

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-MG

HENRIQUE VIEIRA REIS SILVA

**SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE
RUTÊNIO (II) CONTENDO NICOTINAMIDA OU ÓXIDO NÍTRICO E DERIVADOS
PIRIDÍNICOS.**

Alfenas/ MG

2023

HENRIQUE VIEIRA REIS SILVA

SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO NICOTINAMIDA OU ÓXIDO NÍTRICO E DERIVADOS PIRIDÍNICOS.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto
Coorientadora: Dra. Marília I. Frazão Barbosa

Alfenas/ MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Vieira, Henrique Vieira Reis Silva.

Síntese e investigação da atividade citotóxica de complexos de rutênio (II) contendo nicotinamida ou óxido nítrico e derivados piridínicos / Henrique Vieira Reis Silva Vieira. - Alfenas, MG, 2023.

216 f. : il. -

Orientador(a): Antônio Carlos Doriguetto Doriguetto.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Rutênio. 2. Nicotinamida. 3. Óxido nítrico. I. Doriguetto, Antônio Carlos Doriguetto, orient. II. Título.

HENRIQUE VIEIRA REIS SILVA

SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO NICOTINAMIDA OU ÓXIDO NÍTRICO E DERIVADOS PIRIDÍNICOS.

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovada em: 30 de março de 2023.

Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto

Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Maria Vanda Marinho

Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Claudio Viegas Junior

Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Felipe Terra Martins
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Legna Andreina Colina Vegas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Carlos Doriguetto, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2023, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Vanda Marinho, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2023, às 20:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Viegas Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 06:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Terra Martins, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 08:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Legna Andreina Colina Vegas, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0957796** e o código CRC **1EA7A689**.

A minha mãe Maria Bernadete da Silva, tia Barbara Maria da Silva (em memória) e minha namorada Ana Flávia por todo amor, dedicação, apoio e incentivo diários ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus por minha vida e por suas bênçãos nesta jornada. A minha mãe Maria Bernadete da Silva e namorada Ana Flávia que me deram todo amor, carinho, incentivo, suporte e apoio nas situações mais difíceis para que eu pudesse chegar até aqui.! Amo vocês!! Assim como todos os familiares e amigos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, pela oportunidade, orientação, confiança, conhecimentos transmitidos ao longo desta jornada de cerca de 10 anos desde a graduação.

A minha coorientadora Dra. Marília Imaculada Frazão Barbosa por todos os ensinamentos na Química de coordenação do Rutênio. Obrigado pela paciência, apoio, amizade e por me ensinar a ser persistente nesse caminho da síntese Inorgânica. Aos colegas de grupo que tornaram a caminhada mais amena, dividindo preocupações e somando conquistas.

Aos amigos Júlia, Caio e Rafaela, que assim como eu iniciaram a pesquisa na Universidade Federal de Alfenas, obrigada pelos momentos ímpares que vivemos, eles estarão sempre em minha memória.

A todos os professores que participarão de cada etapa na minha formação acadêmica pela paciência, fé depositada e todos os conhecimentos transmitidos.

A profa. Dra. Marisa Ionta, Dr. Bruno Zavan e Dr. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva pela colaboração e realização dos ensaios para análise da atividade citotoxicidade dos complexos sintetizados.

À Dra. Angelica Ellen Graminha por toda assistência na implementação dos ensaios de interação com o DNA e albumina de soro humano na Unifal-MG.

Ao Prof. Dr. Javier Alcides Ellena e o Prof. Dr. João Honorato de Araujo-Neto pelas medidas de monocristais.

À secretaria e à Coordenação do PPGQ pelo suporte, apoio e atenção ao meu acompanhamento acadêmico.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilidade da bolsa ao longo desses anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese, caracterização e o estudo *in vitro* da atividade citotóxica de seis novos complexos fosfínicos de rutênio (II) contendo nicotinamida ou óxido nítrico e ligantes piridínicos, nas linhagens tumorais MCF-7, HepG2, A549, SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1 (adenocarcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de pulmão e melanoma, respectivamente). A série 1 é formada por três compostos de fórmula: [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆ (**C1**), [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF₆ (**C2**), e [RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ (**C3**) em que NIC = nicotinamida; dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano; 4,4'-Me-bipy = 4,4'-dimetil-2,2-bipiridina; 4,4'-Methoxy-bipy = 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina; 5,5'-Me-bipy = 5,5'-dimetil-2,2-bipiridina. A série 2 é constituída por três nitrosilo complexos com ligantes piridínicos de fórmula geral [RuCl₂(NO)(dppb)(L)] PF₆, onde L= piridina (Py) (**C4**), 4-metilpiridina (4Pic) (**C5**) e 4-vinilpiridina (4VPy) (**C6**). Os compostos foram caracterizados por: condutividade molar, análise elementar, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C{¹H} e ³¹P{¹H}, espectroscopias de absorção nas regiões do infravermelho (IR), ultravioleta e visível (UV-Vis), espectrometria de massas (série 1), voltametria cíclica, difração de raios X por policristal e monocristal para (**C1**) e (**C5**). Foi avaliada a estabilidade em solução dos complexos da série 1 em diferentes solventes, sendo estes, dimetilsulfóxido, metanol, etanol e diclorometano. Observou-se que o ligante nicotinamida coordenado sofre eliminação do grupo carbamato em função do solvente avaliado. Já para a série 2, foi observada a isomerização e posterior coordenação do solvente (DMSO), inviabilizando a investigação da viabilidade celular. Os ensaios *in vitro* demonstraram maior atividade citotóxica para **C3** (IC₅₀ = 18.06 ± 0.77 μM) em relação a cisplatina (IC₅₀ = 94,59 ± 3,95 μM) na linhagem de CHL-1 (melanoma). Além disso, o complexo (**C3**) inibiu a capacidade clonogênica e a progressão do ciclo celular das células CHL-1 na fase G₀/G₁ e induziu apoptose (morte celular programada) envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por fim, C3 demonstrou atuar como pró-fármaco gerando a espécie [RuCl(py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ nas condições avaliadas nos ensaios *in vitro*. Os complexos da série 1 demonstraram interação forte com DNA (K_b = 10⁶ L·mol⁻¹) e de fraca-moderada com albumina de soro humana (HSA).

Palavras-Chave: Rutênio; Nicotinamida; Óxido nítrico;

ABSTRACT

The present work describes the synthesis, characterization, and *in vitro* study of the cytotoxic activity of six new ruthenium (II) phosphine complexes containing nicotinamide or nitric oxide and pyridine ligands in tumor cell lines MCF-7, HepG2, A549, SK-MEL-147, WM1366, and CHL-1 (breast adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, lung adenocarcinoma, and melanoma, respectively). Series 1 consists of three compounds with the following formulae: [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆ (**C1**), [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Methoxy-bipy)]PF₆ (**C2**), and [RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ (**C3**), where NIC = nicotinamide; dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane; 4,4'-Me-bipy = 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine; 4,4'-Methoxy-bipy = 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine; 5,5'-Me-bipy = 5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine. Series 2 comprises three new nitrosyl complexes with pyridine ligands of the general formula [RuCl₂(NO)(dppb)(L)]PF₆, where L = pyridine (Py) (**C4**), 4-methylpyridine (4Pic) (**C5**), and 4-vinylpyridine (4VPy) (**C6**). The compounds were characterized by molar conductivity, elemental analysis, ¹H, ¹³C{¹H}, and ³¹P{¹H} nuclear magnetic resonance spectroscopy, absorption spectroscopy in the infrared (IR) and ultraviolet-visible (UV-Vis) regions, mass spectrometry (series 1), cyclic voltammetry, polycrystalline, and single-crystal X-ray diffraction for (**C1**) and (**C5**). The stability in solution of the series 1 complexes in different solvents, namely dimethyl sulfoxide, methanol, ethanol, and dichloromethane, was evaluated. It was observed that the coordinated nicotinamide linker undergoes elimination of a carbamate group depending on the solvent evaluated. As for series 2, isomerization and subsequent coordination of the solvent (DMSO) were observed. The *in vitro* assays showed greater cytotoxic activity for **C3** (IC₅₀ = 18.06 ± 0.77 μM) compared to cisplatin (IC₅₀ = 94.59 ± 3.95 μM) in the CHL-1 (melanoma) cell line. Furthermore, complex **C3** inhibited the clonogenic ability and cell cycle progression of CHL-1 cells in the G₀/G₁ phase and induced apoptosis (programmed cell death) involving the production of reactive oxygen species (ROS). Finally, **C3** demonstrated to act as a prodrug, generating the species [RuCl(Py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ under the conditions evaluated in the *in vitro* assays. The series 1 complexes demonstrated strong interaction with DNA (K_b = 10⁶ L·mol⁻¹) and weak to moderate interaction with human serum albumin (HSA).

Keywords: Ruthenium; Nicotinamide; Nitric oxide;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas: dos constituintes da “Arsfenamina” [mistura de 3 amino-4-hidroxifenil-arsênio(III)] (a), Cisplatina(b), Carboplatina (c), Oxaliplatina (d) e Nedaplatina (e).....	30
Figura 2 - Classificação Nacional do Câncer como Causa de Morte em idades inferiores a 70 Anos em 2019.. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda.	35
Figura 3 - Gráficos de pizza com a distribuição de casos e taxa de mortalidade dos cânceres mais comuns no mundo em 2020, para ambos os sexos.	35
Figura 4 – O processo de angiogênese - início da angiogênese [1] liberação de fatores angiogênicos [2] quebra da matriz extracelular permitindo o surgimento de novos vasos sanguíneos [3] e estabelecimento de suprimento de sangue para o tumor [4].....	37
Figura 5 – Progressão desde a formação do tumor primário até o estabelecimento do tumor metastático.	38
Figura 6 - Estruturas de alguns agentes quimioterápicos de acordo com o modo de ação com o DNA.	41
Figura 7 – Estruturas dos complexos	43
Figura 8 – Representação estrutural do complexo TLD-1433	44
Figura 9 – Representação estrutural dos complexos de rutênio (II): piano stool (A), RAPTA-C, RAPTA-T e RAPTA-B.	45
Figura 10 – Representação estrutural dos complexos de rutênio (II) desenvolvidos pelo grupo de pesquisa com maiores atividades citotóxicas, onde (a) [RuCl(MTNZ)(dppb)(bipy)]PF ₆ , (b) [Ru(cin)(dppb)(bipy)]PF ₆ , (c) trans-[Ru (lap)(PPh ₃) ₂ (phen)]PF ₆ e (d) [RuCl(py)(dppb)(4-bipy)]PF ₆	45
Figura 11 – Principais alvos de complexos de rutênio (II) em células	47
Figura 12 – Representação esquemática dos possíveis modos de interação complexo-DNA.	48
Figura 13 – Representação estrutural do [Ru(bpy)(phpy)(dppz)] ⁺	48
Figura 14 – Estrutura cristalina da albumina sérica humana (HSA).....	51
Figura 15 – Mecanismo de ação para complexos de rutênio (II)	53
Figura 16 – Representação estrutural da nicotinamida em (a) e do ácido nicotínico em (b).	54

Figura 17 – Metabolismo geral da nicotinamida (NAm) e ácido nicotínico (NA)	56
Figura 18 – Representação estrutural proposta dos primeiros complexos com nicotinamida, onde M= Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II) e Cu(II).	58
Figura 19 – Representação estrutural dos complexos de cobre, [Cu(tolf-O)(tolf-O,O')(nia-N) ₂ (EtOH)] (a) e [Cu(meclf-O)(meclf-O,O')(nia-N) ₂ (EtOH)] (b), onde tolf= ácido tolfenâmico, nia= nicotinamida e meclf= ácido meclufenâmico.	59
Figura 20 – Representação estrutural dos complexos de rutênio com nicotinamida. ..	60
Figura 21 – Ligação da piridina com metais.	61
Figura 22 – Representação estrutural de sistemas polipiridínicos.	62
Figura 23 – Diagrama do orbital molecular para o óxido nítrico (NO).	64
Figura 24 – Exemplos de reações radiculares que podem ocorrer no organismo	65
Figura 25 – Esquema da síntese endógena do NO.	65
Figura 26 – Possível mecanismo de ativação da enzima guanilato ciclase pelo NO (A) e Conversão de GTP em cGMP após ativação	67
Figura 27 – Mecanismo de ação do nitroprussiato de sódio relacionado com a vasodilatação.	68
Figura 28 – Representação estrutural dos compostos sintetizados por GOLFETO e colaboradores.....	69
Figura 29 – Sistema de secagem de gás argônio.	70
Figura 30 – Sistema gerador de óxido nítrico empregado.	71
Figura 31 – Sistema de geração de gás cloro.	72
Figura 32 – Representação estrutural dos ligantes fosfínicos (a), ligantes bipyridínicos, piridínicos (b) e nicotinamida (c).	73
Figura 33 – Representação esquemática do método de lenta evaporação de solvente.	85
Figura 34 – Monocristais formados para C1 por evaporação lenta de solvente.	85
Figura 35 – Complexos sintetizados: (A) série 1 e (B) série 2.	92
Figura 36 – Isômeros geométricos para os complexos precursores empregados de fórmula [RuCl ₂ (dppb)(N-N)], sendo a forma <i>cis</i> (A) e <i>trans</i> em (B).....	93
Figura 37 – Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O dos complexos precursores: e <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(5,5'-Me-bipy)] (a), <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Me-bipy)] (b) e <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)] (c).....	94

Figura 38 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ dos complexos da série 1	95
Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de NIC em CDCl_3	96
Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H do complexo C1 , em CDCl_3	97
Figura 41 – Representação estrutural dos complexos <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})\text{I}][\text{PF}_6]$ e <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})_2][\text{PF}_6]_2$	98
Figura 42 – Representação estrutural do complexo $[\text{Mg}(\text{NIC})(\text{Cl})_2(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ demonstrando a interação intramolecular existente em solução.	98
Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H de NIC em CDCl_3	99
Figura 44 – RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ comparativo entre o ligante NIC livre (preto), do complexo precursor <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$ (azul) e do complexo C1 (vermelho).....	101
Figura 45 – Curvas TG e DTA do ligante NIC	104
Figura 46 – Curvas TG dos complexos da série 1	105
Figura 47 – Curvas TG e DTA de C1	105
Figura 48 – Curvas TG e DTA de C2	106
Figura 49 – Curvas TG e DTA de C3	107
Figura 50 – Difratoogramas experimentais dos resíduos obtidos para C1-C3 após análise de TG/DTA e difratograma calculado para RuO_2	109
Figura 51 – Espectro de FTIR do complexos precursores <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (a), <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxi-bipy})]\text{PF}_6$ (b) e <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (c).....	110
Figura 52 – Espectro de FTIR do NIC livre	113
Figura 53 – Espectros de FTIR do NIC livre (em preto), C1 (em vermelho) e do precursor <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$	115
Figura 54 – Espectros de FTIR do NIC livre (em preto), C2 (em vermelho) e do precursor <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxi-bipy})]$	116
Figura 55 – Espectros de FTIR do NIC livre (em preto), C3 (em vermelho) e do precursor <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]$	117
Figura 56 – Diferenciação energética dos orbitais d na presença de ligantes.	119
Figura 57 – Espectro de UV-vis do ligante NIC livre, em CH_2Cl_2 $4.68 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$	120
Figura 58 – Espectro de UV-vis do precursor <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxi-bipy})]$, em CH_2Cl_2 $6.28 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$	121

Figura 59 – Espectro de UV-vis do C2 , em CH ₂ Cl ₂ 4.73x10 ⁻⁵ mol x L ⁻¹	122
Figura 60 – Espectro comparativo de UV-Vis para os complexos obtidos e seus precursores, em CH ₂ Cl ₂	123
Figura 61 – Representação estrutural com marcação parcial dos átomos mostrando a unidade assimétrica do complexo C1 , com poliedro demonstrando geometria octaédrica ao redor do Ru(II). O ânion hexafluorofosfato foi omitido para maior clareza.	126
Figura 62 – Empacotamento da estrutura de C1 projetada em seu plano ac destacando a solução sólida formada por C1 (em laranja) e [RuCl(Py)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF ₆ (em azul claro).....	128
Figura 63 – Voltamogramas cíclicos dos complexos: a) C1 , b) C2 , c) C3 , eletrólito PTBA 0,1 mol·L ⁻¹ em C ₂ H ₃ N vs Ag/AgCl, velocidade de varredura 100 mV·s ⁻¹	130
Figura 64 – Espectro de massas de C3 , empregando um espectrômetro MALDI-TOF-MS (tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz).	131
Figura 65 – Espectro de RMN de ³¹ P{ ¹ H} de C3 em DMSO no tempo de 0h após solubilizado.	132
Figura 66 – Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} de C3 nos tempos de 0, 24 e 48h, em DMSO.	133
Figura 67 – Estabilidade do complexo C3 , nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, em CH ₂ Cl ₂	134
Figura 68 – Estabilidade do complexo C3 , nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, em CH ₃ OH.	135
Figura 69 – Estabilidade do complexo C3 , nos tempos de 0, 24, 48 e 72horas, em CH ₂ CH ₃ OH.	136
Figura 70 – Estabilidade do complexo (a) C3 , em DMSO (800 µL) + DEMEM (300 µL) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas e (b) [RuCl(Py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆ em DMSO (800 µL) + DEMEM (300 µL) após solubilização.	137
Figura 71 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio da sulforrodamina B (SRB), em (A) as células foram tratadas com complexos (C1-C3) a 40 µM, precursores a 100 µM e ligantes (NIC) a 100 µM por 48 h. (B) Curvas dose-resposta exibindo os efeitos do complexo C3	140

Figura 72 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de exclusão do azul de tripano em CHL-1 tratadas com C3 nas concentrações de 10 ou 20 μM por 24 e 48 horas (A); Imagens das culturas de CHL-1 obtidas por microscopia de contraste de fase após 24 e 48 h de tratamento. (B); Efeitos de C3 sobre a cinética de progressão do ciclo celular de culturas de CHL-1 após 24 h de tratamento nas concentrações de 10 e 20 μM (C);Imagens ilustrativas	143
Figura 73 – (A) Células CHL-1 foram tratadas com (C3) a 10 ou 20 μM , e as frequências de células inviáveis foram determinadas pelo ensaio de exclusão de azul de tripano em 0, 24 e 48 h; (B) Imagens representativas das culturas de CHL-1 obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as características morfológicas das células após 48 h de tratamento com C3 a 20 μM ; (C) gráficos de pontos representativos dos ensaios de Anexina V/7-AAD e análises de apoptose realizadas após 48 h de tratamento.	145
Figura 74 – Medidas dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) de culturas de células CHL-1 tratadas com C3 para 0,5 (A e B), 2 (C e D) ou 4 h (E e F). DMSO (0,1% v/v) foi usado como controle negativo. As linhas sólidas no histograma representativo correspondem aos grupos DMSO (preto), C3 a 10 μM (azul) e composto C3 a 20 μM (verde).....	147
Figura 75 – Curvas dose-resposta exibindo os efeitos citotóxicos de C3 (linha preta) e $[\text{RuCl}(\text{py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (linha vermelha) em linhagens tumorais de CHL-1 após 48 horas.....	148
Figura 76 – Espectros de UV-vis de titulações espectroscópicas do complexo C3 $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $[\text{ct-DNA}] = 0,6,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Em preto representa o espectro do complexo na ausência de DNA	149
Figura 77 – Representação estrutural dos aminoácidos aromáticos encontrados na HSA	151
Figura 78 – (A) Espectros de UV-vis de HSA (em preto) e diferentes concentrações do complexo C3 ;(B) espectros de emissão de fluorescência brutos de HSA (em preto) com quantidades crescentes de complexo C3 mostrando as diferenças após a correção de filtro.....	152
Figura 79 – Espectro de emissão da HSA com concentrações crescentes do complexo C3 em (A) na temperatura de 298 K e (B) em 310 K	153

Figura 80 – Gráfico de Stern-Volmer de F_0/F vs $[Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações de C3	154
Figura 81 – Gráficos de $\log (F_0 - F)/F$ vs $\log [Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações de C3	155
Figura 82 – Representação estrutural dos isômeros	158
Figura 83 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ dos complexos precursores: <i>mer</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$ em (A) e <i>fac</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$ em (B).....	158
Figura 84 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ dos complexos da série 2.....	160
Figura 85 – Espectro de FTIR do complexo precursor <i>mer</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$	162
Figura 86 – Possíveis geometrias de ligação do NO coordenado ao metal.....	163
Figura 87 – Espectro de FTIR dos ligantes piridínicos livres empregados.....	164
Figura 88 – Espectros de FTIR de C5 (em preto), 4Pic (em vermelho) e precursor <i>mer</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$ (em azul) realizados em pastilhas de KBr.....	166
Figura 89 – Representação estrutural com marcação parcial átomos mostrando a unidade assimétrica do complexo C5 , com poliedro demonstrando geometria octaédrica ao redor do Ru(II).	168
Figura 90 – Difratoformas experimental e simulado de C5	171
Figura 91 – Difratoformas experimentais dos complexos C4 , C6 e precursor <i>mer</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$	172
Figura 92 – Sobreposição dos difratogramas experimental de C6 e simulado de C5 , mostrando a diferença entre os 2 perfis.....	173
Figura 93 – Espectro de UV-vis do precursor <i>mer</i> - $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$, em CH_2Cl_2 $3.43 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$	174
Figura 94 – Espectro comparativo de UV-Vis para os complexos obtidos e ligantes livres, em CH_2Cl_2	175
Figura 95 – Voltamograma cíclico do complexo C4 , eletrólito PTBA $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em CH_3CN vs Ag/AgCl, velocidade de varredura $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$	178
Figura 96 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de C4 após 0, 15, 60, 240 min, 24 e 48 h de solubilização em DMSO.....	179
Figura 97 – Estrutura proposta após à coordenação do DMSO à C4	179
Figura 98 – Estrutura proposta após a isomerização do ligante piridínico.	180

Figura 99– Espectros de RMN de $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ de C4 com adição de Py após 0, 15, 60, 240 min, 24 e 48 h em CH_2Cl_2	181
Figura 100 – Estruturas propostas após à coordenação da piridina à C4	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Complexos fosfínicos de rutênio com ligantes piridínicos, polipiridínicos e suas atividades como antitumorais após 48h de tratamento das linhagens celulares.	46
Tabela 2 - Deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (Hz) da série 1.	96
Tabela 3 - Deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (Hz) RMN ¹ H para NIC e série 1.	99
Tabela 4 - Deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de RMN de ¹³ C{ ¹ H} para o ligante NIC livre e complexos da série 1	102
Tabela 5 - Dados de análise elementar e condutividade molar para os complexos da série 1.	102
Tabela 6 - Dados das análises térmicas do complexo C1 e atribuições dos possíveis fragmentos decompostos.	106
Tabela 7 - Dados das análises térmicas do complexo C2 e atribuições dos possíveis fragmentos decompostos.	107
Tabela 8 - Dados das análises térmicas do complexo C3 e atribuições dos possíveis fragmentos decompostos.	108
Tabela 9 - Principais bandas e atribuições dos espectros de IV dos precursores <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF ₆ , <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF ₆ e <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆	112
Tabela 10 - Principais bandas e atribuições dos espectros de IV de NIC livre e complexos C1 , C2 e C3	118
Tabela 11 - Coeficientes de absorvidade molar e atribuições dos precursores, NIC e complexos C1-C3	124
Tabela 12 - Valores de pKa das biperidinas e o comprimento de onda atribuído à transição de transferência de carga metal ligante dos complexos sintetizados.	125
Tabela 13 - Principais dados cristalográficos do complexo C1	127
Tabela 14 - Ângulos de ligação selecionados (°) para C1	128
Tabela 15 - Processos eletrônicos para os complexos C1-C3 e o pKa dos ligantes biperidínicos empregados, experimentos realizados em C ₂ H ₃ N empregando 0.10 mol.L ⁻¹ de Bu ₄ N ⁺ ClO ₄ ⁻ e utilizando como eletrodo de	

referência Ag/AgCl e os eletrodos de trabalho e auxiliar, ambos de platina.	130
Tabela 16 - Valores de $-IC_{50}$ (μM) determinados por ensaio colorimétrico após tratamento por 48 h com C3 ou cisplatina.	141
Tabela 17 - Constantes de ligação (K_b) e porcentagens de hipocromismo (%H) dos complexos C1–C3 no comprimento de onda de 405 nm.	150
Tabela 18 - Valores de constante de Stern–Volmer (K_{sv} , $L.mol^{-1}$), constante de taxa de extinção biomolecular (K_q , $L.mol^{-1}.s^{-1}$), constante de ligação (K_b , M^{-1}), número de sítios de ligação (n), energia livre de Gibbs ΔG^0 ($KJ.mol^{-1}$), entalpia ΔH^0 ($KJ.mol^{-1}$) e entropia ΔS^0 ($J.mol^{-1}.K$) para a interação complexos (C1-C3).	157
Tabela 19 - Deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (Hz) para os precursores e complexos da série 2.	161
Tabela 20 - Dados de análise elementar e condutividade molar para os complexos da série 2.	161
Tabela 21 - Tentativa de atribuição das principais bandas dos espectros de IV de <i>mer</i> - $[RuCl_3(NO)(dppb)]$ e ligantes Py, 4Pic, 4VPy.	167
Tabela 22 - Principais dados cristalográficos do complexo C5	169
Tabela 23 - Principais dados cristalográficos do complexo C5	170
Tabela 24 - Absortividade molar e tentativas de atribuições dos ligantes, precursor e complexos da série 2.	176

LISTA DE ABREVIATURAS

1-im	1-metil-imidazol
4,4'-Me-bipy	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
4,4'-Metoxy-bipy	4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina
5,5'-Me-bipy	5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina
4Pic	4 picolina (4metilpiridina)
4VPy	4-vinilpiridina
Bipy	2,2'-bipiridina
Cin	Ácido 3,4-(metilenodioxo)cinâmico
CIM	Cimetidina
ct-DNA	DNA de timo de carneiro " <i>Calf Thymus DNA</i> "
Lap	Lapachol
Mer	Isômero meridional
NIC ou Nic	Nicotinamida (3-piridina carboxamida)
Nif	Nifedipino (2,6-dimetil-4-(2-nitrosfenil)piridina-3,5-dicarboxilato)
Pipe	Ácido piperonílico
Py	Piridina
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ³¹P{¹H}	Ressonância magnética nuclear de fósforo desacoplado do hidrogênio

LISTA DE SIGLAS

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DP	Desvio padrão
Dppb	1,4-bis(difenilfosfina)butano
Dppm	1,1'-bis(difenilfosfina)metano
DRXM	Difração de raios X por monocristal
DRXP	Difração de raios X por policristal
DTA	Análise térmica diferencial
EM	Espectrometria de massas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fac	Isômero facial
GCO	Global Cancer Observatory
HSA	Human serum albumin (Albumina de soro humano)
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
IC₅₀	Concentração Inibitória média para 50% do alvo
IL	Intraligante
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
K_b	Constante de ligação intrínseca
MTNZ	Metroimidazol
N-N	Ligantes N,N-heterocíclicos
NO	óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPh₃	Trifenilfosfina
PTBA	Perclorato de tetrabutylamônio
Ru^{II} ou Ru(II)	Rutênio com estado de oxidação II
TCIL	Transferência de carga intraligante
TCLM	Transição de carga ligante-metal
TCML	Transição de carga metal-ligante

TGA	Análise termogravimétrica
UV-vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível
VC	Voltametria cíclica
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
HepG2	Carcinoma hepatocelular
A549	Adenocarcinoma de pulmão
SK-MEL-147	Linhagem derivada de câncer de melanoma
WM1366	Linhagem derivada de câncer de melanoma
CHL-1	Linhagem derivada de câncer de melanoma

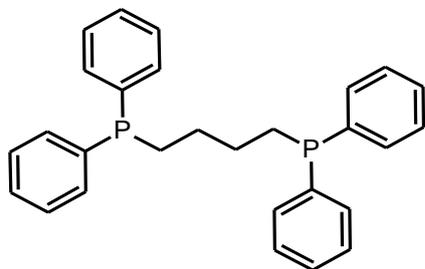
LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro (1×10^{-6})
ν	Estiramento ou deformação axial
δ	Deformação angular no plano nos espectros de IV Deslocamento químico nos espectros de RMN
γ	Deformação angular fora do plano
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
nm	Nanômetros
π	Ligação pi
σ	Ligação sigma
J	Constante de acoplamento
E_{pc}	Potencial de pico catódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
Hz	Hertz
s	Singleto
d	Dubleto
m	Multiplato
M	Molaridade ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

LISTA DE ESTRUTURAS - LIGANTES

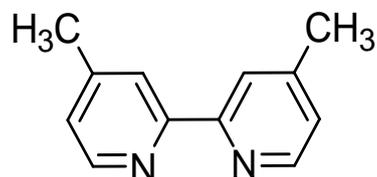
1,4-bis(difenilfosfina)butano

(**dppb**)



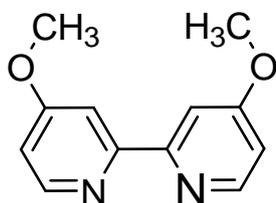
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina

(**4,4'-Me-bipy**)



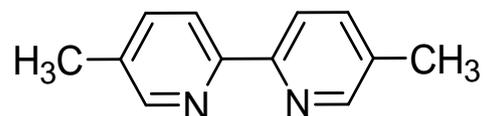
4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina

(**4,4'-Metoxi-bipy**)



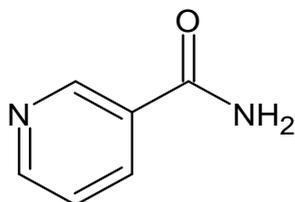
5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina

(**5,5'-Me-bipy**)



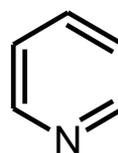
Nicotinamida

(**NIC**)



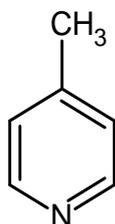
Piridina

(**Py**)



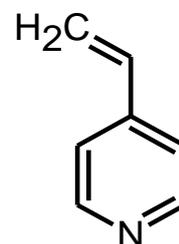
4-metilpiridina

(**4Pic**)



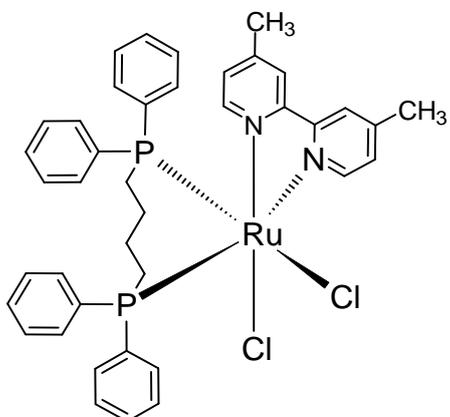
4-vinilpiridina

(**4VPy**)

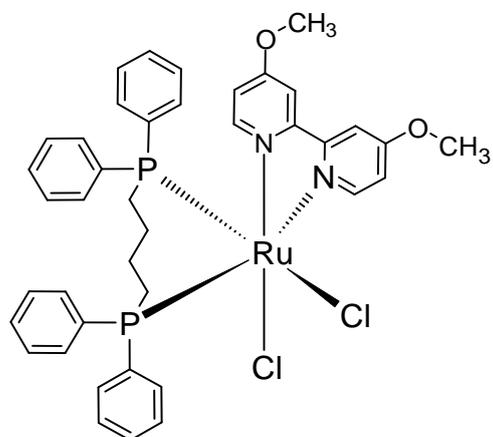


PRECURSORES

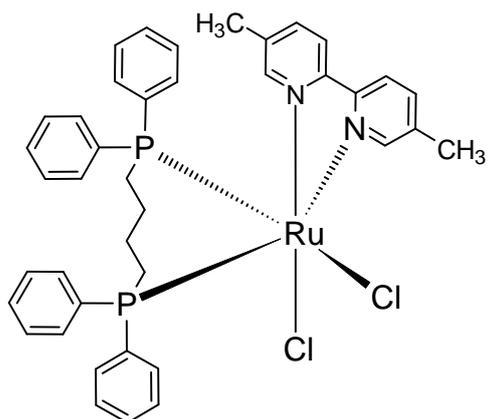
cis-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)]



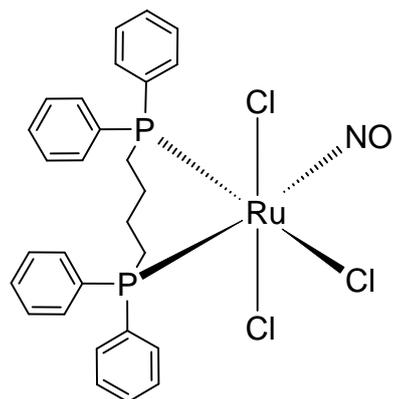
cis-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]



cis-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)]

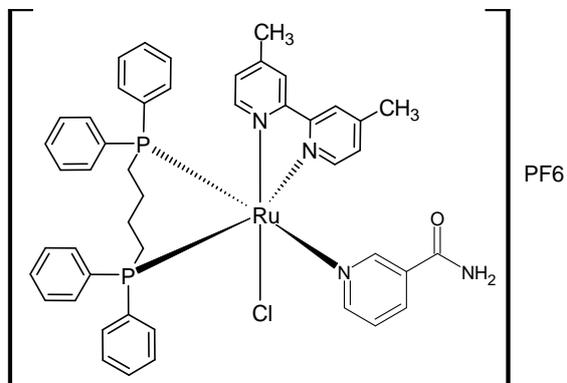


mer-[RuCl₃(NO)(dppb)]

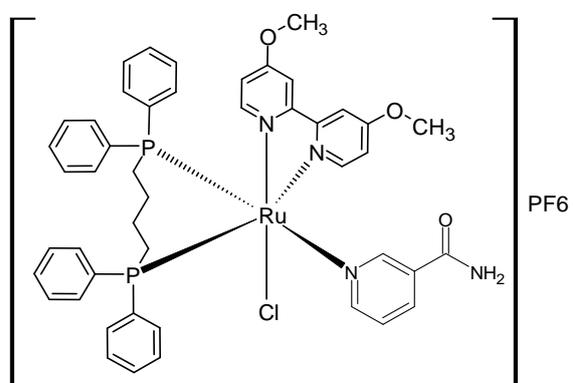


COMPLEXOS SINTETIZADOS

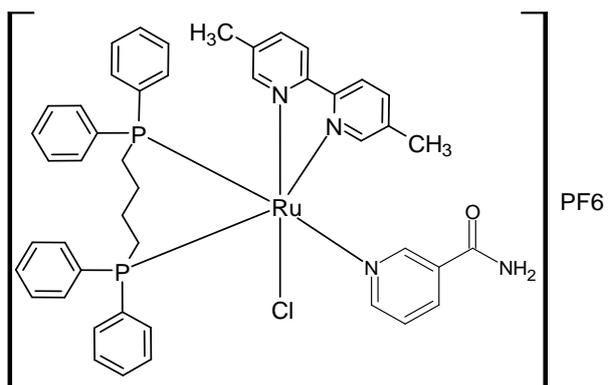
(C1)



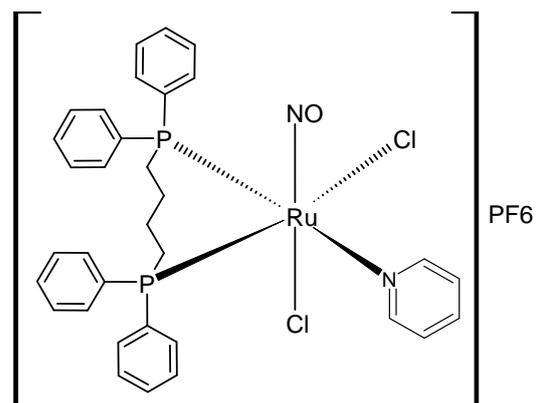
(C2)



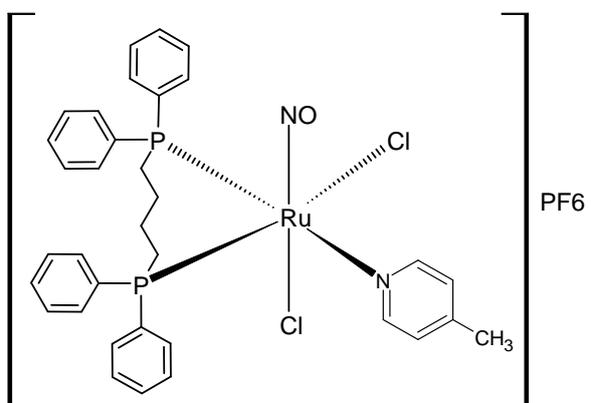
(C3)



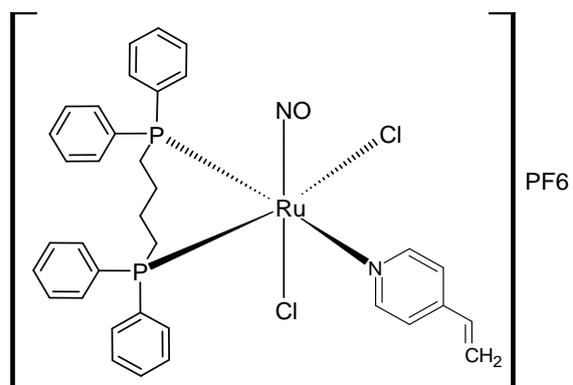
(C4)



(C5)



(C6)



SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	OBJETIVOS.....	32
1.1.1	Objetivos específicos.....	32
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1	CÂNCER: DEFINIÇÃO, CAUSAS E PRINCIPAIS TRATAMENTOS	34
2.2	COMPLEXOS DE RUTÊNIO COMO ANTITUMORAIS.....	41
2.3	PRINCIPAIS ALVOS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO	46
2.4	NICOTINAMIDA: PEQUENA MOLÉCULA E VASTA APLICAÇÃO	54
2.5	LIGANTES PIRIDÍNICOS E FOSFÍNICOS	61
2.6	ÓXIDO NÍTRICO E COMPLEXOS NITROSILA	63
3	MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO	70
3.1	SOLVENTES	70
3.2	OBTENÇÃO DA ATMOSFERA INERTE DE ARGÔNIO	70
3.3	OBTENÇÃO DO GÁS ÓXIDO NÍTRICO	71
3.4	OBTENÇÃO DO GÁS CLORO	71
3.5	REAGENTES E LIGANTES	72
3.6	INSTRUMENTAÇÃO	73
3.6.1	Análise Elementar	73
3.6.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	74
3.6.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	74
3.6.4	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis).....	74
3.6.5	Condutividade Molar	75
3.6.6	Difração de raios X por monocristal (DRXM).....	75
3.6.7	Difração de raios X por policristal (DRXP)	76
3.6.8	Espectrometria de massas (EM).....	76
3.6.9	Voltametria cíclica (VC)	77
3.6.10	Análises Térmicas (TG e DTA)	77
4	METODOLOGIAS	78
4.1	SÍNTESE DOS COMPLEXOS PRECURSORES	78
4.1.1	Dicloro-tris(trifenilfosfina)rutênio(II), [RuCl ₂ (PPh ₃) ₃].....	78
4.1.2	μ-[1,4-bis(difenilfosfina)butano]-bis-dicloro-[1,4-bis(difenilfosfina)butano]dirutênio(II), [Ru ₂ Cl ₄ (μ-dppb) ₃]	78

4.1.3	<i>cis</i> -dicloro[1,4-bis(difenilfosfina)butano]-(N-N)rutênio(II), <i>cis</i> - [RuCl ₂ (dppb)(N-N)], onde N-N = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (4,4'-Me- bipy), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (4,4'-Methoxy-bipy) e 5,5'-dimetil-2,2'- bipiridina (5,5'-Me-bipy)	78
4.1.4	Tricloro[1,4-bis(difenilfosfina)butano](aqua)rutênio (III), <i>mer</i> - [RuCl ₃ (dppb)(H ₂ O)]	80
4.1.5	<i>mer</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppb)]	80
4.1.6	<i>fac</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppb)]	80
4.2	SÍNTESE DOS NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II)	81
4.2.1	Síntese dos complexos [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF ₆ (C1), [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Methoxy-bipy)]PF ₆ (C2) e [RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆ (C3)	81
4.2.2	Síntese dos nitrosilo complexos de rutênio (II) contendo ligantes piridínicos de fórmula <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NO)(dppb)(L)]PF ₆ , onde L= Piridina (Py) (C4), 4-metilpiridina (4Pic) (C5) e 4-vinilpiridina (4VPy) (C6).	82
4.2.3	Síntese do complexo de fórmula [RuCl(Py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆ , onde Py= piridina, dppb= 1,4-bis(difenilfosfina)butano e 5,5'-Me-bipy= 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina.....	83
4.3	ESTUDOS DE ESTABILIDADE	84
4.4	CRESCIMENTO DE CRISTAIS	84
4.5	ESTUDO DA INTERAÇÃO COM DNA POR TITULAÇÃO ESPECTROSCÓPICA	85
4.6	ESTUDO DA INTERAÇÃO COM ALBUMINA DE SORO HUMANA (HSA) POR FLUORIMETRIA	86
4.7	ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	87
4.7.1	Linhagens celulares e condições de cultivo	87
4.7.2	Viabilidade celular.....	88
4.7.3	Teste de exclusão azul Trypan.....	89
4.7.4	Análise da progressão do ciclo celular.....	89
4.7.5	Ensaio da capacidade clonogênica	89
4.7.6	Detecção de apoptose por ensaio de Anexina V/7-AAD.....	90
4.7.7	Medidas dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	90
4.7.8	Análise Estatística.....	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1	SÉRIE 1	93
5.1.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ³¹ P{ ¹ H}	93
5.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H	96
5.1.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³ C{ ¹ H}.....	99

5.1.4	Análise elementar e condutividade molar	102
5.1.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	109
5.1.6	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis).....	119
5.1.7	Difração de raios X por monocristal (DRXM).....	125
5.1.8	Voltametria cíclica.....	129
5.1.9	Espectrometria de massas (EM).....	131
5.1.10	Estudo de estabilidade em solução dos complexos da série 1	132
5.1.11	Estudo da atividade citotóxica dos complexos da série 1	138
5.1.12	Estudo de interação dos complexos com DNA.....	148
5.1.13	Estudo de interação dos complexos com HSA	151
5.2	SÉRIE 2	157
5.2.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	157
5.2.2	Condutividade molar e análise elementar	161
5.2.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	162
5.2.4	Difração de raios X por monocristal (DRXM).....	168
5.2.5	Difração de raios X por policristal (DRXP)	171
5.2.6	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)....	173
5.2.7	Voltametria cíclica.....	176
5.2.8	Estudo de estabilidade em solução dos complexos da série 2	178
6.0	CONCLUSÕES.....	183
	<u>REFERÊNCIAS</u>	185
	<u>ANEXO A - MATERIAL SUPLEMENTAR</u>	201

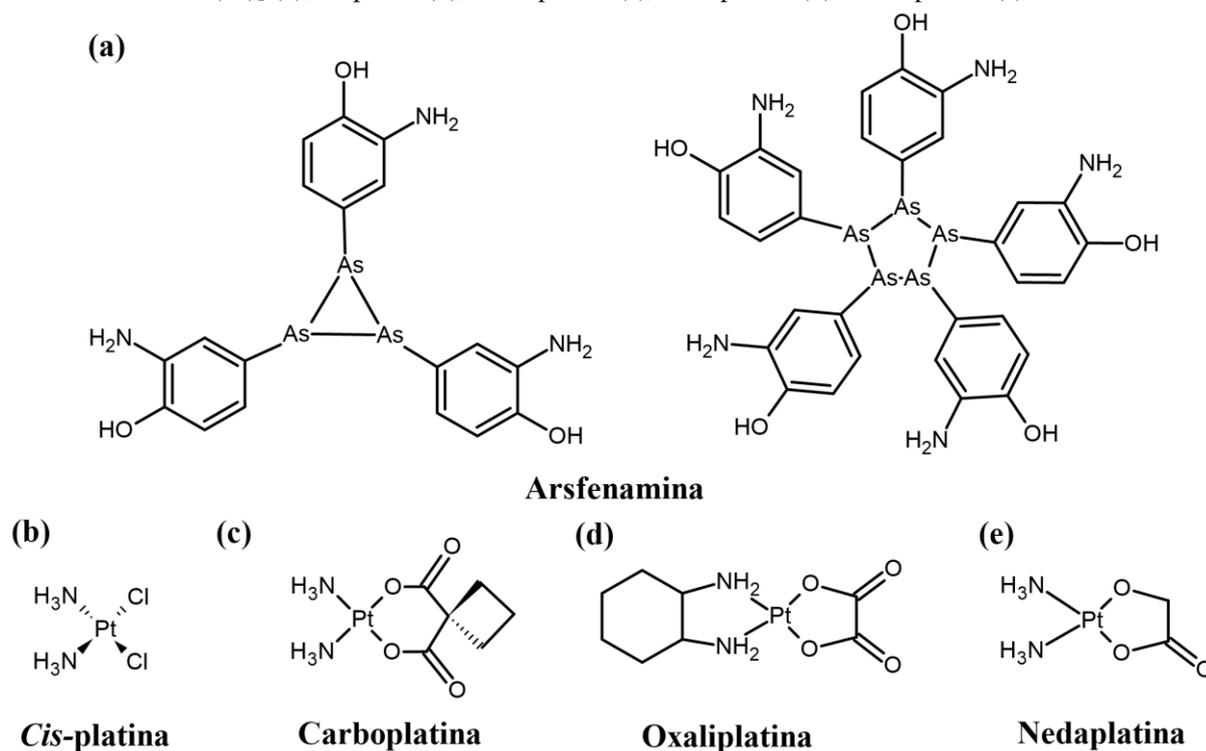
1 INTRODUÇÃO

O emprego de compostos metálicos com fins terapêuticos data desde à antiguidade, onde diferentes civilizações como egípcios, chineses, indianos e assírios utilizavam sais de cobre, zinco e ouro para esterilização da água, como antisséptico e no tratamento de inflamações, respectivamente (YOUSUF *et al.*, 2021). Ademais, compostos organometálicos à base arsênio (Figura 1a) eram utilizados no tratamento da sífilis e outras doenças infecciosas (YOUSUF *et al.*, 2021).

Entretanto o grande marco para o desenvolvimento desta área foi quando Barnett Rosenberg em 1965, observou o efeito do campo elétrico na divisão celular de bactérias de *Escherichia coli* empregando fios de platina em um béquer contendo tampão de cloreto de amônio/hidróxido de amônio. Este, percebeu acidentalmente a formação de um composto de platina (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]) capaz de interromper o processo de divisão celular (RAJAPAKSE; DUNUWEERA, 2017). Ensaios posteriores mostraram que o *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (Figura 1b) apresentou atividade citotóxica promissora em cânceres de bexiga, cabeça, pescoço, pulmão, testículos, cervical e ovário (POURMADADI *et al.*, 2022), se tornando o primeiro fármaco antitumoral baseado em complexos de coordenação de platina (RAJAPAKSE; DUNUWEERA, 2017).

Esta descoberta promoveu o desenvolvimento de novos complexos à base de metais com potenciais aplicações medicinais, a fim de amenizar os efeitos colaterais observados para o fármaco *cis*-platina, sendo estes, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, alopecia e baixa seletividade (POURMADADI *et al.*, 2022). Alguns obtiveram aprovação para uso clínico (FDA- Food and Drug Administration) e são empregados até hoje como por exemplo, a carboplatina (Figura 1 c), oxaliplatina (Figura 1 d) e nedaplatina (Figura 1 e) (MEDINA-FRANCO *et al.*, 2022).

Figura 1 - Estruturas químicas: dos constituintes da “Arsfenamina” [mistura de 3 amino-4-hidroxifenil-arsênio(III)] (a), Cisplatina(b), Carboplatina (c), Oxaliplatina (d) e Nedaplatina (e).



Fonte: do Autor

Desde então a Química Inorgânica Medicinal vem se desenvolvendo e atualmente sabe-se que, além dos complexos de platina, uma vasta biblioteca de complexos metálicos envolvendo outros metais como paládio, ouro e, principalmente, o rutênio tem se destacado com atividades promissoras não somente antitumorais, mas também anti-inflamatórias, antibacterianas, antirreumática, antimalárica e anti-leishmania (MEDICI *et al.*, 2015). (THOTA *et al.*, 2018).

Com relação a atividade antitumoral, (CANDIDO *et al.*, 2022; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017b; MONDELLI *et al.*, 2014; NEGRETI *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2018; THOTA *et al.*, 2018; LIANG *et al.*, 2017; PAPROCKA *et al.*, 2022). reportaram complexos de rutênio mais eficazes, menos tóxicos e mais seletivos contra vários tipos de tumores, quando avaliados *in vitro* e *in vivo* em relação à cisplatina. Ademais, o rutênio apresenta algumas vantagens em relação à platina, sendo estas, a variação nos estados de oxidação, isomeria, ligantes e geometria de coordenação que influenciam diretamente na atuação em sistemas biológicos (MJOS; ORVIG, 2014; KUMAR *et al.*, 2020).

Na literatura, complexos piridínicos e polipiridínicos vem sendo estudados há décadas, apresentando diversas aplicações como fotossensibilizadores, catalisadores e aplicações

biológicas (BRABEC; KASPARKOVA, 2018; GHOSH *et al.*, 2018; MONDELLI *et al.*, 2014). Como exemplo, os complexos piridínicos *ct*-[RuCl(py)(dppb)(4,4'-Mebipy)]PF₆ e [Ru(C-N)(N-N)₂][PF₆] onde dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano, 4,4'-Me-bipy = 4,4'-dimetil-2,2-bipiridina, py = piridina, N-N = 1,10-fenantrolina e C-N = 2-fenilpiridina, apresentaram elevada citotoxicidade em linhagens MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama/IC₅₀ = 9.18 ± 0.30) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama/IC₅₀ = 0.47±0.02) respectivamente (NOVOHRADSKY *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Neste contexto, a nicotinamida (NIC), uma amida do ácido nicotínico, utilizada no tratamento de dermatoses crônicas, dermatite e câncer de pele foi escolhida para o desenvolvimento deste trabalho. Ademais, após ingerida pode ser rapidamente convertida em nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), participando de várias vias metabólicas, como por exemplo, auxiliando no mecanismo de reparo do DNA (BUQUÉ *et al.*, 2020; CAMPAGNA *et al.*, 2021). Testes clínicos preliminares indicaram que a ingestão oral de nicotinamida pode ajudar a prevenir o câncer de pele (BUQUÉ *et al.*, 2020).

Além da nicotinamida, neste trabalho foi empregado o óxido nítrico (NO), que é produzido endogenamente e está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo, controle da pressão arterial, vasodilatação e neurotransmissão. Devido à tais propriedades, tem sido alvo de pesquisas que mostram que este ligante apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e antitumoral (HEINRICH *et al.*, 2011a; SASAHARA *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2022). Um dos mecanismos de ação do óxido nítrico é pautado na indução de estresse oxidativo em células, levando a danos no DNA, que por sua vez regula o supressor tumoral p53 levando à parada do ciclo celular e, conseqüentemente, a apoptose (HEINRICH *et al.*, 2011a; SASAHARA *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2022).

Diante do exposto, o presente trabalho foi fundamentado na síntese, caracterização e estudo *in vitro* da atividade citotóxica de seis novos complexos fosfínicos de rutênio (II) de fórmula [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆ (C1), [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF₆ (C2), [RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ (C3), [RuCl₂(NO)(dppb)(Py)]PF₆ (C4), [RuCl₂(NO)(dppb)(4Pic)]PF₆ (C5) e [RuCl₂(NO)(dppb)(4VPy)]PF₆ (C6), onde NIC = nicotinamida; dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano; 4,4'-Me-bipy = 4,4'-dimetil-2,2-bipiridina; 4,4'-Methoxy-bipy = 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina; 5,5'-Me-bipy = 5,5'-dimetil-2,2-bipiridina, Py = piridina; 4Pic = 4-metilpiridina e 4VPy = 4-vinilpiridina. Avaliados frente à linhagens tumorais MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (adenocarcinoma de pulmão), SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1 (melanoma).

1.1 OBJETIVOS

Síntese, caracterização e investigação da atividade citotóxica de complexos de rutênio (II) contendo nicotinamida ou óxido nítrico, ligantes piridínicos e fosfínicos e avaliação da atividade antitumoral nas linhagens (MCF-7), (HepG2), (A549), (SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1) e vislumbrando a identificação de novos protótipos candidatos a fármacos que representem melhores condições terapêuticas como menor toxicidade e maior seletividade.

1.1.1 Objetivos específicos

Considerando tal escopo, os objetivos específicos são descritos abaixo:

- a) Síntese de complexos fosfínicos de Ru(II) com nicotinamida de fórmula geral $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$, onde NIC = nicotinamida, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e X-bipy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (4,4'-Me-bipy) (C1), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (4,4'-Metoxi-bipy) (C2) e 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (5,5'-Me-bipy) (C3);
- b) Síntese de nitrosilo complexos de Ru(II) com piridina e derivados de fórmula geral $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppb})(\text{L})]\text{PF}_6$, onde NO = óxido nítrico, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e L = piridina (Py) (C4), 4-metilpiridina (4Pic) (C5) e 4-vinilpiridina (4VPy) (C6);
- c) Caracterizar os complexos obtidos utilizando técnicas usuais de caracterização de complexos inorgânicos: condutividade molar, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, espectroscopias de absorção nas regiões do infravermelho (IV) e ultravioleta/visível (UV-Vis), difração de raios X por monocristal (DRXM) quando possível e policristais (DRXP), análise elementar, voltametria cíclica (VC), análises térmicas (TGA e DTA) e espectrometria de massas (EM);
- d) Estudar a estabilidade dos complexos em solução;
- e) Avaliar a atividade citotóxica dos complexos nas linhagens tumorais: adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma hepatocelular (HepG2), adenocarcinoma de pulmão (A549) e derivadas de melanoma (SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1);
- f) Selecionar o(s) complexo(s) mais promissor(es) e avaliar em qual fase do ciclo celular houve interrupção levando conseqüentemente apoptose e se houve produção de espécies reativas de oxigênio;

g) Avaliar se o(s) complexo(s) mais promissor(es) apresenta(m) interações com biomoléculas como albumina (HSA) e DNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

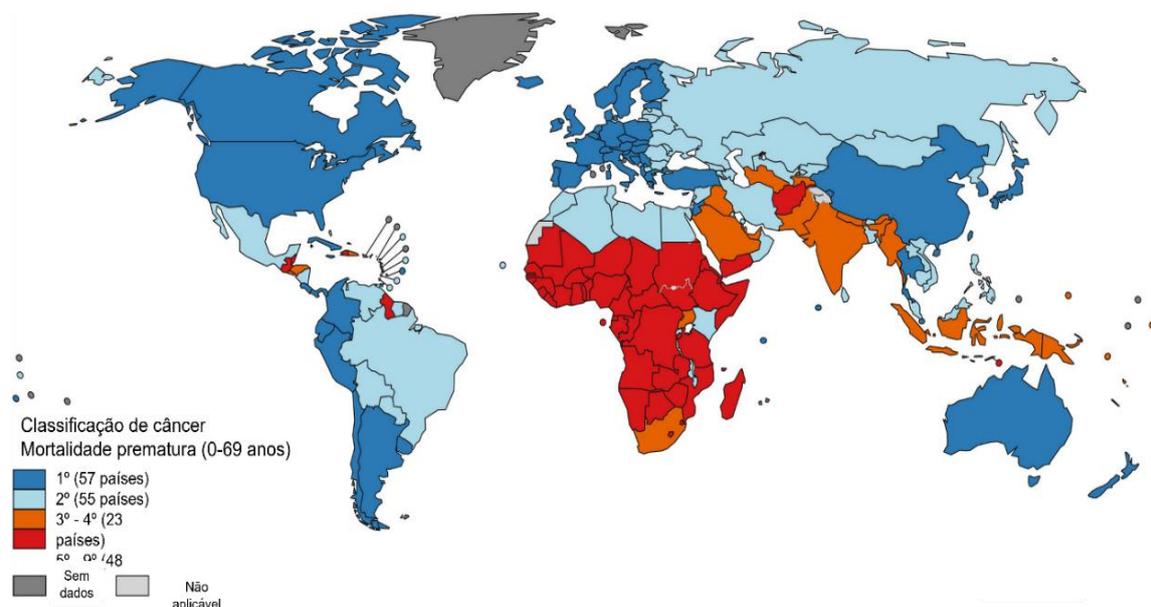
2.1 CÂNCER: DEFINIÇÃO, CAUSAS E PRINCIPAIS TRATAMENTOS

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), câncer é o nome dado para designar um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2020). O crescimento e morte celular ordenada acontecem de maneira natural no organismo, porém quando alguma anormalidade é detectada no processo de crescimento e divisão celular, as células ao invés de morrerem, continuam crescendo descontroladamente gerando tumores (INCA, 2020).

Em 2020, estimou-se 19 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de mortes ocasionados por esta enfermidade (SUNG *et al.*, 2021). Além disto, caracteriza-se como primeira ou segunda principal causa de morte antes de 70 anos em 112 de 183 países, conforme ilustra a Figura 2 (SUNG *et al.*, 2021). As principais causas desse crescimento alarmante são: a diminuição acentuada nas taxas de mortalidade por acidente vascular cerebral e doença cardíaca coronária, envelhecimento, crescimento populacional (SUNG *et al.*, 2021), tabagismo, obesidade, consumo de álcool, dieta, inatividade física, exposição solar, radiação e agentes infecciosos como o HPV, o vírus da hepatite B e a bactéria *Helicobacter pylori* (HULVAT, 2020; RELIGIONI, 2020).

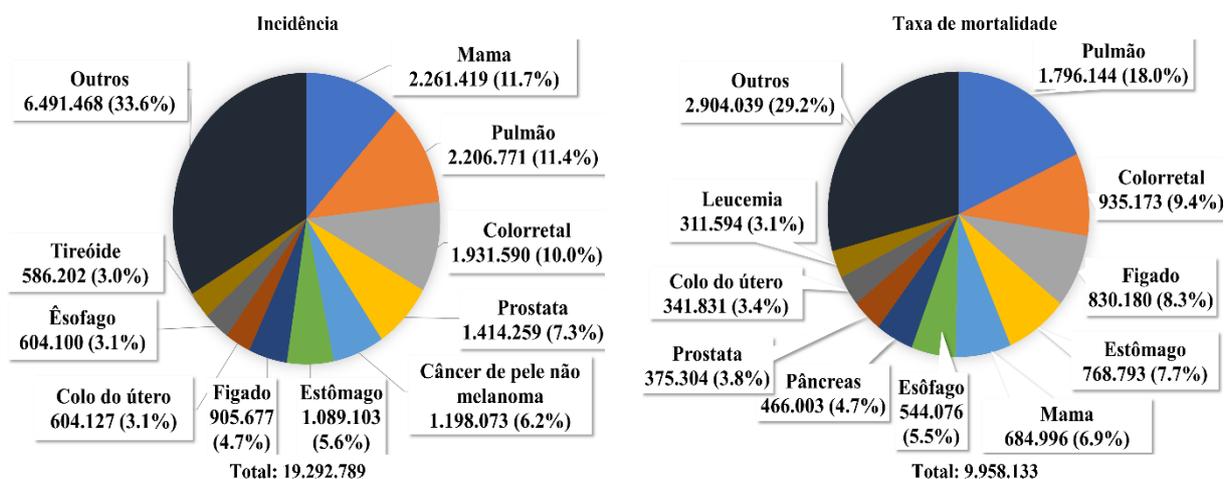
A última avaliação sobre o câncer mundial realizada em 2020 evidenciou que a neoplasia de mama é a mais diagnosticada no mundo, com 2.261.419 (11,7%) de novos casos, seguida das neoplasias de pulmão (11,4%), próstata (7,3%) e de pele não melanoma (6,2%), (Figura 3). Além disso o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer (18,0% do total mortes por câncer), seguido por colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama (6,9%) (SUNG *et al.*, 2021).

Figura 2 - Classificação Nacional do Câncer como Causa de Morte em idades inferiores a 70 Anos em 2019.. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda.



Fonte: Adaptado de (SUNG *et al.*, 2021).

Figura 3 - Gráficos de pizza com a distribuição de casos e taxa de mortalidade dos cânceres mais comuns no mundo em 2020, para ambos os sexos.



Fonte: Adaptado de Câncer, Global Cancer Observatory. Disponível em: <https://gco.iarc.fr>. Acesso em: 22 nov. 2022.

Segundo o mesmo estudo para o sexo masculino o câncer de pulmão é o mais frequente e a principal causa de morte por câncer em homens, seguido pelo câncer de próstata e colorretal. Já para as mulheres o câncer de mama é o câncer mais diagnosticado (seguido por câncer colorretal e de pulmão), sendo considerado a principal causa de morte (SUNG *et al.*, 2021).

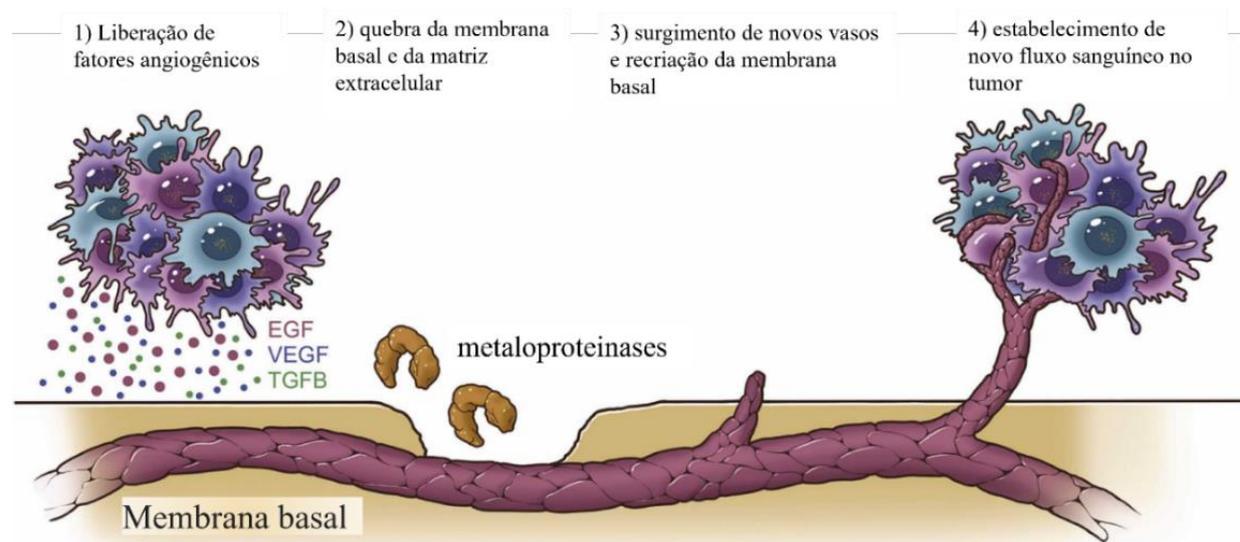
O câncer de pele, alvo deste trabalho, é o quinto de maior incidência no mundo, onde em 2020 mais de 1 milhão e meio de pessoas foram diagnosticadas, levando a 120.774 notificações de mortes, somando os cânceres de melanoma (mais agressivo) e não melanoma (SUNG *et al.*, 2021). Existem diversos tipos de câncer de pele, dependendo do tipo de célula de origem, entretanto, os mais comuns são o de carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas (ambos referidos também como câncer de pele não melanoma) e o melanoma maligno (ADNANE; EL-ZAYAT; FAHMY, 2022). O principal fator de risco destes é a radiação ultravioleta (UV), devido à exposição exagerada a luz solar. A característica ionizante desta, promove danos ao DNA das células quando os níveis de melanina, pigmento que fornece proteção natural a radiação UV, estão baixos, promovendo à formação de fotoprodutos (KŁOS; CHLUBEK, 2022; PFEIFER; BESARATINIA, 2012). Consequentemente, tais lesões geram mutações em genes que codificam proteínas associadas às vias de sinalização que controlam processos celulares importantes, como crescimento, diferenciação, migração, divisão e apoptose celular (CRUSIO; RADEKE, 2019; KŁOS; CHLUBEK, 2022). A mutação mais comum nos melanomas cutâneos ocorre no gene BRAF (40 a 60% dos casos) e gera proliferação celular descontrolada. Outros genes que podem ser afetados incluem NRAS, CDKN2A, VDR, MC1R, TERT, TP53 e 1DH1, que podem levar à proliferação sustentada e resistência aos sinais de morte celular, mesmo na presença de estresse oxidativo e danos ao DNA (PECORA *et al.*, 2021).

O tratamento convencional dos melanomas cutâneos envolve há décadas sua remoção cirúrgica. No entanto, dependendo do caso, as comorbidades, o estágio de desenvolvimento e a intolerância tecidual podem descartar intervenções cirúrgicas (CULLEN *et al.*, 2020). Assim, as opções de tratamento podem envolver radioterapia, inibidores do checkpoint imunológico, inibidores de BRAF e MEK, terapia direcionada e quimioterapia (AHMED; QADIR; GHAFOOR, 2020; GIUGLIANO *et al.*, 2021; KASAKOVSKI *et al.*, 2021; PATEL *et al.*, 2020; RANDIC *et al.*, 2021; HASHEMI *et al.*, 2022; MIRANDA; SAMPAIO; ZUCOLOTTO, 2022; IRAWATI *et al.*, 2021).

Uma das principais vias de disseminação das células cancerígenas após a sua formação para outros tecidos e órgãos é através da angiogênese, (Figura 4) (CASTANEDA *et al.*, 2022). Esta, inicia com a liberação de fatores angiogênicos (EGF, VEGF e TGFB) que estimulam o recrutamento de metaloproteinases capazes de quebrar a matriz extracelular permitindo o surgimento de novos vasos sanguíneos e estabelecendo um suprimento de nutrientes e oxigênio para o tumor (Figura 4 – itens 1-4) (CASTANEDA *et al.*, 2022). Os vasos sanguíneos recém formados no tumor são malformados, permeáveis, ramificados, com

constantes vazamentos que geram a proliferação de células cancerígenas além do tumor primário e também impedem a chegada de drogas quimioterápicas (LÚCIA DE ALMEIDA *et al.*, 2005). A nova vascularização pode ser interrompida a partir de drogas inibidoras da angiogênese, porém o grande entrave é a cardiotoxicidade, além da resistência e eficiência somente em tumores sólidos (CASTANEDA *et al.*, 2022).

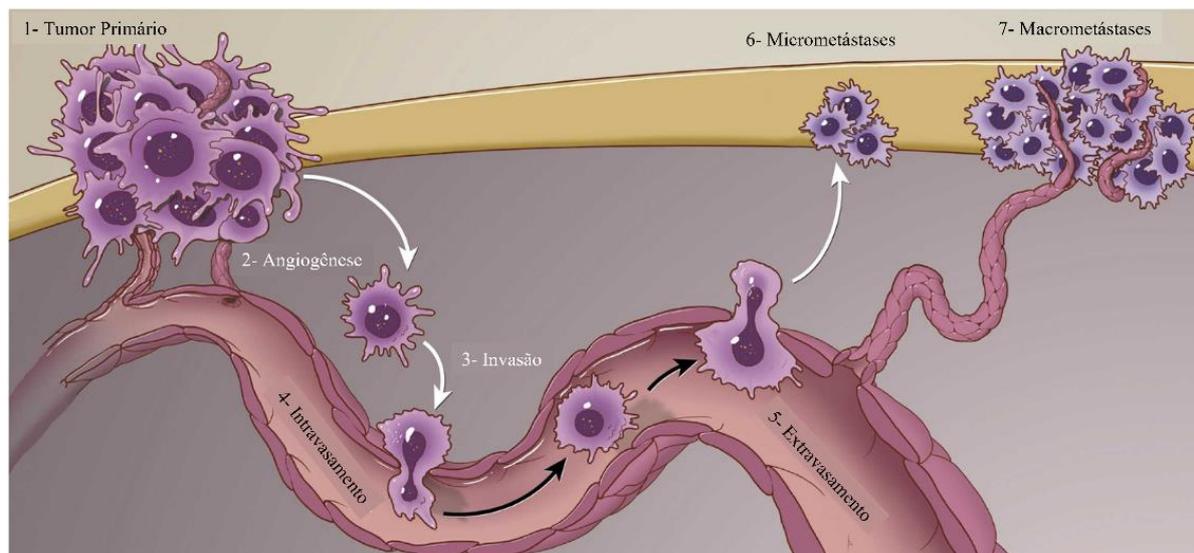
Figura 4 – O processo de angiogênese - início da angiogênese [1] liberação de fatores angiogênicos [2] quebra da matriz extracelular permitindo o surgimento de novos vasos sanguíneos [3] e estabelecimento de suprimento de sangue para o tumor [4].



Fonte: Adaptado de (CASTANEDA *et al.*, 2022).

Por sua vez, pode ocorrer a metástase, termo geral utilizado para descrever quando células cancerosas migram do tumor primário para vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, invadindo, disseminando e proliferando em órgãos distantes resultando em tumores secundários malignos (CASTANEDA *et al.*, 2022). Todo o processo após a formação do tumor primário pode ser resumido pela Figura 5.

Figura 5 – Progressão desde a formação do tumor primário até o estabelecimento do tumor metastático.



Fonte: Adaptado de (CASTANEDA *et al.*, 2022).

O câncer pode ser separado em grupos de acordo com o tipo de célula que o originou, sendo esta denominada classificação primária, se dividindo nos seguintes grupos (LÚCIA DE ALMEIDA *et al.*, 2005):

- a) Carcinomas: são originários de células que revestem o corpo como pele, revestimento internos como boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, e os revestimentos mamários, próstata e pâncreas. Representam os tipos mais comuns de câncer.
- b) Sarcomas: Se formam de tecidos de suporte como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço, encontrados na maior parte do corpo.
- c) Linfomas: Devido a modificações genéticas em células conhecidas como linfócitos, presentes nas glândulas linfáticas e no sangue.
- d) Leucemia: Câncer originário de células da medula óssea, como característica ocorre uma concentração muito elevada de glóbulos brancos (cerca de 10^5 - $10^6/\text{mm}^3$) gerando problemas no sistema imunológico pois as células anormais não exercem normalmente a função além de impedir que a medula gere novas células.
- e) Mielomas: Malignidades nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos.
- f) Tumores das células germinativas: Desenvolvem-se em células dos testículos e ovários.
- g) Melanomas: Característicos de células dos melanócitos, que são responsáveis pela pigmentação da pele.

h) Gliomas: Originam-se a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal. Raramente ocorre metástase.

i) Neuroblastomas: Tumor originário de células malignas embrionárias, geralmente está mais presente em crianças e adolescentes (estima-se que 8 milhões de crianças até 15 anos de idade por ano; 80% dos casos com até 4 anos de idade) (LÚCIA DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Essa vasta gama de tumores torna-se um desafio para o diagnóstico preciso e terapias de tratamentos eficazes. Apesar dos enormes esforços e avanços na pesquisa do câncer, as opções de tratamento padrão são quimioterapia, cirurgia e radioterapia (MIRANDA; SAMPAIO; ZUCOLOTTO, 2022). A radioterapia baseia-se na incidência de radiação ionizante altamente energética, com objetivo de destruir as células cancerígenas e diminuir o tamanho do tumor, aliviando a pressão, reduzindo hemorragias, dores, diminuindo a recorrência e chance de metástase. Pode ser empregada após cirurgia a fim de erradicar quaisquer depósitos tumorais microscópicos remanescentes. Tanto a cirurgia quanto a radioterapia são medidas locais de trabalho indicadas quando o tumor não sofreu processo de metástase.

Nos demais casos, emprega-se a quimioterapia, que se baseia em medicamentos (denominados “quimioterápicos” ou antineoplásicos), que interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celular. No entanto, a maioria dos agentes quimioterápicos não são seletivos, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (PATATT *et al.*, 2022), causa esta, para os efeitos colaterais, como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. (LÚCIA DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Com base no modo de atuação frente ao DNA os antineoplásicos podem se dividir em grupos, onde na Figura 6, são demonstrados alguns exemplos das classes de agentes quimioterápicos mencionadas abaixo:

a) ; Antimetabólitos: são capazes de interagirem com enzimas intracelulares vitais, levando à sua inativação e ao bloqueio da síntese do DNA. Estruturalmente são análogos às bases nitrogenadas (fluoracila, azacitidina e gemcitabina), purinas e ácido fólico (ABOTALEB *et al.*, 2018). A 6-mercaptopurina (Figura 6 a), fluoracil (Figura 6 b) e 5-azacitidina (Figura 6 c) são exemplos de quimioterápicos desta classe empregado atualmente

b) ; Inibidores de topoisomerase, agentes alquilantes e intercaladores: atuam diretamente sobre a macromolécula de DNA. Estes grupos se subdividem em:

c) ; Os inibidores de topoisomerase interagem diretamente como receptores das enzimas topoisomerase I e II, capazes de reparar a dupla fita de DNA e atuando durante as etapas de

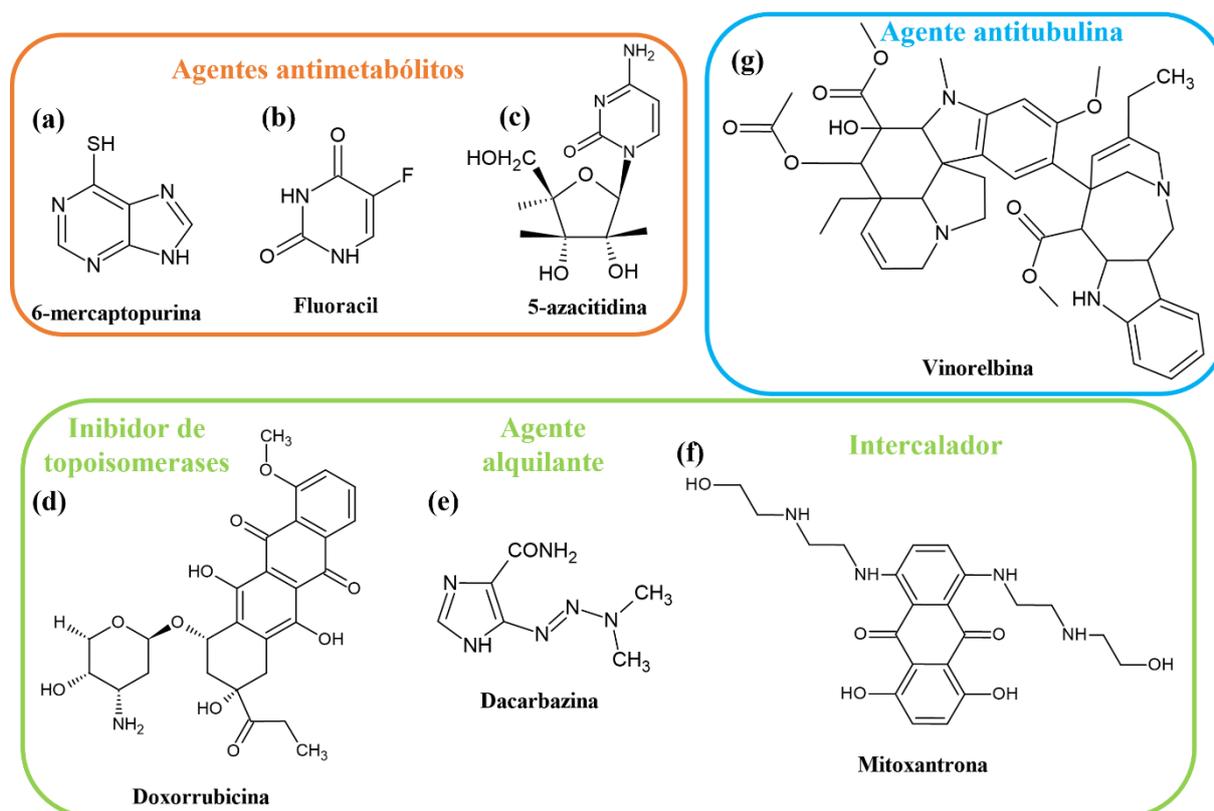
replicação, transcrição e recombinação do ciclo celular (ABOTALEB *et al.*, 2018). Um exemplo, é a Doxorrubicina mostrada na Figura (d).

d) ; Os agentes alquilantes agem como fortes centros eletrofílicos sobre macromoléculas (principalmente DNA), formando ligações covalentes por reação de alquilação com centros nucleofílicos do DNA. Essas ligações cruzadas (“Cross-Link”) com as fitas ou filamentos do DNA podem ocorrer de diferentes formas e todas produzem lesões no DNA (porém as interfilamentares são mais citotóxicas), que alteram por consequência os processos de replicação e transcrição. É a classe mais empregada e entre elas podemos citar o complexo cisplatina, carboplatina, análogos de mostardas nitrogenadas, nitrossuréias, triazenos e alquilsulfonatos (LÚCIA DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Dentre os quimioterápicos empregados a Dacarbazina, Figura 6 (e), é um exemplo desta classe de quimioterápicos.

e) ; Por último, os intercaladores são compostos por moléculas que interagem por intercalação nos pares de base nitrogenada. São constituídos por anéis aromáticos, apresentando alta densidade eletrônica que geram interações do tipo π . O agente quimioterápico mitoxantrona, Figura 6 (f), exemplos é um exemplo dessa classe. A intercalação aumenta o espaçamento entre os pares de base citosina e guanina (3,4 Å para 7 Å) e gera a formação de um trímero constituído pelo intercalante, DNA etopoisomerase II que é estabilizado interrompendo a etapa de transcrição do DNA (ABOTALEB *et al.*, 2018).

f) . Agentes antitubulínicos: interferem diretamente na dinâmica dos microtúbulos, (ou seja, diretamente na última fase da mitose) bloqueando a divisão do núcleo e gerando a morte celular. Os principais membros desta classe incluem os alcalóides da vinca (planta) como a Vinorelbina ilustrada na Figura 6 (g) e os taxanos (composto extraído da casca da árvore *Taxus Brevifolia*) (GUICHARD *et al.*, 2017).

Figura 6 - Estruturas de alguns agentes quimioterápicos de acordo com o modo de ação com o DNA.



Fonte: Adaptado de (ABOTALEB *et al.*, 2018; GUICHARD *et al.*, 2017; LÚCIA DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.2 COMPLEXOS DE RUTÊNIO COMO ANTITUMORAIS

Terapias a base de complexos de rutênio (II e III) têm se destacado como substituintes favoráveis a complexos de platina e derivados, em função dos efeitos colaterais e resistência celular apresentados por estes complexos (THOTA *et al.*, 2018).

Ademais, em relação a platina (II) os complexos de rutênio apresentam maior seletividade para células cancerosas, baixa toxicidade, estados de oxidação (II, III e IV) e processos redox acessíveis em condições fisiológicas, maior diversidade e labilidade controlada dos ligantes dependendo do estado de oxidação e, além disto, o rutênio pode imitar o ferro em ligações com biomoléculas como a transferrina facilitando o transporte (KANAOUJIYA *et al.*, 2022; THOTA *et al.*, 2018). Diante do exposto, a concepção de novos complexos de rutênio tem despertado grande interesse há 4 décadas, gerando exaustivas investigações sobre a atividade antitumoral em várias linhagens cancerígenas (CANDIDO *et al.*, 2022; DIAS *et al.*, 2018; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017b; LIANG *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Os primeiros compostos a apresentar atividade citotóxica promissora foram os complexos de cloroamina Ru(III) e Ru(II) de fórmula geral *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] e o *cis*-

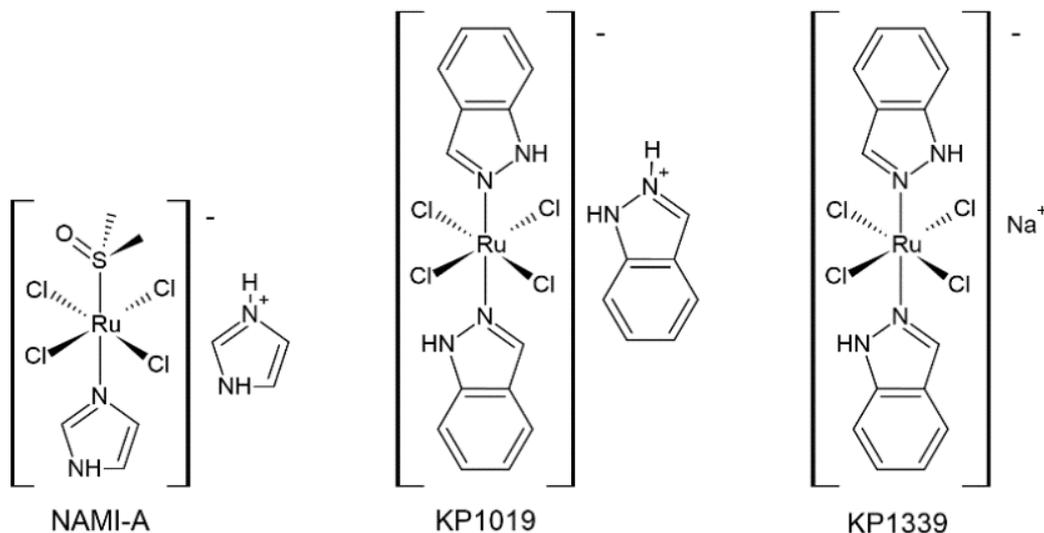
$[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$, respectivamente, descobertos por Clarke e colaboradores no início dos anos 80 (RILAK SIMOVIĆ *et al.*, 2019). Estes são basicamente análogos estruturais da cisplatina (RILAK SIMOVIĆ *et al.*, 2019).

