

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAIO CESAR CANDIDO

**NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO METRONIDAZOL:
INVESTIGAÇÃO CITOTÓXICA E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA**

Alfenas/MG

2022

CAIO CESAR CANDIDO

**NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO METRONIDAZOL:
INVESTIGAÇÃO CITOTÓXICA E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto
Coorientadora: Dr^a. Marília Imaculada Frazão Barbosa

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Candido, Caio Cesar.

Novos complexos de Rutênio(II) contendo Metronidazol: investigação citotóxica e estudo da interação com o DNA / Caio Cesar Candido. - Alfenas, MG, 2022.

99 f. : il. -

Orientador(a): Antônio Carlos Doriguetto.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Metronidazol. 2. Atividade antitumoral. 3. Complexos de rutênio. I. Doriguetto, Antônio Carlos, orient. II. Título.

NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO METRONIDAZOL: INVESTIGAÇÃO CITOTÓXICA E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA

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

Aprovado em: 03 de agosto de 2022

Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Profa. Dra. Edjane Rocha dos Santos
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Profa. Dra. Júlia Scaff Moreira Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Carlos Doriguetto, Professor do Magistério Superior**, em 04/08/2022, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júlia Scaff Moreira Dias, Usuário Externo**, em 04/08/2022, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edjane Rocha dos Santos, Usuário Externo**, em 05/08/2022, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0784419** e o código CRC **4636C456**.

Aos meus pais, irmão e todos os familiares e amigos, por todo amor, apoio, incentivo e torcida nesta etapa concluída.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus por minha vida e por suas bênçãos nesta jornada. Aos meus pais Marco e Ana Carolina e meu irmão Lucas que me deram todo amor, incentivo, suporte e apoio necessários para que eu conseguisse realizar um sonho! Amo vocês!! Assim como todos os familiares e amigos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, pela oportunidade, orientação, confiança, conhecimentos transmitidos e conselhos dados ao longo desta jornada.

A Dra. Marília Imaculada Frazão Barbosa, pela coorientação, paciência, amizade, ensinamentos e dedicação ao longo deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de pesquisa, pelas conversas e ensinamentos transmitidos ao longo do desenvolvimento desta jornada.

A profa. Dra. Marisa Ionta e ao Dr. Bruno Zavan pela realização dos testes biológicos frente a citotoxicidade em linhagens de câncer e ao empenho para resolução dos dados.

A profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães, pelos ensaios iniciais à *leishmaniose*.

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

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

RESUMO

Foram desenvolvidos quatro novos complexos de rutênio(II) contendo ligantes mono e bidentados: $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$, $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Metoxybipy})]\text{PF}_6$, $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$, onde, MTNZ = metronidazol, dppb = 1,4-Bis(difenilfosfina)butano, 4,4'-Mebipy = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, 4,4'-Metoxybipy = 4,4'-dimetoxi-2,2'-bipiridina, bipy = 2,2'-bipiridina e fen = 1,10-fenantrolina; os quais foram caracterizados por análise elementar, condutividade molar, espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) e Ultravioleta e visível (UV-Vis), ressonância magnética nuclear (RMN) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Dept 135 e voltametria cíclica. Após as caracterizações foram realizados ensaios da atividade citotóxica usando diferentes linhagens celulares tumorais (melanoma: SK-MEL-147, fígado: Hep G2, mama: MCF-7 e pulmão: A549). Os complexos $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ apresentaram promissora atividade frente à células de câncer de mama (MCF-7) com valores de IC_{50} $17,47 \pm 1,14$ com índice de seletividade 2,7 e IC_{50} $16,88 \pm 0,97$ com IS de 2,9 respectivamente. Os complexos apresentam-se mais seletivos quando comparados ao fármaco de referência à *cis*-platina. Além do mais, ensaios de anexina V mostraram que $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ são capazes de induzir apoptose e a análise de progressão do ciclo celular mostrou que os mesmos alteram a dinâmica de progressão do ciclo celular e causam bloqueio do ciclo na transição G1/S. Os complexos obtidos apresentaram alta afinidade pelo DNA. Em suma, os dados obtidos no presente estudo suportam investigações adicionais sobre os complexos $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ para potencial aplicação frente a linhagem de câncer de mama MCF-7.

Palavras-chave: metronidazol; atividade antitumoral; complexos de rutênio.

ABSTRACT

Four novel ruthenium(II) complexes containing ligands mono and bidentate were obtained: $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$, $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Methoxybipy})]\text{PF}_6$, $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ and $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{phen})]\text{PF}_6$, where, MTNZ = metronidazole, dppb = 1,4-Bis(diphenylphosphino)butane, 4,4'-Mebipy = 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine, 4,4'-Methoxybipy = 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine, bipy = 2,2'-bipyridine and phen = 1,10-phenanthroline. The complexes were characterized by elemental analysis, molar conductivity, infrared and UV-Vis spectroscopy, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ and Dept 135 NMR and cyclic voltammetry. The interactions of complexes with DNA were evaluated, and the cytotoxicity profiles of compounds were determined using four different tumor cell lines derived from human cancers (melanoma: SK-MEL-147, liver: Hep G2, breast: MCF-7, and lung: A549). Higher cytotoxic activity was observed for compounds $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$ and $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ against cell breast cancer (MCF-7), with IC_{50} $17,47 \pm 1,14$ (SI 2,7) and IC_{50} $16,88 \pm 0,97$ (SI 2,9), respectively. Furthermore, annexin V assays showed that $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$ and $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ can induce apoptosis in MCF cells -7 and cell cycle progression analysis showed that they alter the cell cycle progression dynamics and cause cycle blocking in the G1/S transition. In summary, the data obtained in the present study support further investigations into molecular targets of the $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4'\text{-Mebipy})]\text{PF}_6$ and $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ complexes for potential application against the MCF-7 breast cancer lineage.

Keywords: metronidazole; antitumor activity; ruthenium complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas do imidazol, 5-nitroimidazol e metronidazol	15
Figura 2 – Estruturas químicas do metronidazol	19
Figura 3 – Redução de ativação do metronidazol	19
Figura 4 – Mecanismo de ação do metronidazol	20
Figura 5 – Representação de complexos de Ru com coordenação do MTNZ	21
Figura 6 – Representação de complexos KP 418, KP 1019 e KP1339	22
Figura 7 – Representação do complexo NAMI-A	23
Figura 8 – Representação do complexo RAPTA-C	24
Figura 9 – Representação do complexo de rutênio TLD-1433	24
Figura 10 – Estruturas químicas da fenantrolina, bipyridinas e dppb	25
Figura 11 – Estrutura química do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$	30
Figura 12 – Estrutura química do precursor $[\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\text{dppb})_3]$	31
Figura 13 – Estrutura química do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$	31
Figura 14 – Esquema químico da síntese do Ru-MTNZ	32
Figura 15 – Coloração obtida dos complexos Ru-MTNZ	32
Figura 16 – Estruturas propostas para os complexos obtidos	37
Figura 17 – Comparativo de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do precursor e C3MTNZ 8	39
Figura 18 – RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 10 em diferentes solventes	41
Figura 19 – RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante metronidazol, em DMSO- d_6	42
Figura 20 – Espectro de RMN dept 135 do C3MTNZ 7, em DMSO- d_6	44
Figura 21 – RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dept 135 comparativo entre MTNZ e C3MTNZ 7	45
Figura 22 – Espectro de RMN ^1H do metronidazol, em DMSO- d_6	46
Figura 23 – Espectro de RMN ^1H do C3MTNZ 9, em DMSO- d_6	47
Figura 24 – Representação esquemática das transições	50
Figura 25 – Espectro de UV-Vis comparativo do precursor <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(4,4'\text{-metóxi-bipy})]$ e complexo C3MTNZ 8, em CH_2Cl_2	50
Figura 26 – Espectro de UV-Vis do complexo C3MTNZ 8, em CH_2Cl_2	51
Figura 27 – Espectro comparativo de UV-Vis para os complexos obtidos e seus precursores, em CH_2Cl_2	53
Figura 28 – Mecanismo de redução do grupo nitro do metronidazol	55

