



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CITOTÓXICO DE UM
METALOPROTÓTIPO À BASE DE RUTÊNIO(3+) COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTILEUCÊMICA

SEVERINO VITOR DO NASCIMENTO MOURA

RECIFE
2024

SEVERINO VITOR DO NASCIMENTO MOURA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CITOTÓXICO DE UM
METALOPROTÓTIPO À BASE DE RUTÊNIO(3+) COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTILEUCÊMICA**

Monografia a ser apresentada ao Curso de Licenciatura em Química da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Mônica Freire Belian

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Ana Catarina Macêdo – CRB-4 1781

M929s Moura, Severino Vitor do Nascimento

Síntese, caracterização e estudo citotóxico de um metaloprotótipo à base de rutênio(3+) com potencial atividade antileucêmica / Severino Vitor do Nascimento Moura. – Recife, 2024.

43 f.

Orientador(a): Wagner Eduardo da Silva e Mônica Freire Belian.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Licenciatura Plena em Química, Recife, BR- PE, 2024.

Inclui referências.

1. Rutênio 2. Câncer. Bioinorgânica. Belian, Wagner Eduardo da Silva e Mônica Freire, orient. II. Título

CDD 540

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CITOTÓXICO DE UM
METALOPROTÓTIPO À BASE DE RUTÊNIO(3+) COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTILEUCÊMICA**

Aprovada em: 29 de julho de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner Eduardo da Silva - Orientador

Departamento de Química

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho – 1º Examinador

Departamento de Química

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr.^a Lidiane Macedo Alves de Lima – 2ª Examinadora

Departamento de Química

Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, enfatizo minha imensa gratidão a Deus! Aquele que era, que é e que sempre será o criador e consumidor de todas as coisas. Foi Ele quem colocou no meu coração o desejo de estudar química. Foi Ele quem preparou todo o trajeto de chegada até aqui e é Ele que sempre estará conduzindo cada passo que eu venha dar, entendendo que nada foge do controle dEle.

Agradeço a minha família: Severino, Aparecida, Tiago e Vitória. Obrigado a Severino, meu pai, por ter colocado em mim tantos traços e características suas. Se eu sou o que sou hoje é por que você cultivou em mim a sua vida e, mesmo não estando nesse momento com vida, sei que estás feliz e orgulhoso com toda minha caminhada. Obrigado a Aparecida, minha mãe, por ter se dedicado desde o meu nascimento em me fornecer a educação e o amor necessário. Os valores que você depositou em mim me fizeram almejar esse lugar que cheguei e me fazem desejar lutar para alcançar altos vãos. Obrigado a Tiago e Vitória, meus irmãos, por sempre apoiarem meus sonhos e objetivos, além de sempre acreditarem no meu potencial.

Agradeço aos meus orientadores Mônica Freire Belian e Wagner Eduardo da Silva por toda confiança e amizade que foram construídas com o passar dos anos. Vocês são mais do que professores para mim. O tempo me fez enxergar que vocês são grandes amigos, daqueles que se importam não apenas com o que eu produzo, mas com o meu bem estar. Jamais esquecerei dos conselhos valiosos que vocês me distribuíram, me fazendo lembrar dos verdadeiros objetivos, valores e de nossa missão aqui na terra. Vocês dois foram totalmente fundamentais no meu trajeto acadêmico e sempre estarão presentes na minha formação profissional.

Agradeço a todos os amigos que o Grupo de Bioinorgânica Avançada me proporcionou, em especial: Alex, Amanda, Ana Beatriz, Ana Carolina, Antheógenes, Arthur, Camilla, Danielle, Gabriel, Helena, José Paulino, Larissa, Lidiane, Nayara, Renê, Thayná, Úrsula e tantos outros. Vocês me fizeram compreender a grandeza que a química inorgânica possui através dos auxílios na rotina de bancada, na escrita de relatórios e no tratamento de dados. Além do trabalho, vocês foram cruciais em me possibilitar momentos descontraídos de conversas e risadas. Vocês são gigantes, inteligentes e ótimas pessoas!

Agradeço também ao grupo de estudantes que ingressaram num desafio: serem treinados a participar do laboratório. Sendo eles: Betânia, Ítalo, Júnior, Miguel, Paulo, Rita e Silvia. Obrigado por fazerem parte do meu último ciclo científico durante a graduação. Ensinar vocês me fez enxergar a vida com simplicidade, vivendo um dia de cada vez. Vocês são incríveis e vão alcançar altos lugares. Espero poder estar aqui e continuar contribuindo com a formação de vocês!

Por fim, agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco por dispor do espaço para tornar possível a vivência científica. Agradeço em especial ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, ao qual me vinculei durante cinco anos (um ano como voluntário e quatro anos como bolsista), me fazendo amadurecer cientificamente e almejar a pós graduação. Também enfatizo minha gratidão à CNPq, órgão de fomento que me subsidiou financeiramente durante anos, sendo crucial para a provisão financeira do meu lar durante esses anos.

“Irmão, você não percebeu que você é o único representante do seu sonho na face da terra? Se isso não fizer você correr, chapa, eu não sei o que vai...”

- Emicida

RESUMO

Os complexos de rutênio constitui uma promissora classe de metaloprotótipos devido às atividades biológicas apresentadas. Esses complexos à base de rutênio apresentam características peculiares como baixa toxicidade associada, taxa de labilidade eficaz e “seletividade” a células cancerosas, promovendo danos ao nDNA nuclear e apoptose. Usando estratégias em combinar o íon Ru^{3+} e ligantes com atividades bioativos, o complexo formado pode apresentar respostas biológicas potencializadas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização e estudo citotóxico de um metaloprotótipo contendo rutênio e como ligante o ascorbato. A metodologia sintética utilizada possibilitou a formação do ascorbato de sódio, a partir da desprotonação do ácido ascórbico com bicarbonato de sódio em água, garantindo um rendimento reacional de 83%. Após isso, reagiu-se o ascorbato de sódio sintetizado com o cloreto de rutênio(3+) em água por 12 horas, havendo a formação do composto com fórmula mínima $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ num rendimento de 85%. Dessa forma, foram realizadas caracterizações do ascorbato de sódio por espectroscopia no infravermelho, apresentando deslocamentos significativos nas absorções referentes as ligações $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$, quando comparados ao ácido ascórbico. O complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, sugerindo sua formação através dos deslocamentos observados nas bandas de absorção das ligações $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}-\text{O}$. A caracterização do complexo por espectroscopia de absorção eletrônica apresentou deslocamentos hipsocrômicos das transições localizadas no ligante do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e a presença, no visível, de transições do tipo $d \rightarrow d$. O espectro de RMN de ^1H do complexo apresentou três sinais, cujas multicplicidades foram dois dupletos e um tripleto, o espectro de RMN de apresentou seis sinais coerentes com a estrutura do ligante utilizado e o espectro de RMN em HSQC mostrou três sinais de correlação C-H, sendo coerentes também com o complexo estudado. O espectro de massas de alta resolução do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ mostrou seis sinais para os isótopos de rutênio (^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru e ^{104}Ru) com m/z de maior abundância relativa 278,75, referente à presença de Ru^{3+} e o ligante ascorbato $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6^{102}\text{Ru}]^+$. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$, realizado em células RAW 264,7 (linhagem normal), MCF-7 (câncer de mama) e HL-60 (leucemia humana), mostrou atividade citotóxica para a linhagem HL-60, com IC_{50} de $39,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para a linhagem celular normal, o complexo de rutênio se mostrou não citotóxico ($\text{IC}_{50} > 60,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Portanto, as estratégias sintéticas utilizadas mostraram-se satisfatórias, com rendimentos acima de 80%. As técnicas de caracterização utilizadas apresentaram concordância com a formação do complexo obtido. O ensaio toxicológico *in vitro* apresentou indícios de não-toxicidade para células saudáveis e mostrou-se ativo em células de leucemia humana (HL-60), podendo-se agir como candidato antileucêmico.

Palavras-chave: Complexos de rutênio(3+), ácido ascórbico, agente antitumoral, atividade biológica.

ABSTRACT

Ruthenium complexes constitute a promising class of metalloprototypes due to their biological activities. These ruthenium-based complexes have peculiar characteristics such as low associated toxicity, effective lability rate and “selectivity” to cancer cells, promoting damage to nuclear nDNA and apoptosis. Using strategies in combination with the Ru^{3+} ion and ligands with bioactive activities, the complex formed can show enhanced biological responses. This study aimed to synthesize, characterize and study the cytotoxicity of a metalloprototype containing ruthenium and ascorbate as a ligand. The synthetic methodology used enabled the formation of sodium ascorbate from the deprotonation of ascorbic acid with sodium bicarbonate in water, guaranteeing a reaction yield of 83%. The synthesized sodium ascorbate was then reacted with ruthenium(3+) chloride in water for 12 hours, resulting in the formation of the compound with the minimum formula $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ in a yield of 85%. This form was characterized by spectroscopy at infrared wavelengths, with significant differences in the absorption coefficients, such as the C=O and C=C bonds, when compared to ascorbic acid. The $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ complex was characterized by infrared spectroscopy, suggesting its formation through the shifts observed in the absorption bands of the C=O, C=C and C-O bonds. The characterization of the complex by electronic absorption spectroscopy showed hypsochromic shifts of the transitions located in the ligand of the $\pi \rightarrow \pi^*$ type and the presence, in the visible, of transitions of the $d \rightarrow d$ type. The ^1H NMR spectrum of the complex showed three signals, the multiplicities of which were two doublets and one triplet, the ^{13}C NMR spectrum showed six signals consistent with the structure of the ligand used and the HSQC NMR spectrum showed three C-H correlation signals, also consistent with the complex studied. The high-resolution mass spectrum of the $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ complex showed six signals for the ruthenium isotopes (^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru and ^{104}Ru) with the highest relative m/z of 278.75, referring to the presence of Ru^{3+} and the ascorbate ligand $[\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6^{102}\text{Ru}]^+$. The results of the cytotoxicity tests of the $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ complex, carried out on RAW 264.7 (normal cell line), MCF-7 (breast cancer) and HL-60 (human leukemia) cells, showed cytotoxic activity for the HL-60 cell line, with an IC_{50} of $39.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. For the normal cell line, the ruthenium complex proved to be non-cytotoxic (IC_{50} $60.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Therefore, the synthetic strategies used were satisfactory, with yields above 80%. The characterization techniques used were consistent with the formation of the complex obtained. The in vitro toxicological test showed evidence of non-toxicity to healthy cells and proved to be active in human leukemia cells (HL-60), possibly acting as an anti-leukemia candidate.

