



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FÁRMACIA



LUDMILA SILVA FORTES

**NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) COM LIGANTE ANTI INFLAMATÓRIO:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE**

OURO PRETO

2026

LUDMILA SILVA FORTES

**NOVO COMPLEXO DE RUTÊNIO (II) COM LIGANTE ANTI INFLAMATÓRIO:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em Farmácia
pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Souza
Corrêa.

OURO PRETO

2026



FOLHA DE APROVAÇÃO

Ludmila Silva Fortes

**Novo complexo de rutênio(II) com ligante anti inflamatório: obtenção,
caracterização e avaliação da citotoxicidade**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 05 de Março de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Prof. Dr. Adilson Cândido da Silva (Universidade Federal de Ouro Preto)
Prof^a. Dr^a. Viviane Martins Rebello dos Santos (Universidade Federal de Ouro Preto)

Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 09/03/2026



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo de Souza Correa, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 09/03/2026, às 17:32, 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 http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1071691** e o código CRC **BA4A412A**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar os meus passos em cada etapa dessa jornada, concedendo-me força, sabedoria e perseverança para superar os desafios ao longo do caminho.

À minha família, por todo apoio, incentivo e amor incondicional, sendo o meu alicerce em todos os momentos.

Às minhas amigas Ana, Beatriz, Laura, Lígia, Maria, Pamela e Thainara, pela amizade, apoio, parceria, companheirismo e pelas trocas de conhecimento que tornaram essa caminhada mais leve e especial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo de Souza Corrêa, pela oportunidade, confiança e orientação dedicada na realização deste trabalho.

Aos membros do laboratório LaQuEsl, em especial o Leonan, pela convivência, colaboração e pelos ensinamentos compartilhados no dia a dia desta pesquisa.

À Universidade Federal de Ouro Preto, a Escola de Farmácia, pela formação de qualidade e à FAPEMIG pelo fomento e apoio à realização desta pesquisa.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo a minha sincera gratidão.

RESUMO

O câncer representa um dos principais desafios da saúde pública mundial, com isso a uma busca por novas alternativas terapêuticas que superem as limitações dos tratamentos atuais e sejam mais eficazes e seletivos. Nesse contexto, os metalofármacos a base de rutênio tem despertado grande interesse devido ao seu potencial antitumoral e a menor toxicidade comparados aos compostos de platina. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade citotóxica de um novo complexo de rutênio contendo ácido salicílico como ligante. As caracterizações foram realizadas por ressonância magnética nuclear, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e na região do ultravioleta-visível e voltametria cíclica. A citotoxicidade do complexo foi realizada nas linhagens de MRC- (fibroblasto humano), B16-F10 (melanoma murino) e RAW 264.7 (macrófagos murinos), demonstrando atividade citotóxica moderada dependente do tempo frente a linhagem tumoral. Foi observado uma redução significativa da produção de óxido nítrico na maior concentração testada, indicando uma possível atividade anti-inflamatória. Os resultados obtidos demonstram que o complexo sintetizado apresenta um potencial promissor como candidato a um agente antitumoral, reforçando a relevância da coordenação de anti-inflamatórios a centros metálicos como estratégia de desenvolvimento para novos complexos terapêuticos.

Palavras-chave: Rutênio; Ácido Salicílico; Metalofármacos; Câncer; Anti-inflamatórios.

ABSTRACT

Cancer represents one of the major challenges to global public health, leading to the search for new therapeutic alternatives that overcome the limitations of current treatments and are more effective and selective. In this context, ruthenium-based metallodrugs have attracted considerable interest due to their antitumor potential and lower toxicity compared to platinum compounds. The present study aimed to synthesize, characterize, and evaluate the cytotoxic activity of a new ruthenium complex containing salicylic acid as a ligand. Characterization was carried out using nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, ultraviolet–visible spectroscopy, and cyclic voltammetry. The cytotoxicity of the complex was evaluated in MRC- (human fibroblast), B16-F10 (murine melanoma), and RAW 264.7 (murine macrophage) cell lines, demonstrating moderate time-dependent cytotoxic activity against the tumor cell line. A significant reduction in nitric oxide production was observed at the highest concentration tested, indicating possible anti-inflammatory activity. The results demonstrate that the synthesized complex presents promising potential as a candidate antitumor agent, reinforcing the relevance of coordinating anti-inflammatory agents to metal centers as a development strategy for new therapeutic complexes.

Keywords: Ruthenium; Salicylic Acid; Metallodrugs; Cancer; Anti-inflammatory Agents.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1. Câncer.....	8
2.2. Compostos de Rutênio	9
2.3. O ácido salicílico	11
2.4. Anti – inflamatórios como ligantes	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. Materiais e métodos	17
4.1.1. Solventes e Reagentes	17
4.1.2. Síntese	17
4.1.3. Ressonância magnética nuclear	18
4.1.4. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta – Visível	18
4.1.5. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho	18
4.1.6. Voltametria cíclica	18
4.1.7. Interação com DNA por viscosidade relativa	19
4.1.8. Avaliação da citotoxicidade	19
4.1.8.1. Cultivo celular e plaqueamento	19
4.1.8.2. Citotoxicidade: Fibroblasto humano MRC-5 e melanoma murino B16F10 ...	20
4.1.9. Determinação da produção de óxido nítrico	20
4.1.10. Análises Estatísticas.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Ressonância Magnética Nuclear	22

5.2. Espectroscopia na região do Ultravioleta – Visível.....	25
5.3. Espectroscopia na região do infravermelho	26
5.4. Voltametria cíclica	28
5.5. Interação com DNA por viscosidade relativa	29
5.6. Citotoxicidade.....	30
5.7. Óxido Nítrico.....	31
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo conseqüentemente um dos principais problemas de saúde pública. Em grande parte dos países, corresponde a primeira ou segunda causa de morte prematura (antes dos 70 anos), sendo um problema no aumento da expectativa de vida (Santos *et al.*, 2023).

Aproximadamente 70% das mortes ocorrem em países de baixa e média renda, onde a disponibilidade do tratamento é menos abrangente (OMS, 2024). Esse cenário é agravado pelas desvantagens socioeconômicas como pobreza e a falta de acesso à informação, que elevam a taxa de incidência da doença e favorecem o diagnóstico tardio. Além disso, os pacientes podem apresentar barreiras no tratamento que comprometem a eficácia do procedimento, como atraso no tratamento, perda de doses e não adesão ao tratamento. (Bourgeois *et al.*, 2024)

Além disso, esses países têm maiores propensões a infecções crônicas, sendo um fator de risco para o câncer. Cerca de 13% dos diagnósticos globais de câncer em 2018 foram atribuídos a infecções, como: *Helicobacter pylori*, humanos vírus papiloma (HPV), vírus da hepatite B e vírus da hepatite C (Martel *et al.*, 2020).

A inflamação pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento e progressão do câncer. A correlação entre inflamação e o câncer foi sugerida no século XIX por Rudolf Virchow, através de observações de que o câncer se originava em locais de inflamação crônica e que células inflamatórias eram encontradas em abundância nas biópsias tumorais (Fran *et al.*, 2001, Zhao *et al.*, 2021). Em função disso, existe o interesse no uso de anti-inflamatórios associados aos casos tumorais.

A química medicinal se destina a criação, inovação, descoberta e síntese de compostos com atividade farmacológica e compreensão de seu mecanismo de ação no organismo (Lima *et al.*, 2007). Diferentes procedimentos de identificação de compostos de fontes naturais têm aumentado o número de novas estruturas químicas bioativas para diversas indicações terapêuticas. A busca por novos medicamentos anticancerígenos também tem se expandido, com a finalidade de se encontrar tratamentos mais eficazes e seletivos, ou que visem novos métodos que possam impedir o avanço da doença (Brandão *et al.*, 2010).

Uma das aplicações relevantes da química bioinorgânica é o desenvolvimento de candidatos a fármacos que apresentam metais em sua composição, os chamados metalofármacos. Essa classe de compostos tem se mostrado uma área com grande

potencial a ser explorado no desenvolvimento de novos medicamentos (Mjos *et al*, 2014; Riccardi *et al*, 2018; Reis, 2011).

Embora as pesquisas sobre essa patologia tenham avançado significativamente, ainda temos a necessidade de investimento em novos estudos e no desenvolvimento de novos fármacos para o combate dessa doença, que afeta milhões de pessoas anualmente. Nesse contexto, uma das estratégias pode ser utilizar um fármacos anti-inflamatórios como ligantes ao rutênio, visando a obtenção de novos compostos com potencial para terapia oncológica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer

Por definição, câncer compreende-se como um grupo de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células anormais que possuem a capacidade de penetrar tecidos e órgão do corpo humano (INCA,2022). O desenvolvimento do câncer é denominado de carcinogênese ou oncogênese e pode ocorrer lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê o aparecimento de um tumor (ABC do Câncer, 2020).

A carcinogênese ocorre em decorrência de uma mutação genética nas células provocada pela ação de agentes cancerígenos que promovem a transformação das células normais em células malignas, que passam a se multiplicar de forma descontrolada.

Porém a presença dos agentes cancerígenos, por si só, não pode ser responsabilizada pelo desenvolvimento dos tumores (INCA,2022). De todos os casos de câncer, de 80% estão associados a fatores ambientais, como: tabagismo, alcoolismo, radiação ultravioleta, infecções (HPV), inatividade física, obesidade, alimentação inadequada, além de uso de drogas hormonais e condições imunológicas (Centro de Combate ao Câncer, [S.d.]).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), na última década houve um aumento de 20% na incidência do câncer no Brasil. A estimativa de casos de câncer no mundo segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) é de mais de 35 milhões de novos casos de câncer em 2050, um aumento de 77% em relação ao estimado em 2022 (OMS, 2024).

O câncer representa um desafio significativo para a medicina, não apenas devido à sua complexidade no desenvolvimento, mas também devido à dificuldade em encontrar tratamentos eficazes em todos os casos. Atualmente, as principais formas principais de tratamento do câncer são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, terapia oral e terapia alvo, que podem ser realizadas de forma isolada ou combinadas (Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2024).

A quimioterapia no tratamento do câncer tem sido muito estudada nas últimas décadas. O envolvimento de compostos inorgânicos, principalmente os contendo metais foi limitado até o descobrimento da atividade anticancerígena da cisplatina em 1965 (Fontes et al., 1997). Atualmente a cisplatina e seus análogos são componentes de quase 50% dos tratamentos quimioterápicos (Johnstone; Park; Lippard, 2014).

2.2. Compostos de Rutênio

Após a aprovação da cisplatina como metalofármaco antitumoral, uma série de compostos análogos foram desenvolvidos, tais como a carboplatina e a oxaplatina, que são utilizados atualmente como fármacos para tratamento de câncer colorretal, ovariano, pulmão e bexiga (Cheff; Hall, 2017).