Figura 29 – Voltametria cíclica do metronidazol; eletrólito PTBA 0,1 mol.L ⁻¹ em DMSO vs. Ag/AgCl.....	55
Figura 30 – Voltametria cíclica do complexo C3MTNZ 10; eletrólito PTBA 0,1 mol.L ⁻¹ em DMSO vs. Ag/AgCl.....	56
Figura 31 – Espectro de infravermelho do metronidazol, em KBr	57
Figura 32 – Espectro de infravermelho do C3MTNZ 7, em KBr	58
Figura 33 – Espectro de infravermelho comparativo	59
Figura 34 – Análise de estabilidade por espectro de RMN ³¹ P{ ¹ H} para o complexo C3MTNZ 7, em DMSO-d ₆	61
Figura 35 – Viabilidade celular ensaio de sulforrodamina B (SBR).....	63
Figura 36 – Imagens representativas por microscopia de contraste de fase	65
Figura 37 – Análise de progressão do ciclo celular	66
Figura 38 – Ensaio de anexina V	67
Figura 39 – Espectroscopia de UV-Vis das titulações do C3MTNZ 7 em DNA	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Complexos de rutênio com ligantes fosfínicos, biperidinas e fenantrolina e suas aplicações em linhagens celulares tumorais	26
Tabela 2 – Dados de condutividade molar dos complexos	38
Tabela 3 – Dados de análise elementar dos complexos.....	38
Tabela 4 – Deslocamento químico e constante de acoplamento RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos precursores e dos complexos obtidos	40
Tabela 5 – Deslocamento químico δ (ppm) de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para os Ru-MTNZ	43
Tabela 6 – Bandas atribuídas em RMN ^1H ao metronidazol	47
Tabela 7 – Deslocamento químico δ (ppm) de RMN ^1H para os Ru-MTNZ.....	49
Tabela 8 – Coeficientes de absorvidade molar e atribuições das bandas dos complexos sintetizados.....	52
Tabela 9 – Valores de pka das biperidinas e o comprimento de onda atribuído à transição de transferência de carga metal ligante dos complexos sintetizados.....	54
Tabela 10 – Potenciais de oxidação e redução dos complexos sintetizados	56
Tabela 11 – Correlação entre os valores de $E_{1/2}$ dos complexos e os pkas de seus respectivos ligantes biperidínicos.....	57
Tabela 12 – Comparativo das principais bandas de infravermelho do ligante metronidazol e complexos sintetizados	60
Tabela 13 – Valores de IC_{50} (μM) dos complexos Ru-MTNZ frente <i>Leishmania amazonensis</i>	62
Tabela 14 – Valores de IC_{50} (μM) determinados após 48 horas de tratamento	63
Tabela 15 – Valores de IS determinadas após tratamento por 48 horas	64
Tabela 16 – Valores de K_b e %H dos complexos Ru-MTNZ	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4,4-metil-bipy	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
4,4-metoxi-bipy	4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina
Bipy	2,2'-bipiridina
C3MTNZ 7	[RuCl(MTNZ)(dppb)(4,4-metil-bipy)]PF ₆
C3MTNZ 8	[RuCl(MTNZ)(dppb)(4,4-metóxi-bipy)]PF ₆
C3MTNZ 9	[RuCl(MTNZ)(dppb)(bipy)]PF ₆
C3MTNZ 10	[RuCl(MTNZ)(dppb)(fen)]PF ₆
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
<i>cis</i> -bipy	[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]
<i>cis</i> -fen	[RuCl ₂ (dppb)(fen)]
ct-DNA	Calf Thymus DNA (DNA de timo de carneiro)
d	dubleto
D ₂ O	água deuterada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	dimetil sulfóxido
DMSO-d ₆	dimetil sulfóxido deuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dppb	1,4-bis(difenilfosfina)butano
EtOH	etanol
Fen	1,10-fenantrolina
IC ₅₀	Concentração Inibitória média
IL	Transferência de Carga Intra-ligante
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ip-3t	imidazol[4,5-f][1,10]fenantrolina] <i>tethered</i> 3 tiofenos
IV	Infravermelho
Kb	constante de ligação intrínseca
KP418	<i>trans</i> -[RuCl ₄ (imidazol) ₂](Himidazol)
KP1019	<i>trans</i> -[RuCl ₄ (indazol) ₂](Hindazol)
KP1339	<i>trans</i> -[RuCl ₄ (indazol)](Na)
MTNZ	metronidazol

MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio]
N-N	Ligantes N,N-heterocíclicos
NAMI- A	<i>trans</i> -[RuCl ₄ (DMSO)(imidazol)](Himidazol)
NO	óxido nítrico
NO ₂	grupo nitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PF ₆ ⁻	íon hexafluor fosfato
PFOR	enzima piruvato:ferrodoxina oxireductase
PPh ₃	trifenilfosfina
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano
PTBA	perclorato de tetrabutílamônio
Q	quarteto
RAPTA-C	[Ru(cimeno)Cl ₂ (PTA)]
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Ru(II)	Rutênio no estado de oxidação +2
Ru(III)	Rutênio no estado de oxidação +3
s	singleto
t	triplete
TCML	Transferência de Carga Metal Ligante
TLD1433	[Ru(4,4-metil-bipy) ₂ (ip-3t)]Cl ₂
TrxR	enzima redutase tioredoxin reduate
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo específico	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	CÂNCER	17
2.2	METRONIDAZOL	18
2.2.1	Complexos contendo metronidazol	20
2.3	COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL	21
2.3.1	Complexos contendo ligantes N-N heterocíclicos e fosfínicos	25
3	MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO	27
3.1	SOLVENTES	27
3.2	REAGENTES	27
3.3	ATMOSFERA INERTE (ARGÔNIO)	27
3.4	INSTRUMENTAÇÃO	27
3.4.1	Análise elementar	27
3.4.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	28
3.4.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	28
3.4.4	Condutividade molar	28
3.4.5	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível	28
3.4.6	Voltametria	29
4	METODOLOGIAS	30
4.1	SÍNTESES DOS COMPLEXOS PRECURSORES	30
4.1.1	[RuCl₂(PPh₃)₃]	30
4.1.2	[Ru₂Cl₄(dppb)₃]	30
4.1.3	cis-[RuCl₂(dppb)(N-N)]	31
4.2	SÍNTESE DOS COMPLEXOS COM METRONIDAZOL	31
4.3	ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM O DNA	33
4.4	ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	34
4.4.1	Linhagens celulares e condições de cultivo	34
4.4.2	Esquema de tratamento	34
4.4.3	Viabilidade celular	34

4.4.4	Análise da progressão do ciclo celular	35
4.4.5	Ensaio de anexina V	36
4.4.6	Análise estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1	CONDUTIVIDADE MOLAR	38
5.2	ANÁLISE ELEMENTAR	38
5.3	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	39
5.3.1	Ressonância Magnética Nuclear $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	39
5.3.2	Ressonância Magnética Nuclear $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dept 135	41
5.3.3	Ressonância Magnética Nuclear ^1H	46
5.4	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS	49
5.5	VOLTAMETRIA CÍCLICA	54
5.6	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	57
5.7	ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO POR RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	60
5.8	TESTES BIOLÓGICOS	61
5.8.1	Ensaio de citotoxicidade promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ...	61
5.8.2	Ensaio de citotoxicidade nas linhagens celulares de câncer	62
5.8.3	Análise da progressão do ciclo celular	65
5.8.3	Ensaio de anexina V	66
5.9	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO	80
	APÊNDICE	94

1 INTRODUÇÃO

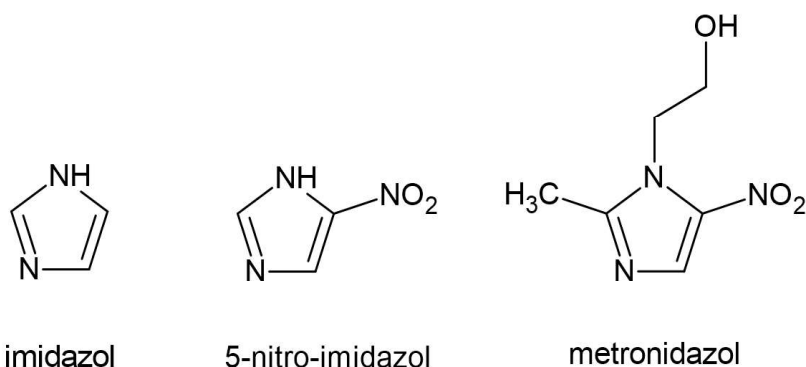
A Química Bioinorgânica é um ramo da química inorgânica que estuda as funções e aplicações de íons metálicos e seus complexos em sistemas biológicos (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007). Os avanços, definições e conceitos mais recentes da Química Inorgânica Medicinal podem ser datados na primeira década dos anos 1900, pelos trabalhos de Paul Ehrlich, ao desenvolver um composto de arsênio para o tratamento da sífilis, denominado Arsfenammina (BERALDO, 2005).

A Química Inorgânica Medicinal, como ferramenta para o tratamento do câncer, teve seu início a partir da descoberta das propriedades antitumorais do fármaco cisplatina, em 1965, que é utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer como: ovário, testículo, pulmão, cabeça, pescoço e bexiga (ALDOSSARY, 2019). Desde então, a busca por novas formas de tratamento foi alavancada, sendo desenvolvido análogos à cisplatina e a utilização de outros metais, com destaque ao rutênio (NIKOLAOU; SILVA, 2018).

A utilização de metalofármacos pode ser beneficiada em contra partida aos fármacos orgânicos, visto que os complexos possuem vasta versatilidade na utilização de diferentes ligantes/substituintes, geometrias, isômeros e estado de oxidação (MJOS; ORVIG, 2014). Relatos na literatura apontam à coordenação de medicamentos orgânicos à metais, fazendo com que haja modificações em suas propriedades farmacológicas (JURCA *et al.*, 2017; ROCHA *et al.* 2011; DIAS *et al.*, 2020).

Derivados imidazólicos são sistemas promissores por sua versatilidade e amplo espectro de aplicações terapêuticas, principalmente frente ao câncer, devido as suas atividades antitumorais (SHARMA *et al.*, 2021; ALGHAMDI *et al.*, 2021). O fármaco metronidazol, disposto na Figura 1, alvo deste trabalho, pertence a uma série de compostos derivados dos imidazóis que apresentam o grupo nitro (NO₂) em sua estrutura, estes são utilizados como agentes antimicrobianos e estudos mostram promissora aplicação frente ao câncer ((ANG *et al.*, 2017; MORETH *et al.*, 2010; LIU; ZHU, 2011; SHARMA *et al.*, 2021).

Figura 1 – Estruturas químicas: imidazol, 5-nitroimidazol e metronidazol



Fonte: do Autor

Aliado as propriedades citadas acima referente aos ligantes imidazólicos, esta dissertação de mestrado, centrou-se na síntese de complexos de rutênio contendo o ligante metronidazol, uma vez que complexos de rutênio se apresentam como destaque em novos e promissores agentes antitumorais, visto que, exibem uma melhor seletividade e especificidade frente as células tumorais quando comparados aos complexos de platina (LEE; KIM; NAM, 2020; THOTA *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2018).

