intragigante
IQ-UFF	Instituto de Química – Universidade Federal Fluminense
IQSC – USP	Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento (Hz)
λ	comprimento de onda (nm)
Λ	condutividade molar ($S\cdot m^2\cdot mol^{-1}$)
L	litro
Labbes	Laboratório de Análítica, Bioanálítica, Biossensores, Eletroanálítica e Sensores –

Laben	Departamento de Química – UFSCar. Sob coordenação do prof. Dr. Orlando Fatibello Filho Laboratório de Biologia do Envelhecimento – Departamento de Gerontologia – UFSCar. Sob coordenação da profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
LERCI	Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos – Departamento de Química – UFSCar. Sob coordenação do prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
μ	micro (10^{-6})
m	mili (10^{-3})
M	mega (10^6)
<i>M</i>	massa molar ($\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$)
MeCN	acetonitrila
MeOH	metanol
min	minutos
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (do inglês, <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)
	
n	nano (10^{-9})
NADH	dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
ORTEP	gráfico de elipsoides térmicos de Oak Ridge (do inglês, <i>Oak Ridge thermal ellipsoid plot</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDOS	densidade de estados parciais (do inglês, <i>partial density of states</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
Ph	grupo fenila
	
pK_a	potencial de constante de dissociação ácida
PPh_3	trifenilfosfina (do inglês, <i>triphenylphosphine</i>)
PTBA	perclorato de tetrabutilamônio
r^2	coeficiente de determinação linear
R.F.U.	unidades relativas de fluorescência (do inglês, <i>relative fluorescence units</i>)
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	ressonância magnética nuclear de carbono desacoplado de hidrogênio
RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	ressonância magnética nuclear de fósforo desacoplado de hidrogênio
SVW	voltametria de onda quadrada (do inglês, <i>square wave voltammetry</i>)
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida
TCML	transferência de carga metal-ligante
u.a.	unidades de absorbância
UV-vis	ultravioleta-visível
VPD	voltametria de pulso diferencial
$\tilde{\nu}$	número de onda (cm^{-1})

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Propriedades químicas e principais efeitos biológicos das moléculas liberadoras de CO (CORMs) apresentadas na Figura 1.6 (Tomado de: ZOBI, 2013).	8
TABELA 4.1 - Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os compostos carbonílicos e precursores em DCM/D $_2\text{O}$.	23
TABELA 4.2 – Dados das análises elementares e de condutância molar (Λ_M) em DCM para os compostos carbonílicos e complexos precursores.	26
TABELA 4.3 – Tentativa de atribuição das bandas mais representativas nos espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, para os compostos carbonílicos e precursores.	27
TABELA 4.4 – Frequências de vibração do grupo carbonila observados nos espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, para compostos do tipo <i>ct</i> -[RuCl(CO)(N-N)(dppb)]PF $_6$.	28
TABELA 4.5 – Dados de espectroscopia de absorção na região do UV-vis em DCM para os compostos carbonílicos e precursores.	30
TABELA 4.6 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H , em (CD $_3$) $_2\text{CO}$, dos hidrogênios dos diferentes ligantes N-N coordenados nos compostos carbonílicos.	33
TABELA 4.7 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H , em CDCl $_3$, dos hidrogênios dos diferentes ligantes N-N coordenados nos precursores.	34
TABELA 4.8 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H , em CDCl $_3$, dos hidrogênios do ligante dpq coordenado em P2 e 2 .	34
TABELA 4.9 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, em (CD $_3$) $_2\text{CO}$ e CDCl $_3$, dos carbonos dos grupos carbonila nos compostos 1–4 .	35
TABELA 4.10 - Dados eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica dos compostos carbonílicos, precursores e alguns compostos análogos aos precursores vs. Ag/AgCl.	38
TABELA 4.11 – Estimativa do valor de pK_a dos ligantes livres dpq, dppz e dpqQX.	40

TABELA 4.12 - Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados das estruturas dos complexos precursores <i>cis</i> -[RuCl ₂ (fen)(dppf)], P1 ; <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpq)(dppf)], P2 e <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppz)(dppf)], P3	42
TABELA 4.13 – Valores das constantes de Stern–Volmer (K_{sv}) e de supressão bimolecular (K_q) e magnitude do coeficiente de determinação (r^2) obtidos para os compostos 1–4	46
TABELA 4.14 – Valores do número de sítios de ligação por molécula (n), da constante de ligação (K_b) e dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os compostos 1–3	47
TABELA 4.15 – Valores de IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtidos pelo ensaio MTT nas linhagens MDA-MB-231 e V79-4 para os compostos 1–4 , os ligantes dppf e N-N, a cisplatina e compostos análogos.	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Alguns fatores de risco associados ao câncer. (Elaborada a partir de WHO, 2015).	1
FIGURA 1.2 – Características dos metais, ligantes e compostos de coordenação que são úteis no desenho de metalofármacos. (Adaptada a partir de: BARRY & SADLER, 2014).	2
FIGURA 1.3 – Fármacos de platina empregados como quimioterápicos e exemplos de outros derivados em estudos clínicos avançados.	3
FIGURA 1.4 – Compostos de rutênio em estudos clínicos (MOTSWAINYANA & AJIBADE, 2015).	5
FIGURA 1.5 – Estruturas dos compostos heterobimetálicos de Ru(II)/Fe(II) <i>fac</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppf)] e [Ru(Spym)(bipy)(dppf)]PF ₆	6
FIGURA 1.6 – Estruturas de algumas moléculas liberadoras de CO (CORMs).	8
FIGURA 1.7 – Estruturas dos compostos carbonílicos de Ru(II) <i>ct</i> - e <i>cc</i> -[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF ₆ e do complexo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppb)].	9
FIGURA 1.8 – Modos de interação não covalentes de complexos metálicos com o DNA. (Adaptada a partir de: ZEGLIS, <i>et al.</i> , 2007).	10
FIGURA 1.9 – a) Estrutura de Lewis do monóxido de carbono. b) Retrodoação-π: representação das estruturas de ressonância da ligação M-CO terminal.	11
FIGURA 1.10 – Ligação metal-fosfina. (Adaptada a partir de: PFENNIG, 2015)	12
FIGURA 4.1 – Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H}, em DCM/D ₂ O, do <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF ₆ (2 , acima) e do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpq)(dppf)] (P2 , abaixo). Inserido: ampliações dos espectros.	23
FIGURA 4.2 - Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H}, em DCM/D ₂ O, do <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF ₆ (4 , acima) e do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpqQX)(dppf)] (P4 , abaixo). Inserido: ampliações dos espectros.	24
FIGURA 4.3 – Possíveis pontos de coordenação do ligante dpqQX.	25
FIGURA 4.4 – Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} para a sínteses do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpqQX)(dppf)] (P4), empregando diferentes relações dos reagentes.	25

- FIGURA 4.5 – Espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, do ligante livre dpq (topo), do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, meio) e do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, base).....29
- FIGURA 4.6 – Espectros de absorção na região do UV-vis, em DCM, do ligante livre dpq (topo), do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, meio) e do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, base).30
- FIGURA 4.7 – Espectros de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, acima) e do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, abaixo).....32
- Figura 4.8 – Comparação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz) do *ct*-[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆ (**1**), adquirido em acetona-D₆ (abaixo) e clorofórmio-D (acima).34
- FIGURA 4.9 – Espectros RMN de ¹³C{¹H} (400 MHz, CDCl₃), do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, abaixo) e do composto *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, acima). Inserido: ampliação na região.....36
- FIGURA 4.10 – Voltamogramas cíclicos do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, linha sólida) e do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, linha pontuada) vs. Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 200 mV/s.....37
- FIGURA 4.11 – Solução de trabalho da eletrólise de **1**, exibindo uma tonalidade amarela (esquerda) e solução contendo o produto da eletrólise de **1** junto com a sal NH₄SCN, exibindo uma tonalidade vermelha (direita).....38
- FIGURA 4.12 – Voltamogramas cíclicos consecutivos do *ct*-[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1**, adquiridos em solução de DCM 0,1 mol·L⁻¹ de PTBA vs. Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 200 mV/s.38
- FIGURA 4.13 - Diagramas de contorno do precursor *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2**, mostrando os coeficientes de participação dos orbitais atômicos na formação dos orbitais de fronteira HOMO (esquerda) e LUMO (direita).39
- FIGURA 4.14 – Gráfico do potencial de oxidação do par redox Ru^{II}/Ru^{III} dos complexos *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)] (N-N = fen, bipy, 4,4'-Me₂bipy e 5,5'-Me₂bipy) em função do pK_a dos ligantes bipyridínicos livres.40

- FIGURA 4.15 - Vista ORTEP dos complexos precursores *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, esquerda) e *cis*-[RuCl₂(dppz)(dppf)] (**P3**, direita) com as elipsoides térmicas ao 50% de probabilidade. Os hidrogênios foram omitidos para uma maior clareza.41
- FIGURA 4.16 – Seguimento por RMN de ³¹P{¹H}, nos tempos de 0, 24 e 48 h, da estabilidade de uma solução 1 mmol·L⁻¹ de **1** em DMSO, junto com os espectros de soluções 1 mmol·L⁻¹, em DMSO, do ligante dppf e do precursor **P1**. Referência externa: capilar de D₂O.44
- FIGURA 4.17 – Curvas de decaimento da fluorescência de uma solução de BSA (2,5 μmol·L⁻¹) em tampão Tris (pH 7,4) com quantidades crescentes de **2** (0-12,5 μmol·L⁻¹). Inserido: Gráficos de Stern – Volmer para **1–4** a T = 25 °C. A emissão foi monitorada a 315 nm.45
- FIGURA 4.18 - Efeito do aumento da concentração dos compostos **1–4** e da cloroquina difosfato (CQ, referência) sobre a viscosidade relativa do CT-DNA. T = 26,5 ± 0,5 °C.48
- FIGURA 4.19 - Efeito do aumento da concentração dos compostos **1–4** sobre o espectro de dicroísmo circular do CT-DNA (50 μmol·L⁻¹), em tampão Trizma (pH 7,4), após incubação a T = 37 °C por 18 h.50
- FIGURA 4.20 – Comportamento dos estudos de interação com CT-DNA empregando titulações espectrofotométricas dos compostos **1** (esquerda) e **2** (direita).51
- FIGURA 4.21 - Comportamento do voltamograma de onda quadrada de **P1** (esquerda) e **P2** (direita) empregando um eletrodo de carbono vítreo (vs. Ag/AgCl) com quantidades crescentes de CT-DNA (0 – 150 μmol·L⁻¹) em uma solução 0,1 mol·L⁻¹ de PTBA em DMSO/Tampão Tris-pH 7,4 (3:10).52
- FIGURA 4.22 – Curvas do ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT para as linhagens MDA-MB-231 (esquerda) e V79-4 (direita) tratadas com os compostos **1–4** por 48 h.54
- FIGURA 4.23 – Curva do ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT na linhagem MDA-MB-231 tratada com o composto **1** por 24 h.54

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 – Rota sintética para obtenção dos compostos carbonílicos heterobimetálicos de Ru(II)/Fe(II).....	22
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMO

“COMPOSTOS CARBONÍLICOS HETEROBIMETÁLICOS DE Ru(II)/Fe(II): PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BSA E DNA”

Fármacos baseados em complexos heterobimetálicos de rutênio e ferro são alternativas para o desenvolvimento de melhores e menos tóxicos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer. Assim, este trabalho apresenta a atividade citotóxica *in vitro* e os estudos de interação *in vitro* com DNA de timo de bezerro (CT-DNA) e albumina de soro bovino (BSA) com os compostos carbonílicos heterobimetálicos de Ru(II)/Fe(II) de fórmula geral $ct\text{-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]PF}_6$, com N-N = 1,10-fenantrolina (fen, **1**); dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina (dpq, **2**); dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz, **3**); dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalino[2,3-*b*]quinoxalina (dpqQX, **4**) e dppf = 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno. Foram empregadas técnicas de espectroscopia (IV, UV-vis, e RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) e voltametria juntamente com a análise elementar para a caracterização dos compostos sintetizados. Titulações espectrofluorométricas mostraram interações fortes e espontâneas de **1–3** com a BSA através de um mecanismo de supressão da fluorescência estático, apresentando constantes de ligação na ordem de $10^4 - 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 310 K. Medidas de viscosidade e espectros de dicroísmo circular, indicam interações de **1–4** com o CT-DNA via intercalações não clássicas ou por via eletrostática. Ensaio MTT nas linhagens celulares MDA-MB-231 e V79-4, revelaram valores de IC_{50} na faixa de $0,19 - 1,11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,29 - 3,85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, com 48h de exposição aos compostos **1–4**. No entanto, estudos de estabilidade de soluções $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de **1–4** em DMSO, mostraram sua rápida reação com este solvente.

ABSTRACT

“CARBONYL HETEROBIMETALLIC COMPOUNDS OF Ru(II)/Fe(II): CYTOTOXIC PROPERTIES AND INTERACTION STUDIES WITH BSA AND DNA”

Ruthenium and iron-based drugs are an option for the development of improved chemotherapeutic agents for cancer treatment with lower toxicity. Thereby, this work present the *in vitro* cytotoxic activity and *in vitro* interaction studies of *Calf-Thymus* DNA (CT-DNA) and bovine serum albumin (BSA) with the synthesized carbonyl heterobimetallic compounds of Ru(II)/Fe(II) with general formula $ct\text{-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]PF}_6$, with N-N = 1,10-phenanthroline (phen, **1**); dipyrido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxaline (dpq, **2**); dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine (dppz, **3**); dipyrido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalino[2,3-*b*]quinoxaline (dpqQX, **4**) and dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene. Spectroscopy (IR, UV-vis and ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR) and voltammetry techniques along with elemental analysis were employed for the characterization of the complexes. Spectrofluorimetric titrations shows strong and spontaneous interactions of **1–3** with BSA through a static quenching mechanism resulting in binding constants in the order of 10^4 - 10^6 L·mol⁻¹ at 310 K. Viscosity measurements and circular dichroism spectra prompts interactions of **1–4** with CT-DNA via non-classical intercalations or by an electrostatic pathway. MTT assays in cell lines MDA-MB-231 and V79-4 revealed IC₅₀ values at range of 0,19 – 1,11 μmol·L⁻¹ and 1,29 – 3,85 μmol·L⁻¹ respectively, after 48 h of exposure to **1–4**. However, stability studies of solutions 1 mmol·L⁻¹ of **1–4** in DMSO shows their rapid reaction with this solvent.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Câncer e metalofármacos: o caso de compostos heterobimetálicos de rutênio/ferro	1
1.2 – Monóxido de carbono e quimioterapia	6
1.3 – Estudos de interação com BSA e DNA.....	9
1.4 – Aspectos químicos dos ligantes monóxido de carbono e 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno	10
Capítulo 2 – OBJETIVOS	13
2.1 – Objetivo Geral.....	13
2.2 – Objetivos Específicos	13
Capítulo 3 – PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1 – Materiais	14
3.1.1 – Obtenção da atmosfera inerte.....	14
3.1.2 – Solventes orgânicos.....	14
3.1.3 – Reagentes químicos	14
3.2 – Técnicas de Caracterização	15
3.2.1 – Análise elementar	15
3.2.2 – Condutividade molar	15
3.2.3 – Espectroscopia de absorção na região do UV-vis	15
3.2.4 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	15
3.2.5 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	15
3.2.6 – Medidas eletroquímicas	16
3.2.7 – Difração de Raios X	16
3.3 – Síntese dos precursores e compostos.....	17
3.3.1 – Síntese dos precursores: complexos do tipo <i>cis</i> -[RuCl ₂ (N-N)(dppf)], com N-N = fen, dpq, dppz e dpqQX.	17
3.3.2 – Síntese dos compostos contendo CO: compostos do tipo <i>ct</i> -[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]PF ₆ , com N-N = fen, dpq, dppz e dpqQX.	17
3.4 – Estudos de interação com as biomoléculas BSA e DNA	18
3.4.1 – Estudos de interação com a BSA por titulações espectrofluorométricas	18
3.4.2 – Estudos de interação com o DNA empregando medidas de viscosidade	19
3.4.3 – Estudos de interação com DNA empregando dicroísmo circular	19
3.4.4 – Estudos de interação com o DNA por titulações espectrofotométricas	19

3.4.5 – Estudos de interação com DNA empregando voltametria de onda quadrada.....	20
3.5 – Determinação da citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	20
Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 - Síntese e caracterização	22
4.1.1 – Espectroscopia RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	22
4.1.2 – Análise Elementar e Condutância Molar	26
4.1.3. – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	26
4.1.4 – Espectroscopia de absorção na região do UV-vis	29
4.1.5 – Espectroscopia RMN de ^1H e COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$	31
4.1.6 – Espectroscopia RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	35
4.1.7 – Medidas eletroquímicas.	36
4.1.8 – Difração de Raios-X.....	41
4.2 - Estudos de estabilidade em DMSO.....	42
4.3 – Estudos de interação com as biomoléculas BSA e DNA	44
4.3.1 – Estudos de interação com a BSA por titulações espectrofluorométricas.....	44
4.3.2 – Estudos de interação com o DNA empregando medidas de viscosidade	47
4.3.3 – Estudos de interação com DNA empregando dicroísmo circular	49
4.3.4 – Estudos de interação com o DNA por titulações espectrofotométricas	50
4.3.5 – Estudos de interação com DNA empregando voltametria de onda quadrada.....	51
4.4 – Determinação da citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	52
Capítulo 5 - CONCLUSÕES.....	55
Capítulo 6 – REFERÊNCIAS	57
Capítulo 7 – APÊNDICES	63

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Câncer e metalofármacos: o caso de compostos heterobimetálicos de rutênio/ferro

Câncer é o nome dado ao conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal e descontrolado de células, as quais se caracterizam por manter a sinalização proliferativa, evadir os supressores de crescimento, permitir a imortalidade replicativa, induzir angiogênese, resistir à morte celular e ter a capacidade de invadir tecidos próximos e se disseminar pelo corpo (metástases); constituindo a segunda causa de morte no mundo após doenças cardiovasculares (HANAHAN & WEINBERG, 2011; WHO, 2015). No Brasil as estimativas indicam que em 2016 serão registrados por volta de 596 mil novos casos de câncer (INCA, 2016), sendo toda a população vulnerável por conta dos diversos fatores de risco conhecidos (Figura 1.1).



FIGURA 1.1 – Alguns fatores de risco associados ao câncer. (Elaborada a partir de WHO, 2015).

Dentre os tratamentos mais comuns para combater o câncer, encontra-se a quimioterapia, a qual consiste no emprego de fármacos e metalofármacos para curar, controlar ou atenuar o mesmo (NIH – National Cancer Institute, 2015), sendo o emprego de metalofármacos promovido após a descoberta das propriedades antineoplásicas da cisplatina por Rosenberg e colaboradores em 1965 (BARRY &

SADLER, 2014; MUHAMMAD & GUO, 2014; ALAMA *et al.*, 2009; ROSENBERG *et al.*, 1965). Os metalofármacos oferecem cinéticas moduláveis e mecanismos de ação que podem ser diferentes dos fármacos orgânicos convencionais (GUO & SADLER, 1999). Além disso, permitem o arranjo de ânions e moléculas orgânicas em distribuições espaciais que podem melhorar sua interação com biomoléculas, mantendo, ao mesmo tempo, suas propriedades químicas e biológicas, como apresentado na Figura 1.2 (ALAMA *et al.*, 2009; MOTSWAINYANA & AJIBADE, 2015).

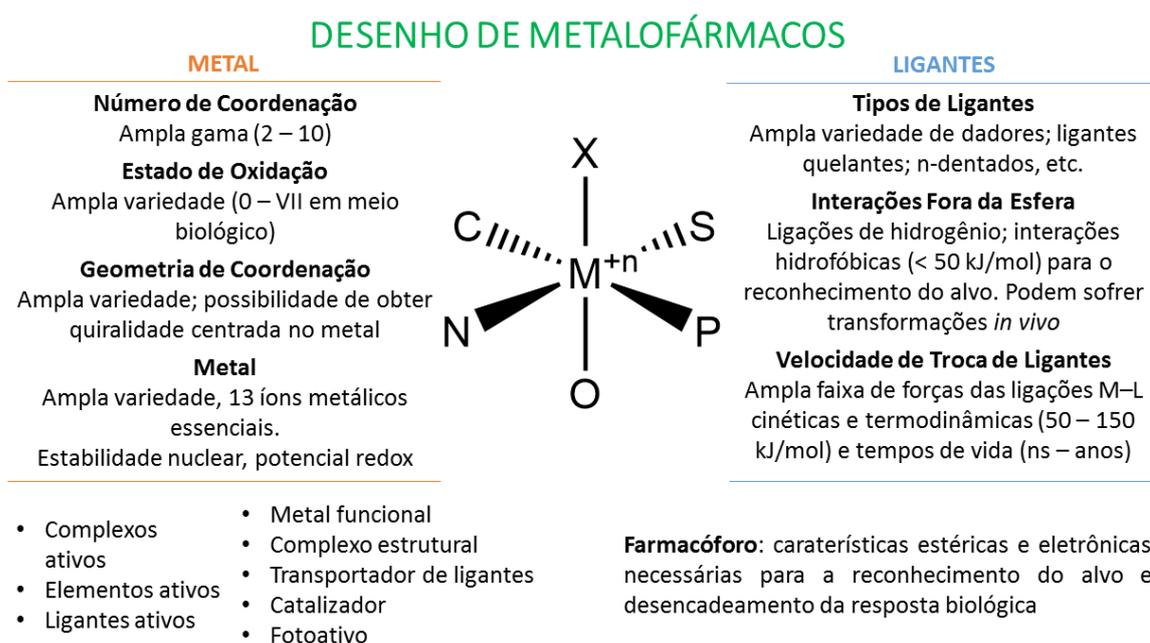


FIGURA 1.2 – Características dos metais, ligantes e compostos de coordenação que são úteis no desenho de metalofármacos. (Adaptada a partir de: BARRY & SADLER, 2014).

Ademais da cisplatina (Figura 1.3), aprovada em 1978 pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), os complexos carboplatina e oxaliplatina (Figura 1.3) foram aprovados em 1989 e 2002, respectivamente, para uso clínico como quimioterápicos ao redor do mundo. Embora o sucesso destes metalofármacos e o potencial clínico apresentado por outros derivados da platina (Figura 1.3), limitações como resistência adquirida e efeitos secundários como nefro-, neuro- e ototoxicidade visam o emprego de outros centros metálicos, destacando-se como uma alternativa promissora os complexos de rutênio (BARRY & SADLER, 2014; MUHAMMAD & GUO, 2014; BERGAMO & SAVA, 2010; MOTSWAINYANA & AJIBADE, 2015). Dentre as características que tornam o rutênio um bom candidato para o desenvolvimento de metalofármacos, sobressaem a

similaridade de sua química com a química do ferro – o que pode favorecer sua ligação com as proteínas de transporte albumina e transferrina – e a possibilidade de obter complexos cineticamente estáveis em solução aquosa e/ou em qualquer um dos seus estados de oxidação, sendo os estados de oxidação II, III e IV os mais comuns em condições fisiológicas (ALLARDYCE & DYSON, 2001; REEDIJK, 2008). Além disso, há relatos na literatura de perfis citotóxicos promissores reportados para vários complexos e possíveis mecanismos de ação que podem não implicar como único ou principal alvo o DNA, o que poderia superar a resistência adquirida apresentada pelos fármacos de platina (ANTONARAKIS & EMADI, 2010; MOTSWAINYANA & AJIBADE, 2015).

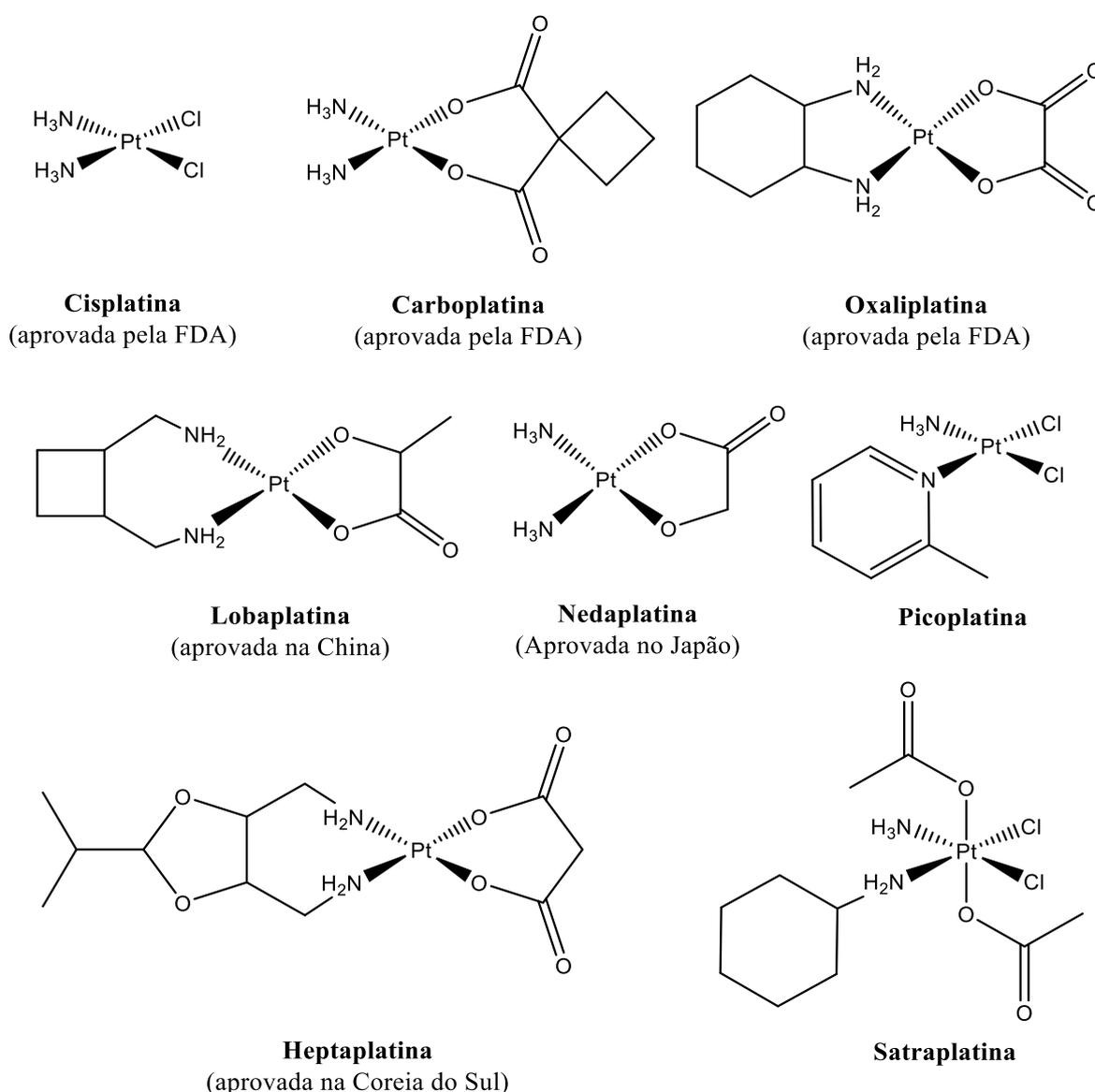


FIGURA 1.3 – Fármacos de platina empregados como quimioterápicos e exemplos de outros derivados em estudos clínicos avançados.

Na atualidade os complexos de rutênio (III) NAMI-A e KP1019 (Figura 1.4) encontram-se em estudos clínicos^a fase 2. O NAMI-A tem baixa citotoxicidade, sendo inativo frente a tumores primários. No entanto, após redução química, o NAMI-A apresenta atividade antiangiogênica e anti-invasiva, exibindo especificidade para tumores metastáticos. Esse metalofármaco interfere na interação das células tumorais com a matriz extracelular, prevenindo seu desenvolvimento e crescimento (SAVA, *et al.*, 2004; SAVA, *et al.*, 2003). Para o composto KP1019, a interação com as proteínas albumina e transferrina, presentes no soro sanguíneo, tem uma importância significativa. Possivelmente, essa interação é responsável por seu alto potencial para atacar células tumorais em vez das suas contrapartes saudáveis, interferindo na fase G2/M do ciclo celular após redução química e bloqueando a síntese do DNA (TRONDL *et al.*, 2014). O sal de sódio solúvel em água do KP1019, o NKP1339 (Figura 1.4), encontra-se em estudos clínicos fase 1, onde estão sendo estudados sua segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica (TRONDL, *et al.*, 2014).

Outros compostos de interesse biológico são os derivados do ferroceno (composto de ferro (II) que permitiu o nascimento à química organometálica moderna), alguns dos quais têm apresentado uma alta atividade *in vitro* e *in vivo* contra diversas doenças como infecções fúngicas e bacterianas, malária, vírus de imunodeficiência humana e câncer (ORNELAS, 2011). O potencial anticancerígeno

^a Os estudos clínicos são conduzidos por pesquisadores em 4 fases cada uma das quais está desenhada para dar resposta a um conjunto de questões em particular, assim (NIH - U.S. National Library of Medicine, 2016; FDA – U.S. Food and Drug Administration, 2016):

Fase 1: O novo fármaco ou tratamento é administrado por vez primeira a um grupo de 20 a 100 pessoas saudáveis e voluntárias para avaliar sua segurança, determinar os valores seguros de dosagem e identificar efeitos secundários.

Fase 2: O fármaco ou tratamento é administrado a um grupo de centenas de pessoas voluntárias com a doença/condição para observar sua efetividade e avaliar sua segurança.

Fase 3: O fármaco ou tratamento é administrado a um grupo de 300 a 3000 pessoas voluntárias com a doença/condição para confirmar sua efetividade, monitorar os efeitos secundários, comparar com outros tratamentos comuns e coletar informação que permitirá empregar o fármaco o tratamento de forma segura.

Fase 4: São realizados estudos em milhares de pessoas após comercialização do fármaco ou tratamento para reunir informação da sua efetividade em diferentes populações e qualquer efeito secundário associado ao seu uso prolongado.

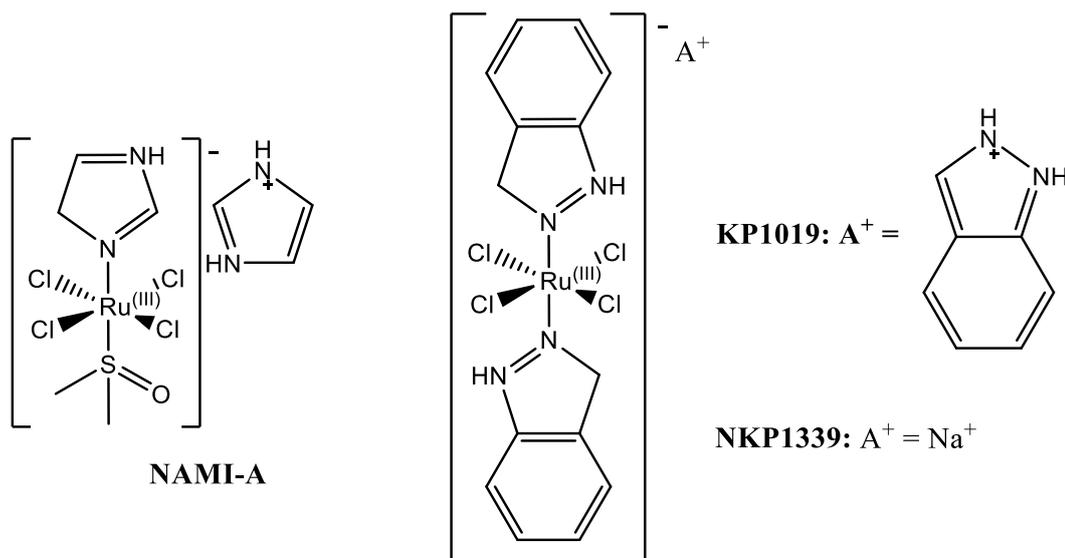


FIGURA 1.4 – Compostos de rutênio em estudos clínicos (MOTSWAINYANA & AJIBADE, 2015).

deste tipo de compostos foi estudado por vez primeira no final da década de 1970, sendo reportada a atividade antitumoral dos compostos de ferroceno como transportadores de grupos amina ou amida contra leucemia linfocítica P-388 (FIORINA, *et al.*, 1978). O ferroceno possui estabilidade no meio aquoso e aeróbico, junto com favoráveis propriedades eletroquímicas, características que o tornam atraente para aplicações biológicas (ORNELAS, 2011; VAN STAVEREN & METZLER-NOLTE, 2004). Juntamente, em ambientes altamente oxidantes como o ambiente intracelular ou pela ação de peroxidases, o ferroceno pode ser oxidado ao ferrocênio, o qual apresenta atividade citotóxica (KÖPF-MAIER, *et al.*, 1984; HOULTON, *et al.*, 1991; EPTON, *et al.*, 1978).

Assim, desde o fim da década de 1980, têm sido reportados na literatura exemplos de derivados bimetálicos do ferroceno com vanádio, rênio, cobalto, ródio, irídio, níquel, paládio, platina, cobre, prata, ouro, zinco, alumínio, estanho o mesmo ferro e, com o elemento central desta dissertação, o rutênio, obtendo em vários casos compostos com atividades biológicas promissoras (ORNELAS, 2011; BRAGA & SILVA, 2013). Alzir Batista (pesquisador líder do Laboratório de Reatividade de Compostos Inorgânicos – LERCI, onde foi desenvolvido o presente trabalho) e colaboradores, têm reportado a atividade citotóxica de diferentes complexos de rutênio contendo o derivado fosfínico do ferroceno 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf, do inglês

1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene), sendo o primeiro relato da atividade citotóxica *in vitro* de um complexo heterobimetálico de Ru/Fe o *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] (Figura 1.5). Este complexo apresenta um valor de IC_{50/48h} frente à linhagem de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 de 10 μmol·L⁻¹, maior atividade que a exibida por seu precursor o RuCl₃(NO)·2H₂O (IC_{50/48h} > 200 μmol·L⁻¹) ou a dppf livre (IC_{50/48h} = 97 μmol·L⁻¹). Assim, é evidente que a dppf coordenada desempenha um papel crucial no perfil citotóxico do *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] (VON POELHSITZ, *et al.*, 2007; BRAGA & SILVA, 2013; ORNELAS, 2011). Frente a esta mesma linhagem celular, a série de complexos [Ru(Spym)(bipy)(P-P)]PF₆, com Spym = ânion pirimidine-2-tiolato e P-P = 1,2-bis(difenilfosfino)etano; 1,3-bis(difenilfosfino)propano e 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (este último representado na Figura 1.5), apresentam valores de IC_{50/24h} *in vitro* iguais a 0,53; 0,35 e 0,26 μmol·L⁻¹ respectivamente, sendo este um outro exemplo da melhora do efeito citostático ao empregar a dppf coordenada ao Ru(II) (LIMA, 2016).

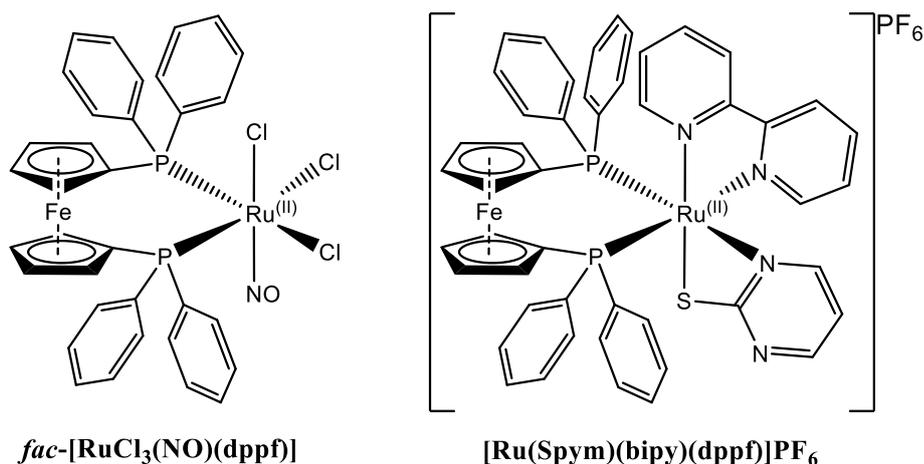


FIGURA 1.5 – Estruturas dos compostos heterobimetálicos de Ru(II)/Fe(II) *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] e [Ru(Spym)(bipy)(dppf)]PF₆.

1.2 – Monóxido de carbono e quimioterapia

Embora o monóxido de carbono seja conhecido como uma molécula tóxica, este é gerado endogenamente em nosso organismo pela ruptura do grupo heme da hemoglobina, reação catalisada pelas enzimas heme oxigenase 1 e 2. O monóxido de carbono endógeno atua em mamíferos como uma molécula gasosa sinalizadora, capaz de modular as funções do sistema cardiovascular e inibir a agregação e adesão plaquetária (MOTTERLINI & OTTERBEIN, 2010; WU, 2005).

No ano 2013, Wegiel e colaboradores reportaram que o monóxido de carbono pode induzir uma exaustão metabólica em células cancerígenas por um rápido aumento da bioenergética celular levando a um colapso mitocondrial. Ao mesmo tempo observaram que a exposição a monóxido de carbono sensibiliza células de câncer de próstata, mas não células normais, à quimioterapia (WEGIEL *et al.*, 2013), demonstrando o potencial terapêutico do CO para o tratamento do câncer.

Moléculas liberadoras de CO (CORMs, do inglês *CO-Releasing Molecules*), têm sido desenhadas para o emprego do monóxido de carbono como anti-inflamatório, vasodilatador e anti-isquêmico, e podem ser estendidas ao uso para tratamento do câncer, destacando-se os complexos carbonílicos de metais de transição como manganês, cobalto, ferro e rutênio, entre outros (BANNENBERG & VIEIRA, 2009). As características procuradas nas CORMs são uma ação terapêutica efetiva, baixa toxicidade, absorção apropriada e boas propriedades de distribuição, metabolismo e excreção, as quais incluem solubilidade e estabilidade no meio aquoso e biocompatibilidade e estabilidade no sangue. Juntamente é esperado que a liberação do CO ocorra nos tecidos alvos e não na corrente sanguínea (ZOBI, 2013; MOTTERLINI & OTTERBEIN, 2010), tendo como possíveis rotas de liberação do CO reações de termólise, oxidação, dissociação e associação. Esta liberação também pode ser promovida por mudanças no pH, radiação eletromagnética e/ou pela ação de enzimas (ZOBI, 2013). Na Figura 1.6 são apresentados exemplos de CORMs, sendo suas propriedades químicas e efeitos biológicos resumidos na Tabela 1.1.

Trabalhos prévios conduzidos no LERCI avaliaram as propriedades citostáticas frente à linhagem tumoral MDA-MB-231 dos compostos *ct*-[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF₆ (IC_{50/24h} = 9,8 μmol·L⁻¹), *cc*-[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF₆ (IC_{50/24h} = 1,9 μmol·L⁻¹) e do respectivo complexo precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)] (IC_{50/24h} = 31,3 μmol·L⁻¹) (Figura 1.7). Ao comparar com o complexo precursor, é evidente que a coordenação do monóxido de carbono aumenta a atividade citotóxica deste grupo de compostos (FRAZÃO, 2007).

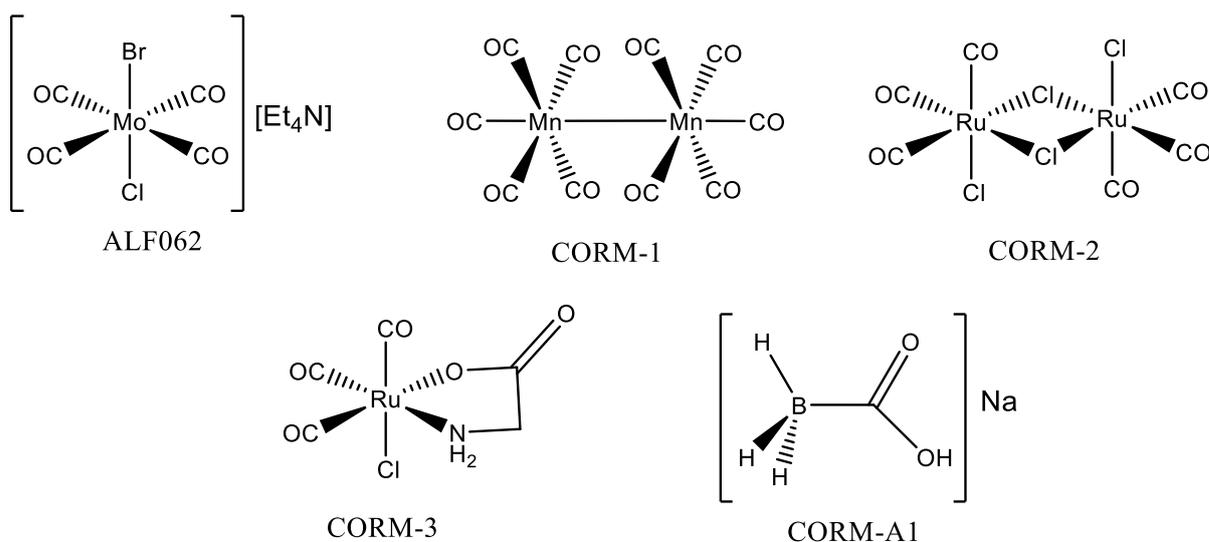


FIGURA 1.6 – Estruturas de algumas moléculas liberadoras de CO (CORMs).

TABELA 1.1 – Propriedades químicas e principais efeitos biológicos das moléculas liberadoras de CO (CORMs) apresentadas na Figura 1.6 (Tomado de: ZOBI, 2013).

CORM	Propriedades químicas	Principais efeitos biológicos
ALF062	Solúvel em DMSO*; instável em condições aeróbicas; $t_{1/2}$ da liberação do CO < 30 min	Eficaz no tratamento de artrite reumatoide (no modelo de artrite induzida por adjuvante em rato)
CORM-1	Solúvel em DMSO*; estável em condições aeróbicas; liberação do CO é fotoinduzida	Dilata arteríolas cerebrais isoladas e pressurizadas em porcos recém-nascidos e arteríolas piais em leitões; atenua a resposta inflamatória em pulmões termicamente feridos de camundongos
CORM-2	Solúvel em DMSO*; estável em condições aeróbicas; $t_{1/2}$ da liberação do CO \approx 1 min	Induz vasorelaxação; atenua a resposta inflamatória em pulmões e fígado feridos de camundongos; ativa os canais dependentes de potássio (K _{Ca} ⁺); protege contra danos por isquemia; candidato a fármaco para o tratamento de hipertensão pulmonar
CORM-3	Solúvel em água*; estável em condições aeróbicas; $t_{1/2}$ da liberação do CO \approx 1 min	Evita a rejeição do enxerto cardíaco em camundongos e ratos; em soluções de preservação melhora a função de fígado e rim após transplante; induz vasorelaxação; impede sepse (infecção geral grave do organismo); efetivo contra infecções bacterianas em camundongos; eficaz no tratamento de artrite reumatoide; melhora a função renal; bem tolerado em leitões e macacos cinomolgos (nome comum da espécie <i>Macaca fascicularis</i>)
CORM-A1	Solúvel em água; estável em condições aeróbicas; liberação rápida do CO em meio ácido	Induz vasorelaxação; incrementa o fluxo sanguíneo e diminui a resistência vascular em rins de ratos; apresenta efeitos promissores como agente cérebro-protetor no tratamento de ataques epilépticos

*Acontece uma reação de troca de ligantes, entrando na esfera de coordenação do metal moléculas do solvente.