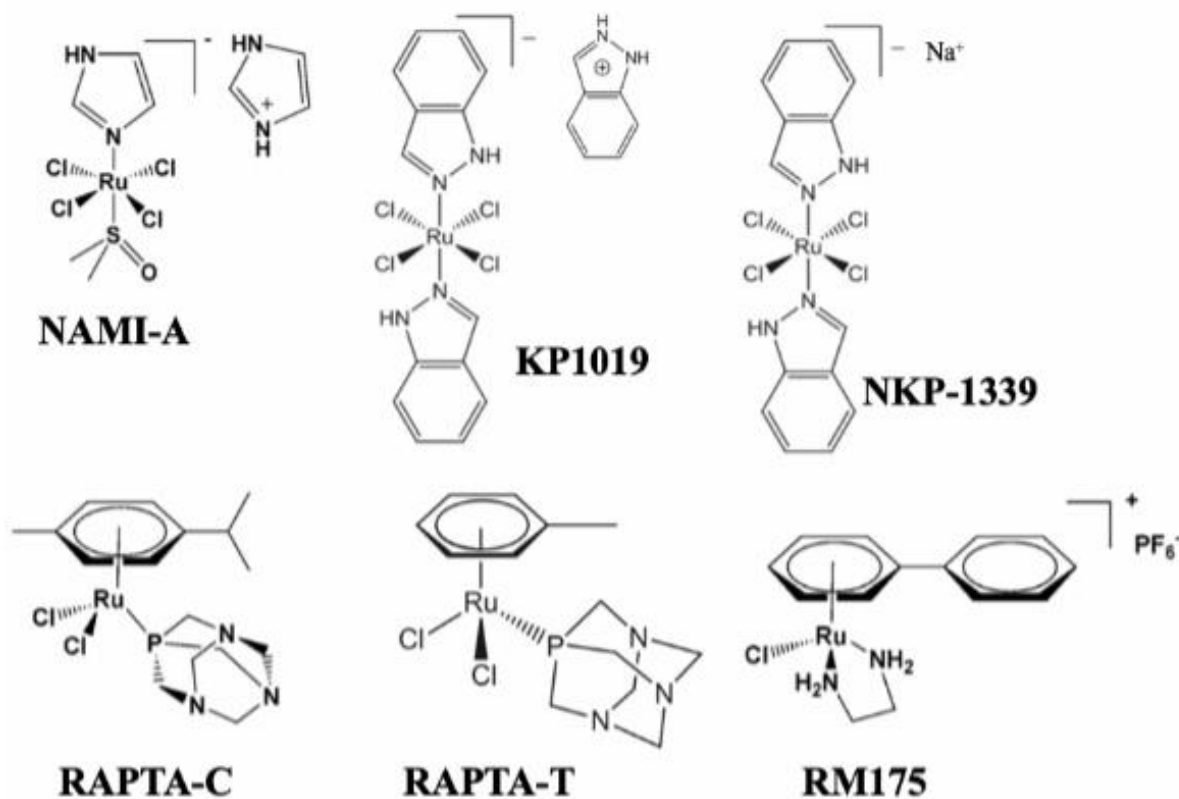
Apesar dos grandes avanços em pesquisas, existem limitações associadas à aplicação dos metalofármacos. Assim como os fármacos convencionais, eles podem apresentar restrições relacionadas aos efeitos colaterais graves e perda de eficácia ao desenvolvimento de resistências.

No contexto do uso de novas espécies metálicas o rutênio, um elemento congênere ao ferro, muito explorado na forma de rutênio (II) e rutênio (III), tem se mostrado um exemplo promissor para desenvolvimento de candidatos a fármacos (Reis, 2021).

Até os dias atuais, os complexos de rutênio que mais avançaram nos ensaios clínicos foram os compostos conhecidos como NAMI-A ([trans-RuCl₄(1H-imidazol)(DMSO-S)]), KP1019 ([trans-RuCl₄(1H-indazol)₂]) e o NKP-1339, que é o sal de sódio do KP1019 (Figura 1). O NAMI-A, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do professor Enzo Alessio, apresenta elevado potencial anti-metastático, atuando tanto na inibição como na redução das metástases. Estudos clínicos de fase I/II empregando o NAMI-A em combinação com a gencitabina, em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, não demonstraram melhoras significativas quando

comparado com a gencitabina isolada e, por isso, seus estudos foram interrompidos (Alessio; Messori, 2019).

Figura 1 - Estrutura dos complexos de rutênio com promissoras propriedades antitumorais



Fonte: Elaboração própria.

O KP1019, desenvolvido por Keppler e colaboradores, atingiu ensaios de fase I, porém seus estudos foram interrompidos e, no momento, apenas o seu sal de sódio, o NKP-1339, também chamado BOLD-100, continua sendo testado, nos Estados Unidos, em ensaios clínicos de fase I, pela empresa Bold Pharmaceuticals (Clinical Research Trial Listing, 2023). Investigações a respeito do mecanismo de ação dos complexos KP1019 e NKP-1339 têm mostrado que eles atuam como pró-drogas, ou seja, ocorre a redução do Ru(III), gerando uma nova espécie de Ru(II) que atua desencadeando os mecanismos de morte celular pela indução de apoptose. Além disso, esses complexos demonstraram elevada afinidade pelas proteínas séricas, como albumina e transferrina (Chellan; Sadler, 2020).

Uma outra classe de compostos que tem sido bastante explorada são os complexos de rutênio-areno, ou “semi sanduíche”, que foi introduzida com os

trabalhos de Dyson e Sadler em 2001. Nesses complexos o rutênio encontra-se coordenado a um anel aromático do ligante areno, de modo a ocupar três pontos de coordenação. Os complexos contendo a monofosfina PTA = 1,3,5-triazo-7 7 fosfadamantano são chamados complexos do tipo RAPTA e são os principais representantes da classe dos compostos “semi sanduíche” (Murray *et al.*, 2016). Alguns exemplos são o RAPTA-C e o RAPTA-T, cujas estruturas são representadas na figura 1.

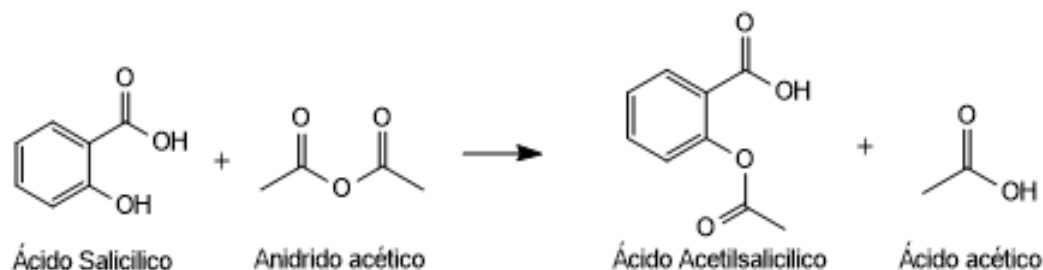
O RAPTA-C não apresenta alta citotoxicidade *in vitro*, todavia, em estudos pré clínicos *in vivo*, tem se mostrado bastante eficiente, inibindo de 50 a 75% o crescimento tumoral e, além disso, apresentou propriedades anti-metastática e antiangiogênica (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2011). Do mesmo modo, o RAPTA-T é fracamente citotóxico *in vitro*, contudo, apresenta elevada seletividade para células tumorais quando comparado com células não tumorais. Além disso, demonstrou uma capacidade significativa de modificar o comportamento celular em termos de invasão e metástase (ambos simulados *in vitro*). Outro importante complexo descoberto em 2001 com significativa atividade antitumoral foi o RM175 (Figura 1) (Bergamo *et al.*, 2010).

2.3. O ácido salicílico

O ácido salicílico possui origem natural, sendo derivado de salicilatos presentes em espécies do gênero *Salix* (Salgueiro). Registros históricos demonstram que o uso terapêutico de extratos dessa planta eram empregados por civilizações antigas para o tratamento de inflamações, dores reumáticas, cólicas, gota, dores de cabeça, febres e dores auriculares. Apesar de apresentar eficácia terapêutica, o ácido salicílico demonstrou efeitos adversos relevantes, causando irritações gastrointestinais e toxicidade quando administrado em doses elevadas. (Montinari *et al.*, 2019)

Com isso, começa a busca pelo desenvolvimento de derivados do ácido salicílico que contornassem essas limitações. Em 1897, Felix Hoffmann, obteve sucesso ao acetilar o grupo fenólico do ácido salicílico, resultando na síntese do ácido acetilsalicílico, apresentado na figura 2. (Rezabakhsh *et al.*, 2021)

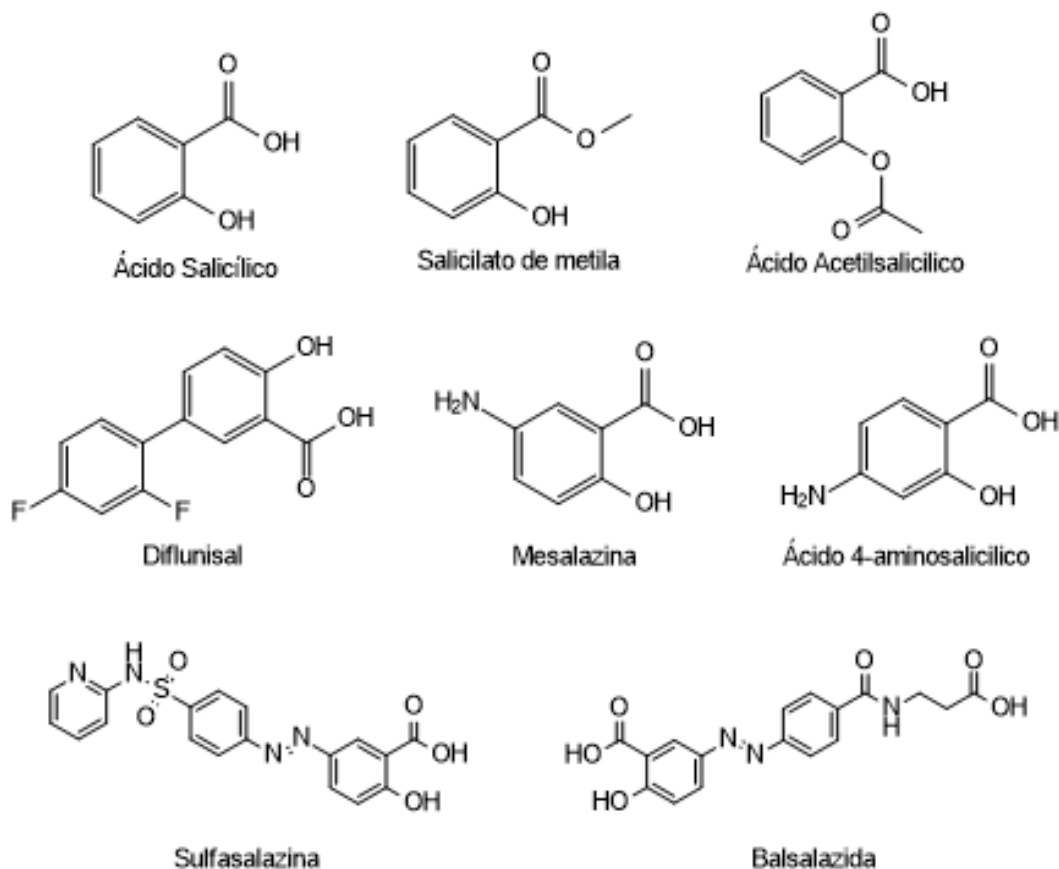
Figura 2 - Síntese da aspirina de Hoffmann, a partir de ácido salicílico e anidrido acético.