Ademais, complexos de rutênio contendo ligantes imidazólicos apresentam promissora atividade anticâncer (DIAS *et al.*, 2018; YANG; LIAO; FU, 2018; CHEN *et al.*, 2016; THOTA *et al.*, 2018).

1.1 OBJETIVOS

Em face das propriedades antitumorais dos derivados nitroimidazólicos e complexos de rutênio, o presente trabalho centrou-se na síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de complexos de rutênio(II) contendo o ligante metronidazol, a fim de desenvolver moléculas mais seletivas frente ao câncer.

1.1.1 Objetivo específicos

Com base nas informações supracitadas, os complexos obtidos foram:

- a) sintetizados complexos de rutênio(II) de fórmula geral: $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{N-N})](\text{PF}_6)$ (Figura 2); onde MTNZ = metronidazol, dppb = 1,4'-bis(difenilfosfina)butano e N-N = ligantes N-heterocíclicos (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina; 4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina; 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina);
- b) caracterizou-se por ressonância magnética nuclear (RMN) de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, Dept 135; espectroscopia de absorção da região do infravermelho e ultravioleta e visível, condutividade molar, voltametria cíclica, análise elementar e ensaios de estabilidade;
- c) avaliou a atividade citotóxica dos complexos obtidos frente as linhagens celulares de mama (MCF-7), pulmão (A549), pele/melanoma (SKMEL-147), fígado (HepG2) e células normais (CCD-1059Sk);
- d) avaliou a interação dos complexos com ct-DNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer (outros termos usados são tumores malignos e neoplasias) é um termo genérico para diversos tipos de doenças que tem como característica o crescimento desordenado e/ou descontrolado de células. O crescimento e morte celular ordenado é algo que acontece com naturalidade nos corpos humanos, entretanto quando ocorre alguma anormalidade no crescimento celular, as células, em vez de morrerem, continuam crescendo de forma não controlada, gerando assim as células cancerosas (INCA, 2020). Essa anormalidade no crescimento celular pode ser proveniente de mutações genéticas na replicação do DNA e/ou agentes cancerígenos (INCA, 2020).

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e transplante de medula óssea, sendo que em alguns casos é necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento (FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018).

Câncer está classificado entre as doenças de maior incidência e com maior dificuldade de tratamento, apresentando altos índices de óbito. Os indicadores da Organização Mundial de Saúde mostraram que a ocorrência de morte proveniente da enfermidade câncer em todo o mundo foi de quase 10 milhões de pessoas, no ano de 2020 (FERLAY *et al.*, 2020). Já os dados brasileiros apontam uma incidência de morte de 108.318 mulheres e 117.512 homens no mesmo período, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022).

O câncer de pulmão é a principal causa de morte, em todo o mundo (THAI *et al.*, 2021). Somente no ano de 2020, um pouco mais de 1,7 milhão de novos óbitos (FERLAY *et al.*, 2020) foram contabilizados. No Brasil o câncer de pulmão provocou uma ocorrência de 30.200 novos casos da doença (17.760 homens e 12.440 mulheres). Os principais fatores de risco para a incidência do câncer de pulmão são o tabagismo, poluição atmosférica, agentes químicos (radônio, asbestos e fibras minerais, sílica, crômio, níquel, arsênico e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), agentes hospedeiros e genéticos (THAI *et al.*, 2021; ZAMBONI, 2002).

O câncer de mama é o câncer de maior ocorrência no mundo (COLES *et al.*, 2022; SILVA; RIUL; 2011; FERLAY *et al.*, 2020). Em 2020 aproximadamente

685.000 casos de morte proveniente ao câncer de mama em todo o mundo (COLES *et al.*, 2022). No Brasil, dados do INCA no ano de 2020, apontaram um total de 66.280 novos casos de câncer de mama somente nas mulheres, e para os homens, apesar de raro, estimasse que afete 1% do total de casos no Brasil, (INCA, 2022). Os fatores de risco para o câncer de mama são a idade avançada, características reprodutivas (menarca precoce, menopausa tardia e gestação tardia), histórico familiar, entre outros (SILVA; RIUL; 2011).

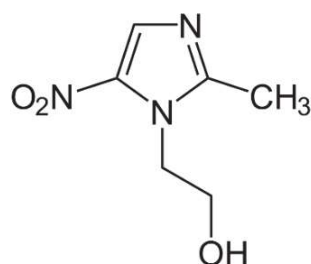
O melanoma é uma das formas mais agressivas de câncer relacionados a pele, sendo responsável por 75% das mortes alistadas a este câncer, devido seu alto potencial metastático (SCHADENDORF *et al.*, 2015; INCA, 2022). Então a identificação precoce é de suma importância para o sucesso do tratamento. O Brasil registrou um total de 8.450 novos casos de câncer de pele melanoma no ano de 2020 (INCA, 2022). Os pontos que aumentam o risco de obtenção do melanoma são a exposição prolongada ao sol (raios ultravioletas), exposição às câmeras de bronzeamento, população caucasiana e histórico familiar (DOMINGUES *et al.*, 2018; INCA, 2022).

O câncer de fígado apresenta dados, que apontam um número superior a 1 milhão de novos casos por ano em todo o mundo (LLOVET *et al.* 2021). São sub classificados em: colangiocarcinoma (inflamações biliares provocadas por vermes, entre outros fatores), angiossarcoma (substâncias químicas encontradas em agrotóxicos, como dióxido de tório, cloreto de vinila e arsênicas) e hepatocarcinoma (INCA, 2022). O hepatocarcinoma é a forma mais comum (90% dos casos), algumas possíveis causas são a contaminação pelo vírus da hepatite B ou C (50%), alcoolismo, diabetes *mellitus*, obesidade e idade avançada (LLOVET *et al.* 2021; INCA, 2022). O Brasil registrou no ano de 2020 um total de 10.764 óbitos provenientes ao câncer de fígado (INCA, 2022).

2.2 METRONIDAZOL

O metronidazol (MTNZ), na Figura 2, conhecido quimicamente por 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etanol, possui fórmula e peso molecular de $C_6H_9N_3O_3$ e $171,15 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente.

Figura 2 – Estruturas química do metronidazol



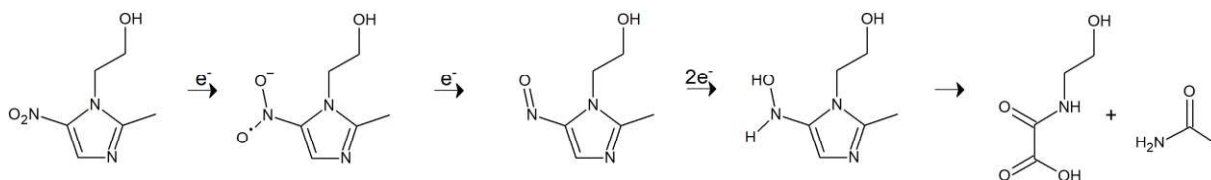
Fonte: do Autor

O fármaco metronidazol foi utilizado em 1959 como forma de tratamento para tricomiase, cuja infecção é causada por um protozoário *Trichomas vaginalis* (CERUELOS *et al.*, 2019; LAU *et al.*, 1992). Entretanto, nos dias atuais é utilizado para diversas enfermidades causadas por agentes antimicrobiano, atuando em bactérias anaeróbicas gram-negativas e gram-positivas, parasitos, amebas, giardíases, rosácea e doença de Crohn (TRIVEDI *et al.*, 2015; CERUELOS *et al.*, 2019; LAMP *et al.*, 1999; LAU *et al.*, 1992).

Além disso, estudos *in vitro* mostram que o metronidazol é eficaz na redução da viabilidade celular em linhagens tumorais de câncer colorretal e em câncer de mama (SADOWSKA *et al.*, 2013 (b); SADOWSKA *et al.*, 2013 (a)).

Sua administração é disponibilizada por via oral, intravenosa, vaginal e retal, sendo a mais comum a via oral (CERUELOS *et al.*, 2019; LAU *et al.*, 1992). Possui rápida absorção e distribuição pelo corpo, onde é metabolizado pelo fígado, passa por processos de hidroxilação, acetilação e/ou conjugação com glucuronídeos e posteriormente os metabólitos são excretados pelos rins (CERUELOS *et al.*, 2019; LAMP *et al.*, 1999; LAU *et al.*, 1992).