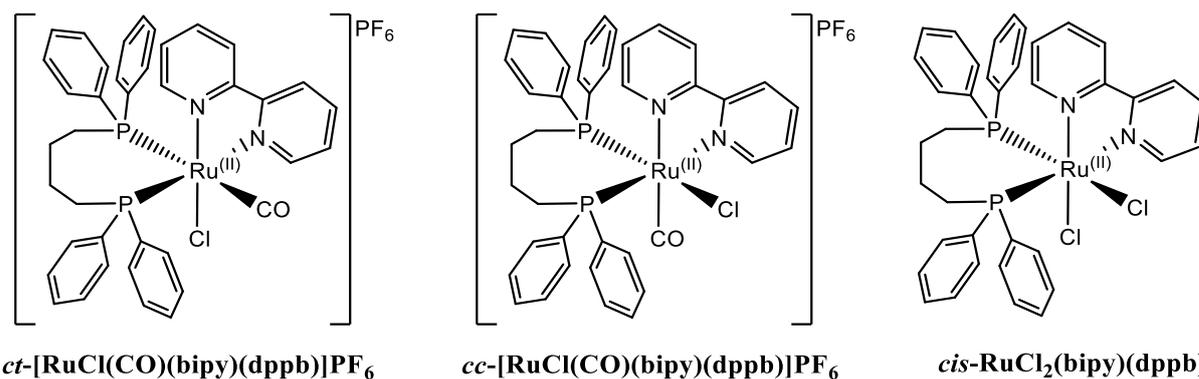


FIGURA 1.7 – Estruturas dos compostos carbonílicos de Ru(II) *ct*- e *cc*-[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF₆ e do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppb)].

1.3 – Estudos de interação com BSA e DNA

Para entender os mecanismos de ação dos metalofármacos, é preciso estudar suas interações com diferentes alvos biológicos (ESPÓSITO & NAJJAR, 2002). As albuminas de soro, como a albumina de soro bovino (BSA), são as proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo de mamíferos. Dentro das suas funções fisiológicas encontram-se o controle da pressão osmótica do sangue; desativação de radicais livres e transporte e distribuição de diferentes compostos (como aminoácidos, ácidos graxos, íons metálicos, hormônios, vitaminas e fármacos) (HE & CARTER, 1992; CARTER & HO, 1994). Em adição, estas proteínas podem ajudar na solubilização de moléculas altamente hidrofóbicas (CURRY, *et al.*, 1998; CURRY, *et al.*, 1999). Portanto, explorar as interações composto-albumina é de grande importância para o desenvolvimento de metalofármacos com perfis atraentes, permitindo estimar sua biodisponibilidade (ESPÓSITO & NAJJAR, 2002).

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um dos principais alvos biológicos a ser estudado. A ligação de pequenas moléculas com o DNA pode alterar e/ou inibir suas funções, permitindo curar ou controlar doenças como o câncer (LIU & SADLER, 2011; SIRAJUDDIN, *et al.*, 2013; ZEGLIS, *et al.*, 2007). Para os complexos metálicos as interações com o DNA estão classificadas como interações covalentes e não-covalentes. Nas interações covalentes, ocorre a formação de uma nova ligação após coordenação de uma das bases nitrogenadas do DNA ao centro metálico. Este tipo de interação é o apresentado pela cisplatina. Por outro lado, as interações não-covalentes envolvem interações- π , ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, e podem ser do tipo (a) intercalação clássica (inserção de um ligante planar

aromático entre as bases nitrogenadas da dupla hélice do DNA); (b) intercalação não clássica (inserção no sulco maior e/ou menor da dupla hélice do DNA) ou (c) por inserção (onde uma das bases nitrogenadas da dupla hélice do DNA é substituída pelo ligante aromático planar do complexo) (Figura 1.8) (ZEGLIS, *et al.*, 2007). Barton e colaboradores, têm observado que a maioria dos complexos que interagem com o DNA de forma não-covalente são cineticamente estáveis, apresentam uma geometria octaédrica ou quadrado-planar e uma estrutura tridimensional rígida (ZEGLIS, *et al.*, 2007), sendo este tipo de interação favorecida ao empregar ligantes planares aromáticos tais como a 1,10'-fenantrona (fen) e derivados como o dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina (dpq) e o dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz).

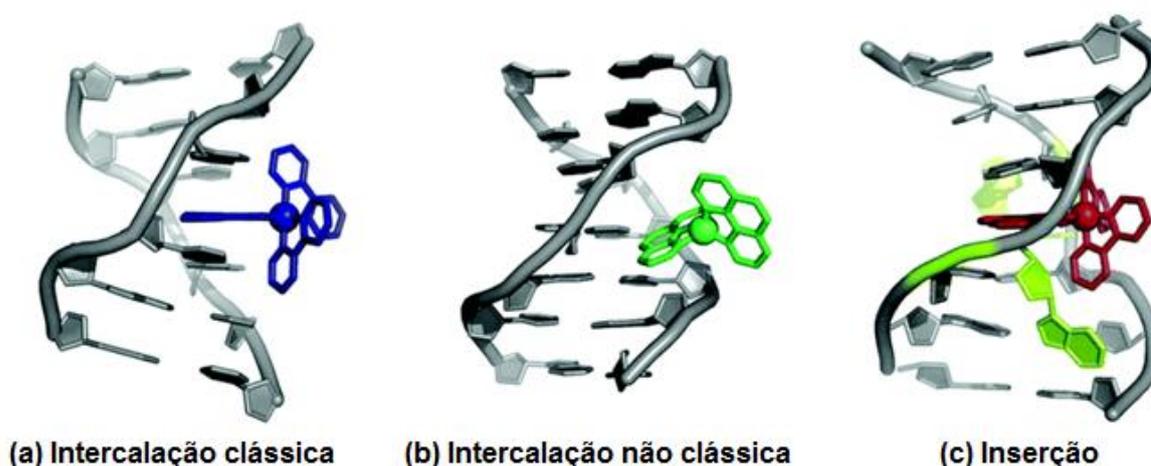


FIGURA 1.8 – Modos de interação não covalentes de complexos metálicos com o DNA. (Adaptada a partir de: ZEGLIS, *et al.*, 2007).

1.4 – Aspectos químicos dos ligantes monóxido de carbono e 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno

O monóxido de carbono e o 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno são catalogados na química de coordenação e organometálica como ligantes σ -doadores e π -aceptores. Isto faz com que suas ligações com centros metálicos sejam o resultado de um processo sinérgico que envolve a doação de elétrons por parte do ligante (atuando como bases de Lewis) para o metal, estabelecendo uma ligação- σ , junto com a retrodoação de elétrons de um orbital *nd* do metal, de simetria- π em função do eixo de ligação metal-ligante, para um orbital antiligante- π^* do ligante (atuando como ácido de Lewis), estabelecendo assim a retrodoação- π . Isso lhes permite estabilizar metais em diversos estados de oxidação (MCNAUGHT

& WILKINSON, 2009; QUEIROZ, 1996). O monóxido de carbono (conhecido como grupo carbonila) é um ligante neutro e simples, de baixo caráter nucleofílico, o que faz com que seja um fraco doador- σ , que após coordenação não altera o estado de oxidação do metal. Seu principal modo de ligação é o terminal M-CO, através do par eletrônico livre, sobre o átomo de carbono (Figura 1.9, a). A retrodoação- π do metal para o monóxido de carbono é dada por interações do tipo $d\pi_{\text{metal}} \rightarrow \pi^*_{\text{CO}}$ e se reflete na diminuição da força da ligação C-O após coordenação (Figura 1.9, b). O grau desta retrodoação- π , depende tanto das características eletrônicas do centro metálico (é maior para centros metálicos em baixos estados de oxidação e/ou ricos em elétrons), como da presença de outros ligantes na esfera de coordenação do metal (HILL, 2002 e ATKINS, *et al.*, 2006).

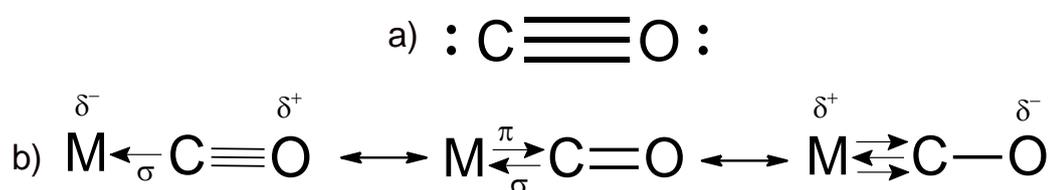


FIGURA 1.9 – a) Estrutura de Lewis do monóxido de carbono. b) Retrodoação- π : representação das estruturas de ressonância da ligação M-CO terminal.

A dppf é uma bifosfina terciária. Dentro da química de coordenação e organometálica, as fosfinas terciárias (PR_3) são reconhecidas por serem ligantes neutros que usualmente não participam nas reações dos complexos, mas que oferecem a possibilidade de modular as propriedades eletrônicas e a reatividade do centro metálico ao qual se encontram ligados pela variação dos grupos $-\text{R}$ e de influenciar propriedades como a solubilidade, características atraentes para o desenho de metalo-fármacos (QUEIROZ, 1996). A ligação- σ metal-fosfina ocorre após coordenação do orbital híbrido sp^3 da fosfina a um orbital vazio do metal (PFENNIG, 2015). Simultaneamente, a retrodoação- π ocorre de parte de um orbital- d cheio do metal para um orbital molecular de simetria π resultante da combinação de um orbital- d de baixa energia do fósforo e o orbital σ^* da fosfina, sendo este último o contribuinte majoritário (Figura 1.10). O grau da retrodoação- π aumenta com caráter eletroatraente dos grupos substituintes $-\text{R}$ na fosfina (PFENNIG, 2015; ATKINS, *et al.*, 2006).

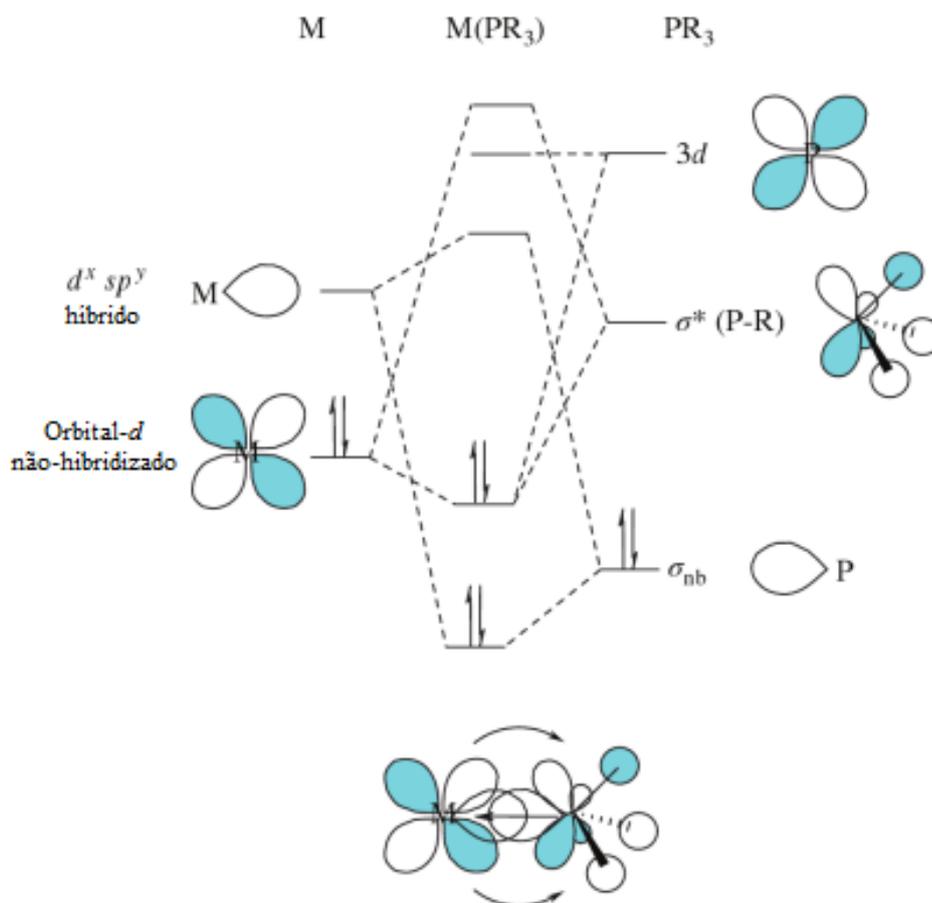


FIGURA 1.10 – Ligação metal-fosfina. (Adaptada a partir de: PFENNIG, 2015)

Outra das características comuns a ambos ligantes é o moderado efeito *trans* estrutural (efeito *trans* termodinâmico) que apresentam. Não obstante, apesar de ser este efeito moderado para o CO, este pode causar uma forte desestabilização da ligação *trans* metal-ligante, pela desestabilização dos estados de transição (COE & GLENWRIGHT, 2000).

Deste modo, conhecendo as propriedades químicas e biológicas do rutênio e dos ligantes dppf, monóxido de carbono e diiminas aromáticas planares, o presente trabalho visa explorar a atividade citotóxica *in vitro* frente à linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 de derivados de rutênio (II) contendo esses ligantes. Juntamente, serão apresentados os estudos de interação com as biomoléculas BSA e o DNA (possível alvo biológico).

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Desenvolver potenciais heterobi-metalofármacos à base de rutênio coordenado aos ligantes 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, carbonilo e α,α' -diiminas aromáticas que possam apresentar atividades citotóxicas e estudar suas interações com as biomoléculas BSA e DNA.

2.2 – Objetivos Específicos

Sintetizar complexos heterobimetálicos à base de rutênio coordenado aos ligantes 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, carbonilo e as α,α' -diiminas aromáticas 1,10-fenantrolina (fen); dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina (dpq); dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz); dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalino[2,3-*b*]quinoxalina (dpqQX) que possam apresentar atividades citotóxicas.

Caracterizar os compostos obtidos por microanálise, técnicas espectroscópicas (absorção na região do infravermelho e UV-vis, ressonância magnética multinuclear de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e quando possível raios-X), voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

Estudar as interações entre os complexos e a biomolécula BSA usando titulações espectrofluorométricas.

Estudar as interações entre os complexos e a biomolécula DNA usando titulações espectrofotométricas, medidas de viscosidade, dicroísmo circular e voltametria de onda quadrada.

Definir indiretamente a citotoxicidade *in vitro* dos compostos por meio do ensaio de viabilidade celular MTT em diferentes linhagens celulares.

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais

3.1.1 – Obtenção da atmosfera inerte

A atmosfera inerte foi obtida pela passagem de fluxo lento de gás argônio (AGA ou White Martins), o qual foi previamente seco e desoxigenado por um sistema de colunas de purificação. Este sistema está composto por uma primeira coluna de camadas alternadas de anéis de vidro (0,5 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura, sendo reativada periodicamente com fluxo lento de hidrogênio a 120 °C durante 48 h) contendo o catalisador BTS-R-11.9 (ativado a 60 °C, Fluka Chemika), seguido de uma coluna contendo sílica gel (Sigma-Aldrich) e uma última contendo peneira molecular 4 Å (sendo reativada a 250 °C, Sigma-Aldrich).

3.1.2 – Solventes orgânicos

Os solventes utilizados neste trabalho (Synth P.A. e Sigma-Aldrich P.A.), foram submetidos a tratamento prévio para o seu correto uso seguindo métodos descritos na literatura (ARMAREGO & CHAI LI LIN, 2013). Os solventes deuterados (Fluka Chemika e Sigma-Adrich) foram utilizados, como fornecidos, na espectroscopia de RMN.

3.1.3 – Reagentes químicos

Os reagentes $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), trifenilfosfina (PPh_3 , Sigma-Aldrich), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf, (dppf, do inglês *1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene*), Sigma-Aldrich), 1,10-fenantrolina (fen, Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (Synth P.A.), ácido fórmico (Merck P.A.) e o hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6 , Sigma-Aldrich), foram utilizados como recebidos.

Os ligantes pirazino[2,3-*f*][1,10]fenantrolina (dpq), dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz) e dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina[2,3-*b*]quinoxalina (dpqQX) foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório do Prof. Fábio da Silva Miranda, Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ.

3.2 – Técnicas de Caracterização

3.2.1 – Análise elementar

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio, foram realizadas usando um analisador FISIONS EA-1108 CHNS-O, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.2.2 – Condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram obtidas usando um condutímetro Micronal B-330 (equipado com célula de Pt com constante igual $0,089 \text{ cm}^{-1}$), para soluções $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada composto em DCM.

3.2.3 – Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Os espectros na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard, modelo 8452A. Os espectros foram obtidos em várias diluições, partindo de $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ empregando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm em DCM (na janela de 245 nm – 800 nm).

3.2.4 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho, foram realizados em pastilha de KBr (Merck, P.A.), na região compreendida entre $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$, usando um espectrofotômetro Bomem Michelson FT MB-102.

3.2.5 – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os experimentos de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (monodimensionais) e de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (bidimensional), foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, em um espectrômetro Bruker AVANCE III operando a 9,4 T, observando os núcleos ^1H a 400,13 MHz; ^{13}C a 100,63 MHz e ^{31}P a 161,98 MHz.

Os espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY foram obtidos em CDCl_3 e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram realizados em DCM não deuterado contendo capilares com D_2O como referência externa, quando não se indique o contrário.

3.2.6 – Medidas eletroquímicas

Os experimentos eletroquímicos foram realizados a temperatura ambiente (a menos que se indique o contrário), usando um potenciostato BAS-100B/W Bioanalytical Systems Instruments e um potenciostato Micro autolab tipo III, gerenciado pelo software GPS 4.9.

Para os experimentos de voltametria cíclica e de pulso diferencial, os eletrodos de trabalho e auxiliar foram tarugos de Pt e como eletrodo de referência utilizou-se fio de Ag recoberto com AgCl (Ag/AgCl), mantido no interior de um capilar Luggin-Haber com uma solução $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{NClO}_4$ (PTBA, Fluka Chemika) no solvente de trabalho. As soluções eletrolíticas, foram preparadas em DCM com concentração de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de PTBA.

Para o experimento de eletrólise, foi usado como eletrodo de trabalho um eletrodo de rede de platina.

3.2.7 – Difração de Raios X

As medidas de difração de raios X de monocristal foram realizadas em dois difratômetros. O primeiro, localizado no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) sob responsabilidade do Prof. Dr. Victor M. Deflon, um difratômetro Bruker APEX DUO. O segundo, localizado no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), sob responsabilidade do Professor Dr. Javier Ellena, um difratômetro automático NONIUS KAPPA CCD. Ambos difratômetros empregam radiação da linha $K\alpha$ do molibdênio ($0,71070 \text{ \AA}$), à temperatura de 298 K.

Os monocristais foram obtidos por evaporação lenta ou por difusão de solventes {DCM/Éter etílico}. As estruturas cristalinas foram resolvidas pelo Prof. Dr. Eduardo E. Castellano e pelo Dr. Richard F. D'vries, membros do Grupo de Cristalografia do IFSC-USP, empregando o software SHELXS 97. Foram empregados métodos diretos. Sucessivos mapas de Fourier-Diferença permitiram a localização dos átomos não hidrogênicos. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método de mínimos quadrados. Detalhes específicos sobre a coleta de dados e os parâmetros são fornecidos no corpo do texto.

3.3 – Síntese dos precursores e compostos

3.3.1 – Síntese dos precursores: complexos do tipo *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)], com N-N = fen, dpq, dppz e dpqQX.

Todos os compostos de fórmula geral *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)], com N-N = fen, dpq, dppz e dpqQX, foram sintetizados adaptando a metodologia descrita na literatura (GALLATTI *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2007). Em um tubo Schlenk, adicionou-se 60 mg (0,11 mmol) de dppf a uma solução de 96 mg (0,10 mmol) do complexo [RuCl₂(PPh₃)₃] (STEPHENSON & WILKINSON, 1966) dissolvido em 25 mL de DCM desaerado. A solução permaneceu sob agitação por 30 minutos, tempo no qual foram adicionados o equivalente em miligramas a 0,10 mmol da α,α' -diimina (N-N). A nova solução obtida permaneceu sob agitação outros 30 minutos. O volume da solução foi reduzido para aproximadamente 2 mL e precipitou-se com éter etílico. O complexo formado foi separado por filtração, lavado com éter etílico e hexano quente e seco sob vácuo.

As quantidades das α,α' -diiminas empregadas, as cores dos sólidos obtidos e os rendimentos para cada uma das sínteses dos precursores **P1-P4** foram as seguintes:

- | | |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| (P1) <i>cis</i> -[RuCl ₂ (fen)(dppf)] | Empregadas 18 mg (0,10 mmol) de fen. Cor: laranja. Rendimento: 71,9 mg (79%). |
| (P2) <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpq)(dppf)] | Empregadas 23 mg (0,10 mmol) de dpq. Cor: vermelha. Rendimento: 76,7 mg (80%). |
| (P3) <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppz)(dppf)] | Empregadas 28 mg (0,10 mmol) de dppz. Cor: marrom. Rendimento: 87,1 mg (86%). |
| (P4) <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpqQX)(dppf)] | Empregadas 33 mg (0,10 mmol) de dpqQX. Cor: marrom. Rendimento: 86,1 mg (85%). |

3.3.2 – Síntese dos compostos contendo CO: compostos do tipo *ct*-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]PF₆, com N-N = fen, dpq, dppz e dpqQX.

Todos os complexos de fórmula geral *ct*-[RuCl(CO)(N-N)(dpq)]PF₆, com N-N = fen, dpq, dppz e dpqQX, foram sintetizados adaptando a metodologia descrita na literatura (FRAZÃO, 2007). Em um tubo Schlenk, adicionou-se o equivalente em miligramas a 0,10 mmol do correspondente precursor em 10 mL de DCM e 16 mg

(0,10 mmol) de NH_4PF_6 solubilizado em 1 mL de MeOH. Em seguida fez-se vácuo e atmosfera de CO (gerado a partir da desidratação do ácido fórmico pelo ácido sulfúrico concentrado). Quando a solução se tornou amarela, o volume da solução foi reduzido para aproximadamente 2 mL e precipitou-se com éter etílico. O complexo formado foi separado por filtração, lavado com éter etílico e água e seco sob vácuo.

As quantidades dos precursores empregadas, as cores dos sólidos obtidos e os rendimentos para cada uma das sínteses dos compostos **1–4** foram as seguintes:

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{fen})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ | Empregadas 91 mg (0,10 mmol) de P1 . Cor: amarela pálida. Rendimento: 84,5 mg (94%). |
| (2) $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ | Empregadas 96 mg (0,10 mmol) de P2 . Cor: amarela pálida. Rendimento: 85,6 mg (90%). |
| (3) $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppz})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ | Empregadas 101 mg (0,10 mmol) de P3 . Cor: amarela. Rendimento: 109 mg (95%). |
| (4) $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpqQX})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ | Empregadas 106 mg (0,10 mmol) de P4 . Cor: mostarda. Rendimento: 108 mg (90%). |

3.4 – Estudos de interação com as biomoléculas BSA e DNA

3.4.1 – Estudos de interação com a BSA por titulações espectrofluorométricas

Nos estudos de interação proteína/complexo seguiu-se a supressão da fluorescência dos resíduos de triptofano de uma solução $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de BSA (albumina de soro bovino, Sigma-Aldrich) em tampão pH 7,4 ($4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH; $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, todos Sigma-Aldrich). A extinção na intensidade de emissão do resíduo em 315 nm (comprimento de onda de excitação 280 nm) foi monitorado empregando como supressores soluções dos compostos dissolvidos em DMSO, nas concentrações 0 – $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os espectros de fluorescência foram adquiridos por triplicata na faixa de 300 – 500 nm, usando uma placa opaca de 96 poços, nas temperaturas de 25 e 37 °C, empregando uma leitora multidetecção da Biotek, modelo Synergy H1.

3.4.2 – Estudos de interação com o DNA empregando medidas de viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas em um viscosímetro Ostwald imerso em um banho de água a 25 °C. A concentração do Calf Thymus DNA (CT-DNA, Sigma-Aldrich) foi mantida constante em todas as amostras (160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em tampão pH 7,4 (4,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl). As concentrações dos compostos dissolvidos em DMSO foram incrementadas de 0 – 56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, mantendo em todas as soluções de trabalho uma quantidade final de DMSO igual ao 10% do volume total. O tempo de retenção foi medido três vezes empregando um cronômetro digital, tomando o valor médio junto com o valor do desvio padrão para o tratamento dos dados. Os dados são representados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus a proporção [composto]/[DNA], onde η e η_0 são as viscosidades específicas do DNA em presença e em ausência do composto, respectivamente. Os valores de η e η_0 foram calculados empregando a expressão $(t - t_b)/t_b$, onde t é o tempo de retenção observado e t_b é o tempo de retenção do tampão empregado. As viscosidades relativas do DNA foram calculadas como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$.

3.4.3 – Estudos de interação com DNA empregando dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) foram registrados em um espectropolarímetro JASCO J-720, empregando uma cubeta cilíndrica com caminho ótico de 1 cm, pertencente ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do IFSC – USP. A concentração do CT-DNA foi mantida como constante em todas as amostras (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em tampão pH 7,4 (4,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl). As concentrações dos compostos em DMSO foram incrementadas de 0 – 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, mantendo em todas as soluções de trabalho uma quantidade de DMSO igual ao 10% do volume total. As amostras foram incubadas a 37 °C por 18 h. Todos os espectros de CD foram tomados a 25 °C na faixa de 240 – 640 nm. Os dados são apresentados como elipticidade molar (em termos de miligraus) versus comprimento de onda.

3.4.4 – Estudos de interação com o DNA por titulações espectrofotométricas

Preparou-se uma solução de DNA pela adição de aproximadamente 40 mg de CT-DNA (DNA de timo de bezerro, Aldrich) em 20 mL de tampão pH 7,4 (4,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH; 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl). A concentração exata do

DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis, onde em uma cubeta contendo o tampão (2000 μL) foram adicionados 50 μL da solução de DNA e realizada a medida. Sabe-se que a absorvidade molar do CT-DNA em 260 nm é $6600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$. Assim, conhecendo-se a absorvância (A), a absorvidade molar (ϵ) em 260 nm e o caminho óptico ($b = 1 \text{ cm}$), determinou-se a concentração (c) do CT-DNA por meio da lei de Beer – Lambert $A = \epsilon bc$.

As titulações foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1 foram adicionados 1800 μL do tampão pH 7,4 e 200 μL de DMSO, correspondendo ao branco, enquanto na cubeta 2 foram adicionados 1800 μL do tampão pH 7,4 e 200 μL da solução de complexo ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em DMSO. Logo após, foram realizadas sucessivas adições de 30 μL de CT-DNA em ambas cubetas, onde a cada adição as soluções foram homogeneizadas por cerca de 1 minuto seguido da obtenção dos espectros da cubeta 1 (branco) e cubeta 2 (amostra), em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard, modelo 8452A.

3.4.5 – Estudos de interação com DNA empregando voltametria de onda quadrada

Para a aquisição dos voltamogramas de onda quadrada, foram utilizados um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, um tarugo de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl, mantido no interior de um capilar Luggin-Haber com uma solução $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de PTBA no solvente de trabalho, como eletrodo de referência. Primeiramente, foi registrada a resposta eletroquímica de uma solução $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ do complexo em tampão pH 7,4 ($4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH; $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) com 20% de DMSO. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de uma solução de CT-DNA de concentração conhecida registrando logo após a resposta eletroquímica da solução.

3.5 – Determinação da citotoxicidade celular *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* dos compostos, determinada de forma indireta a partir de testes de viabilidade celular, foi realizada no Laboratório de Biologia do Envelhecimento – Laben, sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti, no Departamento de Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos (DeGero – UFSCar), pelas alunas Msc. Katia Mara de Oliveira e Msc. Legna Andreina Colina Vegas. Utilizou-se as linhagens celulares adenocarcinoma de mama

humano MDA-MB-231 (ATTC No. HTB-26) e célula normal fibroblasto de pulmão de camundongo V79-4 (ATCC No. CCL-93).

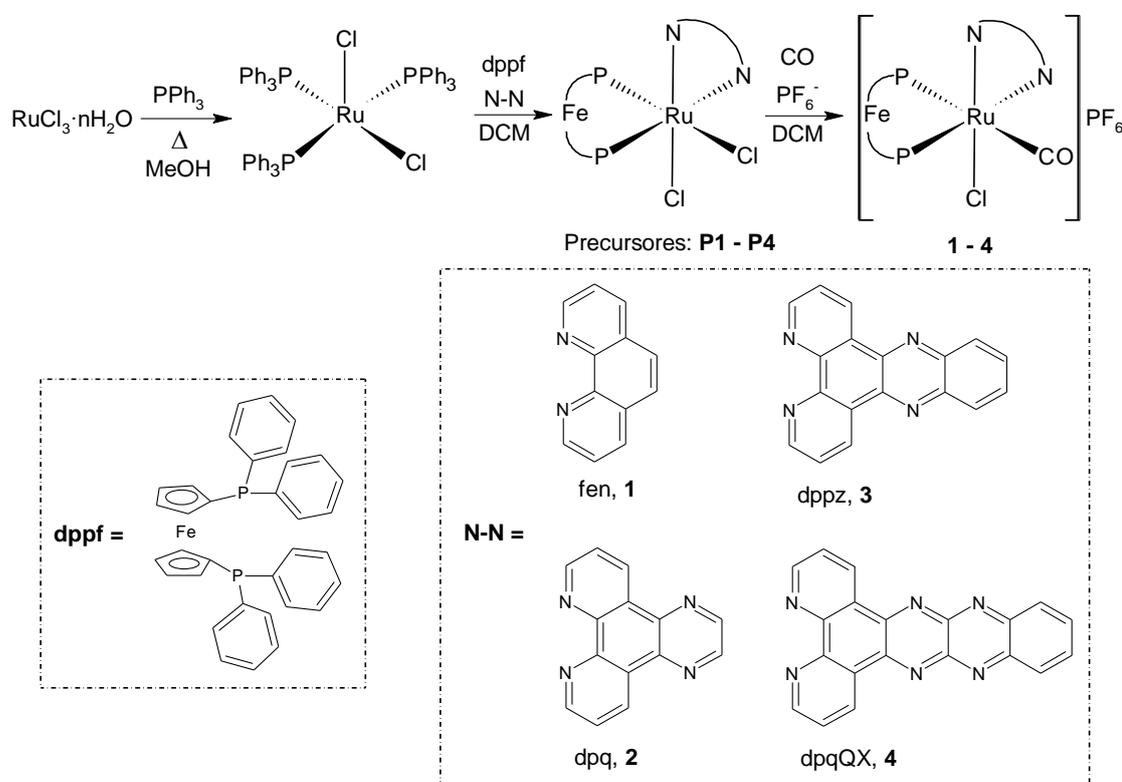
Conforme o protocolo utilizado, as células foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's modified eagle medium*) suplementado com soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) 10%. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Para a realização dos ensaios, as células foram tripsinizadas (separadas do suporte empregando a enzima tripsina) para a contagem e ajuste da concentração de células. Em seguida, aplicou-se as células em placas de cultura de 96 poços (estéril) (densidade de células 1,5 × 10⁴). As placas foram armazenadas em estufa (37 °C / 5% CO₂) por 24 h para a adesão celular. Após este tempo os complexos em diferentes concentrações, solubilizados em DMSO, foram adicionados à placa e a mesma foi novamente mantida na estufa por 48 h. Após este período, retirou-se todo o meio de cultura das placas e lavou-se duas vezes com PBS (NaCl 137 mmol·L⁻¹, KCl 2,7 mmol·L⁻¹, Na₂HPO₄·2H₂O 9,1 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 1,8 mmol·L⁻¹, pH 7,4) e, em seguida, adicionou-se 50 µL de uma solução de MTT em PBS (0,5 mg·mL⁻¹). As mesmas foram deixadas em estufa por um período de 3 h, adicionou-se isopropanol para solubilizar os cristais de formazan formados após redução do MTT e mediu-se espectrofotometricamente. A densidade óptica (absorbância dos poços) foi medida em um leitor de microplacas a 540 nm. Para verificar o efeito do solvente DMSO, controles adicionais receberam 0,5% deste solvente.

Os dados coletados foram tratados nos programas computacionais Excel e GraphPad Prism 5, obtendo curvas a partir das quais foram calculados os valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% das células).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese e caracterização

Os compostos *cis*-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]PF₆ [N-N = fen, **1**; dpq, **2**; dppz, **3** e dpqQX, **4**] foram sintetizados a partir dos correspondentes precursores de fórmula *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)] (**P1–P4**), ao substituir o ligante cloro em posição *trans*- ao átomo de fósforo – cloro lábil – pelo monóxido de carbono (FRAZÃO, 2007). A precipitação dos mesmos foi realizada após adição do contra-íon hexafluorofostato (PF₆⁻). O Esquema 4.1 ilustra as diferentes etapas envolvidas na obtenção de **1–4**, partindo desde a sal RuCl₃·nH₂O.



ESQUEMA 4.1 – Rota sintética para obtenção dos compostos carbonílicos heterobimetálicos de Ru(II)/Fe(II).

4.1.1 – Espectroscopia RMN de ³¹P{¹H}

A espectroscopia de RMN de ³¹P{¹H} foi a técnica empregada para o monitoramento das diferentes reações e para a avaliação primária da formação tanto de **P1-P4** como de **1–4**, por ser a resposta de ambos tipos de compostos conhecida (FRAZÃO, 2007; BAROLLI, 2013, GALLATTI *et al*, 2007; MA *et al.*, 2007). Todos os

espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (adquiridos em DCM/ D_2O), apresentaram dois dubletos num sistema de spins AX, sistema no qual a diferença dos deslocamentos químicos é muito maior que a constante de acoplamento (Tabela 4.1; apêndice 3, p. 69), como mostrado para **P2** e **2** na Figura 4.1. Este padrão nos sinais indica que os átomos de fósforo do ligante dppf coordenado não são nem magnética nem quimicamente equivalentes, confirmando assim a configuração *cis*- de **P1-P4**.

TABELA 4.1 - Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os compostos carbonílicos e precursores em DCM/ D_2O .

Composto*	δ (multiplicidade)	$^2J_{\text{PP}}$ (Hz)
1 <i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF ₆	39,7 (d); 7,7 (d)	23
2 <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF ₆	39,5 (d); 7,7 (d)	23
3 <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF ₆	39,2 (d); 7,5 (d)	23
4 <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF ₆	39,1 (d); 7,7 (d)	23
P1 <i>cis</i> -[RuCl ₂ (fen)(dppf)]	43,0 (d); 36,8 (d)	31
P2 <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpq)(dppf)]	42,5 (d); 36,5 (d)	31
P3 <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppz)(dppf)]	42,0 (d); 36,3 (d)	31
P4 <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpqQX)(dppf)]	41,9 (d); 36,2 (d)	31

d = dubleto. *Para os compostos **1–4**, o sinal referente ao PF₆⁻ corresponde a um hepteto em δ -144,5 ($^1J_{\text{PF}} = 711$ Hz).

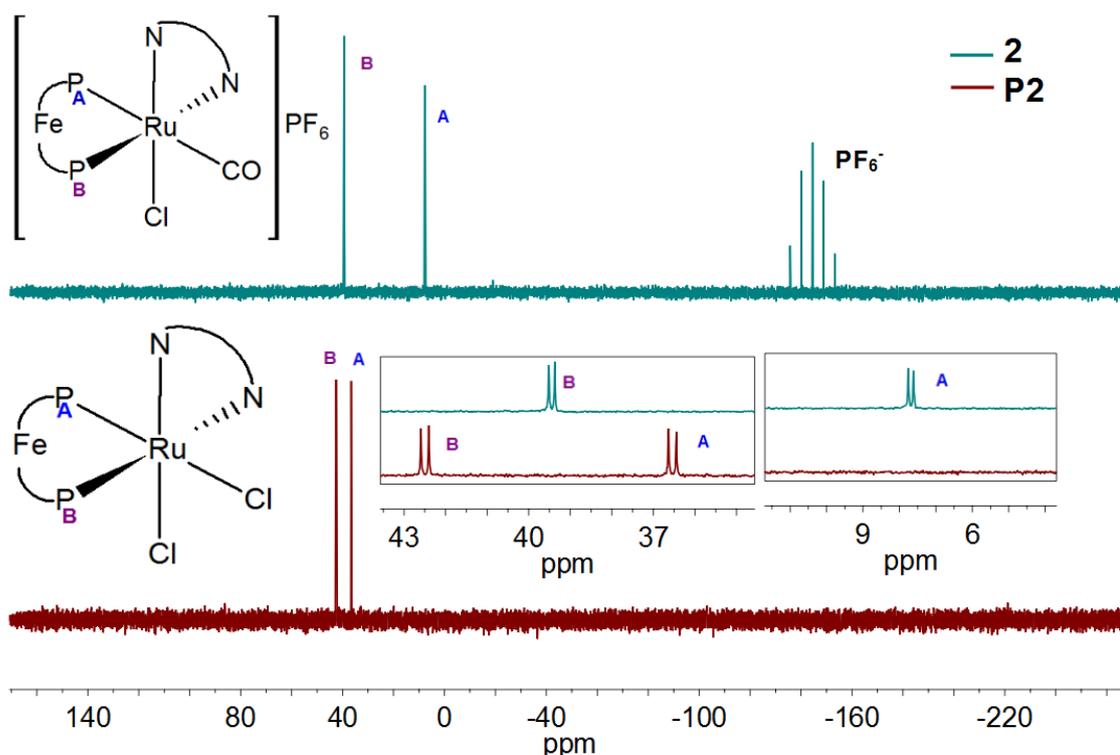


FIGURA 4.1 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, em DCM/ D_2O , do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, acima) e do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, abaixo). Inserido: ampliações dos espectros.

Para os compostos **1–4**, a não equivalência magnética dos núcleos de fósforo sugere como possíveis conformações a *cc*- e a *ct*- (neste caso, a primeira letra indica a posição do CO em relação ao Cl, e a segunda letra, a posição do CO em relação ao átomo de fósforo da dppf). No entanto, foi observado que para os isômeros do $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ o *cc*- apresenta dois dubletos em δ 35,0 e 27,0 ($^2J_{\text{P-P}}$ 30 Hz) enquanto o isômero *ct*- apresenta dois dubletos em δ 37,3 e 7,9 ($^2J_{\text{P-P}}$ 30 Hz) (FRAZÃO, 2007). Assim, para os espectros de **1–4**, o deslocamento químico de um dos dubletos em torno a δ 8,0 sugere a configuração *ct*- o que indica a blindagem do núcleo de P *trans*-CO atribuído ao efeito competitivo gerado por ser tanto a dppf como o CO fortes π -aceptores (FRAZÃO, 2007; VALLE *et al.*, 2009). Para **1–4**, junto com sistema de sinais AX, observou-se um hepteto em δ -144,5 ($^1J_{\text{P-F}}$ 711 Hz) correspondente ao contra-íon PF_6^- .

No caso particular de **P4** e **4**, foram observados mais dois dubletos de baixa intensidade (Figura 4.2), as quais são atribuídos à coordenação do ligante dpqQX através dos nitrogênios 9 e 10. A baixa intensidade dos mesmos, está em acordo com a premissa de ser esta coordenação a menos favorável ao ser gerado um anel rígido de 4 membros (Figura 4.3).

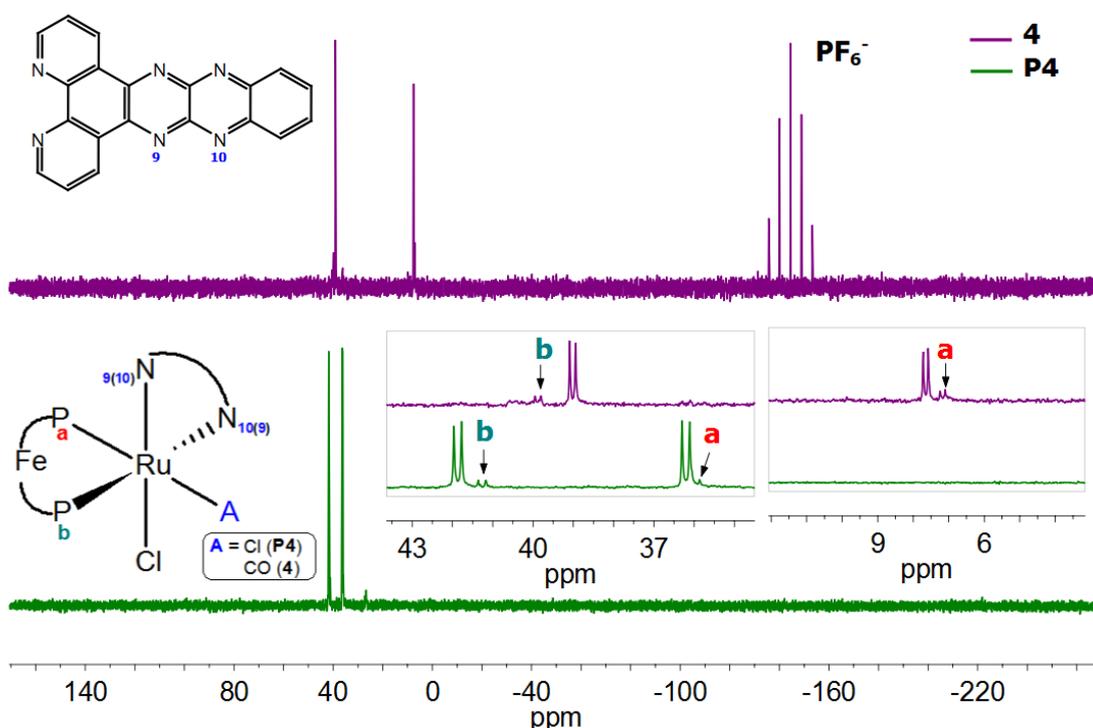


FIGURA 4.2 - Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, em $\text{DCM}/\text{D}_2\text{O}$, do *ct*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpqQX})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (**4**, acima) e do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dpqQX})(\text{dppf})]$ (**P4**, abaixo). Inserido: ampliações dos espectros.

Para corroborar a hipótese da coordenação pelos nitrogênios 9 e 10 foram estudados os precipitados obtidos após empregar as relações estequiométricas 2Ru:2dppf:1dpqQX e 3Ru:3dppf:1dpqQX por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, seguindo a metodologia empregada na sínteses de **P4** (Figura 4.4). Foi observado, além dos dois dubletos correspondentes a **P4**, a formação de um singlete em δ 51 o que sugere inicialmente a formação de um complexo no qual os átomos de fósforo da dppf são magneticamente equivalentes (porém não atribuível ao isômero *trans*-[RuCl₂(dpqQX)(dppf)], *trans*-**P4**, o qual apresenta um singlete em δ 41). Os sinais atribuídos à coordenação ao rutênio pelos nitrogênios 9 e 10 da dpqQX, também foram observados, mas a intensidade dos mesmos se manteve baixa. Juntamente, os voltamogramas cíclicos destes precipitados coincidiram com aquele de **P4**, resultado que não aportou informação clara que permitisse esclarecer a estrutura correspondente ao singlete em δ 51.

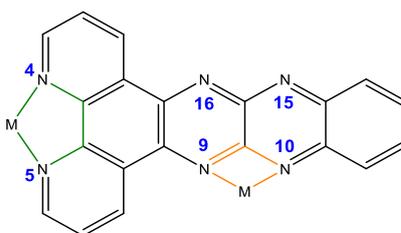


FIGURA 4.3 – Possíveis pontos de coordenação do ligante dpqQX.