Fonte: Elaboração Própria.

Os derivados do ácido salicílico exercem sua ação farmacológica em virtude do seu conteúdo de ácido salicílico. As substituições nos grupos carboxila e hidroxila alteram a potência e a toxicidade dos salicilatos, podendo ter atividades farmacológicas adicionais a anti-inflamatória (Haddad *et al.*, 2007). Essa versatilidade das propriedades, fazem com que os derivados salicílicos (figura 3) continuem sendo amplamente utilizados em diversas áreas como: na medicina, cosmética e indústria.

Figura 3 – Derivados do ácido salicílico utilizados clinicamente



Fonte: Elaboração Própria

O ácido salicílico atualmente é usado topicamente, por sua ação queratolítica, sendo eficaz no tratamento de patologias descamativas, incluindo a psoríase, acne e dermatite seborreica.

O salicilato de metila possui relevância em formulações tópicas com propriedades rubefacientes, promovendo alívio de dores reumáticas, musculares e articulares. Além disso, também vem sendo utilizado em casos leves de distúrbios vasculares periféricos, como frieiras, e em preparações para inalação voltadas ao alívio sintomático de afecções do trato respiratório superior (Haddad *et al.*, 2007).

O ácido 4-aminossalicílico, conhecido como ácido para-aminossalicílico (PAS) possui importância histórica e terapêutica no tratamento da tuberculose, sendo um dos primeiros fármacos introduzidos no tratamento da tuberculose (Minato; Baughn, 2017). Atualmente é utilizado em associação com estreptomicina como alternativa de segunda linha ou em casos de tuberculose multirresistente.

O diflunisal é utilizado como analgésico e no tratamento de artrite reumatoide e osteoartrite devido aos efeitos antipiréticos, anti-inflamatórios e analgésicos (Stone *et al.*, 1977).

A mesalazina (ácido 5-aminossalicílico) é um anti-inflamatório utilizado no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (Abdu-Allah *et al.*, 2016). Entretanto, quando administrada na forma livre por via oral, a mesalazina pode ser parcialmente absorvida no intestino delgado, reduzindo sua disponibilidade no cólon (Tang *et al.*, 2024). Para contornar essa limitação, foram desenvolvidos pró-fármacos capazes de liberar a mesalazina especificamente no intestino grosso. A balsalazida é utilizado como tratamento de primeira linha na colite ulcerativa leve a moderada e na terapia de manutenção, e a sulfassalazina, composta pela mesalazina e sulfapiridina, é empregada no tratamento das doenças inflamatórias intestinais crônicas e como medicamento de segunda linha na artrite reumatoide (Enna; Bylund, 2008).

Além das suas propriedades, o ácido salicílico é um ligante potencialmente bidentado clássico: possui dois centros doadores vizinhos no anel aromático, o grupo carboxilato (COO^-) e o grupo fenolato (O^-). Esses dois átomos de oxigênio podem doar pares de elétrons a um cátion metálico, o que pode levar à formação de novas formas biologicamente ativas.

2.4. Anti – inflamatórios como ligantes

O entendimento sobre a inflamação associada ao câncer tem se ampliado significativamente, possibilitando a aplicação dos conhecimentos na elaboração de novos alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento do câncer. Sabe-se que as enzimas ciclooxigenase – 2 (COX-2) apresenta níveis elevados em vários tipos de tumor e tem um papel fundamental na produção de prostaglandinas, que atuam nas células cancerígenas inibindo a apoptose e aumentando a proliferação celular. Dessa forma, observa-se um direcionamento no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas em agentes capazes de atuar nessa enzima (Crusz; Balkwill, 2015).

Nesse contexto, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são compostos que inibem a atividade da COX e reduzem a produção das prostaglandinas, sendo um composto de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Pesquisas conduzidas por Graminha e colaboradores recentemente, investigaram a síntese e a atividade biológicas de seis complexos de rutênio (II) contendo ácido salicílico e derivados (ácido 4-aminossalicílico (AmSal) e 2,4-diidroxibenzoico) combinados com ligantes de fosfina e bipyridina. O estudo demonstrou que os complexos apresentam citotoxicidade significativa, especialmente em linhagens de câncer de mama triplo-negativo. Dentre os complexos testados, o $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, demonstrou o melhor índice de seletividade, sendo capaz de interagir com a transferrina humana para seu transporte e induzir a morte celular por meio da via intrínseca da apoptose (Graminha et al., 2022).

Teixeira e colaboradores avaliaram a atividade biológica de quatro complexos de rutênio (II) contendo derivados do ácido fenâmico (fenamato, mefenamato, tolfenamato e flufenamato). Os estudos demonstraram que os complexos exibiram citotoxicidade elevada contra o câncer de ovário resistente à cisplatina. Os complexos exibiram citotoxicidade in vitro superior, apresentando valores de IC_{50} significativamente inferiores aos observados para a cisplatina e para os ligantes em sua forma livre, evidenciando a coordenação metálica (Teixeira et al., 2025).

A investigação de Oliveira e colaboradores acerca de quatro complexos de rutênio (II) contendo diclofenaco, avaliaram a eficácia do complexo a linhagens tumorais de pulmão e mama. Os complexos apresentaram elevada citotoxicidade, sendo mais ativos e seletivos do que o diclofenaco livre e, mais eficazes que a

cisplatina. O complexo $[\text{Ru}(\text{dicl})(\text{dppb})(\text{bpy})]\text{PF}_6$ foi o mais potente e seletivo, especialmente para a linhagem de câncer de mama hormônio-dependente (Oliveira et al., 2020).

No âmbito das doenças negligenciadas, Miranda e colaboradores investigaram a atividade leishmanicida de três complexos de rutênio (II) coordenados a diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno. Os ensaios de citotoxicidade in vitro demonstraram que os complexos contendo diclofenaco e naproxeno apresentaram citotoxicidade significativa contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* apresentando IC_{50} comparáveis aos fármacos de primeira linha (Miranda et al., 2018).

De forma geral, os estudos reforçam o potencial dos complexos de rutênio associados a anti-inflamatórios como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes que atuem especialmente em tumores e doenças negligenciadas como a leishmaniose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a produção de óxido nítrico de um complexo de rutênio (II) contendo como ligante o ácido salicílico.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar um complexo neutro de formula geral $[\text{Ru}(\text{sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$ onde, fen = 1,10-fenantrolina, PPh_3 = trifenilfosfina e sal é o salicilato.
- Caracterizar o complexo por técnicas como: Ressonância Magnética Nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e ^1H , espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e voltametria cíclica.
- Avaliar interações com biomoléculas como interação com DNA por meio de medidas de viscosidade (utilizando a técnica de viscosidade relativa).
- Avaliar a citotoxicidade do composto frente a células de melanoma murino (B16-F10), fibroblasto humano (MRC-5) e macrófagos murinos (RAW 264.7).
- Avaliar a determinação da produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Solventes e Reagentes

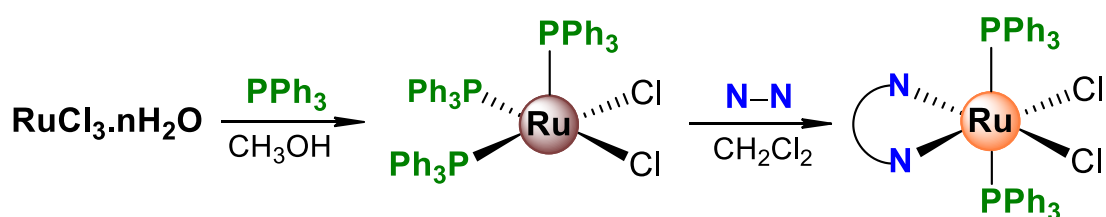
Os solventes utilizados são provindos da Synth P.A ou da Merck P.A, sendo utilizados sem nenhum tratamento prévio, sendo eles o diclorometano, éter etílico e metanol.

Como reagentes, foram utilizados o ácido salicílico, o tricloreto de rutênio hidratado, 1,10-fenantrolina e a trifenilfosfina, originados da Sigma-Aldrich.

4.1.2. Síntese

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi obtido um novo complexo de rutênio empregando o complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{fen})]$, o qual contém como ligantes, a trifenilfosfina (PPh_3), cloretos e 1,10-fenantrolina (fen) (Esquema 1).

Esquema 1: Rota sintética que será empregada para obtenção dos complexos precursores de rutênio. N-N se refere ao ligante 1,10-fenantrolina.

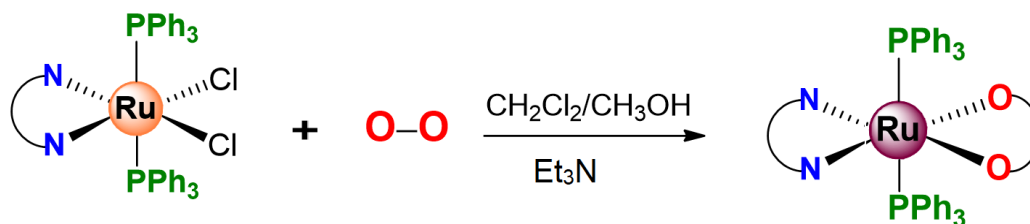


Fonte: Elaboração própria.

A síntese, conforme exibido no Esquema 2, foi realizada utilizando ácido salicílico, reagindo como o complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$, sob atmosfera inerte em solução diclorometano:metanol (2:1). Após a desaeração do solvente, adicionam-se 12 mg do ácido salicílico sobre agitação, juntamente com 17 μL de trietilamina, com a finalidade de promover a desprotonação. Após 5 minutos, foram adicionados 50 mg do complexo precursor.

A reação foi mantida sob agitação e refluxo por 24 horas, período em que se observou a mudança de coloração de amarelo para vermelho, indicando a formação do complexo. Ao término da reação, o volume da solução foi reduzido, sob vácuo até aproximadamente 2 mL, sendo realizada a precipitação do complexo por meio da adição lenta de água destilada. O material obtido foi filtrado, lavado com água destilada e seco a vácuo. O rendimento da reação foi de 78%.

Esquema 2 : Rota sintética genérica ilustrando como será realizada a obtenção do complexo de rutênio. N-N representa o ligante 1,10-fenantrolina e O-O representa a molécula de interesse, ácido salicílico.



Fonte: Elaboração própria.