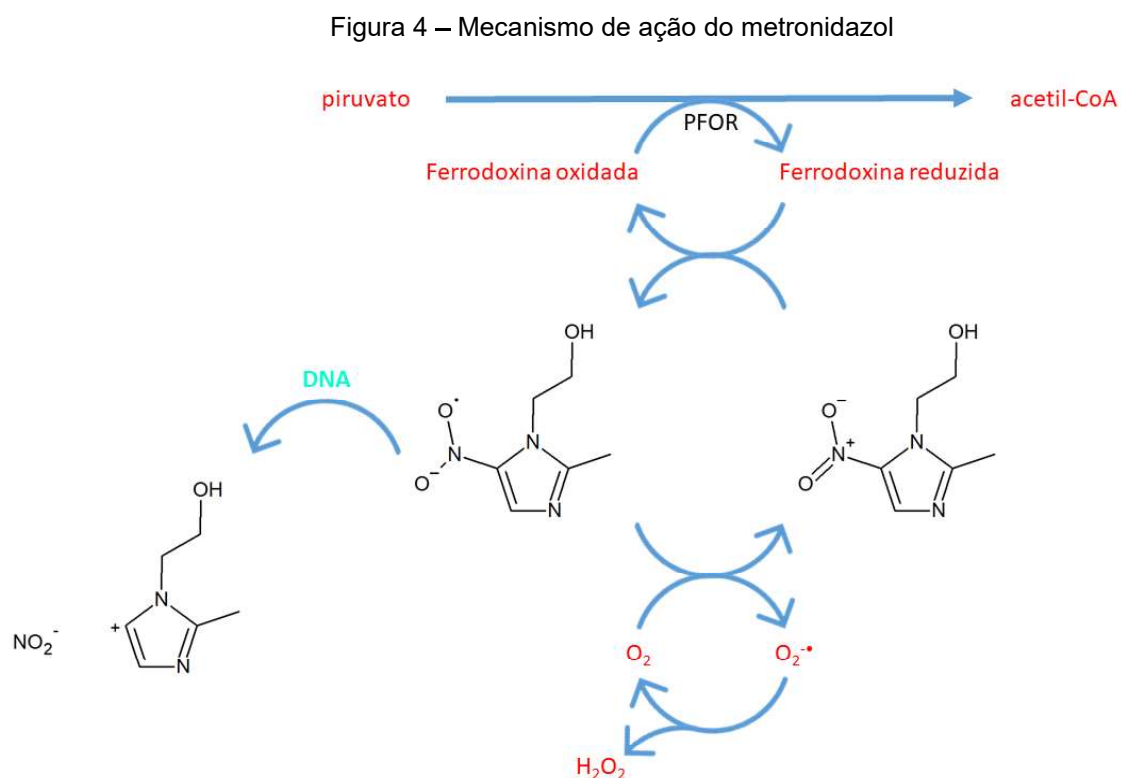
Figura 3 – Redução de Ativação do Metronidazol



Fonte: Adaptado de DINGSDAG; HUNTER, 2018

O mecanismo ocorre geralmente envolvendo algumas etapas como a entrada da molécula nas células por difusão, onde o grupo nitro é reduzido à radicais nitro pelas enzimas redutase tioredoxin redutase (TrxR) ou ferredoxina, e a ação

citotóxica ocorre pela formação dos radicais produzidos como mostrado nas Figuras 3 e 4 (RICE; LONG; KING, 2021; SOARES *et al.*, 2012; CHEIN; LAMBERT; SANVORDEKER, 1975; ANG *et al.*, 2017; CERUELOS *et al.*, 2019; DINGS DAG; HUNTER, 2018; MUSHTAQUE *et al.*, 2016; LAMP *et al.*, 1999; MORETH *et al.*, 2010).



Fonte: Adaptado de ANG *et al.*, 2017

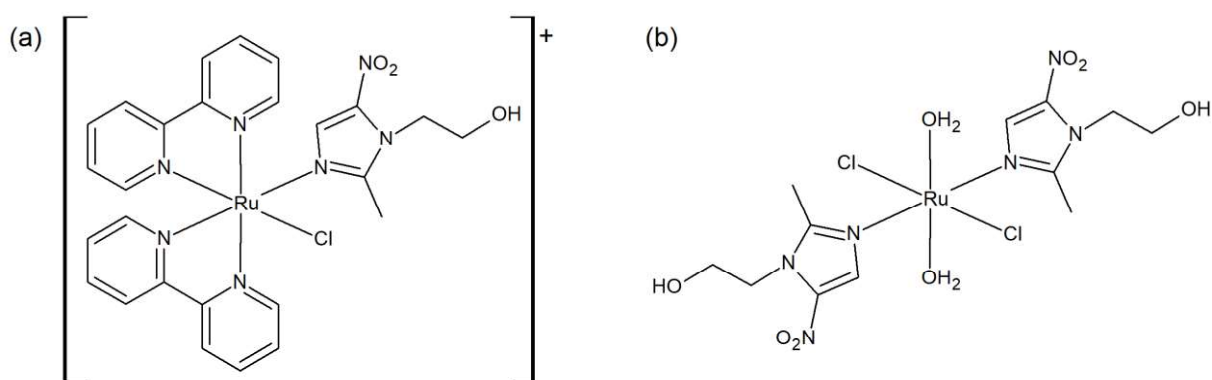
Além disso, pode ocorrer a formação de NO (óxido nítrico) através da formação do ânion NO_2^- (Figura 5), o íon nitrito pode se oxidar e formar o óxido nítrico bioativo em condições de hipóxia (ausência de oxigênio) (SHIVA, 2013). Uma vez que o NO possui uma alta capacidade citotóxica (MCCLEVERTY, 2004).

2.2.1 Complexos contendo metronidazol

A literatura reporta a complexação do metronidazol a vários metais, como por exemplo, magnésio(II), estanho(II), cobre(II), níquel(II), cobalto(II), ferro(II) (CHEIN; LAMBERT; SANVORDEKER, 1975). Ródio(II) (GOODGAME *et al.*, 1986). Cádmio(II) (AJIBOLA *et al.*, 2021). Platina(II) (BALES; MAZID; SADLER, 1985). Prata (I)

(RADKO *et al.*, 2019). Ouro (I) (ATHAR *et al.*, 2005). Rutênio (II) e rutênio (III) (DALE *et al.*, 1992; BAIRD; SKOV; JAMES, 2019; SASAHARA *et al.*, 2020; BAIRD *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 1986; KENNEDY *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2003). A Figura 5 mostra a representação da coordenação do metronidazol aos centros metálicos de rutênio reportados na literatura.

Figura 5 – Representação de complexos de rutênio coordenado ao MTNZ



Fonte: Adaptado de SASAHARA *et al.*, 2020; ATHAR *et al.*, 2005

Como mostrado anteriormente, o modo de coordenação preferencial do metronidazol aos centros metálicos citados é via nitrogênio imidazólico, no entanto, há algumas pouquíssimas ocorrências da coordenação pelo grupo hidroxila e/ou coordenação pelo grupo hidroxila e imidazólico (AL-KHODIR; REFAT, 2017; SHAMLE *et al.*, 2021). Tal fato pode ser explicado pela teoria de ácidos e bases de Pearson, visto que os metais que ocorrem esse fenômeno são ácidos intermediários e duros, por exemplo Co(II), e o grupo hidroxila tem uma dureza maior que o imidazólico.

2.3 COMPLEXOS DE RUTÊNIO E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Nos últimos 30 anos, os complexos de rutênio são destaque no desenvolvimento de novos compostos anticâncer, apresentando estudos promissores *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos (LENIS-ROJAS *et al.*, 2021; NEGRETI *et al.*, 2022).

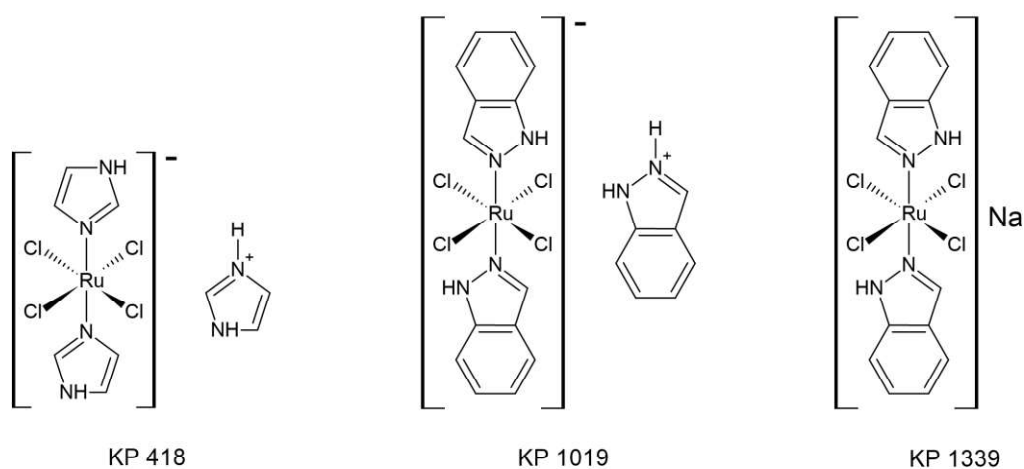
As principais características que tornam os complexos de rutênio uma boa

ferramenta farmacológica para novas formas de tratamento são: diversidade de alvos terapêutico; estados de oxidação (II, III e IV) e processo redox acessíveis em condições fisiológicas; taxas de trocas de ligantes lentas; geometria octaédrica (maior diversidade estrutural quando comparado aos complexos de platina quadrados planares); alta afinidade por pares de elétrons não ligantes, como por exemplo nitrogênio, geralmente ligantes constituintes de biomoléculas; apresentam alta seletividade e especificidade para células tumorais quando comparados aos complexos de platina (GIELEN; TIEKINK, 2005; STORR, 2014; LEE; KIM; NAM, 2020; THOTA *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2018).

Até o presente momento, quatro classes de complexos de rutênio são destaque frente ao tratamento do câncer, sendo eles iniciados em ensaios clínicos:

(a) Os complexos de Ru(III) contendo ligantes imidazólicos ou indazólicos e cloretos em sua estrutura, ou também conhecidos como KP. Estes foram iniciados pelo composto KP418, disposto na Figura 6, com atividade antitumoral para melanoma e leucemia (KEPPLER; RUPP, 1986). Bem como o complexo denominado KP1019, Figura 6, de atividade antitumoral compatível com a anterior, porém com menor toxicidade (ALESSIO; MESSORI, 2019). O KP1019 iniciou em ensaios clínicos frente a um amplo espectro de tumores primários (ALESSIO; MESSORI, 2019). Devido à baixa solubilidade em água, seu análogo KP1339, Figura 6, foi continuado.