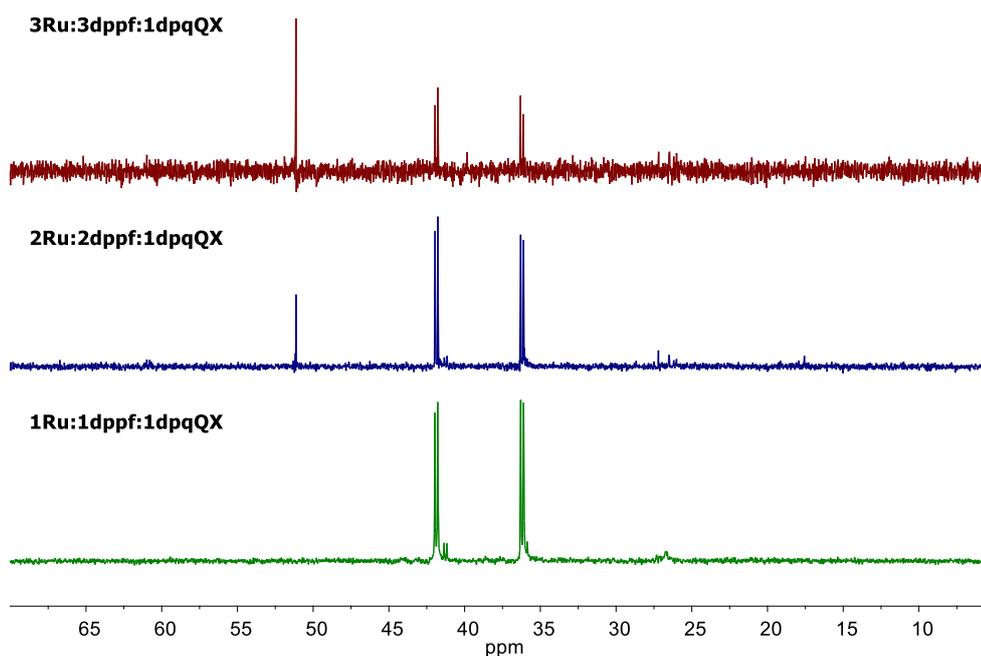


FIGURA 4.4 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para a sínteses do *cis*-[RuCl₂(dpqQX)(dppf)] (**P4**), empregando diferentes relações dos reagentes.

4.1.2 – Análise Elementar e Condutância Molar

As fórmulas propostas foram confirmadas a partir da composição percentual obtida das análises elementares de CHN e indicaram, em alguns casos, a presença de moléculas de água, diclorometano e/ou éter etílico (Tabela 4.2). A presença de dessas moléculas foi confirmada a partir das técnicas de IV e de RMN de ^1H (conforme pode ser observado nos respectivos espectros nos apêndices nas páginas 64 e 74). Como esperado, os valores registrados de condutância molar em DCM se encontraram dentro das faixas de não eletrólitos para **P1-P4** e de eletrólitos 1:1 para **1-4** (Tabela 4.2).

TABELA 4.2 – Dados das análises elementares e de condutância molar (Λ_M) em DCM para os compostos carbonílicos e complexos precursores.

	Composto	Análise elementar (Calc.)			Λ_M^* ($\text{S}\cdot\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$)
		%C	%H	%N	
1	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF ₆	53,68	4,35	2,72	48,7 ± 0,5
	C ₄₇ H ₃₆ ClF ₆ N ₂ OP ₃ FeRu·H ₂ O·(C ₂ H ₅) ₂ O	(53,91)	(4,26)	(2,47)	
2	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF ₆	52,45	3,63	4,59	56,8 ± 0,1
	C ₄₉ H ₃₆ ClF ₆ N ₄ OP ₃ FeRu·½CH ₂ Cl ₂	(52,47)	(3,26)	(4,89)	
3	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF ₆	54,86	4,14	4,78	68,9 ± 0,9
	C ₅₃ H ₃₈ ClF ₆ N ₄ OP ₃ FeRu·2H ₂ O·(C ₂ H ₅) ₂ O	(54,49)	(4,17)	(4,46)	
4	<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF ₆	51,43	3,17	6,83	47,0 ± 0,8
	C ₅₅ H ₃₈ ClF ₆ N ₆ OP ₃ FeRu	(51,69)	(3,25)	(6,46)	
P1	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (fen)(dppf)]	58,73	4,38	2,92	1,04 ± 0,01
	C ₄₆ H ₃₆ Cl ₂ N ₂ P ₂ FeRu·2H ₂ O	(58,61)	(4,28)	(2,97)	
P2	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpq)(dppf)]	59,05	4,03	5,78	0,26 ± 0,01
	C ₄₈ H ₃₆ Cl ₂ N ₄ P ₂ FeRu·½CH ₂ Cl ₂ ·½(C ₂ H ₅) ₂ O	(58,67)	(4,05)	(5,37)	
P3	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppz)(dppf)]	60,61	4,03	5,00	0,69 ± 0,02
	C ₅₂ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ P ₂ FeRu·H ₂ O	(60,83)	(3,93)	(5,43)	
P4	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dpqQX)(dppf)]	57,82	4,36	7,60	0,63 ± 0,05
	C ₅₄ H ₃₈ Cl ₂ N ₆ P ₂ FeRu·4H ₂ O	(57,26)	(4,09)	(7,42)	

*Faixa de condutividade molar para eletrólitos 1:1 em DCM: 43,1 ± 14,4 S·m²·mol⁻¹ (GARCIA, 2006).

4.1.3. – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica útil para a caracterização de compostos metal-carbonila, por ser a região de vibração do CO (em torno a 2000 cm⁻¹) pouco poluída e porque o número e posição das absorções fornecem informações sobre a estrutura, simetria e forma de ligação do grupo CO na molécula (NAKAMOTO, 2008).

Nos espectros IV de **1-4**, adquiridos em pastilha de KBr, foi observada uma única banda de estiramento CO em torno de 2000 cm⁻¹ (Tabela 4.3; apêndice 1, p. 63), sendo esta a principal evidência da coordenação do monóxido de carbono,

que livre apresenta sua frequência vibracional em 2143 cm^{-1} . A presença de um único modo de vibração do grupo carbonila indica a coordenação de uma única molécula de monóxido de carbono por composto e as frequências apresentadas são congruentes com a faixa reportada para compostos metal-carbonila terminais (M-CO, 2125–1850 cm^{-1}) (NAKAMOTO, 2008). Destaca-se que estas bandas não apresentam o perfil agudo característico da maioria dos metal-carbonila (NAKAMOTO, 2008) e sim um perfil largo.

TABELA 4.3 – Tentativa de atribuição das bandas mais representativas nos espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, para os compostos carbonílicos e precursores.

Banda	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1})							
	1	2	3	4	P1	P2	P3	P4
$\nu(\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H})$	3065w	3074w	3061w	3063w	3053w	3065w	3057w	3051w
$\nu(\text{CO})$	1979b,s	1992b,s	2001b,s	2003b,m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
$\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{Ar}}$	1632w	1609w	1603w	1641w	1632w	1637w	1633w	1637m
	1587w	1582w	1574w	1610w	1587w	1585w	1571w	1606m
$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{Ar}}$	1483w	1481m	1493m	1499m	1483m	1444m	1481m	1496m
	1435w	1433m	1435m	1435m	1431m	1415m	1431m	1433m
		1389m	1360m	1387m		1400m	1360m	1385m
$\nu(\text{P}-\text{C}_{\text{Ar}})$	1165m	1165m	1160m	1119m	1088m	1103m	1080m	1088m
	1088m	1085m	1094m	1088m	1040m	1051m	1032m	1037m
$\nu(\text{P}-\text{F})$	843b,s	844b,s	854b,s	845b,s	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
$\delta(\text{P}-\text{F})$	559s	557s	557s	557m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
$\nu(\text{Ru}-\text{P})$	546m	546m	540w	548w	545m	560w	548m	548m
	515w	523w	525m	525w	520m	531w	519m	521m
$\nu(\text{Ru}-\text{N})$	495m	496m	500m	524w	498m	511m	521m	509m
	474w	476m	478m	507m	473m	492m	504m	496m
$\nu(\text{Ru}-\text{Cl})$					353w	366w	353w	347w
					326w	336w	318w	312w

b = larga; s = forte; m = média, w = fraca; n.a. = não aplica.

Ao comparar os deslocamentos da banda $\nu(\text{CO})$ de 1–4 é notório um aumento na frequência do estiramento conforme aumenta a conjugação da α,α' -diimina (Tabela 4.3). Isto sugere que o aumento na conjugação das α,α' -diiminas gera uma diminuição na capacidade σ -dadora (diminuição na basicidade) das mesmas, como observado também para compostos análogos contendo a 1,4-bis(difenilfosfino)butano (dppb) (Tabela 4.4).

TABELA 4.4 – Frequências de vibração do grupo carbonila observados nos espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, para compostos do tipo *ct*-[RuCl(CO)(N-N)(dppb)]PF₆

Composto	pK _a (N-N) livre	ν(CO) (cm ⁻¹)
<i>ct</i> -[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF ₆ ^a	4,44 ^c	1987
<i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dppb)]PF ₆ ^a	4,27 ^c	1987
<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppb)]PF ₆ ^b	3,4 ^d	1996

a – FRAZÃO, 2007. b – BAROLLI, 2013. c – PAVAN, *et al.*, 2011; DOS SANTOS, *et al.*, 2013. d – O presente trabalho, ver Tabela 4.11.

Em adição, frente aos complexos análogos contendo a dppb (Tabela 4.4), os compostos **1–4** exibem um maior valor na frequência ν(CO) indicando que a dppf apresenta uma menor capacidade σ-dadora que a dppb, o que pode estar ligado a uma melhor capacidade π-aceptora. O anterior se encontra em acordo com o reportado na literatura, onde determinando o calor de protonação da dppf foi demonstrado que esta apresenta uma menor capacidade σ-dadora (menor basicidade) que outras bifosfinas contendo pontes alquilas ou arilas (O'CONNOR & NATARO, 2004).

Todos os espectros IV de **1–4**, apresentaram também uma banda forte correspondente ao estiramento P-F junto com a respectiva banda de flexão P-F, dado o emprego do contra-íon PF₆⁻. As bandas de absorção devidas aos sistemas aromáticos presentes na dppf e nos ligantes N-N, foram comuns para os espectros de **1–4** e para os espectros dos respectivos precursores (Tabela 4.3). Assim, a faixa entre 3100 – 3000 cm⁻¹ compreende os estiramentos C_{Ar}-H. Entre 1650 – 1350 cm⁻¹, têm-se absorções dos estiramentos C=C e C=N de sistemas aromáticos. Na faixa entre 1250 – 600 cm⁻¹, encontram-se as deformações angulares da ligação C_{Ar}-H no plano e fora do plano, região que contém as bandas de estiramento P-C_{Ar} entre 1130 – 1090 cm⁻¹. Na faixa entre 990 – 600 cm⁻¹, encontram-se as vibrações das ligações C-C (SILVERSTEIN, 2005). Por último, os espectros exibem bandas na região entre 520 – 390 cm⁻¹, características das vibrações de estiramento das ligações Ru-P e Ru-N (Tabela 4.3). Na Figura 4.5, é apresentado o espectro IV de **2** e do precursor **P2**.

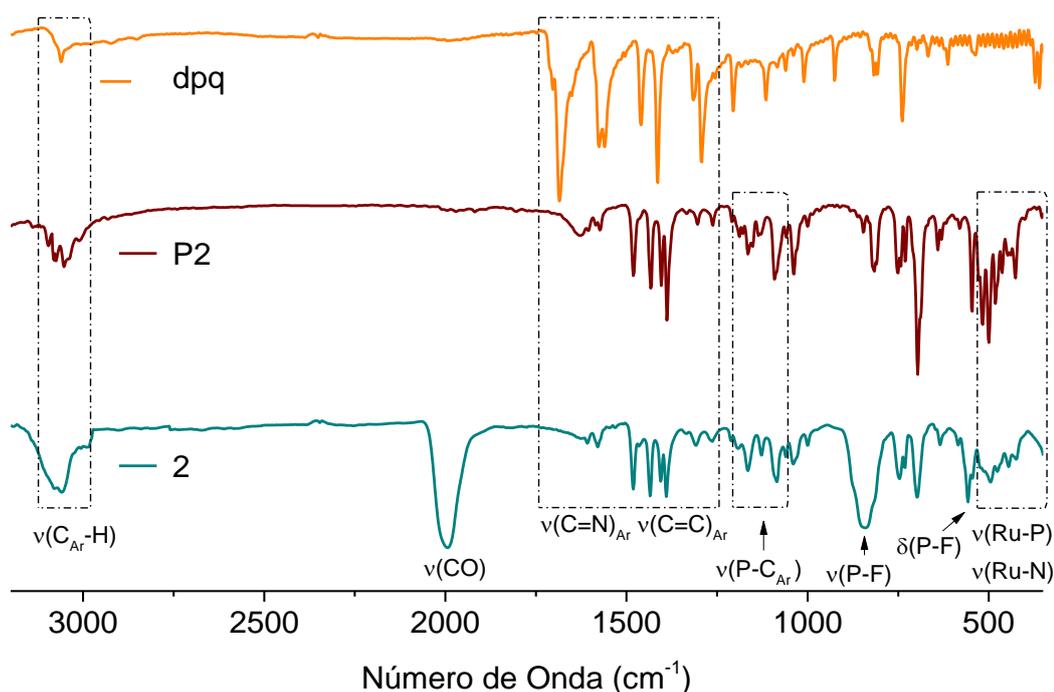


FIGURA 4.5 – Espectros de absorção na região do infravermelho, em pastilha de KBr, do ligante livre dpq (topo), do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, meio) e do *cis*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, base).

4.1.4 – Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Os espectros de absorção na região do UV-vis de **1–4** coletados em DCM (cut-off em $\lambda = 245$ nm), apresentaram bandas atribuídas principalmente à transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligantes (IL) em comprimentos de onda na região do ultravioleta (Tabela 4.5; apêndice 2, p. 67), conforme apresentado para **2** na Figura 4.6 (GALLATTI *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2007 e SILVA *et al.*, 2008). Nos espectros de absorção para os compostos derivados dos ligantes dpq, dppz e dpqQX (**2–4** respectivamente), foi possível identificar transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ IL centradas em seus sistemas azo (SILVA *et al.*, 2008 e VAN DER TOL *et al.*, 1998), as quais, em média, são observadas em maiores comprimentos de onda, conforme aumenta a conjugação das α, α' -diiminas (Tabela 4.5; apêndice 2, p. 67).

Comparado aos espectros eletrônicos dos complexos precursores **P1–P4** (apêndice 2, p. 67) a não presença das absorções na região do visível, atribuídas principalmente a transições de carga metal – ligante TCML $dRu \rightarrow \pi^*N-N$ (GALLATTI *et al.*, 2007), junto com a menor definição nas bandas das transições

centradas nos sistemas azo, constitui a maior variação dos espectros eletrônicos de **1–4**, conforme observado para **P2** e **2** na Figura 4.6. O anterior está em acordo com a alteração observada na coloração que passou de tonalidades laranja – marrom nos precursores para tonalidades amarela pálida – mostarda nos compostos **1–4**, mostrando que a coordenação do CO, que apresenta acidez π , diminui a disponibilidade dos elétrons do metal para realizar as transições TCML (FRAZÃO, 2007).

TABELA 4.5 – Dados de espectroscopia de absorção na região do UV-vis em DCM para os compostos carbonílicos e precursores.

Composto	λ/nm ($\epsilon/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)		
	$\pi \rightarrow \pi^*$ IL(N-N) $\pi \rightarrow \pi^*$ IL(dppf)	$\pi \rightarrow \pi^*$ IL(N-N, azo)	TCML dRu $\rightarrow \pi^*\text{N-N}$
1	262 (29300)	--	--
1	262 (27300)	--	--
3	286 (30800)	368sh, 386sh	--
4	296 (22700)	424 (13000)	--
P1^a	271 (22500)	--	438 (3400)
P2	264 (29300)	296sh, 334sh	452 (3000)
P3	280 (30800)	324sh, 328sh, 376 (7720)	440 (2700)
P4	284 (21400)	404 (15400), 426 (9500)	462sh

sh = ombro. a – GALATTI *et al.*, 2007.

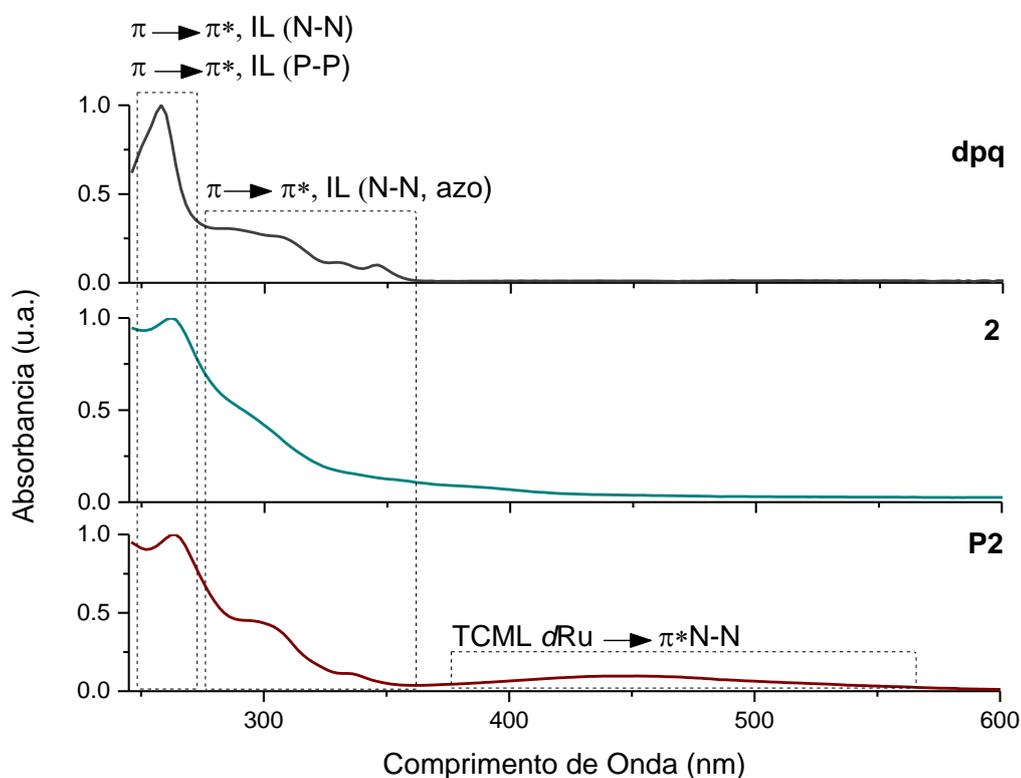


FIGURA 4.6 – Espectros de absorção na região do UV-vis, em DCM, do ligante livre dpq (topo), do *cis*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, meio) e do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, base).

4.1.5 – Espectroscopia RMN de ^1H e COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$

Os espectros de RMN de ^1H de **1–4** (registrados em acetona-D₆ e clorofórmio-D, quando possível; apêndice 4, p. 73) apresentaram picos na faixa compreendida entre δ 3,00 – 10,00, como apresentado para **2** na Figura 4.7. Após a coordenação ao Ru(II) todos os hidrogênios das α,α' -diiminas e do ligante dppf ficaram sem equivalência química e magnética, originando assim, além do deslocamento na frequência de ressonância, um aumento no número de picos com respeito aos espectros dos ligantes livres^b, já que nenhuma das estruturas possui elementos de simetria conforme evidenciado pelos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Todos os picos devidos aos hidrogênios dos anéis das ciclopentadienilas (Cp-) contidos no ligante dppf são mostrados como multipletos não resolvidos na faixa de δ 3,00 – 6,50 (sete ou oito picos são observados para cada composto). Os picos acima de δ 6,50 correspondem às ressonâncias dos hidrogênios das diferentes fenilas (Ph-) da dppf e dos hidrogênios das α,α' -diiminas, os quais possuem um caráter aromático. A atribuição dos hidrogênios correspondentes às diferentes α,α' -diiminas, baseada nos espectros COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (apêndice 5, p. 81), se resume na Tabela 4.6.

Os espectros de RMN de ^1H de **P1-P4** (obtidos em clorofórmio deuterado, ao serem insolúveis em acetona; apêndice 4, p. 74), apresentaram o mesmo perfil que o já descrito para **1–4** e mostraram os característicos picos desblindados, correspondentes aos hidrogênios *orto* das α,α' -diiminas coordenadas (GALLATTI *et al.*, 2007), como apresentado na Tabela 4.7.

^b fen (simetria C_{2v}): RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): 9,18 (dd, $J = 4,3$; 1,8 Hz, 2H); 8,22 (s, 2H); 8,20 (dd, $J = 8,1$; 1,8 Hz, 2H); 7,58 (dd, $J = 8,1$; 4,3 Hz, 2H) (MARTIN, *et al.*, 1966).

dpq (simetria C_{2v}): RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3 , ppm): 9,45 (dd, $J = 8,3$; 0,1 Hz, 2H); 9,3-9,2 (m, 2H); 9,18 (s, 2H); 7,97 (dd, $J = 12,5$; 4,0 Hz, 2H) (VAN DER TOL *et al.*, 1998).

dppz (simetria C_{2v}): RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ppm): 9,51 (d; $J = 6,5$ Hz; 2H); 9,20 (s; 2H); 8,37 (s; 2H); 8,05 (s; 2H); 7,93 (s; 2H).

dpqQX (simetria C_{2v}): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm) 9,83 (dd; $J = 8,1$; 1,5 Hz; 2H); 9,35 (dd; $J = 4,4$; 1,5 Hz; 2H); 8,52 (dd; $J = 7,0$; 3,3 Hz; 2H); 8,07 (dd; $J = 7,0$; 3,3 Hz; 2H); 7,88 (dd; $J = 8,1$; 4,4 Hz; 2H) (SILVA *et al.*, 2008).

dppf (centrossimétrico): RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm) 7,30 (m; 20H, Ph-); 4,26 (m; 4H, Cp-); 3,99 (m; 4H, Cp-).

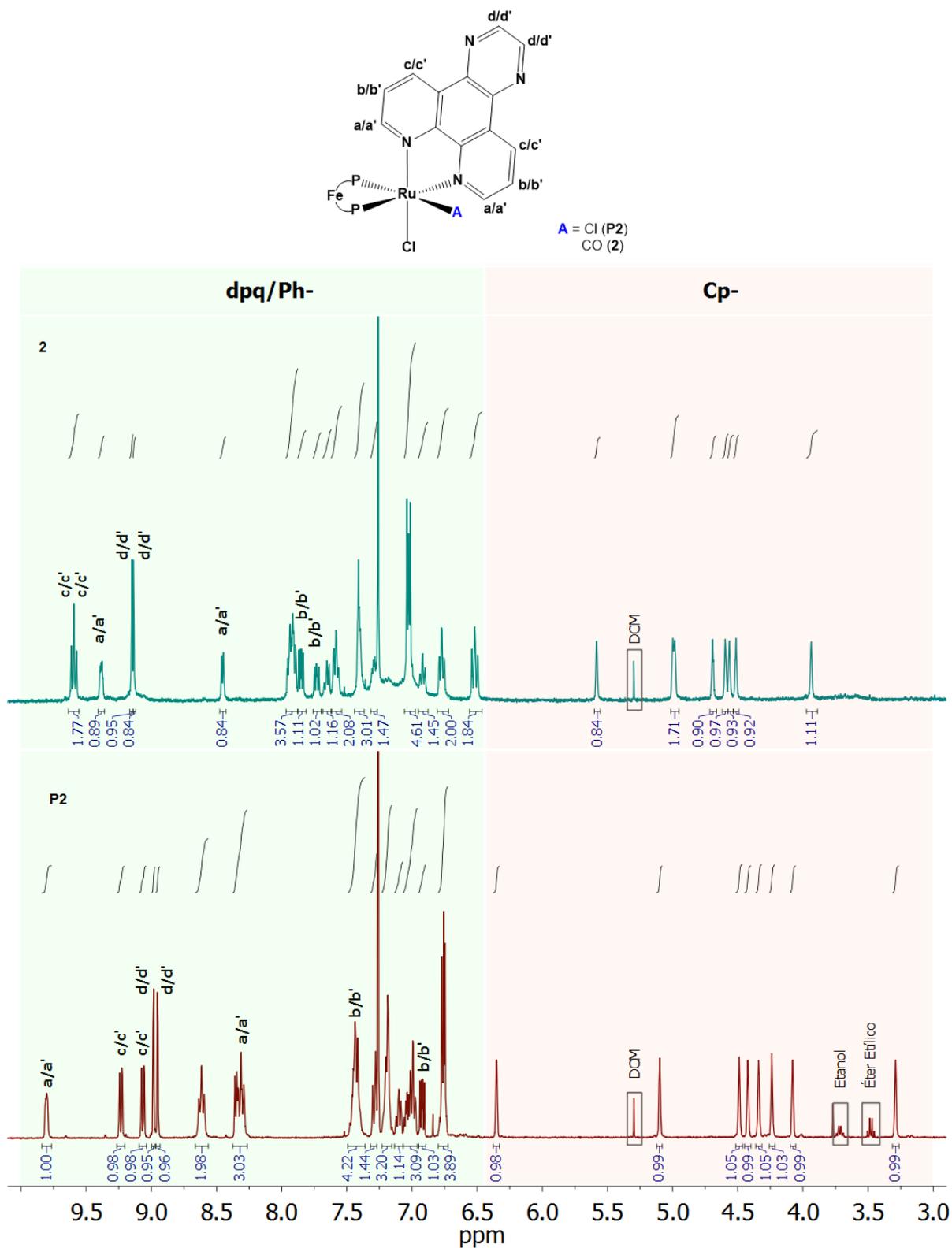
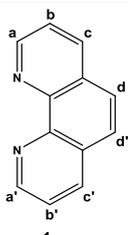


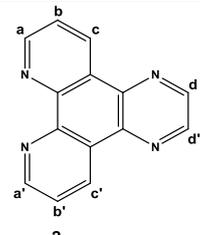
FIGURA 4.7 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), do $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (2, acima) e do $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dpq})(\text{dppf})]$ (P2, abaixo).

TABELA 4.6 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H , em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, dos hidrogênios dos diferentes ligantes N-N coordenados nos compostos carbonílicos.

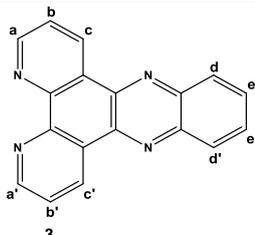
Próton	Composto, δ^*			
	1	2	3	4
Ha/a'	9,18/8,87	9,74/9,70	9,87/9,83	9,94/9,94
Hb/b'	7,92/7,79	8,05/7,98	8,05/7,97	8,13/7,99
Hc/c'	8,87/8,82	9,32/8,98	9,31/8,96	9,01/9,03
Hd/d'	8,30/8,22	9,31/9,29*	8,49**	8,53*
He/e'	n.a.	n.a.	8,19**	8,29*



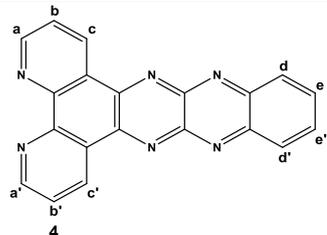
1



2



3



4

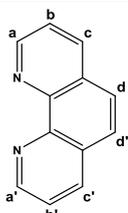
*Atribuições baseadas nos espectros COSY ^1H - ^1H . **Tentativas de atribuições. n.a.: não aplica.

Apenas para o composto **2** foi possível obter um bom espectro de RMN de ^1H em clorofórmio deuterado. Os demais espectros obtidos neste solvente para **1**, **3** e **4** não apresentaram boa resolução dos picos, como mostrado para **1** na Figura 4.8 devido à agregação dos compostos em solução. Assim, ao comparar o espectro de RMN de ^1H (em clorofórmio-D) de **2** frente aquele de **P2**, se observa um dos hidrogênios *orto*- da dpq fica mais desprotegido (Figura 4.7). Este comportamento também é observado nos picos dos grupos Ph- após coordenação do CO (o qual é congruente com o espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ onde o fósforo *trans*- ao CO apresenta uma maior blindagem que seu par). Os picos restantes correspondentes aos hidrogênios do ligante dpq, sofrem um deslocamento a regiões mais desblindadas frente ao espectro do **P2** (Figura 4.7). A diferença de deslocamento químico para os hidrogênios da dpq após coordenação do CO se resume na Tabela 4.8.

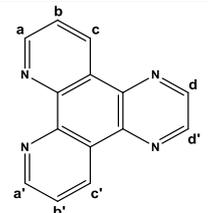
Como atribuição tentativa para os núcleos das diferentes α, α' -diiminas nos compostos precursores e tendo apenas em conta fatores de estas ligações químicas, supomos que aqueles hidrogênios denominados como a-e (aqueles mais protegidos) na Tabelas 4.7 e 4.8, são os que se encontram do lado do nitrogênio *trans*- ao fósforo da dpf nas diferentes estruturas.

TABELA 4.7 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H , em CDCl_3 , dos hidrogênios dos diferentes ligantes N-N coordenados nos precursores.

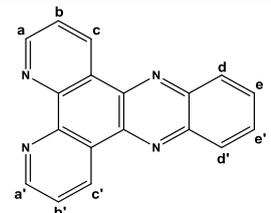
Próton	Composto, δ^*			
	P1	P2	P3	P4
Ha/a'	9,70/8,25	9,82/8,33	9,83/9,24	9,93/9,37
Hb/b'	7,30/6,80	7,44/6,93	7,45/6,90	7,49/6,99
Hc/c'	8,05/7,85	9,24/9,08	9,41/8,34	9,54/8,34
Hd/d'	7,74/7,61	8,99/8,96	8,34/8,34*	8,51/8,51*
He/e'	n.a.	n.a.	7,95/7,95*	8,09/8,09*



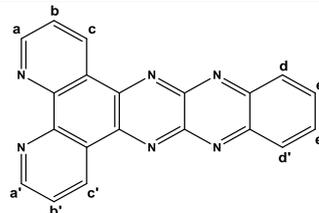
P1



P2



P3



P4

*Atribuições baseadas nos espectros COSY ^1H - ^1H . **Tentativas de atribuições. n.a.: não aplica.

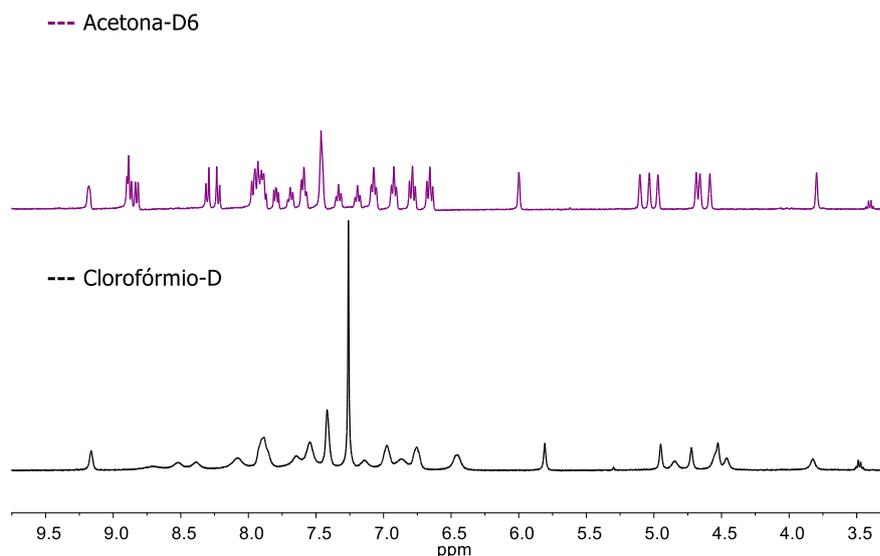
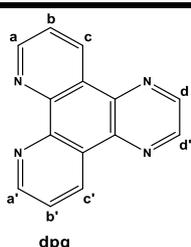


Figura 4.8 – Comparação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do *ct*-[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆ (**1**), adquirido em acetona-D₆ (abaixo) e clorofórmio-D (acima).

TABELA 4.8 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^1H , em CDCl_3 , dos hidrogênios do ligante dpq coordenado em **P2** e **2**.

Próton	Composto, δ^*		
	P2	2	$\Delta\delta$
Ha/a'	9,82/8,33	9,39/8,46	0,43/-0,13
Hb/b'	7,44/6,93	7,74/7,86	-0,30/-0,93
Hc/c'	9,24/9,08	9,60/9,60	-0,36/-0,52
Hd/d'	8,99/8,96	9,16/9,14	-0,17/-0,82



dpq

*Atribuições baseadas nos espectros COSY ^1H - ^1H e nos perfis dos espectros 1D.

4.1.6 – Espectroscopia RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **1–4** foram obtidos tanto em acetona como em clorofórmio deuterado (apêndice 6, p. 85). Conforme esperado, o comportamento apresentado é similar àquele dos espectros de RMN de ^1H , sendo observadas três regiões de picos nos diferentes espectros. A primeira região corresponde aos átomos de carbono dos grupos Cp- da dppf (δ 70 – 80); a segunda região, corresponde aos átomos de carbono dos grupos Ph- da dppf e das α,α' -diiminas (δ 122 - 165). Por último, a terceira região corresponde aos átomos de carbono do grupo carbonila, observados como duplos dubletos devido ao acoplamento carbono-fosforo a duas ligações $^2J_{\text{CP}}$ *trans*- e *cis*-, sendo os deslocamentos químicos os resumidos na Tabela 4.9. Como esperado, os valores das constantes de acoplamento seguiram a tendência $^2J_{\text{CP}}$ *trans*- \gg $^2J_{\text{CP}}$ *cis*- (PREGOSIN, 2012). Ao comparar com os espectros dos respectivos precursores a coordenação do CO provocou um deslocamento químico nos sinais dos átomos de carbono, principalmente da dppf, para regiões mais blindadas, sendo isto coerente com o observado nos espectros de RMN de ^1H e de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Na Figura 4.9, são mostrados os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do composto **2** e seu precursor **P2**.

TABELA 4.9 – Deslocamentos químicos nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ e CDCl_3 , dos carbonos dos grupos carbonila nos compostos **1–4**.

Composto	$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$		CDCl_3	
	δ_{CO}	$^2J_{\text{CP}}$ (Hz)	δ_{CO}	$^2J_{\text{CP}}$ (Hz)
1	197,0 (dd)	107; 18	195,6 (dd)	105; 18
2	196,7 (dd)	107; 18	195,5 (dd)	107; 18
3	Pico não detetado*	--	195,6 (dd)	107; 19
4	Pico não detetado*	--	Pico não detetado*	--

dd = duplo dubleto. *No total, foram destinadas 15 h de máquina na aquisição do espectro. Foi percebida agregação do complexo na solução.

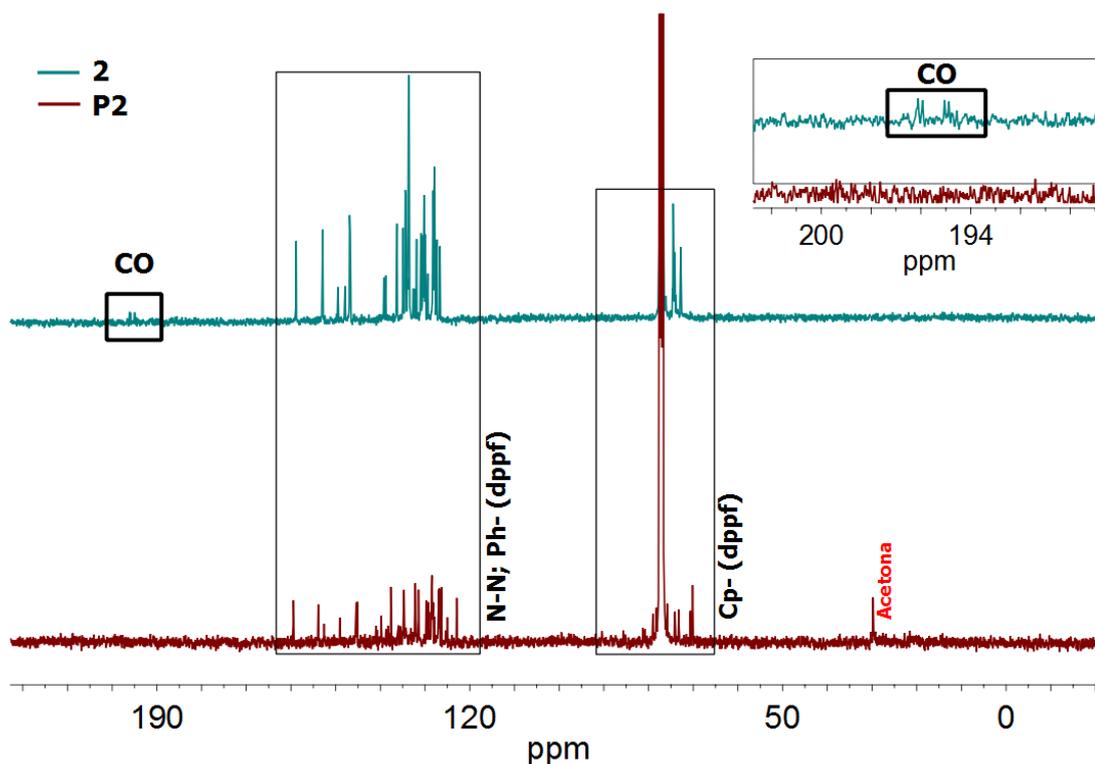


FIGURA 4.9 – Espectros RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (400 MHz, CDCl_3), do complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dpq})(\text{dppf})]$ (**P2**, abaixo) e do composto *ct*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (**2**, acima). Inserido: ampliação na região.

4.1.7 – Medidas eletroquímicas.

As técnicas voltamperométricas permitem, entre outros, estimar a densidade eletrônica de um determinado centro metálico (característica diretamente relacionada ao potencial de oxidação) e estudar a reversibilidade de um sistema.

Ao serem os compostos **1–4** heterobimetálicos, espera-se observar os processos correspondentes às duplas $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ e $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. Não entanto, na janela de potencial de trabalho (0 – 1800 mV), os voltamogramas cíclicos de **1–4**, vs. Ag/AgCl , mostraram um único processo redox, quase-reversível e de um elétron em torno a 1000 mV, atribuído à dupla redox $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ (Tabela 4.10; apêndice 7, p. 91), como apresentado para **2** na Figura 4.10.

A atribuição desse processo à dupla redox $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$, é baseada em quatro observações. A primeira observação, que para os compostos análogos e monometálicos de $\text{Ru}(\text{II})$ *ct*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{fen})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, *ct*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e *ct*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpqQX})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, o processo de oxidação do $\text{Ru}(\text{II})$ foi atingido com potências superiores a 1620 mV vs. Ag/AgCl (em solução de MeCN $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de

PTBA), sendo estes irreversíveis. Nestes casos, foi notada a formação de novas espécies após coordenação da acetonitrila (FRAZÃO, 2007; BAROLLI, 2013). A segunda observação foi o comportamento eletroquímico dos precursores: os voltamogramas cíclicos de **P1-P4** (vs. Ag/AgCl em solução de DCM 1,0· mmol·L⁻¹ de PTBA) mostraram dois processos de óxido-redução quasi-reversíveis de um elétron cada (Tabela 4.10; Figura 4.10), estando o voltamograma cíclico de **P1** descrito na literatura, no qual o primeiro processo é devido ao par redox Ru^{II}/Ru^{III} e o segundo, próximo a 1000 mV, à dupla Fe^{II}/Fe^{III} (GALLATI, *et al.* 2007). Esta atribuição foi confirmada a partir do seguimento da isomerização *trans-cis* de **P2** (apêndice 8, p. 94). A terceira observação foi a obtenção de uma solução de tonalidade vermelha ao reagir NH₄SCN com o produto da eletrolise de uma solução de **1** (em DCM 0,1 mol·L⁻¹ de PTBA) aplicando um potencial de 1250 mV. Esta coloração é devida a formação do íon complexo de Fe(III) [Fe(SCN)₆]³⁻ (Figura 4.11). Por último, a quarta observação foi que, após múltiplas varreduras numa solução de **1** (vs. Ag/AgCl em solução de DCM 1,0· mmol·L⁻¹ de PTBA), o processo, como esperado, não se tornou irreversível nem houve formação de novos processos após a oxidação do Ru(II) para o Ru(III), a qual leva à saída do monóxido de carbono da esfera de coordenação (Figura 4.12).

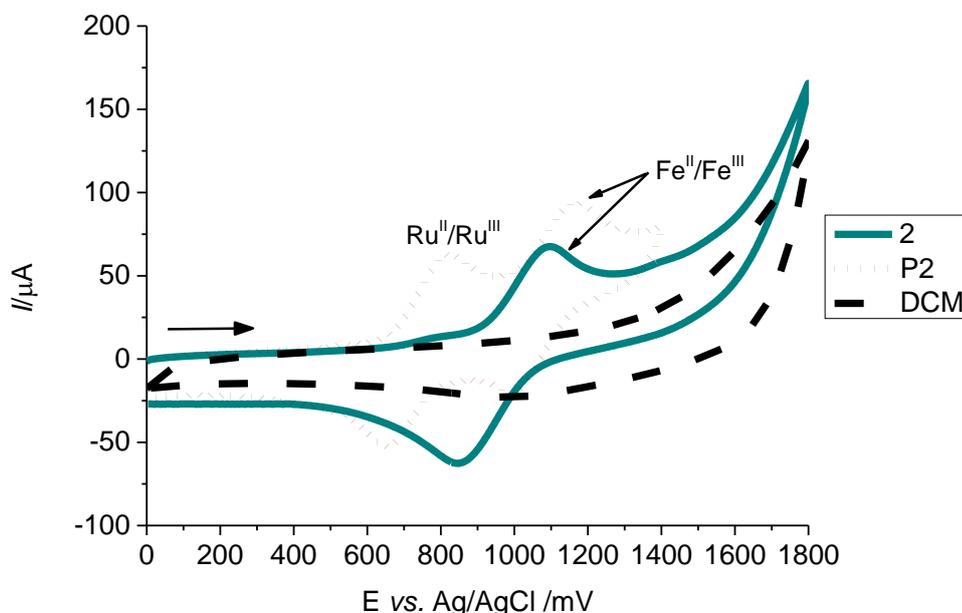


FIGURA 4.10 – Voltamogramas cíclicos do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆ (**2**, linha sólida) e do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, linha ponteadada) vs. Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

TABELA 4.10 - Dados eletroquímicos obtidos por voltametria cíclica dos compostos carbonílicos, precursores e alguns compostos análogos aos precursores vs. Ag/AgCl.

Composto	E_{pa} (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	ΔE (mV)	I_{pa}/I_{pc}
1	1075	955	240	0,8
2	1099	974	250	1,0
3	1109	985	248	0,8
4	1123	976	294	1,2
Ru^{II}/Ru^{III} (Fe^{II}/Fe^{III})				
P1 (<i>cis</i> -[RuCl ₂ (fen)(dppf)])	813 (1182)	701 (1071)	224 (222)	1,4 (0,9)
P2	825 (1164)	739 (1078)	172 (172)	1,3 (0,9)
P3	823 (1166)	738 (1081)	170 (170)	1,4 (1,2)
P4	871 (1236)	771 (1030)	201 (212)	0,8 (1,0)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (bipy)(dppf)]	793 (1162)	707 (1068)	172 (192)	1,4 (0,8)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (4,4'-Me ₂ bipy)(dppf)]	764 (1146)	652 (1030)	225 (232)	0,9 (1,1)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (5,5'-Me ₂ bipy)(dppf)]	750 (1152)	649 (1046)	203 (212)	1,4 (0,8)

Velocidade de varredura: 200 mV/s. Solução do eletrólito suporte: DCM 1,0 mmol·L⁻¹ de PTBA

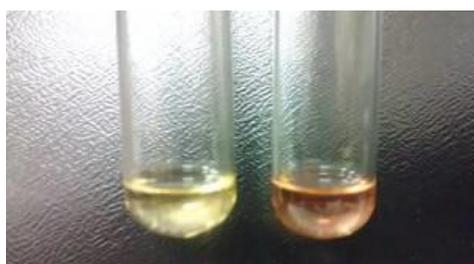


FIGURA 4.11 – Solução de trabalho da eletrólise de **1**, exibindo uma tonalidade amarela (esquerda) e solução contendo o produto da eletrólise de **1** junto com a sal NH₄SCN, exibindo uma tonalidade vermelha (direita).