4.1.3. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de Ressonância magnética nuclear (RMN) de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker Ascend 400 MHz, pertencente ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas do Cipharma/UFOP. Os complexos foram solubilizados em CH_2Cl_2 e adicionados aos tubos de RMN com um capilar de D_2O . Os espectros de ^1H e foram obtidos por solubilização em CDCl_3 .

4.1.4. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta – Visível

Os espectros eletrônicos dos compostos foram obtidos em um espectrofotômetro Thermo Scientific-Genesis 10S. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com 1 cm de espessura tendo solução de concentração conhecida e feita a leitura na região de 190 a 1000 nm.

4.1.5. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho do composto foram obtidos em um espectrômetro Bruker VERTEX 70, utilizando o método de Refletância Total Atenuada (ATR), feita a leitura na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.1.6. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica foi realizada no potenciostato/galvanostato Autolab, modelo PGSTAT302N, tomando-se as medidas em uma célula de três eletrodos, um de referência (prata/cloreto de prata), um eletrodo de trabalho, e outro contra eletrodo, ambos de platina. O solvente em questão é uma solução de PTBA (0,1M, eletrólito de suporte) dissolvido em diclorometano, onde foram submersos os eletrodos.

4.1.7. Interação com DNA por viscosidade relativa

Para a análise de interação do complexo com DNA, foi utilizado a técnica de viscosidade relativa. Foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações do composto, juntamente com tampão Tris-HCl (pH 7,4) e CT-DNA (50 $\mu\text{mol/L}$). As medidas foram feitas em triplicata, utilizando um viscosímetro de Oswald, em banho maria a temperatura de 37°C. Os resultados foram plotados em um gráfico $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs $([\text{DNA}]/[\text{Complexo}])$. O valor da viscosidade foi processado pela equação:

$$\eta = \frac{(t - t_0)[\text{DNA}]}{t_0}$$

onde, η_0 é a viscosidade do DNA sem complexo, η é a viscosidade do DNA na presença dos complexos, t_0 é o tempo de escoamento do DNA livre de complexo e t é o tempo de escoamento das soluções de DNA com complexo.

4.1.8. Avaliação da citotoxicidade

4.1.8.1. Cultivo celular e plaqueamento

Para o cultivo das células foi utilizado meio RPMI 1640 (Sigma®) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e gentamicina 60 $\mu\text{g/L}$ em pH 7,22. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por 48 horas ou até o tempo necessário para obter 80% ou mais de crescimento celular, trocando o meio quando o mesmo apresentava mudança de coloração (róseo-laranja para amarelo).

Após o crescimento e expansão das células, foi preparada a solução estoque (5×10^5 de células/ mL) em meio RPMI completo, conforme descrito anteriormente. Para o preparo da solução estoque, o meio de cultura foi descartado e as células foram desprendidas do frasco de cultura celular por raspagem com auxílio do suporte plástico (*cell scraper*), em seguida, foram adicionados aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 07 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização em vórtex.

Para a quantificação das células, as mesmas foram diluídas 20x em meio RPMI completo. E uma alíquota de 10 μL foi adicionada à câmara de Neubauer para a contagem. Após a devida diluição de forma a obter uma solução com 5×10^5 células/mL de meio RPMI, foram pipetados 100 μL da mesma em cada poço da placa

de cultura de 96 poços estéril. A placa foi incubada em estufa de CO₂ por 24 horas para que as células aderissem na mesma. Após esse período, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com meio RPMI sem fenol completo.

4.1.8.2. Citotoxicidade: Fibroblasto humano MRC-5 e melanoma murino B16F10

Após o cultivo de cada célula e o plaqueamento descritos no item 4.1.8.1, 100 µL do complexo, previamente solubilizados em DMSO 0,08% e meio RPMI sem fenol completo nas concentrações de 80 a 0.015625µg/mL foram adicionadas em quadruplicada às placas. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 e 48 horas. Após a incubação, o meio foi removido e os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com PBS em pH 7,2. As células foram então fixadas por adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 20% frio durante 1 hora a 4 °C. Após este tempo, a placa foi lavada com água destilada e seca.

As células fixadas foram coradas durante 30 minutos com 40 µL de SRB 0,1% solubilizado em ácido acético a 1 %. A placa foi então lavada com ácido acético a 1%, novamente deixada secar e foram adicionados 200 µL de tampão Tris 10 mM (pH 10,5) para solubilizar a coloração, sob abrigo de luz. Depois de aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 490 nm em leitor de placas multifuncional Tecan e os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas) (Skehan *et al.*, 1990).

4.1.9. Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. As células foram cultivadas e plaqueadas conforme descrito no item 4.1.8.1. Após o período de adesão, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 µL do complexo, previamente solubilizado em RPMI (Sigma-Aldrich®) contendo DMSO (Sigma-Aldrich®) a 0,08%, nas concentrações finais de 42,5; 21,2; 10,6; 5,3; 2,7 e 1,3 µM. Estas concentrações escolhidas para teste consistem em valores menores que o IC₅₀ determinado (para a célula RAW 264.7) previamente.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução contendo lipopolissacarídeo (LPS; Sigma-Aldrich®) na concentração de 15 µg/mL e interferon-gamma (IFN-γ; BD OptEIA®) a 100 ng/mL, ambos diluídos em RPMI. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas em condições adequadas de cultura celular. Após os

períodos experimentais, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior determinação de óxido nítrico (NO).

A quantificação do NO foi realizada pelo método de Griess, que permite a determinação indireta dos metabólitos estáveis do óxido nítrico, nitrato e nitrito (NO_3^- e NO_2^-), conforme descrito por Green e colaboradores (Green *et al.*, 1982). O reagente de Griess foi preparado pela combinação, em proporção 1:1, de solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 2,5% e solução de N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1% em água destilada. Para construção da curva padrão, utilizou-se nitrito de sódio (NaNO_2 ; Sigma®) em concentrações variando de 0,500 a 0,00024 nmol/mL, obtidas por diluições seriadas.

Alíquotas de 50 μL das amostras ou das soluções padrão foram transferidas para placas de 96 poços, seguidas da adição de 50 μL do reagente de Griess. Após incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de placas multifuncional Tecan. As amostras foram analisadas em quadruplicata, e as concentrações de nitrito foram determinadas a partir da equação da reta obtida por regressão linear da curva padrão.

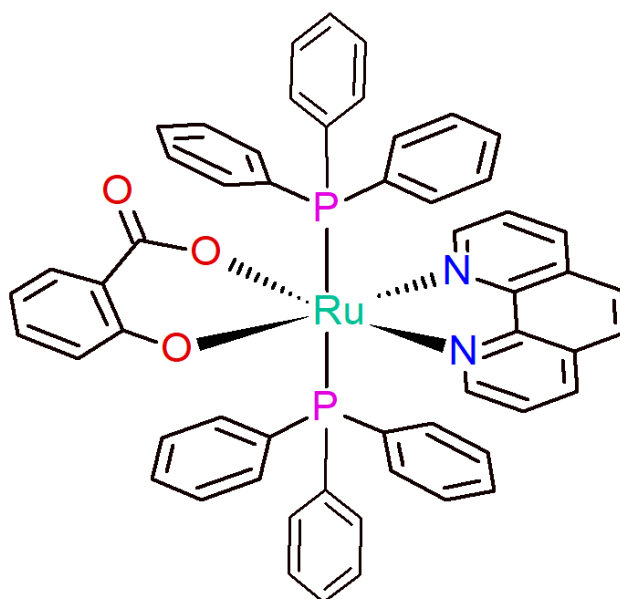
4.1.10. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para conjuntos de dados com distribuição paramétrica, aplicou-se análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo obteve-se um novo complexo identificado como $[\text{Ru}(\text{Sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$, onde sal significa salicilato, fen é 1,10-fenantrolina e PPh_3 se refere à trifenilfosfina. O complexo é neutro tal como indicado por meio de medidas de condutividade molar realizadas em diclorometano que revelaram um valor de apenas $15 \mu\text{S cm}^{-1}$, característico de espécies não eletrolíticas em solução. Esse resultado indica que o complexo se comporta como uma espécie neutra, não ocorrendo dissociação iônica significativa no solvente. Tal observação está em concordância com a fórmula proposta para $[\text{Ru}(\text{Sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$ (Esquema 3), na qual a neutralidade é mantida pelo balanço entre o estado de oxidação do rutênio (2^+) como o salicilato apresentando duas cargas negativas, enquanto a fen e PPh_3 são espécies neutras.

Esquema 3 : Estrutura proposta para o complexo contendo ácido salicílico, o $[\text{Ru}(\text{Sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$.



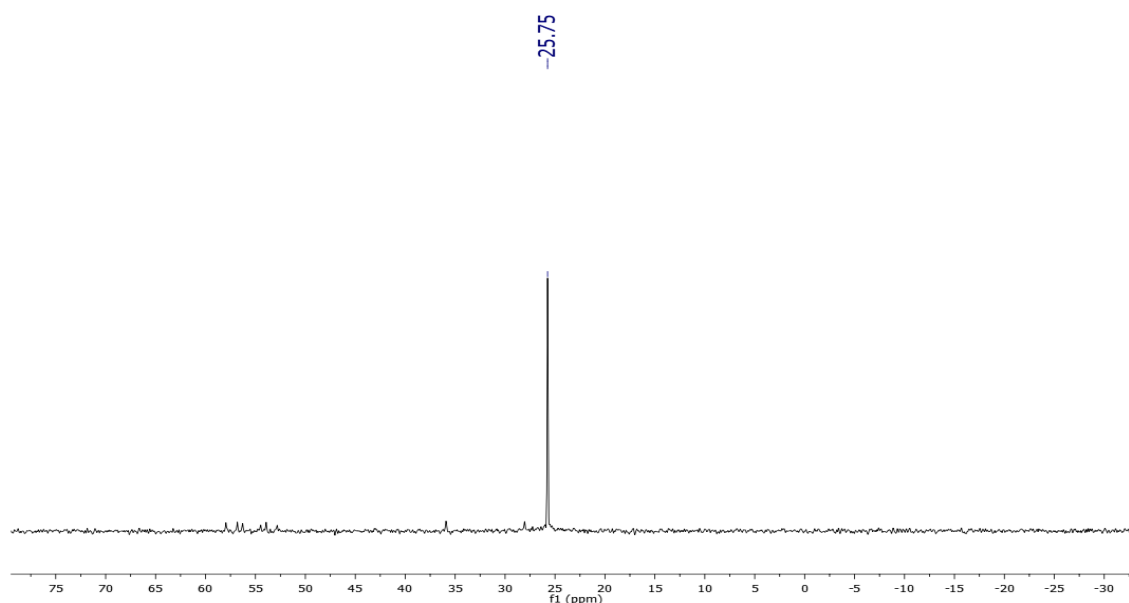
Fonte: Elaboração Própria.