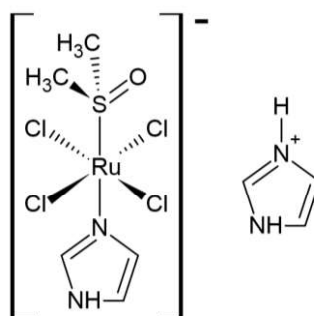
Figura 6 – Representação de complexos de rutênio KP 418, KP 1019 e KP 1339



Fonte: do Autor

(b) O complexo NAMI-A, representado na Figura 7, contendo em sua estrutura Ru(III) e ligantes imidazólicos e DMSO, foi o primeiro complexo de rutênio a entrar em ensaios clínicos em humanos em fase I e II (RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, 2004; LEIJEN *et al.*, 2015; THOTA *et al.*, 2018). Em ensaios pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) o composto apresentou baixa toxicidade, apresentando como característica atividade antimetástática e antiangiogênica em tumores secundários (LEE; KIM; NAM, 2020). Entretanto nos testes clínicos o composto apresentou uma alta toxicidade (NIKOLAOU; SILVA, 2018; THOTA *et al.*, 2018) sendo então descontinuado.

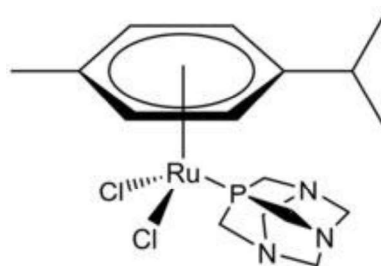
Figura 7 – Representação do complexo NAMI-A



Fonte: do Autor

(c) Os compostos conhecidos como RAPTA, são baseados em complexos de rutênio (II)-areno, que possuem o ligante PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano) em sua estrutura (DORCIER *et al.*, 2005; SCOLARO *et al.*, 2005; LEE; KIM; NAM, 2020). O complexo RAPTA-C representado na Figura 8 induz a morte celular em células de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) via p53-JNK e vias mitocondriais e apresentam uma ótima seletividade celular e baixa citotoxicidade (THOTA *et al.*, 2018). Também foi observada inibição de metástase pulmonar em camundongos portadores de carcinoma mamário demonstrando espectro de atividade antitumoral similar ao NAMI-A (LEE; KIM; NAM, 2020).

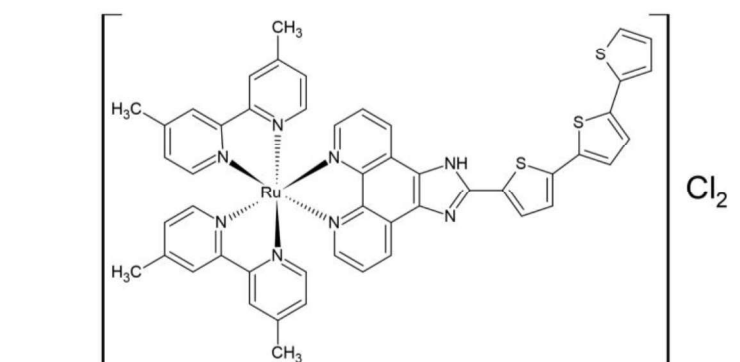
Figura 8 – Representação do complexo RAPTA-C



Fonte: do Autor

(d) O composto denominado TLD-1433, disposto na Figura 9, um complexo de Ru(II) polipiridínico, é o primeiro complexo de rutênio (II) a entrar em ensaios clínicos pela terapia fotodinâmica (identificador NCT03053635) (MONRO *et al.*, 2019). Encontra-se em ensaios clínicos fase II, para o tratamento de câncer de bexiga não músculo invasivo de alto risco através da terapia fotodinâmica na luz verde (CHAMBERLAIN *et al.*, 2020). A incidência da radiação de luz verde (aproximadamente 520-530 nm) faz com que haja excitação dos elétrons do complexo e ao retornar ao seu estado fundamental interage com oxigênio tripleto, produzindo assim espécies reativas de oxigênio (CHAMBERLAIN *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; MONRO *et al.*, 2019). Há relatos também para a aplicação deste composto em câncer de pulmão, melanoma, entre outros (CHAMBERLAIN *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020).

Figura 9 – Representação do complexo de rutênio TLD-1433



Fonte: do Autor

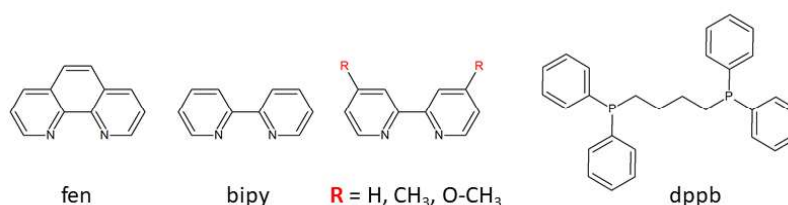
Além do mais, outros exemplos de complexos de rutênio que apresentam promissora atividade *in vitro* para as linhagens celulares de câncer de pulmão (A549)

(DIAS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021; GRAWE *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2020; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017). E também mama (MCF-7) (LEITE *et al.*, 2021; MUTHNÁ *et al.*, 2016; MORAES *et al.*, 2020; PUJANTE-GALIÁN *et al.*, 2020).

2.3.1 Complexos contendo ligantes N-N heterocíclicos e fosfínicos

O caráter básico da piridina concentrado no par de elétrons isolado do nitrogênio, a qualifica como um ligante para coordenação em metais, capaz de formar diversos complexos (PAL; NANDI; MUKHERJEE, 2018). A bipyridina e a fenantrolina, Figura 10, têm sido extensivamente utilizadas como ligantes quelantes devido sua estabilidade redox e facilidade de funcionalização, além do mais, é possível obter uma diversa gama de substituintes/derivados da bipyridina, como exemplificado na Figura 10, com a substituição na posição 4 do anel da piridina, e, com isso modificar algumas propriedades eletrônicas do ligante e as interações σ e π após coordenação (SANTIAGO, 2004).

Figura 10 – Estruturas química da fenantrolina, bipyridinas e dppb



Fonte: do Autor

As características estruturais desta classe, seus derivados e dos complexos obtidos, têm como capacidade mimetizar estruturas de moléculas biológicas: ácidos nucleicos, proteínas e enzimas que possuem propriedades importantes no metabolismo humano (OLIVEIRA, 2014).

Com relação às fosfinas, pode-se mencionar que o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) da fosfina, que contém um par de elétrons isolado, interage com o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) do centro metálico (VALLE *et al.*, 2008).

Desta maneira, ligantes fosfínicos conseguem combinar propriedades da ligação σ doadora forte como as aminas, com as ligações π receptoras, tornando-se

ligantes muito versáteis, capazes de estabilizar as valências mais altas e as mais baixas de metais de transição (VALLE *et al.*, 2008).

O uso de ligantes volumosos com propriedades hidrofóbicas pode produzir impedimentos estéricos e ser a causa do aumento da citotoxicidade, por isso as fosfinas, representada pela dppb na Figura 10 são um bom grupo para projetar potenciais metalofármacos (ECHEVERRI *et al.*, 2018).

Ademais, complexos contendo ligantes fosfínicos, biperidínicos e fenantrolina apresentam grande destaque na química inorgânica medicinal nos últimos tempos. A Tabela 1, sumariza alguns exemplos de complexos contendo esses ligantes.

Tabela 1 - Complexos de rutênio com ligantes fosfínicos, biperidinas e fenantrolina e suas aplicações em linhagens celulares tumorais

Complexos	Linhagens celulares	IC ₅₀ (µM)	Referência
[Ru(pipe)(dppb)(bipy)]PF ₆		17,99 ± 0,39	FERREIRA-SILVA, 2017
[RuCl(1-im)(dppb)(5-bipy)]PF ₆		14,65 ± 0,90	DIAS <i>et al.</i> , 2018
[Ru(dppm) ₂ (lap)]PF ₆	A549	0,063 ± 0,018	OLIVEIRA <i>et al.</i> 2021
[Ru(DPEP)(benzoil)(bipy)]PF ₆		0,009 ± 0,003	GRAWE <i>et al.</i> , 2022
<i>cis</i> -platina		59,54 ± 5,26	
[RuCl(CO)(dppb)(4-bipy)]PF ₆		7,95 ± 0,22	SILVA <i>et al.</i> , 2018
[RuCl(py)(dppb)(4-bipy)]PF ₆	MDA-MB-231	9,18 ± 0,30	SILVA <i>et al.</i> , 2018
[Ru(dppm) ₂ (lap)]PF ₆		0,130 ± 0,010	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2021
<i>cis</i> -platina		49,17 ± 5,00	
[Ru(CF ₃ -cin)(dppb)(bipy)]PF ₆	CHL-1	2,95 ± 1,12	NEGRETI <i>et al.</i> , 2022
<i>cis</i> -platina		> 200	
<i>Cis</i> -[Ru(bipy) ₂ (Hind)](PF ₆) ₂	Hep G2	7,2 ± 1,1	SALES <i>et al.</i> , 2021
<i>cis</i> -platina		16,20 ± 0,71	

Fonte: Elaborada pelo autor (2022)

Legenda: dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano
 dppm = 1,4-bis(difenilfosfina)metano
 DPEP = bis(2-(difenilfosfina)fenil)éter
 fen = 1,10-fenantrolina
 bipy = 2,2'-biperidina
 5-bipy = 5,5'-dimetil-2,2'-biperidina
 4-bipy = 4,4'-dimetil-2,2'-biperidina
 Hind = Indazol
 lap = lapachol
 pipe = ácido piperonílico
 1-im = 1-metil-imidazol
 CF₃-cin = ácido 4-trifluormetil-cinâmico
 benzoil = N,N-dimetil-N'-(benzoil)tioureia

3 MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO

3.1 SOLVENTES

Os solventes utilizados nas sínteses procedentes das empresas Synth ou Êxodo foram empregados como recebidos, sem tratamento prévio, sendo utilizados: diclorometano, etanol, metanol, tolueno, hexano e DMSO. Para a espectroscopia de RMN utilizou-se os solventes deuterados DMSO-d₆ e D₂O provenientes da Aldrich.