Posteriormente, a descoberta dos complexos de Ru(II), *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_4]$ e *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_4]$ (dmsO = dimetilsulfóxido), levou a proposições quanto aos prováveis mecanismos de ação dos complexos de rutênio acima citados (RILAK SIMOVIĆ *et al.*, 2019). Duas características importantes desses complexos chamaram atenção: primeiro, o isômero *trans* demonstrou atividade antitumoral superior ao isômero *cis* (contrário aos análogos da cisplatina), e o segundo, o isômero *trans* exercer atividade contra metástase. Essas duas observações apontaram para possíveis diferenças entre os mecanismos de ação dos complexos de Ru(II) e Pt(II) (RILAK SIMOVIĆ *et al.*, 2019).

Tais descobertas levaram ao desenvolvimento de complexos de Ru(III), onde destaca-se o composto conhecido como NAMI-A, $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$, (Im= imidazol e DMSO = dimetilsulfóxido) (Figura 7), sendo o primeiro candidato a metalofármaco a base de rutênio aprovado em ensaios pré-clínicos e em fase I. Nessas investigações, o NAMI-A exibiu atividade antimetástática e antiangiogênica (tumores secundários), além de baixa toxicidade em células normais (*in vitro* e *in vivo*) (LEE; KIM; NAM, 2020). Foi bem sucedido em estudos clínicos de fase I, mas seus estudos clínicos foram encerrados na fase II devido à baixa eficácia e alta toxicidade (THOTA *et al.*, 2018).

Sequencialmente, motivados pela atividade promissora do NAMI-A, Keppler e colaboradores sintetizaram o composto conhecido como KP1019, (Figura 7) que também entrou em ensaios clínicos de fase I. A baixa solubilidade limitou o seu desenvolvimento, entretanto seu análogo KP1339 (Figura 7), que é um sal sódico, logo mais solúvel, está atualmente em testes clínicos (CONTI *et al.*, 2022).

Figura 7 – Estruturas dos complexos NAMI-A, KP1019 e KP1339.

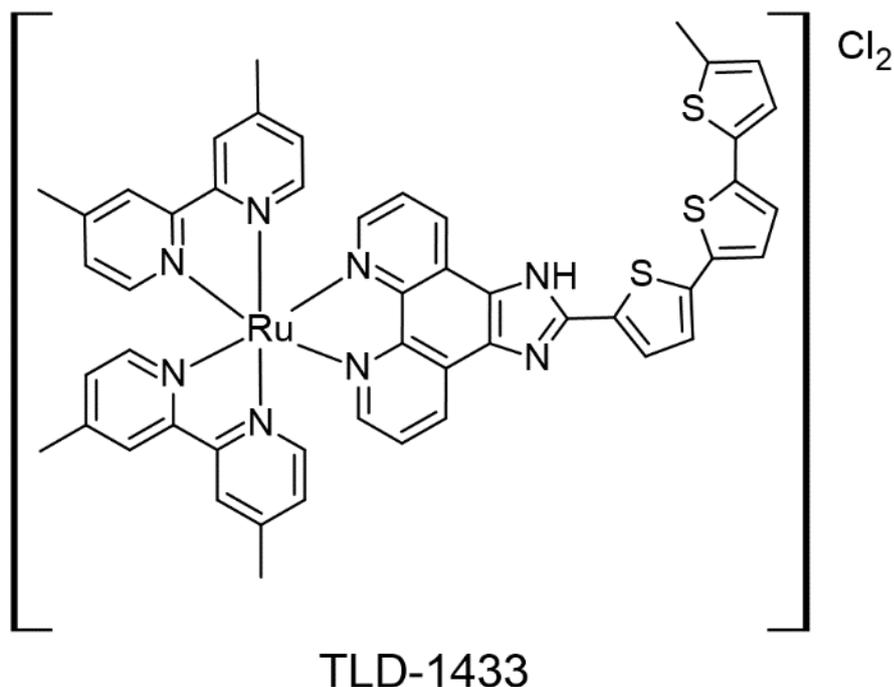


Fonte: Adaptado de (THOTA *et al.*, 2018).

Até o momento, evidências experimentais, indicam que os complexos NAMI-A e KP1019 atuam como pró-fármacos, isto é, quando um composto requer biotransformação metabólica após administração para produzir a atividade farmacológica desejada e ativa (ALLEN JR, *et al.*, 2015). Neste caso, sugere-se que os complexos de Ru(III) são reduzidos a Ru(II), esta última, é responsável pela atividade biológica (ALLEN JR, *et al.*, 2015).

Na última década complexos de Ru(II) contendo sistemas polipiridínicos como a 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina exerceram atividades promissoras frente a várias linhagens tumorais (CLAVEL *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018; ZENG *et al.*, 2016). O complexo polipiridínico denominado TLD-1433 (Figura 8) destacou-se por ser o primeiro complexo de Ru(II) a entrar em ensaios clínicos de fase 2 em 2019, onde até o momento demonstrou atuar no tratamento do câncer de bexiga. (MONRO *et al.*, 2019). Na literatura é reportado que até o momento não houve nenhuma progressão do câncer de bexiga em pacientes tratados com doses terapêuticas do TLD-1433. Desta forma, caracteriza-se por apresentar um tratamento seguro e induzir à regressão tumoral eficaz (YOUSUF *et al.*, 2021).

Figura 8 – Representação estrutural do complexo TLD-1433



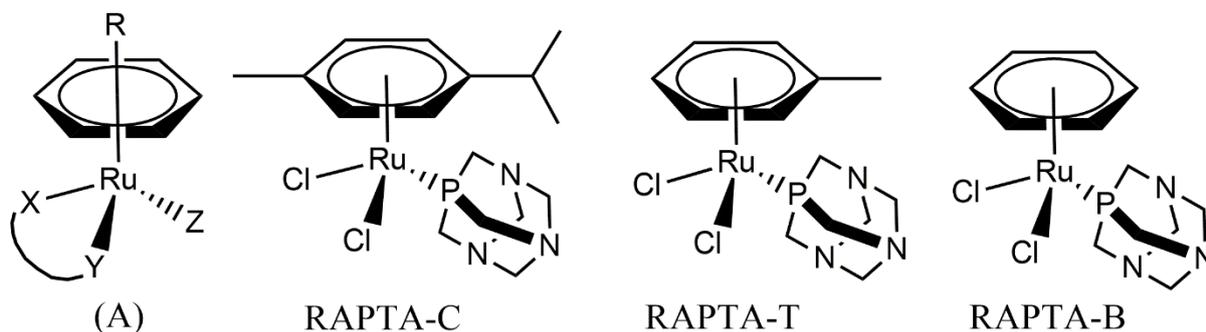
Fonte: do autor

Outra importante família de compostos são os arenos complexos de rutênio (II) (Figura 9 - A). Estes são destaques na literatura por atuarem como agentes anticancerígenos prósperos devido as suas propriedades farmacológicas serem facilmente moduladas através de modificações nos ligantes, além da natureza quelante e a hidrofiliabilidade dos anéis aromáticos que facilita a entrada dos complexos nas células.

O complexo denominado RAPTA-C (Figura 9), reportado em 2004, é o protótipo desses complexos organometálicos que apresenta atividade citotóxica *in vitro*, seletividade e baixa citotoxicidade, ademais é capaz de inibir a metástase pulmonar em camundongos portadores de carcinoma mamário. (THOTA *et al.*, 2018).

A partir de tal descoberta derivados como RAPTA-T (Figura 9) e RAPTA-B (Figura 9) começaram a ser desenvolvidos e apresentaram atividade semelhante ao RAPTA-C. Entretanto os compostos contendo cloretos como ligantes podem sofrer hidrólise *in vivo*, dependendo do pH e da quantidade de cloreto em solução, limitando-os nas aplicações. Para contornar este problema, os cientistas relatam a troca dos ligantes cloretos, por oxalato, que é bidentado, proporcionando alta citotoxicidade na linhagem celular A2780, de carcinoma de ovário humano, (IC₅₀ de 0,14–1,15 μM). Também foi reportado que são mais eficazes que o fármaco cisplatina.

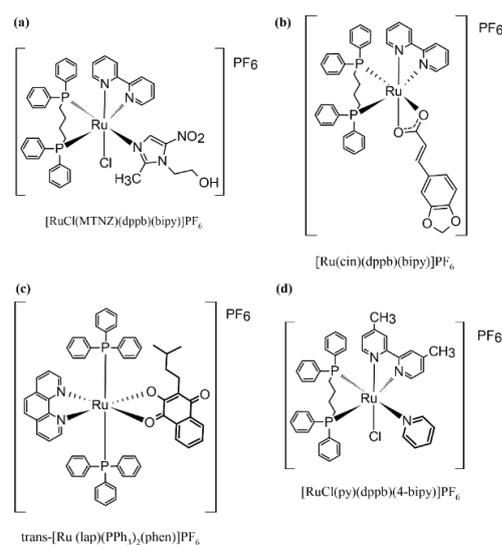
Figura 9 – Representação estrutural dos complexos de rutênio (II): piano stool (A), RAPTA-C, RAPTA-T e RAPTA-B.



Fonte: (ZENG *et al.*, 2017).

Nos últimos anos o desenvolvimento racional de novos candidatos quimioterápicos à base do íon rutênio com ligantes fosfínicos, piridínicos e polipiridínicos vem sendo desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa e os resultados *in vitro* demonstraram-se promissores nas linhagens de células tumorais humanas *A549*, *MDA-MB-23*, *MCF-7*, *CHL-1* e *U251-MG* (pulmão, mama, melanoma e glioblastoma). A concentração inibitória média (IC_{50}) de cada complexo está sumarizada na Tabela 1 e os baixos valores que vem sendo obtidos em relação a cisplatina (droga de referência) evidenciam o quanto esses sistemas são promissores. A Figura 10 abaixo representa a estrutura daqueles mais promissores desenvolvidos nos últimos anos.

Figura 10 – Representação estrutural dos complexos de rutênio (II) desenvolvidos pelo grupo de pesquisa com maiores atividades citotóxicas, onde (a) $[RuCl(MTNZ)(dppb)(bipy)]PF_6$, (b) $[Ru(cin)(dppb)(bipy)]PF_6$, (c) $trans-[Ru(lap)(PPh_3)_2(phen)]PF_6$ e (d) $[RuCl(py)(dppb)(4-bipy)]PF_6$.



Fonte: Adaptado de CANDIDO *et al.*, 2022; NEGRETI *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018.

Tabela 1 - Complexos fosfínicos de rutênio com ligantes piridínicos, polipiridínicos e suas atividades como antitumorais após 48h de tratamento das linhagens celulares.

Complexos	Linhagens celulares	IC ₅₀ (μM)	Referência
[Ru(pipe)(dppb)(bipy)]PF ₆		17,99 ± 0,39	(FERREIRA-SILVA, 2017)
[RuCl(1-im)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆	A549	14,65 ± 0,90	(DIAS et al., 2018)
[RuCl(MTNZ)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF ₆		20,91 ± 2,06	(CANDIDO et al., 2022)
cis-platina		59,54 ± 5,26	
[RuCl(MTNZ)(dppb)(bipy)]PF ₆	MCF-7	16,88 ± 0,97	(CANDIDO et al., 2022)
cisplatina		49,17 ± 5,00	
[RuCl(CO)(dppb)(4,4-Me-bipy)]PF ₆		7,95 ± 0,22	(SILVA et al., 2018)
[RuCl(py)(dppb)(4-bipy)]PF ₆	MDA-	9,18 ± 0,30	(SILVA et al., 2018)
trans-[Ru (lap)(PPh ₃) ₂ (phen)]PF ₆	MB-231	0,20 ± 0,010	(OLIVEIRA et al., 2017)
cisplatina		49,17 ± 5,00	
[Ru(cin)(dppb)(bipy)]PF ₆	CHL-1	2,83 ± 1,17	(NEGRETI et al., 2022)
cisplatina		> 200	
[RuCl(CIM)(dppb)(phen)]PF ₆	U251-	28,39 ± 2,46	(DIAS et al., 2020)
cisplatina	MG	9,54 ± 0,66	

Fonte: Elaborada pelo autor

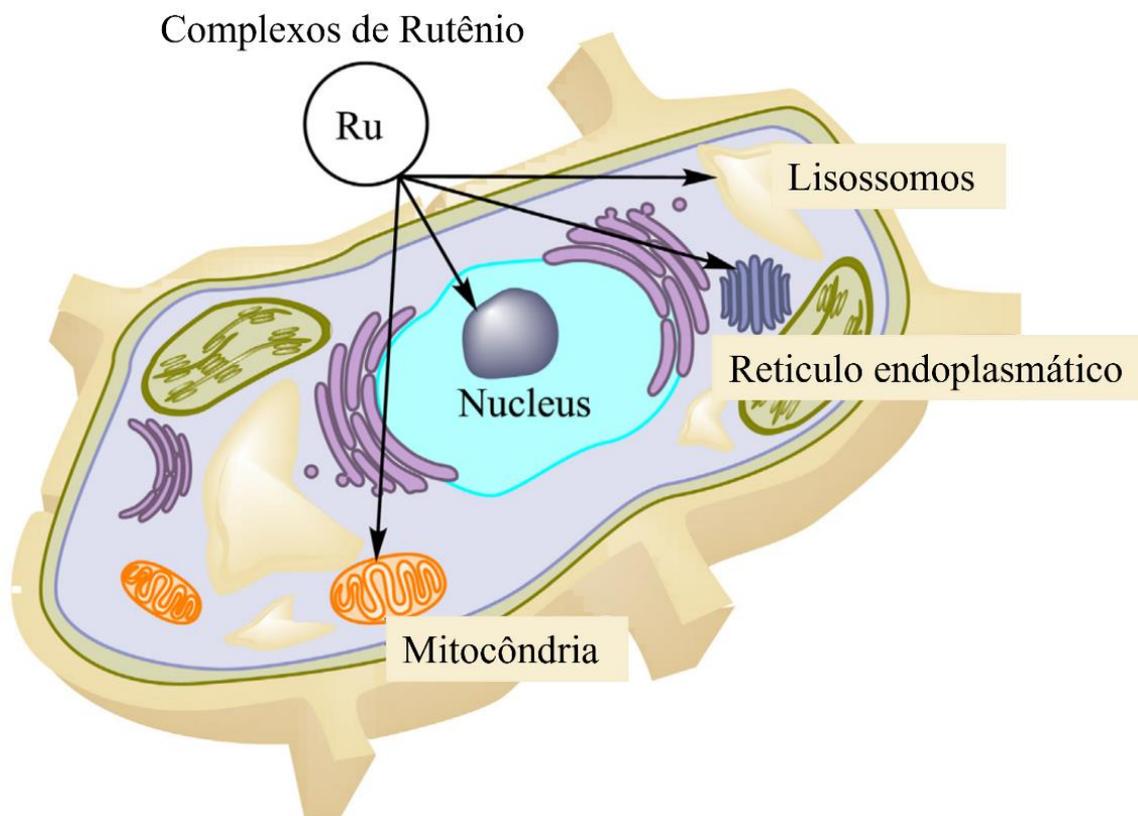
2.3 PRINCIPAIS ALVOS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Atualmente, sabe-se que a absorção de complexos de rutênio, seja por células cancerígenas ou normais, ocorre através da membrana plasmática, que contém diversas proteínas e lipídios, cuja função é regular as substâncias que entram nas células. Compostos de Ru(II) são conhecidos por entrar nas células através de múltiplos mecanismos, como processos independentes de energia (difusão passiva e difusão facilitada) ou com gasto energético (transporte ativo e endocitose). Assim, o mecanismo adotado por cada composto pode variar dependendo do tamanho dos ligantes, lipofilicidade e carga do composto (ZENG *et al.*, 2017)(PUCKETT; BARTON, 2009).

Uma vez no interior da célula esses compostos podem ter vários alvos e se acumularem em organelas conforme ilustrado na Figura 11, sendo estas, o núcleo celular, que tem como principal constituinte, o ácido desoxirribonucleico (DNA). Este caracteriza-se como um dos principais alvos para complexos de coordenação, uma vez que, podem fazer ligações

covalentes/coordenadas e não covalentes através de interações: eletrostáticas, hidrofóbicas dos sulcos ou intercalação (ZENG *et al.*, 2017).

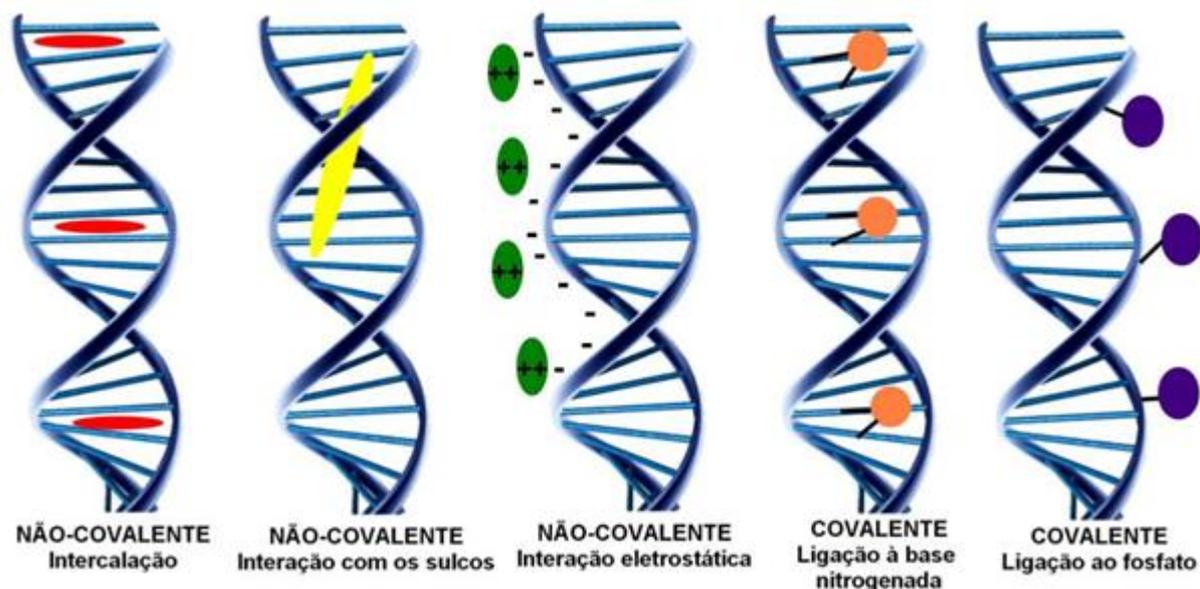
Figura 11 – Principais alvos de complexos de rutênio (II) em células



Fonte: Adaptada de (SUDHINDRA *et al.*, 2020).

As ligações covalentes são irreversíveis e geram adutos de Ru-DNA que distorcem a estrutura da biomolécula, atrapalhando o processo de replicação e a transcrição do DNA, o que leva a morte celular sequencialmente (YOUSUF *et al.*, 2021). Existem três modos distintos de ligação covalente ao DNA: ligações cruzadas inter e intra-fita, alquilação de bases nitrogenadas e substituição de bases nitrogenadas (BARRA; NETTO, 2015). De modo ilustrativo essas interações do DNA com os complexos são resumidas na Figura 12.

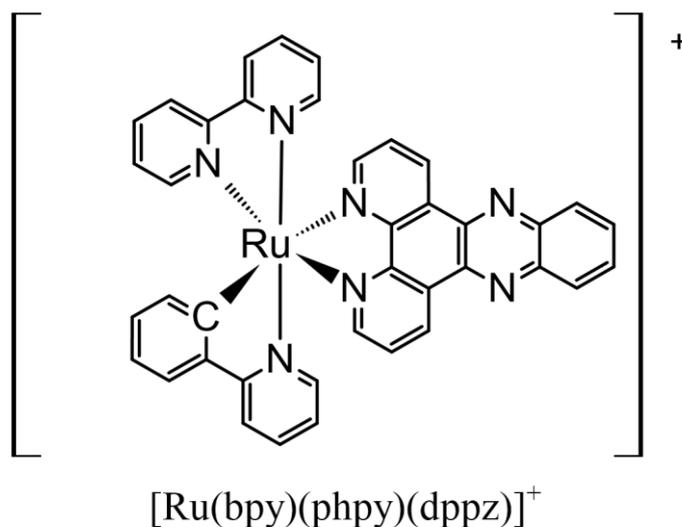
Figura 12 – Representação esquemática dos possíveis modos de interação complexo-DNA.



Fonte: (BARRA; NETTO, 2015).

O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{dppz})]^+$ (Figura 13), onde bpy = bipyridina, phpy = 2-fenilpiridina e dppz = dipiridofenazina é um agente antitumoral, considerado extremamente citotóxico nas linhagens cancerígenas de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), colo de útero (HeLa), fígado (Hep-G2 e BEL-7402), pulmão (A549 e A549/CDDP) e próstata (PC-3). Demonstrou alta afinidade de ligação com o DNA sendo capaz de danificar o processo de transcrição celular e causar morte celular irreversível (HUANG *et al.*, 2014).

Figura 13 – Representação estrutural do $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{dppz})]^+$.



Fonte: Adaptação de (HUANG *et al.*, 2014)

A forma adotada por este trabalho para avaliar a interação dos complexos produzidos com a biomolécula de DNA e a sua estabilidade foi a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, a partir do monitoramento das modificações nas propriedades eletrônicas de absorção da droga ou das moléculas de DNA (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Sendo ela já bem estabelecida em diversos trabalhos semelhantes (COLINA-VEGAS *et al.*, 2015; GRAMINHA *et al.*, 2020).

Uma maneira de verificar a existência de interação entre o DNA e os complexos é examinar o deslocamento das bandas a partir da adição de DNA em diferentes concentrações a solução do complexo (titulação espectroscópica) em comparação com os espectros dos complexos livres. A magnitude desse deslocamento é interpretada como um indício da força da interação DNA-complexo (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

Quando a interação ocorre por intercalação com o DNA, os orbitais π^* dos complexos podem interagir com os orbitais p das bases nitrogenadas e provocar a diminuição da energia da transição $\pi-\pi^*$ ocasionando o deslocamento das bandas para maiores comprimentos de onda (batocromismo). Em oposição, o orbital π do metal permanece semipreenchido, diminuindo a probabilidade das transições e gerando modificações estruturais na dupla-hélice do DNA que resultam na diminuição dos valores de absorbância (hipocromismo) (BARRA; NETTO, 2015).

A magnitude das interações com o DNA pode ser determinada a partir da constante de ligação (K_b), calculada com base no modelo teórico *Neighbor Exclusion* pela seguinte equação (1):

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

Onde $[DNA]$ é a concentração do DNA adicionada durante a titulação, ϵ_a é a razão entre a absorbância medida e a concentração do complexo, ϵ_f é o coeficiente de absorvidade molar do complexo livre, ϵ_b o coeficiente de absorvidade molar do complexo ligado ao DNA e K_b a constante de ligação (WOLFE; SHIMER; MEEHAN, 1987). A razão entre os coeficientes angular e linear do gráfico $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[DNA]$ fornece o valor de K_b .

Embora o núcleo seja o principal alvo dos complexos de rutênio, estudos apontam casos em que o alvo sejam organelas não-nucleares como mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático e proteínas. As mitocôndrias desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, e elas tem como característica apresentar potencial de membrana extremamente negativo (160 a 180 mV), causado pelo gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial. Tal potencial atrai cátions lipofílicos, incluindo certos

compostos de rutênio (II) que acumulam, geram a despolarização e rápida morte celular (ZENG *et al.*, 2017). Um exemplo, é o complexo de fórmula $Ru(dppz)_2(CppH)]^{2+}$, onde CppH = ácido 2-(2'-piridil)-piridimidina-4-carboxílico, que apresenta carga positiva e se acumula nas mitocôndrias.

Os lisossomos são vesículas esféricas encontradas em quase todas as células eucarióticas e contêm enzimas hidrolíticas que degradam numerosas biomoléculas. Desempenham papel no transporte intracelular, degradação e reciclagem de proteínas, endocitose e apoptose (ZENG *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2015).

O retículo endoplasmático está envolvido na síntese, modificação e transporte de proteínas. Quando esta organela está sob estresse ocorre o acúmulo de proteínas inacabadas, gerando o mecanismo de degradação de proteínas e caso essa pressão se torne mais aguda a via de morte celular programada é ativada (PRAGTI; KUNDU; MUKHOPADHYAY, 2021). Dessa forma o retículo endoplasmático vem se tornando frequentemente alvo de metalodrogas, recentemente Gill e colaboradores descobriram que complexos de rutênio (II) geram estresse oxidativo do retículo endoplasmático acelerando a morte celular a partir da ativação de proteínas caspases de células cancerígenas (SUDHINDRA *et al.*, 2020).

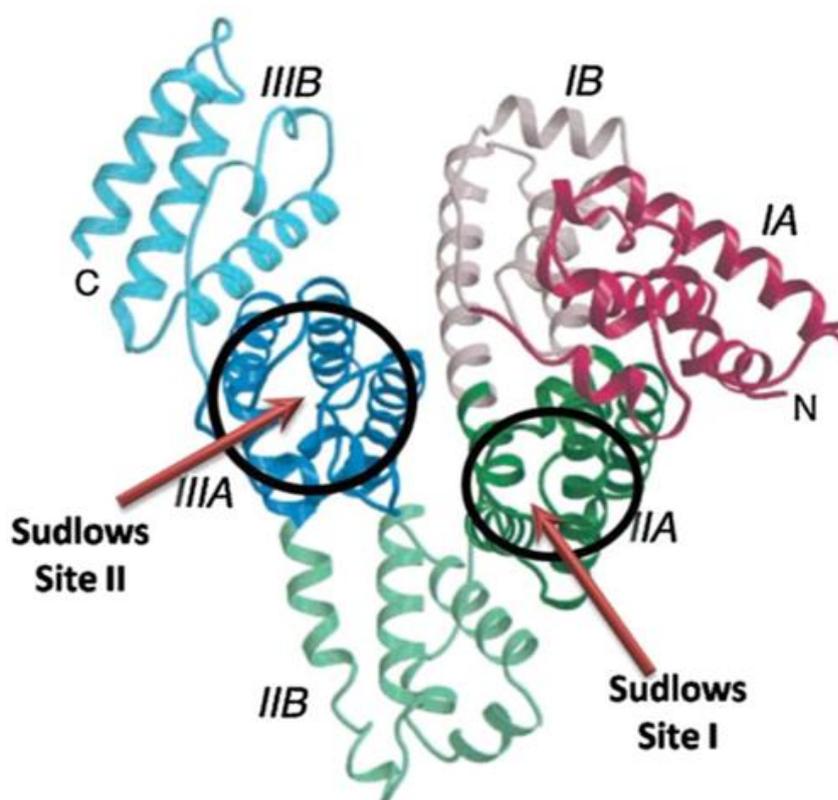
Ao longo das últimas décadas a interação de candidatos à quimioterápicos (complexos de rutênio) com proteínas como albumina vem sendo estudada como forma de avaliar possíveis efeitos terapêuticos além do transporte e eficiência (GLASS *et al.*, 2010). As proteínas desempenham funções cruciais em diversos processos metabólicos, como por exemplo, a captação intracelular de fármacos, proliferação de células cancerígenas, geração de espécies reativas de oxigênio e a morte celular programada (apoptose) (SUDHINDRA *et al.*, 2020; THOTA *et al.*, 2018).

A albumina sérica humana é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo (52-60%) sendo a principal forma de transporte para nutrientes e fármacos do organismo. Atualmente a agência federal americana Food and Drug Administration (FDA), responsável por proteger a saúde pública, exige um relatório sobre a interação com proteínas para a triagem precoce de um potencial agente terapêutico (DEMORO *et al.*, 2019).

As funções da HSA estão ligadas intimamente a sua estrutura que é constituída de 585 aminoácidos, dos quais 17 são grupos tirosina e apenas 1 resíduo de triptofano. Estruturalmente esses aminoácidos são organizados em 3 domínios semelhantes (I-III) sendo cada um apresentando dois subdomínios (A e B) estabilizados a partir de 17 pontes de dissulfeto. Sabe-se que os locais de interação com fármacos estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA (denominados sudlows site I e II na Figura 14) onde as diferenças de tamanho, polaridade,

forma e solubilidade afetam diretamente a interação ou ligação com esses sítios (TAO *et al.*, 2021). Como propriedades físico-químicas apresenta solubilidade em etanol 40%, é tipicamente ácida, além de ser estável em pH entre 4-9. Estas propriedades, bem como sua absorção preferencial por tumores e tecidos inflamados, alta disponibilidade no organismo, biodegradabilidade e ausência de toxicidade a tornam ideal para o transporte de fármacos, além de aumentar a solubilidade de drogas hidrofóbicas no plasma sanguíneo (CHAVES *et al.*, 2018).

Figura 14 – Estrutura cristalina da albumina sérica humana (HSA)



Fonte: (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

Compostos já mencionados como o NAMI-A, KP1019, KP1339 e RAPTA-C apresentaram fortes ligações covalentes ou não covalentes a proteínas intracelulares como HSA, tioredoxina redutase e catepsina B que podem ser responsáveis pela boa atividade citotóxica destes compostos (THOTA *et al.*, 2018). A estabilidade das interações não covalentes está relacionada com a capacidade dos ligantes em interagir com os domínios hidrofóbicos da proteína e seus diferentes modos de ligação podem desempenhar um papel importante em suas distintas propriedades e eficácias farmacológicas (LEE; KIM; NAM, 2020).

O triptofano encontra-se localizado na posição 214 do subdomínio IIA da proteína, sendo juntamente com os grupos de tirosina os aminoácidos responsáveis pela emissão de fluorescência (em 340 nm), característica quando a proteína é excitada em 280 nm. A fluorescência observada é muito sensível ao microambiente dos resíduos de triptofano e tirosina, ou seja, devido a interações com os complexos metálicos podem gerar mudanças de conformações, ligação biomolecular ou desnaturação (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

Com base nesse princípio a técnica de espectroscopia de fluorescência vem sendo empregada com sucesso no estudo das interações existentes entre molécula e HSA. Na maioria dos casos, a interação da molécula e o fluoróforo (HSA) provocam a supressão da fluorescência intrínseca da biomolécula (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

Tal diminuição pode ser explicada pela colisão entre as moléculas supressoras com o fluoróforo que se encontram no estado excitado proposta por Stern-Volmer, que descreveu uma abordagem matemática para explicar esse fenômeno, a qual é representada pela Equação 2 (NETO *et al.*, 2020).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q t_0 [Q] \text{ (eq. 2)}$$

Em que F_0 e F são as intensidades da fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do supressor e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer que pode ser descrita como $K_{sv} = k_q t_0$ (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

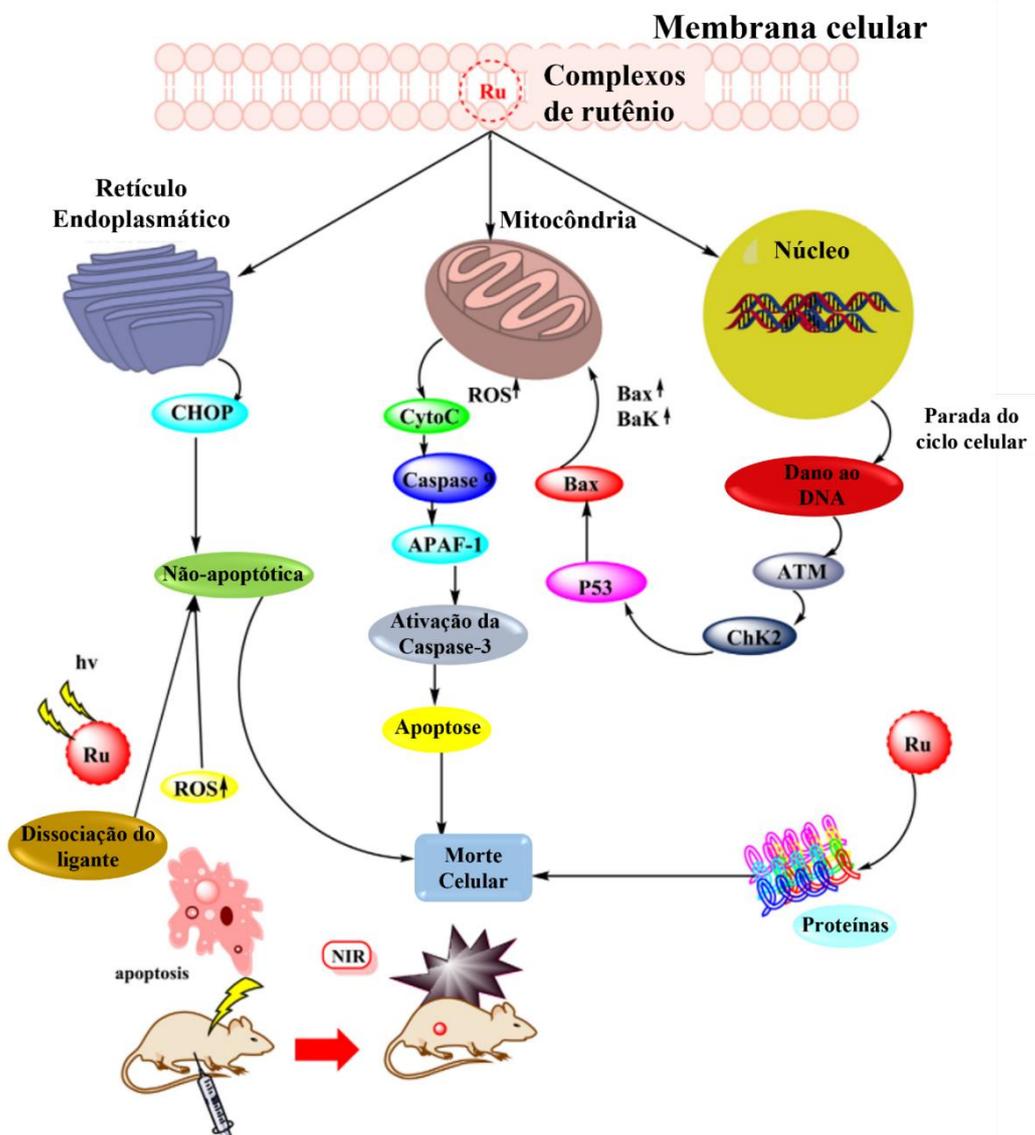
A Equação 1 pode ser reescrita de forma que a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação por molécula de proteína (n) existentes entre o supressor e fluoróforo, são representados pela Equação 3.

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \text{ (eq. 3)}$$

A maneira como as interações ocorrem podem ser descritas por dois mecanismos denominados dinâmico e estático, que se diferem dependendo de alguns fatores como temperatura, viscosidade e tempo de vida do sistema. O mecanismo dinâmico ocorre devido a colisões entre as moléculas excitadas do fluoróforo (HSA) e supressor (por exemplo os complexos de rutênio). Este processo depende da difusão das espécies, em temperaturas elevadas gera no sistema um aumento do K_{sv} devido menor viscosidade. Já o mecanismo estático envolve a formação de adutos não fluorescentes complexos/HSA e um aumento de temperatura gera uma diminuição da formação destes (diminuição de K_{sv}) (SHANG *et al.*, 2007).

Após interação dos complexos metálicos com estes alvos, a morte celular pode ocorrer através de diversos mecanismos, os quais estão sumarizados na Figura 15 (THOTA *et al.*, 2018).

Figura 15 – Mecanismo de ação para complexos de rutênio (II)



Fonte: Adaptada de (SUDHINDRA *et al.*, 2020).

A apoptose (morte celular programada) é induzida a partir de duas vias celulares, a via mediada por mitocôndrias (via intrínseca) e via extrínseca. As mitocôndrias são um dos principais alvos celulares, pois geram ATP (energia) em células normais através da fosforilação oxidativa e em células cancerígenas através da via glicolítica. A via intrínseca mediada por elas é desregulada em células cancerígenas sendo ativada por diversos estímulos físicos e químicos como danos ao DNA, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático (lissosomos), radiação

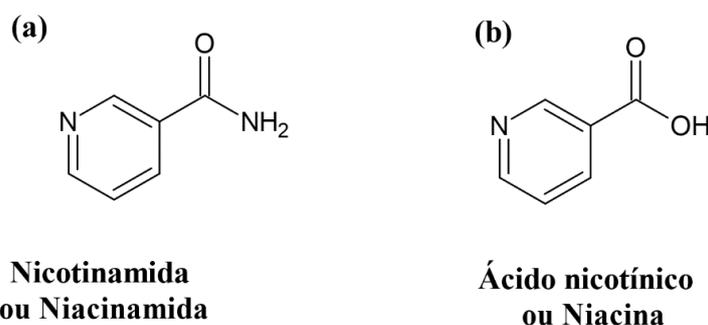
ionizante, calor e drogas quimioterápicas. Esses estímulos induzem a permeabilização da membrana externa das mitocôndrias causando a liberação do citocromo c (pequena proteína responsável por reações de oxidação e redução da cadeia transportadora de elétrons) no citosol, que ativa a proteína caspase 9 induzindo o fator protease apoptótica 1 (APAF1) responsável por induzir a caspase 3, levando a apoptose. A via extrínseca é ativada pela intercalação de complexos de rutênio ao DNA desencadeando a parada do ciclo celular e gerando apoptose das células cancerígenas (SUDHINDRA *et al.*, 2020).

Já a não apoptótica gera a morte celular por necrose através do bloqueio ou parada do ciclo celular e indução da via de estresse do retículo endoplasmático. Uma das outras formas pelas quais os complexos de rutênio(II) podem mostrar atividade anticancerígena é através da geração de espécies reativas de oxigênio, na terapia fotodinâmica, como acontece para o complexo TLD-1433 citado no item anterior (SUDHINDRA *et al.*, 2020; THOTA *et al.*, 2018).

2.4 NICOTINAMIDA: PEQUENA MOLÉCULA E VASTA APLICAÇÃO

A 3-piridinocarboxamida (Figura 16 a), comercialmente conhecida como nicotinamida ou niacinamida é a forma amida do ácido nicotínico (Figura 16 b). Ambos são formas diferentes da vitamina B3 onde, sua síntese em humanos é insuficiente para suprir as necessidades metabólicas e, portanto, sua ingestão diária é fundamental (ISLAM; HORWITZ, 2019). Os alimentos ricos em ácido nicotínico são cereais, leguminosas e sementes. Já para nicotinamida alimentos de origem animal como peixes, carnes magras, aves e ovos. Ambos dependendo da dosagem, apresentam efeito farmacológico, a nicotinamida, por exemplo, é empregada no tratamento de dermatoses crônicas, dermatite e pelagra. A falta deles no organismo pode provocar pelagra e dermatites (CAMPAGNA *et al.*, 2021; MALESU *et al.*, 2020).

Figura 16 – Representação estrutural da nicotinamida em (a) e do ácido nicotínico em (b).



Fonte: do autor.

É muito comum, encontrar na literatura uma confusão em relação às nomenclaturas dessas duas moléculas, mas do ponto de vista químico elas são bastante diferentes. O ácido nicotínico é anfotérico, forma sais com ácidos e bases, além de ser mais estável em solução, apresenta um ácido carboxílico como função orgânica (Figura 16b) e ponto de fusão mais elevado (237 °C). Já a nicotinamida caracteriza-se como uma amida (Figura 16a), solúvel em água, álcool e éter. (ALBERTO BASTOS DE MARIA; FELIPE ALVES MOREIRA, 2011).

O mecanismo de ação da nicotinamida ainda está em investigação, mas está ligada a niacina que é a única vitamina produzida endogenamente, a partir da oxidação do aminoácido aromático essencial triptofano (constituente de diversas proteínas) até glutarato. Eventualmente, ocorre a reciclagem não enzimática do ácido picolínico, o qual é excretado na urina, sendo está a rota fundamental para se atingir a necessidade bioquímica desta vitamina. Após a biossíntese ou ingestão de niacina ou nicotinamida, elas são rapidamente absorvidas na mucosa do estômago e do intestino delgado. Aparentemente, os tecidos captam a nicotinamida ou ácido nicotínico por difusão simples, porém existem algumas evidências de que o transporte de ácido nicotínico, particularmente nas hemácias, ocorre via difusão facilitada (ARENAS-JAL; SUÑÉ-NEGRE; GARCÍA-MONTOYA, 2020; PISSIOS, 2017).

Após absorção ou biossíntese, o ácido nicotínico é convertido em nicotinamida pela enzima nicotinamidase, que promove a incorporação do grupo amida ao anel piridínico. Posteriormente, a nicotinamida formada atua como um precursor das coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+/NADH) e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) em todos os tecidos. A atividade bioquímica da nicotinamida baseada na conversão em NAD^+ é apresentada na Figura 17.

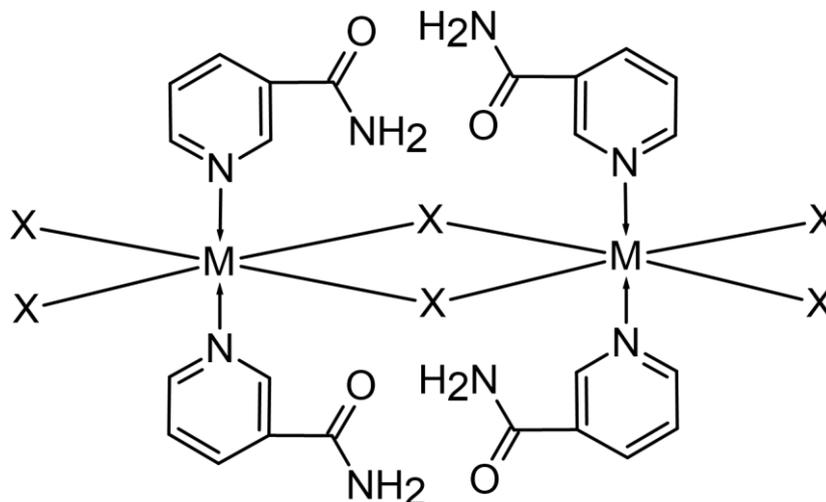
fisiológicas, S-adenosil-metionina, formando a N¹-metilniacinamida. Posteriormente é oxidada a derivados piridínicos como N¹-metil-4-piridona-3-carboxamida e N¹-metil-2-piridona-5-carboxamida (Figura 17) que são excretados pela urina (PISSIOS, 2017).

Na literatura, há relatos do papel do NAD⁺ na regulação do câncer, onde várias enzimas dependentes de NAD⁺ afetam o genoma, mutagênese e reprogramação metabólica, que são os principais fatores que promovem o início e a progressão do câncer. Portanto, oscilações nos níveis de NAD⁺ e estado redox podem ter uma grande influência na formação de tumores. Como células cancerígenas tem um gasto energético maior, restringir a disponibilidade de NAD⁺ pode impedir o crescimento das células e sensibilizar as células cancerígenas ao dano oxidativo causado pela quimioterapia e radioterapia. No entanto, isso também pode interromper outros processos dependentes de NAD⁺, levando à toxicidade para células normais (ARENAS-JAL; SUÑÉ-NEGRE; GARCÍA-MONTOYA, 2020).

Sabe-se que a nicotinamida aumenta o reparo do DNA em queratinócitos (células presentes na epiderme) e melanócitos (células produtoras de melanina) humanos irradiados com UV *in vivo*. Como a radiação UV é uma das principais causas do câncer de pele, estudos realizados *in vitro* com linhagens agressivas de melanoma, evidenciaram que a nicotinamida é capaz de inibir a capacidade das células tumorais de formar redes tubulares ricas em matriz extracelular e reduzir a secreção de citocinas angiogênicas e inflamatórias por células de melanoma (BUQUÉ *et al.*, 2020). Adicionalmente ela apresenta efeitos quimiopreventivos em câncer de queratinócito menos agressivos, onde um estudo duplo-cego controlado em indivíduos de alto risco foi realizado para avaliar a eficácia da nicotinamida como quimiopreventivo e o grupo que ingeriu duas vezes ao dia 500 mg de nicotinamida reduziu a incidência em 23% em relação ao grupo que ingeriu placebo (CHEN *et al.*, 2015).

O primeiro relato de complexos com metais de transição com a nicotinamida foi em 1979 onde Allan e colaboradores reportaram a síntese e caracterização térmica e espectroscópica de compostos de Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II) e Cu(II). Neste trabalho a nicotinamida atuou como ligante monodentado, coordenando pelo nitrogênio piridínico. Apesar de não relatarem a estrutura cristalina, os autores inferiram que os complexos apresentaram geometria octaédrica polimérica (Figura 18), com as moléculas adjacentes de nicotinamida ligadas por meio de interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio envolvendo o grupo amida (ALLAN; BAIRD, 1979).

Figura 18 – Representação estrutural proposta dos primeiros complexos com nicotinamida, onde M= Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II) e Cu(II).

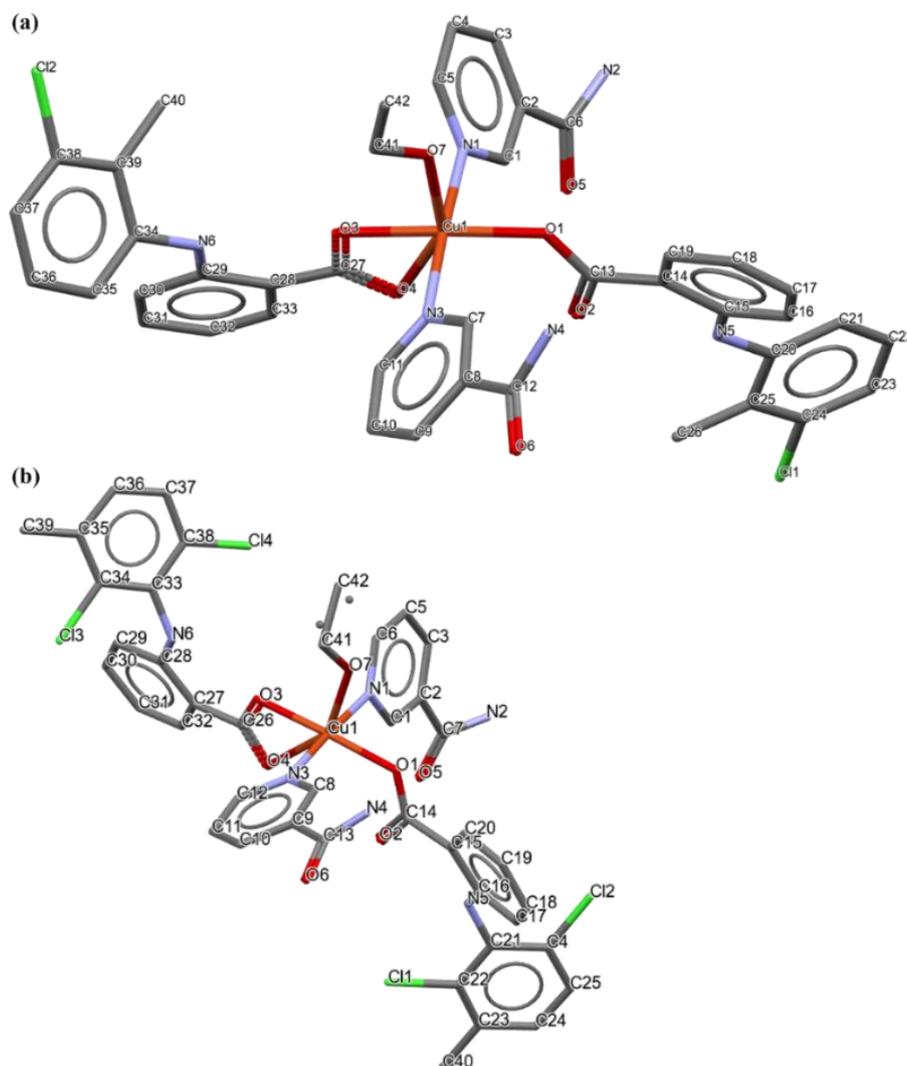


Fonte: Adaptado de (ALLAN; BAIRD, 1979).

Complexos de Cd(II), Au(III) e Ni(II) com fórmula geral $\text{Cd}(\text{NA})\text{Cl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{Au}(\text{NA})\text{Cl}_3$ e $\text{Ni}(\text{NA})\text{Cl}_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ onde NA= nicotinamida, demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e negativas das espécies *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* além das cepas de fungos *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*. Adicionalmente, no mesmo trabalho foi reportado a síntese, caracterização e atividade antitumoral dos complexos de Pt(IV) e Pd(II) de fórmula $\text{Pt}(\text{NA})_2\text{Cl}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Pd}(\text{NA})_2\text{Cl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ na linhagem tumoral de MCF-7 (carcinoma de mama) demonstrando uma concentração inibitória média de 3.10 μg e 4.80 μg respectivamente (AL-SAIF; REFAT, 2012).

Recentemente, complexos de cobre (II) com nicotinamida e substâncias anti-inflamatórias (ácido tolfenâmico e ácido meclofenâmico) (Figura 19) apresentaram citotoxicidade *in vitro* em linhagens de câncer de pulmão (A549), além dos estudos de titulação espectroscópica e viscosidade com ct-DNA demonstrarem intercalação dos complexos a dupla fita de ct-DNA com uma constante de ligação intrínseca (K_b) da ordem de 10^4 - 10^6 M^{-1} (JOZEFÍKOVÁ *et al.*, 2022).

Figura 19 – Representação estrutural dos complexos de cobre, $[\text{Cu}(\text{tolf-O})(\text{tolf-O,O}')(\text{nia-N})_2(\text{EtOH})]$ (a) e $[\text{Cu}(\text{meclf-O})(\text{meclf-O,O}')(\text{nia-N})_2(\text{EtOH})]$ (b), onde tolf= ácido tolfenâmico, nia= nicotinamida e meclf= ácido meclofenâmico.



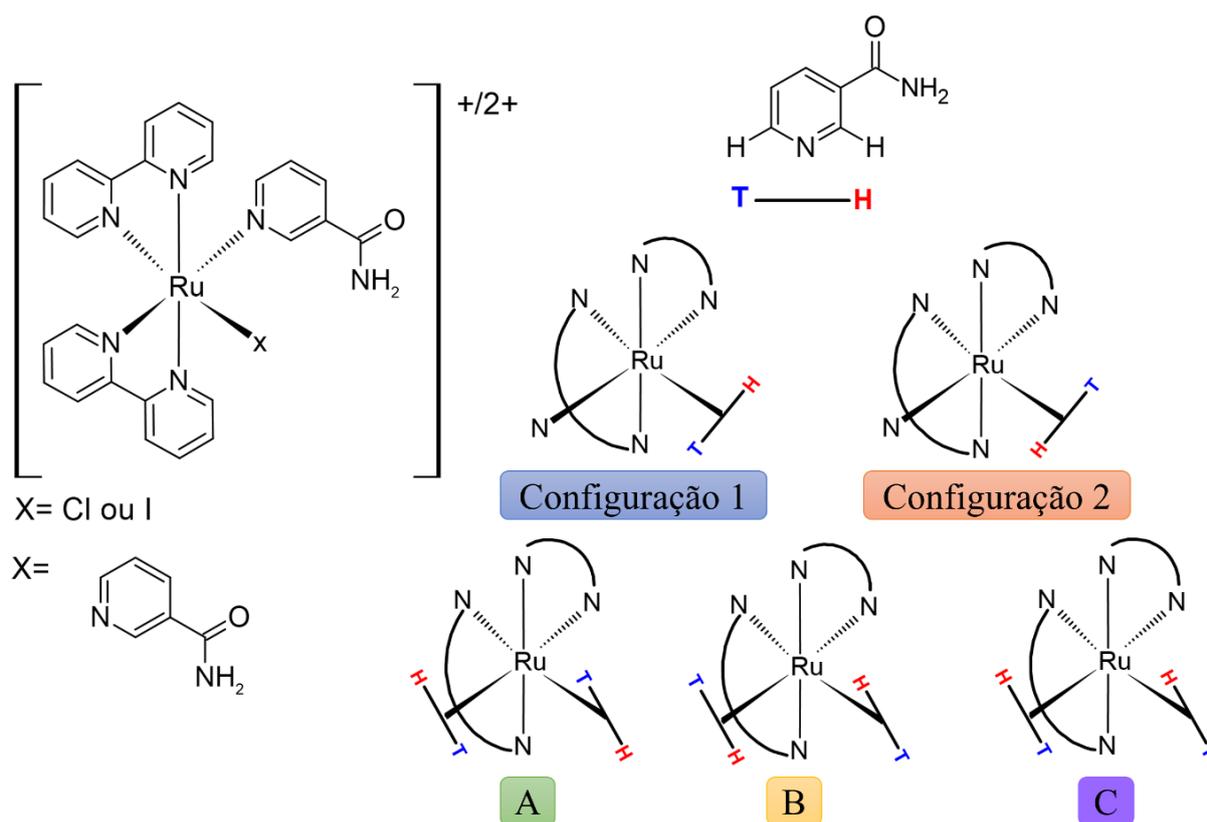
Fonte: Adaptado de (JOZEFÍKOVÁ *et al.*, 2022).

Apesar dos relatos referente a coordenação da nicotinamida com diversos metais de transição e diversas aplicações, a coordenação deste ligante com o íon metálico rutênio é escassa. Wang e colaboradores relataram a síntese, caracterização, atividade antitumoral e possível mecanismo de ação de complexos semi-sanduíche de Ru-areno envolvendo ligantes inibidores da família de proteínas poli(ADP-ribose) polimerase-1 que desempenha papel chave na replicação do DNA, regulação transcricional e reparo de danos ao DNA. A citotoxicidade foi avaliada nas linhagens tumorais A549 (adenocarcinoma de pulmão), HCT116 (Carcinoma colorretal), A2780 (Adenocarcinoma de ovário), Hcc1937 (carcinoma de mama) e na linhagem

de células normais de fibroblastos de pulmão MRC-5. Curiosamente o complexo com a nicotinamida apresentou baixa citotoxicidade nas linhagens avaliadas.(WANG *et al.*, 2014).

Ademais, os complexos cis -[Ru(bpy)₂(NA)Cl]⁺, cis -[Ru(bpy)₂(NA)I]⁺ e cis -[Ru(bpy)₂(NA)₂]⁺² (Figura 20), onde bpy = 2,2'-bipiridina e NA = nicotinamida foram reportados. Experimentos de RMN de ¹H realizados nas temperaturas de 298, 323 e 185K em acetona evidenciaram à formação de dois atropoisômeros denominados configuração 1 e 2 (Figura 10), onde a configuração 1 é a mais estável em solução. Tais observações se explicam pelo ligante haleto (-Cl ou -I) interagir com os prótons do grupo piridil da bipiridina e da nicotinamida através de ligação de hidrogênio. Curiosamente o complexo [Ru(bpy)₂(NA)₂]⁺² apresentou três atropoisômeros em 183K, denominados formas A, B e C, sendo C o mais estável e B o menos em solução (SMITH *et al.*, 2017).

Figura 20 – Representação estrutural dos complexos de rutênio com nicotinamida.

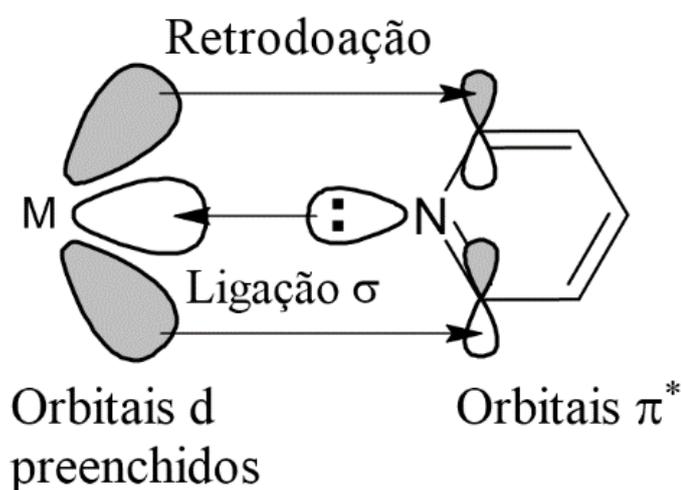


Fonte: (SMITH *et al.*, 2017).

2.5 LIGANTES PIRIDÍNICOS E FOSFÍNICOS

As piridinas apresentam além do caráter básico característico do par de elétrons livre do nitrogênio, o sistema cíclico rico em densidade eletrônica, o que a torna capaz de interagir com ácidos de Lewis como os íons metálicos. Adicionalmente os orbitais π^* do carbono podem se sobrepor com os orbitais semipreenchidos do metal (com simetria e energia compatíveis) e receber a densidade eletrônica do metal, sendo esta conhecida como retrodoação, estabilizando os íons metálicos em estado de oxidação baixo (Figura 21) (PAL, 2018).

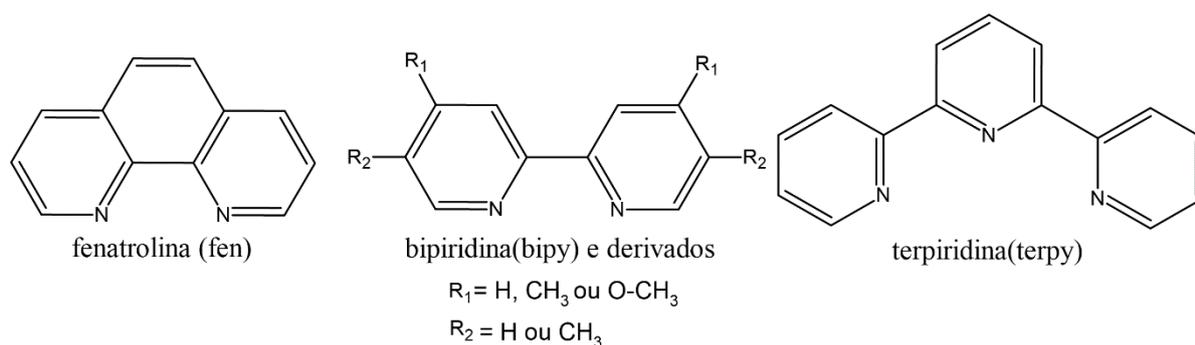
Figura 21 – Ligação da piridina com metais.



Fonte: Adaptado de (PAL, 2018).

Em sistemas polipiridínicos a fusão de dois ou mais anéis piridínicos resulta em agentes quelantes multidentados (PAL, 2018), tais como a bipyridina (bipy), fenantrolina (fen) e terpiridina (Figura 22), devido sua estabilidade redox e facilidade de funcionalização, é possível obter uma diversa gama de substituintes/derivados da bipyridina, como exemplificado na Figura 22, com a substituição na posição 4 ou 5 do anel da piridina, levando a modificações das propriedades eletrônicas e interações σ e π , (SAJJAD HOSSAIN *et al.*, 2019). Tais ligantes vem sendo extensivamente utilizados na complexação a íons metálicos e apresentando potenciais aplicações biológicas (LIANG *et al.*, 2022a), luminescência (YIP; LO, 2018), catalise (TONG *et al.*, 2020) XU; LIU; LI, 2019) e sistemas supramoleculares (BURIAN *et al.*, 2017).

Figura 22 – Representação estrutural de sistemas polipiridínicos.



Fonte: do autor

Essa classe de compostos bem como seus derivados e complexos possuem a capacidade de mimetizar biomoléculas como: proteínas, ácidos nucleicos e enzimas que possuem propriedades importantes no metabolismo humano. Tal característica resulta das propriedades estruturais e a forte interação com essas biomoléculas (MARA DE OLIVEIRA; AZEVEDO BATISTA; CNPQ, 2014).

Já as fosfinas são ligantes neutros que também portam um par de elétrons capaz de formar ligações σ e orbitais híbridos vazios ($3p\sigma^*d\pi$), aptos a receberem elétrons dos orbitais semipreenchidos do metal, formando retrodoação assim como as piridinas. A substituição por grupos retiradores de densidade eletrônica enfraquece a doação σ da fosfina e diminui a energia dos orbitais híbridos ($3p\sigma^*d\pi$) permitindo uma sobreposição mais efetiva com os orbitais do metal levando a maior capacidade de retrodoação. Outro aspecto que demonstra a versatilidade das fosfinas está relacionado ao impedimento estérico. O aumento do tamanho dos substituintes R (PR_3) gera ampliação nos ângulos R-P-R (denominado ângulo de cone de Tolman) e no caso de complexos metálicos gera-se uma série de consequências como: alteração dos ângulos dos ligantes, aumento das distâncias de ligação metal-fósforo e metal-ligante, reduz o caráter doador do fósforo, favorece baixos estados de oxidação do metal e favorecer a coordenação (VALLE *et al.*, 2008).

Tais características tornam essa classe de ligantes muito versáteis sendo capazes de estabilizar as valências mais altas e as mais baixas de metais de transição, promover alterações sobre a reatividade do centro metálico e apresentar um acentuado efeito trans labilizante que leva a formação de complexos facilmente dissociáveis (VALLE *et al.*, 2008).

Complexos fosfínicos de metais de transição vêm sendo estudados há décadas e a aplicação mais conhecida é na catálise. Entretanto, a descoberta do envolvimento de complexos metálicos com fosfinas em atividades antitumorais há cerca de 40 anos é conhecida da literatura

(QUEIROZ; BATISTA, 1996; SIMON *et al.*, 1979). A descoberta que impulsionou estes estudos foi a atividade antitumoral da Auranofina, $\text{Et}_3\text{PAuSGlu}(\text{Ac})_4$, em culturas de células cancerosas e ser uma droga liberada em uso clínico para tratamento da artrite. Complexo análogo (sem fosfina), $\text{AuSGlu}(\text{Ac})_4$, demonstrou atividade cerca de 150 vezes inferior na mesma linhagem tumoral, indicando que a atividade está relacionada a fosfina (QUEIROZ; BATISTA, 1996).

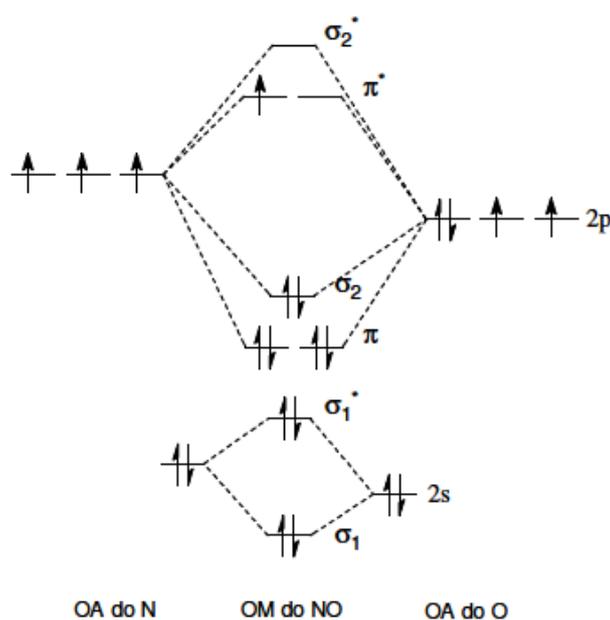
Estudos posteriores visando obter uma relação entre a atividade antitumoral e propriedades dos ligantes fosfínicos (como auto oxidação e pK_a), demonstraram que fosfinas com oxidação lenta e mais ácidas (menor pK_a) são aquelas cujos complexos têm maior atividade. Indicando que a complexação blinda a fosfina da oxidação e permite o transporte da mesma até o alvo terapêutico (BERNERS-PRICE *et al.*, 1987).

A partir de então diversos trabalhos são reportados na literatura envolvendo complexos de metais de transição como: Ru (II), Au(I), Cu (II), Pt(II) e Ag(I) contendo ligantes fosfínicos, os quais na maioria das vezes apresentam atividade antitumoral (DIMBARRE LAO GUIMARÃES *et al.*, 2022; KOMARNICKA *et al.*, 2018; REDDY *et al.*, 2018) e antibacteriana (FAIHAN *et al.*, 2022; YILMAZ *et al.*, 2014).

2.6 ÓXIDO NÍTRICO E COMPLEXOS NITROSILA

O óxido nítrico é uma espécie radicalar (possui um ou mais elétrons desemparelhados) que possui configuração eletrônica de camada de valência $(\sigma 2s)^2 (\sigma 2s^*)^2 (\sigma 2pz)^2 (\pi 2p)^4 (\pi 2p^*)^1$, onde os orbitais σ ligante e antiligante de menor energia juntamente aos orbitais ligantes σ e π estão preenchidos. A formação do NO, se deve a combinação dos orbitais atômicos do nitrogênio e oxigênio, gerando mescla de orbitais moleculares como mostrado na Figura 23. O NO apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas (aproximadamente 2 mM) além de não sofrer hidratação, tais características são uma vantagem em termos de acesso as células pois em membranas lipídicas e solventes apolares sua solubilidade é 6-8 vezes maior (KAMM *et al.*, 2019).

Figura 23 – Diagrama do orbital molecular para o óxido nítrico (NO).

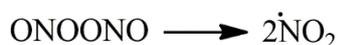
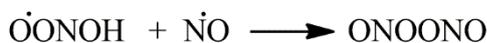
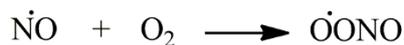


Fonte: Adaptada de (HUHEEY; KEITER; KEITE, 2008).

Até 1987 acreditava-se que o óxido nítrico era uma substância tóxica ao organismo, entretanto Furchgott, Ignarro e Murad descreveram pela primeira vez a relação entre óxido nítrico e vasodilatação, fato que lhes deram o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina em 1998 (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988). Desde então pesquisas visando as funções do NO no organismo foram desenvolvidas e hoje sabe-se que ele atua como molécula fundamental para os processos fisiológicos de neurotransmissão (LOURENÇO *et al.*, 2017), vasodilatação, atua como mensageiro secundário no cérebro e sistema nervoso periférico (CARAMORI *et al.*, 2015), função plaquetária (CARAMORI *et al.*, 2015), além de possuir atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante endógeno (HEINRICH *et al.*, 2011b; MCCLEVERTY, 2004; SERLI *et al.*, 2003).

A fim de compreender esses processos fisiológicos é necessário compreender a natureza da ligação da molécula NO e como ela pode interagir com substâncias presentes no organismo. O NO apresenta baixo potencial de ionização (9,25 eV) indicando que o elétron no orbital π^* (Figura 23) pode ser rapidamente perdido ou reagir com outras moléculas com elétrons desemparelhados como oxigênio gerando uma série de reações conforme a Figura 24 abaixo (KAMM *et al.*, 2019):

Figura 24 – Exemplos de reações radiculares que podem ocorrer no organismo

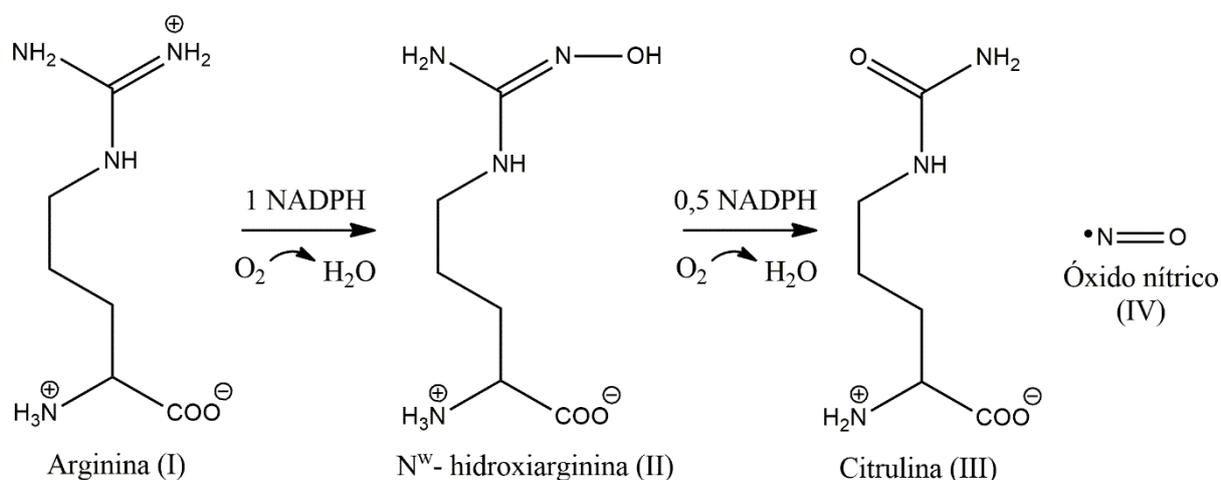


Fonte: (KAMM *et al.*, 2019)

Apesar dessas reações serem extremamente favoráveis em ambiente fisiológico as concentrações baixas de NO e O₂ tornam essas reações lentas. Uma demonstração dessa cinética são dados que em concentrações de NO de 10.000 ppm o t_{1/2} é de apenas 20s, entretanto com concentração de 10 ppm o tempo passa para 6 horas. Esses resultados demonstram a versatilidade do NO podendo participar em diversos processos fisiológicos (KAMM *et al.*, 2019).

Nos mamíferos, esta molécula é produzida endogenamente principalmente pela oxidação de um dos grupos amino presentes no resíduo de guanidina do aminoácido L-arginina. A reação, esta sumarizada na Figura 25, é catalizada pela família de enzimas NO sintetase (NOS) que utiliza oxigênio e NADPH (energia) como co-fator gerando a conversão da L-arginina(I) em L-citrulina (III) (GAO, 2010; TENNYSON; LIPPARD, 2011). Uma maneira alternativa de geração envolve a redução de nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) consumidos a partir de alimentos como vegetais (NO₃⁻), frutas (NO₂⁻), carnes processadas (NO₂⁻) ou gerados endogenamente.

Figura 25 – Esquema da síntese endógena do NO.



Fonte: Adaptado de (IGNARRO, 2000)

É relevante mencionar mais detalhadamente a participação do NO na regulação da atividade vasodilatadora que é realizada a partir da ligação de mensageiros químicos na enzima eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial) causando a sua ativação e posterior interação com a membrana plasmática das células endoteliais (KVIETYS; GRANGER, 2014). Estas interações geram a abertura dos canais de cálcio (Ca^{+2}) causando a diminuição da concentração de Ca^{+2} na célula e ativando assim a enzima eNOS. A partir de então, o óxido nítrico é gerado pela oxidação da L-arginina e desloca-se da célula endotelial até a muscular, onde interage com a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) que catalisa a reação de conversão da guanosina trifosfato em guanilato monofásico cíclico (KVIETYS; GRANGER, 2014). Tal reação ocasiona o aumento de concentração de guanilato que gera o relaxamento muscular e melhora do fluxo sanguíneo (KVIETYS; GRANGER, 2014).

A quantidade de NO presente no organismo varia de 1 nM a 100 μM e recentemente estudos vem demonstrando que o controle dessa concentração está diretamente relacionado aos inúmeros processos fisiológicos que ele participa. Concentrações acima de 1 μM geram efeitos indiretos como a formação de radicais de oxigênio (superóxido, hidroxila e oxigênio molecular), doenças degenerativas (reumatismo, diabetes e choque sépticos) (BHATTACHARYYA et al., 2014; MIRANDA; ESPEY; WINK, 2000). Já inferiores a 1 μM em tecidos geram processos fisiológicos benéficos (BHATTACHARYYA et al., 2014).

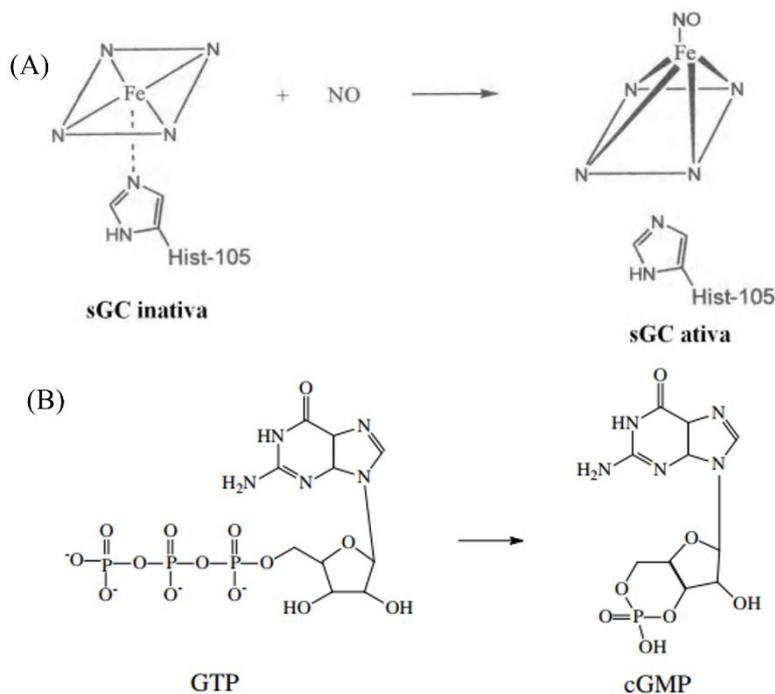
O óxido nítrico pode coordenar com metais de transição como o rutênio através dos orbitais σ (preenchidos) e π^* vazios que possuem energia e simetria adequada para interagir com os orbitais d semipreenchidos do metal. Quando essa interação ocorre, o ligante compartilha seus elétrons do orbital σ com o metal e em contrapartida o metal envia seus elétrons para o ligante, ou seja, retrodoação.

Vale destacar que o NO pode agir como agente sinalizador ativando várias enzimas que apresentam como característica em comum a presença de metais, dentre eles ferro, cobre, ou zinco, formando nitrosilo complexos que desencadeiam a maioria das atividades biológicas. Nesse sentido, alguns autores, tem relatado, sob condições fisiológicas, formação de complexos metálicos ou metaloproteínas como agentes chaves nas reações de nitrosação por NO (pois NO livre não permite a reação), atuando com um ativador dos processos fisiológicos do NO (BUTLER; NICHOLSON, 2003).

Um exemplo, é a forte ligação do NO às porfirinas de ferro (classe de compostos responsáveis pela biossíntese do grupo heme presente na hemoglobina). A formação dessa ligação causa enfraquecimento do ligante imidazólica na posição *trans*, levando a sua

dissociação. A coordenação leva o átomo de ferro para fora do anel porfirínico, expondo o sítio catalítico da enzima para a molécula GTP, ativando a sua conversão para cGMP, gerando como consequência a vasodilatação. Esse mecanismo foi sugerido como modo pelo qual o NO ativa a enzima sGC e causa a vasodilatação (Figura 26) (BUTLER; NICHOLSON, 2003).

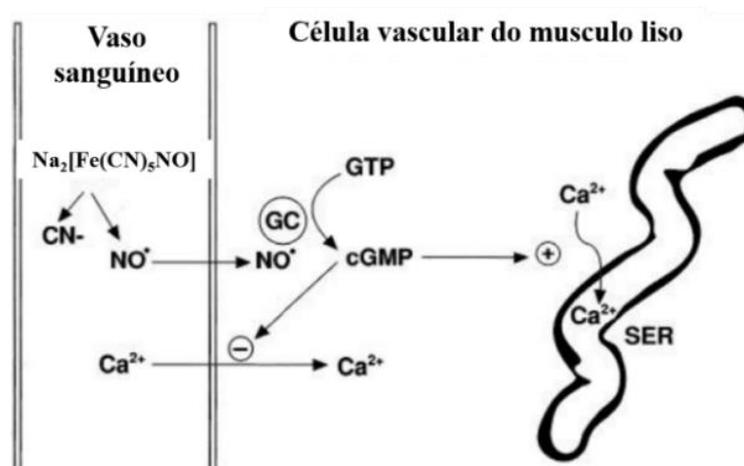
Figura 26 – Possível mecanismo de ativação da enzima guanilato ciclase pelo NO (A) e Conversão de GTP em cGMP após ativação



Fonte: (BUTLER; NICHOLSON, 2003)

O nitroprussiato é o único complexo metálico usado clinicamente para liberação de NO. Foi empregado pela primeira vez em humanos em 1928 e ao ser administrado por via endovenosa sofre interação com a oxihemoglobina, liberando cianeto e óxido nítrico (NO), e por conseguinte gerando a metahemoglobina. A liberação do NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC) presente no músculo liso vascular que tem como função provocar o aumento da concentração de guanosina cíclica monofosfato (cGMP), inibindo a entrada de íons cálcio nas células da musculatura vascular lisa, provocando a maior captação de cálcio pelo retículo endoplasmático e gerando pôr fim a vasodilatação, conforme resume a Figura 27 (FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995).

Figura 27 – Mecanismo de ação do nitroprussiato de sódio relacionado com a vasodilatação.



Fonte: (FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995). Adaptada.

O rutênio é o metal que mais forma nitrosilo complexos (SERLI *et al.*, 2003). Esses compostos tem a habilidade de captar e/ou liberar NO que por consequência os torna capazes de atuarem como fármacos no tratamento de doenças cardiovasculares e câncer. A química de coordenação dos nitrosilos metálicos expandiu-se rapidamente nas últimas décadas e vêm apresentando diferentes propriedades biológicas, fotoquímicas ou espectroscópicas (SERLI *et al.*, 2003).

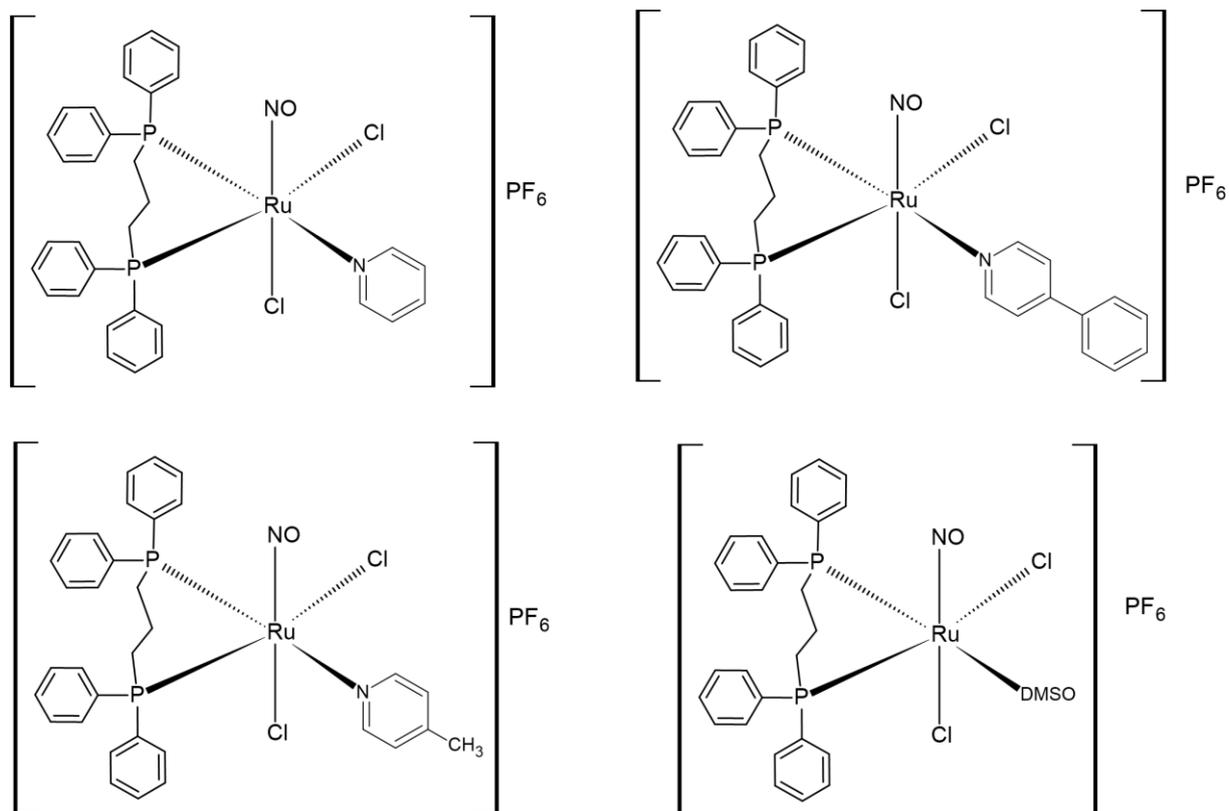
Como exemplo o nitrosilo complexo de aminas e tetraazamacrociclos alifáticos podem doar NO devido a apresentarem características marcantes como: baixa citotoxicidade em células normais, hidrossolubilidade, estabilidade à oxidação do ar e possibilidades de adequação da reatividade do NO coordenado, pela escolha do ligante axial (L_2) em $trans-[Ru^{II}(NO^+)(L_1)_x(L_2)]^{n+}$. Muitos desses doadores de NO apresentaram atividades contra várias doenças (TFOUNI *et al.*, 2010, 2012).

