

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – DOUTORADO
UEL/UEPG/UNICENTRO

IVELISE DIMBARRE LAO GUIMARÃES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DERIVADOS OBTIDOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO-ARENO**

PONTA GROSSA-PR
2020

IVELISE DIMBARRE LAO GUIMARÃES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DERIVADOS OBTIDOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO-ARENO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Wohnrath

Coorientador: Prof. Dr. Jarem Raul Garcia

PONTA GROSSA-PR
2020

Guimarães, Ivelise Dimbarre Lao

G963 Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de derivados obtidos de complexos de rutênio-areno / Ivelise Dimbarre Lao Guimarães. Ponta Grossa, 2020.
260 f.

Tese (Doutorado em Química • Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Wohnrath.
Coorientador: Prof. Dr. Jarem Raul Garcia.

1. Complexos de rutênio-areno. 2. Ligantes triarilfosfina e 3-metil piridina. 3. Atividade citotóxica. 4. Mecanismos de ação. 5. Monocamadas de Langmuir. I. Wohnrath, Karen. II. Garcia, Jarem Raul. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

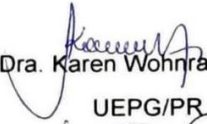
CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

IVELISE DIMBARRE LAO GUIMARÃES

“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS OBTIDOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO-ARENO”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.


Profa. Dra. Karen Wohnrath (Orientador)

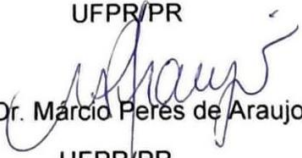
UEPG/PR


Prof. Dr. Jarem Raul Garcia (Coorientador)

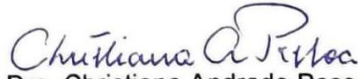
UEPG/PR


Prof. Dr. Herbert Winnischofer

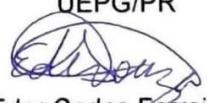
UFPR/PR


Prof. Dr. Marcio Peres de Araujo

UFPR/PR


Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa

UEPG/PR


Prof. Dr. Eder Carlos Ferreira de Souza

UEPG/PR

Ponta Grossa, 14 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais Ivo e Valquíria, por todo esforço e dedicação em todos os momentos, e ao meu esposo Nelton, pelo incentivo e ajuda para prosseguir em busca dos meus objetivos. A vocês, minha gratidão!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo a Deus, que me deu inspiração, força e sabedoria em todos os momentos de minha vida.

À minha família, principalmente meus queridos pais Ivo e Valquíria, meus irmãos Ivonei e Daniel, que me deram o apoio e o incentivo sempre, para que a concretização deste trabalho fosse atingida. Agradeço ainda meu esposo e melhor amigo Nelton, que me deu todo suporte durante estes anos da pós-graduação e a minha cunhada Norma (*in memoriam*), meu maior exemplo de fé, amor e perseverança. Por todo carinho que dedicaram, amo vocês!

À Prof^a. Dr^a. Karen Wohnrath, pela orientação nestes 5 anos e por todos os ensinamentos compartilhados. Obrigada por seu apoio incondicional, incentivo, confiança e pela amizade sincera. Tenho um carinho enorme por você e te agradeço muito por ter contribuído para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Jarem Raul Garcia, por intervir e possibilitar minha entrada no Doutorado. Obrigada por ter me encaminhado e me indicado um caminho, além, de sua coorientação nestes anos.

Ao Prof. Dr. René T. Boéré, que me orientou no período do doutorado sanduíche, na Universidade de Lethbridge, Canadá. Sou grata pelo aprendizado obtido, pelas discussões e pela disponibilidade dos equipamentos e reagentes para realização do trabalho em seu laboratório. Agradeço também pela amizade, carinho e atenção que você e sua família me dedicaram, e por todos os bons momentos que me proporcionaram, deixando saudades e boas recordações para sempre. Também o agradeço pela resolução e estudo das estruturas cristalográficas, além dos experimentos de eletrólise.

À Prof^a. Dr^a. Christiana Andrade Pessôa e aos amigos e colegas do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM), pelas conversas, momentos de descontração e por terem compartilhado conhecimento, vocês foram essenciais nessa caminhada.

Aos professores da banca, Prof. Dr. Márcio Peres de Araujo, Prof. Dr. Herbert Winnischofer, Prof^a. Dr^a. Christiana Andrade Pessôa e Prof. Dr. Éder Souza por aceitarem o convite para participar na banca de defesa.

Às minhas queridas amigas que o doutorado me concedeu, Flávia, Rafaela, Juliane, Franciane e Francielli pela amizade verdadeira, por estarem presentes em momentos importantes que ficarão marcados e pela ajuda em várias etapas do trabalho. Nossa amizade é para sempre. Obrigada!

Ao Nathan e ao Eric, pela recepção, ajuda e amizade durante o tempo que passei no laboratório na Universidade de Lethbridge. Aos demais colegas e amigos do doutorado, principalmente Elenice, Luiz, Renan, Daniele e Ariane, pelas nossas discussões e apoio neste período. Ao Prof. Dr. João Frederico Hass Monteiro, meu amigo Ico, pelo auxílio nas discussões durante elaboração da escrita, pela atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Márcio Peres de Araujo e à Prof^a. Dr^a. Juliana Paula da Silva (UFSC) pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto, pelas discussões importantes e também pela amizade e companheirismo.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Castellen pelo auxílio nos testes de interação com o DNA e também pelos testes antibacterianos. À Prof^a. Dr^a. Tania Toyomi Tominaga pela ajuda inicial nas discussões dos testes de citotoxicidade. À Dr^a. Kátia Mara de Oliveira e ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar), além do Prof. Dr. Roy Golsteyn (UofL) pelos testes de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Lázaro e ao Dr. Renan Ribeiro pelos cálculos teóricos realizados. À Prof^a. Dr^a. Bárbara Celânia Fiorin e ao Prof. Dr. Thiago Rozada por algumas das análises e treinamento do RMN. À Profa. Dra. Vanessa Egea e a Msc. Renata Martins pelas medidas de absorção atômica em forno grafite.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr (IFSC-USP) pela acolhida e permissão para realização das primeiras medidas das monocamadas de Langmuir. À Dr^a. Ellen Wrobel e à Dr^a. Bianca Sandrino, pelo auxílio nas medidas e discussões.

À Prof^a. Dr^a. Carol Galvão (LABMOM-UEPG) por disponibilizar a infraestrutura necessária para realizar os testes antibacterianos. Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-labmu) pelas análises de FTIR e Raman.

Ao Programa de Doutorado em Química e agências brasileiras (CNPq PVE 401271/2014-5 e CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa de estudo.

*“ Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que
faz a diferença. ”*

Benjamin Franklin

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses”

Rubem Alves

RESUMO

O presente trabalho objetiva o estudo de compostos organometálicos de Ru(II)(η^6 -*p*-cimen) contendo como ligantes as triarilfosfinas (PAr₃) mono e 3,5-dissubstituídas e o *N*-heterocíclico 3-metilpiridina (N). Para isso, foi realizada a síntese do ligante Ar= 3,5-di-*terc*-butilfenil (**L1**) e sua reatividade foi testada com os calcogênios O, S, Se, de modo a obter seus derivados inéditos E= PAr₃ e estáveis (**L5-L7**). Além do **L1**, os ligantes com o grupo Ar= 3,5-dimetilfenil (**L2**), 4-metóxi-3,5-dimetilfenil (**L3**) e 4-metóxfenil (**L4**) foram utilizados na síntese de uma série de complexos neutros, [Ru(η^6 -*p*-cimen)PAr₃Cl₂] (**1-4**), e catiônicos, [Ru(η^6 -*p*-cimen)PAr₃NCl] (**5-8**). A composição e estrutura desses compostos foi elucidada com base em análise elementar, técnicas espectroscópicas, tais como RMN de ³¹P{¹H}, ¹H, ¹³C{¹H}, FTIR, UV-Vis, além de condutividade molar. Dentre os complexos obtidos, apenas o **4** é reportado na literatura, porém, sem ter sua caracterização cristalográfica e estudo biológico. Por cálculos teóricos obtidos pela técnica DFT avaliou-se a estereoquímica e o efeito do impedimento estérico do **L1**. As estruturas cristalográficas dos complexos **1-8** foram elucidadas por difratometria de raios X de monocristal e os cálculos DFT desses complexos auxiliaram na determinação das estruturas moleculares e eletrônicas, de modo a auxiliar na interpretação dos resultados de espectroscopia UV-Vis e voltametria cíclica. Os resultados destas técnicas indicam que os ligantes PAr₃ e N estabilizam a unidade Ru(II)(η^6 -*p*-cimen). A atividade citotóxica desses complexos foi avaliada contra as linhagens celulares MRC-5 (pulmão não tumoral), A549 (câncer de pulmão), MDA-MB-231 (câncer de mama), U2-OS (câncer ósseo humano) e os resultados revelaram que **1**, **2** e **4** apresentam alta citotoxicidade, sendo o **1** inativo em relação à linha celular MRC-5, indicando boa seletividade. Já os complexos **5-8** demonstraram atividade promissora. Os testes antibacterianos realizados por disco de difusão e pela determinação da concentração mínima inibitória (CIM) contra modelos de bactérias Gram positivas (*S.aureus* e *B.subtilis*) e Gram negativa (*E.coli*), demonstraram baixos valores de CIM, principalmente para alguns complexos da série (**5-8**). A partir desses resultados preliminares e promissores, foi investigado um provável mecanismo de ação por meio da viscosidade, a fim de avaliar a interação dos complexos com o DNA. Dados obtidos das técnicas de microscopia de fluorescência e microfluídica indicaram que a possível interação destes complexos no meio biológico pode ser com as membranas celulares. Desta forma, estudos de monocamadas de Langmuir foram realizados como modelo alternativo de membrana de câncer (DPPS= 1,2-dipal-mitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sódio), de células saudáveis (DOPC= 2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-colina), de bactéria (*S. aureus* com 55% de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol e 45% de cardiolipina). As alterações das isotermas de pressão e de potencial indicaram que os complexos modificaram o ordenamento das membranas, sugerindo possível interação, cujo efeito foi correlacionado com o potencial biológico dos compostos organometálicos sintetizados.

Palavras-chave: Complexos de rutênio-areno, triarilfosfinas, 3-metilpiridina, atividade citotóxica, atividade antibacteriana, mecanismo de ação, monocamadas de Langmuir.

ABSTRACT

The present work aims the study of organometallics compounds of Ru(II)(η^6 -*p*-cymene), including ligands such as triarylphosphines (PAr₃), mono and 3,5-disubstituted and N heterocyclic 3-methylpyridine (N). For this purpose, the synthesis of the ligand Ar= 3,5-di-*tert*-butylphenyl (**L1**) and its reactivity with O, S, Se were performed, in order to obtain its novel and stable derivatives E = PAr₃ (**L5-L7**). In addition to **L1**, the ligands with the group Ar= 3,5-dimethylphenyl (**L2**), 4-methoxy-3,5-dimethylphenyl (**L3**) and 4-methoxyphenyl (**L4**) were used in the synthesis of a series of neutral complexes, [Ru(η^6 -*p*-cymene)PAr₃Cl₂] (**1-4**), and cationic, Ru(η^6 -*p*-cymene)PAr₃NCl] (**5-8**). The composition and structure of the compounds were elucidated based on elementary analysis, spectroscopic techniques, such as ³¹P{¹H}, ¹H, ¹³C{¹H} NMR, FTIR, UV-Vis, in addition to molar conductivity. Among the complexes obtained, only **4** is reported in the literature, however, without crystallographic characterization and biological studies. Theoretical calculations obtained by the DFT technique evaluated the stereochemistry and the effect of the **L1** steric hindrance. The crystallographic structures of complexes **1-4** and **5-8** were elucidated by monocrystal X ray diffractometry and the DFT calculations of these complexes helped to determine the molecular and electronic structures, in order to assist in the interpretation of the results of UV-Vis spectroscopy and cyclic voltammetry, and the results of these techniques indicate that the PAr₃ and N ligands stabilize the Ru (II)-(η^6 -*p*-cymene) unit. The complexes were subjected to evaluation of cytotoxic activity against the cell lines MRC-5 (non-tumor lung), A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), U2-OS (human bone cancer) and the results revealed that **1**, **2** and **4** show high cytotoxicity, with **1** being inactive in relation to the MRC-5 cell line, indicating good selectivity. Complexes **5-8** showed promising activity. The antibacterial tests performed by diffusion disc and by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), against Gram positive (*S.aureus* and *B.subtilis*) and Gram negative (*E.coli*) bacteria models, demonstrated low MIC values, mainly for some complexes in the series (**5-8**). From these preliminary, but promising results, a probable mechanism of action through viscosity was investigated in order to evaluate the interaction of complexes with DNA. Data obtained from fluorescence microscopy and microfluidics techniques indicated that the possible interaction of these complexes in the biological environment can be with cell membranes. Thus, studies of Langmuir monolayers were performed with cancer membrane models (DPPS = 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine sodium), of bacteria (*S. aureus* with 55% 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylglycerol (DOPG) and 45% cardiolipin (CL)) and healthy cells (DOPC= 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-choline). By pressure and potential isotherm measurements, it was noted that the complexes altered the ordering of the membranes, indicating possible interaction, correlating with their biological potential.

Keywords: Ruthenium-arene complexes, triarylphosphines, 3-methylpyridine, cytotoxic activity, antibacterial activity, mechanism of action, Langmuir monolayers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1: Representação dos orbitais e as interações entre metal-ligante: a) ligação σ ; b) retroligação π	34
Figura 2. 2: Diagrama de orbitais M-PR ₃ : a) Representação do diagrama para formação dos complexos M-PR ₃ ; b) O orbital vazio P-R σ^* estabiliza com o aumento da eletronegatividade do átomo ligado ao fósforo (R), diminuindo a energia deste orbital e, consequentemente, tornando-o melhor aceitador da ligação com metal.	35
Figura 2. 3: Ângulo de Tolman para molécula Ni-PR ₃	36
Figura 2. 4: Efeitos estéricos em substituintes PAr ₃	39
Figura 2. 5: Espectros vibracionais na região do infravermelho para L1 e derivados (L5-L7) em pó, obtidos por espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR).....	46
Figura 2. 6: Espectros de RMN dos ligantes L1 , L5-L7 : (a) RMN ³¹ P{ ¹ H} (121,49 MHz, CDCl ₃); (b) RMN ¹ H (300,13 MHz, CDCl ₃). (Expansão RMN ¹ H, região entre 7,00-7,60 ppm, em A2.1).	48
Figura 2. 7: Representação ORTEP das estruturas de L1 com 4 moléculas independentes P1, P100, P200 e P300. Cristais crescidos a partir de etanol 99%	50
Figura 2. 8: Elipsóides de deslocamento (30% de probabilidade) de (a) conformação "plana" designada por P1 contendo C1→C54; (b) uma das conformações helicoidais designadas por P100; (c) Diagramas de perspectiva das moléculas P1 e P100 para as principais conformações tBu na estrutura cristalina. (Moléculas P200 e P300, representação das estruturas, em A2.2).	51
Figura 2. 9: Desenho em perspectiva dos confôrmeros P (sentido horário) e M (sentido anti-horário) para as moléculas de hélice piramidal.	52
Figura 2. 10: Confôrmero de energia mínima obtida por DFT: grupos tBu superiores orientados com um grupo metil coplanar <i>syn</i> (vermelho) e todos os grupos tBu inferiores orientados <i>anti</i> (verde).	52
Figura 2. 11: Varreduras computacionais comparativas de energia no nível de teoria B3LYP/6-31G (2d, p) para L1 e PPh ₃ com otimização de todos os parâmetros além dos ângulos de torção C _{ipso} -P-C _{ipso} -C _{orto} . Conformações moleculares para os máximos e mínimos de energia também são representadas.....	53
Figura 2. 12: Perspectivas (vistas de cima) dos processos clássicos de "giro" para racemização das moléculas, segundo Mislow.	53
Figura 2. 13: Gráfico dos elipsoides de deslocamento (40% de probabilidade) de um dos dois dímeros com pontes de água, cristalograficamente independentes e centrossimétricos do L5	56

Figura 2. 14: Elipsóides de deslocamento (40% de probabilidade), que descreve a estrutura molecular do (a) L6 e (b) L7 , conforme encontrado em suas redes cristalinas.	56
Figura 2. 15: (a) Voltamogramas cíclicos das fosfinas L1-L4 obtidos em soluções CH ₃ CN/[nBu ₄ N] [ClO ₄] obtidas vs. Ag/AgCl a 100 mV e expressas na escala Fc ⁺ /0; (b) Basicidade de L1-L4 e PPh ₃ avaliada em função da correlação entre energias de E _{pa} e HOMO de DFT; (c) (Inser.) Diagrama da superfície orbital de Kohn-Sham para o orbital molecular da espécie reduzida de L1	58
Figura 3. 1: Imagem retratando a analogia entre a estrutura de um “ <i>piano-stool</i> ” (esquerda) e um complexo de rutênio-areno e seus ligantes XYZ (direita).....	65
Figura 3. 2: Compostos de Ru(II)-areno desenvolvidos por Dyson: A) RAPTA-C, B) RAPTA-T.	66
Figura 3. 3: Preparação dos complexos [Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimeno)(L)Cl ₂] contendo fosfinas e fosfitos fluorados.	67
Figura 3. 4: Rota sintética de complexos rutênio-areno com ligantes flavonóides e seus derivados (aminoflavonas).	69
Figura 3. 5: Complexos mono e bidentados sintetizados por Richter e colaboradores.....	70
Figura 3. 6: Espectros vibracionais na região do infravermelho para 1-4 obtidos em pastilhas de KBr.	85
Figura 3. 7: Espectros de espalhamento Raman, obtido no estado sólido para 1-4	88
Figura 3. 8: Espectros eletrônicos para a série 1-4 obtidos em 1.10 ⁻⁴ e 1.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em CH ₂ Cl ₂	89
Figura 3. 9: Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} para 1-4 em CDCl ₃ (300,13 MHz).	91
Figura 3. 10: Espectros de RMN de ¹ H para os complexos da série 1-4 , em CDCl ₃ (300,13 MHz). (Expansão dos sinais ver A3.10).....	93
Figura 3. 11: Espectros de RMN de ¹³ C{ ¹ H} para os complexos da série 1-4 obtidos em CDCl ₃ , (75,18 MHz).....	94
Figura 3. 12: Representação das estruturas para 1-4 pelo programa ORTEP. Elipsóides de deslocamento (50% de probabilidade) com os átomos principais representados.....	97
Figura 3. 13: Orbitais moleculares de fronteira e níveis de energia, com representações do orbital de Kohn-Sham para o complexo [Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimeno)PPh ₃ Cl ₂] em fase gasosa obtidos a partir dos cálculos DFT/TZVP/RPE0 com correção de dispersão.....	103
Figura 3. 14: Voltamogramas cíclicos para os complexos 1-4 a 2,0.10 ⁻³ mol L ⁻¹ em PTBA 0,1 mol L ⁻¹ em acetonitrila vs Ag/AgCl; obtido em 100 mV s ⁻¹	104

Figura 3. 15: Voltamogramas cíclicos para 1-4 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/AgCl; obtido em 100 mV s^{-1} , faixas de potencial de 0 a +1,5 V.....	105
Figura 3. 16: Voltamogramas cíclicos do 1 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$)	108
Figura 3. 17: Voltamogramas cíclicos do 2 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).....	108
Figura 3. 18: Voltamogramas cíclicos do 3 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).....	109
Figura 3. 19: Voltamogramas cíclicos do 4 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).....	109
Figura 3. 20: Espectros vibracionais na região do infravermelho para 5-8	112
Figura 3. 21: Espectros eletrônicos para 5-8 obtidos em $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em CH ₂ Cl ₂	114
Figura 3. 22: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da série 5-8 em CDCl ₃ (300,13 MHz).....	116
Figura 3. 23: Espectros de RMN de ^1H para 5-8 em CDCl ₃ (300,13 MHz). (Expansão dos sinais ver A3.23)	118
Figura 3. 24: Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para 5-8 em CDCl ₃ , (75,18 MHz).....	120
Figura 3. 25: Representação das estruturas catiônicas dos 5-8 pelo programa ORTEP. Elipsóides de Deslocamento (50% de probabilidade), mostrando apenas a numeração dos átomos principais.....	122
Figura 3. 26: Orbitais moleculares de fronteira e níveis de energia para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$, em fase gasosa obtidos a partir dos cálculos DFT/TZVP/RPE0 com correção de dispersão	126
Figura 3. 27: Voltamogramas cíclicos para 5-8 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila vs Ag/AgCl; obtido em 100 mV s^{-1}	127
Figura 3. 28: Voltamogramas cíclicos do 5 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).	130

Figura 3. 29: Voltamogramas cíclicos do 6 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).	131
Figura 3. 30: Voltamogramas cíclicos do 7 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).	131
Figura 3. 31: Voltamogramas cíclicos do 8 a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH ₃ CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag ⁺ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).	132
Figura 4. 1: Medicamentos de platina em uso clínico (com nomes genéricos em entre parênteses), e os anos em que receberam a aprovação regular total ou limitada.....	142
Figura 4. 2: Estruturas dos complexos: (A) NAMI-A; (B) KP1019.....	144
Figura 4. 3: Estrutura dos complexos (A): RAPTA-C, (B): RAPTA-T e (C) RM-175.....	146
Figura 4. 4: a) Estrutura da <i>cis</i> -diaminodicloroplatina II; b) mecanismo de ação da cisplatina do interior da célula.....	148
Figura 4. 5: Complexos de rutênio e rutênio-areno investigados por (A) Chao ^[38] e (B) Mitra ^[39]	149
Figura 4. 6: Representação de uma cuba de Langmuir e seus acessórios.....	151
Figura 4. 7: Representação esquemática de um fofolípídeo e a orientação destas na interface entre o ar e a água.....	151
Figura 4. 8: Isoterma de superfície para o fosfolípídeo DPPS, sendo (G) fase gasosa, (LE) fase líquido-expandido e (LC) fase líquido-condensada, sendo indicada a área de maior ordenamento (A _{ex}) a partir da tangente à fase condensada da isoterma.	152
Figura 4. 9: Estrutura química dos compostos (a) 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (DOPC), (b) 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo- <i>L</i> -serina (DPPS).	158
Figura 4. 10: Imagens de microscopia de luz com contraste de fase obtidas para os complexos da série 5-8 após 24 h.....	162
Figura 4. 11: Gráfico de viscosidade considerando o aumento da concentração dos complexos em relação a viscosidade relativa do CT-DNA ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) a 25°C.	167
Figura 4. 12: (A) Isotermas de pressão de superfície (π -A) (Inserção= módulos de compressão CS – 1) e (B) potencial de superfície (ΔV -A) para o filme de Langmuir dos complexos 1-4 em subfase de tampão PBS (pH = 7,4).....	169

Figura 4. 13: Isotermas de pressão de superfície (A) (inserção: CS – 1) e potencial de superfície (B) para o DPPS puro e misturas DPPS/complexos 5% dos complexos 1-4 em subfase de tampão PBS (pH = 7,4).....	171
Figura 4. 14: (A-C) isotermas π -A (Inserção C_S^{-1}) para os complexos 1, 2 e 4 respectivamente; (D-F) isotermas ΔV -A para monocamadas DPPS/ 1 , DPPS/ 2 e DPPS/ 4 mistas em tampão PBS (pH 7,4), para várias porcentagens molares dos complexos (5-90 %).....	173
Figura 4. 15: Análise termodinâmica de área em excesso (ΔA^E) (a, c, e) e excesso de energia livre (ΔG^E) (b, d, f) em função da razão molar dos complexos das monocamadas mistas DPPS/ 1 , DPPS/ 2 e DPPS/ 4 respectivamente, a $\pi = 5-30 \text{ mN m}^{-1}$	177
Figura 4. 16: Isotermas de pressão de superfície (A) (inserção: C_S^{-1}) e potencial de superfície (B) para o DOPC puro e misturas DOPC/complexos, 5% dos complexos 1-4 em subfase de tampão PBS (pH = 7,4).....	179
Figura 4. 17: (A-C) isotermas π -A (Inserção C_S^{-1}) para os complexos 1, 2 e 4 respectivamente; (D-F) isotermas ΔV -A para monocamadas DOPC/ 1 , DOPC/ 2 e DOPC/ 4 mistas em tampão PBS (pH 7,4), para várias porcentagens molares dos complexos (5-90 %).....	181
Figura 4. 18: Análise termodinâmica de área em excesso (ΔA^E) (a, c, e) e excesso de energia livre (ΔG^E) (b, d, f) em função da razão molar dos complexos das monocamadas mistas DOPC/ 1 , DOPC/ 2 e DOPC/ 4 respectivamente, a $\pi = 5-30 \text{ mN m}^{-1}$	183
Figura 5. 1: Estruturas possíveis para o SALVARSAN®.	193
Figura 5. 2: Estrutura básica da parede celular de uma bactéria Gram-positiva (a) e Gram-negativa (b).....	195
Figura 5. 3: Complexos mononucleares de polipiridilrutênio (II) com atividade antimicrobiana. (A) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$; (B) $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$	197
Figura 5. 4: Estruturas dos complexos da série: p,t - $[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PR}_3)(\text{tren})]\text{Cl}_2$	198
Figura 5. 5: A) Complexo de rutênio com 2-mercaptobenzotiazolina (Rumcbtz) e B) com 2-mercaptotiazolina (Rumctz)	199
Figura 5. 6: Estrutura química dos compostos (a) 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) e (b) 1',3'-bis[1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo]-glicerol (CL).	205
Figura 5. 7: (A) Halos de inibição para os complexos da série 1-4 e (B) seus respectivos ligantes e precursor contra <i>S. Aureus</i> e <i>E.Coli</i> . Controle positivo Canamicina e Controle negativo DMSO 6%.	206
Figura 5. 8: Halos de inibição para os complexos da série 5-8 contra <i>A-E.Coli</i> , <i>B-S.Aureus</i> e <i>C- B. subtilis</i> . Controle positivo Canamicina (KM^{100}) e Controle negativo DMSO 6%	207

Figura 5. 9: Imagens de microscopia de fluorescência de <i>B. subtilis</i> e <i>S. aureus</i> incubadas com os complexos 2 e 4 na concentração 2x (CIM). Membrana com corante verde FMI-43, ácidos nucleicos (DNA) com o corante azul DAPI e a permeabilidade celular (em vermelho) com o iodeto de propídio. Setas vermelhas: perda de integridade da membrana. Setas amarelas: vesículas na membrana.	211
Figura 5. 10: Influência do clorafenicol (B), complexo 4 (C), e CCCP (D) no crescimento das espécies bacterianas de <i>B. subtilis</i>	213
Figura 5. 11: Influência do cloranfenicol (B), Complexo 4 (C) e CCCP (D) na síntese de proteínas em <i>B. subtilis</i> . A intensidade de fluorescência normalizada (unidades arbitrárias) foi plotada contra o tempo em minutos	214
Figura 5. 12: Isotermas π -A e ΔV -A para o modelo de membrana da <i>S. Aureus</i> (DOPG/CL; 58/42) e suas monocamadas mistas contendo 5% de 1-4 espalhados sobre tampão PBS (pH 7,4).	215
Figura 5. 13: (A-C) Isotermas π -A (Inserção Cs^{-1}) para os complexos 1 , 2 e 4 respectivamente; e (D-F) Isotermas ΔV -A para as monocamadas mistas <i>S. Aureus</i> / 1 , <i>S. Aureus</i> / 2 , e <i>S. Aureus</i> / 4 , respectivamente, sobre subfase de tampão PBS (pH 7,4), para várias proporções dos complexos	217
Figura 5. 14: Análise termodinâmica de área em excesso (ΔA^E) (a, c, e,) e excesso de energia livre (ΔG^E) (b, d, f,) em função da razão molar dos complexos para as monocamadas mistas <i>S. Aureus</i> / 1 , <i>S. Aureus</i> / 2 , e <i>S. Aureus</i> / 4 , respectivamente, em $\pi = 5-30 \text{ mN m}^{-1}$	219

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1: Atribuição das bandas dos espectros FTIR (cm^{-1}) observadas para L1 e derivados (L5-L7).....	47
Tabela 2. 2: Cristal, determinação da estrutura e parâmetros de refinamento.	55
Tabela 2. 3: Dados voltamétricos experimentais e energias dos orbitais redox calculadas por DFT.	58
Tabela 3. 1: Valores Experimentais (Exp.) e calculados (Cal.) de análise elementar (C, H) obtidos para 1-4	83
Tabela 3. 2: Valores de condutividade molar para 1-4	84
Tabela 3. 3: Atribuição das bandas principais dos espectros FTIR (cm^{-1}) observadas para 1-4	87
Tabela 3. 4: Atribuição das principais bandas dos espectros de Raman para 1-4	88
Tabela 3. 5: Atribuição das bandas dos espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível da série de complexos 1-4	90
Tabela 3. 6: Deslocamentos químicos (δ) para 1-4 e seus respectivos ligantes livres ($\delta = \text{ppm}$, $\Delta\delta = \text{variação de } \delta \text{ com a coordenação}$)	91
Tabela 3. 7: Principais deslocamentos químicos ($\delta = \text{ppm}$) e multiplicidade dos sinais do RMN de ^1H para 1-4	93
Tabela 3. 8: Deslocamentos químicos (δ) e respectivas constantes de acoplamento (J) em Hz para a série 1-4	94
Tabela 3. 9: Dados cristalográficos de refinamento para série 1-4	96
Tabela 3. 10: Distâncias interatômicas (Å) e ângulos ($^\circ$) a partir da Análise por raios X de monocristal para 1-4	99
Tabela 3. 11: Parâmetros de geometria para 1-4 em comparação com o complexo com PPh_3 , reportado da literatura ^[14]	100
Tabela 3. 12: Geometrias moleculares analisadas para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{PPh}_3\text{Cl}]^+$ em diferentes estados oxidados. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$).....	102
Tabela 3. 13: Valores dos potenciais (V) e corrente de pico (μA) obtidos dos voltamogramas cíclicos dos 1-4	104

Tabela 3. 14: Valores Experimentais (Exp.) e calculados (Cal.) de análise elementar (C, H) obtidos para 5-8	111
Tabela 3. 15: Valores de condutividade molar para a série de complexos 5-8	112
Tabela 3. 16: Atribuição das principais bandas dos espectros FTIR (cm ⁻¹) observadas para 5-8	113
Tabela 3. 17: Atribuição das bandas dos espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível da série de complexos 5-8	115
Tabela 3. 18: Deslocamentos químicos (δ) para 5-8 e seus precursores 1-4	117
Tabela 3. 19: Principais deslocamentos químicos (δ = ppm) do RMN de ¹ H para os complexos 5-8	119
Tabela 3. 20: Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento dos 5-8	121
Tabela 3. 21: Comprimentos e ângulo de ligações na estrutura de raios X dos principais átomos das estruturas dos complexos 5-8	123
Tabela 3. 22: Geometrias moleculares analisadas para o complexo [Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimen)PPh ₃ NCl] ⁺ em diferentes estados oxidados. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°)	125
Tabela 3. 23: Valores dos potenciais (V) e outros dados obtidos dos voltamogramas cíclicos dos complexos 5-8	128
Tabela 3. 24: Comparação dos processos anódicos e catódicos (V) das séries de complexos estudadas neste trabalho	129
Tabela 4. 1: Resultados de IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) para 1-4 , seus respectivos ligantes livres (L1-L4) e oxidados (L01-L04) em um período de 48 horas.....	160
Tabela 4. 2: Valores de índice de seletividade para 1, 2 e 4 e droga de referência.	160
Tabela 4. 3: Coeficiente de partição (log P) para 1, 2 e 4 sintetizados.....	164
Tabela 4. 4: Dados empíricos ^a de LogP para os ligantes triarilfosfina substituídas (L1-L4) e PPh ₃	165
Tabela 4. 5: Parâmetros para as monocamadas de Langmuir dos complexos (1-4).....	169
Tabela 5. 1: Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) em mg mL ⁻¹ dos complexos 1-4	207
Tabela 5. 2: Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) em mg mL ⁻¹ dos complexos 5-8	208

LISTA DE ESQUEMAS

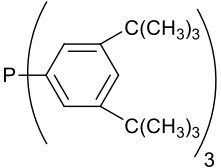
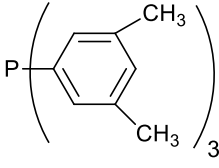
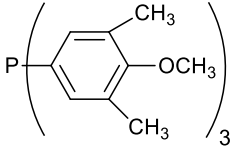
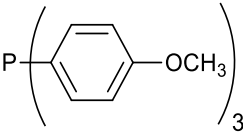
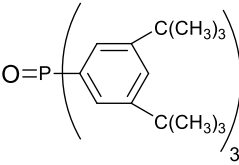
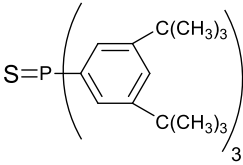
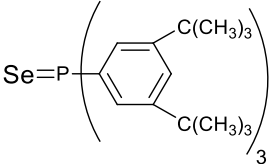
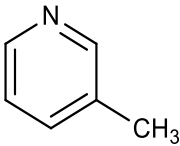
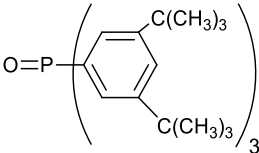
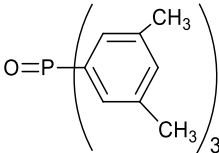
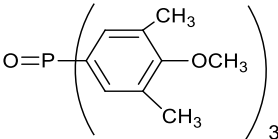
Esquema 2. 1: Esquema de síntese para obtenção do ligante L1 e seus derivados L5 , L6 e L7	46
Esquema 3. 1: Reação empregada para a formação do precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$	65
Esquema 3. 2: Preparação dos complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{Cl}]^+$, onde PAr_3 são triarilfosfinas substituídas derivadas do ácido etacrínico.	68
Esquema 3. 3: Esquema reacional para a síntese dos complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{LCl}_2]$, onde L simboliza isômeros estruturais da metilpiridina (A), dimetilmetilpiridina (B) e metilaminobenzeno (C).	70
Esquema 3. 4: Rota de síntese do complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$	73
Esquema 3. 5: Rotas de síntese para reações realizadas neste trabalho, relatando as sínteses bem sucedidas (1-4) e as falhas (a-c).	82
Esquema 3. 6: Rota de síntese das reatividades do complexo 4	84
Esquema 3. 7: Representação do processo para formação do novo composto gerado em solução $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{CH}_3\text{CN})_3(p\text{-MeO-C}_6\text{H}_4)\text{Cl}_2]$	106
Esquema 3. 8: Rota sintética dos complexos da série 5-8	111

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

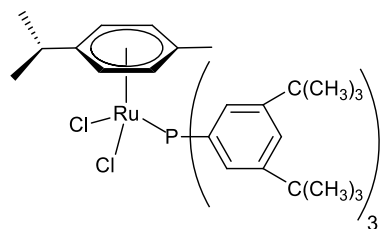
A _{ex}	Área de maior ordenamento
A549	Linhagem celular de câncer de pulmão
BSA	Albumina de soro bovino
B16F10	Linhagem tumoral de melanoma murino
CCCP	Cianeto de carbonila m-clorofenil-hidrazina
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CL	1',3'-bis[1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo]-glicerol
CMH	Caldo Müeller Hinton
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy (Correlação Espectroscópica Homonuclear)
CT-DNA	Calf-Thymus Deoxyribonucleic Acid (DNA de timo de vitelo)
DFT	Density Functional Theory (Teoria do Funcional de Densidade)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DPPS	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo- <i>L</i> -serina
DOPG	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilglicerol
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
FMOs	Orbitais moleculares de fronteira
HEp- 2	Linhagem tumoral de Carcinoma epidermóide de laringe humana
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações)
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Coerência Heteronuclear de Quantum Simples)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
I _{pa}	Corrente de pico anódica
I _{pc}	Corrente de pico catódica
LB	Meio de cultura Luria Bertani
Log P	Coeficiente de partição
LUMO	<i>Lowest Unnoccupied Molecular Orbital</i> (Orbital Molecular desocupado de Menor Energia)
LPPSs	Lipopolissacarídeo
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de adenocarcinoma de mama
MRC-5	Linhagem celular de pulmão não-tumoral
MOA	Mecanismo de ação
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PTBA	Perclorato de Tetrabutilamônio
PTFE	Politetrafluoretileno (Teflon®)
RNA	Ácido ribonucleico
TCML	Transferência de Carga Metal-Ligante
TMS	Tetrametilsilano
TLC	Cromatografia em camada delgada
THF	Tetrahidofurano

U2-OS	Linhagem celular de osteossarcoma ósseo humano
γ	Vibrações de deformação angular fora do plano
η	Hapaticidade
δ	Deslocamento químico
xJ_{Y-Z}	Constante de Acoplamento a x ligações entre os átomos y
ΔA^E	Área em excesso
ΔG^E	Energia livre em excesso
ΔV	Potencial de superfície
$\Delta V-A$	Isoterma de potencial de superfície vs área molecular
$\pi-A$	Isoterma de pressão de superfície vs área molecular

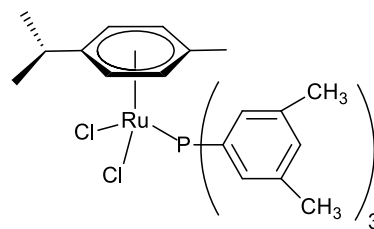
LISTA DE LIGANTES

 L1= tris(3,5-di-<i>terc</i>-butilfenil)fosfina	 L2= tris(3,5-dimetilfenil)fosfina
 L3= tris(4-metóxi-3,5-dimetilfenil)fosfina	 L4= tris(4-metóxifenil)fosfina
 L5= tris(3,5-di-<i>terc</i>-butilfenil)fosfina óxido monohidratada	 L6= tris(3,5-di-<i>terc</i>-butilfenil)fosfina sulfureto
 L7= tris(3,5-di-<i>terc</i>-butilfenil)fosfina seleneto	 L8= 3-metilpiridina
 L01= tris(3,5-di-<i>terc</i>-butilfenil)fosfina óxido	 L02= tris(3,5-dimetilfenil))fosfina óxido
 L04= tris(4-metóxifenil)fosfina óxido	

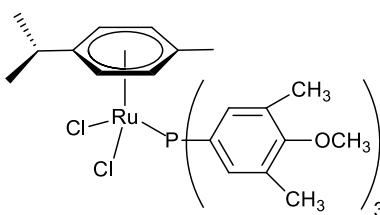
LISTA DE COMPLEXOS



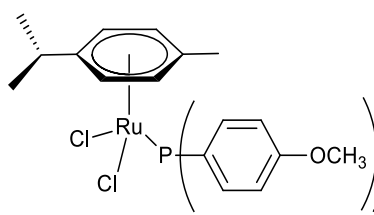
1 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(3,5\text{-C}(\text{CH}_3)_3\text{-C}_6\text{H}_3)_3\text{Cl}_2]$



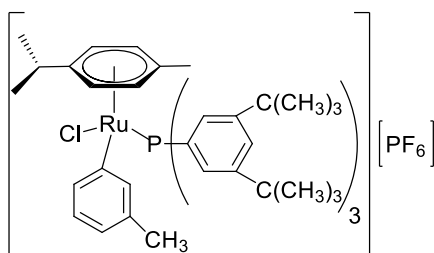
2 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(3,5\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_3)_3\text{Cl}_2]$



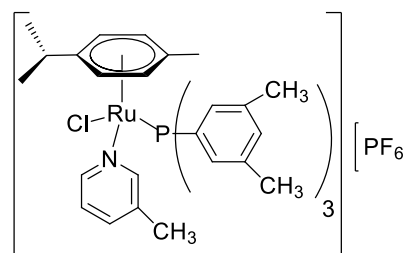
3 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(4\text{-MeO-}3,5\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_2)_3\text{Cl}_2]$



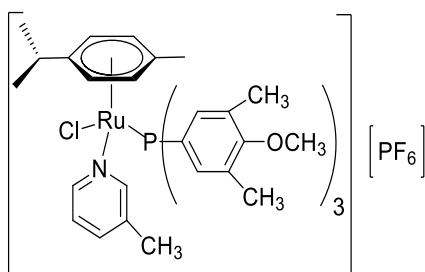
4 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4)_3\text{Cl}_2]$



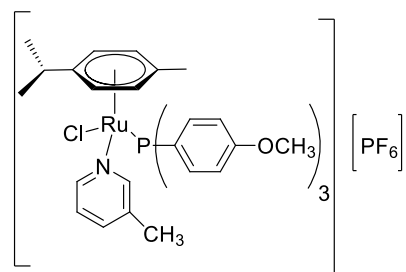
5 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(3,5\text{-C}(\text{CH}_3)_3\text{-C}_6\text{H}_3)_3(3\text{-metilpiridina})\text{Cl}] [\text{PF}_6]$



6 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(3,5\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_3)_3(3\text{-metilpiridina})\text{Cl}] [\text{PF}_6]$



7 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(4\text{-MeO-}3,5\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_2)_3(3\text{-metilpiridina})\text{Cl}] [\text{PF}_6]$



8 = $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4)_3(3\text{-metilpiridina})\text{Cl}] [\text{PF}_6]$

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	27
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 1. OBJETIVOS	32
1.1 OBJETIVO GERAL	32
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO 2. LIGANTES TRIARILFOSFINA PAr_3	33
2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	33
2.1.1 A química das fosfinas PAr_3	33
2.1.2 Características eletrônicas	34
2.1.3 Características estéricas.....	36
2.2 OBJETIVOS	40
2.2.1 Objetivo geral.....	40
2.2.2 Objetivos específicos.....	40
2.3 METODOLOGIA	40
2.3.1 Reagentes	40
2.3.2 Síntese do ligante tris(3,5-di- <i>terc</i> -butilfenil) fosfina (L1) e suas variações (L5-L7).....	41
2.3.2.1 tris(3,5-di- <i>terc</i> -butilfenil) fosfina (L1)	41
2.3.2.2 tris(3,5-di- <i>terc</i> -butilfenil) fosfina oxidada monohidratada (L5).....	42
2.3.2.3 tris(3,5-di- <i>terc</i> -butilfenil) fosfina sulfurada (L6)	42
2.3.2.4 tris(3,5-di- <i>terc</i> -butilfenil) fosfina selenato (L7).....	43
2.3.3 Caracterizações do ligante tris(3,5-di- <i>terc</i> -butilfenil) fosfina e suas variações	43
2.3.3.1 Análise elementar e ponto de fusão.....	43
2.3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	43
2.3.3.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	44
2.3.3.5 Caracterização eletroquímica por medidas de voltametria cíclica	44
2.3.3.6 Difratorimetria de raios X de monocristal	45
2.3.3.7 Cálculos teóricos.....	45
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
2.4.1 Considerações sobre as sínteses	45
2.4.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos ligantes	46
2.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos ligantes	47
2.4.4 Estudo Cristalográfico e Computacional das estruturas do L1	49

2.4.4.1 Estrutura do cristal L1	49
2.4.4.2 Análise computacional das conformações de (L1)	52
2.4.4.3 Caracterização cristalográfica dos derivados de L1	54
2.4.4.4 Índice de Piramidalidade dos ligantes $\Sigma\{\angle CPC\}$ e o efeito estérico.	57
2.4.5 Estudo eletroquímico e força doadora dos ligantes L1-L4	57
2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	59
REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 3. COMPLEXOS DE RUTÊNIO-ARENO COM LIGANTES TRIARILFOSFINA (PAr₃) E 3-METILPIRIDINA (N)	64
3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	64
3.1.1 Complexos de rutênio-areno	64
3.1.2 Complexos de rutênio-areno com ligante fosfina	66
3.1.3 Complexos de rutênio-areno com ligantes N-heterocíclicos.....	68
3.2 OBJETIVOS	71
3.2.1 Objetivo Geral.....	71
3.2.2 Objetivos específicos.....	71
3.3 METODOLOGIA	72
3.3.1 Reagentes	72
3.3.2 Síntese do complexo precursor e dos complexos 1-8	72
3.3.2.1 Síntese do complexo precursor $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen}) (\mu\text{-Cl})Cl]_2$	72
3.3.2.2 Síntese dos complexos da série $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PAr_3Cl_2]$ (1-4).....	73
3.3.2.3 Síntese dos complexos da série $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PAr_3NCl][PF_6]$ (5-8)	75
3.3.3 Caracterização dos complexos 1-8	77
3.3.3.1 Análise elementar e ponto de fusão.....	77
3.3.3.2 Condutividade Molar	78
3.3.3.3 Teste de solubilidade e estabilidade	78
3.3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	79
3.3.3.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)	79
3.3.3.6 Espectroscopia Raman.....	79
3.3.3.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	80
3.3.3.8 Caracterização eletroquímica por medidas de voltametria cíclica	80
3.3.3.9 Difractometria de raios X de monocristal	81
3.3.3.10 Cálculos Teóricos.....	81
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.4.1 Complexos da série $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PAr_3Cl_2]$ (1-4)	81

3.4.1.1 Considerações sobre as sínteses	81
3.4.1.2 Análise Elementar	83
3.4.1.3 Condutividade molar, estudos de estabilidade e reatividade	83
3.4.1.4 Espectroscopia na região do infravermelho e Raman	85
3.4.1.5 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível	88
3.4.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D	90
3.4.1.7 Difratomia de raios X de monocristal	95
3.4.1.8 Cálculos de DFT para o complexo $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PPh_3Cl_2]$	100
3.4.1.9 Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica	103
3.4.1.10 Estudo da variação da velocidade de varredura	107
3.4.2 Complexos da série $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PAr_3NCl]^+$ (5-8)	110
3.4.2.1 Considerações sobre as sínteses	110
3.4.2.2 Análise Elementar	111
3.4.2.3 Condutividade molar e estabilidade	111
3.4.2.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	112
3.4.2.5 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível	113
3.4.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D	115
3.4.2.7 Difratomia de raios X de monocristal	120
3.4.2.8 Cálculos de DFT para o complexo $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PPh_3NCl]^+$	124
3.4.2.9 Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica	127
3.4.2.10 Estudo da variação da velocidade de varredura	130
3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	132
REFERÊNCIAS	133
CAPÍTULO 4. TESTES DE ATIVIDADE ANTICÂNCER E ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO PARA AS SÉRIES DE COMPLEXOS 1-4 E 5-8	141
4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	141
4.1.1 Complexos metálicos e atividade anticâncer	141
4.1.2 Complexos de rutênio e atividade anticâncer	142
4.1.3 Complexos de rutênio-areno e atividade anticâncer	145
4.1.4 Mecanismo de ação dos complexos organometálicos	147
4.1.4.1 Estudos de interação com DNA	147
4.1.4.2 Estudos de interação com membranas por Filmes de Langmuir	149
4.2 OBJETIVOS	155
4.2.1 Objetivo Geral	155
4.2.2 Objetivos Específicos	155

4.3 METODOLOGIA	155
4.3.1 Ensaios de citotoxicidade dos complexos da série 1-4	155
4.3.2 Ensaio de citotoxicidade dos complexos da série 5-8	156
4.3.3 Coeficiente de partição ou Lipofilicidade (Log P).....	157
4.3.4 Estudo de Interação com DNA - Viscosidade.....	158
4.3.5 Obtenção e Caracterização dos Filmes de Langmuir dos complexos com modelo de membranas.....	158
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	159
4.4.1 Ensaios de atividade anticâncer para os complexos da série [Ru(η^6 - <i>p</i> -cimen)PAr ₃ Cl ₂] (1-4) e [Ru(η^6 - <i>p</i> -cimen)PAr ₃ NCl] ⁺ (5-8).....	159
4.4.2 Coeficiente de partição (log P) dos complexos 1-4	163
4.4.3 Estudos para identificação do mecanismo de ação para a série 1-4	165
4.4.3.1 <i>Estudo de interação com o DNA por viscosidade</i>	166
4.4.3.2 <i>Estudo do mecanismo de ação por filmes de Langmuir de fosfolipídios</i>	167
4.4.3.2.1 Filmes de Langmuir dos complexos da série 1-4	168
4.4.3.2.2 Efeito dos complexos 1-4 em modelos de membrana de célula de câncer (DPPS)	171
4.4.3.2.3 Estudo da interação entre DPPS e 1, 2, 4 por parâmetros termodinâmicos	175
4.4.3.2.4 Efeito dos complexos 1-4 em DOPC como modelo de membrana saudável	178
4.4.3.2.5 Estudo da interação DOPC/1,2 ou 4 por parâmetros termodinâmicos	182
4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	184
REFERÊNCIAS.....	184
CAPÍTULO 5. TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPLEXOS 1-8	193
5.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	193
5.1.1 Agentes antimicrobianos- um breve histórico.....	193
5.1.2 Complexos de rutênio na atividade antibacteriana.....	196
5.1.3 Estudos do mecanismo de ação por monocamadas de Langmuir e Microscopias de Fluorescência e Microfluídica	198
5.1.3.1 <i>Atividade bacteriana e Monocamadas de Langmuir</i>	198
5.1.3.2 <i>Microscopia de Fluorescência e Microfluídica</i>	199
5.2 OBJETIVOS	202
5.2.1 Objetivo Geral.....	202
5.2.2 Objetivos Específicos.....	202
5.3 METODOLOGIA	203
5.3.1 Técnica de difusão em disco	203
5.3.2 Testes de determinação de concentração inibitória mínima (CIM)	203

5.3.3 Imagens de microscopia de fluorescência	204
5.3.4 Imagens de microscopia microfluídica	204
5.3.5 Obtenção e Caracterização dos filmes de Langmuir de 1-4 com modelo de membrana <i>S.Aureus</i>	205
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	205
5.4.1 Ensaios de atividade antibacteriana para os complexos da série [Ru(η^6 - <i>p</i> -cimen)PAr ₃ Cl ₂] (1-4) e [Ru(η^6 - <i>p</i> -cimen)PAr ₃ NCl] ⁺ (5-8).....	205
5.4.2 Estudos para identificação do mecanismo de ação para a série de complexos 1-4	210
5.4.2.1 Microscopia de Fluorescência	210
5.4.2.2 Microscopia Microfluídica.....	212
5.4.2.3 Efeito dos complexos de rutênio 1-4 em modelos de membrana bacteriana	214
5.4.2.3.1 Estudo da interação DOPG/complexos 1-4 por parâmetros termodinâmicos	218
5.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	220
REFERÊNCIAS.....	221
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	225
ANEXOS- CAPÍTULO 2	228
ANEXOS: CAPITULO 3	232
ANEXOS: CAPÍTULO 4	253
ANEXOS: CAPÍTULO 5	260

APRESENTAÇÃO

Por muitos anos, os metais e complexos metálicos têm sido considerados formas eficazes em uso medicinal, apresentando atividade contra doenças que envolvam diversos tipos de câncer e bactérias^[1]. O câncer é classificado como a segunda doença que mais afeta os seres humanos em todo o mundo, após, as doenças cardiovasculares^[2]. Além disso, a resistência a antibióticos se tornou uma ameaça à saúde pública, devido seu amplo uso durante o tempo, contra a remoção de infecções bacterianas^[1,3]. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novos e eficazes medicamentos contra o câncer, bem como uma nova classe de agentes antimicrobianos, e neste contexto, a química organometálica dos compostos de rutênio tem evoluído, pois, este metal tem demonstrado menor citotoxicidade frente aos compostos já aplicados^[1,3,4,5].

Os complexos de rutênio desempenham um papel importante na busca para alternativas para as metalodrogas à base de cisplatina, *cis*-diaminodicloridoplatina(II), e seus derivados como carboplatina e oxiplatina, assim como de medicamentos anticâncer à base de outros metais mais conhecidos. Embora a cisplatina e seus derivados tenham atividades citotóxicas notáveis no tratamento da maioria dos tumores, eles também são tóxicos para células não cancerígenas, apresentando uma atividade limitada, redução da eficácia causada pela resistência aos medicamentos e efeitos colaterais indesejáveis. Devido às essas limitações, a pesquisa de novos medicamentos anticâncer concentra-se cada vez mais em complexos com outros metais, entre os quais, os complexos de rutênio despertam grande atenção^[6,7,8].

Dentre as propriedades farmacológicas do rutênio ressalta-se os diversos estados de oxidação (II, III e IV) sob condições fisiologicamente relevantes, sua toxicidade baixa e alta seletividade^[9]. Pesquisas recentes têm se concentrado nas propriedades anticancerígenas promissoras de complexos organometálicos rutênio(II)-areno do tipo $[Ru(\eta^6\text{-areno})(XY)(Z)]$, onde XY é um ligante quelante mono ou bidentado e Z é um ligante lábil. Esses complexos são atraentes devido às diversas possibilidades de substituição no ligante areno e variedade de ligantes que podem gerar a funcionalização com grupos ativos biologicamente^[6,7,10]. Os ligantes areno estabilizam o Ru(II) e também fornecem uma face hidrofóbica para o complexo, que pode melhorar os processos de reconhecimento biomolecular e o transporte do composto. Um ligante monodentado, geralmente cloreto, facilita a ligação das biomoléculas ao centro metálico. Finalmente, ligantes mono ou bidentados afetam a cinética e podem influenciar as propriedades farmacológicas desses complexos^[10]. Todas estas propriedades também são atrativas para

utilização destes como agentes antimicrobianos, na busca para encontrar novos compostos que inibem o crescimento ou a virulência de bactérias patogênicas, devido ao sucesso de agentes anticâncer de platina^[3,11].

Estes complexos têm sido amplamente investigados devido à apresentarem um caráter lipofílico/hidrofílico em suas estruturas, permitindo que essas moléculas atravessem a membrana celular, aumentando sua atividade^[6]. Em relação aos ligantes, diferentes tipos substituintes sendo doadores ou retiradores de densidade eletrônica, podem ser usados para ajustar as propriedades biológicas dos complexos correspondentes. Portanto, a variação de grupos funcionais pode direcionar a entrega do agente citotóxico, aumentando sua seletividade e eficiência^[8].

Nesta classe de compostos, é possível destacar aqueles pertencentes à família RAPTA, que apresentaram resultados promissores, como o RAPTA-C, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{pta})\text{Cl}_2]$, com pta= 1,3,5-triazo-7-fosfatriciclo-[3.3.1.1]decano; que desencadeou o estudo e desenvolvimento de compostos de rutênio e derivados, incluindo análogos para os quais o ligante pta foi substituído^[8,10]. Relacionando estes compostos, nota-se que o ligante pta é substituído por derivados de ligantes da classe das trifarilfosfinas. Embora a lipofilicidade dessas fosfinas resultem em uma diminuição da solubilidade em água dos complexos, as fosfinas mais hidrofóbicas aumentam a capacidade de captação intracelular e citotoxicidade^[12,13]. Com o objetivo de modular a atividade biológica de complexos do tipo $\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})$, um número de moléculas com função biológica/farmacológica conhecida pode ser coordenado a esta unidade. Esses compostos geralmente têm sido obtidos pela inclusão de espécies com ligante areno previamente funcionalizados, ou com ligantes quelatos com O,O; N,O(S) N,N ou ligantes monodentados P e N ao Ru(II) ^[12,13,14,15].

A eficácia destes novos complexos está sendo investigada e estão em fase de desenvolvimento, os quais, são projetados principalmente para imitar a cisplatina amplamente utilizada, tendo como seu mecanismo de ação a interação com o DNA. Além do dano ao DNA, a cisplatina é capaz de induzir espécies reativas de oxigênio e estresse do retículo endoplasmático, além de se ligar a peptídeos e proteínas^[16]. Com base nisso, existem diferentes modos de ação citotóxica propostos para os compostos de rutênio. Embora o mecanismo exato ainda não seja conhecido, há relatos que indicam o modo de interação com proteínas, tal como a albumina do soro humano (HSA)^[10], solvólise das ligações Ru-Cl dos complexos, que representa um mecanismo para a ativação^[17] e interação com as bases do DNA ou enzima topoisomerase II^[18].

Com base em toda literatura relatada, o presente trabalho visou a síntese de novos complexos de rutênio(II)-areno neutros e catiônicos, com ligantes das classes das triarilfosfinas lipofílicas substituídas PAr_3 e de um ligante monodentado N-heterocíclico. A escolha destes ligantes é baseada nos complexos análogos que inibem a progressão do crescimento de câncer, principalmente após a coordenação de um ligante fosfina. A realização dos testes biológicos para identificar se os complexos obtidos são promissores como metalodrogas anticâncer e como futuros antibióticos, assim como propôr um mecanismo de ação para estes compostos também foi objetivo deste doutorado, desenvolvido no período de março de 2015 a dezembro de 2019. Ressalta-se que este trabalho originou-se de um projeto de pesquisa elaborado e aprovado pela Prof. Dra Karen Wohnrath em parceria com o Prof. Dr. René Boere, da University of Lethbridge-(UofL)-Canadá, do Prof. Dr. Márcio P. de Araújo (UFPR) e Prof. Dr. Jarem R. Garcia (Chamada de Projetos MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs Nº 03/2014, Cronograma 3).

Essa tese foi organizada em seis capítulos. Se inicia com o **Capítulo 1**, onde há a descrição dos objetivos do trabalho. No **Capítulo 2** estão dispostos os resultados que envolvem a síntese do ligante triarilfosfina PAr_3 , onde $\text{Ar}=3,5\text{-di-}i\text{-terc-butilfenil}$, o estudo de sua reatividade, caracterização e estudo de propriedades eletrônicas e estéricas em comparação com outros ligantes do tipo (PAr_3) utilizados neste trabalho. No **Capítulo 3** são apresentadas as sínteses dos complexos de rutênio-areno $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}i\text{-p-cimeno})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**) e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}i\text{-p-cimeno})\text{PAr}_3\text{NCl}]$ (**5-8**), suas caracterizações químicas, espectroscópicas e eletroquímica. No **Capítulo 4** são apresentados os principais resultados para os testes citotóxicos contra linhagens celulares de câncer, para as duas séries de complexos, além de ser discutida também através de algumas técnicas (viscosidade, monocamadas de Langmuir), o possível mecanismo de ação destes compostos. No **Capítulo 5**, estão descritos os resultados de atividade antibacteriana para as duas séries de complexos sintetizados, além, de técnicas como Microscopia de Fluorescência, Microscopia Microfluídica, e Monocamadas de Langmuir para tentar elucidar o mecanismo de ação. Por fim, encontram-se as Considerações Finais e perspectivas do trabalho no **Capítulo 6**.

REFERÊNCIAS

- [1] ODULARU, A. T.; AJIBADE, P. A.; MBESE, J. Z.; OYEDEJI, O. O. Developments in Platinum-Group Metals as Dual Antibacterial and Anticancer Agents. **Journal of Chemistry**, 2019.
- [2] BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa de câncer. <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acesso em: 15 dez 2019.
- [3] LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 8, p. 2529-2542, 2015.
- [4] BIANCALANA, L.; PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Arene ruthenium (II) complexes with phosphorous ligands as possible anticancer agents. **Chimia International Journal for Chemistry**, v. 71, n.9, p. 573-579, 2017.
- [5] BIANCALANA, L.; GRUCHAŁA, M.; BATCHELOR, L. K.; BŁAUŻ, A.; MONTI, A., PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Conjugating Biotin to Ruthenium (II) Arene Units via Phosphine Ligand Functionalization. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2019.
- [6] PETRUK, G.; MONTI, D. M.; FERRARO, G.; PICA, A.; D'ELIA, L.; PANE, F.; MERLINO, A. Encapsulation of the Dinuclear Trithiolato-Bridged Arene Ruthenium Complex Diruthenium-1 in an Apoferritin Nanocage: Structure and Cytotoxicity. **ChemMedChem**, v. 14, n.5, p. 594-602, 2019.
- [7] NIKOLIĆ, S.; GRGURIĆ-ŠIPKA, S.; DJORDJEVIĆ, I. S.; DAHMANI, R.; DEKANSKI, D.; VIDIČEVIĆ, S.; GRUBIŠIĆ, S. Half-sandwich ruthenium (II)-arene complexes: synthesis, spectroscopic studies, biological properties, and molecular modeling. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 148-163, 2019.
- [8] BRISSOS, R. F.; CLAVERO, P.; GALLEN, A.; GRABULOSA, A.; BARRIOS, L. A.; CABALLERO, A. B.; GAMEZ, P. Highly cytotoxic ruthenium (II)-arene complexes from bulky 1-pyrenylphosphane ligands. **Inorganic chemistry**, v. 57, n. 23, p. 14786-14797, 2018.
- [9] GICHUMBI, J. M.; FRIEDRICH, H. B.; OMONDI, B.; SINGH, M.; NAICKER, K.; CHENIA, H. Y. Synthesis, characterization, and cytotoxic and antimicrobial activities of ruthenium (II) arene complexes with N, N-bidentate ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 69, n. 23, p. 3531-3544, 2016.
- [10] BERG, C.; CHARI, S.; JURGAITYTE, K.; LAURORA, A.; NALDONY, M.; POPE, F.; BAUMGARTNER, J. Modulation of the solubility properties of arene ruthenium complexes bearing stannyl ligands as potential anti-cancer agents. **Journal of organometallic chemistry**, v. 891, p. 12-19, 2019.
- [11] NYAWADE, E. A.; FRIEDRICH, H. B.; OMONDI, B.; CHENIA, H. Y.; SINGH, M.; GORLE, S. Synthesis and characterization of new α, α' -diaminoalkane-bridged dicarbonyl (η^5 -cyclopentadienyl) ruthenium (II) complex salts: antibacterial activity tests of η^5 -

cyclopentadienyl dicarbonyl ruthenium (II) amine complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 799, p. 138-146, 2015.

[12] BIANCALANA, L.; BATCHELOR, L. K.; DE PALO, A.; ZACCHINI, S.; PAMPALONI, G.; DYSON, P. J.; MARCHETTI, F. A general strategy to add diversity to ruthenium arene complexes with bioactive organic compounds via a coordinated (4-hydroxyphenyl) diphenylphosphine ligand. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 36, p. 12001-12004, 2017.

[13] BIANCALANA, L.; PRATESI, A.; CHIELLINI, F.; ZACCHINI, S.; FUNAIOLI, T.; GABBIANI, C.; MARCHETTI, F. Ruthenium arene complexes with triphenylphosphane ligands: cytotoxicity towards pancreatic cancer cells, interaction with model proteins, and effect of ethacrynic acid substitution. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 23, p. 14574-14588, 2017.

[14] SÁEZ, R.; LORENZO, J.; PRIETO, M.J.; FONT-BARDIA, M.; CALVET, T.; OMEÑACA, N.; VILASECA, M.; MORENO, V. Influence of PPh₃ moiety in the anticancer activity of new organometallic ruthenium complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 136, p. 1-12, 2014.

[15] PARVEEN, S.; HANIF, M.; MOVASSAGHI, S.; SULLIVAN, M. P.; KUBANIK, M.; SHAHEEN, M. A.; HARTINGER, C. G. Cationic Ru(η^6 -p-cymene) Complexes of 3-Hydroxy-4-pyr (id) ones–Lipophilic Triphenylphosphine as Co-Ligand Is Key to Highly Stable and Cytotoxic Anticancer Agents. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 1721-1727, 2017.

[16] PERNAR, M.; KOKAN, Z.; KRALJ, J.; GLASOVAC, Z.; TUMIR, L. M.; PIANTANIDA, I.; KIRIN, S. I. Organometallic ruthenium (II)-arene complexes with triphenylphosphine amino acid bioconjugates: Synthesis, characterization and biological properties. **Bioorganic chemistry**, v. 87, p. 432-446, 2019.

[17] BIANCALANA, L.; ZACCHINI, S.; FERRI, N.; LUPO, M. G.; PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Tuning the cytotoxicity of ruthenium (II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/phenoxydiphenylphosphine ligand. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 47, p. 16589-16604, 2017.

[18] MITRA, R.; DAS, S.; SHINDE, S. V.; SINHA, S.; SOMASUNDARAM, K.; SAMUELSON, A. G. Anticancer Activity of Hydrogen-Bond-Stabilized Half Sandwich RuII Complexes with Heterocycles. **Chemistry – A European Journal**, v. 18, n. 39, p. 12278-12291, 2012.

CAPÍTULO 1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar novos complexos de rutênio-areno contendo ligantes da classe das triarilfosfinas monodentadas e estericamente impedidas PAr_3 e ligantes *N*-heterocíclicos como 3-metilpiridina, visando o estudo das propriedades terapêuticas destes complexos, por meios de testes de viabilidade celular *in vitro* contra linhagens celulares de câncer e de bactérias Gram positivas e Gram negativas, com o posterior estudo por diversas técnicas, para indicar um provável mecanismo de ação.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o ligante tris(3,5-di-*terc*-butilfenil)fosfina e realizar sua reatividade por meio de oxidações químicas com O, S, Se, obtendo suas variações;
- Sintetizar complexos de rutênio-areno de fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{NCl}]$, onde PAr_3 = triarilfosfinas estericamente substituídas e N= 3-metilpiridina.
- Elucidar as estruturas cristalográficas do ligante e dos complexos sintetizados, por meio da Difractometria de raios X de monocristal.
- Caracterizar os compostos por métodos espectroscópicos;
- Realizar as caracterizações físico-químicas;
- Caracterizar os ligantes e complexos por técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica;
- Realizar estudos teóricos por meio da técnica DFT para estudos das estruturas;
- Realizar testes biológicos para verificar a atividade e potencialidade antitumoral e antibacteriana dos complexos e ligantes na presença de diferentes linhagens tumorais, bacterianas e frente às células saudáveis;
- Avaliar o mecanismo de ação dos complexos por meio de técnicas de microscopias e monocamadas de Langmuir.

CAPÍTULO 2. LIGANTES TRIARILFOSFINA PAr_3

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1.1 A química das fosfinas PAr_3

As fosfinas (PR_3) estão entre os ligantes mais empregados na química de coordenação. Desde 1870, é conhecido que esses compostos possuem algumas vantagens sobre ligantes amina, tal como a sua maior solubilidade em solventes orgânicos e sua compatibilidade com metais em diferentes estados de oxidação^[1]. Esses ligantes têm uso extenso em catálise homogênea, por muitos deles apresentarem eficiência e seletividade em diversos processos como: hidrogenação, hidroformilação e polimerização de substratos orgânicos, além de apresentarem atividades antitumorais quando em complexos metálicos^[2].

As fosfinas permanecem entre os ligantes mais importantes na química de coordenação organometálica, como bases de Lewis na química dos pares de Lewis frustrados (FLP)^{*[3]} e por sua aplicação em processos orgânicos importantes, como a reação de Mitsunobu^{**[6]}. Especificamente, as triarilfosfinas PAr_3 e seus derivados $\text{Ar}_3\text{P}=\text{E}$, onde $\text{E} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$, por possuírem três anéis arila ligados ao átomo de P, são objeto de estudos por apresentarem uma variedade de processos de estereoisomerização devido ao forte acoplamento dos movimentos rotacionais dos anéis da estrutura^[8,9]. O elemento químico fósforo apresenta várias características de flexibilidade estrutural na formação de complexos, além de seu núcleo ^{31}P ser 100 % abundante. Outra vantagem do estudo destes ligantes (PAr_3) é o fato de P atuar como um átomo doador na formação de complexos com metais de transição, de acordo com a teoria de acidez de Pearson. Além disso, a facilidade de rotas sintéticas e a análise por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{31}P , tornam este elemento uma excelente escolha no desenvolvimento e síntese de novos ligantes^[10].

As trifenilfosfinas (PPh_3), despertam um grande interesse por apresentarem propriedades estéricas e eletrônicas distintas, podendo em alguns casos estimar qual destes

***Par de Lewis frustrado (FLP):** composto contendo um ácido e uma base de Lewis, impedidos estereoquimicamente, que ao se combinarem, não formam adutos simples-ácido-base de Lewis^[4,5].

****Reação de Mitsunobu:** substituição de álcoois primários ou secundários por nucleófilos mediados por uma combinação redox de uma triaril ou triarilfosfina e de um dialquil azodicarboxilato. Descoberta em 1967 pelo professor Oyo Mitsunobu (1934-2003), com papel de destaque em síntese orgânica e na química medicinal, condições estereoespecíficas e reação moderadas^[7].

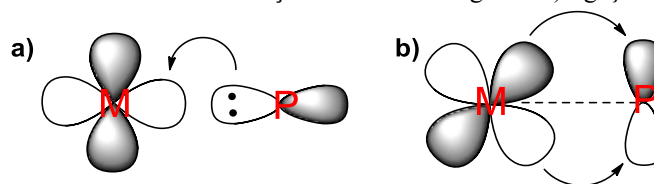
efeitos é predominante. Este interesse baseia-se no pressuposto de que as propriedades doadoras/aceitadoras e o volume do ligante influenciam fortemente o curso da reação em compostos de metal de transição^[11]. Tais ligantes conseguem combinar as propriedades da ligação σ doadora forte como as aminas, com as ligações π receptoras que são semelhantes ao monóxido de carbono, tornando-se muito versáteis, capazes de estabilizar tanto as valências mais altas como as mais baixas dos metais de transição. Podem exercer também alterações sobre a reatividade do centro metálico e apresentar um acentuado efeito *trans* labilizante, que aliado a efeitos estéricos, formam complexos facilmente dissociáveis, que são capazes de gerar um sítio de coordenação livre^[2,12].

Ligantes triarilfosfinas como PMes₃, onde: Mes= 2,4,6-trimetilfenil e PTip₃, onde: Tip= 2,4,6-triisopropilfenil, por apresentarem ângulo de ligação amplo ao redor do fósforo e consequentemente, elevado efeito estérico, possibilitam estruturas moleculares pseudo-planares diversas e não-usuais^[13]. Estes ligantes também despertam interesse em reações para formação de triarilfosfinas provenientes de uma oxidação química (POAr₃)^[14] e na síntese de complexos de coordenação^[15,16].

2.1.2 Características eletrônicas

A coordenação das fosfinas ao centro metálico ocorre pela interação entre o par de elétrons do átomo de fósforo e um orbital presente no metal, formando uma ligação σ . Simultaneamente, há possibilidade da ocorrência da retroligação π entre um orbital do metal e um orbital do ligante ($3p\sigma^*3d\pi$), similar ao observado na molécula de monóxido de carbono (CO). Neste tipo de ligação, a densidade eletrônica é sinergisticamente compartilhada entre o ligante e o metal, originando ligações mais estáveis, como ilustra a **Figura 2.1**. Por apresentar características de uma base mole, quando a fosfina é coordenada aos metais de transição do bloco d em estados de oxidação mais baixos, proporciona estabilidade a estes complexos^[2,12].

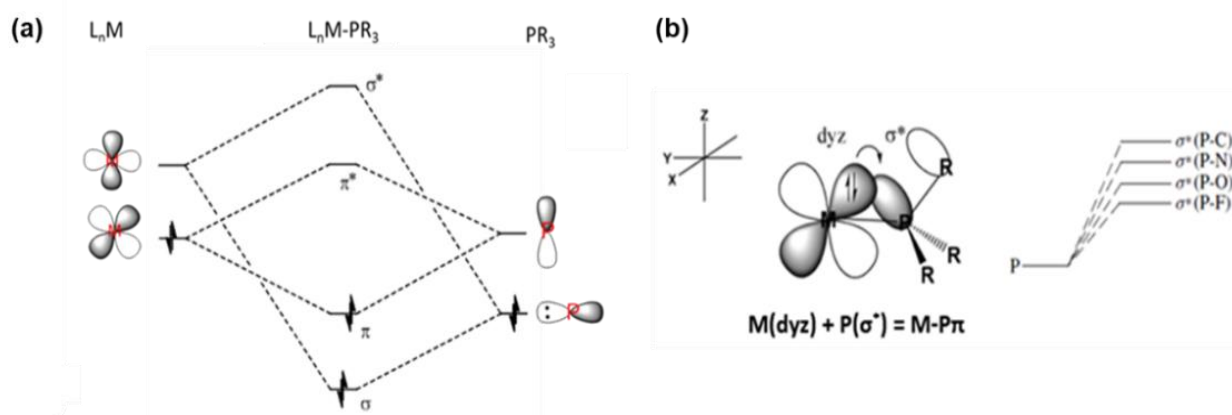
Figura 2. 1: Representação dos orbitais e as interações entre metal-ligante: a) ligação σ ; b) retroligação π .



Fonte: A autora.

Esta classe de ligantes, ainda possibilita a variação dos grupos substituintes ligados ao átomo de fósforo, com a inclusão de diferentes grupos doadores ou receptores de densidade eletrônica. Isso, torna as fosfinas notáveis para o estudo dos efeitos dos ligantes (L) na labilidade da ligação de alguns complexos do tipo P-M-L, cujo diagrama de orbitais está representado na **Figura 2.2(a)**, bem como a afinidade do centro metálico por tais ligantes. Mudanças também podem ser observadas nos substituintes R de ligantes como (PR₃), e isto pode alterar a habilidade dos mesmos em influenciar a atividade, seletividade e estabilidade de sistemas catalíticos, uma vez que a extensão tanto da ligação σ quanto π , dependem da natureza do substituinte presente. Nos complexos como M-PR₃, os orbitais P-R σ^* desempenham o mesmo papel que nos complexos M-CO com os orbitais π^* , os quais, aceitam a ligação provinda do metal. Neste contexto, a natureza dos grupos R determina a capacidade doadora e aceitadora do ligante em função da eletronegatividade do átomo ligado diretamente ao fósforo. Com o aumento da eletronegatividade não só orbitais σ como também σ^* estabilizam, visto que energeticamente, há um aumento da contribuição do átomo de fósforo para a orbital σ^* . O consequente incremento do tamanho do orbital, melhora a sobreposição do orbital σ^* com as orbitais d do metal, facilitando a ocorrência da retroligação π , **Figura 2.2(b)**. Portanto, as fosfinas podem exibir uma gama de capacidades σ -doadora e π -aceitadora, onde as propriedades eletrônicas de um centro metálico podem ser variáveis pela substituição de fosfinas eletronicamente diferentes [11,12].

Figura 2. 2: Diagrama de orbitais M-PR₃: a) Representação do diagrama para formação dos complexos M-PR₃; b) O orbital vazio P-R σ^* estabiliza com o aumento da eletronegatividade do átomo ligado ao fósforo (R), diminuindo a energia deste orbital e, consequentemente, tornando-o melhor aceitador da ligação com metal.



Fonte: Adaptado de CRABTREE, 2005^[17].

Assim, como em ligantes do tipo NR₃, as fosfinas têm um par livre no átomo central que pode ser doado a um metal. Porém, ao contrário do NR₃, são ligantes considerados π -ácidos, característica que depende também da natureza dos grupos R. Para alquilfosfinas, a acidez π é

CAPÍTULO 2

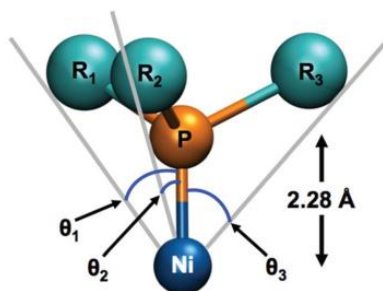
considerada fraca, no entanto, fosfinas com grupos aril, dialquilamino e alcóxi, são sucessivamente mais eficazes na promoção da acidez π e no caso de uma fosfina como PF_3 , a acidez π torna-se tão expressiva quanto a encontrada para o ligante CO, de acordo com a seguinte sequência^[17]:



2.1.3 Características estéricas

Outro aspecto interessante da versatilidade destes ligantes na química de coordenação refere-se ao impedimento estérico, como descrito pelo ângulo de cone (θ) desenvolvido por Chadwick A. Tolman, cuja demonstração está representada para a ligação Ni- PR_3 ilustrada na **Figura 2.3**. Este conceito é um dos mais aplicados para quantificar o volume estérico de monofosfinas, as quais, raramente formam um cone perfeito^[1,18].

Figura 2. 3: Ângulo de Tolman para molécula Ni- PR_3 .



Fonte: JOVER; CIRELA, 2019^[1].

Este parâmetro é definido como o ângulo do ápice de um cone com sua origem no centro metálico com a propagação das arestas ao longo das esferas de van der Waals dos átomos mais externos, como ilustra a **Figura 2.3**. Apesar de sua ampla aceitação e uso constante, este parâmetro foi falho desde a sua criação no final da década de 1970. Originalmente, o ângulo do cone de Tolman foi desenvolvido para ligantes de fosfina monodentados simétricos ligados ao centro metálico de níquel, em um arranjo tetraédrico. A distância Ni – P foi fixada em um valor de 2,28 Å, que é uma distância média obtida a partir de estruturas cristalinas, e o ângulo do cone foi medido usando um modelo físico de preenchimento de espaço. No caso de ligantes de fosfina assimétricos, o ângulo do cone pode ser estimado calculando a média dos três ângulos θ entre os substituintes de fósforo: $\theta = 1/3(\theta_1 + \theta_2 + \theta_3)$ ^[1,17].

Embora o procedimento seja apenas uma aproximação, os ângulos obtidos foram muito eficazes para racionalizar o comportamento de uma ampla variedade de complexos metálicos

CAPÍTULO 2

com ligantes desta classe, por exemplo, o PH_3 ou PMe_3 , mas falhou em grande parte para os ligantes com maior volume e substituintes flexíveis, sendo assim calculados adequadamente apenas para alguns exemplos. Podemos, portanto, esperar que a química de um complexo contendo fosfina tenha uma variação com a sua posição e com o volume apresentado. Pode-se verificar que o ângulo de cone formado varia de acordo com as substituições nas fosfinas: $\text{PH}_3=87^\circ$, $\text{PPh}_3=145^\circ$, $\text{P}(\text{tBu})_3=182^\circ$ e $\text{P}(\text{mesitol})_3=212^\circ$. Apesar de certas fosfinas apresentarem-se mais volumosas, ainda podem formar complexos metálicos, porém com baixos números de coordenação ^[1,18,19].

Objetivando a distinção entre efeitos estéricos que são principalmente de proteção e aqueles que estão principalmente associados à geração de pressão estérica, há relatos desta relação para geometria das moléculas do tipo $\text{Dipp}_3\text{P} = \text{tris}(2,6\text{-diisopropilfenil})\text{fosfina}$ e $\text{Tripp}_3\text{P} = \text{tris}(2,4,6\text{-triisopropilfenil})\text{fosfina}$. O estudo demonstra que um único conjunto de substituintes na posição *orto* dos anéis arila, pode fornecer uma proteção estérica considerável para o par de elétrons livre do P e consequentemente, um grande ângulo de cone de Tolman, ao redor do P. Mas a presença de substituintes nas posições 2 e 6 do anel, induz uma pressão estérica, diminuindo o ângulo resultante, fornecendo uma maior blindagem para o par solitário nestes compostos ^[19,20].

Outras propostas de medidas quantitativas estéricas foram desenvolvidas desde o ângulo do cone de Tolman, as quais incluem os ângulos sólidos (θ) ^[10] e alternativamente tem-se os métodos computacionais. Neste caso, as estruturas otimizadas por DFT são usadas como fonte para obter ângulos de cone por diferentes pesquisas ^[10]. Atualmente, as técnicas de modelagem molecular são cada vez mais usadas para racionalizar as relações estrutura/reatividade, enquanto as análises estruturais de raios X de alta resolução e os cálculos *ab initio*, fornecem uma visão da estrutura eletrônica dos compostos ^[11].

O ângulo sólido (θ) considera o volume estérico ou a deformação estérica sob o átomo de fósforo, sendo esta, uma medida mais simples, a qual compara as somas dos ângulos ao redor do fósforo, que serão 360° para uma geometria planar trigonal - o limite máximo para uma molécula de três coordenadas - e cerca de 328° para uma molécula piramidal, com ângulos de conexão "tetraédricos" ^[20]. Esta é uma abordagem similar, que pode ser uma alternativa para suprir algumas limitações no estudo do ângulo do cone de Tolman, onde a partir de dados cristalográficos ou estruturas calculadas, os raios dos átomos do ligante são projetados na superfície metálica, fornecendo uma medida do volume estérico ^[10].

Os efeitos estéricos conferidos a esta classe de ligantes, podem ser controlados e, como consequência, propiciar uma facilidade para reações de síntese, sendo excelentes para

CAPÍTULO 2

coordenação com metais de transição^[17,20]. Aumentando-se o tamanho do substituinte R em fosfinas do tipo PR_3 , é possível aumentar os ângulos R–P–R (ângulo de cone de Tolman). Pode-se também variar os ângulos entre os ligantes associados ao metal, aumentar a distância M–P e M–L, reduzir o caráter doador dos pares de elétrons isolados do fósforo, favorecer baixos estados de oxidação do metal e as reações de adição oxidativa e intramolecular e ainda, favorecer a coordenação e a formação de isômeros, onde o impedimento estérico seja menor. A capacidade de controlar o volume do ligante na estrutura do complexo permite controlar a reatividade que o complexo metálico pode apresentar^[12,17].

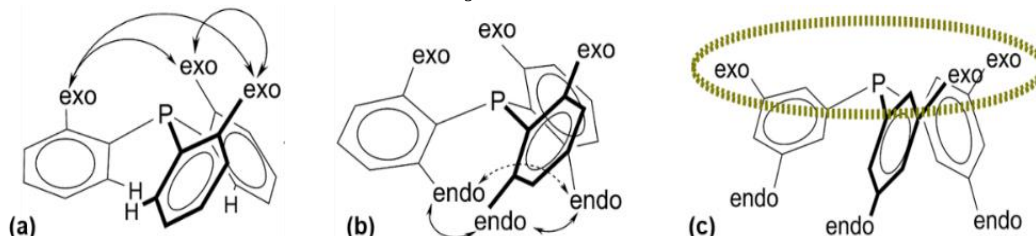
A química das triarilfosfinas (PAr_3) incorporando substituintes volumosos, vem sendo estudada pela facilidade de obtenção, sendo em alguns casos, comercialmente disponíveis; possuem na estrutura fósforo trivalente e substituintes volumosos derivados do ligante arila; que propiciam uma riqueza de dados estruturais para serem explorados na química de coordenação^[20]. Recentemente encontra-se um artifício para auxiliar na definição das formas estruturais de ligantes organofosfinas e outras moléculas relacionadas. Este artifício denomina-se índice de piramidalidade, $\Sigma\{\angle\text{CPC}\}$, obtido a partir das geometrias internas de estruturas do cristal ou dados computacionais, acomodando bem os desvios de simetria, não havendo necessidade de definir um eixo principal^[20,21]. Um índice de 360° é trigonal planar e $280,8^\circ$ é uma geometria quase em ângulo reto, como apresenta a fosfina PH_3 . Em comparação com esta fosfina PH_3 , três anéis arila causam uma redução significativa na piramidalidade estrutural, por exemplo, $\Sigma\{\angle\text{CPC}\} = 308,2(4)^\circ$ em uma fosfina como PPh_3 , determinado pela média de múltiplas estruturas cristalinas^[11].

Relata-se uma certa experiência com fosfinas hidrofóbicas do tipo (PAr_3) 2,6-dissubstituídas, e estas induzem piramidalidade reduzida, como podemos citar: $\Sigma\{\angle\text{CPC}\} = 335,6(3)^\circ$ em Dipp_3P , tris(2,6-diisopropilfenil)fosfina^[19,22], $334,4(3)^\circ$ em Tripp_3P , tris(2,4,6-triisopropilfenil)fosfina^[13] e $329,1(5)^\circ$ em Mes_3P , tris(2,4,6-trimetilfenil)fosfina^[23], todos os dados obtidos de estudos de difração de um monocristal. Estes ligantes não eram eficazes para coordenação em complexos, pois, estariam muito impedidas estereoquimicamente para coordenar com o centro metálico. A piramidalidade também é reduzida após a oxidação química desta classe de ligantes, por exemplo, $\Sigma\{\angle\text{CPC}\}$ diminui para $319,26(3)^\circ$ em Ph_3PO ^[24], $317,5(4)^\circ$ em Ph_3PS ^[25] e $317,9(6)^\circ$ em Ph_3PSe ^[26]. Portanto, há o interesse em ligantes análogos como fosfinas da classe PAr_3 do tipo 3,5-dissubstituídas, as quais, apresentam uma maior basicidade e podem ocasionar uma maior lipofilicidade aos complexos formados.

Para obter os índices de piramidalidade das estruturas destes ligantes faz-se a soma dos ângulos em torno do átomo de fósforo, $\Sigma(\angle\text{CPC})$, como por exemplo, em fosfinas 2,6-

dissubstituídas volumosas^[20]. A substituição sistemática na posição 2 fornece uma blindagem estérica (**Figura 2.4(a)**) criando uma cavidade ao redor dos pares de elétrons do átomo de P. Isso ocorre quando todos os substituintes estão orientados na posição *exo*, o que seria mais comum, mas não observado exclusivamente em complexos de coordenação^[20]. Contudo, a 2,6-dissubstituição também gera pressão estérica (**Figura 2.4(b)**) entre os substituintes orientados nas posições *endo*. Essa interação repulsiva pode diminuir significativamente a piramidalidade do ligante PAr_3 , ocasionando o aumento de energia do HOMO (induzindo uma maior basicidade) e o aumento do efeito estérico na estrutura, ao forçar os substituintes nas posições *exo* a se aproximarem do átomo doador de fósforo^[19,20]. Quando há uma substituição sistemática na posição 3, esta pode proporcionar uma oportunidade para os grupos em *exo* criarem uma bolsa de coordenação (perímetro tracejado na **Figura 2.4(c)**) sem interferência direta com o sítio doador (volume estérico distal ao redor do átomo de P do ligante). Propõe-se então, que esta cavidade disponível pelo ligante, force um centro nucleofílico, como o centro metálico de alguns compostos, a efetivarem uma ligação, tornando possível a coordenação e geração de novas estruturas^[27,28]. Mas a 3,5-disubstituição também gera pressão estérica dos substituintes nas posições *endo*, porém, é prevista um favorecimento de um sítio de coordenação com centros metálicos para formação de novos complexos.

Figura 2. 4: Efeitos estéricos em substituintes PAr_3 .



Fonte: BOERÉ, ZHANG, 2005^[20].

A literatura relata alguns trabalhos que estudaram alguns ligantes estericamente impedidos, gerando assim um interesse significativo nesta classe. Vulovik e colaboradores^[29]; Cinderella e colaboradores^[30], realizam a síntese e aplicação de uma fosfina 3,5-*di-terc*-butilfenil como ligante e catalisador nas reações, relatando as suas propriedades eletrônicas e estéricas favoráveis no estudo. Szigeti e colaboradores^[6], realizaram a aplicação de ligantes triarilfosfina como (PPh_3 e *t*Bu) como reagentes nas reações de Mitsunobu.

CAPÍTULO 2

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste capítulo é a síntese e caracterização espectroscópica e estrutural de um ligante fosfina da classe PAr_3 3,5-dissubstituído e sua comparação com outros ligantes comercialmente disponíveis. Fornecer evidências para as forças relativas destas fosfinas com propriedades doadoras e explorar os efeitos estéricos destes ligantes e em seus derivados, formados a partir de reações de oxidação química com O, S e Se, para obtenção de moléculas mais estáveis.

2.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o ligante tris(3,5-di-*terc*-butilfenil) fosfina (**L1**), por uma rota sintética modificada da literatura^[31];
- Realizar a reatividade do ligante **L1** por meio de oxidações químicas com os calcogênios O, S, Se, de modo a obter suas variações (**L5**, **L6** e **L7**, respectivamente);
- Caracterizar os ligantes obtidos por análise elementar e ponto de fusão;
- Caracterizar os ligantes por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e ^1H), espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR).
- Elucidar as estruturas cristalinas dos ligantes, por meio da difratometria de raios X de monocristal.
- Realizar estudos teóricos por meio da técnica DFT, para estudos das estruturas, da estereoquímica e das energias dos conformeros resultantes.
- Caracterizar os ligantes por medidas de voltametria cíclica, para definição dos processos redox e elucidar o mecanismo eletroquímico.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Reagentes

A síntese do ligante tris(3,5-di-*terc*-butilfenil) fosfina (**L1**) foi realizada em atmosfera de N_2 e com solventes de grau analítico. Os solventes utilizados foram tratados por destilação com o respectivo sal secante designado para cada solvente descrito por Perrin e Armarego^[32].

CAPÍTULO 2

O solvente tetraidrofurano (THF) utilizado na síntese do ligante, foi seco sob refluxo em sódio metálico e benzofenona sob atmosfera de N₂. A acetonitrila (CH₃CN) e o diclorometano (CH₂Cl₂) foram destilados com hidreto de cálcio e armazenados em peneira molecular sob temperatura ambiente. tris(4-metóxfenil) fosfina (**L4**), tris(4-metóxi-3,5-dimetilfenil) fosfina (**L3**), tris(3,5-dimetilfenil) fosfina (**L2**) e 1-bromo-3,5-*terc*-butil benzeno foram disponíveis comercialmente da Aldrich, com grau reagente. Todo o trabalho com fosfinas sensíveis ao ar foi conduzido em atmosfera de N₂ seco, usando técnicas de Schlenk e linha de vácuo. O sal perclorato de tetrabutylamônio (PTBA- Aldrich) foi empregado sem nenhum tratamento prévio.

2.3.2 Síntese do ligante tris(3,5-di-*terc*-butilfenil) fosfina (**L1**) e suas variações (**L5-L7**)

2.3.2.1 tris(3,5-di-*terc*-butilfenil) fosfina (**L1**)

A síntese foi realizada pela rota reportada em Manabe, 1998^[31], a qual foi modificada para este trabalho. Uma solução de 5,0 g (18,6 mmol) de 1-bromo-3,5-di-*terc*-butilbenzeno em 18 mL de THF seco em um balão de 250 mL equipado com uma saída lateral, foi arrefecida até -78 °C durante 10 min sob agitação. Então foram adicionados 13,2 mL (19,5 mmol) de *n*-butil lítio (1,6 mol em hexano) durante 10 min. Em seguida, adicionou-se 0,540 mL (6,2 mmol) de PCl₃ ao longo de mais 10 min. A mistura resultante foi aquecida a 0 °C e depois agitou-se durante 30 min. Finalizando a reação, removeu-se o solvente sob pressão reduzida e adicionou-se ao resíduo formado uma solução de 10 mL de H₂O/1mL de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹ desgaseificada por ebulição em N₂. Em seguida adicionou-se 2 vezes a esta mistura 20 mL de CH₂Cl₂ desgaseificado e manteve esta solução sob atmosfera de N₂. Formaram-se duas camadas e separou-se a fase orgânica (CH₂Cl₂+fosfina) com o auxílio de uma cânula, sendo esta solução na sequência tratada com Na₂SO₄ anidro, utilizando depois a mesma cânula para separar a solução do excesso de sal. Evaporou-se todo solvente, formando um pó branco. Este sólido foi transferido para o tubo de Schlenk, o qual foi mantido sob atmosfera de N₂. A recristalização foi feita numa mistura MeOH/EtOH 3:1 a frio sob N₂ e a etanol 99%. Rendimento: 3,13 g (84,4%). **RMN** ¹H (300.13 MHz, CDCl₃, δ ppm): H₁ 1,21 (s, 54 H, -C(CH₃)₃]; H₂ 7,06 (d, 6 H, *J*_{H,P}= 9.0 Hz); H₃ 7,34 (s, 3 H, -CH) (*Lit.* δ: 1,22, 7,08, 7,36)^[31]. **RMN** ³¹P {¹H} (121.49 MHz, CDCl₃): δ -1.30. FTIR (ν/cm⁻¹)= 2951 (Csp³-H), 1578 e 1472 (C=C), 1131 e 710 (P-C), 873, 775 (C-H (aromático)). (*Lit.* (ν/cm⁻¹)KBr 2950, 1575, 1475)^[31].

2.3.2.2 *tris(3,5-di-terc-butilfenil) fosfina oxidada monohidratada (L5)*

Uma certa quantidade do **L1** foi colocada em um balão de 50 mL e dissolvida em 20 mL de acetona. Em seguida fez-se uma cromatografia em camada delgada (TLC) antes da reação, em 95% de hexano e 5% de acetato de etila. Na sequência, a solução foi aquecida e agitada até à ebulição, depois adicionou-se gotas de H₂O₂ a 4% (0,7 mL de H₂O₂ 30% em 5 mL de H₂O). Esta mistura reacional foi monitorada por TLC por 1 hora. Esta solução foi deixada à temperatura ambiente, onde houve a formação de cristais, realizando na sequência a filtração. Os cristais formados foram purificados com 10 mL de CH₂Cl₂ e Na₂SO₄ como agente secante. Depois, filtrou-se e evaporou-se todo o solvente. A recristalização foi feita em 2 mL de *n*-heptano, sob agitação e aquecimento. Após arrefecer a solução à temperatura ambiente, resfriou-se (-30°C). Obtiveram-se cristais incolores do fosfina oxidada monohidratada. (m= 0,279 g). C₄₂H₆₃PO·*n*H₂O. MM= 614,90 g mol⁻¹. Análise elementar, C₄₂H₆₃OP·0,35H₂O (melhor ajuste ao teor de água residual): Calc: C 81,20, H 10,34%. Enc.: C 80,88, H 9,96%. PF: 180-189 °C. **RMN ¹H** (300.13 MHz, CDCl₃, δ ppm): H₁ 1,26 (s, 54 H, -C(CH₃)₃]; H₂ 7,46 (d, 6 H, *J*_{H,P} = 10,8 Hz); H₃ 7,55 (t, 3 H, -CH, *J*_{H,H} = 1,8 Hz) (*Lit.* δ: 1,26, 7,48, 7,59)^[7]. **RMN ³¹P {¹H}** (121.49 MHz, CDCl₃, δ ppm): +35,00. **FTIR** (v/cm⁻¹): 2954 (Csp³-H), 1593 e 1474 (C=C), 1255 (P=O), 1149 e 709 (P-C), 873 e 787 (C-H, aromático).

2.3.2.3 *tris(3,5-di-terc-butilfenil) fosfina sulfurada (L6)*

Em um balão de 25 mL, foram adicionados 300 mg (0,50 mmol) do **L1** e 50 mg (0,19 mmol) de enxofre (S₈) em 5 mL de *m*-xileno. Esta solução foi agitada e mantida sob refluxo (~160 °C) sob N₂ durante 2 horas. A reação foi monitorada por TLC em hexano, até à formação completa do composto. Em seguida, arrefeceu-se a solução à temperatura ambiente e removeu-se o solvente sob pressão reduzida. Ao resíduo formado foi adicionado 6 mL de *n*-heptano, sob agitação e aquecimento. Com o resfriamento, formou-se cristais brancos que foram filtrados e secos. Rendimento: 0,172 g (57,33%). Análise elementar: Calc. para C₄₂H₆₃PS (MM: 630,99 g mol⁻¹): C 79,94; H 10,06; S 5,08 %. Enc.: C 80,18; H 9,79; S 4,90 %. PF: 240-250 °C. **¹H NMR** (300.13 MHz, CDCl₃, δ ppm): H₁ 1,24 (s, 54 H, -C(CH₃)₃]; H₂ 7,46 (d, 6H, *J*_{H,P} = 14,40 Hz); H₃ 7,50 (t, 3 H, -CH, *J*_{H,H} = 1,8 Hz). **RMN ³¹P {¹H}** (121.49 MHz, CDCl₃, δ ppm): +47,92. **FTIR** (v/cm⁻¹): 2959 (Csp³-H), 1593 e 1468 (C=C), 1136 e 712 (P-C), 673 (P=S), 875 e 781 (C-H, aromático).

CAPÍTULO 2

2.3.2.4 *tris(3,5-di-terc-butilfenil) fosfina selenato (L7)*

Em um frasco de 25 mL, foram adicionados 300 mg (0,50 mmol) do **L1** e 210 mg (2,66 mmol) de selênio em 5 mL de *m*-xileno. Esta solução foi agitada e mantida sobre refluxo (~160 °C) sob N₂ durante 2 horas. A reação foi monitorizada por TLC em 95% de hexano e 5% de acetato de etila, até completar a formação do composto. Em seguida, arrefeceu-se à temperatura ambiente e fez-se a filtração em Celite para remover o excesso de selênio. Na sequência, removeu-se o solvente sob pressão reduzida e adicionou-se ao resíduo formado 6 mL de *n*-heptano, sob agitação e aquecimento. Com o resfriamento, houve a formação de cristais brancos que foram filtrados e secos. Rendimento: 0,1 g (37 %). Análise elementar: Calc. para C₄₂H₆₃PSe (MM: 677,89 g mol⁻¹): C 74,42; H 9,37%. Enc.: C 73,96; H 8,91%. PF: 274-278 °C. ¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃, δ ppm): H₁ 1,40 (s, -C(CH₃)₃); H₂ 7,44 (d, 6H, J_{H,P} = 14 Hz); H₃ 7,50 (t, 3 H, -CH, J_{H,H} = 1,5 Hz). RMN ³¹P {¹H} (121.49 MHz, CDCl₃, δ ppm): +39.54 (J_{P-Se} = 719 Hz). *Lit.* δ: +37,4 (J_{P-Se} = 714,0 Hz)^[28]. FTIR (ν/cm⁻¹): 2960 (Csp³-H), 1590 e 1474 (C=C), 1136 e 707 (P-C), 580 (P=Se), 879 e 787 (C-H, aromático).

2.3.3 Caracterizações do ligante *tris(3,5-di-terc-butilfenil) fosfina* e suas variações2.3.3.1 *Análise elementar e ponto de fusão*

As análises elementares da porcentagem de C, H, N foram realizadas utilizando-se Analisador Elementar Micro-cubo Vario. O ponto de fusão foi realizado em um equipamento Electrothermal Mel-temp 3.0. Equipamentos alocados no Laboratório de microanálises do Departamento de Química e Bioquímica da UofL-Canadá.

2.3.3.2 *Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)*

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 disponível no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da UofL -Canadá. A amostra foi analisada em uma cubeta de quartzo, com caminho óptico de 1 cm. Os espectros foram obtidos em diclorometano, em uma concentração de 1.10⁻⁵ mol L⁻¹ em uma faixa de comprimento de onda de 200-900 nm.

CAPÍTULO 2

2.3.3.3 Espectroscopia de vibração na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram registrados no espectrofotômetro modelo Bruker Tensor 37 alocado no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da UofL-Canadá. A análise foi realizada no modo de transmissão com resolução de 4 cm^{-1} , com acumulação de 64 scans. Utilizou-se o modo de transmissão, onde os complexos foram analisados por meio de amostras em pó, na região de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, por espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR).

2.3.3.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN 1D $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e ^1H foram registados em solução de clorofórmio deuterado $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$ num espectrômetro Bruker Avance II de 300 MHz alocado no Departamento de Química e Bioquímica da UofL-Canadá e os deslocamentos químicos presentes no espectro de RMN de ^1H , foram determinados em relação ao tetrametilsilano (TMS). O RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foi obtido com 32 scans; largura espectral de 49019,609 Hz; tempo de aquisição 0,66 s; tamanho do FID 65536 e comprimento de pulso 40° . Já para o RMN ^1H , o espectro foi obtido com 16 scans, largura espectral de 6188,119 Hz, tempo de aquisição 5,99 s, tamanho do FID 74256 e comprimento de pulso 90° .

2.3.3.5 Caracterização eletroquímica por medidas de voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas à temperatura ambiente com um potenciostato/galvanostato μ -Autolab (Tipo III, Metrohm-Eco Chemie), alocado no Laboratório de Desenvolvimento de eletrodos modificados, GDEM-UEPG. Estes experimentos foram realizados utilizando CH_3CN tratada, contendo Bu_4NClO_4 0,10 M (perclorato de tetrabutilamônio- PTBA) como eletrólito suporte e uma célula eletroquímica baseada em três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo com área eletroativa de 3 mm^2 , eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl em capilar de Luggin, com a utilização da solução de PTBA em acetonitrila ($0,1\text{ mol L}^{-1}$). Nestas condições, o ferroceno (Fc) é oxidado a $+0,375\text{ V}$ e os dados são corrigidos para a escala $\text{Fc}^{+}/^0$. As análises foram realizadas com os ligantes em solução com concentração de $1.10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, sob atmosfera de N_2 e os voltamogramas foram registrados em diferentes velocidades de varredura variando de 50 a 2000 mV s^{-1} .

CAPÍTULO 2

2.3.3.6 Difractometria de raios X de monocristal

As estruturas do ligante e suas variações foram determinadas por cristalografia de raios X de um monocristal a 100 K, pelo Prof. Dr. René Boéré, com um difratômetro Rigaku-Oxford, Super Nova, equipado com um detector Pilatus P200 HPAD e utilizando radiação Cu-K α , λ = 1,54184 Å, alocado no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da UofL-Canadá. As imagens foram integradas, os dados processados e corrigidos para absorção usando CrysAlisPro 1.171.38.43, resolvido com SHELXT^[33] e refinado usando SHELXL-2014^[34] dentro do conjunto de programas Olex2^[35].