3.2 REAGENTES

Os reagentes de pureza analítica foram empregados como fornecidos, sem tratamento prévio, sendo eles: tricloreto de rutênio hidratado; hexafluorofosfato de amônio; trietilamina; trifenilfosfina; 1,4-bis(difenilfosfina)butano; 2,2'-bipiridina; 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina; 4,4'-dimetóxi-2,2'-bipiridina; 1,10-fenantrolina, pela Aldrich e o metronidazol foi obtido junto ao Laboratório de Controle de Qualidade UNIFAL-MG.

3.3 ATMOSFERA INERTE (ARGÔNIO)

Os complexos foram sintetizados sob atmosfera inerte, através de um sistema de secagem de gás argônio montado no Laboratório Química Estrutural e Novos Materiais da UNIFAL-MG. A atmosfera inerte foi obtida pela passagem de fluxo de argônio por uma coluna de purificação composta de camadas alternadas de anéis de vidro (0,5 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura) e catalisador do tipo BTS - R - 3 - 11 (Fluka Chemika), mantida à 60 °C para o catalisador permanecer ativado, seguindo então para colunas contendo sílica gel e cloreto de cálcio, respectivamente.

3.4 INSTRUMENTAÇÃO

3.4.1 Análise elementar

As medidas do percentual de CHN foram realizadas no analisador elementar ThermoScientific de modelo FlashSmart pertencente à CAQUI-USP (Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos).

3.4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Dept 135 foram realizados no espectrômetro BRUKER modelo AC-300, operando pra ^1H a 300 MHz, na Universidade Federal de Alfenas. Todos os experimentos foram realizados em tubos de quartzo na presença de solventes deuterados. Os espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dept 135 das amostras, foram obtidos em DMSO- d_6 . Para os espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ as amostras foram solubilizadas em diclorometano e adicionou-se um capilar contendo D_2O no interior do tubo de RMN.

3.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho, IV, foram através do espectrofotômetro Shimadzu - Prestige 21, atuando na faixa de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com 64 scans, no Laboratório Interdisciplinar de Química (Labic) da UNIFAL-MG. As amostras foram preparadas pela maceração com brometo de potássio (KBr) e posterior pastilhamento em prensa hidráulica.

3.4.4 Condutividade molar

As medidas de condutividade foram realizadas na própria instituição em um condutivímetro MS Tecnopon modelo mCA-100, equipado com cela de platina e constante igual a 1MICRONAL modelo B 330, equipado com cela de platina com constante igual a $0,089 \text{ cm}^{-1}$. Utilizou-se soluções com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.4.5 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800 pertencente ao Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (UNIFAL-MG). As soluções dos compostos estudados foram preparadas em diclorometano, nas concentrações C3MTNZ 7 ($5,64 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), C3MTNZ 8 ($5,02 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), C3MTNZ 9 ($6,76 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e C3MTNZ 10 ($4,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). As medidas foram realizadas

utilizando-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm na região entre 200 a 800 nm.

3.4.6 Voltametria

As medidas eletroquímicas foram obtidas em um potenciostato Autolab® PGSTAT 128N (Eco Chemie) do Laboratório Interdisciplinar de Química (Labic) da UNIFAL-MG e os dados foram processados utilizando o software GPES (General Purpose Electrochemical System). O sistema foi composto por uma célula eletroquímica de vidro, com capacidade para 10 mL e três eletrodos: um de referência Ag/AgCl e os eletrodos de trabalho e auxiliar, ambos de platina. Soluções eletrolíticas $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio (PTBA) em diclorometano para os complexos e em DMSO para o metronidazol.

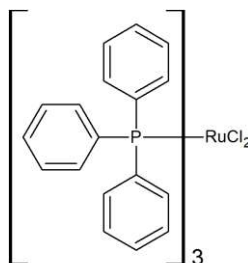
4 METODOLOGIAS

4.1 SÍNTESES DOS COMPLEXOS PRECURSORES

4.1.1 [RuCl₂(PPh₃)₃]

O precursor [RuCl₂(PPh₃)₃], Figura 11, foi obtido pela redução do tricloreto de rutênio com trifenilfosfina (PPh₃), a partir de modificações do procedimento descrito na literatura por Stephenson e Wilkinson (1966), no qual, 1,00 g de RuCl₃.xH₂O (4,80 mmol) foi dissolvido em 200 mL de metanol previamente desaerado, sob refluxo e atmosfera inerte, por aproximadamente 15 minutos. Em seguida 5,75 g de PPh₃ (21,90 mmol) foram adicionados. A solução permaneceu sob refluxo e atmosfera inerte por três horas. O precipitado marrom escuro formado foi filtrado a quente, utilizando-se um funil de placa porosa, lavado com metanol e hexano desaerados, para a retirada de excesso de fosfina livre e seco a vácuo. Rendimento: 83% (3,83g).

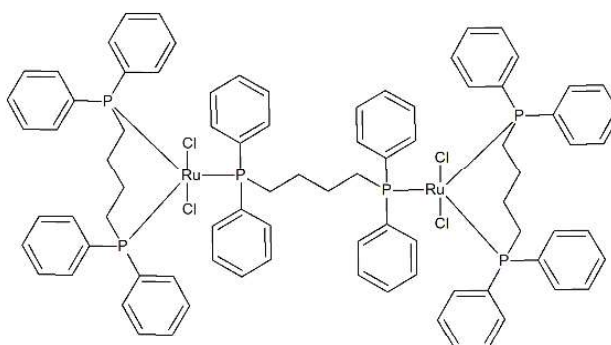
Figura 11 – Estrutura química do precursor [RuCl₂(PPh₃)₃]



Fonte: do Autor

4.1.2 [Ru₂Cl₄(dppb)₃]

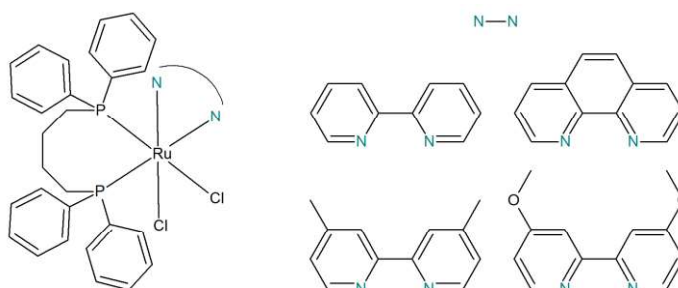
O precursor [Ru₂Cl₄(dppb)₃], Figura 12, foi preparado segundo procedimento descrito na literatura por Bressan e Rigo, (1975). Adicionou-se [RuCl₂(PPh₃)₃] (1,0 g; 1,04 mmol) e 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb) (0,53 g; 1,24 mmol) em hexano (130 mL) previamente desaerado. Deixou-se em refluxo por 6 horas; posteriormente o precipitado verde formado na solução foi filtrado e lavado com metanol para a retirada de excesso de bifosfina livre e em seguida lavado com hexano, logo depois seco sob vácuo. Rendimento: 85% (0,42 g).

Figura 12 – Estrutura química do precursor $[\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\text{dppb})_3]$ 

Fonte: do Autor

4.1.3 *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$

O complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$, dispostos na Figura 13, foi sintetizado como descrito na literatura (QUEIROZ *et al.*, 1998). Inicialmente (0,620 mmol) de $[\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\text{dppb})_3]$ foram dissolvidos em 40 mL de tolueno previamente desaerado. Logo em seguida adicionou-se o ligante (N-N) (bipy; 4,4-metil-bipy; 4,4-metóxi-bipy e 1,10-fenantrolina) (1,550 mmol) na proporção de 1:2,5 (precursor/ligante). Fez-se vácuo no schlenk fechado e a reação permaneceu sob refluxo em atmosfera inerte por 72 horas. A solução com o precipitado vermelho formado foi filtrada, utilizando-se um funil de placa porosa, lavado com tolueno e seco a vácuo. Rendimento aproximadamente 83,0 %.