Keywords: Ruthenium(3+) complexes, ascorbic acid, antitumor agent, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da captação das espécies de ferro (1A) e rutênio (1B) por receptores transferrina em meio biológico.	18
Figura 2: Esquema de acesso celular das espécies de rutênio, destacando-se a etapa de aquação, viabilizando a ligação frente ao nDNA.	19
Figura 3: Esquema cinético da taxa de saída de ligantes água das espécies metálicas.	20
Figura 4: Estruturas químicas para os complexos de rutênio utilizados em ensaios clínicos.	21
Figura 5: Esquema de síntese do ascorbato de sódio.	23
Figura 6: Esquema de síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O}_4)\text{Cl}_2]$	24
Figura 7: Espectro de FTIR do composto ascorbato de sódio (em preto) e do ácido ascórbico (em vermelho).	27
Figura 8: Espectro de FTIR do composto de coordenação RuAsc (em vermelho) e do ácido precursor Ácido Ascórbico (em preto).	28
Figura 9: Espectro de absorção eletrônica na região do ultravioleta do composto de coordenação RuAsc (em vermelho) e do Ácido Ascórbico (em preto). Concentração das soluções: $1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	29
Figura 10: Espectro de absorção eletrônica na região do visível do composto RuAsc (em vermelho) e do ligante Ácido Ascórbico (em preto). Concentração das soluções: $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	30
Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do RuAsc, em D_2O	31
Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C (98 MHz) do RuAsc, em D_2O	32
Figura 13: Espectro de HSQC do RuAsc em D_2O	33
Figura 14: Espectro de massas do complexo RuAsc contendo o íon molecular. Em preto: resultado experimental. Em vermelho: resultado calculado.	34
Figura 15: Esquema de desidratação do composto $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$	34
Figura 16: Espectro de massas do complexo RuAsc contendo outra ionização. Em preto: resultado experimental. Em vermelho: resultado calculado.	35
Figura 17: Esquema de ionização para a formação do fragmento de m/z 259,82.	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	METALOFÁRMACOS: BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÕES	16
3.2	RUTÊNIO	16
3.2.1	Histórico e Aplicações	16
3.2.2	Comportamento Biológico e Celular	17
3.2.3	Atividades Biológicas	20
3.3	ÁCIDO ASCÓRBICO	21
3.3.1	Histórico e Aplicação Biológica	21
4	METODOLOGIA	23
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.2	SÍNTESE DO ASCORBATO DE SÓDIO	23
4.3	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$	24
4.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	24
4.4.1	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	24
4.4.2	Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV-Vis)	24
4.4.3	Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C E HSQC)	25
4.4.4	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI/MS)	25
4.5	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	25
4.5.1	Linhagem Celular e Condições de Cultivo	25
4.5.2	Ensaio de Citotoxicidade	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	ASCORBATO DE SÓDIO	27
5.2	COMPLEXO DE RUTÊNIO $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$	28
5.2.1	Caracterização do complexo RuAsc	28

5.2.2	Ensaio de citotoxicidade	36
6	CONCLUSÕES.....	38
7	PERSPECTIVAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer se configura como um conjunto de patologias humanas, oriundas de modificações gênicas de células saudáveis, que passam a se dividir e proliferar de maneira acelerada e desordenada (Hassanpour; Dehghani, 2017). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde haverá em todo o planeta até 2040, um aumento de 49,7% de novos casos de câncer. Na América do Sul e no Brasil essas estimativas mostram um aumento de 65,6% no número de casos (OMS, 2024). Dessa forma, as doenças oncológicas podem ser conjecturadas como uma problemática nacional e mundial, havendo a necessidade de desenvolver estratégias para o tratamento das mesmas.

O tratamento de câncer geralmente ocorre através de cinco processos: radioterapia, imunoterapia, hormonioterapia, cirurgias e/ou quimioterapia; os quais podem ser usados de forma combinada ou isolada a depender da complexidade de cada caso. A quimioterapia é um tratamento que se usa compostos químicos com a finalidade de impedir ou retardar a evolução do quadro canceroso (Miller *et al*, 2022). Os agentes quimioterápicos se dividem em orgânicos e inorgânicos, e classificam-se de acordo com o mecanismo de atuação, como ciclo celulares específicos e não específicos. Dentre os compostos inorgânicos tem-se os complexos de platina(2+).

Os primeiros relatos acerca da utilização de complexos metálicos como agente antineoplásico foi em 1960, por Rosemberg Barnett. Essa descoberta “miraculosa”, conhecida também como o advento da cisplatina, determinou que essas espécies complexas eram responsáveis pela inibição mitótica de células bacterianas (Karges; Stokes; Cohen, 2022). Assim, se deu início aos estudos desses compostos à base de platina, que apesar de possuir ampla janela de atuação, apresentaram efeitos colaterais severos, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, ototoxicidade, dentre outros. Assim como, fatores de resistência desencadeados pelo uso de complexos de metálicos, e o fenômeno de resistência às múltiplas drogas, o qual atualmente é responsável pelo insucesso de diversas drogas quimioterápicas (Shen *et al*, 2012). Em decorrência disso, outros complexos de platina foram desenvolvidos e aprovados, assim como, complexos com outros íons metálicos, tendo destaque mais recentemente para os complexos de rutênio.

Os complexos de rutênio relatados na literatura tem demonstrado baixa toxicidade em meio biológico, pois as células cancerosas necessitam de maior captação de ferro para manter o processo de mitose celular acelerado, logo apresentam maior expressão de receptores de transferrina, e isso facilita a captação de ferro ao interior celular e, devido a isso os complexos

de rutênio tornam-se quase “seletivos” para essas células, o que potencializa a atividade antitumoral com menores efeitos colaterais associados (Gasser; Nolte, 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a síntese, caracterização e estudo citotóxico de um metaloprotótipo à base de rutênio(3+) constituído por ligante ascorbato, com a proposta de um composto com potencial atividade antineoplásica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, caracterizar e avaliar a citotoxicidade de um novo composto de coordenação à base de rutênio(3+) contendo ascorbato de sódio como ligante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar o ligante ascorbato de sódio;
- Sintetizar o complexo de rutênio(3+) partindo do ascorbato de sódio;
- Avaliar a reprodutibilidade da reação, bem como o rendimento reacional;
- Caracterizar o composto de coordenação obtido por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de absorção eletrônica, ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e HSQC e espectrometria de massas de alta resolução;
- Avaliar a citotoxicidade associada (IC_{50}) do composto de rutênio(3+) sintetizado em célula de linhagem normal (RAW 264,7) e neoplásicas (HL-60 e MCF-7).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 METALOFÁRMACOS: BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÕES

Os metalocompostos bioativos são substâncias químicas que possuem propriedades e potencialidades biológicas, sendo constituídas principalmente por espécies metálicas (Nikolaou, Silva, 2018). Os metais adquiriram relevância desde a descoberta da participação em diversos processos de organismos vivos, tais como: a funcionalidade do magnésio na composição da clorofila, contribuindo para o processo fotossintético de plantas (Shaul, 2002); a relevância do ferro presente na hemoglobina cooperando para o transporte de oxigênio durante a respiração (Abbaspour, Hurrell, Kelishadi, 2014); os complexos de cobalto, os quais constituem a vitamina B12 (Cobalaminas) e participam nos mecanismos de síntese de nucleotídeos, estabilizando o nDNA e protegendo-o de estresses oxidativos por meio de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Halczuk *et al*, 2023).

No ano de 1969, após o advento da cisplatina, iniciaram-se a busca por compostos metálicos com propriedades terapêuticas, o que tornou possível o desenvolvimento de metalocompostos para o tratamento de diversas enfermidades (Ghosh, 2019). Todavia, após a descoberta da cisplatina e do seu efeito frente a diversas linhagens tumorais, vários aspectos toxicológicos foram avaliados (efeitos colaterais), uma vez que os metalofármacos apresentam toxicidade cardiovascular; danos ao sistema nervoso; ototoxicidade e perturbação ocular; efeitos hematológicos; toxicidade gastrointestinal, hepática, renal, urinária e cutânea; danos ao sistema imunológico; além de efeitos adversos tardios associados (Hartmann, Lipp, 2003).

Desse modo, surgiu a necessidade de pensar em novos metalofármacos com atividade biológica relevante, porém com baixa toxicidade associada. Assim, iniciou-se os estudos da química medicinal e biológica dos compostos de rutênio (Clarke, 2002).

3.2 RUTÊNIO

3.2.1 Histórico e Aplicações

O elemento químico rutênio é um metal de transição que compõe o grupo 8 da tabela periódica, possui a configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$, e espécies no estado de oxidação de 2- a 8+, sendo os números de oxidação (NOX) mais comuns 2+, 3+ e 4+. Além disso, esse elemento pode ser encontrado em minérios de platina, numa mistura com outros metais nobres, chamados também de Metais do Grupo da Platina (MGP) (Silva, Guerra, 2012). O rutênio foi descoberto em 1844 quando alguns rejeitos de platina foram tratados com água régia, por Karl Karlovith Klaus, o que o fez perceber a presença de sólidos escuros insolúveis, os quais tinham em sua constituição osmio, irídio, paládio e rutênio (Alves, Silva, Guerra, 2010). Nessa perspectiva, a literatura dispõe para o

elemento rutênio diversos trabalhos relevantes, podendo-se destacar o uso dos óxidos de rutênio(4+) e rutênio(8+) (Griffith, 2011). A funcionalidade dessas composições se dá pela participação em reações de oxidação de compostos orgânicos, por via aeróbia, sendo gerado resíduos com baixa toxicidade. Dessa forma, é possível utilizar os óxidos de rutênio em reações de ciclização em alcinos, *orto* alquenação oxidativa, acoplamentos C-N e oxidação de álcoois (Muthusamy *et al*, 2016). Outra aplicação que tem sido estudada para os compostos de Rutênio é a propriedade catalítica que esses materiais podem desenvolver. Nesse sentido, Duan e colaboradores, em 2012, desenvolveram um material catalítico à base de rutênio e ligante bipyridínico-dicarboxilato capaz de favorecer a oxidação de moléculas de água, adquirindo resultados superiores a padrões utilizados por catalisadores de Cério(4+) (Duan *et al*, 2012).

Também foi estudado o potencial catalítico de complexos de rutênio em reações de hidrogenação para a conversão de grupos carbonílicos (aldeídos, cetonas e amidas) em aminas e álcoois, como também em alcinos e alcenos convertendo-os a alcanos (Muller, 2023). Similarmente, utilizou-se o rutênio metálico dopado à carvão ativado para catálise hidrogenolítica de lignina, visando a clivagem dos grupos éteres presentes no biopolímero, o que resultou em taxas de conversão mais significativas com o material à base de rutênio (42% em peso) em relação ao análogo de platina também dopada em carvão (11% em peso, reação hidrogenolítica usual) (Kistianto *et al*, 2017).