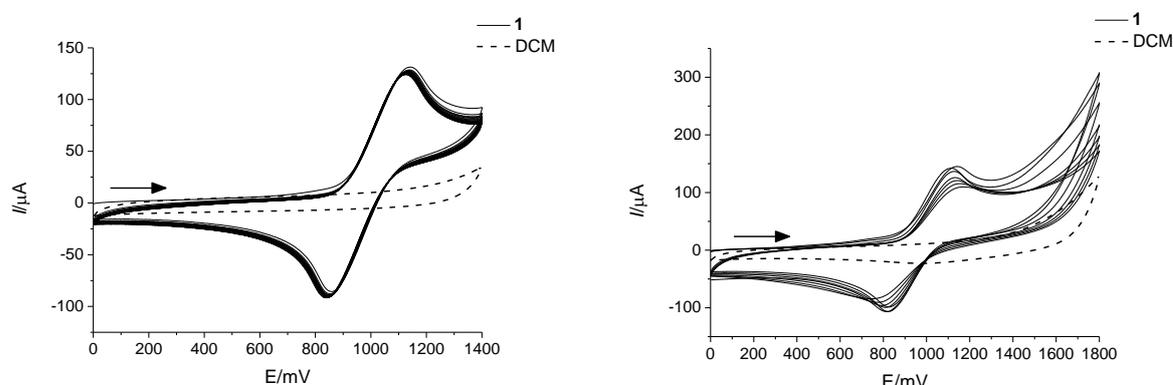


FIGURA 4.12 – Voltamogramas cíclicos consecutivos do *ct*-[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1**, adquiridos em solução de DCM 0,1 mol·L⁻¹ de PTBA vs. Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

Cálculos PDOS (do inglês, *partial density of states*) efetuados para **P2**, determinaram uma participação de 21% dos orbitais *d* do Ru no orbital HOMO do complexo frente a uma participação < 1% dos orbitais *d* do Fe (Figura 4.13). Isto se encontra em acordo com os perfis eletroquímicos apresentados pelo composto e demais precursores (onde a oxidação do Ru^{II} ocorre a menor potencial que aquele requerido para o Fe^{II}).

Assim, para **1–4** é estabelecida uma forte interação de retrodoação- π Ru^{II} \rightarrow CO, a qual diminui a densidade eletrônica sobre o centro de rutênio e dificulta atingir o processo redox Ru^{II}/Ru^{III}. Isto reflete que o monóxido de carbono é um acceptor- π mais forte que a dppf. Caso estes dois ligantes possuíssem o mesmo grau de competição pelos elétrons *d* do metal, seus efeitos anulariam-se deixando o centro de rutênio rico em elétrons e facilitando sua redução (BATISTA, 2001). Em adição, foi possível observar a capacidade da dppf de atuar como ‘tampão eletrônico’ ao ocorrer o processo redox Fe^{II}/Fe^{III} a potenciais próximos tanto nos precursores como nos compostos.

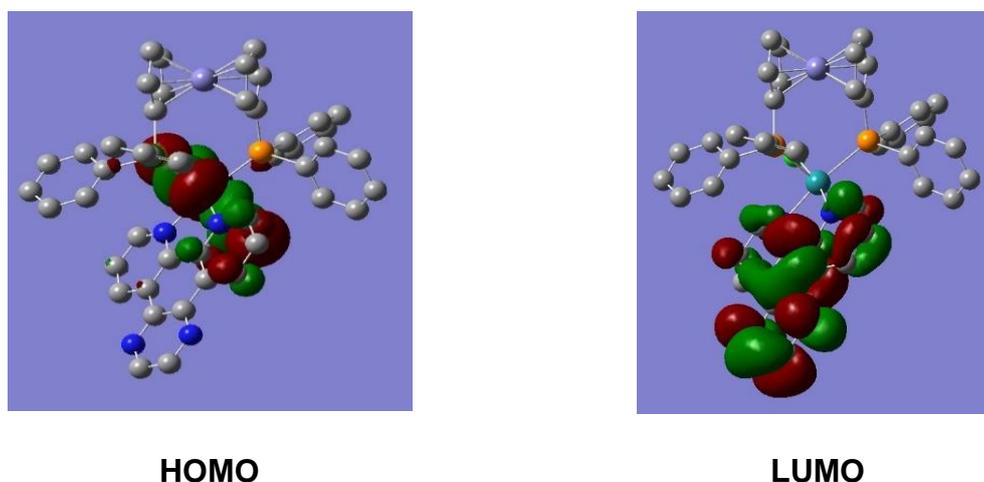


FIGURA 4.13 - Diagramas de contorno do precursor *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2**, mostrando os coeficientes de participação dos orbitais atômicos na formação dos orbitais de fronteira HOMO (esquerda) e LUMO (direita).

Com o intuito de estimar os potenciais das constantes de dissociação ácida (pK_a) dos ligantes livres dpq, dppz e dpqQX – valores não conhecidos –, foi construído o gráfico dos potenciais de oxidação (E_{pa}) da dupla redox Ru^{II}/Ru^{III} nos compostos *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)] (com N-N = fen, 2,2'-bipiridina (bipy), 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (4,4'-Me₂bipy) e 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (5,5'-Me₂bipy); Tabela 4.10)

em função do potencial de constante de dissociação ácida (pK_a) dos ligantes livres fen ($pK_a = 4,27$), bipy ($pK_a = 4,44$), 4,4'-Me₂bipy ($pK_a = 4,92$) e 5,5'-Me₂bipy ($pK_a = 5,01$) (Figura 4.14) (PAVAN, *et al.*, 2011; DOS SANTOS, *et al.*, 2013). Os valores de pK_a para os ligantes livres dpq, dppz e dpqQX obtidos a partir da equação da regressão linear elaborada, são apresentados na Tabela 4.11.

TABELA 4.11 – Estimativa do valor de pK_a dos ligantes livres dpq, dppz e dpqQX.

Ligante	pK_a estimado*
dpq	$4,0 \pm 0,6$
dppz	$4,1 \pm 0,6$
dpqQX	$3,4 \pm 0,5$

*Valores obtidos a partir da extrapolação linear da correlação do E_{pa} do par Ru^{II}/Ru^{III} dos complexos *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)] (N-N = fen, bipy, 4,4'-Me₂bipy e 5,5'-Me₂bipy) em função do pK_a dos ligantes bipyridínicos livres.

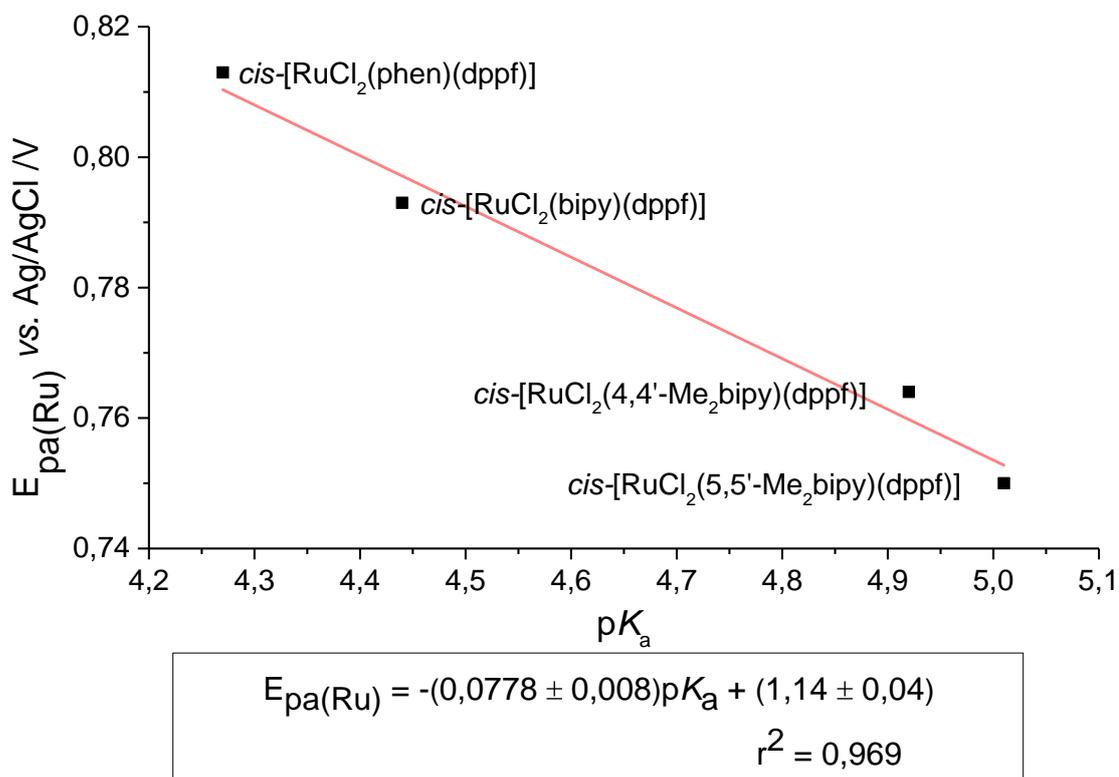


FIGURA 4.14 – Gráfico do potencial de oxidação do par redox Ru^{II}/Ru^{III} dos complexos *cis*-[RuCl₂(N-N)(dppf)] (N-N = fen, bipy, 4,4'-Me₂bipy e 5,5'-Me₂bipy) em função do pK_a dos ligantes bipyridínicos livres.

4.1.8 – Difração de Raios-X

Para os compostos **P2** e **P3**, foi possível obter monocristais adequados para difração de raios X mediante difusão lenta da mistura de solventes DCM/Éter etílico (os dados cristalinos e de refinamento são apresentados no apêndice 9, p. 95). Os dados coletados após difração permitiram verificar as estruturas propostas em configuração *cis*- (Figura 4.15), sendo estas estruturas análogas a aquela reportada para **P1** (GALLATTI *et al*, 2007). A geometria do íon Ru(II) nas estruturas **P1-P3** é um octaedro distorcido, como observado pelos valores dos ângulos de ligação P-Ru-P (na faixa de 96,85 – 99,37°), N-Ru-N (78,60 – 77,90°) e Cl-Ru-Cl (86,85 – 94,57°) (Tabela 4.12). Os comprimentos das ligações Ru-Cl para os cloros *trans*- ao fosforo são em torno de 0,05 Å maiores que para aqueles *trans*- aos nitrogênios, como esperado pelo efeito *trans* exercido pelo ligante dppf (Tabela 4.12). Em adição, os dois anéis de Cp do ligante dppf apresentam como conformação a *synclinal* (MCNAUGHT & WILKINSON, 2009), dado que os valores dos ângulos de torsão P-C-C-P (35,54° para **P1** (GALLATTI *et al*, 2007); 18,57° para **P2** e 20,39° para **P3**) estão na faixa $30 \geq \theta \geq 90^\circ$.

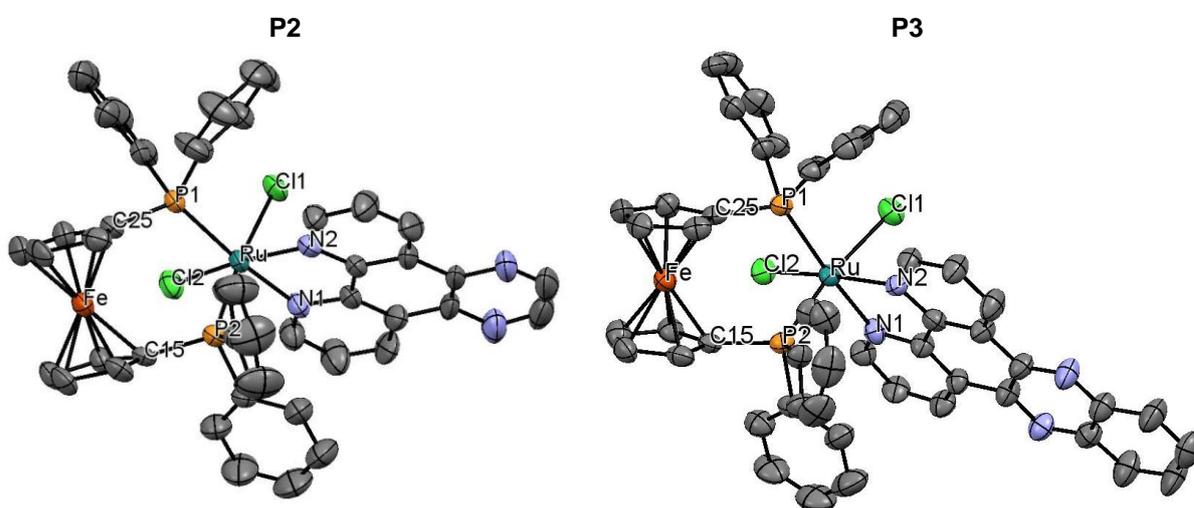


FIGURA 4.15 - Vista ORTEP dos complexos precursores *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)] (**P2**, esquerda) e *cis*-[RuCl₂(dppz)(dppf)] (**P3**, direita) com as elipsóides térmicas ao 50% de probabilidade. Os hidrogênios foram omitidos para uma maior clareza.

TABELA 4.12 - Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação selecionados das estruturas dos complexos precursores *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1**; *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2** e *cis*-[RuCl₂(dppz)(dppf)], **P3**.

Composto	P1 ^a	P2	P3
<i>Comprimentos de Ligação (Å)</i>			
Ru-Cl(1)	2,4621(8)	2,4659(16)	2,4825(16)
Ru-Cl(2)	2,4206(8)	2,4105(15)	2,4076(15)
Ru-N(1)	2,122(3)	2,102(4)	2,112(5)
Ru-N(2)	2,108(3)	2,106(4)	2,105(5)
Ru-P(1)	2,3664(8)	2,3430(15)	2,3506(17)
Ru-P(2)	2,3210(8)	2,2890(16)	2,2901(17)
Fe-C(15)	2,019(3)	2,018(5)	2,027(6)
Fe-C(25)	2,024(3)	2,052(6)	2,065(6)
<i>Ângulos de Ligação (°)</i>			
Cl(1)-Ru-Cl(2)	86,85(3)	91,74(5)	94,57(6)
N(1)-Ru-N(2)	78,60(10)	77,97(19)	77,90(19)
P(1)-Ru-P(2)	99,37(3)	97,23(5)	96,85(6)

a - GALLATTI *et al*, 2007

4.2 - Estudos de estabilidade em DMSO

Com o intuito de determinar o melhor co-solvente a empregar nos diferentes ensaios de interação com as biomoléculas BSA e DNA e na determinação da citotoxicidade *in vitro* dos mesmos (ao serem os compostos insolúveis em água), foram realizados testes qualitativos de solubilidade nos solventes DMSO, DMF, EtOH, no surfactante Tween 20, no tampão Tris (pH 7,4) e diretamente no meio de cultura celular a ser empregado na determinação dos valores de citotoxicidade. Para tanto, foram preparadas soluções de concentração^c 200 μmol·L⁻¹ de **1–4**. Dentro desta série de solventes, os compostos **1–4** apresentam total solubilidade apenas em DMSO.

A estabilidade dos compostos em DMSO foi testada empregando RMN de ³¹P{¹H}, ao ser este um solvente coordenante. Foram adquiridos espectros de soluções de **1–4** (1 mmol·L⁻¹) em DMSO. Após 48 h, foi observado que os espectros não correspondiam àqueles das soluções iniciais, observando-se além dos sinais correspondentes aos compostos **1–4**, sinais devidos à bifosfina dppf livre e a dppf

^c Valor escolhido ao ser a máxima concentração por ser testada nos ensaios de MTT.

bioxidada (dppfO₂), entre outras, como mostrado para **1** na Figura 4.16. Em adição, nenhum destes sinais corresponde aos observados nos estudos de estabilidade em DMSO para os precursores, onde permanecem em solução os complexos precursores e os derivados *cis*-[RuCl(N-N)(DMSO)(dppf)]⁺ (Figura 4.16).

Assim, os dados de RMN de ³¹P{¹H}, onde é mostrado que a dppf se labiliza em DMSO, sugerem que de fato o CO tem um efeito *trans* mais acentuado que a dppf. Desta forma quando a ligação Ru-P *trans* ao CO é labilizada, o ligante dppf se dissocia completamente do centro metálico. Esta observação está em acordo com o observado nos correspondentes estudos eletroquímicos, onde é evidenciado que nos complexos **1–4**, o monóxido de carbono compete de forma mais efetiva pelos elétrons *d* do rutênio, o qual nos indica que este é um melhor π-acceptor que a dppf.

Por tanto, os estudos de estabilidade em DMSO indicam que nos diferentes estudos de interação com as biomoléculas BSA e DNA e nos ensaios de citotoxicidade, a ser discutidos na frente, além dos compostos **1–4** em solução se têm a presença de traços da bifosfina dppf e do seu bióxido (dppfO₂) junto com outras espécies derivadas contendo DMSO, sugerindo como possibilidade a formação dos complexos [RuCl(CO)(DMSO)₂(N-N)]⁺ e [RuCl(DMSO)₃(N-N)]⁺. Assim, nas discussões a seguir, isto deverá ser levado a conta.

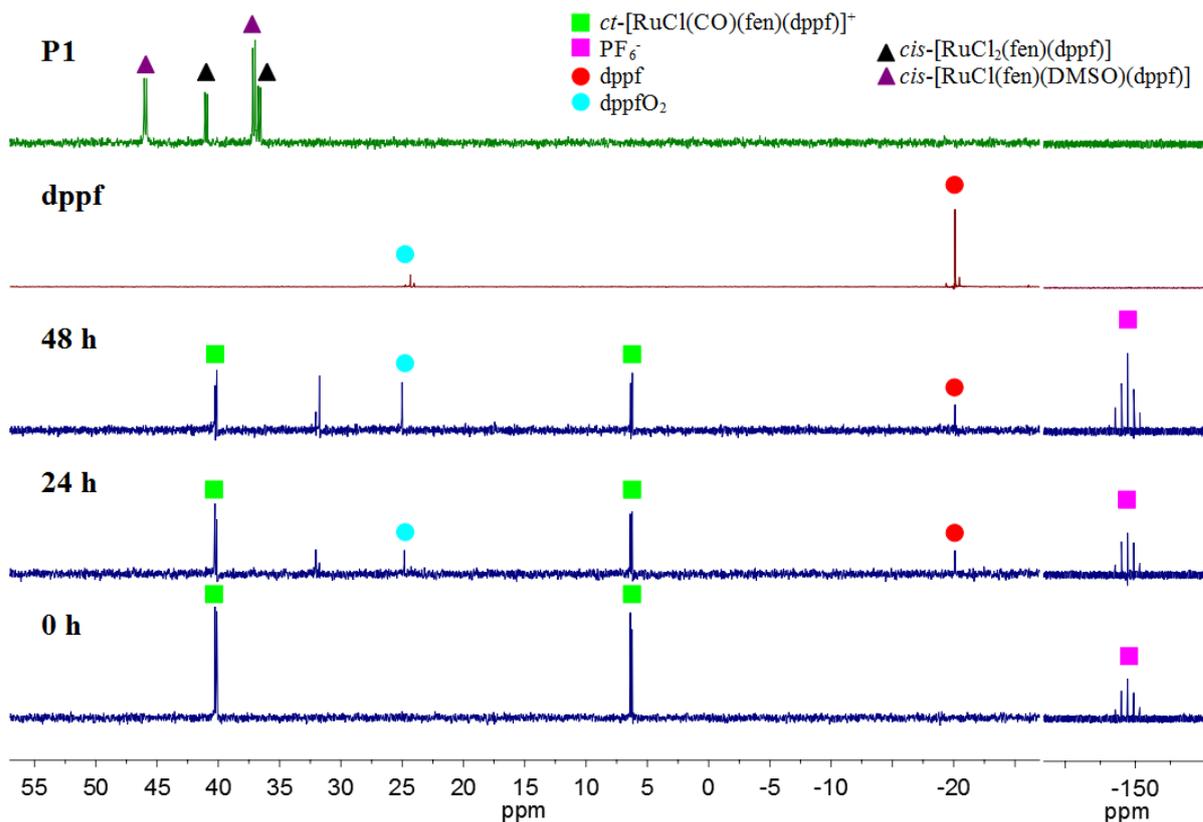


FIGURA 4.16 – Seguimento por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, nos tempos de 0, 24 e 48 h, da estabilidade de uma solução $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de **1** em DMSO, junto com os espectros de soluções $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, em DMSO, do ligante dppf e do precursor **P1**. Referência externa: capilar de D_2O .

4.3 – Estudos de interação com as biomoléculas BSA e DNA

4.3.1 – Estudos de interação com a BSA por titulações espectrofluorométricas

A interação entre os compostos **1–4** e a BSA, foi estudada mediante o seguimento do decaimento da fluorescência, em duas temperaturas diferentes, de uma solução de concentração conhecida da proteína em presença de quantidades crescentes dos compostos, como exemplificado para **2** na Figura 4.17. Em todos os casos, foi observado um decaimento na intensidade da fluorescência após adição dos compostos (sem atingir a supressão total da mesma com as concentrações de trabalho).

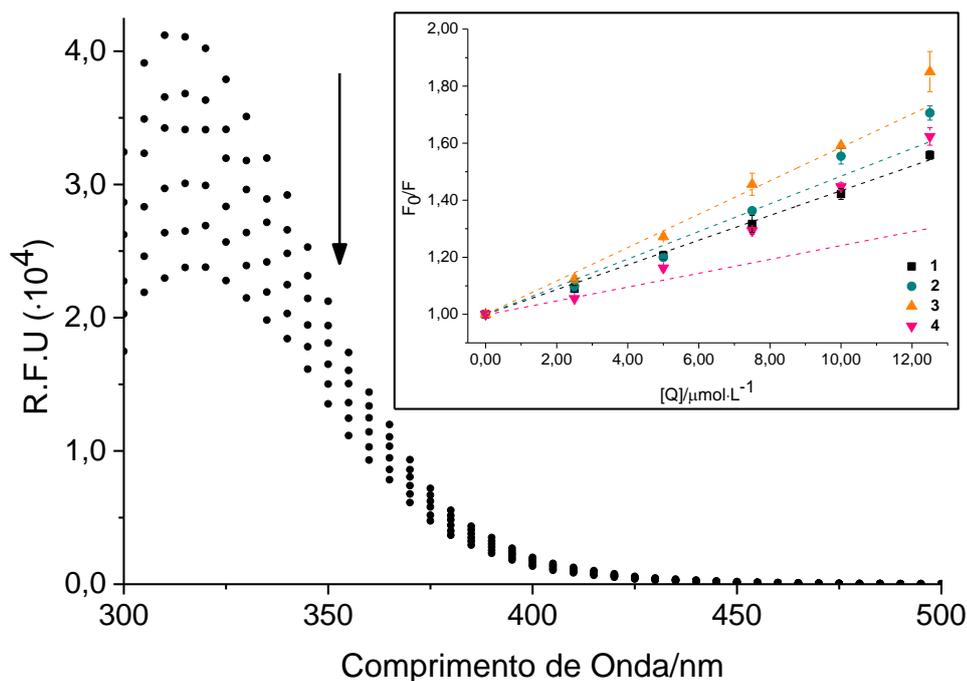


FIGURA 4.17 – Curvas de decaimento da fluorescência de uma solução de BSA ($2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em tampão Tris (pH 7,4) com quantidades crescentes de **2** (0 – $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Inserido: Gráficos de Stern – Volmer para **1–4** a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. A emissão foi monitorada a 315 nm .

Para determinar o mecanismo de supressão da fluorescência envolvido nos diferentes estudos de interação, foram analisados os gráficos de Stern – Volmer os quais representam a relação:

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

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência em ausência e presença dos compostos, respectivamente; K_{SV} , a constante de supressão da fluorescência de Stern-Volmer; K_q , a constante de supressão bimolecular; τ_0 , o tempo de vida médio da fluorescência ($6,2 \text{ ns}$) e $[Q]$ a concentração do composto supressor (GANESHPIANDIAN *et al.*, 2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2005). A partir destes gráficos (Figura 4.17) foi possível determinar que existe uma contribuição tanto do mecanismo estático como do mecanismo dinâmico nos processos de supressão da fluorescência da BSA em presença de **1–4**, o qual é sugerido pelo desvio da linearidade em direção ao eixo-y com o aumento na concentração dos compostos (PAPADOPOULOU *et al.*, 2005). No entanto, para os compostos **1–3** o principal mecanismo envolvido foi o estático já que os valores de K_{SV} diminuem enquanto aumenta a temperatura e os valores de K_q superam o valor permitido para o mecanismo de supressão dinâmico ($2,0\cdot 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (GANESHPIANDIAN *et al.*,

2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2005), como mostrado na Tabela 4.13. Como já tem sido descrito na literatura, no mecanismo estático a molécula supressora da fluorescência forma um aduto com a BSA no estado basal e com o aumento na temperatura a concentração desse aduto diminui o que leva a um decréscimo na supressão da fluorescência. Em contraste, no mecanismo dinâmico o número de colisões entre a molécula supressora da fluorescência e o estado excitado do fluoróforo incrementa junto com o aumento na temperatura o que acrescenta a supressão da fluorescência (CASTANHO & PRIETO, 1998).

Determinar o número de sítios de ligação por molécula de BSA (n) e o valor da constante de ligação composto – BSA (K_b) é uma boa aproximação se o mecanismo de supressão é estático (GANESHPIANDIAN *et al.*, 2014). Assim estes parâmetros, foram calculados para os compostos **1–3** mediante a relação:

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

TABELA 4.13 – Valores das constantes de Stern–Volmer (K_{SV}) e de supressão bimolecular (K_q) e magnitude do coeficiente de determinação (r^2) obtidos para os compostos **1–4**.

Composto	T (°C)	$K_{SV} \cdot 10^4$ (L·mol ⁻¹)	$K_q \cdot 10^{12}$ (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)	r^2
1	25	4,33±0,10	6,99	0,997
	37	3,99±0,13	6,44	0,995
2	25	4,84±0,11	7,81	0,997
	37	4,42±0,27	7,13	0,982
3	25	5,85±0,12	9,44	0,998
	37	5,46±0,19	8,81	0,994
4	25	2,43±0,34	3,91	0,909
	37	3,22±0,48	5,19	0,899

Em geral foi observado que existe aproximadamente um sítio de ligação por molécula de BSA (Tabela 4.14) o qual indica que (i) o sítio de ligação na BSA é único e (ii) o ambiente hidrofóbico do resíduo de triptofano é facilmente acessível pelos compostos (GAO *et al.*, 2004). A tendência na força de ligação obtida foi **2** (na ordem de 10^6) >> **3** > **1** (na ordem de 10^5) (Tabela 4.14). Finalmente, com os valores de K_b calculados, foi possível conhecer os parâmetros termodinâmicos das interações de **1–3** com a BSA empregando as seguintes relações:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

$$\ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H^0}{R} \quad (4)$$

Os valores de ΔG^0 negativos (Tabela 4.14) manifestam que os processos de interação de **1–3** com a BSA são espontâneos. Para **1**, os valores negativos de ΔH^0 e ΔS^0 indicam que principalmente forças de van der Waals são as responsáveis da interação composto-proteína, em quanto que para **2** e **3** os valores positivos de ΔH^0 e ΔS^0 sugerem principalmente a presença de forças hidrofóbicas (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981).

TABELA 4.14 – Valores do número de sítios de ligação por molécula (n), da constante de ligação (K_b) e dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os compostos **1–3**.

Composto	T (°C)	n	K_b	ΔG^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔH^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS^0 (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
1	25	1,12±0,03	(1,69±0,05)·10 ⁵	-29,83	-100,97	-238,74
	37	0,99±0,09	(3,50±0,35)·10 ⁴	-26,97		
2	25	1,34±0,05	(2,77±0,18)·10 ⁶	-36,75	15,61	175,71
	37	1,37±0,07	(3,53±0,29)·10 ⁶	-38,86		
3	25	1,13±0,04	(2,68±0,12)·10 ⁵	-30,97	75,79	358,24
	37	1,24±0,09	(8,76±0,92)·10 ⁵	-35,27		

4.3.2 – Estudos de interação com o DNA empregando medidas de viscosidade

Alterações no comprimento da dupla hélice do DNA geram mudanças em sua viscosidade (SATYANARAYANA *et al.*, 1992). Por conseguinte, medir a viscosidade de soluções de DNA em presença de complexos é uma técnica que permite estabelecer se estão presentes interações por intercalação clássica; interações por intercalação parcial/não clássicas ou interações eletrostáticas. Na intercalação clássica, existe um aumento no comprimento do contorno do DNA pela separação das bases nitrogenadas após intercalação dos complexos o que aumenta a viscosidade (LERMAN, 1961). As interações por intercalação parcial/não clássica geram uma torção na dupla hélice do DNA o que diminui seu comprimento e viscosidade (SATYANARAYANA *et al.*, 1993). Na interação eletrostática ou por ligação nos sulcos, a viscosidade permanece constante ao não sofrer o contorno do DNA uma mudança significativa (LIU *et al.*, 1999).

Para os compostos **1–4** os perfis de viscosidade obtidos do CT-DNA na sua presença, mostraram como tendência uma diminuição não uniforme da mesma,

o que exclui como modo de interação o intercalativo clássico. Caso contrário foi o observado para a cloroquina difosfato, molécula empregada como agente intercalador clássico de referência (VILLARREAL *et al.*, 2015) (Figura 4.18). Para **1–4**, o tipo de mudança gerada na viscosidade do CT-DNA, pode indicar a presença de interações por intercalações parciais o não clássicas como determinado para os complexos Δ -[Ru(fen)₃]²⁺ (SATYANARAYANA *et al.*, 1993) e [Ru(bipy)₂(CIP)]²⁺ (XIONG *et al.*, 1999), os quais também geram uma diminuição geral da viscosidade do CT-DNA conforme aumenta a concentração de complexo, apresentando quedas e subidas no seu perfil. No entanto, uma interação covalente não pode ser descartada. Como visto nos estudos de estabilidade, em presença do DMSO a dppf sai da esfera de coordenação o que leva a ter pelo menos dois sítios de ligação do Ru(II) livres, permitindo ao centro metálico estabelecer ligações com às bases nitrogenadas do DNA.

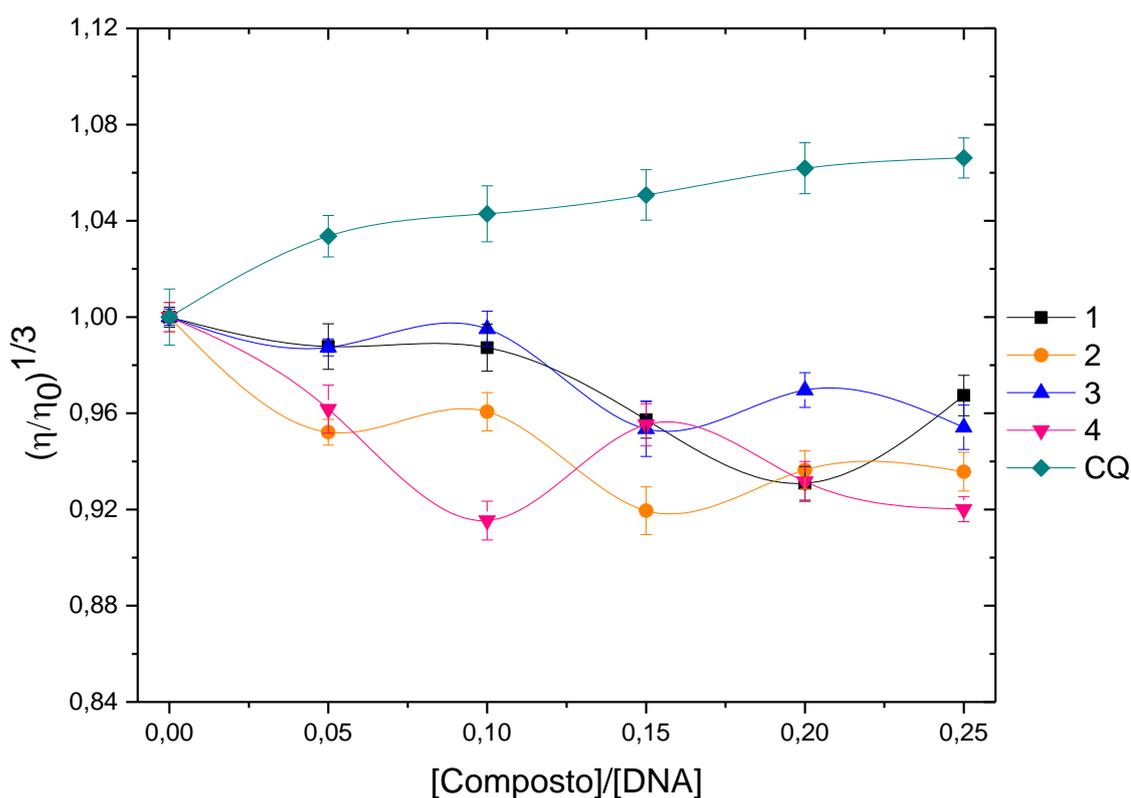


FIGURA 4.18 - Efeito do aumento da concentração dos compostos **1–4** e da cloroquina difosfato (CQ, referência) sobre a viscosidade relativa do CT-DNA. $T = 26,5 \pm 0,5$ °C.

4.3.3 – Estudos de interação com DNA empregando dicroísmo circular

Empregando a técnica de dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) podem ser estudadas mudanças na conformação secundária do DNA causadas pela interação com complexos. O espectro de CD do CT-DNA em solução aquosa, que assume a conformação B, apresenta um mínimo em 248 nm (devido a rotação à direita da dupla hélice) e um máximo a 275 nm (devido ao empilhamento das bases nitrogenadas). Uma interação por intercalação clássica incrementa a intensidade destas bandas ao estabilizar a conformação B enquanto que ligações nos sulcos e interações eletrostáticas não geram alterações significativas no espectro CD do CT-DNA (NORDÉN & TJERNELD, 1994).

Os espectros de CD tomados para soluções de CT-DNA em presença dos compostos **1**, **2** e **4** (Figura 4.19), não mostraram mudanças significativas na banda positiva do espectro ao comparar com o espectro do CT-DNA na ausência dos mesmos, o que indica que a interação entre estes não leva alterações no empilhamento das bases, o que exclui de novo a possibilidade de ter intercalações clássicas dos compostos entre as bases do DNA. Este comportamento estaria em acordo com interações via intercalação nos sulcos (intercalação não clássica) e/ou interações eletrostáticas (SAHOO, *et al.*, 2010; MATI, *et al.*, 2013; GOSH, *et al.*, 2014). Em contraste, a banda negativa diminui sua intensidade com o aumento na concentração de **1**, **2** e **4**, o qual é atribuído à interferência causada pela resposta inerente dos compostos nesta região a qual é devida a transições centradas na dppf e nas α,α' -diiminas (HIDAKA & DOUGLAS, 1964). Para o caso específico de **3** ocorre uma saturação maior da resposta, ao observar que o espectro de CD para o $n = 0,6$ apresenta praticamente a mesma resposta que para o espectro do composto livre na região entre 240 e 262 nm, o que faz com que o aumento na intensidade da banda positiva não possa ser simplesmente atribuído a alterações no empilhamento das bases do CT-DNA.

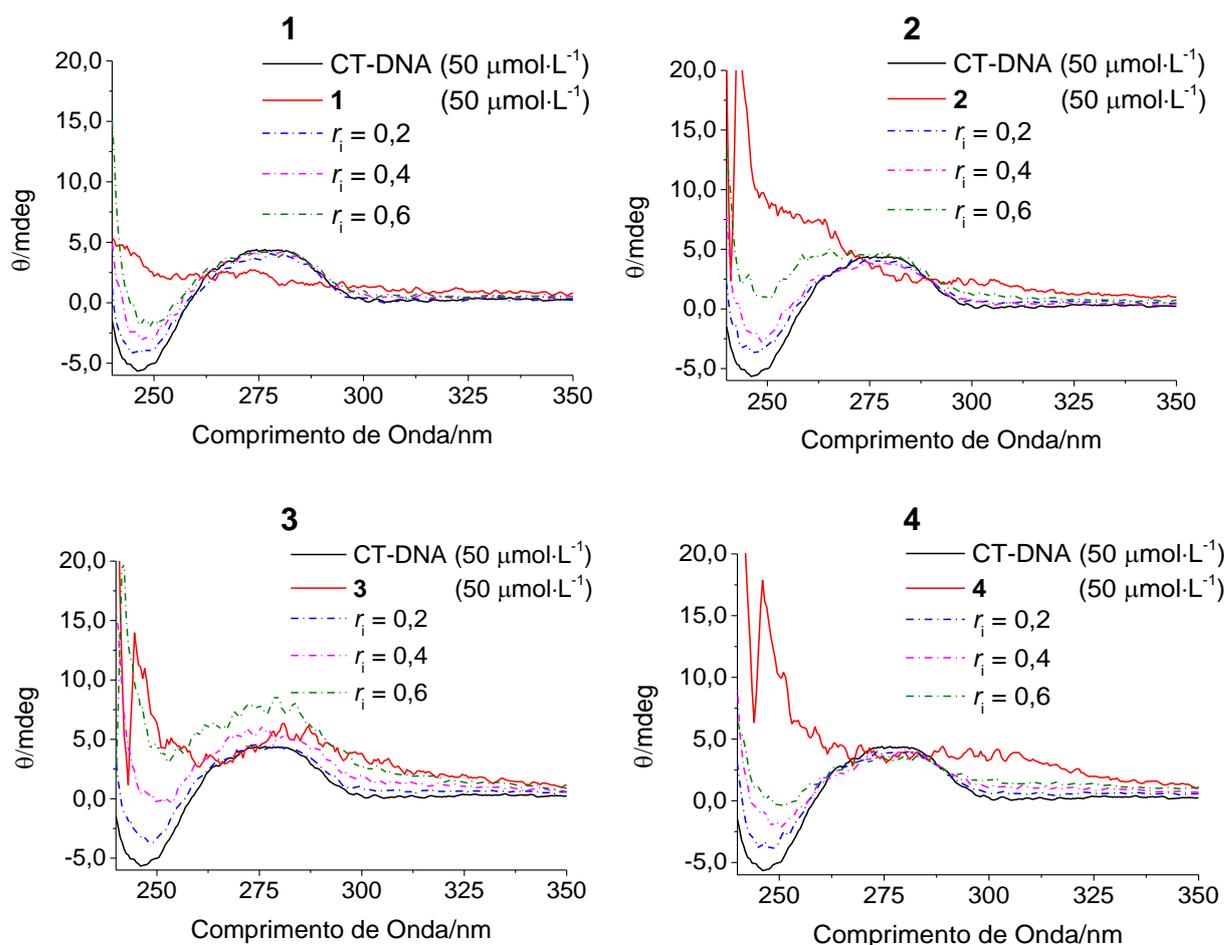


FIGURA 4.19 - Efeito do aumento da concentração dos compostos **1–4** sobre o espectro de dicroísmo circular do CT-DNA ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), em tampão Trizma (pH 7,4), após incubação a $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18 h.

4.3.4 – Estudos de interação com o DNA por titulações espectrofotométricas

Mediante a técnica de titulações espectrofotométricas, são monitoradas mudanças nos espectros de absorção na região do ultravioleta de soluções dos compostos de interesse depois da adição de DNA. A partir destas mudanças podem ser determinados valores de constantes de ligação. No entanto, esta técnica não é viável se existem absorções fracas ou superposição das transições eletrônicas com aquelas da molécula de DNA em 260 e 280 nm (SIRAJUDDIN *et al.*, 2013), como em nosso caso (Figura 4.20).

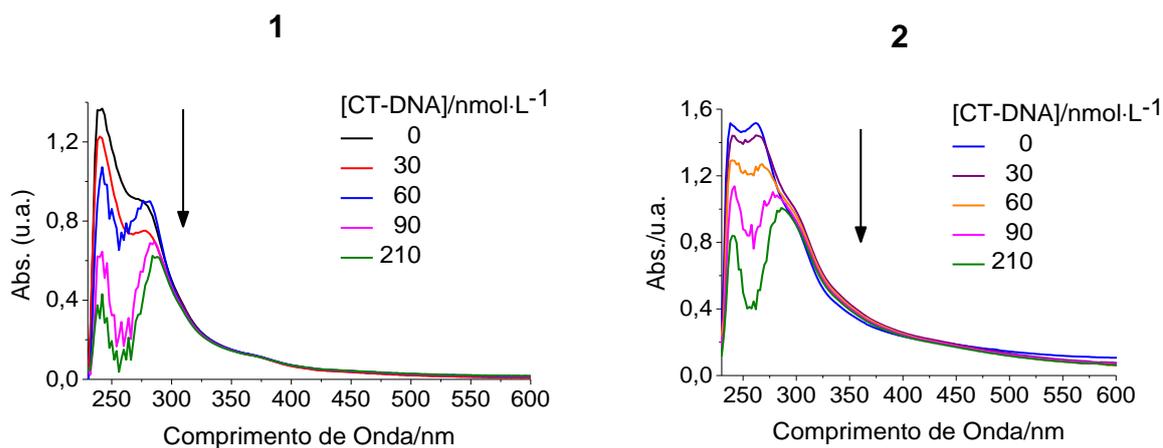


FIGURA 4.20 – Comportamento dos estudos de interação com CT-DNA empregando titulações espectrofotométricas dos compostos **1** (esquerda) e **2** (direita).

4.3.5 – Estudos de interação com DNA empregando voltametria de onda quadrada

A resposta eletroquímica de um dado complexo pode sofrer alterações na presença do DNA (SIRAJUDDIN *et al.*, 2013). Interações por intercalação provocam um deslocamento do potencial de meia-onda a maiores valores; interações eletrostáticas diminuem este potencial já que ocorre uma transferência de elétrons do DNA para o complexo e interações covalentes, ao gerar novas espécies, levam a aparição de novos processos redox.

Os estudos de interação de **1–4** com o DNA mediante esta técnica não conseguiram ser realizados ao não conseguir atingir o processo de oxidação do centro de rutênio na janela de potencial de trabalho, tornando esta técnica inadequada. Como observado nos estudos eletroquímicos dos complexos, o metaloceno na estrutura da dppf pode amortecer – eletroquimicamente – mudanças na esfera de coordenação do rutênio, pelo qual análises centrados exclusivamente no processo Fe(II)/Fe(III), podem levar a falsos positivos ou negativos.

No entanto, foi estudada a interação dos precursores **P1** e **P2** com o DNA para avaliar uma possível interação por intercalação (para **P3** e **P4**, não foi possível obter reprodutibilidade no experimento por precipitação).

Assim, após adição do CT-DNA foi observado o deslocamento a maiores potenciais junto com uma diminuição na corrente registrada para os

processos redox $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ para **P1** e **P2** (Figura 4.21). Este comportamento sugere como modo de interação complexo/DNA o intercalativo.