Figura 13 – Estruturas químicas dos precursores $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$ 

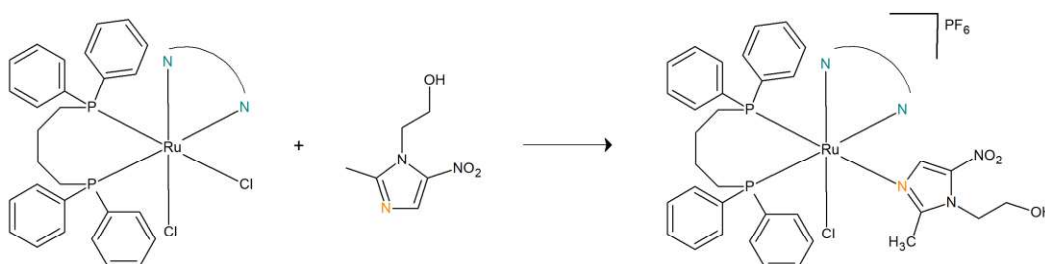
Fonte: do Autor

4.2 SÍNTE DOS COMPLEXOS COM METRONIDAZOL

A síntese dos complexos de rutênio (II) com o ligante metronidazol foram

realizadas utilizando-se uma proporção de 1:3 (precursor/ligante). Primeiramente, 10 mL de diclorometano e 1 mL de etanol foram desaerados em um schlenk em temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 0,0315 g (0,184 mmol) de metronidazol (MTNZ), e logo em seguida adicionou-se o $\approx 0,05$ g (0,061 mmol) do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$ e subsequentemente adicionou-se o contra-íon (NH_4PF_6) em pequeno excesso, rota sintética encontra-se na Figura 14. Fez-se vácuo no sistema e manteve-se agitação por dez minutos. O volume foi reduzido para aproximadamente 1 mL, e em seguida 20 ml de H_2O destilada previamente desaerada foram adicionados, e a formação de um precipitado de cor laranja foi observado. Em seguida filtrou-se sob vácuo em funil de placa porosa, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida. Rendimento 60-70%.

Figura 14 – Esquema químico da síntese do Ru-MTNZ



Fonte: do Autor

Os complexos precursores apresentam coloração avermelhada, assim que há a coordenação do metronidazol, as cores obtidas dos complexos variam em tons alaranjados, conforme Figura 15, sendo identificados da esquerda à direita ($[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4\text{-Metil-bipy})]\text{PF}_6$ (C3MTNZ 7), $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4\text{-Metóxi-bipy})]\text{PF}_6$ (C3MTNZ 8), $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (C3MTNZ 9), $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ (C3MTNZ 10).

Figura 15 – Coloração obtida dos complexos Ru-MTNZ



Fonte: do Autor

4.3 ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM O CT-DNA

Uma solução de DNA foi preparada adicionando-se 0,0200 g de ct-DNA em 10,0 mL de tampão Tris-HCl (4,50 mM de Tris HCl; 0,50 mM de Tris base e 50,0 mM de NaCl) com pH de 7,40.

Posteriormente, determinou-se a concentração de DNA por espectroscopia de UV-vis, através da Lei de Lambert-Beer. Foram adicionados em uma cubeta de quartzo 2000,0 μL de tampão, 80,0 μL da solução de ct-DNA. Sabendo que o ct-DNA absorve em 260 nm e possui uma absorvidade molar de $6600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ aplicou-se os valores conhecidos na lei de Lambert-Beer.

Para realizar o experimento de interação complexo-DNA, utilizou-se duas cubetas para as titulações feitas, de modo que na cubeta 1 uma solução padrão foi preparada com 1800,0 μL de tampão e 200,0 μL de DMSO atuando, portanto, como referência, enquanto na cubeta 2 empregou-se 1800,0 μL de tampão, 80,0 μL de DMSO e 120,0 μL da solução do complexo em DMSO (1 mmol). Em seguida sucessivas titulações foram realizadas adicionando-se 20,0 μL de ct-DNA em ambas cubetas; as soluções foram então homogeneizadas e a leitura foi adquirida.

Por fim, a constante de ligação intrínseca de ligação dos complexos com o DNA (K_b) foi calculada utilizando-se a análise de regressão, considerando as alterações na intensidade de absorção de acordo com o aumento da concentração de ct-DNA.

A intensidade da interação entre um complexo e o DNA pode ser conhecida através da equação de Benesi-Hildebrand (BARRA; NETTO, 2015) (Eq. 1):

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K_b (\epsilon_B - \epsilon_F) \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

$[\text{DNA}]$ é a concentração adicionada de DNA;

$\epsilon_A = A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$

ϵ_F é o coeficiente de absorvidade molar do complexo livre

ϵ_B é o coeficiente de absorvidade molar do complexo-DNA

Assim, a constante K_b é a razão entre os coeficientes angular e linear de um gráfico $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$.

4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

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

4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Os ensaios foram realizados nas linhagens de células tumorais humanas: HepG2 (carcinoma hepatocelular - fígado), A549 (adenocarcinoma de pulmão), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), SK-MEL-147 (pele melanoma). Para avaliação do perfil de citotoxicidade frente células normais foi utilizada a linhagem CCD-1059Sk. As referidas linhagens foram obtidas por meio do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10 % de Soro Bovino Fetal (FBS, Cultilab, SP, Brasil), mantidas em atmosfera controlada (37 °C e 5 % de CO₂).

4.4.2 Esquema de tratamento

Os complexos foram solubilizados em DMSO, sendo que a concentração da solução-estoque foi de 20 mM. As diluições foram realizadas em meio de cultura, prontamente antes do uso. A quantidade de DMSO (v/v) não foi superior à 0,1%.

As células foram semeadas em placas com diferentes áreas de crescimento. Após aderência (24h), as células foram tratadas por 12, 24 ou 48 h com os complexos sintetizados. Curvas dose-resposta foram realizadas utilizando diferentes concentrações.

4.4.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular relativa foi avaliada por ensaio colorimétrico usando a sulforrodamina B (SRB) (Vichai; Kirtikara, 2006) para quantificar o conteúdo proteico das amostras (Skehan *et al.*, 1990). As células foram semeadas em placas de 96

poços, utilizando inóculo de 1×10^4 (MCF-7, HepG2, SK-MEL-147, CCD-1059Sk) ou 5×10^3 células (A549) por poço. Após o tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (4 °C) (proporção 1:2 em meio de cultura, concentração final de 5%). As amostras foram lavadas e, após secas, coradas com SRB (0,4%) por 1 hora (temperatura ambiente). Na sequência, as amostras foram lavadas com ácido acético 1% e, após secas, a SRB foi solubilizada em Tris-NaOH (pH:10,0) por 30 minutos. As culturas foram, inicialmente, tratadas com as substâncias de interesse na concentração de 40 μM (*screening*) por 48 horas e, posteriormente, curvas dose-respostas foram obtidas a partir do tratamento (nas concentrações de 0,2; 2,0; 20,0; 100,0 e 200,0 μM) por 48h para os complexos ativos. A análise foi realizada em espectrofotômetro (540 nm com referência de 690 nm). Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os dados apresentados representam a média \pm o desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. Os valores de IC50 foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4.4.4 Análise da progressão do ciclo celular

A linhagem celular MCF-7 escolhida para a análise do ciclo celular. As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro, utilizando inóculo de 1×10^5 células por placa. Após 48h de tratamento com os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 nas concentrações de 7,5 e 15 μM , as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1500 rpm) e na sequência as células foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase ($2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e Iodeto de Propídio ($90 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Guava Technologies, Merck Millipore). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7. Os dados foram apresentados como média \pm DP de 3 experimentos independentes.

4.4.5 Ensaio de Anexina V

A externalização da fosfatidilserina foi avaliada utilizando-se o Kit Guava Nexin® (Merk Millipore, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células por poço. As culturas celulares (MCF-7) foram tratadas com os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 nas concentrações de 7,5 e 15,0 μM por 48 h coletados por digestão enzimática (Trypsin/EDTA, Sigma).

As amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C, lavadas com PBS frio, e então 2×10^4 células foram suspensas em 100 μL de DMEM. Em seguida, foi adicionado 100 μL de solução de mistura contendo tampão V-PE e 7-AAD. As amostras foram lidas após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente em uma câmara escura. A análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando GoiabaSoft 2.7 Software.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes. Os dados foram apresentados como média \pm SD.