O NO em células cancerígenas é capaz de promover o vazamento de citocromo c da membrana plasmática e ativar a família de proteínas caspases em uma cascata de sinalização e desencadear apoptose (TFOUNI *et al.*, 2010). Estudos com nitrosilo complexos de rutênio com piridinas e seus derivados como o $trans-[Ru^{II}(NO^+)(NH_3)_4(py)]^{3+}$ induziu apoptose em linhagens de carcinoma hepático HepG2 (PESTANA *et al.*, 2009).

Ademais, complexos fosfínicos contendo piridinas com o íon metálico rutênio reportado por GOLFETO e colaboradores $cis-[Ru^{II}(NO^+)(dppp)(L)Cl_2]PF_6$, onde dppp = 1,3-bis(difenilfosfina)propano e L = piridina, 4-picolina, 4-fenilpiridina ou dmsO, apresentaram atividade citotóxica, *in vitro*, contra linhagens de células tumorais de carcinoma de mama

humano (MDA-MB-231), $IC_{50} = 19,0; 7,4; 7,1$ e $12,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O valor de IC_{50} da cisplatina foi de $63 \mu\text{mol L}^{-1}$ nas mesmas condições experimentais, demonstrando que os nitrosilo complexos foram três a nove vezes mais ativos do que a cisplatina. As estruturas desses compostos estão representadas na Figura 28 (GOLFETO *et al.*, 2010).

Figura 28 – Representação estrutural dos compostos sintetizados por GOLFETO e colaboradores.



Fonte: (GOLFETO *et al.*, 2010)

Diante desse vasto arcabouço teórico referente a química dos complexos de rutênio (II), além do potencial antitumoral destes compostos potencializados pelas atividades terapêuticas da nicotinamida, óxido nítrico, fosfinas, piridinas e bipyridinas, motivaram o desenvolvimento de novos compostos promissores.

3 MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO

3.1 SOLVENTES

Os solventes empregados nas sínteses (diclorometano, éter etílico, tolueno, hexano, metanol e etanol) são de procedência das empresas Sigma Aldrich ou Synth e foram utilizados sem tratamento prévio em atmosfera inerte de gás argônio. Nas análises de ressonância magnética nuclear de ^{13}C , ^1H e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ empregou-se CD_2Cl_2 , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, CD_3OD , $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$ e D_2O da Sigma Aldrich.

3.2 OBTENÇÃO DA ATMOSFERA INERTE DE ARGÔNIO

Os complexos foram sintetizados sob atmosfera inerte e em condições anidras, através de um sistema de secagem de gás argônio montado no laboratório E-109 da UNIFAL-MG, conforme ilustrado na Figura 29. A atmosfera inerte foi obtida através da passagem de fluxo de argônio por uma coluna de purificação composta de camadas alternadas de anéis de vidro (0,5 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura) e catalisador do tipo BTS - R - 3 - 11 (Fluka Chemika), mantida à 60 °C para que o catalisador permaneça ativado, seguindo então para colunas contendo sílica gel e cloreto de cálcio, respectivamente. A coluna contendo o catalisador foi reativada periodicamente com H_2 a 120 °C, durante pelo menos 24 horas. Estes procedimentos foram necessários para desoxigenar e secar o gás comercial.

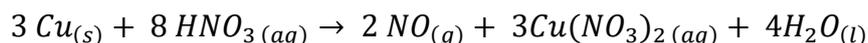
Figura 29 – Sistema de secagem de gás argônio.



Fonte: do autor

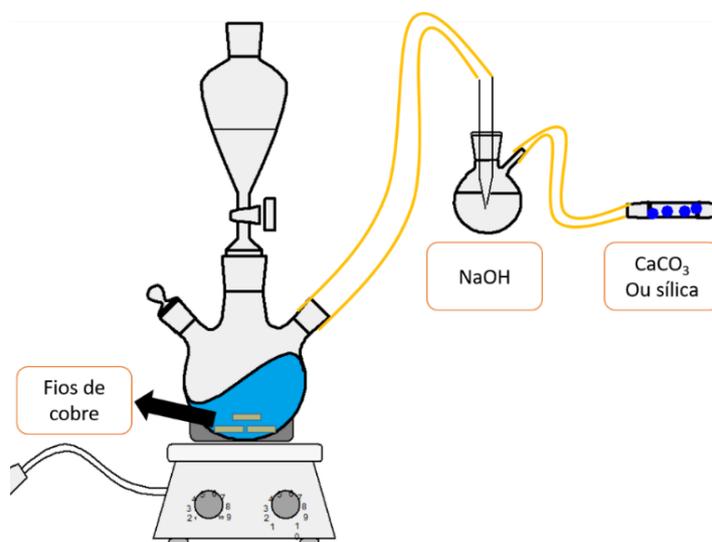
3.3 OBTENÇÃO DO GÁS ÓXIDO NÍTRICO

O gás de óxido nítrico (NO) foi gerado conforme ilustrado na Figura 30, onde em um balão de 3 bocas contendo fios de cobre metálico foi adicionado uma solução de ácido nítrico 33% a partir de um funil de adição. A redução do HNO₃ levando a formação de NO_(g) ocorre segundo a reação (FEELISCH & STAMLER 1996):



Após a reação o óxido nítrico gerado passa por um balão de duas bocas contendo solução saturada de hidróxido de sódio com finalidade de remover possíveis vapores de ácido, e água que podem ser carregados com o gás. Por fim um tubo contendo carbonato de cálcio ou sílica remove o possível dióxido de nitrogênio (NO₂) formado pela oxidação do NO em contato com oxigênio. Ao fim, o NO devidamente seco e purificado chega a saída de gás para reagir e formar o complexo desejado.

Figura 30 – Sistema gerador de óxido nítrico empregado.



Fonte: do autor

3.4 OBTENÇÃO DO GÁS CLORO

O cloro foi gerado a partir da reação de oxidação do ácido clorídrico em contato com permanganato de potássio (KMnO₄) por meio de um aparato esquematizado na Figura 31, empregando um funil de adição e erlenmeyer. A reação é descrita á seguir.

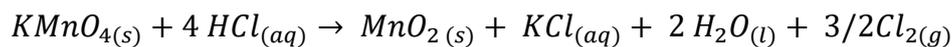
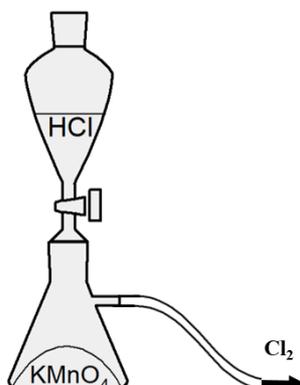


Figura 31 – Sistema de geração de gás cloro.



Fonte: do autor

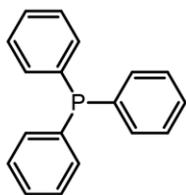
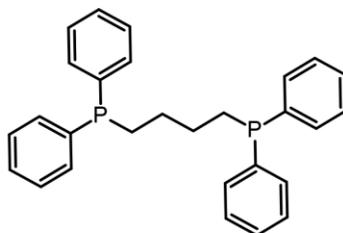
3.5 REAGENTES E LIGANTES

Reagentes de pureza analítica foram empregados como fornecidos, sem tratamento prévio, sendo eles: cloreto de rutênio (III) hidratado, hexafluorofosfato de amônio, ácido nítrico, ácido clorídrico e permanganato de potássio provenientes da Sigma Aldrich. O perclorato de tetrabutylamônio, PTBA, da Acros.

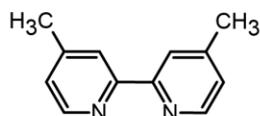
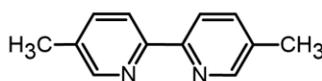
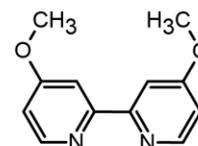
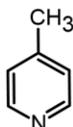
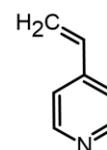
Os ligantes fosfínicos empregados estão representados na Figura 32 (a), sendo estes, trifenilfosfina e 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb). Já os ligantes piridínicos e bipyridínicos: piridina, 4-picolina e 4-vinilpiridina; 4,4'-dimetil-2,2'-bipyridina (4,4'-Me-bipy); 5,5'-dimetil-2,2'-bipyridina (5,5'-Me-bipy) e 4,4'-dimetóxi-2,2'-bipyridina (4,4'-Methoxy-bipy) (Figura 32 (b)), foram obtidos comercialmente, todos de pureza analítica e procedentes da Sigma-Aldrich. O ligante nicotinamida (Figura 32 (c)) foi obtido junto ao Laboratório de Controle de Qualidade UNIFAL-MG.

Figura 32 – Representação estrutural dos ligantes fosfínicos (a), ligantes biperidínicos, piridínicos (b) e nicotinamida (c).

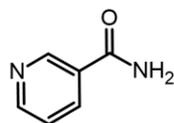
(a)

Trifenilfosfina (**PPh₃**)1,4-bis(difenilfosfina)butano (**dppb**)

(b)

4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
(**4,4'-Mebipy**)5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina
(**5,5'-Mebipy**)4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina
(**4,4'-Mebipy**)Piridina (**Py**)4-metilpiridina (**4Pic**)4-vinilpiridina (**4VPy**)

(c)

Nicotinamida (**Nic**)

Fonte: do autor

3.6 INSTRUMENTAÇÃO

3.6.1 Análise Elementar

As medidas de análise elementar foram realizadas para determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, utilizando-se um analisador ThermoScientific de modelo FlashSmart pertencente à CAQUI-USP (Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos).

3.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram realizados no espectrômetro Bruker modelo AC-300MHz, operando pra ^1H a 300 MHz, 75 MHz para RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e 130 MHz para RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, instalado na Universidade Federal de Alfenas. Todos os experimentos foram realizados em tubos de quartzo, para RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram obtidos solubilizando-se as amostras em CDCl_3 ou $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ dependendo da solubilidade do composto. Para os espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ as amostras foram solubilizadas em diclorometano e um capilar contendo D_2O foi adicionado no interior do tubo de RMN. Todas as análises de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram realizadas a temperatura de 298k e empregando TMS (tetrametilsilano) como referência.

3.6.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro por transformada de Fourier (FTIR) da Shimadzu - Prestige 21, disponível no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ), localizado na Unifal-MG. As amostras foram preparadas macerando-se os complexos com brometo de potássio (KBr) devidamente seco e produzindo pastilhas com o auxílio de uma prensa hidráulica. As análises foram realizadas na região espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} , adquirindo-se 32 scans e utilizando uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.6.4 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros de absorção na região do UV-vis foram registrados utilizando um espectrofotômetro da Thermo Scientific™, modelo Evolution 60S disponível no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ), localizado na Unifal-MG. Os compostos foram solubilizados em diclorometano, obtendo-se soluções nas seguintes concentrações **C1** = $4,79 \times 10^{-5}$, **C2** = $4,73 \times 10^{-1}$ e **C3** = $5,56 \times 10^{-5}$, **C4** = $3,40 \times 10^{-5}$, **C5** = $2,64 \times 10^{-5}$ e **C6** = $4,16 \times 10^{-5}$ mol.L^{-1} . Para os ligantes e precursores preparou-se soluções de concentração de 1×10^{-3} mol.L^{-1} e posteriormente diluiu-se para as concentrações desejadas. As medidas foram realizadas utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm na região compreendida entre 190 e 900 nm.

3.6.5 Condutividade Molar

O condutivímetro empregado nas análises foi MS Tecnopon modelo mCA-150, equipado com cela de platina e constante igual a 1, localizado na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Foram preparadas soluções em CH₂Cl₂ com concentrações na ordem de 1x10⁻³ mol.L⁻¹.

3.6.6 Difração de raios X por monocristal (DRXM)

Monocristais laranja de tamanho adequado foram obtidos para **C1** e **C5** a partir da técnica de evaporação lenta de solventes. As medidas de DRXM foram realizadas em um difratômetro Rigaku XtaLAB Synergy-S, equipado com detector HyPix-6000HE e empregando como fonte de radiação o MoK α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), instalado no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos em parceria com o Prof. Dr. Javier Alcides Ellena e o Prof. Dr. João Honorato de Araujo-Neto.

Os cristais foram separados e selecionados utilizando óleo mineral em cryloop. O software CrysAlisPro (CRYALIS PRO, 2014) foi empregado na coleta de dados, refinamento de cela, redução dos dados e o método multi-scan para correção de absorção. Todas as estruturas foram resolvidas e refinadas utilizando-se o software SHELXL-2018/3 (SHELDRICK, 2015) contido no WinGX (FARRUGIA, 2012). Todas as representações estruturais foram obtidas empregando o (MACRAE *et al.*, 2008).

Para o complexo **C1** todos os átomos, exceto hidrogênio e flúor, foram claramente identificados e refinados por uma matriz completa de mínimos quadrados F2 com parâmetros térmicos anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono foram posicionados estereoquimicamente seguindo um modelo de equitação com comprimentos de ligação C-H fixos de 0,93, 0,96 e 0,97 Å para os grupos aromático, metil e metileno, respectivamente. Os parâmetros térmicos isotrópicos de todos os hidrogênios dependiam dos deslocamentos térmicos isotrópicos equivalentes dos átomos ligados a eles [$U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}$ (C-aromático and C-metilênico) or $1.5U_{\text{eq}}$ (C-metilênico)]. Devido à desordem apresentada pelos átomos de flúor do contra-íon hexafluorofosfato, uma restrição do modelo (octaedro regular) foi aplicada no SHELXL-2018/3 (SHELDRICK, 2015) para o refinamento final dividindo quatro dos seis átomos de flúor em dois grupos (G1 = F1, F2, F3 e F5; G2 = F7, F8, F9 e F10), resultando em uma ocupação final após refinamento de 62:38. Surpreendentemente, os refinamentos apontaram para uma ocupação incompleta da porção carboxamida do ligante

nicotinamida (C6, O1, N4, H4a, H4b). O melhor ajuste encontrou uma ocupação de aproximadamente 25%. Em seguida, o refinamento final teve a ocupação da fração carboxamida fixada em 25%. Picos de densidade eletrônica possivelmente referentes ao solvente (moléculas de água e/ou metanol) foram localizados a partir dos mapas de diferença de Fourier. Devido à desordem e às altas correlações de ocupação/parâmetros térmicos, sua contribuição para a dispersão foi removida em ambos os conjuntos de dados usando a ferramenta de máscara de solvente disponível em OLEX2 (DOLOMANOV *et al.*, 2009).

3.6.7 Difração de raios X por policristal (DRXP)

As medidas de DRXP foram realizadas no difratômetro automático de policristal da marca Rigaku modelo ULTIMA IV do Laboratório de Cristalografia na UNIFAL-MG. Durante os experimentos foi empregado a radiação CuK α (tubo selado) ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) usando ótica instrumental de feixe paralelo. A varredura foi realizada no modo step-scan, entre 3 a 50° 2 θ , adquirindo a contagem a cada 0,05° 2 θ com um tempo de contagem de 5 segundos e para C6 de 15 segundos. Foi usado uma voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA.

Foram realizados refinamento de Rietveld (RIETVELD, 1967, 1969) para os difratogramas de C6 empregando FullProf Suite Toolbar (CARVAJAL, 2001) com a finalidade de confirmar a estrutura isoestrutural de C6 em relação a C5 (determinado por DRXM) com base nos difratogramas obtidos, bem como para obter informações sobre orientação preferencial e estrutura cristalina refinada (parâmetros de célula e coordenadas fracionadas). Pseudo-Voigt Thompson-Cox-Hasting, e a função modificada de March foi usada para modelar a orientação preferencial. Para o refinamento Rietveld final, todos os parâmetros de rede foram liberados iterativamente, e algumas posições atômicas e parâmetros térmicos foram submetidos a refinamento.

3.6.8 Espectrometria de massas (EM)

Os experimentos de espectrometria de massas para os complexos C1, C2 e C3 foram realizados em um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Bruker modelo Maldi Autoflex Max. As amostras foram preparadas com matrix HCCA contendo 10 mg mL⁻¹ em 50% de acetonitrila e 0.1% TFA(ácido trifluoracético) na proporção 1:1 (v/v) e depois foram depositadas em placas seguindo o método da gota seca.

3.6.9 Voltametria cíclica (VC)

As medidas eletroquímicas foram obtidas em um potenciostato Autolab® PGSTAT 128N (Eco Chemie) da Universidade Federal de Alfnas e os dados foram processados utilizando-se o software GPES (General Purpose Electrochemical System). O sistema foi composto por uma célula eletroquímica de vidro, com capacidade para 10 mL e três eletrodos: um de referência Ag/AgCl e os eletrodos de trabalho e auxiliar, ambos de platina. Soluções eletrolíticas 0,1 mol·L⁻¹ de perclorato de tetrabutílamônio (PTBA) em diclorometano foram preparadas de modo a se obter concentrações dos complexos a serem analisados da ordem de 1,0 x 10⁻³ mol·L⁻¹. Durante todas as medidas utilizou-se atmosfera inerte.

3.6.10 Análises Térmicas (TG e DTA)

As técnicas de termogravimetria (TGA) e Análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas empregando-se a termo balança da TA Instruments, modelo Q600 disponível no Laboratório Interdisciplinar de Química da UNIFAL-MG. Cada amostra com massa de aproximadamente 10 mg foi analisada em um cadinho de alumina e submetida a um aquecimento controlado até 1000 °C, com razão de aquecimento de 20°C·min⁻¹, sob atmosfera de ar sintético e fluxo contínuo de 100 mL·min⁻¹.

4 METODOLOGIAS

4.1 SÍNTESE DOS COMPLEXOS PRECURSORES

4.1.1 Dicloro-tris(trifenilfosfina)rutênio(II), $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$

O precursor $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$, foi obtido a partir da redução do tricloreto de rutênio (III) hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) com trifenilfosfina (PPh_3), utilizando modificações do procedimento descrito na literatura por (STEPHENSON; WILKINSON, 1966). Cerca de 1,00 g de $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (4,82 mmol) foi dissolvido em 200 mL de metanol desaerado sob refluxo em balão volumétrico e sob atmosfera inerte por 20 minutos. Na sequência, 6,32 g (24,11 mmol) de trifenilfosfina foram adicionados e a solução foi mantida sob refluxo em atmosfera inerte por três horas. Nesse período observou-se a formação de um precipitado marrom que foi filtrado em funil de placa porosa, lavado com metanol e hexano a quente e previamente desaerados (remoção do excesso de fosfina livre) e por fim seco sob vácuo. Rendimento: 3,94 g (85,2 %).

4.1.2 μ -[1,4-bis(difenilfosfina)butano]-bis-dicloro-[1,4-bis(difenilfosfina)butano]dirutênio(II), $[\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\mu\text{-dppb})_3]$

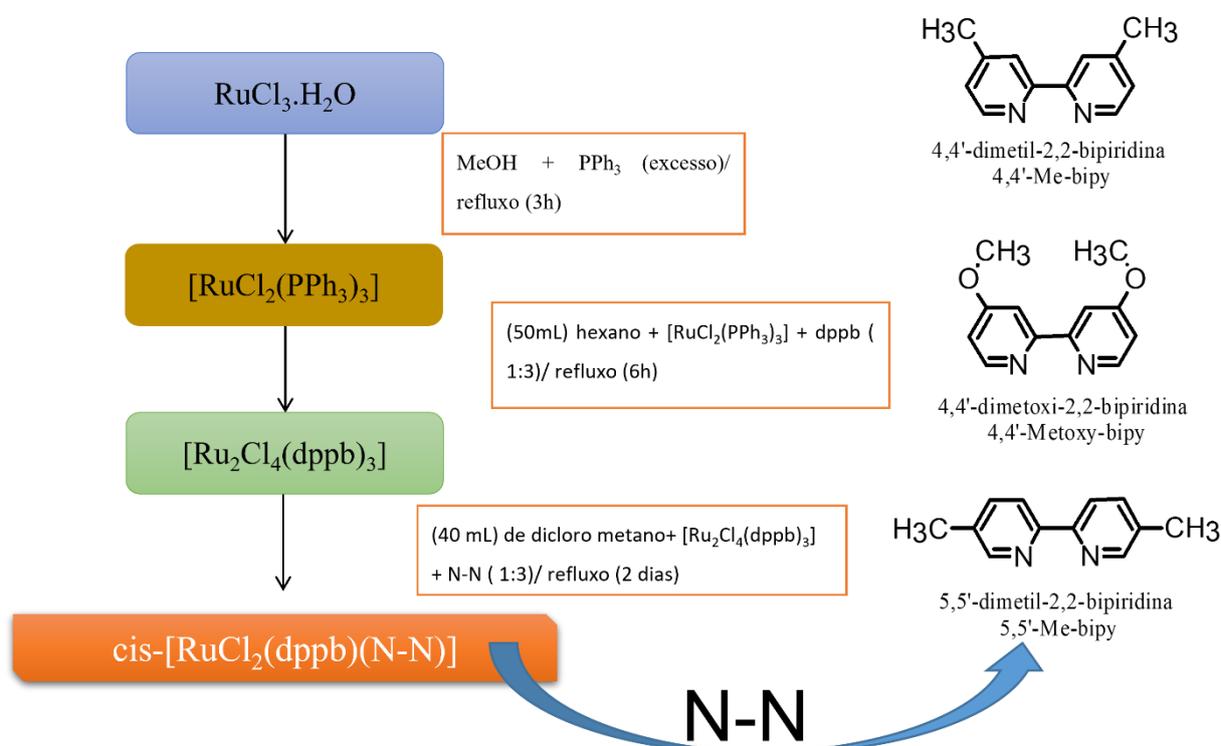
O complexo binuclear de rutênio (II) foi sintetizado de acordo com o procedimento da literatura (BRESSAN; RIGO, 1975), que consistiu em adicionar 100 mL de hexano em um balão volumétrico e desaerar em atmosfera de argônio por 20 minutos. Posteriormente adicionou-se 0,50 g (0,52 mmol) do complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ e 0,67 g (1,56 mmol) de 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb) numa proporção 1:3 (precursor/ligante). O meio reacional foi mantido sob refluxo e agitação por 6 horas. Formou-se um precipitado verde que foi filtrado e lavado com metanol desaerado (2 x 20 mL) e depois com hexano desaerado (2 x 20 mL) a fim de remover o excesso de trifenilfosfina. Por fim, o composto foi seco a vácuo. Rendimento: 0,78 g (92,10 %).

4.1.3 *cis*-dicloro[1,4-bis(difenilfosfina)butano]-(N-N)rutênio(II), *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$, onde N-N = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (4,4'-Me-bipy), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (4,4'-Metoxy-bipy) e 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (5,5'-Me-bipy)

As sínteses dos complexos precursores bipyridínicos foram realizadas como descrito na literatura por (QUEIROZ *et al.*, 1998) com algumas modificações. Adicionou-se 0,30 g (0,18 mmol) do complexo $[\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\mu\text{-dppb})_3]$ em 40 mL de tolueno desaerados no interior de um frasco tipo schlenk. Foi realizado vácuo e mantido sob agitação até a dissolução, na sequência adicionou-se 0,10 g (0,55 mmol); 0,12 g (0,55 mmol) do ligante bipyridínico N-N= 4,4'-Me-bipy/5,5'-Me-bipy ou 4,4'-Metoxy-bipy respectivamente na proporção 1:3 precursor/ligante. O meio reacional foi mantido sob agitação, atmosfera inerte e aquecimento em refluxo por 48 h. Ao final houve a formação de um precipitado vermelho, o qual foi filtrado sob vácuo, lavado com hexano e seco à vácuo. Rendimentos: 0,13 g (89,9 %), 0,12 g (83,0 %) e 0,13 g (86,4 %) referentes aos complexos *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxy-bipy})]$, respectivamente.

Dessa maneira os precursores empregados na serie 1 de complexos sintetizados neste trabalho apresentaram rota sintética sumarizada no Esquema 1 abaixo

Esquema 1 – Rota sintética empregada na obtenção dos precursores *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$, onde N-N = 4,4'-dimetil-2,2-bipiridina (4,4'-Me-bipy), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (4,4'-Metoxy-bipy) e 5,5'-dimetil-2,2-bipiridina (5,5'-Me-bipy).



4.1.4 Tricloro[1,4-bis(difenilfosfina)butano](aqua)rutênio (III), *mer*-[RuCl₃(dppb)(H₂O)]

O aqua complexo foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita na literatura por (BATISTA; QUEIROZ, 2006), dissolvendo-se 0,20 g (0,12 mmol) do precursor binuclear [Ru₂Cl₄(μ-dppb)₃] em 20 mL de metanol desaerado contidos em um schlenk. À solução foi borbulhado gás cloro (utilizando-se do sistema mostrado na seção 3.4) até a formação de um precipitado vermelho, que foi lavado com éter etílico e seco a vácuo. Rendimento: 0,073 g (90,9 %).

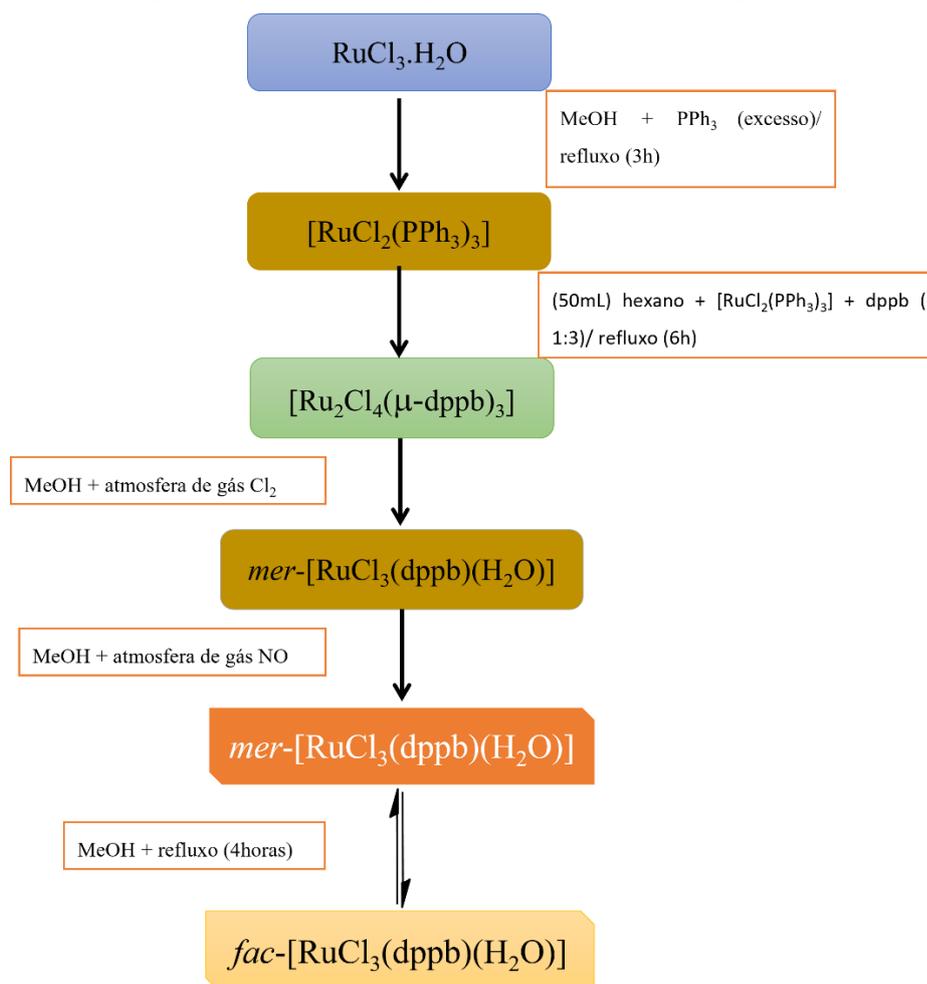
4.1.5 *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)]

O complexo foi preparado pela metodologia descrita na literatura (BATISTA *et al.*, 1999) que consistiu em adicionar 0,20 g (0,31 mmol) do complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(H₂O)] em um frasco tipo schlenk contendo 15 mL de diclorometano desaerado. A solução foi conectada à saída da linha do sistema gerador de óxido nítrico (seção 3.3) e na sequência foi feito vácuo e atmosfera de NO várias vezes com agitação até que a coloração da solução mudasse do vermelho para o marrom. A partir desse momento, reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 3 mL e na sequência adicionou-se éter etílico desaerado, promovendo a formação de precipitação marrom claro, o qual foi filtrado, lavado com éter e seco sob vácuo. Rendimento: 0,16 g (78,5 %).

4.1.6 *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)]

O isômero facial foi preparado de acordo com a metodologia descrita na literatura por (VON POELHSITZ *et al.*, 2002), onde desaerou-se cerca de 40 mL de metanol em um frasco tipo schlenk por cerca de 20 minutos e então adicionou-se 0,20 g (0,30 mmol) do complexo *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)]. O meio reacional foi mantido sob agitação e em aquecimento sob refluxo por 4 horas, observando-se ao final a formação de um precipitado amarelo. O mesmo foi filtrado em funil de placa sinterizada e lavado com éter etílico e metanol desaerado para remover qualquer excesso do isômero *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)].

Por fim a rota sintética completa para o precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] empregado na síntese dos complexos da série 2 encontra-se resumida no Esquema 2 abaixo.

Esquema 2 – Rota sintética empregada na obtenção dos precursor $mer\text{-}[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$.

Fonte: do autor

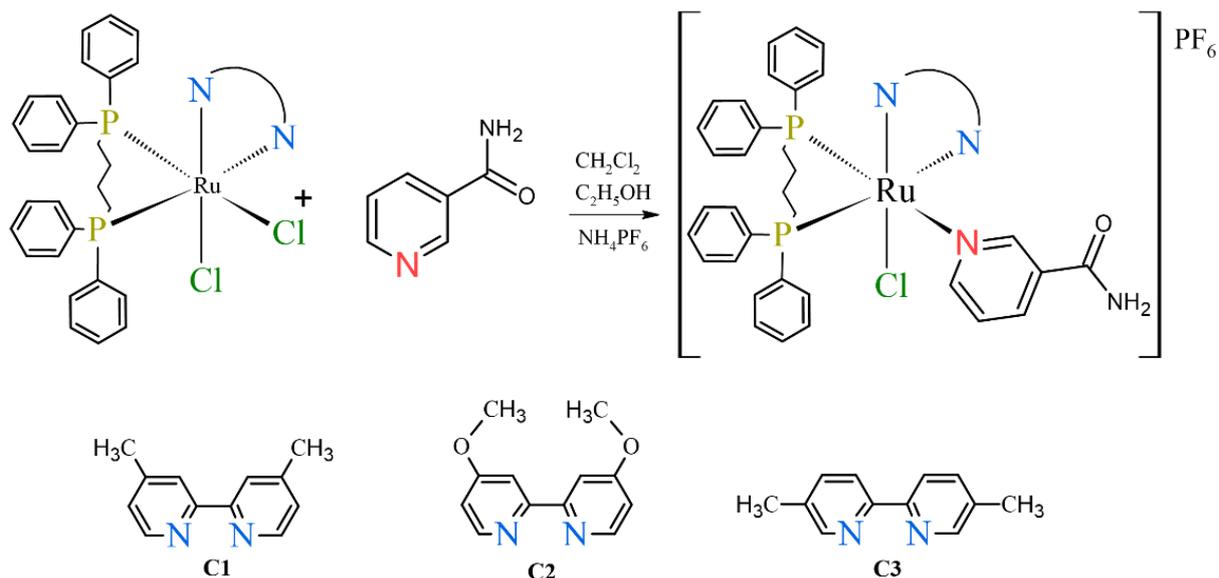
4.2 SÍNTESE DOS NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II)

4.2.1 Síntese dos complexos $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (C1), $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(4,4'\text{-Methoxy-bipy})]\text{PF}_6$ (C2) e $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (C3)

As sínteses de **C1**, **C2** e **C3** foram realizadas pela adição de 0,05 g (0,06 mmol) dos respectivos precursores com 0,016 g (0,13 mmol) de nicotinamida, proporção 1:2 precursor/ligante, e aproximadamente 0,010 g (0,064 mmol) de hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6) em uma solução de CH_2Cl_2 (15 mL) e $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (5 mL) devidamente desaerada, na proporção 1:3 e no interior de um frasco tipo schlenk. As reações permaneceram sob atmosfera inerte de argônio com agitação por 2 h. Decorrido o tempo notou-se a mudança de coloração de vermelho para laranja, então a solução foi concentrada até aproximadamente 1 mL e então adicionou-se água e obteve-se um precipitado de coloração alaranjada que foi filtrado e

seco a vácuo. Rendimentos: 0,047 g (72,5 %), 0,047 g (73,2 %) e 0,045g (69,4 %) para **C1**, **C2** e **C3** respectivamente. A rota sintética esta representada no Esquema 3.

Esquema 3 – Rota sintética empregada na obtenção dos complexos **C1-C3**.

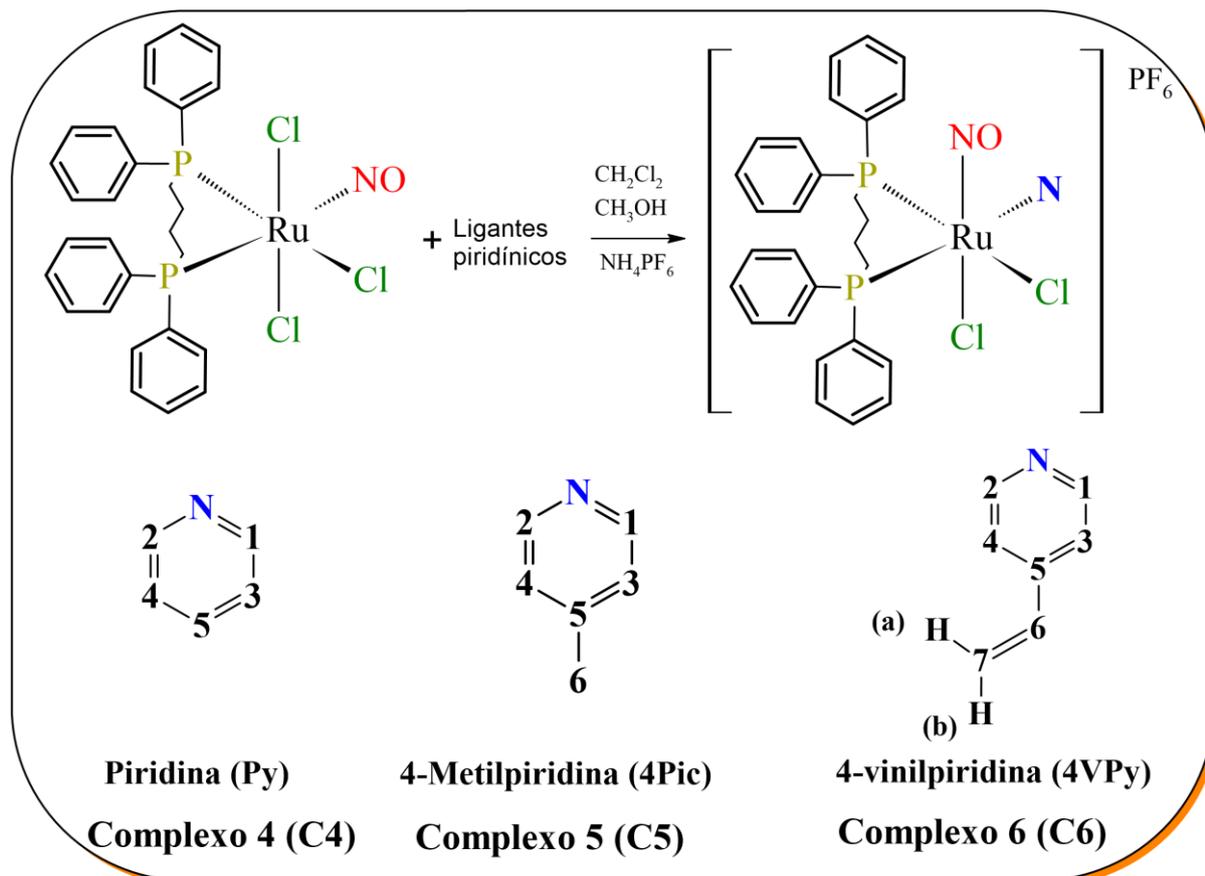


Fonte: do autor

4.2.2 Síntese dos nitrosilo complexos de rutênio (II) contendo ligantes piridínicos de fórmula *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppb})(\text{L})]\text{PF}_6$, onde L= Piridina (Py) (**C4**), 4-metilpiridina (**4Pic**) (**C5**) e 4-vinilpiridina (**4VPy**) (**C6**).

Os compostos foram preparados pela adição de 0,050 g (0,075 mmol) do precursor *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$, 22 μL (0,22 mmol) dos respectivos ligantes piridínicos (1:3 precursor/ligante) e 0,012 g (0,075 mmol) de NH_4PF_6 em um schlenk contendo uma solução de CH_2Cl_2 (12 mL) e CH_3OH (4 mL) previamente desaerados. As reações foram mantidas sob agitação e atmosfera inerte por 2 h, onde notou-se ma mudança de coloração de marrom escuro para marrom claro. Em seguida, a solução foi concentrada para aproximadamente 1 mL e éter etílico foi adicionado forçando a precipitação de um sólido marrom claro, que foi filtrado, lavado com água para remover o excesso do ligante e seco sob vácuo. Rendimentos: 0,053 g (85,2 %), 0,055 g (84,3 %) e 0,058 g (87,6 %) para **C4**, **C5** e **C6** respectivamente. A rota sintética esta sumarizada no Esquema 4 abaixo.

Esquema 4 – Rota sintética empregada para obtenção dos complexos C4, C5 e C6



Fonte: do autor

4.2.3 Síntese do complexo de fórmula $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$, onde Py= piridina, dppb= 1,4-bis(difenilfosfina)butano e 5,5'-Me-bipy= 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina.

O complexo foi sintetizado de acordo com procedimento descrito na literatura por (SILVA *et al.*, 2018). Adicionou-se 0,050 g (0,06 mmol) do precursor $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]$ em schlenk contendo em 15 mL de CH_2Cl_2 previamente desaerado. Na sequência, 15,5 μL (0,19 mmol) de piridina e 0,02 g (0,13 mmol) do contra-íon NH_4PF_6 foram adicionados. O meio reacional foi mantido sob agitação e atmosfera inerte por 30 minutos. A solução foi concentrada até aproximadamente 1 mL e então 15 mL de água foram inseridos para forçar a precipitação de um sólido laranja, que foi filtrado e seco a vácuo. Rendimento 0,052 (80,7 %)

4.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

O estudo da estabilidade em solução dos complexos sintetizados foi avaliado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ no espectrômetro Bruker modelo AC-300MHz, operando a 130 MHz localizado na Universidade Federal de Alfenas.

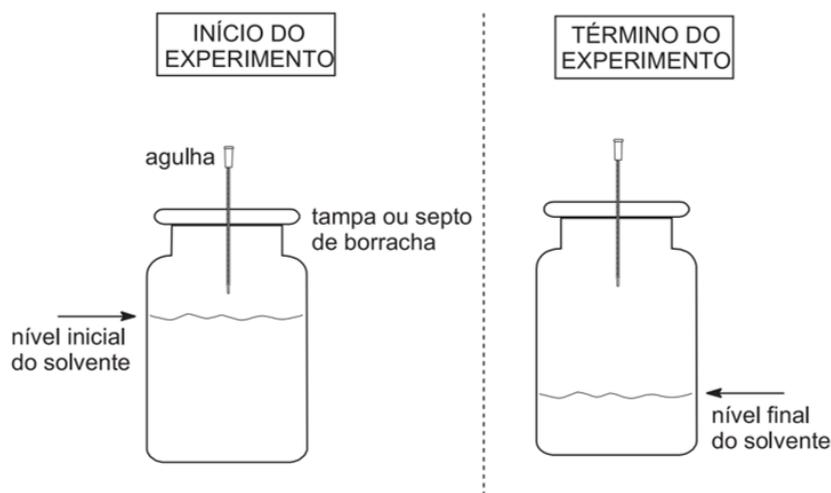
Para a série 1, as amostras foram preparadas individualmente pesando-se 0,01 g do composto e 600 μL dos seguintes solventes $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, CD_2Cl_2 , CD_3OD ou $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$. Os compostos **C1**, **C2** e **C3** foram avaliados nos intervalos de 0, 24 e 48 horas para $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e nos demais solventes 0, 24, 48 e 72 horas. Em uma segunda etapa, cada amostra foi solubilizada em DMSO (sem exceder 0,5% v/v permitido em análises biológicas *in vitro*) e meio biológico de cultivo das células (DMEM) na proporção 8:3 foi adicionado. Estas soluções foram analisadas nos intervalos de 0, 24 e 48 horas.

Já a série 2, os ensaios de estabilidade foram avaliados $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (capilar de D_2O), nos tempos 0, 15, 60, 240 minutos, 24 e 48 horas. Ademais, preparou-se uma solução contendo 0,012 g do composto **C4** em 600 μL de CD_2Cl_2 e 5 μL do ligante piridina livre e avaliou-se nos tempos mencionados.

4.4 CRESCIMENTO DE CRISTAIS

Os monocristais de **C1** e **C5** foram obtidos a partir do método simples, porém eficaz de evaporação lenta de solvente, conforme ilustrado na Figura 33, que baseia-se em solubilizar os complexos de interesse em um solvente, ou mistura de solventes (com diferentes polaridades), vedando o cristalizador e realizando pequenas perfurações na vedação com o objetivo de que o vapor de solvente em equilíbrio com a solução escape o mais lentamente possível. Após a montagem do sistema, deixou-se o cristalizador em repouso até atingir o ponto de saturação do sólido e favorecer o processo de nucleação e crescimento do cristal (ROSA, I. M. L. 2012, p.67).

Figura 33 – Representação esquemática do método de lenta evaporação de solvente



Fonte: (CUNHA, 2008).

Neste trabalho empregou-se as misturas de solventes: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ na proporção 1:2 v/v para o complexo **C1** e $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ na proporção 3:1 v/v para **C5**, estas foram armazenadas no freezer, resultando na formação de monocristais como o da Figura 34, para **C1**.

Figura 34 – Monocristais formados para **C1** por evaporação lenta de solvente.



Fonte: do autor

4.5 ESTUDO DA INTERAÇÃO COM DNA POR TITULAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

O estudo da interação dos complexos sintetizados da série 1 com o DNA foi realizado em um espectrofotômetro Shimadzu UV1800 disponível no Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (LACFar - Unifal-MG). As análises foram realizadas por meio de titulação espectroscópica à temperatura ambiente, onde uma solução de DNA foi preparada

adicionando-se 0,02 g de ct-DNA em 10 mL de tampão Trizma (4,5 mM de Tris HCl; 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) com pH = 7,4.

A concentração real de DNA por nucleotídeo foi determinada por espectroscopia de UV-vis, empregando o coeficiente de absorção molar de 6600 L·mol⁻¹·cm⁻¹ em 260 nm e aplicando-se a lei de Lambert-Beer descrita abaixo:

$$A_{260} = \epsilon_{260} \cdot b \cdot c$$

Na equação acima, A (u.a) refere-se à absorbância do cromóforo, neste caso o DNA, ϵ (L·mol⁻¹·cm⁻¹) é a absorvidade molar, b (cm) é o caminho óptico e c (mol·L⁻¹) é a concentração molar da solução.

As titulações foram realizadas adicionando-se em uma cubeta 1800 μ L de tampão trizma, 120 μ L da solução do complexo a ser analisado em DMSO na concentração de 1x10⁻³ mol·L⁻¹ (100 μ L para **C2** e **C3**) e 80 μ L de DMSO (100 μ L para **C2** e **C3**). Em outra cubeta, a de referência, foi adicionado 1800 μ L de tampão trizma e 200 μ L de DMSO com a finalidade de subtrair as diferenças de absorbância entre o espectro da solução e dos complexos analisados.

Posteriormente em cada cubeta foi adicionado 15 μ L de DNA-ct, estas foram homogeneizadas durante 2 minutos e em seguida os espectros foram registrados na região espectral de 200 a 450 nm. Este procedimento foi repetido até não se observar grandes alterações na absorvidade molar da solução do complexo após adição contínua de DNA-ct.

A constante de ligação de equilíbrio intrínseca (K_b) dos complexos com DNA foi obtida monitorando as alterações na intensidade de absorção com o aumento da concentração de DNA-ct através da análise de regressão e da equação de *Neighbor Exclusion*, descrita no item 4.3. O DNA-ct, a solução tampão Trizma e solvente DMSO foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich.

4.6 ESTUDO DA INTERAÇÃO COM ALBUMINA DE SORO HUMANA (HSA) POR FLUORIMETRIA

Os complexos da série 1 foram avaliados quanto à sua habilidade de interagir com a proteína mais abundante no corpo humano, a albumina de soro humana (HSA). Tais interações foram avaliadas a partir da supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano e tirosina

presentes na HSA ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão Trizma ($4,5 \text{ mM}$ de Tris HCl; $0,5 \text{ mM}$ de Tris base e 50 mM de NaCl) com $\text{pH} = 7,4$.

As análises foram realizadas em um fluorímetro Cary Eclipse da Varian em triplicata utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm , presente no Laboratório de Bioquímica da Unifal-MG. Nos ensaios, preparou-se uma solução de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HSA em tampão e adicionou-se soluções dos complexos em diferentes concentrações (0 - $50 \mu\text{M}$). Uma solução padrão foi preparada com $900 \mu\text{L}$ de HSA e $100 \mu\text{L}$ de DMSO e sua fluorescência foi medida, atuando como referência.

O comprimento de onda de excitação HSA foi definido em 280 nm e as medições foram realizadas em três temperaturas de incubação (298 , 304 e 310 K), permitindo a aquisição de espectros de emissão de 290 - 450 nm . A HSA, a solução de tampão Trizma e solvente DMSO foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich.

4.7 ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

A avaliação da atividade antiproliferativa e citotóxica dos complexos sintetizados foi realizada no Laboratório de Avaliação de Protótipos Antitumorais (LAPAN), Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, sob a supervisão da Profa. Dra. Marisa Ionta, Dr. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva e Dr. Bruno Zavan.

4.7.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Os ensaios foram realizados nas linhagens tumorais: adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma hepatocelular (HepG2), adenocarcinoma de pulmão (A549) e melanoma (SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1). Para avaliação do perfil de citotoxicidade frente células normais foi utilizada a linhagem de fibroblastos normais derivados de pele humana saudável (FPM). Todas as linhagens celulares foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS, Cultilab, SP, Brasil), mantidas em atmosfera controlada ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2). Os complexos de rutênio (II) foram solubilizados em DMSO e diluídos no meio de cultura para obtenção das soluções de trabalho imediatamente antes dos tratamentos. A concentração final de DMSO no meio de cultura não ultrapassou $0,1\%$ (v/v).

4.7.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico empregando sulforrodamina B (SRB) para quantificar o conteúdo proteico. As células foram semeadas em placas de 96 poços, utilizando inóculo de 2×10^4 (HepG2), 1×10^4 em células SK-MEL-147, WM1366, CHL-1 e MCF-7 ou 5×10^3 células de A549 por poço. Inicialmente, as culturas foram tratadas com os complexos **C1-C3** (screening) na concentração de 40 μ M por 48 h para HepG2, A549, MCF-7 e SK-MEL-147. Os precursores e o ligante NIC foram incluídos nesta análise empregando 100 μ M de concentração por 48 h e, posteriormente, curvas dose-respostas foram obtidas a partir do tratamento por 48 h para os complexos ativos. Em uma segunda etapa, as células de melanoma (SK-MEL-147, CHL-1 e WM1366) foram tratadas com várias concentrações (1-100 μ M) de **C3** por 48 h para determinar a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (IC_{50}).

Após o tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 15% a 4°C por 1 h. Em seguida, as amostras foram coradas com solução SRB 0,4% por 1 hora. Após várias etapas de lavagem em ácido acético a 1 %, o SRB ligado foi solubilizado com um tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (10 Mm). Decorrido o tratamento as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm e a viabilidade celular foi definida comparando-se os valores de absorbância entre amostras tratadas com os valores de absorbância obtidos nas amostras controles.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os dados apresentados representam a média \pm o desvio padrão (DP), mediante o cálculo da concentração inibitória mínima (IC_{50}).

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{(\text{Abs amostra} \times 100)}{\text{Abs controle}}$$

Após as análises das curvas de viabilidade (% de células viáveis em relação ao controle não tratado), os valores de CI_{50} foram determinados usando o programa GraphPadPrism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O índice de seletividade (SI) foi determinado por meio da razão entre o valor de IC_{50} para a linha celular normal e o valor de IC_{50} para a linha celular de câncer

Os valores de IC_{50} foram determinados a partir de regressão não linear usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) e o índice de

seletividade (SI) foi definido como a razão entre o valor de IC₅₀ para a linhagem celular normal e tumoral.

4.7.3 Teste de exclusão azul Trypan

Para o ensaio de exclusão com azul de tripano as células foram semeadas em placas de 35 mm a uma densidade de 2×10^5 células/placa. Após a adesão, as células foram tratadas com o **C3** nas concentrações de 10 e 20 μM por 24 e 48 h. Decorrido o tempo de tratamento, as populações de células viáveis e inviáveis foram coletadas com tripsina/EDTA e a solução de azul de Trypan (0,4 %) foi adicionada à suspensão celular (1:1) as células foram coletadas com tripsina/EDTA e solução de azul de tripano (0,4 %) foi adicionada à suspensão celular (1:1). Posteriormente, as células foram contadas usando uma câmara de hemocitômetro e um microscópio de luz para determinar a frequência de células inviáveis (coloridas em azul) e viáveis (não coradas).

4.7.4 Análise da progressão do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada de acordo com o trabalho de Ferreira-Silva e colaboradores (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017a). As células CHL-1 foram semeadas em placas com 35 mm com densidade de 1×10^5 células/poço. Após a adesão, as células foram tratadas com **C3** nas concentrações 10 μM e 20 μM por 24 h. Após o término do tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática com solução de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e fixadas com etanol a 4°C (75% em solução salina de fosfato tamponada com PBS) por 30 min. Após centrifugação (5 min a 1000 rpm), o precipitado de células foi homogeneizado em tampão salina fosfato e as células fixadas em etanol gelado (75 %) por 30 min. Posteriormente, as células foram coradas por 1 h com solução corante contendo RNase (1,5 mg mL⁻¹, Sigma) e iodeto de propídio (90 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A análise foi realizada em um citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT, contendo o software GuavaSoft 2.7). Os dados foram apresentados como média \pm DP de 3 experimentos independentes.

4.7.5 Ensaio da capacidade clonogênica

O ensaio clonogênico foi realizado de acordo com algumas modificações dos procedimentos descritos por Franken e colaboradores (FRANKEN *et al.*, 2006). As células foram semeadas em placas de 35 mm de diâmetro com densidade de 500 células/placa. Após a

adesão (24h), as células foram tratadas com o composto **C3** nas concentrações de 10 e 20 μM por 24 h. Decorrido o período de tratamento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco, e as culturas celulares foram mantidas na incubadora (37 °C) por 15 dias subsequentes. Após o período de incubação, as culturas foram lavadas com PBSA e fixadas por 30 minutos com metanol P.A (Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). Após secagem, as placas foram coradas com cristal violeta por 5 minutos. A quantificação das colônias foi realizada em microscópio estéreo (aumento de 20x) e foram contadas apenas as colônias com pelo menos 50 células.

4.7.6 Detecção de apoptose por ensaio de Anexina V/7-AAD

O ensaio de anexina V foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico do tratamento com o complexo **C3** frente a linhagem CHL-1. Assim sendo, foi empregado o Kit Guava Nexin Reagent (Merck/millipore) de acordo com instruções do fabricante. As células foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço. As culturas foram tratadas com o composto **C3** por 48 h nas concentrações de 10 e 20 μM . A *cis*-platina foi utilizada como controle positivo na concentração de 100 μM . Após o tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina/EDTA, Sigma-Aldrich LTDA, Brasil), centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4 °C e lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram homogeneizadas em solução contendo Anexina V conjugada a PE (ficoeritrina) e 7-AAD (7-amino-actinomicina D). As amostras foram incubadas por 20 minutos, protegidas da luz em temperatura ambiente e a análise foi feita por citometria de fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) por meio do software GuavaSoft 2.7.

4.7.7 Medidas dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), as células foram semeadas em placas de 35 mm a uma densidade de 1×10^5 células/poço. Após 24 h, as células foram tratadas com composto **C3** nas concentrações de 10 e 20 μM por 30 min, 2 h e 4 h. Em seguida, as culturas celulares foram incubadas com CellROX® Green Reagent (concentração final de 5 μM) por 30 min a 37 °C. As células foram coletadas e a análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando o Guava Mini Easy Cyte contendo o software GuavaSoft 2.7.

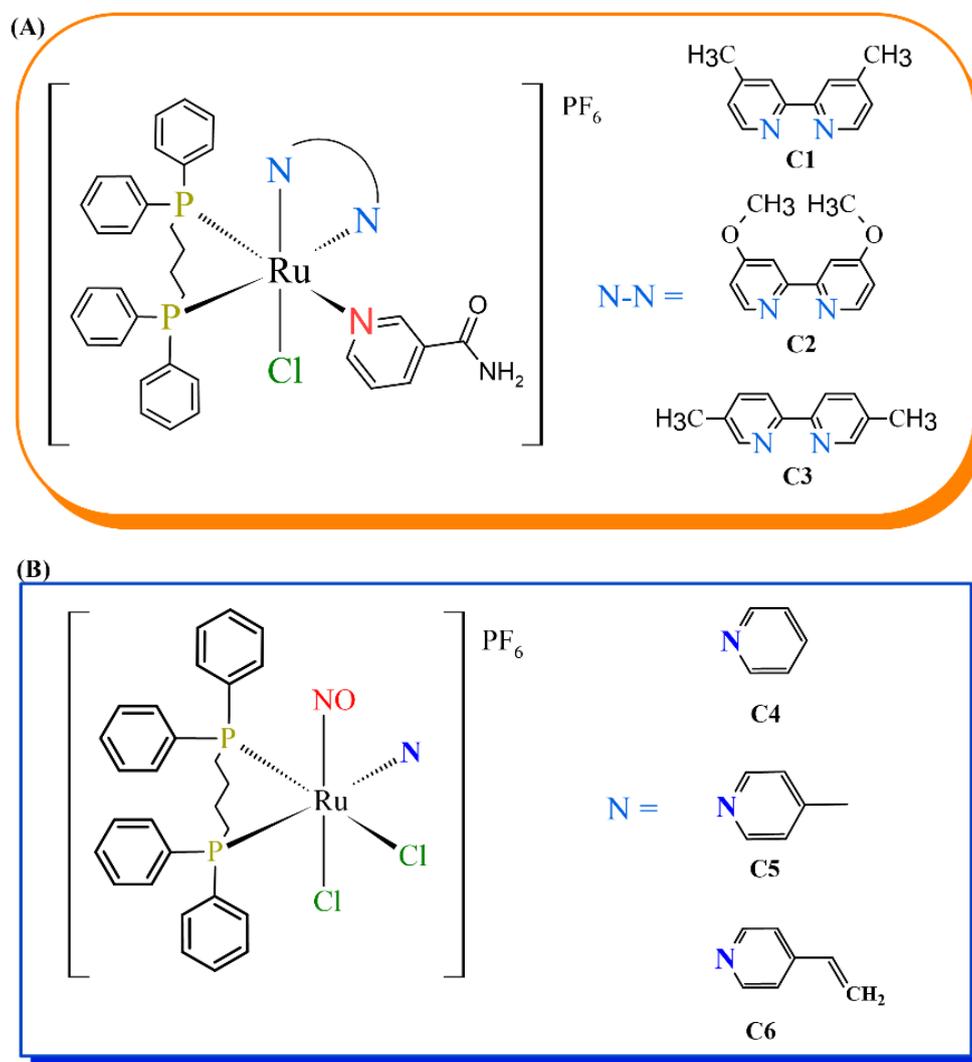
4.7.8 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão (DP) de, pelo menos, três experimentos independentes. Diferenças significativas foram determinadas usando análises de variância (ANOVA) seguidas pelo pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em consideração a semelhança estrutural dos complexos de rutênio (II) obtidos nesta tese, optou-se por apresentar os resultados e discussão em séries, sendo estas a **série 1**, a qual é composta por três complexos de fórmula geral $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$, onde NIC = nicotinamida, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e X-bipy= 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (**C1**), 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina (**C2**) e 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (**C3**) (Figura 35 – A) e a **série 2**, que é composta por nitrosilo complexos de Ru(II) de fórmula geral $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppb})(\text{L})]\text{PF}_6$, onde L= piridina (**C4**), 4-metilpiridina (**C5**) e 4-vinilpiridina (**C6**) (Figura 35 – B).

Figura 35 – Complexos sintetizados: (A) série 1 e (B) série 2.



Fonte: do autor

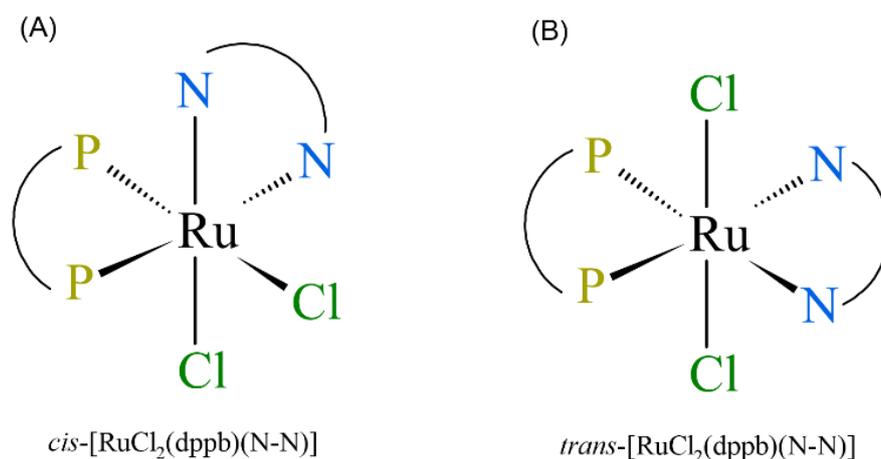
A rota sintética foi acompanhada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, sendo fundamental para verificar o término das reações, já que o fósforo é sensível a modificações estruturais trans posicionadas a ele. Dessa forma foi possível verificar quando os precursores foram completamente consumidos, conforme veremos a seguir nas caracterizações.

5.1 SÉRIE 1

5.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

Os complexos precursores empregados na série 1 apresentam dois isômeros geométricos, as quais estão representados na Figura 36. Estes, caracterizam-se por apresentar os átomos de cloro na posição *cis* Figura 36 (A), ou na posição *trans* Figura 36 (B) (QUEIROZ *et al.*, 1998). No isômero *cis*, os átomos de fósforo não são equivalentes levando a observação de dois dubletos no espectro, além de representar a estrutura mais estável termodinamicamente. Já o isômero *trans*, o mais estável cineticamente, apresenta átomos de fósforo equivalentes, o que é característico da observação de um singlete no espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (SANTOS, 2011).

Figura 36 – Isômeros geométricos para os complexos precursores empregados de fórmula $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$, sendo a forma *cis* (A) e *trans* em (B).

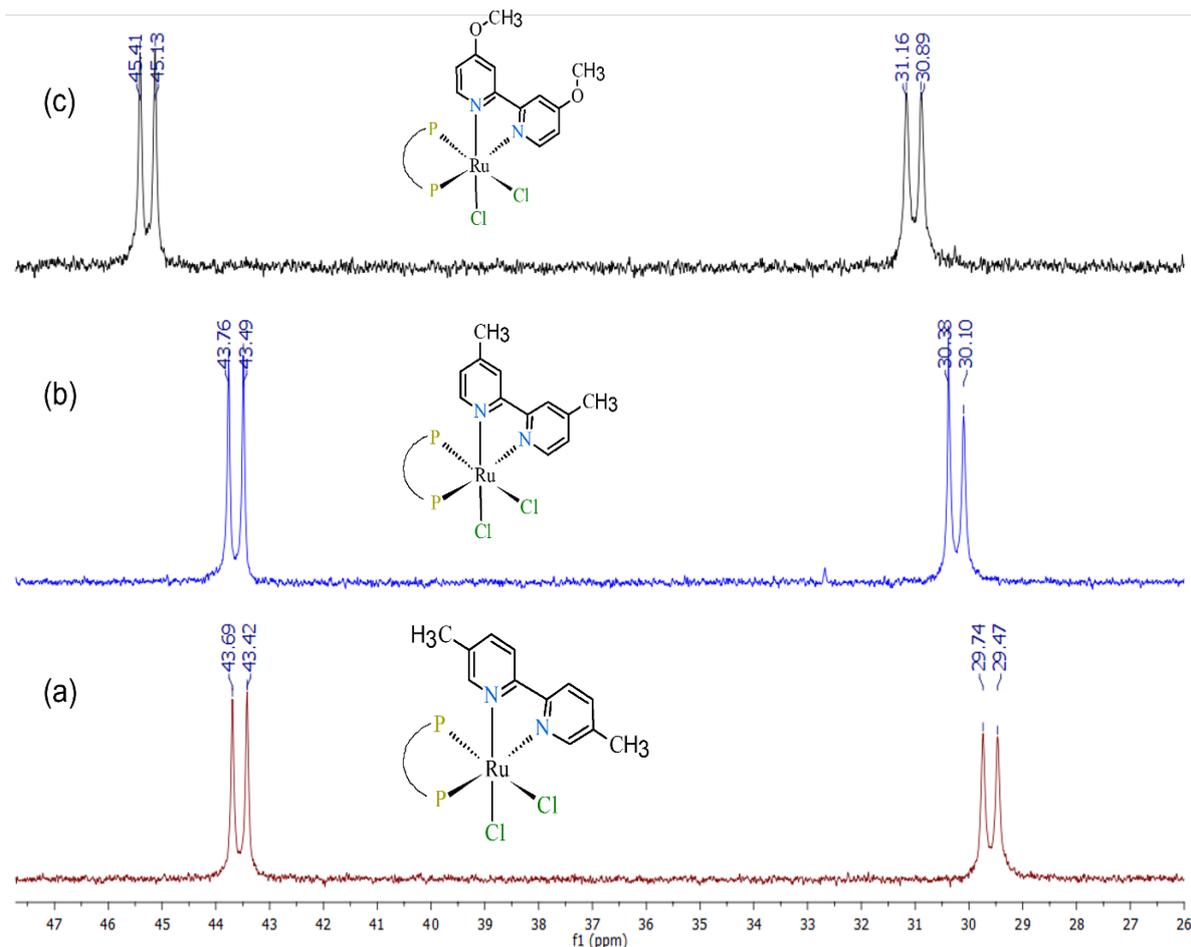


Fonte: do autor

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos precursores *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxi-bipy})]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]$ são demonstrados na

Figura 37, e estão condizentes com o perfil encontrado na literatura (MACFARLANE *et al.*, 1996; QUEIROZ *et al.*, 1998; SANTIAGO, O.M, 2004). Ademais, os deslocamentos químicos bem como as constantes de acoplamento ($^2J_{P-P}$) estão sumarizados na Tabela 2.

Figura 37 – Espectros de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ em CH_2Cl_2/D_2O dos complexos precusores: e *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)] (a), *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)] (b) e *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)] (c)



Fonte: do autor

Como esperado, quando comparamos o efeito da posição dos grupos metílicos nas bipyridinas substituídas nos complexos *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)] e *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)] observamos diferenças sutis nos deslocamentos de $^{31}P\{^1H\}$. Já para o precursor com a 4,4'-Metoxi-bipy, uma bipyridina mais básica (Tabela 2) os deslocamentos químicos no espectro de $^{31}P\{^1H\}$ são observadas um pouco mais desblindados.

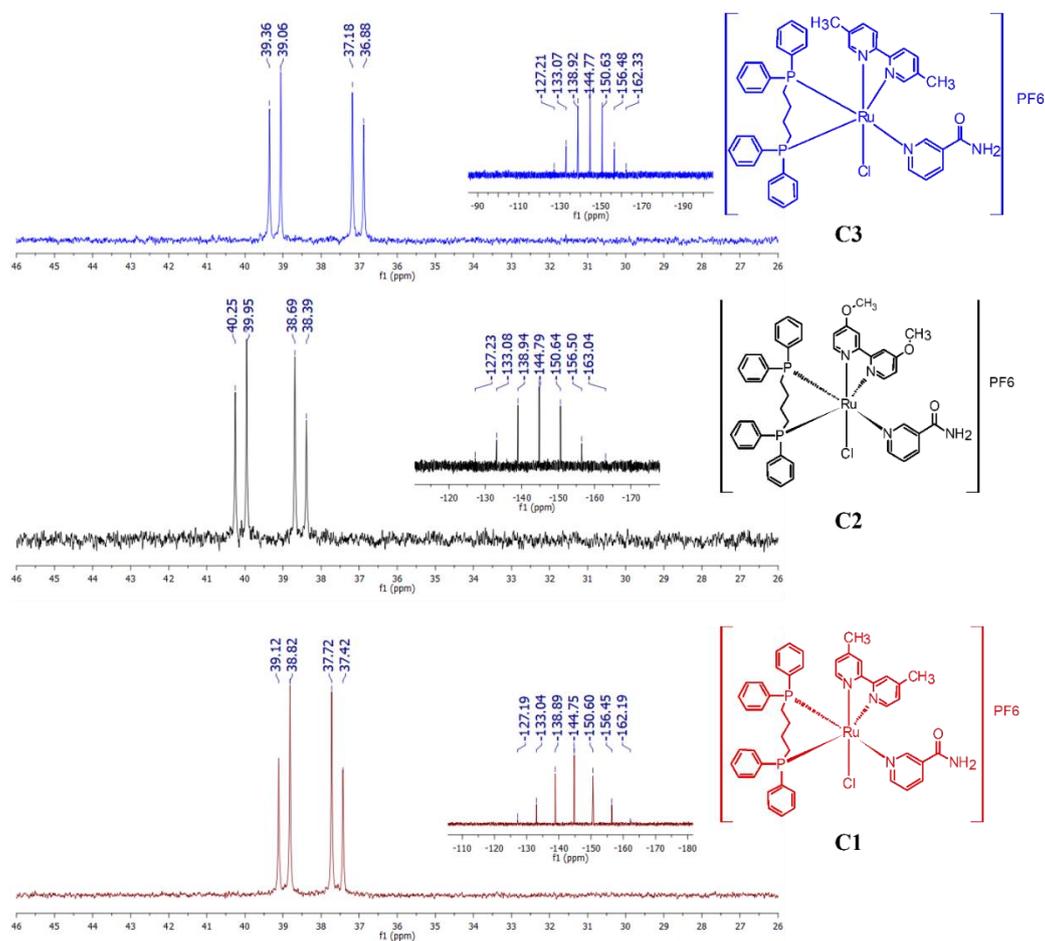
Os complexos da série 1, apresentaram dois dubletos próximos na faixa de δ 40,1 - 37,0 ppm, indicando a não equivalência magnética dos átomos de fósforo, conforme ilustrado na Figura 38. A substituição do cloreto, um ligante σ e π doador, pela nicotinamida, um ligante

doador σ e receptor π , deslocou os sinais para regiões mais blindadas do espectro, como esperado.

A aproximação dos dubletos observada para os complexos da série 1 (Figura 38) quando comparado aos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos precursores (Figura 37) é justificada pela similaridade do ambiente químico do átomo de nitrogênio da bipyridina e o nitrogênio da nicotinamida, ambos *trans* ao átomo de fósforo da bisfosfina, depois da substituição do cloreto pelo ligante NIC, como ilustrado na Figura 34. Este comportamento é conhecido da literatura (CANDIDO *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2018).

Este comportamento já foi estudado por (VALLE *et al.*, 2008) onde a junção dos deslocamentos químicos de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ podem ser consequência do fato de que os deslocamentos químicos do fósforo *trans* ao nitrogênio do ligante, neste caso a nicotinamida, ou da bipy serem ambos próximos de δ 40 ppm e que a temperatura e o solvente são capazes de modificar as múltiplas e sensíveis características físicas dos átomos de fósforo da dppb, ângulo de cone e solvatação, por exemplo.

Figura 38 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ dos complexos da série 1



Fonte: do autor

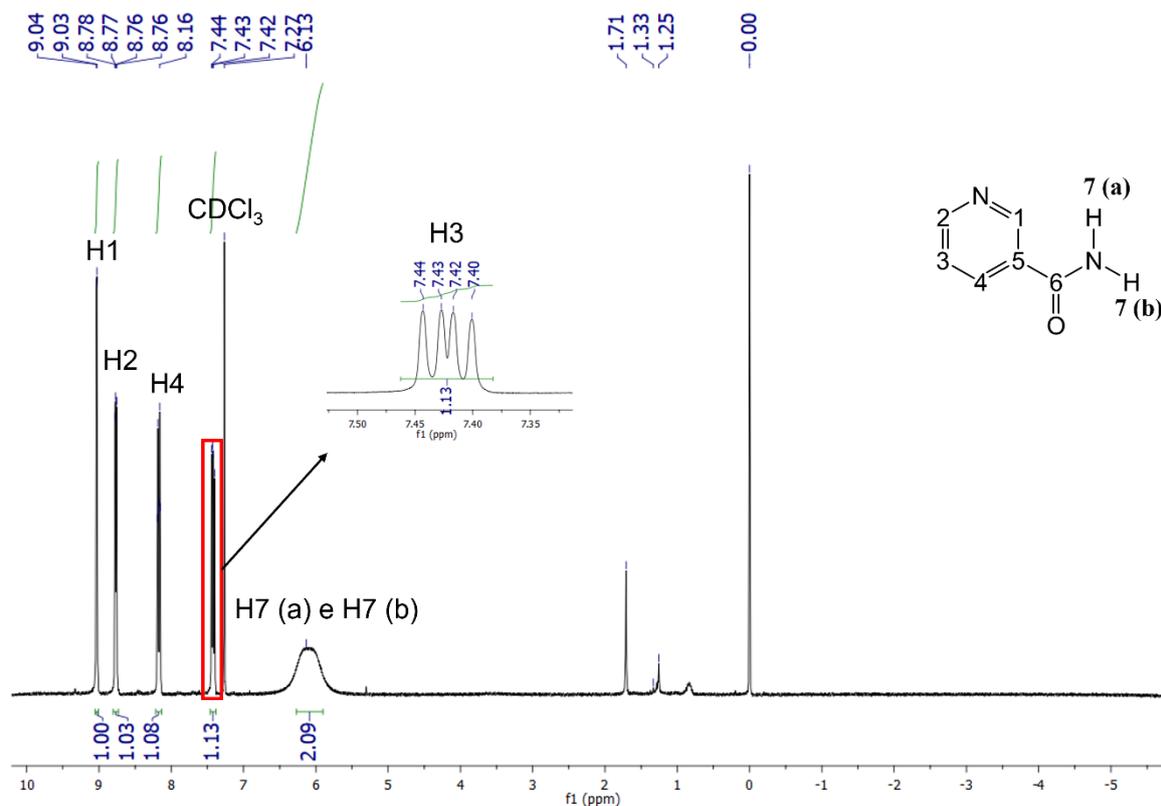
Tabela 2 - Deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (Hz) da série 1.

Complexos	δ (ppm) CH_2Cl_2	$^2J_{P-P}$ (Hz)	pKa	bipiridina
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Me-bipy)]	43,7 e 30,1	34,0	4,92	4,4'-Me-bipy
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(5,5'-Me-bipy)]	43,6 e 29,6	32,8	4,93	5,5'-Me-bipy
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]	45,3 e 31,0	34,0	5,74	4,4'-Methoxy-bipy
C1	39,0 e 37,6	36,4	4,92	4,4'-Me-bipy
C2	40,1 e 38,5	36,4	5,74	4,4'-Methoxy-bipy
C3	39,2 e 37,0	36,4	4,93	5,5'-Me-bipy

Fonte: do autor

5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H

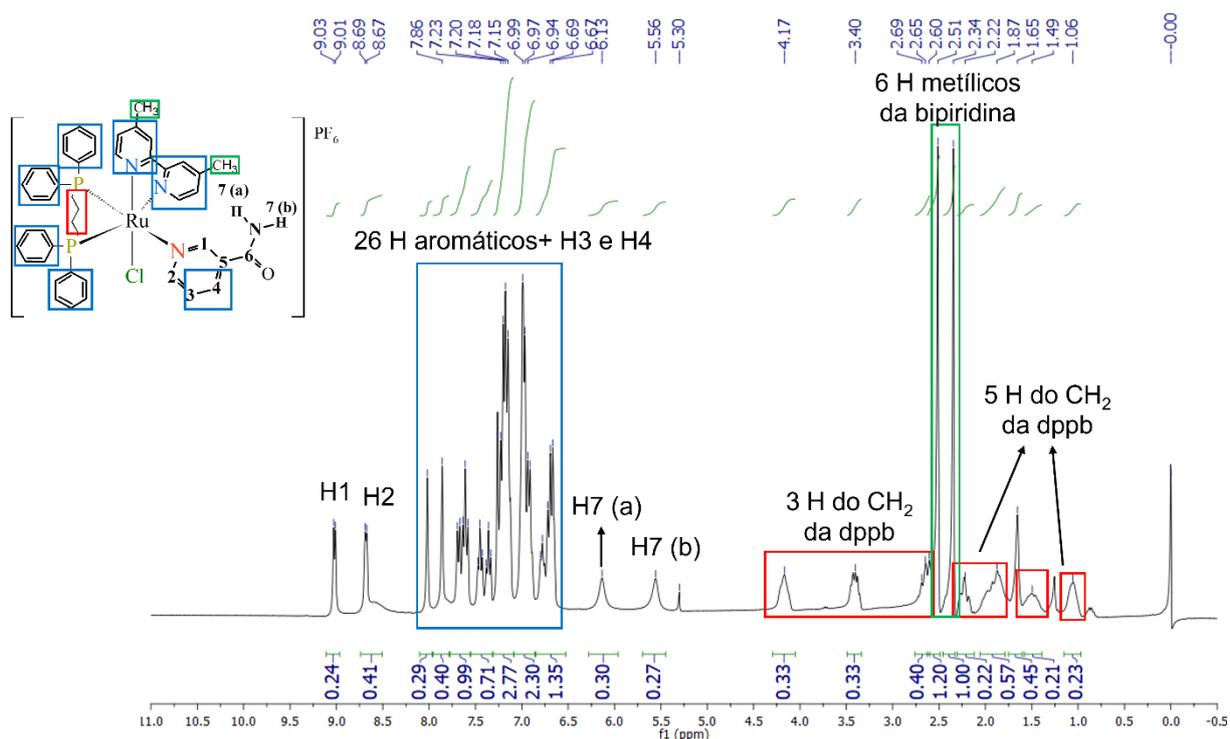
As atribuições dos espectros de RMN de ^1H dos compostos da série 1, foram realizadas baseando-se na atribuição dos hidrogênios dos ligantes bipiridínicos, da bifosfina e nicotinamida. O espectro de RMN de ^1H e a atribuição numérica dos complexos estão representados nas Figuras 39 e 40, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) e as constantes de acoplamentos encontram-se na Tabela 3.

Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de NIC em CDCl_3 

Fonte: do autor.

No espectro de ^1H da nicotinamida (Figura 39) observou-se um duplete em δ 9,03 ppm atribuído ao hidrogênio H1. Já em δ 8,77 ppm, um duplo duplete foi observado, sendo referente ao hidrogênio piridínico mais blindado (H2). Um duplo triplete em δ 8,17 ppm foi designado ao hidrogênio H4, um quarteto atribuído ao hidrogênio aromático H3 (δ 7,42 ppm) e os hidrogênios do grupo amida H7(a) e H7(b) em δ 6,13 ppm.

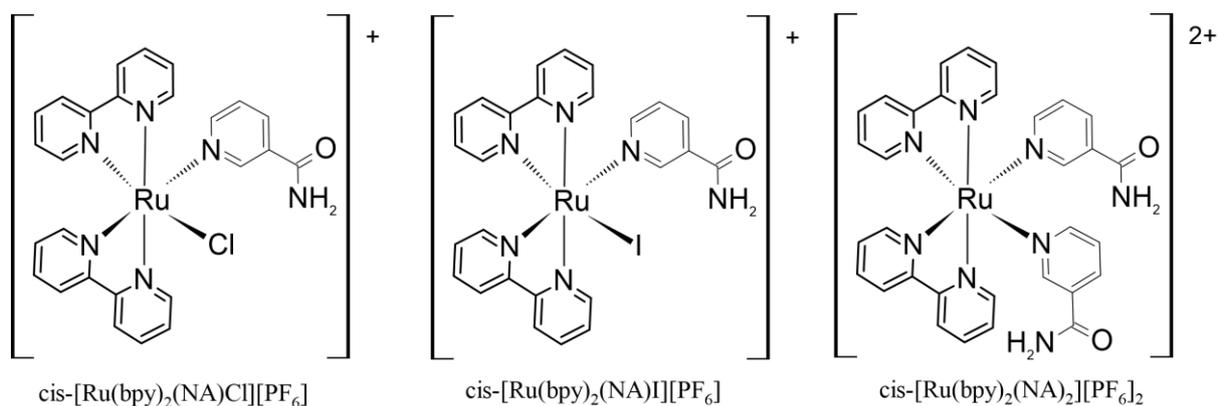
Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H do complexo **C1**, em CDCl_3



Fonte: do autor.

Após a coordenação os átomos de hidrogênio H1 e H2 apresentaram-se em δ 9,02 e 8,68 ppm (Figura 40), ou seja, mais blindados quando comparados ao ligante livre. Este comportamento observado, vai de encontro com o observado para complexos bipyridínicos de rutênio contendo a nicotinamida coordenada, $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})\text{I}][\text{PF}_6]$ e $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})_2][\text{PF}_6]_2$ onde $\text{bpy} = 2,2'$ -bipiridina e $\text{NA} =$ nicotinamida (Figura 41), relatados por SMITH e colaboradores (SMITH *et al.*, 2017).

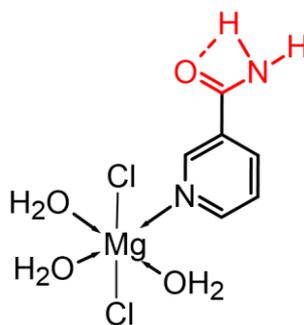
Figura 41 – Representação estrutural dos complexos $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})\text{I}][\text{PF}_6]$ e $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NA})_2][\text{PF}_6]_2$.



Fonte: Adaptado de (SMITH *et al.*, 2017)

Na região entre δ 8,02-6,67 ppm observam-se os átomos de hidrogênio aromáticos da 4,4'-Me-bipy, dppb, H3 e H4 da nicotinamida, totalizando 28 átomos de hidrogênio como esperado. Os singletos pouco intensos e alargados, característicos do grupo amida são observados em δ 6,13 e 5,55, H7(a) e H7(b), respectivamente. A blindagem observada para H7(b) após a complexação está de acordo com o reportado na literatura, e tal fato, é proveniente da formação de ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares conforme ilustrado na Figura 42, para o complexo de fórmula $[\text{Mg}(\text{NIC})(\text{Cl})_2(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (AL-SAIF, 2013). Por fim, na região de δ 1,0- 4,17 ppm encontram-se 8 átomos de hidrogênio alifáticos do grupo CH_2 da dppb e 6 hidrogênios metílicos da 4,4'-Me-bipy. Vale destacar que os sinais em δ 7,27; 1,33 e 1,25 ppm são relativos aos solventes clorofórmio e etanol (empregados na síntese) de acordo com o reportado na literatura por (FULMER *et al.*, 2010). Os espectros de RMN de ^1H dos complexos **C2** e **C3** bem como os precursores $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxy-bipy})]$ e $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$ encontram-se nas Figuras A1-A4 do Anexo A.