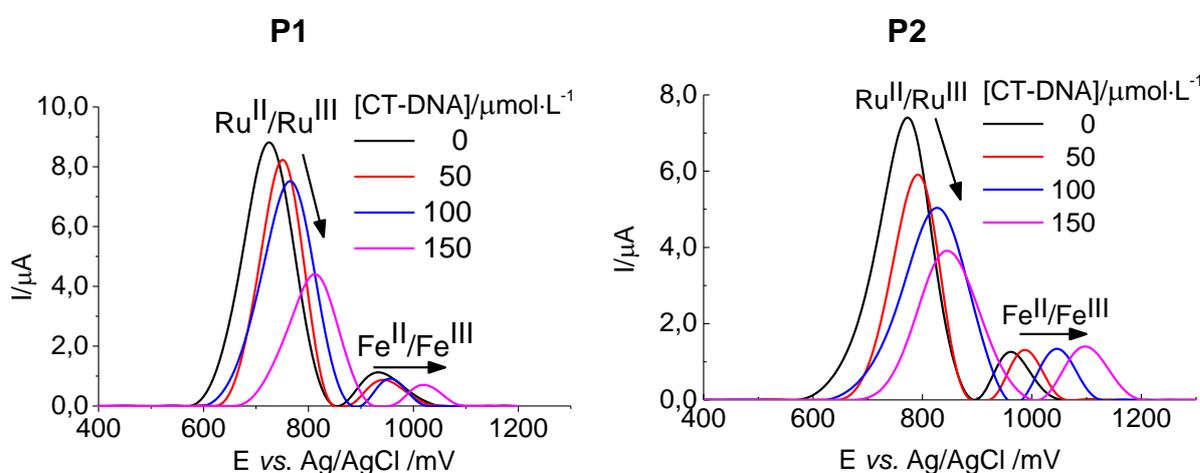


FIGURA 4.21 - Comportamento do voltamograma de onda quadrada de **P1** (esquerda) e **P2** (direita) empregando um eletrodo de carbono vítreo (vs. Ag/AgCl) com quantidades crescentes de CT-DNA (0 – 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em uma solução 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de PTBA em DMSO/Tampão Tris-pH 7,4 (3:10).

A partir dos dados obtidos, é possível determinar o valor da constante de interação complexo/biomolécula (K) empregando a relação:

$$\log \frac{1}{[\text{DNA}]} = \log K + \log \frac{I_{\text{H-G}}}{[I_{\text{G}} - I_{\text{H-G}}]} \quad (5)$$

Onde $I_{\text{H-G}}$ e I_{G} são as correntes registradas para o complexo em presença e em ausência do CT-DNA, respectivamente (SIRAJUDDIN *et al.*, 2013). Desta forma, os valores obtidos para as constantes de interação foram $K_{\text{P1}} = (6,2 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $K_{\text{P2}} = (5,74 \pm 0,06) \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4.4 – Determinação da citotoxicidade celular *in vitro*

As células viáveis (que apresentam atividade metabólica) são capazes de reduzir o MTT (que apresenta coloração amarela) ao formazan, o qual exibe uma coloração azul/púrpura, graças a que este processo é dependente do ciclo metabólico dos cofatores NADH e NADPH (ALBERTS *et al.*, 2004). Assim, o ensaio MTT é um ensaio colorimétrico que permite determinar o número de células viáveis após exposição a um agente determinado e de maneira indireta a citotoxicidade do mesmo, a qual está dada pelo valor do IC_{50} .

Como primeiro screening para determinar a viabilidade dos compostos **1–4** de atuar como agentes citotóxicos foram executados ensaios MTT nas linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231 e de fibroblasto de pulmão de camundongo V79-4 (célula normal), com um período de exposição aos mesmos de 48 h. Os resultados obtidos (Tabela 4.15) mostram que todos os compostos exibem efeitos citostáticos sobre as células com doses significativamente menores que aquelas necessárias para atingir o mesmo resultado empregando os ligantes dppf e N-N livres ou a cisplatina (fármaco de referência), sendo o composto **1** o que apresentou os melhores valores de citotoxicidade e de índice de seletividade (e a menor afinidade pela BSA). Na Figura 4.22, são mostradas as curvas da porcentagem de viabilidade celular em função da concentração para cada um dos compostos.

Em comparação com o valor de $IC_{50/48h}$ na linhagem MDA-MB-231 obtido para o composto análogo $ct-[RuCl(CO)(dpqQX)(dppb)]PF_6$ (Tabela 4.15), é observada uma diminuição no efeito citostático, o que indica que nesta linhagem a coordenação da dppf em substituição da dppb diminui a atividade citotóxica, pelo menos, do composto carbonílico apresentado neste trabalho contendo a dpqQX (**4**).

Determinou-se também o valor de citotoxicidade *in vitro* do composto **1** com 24 h de exposição frente à linhagem MDA-MB-231 (Tabela 4.15; Figura 4.23), sendo que o valor de $IC_{50/24h}$ obtido é aproximadamente 6 vezes maior que aquele determinado para 48 h. Quando comparamos os valores de $IC_{50/24h}$ de **1** e do composto análogo $ct-[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF_6$ frente à linhagem MDA-MB-231 (Tabela 4.15), vemos como **1** é oito vezes mais ativo.

Por último, tentando avaliar se a atividade citotóxica é devida às espécies $ct-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]^+$ ou a alguma das espécies derivadas em solução de DMSO, realizou-se também o teste de viabilidade celular empregando soluções $200 \mu mol \cdot L^{-1}$ de **1–4** em DMSO armazenadas por 5 dias a temperatura ambiente, sendo que estas não apresentaram nenhum efeito citostático. Assim, o efeito citotóxico observado em cada um dos casos é atribuído principalmente às espécies $ct-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]^+$ em solução.

Para os precursores **P1-P4**, não foi possível atingir uma concentração de trabalho adequada em DMSO ($200 \mu mol \cdot L^{-1}$) para elaborar os testes de citotoxicidade.

TABELA 4.15 – Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtidos pelo ensaio MTT nas linhagens MDA-MB-231 e V79-4 para os compostos 1–4, os ligantes dppf e N-N, a cisplatina e compostos análogos.

Composto	MDA-MB-231	V79-4	IS**
	IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) - 48 h		
1, <i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF ₆	0,21 ± 0,02	1,33 ± 0,04	6,33 ± 0,13
2, <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF ₆	0,81 ± 0,01	3,28 ± 0,28	4,05 ± 0,10
3, <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF ₆	1,02 ± 0,09	2,34 ± 0,36	2,29 ± 0,24
4, <i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF ₆	0,78 ± 0,08	3,76 ± 0,09	4,82 ± 0,13
dppf	> 50	> 50	--
fen	> 50	> 50	--
dpq	> 50	> 50	--
dppz	> 50	> 50	--
dpqQX	> 50	> 50	--
cisplatina*	2,43 ± 0,19	21,60 ± 1,28	8,85 ± 0,14
<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppb)]PF ₆ ^a	0,10 ± 0,22	ND	--
	IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) - 24 h		
1, <i>ct</i> -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF ₆	1,20 ± 0,04	ND	--
<i>ct</i> -[RuCl(CO)(bipy)(dppb)]PF ₆ ^b	9,8 ± 4,2	ND	--

*Fármaco de referência. **IS = $IC_{50}V79/IC_{50}MDA-MB-231$. ND = Não determinado. a- (BAROLLI, 2013). b- (FRAZÃO, 2013)

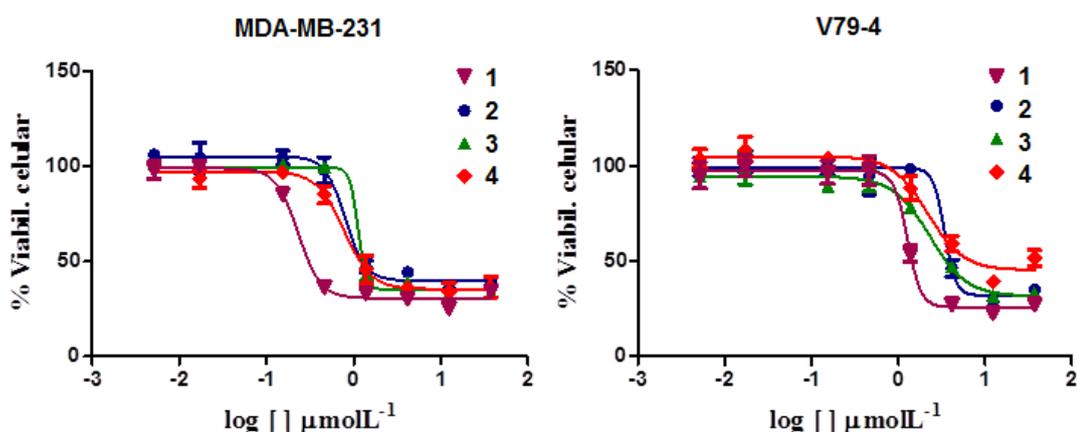


FIGURA 4.22 – Curvas do ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT para as linhagens MDA-MB-231 (esquerda) e V79-4 (direita) tratadas com os compostos 1–4 por 48 h.

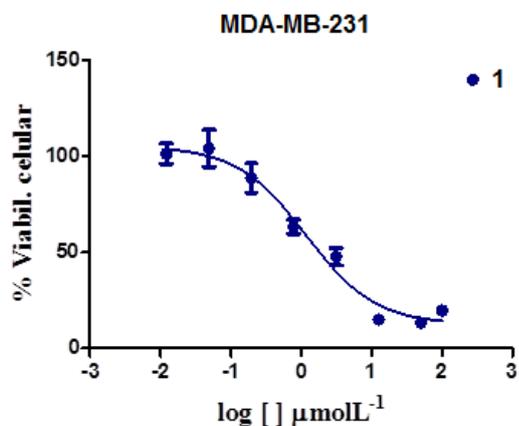


FIGURA 4.23 – Curva do ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT na linhagem MDA-MB-231 tratada com o composto 1 por 24 h.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Os compostos de fórmula geral $cis-[RuCl(CO)(N-N)(dppf)]PF_6$, com N-N = 1,10-fenantrolina (fen); dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina (dpq); dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz); dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalino[2,3-*b*]quinoxalina (dpqQX) e dppf = 1,1'-bis (difenilfosfino)ferroceno, foram sintetizados a partir dos correspondentes complexos precursores de fórmula $cis-[RuCl_2(N-N)(dppf)]$.

A ordem de ligação do CO nos compostos **1–4** aumenta conforme acrescenta a conjugação dos ligantes poli-N-heterocíclicos, qual é evidenciado pelas frequências de vibração observadas para o grupo carbonila nos diferentes espectros de absorção na região do IV. Ao mesmo tempo, comparando com espectros IV de compostos análogos contendo como bifosfina a dppb pode-se ratificar que a dppf apresenta uma menor capacidade σ -dadora (menor basicidade) que a dppb, provavelmente devido a uma melhor capacidade π -aceptora, como descrito na literatura (O'CONNOR & NATARO, 2004).

Frente aos compostos precursores, a coordenação do CO dificulta as transições eletrônicas do tipo 'TCML' centradas no rutênio, como observado a partir dos espectros UV-vis. Isto reflete uma baixa densidade eletrônica no rutênio (II) nos compostos **1–4**. O anterior também é evidenciado na eletroquímica dos compostos: após coordenação do grupo carbonila nos voltamogramas cíclicos em DCM (*vs.* Ag/AgCl) é observado, na janela de potencial de trabalho, unicamente um processo quase-reversível em torno de 950 mV atribuído a dupla Fe(II)/Fe(III), enquanto nos precursores foram observados os processos redox Ru(II)/Ru(III) (em torno a 740 mV) e Fe^{II}/Fe^{III} (em torno 1070 mV). Este comportamento já tinha sido observado para compostos análogos contendo a dppb e outros metalo-carbonilas contendo bifosfinas (FRAZÃO; 2007; BAROLLI, 2013; MILLER, *et al.*, 1989; OHS, *et al.* 2004). Como esperado, a variação do processo redox do Fe(II) da dppf após coordenação do CO foi amortecido evidenciando a capacidade do grupo ferroceno de atuar como tampão eletrônico.

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C{¹H} e ³¹P{¹H} mostraram que os núcleos da dppf apresentam uma blindagem após coordenação do grupo carbonilo ao comparar com os espectros dos complexos precursores. Em todos os casos, o número de

sinais observados nos espectros confirmou a ausência de elementos de simetria nos compostos **1–4**.

Titulações espectralfluorométricas mostraram interações fortes e espontâneas de **1–3** com a BSA por meio de um único sítio de interação resultando em constantes de interação na ordem de $10^{-4} - 10^{-6} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 310 K, seguindo um mecanismo de supressão da fluorescência principalmente estático. As principais forças responsáveis da interação composto-proteína são forças de van der Waals para **1** e forças hidrofóbicas para **2** e **3**. No caso particular de **4**, o principal mecanismo de supressão da fluorescência foi o dinâmico, fato pelo qual não foi possível determinar o valor da constante de supressão e os parâmetros termodinâmicos.

Medidas de viscosidade e dicroísmo circular mostram que os compostos **1–4** interagem com o CT-DNA via intercalação não clássica ou por interações eletrostáticas. Titulações espectrofotométricas e o emprego de voltametria de onda quadrada não foram técnicas adequadas para o estudo de interação de **1–4** com o CT-DNA.

Ensaio MTT mostraram que **1–4** são citotóxicos frente às linhagens de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50/48\text{h}} = 0,19 - 1,11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e de fibroblasto normal de camundongo V79-4 ($\text{IC}_{50/48\text{h}} = 1,29 - 3,85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; célula normal), sendo **1** o composto mais ativo. Estes valores de IC_{50} refletem uma maior atividade inibitória de **1–4** quando comparado com a apresentada pela cisplatina (fármaco de referência). No entanto fatores como a baixa solubilidade em diferentes solventes e a rápida reação dos mesmos com DMSO (co-solvente em testes biológicos), limitam o emprego de **1–4** como agentes citotóxicos promissores.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS

- ALAMA, A.; TASSO, B.; NOVELLI, F. & SPARATORE, F. "Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents". *Drug Discov. Today*, 14(9–10): 500, 2009.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 235-331.
- ALLARDYCE, C. S. & DYSON, P. J. "Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects". *Platin. Met. Rev.*, 45(2): 62, 2001.
- ANTONARAKIS, E.S. & EMADI, A. "Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time?". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66(1): 1, 2010.
- ARMAREGO, W. & CHAI LI LIN, C. *Purification of Laboratory Chemicals*. 7 ed. Oxford, Butterworth-Heinemann, 2013. p. 1002.
- ASTANHO, M. A. R. & PRIETO, M. J. "Fluorescence quenching data interpretation in biological systems". *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1373(1): 1, 1998.
- ATKINS, P.; OVERTON, T.; ROURKE, J.; WELLER, M. & ARMSTRONG, F. *Shriver & Atkins' Inorganic Chemistry*. 4a ed. Oxford, Oxford University Press, 2006. cap: 21.
- BANNENBERG, G. L. & VIEIRA, H. L. "Therapeutic applications of the gaseous mediators carbon monoxide and hydrogen sulfide". *Expert. Opin. Ther. Pat.* **19**: 663, 2009.
- BAROLLI REIS, J.P. *Complexos de Rutênio (II) com Potenciais Atividades Antitumorais: Síntese, Caracterização e Ensaio Biológicos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de doutorado, 234 p.
- BARRY, N.P.E & SADLER, P.J. "100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs". *Pure Appl. Chem.*, 86(12): 1897, 2014.
- BATISTA, A.A.; SANTIAGO, M.O.; DONNICI, C.L.; MOREIRA, I.S.; HEALY, P.C.; BERNERS-PRICE, S.J. & QUEIROZ, S.L. "Electrochemical and spectroscopic studies on $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N})_2$ and $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N-N})$ complexes (N = pyridine derivatives and N-N = phenanthroline or bipyridine derivatives). X-ray structure of $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{phen})$ ". *Polyhedron*, **20**: 2123, 2001.
- BERGAMO, A. & SAVA, G. "Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs". *Dalton Trans.*, 40(31): 7817, 2011.
- BRAGA, S.S. & SILVA, A.M.S. "A new age for iron: Antitumoral ferrocenes". *Organometallics*, 32(20): 5626, 2013.
- CARTER, D.C. & HO, J.X. "Structure of Serum Albumin". *Adv. Prot. Chem.*, **45**: 153, 1994.
- CHIEN, S.W. & HOR, T.S.A. "The coordination and homogeneous catalytic chemistry of 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene and its chalcogenide derivatives" EM: *Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules*. STEPNIČKA, P. (Ed.). West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd., 2008. cap. 2.
- COE, B.J. & GLENWRIGHT, S.J. "Trans-effects in octahedral transition metal complexes". *Coord. Chem. Rev.*, 203(1): 5, 2000.

CURRY, S.; MANDELKOW, H.; BRICK, P. & FRANKS, N. "Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites". *Nat. Struct. Biol.*, 5(9): 827, 1998.

CURRY, S.; BRICK, P. & FRANKS, N.P. "Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies". *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1441(2-3): 131, 1999.

DOS SANTOS, E.R.; MONDELLI, M.A.; POZZI, L.V.; CORREA, R.S.; SALISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; ELLENA, J.; MALTA, V.R.S.; MACHADO, S.P. & BATISTA, A.A. "New ruthenium(II)/phosphines/diimines complexes: promising antitumor (human breast cancer) and *Mycobacterium tuberculosis* fighting agents". *Polyhedron*, 51(1): 292, 2013.

EPTON, R.; HOBSON, M.E. & MARR, G.J. "Oxidation of ferrocene and some substituted ferrocenes in the presence of horseradish peroxidase". *Organomet. Chem.*, 149(2): 231, 1978.

ESPÓSITO, B.P. & NAJJAR, R. "Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin". *Coord. Chem. Rev.*, 232(1-2): 137, 2002.

FIORINA, V.J.; DUBOIS, R.J. & BRYNES, S. "Ferrocenyl polyamines as agents for the chemoimmunotherapy of cancer". *J. Med. Chem.*, (21): 4, 393, 1978.

FRAZÃO BARBOSA, M. I. Complexos Carbonílicos de Rutênio. "De um Gás Tóxico a uma Droga com Potencial Agente Citotóxico". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Dissertação de mestrado, 105 p.

FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; GOTTLIEB, H. E.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B. M.; BERCAW, J. E. & GOLDBERG, K. I. "NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist". *Organometallics*, 29(9): 2176, 2010.

GALLATTI, T. F.; BOGADO, A. L.; VON POELHSITZ, G.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A. & DE ARAÚJO, M. P. "Heterobimetallic [Ru(II)/Fe(II)] complexes: on the formation of trans- and cis-[RuCl₂(dppf)(diimines)]". *J. Organomet. Chem.*, 692(24): 5447, 2007.

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

GAO, H.; LEI, L. D.; LIU, J. Q.; KONG, Q.; CHEN, X. G. & HU, Z. D. "The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods". *J. Photochem. Photobiol. a-Chemistry*, 167(2-3): 213, 2004.

GARCIA VELHO, R. Medidas de Condutividade na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de mestrado, 170 p.

GHOSH, S.; KUNDU, P.; PAUL, B.K. & CHATTOPADHYAY, N. "Binding of an anionic fluorescent probe with Calf Thymus DNA and effect of salt on the probe-DNA

binding: a spectroscopic and molecular docking investigation". *RSC Adv.*, 4(108): 63549, 2014.

GUO, Z. & SADLER P.J. "Medicinal inorganic chemistry" IN: *Advances in Inorganic Chemistry*. Vol. 49. SYKES, A.G. (Ed.) San Diego, Academic Press, 1999, p. 183.

HANAHAHAN D. & WEINBERG, R.A. "Review hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, 144(5): 646, 2011.

HE, X.M. & CARTER, D.C. "Atomic structure and chemistry of human serum albumin". *Nature*, 358(6383): 209, 1992.

HIDAKA, J & DOUGLAS, B.E. "Circular dichroism of coordination compounds. II. Some metal complexes of 2,2'-dipyridil and 1,10-phenanthroline". *Inorg. Chem.*, 3(8): 1180, 1964.

HILL, A. F. *Organotransition Metal Chemistry*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2002. p. 45.

HOULTON, A.; ROBERTS, R. M. G. & SILVER, G. J. "Studies on the anti-tumour activity of some iron sandwich compounds". *Organomet. Chem.*, 418(1): 107, 1991.

KÖPF-MAIER, P.; KÖPF, H. & NEUSE, E. W. "Ferrocenium salts — the first antineoplastic iron compounds". *Angew. Chem.*, 23(6): 456, 1984.

LERMAN, L. S. "Structural considerations in the interaction of DNA and acridines". *J. Mol. Biol.*, 3(1): 18, 1961.

LIMA, B.A.V.; CORRÊA, R.S.; GRAMINHA, A.E.; KUZNETSOV, A.; ELLENA, J.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F. & BATISTA, A.A. "Anti-*Mycobacterium tuberculosis* and cytotoxicity activities of ruthenium(II)/bipyridine/diphosphine/pyrimidine-2-thiolate complexes: the role of the non-coordinated N-atom". *J. Braz. Chem. Soc.*, 27(1): 30, 2016.

LIU, H.K. & SADLER, P.J. "Metal complexes as DNA intercalators". *Acc. Chem. Res.* **44**: 349, 2011.

LIU, J.G.; YE, B.H.; LI, H.; ZHEN, Q.X.; JI, L.N. & FU, Y.H. "Polypyridyl ruthenium (II) complexes containing intramolecular hydrogen-bond ligand: syntheses, characterization, and DNA-binding properties". *J. Inorg. Biochem.*, 76(3–4): 265, 1999.

MA, G.; MCDONALD, R.; FERGUSON, M.; CAVELL, R. G.; PATRICK, B. O.; JAMES, B. R. & HU, T. Q. "Ruthenium(II) diphosphine/diamine/diimine complexes and catalyzed hydrogen-transfer to ketones". *Organometallics*, 26(2): 846, 2007.

MATI, S.S.; ROY, S.S.; CHALL, S.; BHATTACHARYA, S. & BHATTACHARYA, S.C. "Unveiling the groove binding mechanism of a biocompatible naphthalimide-based organoselenocyanate with *Calf Thymus* DNA: an 'Ex Vivo' fluorescence imaging application appended by biophysical experiments and molecular docking simulations". *J. Phys. Chem. B*, 117(47): 14655, 2013.

MARTIN, R. H.; DEFAY, N.; CEERTS-EVRARD, F. & BOGAERT-VERHOOGEN, D. "Applications of NMR spectroscopy in the field of polycondensed aromatic systems —XIV: Spectra of 26 polycondensed aza-aromatic derivatives — well resolved long-range cross-ring couplings". *Tetrahedron Suppl.*, **8**: 181, 1966.

MCNAUGHT A. D. & WILKINSON, A. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2a ed., Research Triangle Park, IUPAC, 2009. p. 1547.

MOTSWAINYANA, W. M. & AJIBADE, P. A. "Anticancer activities of mononuclear ruthenium (II) coordination complexes". *Adv. Chem.*, **2015**: 1, 2015.

MU, C.; CHANG, S.W.; PROSSER, K.E.; LEUNG, A.W.Y.; SANTACRUZ, S.; JANG, T.; THOMPSON, J.R.; YAPP, D.T.T.; WARREN, J.J.; BALLY, M.B.; BEISCHLAG, T.V. & WALSBY, C.J. "Induction of cytotoxicity in pyridine analogues of the anti-metastatic Ru(III) complex NAMI-A by ferrocene functionalization". *Inorg. Chem.*, **55**(1): 177, 2016.

MUHAMMAD, N. & GUO, Z. "Metal-based anticancer chemotherapeutic agents". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **19**: 144, 2014.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry. 6a ed. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 132.

NIH - National Cancer Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/research/areas/treatment>>. Acessado em: 17 de dezembro de 2015.

NIH - U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://www.nlm.nih.gov/services/ctphases.html>>. Acessado em: 20 de janeiro de 2016.

NORDÉN, B. & KURUCSEV, T. "Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism". *J. Mol. Recognit.*, **7**:141, 1994.

MOTTERLINI, R. & OTTERBEIN, L.E. "The therapeutic potential of carbon monoxide". *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**(9): 728, 2010.

O'CONNOR, A.R. & NATARO, C. "Determination of the basicity of 1,1'-bis(diphenylphosphino)metallocenes". *Organometallics*, **23**(3): 615, 2004.

ORNELAS, C. "Application of ferrocene and its derivatives in cancer research". *New J. Chem.*, **35**(10): 1973, 2011.

PAPADOPOULOU, A.; GREEN, R. J. & FRAZIER, R. A. "Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study". *J. Agric. Food Chem.*, **53**(1): 158, 2005.

PAVAN, F.R.; POELHSITZ, G.V.; BARBOSA, M.I.F.; LEITE, S.R.A.; BATISTA, A.A.; ELLENA, J.; SATO, L.S.; FRANZBLAU, S.G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; & LEITE, C.Q.F. "Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis". *Eur. J. Med. Chem.*, **46**(10): 5099, 2011.

PFENNIG, B.W. Principles of Inorganic Chemistry. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc. 2015. p. 640

PREGOSIN, P.S. NMR in Organometallic Chemistry. Weinheim, Wiley - VCH, 2012. p. 254.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. "Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina". *Quím. Nova*, **19**(6): 651, 1996.

- REEDIJK, J. "Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes". *Platin. Met. Rev.*, 52(1): 2, 2008.
- ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. & KRIGAS, T. "Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode". *Nature*, **205**: 698, 1965.
- ROSS, P. D. & SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability". *Biochemistry*, **20**: 3096, 1981.
- SAHOO, D.; BHATTACHARYA, P. & CHAKRAVORTI, S. "Quest for mode of binding of 2-(4-(dimethylamino)styryl)-1-methylpyridinium iodide with *Calf Thymus* DNA". *J. Phys. Chem. B*, 114(5): 2044, 2010.
- SATYANARAYANA, S.; DABROWIAK, J. C. & CHAIRES, J. B. "Neither delta- nor lambda-tris(phenanthroline)ruthenium(II) binds to DNA by classical intercalation". *Biochemistry*, 31(39): 9319, 1992.
- SATYANARAYANA, S.; DABROWIAK, J. C. & CHAIRES, J. B. "Tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomer interactions with DNA: Mode and specificity of binding". *Biochemistry*, 32(10): 2573, 1993.
- SAVA, G.; ZORZET, S.; TURRIN, C.; VITA, F.; SORANZO, M.; ZABUCCHI, G.; COCCHIETTO, M.; BERGAMO, A.; DIGIOVINE, S.; PEZZONI, G. & SARTOR, L. "Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis : selective targeting of metastatic cells and binding to collagen 1". *Clin. Cancer Res.*, **9**: 1898, 2003.
- SAVA, G.; FRAUSIN F.; COCCHIETTO, M.; VITA, F.; PODDA, E.; SPESSOTTO, P.; FURLANI, A.; SCARCIA, V. & ZABUCCHI, G. "Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A". *Eur. J. Cancer.*, 40(9): 1383, 2004.
- SILVA MIRANDA, F. da; SIGNORI, A. M.; VICENTE, J.; SOUZA, B. de; PRIEBE, J. P.; SZPOGANICZ, B.; GONÇALVES, N. S. & NEVES, A. "Synthesis of substituted dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazines and a new heterocyclic dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalino[2,3-b]quinoxaline". *Tetrahedron*, 64(22): 5410, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. & KIEMLE, D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7a ed. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 80.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S. & BADSHAH, A. "Drug-DNA interactions and their study by UV-visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry". *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **124**: 1, 2013.
- SOUZA, A.P.C. Complexos de Rutênio (II) de Interesse Biológico: Avaliação *In Vitro* e *In Vivo* do Potencial Antitumoral e Genotóxico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2014. Tese de doutorado, 197 p.
- STEPHENSON, T. A. & WILKINSON, G. "New complexes of ruthenium (II) and (III) with triphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands". *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 28(4): 945, 1966.
- TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C.R.; JAKUPEC, M.A.; BERGER, W. & KEPPLER, B.K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application". *Chemical Science*, 5(8): 2925, 2014.

- VALLE, E. M. A.; LIMA, B. A. V.; FERREIRA, A. G.; NASCIMENTO, F. B. do; DEFLON, V. M.; DIÓGENES, I. C. N.; ABRAM, U.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E. & BATISTA, A. A. "Driving forces in substitution reactions of octahedral complexes: the influence of the competitive effect". *Polyhedron*, 28(16): 3473, 2009.
- VAN DER TOL, E. B.; VAN RAMESDONK, H. J.; VERHOEVEN, J. W.; STEEMERS, F. J.; KERVER, E. G.; VERBOOM, W. & REINHOUDT, D. N. "Tetraazatriphenylenes as extremely efficient antenna chromophores for luminescent lanthanide ions". *Chem. - A Eur. J.*, 4(11): 2315, 1998.
- VAN STAVEREN, D.R. & METZLER-NOLTE, N. "Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene". *Chem. Rev.*, 104(12): 5931, 2004.
- VILLARREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, C.; TENORIO, J.C.; ELLENA, J.; GOZZO, F.C.; COMINETTI, M.R.; FERREIRA, A.G.; FERREIRA, M.A.B.; NAVARRO, M. & BATISTA, A. A. "Chiral platinum (II) complexes featuring phosphine and chloroquine ligands as cytotoxic and monofunctional DNA-binding agents". *Inorg. Chem.*, 54(24): 11709, 2015.
- VON POELHSITZ, G.; BOGADO, A.L.; DE ARAUJO, M.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, 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, 2007.
- WEGIEL, B.; GALLO, D.; CSIZMADIA, E.; HARRIS, C.; BELCHER, J.; VERCELLOTTI, G.M.; PENACHO, N.; SETH, P.; SUKHATME, V.; AHMED, A.; PANDOLFI, P.P.; HELCZYNSKI, L.; BJARTELL, A.; PERSSON, J.L. & OTTERBEIN, L.E. "Carbon monoxide expedites metabolic exhaustion to inhibit tumor growth". *Cancer Res.*, 73(23): 7009, 2013.
- WHO - World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acessado em: 17 de dezembro de 2015.
- WU, L. "Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications". *Pharmacol. Rev.*, 57(4): 585, 2005.
- XIONG, Y.; HE, X.; ZOU, X.; WU, J.; CHEN, X.; JI, L.; LI, R.; ZHOU, J. & YU, K. "Interaction of polypyridyl ruthenium(II) complexes containing non-planar ligands with DNA". *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1: 19, 1999.
- ZEGLIS, B.M.; PIERRE, V.C. & BARTON, J.K. "Metallo-intercalators and metallo-insertors". *Chem. Commun.*, 7345(44): 4565, 2007.
- ZOBI, F. "CO and CO-releasing molecules in medicinal chemistry". *Future Med. Chem.*, 5(2): 175, 2013.

CAPÍTULO 7 – APÊNDICES

Apêndice 1. Espectros de absorção na região do infravermelho

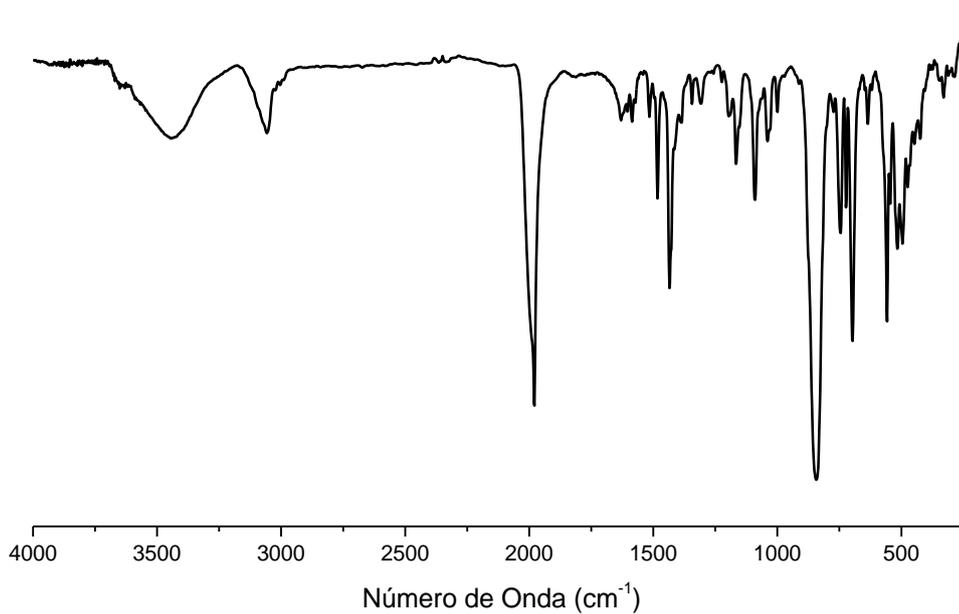


Figura A1.1 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *ct*-RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1**.

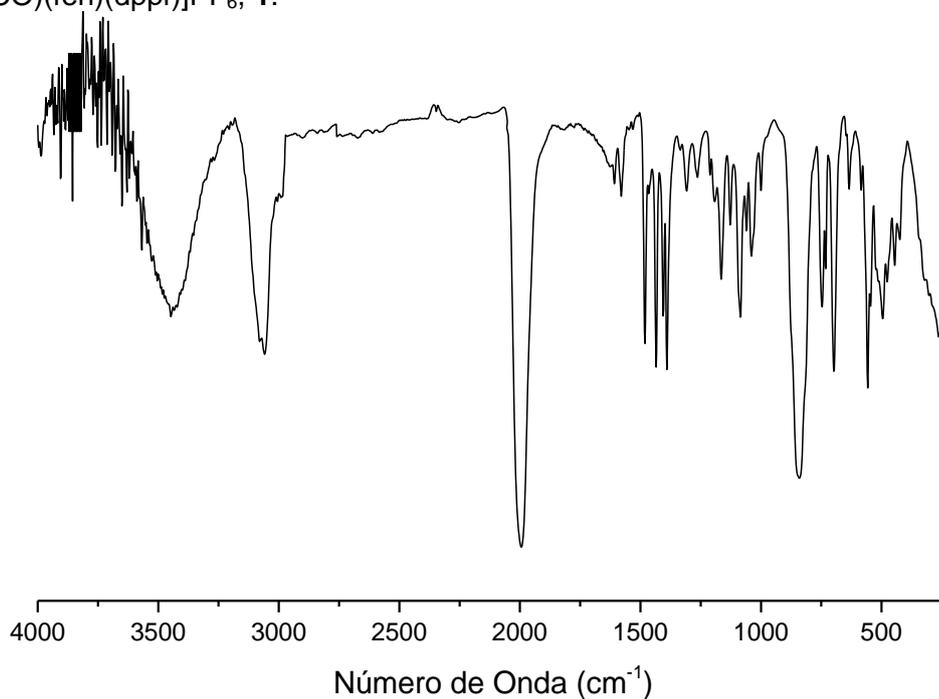


Figura A1.2 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆, **2**.

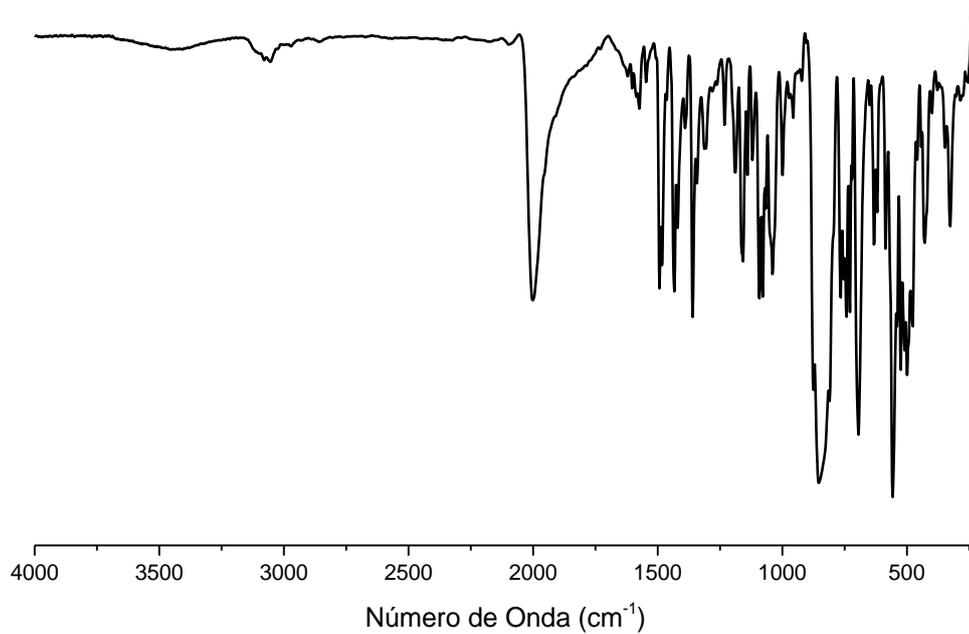


Figura A1.3 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *ct*-[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF₆, **3**.

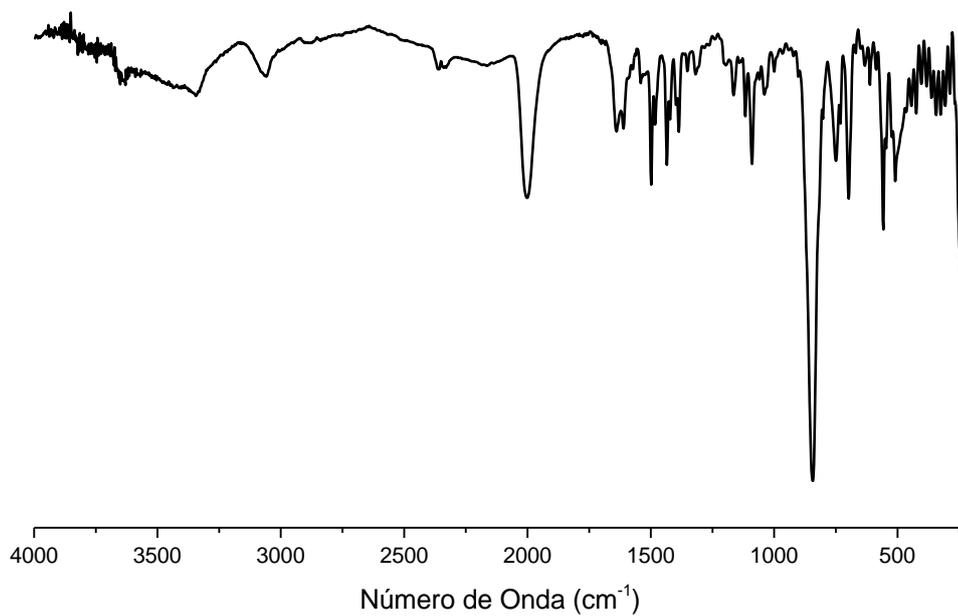


Figura A1.4 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *ct*-[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF₆, **4**.

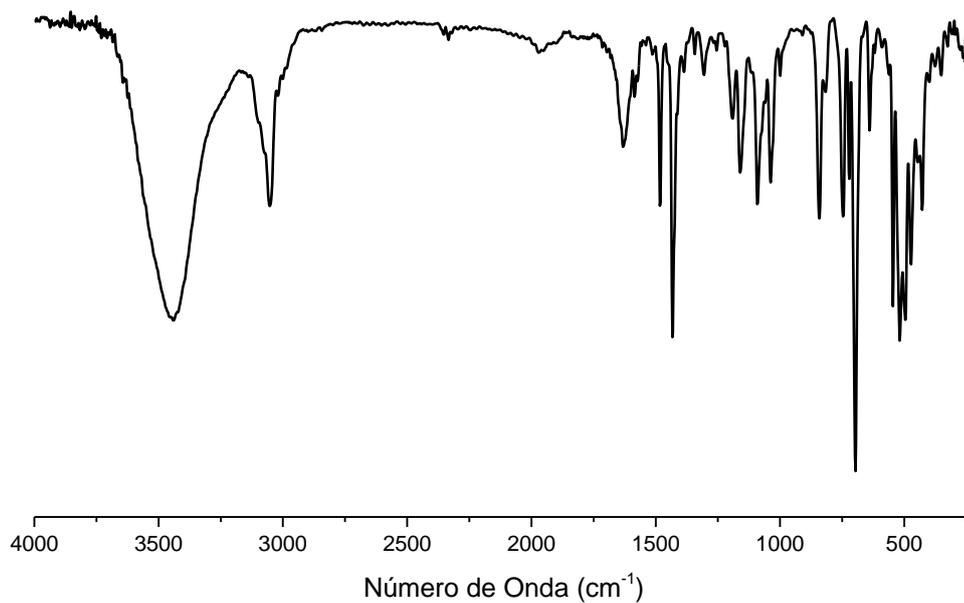


Figura A1.5 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1**.

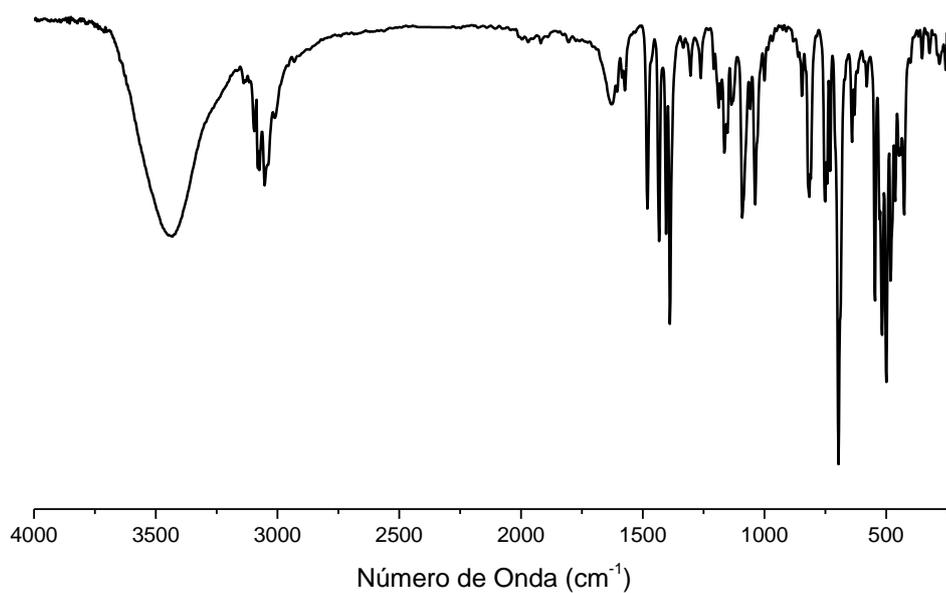


Figura A1.6 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2**.

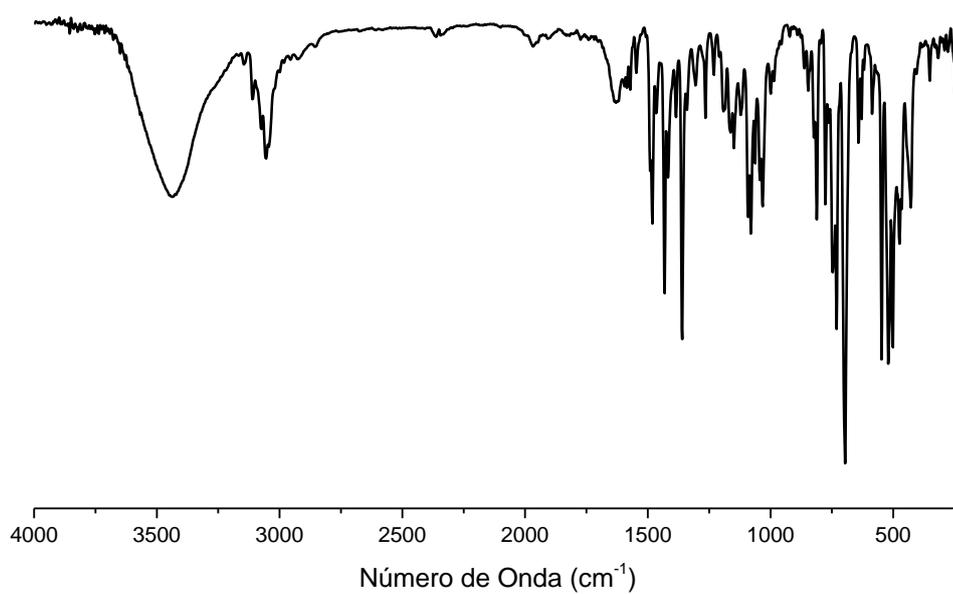


Figura A1.7 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *cis*-[RuCl₂(dppz)(dppf)], **P3**.