2.3.3.7 Cálculos teóricos

Os cálculos da teoria do funcional da densidade híbrida (DFT) na fase gasosa no nível de teoria B3LYP/6-31G (2d,p) foram conduzidos utilizando W03 Gaussiano (ou em parte, GW16). Os resultados foram interpretados usando GaussView 6.5. As geometrias corrigidas por dispersão usando fatores empíricos D3 de Grimme.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Considerações sobre as sínteses

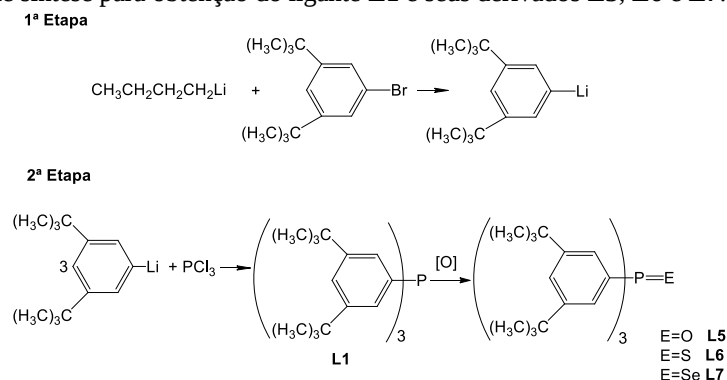
A síntese do **L1** seguiu o procedimento relatado por Manabe, 1998^[31] com algumas modificações para facilitar o trabalho em atmosfera inerte, usando técnicas de cânula. Este ligante apresenta uma coloração branca no estado sólido e como é instável na presença de oxigênio, é necessário mantê-lo sob atmosfera inerte (N₂). A purificação se mostrou difícil, o que influenciou no rendimento final de todas as preparações. Este fato foi devido à solubilidade alta apresentada pelo **L1** em álcoois e em solventes como éter, acetonitrila, diclorometano e clorofórmio à temperatura ambiente (25 °C). Todas as sínteses obtiveram alto grau de pureza, como pode ser evidenciado pelos valores de C e H e pelos espectros de RMN.

Realizou-se o estudo da reatividade do **L1**, já que o mesmo possui uma instabilidade em oxigênio. Sua oxidação é induzida por processos de transferência de elétrons porque a blindagem estérica causada pelos substituintes (*t*Bu) bloqueia o acesso das reações de oxidação ao átomo de fósforo. O grupamento PPh₃, em contraste, é facilmente acessível aos oxidantes e, tem um potencial de oxidação substancialmente mais elevado. Para investigar esse

CAPÍTULO 2

comportamento, avaliou-se a oxidação química com oxigênio, enxofre e selênio, obtendo assim variações do **L1**. O resumo desta síntese está representado no **Esquema 2.1**. A investigação cristalográfica demonstrou que os cristais, livres de contaminação por óxido eram difíceis de serem observados devido à reatividade das fosfinas com o O. O óxido **L5** formado foi sintetizado para confirmar esta reatividade. Verificou-se que a recristalização de **L1** em uma quantidade mínima de uma mistura de MeOH/EtOH 3:1 a frio sob N₂, produziu pequenas agulhas incolores, possibilitando assim, a elucidação da sua estrutura.

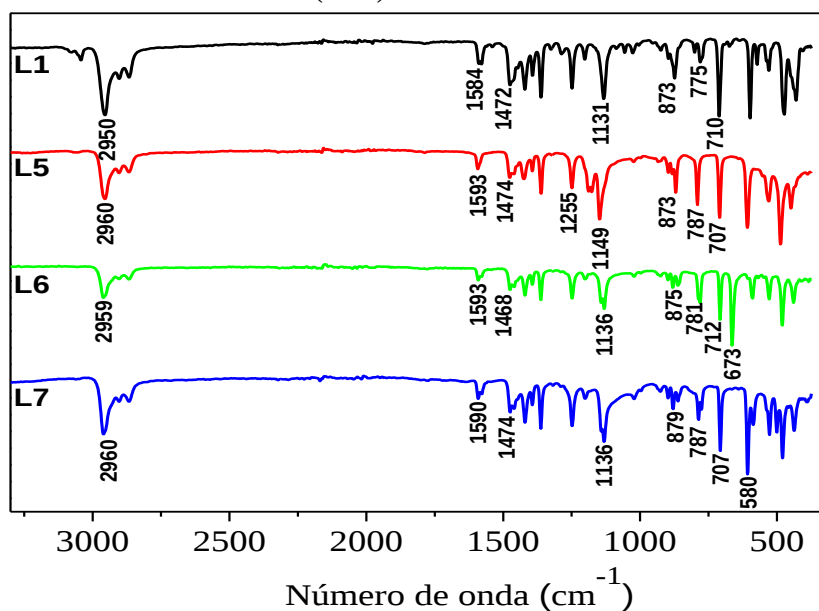
Esquema 2. 1: Esquema de síntese para obtenção do ligante **L1** e seus derivados **L5**, **L6** e **L7**.



2.4.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos ligantes

Os espectros obtidos pela análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho para **L1** e derivados (**L5-L7**), obtidos por meio de amostras em pó, são ilustrados na **Figura 2.5**.

Figura 2. 5: Espectros vibracionais na região do infravermelho para **L1** e derivados (**L5-L7**) em pó, obtidos por espectroscopia de Refletância Total Atenuada (ATR).



Segundo Manabe, 2008^[31], a banda intensa em 2950 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento assimétrico ($\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$) do grupamento tBu, substituinte do anel aromático do ligante triarilfosfina. Já as bandas em 1584 e 1472 cm⁻¹ são atribuídas ao ($\nu_{\text{as}}\text{C}=\text{C}$) do anel aromático. Pode-se evidenciar ainda bandas em 1131 e 710 cm⁻¹, referentes ao estiramento ($\nu_{\text{P-C}}$), resultante da ligação entre o átomo de P e o C do anel aromático 3,5-dissubstituído. Em relação a este modo de substituição, observam-se as bandas em 775 e 873 cm⁻¹. Os ligantes **L5**, **L6** e **L7** apresentam bandas semelhantes com poucas variações nos valores citados, porém, algumas bandas mais características podem ser observadas e que comprovam as reações de oxidação química, tais como, no espectro do **L5** há uma banda em 1255 cm⁻¹ relacionada ao $\nu_{\text{P=O}}$ ^[36]; no **L6** há uma banda por volta de 673 cm⁻¹ atribuída ao $\nu_{\text{P=S}}$ ^[36]; o espectro do **L7** apresenta uma banda em 580 cm⁻¹ resultante do modo $\nu_{\text{P=Se}}$ ^[36]. A **Tabela 2.1** resume os modos vibracionais com as principais atribuições relatadas.

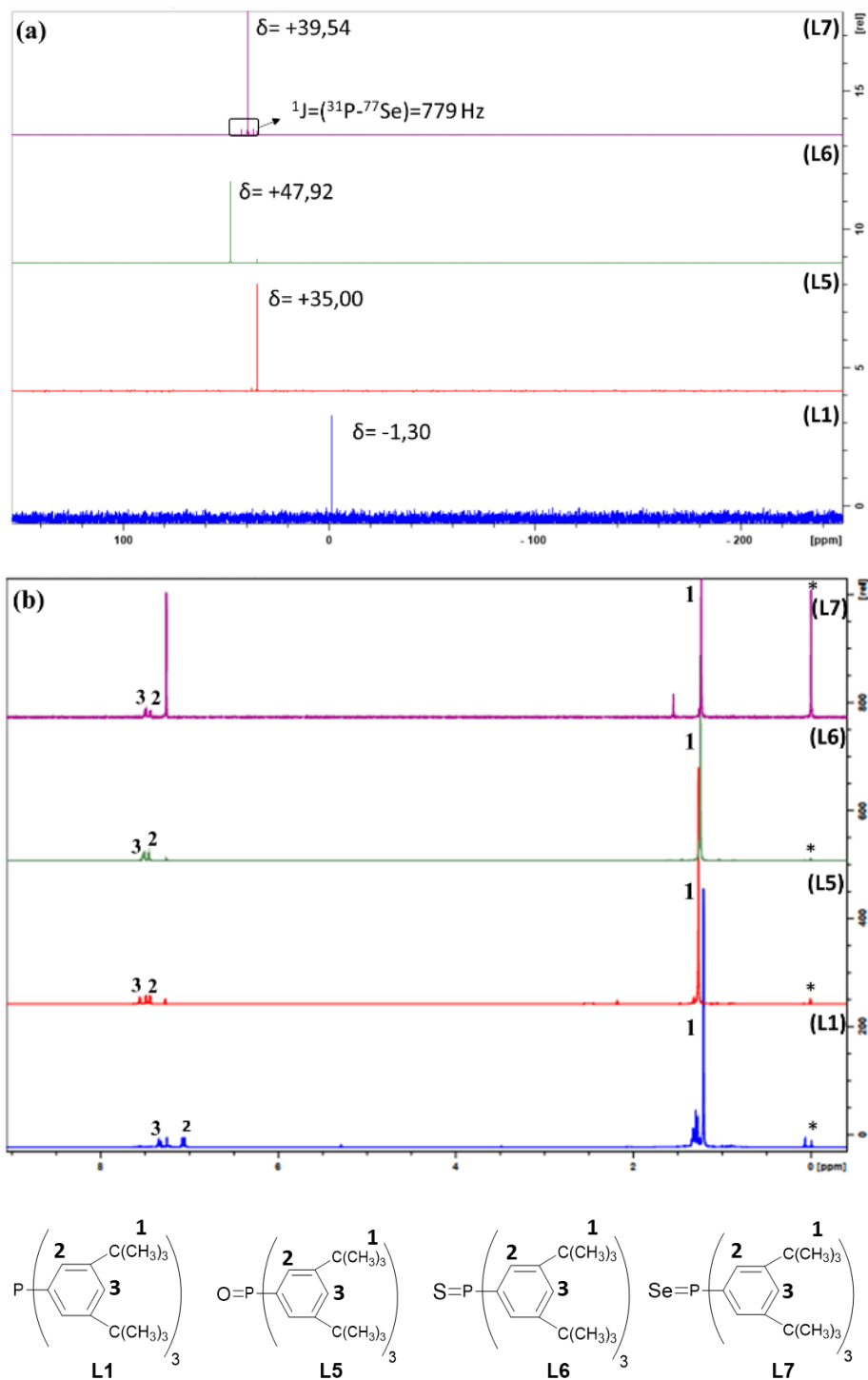
Tabela 2. 1: Atribuição das bandas dos espectros FTIR (cm⁻¹) observadas para **L1** e derivados (**L5-L7**).

	L1	L5	L6	L7
$\nu(\text{Csp}_3\text{-H})$	2950	2960	2959	2960
$\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{C})$	1584, 1472	1593, 1474	1593, 1468	1590, 1474
$\nu(\text{P-C})$	1131, 710	1149, 709	1136, 712	1136, 707
$\nu(\text{P=O})$	-	1255	-	-
$\nu(\text{P=S})$	-	-	673	-
$\nu(\text{P=Se})$	-	-	-	580
$\delta(\text{C-H})$ (aromático)	873, 775	873, 787	875, 781	879, 787

2.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos ligantes

Pela espectroscopia RMN de ³¹P{¹H} e ¹H evidenciou-se os deslocamentos químicos (δ) característicos, que podem ser diretamente ligados às estruturas propostas dos ligantes sintetizados em solução. As atribuições dos sinais na **Figura 2.6**, foram realizadas a partir das correlações observadas nos espectros e por meio da comparação com os valores de deslocamentos químicos para ligantes análogos ou já descritos na literatura^[6,30,31,36].

Figura 2. 6: Espectros de RMN dos ligantes **L1**, **L5-L7**: (a) RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (121,49 MHz, CDCl_3); (b) RMN ^1H (300,13 MHz, CDCl_3). (Expansão RMN ^1H , região entre 7,00-7,60 ppm, em **A2.1**).



Nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, **Figura 2.6(a)**, nota-se a presença de simpletos na faixa de δ -1,30 a +39,54 ppm. Os diferentes deslocamentos químicos indicam as oxidações do ligante (**L1**), as quais, desblindam os sinais no espectro, devido as ligações formadas do P com elementos de maior eletronegatividade. Similar a este resultado observado, a série de ligantes obtida com tris(4-piridil)fosfina^[30] e suas variações químicas (O, S, Se), demonstrou a mesma

CAPÍTULO 2

tendência de desvios químicos das ressonâncias $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$: $\delta = 22,4$ ppm para óxido, $\delta = 38,4$ ppm para sulfeto, e um ressonância intermediária em $\delta = 31,4$ ppm para o seleneto.

No espectro de RMN ^1H , **Figura 2.6(b)**, são observados os deslocamentos químicos do anel aromático 3,5-dissubstituído, com simpletos entre δ 1,21-1,26 ppm, atribuídos ao deslocamento químico dos hidrogênios do grupo *t*Bu (H_1), nas posições 3,5 do anel, os quais, apresentam uma maior blindagem. Os dupletos com deslocamentos químicos em δ 7,06 ppm ($J_{\text{H-P}} = 9,0$ Hz) e entre 7,44-7,46 ppm ($J_{\text{H-P}} = 14,0$ a 15,0 Hz) referem-se aos hidrogênios na posição *orto* do anel aromático (H_2), que estão mais desblindados, devido o acoplamento com o átomo de fósforo, que leva a um desdobramento do sinal. Por fim, o deslocamento do sinal na forma de tripleto em regiões mais desblindadas do espectro, δ 7,34 ppm e entre 7,50-7,55 ppm ($J_{\text{H-H}} = 1,5$ a 1,8 Hz) é atribuído aos hidrogênios em posição *para* do anel aromático (H_3). Esta maior desblindagem é resultante da aproximação com os substituintes *t*Bu, por serem volumosos, com grande efeito estérico.

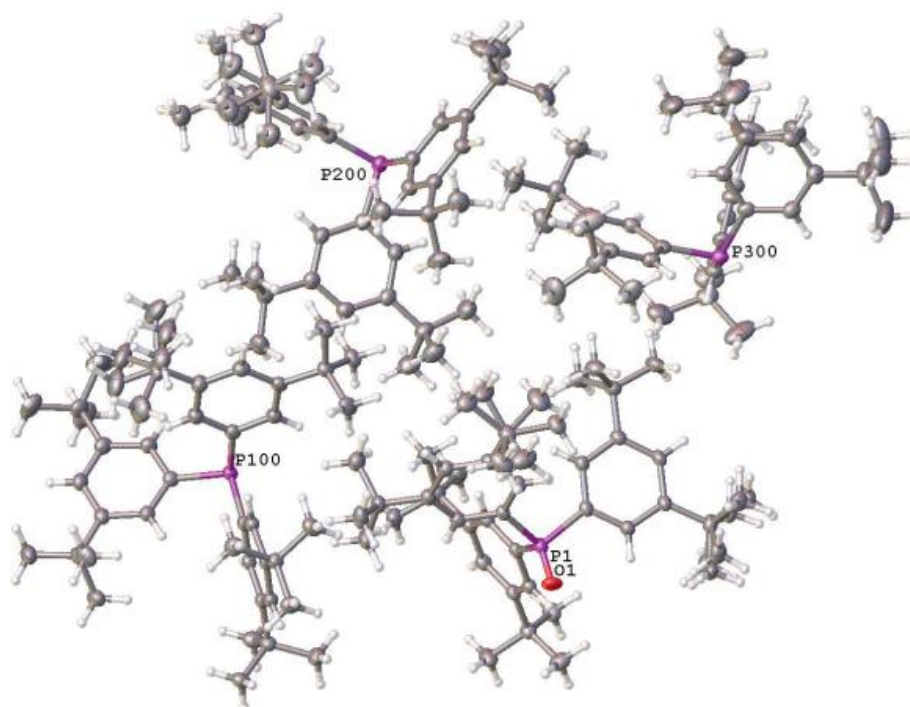
Os sinais para os hidrogênios (H_2 e H_3), em posição *orto* e *para* do anel aromático, respectivamente do **L5**, **L6** e **L7**, estão situados na região mais desblindada do espectro, em relação aos sinais do **L1**. Novamente isso é ocasionado pela interação do átomo de fósforo com os elementos O, S e Se, proveniente das oxidações químicas, que mudam o ambiente químico dos hidrogênios ao redor do átomo de P.

2.4.4 Estudo Cristalográfico e Computacional das estruturas do **L1**

2.4.4.1 Estrutura do cristal **L1**

A difratometria de raios X de um monocristal de **L1** demonstrou que a estrutura é formada por pequenas placas longas e finas incolores, quando obtidas por recristalização em etanol ou metanol. A estrutura é complexa, formada por 4 moléculas independentes, que cristalizaram nos sistemas cristalinos triclinicos e apresentaram grupo espacial em uma rede $\text{P2}_1/\text{c}$ (denotada como $Z' = 4$), **Figura 2.7**.

Figura 2. 7: Representação ORTEP das estruturas de **L1** com 4 moléculas independentes P1, P100, P200 e P300. Cristais crescidos a partir de etanol 99%.



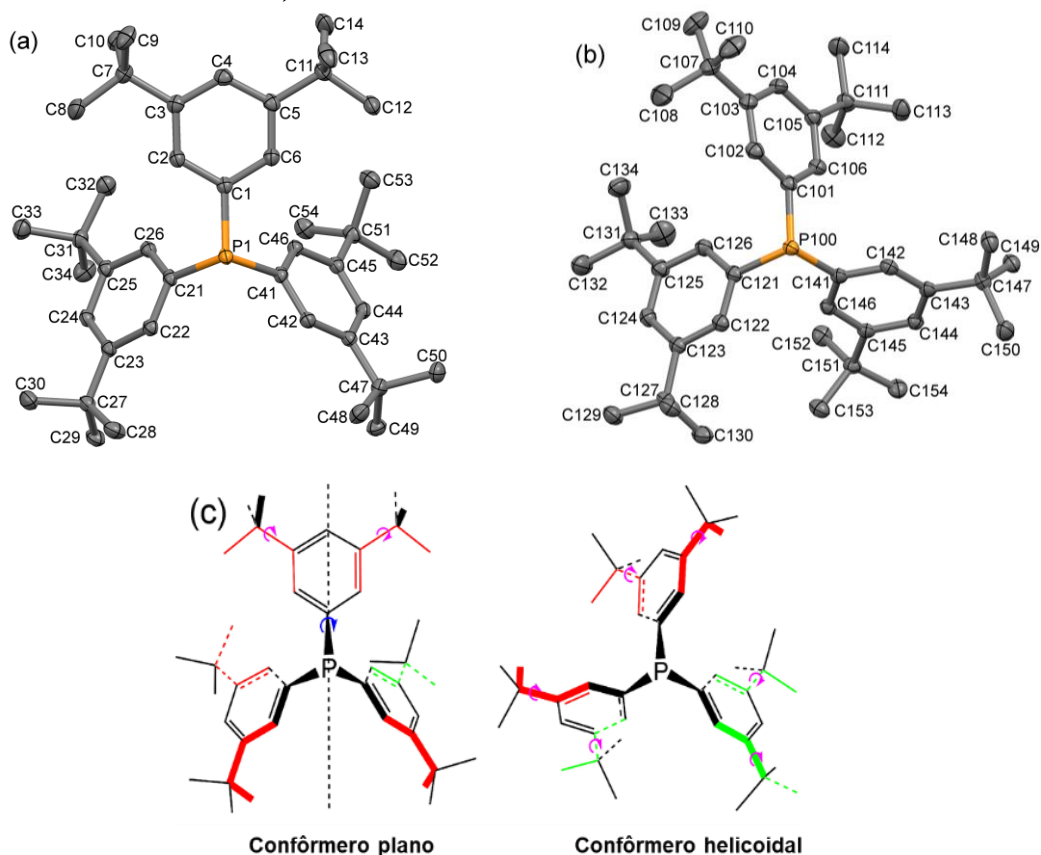
FONTE: GUIMARÃES et al., 2018^[37].

A base de dados de Durham Z' para $Z' > 4$ não apresenta dados para ligantes do tipo PAr_3 . Convencionalmente este parâmetro Z' é usado para denotar o número de moléculas na unidade assimétrica. É definido como o número de unidades de fórmula na célula unitária, dividido pelo número de posições das moléculas independentes. A complexidade da unidade assimétrica deriva do fato de que as moléculas estão livres para se associarem ao espaço tridimensional^[38]. Uma revisão realizada em CSD* (CSD Versão 5.39, novembro de 2017), para a estrutura tris[3,5-bis(trifluormetil)fenil]fosfina (CSD refcode: IGAGIG), um análogo estrutural próximo de **L1**, em vista do tamanho molecular semelhante de CF_3 e substituintes tBu , também cristaliza com $Z' = 4$ ^[39]. Além disso, nessa estrutura, três das quatro moléculas estão predominantemente em uma conformação “plana” e apenas uma é helicoidal.

Estas moléculas, existem como dois isômeros conformacionais distintos, um contendo o anel arila $\text{C1} > \text{C6}$ orientado de forma “plana”, isto é, ortogonal a um plano que contém o eixo principal da molécula através de P1 e os elétrons isolados do fósforo, como mostra a **Figura 2.8(a)**, as outras três moléculas têm um arranjo helicoidal comum aos três anéis arila **Figura 2.8(b)**). Os dois tipos de conformação são ilustrados em perspectiva na **Figura 2.8(c)**.

The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-system/components/csd/>

Figura 2. 8: Elipsóides de deslocamento (30% de probabilidade) de (a) conformação "plana" designada por P1 contendo C1→C54; (b) uma das conformações helicoidais designadas por P100; (c) Diagramas de perspectiva das moléculas P1 e P100 para as principais conformações tBu na estrutura cristalina. (Moléculas P200 e P300, representação das estruturas, em A2.2).

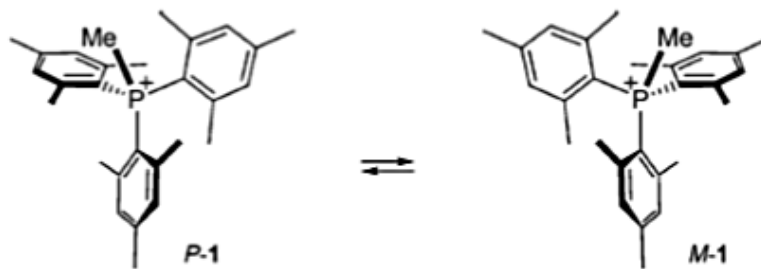


FONTE: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2018^[37].

A molécula designada por P100 tem uma rotação no sentido anti-horário (configuração P) se vista de cima, enquanto P200 e P300 (outras moléculas conformacionais) possuem rotação no sentido horário (configuração M). Portanto, três das quatro moléculas da estrutura possuem uma perturbação rotacional dos anéis arila. As conformações limitantes dos grupos tBu observadas na **Figura 2.8(c)**, têm um grupo metila no plano ou *sin* com o lado do anel arila (cor vermelha) ou *anti* (cor verde).

Este controle estereoquímico sobre o isomerismo de estruturas em forma de hélice de cátions trimesitilmetilfosfônio já foram obtidos, pois, os mesmos são conhecidos por adotarem tais geometrias quirais que diferem, tanto em solução quanto no estado sólido, no sentido da torção dos três anéis aromáticos presentes em tais estruturas. Essas porções existem, portanto, em dois enantiômeros com configurações P (sentido horário) ou M (sentido anti-horário)^[40], como mostra **Figura 2.9**. A maioria dos sistemas, incluindo triarilfosfatos e sais de triarilfosfônio, apresentam uma troca rápida entre os enantiômeros em solução e seu isolamento à temperatura ambiente na forma não racêmica.

Figura 2. 9: Desenho em perspectiva dos confôrmeros P (sentido horário) e M (sentido anti-horário) para as moléculas de hélice piramidal.



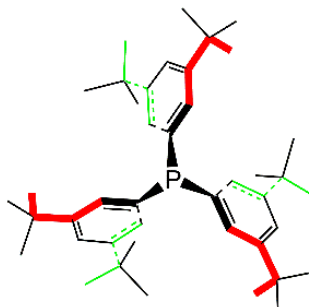
FONTE: LALEU, et al., 2006^[40].

2.4.4.2 Análise computacional das conformações de (L1)

A fim de compreender quais estruturas coexistem na estrutura cristalina de **(L1)** com ($Z'=4$), considerando as diferentes conformações apresentadas pela molécula, verificou-se qual estrutura, sendo ela plana ou helicoidal, a de menor energia e qual a diferença de energia entre os confôrmeros apresentados. Este estudo foi realizado por simulações computacionais baseadas na Teoria do Funcional de Densidade (DFT) aliada ao funcional híbrido no nível de teoria B3LYP/6-31G (2d, p) e uma otimização que começa com a forma plana de **L1** (**Figura 2.9**), convertendo-se em uma geometria helicoidal. A geometria plana otimizada foi encontrada em aproximadamente de 6 kJ.mol⁻¹, valor mais alto em energia do que o valor para a conformação helicoidal otimizada.

Uma vez descoberto que a forma helicoidal é a mais estável, foi dada atenção às conformações limitantes dos grupos tBu na molécula de **L1**. A conformação simétrica tripla em que todos os três grupos tBu *exo* (no lado do átomo de fósforo da pirâmide) são *syn* e os três grupos *endo* todos anti (**Figura 2.10**), é a energia mais baixa neste nível de teoria.

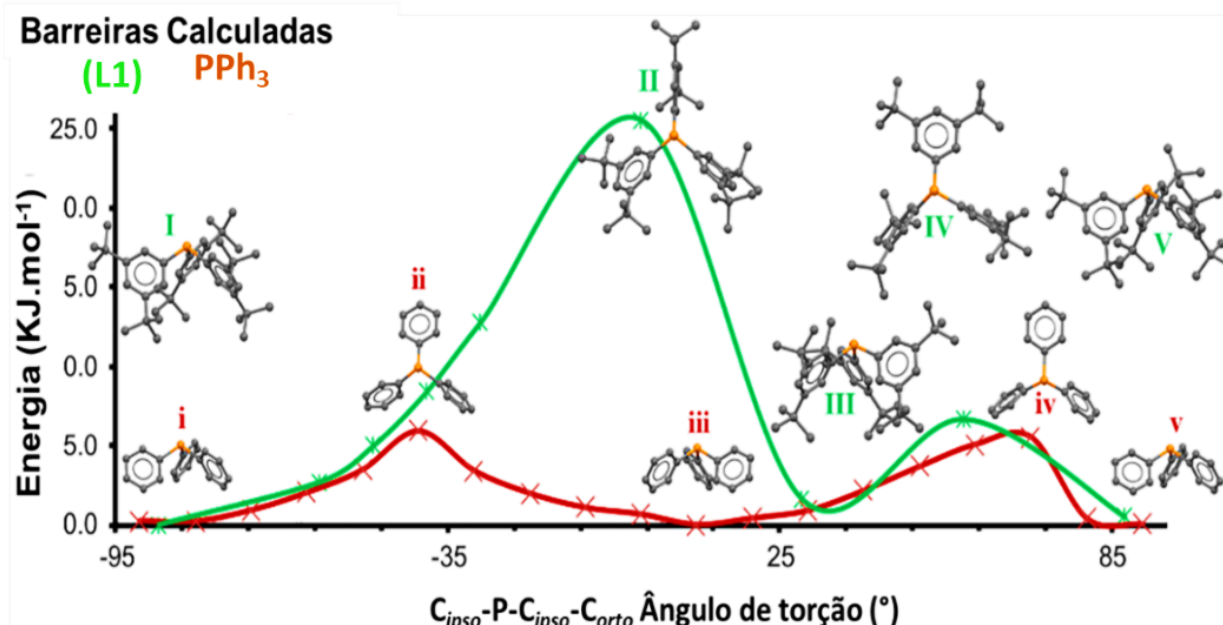
Figura 2. 10: Confôrmero de energia mínima obtida por DFT: grupos tBu superiores orientados com um grupo metil coplanar *syn* (vermelho) e todos os grupos tBu inferiores orientados *anti* (verde).



FONTE: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2018^[37].

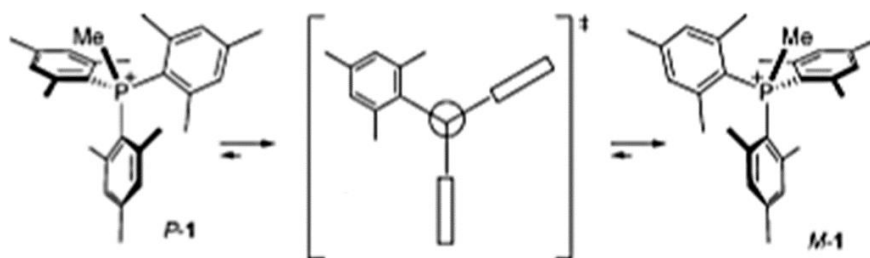
A geometria apresentada na **Figura 2.10**, com orientações otimizadas do grupo tBu, foi então usada para investigação computacional da conformação^[9], **Figura 2.11**. Para comparação, utilizou-se a a fosfina PPh₃ uma varredura similar no mesmo nível de teoria. As varreduras foram realizadas em aproximadamente 180°. Para PPh₃ a partir do enantiômero helicoidal M, **i**, a energia aumenta até um máximo de **ii** em cerca de 5,6 kJ mol⁻¹, com uma orientação “plana” de um dos anéis, de acordo com a determinação por Mislow de que o giro de dois anéis, é o mecanismo limite para racemização de moléculas triaril de forma piramidais, como está representado na **Figura 2.12**^[9,40].

Figura 2. 11: Varreduras computacionais comparativas de energia no nível de teoria B3LYP/6-31G (2d, p) para **L1** e PPh₃ com otimização de todos os parâmetros além dos ângulos de torção C_{ipso}-P-C_{ipso}-C_{orto}. Conformações moleculares para os máximos e mínimos de energia também são representadas.



FONTE: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2018^[37].

Figura 2. 12: Perspectivas (vistas de cima) dos processos clássicos de "giro" para racemização das moléculas, segundo Mislow.



FONTE: LALEU, et al., 2006^[40].

Além desse máximo obtido pela estrutura **M ii** do ligante PPh_3 , a estrutura helicoidal **P iii** é alcançada. A condução adicional dos ângulos diédricos leva a uma segunda conformação de forma “plana” em **iv** a $5,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, que difere de **ii** nas torções relativas dos outros dois anéis arila, que depois cai rapidamente para uma geometria **M** helicoidal **v** que é idêntica a conformação **i**. Isto não é surpreendente, mas quando a mesma varredura é realizada na geometria otimizada de **L1**, a partir do estado fundamental **M**, a energia sobe abruptamente e atinge um máximo para o confômero **II** por volta de 26 kJ mol^{-1} , para o qual, a geometria está muito próxima do intermediário idealizado por Mislow, por um mecanismo de inversão de um anel (um anel arila paralelo ao eixo principal). No confômero **III**, o enantiômero **P1** é alcançado (o que pode ser otimizado para a mesma energia que o confômero **I**). A condução adicional do diedro leva ao confômero **IV** a $6,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, com o único anel arila “plano”. Aqui pode-se evidenciar uma comparação, onde a barreira de energia para os intermediários **IV** e **iv** são extremamente semelhantes, apesar das grandes diferenças no volume de seus substituintes. Assim, pode-se esperar que o ligante estudado **L1** mude de conformação, invertendo-se sobre a barreira de energia em **IV**, para interconverter sua quiralidade. Desta forma pode-se propor que, as estruturas que apresentam menor energia, **III**, **IV** e **V**, coexistem na estrutura cristalina ($Z' = 4$), de acordo com as estruturas obtidas por raios X.

2.4.4.3 Caracterização cristalográfica dos derivados de **L1**

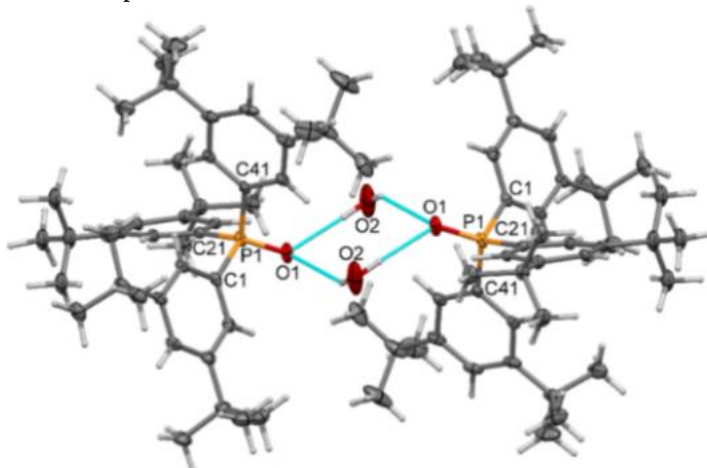
Os dados das estruturas cristalográficas resolvidas pela técnica de difratometria de raios X do **L1** e seus derivados (**L5-L7**), podem ser verificados na Tabela 2.2 e os principais comprimentos e ângulos de ligação na Tabela A2.3. Durante o desenvolvimento deste trabalho, breves relatos foram encontrados para a preparação do óxido (**L5**)^[29] e o ligante com selênio (**L7**)^[30], com caracterização parcial para cada um destes compostos formados.

Tabela 2. 2: Cristal, determinação da estrutura e parâmetros de refinamento.

Ligante	L1	L5	L6	L7
Fórmula empírica	C ₄₂ H ₆₃ P	C ₄₂ H ₆₃ OP·0.8H ₂ O	C ₄₂ H ₆₃ PS	C ₄₂ H ₆₃ PSe
Peso Molecular	598.89	629.34	630.95	677.85
Temperatura	99.9(2)	99.99(17)	100.00(10)	99.99(14)
Sistema cristalino	monoclínico	triclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P1	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c
a/Å	33.5426(3)	14.5038(2)	10.37504(9)	10.31240(10)
b/Å	10.06131(11)	16.8369(2)	19.11982(16)	19.3690(3)
c/Å	46.2696(5)	18.8775(2)	20.46184(16)	20.3821(3)
α/°	90	68.1500(10)	-	-
β/°	93.3735(9)	72.7510(10)	91.3953(7)	90.5170(10)
γ/°	90	89.9500(10)	-	-
Volume/Å³	15588.1(3)	4054.98(9)	4057.79(6)	4070.97(10)
Cela unitária Z	16	4	4	4
Z'	4	2	1	1
ρ_{calc}/cm³	1.021	1.037	1.033	1.106
μ/mm⁻¹	0.790	0.819	1.249	1.788
F(000)	5280	1392	1384	1456
Tamanho do cristal/mm³	0.15 × 0.12 × 0.03	0.339 × 0.089 × .035	0.28 × 0.18 × 0.13	0.07 × 0.06 × 0.05
Radiação	CuKα (λ = 1.54184)	CuKα (λ = 1.54184)	CuKα (λ = 1.54184)	CuKα (λ = 1.54184)
Limites de 2θ para coleta de dados /°	6.7 to 155.122	6.43 to 155.474	8.526 to 155.128	8.564 to 159.654
Índices	-41 ≤ h ≤ 42, -6 ≤ k ≤ 12, -57 ≤ l ≤ 58	-18 ≤ h ≤ 18 -21 ≤ k ≤ 21 -23 ≤ l ≤ 23	-13 ≤ h ≤ 11 -23 ≤ k ≤ 23 -24 ≤ l ≤ 25	-13 ≤ h ≤ 13 -24 ≤ k ≤ 24 -26 ≤ l ≤ 25
Reflexões coletadas	98894	162605	40872	64116
Reflexões independentes	32038	17081	8443	8813
R_{int} =, R_{sigma} =	0.0381, 0.0401	0.0392, 0.0172	0.0382, 0.0257	0.0566, 0.0305
Dados/limitações/parâmetros	32038/1620/1825	17081/1146/1104	8443/426/477	8813/345/424
Refinamento (F²)	1.014	1.035	1.035	1.103
R final [I>2σ]	0.0562	0.0613	0.0636	0.0747
wR₂ [todos os dados]	0.1452	0.1618	0.1755	0.1895
Max, min residual	0.73/-0.39	0.89/-0.52	01.01/-0.69	1.04/-0.92

O **L5**, a partir de uma mistura acetona/água, cristaliza na forma de dois dímeros centrossimétricos conectados em ponte por duas moléculas de água, com ($Z' = 2$), como ilustra a **Figura 2.13**.

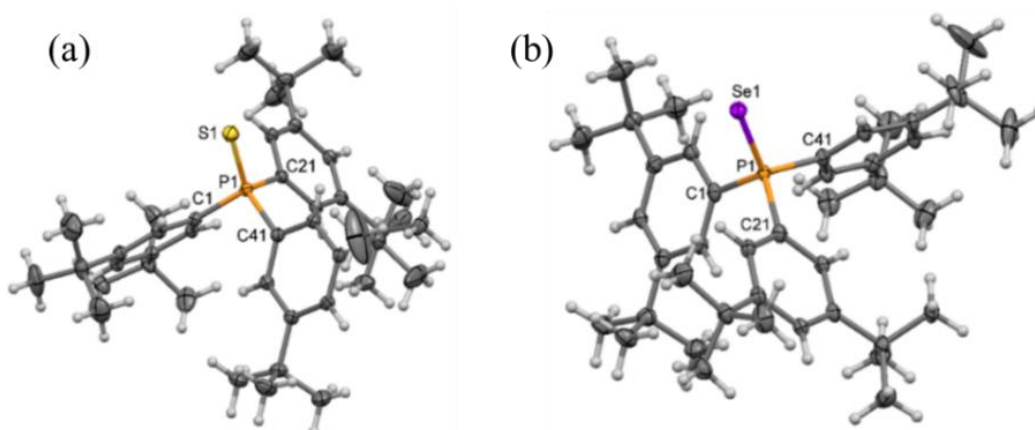
Figura 2.13: Gráfico dos elipsoides de deslocamento (40% de probabilidade) de um dos dois dímeros com pontes de água, cristalograficamente independentes e centrossimétricos do **L5**.



FONTE: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2018^[37].

As estruturas cristalinas do **L6** e **L7** formaram-se em soluções de *n*-heptano a quente, sendo isoestruturais em uma rede $P2_1/c$, representadas na **Figura 2.14**. Nota-se que a presença dos substituintes 3,5-*t*Butil proporcionam menores interações na rede cristalina. Ambas as redes também contêm espaços vazios ($67 \text{ \AA}^3$, 1,7% do volume da célula para **L6**; $141 \text{ \AA}^3$, 3,5% do volume da célula para **L7**), mas os volumes desses vazios são muito pequenos para serem acessíveis ao solvente. Não há também contatos intermoleculares significativos em nenhuma das estruturas relatadas.

Figura 2.14: Elipsóides de deslocamento (40% de probabilidade), que descreve a estrutura molecular do (a) **L6** e (b) **L7**, conforme encontrado em suas redes cristalinas.



FONTE: Adaptado de GUIMARÃES et al., 2018^[37].

2.4.4.4 Índice de Piramidalidade dos ligantes $\Sigma\{\angle CPC\}$ e o efeito estérico.

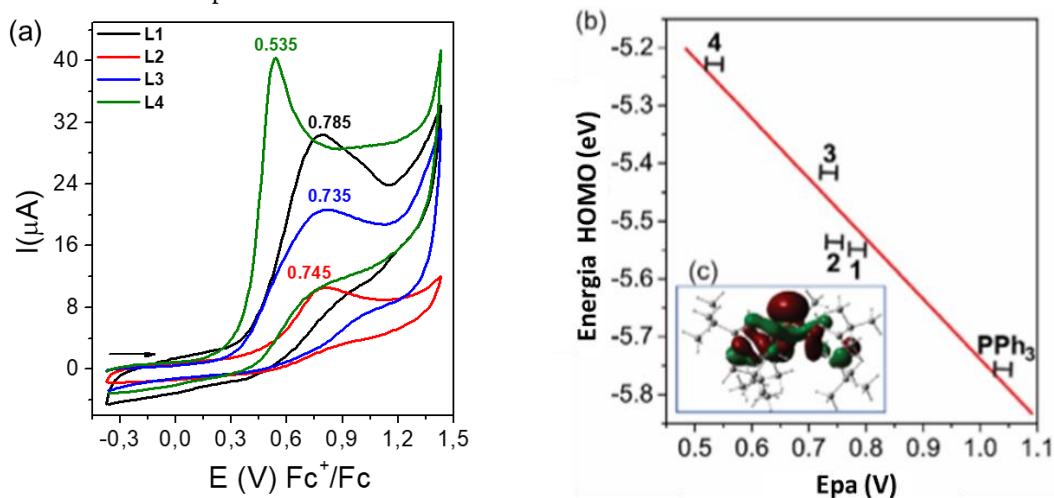
O índice de piramidalidade $\Sigma\{\angle CPC\}$ do **L1** é $303,5(2)^\circ$ para as geometrias helicoidais (P200, 300, 400), mas $308,5(1)^\circ$ para a geometria planar da molécula P1 na rede cristalina. Podemos também comparar $\Sigma\{\angle CPC\} = 313,31(5)^\circ$ em **L5**, $314,69(5)^\circ$ em **L6** e $315,28(10)^\circ$ em **L7**. A partir destes dados, percebe-se que exceto para a geometria planar em **L1**, todos os derivados de tris(3,5-di-*terc*-butilfenil) fosfina são consistentemente mais piramidais que os análogos E=PPh₃, onde E=O, S, Se: $\Sigma\{\angle CPC\} = 319,26(3)^\circ$ para O=PPh₃^[24], $317,5(4)^\circ$ para S=PPh₃^[25] e $317,9(6)^\circ$ em Se=PPh₃^[26]. Assim, pode-se confirmar que os grupos 3,5-*t*Bu substituídos em anéis arila das fosfinas estudadas PAr₃, não geram pressão estérica em posições *endo*, mostrando uma interação não repulsiva nestas regiões.

As origens mais prováveis para essa interação que resultam do aumento da piramidalidade para esses ligantes, são as forças de dispersão que operam entre os grupos 3,5-substituídos e a densidade eletrônica π dos anéis aromáticos ricos em elétrons^[41]. Para confirmar esta hipótese, os cálculos DFT originalmente usados na análise de dados foram repetidos no mesmo nível de teoria, com otimização da geometria para **L1** a **L4**. E os resultados mostraram que têm valores decrescidos de $\Sigma\{\angle CPC\}$, os quais se correlacionam diretamente com a identidade dos substituintes 3,5-substituídos, ou seja, $\Sigma\{\angle CPC\} > 305,4^\circ$ para **L4**, $\Sigma\{\angle CPC\} = 304,8^\circ$ para **L2** e **L3** (com pequena alteração) e $\Sigma\{\angle CPC\} = 298,3^\circ$ para **L1** (com contração considerável).

2.4.5 Estudo eletroquímico e força doadora dos ligantes **L1-L4**

As propriedades eletroquímicas das fosfinas **L1-L4** e PPh₃ foram estudadas por voltametria cíclica em soluções de CH₃CN/[nBu₄N][ClO₄], e os voltamogramas obtidos estão apresentados na **Figura 2.15**, onde está disposta também a correlação entre energias de E_{pa} (potencial de pico anódico) com a energia dos respectivos orbitais HOMO.

Figura 2. 15: (a) Voltamogramas cíclicos das fosfinas **L1-L4** obtidos em soluções $\text{CH}_3\text{CN}/[\text{nBu}_4\text{N}][\text{ClO}_4]$ obtidas vs. Ag/AgCl a 100 mV e expressas na escala Fc^+/Fc ; (b) Basicidade de **L1-L4** e PPh_3 avaliada em função da correlação entre energias de E_{pa} e HOMO de DFT; (c) (Inser.) Diagrama da superfície orbital de Kohn-Sham para o orbital molecular da espécie reduzida de **L1**.



FONTE: GUIMARÃES et al., 2018^[37].

Os voltamogramas mostram a presença de um processo de oxidação irreversível com potenciais de pico anódico (E_{pa}) na faixa de +0,54 a +0,79 V, tais valores estão apresentados na **Tabela 2.3**. Este processo de oxidação irreversível foi atribuído à formação de uma espécie estável, que não sofre nenhum processo de redução na sequência, de acordo com a reação a seguir^[19,20]:



Tabela 2. 3: Dados voltamétricos experimentais e energias dos orbitais redox calculadas por DFT.

Fosfina	E_{pa} (V) ^[a]	ΔE de L1 (V)	HOMO (eV) ^[b]
PPh₃	1,04 ^(d)	-0,251	-5,755
L1	0,785	0,000	-5,549
L2	0,745	0,025	-5,536
L3	0,735	0,039	-5,416
L4	0,535	0,251	-5,228

^[a]Medidos em soluções de $\text{CH}_3\text{CN}/[\text{nBu}_4\text{N}][\text{ClO}_4]$, vs. Ag/AgCl e calibrados versus Fc^+/Fc , $E_{1/2} = +0,375$ V. Erro estimado = $\pm 0,010$ V. ^[b]Dados da geometria otimizada B3LYP/6-31G (2d, p), a partir de cálculos híbridos DFT incorporando as correções de dispersão empírica D3 da Grimme.

Além disso, boas correlações dos potenciais de pico anódicos (E_{pa}) foram obtidas para a basicidade relativa das fosfinas (ΔE em relação ao potencial do **L1**). O potencial de oxidação obtido por voltametria cíclica é um parâmetro frequentemente usado para classificar as propriedades das fosfinas. Esta medição é realizada diretamente sobre a fosfina livre, e assim, a escala resultante é independente de qualquer questão relacionada com a síntese ou utilização

de complexos metálicos. Por este método podemos determinar as habilidades de σ -doador e caráter π -aceitador dos ligantes testados^[43]. Os cálculos DFT B3LYP/6-31G (2d,p) otimizados para determinar a geometria, incorporando a correção de dispersão empírica D3 de Grimme, foram realizados para **L1-L4**, e a energia do HOMO de cada fosfina está listada na **Tabela 2.3**.

Nota-se que a faixa de potenciais dos ligantes **L1-L4** (0,25 V) é razoavelmente grande para essa variação nos substituintes. Os dados do potencial de oxidação se correlacionam linearmente com as energias do HOMO calculadas para **L1-L4**, cujo orbital é o que envolve a remoção de um elétron na oxidação eletroquímica (**Figura 2.15(c)**, inserção), resultando em uma correlação linear com R^2 de 0,97 (**Figura 2.15(b)**). De acordo com esses dados voltamétricos e com as energias dos orbitais HOMO nota-se que as forças doadoras de **L1-L3** são semelhantes, e que, o **L4** é o ligante que apresenta maior basicidade, devido ao efeito ressonante do substituinte MeO.

O estudo da variação da velocidade de varredura para **L1-L4** foi realizado em um intervalo de 100 a 1200 mV s⁻¹ (ver **A2.4**) onde, avaliou-se a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo. Para a determinação do processo de transferência de massa, fez-se uma correlação entre a intensidade da corrente do pico anódico (I_{pa}) vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), e os resultados sugerem que a transferência de massa dos ligantes em solução até a superfície do eletrodo de trabalho ocorre por meio de um processo difusional, devido à maior linearidade observada na relação entre $I_{pa} \times v^{1/2}$ [44].

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

As sínteses do **L1** e derivados (**L5-L7**) foram realizadas com sucesso, obtendo-se compostos de pureza elevada por meio de recristalização. As técnicas de caracterização químicas e espectroscópicas permitiram confirmar as estruturas propostas para estes ligantes. Os espectros de RMN ³¹P{¹H} evidenciaram a presença de simpletos na faixa de δ -1,30 a +39,54 ppm, sendo os maiores deslocamentos químicos resultantes das oxidações do **L1**, as quais, desblindam os sinais no espectro, devido às ligações formadas entre o átomo de P com elementos de maior eletronegatividade (O, S, Se). A estrutura cristalográfica determinada para **L1** apresentou uma desordem com 4 moléculas independentes, denotada como $Z' = 4$, estendendo o estudo devido ao volume dos substituintes e seu efeito estérico e eletrônico decorrente. Na estrutura do **L1** com $Z' = 4$ existem dois isômeros conformacionais, um com o anel arila de forma “plana” e outras três moléculas têm um arranjo helicoidal comum aos três anéis arila, sendo esta última forma a mais estável.

As propriedades estruturais de **L1** e **L5-L7** demonstraram em sua cristalografia os desafios impostos pela substituição do grupo 3,5-*t*Bu. O **L1** cristaliza como um aglomerado complexo de quatro moléculas com várias conformações diferentes ($Z'=4$), o **L5** tem uma afinidade forte pela água; e as estruturas de **L6** e **L7** apresentam espaços vazios que não são preenchidos por solvente, mas indicam que as formas volumosas têm dificuldade em preencher o espaço eficientemente. A partir dos resultados dos índices de piramidalidade das estruturas, $\Sigma\{\angle\text{CPC}\}$, confirma-se que os grupos 3,5-*t*Bu substituídos nos anéis das PAr_3 e seus derivados, não geram pressão estérica em posições *endo*, mostrando uma interação não repulsiva nestas regiões.

Uma vez que uma maior piramidalidade está associada ao aumento da contribuição orbital *s* para o HOMO, a crescente piramidalidade resultante das maiores forças de dispersão, também são uma explicação plausível para que a basicidade de **L1-L3** seja menor do que esperado. Em vista da correlação com as energias HOMO calculadas pelo DFT, sugerimos que a força doadora das fosfinas **L1-L4**, estabelecida pelos potenciais de pico anódico do processo irreversível, é de certa forma precisa para estes ligantes, sendo o **L4** o que apresenta maior basicidade.

REFERÊNCIAS

- [1] JOVER, J.; CIRERA, J. Computational assessment on the Tolman cone angles for P-ligands. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 40, p. 15036-15048, 2019.
- [2] QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A. A. Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina. **Química Nova**, v. 19, n.6, p. 651-659, 1996.
- [3] ULLRICH, M.; LOUGH, A. J.; STEPHAN, D.W. Dihydrogen activation by $\text{B}(\text{p-C}_6\text{F}_4\text{H})_3$ and phosphines. **Organometallics**, v. 29, n. 16, p. 3647-3654, 2010.
- [4] STEPHAN, D. W. "Frustrated Lewis pairs: a concept for new reactivity and catalysis". **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 1535–1539, 2008.
- [5] STEPHAN, D.W.; ERKER, G. "Frustrated Lewis Pairs: Metal-free Hydrogen Activation and More". **Angewandte Chemie International Edition**, v.49, n.1, p.46–76, 2010.
- [6] SZIGETI, M.; DOBI, Z.; SOÓS, T. The Goldilocks Principle in Phase Labeling. Minimalist and Orthogonal Phase Tagging for Chromatography-Free Mitsunobu Reaction. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 2869-2874, 2018.
- [7] SWAMY, K. K., KUMAR, N. B., BALARAMAN, E., & KUMAR, K. P. Mitsunobu and related reactions: advances and applications. **Chemical reviews**, v.109, n.6, p. 2551-2651, 2009.

- [8] MISLOW, K. Stereochemical consequences of correlated rotation in molecular propellers. **Accounts of Chemical Research**, v. 9, n. 1, p. 26-33, 1976.
- [9] ANDOSE, J.D.; MISLOW, K. Structure and Dynamic Stereochemistry of Trimesitylmethane. Empirical Force Field Calculations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n.7, p. 2168-2175, 1974.
- [10] GILLESPIE, J. A.; DODDS, D. L.; KAMER, P. C.J. Rational design of diphosphorus ligands—a route to superior catalysts. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 11, p. 2751-2764, 2010.
- [11] BRUCKMANN, J.; KRÜGER, C.; LUTZ, F. Systematic Structural Investigations on Phosphines. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 50, n. 3, p. 351-360, 1995.
- [12] VALLE, E. M. A.; NASCIMENTO, F. B. D.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.; MONTEIRO, M. C. R., MACHADO, S. D. P.; AZEVEDO, E. R. D. Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em complexos difosfínicos de rutênio. **Química Nova**, v. 31(4), p. 807-812, 2008.
- [13] SASAKI, S.; YOSHIFUJI, M. Synthesis, structure and properties of crowded triarylphosphines. **Current Organic Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 17-31, 2007.
- [14] PUIGJANER, C., VELA, S., FONT-BARDIA, M., NOVOA, J. J. The polymorphism of a triarylphosphine oxide: a case of missing isomers. **CrystEngComm**, v.16, n.35, p. 8214-8223, 2014.
- [15] CONRADIE, J. Conformational analysis of triphenylphosphine in square planar organometallic complexes: $[(\text{PPh}_3)(\text{ML}_1\text{L}_2\text{L}_3)]$ and $[\text{M}(\text{acac})(\text{L}')(\text{PPh}_3)]$. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 35, p. 10633-10642, 2012.
- [16] BRUNNER, H.; OESCHEY, R.; NUBER, B. Propeller Isomerism of the Triphenylphosphane Ligand in Half-Sandwich Ru II Complexes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 8, p. 866-868, 1994.
- [17] CRABTREE, R.H. The Organometallic Chemistry of the Transition Metals, John Wiley & Sons, INC. 4th edition 2005, p. 99-100, 302.
- [18] TOLMAN, C. A. Steric effects of phosphorus ligands in organometallic chemistry and homogeneous catalysis. **Chemical Reviews**, v. 77, n. 3, p. 313-348, 1977.
- [19] BOERÉ, R. T., BOND, A. M., CRONIN, S., DUFFY, N. W., HAZENDONK, P., MASUDA, J. D.ZHANG, Y. Photophysical, dynamic and redox behavior of tris-(2,6-diisopropylphenyl) phosphine. **New Journal of Chemistry**, 32(2), 214-231, 2008.
- [20] BOERÉ, R. T., ZHANG, Y. Extremely bulky triarylphosphines incorporating 2,6-diisopropylphenyl substituents; consideration of steric shielding and steric pressure. **Journal of organometallic chemistry**, v. 690, n. 10, p. 2651-2657, 2005.
- [21] BOERÉ, R. T.; ZHANG, Y. A study of the pyramidity index in tris-(2,4,6-triisopropylphenyl) phosphonium perchlorate. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 69, n. 9, p. 1051-1054, 2013.

- [22] BULLOCK, J. P., BOND, A. M., BOERÉ, R. T., GIETZ, T. M., ROEMMELE, T. L., SEAGRAVE, S. D., PARVEZ, M. Synthesis, Characterization, and Electrochemical Studies of $\text{PPh}_3\text{-n (dipp)}_n$ (dipp= 2,6-Diisopropylphenyl): Steric and Electronic Effects on the Chemical and Electrochemical Oxidation of a Homologous Series of Triarylphosphines and the Reactivities of the Corresponding Phosphoniumyl Radical Cations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 30, p. 11205-11215, 2013.
- [23] BLOUNT, J. F.; CAMP, D.; HART, R. D.; HEALY, P. C.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. The synthesis and structural characterization of mesityldiphenylphosphine, dimesitylphenylphosphine and trimesitylphosphine. **Australian Journal of Chemistry**, v.47, n.8, 1631-1639, 1994.
- [24] THOMAS, J. A.; HAMOR, T. A. Structure of orthorhombic triphenylphosphine oxide: a redetermination at room temperature. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 49, n. 2, p. 355-357, 1993.
- [25] SCHULZ, T., MEINDL, K., LEUSSER, D., STERN, D., GRAF, J., MICHAELSEN, C., STALKE, D. A comparison of a microfocus X-ray source and a conventional sealed tube for crystal structure determination. **Journal of Applied Crystallography**, v.42, n.5, p. 885-891, 2009.
- [26] CODDING, P. W., KERR, K. A. Triphenylphosphine Selenide. **Acta Crystallographica Section B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.**, v. 35, p. 1261-1263, 1979.
- [27] OHTA, H.; TOKUNAGA, M.; OBORA, Y.; IWAI, T.; IWASAWA, T.; FUJIHARA, T.; TSUJI, Y. A bowl-shaped phosphine as a ligand in palladium-catalyzed Suzuki–Miyaura coupling of aryl chlorides: Effect of the depth of the bowl. **Organic letters**, v. 9, n.1, p. 89-92, 2007.
- [28] IWAI, T.; SAWAMURA, M. Transition-Metal Catalysis with Hollow-Shaped Triethynylphosphine Ligands. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 87, n. 11, p. 1147-1160, 2014.
- [29] VULOVIC, B.; CINDERELLA, A. P.; WATSON, D. A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling of Monochlorosilanes and Grignard Reagents. **ACS catalysis**, v. 7, n. 12, p. 8113-8117, 2017.
- [30] CINDERELLA, A. P.; VULOVIC, B.; WATSON, D. A. Palladium-catalyzed cross-coupling of silyl electrophiles with alkylzinc halides: a Silyl-Negishi reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 23, p. 7741-7744, 2017.
- [31] MANABE, K. Synthesis of novel chiral quaternary phosphonium salts with a multiple hydrogen-bonding site, and their application to asymmetric phase-transfer alkylation. **Tetrahedron**, v. 54, n. 48, p. 14465-14476, 1998.
- [32] PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.F. **Purification of laboratory chemicals**. 4^a ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1996, p. 529.

- [33] SHELDRICK, George M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section A: Structural Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015.
- [34] SHELDRICK, George M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015.
- [35] DOLOMANOV, O. V., BOURHIS, L. J., GILDEA, R. J., HOWARD, J. A., PUSCHMANN, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, v.42, n.2, p.339-341, 2009.
- [36] DUBOVÁN, L.; PÖLLNITZ, A.; SILVESTRU, C. Tri(3-pyridyl)-and Tri(4-pyridyl) phosphine Chalcogenides and Their Complexes with ZnTPP (TPP= Tetraphenylporphyrinate). **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2016, n. 10, p. 1521-1527, 2016.
- [37] GUIMARÃES, I.D.L., GARCIA, J. R., WOHNATH, K., BOERÉ, R. T. Chemical and Electrochemical Oxidation of Tris (3,5-di-tert-butylphenyl) phosphine–High Z' Crystal Structures and Conformational Effects Associated with Bulky meta Substituents. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.32, p. 3606-3614, 2018.
- [38] Base de dados da Durham University Z'. Disponível em: <http://zprime.co.uk/>.
- [39] JESSOP, P. G.; OLMSTEAD, M. M.; ABLAN, C. D.; GRABENAUER, M.; SHEPPARD, D.; ECKERT, C. A.; LIOTTA, C. L. Carbon dioxide as a solubility “switch” for the reversible dissolution of highly fluorinated complexes and reagents in organic solvents: application to crystallization. **Inorganic chemistry**, v.41, n.13, p. 3463-3468, 2002.
- [40] LALEU, B.; BERNARDINELLI, G.; CHAUVIN, R.; LACOUR, J. Trimesitylmethylphosphonium cation. Supramolecular stereocontrol and simple enantiomerization mechanism determination. **The Journal of organic chemistry**, v. 71, n.19, p. 7412-7416, 2006.
- [41] HILL, N. D.D; BOERÉ, R. T. Two tris (3, 5-disubstituted phenyl) phosphines and their isostructural PV oxides. **Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications**, v. 74, n. 7, p. 889-894, 2018.
- [42] CULCASI, M., BERCHADSKY, Y., GRONCHI, G.,TORDO, P. Anodic behavior of crowded triarylphosphines. ESR study of triarylphosphoniumyl radicals, Ar₃P⁺. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n.11, p. 3537-3542, 1991.
- [43] ALCARAZO, M. Synthesis, Structure, and Applications of α -Cationic Phosphines. **Accounts of chemical research**, v. 49, n. 9, p. 1797-1805, 2016.
- [44] BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. **New York: John wiley**, p. 389, 2001.

CAPÍTULO 3. COMPLEXOS DE RUTÊNIO-ARENO COM LIGANTES TRIARILFOSFINA (PAr_3) E 3-METILPIRIDINA (N)

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 Complexos de rutênio-areno

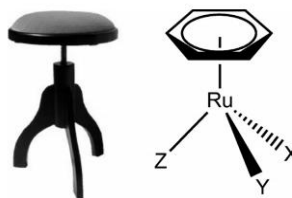
O átomo de rutênio com sua configuração eletrônica $[\text{Kr}]4d^7,5s^1$, pertencente ao grupo VIII dos metais de transição da Tabela periódica, tem inúmeras propriedades que o destacam frente a outros metais, como, por exemplo os diversos números de oxidação que pode apresentar, na faixa de 2- a 8+, sendo mais comum complexos com o metal no seu estado de oxidação 3+ e 2+[^{1,2}]. Os compostos deste metal podem compreender diversas geometrias como octaédrica, tetraédrica, piramidal trigonal e trigonal plana, dependendo do seu estado de oxidação. O rutênio pode formar complexos com diversos grupos de ligantes como a carbonila, fosfinas terciárias, ciclopentadienilas, arenos, ligantes N-doadores, dienos e carbenos[¹].

A química organometálica do rutênio tem evoluído, podendo destacar os principais avanços destes complexos em áreas como biologia, medicina, catálise, nanociência, processos redox e materiais fotoativos[^{3,4}]. Dentro desta classe de compostos, os complexos organometálicos de rutênio com o ligante areno (especificamente o n^6 -*p*-cimeno) têm despertado grande interesse devido sua estabilidade, facilidade de síntese, e características como hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade evidentes[⁵].

Os compostos com a presença dos ligantes areno são definidos como hidrocarbonetos aromáticos com alternância das ligações π e σ , onde a importância da química destes ligantes deve-se à sua capacidade de doar densidade eletrônica para os centros metálicos, com uma ligação do tipo retroligação de caráter π (ligante σ -doador e π -aceptor). O centro metálico está num ambiente de coordenação *pseudo*-octaédrica, no qual três sítios de coordenação estão ocupados pelo ligante areno, ligado sob a forma η^6 , enquanto vários ligantes podem ocupar os outros três sítios de coordenação[⁶]. Uma analogia à estrutura destes complexos pode ser feita em comparação com um banquinho de piano de três pernas, também chamada a estrutura “*piano-stool*”, **Figura 3.1**[^{7,8}]. A ligação entre metal-hidrocarboneto nestes complexos é altamente estável em ácido, base, bem como em condições redutoras ou oxidantes, enquanto que os outros ligantes podem ser facilmente substituídos. As propriedades dos complexos de rutênio-areno podem ser facilmente alteradas por modificação do areno e dos ligantes na estrutura[⁶]. O substituinte areno tem a ação de estabilizar o rutênio no seu estado de oxidação

(2+), mantendo-o relativamente inerte e pequenas variações no anel aromático deste ligante, pode tornar a molécula mais versátil e melhorar seu desempenho^[9,10,11].

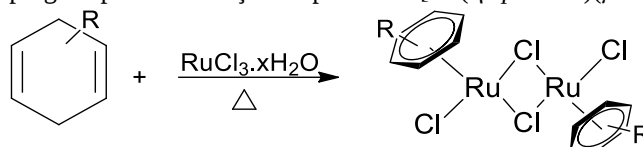
Figura 3. 1: Imagem retratando a analogia entre a estrutura de um “*piano-stool*” (esquerda) e um complexo de rutênio-areno e seus ligantes XYZ (direita).



Fonte: PAGE, 2012^[7].

Os complexos organometálicos de rutênio-areno têm atraído a atenção de vários cientistas, químicos e biólogos, devido às suas propriedades químicas específicas. O progresso na química destes compostos resultou da descoberta dos complexos binucleares com clorido em ponte, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$, por Winkhaus e Singer^[13]. Depois de alguns anos a sua estrutura binuclear foi estabelecida, por estudos realizados por Bennett e Matheson^[14] e modificada por Jensen, Rodger e Spicer^[15], cuja rota sintética é adotada atualmente (**Esquema 3.1**). Zelonka e Baird^[16] mostraram que a rota de síntese estipulada leva à formação de precursores indispensáveis na química organometálica do rutênio, pela formação de um dímero estável que pode reagir com uma variedade de ligantes.

Esquema 3. 1: Reação empregada para a formação do precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-areno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$.



FONTE: Adaptado de BENNETT e MATHESON^[14].

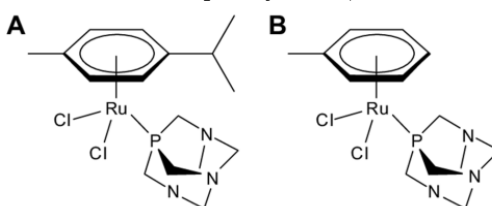
Nesta classe, o ligante $(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(1\text{-metil-4-isopropilbenzeno})$ é o ligante areno mais investigado para a preparação de complexos de rutênio (II). Esta notoriedade deve-se em parte à síntese do dímero $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ a partir de cloreto de rutênio (III) hidratado e α -felandreno, um terpeno que ocorre naturalmente. A fácil clivagem da ponte de cloreto do complexo dímero com 2 equivalentes de uma fosfina como ligante, por exemplo, ocorre prontamente levando à formação de complexos monometálicos de rutênio-areno^[17].

A coordenação do ligante $(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})$ ao centro metálico confere várias funcionalidades ao complexo sintetizado, podendo influenciar na solubilidade de tais compostos em água e em solventes orgânicos polares e apolares. Os outros três sítios de

coordenação (X, Y e Z), **Figura 3.1**, são modificados para gerar complexos neutros e catiônicos, que poderão influenciar na atividade/reactividade desses no meio fisiológico/catalítico, aliado ao efeito sinérgico ligante-metal^[18]. Devido estas propriedades citadas, estes complexos são frequentemente utilizados em catálise na área biológica, para várias reações orgânicas e suas transformações^[19], podem atuar em arranjos supramoleculares^[6], sensores eletroquímicos^[20], além de serem promissores em atividades antitumoral^[21,22], antifúngica e antiparasitária^[23] e antimicrobiana^[24,25].

Um exemplo clássico de complexos de rutênio(II)-areno, são os chamados RAPTAs. A síntese desses complexos é baseada na adição do ligante (pta= 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) com o dímero $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$, resultando na formação desta nova classe de complexos. Destaca-se a formação de dois complexos, os denominados RAPTA-C e o RAPTA-T de fórmulas moleculares $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{pta})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-tolueno})(\text{pta})\text{Cl}_2]$, respectivamente (**Figura 3.2**). Esses complexos possuem propriedades citotóxicas e antitumorais e estão em estudos pré-clínicos^[26,27,28]. O ligante pta é hidrofílico conferindo uma boa solubilidade aos complexos, característica também relevante pela presença do rutênio e dos ligantes cloridos. Em contraste, $(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})$ e $(\eta^6\text{-tolueno})$ possuem uma característica hidrofóbica. Estas duas propriedades, dão a estes complexos de rutênio-areno um caráter anfifílico, sendo importante para aplicações principalmente em estudos biológicos, por apresentarem maior facilidade de interação com o material biológico^[27,29,30]

Figura 3. 2: Compostos de Ru(II)-areno desenvolvidos por Dyson: **A)** RAPTA-C, **B)** RAPTA-T.



FONTE: Bergamo, 2012^[27].

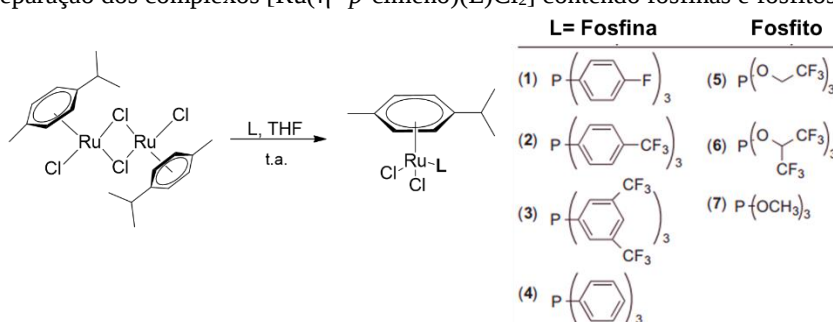
3.1.2 Complexos de rutênio-areno com ligante fosfina

Na química de coordenação, as fosfinas são os ligantes mais comuns e desempenham um papel importante, devido à sua capacidade de permitir principalmente a reatividade, a estabilidade e o aumento da basicidade de complexos organometálicos^[31], como descrito no **Capítulo 2**. A possibilidade de variar os grupos substituintes ligados ao átomo de fósforo torna esses ligantes interessantes para o estudo dos efeitos desta substituição, como realizado para a classe de fosfinas estudadas neste trabalho^[32].

Na literatura são reportados exemplos de diversos complexos de rutênio-areno fosfina, dentre eles, podemos citar três estudos que relatam o efeito da variação da estrutura do ligante nas propriedades químicas e aplicações dos mesmos. Hodson e Simpson^[33] reagiram o dímero $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})](\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ com as fosfinas $\text{P}(\text{OPh})_3$, $\text{P}(\text{OMe})_3$, PPh_3 e PMe_3 , em hexano a quente, e obtiveram a série de compostos monoméricos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L})\text{X}_2]$ (onde L = fosfinas e X = Cl, I, Br). As caracterizações desses compostos pelas correlações $\{^{13}\text{C}\text{--}^1\text{H}\}$ e $\{^1\text{H}\text{--}^1\text{H}\}$ COSY e NOESY permitiram a diferenciação dos prótons em posição *orto* para o grupo isopropil do anel $\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$, em deslocamentos químicos maiores, em relação ao substituinte metil em *orto* no anel.

Lee e colaboradores^[34] sintetizaram os complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L})\text{Cl}_2]$ contendo ligantes fosfinas ou fosfitos derivados de flúor (**Figura 3.3**). Como os complexos com as fosfinas fluoradas foram mais solúveis em água, é esperado pelos autores ser um fator importante na citotoxicidade destes compostos, provocando maior lipofilicidade. O estudo das propriedades eletrônicas por meio de cálculos teóricos, sugeriram que o flúor afeta a capacidade doadora da fosfina ou fosfito, reduzindo a σ -doação (basicidade de Lewis), fazendo que o orbital LUMO mude de um caráter que envolve $\text{Ru}(\text{d}_{xz}$ ou $\text{d}_{yz})$ para um caráter π^* do ligante fosfina.

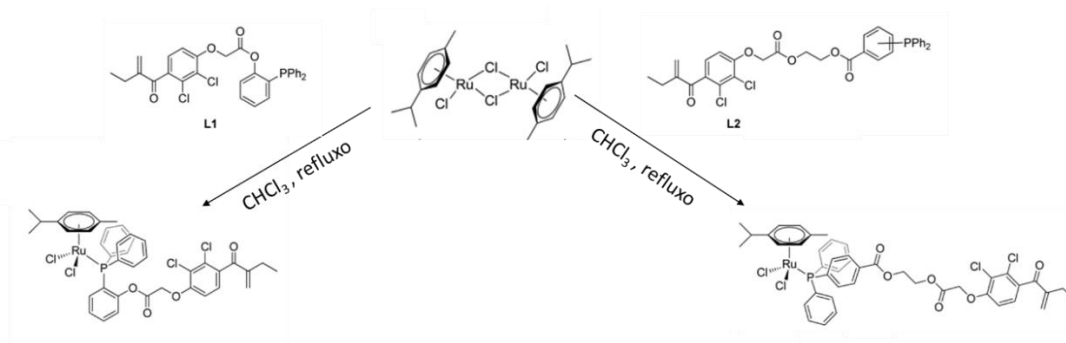
Figura 3. 3: Preparação dos complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L})\text{Cl}_2]$ contendo fosfinas e fosfitos fluorados.



FONTE: LEE et al., 2016^[34].

Biancalana e colaboradores^[35] sintetizaram os complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{kP-PPh}_2(2\text{-C}_6\text{H}_4\text{OCO-EA}))\text{Cl}_2]$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{kP-PPh}_2(4\text{-C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO EA}))\text{Cl}_2]$, onde (EA-CO₂H= ácido etacrínico) (**Esquema 3.2**). A incorporação do ácido etacrínico via fosfato, uma molécula biologicamente ativa que é um inibidor de glutathione transferases (GSTs) envolvido em mecanismos de resistência, implicou na melhora da atividade antiproliferativa *in vitro* destes compostos contra a linhagem BxPC3, adenocarcinoma pancreático, com valores de IC₅₀ de 13,4 μM e 7,7 μM , próximos ao complexo de referência cisplatina 11,0 μM .

Esquema 3. 2: Preparação dos complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{(PAr}_3\text{)Cl}_2]$, onde PAr_3 são triarilfosfinas substituídas derivadas do ácido etacrínico.



FONTE: BIANCALANA et al., 2016^[35].

3.1.3 Complexos de rutênio-areno com ligantes *N*-heterocíclicos

A troca de um ligante no ambiente de coordenação de um complexo pode favorecer mudanças tanto químicas e estruturais, quanto as propriedades biológicas, levando a um aumento pronunciado das características terapêuticas e modo de interação destes complexos. Neste contexto, os ligantes contendo átomos *N*-doadores estão entre os mais aplicados para a síntese de complexos de metais de transição, dentre eles estão a classe das piridinas, bipyridinas e aminas. Estes ligantes apresentam uma forte estabilização do campo ligante em solução aquosa, nos estados de oxidação mais comuns para o centro metálico de Ru (II), Ru (III) e Ru (IV), e geralmente são estruturas octaédricas e inertes à substituição^[35,36,37].

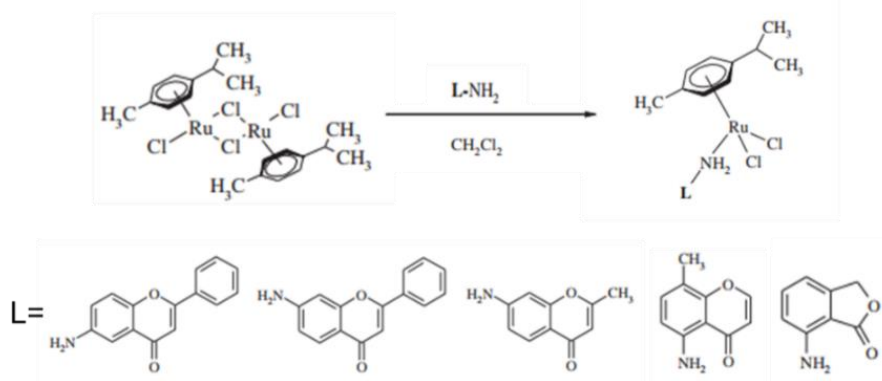
As vantagens de se utilizar complexos de rutênio com ligantes *N*-heterocíclicos incluem: a confiabilidade para sintetizar complexos com estruturas estáveis e previsíveis, habilidades de ajustar afinidades de ligantes, e potenciais resultados biológicos^[38]. Além disso, os efeitos estéricos e eletrônicos em torno do átomo de rutênio podem ser escolhidos de forma apropriada por substituintes volumosos e/ou substituintes retiradores ou doadores de elétrons incorporados nos ligantes nitrogenados^[36].

É reconhecido que esta classe de ligantes proporcionam uma boa estabilidade para a estrutura de Ru(II), devido às suas propriedades eletrônicas π -receptoras, que permitem a interação com estruturas supramoleculares. Esses ligantes estabelecem interações direcionais não covalentes do tipo π - π , que são mais fracas do que as ligações de hidrogênio, mas forte o suficiente para aumentar a estabilidade dos complexos, tanto em solução como no estado sólido.

Dentre os complexos de rutênio-areno com ligantes *N*-heterocíclicos, destaca-se a série $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L})\text{Cl}_2]$, sendo que L são flavonóides e seus derivados (aminoflavonas) de origem de compostos naturais capazes de induzir efeito citotóxico em várias linhagens. As

propriedades de transferência eletrônica de todos os complexos, confirmaram um processo irreversível de transferência de elétrons ocorrendo, o que provavelmente resulta em maior estabilidade eletroquímica dos compostos *in vivo*. A citotoxicidade desses compostos foi avaliada em várias linhagens celulares de melanomas e leucemia, demonstrando uma aplicação promissora no que se refere à toxicidade^[9], **Figura 3.4**.

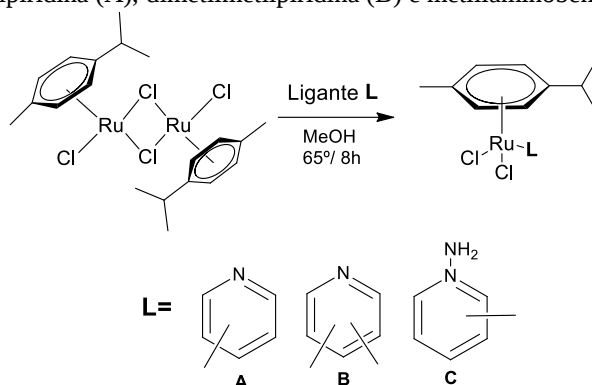
Figura 3.4: Rota sintética de complexos rutênio-areno com ligantes flavonóides e seus derivados (aminoflavonas).



FONTE: PASTUSZKO et al., 2013^[9].

Grau e colaboradores^[40] descreveram a síntese de três séries de compostos organometálicos com estrutura $[Ru(\eta^6-p\text{-cimeno})LCl_2]$ onde (L = 2-, 3- ou 4-metilpiridina (A); L = 2,3-, 2,4-, 2,5-, 3,4-, 3,5-dimetilpiridina (B) e L = 1,2-, 1,3- 1,4-metilaminobenzeno (C)), ilustradas no **Esquema 3.3**. Por dicróismo circular percebeu-se que após hidrólise do ligante Cl^- houve interação destes complexos com estrutura secundária do DNA, sendo esta de natureza covalente devido à afinidade do rutênio (II) com o N da guanina, principalmente na posição N7, confirmando um possível mecanismo de ação. Os compostos com os ligantes metilpiridina da série A e C tiveram seus testes de citotoxicidade realizados, porém, para os complexos do tipo C, não foi possível estimar porque esses são fracamente solúveis nas condições experimentais dos ensaios. A série A exibiu propriedades citotóxicas *in vitro* contra para células de câncer do cólon (LoVo), sendo os valores de IC_{50} variáveis de acordo com a substituição do ligante na série A, com 2-, 3- ou 4-metilpiridina e valores de IC_{50} de 78, 90 e $>50 \mu M$, respectivamente.

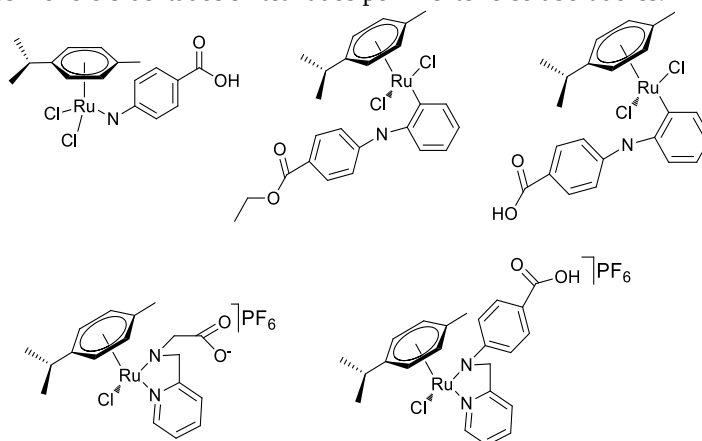
Esquema 3. 3: Esquema reacional para a síntese dos complexos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{LCl}_2]$, onde L simboliza isômeros estruturais da metilpiridina (A), dimetilmetilpiridina (B) e metilaminobenzeno (C).



FONTE: GRAU et al., 2016^[40].

Richter e colaboradores^[41] sintetizaram complexos com ligantes *N*-doadores mono ou bidentados, com substituintes do grupo carboxila ou éster, **Figura 3.5**. Os testes para prever a interação destes compostos, indicaram que os complexos monodentados interagem com o DNA por uma ligação covalente, semelhante a interação apresentada pela cisplatina, enquanto que os complexos em sua forma bidentada, apresentaram uma interação covalente com o DNA após exposição à luz ultravioleta, semelhante aos análogos da cisplatina. Os autores sugerem que a fotoexcitação promove uma hidrólise das espécies, onde o ligante clorido é convertido a um ligante aquo, e assim, a interação com o DNA ocorra mais facilmente. Os compostos são seletivamente citotóxicos contra várias linhas de células tumorais, sendo os complexos monodentados os que apresentaram melhores resultados.

Figura 3. 5: Complexos mono e bidentados sintetizados por Richter e colaboradores.



FONTE: RICHTER et al., 2016^[41].

Baseado nas atividades promissoras de complexos de rutênio-areno contendo ligantes fosfinas e *N*-heterocíclicos, e a partir de trabalhos que relatam a síntese de complexos de rutênio

com os dois ligantes presentes, do tipo $\text{mer-}[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{N}]^{[42]}$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PPh}_3\text{NCl}]^{[43]}$ onde: dppb= 1,4-bis(difenilfosfina)butano; PPh_3 = trifenilfosfina e N= piridina, neste trabalho sintetizou-se complexos com fosfinas volumosas e estendeu-se a série adicionando à esfera de coordenação um ligante piridina, para estudo das variações das características químicas, estruturais e biológicas dos complexos resultantes.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar duas novas séries de complexos de rutênio-areno contendo ligantes da classe das triarilfosfinas monodentadas estericamente impedidas e *N*-heterocíclico.

3.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar duas séries de complexos organometálicos de rutênio-areno de fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**) e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{NCl}][\text{PF}_6]$ (**5-8**);
- Obter as estruturas cristalográficas dos complexos pela técnica de difratometria de raios X de monocristal;
- Realizar a caracterização físico-química dos complexos através do ponto de fusão, análise elementar, solubilidade e estabilidade, condutividade molar.
- Caracterizar os complexos por métodos espectroscópicos, como UV-Vis, FTIR, Raman, RMN 1D (^1H , ^{13}C , ^{31}P) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), para previsão da interação dos ligantes com o centro metálico.
- Realizar a caracterização eletroquímica por voltametria cíclica para elucidação dos principais processos de oxirredução;
- Realizar estudos teóricos por meio da técnica DFT, a fim de elucidar o mecanismo eletroquímico e os espectros de UV-Vis.

3.3 METODOLOGIA

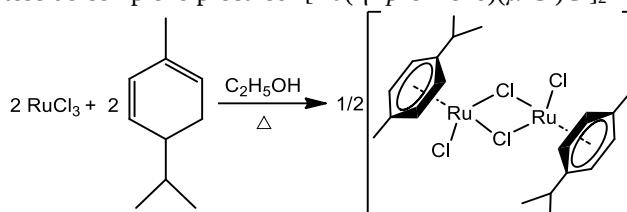
3.3.1 Reagentes

As sínteses dos complexos neutros **1-4** foram realizadas em atmosfera inerte de N₂ usando técnicas de Schlenk e linha de vácuo, e para os catiônicos **5-8** sem atmosfera inerte, e com solventes de grau analítico. Os solventes utilizados nas sínteses e no estudo eletroquímico foram tratados por destilação com o respectivo sal secante designado para cada solvente descrito por Perrin e Armarego^[44]. Os solventes CH₃CN e CH₂Cl₂ foram destilados com hidreto de cálcio e armazenados em peneira molecular sob temperatura ambiente. Os ligantes tris(4-metóxfenil)fosfina, tris(4-metóxi-3,5-dimetilfenil)fosfina, tris (3,5-dimetilfenil)fosfina e 3-metilpiridina, foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich, com grau reagente. O sal tricloreto de rutênio trihidratado (RuCl₃·3H₂O) foi proveniente da Strem e o pré-ligante α -felandreno da Sigma-Aldrich. O sal perclorato de tetrabutilamônio (PTBA- Sigma-Aldrich), foi empregado sem nenhum tratamento prévio.

3.3.2 Síntese do complexo precursor e dos complexos **1-8**

3.3.2.1 Síntese do complexo precursor $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})Cl]_2$

O complexo precursor foi sintetizado de acordo com a rota reportada na literatura por Bennet *et al.*, 1979 e Jensen, Rodger e Spicer, 1998^[45,46] (**Esquema 3.4**). Em um balão de 500 mL colocou-se 150 mL de etanol (95%) desaerado com N₂. Adicionou-se em seguida 5 g (19,12 mmol) de RuCl₃·nH₂O e 25 mL (156 mmol) do ligante α -felandreno. Esta solução foi submetida ao refluxo e agitação durante um período de 4 h sob atmosfera de N₂. Após o resfriamento da solução, o produto foi depositado como um sólido cristalino de coloração vermelha, sendo logo após isolado por filtração a vácuo, em um funil de placa porosa, onde foi lavado com metanol (2x100 mL) e éter etílico (2x100 mL) em banho de gelo, para que assim fosse removido qualquer excesso do ligante (α -felandreno) e impurezas presentes. Após isto, o sólido foi seco sob vácuo. Rendimento da reação de 91,30%.

Esquema 3. 4: Rota de síntese do complexo precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ 

3.3.2.2 Síntese dos complexos da série $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAR}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**)

As sínteses consistiram de uma rota adaptada da literatura^[47], que consistiu em agitar a solução do complexo precursor com o respectivo ligante PAR_3 na proporção de 1:2 em CH_2Cl_2 previamente desgaseificado (50 mL) por 1 h à temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 . Após remoção do solvente, ao resíduo formado, foram adicionados 50 mL de éter dietílico (**2-4**) ou pentano (**1**) sob agitação por 30 min. O precipitado formado foi filtrado, lavado com éter dietílico ou pentano e seco sob pressão reduzida. Um cristal adequado de **1** foi cultivado em uma solução saturada de metanol e para **2-4** os cristais de alta qualidade foram obtidos em uma solução saturada de CH_2Cl_2 com infusão lenta de éter dietílico.

- $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(3,5\text{-C}(\text{CH}_3)_3\text{-C}_6\text{H}_3)_3\text{Cl}_2]$ (**1**)

Obtido como sólido alaranjado. Rendimento: 0,69 g, (71,88%). MM: 905,13 g mol⁻¹. Análise Elemental calc para: $\text{C}_{52}\text{H}_{77}\text{Cl}_2\text{PRu}$ (%): C, 68,97; H, 8,57. Encontrada: C, 69,26; H, 8,28. P.F.: 168-175 °C (dec.). $\Lambda_m = 32,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ (24 h, 25°C). **RMN de ^1H (300,13 MHz, CDCl_3):** δ H_5 0,97 (d, 6H, 2 CH_3 , $J=6,9$ Hz); H_7 1,22 (s, 54H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, PPh); H_1 1,80 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); H_4 2,48 (sept, 1H, $-\text{CH}$, $J_{\text{H-H}}=7,5$ Hz); H_2 5,11 (dd, 2H, C_6H_4 , $J_{\text{H-H}}=5,1$ Hz); H_3 5,17 (dd, 2H, C_6H_4 , $J_{\text{H-H}}=6,0$ Hz); H_8 7,36 (s, 3H, $-\text{CH}$, PPh), H_6 7,74 (d, 6H, $J_{\text{H-P}}=11,1$ Hz). **RMN de ^{13}C (75,48 MHz, CDCl_3):** δ C_a 17,82 (s, CH_3 , C_6H_4), C_g 22,19 (s, 2 CH_3 , C_6H_4); C_f 29,80 (s, CH , C_6H_4), C_l 31,52 (s, t-Bu, PPh); C_k 35,07 (s, $\text{C}-(\text{CH}_3)_3$, PPh); C_d 86,50 (d, CH , C_6H_4 , $J_{\text{P-C}}=5,4$ Hz); C_c 88,65 (s, CH , C_6H_4 , $J_{\text{P-C}}=3,91$ Hz); C_b 96,52 (s, $\text{C-CH}(\text{CH}_3)_2$, C_6H_4); C_e 109,17 (d, C-CH_3 , C_6H_4 , $J_{\text{H-H}}=25,7$ Hz); C_m 123,68 (s, 3H, PPh, $^4J_{\text{C-P}}=2,34$ Hz); C_i 128,79 (d, PPh, $^2J_{\text{C-P}}=9,81$ Hz); C_h 133,81 (d, PPh, $^1J_{\text{C-P}}=44,45$ Hz); C_j 149,66 (d, PPh, $^3J_{\text{C-P}}=9,58$ Hz). **RMN de ^{31}P (121,49 MHz, CDCl_3):** δ 27,20. **FTIR (cm^{-1}):** 3046 ($\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$), 2953, 2900 e 2856 ($\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$), 1583, 1475, 1422 ($\nu_{\text{asC=C}}$), 1125, 587 ($\nu_{\text{P-C}}$), 859, 705 ($\delta_{\text{C-H}}(\text{aromático})$). **UV-Vis (CH_2Cl_2 , $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$) ($\epsilon_{\text{max}}/\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$):** 284 (13900), 247 (39300), 374 (3610), 498 (901).

- [Ru(η^6 -*p*-cimenol)P(3,5-CH₃-C₆H₃)₃Cl₂] (2)

Obtido como sólido alaranjado. Rendimento: 0,88 g, (95,24%). MM: 652,65 g mol⁻¹. Análise Elemental calc. para: C₃₄H₄₁Cl₂PRu (%): C, 62,57; H, 6,33. Encontrada: C, 63,12; H, 6,14. P.F.: 186-196 °C (dec.). Λ_m = 55,8 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃):** δ H₅ 1,04 (d, 6H, 2 CH₃, J =6,9 Hz); H₁ 1,96 (s, 3H, -CH₃); H₇ 2,28 (s, 18H, -CH₃, PPh); H₄ 2,75 (sept, 1H, -CH, J_{H-H} = 6,6 Hz); H₃ 4,99 (dd, 2H, C₆H₄, J_{H-H} = 6,0 Hz); H₂ 5,09 (dd, 2H, C₆H₄, J_{H-H} = 5,7 Hz); H₈ 6,99 (s, 3H, -CH, PPh), H₆ 7,46 (d, 6H, J_{H-P} = 10,8 Hz). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃):** C_a 17,58 (s, CH₃, C₆H₄), C_k 21,49 (s, 2 CH₃, PPh); C_g 21,84 (s, 2 CH₃, C₆H₄); C_f 30,18 (s, CH, C₆H₄), C_d 85,77 (d, CH, C₆H₄, J_{P-C} = 6,0 Hz); C_c 90,67 (s, CH, C₆H₄, J_{P-C} = 4,0 Hz); C_b 95,00 (s, C-CH₃, C₆H₄); C_e 110,00 (s, C-CH(CH₃)₂, C₆H₄); C_i 131,90 (d, PPh, $^2J_{C-P}$ = 11 Hz); C_l 131,86 (d, C-P, PPh, $^4J_{C-P}$ = 2,8 Hz), C_h 133,91 (d, C-P, PPh, $^1J_{C-P}$ = 45,3 Hz); C_j 137,14 (d, PPh, $^3J_{C-P}$ = 9,2 Hz). **RMN de ³¹P (121,49 MHz, CDCl₃):** δ 24,20. **FTIR (cm⁻¹):** 3047 (ν_{asCsp^2-H}), 2972, 2912 e 2853 (ν_{asCsp^3-H}), 1589, 1469, 1410 ($\nu_{asC=C}$), 1118, 559 (ν_{P-C}), 840, 687 (δ_{C-H} (aromático)). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max}/nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹):** 289 (11800), 376 (3280), 494 (853).

- [Ru(η^6 -*p*-cimenol)P(4-MeO-3,5-CH₃-C₆H₂)₃Cl₂] (3)

Obtido como um sólido de coloração avermelhada. Rendimento: 0,92 g, (93%). MM: 742,73 g mol⁻¹. Análise Elemental calc. para: C₃₇H₄₇Cl₂O₃PRu (%): C, 59,83; H, 6,38. Encontrada: C, 60,21; H, 6,40. P.F.: 199,0-208,5 °C (dec.). Λ_m = 58,0 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃):** δ H₅ 0,99 (d, 6H, 2 CH₃, J =7,2 Hz); H₁ 1,95 (s, 3H, -CH₃); H₇ 2,22 (s, 18H, -CH₃, PPh); H₄ 2,68 (sept, 1H, -CH, J_{H-H} = 6,9 Hz); H₈ 3,71 (s, 9H, -OCH₃); H₃ 4,97 (dd, 2H, C₆H₄, J_{H-H} = 6,0 Hz); H₂ 5,08 (dd, 2H, C₆H₄, J_{H-H} = 6,3 Hz); H₆ 7,44 (d, 6H, PPh, J_{H-P} = 10,5 Hz). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃):** δ C_k 16,31 (s, CH₃, PPh); C_a 17,60 (s, CH₃, C₆H₄), C_g 21,77 (s, 2 CH₃, C₆H₄); C_f 30,08 (s, CH, C₆H₄), C_m 59,59 (s, C-O); C_d 85,98 (d, CH, C₆H₄, J_{P-C} = 6,0 Hz); C_c 90,49 (s, CH, C₆H₄, J_{P-C} = 4,0 Hz); C_b 94,77 (s, C-CH₃, C₆H₄); C_e 109,24 (s, C-CH(CH₃)₂, C₆H₄); C_h 129,02 (d, C-P, PPh, $^1J_{C-P}$ = 47 Hz); C_j 130,26 (d, PPh, $^2J_{C-P}$ = 11 Hz); C_i 134,85 (d, PPh, $^3J_{C-P}$ = 10 Hz); C_l 158,49 (d, C-OCH₃, J_{C-O} = 3 Hz). **RMN de ³¹P NMR (121,49 MHz, CDCl₃):** δ 22,00. **FTIR (cm⁻¹):** 3046 (ν_{asCsp^2-H}), 2960, 2912 e 2859 (ν_{asCsp^3-H}), 1576, 1473, 1451 ($\nu_{asC=C}$), 1020, 1228 (ν_{asC-O}) 1116, 534 (ν_{P-C}), 860 (δ_{C-H} (aromático)). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max}/nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹):** 249 (53300), 374 (3520), 498 (880).

- [Ru(η^6 -*p*-cimeno)P(4-MeO-C₆H₄)₃Cl₂] (**4**)

Obtido como um sólido de coloração avermelhada. Rendimento: 0,99 g, (90%). MM: 658,53 g mol⁻¹. Análise Elementar calc. para: C₃₁H₃₅Cl₂O₃PRu (%): C, 56,54; H, 5,35. Encontrada: C, 57,23; H, 5,20. P.F.: 176-187 °C (dec.). Λ_m = 53,8 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃):** δ H₅ 1,13 (d, 6H, 2 CH₃, J =6,9 Hz); H₁ 1,85 (s, 3H, -CH₃); H₄ 2,89 (sept, 1H, -CH, J_{H-H} = 6,8 Hz); H₈ 3,80 (s, 9H, -OCH₃); H₂ 4,94 (dd, 2H, C₆H₄, J_{H-H} = 5,1 Hz); H₃ 5,22 (dd, 2H, C₆H₄, J_{H-H} = 6,3 Hz); H₇ 6,86 (d, 6H, $^3J_{H-H}$ = 9,0 Hz); H₆ 7,71 (dd, 6H, $^3J_{H,H}$; $^3J_{P,J}$). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃):** δ C_a 17,86 (s, CH₃, C₆H₄); C_g 21,93 (s, 2 CH₃, C₆H₄); C_f 30,30 (s, CH, C₆H₄); C_l 55,27 (s, C-O); C_d 87,36 (d, CH, C₆H₄, J_{C-P} = 5,3 Hz); C_c 88,52 (d, CH, C₆H₄, J_{C-P} = 3,0 Hz); C_b 95,76 (s, C-CH₃, C₆H₄); C_e 111,03 (d, C-CH(CH₃)₂, C₆H₄, J_{C-P} = 3,8 Hz); C_i 113,54 (s, PPh, $^2J_{C-P}$ = 10,94 Hz); C_h 125,34 (d, C-P, PPh, $^1J_{C-P}$ = 51 Hz); C_j 135,83 (d, PPH, $^3J_{C-P}$ = 10,72 Hz); C_k 160,90 (d, C-OCH₃, J_{C-O} = 2,3 Hz). **RMN de ³¹P (121,49 MHz, CDCl₃):** δ 23,70. **FTIR (cm⁻¹):** 3048 (ν_{asCsp^2-H}), 2966, 2939 e 2826 (ν_{asCsp^3-H}), 1589, 1491 e 1440 ($\nu_{asC=C}$), 1023, 1246 (ν_{asC-O}), 1090, 528 (ν_{P-C}), 810 (δ_{C-H} (aromático)). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max}/nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹):** 243 (85900), 276 (41700), 371 (4320), 497 (1020).

3.3.2.3 Síntese dos complexos da série [Ru(η^6 -*p*-cimeno)PAr₃NCl][PF₆] (**5-8**)

Todas as sínteses consistiram em uma rota adaptada da literatura^[43], em agitar a solução dos complexos precursores (**1-4**) com o ligante 3-metilpiridina e o contra-íon KPF₆ na proporção 1:1:1 (**5**, **6**, **8**) e na proporção 1:2:1 (**7**) em CH₃OH desgaseificado (5 mL) durante 4 h em temperatura ambiente. Durante a reação, houve mudança na coloração da solução de vermelho para laranja. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida, e ao resíduo formado foram adicionados ~ 4 mL de CH₂Cl₂ para dissolver o complexo e precipitar o excesso de sal formado KCl. Esta solução foi filtrada lentamente em filtro de placa porosa, sem a utilização do sistema de filtragem a vácuo. A solução filtrada foi recolocada em um balão, onde foi reduzida sob vácuo até formar um sólido no fundo do balão, que foi raspado. Um cristal adequado para **5** foi obtido por evaporação lenta em uma solução saturada de éter dietílico e para **6-8** os cristais cresceram em uma solução saturada de clorofórmio com infusão lenta de éter dietílico.

- [Ru(η^6 -*p*-cimenol)P(3,5-C(CH₃)₃-C₆H₃)₃(3-CH₃-C₅H₄N)Cl][PF₆] (5)

Complexo obtido como um sólido alaranjado. Rendimento: 40,4 mg (72,70 %). MM: 1107,72 g mol⁻¹. Análise elementar calc. para: C₅₈H₈₄ClF₆NP₂Ru (%): C, 62,83; H, 7,58; N, 1,26. Encontrada: C, 61,37; H, 6,95; N, 1,30. P.F.: 150 – 160 °C (dec). Λ_m : 126,1 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃)**: δ H₅ 1,13 (dd, 6H); H₇ 1,18 (s, 54H); H₁ 1,56 (s, 3H); H₁₀ 2,14 (s, 3H); H₄ 2,28 (sept, 1H); H₂ 5,16 (d, 1H); H₃ 5,40 (d, 1H); H_{2'} 5,82 (d, 1H); H_{3'} 5,87 (d, 1H); H₁₂ 7,04 (t, 1H); H₆ 7,07 (d_(alargado), 6H); H₁₁ 7,42 (d, 1H); H₈ 7,45 (s, 3H); H₉ 8,55 (s, 1H); H₁₃ 8,62 (d, 1H). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃)**: δ C_a 18,21; C_g 22,27; C_f 30,49; C_c 81,70; C_d 82,7; C_b 97,75; C_e 103,05; C_k 112,21; C_i 114,04; C_j 138,47; C_h 152,24; C_l 162,59. **RMN de ³¹P (121,49 MHz, CDCl₃)**: δ 39,87; -126 a -161 (sept, PF₆). **FTIR (cm⁻¹)**: 3072 ($\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$), 2964, 2907, 2868 ($\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$), 1473, 1420 ($\nu_{\text{asC=C}}$), 1586 ($\nu_{\text{asC=N}}$), 1127, 557 ($\nu_{\text{P-C}}$), 847 ($\nu_{\text{PF}_6^-}$), 705 ($\delta_{\text{C-H}}$ (aromático)). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max} /nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹)**: 275 (5430); 340 (930); 545 (230).

- [Ru(η^6 -*p*-cimenol)P(3,5-CH₃-C₆H₃)₃(3-CH₃-C₅H₄N)Cl][PF₆] (6)

Complexo obtido como um sólido alaranjado. Rendimento: 39,2 mg (67,90 %). MM: 865,46 g mol⁻¹. Análise Elementar calc. para: C₄₁H₄₉Cl₄F₆NP₂Ru (%): C, 55,46; H, 5,62; N, 1,62. Encontrada: C, 53,08; H, 5,20; N, 1,47. P.F.: 145 – 167 °C (dec). Λ_m : 127,5 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃)**: δ H₅ 1,10 (dd, 6H); H₁ 1,71 (s, 3H); H₁₀ 2,14 (s, 3H); H₄ 2,21 (sept, 1H); H₇ 2,22 (s, 18H); H₂ 5,19 (d, 1H); H₃ 5,44 (d, 1H); H_{2'} 5,79 (d, 1H); H_{3'} 5,84 (d, 1H); H₆ 6,82 (d_(alargado), 6H); H₈ 7,03 (s, 3H); H₁₂ 7,06 (t, 1H); H₁₁ 7,38 (d, 1H); H₉ 8,52 (s, 1H); H₁₃ 8,62 (d, 1H). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃)**: δ C_a 18,21; C_g 22,27; C_f 30,49; C_c 81,70; C_d 82,97; C_b 97,75; C_e 103,05; C_k 112,21; C_i 114,4; C_j 138,47; C_h 152,24; C_l 162,59. **RMN de ³¹P (121,49 MHz, CDCl₃)**: δ 35,76; -126 a -162 (sept, PF₆). **FTIR (cm⁻¹)**: 3078 ($\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$), 2972, 2924, 2860 ($\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$), 1593 ($\nu_{\text{asC=N}}$), 1473, 1421 ($\nu_{\text{asC=C}}$), 1120, 561 ($\nu_{\text{P-C}}$), 840 ($\nu_{\text{PF}_6^-}$), 687 ($\delta_{\text{C-H}}$ (aromático)). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max} /nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹)**: 268 (7000); 340 (980); 545 (220).