Figura 42 – Representação estrutural do complexo $[\text{Mg}(\text{NIC})(\text{Cl})_2(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ demonstrando a interação intramolecular existente em solução.



Fonte: (AL-SAIF, 2013)

Tabela 3 - Deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (Hz) RMN ^1H para NIC e série 1.

Átomos de Hidrogênio	δ ppm (multiplicidade)				$\Delta\delta$ (ppm)
	NIC	(C1)	(C2)	(C3)	
1	9,03 (d) $^2J_{\text{(H-H)}} = 3$	9,02 (d) $^2J_{\text{(H-H)}} = 6$	8,94 (d)	9,06 (s)	0,01; 0,09; -0,03
2	8,77 (dd) $^2J_{\text{(H-H)}} = 3$	8,68 (d) $^2J_{\text{(H-H)}} = 6$	8,66 (d)	8,60 (s)	0,09; 0,11; 0,17
3	7,42 (q) $^2J_{\text{(H-H)}} = 6$	8,02-6,67 (m)	7,74-6,35 (m)	8,00-6,70 (m)	-
4	8,17 (dt) $^2J_{\text{(H-H)}} = 3$	8,02-6,67 (m)	7,74-6,35 (m)	8,00-6,70 (m)	-
7 (a)	6,13 (s)	6,13 (s)	6,03(s)	6,24 (s)	0; 0,10; -0,11
7 (b)	6,13 (S)	5,55 (s)	5,49(s)	5,73 (s)	0,58; 0,64; 0,40

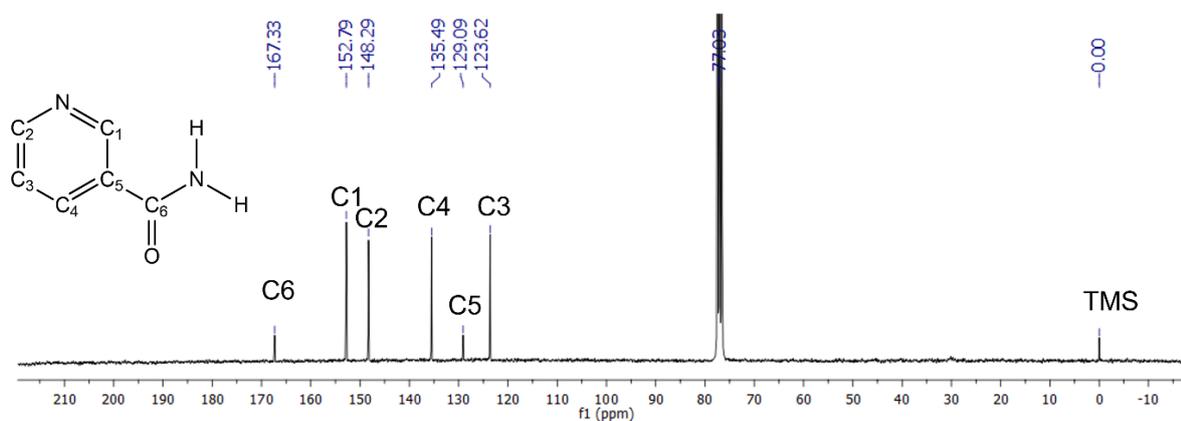
Fonte: do autor

Notas: s = singlete, d = dublete, dd = duplo dublete, q = quarteto e m = multipeto

5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da nicotinamida livre foi realizado em CDCl_3 empregando TMS como padrão interno, conforme ilustrado na Figura 42. As atribuições dos sinais foram feitas comparando os dados do ligante livre, complexos precursores e **C1-C3**, além da comparação com os dados reportados na literatura (SMITH *et al.*, 2017; QUEIROZ *et al.*, 1998). Os deslocamentos químicos (δ) e as tentativas de atribuições encontram-se na Tabela 4.

No espectro RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante nicotinamida livre, observa-se em δ 167,33 ppm o carbono (C6) do grupamento amida, posteriormente na região aromática os sinais em δ 152,79; 148,29; 135,49; 129,09 e 123,62 ppm são atribuídos à C1, C2, C4, C5 e C3, respectivamente. Estes encontram-se de acordo com os dados reportados na literatura por Aleksandriiskii e colaboradores (ALEKSANDRIISKII *et al.*, 2016; SHARNIN *et al.*, 2013).

Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H de NIC em CDCl_3 

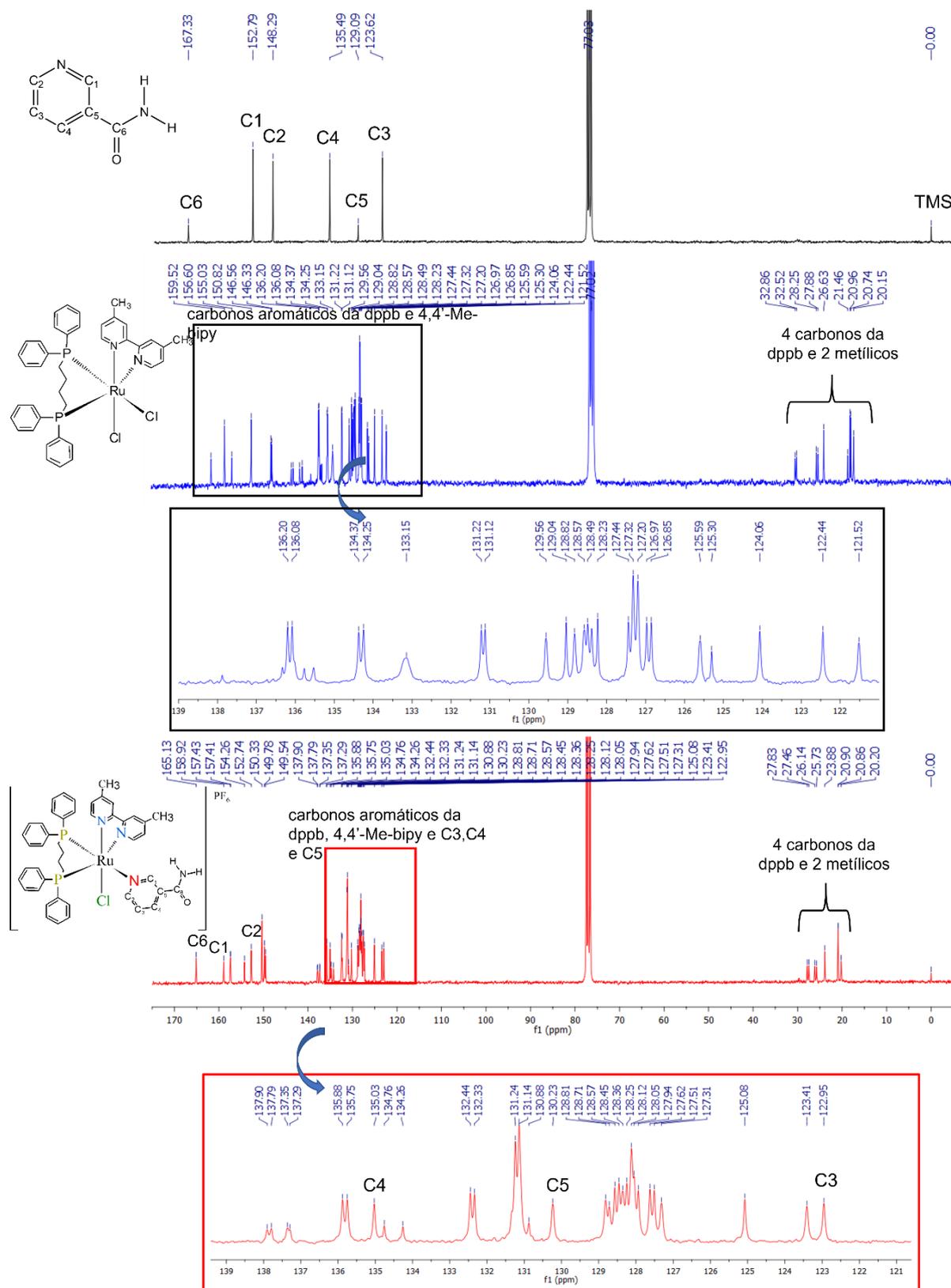
Fonte: do autor

Um espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ representativo da série 1 é apresentado na Figura 44. Ademais, nesta, uma comparação com o ligante livre e o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)] também é apresentada. Os demais espectros (**C2** e **C3**) e precursores encontram-se nas Figuras A5-A9 do Anexo A. Após coordenação o sinal referente ao carbono C6 do grupamento amida foi observado em regiões mais blindadas do espectro δ 165,13, 165,06 e 165,28 ppm para **C1**, **C2** e **C3** respectivamente (Tabela 4). Esta blindagem, pode ser justificada pela natureza aceptora de densidade eletrônica (orbital π^*) do grupo carbonila (GOODEN *et al.*, 1997).

Em contrapartida, como esperado, os sinais entre δ 150,20-158,09 ppm dos complexos **C1-C3** atribuídos aos carbonos aromáticos C1 e C2, vizinhos ao nitrogênio piridínico, deslocaram-se para regiões de maior frequência comparados aos deslocamentos químicos observados para a ligante nicotinamida livre, indicando a coordenação pelo nitrogênio piridínico, como esperado. Comportamento semelhante ao observado a trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa para complexos de fórmula geral [RuCl(imid)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]Cl, [RuCl(imid)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]Cl e [RuCl(MTNZ)(dppb)(4,4'-Methoxy-bipy)]PF₆ onde (imid) = imidazol e (MTNZ) = metronidazol, os quais ambos apresentam coordenação pelo nitrogênio piridínico, como aqui demonstrado (CANDIDO *et al.*, 2022; DIAS *et al.*, 2018).

Na região de δ 138,25 - 121,26 ppm são observados os carbonos aromáticos dos ligantes dppb e X-bipy, além dos carbonos aromáticos C3, C4 e C5 do ligante NIC. Esta região é de difícil atribuição, no entanto, uma tentativa de atribuição comparando os espectros do ligante livre, precursor e C2 foi realizada como demonstrada na Figura 44. Por fim, sinais em torno de δ 17-30 ppm são atribuídos aos átomos de carbono alifático e grupos metila dos ligantes dppb e X-bipy (QUEIROZ *et al.*, 1998).

Figura 44 – RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ comparativo entre o ligante NIC livre (preto), do complexo precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$ (azul) e do complexo C1 (vermelho).



Fonte: do autor

Tabela 4 - Deslocamentos químicos (ppm) dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o ligante NIC livre e complexos da série 1

Compostos	Átomos de Carbono					
	1	2	3	4	5	6
NIC	152,79	148,29	123,62	135,49	129,09	167,33
[RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF ₆ (C1)	157,43	152,74	-	-	-	165,13
[RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF ₆ (C2)	153,05	150,20	-	-	-	165,06
[RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆ (C3)	158,09	152,49	-	-	-	165,28
$\Delta\delta$ (ppm)*	4,64; 0,26; 5,34	4,45; 1,91; 4,20	-	-	-	2,2; 2,27; 2,05

Fonte: do autor

5.1.4 Análise elementar e condutividade molar

A análise elementar e a condutividade molar sugerem as estruturas propostas e a pureza dos complexos. A medida de condutividade molar foi efetuada utilizando-se concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹, à 25 °C, empregando CH₂Cl₂ como solvente (Tabela 5). Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura que relata uma faixa de 12 a 77 ohm⁻¹cm²mol⁻¹ para eletrólitos 1:1, em diclorometano (GEARY, 1971).

Tabela 5 - Dados de análise elementar e condutividade molar para os complexos da série 1.

Comple xos	%C			%H			%N			Condutivida de Molar ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹ (Temp.)
	Exp.	Calc.	Erro (%)	Exp.	Calc.	Erro (%)	Exp.	Calc.	Erro (%)	
C1	55,36	54,47	1,63	4,87	4,57	6,56	5,24	5,52	5,07	38,8 (23°C)
C1·H ₂ O	55,36	53,52	3,44	4,87	4,69	3,84	5,24	5,43	3,50	
C2	51,89	52,80	1,72	4,54	4,43	2,48	5,09	5,35	4,86	36,3 (23°C)
C2·H ₂ O	51,89	51,91	0,04	4,54	4,55	0,22	5,09	5,26	3,23	
C3	55,27	54,47	1,47	4,93	4,57	7,88	5,28	5,52	4,35	48,8 (23,5°C)

Fonte: do autor

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos e calculados para os complexos da série 1 estão sumarizados na Tabela 5. Para os teores de hidrogênio e nitrogênio dos complexos **C1** e **C2** considerados anidros, observa-se um maior erro relativo, levando a supor a existência de solvente de hidratação.

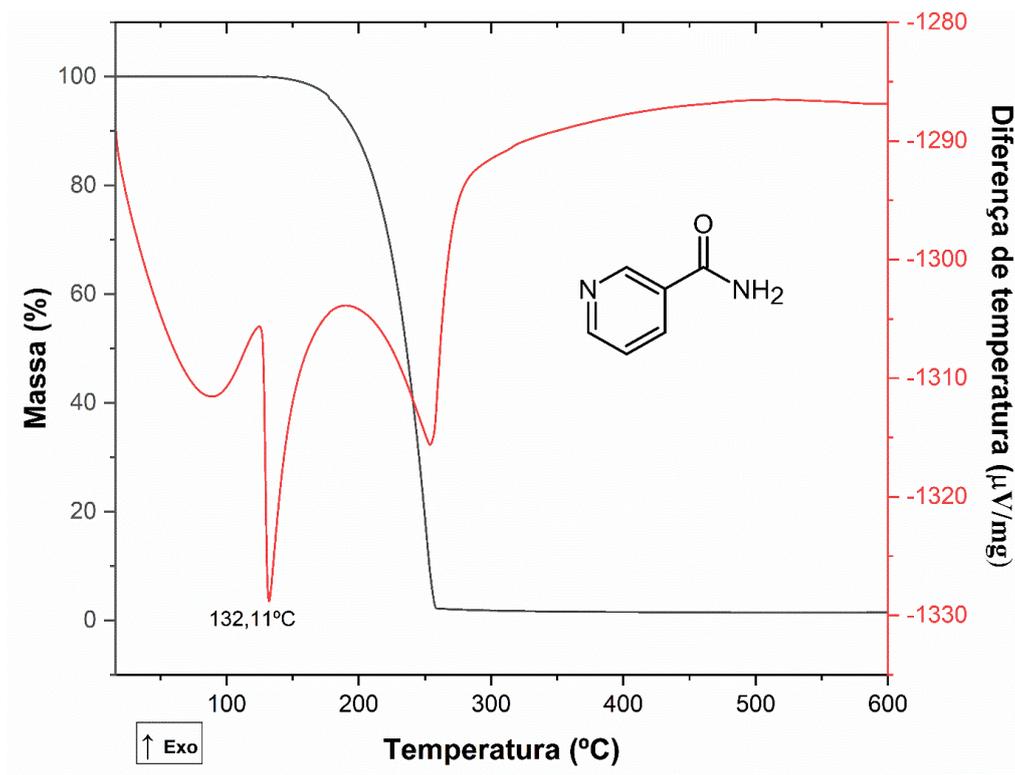
Com o objetivo de corroborar para essa hipótese foram realizados experimentos de análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) do ligante NIC e dos complexos sintetizados. Sabe-se que TGA e DTA permitem registrar informações sobre fenômenos físicos e químicos (desidratação, sublimação, absorção, decomposição, oxidação ou redução) à medida que variações de massa (TGA) e calor (em relação a um material de referência) (DTA) ocorrem sob um forno com atmosfera controlada e temperatura ou tempo programados (IONASHIRO, 2004).

Dessa forma o ligante NIC e os complexos sintetizados **C1-C3** tiveram sua estabilidade térmica avaliada por TGA e DTA até 1000 °C, empregando ar sintético como atmosfera com fluxo de 100 mL·min⁻¹ e razão de aquecimento de 20 °C·min⁻¹.

As curvas TG/DTA do ligante NIC se encontram na Figura 45 e indicam que houve decomposição total, sem a formação de massa residual, já que corresponde a molécula orgânica submetida a elevada temperatura em atmosfera oxidante.

Nota-se a formação de um evento endotérmico, sem variação de massa, condizente com o fenômeno físico de fusão em 132,11 °C, demonstrado pelas curvas TG/DTA. Logo após a fusão inicia-se a decomposição térmica que ocorre em uma única etapa com pico endotérmico, conforme a curva TG/DTA (Figura 45), com término em aproximadamente 250 °C.

Figura 45 – Curvas TG e DTA do ligante NIC

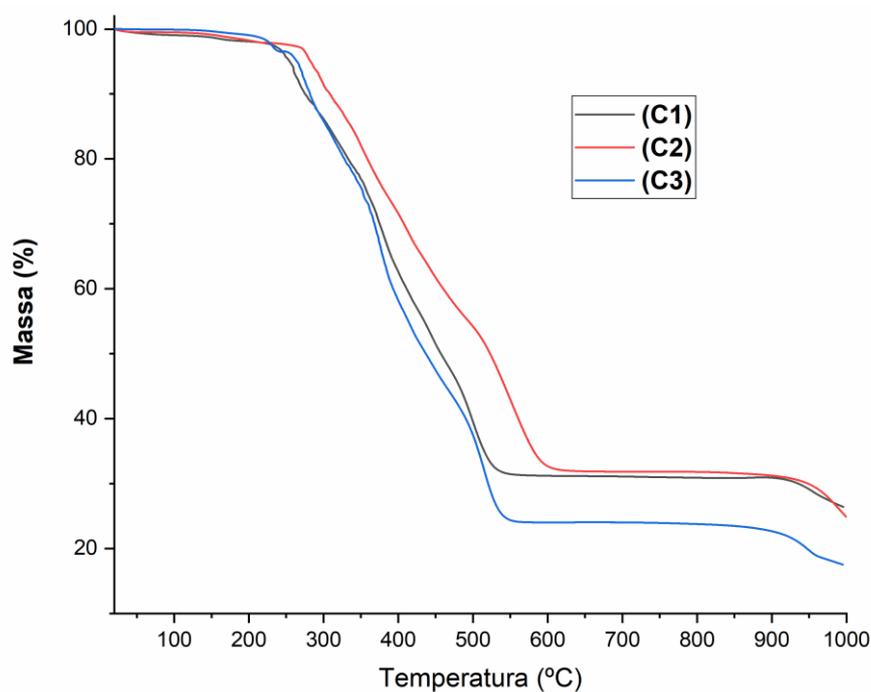


Fonte: do autor

As curvas TG dos complexos encontram-se reunidas na Figura 46, sendo possível observar mudanças no perfil de degradação quando comparadas com o ligante nicotinamida livre, como aumento do número de eventos, estabilidade térmica, além da formação de resíduos a elevadas temperaturas, indicando a presença de metais na estrutura.

O início de decomposição térmica do complexo **C3** ocorreu em aproximadamente 250 °C, onde as curvas TG apresentaram semelhanças e demonstram a ausência de solventes na estrutura. Em contrapartida, **C1** e **C2** apresentou evidências de desidratação com pequena perda de massa compatível com molécula de água fortemente ligada a estrutura seguida de decomposição após aproximadamente 180 °C (WUDDIVIRA *et al.*, 2012).

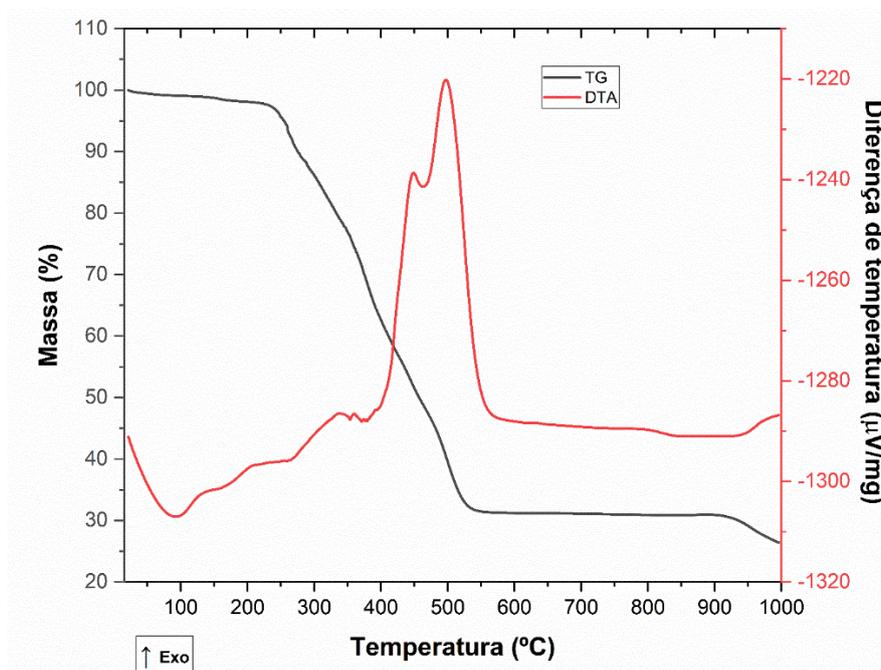
Figura 46 – Curvas TG dos complexos da série 1



Fonte: do autor

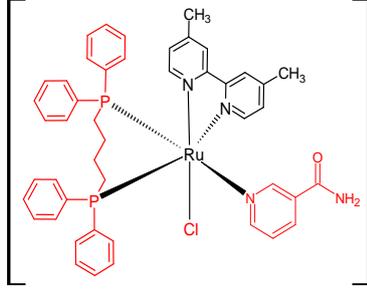
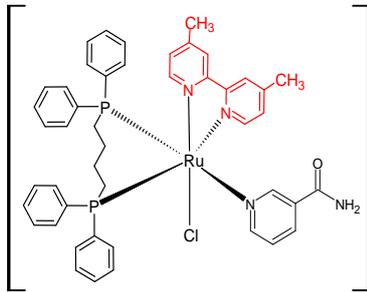
As curvas TG/DTA dos complexos estão representadas nas Figuras 47-49 e as tentativas de atribuições da decomposição térmica dos fragmentos de decomposição estão sumarizados nas Tabelas 6-8.

Figura 47 – Curvas TG e DTA de C1



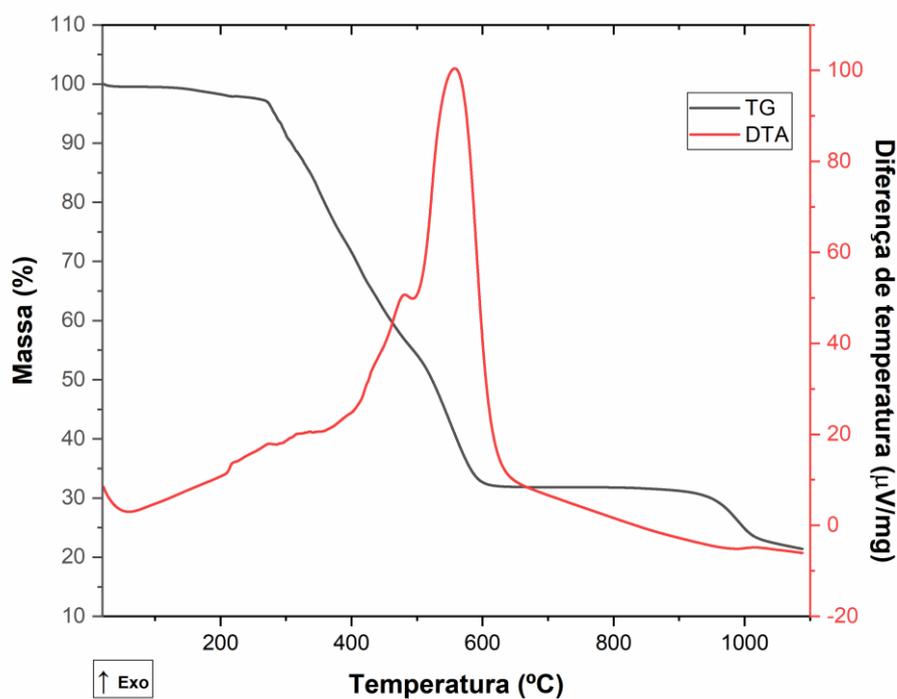
Fonte: do autor

Tabela 6 - Dados das análises térmicas do complexo C1 e atribuições dos possíveis fragmentos decompostos.

Etapas	ΔT (°C)	Δm (%)		DTA picos (°C)		Atribuições
		Exp.	Calc.	Exo.	End.	
1	21-188	-1,84	-1,74		128	H ₂ O
2 e 3	188- 614	-66,98	-70,62	449 e 497		
4	614- 996	-4,771	-17,85	985		
Resíduo	996	26,41	12,89			RuO _{2(s)}

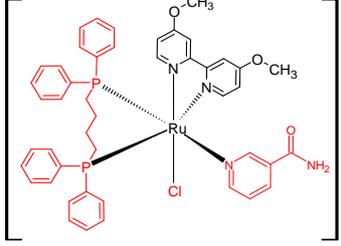
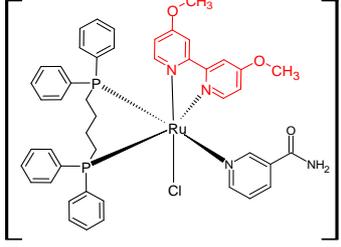
Fonte: do autor

Figura 48 – Curvas TG e DTA de C2



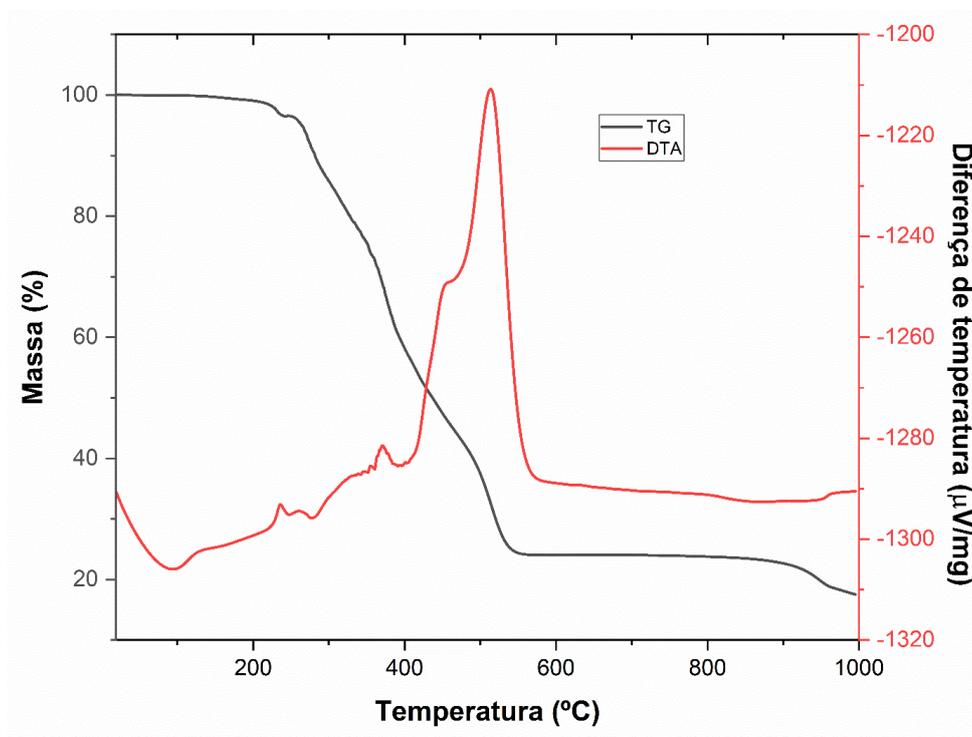
Fonte: do autor

Tabela 7 - Dados das análises térmicas do complexo **C2** e atribuições dos possíveis fragmentos decompostos.

Etapas	ΔT (°C)	Δm (%)		DTA picos (°C)		Atribuições
		Exp.	Calc.	Exo.	End.	
1	21-219	-2,82	-1,69	219	-	H ₂ O
2 e 3	219-657	-66,03	-68,49	481 e 557	-	
4	657-1088	-10,47	-20,32	1017	-	
Resíduo	1088	21,40	12,50	-	-	RuO _{2(s)}

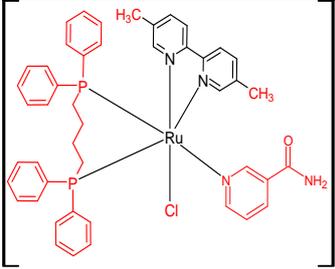
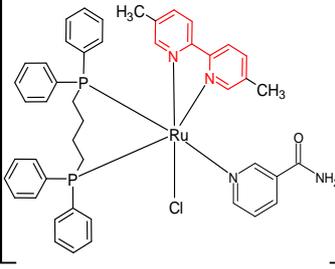
Fonte: do autor

Figura 49 – Curvas TG e DTA de C3



Fonte: do autor

Tabela 8 - Dados das análises térmicas do complexo **C3** e atribuições dos possíveis fragmentos decompostos.

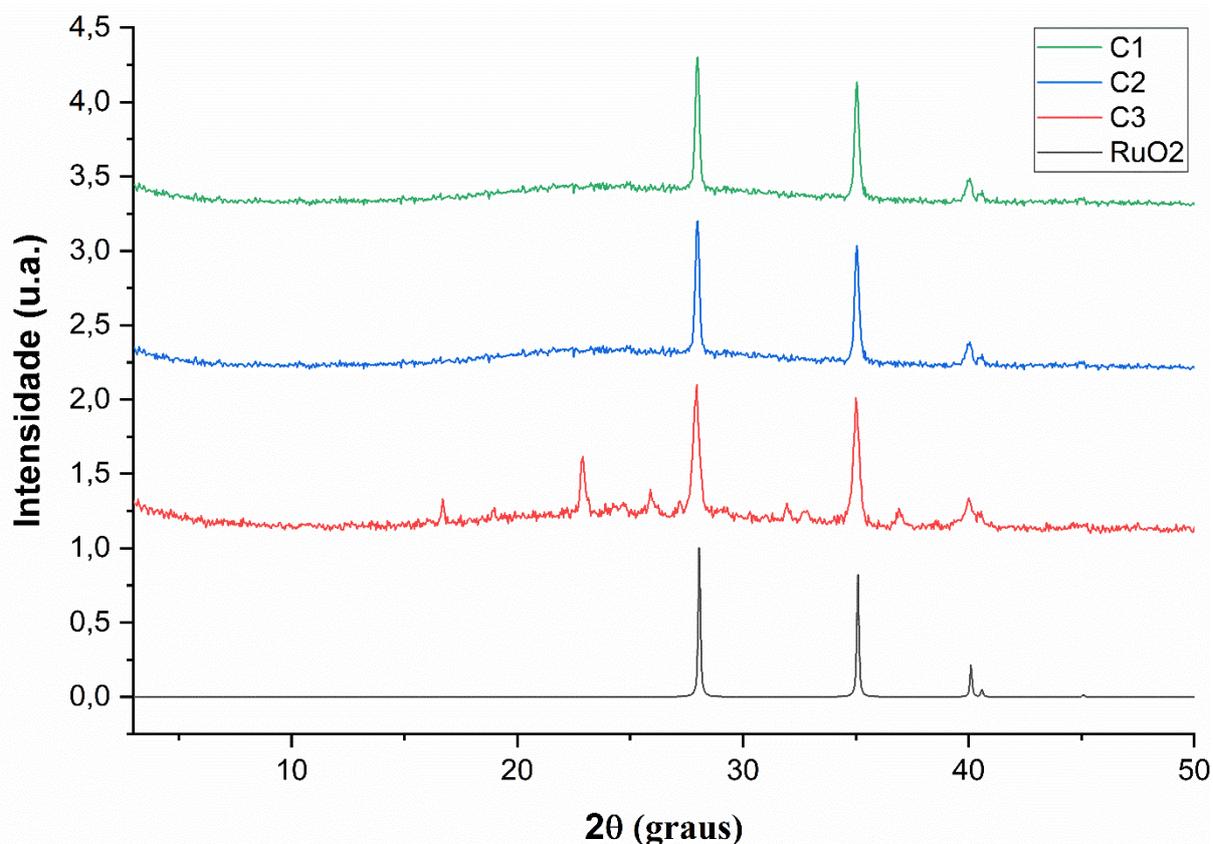
Etapas	ΔT (°C)	Δm (%)		DTA picos (°C)	Atribuições
		Exp.	Calc.		
1	200-597	-75,98	-74,08	456 e 514	 PF_6
2	597-995	-6,5	-15,20	968	 PF_6
Resíduo	995	17,52	13,12		$RuO_{2(s)}$

Fonte: do autor

Os elevados erros percentuais entre as perdas de massa teórica e experimental presentes na última etapa de decomposição e no resíduo são justificados pela não formação de um patamar bem definido após 1000 °C, impactando diretamente nos cálculos de atribuições. Utilizou-se esta condição final de temperatura, uma vez que é a permitida a ser utilizada no equipamento. Embora a literatura seja escassa quanto análises térmicas envolvendo complexos de rutênio, é reportado na literatura a formação do óxido de rutênio RuO_2 (s) nestes compostos contendo ligantes fluoroquinolonas em elevadas temperaturas (UIVAROSI *et al.*, 2011).

A fim de obter informações para auxiliar nas atribuições propostas, todos os resíduos obtidos após as análises térmicas foram analisados por difração de raios X por policristais (DRXP). Os difratogramas estão sumarizados na Figura 50 e apresentam como característica comum picos largos e formação de halo, estes são provenientes do porta-amostra, uma vez que uma pequena quantidade de amostra foi empregada. Para os complexos **C1** e **C2** nota-se concordância dos picos com o difratograma do banco de dados ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) para $RuO_{2(s)}$ na forma de rutilo. O difratograma de **C3** (Figura 46) apresentou mistura de fase cristalina envolvendo o RuO_2 e fragmento da molécula que não terminou de degradar, como mencionado acima.

Figura 50 – Difratomogramas experimentais dos resíduos obtidos para **C1-C3** após análise de TG/DTA e difratograma calculado para RuO₂



Fonte: do autor

Nota: RuO₂ – Inorganic Crystal Structure Database – 84618-ICSD.

Notadamente, de acordo com os resultados obtidos pelas análises térmicas pode-se observar que os complexos **C1** e **C2** apresentam uma molécula de água de hidratação, uma vez que os complexos são precipitados com água. Já **C3** foi considerado anidro pelos dados de análise térmica.

5.1.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

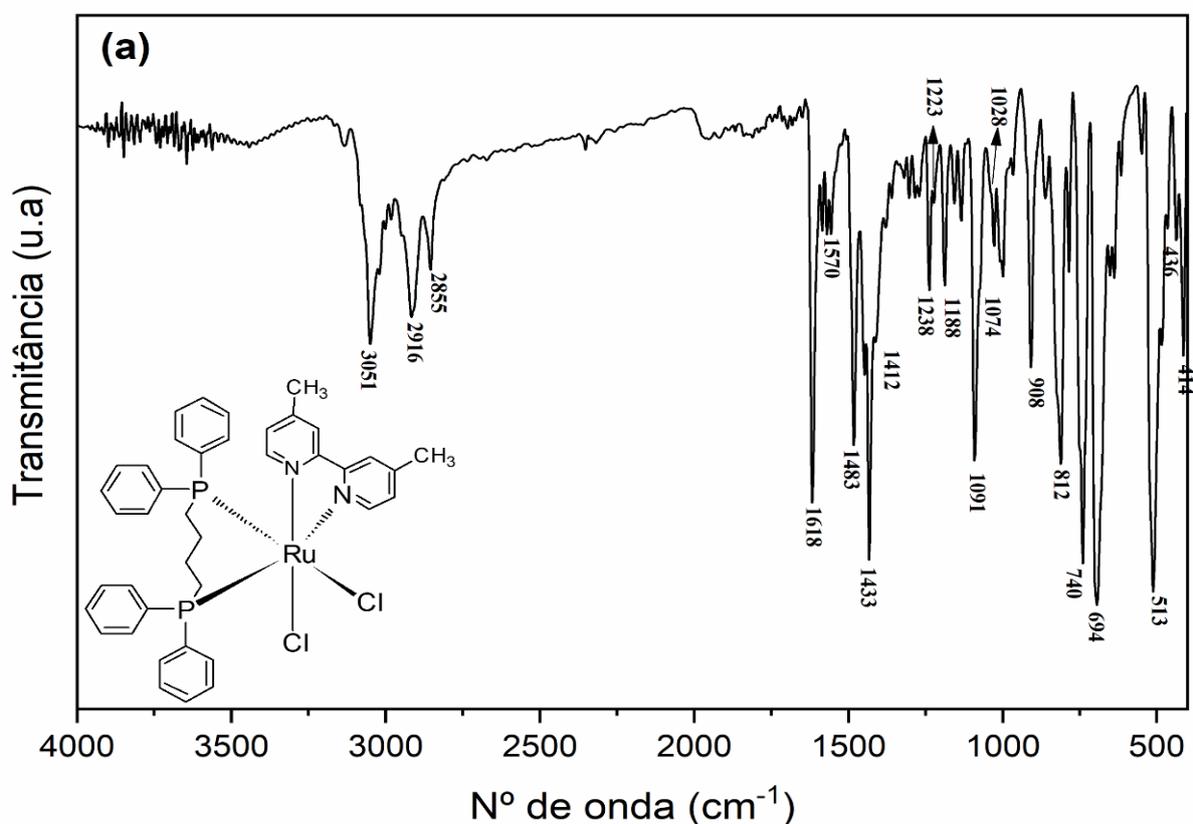
A fim de observar informações importantes sobre a natureza da ligação metal-ligante foram obtidos espectros de FTIR dos precursores (Figuras 51 e Tabela 9), da NIC livre (Figura 52) e dos complexos sintetizados (Figuras 53-55).

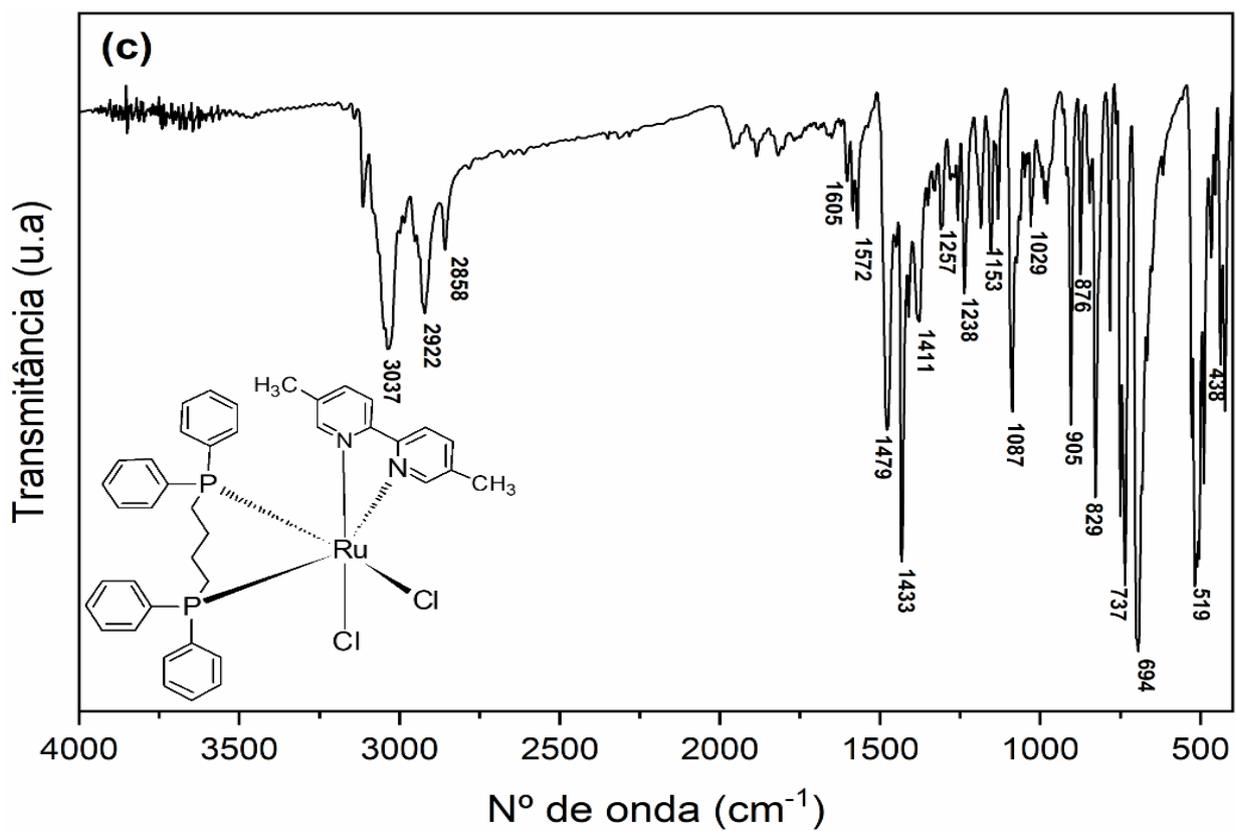
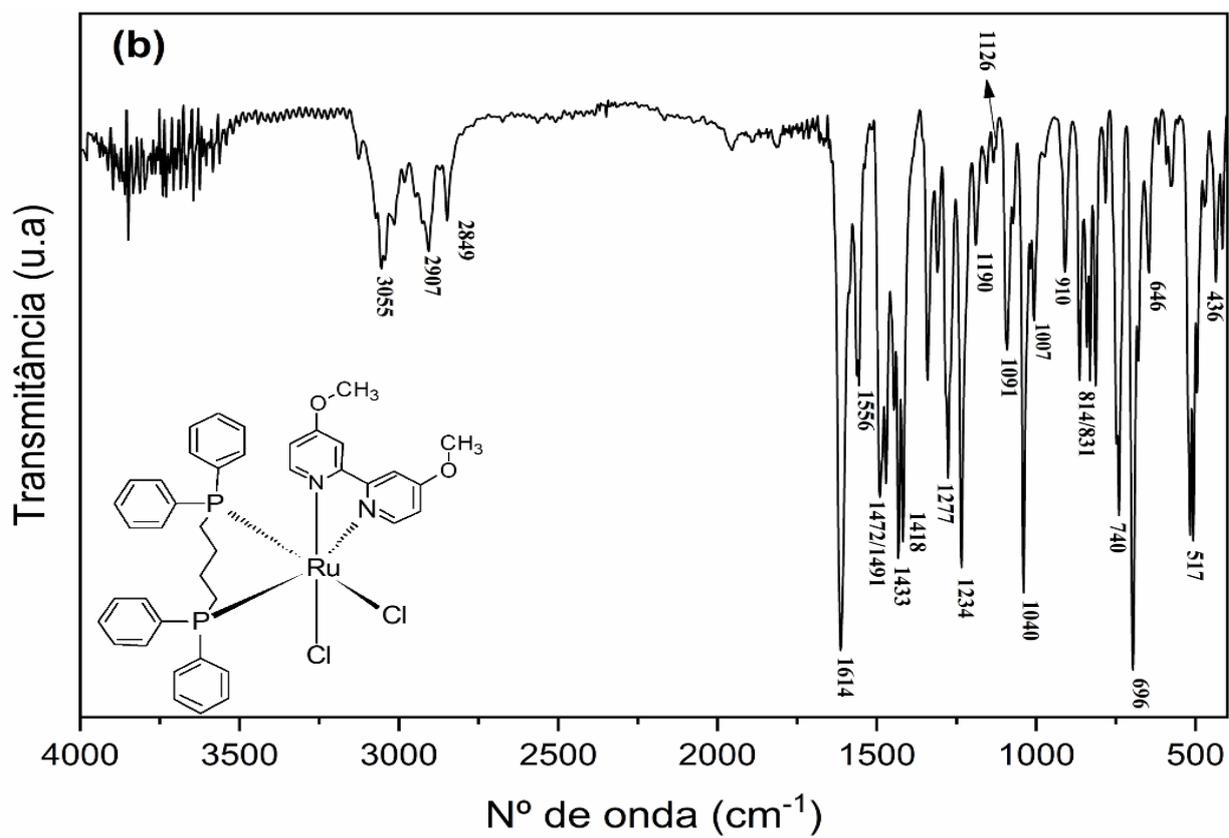
Os espectros dos precursores apresentam bandas características entre 1153-1190 cm⁻¹, referentes ao estiramento assimétrico (ν_{as}) da ligação fósforo carbono aromático, correspondente ao ligante dppb. Na região de 490-519 cm⁻¹ duas bandas são observadas e

referem-se aos estiramentos ν_{as} e ν_s da ligação Ru-P. A banda de fraca intensidade em 430 cm^{-1} é atribuída ao estiramento ν_{as} da ligação Ru-N, em decorrência dos ligantes bipyridínicos.

O precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF₆ apresentou bandas características em 1277, 1072, 831, 814 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos ν_{as} e ν_s da ligação C-O, referentes ao grupo metoxila (O-CH₃). Adicionalmente, identificou-se bandas que denotam deformações angulares no plano (δ) envolvendo as ligações C-O-C em 814 cm^{-1} . As demais bandas e respectivas atribuições encontram-se sumarizadas na Tabela 9.

Figura 51 – Espectro de FTIR do complexos precursores *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆ (a), *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF₆ (b) e *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ (c)





Fonte: Do autor

Tabela 9 - Principais bandas e atribuições dos espectros de IV dos precursores *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆, *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF₆ e *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆.

Bandas (cm ⁻¹)	<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(X-bipy)]PF ₆			Referências
	4,4'-Me-bipy	4,4'-Metoxi-bipy	5,5'-Me-bipy	
v _s (C-H) _{ar} (f)	3051	3055	3038	
v _{as} (C-H) _{ali} (f)	2916	2907	2922	
v _s (C-H)	2855	2849	2858	
v _s (C=N) (F) e (f)	1618	1614	1605 (f)	
v _s (C=C) (m)	1570	1556	1572 (f)	
v _{ass} (C=C) (F)	1483	1490	1479	
		1472		(SILVERST
ρ C-H (CH ₃) (m)	1433	1433	1433	EIN, 2006)
δ _s (C-H) CH ₃ (m)	1412	1418	1411	(SANTIAG
ρ C-H	1223 (f)	1234 (F)	1238(m)	O, 2004)
	1238 (m)		1257 (f)	(NAKAMO
v _{ass} (C-O) (F)	-	1277 (F)	-	TO, 2009)
v _s (C-O) (F)	-	1040 (m)	-	
v(P – C) aromático e	1188	1190	1186	
βC-H (φ)(F,m e f)	1091	1091	1087	
	999	1007	987	
δ _s (C-H)	1074 (m)	1126 (f)	1029 (f)	
	1028 (m)			
τ C-H (m)	908	910	905	
δ(C-H) aromático (m)	875 (m)	864 (F)	875 (m)	
ω C-H (F)	812 (F)		829 (F)	
ρ C-O-C (F)	-	831	-	
δ C-O-C (F)	-	814	-	
γ(C-H) aromático (F)	741	740	737	
γ(C-H) (F)	694	696	694	
δ C-C-C (m)	638	646	667 ombro	
v(Ru-P) (F/f)	513 F	517 F	519 (F)	
	493 f	495 f	493 f	
v _{sim} (Ru-N) f	436	436	438	

Fonte: Do autor

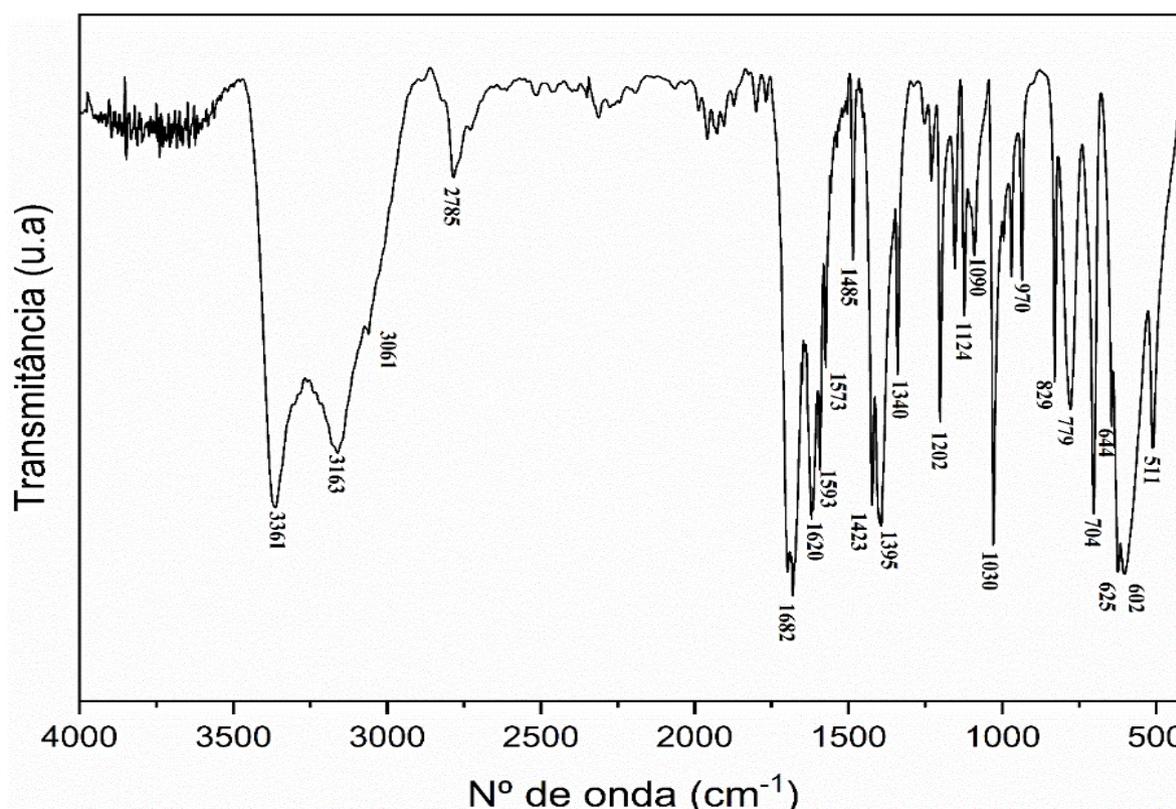
Notas: F = forte, m = média e f = fraca. v = estiramento ou deformação axial, δ = deformação angular no plano, δ t = deformação angular fora do plano do tipo tesoura, γ = deformação angular fora do plano, ρ = flexão no plano, τ = dobramento fora do plano e β = vibração de deformação no plano.

A nicotinamida é um derivado da piridina que apresenta como característica um grupo amida primária substituído na posição meta do anel aromático (ATAÇ; YURDAKUL; BERBER, 2011). Amidas primárias absorvem na região entre 3370-3160 cm⁻¹ e no espectro da nicotinamida observa-se duas bandas de forte intensidade nessa região (3363 e 3163 cm⁻¹, Figura 52), as quais correspondem ao estiramento v_{as} e v_s do grupo NH₂. Em 1620 cm⁻¹ uma banda de forte intensidade é atribuída a deformação angular fora do plano do tipo tesoura δ tNH₂

juntamente com o estiramento $\nu_s(\text{C}=\text{N})$ (BAYARI; ATAÇ; YURDAKUL, 2003), enquanto entre $600\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ identificou-se deformação angular fora do plano (γ) do grupo amina. As bandas em 1485 cm^{-1} e 1395 cm^{-1} referem-se, respectivamente, aos estiramentos $\nu\text{C}=\text{C}$ aromático e $\nu\text{C}-\text{N}$ da amina.

A ligação $\text{C}=\text{O}$ de amida dá origem a uma banda de forte intensidade em 1682 cm^{-1} , devido à conjugação existente entre a carbonila e o nitrogênio do grupo (BAYARI; ATAÇ; YURDAKUL, 2003). As demais bandas estão atribuídas na Tabela 10.

Figura 52 – Espectro de FTIR do NIC livre



Fonte: do autor

Nos espectros de IV de todos os complexos **C1-C3** (Figuras 53-51 e Tabela 10) observou-se deslocamentos das bandas referentes aos estiramentos ν_{as} e ν_s N-H para maiores números de onda (3390 e 3190 cm^{-1}), em relação às bandas em 3363 e 3163 cm^{-1} do ligante NIC livre. Sabe-se que quando o nitrogênio do grupo amino está envolvido na formação do complexo, ocorrem deslocamentos das bandas para regiões de menor número de onda. Por outro lado, quando o nitrogênio do anel piridínico está envolvido na formação de complexos, certos modos vibracionais como $\nu_s(\text{C}=\text{N})$ (F) e $\nu_s(\text{C}=\text{C})$ deslocam-se para maiores números de onda,

devido ao acoplamento com as vibrações da ligação M – N (piridina) (BAYARI; ATAÇ; YURDAKUL, 2003).

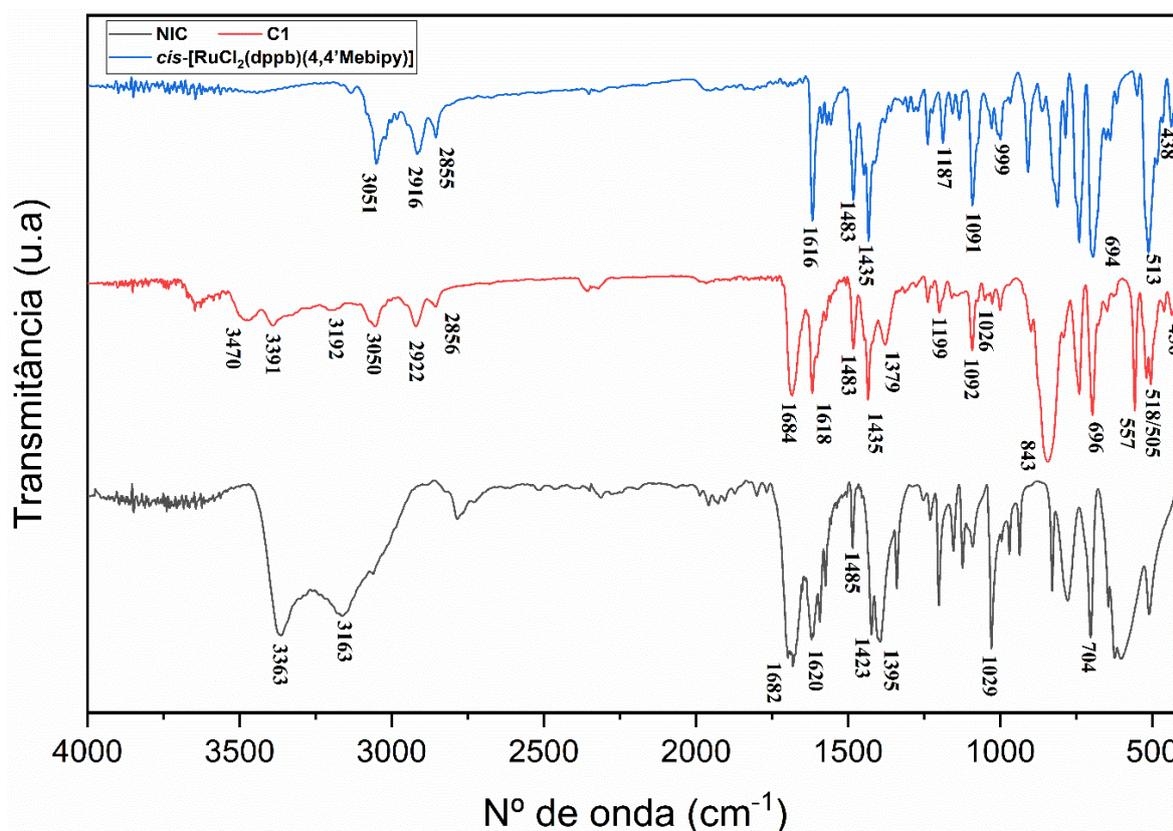
Outro possível sítio de coordenação consiste no grupo carbonila (C=O), o qual apresenta no espectro de IV do ligante uma banda em 1682 cm^{-1} . No entanto, nos espectros dos complexos sintetizados foi observado um pequeno deslocamento para maiores números de onda, indicando que a coordenação não ocorreu por esse sítio.

Notou-se, também, o surgimento de uma banda na região entre $3470\text{-}3480\text{ cm}^{-1}$, a qual é atribuída ao estiramento $\nu\text{N-H}$ que ocorre nos complexos, devido uma ligação de hidrogênio intramolecular entre a carbonila e o hidrogênio da amina, comportamento semelhante relatado em outros trabalhos envolvendo complexos de nicotinamida (ALLAN; BAIRD, 1979; ATAÇ; YURDAKUL; BERBER, 2011; BAYARI; ATAÇ; YURDAKUL, 2003; EL-SHWINIY *et al.*, 2021). Tal informação permite inferir que a coordenação ocorreu a partir do nitrogênio piridínico (Tabela 10).

No espectro do ligante livre (Figura 52), uma banda em 1620 cm^{-1} resultante do estiramento $\nu\text{C=N}$ e da deformação angular fora do plano do tipo tesoura $\delta\text{ tNH}_2$ foi observada e a mesma deslocou-se para menores números de onda nos complexos metálicos (Figuras 53-55), devido à coordenação via nitrogênio do anel piridínico (GOLFETO *et al.*, 2010; MONDELLI *et al.*, 2014). A banda intensa em 1485 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu_{\text{as}}\text{C=C}$, deslocou-se para menor número de onda para os complexos **C1** e **C3** em 1485 e 1475 cm^{-1} . Este enfraquecimento pode ser explicado pela ligação C=C estar próxima ao nitrogênio piridínico que coordenou-se ao centro metálico, comportamento semelhante ao reportado na literatura (BAYARI; ATAÇ; YURDAKUL, 2003). No espectro de IV do complexo **C2** ocorreu um deslocamento para maiores números de onda das bandas que ocorrem na faixa de $1614\text{-}1493\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento $\nu_{\text{as}}\text{C=C}$, como esperado, devido ao maior caráter básico da bipyridina 4,4'-Metoxi-bipy. Ademais, outras bandas foram atribuídas (Tabela 10), como por exemplo: em 2856 cm^{-1} referente ao estiramento $\nu_{\text{as}}\text{C-H}$ do grupo metila (CH_3) substituinte da bipyridina e em 1091 cm^{-1} correspondente ao estiramento $\nu\text{P-C}$ da dppb.

Todos os complexos **C1-C3** apresentaram o surgimento de bandas na região entre $505\text{-}518\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento ν_{as} e ν_{s} Ru-P (NAKAMOTO, 2008), bem como bandas de fraca intensidade variando entre $436\text{-}438\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao $\nu(\text{Ru-N})$. O contra-íon PF_6^- pôde ser identificado pelas bandas intensas em torno de 840 e 550 cm^{-1} atribuídas ao estiramento ν_{as} e $\nu_{\text{s}}\text{P-F}$ (CANDIDO *et al.*, 2022; DIAS *et al.*, 2020, 2018).

Figura 53 – Espectros de FTIR do NIC livre (em preto), C1 (em vermelho) e do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)]

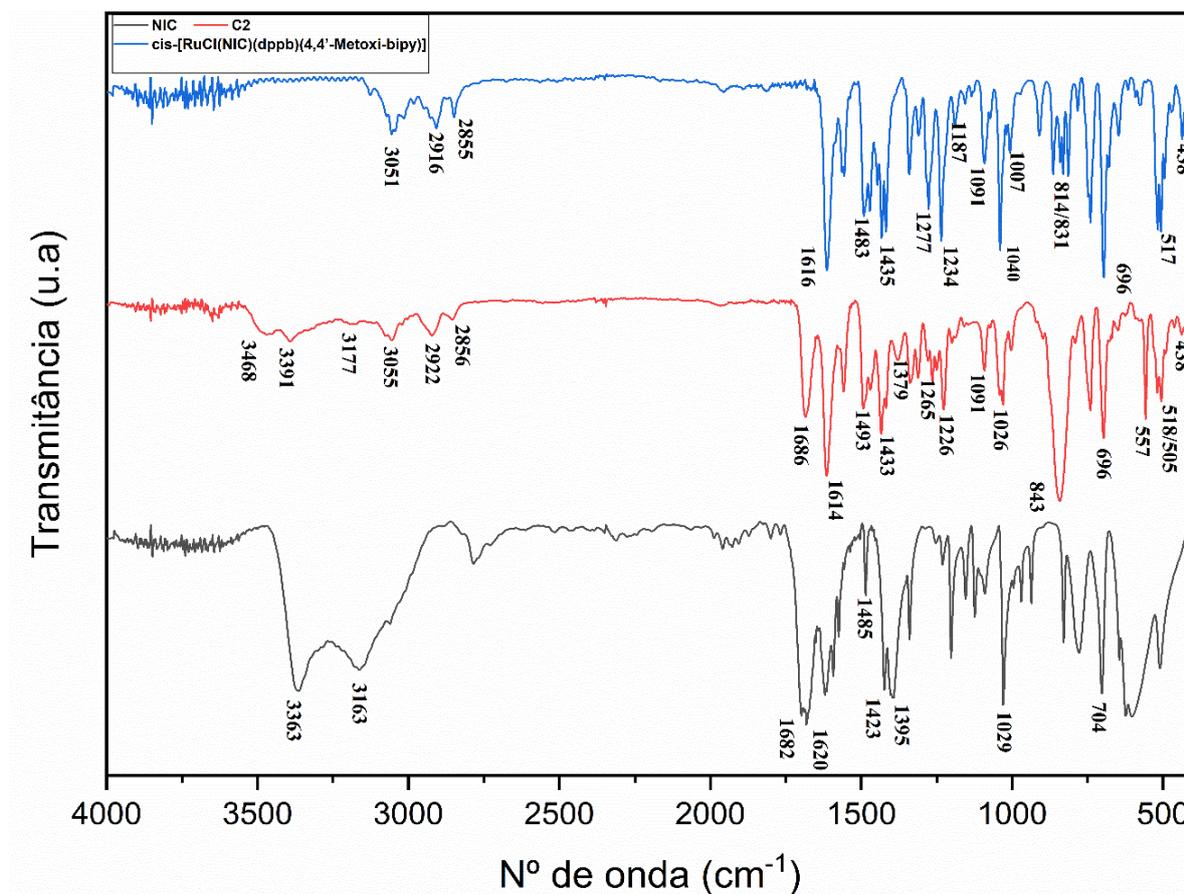


Fonte: Do autor.

Notas: **NIC** 3363 cm⁻¹ (m) e 3163 cm⁻¹ (m) v(N-H) amina; 3061 cm⁻¹ (f) v(C-H) aromático; 1682 cm⁻¹ (F) v(C=O) carbonila; 1620 cm⁻¹ (F) v(C=N) aromático; 1485 e 1423 cm⁻¹ (m a F) v(C=C) aromático; 1395 cm⁻¹ (F) v(C-N) amina; 1029 cm⁻¹ ρ C-H (m/f); 704 cm⁻¹ (F) δ(C-H) aromático e β(C=O)

(C1) 3470 cm⁻¹ (m), 3391 cm⁻¹ (m) e 3192 cm⁻¹ (m) v(N-H) amina; 3050 cm⁻¹ (f) v(C-H) aromático; 2922 e 2856 cm⁻¹ (f) v(C-H) alifático; 1684 cm⁻¹ (F) v(C=O) carbonila; 1618 cm⁻¹ (F) v(C=N) aromático; 1483 e 1435 cm⁻¹ (m a F) v(C=C) aromático; 1379 cm⁻¹ (m) v(C-N) amina; 1199 cm⁻¹ v(C-NH₂) (f); 1092 cm⁻¹ δ(C-H) (m/f); 1026 cm⁻¹ ρ C-H (f); 843 cm⁻¹ v(P-F) (F); 696 (F) δ(C-H) aromático e β(C=O); 557 cm⁻¹ v(P-F) (F); 518 e 505 cm⁻¹ v(Ru-P) (m); 436 cm⁻¹ v(Ru-N) (f). **F** = forte, **m** = média, **f** = fraca, **v** = estiramento ou deformação axial, **δ** = deformação angular no plano e **γ** = deformação angular fora do plano.

Figura 54 – Espectros de FTIR do NIC livre (em preto), **C2** (em vermelho) e do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]

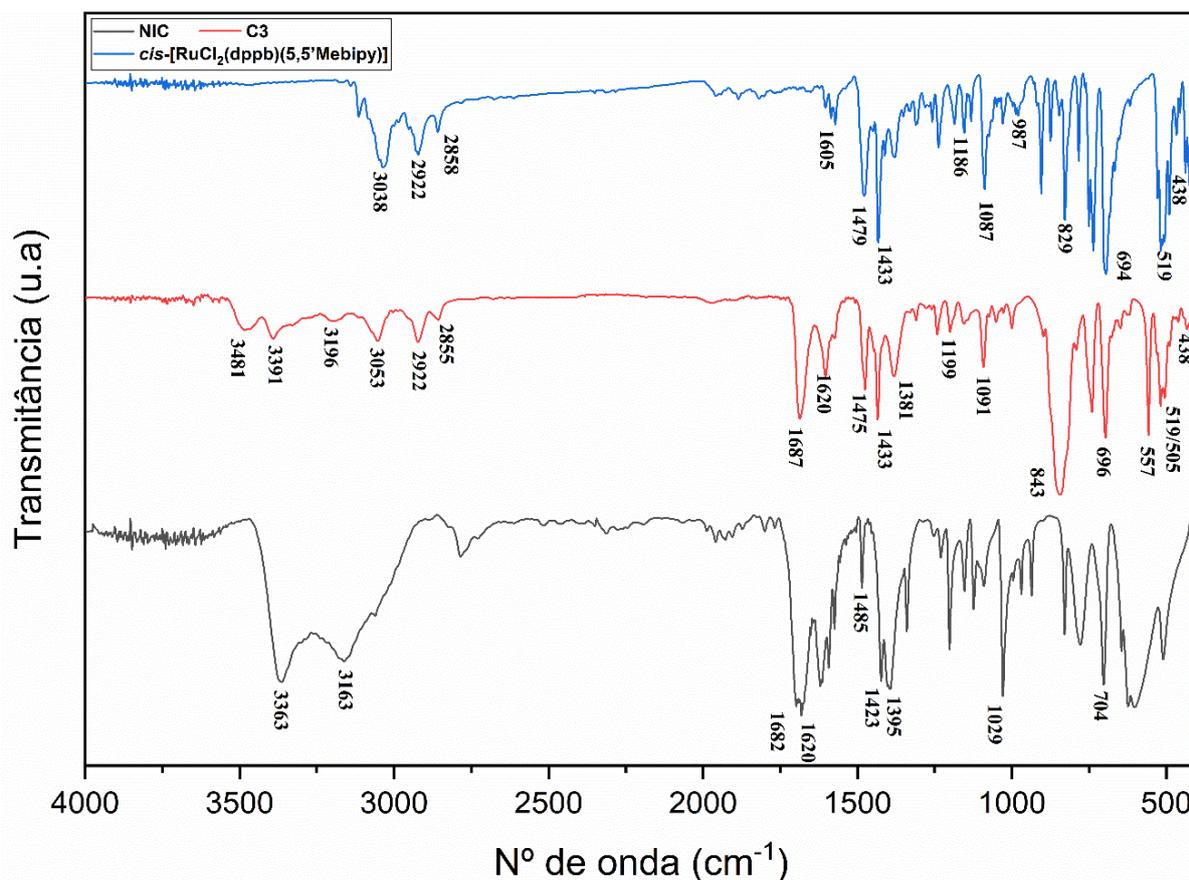


Fonte: Do autor.

Notas: **NIC**- 3363 cm⁻¹ (m) e 3163 cm⁻¹ (m) ν (N-H) amina; 3061 cm⁻¹ (f) ν (C-H) aromático; 1682 cm⁻¹ (F) ν (C=O) carbonila; 1620 cm⁻¹ (F) ν (C=N) aromático; 1485 e 1423 cm⁻¹ (m a F) ν (C=C) aromático; 1395 cm⁻¹ (F) ν (C-N) amina; 1029 cm⁻¹ ρ C-H (m/f); 704 cm⁻¹ (F) δ (C-H) aromático e β (C=O)

C2- 3468 cm⁻¹ (m), 3391 cm⁻¹ (m) e 3177 cm⁻¹ (m) ν (N-H) amina; 3055 cm⁻¹ (f) ν (C-H) aromático; 2922 e 2856 cm⁻¹ (f) ν (C-H) alifático; 1686 cm⁻¹ (F) ν (C=O) carbonila; 1614 cm⁻¹ (F) ν (C=N) aromático; 1493 e 1433 cm⁻¹ (m a F) ν (C=C) aromático; 1379 cm⁻¹ (m) ν (C-N) amina; 1265 e 1041 cm⁻¹ ν (C-O) (m) metoxila; 1091 cm⁻¹ δ (C-H) (m/f); 1026 cm⁻¹ ρ C-H (f); 843 cm⁻¹ ν (P-F) (F); 696 (F) δ (C-H) aromático e β (C=O); 557 cm⁻¹ ν (P-F) (F); 518 e 505 cm⁻¹ ν (Ru-P) (m); 438 cm⁻¹ ν (Ru-N) (f). **F** = forte, **m** = média, **f** = fraca, **ν** = estiramento ou deformação axial, **δ** = deformação angular no plano e **γ** = deformação angular fora do plano.

Figura 55 – Espectros de FTIR do NIC livre (em preto), **C3** (em vermelho) e do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)]



Fonte: Do autor.

Notas: **NIC** 3363 cm⁻¹ (m) e 3163 cm⁻¹ (m) v(N-H) amina; 3061 cm⁻¹ (f) v(C-H) aromático; 1682 cm⁻¹ (F) v(C=O) carbonila; 1620 cm⁻¹ (F) v(C=N) aromático; 1485 e 1423 cm⁻¹ (m a F) v(C=C) aromático; 1395 cm⁻¹ (F) v(C-N) amina; 1029 cm⁻¹ ρ C-H (m/f); 704 cm⁻¹ (F) δ(C-H) aromático e β(C=O)

(C3) 3481 cm⁻¹ (m), 3391 cm⁻¹ (m) e 3196 cm⁻¹ (m) v(N-H) amina; 3053 cm⁻¹ (f) v(C-H) aromático; 2922 e 2855 cm⁻¹ (f) v(C-H) alifático; 1687 cm⁻¹ (F) v(C=O) carbonila; 1620 cm⁻¹ (F) v(C=N) aromático; 1475 e 1433 cm⁻¹ (m a F) v(C=C) aromático; 1381 cm⁻¹ (m) v(C-N) amina; 1199 cm⁻¹ v(C-NH₂) (f); 1091 cm⁻¹ δ(C-H) (m/f); 843 cm⁻¹ v(P-F) (F); 696 (F) δ(C-H) aromático e β(C=O); 557 cm⁻¹ v(P-F) (F); 519 e 505 cm⁻¹ v(Ru-P) (m); 438 cm⁻¹ v(Ru-N) (f). **F** = forte, **m** = média, **f** = fraca, **v** = estiramento ou deformação axial, **δ** = deformação angular no plano e **γ** = deformação angular fora do plano.

Tabela 10 - Principais bandas e atribuições dos espectros de IV de NIC livre e complexos C1, C2 e C3.

Bandas (cm ⁻¹)	NIC	C1	C2	C3	Referências
ν (N-H) (m)	-	3470	3468	3481	
ν_{as} (N-H) (m)	3363	3391	3391	3391	
ν_{sim} (N-H) (f)	3163	3192	3177	3196	
$\nu_{sim}(C-H)_{ar}$ (f)	3061	3050	3055	3053	
$\nu_{ass}(C-H)$	-	2922	2922	2922	
$\nu_{sim}(C-H)$	-	2856	2856	2855	
$\nu_{ass}(C=O)$ (F)	1682	1684	1686	1687	
$\nu(C=N)_{ar}$ e δt NH ₂	1620	1618	1614	1620	
$\nu(C=C)_{ar}$ (m/f)	1573- 1540	1602-1483	1614-1493	1603-1475	
$\nu(C=C)_{ar}$ (m)	1485 1423	1483 1435	1493 1433	1475 (m) 1433 (m)	(ALLAN; BAIRD, 1979;
$\nu(C-C)$ (f)	1423	1419	1418	1419	ATAÇ; YURDAKUL;
$\nu(C-N)_{amina}$ (m)	1395	1379	1379	1381	BERBER, 2011;
$\nu_{ass}(C-O)$ (m)	-	-	1265 /1041	-	BAYARI;
$\nu(C-N)_{ass ar}$ (f)	-	1238	1249	1242	ATAÇ;
$\nu(C-NH_2)$ (F)	1202 (F)	1199 (f)	-	1199(f)	YURDAKUL, 2003; EL-
$\nu(C-N)_{sim}$ (f)	1153	1159	1188	1155	SHWINIY <i>et</i>
ρ C-H (m/f)	1029	1026 (f)	1026 (m)	1026 (f)	<i>al.</i> , 2021;
$\delta(C-H)$ (m/f)	1124 / 1090 e 1030	1092	1091	1091	NAKAMOTO, 2009)
$\nu(P-C)$ e β C-H (ϕ)	-	1199,1092	1002, 1091	1001, 1091	
$\gamma(C-H)$ (f e F)	970, 935, 829, 779	898, 790 e 740	898, 790 e 740	898, 790 e 741	
$\beta(C=O)$ (F)	704	696	696	696	
$\delta(N-H) / \gamma(C-H)$ (F)					
$\delta\omega$ NH ₂ (m/f)	644	648	648	648	
ν (O-CN)	602	-	-	-	
$\delta(CCC)$ (F)	625	623	627	627	
$\delta(C-NH_2)$ (m)	511	sobreposição	sobreposição	sobreposição	
$\nu(P-F)$ (F/f)	-	843 557	843 557	843 557	
$\nu(Ru-N)$ (f)	-	436	438	438	
$\nu(Ru-P)$ (m)	-	518, 505	518, 505	519, 505	

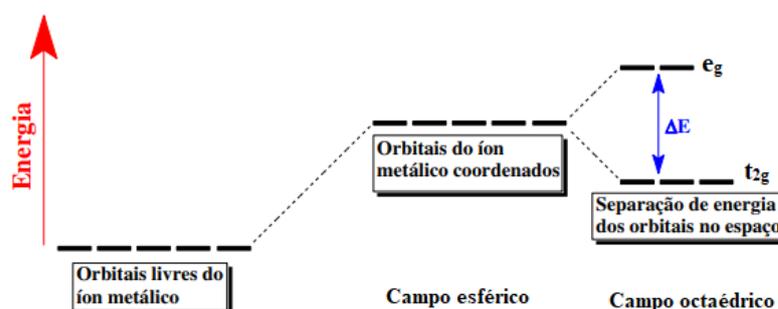
Fonte: do autor

Notas: F = forte, m = média e f = fraca. ν = estiramento ou deformação axial, δ = deformação angular no plano, δt = deformação angular fora do plano do tipo tesoura, γ = deformação angular fora do plano, ρ = flexão noplano, β = vibração de deformação no plano e $\delta\omega$ = deformação angular fora do plano do tipo wagging.

5.1.6 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

Um dos aspectos mais marcantes de muitos compostos de coordenação são suas cores, fenômeno possível de ser observado devido a aproximação de ligantes a um íon metálico central ocasionar a quebra da degenerescência dos orbitais d ao formar uma ligação. Em um complexo octaédrico, o desdobramento dos orbitais d ocorre em dois grupos, o de menor energia é triplamente degenerado (t_{2g}) e o de maior energia é duplamente degenerado (e_g) (Figura 56). Esta diferença de energia entre os níveis t_{2g} e e_g permite a ocorrência de transições eletrônicas que neste caso são características da região visível do espectro, permitindo, portanto, a visualização das diferentes cores (MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

Figura 56 – Diferenciação energética dos orbitais d na presença de ligantes.



Fonte: Adaptado de (MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

As propriedades químicas dos metais e ligantes envolvidos determinam a energia dos orbitais e afetam por consequência a quantidade de energia que será absorvida quando um elétron é promovido para um nível superior (MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

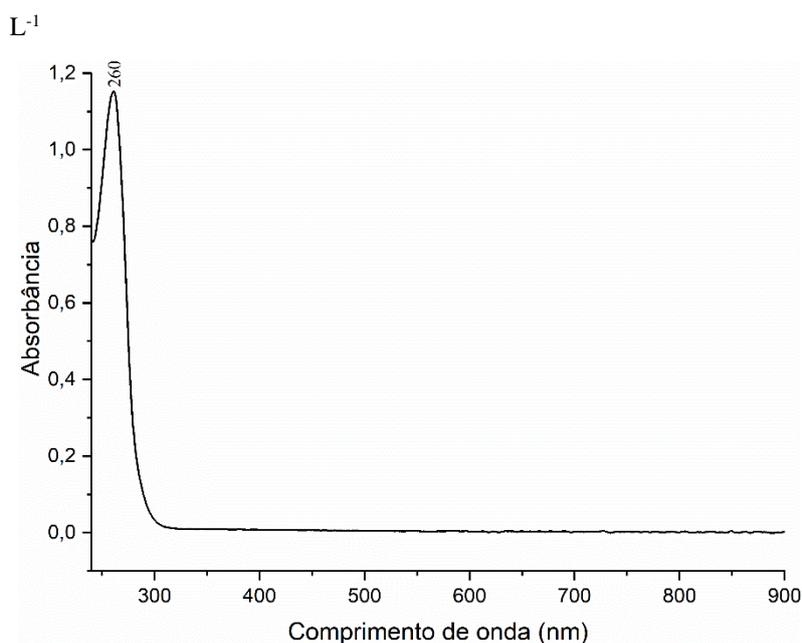
De modo geral os espectros eletrônicos de complexos de metais de transição são caracterizados por apresentar quatro tipos distintos de transições, sendo elas (LEVER, 1984):

- Bandas provenientes de transições eletrônicas internas dos ligantes, provenientes das transições de orbitais $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ características dos ligantes livre. (IL)
- Bandas oriundas das transições dos orbitais d do centro metálico, que sofrem desdobramento do campo cristalino devido as interações eletrostáticas com a aproximação dos ligantes.
- Bandas de transferência de carga atribuídas as transferências de elétrons dos orbitais dos ligantes que apresentam energia e simetria adequadas para os orbitais do metal. (TCLM)

- Por fim bandas de transferência de carga devido a transições eletrônicas dos orbitais $d\pi$ do metal para os orbitas do ligante. TCML

O espectro eletrônico do ligante de nicotinamida (Figura 57) apresentou uma banda de absorção na região ultravioleta, no entanto, na literatura existem relatos que essa banda pode deslocar-se para regiões de maior comprimento de onda devido à forte conjugação existente na molécula (AL-SAIF; REFAT, 2012).

Figura 57 – Espectro de UV-vis do ligante NIC livre, em CH_2Cl_2 4.68×10^{-4} mol x



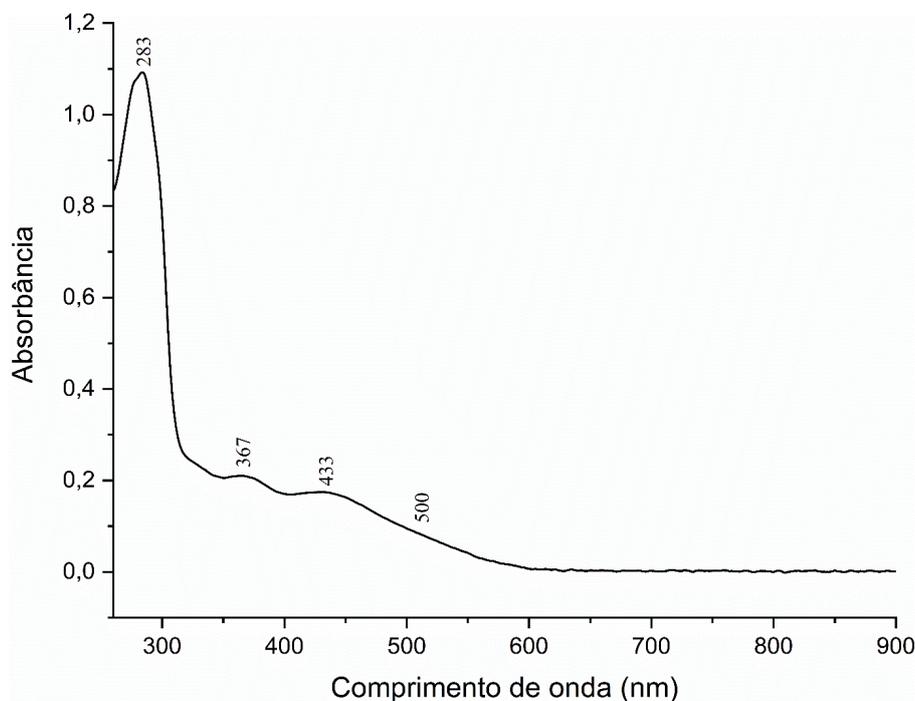
Fonte: do autor

Sabe-se que complexos de rutênio (II) com ligantes biperidínicos (X-bipy) apresentam bandas intensas de absorção na região do UV-vis, onde são observadas bandas de transferência de carga do metal para ligante (TCML) $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bipy})$ entre 320 e 600 nm (LEVER, 1984).