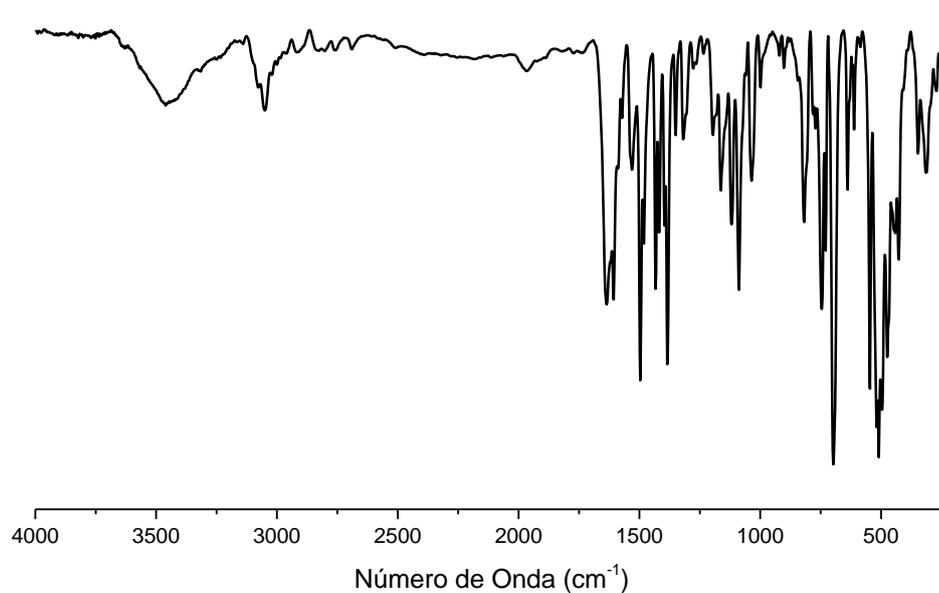


Figura A1.8 - Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) do *cis*-[RuCl₂(dpqQX)(dppf)], **P4**.

Apêndice 2. Espectros de absorção na região do UV-vis

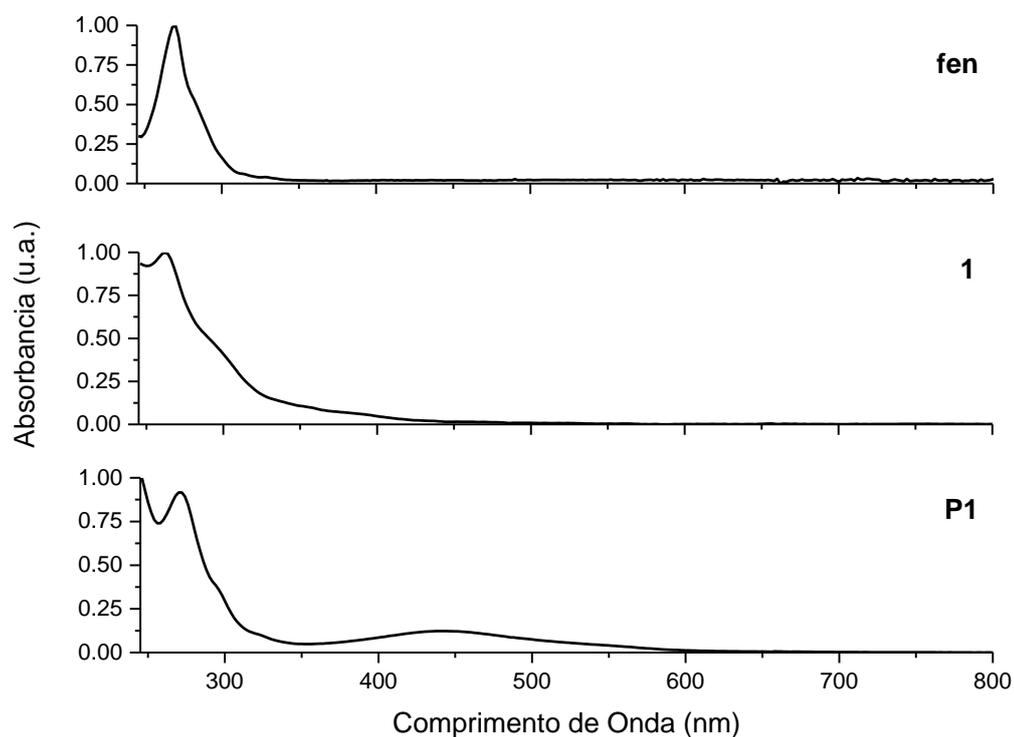


Figura A2.1 - Espectros de absorção normalizados na região do UV-vis (DCM) do ligante livre **fen** (topo) e dos complexos ct -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1** (meio) e cis -[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1** (base).

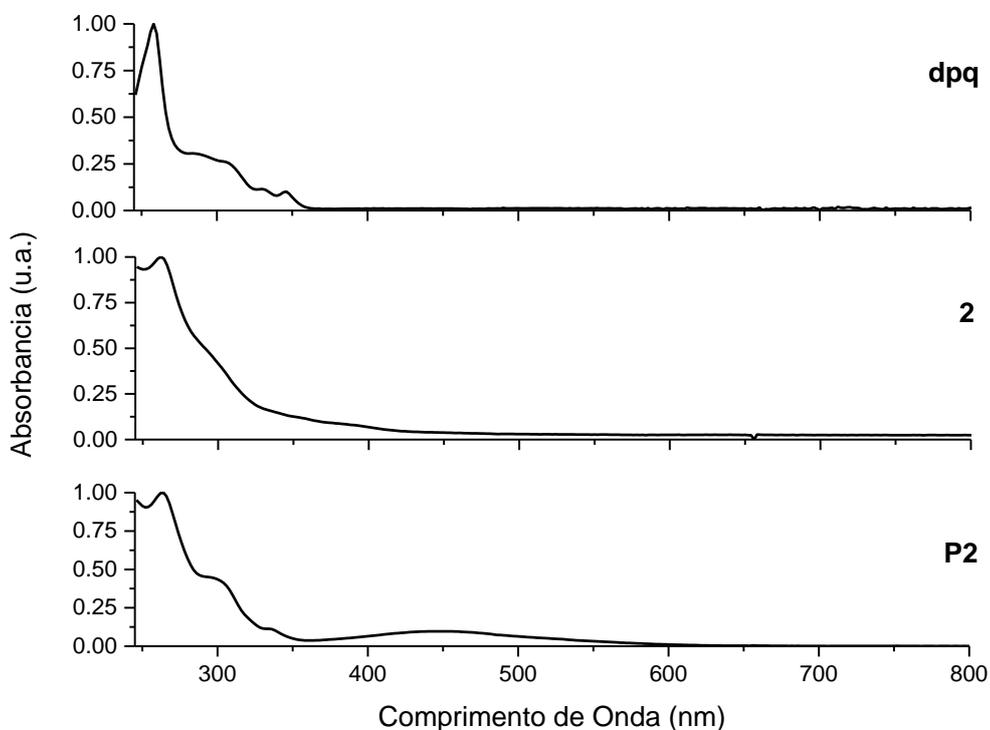


Figura A2.2 - Espectros de absorção normalizados na região do UV-vis (DCM) do ligante livre **dpq** (acima) e dos complexos ct -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆, **2** (meio) e cis -[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2** (base).

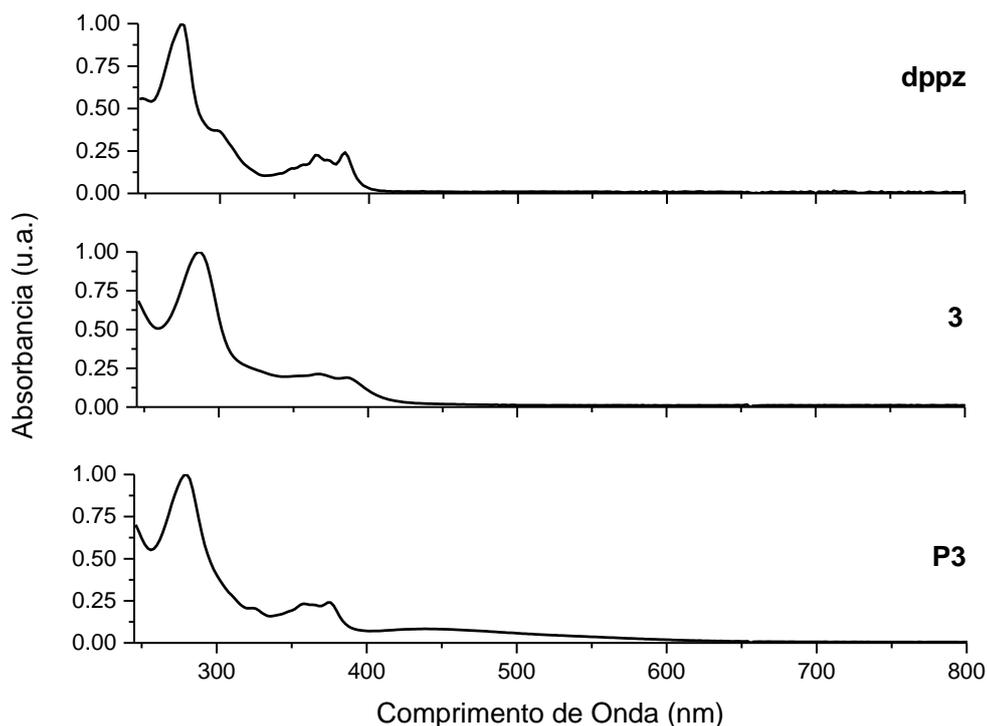


Figura A2.3 - Espectros de absorção normalizados na região do UV-vis (DCM) do ligante livre **dppz** (acima) e dos complexos ct -[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF₆, **3** (meio) e cis -[RuCl₂(dppz)(dppf)], **P3** (base).

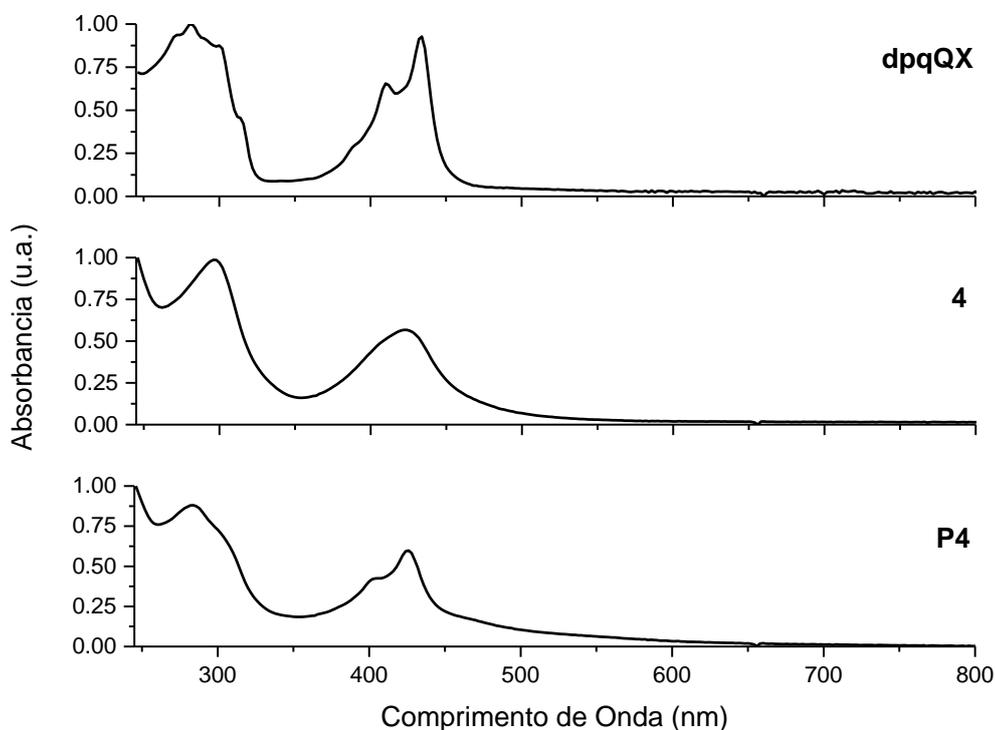


Figura A2.4 - Espectros de absorção normalizados na região do UV-vis (DCM) do ligante livre **dpqQX** (acima) e dos complexos ct -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF₆, **4** (meio) e cis -[RuCl₂(dpqQX)(dppf)], **P4** (base).

Apêndice 3. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

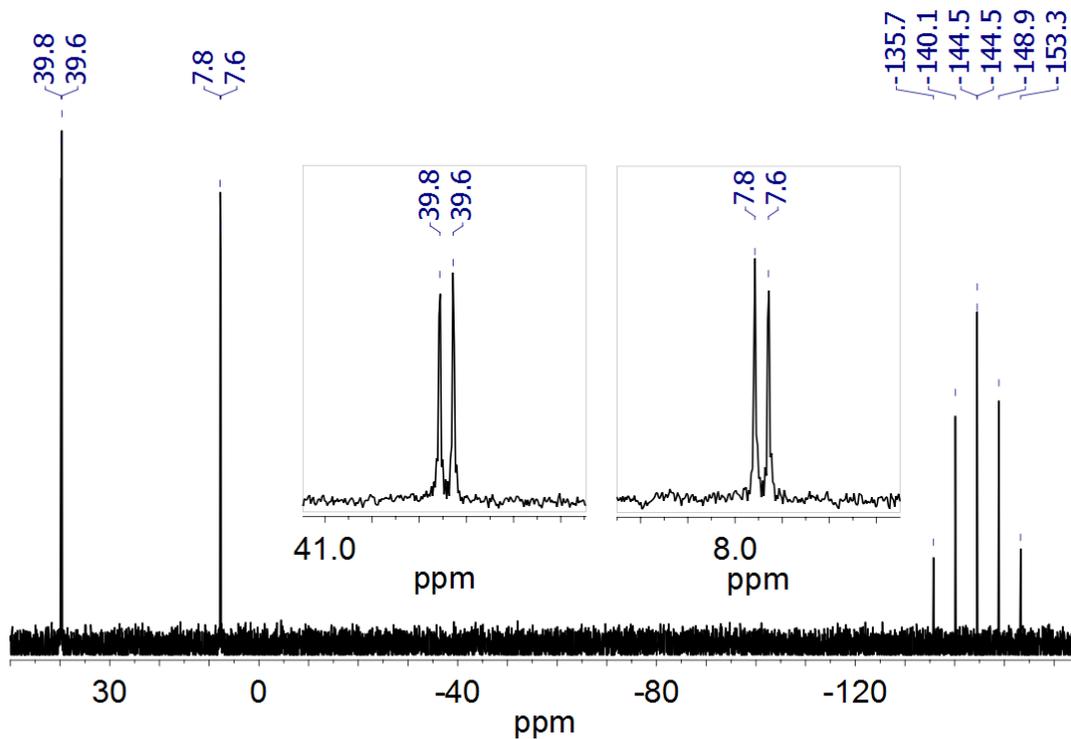


Figura A3.1 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DCM/D₂O) do *ct*-[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1**.

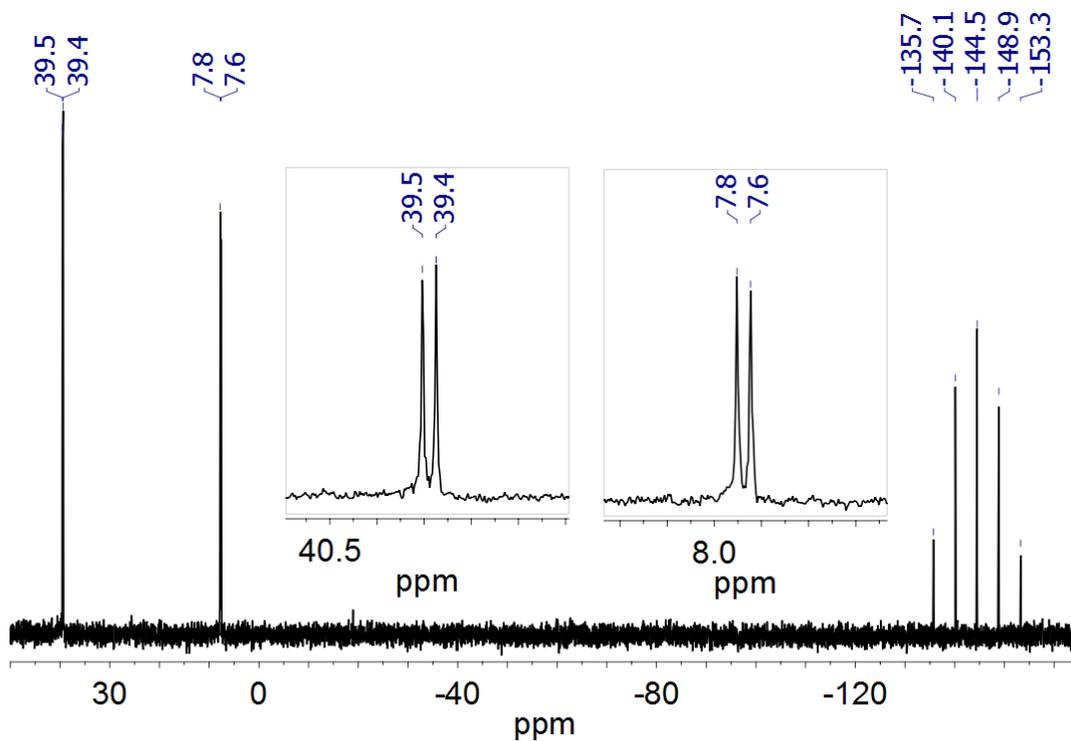


Figura A3.2 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DCM/D₂O) do *ct*-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆, **2**.

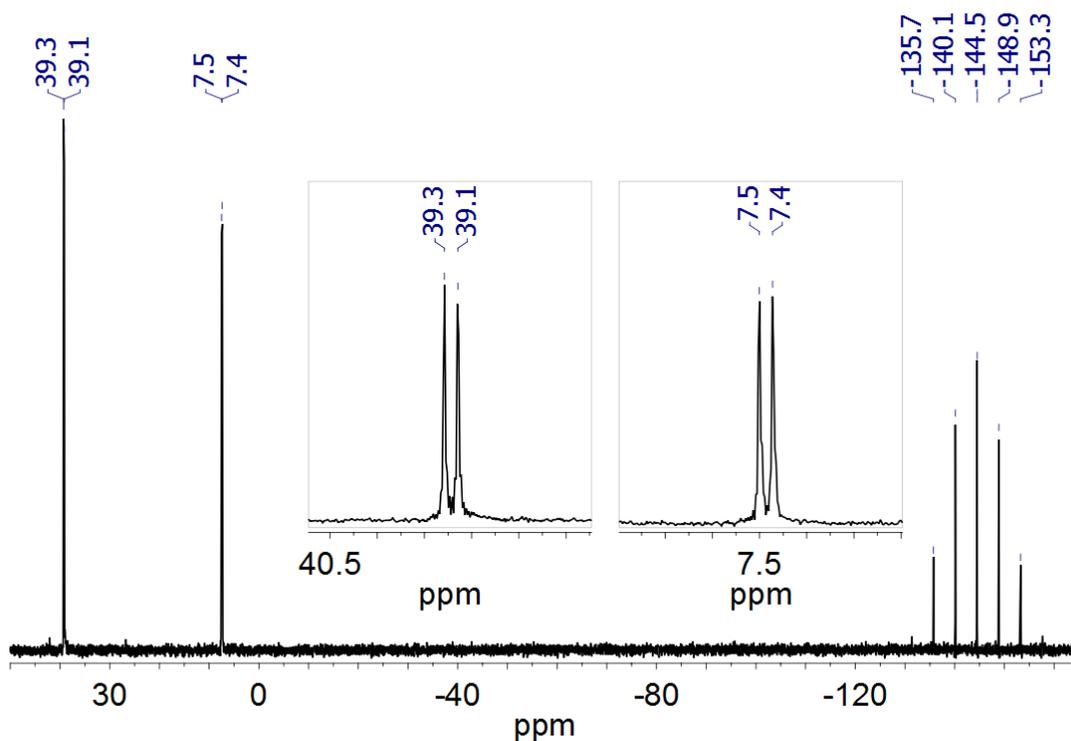


Figura A3.3 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DCM/D $_2\text{O}$) do $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppz})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **3**.

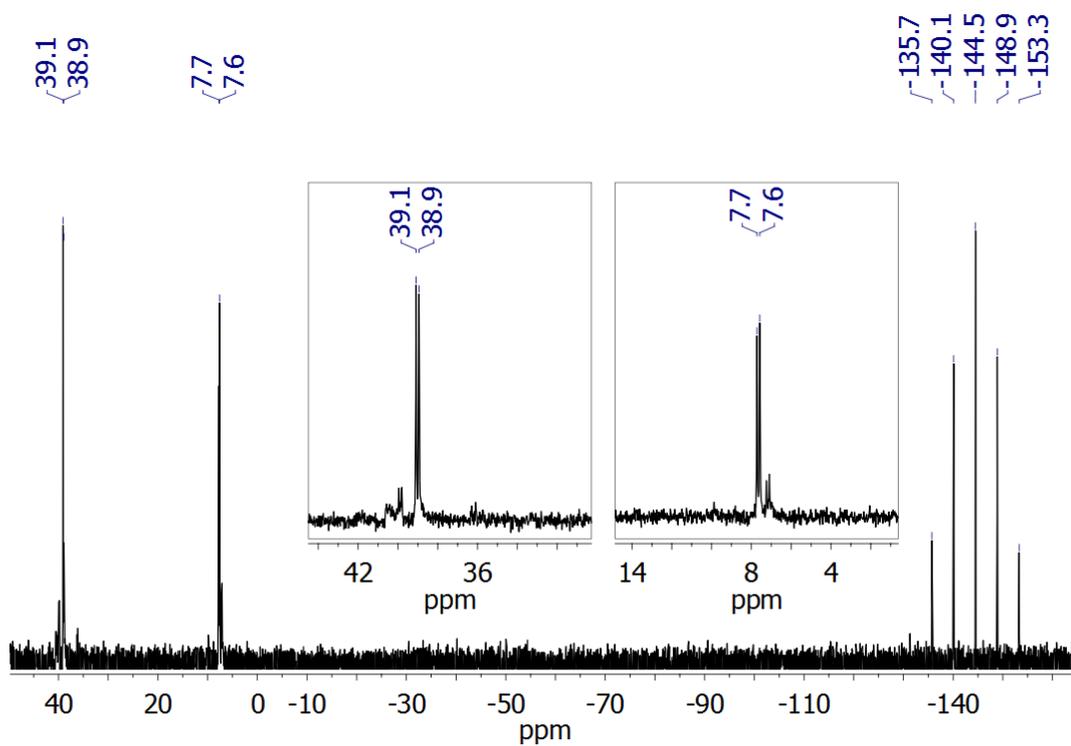


Figura A3.4 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DCM/D $_2\text{O}$) do $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpqQX})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **4**.

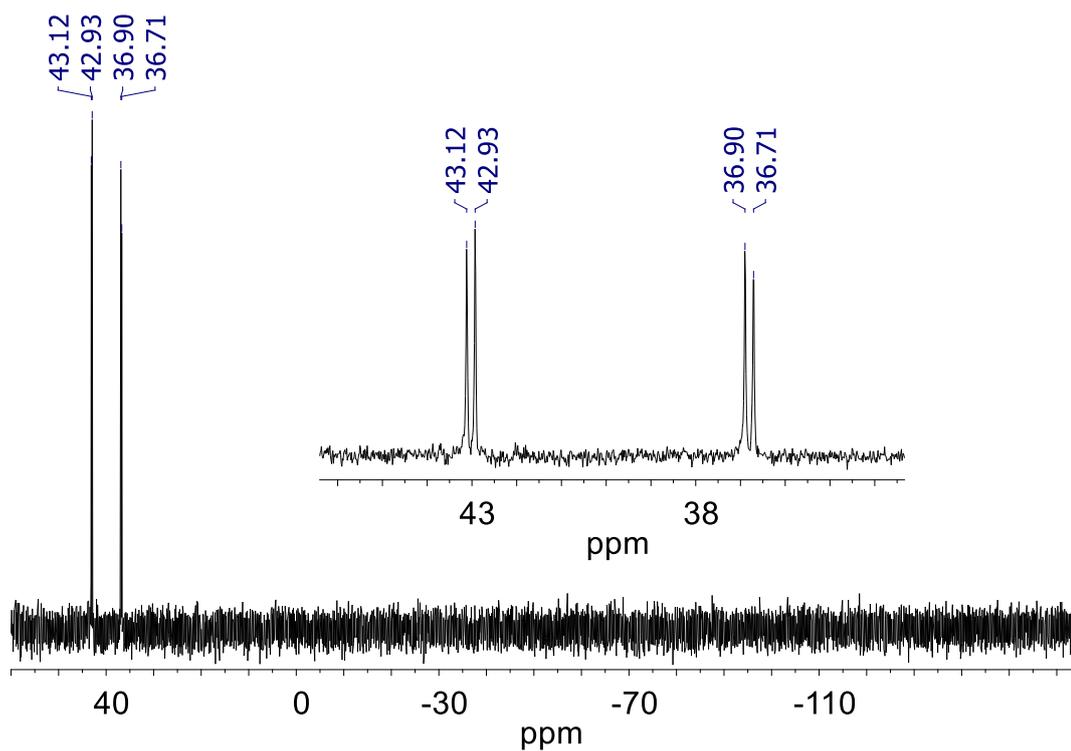


Figura A3.5 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DCM/D₂O) do *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1**.

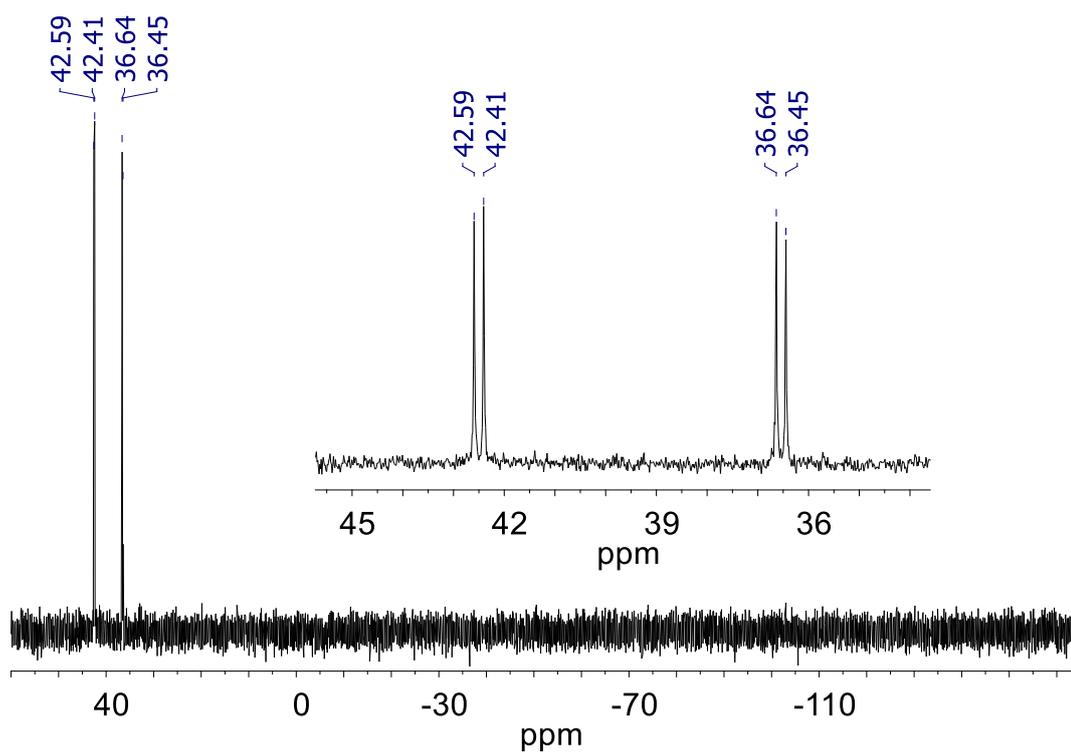


Figura A3.6 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (DCM/D₂O) do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2**.

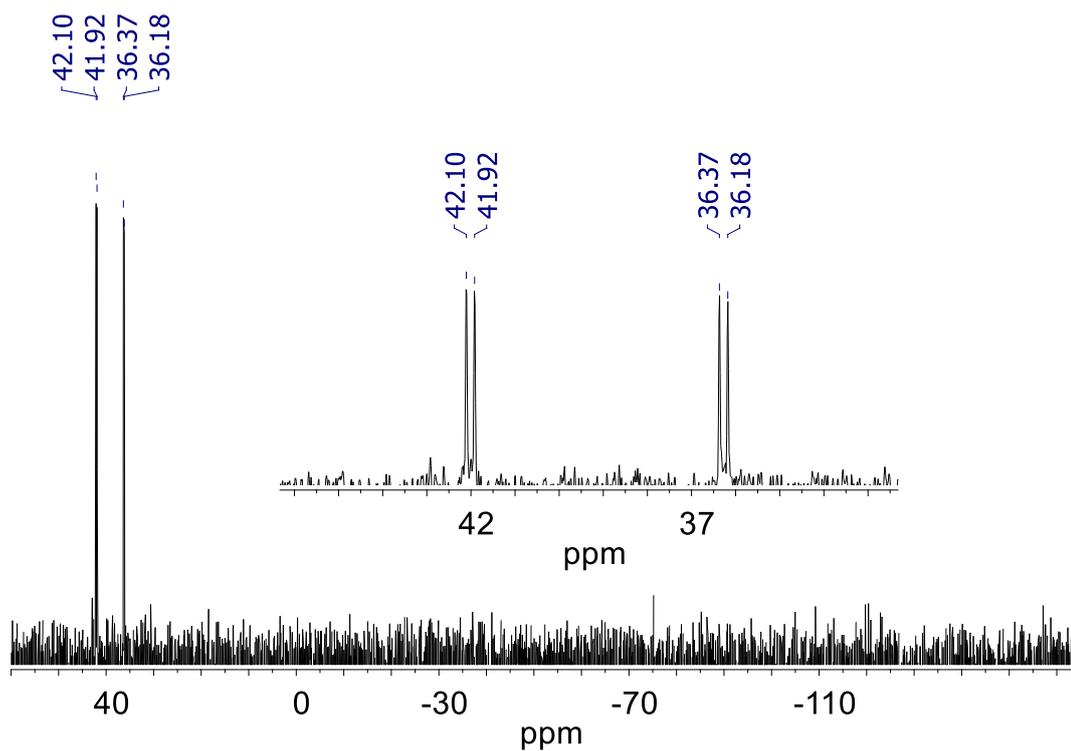


Figura A3.7 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ($\text{DCM}/\text{D}_2\text{O}$) do $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppz})(\text{dppf})]$, **P3**.

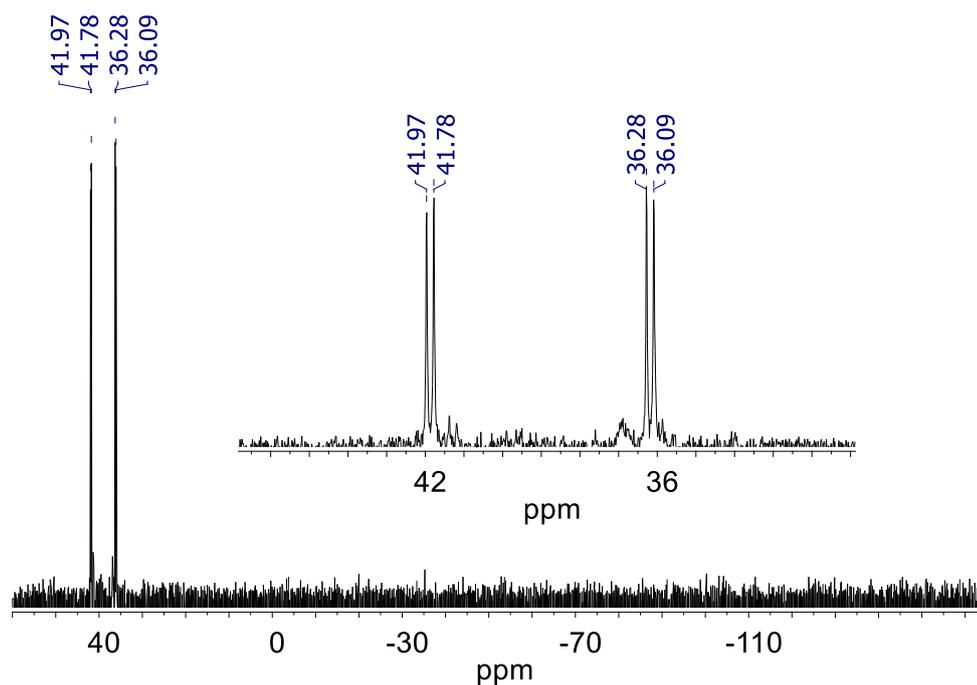
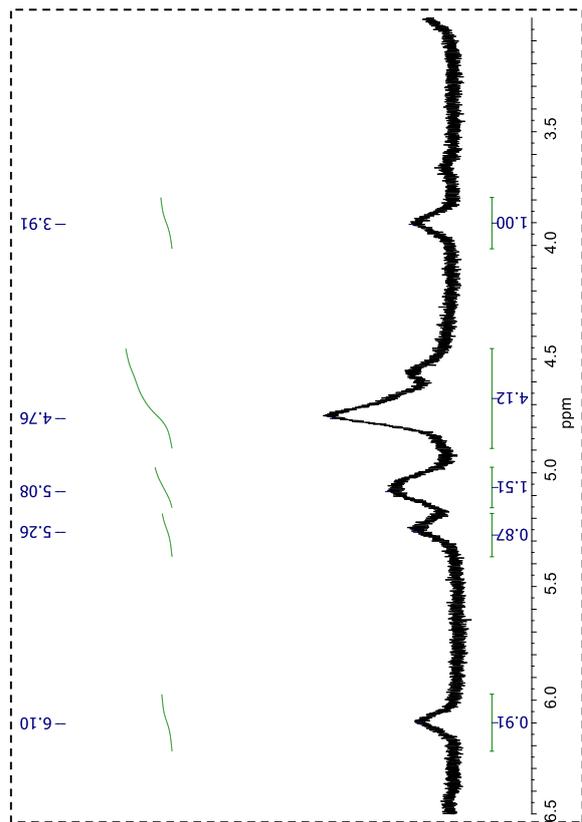


Figura A3.8 - Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ($\text{DCM}/\text{D}_2\text{O}$) do $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dpqQX})(\text{dppf})]$, **P4**.



RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ) 9,96 (m, 1H), 9,40 (s, 1H); 9,04 (m, 1H); 8,56 (m, 2H); 8,30 (s, 2H); 8,03 (s, 5H); 7,71 (m, 4H); 7,53 (m, 5H), 7,29 – 6,82 (m, 9H); 6,10 (m, 1H, Cp-); 5,26 (m, 1H, Cp-); 5,08 (m, 1H, Cp-); 4,76 (m, 4H, Cp-); 3,91 (m, 1H, Cp-).

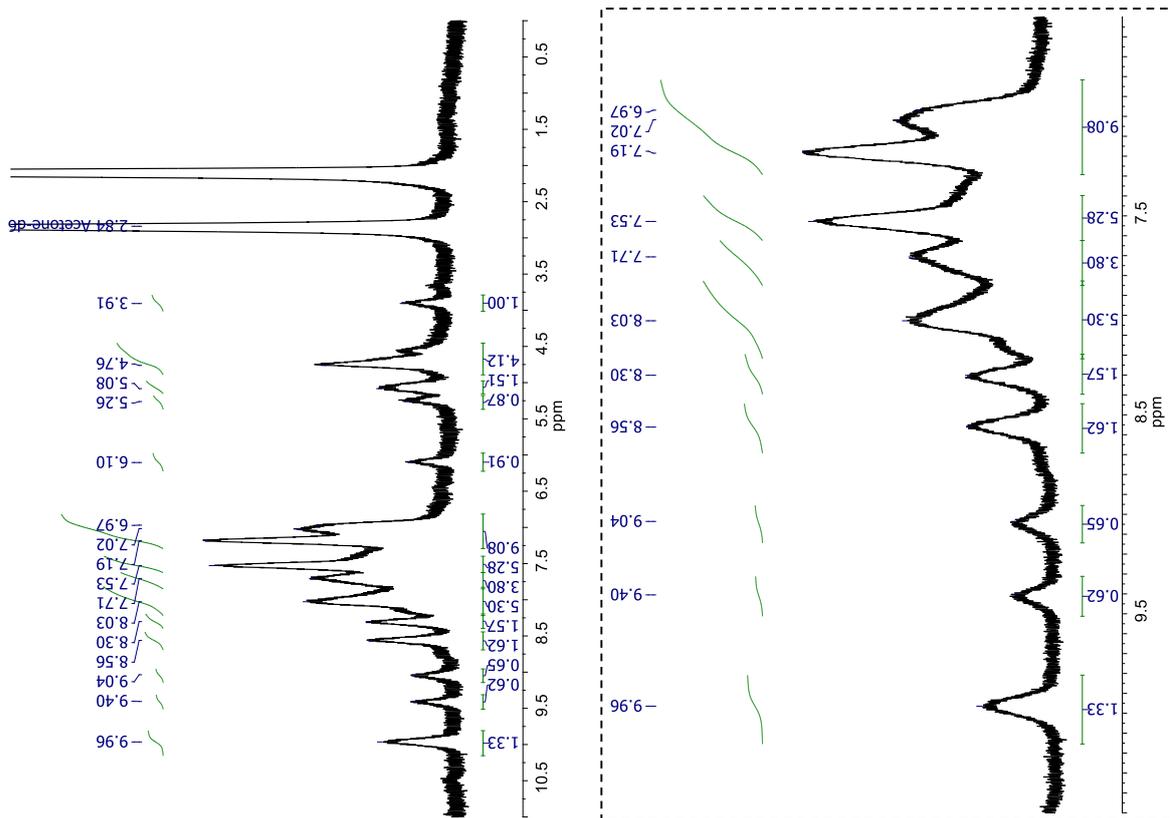
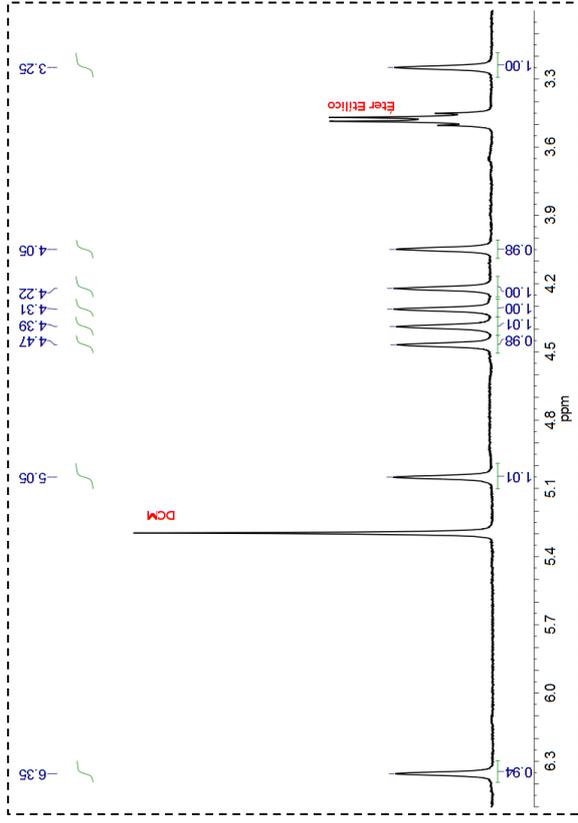
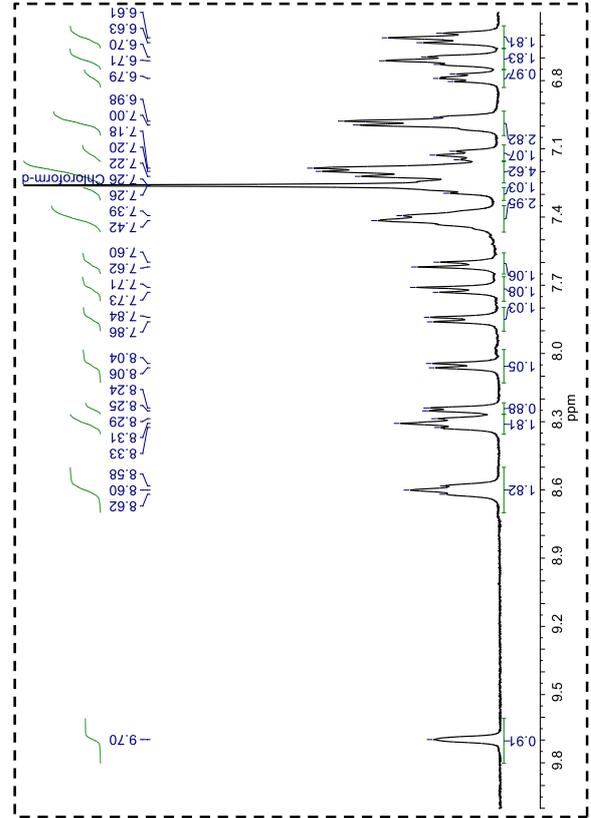
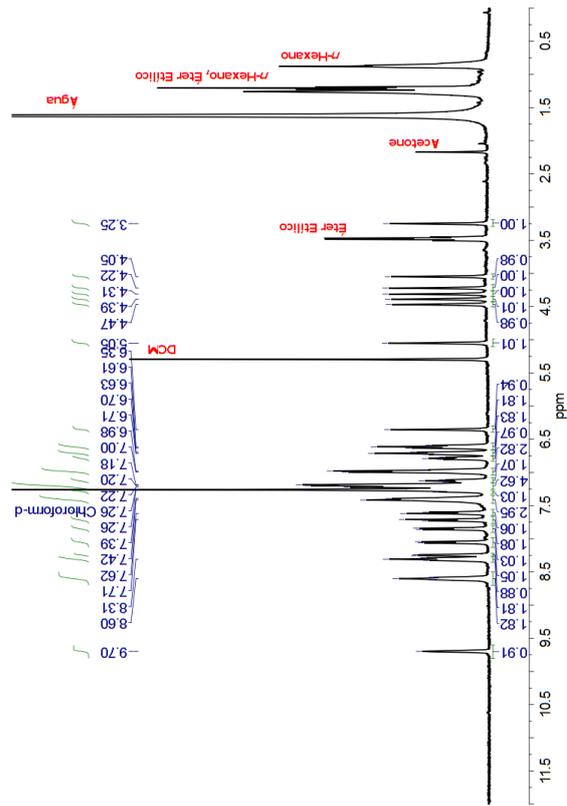


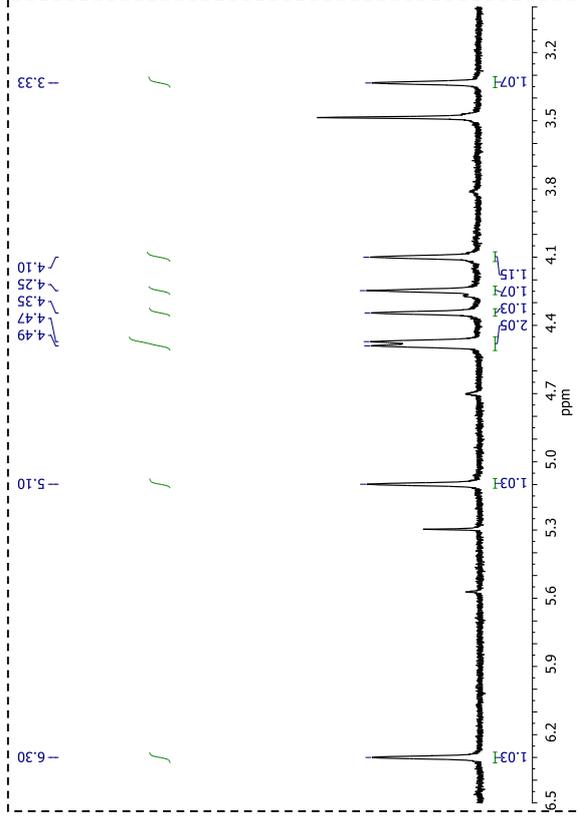
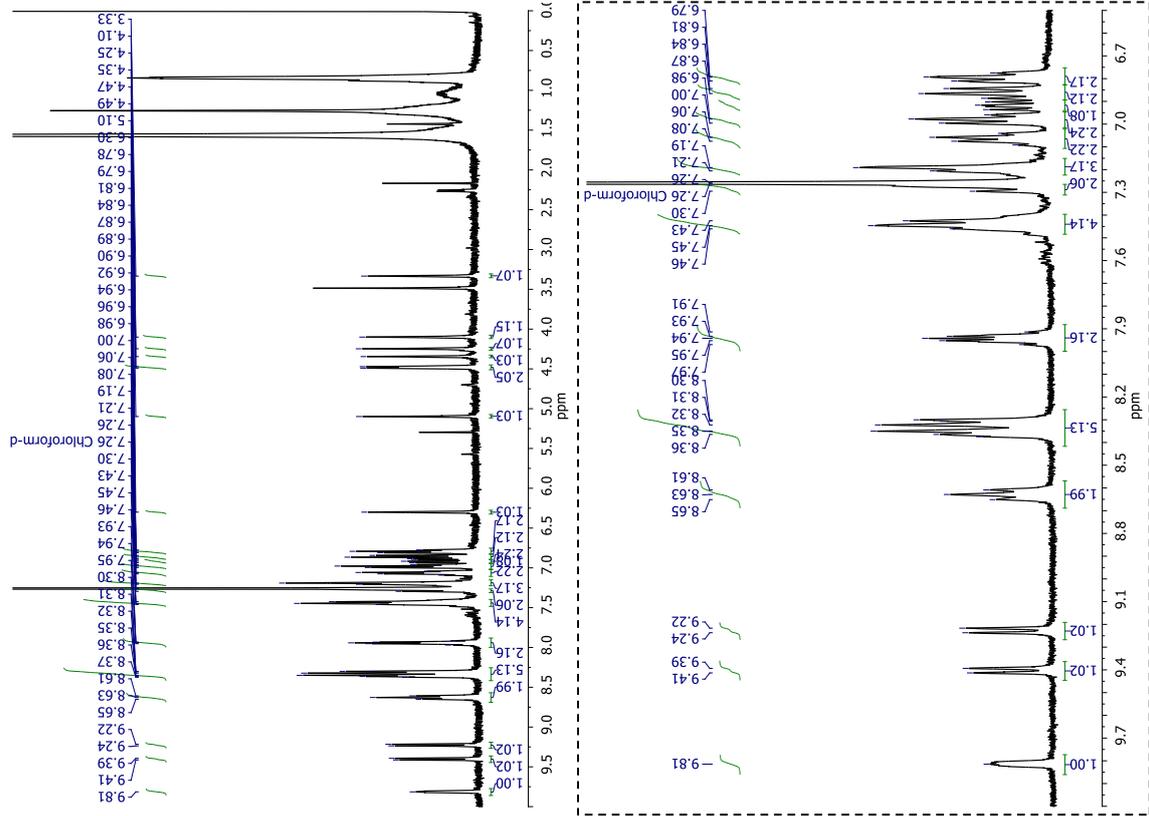
Figura A4.3 - Espectro de RMN de ^1H e ampliações (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do *ct*- $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpqX})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **4**.