5.1. Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de fósforo desacoplado com hidrogênio, apresentado na Figura 4, permitiu atestar a formação e a pureza do complexo. O complexo apresentou um singlete com deslocamento de 24,75 ppm. A presença desse singlete indica que os dois ligantes trifenilfosfina estão quimicamente e magneticamente equivalentes no ambiente de coordenação do rutênio, sugerindo

uma geometria bem definida e simétrica ao redor do centro metálico. Caso do presente complexo, há dois ligantes PPh_3 em uma configuração trans. Caso houvesse fósforos distintos, como em arranjos cis ou misturas de espécies, seriam observados mais sinais distintos ou mesmo padrões de acoplamento fósforo-fósforo distintos, como $^2J_{\text{PP}}$. Portanto, o fato de se observar apenas um singlete reforça a hipótese de que o complexo foi obtido como uma única espécie em solução, sem a presença de isômeros detectáveis ou subprodutos contendo fósforo. Além disso, o deslocamento químico em 24,75 ppm é consistente com valores descritos na literatura para complexos de rutênio (II) coordenados a ligantes fosfínicos, e ligeiramente diferente do deslocamento químico observado para o complexo precursor utilizado nesse trabalho $[\text{RuCl}_2(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$ com deslocamento químico em aproximadamente 23 ppm. Em comparação com a trifenilfosfina livre ou oxidada, cujo sinal de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ geralmente aparece em torno de -5 e 28 ppm, respectivamente, observa-se um deslocamento significativo para campo baixo, evidenciando a coordenação do átomo de fósforo ao centro metálico. Comparado como a PPh_3 livre, esse deslocamento é consequência da diminuição da densidade eletrônica sobre o fósforo após a formação da ligação coordenada P-Ru, alternando seu ambiente eletrônico. A ausência de sinais adicionais na região típica de fosfinas livres e oxidada confirma que não há excesso significativo de PPh_3 não coordenada na amostra, corroborando a pureza do complexo sintetizado.

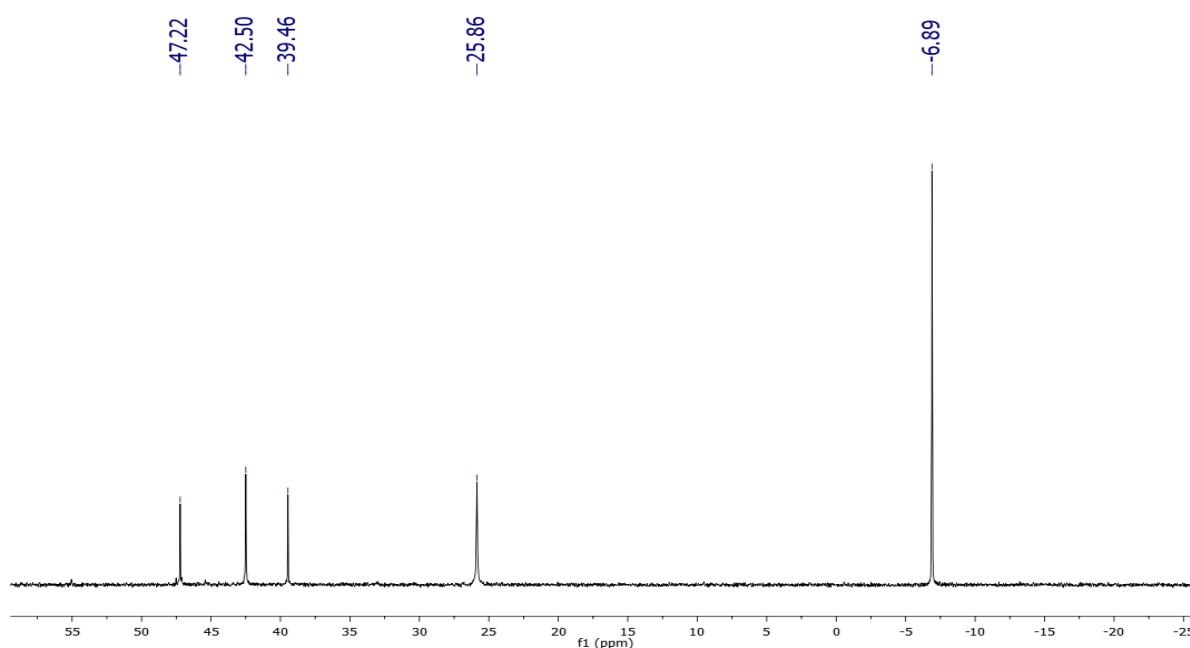
Figura 4 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, realizado em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.



Fonte: Elaboração Própria

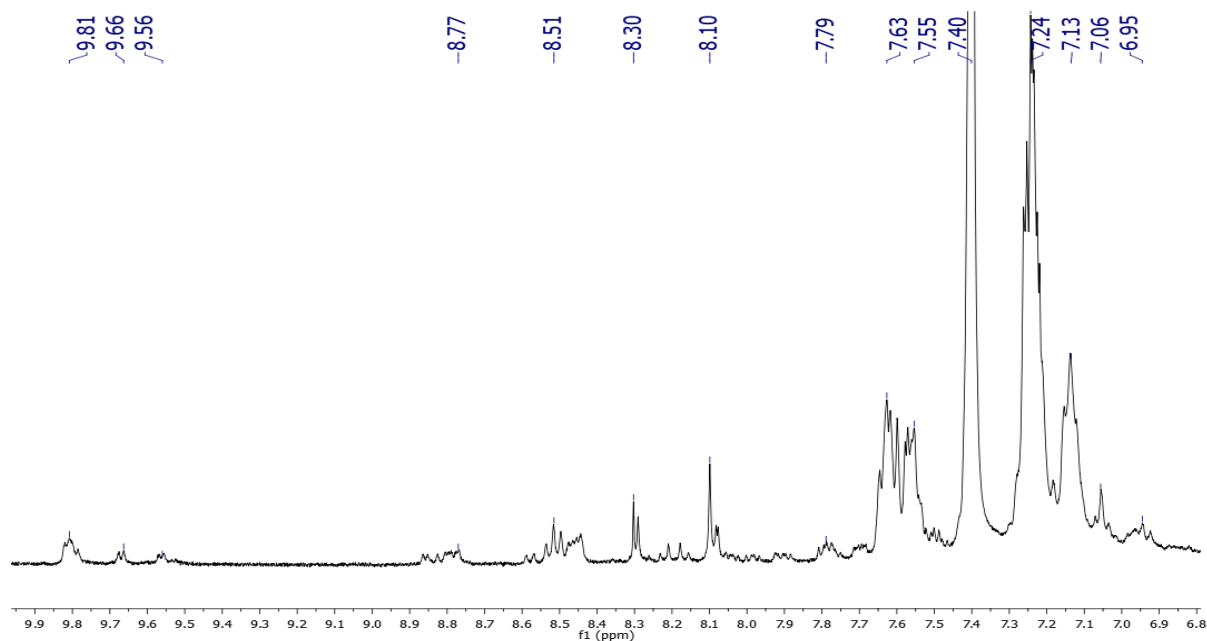
O complexo obtido apresentou baixa solubilidade em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Dessa forma, para a aquisição do espectro de RMN de ^1H , optou-se pela utilização de DMSO-d_6 como solvente. Considerando que o DMSO é um solvente coordenante, avaliou-se também a possível estabilidade do complexo nesse meio. As figuras apresentam os espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (Figura 5) e ^1H (Figura 6) do complexo em DMSO-d_6 . Observa-se que, nesse solvente, o comportamento espectral do complexo $[\text{Ru}(\text{Sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$ difere daquele obtido em diclorometano, sendo detectados novos sinais no espectro de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Esses resultados sugerem que o complexo apresenta certa instabilidade em DMSO , possivelmente em decorrência da coordenação do solvente ao centro metálico $\text{Ru}(\text{II})$. A presença de um sinal em aproximadamente $-6,8$ ppm é indicativa da liberação do ligante monodentado trifenilfosfina (PPh_3), uma vez que essa região é característica de PPh_3 livre. Esse fato sugere a ocorrência de um processo de labilização da monofosfina, com possível substituição por uma molécula de solvente. O sinal observado em 25 ppm foi atribuído ao complexo $[\text{Ru}(\text{Sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$ de interesse, enquanto os sinais em 39 , 42 e 47 ppm podem estar relacionados à formação de espécies intermediárias em equilíbrio no meio com a coordenação do solvente. Esse complexo é particularmente relevante, pois indica que, em meio coordenante, o complexo pode sofrer modificações estruturais, sugerindo um possível comportamento de pró-fármaco sob condições biológicas.

Figura 5 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, realizado em DMSO-d_6 .



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 6 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^1H , realizado em DMSO-d_6 .



Fonte: Elaboração Própria.

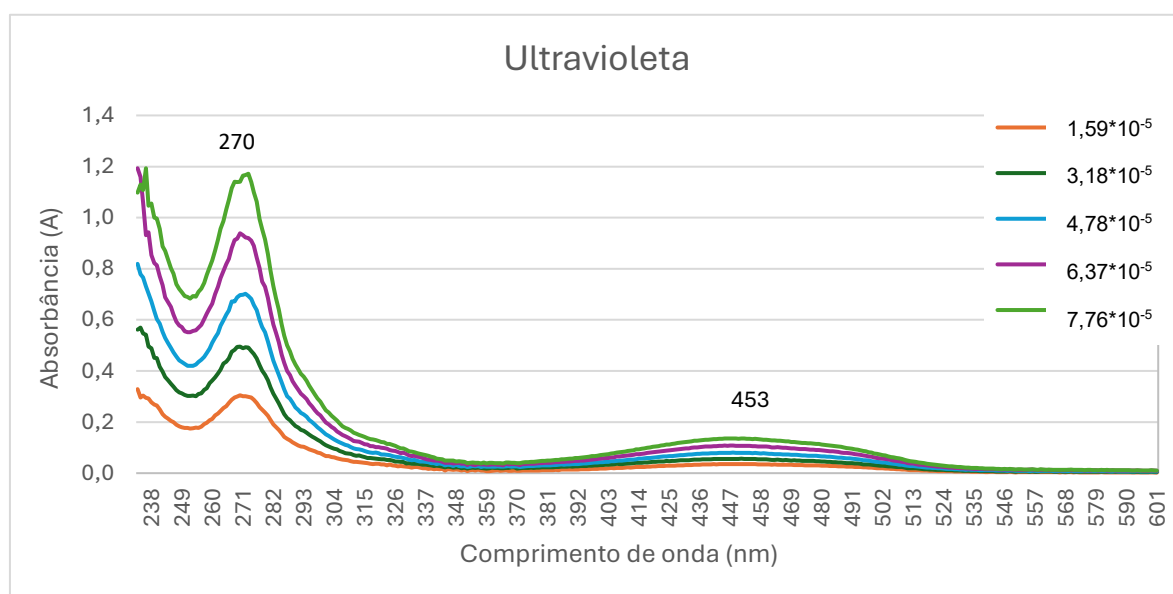
A instabilidade parcial do complexo em DMSO torna a interpretação do espectro de RMN de ^1H mais desafiadora, devido à presença de múltiplos sinais sobrepostos. Ainda assim, o espectro foi analisado com o objetivo de identificar sinais atribuíveis aos ligantes coordenados. Essa análise é dificultada pelo fato de todos os hidrogênios presentes no complexo serem aromáticos, resultando em regiões espectrais mais congestionadas ainda com vários multipletos. Para o ligante salicilato, são esperados sinais na região entre 6,9 e 7,8 ppm. No espectro obtido (Figura 6), os sinais em 6,95 e 7,06 ppm foram atribuídos a esse ligante, corroborando a presença deste ligante no complexo sintetizado. Os demais sinais nessa região encontram-se sobrepostos aos sinais na faixa de 7,8 a 9,8 ppm foram atribuídos ao ligante 1,10-fenantrolina, em concordância com o padrão esperado para sistemas aromáticos heterocíclicos desse tipo.