Os precursores utilizados neste trabalho apresentam espectros de UV-Vis semelhantes, desta forma, o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4-Metoxi-bipy)] foi utilizado como exemplo representativo (Figura 58). Na região do ultravioleta observa-se uma banda em aproximadamente 283 nm característica de transições intraligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos da bifosfina e ligantes biperidínicos (KETTLE, 1998). A banda em 367 nm refere-se a transferência de carga ligante metal da biperidina. Já as bandas no intervalo de 433 e 500 nm são atribuídas a transferência de carga metal ligante (TCML) $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(4,4'\text{-metóxi-2,2'-bipy})$ (SANTIAGO, 2004; QUEIROZ *et al.*, 1998). Os espectros para os precursores *cis*-

[RuCl₂(dppb)(4,4'-Mebipy)] e *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Mebipy)] encontram-se no apêndice, Figuras A10 e A11.

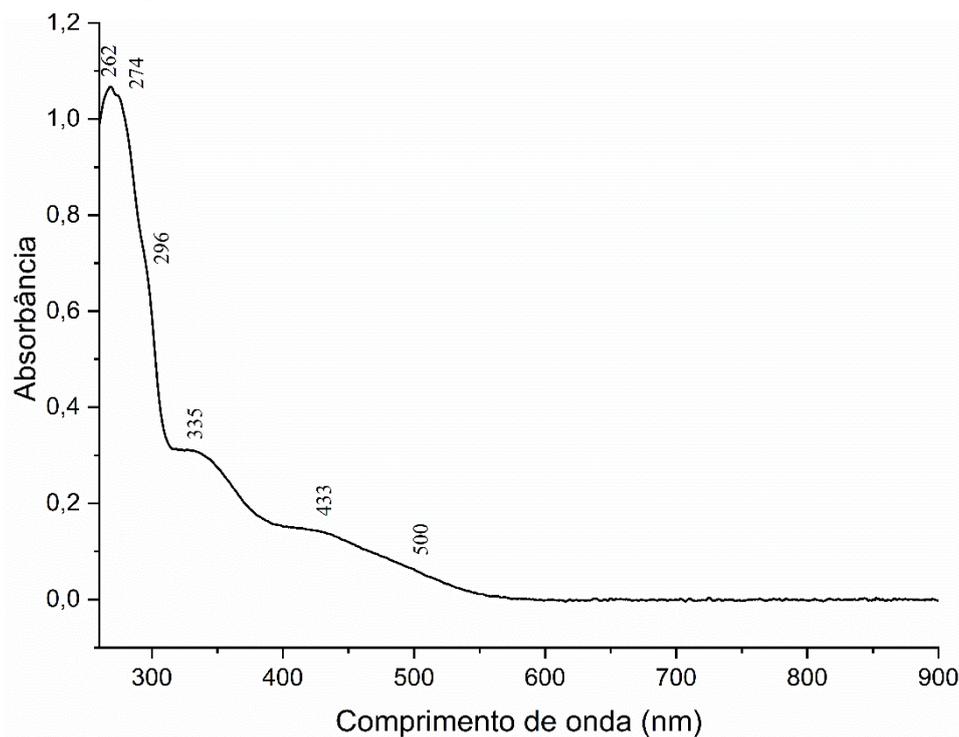
Figura 58 – Espectro de UV-vis do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)], em CH₂Cl₂ 6.28x10⁻⁵ mol x L⁻¹



Fonte: do autor

O complexo **C2**, representativo desta série, Figura 59, apresentou três bandas na região UV (260 – 313 nm) atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, as quais são características da bifosfina, ligantes bipyridínicos e NIC (QUEIROZ *et al.*, 1998; THOTA *et al.*, 2018). As bandas em torno de 433-500 nm foram atribuídas a transferência de carga do metal para o ligante, ou seja, do íon rutênio para os ligantes X-bipy, NIC e/ou dppb. Atribuições semelhantes foram propostas para outros complexos de Ru(II) (RIBEIRO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018) e complexos com nicotinamida (AL-SAIF; REFAT, 2012; MIESSLER,2014). Os valores de absorvidade molar e as tentativas de atribuições estão sumarizadas na Tabela 11.

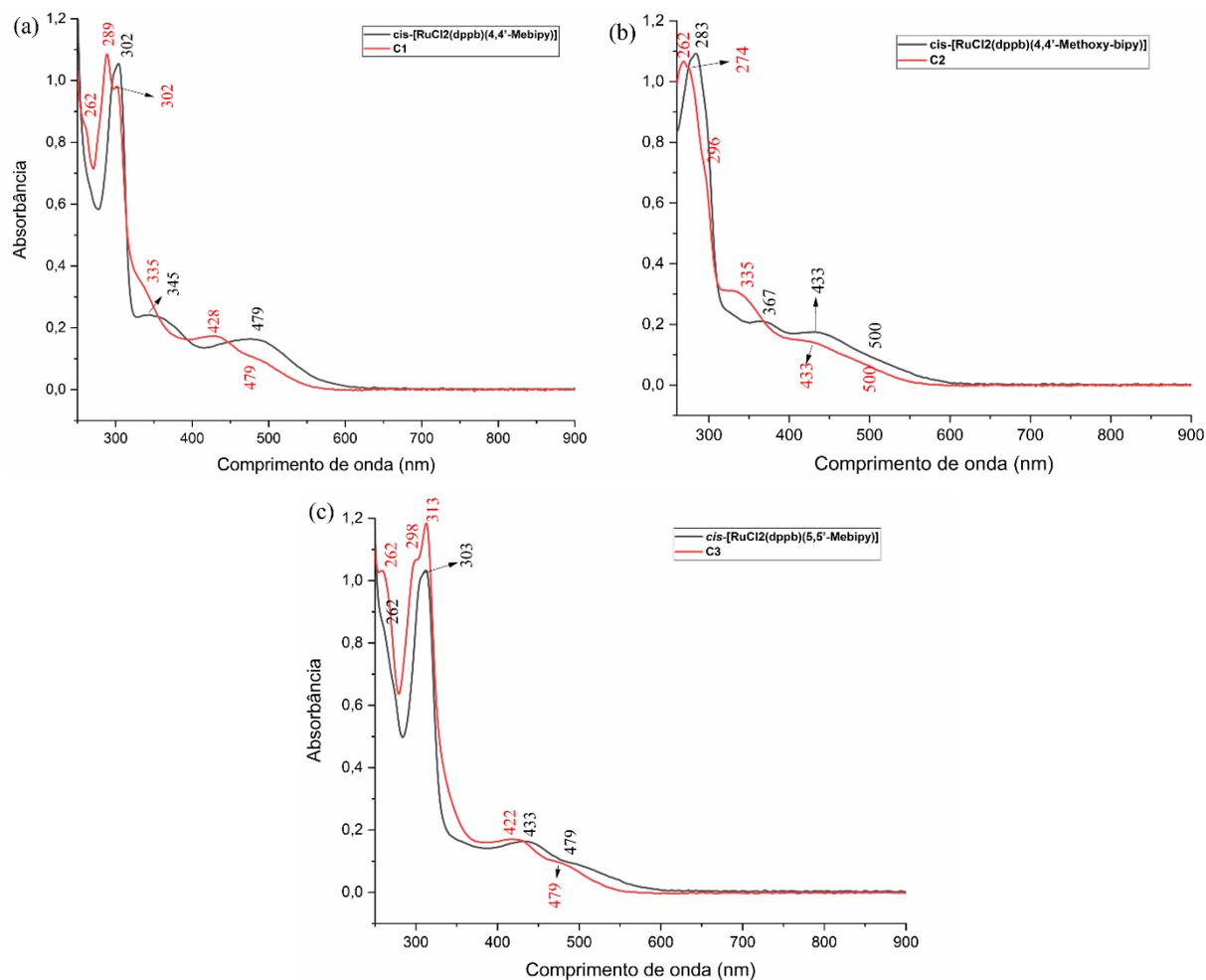
Como pode ser observado, todos os complexos da série 1 apresentaram absorção na região espectral do azul/roxo em torno de 428-500nm do espectro visível. Essa absorção resulta na coloração entre amarelo e laranja dos complexos sintetizados já que são as cores complementares (MIESSLER,2014).

Figura 59 – Espectro de UV-vis do C2, em CH₂Cl₂ 4.73x10⁻⁵ mol x L⁻¹.

Fonte: do autor

Ao comparar os espectros dos precursores com os respectivos complexos obtidos (Figura 60), após a troca do ligante cloreto pela nicotinamida, observou-se deslocamentos para menores comprimentos de onda (deslocamento hipsocrômico), como esperado, uma vez que o cloro é um ligante σ e π doador, comparado ao nitrogênio piridínico da nicotinamida que é um ligante σ doador e π^* receptor (RIBEIRO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018).

Figura 60 – Espectro comparativo de UV-Vis para os complexos obtidos e seus precursores, em CH_2Cl_2 .



Fonte: do autor

Notas: **a)** $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$ $6,88 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$ e **C1** $4,79 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$, **b)** $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Methoxy-bipy})]$ $6,28 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$ e **C2** $4,73 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$ e **c)** $\text{cis-[RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]$ $5,10 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$ e **C3** $5,56 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$

Tabela 11 - Coeficientes de absorvidade molar e atribuições dos precursores, NIC e complexos C1-C3

Complexos	λ (nm)/ Absorbancia	$\epsilon \times 10^3$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Transições
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Mebipy)]	303 / 1.0547	15,329	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	345 / 0.2417	3,513	TCLM $\pi \rightarrow d\pi$
	479 / 0.1634	2,375	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(5,5'-Mebipy)]	262 / 0.8237	ombro	-
	303 / 0,9657	18,935	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	433 / 0.1635	3,206	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$
	479/0,1025	ombro	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]	283 / 1.0916	17,382	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	367 / 0.2110	3,359	TCLM $\pi \rightarrow d\pi$
	433 / 0.1742	2,774	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$
	500/0,0950	ombro	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$ (bipy)
NIC	260 / 1.1535	2,465	IL $\pi - \pi^*$ e $n - \pi^*$
C1	262 / 0.8375	ombro	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \pi^*$
	289 / 1.0854	22,660	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	303 / 0,9803	20,465	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	335/ 0.341	7,119	TCLM $d\pi \rightarrow \pi^*$ (bipy)
	428 / 0.1728	3,607	TCLM $d\pi \rightarrow \pi^*$ (NIC)
C2	479 / 0.1064	ombro	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$ (dppb)
	262 / 1,0206	21,577	TCIL $n \rightarrow \pi^*$
	274 / ombro	ombro	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	296/ombro	ombro	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	335 / 0.3072	6,495	TCLM $d\pi \rightarrow \pi^*$ (bipy)
C3	433 / 0,1383	3,106	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$ (NIC)
	500/0,0627	ombro	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$ (bipy)
	262 / 1.0300	ombro	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	298 / 1.0600	19,065	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	313 / 1.1839	21,293	TCIL $\pi \rightarrow \pi^*$
	422 / 0.1700	3,057	TCLM $d\pi \rightarrow \pi^*$ (NIC)
	479 / ombro	ombro	TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$ (bipy)

Fonte: Elaborada pelo autor.

As bandas de transferência de carga são sensíveis aos grupos doadores ou retiradores de densidade eletrônica nos ligantes biperidínicos, tal fato, pode levar as mudanças energéticas das transições de transferência de carga metal-ligante (BARBOSA, 2007).

Como observado nos complexos sintetizados da série 1, as variações nos ligantes biperidínicos, sendo elas, de posição (4,4 e 5,5-Mebipy) e de substituintes (-CH₃ e -OCH₃), influenciam no valor de pKa destas. Assim, quanto maior valor de pKa, maior será a doação eletrônica ao centro metálico e por consequência a transferência de carga ligante metal será favorecida, levando a observação de bandas em maior comprimento de onda (energia é

inversamente proporcional ao comprimento de onda), conforme os dados na Tabela 12. Os espectros de **C1** e **C3** encontram-se representados nas Figuras A12 e A13 no Anexo A

Tabela 12 - Valores de pKa das biperidinas e o comprimento de onda atribuído à transição de transferência de carga metal ligante dos complexos sintetizados.

Complexos	Ligante biperídínico	pKa	λ (nm) TCML $d\pi \rightarrow \pi^*$
C1	4,4'-Me-bipy	4,92	428
C2	4,4'-Metoxi-bipy	5,74	433
C3	5,5'-Me-bipy	4,93	422

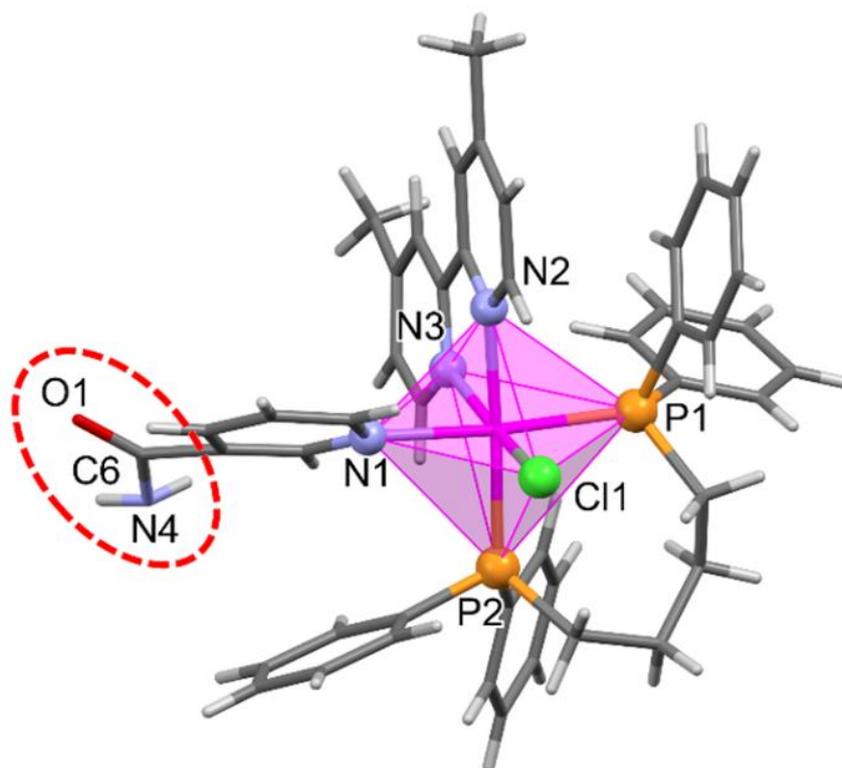
Fonte: do autor

5.1.7 Difração de raios X por monocristal (DRXM)

Para a série 1 empregou-se a técnica de evaporação lenta de solvente, para tal, uma mistura de diclorometano/metanol (1:1) e o respectivo complexo foi solubilizado e mantido em baixa temperatura (freezer). Com este método, foi possível obter monocristais para o complexo **C1**. Como representado na Figura 61, foi possível confirmar a formulação proposta, onde o cátion Ru(II) encontra-se ligado aos dois átomos de fósforo do ligante bifosfínico, dois átomos de nitrogênio do ligante 4,4'-Mebipy, um ânion cloreto e o ligante nicotinamida coordenado pelo nitrogênio piridínico, de modo monodentado. Como esperado, a nicotinamida substituiu o ligante cloreto *trans* ao átomo de fósforo da dppb no precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Mebipy)], de modo semelhante a outras estruturas análogas contendo biperidina e derivados de piridina como ligantes bidentados e monodentados respectivamente (BATISTA *et al.*, 2001; GODWIN; MEYER, 1971; PAVAN *et al.*, 2011; VALLE *et al.*, 2009). Os principais dados cristalográficos, de coleta e refinamento estão reunidos na Tabela 13.

A geometria octaédrica em torno do cátion Ru em **C1** (Ru1—N1 = 2.196(4) Å, Ru—N2 = 2.113(3) Å, Ru—N3 = 2.077(3) Å, Ru—Cl1 = 2.430(1) Å, Ru—P1 = 2.327(1) Å, Ru—P2 = 2.349(1) Å, e os ângulos de ligação de 77.7(1) até 103.7(1)°; Tabela 14) é similar à de estruturas análogas como o [RuCl(Py)(dppb)(bipy)]⁺ (onde Py e bipy são derivados de piridina e biperidina) (MONDELLI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018).

Figura 61 – Representação estrutural com marcação parcial dos átomos mostrando a unidade assimétrica do complexo **C1**, com poliedro demonstrando geometria octaédrica ao redor do Ru(II). O ânion hexafluorofosfato foi omitido para maior clareza.



Fonte: software Mercury (versão 4.2.0) (MACRAE *et al.*, 2008)

Notas: O círculo tracejado na porção carboxamida chama a atenção para sua ocupação incompleta do sítio (25%) indicando que o cristal formado a partir de **C1** era na verdade uma solução sólida de $\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})\text{PF}_6$ (**C1**) e $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ na proporção de 25:75%.

Tabela 13 - Principais dados cristalográficos do complexo **C1**

Complexo	C1
Código de depósito CCDC	2213016
Fórmula empírica	$C_{45,25}ClF_6H_{45,25}N_{3,25}O_{0,25}P_3Ru$
Peso molecular (g/mol)	982,03
Temperatura (K)	100,0(10)
Sistema Cristalino	<i>Triclínico</i>
Grupo Espacial	$P\bar{1}$
Parâmetros de célula (Å)	a= 10,6388(3)
	b= 12,6384(3)
	c= 18,6638(5)
	α = 74,689(2)
	β = 77,731(2)
(°)	γ = 83,112(2)
Volume (Å³)	2359,71(11)
Z	2
Densidade ($\rho_{\text{calc}}/\text{g cm}^{-3}$)	1,435
μ/mm^{-1}	0,554
F(000)	1044,1
Dimensão do cristal/mm³	0,202 × 0,171 × 0,146
Comprimento de onda	Mo K α (λ = 0,71073)
Intervalo θ da coleta de dados (°)	4,16-51,36
Limite de índices	-14 ≤ h ≤ 15;
	-17 ≤ k ≤ 17;
	-25 ≤ l ≤ 26
Reflexões coletadas	35215
Reflexões independentes	8908 [$R_{\text{int}} = 0,0451$, $R_{\text{sigma}} = 0,0502$]
Dados / restrições / parâmetros	8908/122/624
GooF	1,053
Índices R final [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0465$, $wR_2 = 0,1146$
Índices R final [todos os dados]	$R_1 = 0,0543$, $wR_2 = 0,1184$
Largest diff. peak/hole / e Å⁻³	0,96/-0,54

Fonte: do autor

A difração de raios X por monocristal revelou que o cristal obtido trata-se de uma solução sólida constituída pelos complexos **C1** e $[RuCl(Py)(dppb)(4,4'\text{-Me-bipy})]PF_6$, na

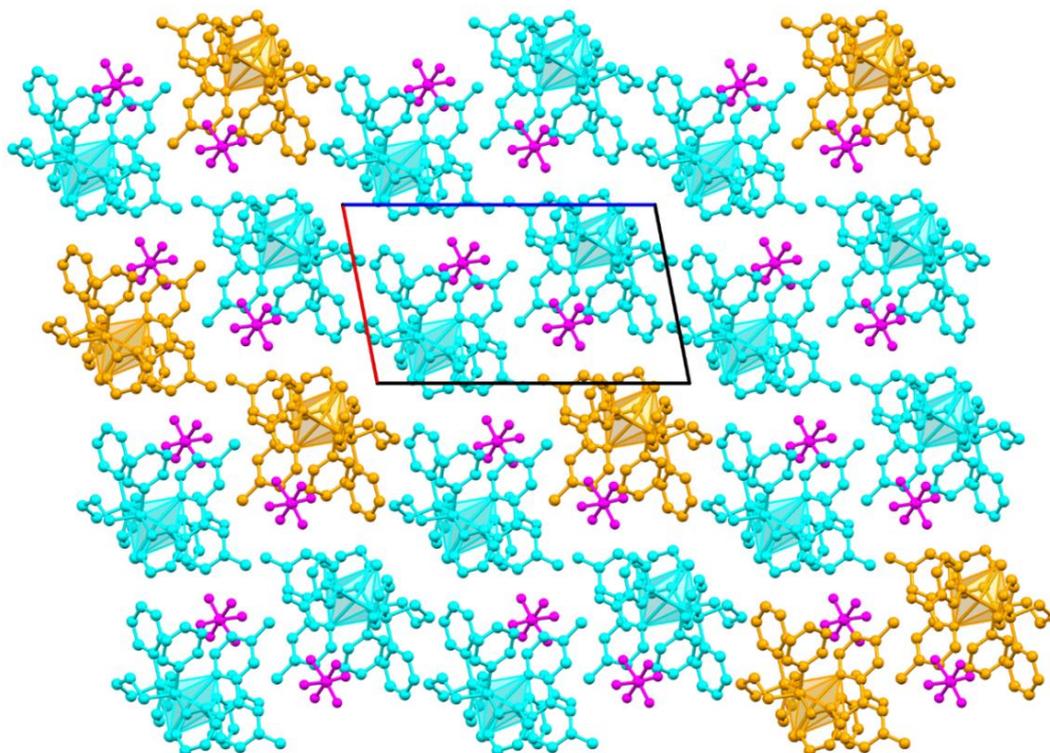
proporção de 25:75 (ver seção 3.6.6), conforme mostrado na Figura 62. Em outras palavras, **C1** foi parcialmente convertido em $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ durante o processo de recristalização, corroborando com os resultados de estabilidade em solução que serão apresentados adiante.

Tabela 14 - Ângulos de ligação selecionados ($^\circ$) para **C1**.

$\text{Cl1—Ru1—P2} = 87.03(3)$	$\text{N3—Ru1—N2} = 77.7(1)$
$\text{N1—Ru1—Cl1} = 88.75(9)$	$\text{P1—Ru1—Cl1} = 85.50(4)$
$\text{N1—Ru1—N2} = 84.0(1)$	$\text{P1—Ru1—N2} = 89.0(1)$
$\text{N1—Ru1—N3} = 85.1(1)$	$\text{P1—Ru1—N3} = 99.2(1)$
$\text{N1—Ru1—P2} = 92.94(9)$	$\text{P1—Ru1—P2} = 93.87(4)$
$\text{N2—Ru1—Cl1} = 91.3(1)$	$\text{P2—Ru1—N3} = 103.7(1)$

Fonte: do autor

Figura 62 – Empacotamento da estrutura de **C1** projetada em seu plano ac destacando a solução sólida formada por **C1** (em laranja) e $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (em azul claro).



Fonte: do autor

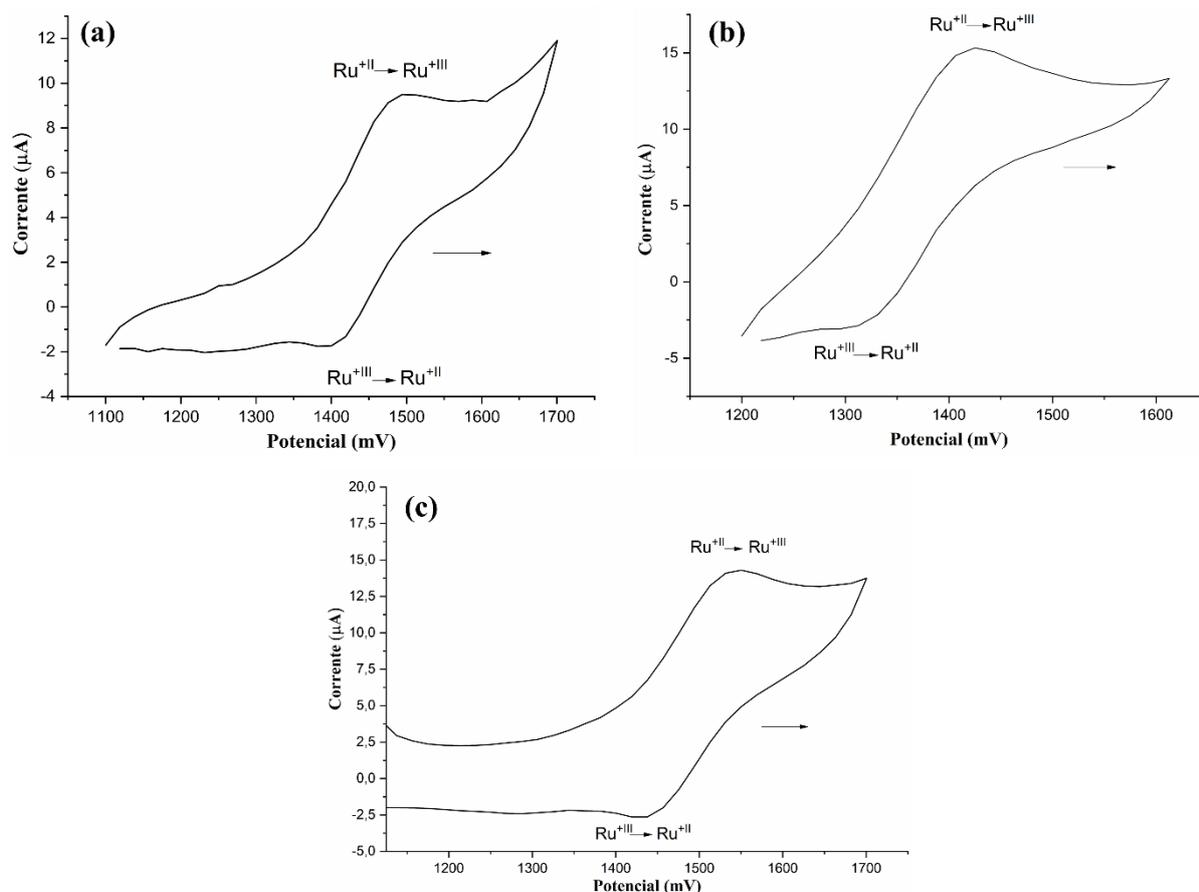
Notas: O ânion hexafluorofosfato foi representado em roxo e tem a sua desordem omitida. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza

5.1.8 Voltametria cíclica

As análises de voltametria cíclica são úteis para comparar a densidade eletrônica do centro metálico, em função da variação dos ligantes coordenados (ELGRISHI et al., 2018). Os precursores utilizados nas sínteses do tipo *cis*-[RuCl₂(dppb)(X-bipy)] apresentam potenciais redox próximos de 600 mV de acordo com (ELGRISH *et al.*, 2018) e após a coordenação com o ligante nicotinamida estes valores aumentaram para aproximadamente 1500 mV, tais resultados evidenciam a troca do átomo de cloro, bom doador σ e π por um ligante retirador de densidade eletrônica como o nitrogênio piridínico do ligante nicotinamida fazendo com que a oxidação do par Ru(II)/Ru(III) seja dificultada, refletindo em um potencial de oxidação elevado (SANTIAGO, 2004; BARBOSA, 2007).

Os voltamogramas obtidos para os complexos estão sumarizados na Figura 63 e são centrados em processos redox do par Ru^(II)/Ru^(III). Uma correlação interessante pode ser observada ao comparar os potenciais de oxidação e redução com a basicidade dos ligantes bipyridínicos, a qual é demonstrada na Tabela 15. Como mencionado anteriormente, quanto mais básico o substituinte do ligante bipyridínico (pKa mais elevado) menor o potencial de oxidação, uma vez que ele favorece a doação de densidade eletrônica para o centro metálico facilitando o processo de oxidação Ru^(II)/Ru^(III). A Tabela 15 mostra que os complexos **C1** e **C3** possuem o maior potencial de oxidação por apresentam ligantes bipyridínicos mais ácidos, são estes 4,4'-Me-bipy e 5,5'-Me-bipy respectivamente.

Figura 63 – Voltamogramas cíclicos dos complexos: a) **C1**, b) **C2**, c) **C3**, eletrólito PTBA 0,1 mol·L⁻¹ em C₂H₅N vs Ag/AgCl, velocidade de varredura 100 mV·s⁻¹.



Fonte: do autor

Tabela 15 - Processos eletrônicos para os complexos **C1-C3** e o pKa dos ligantes biperidínicos empregados, experimentos realizados em C₂H₅N empregando 0.10 mol.L⁻¹ de Bu₄N⁺ClO₄⁻ e utilizando como eletrodo de referência Ag/AgCl e os eletrodos de trabalho e auxiliar, ambos de platina.

Complexos	E _{pa} Ru ^{+II} → Ru ^{+III} (mV)	E _{pc} Ru ^{+III} → Ru ^{+II} (mV)	E _{1/2}	pKa
[RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF ₆	1494	1400	1.32	4,92
[RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF ₆	1425	1331	2,25	5,74
[RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF ₆	1550	1419	1.38	4,93

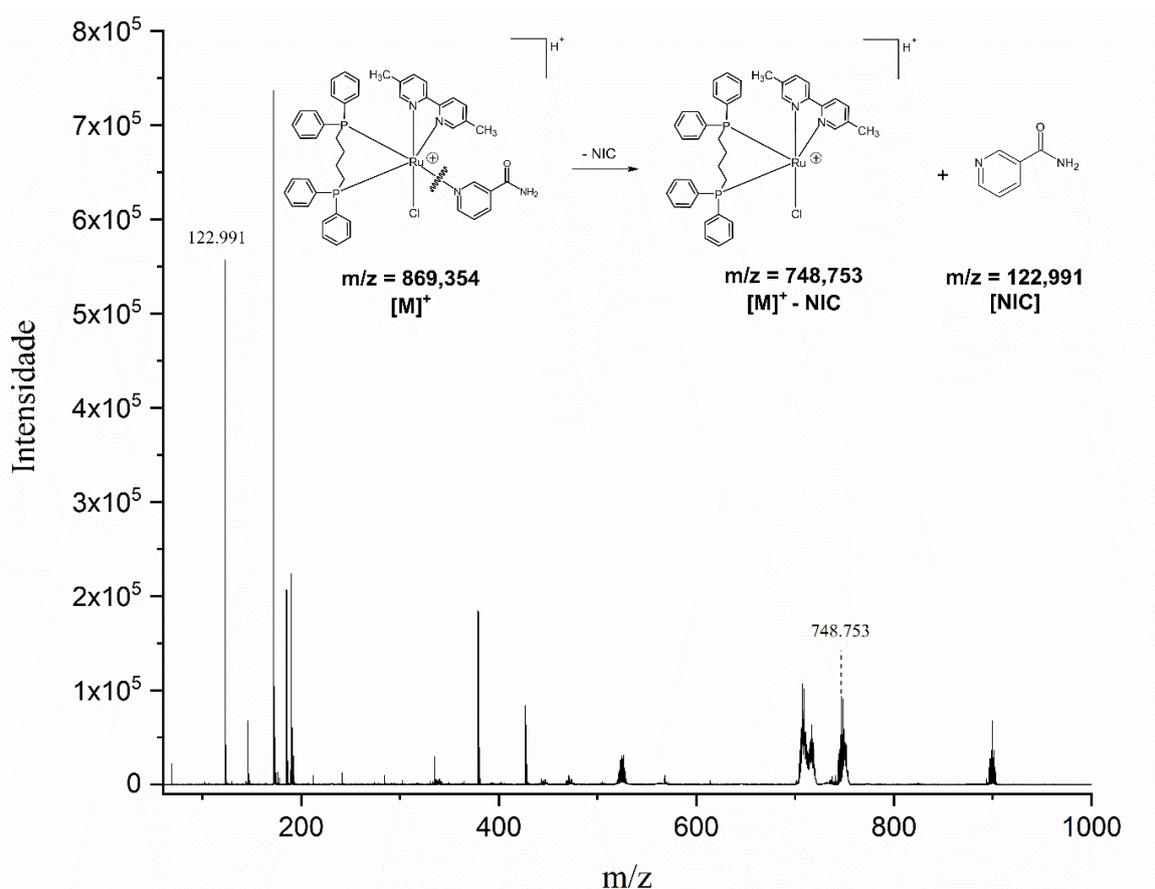
Fonte: do autor

5.1.9 Espectrometria de massas (EM)

Os três complexos analisados (**C1-C3**) compartilharam os mesmos padrões de fragmentação, e por isso um espectro representativo do complexo **C3** está demonstrado na Figura 64, os demais encontram-se nas Figuras A14 e A15 no Anexo A.

Inicialmente podemos notar que o pico referente a molécula ionizada sem fragmentação em m/z 869,359 e 901,353, respectivamente para **C1/C3** e **C2**, não foram observados no espectro de massas (Figura 64). No entanto, foram observados os picos em m/z $[M]^+$ 748,740, 780,682 e 748,753, para **C1**, **C2** e **C3**, respectivamente, correspondentes a perda do ligante nicotinamida. Ademais, o fragmento correspondente a m/z 122,991, referente a nicotinamida, foi detectado, conforme ilustrado na Figura 64.

Figura 64 – Espectro de massas de **C3**, empregando um espectrômetro MALDI-TOF-MS (tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz).



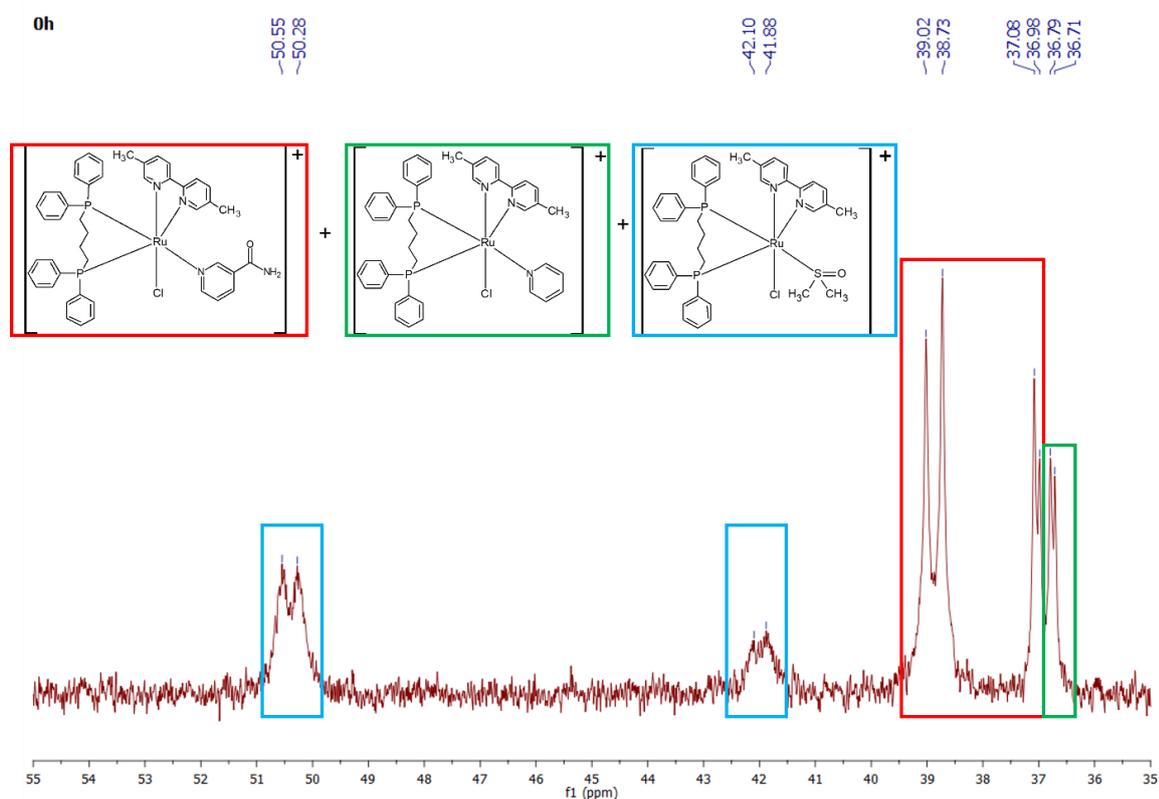
Fonte: do autor

5.1.10 Estudo de estabilidade em solução dos complexos da série 1

A fim de verificar a influência dos solventes na degradação da nicotinamida coordenada, uma vez que a determinação estrutural por difração de raios X por monocristal de **C1**, mostrou uma solução sólida com os ligantes, piridina e a nicotinamida coordenados, avaliou-se a estabilidade dos complexos por RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em diferentes solventes, sendo estes, DMSO, diclorometano, etanol, metanol e uma mistura de DEMEM e DMSO (3: 8). Os tempos avaliados foram 0, 24, 48 e 72 horas após a solubilização. Vale destacar que nessa etapa da investigação escolhemos realizar somente com **C3** pois ele apresentou a maior atividade citotóxica, conforme será relatado adiante.

Os complexos da série 1 demonstraram que quando foram solubilizados em DMSO, os complexos $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$, $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{DMSO})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$ foram obtidos, como pode ser observado no espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para **C3** no tempo 0h (Figura 65). Esta atribuição foi realizada de acordo com dados obtidos para complexos semelhantes em que a coordenação de DMSO e piridina são reportados (CARMICHAEL *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2018).

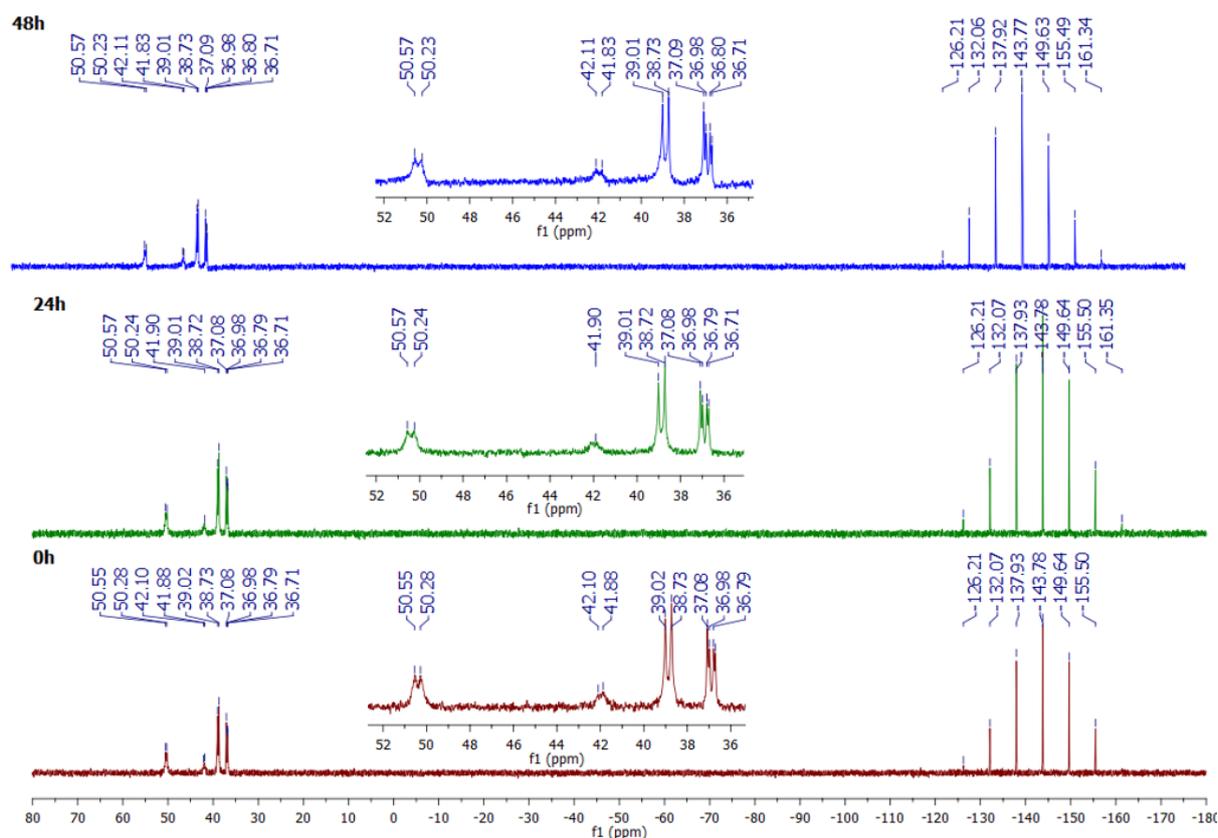
Figura 65 – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **C3** em DMSO no tempo de 0h após solubilizado.



Fonte: do autor

Avaliou-se também a estabilidade em DMSO nos tempos de 24 e 48 horas, e a manutenção dos sinais referentes aos complexos $[\text{RuCl}(\text{NIC})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$, $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{DMSO})(\text{dppb})(\text{X-bipy})]\text{PF}_6$ foi observada para ambos complexos da série 1 (Figura 66 e Figuras A16 e A17 do Anexo A) para **C3**, **C1** e **C2**, respectivamente.

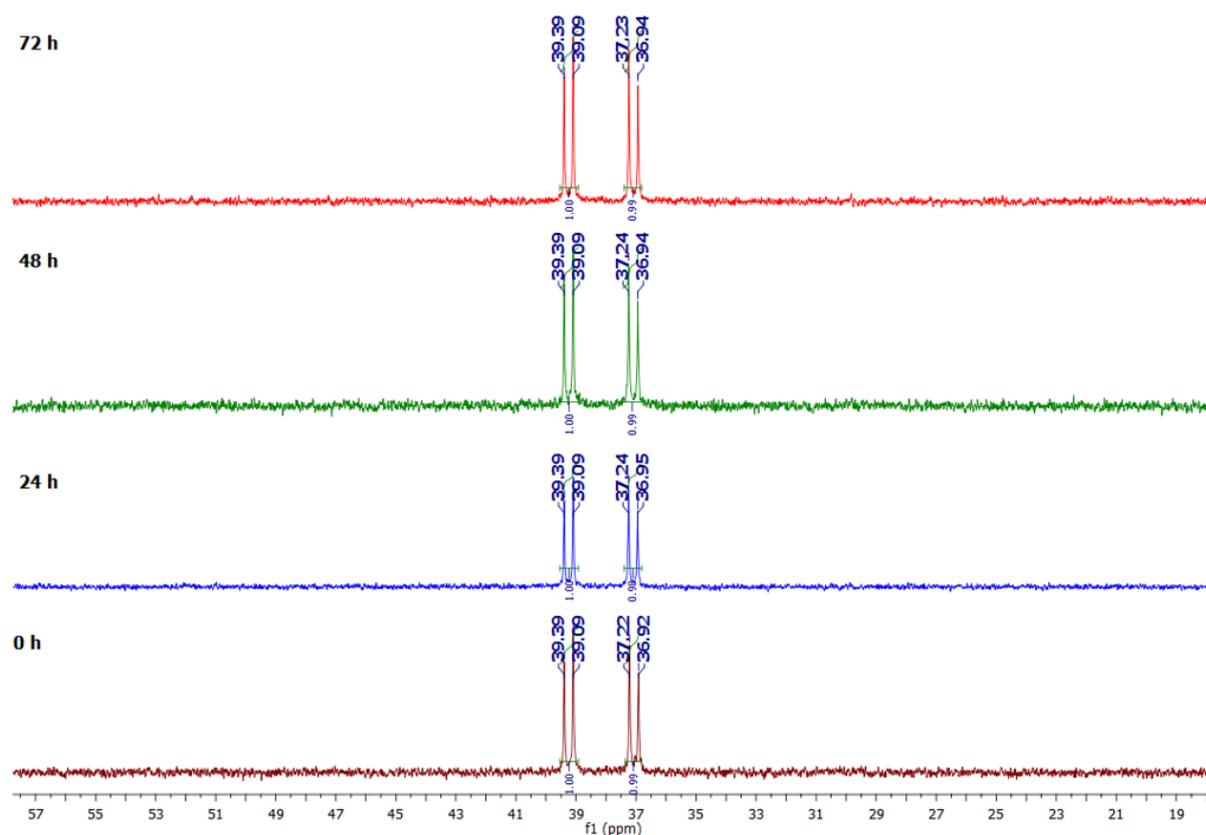
Figura 66 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **C3** nos tempos de 0, 24 e 48h, em DMSO.



Fonte: do autor

Diante do exposto e a partir dos relatos dos mecanismos de degradação do ligante nicotinamida, avaliou-se o comportamento de **C3** em diferentes solventes. Em diclorometano, como esperado (solvente empregado na síntese), o complexo **C3** permaneceu estável ao longo de todo experimento, apresentando somente dois dubletos em δ 39,24 e 37,08 ppm com constante de acoplamento $^2J(\text{p-p}) = 30,0$ Hz, conforme ilustra a Figura 67.

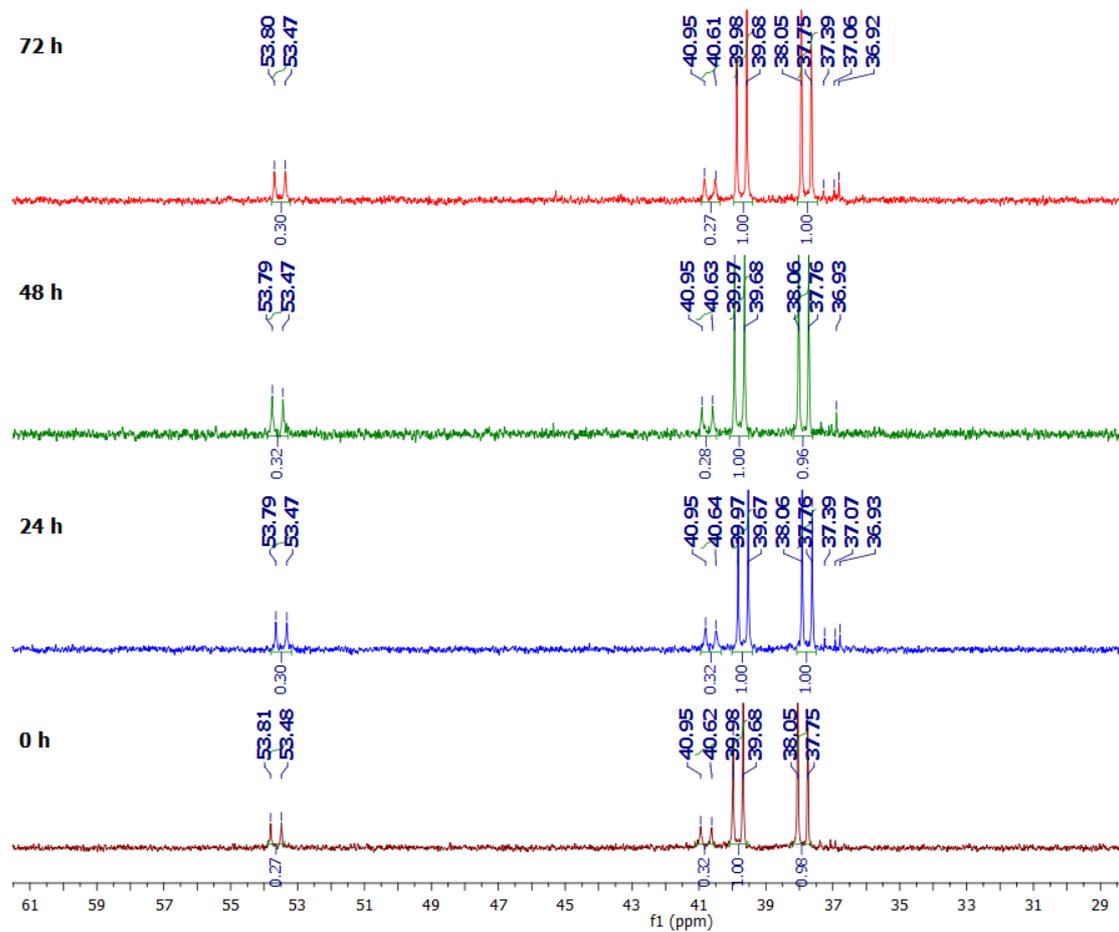
Figura 67: Estabilidade do complexo **C3**, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, em CH₂Cl₂.



Fonte: do autor

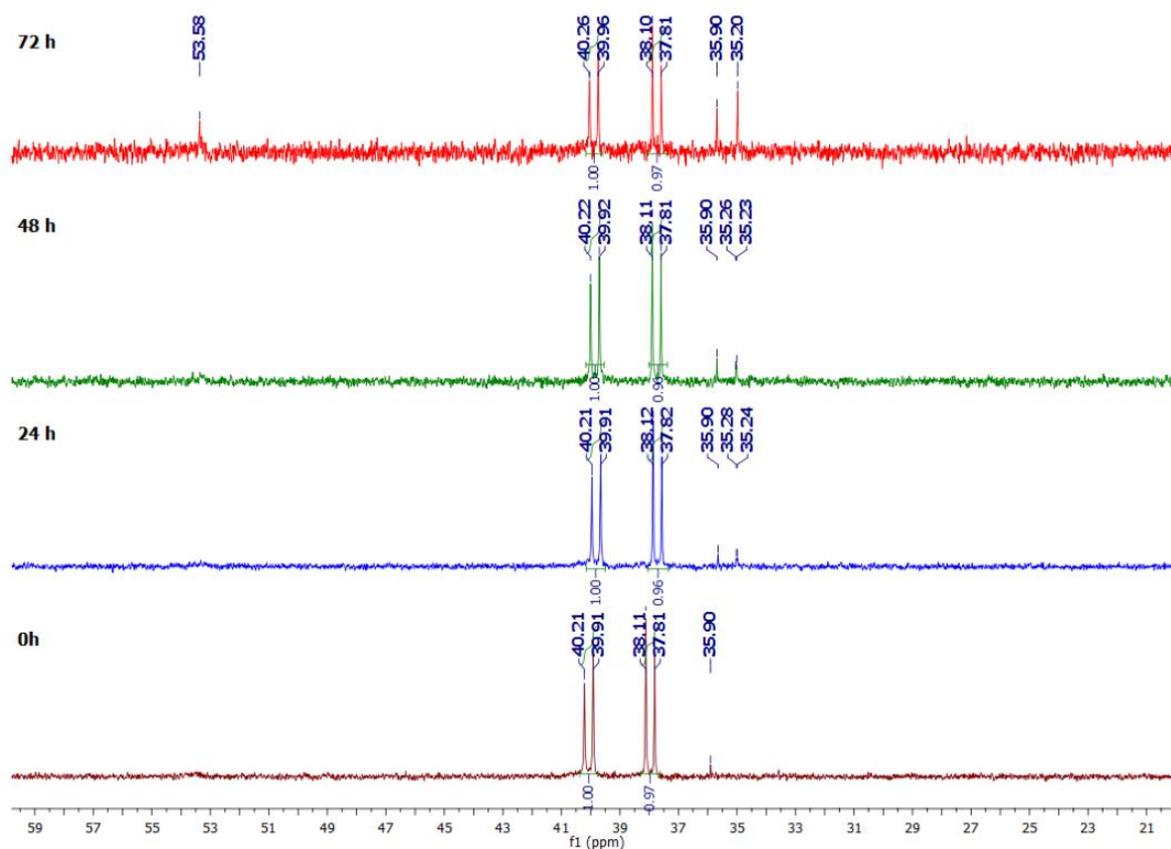
No entanto, quando os compostos foram solubilizados em metanol, dubletos em aproximadamente δ 53,0 e 44,0 ppm atribuídas a coordenação do metanol pela troca do ligante piridina foram observados, conforme reportado na literatura por (DYKEMAN *et al.*, 2007; KUZNETSOV *et al.*, 2002). Ademais, singletos em aproximadamente δ 37,0 ppm, os quais são característicos do complexo [RuCl(Py)(dppb)(X-bipy)]PF₆ são observados (Figura 68). Estes, também foram observados quando **C3** foi solubilizado em etanol, conforme ilustrado na Figura 69.

Figura 68 – Estabilidade do complexo **C3**, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, em CH₃OH.



Fonte: do autor

Figura 69 – Estabilidade do complexo **C3**, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, em CH₂CH₃OH.

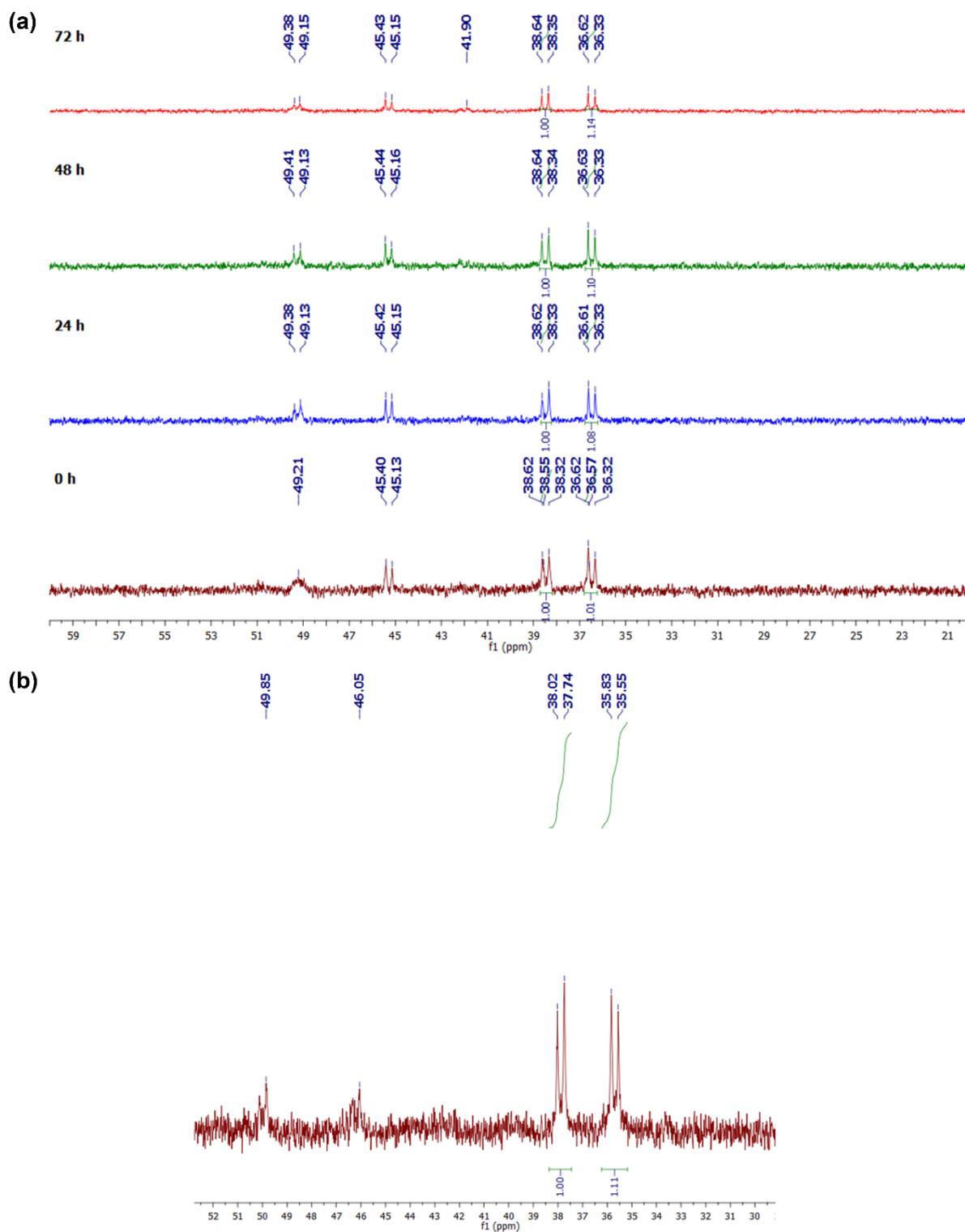


Fonte: do autor

Após a obtenção de mais estes indícios da provável degradação da fração amida da nicotinamida dos complexos em determinados solventes, seguiu-se a investigação com a solubilização de **C3** em meio de cultivo (DMEM) (800 μ L) e DMSO (300 μ L), e posterior análise por RMN de ³¹P{¹H} (Figura 70 A), com o objetivo de verificar a estabilidade nas mesmas condições empregadas nos ensaios biológicos. Como observado no espectro da Figura 70 A, dois dubletos em δ 38,5 e 36,5 ppm, que podem ser referentes aos compostos [RuCl(Py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ ou [RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆, e mais dois dubletos em δ 49,0 e 45,0 ppm.

Para identificar o composto formado quando **C3** é solubilizado em DMEM/ DMSO, o complexo [RuCl(Py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ foi sintetizado (Figura A18 do Anexo A), e analisado por RMN de ³¹P{¹H} em (DMEM) (800 μ L) e DMSO (300 μ L), mostrado na Figura 70 B.

Figura 70 – Estabilidade do complexo (a) **C3**, em DMSO (800 μ L) + DEMEM (300 μ L) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas e (b) $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ em DMSO (800 μ L) + DEMEM (300 μ L) após solubilização.



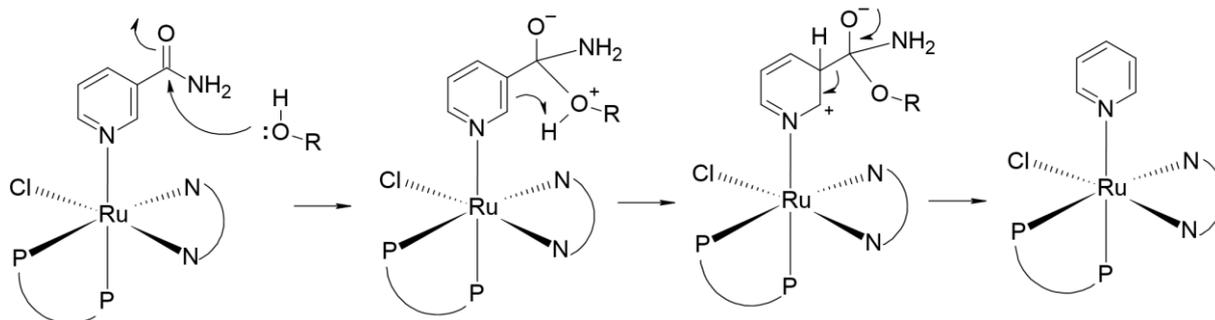
Fonte: do autor

Analisando os espectros de RMN de fósforo das Figuras 65-70 (A e B) podemos inferir que quando **C3** é solubilizado em DMEM + DMSO, uma mistura dos complexos contendo a piridina coordenada (oriunda da nicotinamida) e uma segunda espécie obtida pela troca da piridina por água, ou algum constituinte proveniente do meio biológico DMEM, como aminoácido, é obtida.

A formação do complexo $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me -bipy})]\text{PF}_6$ a partir de **C3** pode ser atribuída pelo ataque de um solvente nucleófilo prótico, como etanol e metanol, ao carbono do grupo amida da nicotinamida, que apresenta maior eletrofilicidade após a coordenação. Já quando **C3** é solubilizado em DMSO, o ataque nucleófilo prótico pode ser oriundo da água presente no solvente.

O mecanismo proposto para a reação é representado no Esquema 1. Neste, após o ataque do nucleófilo, a dupla ligação do anel aromático abstrai o hidrogênio da porção nucleofílica e quando o oxigênio do grupo amida reestabelece a dupla ligação, leva a saída do grupo amida e formação da piridina, que permanece coordenada. A velocidade da reação foi proporcional à força e viabilidade do nucleófilo conforme observado comparando os diferentes meios do teste de estabilidade (Figuras 65 – 70). Vale destacar que maiores estudos com o intuito de confirmar os intermediários propostos precisam ser realizados, visto que o complexo **C3** pode ainda ser um promissor catalisador deste tipo de reação.

Esquema 5- Mecanismo proposto para a formação do complexo com piridina a partir de **C3**.



Fonte: do autor

5.1.11 Estudo da atividade citotóxica dos complexos da série 1

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados empregando inicialmente uma concentração de 40 μM de **C1-C3** nas linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama positivo para estrogênio), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (adenocarcinoma pulmonar) e SK-

MEL-147 (melanoma) e os perfis citotóxicos desses complexos foram determinados após 48 h de tratamento.

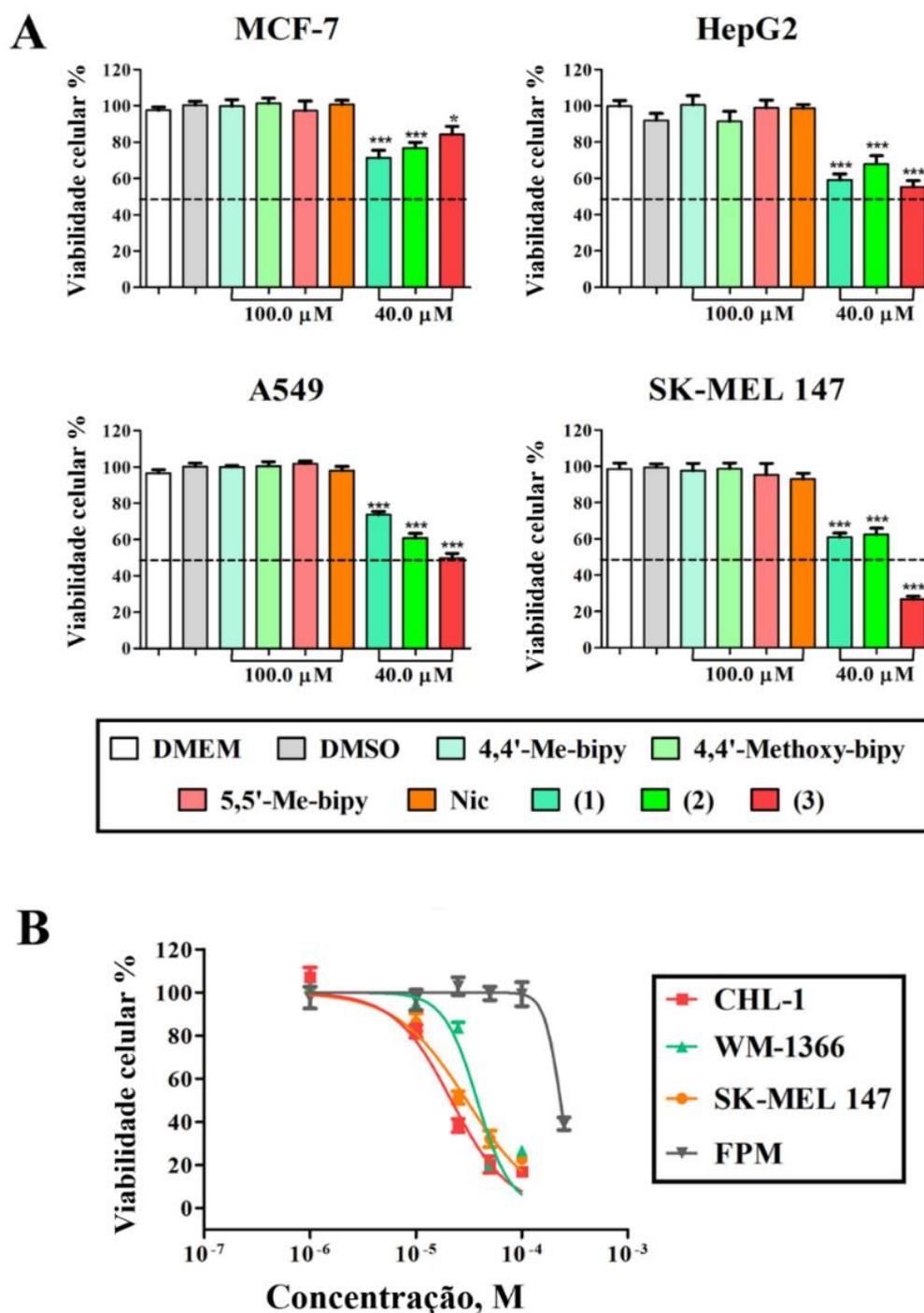
Todos os complexos testados reduziram a viabilidade das células tumorais avaliadas, no entanto, **C3** foi o mais ativo nas células A549 e SK-MEL-147. As taxas de viabilidade obtidas para **C3** nessas linhagens foram em torno de 50% e 28%, respectivamente conforme ilustra a Figura 71 A. Nenhum efeito citotóxico foi observado para precursores ou ligante NIC livre na concentração de 100 μ M (Figura 71 A) em células tumorais. Assim, a estrutura química desses complexos de rutênio (II) parece ser crítica para sua citotoxicidade. Além disso, a presença do arranjo estrutural obtido (**C1-C3**) mostrou-se importante para a atividade citotóxica nas linhagens avaliadas e na seletividade quando comparados aos precursores e ligante livre (CANDIDO *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2011; MCCAIN *et al.*, 2019; NEGRETI *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2021; RAMADEVI *et al.*, 2015).

Considerando a eficiente citotoxicidade de **C3** em células de melanoma SK-MEL-147, decidimos avaliar os efeitos deste composto em outras linhagens celulares derivadas de melanoma (CHL-1 e WM1366). Os melanomas cutâneos são altamente heterogêneos e exibem diferentes alterações genômicas, que desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer, resistência a medicamentos e progressão do câncer (NEGRETI *et al.*, 2022). Assim, os valores de IC_{50} do **C3** foram determinados para três linhagens de células de melanoma que exibem perfis de mutação distintos e são representativos de diferentes subtipos de melanoma.

Considerando estes resultados o complexo **C3** foi selecionado para análises subsequentes considerando sua capacidade de reduzir em mais de 50 % a taxa de viabilidade em culturas de SKMEL-147 quando usado na concentração de 40 μ M. Desta forma, os efeitos de **C3** sobre o comportamento proliferativo de linhagens de melanoma foram avaliados (SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1).

As curvas dose-resposta representadas na Figura 71 B mostraram que o composto **C3** foi eficaz na redução da viabilidade de todas as linhagens celulares de melanoma após 48 h de tratamento. No entanto, o IC_{50} mais baixo foi observado para a linhagem celular CHL-1 (Tabela 16), que abriga as mutações inativadoras de *TP53* e *CDKN1A*.

Figura 71 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio da sulforrodamina B (SRB), em (A) as células foram tratadas com complexos (C1-C3) a 40 μ M, precursores a 100 μ M e ligantes (NIC) a 100 μ M por 48 h. (B) Curvas dose-resposta exibindo os efeitos do complexo C3.



Fonte: do autor

Notas: Estatisticamente diferente (* $p < 0,05$, e *** $p < 0,001$) do grupo controle de acordo com análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. Grupo DMEM: As células foram cultivadas em meio de cultura. Grupo DMSO: as células foram cultivadas em meio contendo veículo DMSO (0,1%, v/v). MCF-7 (câncer de mama positivo para estrogênio), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (adenocarcinoma pulmonar) e SK-MEL-147, CHL-1 e WM1366 (melanoma).

O complexo **C3** também foi testado em fibroblastos derivados da pele (FPM). O valor de IC₅₀ encontrado para células normais (231,13 ± 2,01) foi maior do que o obtido para linhagens celulares de melanoma (18,06 ± 0,77; 37,95 ± 1,90; 30,10 ± 1,88 para CHL-1, WM1366 e SK-MEL-147). O índice de seletividade de **C3** para células CHL-1 foi de aproximadamente 13,00 indicando que **C3** atende aos critérios para estudos *in vivo* em trabalhos futuros, além de ser altamente seletivo. A linhagem CHL-1 mostrou-se mais responsiva ao tratamento com **C3**, quando comparada as demais (WM1366 e SK-MEL-147), considerando que os valores de IC₅₀ determinados para tais linhagens foram, em média, duas vezes maiores que o valor encontrado para CHL-1. A cisplatina foi utilizada como controle positivo e apresentou valor de IC₅₀ igual a 94,59 ± 3,95 µM na linhagem CHL-1, ou seja, resultado em média cinco vezes maior que o IC₅₀ de **C3** na mesma linhagem (Tabela 16).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa reportou que complexos fosfínicos de rutênio contendo derivados do ácido cinâmico reduziram eficientemente a viabilidade celular de linhagens celulares de melanoma (IC₅₀ variando de 2,83-14,39) (NEGRETI *et al.*, 2022). No entanto, os índices de seletividade desses complexos para células de melanoma foram muito menores (NEGRETI *et al.*, 2022) em comparação com os observados para **C3**. Essas descobertas são promissoras e sugerem que **C3** é um valioso protótipo antitumoral.

Tabela 16 - Valores de -IC₅₀ (µM) determinados por ensaio colorimétrico após tratamento por 48 h com C3 ou cisplatina.

Linhagens celulares	C3	Cisplatina	IS*
CHL-1	18,06 ± 0,77	94,59 ± 3,95	13,00
WM1366	37,95 ± 1,90	68,15 ± 4,12	6,00
SK-MEL-147	30,10 ± 1,88	19,54 ± 1,10	8,00
FPM	231,13 ± 2,01	n.d	n.d

Fonte: Do autor

Notas: Índice de Seletividade determinado pela razão entre IC₅₀FPM/IC₅₀ SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1 para o complexo **C3**.

n.d = não determinando, considerando que o tratamento não reduziu em 50% a viabilidade na faixa de concentração avaliada (2,5 a 100 µM). Cisplatina foi utilizada como controle positivo. SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1 (linhagens derivadas de melanoma).

Os efeitos do **C3** no comportamento proliferativo das células CHL-1 e na viabilidade celular foram determinados após 24 e 48 h de tratamento pelo ensaio de exclusão do azul de tripano. Este ensaio permite a determinação na frequência de células viáveis (vivas) e inviáveis

(mortas), pois o corante azul de tripano penetra somente nas células que perderam a integridade de membrana o que deixa as células inviáveis com uma coloração azul-arroxeadada (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2014).

O número de células viáveis foi menor nos grupos tratados com **C3** em 24 e 48 h em comparação com os controles nos tempos correspondentes (Figura 72A). Isso indicou que **C3** inibiu a proliferação de células CHL-1. As frequências de células viáveis foram reduzidas para 78,56% (24 h) e 54,70% (48 h) nas culturas de células CHL-1 tratadas com **C3** a 10 μ M. Entretanto, quando este composto foi utilizado na concentração de 20 μ M, as frequências de células viáveis foram de 53,90% (24 h) e 34,90% (48 h).

As características morfológicas das células CHL-1 foram monitoradas por microscopia de contraste de fase durante o tratamento com **C3** após 24 e 48 horas nas concentrações de 10 e 20 μ M (Figura 72 B). Nas culturas tratadas a 10 μ M observou-se células maiores e com maior quantidade de grânulos citoplasmáticos em relação às amostras controle tanto em 24 e 48 horas. Mudanças ainda mais drásticas nas linhagens de CHL-1 tratadas a 20 μ M, sendo possível observar menor densidade celular e maior frequência de células arredondadas e fragmentos celulares principalmente após 48 horas de tratamento, indicando que **C3** possui alta citotoxicidade nessa concentração.

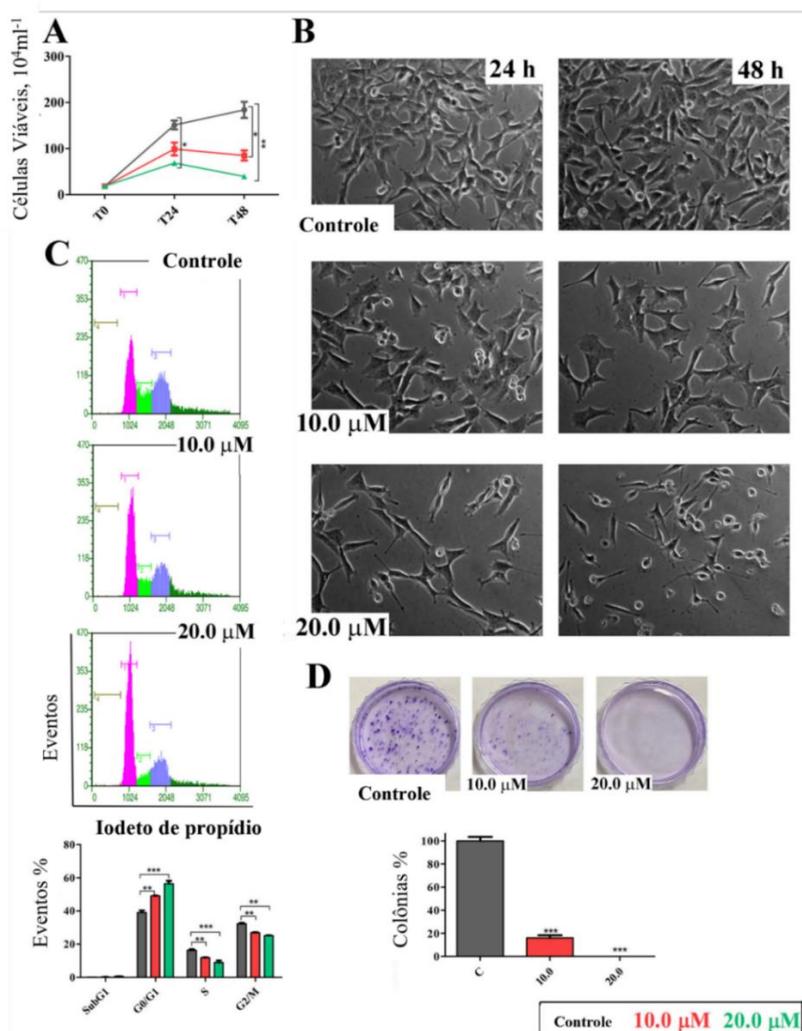
O ensaio de ciclo celular foi utilizado para determinar da frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular. O ensaio mostrou que **C3** causou uma parada do ciclo na transição G1/S. Houve um aumento na população G0/G1, que são as fases iniciais do ciclo onde ocorre a produção de constituintes celulares essenciais para a multiplicação das células como por exemplo: organelas, enzimas e RNA (Almeida *et al.*,2005). Nas fases subsequentes notaram-se diminuição nas frequências das fases S (responsável pela autorreplicação do DNA) e G2/M (preparo e início da mitose) nas culturas de células CHL-1 tratadas com **C3** a 10 e 20 μ M por 24 h (Figura 72 C).

Também observamos uma redução significativa na capacidade de formação de colônias (85% de redução) em culturas tratadas por 24 h com **C3** a 10,0 μ M. Nenhuma colônia foi observada no grupo tratado com este composto a 20,0 μ M (Figura 72 D). Essas descobertas reforçam os resultados de viabilidade anteriores e indicam que o composto **C3** tem uma atividade antiproliferativa robusta em células de melanoma CHL-1.

A intensa proliferação de células tumorais está associada à ativação de vias oncogênicas e à expressão sustentada de reguladores positivos dos ciclos celulares, principalmente aqueles necessários para as transições G1/S. Nós demonstramos anteriormente que complexos de rutênio (II) contendo ácido piperonílico (PIPE) podem inibir a proliferação

da linha celular de adenocarcinoma pulmonar (A549) por induzir o ciclo celular em G1/S (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017b). O PIPE modulou a sinalização MAPK/ERK e reduziu a expressão de ciclina D1 nas células A549. Recentemente, relatamos que complexos de rutênio(II) contendo ácido *trans*-4-(trifluorometil)cinâmico também foi capaz de induzir paradas no ciclo celular na transição G1/S em CHL-1. No entanto, este efeito foi associado com a regulação negativa da ciclina E (NEGRETI *et al.*, 2022). Novos estudos serão realizados para investigar o mecanismo molecular associado à atividade antiproliferativa de **C3** em células CHL-1.

Figura 72 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de exclusão do azul de tripano em CHL-1 tratadas com **C3** nas concentrações de 10 ou 20 μM por 24 e 48 horas (A); Imagens das culturas de CHL-1 obtidas por microscopia de contraste de fase após 24 e 48 h de tratamento. (B); Efeitos de **C3** sobre a cinética de progressão do ciclo celular de culturas de CHL-1 após 24 h de tratamento nas concentrações de 10 e 20 μM (C); Imagens ilustrativas e análises de ensaios clonogênicos após um tratamento de 24 horas (D).



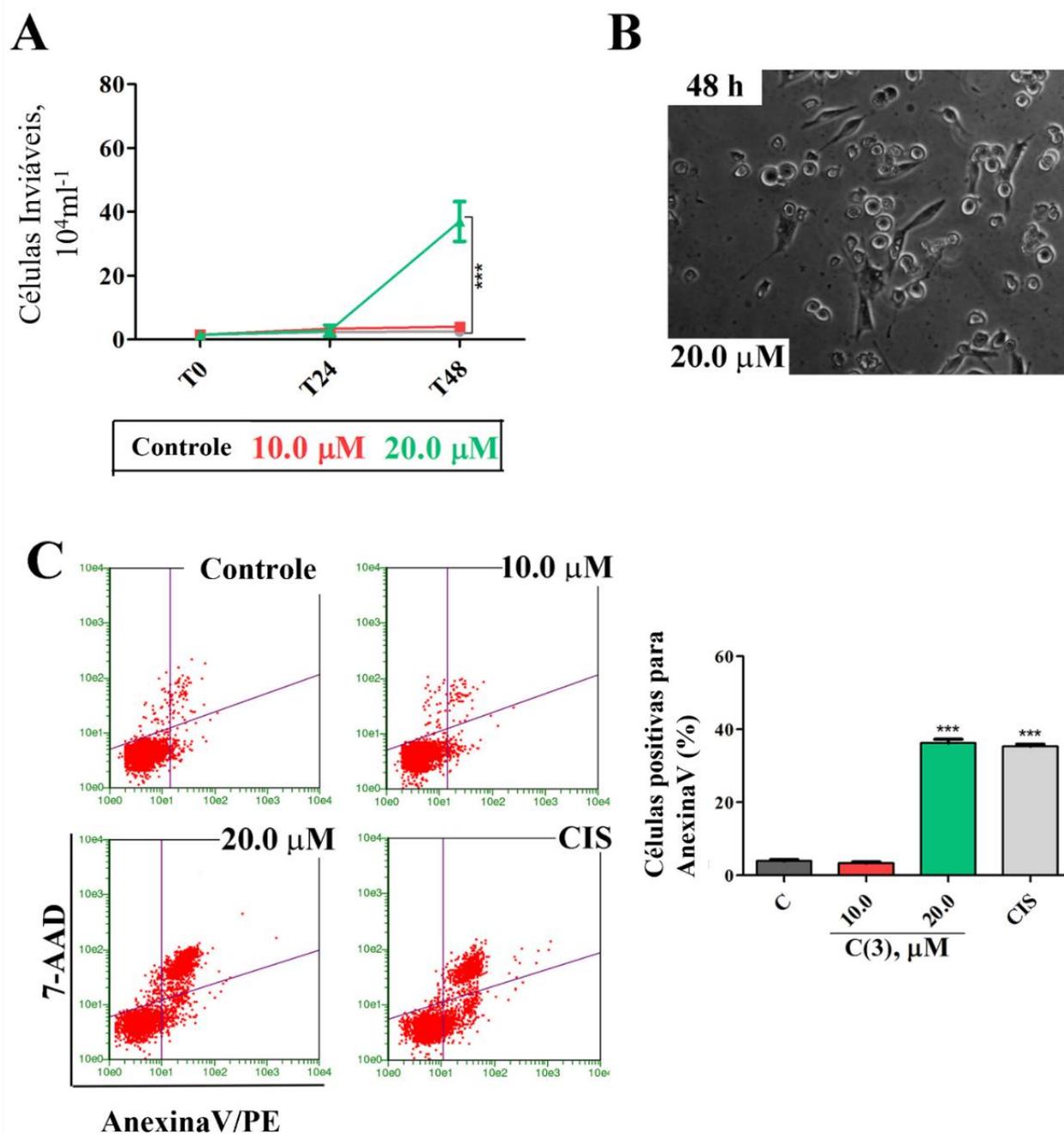
Fonte: Do autor

O composto **C3** induziu a morte nas células CHL-1. Numerosas células arredondadas e fragmentos celulares foram observados nas amostras tratadas com **C3** a 20 μM por 48 h. Nessas condições experimentais, o número de células inviáveis foi significativamente maior nas culturas tratadas com **C3**, do que naquelas com os controles (Figuras 73 A e 73 B).

Dessa forma o ensaio de anexina V foi utilizado para avaliar se o tratamento com **C3** induz apoptose em culturas de células CHL-1. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que a frequência de eventos apoptóticos foi 10 vezes maior nas culturas CHL-1 tratadas com **C3** a 20 μM por 48 h em relação ao grupo controle (Figura 73 C). Isso sugere que a citotoxicidade de **C3** nas células CHL-1 está associada à sua capacidade de induzir apoptose. Sabe-se que células cancerígenas apresentam mecanismos para escapar do processo de apoptose (morte celular programada) (HANAHAN; WEINBERG, 2011) além de resistência aos medicamentos quimioterápicos (BERGERS; HANAHAN, 2008; MOLLAEI *et al.*, 2021).