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ) 9,70 (s, 1H); 8,60 (t, J = 7,4 Hz, 2H); 8,31 (t, J = 7,8 Hz, 2H); 8,25 (d, J = 5,1 Hz, 1H); 8,05 (d, J = 7,6 Hz, 1H); 7,85 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,72 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,61 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 7,40 (d, J = 8,8 Hz, 3H); 7,30 (s, 1H); 7,25 – 7,15 (m, 5H); 7,13 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 6,98 (t, J = 6,9 Hz, 3H); 6,83 – 6,75 (m, 1H); 6,71 (t, J = 6,6 Hz, 2H); 6,61 (t, J = 8,3 Hz, 2H); 6,35 (s, 1H, Cp-); 5,05 (s, 1H, Cp-); 4,47 (s, 1H, Cp-); 4,39 (s, 1H, Cp-); 4,31 (s, 1H, Cp-); 4,22 (s, 1H, Cp-); 4,05 (s, 1H, Cp-); 3,25 (s, 1H, Cp-).

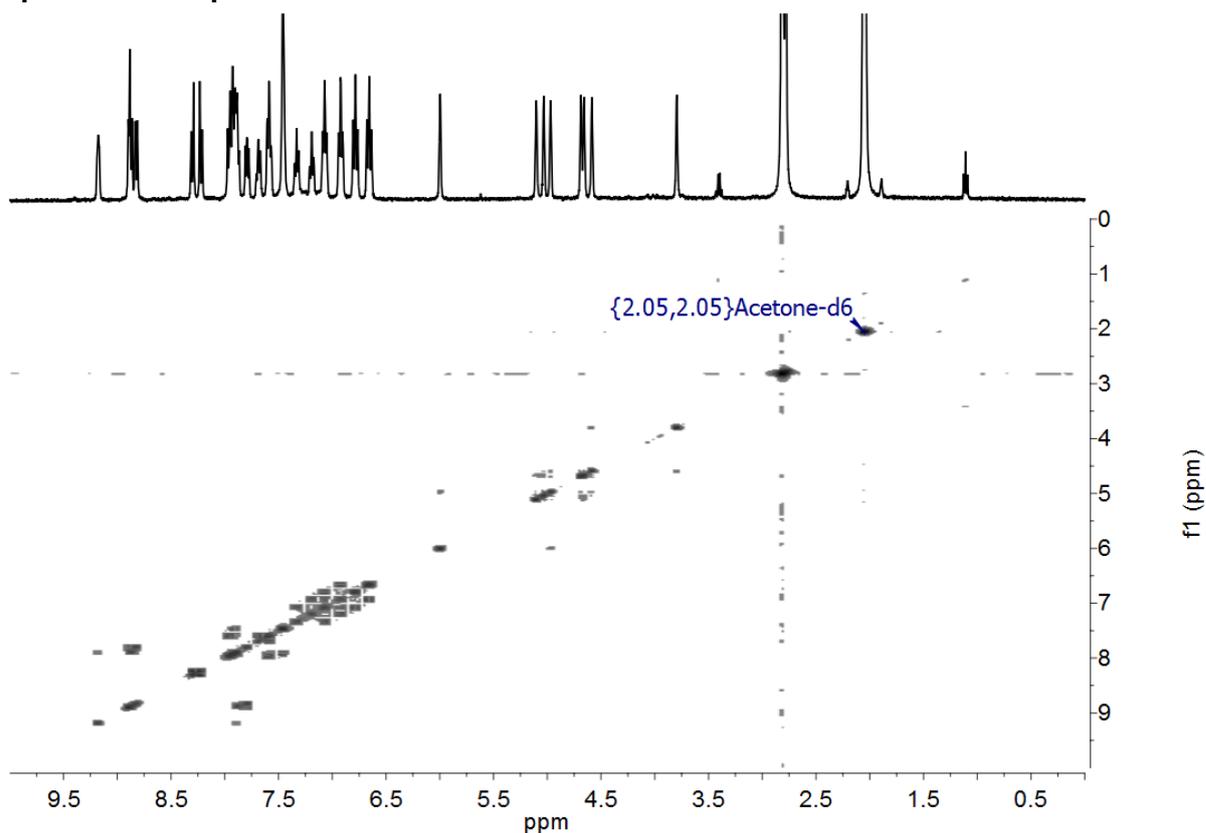
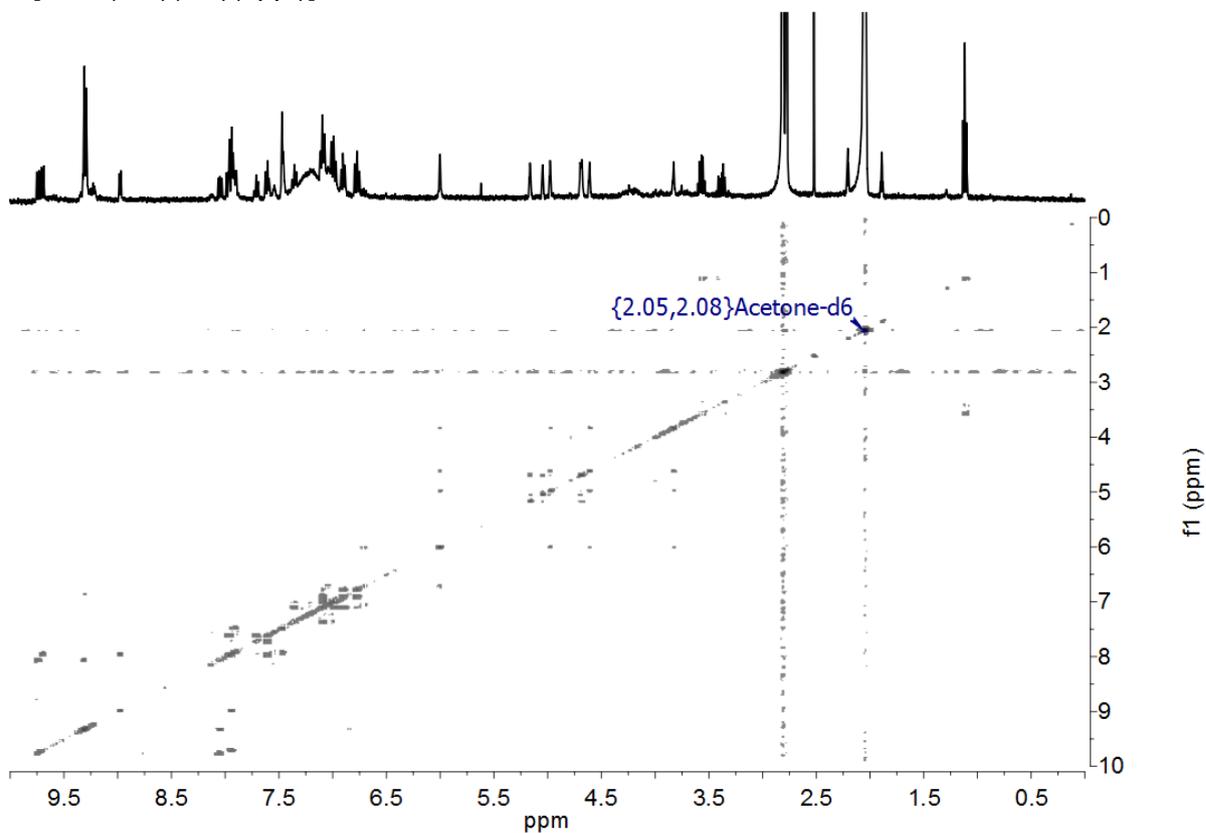
Figura A4.5 - Espectro de RMN de ¹H e ampliações (400 MHz, CDCl₃) do *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1**.





RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) 9,81 (s, 1H); 9,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 9,23 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 8,63 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H); 8,42 – 8,26 (m, 5H); 8,00 – 7,88 (m, 2H); 7,48 – 7,40 (m, 4H); 7,30 (s, 2H); 7,20 (d, $J = 5,8$ Hz, 3H); 7,07 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H); 6,98 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 6,94 – 6,89 (m, 1H); 6,87 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H); 6,79 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 6,30 (s, 1H, Cp-); 5,10 (s, 1H, Cp-); 4,48 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, Cp-); 4,35 (s, 1H, Cp-); 4,25 (s, 1H, Cp-); 4,10 (s, 1H, Cp-); 3,33 (s, 1H, Cp-).

Figura A4.7 - Espectro de RMN de ^1H e ampliações (400 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppz})(\text{dppf})]$, **P3**.

Apêndice 5. Espectros de RMN COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ Figura A5.1 - Espectro de RMN COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do ct -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1**.Figura A5.2 - Espectro de RMN COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do ct -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆, **2**.

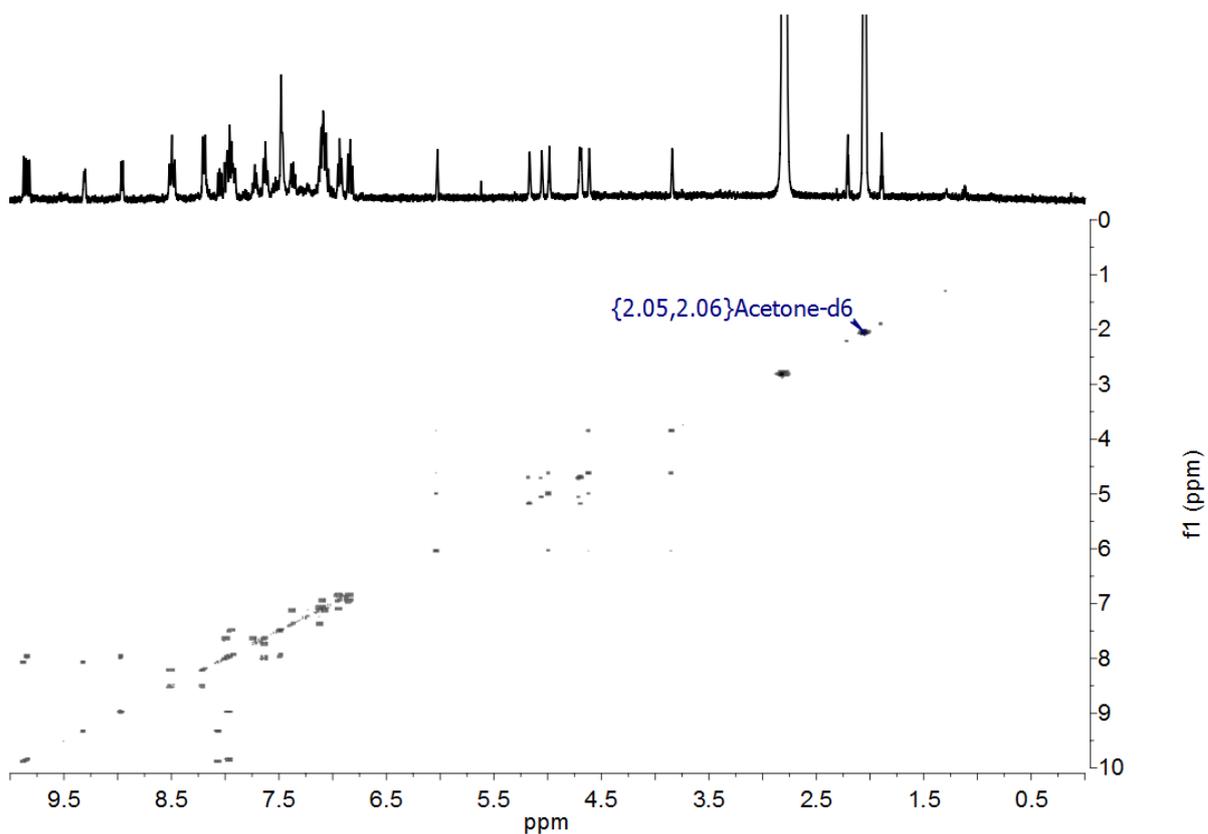


Figura A5.3 - Espectro de RMN COSY ¹H - ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) do *ct*-[RuCl(CO)(dppz)(dppf)]PF₆, **3**.

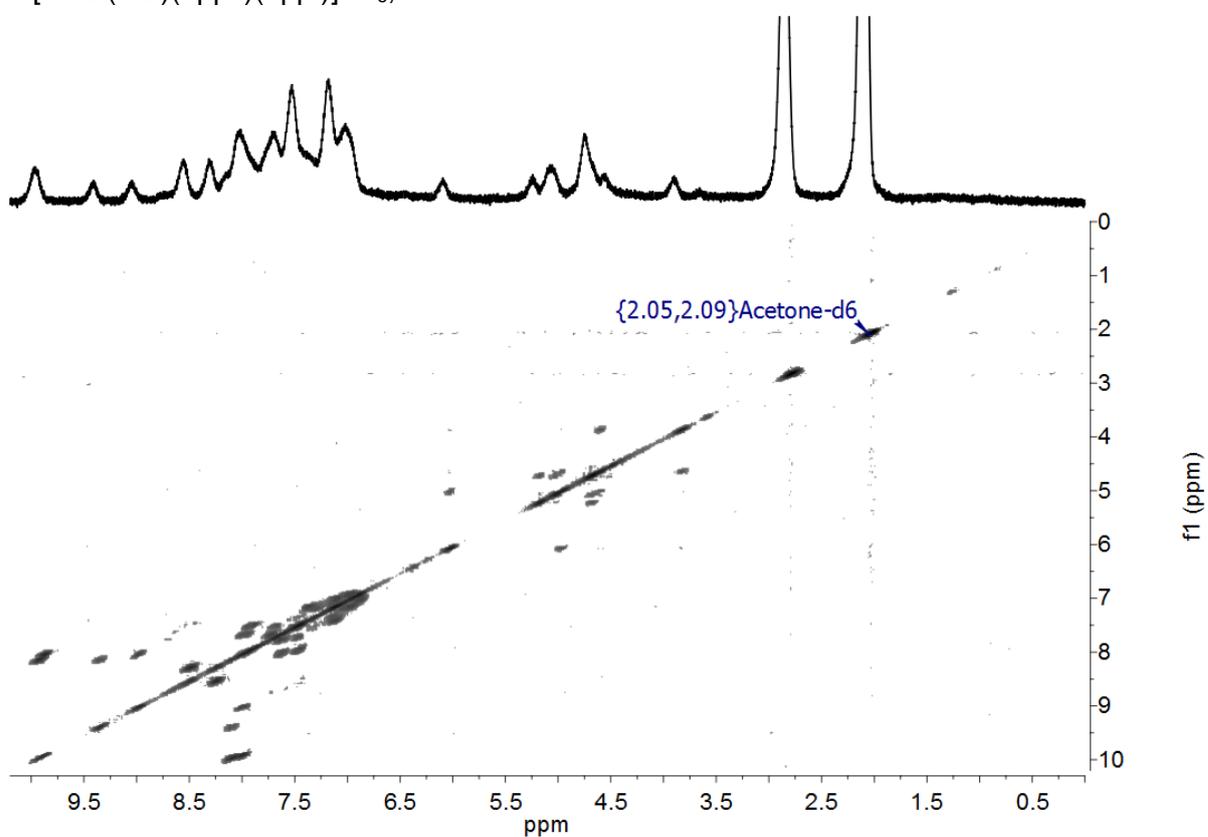


Figura A5.3 - Espectro de RMN COSY ¹H - ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) do *ct*-[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF₆, **4**.

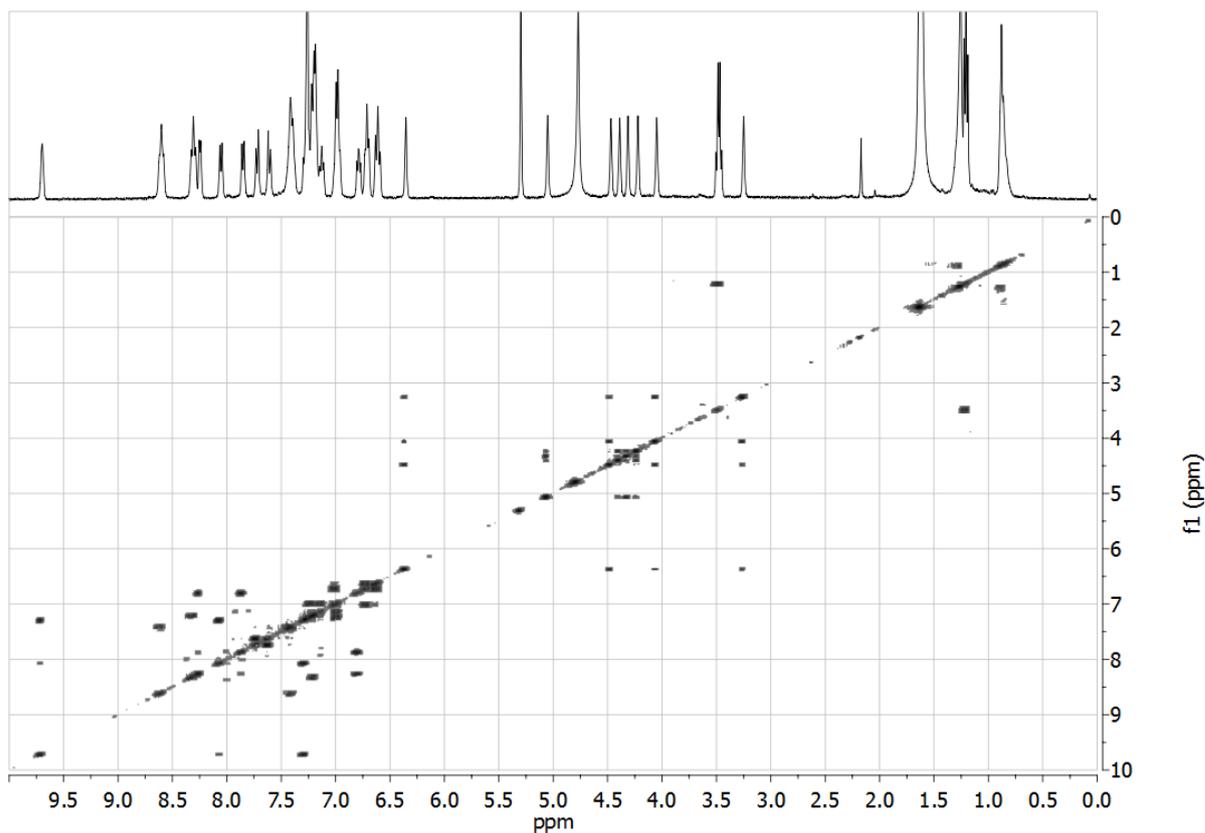


Figura A5.5 - Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{fen})(\text{dppf})]$, **P1**.

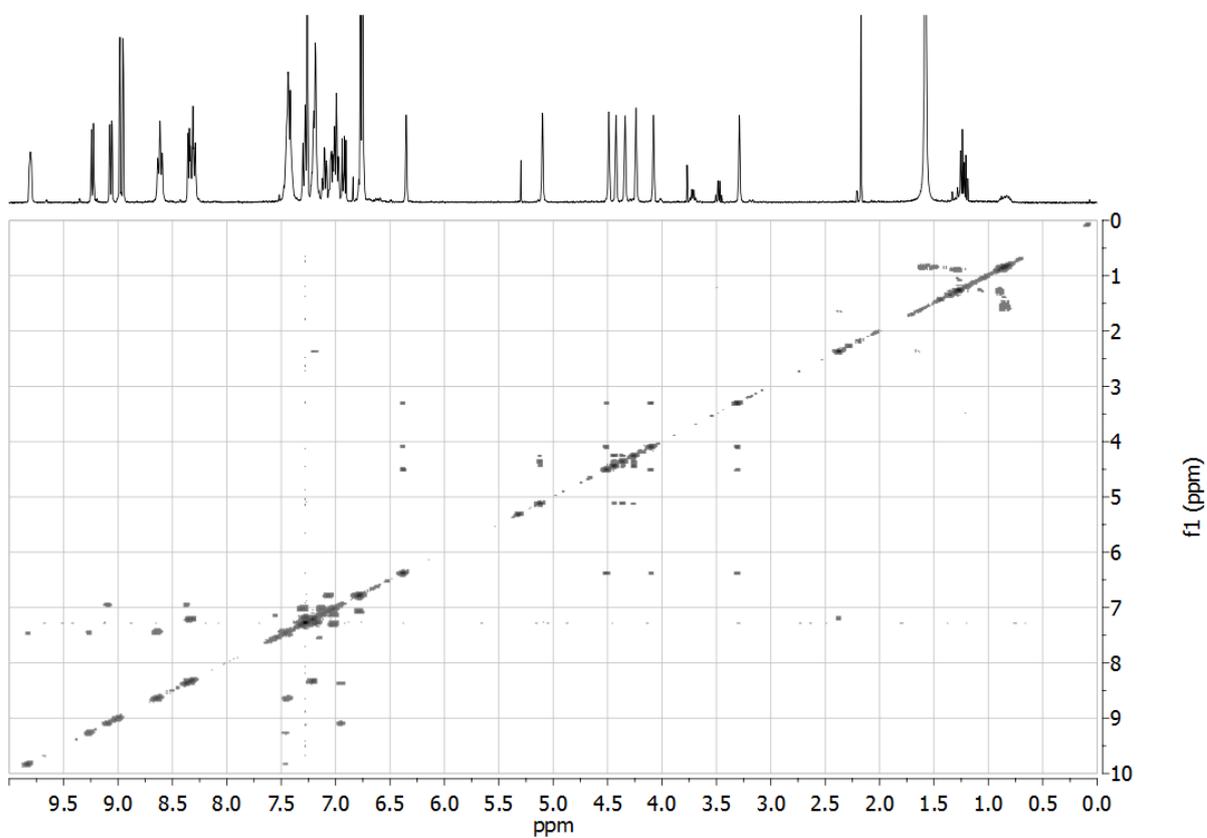


Figura A5.6 - Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dpq})(\text{dppf})]$, **P2**.

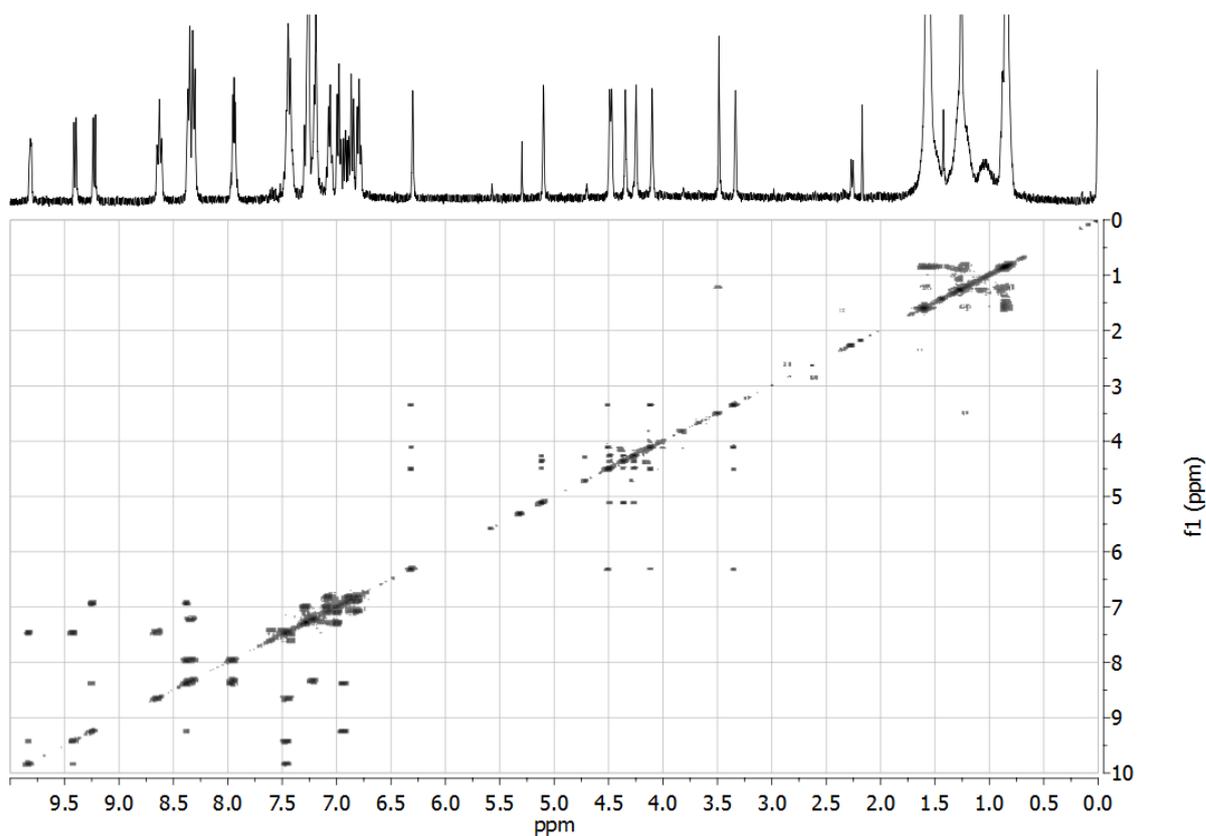


Figura A5.7 - Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppz})(\text{dppf})]$, **P3**.

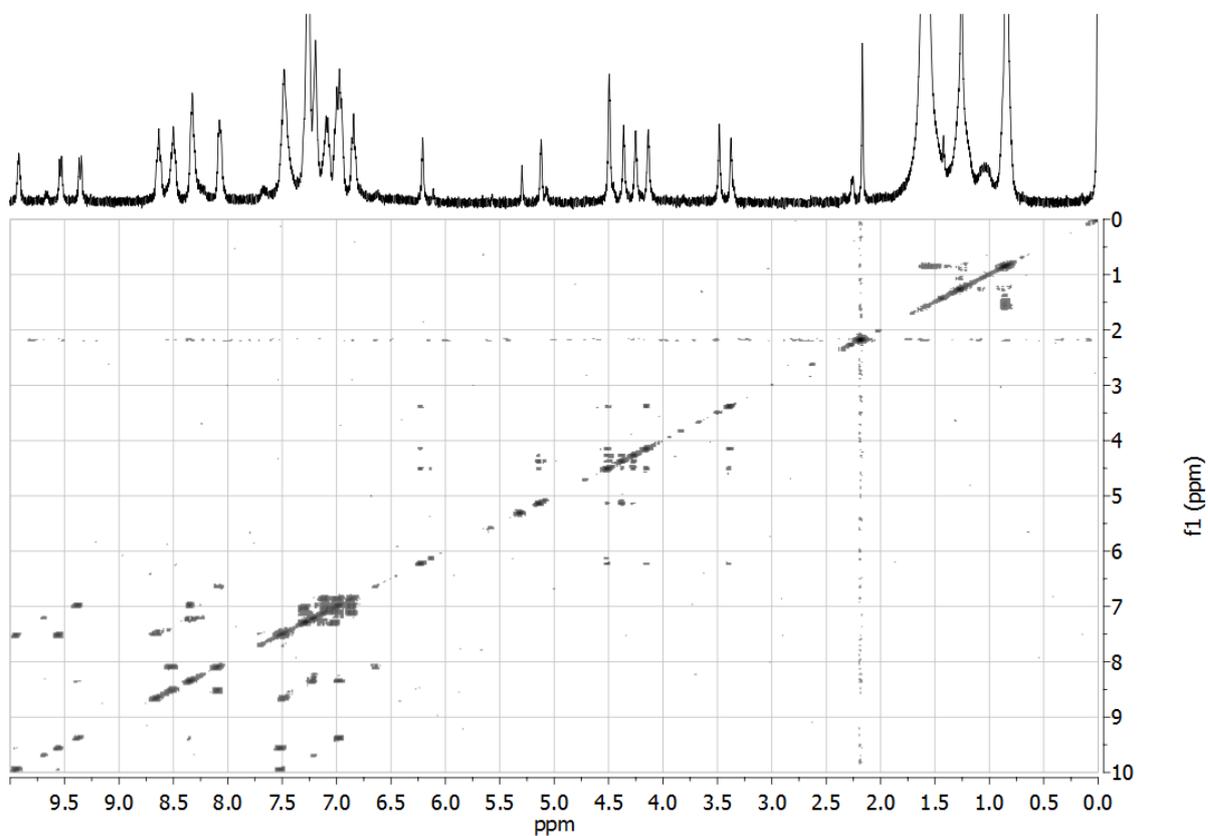
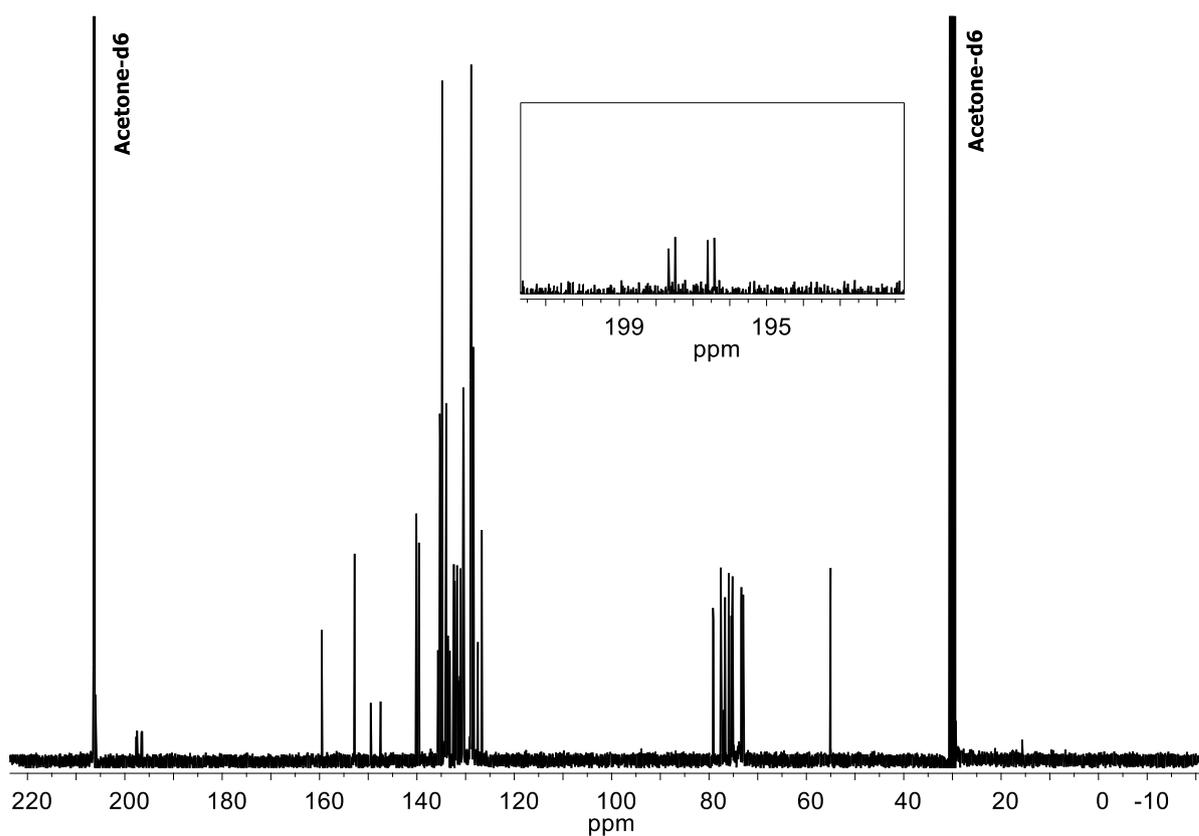
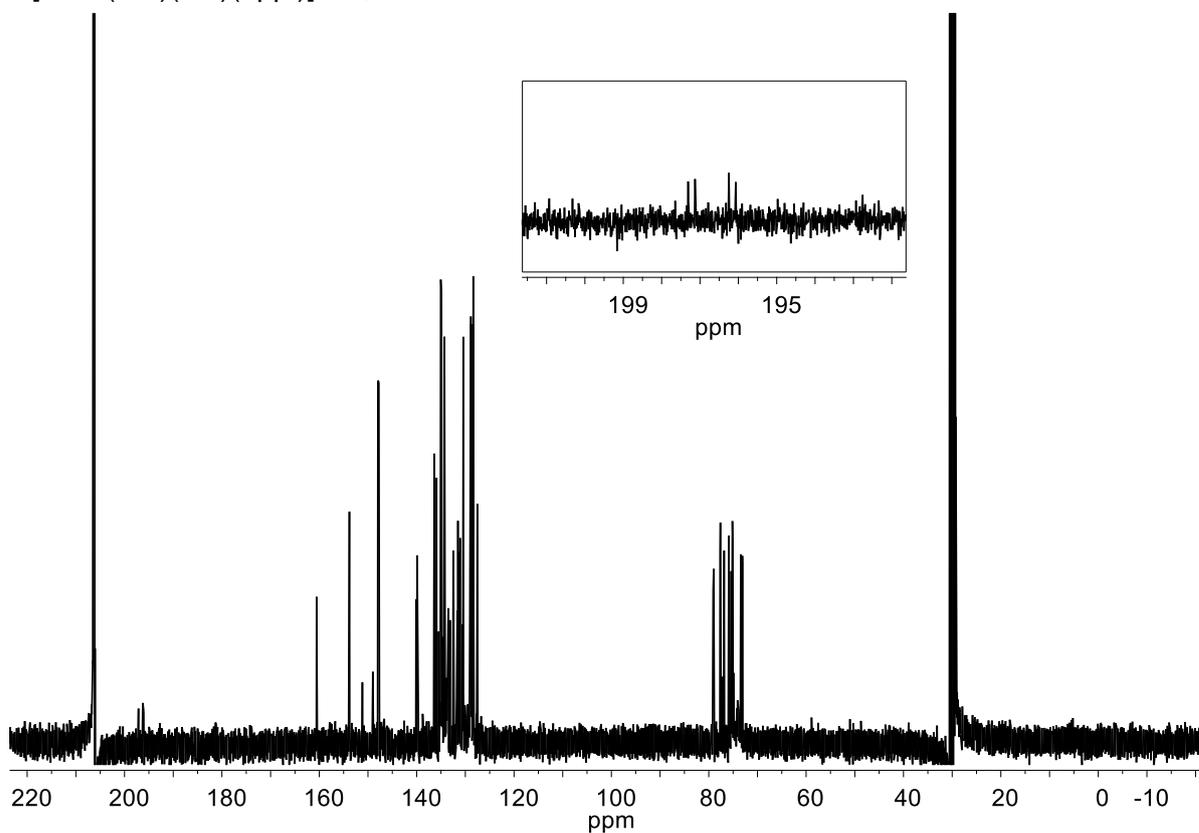


Figura A5.8 - Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dpqQX})(\text{dppf})]$, **P4**.

Apêndice 6. Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Figura A6.1 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do $ct\text{-[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF}_6$, **1**.Figura A6.2 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do $ct\text{-[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF}_6$, **2**.

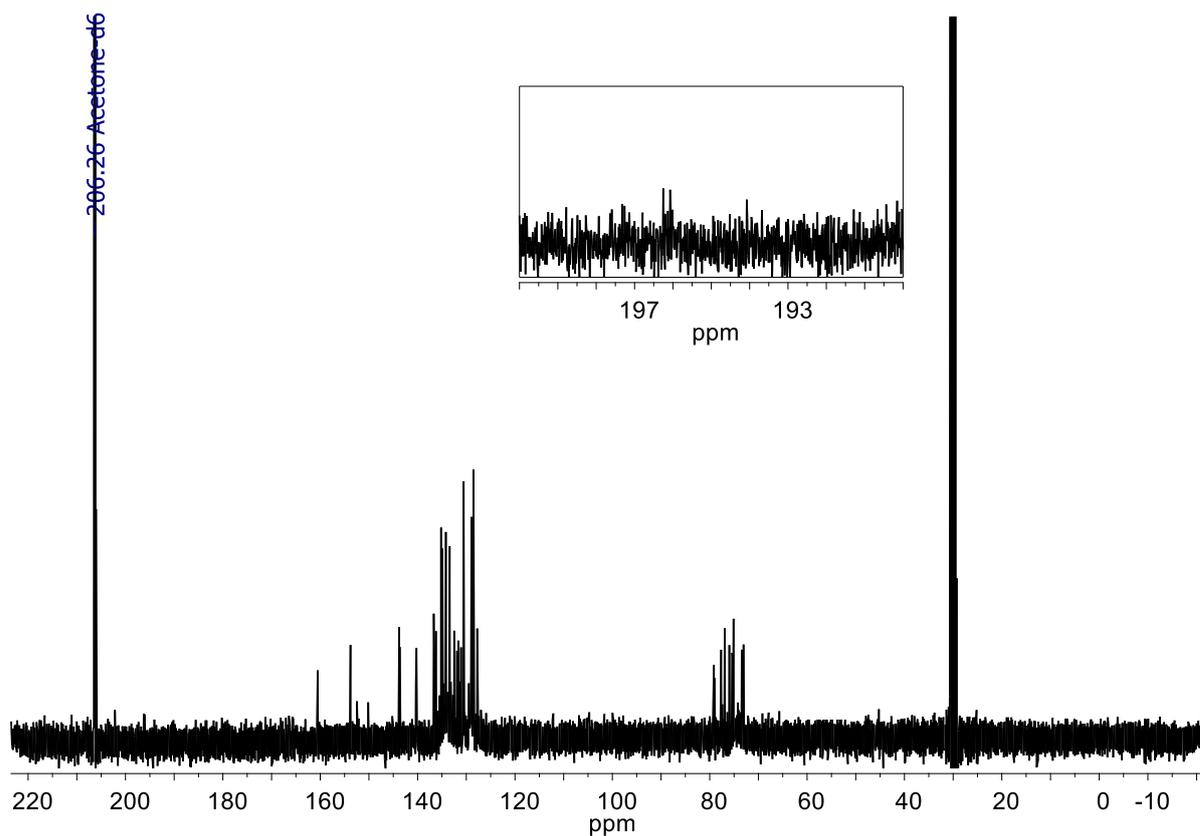


Figura A6.3 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do ct - $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **3**.

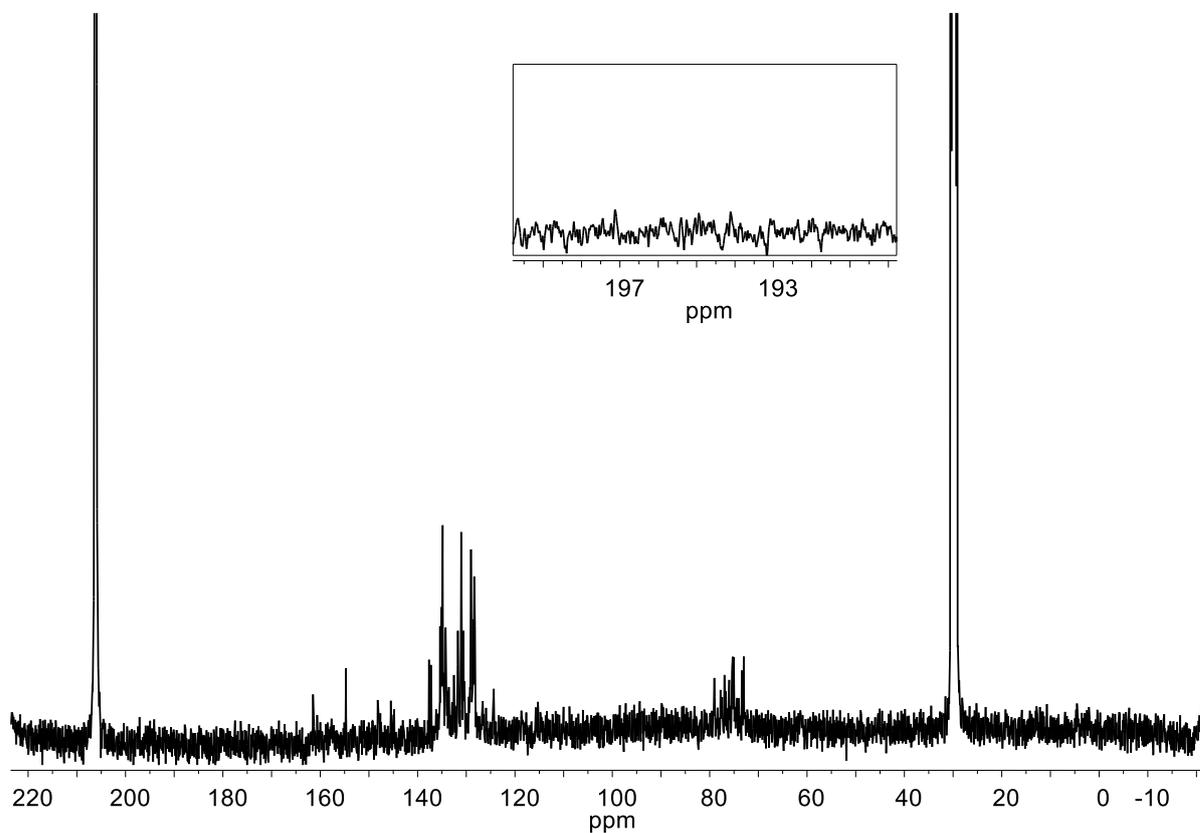


Figura A6.4 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do ct - $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **4**.