- [Ru(η^6 -*p*-cimenol)P(4-MeO-3,5-CH₃-C₆H₂)₃(3-CH₃-C₅H₄N)Cl][PF₆] (7)

O complexo obtido como um sólido de coloração amarela. Rendimento: 55,2 mg (86,54 %). MM: 945,44 g mol⁻¹. Análise Elementar calc. para: C₄₃H₅₄ClF₆NO₃P₂Ru (%): C, 54,58; H, 5,71; N, 1,48. Encontrada: C, 55,80; H, 5,52; N, 1,49. Λ_m : 123,4 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). P.F.: 152 – 175 °C (dec). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃):** δ H₅ 1,10 (dd, 6H); H₁ 1,71 (s, 3H); H₇ 2,12 (s, 18H); H₄ 2,19 (sept, 1H); H₁₀ 2,23 (s, 3H); H₈ 3,72 (s, 9H); H₂ 5,19 (d, 1H); H₃ 5,44 (d, 1H); H_{2'} 5,79 (d, 1H); H_{3'} 5,85 (d, 1H); H₆ 6,84 (d_(alargado), 6H); H₁₂ 7,07 (t, 1H); H₁₁ 7,39 (d, 1H); H₉ 8,54 (s, 1H); H₁₃ 8,60 (d, 1H). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃):** δ C_a 18,21; C_g 22,27; C_f 30,49; C_c 81,70; C_d 82,97; C_b 97,75; C_e 103,05; C_k 112,21; C_i 114,04; C_j 138,47; C_h 152,24; C_l 162,59. **RMN de ³¹P (121,49 MHz, CDCl₃):** δ 33,91; -135 a -153 (sept, PF₆). **FTIR (cm⁻¹):** 3072 ($\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$), 2932, 2864, 2827 ($\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$), 1586 ($\nu_{\text{asC=N}}$), 1480, 1426 ($\nu_{\text{asC=C}}$), 1112, 552 ($\nu_{\text{P-C}}$), 840 ($\nu_{\text{PF}_6^-}$). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max} /nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹):** 273 (6680); 341 (1020); 545 (190).

- [Ru(η^6 -*p*-cimenol)P(4-MeO-C₆H₄)₃(3-CH₃-C₅H₄N)Cl][PF₆](8)

O complexo obtido como um sólido de coloração amarela. Rendimento: 41,0 mg (70,80 %). MM: 861,17 g mol⁻¹. Análise Elementar calc. para: C₃₇H₄₂ClF₆NO₃P₂Ru (%): C, 51,56; H, 4,88; N, 1,62. Encontrada: C, 52,45; H, 4,85; N, 1,76. Λ_m : 140,0 μ S cm⁻¹ (24 h, 25°C). P.F.: 140 – 170 °C (dec). **RMN de ¹H (300,13 MHz, CDCl₃):** δ H₅ 1,08 (dd, 6H); H₁ 1,69 (s, 3H); H₁₀ 2,13 (s, 3H); H₄ 2,18 (sept, 1H); H₈ 3,81 (s, 9H); H₂ 5,22 (d, 1H); H₃ 5,40 (d, 1H); H_{2'} 5,83 (d, 1H); H_{3'} 5,86 (d, 1H); H₆ 6,86 (t, 6H); H₁₂ 7,07 (t, 1H); H₇ 7,18 (s, 6H); H₁₁ 7,37 (d, 1H); H₉ 8,51 (s, 1H); H₁₃ 8,72 (d, 1H). **RMN de ¹³C (75,48 MHz, CDCl₃):** δ C_a 18,21; C_g 22,27; C_f 30,49; C_c 81,70; C_d 82,97; C_b 97,75; C_e 103,05; C_k 112,21; C_i 114,04; C_j 138,47; C_h 152,24; C_l 162,59. **RMN de ³¹P (121,49 MHz, CDCl₃):** 33,89; -126 a -162 sept, PF₆. **FTIR (cm⁻¹):** 3076 ($\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$), 2968, 2839 ($\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$), 1580 ($\nu_{\text{asC=N}}$), 1491, 1453 ($\nu_{\text{asC=C}}$), 1100, 557 ($\nu_{\text{P-C}}$), 841 ($\nu_{\text{PF}_6^-}$). **UV-Vis (CH₂Cl₂, λ_{max} /nm) (ϵ max/L mol⁻¹cm⁻¹):** 274 (8050); 341 (1080), 545 (230).

3.3.3 Caracterização dos complexos 1-8

3.3.3.1 Análise elementar e ponto de fusão

A determinação do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada em um analisador CHN modelo EA 1108 da FISONs, no Laboratório de Microanálise do Departamento de Química da UFSCar. O ponto de fusão foi obtido em triplicata em um medidor de ponto de fusão a seco, marca Quimis, modelo: Q340S, disponível no laboratório de Química Orgânica DEQUIM/UEPG.

3.3.3.2 Condutividade Molar

As medidas foram todas realizadas em triplicata e em temperatura ambiente utilizando um condutivímetro Infolab, modelo WTW TetraCon® 325, equipado com uma cela de platina. Concentração dos complexos de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila. Como padrão de referência de PTBA em acetonitrila com condutividade igual a $146,6 \mu\text{S cm}^{-1}$.

3.3.3.3 Teste de solubilidade e estabilidade

Teste Qualitativo:

O teste de solubilidade dos complexos foi realizado nos solventes: água, tampão PBS, solução de DMSO 2%, DMSO, diclorometano, acetonitrila, diclorometano, clorofórmio, acetona, metanol, éter etílico, pentano e etanol. Neste estudo manteve-se a concentração de 0,1 g de complexo em 100 μL do solvente, sendo realizado à temperatura ambiente e a estabilidade dos complexos avaliada após 24 h.

Teste Quantitativo:

As soluções dos complexos **1-4** foram preparadas em tubos Falcon de 15 mL. Cerca de 1 mg do complexo foi dissolvido em 5 mL de água destilada. Essas soluções foram deixadas no ultrassom por 1 h. Em seguida, deixou-se na centrífuga por outros 30 min (500 rpm, 25 °C). Filtrou-se as soluções por filtração simples para remover as partículas sólidas. Estas soluções foram reservadas e a determinação da concentração de rutênio foi conduzida por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite – GF AAS (SpectrAA 240, Varian) acoplado a um corretor de fundo, com efeito Zeeman, e tubos de grafite pirolítico (Varian). Para esta determinação, foi utilizada uma lâmpada de cátodo-oco monoelementar (Ru, $\lambda = 349,9 \text{ nm}$; tamanho de fenda= 37 mm) (Varian Agilent). O gás inerte utilizado foi argônio e as quantificações foram realizadas por padronização externa, utilizando curvas analíticas de 0,0 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o elemento. O programa de aquecimento do forno de

grafite empregado nas determinações de Ru foi avaliado por condições de pirólise e atomização. Para a curva de pirólise, a temperatura de atomização foi mantida fixa em 2600 °C e a temperatura de pirólise em 1000 °C. A temperatura de limpeza foi fixa em 2850 °C. As medidas foram obtidas em triplicata.

3.3.3.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary-50 Bio disponível no laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200-900 nm e todas as leituras foram realizadas em cubetas de quartzo possuindo caminho óptico de 0,5 cm, para os complexos em uma concentração de 1.10^{-4} mol L⁻¹ em diclorometano.

3.3.3.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais foram obtidos em um espectrofotômetro IRPrestige-21, DRS-8000/ Shimadzu, disponível no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, C-labmu-UEPG. A análise foi realizada com os complexos em pastilha de KBr, no modo de reflectância difusa com resolução de 4 cm⁻¹, com acumulação de 64 scans e na região de 400-4000 cm⁻¹.

3.3.3.6 Espectroscopia Raman

Os espectros de espalhamento Raman para os complexos fosfínicos foram obtidos no estado sólido, em um espectroscópio XploRa confocal Raman com microscopia ótica da Horiba, disponível C-labmu-UEPG. Os parâmetros utilizados para estas medidas foram com mapeamentos espectrais, com resolução espacial de aproximadamente 50 x 1000 µm, usando uma lente objetiva de 20 x e detector abc. A intensidade de potência do laser foi de 0,2 mW, e a faixa de varredura utilizada foi de 40 a 4400 cm⁻¹, com um tempo de interação com as amostras de 10 s.

3.3.3.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN 1D ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, e 2D COSY, HSQC, HMBC foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance II 300 MHz, alocado no Departamento de Química e Bioquímica da UofL-Canadá e em um espectrofotômetro BRUKER Model DRX 400 MHz, pertencente ao C-labmu-UEPG. Os deslocamentos químicos presentes no espectro de RMN de ^1H , foram determinados em relação ao tetrametilsilano (TMS), e o solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$) ou dimetilsulfoxido (dmso-d_6). Os espectros de RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram obtidos com 16, 200 e 32 scans; largura espectral de 6188.119 Hz, 18028.846 Hz e 49019.609 Hz; tempo de aquisição 5,99 s, 3,63 s e 0,66 s; tamanho do Fid 74256, 131072 e 65536; comprimento de pulso 90° , 80° e 40° , respectivamente.

Os espectros de RMN 2D foram realizados para as medidas $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ gCOSY, $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ gHSQC e $\text{H-}^{13}\text{C}$ gHMBC e os parâmetros utilizados para tais medidas estão descritos a seguir: $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ gCOSY: largura espectral: 6188.119 Hz para F2 e F1; tempo de relaxação de 1,5 s; tempo de aquisição 0.3309568 s para F2 e 0.0103424 s para F1; tamanho do Fid 4096 para F1 e 128 para F2; e com a acúmulo de 4scans. $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ gHSQC: largura espectral: 6188.119 Hz para F2 e 18028.844 Hz para F1; tempo de relaxação de 2,5 s; tempo de aquisição 0.3309568 s para F2 e 0.0070997 s para F1; tamanho do Fid 4096 para F1 e 256 para F2; e com a acúmulo de 14 scans. $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ gHMBC: largura espectral: 6188.119 Hz para F2 e 18028.844 Hz para F1; tempo de relaxação de 5,0 s; tempo de aquisição 0.3309568 s para F2 e 0.0283989 s para F1; tamanho do Fid 4096 para F1 e 512 para F2; e com a acúmulo de 16 scans.

3.3.3.8 Caracterização eletroquímica por medidas de voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas à temperatura ambiente com um potenciostato/galvanostato μ -Autolab (Tipo III, Metrohm-Eco Chemie), alocado no GDEM-UEPG. Estes experimentos foram realizados utilizando acetonitrila previamente tratada (CH_3CN), contendo PTBA como eletrólito suporte e uma célula eletroquímica baseada em três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo com área eletroativa de 3 mm^2 , eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl em capilar de Luggin, com a utilização da solução de PTBA em acetonitrila ($0,1\text{ mol L}^{-1}$). As análises foram realizadas com os complexos em solução com concentração de $2 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio em uma velocidade de varredura de 50 a 2000 mV s^{-1} , em sentidos catódicos e/ou anódicos.

3.3.3.9 Difractometria de raios X de monocristal

As estruturas foram determinadas por cristalografia de raios X de um monocristal a 100 K, pelo Prof. Dr. René Boéré. Os cristais obtidos foram analisados em um difratômetro [MiTeGen 200um], SuperNova, equipado com um detector Pilatus P200 HPAD e utilizando radiação Cu-K α , λ = 1,54184 Å, alocado no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica da UofL-Canadá.

3.3.3.10 Cálculos Teóricos

As simulações computacionais foram realizadas pelo Professor Dr. Sérgio Lázaro e pelo Dr. Renan Ribeiro. Os cálculos *ab initio* usando Teoria Funcional da Densidade (DFT) foram computados em fase gasosa, zero Kelvin, em duas condições de solventes: vácuo e em acetonitrila. As simulações computacionais baseadas na Teoria do Funcional de Densidade (DFT) aliada ao híbrido funcional B3LYP, ambos empregados no programa GAUSSIAN09. Nas simulações realizadas, os átomos de C, H, Cl e N foram descritos por conjuntos de base *all electron* 6-31G+(d); enquanto que o conjunto de base Sapporo (SPK-DZCD) foi empregado para descrição dos átomos de Ru. Para otimizar as geometrias moleculares, o efeito solvente foi inserido a partir do Método de Contínuo Polarizado (PCM); 10^{-6} Hartree e 10^{-8} Hartree para SCF com base no formalismo Hartree-Fock e nos critérios de energia total, respectivamente. Os experimentos de UV-Vis foram obtidos a partir da contribuição dos Orbitais Moleculares de Fronteira (FMOs) para moléculas neutras, pois, elas podem localizar densidades eletrônicas onde existe a possibilidade de excitação eletrônica. Geometrias moleculares para estados oxidados como cargas -1, +1 e +2 foram otimizadas para elucidar os resultados voltamétricos, labilização de grupos químicos e distâncias e ângulos de ligações químicas, obtidos por difratometria de raios X.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Complexos da série [Ru(η^6 -*p*-cimenol)PAR₃Cl₂] (**1-4**)

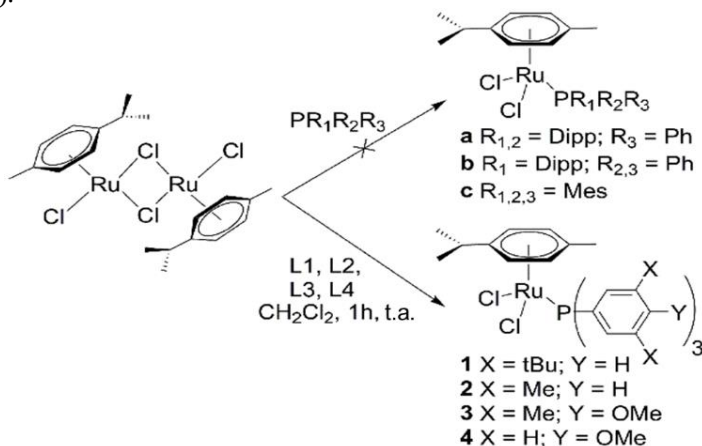
3.4.1.1 Considerações sobre as sínteses

Os complexos da série [Ru(η^6 -*p*-cimenol)PAR₃Cl₂] (**1-4**) foram obtidos por meio da reação do dímero precursor [Ru(η^6 -*p*-cimenol)(μ -Cl)Cl]₂ pela clivagem das pontes de cloreto

com ligantes da classe das fosfinas estericamente impedidas e monodentadas. A síntese baseou-se na variação de grupos alquil presentes nos anéis aromáticos dos ligantes fosfinas. Assim, foram testadas fosfinas do tipo $\text{PPh}_3\text{-n(dipp)n}$ onde: dipp= 2,6 diisopropilfenil e PAr_3 , sendo Ar = 3,5-di-*tert*-butilfenil (**1**), 3,5-dimetilfenil (**2**), 4-metóxi-3,5-dimetilfenil (**3**), 4-metóxi-3,5-dimetilfenil (**4**), conforme rota de síntese ilustrado no **Esquema 3.5**.

Bullock e colaboradores^[48] relatam uma certa experiência com triarilfosfinas altamente substituídas contendo os grupos 2,6-diisopropilfenil (Dipp), demonstrado que estes ligantes apresentam estruturas eletrônicas planarizadas e facilmente oxidadas para uma série P(Dipp)_3 , PDipp_2Ph , **a**, PDippPh_2 , **b**. Assim como a conhecida fosfina PMes_3 onde Mes = 2,4,6 trimesitilfosfina, **c**, estas fosfinas têm capacidades limitadas para coordenar com centros metálicos e a reatividade com o dímero precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ ainda não é relatada. Nota-se pelo **Esquema 3.5**, que a reação do dímero com as triarilfosfinas **a**, **b** e **c** foram malsucedidas, mesmo quando aquecidas sob refluxo e monitoradas por espectroscopia $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR. Apesar do ligante **b** com apenas um grupo Dipp já ter sido utilizado na síntese do tetrâmero $[\text{Cu}_4(\text{Dipp})_4]^{[49]}$, não houve indícios de reação neste trabalho, pois, estas fosfinas possuem seus substituintes na posição *orto*, propiciando um grande impedimento estérico para formação dos complexos mononucleares.

Esquema 3. 5: Rotas de síntese para reações realizadas neste trabalho, relatando as sínteses bem sucedidas (**1-4**) e as falhas (**a-c**).



Em contrapartida, as reações dos complexos neutros da série **1-4** com ligantes 3,5-dissubstituídos, com o precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ na proporção 2:1, respectivamente, foram rápidas e completas à temperatura ambiente (**Esquema 3.5**), produzindo complexos organometálicos de fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ onde (**1**) (Ar = 3,5-di-*tert*-butilfenil), (**2**) (Ar = 3,5-dimetilfenil), (**3**) (Ar = 4-metóxi-3,5-dimetilfenil) e

(4) (Ar= 4-metóxfenil). Todas as reações foram conduzidas em diclorometano desgaseificado à temperatura ambiente e sob N₂, com bons rendimentos (70-95%). Os quatro complexos foram recristalizados a partir de soluções concentradas em CH₂Cl₂ e diluídos por difusão utilizando n-pentano (1) ou éter dietílico (2-4) à temperatura ambiente, num recipiente selado protegido da luz. Os complexos 1-3 que possuem os substituintes nas posições 3,5- do anel arila, são inéditos, enquanto o 4 possui sua síntese reportada por Serron e Nolan, 1995^[47]. Apesar da síntese estar descrita na literatura, este complexo não foi estruturalmente caracterizado. Os complexos sintetizados são sólidos de coloração vermelho/laranja, estáveis à luz e ao ar, com alta pureza, evidenciados por espectros de RMN e análise elementar, que foram consistentes com as fórmulas propostas para suas estruturas cristalográficas. Além disso, todos os complexos são solúveis em acetonitrila, diclorometano e clorofórmio e quase insolúveis em água. As solubilidades qualitativas em uma variedade de solventes orgânicos e a solubilidade quantitativa em água, estão apresentada nas Tabelas A3.1 e A3.2.

3.4.1.2 Análise Elementar

A partir dos resultados de análise elementar obtidos pela microanálise dos complexos da série 1-4 listados na Tabela 3.1, confirmou-se a composição química e respectivas fórmulas moleculares destes complexos fosfínicos sintetizados. Para todos os complexos, os valores teóricos calculados, estão coerentes com os resultados obtidos experimentalmente.

Tabela 3. 1: Valores Experimentais (Exp.) e calculados (Cal.) de análise elementar (C, H) obtidos para 1-4.

Complexos	% C	% H
	Exp./ Cal.	Exp./Cal.
1	68,97/ 69,26	8,57/ 8,28
2	62,57/ 63,12	6,28/ 6,14
3	59,83/ 60,21	6,38/ 6,40
4	56,54/ 56,62	5,32/ 5,30

3.4.1.3 Condutividade molar, estudos de estabilidade e reatividade

Os valores de condutividade molar obtidos em acetonitrila em uma concentração de 1.10⁻³ mol L⁻¹, Tabela 3.2, indicam que 1-4 são não eletrólitos, quando comparados com soluções de eletrólitos 1:1 em acetonitrila (120 a 160 μS cm⁻¹)^[50] e com a série de complexos neutros [Ru(η⁶-*p*-cimeno)LCl₂] onde L= derivados de piridina monodentados, (31 a 35 μS cm⁻¹)^[51] sintetizados em nosso grupo. Para avaliar a estabilidade dos complexos na

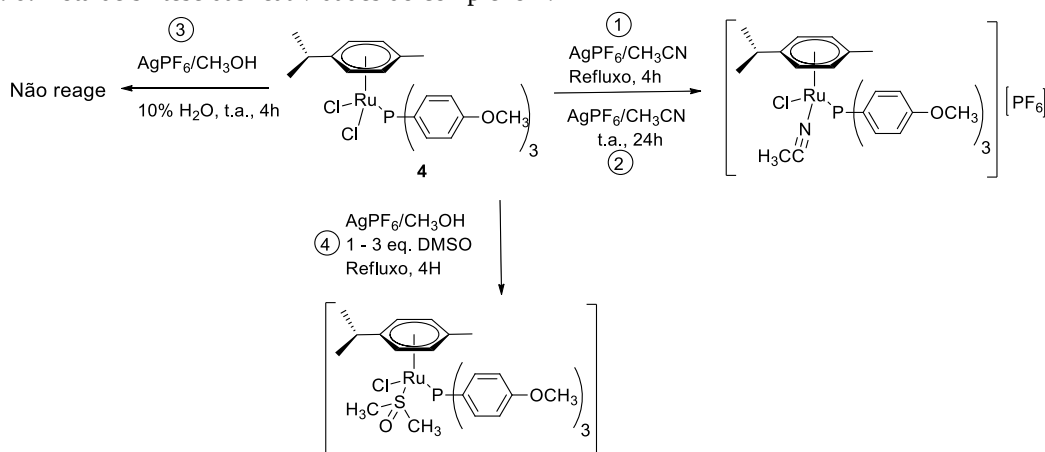
presença de acetonitrila, foram realizadas medições em diferentes tempos e houve uma diferença substancial nos valores após 12 h. Este resultado pode indicar a substituição parcial por CH₃CN com a consequente labilização de um dos ligantes cloridos.

Tabela 3. 2: Valores de condutividade molar para 1-4.

Complexos	Λ_m ($\mu\text{S cm}^{-1}$)-0 h	Λ_m ($\mu\text{S cm}^{-1}$)-12 h	Λ_m ($\mu\text{S cm}^{-1}$)-24 h	Λ_m ($\mu\text{S cm}^{-1}$)-48 h
(1)	3,6	35,1	42,3	47,4
(2)	1,3	56,1	60,0	69,3
(3)	1,7	60,9	62,1	70,9
(4)	1,4	49,6	54,2	60,6

Em função da alteração dos valores de condutividade, realizou-se alguns testes de estabilidade e reatividade do complexo **4** em solventes orgânicos e em solução aquosa. O primeiro teste foi realizado com a amostra do complexo dissolvida em CH₃CN na presença de KPF₆ e aquecida sob refluxo por 4 h ou deixada à temperatura ambiente por 24 h, para obter como produto o composto de estrutura [Ru(η^6 -*p*-cimeno)L4(Cl)(NCCH₃)] [PF₆], (**Figura 3.6**, reações 1 e 2). A formação deste complexo, indicou a mudança de coordenação, ao labilizar um dos cloridos e substituição por uma molécula de solvente CH₃CN, evidenciado por RMN ³¹P{¹H} e ¹H (**A3.3 e A3.4**). O produto obtido foi recristalizado por difusão de vapor de éter dietílico em uma solução de CH₂Cl₂, e uma única análise do monocristal formado neste sistema, por Difractometria de raios X, confirmou a estrutura cristalina do complexo (**A3.5 e A3.6**).

Esquema 3. 6: Rota de síntese das reatividades do complexo **4**.



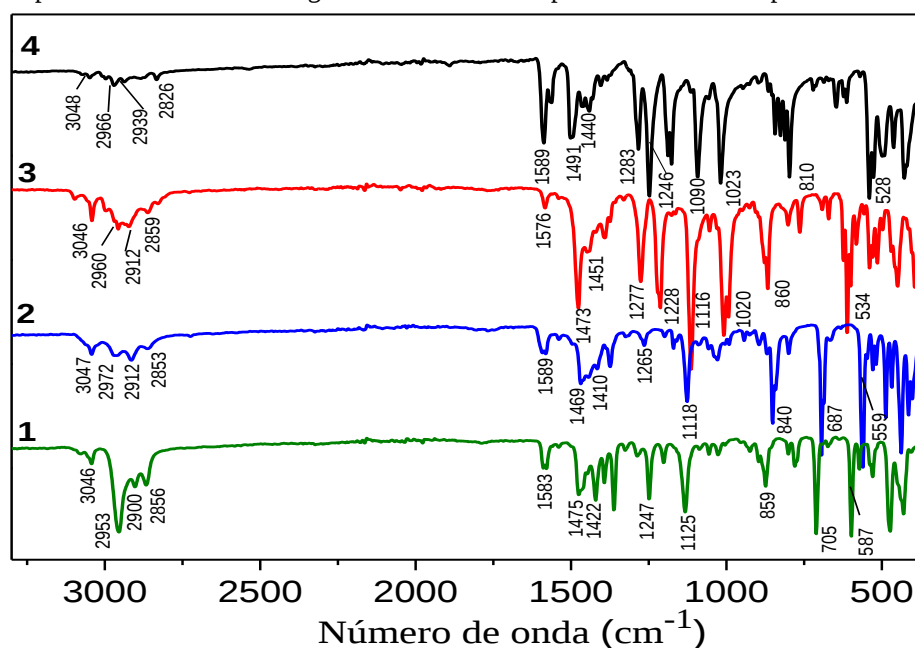
Também avaliou-se a reatividade do **4** em DMSO. Uma amostra foi deixada sob refluxo em metanol contendo 1-3 equivalentes de DMSO, (**Esquema 3.6**, reação 4). A caracterização por RMN ¹H do resíduo ao final da reação, demonstrou um possível deslocamento do **L4** na

sua forma oxidada e sinais característicos que podem evidenciar a coordenação de uma molécula de DMSO ao centro metálico, com a labilização de um dos Cl^- na estrutura, com deslocamentos químicos em $\delta = 2,62$ e $3,34$ ppm, para os dois grupos metil (**Figura A3.7**). Estes deslocamentos indicam também que a coordenação do DMSO ao centro metálico ocorre pelo átomo de enxofre^[52,53]. O espectro evidencia também a formação de uma mistura em solução, não sendo possível o isolamento do complexo final e sua caracterização. Além disso, com o intuito de determinar a estabilidade em relação à hidrólise, reagiu uma amostra do **4** à temperatura ambiente em metanol aquoso (10% H_2O) na presença de AgPF_6 (**Figura 3.6**, reação **3**). Nenhuma evidência de reação foi encontrada no espectro de RMN ^1H , (**Figura A3.8**) indicando que complexos do tipo **1–4** são estáveis em relação à hidrólise.

3.4.1.4 Espectroscopia na região do infravermelho e Raman

Os espectros na região do infravermelho e espalhamento Raman dos **1–4** (**Figuras 3.6 e 3.7**, respectivamente), apresentaram um perfil semelhante para cada complexo, com relação as intensidades das bandas entre si, com pequenas variações do número de onda dependendo da natureza do substituinte dos anéis aromáticos dos ligantes fosfinas em cada estrutura, como resumem as **Tabelas 3.3 e 3.4**.

Figura 3. 6: Espectros vibracionais na região do infravermelho para **1–4** obtidos em pastilhas de KBr.



Diante dos espectros de infravermelho apresentados, as bandas em altas frequências na faixa entre 3046-3048 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento assimétrico no plano ($\nu_{\text{Csp}^2\text{-H}}$) pela presença dos anéis aromáticos dos ligantes ($\eta^6\text{-p-cimeno}$) e ligantes fosfinas PAr_3 . As bandas entre 2859-2972 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico ($\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$) do grupo substituinte metil dos ligantes ($\eta^6\text{-p-cimeno}$) e PAr_3 coordenados, sendo esta banda mais intensa no espectro do **1** em função da presença de mais unidades de substituintes -CH_3 no anel aromático da fosfina.

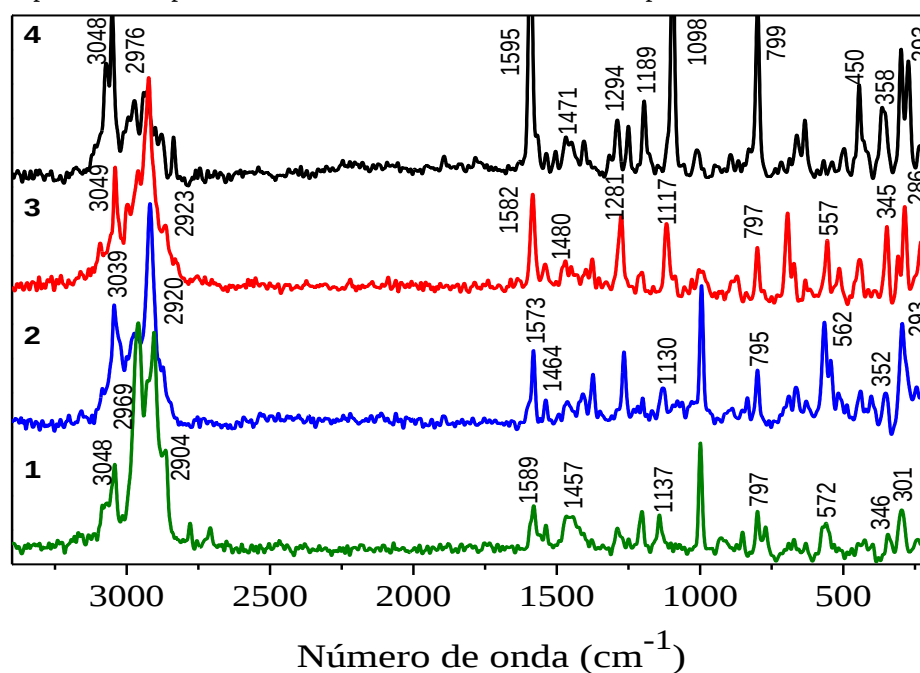
As três bandas correspondentes ao estiramento assimétrico no plano ($\nu_{\text{asC=C}}$) são observadas entre 1410-1589 cm^{-1} . Em relação aos substituintes metil e isopropil do anel aromático ($\eta^6\text{-p-cimeno}$) é observada uma banda que refere-se ao estiramento assimétrico da ligação ($\nu_{\text{C-H}}$) em 1247-1283 cm^{-1} e bandas entre 810-860 cm^{-1} , atribuídas à deformação angular ($\delta_{\text{C-H}}$), da ligação entre os átomos de carbono e hidrogênio do anel aromático ($\eta^6\text{-p-cimeno}$), o qual, apresenta um padrão de substituição na posição *p*-dissubstituído para os substituintes isopropil e metil^[54,55]. Para os complexos da série, as bandas não sofrem deslocamentos significativos, podendo ressaltar que apenas para os estiramentos assimétricos ($\nu_{\text{Csp}^2\text{-H}}$) e ($\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$) um pequeno deslocamento ocorre. Isso pode ser atribuído à coordenação do centro metálico com os ligantes PAr_3 , considerados fortes receptores π , os quais, realizam ainda a retroligação, causando uma maior distribuição da densidade eletrônica no átomo de rutênio e no ligante ($\eta^6\text{-p-cimeno}$), causando assim, um deslocamento para menores número de onda em relação ao complexo precursor.

A comprovação da coordenação dos ligantes fosfinas aos referidos complexos, é confirmada pelas bandas observadas em 1090-1125 cm^{-1} e 528-587 cm^{-1} , as quais, são referentes aos estiramentos assimétricos da ligação P-C. Os espectros do **3** e **4** apresentaram duas bandas para o estiramento assimétrico ($\nu_{\text{asC-O}}$), do substituinte OCH_3 em 1228 e 1246 cm^{-1} e 1020 e 1023 cm^{-1} , respectivamente. Para **1** e **2**, as bandas intensas observadas em 705 e 687 cm^{-1} , são atribuídas à deformação angular ($\delta_{\text{C-H}}$) que identificam o padrão de substituição nos anéis aromáticos dos ligantes fosfinas como *m*-dissubstituídos^[55,54,56].

Tabela 3. 3: Atribuição das bandas principais dos espectros FTIR (cm^{-1}) observadas para **1-4**.

Atribuição	Precursor	1	2	3	4
$\nu_{\text{asCsp}}^2\text{-H}$	3055	3046	3047	3046	3048
$\nu_{\text{asCsp}}^3\text{-H}$	2963, 2912, 2870	2953, 2900, 2856	2972, 2912, 2853	2960, 2912, 2859	2966, 2939, 2826
$\nu_{\text{asC=C}}$	1596, 1475, 1444	1583, 1475, 1422	1589, 1469, 1410	1576, 1473, 1451	1589, 1491, 1440
$\nu_{\text{C-H}}$	1279	1247	1265	1277	1283
$\delta_{\text{C-H}}$	874	859	840	860	810
$\delta_{\text{C-H}}$	-	705	687	-	-
$\nu_{\text{P-C}}$	-	1125, 587	1118, 559	1116, 534	1090, 528
$\nu_{\text{asC-O}}$	-	-	-	1020, 1228	1023, 1246

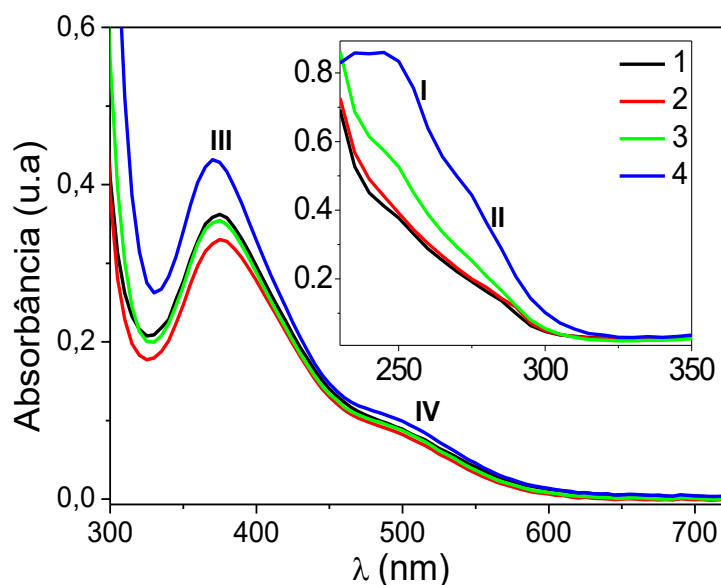
A espectroscopia Raman foi realizada para auxiliar na caracterização da série **1-4**, tendo em vista, que esta técnica apresenta bandas que não são possíveis de serem observadas na espectroscopia vibracional na região do Infravermelho, sendo assim, considerada uma técnica complementar na identificação dos grupos funcionais. A análise do espectro de espalhamento Raman (**Figura 3.7**), permitiu o reconhecimento das bandas decorrentes do estiramento assimétrico da ligação entre o rutênio e os ligantes cloridos da estrutura ($\nu_{\text{asRu-Cl}}$) entre 286-362 cm^{-1} ^[57]. Para o complexo precursor estas bandas se encontram em 246-389 cm^{-1} , verificando então uma pequena variação nos valores apresentados para **1-4**, onde as bandas de mesma atribuição, são observadas em maior número de onda, resultado da coordenação do rutênio aos ligantes fosfinas. As demais bandas presentes no espectro seguem as atribuições já sugeridas pelo espectro de Infravermelho e com base na literatura^[58], cujas atribuições estão dispostas na **Tabela 3.4**.

Figura 3. 7: Espectros de espalhamento Raman, obtido no estado sólido para **1-4**.**Tabela 3. 4:** Atribuição das principais bandas dos espectros de Raman para **1-4**.

Atribuição	1	2	3	4
$\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$	3048	3039	3049	3048
$\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$	2969, 2904	2920	2923	2976
$\nu_{\text{asC=C}}$	1589, 1457	1573, 1464	1582, 1480	1595, 1471
$\nu_{\text{asC-O}}$	-	-	1281	1294
$\nu_{\text{P-C}}$	1137, 572	1130, 562	1117, 557	1098, 450
$\delta_{\text{C-H}}$	797	795	797	799
$\nu_{\text{asRu-Cl}}$	346, 301	352, 293	345, 286	358, 293

3.4.1.5 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível do **1-4** obtidos em uma concentração de 1.10^{-4} mol L⁻¹ e 1.10^{-5} mol L⁻¹ em diclorometano a temperatura ambiente, permitiram a interpretação das propriedades eletrônicas e demonstraram a boa solubilidade destes complexos neste solvente. A partir dos espectros eletrônicos (**Figura 3.8**) observam-se quatro bandas de absorção pouco definidas, sendo que destas, “ombros” (**I, II**) se encontram na região ultravioleta, uma banda (**III**) e um outro “ombro” (**IV**), na região visível dos espectros eletromagnéticos dos quatro complexos. Os valores de comprimento de onda (λ) e de absortividade molar (ϵ / L mol⁻¹ cm⁻¹) calculados estão apresentados na **Tabela 3.5**, junto das atribuições para as bandas observadas nos espectros.

Figura 3. 8: Espectros eletrônicos para a série **1-4** obtidos em 1.10^{-4} e 1.10^{-5} mol L⁻¹ em CH₂Cl₂.

Os espectros são muito semelhantes, sendo os "ombros" (**I**, **II**) de alta intensidade na região do ultravioleta do espectro, centrados em cerca de 243-289 nm ($\epsilon = 11800-85900$ L mol⁻¹ cm⁻¹) atribuídos às transições intraligantes $\pi-\pi^*$ dos ligantes triarilfosfina PAr₃ e (η^6 -*p*-cimenos) [59]. Bandas de menor energia e menor intensidade (**III**) na faixa de 371-376 nm ($\epsilon = 3280-4320$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) são atribuídas às transições de transferência de carga metal-ligante (TCML) do Ru para orbitais π^* dos ligantes. A atribuição desta banda foi confirmada pelos cálculos teóricos TD-DFT para o complexo [Ru(η^6 -*p*-cimenos)PPh₃Cl₂], sem as substituições nos anéis aromáticos do ligante PPh₃. Além disso, o efeito do solvente (CH₃CN) foi descrito mediante a inclusão da respectiva constante dielétrica para descrever a esfera de solvatação proposta na metodologia PCM (modelo contínuo polarizável). Constatou-se que a transferência de carga ocorre entre os orbitais de fronteira HOMO/LUMO+3, sendo que o orbital HOMO é composto majoritariamente pela contribuição dos orbitais (*t_{2g}*) do átomo de rutênio e de ambos os átomos de Cl por meio dos orbitais 2p, enquanto o orbital LUMO+3 apresenta uma maior contribuição dos orbitais π^* do ligante triarilfosfina PPh₃ (HOMO(Ru(d)/Cl(2p)) $\rightarrow$ LUMO+3(π^*)).

Uma terceira região de menor energia observada nos espectros eletrônicos (**IV**), mais próxima a 500 nm, ocorre em todos os espectros como "ombros", envolvendo transições entre *t_{2g}* e *eg* do Ru. Esta atribuição foi proposta com base nos cálculos TD-DFT realizados, onde os resultados iniciais indicam transições que ocorrem envolvendo orbitais ocupados de maior energia, que contribuem para o caráter d-d desta transição, envolvendo a excitação dos elétrons

localizados no orbital HOMO-2 para o orbital disponível LUMO (HOMO-2(Ru(t_2g))→LUMO Ru(eg)). As atribuições das transições de carga aqui descritas, confirmadas por cálculos teóricos (ver A3.9), estão de acordo também com o encontrado na literatura para complexos análogos^[58,59,60].

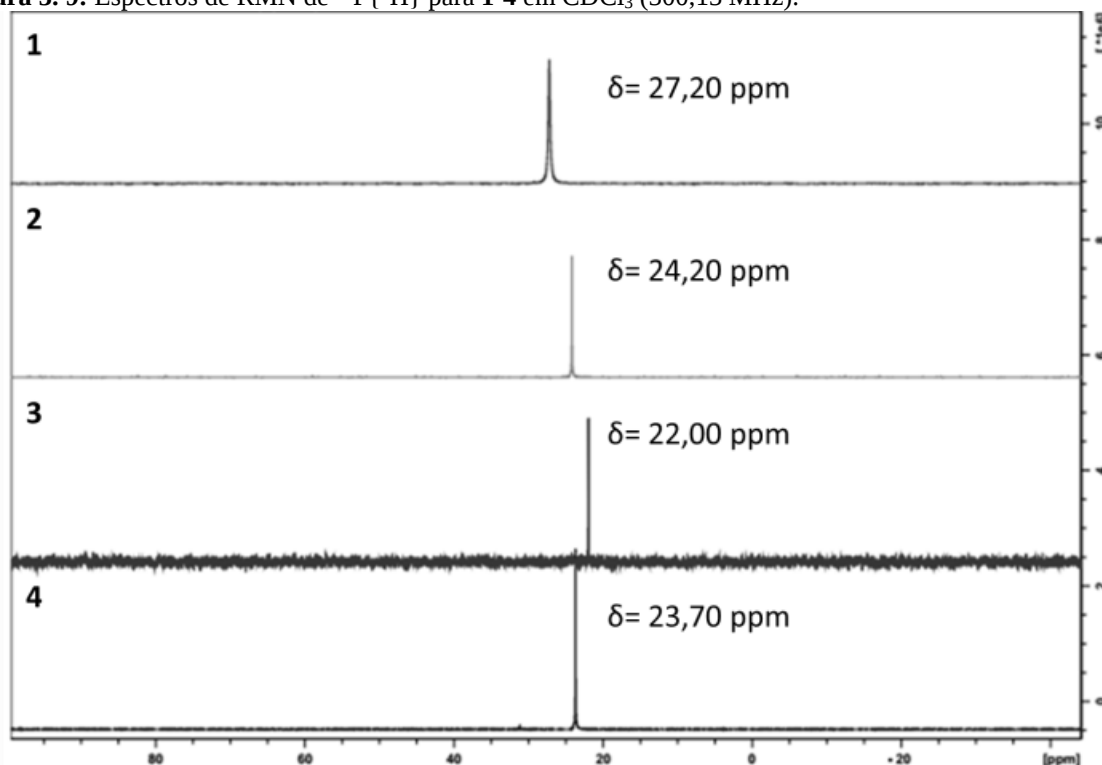
Tabela 3. 5: Atribuição das bandas dos espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível da série de complexos **1-4**.

Complexo	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)	Atribuição
1	284	13900	$\pi \rightarrow \pi^*$ η^6 -p-cimeno e PAr ₃
	247	39300	$\pi \rightarrow \pi^*$ η^6 -p-cimeno e PAr ₃
	374	3610	TCML
	498	901	Ru(d π)→Ru(d π^*)
2	289	11800	$\pi \rightarrow \pi^*$ η^6 -p-cimeno e PAr ₃
	376	3280	TCML
	494	853	Ru(d π)→Ru(d π^*)
3	249	53300	$\pi \rightarrow \pi^*$ η^6 -p-cimeno e PAr ₃
	374	3520	TCML
	498	880	Ru(d π)→Ru(d π^*)
4	243	85900	$\pi \rightarrow \pi^*$ η^6 -p-cimeno e PAr ₃
	276	41700	$\pi \rightarrow \pi^*$ η^6 -p-cimeno e PAr ₃
	371	4320	TCML
	497	1020	Ru(d π)→Ru(d π^*)

3.4.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

Os dados reportados pelos espectros de RMN 1D (³¹P{¹H}, ¹H e ¹³C{¹H}) confirmaram as estruturas da série **1-4** em solução, a partir de sinais característicos e representativos das formulações obtidas. Baseada na caracterização do complexo precursor estabeleceu-se as comparações com os complexos desta série, além da comparação dos valores de deslocamentos químicos (δ) para complexos de rutênio-areno análogos.

Os espectros de RMN ³¹P{¹H} do **1-4** (**Figura 3.9**) apresentaram um simpleto com deslocamentos químicos próximos entre 22,00 a 27,30 ppm, atribuído ao átomo de fósforo dos ligantes triarilfosfina PAr₃. Como enumerado na **Tabela 3.6**, todos estes sinais estão em regiões mais desblindadas quando comparados aos sinais dos respectivos ligantes livres (-1,31 a -8,03 ppm), desta forma, confirmando a coordenação e a formação dos novos complexos^[47].

Figura 3. 9: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para **1-4** em CDCl_3 (300,13 MHz).**Tabela 3. 6:** Deslocamentos químicos (δ) para **1-4** e seus respectivos ligantes livres ($\delta = \text{ppm}$, $\Delta\delta = \text{variação de } \delta \text{ com a coordenação}$).

	$\delta \text{ PAr}_3 \text{ (livre)}$	$\delta \text{ Complexo}$	$\Delta\delta$
1	-1,31	27,20	+28,6
2	-2,75	24,20	+26,9
3	-5,55	22,00	+27,5
4	-8,03	23,70	+31,7

A partir da **Tabela 3.6**, nota-se que os deslocamentos químicos dependem do substituinte do anel aromático do PAr_3 coordenado. Nos espectros dos complexos com os substituintes retiradores ($-\text{OCH}_3$) no anel aromático (**3-4**) os deslocamentos químicos são observados em regiões mais blindadas ($\delta = 22,00 \text{ ppm}$ e $23,70 \text{ ppm}$, respectivamente), e nos espectros dos complexos com os substituintes doadores ($-\text{CH}_3$) no anel aromático (**1-2**) em regiões mais desblindadas ($\delta = 27,20$ e $24,20 \text{ ppm}$, respectivamente). Esta evidência deve-se ao fato de que com o substituinte $-\text{OCH}_3$, o efeito indutivo retirador de elétrons no anel aromático é maior, porém, na mesma estrutura há o efeito ressonante deste substituinte, o qual prevalece. Desta forma, os sinais aparecem em regiões mais blindadas, devido ao aumento de densidade eletrônica possibilitada por este efeito.

Nos espectros de RMN de ^1H (**Figura 3.10**) são evidenciados os principais prótons existentes nas estruturas dos complexos sintetizados. A análise revelou a presença de sinais

característicos do ligante (η^6 -*p*-cimeno) e dos ligantes triarilfosfina coordenados ao centro metálico. Os dupletos observados na faixa de δ 0,97 a 1,13 ppm (H5, 6H, $^3J_{H4-H5}$ = 6,8-6,9 Hz) referem-se aos prótons metílicos (CH₃) do grupo isopropil do ligante η^6 -*p*-cimeno, e os septetos entre δ 2,48 a 2,89 ppm (H4, 1H, $^3J_{H4-H5}$ = 6,6-7,5 Hz) correspondem ao próton metino (CH) deste ligante. Os prótons metílicos (CH₃) são observados como um simpleto com valor de deslocamento químico entre δ 1,80 a 1,97 ppm (H1, 3H). Já os dupletos presentes no espectro com deslocamentos químicos entre δ 4,95 a 5,22 ppm (H2 e H3, 4H, $^3J_{H2-H3}$ = 5,40-6,09 Hz) são referentes aos prótons do anel aromático. Ao comparar os espectros do **1-4** com o espectro obtido para o complexo precursor, **Tabela 3.7**, observa-se que todos os sinais estão deslocados para regiões mais blindadas. Esse deslocamento resulta do aumento da blindagem dos hidrogênios pela coordenação com os ligantes triarilfosfina, os quais, aumentam a densidade eletrônica do centro metálico^[9,61,62].

Os sinais nos espectros dos ligantes PAr₃ variaram de acordo com o substituinte no anel aromático. Os dupletos com deslocamentos químicos entre δ 7,45 e 7,75 ppm (H6, J_{H-P} = 10,44-11,10 Hz) e o tripleto em 7,71 (H6, J_{H-P} = 9,40 Hz) são os sinais mais desblindados devido o acoplamento H-P. Este sinal comprova a coordenação dos ligantes (PAr₃) quando comparados aos diferentes valores de deslocamento químico dos mesmos, quando fora da esfera de coordenação. Para **2-3** um simpleto em δ 2,22 e 2,28 ppm (H7), respectivamente, confirmam a presença da substituição 3,5-dimetil no anel aromático. Para **3-4** um simpleto em δ 3,80 e 3,71 ppm (H8), respectivamente, indica a presença do grupo *p*-MeO como substituinte no anel aromático. O simpleto em δ 1,22 ppm (H7) no espectro do **1** é característico do substituinte ^tbutil nas posições 3,5- do anel^[47,63]. Todos os deslocamentos químicos para os complexos sintetizados estão dispostos na **Tabela 3.7**.

Figura 3. 10: Espectros de RMN de ^1H para os complexos da série **1-4**, em CDCl_3 (300,13 MHz). (Expansão dos sinais ver A3.10)

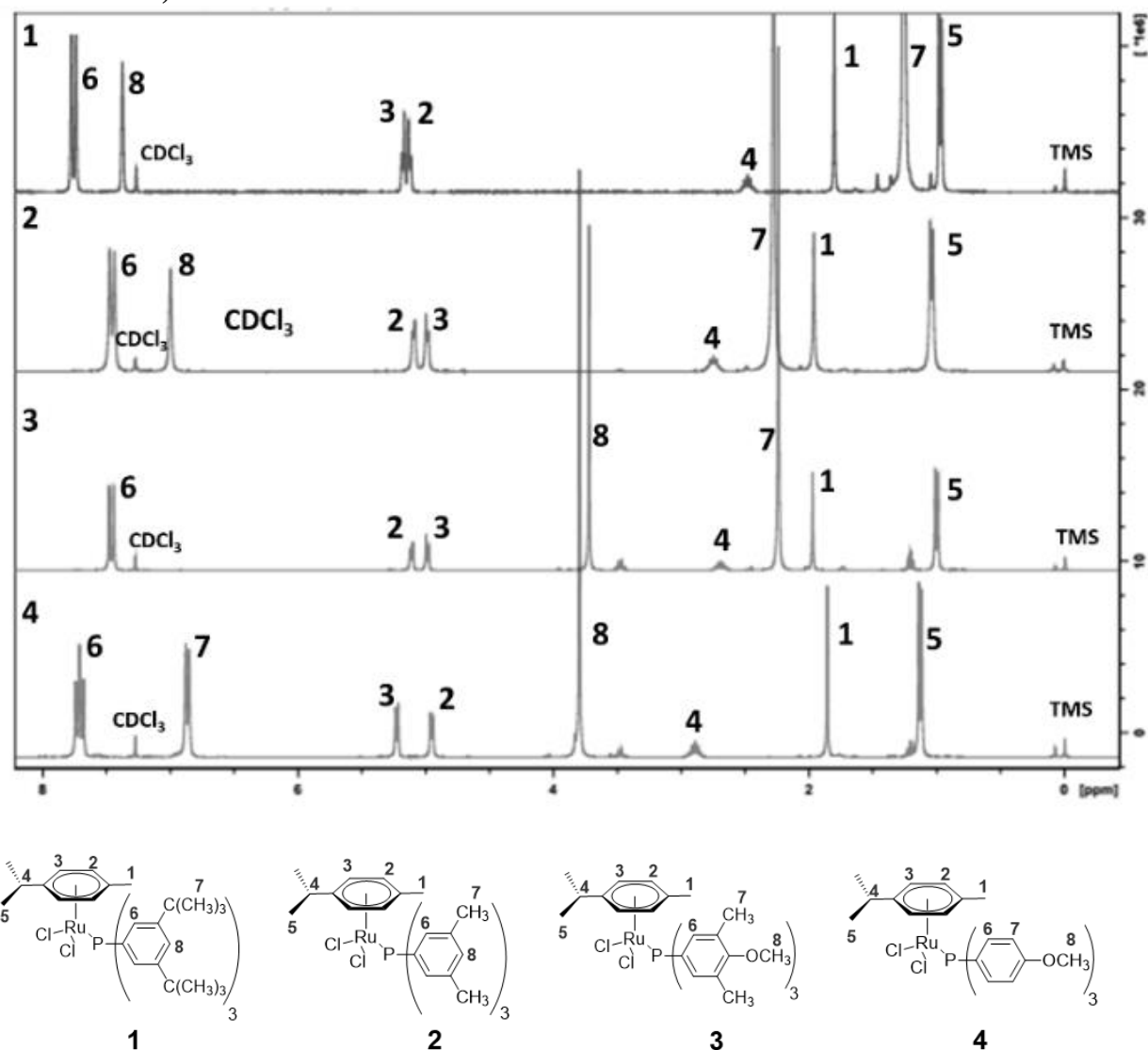


Tabela 3. 7: Principais deslocamentos químicos (δ =ppm) e multiplicidade dos sinais do RMN de ^1H para **1-4**.

	Precursor	1	2	3	4
H1	2,20 (s)	1,80 (s)	1,96 (s)	1,97 (s)	1,86 (s)
H2	5,37 (d)	5,12 (d)	5,09 (d)	5,11 (d)	4,95 (d)
H3	5,51 (d)	5,18 (d)	4,97 (d)	4,98(d)	5,22 (d)
H4	2,95 (sept)	2,48 (sept)	2,75(sept)	2,69 (sept)	2,89 (sept)
H5	1,32 (d)	0,97 (d)	1,04(d)	0,99 (d)	1,13(d)
H6	-	7,74 (d)	7,46 (d)	7,46 (d)	7,71 (t)
H7	-	1,25 (s)	2,27 (s)	2,24 (s)	6,87(d)
H8	-	7,38 (s)	7,02 (s)	3,72 (s)	3,80 (s)

A análise dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **1-4** (**Figura 3.11**) confirmam a coordenação dos ligantes PAR_3 através de alguns sinais característicos do acoplamento C-P

presentes em cada estrutura, gerando dupletos. Os valores destes deslocamentos químicos juntamente com a constante de acoplamento estão dispostos na **Tabela 3.8**, e uma tabela completa encontra-se no **A3.11**.

Figura 3. 11: Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da série **1-4** obtidos em CDCl_3 , (75,18 MHz).

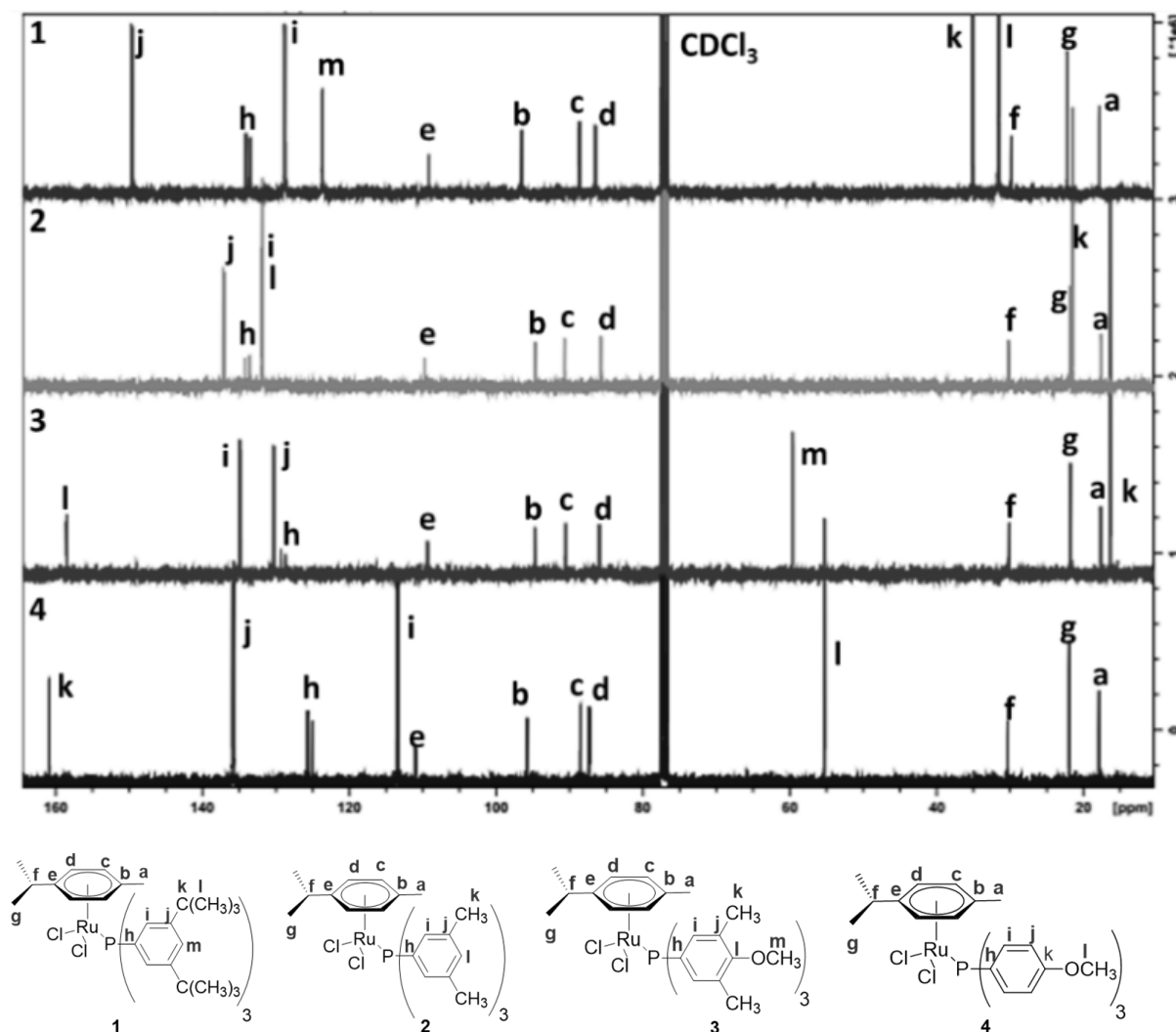


Tabela 3. 8: Deslocamentos químicos (δ) e respectivas constantes de acoplamento (J) em Hz para a série **1-4**.

Complexo	d, C-P δ , ($^1J_{\text{C-P}}$)	d, Corto δ , ($^2J_{\text{C-P}}$)	d, Cmeta δ , ($^3J_{\text{C-P}}$)	d, Cpara δ , ($^4J_{\text{C-P}}$)
1	133,81 (44,45)	128,79 (9,81)	149,66 (9,58)	123,68 (2,34)
2	133,91 (45,3)	131,90 (11 Hz)	137,14 (9,2)	131,86 (2,8)
3	129,02(47)	130,26 (11)	134,85 (10)	158,47 (2,76)
4	125,34 (51)	113,54 (10,94)	135,83 (10,72)	160,89 (2,33)

Todos os sinais e atribuições dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para **1-4** foram confirmados pelos espectros de RMN 2D (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC e ^1H - ^{13}C gHMBC)

apresentados no **A3.12**, nos quais, podem ser analisados os principais acoplamentos que auxiliaram no estudo e confirmação das estruturas. Ressalta-se que a correlação ^1H - ^{13}C nas técnicas HSQC e HMBC determinaram a atribuições dos sinais dos hidrogênios H2 e H3, nas estruturas dos complexos, atribuídos aos hidrogênios do ligante (η^6 -*p*-cimeno) em mesmo ambiente químico.

3.4.1.7 Difractometria de raios X de monocristal

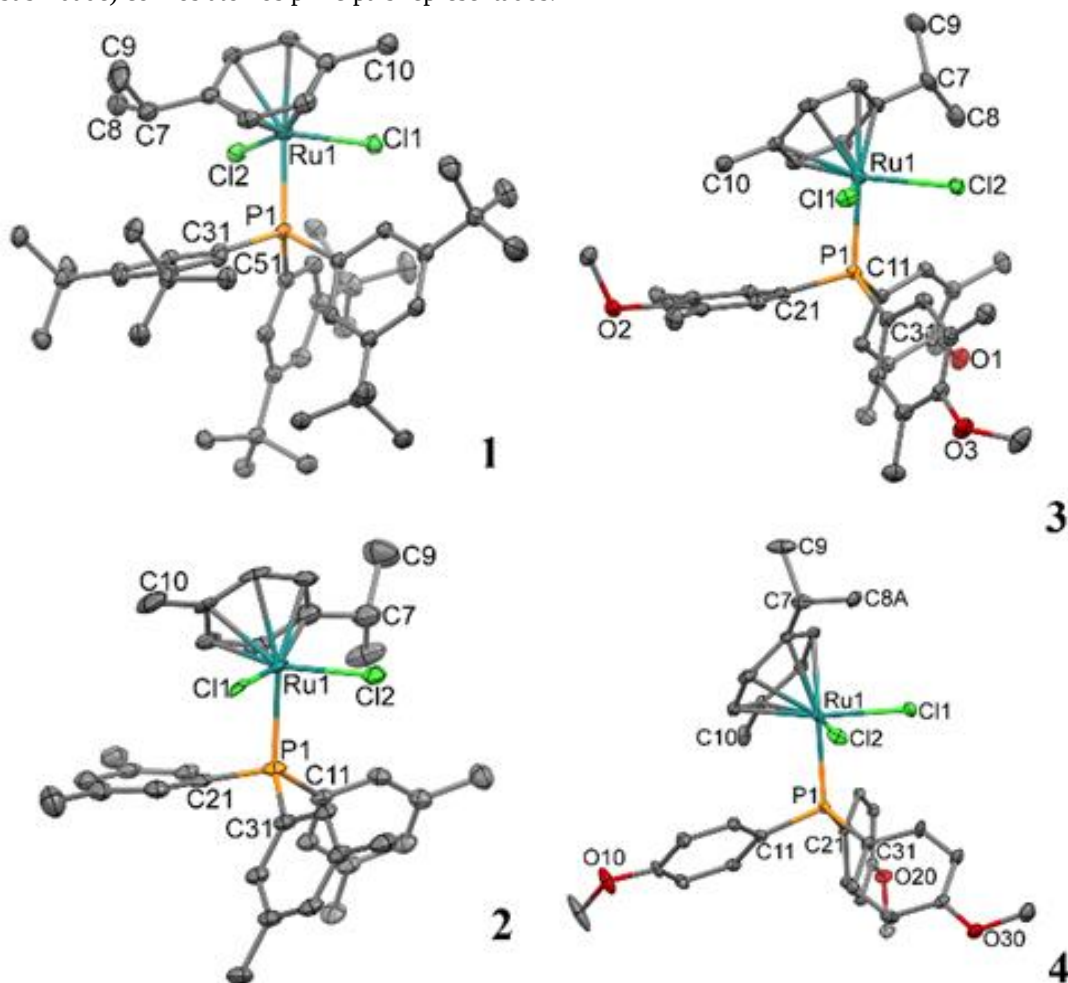
Os monocristais da série **1-4** foram obtidos primeiramente por evaporação lenta de uma solução CDCl_3 e camadas de pentano (amostra presente no tubo de RMN), sob arrefecimento a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Os cristais dos **2**, **3** e **4** foram cultivados desta maneira, mas todos apresentaram o solvente (CDCl_3) em sua rede cristalina (Dados Cristalográficos **A3.13**). Porém, de modo a obter amostras adequadas para testes biológicos, fez-se uma nova recristalização dos complexos com intuito de obter cristais que fossem isentos de solvente. Os cristais de **1** foram obtidos por evaporação lenta de uma solução de pentano; do **2** por evaporação lenta de uma solução de metanol; do **3-4** por difusão de vapor de éter dietílico em uma solução concentrada dos complexos em CH_2Cl_2 em um tubo de Schlenk selado, em temperatura ambiente. Um resumo dos principais parâmetros cristalográficos de refinamento para estas estruturas é fornecido pela **Tabela 3.9** e as geometrias dos complexos neutros ilustradas por seus ORTEP na **Figura 3.12**.

Tabela 3. 9: Dados cristalográficos de refinamento para série 1-4.

	1	2	3	4
Depósito CCDC¹	1891875	1891876	1891877	1891878
Fórmula empírica	C ₅₂ H ₇₇ Cl ₂ PRu	C ₃₄ H ₄₁ Cl ₂ PRu	C ₃₇ H ₄₇ Cl ₂ O ₃ PRu	C ₃₁ H ₃₅ Cl ₂ O ₃ PRu
Peso molecular	905,07	652,61	742,68	658,53
Temperatura/K	100,00(2)	100,0(4)	100,00(12)	99,98(15)
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Ortorrômbico
Grupo espacial	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$	P2 ₁ /n	P2 ₁ 2 ₁ 2
a/Å	17,69876(14)	9,4712(4)	11,1100(5)	19,0841(6)
b/Å	23,8825(2)	10,6072(3)	19,0000(7)	18,0116(5)
c/Å	37,8519(4)	16,1138(4)	16,9863(8)	8,0511(2)
α /°	78,1577(8)	86,534(2)	90	90
β /°	88,1043(7)	85,984(3)	104,101(4)	90
γ /°	76,7822(7)	71,412(3)	90	90
Volume/Å ³	15242,6(2)	1529,39(9)	3472,4(3)	2767,45(13)
Cela unitária Z	12	2	4	4
ρ_{calc} /cm ³	1,183	1,417	1,421	1,581
μ /mm ⁻¹	3,982	0,761	0,686	0,850
F(000)	5784	676	1544	1352
Tamanho do cristal/mm ³	0,2 × 0,15 × 0,1	0,28 × 0,2 × 0,15	0,124 × 0,053 × 0,038	0,259 × 0,089 × 0,042
Radiação	CuK α (λ = 1,54184)	MoK α (λ = 0,71073)	MoK α (λ = 0,71073)	MoK α (λ = 0,71073)
Limites 2 θ para coleta de dados/°	6,951 to 160,358	6,862 to 61,392	6,546 to 63,696	6,622 to 65,994
Índices	-22 ≤ h ≤ 22, -30 ≤ k ≤ 29, -48 ≤ l ≤ 48	-12 ≤ h ≤ 11, -14 ≤ k ≤ 14, -22 ≤ l ≤ 21	-16 ≤ h ≤ 16, -25 ≤ k ≤ 27, -23 ≤ l ≤ 24	-26 ≤ h ≤ 27, -27 ≤ k ≤ 25, -11 ≤ l ≤ 12
Reflexões coletadas	462422	48299	52837	47663
Reflexões independentes	65844 [R _{int} = 0,0745, R _{sigma} = 0,0354]	7984 [R _{int} = 0,0699, R _{sigma} = 0,0314]	10248 [R _{int} = 0,0582, R _{sigma} = 0,0511]	9024 [R _{int} = 0,0571, R _{sigma} = 0,0487]
Dados/limitações/p arâmetros	65844/3285/3181	7984/634/449	10248/0/409	9024/0/361
Refinamento (F ²)	1,021	1,060	1,034	1,186
R Índices finais [I ≥ 2 σ (I)]	R ₁ = 0,0622, wR ₂ = 0,1627	R ₁ = 0,0726, wR ₂ = 0,1958	R ₁ = 0,0409, wR ₂ = 0,0895	R ₁ = 0,0453, wR ₂ = 0,0850
R Índices finais [todos os dados]	R ₁ = 0,0759 1, wR ₂ = 0,1755	R ₁ = 0,0791, wR ₂ = 0,2047	R ₁ = 0,0593, wR ₂ = 0,0950	R ₁ = 0,0499, wR ₂ = 0,0863

¹CCDC: The Cambridge Crystallographic Data Centre.

Figura 3. 12: Representação das estruturas para **1-4** pelo programa ORTEP. Elipsóides de deslocamento (50% de probabilidade) com os átomos principais representados.



A partir das estruturas refinadas por difratometria de raios X para **1-4** observa-se que todas apresentaram semelhanças em suas redes cristalinas, confirmando a estrutura, composição e pureza das mesmas. Foi possível definir a coordenação *pseudo*-octaédrica esperada para os complexos de rutênio-areno, como mostra a **Figura 3.12**, em uma geometria “*piano stool*”, com o anel aromático do ligante (η^6 -*p*-cimeno) ocupando três sítios de coordenação do rutênio (hapticidade η^6), as triarilfosfinas coordenadas de forma monodentada pelo átomo de P e os dois cloridos ocupando os outros sítios de coordenação disponíveis nas moléculas^[64,65].

As estruturas desta série apresentaram uma complexidade considerável, principalmente para **1**, o qual apresenta uma “super-rede” com $Z' = 6$ ^[56] no grupo espacial P1, devido às pequenas mudanças ocasionadas pela rotação ou desordem do substituinte 3,5-di-*terc*-butil do

¹ Base de dados de Durham Z' : parâmetro usado para denotar o número de moléculas independentes na cela unitária ou unidade assimétrica.

L1. Uma complexidade semelhante ocorreu na estrutura cristalina deste ligante com $Z' = 4$, no grupo espacial $P2_1/c$ ^[67], indicando que essas estruturas são extremamente lipofílicas e com ligações intermoleculares fracas. Um exame da unidade assimétrica (**Figura A3.14**) mostra que as seis estruturas independentes, refinadas como "resíduos" baseados nos átomos de Ru, ou seja, Ru_1,... Ru_6, possuem **L1** em uma conformação semelhante, correspondendo a um anel "plano" em relação à ligação P-Ru. Esta conformação já foi relatada em uma das quatro conformações na unidade assimétrica da estrutura cristalina de **L1** ($Z' = 4$)^[67], vide **Capítulo 2**. Além disso, em todas as seis moléculas independentes, os substituintes *i*Pr do ligante (η^6 -*p*-cimeno) estão orientados em direção à face do anel "plano" da fosfina. Entretanto, elas diferem de acordo com a orientação para esquerda ou para direita dos ligantes cloridos coordenados, e também pelo fato de o grupo C-H ou CH₃ do substituinte *i*Pr, estar direcionado para a face do anel arila. Pode-se relatar que apenas o resíduo_1 contém um grupo *t*Bu rotacionalmente de forma desordenada.

Os demais complexos da série mostraram outros fenômenos de desordem. O complexo (**2**), cristalizou em um sistema cristalino triclinico, no grupo espacial P1, com as unidades [Ru(η^6 -*p*-cimeno)Cl₂] na estrutura apresentando desordem. Este padrão de desordem é fornecido considerando-se os diagramas de empacotamento e preenchimento de espaço (**Figura A3.15**). A estrutura exhibe os mesmos distúrbios posicionais, em que [Ru(η^6 -*p*-cimeno)Cl₂] existem em duas orientações de deslocamento com os componentes *i*Pr e CH₃ orientados em direções opostas em relação à fosfina (**L2**). A existência de uma desordem no **1-2** apresenta uma resposta diferente ao grande volume estérico apresentado por seus ligantes. No entanto, essas duas estruturas altamente desordenadas, enfatizam a dominância de ligantes do tipo fosfina lipofílicas nas redes cristalinas de seus complexos.

O **3** é altamente cristalino e a estrutura se refina extremamente bem no grupo espacial $P2_1/n$, não apresentando complexidades cristalográficas. A conformação da fosfina **L3** está muito próxima do intermediário idealizado por Mislow^[68], com o anel C21-C26 de forma "plana" (anel paralelo ao eixo principal) e os outros anéis perpendiculares a ele (**Figura A3.16**). Pode-se relatar ainda pela estrutura, um contato muito curto de aproximadamente 3,419 Å entre o anel arila da fosfina e o carbono C10 do grupo metil do ligante (η^6 -*p*-cimeno), refletindo em uma interação dispersiva com o grupo CH₃ e na curvatura significativa direcionada para cima do anel arila da ligação P-C21, de modo que o átomo de P seja 0,35 Å acima do plano em relação ao anel arila. A geometria e a conformação do complexo podem ser comparadas com as reportadas para o ligante livre (**L3**)^[69]. Já, o **4** cristaliza no grupo espacial quiral $P2_12_12$ e tem um distúrbio, que refina a ocupação de quase 50:50 para dois conformêros na estrutura,

para o grupo metil, especificamente nos C8 do grupo *i*Pr do ligante (η^6 -*p*-cimeno) coordenado. A partir de contatos curtos induzidos quando estes dois conformêros se emparelham em torno de um eixo de rotação, (**Figura A3.17**), dão origem ao grupo espacial quiral; sendo a quiralidade portanto, apenas um fator conformacional na estrutura geral. A estrutura é de excelente qualidade e a desordem aparente é provavelmente uma causa de conformações alternativas em pares de moléculas "diméricas".

Os principais parâmetros geométricos médios como comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados, estão resumidos na **Tabela 3.10** para as estruturas determinantes dos complexos (**1- 4**).

Tabela 3. 10: Distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) a partir da análise por raios X de monocristal para **1- 4**.

Distâncias de ligação (Å)				
	1	2	3	4
Ru1-P1	2,367(8)	2,426(2)	2,382(6)	2,369(12)
Ru1-Cl1	2,415(4)	2,409(10)	2,415(5)	2,410(13)
Ru1-Cl2	2,407(2)	2,435(4)	2,418(6)	2,424(11)
Ru1- <i>c</i> Ar	2,215(2)	2,189(8)	2,214(3)	2,216(4)
P1-C11	1,844(3)	1,833(3)	1,828(2)	1,822(5)
P1-C21	1,845(8)	1,831(3)	1,829(2)	1,824(5)
P1-C31	1,836(3)	1,834(3)	1,840(2)	1,827(5)
Ângulos de ligação (°)				
	1	2	3	4
Cl1-Ru-Cl2	90,22(4)	88,71(4)	90,74(19)	90,35(5)
P1 Ru Cl1	89,81(3)	85,59(4)	86,48(19)	83,49(4)
P1 Ru Cl2	83,94(3)	91,54(4)	88,41(19)	88,88(4)
C11 P1 Ru1	109,46(4)	117,54(13)	116,38(7)	109,19(16)
C21 P1 Ru1	116,57(4)	107,60(15)	108,79(7)	116,22(15)
C31 P1 Ru1	122,01(4)	120,03(14)	119,59(7)	118,73(16)

^aTodos os valores relatados para **1** usam as médias das seis moléculas independentes na unidade assimétrica.

As distâncias da ligação Ru-P variaram de 2,367(8) a 2,426(2) Å com um valor médio de 2,386(23) Å. Estes valores são um pouco mais longos quando comparados com estruturas análogas que apresentaram valores médios de 2,348(16)^[34], 2,358(9)^[70] e 2,352(1) Å^[71]. Apesar

dos valores obtidos terem uma tendência para comprimentos maiores, os mesmos estão dentro da incerteza padrão ao nível de confiança de 99%. A ligação P-Ru-Cl1 gera ângulos menores de 88,81(3), 86,48(19) e 83,49(4) Å nos complexos **1**, **3** e **4**, respectivamente, em relação aos respectivos ângulos Cl-Ru-Cl, 90,22(4), 90,74(19) e 90,35(5) Å. Esta variação nos ângulos também foi constatada para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{P}(\text{OPh})_3\text{Cl}_2]$, em que o ângulo de ligação para P-Ru-Cl foi de 85,01(3) Å e para Cl-Ru-Cl de 87,45(3) Å^[33]. Pode-se observar ainda que os ângulos da ligação Cl1-Ru-Cl2, Cl11-Ru-P1, Cl2-Ru-P1, em aproximadamente 90 Å, confirmam a geometria *pseudo*-octaédrica distorcida dos complexos rutênio-areno^[72].

O estudo cristalográfico permitiu visualizar as configurações dos anéis aromáticos das triarilfosfinas, de modo a minimizarem os efeitos de repulsão eletrônica, que podem ser evidenciados pelos ângulos de ligação para cada complexo. Os ângulos entre as ligações do ligante triarilfosfina e o centro metálico (C11 P1 Ru1, C21 P1 Ru1, C31 P1 Ru1) observados para **1** são um pouco maiores, pois, sua estrutura possui um ligante fosfínico com elevado volume estérico. A **Tabela 3.11** expressa uma comparação de comprimentos e ângulos de ligação do **1-4** e do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PPh}_3\text{Cl}_2]$ ^[73]. A comparação destes valores revelou que o impedimento estérico causado pelos anéis aromáticos dos ligantes é semelhante para as estruturas, não demonstrando variações significativas nos Σ dos ângulos das ligações ao redor do átomo de Ru. As médias das distâncias Ru-C no anel ($\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}$) para os complexos também se mostram semelhantes, e percebe-se que a medida que o comprimento da ligação Ru-Cl aumenta, há um encurtamento da ligação Ru-P, proporcionado por um pequeno efeito *trans* entre os ligantes nas estruturas^[74]. Este efeito é visualizado de forma diferenciada para o complexo **2**, devido à desordem apresentada para o anel ($\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}$) na estrutura.

Tabela 3. 11: Parâmetros de geometria para **1-4** em comparação com o complexo com PPh₃, reportado da literatura^[14].

	1	2	3	4	PPh₃
Σ dos ângulos^(a)	263,97	265,84	265,63	262,72	265,77
Ru-P	2,367(8)	2,426(2)	2,382(6)	2,369(12)	2,3438
Ru-Cl1	2,415(4)	2,409(10)	2,415(5)	2,410(13)	2,415
Ru-C (média)^(b)	2,215(2)	2,189(8)	2,214(2)	2,216(4)	2,218

^(a) Σ dos ângulos (°) = P—Ru—Cl, P—Ru—Cl e Cl—Ru—Cl. ^(b) Média dos comprimentos de ligação Ru-C (Å) no anel ($\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}$).

3.4.1.8 Cálculos de DFT para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PPh}_3\text{Cl}_2]$

As simulações computacionais baseadas em cálculos da Teoria Funcional da Densidade (DFT) no nível de teoria UB3LYP/6-31+G(d), SPK-DZCD, com o complexo

[Ru(η^6 -*p*-cimen)PPh₃Cl₂], foram realizadas para verificar a estrutura eletrônica, espectros de absorção eletrônica e o comportamento voltamétrico e assim, comparar aos **1-4**, os quais, possuem estrutura similar, com os ligantes PAr₃ 3,5-dissubstituídos. Essa estrutura foi selecionada com objetivo de reduzir o custo computacional.

Nesse caso, tanto o complexo neutro, quanto as espécies catiônicas e aniônicas com geometrias moleculares para os estados ionizados com cargas -1, +1 e +2, foram totalmente otimizadas na fase gasosa e com um modelo contínuo polarizável (PCM) para o solvente CH₃CN. Essas simulações foram desenvolvidas com objetivo de descrever os processos de oxirredução envolvendo as espécies Ru (II/I), Ru (II/III) e Ru (III/IV); respectivamente. O objetivo principal foi descrever as modificações na coordenação ao redor do átomo de rutênio, a partir dos comprimentos e ângulos de ligação, cujos parâmetros encontrados estão dispostos na **Tabela 3.12**. Em comparação ao complexo neutro (18 elétrons), o aumento da carga catiônica (17 e 16 elétrons), pode ser entendido como um processo de oxidação do centro de Ru (II/III) causando poucas alterações nos comprimentos de ligação de Ru-Cl, Ru-P e Ru-C₆. Além disso, o ângulo Cl(1)-Ru-Cl(2) aumenta, e evidencia um pequeno aumento da distância da ligação Cl(1)-Cl(2), enquanto os ângulos Cl(1)-Ru-P e Cl(2)-Ru-P diminuem, mostrando uma aproximação entre os ligantes clorido e PPh₃. Portanto, a geometria molecular do complexo é muito estável durante o processo de oxidação.

O processo de redução de carga (19 elétrons) associado ao Ru(II/I) apresentou um caráter irreversível, sendo relacionado a adição de elétrons ao orbital LUMO, que é dominado pela interação Ru-Cl σ^* , formando o complexo aniônico. No entanto, a localização dessa carga negativa não ocorre preferencialmente no rutênio devido à sua baixa eletronegatividade e, assim, o mecanismo mais favorável é associado a deslocalização da carga negativa sobre os grupos benzeno, clorido ou PPh₃. Além disso, notou-se que o comprimento de ligação Ru-Cl aumenta (**Tabela 3.12**), indicando que a carga negativa em excesso é direcionada para um dos íons cloridos devido sua alta eletronegatividade, causando a labilização do mesmo. Assim, durante o processo de redução a geometria do complexo se torna muito instável, de forma que a estabilidade seja reestabelecida mediante a labilização do ligante clorido na estrutura.

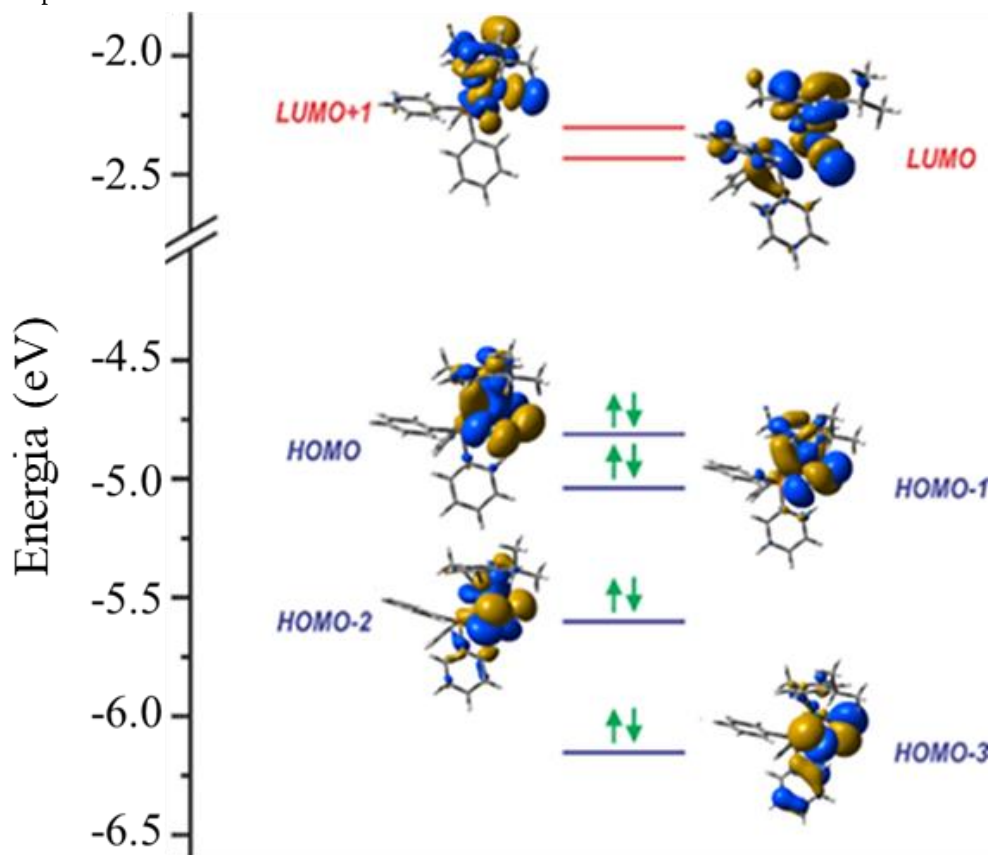
Tabela 3. 12: Geometrias moleculares analisadas para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PPh}_3\text{Cl}]^+$ em diferentes estados oxidados. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°).

	Comprimento de ligação (Å)			
	Ru(I)	Ru(II)	Ru(III)	Ru(IV)
Ru-Cl(1)	2,535	2,477	2,388	2,342
Ru-Cl(2)	5,274	2,478	2,395	2,338
Ru-P	2,450	2,465	2,470	2,558
Ru-C₆	2,317	2,290	2,411	2,390
	Ângulos de ligação (°)			
Cl(1)-Ru-Cl(2)	91,324	91,140	99,429	104,334
Cl(1)-Ru-P	84,908	84,908	85,770	82,754
Cl(2)-Ru-P	88,387	88,387	85,282	83,793

As energias e topologias dos orbitais moleculares de fronteira (FMOs) estão representadas na Figura 3.13. O orbital ocupado de maior energia HOMO apresenta uma contribuição majoritária dos orbitais Ru $3d$ (44,5%) e Cl $p\text{-}\pi^*$ (39,2%), como também pelos orbitais do ligante ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$). O mesmo se aplica ao HOMO-1 (41,0 e 45,6%) e HOMO-2 (37,3 e 53,0%) para a contribuição dos orbitais do Ru $3d$ e Cl $p\text{-}\pi^*$, respectivamente. Juntos, esses três FMOs têm energia próxima e correspondem aproximadamente ao conjunto dos orbitais degenerados Ru(t_{2g}) para uma estrutura octaédrica ideal. Como para qualquer metal de transição com quaisquer ligantes da base π (halogênios, alcóxidos, RS- e similares), esses MOs preencheram as contribuições do par de elétrons do ligante clorido. Além disso, o HOMO-3 tem principalmente contribuições de elétrons sem ligação com Cl π de uma combinação de simetria que não corresponde a nenhum orbital d em Ru (82,9%).

Os orbitais moleculares desocupados de menor energia LUMO e o LUMO +1 são formados majoritariamente pela contribuição dos estados eletrônicos associados à ligação Ru- $p\text{-cimen}$ π^* e Ru-Cl σ^* . Para LUMO, a composição foi calculada como Ru d (49,5%), Cl p (10,0%) e ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$) (8,1%), enquanto o LUMO +1 foi descrito como composição mista de Ru d (55,6%), Cl p (14,7%) e ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$) (10,8%). Esses dois MOs correspondem aproximadamente ao conjunto de orbitais Ru(e_g).

Figura 3. 13: Orbitais moleculares de fronteira e níveis de energia, com representações do orbital de Kohn-Sham para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PPh}_3\text{Cl}_2]$ em fase gasosa obtidos a partir dos cálculos DFT/TZVP/RPE0 com correção de dispersão.



FONTE: A Autora.

3.4.1.9 Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica

Experimentos de voltametria cíclica foram realizados para **1-4** a fim de investigar o mecanismo eletroquímico. Os voltamogramas cíclicos foram registrados em eletrodo de carbono vítreo em solução de PTBA/ CH_3CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (vs. Ag/AgCl), e estão apresentados na **Figura 3.14**, onde pode-se perceber a semelhança no perfil apresentado por todos os complexos da série. Em potenciais anódicos são apresentados dois processos redox *quasi*-reversíveis (**I** e **III**) e um processo de oxidação irreversível (**II**). Em potenciais catódicos é possível constatar a presença de dois processos de redução (**IV** e **V**) e outro de oxidação (**VI**) irreversíveis. Os valores dos potenciais para **1-4** estão dispostos na **Tabela 3.13**.

Figura 3. 14: Voltamogramas cíclicos para os complexos (1-4) a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PTBA 0,1 mol L⁻¹ em acetonitrila vs Ag/AgCl; obtido em 100 mV s⁻¹.

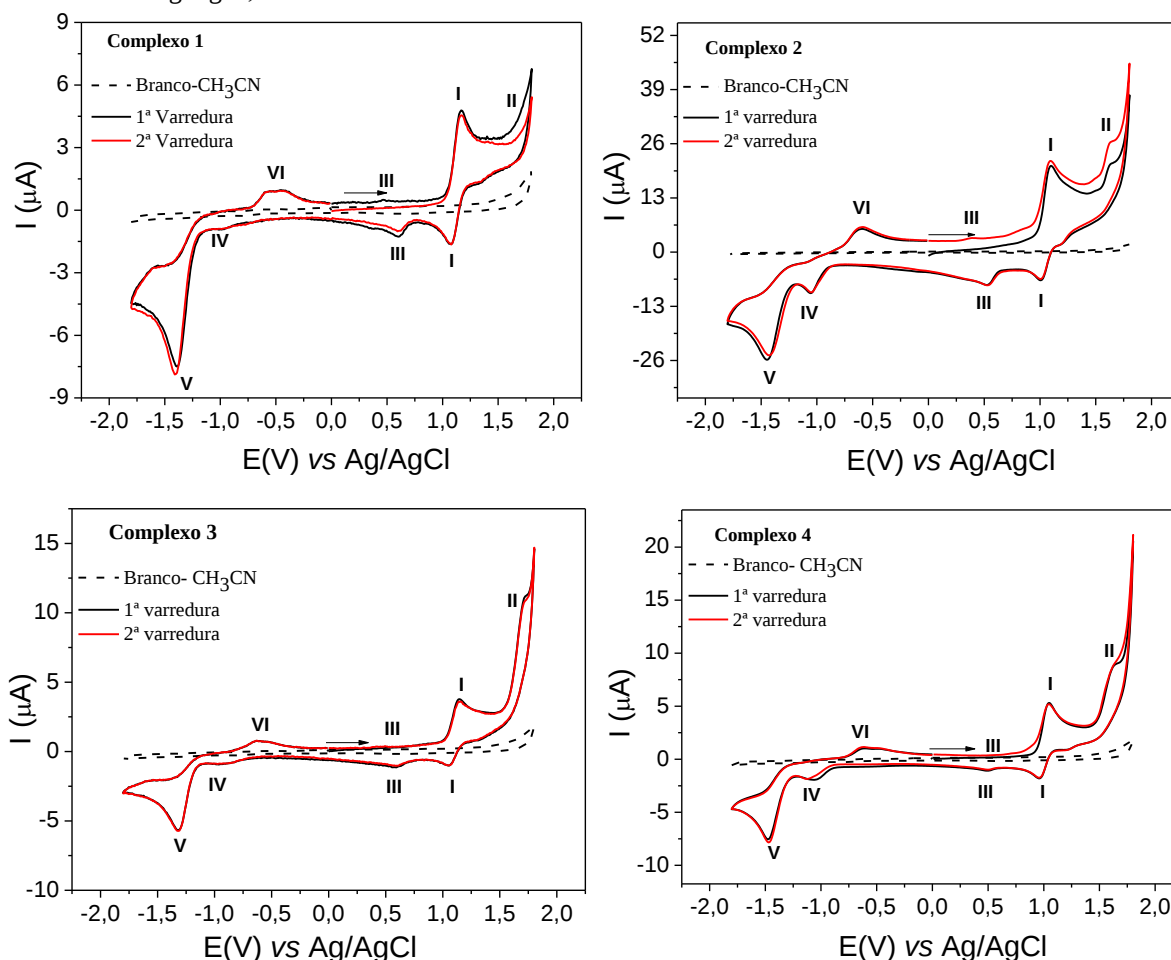


Tabela 3. 13: Valores dos potenciais (V) e corrente de pico (μA) obtidos dos voltamogramas cíclicos dos 1-4.

	E_{pa}^I	E_{pc}^I	E_m^{Ia}	I_{pc}/I_{pa}^I	ΔE_p^{Ib}	E_{pa}^{II}	E_{pc}^{IIIc}	E_{pa}^{IIIc}	E_{pc}^{IV}	E_{pc}^V	E_{pa}^{VI}	ΔE^d
1	1,17	1,07	1,12	0,34	0,09	1,72	0,62	0,65	-0,97	-1,39	-0,50	2,56
2	1,17	1,06	1,11	0,31	0,08	1,69	0,61	0,65	-0,90	-1,31	-0,59	2,48
3	1,15	1,05	1,10	0,25	0,07	1,72	0,60	0,65	-0,85	-1,32	-0,51	2,47
4	1,13	1,04	1,08	0,25	0,07	1,70	0,60	0,65	-0,93	-1,30	-0,59	2,43

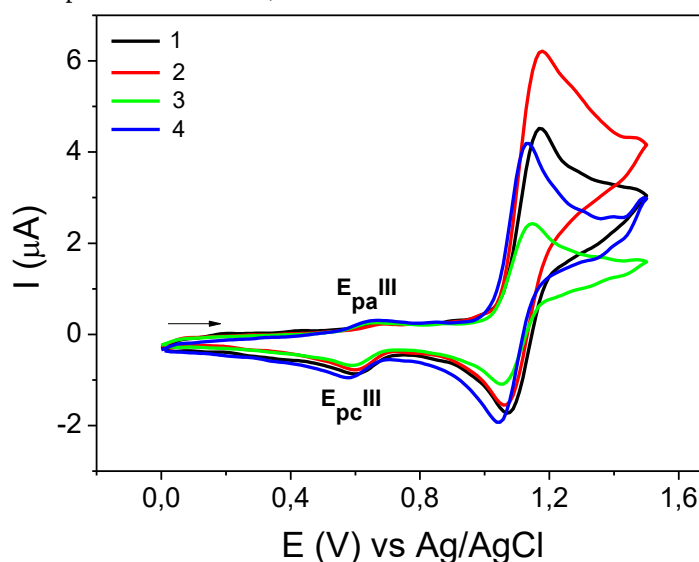
^a $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$; ^bMedida pela diferença entre E_{pa} e E_{pc} ; ^cprocesso quasi-reversível com coordenação do CH₃CN; ^dMedido pela diferença entre E_{pa}^I e E_{pc}^V .

Observando os voltamogramas da **Figura 3.14**, relata-se que na região anódica se observa um processo redox *quasi-reversível* (E_{pa}^I/E_{pc}^I) atribuído à oxirredução centrada no par (Ru^{II}/Ru^{III}) dos complexos, devido a remoção de um elétron do orbital HOMO, com valores de potenciais que variam de $E_{pa} = +1,13$ a $E_{pc} = +1,07$ V, e $E_{1/2} = 1,08$ a $1,12$ V. Esta atribuição foi baseada em resultados relatados na literatura, como para os complexos $[Ru(\eta^6-p\text{-cimen})(L)Cl_2]$, onde $L = PMe_3$, PPh_3 ou $P(OMe)_3$, com valores de potenciais na faixa de $E_{1/2} = 0,99$ a $1,09$ V^[75] e $E_{1/2} = 1,11$ a $1,15$ V^[35]. O processo de oxidação irreversível em

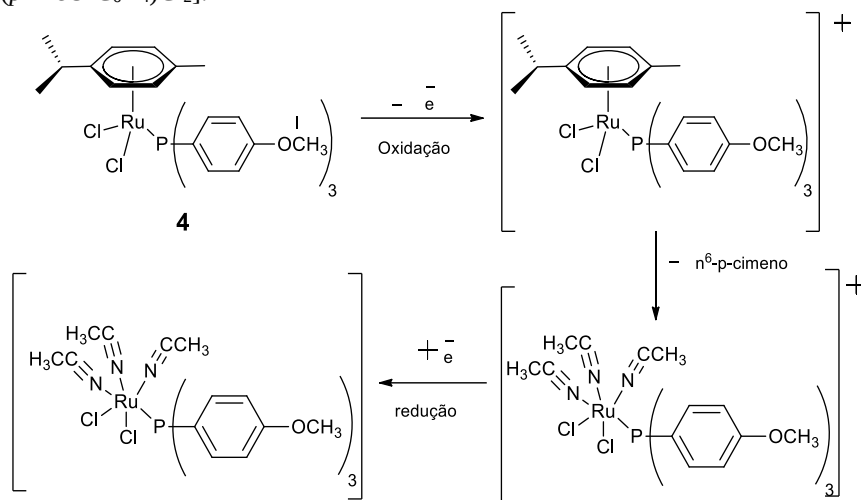
maiores potenciais nos voltamogramas $E_{pa}^{II} \sim 1,70$, pode estar relacionado à oxidação do ligante (η^6 -*p*-cimeno) labilizado da esfera de coordenação, após a oxidação do complexo (Ru^{II}/Ru^{III}). Através dos cálculos DFT (seção 3.4.1.8), o orbital HOMO tem uma combinação dos caracteres Ru d e Cl p- π^* , de forma que a oxidação deve fortalecer significativamente a ligação Ru-Cl e ter um pequeno efeito enfraquecedor na ligação ao (η^6 -*p*-cimeno), porém, não o suficiente para causar a labilização. Para o caminho da oxidação, a molécula foi estável em alta faixa de potencial voltamétrico, enquanto que, no caminho da redução, a molécula foi modificada.

A partir dos voltamogramas percebe-se a formação de um novo processo redox em **(III)** após a varredura dos processos **(I)** e **(II)**. O ciclo repetido entre 0 e +1,5 V vs Ag/AgCl produz um pico anódico para **(III)**, com intensidades de correntes muito mais baixas do que para o processo **(I)**, como mostra a **Figura 3.15**. Com base na proposta já descrita por Smith et al. para um complexo $[Ru(\eta^6$ -*p*-cimeno)(PPh₂(CH₂)₃Ph)Cl₂]^[76], postulamos que o processo **(III)** é o par redox Ru(II/III) para uma nova espécie em solução, $[Ru^{III}(CH_3CN)_3PAR_3Cl_2]$, devido a deslocamento do (η^6 -*p*-cimeno) após a oxidação inicial em **(I)** e sua substituição pelo solvente coordenante acetonitrila, nos três sítios de ligação anteriormente ocupados pelo ligante, consistente com um típico processo eletroquímico-químico (EC). O **Esquema 3.7**, ilustra este processo de formação da nova espécie em solução.

Figura 3. 15: Voltamogramas cíclicos para **1-4** a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/AgCl; obtido em 100 mV s⁻¹, faixas de potencial de 0 a +1,5 V.



Esquema 3. 7: Representação do processo para formação do novo composto gerado em solução $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{CH}_3\text{CN})_3(\text{p-MeO-C}_6\text{H}_4)\text{Cl}_2]$.



Para confirmar a formação de um novo composto em solução com CH_3CN , realizou-se uma eletrólise em massa com potencial controlado do **4** em solução de CH_3CN . Uma oxidação exaustiva a +1,5 V foi seguida por uma redução subsequente a 0,0 V, produzindo uma solução amarela, cujo voltamograma cíclico com $E_{1/2} = 0,625$ V correspondia muito ao potencial apresentado para processo (III) no **4** e nos demais complexos da série estudada (**Figura A3.18**). O material produzido pelo processo de eletrólise foi caracterizado por RMN de ^{31}P e ^1H , (**Figura A3.19**) e os dados de deslocamentos químicos característicos dos espectros quando comparados ao **4** evidenciaram a formação do complexo $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3(\text{4})\text{Cl}_2]$, resultante da substituição do ligante (η^6 -p-cimeno) por CH_3CN por meio de um intermediário formado por $\text{Ru}(\text{III})$ (etapa 2 no **Esquema 3.7**), que é consistente com um processo eletroquímico-químico (EC). Para confirmar e identificar a formação deste complexo, realizou-se ainda uma síntese térmica sob refluxo na presença do solvente CH_3CN , e foram observados dados semelhantes de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e ^1H , que indicaram a caracterização da nova espécie (**Figura A3.20**). Estes testes foram realizados para **4** cuja estrutura possui um ligante fosfina com menor impedimento estérico, o que acarretaria a melhor reação de substituição neste estudo. Devido todos os complexos da série apresentarem uma eletroquímica semelhante, visto pelos perfis dos processos evidenciados, a formação desta nova espécie em solução, ocorre para a estrutura de todos os complexos aqui estudados.

Em contraste, as varreduras na região catódica mostram apenas uma redução quimicamente irreversível (V), E_{pc} de -1,29 a -1,39 V, que então induz a re-oxidação fortemente compensada em (VI) com $E_{\text{pa}} = -0,50$ a -0,59 V. As atribuições destes processos foram baseadas em estudos anteriormente realizados em nosso grupo de pesquisa^[51] e nos cálculos DFT, que

indicaram um rápido deslocamento de um ânion clorido após a redução do centro metálico Ru (II/I). É possível ver na **Tabela 3.12** (seção 3.4.1.8), um aumento do comprimento de ligação Ru-Cl, indicando que a carga negativa em excesso direcionada para o íon clorido, causou a sua labilização do complexo. Esse resultado mostrou que a coordenação ao redor do Ru é muito instável para o processo de redução. Relata-se ainda a presença de um processo de redução irreversível com baixa corrente em (IV), $E_{pc} = -0,85$ a $-0,97$ V, atribuído à redução de (II/I), do complexo formado com acetonitrila coordenada aos sítios de ligação do rutênio.

Todos os processos redox estão em concordância qualitativa com a estrutura eletrônica determinada por cálculos para o complexo $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})PPh_3Cl_2]$, incluindo a perda do caráter de ligação π ao ligante ($\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}$) ao remover um elétron do orbital HOMO e a indução do caracter σ^* ao adicionar um elétron ao orbital LUMO. Essas hipóteses foram confirmadas ainda a partir de um exame detalhado dos estudos otimizados de DFT dos estados carregados para a estrutura, usando um modelo de solvatação PCM (seção 3.4.1.8).

Estes estudos voltamétricos realizados podem fornecer evidências de uma extensa faixa de estabilidade da janela de potencial, com valores de potencial redox ($\Delta E = 2,43$ a $2,56$ V) (**Tabela 3.13**), definida pela diferença entre E_{pa}^I na região anódica e E_{pc}^V na região catódica. Essa faixa de valores fornece a estabilidade do rutênio no estado de oxidação (2+) quando coordenado com o ligante ($\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}$), sendo esta faixa mais ampla quando comparada à faixa fisiológica de E, entre $\sim +1$ V a -1 V vs. EPH. Assim, espera-se que a série de complexos **1-4** seja estável com o rutênio em seu estado de oxidação 2+ *in vivo*, desde que o ligante ($\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}$) permaneça coordenado^[77].

3.4.1.10 Estudo da variação da velocidade de varredura

Com o objetivo de avaliar a natureza do transporte de material eletroativo para superfície do eletrodo, fez-se o estudo da influência da velocidade de varredura dos complexos da série **1-4**, num intervalo de 50 a 2000 mV s⁻¹, cujos voltamogramas cíclicos para as regiões de pico anódicas e catódicas, estão apresentados nas **Figuras 3.16 a 3.19 (a-b)**. A determinação do processo de transferência de massa é obtida pela correlação entre a intensidade da corrente de pico (I_{pa} ou I_{pc}) e a velocidade de varredura (v) e entre a intensidade da corrente de pico (I_{pa} ou I_{pc}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), cujos gráficos desta última correlação, estão apresentados nas **Figuras 3.16 a 3.19 (c-d)**.