3.2.2 Comportamento Biológico e Celular

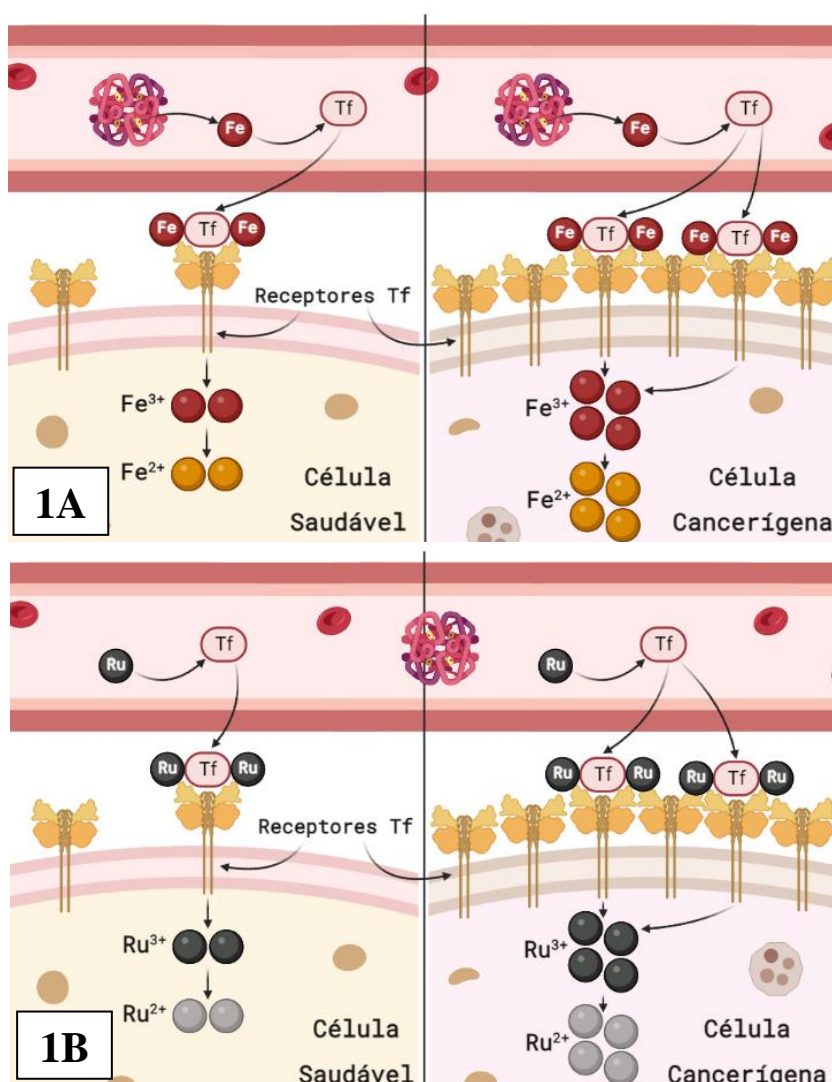
Os compostos de rutênio apresentam mecanismos biológicos e celulares, os quais garantem propriedades singulares, como mecanismo de transporte e biodistribuição similares ao ferro, o que gera baixa toxicidade associada; seletividade por células cancerígenas; redução química em meio celular tornando-se uma espécie citotóxica; e a labilidade efetiva na troca de ligantes facilitando interações metal-DNA nuclear.

Nessa perspectiva, os estudos sobre os complexos de rutênio propõem que a baixa toxicidade desses materiais se dá devido às vias de compatibilização que o meio biológico admite para o transporte de espécies de ferro. As células, por sua vez, admitem ferro no seu interior por meio do carregamento via transferrina e albumina, além da sinalização por receptores celulares do tipo transferrina (TfR) (Grotto, 2008). Todavia, quando essas células são modificadas geneticamente, desenvolvem um quadro deficiência de ferro, desencadeando o aumento da expressão de receptores de transferrina, o que corrobora também para maior admissão de ferro no interior celular (Figura

1A), regularizando os danos celulares associados (Kawamoto *et al*, 2011).

De modo similar, as espécies de Ru^{3+} são metabolizadas, diminuindo a toxicidade desse metal (Figura 1B). As espécies de rutênio podem também se ligar a proteínas transportadoras (transferrina e albumina) e serem captadas pelos mesmos receptores (TfR). Esse fato também acarreta maior bioacumulação de Ru^{3+} a células neoplásicas do que a células saudáveis, o que coopera no melhoramento de atividade, sobretudo antitumoral, desse metal (Sava, 1994; Allardyce, Dyson, 2001). O esquema da Figura 3 apresenta o mesmo esquema da Figura 2, todavia aplicado ao Rutênio.

Figura 1: Ilustração da captação das espécies de ferro (1A) e rutênio (1B) por receptores transferrina em meio biológico.



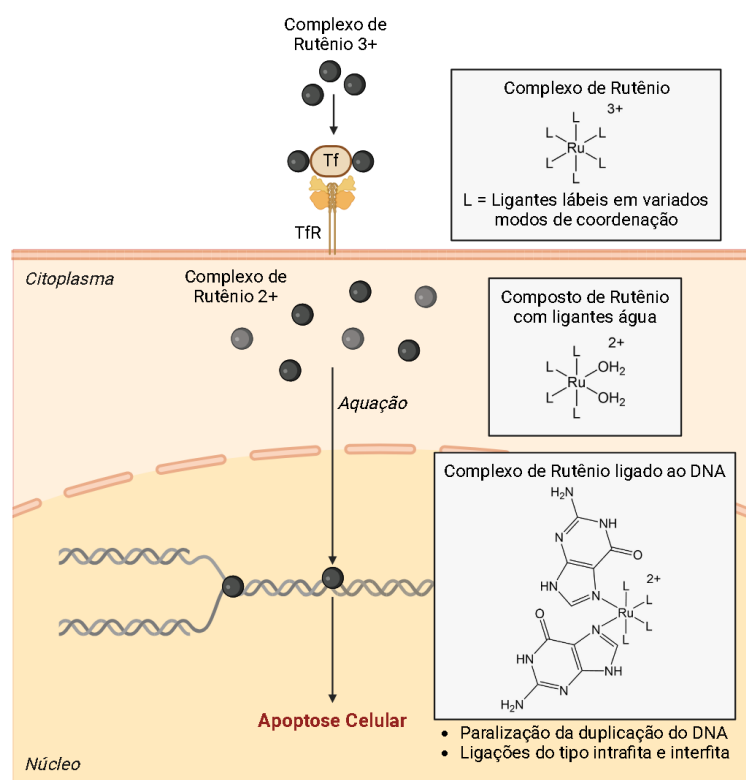
Fonte: o autor, (2024), criado em Biorender.com.

Além disso, autores descrevem que a especiação dos cátions de rutênio no meio biológico pode ser chave para maior eficácia no tratamento antitumoral. As espécies de Ru^{3+} possuem melhor

estabilidade cinética no meio biológico, o que contribui para a baixa toxicidade atenuada em culturas de células. A ativação do rutênio no interior celular se dá a partir da redução química com o ácido ascórbico em fluxo sanguíneo ou por meio de glutathione em fluxo celular, convertendo Ru^{3+} à Ru^{2+} . Para a espécie de Ru^{2+} é atribuído o potencial citotóxico, promovendo danos a célula, sobretudo células neoplásicas (Antonakas, Emadi, 2010; Riccardi *et al*, 2019).

Por fim, outro aspecto mencionado que promove a ativação e reatividade das espécies de rutênio contribuindo também para a sua citotoxicidade é a taxa de labilidade das moléculas de águas complexadas. Os complexos cisplatínicos ao serem introduzidos no ambiente celular, são submetidos a reação de substituição dos grupos cloretos. Essa reação permite a inserção de moléculas de águas na primeira esfera de coordenação da espécie metálica, estabelecendo ligações lábeis. Assim, o novo complexo se torna apto para reagir com o ácido desoxirribonucléico (nDNA), ligando-se aos nitrogênios 7 da guanina, gerando danos à fita helicoidal e apoptose induzida (Hambley, 2001). Quanto ao rutênio, a literatura propõe diversos modos de danos ao DNA nuclear (nDNA), porém destaca-se a maneira análoga à cisplatina que esses compostos interagem, se ligando em maior proporção a sítios imínicos da guanina (N7, Figura 2), como também estabelecendo ligações com adenina ou citosina (Besker *et al*, 2007).

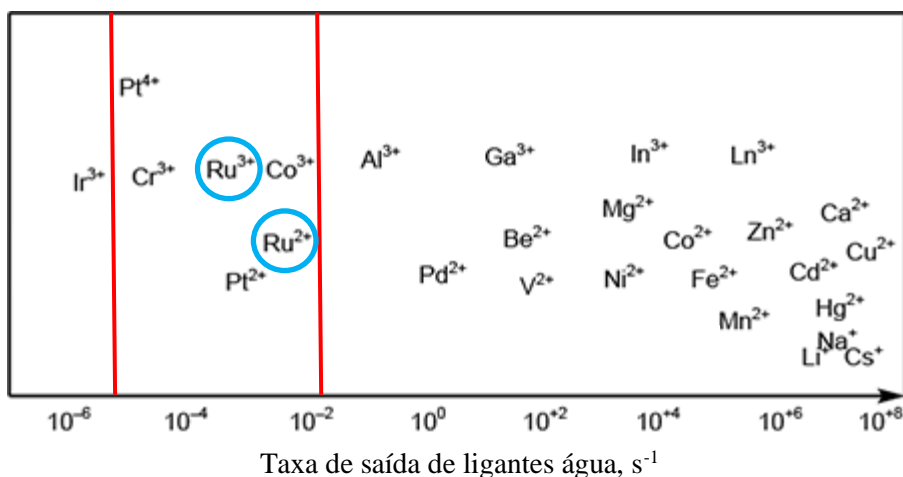
Figura 2: Esquema de acesso celular das espécies de rutênio, destacando-se a etapa de aquação, viabilizando a ligação frente ao nDNA.



Fonte: o autor, (2024), criado em Biorender.com.

Pode-se destacar também a taxa de labilidade dos ligantes água, presentes tanto nos compostos de platina(2+) e rutênio (2+) após etapa de aquação, uma vez que a reação de saída desses grupos demora horas no organismo celular, sendo o tempo hábil para que a espécie metálica se ligue ao nDNA, induzindo a apoptose (Reedijk, 2008). Na Figura 3 é possível observar a taxa cinética da troca dos ligantes água realizadas pelas espécies metálicas.

Figura 3: Esquema cinético da taxa de saída de ligantes água das espécies metálicas.



Fonte: Reedijk, (2008), modificado.

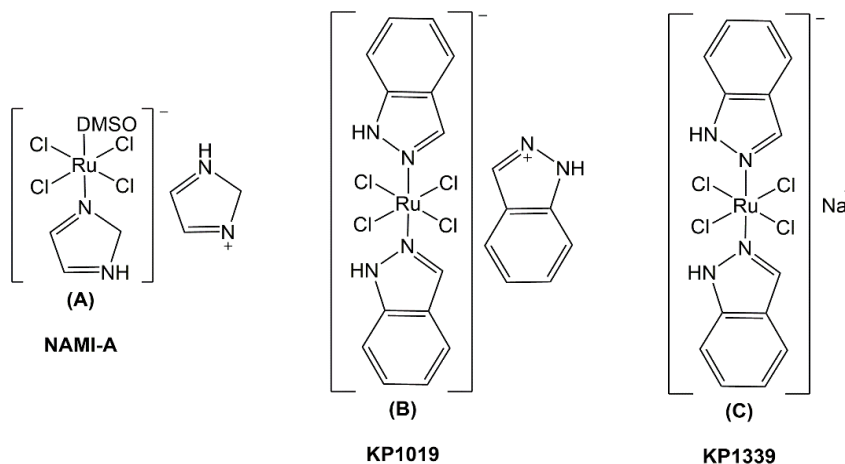
3.2.3 Atividades Biológicas

Os compostos de coordenação à base de Rutênio têm sido fortes candidatos terapêuticos, apresentando potencial finalidade medicinal. Para essa classe de compostos, pode-se mencionar alguns protótipos que avançaram para os testes clínicos, como o NAMI-A (Figura 4A), o KP1019 (Figura 4B) e o KP1339 (Figura 4C). O NAMI-A foi desenvolvido durante a década de 90 e se tornou o primeiro composto de Rutênio desenvolvido para o tratamento antitumoral que progrediu para o teste clínico. *In vitro*, verificou-se citotoxicidade direta para as células cancerosas e *in vivo* inibiu a proliferação tumoral, como também reduziu o potencial metastático de tumores pulmonares. Porém, a baixa eficácia terapêutica do composto devido a toxicidade hepática (elevação da creatinina) e toxicidade renal fez com que os testes pausarem (Alessio, 2017).