Portanto, complexos de rutênio(II) capazes de induzir apoptose em células tumorais são protótipos antitumorais promissores. A resistência das células tumorais aos sinais apoptóticos envolve múltiplos mecanismos, incluindo o aumento e diminuição de genes anti e pró-apoptóticos, respectivamente (MOLLAEI *et al.*, 2021). Recentemente, revelamos que complexos de rutênio(II) induzem apoptose em células CHL-1 ativando as vias intrínsecas da apoptose. A indução da apoptose ocorreu através da modulação dos genes pró e anti-apoptóticos da família BCL-2. Houve uma regulação positiva da proteína BAX com uma regulação negativa concomitante de BCL-2 (NEGRETI *et al.*, 2022).

Figura 73 – (A) Células CHL-1 foram tratadas com (C3) a 10 ou 20 μM , e as frequências de células inviáveis foram determinadas pelo ensaio de exclusão de azul de tripano em 0, 24 e 48 h; (B) Imagens representativas das culturas de CHL-1 obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as características morfológicas das células após 48 h de tratamento com C3 a 20 μM ; (C) gráficos de pontos representativos dos ensaios de Anexina V/7-AAD e análises de apoptose realizadas após 48 h de tratamento.



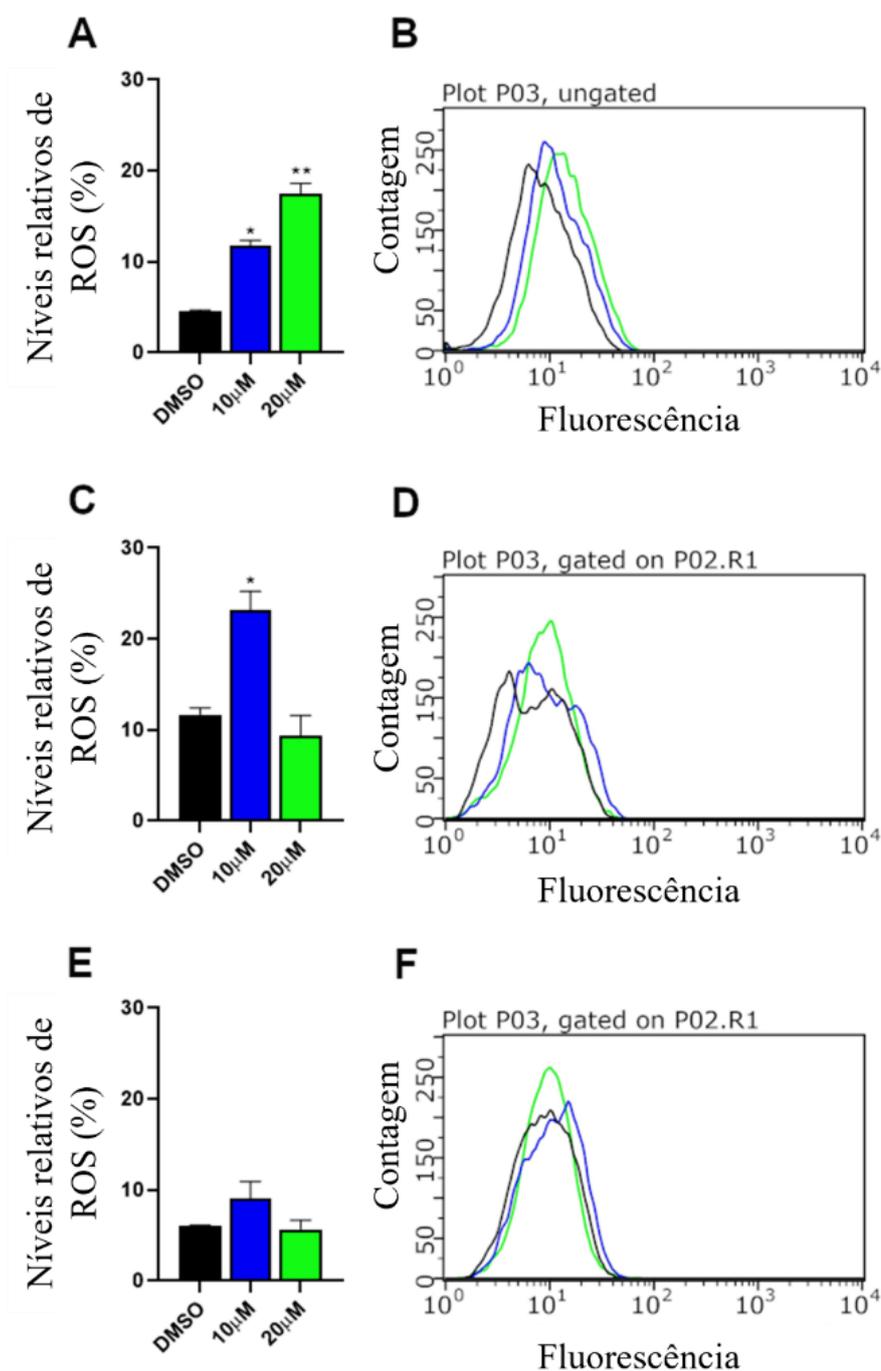
Fonte: Do autor

Notas: As células viáveis (quadrantes inferiores esquerdos), apoptose inicial (quadrantes inferiores direitos), apoptose tardia (quadrantes superiores direitos) e células necróticas (quadrantes superiores esquerdos) são mostradas em gráficos de pontos.

Numerosos medicamentos quimioterápicos podem induzir apoptose por meio de vias intrínsecas, induzindo estresse oxidativo e dano ao DNA (DEWANJEE *et al.*, 2017; JAYANTHI *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2013). Complexos de rutênio podem aumentar a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e, finalmente, induzir apoptose em células cancerígenas (JUNGWIRTH *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2022b; YANG *et al.*, 2012). Por esse motivo medimos os níveis de ROS nas linhagens celulares de CHL-1 tratadas com **C3**.

Avaliamos os níveis de ROS após 0,5, 2 e 4 h de tratamento. Os níveis de ROS foram 3 vezes e 4 vezes maiores nas amostras tratadas com **C3** nas concentrações de 10 μM e 20 μM por 30 min, respectivamente, em comparação com os grupos controle (Figuras 74 A e B). Após 2 h de tratamento, os níveis de ROS sofreram aumento somente nas amostras tratadas com **C3** empregando concentrações de 10 μM (Figuras 74 C e D). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de ROS das amostras tratadas com **C3** por 4 horas e os controles (Figura 74 E e F). Essas informações sugerem a capacidade de **C3** aumentar rapidamente os níveis de ROS nas células CHL-1 em um curto período de tempo. Dessa forma, o efeito pró-oxidante juntamente a sua atividade pró-apoptótica podem estar associados à sua boa atividade citotóxica, conforme relatado para o complexos de rutênio (II) como o complexo contendo o ligante lapachol de fórmula $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{dppm})(\text{fen})]\text{PF}_6$, onde Lap= lapachol, dppm = 1,1'-bis(difenilfosfina)metano e fen= 1,10-fenantrolina (DE GRANDIS *et al.*, 2021; LIANG *et al.*, 2022a).

Figura 74 – Medidas dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) de culturas de células CHL-1 tratadas com **C3** para 0,5 (A e B), 2 (C e D) ou 4 h (E e F). DMSO (0,1% v/v) foi usado como controle negativo. As linhas sólidas no histograma representativo correspondem aos grupos DMSO (preto), **C3** a 10 μ M (azul) e composto **C3** a 20 μ M (verde)

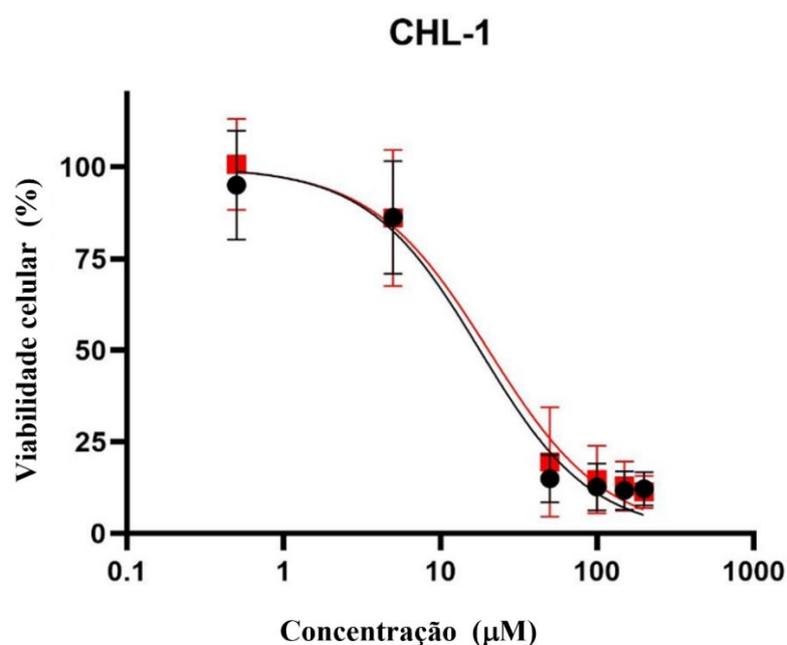


Fonte: Do autor

Como última análise envolvendo a citotoxicidade de **C3** e uma forma de relacionar com o comportamento de estabilidade em solução observada anteriormente onde o complexo

$[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ foi formado quando **C3** foi solubilizado em uma solução de DMEM/DMSO. Para verificar se a citotoxicidade de **C3** contra CHL-1 é decorrente da formação do complexo $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$, sintetizamos e avaliamos a citotoxicidade, sob as mesmas condições de **C3**, frente à CHL-1. Os resultados revelaram diminuição da viabilidade celular (Figura 75), com valor de IC_{50} de $21,32 \pm 0,93 \mu\text{M}$, muito próximo ao valor de IC_{50} obtido para o complexo **C3** ($18,06 \pm 0,77$). Dessa forma os resultados obtidos do estudo de estabilidade, DRXM e ensaios biológicos mostram que **C3** atuou como um pró-fármaco para produzir espécies biologicamente ativas como o $[\text{RuCl}(\text{Py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$.

Figura 75 – Curvas dose-resposta exibindo os efeitos citotóxicos de **C3** (linha preta) e $[\text{RuCl}(\text{py})(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]\text{PF}_6$ (linha vermelha) em linhagens tumorais de CHL-1 após 48 horas.



Fonte: Do autor

5.1.12 Estudo de interação dos complexos com DNA

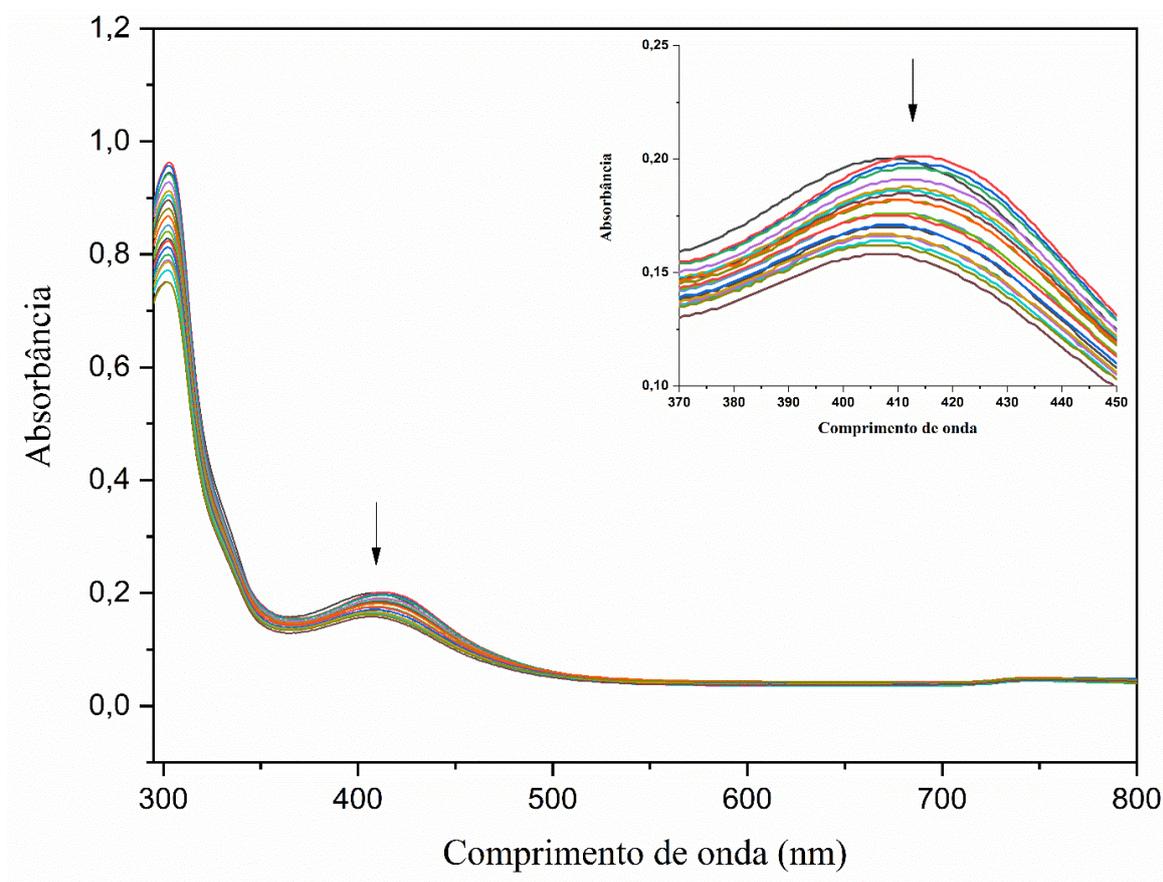
Como todos os complexos da série 1 apresentaram capacidade de reduzir a viabilidade das células tumorais avaliadas, decidimos verificar a interação destes complexos com possíveis alvos terapêuticos contra o câncer.

Como já relatado, o DNA é uma biomolécula que está diretamente envolvida com a atividade antitumoral de compostos de coordenação. Nas últimas décadas, os mecanismos de

ação de uma grande quantidade de compostos de coordenação à base de rutênio têm sido associados a interações com o DNA (GILL *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2019). Relembrando que os modos de interação podem ser divididos em interações covalentes, ocorrendo através da ligação direta do complexo ao DNA através de suas bases nitrogenadas ou do grupo fosfato, ou interações não covalentes, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ou intercalações do complexo na dupla hélice (BOER; CANALS; COLL, 2009; KEENE; SMITH; COLLINS, 2009).

O método escolhido durante as análises foi titulação espectroscópica na região UV-vis sendo este bastante difundido para determinação da constante de ligação (K_b) de complexos metálicos com DNA. Todas as titulações foram realizadas em triplicata e um espectro representativo para série 1 é apresentado na Figura 76, sendo que o espectro inicial (em preto) corresponde ao complexo na ausência de DNA e os demais correspondem às sucessivas adições de ct-DNA à solução inicial. Os espectros obtidos para os compostos **C1** e **C2** estão nas Figuras A19 e A20 do anexo A.

Figura 76 – Espectros de UV-vis de titulações espectroscópicas do complexo **C3** $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com [ct-DNA] = $0-6,29 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Em preto representa o espectro do complexo na ausência de DNA



Observou-se para os três complexos avaliados uma diminuição na intensidade de absorção (hipocromismo) ao adicionar quantidades crescentes de ct-DNA às soluções dos complexos (**C1-C3**), indicando interação do DNA com os compostos. Além disso, os espectros mostraram um deslocamento das bandas para a região vermelha do espectro (batocromismo), sugerindo que ocorreu uma interação por intercalação, comportamento análogo ao relatado em outros trabalhos envolvendo complexos metálicos e ligantes piridínicos (GILL *et al.*, 2016). Esse fenômeno ocorreu devido às interações entre os orbitais π^* do complexo e os orbitais p das bases nitrogenadas do DNA, gerando uma diminuição no nível de energia do orbital π^* do complexo e gerando o deslocamento da banda (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013).

A partir dos resultados das titulações espectrais obtidas considerando a região de aproximadamente 405 nm e aplicando a equação de *Neighbor Exclusion* (eq. 1) pode-se calcular a magnitude de cada interação com o DNA a partir do K_b (constante de ligação) e da porcentagem de hipocromismo (%H). Os resultados obtidos são dispostos na Tabela 17.

Tabela 17 - Constantes de ligação (K_b) e porcentagens de hipocromismo (%H) dos complexos **C1-C3** no comprimento de onda de 405 nm.

Complexos	K_b (M^{-1})	%H
C1	$5,39 \times 10^6$	9,04
C2	$7,55 \times 10^5$	7,65
C3	$9,48 \times 10^6$	16,18

Fonte: Do autor

Os compostos **C1** e **C3** interagiram com o DNA com constantes de ligação, K_b , da ordem de $10^6 M^{-1}$, que é a mesma ordem de grandeza de moléculas intercaladoras clássicas, como brometo de etídio ($10 \times 10^6 M^{-1}$) (WARING, 1965). Uma molécula intercaladora que ao inserir-se entre pares nucleotídeos do DNA provoca alterações estruturais que gera enrijecimento, alongamento e/ou desenrolamento da dupla fita que interrompe o processo de replicação de DNA e freia o crescimento de tumores (BARRA; NETTO, 2015).

Por outro lado, **C2** apresentou valor de K_b inferior, da ordem de 10^5 , comparável as interações de complexos metálicos com CT-DNA através de ligações não covalentes (eletrostáticas ou de hidrogênio) relatadas na literatura, tais interações foram observadas para complexos Ru(II)/fosfina/diimina relatados na literatura (GILL *et al.*, 2016; SHILPA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2018).

5.1.13 Estudo de interação dos complexos com HSA

Os complexos foram avaliados quanto sua capacidade de interagir com a albumina de soro humana (HSA). Como vimos na revisão bibliográfica a interação de quimioterápicos com proteínas como a albumina é importante no transporte e eficiência de fármacos (GLASS et al., 2010). A albumina sérica humana contém aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), mostrados na Figura 77, que em solução exibem fluorescência. O monitoramento da supressão dessa fluorescência decorrente da presença dos complexos **C1-C3** fornece informações sobre as interações com HSA.

Figura 77 – Representação estrutural dos aminoácidos aromáticos encontrados na HSA



Fonte: Do autor

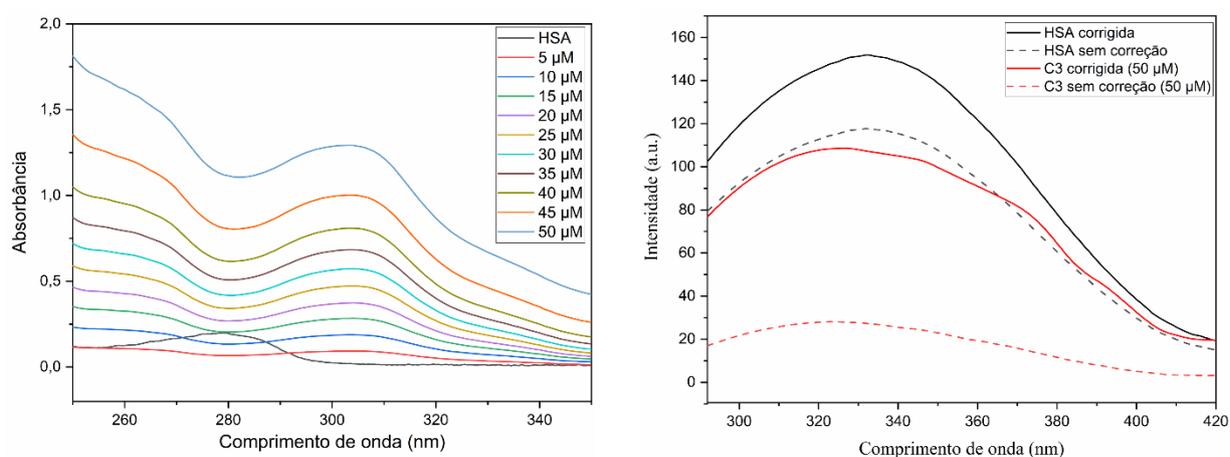
Os experimentos foram realizados em três temperaturas distintas (298, 304 e 310 K), adicionando-se a solução de HSA ($5,0 \mu\text{mol}^{-1}$) concentrações crescentes de complexo ($0-50 \mu\text{mol}^{-1}$). As medidas de fluorescência foram realizadas provocando a excitação da proteína em 280 nm (maior absorção) e fazendo-se a leitura na faixa de 290-500 nm (HSA tem fluorescência máxima em aproximadamente 350 nm), com o intuito de elucidar o mecanismo pelo qual ocorreu a interação.

Considerando que os três complexos relatados apresentaram absorção na região supracitada, uma correção de filtro interno fez-se necessária, onde os valores de fluorescência corrigida foram obtidos a partir da seguinte equação (4):

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad (4) \quad (\text{GRAMINHA } et \text{ al.}, 2020)$$

Em que F_{corr} e F_{obs} correspondem as intensidades de fluorescência corrigida e observada, e A_{ex} e A_{em} compreendem as absorbâncias no comprimento de onda de excitação (280 nm) e emissão (325nm), respectivamente. A Figura 78 (A) mostra claramente a absorção de **C3** em diferentes concentrações na região espectral analisada e a Figura 78 (B) uma comparação dos dados de fluorescência antes e após correção evidenciando a importância da correção para a análise.

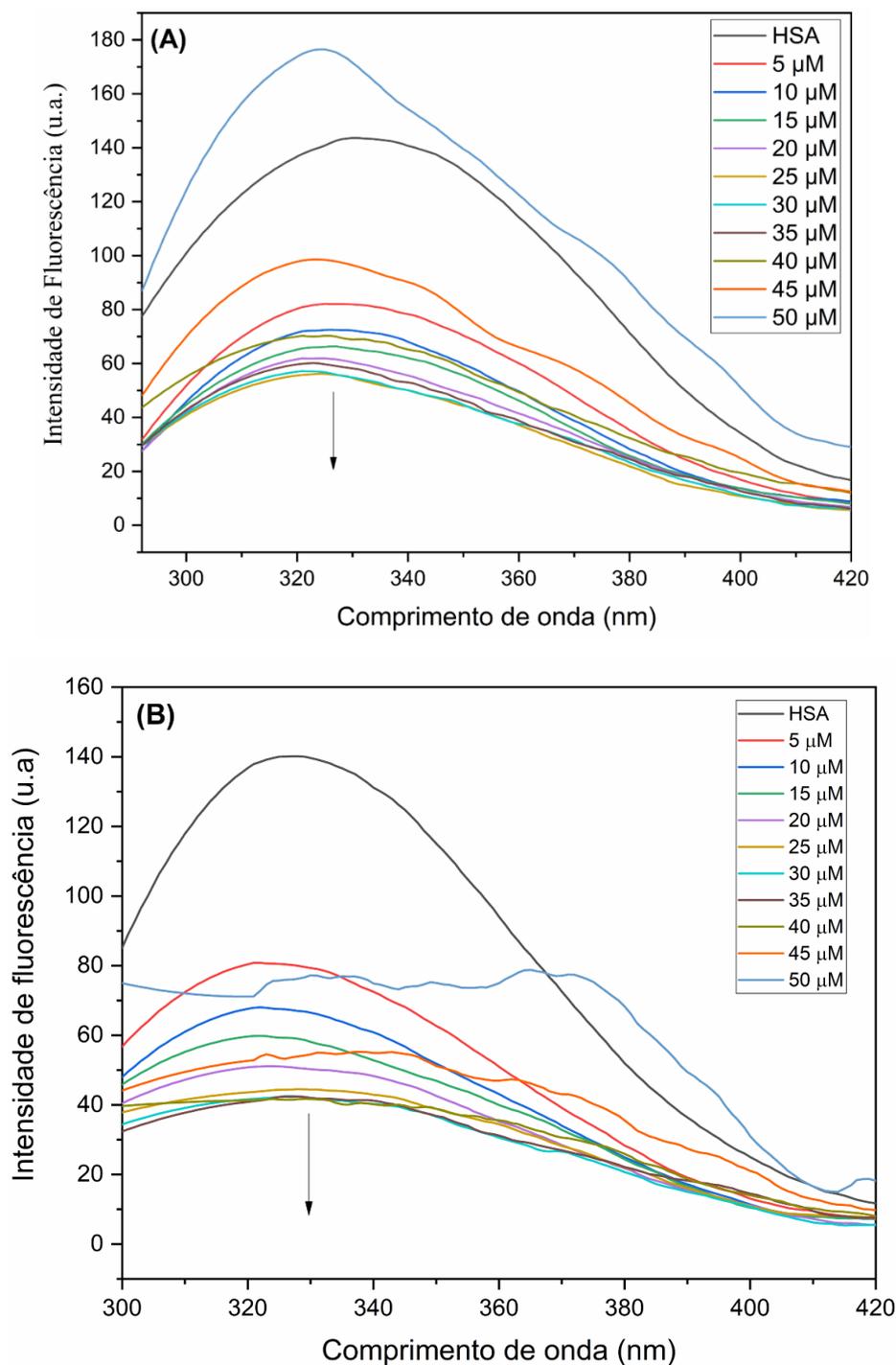
Figura 78 – (A) Espectros de UV-vis de HSA (em preto) e diferentes concentrações do complexo **C3**; (B) espectros de emissão de fluorescência brutos de HSA (em preto) com quantidades crescentes de complexo **C3** mostrando as diferenças após a correção de filtro.



Fonte: Do autor

Os efeitos dos complexos na intensidade de fluorescência da proteína são apresentados na Figura 79 para **C3** e nas Figuras A21 e A22 do Anexo A para os demais complexos. De maneira geral, observou-se que a intensidade de fluorescência da proteína HSA diminui com o aumento da concentração dos complexos, sugerindo a interação dos complexos com o HSA. A mudança na intensidade da banda é devido a mudanças conformacionais na HSA, principalmente nos resíduos de triptofano.

Figura 79 – Espectro de emissão da HSA com concentrações crescentes do complexo **C3** em (A) na temperatura de 298 K e (B) em 310 K



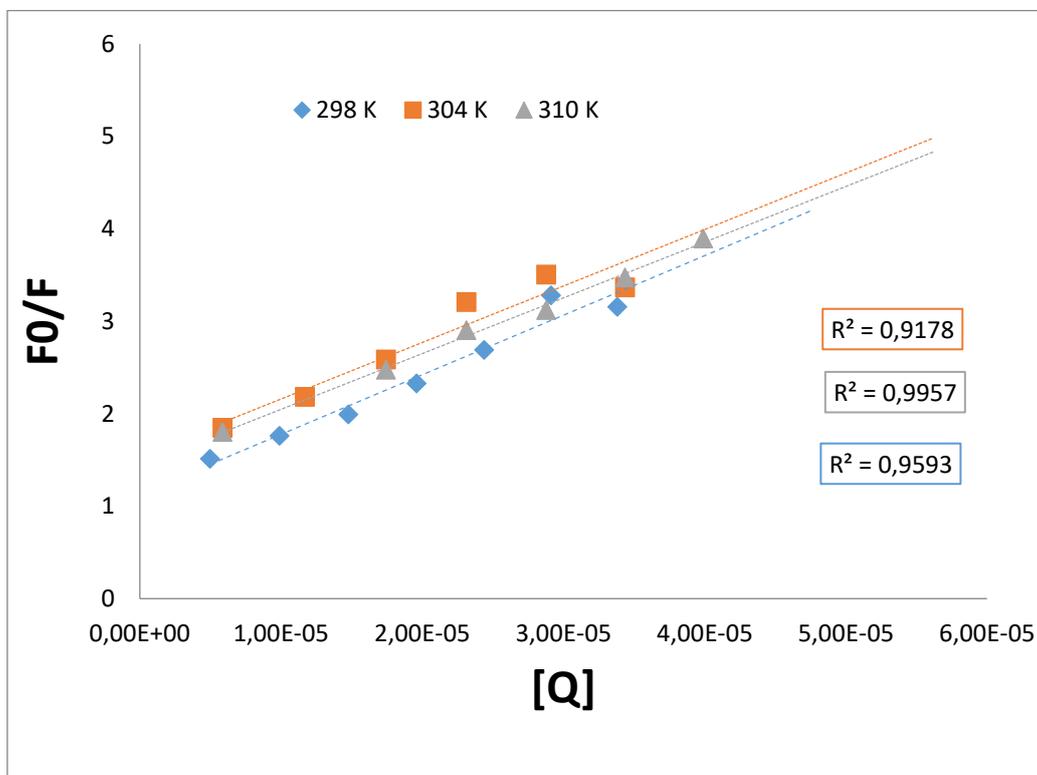
Fonte: Do autor

Nota: $[HSA] = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$.

Através da equação de Stern-Volmer (apresentada na eq. 2 na revisão bibliográfica), aplicando tratamentos matemáticos e relacionando com a equação da reta ($y = mx + n$), ao plotar o gráfico de F_0/F em função da concentração do complexo $[Q]$ para cada temperatura (Figura

80) para **C3** e Figura A23 para **C1** e **C2** respectivamente do Anexo A), pode-se determinar K_{sv} (constante de Stern–Volmer) e K_q , conforme sumarizado na Tabela 18.

Figura 80 – Gráfico de Stern-Volmer de F_0/F vs $[Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações de **C3**



Fonte: do autor

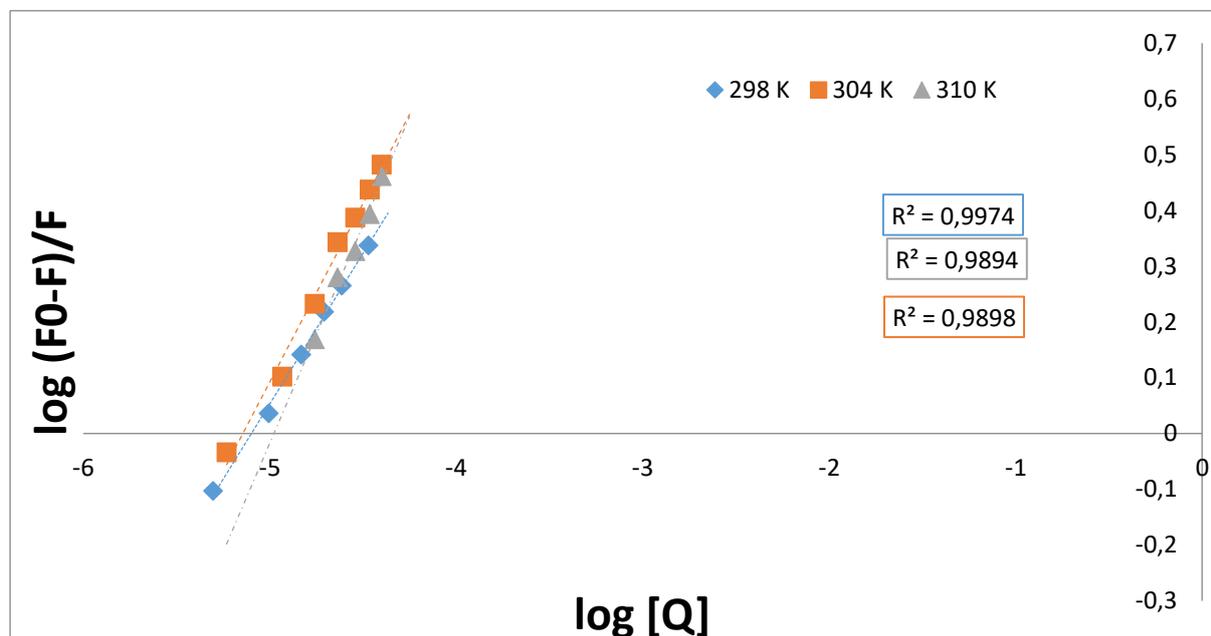
Nota: [HSA] = 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{ex.}$ = 280 nm.

Observando os resultados, nota-se que **C1** apresentou valores de K_q superiores ao valor máximo da constante de difusão ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ademais, os valores de K_{sv} aumentaram quando a temperatura variou de 298 a 304 K, com diminuição em 310 K, indicando a ocorrência de mecanismos dinâmico e estático de supressão de fluorescência (ZHAO *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011). O complexo **C2** mostra uma diminuição no K_{sv} com o aumento da temperatura, além disso, os valores de K_q obtidos são maiores que a constante de difusão máxima ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), indicando um mecanismo estático (ZHAO *et al.*, 2010). No entanto, **C3** apresentou um leve aumento no K_{sv} com o aumento da temperatura e alto valor de K_q , sugerindo um mecanismo estático.

Posteriormente, foram obtidos os gráficos de $\log (F_0-F)/F$ vs $\log [Q]$ (Figura 81 para **C3**, os demais estão apresentados na Figura A24) que permitiram determinar os valores de K_b (constante de ligação) e n (número de sítios de interação) (Tabela 18) através dos coeficientes angular e linear da reta, respectivamente. Os valores de R^2 obtidos para os complexos em cada

uma das temperaturas apresentou valores adequados indicando uma boa correlação com a equação da reta obtida.

Figura 81 – Gráficos de $\log (F_0 - F)/F$ vs $\log [Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações de **C3**.



Fonte: do autor

Nota: [HSA] = 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$.

A magnitude da constante de ligação (K_b) variou de grandeza na ordem de 10^2 - 10^3 , indicando interação moderada a fraca com a proteína. De fato, muitos complexos de rutênio que interagem fortemente com a biomolécula e que foram descritos na literatura apresentam K_b na ordem de grandeza de 10^5 M^{-1} (DEMORO *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018). Além disso, **C1** e **C3** apresentaram aumento nos valores de K_b com o aumento da temperatura. Para **C2**, houve uma diminuição acentuada em K_b com o aumento da temperatura. Todos os complexos apresentaram sítios de ligação de aproximadamente 1, indicando a inserção de apenas uma molécula do complexo na estrutura proteica.

A partir dos valores K_b e aplicando a equação de van't Hoff (5) pode-se obter parâmetros termodinâmicos como variações de entropia (ΔS°), entalpia (ΔH°) e energia livre de Gibbs (ΔG°), sobre essas interações que estão sumarizados na Tabela 18.

$$\ln \frac{K_{b1}}{K_{b2}} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (5)$$

$$\Delta G^\circ = - R \times T \times \ln(K_b) = \Delta H^\circ - T \times \Delta S^\circ \quad (6)$$

$$\ln K_b = - \Delta H / (R \times T) + \Delta S / R \quad (7)$$

Essas interações podem consistir em diferentes tipos, como ligações de hidrogênio, van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. De acordo com a literatura, essas interações podem ser classificadas com base nesses parâmetros: os valores para $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ implicam no envolvimento de forças hidrofóbicas, $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$ correspondem a interações de van der Waals, e $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ sugerem forças eletrostáticas (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). A partir dos dados obtidos notamos inicialmente valores ΔG° negativos para todos os complexos, ou seja, em todas as temperaturas acontecem interações espontâneas entre a proteína e os compostos.

Os compostos **C1** e **C3** apresentaram valores positivos de ΔH° e ΔS° , indicando que as interações com HSA ocorreram por meio de interações hidrofóbicas. Tal interação causa alteração momentânea da estrutura do HSA, evidenciando fragmentos proteicos apolares que induziram uma reorganização das moléculas de água adicionadas ao novo sistema. Já **C2** apresentou comportamento oposto, com valores negativos de ΔH° e ΔS° , indicando prevalência de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Tal observação foi interessante, pois como **C2** apresenta um grupo metoxila em sua estrutura, que podem favorecer a interação intermolecular com os aminoácidos da HSA. Diante do exposto, os complexos avaliados podem interagir com HSA e serem transportados até os alvos terapêuticos gerando respostas citotóxicas à células tumorais.

Tabela 18 - Valores de constante de Stern–Volmer (K_{sv} , $L.mol^{-1}$), constante de taxa de extinção biomolecular (K_q , $L.mol^{-1}.s^{-1}$), constante de ligação (K_b , M^{-1}), número de sítios de ligação (n), energia livre de Gibbs ΔG^0 ($KJ.mol^{-1}$), entalpia ΔH^0 ($KJ.mol^{-1}$) e entropia ΔS^0 ($J.mol^{-1}.K$) para a interação complexos (C1-C3).

	T (K)	$K_{sv} \pm$ DP (10^4) ($L \times M^{-1}$)	$K_q \pm$ DP (10^{13}) ($M^{-1} s^{-1}$)	$K_b \pm$ DP (10^3) (M^{-1})	n	ΔG^0 KJ mol^{-1}	ΔH^0 KJ mol^{-1}	ΔS^0 Jmol $^{-1}$ K
C1	298	$4,19 \pm 0,25$	$4,19 \pm 0,35$	$0,21 \pm 0,012$	0,47	-13,3	23,4	123,3
	304	$7,53 \pm 0,30$	$7,53 \pm 0,30$	$5,64 \pm 0,0011$	0,73	-21,8		
	310	$3,06 \pm 0,21$	$3,06 \pm 0,21$	$0,31 \pm 0,0021$	0,53	-14,8		
C2	298	$2,64 \pm 0,45$	$2,64 \pm 0,45$	$5,90 \pm 0,0050$	0,79	-21,5	-325,2	-1019,2
	304	$1,40 \pm 0,08$	$1,40 \pm 0,08$	$0,046 \pm 0,012$	0,39	-9,7		
	310	$1,24 \pm 0,12$	$1,27 \pm 0,12$	$0,037 \pm 0,013$	0,36	-9,3		
C3	298	$5,30 \pm 0,81$	$5,30 \pm 0,81$	$2,27 \pm 0,0031$	0,67	-19,1	38,4	193,2
	304	$5,52 \pm 0,42$	$5,52 \pm 0,43$	$3,21 \pm 0,0019$	0,69	-20,4		
	310	$5,87 \pm 0,11$	$5,87 \pm 0,11$	$4,13 \pm 0,0021$	0,73	-21,5		

Fonte: do autor

5.2 SÉRIE 2

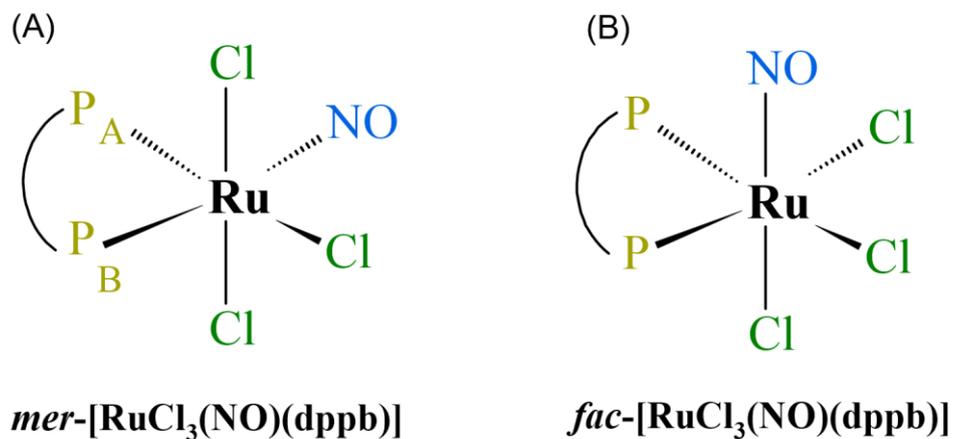
5.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{31}P\{^1H\}$

Nesta série empregou-se o precursor contendo óxido nítrico *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)], ilustrado na Figura 82 A. Este complexo, quando solubilizado em CH₂Cl₂ sofre lenta isomerização para o isômero *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (Figura 82 B), conforme descrito na literatura por (BATISTA *et al.*, 1999; VON POELHSITZ *et al.*, 2002). Uma maneira de acompanhar a conversão entre estes isômeros é por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{31}P\{^1H\}$, uma vez que o isômero facial apresenta um singlete com deslocamento químico em δ 22,06 ppm, já que os átomos de fósforo são equivalentes (ambos *trans* posicionados ao ligante cloreto).

Entretanto o isômero meridional apresenta dois dubletos com deslocamentos químicos em δ 12,87 e 9,43 ppm, constante de acoplamento 36,4 Hz, uma vez que os átomos de fósforo estão *trans* ao cloreto (P_A) e ao óxido nítrico (P_B) (Figura 83 (A)). Caso o isômero *mer*-

[RuCl₃(NO)(dppb)] permaneça em refluxo em metanol por 2 horas ocorre a conversão total para o isômero *facial* (VON POELHSITZ *et al.*, 2002) (Figura 83 (B)).

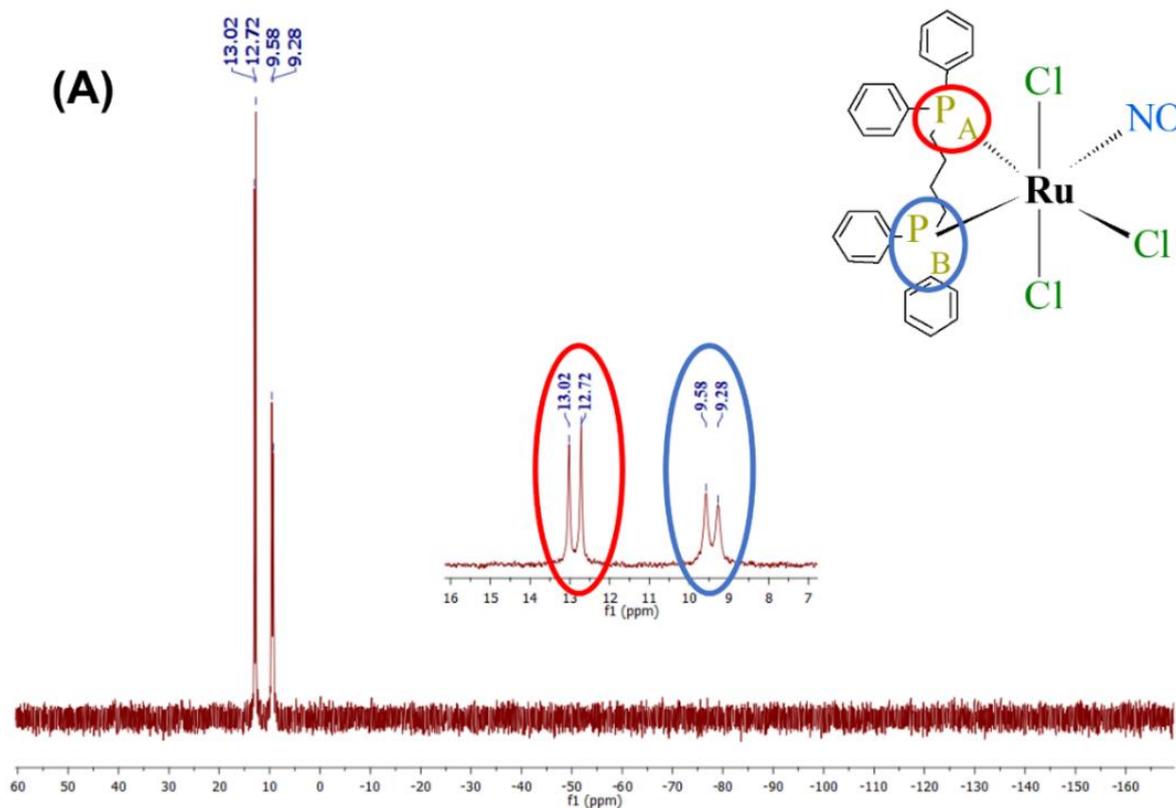
Figura 82 – Representação estrutural dos isômeros *mer* e *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)].

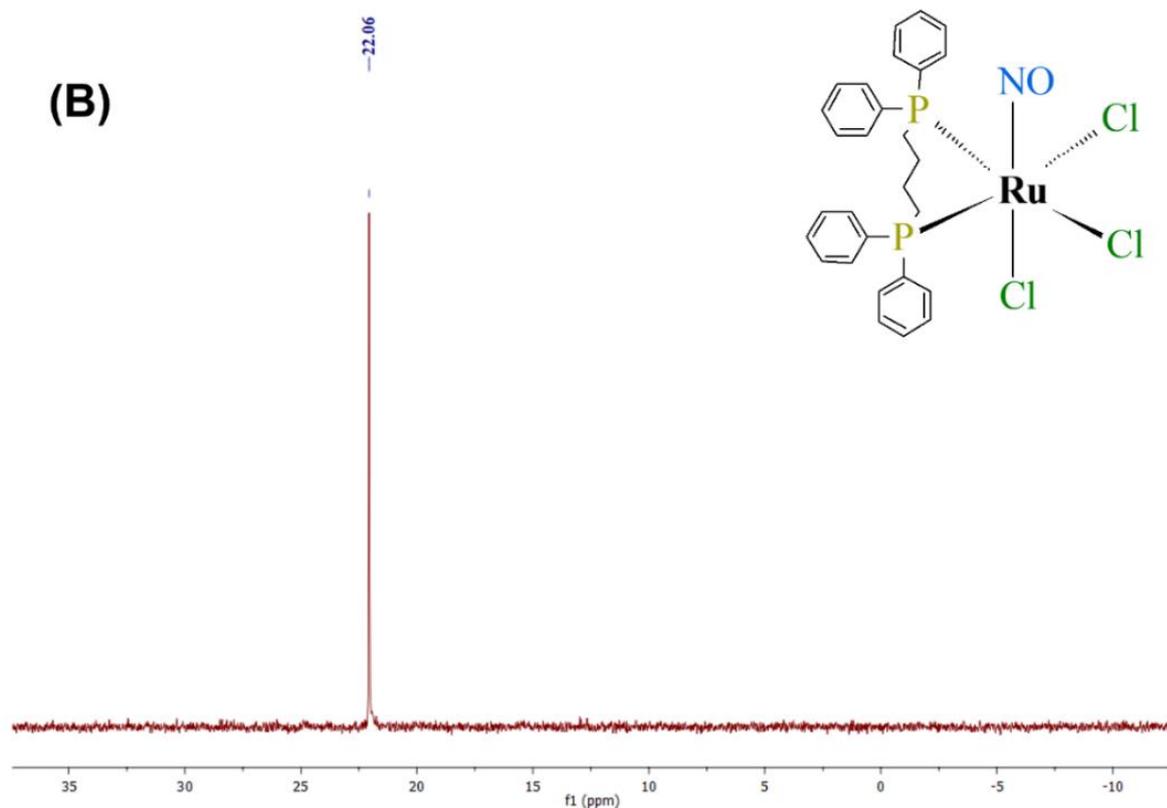


Fonte: do autor

Os espectros de ³¹P{¹H} dos isômeros *mer* e *fac* são apresentados na Figura 83 (A) e (B), respectivamente e os dados de deslocamentos e constantes de acoplamento na Tabela 19.

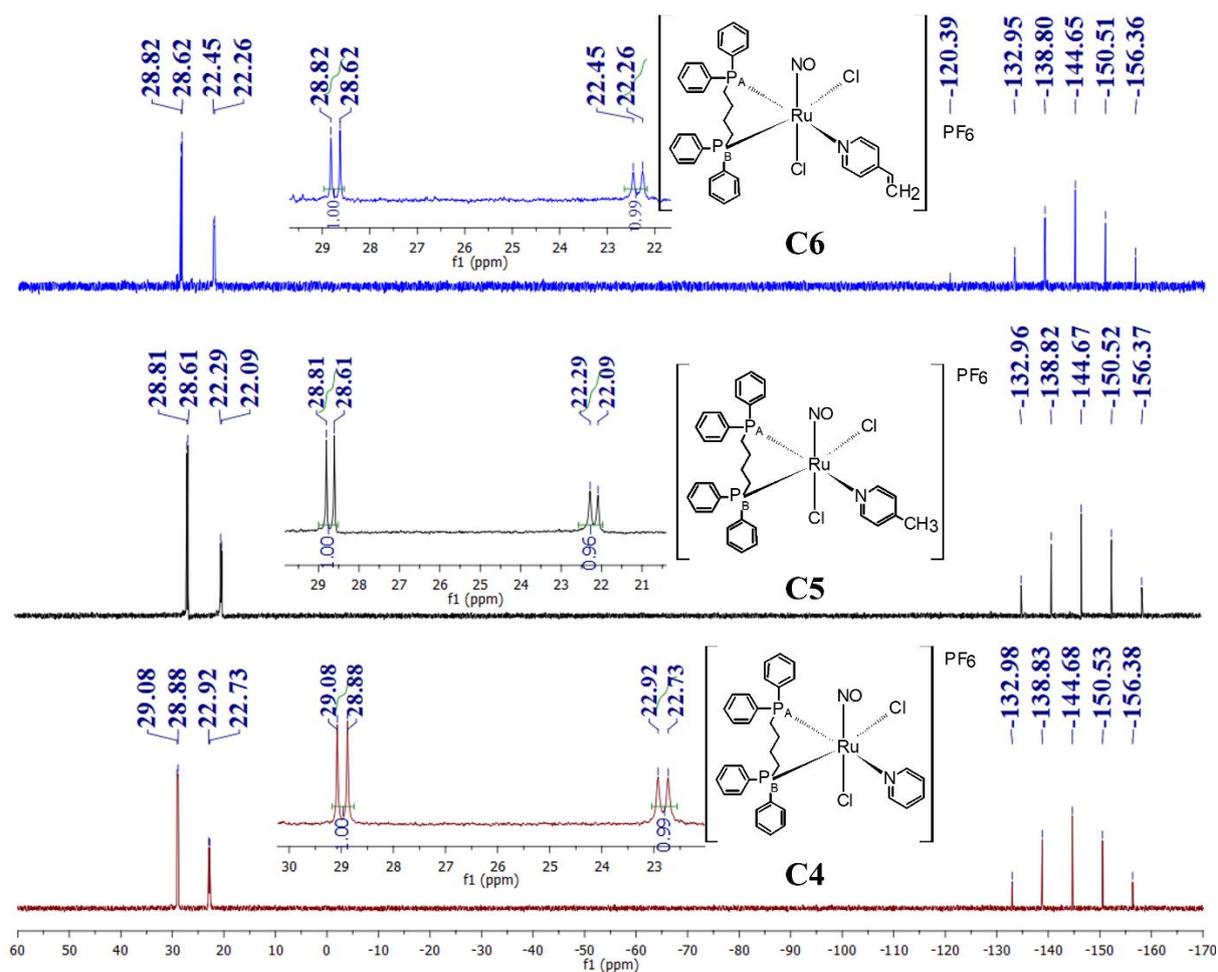
Figura 83 – Espectros de RMN de ³¹P{¹H} em CH₂Cl₂/D₂O dos complexos precusores: *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] em (A) e *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] em (B).





Fonte: do autor

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **C4-C6** apresentaram dois dubletos em aproximadamente δ 28,6 e 22,5 ppm, indicando a não equivalência magnética dos dois átomos de fósforo, como esperado, em que um átomo de fósforo está *trans* ao átomo de Cl e o outro *trans* ao átomo de nitrogênio dos ligantes piridínicos utilizados. Os espectros obtidos para **C4-C6** estão apresentados na Figura 84 e deslocamentos químicos e constantes de acoplamento ($^2J_{\text{P-P}}$) são descritos na Tabela 19.

Figura 84 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$ dos complexos da série 2.

Fonte: do autor

A troca do ligante cloreto pelos ligantes piridínicos (piridina, 4-metilpiridina ou 4-vinilpiridina), ligantes σ doadores e π aceptores, e a isomerização do ligante óxido nítrico, são responsáveis pelos novos deslocamentos químicos observados no RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos da série 2. Desta forma, o duplete observado em aproximadamente δ 28,6 ppm refere-se ao átomo de fósforo *trans* ao nitrogênio piridínico (PA) (Tabela 19) e o duplete observado em aproximadamente δ 22,0 ppm refere-se ao fósforo *trans* ao cloreto (PB) (Tabela 19). Tais características são observadas em trabalhos descritos na literatura por (CANDIDO *et al.*, 2022; GOLFETO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2018). Os sinais em aproximadamente -144 ppm correspondem ao átomo de fósforo no contra-íon PF₆⁻.

Tabela 19 - Deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (Hz) para os precursores e complexos da série 2.

Complexos	δ (ppm) CH ₂ Cl ₂		² J _{P-P} (Hz)
	P _A *	P _B *	
<i>mer</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppb)]	12,9	9,4	36,4
<i>fac</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppb)]		22,1	-
C4	29,0	22,8	24,3
C5	28,7	22,2	24,3
C6	28,7	22,3	24,3

Fonte: do autor

Notas: *P_A fósforo *trans* N piridínico, *P_B fósforo *trans* Cl

5.2.2 Condutividade molar e análise elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos e calculados para os complexos da série 2 estão sumarizados na Tabela 20, ademais os valores teóricos foram calculados considerando os complexos anidros. As análises foram realizadas em triplicata e os valores obtidos estão de acordo com as formulações propostas.

Os valores de condutividade molar para os complexos da série 2 encontram-se na Tabela 20 e foram realizados empregando-se CH₂Cl₂ como solvente. Os resultados estão condizentes com eletrólitos do tipo 1:1, como esperado, já que houve a substituição de um ligante Cl⁻ pelo nitrogênio piridínico na esfera de coordenação, sendo necessário a presença de um contra-íon. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura que relata faixa de 12 a 77 $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ para eletrólitos 1:1, em diclorometano (GEARY, 1971). Destaca-se ainda que os precursores *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] e *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] apresentaram condutividade molar de 5.97 e 5.96 $\text{ohm}^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ condizentes com eletrólitos neutros.

Tabela 20 - Dados de análise elementar e condutividade molar para os complexos da série 2.

	%C			%H			%N			Condutividade Molar ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹ (Temp.)
	Exp.	Calc.	Erro (%)	Exp.	Calc.	Erro (%)	Exp.	Calc.	Erro (%)	
C4	46,22	46,49	0,58	4,05	3,90	3,85	3,15	3,29	4,25	29,0 (26,1°C)
C5	47,40	47,13	0,57	4,27	4,07	4,91	3,33	3,23	3,00	39,2 (27,8°C)
C6	48,17	47,85	0,67	4,12	4,02	2,49	3,23	3,19	1,24	32,0 (25,0°C)

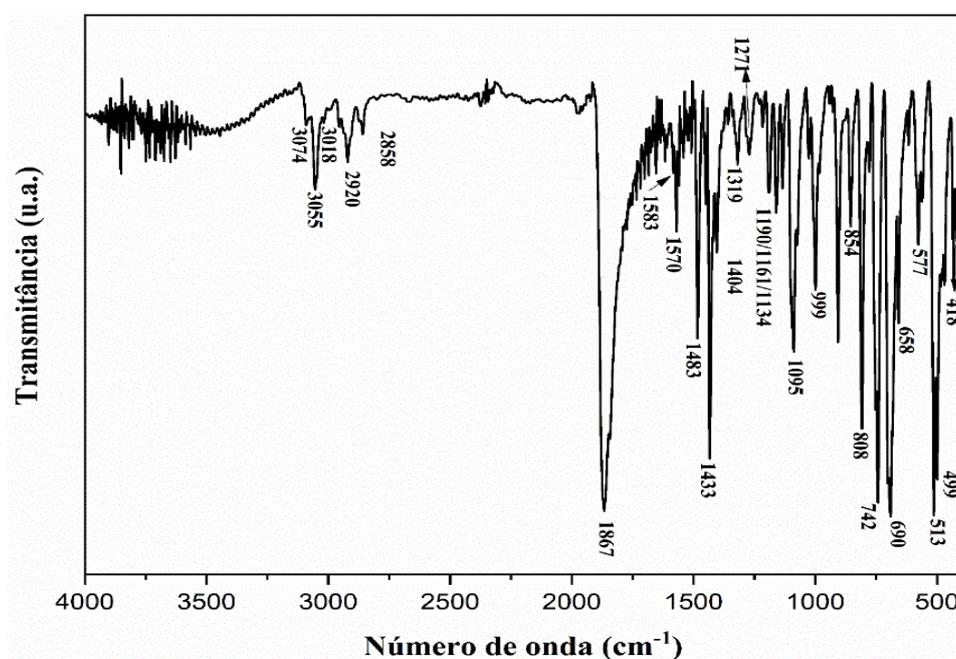
Fonte: do autor

5.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os complexos da série 2 (C4-C6), os ligantes Py, 4Pic e 4VPy e o precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, a fim de se observar modificações nos espectros, como deslocamentos e/ou ausências de bandas (Tabela 21), resultados que poderiam indicar a coordenação.

O precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] empregado nesta série de compostos apresentou no espectro de IV (Figura 85) bandas na região entre 3100-2800 cm⁻¹, característicos de estiramentos ν_s e ν_{as} C-H dos anéis aromáticos da dppb, bem como estiramentos ν_{as} e ν_s dos grupos CH₂ que estão em ponte entre os dois átomos de fósforo da dppb (NAKAMOTO, 2008).

Figura 85 – Espectro de FTIR do complexo precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)]



Fonte: do autor

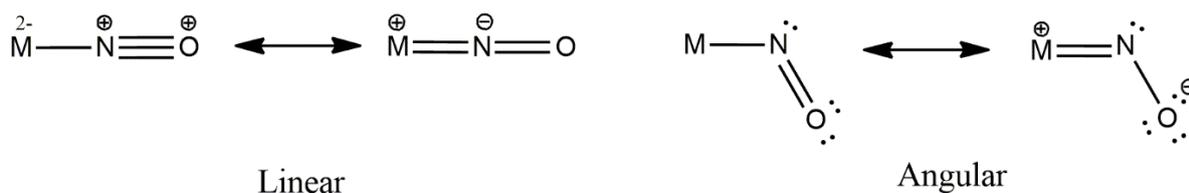
Na região entre 1600-1400 cm⁻¹ bandas de fraca a forte intensidade, típicas de estiramentos $\nu_{C=C}$ dos anéis aromáticos foram observadas. Aproximadamente quatro bandas de fraca intensidade entre 1400-1020 cm⁻¹ são atribuídas aos modos vibracionais dos anéis aromáticos da dppb, mais especificamente à vibração de deformação no plano β_{C-H} dos anéis aromáticos. A banda em 1000 cm⁻¹ de média intensidade é atribuída ao estiramento ν_{C-H} dos anéis fenílicos, enquanto os estiramentos dos anéis aromáticos da bifosfina (dppb) são

responsáveis por três bandas de média a forte intensidade na região entre 750-600 cm^{-1} , atribuídas às deformações angulares fora do plano $\gamma\text{C-H}$ do anel aromático (WHIFFEN, 1956).

O precursor utilizado para sintetizar esta série de complexos apresenta o ligante NO, o qual pode demonstrar duas formas distintas de geometria de ligação: linear ou angular (Figura 86). A ligação linear ocorre quando o NO encontra-se com hibridização sp do átomo de nitrogênio, onde os orbitais π^* parcialmente vazios estão aptos a receber densidade eletrônica do metal, sendo as formas NO^+ (íon nitrosônio) ou NO^0 .

A ligação angular é observada quando ocorre aumentando-se a densidade eletrônica nos orbitais π^* do metal, comportando-se como NO^- (íon nitrosil) de hibridização sp^2 no átomo de nitrogênio. Na geometria angular o metal doa um elétron para o NO formando o íon nitrosônio, o qual possui orbitais σ que interagem com o metal e deixa o par de elétrons localizado no orbital sp^2 do nitrogênio.

Figura 86 – Possíveis geometrias de ligação do NO coordenado ao metal



Fonte: (SCHODER; STEPHENSON,1987).

A técnica de Espectroscopia de absorção na região do infravermelho além de permitir verificar a presença do grupo NO no complexo, fornece indícios se o nitrosilo se coordena na forma linear ou angular. A forma linear caracteriza-se por bandas intensas na região entre 1650-1958 cm^{-1} e a angular por bandas intensas entre 1525-1590 cm^{-1} em complexos de rutênio (SCHODER; STEPHENSON,1987).

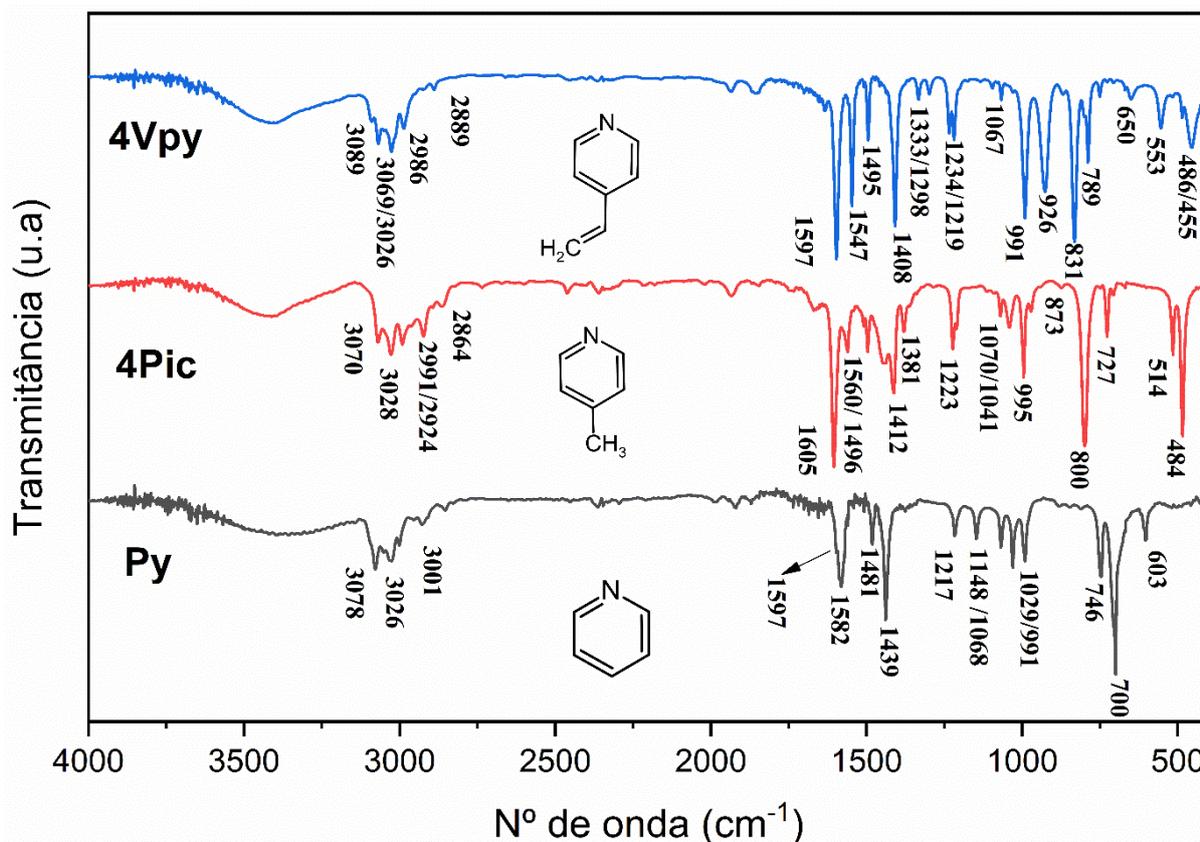
Os modos vibracionais referentes ao NO são os mais marcantes e a partir dele é possível verificar a coordenação desse ligante ao centro metálico. Essa coordenação leva ao surgimento de três bandas características, uma de maior energia e intensidade que ocorre em aproximadamente 1868 cm^{-1} , referente ao estiramento ν_{asNO} (indicando a forma NO^+ linear). A segunda refere-se ao estiramento $\nu_{\text{asRu-N}}$ de fraca intensidade que no precursor ocorreu em 577 cm^{-1} . Por fim, a deformação angular $\delta\text{Ru-NO}$ em aproximadamente 540-570 cm^{-1} que frequentemente pode acoplar com a banda $\nu\text{Ru-N}$ (NAKAMOTO, 2008). As demais bandas

como os estiramentos ν P-C alifático (em aproximadamente 1190 e 650 cm^{-1}) e ν Ru-P (490 - 510 cm^{-1}) estão atribuídas na Tabela 21 (MILTON *et al.*, 2002).

Os ligantes piridínicos Py, 4Pic e 4VPy apresentaram bandas em 3089 - 3000 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos ν C-H dos anéis aromáticos. Três bandas de fraca à média intensidade também foram identificadas na região entre 1580 - 1400 cm^{-1} e referentes aos estiramentos ν C=C do anel. Adicionalmente, foi possível observar bandas referentes à substituição no anel aromático dos ligantes 4Pic e 4VPy, como os estiramentos do grupo metila e etila em ν_{as} 2924 e 2986 cm^{-1} , além do ν_s em 2864 e 2889 cm^{-1} , bem como a deformação angular δ CH₂ em 926 e 873 cm^{-1} .

Na região entre 1597 - 1605 cm^{-1} uma banda de forte intensidade é atribuída ao estiramento ν C=N típica de piridinas. Os espectros dos ligantes livres e as atribuições das principais bandas encontram-se na Figura 87 e Tabela 21.

Figura 87 – Espectro de FTIR dos ligantes piridínicos livres empregados



Fonte: do autor

Os complexos **C4**, **C5** e **C6** apresentaram espectros de IV semelhantes, desta forma considerou-se o espectro de **C5** para discutir os resultados obtidos nesta série (Figura 88),

enquanto os espectros obtidos para os demais complexos encontram-se nas Figuras A25 e A26 do Anexo A.

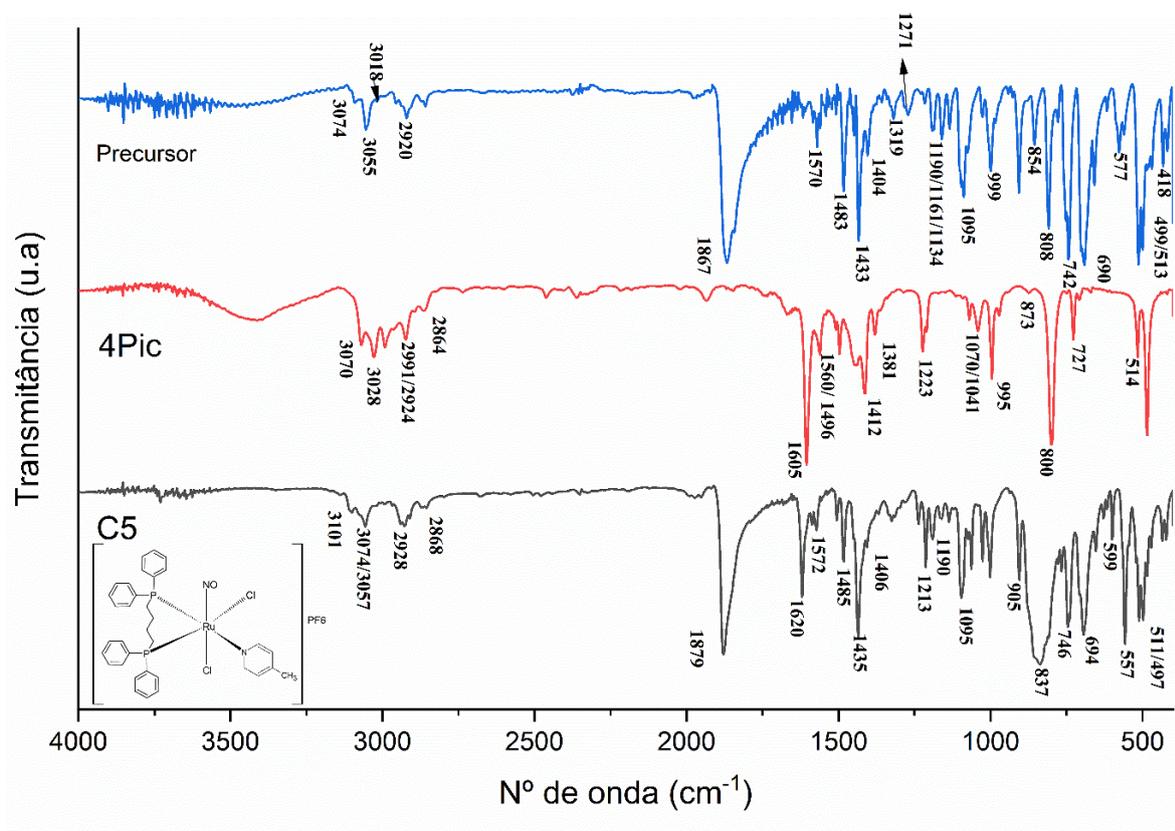
A banda mais intensa dos espectros de **C4**, **C5** e **C6** corresponde ao estiramento $\nu_{as}NO$ que ocorre em 1875, 1879 e 1877 cm^{-1} , respectivamente. Esses valores encontram-se levemente deslocados para regiões de maiores números de onda em relação ao precursor (1867 cm^{-1}), indicando que após a coordenação, a ligação do grupo NO ao metal tornou-se mais forte. Essas altas frequências estão de acordo com valores típicos de NO coordenado de modo linear ao rutênio, já que apresentam complexos similares (GOLFETO *et al.*, 2010).

Na região entre 3100-2860 cm^{-1} foi possível observar bandas de fraca a média intensidade características dos estiramentos ν_{as} e ν_sC-H dos anéis aromáticos, bem como do grupo metila e etila nos complexos **C5** e **C6**, respectivamente. Adicionalmente, notou-se bandas de fraca a média intensidades entre 1620-1300 cm^{-1} referentes ao estiramento $\nu C=N$ e $\nu C=C$, as quais foram deslocadas para regiões mais energéticas em relação aos ligantes piridínicos livres (Tabela 21), indicando que a coordenação com o metal intensificou a densidade eletrônica no anel, devido ser um bom aceptor π e estar competindo pelos elétrons do íon Ru^{II} (GOLFETO *et al.*, 2010; MAŁECKI, 2011; MAŁECKI; MARÓN, 2012; MONDELLI *et al.*, 2014). As bandas observadas em aproximadamente 837 e 557 cm^{-1} são características de estiramentos ν_{as} e ν_sP-F indicando, portanto, a presença do contra-íon PF_6 nos complexos sintetizados (GICHUMBI; FRIEDRICH; OMONDI, 2016).

Nos espectros de IV de **C4-C6** observou-se uma banda de fraca intensidade em 594 cm^{-1} correspondente ao $\nu(Ru-N)$. Esta encontra-se deslocada para maiores números de onda em relação ao precursor (577 cm^{-1}), fornecendo um indício de que houve o fortalecimento da ligação Ru-N. A deformação angular da ligação Ru-NO não foi observada em nenhum dos complexos, uma vez que encontra-se na mesma região e pode estar ocorrendo sobreposição de bandas (NAKAMOTO, 2008).

Na região entre 499-513 cm^{-1} foram observadas bandas nos espectros dos complexos sintetizados e do precursor, estas correspondem ao estiramento $\nu_{as}Ru-P$ indicando, portanto, a presença do ligante dppb na esfera de coordenação.

Figura 88 – Espectros de FTIR de **C5** (em preto), 4Pic (em vermelho) e precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (em azul) realizados em pastilhas de KBr



Fonte: do autor

Tabela 21 - Tentativa de atribuição das principais bandas dos espectros de IV de *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] e ligantes Py, 4Pic, 4VPy.

Atribuições*	<i>mer</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppb)] (cm ⁻¹)	Py (cm ⁻¹)	4Pic (cm ⁻¹)	4VPy (cm ⁻¹)	C4 (cm ⁻¹)	C5 (cm ⁻¹)	C6 (cm ⁻¹)
v _s (C-H)φ (f)	3074	3078	3070	3089	3095	3101	3095
v _{as} (C-H)φ (m)	3055	3026	3028	3069	3059	3074	3057
v _{as} (C-H) (f)	3018	3001	2991	3026	3032	3057	3020
v _{as} (C-H)ali (f)	2920	-	2924	2986	2926	2928	2931
v _s (C-H)ali (f)	2858	-	2864	2889	2866	2868	2870
vNO	1867	-	-	-	1875	1879	1877
v (C=N)φ (m/F)	-	1597	1605	1597	1605	1620	1616
vC=Cφ (f/m)	1583	1582	1560	1547	1574	1572	1572
	1570	1481	1496	1495	1485	1485	1485
	1483	1439	1412	1446	1448	1435	1435
	1433				1435		
δ t CH ₂ (f)	1404	-	-	1408	1400	1406	1418
	1319			1333	1317	1316	1317
βC-H (φ)	1271	1217	1223	1298	1223	1213	1165
	1161	1148		1234	1161	1161	
				1219			
βC-H (φ) e v(P-C) (f/m)	1190/1095	1068/1029	1070/1041	1067	1192/1094	1190/1095	1190/1095
τCH ₂ (f)	1134	-	-	-	-	-	-
v (φ) (f)	999	991	995	991	1001	1001	999
v _{as} P-F (F)	-	-	-	-	837	837	839
ρCH ₂ (f/F)	856	-	873	926	sobrep.	sobrep.	sobrep.
	808						
γC-H (φ) (F)	742	746	800	831	741	746	744
γ (φ) (F)	690	700	727	789	692	694	694
v(P-CH ₂) (m)	658	-	-	-	-	599	598
v(Ru-N) (f)	577	-	-	-	597	599	486
v _s P-F (F)					557	557	557
vRu-P e δP-C (f/m)	499	-	-	-	499	497	497
	513				513	511	511

Fonte: do autor.

Notas: sobrep. = sobreposição, - = ausência de banda, F = forte, m = média e f = fraca. v = estiramento ou deformação axial, δ = deformação angular no plano, δ t = deformação angular fora do plano do tipo tesoura, γ = deformação angular fora do plano, ρ = flexão no plano, τ = dobramento fora do plano e β = vibração de deformação no plano.

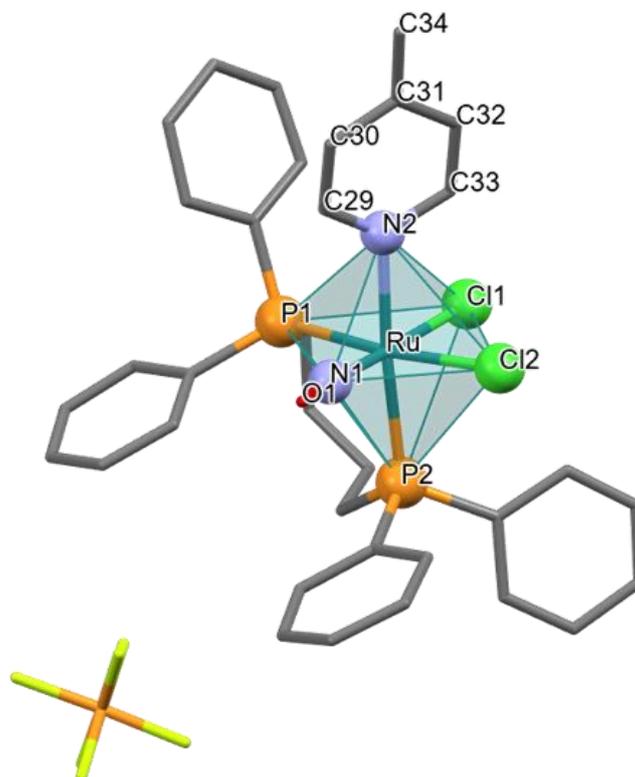
* (NAKAMOTO, 2009; SILVERSTEIS; WEBSTER; KIEMLE, 2005; POELHSITZ, 2005).

5.2.4 Difração de raios X por monocristal (DRXM)

Foram obtidos cristais de tamanho e morfologia adequados que permitiram a determinação estrutural do complexo **C5** através da difração de raios X por monocristal, corroborando com os resultados apresentados acima. Os principais dados da coleta e refinamento encontram-se na Tabela 22.

A representação estrutural de **C5** é demonstrada na Figura 89, onde foi possível demonstrar que o cátion Ru(II) exibe geometria octaédrica distorcida com o grupo nitrosilo posicionado *trans* ao íon cloreto (Cl1), enquanto Cl2 e o ligante 4Pic estão *trans* posicionados aos átomos de fósforo P1 e P2, respectivamente. A coordenação observada confirma a isomerização do precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] para *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (conforme Figura 82) durante a etapa sintética dos complexos, comportamento semelhante ao reportado por (BATISTA *et al.*, 1997; GOLFETO *et al.*, 2010; MONDELLI *et al.*, 2014; WALTON *et al.*, 2018).

Figura 89 – Representação estrutural com marcação parcial átomos mostrando a unidade assimétrica do complexo **C5**, com poliedro demonstrando geometria octaédrica ao redor do Ru(II).



Fonte: do autor

Tabela 22 - Principais dados cristalográficos do complexo **C5**.

Complexo	C5
Código de depósito CCDC	-
Fórmula empírica	[C ₃₄ H ₃₅ Cl ₂ F ₆ N ₂ OP ₃ Ru]
Peso molecular (g/mol)	866,52
Temperatura (K)	293(2)
Sistema Cristalino	<i>Ortorrômbico</i>
Grupo Espacial	<i>P2₁2₁2₁</i>
Parâmetros de célula (Å)	a = 9,7221(12) b = 15,9566(17) c = 24,056(3)
(°)	$\alpha = 90$ $\beta = 90$ $\gamma = 90$
Volume (Å³)	3731,8(8)
Z	4
Densidade ($\rho_{\text{calc}}/\text{g cm}^{-3}$)	1,542
Coefficiente de absorção (mm⁻¹)	0,752
F(000)	1752
Dimensão do cristal/mm³	
Comprimento de onda	Mo K α ($\lambda = 0,71073$)
Intervalo θ da coleta de dados (°)	2,553 - 25,749
Limite de índices	-11 \leq h \leq 10, -19 \leq k \leq 19, -29 \leq l \leq 29
Reflexões coletadas	23650
Reflexões independentes	6941 [R(int) = 0,1748]
Completeza de θ (%)	97,5
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa
Dados / restrições / parâmetros	6941/388/443
Goof	0,987
Índices R final [$I \geq 2\sigma(I)$]	R1 = 0,1042; wR2 = 0,2368
Índices R final [todos os dados]	R1 = 0,2001, wR2 = 0,3339

Fonte: do autor

O grupo nitrosilo e o rutênio são essencialmente lineares (Figura 86), como pode ser visto na Tabela 23 nos comprimentos de ligação Ru-N(1) (1,75 Å) e N(1)-O(1) (1,10 Å) além do ângulo Ru-N(1)-O(1) = 172(2)°. Esses dados, juntamente com a presença de bandas no IR em altas frequências em torno de 1876 cm⁻¹ referentes à ligação ν N-O, confirmam a coordenação na forma linear do ligante NO⁺ (ν NO⁺: 1650-1985 cm⁻¹) de acordo com o observado por GOLFETO *et al.*, 2010; SERLI *et al.*, 2003; VON POELHSITZ *et al.*, 2002. As

distâncias das ligações Ru-Cl variaram de 2,33-2,40 Å sendo características de complexos fosfínicos (BATISTA *et al.*, 1997; BATISTA *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2021).

Nota-se na Tabela 23 que a distância Ru-Cl(2)= 2,403(7) Å é maior que a distância Ru(1)-Cl(1)= 2,331(6) Å, como consequência do clássico efeito *trans* inverso, onde a forte natureza π -aceptora do ligante NO⁺ compete pelos orbitais metálicos com o ligante Cl⁻ (bom σ -doador), gerando um aumento na doação σ e encurtando a ligação Ru-Cl (*trans* à ligação Ru-NO) (COE; GLENWRIGHT, 2000; MAŁECKI; JAWORSKA; KRUSZYNSKI, 2005). Ademais, tornando os orbitais p do NO polarizados, assim gerando um aumento da densidade eletrônica sobre o átomo de oxigênio. Essa característica também é observada na distância de ligação Ru-P(2) 2,405(6) Å que é menor em relação à distância Ru-P(1) 2,453(6) Å (Tabela 21).

Tabela 23 - Principais dados cristalográficos do complexo C5.