Figura 3. 16: Voltamogramas cíclicos do **1** a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/ CH_3CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag^+ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$)

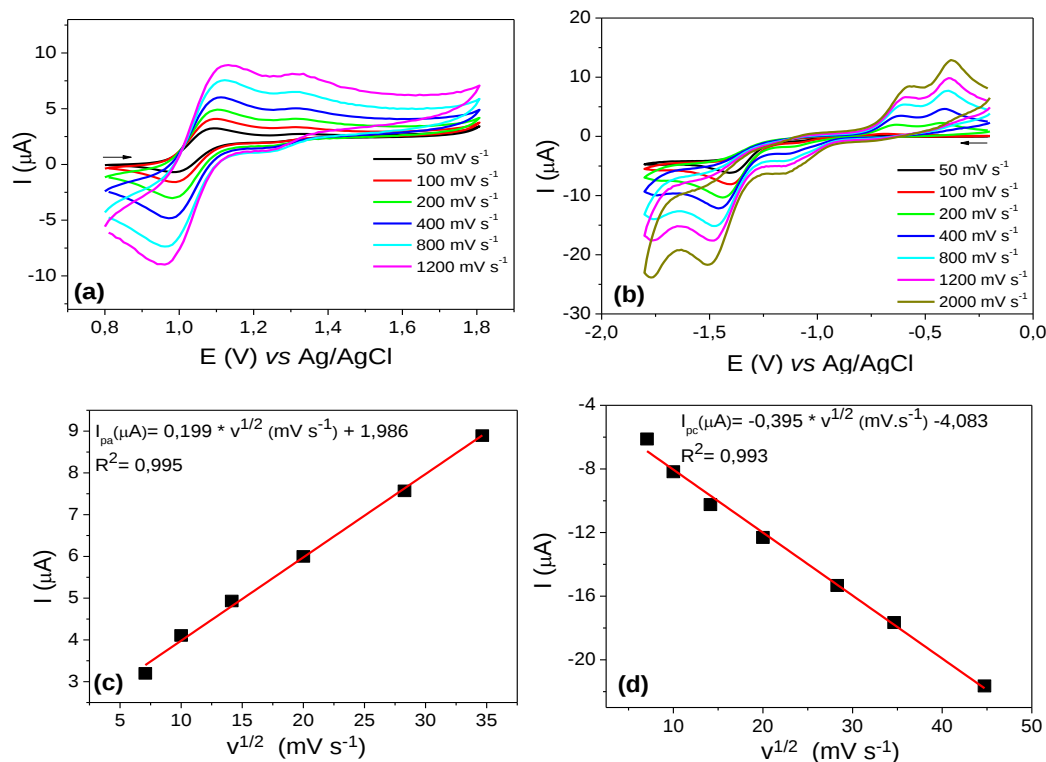


Figura 3. 17: Voltamogramas cíclicos do **2** a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/ CH_3CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag^+ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

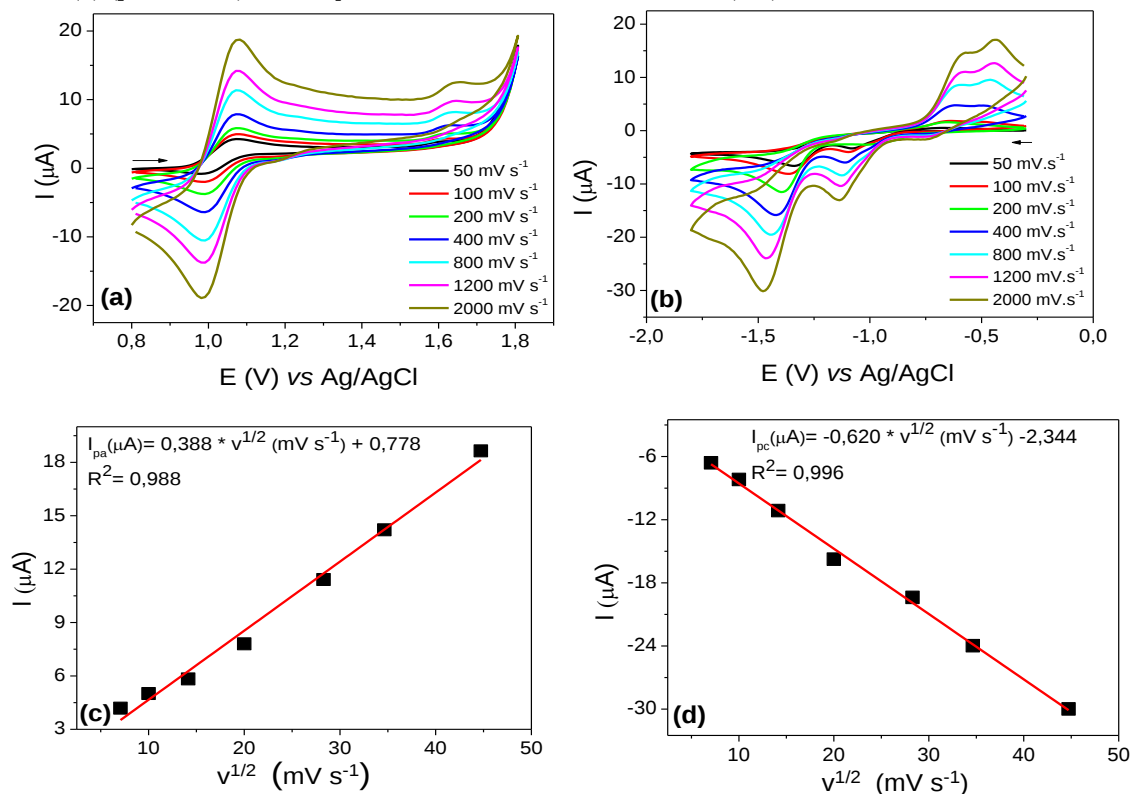


Figura 3. 18: Voltamogramas cíclicos do **3** a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/Ag⁺; obtido de 50 a 2000 mV s⁻¹ em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

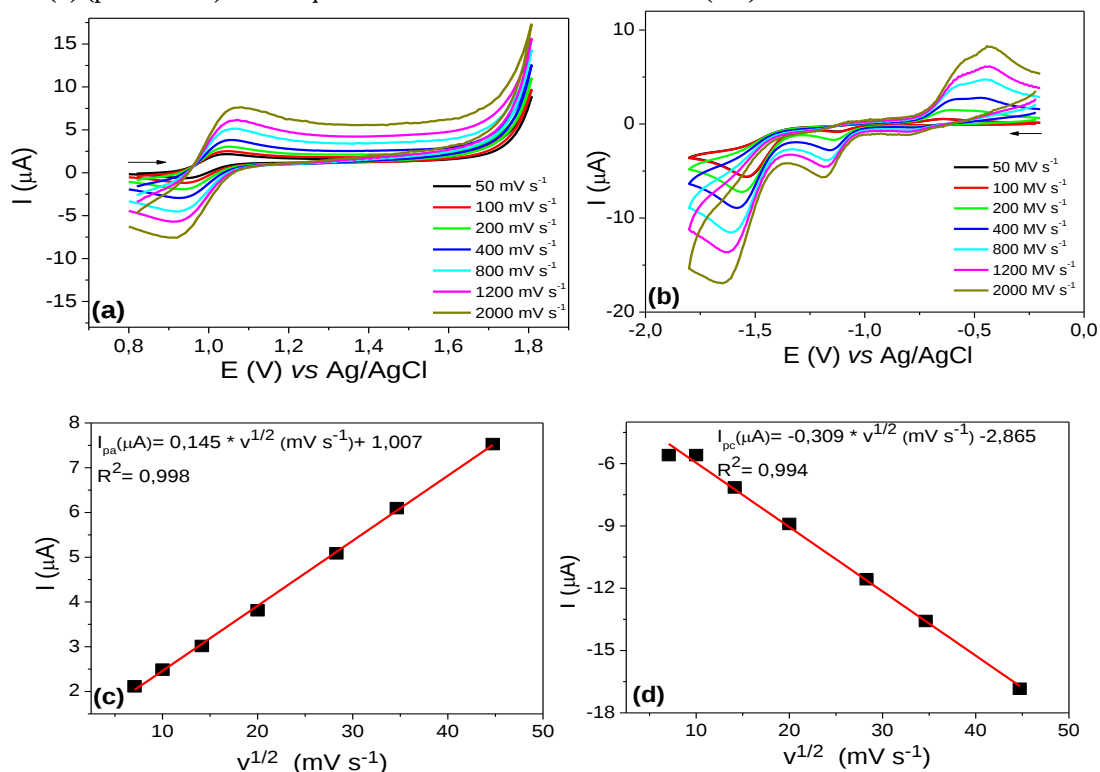
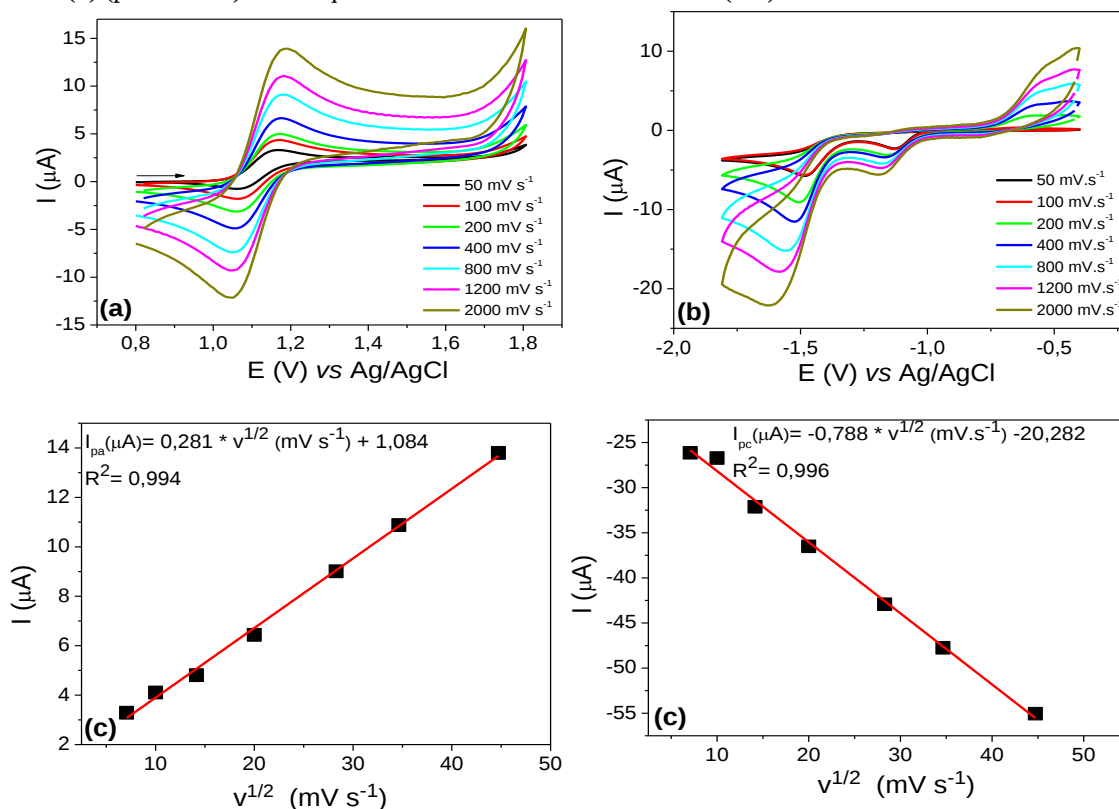


Figura 3. 19: Voltamogramas cíclicos do **4** a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/Ag⁺; obtido de 50 a 2000 mV s⁻¹ em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo I) e correntes catódicas (d) (processo V) vs raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

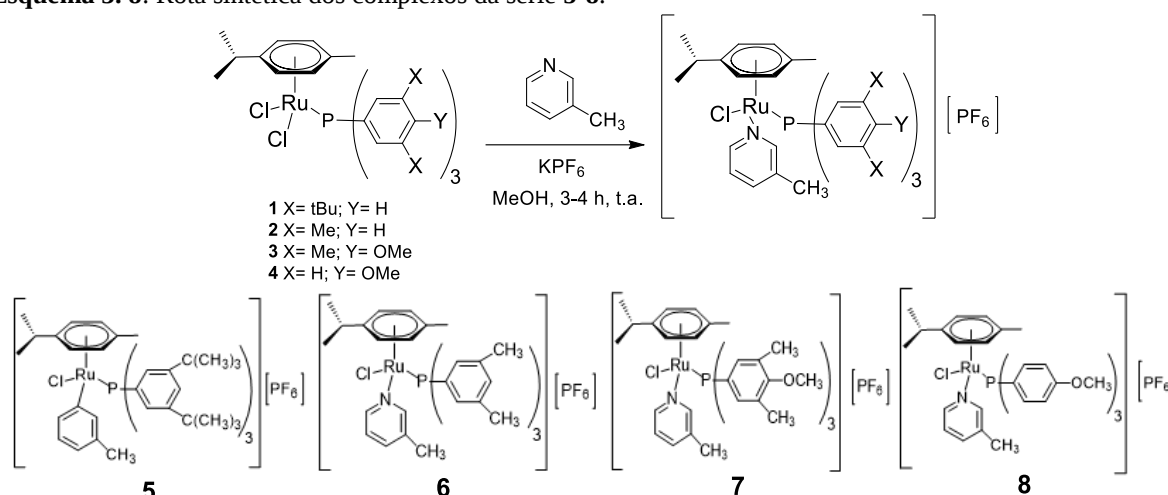


Os resultados obtidos pela correlação I_{pa} ou I_{pc} vs. $v^{1/2}$ evidenciaram que a transferência de massa de todos os complexos em solução até a superfície do eletrodo de trabalho aplicado, ocorre por meio de um processo difusional, para ambas as regiões anódicas e catódicas^[78]. Os gráficos desta correlação confirmam uma boa linearidade observada, cuja a mesma não foi alcançada com a correlação I_{pa} ou I_{pc} vs. v que indicaria um processo adsorptivo de transferência de material eletroativo ao eletrodo. É possível observar ainda pelos voltamogramas representativos das regiões anódicas, que a medida que há o aumento da velocidade de varredura de potencial, ocorre um pequeno deslocamento do pico de oxidação (E_{pa}^I) para potenciais mais positivos, e esta mudança é característica de processos *quasi-reversíveis*^[79].

3.4.2 Complexos da série $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})PAr_3NCl]^+$ (**5-8**)

3.4.2.1 Considerações sobre as sínteses

Os complexos catiônicos de rutênio-areno de fórmula geral $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})PAr_3NCl]^+$ (**5-8**), onde N= 3-metilpiridina, foram obtidos a partir dos complexos fosfínicos $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})PAr_3Cl_2]$ (**1-4**), pela fácil substituição de um dos ligantes cloridos em cada estrutura, segundo rota adaptada da literatura^[43] como mostra o **Esquema 3.8**. As sínteses foram de fácil obtenção, conduzidas em metanol à temperatura ambiente, com bons rendimentos em torno de 67-86%, apresentando-se como sólidos de coloração amarelo-alaranjados, estáveis à luz e ao ar em temperatura ambiente. Todos os complexos são inéditos, não apresentando sua síntese e caracterizações descritas na literatura. A solubilidade desta série de complexos indicou que estes são solúveis em solventes orgânicos como dimetilsulfóxido, acetonitrila, diclorometano e clorofórmio, e praticamente insolúveis em água e éter etílico. Nos demais solventes as solubilidades dos complexos diferem entre si a 25°C, como pode ser notado pela Tabela **A3.21**. Nenhuma mudança de coloração das soluções foi observada, o que pode refletir que não teve degradação destes complexos. Além disso, os **6-8** foram recristalizados preparando soluções concentradas em CH_3Cl e diluídos por difusão, utilizando éter dietílico à temperatura ambiente, num recipiente selado protegido da luz. O **5** foi recristalizado por evaporação lenta em solução de éter etílico. Todos apresentaram alta pureza, evidenciada por espectros de RMN e análise elementar, que foram consistentes com a fórmula proposta para suas estruturas cristalográficas.

Esquema 3. 8: Rota sintética dos complexos da série 5-8.

3.4.2.2 Análise Elementar

A partir dos resultados de análise elementar obtidos pela microanálise dos cristais dos complexos da série 5-8, listados na **Tabela 3.14**, confirmou-se a composição química. Para todos os complexos, os valores teóricos calculados, estão coerentes com os resultados experimentais obtidos pela análise elementar. Para **6** foi necessária a inclusão de uma molécula de solvente CHCl_3 , a qual está presente no cristal obtido para este complexo, conforme os dados de raios X, discutidos mais adiante.

Tabela 3. 14: Valores Experimentais (Exp.) e calculados (Cal.) de análise elementar (C, H) obtidos para 5-8.

Complexo	% C Exp./ Cal.	% H Exp./Cal.	% N Exp./Cal.
5	61,37 / 62,83	6,95 / 7,58	1,30 / 1,26
6	56,89 / 55,46	5,70 / 5,62	1,50 / 1,62
7	55,80 / 54,58	5,52 / 5,71	1,49 / 1,48
8	52,45 / 51,56	4,85 / 4,88	1,76 / 1,62

3.4.2.3 Condutividade molar e estabilidade

Os valores de condutividade molar em acetonitrila em uma concentração de $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, **Tabela 3.15**, indicam que 5-8 são considerados eletrólitos, quando comparados com soluções de eletrólitos 1:1 em acetonitrila ($120 \text{ a } 160 \mu\text{S cm}^{-1}$)^[50]. Estes resultados confirmam a formação dos novos complexos, pois, os mesmos adquirem um caráter catiônico em relação aos seus respectivos complexos precursores (**1-4**) com a labilização de um dos cloridos da estrutura para coordenação do ligante 3-metilpiridina. Para analisar a estabilidade

dos complexos na presença de acetonitrila, foram realizadas medições após 24 h, não observando diferença substancial nos valores de condutividade molar comprovando a estabilidade dos mesmos.

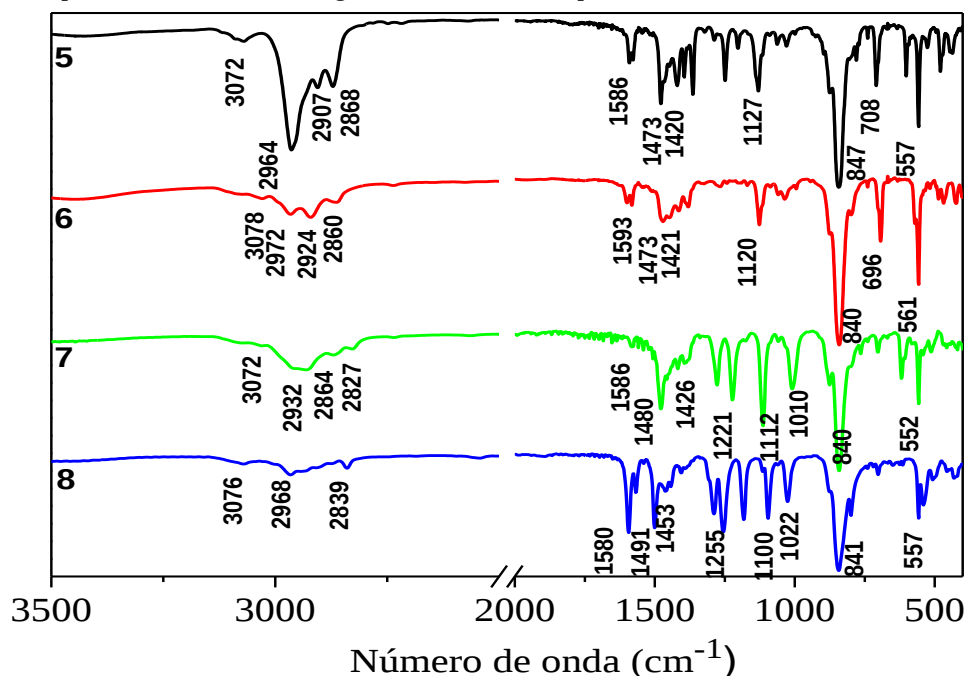
Tabela 3. 15: Valores de condutividade molar para a série de complexos (5-8).

Complexo	$\Lambda_m (\mu S\ cm^{-1}) - 0\ h$	$\Lambda_m (\mu S\ cm^{-1}) - 24h$
5	122,5	126,1
6	124,7	127,5
7	120,4	123,4
8	135,3	140,0

3.4.2.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros na região do Infravermelho para 5-8 obtidos em pastilha de KBr, dispostos na **Figura 3.20**, apresentaram um perfil semelhante com relação as intensidades das bandas entre si, e os modos vibracionais com as principais atribuições dos espectros estão relacionados na **Tabela 3.16**.

Figura 3. 20: Espectros vibracionais na região do infravermelho para 5-8.



De acordo com os espectros de infravermelho, as bandas em altas frequências na faixa entre 3072-3078 cm^{-1} e 2827-2972 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos assimétricos da ligação C-H no plano (ν_{Csp^2-H}) e (ν_{Csp^3-H}), devido a presença dos anéis aromáticos e do grupo

substituinte metil, respectivamente, dos ligantes η^6 -*p*-cimeno, fosfinas PAr_3 e 3-metilpiridina coordenados aos referidos complexos. As bandas correspondentes ao estiramento assimétrico no plano da ligação dupla entre carbonos do anel aromático ($\nu_{\text{asC}=\text{C}}$), são observadas para os complexos em duas bandas com número de onda entre 1420-1491 cm^{-1} [9,55]. As bandas em torno de 1580-1593 cm^{-1} ($\nu_{\text{asC}=\text{N}}$) comprovaram a coordenação do ligante 3-metilpiridina aos complexos organometálicos pelo átomo de N presente no anel[43,80].

Os espectros do **7** e **8** apresentaram duas bandas características para o estiramento assimétrico ($\nu_{\text{asC-O}}$), do substituinte OCH_3 em 1221 e 1255 cm^{-1} e 1010 e 1022 cm^{-1} , respectivamente. As bandas observadas em 1100-1127 cm^{-1} e 552-561 cm^{-1} são referentes aos estiramentos assimétricos da ligação P-C, das fosfinas aromáticas PAr_3 . Para os complexos **5** e **6**, as bandas intensas observadas em 706 e 696 cm^{-1} , são atribuídas à deformação angular ($\delta_{\text{C-H}}$) que identificam o padrão de substituição nos anéis aromáticos dos ligantes fosfinas como *m*-dissubstituídos[54,55,56]. No geral, os espectros dos complexos apresentaram bandas de intensidade forte, que não foram observadas nos espectros de seus precursores (**1-4**), correspondentes ao contra-íon PF_6^- em torno de 840 e 847 cm^{-1} , confirmando a formação dos complexos catiônicos[81,82].

Tabela 3. 16: Atribuição das principais bandas dos espectros FTIR (cm^{-1}) observadas para **5-8**.

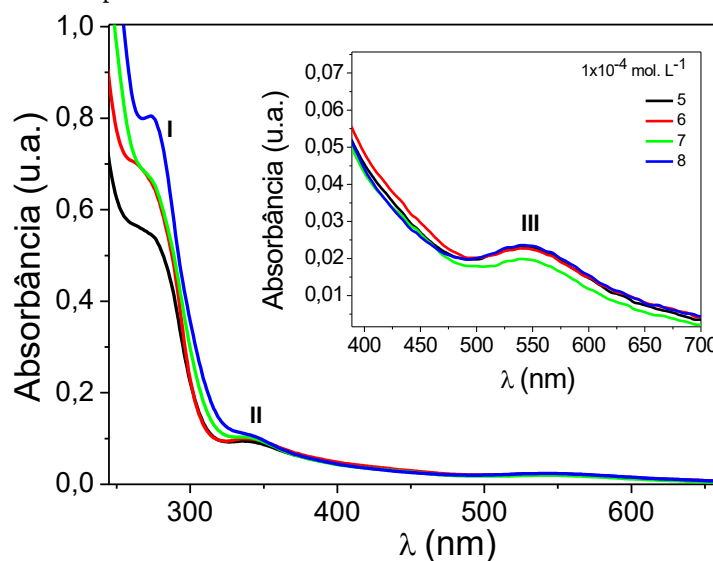
Atribuição	5	6	7	8
$\nu_{\text{asCsp}^2\text{-H}}$	3072	3078	3072	3076
$\nu_{\text{asCsp}^3\text{-H}}$	2964, 2907, 2868	2972, 2924, 2860	2932, 2864, 2827	2968, 2839
$\nu_{\text{asC}=\text{N}}$	1586	1593	1586	1580
$\nu_{\text{asC}=\text{C}}$	1473, 1420	1473, 1421	1480, 1426	1491, 1453
$\nu_{\text{P-C}}$	1127, 557	1120, 561	1112, 552	1100, 557
$\nu_{\text{asC-O}}$	-	-	1010, 1221	1022, 1255
$\nu_{\text{PF}_6^-}$	847	840	840	841
$\delta_{\text{C-H}}$	705	687	-	-

3.4.2.5 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível realizada para os complexos da série **5-8**, em uma concentração de $1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 a temperatura ambiente, permitiram a interpretação das propriedades eletrônicas como mostra os espectros

eletrônicos da **Figura 3.21**. Observa-se que os complexos apresentaram três bandas de absorção pouco definidas, sendo que destas, “ombros” (I, II) na região ultravioleta e visível, e uma banda (III) na região visível dos espectros eletromagnéticos dos quatro complexos. Os valores de comprimento de onda (λ) e valores da absortividade molar ($\epsilon/\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) calculados estão apresentados na **Tabela 3.17**, junto das atribuições para as bandas observadas nos espectros.

Figura 3. 21: Espectros eletrônicos para 5-8 obtidos em $1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 .



Analisando os espectros eletrônicos obtidos para 5-8 constata-se um perfil semelhante entre eles, sendo o "ombro" (I) de alta intensidade na região do ultravioleta do espectro, centrado em cerca de 268-275 nm ($\epsilon = 7000\text{-}8050 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) atribuídos às transições intraligantes $\pi\text{-}\pi^*$ dos ligantes triarilfosfina (PAr_3), ($\eta^6\text{-p-cimeno}$) e 3-metilpiridina coordenados ao centro metálico. O “ombro” localizado em $\lambda = 341 \text{ nm}$ ($\epsilon = 930\text{-}1080 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), foi atribuído às transições de transferência de carga metal-ligante (TCML) do rutênio para orbitais π^* dos ligantes. A atribuição desta banda foi confirmada pelos cálculos teóricos TD-DFT realizados com o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$, onde PPh_3 corresponde a fosfina sem as substituições nos anéis aromáticos e N ao ligante 3-metilpiridina. Constatou-se que a transferência de carga ocorre entre os orbitais HOMO-1/LUMO, sendo o orbital HOMO composto majoritariamente pela contribuição dos orbitais (t_{2g}) do átomo de rutênio e o orbital LUMO com uma maior contribuição dos orbitais π^* do ligante clorido e uma pequena contribuição provinda do ligante $\eta^6\text{-p-cimeno}$ ($\text{HOMO}(\text{Ru}(\text{d})/\text{Cl}(2\text{p})) \rightarrow \text{LUMO}(\pi^*)$).

Uma terceira região de menor energia observada nos espectros eletrônicos com bandas de menor intensidade (III), próximas a $\lambda = 545 \text{ nm}$ ($\epsilon = 190\text{-}230 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) foram atribuídas

às transições nos orbitais ocupados de maior energia t_{2g} e eg do átomo de rutênio, que contribuem para o caráter d-d desta transição. Os baixos valores de absorvidade molar encontrados para os complexos da série, também caracterizam esta transição.

Além disto, os resultados teóricos dos cálculos TD-DFT indicam transições que ocorrem entre os orbitais de fronteira HOMO-LUMO (HOMO(Ru(t_{2g}))→LUMO Ru(eg)), confirmando o caráter d-d dessa transição eletrônica. No entanto, os resultados teóricos indicam a presença de uma pequena contribuição da transição (TCLM) pela excitação eletrônica entre os orbitais (HOMO-2→LUMO), sendo o HOMO-2 constituído por uma contribuição dos orbitais Ru(t_{2g}) do átomo de rutênio e pelos orbitais 2p do ligante clorido, além de uma contribuição mais evidente dos orbitais π do ligante 3-metilpiridina. Já o LUMO, é formado por uma contribuição majoritária dos orbitais antiligantes Ru(eg), desta forma caracterizando a transição (HOMO-2($p\pi$ (3-metilpiridina))→LUMO(Ru(eg)). Teoricamente, essa banda é representada como uma banda de intensidade baixa localizada em 350 nm, sendo omitida no espectro obtido para o cálculo, devido apresentar um efeito eletrônico muito baixo. As atribuições das transições de carga aqui descritas, confirmadas por cálculos teóricos, estão apresentadas na **Figura A3.22**.

Tabela 3. 17: Atribuição das bandas dos espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível da série de complexos **5-8**.

	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	Atribuição
5	275	5430	$\pi \rightarrow \pi^*$
	340	930	TCML
	545	230	Ru($d\pi$)→Ru($d\pi^*$) e TCLM
6	268	7000	$\pi \rightarrow \pi^*$
	340	980	TCML
	545	220	Ru($d\pi$)→Ru($d\pi^*$) e TCLM
7	273	6680	$\pi \rightarrow \pi^*$
	341	1020	TCML
	545	190	Ru($d\pi$)→Ru($d\pi^*$) e TCLM
8	274	8050	$\pi \rightarrow \pi^*$
	341	1080	TCML
	545	230	Ru($d\pi$)→Ru($d\pi^*$) e TCLM

3.4.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

Os dados reportados pelos espectros de RMN 1D (³¹P{¹H}, ¹H e ¹³C{¹H}) puderam confirmar as estruturas da série **5-8** em solução, a partir de sinais característicos e representativos das formulações obtidas. Estabeleceram-se comparações dos valores de

deslocamentos químicos (δ) para a atribuição dos sinais dos espectros desta nova série de complexos com os respectivos precursores (1-4).

Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do 5-8 (**Figura 3.22**) apresentaram um simpleto com deslocamentos químicos próximos entre ($\delta=33\text{-}40$ ppm), atribuído ao átomo de fósforo dos ligantes triarilfosfina PAr_3 . Como enumerado na **Tabela 3.18**, todos estes sinais estão em regiões mais desblindadas quando comparados aos sinais dos respectivos complexos precursores fosfínicos ($\delta=21,93$ a $27,30$ ppm), desta forma, confirmando a mudança de coordenação ao redor do centro metálico e a formação dos novos complexos com o ligante 3-metilpiridina^[47]. Esta desblindagem dos sinais dos complexos com a inclusão de um ligante nitrogenado, pode ser explicada devido à forte interação da ligação Ru-N em relação à interação Ru-P, cuja ligação é enfraquecida. Este efeito será relatado no estudo das estruturas de raios X mais adiante, que podem confirmar a variação dos comprimentos de ligação e um pequeno Efeito *trans* entre esses ligantes. Observa-se um outro sinal na faixa de deslocamento entre $\delta=-131$ a -157 ppm, atribuído ao septeto relacionado ao acoplamento do fósforo com os átomos de flúor do contra-íon PF_6 nas estruturas resultantes^[43].

Figura 3. 22: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da série 5-8 em CDCl_3 (300,13 MHz).

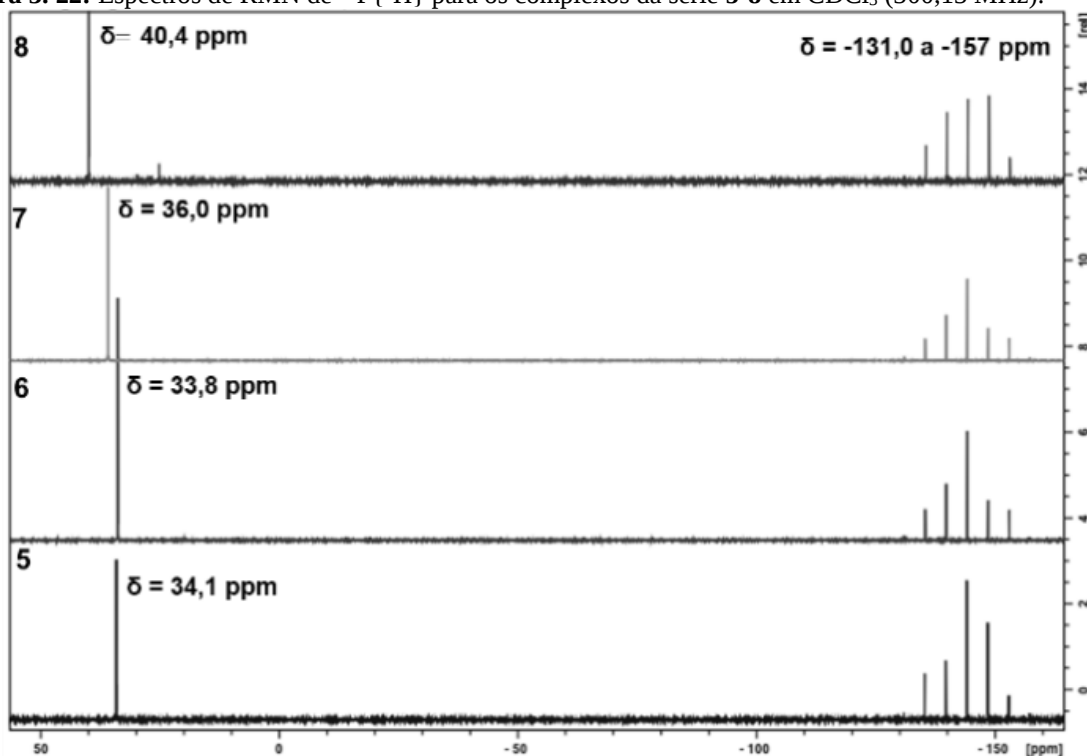
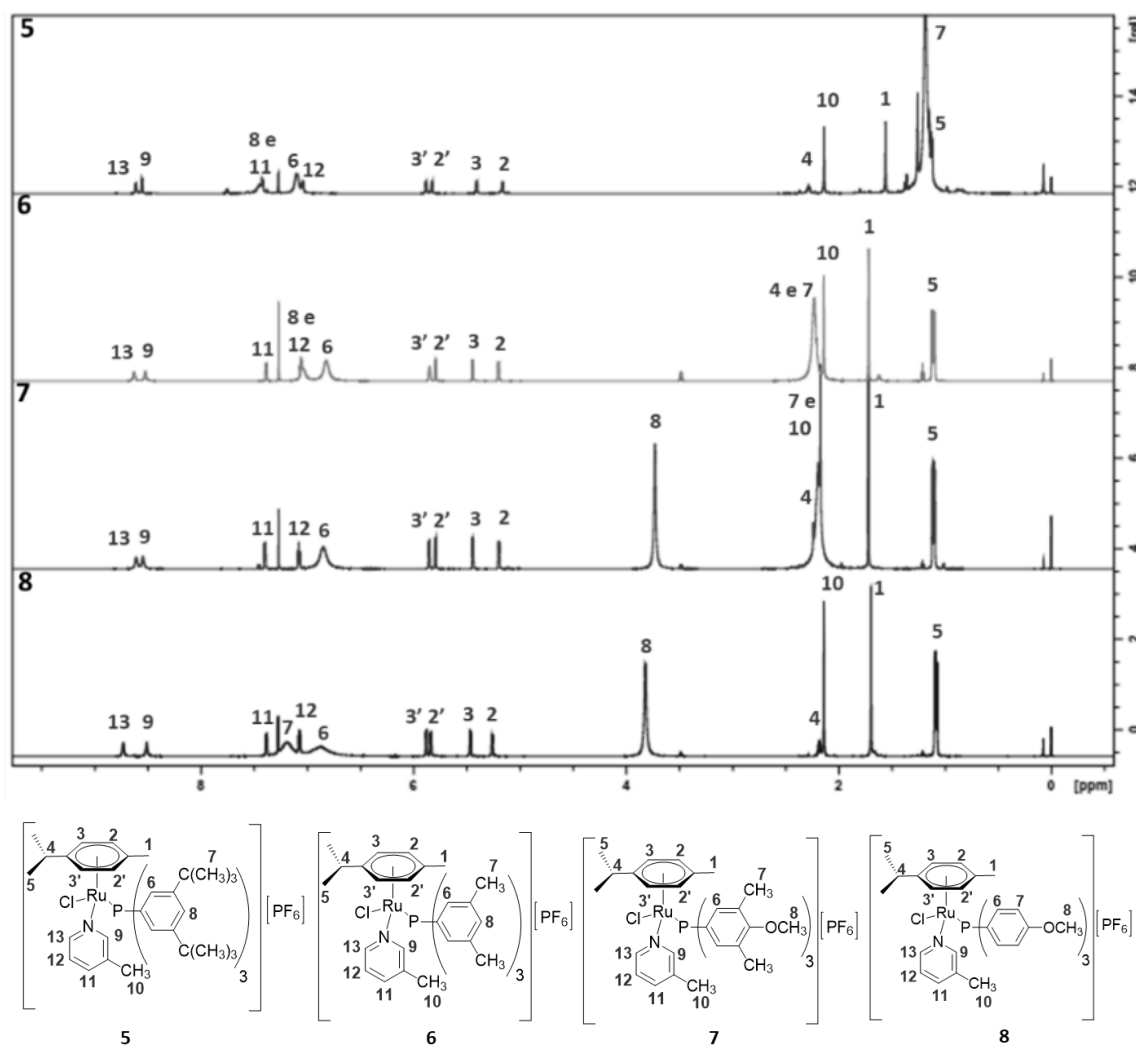


Tabela 3. 18: Deslocamentos químicos (δ) para 5-8 e seus precursores 1-4.

Complexo	δ (ppm)	Complexo	δ (ppm)
1	27,20	5	40,4
2	24,20	6	36,0
3	22,00	7	33,8
4	23,70	8	34,1

A partir da **Tabela 3.18**, nota-se que os deslocamentos químicos entre os complexos seguem a mesma tendência em relação ao substituinte do anel aromático do PAr_3 coordenado. Nos espectros dos complexos com os substituintes retiradores ($-\text{OCH}_3$) no anel aromático, **7** e **8**, os deslocamentos químicos são observados em regiões mais blindadas ($\delta = 33,8$ e $34,1$ ppm, respectivamente), e nos espectros dos complexos com os substituintes doadores ($-\text{CH}_3$) no anel aromático, **5** e **6**, em regiões mais desblindadas ($\delta = 40,4$ e $36,0$ ppm, respectivamente). Esta evidência, como já relatada, é devido ao efeito ressonante do substituinte $-\text{OCH}_3$ que causa o aumento de densidade, blindando os sinais.

Os espectros de RMN de ^1H (**Figura 3.23**) revelam a presença de sinais característicos do ligante (η^6 -*p*-cimeno) ($\text{H} = 1,2,3,4,5$). O conjunto de dupletos (H_2) e (H_3) que se mostram presentes em região desblindada do espectro com deslocamentos químicos na faixa entre 5,16 e 5,46 ppm (H_2 e H_3 , 2H, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 5,88\text{--}6,02$ Hz) são referentes aos prótons aromáticos do ligante (η^6 -*p*-cimeno). Porém, com a coordenação do ligante piridina, surgem mais dois conjuntos de dupletos, os quais estão em ambientes químicos diferentes, sendo eles (H_2') e (H_3') entre 5,82 e 5,87 ppm (H_2' e H_3' , 2H, $^3J_{\text{H}_2'-\text{H}_3'} = 5,81\text{--}6,09$ Hz). Os prótons metílicos (H_1) deste ligante são observados como um simpleto em 1,56-1,71 ppm. Os sinais atribuídos ao substituinte isopropílico do ligante η^6 -*p*-cimeno são observados como duplo dupletos em 1,10-1,13 ppm (6H, $^3J_{\text{H}_4-\text{H}_5} = 5,90\text{--}7,84$ Hz), os quais, correspondem aos prótons metílicos (H_5) e como septetos em 2,18-2,28 ppm, sinal atribuído ao próton metino (H_4)^[9,61,62].

Figura 3. 23: Espectros de RMN de ^1H para **5-8** em CDCl_3 (300,13 MHz).). (Expansão dos sinais ver A3.23)

Os sinais referentes à presença dos ligantes triarilfosfinas PAr_3 aparecem em região mais desblindada dos espectros e variaram de acordo com o substituinte no anel aromático. Os dupletos alargados entre δ 6,82-7,07 ppm e o tripleto em 6,86 ppm (H6), são os sinais mais desblindados devido o acoplamento H-P. Para **7** e **8** um singlete em δ 3,72 e 3,81 ppm (H8), respectivamente, indica a presença do grupo 4-MeO como substituinte no anel aromático. Para **6** e **7** um simpleto em δ 2,22 e 2,17 ppm (H7), respectivamente, confirmam a presença da substituição 3,5-dimetil no anel aromático. O simpleto em δ 1,18 ppm (H7) no espectro do **5** é característico do substituinte t-butil nas posições 3 e 5 do anel^[47,63].

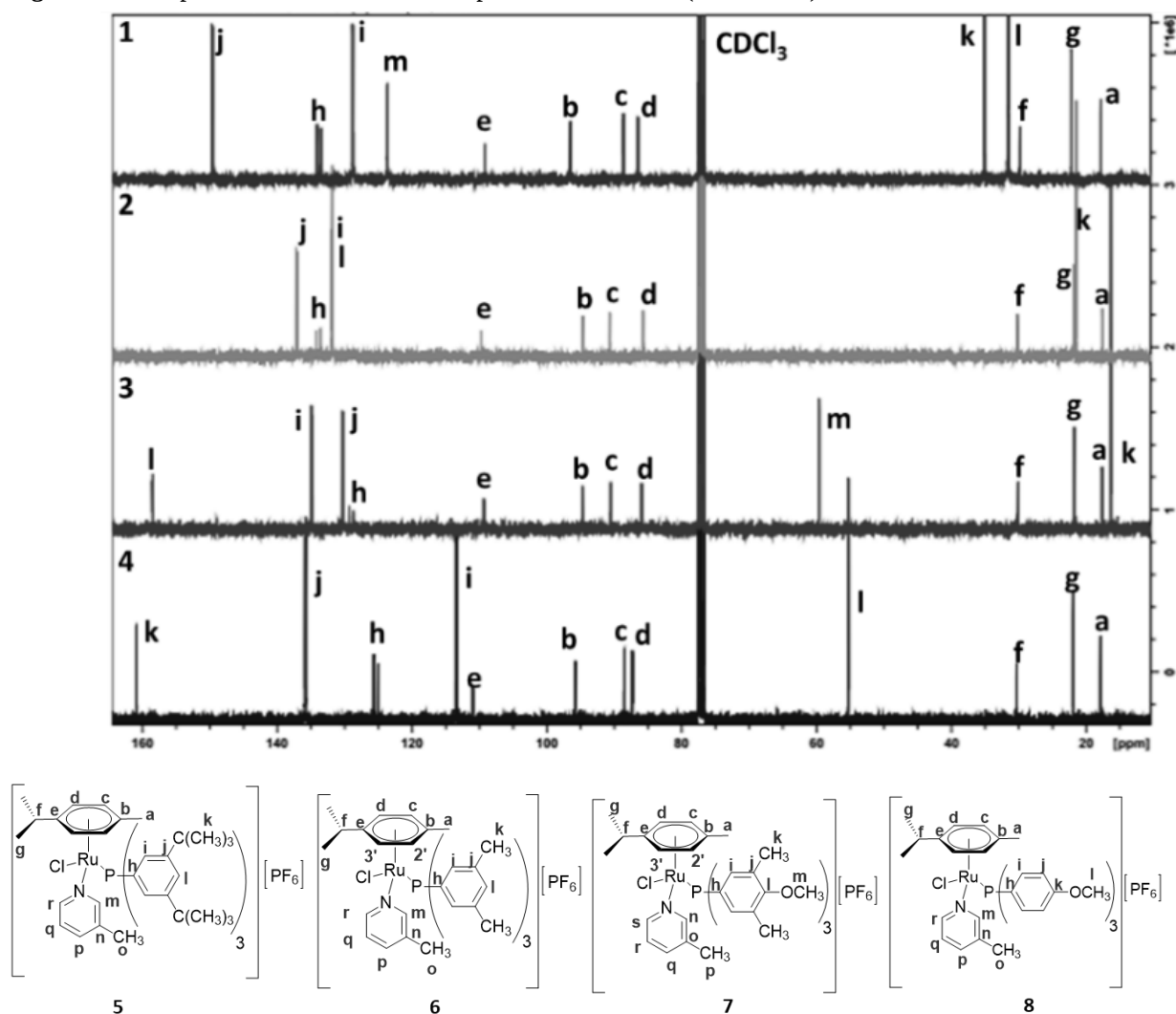
Ao comparar os espectros da série **5-8** e de seus respectivos precursores de reação (**1-4**) (seção 3.4.1.6), observa-se que alguns dos sinais estão deslocados para regiões mais blindadas, como alguns dos prótons do ligante (η^6 -*p*-cimeno) (H1, H4), deslocamento resultante do aumento da blindagem destes hidrogênios pela coordenação com o ligante *N*-heterocíclico, que ocasiona uma aproximação com estes hidrogênios substituintes do ligante. A substituição de

um ligante clorido (doador σ/π), por um ligante *N*-heterocíclico monodentado (receptor π) causou também um efeito de desblindagem dos sinais dos prótons arílicos (H2 e H3) do ligante (η^6 -*p*-cimeno), e a blindagem dos prótons diretamente ligados ao átomo de P da triarilfosfina (H6). Estes deslocamentos, podem ser resultantes do aumento da densidade eletrônica ao redor do centro metálico propiciada pelo novo ligante, fazendo com que ocorra uma maior distribuição de elétrons nestas estruturas, modificando a localização destes sinais. Os sinais mais desblindados de todos os espectros foram atribuídos aos prótons do anel do ligante 3-metilpiridina coordenado, os quais sofrem uma maior desblindagem pela interação com o átomo de nitrogênio. Em relação aos sinais, os hidrogênios (9, 11, 12 e 13) foram atribuídos aos H do anel do ligante, comprovando assim, a coordenação aos complexos obtidos. Ainda verifica-se um sinal em regiões de baixa frequência por volta de 2,13-2,24 ppm (H10), que indica a presença do grupamento CH₃, substituinte do anel aromático piridínico^[43]. Todos os deslocamentos químicos e integrais dos sinais estão dispostos na **Tabela 3.19**. Alguns sinais mesmo não apresentando ambiente químico semelhante, seus deslocamentos químicos coincidem e, portanto, eles são observados no mesmo sinal e estão sobrepostos como multipletos. As atribuições foram então confirmadas pelo valor da integral do sinal.

Tabela 3. 19: Principais deslocamentos químicos (δ = ppm) do RMN de ¹H para os complexos 5-8.

	5	6	7	8
H1	1,56 (s)	1,71 (s)	1,71 (s)	1,69 (s)
H2	5,16 (d)	5,19 (d)	5,19 (d)	5,22 (d)
H2'	5,82 (d)	5,79 (d)	5,79 (d)	5,83(d)
H3	5,40 (d)	5,44 (d)	5,44(d)	5,40 (d)
H3'	5,87(d)	5,84 (d)	5,85 (d)	5,86 (d)
H4	2,28 (sept)	2,21(sept)	2,19 (sept)	2,18 (sept)
H5	1,13 (dd)	1,10(dd)	1,10 (dd)	1,08(dd)
H6	7,07 (d) alargado	6,82 (d) alargado	6,84 (d) alargado	6,86 (t)
H7	1,18 (s)	2,22 (s)	2,17 (s)	7,18 (d)
H8	7,45 (s)	7,03 (s)	3,72 (s)	3,81 (s)
H9	8,55 (s)	8,52 (s)	8,54 (s)	8,51 (s)
H10	2,14 (s)	2,14 (s)	2,23 (s)	2,13 (s)
H11	7,42 (d)	7,38 (d)	7,39 (d)	7,37 (d)
H12	7,04 (t)	7,06 (t)	7,07 (t)	7,07 (t)
H13	8,62 (d)	8,62 (d)	8,60 (d)	8,72 (d)

Os espectros de RMN de ¹³C{¹H} da série 5-8, **Figura 3.24**, comprovam a partir das atribuições dos sinais observados, as estruturas propostas para estes complexos.

Figura 3. 24: Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para 5-8 em CDCl_3 , (75,18 MHz).

Todos os sinais e atribuições dos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos da série 5-8 foram confirmadas pelos espectros de RMN 2D (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C gHSQC e ^1H - ^{13}C gHMBC) apresentados no A3.24, nos quais, podem ser analisados os principais acoplamentos que auxiliaram no estudo e confirmação das estruturas.

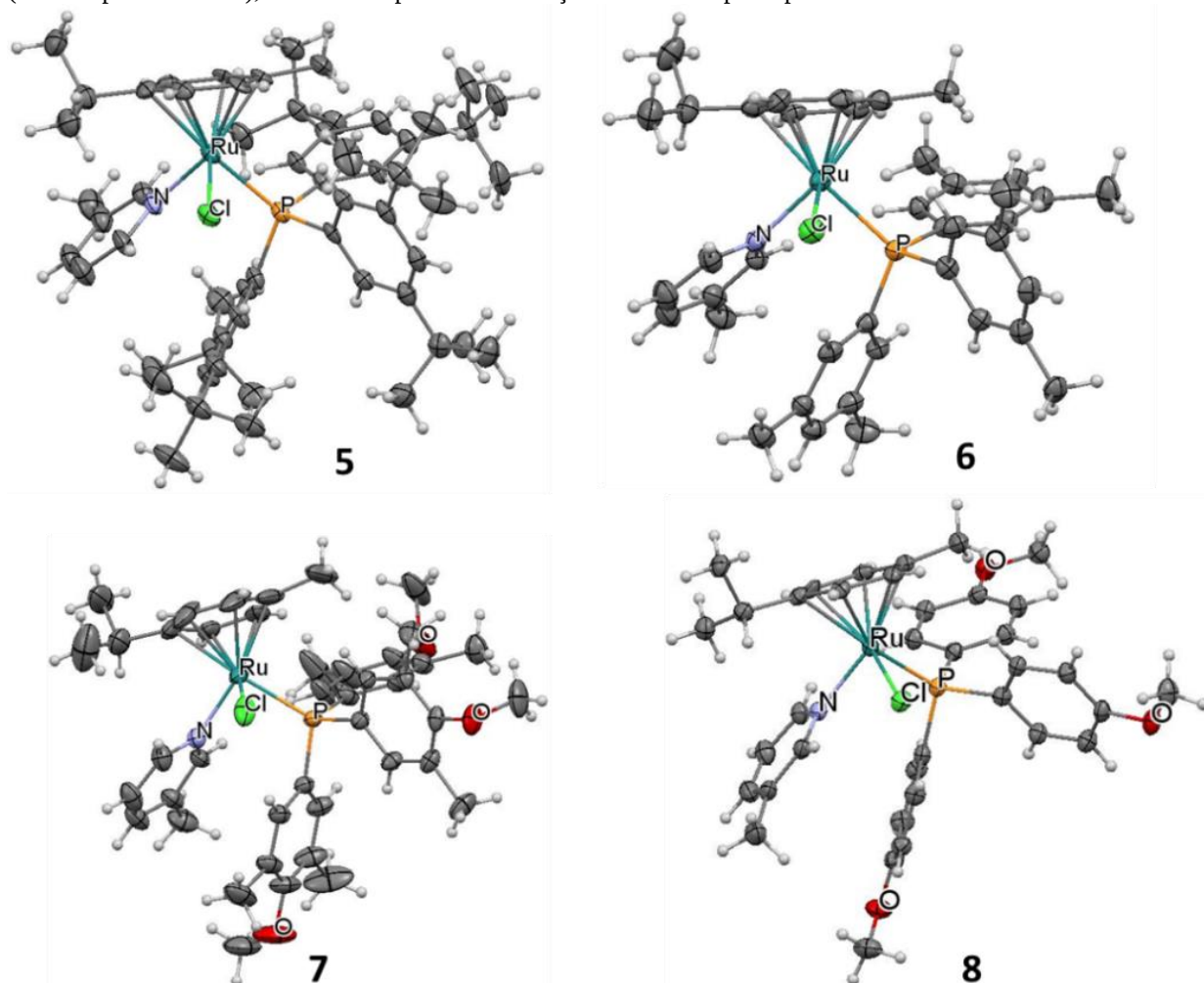
3.4.2.7 Difratometria de raios X de monocristal

Os monocristais da série 5-8 foram obtidos de duas formas diferenciadas, sendo os cristais dos 6-8 obtidos por difusão de vapor de éter dietílico em uma solução concentrada em CHCl_3 em um tubo selado, em temperatura ambiente. Os cristais do 5 foram obtidos por evaporação lenta de uma solução de metanol, em temperatura ambiente. Os principais parâmetros cristalográficos de refinamento para estas estruturas são fornecidos na Tabela 3.20 e as geometrias dos complexos catiônicos são ilustradas por seus ORTEP na Figura 3.25.

Tabela 3. 20: Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento dos 5-8.

Complexo	5	6	7	8
Fórmula empírica	C ₅₈ H ₈₄ ClF ₆ NP ₂ Ru	C ₄₁ H ₄₉ Cl ₄ F ₆ NP ₂ Ru	C ₄₃ H ₅₄ ClF ₆ NO ₃ P ₂ Ru	C ₃₇ H ₄₂ ClF ₆ NO ₃ P ₂ Ru
Peso Molecular	1107,72	974,62	945,33	861,17
T/K	100,0(3)	116,2(7)	116,1(3)	99,97(16)
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P-1	P2 ₁ /c	P-1
a/Å	15,49034(13)	15,7484(3)	19,4768(2)	11,2877(2)
b/Å	19,01025(14)	16,5043(3)	12,2566(10)	11,4003(3)
c/Å	39,7747(5)	16,7772(3)	18,8447(2)	16,5321(4)
α/°	90	79,2390(10)	90	84,037(2)
β/°	92,6841(9)	88,1370(10)	106,760(10)	76,216(2)
γ/°	90	85,2890(10)	90	62,869(2)
Volume/Å³	11699,81(19)	4268,85(14)	4307,50(8)	1838,76(8)
Cela unitária Z	8	4	4	2
ρ_{calc}/cm³	1,258	1,516	1,458	1,555
μ/mm⁻¹	3,551	6,475	4,780	5,539
F(000)	4672,0	1992,0	1952,0	880,0
Tamanho do cristal/mm³	0,15 × 0,11 × 0,1	0,3 × 0,09 × 0,08	0,2 × 0,2 × 0,02	0,19 × 0,182 × 0,04
Radiação	CuK α (λ = 1,5418)	CuK α (λ = 1,5418)	CuK α (λ = 1,5418)	CuK α (λ = 1,5418)
Limites de 2θ para coleta de dados /°	6,436 to 159,622	6,916 a 161,298	8,634 a 160,792	8,716 a 159,992
Índices	-19 ≤ h ≤ 16, -23 ≤ k ≤ 23, -48 ≤ l ≤ 50	-18 ≤ h ≤ 20, -21 ≤ k ≤ 20, -21 ≤ l ≤ 21	-24 ≤ h ≤ 24, -14 ≤ k ≤ 15, -24 ≤ l ≤ 23	-10 ≤ h ≤ 14, -14 ≤ k ≤ 14, -21 ≤ l ≤ 21
Reflexões coletadas	131633	104980	70754	39413
Reflexões independentes	25198 [R _{int} = 0,0854, R _{sigma} = 0,0526]	18462 [R _{int} = 0,0544, R _{sigma} = 0,0283]	9390 [R _{int} = 0,0432, R _{sigma} = 0,0233]	7896 [R _{int} = 0,0418, R _{sigma} = 0,0288]
Dados/limitações/parâmetros	25198/1368/1357	18462/0/1011	9390/615/551	7896/0/467
Refinamento (F²)	1,028	1,096	1,027	1,062
R Índices finais [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0,0678, wR ₂ = 0,1474	R ₁ = 0,0651, wR ₂ = 0,1741	R ₁ = 0,0602, wR ₂ = 0,1392	R ₁ = 0,0444, wR ₂ = 0,1281
R Índices finais [todos os dados]	R ₁ = 0,0841, wR ₂ = 0,1556	R ₁ = 0,0771, wR ₂ = 0,1885	R ₁ = 0,0633, wR ₂ = 0,1413	R ₁ = 0,0459, wR ₂ = 0,1294
Max, min residual / e Å⁻³	0,90/-2,14	3,48/-2,03	1,58/-1,81	1,96/-1,45

Figura 3. 25: Representação das estruturas catiônicas dos **5-8** pelo programa ORTEP. Elipsóides de Deslocamento (50% de probabilidade), mostrando apenas a numeração dos átomos principais.



A partir das estruturas refinadas por difratometria de raios X para **5-8** observa-se que todas apresentaram semelhanças em suas redes cristalinas, assim como relatado para seus complexos precursores (**1-4**), confirmando a estrutura, composição e pureza das mesmas, podendo correlacionar as caracterizações espectroscópicas realizadas em solução e estado sólido. Foi possível definir a coordenação *pseudo*-octaédrica esperada para os complexos de rutênio-areno, como ilustrado na **Figura 3.26**, em uma geometria mais comparável a um “*piano stool*”, com o anel aromático do ligante (η^6 -*p*-cimeno) ocupando três sítios de coordenação do rutênio (hapticidade η^6), as triarilfosfinas (PAr_3) e 3-metilpiridina coordenadas de forma monodentada pelo átomo de P e N, respectivamente, e um ligante clorido ocupando outro sítio de coordenação *pseudo* octaédrica na molécula^[43,65].

As estruturas desta série de complexos apresentaram alguns distúrbios estruturais, sendo as do **5** e **6** mais evidentes devido à presença dos ligantes volumosos (**L1** e **L2**). O fato da desordem em suas estruturas cristalinas deve-se às duas estruturas independentes com $Z' = 2$.

No **5**, por consequência da lipofilicidade, pequenas forças podem induzir posições alternativas dos átomos nas estruturas das moléculas. Verifica-se também uma desorganização do íon PF_6 , o qual, é tão pequeno se comparado ao tamanho do complexo metálico com a fosfina. Na estrutura do **6** percebe-se que o complexo principal parece estar totalmente 'ordenado', e com o surgimento de resíduos de solvente na segunda estrutura, resultante da cristalização com CHCl_3 . As estruturas para o **7** e **8** são organizadas, sendo todos os átomos corretamente arranjados em suas redes cristalinas. Os principais parâmetros geométricos como comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados, estão resumidos na **Tabela 3.21**.

Tabela 3. 21: Comprimentos e ângulo de ligações na estrutura de raios X dos principais átomos das estruturas dos complexos **5-8**.

Comprimentos de ligação (Å)				
	5 ^a	6 ^a	7	8
Ru1-P1	2,3703(11)	2,3706(11)	2,3501(9)	2,367(8)
Ru1-Cl1	2,3892(11)	2,3979(11)	2,3899(12)	2,395(8)
Ru1-N1	2,148(4)	2,136(4)	2,125(3)	2,146(3)
Ru1-cAr	2,228(4)	2,223(4)	2,231(4)	2,228(3)
P1-C11	1,829(4)	1,832(5)	1,828(4)	1,825(3)
P1-C21	1,836(4)	1,842(5)	1,829(3)	1,831(3)
P1-C31	1,829(4)	1,833(4)	1,827(4)	1,830(3)
Ângulos de ligação ($^\circ$)				
	5 ^a	6 ^a	7	8
N1 Ru Cl1	90,72(11)	87,41(11)	87,18(9)	87,96(8)
N1 Ru P	87,50(10)	89,01(11)	90,11(8)	87,98(8)
P1 Ru Cl1	83,36(4)	87,22(4)	84,86(3)	86,83(3)
C11 P1 Ru1	116,52(14)	113,83(15)	117,50(11)	115,68(11)
C21 P1 Ru1	113,55(14)	114,11(14)	114,77(12)	114,47(10)
C31 P1 Ru1	113,48(15)	114,98(16)	114,21(13)	114,83(11)

^aValores relatados para uma das moléculas independentes na unidade assimétrica.

A partir dos dados da **Tabela 3.21** observou-se que as distâncias da ligação Ru-P variaram de 2,3501(9) a 2,3706(11) Å, e estão na faixa dos valores encontrados para complexos com ligantes análogos com valores de 2,379(10)^[43] e 2,3031(5)^[83]. Pode-se observar ainda que

os ângulos da ligação N1-Ru-Cl1, P1-Ru-Cl1, N1-Ru-P1, em aproximadamente 90 Å, que confirmam a geometria *pseudo*-octaédrica distorcida dos complexos rutênio-areno e seus ligantes. As médias das distâncias da ligação Ru-C no anel (η^6 -*p*-cimenos) para os complexos também são semelhantes, podendo atribuir à planaridade do anel deste ligante, como evidenciado por Pastusko e colaboradores^[9], com valores médios de 2,180(3) Å e por Biancalana e colaboradores^[65] com valores médios de 2,210(3)-2,224(10) Å.

Percebe-se que à medida que o comprimento da ligação Ru-P aumenta, há um encurtamento da ligação Ru-N, proporcionado por um pequeno efeito *trans* entre os ligantes nas estruturas. Estes valores podem ser encontrados para complexos do tipo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{PPh}_3(\text{N})(\text{Cl})]$, com valores de comprimentos de ligação Ru-N e Ru-P de 2,135(6)-2,147(3) Å e 2,373(3)-2,381(14) Å, respectivamente^[43]. Este efeito pode ser correlacionado com o deslocamento químico no RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para esta série de complexos em relação aos seus complexos precursores. Estes dados correlacionam com os valores dos deslocamentos químicos dos fósforos no **5-8**, os quais estão em regiões mais desblindadas dos espectros, e isto, é resultante da forte interação da ligação Ru-N, o que faz com que os núcleos de fósforos fiquem mais desprotegidos.

3.4.2.8 Cálculos de DFT para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimenos})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$

Simulações computacionais baseadas em cálculos da Teoria Funcional da Densidade (DFT) no nível de teoria UB3LYP/6-31+G(d), SPK-DZCD, foi realizada com o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimenos})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$, onde: PPh_3 = triarilfosfina não substituída e N = 3 metilpiridina. Essa estrutura foi selecionada com objetivo de reduzir o custo computacional, apresentando uma estrutura mais simples em relação aos complexos da série **5-8**, com a presença dos ligantes PAr_3 3,5-dissubstituídos. A fim de validar o uso desse modelo, os resultados teóricos foram comparados com as medidas experimentais das estruturas complexas de **5-8**, onde observou-se que tanto a geometria molecular quanto os espectros de absorção eletrônica foram bem descritos pelo modelo escolhido. Assim, justifica-se a utilização do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimenos})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$, para descrever níveis eletrônicos, características dos orbitais moleculares de fronteira e distribuição da densidade de carga.

A geometria molecular do complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimenos})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$ foi otimizada em relação a energia total do sistema. Posteriormente, considerou-se as diferentes formas catiônicas para o complexo mediante a retirada (inserção) de um elétron de forma a representar os estados de oxidação Ru(III) e Ru(I). Essas simulações foram desenvolvidas com

objetivo de descrever os processos de oxirredução envolvendo as espécies Ru(II/I) e Ru(II/III), respectivamente. O objetivo principal foi descrever as modificações na coordenação ao redor do átomo de rutênio, a partir dos comprimentos e ângulos de ligação, cujos parâmetros encontrados estão dispostos na **Tabela 3.22**.

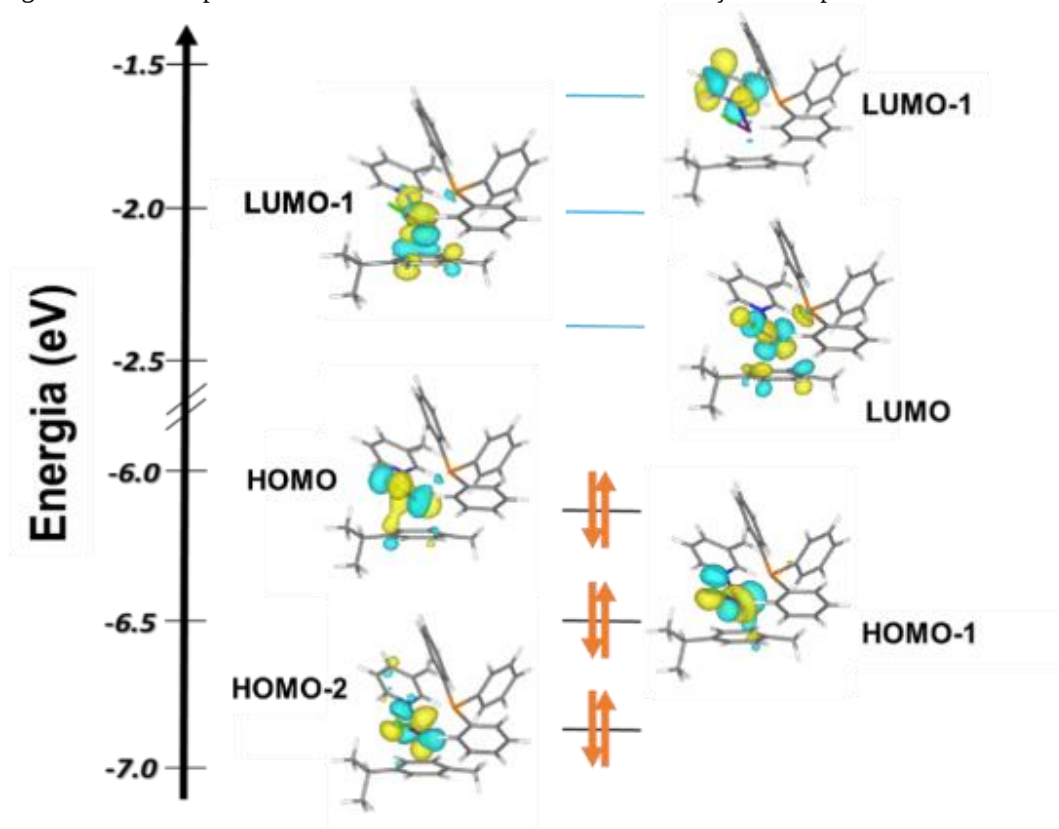
Tabela 3. 22: Geometrias moleculares analisadas para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$ em diferentes estados oxidados. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$).

Comprimento de ligação (Å)			
	Ru(II)	Ru(III)	Ru(I)
Ru-Cl	2,505	2,368	4,497
Ru-N	5,160	2,130	2,153
Ru-P	2,492	2,514	2,478
Ru-C₆	2,334	2,469	2,334
P-C	1,889	1,877	1,891
Ângulo de ligação ($^\circ$)			
	Ru(II)	Ru(III)	Ru(I)
Cl-Ru-N	90,381	95,159	78,813
Cl-Ru-P	85,072	85,770	87,497
N-Ru-P	90,022	87,866	92,632

No estado neutro (18 elétrons), o complexo apresenta a estrutura com maior estabilidade. O aumento da carga catiônica (17 elétrons), pode ser entendido como um processo de oxidação do centro de Ru (II/III) causando poucas alterações nos comprimentos de ligação entre os átomos de Ru-Cl, Ru-P e Ru-C₆. Além disso, observou-se que os ângulos de ligação são pouco alterados, sugerindo que a geometria molecular do complexo se mantém estável no processo de oxidação. Porém, para a espécie reduzida (19 elétrons), o processo está associado à redução Ru (II/I) e pode ser explicado pela adição de elétrons ao orbital LUMO, que é fortemente associado a ligação Ru-Cl tendo caráter σ^* , formando o complexo aniônico. No entanto, a localização dessa carga negativa não ocorre preferencialmente no rutênio, assim como visto para os complexos da série **1-4** devido à sua baixa eletronegatividade. Por outro lado, a **Tabela 3.22**, indica que o comprimento de ligação Ru-Cl é maior, indicando que a carga negativa em excesso é direcionada para o íon clorido devido sua alta eletronegatividade, causando a labilização do mesmo. Assim, durante o processo de redução a geometria do complexo se torna muito instável, de forma que a estabilidade seja reestabelecida mediante a labilização do ligante clorido na estrutura.

As energias e topologias dos orbitais moleculares de fronteira (FMOs) para estes complexos (**5-8**), estão representadas na **Figura 3.26**.

Figura 3. 26: Orbitais moleculares de fronteira e níveis de energia para o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$, em fase gasosa obtidos a partir dos cálculos DFT/TZVP/RPE0 com correção de dispersão.



Nota-se da **Figura 3.26** que os orbitais ocupados de maior energia (HOMO, HOMO-1 e HOMO-2) apresentam uma contribuição majoritária dos orbitais 3d dos átomos de Ru (55,4; 58,5 e 65,2 %, respectivamente) associados com os orbitais Cl $p\text{-}\pi^*$ (21,2; 21,1 e 13,6 %, respectivamente) e, em menor extensão, dos ligantes ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$) π^* e 3-metilpiridina. Além disso, notou-se que a diferença de energia desses orbitais molecular é pequena, correspondendo aproximadamente ao conjunto dos orbitais degenerados $\text{Ru}(t_{2g})$ com contribuições do par de elétrons do ligante clorido.

Os orbitais moleculares desocupados de menor energia LUMO e o LUMO + 1 são formados majoritariamente pela contribuição dos estados eletrônicos associados à ligação Ru- $p\text{-cimen}$ π^* e Ru-Cl σ^* . Para LUMO, a composição foi calculada como Ru d (53,5 %), Cl p (10,0 %) e $p\text{-cimen}$ (18,8%), enquanto o LUMO + 1 foi descrito como composição mista de Ru d (53,4 %) e $p\text{-cimen}$ (24,8%), com pequenas contribuições oriundas das interações Ru(eg)-N σ^* (7,7%). Esses dois MOs correspondem aproximadamente ao conjunto de orbitais Ru(eg). O orbital LUMO+2, demonstra uma contribuição majoritária dos orbitais do ligante 3-metilpiridina π^* (85,1%).

3.4.2.9 Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos do **5-8** foram registrados em eletrodo de carbono vítreo em solução de PTBA/ CH_3CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (vs. Ag/AgCl) e estão apresentados na **Figura 3.27**, onde pode perceber uma semelhança no perfil apresentado por todos os complexos da série. Em potenciais anódicos são apresentados um processo redox *quasi*-reversível (**I**) e um processo de oxidação irreversível (**II**). Em potenciais catódicos é possível constatar a presença de um processo de redução irreversível (**III**) e outro de oxidação irreversível (**IV**). Os valores dos potenciais para todos os complexos da série **5-8** estão dispostos na **Tabela 3.23**.

Figura 3. 27: Voltamogramas cíclicos para **5-8** a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila vs Ag/AgCl ; obtido em 100 mV s^{-1} .

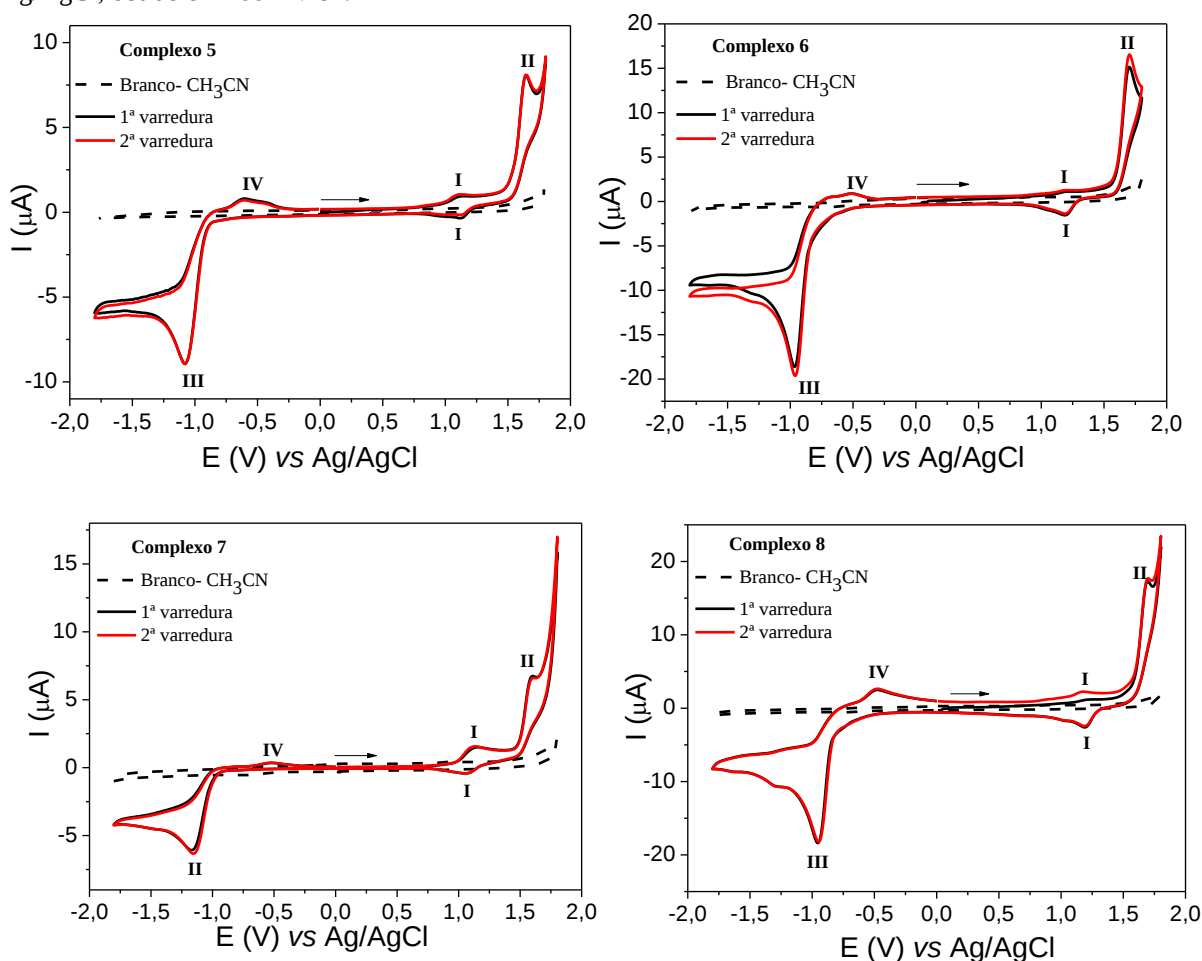


Tabela 3. 23: Valores dos potenciais (V) e outros dados obtidos dos voltamogramas cíclicos dos complexos 5-8

	E_{pa}^I	E_{pc}^I	$E_m^{I\ a}$	I_{pa}/I_{pc}^I	$\Delta E_p^{I\ b}$	E_{pa}^{II}	E_{pc}^{III}	E_{pa}^{IV}	ΔE^c
5	1,11	1,04	1,07	0,20	0,07	1,64	-1,08	-0,60	2,72
6	1,21	1,16	1,18	1,08	0,05	1,67	-0,97	-0,51	2,67
7	1,13	1,07	1,10	0,25	0,06	1,61	-1,14	-0,57	2,75
8	1,15	1,12	1,13	1,09	0,03	1,65	-1,08	-0,58	2,73

^a $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$; ^bMedida pela diferença entre E_{pa} e E_{pc} ; ^cMedido pela diferença entre E_{pa}^{II} e E_{pc}^{III} .

Baseado nos voltamogramas da **Figura 3.27**, relata-se que na região anódica há um processo redox *quasi*-reversível (E_{pa}^I/E_{pc}^I) atribuído à oxirredução centrada no par Ru^{II}/Ru^{III} dos complexos, devido à remoção de um elétron do orbital HOMO, com valores de potenciais que variam de $E_{pa} = +1,11$ a $E_{pc} = +1,16$ V, e $E_{1/2} = 1,07$ a $1,18$ V. Esta atribuição foi baseada em resultados relatados na literatura, como para os complexos $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})PCl_2]$, onde $P = PPh_3$ com valores de potenciais na faixa de $E_{1/2} = 1,11$ a $1,15$ V^[35], $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})NCl_2]$ onde $N = dpa = 2,20$ -dipiridilamina e $dpb = di\text{-}2\text{-piridilbenzilamina}$, com $E_{1/2} = 0,72$ a $0,82$ V^[62] e $[RuCp(PPh_3)_2L][PF_6]$ onde $L = 5\text{-fenil-1H-tetrazol (TzH)}$ e $imidazol (ImH)$, com $E_{1/2} = 1,06$ a $1,24$ V^[84].

O processo de oxidação irreversível em maiores potenciais nos voltamogramas E_{pa}^{II} 1,61 a 1,70 V, pode estar correlacionado à oxidação do ligante ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$) coordenado ao centro metálico. Os resultados teóricos, apresentados anteriormente, indicam que o comprimento da ligação $Ru\text{-}C_6$ apresenta um encurtamento durante o processo de oxidação $Ru(II/III)$, variando de 2,334 para 2,469 Å. Esta pequena variação indica que o ligante ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$), é afetado durante o processo de oxidação sem labilizar da esfera de coordenação dos referidos complexos. Outra confirmação deste efeito, é que não foi observado nenhum outro processo de formação de uma nova espécie em CH_3CN , como para a série **1-4**, para a qual, foi sugerido e confirmado a labilização do ligante areno.

Através dos cálculos de DFT (seção 3.4.2.8), o orbital HOMO tem uma combinação dos caracteres $Ru\ d$ e $Cl\ p\text{-}\pi^*$. A oxidação deve fortalecer significativamente a ligação $Ru\text{-}Cl$ e ter um pequeno efeito enfraquecedor na ligação ao ($\eta^6\text{-}p\text{-cimen}$), porém, não o suficiente para causar a labilização deste ligante, como já evidenciado. Na oxidação, a molécula foi estável em alta faixa de potencial voltamétrico, enquanto que, no sentido da redução, a molécula sofreu modificação.

As varreduras na região catódica mostram uma redução quimicamente irreversível (**III**), E_{pc} de -0,97 a -1,18 V, que então induz a re-oxidação fortemente compensada em (**IV**) com E_{pa} = -0,51 a -0,60 V, atribuídas ao processo Ru(II/I). As atribuições destes processos foram baseadas nos resultados obtidos para série **1-4**, em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa^[51] e nos cálculos de DFT, que indicaram um rápido deslocamento de um ânion clorido após a redução do centro metálico Ru(II/I). É possível ver na **Tabela 3.22** (seção 3.4.2.8), um elevado comprimento de ligação Ru-Cl, indicando o enfraquecimento desta, com a sua labilização do complexo, devido a carga negativa em excesso direcionada para o íon clorido. Esse resultado mostrou que a coordenação ao redor do Ru é muito instável para o processo de redução descrito.

Ao comparar os potenciais redox da série **5-8** em relação aos seus precursores (**1-4**), percebe-se algumas diferenças nos potenciais E_{pa}^{II} , E_{pc}^{III} e E_{pa}^{II} , E_{pc}^V , respectivamente. O processo E_{pa}^{II} referente à oxidação do ligante η^6 -*p*-cimeno ocorre em potenciais mais positivos para a série **1-4**, assim como o processo E_{pc}^V , atribuído à redução centrada em Ru(II/I), que ocorre em potenciais menos negativos, como relata a **Tabela 3.24**. Estas variações podem ser devido à coordenação do ligante 3-metilpiridina, o qual aumenta a densidade eletrônica ao redor do centro metálico, neste caso, facilitando sua oxidação. Para o ligante (η^6 -*p*-cimeno), o qual é doador π /receptor σ , este aumento de densidade de elétrons na estrutura, faz com que a oxidação ocorra em potenciais menores.

Tabela 3. 24: Comparação dos processos anódicos e catódicos (V) das séries de complexos estudadas neste trabalho.

Complexo	E_m^{Ia}	E_{pa}^{II}	E_{pc}^V	Complexo	E_m^{Ia}	E_{pa}^{II}	E_{pc}^{III}
1	1,12	1,72	-1,39	5	1,07	1,64	-1,08
2	1,11	1,69	-1,31	6	1,18	1,67	-0,97
3	1,10	1,72	-1,32	7	1,10	1,61	-1,14
4	1,08	1,70	-1,30	8	1,13	1,65	-1,08

$$^aE_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2.$$

Da mesma forma que para a série de complexos precursores (**1-4**), os estudos voltamétricos realizados forneceram evidências de uma extensa faixa de estabilidade da janela de potencial, com valores redox ($\Delta E = 2,67$ a $2,75$ V) (**Tabela 3.23**), comparado aos valores para os complexos (**1-4**) ($\Delta E = 2,43$ a $2,56$ V), os quais, possuem potenciais menores. Essa faixa de valores fornece a estabilidade do rutênio no estado de oxidação (2+) quando coordenada com o ligante (η^6 -*p*-cimeno), sendo esta faixa mais ampla quando comparada à

faixa fisiológica de E, entre $\sim +1\text{ V}$ a -1 V vs. EPH. Assim, espera-se que esta série de complexos **(5-8)**, com a inclusão do ligante 3-metilpiridina coordenado, seja também estável *in vivo*^[77].

3.4.2.10 Estudo da variação da velocidade de varredura

O estudo da influência da velocidade de varredura dos complexos **(5-8)**, num intervalo de 50 a 2000 mV s^{-1} , **Figuras 3.28 a 3.31 (a-b)**, e análise dos valores da correlação entre a intensidade da corrente de pico (I_{pa} ou I_{pc}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), **Figuras 3.29 a 3.31 (c-d)**, permitiu inferir que nos dois sentidos de varredura de potencial, o transporte de material eletroativo para superfície do eletrodo é difusional.

Figura 3. 28: Voltamogramas cíclicos do **5** a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/ CH_3CN $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ vs Ag/Ag^+ ; obtido de 50 a 2000 mV s^{-1} em regiões anódicas **(a)** e catódicas **(b)**. Gráfico de correntes anódicas **(c)** (processo **II**) e correntes catódicas **(d)** (processo **III**) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

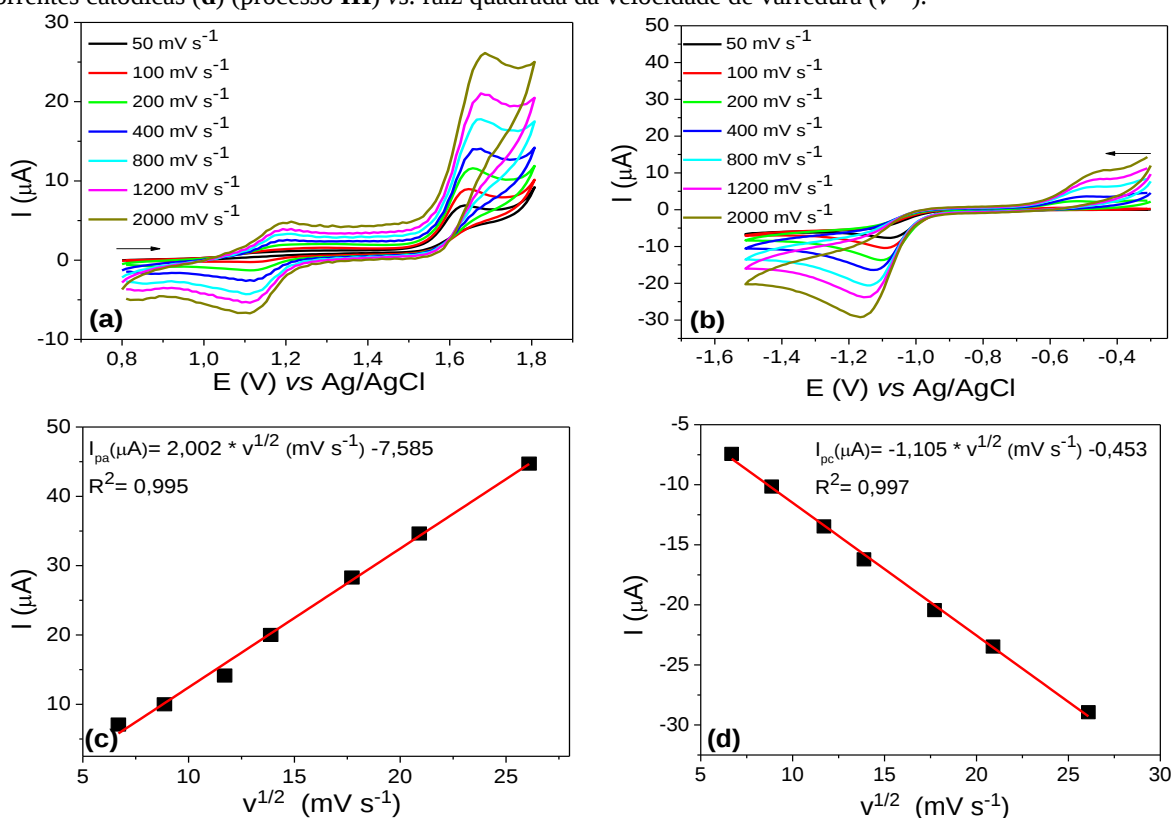


Figura 3. 29: Voltamogramas cíclicos do **6** a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/Ag⁺; obtido de 50 a 2000 mV s⁻¹ em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

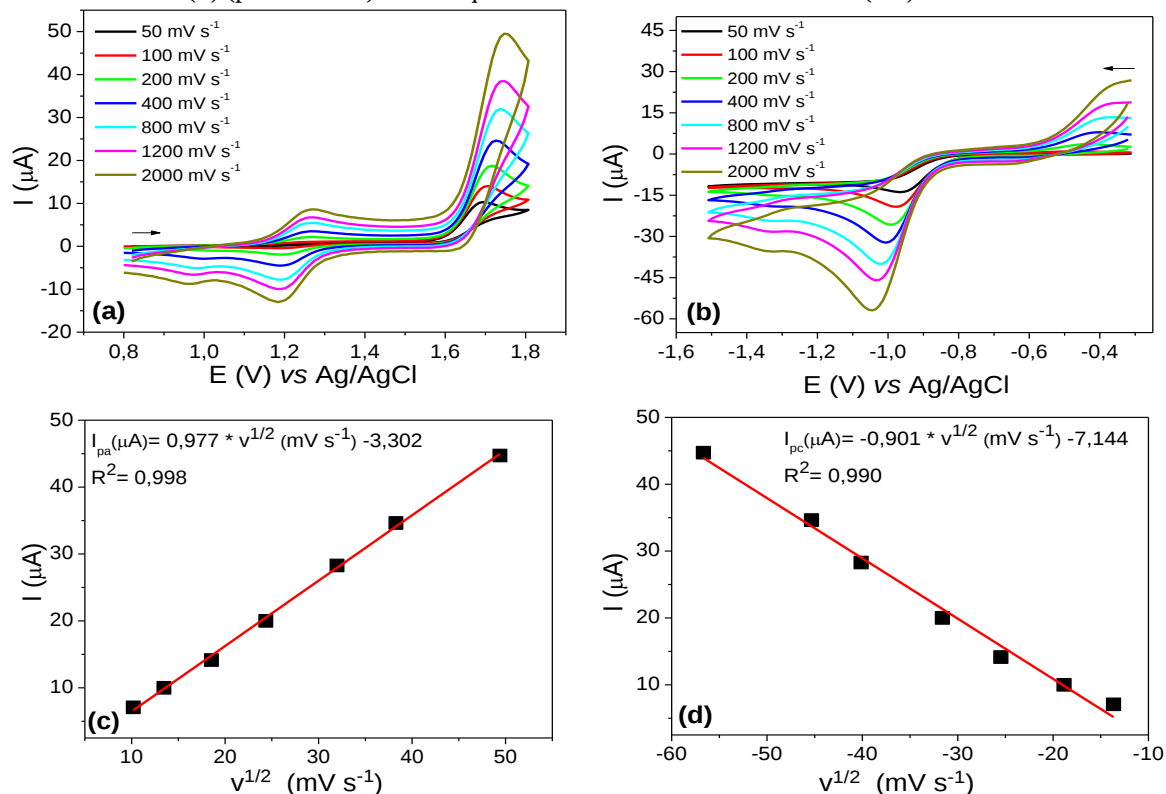


Figura 3. 30: Voltamogramas cíclicos do **7** a $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/Ag⁺; obtido de 50 a 2000 mV s⁻¹ em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

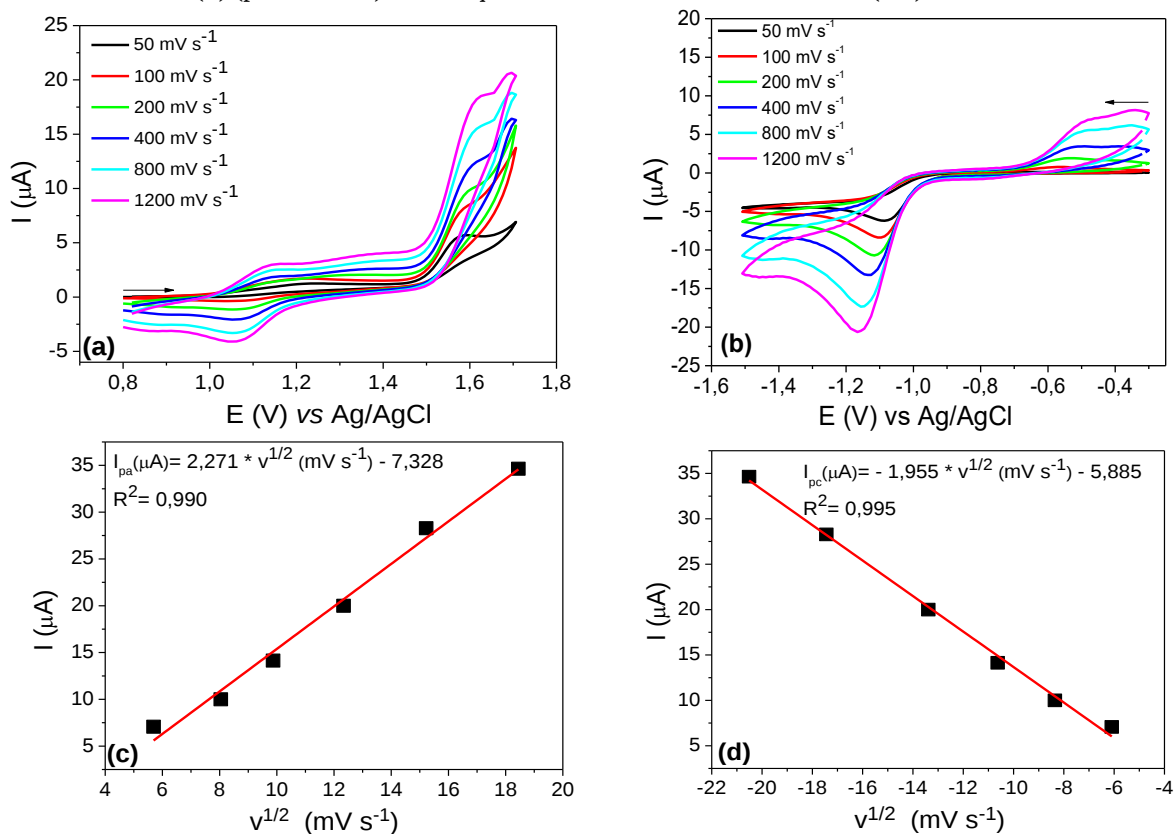
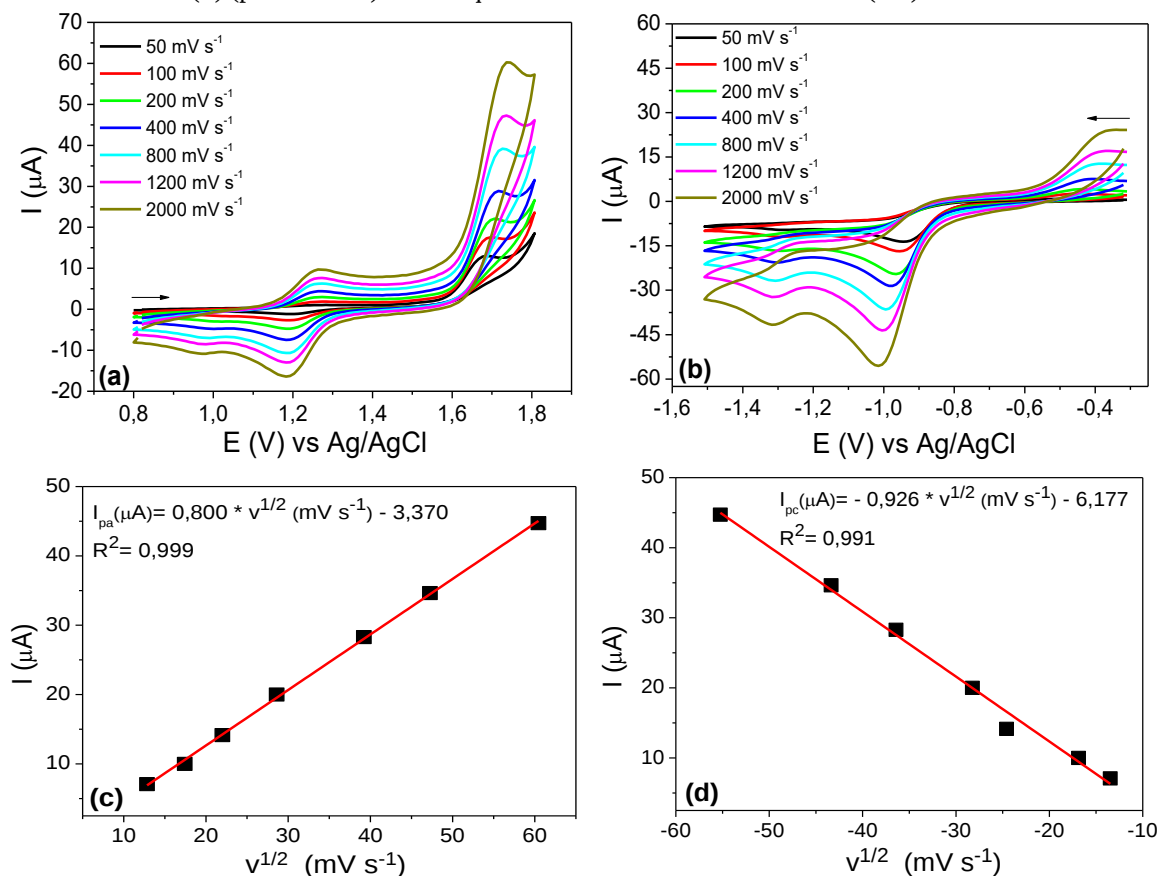


Figura 3. 31: Voltamogramas cíclicos do **8** a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ vs Ag/Ag⁺; obtido de 50 a 2000 mV s⁻¹ em regiões anódicas (a) e catódicas (b). Gráfico de correntes anódicas (c) (processo II) e correntes catódicas (d) (processo III) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).



Estes resultados indicam que nenhuma espécie é gerada após oxidação ou redução e o consequentemente não tem espécies adsorvidas, confirmando o processo difusional. Os gráficos desta correlação confirmam uma boa linearidade observada, cuja a mesma não foi alcançada com a correlação (I_{pa} ou I_{pc}) versus (v) que indicaria um processo adsorptivo de transferência de material eletroativo ao eletrodo [78].

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

As sínteses de duas novas séries de complexos de rutênio-areno, sendo eles neutros [Ru(η^6 -*p*-cimen)PAR₃Cl₂] (**1-4**) e catiônicos [Ru(η^6 -*p*-cimen)PAR₃NCl]⁺ (**5-8**), partiram de rotas sintéticas modificadas da literatura, apresentando bons rendimentos e alto grau de pureza, evidenciados por espectros de RMN e análise elementar, que foram consistentes com a fórmula proposta para suas estruturas cristalográficas.

As técnicas de caracterização espectroscópicas permitiram confirmar as estruturas propostas para as séries de complexos. As estruturas cristalográficas apresentaram uma

complexidade considerável, principalmente para **1** e **5** devido às pequenas mudanças ocasionadas pela desordem do substituinte tBu (**L1**).

Os cálculos de DFT auxiliaram na elucidação dos principais processos eletroquímicos para estas séries de complexos, além, de confirmar as atribuições das principais absorções nos espectros UV-Vis. Os estudos voltamétricos realizados forneceram evidências de uma extensa faixa de estabilidade da janela de potencial, com valores redox. Essa faixa de valores fornece a estabilidade do rutênio no estado de oxidação (2+) quando coordenada com o ligante (η^6 -*p*-cimeno), que nos dá evidência de estabilidade em meio biológico.

REFERÊNCIAS

- [1] MURAHASHI, S.I. **Ruthenium in organic synthesis**. John Wiley & Sons, 2006.
- [2] LEE, J.D. **Química Inorgânica não tão Concisa**; 5.ed, São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 1999.
- [3] DRAGUTAN, I; DRAGUTAN, V; DEMONCEAU, A. Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes. **Molecules**, v. 20, n.9, p. 17244-17274, 2015.
- [4] ZENG, L.; GUPTA, P.; CHEN, Y.; WANG, E.; JI, L.; CHAO, H.; CHEN, Z. The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, p. 5771, 2017.
- [5] MOON, S.; HANIF, M.; KUBANIK, M.; HOLTKAMP, H.; SÖHNEL, T.; JAMIESON, S.M.; HARTINGER, C. G. Organoruthenium and Osmium Anticancer Complexes Bearing a Maleimide Functional Group: Reactivity to Cysteine, Stability, and Cytotoxicity. **ChemPlusChem**, v. 80, n.1, p. 231-236, 2015.
- [6] SINGH, A.K.; PANDEY, D.S.; XU, Q.; BRAUNSTEIN, P. Recent advances in supramolecular and biological aspects of arene ruthenium (II) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 270, p.31-56, 2013.
- [7] PAGE, S. Ruthenium compounds as anticancer agents: New ruthenium based compounds with fewer and less severe side effects, could replace longstanding platinum-based anticancer drugs. **Education in Chemistry**, p. 26-29, 2012.
- [8] SMITH, G. S.; THERRIEN, B., Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 41, p.10793-10800, 2011.
- [9] PASTUSZKO, A.; NIEWINNA, K.; CZYZ, M.; JÓZWIAK, A.; MALECKA, M.; BUDZISZ, E. Synthesis, X-ray structure, electrochemical properties and cytotoxic effects of new arene ruthenium(II) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 745-746, p. 64-70, 2013.

- [10] CLARKE, J.M. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v.236, p. 209-233, 2003.
- [11] ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J.; ELLIS, D.J.; SALTER, P.A.; SCOPELLITI, R., Synthesis and characterization of some water soluble ruthenium(II)/arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 668, p. 35-42, 2003.
- [12] JONES, D.; PRATT, L.; WILKINSON, G., π -Cyclohexadienyl compounds of manganese, rhenium, iron, and ruthenium. **Journal of the Chemical Society**, p. 4458-4463, 1962.
- [13] WINKHAUS, G., SINGER, H., Ruthen(II)komplexe mit zweiziihnigem cycloheptatrien und benzol. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 7, p. 487-491, 1967.
- [14] BENNETT, M.A.; MATHESON, T.W., A simple preparation of bis-arene ruthenium cationic complexes, including those containing different arenes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 175, p. 87-93, 1979.
- [15] JENSEN, B.S.; RODGER, J.S.; SPICER, D.M. Facile preparation of η^6 -p-cymene ruthenium diphosphine complexes. Crystal structure of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{dppf})\text{Cl}]\text{PF}_6$. **Journal of Organometallic Chemistry**, v.556, p.151-158, 1998.
- [16] ZELONKA, R.A., BAIRD, M.C. Benzene Complexes of Ruthenium(II). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 50, p. 3063-3072, 1972.
- [17] CZERWINSKA, I.; FAR, J.; KUNE, C.; ANDALUZ, C. L.; DELAUDE, L.; PAUW, E. Structural analysis of ruthenium-arene complexes using ion mobility mass spectrometry, collision-induced dissociation, and DFT. **Dalton Transactions**, v. 45, n.15, p. 6361-6370, 2016.
- [18] SMITH, G. S.; THERRIEN, B., Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. **Dalton Transactions**, v.40, n.41, p. 10793-10800, 2011.
- [19] KALOĞLU, N.; ACHARD, M.; BRUNEAU, C.; ÖZDEMİR, İ. Ruthenium (II)-(Arene)-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Efficient and Selective Catalysts for the N-Alkylation of Aromatic Amines with Alcohols. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 21, p. 2598-2606, 2019.
- [20] MACHADO, S.; CALAÇA, G. N.; DA SILVA, J. P.; DE ARAUJO, M. P.; BOERÉ, R. T.; PESSÔA, C. A.; WOHNATH, K. Electrochemical characterization of a carbon ceramic electrode modified with a Ru (II) arene complex and its application as voltammetric sensor for paracetamol. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 164, n.6, p. B314-B320, 2017.
- [21] BIANCALANA, L.; GRUCHAŁA, M.; BATCHELOR, L. K.; BŁAUŻ, A.; MONTI, A., PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Conjugating Biotin to Ruthenium (II) Arene Units via Phosphine Ligand Functionalization. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2019.