O KP1019 foi sintetizado, posteriormente, garantindo reduções consideráveis (cerca de 95%) do volume do tumor em linhagens de câncer de cólon (Keppler *et al*, 1989), todavia havendo baixa solubilidade em meio aquoso e a necessidade de grande quantidade de solução de infusão para aplicação do composto, foi necessário pausar as etapas de testes (Alessio, Messori, 2019). Por fim, o KP1339 foi desenvolvido, sendo um sal de sódio facilmente solúvel em água, além de também

apresentar menores efeitos adversos quando comparado ao KP1019 e estabilização na evolução de novos quadros tumorais (Trondl *et al*, 2014).

Figura 4: Estruturas químicas para os complexos de rutênio utilizados em ensaios clínicos.



Fonte: o autor (2024)

Além da atividade antitumoral, os compostos de Ru³⁺ podem ter potencial frente a atividade antidiabética, uma vez que, observou-se a inibição de fibrilas do hIAPP (responsáveis pelo desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2). Atividade inibitória por complexos de Ru²⁺ em proteínas tirosina fosfatase (PTP), sendo essas responsáveis pela fosforilação inapropriada de resíduos de tirosina, desencadeando quadros diabéticos. Como também, ação inibidora na enzima Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK-3), já que quando perturbada frente ao nível glicêmico alto, pode desencadear resistência à insulina (Maikoo *et al*, 2021). Em suma, também se têm estudado a atividade do rutênio frente às diversos patógenos, como atividade antimicrobiana (Munteanu, Uivarosi, 2021); antibacteriana e antifúngica (Cetinkaya *et al*, 1999); antileishmania (Braga, 2002); antioxidante e anti-inflamatória (Sasahara *et al*, 2020) e antiviral aplicado aos testes frente ao COVID-19 (Cirri *et al*, 2021).

3.3 ÁCIDO ASCÓRBICO

3.3.1 Histórico e Aplicação Biológica

Os ligantes podem contribuir, significativamente, para a aplicabilidade terapêutica na obtenção de metalofármacos bioativos, uma vez que podem sinalizar baixa toxicidade e uma melhor biocompatibilidade (Karges *et al*, 2021). Aliado a isso, pode-se mencionar o ligante ácido L-ascórbico (vitamina C) que possui atividade antioxidante, sendo essencial para o metabolismo vegetal e animal. Unir essa estrutura a centros metálicos pode garantir uma melhor

biocompatibilização do material formado, podendo contribuir na biossíntese de colágeno, além de atuar na absorção do ferro oriundo da dieta (Fenech *et al*, 2019).

O ácido ascórbico na sua forma desprotonada, como ascorbato de sódio, possui efeitos antitumorais quando utilizado em dosagens altas e não letais (1g/kg). Essa composição promove a inibição do crescimento dessas células, por meio do estresse oxidativo decorrente da elevada produção de peróxido de hidrogênio extracelular (Verrax, Calderón, 2009).

Também se averiguou que o ácido ascórbico possui correlação com quadros evolutivos de diabetes. Essa relação se dá devido ao ácido ter propriedade antioxidante, o que favorece a redução do estresse oxidativo pós-prandial após alimentação no sangue e tecidos, diminuição de lesões podocitárias (além de proteger o podócito), diminuição do estresse oxidativo renal, redução da neovascularização, prevenção da retinopatia induzida pelo estresse oxidativo, dentre outros efeitos (Chambial *et al*, 2013).

Diante disso, esse estudo propôs realizar a síntese, caracterização e avaliar a citotoxicidade de um metaloprotótipo à base de rutênio(3+) e ascorbato de sódio como ligante.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e solventes utilizados na síntese do composto de coordenação estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Solventes e reagentes utilizados nas sínteses.

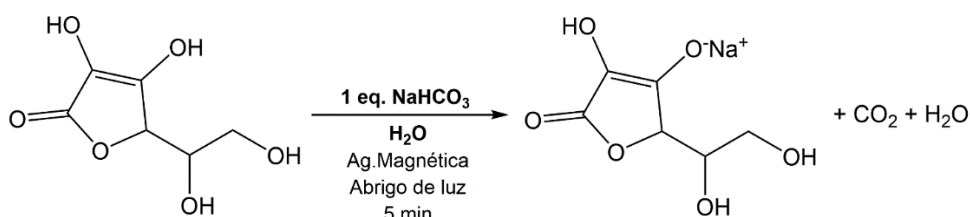
Reagentes/Solventes	Procedência
Ácido L-Ascórbico P.A.	NEON
Álcool Etílico Absoluto	Química Moderna
Álcool Isopropílico P.A.	Química Moderna
Bicarbonato de Sódio P.A.	VETEC
Cloreto de Rutênio III	Aldrich

Fonte: O autor (2024)

4.2 SÍNTESE DO ASCORBATO DE SÓDIO

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 mmol (0,176 g) de ácido ascórbico, 1 mmol (0,084 g) de bicarbonato de sódio e 5 mL de água destilada. A reação foi protegida ao abrigo de luz e mantida até total formação de dióxido de carbono, cerca de 5 minutos (Figura 5).

Figura 5: Esquema de síntese do ascorbato de sódio.



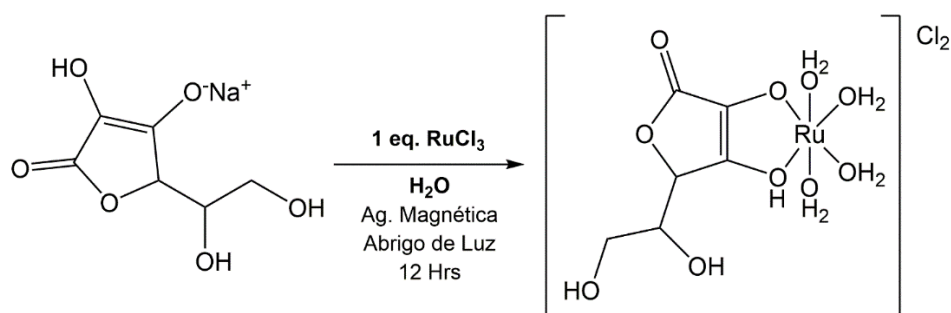
Fonte: o autor (2024)

Após total borbulhamento da reação, adicionou-se 90% em volume (45 mL) de álcool isopropílico e resfriou-se o sistema por 24 horas para total precipitação do ligante formado. Em seguida lavou-se o composto obtido com álcool etílico, secou-se o material sob vácuo em dessecador e obteve-se um sólido branco com rendimento de 83%, o qual foi conduzido às devidas análises espectroscópicas.

4.3 SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 mmol (0,207 g) de cloreto de rutênio previamente solubilizado em 15 mL de água deionizada. Ao sistema, também adicionou-se lentamente 1 mmol (0,198 g) de ascorbato de sódio solubilizado em 10 mL do mesmo solvente. A reação foi mantida ao abrigo da luz e agitação magnética por 12 horas (Figura 6).

Figura 6: Esquema de síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O}_4)\text{Cl}_2]$.



Fonte: o autor (2024)

Após término da reação, a solução foi conduzida para a remoção do solvente por liofilização. O produto secado foi ressolubilizado em etanol à frio, segregando reagentes residuais do produto esperado. O solvente foi removido por rotaevaporação e o produto foi seco sob vácuo em dessecador. Dessa forma, obteve-se um material sólido verde com rendimento de 85%, o qual foi reservado para as devidas caracterizações espectroscópicas.

4.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.4.1 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais foram obtidos a partir da técnica de reflectância total atenuada (ATR). O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro com transformada de Fourier modelo IRTracer-100 da Shimadzu® abrangendo a região de 4000 à 600 cm^{-1} . A resolução espectral foi de 4 cm^{-1} e a composição do cristal das análises de ATR é de diamante e seleneto de zinco.

4.4.2 Espectroscopia de Absorção Eletrônica (UV-Vis)

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos no espectrofotômetro de absorção

eletrônica modelo UV-1280 da Shimadzu® abrangendo a região de 1100 nm à 190 nm. A largura de banda foi de 5 nm com precisão por comprimento de onda de ~1 nm e as lâmpadas para a radiação foram de Tungstênio (região do visível) e Deutério (região do ultravioleta). A concentração utilizada para as soluções na região do ultravioleta (200 a 400 nm) foi de 1.10^{-4} mol L⁻¹ e para as soluções na região do visível (500 a 900 nm) foi de 1.10^{-3} mol L⁻¹.

4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (¹H, ¹³C E HSQC)

Os sinais de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e HSQC foram obtidos no espectrômetro de ressonância magnética nuclear modelo UNMRS 400 MHz da VARIAN® com frequência para ¹H de 400 MHz e ¹³C de 98 MHz. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) para a referência de deslocamento e água deuterada como solvente de análise.

4.4.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI/MS)

A espectrometria de massas de alta resolução (ESI/MS) foi realizada utilizando um espectrômetro de massas da marca Thermo Scientific™, modelo Q Exactive™ Hybrid Plus com analisador massa/carga (m/z) do tipo Quadrupole-Orbitrap e transformada de Fourier (FT-MS). O equipamento também possui uma fonte de ionização por eletro-spray (ESI), operando no modo de aquisição positivo e temperatura do capilar de 320 °C.

4.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.5.1 Linhagem Celular e Condições de Cultivo

Para o teste foram utilizadas células da linhagem cancerígena HL-60 (Leucemia promielocítica humana), MCF-7 (câncer de mama humano) e linhagem não-cancerosa RAW 264.7 (macrófago murino). As células foram obtidas no Banco de células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Prospecção Farmatocológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX) do Departamento de Antibióticos da UFPE. As células RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas para cultura de células com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), acrescido dos antibióticos a 1 %, penicilina e estreptomicina. As linhagens HL-60 e MCF-7 foram cultivadas em garrafas para cultura de células com meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), acrescido dos antibióticos a 1 %, penicilina e estreptomicina. As células foram

mantidas sob incubação em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado até 80 - 100% da confluência em microscópio invertido.

4.5.2 Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação do efeito citotóxico das amostras foi realizada através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que é um ensaio quantitativo *in vitro* para estimar a proliferação e a sobrevivência celular (Alley *et al*, 1988; Mosmann, 1983). Este teste é baseado na capacidade da enzima succinato desidrogenase, ativa nas mitocôndrias de células viáveis, converter o sal tetrazolium (MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. As células RAW 264.7, HL-60 e MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas *overnight* para aderência e formação da monocamada celular. Posteriormente, as amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,8 – 25 µg/mL em triplicatas. As placas foram novamente incubadas por 72 horas após a exposição aos compostos. Previamente, foram adicionados 25 µL de solução do MTT (5 mg/mL) por 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a leitura em leitor de microplacas (OD 570 nm). A viabilidade das células nos diferentes tratamentos, foram comparadas com o controle negativo a partir da Equação 1 (Wang *et al.*, 2011).