Comprimento de ligação (Å) e ângulos (°)	C5
Ru(1)-N(1)	1,744(19)
Ru(1)-N(2)	2,211(16)
Ru(1)-Cl(1)	2,331(6)
Ru(1)-Cl(2)	2,403(7)
Ru(1)-P(2)	2,405(6)
Ru(1)-P(1)	2,453(6)
N(1)-O(1)	1,11(2)
N(2)-C(29)	1,358(16)
N(2)-C(33)	1,361(15)
C(33)-C(32)	1,371(15)
C(31)-C(32)	1,382(15)
C(29)-C(30)	1,377(15)
C(34)-C(31)	1,46(3)
C(31)-C(30)	1,378(15)
O(1)-N(1)-Ru(1)	172(2)
N(1)-Ru(1)-Cl(1)	175,4(7)
N(2)-Ru(1)-Cl(1)	88,0(4)
P(2)-Ru(1)-P(1)	94,2(2)
N(1)-Ru(1)-P(1)	99,0(6)
N(2)-Ru(1)-P(1)	91,6(4)
N(2)-Ru(1)-P(2)	174,2(4)
N(1)-Ru(1)-P(2)	91,2(7)
N(1)-Ru(1)-Cl(2)	88,0(7)
P(2)-Ru(1)-Cl(2)	88,8(2)

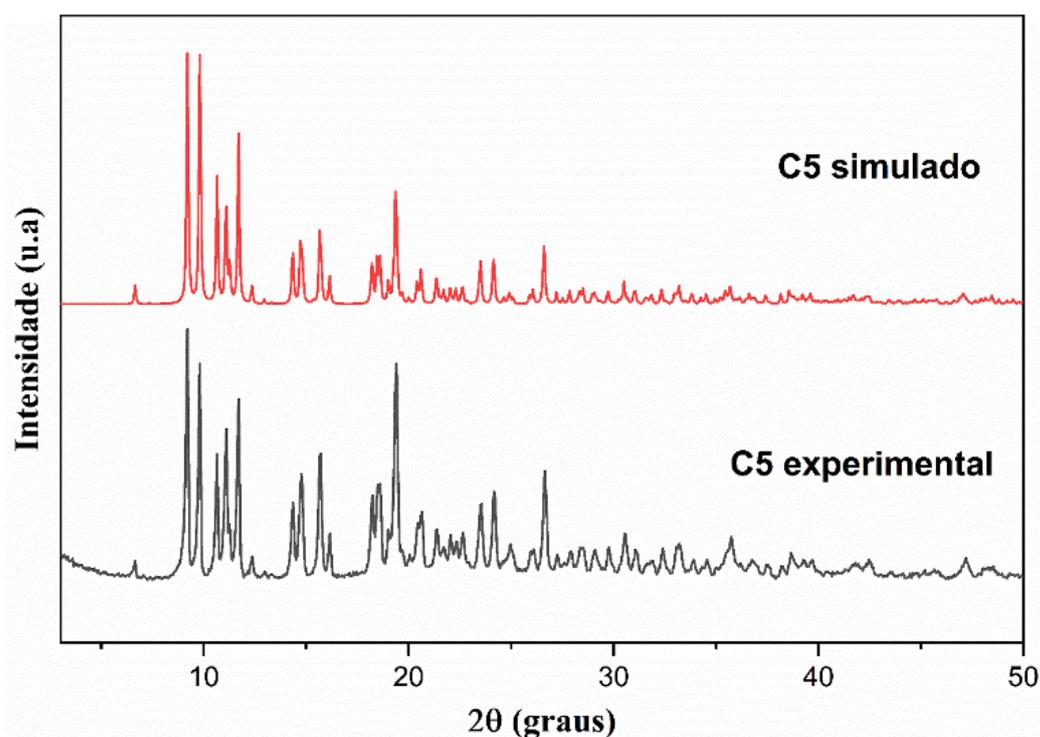
Fonte: do autor

5.2.5 Difração de raios X por policristal (DRXP)

Neste trabalho, todas formas sólidas dos complexos foram analisadas por DRXP, de forma que o composto cuja estrutura foi elucidada por DRXM (**C5**) tiveram seus difratogramas experimental e simulado comparados, a fim de confirmar a presença de uma única fase cristalina. Os compostos dessa série não apresentaram halos no difratograma, característicos de compostos amorfos, como os da série 1.

Dessa forma para essa série de complexos os difratogramas experimental e simulado do complexo **C5** estão apresentados na Figura 90. Os perfis apresentam concordância, sendo perceptível os principais picos previstos pela estrutura elucidada e ausência de picos espúrios, indicando que o bulk é policristalino e com uma única fase cristalina.

Figura 90 – Difratogramas experimental e simulado de **C5**

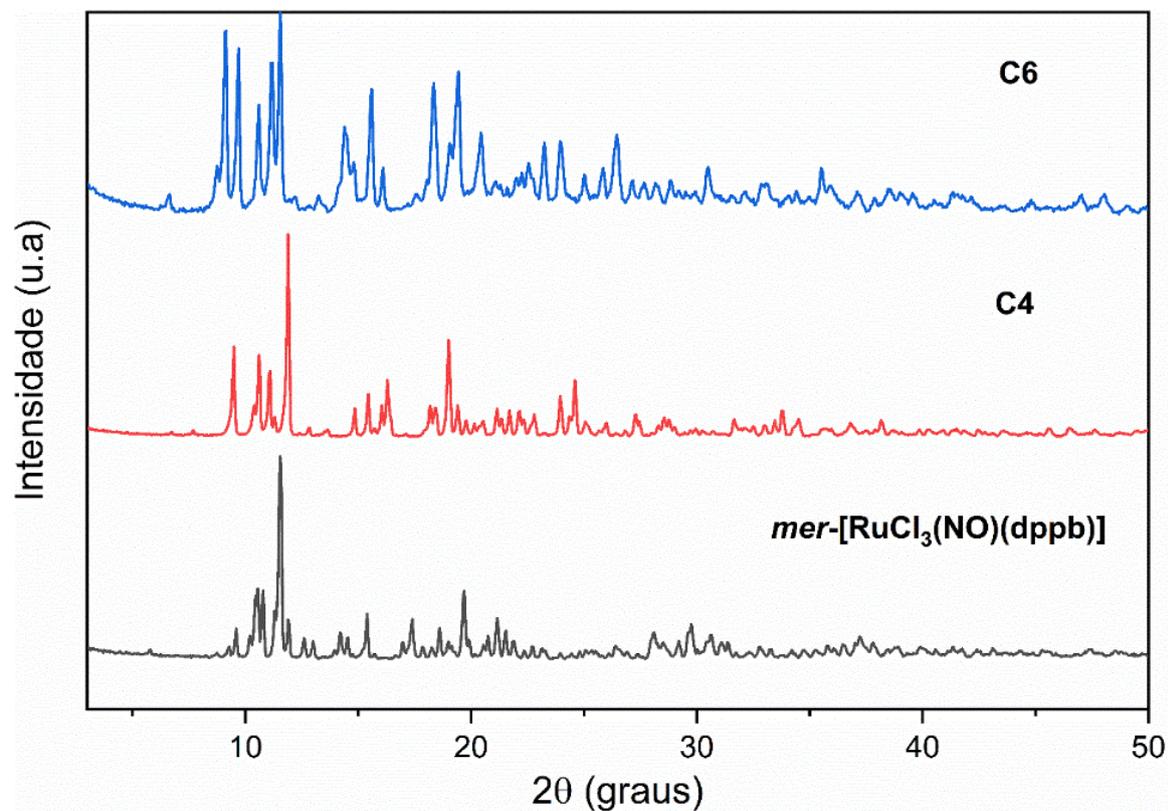


Fonte: do autor

Embora para os complexos **C4** e **C6** não foram obtidos monocristais até o momento, foram realizados DRXP das formas sólidas e comparadas com o precursor com a finalidade de observar resquícios do reagente de partida ou novas fases cristalinas. De acordo com os difratogramas apresentados na Figura 91, pode-se observar que não há correspondência com a

fase cristalina do precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)], indicando, provavelmente a formação de um novo composto já que, uma nova forma cristalina nos difratogramas de **C4** e **C6**.

Figura 91 – Difratogramas experimentais dos complexos **C4**, **C6** e precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)].



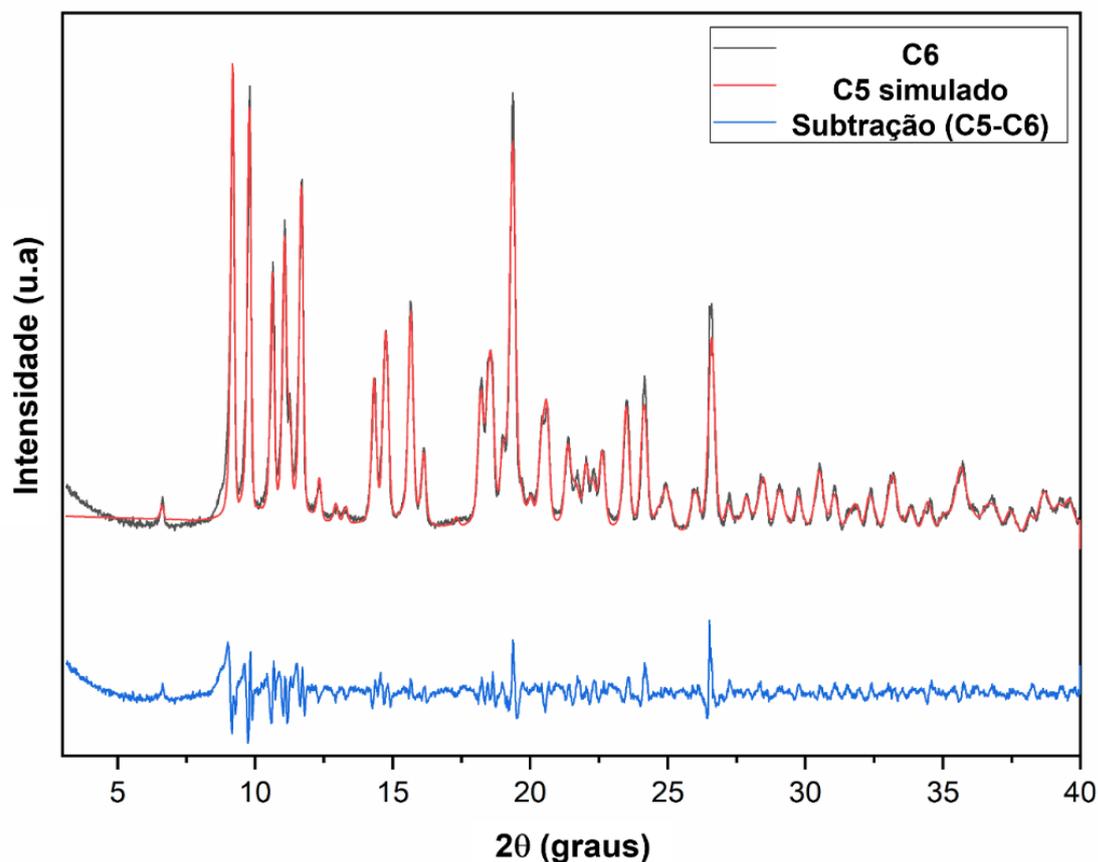
Fonte: do autor

Como os 3 compostos apresentam semelhança estrutural, levantamos a hipótese de algum deles serem isomorfos em relação a **C5** que teve a sua estrutura elucidada. Curiosamente, ao compararmos os difratogramas experimental do *bulk* de **C6** com o simulado para o complexo **C5** (Figura 92) observamos muita similaridade, indicando que **C6** é isoestrutural.

Para verificar essa possibilidade, foi realizado um refinamento pelo método de Rietveld nos difratogramas de **C5** simulado e **C6** experimental. A Figura 87 mostra uma boa concordância entre eles, confirmando que o composto **C6** é isoestrutural. Todas as coordenadas cristalográficas e parâmetros térmicos foram refinados com exceção dos substituintes p dos ligantes piridina. Os critérios de qualidade e os parâmetros refinados da rede celular foram obtidos como: Fator R de Bragg = 3,05, fator R_f = 1,32, $\chi^2 = 10,3$, a = 9,728997, b = 15,965275, c = 24,062494, $\alpha = 90$, $\beta = 90$, $\gamma = 90$, com volume de 3737,531 (0,304). O modelo final sugere que a fase cristalina é orientada no plano (2 1 1). Vale ressaltar que foram feitas medidas a alto

ângulo de **C6** a fim de verificar a existência de mais picos que não foram observados e por esse motivo a análise se limitou até $2\theta=40^\circ$.

Figura 92 – Sobreposição dos difratogramas experimental de **C6** e simulado de **C5**, mostrando a diferença entre os 2 perfis.



Fonte: do autor

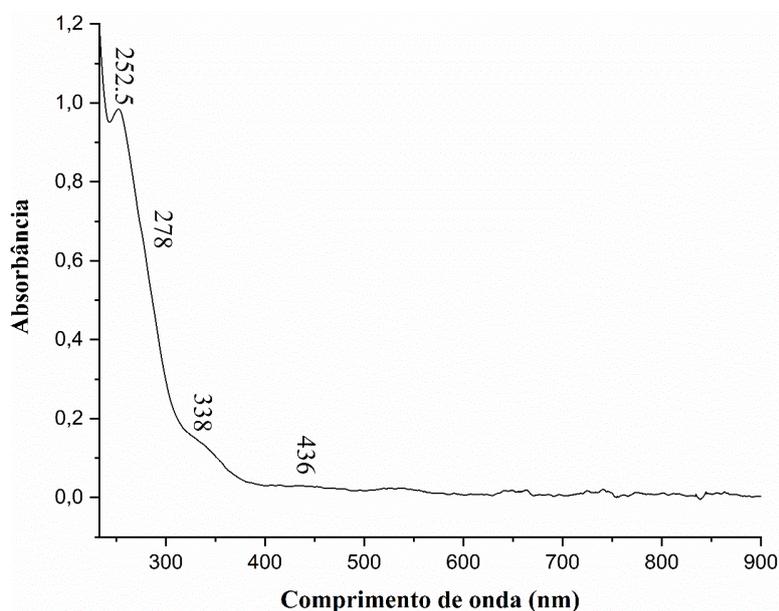
5.2.6 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos obtidos para a série 2 foram realizados em diclorometano e apresentaram bandas de absorção na região do visível e ultravioleta. O espectro do precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (Figura 93), apresentou uma banda bem definida em 252,5 nm com elevada absorvidade molar ($28691 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), que de acordo com a literatura é atribuída a transição intraligante (IL) $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante dppb. Segundo trabalhos da literatura o isômero *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] apresenta essa banda deslocada para regiões de maior comprimento de onda (aproximadamente 270 nm), tal diferença justifica-se devido a presença do NO (forte π receptor) *trans* ao átomo de fósforo no isômero meridional, causando a diminuição da

retrodoação entre Ru→P. O átomo de fósforo compensa essa deficiência drenando a densidade eletrônica dos anéis aromáticos e aumentando a energia da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (POELHSITZ, 2005). Adicionalmente observou-se um ombro em 278 nm referente a transferências de carga dos ligantes cloretos e bifosfina para o metal.

Em 338 nm uma banda de absorvidade molar ($3924 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) compatível com banda de transferência de carga dos ligantes cloreto e fosfina para os orbitais d do metal. Por fim a banda na região do visível em 436 nm pode ser atribuída a transferência de carga do metal para ligante (POELHSITZ, 2005).

Figura 93 – Espectro de UV-vis do precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)], em CH₂Cl₂ $3,43 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$.



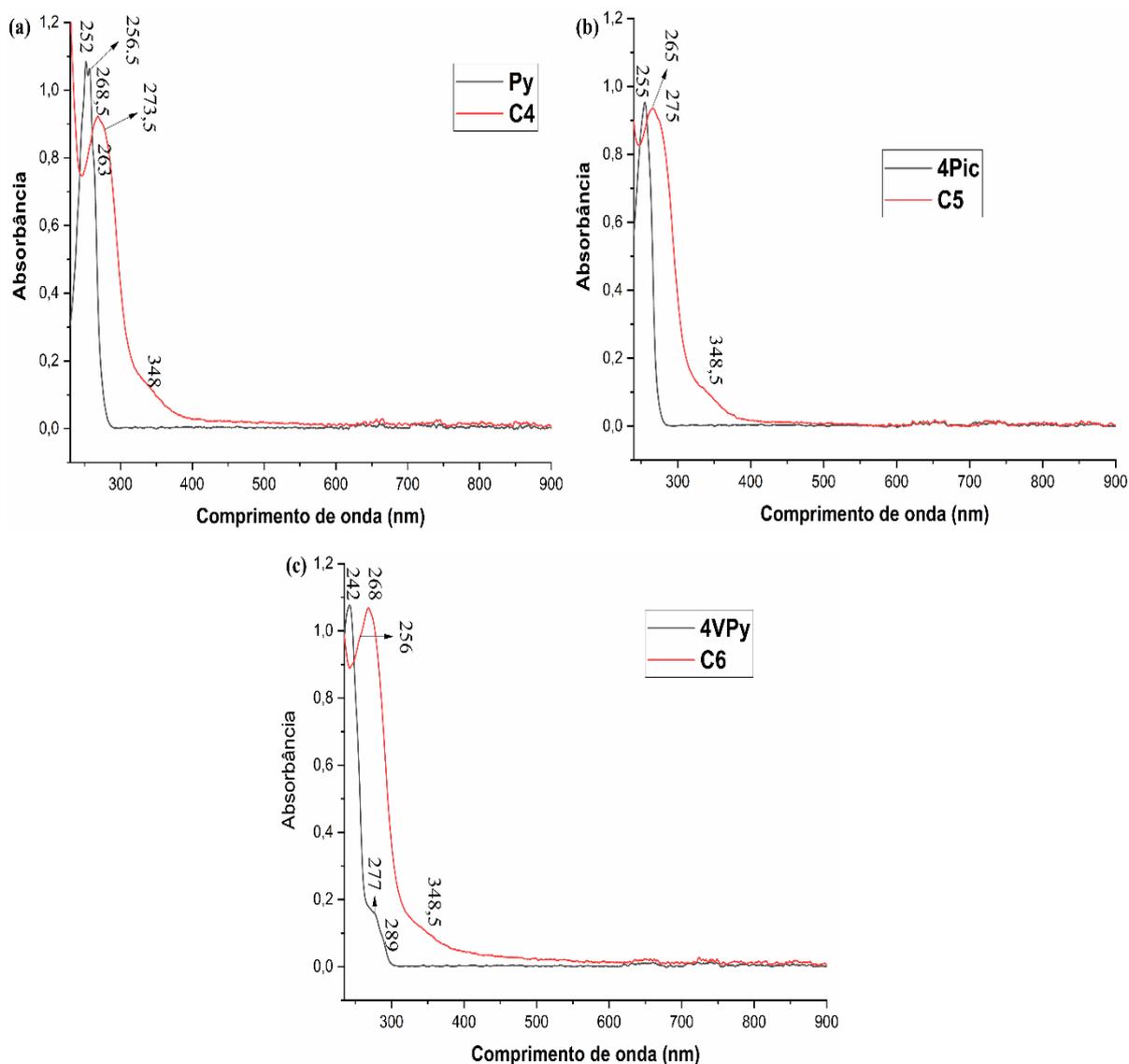
Fonte: do autor

Os espectros dos complexos da série 2 (Figura 94) foram atribuídos com base no espectro do precursor e também a partir da comparação com os ligantes livres e outros complexos semelhantes reportados na literatura (GOLFETO *et al.*, 2010; MAŁECKI; MAROŃ, 2012). Todas as tentativas de atribuições estão sumarizadas na Tabela 24.

Observou-se na região do ultravioleta uma banda e dois ombros com altos valores de absorvidade molar (em torno de $30000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) já presentes na bifosfina e também nos ligantes piridínicos livres que são atribuídos a transições intraligantes (IL) do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos. Nas regiões próximas ao visível foram observados ombros que podem ser atribuídos, segundo a literatura, a transições de transferência de carga do metal para o ligante

(TCML) ($\pi\text{Cl} \rightarrow d/\pi\text{Ph} \rightarrow d/\pi\text{L} \rightarrow d/\pi\text{L} \rightarrow d$) e transições interligantes envolvendo os orbitais vazios do NO.

Figura 94 – Espectro comparativo de UV-Vis para os complexos obtidos e ligantes livres, em CH_2Cl_2 .



Fonte: do autor.

Notas: **a)** Py $5,75 \times 10^{-4} \text{ mol x L}^{-1}$ e **C4** $3,40 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$, **b)** 4Pic $6,85 \times 10^{-4} \text{ mol x L}^{-1}$ e **C5** $2,64 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$ e **c)** 4VPy $1,29 \times 10^{-4} \text{ mol x L}^{-1}$ e **C6** $4,16 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$

Comparando os espectros com os ligantes livres nota-se que ocorreu um deslocamento para regiões menos energéticas do espectro (deslocamento batocrômico) indicando mudanças nos níveis eletrônicos, conforme esperado, já que novas ligações químicas são formadas e consequentemente as diferenças de energia entre orbitais moleculares são modificadas, implicando em energias diferentes para promover as transições eletrônicas (BARBOSA,2007).

Tabela 24 - Absortividade molar e tentativas de atribuições dos ligantes, precursor e complexos da série 2.

Compostos	λ (nm)/ Absorbância	$\epsilon \times 10^3$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Tentativa de atribuição
Py	252 / 1,0843	1,886	IL $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	265.5 / 1,0634	ombro	
	263 / 0,7877	ombro	
4Pic 4VPy	255 / 0,9527	1,391	$\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$
	242 / 1,0767	8,346	
	277 / 0,1583	ombro	
	289 / 0,0784	ombro	
<i>mer</i> - [RuCl₃(NO)(dppb)]	252.5 / 0,9841	28,691	IL $\pi \rightarrow \pi^*$ TCLM CTLL TCLM TCML
	278 / 0,6383	ombro	
	338 / 0,1346	3,924	
	436 / 0,0298	0,868	
C4	268.5 / 0,9230	27,147	IL TCLM $\pi_{Cl} \rightarrow d\pi / \pi_{Ph} \rightarrow d\pi / \pi_{Py} \rightarrow$ $d\pi / \pi_{Cl} + \pi_{Ph} + \pi_{Py} \rightarrow d\pi$ TCML $\pi_{Cl} \rightarrow d / \pi_{Ph} \rightarrow d/\pi L \rightarrow$ $d/\pi L \rightarrow d$
	273.5 / 0,9048	ombro	
	348 / 0,1158	ombro	
C5	265 / 0,9350	35,417	$\pi \rightarrow \pi^*$ fosfina e IL TCLM $\pi_{Cl} \rightarrow d\pi / \pi_{Ph} \rightarrow d\pi / \pi_{4Pic} \rightarrow$ $d\pi / \pi_{Cl} + \pi_{Ph} + \pi_{4Pic} \rightarrow d\pi$ TCML $\pi_{Cl} \rightarrow d / \pi_{Ph} \rightarrow d/\pi L \rightarrow$ $d/\pi L \rightarrow d$
	275 / 0,8982	ombro	
	348,5/ 0,0975	ombro	
C6	256 / 0,9779	ombro	IL $\pi \rightarrow \pi^*$ 4VPy $\pi \rightarrow \pi^*$ fosfina TCML $\pi_{Cl} \rightarrow d / \pi_{Ph} \rightarrow d/\pi L \rightarrow$ $d/\pi L \rightarrow d$
	268 / 1,0684	25,683	
	348.5 / 0,1023	ombro	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Notas: IL = Transição intra-ligante: $\pi \rightarrow \pi^*$, TCML = Transição de carga metal ligante $d\pi \rightarrow \pi^*$

CTLL = transferência de carga ligante-ligante, Ph = fosfina

5.2.7 Voltametria cíclica

O comportamento eletroquímico dos compostos sintetizados foi estudado por voltametria cíclica. As medidas foram realizadas utilizando o método de arranjo convencional contendo três eletrodos, consistindo de um eletrodo de platina como eletrodo de trabalho, um

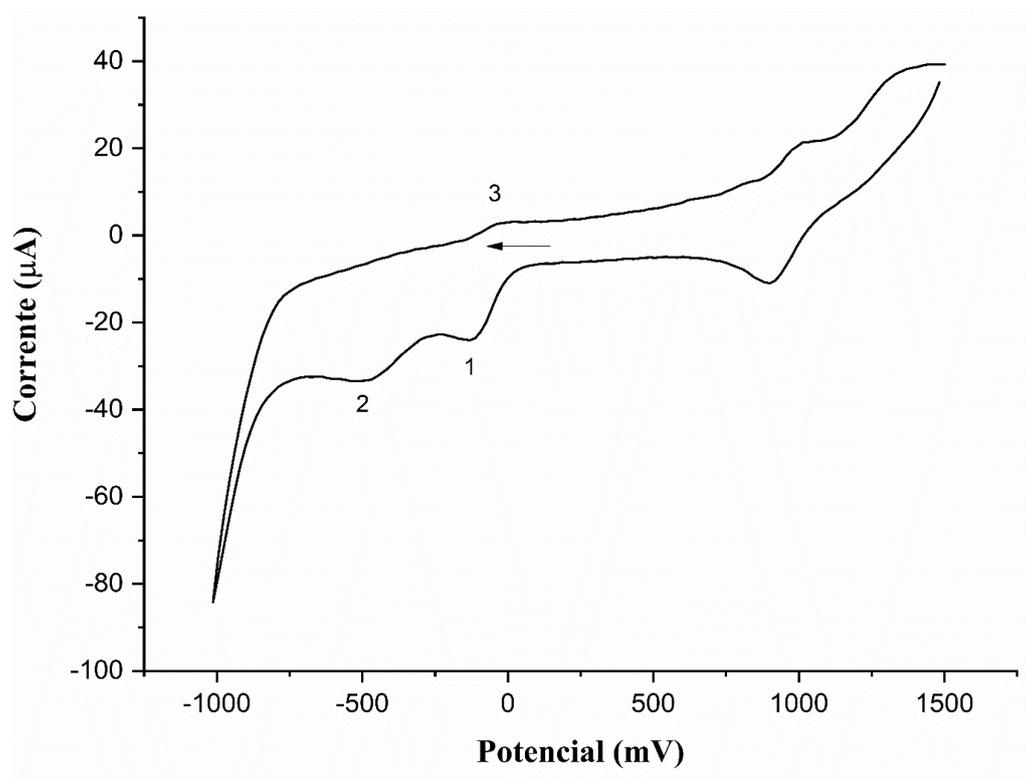
auxiliar de platina e um de referência, de Ag/AgCl. Os voltamogramas foram obtidos em solução de MeCN, utilizando PTBA (0,1 mol. L⁻¹) como eletrólito suporte e velocidade de varredura igual a 100 mV.s⁻¹.

Os complexos da série 2 apresentam em comum a presença do fragmento Ru-NO⁺. Desta forma os processos eletroquímicos destes compostos são centrados no ligante nitrosilo (VON POELHSITZ *et al.*, 2006). Não foi observado em nenhum dos complexos obtidos processos referentes à oxidação do metal, no solvente utilizado. Tem sido sugerido por alguns autores que o rutênio, em nitrosilos complexos, só é eletroativo em potenciais superiores a +1,4 V. Esse potencial alto é justificado pelo domínio que a acidez π do NO (forte π receptor) impõe em seus complexos, que pela retrodoação leva à diminuição da densidade eletrônica sobre o metal, consequentemente estabilizando-o (VON POELHSITZ *et al.*, 2006).

Um voltamograma representativo para esta série (**C4**) é ilustrado na Figura 95, onde estão destacados os processos eletroquímicos atuantes. Na varredura catódica, nota-se dois processos bem definidos. Sendo o primeiro reversível (1) com $E_{pc} = -123$ mV, atribuído a redução do grupo nitrosilo $\text{Ru-NO}^+ \rightarrow \text{Ru-NO}^0$. O segundo, com $E_{pc} = -488$ mV característico da redução de $\text{Ru-NO}^0 \rightarrow \text{Ru-NO}^-$.

Após as reduções, varrendo para potenciais positivos (Figura 95), podemos observar o processo referente a oxidação de $\text{Ru-NO}^0 \rightarrow \text{NO}^+$ (3) com $E_{pa} = -40$ mV. O processo observado em aproximadamente 1100 mV é característico da coordenação da acetonitrila, após a liberação do óxido nítrico, quando este é reduzido, como pode ser observado na Figura 95, que mostra a presença de um processo quasi-irreversível quando Ru-NO^0 é reduzido a Ru-NO^- ou seja, após a redução, nem todo o óxido nítrico coordenado mantém-se na estrutura. Os resultados obtidos estão de acordo com o reportado por (VON POELHSITZ *et al.*, 2006). Os demais voltamogramas dos complexos **C5** e **C6** encontram-se nas Figuras A27 e A28 do Anexo A.

Figura 95 – Voltamograma cíclico do complexo **C4**, eletrólito PTBA 0,1 mol·L⁻¹ em CH₃CN vs Ag/AgCl, velocidade de varredura 100 mV·s⁻¹

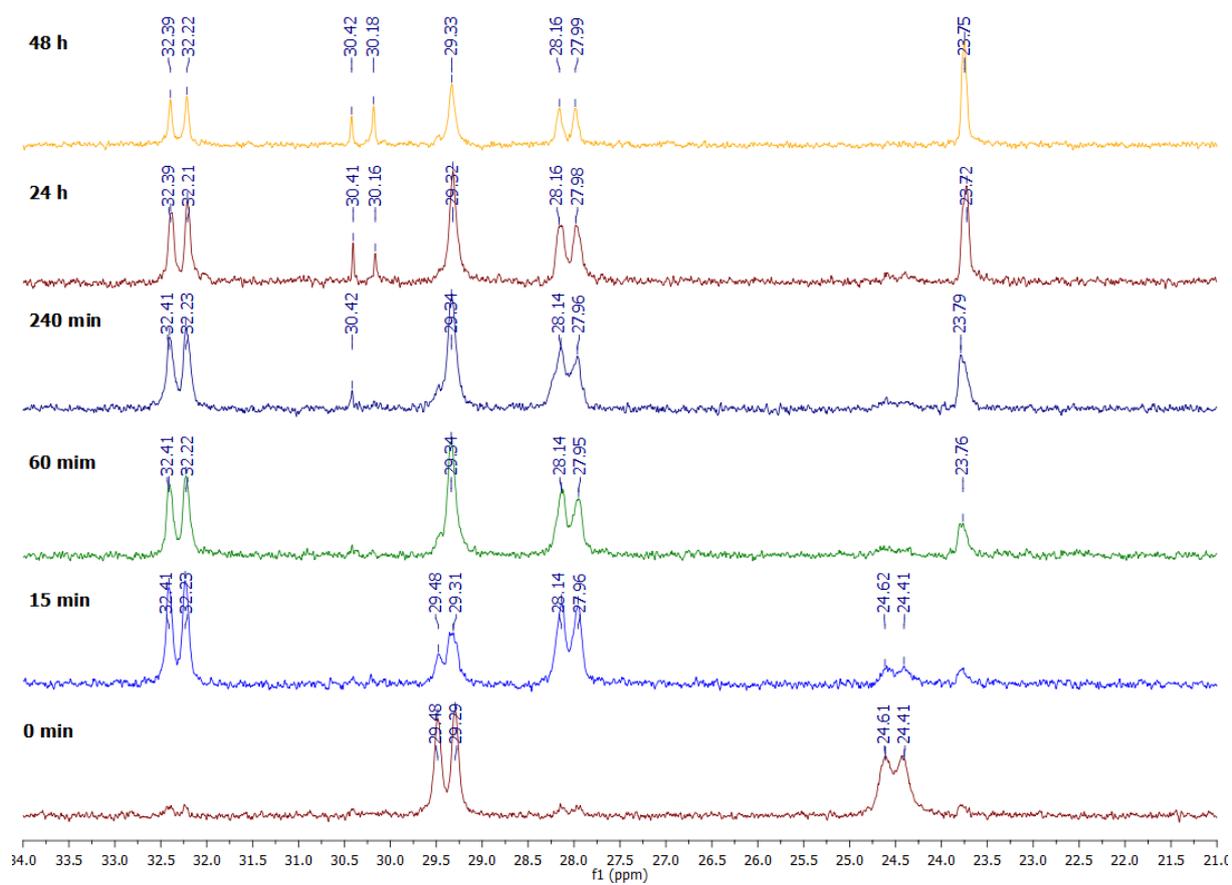


Fonte do autor

5.2.8 Estudo de estabilidade em solução dos complexos da série 2

A estabilidade em solução dos complexos [RuCl₂(NO)(dppb)(Py)]PF₆, [RuCl₂(NO)(dppb)(4Pic)]PF₆ e [RuCl₂(NO)(dppb)(4VPy)]PF₆ foi avaliada em DMSO nos tempos 0, 15, 60, 240 min, 24h e 48h empregando a técnica de RMN de ³¹P{¹H}. Os espectros obtidos estão dispostos nas Figuras 96 e A35-A36 do Anexo A, para **C4**, **C5** e **C6**, respectivamente.

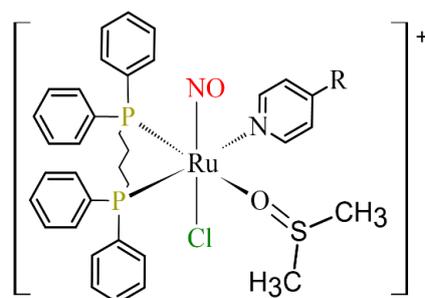
Figura 96 – Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **C4** após 0, 15, 60, 240 min, 24 e 48 h de solubilização em DMSO.



Fonte do autor

No espectro da Figura 96, pode-se observar além dos sinais referentes à **C4** (δ 29,38 e 24,51 ppm), dois dubletos em (δ 32,32 e 28,05 ppm), estes podem ser atribuídos à coordenação do DMSO, pela troca do cloreto *trans* a fósforo, uma vez que o cloreto *trans* a NO^+ , dificilmente é substituído, em função do efeito *trans* do óxido nítrico. Desta forma, a estrutura proposta após a coordenação do DMSO é reportada na Figura 97.

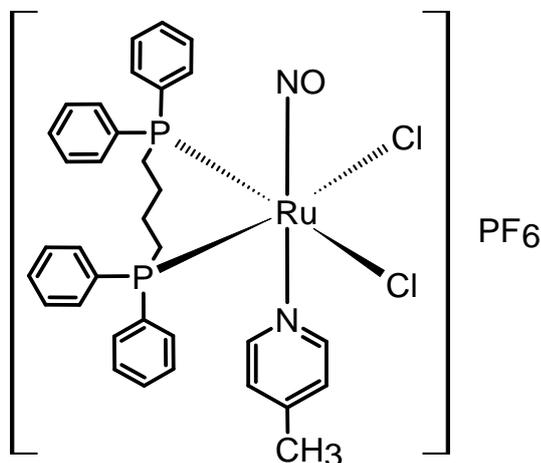
Figura 97 – Estrutura proposta após à coordenação do DMSO à **C4**.



Fonte: do autor

Ademais, o singlete observado em aproximadamente δ 23,70 ppm (Figura 96), pode ser atribuída ao complexo ilustrado na Figura 98.

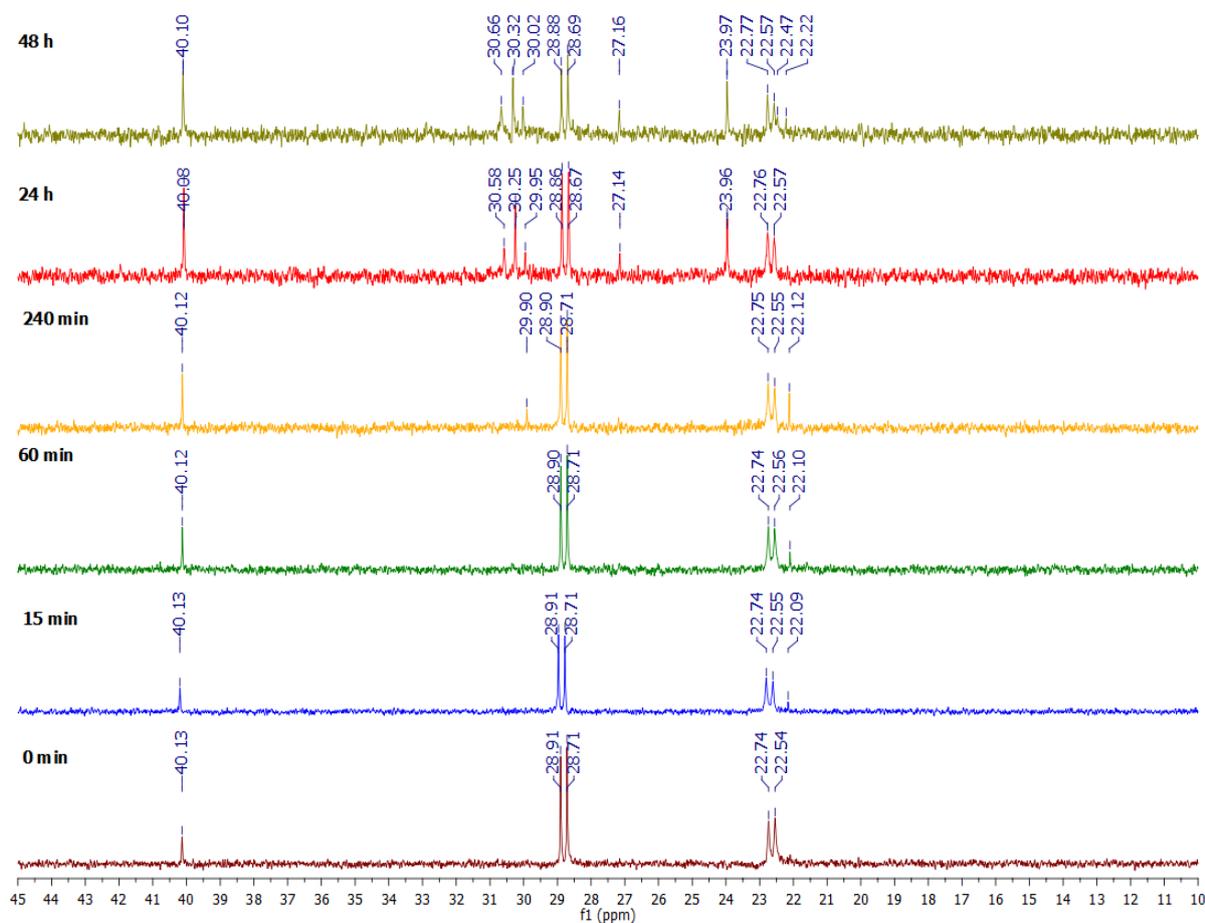
Figura 98 – Estrutura proposta após a isomerização do ligante piridínico.



Fonte: do autor

Para investigar as espécies formadas após 15 min., analisou-se a estabilidade de **C4** em CH₂Cl₂ com adição de piridina. O estudo foi feito nos tempos 0, 15, 60, 240 min, 24h e 48h empregando a técnica de RMN de ³¹P{¹H}. Os espectros obtidos estão dispostos na Figura 99.

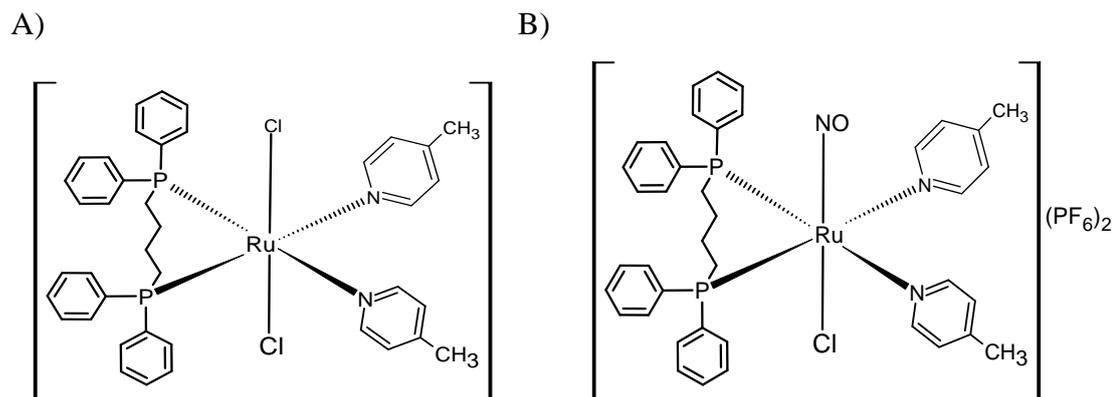
Figura 99– Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **C4** com adição de Py após 0, 15, 60, 240 min, 24 e 48 h em CH_2Cl_2 .



Fonte do autor

Pode-se observar na Figura 99, já no tempo inicial, um singlete em δ 40,13 ppm, e após 15 min, um singlete em δ 22,09 ppm, os quais podem ser atribuídos à formação dos complexos ilustrados nas Figura 100 (A) e (B), respectivamente. O singlete em δ 40,13 ppm, apresenta-se em regiões no espectro de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ característico da ausência de NO^+ coordenado, enquanto que o sinal em δ 22,09 ppm, deve-se a presença deste ligante, que promove o aumento da densidade eletrônica sobre o fósforo, deixando-o mais protegido, ou seja, o sinal no espectro aparece deslocado para campo mais alto.

Figura 100 – Estruturas propostas após à coordenação da piridina à C4.



Fonte: do autor

Diante do exposto, foi observado que os complexos da série 2, não apresentaram estabilidade nas condições avaliadas, o que impacta na utilização destes, com os estudos até o momento realizados, para avaliação da atividade citotóxica. Ressalta-se, que em trabalhos futuros estudos serão realizados a fim de investigar a labilidade do óxido nítrico e comportamento dos demais ligantes. Uma alternativa á a utilização de ligantes bidentados, visando a estabilização destes.

6.0 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram sintetizados e caracterizados os complexos [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆ (C1), [RuCl(NIC)(dppb)(4,4'-Metoxi-bipy)]PF₆ (C2) e [RuCl(NIC)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]PF₆ (C3), os quais compõe a série 1 e os nitrosilo complexos [RuCl₂(NO)(dppb)(Py)]PF₆ (C4), [RuCl₂(NO)(dppb)(4Pic)]PF₆ (C5) e [RuCl₂(NO)(dppb)(4VPy)]PF₆ (C6), a série 2. Os complexos obtidos tiveram suas estruturas propostas pelas técnicas usuais de caracterização de complexos inorgânicos, sendo estas, espectroscopia de RMN ³¹P{¹H}, ¹³C{¹H} e ¹H, UV-Vis, IV, análise elementar, DRXP, condutividade molar, voltametria cíclica, espectrometria de massas, análises térmicas e DRXM para os complexos **C1** e **C5**.

Com os resultados de DRXM, para **C1**, foi possível confirmar que a ligante nicotinamida coordenou-se pelo nitrogênio piridínico, de modo monodentado, como esperado. Ademais, revelou que o cristal obtido trata-se de uma solução sólida constituída pelos complexos **C1** e [RuCl(Py)(dppb)(4,4'-Me-bipy)]PF₆, na proporção de 25:75, sendo esta conversão, durante o processo de recristalização. Já **C5**, apresentou o grupo nitrosilo posicionado *trans* ao cloreto, enquanto o ligante 4Pic *trans* posicionado ao átomo de fosforo P2, confirmando a isomerização do precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] para *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)].

A espectrometria de massas confirmou a fragmentação do ligante nicotinamida com *m/z* de 22,991 para os complexos da série 1. Ademais as técnicas espectroscópicas, como RMN de ³¹P{¹H} demonstraram que a nicotinamida substituiu um dos cloretos, tanto para precursores da série 1, como os da série 2, levando à deslocamentos em regiões mais desblindadas do espectro. Os valores obtidos para condutividade molar das séries 1 e 2 indicaram eletrólitos 1:1, confirmando a presença do estiramento νP-F do contra-íon PF₆⁻ observado no espectro de infravermelho. Os complexos da série 2, apresentaram o estiramento νNO na faixa de 1875 a 1879 cm⁻¹, características do óxido nítrico coordenado de forma linear.

O estudo de estabilidade dos complexos da série 1 demonstrou que os compostos reagem com DMSO, DMSO+DEMAM, metanol e etanol, sendo obtido uma mistura do respectivo complexo da série 1 e [RuCl(Py)(dppb)(X-bipy)]PF₆. A reação da nicotinamida coordenada, acontece na presença de um nucleófilo prótico ao carbono do grupo amida, que apresenta maior eletrofilicidade após a coordenação. Tal resultado merece ser melhor estudado em trabalhos futuros, já que os complexos podem apresentar uma importante contribuição na área de catálise.

Já a série 2 mostrou-se instável em solventes coordenastes, inviabilizando a investigação da viabilidade celular.

O estudo da atividade citotóxica dos complexos da série 1, revelou resultados promissores para **C3**, nas linhagens de melanoma (CHL-1, WM1366 e SK-MEL-147), com IC_{50} igual a $18,06 \pm 0,77$, inferior ao da cisplatina ($IC_{50} = 94,59 \pm 3,95$), com índice de seletividade (IS) 13 vezes maior para a linhagem de CHL-1 em relação a de fibroblasto normal (FPM).

Ensaio subsequentes apontaram sua capacidade de inibir a proliferação de células CHL-1 e indução de apoptose, sendo estes eventos associados a interrupção do ciclo celular entre as fases G1/S (responsáveis pela preparação celular e autorreplicação do DNA) e atividade pró-oxidante de espécies reativas de oxigênio (ROS)..

Os resultados de interação dos complexos da série 1 com HSA revelaram que os complexos provocam supressão de fluorescência através dos mecanismos estáticos e dinâmicos com a inserção de apenas uma molécula do complexo na estrutura proteica ($n \approx 1$). Quanto aos parâmetros termodinâmicos **C1** e **C3** apresentaram valores positivos de ΔH^0 e ΔS^0 , indicando que as interações com HSA ocorreram por meio de interações hidrofóbicas. Já **C2** apresentou comportamento oposto, com valores negativos de ΔH^0 e ΔS^0 , indicando prevalência de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Ademais, os estudos de interação com DNA apontaram que entre os complexos analisados **C1** e **C3** apresentaram maior afinidade com a biomolécula.

Em suma, pode-se concluir que o presente trabalho alcançou os objetivos propostos de síntese e caracterização de novos complexos de rutênio (II) contendo nicotinamida ou óxido nítrico, e o desenvolvimento de complexos mais seletivos, quando avaliados *in vitro*, consequentemente menos tóxicos que o fármaco de referência cisplatina.

REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, M. *et al.* Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **Biomedicine and Phamacoterapy**, [S. l.], v. 101, p. 458-477, 2018.
- ADNANE, F.; EL-ZAYAT, E.; FAHMY, H. M. The combinational application of photodynamic therapy and nanotechnology in skin cancer treatment: A review. **Tissue and Cell**, [S. l.], v.77, n.1 , p. 101856, 2022.
- AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, [S. l.], v. 30, p. 291–297, 2020.
- ALBERTO BASTOS DE MARIA, C.; FELIPE ALVES MOREIRA, R. A INTRIGANTE BIOQUÍMICA DA NIACINA-UMA REVISÃO CRÍTICA. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1739 – 1752, 2011.
- ALEKSANDRIISKII, V. V. *et al.* Solvation State of Nicotinamide in Binary Solvents by ¹³C NMR Probing at Different Temperatures. **Applied Magnetic Resonance**, Vienna, v. 47, n. 3, p. 349–359, 2016.
- ALLAN, J. R.; BAIRD, N. D. Some first row transition metal complexes of nicotinamide and nicotinic acid. **Journal of Thermal Analysis**, Budapest, v. 16, p. 79–90, 1979.
- ALMEIDA, V. L. DE *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- AL-SAIF, F. A. Spectroscopic characterization and thermal studies of nicotinamide alkaline earth metal complexes. **International Journal Chemical Science**, Índia, v. 11, n. 2, p. 1117–1130, 2013.
- AL-SAIF, F. A.; REFAT, M. S. Ten metal complexes of vitamin B3/niacin: Spectroscopic, thermal, antibacterial, antifungal, cytotoxicity and antitumor studies of Mn (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), Pd (II), Cd (II), Pt (IV) and Au (III) complexes. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1021, p. 40–52, 2012.
- ARENAS-JAL, M.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; GARCÍA-MONTOYA, E. Therapeutic potential of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). **European Journal of Pharmacology**, Netherlands, v. 879, p. 1-12, 2020.
- ATAÇ, A.; YURDAKUL, Ş.; BERBER, S. Synthesis, spectroscopy, and characterization of some bis-nicotinamide metal(II) dihalide complexes. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 81, n. 1, p. 684–689, 2011.
- AVELAR-FREITAS, B. A. *et al.* Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 307–315, 2014.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour complexes and DNA interactions and their tools of analysis: An approach to metalointercalators. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

BARBOSA, Marília Imaculada Frazão. Busca por novos metalofármacos contra doenças negligenciadas (malária, doença de chagas e leishmaniose). 2012. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2012.

BARBOSA, Marília Imaculada Frazão. **Complexos carbonílicos de Rutênio: de um gás tóxico a uma droga com potencial agente citotóxico**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2007.

BATISTA, A. A. *et al.* Nitrosyl ruthenium complexes with general formula $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{P-P})\text{I}]$ ($\text{P-P} = \{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}$, $n = 1-3$ and $\{\text{PPh}_2\text{-CH-CH-pPh}_2\}$). X-ray structure of $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2)]$. **Polyhedron**, Great Britain, v. 16, n. 6, p.927 – 933, 1997.

BATISTA, A. A. *et al.* Synthesis and characterization of the *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$ isomer. X-ray structures of *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppm})]$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})_2]$ and *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppb})]$ [$\text{dppm} = 1,2\text{-Bis(diphenylphosphino)methane}$ and $\text{dppb} = 1,4\text{-Bis(diphenylphosphino)butane}$]. **Polyhedron**, Great Britain, v. 18, p. 2079–2083, 1999.

BATISTA, A. A. *et al.* Electrochemical and spectroscopic studies on $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N})_2$ and $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N-N})$ complexes ($\text{N} = \text{pyridine derivatives}$ and $\text{N-N} = \text{phenanthroline or bipyridine derivatives}$). X-ray structure of $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{phen})$. **Polyhedron**, Great Britain, v. 20, p. 2123–2128, 2001.

BAYARI, S.; ATAÇ, A.; YURDAKUL, Ş. Coordination behaviour of nicotinamide: An infrared spectroscopic study. **Journal of Molecular Structure**, Portugal, v. 655, n. 1, p. 163–170, 2003.

BERGERS, G.; HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 592–603, 2008.

BHATTACHARYYA, A. *et al.* Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 94, p. 329–354, 2014.

BOER, D. R.; CANALS, A.; COLL, M. DNA-binding drugs caught in action: The latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Transactions**, [S. l.], n. 3, p. 399–414, 2009.

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 376, p. 75 - 94, 2018.

BRESSAN, M.; RIGO, P. Five-Coordinate Complexes of Ruthenium (II) with Di(tertiaryphosphines). **Inorganic Chemistry**, Michigan, v. 14, n. 9, p. 2286–2288, 1975.

BUQUÉ, A. *et al.* Possible mechanisms of cancer prevention by nicotinamide. **British Journal of Pharmacology**, Great Britain, v. 178, n. 10, p. 2034 – 2040, 2020.

BURIAN, M. *et al.* Ruthenium based photosensitizer/catalyst supramolecular architectures in light driven water oxidation. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 454, p. 171–175, 2017.

CAMPAGNA, R. *et al.* Beyond nicotinamide metabolism: Potential role of nicotinamide n-methyltransferase as a biomarker in skin cancers. **Cancers**, [S. l.], v. 13, n. 19, 2021.

CANDIDO, C. C. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of ruthenium(II) metronidazole complexes: Cell cycle progression at G1/S transition and apoptosis induction in MCF-7 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 237, p. 1 - 12, 2022.

CARAMORI, G. F. *et al.* Ruthenium nitrosyl complexes containing pyridine-functionalized carbenes - A theoretical insight. **Journal of Organometallic Chemistry**, [S. l.], v. 800, p. 54–60, 2015.

CARMICHAEL, D. *et al.* Ruthenium(II) complexes of a 2,2'-biphosphinine. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 200, p. 437–441, 1992.

CASTANEDA, M. *et al.* Mechanisms of cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 87, p. 17–31, 2022.

CHAVES, O. A. *et al.* Multi-spectroscopic and theoretical analysis on the interaction between human serum albumin and a Capsaicin derivative—RPF101. **Biomolecules**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2018.

CHEN, A. C. *et al.* A Phase 3 Randomized Trial of Nicotinamide for Skin-Cancer Chemoprevention. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 373, n. 17, p. 1618–1626, 2015.

CLAVEL, C. M. *et al.* Modulating the anticancer activity of ruthenium(II)-arene complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 8, p. 3356–3365, 2015.

COE, B. J.; GLENWRIGHT, S. J. Trans-effects in octahedral transition metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v.203, p. 5 – 80, 2000.

COLINA-VEGAS, L. *et al.* 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**, [S. l.], v. 153, p. 150–161, 2015.

CONTI, L. *et al.* Combination of light and Ru(II) polypyridyl complexes: Recent advances in the development of new anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 469, p. 1 – 54, 2022.

CRUSIO, W. E.; RADEKE, H. H. **Advances in Experimental Medicine and Biology Series Editors**. 3^a ed. Springer, Germany, 2019.

CRYSALIS PRO. Agilent, Agilent Technologies Ltd, Yarnton. Oxfordshire, England, 2014.
CULLEN, J. K. *et al.* Topical treatments for skin cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Oxfordshire, v. 153, p. 54–64, 2020.

CUNHA, S. MÉTODOS SIMPLES DE FORMAÇÃO DE MONOCRISTAL DE SUBSTÂNCIA ORGÂNICA PARA ESTUDO ESTRUTURAL POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 906–909, 2008.

DE GRANDIS, R. A. *et al.* A Novel Ruthenium(II) Complex With Lapachol Induces G2/M Phase Arrest Through Aurora-B Kinase Down-Regulation and ROS-Mediated Apoptosis in Human Prostate Adenocarcinoma Cells. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 11, p. 1 – 18, 2021.

DEMORO, B. *et al.* Interaction with blood proteins of a Ruthenium(II) nitrofuryl semicarbazone complex: Effect on the antitumoral activity. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 16, 2019.

DEWANJEE, S. *et al.* Edible leaf extract of *Ipomoea aquatica* Forssk. (Convolvulaceae) attenuates doxorubicin-induced liver injury via inhibiting oxidative impairment, MAPK activation and intrinsic pathway of apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 105, p. 322–336, 2017.

DIAS, J. *et al.* Novel ruthenium(II) complexes with cimetidine: DFT calculations and in vitro cytotoxic activities against glioblastoma cell lines. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 506, p. 1 – 8, 2020.

DIAS, J. S. M. *et al.* Pro-apoptotic activity of ruthenium 1-methylimidazole complex on non-small cell lung cancer. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 187, p. 1–13, 2018.

DIAS, J. S. M. *et al.* Novel ruthenium(III) complexes with hydroxybenzophenones: Experimental and theoretical characterization and: In vitro leishmanicidal activity comparing complexes and ligands. **New Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 45, n. 17, p. 7501–7515, 2021.

DIMBARRE LAO GUIMARÃES, I. *et al.* Synthesis, characterization and anticancer activities of cationic η^6 -p-cymene ruthenium (II) complexes containing phosphine and nitrogenous ligands. **Polyhedron**, Great Britain, v. 224, p. 1 – 18, 2022.

DOLOMANOV, O. V. *et al.* OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. **Journal of Applied Crystallography**, [S. l.], v. 42, p. 339 – 341, 2009.

DYKEMAN, R. R. *et al.* Catalytic deoxygenation of terminal-diols under acidic aqueous conditions by the ruthenium complexes $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{X})(\text{N}\cap\text{N})](\text{OTf})_n$, X = H₂O, H, η^6 -arene = p-Me-ⁱPr-C₆H₄, C₆Me₆, N \cap N= bipy, phen, 6,6'-diamino-bipy, 2,9-diamino-phen, n= 1, 2) Influence of the ortho-amine substituents on catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [S. l.], v. 277, n. 1, p. 233–251, 2007.

ELGRISHI, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

EL-SHWINIY, W. H. *et al.* Structural elucidation, molecular modeling, and biological and antioxidant studies of phenanthroline/nicotinamide metals complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, [S. l.], v. 35, n. 6, 2021.

FAIHAN, A. S. *et al.* Antibacterial, spectroscopic and X-ray crystallography of newly prepared heterocyclic thiourea dianion platinum(II) complexes with tertiary phosphine ligands. **Polyhedron**, Great Britain, v. 212, p. 1 – 5, 2022.

FARRUGIA, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: An update. **Journal of Applied Crystallography**, [S. l.], v. 45, p. 849 – 854, 2012.

FERREIRA-SILVA, G. Á. *et al.* Casearin D inhibits ERK phosphorylation and induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 38, p. 27–32, 2017a.

FERREIRA-SILVA, G. A. *et al.* [Ru(pipe)(dppb)(bipy)]PF₆: A novel ruthenium complex that effectively inhibits ERK activation and cyclin D1 expression in A549 cells. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 44, p. 382–391, 2017b.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRIEDERICH, J. A.; BUTTERWORTH, J. F. Sodium Nitroprusside: Twenty Years and Counting. **International Anesthesia Research Society**, [S. l.], v. 81, p. 152–162, 1995.

FULMER, G. R. *et al.* NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 2176–2179, 2010.

GAO, Y. The multiple actions of NO. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 459, p. 829 - -839, 2010.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Review**, [S. l.], v. 7, p. 81–122, 1971.

GHOSH, G. *et al.* Cyclometalated Ruthenium(II) Complexes Derived from α -Oligothiophenes as Highly Selective Cytotoxic or Photocytotoxic Agents. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 13, p. 7694–7712, 2018.

GICHUMBI, J. M.; FRIEDRICH, H. B.; OMONDI, B. Synthesis and characterization of piano-stool ruthenium complexes with N,N'-pyridine imine bidentate ligands and their application in styrene oxidation. **Journal of Organometallic Chemistry**, [S. l.], v. 808, p. 87–96, 2016.

GILL, M. R. *et al.* A ruthenium polypyridyl intercalator stalls DNA replication forks, radiosensitizes human cancer cells and is enhanced by Chk1 inhibition. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 1 -13, 2016.

GIUGLIANO, F. *et al.* First line treatment of BRAF mutated advanced melanoma: Does one size fit all? **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 99, p. 1 – 9, 2021.

GLASS, L. T. S. *et al.* Semi-automated high-throughput fluorescent intercalator displacement-based discovery of cytotoxic DNA binding agents from a large compound library. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 1685–1688, 2010.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. Nitrosyl-Nitrite Interconversion in Ruthenium Complexes. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 10, p. 2150–2153, 1971.

GOLFETO, C. C. **Nitrosilo complexos de rutênio: Síntese, caracterização e avaliação de suas potencialidades citotóxicas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2005.

GOLFETO, C. C. *et al.* Synthesis, characterization and cytotoxic activities of the [RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆ complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 489–495, 2010.

GOODEN, V. M. *et al.* The synthesis and characterization of monomeric complexes of Ru(bpy)₂ with dihydroxyanthraquinones. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 255, p. 105 – 110, 1997.

GRAMINHA, A. E. *et al.* Evaluation of the biological potential of ruthenium(II) complexes with cinnamic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 206, p. 1 – 15, 2020.

GUICHARD, N. *et al.* Antineoplastic drugs and their analysis: A state of the art review. **Analyst. Royal Society of Chemistry**, [S. l.], v. 142, n. 13, p. 2273 - 2321, 2017.

H WHIFFEN, B. D. Vibrational Frequencies and Thermodynamic Properties of Fluoro-, Chloro-, Bromo-, and Iodo-benzene. **Journal of the Chemical Society**, [S. l.], v. 1, p. 1350–1356, 1956.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEINRICH, T. A. *et al.* A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 3616–3622, 2011.

HUANG, H. *et al.* Targeting nucleus DNA with a cyclometalated dipyrrophenazine ruthenium(II) complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 21, p. 8971–8983, 2014.

HUANG, H. *et al.* Highly Charged Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes as Lysosome-Localized Photosensitizers for Two-Photon Photodynamic Therapy. **Angewandte Chemie**, [S. l.], v. 127, n. 47, p. 14255–14258, 2015.

HULVAT, M. C. Cancer Incidence and Trends. **Surgical Clinics of North America** W.B. Saunders, [S. l.], v. 100, p. 469 - 481, 2020.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. 1^a ed. GIZ, São Paulo, 2004.

IRAWATI, W. *et al.* Radiotherapy Treatment for Melanoma Skin Cancer Disease. **Bioeduscience**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 154–159, 2021.

ISLAM, P.; HORWITZ, M. E. Small-molecule nicotinamide for ex vivo expansion of umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, [S. l.], v. 80, p. 11–15, 2019.

JAYANTHI, E. *et al.* Solvent assisted formation of ruthenium (III) and ruthenium (II) hydrazone complexes in one-pot with potential in vitro cytotoxicity and enhanced LDH, NO and ROS release. **Dalton Transactions**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 1693–1707, 2016.

JIA, F. *et al.* Recent developments in the interactions of classic intercalated ruthenium compounds: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ with a DNA Molecule. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 4, 2019.

JOZEFÍKOVÁ, F. *et al.* In vitro biological activity of copper(II) complexes with NSAIDs and nicotinamide: Characterization, DNA- and BSA-interaction study and anticancer activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 228, p. 111696 – 111696, 2022.

JUNGWIRTH, U. *et al.* Anticancer activity of metal complexes: Involvement of redox processes. **Antioxidants and Redox Signaling**, France, v. 15, n. 4, p. 1085–1127, 2011.

KAMM, A. *et al.* Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. **Nitric Oxide**, [S. l.], v. 93, p. 102 - 114, 2019.

KANAOUJIYA, R. *et al.* Recent advances and application of ruthenium complexes in tumor malignancy. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 72, p. 2822 – 2827, 2023.

KASAKOVSKI, D. *et al.* Advances in targeting cutaneous melanoma. **Cancers**, [S. l.], v. 13, n. 9, 2021.

KEENE, F. R.; SMITH, J. A.; COLLINS, J. G. Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 253, n. 15–16, p. 2021–2035, 2009.

KETTLE, S. F. A. **Physical Inorganic Chemistry: A Coordination Chemistry Approach**. 1^a ed. British Library Cataloguing, British, 1998.

KŁOS, P.; CHLUBEK, D. Plant-Derived Terpenoids: A Promising Tool in the Fight against Melanoma. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 3, 2022.

KOMARNICKA, U. K. *et al.* Selective Cu(I) complex with phosphine-peptide (SarGly) conjugate contra breast cancer: Synthesis, spectroscopic characterization and insight into cytotoxic action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 186, p. 162–175, 2018.

KUMAR, M. *et al.* 3- **Advances in Metallodrugs: Preparation and Applications in Medicinal Chemistry**. 1^a ed. Scrivener Publishing, Nova Jersey, p. 71–114, 2020.

KUZNETSOV, V. F. *et al.* Chiral ruthenium complexes of N,N'-bis(diphenylphosphino) 1,2-diamines. **Organometallics**, [S. l.], v. 21, n. 20, p. 4241–4248, 2002.

KVIETYS, P.; GRANGER, D. N. Mediators and Mechanisms of the Increased Blood Flow, Vascular Permeability, and Blood Vessel Proliferation in Inflamed Tissue. **Pathobiology of Human Disease**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 244–257, 2014.

LEE, S. Y.; KIM, C. Y.; NAM, T. G. Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives. **Drug Design, Development and Therapy**, [S. l.], v. 14, p. 5375 – 5392, 2020.

LEVER, A. B. P. **Inorganic Electronic Spectroscopy**. 2^a. Ed. Elsevier, Amsterdam, 1984.

LI, L.; LI, L. Recent advances in multinuclear metal nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 306, p. 678 - 700, 2016.

LIANG, J. X. *et al.* Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 177, p. 276–286, 2017.

LIANG, L. *et al.* Synthesis and characterization of polypyridine ruthenium(II) complexes and anticancer efficacy studies in vivo and in vitro. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 236, p. 1 – 16, 2020.

LIU, Y. *et al.* Ruthenium-porphyrin complexes induce apoptosis by inhibiting the generation of intracellular reactive oxygen species in the human hepatoma cell line (HepG2). **European Journal of Inorganic Chemistry**, [S. l.], n. 12, p. 1974–1980, 2011.

LOURENÇO, C. F. *et al.* Neurovascular-neuroenergetic coupling axis in the brain: master regulation by nitric oxide and consequences in aging and neurodegeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 108, p. 668 - 682, 2017.

LÚCIA DE ALMEIDA, V. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

MACFARLANE, K. S. *et al.* Characterization of Five-Coordinate Ruthenium(II) Phosphine Complexes by X-ray Diffraction and Solid-State ³¹P CP/MAS NMR Studies and Their Reactivity with Sulfoxides and Thioethers. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 35, p. 7304–7310, 1996.

MACRAE, C. F. *et al.* Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, [S. l.], v. 41, p.466 – 470, 2008.

MAŁECKI, J. G. Synthesis, crystal, molecular and electronic structures of hydride carbonyl ruthenium(II) complexes with pyridine and its derivative ligands. **Polyhedron**, Great Britain, v. 30, n. 1, p. 79–85, 2011.

MAŁECKI, J. G.; JAWORSKA, M.; KRUSZYNSKI, R. Synthesis, molecular, crystal and electronic structure of [RuCl₃(NO)(PPh₃)(HPz)]. **Polyhedron**, Great Britain, v. 24, n. 2, p. 359–368, 2005.

MAŁECKI, J. G.; MAROŃ, A. Study on molecular and electronic structures, and spectroscopic properties of azide ruthenium complexes with pyridine and β -picoline ligands. **Polyhedron**, Great Britain, v. 31, n. 1, p. 44–50, 2012.

MALESU, R. *et al.* Nicotinamide for skin cancer chemoprevention: Effects of nicotinamide on melanoma: In vitro and in vivo. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 19, n. 2, p. 171–179, 2020.

MARA DE OLIVEIRA, K.; AZEVEDO BATISTA, A.; CNPQ, B. **Complexos de Rutênio Contendo Lapachol e Lausona: Síntese, Caracterização e suas Propriedades Quimioterapêuticas**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2014.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. Chemistry and colors. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 1508–1534, 2015.

MCCAIN, J. *et al.* Photophysical Properties and Photobiological Activities of Ruthenium(II) Complexes Bearing π -Expansive Cyclometalating Ligands with Thienyl Groups. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 16, p. 10778–10790, 2019.

MCCLEVERTY, J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 104, p. 403 – 418, 2004.

MEDICI, S. *et al.* Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 284, p. 329–350, 2015.

MEDINA-FRANCO, J. L. *et al.* Bridging informatics and medicinal inorganic chemistry: Toward a database of metallodrugs and metallodrug candidates. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1420–1430, 2022.

MILTON, A. *et al.* Infrared and laser Raman studies of $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{dppe})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{dppe})_2\text{Cl}_2]\text{PF}_6$ (dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane). **Spectrochimica Acta Part A**, [S. l.], v. 58, p. 1703 – 1712, 2002.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress incytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 79, p. 237–240, 2000.

MIRANDA, R. R.; SAMPAIO, I.; ZUCOLOTTO, V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 210, p. 1 – 13, 2022.

MESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química Inorgânica**. 5^a ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 2014.

MOLLAEI, M. *et al.* Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? **Translational Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 5, 2021.

MONDELLI, M. A. *et al.* Ruthenium(II)/4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine complexes: Synthesis, characterization, X-ray structures and in vitro cytotoxicity activities on cancer cell lines. **Polyhedron**, Great Britain, v. 68, p. 312–318, 2014.

MONRO, S. *et al.* Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. **Chemical Reviews American Chemical Society**, [S. l.], v. 119, n. 2, p. 797 - 828, 2019.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry**. 6^a ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances - Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [S. l.], v. 14, p. 53 – 71, 2013.

NEGRETI, A. A. *et al.* Ruthenium(ii) complex containing cinnamic acid derivative inhibits cell cycle progression at G0/G1 and induces apoptosis in melanoma cells. **New Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 7, p. 3325–3337, 2022.

NETO, G. L. B. *et al.* INTERAÇÕES COMPETITIVAS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO DIMETILSULFÓXIDO E LIGANTES N-HETEROCÍCLICOS COM ALBUMINA DE SORO HUMANO. **Química Nova**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 261–270, 2020.

NOVOHRADSKY, V. *et al.* Organoruthenium Complexes with C^N Ligands are Highly Potent Cytotoxic Agents that Act by a New Mechanism of Action. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 23, n. 61, p. 15294–15299, 2017.

OLIVEIRA, K. M. *et al.* Ruthenium(II)/triphenylphosphine complexes: An effective way to improve the cytotoxicity of lapachol. **Polyhedron**, Great Britain, v. 130, p. 108–114, 2017.

OLIVEIRA, K. M. *et al.* Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 214, p. 1- 14, 2021.

PAL, S. **Pyridine: A Useful Ligand in Transition Metal Complexes**. 1^a ed. InTech, Oxford, 2018.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, [S. l.], v. 333, p. 664–666, 1988.

PATATT, F. S. A. *et al.* Ototoxic effects of antineoplastic drugs: a systematic review. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 130 - 140, 2022.

PATEL, H. *et al.* Current advances in the treatment of braf-mutant melanoma. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 2, 2020.

PAVAN, F. R. *et al.* Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011.

PECORA, A. *et al.* Skin cancers and the contribution of rho GTPase signaling networks to their progression. **Cancers**, [S. l.], v. 13, n. 17, 2021.

PESTANA, C. R. *et al.* Effects on mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 24–30, 2009.

PFEIFER, G. P.; BESARATINIA, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 90–97, 2012.

PISSIOS, P. Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 340 - 353, 2017.

POELHSITZ, G. V. **Nitrosilo complexos de rutênio com ligantes bifosfínicos: Espectroscopia, eletroquímica, estudo da reatividade e liberação de NO**. 2005. 284 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2005.

POURMADADI, M. *et al.* Cisplatin-loaded nano formulations for cancer therapy: A comprehensive review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 77, p. 1–19, 2022.

PRAGTI; KUNDU, B. K.; MUKHOPADHYAY, S. Target based chemotherapeutic advancement of ruthenium complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 448, p. 1 - 40, 2021.

QUEIROZ, S.; BATISTA, A. Complexos fosfínicos e suas aplicações na Medicina. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 651–659, 1996.

QUEIROZ, S. L. *et al.* The reactivity of five-coordinate Ru (II) (1,4-bis (diphenylphosphino) butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenediamine. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 267, p. 209–221, 1998.

RAJAPAKSE, M.; DUNUWEERA, S. Discovery, Chemistry, Anticancer Action and Targeting of Cisplatin. **International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 65–74, 2017.

RAMADEVI, P. *et al.* Ruthenium complexes of ferrocene mannich bases: DNA/BSA interactions and cytotoxicity against A549 cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [S. l.], v. 305, p. 1–10, 2015.

RANDIC, T. *et al.* NRAS mutant melanoma: Towards better therapies. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 99, p. 1 -12, 2021.

REDDY, T. S. *et al.* Synthesis of gold(I) phosphine complexes containing the 2-BrC₆F₄PPh₂ ligand: Evaluation of anticancer activity in 2D and 3D spheroidal models of HeLa cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 145, p. 291–301, 2018.

RELIGIONI, U. Cancer incidence and mortality in Poland. **Clinical Epidemiology and Global Health**, [S. l.], v.8, p. 329 – 334, 2020.

RIBEIRO, G. H. *et al.* Ruthenium(II) phosphine/mercapto complexes: Their in vitro cytotoxicity evaluation and actions as inhibitors of topoisomerase and proteasome acting as possible triggers of cell death induction. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 20, p. 15004–15018, 2020.

RIETVELD, H. M. Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement. **Acta Crystallographica**, [S. l.], v. 22, p. 151–152, 1967.

RIETVELD, H. M. A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures. **Journal of Applied Crystallography**, [S. l.], v. 2, p. 65–71, 1969.

RILAK SIMOVIĆ, A. *et al.* Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 338, p. 1 – 26, 2019.

ROSA, I. M. L. **Síntese, cristalquímica e atividade biológica de complexos de Paládio (II), Cobre (II) e Níquel (II) com benzofenonas hidroxiladas**. 2012. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, MG.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability1. **Biochemistry**, [S. l.], v. 20, p. 3096–3102, 1981.

SANTOS, Edjane Rocha dos. **Síntese e caracterização de complexos de fórmula geral [Ru(AA)(P-P)(N-N)]PF₆, onde (AA= aminoácidos; P-P= bifosfinas; N-N= 2,2'-bipiridina e derivados e 1,10-fenantrolina) – Avaliação de suas potencialidades citotóxicas**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

SANTIAGO, O. M. **Síntese, caracterização e estudos cinéticos da isomerização de compostos de Ru (II) contendo ligantes (X-bipy)**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

SAJJAD HOSSAIN, M. *et al.* Synthesis, Characterization and Biological Activity Studies of Mixed Ligand Complexes with Schiff base and 2,2'-Bipyridine. **International Journal of Applied Science-Research and Review**, [S. l.], v. 6, p. 1–7, 2019.

SASAHARA, G. L. *et al.* Nitro-imidazole-based ruthenium complexes with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 206, p. 1 – 12, 2020.

SCHODER, M.; STEPHENSON, T. A. Ruthenium. **Comprehensive Coordination Chemistry. The synthesis, reactions and applications of coordination compounds**. 1 ed. Nova Iorque, Pergamon Press, 1987.

SERLI, B. *et al.* Coordination and release of NO by ruthenium-dimethylsulfoxide complexes - Implications for antimetastases activity. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. 1.], v. 254, p. 73 - 83 2003.

SHANG, L. *et al.* PH-dependent protein conformational changes in albumin: Gold nanoparticle bioconjugates: A spectroscopic study. **Langmuir**, [S. 1.], v. 23, n. 5, p. 2714–2721, 2007.

SHARMA, N. *et al.* Photo controlled release of nitric oxide (NO) from amphiphilic and nanoscale vesicles-based ruthenium nitrosyl complex: NO release and cytotoxicity studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [S. 1.], v. 425, p. 1 – 10, 2022.

SHARNIN, V. A. *et al.* Stability of H-complexes of nicotinamide nitrogen heteroatom with water and ethanol in mixed solvents by ¹³C NMR probing. **Magnetic Resonance in Chemistry**, [S. 1.], v. 51, n. 4, p. 193–198 2013.

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, [S. 1.], v. 71, p. 3–8, 2015.

SHILPA, M. *et al.* DNA-interactions of ruthenium(II) & cobalt(III) phenanthroline and bipyridine complexes with a planar aromatic ligand 2-(2-fluoronyl)1H-imidazo[4,5- f][1,10-Phenanthroline]. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, [S. 1.], v. 70, n. 1–2, p. 187–195, 2011.

SILVA, H. V. R. *et al.* Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, Great Britain v. 144, p. 55–65, 2018.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. LTC, New York, 2006.

SIMON, T. M. *et al.* Inhibitory effects of a new oral gold compound on HELLA cells. **Cancer**, [S. 1.], v. 44, p. 1965–1975, 1979.

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**, [S. 1.], v.124, p. 1 – 19, 2013.

SMITH, N. A. *et al.* Synthesis, characterisation and dynamic behavior of photoactive bipyridyl ruthenium(II)-nicotinamide complexes. **Inorganica Chimica Acta**, [S. 1.], v. 454, p. 240–246, 2017.

STEPHENSON, T. A.; WILKINSON, G. NEW COMPLEXES OF RUTHENIUM (II) AND (III) WITH TRIPHENYLPHOSPHINE, TRIPHENYLARSINE, TRICHLOROSTANNATE, PYRIDINE AND OTHER LIGANDS. **Journal Inorganic and Nuclear Chemistry**, [S. 1.], v. 28, p. 279, 1966.

SUDHINDRA, P. *et al.* Recent advances in cytotoxicity, cellular uptake and mechanism of action of ruthenium metallodrugs: A review. **Polyhedron**, Great Britain, v. 192, p. 1 - 32, 2020.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAO, H. YU *et al.* The development of human serum albumin-based drugs and relevant fusion proteins for cancer therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 187, p. 24 - 34, 2021.

TENNYSON, A. G.; LIPPARD, S. J. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. **Chemistry and Biology**, [S. l.], v.18, n.10, 2011.

TFOUNI, E. *et al.* Tailoring NO Donors Metallo pharmaceuticals: Ruthenium Nitrosyl Ammines and Aliphatic Tetraazamacrocycles. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v.17, p. 3643 – 3657, 2010.

TFOUNI, E. *et al.* Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [S. l.], v. 26, n.1, p.38 – 53, 2012.

THOTA, S. *et al.* Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 14, p. 5805–5821, 2018.

TONG, L. *et al.* First-row transition metal polypyridine complexes that catalyze proton to hydrogen reduction. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 402, p. 1 – 22, 2020.

UIVAROSI, V. *et al.* Thermal degradation behavior of some ruthenium complexes with fluoroquinolone derivatives as potential antitumor agents. **Journal Thermal Anal Calorim**, [S. l.], v.1, p. 645–650, 2011.

VALLE, E. M. A. *et al.* Driving forces in substitution reactions of octahedral complexes: The influence of the competitive effect. **Polyhedron**, Great Britain, v. 28, n. 16, p. 3473–3478, 2009.

VALLE, M. *et al.* SOBRE UMA DEGENERESCÊNCIA ACIDENTAL NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ EM COMPLEXOS DIFOSFÍNICOS DE RUTÊNIO. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 807 – 812, 2008.

VON POELHSITZ, G. *et al.* *fac*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (I) and *mer*-[RuCl₃(NO)(diop)] (II) complexes: syntheses, characterization and X-ray structures. **Polyhedron**, Great Britain, v. 21, p. 2221 – 2225, 2002.

VON POELHSITZ, G. *et al.* Influence of ligands on the *fac* underover(\rightleftharpoons , Δ , h v) *mer* isomerization in [RuCl₃(NO)(P-P)] complexes. **Inorganica Chimica Acta**, [S. l.], v. 359, n. 9, p. 2896–2909, 2006.

WALTON, L. R. *et al.* The reactions of $\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{PPh}_3)_2$ and $\text{RuCl}_3(\text{NO})\cdot\text{H}_2\text{O}$ with $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{P}(\text{O})\text{Ph}_2$, $n=1, 2$, or 3 : Crystal structures of ruthenium nitrosyl complexes containing monodentate and chelating $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{P}(\text{O})\text{Ph}_2$ ligands. **Polyhedron**, Great Britain, v. 144, p. 44–54, 2018.

WANG, Z. *et al.* Multi-targeted organometallic ruthenium(II)-arene anticancer complexes bearing inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1: A strategy to improve cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 131, p. 47–55, 2014.

WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 269–282, 1965.

WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA. **American Chemical Society**, [S. l.], v. 26, p. 6392 – 6396, 1987.

WUDDIVIRA, M. N. *et al.* Estimation of Soil Clay Content from Hygroscopic Water Content Measurements. **Soil Science Society of America Journal**, [S. l.], v. 76, n. 5, p. 1529–1535, 2012.

YANG, X. *et al.* Ruthenium methylimidazole complexes induced apoptosis in lung cancer A549 cells through intrinsic mitochondrial pathway. **Biochimie**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 345–353, 2012.

YILMAZ, V. T. *et al.* Di- and polynuclear silver(I) saccharinate complexes of tertiary diphosphane ligands: Synthesis, structures, in vitro DNA binding, and antibacterial and anticancer properties. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 29–44, 2014.

YIP, A. M. H.; LO, K. K. W. Luminescent rhenium(I), ruthenium(II), and iridium(III) polypyridine complexes containing a poly(ethylene glycol) pendant or bioorthogonal reaction group as biological probes and photocytotoxic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 361, p. 138 – 163, 2018.

YOUSUF, I. *et al.* Advancement of metal compounds as therapeutic and diagnostic metallodrugs: Current frontiers and future perspectives. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 445, p. 1–30, 2021a.

ZENG, L. *et al.* Ruthenium(II) Complexes with 2-Phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline Derivatives that Strongly Combat Cisplatin-Resistant Tumor Cells. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 1- 13, 2016.