5.2. Espectroscopia na região do Ultravioleta – Visível

A técnica de espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) foi utilizada com o intuito de avaliar os tipos de transição eletrônica existentes no complexo.

Foi possível observar no espectro (Figura 6) a presença de duas bandas, sendo uma de maior intensidade, e outra de menor intensidade. A primeira, em 270 nm é referente as transições eletrônicas que ocorrem do orbital π -ligante ao π -antiligante da fenantrolina, trifenilfosfina e do ácido salicílico. A banda de 453 nm está relacionada com as transições do tipo Transição de Carga do Metal para o Ligante (MLCT).

Figura 6 – Espectro de UV-Vis do complexo.



Fonte: Elaboração Própria

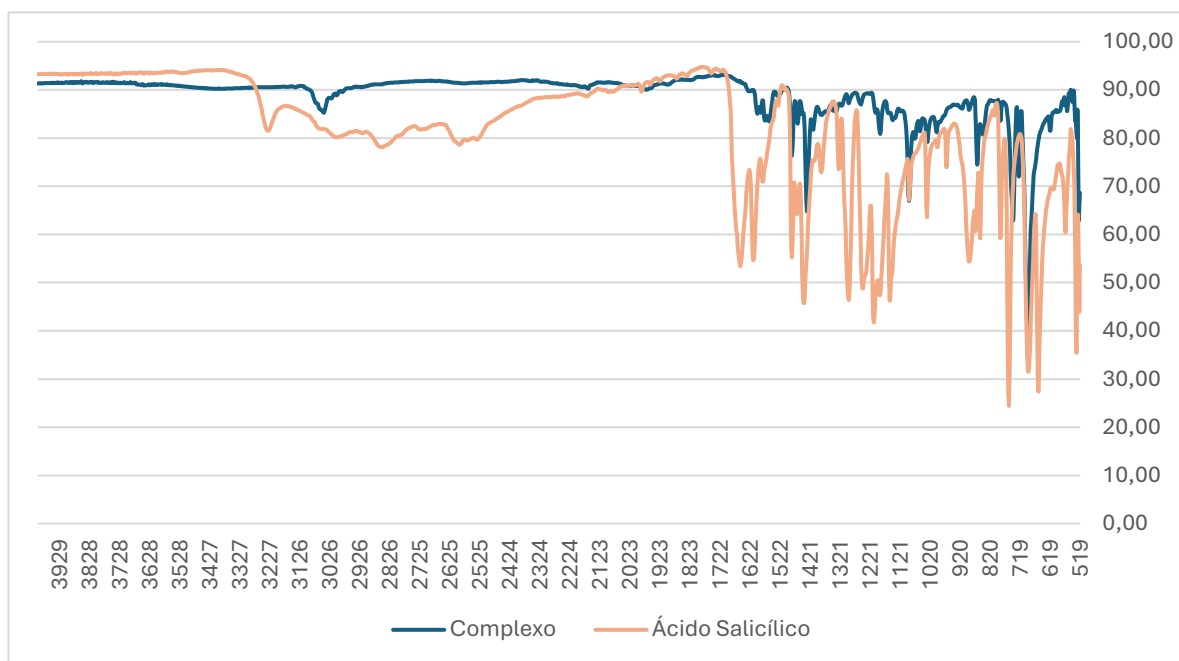
Tabela 1 – Dados de comprimento de onda máximo de absorção (λ_{MAX}), absortividade molar (ϵ) e tentativas de atribuição de bandas.

λ_{MAX} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Transição
270	19.182	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
453	2.201	MLCT

5.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para a devida caracterização do complexo obtido, podendo visualizar e estudar as vibrações da molécula, bem como fazer a comparação entre o complexo e o ligante.

Figura 7 - Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante e do complexo.



Fonte: Elaboração Própria.

A formação do complexo em questão pode ser comprovada, a partir da comparação dos espectros do ligante livre e do complexo (Figura 7). Ao observar o espectro do complexo, observa-se a ausência da banda em 3233 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{O-H})$ fenólico, bem como o desaparecimento da banda larga na região de $3280 - 2500 \text{ cm}^{-1}$, característica do estiramento $\nu(\text{O-H})$ do grupo carboxílico. Essas alterações indicam a dupla desprotonação do ácido salicílico para a sua coordenação.

Além disso, observa-se o desaparecimento da banda em 1652 cm^{-1} atribuída a estiramento $\nu(\text{C=O})$ do ácido livre, acompanhado com a presença das bandas em 1580 e 1431 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico e simétrico do carboxilato $\nu(\text{COO}^-)$. Essas evidencias confirmam a desprotonação do grupo carboxílico para a sua coordenação ao grupo metálico.

Observa-se ainda em 1090 cm^{-1} uma banda, atribuída ao estiramentos $\nu(\text{P-C})$ e uma banda em 523 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu(\text{Ru-P})$, que comprovam a coordenação da trifenilfosfina ao centro metálico.

As bandas referentes as ligações $\nu(\text{Ru-O})$ e $\nu(\text{Ru-N})$, não foram passíveis de serem observadas, uma vez que essas vibrações aparecerem em regiões abaixo de 500 cm^{-1} , região em que não foi possível observar na análise.

Tabela 2 – Tentativa de atribuição das principais bandas de absorção na região do infravermelho.

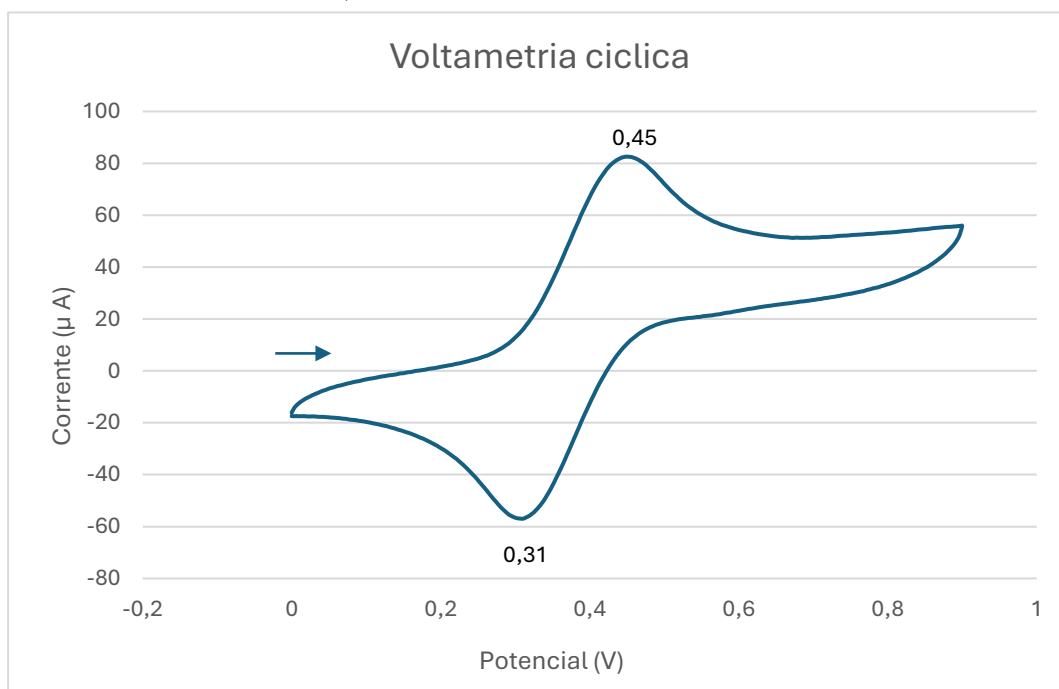
Atribuições	Ligante	Complexo
$\nu\text{O-H}_{\text{fenol}}$	3233	-
$\nu\text{O-H}_{\text{carboxila}}$	3280 - 2500	-
$\nu\text{C-H}$	3000 - 2831	3045
$\nu\text{C=O}$	1652	-
$\nu(\text{COO}^-)$	-	1431; 1580
$\nu\text{C-P}$	-	1090
$\nu\text{Ru-P}$	-	523

5.4. Voltametria cíclica

Para avaliar o comportamento de oxi-redução dos complexos metálicos, foram realizados estudos eletroquímicos utilizando a técnica de voltametria cíclica. Essa técnica permitiu obter informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos redox do complexo metálico, bem como avaliar a influência que os ligantes possam ter sobre o metal, a partir do deslocamento do potencial de oxidação Ru(II)/Ru(III) .

É possível observar na Figura 8 o voltamograma cíclico do complexo, onde seus dados associados, estão compilados na Tabela 3.

Figura 8 - Voltamograma cíclico do complexo em solução de diclorometano na concentração de 1×10^{-3} mol/L em 0,1 mol/L de PTBA. Velocidade de varredura de 50 mV/s.



Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 3 - Potenciais de oxidação RuIII/RuII e correntes anódicas e catódicas dos complexos.