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Média\ da\ absorbância\ dos\ tratados}{Média\ dos\ controles} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

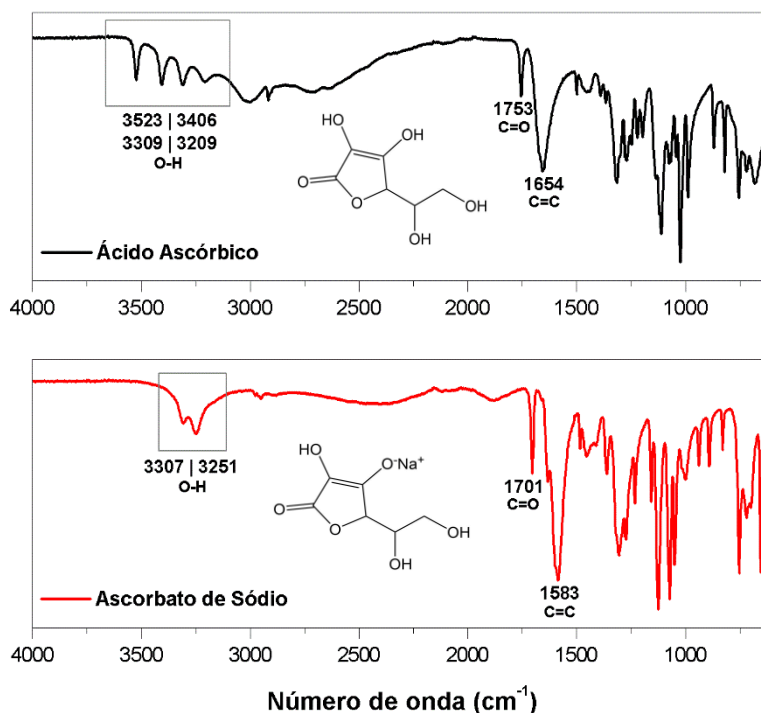
A IC₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle negativo, foi calculada a partir de regressão não linear no *software* GraphPad Prisma 8.0 demo. Os experimentos foram realizados em triplicata e em dois experimentos independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ASCORBATO DE SÓDIO

A figura 7 apresenta o espectro de FTIR do ascorbato de sódio e do ácido precursor (ácido ascórbico).

Figura 7: Espectro de FTIR do composto ascorbato de sódio (em preto) e do ácido ascórbico (em vermelho).



Fonte: o autor (2024)

Como é possível observar, os perfis de bandas de ambos compostos são distintos, propondo a presença de duas composições diferentes. Avaliando o espectro no infravermelho do ácido precursor (em preto) é possível notar a presença de quatro bandas em 3523 cm⁻¹, 3406 cm⁻¹, 3309 cm⁻¹, 3209 cm⁻¹ referentes ao estiramento da ligação O-H presente nos grupos alcoólicos e enólicos da estrutura. No espectro do ascorbato de sódio (em vermelho), observa-se em 3307 cm⁻¹ e 3251 cm⁻¹ duas bandas de estiramento O-H referentes aos grupos alcoólicos, havendo a desapareição das absorções para os grupos enólicos. Assim, é possível sugerir que houve mudança estrutural na molécula estudada, uma vez que as absorções para os grupos enólicos desapareceram, sugerindo a efetividade na desprotonação do ácido ascórbico. (Hvoslef, Klaeboe, 1971).

Ainda no espectro do ascorbato de sódio (Figura 7), na região de 1701 cm⁻¹ é possível observar um pico referente ao estiramento da ligação C=O deslocado para menores números de onda (estiramento em 1753 cm⁻¹ para o ácido ascórbico). O deslocamento dessa absorção se dá

devido a ligação dupla conjugada presente no ascorbato de sódio (Hvoslef, Klaeboe, 1971).

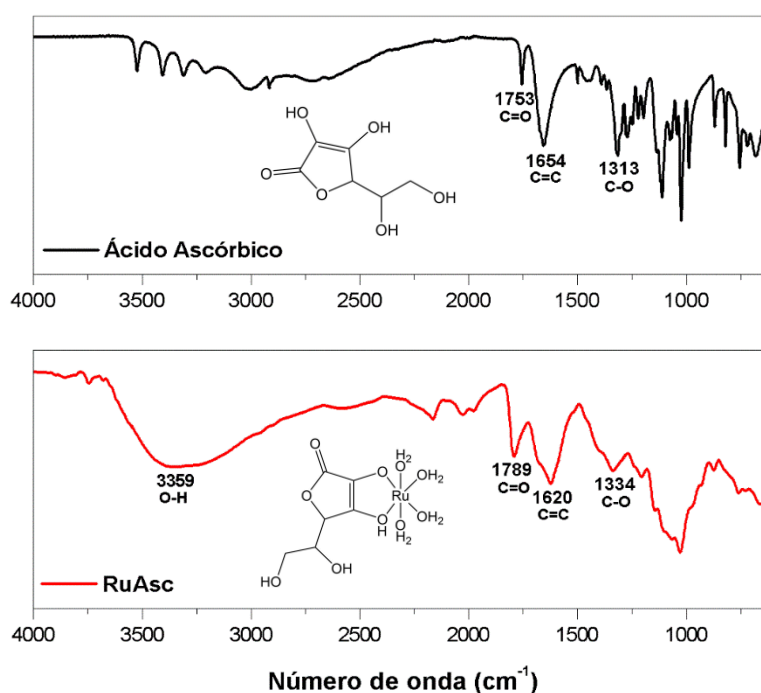
Por fim, no espectro de infravermelho do ascorbato de sódio em 1583 cm^{-1} , tem a presença de uma banda referente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$. Essa absorção, quando comparado ao espectro do ligante ácido, se encontra na região de 1654 cm^{-1} , observando-se um deslocamento significativo de absorção, podendo-se elucidar que houve modificação química na região enólica do ligante sintetizado (Hvoslef, Klaeboe, 1971). Dessa forma, é possível constatar que possivelmente houve a desprotonação do ácido ascórbico, sendo, dessa forma, formado o sal ascorbato de sódio.

5.2 COMPLEXO DE RUTÊNIO $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$

5.2.1 Caracterização do complexo RuAsc

A figura 8 apresenta o espectro de FTIR do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2$ e do ácido precursor utilizado como ligante (ácido ascórbico).

Figura 8: Espectro de FTIR do composto de coordenação RuAsc (em vermelho) e do ácido precursor Ácido Ascórbico (em preto).



Fonte: o autor (2024)

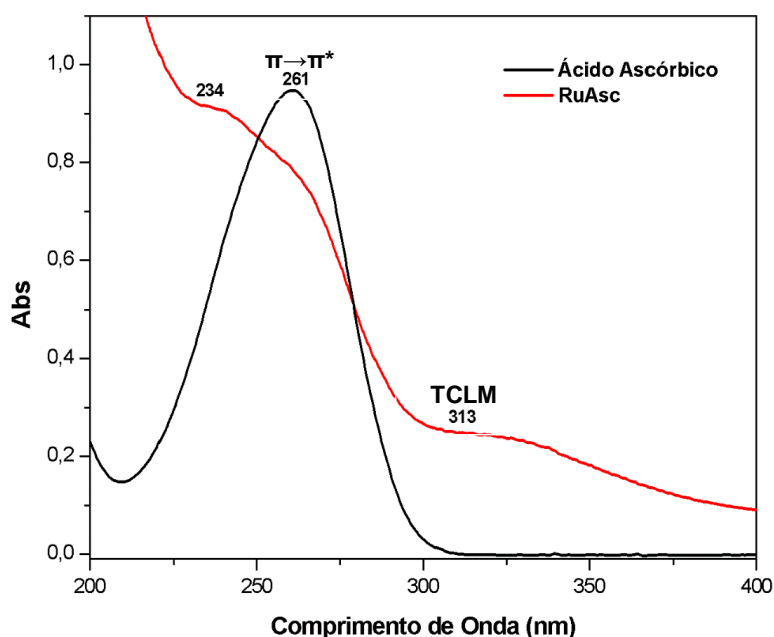
Como é possível observar na Figura 8, os perfis de bandas de ambos compostos são distintos, propondo a presença de duas composições diferentes. Avaliando o espectro do complexo (em vermelho) é possível ver a aparição de uma banda larga em 3359 cm^{-1} referente à vibração da ligação

O-H, podendo fazer referência às águas de coordenação (Pavia *et al*, 2015).

No espectro do complexo, na região de 1789 cm^{-1} é possível ver um pico referente ao estiramento da ligação C=O característico do grupo éster, o que também está em coerência com a estrutura do ligante (estiramento da ligação C=O em 1753 cm^{-1}). Além disso, nota-se o deslocamento dessa absorção para um número de onda maior devido à quebra de ressonância que existia na lactona insaturada, uma vez que o par de elétron ressonante efetivou a complexação ao centro metálico. Ainda no espectro do complexo, 1620 cm^{-1} , se tem a presença de uma banda referente ao estiramento da ligação C=C. Essa absorção, quando comparado ao espectro do ligante de partida, está na região de 1654 cm^{-1} , observando-se um deslocamento significativo de absorção, podendo-se inferir que essa região seja o sítio de coordenação ao ácido metálico (Pavia *et al*, 2015). Por fim, observa-se no espectro do composto RuAsc, a presença de uma banda de intensidade média na região de 1334 cm^{-1} . Essa absorção faz referência ao estiramento da ligação C-O para os álcoois insaturados (que no ligante de partida se encontra na região de 1313 cm^{-1}) (Pavia *et al*, 2015). O deslocamento observado pode sugerir que o ligante ascorbato se complexou ao sítio metálico de maneira bidentada pelos oxigênios enólicos.

Na Figura 9 são apresentados os espectros de absorção eletrônica do ácido ascórbico e do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$ sobrepostos na região do ultravioleta.

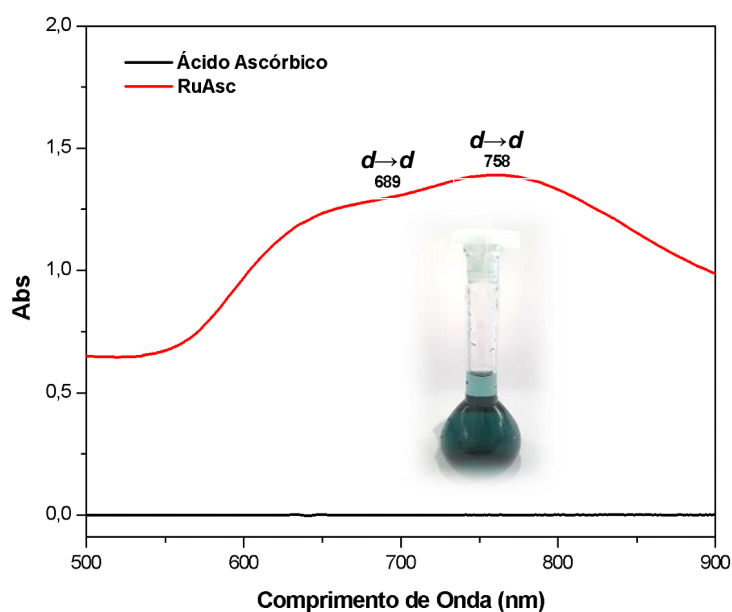
Figura 9: Espectro de absorção eletrônica na região do ultravioleta do composto de coordenação RuAsc (em vermelho) e do Ácido Ascórbico (em preto). Concentração das soluções: $1.10^{-4}\text{ molL}^{-1}$.



Fonte: o autor (2024)

No espectro do ligante (em preto) há apenas uma absorção na região de 261 nm ($\epsilon = 9472 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), referente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, devido ao grupo orgânico lactona insaturada presente na estrutura do ligante. Entretanto, no espectro do complexo (em vermelho) se tem uma banda na região de 234 nm ($\epsilon = 9162 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), também referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, sugerindo a presença do ascorbato na estrutura proposta, além de observar um deslocamento hipsocrômico (mais energético) para um comprimento de onda menor, quando comparado ao ligante. Em 313 nm ($\epsilon = 2467 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) observa-se uma banda, referente ao tipo de transição de transferência de carga ligante-metal (TCLM), a qual sugere a transição de cargas eletrônicas do ligante para o cátion metálico. Com isso, é possível ver eventos diferentes na região do ultravioleta, sugerindo a formação do complexo de rutênio. Também foi possível observar bandas de absorções no espectro do complexo na região do visível (Figura 10).