- [22] PETRUK, G.; MONTI, D. M.; FERRARO, G.; PICA, A.; D'ELIA, L.; PANE, F.; MERLINO, A. Encapsulation of the Dinuclear Trithiolato-Bridged Arene Ruthenium Complex Diruthenium-1 in an Apoferritin Nanocage: Structure and Cytotoxicity. **ChemMedChem**, v. 14, n.5, p. 594-602, 2019.
- [23] JELK, J.; BALMER, V.; STIBAL, D.; GIANNINI, F.; SÜSS-FINK, G.; BÜTIKOFER, P.; HEMPHILL, A. Anti-parasitic dinuclear thiolato-bridged arene ruthenium complexes alter the mitochondrial ultrastructure and membrane potential in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. **Experimental parasitology**, n. 205, p. 107753, 2019.
- [24] GICHUMBI, J. M.; FRIEDRICH, H. B.; OMONDI, B.; SINGH, M.; NAICKER, K.; CHENIA, H. Y. Synthesis, characterization, and cytotoxic and antimicrobial activities of ruthenium (II) arene complexes with N, N-bidentate ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 69, n. 23, p. 3531-3544, 2016.
- [25] NAMIECIŃSKA, E.; SADOWSKA, B.; WIĘCKOWSKA-SZAKIEL, M.; DOŁĘGA, A.; PASTERNAK, B.; GRAZUL, M.; BUDZISZ, E. Anticancer and antimicrobial properties of novel η^6 -*p*-cymene ruthenium (II) complexes containing a N, S-type ligand, their structural and theoretical characterization. **RSC Advances**, v. 9, n. 66, p. 38629-38645, 2019.
- [26] ANG, W. H.; CASINI, A.; SAVA, G.; DYSON, P. J., Organometallic ruthenium based antitumor compounds with novel modes of action. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 696, n.5, p. 989-998, 2011.
- [27] BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H.; SAVA, G., Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.106, n.1, p. 90-99, 2012.
- [28] NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy—an update from drug design perspective. **Drug design, development and therapy**, v. 11, p. 599, 2017.
- [29] MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v.284, p. 329-350, 2015.
- [30] HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J., Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. **Chemical Society Reviews**, v.38, p. 391-401, 2009.
- [31] JIA, G.; RHEINGOLD, A. L.; HAGGERTY, B. S.; MEEK, D. W. Synthesis and characterization of ruthenium acetate complexes containing triphosphines. **Inorganic Chemistry**, v. 31, n.5, p. 900-904, 1992.
- [32] GILLESPIE, J. A.; DODDS, D. L.; KAMER, P. C. Rational design of diphosphorus ligands—a route to superior catalysts. **Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)**, v.39, n.11, p. 2751-64, 2010.
- [33] HODSON, E.; SIMPSON, S. J. Synthesis and characterisation of $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L})\text{X}_2]$ compounds: single crystal X-ray structure of $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{P}\{\text{OPh}\}_3)\text{Cl}_2]$ at 203 K. **Polyhedron**, v. 23, n. 17, p. 2695-2707, 2004.

- [34] LEE, J. P.; HANKINS, M. J.; RINER, A. D.; ALBU, T. V. Synthetic, structural, and spectroscopic studies of mixed sandwich Ru (II) complexes involving η^6 -p-cymene with monodentate fluorine-containing phosphines or phosphites. **Journal of Coordination Chemistry**, v.69, n.1, p.20-38, 2016.
- [35] BIANCALANA, L.; PRATESI, A.; CHIELLINI, F.; ZACCHINI, S.; FUNAIOLI, T.; GABBIANI, C.; MARCHETTI, F. Ruthenium arene complexes with triphenylphosphane ligands: cytotoxicity towards pancreatic cancer cells, interaction with model proteins, and effect of ethacrynic acid substitution. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 23, p.14574-14588, 2017.
- [36] GOK, L.; TURKMEN, H. Half-sandwich η^6 -areneruthenium(II) complexes bearing 1-alkyl(benzyl) imidazo[4,5-f][1,10]-phenanthroline (IP) derivatives: the effect of alkyl chain length of ligands to catalytic activity. **Tetrahedron**, v. 69, p. 10669-10674, 2013.
- [37] BEIRITH A.; CRECZINSKY-PASA, T. B.; BONETTI, V.R.; KOZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M. M.S.; FRANCO, C. V.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **Europe Journal Pharmacology**, v. 369, p. 289-297, 1999.
- [38] CLARKE, J.M. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 239, p. 209-233, 2003.
- [39] VEGAS, C.L; VILLARREAL, W; NAVARRO,M; OLIVEIRA, R.C; GRAMINHA, E.A; MAIA,S.I.P; DEFLON,M.V; FERREIRA,G.A; COMINETTI,R.M; BATISTA,A.A. Cytotoxicity of Ru(II) piano-stool complexes with chloroquine and chelating ligands against breast and lung tumor cells: Interactions with DNA and BSA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 150-161, 2015.
- [40] GRAU, J.; NOE, V.; CIUDAD, C.; PRIETO, M. J., FONT-BARDIA, M., CALVET, T.; MORENO, V. New π -arene ruthenium (II) piano-stool complexes with nitrogen ligands. **Journal of inorganic biochemistry**, 109, 72-81, 2012.
- [41] RICHTER, S.; SINGH, S.; DRACA, D.; KATE, A.; KUMBHAR, A.; KUMBHAR, A. S.; HEY-HAWKINS, E., Antiproliferative activity of ruthenium (II) arene complexes with mono- and bidentate pyridine-based ligands. **Dalton Transactions**. v. 45, n. 33, p. 13114-13125, 2016.
- [42] RODRIGUES, C.; DELOLO, F. G.; FERREIRA, L. M.; MAIA, P. I. D. S.; DEFLON, V. M.; RABEAH, J.; BATISTA, A. A. Ruthenium (III)/phosphine/pyridine complexes applied in the hydrogenation reactions of polar and apolar double bonds. **Journal of Molecular Structure**, v. 1111, p. 84-89, 2016.
- [43] SÁEZ, R.; LORENZO, J.; PRIETO, M.J.; FONT-BARDIA, M.; CALVET, T.; OMEÑACA, N.; VILASECA, M.; MORENO, V. Influence of PPh₃ moiety in the anticancer activity of new organometallic ruthenium complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v.136, p. 1-12, 2014.
- [44] PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.F. **Purification of laboratory chemicals**. 4^a ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, p. 529, 1996.

- [45] BENNETT, M.A.; MATHESON, T.W., A simple preparation of bis-arene ruthenium cationic complexes, including those containing different arenes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 175, p. 87-93, 1979.
- [46] JENSEN, B.S.; RODGER, J.S.; SPICER, D.M. Facile preparation of η^6 -pcymene ruthenium diphosphine complexes. Crystal structure of $[(\eta^6\text{-pcymene})\text{Ru}(\text{dppf})\text{Cl}]\text{PF}_6$. **Journal of Organometallic Chemistry**, v.556, p.151–158, 1998.
- [47] SERRON, S. A.; NOLAN, S. P. Enthalpies of reaction of $((p\text{-cymene})\text{RuCl}_2)_2$ with monodentate tertiary phosphine ligands. Importance of both steric and electronic ligand factors in a ruthenium (II) system. **Organometallics**, v.14, p. 4611-4616, 1995.
- [48] BULLOCK, J. P., BOND, A. M., BOERÉ, R. T., GIETZ, T. M., ROEMMELE, T. L., SEAGRAVE, S. D.; PARVEZ, M. Synthesis, Characterization, and Electrochemical Studies of $\text{PPh}_{3-n}(\text{dipp})_n$ ($\text{dipp}=2,6\text{-Diisopropylphenyl}$): Steric and Electronic Effects on the Chemical and Electrochemical Oxidation of a Homologous Series of Triarylphosphines and the Reactivities of the Corresponding Phosphoniumyl Radical Cations. **Journal of the American Chemical Society**, v.135, n.30, p.11205-11215, 2013.
- [49] BOERÉ, R. T.; MASUDA, J. D., TRAN, P. Synthesis, crystal structure and DFT calculations on 2,6-diisopropylphenylcopper; its use in the preparation of dichloro-2,6-diisopropylphenylphosphine. **Journal of organometallic chemistry**, v.691, n. 26, p. 5585-5591, 2006.
- [50] GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v.7, n.1, p. 81-122, 1971.
- [51] MARSZAUKOWSKI, F.; GUIMARÃES, I. D. L.; DA SILVA, J. P.; DA SILVEIRA LACERDA, L. H.; DE LAZARO, S. R.; DE ARAUJO, M. P.; WOHNATH, K. Ruthenium (II)-arene complexes with monodentate aminopyridine ligands: Insights into redox stability and electronic structures and biological activity. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 881, p. 66-78, 2019.
- [52] DAVIES, J. A. The coordination chemistry of sulfoxides with transition metals. In: **Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry**. Academic Press, p. 115-187, 1981.
- [53] PAULA, Q. A.; BATISTA, A. A.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J. On the lability of dimethylsulfoxide (DMSO) coordinated to the $\{\text{RuII-NO}^+\}$ species: X-ray structures of $\text{mer-}[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})_2(\text{NO})]$ and $\text{mer-}[\text{RuCl}_3(\text{CD}_3\text{CN})(\text{DMSO})(\text{NO})]$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.90, n.3-4, p.144-148, 2002.
- [54] PRETSCH, E.; BUHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data, Berlin. 4^a ed. Springer-Verlag, 2009.
- [55] VALLE, E. M. A.; NASCIMENTO, F. B. D.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A.; MONTEIRO, M. C. R., MACHADO, S. D. P.; AZEVEDO, E. R. D. Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em complexos difosfínicos de rutênio. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 807-812, 2008.

- [56] DAASCH, L.; SMITH, D. Infrared Spectra of Phosphorus Compounds. **Analytical Chemistry**, v. 23, n.6, p. 853-868, 1951.
- [57] ALBINATI, A.; JIANG, Q.; RÜEGGER, H.; VENANZI, L.M. Ruthenium(II) complexes containing bis(2-(diphenylphosphino)ethyl)phenylphosphine and bis(3-(diphenylphosphino)propyl)phenylphosphine. **Inorganic Chemistry**, v.32, p.4940, 1993.
- [58] EDWARDS, H. G. M.; LEWIS, I. R.; TURNER, P. H. Raman and infrared spectroscopic studies of tris triphenyl phosphine chloride complexes of transition metals. **Inorganica chimica acta**, v. 216, n. 1-2, p. 191-199, 1994.
- [59] SANTOS, E. R.; MONDELLI, M.A.; POZZI, L.V.; CORRÊA, R.S.; ARAÚJO, H. S. 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**, v.51, p. 292–297, 2013.
- [60] KALIDASAN, M.; NAGARAJAPRAKASH, R.; FORBES, S.; MOZHARIVSKYI, Y.; RAO, K. M. Synthesis, Spectroscopic and Molecular Studies of Half-Sandwich η^6 -Arene Ruthenium, Cp* Rhodium and Cp* Iridium Metal Complexes with Bidentate Ligands. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 641, n. 3-4, p. 715-723, 2015.
- [61] SINGH, K.A.; YADAV, M.; PANDEY, R.; KUMAR,P.; PANDEY,S.D. Half-sandwich ruthenium, rhodium and iridium complexes containing dipyriddy amine based ligands. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 695, p. 1932-1939, 2010.
- [62] KUMAR, P.; SINGH, A. K.; PANDEY, R., LI, P. Z., SINGH, S. K.; XU, Q.; PANDEY, D. S. Synthesis, characterization and reactivity of arene ruthenium compounds based on 2, 2'-dipyridylamine and di-2-pyridylbenzylamine and their applications in catalytic hydrogen transfer of ketones. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 695, n.19-20, p. 2205-2212, 2010.
- [63] MANABE, K. Synthesis of novel chiral quaternary phosphonium salts with a multiple hydrogen-bonding site, and their application to asymmetric phase-transfer alkylation. **Tetrahedron**, v.54, n.48, p. 14465-14476, 1998.
- [64] CUNHA, B. N.; COLINA-VEGAS, L.; PLUTÍN, A. M.; SILVEIRA, R. G.; HONORATO, J.; OLIVEIRA, K. M.; BATISTA, A. A. Hydrolysis reaction promotes changes in coordination mode of Ru (II)/acylthiourea organometallic complexes with cytotoxicity against human lung tumor cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.186, 147–156, 2018.
- [65] BIANCALANA, L.; ZACCHINI, S.; FERRI, N.; LUPO, M. G.; PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Tuning the cytotoxicity of ruthenium (II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/phenoxydiphenylphosphine ligand. **Dalton Transactions**, v.46, n.47, p.16589-16604, 2017.
- [66] Base de dados da Durham University Z'. Disponível em: <http://zprime.co.uk/>.
- [67] GUIMARÃES, I.D.L; GARCIA, J. R.; WOHNATH, K.; BOERÉ, R. T. Chemical and Electrochemical Oxidation of Tris-(3, 5-di-tert-butylphenyl) phosphine–High Z' Crystal

Structures and Conformational Effects Associated with Bulky meta Substituents. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.2018, n.32, p.3606-3614, 2018.

[68] LALEU, B.; BERNARDINELLI, G.; CHAUVIN, R.; LACOUR, J. Trimesitylmethylphosphonium cation. Supramolecular stereocontrol and simple enantiomerization mechanism determination. **The Journal of organic chemistry**, v. 71, n.19, p. 7412-7416, 2006.

[69] HILL, N. D.D; BOERÉ, R. T. Two tris (3, 5-disubstituted phenyl) phosphines and their isostructural PV oxides. **Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications**, v. 74, n. 7, p. 889-894, 2018.

[70] BIANCALANA, L., BATCHELOR, L. K., DE PALO, A., ZACCHINI, S., PAMPALONI, G., DYSON, P. J., MARCHETTI, F. A general strategy to add diversity to ruthenium arene complexes with bioactive organic compounds via a coordinated (4-hydroxyphenyl) diphenylphosphine ligand. **Dalton Transactions**, v.46, n.36, p.12001-12004, 2017.

[71] GOLBAGHI, G., HAGHDOOST, M. M., YANCU, D., LÓPEZ DE LOS SANTOS, Y., DOUCET, N., PATTEN, S. A., CASTONGUAY, A. Organoruthenium (II) Complexes Bearing an Aromatase Inhibitor: Synthesis, Characterization, in Vitro Biological Activity and in Vivo Toxicity in Zebrafish Embryos. **Organometallics**, v.38, n.3, p.702-711, 2019.

[72] LALREMPUIA, R.; PATRICK. J. C.; MOHAN R. K. Syntheses of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{EPh}_3)_2\text{Cl}]^+$ complexes and molecular structure of chloro $(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{bis}(\text{triphenylphosphine})\text{ruthenium(II)}$ tetrafluoroborate (E= P, As and Sb). **Journal of Coordination Chemistry**, v. 56, n.17, p. 1499-1504, 2003.

[73] VIEILLE-Petit, L., THERRIEN, B.; SUSS-Fink, G. Chiral Arene Ruthenium Complexes: Synthesis and Molecular Structure of the Enantiopure Cluster Cation (S)- $[\text{H}_3\text{Ru}_3\{\text{C}_6\text{H}_5[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}]\}(\text{C}_6\text{Me}_6)_2(\text{O})]^+$. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 20, p. 3707-3711, 2003.

[74] ELSEGOOD, M.R., SMITH, M.B.; SANCHEZ-Ballester, N. M. Dichloro $(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{triphenylphosphine})\text{ruthenium (II)}$. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, 62(11), m2838-M2840, 2006.

[75] DEVANNE, D., Dixneuf, P. H. Carbene derivatives of areneruthenium (II) complexes in one step from terminal alkynes. **Journal of organometallic chemistry**, v. 390, n.3, p. 371-378, 1990.

[76] SMITH, D.P; WRIGHT, H.A. Synthesis and structure of a chelating arene–ruthenium complex $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{-}\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5)]$. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 559, p. 141–147, 1998.

[77] HOSSEINZADEH, P.; LU, Y., Design and fine-tuning redox potentials of metalloproteins involved in electron transfer in bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1857, n. 5, p. 557-58, 2016.

[78] BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. **New York: John wiley**, p. 389, 2001.

- [79] BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. **Electrochemistry: Principles, Methods and Applications**. Oxford, 1993.
- [80] MARCHETTI, F., PETTINARI, C., CERQUETELLA, A., CINGOLANI, A., PETTINARI, R., MONARI, M., POMBEIRO, A. J. Switching between κ^2 and κ^3 Bis (pyrazol-1-yl) acetate ligands by tuning reaction conditions: Synthesis, spectral, electrochemical, structural, and theoretical studies on arene-Ru (II) derivatives of bis (azol-1-yl) acetate Ligands. **Inorganic chemistry**, v. 48, n.13, p. 6096-6108, 2009.
- [81] HANSEN, P. W. J., P. W., Vibrational studies on bisterpyridineruthenium(II) complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 50, n. 1, p. 169-183, 1994.
- [82] DWIVEDI, S. D., SINGH, A. K., SINGH, S. K., SHARMA, S., CHANDRA, M., & PANDEY, D. S. Ruthenium Complexes Containing Pyridine-2-carbaldehyde Azine as a Synthon in the Synthesis of Bi-/Trimetallic Complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 36, p. 5666-5673, 2008.
- [83] APPELT, P.; FAGUNDES, F. D.; FACCHIN, G.; KRAMER, M. G.; BACK, D. F., CUNHA, M. A.; ARAUJO, M. P. Ruthenium (II) complexes containing 2 mercaptothiazolates as ligands and evaluation of their antimicrobial activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 436, p. 152-158, 2015.
- [84] MORENO, V.; LORENZO, J.; AVILES, F. X.; GARCIA, M. H.; RIBEIRO, J. P.; MORAIS, T. S.; ROBALO, M. P. Studies of the antiproliferative activity of ruthenium (II) cyclopentadienyl-derived complexes with nitrogen coordinated ligands. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2010, 2010.

CAPÍTULO 4. TESTES DE ATIVIDADE ANTICÂNCER E ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO PARA AS SÉRIES DE COMPLEXOS 1-4 E 5-8

4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1.1 Complexos metálicos e atividade anticâncer

A busca por novos e eficazes medicamentos contra o câncer que superam as limitações da quimioterapia à base de complexos com platina, atualmente usados em tratamentos clínicos, ainda representa um dos objetivos mais importantes da ciência moderna. Neste contexto, a química organometálica do rutênio tem evoluído, pois, este metal tem demonstrado ser menos citotóxico que a platina e outros metais^[1-3]. Quando relaciona-se o uso como agentes terapêuticos é possível considerar, que todos os elementos da tabela periódica apresentam um potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos^[4]. Em relação a utilização de metais, deve-se considerar que não só a concentração do metal dentro da célula ou no restante do organismo, como também, o ambiente de coordenação em que o mesmo é submetido, sendo neste caso, determinante dos efeitos benéficos e tóxicos no meio biológico^[5].

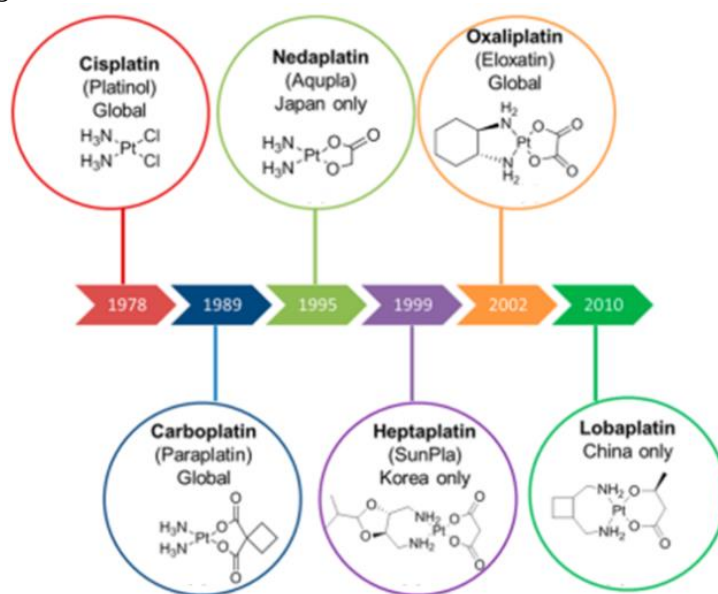
Complexos metálicos, com diferentes números de coordenação e geometrias variadas, podem oferecer uma maior diversidade estrutural, enquanto que a diversidade de potenciais redox, também pode ser explorada. A incorporação de ligantes lábeis a estes complexos podem propiciar importantes reações de substituição com alvos biomoleculares, como por exemplo, a interação entre adutos de drogas baseadas na platina e as nucleobases de DNA^[6,7]. Os ligantes também podem servir para melhorar as propriedades farmacocinéticas dos metalofármacos, ou podem apresentar algumas propriedades relevantes com características biológicas desejadas. A aplicação de medicamentos à base de metal como antimicrobiano, antidiabético, antiartrítico e anticâncer, além de agentes de diagnóstico por imagem e radiosensibilizadores, é um testemunho de sua diversidade química e estrutural^[8,9].

Segundo dados recentes obtidos pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estima-se, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. Excluindo o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. Essas estimativas refletem que os cânceres de próstata, pulmão, mama, cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago^[10]. Dentre as modalidades de tratamento do câncer incluem a cirurgia, terapia de radiação e a quimioterapia. Mas recentemente tem-se a imunoterapia, que é uma forma de tratamento que estimula o

sistema imunológico a destruir células cancerígenas, uma opção promissora para complementar os regimes terapêuticos já existentes^[9,11]. Os compostos quimioterapêuticos tem ação individual ou podem fazer parte de uma combinação de medicamentos, que podem bloquear a proliferação indesejada de células cancerígenas. Relacionando os medicamentos de platina, estes constituem uma classe importante de agentes quimioterapêuticos, sendo extensamente aplicados aos pacientes com câncer que necessitam de quimioterapia^[9].

Quando relata-se o estudo citotóxico com compostos baseados em metais de transição, pode-se dizer que o impulso para a aplicação dos mesmos como agentes anticancerígenos, se deu a partir da descoberta da atividade da cisplatina de estrutura [cis-diaminodicloroplatina (II)] em 1965 por Rosenberg e colaboradores^[12]. Apesar da introdução clínica da cisplatina há mais de 40 anos, apenas três medicamentos baseados neste metal foram aprovados até o momento em todo o mundo, sendo a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, enquanto três outras, nedaplatina, heptaplatina e lobaplatina, estão em uso apenas no Japão, Coréia do Sul e China^[9], respectivamente, cujas estruturas estão apresentadas na **Figura 4.1**.

Figura 4. 1: Medicamentos de platina em uso clínico (com nomes genéricos entre parênteses), e os anos em que receberam a aprovação regular total ou limitada.



FONTE: KENNY et al, 2019^[9].

4.1.2 Complexos de rutênio e atividade anticâncer

Como agentes anticancerígenos, os complexos de rutênio são metalodrogas promissoras, pois, podem apresentar atividade em tumores que desenvolvem resistência à cisplatina, como também, oferecer toxicidade reduzida podendo ser melhores tolerados *in vivo*.

A cisplatina demonstra um enorme potencial, porém uma toxicidade e não seletividade relevante, com isto, os complexos de rutênio surgem como alternativa para esta metalodroga e seus derivados, como também para as limitações das terapias atuais do câncer, devido à sua variedade de geometrias e reatividades químicas, onde as atividades destes compostos dependem do íon metálico e do seus ligantes coordenados^[13,14].

Dentre as principais características dos complexos de rutênio, que os tornam adequados para uso medicinal, pode-se ressaltar:

(i) sua alta estabilidade, que pode dar origem a compostos com uma extensa variedade de ligantes e com rotas sintéticas confiáveis;

(ii) por meio da variação em seus estados de oxidação (II e III), é capaz de possibilitar um mecanismo diferente em condições fisiológicas;

(iii) o processo de ativação por redução, onde complexos de Ru (III) tendem a ser mais inertes e podem ser administrados sem causar danos às células saudáveis, e então reduzidos a rutênio II no interior das células cancerígenas, que é mais reativo;

(iv) capacidade de mimetizar o ferro em ligações com biomoléculas, tais como a transferrina que provoca a solubilização e transporta o ferro no plasma, explorando desta forma o mecanismo de entrega pelo organismo, pelo fato de o Ru e Fe estarem presente no mesmo grupo da tabela periódica. Entretanto, os sítios de coordenação do Fe no meio biológico são bem específicos, o que torna questionável a possibilidade de o Ru competir com o Fe, uma vez que o ferro é menor que o rutênio e, por ser da primeira série de transição, pode formar complexos de spin alto e spin baixo enquanto o rutênio forma complexos de spin baixo;

(iv) Cinética de troca de ligante, onde em solução é lenta, indicando que se o Ru se ligar a algo no interior da célula é provável que permaneça ligado durante o tempo de vida da célula.

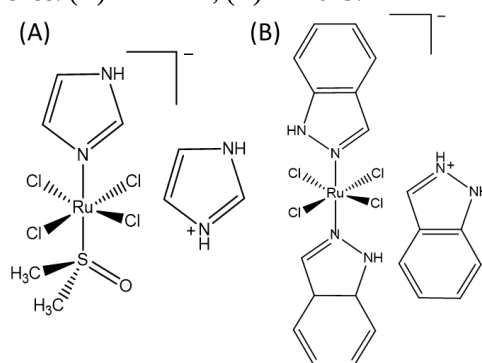
(v) Complexos octaédricos e afinidade por diferentes ligantes, onde esta estrutura permite a inclusão de ligantes monodentados ou um bidentado na esfera de coordenação se comparado com a Pt (II), que forma complexos quadrado planares^[15-18].

O substituinte areno tem a ação de estabilizar o rutênio no seu estado de oxidação 2+, mantendo-se relativamente inerte sob condições fisiológicas. Pequenas variações no areno presente na estrutura do complexo podem tornar a molécula mais versátil e melhorar seu desempenho frente às propriedades farmacológicas^[17,19]. Os possíveis mecanismos de ação de compostos de rutênio ainda se encontram em estudo, porém sua atividade anti-tumoral pode envolver uma interação direta com o DNA, com a redução da síntese de RNA. Este tipo de interação é distinta quando comparado à cisplatina, e outra diferença proeminente pode estar

no fato do alvo biológico dos compostos de rutênio não ser o DNA, mas sim proteínas ou enzimas^[20].

A literatura relata uma variedade de complexos de rutênio sendo estudados com possíveis propriedades antitumorais, mas, dois complexos encontram-se em destaque: *trans*-[RuCl₄(Im)(dmsO)]ImH (NAMI-A) e o *trans*-[RuCl₄(Ind)₂]IndH (KP1019), onde Im= imizazol e Ind= indazol (**Figura 4.2**), desenvolvidos por Sava e Keppler, respectivamente^[21] também merecem destaque pois estes apresentam atividade antimetastática e atividade contra uma série de tumores, incluindo o carcinoma de pulmão, melanoma e câncer mamário. O composto NAMI-A já foi considerado como um dos complexos de rutênio mais promissores sintetizados, porém, durante a fase II de testes clínicos, teve seus ensaios encerrados devido aos altos efeitos colaterais causados pelo uso da droga^[22].

Figura 4. 2: Estruturas dos complexos: (A) NAMI-A; (B) KP1019.



Fonte: Antonarakis, 2010^[21]

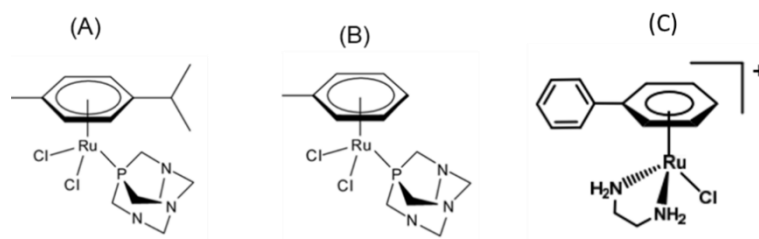
Durante a realização dos testes clínicos para o complexo NAMI-A, foi possível comprovar que a ação deste independe do tipo do tumor, em estágio primário ou em processo de metástase, comprovação relatada perante a inibição do crescimento da metástase já desenvolvida, quando na presença do complexo. Os estudos realizados em fase pré-clínica em animais, indicaram que o mesmo proporciona uma atividade seletiva contra as metástases pulmonares de uma variedade de tumores primários em ratos. E estudos para avaliar a toxicidade do complexo frente às células saudáveis, realizado em cães e camundongos, revelaram uma baixa toxicidade em testes *in vitro*. Já o complexo KP1019 é eficaz contra tumores colorretais e tumores humanos primários resistentes à cisplatina, e com os resultados positivos apresentados nos testes pré-clínicos e na fase I, este complexo configura-se como um promissor agente quimioterápico^[21]. O mecanismo de ação para estes dois complexos e o alvo biológico que atingem ainda são desconhecidos. Porém, sugere-se que ambos os complexos sejam carregados para o interior das células, através da transferrina, e então, quando os mesmos

estão presentes no interior das células são supostamente reduzidos por moléculas biologicamente redutoras, tais como a glutatona. Após a redução dos complexos, ocorre a labilização do ligante clorido (grupo abandonador), e então uma possível interação com a molécula de DNA, ou ainda com uma outra biomolécula gerando a morte celular por apoptose^[23].

4.1.3 Complexos de rutênio-areno e atividade anticâncer

Outra classe de compostos bastante estudada são os complexos de rutênio(II) com ligante areno, onde este ligante tem a capacidade de estabilizar o rutênio no estado de oxidação II, podendo também ter suas características alteradas pelas diferentes substituições ao anel, além de proporcionarem ao complexo uma característica anfifílica^[24]. Uma das classes mais promissoras são os complexos da família RAPTA, tais como o $[\text{Ru}(p\text{-cimen})(\text{pta})\text{Cl}_2]$ (RAPTA-C) e o $[\text{Ru}(\text{tolueno})(\text{pta})\text{Cl}_2]$ (RAPTA-T), onde (pta= 1,3,5-triaza-7 fosfoadamantano), **Figura 4.3**, os quais, desenvolvidos por Dyson e colaboradores, possuem propriedades antitumorais e estão em estudos pré-clínicos^[25,26]. Estudos realizados com complexos RAPTA contendo ligantes PPh_3 , sugerem que a adição do ligante PPh_3 hidrofóbico resulta em metalofármacos mais citotóxicos e menos seletivos, presumivelmente por causa de uma maior absorção das drogas. Em testes *in vitro*, para a determinação da atividade citotóxica o complexo RAPTA-T apresentou uma maior toxicidade em relação ao complexo RAPTA-C, frente às células cancerígenas adenocarcinoma murino (TS/A), não apresentando citotoxicidade frente às células saudáveis mamárias (HBL-100)^[27]. A possibilidade de controlar a solubilidade do ligante pta de acordo com a variação do pH do meio chamou a atenção dos pesquisadores para um potencial efeito no meio biológico, uma vez que esta característica poderia facilitar a entrada do complexo no interior da célula^[28].

Sadler e colaboradores estudaram o complexo de rutênio-areno com o ligante etilenodiamina (en), $[\text{Ru}(\text{areno})(\text{en})\text{Cl}]^+$, o qual demonstrou um valor de inibição de 50% do crescimento das células de câncer (IC_{50}) de ovário (A2780) entre 6-9 μM , comparável ao fármaco anticancerígeno carboplatina ($[\text{C}_4\text{H}_6(\text{CO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$) clinicamente utilizado (6 μM). O estudo com este complexo evidenciou possível relação entre a citotoxicidade e o tamanho dos substituintes no areno, que por sua vez, pode estar relacionada com as interações hidrofóbicas entre o complexo e o DNA. A correlação dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* sugerem que estes complexos são tanto mais ativos quanto mais hidrofóbicos for o areno, e ainda, quanto mais volumoso o ligante, mais efetiva a citotoxicidade do complexo^[29].

Figura 4. 3: Estrutura dos complexos (A): RAPTA-C, (B): RAPTA-T e (C) RM-175.

FONTE: BERGAMO et al., 2010^[26], DOUGAN; SADLER, 2007^[29]

O ligante pta é uma base forte e é bastante solúvel em água, quando comparados com uma outra classe de ligantes como PAr_3 , empregado na química de coordenação de complexos de rutênio. As triarilfosfinas PAr_3 , em particular, são consideradas mais lipofílicas para uso em fármacos baseados em metais; apesar disso, houve um aumento recente no interesse em seu uso com complexos $\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})$, com relatos de melhor atividade em meio biológico^[30,31].

Biancalana e colaboradores^[30] relataram a síntese de alguns complexos com ligantes fosfina substituídas como $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\kappa\text{P-Ph}_2\text{PR})]$ onde $[\text{R} = 4\text{-C}_6\text{H}_4\text{OSiMe}_2^t\text{Bu}, 4\text{-C}_6\text{H}_4\text{Br}, \text{OC(=O)CHCl}_2, \text{OPh}, \text{O(2-C}_6\text{H}_4\text{OSiMe}_2^t\text{Bu)}$ e a atividade antitumoral e citotoxicidade contra a linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231), câncer de ovário (A2780) e fibroblastos de pele humana (HSF). Esses complexos apresentaram atividade citotóxica considerável, com valores mais baixos de IC_{50} ($9,2 \pm 1,1$ a $29,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$) em relação à cisplatina ($59,4 \mu\text{M}$) contra linhagem (MDA-MB-231). Estes resultados indicam que a presença da PPh_3 e a monossustituição de um anel arila, podem levar a um aumento significativo da citotoxicidade que contribuiu para a lipofilicidade e interações desses complexos.

Saez e colaboradores^[31], relatam o estudo com complexos catiônicos do tipo de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PPh}_3\text{NCl}]^+$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{NCl}_2]$ (PPh_3 = triarilfosfina e N = derivados de piridina), investigando a atividade antitumoral contra a linhagem de células HL-60 (células tumorais de leucemia). Estes compostos demonstraram que houve um aumento acentuado da atividade antitumoral e citotoxicidade dos complexos, com valores de IC_{50} variando de $202 \mu\text{M}$ a $5,2 \mu\text{M}$, após a inclusão do ligante PPh_3 nas estruturas. O mecanismo de ação destes complexos pode estar relacionado com sua ligação ao DNA, resultando em uma distorção das estruturas secundárias e terciárias.

Trabalhos mais recentes reportam a relação destes ligantes fosfinas com o aumento de lipofilidade destas moléculas, bem como ação citotóxica resultante. Parveen e colaboradores^[32] compararam os ensaios de citotoxicidade *in vitro* contra linhas de células de câncer humano para complexos com o ligante fosfina mais lipofílico PPh_3 e compostos análogos com ligante

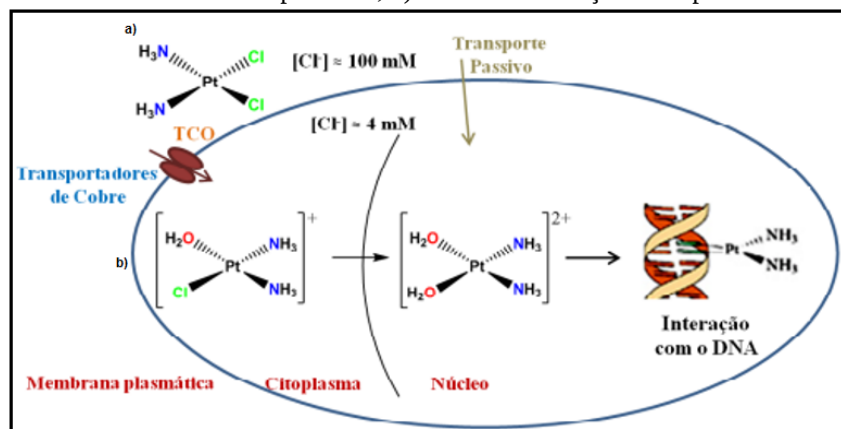
pta (1,3,5-Triaza-7-fosfadamantano). Quando o ligante trifenilfosfina (PPh_3) altamente lipofílico foi coordenado com $\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})[\text{3-hidroxi-4(1H)-pir(id)ona}]\text{Cl}$ foram obtidas citotoxicidades relevantes frente a linhagem celular de câncer colorretal (HCT116), com valores de IC_{50} $1,58 \pm 0,2 \mu\text{M}$, enquanto os complexos análogos que caracterizam o ligante pta hidrofílico foram inativos $\text{IC}_{50} > 150 \mu\text{M}$. Este resultado indicou que as propriedades lipofílicas estão relacionadas ao modo de atividade destes compostos, sendo então confirmada pelo valores de $\log P$ dos referidos ligantes, que é o coeficiente de partição ou lipofilicidade em meio orgânico e aquoso, geralmente, octanol/água. Verificou-se que o ligante pta é muito mais hidrofílico, com um valor de $\log P$ de -1,43 em comparação com 5,69 para PPh_3 . Essas diferenças afetam claramente a atividade anticâncer *in vitro* dos complexos investigados com a alta lipofilicidade da trifenilfosfina, que provavelmente leva a maior acúmulo intracelular e, portanto, maior citotoxicidade.

Devido a estes estudos já realizados apontando a atividade citotóxica favorável de complexos de rutênio-areno, como também, de ligantes fosfinas e ou/heterocíclicos na esfera de coordenação, houve a motivação para o estudo de novas classes de complexos com ligantes mais lipofílicos, de forma a relacionar sua atividade. Além disso, percebe-se que o mecanismo de ação para os complexos desta classe não está bem resolvido, desta forma, necessita-se de novas metodologias que possam elucidar, sendo este também o foco deste estudo.

4.1.4 Mecanismo de ação dos complexos organometálicos

4.1.4.1 Estudos de interação com DNA

Os principais complexos em tratamento quimioterápico em uso que é a cisplatina e seus derivados, tem seu mecanismo de ação no interior das células bem relatado. Sua ação consiste na hidrólise do centro metálico de Pt(II) , o qual interage diretamente com o DNA formando adutos, originando assim, ligações intra e intercadeias, as quais induzem alterações estruturais (**Figura 4.4b**). Apesar de seu sucesso no tratamento de tumores, a eficácia clínica deste composto tem sido grandemente limitada, como resistência intrínseca ou adquirida à droga e efeitos colaterais citotóxicos significativos como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade. Como consequência disto, estas limitações deram um incentivo para uma maior investigação de um complexo com outro metal de transição, na tentativa de desenvolver novas drogas que superassem os inconvenientes associados à terapia com cisplatina^[6,14].

Figura 4. 4: a) Estrutura da *cis*-diaminodicloroplatina II; b) mecanismo de ação da cisplatina do interior da célula.

Fonte: Neves e Vargas, 2011^[33].

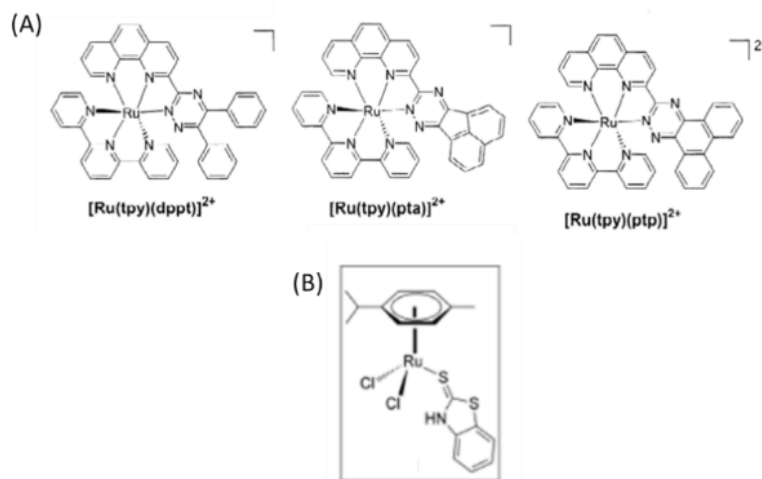
A partir do conhecimento do mecanismo de ação da cisplatina, adotou-se a molécula de DNA, como alvo farmacológico de vários medicamentos atualmente usados em terapias medicinais ou em fase de investigação clínica avançada. Sua estrutura proeminente, faz com que a molécula de DNA possa interagir dentro dos sistemas vivos de maneira covalente através da ligação direta do complexo ao DNA (mecanismo visto na cisplatina e seus derivados), por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato, ou ainda não-covalente, através de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor do DNA, ou através da intercalação^[34,35,36]. O DNA pode interagir reversivelmente por ligação não-covalente com uma ampla variedade de espécies que incluem água, íons metálicos e seus complexos, pequenas moléculas orgânicas e proteínas^[37].

O estudo do mecanismo de ação de alguns complexos de rutênio já são descritos na literatura, como reportado por Chao e colaboradores^[38] que investigaram através de espectroscopias de absorção e fluorescência, e também por medidas de viscosidade, as interações para os complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppt})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pta})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{ptp})]^{2+}$ onde: tpy=2,2':6',2''-terpiridina, dppt=3-(1,10-fenatrolin-2-il)-5,6-difenil-*as*-triazina, pta=3-(1,10-fenatrolin-2-il)-*as*-triazina[5,6-*f*]acenaptileno, ptp=3-(1,10-fenatrolin-2-il)-*as*-triazina[5,6-*f*]fenantreno), **Figura 4.5(A)**. Os resultados dos testes indicaram que os complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pta})]$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{ptp})]$ interagem com o DNA de modo intercalativo, enquanto que para o complexo $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppt})]$, a interação ocorria por intercalação parcial. Esta variação do modo de ligação a biomolécula era dependente da ordem de planaridade do ligante coordenado aos complexos, sendo $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppt})] < [\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pta})] < [\text{Ru}(\text{tpy})(\text{ptp})]$.

Mitra e colaboradores^[39] sintetizaram vários complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Cl}_2(\text{L})]$, onde dentre os ligantes L estavam 2-mercaptotiazolina, **Figura 4.5(B)**, com o qual foi feito o estudo da interação com o DNA. Este complexo apresentou alta

toxicidade frente às células cancerígenas, e não apresentou toxicidade frente às células saudáveis. A interação com o CT-DNA indicou que o modo de interação com as bases da molécula de DNA foi através de uma fusão bifásica em altas concentrações ou inibição da atividade da enzima topoisomerase II.

Figura 4. 5: Complexos de rutênio e rutênio-areno investigados por (A) Chao^[38] e (B) Mitra^[39].



Como já relatado, provavelmente a cisplatina e os seus derivados e alguns complexos de rutênio tem como alvo principal o DNA, interações estas do tipo não covalente entre os complexos e proteínas, ou complexos e lipídios, localizados na superfície celular. A efetivação destas interações depende do tipo de ligante e do estado de oxidação do centro metálico. Mas diferente disto, os fármacos de rutênio podem se ligar a vários outros alvos biológicos diretamente, como peptídeos e proteínas^[40,41], ou apresentar um mecanismo de solvólise das ligações Ru-Cl dos complexos, que representa um mecanismo para a ativação^[42]. Portanto, o estudo da interação de complexos metálicos com lipídios é de grande importância para compreensão do comportamento destes compostos com o meio celular.

4.1.4.2 Estudos de interação com membranas por Filmes de Langmuir

A utilização de fosfolipídios na obtenção de filmes de Langmuir é um assunto ainda explorado, pois a monocamada lipídica representa um modelo eficiente que mimetiza alguns aspectos da membrana celular. No caso das monocamadas de fosfolipídios na interface ar-água como um modelo de membranas biológicas, é simples, mas muito eficiente, pois o arcabouço de tais membranas é formado por uma bicamada de fosfolipídios^[43]. Substâncias incorporadas dentro de uma monocamada podem proporcionar mudanças características, como densidade de empacotamento, a organização de moléculas durante a formação de filmes de Langmuir, as

propriedades elétricas das monocamadas, entre outras. Dentre os diferentes filmes de Langmuir que podem ser obtidos, um tipo específico é o formado por moléculas anfifílicas de fosfolípídios, moléculas orgânicas constituintes de membrana celular. O avanço das técnicas de caracterização dos filmes de Langmuir tem se mostrado úteis em investigações a nível molecular. Estes reconhecidos modelos de membrana são de grande interesse uma vez que são sistemas relativamente simples que permitem avaliar interações específicas entre átomos ou grupos funcionais o que não é viável em sistemas de elevada complexidade como experimentos de cultura celular^[44].

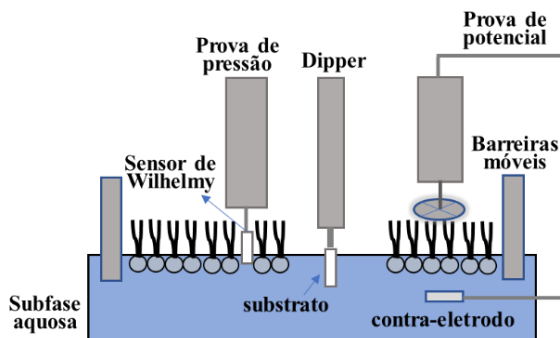
Em contexto histórico, Irving Langmuir, em 1917, foi o primeiro a investigar a formação de monocamadas de substâncias puras ao invés de óleo, utilizando os compostos anfifílicos. Ele desenvolveu a técnica de obtenção de filmes finos sobre a subfase aquosa evidenciando a natureza monomolecular dos filmes e sugerindo a orientação das moléculas na interface ar-água. Estas monocamadas são conhecidas como filmes de Langmuir, em homenagem a este cientista. Poucos anos depois, junto com sua assistente Katharine Blodgett, iniciou estudos da transferência destes filmes monomoleculares para substratos sólidos, dando origem aos filmes Langmuir- Blodgett (LB)^[45,46].

Algumas moléculas possuem a capacidade de se orientar na interface entre as fases gasosa e líquida, minimizando a energia livre que um sistema possui. O filme resultante na superfície possui a espessura de uma molécula e é então chamado de monocamada. As moléculas da superfície de um líquido possuem uma força resultante atrativa que tende a contrair, e assim diminuir o excesso de energia livre. Essa força é conhecida como tensão superficial^[45]. Quando temos a presença de um filme monomolecular sobre a superfície aquosa, ele altera a tensão superficial e esta alteração é mensurada experimentalmente através da pressão de superfície (π), a qual é definida como a diferença em tensão superficial entre uma subfase na ausência do material (γ_0) e uma subfase com a monocamada (γ). O valor máximo de pressão de superfície chega a $72,8 \text{ mN m}^{-1}$, a 20°C , o qual é referente à tensão superficial da água^[43,45].

A respeito da técnica, as monocamadas ou filmes de Langmuir são obtidos através da dissolução da substância apropriada em um solvente apolar (de baixa constante dielétrica), volátil, seguida da sua distribuição sobre a superfície da subfase. Os filmes são formados e caracterizados em um equipamento denominado de cuba de Langmuir (**Figura 4.6**), o qual existe disponível comercialmente em diferentes modelos e marcas. Estes equipamentos são geralmente retangulares e feitos de um material hidrofóbico, geralmente politetrafluoretileno, PTFE (Teflon®), onde é adicionada a subfase aquosa. As cubas possuem barreiras móveis que

se movem simetricamente em direção ao centro da cuba ou às laterais e possui instrumentos para a caracterização das monocamadas obtidas, como por exemplo, eletrobalança com sensor de Wilhelmy para medida da variação da pressão de superfície, prova de potencial de Kelvin para aferir a variação do potencial de superfície e motor de imersão e emersão do substrato sólido na subfase líquida denominado de *dipper*^[43,45,46].

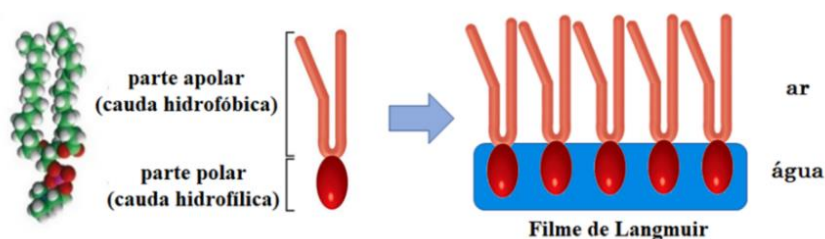
Figura 4. 6: Representação de uma cuba de Langmuir e seus acessórios.



FONTE: A Autora.

Geralmente os estudos com as monocamadas de Langmuir são realizados a partir de moléculas com características anfifílicas como mostra **Figura 4.7**, ou seja, com uma região hidrofílica (interação com meio aquoso) responsável pelo espalhamento do filme na superfície da água devido à sua maior interação com esta subfase; e uma região hidrofóbica (baixa interação com meio aquoso), sendo frequentemente formada de cadeias alifáticas, diminuindo a solubilidade das moléculas na subfase aquosa. Moléculas anfifílicas podem se orientar na interface ar-água com uma fase gasosa ou uma fase líquida para minimizar sua energia livre. Essas moléculas, como por exemplo, ácidos graxos e os fosfolipídios, apresentam uma estrutura perfeita para a obtenção de filmes monomoleculares, porque em subfase aquosa as moléculas se organizam espontaneamente em monocamadas altamente estáveis^[43,45,47].

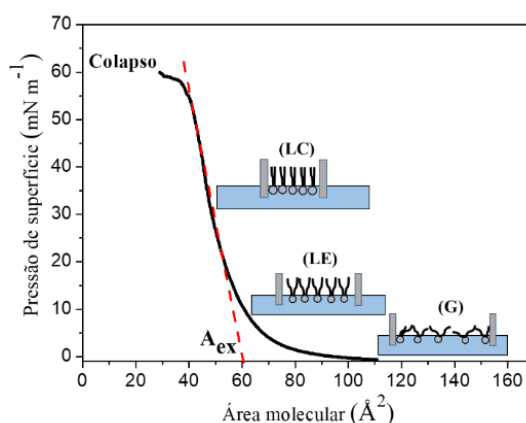
Figura 4. 7: Representação esquemática de um fofolipídeo e a orientação destas na interface entre o ar e a água.



FONTE: A Autora.

Para que o filme formado sob a subfase seja tão fino a ponto de se atingir a espessura de uma molécula, esta área superficial deve ser extensa e/ou a quantidade de material espalhado suficientemente pequena. Um composto solubilizado em um solvente orgânico volátil e imiscível em água ($0,1 - 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$), geralmente clorofórmio, é espalhado sobre a superfície aquosa. Após a evaporação do solvente, a monocamada é comprimida com as barreiras móveis, diminuindo a área ocupada pelo filme e ocasionando em transformações de fase. Se a área disponível por molécula for elevada, o filme se encontra no estado denominado gasoso, onde as interações entre as moléculas são fracas e podem ser desprezadas. Se a área superficial para o filme for diminuída, através da compressão do filme com uma barreira móvel, as moléculas interagirão progressivamente à medida que a área média ocupada por molécula diminuir. Estas transições podem ser identificadas pelo monitoramento da pressão de superfície em função da área ocupada pelo filme, gerando um gráfico chamado de isoterma $\pi-A$ ^[43,45,46] (**Figura 4.8**).

Figura 4. 8: Isoterma de superfície para o fosfolipídio DPPS, sendo (G) fase gasosa, (LE) fase líquido-expandido e (LC) fase líquido-condensada, sendo indicada a área de maior ordenamento (A_{ex}) a partir da tangente à fase condensada da isoterma.



FONTE: A Autora.

O arranjo regular das moléculas dispersas é direcionado devido o início da compressão das barreiras, o que leva a uma mudança da área superficial do filme devido à organização das moléculas, surgindo assim fases distintas: fase gasosa (G) onde as moléculas da monocamada estão separadas, exercendo pouca força umas sobre as outras, não interagindo entre si, mantendo a tensão superficial inalterada; fase líquido-expandida (LE): à medida que a área superficial da monocamada é reduzida, as moléculas começam a interagir, ficando mais próximas; fase líquido-condensada (LC): com a área molecular reduzida, as moléculas tendem a formar um arranjo regular, no qual o filme apresenta-se organizado, com moléculas bem empacotadas e orientadas^[43,46].

Com a compressão contínua das barreiras móveis, ocorre a situação chamada de colapso, a qual se deve ao aumento da pressão de superfície até atingir um valor máximo de compactação das moléculas; fazendo com que o material seja expelido da interface ar-água^[46,48]. A pressão de superfície nesse valor limite é chamada de pressão de colapso (π_c) que ocorre acima da pressão em que a monocamada está em equilíbrio com o *bulk*, indicando que a monocamada está em um estado supersaturado (metaestável)^[48]. Outra informação relevante é a partir da isoterma π -A é possível estimar a área que cada molécula ocupa quando está no seu estado de maior ordenamento (A_0), também denominada de área extrapolada (A_{ex}), traçando uma reta tangente à fase condensada. Matematicamente, a área por molécula é calculada pela **Equação 4.1**. Ao dividir a área do filme (A) pelo número total de moléculas sobre a superfície da água, obtém-se a área ocupada por uma molécula (a).

$$a = \frac{AM}{N_A V} = \frac{CA}{cN_A V} \quad [4.1]$$

onde, M é a massa molecular do material, C é a concentração da solução espalhada, N_A é o número de Avogadro, c é a concentração molar específica da solução e V é o volume da solução^[44,45].

Os filmes de Langmuir quando obtidos, podem ser caracterizados por diversas técnicas, sendo a seguir relatadas as utilizadas neste trabalho:

- Pressão de superfície (π -A): fornece informações sobre a área molecular; fases formadas durante a compressão das barreiras; colapso; compressibilidade; interação com espécies na subfase ar-água; estabilidade do filme; análise termodinâmica de sistemas mistos^[43,46].
- Potencial de superfície (ΔV -A): fornece a orientação de dipolos moleculares; estado de agregação molecular; interação com espécies na subfase ar-água; momento de dipolo^[43,45,46].
- Módulo de compressão (C_s^{-1}): indica a fase das monocamadas (G) gasosa, (LE) líquido-expandida, (L) líquida, (LC) líquido-condensada e (S) sólida^[49]. De acordo com Davies e Rideal^[47], valores C_s^{-1} entre 0–12,5, 12,5–50, 50–100 e 100–250 mN m⁻¹ indicam que a monocamada está na fase gasosa, líquido-expandida, líquida e líquido-condensada, respectivamente. Valores de C_s^{-1} superiores a 250 mN m⁻¹ representam um filme tipicamente em fase sólida.

Em resumo, esta técnica revela os aspectos dinâmicos das interações moleculares através de medidas de tensão superficial ou potencial de superfície. Por este método é possível acompanhar as interações moleculares que podem ocorrer e que induzirão mudanças nas propriedades físico-químicas, sendo estas relacionadas com a conformação dos complexos e

dos fosfolipídios. Portanto, a partir disso é possível avaliar o mecanismo de ação dos potenciais candidatos à metalodrogas ou antibióticos.

Na literatura, já são relatados alguns estudos com filmes de Langmuir de modelos de membranas com os mais diferentes tipos de compostos candidatos a fármacos, mas ainda pouco se exploram o uso de complexos como metalodrogas e antibióticos no estudo de sua interação e mecanismo de ação.

Em um trabalho recente reportado, desenvolvido por Carvalho e colaboradores^[50], derivados de isovanilina foram preparados para avaliar suas propriedades citotóxicas contra linhas celulares de câncer B16F10 (melanoma murino), HL-60 (leucemia), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A2058 (melanoma humano) e HeLa (adenocarcinoma de colo uterino). A diferença nas estruturas destes derivados alterava a lipofilicidade dos mesmos, assim, os autores investigaram a interação dos derivados citotóxicos da isovalinina em modelos de membrana celular através das monocamadas de Langmuir, empregando os lipídios DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e DPPS (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina). As mudanças estruturais dos compostos modulavam a interação com os fosfolipídios sob a interface ar-água. Esses resultados foram muito importantes para entender os aspectos biofísicos relacionados à interação dos compostos citotóxicos com a membranas de celulares cancerígenas.

O complexo bisfosfínico $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{VPy})\text{Cl}_3]$, onde: dppb= 1,4-bis-(difenilfosfina) butano e VPy= 4-vinilpiridina, teve sua atividade antitumoral testada contra as células de carcinoma de laringe humana, Hep-2 e em células controle normais de rim de macaco verde africano, denominadas células VERO, com resultados da viabilidade celular expressa como IC_{50} de $120 \pm 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $67 \pm 7 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, indicando alta toxicidade do complexo para células normais. Investigou-se seu modo de ação principalmente relacionado ao seu efeito sobre as membranas celulares por monocamadas de Langmuir na presença dos fosfolipídios zwitteriônico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e o dipalmitoilfosfatidilglicerol carregado negativamente (DPPG). Neste estudo observou-se que o complexo teve um forte efeito sobre as isotermas de pressão de superfície de ambos os lipídios, principalmente em termos de propriedades elásticas das monocamadas. Foi observado que maiores interações entre o complexo e os fosfolipídios ocorriam em pressões próximas de 30 mN m^{-1} , valor este da organização da membrana lipídica. Outros mecanismos de ação via receptores ou outros componentes celulares não podem ser descartados, mas os resultados evidenciaram efeitos significativos nas membranas celulares, que provavelmente estão associados com a alta toxicidade deste complexo bifosfínico^[51].

Portanto, nesse capítulo serão apresentados os resultados da atividade citotóxica e o estudo das monocamadas de Langmuir na presença de fosfolipídios que mimetizam a membrana celular, para identificar um possível mecanismo de ação dos complexos.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade citotóxica dos complexos **1-8** contra linhagens celulares de câncer e saudável, e a partir de alguns testes de interação biológica, investigar um possível mecanismo de ação para os complexos da série **1-4**.

4.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos complexos neutros $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**) e catiônicos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{NCl}]^+$ (**5-8**) frente às linhagens celulares MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26, adenocarcinoma de mama), A549 (ATCC: CCL-185, câncer de pulmão) e MRC-5 (ATCC: CCL-171, pulmão não-tumoral), (U2-OS) (ATCC HTB-96) osteossarcoma ósseo humano.
- Obter dados quantitativos e qualitativos do potencial citotóxico dos complexos a partir dos valores de IC_{50} ou por imagens ópticas, respectivamente, que demonstrem a ação destes compostos em meio celular, assim como estabelecer uma comparação com a metalodroga de referência, a cisplatina.
- Determinar a lipofilicidade do **1-4** por meio experimental ou teórico.
- Realizar o teste de viscosidade do **1-4** para avaliar a interação com biomoléculas como DNA.
- Investigar um possível mecanismo de ação dos complexos **1-4** por estudos de monocamadas de Langmuir, mimetizando membranas células de câncer e células saudáveis e correlacionar com o potencial citotóxico desses complexos.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Ensaios de citotoxicidade dos complexos da série **1-4**

A citotoxicidade dos complexos foi avaliada contra três linhas celulares, adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26,), câncer de pulmão A549 (ATCC: CCL-185,) e pulmão não-tumoral MRC-5 (ATCC: CCL-171). Essas células foram cultivadas em meio de cultura de meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e L-glutamina (2 mM). As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração de células. Em seguida, aplicou-se as células em placas de cultura de 96 poços (estéril) (densidade de células 1,5.10⁴ células/poço para MDA-MB-231 e A549 e 1.10⁴ células/poço para MRC-5). As placas foram armazenadas em um forno (37 °C - 5% de CO₂) durante 24 h para adesão celular. Após este tempo, os complexos em diferentes concentrações (100 a 0,048 µM), foram adicionados às placas e foram mantidos no forno durante 48 h. Vale ressaltar que **1** e **2** foram solubilizados em DMSO e **4** em etanol; sendo que **3** não foi solúvel para o teste. Para todos os complexos, a porcentagem de solvente utilizada no experimento foi de 0,5%, e essa mesma porcentagem foi adicionada aos poços utilizados como controle. Após o tempo de incubação de 48 h, o meio de cultura foi removido das placas e foram adicionados 50 µL de MTT (0,5 mg/mL em PBS) a cada poço, que foram então incubados no forno (37 °C - 5% de CO₂) por um período de 3-4 horas. Os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de isopropanol e a absorbância dos poços foram registrados por um leitor de microplacas (Labtech LT4000) a um comprimento de onda de 540 nm. Os valores de IC₅₀ (concentração do complexo capaz de inibir 50% do crescimento celular) foram calculados por meio dos valores de absorbância registrados. Estes testes foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar) e a Dra. Katia Mara de Oliveira (UFSCar). Todas os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2 Ensaio de citotoxicidade dos complexos da série 5-8

A citotoxicidade da série **5-8** foi avaliada contra linhagem celular osteossarcoma ósseo humano U2-OS (ATCC HTB-96), que foi cultivado em meio de cultura de meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/F-12 (Gibco; 11320-082), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco; 12484028), 2 mM Aminoácidos não essenciais médios (MEM NEAA) (Gibco; 11140050) e 15 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1 piperazinoetanossulfônico), pH 7,4. As células foram cultivadas a 37 °C em 5% de CO₂ e os meios foram trocados a cada dois ou três dias. As células foram plaqueadas a 5,0x10⁵ células/ balão de 75 cm² e cultivadas

durante 48 h antes do tratamento. O complexocisplatina (Calbiochem 232120; 300 g/mol) foi preparado em DMSO a uma concentração de 25 mM e armazenado por um máximo de 2 semanas a -20 °C.

As células foram semeadas a $1,0 \cdot 10^5$ /poço em uma placa de cultura de 6 poços e incubadas a 37 °C por 48 h antes do tratamento. Estas células foram tratadas com DMSO (0,1% volume/volume) como solvente controle, com a cisplatina a $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou com os complexos em uma faixa de concentrações (0,5, 1,0, $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Imagens de células vivas foram capturadas em temperatura ambiente com uma câmera Infinity 1 operada pelo software de imagem Infinity Capture (Lumenera Corporation) em um microscópio invertido Olympus CKX41 usando uma objetiva Olympus LUCPlanFLN 20x com abertura numérica de 0,45. As imagens foram processadas usando o Adobe Photoshop (CC 2014.1.0). Este teste foi realizado em colaboração com o Roy M. Golsteyn do Dept. of Biological Sciences, University of Lethbridge.

4.3.3 Coeficiente de partição ou Lipofilicidade (Log P)

Inicialmente obteve-se uma curva padrão para octanol, a partir das soluções de complexos em concentrações (2×10^{-4} , 4×10^{-4} , 6×10^{-4} , 8×10^{-4} e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Para o teste adicionou-se em um frasco uma mistura de 50 mL de água destilada e 50 mL de octanol, que foi deixado sob agitação contínua por 12 horas. Em seguida, a mistura foi colocada em um funil de separação, separando dois líquidos co-saturados. A preparação das amostras consistiu dos complexos numa concentração de (0,6 mmol) com 3 mL de octanol e 3 mL da água pré-saturados em um tubo Falcon. Em seguida, foram sonificados por 30 min. Realizou-se a centrifugação desta solução por 30 min a 300 rpm. Em seguida, removeu-se a fase octanol (laranja) para determinação da concentração no UV-Vis, e a fase aquosa (incolor) para medição do Ru pelo forno atômico de grafite, Espectrometria de absorção (GF AAS), conforme procedimento descrito no **item 3.3.3.3** As medidas foram repetidas em triplicata. A concentração dos complexos obtida em cada fase foi utilizada na determinação dos valores de Log P pela **Equação 4.1**.

$$\text{LogP} = \frac{[\text{complexo}]_{(\text{octanol})}}{[\text{complexo}]_{(\text{água})}} \quad [4.1]$$

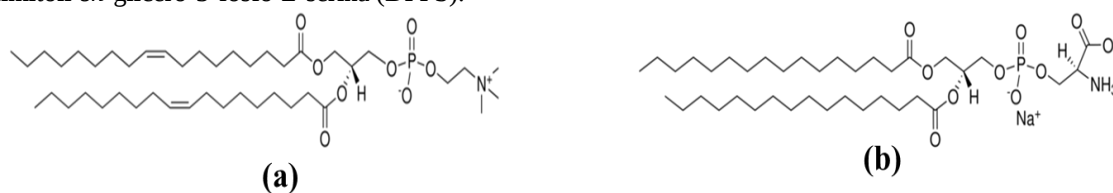
4.3.4 Estudo de Interação com DNA - Viscosidade

As medidas de viscosidade dos complexos **(1-4)** foram realizadas usando um viscosímetro de Ostwald imerso em um banho-maria mantido a 25 °C. A concentração de DNA no tampão PBS, pH 7,4, foi mantida constante em todas as amostras (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$), enquanto a concentração dos complexos foi aumentada de 0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O tempo do fluxo foi medido 5 vezes com um cronômetro digital e o valor médio foi calculado. Os dados são apresentados em um gráfico com $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus a razão [complexo]/[DNA], onde η e η_0 são as viscosidades específicas do DNA na presença e na ausência do complexo, respectivamente. Os valores de η e η_0 foram calculados usando a expressão $(t-t_b)/t_b$, onde t é o tempo do fluxo observado e t_b é o tempo do fluxo do tampão PBS.

4.3.5 Obtenção e Caracterização dos Filmes de Langmuir dos complexos com modelo de membranas

Os lipídios 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), e 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-*L*-serina (DPPS) foram adquiridos da *Avanti Polar Lipids*. Todos os lipídios apresentavam grau de pureza maior que 99%, e foram usados sem purificação prévia. As estruturas dos lipídios são ilustradas na **Figura 4.9**.

Figura 4. 9: Estrutura química dos compostos (a) 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), (b) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-*L*-serina (DPPS).



As monocamadas de Langmuir foram preparadas a partir do espalhamento das soluções de **1-4**, DOPC e DPPS ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) em CHCl_3 ou CHCl_3 :metanol (4:1) sobre subfase de tampão PBS (pH=7,4; 150 mM de NaCl). As monocamadas mistas de DOPC/Ru, DPPS/Ru, foram preparadas usando diferentes volumes das soluções estoque dos complexos Ru para atingir proporções molares de 95: 5, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 e 10:90 (lipídio/complexo Ru). As medidas de pressão e potencial de superfície foram realizadas em uma Cuba de Langmuir KSV (modelo KN 1003, *KSV Instruments, Ltd., Helsinki, Finlândia*) a qual tem uma área máxima de 273 cm^2 , alocada no Laboratório GDEM- UEPG. A cuba é equipada com uma placa Wilhelmy (papel de cromatografia Whatman Chr1) como sensor de pressão de superfície e,

com uma prova de Kelvin como sensor de potencial de superfície, usando o método da placa vibrante. Os experimentos foram realizados a ~ 20 °C. Após 15 minutos para a evaporação do solvente, as monocamadas foram comprimidas na velocidade de 10 mm min^{-1} . Os experimentos foram efetuados em triplicata.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Ensaio de atividade anticâncer para os complexos da série $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**) e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{NCl}]^+$ (**5-8**)

A citotoxicidade *in vitro* dos complexos de rutênio **1**, **2** e **4** foi determinada contra linhas celulares de tumor humano (MDA-MB-231-Adenocarcinoma mamário e A549- câncer de pulmão) e não tumoral (MRC-5- células saudáveis de pulmão) usando o método MTT colorimétrico. Os resultados dos valores IC_{50} estão resumidos na **Tabela 4.1**, os quais foram obtidos a partir da incubação de $5 \cdot 10^5$ células/ mL^{-1} com diferentes concentrações dos complexos, em solução estoque de DMSO e etanol por um período de incubação de 48 horas.

O valor de IC_{50} representa a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células, sendo encontrado através da densidade ótica após a adição de MTT tanto nas células tratadas com os complexos de rutênio, quanto no controle negativo (células sem tratamento). Os testes foram realizados em triplicatas independentes. Como controles adicionais, a citotoxicidade da cisplatina, dos ligantes triarilfosfinas **L1**, **L2** e **L4**, bem como os óxidos de seus ligantes **L01**, **L02** e **L04** (visto que, que as fosfinas podem sofrer oxidação espontânea nas condições de teste da célula), foi determinada nas mesmas condições de teste, contra as mesmas linhas celulares. O estudo não foi realizado para **3**, pela baixa solubilidade apresentada nos solventes utilizados no experimento, desta forma, inviabilizando os testes.

Tabela 4. 1: Resultados de IC₅₀ (μmol L⁻¹) para **1-4**, seus respectivos ligantes livres (**L1-L4**) e oxidados (**L01-L04**) em um período de 48 horas.

Complexos	IC ₅₀ μM		
	MDA-MB-231	A549	MRC-5
1 ^a	28,01 ± 2,28	26,28 ± 1,62	> 100
2 ^b	3,13 ± 0,11	1,53 ± 0,10	1,85 ± 0,32
4 ^b	15,51 ± 0,90	14,72 ± 0,34	9,38 ± 0,75
L1	85,53 ± 12,53	> 150	118,13 ± 5,60
L2	118,45 ± 10,55	> 150	78,00 ± 12,21
L4	177,93 ± 24,51	> 150	> 150
L01	74,25 ± 1,41	86,91 ± 8,41	55,70 ± 7,33
L02	51,11 ± 1,80	168,93 ± 4,02	69,87 ± 8,82
L04	150,50 ± 4,47	108,03 ± 8,06	> 150
Cisplatina ^c	2,43 ± 0,20	11,5 ± 1,2	29,09 ± 0,78

^a Solução estoque em EtOH. ^b Solução estoque em DMSO. ^c Solução estoque em DMF.

Os valores IC₅₀ para os complexos apresentaram um comportamento promissor para a atividade citotóxica nas linhas celulares de câncer humano e foram superiores aos respectivos ligantes livres, mostrando um efeito satisfatório na coordenação com o rutênio para formação dos complexos. Nos ensaios de citotoxicidade para os diferentes ligantes os valores de IC₅₀ nas linhagens avaliadas, não foram ativos na maior concentração testada >150 μM.

O **2** e **4** foram ativos contra células tumorais (MDA-MB-231 e A549), como também citotóxicos contra células não tumorais, porém, o **2** com valores de IC₅₀ 1,53 ± 0,10 μM, teve uma melhor atividade quando comparado à cisplatina com IC₅₀ 11,5 ± 1,2 μM, para a linha celular A549. Como pode ser visto o **1** é menos ativo que o **2** e **4**, mas não mostra atividade contra as células não tumorais MRC-5 (IC₅₀>100 μM). A partir dos resultados de citotoxicidade para os complexos estudados, foi possível realizar o cálculo do índice de seletividade (IS)^[52], **Equação 4.2**, que indica o quão seletivo o complexo testado é aos danos causados às linhagens de células tumorais em relação às células normais, valores dispostos na **Tabela 4.2**.

$$IS = IC_{50} (MRC-5) / IC_{50} (MDA-MB-231 \text{ ou } A549) \quad [4.2]$$

Tabela 4. 2: Valores de índice de seletividade para **1**, **2** e **4** e droga de referência.

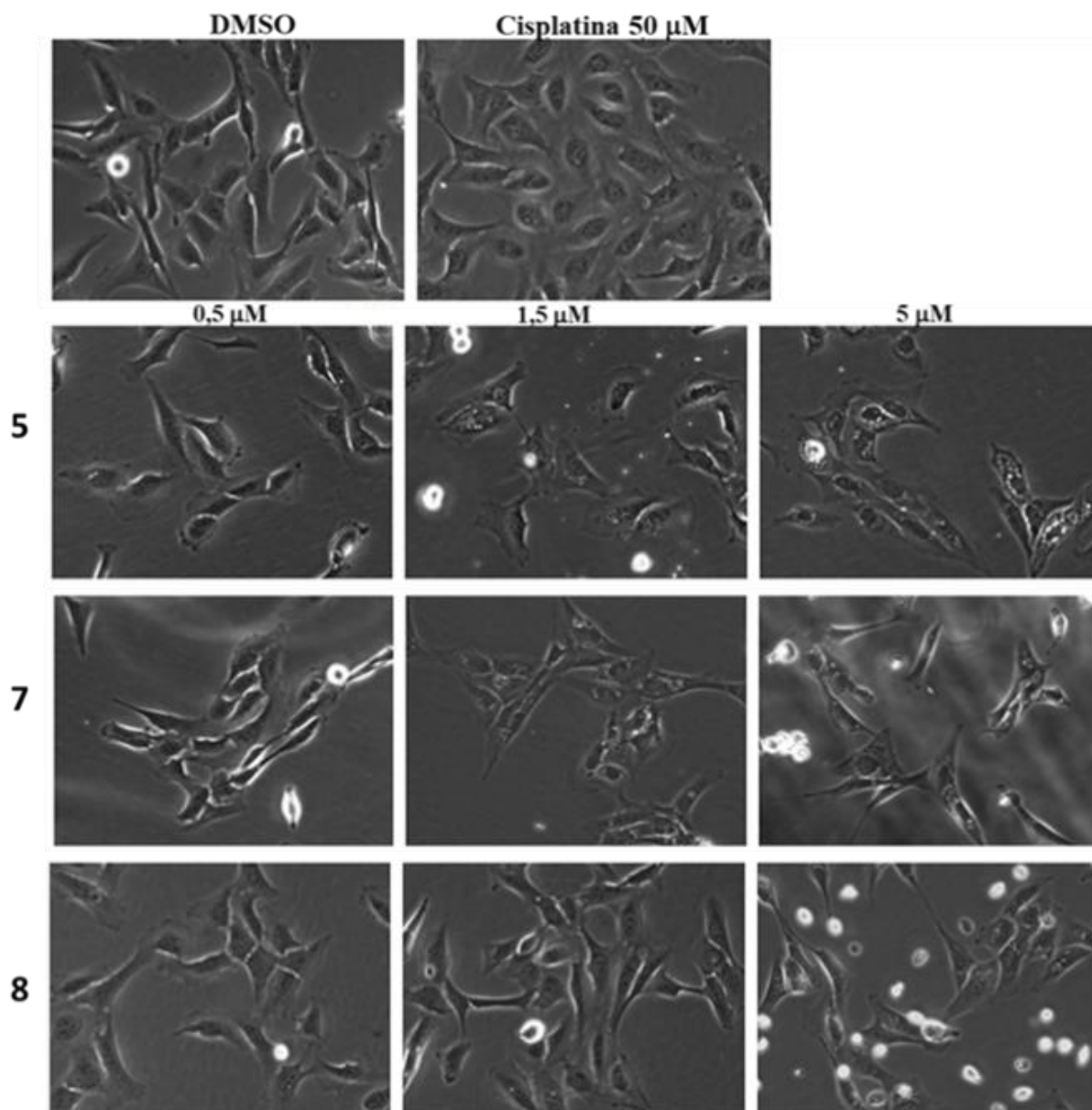
Complexo	Índice de Seletividade (IS)	
	MDA-MB-231	A549
1	3,57	3,80
2	0,59	1,21
4	0,60	0,64
Cisplatina	11,97	2,53

Sabendo que os valores de $IS \geq 2$ são considerados significativos^[52], tem-se que o **1** se destacou dentre os demais, apresentando valores satisfatórios ($IS=3,57$ para MDA-MB-231 e $3,80$ para A549). Para este complexo o potencial citotóxico não foi melhor quando comparados aos outros complexos, porém, não foi citotóxico para a linhagem não tumoral MRC-5, demonstrando uma alta seletividade para o câncer de pulmão (A549) *in vitro* em relação aos outros complexos estudados. O **2** apresentou uma melhor atividade citotóxica contra a linhagem celular (A549) em menores concentrações, quando comparado ao cisplatina, porém, menor índice de seletividade, o que sugere que este complexo é capaz de matar células cancerígenas de maneira mais eficaz, porém menos seletiva^[53]. Tendo estes resultados promissores, avaliou-se a estabilidade dos complexos frente ao DMSO, uma vez que os estudos biológicos são realizados na presença deste solvente, tornando-se necessária certificar que atividade citotóxica esteja de fato relacionada aos complexos, ou de um produto secundários formado, uma vez que o DMSO é um solvente altamente coordenante. Marszaukowski e colaboradores^[54] realizaram testes de atividade biológica em DMSO para complexos do tipo $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})LCl_2]$, $L =$ 2-aminopiridina, 2-metilaminopiridina, 2-benzilaminopiridina e piridina, e demonstraram que houve a labilização do ligante piridina da esfera de coordenação pela molécula de DMSO.

Sendo assim, a estabilidade do **2** e **4** foi testada em DMSO- d^6 , por RMN $^{31}P\{^1H\}$, para verificar através dos espectros obtidos se sofriam alguma alteração durante um período de 48h. Os espectros destes complexos testados estão apresentados em **A4.1** e **A4.2**, onde é possível notar que os mesmos se mantêm inalterados quando comparados com os espectros do complexo em outro solvente e com o seu ligante livre. O pequeno deslocamento químico é devido aos diferentes solventes utilizados. Isto confirma que os resultados dos testes biológicos podem ser atribuídos aos próprios complexos, e não à formação de produtos secundários com DMSO coordenado. O **1** foi dissolvido em etanol para realização do teste, não sendo possível realizar seu teste de estabilidade.

Para os complexos da série **5-8** o teste de atividade citotóxica *in vitro* foi realizado frente linhagens celulares de câncer ósseo humano (U2-OS), as quais foram cultivadas por um período de 24 h. Estas células foram tratadas com DMSO, como solvente controle do teste a cisplatina numa concentração de (50 μM) e com o **5**, **7** e **8** numa faixa variável de concentrações (0,5-1,5 μM). O **6** apresentou resultados semelhantes ao **7**, como explicado pelas imagens obtidas em 1,5 μM para estes dois complexos (Figura **A4.3**). Após 24 h de tratamento, as células foram observadas por microscopia de luz com contraste de fase, cujas imagens representativas da interação dos complexos em meio celular estão ilustradas na **Figura 4.10**.

Figura 4. 10: Imagens de microscopia de luz com contraste de fase obtidas para os complexos da série 5-8 após 24 h.



As imagens apresentadas na **Figura 4.10** evidenciam que todos os complexos tiveram atividade citotóxica contra a linhagem celular testada, mostrando algumas deformações nas estruturas celulares. Em uma concentração de 0,5 μM são perceptíveis a formação de vesículas (pequenos pontos claros) que aparecem no retículo endoplasmático na maioria das células. Já em 1,5 μM as vesículas são mais fáceis de observar e presentes na maioria das células, como mostra a Figura 4.10 (áreas pequenas e arredondadas claras). Em 5 μM , a maioria das células estão mortas cessando a divisão celular das mesmas (pontos arredondados claros) e as células restantes têm vesículas muito grandes. Percebe-se formações de pequenas vesículas mais proeminentes (zonas redondas e claras) dentro das células, principalmente para o complexo 5

numa concentração de 5 μM . Como os complexos induzem a formação de vesículas celulares, pelo contrário, as células tratadas com cisplatina não têm presença de vesículas, o que sugere como alvo do mecanismo de ação destes complexos, o retículo endoplasmático celular, resultante da interação com a membrana celular. Imagens mais evidentes da formação de vesículas e da mortalidade de células, estão dispostas no **A4.3**. Este teste foi mais qualitativo, podendo nos conferir apenas, a favorável atividade destes complexos, necessitando futuramente de testes quantitativos para obter dados de IC_{50} para comparar com a série de complexos (**1-4**), e determinar se a inclusão de um ligante N-heterocíclico à esfera de coordenação, provoca alguma diferença na atividade citotóxica.

A atividade citotóxica de complexos neutros e catiônicos similares aos complexos da série **1-4** e **5-8**, com ligantes fosfinas e N-heterocíclicos, contra diferentes linhagens celulares de câncer já foram relatados e estão dispostos na Tabela **A4.4**.

4.4.2 Coeficiente de partição (log P) dos complexos **1-4**

Os complexos sintetizados são formados por ligantes triarilfosfinas que são altamente lipofílicos, desta forma, para expressar a lipofilicidade destes complexos, fez-se testes para determinar o coeficiente de partição (log P).

O coeficiente de partição ou lipofilicidade é um parâmetro que demonstra a tendência de distribuição de um composto no organismo humano quanto à difusão por estruturas apolares como membranas celulares ou soluções biológicas como o plasma sanguíneo^[55,56]. Este parâmetro molecular descreve o equilíbrio de partição de uma molécula entre água e um solvente orgânico imiscível como o *n*-octanol, e pode ser calculado pela **Equação 4.3**.

$$\text{LogP} = [\text{complexo}]_{\text{octanol}} / [\text{complexo}]_{\text{água}} \quad [4.3]$$

Estudos mostram que quanto maior o valor de log P maior será a lipofilicidade de um composto, e maior permeação através das membranas biológicas, e isso pode ter relação com a eficácia de um futuro medicamento anticâncer *in vitro*. Deste modo, um valor positivo para log P reflete uma preferência pela fase orgânica, e um valor negativo reflete uma afinidade relativa pela fase aquosa^[55,56].

Em trabalhos anteriores envolvendo complexos de rutênio, percebe-se que houve uma investigação na tentativa de correlacionar lipofilicidade e citotoxicidade, e relatar a acumulação efetiva no interior das células. Os complexos reportados por Huang e colaboradores^[57] contendo

ligantes terpiridil substituídos tais como $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ (**Ru1**), $[\text{Ru}(\text{phtpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ (**Ru2**) e $[\text{Ru}(\text{biphtpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ (**Ru3**) exibiram atividade antiproliferativa diferenciada que pôde ser correlacionada com a lipofilicidade das estruturas. Estes autores constataram que o **Ru3** foi relativamente mais hidrofóbico ($\text{LogP}=0,63$) que **Ru1** e **Ru2**, com valores de LogP de -1,1 e -0,35, respectivamente. Logo, o **Ru1** não foi citotóxico ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), enquanto o **Ru3** exibiu citotoxicidade muito promissora ($\text{IC}_{50} = 3,3 \mu\text{M}$) para linhagem celular HeLa.

Os valores de ($\log P$) obtidos experimentalmente para **1**, **2** e **4** estão dispostos na **Tabela 4.3**, e os dados e gráficos obtidos para obter as concentrações dos complexos em meio aquoso e orgânico (*n*-octanol), estão em **A4.5** e **A4.6**.

Tabela 4. 3: Coeficiente de partição ($\log P$) para **1**, **2** e **4** sintetizados.

Complexo	$\log P$
1	2,21
2	2,10
4	2,03

Ao analisar os dados da **Tabela 4.3** nota-se que os valores de $\log P$ para os complexos estudados estão na faixa de 2,03-2,21, o que nos dá um indício que todos os complexos apresentam afinidade semelhante pela fase orgânica, independente das diferenças dos ligantes em suas estruturas. Como o método experimental teve alguns problemas para a separação das fases orgânica e aquosa, houve a dificuldade de solubilidade destes complexos em meio aquoso, os respectivos valores de LogP podem não ser reais pelo método experimental.

Como uma alternativa para elucidar os possíveis valores de lipofilicidade desta série de complexos, o caráter lipofílico foi estimado a partir dos valores calculados do $\log P$ para seus ligantes livres, usando alguns softwares computacionais como ALOGSP 2.1 e Molinspector^[58], assumindo que os valores obtidos são proporcionais aos valores dos referidos complexos lipofílicos^[59]. Essa estratégia já foi anteriormente explorada para avaliar a lipofilicidade de alguns complexos de Ru(II)–areno, obtendo boas correlações. Obviamente, não é uma comparação quantitativa, mas uma medida relativa para estimar o potencial de acúmulo dos compostos nas células, o que, por sua vez, algumas vezes, tem impacto na citotoxicidade^[60]. Os valores calculados e a média obtida estão dispostos na **Tabela 4.4**.

Tabela 4. 4: Dados empíricos^a de LogP para os ligantes triarilfosfina substituídas (**L1-L4**) e **PPh₃**.

	L1	L2	L3	L4	PPh₃
ALOGPS 2.1 ^b	10,51	7,45	6,90	5,86	5,46
Molinspiration ^c	10,06	7,30	7,25	4,99	4,82
Média	10,29	7,38	7,08	5,43	5,15

^a LogP computacional empírico determinado a partir das geometrias 3D (SMILES).^b<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>. ^c<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

Os resultados obtidos puderam enfatizar a importância da lipofilicidade no design de novas drogas, no que diz respeito a mudanças na estrutura. Pequenas variações nos ligantes, podem afetar a atividade destes complexos. Aqui, temos diferentes formas de substituição nos ligantes considerados de alta lipofilicidade e os resultados empíricos estão de acordo com a lipofilicidade esperada para os ligantes (**L1>L2>L3>L4**). Pelos dados da Tabela 4.4, podemos verificar que o **L1**, o que apresenta substituintes mais apolares em sua estrutura, conseqüentemente, uma estrutura mais lipofílica, mostra um maior valor de Log P em relação ao **L4**, o qual possui substituintes de maior polaridade. Neste contexto, a lipofilicidade pode ser utilizada, embora sendo uma medida limitada, como uma ferramenta para prever a atividade antiproliferativa nesta classe de complexos. Porém, neste estudo, esses resultados não tiveram relação com a citotoxicidade encontrada para os complexos, de modo que o **1** foi o que apresentou uma menor atividade citotóxica quando comparado ao **4** (**Tabela 4.1**). Resultados semelhantes foram obtidos na literatura, onde não foi encontrada uma relação linear de valores de LogP e citotoxicidade para uma série de complexos de rutênio-areno^[60].

Fazendo uma relação da estrutura e a atividade destes compostos, o **1** teria a tendência de apresentar uma maior citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais, frente aos demais complexos da série, devido à presença do **L1**, altamente lipofílico, que poderia conferir uma maior interação com o meio celular. Portanto, o maior valor de IC₅₀ pode ser atribuído à dificuldade de solubilização, ocasionando maior precipitação no decorrer do teste realizado em solução tampão PBS, fazendo com que os dados de IC₅₀, neste caso, se apresentem em maiores concentrações.

4.4.3 Estudos para identificação do mecanismo de ação para a série **1-4**

Como já relatado, provavelmente a cisplatina e os seus derivados tem como alvo principal o DNA, mas diferente disto, os fármacos de rutênio podem se ligar a vários outros alvos biológicos, interações estas do tipo não covalente entre os complexos e proteínas, ou

complexos e lipídios, localizados na superfície celular. A efetivação destas interações depende do tipo de ligante e do estado de oxidação do centro metálico. Portanto, o estudo da interação de complexos metálicos com diferentes tipos de biomoléculas é de grande importância para compreensão do comportamento destes compostos com o meio celular.

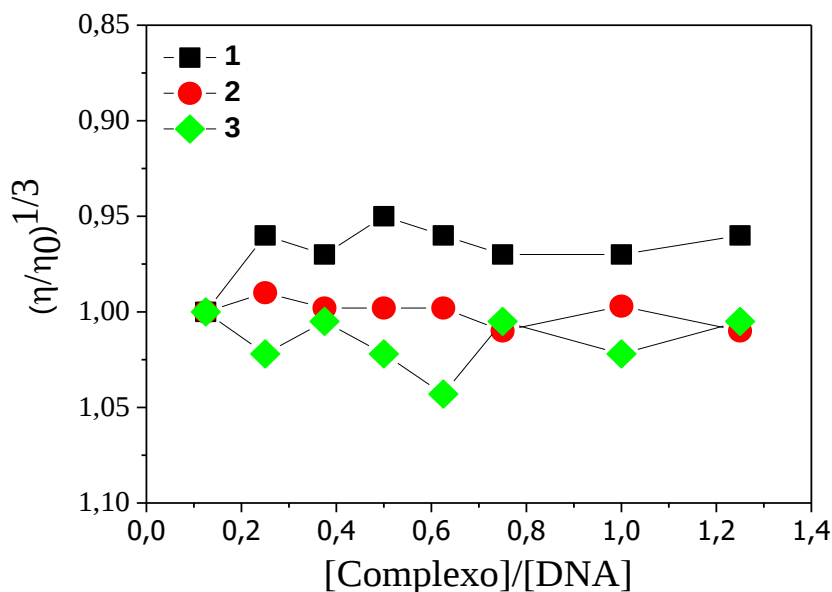
4.4.3.1 Estudo de interação com o DNA por viscosidade

Uma das formas mais precisas de se investigar o mecanismo de ação de complexos e identificar seu efeito terapêutico, é avaliar sua interação com o DNA. Possivelmente, devido ao sucesso dos medicamentos à base de platina (cisplatina), os ácidos nucleicos são geralmente considerados como alvos potenciais para um novo medicamento à base de metal, onde para estes complexos a interação ocorre covalentemente através das bases nitrogenadas do DNA, impedindo sua replicação. Como resultado, as interações de complexos à base de rutênio com DNA e RNA são extensivamente estudadas^[61,62,63].

Devido às características estruturais apresentadas pelo DNA, as interações com complexos metálicos podem ocorrer por meio de uma coordenação covalente direta, intercalação, interações hidrofóbicas nos sulcos do DNA e por interações eletrostáticas^[63,64,65]. Nesse sentido, realizou-se a caracterização do modo de ação dos complexos de rutênio-areno sintetizados, usando medidas de viscosidade para testar se há interação com o DNA. A viscosidade é uma propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento, em uma determinada temperatura, ou seja, quanto maior for a viscosidade de um determinado material, menor será a velocidade que o fluido se movimenta^[38]. Quando o complexo se liga ao DNA afeta a estrutura da dupla hélice, causando variações em sua viscosidade, evidenciando uma possível interação entre o complexo e o DNA^[65].

Os valores de viscosidade podem ser obtidos pela construção de um gráfico de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ (onde η e η_0 são as viscosidades específicas da solução de CT-DNA, na presença e ausência dos complexos, (respectivamente), vs. [Complexo]/[CT-DNA], obtendo uma curva que apresenta o tipo de interação existente^[57]. Pode-se observar pelo gráfico obtido **na Figura 4.11**, que as concentrações crescentes do **1**, **2** e **4** não alteram muito a viscosidade do CT-DNA, não podendo estabelecer uma tendência constante, o que indica que não há interação evidente.

Figura 4. 11: Gráfico de viscosidade considerando o aumento da concentração dos complexos em relação a viscosidade relativa do CT-DNA ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) a 25°C .



Pelos resultados obtidos por este teste já é possível excluir a possibilidade de dois tipos de interação: a intercalação, que resulta no alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice, aumentando a viscosidade da solução; e a ligação covalente, que ocasiona a fragmentação do DNA, e consequente ligação do complexo ao grupo fosfato ou aos pares de bases nitrogenadas, ocasionando o rompimento das interações entre as fitas e das ligações entre os nucleotídeos, levando a uma diminuição da viscosidade, como ocorre com a cisplatina). Porém, a tendência que foi observada para esta série de complexos pode ser atribuída às interações fracas entre os complexos e o DNA, tais como: ligações de hidrogênio, pelos sulcos, eletrostáticas ou ausência de interação. Estas interações não provocam alterações significativas na viscosidade da solução de DNA com o aumento da concentração dos complexos testados^[37,66,67].

4.4.3.2 Estudo do mecanismo de ação por filmes de Langmuir de fosfolipídios

A solubilidade extremamente baixa em água e em tampão PBS dos complexos estudados, impediu a implementação de diversos testes para outras atividades biológicas, que pudessem reconhecer o mecanismo de ação destes compostos. Portanto, a fim de obter mais informações sobre suas promissoras atividades citotóxicas, os complexos da série (1-4) foram investigados por meio de fosfolipídios presentes na membrana celular, que mimetizassem a composição de membranas celulares cancerígenas, usando monocamadas de Langmuir como modelos físicos que podem refletir os aspectos das condições biológicas.

Estudos por meio de filmes de Langmuir de fosfolipídios são atraentes, pois, apesar de não serem bicamadas como membranas celulares reais, possibilitam um controle rigoroso da composição, do estado de compactação e estruturação da monocamada, características que se aproximam ao formato de uma superfície celular, fazendo que estes filmes obtidos sejam um modelo adequado^[68]. Neste estudo utilizamos os fosfolipídios de membrana DPPS para minimizar a composição de células cancerígenas e DOPC para células saudáveis, de modo a avaliar os seus efeitos antes e após a incorporação dos complexos. Os filmes foram obtidos em subfase de tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,4, para se aproximar ao ambiente biológico celular e os complexos foram solubilizados em CHCl₃. Alterações na membrana celular tem sido descrita como fator chave em diversas patologias, incluindo o câncer, sendo que as células cancerosas apresentam diversas características químicas, estruturais, metabólicas e biofísicas que diferem das células normais. Estas exibem um folheto externo que é basicamente composto de lipídios zwitteriônicos, como as fosfatidilcolinas (PC) e a esfingomielina (SM), enquanto os lipídios aniônicos, como as fosfatidilserinas (PS) e fosfatidiletanolamina (PE), estão presentes no folheto interno da membrana celular. A perda dessa distribuição lipídica na membrana tem sido observada em vários tipos de câncer, o que resulta na exposição do lipídio carregado negativamente, PS, na superfície das membranas. Sendo assim, o DPPS foi escolhido como lipídio para se estudar no modelo de membrana cancerosa^[69].

Segundo os ensaios citotóxicos *in vitro* contra as linhagens celulares de tumor humano de câncer de mama e pulmão (MDA-MB-231 e A549, respectivamente) os complexos **1**, **2** e **4** apresentaram valores IC₅₀ de 28,01, 3,13 e 15,52 µM para a linhagem MDA-MB-231, respectivamente, e 26,29, 1,53, 14,72 µM para a linhagem A549, respectivamente. Estes valores são considerados promissores, uma vez que a cisplatina apresentou IC₅₀ de 2,43 e 11,54 µM para as linhagens MDA-MB-231 e A549, respectivamente. Sendo assim, se faz necessário entender os mecanismos envolvidos na atividade anticâncer dos complexos de rutênio. Um possível mecanismo seria a interação e rompimento da membrana celular, a qual pode ser mimetizada por monocamadas de Langmuir.

4.4.3.2.1 Filmes de Langmuir dos complexos da série 1-4

O comportamento dos complexos **1-4** foi avaliado quando espalhados na subfase do tampão PBS (pH 7,4, simulando o meio fisiológico da membrana celular) e comprimidos para obtenção das monocamadas de Langmuir. As isotermas de pressão de superfície (π -A),

módulos de compressão (C_s^{-1}) e potencial de superfície (ΔV -A), estão ilustradas na **Figura 4.12** e os dados experimentais obtidos estão sumarizados na **Tabela 4.5**.

Figura 4. 12: (A) Isotermas de pressão de superfície (π -A) (Inserção= módulos de compressão C_s^{-1}) e (B) potencial de superfície (ΔV -A) para o filme de Langmuir dos complexos **1-4** em subfase de tampão PBS (pH = 7,4).

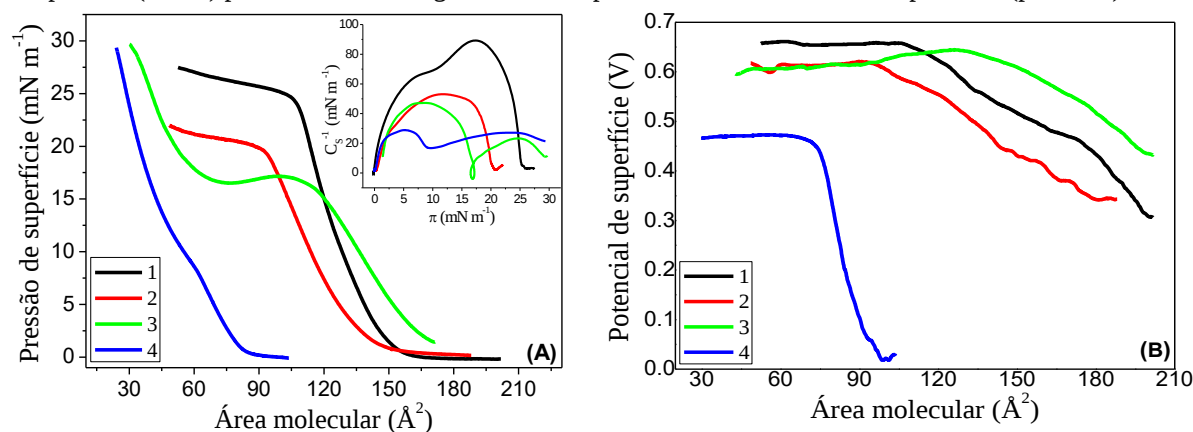


Tabela 4. 5: Parâmetros para as monocamadas de Langmuir dos complexos **1-4**.

	Momento de dipolo, μ (Debye) ^a	Área molecular (Å ²)	$A_{cs}(\text{Å}^2)^b$	π_{colapso} (mN m ⁻¹)	ΔV_{max} (V)	$C_s^{-1}_{\text{max}}$ (mN m ⁻¹)
1	7,50	143	161*	25	0,65	89
2	7,93	134	124*	20	0,62	53
3	7,97	84	73**	29	0,63	47
4	8,63	59	64**	30	0,47	27

^aA partir dos cálculos PBE0/Def2TZVP nas geometrias cristalográficas. ^bÁrea do complexo obtida a partir de geometrias de estruturas cristalinas: *fator de esferas CP= 0,91; **fator de triângulos= 0,5. (**Figura A4.7**).

Como observado pelas isotermas da **Figura 4.12**, todos os complexos **1-4** mostram um aumento das pressões da superfície para valores acima de zero, o que demonstra que estes complexos lipofílicos são capazes de formar monocamadas de Langmuir em uma subfase de tampão PBS; embora não sejam moléculas anfipáticas. Estes complexos apresentaram momentos de dipolos calculados com valores entre 7,50 e 8,63 Debye, como apresentado na **Tabela 4.5**.

As isotermas de pressão de superfície (π -A) (**Figura 4.12(A)**) para **1-4** evidenciam que esses complexos ocupam áreas moleculares diferentes, obtidas pela extrapolação da curva para pressão zero (A_0) (**Tabela 4.5**), com áreas moleculares de 143, 134, 84 e 59 Å², respectivamente. Os valores da área molecular diminuíram à medida que a estrutura dos complexos mudou de (**1**) para (**4**). A maior área molecular encontrada para o **1** é explicada pelo distúrbio relacionado ao impedimento estérico presente no ligante triarilfosfina **L1** na estrutura. Esses valores estão próximos da área estimada por suas estruturas cristalinas (A), se forem

levadas em consideração a natureza globular apresentada pelas estruturas do **1** e **2** em comparação com a forma triangular do **3** e **4**. A similaridade em A_{ext} determinada para **3** e **4** é uma indicação de que as interações específicas dos grupos *p*-OMe polares, com moléculas vizinhas ou mais provavelmente com a água, levam a um empacotamento mais denso para esses complexos. No caso do **1** e **2**, as áreas moleculares maiores são explicadas pelos maiores tamanhos dessas estruturas globulares (**Figura A4.6 e A4.7**).

As isotermas de π -A também apresentam a pressão de colapso que ocorre a 25, 20, 29 e 30 mN.m⁻¹, para **1-4**, respectivamente. As isotermas π -A do **3** e **4** exibem um platô a 17 e 10 mN m⁻¹, respectivamente, relacionado a uma transição de fase ou mesmo ao início do processo de colapso da monocamada, onde esta deixa de ser ordenada dando lugar a agregados e multicamadas. Isso pode ocorrer devido a uma alteração na orientação da estrutura do complexo devido à presença do substituinte *p*-OMe do PAr₃ em seu estado condensado.

Para investigar as transições de fase e elasticidade apresentadas pelas monocamadas de Langmuir, foram calculados os módulos de compressão C_S^{-1} dada pela **Equação 4.4**, onde A é a área molecular à pressão π . De acordo com Davies e Rideal^[47], os valores de C_S^{-1} entre 0-12,5 mN m⁻¹ indicam que a monocamada está na fase gasosa, 12,5-50 mN m⁻¹ na fase líquido-expandida, 50-100 mN m⁻¹ fase líquida, 100-250 mN m⁻¹ para uma monocamada de líquido-condensada, e valores acima de 250 mN m⁻¹ uma fase de condensação sólida.

$$C_S^{-1} = -A \cdot \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad [4.4]$$

A inserção na **Figura 4.12(A)** ilustra os módulos de compressão indicando que a elasticidade interfacial diminuiu do **1** ao **4** (89, 53, 47 e 27 mN m⁻¹, respectivamente). Assim, o **1** forma uma monocamada líquida, enquanto **2**, **3** e **4** produzem monocamadas líquido-expandidas. Como o módulo de compressão de uma monocamada insolúvel é uma medida da rigidez do filme formado^[70], o valor mais alto de C_S^{-1} para o **1** indica que seus filmes têm uma maior elasticidade, devido à sua estrutura volumosa globular (**Figura A4.12**), levando a esferas mais compactadas. Por outro lado, as monocamadas formadas apresentam-se mais flexíveis para o **4**, e provavelmente refletem num empacotamento menos eficiente de sua geometria ou na competição entre organização dipolar com ligação de H de curto alcance e átomos de oxigênio do grupo *p*-OMe.