E_{PA} (V)	0,45
E_{PC} (V)	0,31
E_{1/2} (V)	0,38
I_{PA} (uA)	76
I_{PC} (uA)	78
I_{PA}/ I_{PC} (uA)	0,97

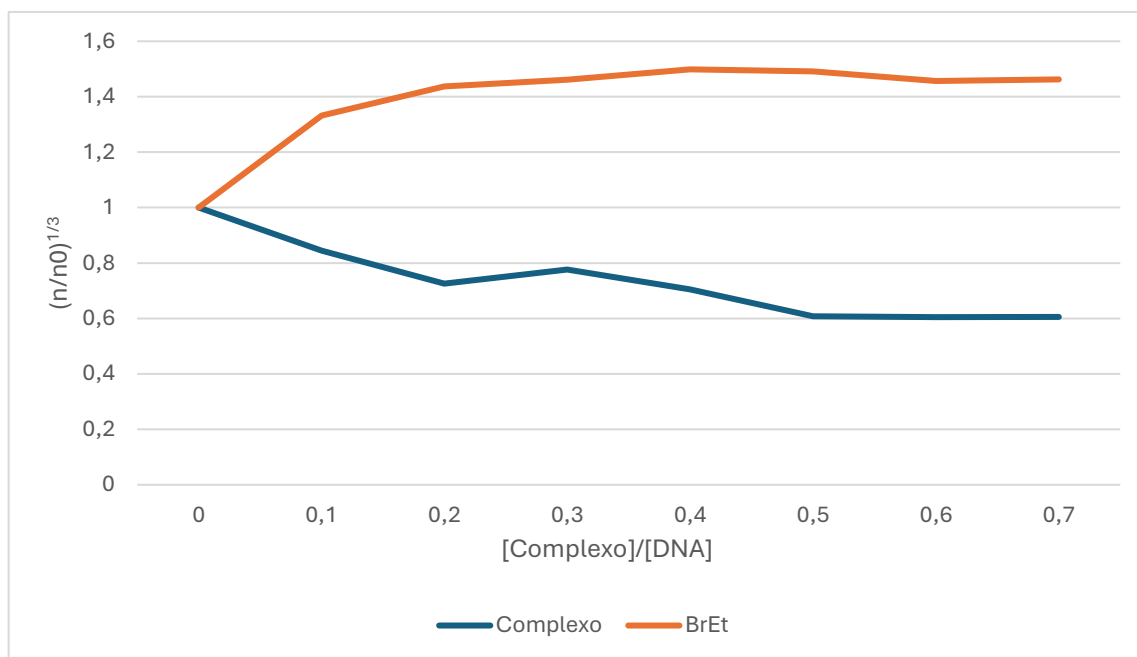
Ao se analisar os dados da corrente de pico anódico e catódico, é possível afirmar que o complexo sintetizado apresenta caráter quasi-reversível, uma vez que a razão entre os valores de corrente é próximo de 1, característica típica de sistema redox reversíveis. Nota-se que em torno de 450 mV há um processo de oxidação de Ru²⁺ para Ru³⁺, enquanto a redução de Ru³⁺ para Ru²⁺, ocorre em torno de 310 mV.

5.5. Interação com DNA por viscosidade relativa

Através da viscosidade conseguimos diferenciar os três tipos de interação principais com o DNA. Isso ocorre porque a intercalação da molécula com as bases nitrogenadas do DNA podem promover o alongamento, enrijecimento desenrolamento parcial da dupla hélice, aumentando a viscosidade. Os compostos que estabelecem ligações covalentes coordenadas, provocam a distorção da dupla hélice, reduzindo o comprimento e consequentemente a diminuição da viscosidade. Já os compostos que interagem com os sulcos do DNA não alteram significativamente o comprimento da molécula, desse modo a viscosidade não sofre alterações significativas.

Com base nos dados apresentados na Figura 9, o brometo de etídio (BrEt) promoveu um aumento da viscosidade, comportamento característico de um intercalador clássico, que causa o alongamento da dupla hélice. Por outro lado, o complexo analisado apresenta leve diminuição da viscosidade, descartando o mecanismo de interação por intercalação. Esse comportamento sugere uma interação externa ao DNA, possivelmente por ligações nos sulcos do DNA.

Figura 09 – Viscosidade relativa do CT-DNA do complexo e do padrão brometo de etídio, em diferentes razões molares [Composto]/[DNA].



Fonte: Elaboração Própria

5.6. Citotoxicidade

A citotoxicidade do complexo, foi realizada frente às linhagens MRC-5 (fibroblastos humanos), B16-F10 (melanoma murino) e RAW 264.7 (macrófagos murinos), nos períodos de 24 e 48 horas. Determinou-se a concentração inibitória 50 (IC_{50}), definida como a dose responsável por inibir em 50% o crescimento celular. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores de IC_{50} do complexo em fibroblasto humano MRC-5, melanoma murino B16-F10 e macrófago murino RAW 264.7.

	IC_{50} (μM)	
	24 horas	48 horas
MRC-5	$49,50 \pm 1,2$	$>80,0 \pm 0,0$
B16-F10	$>80,0 \pm 0,0$	$47,88 \pm 2,8$
RAW 264.7	$48,52 \pm 3,1$	$>80,0 \pm 0,0$

Os resultados demonstram que, após 24 horas de exposição, o complexo apresentou um IC_{50} de $49,5 \pm 1,2 \mu M$ para a linhagem MRC-5 e $48,52 \pm 3,1 \mu M$ para

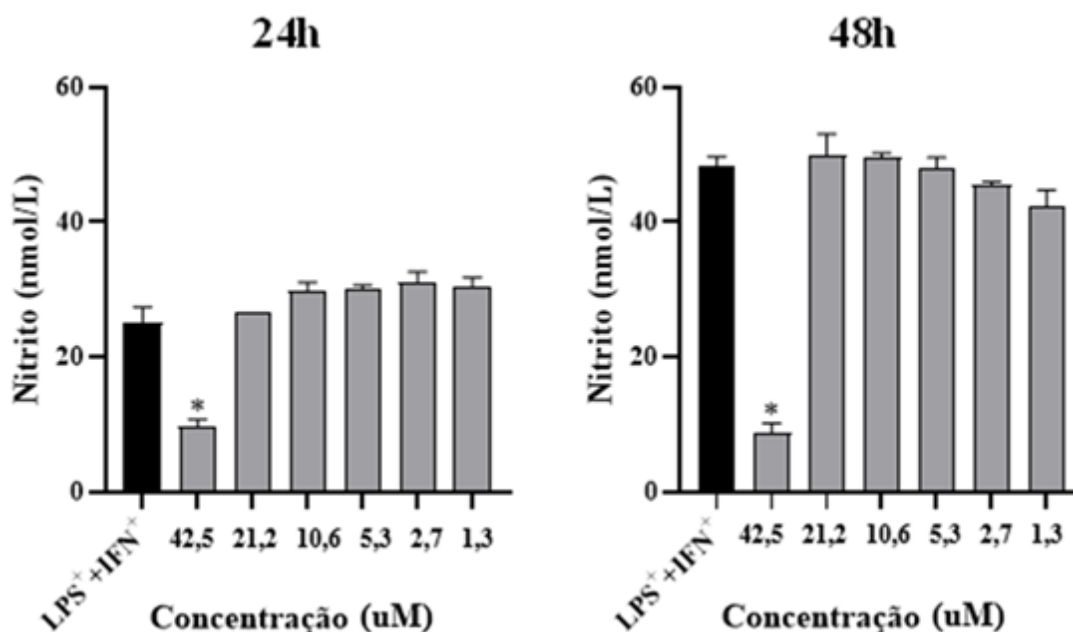
RAW 264.7, enquanto para a linhagem tumoral B16-F10 o valor foi superior a 80 μ M, indicando que, no período inicial, o complexo apresentou citotoxicidade moderada em células não tumorais e macrófagos, mas baixa atividade frente às células tumorais.

Entretanto, após o período de 48 horas de tratamento, observou-se uma inversão desse perfil. A linhagem B16-F10 apresentou IC_{50} de $47,88 \pm 2,8$ μ M, apresentando um aumento da atividade citotóxica dependente do tempo. Enquanto, as linhagens MRC-5 e RAW 264.7 apresentaram valores superiores a 80 μ M. Esse comportamento sugere que as células não tumorais e os macrófagos sobreviventes ao período inicial (24 horas) foram capazes de recuperar sua viabilidade e retomar o ciclo celular, indicando um potencial de seletivo do complexo em exposições prolongadas.

5.7. Óxido Nítrico

A quantificação indireta de óxido nítrico (NO) foi realizada em sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS+IFN, tratados com o complexo em diferentes concentrações e avaliados nos tempos 24 e 48 horas, apresentados na Figura 10. Esse ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial efeito do complexo de Ru/salicilato sobre a modulação da resposta inflamatória, uma vez que a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados constitui um importante marcador de ativação celular e de processos inflamatórios. Dessa forma, a análise dos níveis de NO permite inferir possíveis propriedades imunomoduladoras ou anti-inflamatórias do composto em estudo. Como o ligante utilizado é um agente anti-inflamatório, a investigação se ele desempenharia algum efeito, torna-se relevante.

Figura 10 - Quantificação indireta de óxido nítrico em sobrenadante de macrófagos RAW estimulados com LPS+IFN e tratados com diferentes concentrações do complexo.



*Concentração de Nitrito (nmol/L) significativamente menor ($p < 0,05$) que os macrófagos estimulados e não tratados (LPS⁺+IFN⁺).

Fonte: Elaboração Própria.

Com os resultados obtidos, em todos os tempos avaliados, apenas o tratamento com a maior concentração testada, 42,5 μ M, promoveu a redução significativa da produção de NO quando comparado aos macrófagos estimulados com LPS⁺+IFN⁺ e não tratados. Esse comportamento sugere que o complexo apresenta potencial atividade anti-inflamatória dependente da concentração, manifestada apenas na maior concentração investigada. Dessa forma, pode-se inferir que a coordenação do salicilato ao centro metálico não potencializou significativamente o efeito anti-inflamatório nas concentrações mais baixas, indicando que sua contribuição para a modulação da produção de NO pode estar limitada às condições de maior exposição ao complexo.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi sintetizado um novo complexo de rutênio (II) com ligante ácido salicílico, junto aos ligantes auxiliares trifenilfosfina e fenantrolina de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{Sal})(\text{fen})(\text{PPh}_3)_2]$. O complexo foi caracterizado através das técnicas de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de absorção na região de infravermelho e ultravioleta e visível e voltametria cíclica, que confirmaram a formação do complexo. A análise de interação com DNA por viscosidade relativa mostrou que o complexo possivelmente apresenta interação externa ao DNA, possivelmente por ligações nos sulcos do DNA.

Por fim os ensaios biológicos apontaram que o complexo apresentou atividade citotóxica moderada frente à linhagem tumoral B16-F10, demonstrando maior efeito após 48 horas de exposição. Além disso, na concentração de 40 μM observou-se uma redução significativa na produção de óxido nítrico indicando potencial atividade anti-inflamatória. Dessa forma, os resultados sugerem que o complexo possui um potencial promissor em futuras otimizações estruturais, na busca de tentar compreender melhor suas relações de estrutura atividade e elucidar o seu possível mecanismo de ação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro : INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/abc-do-cancer-abordagens-basicas-para-o-controle-do-cancer>. Acesso em: 13 jan. 2026.

ABDU-ALLAH, Hajjaj; EL-SHORBAGI, Abdel-Nasser; ABDEL-MOTY, Samia; EL-AWADY, Raafat; ABDEL-ALIM, Abdel-Alim. 5-Aminosalicylic Acid (5-ASA): A Unique Anti-Inflammatory Salicylate. **Medicinal chemistry (Los Angeles)** **2161-0444**, [S.l.], v. 6, p. 306–315, 9 maio 2016. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000361>.

ALESSIO, Enzo; MESSORI, Luigi. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [S.l.], v. 24, n. 10, p. 1995, 24 maio 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>.

BERGAMO, A.; MASI, A.; PEACOCK, A. F. A.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P. J.; SAVA, G. In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S.l.], v. 104, n. 1, p. 79–86, jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.10.005>.