Figura 10: Espectro de absorção eletrônica na região do visível do composto RuAsc (em vermelho) e do ligante Ácido Ascórbico (em preto). Concentração das soluções: $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



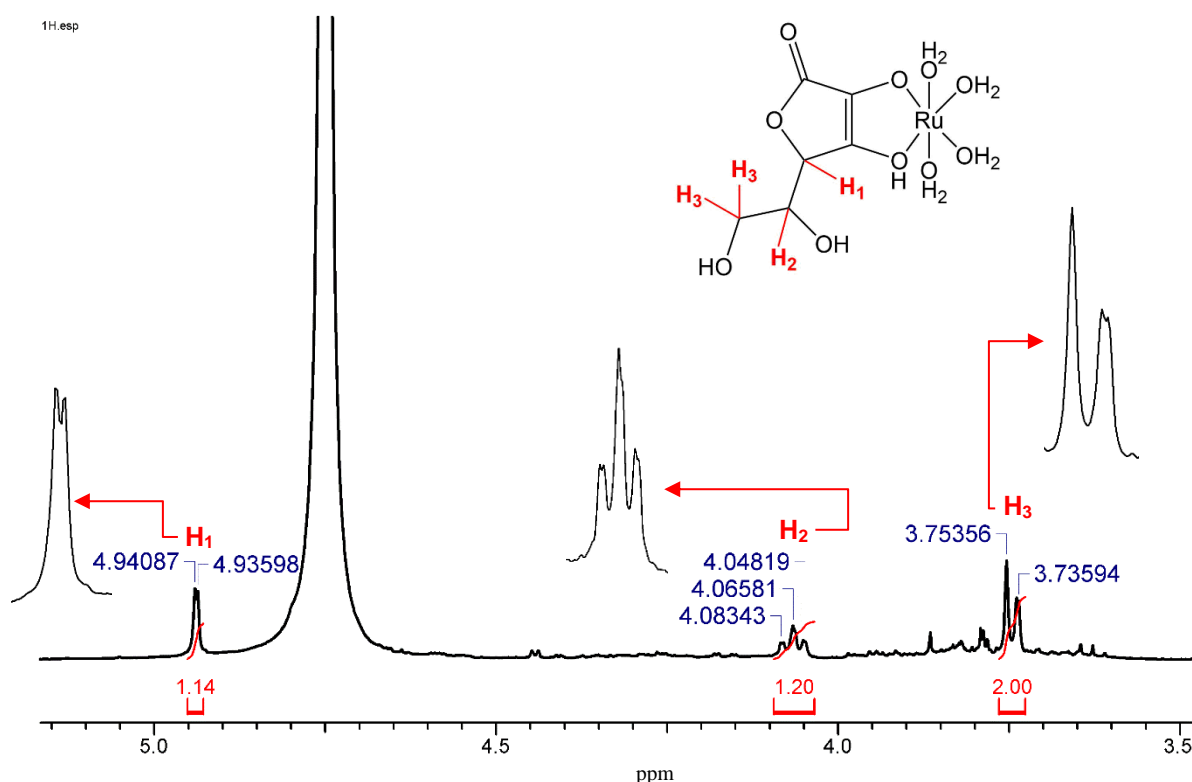
Fonte: o autor (2024)

É possível observar que o ligante (em preto), como esperado, não possuiu absorção na região do visível, diferente do composto de coordenação que evidenciou algumas transições. O complexo RuAsc (em vermelho) apresentou uma absorção na região de 758 nm ($\epsilon = 1390 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) acompanhada de outra absorção em 689 nm ($\epsilon = 1294 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Essas bandas se referem a transições $d \rightarrow d$, devido ao relaxamento da regra de Laporte, uma vez que os orbitais energéticos do rutênio, no complexo, não possuem paridade bem definida devido à baixa simetria que a estrutura possui (grupo de simetria C_1). Além disso, a falta de simetria do composto sintetizado também

garante transições eletrônicas menos energéticas no orbital d, o que atribui absorção ao composto na faixa de comprimento de onda acima de 700 nm, na região do infravermelho, correspondendo a coloração verde do composto sintetizado (absorve vermelho / emite verde).

Os espectros de ressonância magnética nuclear obtidos foram cruciais para a elucidação das estruturas propostas, sendo estudado os tipos de próton (hidrogênio), carbono 13 e a correlação bidimensional desses sinais. Na Figura 11 é apresentado o espectro RMN ^1H do complexo RuAsc.

Figura 11: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do RuAsc, em D_2O .

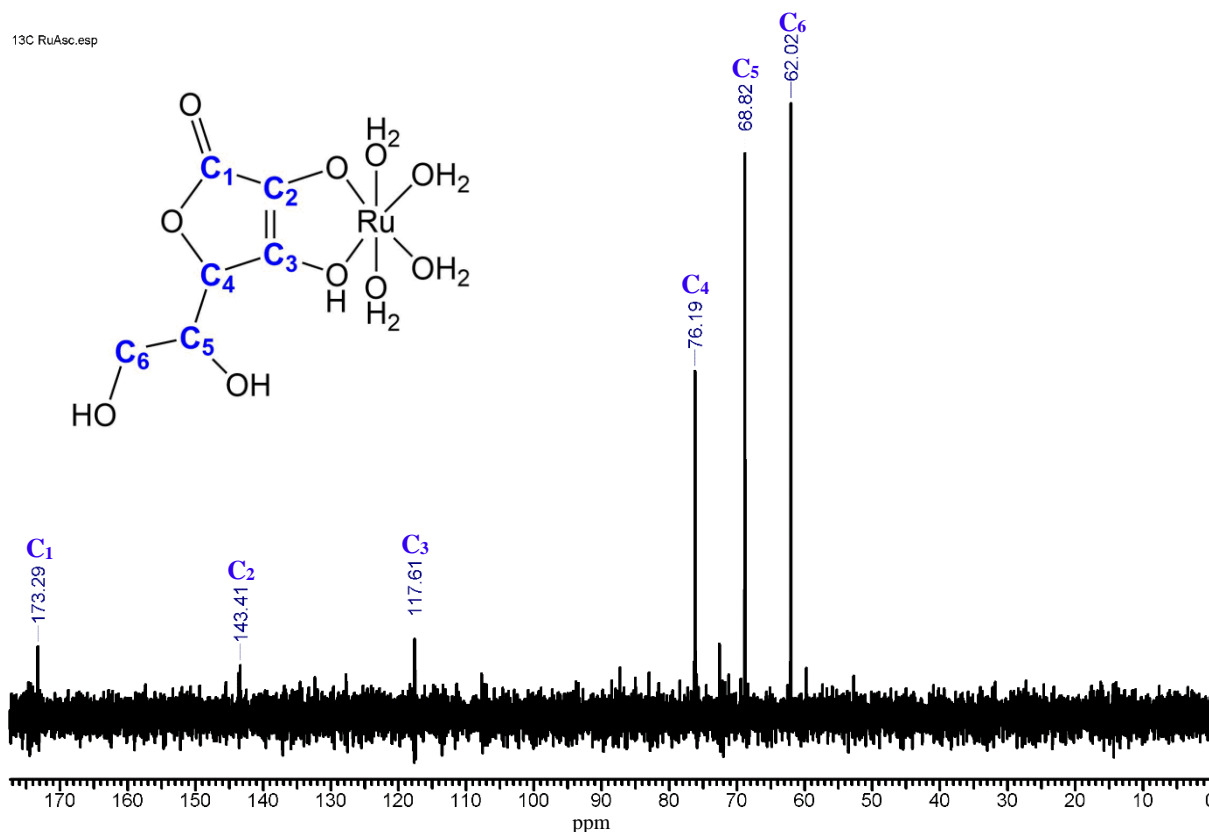


Fonte: o autor (2024)

A partir do espectro apresentado na Figura 11 é possível observar três sinais de hidrogênios diferentes, podendo-se sugerir que fazem parte da estrutura do ligante. O sinal em 4,94 ppm e 4,93 ppm (H_1 , $J = 1,95$) possui maior desblindagem frente aos outros hidrogênios da estrutura devido ao efeito anisotrópico do anel lactônico, como também multiplicidade de um duplete com área de integração igual a 1, o que é coerente com a estrutura proposta. Além disso, a composição também apresentou, no espectro, um sinal em 4,08 ppm, 4,06 ppm e 4,04 ppm (H_2 , $J = 7,05$), com multiplicidade de um tripleto e área de integração igual a 1, como também um sinal em 3,75 ppm e 3,73 ppm (H_3 , $J = 7,04$), sendo esse o mais blindado no deslocamento químico, além de possuir multiplicidade de um duplete e área de integração igual a 2, o que também entra em concordância com a estrutura idealizada. Pode-se, então, afirmar que no espectro de ressonância observado tem-

se três sinais de hidrogênios que possuem multiplicidades, deslocamentos químicos e área de integração concordante com a estrutura proposta para o composto de coordenação RuAsc, sendo esses hidrogênios advindos do ligante complexado (ascorbato). Na Figura 12 é apresentado o espectro de RMN de ^{13}C do RuAsc.

Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C (98 MHz) do RuAsc, em D_2O .

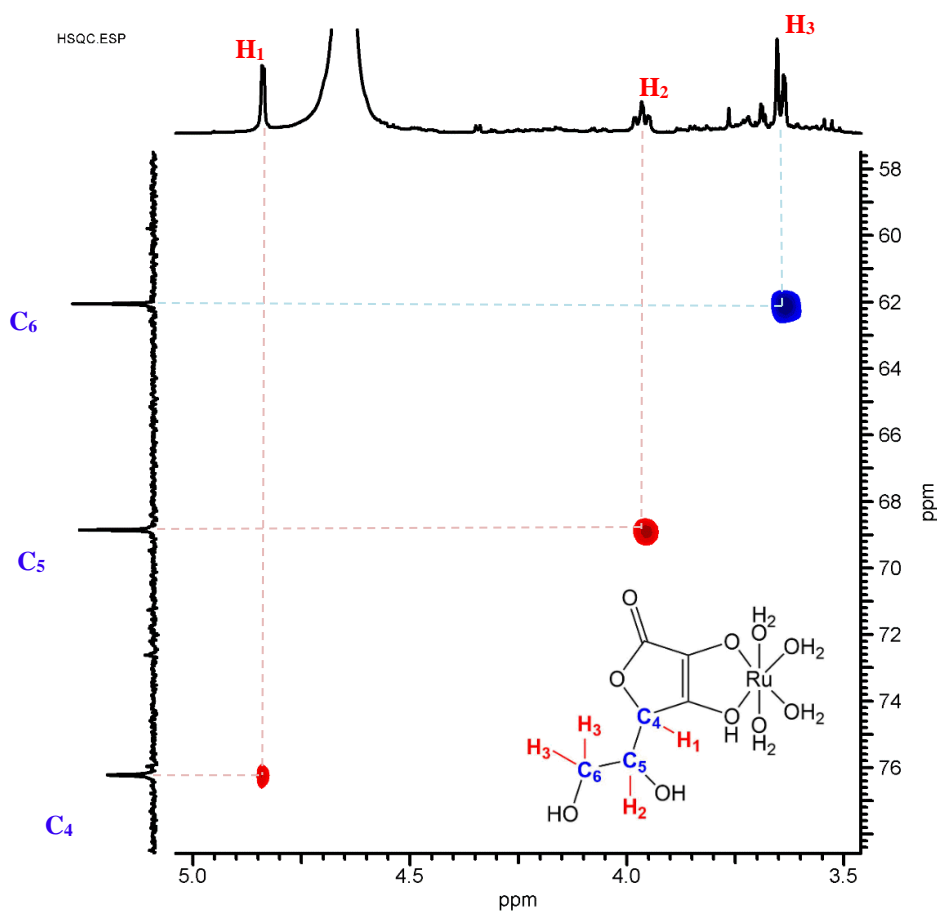


Fonte: o autor (2024)