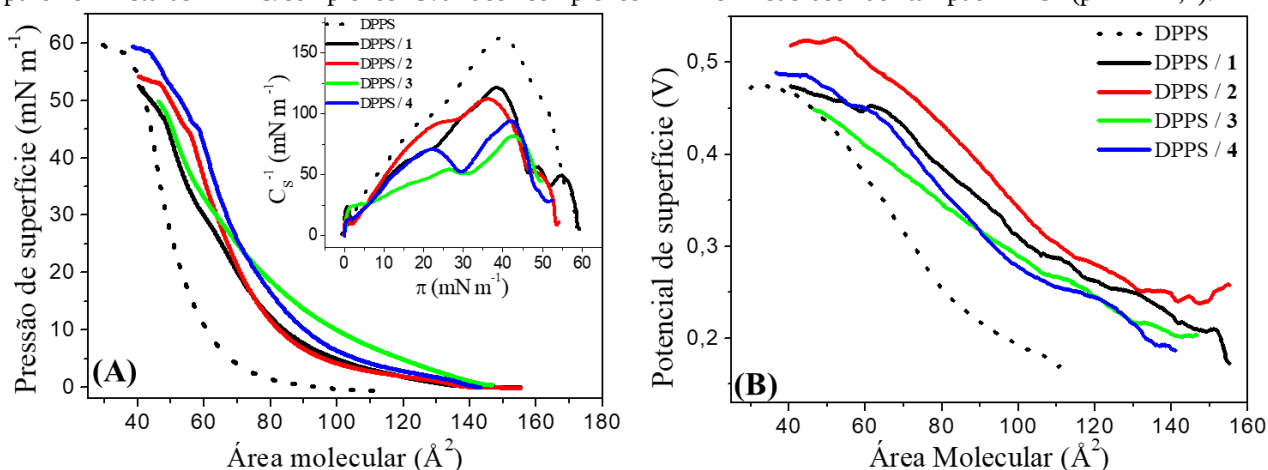
As isotermas de potencial de superfície (ΔV -A) exibiram uma diminuição do potencial máximo, apresentando valores de 0,65, 0,62, 0,63 e 0,47 V, para **1-4**, respectivamente,

conforme **Tabela 4.5**. Os potenciais superficiais iniciais não são zero em grandes áreas moleculares para **1** a **3**, o que pode indicar a ocorrência de agregação molecular na interface desde o início da compressão^[71]. O maior valor do potencial de superfície máximo para o **1**, revela que os maiores substituintes (t-Bu) no **L1**, contribuem para as propriedades elétricas das monocamadas, aumentando sua capacitância.

4.4.3.2.2 Efeito dos complexos 1-4 em modelos de membrana de célula de câncer (DPPS)

Para estudar a interação dos complexos **1-4** com DPPS, monocamadas do fosfolipídio puro e monocamadas mistas de DPPS com os complexos, numa composição de 5% (mol/mol) foram obtidas, e os resultados estão dispostos na **Figura 4.13**.

Figura 4.13: Isotermas de pressão de superfície (A) (inserção: C_s^{-1}) e potencial de superfície (B) para o DPPS puro e misturas DPPS/complexos 5% dos complexos 1-4 em subfase de tampão PBS (pH = 7,4).



As isotermas da monocamada do DPPS na subfase do tampão PBS (**Figura 4.13(A)**) reproduziram as reportadas na literatura^[73,74]. A curva de π -A apresenta um aumento acentuado da pressão de superfície começando em aproximadamente 75 Å², o qual é contínuo até atingir o colapso em 59 mN m⁻¹. Os dados de módulo de compressão (inserção **Figura 4.13(A)**) evidenciam uma transição de fase em aproximadamente 18 mN m⁻¹, que é consistente com uma fase LE com C_s^{-1} de 92 mN m⁻¹ e outra transição em 40 mN m⁻¹ com um C_s^{-1} em 163 mN m⁻¹, relacionado a um estado de empacotamento da monocamada em uma fase LC. A área extrapolada para pressão zero é de aproximadamente ~ 59 Å², também consistente com a literatura^[73,74]. O potencial de superfície, **Figura 4.13(B)**, não foi zero em grandes áreas por molécula (0,17 V a 110 Å²) e aumentou acentuadamente até atingir 0,47 V para uma monocamada condensada.

No estudo das monocamadas mistas ressalta-se que o **3** não teve sua atividade biológica determinada, devido sua baixa solubilidade pela sua possível cristalização nos testes biológicos. Assim, estabelecemos uma comparação para as isotermas obtidas para as monocamadas mistas apenas com o **1**, **2** e **4**, considerando que o **3** tenha o mesmo mecanismo de ação. Foi estudada a interação do DPPS com 5% dos complexos (mol/mol), pois, considerou-se os seus respectivos valores de IC_{50} obtidos nos estudos de atividade citotóxica.

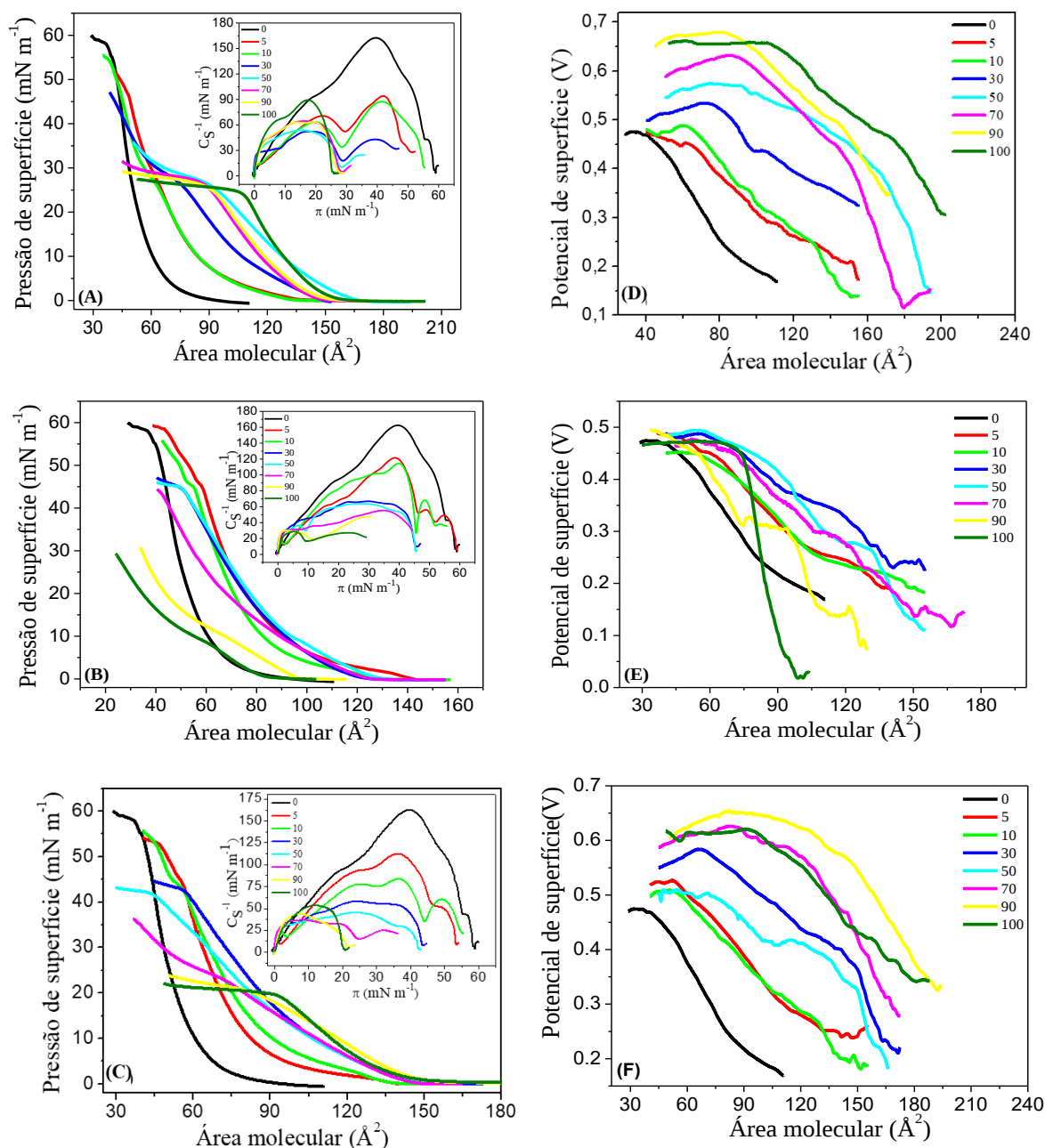
A incorporação do **1-4** nas monocamadas de DPPS ocasionou em uma expansão nas isotermas de pressão de superfície (**Figura 4.13(A)**), com aumento da área molecular média de 58 para 86, 83, 94 e 89 Å², respectivamente, indicando a interação dos complexos nas monocamadas lipídicas (Tabela **A4.8**). Essa expansão significativa, pode estar relacionada à sua atividade citotóxica para as células cancerígenas MDA-MB-231 e A549, demonstrando que o mecanismo de ação dos complexos, pode estar relacionado à interação com perda da integridade da membrana celular.

O potencial de superfície da monocamada DPPS aumentou de 0,47 para 0,47, 0,53, 0,45 ou 0,49 V para as monocamadas contendo **1-4**, respectivamente (**Figura 4.13(B)**). Essa caracterização mostrou que os complexos também afetaram as propriedades elétricas da membrana, alterando a orientação dipolar do fosfolípido. Os valores distintos de ΔV revelam que a incorporação do **2** tem um efeito mais significativo nas propriedades elétricas da membrana, cujo composto é o que apresenta o maior efeito citotóxico.

Pela caracterização de módulo de compressão (C_s^{-1}) verificou-se uma variação nos valores da monocamada DPPS quando os complexos estavam presentes (inserção da **Figura 4.13(A)**). Este efeito está relacionado à interação entre DPPS e os complexos, que levou a uma diminuição significativa da elasticidade interfacial da monocamada lipídica. Por exemplo, perto de 30 mN m⁻¹[75], que é a pressão da membrana biológica, o módulo de compressão diminuiu de 129 mN m⁻¹ para 98, 98, 50 e 53 mN m⁻¹ para as monocamadas mistas de DPPS/**1**, DPPS/**2**, DPPS/**3** e DPPS/**4**, respectivamente. A incorporação dos complexos na monocamada de DPPS torna-a mais fluída, com um efeito mais significativo para **2** e **4**, de maior citotoxicidade. Esses resultados são relevantes, uma vez que a atividade de alguns fármacos está relacionada à sua capacidade de alterar a elasticidade da membrana, comprometendo a integridade da membrana celular^[74]. Também estudou-se o efeito da concentração de **1-4** no modelo de membrana DPPS, e para isso, prepararam-se monocamadas mistas de DPPS/complexo em diferentes proporções molares (5, 10, 30, 50, 70 e 90%) de modo a verificar a interação nas diferentes concentrações dos complexos e seus efeitos na membrana. As isotermas π -A, ΔV -A e C_s^{-1} de DPPS puro,

complexo (1,2,4) e suas misturas DPPS/(1,2,4) são exibidas na Figura 4.14 e os dados experimentais estão dispostos na Tabela A4.9.

Figura 4. 14: (A-C) isotermas π -A (Inserção C_S^{-1}) para os complexos 1, 2 e 4 respectivamente; (D-F) isotermas ΔV -A para monocamadas DPPS/1, DPPS/2 e DPPS/4 mistas em tampão PBS (pH 7,4), para várias porcentagens molares dos complexos (5-90 %).



A partir das isotermas de pressão de superfície π -A (**Figura 4.14 (A-C)**) percebe-se uma mudança em direção a áreas moleculares maiores em comparação com os compostos puros e esse aumento não é linear em função da razão molar de 1, 2 e 4. Este efeito indica a formação de monocamadas mistas expandidas. As monocamadas mistas DPPS/1 e DPPS/2 estão situadas entre às correspondentes do DPPS e do respectivo complexo, exceto a monocamada com 50%

de **1** e com 70 e 90% de **2**, as quais ultrapassam estas áreas moleculares. Por outro lado, nas isotermas em todas as proporções do **4** apresentaram valores superiores às áreas dos respectivos componentes puros, provavelmente devido à pequena área do complexo ou ao maior valor do momento de dipolo. Nota-se também que a concentração de 5 % dos complexos já altera a área do DPPS, mostrando que esta concentração já é o suficiente para afetar a membrana cancerígena, evidenciado pela modificação do perfil das isotermas e diminuição da pressão de superfície de colapso. Em concentrações mais altas (**50-90%**) as isotermas de π -A seguem o perfil dos complexos puros, exceto para o **4**. Outra característica interessante é a diminuição da pressão de colapso (20 a 49 mN m⁻¹) causada pelo aumento da proporção dos complexos em relação ao DPPS (59 mN m⁻¹). Este fato deve ser atribuído à penetração dos complexos na parte hidrofóbica da monocamada de DPPS, de modo a diminuir a estabilidade da monocamada e antecipação do processo de colapso. Essas observações podem ser relacionadas com o aumento da citotoxicidade do **2** e **4** em relação ao **1**.

Os módulos de compressão C_s^{-1} para as monocamadas mistas (Inserção **Figura 4.14(A-C)**) revelam duas transições de fases para todas as concentrações, seguindo o perfil do DPPS, porém, nas misturas DPPS/**1** e DPPS/**2** em baixas concentrações são observadas duas transições enquanto em altas concentrações apenas uma transição de fase é evidenciada, a qual, se aproxima do complexo puro. Com o desaparecimento da transição de fase em altas proporções dos complexos, pode-se sugerir que o **1** e **2** impedem a formação da fase condensada na monocamada, em comparação com os filmes obtidos para o DPPS, ocasionando a formação de monocamadas líquido-expandidas (LE) ^[76]. As misturas com o **4** seguem além das duas transições de fase do DPPS, as transições do complexo puro. De uma maneira geral os valores de compressibilidade diminuem com o aumento da concentração dos complexos, formando monocamadas mais expandidas e menos compressíveis sendo uma tendência linear para as misturas DPPS/**4**. Logo, em concentrações maiores as monocamadas são mais flexíveis, pois, permitem a permeabilidade do complexo na membrana, sendo que no DPPS/**4** esta alteração é mais pronunciada. Na região relevante para membranas celulares (30 mN m⁻¹) nota-se que em 5 e 10% há uma diminuição acentuada dos valores de C_s^{-1} e nas demais concentrações este decréscimo é menos evidente. Esse resultado sugere que a inserção de baixas concentrações dos complexos na membrana celular causa um impacto nas propriedades dos filmes.

Com relação ao potencial de superfície (**Figura 4.14(D-F)**), a literatura estabelece que o mesmo é sensível à orientação das cadeias e à orientação dos grupos polares que constituem o fosfolipídio^[77]. Os dados mostram um aumento no potencial de superfície máximo à medida

que a razão molar de **1**, **2** e **4** foi aumentada, sendo que para o **2** e **4** um aumento de $\Delta V_{\max}$ não é linear em função da proporção, ressaltando que em baixa proporção (5%) destes compostos, já ocorre um aumento notável no potencial da superfície, em relação ao DPPS puro. O (**1**) é um composto mais lipofílico, que provavelmente interage com a parte hidrofóbica do DPPS e contribui para efeitos notáveis na organização dipolar da monocamada lipídica. Deve ser apontado também que o fato dos potenciais em altas áreas moleculares não serem nulos é provavelmente devido à auto agregação do **1**, **2** e **4**. O estado de agregação pode estar ligado ou dissociado da membrana de DPPS, mas como foi evidenciada uma expansão nas isotermas π -A, o estado de agregação dos complexos ligados à membrana corrobora com esta expansão.

4.4.3.2.3 Estudo da interação entre DPPS e 1, 2, 4 por parâmetros termodinâmicos

Informações adicionais sobre a miscibilidade e as interações moleculares que ocorrem nas monocamadas mistas entre DPPS e os complexos, foram analisadas termodinamicamente a partir da análise dos valores da área em excesso por molécula (ΔA^E) e energia livre em excesso (ΔG^E). De acordo com a regra da aditividade, uma monocamada mista apresenta comportamento não-ideal, causado pelas interações moleculares, quando suas propriedades não dependem linearmente da composição da monocamada. Uma mistura ideal segue a Equação 4.5 e a área molecular média para uma monocamada mista ideal segue a **Equação 4.5**^[78,79,80]:

$$A_{12}(\pi) = A_1X_1(\pi) + A_2X_2(\pi) \quad [4.5]$$

onde A_{12} é a área molecular da mistura ideal, A_1 e A_2 são a área molecular na mesma pressão de superfície, X_1 e X_2 descrevem as frações molares dos componentes no filme misto.

Uma dependência linear pode indicar a existência de uma mistura ideal de moléculas que não interagem entre si ou apresentando uma completa imiscibilidade. E qualquer desvio à regra da aditividade indica algum tipo de interação molecular, bem como algum grau de miscibilidade^[79,81]. Desvios positivos à regra da aditividade indicam a presença de interações repulsivas entre as diferentes moléculas na monocamada mista, enquanto interações atrativas são evidenciadas com desvios negativos. Para algumas misturas, são observados alguns segmentos lineares, o que prova que os componentes são parcialmente miscíveis^[82].

Os valores da área em excesso a uma dada pressão de superfície são calculados pela **Equação 4.6**, visando determinar o efeito dos complexos na monocamada lipídica. A área experimental da monocamada mista pode ser comparada com a área ideal, onde ΔA^E representa

a área em excesso, A_{exp} a área experimental obtida nas isotermas π -A e A_{12} a área molecular média da mistura ideal^[83].

$$\Delta A^E = A_{exp} - A_{12} \quad [4.6]$$

Se a mistura é ideal, ou se os componentes são imiscíveis, ΔA^E é igual a zero; e o gráfico da área em função da composição da monocamada será uma linha reta. Efeito de condensação e/ou interações atrativas levam a valores negativos de área em excesso. Já interações repulsivas e/ou efeito de expansão entre as moléculas na mistura resultam em valores de ΔA^E maiores que zero. Estes efeitos ocorrem devido a fatores geométricos ou interações hidrofóbicas presentes nas estruturas dos compostos^[82,83].

As interações entre os complexos e DPPS nas monocamadas mistas foram analisadas quantitativamente pelo excesso de energia livre, calculada pela **Equação 4.7**:

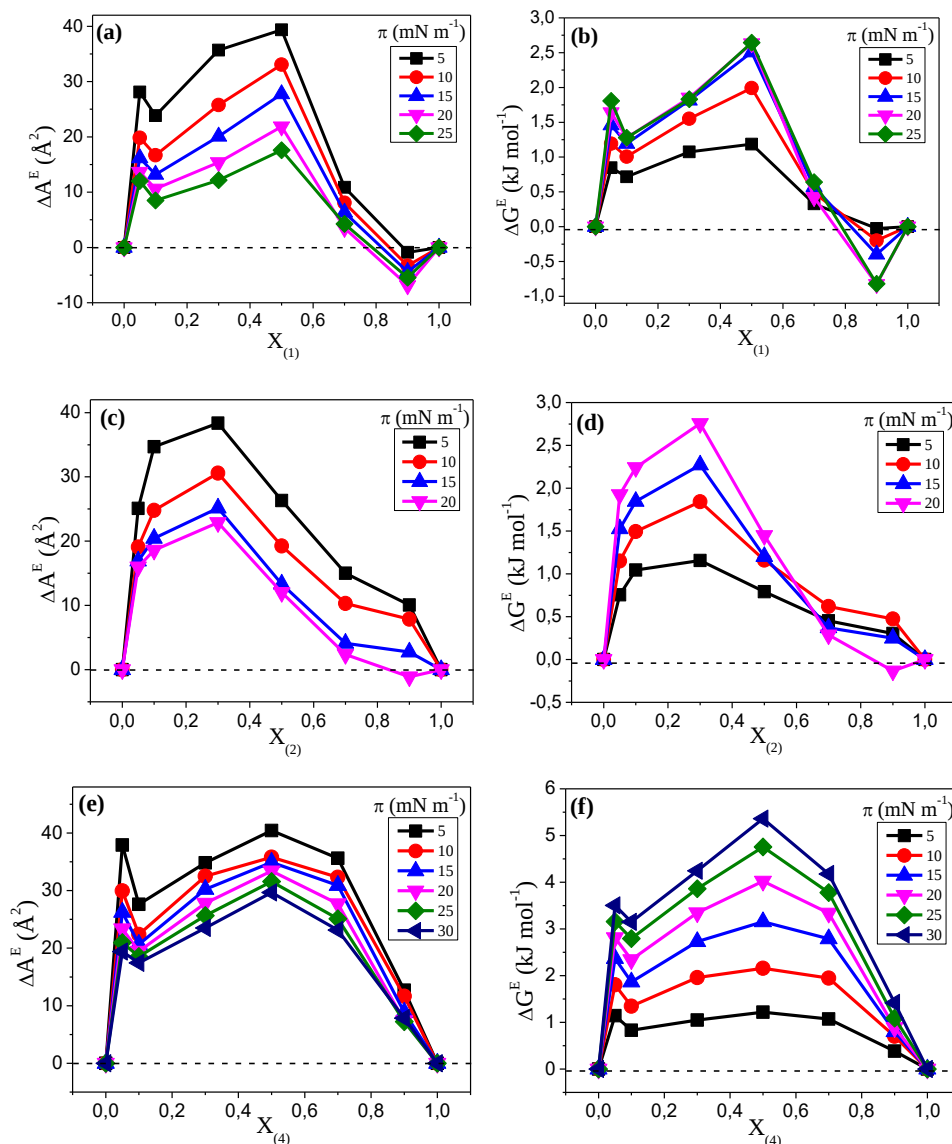
$$\Delta G^E = \int_0^\pi [A_{exp} - A_{12}] d\pi \quad [4.7]$$

ΔG^E é um parâmetro utilizado para estudar interações moleculares e analisar quantitativamente as propriedades termodinâmicas de um filme misto. Este parâmetro pode ser tratado como uma indicação de interação e estabilidade da monocamada mista^[82,80]. Valores negativos de ΔG^E indicam uma tendência de condensação devido à presença de uma interação atrativa entre as moléculas e a estabilidade da monocamada. Enquanto valores positivos indicam a predominância de interações repulsivas entre as moléculas e sugerem a separação de fase na monocamada, uma vez que as moléculas têm menor tendência de interagir devido a tais interações^[85].

As monocamadas mistas ou imiscíveis quando ideais exibem ΔA^E e $\Delta G^E = 0$. Valores negativos desses parâmetros indicam que a mistura é termodinamicamente mais favorável do que a separação entre os respectivos componentes e as interações são energeticamente mais favoráveis do que em uma mistura ideal. Embora os valores positivos indiquem a separação de fases e/ou repulsão, ou seja, as interações entre as moléculas são mais fracas que as dos respectivos filmes puros^[80,86].

Os gráficos obtidos pela análise termodinâmica, os valores da área em excesso por molécula (ΔA^E) e energia livre em excesso (ΔG^E), estão apresentados na **Figura 4.15**.

Figura 4.15: Análise termodinâmica de área em excesso (ΔA^E) (a, c, e) e excesso de energia livre (ΔG^E) (b, d, f) em função da razão molar dos complexos das monocamadas mistas DPPS/1, DPPS/2 e DPPS/4 respectivamente, a $\pi = 5-30 \text{ mN m}^{-1}$



De acordo com os gráficos da **Figura 4.15**, as monocamadas mistas DPPS/complexos, nas frações molares de $X = 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; \text{ e } 0,7 \text{ e } 0,9$ não seguiram a regra de aditividade (ΔA^E e $\Delta G^E \neq 0$), indicando que esses sistemas se comportam de maneira não-ideal^[80,86]. Ao aumentar a pressão de superfície, os valores de ΔA^E diminuíram e os de ΔG^E aumentaram. As variações observadas para ΔA^E e ΔG^E são principalmente positivas, então sugeriu-se que as interações entre DPPS e os complexos foram mais fracas e menos atrativas que nas monocamadas puras, portanto, DPPS/1, DPPS/2 e DPPS/4 exibem um grau relativamente alto de desordem, concluindo-se que os complexos podem desestruturar a organização das moléculas lipídicas do modelo de membrana de células de câncer, conforme observado pelas isotermas π -A mais expandidas.

Além disso, os valores de ΔG^E se tornaram mais positivos à medida que a pressão de superfície foi aumentada, sugerindo-se que a extensão da interação molecular foi reduzida com o rearranjo das moléculas na interface, o que está de acordo com a ruptura da membrana celular e a consequente citotoxicidade dos complexos contra as linhagens celulares de câncer MDA-MB-231 e A549. Um valor ΔG^E máximo de 2,67, 2,74 e 5,36 kJ mol⁻¹ foi identificado para DPPS/1, DPPS/2 e DPPS/4, respectivamente. O valor mais alto de ΔG^E para o modelo de membrana de células de câncer contendo o **4** pode indicar que esse complexo afeta mais significativamente a membrana celular, porém, os demais complexos apresentam valores que evidenciam interação e atividade citotóxica.

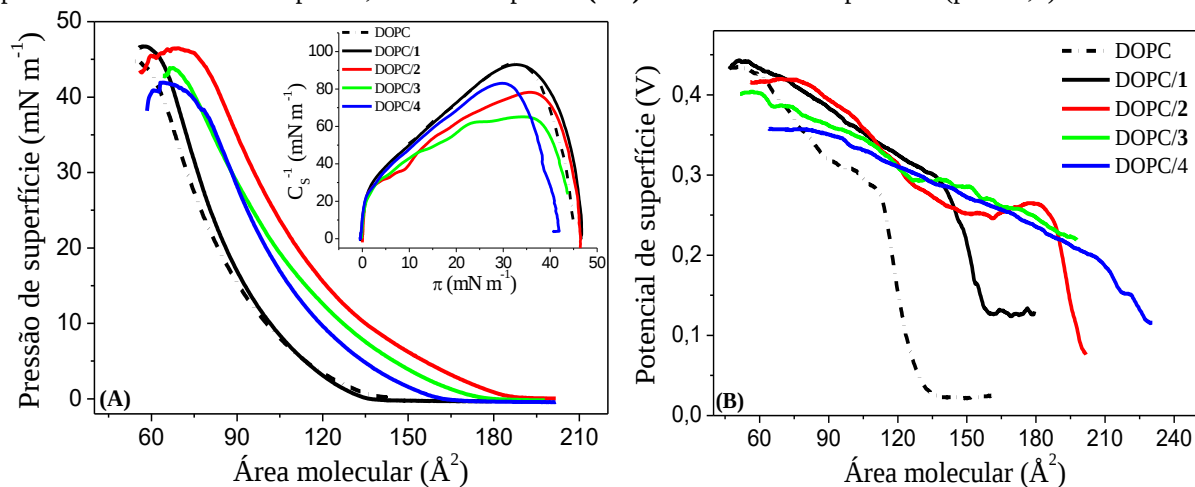
4.4.3.2.4 Efeito dos complexos 1-4 em DOPC como modelo de membrana saudável

Como os complexos **1**, **2** e **4** apresentaram citotoxicidade significativa contra células cancerosas, é importante estudar o seu efeito em membranas celulares saudáveis.

As membranas de mamíferos contêm alta proporção de fosfatidilcolinas (PC), tanto saturadas quanto insaturadas (DPPC e DOPC)^[87,88]. As fosfatidilcolinas são os fosfolipídios mais abundantes na parte externa de células eucarióticas. Estes lipídios são componentes estruturais importantes de todas as membranas organelares^[89], e também tem muitas outras funções importantes nas células. Além disso, PC são constituintes críticos do surfactante pulmonar humano, lipoproteínas séricas e bile^[90]. Baseando-se nisto, escolheu-se estudar o DOPC como modelo de membrana de células saudáveis.

A **Figura 4.16(A)** ilustra a isoterma π -A para a monocamada DOPC sobre subfase de tampão PBS, a qual está de acordo com a literatura^[88]. À medida que a monocamada de DOPC foi comprimida, a área molecular diminuiu e a pressão de superfície aumentou, até o processo de colapso. O DOPC exibe uma área molecular de 100 Å² e o colapso ocorre em torno de ~ 45 mN m⁻¹. Pela análise da isoterma π -A observam-se dois estágios distintos da formação da monocamada: a fase gasosa (π = 0 mN m⁻¹) e a líquida (π = 5 - 35 mN.m⁻¹).

Figura 4. 16: Isotermas de pressão de superfície (A) (inserção: C_s^{-1}) e potencial de superfície (B) para o DOPC puro e misturas DOPC/complexos, 5% dos complexos (1-4) em subfase de tampão PBS (pH = 7,4).



Pelos dados de módulo de compressão (Inserção **Figura 4.16(A)**) verificou-se que o DOPC apresenta apenas uma transição de fase, sendo esta da fase gasosa para líquida. O máximo de organização da monocamada de DOPC foi evidenciado em $\pi \sim 32 \text{ mN m}^{-1}$ com C_s^{-1} de 94 mN m^{-1} , o qual é característico de uma monocamada líquido-condensada. A caracterização de potencial de superfície revela alterações na orientação e conformação das moléculas na monocamada induzidas pela compressão. Os valores de ΔV da monocamada de DOPC aumentam à medida que é comprimida (**Figura 4.1(B)**), o que está de acordo com um aumento da orientação molecular na direção normal ao plano da superfície^[91,92]. Quando a monocamada de DOPC atinge o estado mais compacto, ΔV atinge 0,43 V, o qual está de acordo com a literatura^[91].

O estudo da interação do **1**, **2** e **4** com DOPC foi realizado visando compreender a citotoxicidade dos mesmos em células saudáveis. Ressalta-se que a interação do DOPC com 5% dos complexos (mol/mol) foi estudada considerando os valores de IC_{50} , o que já seriam indicativos de interação. A incorporação do **1** tem um efeito muito pequeno nas isotermas do DOPC, o que está de acordo com a sua baixa atividade citotóxica determinada para a linhagem celular não tumoral MRC-5 ($IC_{50} > 100 \text{ } \mu\text{M}$). Além disso, não foram observadas alterações significativas no perfil da isoterma π -A e nos valores de pressão de colapso, como também nenhuma mudança nos valores máximos de potencial de superfície e de módulo de compressão, Tabela **A4.9**.

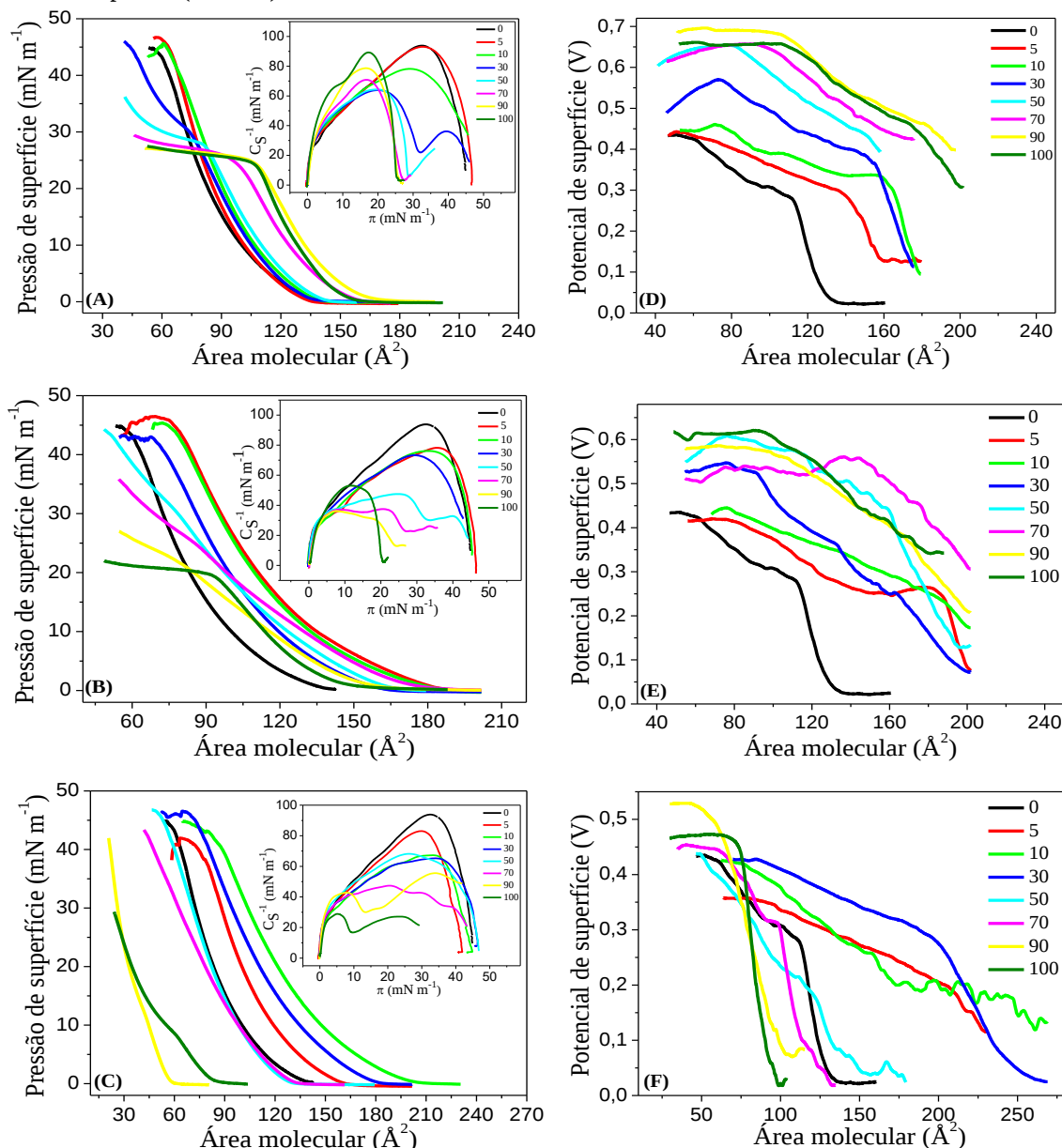
A incorporação do **2** e **4** nas monocamadas de DOPC ocasionaram uma expansão das isotermas π -A (**Figura 4.16(A)**), aumentando a área molecular de 100 para 136 e 121 Å², respectivamente. Este aumento relevante na área molecular do DOPC pode estar relacionado

com a citotoxicidade dos complexos para a linhagem celular MRC-5 (1,85 e 9,38 μM para os complexos **(2)** e **(4)**, respectivamente). A isoterma de potencial de superfície da monocamada de DOPC diminuiu de 0,435 para 0,42 e 0,36 V para as monocamadas contendo **2** e **4**, respectivamente (**Figura 4.16(B)**), apresentam pequenas alterações na área molecular média com incorporação de **2** e **4**, cujos complexos não possuem estruturas globulares como **1**. Os complexos também afetaram a elasticidade das monocamadas de DOPC (Inserção na **Figura 4.16(A)**), uma vez que a interação entre DOPC e as moléculas de **2** e **4** ocasionaram em um decréscimo de C_s^{-1} da monocamada lipídica. Na pressão em meio biológico de $\sim 30 \text{ mN m}^{-1}$, o valor de C_s^{-1} diminuiu de 92 mN m^{-1} da monocamada de DOPC para 73 e 83 mN m^{-1} nas monocamadas mistas com **2** e **4**, respectivamente. Sendo assim, houve modificação na organização e na compactação da monocamada de DOPC na presença dos referidos complexos, o que está de acordo com a alta citotoxicidade apresentada frente à linhagem celular saudável MRC-5.

Estes resultados apontam para uma organização mais específica da monocamada, possivelmente com uma separação da parte positivamente carregada desses complexos. Essas moléculas (**2** e **4**) tenderiam a induzir algumas alterações no grupo fosfato do fosfolípido, semelhante ao observado para o $\text{mer-[RuCl}_3(\text{PP})(\text{Vpy})]$ onde: PP= 1,4-bis (difenílfosfino)butano; Vpy= 4-vinilpiridina^[52]. Em resumo, o comportamento das monocamadas mistas nas isotermas de pressão e potencial de superfície fornecem evidências de uma baixa interação entre o **1** e a monocamada de DOPC, enquanto os complexos **2** e **4** interagem com mais intensidade com as paredes celulares das membranas.

Estudou-se o efeito da concentração de **1-4** no modelo de membrana DOPC, preparando monocamadas mistas de DOPC/(**1,2,4**) em diferentes proporções molares (5, 10, 30, 50, 70 e 90%) dos complexos. As isotermas π -A, ΔV -A e C_s^{-1} de para DOPC puro, complexos **1,2** e **4** puros e para o sistema DOPC/(**1,2,4**) são ilustradas na **Figura 4.17** e os dados estão apresentados na Tabela **A4.10**.

Figura 4. 17: (A-C) isothermas π -A (Inserção C_S^{-1}) para os complexos **1**, **2** e **4** respectivamente; (D-F) isothermas ΔV -A para monocamadas DOPC/**1**, DOPC/**2** e DOPC/**4** mistas em tampão PBS (pH 7,4), para várias porcentagens molares dos complexos (5-90 %).



Com 50% de **1**, as isothermas π -A se deslocaram para áreas moleculares maiores, com a pressão de colapso diminuiu ($\sim 26 \text{ mN m}^{-1}$), a qual coincide à obtida para o complexo **1** puro. Este comportamento demonstra que somente em altas proporções do **1** pode alterar o modelo de membrana saudável, o que está de acordo com a baixa citotoxicidade observada nos ensaios *in vitro*. Contudo, a proporção mais baixa de **2** e **4** já afeta a isothermas π -A de DOPC, uma vez que estes complexos aumentaram significativamente a área molecular do fosfolípido. Ao aumentar a proporção de **2** e **4** a área molecular diminuiu, e a pressão de colapso também. O perfil da isoterma ΔV -A do DOPC também foi modificado, indicando variação no ordenamento das monocamadas, resultante da interação dos complexos e fosfolípido.

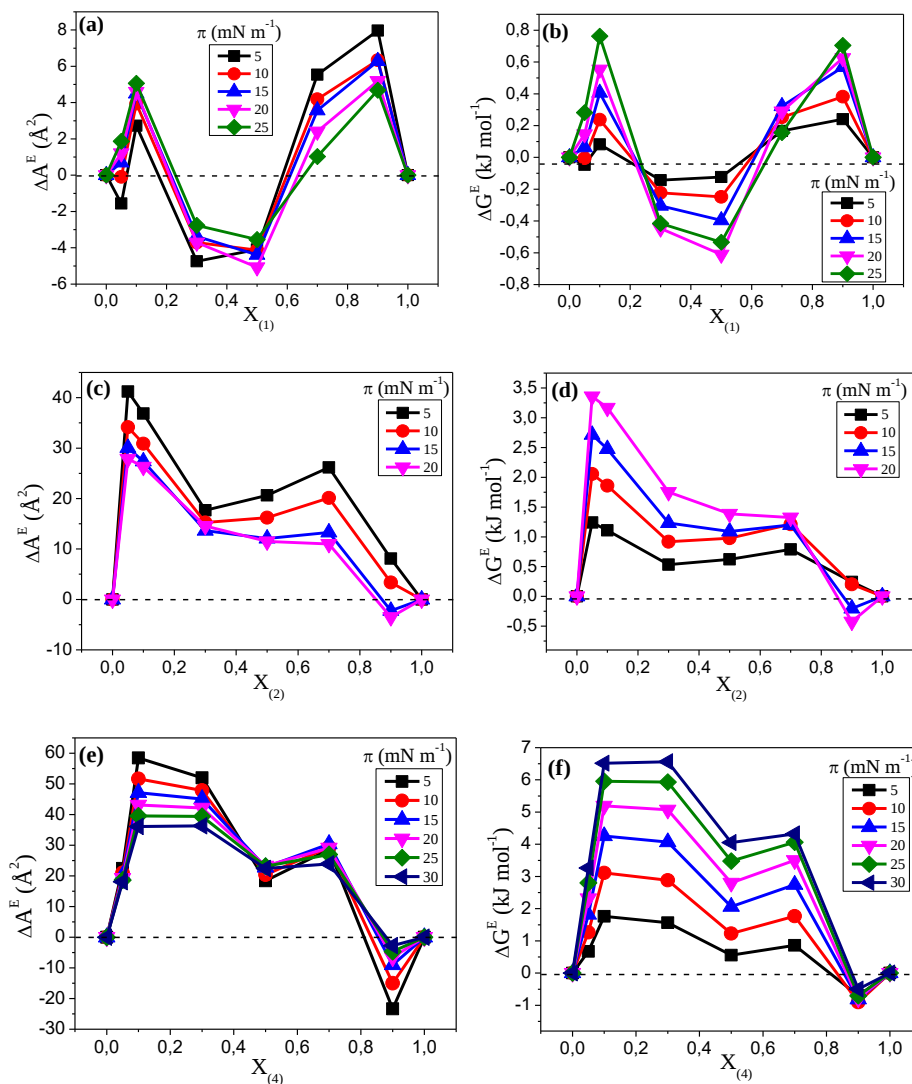
O módulo de compressão para as monocamadas mistas (Inserção da **Figura 4.17(A)**) revela dois máximos, em ~ 15 e 35 mN m^{-1} , relacionado com C_S^{-1} do **1**, e entre 60 - 90 mN m^{-1} , relacionada com o DOPC. Os valores de C_S^{-1} aumentam à medida que a proporção de **1** aumenta, confirmando que apenas altas proporções de **1** afetam o ordenamento da monocamada de lipídica. A interação entre o DOPC e **2** e **4** também afeta o módulo de compressão (Inserção da **Figura 4.17(B-C)**). Com a adição de **2** e **4** a monocamada de DOPC torna-se mais fluída e o C_S^{-1} máximo diminuiu, indicando um menor grau de empacotamento das moléculas na monocamada de DOPC.

Os dados de potencial de superfície (**Figura 4.17(D-F)**) exibem um aumento do potencial máximo à medida que se aumenta a proporção dos complexos na monocamada lipídica, porém, a mudança de ΔV_{max} não foi linear em função da proporção de **4**, ressaltando que em baixa proporção (5%) destes compostos, já ocorre um aumento notável no potencial de superfície em relação ao DOPC puro. Novamente percebe-se o fato dos potenciais em altas áreas moleculares não serem nulos, sugerido à auto-agregação desses complexos.

4.4.3.2.5 Estudo da interação DOPC/**1,2** ou **4** por parâmetros termodinâmicos

A interação entre o modelo de membrana saudável e os complexos também foi analisada pelos parâmetros de área em excesso (ΔA^E) e energia livre em excesso (ΔG^E), cujas fórmulas já foram deduzidas anteriormente, onde os resultados estão apresentados nos gráficos da **Figura 4.18**.

Figura 4. 18: Análise termodinâmica de área em excesso (ΔA^E) (a, c, e) e excesso de energia livre (ΔG^E) (b, d, f) em função da razão molar dos complexos das monocamadas mistas DOPC/1, DOPC/2 e DOPC/4 respectivamente, a $\pi = 5-30 \text{ mN m}^{-1}$.



As monocamadas mistas DOPC/1, 2 ou 4, contendo $X = 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7$ e $0,9$ dos complexos, não seguiram a regra da aditividade (ΔA^E e $\Delta G^E \neq 0$), indicando que estes sistemas não se comportam idealmente. Desvios positivos da idealidade são observados para as monocamadas mistas DOPC/2 e DOPC/4, exceto para as monocamadas contendo 90% de (4) (Figura 4.18(e) e 4.218(f)). A monocamada mista de DOPC/1 apresentou um desvio negativo para as monocamadas contendo 30 e 50% de (1). Como ΔA^E e ΔG^E são preferencialmente positivos, com algumas exceções, sugere-se que as interações entre o DOPC e os complexos 1, 2 e 4 são mais fracas e menos atrativas do que nas monocamadas puras. Este resultado sugere que os sistemas mistos exibem um grau de desordem relativamente alto. O valor máximo de ΔG^E foi de 0,76, 3,41, e $6,59 \text{ kJ.mol}^{-1}$ para as monocamadas mistas DOPC/1, DOPC/2, e

DOPC/**4**, respectivamente. O menor valor de ΔG^E para o modelo de membrana contendo o **1** pode estar relacionado com a sua baixa citotoxicidade para esta linhagem celular.

4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os complexos da série **1-4** apresentaram uma atividade citotóxica promissora e foram superiores aos respectivos ligantes livres, o que nos mostra que a coordenação do ligante ao centro metálico é interessante sob o ponto de vista biológico. Os complexos **2** e **4** foram ativos contra células tumorais (MDA-MB-231 e A549), como também citotóxicos contra células não tumorais, porém, o **2** com valores de IC_{50} $1,53 \pm 0,10 \mu M$, teve uma melhor atividade quando comparado à cisplatina com IC_{50} $11,5 \pm 1,2 \mu M$, para a linha celular A549. Já o **1** é menos ativo que o **2** e **4**, mas não citotóxico contra as células saudáveis.

As imagens obtidas para os complexos **5-8** indicam uma atividade citotóxica contra a linhagem celular de câncer ósseo humano (U2-OS), por formação de pequenas vesículas dentro das células. Este resultado sugere como alvo do mecanismo de ação destes complexos, o retículo endoplasmático celular, resultante da interação com a membrana celular. Em relação ao mecanismo de ação dos complexos neutros **1-4** a tendência que foi observada para esta série de complexos pode ser atribuída às interações fracas com o DNA. Porém, os complexos foram capazes de formar monocamadas sob uma interface ar/tampão PBS, e induziram interação com modelos de membranas de câncer, indicando um possível mecanismo de ação. Os resultados de interação obtidos por estudos com filmes de Langmuir puderam ser associados à citotoxicidade dos complexos estudados, onde o **4** teve maior interação com a membrana lipídica, fato este que corrobora com sua expressiva atividade.

REFERÊNCIAS

- [1] BIANCALANA, L.; GRUCHAŁA, M.; BATCHELOR, L. K.; BŁAUŻ, A.; MONTI, A., PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Conjugating Biotin to Ruthenium (II) Arene Units via Phosphine Ligand Functionalization. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2019.
- [2] ZENG, L.; GUPTA, P.; CHEN, Y.; WANG, E.; JI, L.; CHAO, H.; CHEN, Z. The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, p. 5771, 2017.
- [3] BIANCALANA, L., PAMPALONI, G., MARCHETTI, F. Arene ruthenium (II) complexes with phosphorous ligands as possible anticancer agents. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 71, n.9, p. 573-579, 2017.

- [4] MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A., Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329-350, 2015.
- [5] BERTRAND, B.; CASINI, A., A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 11, p. 4209-4219, 2014.
- [6] BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New Trends for Metal Complexes with Anticancer Activity. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 12, 197-206, 2018.
- [7] JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. **Chem. Rev.** v. 116, p. 3436-3486, 2016.
- [8] MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chem. Rev.** v.114, p.4540-4563, 2014.
- [9] KENNY, R. G., MARMION, C. J. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs—A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens. **Chemical reviews**, v. 119, n.2, p.1058-1137, 2019.
- [10] BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa de câncer. <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acesso em: 29 out 2019.
- [11] PHAM, T.; ROTH, S.; KONG, J.; GUERRA, G.; NARASIMHAN, V.; PEREIRA, L.; DESAI, J.; HERIOT, A.; RAMSAY, R. An Update on Immunotherapy for Solid Tumors: A Review. **Annals Surg. Oncol.** v. 25, p. 3404-3412, 2018.
- [12] KAUFFMAN, G. B.; PENTIMALLI, R.; DOLDI, S.; HALL, M. D., MICHELE PEYRONE. Discoverer of Cisplatin. **Platinum Metals Review**, v. 54, n.4, 250-256, 2010.
- [13] SANTOS, E. R.; MONDELLI, M.A.; POZZI, L.V.; CORRÊA, R.S.; ARAÚJO, H. S. 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**, v. 51, p. 292–297, 2013.
- [14] MOTSWAINYANA, W. M.; AJIBADE, P.A. Anticancer activities of mononuclear ruthenium (II) coordination complexes. **Advances in Chemistry**, v. 2015, 2015.
- [15] PAGE, S., Ruthenium compounds as anticancer agents. **Education in Chemistry**, p. 26-29, 2012.
- [16] ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J., Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, p. 62-69, 2001.
- [17] PASTUSZKO, A.; NIEWINNA, K.; CZYZ, M.; JÓZWIAK, A.; MALECKA, M.; BUDZISZ, E. Synthesis, X-ray structure, electrochemical properties and cytotoxic effects of

new arene ruthenium(II) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 745-746, n. 64-70, 2013.

[18] ALESSIO, E. Thirty years of the drug candidate nami-a and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective. **European journal of inorganic chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1549-1560, 2017.

[19] CLARKE, J.M. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 209-233, 2003.

[20] LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P.A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metalomics**, v. 1, n. 6, p. 458-470, 2009.

[21] ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A., Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 66, p. 1-9, 2010.

[22] LEIJEN, S.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN WERKHOVEN, E.; SCHELLENS, J. H., Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Investigational new drugs**, v. 33, p. 201-214, 2015.

[23] JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton transactions**, v. 2, p. 183-194, 2008.

[24] YAN, Y. K.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P. J., Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. **Chemical Communications**, v. 38, p. 4764-4776, 2005.

[25] HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J., Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 391-401, 2009.

[26] BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H.; SAVA, G., Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, n.1, p. 90-99, 2012.

[27] ALLARDYCE, C. S.; DOCIER, A.; SCOLARO, C.; DYSON, P. J. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals, **Applied Organometallic Chemistry**, 19, 1-10, 2005.

[28] RENFREW, A. K.; PHILLIPS, A. D.; EGGER, A. E.; HARTINGER, C. G.; BOSQUAIN, S. S.; NAZAROV, A. A.; KEPPLER, B. K.; GONSALVI, L.; PERUZZINI, M.; DYSON, P. J., Influence of Structural Variation on the Anticancer Activity of RAPTA-Type Complexes: ptn versus pta. **Organometallics**, v. 28, n.4, p. 1165-1172, 2009.

[29] DOUGAN, S.J.; SADLER, P.J. The Design of Organometallic Ruthenium Arene Anticancer Agents, **Chimia**, v. 61, n.11, p. 704-715, 2007.

- [30] BIANCALANA, L., ZACCHINI, S., FERRI, N., LUPO, M. G., PAMPALONI, G., & MARCHETTI, F. (2017). Tuning the cytotoxicity of ruthenium (II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/phenoxydiphenylphosphine ligand. *Dalton Transactions*, v. 46, n.47, p.16589-16604.
- [31] SÁEZ, R.; LORENZO, J.; PRIETO, M.J.; FONT-BARDIA, M.; CALVET, T.; OMEÑACA, N.; VILASECA, M.; MORENO, V. Influence of PPh₃ moiety in the anticancer activity of new organometallic ruthenium complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, v. 136, n.1-12, 2014.
- [32] PARVEEN, S.; HANIF, M.; MOVASSAGHI, S.; SULLIVAN, M. P.; KUBANIK, M.; SHAHEEN, M. A.; HARTINGER, C. G. Cationic Ru (η^6 -p-cymene) Complexes of 3-Hydroxy-4-pyr (id) ones–Lipophilic Triphenylphosphine as Co-Ligand Is Key to Highly Stable and Cytotoxic Anticancer Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 2017, n.12, p. 1721-1727, 2017.
- [33] NEVES, A. P.; VARGAS, M.D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.
- [34] KEENE, F. R.; SMITH, J. A.; COLLINS, J. G. Metal complexes as structure selective binding agents for nucleic acids. *Coordination Chemistry Reviews*. v. 253, p. 2021, 2009.
- [35] BOER, D. R.; CANALS, A.; COLL, M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. *Dalton Transactions*. v. 3, p. 399, 2009.
- [36] REEDJIK, J. New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 7, p. 3611-3616, 2003.
- [37] BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalointercaladores. *Revista Virtual Química*. v. 7, p. 1998-2016, 2015.
- [38] CHAO, H.; MEI, W. J.; HUANG, Q. W.; JI, L. N. DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 92, p. 165-170, 2002.
- [39] MITRA, R.; DAS, S.; SHINDE, S. V.; SINHA, S.; SOMASUNDARAM, K.; SAMUELSON, A. G., Anticancer Activity of Hydrogen-Bond-Stabilized HalfSandwich RuII Complexes with Heterocycles. *Chemistry – A European Journal*, v. 18, n. 39, p. 12278-12291, 2012.
- [40] PERNAR, M.; KOKAN, Z.; KRALJ, J.; GLASOVAC, Z.; TUMIR, L. M.; PIANTANIDA, I.; KIRIN, S. I. Organometallic ruthenium (II)-arene complexes with triphenylphosphine amino acid bioconjugates: Synthesis, characterization and biological properties. *Bioorganic chemistry*, v. 87, p. 432-446, 2019.

- [41] BERG, C.; CHARI, S.; JURGAITYTE, K.; LAURORA, A.; NALDONY, M.; POPE, F.; BAUMGARTNER, J. Modulation of the solubility properties of arene ruthenium complexes bearing stannyl ligands as potential anti-cancer agents. **Journal of organometallic chemistry**, v. 891, p. 12-19, 2019.
- [42] BIANCALANA, L.; ZACCHINI, S.; FERRI, N.; LUPO, M. G.; PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Tuning the cytotoxicity of ruthenium (II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/phenoxydiphenylphosphine ligand. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 47, p. 16589-16604, 2017.
- [43] FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA JR., O. N. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- [44] STEFANIU, C. et al. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces, **Adv. Colloid Interface Sci**, 208, 197–213, 2014.
- [45] PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett Films: An introduction**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 1996.
- [46] DYNAROWICZ-LATKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA JR., O. N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, p. 221-293, 2001.
- [47] DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial Phenomena**, Academic Press, New York, 1963.
- [48] GOTO, T. E.; CASELI, L. Understanding the Collapse Mechanism in Langmuir Monolayers through Polarization Modulation-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. **Langmuir**, v. 29, p. 9063-9071, 2013.
- [49] DERVICHIAN, D. G. Changes of Phase and Transformations of Higher Order in Monolayers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 7, p. 931- 947, 1939.
- [50] CARVALHO, A. C., GIROLA, N., DE FIGUEIREDO, C. R., MACHADO, A. C., DE MEDEIROS, L. S., GUADAGNIN, R. C., VEIGA, T. A. Understanding the cytotoxic effects of new isovanillin derivatives through phospholipid Langmuir monolayers. **Bioorganic chemistry**, v.83, p. 205-213, 2019.
- [51] SANDRINO B.; TOMINAGA T. T.; NOBRE T. M.; SCORSIN L.; WROBEL E. C.; FIORIN B. C.; DE ARAÚJO M. P.; CASELI L., OLIVEIRA JR. O. N.; WOHNATH K. Correlation of [RuCl₃(dppb)(VPy)] Cytotoxicity with its Effects on the Cell Membranes: An Investigation Using Langmuir Monolayers as Membrane Models. **J. Phys. Chem. B**, v. 118, n. 36, p.10653–1066, 2014.
- [52] LOPES, J., DAMASCENO, J. L., OLIVEIRA, P. F., GUEDES, A. P., TAVARES, D. C., DEFLON, V. M., VON POELHSITZ, G. Ruthenium (II) Complexes containing anti-inflammatory drugs as ligands: synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity activities on cancer cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n.9, p.1838-1847, 2015.

- [53] ZHAO, Y.; ZHANG, L.; LI, X., SHI, Y.; DING, R.; TENG, M.; STANG, P. J. Self-assembled ruthenium (II) metallacycles and metallacages with imidazole-based ligands and their in vitro anticancer activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n.10, p. 4090-4098, 2019.
- [54] MARSZAUKOWSKI, F., GUIMARÃES, I. D. L., DA SILVA, J. P., DA SILVEIRA LACERDA, L. H., DE LAZARO, S. R., DE ARAUJO, M. P., WOHNATH, K. Ruthenium (II)-arene complexes with monodentate aminopyridine ligands: Insights into redox stability and electronic structures and biological activity. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 881, p. 66-78, 2019.
- [55] PLISKA, V.; TESTA, B. & WATERBEEMD, H. V. **Lipophilicity in drug action and toxicology**. 1a ed., Weinheim, VCH, 1996. p. 463.
- [56] VEGAS, C.L; VILLARREAL, W; NAVARRO,M; OLIVEIRA, R.C; GRAMINHA, E.A; MAIA,S.I.P; DEFLON,M.V; FERREIRA,G.A; COMINETTI,R.M; BATISTA,A.A. Cytotoxicity of Ru(II) piano-stool complexes with chloroquine and chelating ligands against breast and lung tumor cells: Interactions with DNA and BSA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 153, p. 150-161, 2015.
- [57] H. HUANG, P. ZHANG, Y. CHEN, L. JI, H. CHAO, Labile ruthenium(II) complexes with extended phenyl-substituted terpyridyl ligands: synthesis, aquation and anticancer evaluation, **Dalton Trans**, v. 44, p. 15602-15610, 2015.
- [58] HAGHDOOST, M.; GOLBAGHI, G.; LÉTOURNEAU, M.; PATTEN, S. A.; CASTONGUAY, A. Lipophilicity-antiproliferative activity relationship study leads to the preparation of a ruthenium (II) arene complex with considerable in vitro cytotoxicity against cancer cells and a lower in vivo toxicity in zebrafish embryos than clinically approved cis-platin. **European journal of medicinal chemistry**, v. 132, p. 282-293, 2017.
- [59] WILSON, J. J.; LIPPARD, S. J. In vitro anticancer activity of cis-diammineplatinum (II) complexes with β -diketonate leaving group ligands. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5326-5336, 2012.
- [60] KUBANIK, M., TU, J. K., SÖHNEL, T., HEJL, M., JAKUPEC, M. A., KANDIOLLER, W., HARTINGER, C. G. Expanding on the Structural Diversity of Flavone-Derived Ruthenium(II) (η^6 -arene) Anticancer Agents. **Metallodrugs**, v. 1, n.1, p. 24-35, 2015.
- [61] PIZARRO, A. M., SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n.10, p. 1198-211, 2009.
- [62] BOER, D. R.; CANALS, A.; COLL, M. DNA-binding drugs caught in action:the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Transactions**. v. 3,p. 399, 2009.
- [63] SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. "Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry". **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, p. 1-19, 2013.

- [64] YAN, X. W.; XIE, Y. R.; JIN, Z. M.; HU, M. L.; ZHOU, L. P., Three Arene-Ru (II) compounds of 2-halogen-5-aminopyridine: Synthesis, characterization, and cytotoxicity. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n.1, 2018.
- [65] SUH, D., CHAIRES, J. B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 3, n.6, 723–728, 1995.
- [66] WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. “Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA”. **Biochemistry**, v. 26, n.20, p.6392-6396, 1987.
- [67] LIU X.W.; CHEN Y.D.; LI L.; LU J.L.; ZHANG D.S., DNA-binding and photocleavage studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric intercalative ligand, *Spectrochimica Acta*. **Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 86, p. 554, 2012.
- [68] BREZESINSKI, G.; MÖHWALD H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100–102, p. 563– 584, 2003.
- [69] ALVES, A. C.; RIBEIRO, D.; NUNES, C.; REIS, S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1858, p. 2231–2244, 2016.
- [70] CARINO, S. R., DURAN, R. S., BANEY, R. H., GOWER, L. A., HE, L., SHETH, P. K. Chemical cross-linking, surface compressional modulus, and viscosity of n-octadecyltrimethoxy silane monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n.9, p. 2103-2104, 2001.
- [71] DHANABALAN, A.; GAFFO, L.; BARROS, A. M.; MOREIRA, W. C.; OLIVEIRA JR., O. N. Surface Pressure and Surface Potential Isotherms of Ytterbium Bisphthalocyanine Langmuir Monolayers. **Langmuir** 1999, v. 15, p. 3944- 3949, 1999.
- [72] PREETHA, A.; BANERJEE, R.; HUILGOL, N. Surface activity, lipid profiles and their implications in cervical cancer, *J. Cancer Res. Ther*, v. 2005, p. 180–186, 2005.
- [73] MINONES, J., MINONES, J., RODRIGUEZ-PATINO, J. M., CONDE, O., & IRIBARNEGARAY, E. Miscibility of amphotericin B– dipalmitoyl phosphatidyl serine mixed monolayers spread on the air/water interface. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n.17, p. 4189-4195, 2003.
- [74] SANDRINO, B., WROBEL, E. C., NOBRE, T. M., CASELI, L., LAZARO, S. R., JÚNIOR, A. C., WOHNATH, K. Interaction between active ruthenium complex [RuCl₃(dppb)(VPy)] and phospholipid Langmuir monolayers: Effects on membrane electrical properties. **Chemical Physics Letters**, v. 649, p. 29-36, 2016.
- [75] MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.**, v. 1286, p. 183- 223, 1996.

- [76] WĘDER, K., MACH, M., HĄC-WYDRO, K., & WYDRO, P. Studies on the interactions of anticancer drug-Minerval-with membrane lipids in binary and ternary Langmuir monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n.11, p. 2329-2336, 2018.
- [77] NASCIMENTO FILHO, J. M., DE MELO, C. P., SANTOS-MAGALHÃES, N. S., ROSILIO, V., MACIEL, M. A., ANDRADE, C. A. Thermodynamic investigation of mixed monolayers of trans-dehydrocrotonin and phospholipids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 358, n.1-3, p. 42-49, 2010.
- [78] COSTIN, I. S.; BARNES, G. T. Two-component monolayers. II. Surface pressure—area relations for the octadecanol—docosyl sulphate system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 51, n. 1, p. 106-121, 1975.
- [79] GAINES Jr.; G. L. Thermodynamic relationships for mixed insoluble monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, p. 315-319, 1966.
- [80] HE, G.; SUN, R.; HAO, C.; YANG, J.; WANG, M.; ZHANG, L. Thermodynamic analysis and AFM study of the interaction of palmitic acid with DPPE in Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 184–194, 2014.
- [81] MINONES, J.; MUNOZ, M.; TRILLO, J. M.; HARO, I.; BUSQUETS, M. A.; ALSINA, M. A. Miscibility and Langmuir Studies of the Interaction of E2 (279-298) Peptide Sequence of Hepatitis G Virus/GB Virus-C with Dipalmitoylphosphatidyl Choline and Dimiristoylphosphatidyl Choline Phospholipids. **Langmuir**, v. 31, p. 10161-10172, 2015.
- [82] DYNAROWICZ-LATKA, P.; KITA, K. Molecular interaction in mixed monolayers at their/ water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 79, p. 1-17, 1999.
- [83] GARCÍA-ANTÓN, J. M., REIG, F., MESSEGUER, A., COMELLES, F., ESPINA, M., & ALSINA, M. A. Interfacial behavior of chroman-6 and chroman-6 palmitoyl ester and their interaction with phospholipids. **Colloid and Polymer Science**, v. 291, n.5, p. 1065-1075, 2013.
- [84] FILHO, J. M. N.; DE MELO, C. P.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROSILIO, V.; MACIEL, M. A. M.; ANDRADE, C. A. S. Thermodynamic investigation of mixed monolayers of trans-dehydrocrotonin and phospholipids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 358, p. 42–49, 2010.
- [85] GE, A.; WU, H. L.; DARWISH, T. A.; JAMES, M.; OSAWA, M.; YE, S. Structure and Lateral Interaction in Mixed Monolayers of Dioctadecyldimethylammonium Chloride (DOAC) and Stearyl Alcohol. **Langmuir**, v. 29, p. 5407-5417, 2013.
- [86] NAGADOME, S., SUZUKI, N. S., MINE, Y., YAMAGUCHI, T., NAKAHARA, H., SHIBATA, O., SUGIHARA, G. Monolayers (Langmuir films) behavior of multi-component systems composed of a bile acid with different sterols and with their 1: 1 mixtures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, n.2, p.121-136, 2007.
- [87] MIÑONES JR., J.; PAIS, S.; MIÑONES, J.; CONDE, O.; DYNAROWICZ-ŁATKA, P. Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi

cellular membranes — A Langmuir monolayer study. **Biophysical Chemistry**, v. 140, p. 69-77, 2009.

[88] AOKI, P. H. B.; MORATO, L. F. C.; PAVINATTO, F. J.; NOBRE, T. M.; CONSTANTINO, C. J. L.; OLIVEIRA, JR., O. N. Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin. **Langmuir**, v. 32, p. 3766-3773, 2016.

[89] KORCHOWIEC, B.; GORCZYCA, M.; SALEM, A. B.; DE VAINS, J. R.; ROGALSKA, E. Interaction of a β -lactam calixarene derivative with a model eukaryotic membrane affects the activity of PLA2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 217-222, 2013.

[90] KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1376, p. 91-145, 1998.

[91] SAKAMOTO, S., NAKAHARA, H., UTO, T., SHOYAMA, Y., SHIBATA, O. Investigation of interfacial behavior of glycyrrhizin with a lipid raft model via a Langmuir monolayer study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v.1828, n.4, p. 1271-1283, 2013.

[92] VOGEL, V., MÖBIUS, D. Local surface potentials and electric dipole moments of lipid monolayers: contributions of the water/lipid and the lipid/air interfaces. **Journal of colloid and interface science**, v.126, n.2, p. 408-420, 1998.

CAPÍTULO 5. TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ESTUDOS DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPLEXOS 1-8

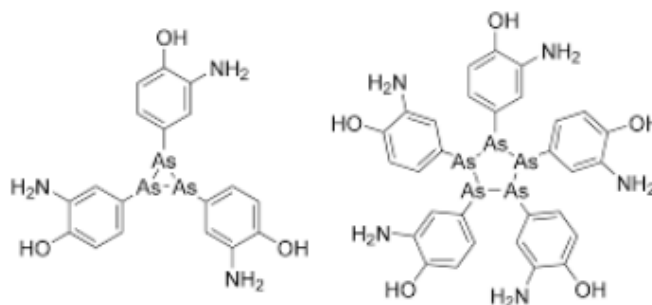
5.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

5.1.1 Agentes antimicrobianos- um breve histórico

Um dos principais avanços da ciência médica no último século foi o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. No entanto, a consequência de seu amplo uso durante o tempo, tem sido o surgimento de populações de microrganismos resistentes à medicamentos. Notavelmente a infecção por tais patógenos resistentes tornaram-se uma importante causa de mortalidade em todo o mundo. Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com estruturas diferenciadas^[1].

Com o surgimento da quimioterapia moderna no início do século XX, o estudo com bactérias teve seu importante marco conferido ao alemão Paul Ehrlich, o qual, tinha como objetivo corar bactérias sem corar os tecidos circundantes, desta forma, poderia descobrir um composto capaz de destruir patógenos de forma seletiva, sem causar qualquer mal aos hospedeiros, composto que denominou como “bala mágica” (*magic bullet*)^[2]. Com esses princípios, Ehrlich pode ser considerado como o fundador da quimioterapia e introduziu as primeiras ideias sobre relação estrutura-atividade e o conceito de índice terapêutico^[3]. Em 1910, Ehrlich sintetizou o primeiro composto químico a partir do arsênio, o qual foi denominado comercialmente de Salvarsan®, **Figura 5.1**, que agisse seletivamente contra bactéria *Treponema pallidum* agente causador da sífilis, doença sexualmente transmissível. Tal composto teve uma contribuição significativa para o avanço dos estudos na área da medicina, porém, devido a sua elevada toxicidade foi determinado sua exclusão para uso^[4,5].

Figura 5. 1: Estruturas possíveis para o SALVARSAN®.



FONTE: PATRA e colaboradores^[4]

O Salvarsan® tornou-se o medicamento mais frequentemente prescrito para o tratamento de infecções antimicrobianas até sua substituição pela penicilina na década de 1940, resultante do trabalho de Fleming, Florey e Chain^[6]. A descoberta da penicilina em 1928, pelo médico e bacteriologista Alexander Fleming, se deu de forma acidental, quando Fleming, pesquisando substâncias capazes de combater bactérias em feridas, esqueceu seu material de estudo sobre a mesa enquanto saía de férias. Ao retornar, pode observar que suas culturas de *Staphylococcus aureus* estavam contaminadas por uma espécie de mofo e que, de alguma forma nos locais onde havia o fungo, haviam halos transparentes, indicando que este poderia conter alguma substância bactericida. Ao realizar estudos em relação as propriedades deste mofo, identificou como o mesmo pertencente ao gênero *Penicillium*, e que esta substância que recebeu o nome de “penicilina” era capaz de eliminar diversas bactérias^[7]. Na década de 1960, a descoberta acidental de Rosenberg de que os complexos de platina inibiam a divisão celular de *E. coli* levou à aplicação clínica da cisplatina como droga antitumoral na década de 1970^[1].

Desde a descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico, outros compostos foram desenvolvidos e usados clinicamente no tratamento de infecções por bactérias e outros patógenos. No entanto, não muito tempo depois do início do "Era dos antibióticos", que chegou ao fim há no mínimo 50 anos atrás, outro grande desafio foi o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos existentes, bem como a outros agentes antimicrobianos^[1]. Isso é devido principalmente à resistência que as bactérias estão apresentando aos medicamentos. As bactérias se tornam resistentes devido às mutações ou ainda adquirindo um DNA externo, tornando-se resistentes impedindo assim, o antibiótico de se ligar ao seu alvo. Além disso, as bactérias podem produzir subpopulações de células dormentes que são tolerantes à morte por antibióticos existentes^[8].

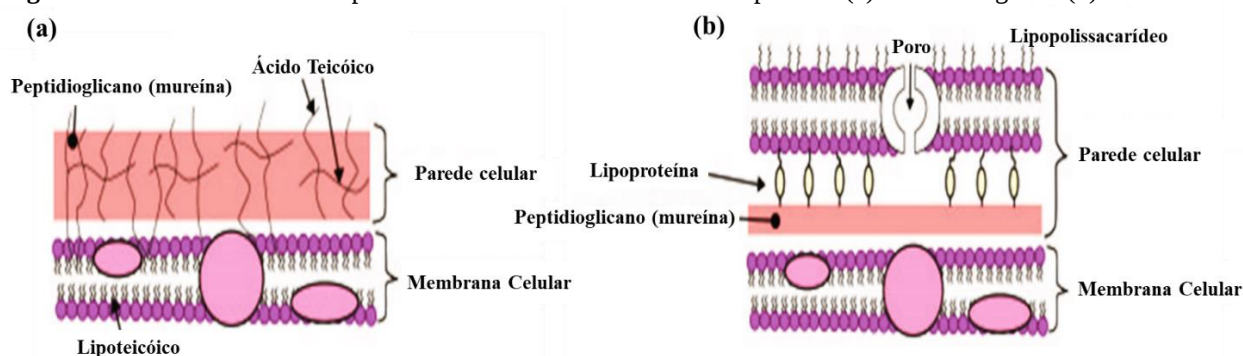
Atualmente, considera-se que o mundo está enfrentando a era pós-antibióticos, em que infecções comuns poderão matar novamente. A Organização Mundial da Saúde atualmente considera prioritária a pesquisa para identificação de novos medicamentos antibacterianos^[9]. Isso ocorre devido à prevalência de doenças infecciosas como a segunda maior causa de mortalidade do mundo e ao decréscimo do número total de novos agentes antimicrobianos desenvolvidos nas últimas décadas^[10]. Nesse período, as principais ações de desenvolvimento de medicamentos antibacterianos consistiu em realizar modificações em drogas já existentes e em inovar métodos de síntese a fim de obter novas estruturas^[11,12]. Desde o ano 2000, somente cinco novas classes de antibióticos foram colocadas no mercado e nenhuma delas tem ação contra bactérias Gram negativas, as quais, devido à maior complexidade de sua parede celular, são mais resistentes à ação de antibióticos^[13].

Os agentes antibacterianos existentes podem ser classificados em quatro grupos principais com base em seu alvo intracelular e de acordo com seu mecanismo de ação:

- inibição da síntese da parede celular: ex, penicilina e seus derivados, cefalosporinas, carbapenêmicos e glicopeptídeos. Estes compostos são mais eficazes contra a infecção por bactérias Gram positivas.
- ruptura da membrana celular; ex, os antibióticos policatiônicos peptídicos chamados polimixinas, utilizados no tratamento de infecção por bactérias Gram negativas.
- inibição da síntese de ácido nucleico; ex, quinolonas, rifampicina e sulfonamidas.
- inibição da síntese de proteínas; ex, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol. Uma grande proporção de antibacterianos usados clinicamente, tendem a inibir a síntese de proteínas, visando as superfícies ricas em RNA ribossômico, em alguns casos podem ser eficazes contra a tuberculose^[1].

As bactérias são classificadas como organismos unicelulares que pertencem ao Reino Monera, elas podem apresentar diferentes formas, como: esféricas (cocos), cilíndricas ou bacilos e de espiral^[7]. De um modo geral, existem dois grupos principais de bactérias: as espécies Gram-negativas, e as espécies Gram-positivas, **Figura 5.2**. Essas espécies de bactérias apresentam algumas distinções em sua estrutura, composição química, permeabilidade da parede celular, entre outras. Em termos gerais, as espécies Gram-positivas possuem a parede celular formada com muitas camadas de peptideoglicana, dando origem a uma estrutura rígida e espessa. Já as espécies Gram-negativas possuem uma estrutura mais complexa, formada por poucas camadas de peptideoglicana e uma membrana externa, que é composta de lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteína (lipídeos covalentemente ligados a proteínas) e fosfolipídios^[7,14,15].

Figura 5. 2: Estrutura básica da parede celular de uma bactéria Gram-positiva (a) e Gram-negativa (b).



FONTE: <http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap3.pdf>^[15].

Devido à maior complexidade de sua parede celular, as bactérias Gram negativas são mais resistentes à ação de antibióticos. Em geral, para serem efetivos nesse grupo de microrganismos, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos, o que dificulta a identificação de moléculas ativas.

5.1.2 Complexos de rutênio na atividade antibacteriana

Entre os complexos de metais de transição, os complexos à base de rutênio estão sendo amplamente estudados e alguns apresentaram atividade biológica significativa, devido as diversas características reconhecidas que já foram discutidas neste trabalho^[1,16]. Destaca-se a estereoquímica variável destes complexos, que permite a criação de numerosos compostos que são estruturalmente diferentes e interações aos sistemas biológicos. Além disso, os complexos metálicos também podem ser carregados positivamente, e dessa forma, utilizar a força eletrostática para facilitar a ligação com componentes celulares e moléculas carregadas negativamente (por exemplo, parede celular, DNA, RNA, fosfolipídios e regiões específicas de proteínas). Dessa maneira, complexos metálicos abrem caminhos adicionais para combater infecções microbianas^[17].

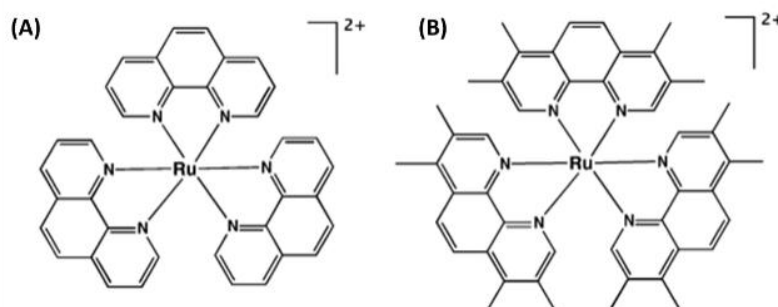
Nestes complexos o papel do íon rutênio é atuar como um suporte central, no qual, os ligantes bioativos, podem ser coordenados. Desta forma, a composição química e as propriedades dos ligantes coordenados determinam a atividade antimicrobiana^[16,18]. Os complexos com rutênio têm um evidente papel estrutural; sua química de coordenação é bem caracterizada, fornecendo um mecanismo para otimizar a atividade antimicrobiana por meio de ajustes nos seus ligantes de coordenação, a fim de melhorar a especificidade do alvo e/ou aumentar a lipofilicidade, que acarreta uma melhor interação celular bacteriana^[1,18].

Os primeiros relatos das atividades antimicrobianas dos complexos de rutênio ocorreram na década de 1960, após investigações de Dwyer e colaboradores^[19], embora o maior interesse em antimicrobianos à base de rutênio tenha surgido nas últimas duas décadas^[1]. Apesar de inúmeros relatos da atividade antimicrobiana desses complexos *in vitro*, existem poucos estudos relatando tal atividade, e até hoje, nenhum alcançou desenvolvimento clínico^[20].

Ressaltando um dos trabalhos citados em uma revisão reportada na literatura recentemente^[1], há mais de 60 anos, Dwyer e colaboradores iniciaram o estudo da atividade biológica de complexos metálicos com ligantes polipiridil. Os complexos estudados eram com metais inertes, utilizando ligantes tais como 1,10- fenantrolina e seus derivados (por exemplo

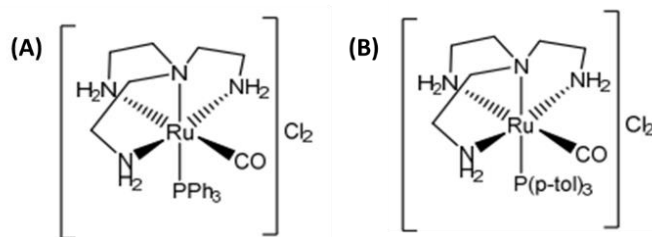
3,5,6,8-tetrametil-1,10-fenantrolina e 5-nitro-1,10-fenantrolina) e 2,2'-Bipiridina e seus derivados, coordenados predominantemente com rutênio ou ferro. As atividades antibacterianas destes complexos foram avaliadas contra bactérias Gram positiva e Gram negativa e bactérias ácido-álcool-resistentes (*Mycobacterium tuberculosis*). O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, **Figura 5.3(A)** mostrou-se inativo contra todas as linhagens bacterianas. Porém, notou-se que a inclusão de substituintes metil no ligante fenantrolina, formando o complexo $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$ (**Figura 5.3(B)**), aumentou notavelmente a atividade contra todas as linhagens bacterianas em estudo, principalmente, bactérias Gram positivas e *Mycobacterium tuberculosis*, assim indicando a importância e a relação que há entre a lipofilicidade e a atividade antibacteriana.

Figura 5. 3: Complexos mononucleares de polipiridilrutênio (II) com atividade antimicrobiana. (A) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$; (B) $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$



FONTE: LI et al., 2015^[1]

Fagundes e colaboradores^[21] desenvolveram uma série de complexos de rutênio solúveis em água, de fórmula: $p,t\text{-}[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PR}_3)(\text{tren})]\text{Cl}_2$ (onde R: fenil ou *p*-toluil; tren: [tris(2-aminoetilamina)]), cujas estruturas estão demonstradas na **Figura 5.4(A)** e **5.4(B)**, respectivamente. Estes complexos tiveram sua atividade antibacteriana testada contra linhagens de bactérias *S. aureus* (Gram-positivas) e *P. aeruginosa* (Gram negativas). Os resultados obtidos, evidenciaram que o complexo $p,t\text{-}[\text{Ru}(\text{CO})(\text{P}\{p\text{-tol}\}_3)(\text{tren})]\text{Cl}_2$, apresentou melhores resultados quando comparados ao antibiótico cloranfenicol. O complexo $p,t\text{-}[\text{Ru}(\text{CO})(\text{PPh}_3)(\text{tren})]\text{Cl}_2$ (5.4(A), apresentou CIM (concentração mínima inibitória) ≤ 350 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas bacterianas. A maior atividade do complexo 5.4(B) pode estar relacionada ao maior caráter lipofílico devido a coordenação com o ligante $\text{P}(p\text{-tol})_3$ comparado com o ligante PPh_3 .

Figura 5. 4: Estruturas dos complexos da série: p,t -[Ru(CO)(PR₃)(tren)]Cl₂

FONTE: FAGUNDES et al., 2016^[24]

5.1.3 Estudos do mecanismo de ação por monocamadas de Langmuir e Microscopias de Fluorescência e Microfluídica

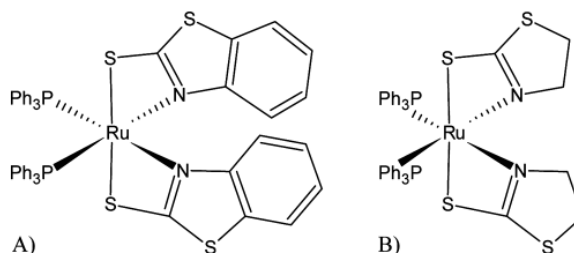
5.1.3.1 Atividade bacteriana e Monocamadas de Langmuir

Assim como relatado no **Capítulo 4**, o mecanismo de ação de compostos candidatos a promissores agentes anticancerígenos, pode ser investigado por meio de testes para prever o modo de interação com biomoléculas, como o DNA, ou por meio do estudo da interação via modelos de membrana celular, que mimetizem a composição das membranas de células cancerígenas e bacterianas.

Desta forma, os efeitos induzidos por antibióticos nas membranas das bactérias também podem estar correlacionados com a atividade bacteriana, e tal interação em nível molecular pode ser avaliada por monocamadas de Langmuir que representam a membrana celular. Aqui, reportamos da literatura o estudo realizado por Sandrino e colaboradores, que investigaram a interação entre os complexos [Ru(mcbtz)₂(PPh₃)₂] (mcbtz= 2-mercaptobenzotiazolina) e [Ru(mctz)₂(PPh₃)₂] (mctz= 2-mercaptotiazolina), **Figura 5.5**, com monocamadas de Langmuir mistas constituídas por um extrato lipídico de *E. coli*, extrato de lipopolisacarídeos (LPSs) e fosfolípido zwitteriônico dioleoilfosfatidil colina (DOPC). A atividade bactericida para [Ru(mcbtz)₂(PPh₃)₂] foi maior, acima de 40 µg/mL, e a atividade de [Ru(mctz)₂(PPh₃)₂] foi não significativamente diferente do controle, pois, ocorreu a precipitação do complexo, que tem uma solubilidade limitada em água. Ambos os complexos tiveram poucos efeitos sobre o DOPC, apresentando insignificante toxicidade em relação às células de mamíferos que podem ser aproximadas por uma monocamada zwitteriônica. Também foram pouco efeitos nos LPSs. Em contrapartida, os complexos induziram expansão nas isotermas de pressão superficial, enquanto o complexo com o ligante (mcbtz) mais hidrofóbico, parecia afetar as caudas hidrofóbicas da *E. coli*, de acordo com os resultados da espectroscopia de reflexão-absorção na

região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), método pelo qual é possível caracterizar as mudanças nos grupamentos que compõem o fosfolípido. Porém, a evidência de uma interação mais forte não pôde ser confirmada, não correlacionando com a atividade bactericida^[22].

Figura 5. 5: A) Complexo de rutênio com 2-mercaptobenzotiazolina (Rumcbtz) e B) com 2-mercaptotiazolina (Rumctz).



FONTE: SANDRINO et al., 2017^[22]

5.1.3.2 Microscopia de Fluorescência e Microfluídica

O estudo do mecanismo de ação de alguns compostos por microscopia de fluorescência, possibilita uma combinação de detecção e visualização, sendo uma ferramenta poderosa para investigar processos biológicos. Embora em uso por várias décadas, atualmente está em um estado de rápida evolução. As melhorias técnicas nos microscópios, juntamente com o desenvolvimento constante de novas sondas fluorescentes e o avanço dos softwares de aquisição e documentação de imagens, tornam o progresso na microscopia de fluorescência muito valioso para a pesquisa^[23]. Esta técnica é baseada na propriedade de algumas substâncias chamadas fluoróforos, fluorocromos ou corantes fluorescentes para produzir fluorescência após a absorção de energia. Fluorescência é a emissão de luz que ocorre como resultado da absorção da luz de excitação. Assim, excitação e emissão são dois valores diferentes de comprimento de onda, sendo a energia absorvida emitida em comprimentos de onda maiores. As moléculas fluorescentes são vistas através de filtros que filtram a luz de excitação, permitindo a observação apenas da luz emitida^[24].

Através desta análise, os microorganismos e as estruturas celulares, podem ser corados com um corante de fluorescência, um fluorocromo, para serem observados através de um microscópio de fluorescência e produzir imagens nas quais as estruturas alvo terão uma aparência colorida ou brilhante. Muitos fluorocromos são específicos para componentes celulares e são amplamente utilizados em microbiologia. Os corantes se ligam ao DNA, RNA, lipídios intracelulares ou lipídios de membrana^[23].

Existem várias classes de corantes de ácido nucleico, mostrando diferentes modos de ligação ao DNA e diferenças na permeabilidade da membrana celular. Eles são usados em microscopia, não só para coloração de células bacterianas, mas também para distinguir entre bactérias vivas e mortas ou para a contagem do total de bactérias em amostras clínicas. O corante (4',6-diamidino-2-fenilindol) DAPI comumente usado, se liga ao sulco menor do DNA nos sítios dos nucleotídeos A-T. Além disso, o DAPI também se intercala nos locais dos nucleotídeos G-C^[25]. As séries de corantes de cianina SYTO, penetram apenas células com membrana comprometida e não cruzam as membranas de células vivas, sendo extremamente útil para manchar células Gram-positivas e Gram-negativas. Por exemplo, a mancha fluorescente propiciada pelo iodeto de propídio de coloração vermelha, que penetra apenas as células da membrana bacterianas danificadas em combinação com o corante SYTO 9, que difunde-se passivamente através das membranas, permite a visualização de células bacterianas mortas e vivas^[23,26]. Particularmente, os corantes como FM 4-64 e o FM 1-63 se ligam rápida e reversivelmente a membranas com forte fluorescência. Estes são apenas alguns exemplos de sondas lipídicas fluorescentes usadas na pesquisa de membranas bacterianas^[27].

As amostras após preparadas, precisam ser observadas após o tempo necessário para incubação e as imagens devem ser obtidas imediatamente. Esses processos são altamente exigentes devido à preparação do material, coloração, observação microscópica e imagem, que precisa ser feita sucessivamente.

A microscopia de fluorescência foi empregada para determinar o mecanismo de interação de complexos de rutênio. O complexo de estrutura $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$ onde $(\text{Me}_4\text{phen})_3=3,5,6,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina}$, não apresentou permeabilização da membrana, indicando uma diferença significativa em nível biológico desse complexo e de complexos dinucleares como Rubb_n (polipiridilruthenium(II) onde $n = 2, 5, 7, 10, 12, 14$ ou 16). Foi proposto que o complexo $[\text{Ru}(\text{Me}_4\text{phen})_3]^{2+}$ tinha um modo diferente de interação com o meio celular e/ou alvo intracelular em comparação com os complexos dinucleares de rutênio. Embora os complexos possam permeabilizar as membranas, os estudos de localização celular também mostraram que o composto mais ativo Rubb_{16} liga preferencialmente ao RNA em bactérias vivas, acumulando-se nos ribossomos e condensando os ribossomos quando eles existiam como polissomos^[1].

Outra técnica que recentemente tem sido utilizada para avaliar a eficácia e a segurança dos antibióticos, são as novas tecnologias microfluídicas, as quais, possibilitam estudos exclusivos no campo da microbiologia para facilitar a compreensão dos diversos microrganismos. A microfluídica é a ciência que explora o escoamento em canais de dimensões

micrométricas, permitindo a redução de tempo de investigação e o consumo de reagentes. Ela trata de fluídos em sistemas miniaturizados e de alto rendimento, onde dispositivos com microambientes controlados podem ser criados para estudos microbianos, e têm aplicações nas áreas de engenharia química, farmacêutica, biotecnológicas e na medicina moderna. Esta técnica busca maximizar resultados por meio de métodos microanalíticos, propondo formas mais compactas e versáteis para os procedimentos convencionais^[28,29].

A microfluídica se mostra eficiente, quando aplicada a métodos convencionais que normalmente levavam muito tempo para serem desenvolvidos como no estudo da cinética celular, monitoramento das reações intracelulares, quantificação do crescimento microbiano, técnicas de manipulações genéticas^[30,31]. Ela ainda permite observações em alta resolução espacial e temporal em microambientes cuidadosamente controlados^[32]. Recentes progressos em química e física aplicadas levaram o desenvolvimento de plataformas microfluídicas com potencial para realizar estudos farmacológicos. Ao reduzir os sistemas convencionais em macroescala para microescala, a microfluídica aparece como uma solução para triagem e testes mais baratos, rápidos e precisos de antibióticos e outros tipos de medicamentos. A natureza do fluxo de fluido laminar em microescala permite a geração de gradientes que imitam o microambiente celular *in vivo*^[33,34].

Dentre as aplicações desta técnica, várias pesquisas encontram-se relatadas na literatura. Vegas e colaboradores desenvolveram um quimiostato microfluídico que permitiu identificar o papel crítico que a comunicação química bacteriana desempenha na formação de antibióticos resistentes. Esses autores observaram que as células de *E. coli* expostas a níveis fisiológicos de Indol (um sinal químico que afeta as respostas ao estresse celular), exibiram níveis de persistência que era superior às células não expostas. Ao projetar uma cepa mutante com uma substância fluorescente específica para essa via de detecção química, os autores puderam rastrear os níveis de Indol detectados por células individuais no quimiostato microfluídico e correlacionar esses níveis com a capacidade de cada célula em sobreviver ao tratamento com antibióticos^[33,35].

A dinâmica de crescimento de *E. coli* persistentes foi analisada por Gefen e colaboradores usando um dispositivo microfluídico que permitia modular o suprimento dos meios de crescimento e antibióticos durante o tempo de vida. As células foram armazenadas em câmaras fluídicas que permitiam o fornecimento contínuo de meios de crescimento e imagens em tempo real. Utilizando substâncias fluorescentes, os autores observaram que as bactérias resistentes de *E. coli* continuaram a sintetizar proteínas e isso apresentou uma janela de vulnerabilidade aos antibióticos. Essa janela de vulnerabilidade pode ser importante para o

tratamento clínico de infecções persistentes. A observação de células únicas sob condições de ambiente controladas também levou a um grau de previsibilidade em relação a quais células se tornam resistentes com o tempo^[33,36]. Similar ao relatado, os sistemas microfluídicos também podem ser integrados a sistemas mais complexos que podem monitorar células *in situ* em tempo real para determinar o modo de ação de metalodrogas anticâncer. Por exemplo, Caviglia e colaboradores, desenvolveram uma plataforma integrada de cultura de células microfluídicas e análise eletroquímica com um sistema embutido de manuseio e detecção de fluidos. A plataforma permite a medição espectroscópica de impedância eletroquímica paralela e detecção óptica para monitoramento e avaliação em tempo real das respostas das células cancerígenas aos medicamentos anticâncer (doxorubicina e oxaliplatina)^[34,37].

O avanço dos microfluídicos facilita a avaliação da eficácia dos antibióticos no tratamento de várias infecções, bem como a toxicidade e efeitos colaterais dos medicamentos nos tecidos humanos, que podem ser determinantes de acordo com seu mecanismo de ação frente a linhagens celulares. A capacidade da manipulação de fluídos e a flexibilidade em geometrias e materiais, tornam os dispositivos microfluídicos uma ferramenta versátil para quase todas as etapas da descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos^[34].

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade antimicrobiana qualitativa e quantitativa dos complexos **1-8** e a partir de técnicas microscópicas e monocamadas de Langmuir propôr um mecanismo de ação para estes compostos.

5.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos complexos das séries $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**) e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAr}_3\text{NCl}]^+$ (**5-8**), e dos ligantes livres, frente às linhagens de bactérias Gram positivas [(*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Bacillus subtilis* (PY79))], e Gram negativa [(*Escherichia coli* (ATCC 25922))].
- Caracterizar a atividade destes complexos pelo método de Disco de difusão (teste qualitativo) e concentração mínima inibitória (teste quantitativo) e comparar com o antibiótico de referência.

- Elucidar o mecanismo de ação dos complexos **1-4** que apresentaram atividade antibacteriana promissora, por técnicas de Microscopia de Fluorescência e Microfluídica, e por monocamadas de Langmuir, as quais, mimetizam membranas de células bacterianas.

5.3 METODOLOGIA

5.3.1 Técnica de difusão em disco

Foram utilizados discos de papel de filtro Whatman, 6 mm de diâmetro, estéreis e saturados com 5µL das soluções dos complexos. Uma espécie Gram(+) *Staphylococcus aureus* (ATT25923) e uma espécie Gram(-) *Escherichia coli* (ATT25922) foram usadas para preparar os pré-inóculos. Estes foram preparados em meio líquido Luria Bertani, incubados a 37 °C durante 16 h. Os cultivos foram transferidos para meio sólido ágar Mueller Hinton, espalhados com o auxílio de swabs estéreis. Utilizou-se soluções de DMSO e Canamicina 100 mg/mL como controles negativo e positivo, respectivamente. Após a adição dos compostos, os discos de papel filtro foram transferidos para as placas de Petri contendo meio sólido. Após incubação durante 24 horas, as placas foram analisadas com um paquímetro, para determinar o tamanho dos halos de inibição nos antibiogramas.

5.3.2 Testes de determinação de concentração inibitória mínima (CIM)

Foram utilizadas as espécies *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Bacillus subtilis* (PY79). Os cultivos bacterianos foram crescidos a 37 °C em caldo Mueller Hinton (CMH) até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \cdot 10^8$ UFC/mL). Em seguida, o cultivo foi diluído na proporção 1:150 em CMH obtendo-se uma suspensão de $5,0 \cdot 10^5$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios. A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita no *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para as bactérias aeróbicas. As concentrações da diluição seriada foram de $1,33 \text{ mg mL}^{-1}$ até $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$. Canamicina $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ foi utilizada como controle positivo e DMSO 6 % como controle negativo. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. A determinação da concentração mínima de inibição apresentada pelos complexos foi realizada visualmente.

5.3.3 Imagens de microscopia de fluorescência

As linhagens bacterianas de *B. subtilis* (PY79) e *S. aureus* (ATCC25923) foram inoculadas em meio Luria Bertani LB e crescidos por 6 h a 37 °C sob agitação constante. Em seguida, os cultivos foram re-inoculados e crescidos até uma D.O.₆₀₀=0,1. Atingida a D.O., os compostos **2** e **4** foram adicionados aos cultivos na concentração de 0,084 mg mL⁻¹, correspondente ao dobro da CIM. Após incubação por 30 min, o cultivo foi concentrado para 20 % do volume inicial e foram adicionados os corantes iodeto de propídeo (100 mg mL⁻¹), DAPI (100 ug mL⁻¹) e FM1-43 (50 mg mL⁻¹). Os experimentos foram realizados em microscópio Nikon Eclipse Ti, equipado com filtros GFP BrightLine and mCherry BrightLine (Semrock), objetiva Plan APO VC Nikon (oil 100x, NA=1,4), um shutter de 25mm SmartShutter e uma câmera Andor, modelo Ixon EMCCD com sensor CCD (1004x1002 SQ Pixels). Os tempos de exposição variaram de 0,3 a 1 s. As células crescidas até a fase exponencial foram incubadas em câmaras contendo meio LB mais 1 % de agarose. Todas as imagens foram capturadas com o programa NIS 3.07 (Nikon) e processadas com o programa ImageJ. Estes ensaios foram realizados pela Profa. Dra. Patrícia Castellen (IFSC).

5.3.4 Imagens de microscopia microfluídica

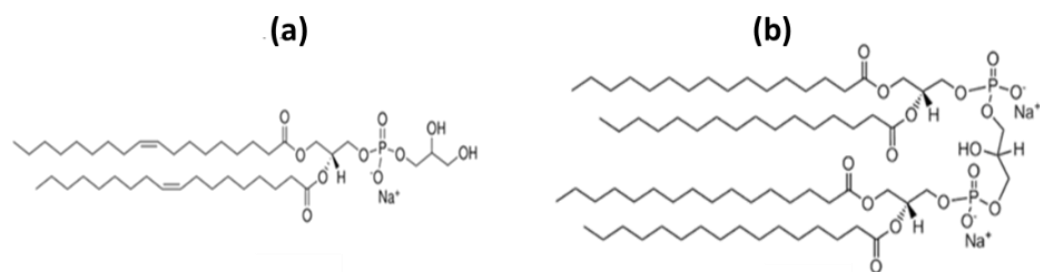
Os experimentos microfluídicos foram feitos usando a plataforma CellASIC de Merck Millipore (Billerica, Massachusetts) foi usado com placas B04A. Linhagens *B. subtilis* (PY79) (com mNG, plasmídeo), foram crescidas em meio LB (Luria Bertani), a 37 °C, colocado em LB + 2 % de agarose e fotografado com contraste de fase por 90 min em intervalos de 2 min. O crescimento celular individual foi analisado por um método personalizado Código MATLAB. Primeiro, a área das células foi medida com base na segmentação da fase imagens de contraste. As células foram rastreadas ao longo do tempo e a área de cada célula por quadro foi calculada. A taxa de crescimento de cada célula é calculada pela inclinação do ajuste linear do logaritmo das áreas totais. Para cada ajuste linear da área total de células, o limiar do quadrado R é definido como 0,95.

Para observar os efeitos do **2** e **4**, cloranfenicol e CCCP no aparelho de crescimento celular e síntese de proteínas de *B. subtilis*, utilizou o sistema CellASIC microfluídico da EMD Millipore com placas B04A. Células em ótimas condições de crescimento foram carregadas no dispositivo e equilibrada por 1 h em meio CH a um fluxo de 3 Psi. Esta análise foi realizada Prof Dr. Alexandre Bisson, na Universidade de Harvard (USA).

5.3.5 Obtenção e Caracterização dos filmes de Langmuir de **1-4** com modelo de membrana *S. Aureus*.

O fosfolipídio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol (DOPG), 1',3'-bis[1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-glicerol (CL) foram adquiridos da *Avanti Polar Lipids*. Todos os lipídios apresentavam grau de pureza maior que 99%, e foram usados sem purificação prévia. As estruturas dos lipídios são ilustradas na **Figura 5.6**. A membrana celular da bactéria *S. Aureus* é basicamente composta de 58% de DOPG e 42% de CL.

Figura 5. 6: Estrutura química dos compostos (a) 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) e (b) 1',3'-bis[1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-glicerol (CL).



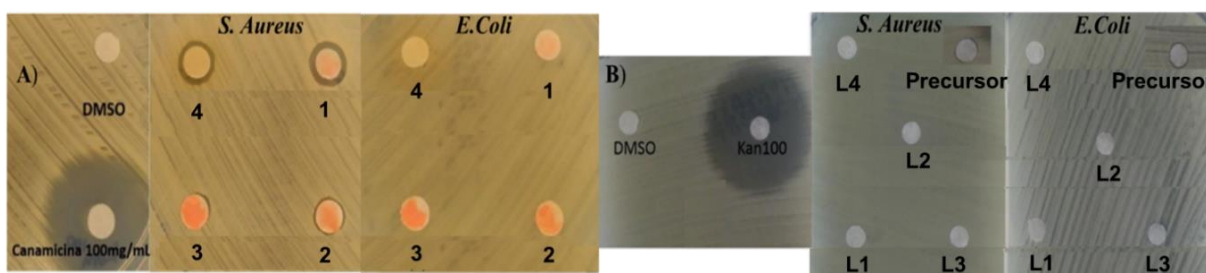
As monocamadas de Langmuir foram preparadas a partir do espalhamento das soluções de (**1-4**), *S. Aureus* (DOPG/CL 0,58/0,42) em CHCl_3 ou CHCl_3 :metanol (4:1) sobre subfase de tampão PBS (pH=7,4; 150 mM de NaCl). As monocamadas mistas de *S. Aureus*/Ru foram preparadas usando diferentes volumes das soluções estoque dos complexos Ru para atingir proporções molares de 95: 5, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 e 10:90 (lipídio/complexo Ru). As medidas de pressão e potencial de superfície foram realizadas em uma Cuba de Langmuir KSV (modelo KN 1003, *KSV Instruments, Ltd., Helsinki, Finlândia*) a qual tem uma área máxima de 273 cm^2 , alocada no Laboratório GDEM- UEPG. A cuba é equipada com uma placa Wilhelmy (papel de cromatografia Whatman Chr1) como sensor de pressão de superfície e, com uma prova de Kelvin como sensor de potencial de superfície, usando o método da placa vibrante. Os experimentos foram realizados a $\sim 20^\circ \text{C}$. Após 15 minutos para a evaporação do solvente, as monocamadas foram comprimidas na velocidade de 10 mm min^{-1} . Os experimentos foram efetuados em triplicata.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Ensaios de atividade antibacteriana para os complexos da série $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAR}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**) e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{PAR}_3\text{NCl}]^+$ (**5-8**)

Os complexos organometálicos da série **1-4**, os respectivos ligantes livres e o complexo precursor das sínteses foram investigados inicialmente pela técnica de disco de difusão, para determinar qualitativamente sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra as linhagens de *Escherichia coli* (ATT25922) e *Staphylococcus aureus* (ATT25923), como ilustra a **Figura 5.7**. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 6% e como controle positivo o antibiótico Canamicina, que possui um amplo espectro de ação contra as espécies testadas.

Figura 5. 7: (A) Halos de inibição para os complexos da série **1-4** e (B) seus respectivos ligantes e precursor contra *S. Aureus* e *E.Coli*. Controle positivo Canamicina e Controle negativo DMSO 6 %.