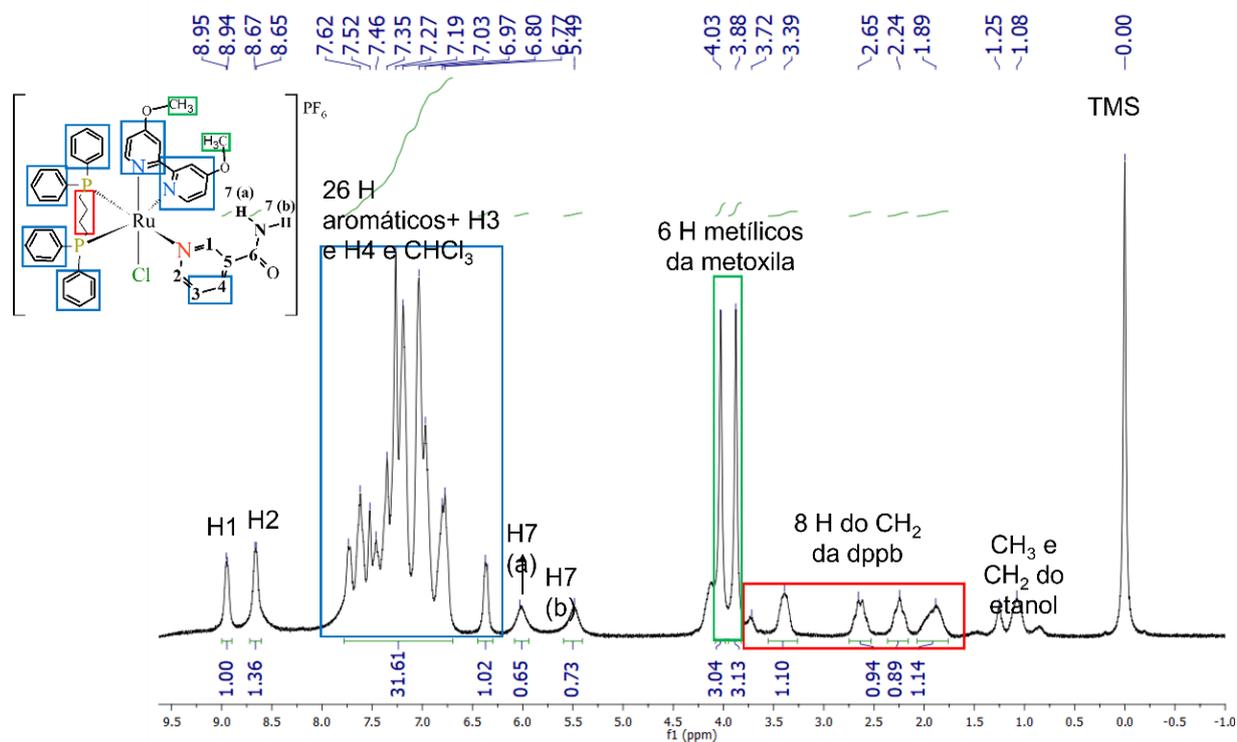
ZENG, L. *et al.* The development of anticancer ruthenium(II) complexes: From single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 46, p.5771 - 5804, 2017.

ZHAO, X. *et al.* New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. **Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 114, n. 16, p. 5625–5631, 2010.

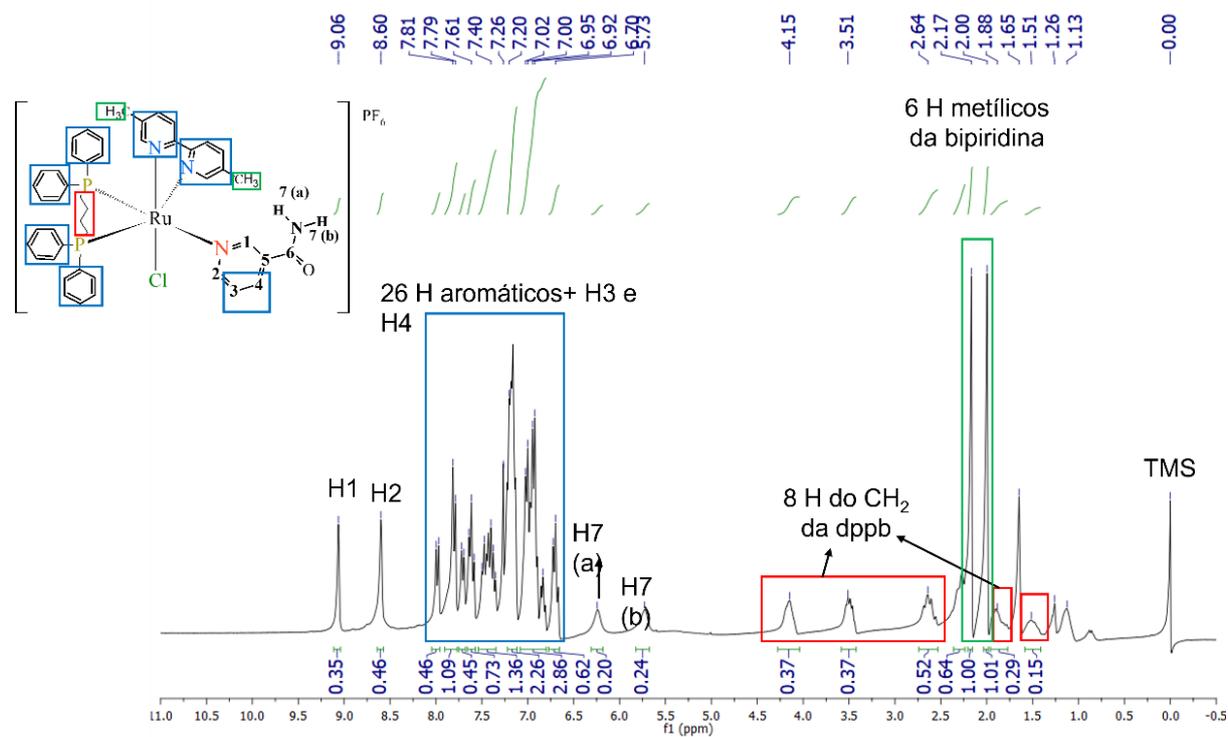
ZHAO, X. *et al.* The interaction between Ag^+ and bovine serum albumin: A spectroscopic investigation. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 409, n. 5, p. 892–897, 2011.

ZHONG, Y. J. *et al.* Anticancer effects of Ac-Phe-Lys-PABC-doxorubicin via mitochondria-centered apoptosis involving reactive oxidative stress and the ERK1/2 signaling pathway in MGC-803 cells. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 1681–1686, 2013.

ANEXO A - MATERIAL SUPLEMENTAR

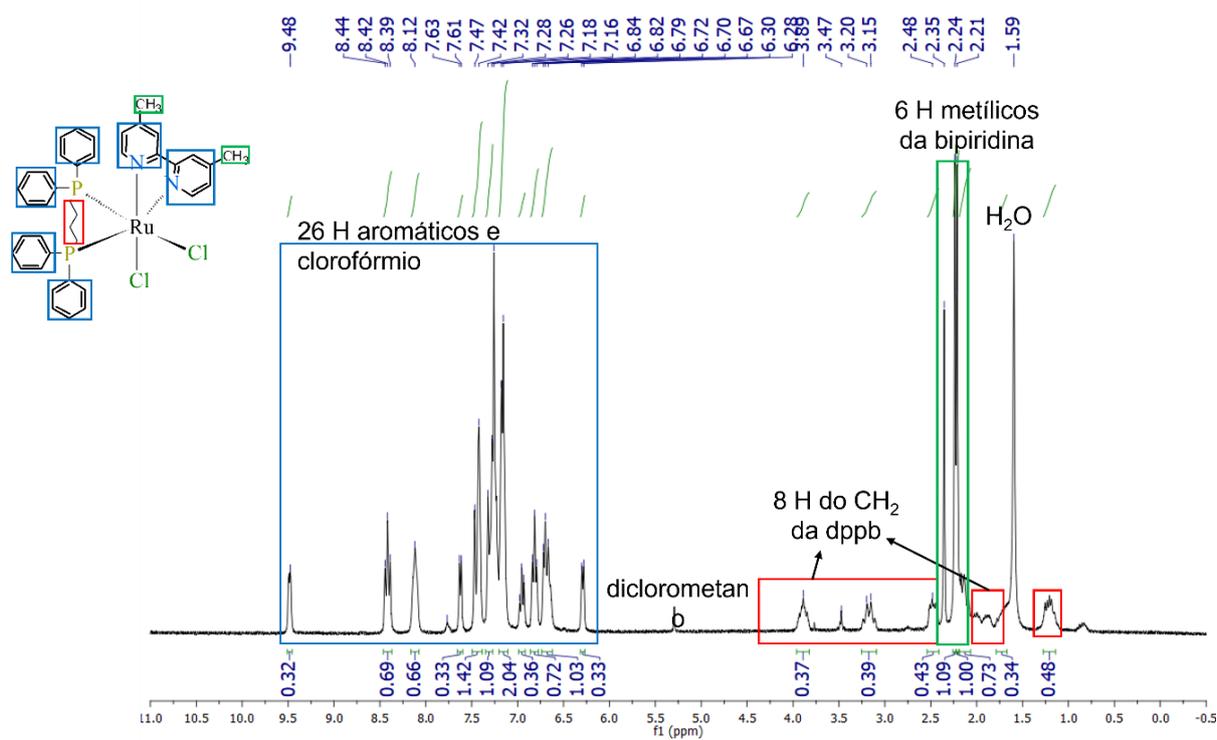
Figura A1: Espectro de RMN de ^1H do complexo **C2** em CDCl_3 

Fonte: do autor

Figura A2: Espectro de RMN de ^1H do complexo **C3** em CDCl_3 

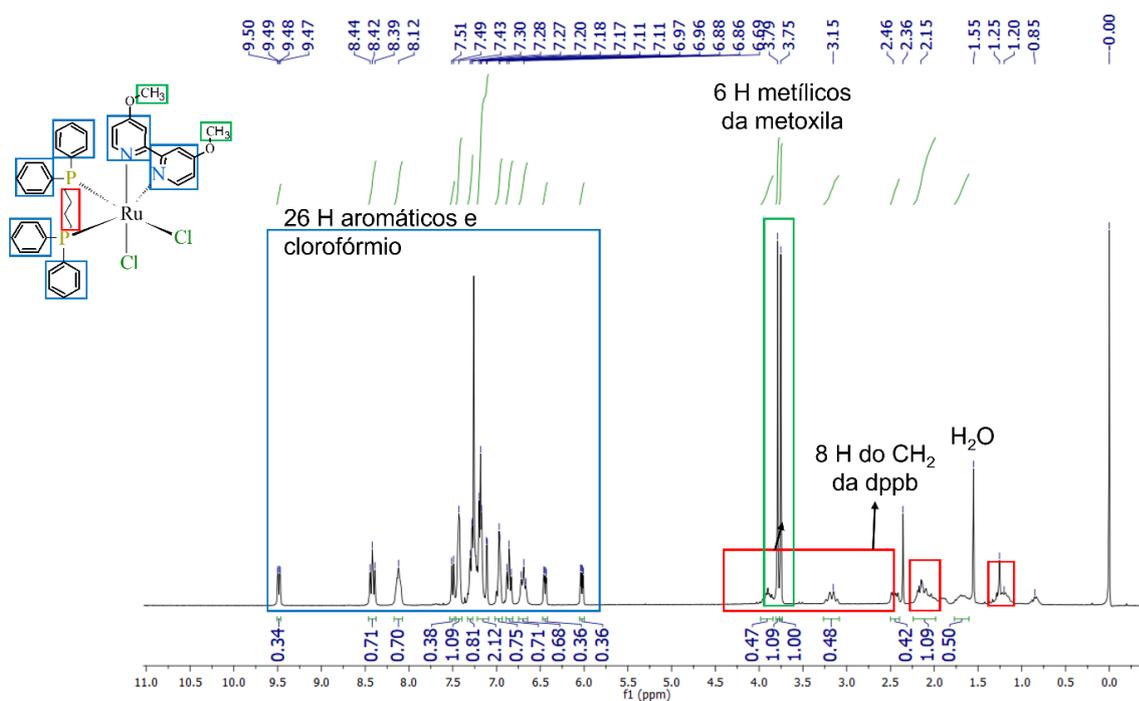
Fonte: do autor.

Figura A3: Espectro de RMN de ^1H do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$ em CDCl_3

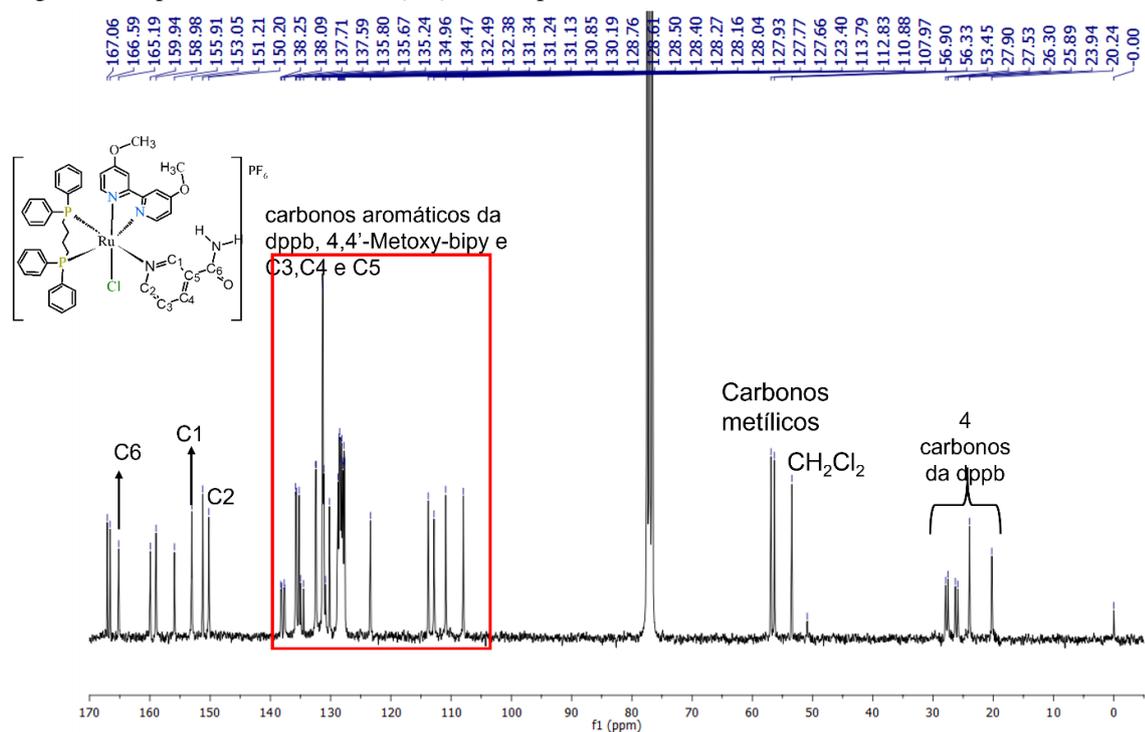


Fonte: do autor.

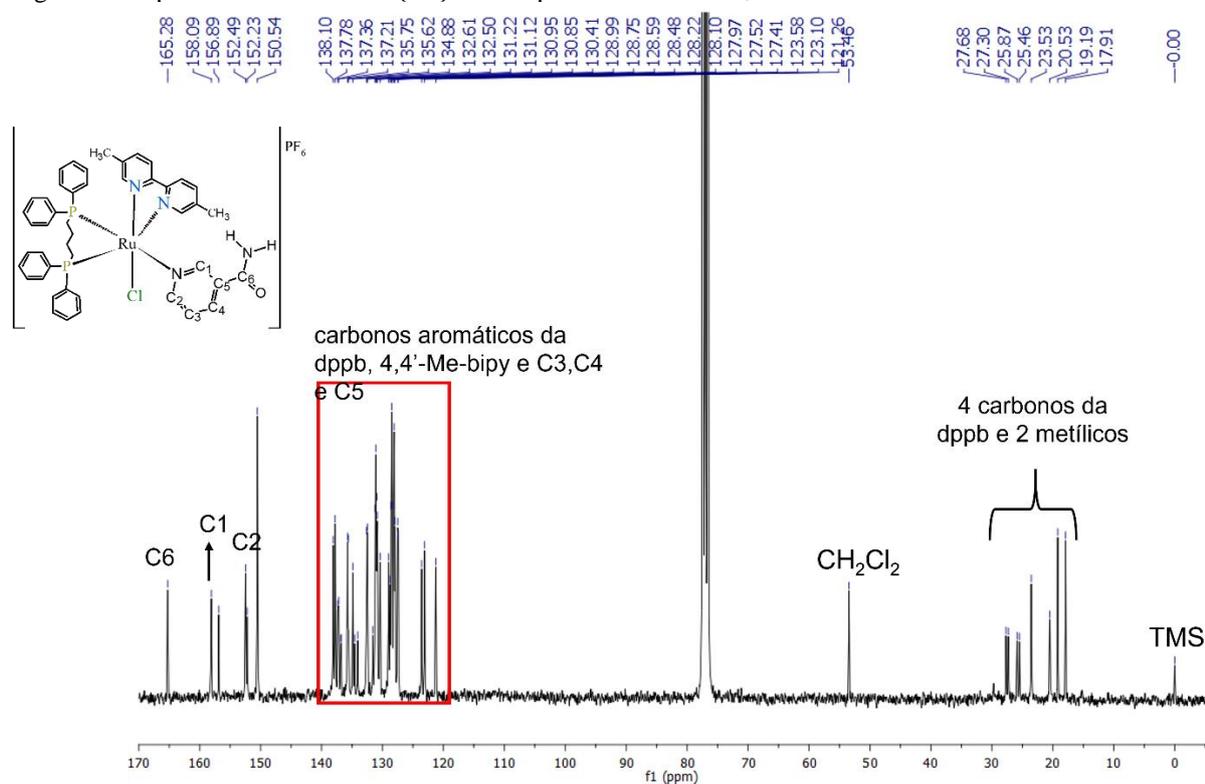
Figura A4: Espectro de RMN de ^1H do complexo precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxi-bipy})]$ em CDCl_3



Fonte: do autor.

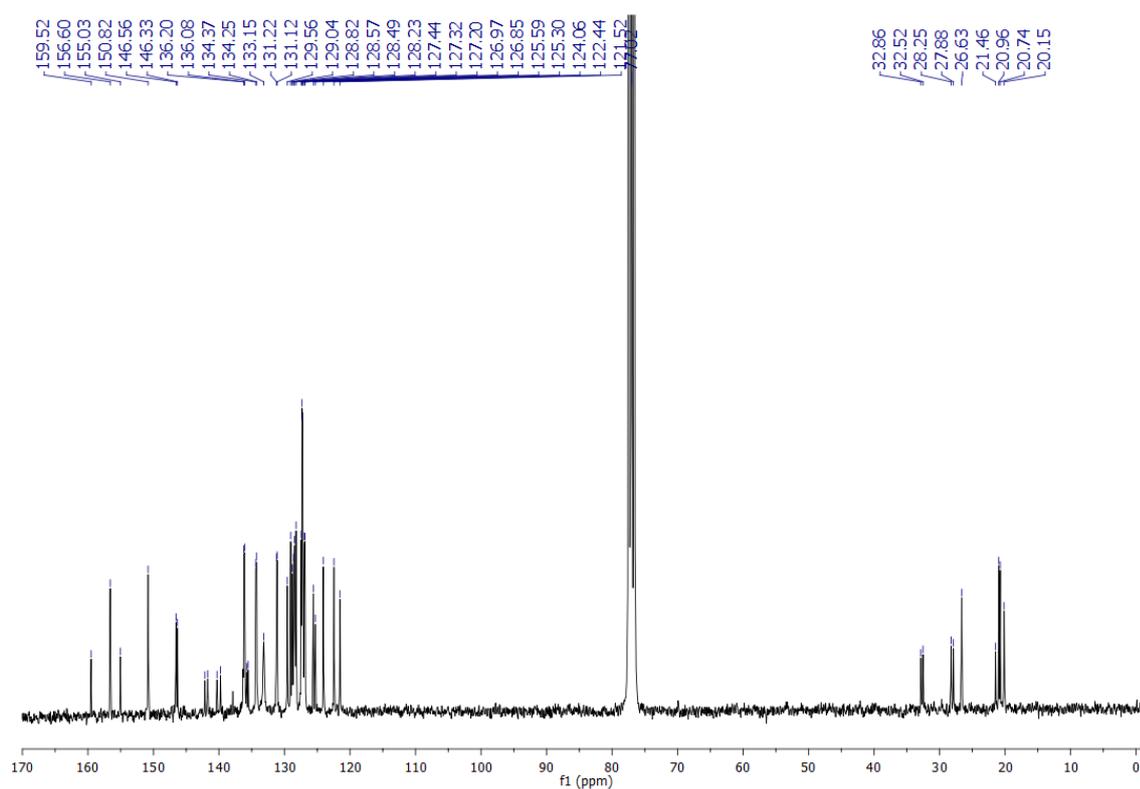
Figura A5: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **C2** em CDCl_3 .

Fonte: do autor

Figura A6: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo **C3** em CDCl_3 .

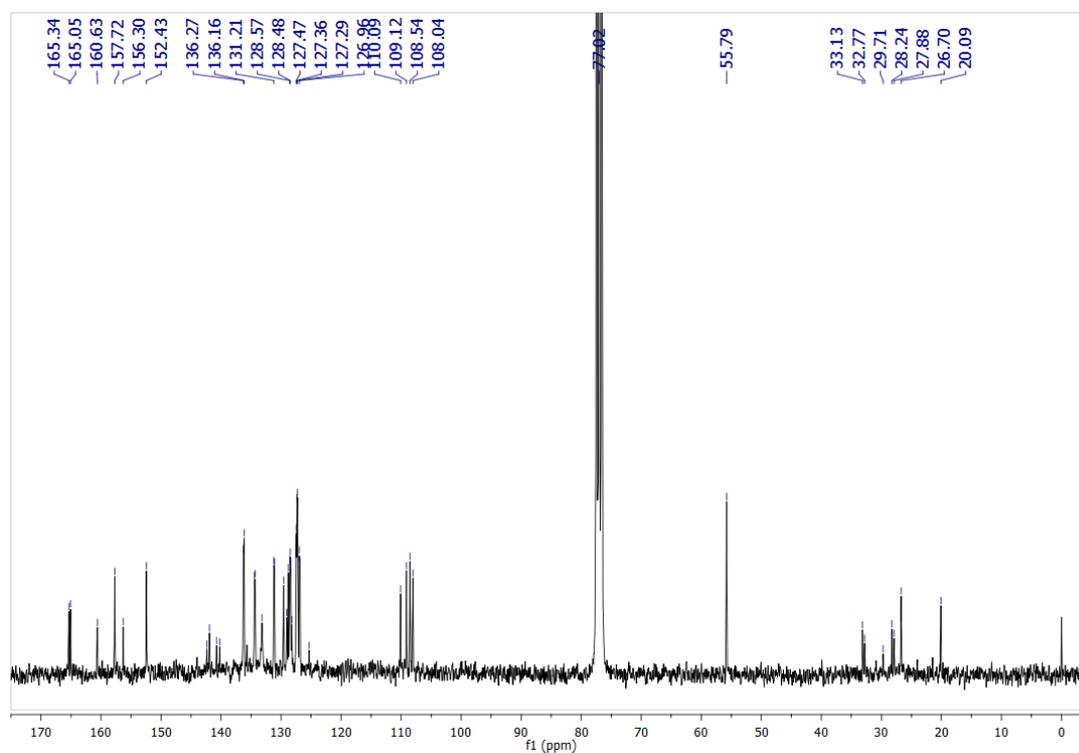
Fonte: do autor

Figura A7: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do precursor **cis-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Me-bipy)]** em CDCl_3 .



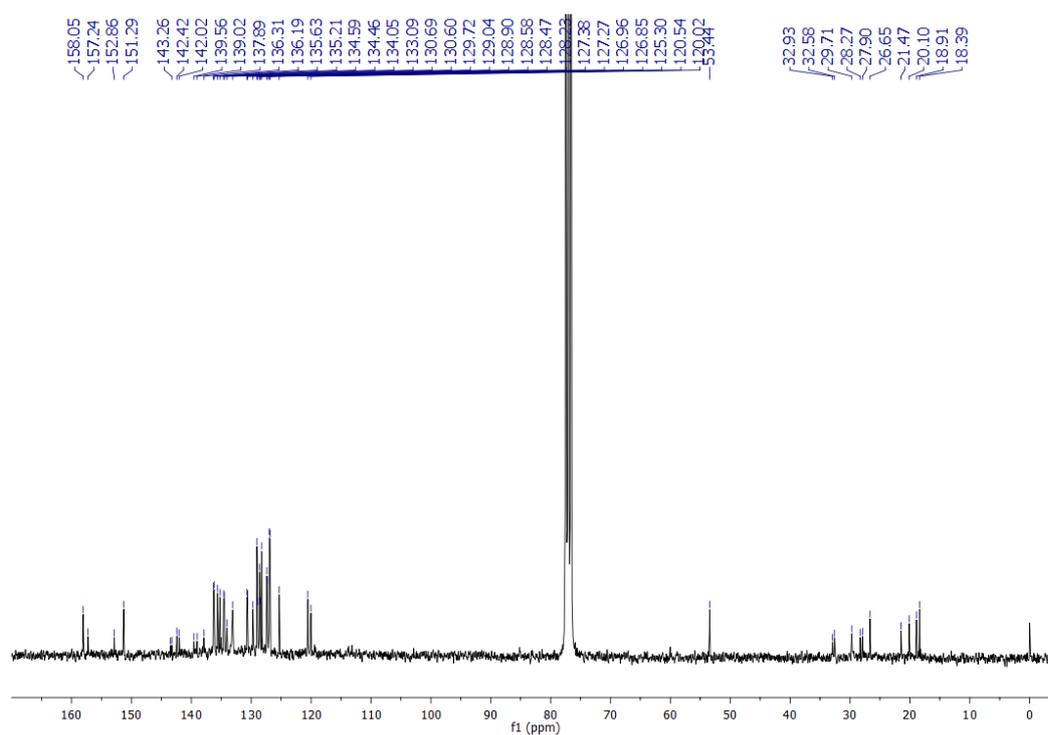
Fonte: do autor

Figura A8: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do precursor **cis-[RuCl₂(dppb)(4,4'-Methoxy-bipy)]** em CDCl_3 .



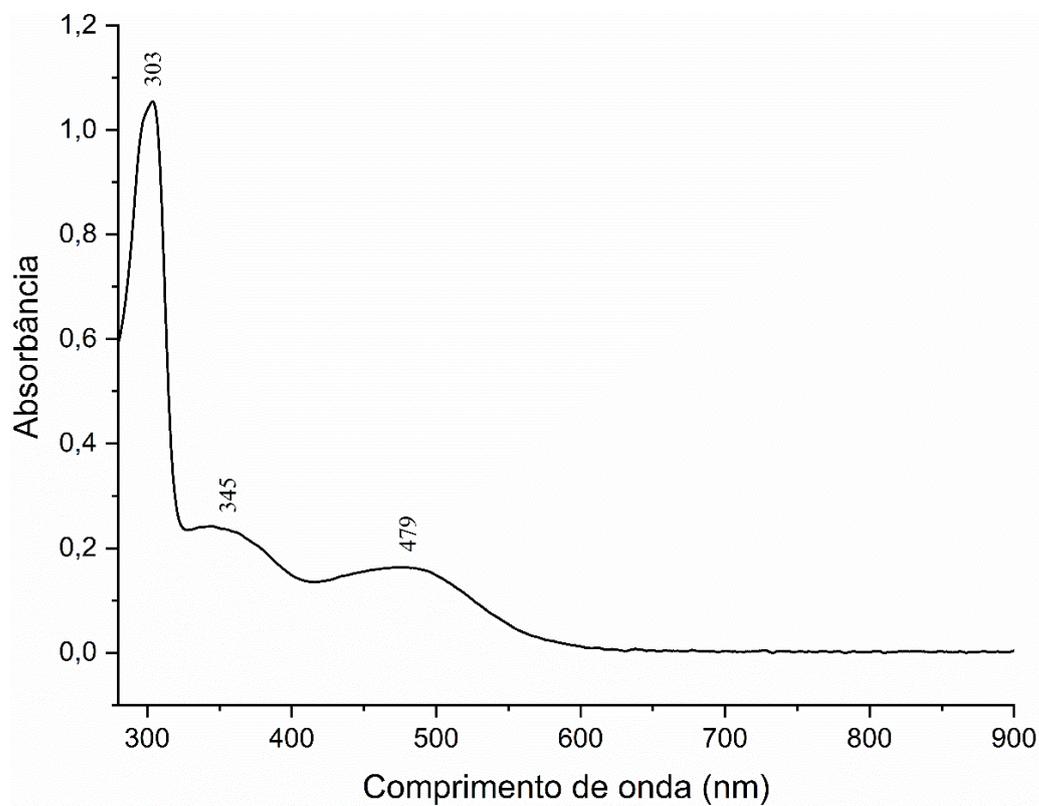
Fonte: do autor

Figura A9: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(5,5'\text{-Me-bipy})]$ em CDCl_3 .

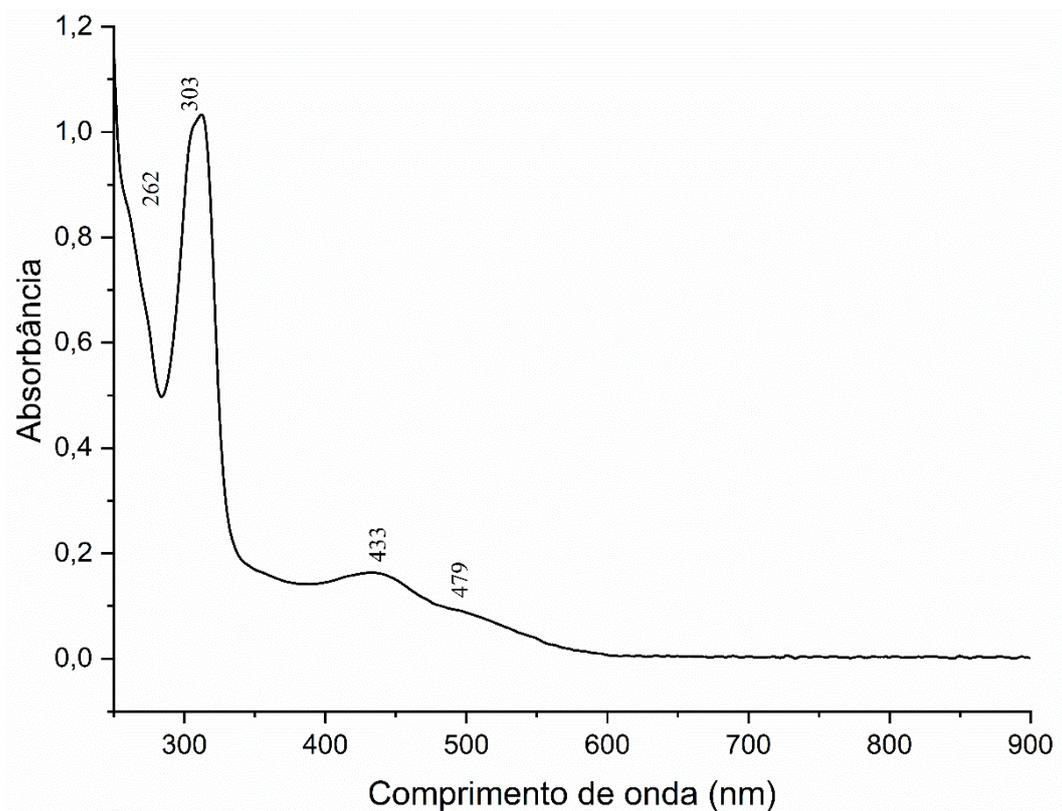


Fonte: do autor

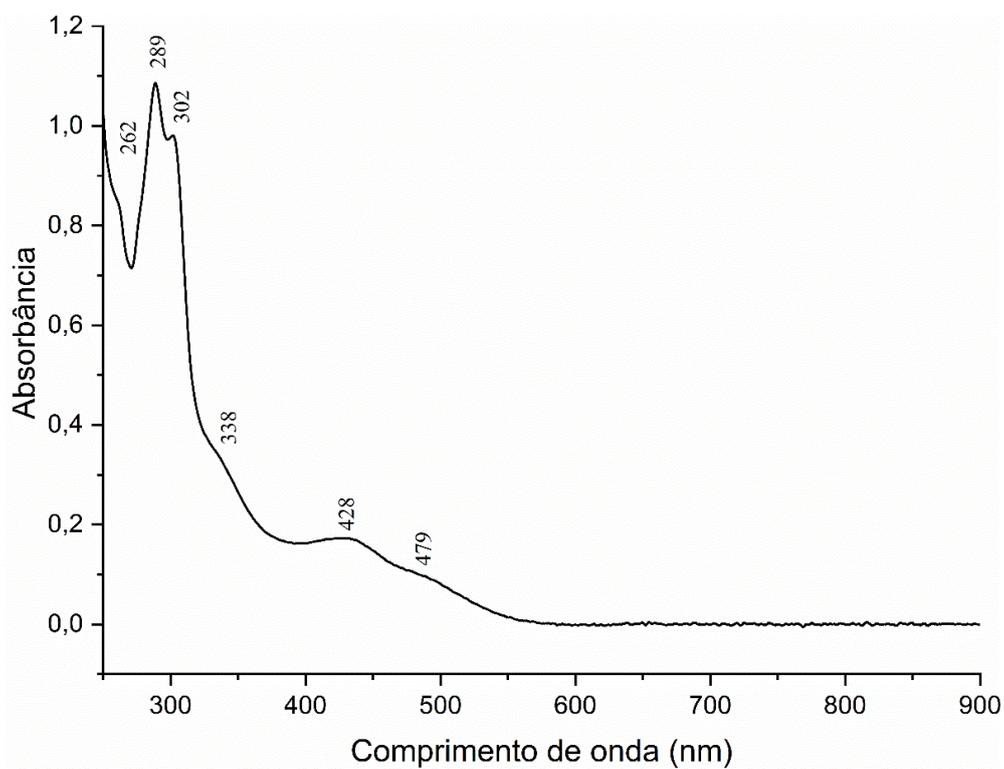
Figura A10: Espectro de UV-vis do precursor $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-Me-bipy})]$, em CH_2Cl_2 $6.88 \times 10^{-5} \text{ mol x L}^{-1}$.



Fonte: do autor

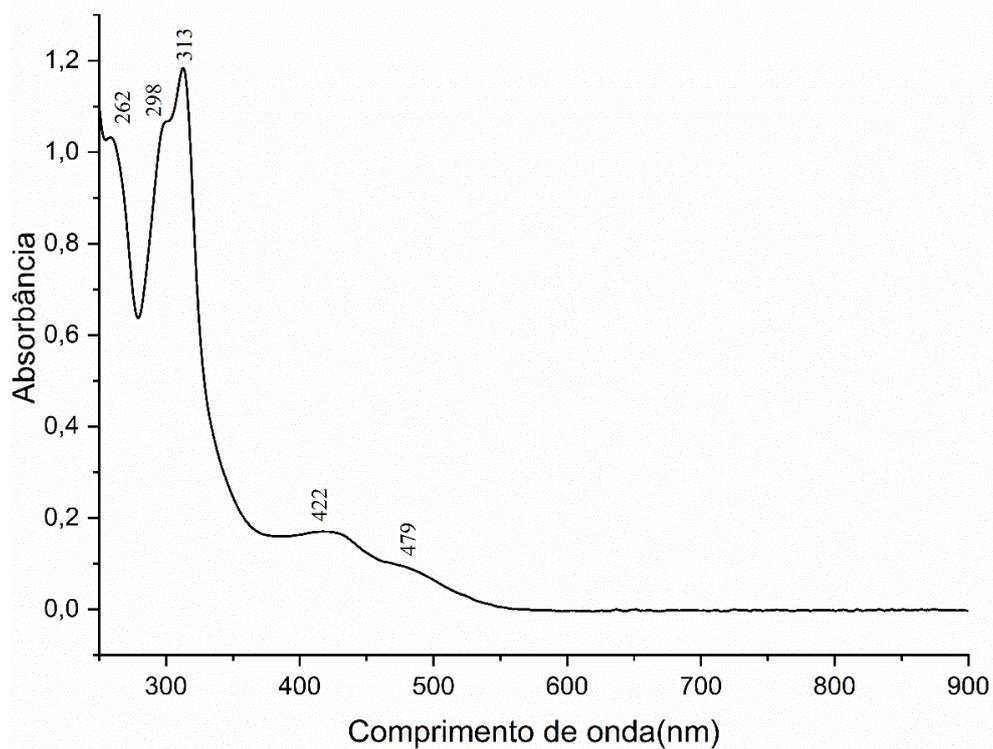
Figura A11: Espectro de UV-vis do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-Me-bipy)], em CH₂Cl₂ 5.10x10⁻⁵ mol x L⁻¹.

Fonte: do autor

Figura A12: Espectro de UV-vis de C1, em CH₂Cl₂ 4.79x10⁻⁵ mol x L⁻¹.

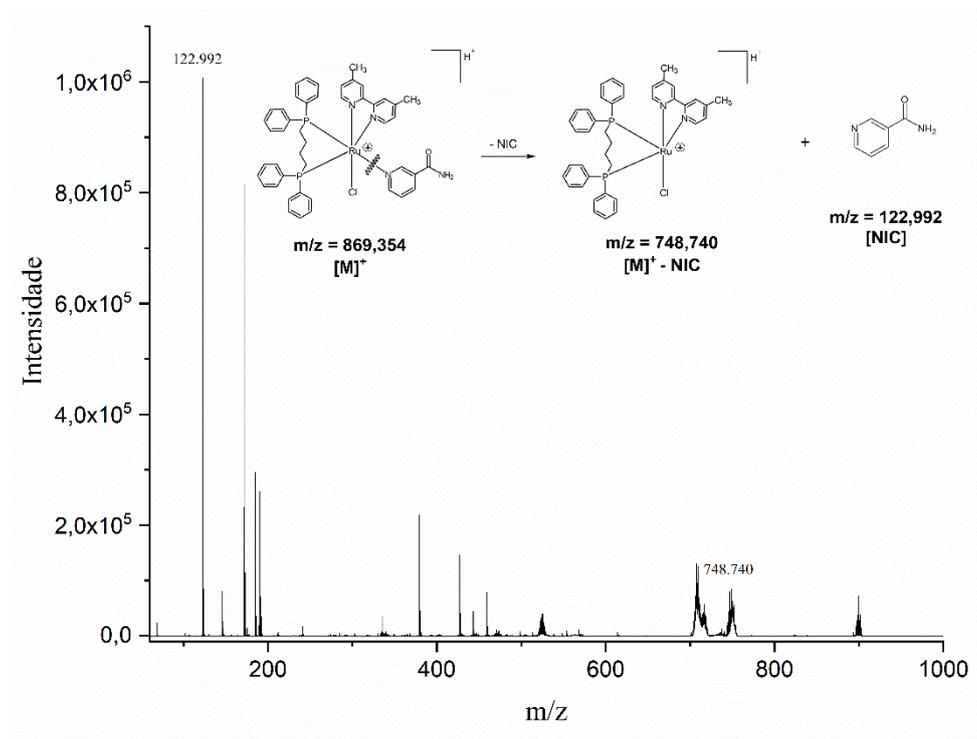
Fonte: do autor

Figura A13: Espectro de UV-vis de **C3**, em CH_2Cl_2 $5.56 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$.



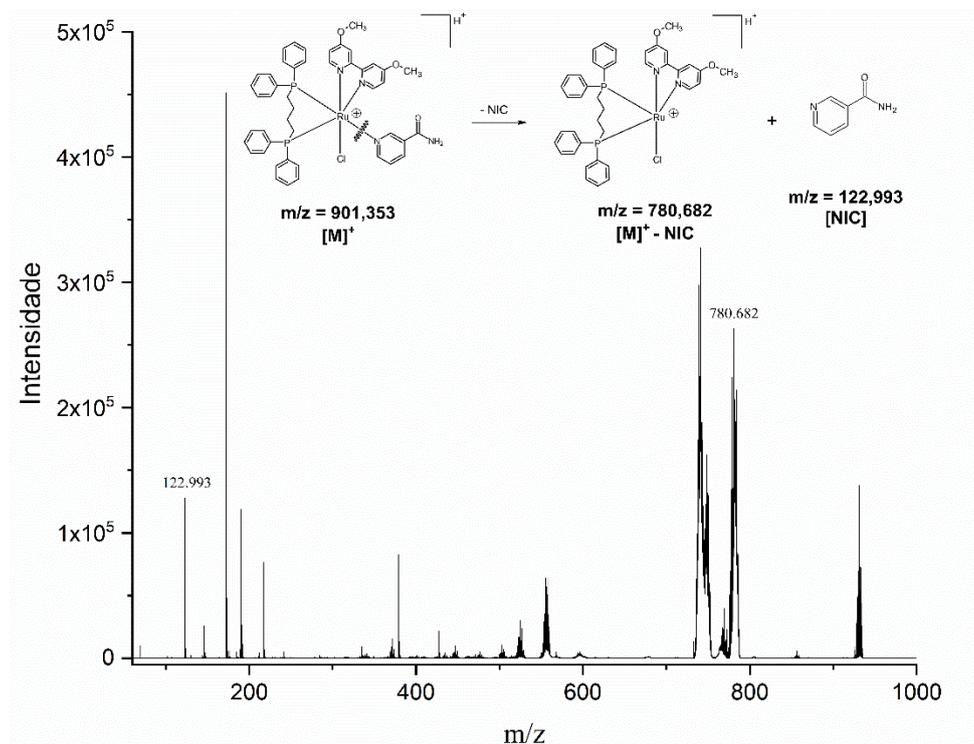
Fonte: do autor

Figura A14: Espectro de massas de **C1**, empregando um espectrômetro MALDI-TOF-MS (tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz).



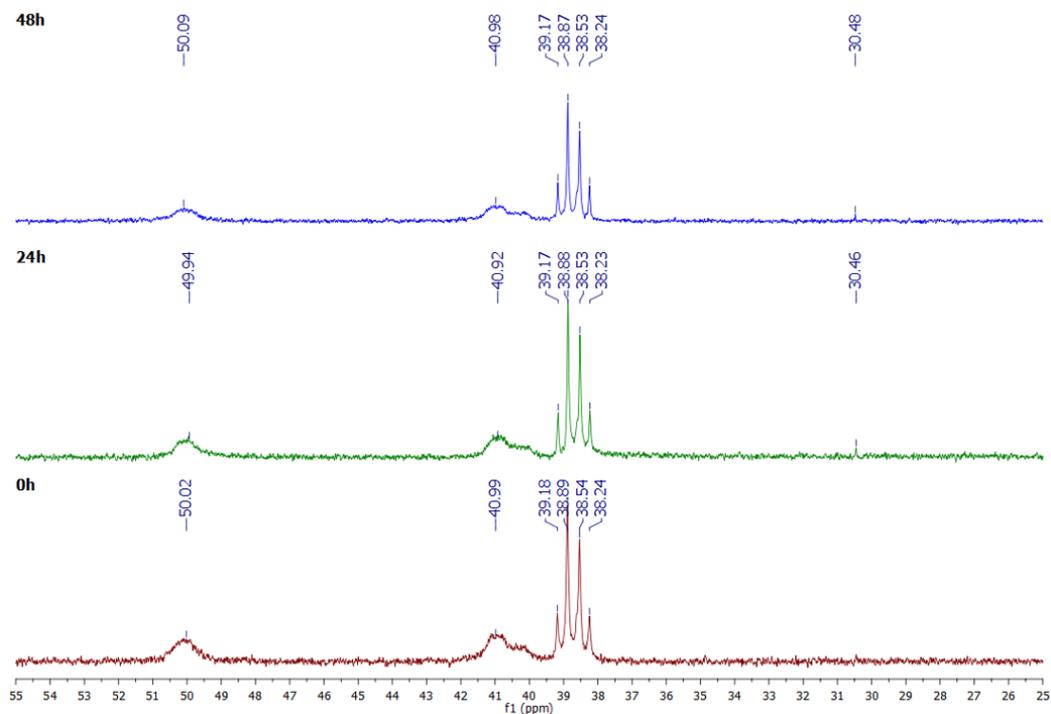
Fonte: do autor

Figura A15: Espectro de massas de **C2**, empregando um espectrômetro MALDI-TOF-MS (tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz).



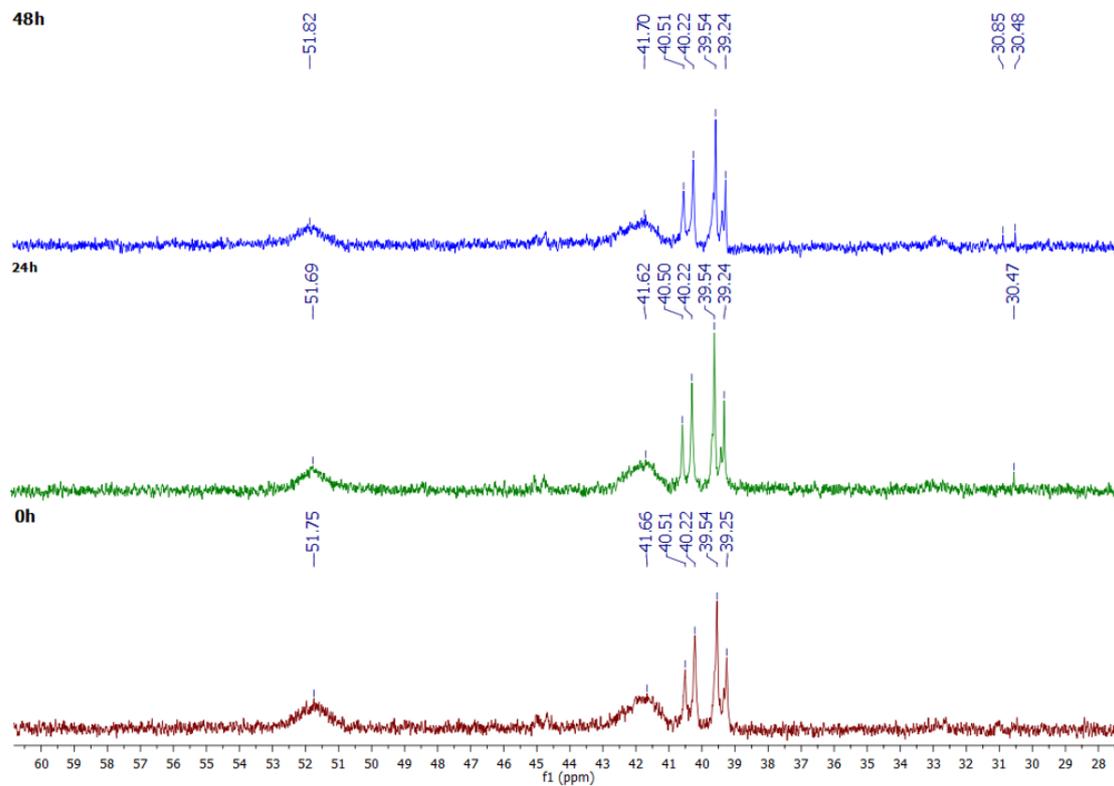
Fonte: do autor

Figura A16: Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **C1** em DMSO no tempo de 0, 24 e 48h após diluição.



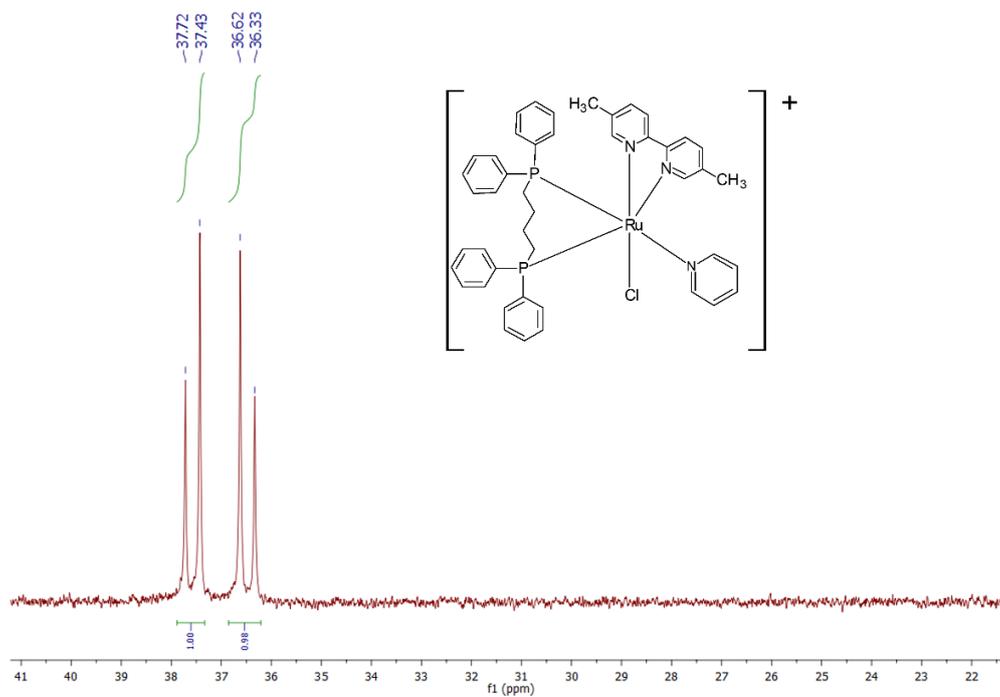
Fonte: do autor

Figura A17: Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **C2** em DMSO no tempo de 0, 24 e 48h após diluição.



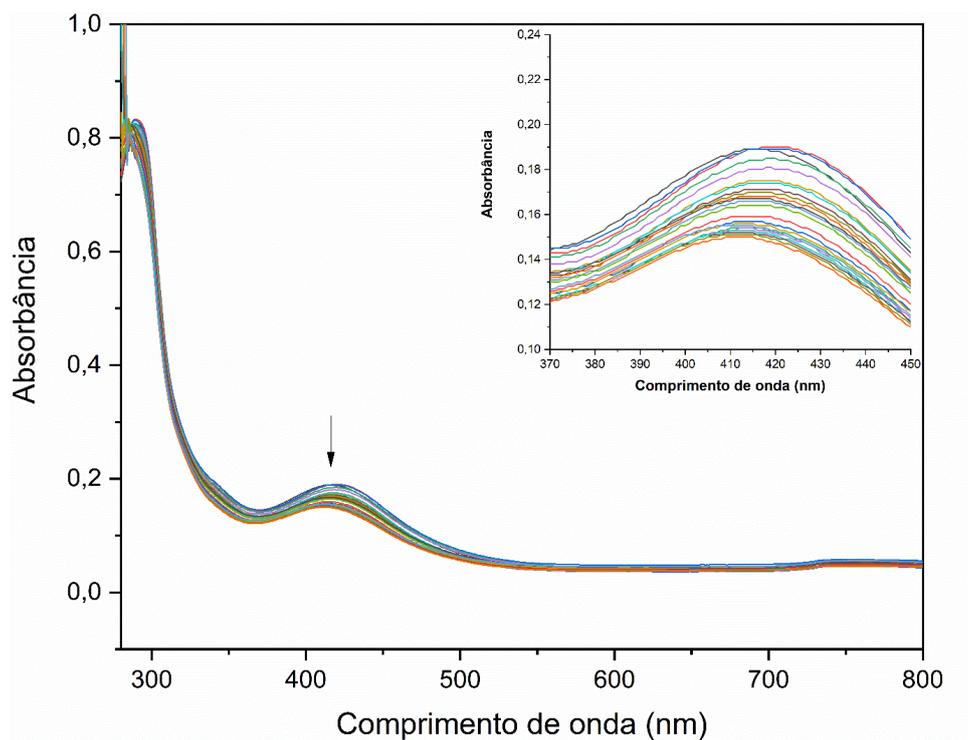
Fonte: do autor

Figura A18: Espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **[RuCl(Py)(dppb)(5,5'-Me-bipy)]** em CH_2Cl_2 .



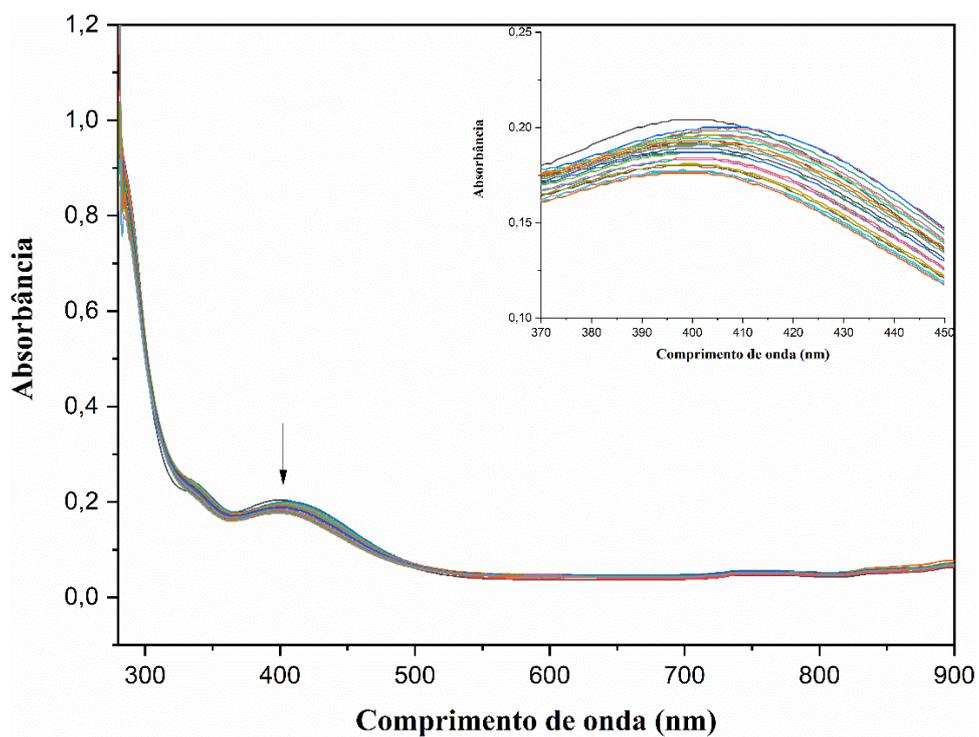
Fonte: do autor

Figura A19: Espectros de UV-vis de titulações espectroscópicas do complexo **C1** $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com $[\text{ct-DNA}] = 0-6,29 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em preto representa o espectro do complexo na ausência de DNA



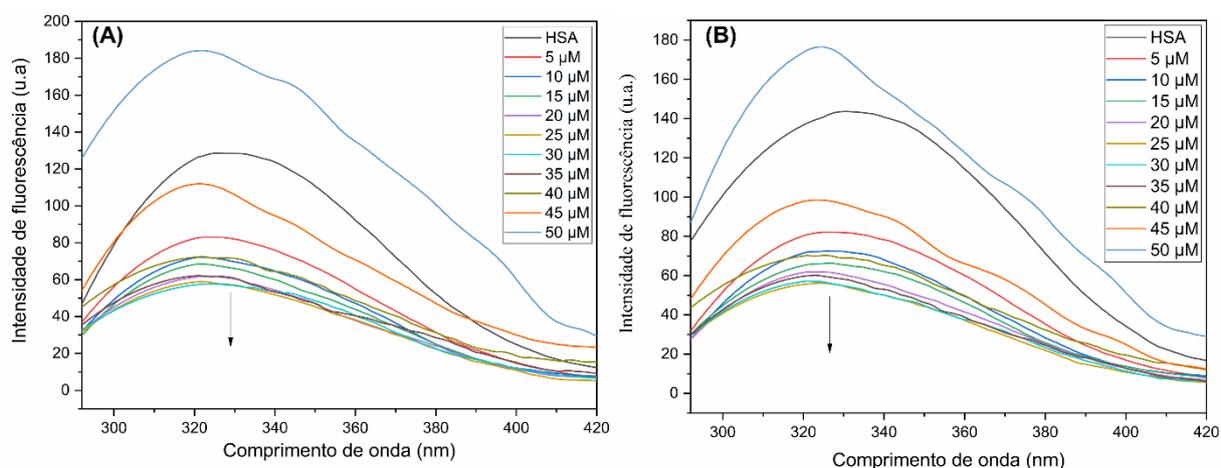
Fonte: do autor

Figura A20: Espectros de UV-vis de titulações espectroscópicas do complexo **C2** $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com $[\text{ct-DNA}] = 0-6,29 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em preto representa o espectro do complexo na ausência de DNA



Fonte: do autor

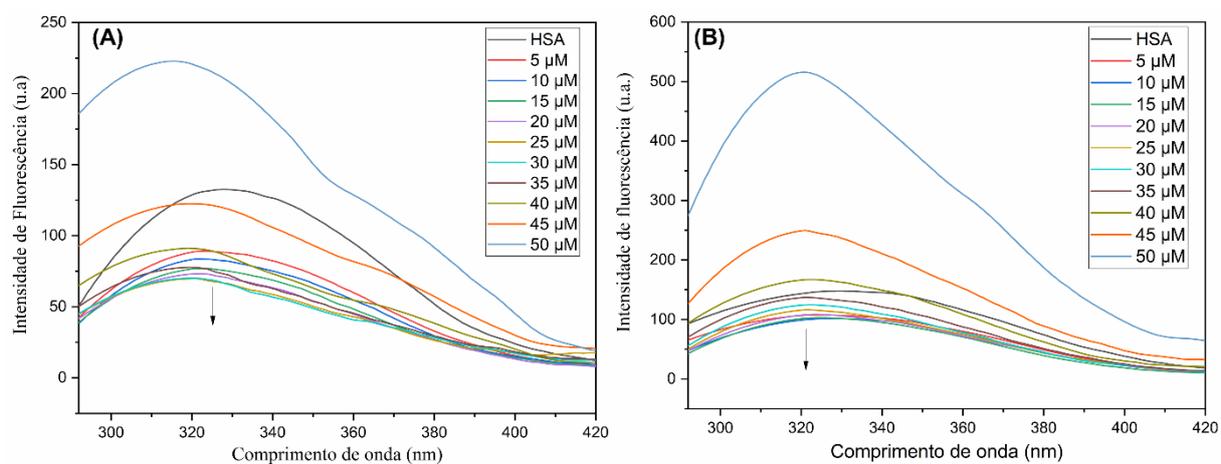
Figura A21: Espectro de emissão da HSA com concentrações crescentes do complexo C1 em (A) na temperatura de 298 K e (B) em 310 K.



Fonte: Do autor

Nota: $[HSA] = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$.

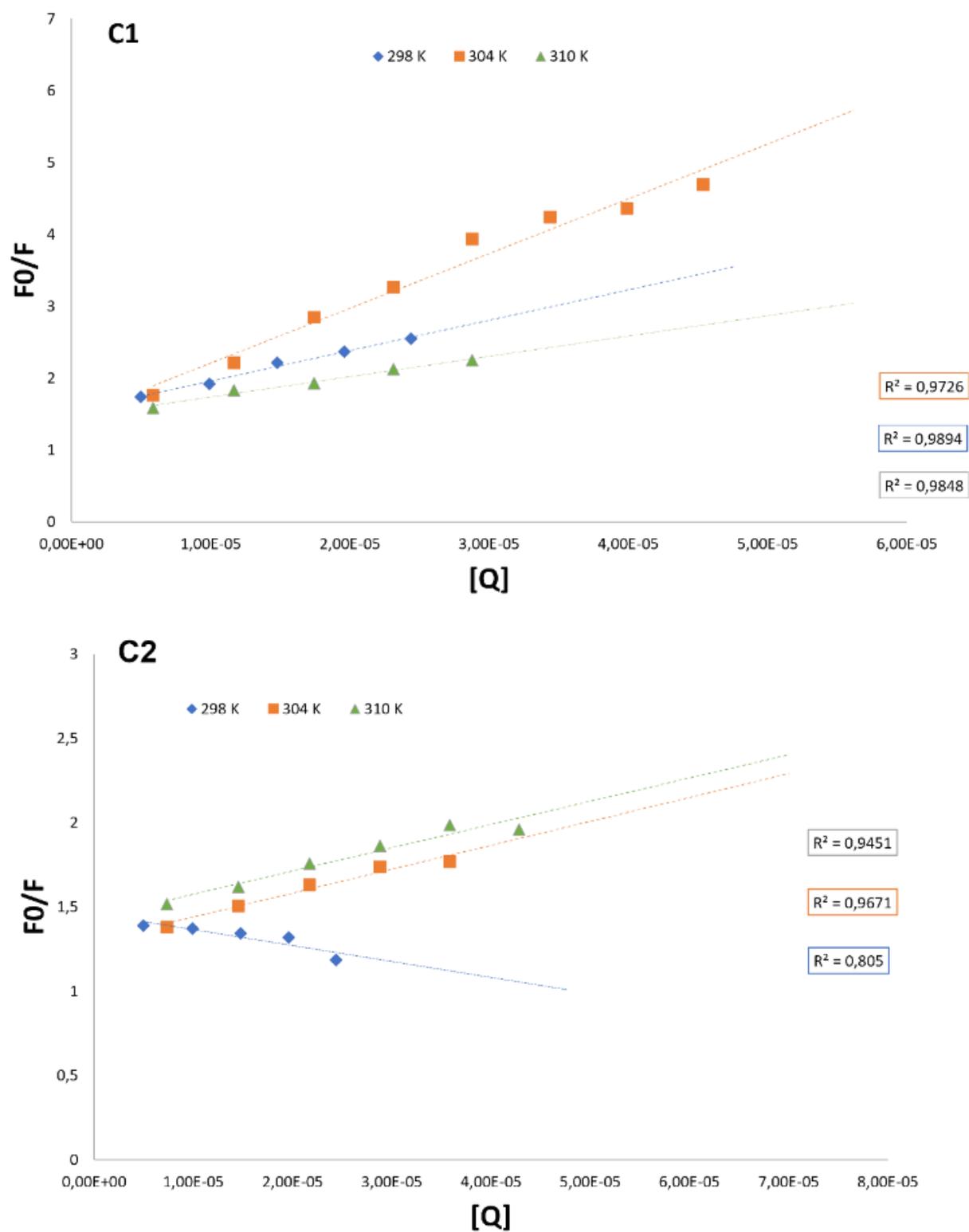
Figura A22: Espectro de emissão da HSA com concentrações crescentes do complexo C2 em (A) na temperatura de 298 K e (B) em 310 K.



Fonte: Do autor

Nota: $[HSA] = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$.

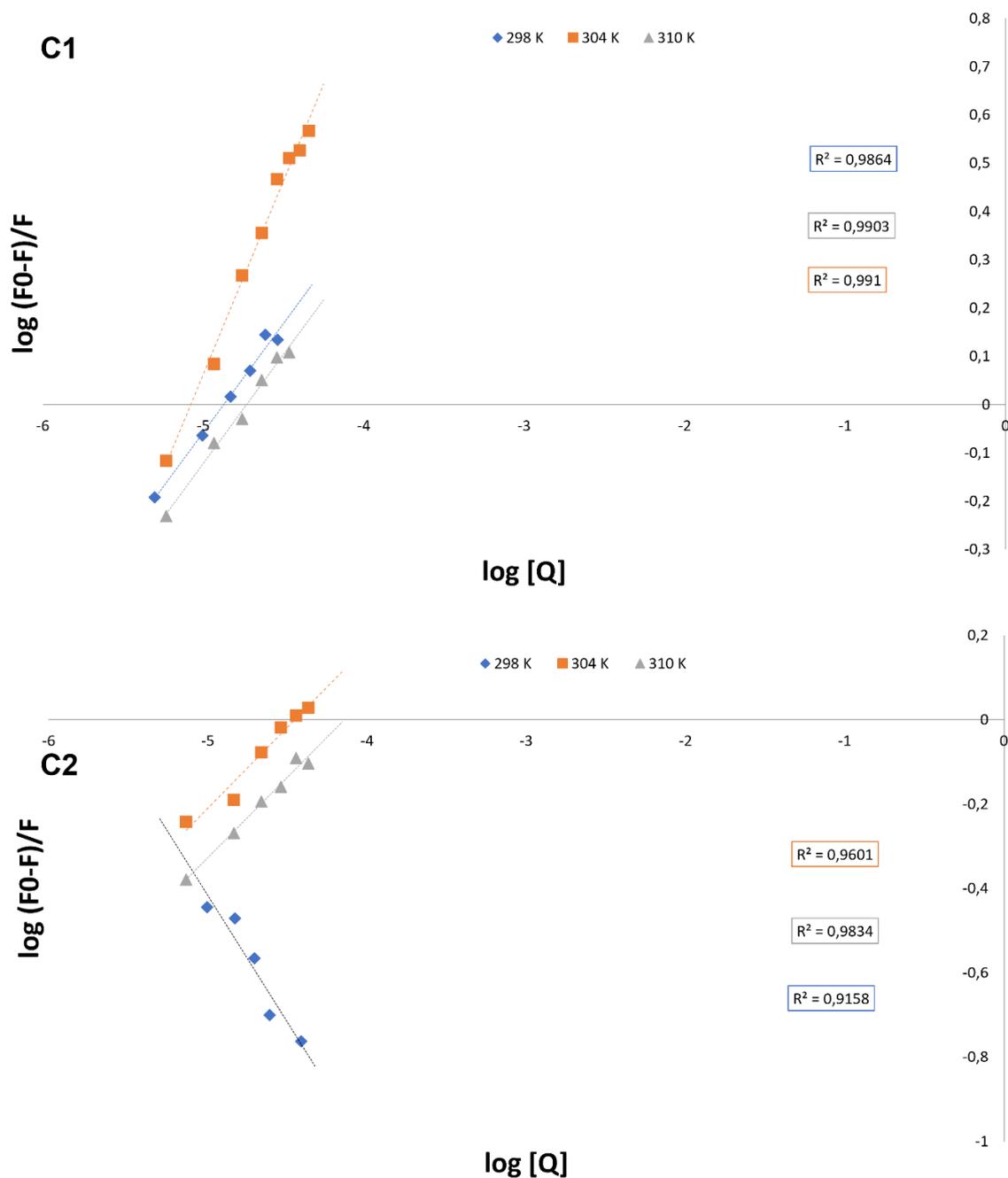
Figura A23: Gráfico de Stern-Volmer de F_0/F vs $[Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações de C1 e C2



Fonte: Do autor

Nota: $[HSA] = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{ex.} = 280 \text{ nm}$.

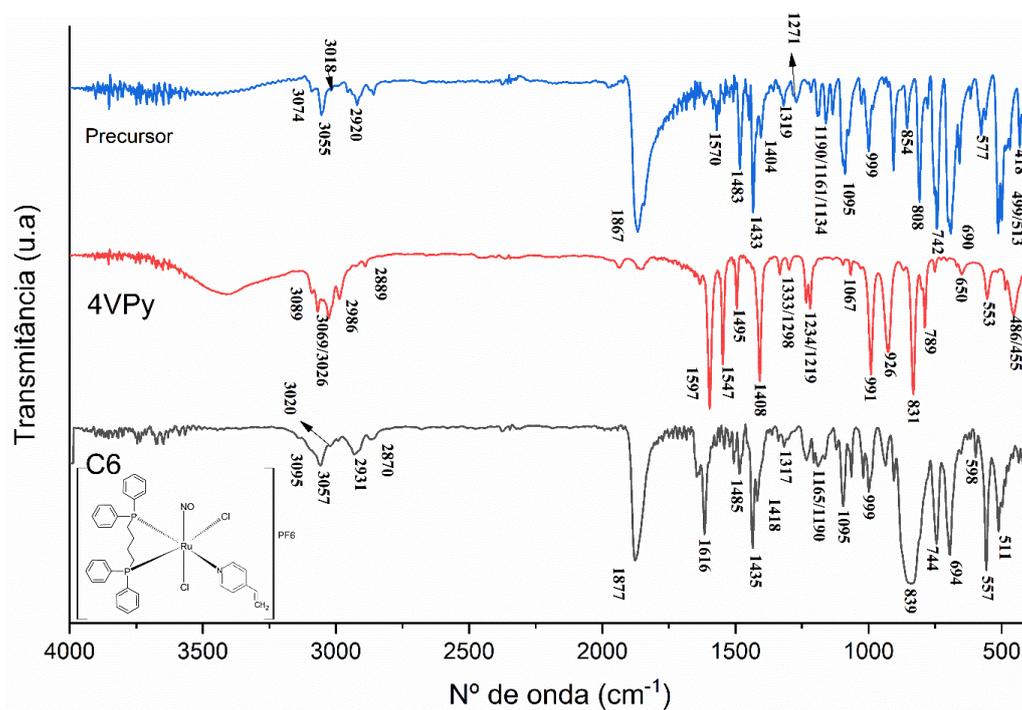
Figura A24: Gráficos de $\log (F_0 - F)/F$ vs $\log [Q]$ para HSA na presença de diferentes concentrações de **C1** e **C2**



Fonte: Do autor

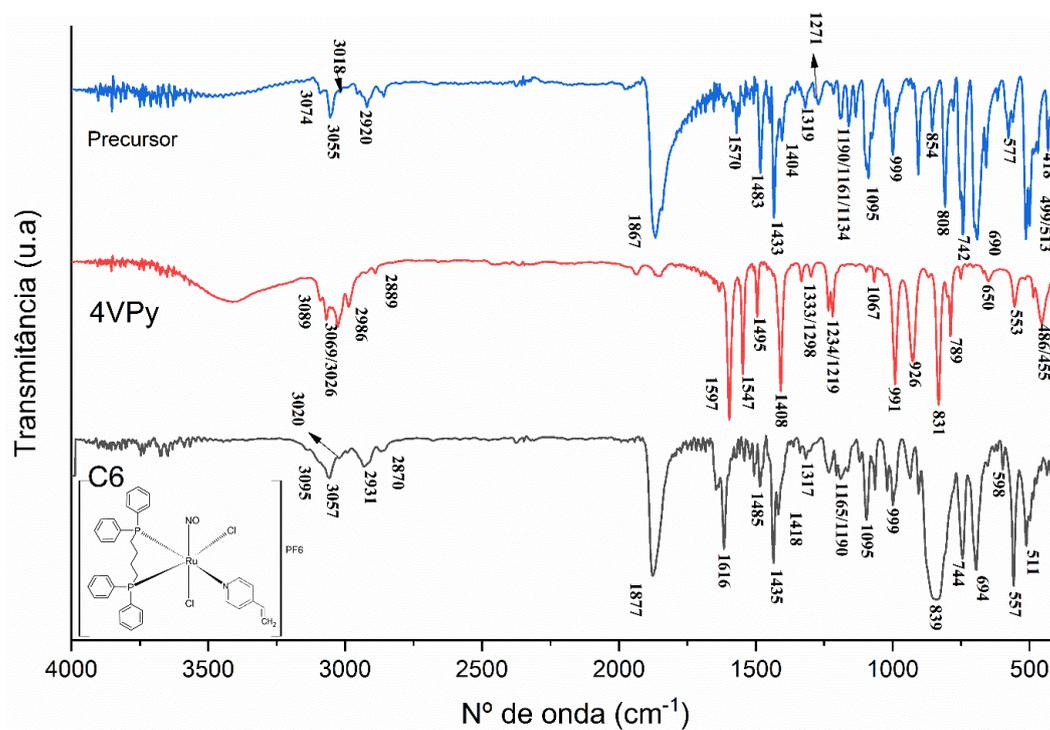
Nota: $[HSA] = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em solução tampão Tris-HCl pH = 7,4, $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$.

Figura A25: Espectros de FTIR de **C4** (em preto), Py (em vermelho) e precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (em azul) realizados em pastilhas de KBr.



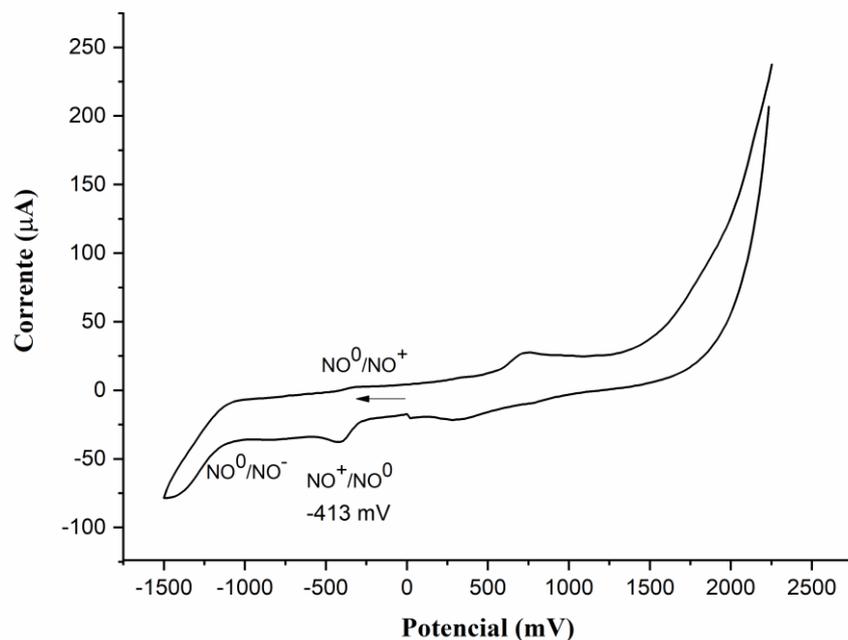
Fonte: Do autor

Figura A26: Espectros de FTIR de **C6** (em preto), 4VPy (em vermelho) e precursor *mer*-[RuCl₃(NO)(dppb)] (em azul) realizados em pastilhas de KBr.



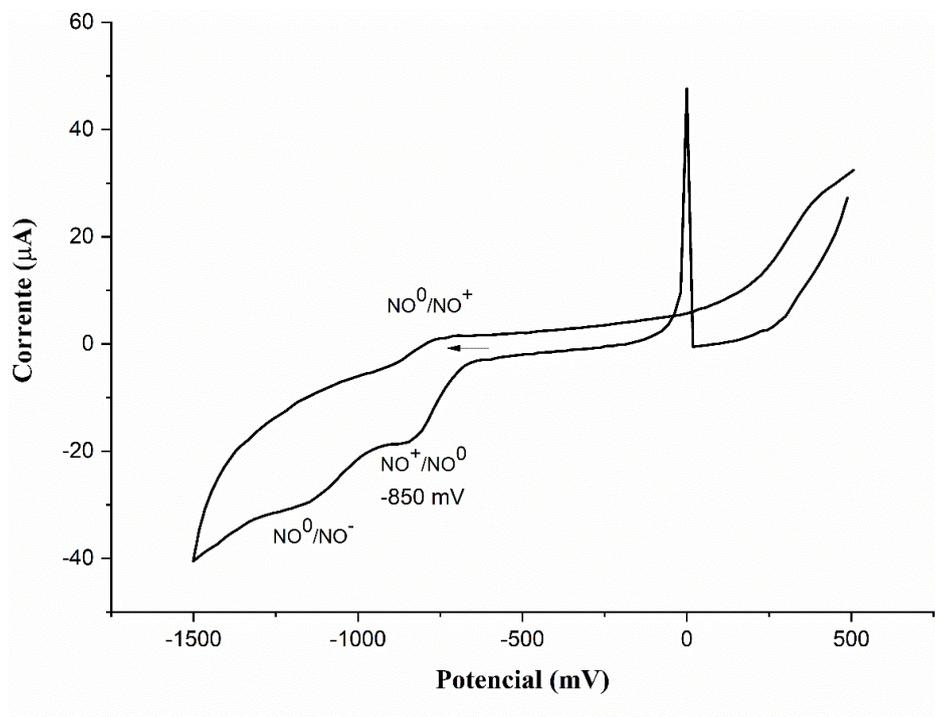
Fonte: Do autor

Figura A27: Voltamogramas cíclicos do complexo **C5**, eletrólito PTBA 0,1 mol·L⁻¹ em C₂H₃N vs Ag/AgCl, velocidade de varredura 100 mV·s⁻¹



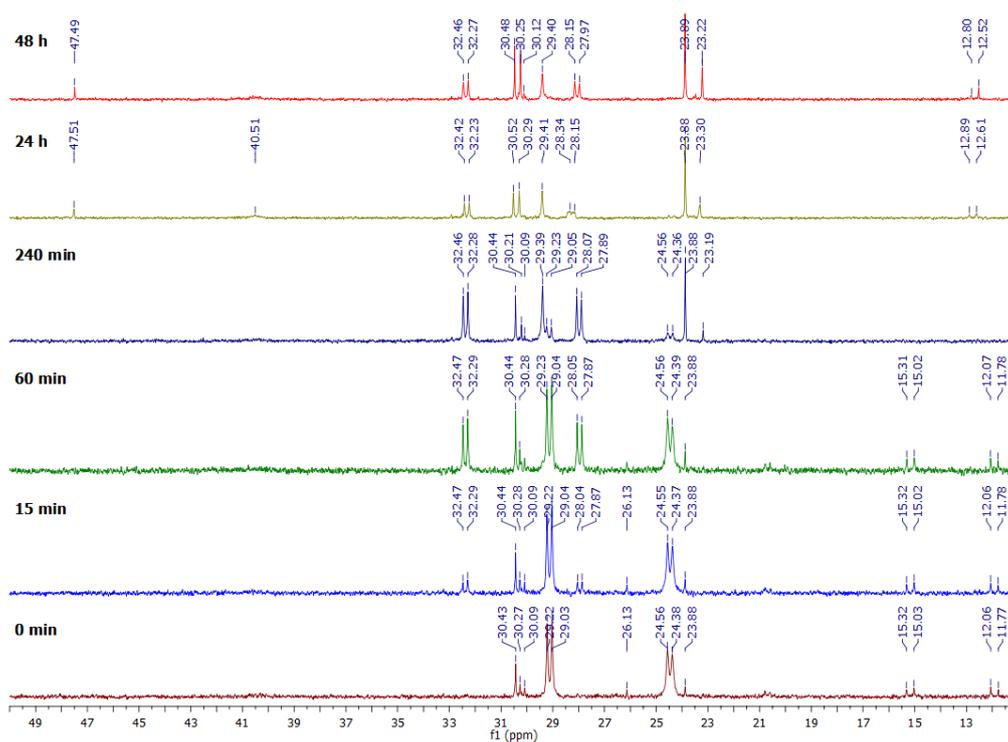
Fonte: Do autor

Figura A28: Voltamogramas cíclicos do complexo **C6**, eletrólito PTBA 0,1 mol·L⁻¹ em C₂H₃N vs Ag/AgCl, velocidade de varredura 100 mV·s⁻¹



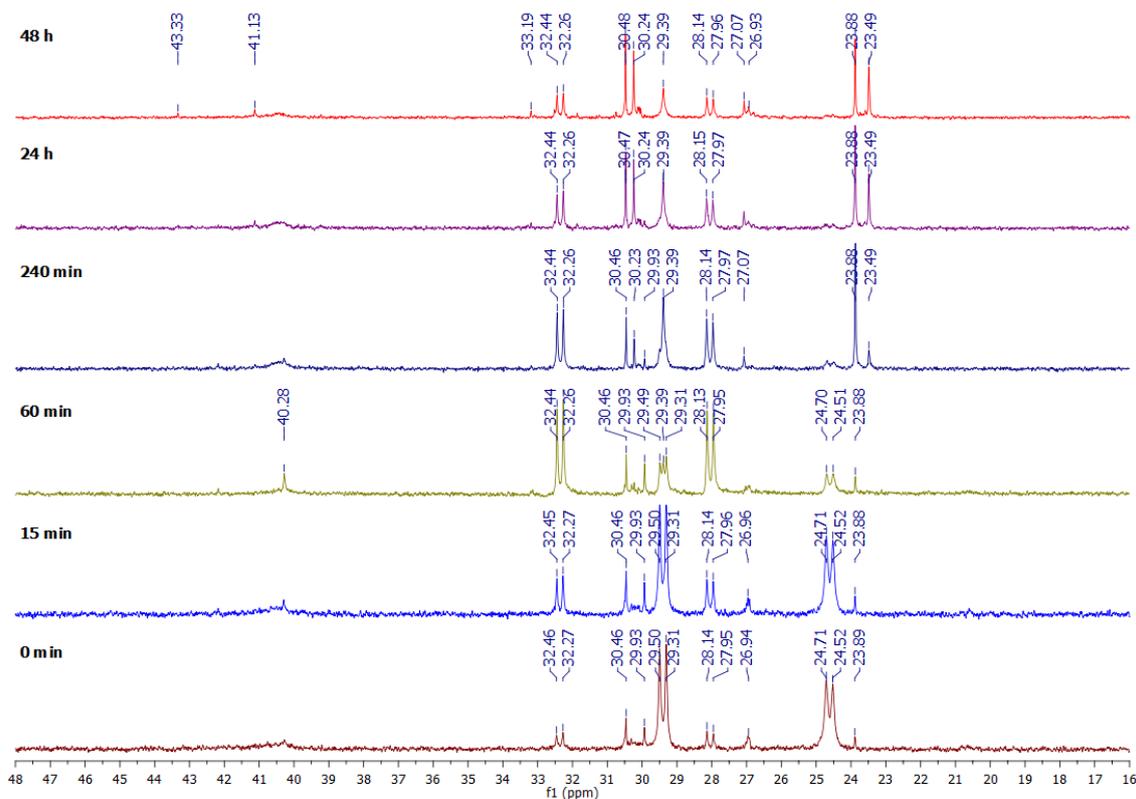
Fonte: Do autor

Figura A29: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de C5 após 0, 15, 60, 240 min, 24 e 48 h de solubilização em DMSO.



Fonte: Do autor

Figura A30: Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de C6 após 0, 15, 60, 240 min, 24 e 48 h de solubilização em DMSO.



Fonte: Do autor