É possível observar através do espectro de RMN de ^{13}C do RuAsc, a presença de seis sinais de carbono. Cada sinal é referente a presença de diferentes carbonos que compõe a estrutura do ligante ascorbato complexado ao Ru^{3+} . Em 173,29 ppm (C1) é possível localizar um sinal referente à um carbono carbonílico, sendo esse carbono o mais desblindado devido ao também efeito anisotrópico relatado. Em 143,41 ppm (C2) e 117,61 ppm (C3) é possível observar dois sinais de carbonos, os quais são referentes à núcleos carbônicos quaternários insaturados, fazendo-se referência a estrutura $\text{C}=\text{C}$ que o ligante ascorbato possui. Além disso, em 76,19 ppm (C4), 68,82 ppm (C5) e 62,02 ppm (C6) tem-se a presença de três sinais de carbonos, os quais apresentam-se como carbonos saturados, sendo o carbono C6 o mais blindado dentre esses (o que menos sofre perturbação nuclear frente ao campo eletromagnético). Assim, é possível sugerir que no composto de coordenação estudado existe a presença de seis núcleos de carbonos diferentes, os quais são todos coerentes com o esqueleto carbônico do ligante Ascorbato, indicando a formação do complexo

RuAsc. Na Figura 13 é apresentada o espectro de RMN de HSQC do complexo RuAsc.

Figura 13: Espectro de HSQC do RuAsc em D₂O.

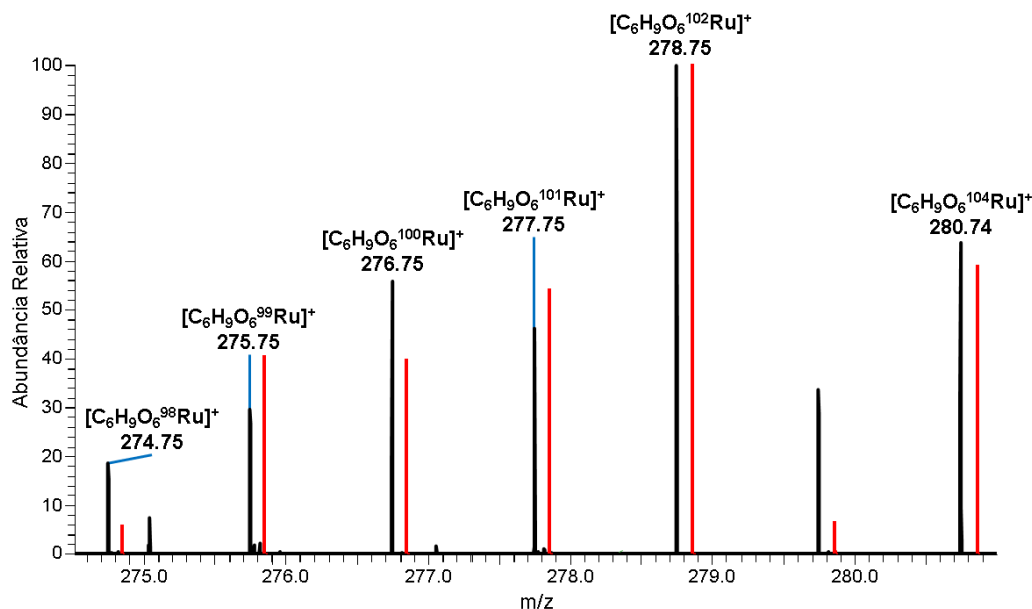


Fonte: o autor (2024)

No espectro HSQC do complexo RuAsc é possível observar a presença de três regiões de correlação entre prótons e carbonos. Duas apresentam a cor vermelha e são referentes à carbonos do tipo metínicos e a de cor azul é referente ao carbono do tipo metilênico, o que evidencia a presença de grupos carbono-hidrogênio semelhante ao esqueleto da estrutura do ligante ascorbato. Observa-se também, na região em azul, a correlação de dois hidrogênios H₃ com o carbono C₆, sendo essa correlação, como já comentada, do tipo CH₂. Além do mais, ver-se a correlação entre H₂-C₅ e H₁-C₄, evidenciando a interação carbono-hidrogênio do tipo metínico. Dessa forma, é possível sugerir que os resultados de interação entre prótons e carbonos do espectro HSQC referente ao composto de coordenação RuAsc são coerentes, o que indica a formação da estrutura proposta.

O complexo RuAsc foi submetido à análise por Espectrometria de Massas, com a finalidade de obter a razão massa/carga do composto. Na Figura 14 é apresentado o espectro de massas do íon molecular H[M]⁺.

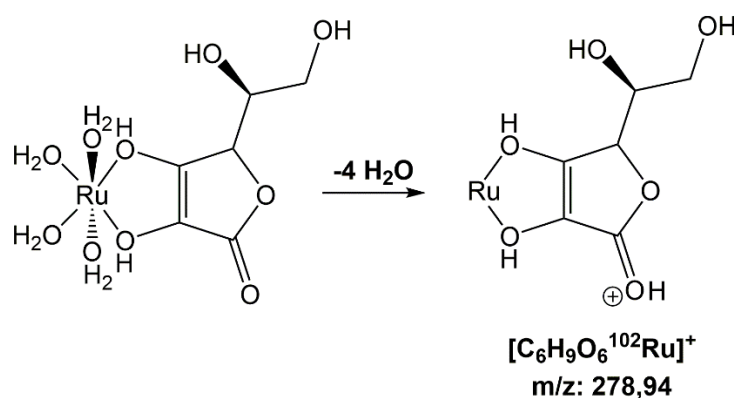
Figura 14: Espectro de massas do complexo RuAsc contendo o íon molecular. Em preto: resultado experimental. Em vermelho: resultado calculado.



Fonte: o autor (2024)

O espectro de massas do complexo RuAsc apresentou seis sinais referentes aos isótopos de rutênio (^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru e ^{104}Ru), sendo o sinal com m/z de 278,75 referente a maior abundância relativa e fórmula mínima $[\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6^{102}\text{Ru}]^+$. Essa massa está associada ao complexo ionizado após a perda de quatro moléculas de água de coordenação por desidratação, uma vez que o processo de ionização por eletrospray acontece em temperaturas elevadas (320 °C) (Figura 15).

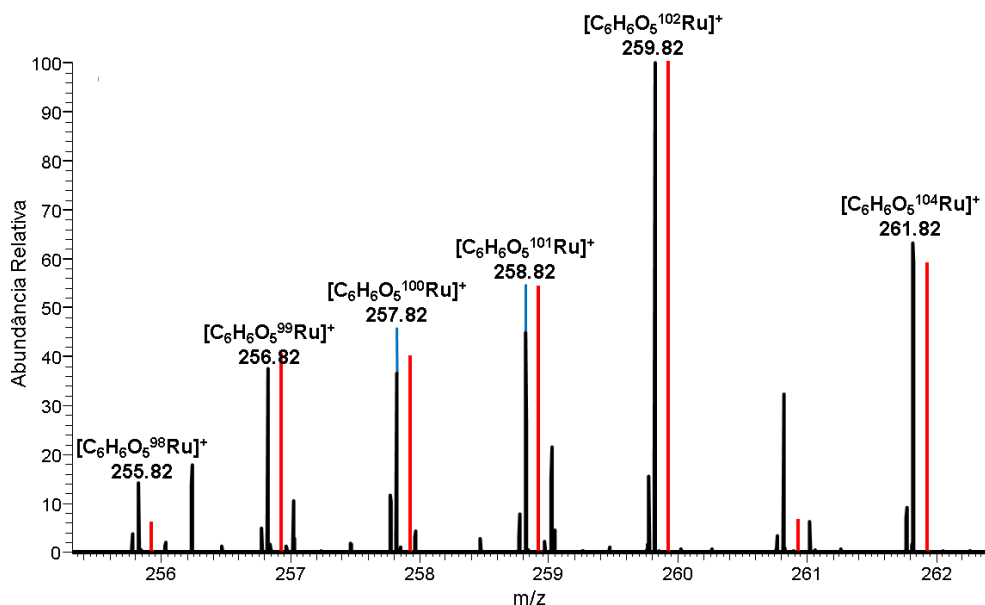
Figura 15: Esquema de desidratação do composto $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{OH}_2)_4]\text{Cl}_2$.



Fonte: o autor (2024)

Além disso, também foi possível detectar outra coletânea de sinais referentes a um fragmento por ionização do complexo sintetizado, podendo-se observar na figura 16.

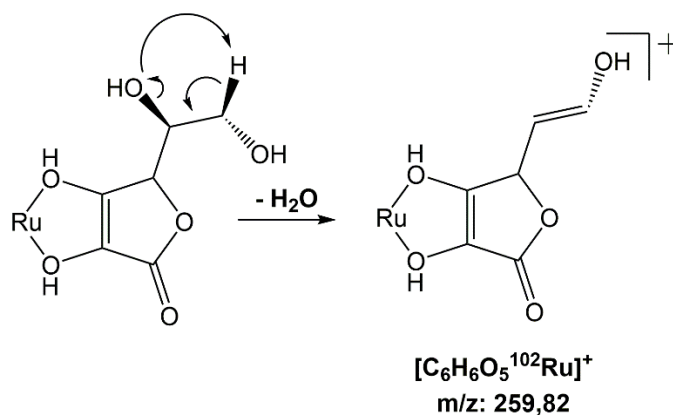
Figura 16: Espectro de massas do complexo RuAsc contendo outra ionização. Em preto: resultado experimental. Em vermelho: resultado calculado.



Fonte: o autor (2024)

O segundo espectro de massas do complexo RuAsc apresentou também seis sinais referentes aos isótopos de rutênio (^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru e ^{104}Ru), sendo o sinal com m/z de 259,82 referente a maior abundância relativa e fórmula mínima $[\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5^{102}\text{Ru}]^+$. Essa massa está associada ao complexo ionizado após a desidratação de um grupo alcoólico contido na estrutura do ligante, havendo a perda de uma molécula de água $[\text{M}]^+ - 18$ (Figura 17).

Figura 17: Esquema de ionização para a formação do fragmento de m/z 259,82.



Fonte: o autor (2024)

Os espectros de massas apresentaram concordância com a composição estudada, indicando

formação do complexo de rutênio ligado ao ligante ascorbato.

5.2.2 Ensaio de citotoxicidade

O composto RuAsc após devidas caracterizações estruturais foi conduzido ao teste de citotoxicidade. O material foi testado frente a uma linhagem normal (RAW 264.7) e duas cancerosas (HL60 e MCF-7). Os resultados calculados de IC_{50} são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de IC_{50} obtidos para o RuAsc e o Paclitaxel (fármaco padrão).