BOLD-100 IN COMBINATION WITH FOLFOX FOR THE TREATMENT OF ADVANCED SOLID TUMOURS | **CLINICAL RESEARCH TRIAL LISTING**. Disponível em: <https://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/NCT04421820/bold-100-in-combination-with-folfox-for-the-treatment-of-advanced-solid-tumours/bold-100-in-combination-with-folfox-for-the-treatment-of-advanced-solid-tumours>. Acesso em: 20 fev. 2026.

BOURGEOIS, Amber; HORRILL, Tara; MOLLISON, Ashley; STRINGER, Eleah; LAMBERT, Leah K.; STAJDUHAR, Kelli. Barriers to cancer treatment for people experiencing socioeconomic disadvantage in high-income countries: a scoping review. **BMC health services research**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 670, 28 maio 2024. <https://doi.org/10.1186/s12913-024-11129-2>.

BRANDÃO, Hugo N.; DAVID, Juceni P.; COUTO, Ricardo D.; NASCIMENTO, Jorge A. P.; DAVID, Jorge M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, [S.l.], v. 33, p. 1359–1369, 2010. DOI: [10.1590/S0100-40422010000600026](https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/h8yW6Tn836WYxN4f8FzcRPn/>. Acesso em: 8 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Câncer* — Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer>. Acesso em: 20 fev. 2026.

CENTRO DE COMBATE AO CÂNCER. *Os fatores de risco ambientais*. São Paulo, SP. Disponível em: <https://cccancer.net/o-cancer/os-fatores-de-risco-ambientais/>. Acesso em: 19 jan. 2026.

CHEFF, Dorian M.; HALL, Matthew D. A Drug of Such Damned Nature.1 Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 60, n. 11, p. 4517–4532, 8 jun. 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01351>.

CHELLAN, Prinessa; SADLER, Peter J. Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. **Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)**, [S.l.], v. 26, n. 40, p. 8676–8688, 17 jul. 2020. DOI: [10.1002/chem.201904699](https://doi.org/10.1002/chem.201904699). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7496994/>. Acesso em: 25 jan. 2024.

CRUSZ, Shanthini M.; BALKWILL, Frances R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.l.], v. 12, n. 10, p. 584–596, out. 2015. DOI: [10.1038/nrclinonc.2015.105](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.105). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2015.105>. Acesso em: 21 jan. 2026.

ENNA, S. J.; BYLUND, David B. (Ed.). *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Amsterdam; Boston: **Elsevier**, 2008. ISBN 978-0-08-055232-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780080552323/xpharm-the-comprehensive-pharmacology-reference>. Acesso em: 20 fev. 2026.

FONTES, Ana Paula Soares; ALMEIDA, Sérgio Gama de; NADER, Letícia de Andrade. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**, [S.l.], v. 20, p. 398–406, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000400010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/MmftMSJ4WdLwhjpDQRpcPXg/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 19 jan. 2026.

GRAMINHA, Angelica E.; POPOLIN, Cecília; HONORATO DE ARAUJO-NETO, João; CORREA, Rodrigo S.; DE OLIVEIRA, Kátia M.; GODOY, Luani R.; VEGAS, Legna Colina; ELLENA, Javier; BATISTA, Alzir A.; COMINETTI, Marcia R. New ruthenium complexes containing salicylic acid and derivatives induce triple-negative tumor cell death via the intrinsic apoptotic pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 243, p. 114772, 5 dez. 2022. DOI: [10.1016/j.ejmech.2022.114772](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114772). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523422006742>. Acesso em: 10 fev. 2026.

GREEN, Laura C.; WAGNER, David A.; GLOGOWSKI, Joseph; SKIPPER, Paul L.; WISHNOK, John S.; TANNENBAUM, Steven R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 out. 1982. DOI: [10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326978290118X>. Acesso em: 20 fev. 2026.

HADDAD, Lester M.; SHANNON, Michael W.; BORRON, Stephen W.; BURNS, Michael J.; WINCHESTER, James F. *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. 4. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2007. ISBN 9780721606934. Disponível em: <https://ndl.ethernet.edu.et/handle/123456789/91174>. Acesso em: 20 fev. 2026.

JOHNSTONE, Timothy C.; PARK, Ga Young; LIPPARD, Stephen J. Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs – Phenanthriplatin. **Anticancer research**, [S.l.], v. 34, n. 1, p. 471–476, jan. 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3937549/>. Acesso em: 20 fev. 2026.

LIMA, Lídia M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, [S.l.], v. 30, p. 1456–1468, dez. 2007. DOI: [10.1590/S0100-40422007000600015](https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000600015). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/z9ZYt7BxsMVCgLv8Wp7Fvnd/>. Acesso em: 21 out. 2024.

MARTEL, Catherine de; GEORGES, Damien; BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; CLIFFORD, Gary M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. e180–e190, 1 fev. 2020. DOI: [10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(19\)30488-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(19)30488-7/fulltext). Acesso em: 20 fev. 2026.

MINATO, Yusuke; BAUGHN, Anthony D. Para-aminosalicylic acid (PAS). **Kucers the Use of Antibiotics**. [S.l.]: CRC Press, 1 jan. 2017. p. 2488–2492. Disponível em: <https://www.scopus.com/pages/publications/85056691523>. Acesso em: 4 fev. 2026.

MIRANDA, Victor M.; COSTA, Monica S.; GUILARDI, Silvana; MACHADO, Antonio E. H.; ELLENA, Javier A.; TUDINI, Kelly A. G.; VON POELHSITZ, Gustavo. In vitro leishmanicidal activity and theoretical insights into biological action of ruthenium(II) organometallic complexes containing anti-inflammatories. **Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, [S.l.], v. 31, n. 6, p. 1003–1017, dez. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0145-z>.

MONTINARI, Maria Rosa; MINELLI, Sergio; DE CATERINA, Raffaele. The first 3500 years of aspirin history from its roots – A concise summary. **Vascular Pharmacology**, [S.l.], v. 113, p. 1–8, 1 fev. 2019. DOI: [10.1016/j.vph.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.10.008). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189118303549>. Acesso em: 3 fev. 2026.

MURRAY, Benjamin S.; BABAK, Maria V.; HARTINGER, Christian G.; DYSON, Paul J. The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors. **Coordination Chemistry Reviews**, [S.l.], v. 306, p. 86–114, 1 jan. 2016. DOI: [10.1016/j.ccr.2015.06.014](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.06.014). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854515002192>. Acesso em: 25 jan. 2024.

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja; VAN BEIJNUM, Judy R.; CASINI, Angela; NAZAROV, Alexey A.; WAGNIÈRES, Georges; VAN DEN BERGH, Hubert; DYSON, Paul J.; GRIFFIOEN, Arjan W. Organometallic Ruthenium(II) Arene Compounds with Antiangiogenic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 54, n. 11, p. 3895–3902, 9 jun. 2011. DOI: [10.1021/jm2002074](https://doi.org/10.1021/jm2002074). Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm2002074>. Acesso em: 25 jan. 2024.

OLIVEIRA, Katia M.; HONORATO, João; GONÇALVES, Guilherme R.; COMINETTI, Marcia R.; BATISTA, Alzir A.; CORREA, Rodrigo S. Ru(II)/diclofenac-based complexes: DNA, BSA interaction and their anticancer evaluation against lung and breast tumor cells. **Dalton Transactions**, [S.l.], v. 49, n. 36, p. 12643–12652, 22 set. 2020. DOI: [10.1039/D0DT01591A](https://doi.org/10.1039/D0DT01591A). Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/dt/d0dt01591a>. Acesso em: 10 fev. 2026.

REIS, Josiane Aparecida dos. *Química bioinorgânica dos complexos de rutênio: uma breve revisão da literatura*. 2021. 104 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/32290>. Acesso em: 20 fev. 2026.

REZABAKHSH, Aysa; MAHMOODPOOR, Ata; SOLEIMANPOUR, Hassan. Historical perspective of aspirin: A journey from discovery to clinical practice Ancient and modern history. **Journal of Cardiovascular and Thoracic Research**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 179–180, 2021. DOI: [10.34172/jcvtr.2021.28](https://doi.org/10.34172/jcvtr.2021.28). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8302889/>. Acesso em: 3 fev. 2026.

SANTOS, Marceli de Oliveira; LIMA, Fernanda Cristina da Silva de; MARTINS, Luís Felipe Leite; OLIVEIRA, Julio Fernando Pinto; ALMEIDA, Liz Maria de; CANCELA, Marianna de Camargo. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023. DOI: [10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700](https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700). Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>. Acesso em: 8 jan. 2024.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, [S.l.], v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. *Conheça os principais tipos de tratamentos de câncer*. Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2024. Disponível em: <https://sbcancer.org.br/conheca-os-principais-tipos-de-tratamentos-de-cancer/>. Acesso em: 20 fev. 2026.

STONE, C. A.; VAN ARMAN, C. G.; LOTTI, V. J.; MINSKER, D. H.; RISLEY, E. A.; BAGDON, W. J.; BOKELMAN, D. L.; JENSEN, R. D.; MENDLOWSKI, B.; TATE, C. L.; PECK, H. M.; ZWICKLEY, R. E.; MCKINNEY, S. E. Pharmacology and toxicology of diflunisal. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S.l.], v. 4 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 19S-29S, fev. 1977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1977.tb04510.x>.

TANG, Sicheng; WANG, Wenchao; WANG, Yijian; GAO, Yuhao; DAI, Keke; ZHANG, Wenjing; WU, Xudong; YUAN, Xiaodie; JIN, Chaofan; ZAN, Xingjie; ZHU, Limeng; GENG, Wujun. Sustained release of 5-aminosalicylic acid from azoreductase-responsive polymeric prodrugs for prolonged colon-targeted colitis therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 468, 6 ago. 2024. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02724-w>.

TEIXEIRA, Tamara; PALMEIRA-MELLO, Marcos V.; MACHADO, Pedro Henrique; MORAES, Carlos A. F.; PINTO, Camila; COSTA, Rayane C.; BADARÓ, Wladimir; GOMES NETO, José A.; ELLENA, Javier; VIEIRA ROCHA, Fillipe; BATISTA, Alzir A.; CORREA, Rodrigo S. Ru(II)-Fenamic-Based Complexes as Promising Human Ovarian Antitumor Agents: DNA Interaction, Cellular Uptake, and Three-Dimensional Spheroid Models. **Inorganic Chemistry**, [S.l.], v. 64, n. 8, p. 3707–3718, 3 mar. 2025. DOI: [10.1021/acs.inorgchem.4c04344](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c04344). Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.4c04344>. Acesso em: 10 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services*. 1 fev. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Acesso em: 20 fev. 2026.

ZHAO, Huakan; WU, Lei; YAN, Guifang; CHEN, Yu; ZHOU, Mingyue; WU, Yongzhong; LI, Yongsheng. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 263, 12 jul. 2021. DOI: [10.1038/s41392-021-00658-5](https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00658-5>. Acesso em: 19 jan. 2026.