O controle negativo com o solvente DMSO não apresentou atividade antimicrobiana e o controle positivo com Canamicina apresentou atividade com halo de inibição de crescimento de 12 mm e 10 mm (**Figura 5.7A e 5.7B**). O **1** e **4** apresentaram maior atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria *S.aureus* com halos de inibição de crescimento de 2 e 1,5 mm, respectivamente (**Figura 5.7A**). O **2** apresentou um halo de inibição de 1 mm, mostrando uma menor atividade. Os ligantes e o complexo precursor quando testados isoladamente, não apresentaram halos de inibição significativos, não demonstrando atividade antimicrobiana contra *S.aureus* e *E. coli* (**Figura 5.7B**). Isto indica que os efeitos de inibição de crescimento observados na presença do complexo ocorrem apenas quando os ligantes estão complexados ao precursor, o que leva a formação dos complexos estudados. A bactéria *S. aureus* é um dos modelos de estudo para bactérias Gram positivas. Esse grupo de microrganismos apresenta parede celular mais simples e membrana plasmática mais acessível a compostos com atividade biológica, quando comparado às bactérias Gram negativas^[15].

Para obter resultados qualitativos da atividade antibacteriana do **1**, **2** e **4**, confirmada pelo teste de disco de difusão, determinou-se os valores concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para uma linhagem de bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli* (ATCC25922), e para duas cepas de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC25932) e *Bacillus subtilis* (PY79). Os valores encontrados para os complexos são resumidos na **Tabela 5.1**. Os valores de CIM, foram determinados com base em leituras visuais, sendo anotada a última concentração na qual não houve desenvolvimento de turbidez nos poços testados para cada um

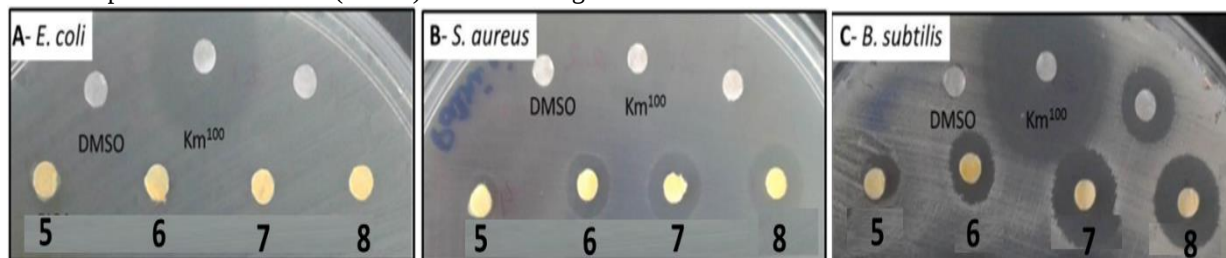
dos microorganismos. Enquanto percebe-se uma turbidez na solução, há presença de bactérias viáveis, onde os compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano.

Tabela 5. 1: Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL dos complexos 1-4.

Complexo	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
1	>1,33	0,167	0,667
2	>1,33	0,083	0,167
3	>1,33	>1,33	>1,33
4	1,33	0,042	0,042
Canamicina	<0,1	<0,1	<0,1

De acordo com esses testes, o **1, 2 e 4** exibiram atividade promissora contra *S. Aureus* e *B. Subtilis*. Para *S. aureus* e *B. subtilis*, o **4** inibiu o crescimento com CIM média de 0,042 mg mL⁻¹; enquanto que o **1** e **2** apresentaram CIM de 0,167 mg mL⁻¹ e 0,083 mg mL⁻¹ para *S. aureus* e 0,667 mg mL⁻¹ e 0,167 mg mL⁻¹ para *B. Subtilis*, respectivamente. Os compostos não apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*. Os complexos organometálicos da série **5-8**, também foram testados com intuito de verificar se a atividade antibacteriana foi modificada com a coordenação de um ligante *N*-heterocíclico, ao comparar os dados com os seus complexos precursores da série (**1-4**). Primeiramente, fez-se os testes para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* qualitativamente pela técnica de disco de difusão, como ilustra a **Figura 5.8**. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 6 % e como controle positivo o antibiótico Canamicina (KM¹⁰⁰) e Controle negativo DMSO 6 %.

Figura 5. 8: Halos de inibição para os complexos da série (**5-8**) contra A-*E. Coli*, B-*S. Aureus* e C- *B. subtilis*. Controle positivo Canamicina (KM¹⁰⁰) e Controle negativo DMSO 6 %.



Nenhum dos complexos teve atividade de inibição de crescimento sobre *E. Coli*. Todos os complexos inibiram o crescimento das Gram positivas *S. aureus* e *B. subtilis*, sendo que o **6, 7 e 8** os mais eficientes contra *S. aureus* e o **5** apresentou menor halo de inibição; já o **7 e 8** foram mais efetivos contra *B. subtilis* quando comparados com **5 e 6** (**Figura 5.8 B e C**). A

falta de atividade inibitória frente às cepas de *E.coli* evidenciam a especificidade desses complexos para bactérias do tipo Gram-positivas, similar à atividade dos seus complexos precursores **1-4**. Para obter resultados quantitativos da atividade antibacteriana do **5-8**, confirmada pelo teste de disco de difusão, determinou-se os valores concentrações inibitórias mínimas para uma linhagem de bactéria Gram-negativa e Gram-positivas e os valores encontrados para os complexos estão resumidos na **Tabela 5.2**.

Tabela 5. 2: Resultados de concentração inibitória mínima (CIM) em mg mL⁻¹ dos complexos **5-8**.

Complexo	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
5	>1,33	>1,33	>1,33
6	0,041	0,005	0,005
7	-	0,005	0,005
8	-	0,005	0,005
Canamicina	<0,1	<0,1	<0,1

Os resultados do experimento descritos na **Tabela 5.2** apontam que o complexo **6** apresentou CIM de 0,041 mg mL⁻¹ para a linhagem *E. coli* e os demais compostos não apresentaram atividade antibacteriana contra essa espécie. Os compostos **6 a 8** apresentaram atividade antimicrobiana para as espécies Gram positivas. Tanto para *S. aureus* quanto para *B. subtilis* os compostos apresentaram CIM de 0,005 mg mL⁻¹. O **5** não inibiu o crescimento de nenhuma das espécies testadas. Os resultados obtidos permitem inferir que o **6** apresenta atividade antibacteriana de maior espectro, uma vez que inibe o crescimento tanto de espécies Gram positivas como da espécie Gram negativa testadas. Apesar disso, sua CIM é alta em comparação com os antimicrobianos utilizados atualmente. Já os compostos da série **5 a 8** apresentam boa atividade de inibição de crescimento contra Gram positivas, com valores mais baixos de CIM.

A atividade antimicrobiana de complexos de rutênio foi descrita em alguns trabalhos. Abebe e Hailemariam (2016)^[38] sintetizaram o complexo do tipo [Ru(Phen)₂(G)(Cl)]Cl.H₂O, onde phen= 1,10-fenantrolina e G= guanida e foram descritos valores de CIM 0,4 mg mL⁻¹ para *S.aureus* e 0,3 mg mL⁻¹ para *E.coli*. O complexo de fórmula geral *p,t*-[Ru(CO)(PR₃)(tren)]X₂ [R= Ph ou *p*-tol; tren =tris(2-aminoetil)amina; X = Cl⁻, PF₆⁻, apresentaram valores de CIM para *E.coli* de 0,45 e 0,34 mg mL⁻¹ e para *S. aureus* de 0,50 e 0,15 mg mL⁻¹ ^[21]. Resultados de atividade antibacteriana também foram encontrados para complexos de rutênio-areno solúveis em água como [Ru(η⁶-*p*-cimen)X₂]₂ (X =Cl, Br, I ou NCS), [Ru(η⁶-*p*-cimen)X₂(pta)] (X= Cl, Br, I ou NCS; pta= 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1]decano) e o cluster de tetrarutênio [H₄Ru₄(η⁶-*p*-benzeno)₄]₂⁺. Conforme avaliado por testes de difusão em disco, o

derivado de iodeto retardou levemente o crescimento de *B. subtilis* com halos de inibição de aproximadamente 1 mm (da borda do disco até a borda da zona de inibição)^[39]. Há também exemplos de complexos de $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{(L)}\text{Cl}_2]$ com ligantes derivados de 2-acetamidotiazol. Três desses complexos foram moderadamente ativos contra *E. coli* com diâmetros de halo de inibição de 8 mm e dois complexos formaram halos de inibição de 14 mm para *S. aureus*^[40]. Da mesma forma, os complexos organometálicos $\text{Ru}^{\text{(II)}}\text{-(}\eta^6\text{-}p\text{-cimen)}$ ligados ao ferroceno (Fc) via ligantes heterociclos de nitrogênio, demonstraram ser potenciais agentes antibacterianos contra *B. subtilis* com valores de concentração inibitória máxima (CIM) variando de 21 a 78 μM , sem efeito sobre o crescimento de *E. coli*. Estes complexos são análogos de complexos anticancerígenos como o RAPTA-C^[41].

Os resultados de atividade antimicrobiana, das séries de complexos sintetizadas neste trabalho, foram promissores e com valores de CIM determinantes. Ao comparar a série **5-8**, a qual, tem a coordenação de um ligante piridínico na esfera de coordenação, pode-se evidenciar a melhora na atividade antibacteriana, obtendo valores de CIM menores relativamente. Isso se deve, pela formação de complexos catiônicos, provinda dos precursores neutros **1-4**. O surgimento da carga nestes complexos, pode facilitar a interação com as membranas celulares ou biomoléculas específicas, levando uma maior atividade destes compostos. Estes resultados de atividade antimicrobiana, motivaram o estudo do possível mecanismo de ação destes compostos, na tentativa de comparar com o mecanismo elucidado para a atividade anticâncer. Desta forma, fez-se alguns testes físico-químicos para prever o mecanismo de ação da série de complexos **1-4**.

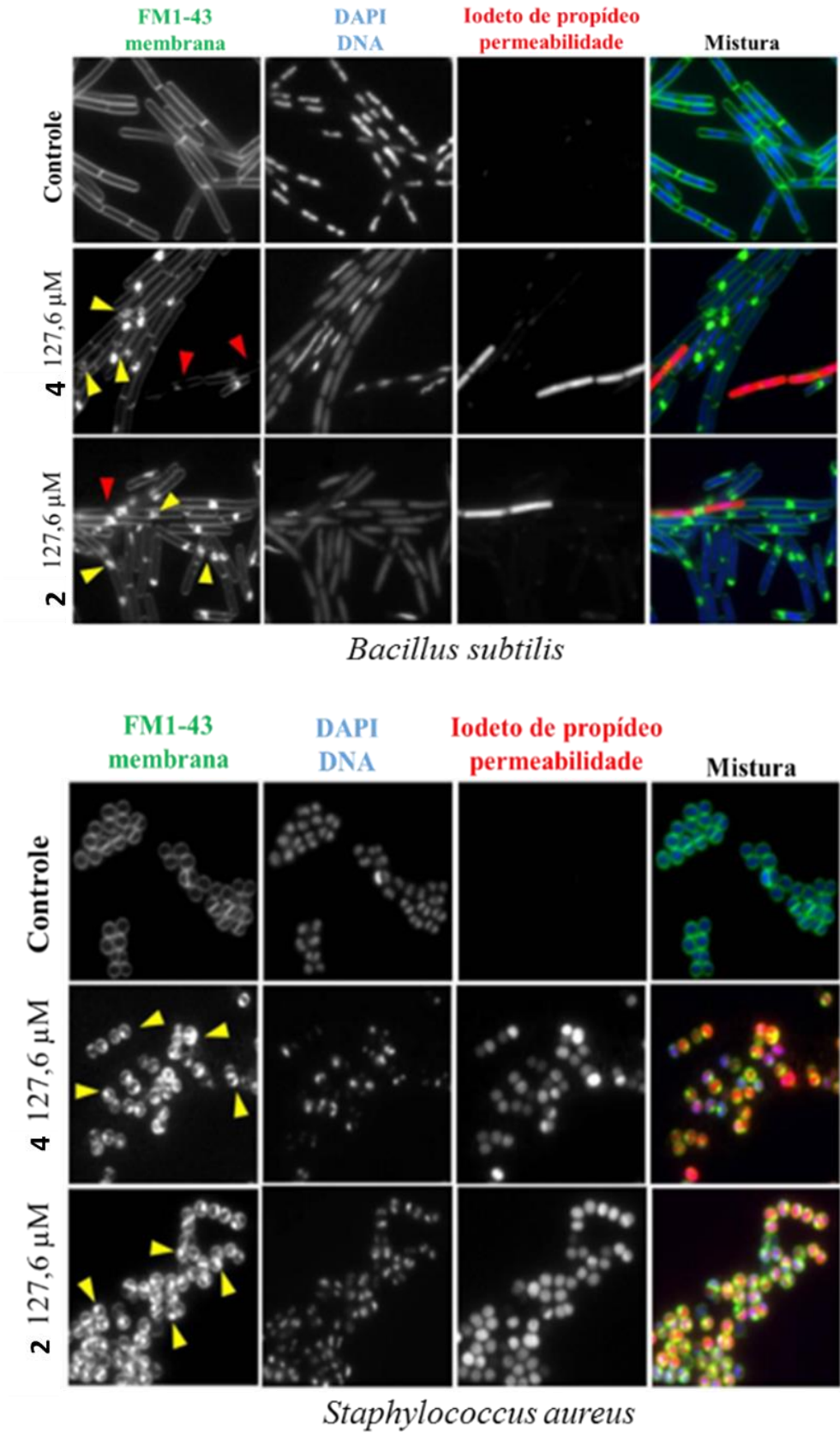
5.4.2 Estudos para identificação do mecanismo de ação para a série de complexos 1-4.

5.4.2.1 Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência permite o reconhecimento seletivo de estruturas complexas de componentes biomoleculares específicos para a investigação de processos biológicos. É frequentemente usado para criar imagens características específicas microbianas. A microscopia de fluorescência em microbiologia pode investigar a localização e os níveis de moléculas e pode fornecer informações sobre sua distribuição, dinâmica e interações, tanto em amostras vivas quanto em amostras fixas^[27]. A partir destes resultados, realizou-se a investigação do mecanismo de ação (MOA) do **2** e **4** que apresentaram menores valores de CIM, a partir da microscopia de fluorescência, para avaliar como estes afetam a morfologia celular bacteriana. As imagens estão apresentadas na **Figura 5.9**.

As imagens da **Figura 5.9** evidenciam que os complexos **2** e **4** são capazes de induzir a completa descondensação do DNA e formação de vesículas na membrana plasmática, a qual apresenta perda de sua integridade e do potencial de organização de suas cargas, permitindo a permeabilidade do iodeto de propídio (corante vermelho). Esses resultados indicam que ambos podem bloquear a transcrição de RNA (RNA polimerase) e afetar a estrutura da membrana em ambas as espécies, *B. subtilis* e *S. aureus*. Esta constatação foi por meio de dados pertinentes da literatura, que demonstram os principais mecanismos de ação para os antibióticos aplicados, como a Rifampicina e Monensina, cujo mecanismo é o de inibição da transcrição do RNA e ação na membrana celular, sendo similar aos complexos aqui relatados^[41].

Figura 5. 9: Imagens de microscopia de fluorescência de *B. subtilis* e *S. aureus* incubadas com os complexos (2) e (4) na concentração 2x (CIM). Membrana com corante verde FMI-43, ácidos nucleicos (DNA) com o corante azul DAPI e a permeabilidade celular (em vermelho) com o iodeto de propídio. Setas vermelhas: perda de integridade da membrana. Setas amarelas: vesículas na membrana.



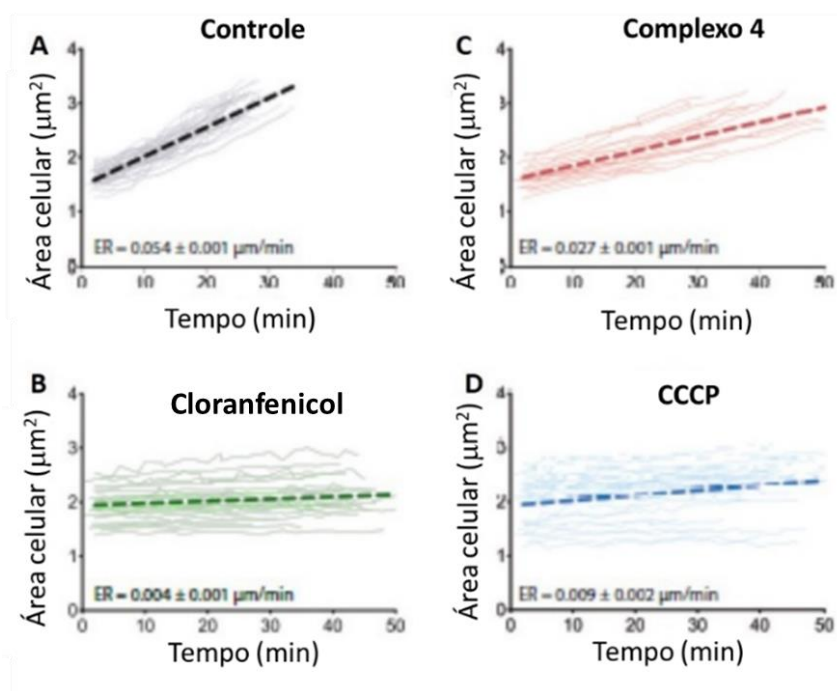
5.4.2.2 Microscopia Microfluídica

Dado que o DNA pode não ser o alvo biológico dos complexos deste trabalho, avaliamos seu efeito direto no crescimento de células bacterianas e na síntese de proteínas. Para verificar mudanças no crescimento celular em resposta a estímulos específicos, os métodos analíticos tradicionais incluem a construção de curvas de crescimento, com base em medições de turbidez de culturas a granel. Este método foi recentemente utilizado para descrever a atividade antibacteriana de complexos organometálicos de $\text{Ru}^{\text{II}}-(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})^{[42]}$. No entanto, o crescimento celular em grandes culturas altera o ambiente devido à depleção de nutrientes e acúmulo de produtos metabólicos. Para lidar com esse problema, usamos um sistema de cultura de células microfluídicas, que disponibiliza fluxo contínuo de meio de crescimento, produzindo um ambiente de crescimento uniforme.

Foram testados os complexos **2** e **4**, mas obteve-se como o esperado, problemas com a solubilidade do complexo **1** no meio de cultura. O **1** é bem solúvel em etanol, mas após a diluição para atingir a concentração da CIM, ele precipitou. Por isso, os estudos não foram possíveis.

Como representado na **Figura 5.10(C)**, a presença do **4** causou uma diminuição na área celular de *B. subtilis* de aproximadamente metade em comparação com o controle (**Figura 5.10 (A)**) no decorrer do tempo. Esta diminuição significa um crescimento celular bacteriano defeituoso que implica em velocidade de crescimento de $0,027 \mu\text{m min}^{-1}$, metade da velocidade de crescimento do controle ($0,054 \mu\text{m min}^{-1}$). Como esperado, o controle positivo com cloranfenicol (**Figura 5.10 B**) exibiu quase nenhum aumento na área celular ao longo do tempo, com velocidade de crescimento de $0,004 \mu\text{m min}^{-1}$. O efeito do **4** no crescimento celular bacteriano foi um pouco semelhante ao efeito do cianeto de carbonila *m*-clorofenil-hidrazina (CCCP) (**Figura 5.10(D)**), que também diminuiu o crescimento celular. O CCCP é um ionóforo de prótons sem valor terapêutico que aumenta a permeabilidade da membrana e reduz a produção de ATP em bactérias, causando morte celular. Devido aos seus efeitos, os protonóforos são comumente usados como modelos para estudar as interações entre antibióticos e membrana plasmática bacteriana^[43,44,45]. O complexo **2** produz efeitos semelhantes sobre o crescimento celular de *B. subtilis*, enquanto o complexo **1**, como já citado, por problemas de solubilidade, não teve o teste realizado.

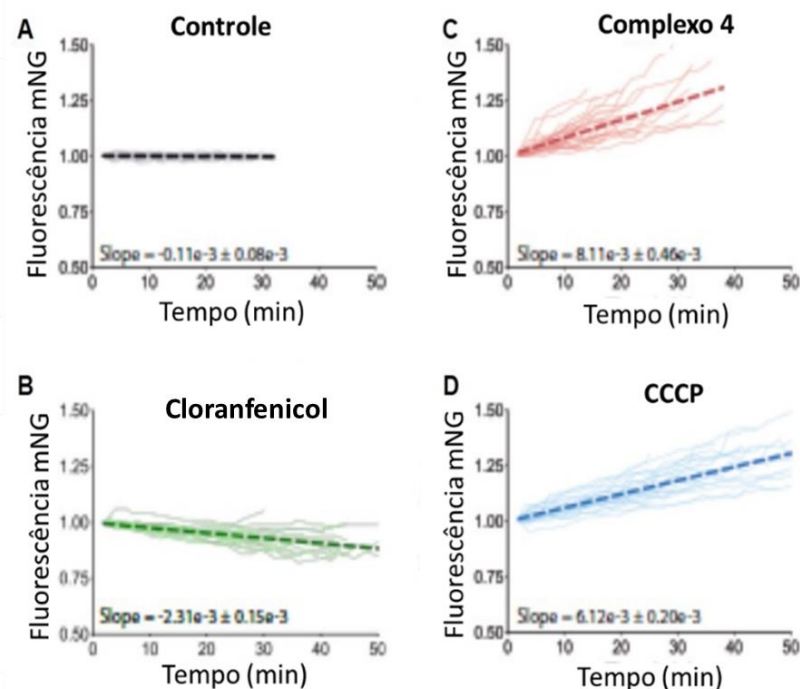
Figura 5. 10: Influência do cloranfenicol (B), complexo 4 (C), e CCCP (D) no crescimento das espécies bacterianas de *B. subtilis*.



Como a inibição da síntese proteica é um modo de ação comum para compostos antibacterianos, verificamos se essa via metabólica é afetada na presença dos complexos. Utilizou-se uma proteína fluorescente verde-amarela, mNeonGreen (mNG), como um marcador de fusão para a proteína. A proteína mNG possui uma alta intensidade de emissão de fluorescência que permite quantificar proteínas endógenas em níveis de expressão fisiológica^[46]. Portanto, foi empregada essa proteína como repórter transcricional para nossa análise *in vivo*. Novamente, utilizou-se um sistema microfluídico para fornecer um ambiente de crescimento invariável ao longo do tempo.

Na presença do complexo 4, a intensidade da fluorescência aumentou enquanto a intensidade do controle permaneceu constante ao longo do tempo (**Figura 5.11. C e A**, respectivamente). Este aumento na intensidade da fluorescência pode ser atribuído a uma maior concentração de mNG no interior da célula de *B. subtilis*. Como a área celular na presença do 4 é significativamente menor (**Figura 5.11C**), é possível inferir que a concentração de mNG é maior devido ao volume reduzido de citoplasma. O cloranfenicol é uma acetamida usada como antibiótico de amplo espectro que impede a síntese de proteínas, dificultando a atividade da peptidil transferase do ribossomo. Liga-se à subunidade ribossômica 50S, afetando a ligação do substrato e, dessa forma, impedindo a formação de ligações peptídicas^[47]. Como esperado, a presença de cloranfenicol diminui a intensidade da fluorescência devido a uma produção reduzida de mNG ao longo do tempo (**Figura 5.11 B**).

Figura 5. 11: Influência do cloranfenicol (B), Complexo 4 (C) e CCCP (D) na síntese de proteínas em *B. subtilis*. A intensidade de fluorescência normalizada (unidades arbitrárias) foi plotada contra o tempo em minutos.



Em conjunto, esses resultados revelaram que o **4** não tem influência nociva sobre as formas metabólicas envolvidas na síntese de proteínas. Mais uma vez, os efeitos do **4** e CCCP foram semelhantes, indicando que esse complexo pode interferir na integridade da membrana celular bacteriana (**Figura 5.11. D**). Ressalta-se que o **2** apresenta resultados semelhantes, e este efeito na membrana celular corrobora com os resultados visualizados pela microscopia de fluorescência.

5.4.2.3 Efeito dos complexos de rutênio 1-4 em modelos de membrana bacteriana

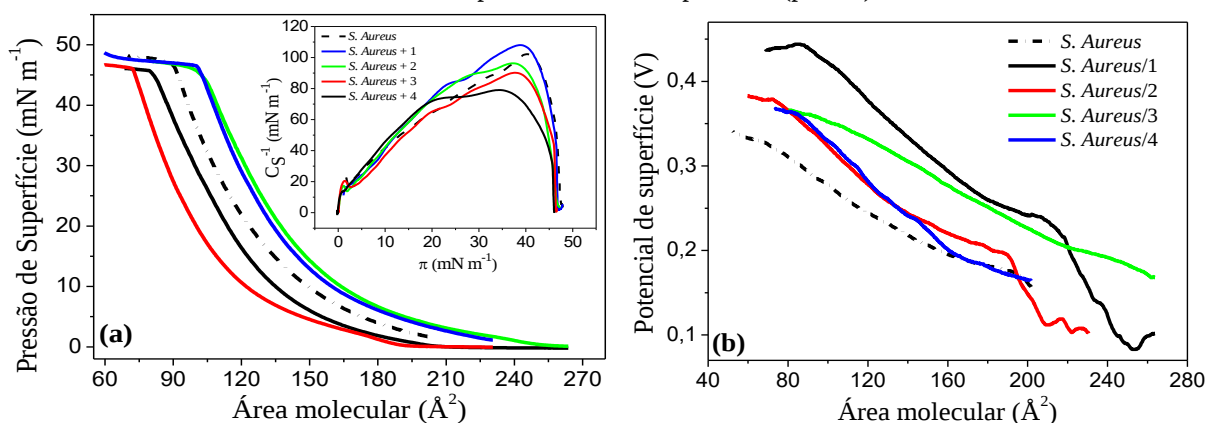
Segundo estudos antimicrobianos os complexos de rutênio apresentam atividade antibacteriana contra a *S. Aureus*. Sendo assim, seria interessante entender os mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana desses complexos frente a esta linhagem celular. Como já foi relatado nos testes anteriores, um possível mecanismo de ação seria a interação e rompimento da membrana celular, a qual, pode ser mimetizada por monocamadas de Langmuir.

Membranas bacterianas contém grandes quantidades de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilglicerol (PG), ou derivados de PG como o difosfatidilglicerol (DPG) ou cardiolipina, mas não tem colesterol. Além disso, a composição lipídica depende também da classe que a bactéria pertence, Gram-negativa ou Gram-positiva. Em geral, quantidades mais elevadas de

PE são encontradas na membrana interna das bactérias Gram-negativas, enquanto as membranas citoplasmáticas das bactérias Gram-positivas são mais ricas de PG. Por exemplo, PE representa cerca de 82% da membrana citoplasmática interna de *Escherichia coli*, enquanto que PG são os fosfolipídios predominantes da membrana *Staphylococcus aureus*. As diferentes composições lipídicas alteram as propriedades da membrana, tais como estrutura, empacotamento, rigidez e densidade de carga superficial^[48]. Sendo assim, uma mistura contendo 58% de DOPG e 42% de cardiolipina (CL) foi escolhida para se estudar o modelo de membrana bacteriana para *S. Aureus*.

A isoterma π -A obtida para o modelo de membrana de *S. Aureus* sobre subfase de tampão PBS (**Figura 5.12(a)**) indicou que em seu nível de maior ordenamento, ela ocupa uma área de $145 \text{ \AA}^2$ e o processo de colapso inicia em 47 mN m^{-1} . Ainda na isoterma π -A observa-se um aumento da pressão de superfície a medida que a área é reduzida, indicando uma transição de fase gasosa para a fase líquida. Os dados de módulo de compressão (Inserção na **Figura 5.12(a)**) exibem apenas um máximo em aproximadamente 40 mN m^{-1} , a qual é consistente com uma fase líquido-condensada (LC) (C_S^{-1} de 103 mN m^{-1}). O potencial de superfície na **Figura 5.12(b)** não foi zero em grandes valores de área molecular ($0,16 \text{ V}$ em $200 \text{ \AA}^2$), o qual aumentou à medida que a monocamada foi se organizando até atingir $0,33 \text{ V}$ (ΔV_{max}) em seu nível de maior ordenamento.

Figura 5. 12: Isotermas π -A e ΔV -A para o modelo de membrana da *S. Aureus* (DOPG/CL; 58/42) e suas monocamadas mistas contendo 5% de **1-4** espalhados sobre tampão PBS (pH 7,4).



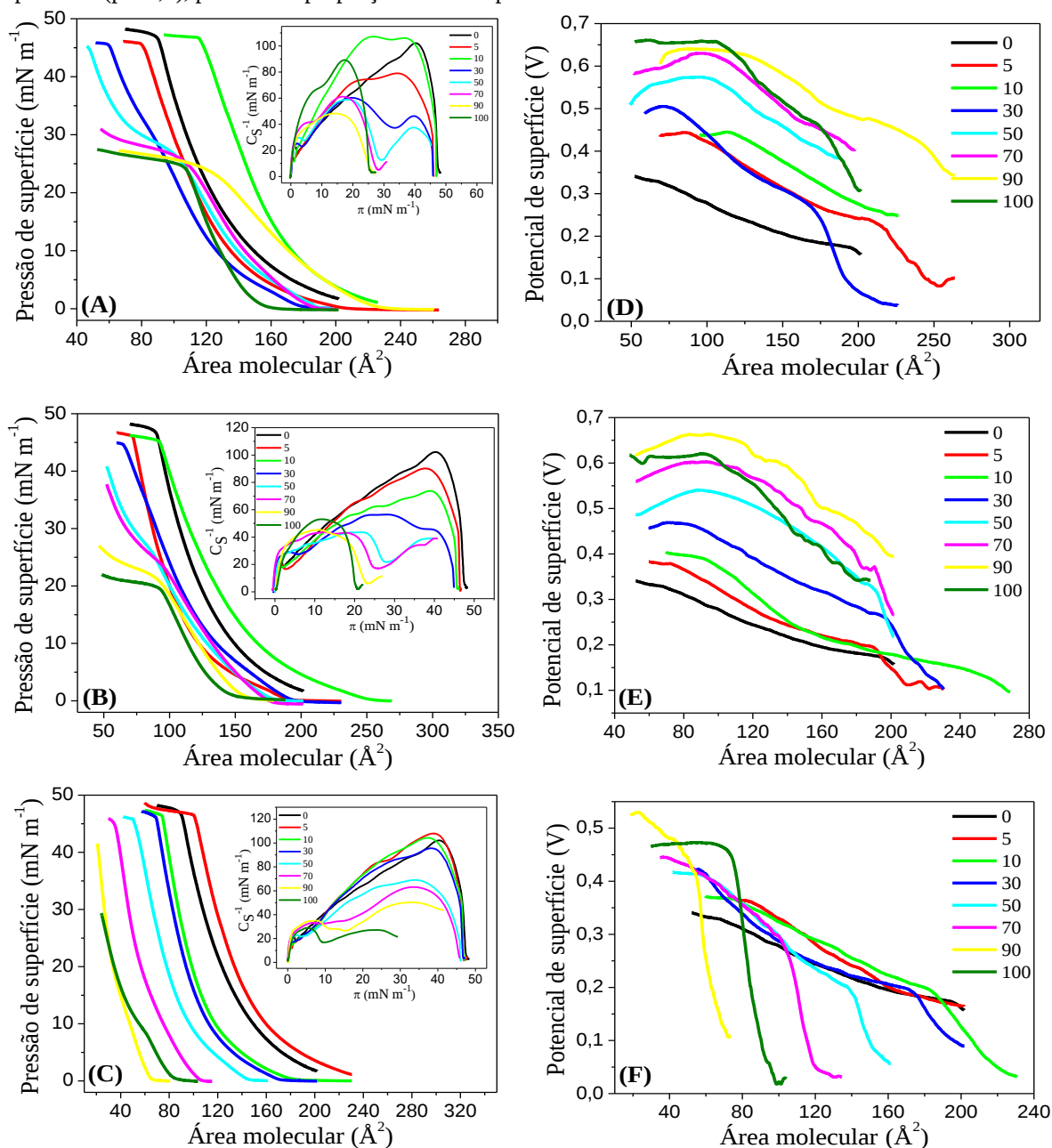
As isotermas π -A e ΔV -A para os filmes de Langmuir de *S. Aureus* contendo 5% de **1-4** (mol/mol) são ilustradas na **Figura 5.12(a) e (b)**, respectivamente. A incorporação do **1** e **2** no modelo de membrana bacteriana ocasionou a contração das isotermas de pressão de superfície, diminuindo a área molecular média em baixos valores de pressão, o que pode indicar interação entre os complexos de rutênio e os componentes que compõem a membrana celular. Já a

incorporação dos complexos **3** e **4** levou à expansão da isoterma da *S. Aureus*, aumentando a área molecular, sugerindo a penetração dos compostos na monocamada lipídica. Estas alterações na monocamada podem estar relacionadas com a atividade antimicrobiana dos complexos, indicando que um dos possíveis mecanismos de ação destes compostos é a interação com os fosfolipídeos da membrana celular.

Ao analisar as isotermas de potencial ΔV -A (**Figura 5.12(b)**), observou-se que a incorporação dos complexos afetou significativamente as propriedades elétricas da membrana, uma vez que a interação com todos os complexos ocasionou no aumento do potencial de superfície máximo, sendo esse efeito mais proeminente no sistema *S. Aureus*/**1**, afetando a organização da monocamada. A partir dos dados de módulo de compressão (Inserção na **Figura 5.12(a)**), observou-se que a interação com **1** e **2** tornou as monocamadas mais fluidas, ou seja, a compressibilidade máxima (C_S^{-1}) diminuiu. Já a interação com os complexos **3** e **4** tornou as monocamadas mais rígidas, uma vez que os valores de C_S^{-1} aumentaram. Em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, o C_S^{-1} foi alterado de 84 mN m^{-1} para a monocamada de *S. Aureus* para 76, 80, 90 e 92 mN m^{-1} para os sistemas mistos *S. Aureus*/**1**, *S. Aureus*/**2**, *S. Aureus*/**3** e *S. Aureus*/**4**, respectivamente, indicando que os complexos perturbam as propriedades reológicas da monocamada do modelo de membrana bacteriana. Assim como observado para o sistema DPPS/complexo, a similaridade dos valores de C_S^{-1} para os sistemas mistos contendo **1-2** e **3-4** pode ser explicada pela semelhança estrutural dos complexos. Esses resultados são relevantes uma vez que a atividade de algumas drogas está relacionada com a habilidade de alterar a elasticidade da membrana, comprometendo sua integridade. Em relação à pressão de superfície de colapso, observamos que a presença de 5% dos complexos na monocamada de *S. Aureus* não afetou os valores, sendo que todos ficam próximos a 47 mN m^{-1} .

Para verificar o efeito da concentração dos complexos com atividade antibacteriana nos modelos de membrana bacteriana, filmes mistos *S. Aureus*/complexo em diferentes proporções foram estudados. As isotermas π -A, ΔV -A e C_S^{-1} para o sistema *S. Aureus*/**1**, **2** e **4** são ilustradas na **Figura 5.13** e os principais valores experimentais na Tabela **A5.1**.

Figura 5.13: (A-C) Isotermas π -A (Inserção C_S^{-1}) para os complexos **1**, **2** e **4** respectivamente; e (D-F) Isotermas ΔV -A para as monocamadas mistas *S. Aureus*/**1**, *S. Aureus*/**2**, e *S. Aureus*/**4**, respectivamente, sobre subfase de tampão PBS (pH 7,4), para várias proporções dos complexos.



As isotermas de pressão π -A para as monocamadas contendo 5 e 10% de **1** e **2** Os (Figura 5.13(A-B)) seguem o perfil do lipídio puro, porém na presença de 5% de **1** e **2** área molecular diminuiu e nos filmes com 10% ocorreu um significativo aumento na área molecular. Este comportamento pode sugerir diferentes mecanismos de interação, dependendo da composição do filme. A adição do **4** às monocamadas de *S. Aureus* desviam as isotermas para menores áreas moleculares (Figura 5.13(C)), exceto para as monocamadas contendo 5% do complexo.

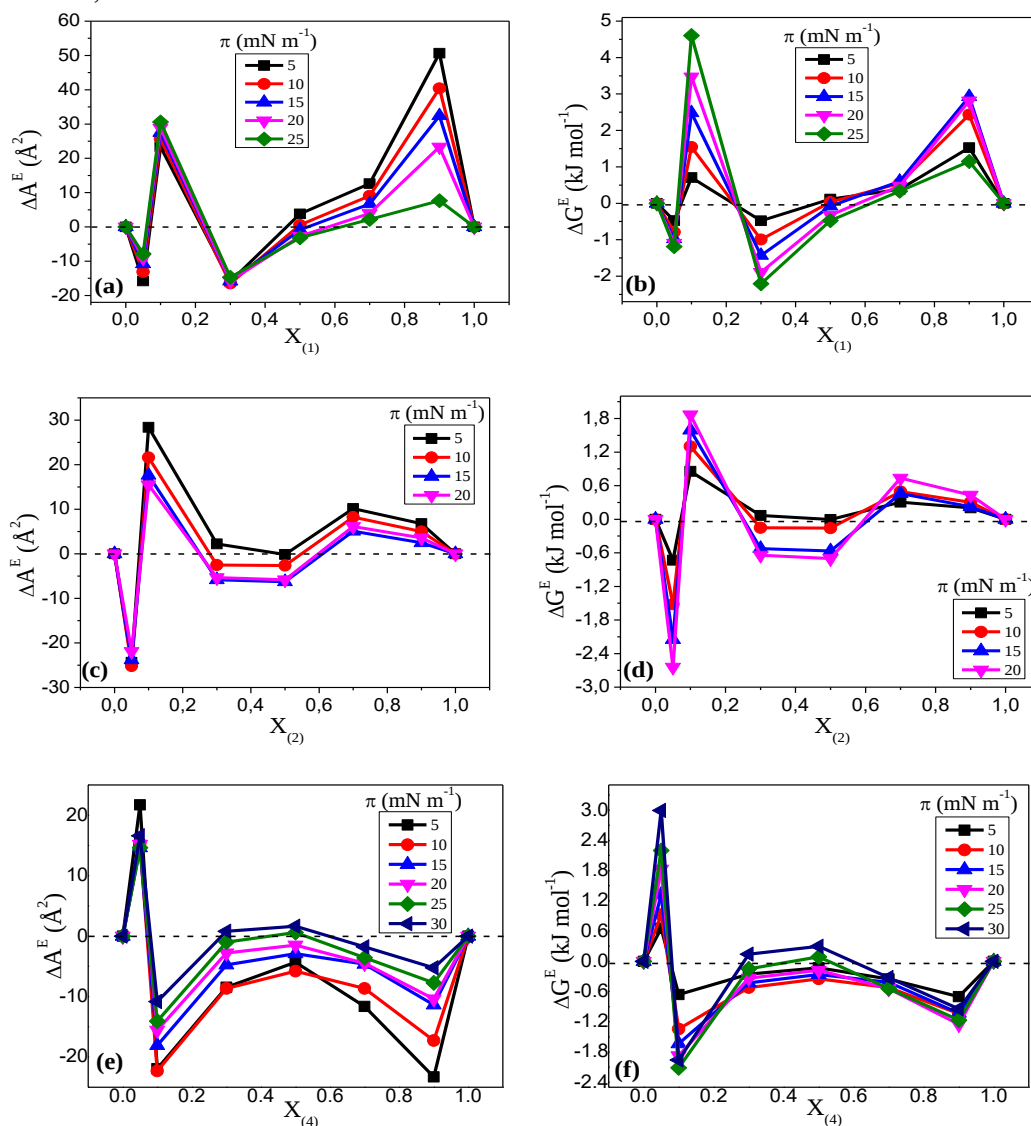
O módulo de compressão para as monocamadas mistas *S. Aureus*/1 (**Inserção Figura 5.13(a)**) apresentam, em sua maioria, duas transições de fase, em ~ 17 e 40 mN m^{-1} . A primeira está relacionada com os dados de elasticidade do **1** (puro) e os valores estão entre $40\text{-}70 \text{ mN m}^{-1}$, indicando a formação de monocamadas em fase líquido-expandidas. A segunda transição de fase está associada ao *S. Aureus*, sendo que os valores de C_S^{-1} diminuem (de 103 para 67, 99 e 45 mN m^{-1} para as monocamadas contendo 5, 10 e 30% de **1**, respectivamente. Estes resultados sugerem então, que o **1** tem um grande efeito sobre o ordenamento das moléculas de DOPG e cardiolipina na monocamada. A presença do **2** e **4** na monocamada de *S. Aureus* também afetou na sua elasticidade interfacial, uma vez que ocorre uma significativa diminuição do módulo de compressão (**Inserção da Figura 5.13(B-C)**). Este efeito torna os filmes mais fluídos, refletindo também no formato das curvas, sugerindo que a presença destes compostos reduziu o empacotamento das moléculas de DOPG e cardiolipina, aumentando a fluidez da monocamada, tornando-as mais expandidas e menos compressíveis.

Os dados de potencial de superfície (**Figura 5.13(D-E)**) exibem um aumento no potencial de superfície máximo à medida que a proporção dos complexos aumentou na monocamada mista, não seguindo uma linearidade para o **4**. As alterações nos valores de potencial bem como no perfil da isoterma de *S. Aureus* sugerem a inserção dos complexos na monocamada lipídica, resultando na interação.

5.4.2.3.1 Estudo da interação DOPG/complexos 1-4 por parâmetros termodinâmicos

A interação entre o modelo de membrana da *S. Aureus* e os complexos da série **1-4** também foi analisada termodinamicamente a partir dos parâmetros de área em excesso (ΔA^E) e energia livre em excesso (ΔG^E), como já descritos no **Capítulo 4**. Os resultados obtidos estão representados nos gráficos da **Figura 5.14**.

Figura 5. 14: Análise termodinâmica de área em excesso (ΔA^E) (a, c, e,) e excesso de energia livre (ΔG^E) (b, d, f,) em função da razão molar dos complexos para as monocamadas mistas *S. Aureus*/1, *S. Aureus*/2, e *S. Aureus*/4, respectivamente, em $\pi = 5-30 \text{ mN m}^{-1}$.



As monocamadas mistas *S. Aureus*/complexo, contendo $X = 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7$ e $0,9$ dos complexos de rutênio, não seguem a regra da aditividade que denota (ΔA^E e $\Delta G^E \neq 0$), indicando que estes sistemas não se comportam de maneira ideal. As monocamadas de *S. Aureus*/1, *S. Aureus*/2 apresentaram, em sua grande maioria, desvios positivos da idealidade, exceto para algumas proporções de complexos. Para esses três sistemas, como ΔA^E e ΔG^E são preferencialmente positivos, sugere-se que as interações entre as moléculas da membrana de *S. Aureus* e os referidos complexos são mais fracas e menos atrativas do que nas monocamadas puras, indicando assim que os sistemas mistos exibem um significativo grau de desordem.

Já para as monocamadas mistas *S. Aureus*/4 observou-se um desvio negativo em relação a uma mistura ideal, exceto para as monocamadas contendo 5% do complexo. Para esse

sistema, as interações entre os componentes são preferencialmente atrativas, devido a um efeito de condensação da monocamada mista. O valor máximo de ΔG^E foi de 4,64, 1,88 e 3,01 kJ mol⁻¹ para as monocamadas mistas *S. Aureus*/1, *S. Aureus*/2 e *S. Aureus*/4, respectivamente. Todos estes efeitos confirmam que ocorre interação dos complexos estudados e a membrana celular que mimetiza a composição *S. Aureus*.

5.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos pelos testes de atividade antibacteriana indicaram que o **2** e **4** apresentaram maiores halos de inibição de crescimento significativos frente a bactéria *S.aureus*. O **4** inibiu o crescimento das bactérias *S. aureus* e *B.subtilis* em menores concentrações, com CIM média de 0,042 mg mL⁻¹. Todos os compostos não apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*. Para a série de complexos catiônicos **5-8** constatou-se a inibição de crescimento das Gram positivas, *S. aureus* e *B. subtilis*, sendo que o **6**, **7** e **8** foram mais eficientes contra *S. aureus*, e o **7** e **8** mais efetivos contra *B. subtilis*. Os valores de CIM menores para o **6** (0,041 mg mL⁻¹) para a linhagem *E. coli* e para **8 a 6** (0,005 mg mL⁻¹) contra *S. aureus* e *B. subtilis* indicam resultados são promissores, após a coordenação de um ligante piridínico na esfera de coordenação.

Os testes para elucidar o mecanismo de ação da série **1-4** frente às células bacterianas por microscopia de fluorescência indicou que esses são capazes de induzir a completa descondensação do DNA e formação de vesículas na membrana plasmática, a qual apresenta perda de sua integridade e do potencial de organização de suas cargas, afetando a estrutura da membrana em ambas as espécies, *B. subtilis* e *S. aureus*, que indica uma possível interação via membrana celular, o que foi constatado também pela microscopia microfluídica para os complexos **2** e **4**. Pelos estudos das monocamadas de Langmuir para o modelo de membrana bacteriana para *S. Aureus* (58% de DOPG e 42% de cardiolipina (CL)), todos os complexos **1-4**, parecem alterar as propriedades da membrana celular, desta forma também, indicando interação por este meio, na presença dos complexos.

REFERÊNCIAS

- [1] LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 8, p. 2529-2542, 2015.
- [2] GARCÍA-SÁNCHEZ, J. E.; GARCÍA, E.; LUCILA MERINO, M., Cien años de la bala mágica del Dr. Ehrlich (1909–2009). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 8, p. 521-533, 2010.
- [3] BERALDO, H., Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461-471, 2004.
- [4] PATRA, M.; GASSER, G.; METZLER-NOLTE, N. Small organometallic compounds as antibacterial agents. **Dalton Trans**, v. 41, n. 21, p. 6350-8, 2012.
- [5] AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.
- [6] CHAIN, E., FLOREY, H. W., GARDNER, A. D., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., ORR-EWING, J. The classic: Penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 439, p. 23–26, 2005.
- [7] TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R., **Microbiologia**, 12.ed. Artmed: 2016.
- [8] LEWIS, K.; SHAN, Y., Why tolerance invites resistance. **Science**, v. 355, p.796-796, 2017.
- [9] World Health Organization, PRIORITIZATION OF PATHOGENS TO GUIDE DISCOVERY, RESEARCH AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS FOR DRUG-RESISTANT BACTERIAL INFECTIONS, INCLUDING TUBERCULOSIS. WHO/EMP/IAU/2017.12. Disponível em https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1. Acesso em: 29.out.2019.
- [10] LUZHETSKYY, A.; PELZER, S.; BECHTHOLD, A. The future of natural products as a source of new antibiotics. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 8, n. 8, p. 608-13, 2007.
- [11] AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochem Pharmacol**, v. 1; n.133, p.4-19, 2017.
- [12] AMINOV, R., History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.
- [13] FAIR, R.J., TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspect Medicin Chem**, v. 6, p. 25-64, 2014.
- [14] LEVINSON, W., **Microbiologia médica e imunologia**. McGraw Hill Brasil: 2016.

- [15] NOGUEIRA, J.M. DA R.; MIGUEL, L.DE F. S. **Bacteriologia**. Capítulo 3. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/cap3.pdf>. Acesso em: 20. Nov. 2019.
- [16] GIANFERRARA, T., BRATSOS, I., ALESSIO, E. (2009). A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. **Dalton Transactions**, v. 37, p. 7588–7598, 2009.
- [17] REGIEL-FUTYRA, A.; DĄBROWSKI, J. M.; MAZURYK, O.; ŚPIEWAK, K.; KYZIOŁ, A.; PUCELIK, B.; BRINDELL, M.; STOCHEL, G. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 76-117, 2017.
- [18] GILL, M. R., THOMAS, J. A. Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA— From structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 3179–3192, 2012.
- [19] Dwyer, F. P., Mellor, D. P. Chelating agents and metal chelates. New York: Academic Press, p. 530. 1964.
- [20] SOUTHAM, H. M., BUTLER, J. A., CHAPMAN, J. A., POOLE, R. K. The microbiology of ruthenium complexes. In **Advances in microbial physiology**, v. 71, p. 1-96, 2017.
- [21] FAGUNDES, F. D.; REIS, J. D.; APPELT, P.; CAVARZAN, D. A.; MURAKAMI, F. S.; SCOPELLITI, R.; DE ARAUJO, M. P. *p, t*-[Ru(CO)(PR₃)(tren)]₂⁺ [R= Ph or *p*-tol; tren= *tris*(2-aminoethyl)amine], Ru(II) complexes bearing a simple tripodal tetradentate amine: synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Journal of Coordination Chemistry**, v.69, n.18, p. 2637-2646, 2016.
- [22] SANDRINO, B., OLIVEIRA, J. F. A., NOBRE, T. M., APPELT, P., GUPTA, A., ARAUJO, M. P., OLIVEIRA Jr, O. N. Challenges in Application of Langmuir Monolayer Studies To Determine the Mechanisms of Bactericidal Activity of Ruthenium Complexes. **Langmuir**, v. 33, n. 49, p. 14167-14174, 2017.
- [23] MOLINARI, G. Fluorescence Microscopy for Microbiology. In: **Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. p. 49-69.
- [24] LICHTMAN, J. F, CONCHELLO, J. A. **Fluorescence microscopy**. Nat Methods 2:920–931, 2005.
- [25] BLACKBURN, G. M. **Nucleic acids in chemistry and biology**. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 2006.
- [26] STIEFEL P, SCHMIDT-EMRICH S, MANIURA-WEBER K, REN Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. **BMC Microbiol**, v.15, n.36, 2015.
- [27] TREVORS, J.T. Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. **J Biochem Biophys Methods**, v. 57, p. 87–103, 2003.

- [28] SIDDIQUI, S.; TUFENKJI, N.; MORAES, C. Microfluidics in microbiology: putting a magnifying glass on microbes. **Integrative Biology**, v. 8, n. 9, p. 914-917, 2016.
- [29] WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–73, 2006.
- [30] ATENCIA, J.; BEEBE, D. J. Controlled microfluidic interfaces. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 648–55, 2005.
- [31] PARK, J. Y. et al. Simultaneous generation of chemical concentration and mechanical shear stress gradients using microfluidic osmotic flow comparable to interstitial flow. **Lab on a chip**, v.9, n. 15, p. 2194–202, 2009.
- [32] AHMED, T.; SHIMIZU, T. S.; STOCKER, R. Bacterial chemotaxis in linear and nonlinear steady microfluidic gradients. **Nano letters**, v. 10, n. 9, p. 3379-3385, 2010.
- [33] RUSCONI, R.; GARREN, M.; STOCKER, R. Microfluidics expanding the frontiers of microbial ecology. **Annual review of biophysics**, v. 43, p. 65-91, 2014.
- [34] DAI, J.; HAMON, M.; JAMBOVANE, S. Microfluidics for antibiotic susceptibility and toxicity testing. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.
- [35] VEGA, N. M.; ALLISON, K. R.; KHALIL, A.S.; COLLINS, J.J. Signaling-mediated bacterial persister formation. **Nat. Chem. Biol**, v. 8, n.43, p.1–3, 2012.
- [36] GEFEN, O.; GABAY, C.; MUMCUOGLU, M.; ENGEL, G.; BALABAN, N. Q. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n.16, p. 6145-6149, 2008.
- [37] CAVIGLIA, C.; ZOR, K.; MONTINI, L.; TILLI, V.; CANEPA, S.; MELANDER, F.; HEISKANEN, A. Impedimetric toxicity assay in microfluidics using free and liposome-encapsulated anticancer drugs. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 4, p. 2204-2212, 2015.
- [38] ABEBE, A., HAILEMARIAM, T. Synthesis and Assessment of Antibacterial Activities of Ruthenium (III) Mixed Ligand Complexes Containing 1,10-Phenanthroline and Guanide. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2016, 2016.
- [39] ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; ELLIS, D. J.; SALTER, P. A.; SCOPELLITI, R. Synthesis and characterisation of some water soluble ruthenium (II)–arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. **Journal of organometallic chemistry**, v.668, n.1-2, p. 35-42, 2003.
- [40] SINGH, K. S.; DEVI, P.; SAWANT, S. G.; KAMINSKY, W. Arene ruthenium(II) complexes with 2-acetamidothiazole derived ligands: Synthesis, structural studies, antifouling and antibacterial properties. **Polyhedron**, v. 100, p. 321–325, 2015.
- [41] NONEJUIE, P.; BURKART, M.; POGLIANO, K.; POGLIANO, J. Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n.40, p.16169-16174, 2013.

- [42] MU, C.; PROSSER, K. E.; HARRYPERSAD, S.; MACNEIL, G. A.; PANCHMATIA, R.; THOMPSON, J. R.; WALSBY, C. J. Activation by Oxidation: Ferrocene-Functionalized Ru(II)-Arene Complexes with Anticancer, Antibacterial, and Antioxidant Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 15247-15261, 2018.
- [43] SPINDLER E. C.; HALE J. D. F.; GIDDINGS T. H.; HANCOCK R. E. W.; GILL R. T. Deciphering the mode of action of the synthetic antimicrobial peptide Bac8c. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 55, p. 1706–1716, 2011.
- [44] FAUST, J.E.; YANG, Pei-Yin; HUANG, H.W. Action of Antimicrobial Peptides on Bacterial and Lipid Membranes: a direct Comparison. **Biophysical Journal**, v. 112, n.8, p.1663-1672, 2017.
- [45] CHERIAN, P. T.; WU, X.; MADDOX, M. M.; SINGH, A. P.; LEE, R. E.; HURDLE, J. G. Chemical modulation of the biological activity of reutericyclin: a membrane-active antibiotic from *Lactobacillus reuteri*. **Scientific reports**, v. 4, p. 4721, 2014.
- [46] HOSTETTLER, L., GRUNDY, L., KÄSER-PÉBERNARD, S., WICKY, C., SCHAFFER, W. R., & GLAUSER, D. A. The bright fluorescent protein mNeonGreen facilitates protein expression analysis in vivo. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 7, n. 2, p. 607-615, 2017.
- [47] WOLFE, A. D.; HAHN, F. E. Mode of action of chloramphenicol IX. Effects of chloramphenicol upon a ribosomal amino acid polymerization system and its binding to bacterial ribosome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 95, n. 1, p. 146-155, 1965.
- [48] EPAND, R. F.; SAVAGE, P. B.; EPAND, R. M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2500–2509, 2007.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho permitiu desenvolver a síntese de novos organometálicos $\text{Ru}^{\text{III}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})$ derivados de triarilfosfinas monodentadas do tipo PAr_3 , sendo algumas triarilfosfinas estericamente impedidas, tal como $\text{tris}(3,5\text{-di-}t\text{-}c\text{-}butilfenil)\text{fosfina}$ **L1**. Essa fosfina obtida por modificação de uma rota já reportada da literatura, frente aos calcogênios O, S e Se, forma compostos de pureza elevada $\text{E}=\text{PAr}_3$ (**L5-L7**), mais estáveis do que seu precursor. Sua estrutura cristalográfica apresentou uma desordem, onde cristaliza como um aglomerado de quatro moléculas independentes ($Z' = 4$) com conformações diferentes. Devido o volume dos substituintes e seu efeito estérico e eletrônico decorrente, procedeu-se com a análise computacional das conformações permitidas e obteve-se a forma helicoidal como sendo a mais estável. A partir das estruturas cristalográficas do **L1** e demais PAr_3 3,5-disubstituídas ($\text{Ar} = 3,5\text{-dimetilfenil}$ (**L2**), $4\text{-metóxi-}3,5\text{-dimetilfenil}$ (**L3**) e 4-metóxifenil (**L4**)), calculou-se o índice de piramidalidade $\Sigma\{\angle\text{CPC}\}$, que apresentou valores decrescidos para **L1** a **L4**, os quais, se correlacionam diretamente com o efeito estérico dos substituintes. Estes ligantes foram utilizados na síntese de uma série de complexos neutros, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-4**), e catiônicos, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{NCl}]^+$ (**5-8**).

Da reatividade destas PAr_3 com o precursor $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ obteve-se sete complexos inéditos, sendo quatro neutros $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{Cl}_2]$ (**1-3**), um já reportado na literatura **4** e quatro catiônicos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{PAr}_3\text{NCl}]^+$ (**5-8**), obtidos pela labilização do ligante clorido e coordenação do ligante 3-metilpiridina. Os complexos apresentaram bons rendimentos e alto grau de pureza, evidenciados por espectros de RMN e análise elementar, que foram consistentes com as fórmulas propostas para suas estruturas cristalográficas, as quais, apresentaram uma complexidade considerável, principalmente para **1** e **5**, devido às pequenas mudanças ocasionadas pela rotação ou desordem estrutural do substituinte $t\text{Bu}$ de **L1**. Todos os complexos neutros e catiônicos são insolúveis em meio aquoso e apresentam condutividade molar distintas.

No que diz respeito às propriedades eletrônicas, constatou-se que nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos com os substituintes retiradores de elétrons ($-\text{OCH}_3$) no anel aromático (**3**, **4**, **7** e **8**), os deslocamentos químicos do átomo de fósforo são observados em regiões mais blindadas do que nos complexos com os substituintes doadores ($-\text{CH}_3$) no anel aromático (**1**, **2**, **5** e **6**), devido ao efeito ressonante do substituinte $-\text{OCH}_3$ que causa o aumento de densidade, blindando os sinais. Em relação à coordenação do ligante 3-metilpiridina na série

5-8, constatou-se que o sinal do fósforo é mais desblindado, assim como há um alongamento da ligação Ru-P em relação à série **1-4**. Este fato é ocasionado pelo caráter σ -doador do ligante *N*-heterocíclico, o qual também aumenta a densidade eletrônica ao redor do centro metálico, neste caso, facilitando a oxidação desses complexos, como evidenciado pelos estudos voltamétricos, por isto, os potenciais anódicos dos complexos catiônicos **5-8** foram menos positivos que os respectivos neutros **1-4**, enquanto os potenciais catódicos são menos negativos. Desta forma, os complexos **5-8** possuem maior facilidade de estabilizar o ligante (η^6 -*p*-cimeno), também comprovado por cálculos de DFT, onde foi constatada a labilização do ligante (η^6 -*p*-cimeno) apenas para **1-4**.

De modo geral o perfil eletroquímico das duas séries de complexos segue o reportado na literatura para derivados Ru^(II)-areno e por cálculos de DFT sugere-se que há labilização do íon clorido após a redução do Ru(II/I) em ambas as séries. Além disso, os estudos voltamétricos forneceram evidências de que estes complexos possuem atividades biológicas promissoras devido à uma extensa faixa de estabilidade da janela de potencial para ambas as séries, sendo os complexos catiônicos uma faixa um pouco mais ampla quando comparada à faixa fisiológica ($\sim +1$ a -1 V vs. EPH). Nos resultados dos testes de atividade citotóxica contra células de câncer, os valores IC₅₀ para **1-8** foram superiores aos respectivos ligantes livres, mostrando efeito satisfatório na coordenação com o rutênio. A partir destes resultados, **2** e **4** foram ativos contra células tumorais (MDA-MB-231 e A549), como também citotóxicos contra células não tumorais, porém, o **2** com valores de IC₅₀ $1,53 \pm 0,10$ μ M, teve uma melhor atividade quando comparado à cisplatina, com IC₅₀ $11,5 \pm 1,2$ μ M, para a linha celular A549. Apesar que o **1** é menos ativo que **2** e **4**, este é mais seletivo, pois não é citotóxico contra as células não tumorais MRC-5 (IC₅₀ >100 μ M). Em relação á **5-8**, apesar de não termos dados quantitativos podemos notar por imagens de microscopia, que estes apresentaram atividade citotóxica devido às deformações nas estruturas celulares de células tumorais (U2-OS). Diferente da cisplatina, esses complexos induzem a formação de vesículas celulares, o que sugere como alvo do mecanismo de ação o retículo endoplasmático celular, resultante da interação com a membrana. A exclusão do mecanismo por interação com DNA por intercalação e ligação covalente, foi descartada por testes de interação com DNA por viscosidade realizados com **1-4**.

A fim de comprovar o mecanismo por interação com a membrana celular, procedeu-se o estudo com monocamadas lipídicas que mimetizam membranas celulares saudáveis ou cancerígenas como DOPC e DPPS, respectivamente. A partir das alterações das isotermas de π -A e ΔV -A, assim como C_s^{-1} dos lipídios puros, a mudança na organização e propriedades

elétricas da membrana indicou que os complexos podem desestruturar a organização das moléculas lipídicas do modelo de membrana de células de câncer. Como observado por dados termodinâmicos, em baixas concentrações dos complexos, obteve-se uma interação repulsiva entre os componentes das monocamadas. Sendo que o **1** apresentou pequena variação para moléculas lipídicas do modelo de membrana de células saudáveis, condizente a falta de atividade citotóxica. Esses resultados são relevantes, uma vez que a atividade de alguns fármacos está relacionada à sua capacidade de alterar a elasticidade da membrana, comprometendo a integridade da membrana celular.

Quanto à atividade antibacteriana, **2** e **4** apresentaram maior atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria *S.aureus* e *B.subtilis*, com halos de inibição de crescimento e valores de CIM mais significativos. Os compostos não apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*. Valores mais satisfatórios de CIM para todas as linhagens bacterianas foram obtidos para **6-8**. Este resultado comprova que a coordenação do ligante piridina ao centro metálico auxilia na atividade biológica.

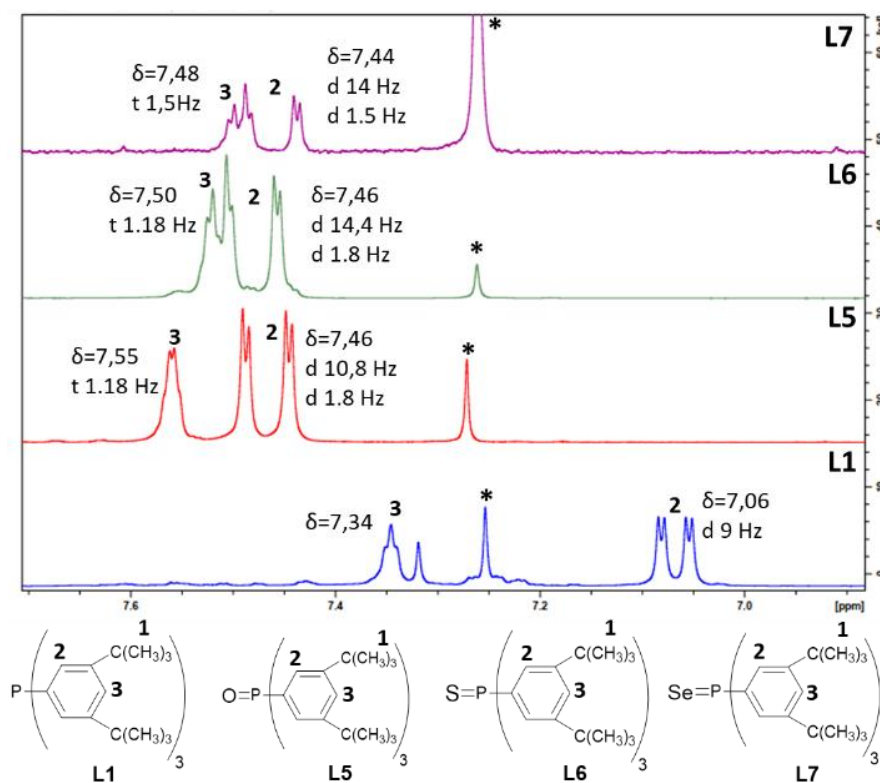
O mecanismo de ação de **1-4**, frente células bacterianas baseou-se no estudo das microscopias de fluorescência e microfluídica. Por microscopia de fluorescência com **2** e **4** constatou-se que houve indução da descondensação do DNA e formação de vesículas na membrana plasmática, a qual apresenta perda de sua integridade e do potencial de organização de suas cargas, afetando a estrutura da membrana em ambas as espécies, *B. subtilis* e *S. aureus*, que indica uma possível interação via membrana celular. A microscopia microfluídica revelou que esses complexos não alteram a síntese de proteínas, mas interferem na integridade da membrana celular bacteriana, o que corrobora com os resultados visualizados pela microscopia de fluorescência. Além disso, pelos estudos das monocamadas de Langmuir para o modelo de membrana bacteriana para *S. Aureus*, confirmou-se que **1-4** alteraram as propriedades da membrana celular, desta forma também, indicando interação dos componentes da membrana com os complexos nas mesmas concentrações dos valores de CIM. Apesar de não termos feito os testes de mecanismo de ação com os complexos catiônicos **5-8**, seria esperado que apresentassem um mecanismo similar.

Como perspectiva do trabalho seria o método de encapsulamento destas metalodrogas, de modo a controlar a citotoxicidade e a liberação destes compostos no organismo. Para isto, desenvolver um sistema *drug-delivery* com os complexos, um fosfolipídio e um polímero, por meio da obtenção de uma nanopartícula polimérica, tendo o composto encapsulado. Realizar também os testes *in vitro* destas séries de complexos, para determinar seu efeito citotóxico e relatar a eficácia promissoras como futuros compostos terapêuticos.

ANEXOS- CAPÍTULO 2

A2.1:

Expansão RMN ^1H , região entre 7,00-7,60 ppm.

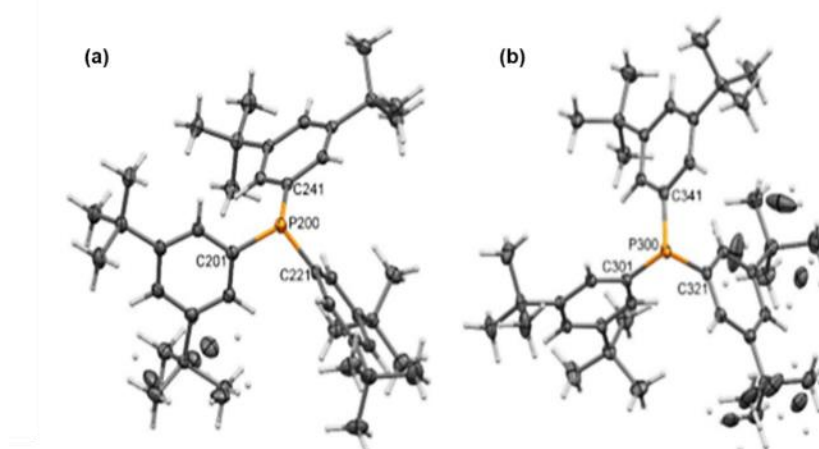


Deslocamentos químicos (δ em ppm) para o ligante L1 e suas variações.

	Integral	L1	L5	L6	L7
H1	54H	1,21(s)	1,26(s)	1,24(s)	1,22(s)
H2	6H	7,06(d)	7,46(d)	7,46(d)	7,44(d)
H3	3H	7,34(t)	7,55(t)	7,50(t)	7,48(t)

A2.2:

Gráfico de elipsóides de deslocamento (30% de probabilidade) para (a) a molécula P200 na estrutura reportada e (b) o mesmo para a molécula P300.



A2.3:

Principais distâncias interatômicas (Å) e ângulos (°) a partir de análise de raios X para os ligantes **L1**, **L5**, **L6** e **L7**. O esquema de numeração de átomos empregado pode ser observado nas estruturas dos referidos ligantes.

L1

Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões
P(1)-C(1)	1.8164(19)	P(200)-P(241)	1.838(2)	C(2)-C(1)-C(6)	118.70(17)
P(1)-C(21)	1.8362(19)	C(201)-C(202)	1.389(3)	C(6)-C(1)-P(1)	120.25(14)
P(1)-C(41)	1.8420(18)	C(201)-C(206)	1.400(3)	C(101)-P(100)-C(121)	100.85(9)
C(1)-C(2)	1.400(3)	C(221)-C(222)	1.392(3)	C(101)-P(100)-C(141)	101.50(9)
C(1)-C(6)	1.403(3)	C(221)-C(226)	1.400(3)	C(121)-P(100)-C(141)	100.89(9)
C(21)-C(22)	1.398(3)	C(241)-C(242)	1.388(3)	C(102)-C(101)-P(100)	117.19(15)
C(21)-C(26)	1.387(3)	C(241)-C(246)	1.393(3)	C(106)-C(101)-P(100)	123.16(15)
C(41)-C(42)	1.393(3)	P(300)-C(301)	1.840(2)	C(106)-C(101)-(102)	119.62(18)
C(41)-C(46)	1.390(3)	P(300)-C(321)	1.845(2)	C(201)-P(200)-C(221)	102.16(9)
P(100)-C(101)	1.829(2)	P(300)-C(341)	1.841(2)	C(201)-P(200)-C(241)	101.67(9)
P(100)-C(121)	1.841(2)	C(301)-C(302)	1.396(3)	C(241)-P(200)-C(221)	99.97(9)
P(100)-C(141)	1.846(2)	C(301)-C(306)	1.391(3)	C(202)-C(201)-P(200)	123.08(17)
C(101)-C(102)	1.402(3)	C(321)-C(322)	1.390(3)	C(202)-C(201)-(206)	119.6(2)
C(101)-C(106)	1.387(3)	C(321)-C(326)	1.391(3)	C(206)-C(201)-P(200)	117.36(16)
C(121)-C(122)	1.403(3)	C(341)-C(342)	1.383(3)	C(301)-P(300)-C(321)	99.90(9)
C(121)-C(126)	1.388(3)	C(341)-C(346)	1.404(3)	C(301)-P(300)-C(341)	103.41(10)
C(141)-C(142)	1.411(3)	C(1)-P(1)-(21)	104.63(8)	C(341)-P(300)-C(321)	100.04(9)
C(141)-C(146)	1.385(3)	C(1)-P(1)-(41)	103.39(8)	C(302)-C(301)-P(300)	122.74(15)
P(200)-C(201)	1.834(2)	C(21)-P(1)-(41)	100.51(8)	C(306)-C(301)-P(300)	118.24(15)
P(200)-C(221)	1.842(2)	C(2)-C(1)-P(1)	120.40(14)	C(306)-C(301)-(302)	118.99(18)

L5

Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões
P(1)-O(1)	1.4927(12)	C(101)-C(102)	1.394(2)	C(41)-P(1)-C(1)	105.4(3)
P(1)-C(1)	1.8017(16)	C(101)-C(106)	1.395(2)	C(41)-P(1)-C(21)	110.1(2)
P(1)-C(21)	1.8089(16)	C(1)-P(1)-C(21)	104.63(8)	C(2)-C(1)-P(1)	118.82(12)
P(1)-C(41)	1.752(7)	C(1)-P(1)-C(41)	103.39(8)	C(2)-C(1)-C(6)	120.34(15)
P(1)-C(41A)	1.934(13)	C(21)-P(1)-C(41)	100.51(8)	C(6)-C(1)-P(1)	120.73(13)
C(1)-C(2)	1.391(2)	C(2)-C(1)-P(1)	120.40(14)	O(100)-P(100)-(101)	114.54(7)
C(1)-C(6)	1.394(2)	C(2)-C(1)-C(6)	118.70(17)	O(100)-P(100)-(121)	112.49(7)
C(21)-C(22)	1.399(2)	C(6)-C(1)-P(1)	120.25(14)	O(100)-P(100)-(141)	113.63(8)
C(21)-C(26)	1.391(2)	O(1)-P(1)-C(1)	112.61(8)	C(121)-P(100)-C(101)	105.00(7)
C(41)-C(42)	1.383(7)	O(1)-P(1)-C(21)	113.11(7)	C(141)-P(100)-C(101)	104.62(7)
C(41)-C(46)	1.390(6)	O(1)-P(1)-C(41)	109.9(2)	C(141)-P(100)-C(121)	105.69(7)
P(100)-O(100)	1.4915(12)	O(1)-P(1)-C(41A)	118.5(4)	C(102)-C(101)-P(100)	118.27(12)
P(100)-C(101)	1.8095(16)	C(1)-P(1)-C(21)	105.34(7)	C(102)-C(101)-(106)	120.61(14)
P(100)-C(121)	1.8043(16)	C(1)-P(1)-C(41A)	106.8(5)	C(106)-C(101)-P(100)	120.98(12)
P(100)-C(141)	1.8021(18)	C(21)-P(1)-C(41A)	98.9(3)		

L6

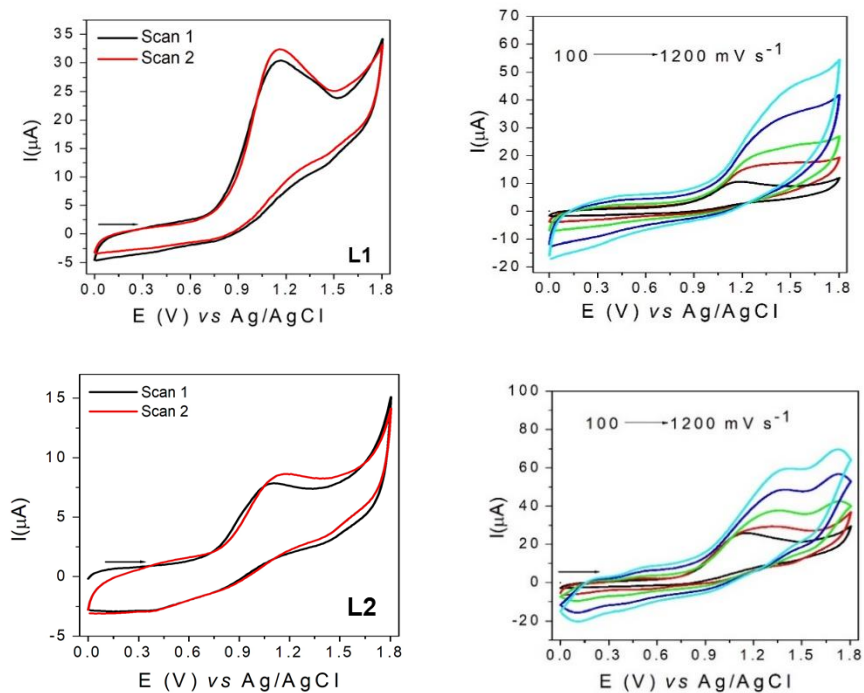
Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões
S(1)-P(1)	1.9596(7)	C(41)-C(46)	1.391(3)	C(6)-C(1)-C(2)	120.07(19)
P(1)-C(1)	1.815(2)	C(1)-P(1)-S(1)	113.08(7)	C(22)-C(21)-P(1)	118.28(16)
P(1)-C(21)	1.819(2)	C(1)-P(1)-C(21)	104.35(9)	C(26)-C(21)-P(1)	121.49(15)
P(1)-C(41)	1.818(2)	C(1)-P(1)-C(41)	104.91(9)	C(26)-C(21)-C(22)	120.13(19)
C(1)-C(2)	1.395(3)	C(21)-P(1)-S(1)	114.11(7)	C(42)-C(41)-P(1)	118.61(15)
C(1)-C(6)	1.384(3)	C(41)-P(1)-S(1)	113.99(7)	C(46)-C(41)-P(1)	121.20(16)
C(21)-C(22)	1.398(3)	C(41)-P(1)-C(21)	105.43(9)	C(46)-C(41)-C(42)	120.18(19)
C(21)-C(26)	1.384(3)	C(2)-C(1)-P(1)	118.12(15)		
C(41)-C(42)	1.398(3)	C(6)-C(1)-P(1)	121.81(15)		

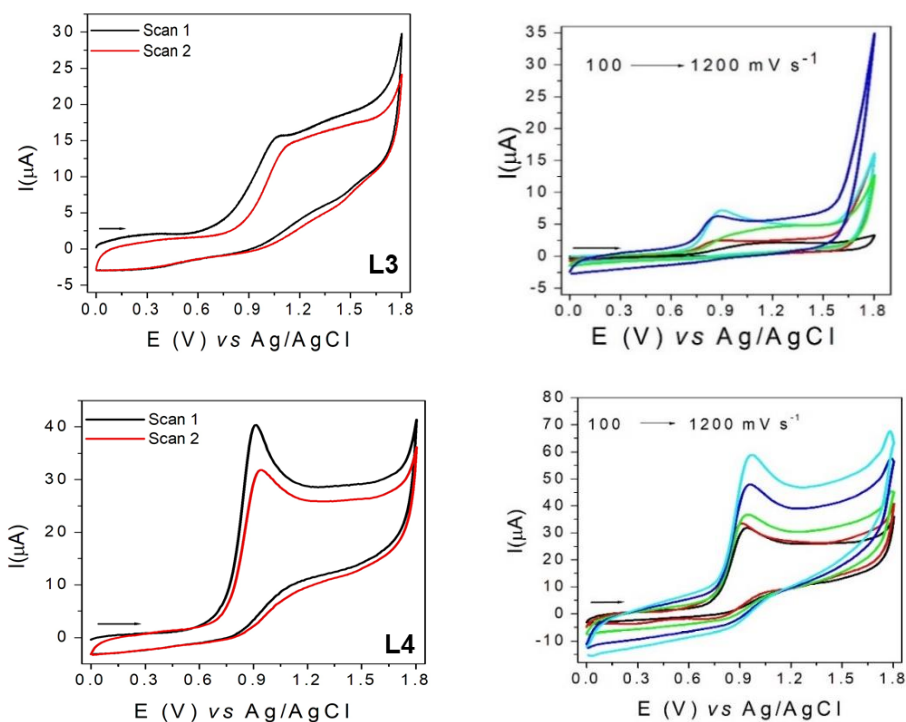
L7

Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões	Átomos	Dimensões
Se(1)-P(1)	2.1154(10)	C(41)-C(46)	1.382(5)	C(42)-C(41)-P(1)	118.6(3)
P(1)-C(1)	1.825(4)	C(41)-P(1)-Se(1)	113.90(13)	C(22)-C(21)-P(1)	119.5(3)
P(1)-C(21)	1.820(4)	C(41)-P(1)-C(1)	104.61(17)	C(22)-C(21)-C(26)	120.3(4)
P(1)-C(41)	1.822(4)	C(21)-P(1)-Se(1)	113.66(13)	C(26)-C(21)-P(1)	120.2(3)
C(2)-C(1)	1.395(5)	C(21)-P(1)-C(41)	105.57(17)	C(2)-C(1)-P(1)	117.8(3)
C(1)-C(6)	1.380(5)	C(21)-P(1)-C(1)	105.23(18)	C(6)-C(1)-P(1)	121.5(3)
C(21)-C(22)	1.391(5)	C(1)-P(1)-Se(1)	112.98(13)	C(6)-C(1)-C(2)	120.8(4)
C(21)-C(26)	1.395(5)	C(46)-C(41)-P(1)	120.9(3)		
C(41)-C(42)	1.395(5)	C(46)-C(41)-C(42)	120.5(3)		

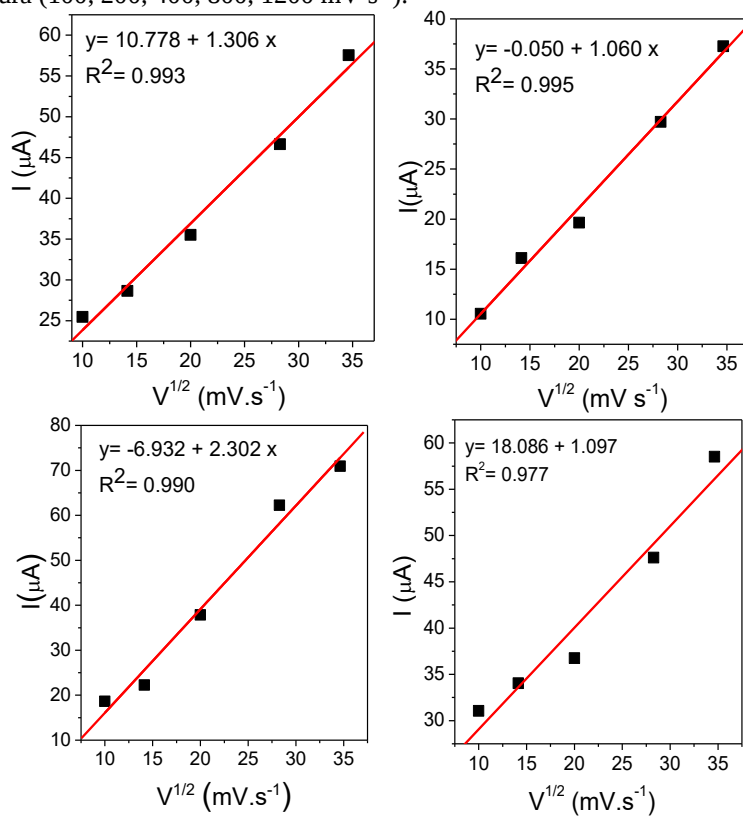
A2.4

Voltamogramas cíclicos de fosfinas **L1-L4**, CH₃CN/[*n*Bu₄N] [ClO₄] vs. Ag/AgCl, 100 mV s⁻¹, e respectivas velocidades de varredura (100, 200, 400, 800, 1200 mV s⁻¹).





Dependência da variação da corrente de pico anódico (E_{pa}) para as fosfinas **L1** - **L4** com o quadrado da raiz da velocidade de varredura (100, 200, 400, 800, 1200 mV s⁻¹).



ANEXOS: CAPÍTULO 3

A3.1:

Solubilidade qualitativa dos complexos 1-4 a 25°C.

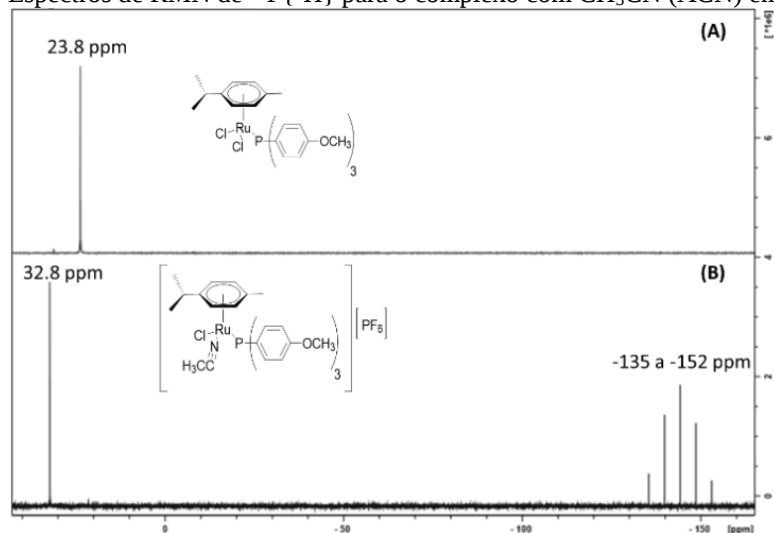
	1	2	3	4
Solúvel	Acetonitrila, etanol, metanol, diclorometano, clorofórmio, éter etílico e acetona	Acetonitrila, etanol, diclorometano, clorofórmio, dimetilsulfóxido, octanol e acetona	Acetonitrila, diclorometano, clorofórmio e acetona	Acetonitrila, etanol, diclorometano, clorofórmio, dimetilsulfóxido, octanol e acetona
Insolúvel	Água, pentano, tampão PBS, dimetilsulfóxido	Água, metanol, éter etílico, pentano, tampão PBS	Água, metanol, etanol, éter etílico, pentano, tampão PBS, dimetilsulfóxido	Água, metanol, éter etílico, pentano, Tampão PBS

A3.2:

Solubilidade quantitativa dos complexos 1-4.

Complexos	C média $\mu\text{g L}^{-1}$	C mg L^{-1}
1	52,0	0,520
2	37,6	0,376
3	168,2	1,682
4	104,5	1,045

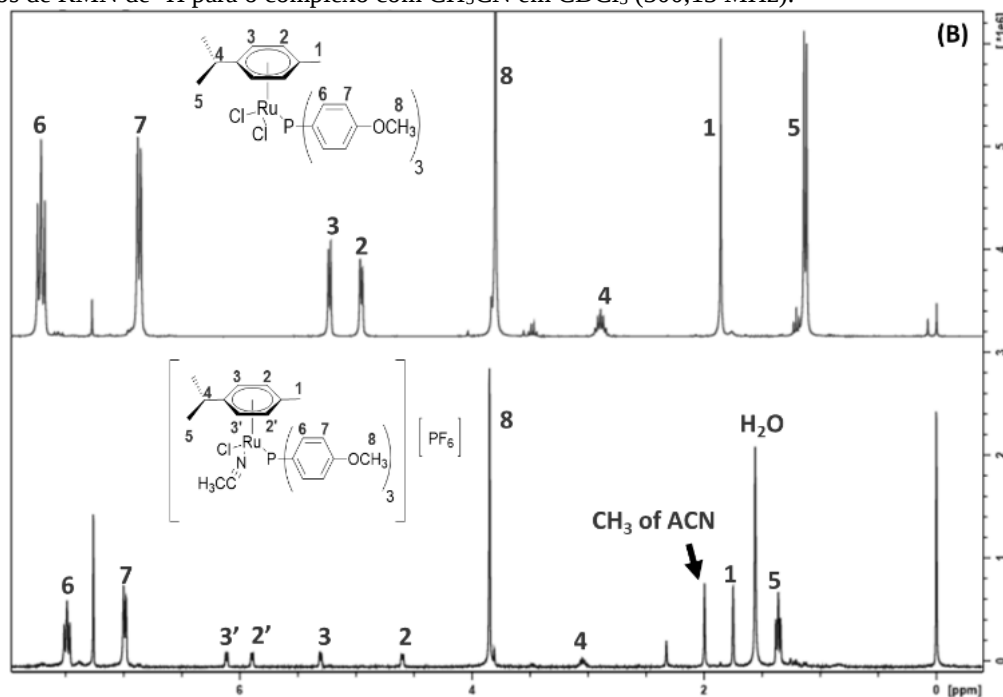
A3.3:

Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo com CH_3CN (ACN) em CDCl_3 (300,13 MHz).

	Complexo 4 δ (ppm)	Complexo (ACN) δ (ppm)	Integral (H)
H1	1,85 (s)	1,75 (s)	3H
H2	4,94 (d)	5,92 (d)	1H
H3	5,23 (d)	6,12 (d)	1H
H2'	5,90 (d)	6,10 (d)	1H
H3'	5,23 (d)	6,12 (d)	1H
H4	2,89 (sept)	3,05 (sept)	1H
H5	1,13 (d)	1,37 (d)	6H
H6	6,86 (d)	7,00 (d)	6H
H7	7,73 (t)	7,48 (t)	6H
H8	3,81 (s)	3,86 (s)	9H
ACN	-	1,99 (s)	3H

A3.4:

Espectros de RMN de ^1H para o complexo com CH_3CN em CDCl_3 (300,13 MHz).



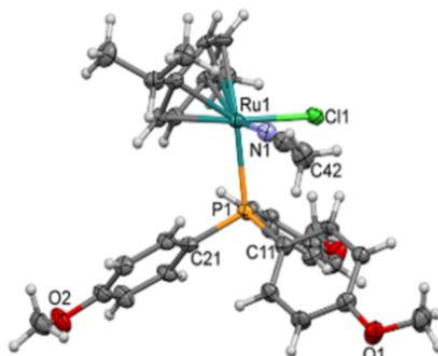
A3.5

Dados cristalográficos de refinamento para o complexo com CH_3CN .

Fórmula empírica	$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{ClF}_6\text{NO}_3\text{P}_2\text{Ru}$
Peso molecular	809,10
Sistema cristalino	Triclinic
Grupo espacial	$P\bar{1}$
a/Å	9,6220(2)
b/Å	10,2967(2)
c/Å	17,8674(4)
$\alpha/^\circ$	80,072(2)
$\beta/^\circ$	78,660(2)
$\gamma/^\circ$	81,714(2)
Volume/Å³	1698,49(6)
Cela unitária Z	2
$\rho_{\text{calc}}/\text{g}/\text{cm}^3$	1,582
μ/mm^{-1}	5,954
F(000)	824
Tamanho do cristal/mm^3	0,21 × 0,17 × 0,13
Radiação	$\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184$)
Limites 2θ para coleta de dados/$^\circ$	8,776 to 161,566
Índices	$-12 \leq h \leq 12, -13 \leq k \leq 13, -22 \leq l \leq 22$
Reflexões coletadas	64875
Reflexões independentes	7320 [$R_{\text{int}} = 0,0509, R_{\text{sigma}} = 0,0199$]
Dados/limitações/parâmetros	7320/0/431
Refinamento (F^2)	1,116
R Índices finais [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0555, wR_2 = 0,1370$
R Índices finais [todos os dados]	$R_1 = 0,0591, wR_2 = 0,1391$
Max, min residual e Å⁻³	2,41/-1,11

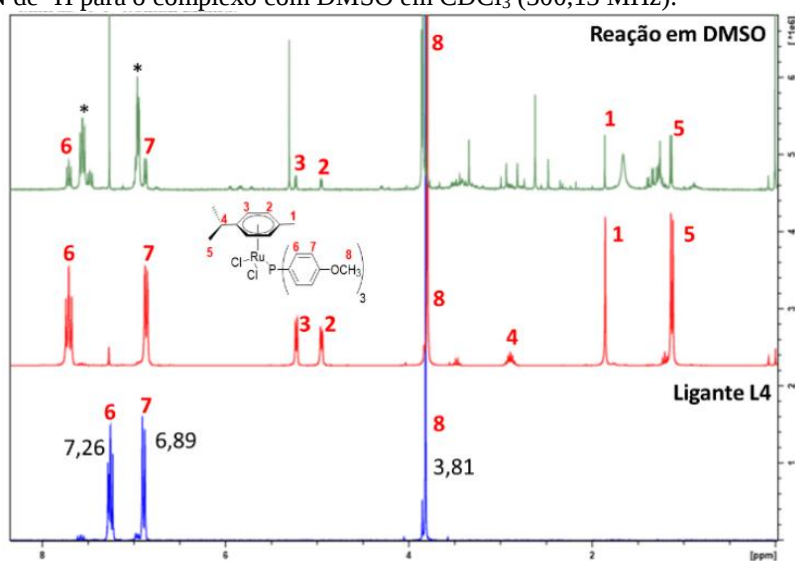
A3.6

Representação das estruturas ORTEP do complexo com CH_3CN .



A3.7:

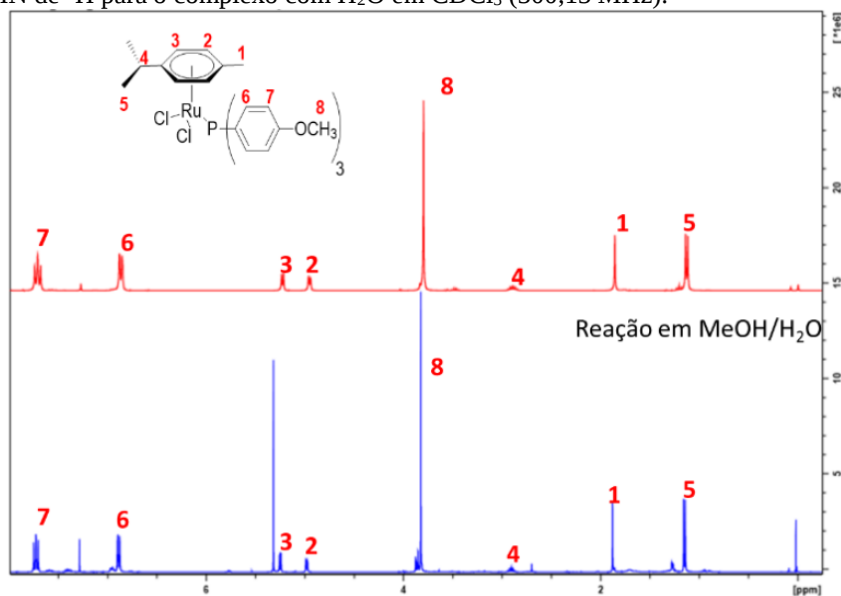
Espectros de RMN de ^1H para o complexo com DMSO em CDCl_3 (300,13 MHz).



*sinais do ligante L4 oxidado: δ 6,95 ppm, δ 7,56 ppm.

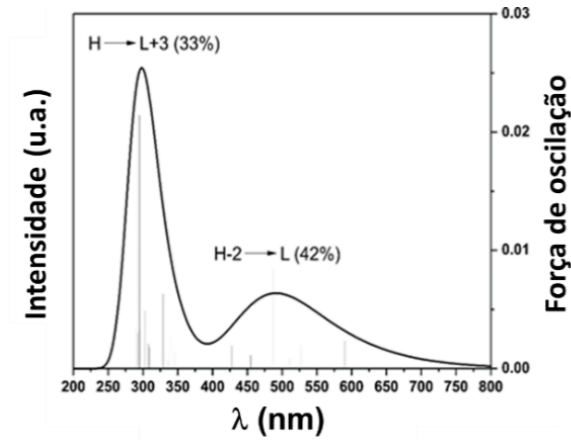
A3.8:

Espectros de RMN de ^1H para o complexo com H_2O em CDCl_3 (300,13 MHz).



A3.9

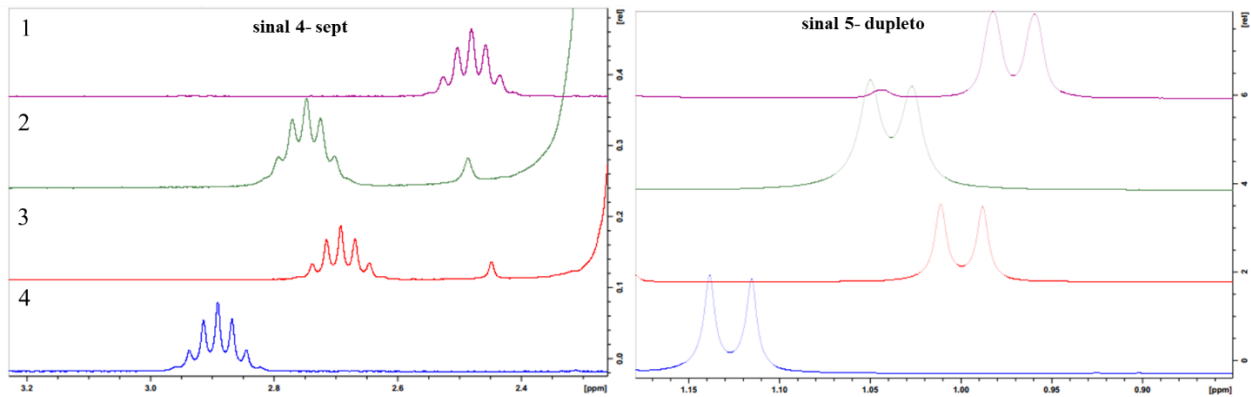
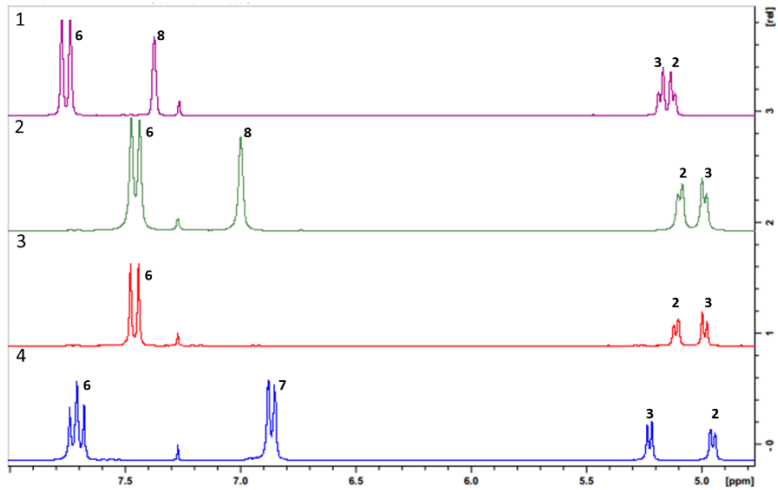
Espectro de UV-Vis para o complexo [Ru(η^6 -*p*-cimeno)(PPh₃)Cl₂] no nível de teoria 3LYP/6-31G+(d) + SPK-DZP, e os valores e contribuições das transições eletrônicas, relacionados às principais excitações dos cálculos de TDDFT.



Energia, eV	λ, nm	Transição eletrônica*
4,2103	295	H→L+3 (33%)
		H→L+5 (22%)
2,5460	487	H-2→L (42%)
		H→L (31%)

A3.10

Expansão dos sinais dos espectros de RMN de ¹H dos complexos **1-4**.



A3.11

Deslocamentos químicos (δ) para a série de complexos 1-4.

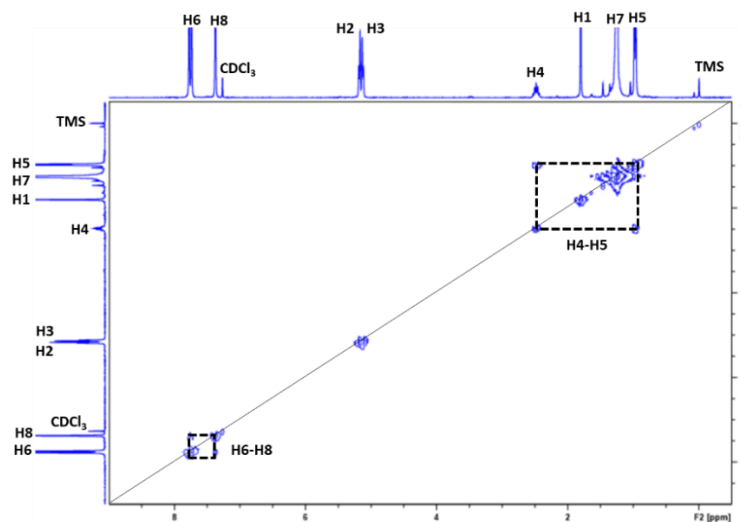
	Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4
C _a	17,82	17,58	17,60	17,86
C _b	96,52	95,00	94,77	95,76
C _c	88,65	90,67	90,49	88,52
C _d	86,50	85,77	85,98	87,36
C _e	109,17	110,00	109,24	111,03
C _f	29,80	30,18	30,08	30,30
C _g	22,19	21,84	21,77	21,93
C _h	133,81	133,91	129,02	125,34
C _i	128,79	131,90	134,85	113,54
C _j	149,66	137,14	130,26	135,83
C _k	35,07	21,49	16,31	160,90
C _l	31,52	131,86	158,49	55,27
C _m	123,68	-	59,59	-

A3.12

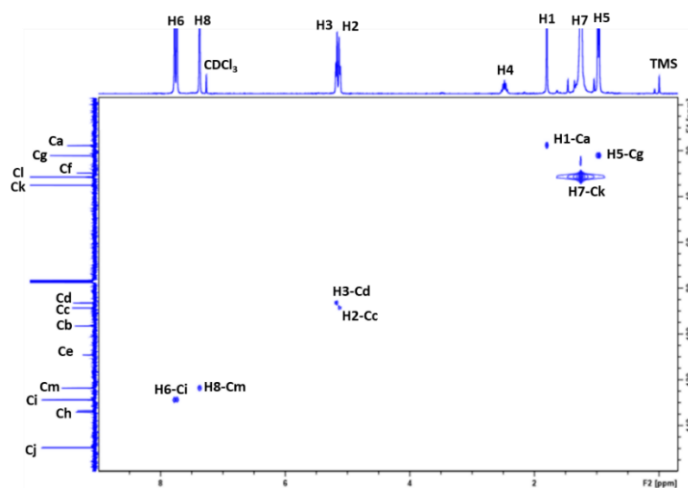
Espectros de RMN 2D, (^1H - ^1H gCOSY), (^1H - ^{13}C gHSQC) e (^1H - ^{13}C gHMBC) dos complexos 1-4.