Composto	IC_{50} ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)		
	RAW 264.7	HL-60	MCF-7
RuAsc	>60,0	39,3	>60,0
Paclitaxel	1,5	0,3	0,6

Fonte: O autor (2024)

Nas dosagens testadas (1,9 a $59,6 \mu\text{mol mL}^{-1}$), o valor mínimo de IC_{50} para que o composto RuAsc não demonstrasse citotoxicidade foi de aproximadamente $60,0 \mu\text{mol mL}^{-1}$. De acordo com a tabela 2, o complexo sintetizado apresentou para células do tipo RAW 264.7 e MCF-7 IC_{50} maior que $60 \mu\text{mol mL}^{-1}$. Esses valores propõe a não-toxicidade do composto em células de câncer de mama (MCF-7), mostrando-se inativo para esse tipo de linhagem celular, como também para células saudáveis (RAW 264.7), o que aumenta a efetividade terapêutica desse composto. Além disso, o complexo de rutênio(3+) apresentou para células leucêmicas (HL-60) IC_{50} de $39,3 \mu\text{mol mL}^{-1}$, se configurando como citotóxico nessa dosagem, com um percentual toxicológico de 65,9% de atividade. Esse resultado indica que o composto RuAsc, quando testado *in vitro* em até $60 \mu\text{mol mL}^{-1}$, apresenta toxicidade seletiva para células leucêmicas, com alta eficiência terapêutica por não ser tóxico a células saudáveis, tornando-se candidato ao tratamento de leucemia.

Salienta-se também que o complexo sintetizado apresenta taxa de IC_{50} maior que os compostos atualmente utilizados como quimioterápicos (paclitaxel, por exemplo). Quando comparado os resultados de IC_{50} para células leucêmicas, observa-se que o paclitaxel é 100 vezes mais citotóxico do que o complexo de rutênio(3+), o que torna o paclitaxel uma droga com maiores efeitos adversos, possuindo menor efetividade terapêutica. Heffeter e colaboradores (2005), ao estudar o comportamento citotóxico do composto KP1019 (complexo de rutênio que chegou à fase clínica), observou para células do tipo HL-60 valores de IC_{50} de $56,0 \mu\text{mol mL}^{-1}$ (Heffeter et al, 2005). Quando comparado esse resultado ao complexo RuAsc, observa-se maior potencialidade do composto RuAsc, uma vez que na mesma linhagem celular o complexo apresentou IC_{50} de 39,3

$\mu\text{mol mL}^{-1}$, o que o torna mais citotóxico que o KP1019.

6 CONCLUSÕES

O trabalho teve seu objetivo alcançado, uma vez que além da proposta sintética de novos compostos de coordenação à base de rutênio, os mesmos podem contribuir para os avanços científicos da química inorgânica e bioinorgânica, tornando mais evidente as descobertas e apresentações de protótipos terapêuticos que sejam capazes de apresentarem melhores resoluções toxicológicas.

O complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2$ foi caracterizado através de técnicas espectroscópicas e espectrométrica. Através do espectro no infravermelho observou-se bandas em 3359 cm^{-1} referente à águas de coordenação presentes no complexo obtido; e em 1789 cm^{-1} referente ao grupo $\text{C}=\text{O}$ do grupo éster. O espectro de absorção do complexo apresentou uma banda na região de 234 nm ($\epsilon = 9162\text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, sugerindo a presença do ascorbato; em 313 nm ($\epsilon = 2467\text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) observa-se uma banda de transferência de carga ligante-metal (TCLM), a qual sugere a transição de cargas eletrônicas do ligante para o cátion metálico; e, em 758 e 689 nm referente a transições $d \rightarrow d$.

O espectro de RMN ^1H apresentou três sinais, em $4,94$ e $4,93\text{ ppm}$ referente ao anel lactônico; em $4,08$; $4,06$ e $4,04\text{ ppm}$ com multiplicidade de um tripleto; e em $3,75$ e $3,73\text{ ppm}$. No espectro de RMN de ^{13}C do RuAsc observou-se a presença de seis sinais de carbono, concordando com a estrutura proposta. O espectro de massas do complexo RuAsc apresentou dois sinais de razão massa/carga de $278,75$ e $259,82$, coerentes com a presença dos isótopos naturais de rutênio.

Os resultados obtidos através dos ensaios de citotoxicidade demonstraram baixa toxicidade do complexo $[\text{Ru}(\text{Asc})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2$ frente à células normais de RAW 264.7. Esse complexo apresentou citotoxicidade significativa frente à células do tipo HL-60 com IC_{50} de $39,3\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$, tornando-se um promissor candidato contra células de leucemia.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretende-se:

- Caracterizar o ligante utilizado e o complexo obtido por voltametria cíclica e Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE);
- Estudar a estabilidade aquosa do complexo obtido em condições próximas ao meio fisiológico
- Realizar ensaios de atividade antioxidante do complexo obtido por métodos espectrofotométricos (FRAP e CUPRAC);
- Realizar novos ensaios citotóxicos em outras linhagens celulares neoplásicas, avaliando o IC₅₀;
- Avaliar em modelo animal a toxicidade aguda do composto por dosagem e a atividade antitumoral;
- Estudar os parâmetros histopatológicos e hematológicos do complexo utilizado para teste.

REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 164–174, 2014.
- ALESSIO, E. Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: A personal perspective: Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: A personal perspective. **European journal of inorganic chemistry**, v. 2017, n. 12, p. 1549–1560, 2017.
- ALESSIO, E.; MESSORI, L. NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: A case story in medicinal inorganic chemistry. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 10, p. 1995, 2019.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum metals review**, v. 45, n. 2, p. 62–69, 2001.
- ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, v. 48, n. 3, p. 589–601, 1988.
- ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2010.
- BESKER, N. et al. Binding of antitumor ruthenium complexes to DNA and proteins: a theoretical approach. **The journal of physical chemistry. B**, v. 111, n. 33, p. 9955–9964, 2007.
- BRAGA, S. S. Ruthenium complexes, an emerging class of leishmanicidal drug candidates. **Applied Biosciences**, v. 1, n. 2, p. 129–142, 2022.
- CETINKAYA, B. et al. Antibacterial and antifungal activities of complexes of ruthenium (II). **Arzneimittel-Forschung**, v. 49, n. 6, p. 538–540, 1999.
- CHAMBIAL, S. et al. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. **Indian journal of clinical biochemistry: IJCB**, v. 28, n. 4, p. 314–328, 2013.
- CIRRI, D. et al. Metallo therapeutics for COVID-19. Exploiting metal-based compounds for the discovery of new antiviral drugs. **Expert opinion on drug discovery**, v. 16, n. 1, p. 39–46, 2021.
- CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination chemistry reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 69–93, 2002.
- DUAN, L. et al. A molecular ruthenium catalyst with water-oxidation activity comparable to that of

photosystem II. **Nature chemistry**, v. 4, n. 5, p. 418–423, 2012.

FENECH, M. et al. Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 2006, 2018.

GASSER, G.; METZLER-NOLTE, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. **Current opinion in chemical biology**, v. 16, n. 1–2, p. 84–91, 2012.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic chemistry**, v. 88, n. 102925, p. 102925, 2019.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**; 30(5):390-397, (2008);

GUERRA, W.; ALVES, F. E.; SILVA, P. P. Metais do Grupo da Platina: História, Propriedades e Aplicações. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, p. 27, 2010.

HALCZUK, K. et al. Vitamin B12-multifaceted in vivo functions and in vitro applications. **Nutrients**, v. 15, n. 12, 2023.

HAMBLEY, T. W. Platinum binding to DNA: structural controls and consequences. **Journal of the Chemical Society**, n. 19, p. 2711–2718, 2001.

HARTMANN, J. T.; LIPP, H.-P. Toxicity of platinum compounds. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 4, n. 6, p. 889–901, 2003.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of cancer research and practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

HEFFETER, P. et al. Intrinsic and acquired forms of resistance against the anticancer ruthenium compound KP1019 [indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A). **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 312, n. 1, p. 281–289, 2005.

HVOSLEF, J. et al. Vibrational spectroscopic studies of L-ascorbic acid and sodium ascorbate. **Acta chemica Scandinavica (Copenhagen, Denmark: 1989)**, v. 25, p. 3043–3053, 1971.

KARGES, J.; STOKES, R. W.; COHEN, S. M. Metal complexes for therapeutic applications. **Trends in chemistry**, v. 3, n. 7, p. 523–534, 2021.

KAWAMOTO, M. et al. A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells. **BMC cancer**, v. 11, n. 1, p. 359, 2011.

KEPPLER, B. K. et al. New ruthenium complexes for the treatment of cancer. Em: **Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy**. Berlin, Heidelberg: Springer

Berlin Heidelberg, 1989. p. 41–69.

KRISTIANO, I. et al. Effective depolymerization of concentrated acid hydrolysis lignin using a carbon-supported ruthenium catalyst in ethanol/formic acid media. **Bioresource technology**, v. 234, p. 424–431, 2017.

MAIKOO, S. et al. Ruthenium compounds as potential therapeutic agents for type 2 diabetes mellitus. **European journal of medicinal chemistry**, v. 213, n. 113064, p. 113064, 2021.

MAITLIS, P. “ruthenium oxidation complexes: Their uses as homogenous organic catalysts”. **Platinum metals review**, v. 55, n. 3, p. 193–195, 2011.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 5, p. 409–436, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MÜLLER, T. E. Ruthenium - Materials Properties, Device Characterizations, and Advanced Applications. **IntechOpen**, 2023.

MUNTEANU, A.-C.; UIVAROSI, V. Ruthenium complexes in the fight against pathogenic microorganisms. An extensive review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 874, 2021.

MUTHUSAMY, S. et al. Recent advances in aerobic oxidation with ruthenium catalysts. **Tetrahedron letters**, v. 57, n. 50, p. 5551–5559, 2016.

NIKOLAOU, S.; SILVA, C. F. N. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de Rutênio. **Química Nova**. Jul, v. 41, n. 7, p. 833–8, 2018.

OMS. Cancer Tomorrow. International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>. Acesso em 26 de julho de 2024;

PAVIA, D. L. et al. Introdução À Espectroscopia. **Cengage Learning**, 2015;

REEDIJK, B. J. Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes. **Platinum metals review**, v. 52, n. 1, p. 2–11, 2008.

RICCARDI, C. et al. Anticancer ruthenium(III) complexes and Ru(III)-containing nanoformulations: An update on the mechanism of action and biological activity. **Pharmaceutics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 4, p. 146, 2019.

SASAHARA, G. L. et al. Nitro-imidazole-based ruthenium complexes with antioxidant and anti-

inflammatory activities. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 206, n. 111048, p. 111048, 2020.

SAVA, G. Ruthenium compounds in cancer therapy. Em: **Metal Compounds in Cancer Therapy**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 65–91, 1994.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 15, n. 3, p. 309–323, 2002.

SHEN, D.-W. et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 706–721, 2012.

SILVA, P. P. S.; GUERRA, W. Rutênio. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 2, p. 99-100, 2012.

TRONDL, R. et al. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. **Chemical science (Royal Society of Chemistry: 2010)**, v. 5, n. 8, p. 2925–2932, 2014.

VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. **Free radical biology & medicine**, v. 47, n. 1, p. 32–40, 2009.

WANG, L. et al. Growth propagation of yeast in linear arrays of microfluidic chambers over many generations. **Biomicrofluidics**, v. 5, n. 4, p. 44118–441189, 2011.