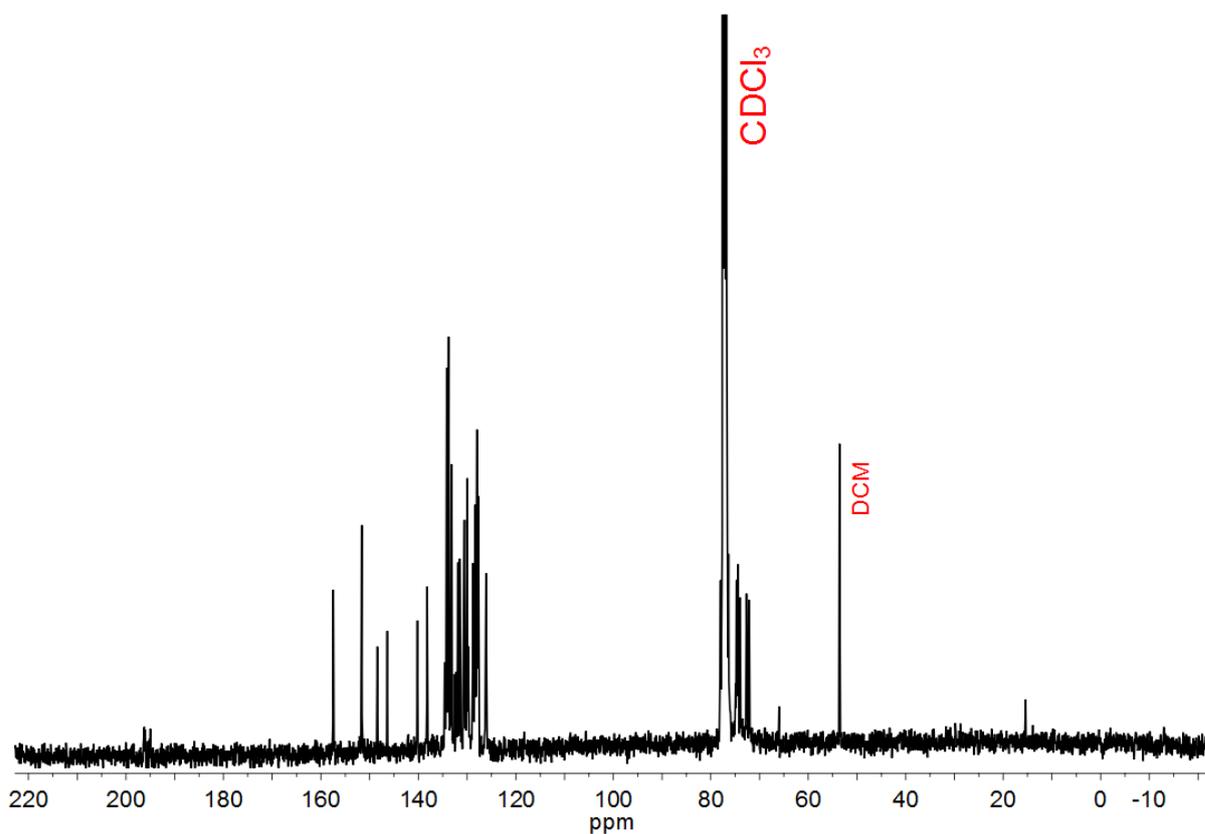


Figura A6.5 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do ct - $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{fen})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **1**.

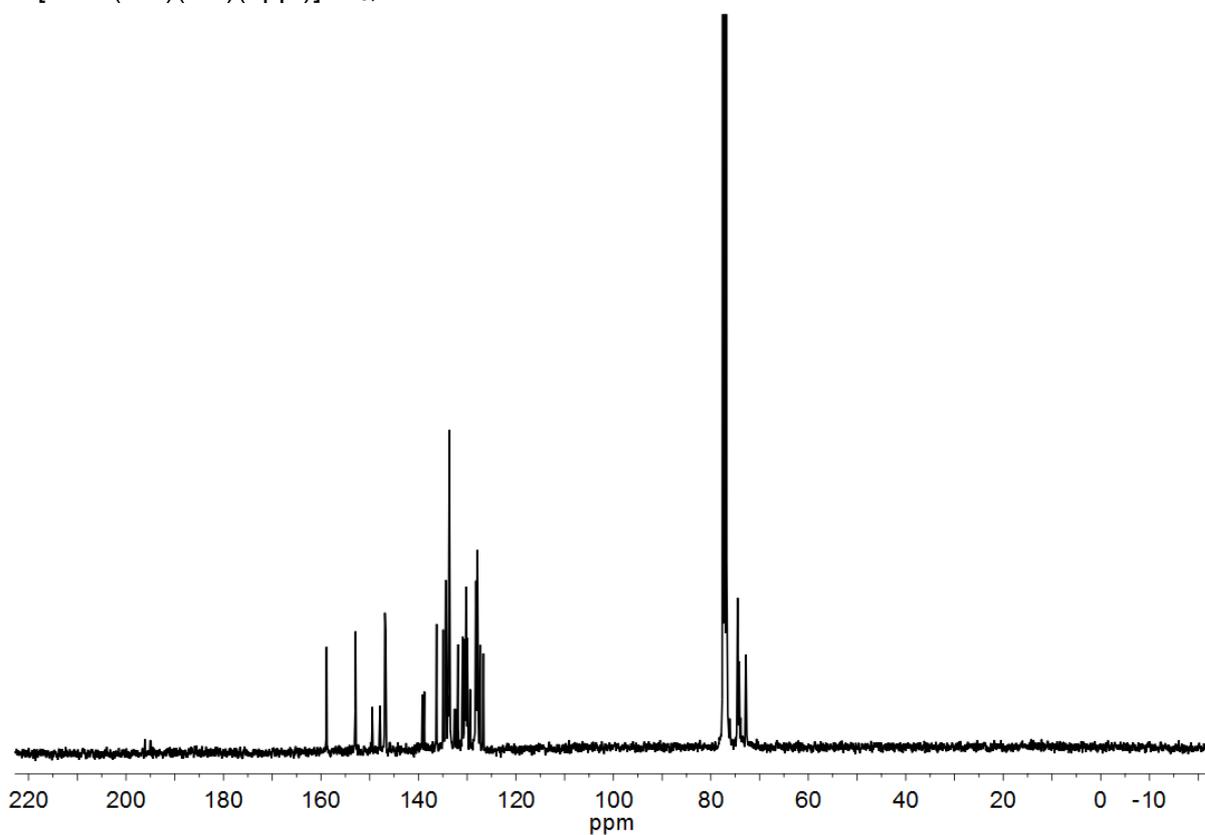


Figura A6.6 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do ct - $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **2**.

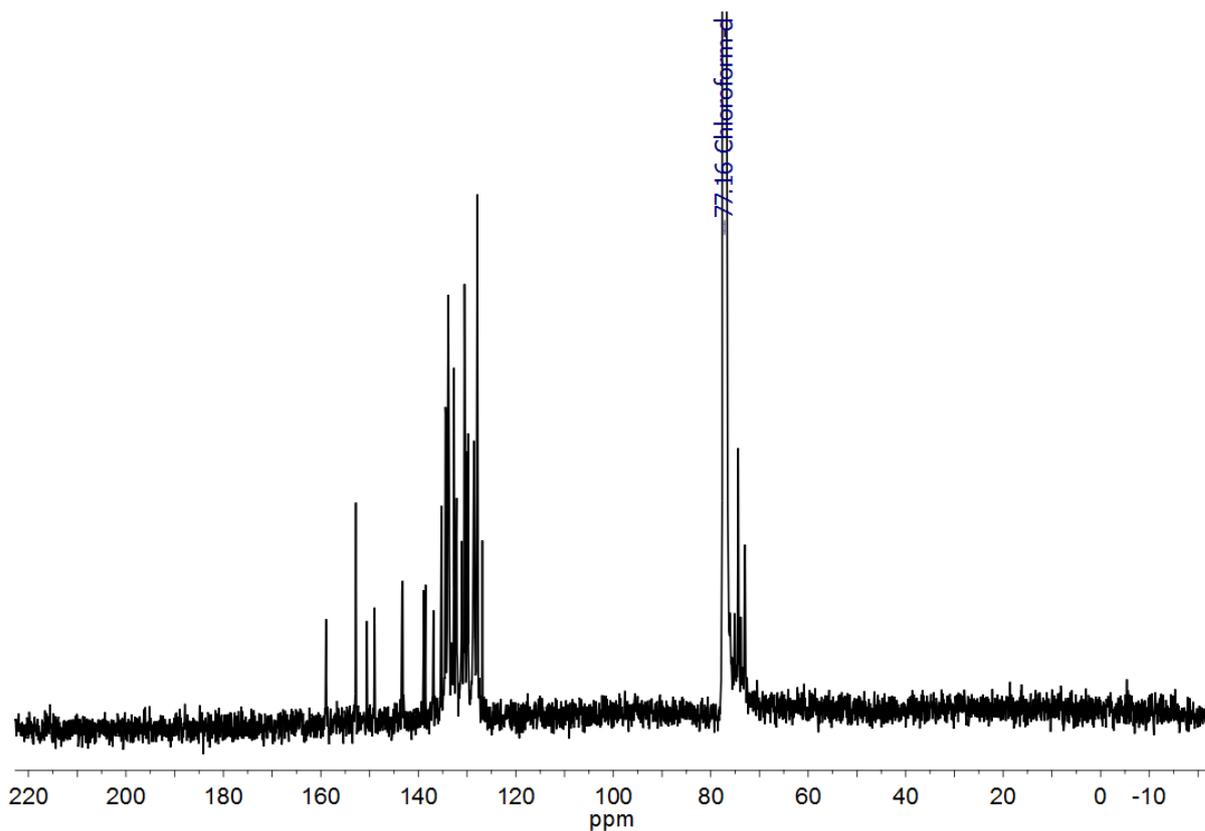


Figura A6.7 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **3**.

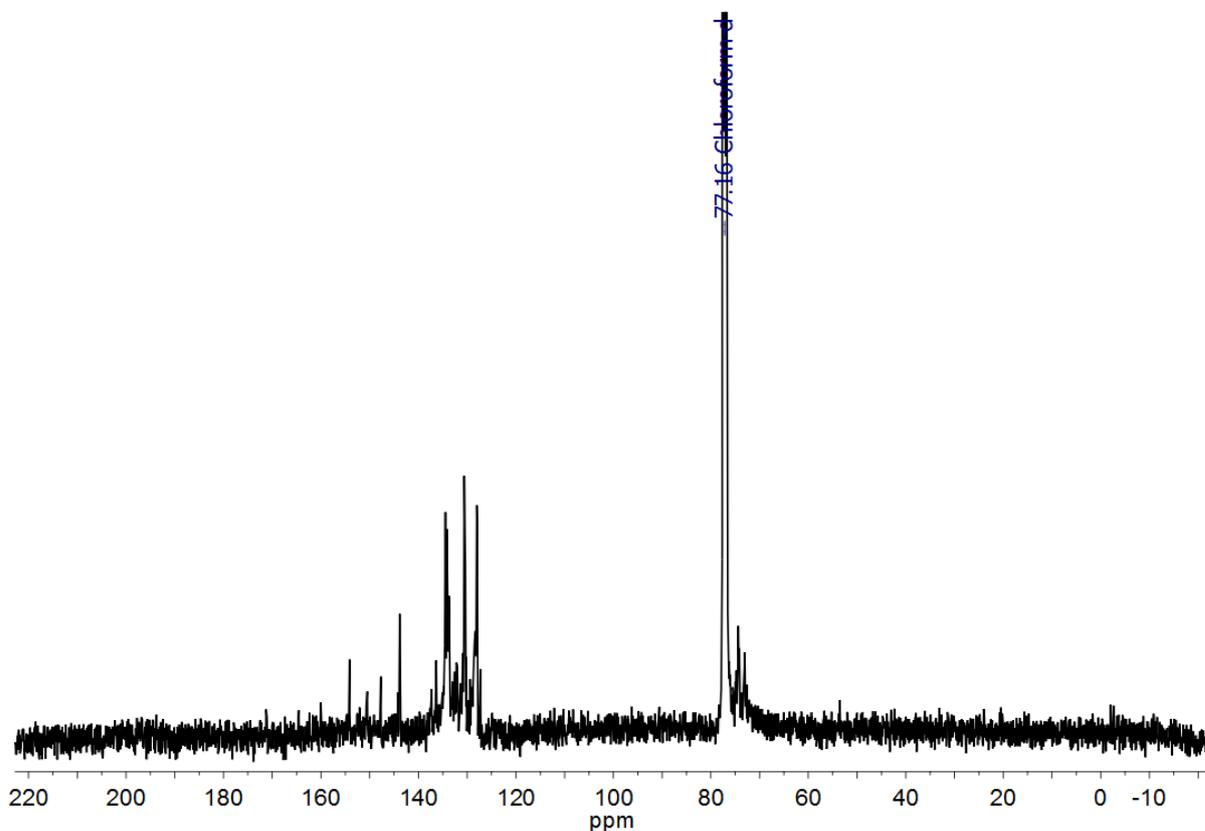


Figura A6.8 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dpq})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, **4**.

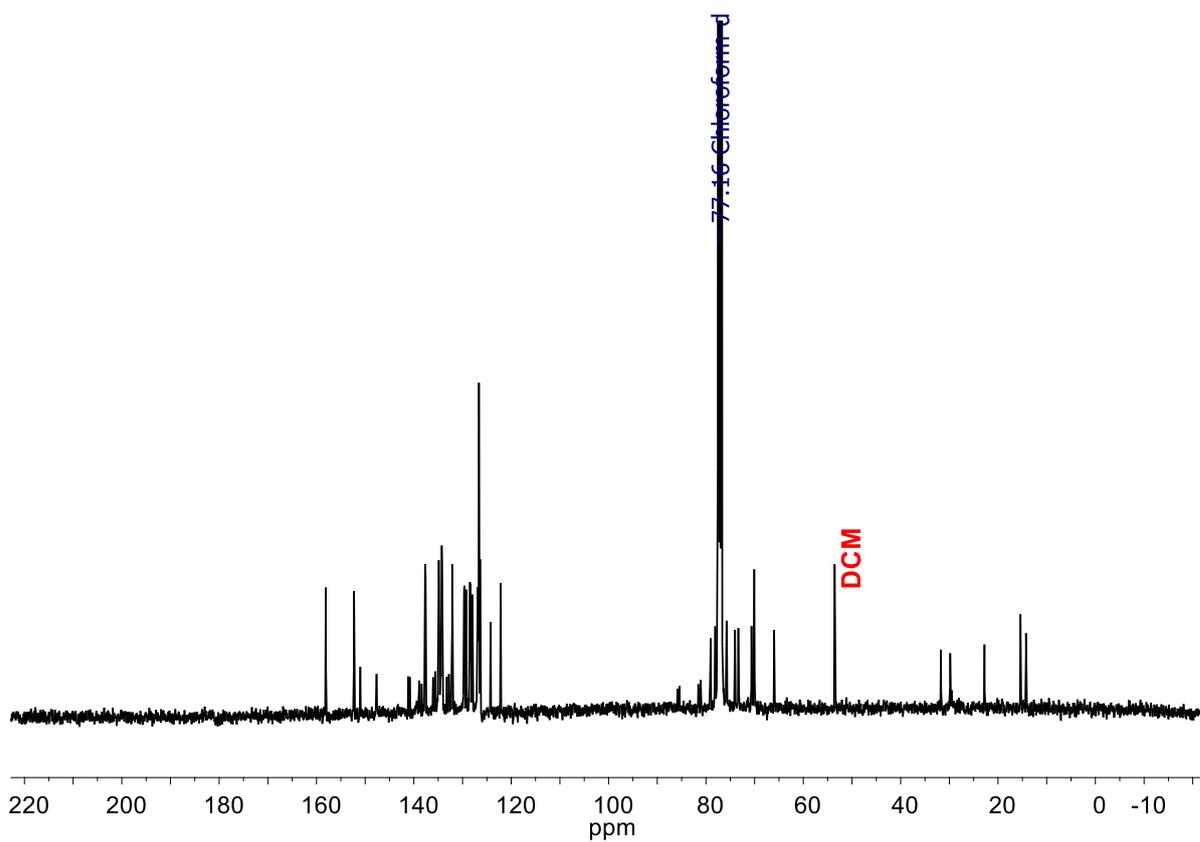


Figura A6.9 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1**.

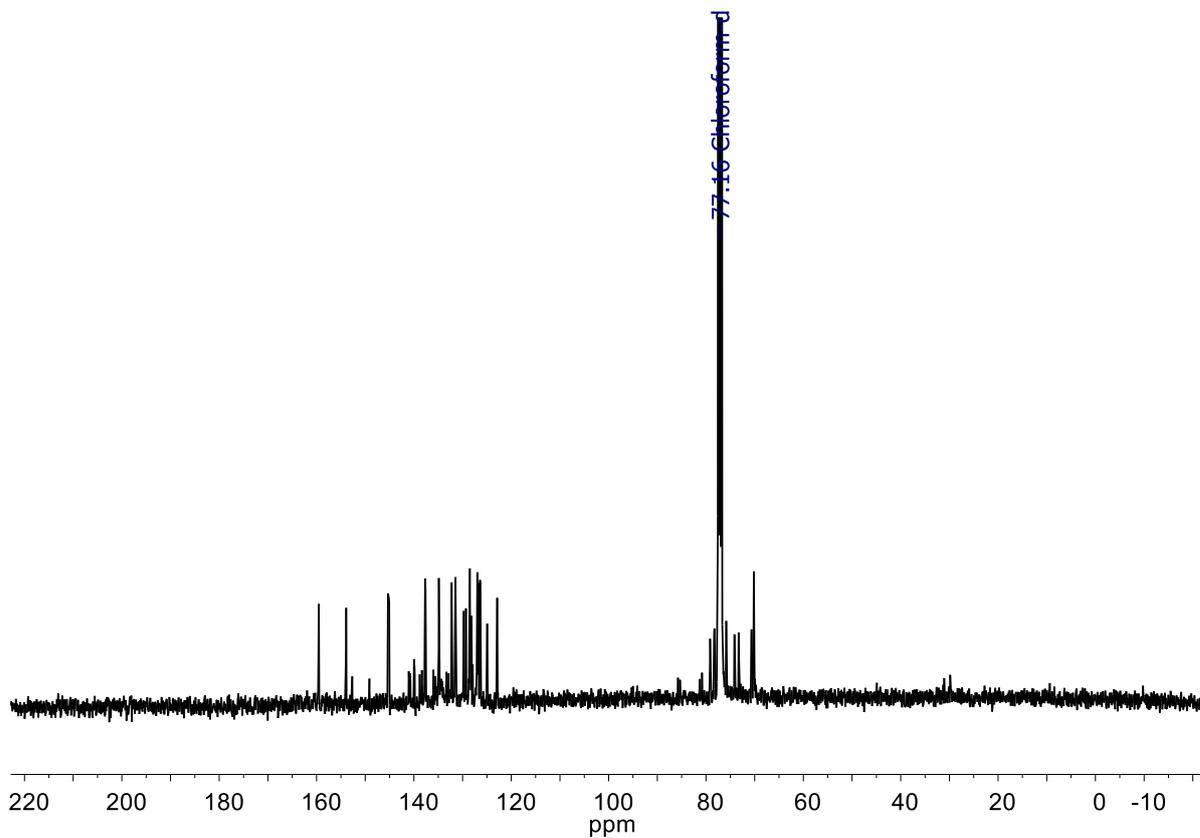


Figura A6.10 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2**.

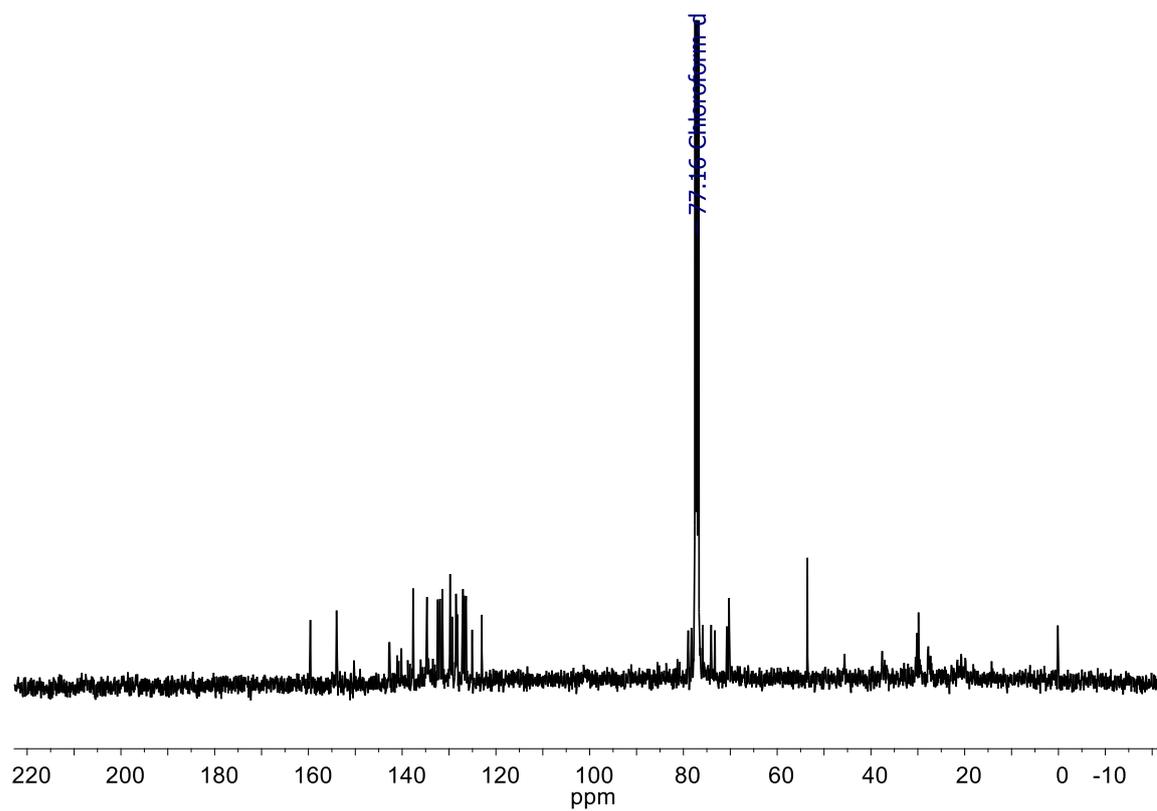


Figura A6.11 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppz})(\text{dppf})]$, **P3**.

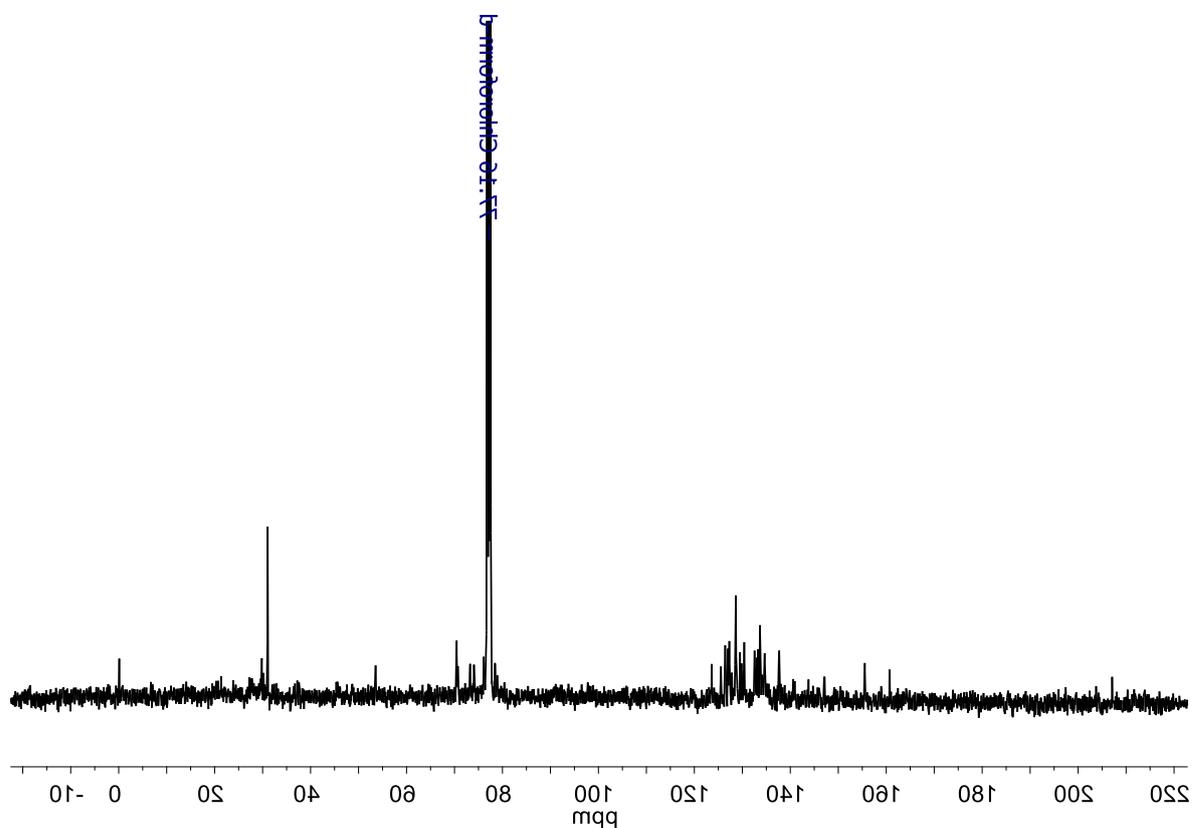


Figura A6.12 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dpqQX})(\text{dppf})]$, **P4**.

Apêndice 7. Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial.

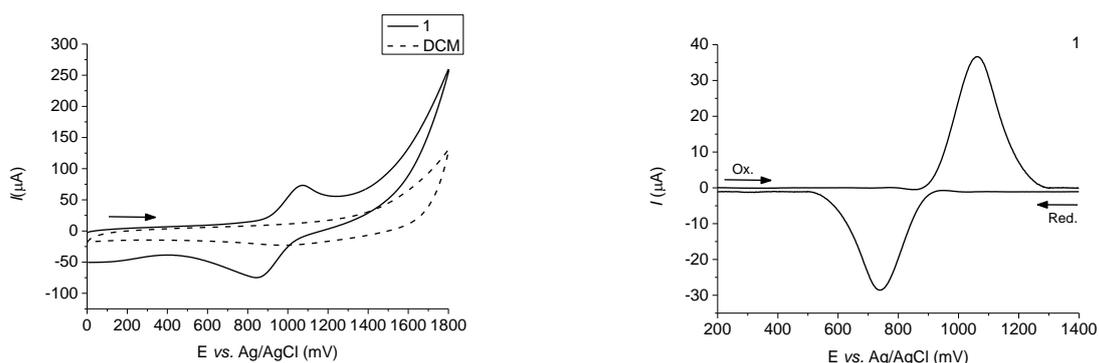


Figura A7.1 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do ct -[RuCl(CO)(fen)(dppf)]PF₆, **1**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ $E_{1/2} = 548$ mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

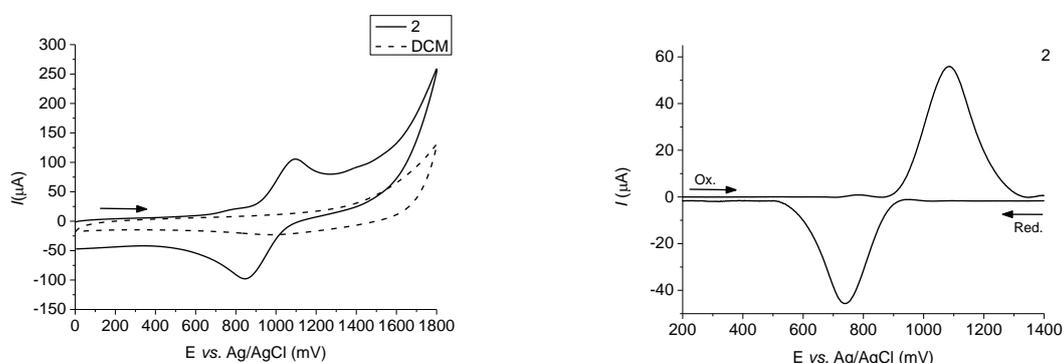


Figura A7.2 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do ct -[RuCl(CO)(dpq)(dppf)]PF₆, **2**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ $E_{1/2} = 548$ mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

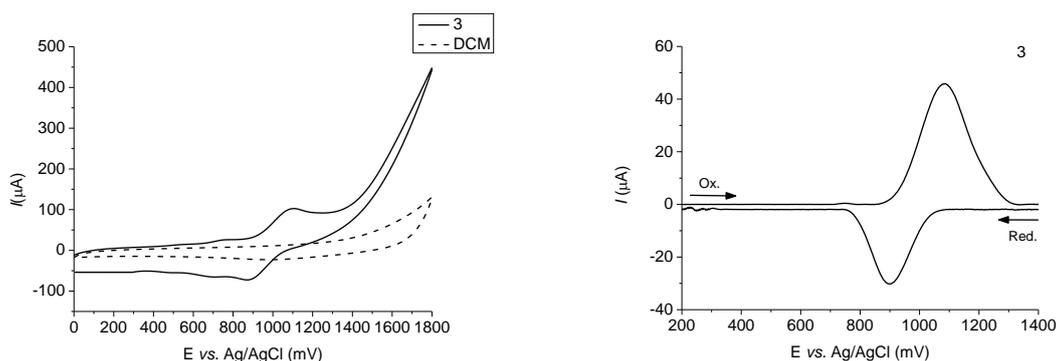


Figura A7.3 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do ct -[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF₆, **3**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ $E_{1/2} = 548$ mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

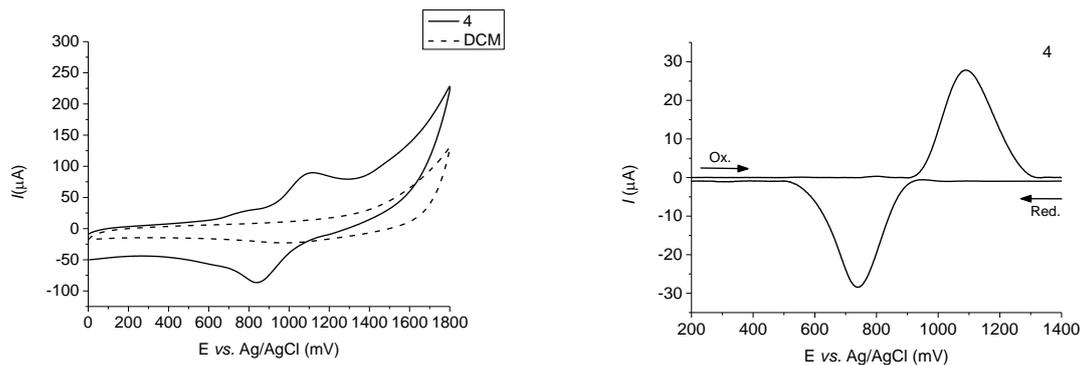


Figura A7.4 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do *ct*-[RuCl(CO)(dpqQX)(dppf)]PF₆, **4**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ E_{1/2} = 548 mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

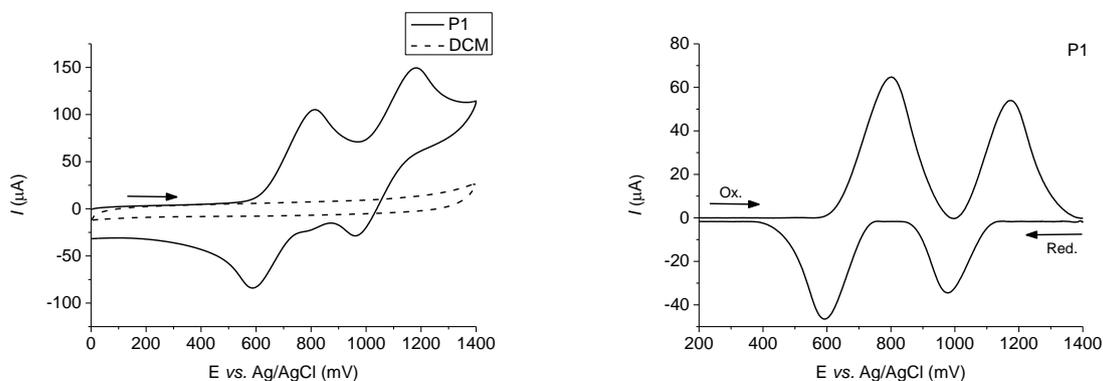


Figura A7.5 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], **P1**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ E_{1/2} = 528 mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

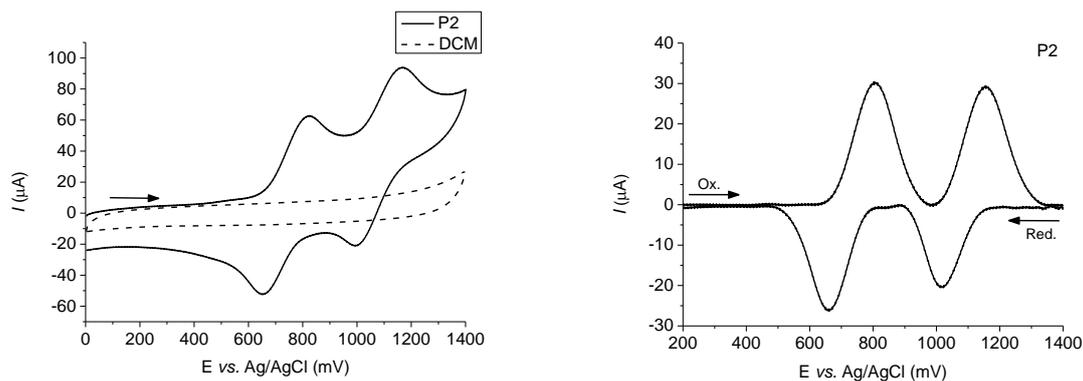


Figura A7.6 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], **P2**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ E_{1/2} = 528 mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

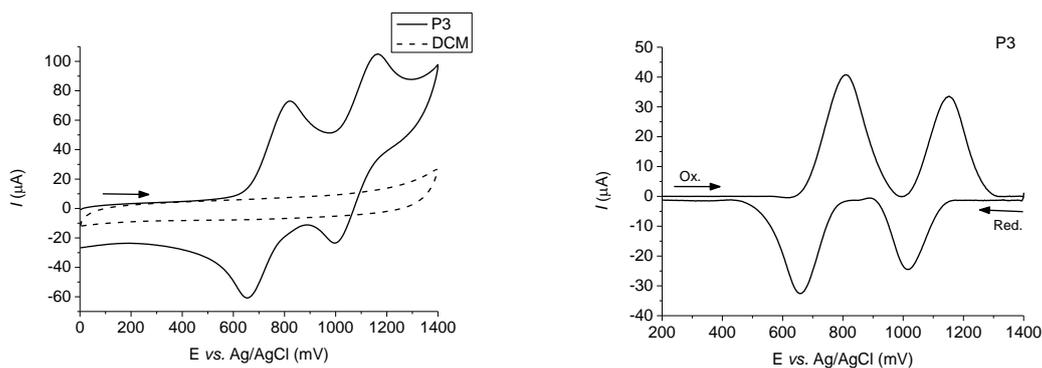


Figura A7.7 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do *cis*-[RuCl₂(dppz)(dppf)], **P3**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ $E_{1/2} = 528$ mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

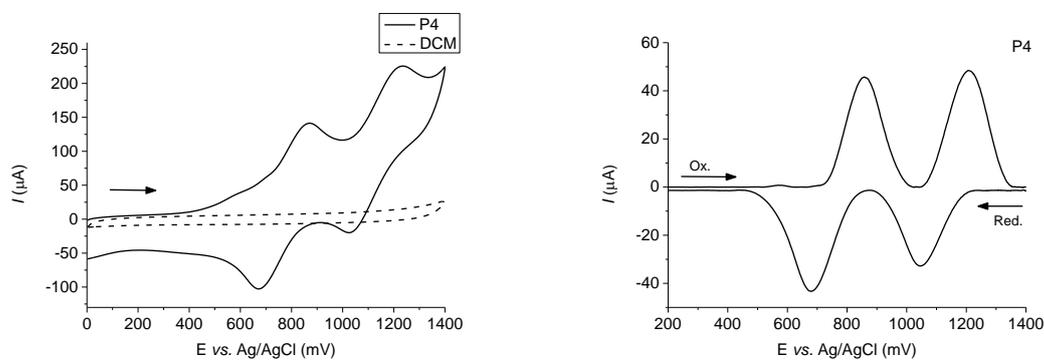


Figura A7.8 - Voltamograma cíclico (esquerda) e de pulso diferencial com correção de linha base (direita) do *cis*-[RuCl₂(dpqQX)(dppf)], **P4**, em solução de DCM 0,1 M de PTBA vs. Ag/AgCl. No meio de trabalho para o par Fc/Fc⁺ $E_{1/2} = 528$ mV. Velocidade de varredura: 200 mV/s.

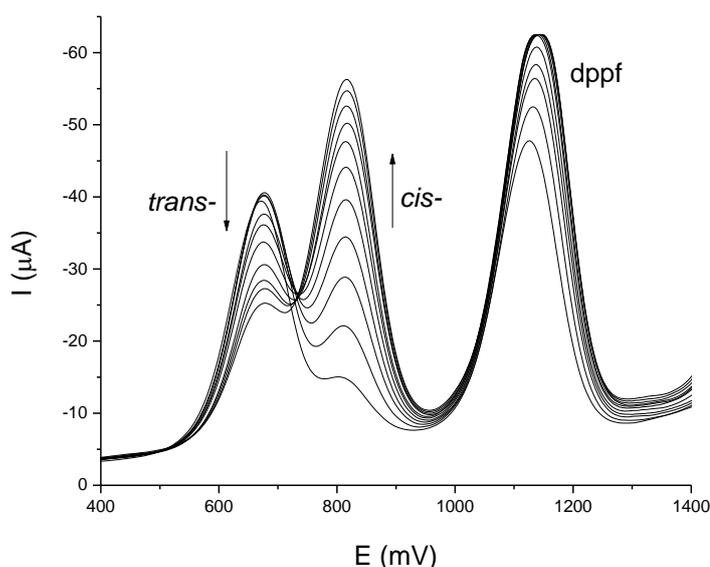
Apêndice 8. Seguimento da isomerização *trans-cis* para o [RuCl₂(dpq)(dppf)], P2.


Figura A8.1 - Processo de foto-isomerização *trans-cis* do [RuCl₂(dpq)(dppf)] seguido por voltametria de pulso diferencial em solução 0,1M de PTBA em DCM vs. Ag/AgCl (T = 294 K). Com o decorrer do tempo, pode-se observar a diminuição na intensidade da sinal do processo de oxidação Ru(II) → Ru(III) para o isômero *trans-* acompanhado pelo aumento na intensidade da sinal referente ao mesmo processo no isômero *cis-*. O potencial para o processo de oxidação Fe(II) → Fe(III) centrado na dppf, fica imutável.

Tabela A8.1 - Valores das constantes de velocidade (*k*) e da energia de Gibbs de ativação (ΔG^\ddagger) as temperaturas de trabalho (T), para a reação de isomerização *trans-cis* de P2.

T (K)	<i>k</i> (s ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (s)	ΔG^\ddagger (J·mol ⁻¹)
290	5,81×10 ⁻⁵	1,18×10 ⁴	9,42×10 ⁴
294	2,71×10 ⁻⁴	2,55×10 ³	9,41×10 ⁴
304	5,90×10 ⁻⁴	1,2×10 ³	9,38×10 ⁴
308	7,06×10 ⁻⁴	9,81×10 ²	9,37×10 ⁴

Tabela A8.2 - Parâmetros cinéticos (A, Ea) e termodinâmicos (ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger) determinados para a reação de isomerização *trans-cis* de P2.

Parâmetro	Valor
A, constante pre-exponencial	3,48×10 ¹⁴ s ⁻¹
Ea, energia de ativação	1,04×10 ⁵ J·mol ⁻¹
ΔH^\ddagger , entalpia de ativação	1,01×10 ⁵ J·mol ⁻¹
ΔS^\ddagger , entropia de ativação	2,51×10 ¹ J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹

Apêndice 9. Dados cristalinos e de refinamento dos complexos precursores *cis*-[RuCl₂(fen)(dppf)], P1; *cis*-[RuCl₂(dpq)(dppf)], P2 e *cis*-[RuCl₂(dppz)(dppf)], P3.

	P2	P3
Fórmula empírica	C ₄₈ H ₃₆ Cl ₂ FeN ₄ P ₂ Ru	C ₅₂ H ₃₈ Cl ₂ FeN ₄ P ₂ Ru
Massa molecular	958,57	1008,65
Temperatura (K)	296(2)	294(2)
Comprimento de onda (Å)	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c
<i>Dimensões da cela unitária</i>		
<i>a</i> (Å); α (°)	9,8487(5); 90	21,4979(14); 90
<i>b</i> (Å); β (°)	24,0956(13); 101,241(4)	9,7578(4); 105,565(3)
<i>c</i> (Å); γ (°)	19,1473(13); 90	22,7530(15); 90
Volume (Å ³)	4456,7(5)	4597,9(5)
Z	4	4
<i>D</i> _{calc} (Mg/m ³)	1,429	1,529
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,894	0,876
<i>F</i> (000)	1944	2168
Tamanho do cristal (mm ³)	0,00 x 0,00 x 0,00	0,024 x 0,093 x 0,377
Faixa de tetha para a captação dos dados (°)	1,7-25,0	2,584-24,422
Index ranges	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -28 ≤ <i>k</i> ≤ 28, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 22	-25 ≤ <i>h</i> ≤ 22, -9 ≤ <i>k</i> ≤ 11, -26 ≤ <i>l</i> ≤ 24
Reflexões coletadas	29941	20606
Reflexões independentes [<i>R</i> (int)]	7834 [0,101]	7500 [0,0800]
Completeness to theta	=25,042°, 99,6%	= 25,242°, 90,1%
Dados/restrições/parâmetros	7834/0/524	7590/0/560
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0,95	1,007
Índices <i>R</i> finais [<i>I</i> > 2.0σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0,0514, <i>wR</i> ₂ = 0,1396	<i>R</i> ₁ = 0,0564, <i>wR</i> ₂ = 0,1425
Largest difference in peak and hole (eÅ ⁻³)	-0,57 e 0,69	1,153 e -0,988