Complexo 1

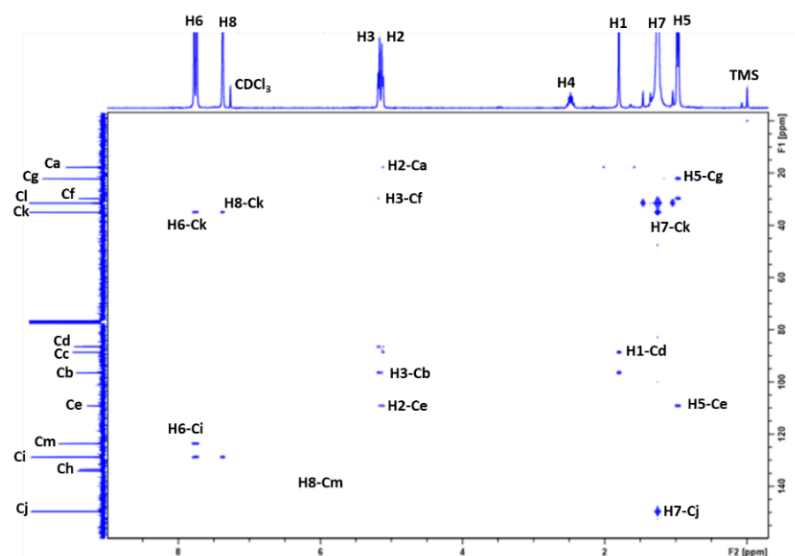
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC

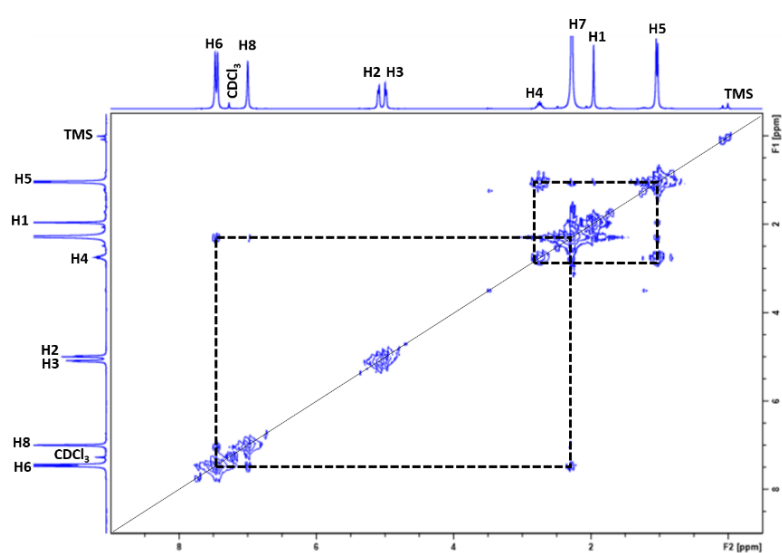


- ^1H - ^{13}C gHMBC

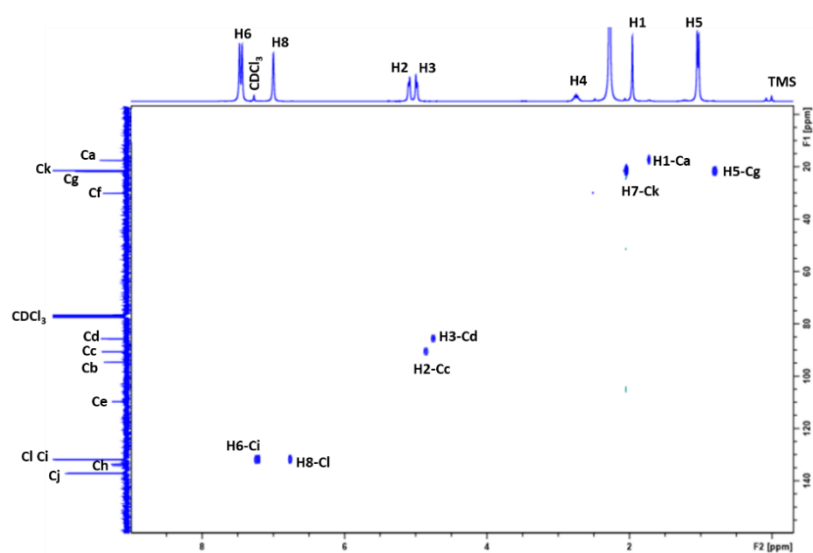


Complexo 2

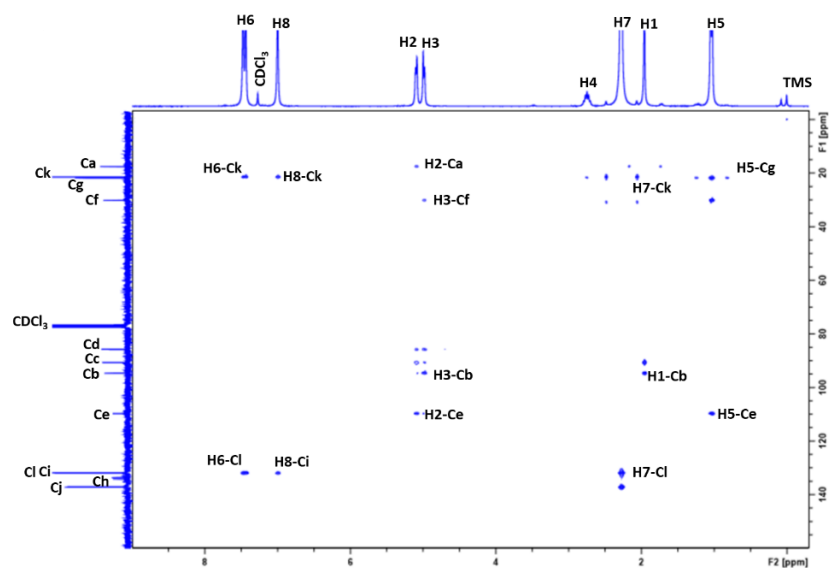
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC

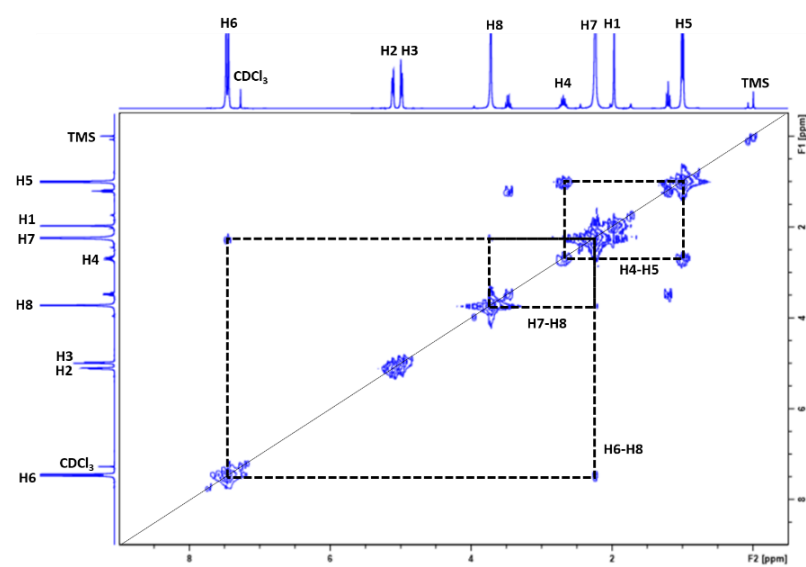


- ^1H - ^{13}C gHMBC

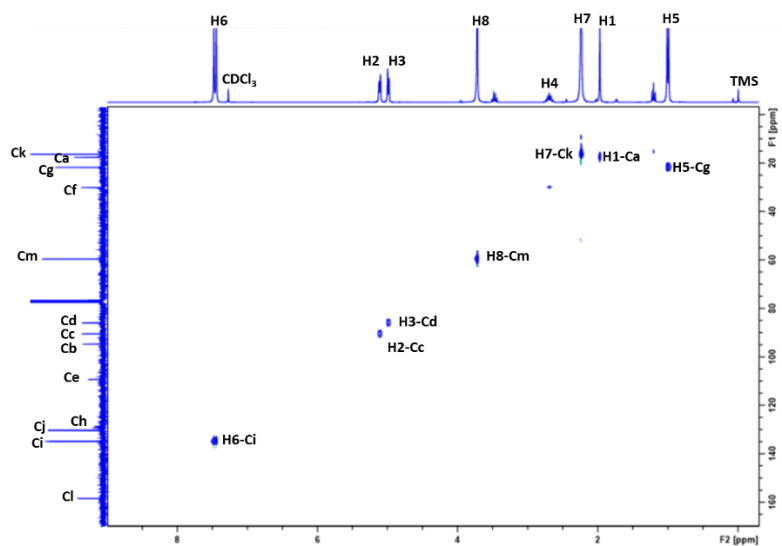


Complexo 3

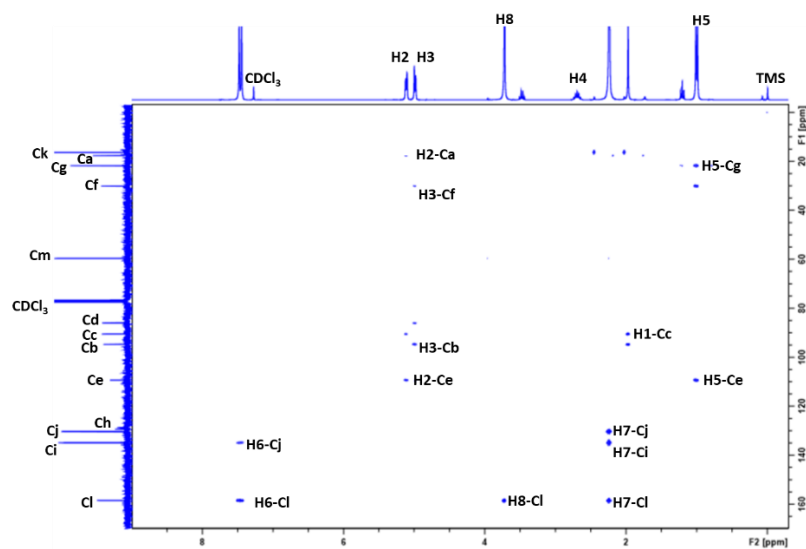
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC

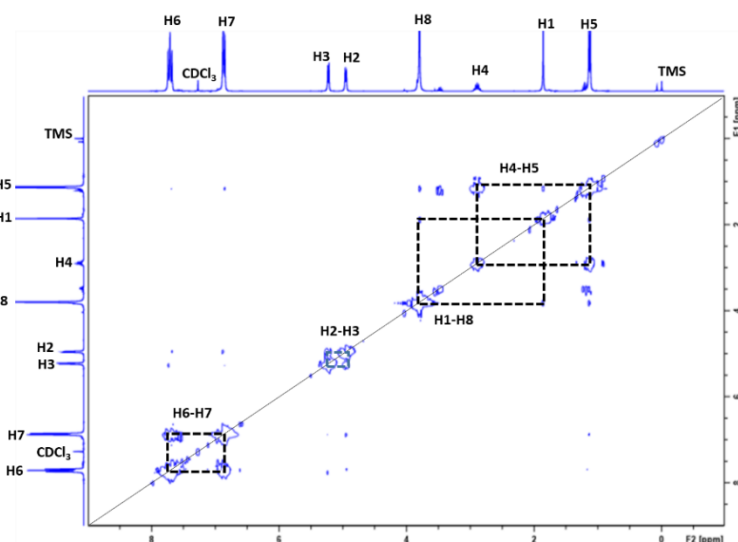


● ^1H - ^{13}C gHMBC

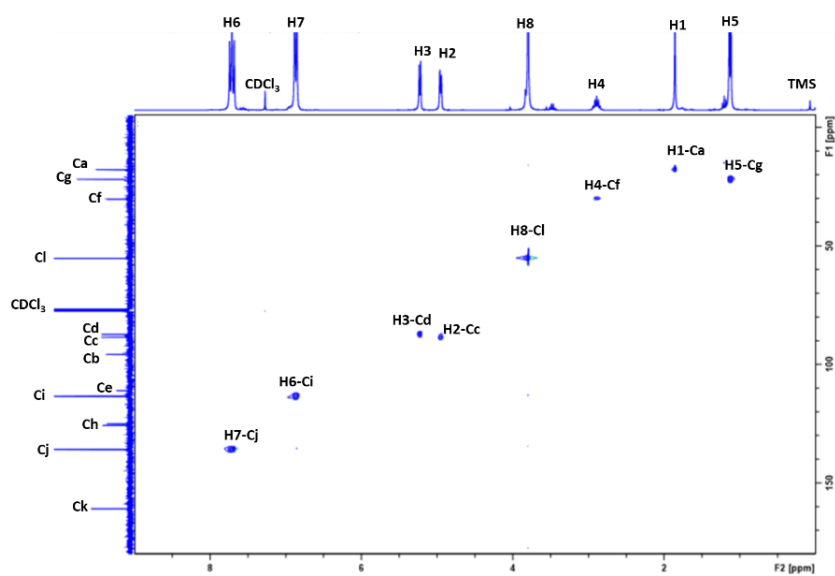


Complexo 4

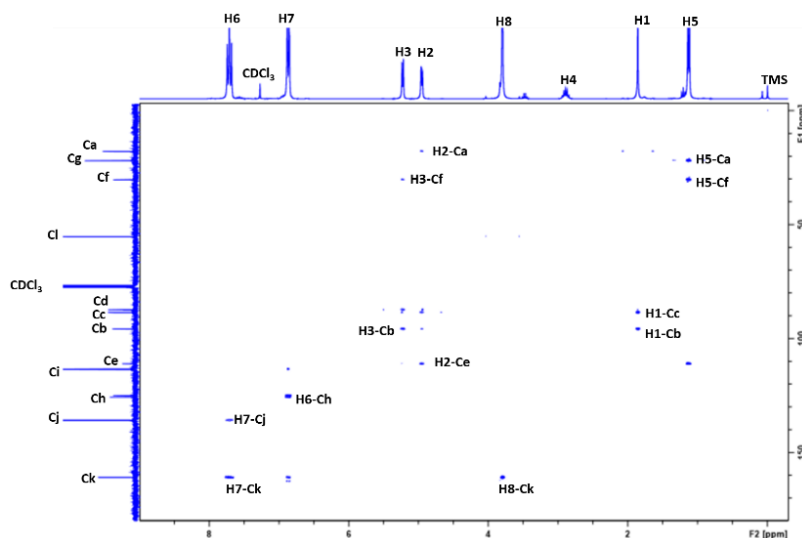
● ^1H - ^1H gCOSY



● ^1H - ^{13}C gHSQC



● ^1H - ^{13}C gHMBC

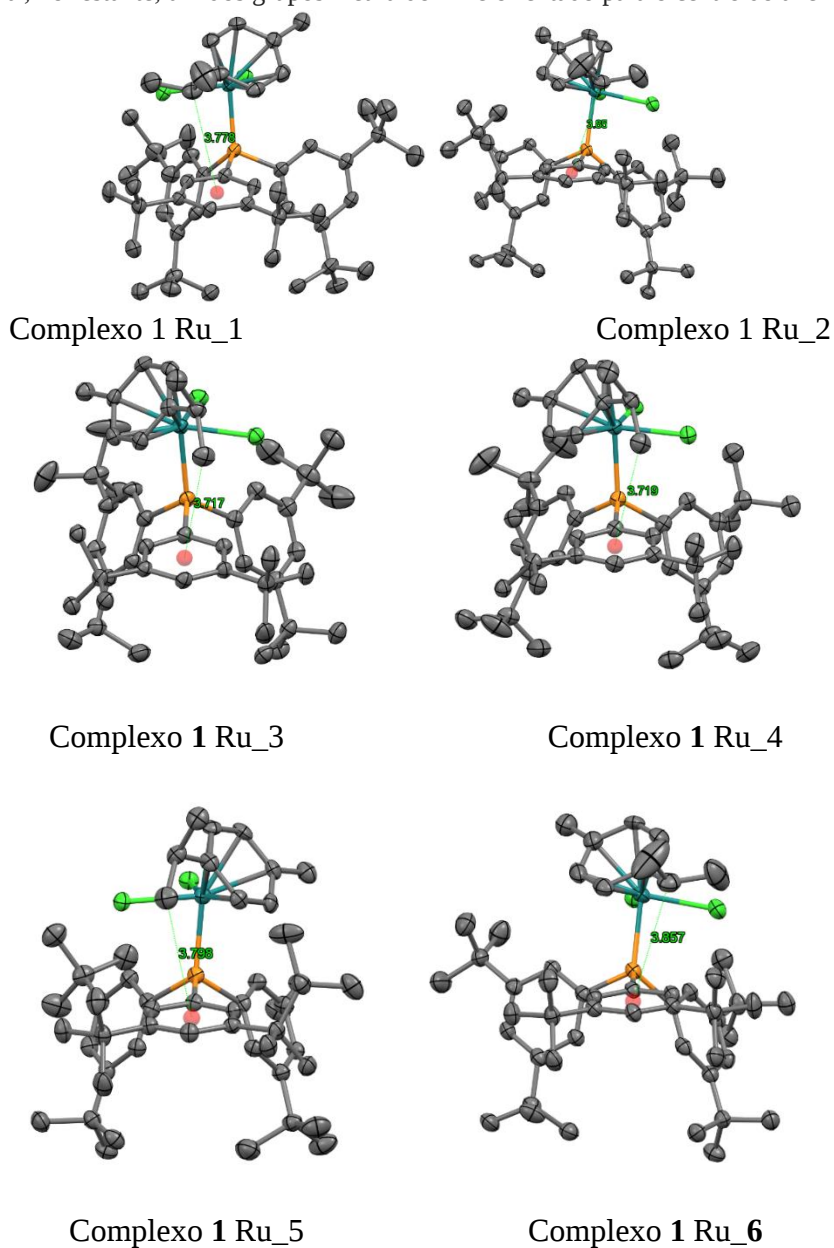


A 3.13

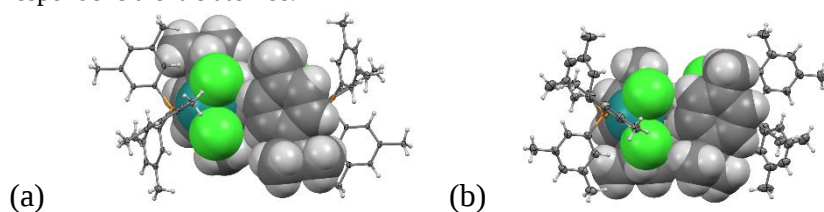
Dados cristalográficos de refinamento dos complexos **2-4** com CDCl_3 .

Complexos	2'	3'	4'
Depósito CCDC	1891880	1891881	1891882
Fórmula empírica	$\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{PRu}$.	$\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{PRu}$.	$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{PRu}$.
	2 CHCl_3	1.5 CHCl_3	0.5 CHCl_3
Peso molecular	652,61 ^b	921,74	718,21
Temperatura/K	99,97(11)	100,00(10)	99,94(19)
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	$P\bar{1}$	$P2_1/c$	$P\bar{1}$
a/Å	11,2881(2)	11,82174(7)	13,6776(3)
b/Å	13,7043(3)	20,40053(11)	15,3501(3)
c/Å	14,0121(3)	17,85669(14)	15,8930(4)
$\alpha/^\circ$	95,829(2)	90	71,824(2)
$\beta/^\circ$	110,942(2)	106,3152(7)	85,8109(19)
$\gamma/^\circ$	96,772(2)	90	77,0453(19)
Volume/Å ³	1986,02(8)	4133,08(5)	3089,56(13)
Cela unitária Z	2	4	4
$\rho_{\text{calc}}/\text{g}/\text{cm}^3$	1,091	1,481	1,544
μ/mm^{-1}	4,929	7,582	7,637
F(000)	676 ^b	1892	1468
Tamanho do cristal/ mm^3	$0,132 \times 0,111 \times 0,079$	$0,216 \times 0,106 \times 0,065$	$0,1 \times 0,03 \times 0,01$
Radiação	$\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184$)	$\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184$)	$\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54184$)
Limites 2 θ para coleta de dados/ $^\circ$	8,506 to 155,048	6,736 to 155,236	7,118 to 156,3
Índices	$-13 \leq h \leq 14$, $-17 \leq k \leq 17$, $-17 \leq l \leq 17$	$-14 \leq h \leq 14$, $-25 \leq k \leq 25$, $-21 \leq l \leq 22$	$-17 \leq h \leq 16$, $-19 \leq k \leq 19$, $-20 \leq l \leq 20$
Reflexões coletadas	38291	52837	66547
Reflexões independentes	8182 [$R_{\text{int}} = 0,0596$, $R_{\text{sigma}} = 0,0410$]	8694 [$R_{\text{int}} = 0,0562$, $R_{\text{sigma}} = 0,0244$]	12913 [$R_{\text{int}} = 0,0766$, $R_{\text{sigma}} = 0,0513$]
Dados/limitações/parâmetros	8182/481/416	8694/6/478	12913/0/734
Refinamento (F^2)	1.048	1.065	1,029
R Índices finais [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0578$, $wR_2 = 0,1612$	$R_1 = 0,0691$, $wR_2 = 0,1904$	$R_1 = 0,0648$, $wR_2 = 0,1697$
R Índices finais [todos os dados]	$R_1 = 0,0657$, $wR_2 = 0,1745$	$R_1 = 0,0733$, $wR_2 = 0,1947$	$R_1 = 0,0856$, $wR_2 = 0,1888$
Max, min residual e Å ⁻³	1,17/-1,09	3,17/-2,52	1,43/-1,75

A3.14: Elipsóides de deslocamento (40% de probabilidade) com H omitidos, mostrando as conformações relativas nos seis resíduos diferentes no modelo de refinamento para a estrutura cristalina de **1**. Nos resíduos 1, 2 e 6, há a aproximação do grupo *i*Pr do ligante (η^6 -*p*-cimeno) com a porção CH apontando para o anel arila da fosfina de conformação 'plana'; no restante, um dos grupos metila do *i*Pr é orientado para o centro do anel



A3.15: (a) Empacotamento de duas moléculas de **2** na rede cristalina, com os componentes não-fosfina como esferas de preenchimento de espaço. (b) Empacotamento de duas moléculas de **2'** nas quais o componente principal à esquerda é emparelhado com o componente de desordem menor à direita, apresentando uma melhor correspondência entre átomos.



A3.16

Estrutura molecular de **3** como encontrado na rede cristalina, mostrando a conformação de **L3**, o deslocamento de P1 do plano LS de C21-C26, e o contato curto do grupo metil C10 para o centróide do anel arila da fosfina.

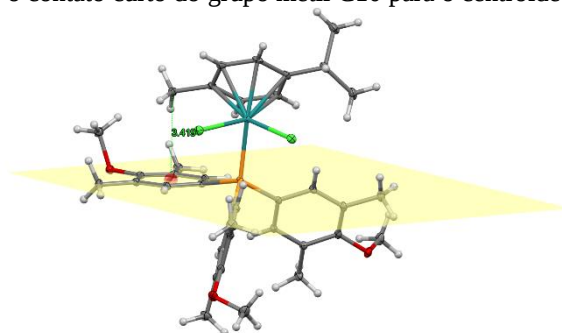
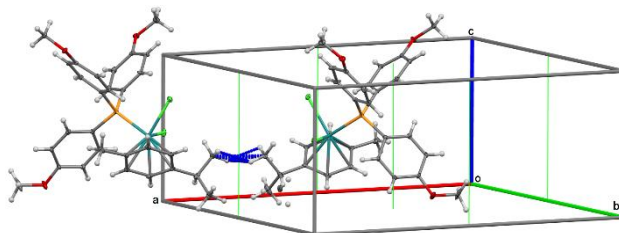
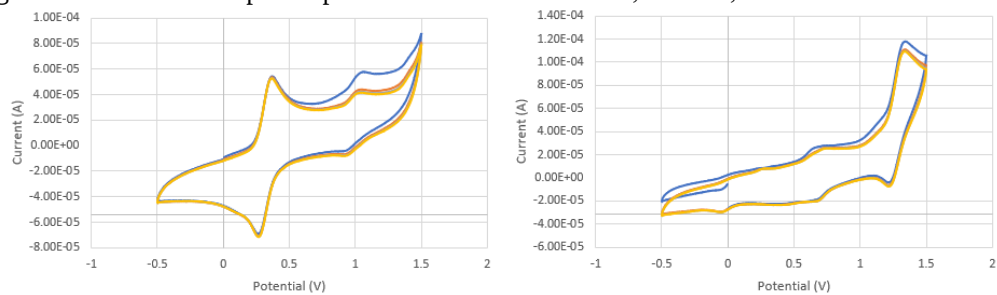
**A3.17**

Diagrama da célula unitária com elipsóides de deslocamento (30% de probabilidade), mostrando duas moléculas ligadas por contatos curtos centrados em 2 eixos de rotação. Estes eixos provavelmente se alternam nas duas conformações.

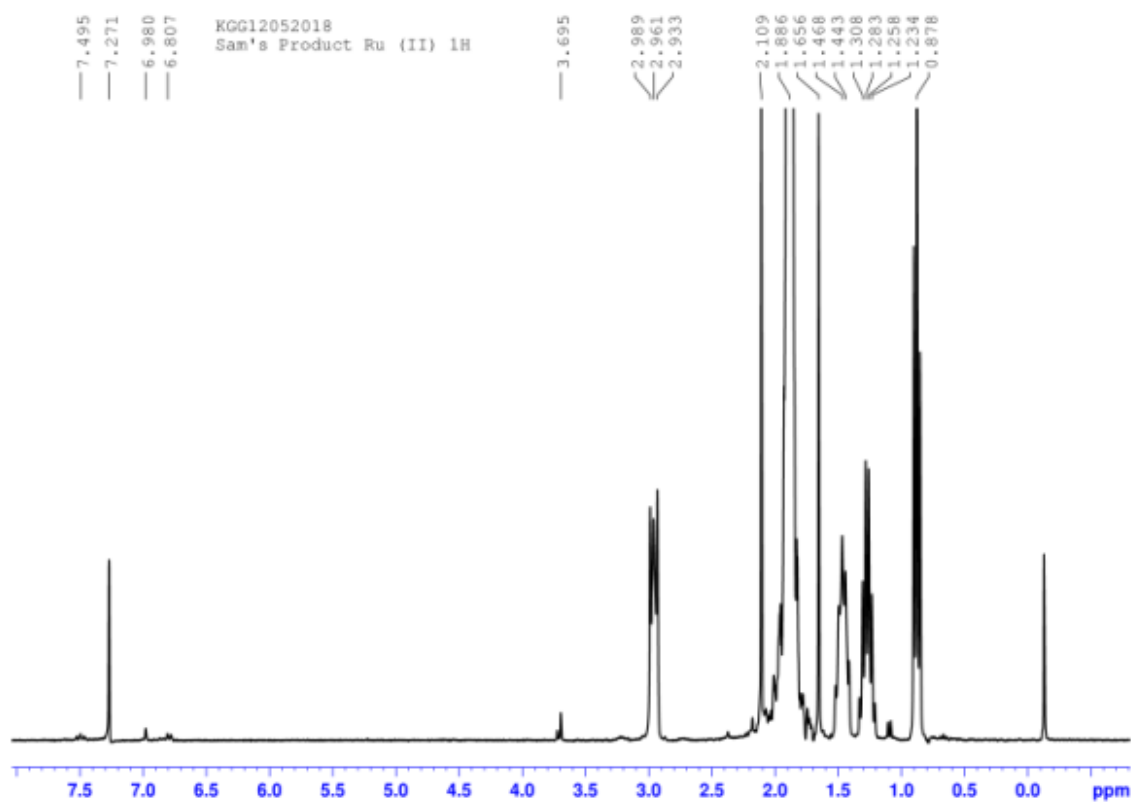
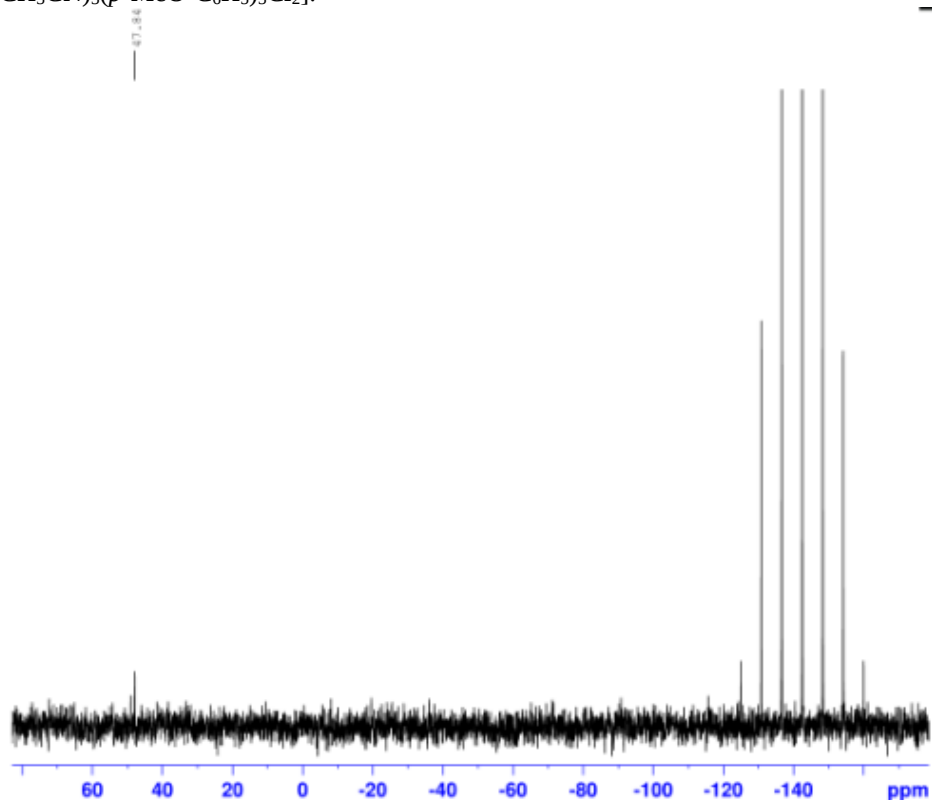
**A3.18**

Voltamogramas cíclicos do composto após a eletrólise em massa a 1,15 V e 0,00 V.



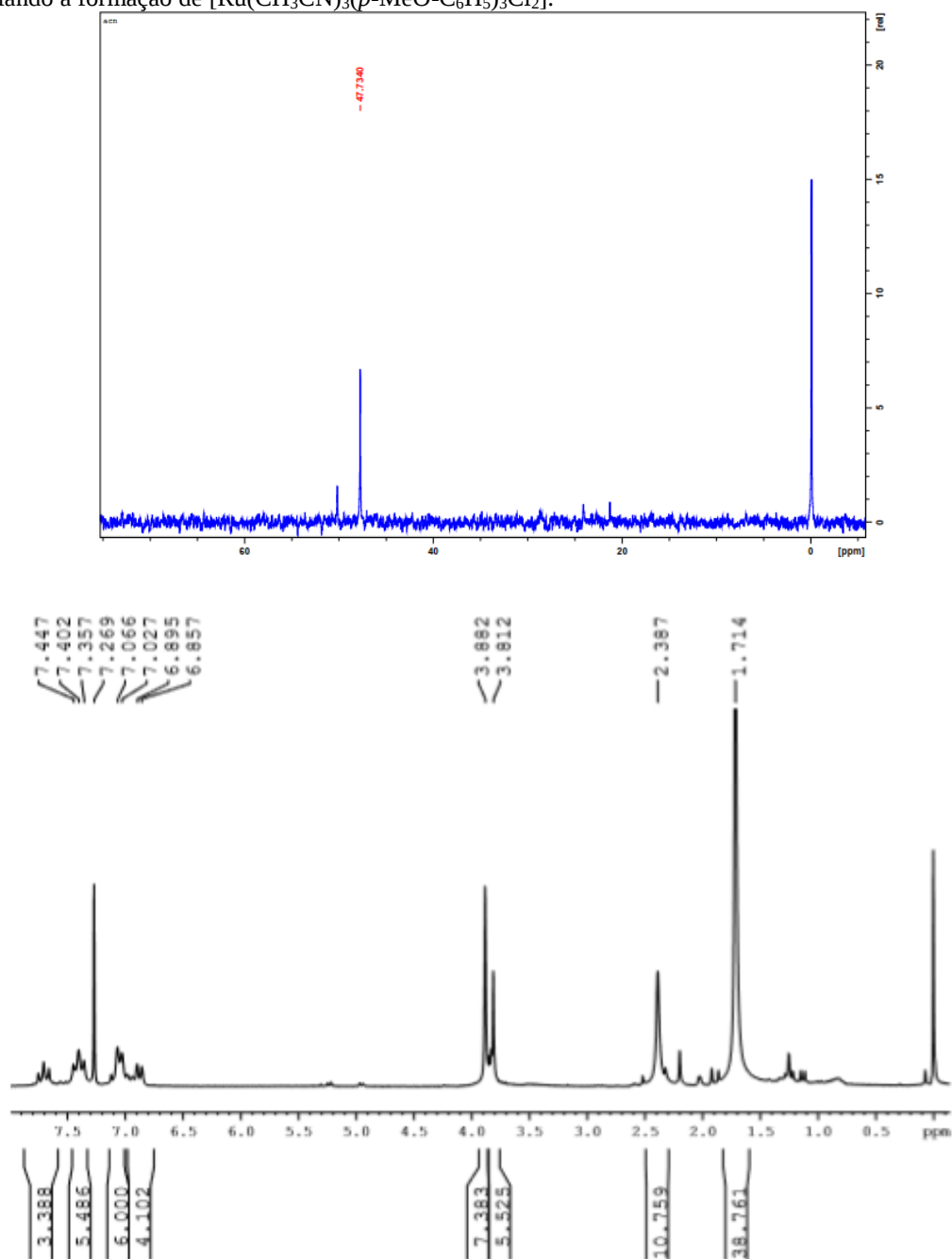
A3.19

Espectros de RMN de ^{31}P and ^1H NMR para o produto coletado após processo de eletrólise em massa sob potencial controlado $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3(p\text{-MeO-C}_6\text{H}_5)_3\text{Cl}_2]$.



A3.20

Espectros de RMN de ^{31}P and ^1H NMR para o resíduo formado após processo síntese térmica em CH_3CN , evidenciando a formação de $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3(p\text{-MeO-C}_6\text{H}_5)_3\text{Cl}_2]$.

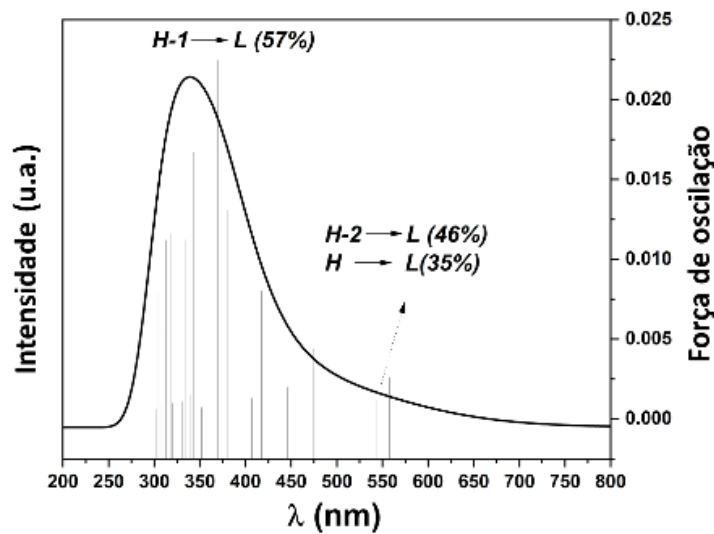


	Complexo 4	Complexo $(\text{CH}_3\text{CN})_3$ Eletrólise	Complexo $(\text{CH}_3\text{CN})_3$ Síntese térmica
H1	1,85 (s)	-	-
H2	4,94 (d)	-	-
H3	5,23 (d)	-	-
H4	2,89 (sept)	-	-
H5	1,13 (d)	-	-
H6	6,86 (d)	6,80 (d)	7,07 (d)
H7	7,73 (t)	7,49 (t)	7,40(t)
H8	3,81 (s)	3,69 (s)	3,88 (s)
H9	-	2,93 (s)	2,40 (s)

A3.21:
Solubilidade qualitativa dos complexos **1-4** a 25°C.

	5	6	7	8
Solubilidade	Solúvel: metanol, etanol, éter etílico (parcialmente), diclorometano, acetonitrila, clorofórmio, DMSO, octanol (parcialmente).	Solúvel: metanol, etanol diclorometano, acetonitrila, clorofórmio, DMSO	Solúvel: metanol, etanol (parcialmente), diclorometano, acetonitrila, clorofórmio, DMSO	Solúvel: metanol, etanol (parcialmente), diclorometano, acetonitrila, clorofórmio, DMSO
	Insolúvel: pentano, água, tampão PBS.	Insolúvel: éter etílico, pentano, água, tampão PBS, octanol.	Insolúvel: éter etílico, pentano, água, tampão PBS, octanol.	Insolúvel: éter etílico, pentano, água, tampão PBS, octanol.

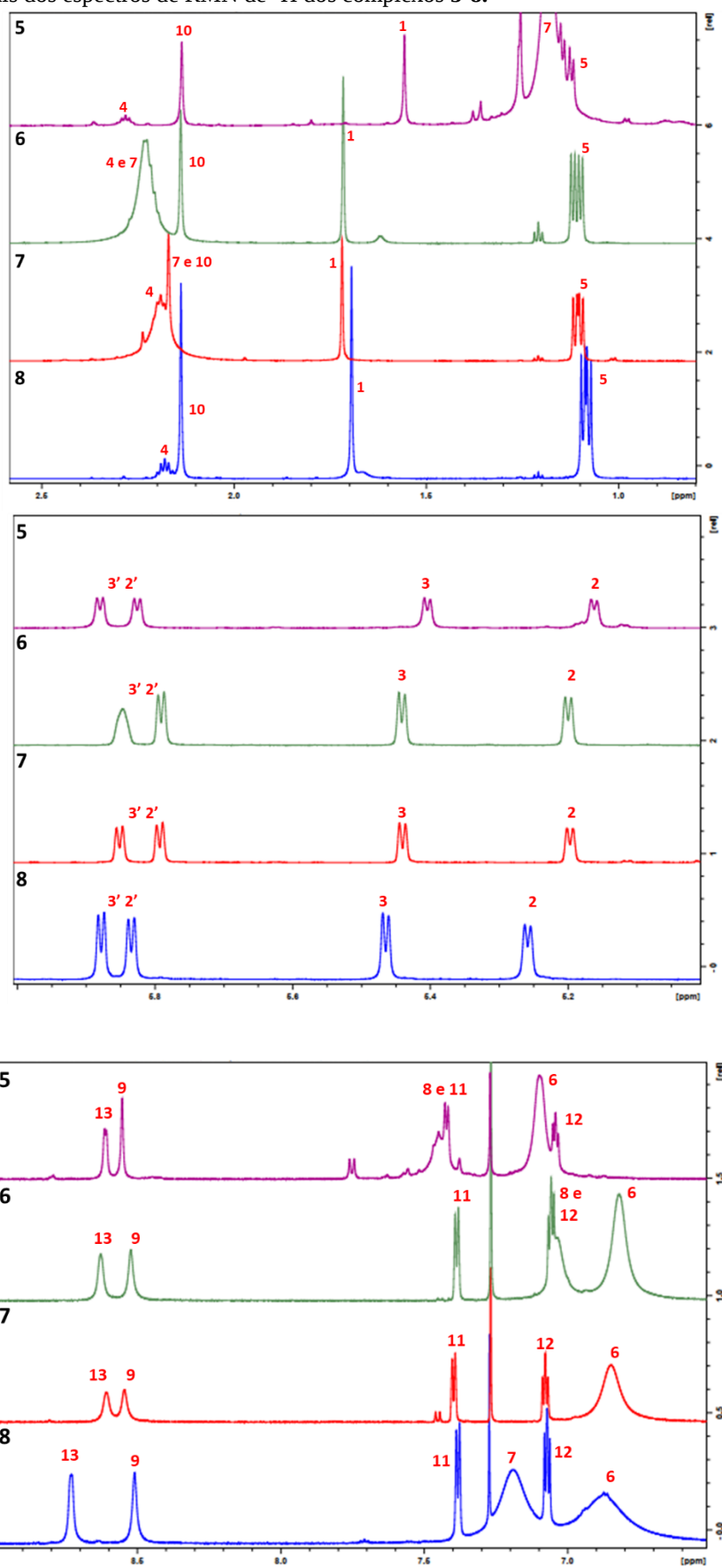
A3.22:
Espectro de UV-Vis para o complexo [Ru(η^6 -*p*-cimen)PPh₃NCl] no nível de teoria 3LYP/6-31G+(d)+ SPK-DZP, e os valores e contribuições das transições eletrônicas, relacionados às principais excitações dos cálculos de TDDFT.



Energia, eV	λ , nm	Transição eletrônica
3,610	350	H-1 $\rightarrow$ L (57%)
2,222	550	H-2 $\rightarrow$ L (46%)
		H $\rightarrow$ L (35%)

A3.23

Expansão dos sinais dos espectros de RMN de ^1H dos complexos 5-8.

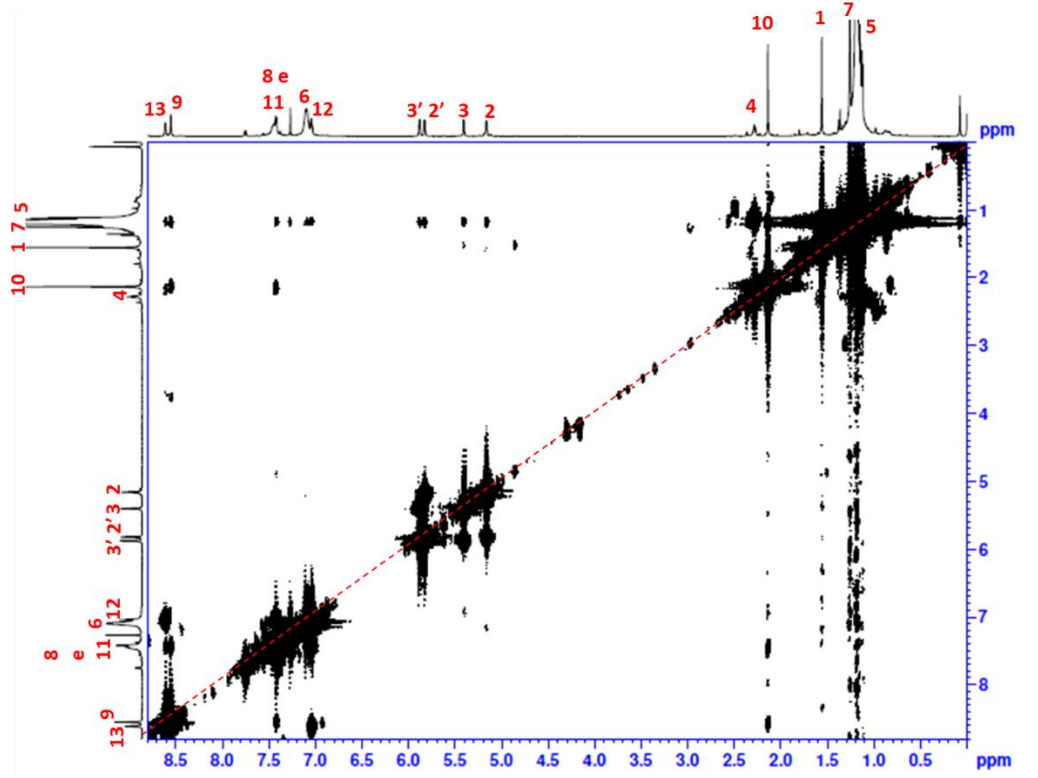


A3.24

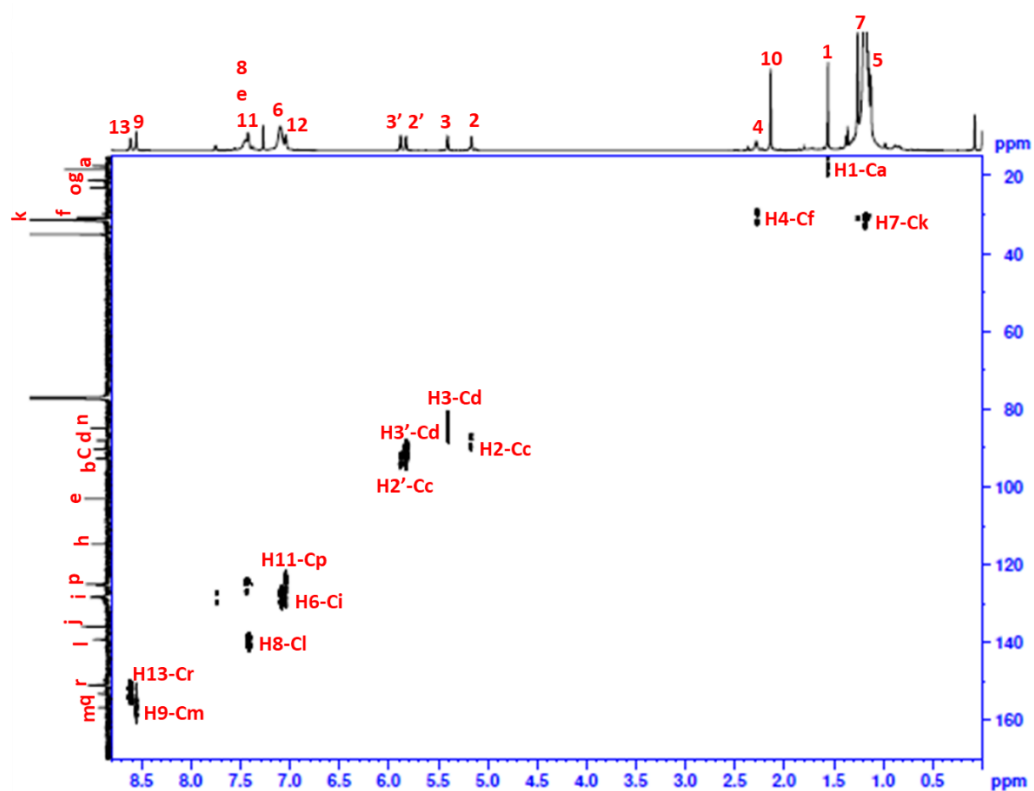
Espectros de RMN 2D, (^1H - ^1H gCOSY), (^1H - ^{13}C gHSQC) e (^1H - ^{13}C gHMBC) dos complexos 5-8.

Complexo 5

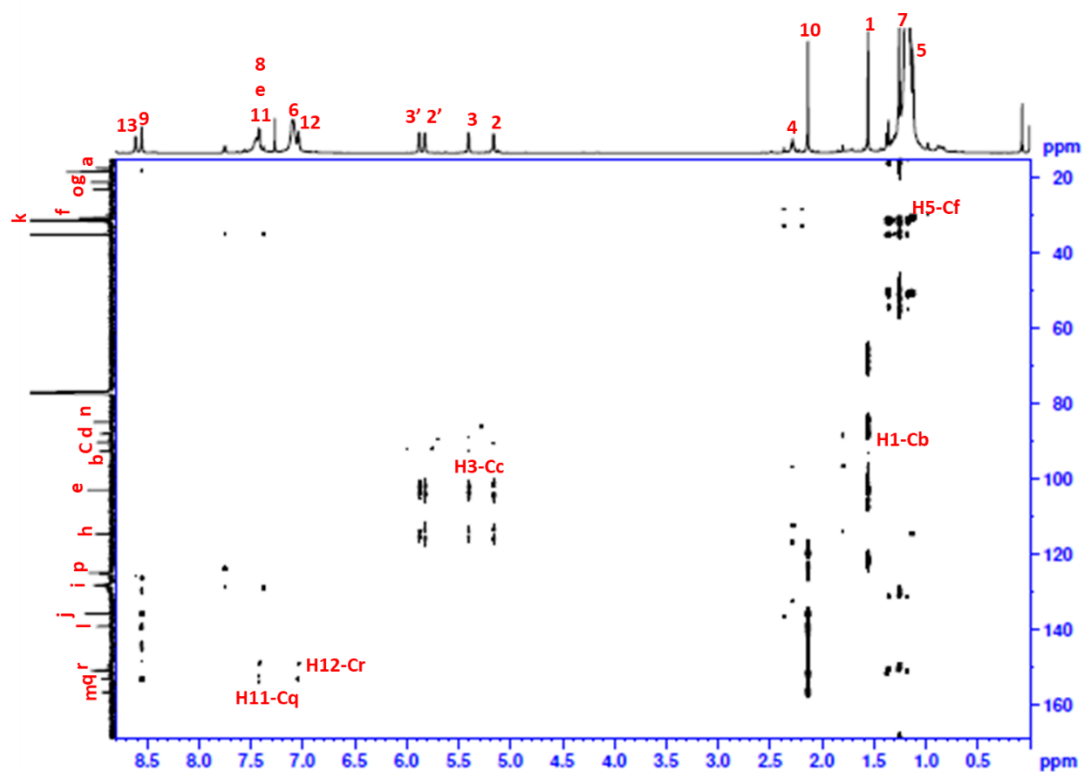
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC

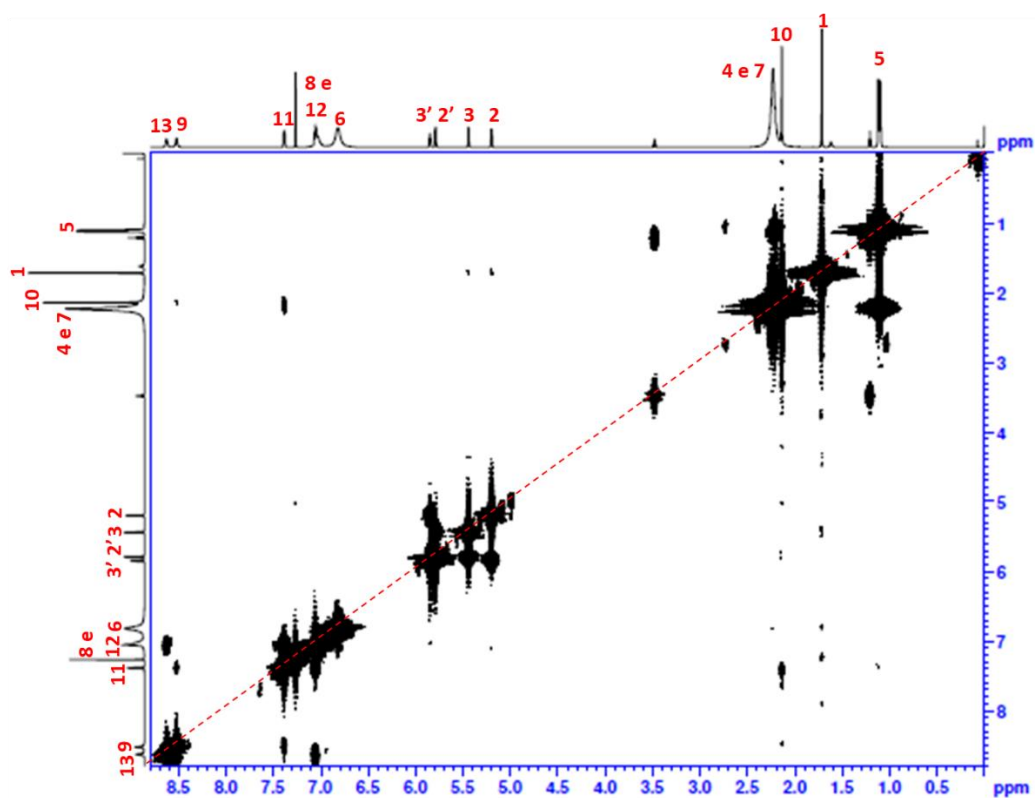


- ^1H - ^{13}C gHMBC

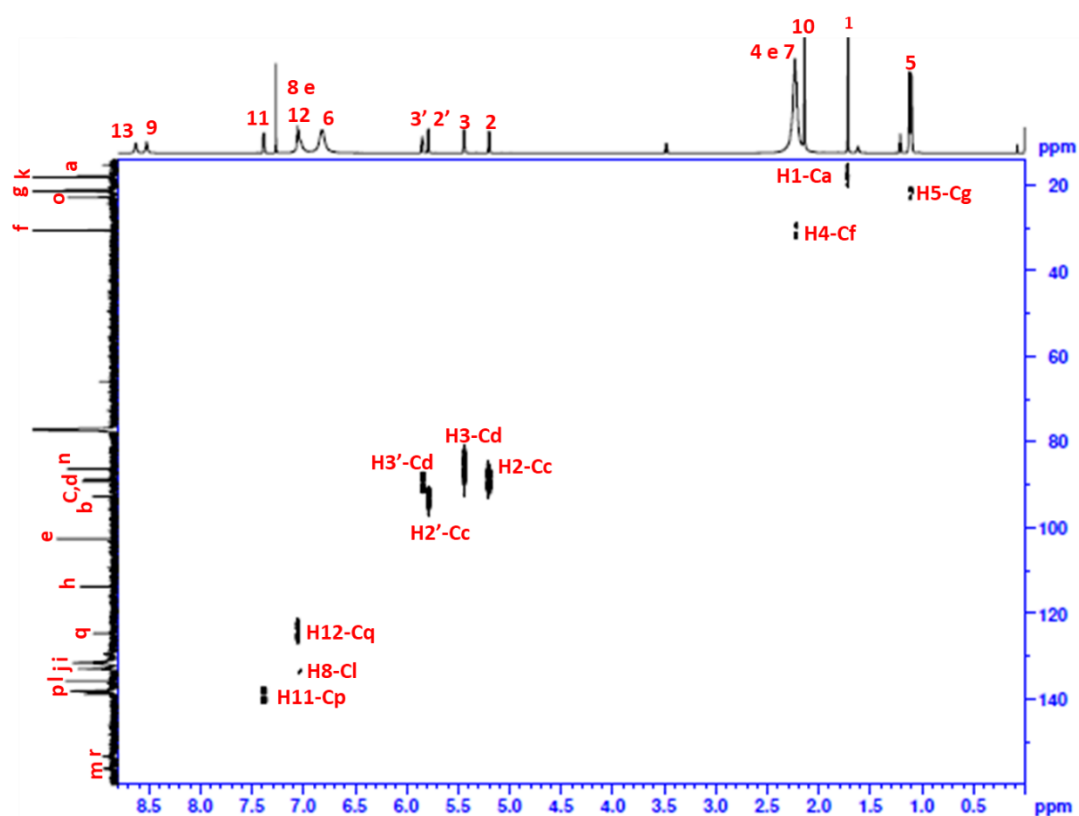


Complexo 6

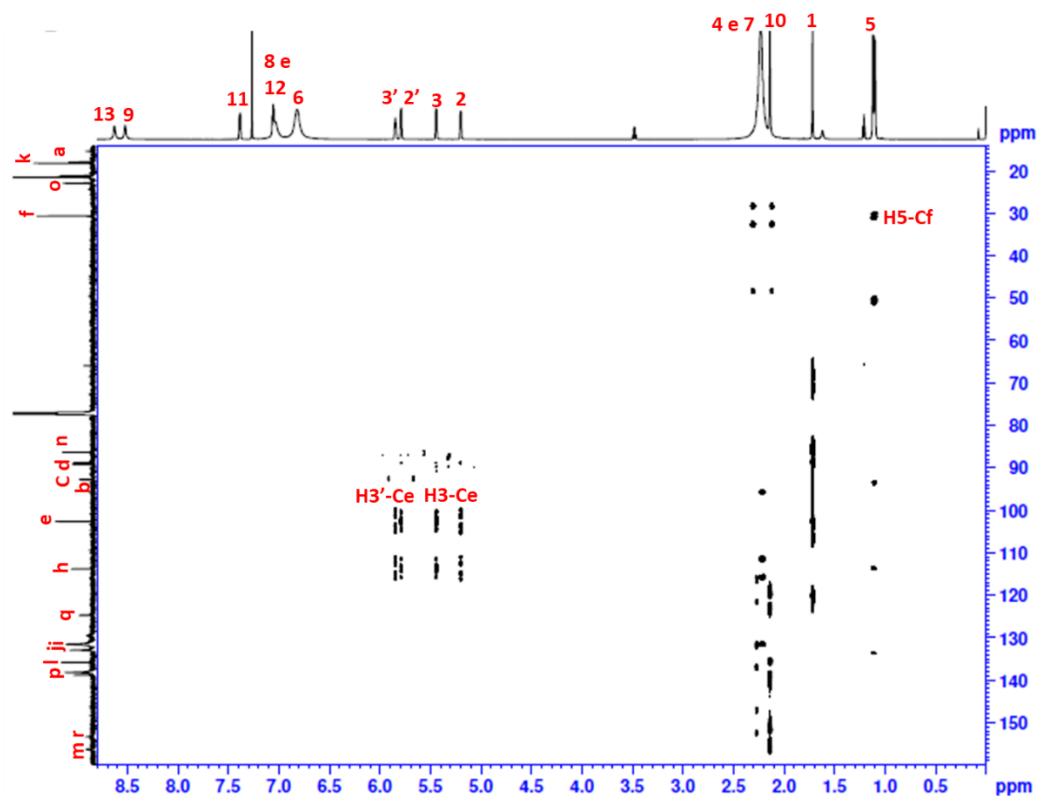
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC

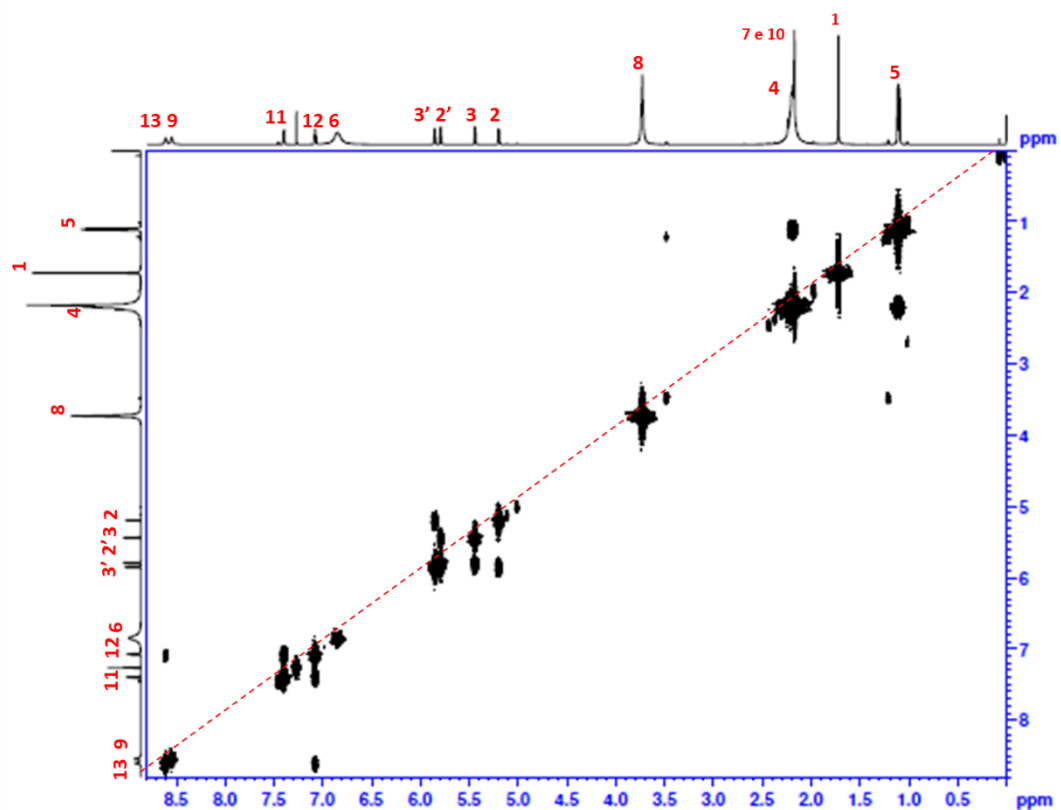


- ^1H - ^{13}C gHMBC

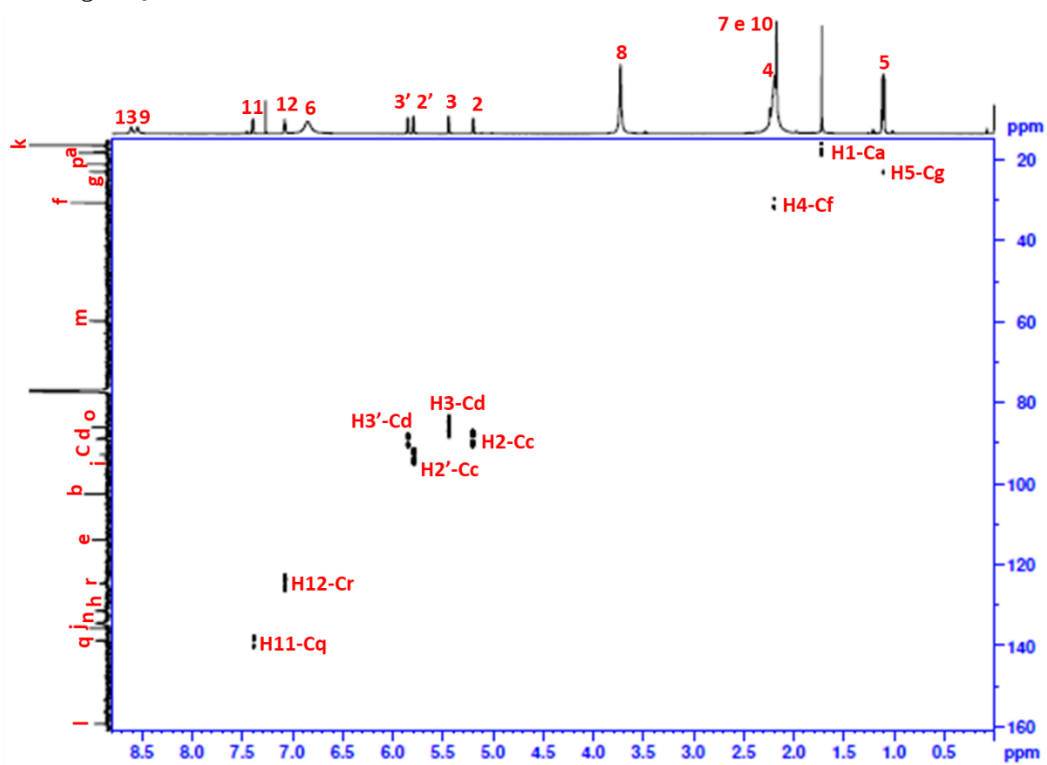


Complexo 7

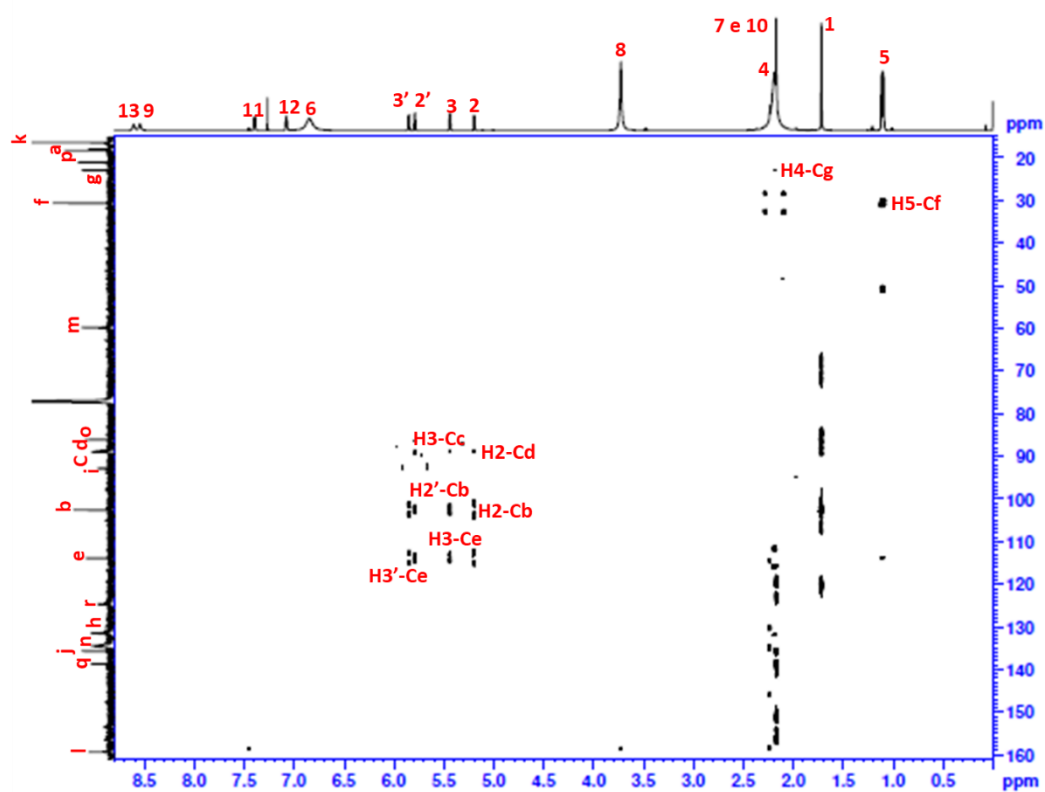
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC

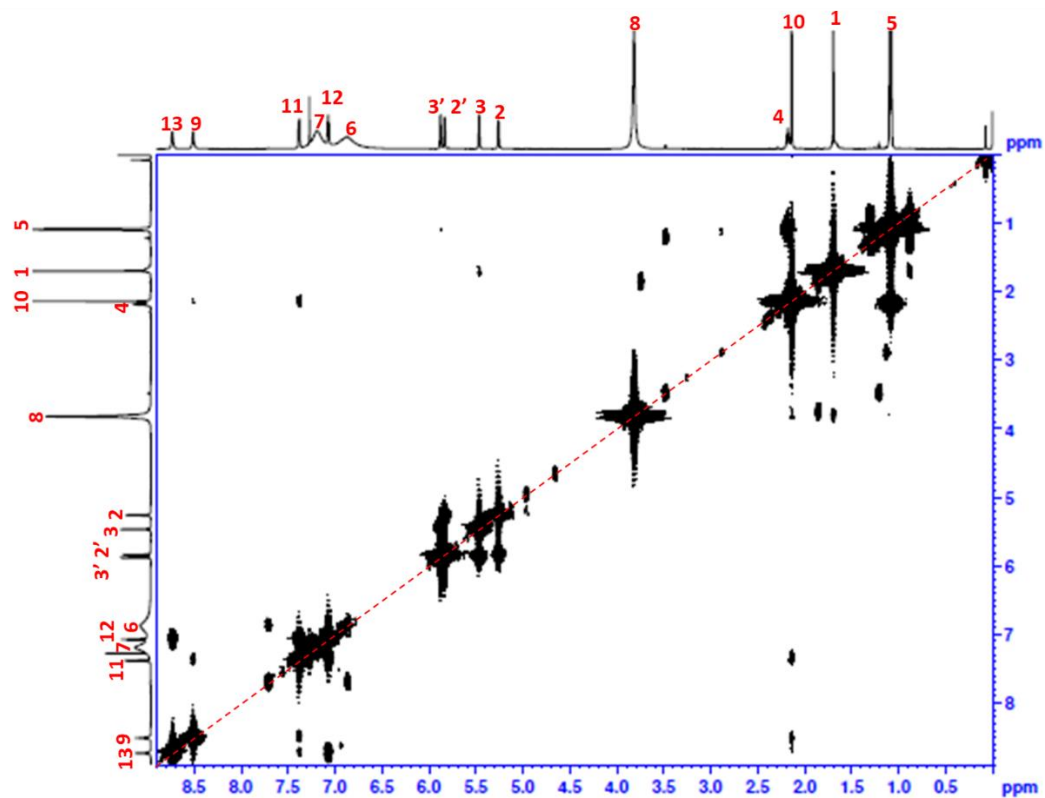


- ^1H - ^{13}C gHMBC

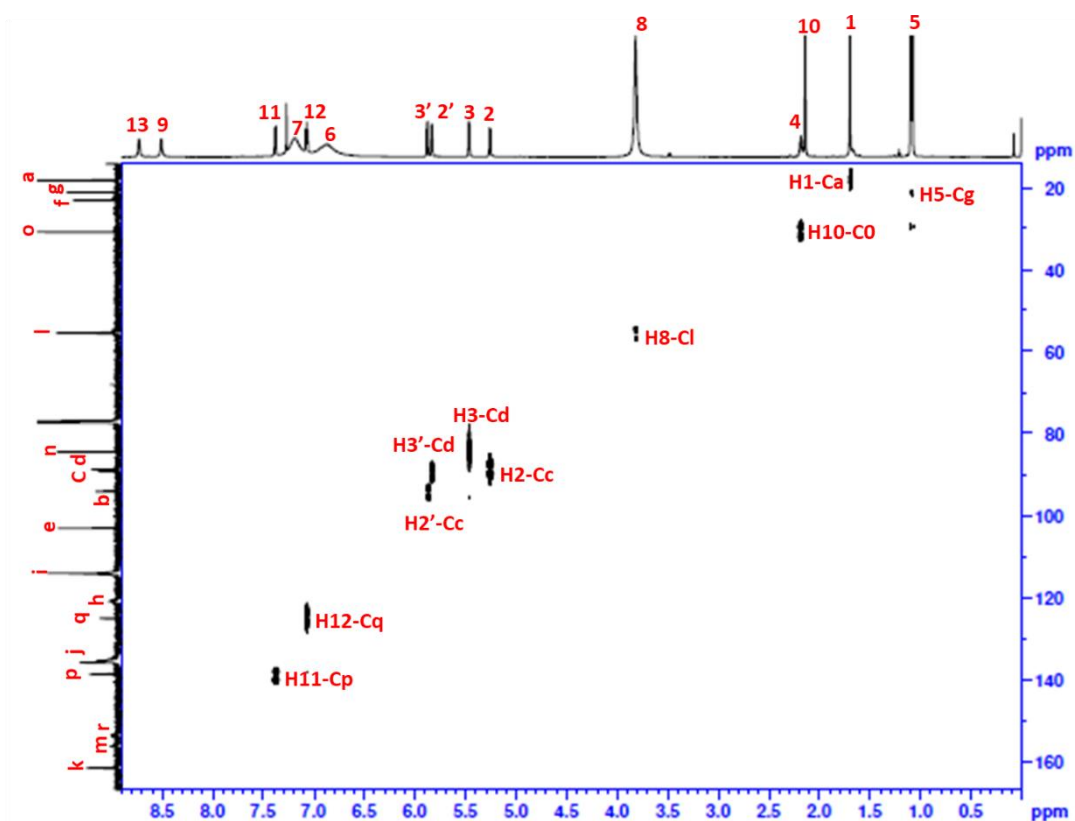


Complexo 8

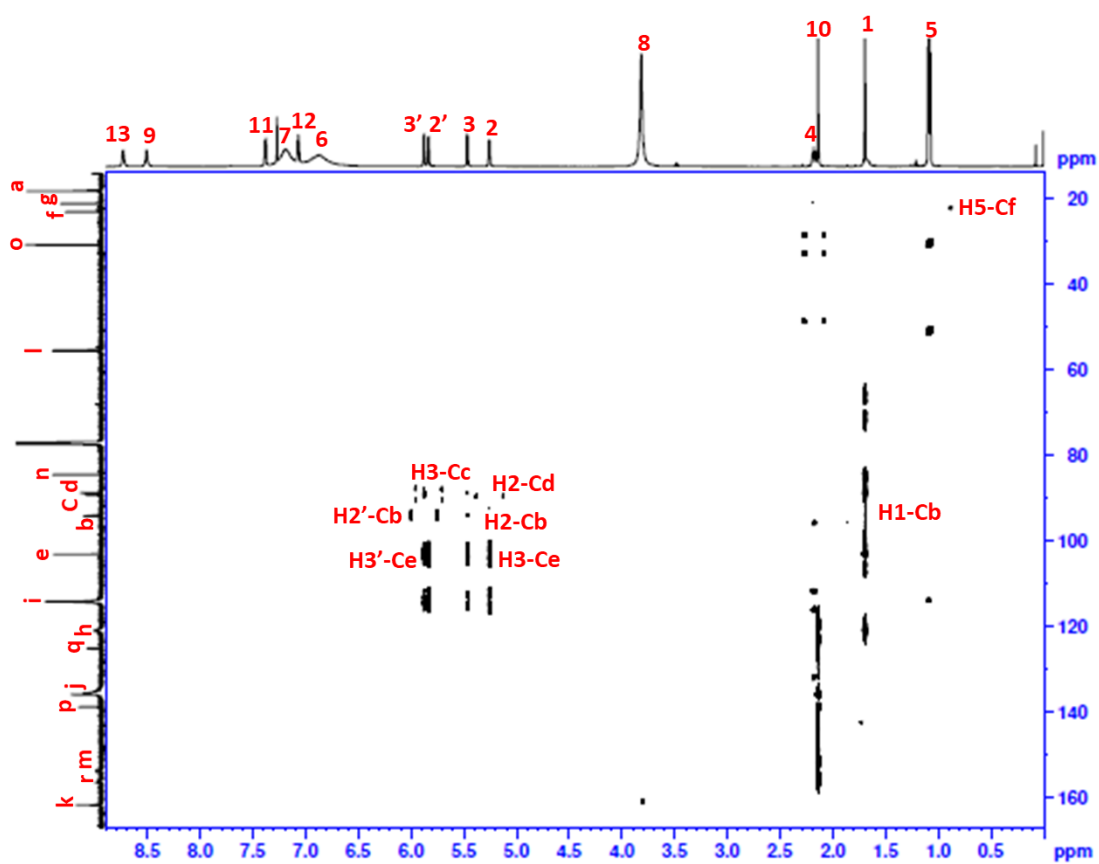
- ^1H - ^1H gCOSY



- ^1H - ^{13}C gHSQC



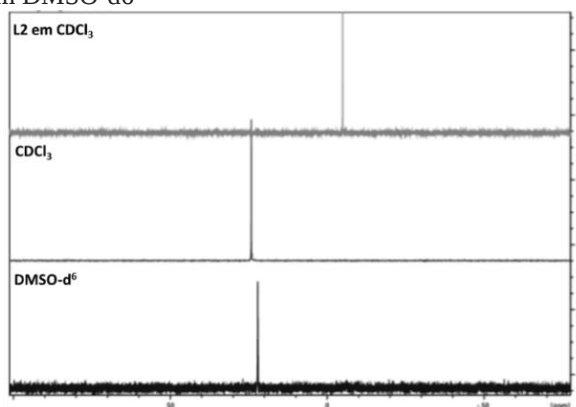
- ^1H - ^{13}C gHMBC



ANEXOS: CAPÍTULO 4

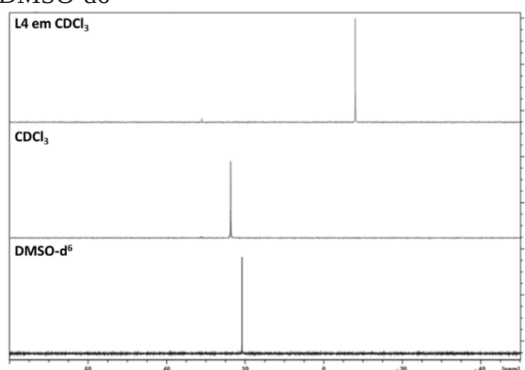
A4.1

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ complexo 2 em DMSO-d₆



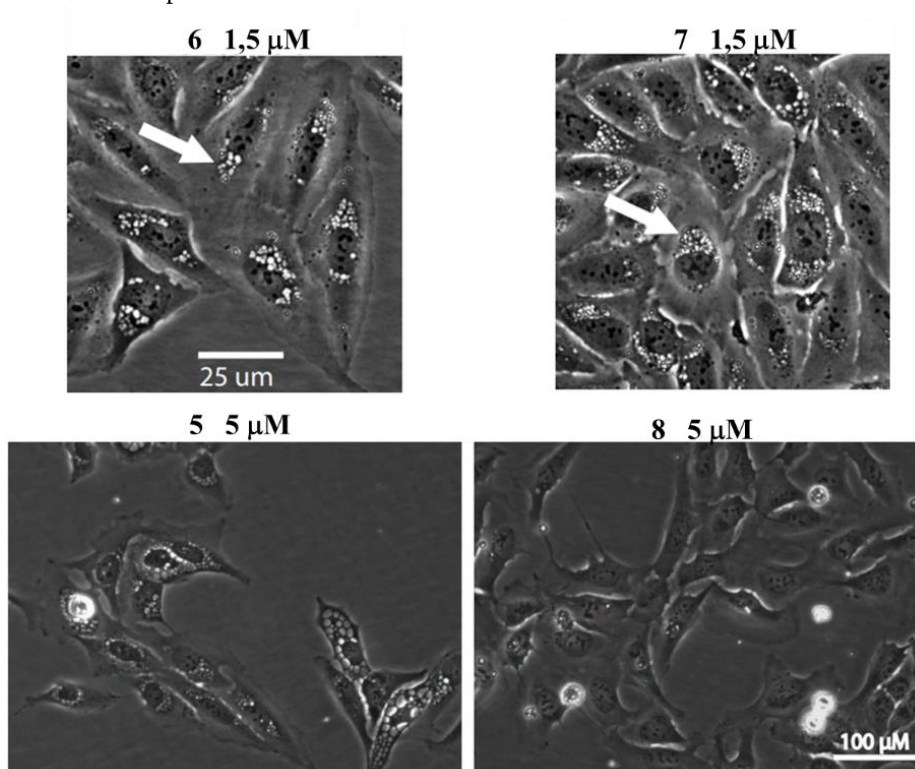
A4.2

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ complexo 4 em DMSO-d₆



A4.3

Imagens de Microscopia obtidas para os complexos da série 5-8 em várias concentrações. Flechas indicam a formação das vesículas e os pontos arredondados morte das células.



A4.4

Concentrações inibitórias (IC₅₀, μM) para complexos neutros [Ru(η⁶-*p*-cimeno)(L)Cl₂] em células cancerígenas humanas e células saudáveis *.

Complexos Neutros η ⁶ - <i>p</i> -cimeno; L	Linhas Celulares	IC ₅₀ (μM)	Referência **
<i>p</i> -cimeno; <i>bis</i> -difosfinometano	MCF-7 HCC1937	2,6 ± 0,2 1,4 ± 0,3	1
<i>p</i> -cimeno; κ <i>P</i> -Ph ₂ P(4-C ₆ H ₄ Br)	BxPC3 Balb/3T3 CloneA31	13,4 ± 0,4 8,6 ± 0,5	2
<i>p</i> -cimeno; κ <i>P</i> -Ph ₂ P(4-C ₆ H ₄ OSiMe ₂ ^t Bu)	MDA-MB-231 A2780 HSF	9,2 ± 1,1 3,6 ± 0,6 7,2 ± 1,0	3
<i>p</i> -cimeno; κ <i>P</i> -Ph ₂ P(4-C ₆ H ₄ Br)	MDA-MB-231 A2780 HSF	13,9 ± 1,2 7,0 ± 1,6 31,9 ± 1,1	3
<i>p</i> -cimeno; κ <i>P</i> -Ph ₂ P(4-C ₆ H ₄ OH)	A2780 A2780CisR HEK-293	21 ± 1 32 ± 2 24 ± 1	4
<i>p</i> -cimeno; dimetil(1-pirenil)fosfano	A549 A375 SW620 MCF7 MCF10A	17,16 ± 0,53 8,99 ± 0,07 6,46 ± 0,78 9,74 ± 0,13 6,88 ± 0,31	5
<i>p</i> -cimeno; difenil(1-pirenil)fosfano	A549 A375 SW620 MCF7 MCF10A	74,73 ± 2,31 25,01 ± 1,83 28,53 ± 0,93 36,15 ± 5,22 34,69 ± 3,63	5
<i>p</i> -cimeno; (S)-metilfenil(1-pirenil)- fosfano	A549 A375 SW620 MCF7 MCF10A	8,74 ± 1,01 4,21 ± 0,41 3,14 ± 0,40 5,40 ± 1,01 4,31 ± 0,37	5
η ⁶ -C ₆ H ₅ OCH ₂ CH ₂ OH; P(OPh) ₃	MCF-7	10	6

* Células: MCF7 e HCC1937 (câncer de mama); BxPC3 (câncer do pâncreas); Balb/3T3 CloneA31 (fibroblastos de camundongo); MDA-MB-231 (mama humana), A2780 (câncer de ovário), HSF (células de fibroblastos da pele humana), A2780CisR (células de câncer de ovário resistentes a cisplatina), HEK-293 (câncer de rim), A549 (adenocarcinoma pulmonar), A375 (melanoma), SW620 (adenocarcinoma colorretal), MCF7 (adenocarcinoma de mama), MCF10A (mama epitelial não tumoral).

[1] Chuklin, P.; Chalermpanaphan, V.; Nhukeaw, T.; Saithong, S.; Chainok, K.; Phongpaichit, S.; Ratanaphan, R.; Leesakul, N. Synthesis, X-ray structure of organometallic ruthenium (II) *p*-cymene complexes based on P-and N-donor ligands and their in vitro antibacterial and anticancer studies. *J. Organomet. Chem.*, 2017, 846, 242- 250, DOI: 10.1016/j.jorgchem.2017.06.017

[2] Biancalana, L.; Pratesi, A.; Chiellini, F.; Zacchini, S.; Funaioli, T.; Gabbiani, C.; Marchetti, F. Ruthenium arene complexes with triphenylphosphane ligands: cytotoxicity towards pancreatic cancer cells, interaction with model proteins, and effect of ethacrynic acid substitution. *New J. Chem.* 2017, 41, 14574- 14588, DOI: 10.1039/c7nj02300f

[3] Biancalana, L.; Zacchini, S.; Ferri, N.; Lupo, M. G.; Pampaloni, G.; Marchetti, F. Tuning the cytotoxicity of ruthenium (II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/phenoxydiphenylphosphine ligand. *Dalton Trans.* 2017, 46, 16589- 16604, DOI: 10.1039/C7DT03385K

[4] Biancalana, L.; Batchelor, L. K.; De Palo, A.; Zacchini, S.; Pampaloni, G.; Dyson, P. J.; Marchetti, F. A general strategy to add diversity to ruthenium arene complexes with bioactive organic compounds via a coordinated (4-hydroxyphenyl)diphenylphosphine ligand. *Dalton Trans.* 2017, 46, 12001- 12004, DOI: 10.1039/c7dt02062g

[5] Brissos, R. F.; Clavero, P.; Gallen, A.; Grabulosa, A.; Barrios, L. A.; Caballero, A. B.; Korrodi-Gregório, L.; Pérez-Tomás, R.; Muller, G.; Soto-Cerrato, V.; Gamez, P. Highly cytotoxic ruthenium (II)-arene complexes from bulky 1-pyrenylphosphane ligands. *Inorg. Chem.* 2018, 57, 14786- 14797, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b02541

[6] Berg, C.; Chari, S.; Jurgaityte, K.; Laurora, A.; Naldony, M.; Pope, F.; Romano, D.; Medupe, T.; Prince, S.; Ngubane, S.; Baumgartner, J.; Blom, B. Modulation of the solubility properties of arene ruthenium complexes bearing stannyl ligands as potential anti-cancer agents. *J. Organomet. Chem.* 2019, 891, 12- 19, DOI: 10.1016/j.jorganchem.2019.04.002

A4.4

Concentrações inibitórias (IC₅₀, µM) para complexos catiônicos [Ru(η⁶-p-cimeno)(X)(L)Cl] em células cancerígenas humanas e células saudáveis *.

Complexos catiônicos	Linhagens Celulares	IC ₅₀ (µM)	Referência **
[Ru(η ⁶ -p-cimeno)(PPh ₃)(T)Cl] PF ₆ T = N-acil-N'(monossobstituída)tioureia	A549 MRC-5	0,63 ± 0,09 1,28 ± 0,09	1
[Ru(η ⁶ -p-cymene)(PPh ₃)(T)] PF ₆ T = N-acil-N'(monossobstituída) tioureia	A549 MRC-5	0,25 ± 0,04 1,35 ± 0,10	1
[(η ⁶ -C ₆ H ₆)Ru(SnCl ₃)(PPh ₃)(DAMP)] [BF ₄] DAMP=dimetilaminopiridina	A2780 A2780cisR HEK293	3,4 ± 0,4 4,1 ± 0,9 14,2 ± 4,9	2
[(η ⁶ -C ₆ H ₆)Ru (PPh ₃)(DAMP)Cl] [BF ₄] DAMP= dimetilaminopiridina	A2780 A2780cisR HEK293	6,5 ± 0,9 7,1 ± 1,6 3,2 ± 0,3	2
[(η ⁶ -p-cimeno)Ru(3-picolina)PPh ₃ Cl][PF ₆] 3-picolina = 3-metilpiridina	HL60	10,1	3
[(η ⁶ -p-cimeno)Ru(3,4-lutidina)PPh ₃ Cl][PF ₆] 3,4-lutidina = 3,4-dimetilpiridina	HL60	5,2	3

*Células: A549 (adenocarcinoma pulmonar), MRC-5 (fibroblastos do pulmão fetal humano), A2780 (câncer de ovário), A2780CisR (células de câncer de ovário resistentes a cisplatina), HEK-293 (câncer de rim), HL60 (leucemia).

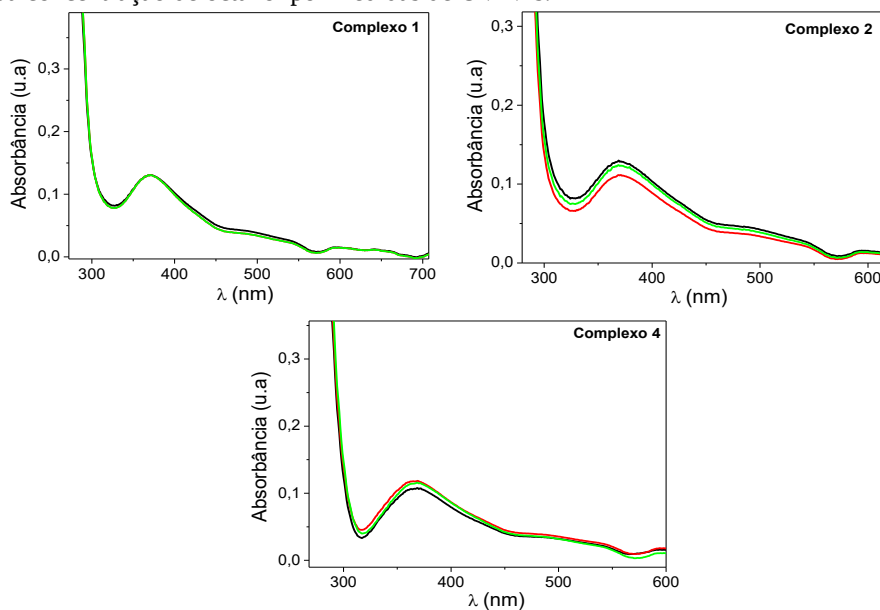
[1] Cunha, B. N., Colina-Vegas, L., Plutín, A. M., Silveira, R. G., Honorato, J., Oliveira, K. M., Batista, A. A. Hydrolysis reaction promotes changes in coordination mode of Ru (II)/acylthiourea organometallic complexes with cytotoxicity against human lung tumor cell lines. *Journal of inorganic biochemistry*, 186, 147-156, 2018.

[2] Renier, O., Deacon-Price, C., Peters, J., Nurekeyeva, K., Russon, C., Dyson, S., Chiririwa, H. Synthesis and In Vitro (Anticancer) Evaluation of η⁶-Arene Ruthenium Complexes Bearing Stannyl Ligands. *Inorganics*, 5(3), 44, 2017.

[3] Sáez, R., Lorenzo, J., Prieto, M. J., Font-Bardia, M., Calvet, T., Omeñaca, N., Moreno, V. Influence of PPh₃ moiety in the anticancer activity of new organometallic ruthenium complexes. *Journal of inorganic biochemistry*, 136, 1-12, 2014.

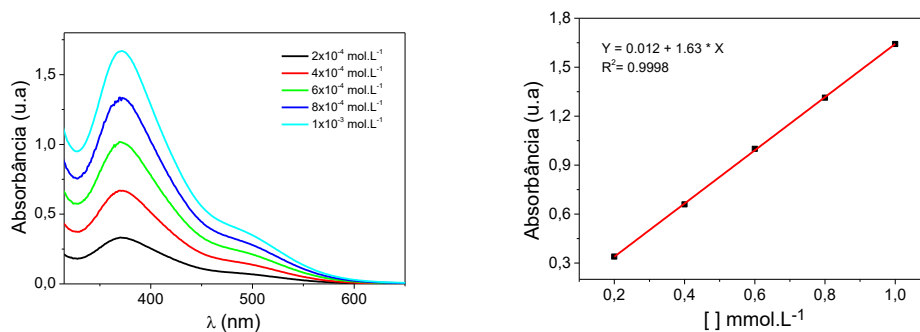
A4.5

Determinação da concentração de octanol por medidas de UV-Vis.

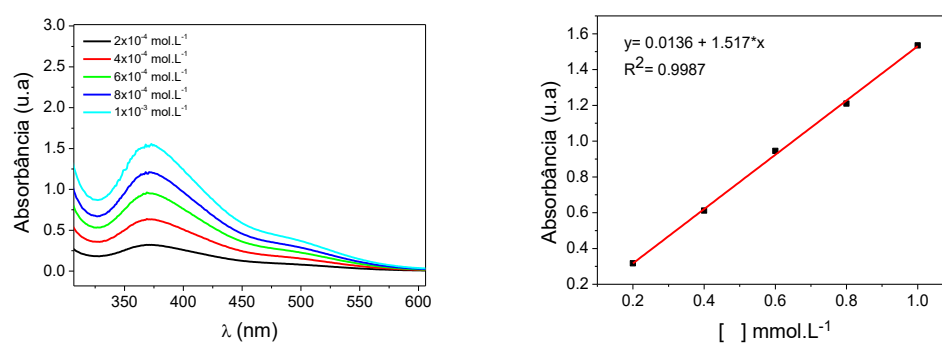


Curvas padrões para determinação da concentração dos complexos em octanol.

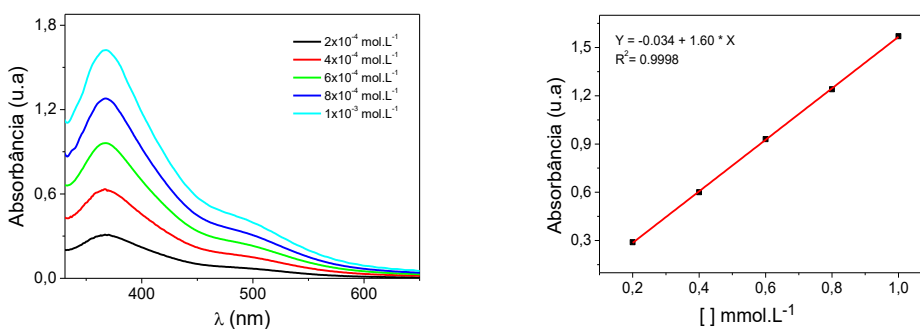
Complexo 1



Complexo 2



Complexo 4



A4.6:

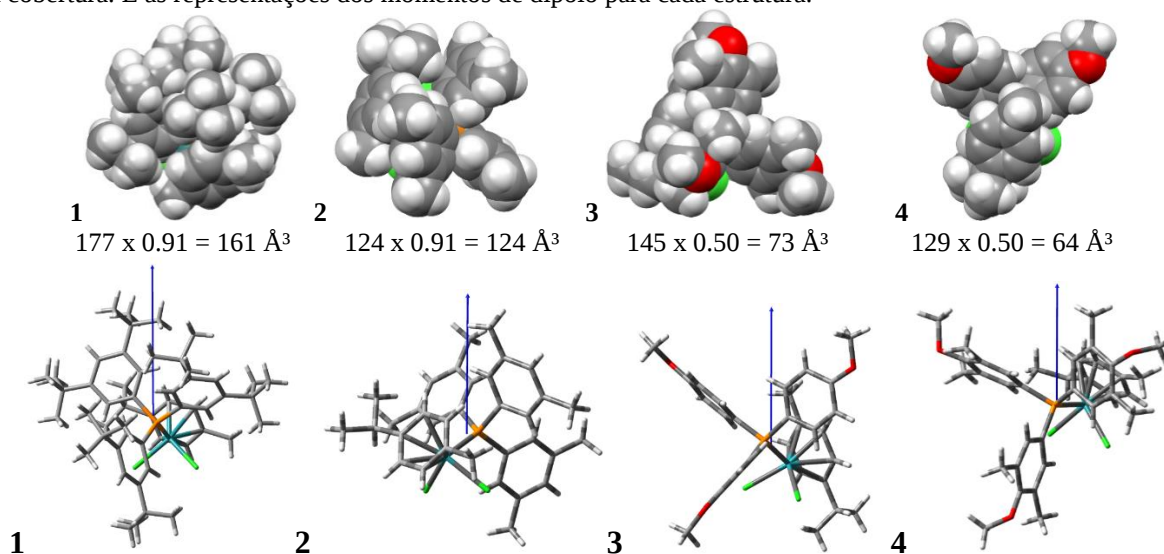
Resultados para o LogP

Complexos	[complexo] _{H₂O} (AA)* mg L ⁻¹	[complexo] _{água} (AA) mmol	[complexo] _{octanol} (UV-Vis) mmol	LogP=[complexo] _{octanol} / [complexo] _{água}
1	0,406	0,000448	0,0728	2,21
2	0,380	0,000582	0,0743	2,10
4	0,568	0,000862	0,0936	2,03

* Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

A4.7:

Modelos em escala de preenchimento de espaço dos complexos **1** a **4**, conforme usados para determinar as áreas moleculares relativas. Fatores de cobertura esféricos e triangulares de 0,91 e 0,50 foram aplicados para determinar a cobertura. E as representações dos momentos de dipolo para cada estrutura.



A4.8

Parâmetros para as monocamadas de Langmuir dos complexos da série **1-4**.

	DPPS/complexos			DOPC/complexos		
	A ₀ (Å ²)	ΔV (V)	C _s ⁻¹ (mN m ⁻¹)	A ₀ (Å ²)	ΔV (V)	C _s ^{-1e} (mN m ⁻¹)
1	86	0,47	98	105	0,44	91
2	83	0,53	98	136	0,42	74
3	94	0,45	50	129	0,40	64
4	89	0,49	53	121	0,36	83
DPPS ^f	58	0,47	129			
DOPC				103	0,43	92

A4.9:**Dados experimentais para as misturas dos complexos DPPS**

	Área molecular	Pressão de colapso	Potencial de superfície	Compressibilidade
	Complexo 1			
DPPS	59 Å ²	59 mN m ⁻¹	0.47 V	163 mN m ⁻¹
(5%)	86 Å ²	49 mN m ⁻¹	0.47 V	94 mN m ⁻¹
(10%)	92 Å ²	55 mN m ⁻¹	0.49 V	87 mN m ⁻¹
(30%)	122 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.53 V	43 mN m ⁻¹
(50%)	154 Å ²	28 mN m ⁻¹	0.57 V	54 mN m ⁻¹
(70%)	136 Å ²	27 mN m ⁻¹	0.63 V	64 mN m ⁻¹
(90%)	137 Å ²	26 mN m ⁻¹	0.68 V	64 mN m ⁻¹
Ru 1	143 Å ²	25 mN m ⁻¹	0.66 V	89 mN m ⁻¹
	Complexo 2			
DPPS	59 Å ²	59 mN m ⁻¹	0.47 V	163 mN m ⁻¹
(5%)	83 Å ²	53 mN m ⁻¹	0.526 V	112 mN m ⁻¹
(10%)	92 Å ²	55 mN m ⁻¹	0.51 V	83 mN m ⁻¹
(30%)	114 Å ²	43 mN m ⁻¹	0.58 V	58 mN m ⁻¹
(50%)	116 Å ²	42 mN m ⁻¹	0.505 V	45 mN m ⁻¹
(70%)	140 Å ²	24 mN m ⁻¹	0.62 V	36 mN m ⁻¹
(90%)	150 Å ²	21 mN m ⁻¹	0.65 V	43 mN m ⁻¹
Ru 2	134 Å ²	20 mN m ⁻¹	0.61 V	53 mN m ⁻¹
	Complexo 4			
DPPS	59 Å ²	59 mN m ⁻¹	0.47 V	163 mN m ⁻¹
(5%)	89 Å ²	59 mN m ⁻¹	0.486 V	122 mN m ⁻¹
(10%)	83 Å ²	51 mN m ⁻¹	0.45 V	115 mN m ⁻¹
(30%)	94 Å ²	45 mN m ⁻¹	0.49 V	67 mN m ⁻¹
(50%)	102 Å ²	45 mN m ⁻¹	0.495 V	64 mN m ⁻¹
(70%)	83 Å ²	44 mN m ⁻¹	0.48 V	55 mN m ⁻¹
(90%)	65 Å ²	--- mN m ⁻¹	0.49 V	47 mN m ⁻¹
Ru 4	59 Å ²	--- mN m ⁻¹	0.47 V	27 mN m ⁻¹

A4.10:**Dados experimentais para as misturas dos complexos e DOPC**

	Área Molecular	Pressão de colapso	Potencial de superfície	Compressibilidade
	Complexo 1			
DOPC	101 Å ²	44 mN m ⁻¹	0,435 V	93 mN m ⁻¹
Ru 1 (5%)	99 Å ²	47 mN m ⁻¹	0,44 V	93 mN m ⁻¹
Ru 1 (10%)	110 Å ²	46 mN m ⁻¹	0,46 V	78 mN m ⁻¹
Ru 1 (30%)	115 Å ²	46 mN m ⁻¹	0,57 V	64 mN m ⁻¹
Ru 1 (50%)	126 Å ²	28 mN m ⁻¹	0,65 V	64 mN m ⁻¹
Ru 1 (70%)	139 Å ²	26 mN m ⁻¹	0,65 V	70 mN m ⁻¹
Ru 1 (90%)	149 Å ²	25 mN m ⁻¹	0,69 V	78 mN m ⁻¹
Ru 1	143 Å ²	25 mN m ⁻¹	0,66 V	89 mN m ⁻¹
	Complexo 2			
DOPC	101 Å ²	44 mN m ⁻¹	0,435 V	93 mN m ⁻¹
Ru 2 (5%)	136 Å ²	46 mN m ⁻¹	0,418 V	78 mN m ⁻¹
Ru 2 (10%)	136 Å ²	45 mN m ⁻¹	0,44 V	76 mN m ⁻¹
Ru 2 (30%)	124 Å ²	43 mN m ⁻¹	0,54 V	73 mN m ⁻¹
Ru 2 (50%)	144 Å ²	44 mN m ⁻¹	0,60 V	47 mN m ⁻¹
Ru 2 (70%)	164 Å ²	26 mN m ⁻¹	0,56 V	37 mN m ⁻¹
Ru 2 (90%)	153 Å ²	23 mN m ⁻¹	0,583 V	36 mN m ⁻¹
Ru 2	134 Å ²	20 mN m ⁻¹	0,61 V	53 mN m ⁻¹
	Complexo 4			
DOPC	101 Å ²	44 mN m ⁻¹	0.435 V	93 mN m ⁻¹
Ru 4 (5%)	121 Å ²	42 mN m ⁻¹	0.358 V	83 mN m ⁻¹
Ru 4 (10%)	152 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.422 V	68 mN m ⁻¹
Ru 4 (30%)	136 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.43 V	66 mN m ⁻¹
Ru 4 (50%)	103 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.438 V	68 mN m ⁻¹
Ru 4 (70%)	108 Å ²	43 mN m ⁻¹	0.45 V	47 mN m ⁻¹
Ru 4 (90%)	41 Å ²	---	0.53 V	56 mN m ⁻¹
Ru 4	59 Å ²	---	0.47 V	27 mN m ⁻¹

ANEXOS: CAPÍTULO 5

A5.1:

Dados experimentais para as misturas dos complexos e *S.Aureus*

	Área Molecular	Pressão de colapso	Potencial de superfície	Compressibilidade
Complexo 1				
<i>S. Aureus</i>	145 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.33 V	103 mN m ⁻¹
Ru 1 (5%)	140 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.444 V	79 mN m ⁻¹
Ru 1 (10%)	177 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.446 V	106 mN m ⁻¹
Ru 1 (30%)	141 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.50 V	60 mN m ⁻¹
Ru 1 (50%)	165 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.57 V	59 mN m ⁻¹
Ru 1 (70%)	164 Å ²	27 mN m ⁻¹	0.63 V	61 mN m ⁻¹
Ru 1 (90%)	204 Å ²	25 mN m ⁻¹	0.64 V	48 mN m ⁻¹
Ru 1	143 Å ²	25 mN m ⁻¹	0.66 V	89 mN m ⁻¹
Complexo 2				
<i>S. Aureus</i>	145 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.33 V	103 mN m ⁻¹
Ru 2 (5%)	125 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.378 V	90 mN m ⁻¹
Ru 2 (10%)	167 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.395 V	73 mN m ⁻¹
Ru 2 (30%)	144 Å ²	45 mN m ⁻¹	0.47 V	56 mN m ⁻¹
Ru 2 (50%)	153 Å ²	26 mN m ⁻¹	0.54 V	43 mN m ⁻¹
Ru 2 (70%)	166 Å ²	25 mN m ⁻¹	0.60 V	43 mN m ⁻¹
Ru 2 (90%)	153 Å ²	22 mN m ⁻¹	0.66 V	45 mN m ⁻¹
Ru 2	134 Å ²	20 mN m ⁻¹	0,61 V	53 mN m ⁻¹
Complexo 4				
<i>S. Aureus</i>	145 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.33 V	103 mN m ⁻¹
Ru 4 (5%)	155 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.36 V	109 mN m ⁻¹
Ru 4 (10%)	117 Å ²	47 mN m ⁻¹	0.37 V	105 mN m ⁻¹
Ru 4 (30%)	111 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.42 V	96 mN m ⁻¹
Ru 4 (50%)	100 Å ²	46 mN m ⁻¹	0.416 V	69 mN m ⁻¹
Ru 4 (70%)	67 Å ²	45 mN m ⁻¹	0.44 V	64 mN m ⁻¹
Ru 4 (90%)	42 Å ²	---	0.53 V	50 mN m ⁻¹
Ru 4	59 Å ²	---	0.47 V	27 mN m ⁻¹