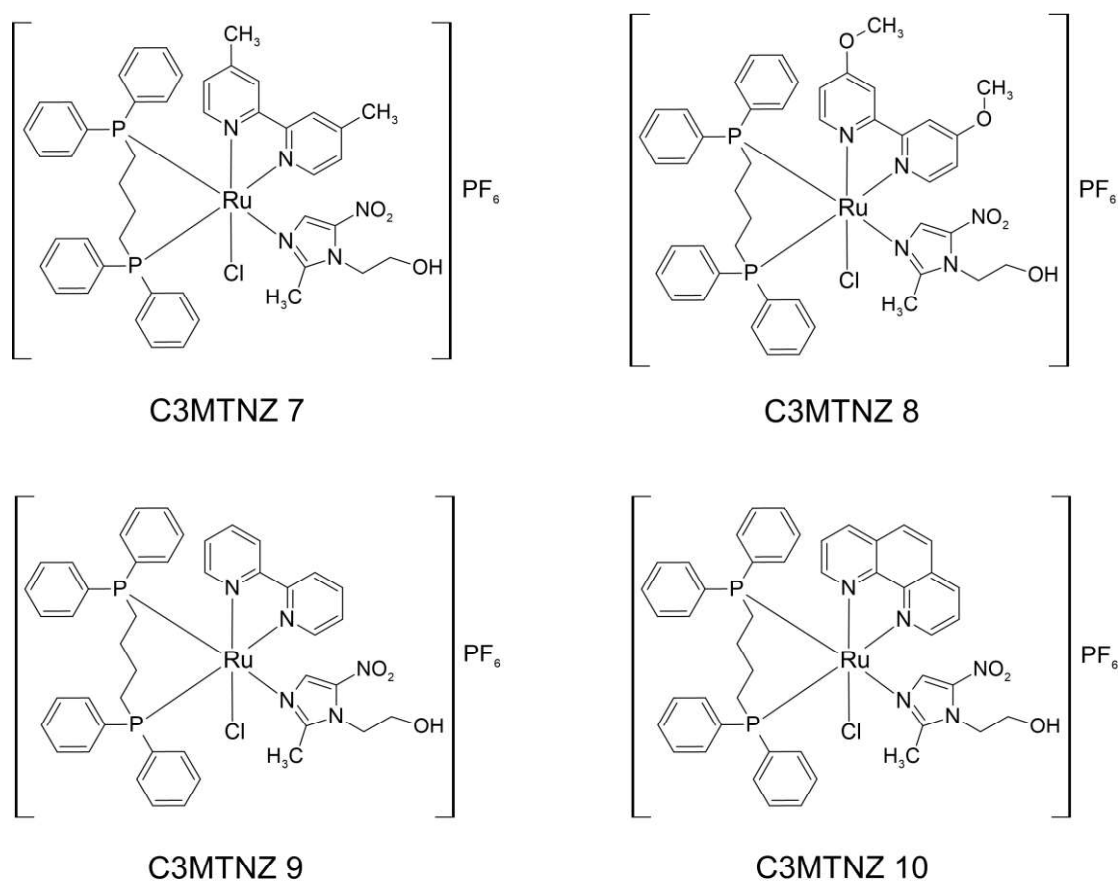
4.4.6 Análise Estatística

Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão (DP) de, pelo menos, 3 experimentos independentes. Diferenças significativas foram evidenciadas de acordo com a ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet usando o software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

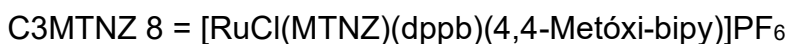
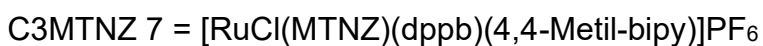
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estruturas propostas para os complexos obtidos neste trabalho estão representadas na Figura 16, sendo também identificados pelos seguintes códigos C3MTNZ 7, C3MTNZ 8, C3MTNZ 9 e C3MTNZ 10.

Figura 16 – Estrutura propostas para os complexos obtidos



Fonte: do Autor



Nas seções subsequentes serão abordadas apresentados os dados das caracterizações obtidas através das técnicas supracitadas na metodologia e os resultados dos ensaios biológicos e interação com o ct-DNA.

5.1 CONDUTIVIDADE MOLAR

Os dados de condutividade molar para os complexos obtidos estão dispostos na Tabela 2, de acordo com esses resultados, os complexos obtidos apresentam-se como eletrólitos 1:1, como esperado, uma vez que ocorre à substituição do ligante Cl^- da esfera de coordenação pelo nitrogênio imidazólico do metronidazol, e para estabilização dos complexos indica-se a presença de um contra-íon. Ademais os compostos enquadram-se na faixa reportada na literatura, 12 a 77 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ para eletrólitos 1:1, em diclorometano (GEARY, 1971).

Tabela 2 - Dados de condutividade molar ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) dos complexos em diclorometano

Complexos	Condutividade ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
C3MTNZ 7	34,87	23,1
C3MTNZ 8	33,07	23,1
C3MTNZ 9	40,35	22,9
C3MTNZ 10	34,66	23,0

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.2 ANÁLISE ELEMENTAR

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos complexos calculados e teóricos encontram-se na Tabela 3, e estão de acordo com as fórmulas esperadas.

Tabela 3 - Dados de análise elementar dos complexos

Complexos	% C	Erro (%C)	% H	Erro (%H)	% N	Erro (%N)
C3MTNZ 7	52,13 (51,96)	0,33 %	4,48 (4,64)	3,44 %	6,40 (6,59)	2,88 %
C3MTNZ 8	50,95 (50,44)	1,00 %	4,41 (4,51)	2,22 %	7,00 (6,39)	9,56 %
C3MTNZ 9	51,20 (51,05)	0,29 %	4,34 (4,38)	0,91 %	6,82 (6,76)	0,89 %
C3MTNZ 10	52,45 (52,16)	0,56 %	4,31 (4,28)	0,71 %	6,34 (6,61)	4,08 %

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

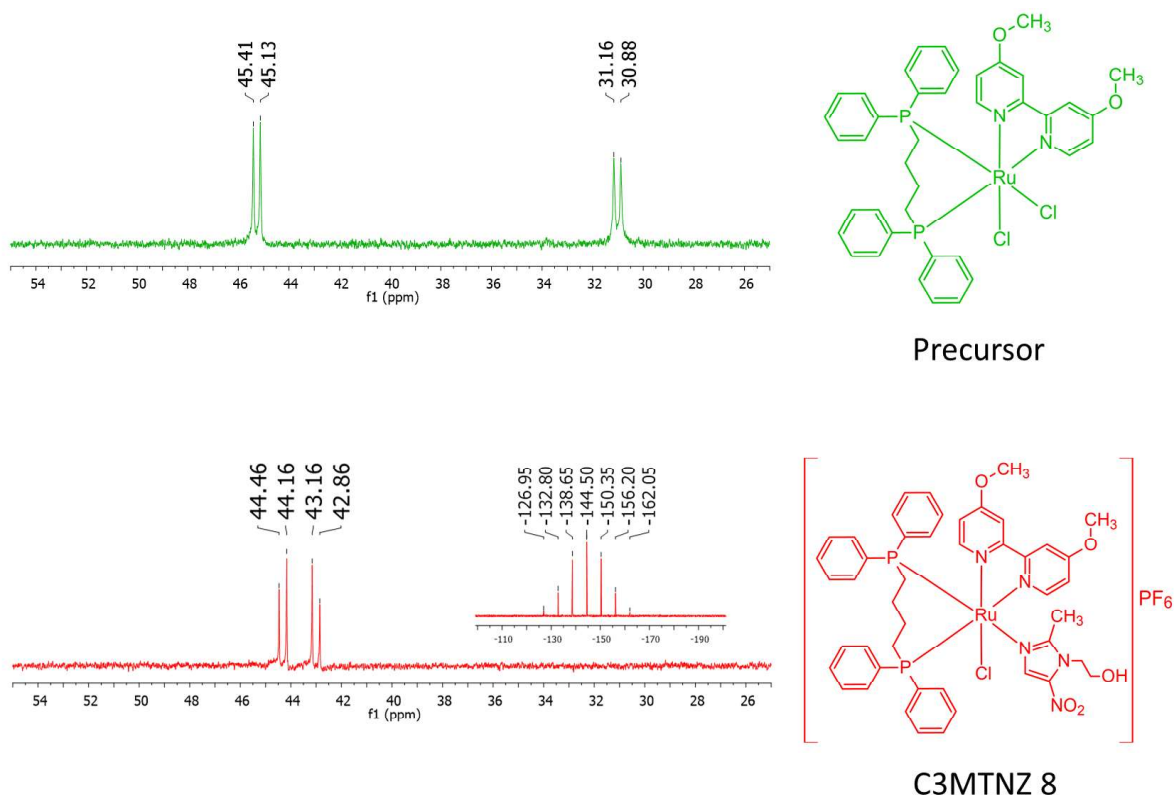
Legenda: valores calculados em parênteses

5.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

5.3.1 Ressonância magnética nuclear $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

Os complexos precursores de fórmula $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N-N})]$ apresentam no RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dois dubletos, referente a um átomo de fósforo apresentar-se *trans* ao átomo de nitrogênio (δ 45/42 ppm), e outro átomo de fósforo *trans* ao átomo de cloro (δ 31/30 ppm), conforme exemplo na Figura 17. Tal fato é explicado em função do átomo de fósforo *trans* a nitrogênio estar mais desblindado em relação ao fósforo *trans* a cloro (SANTIAGO, 2004). Os deslocamentos químicos dos precursores estão disponíveis na Tabela 4.

Figura 17 – Comparativo de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo precursor e C3MTNZ 8



Fonte: do Autor

Já os complexos contendo o MTNZ apresentaram no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dois dubletos próximos em aproximadamente δ 44/42 e δ 43/41 ppm, dados encontram-se na Tabela 4, mais desblindados que o precursor, indicando assim a substituição de um cloreto e a coordenação do MTNZ pelo nitrogênio imidazólico.

Um espectro representativo (C3MTNZ 8) para os complexos obtidos é disposto na Figura 17, e os demais em anexo (Figuras S1-S3). Além disso, observou-se em todos os espectros um multiplete em δ -144 ppm referente aos sinais do contra íon (PF_6), acoplamento fósforo flúor como apresentado na Figura 18.

Sugere-se que as aproximações dos deslocamentos químicos dos fósforos foram promovidas pela similaridade química em que os átomos de nitrogênio se encontram após a troca do ligante Cl^- pelo nitrogênio imidazólico do MTNZ, como reportado na literatura (DIAS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Desta forma os resultados indicam que um dos átomos de fósforo está *trans* a um nitrogênio piridínico e o outro, *trans* ao nitrogênio do anel imidazólico do metronidazol, levando-nos a propor a estrutura representada na Figura 16.

Tabela 4 - Deslocamento químico e constante de acoplamento no RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos precursores e dos complexos obtidos

Complexo	δ $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm)	$^2J_{\text{p-p}}$ (Hz)
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Mebipy)]	43,6 / 30,1	32,8
C3MTNZ 7	43,2 / 42,3	36,4
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-Methoxybipy)]	45,3 / 31,0	34,0
C3MTNZ 8	44,3 / 42,9	36,4
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	42,2 / 30,4	32,8
C3MTNZ 9	42,9 / 41,1	36,4
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(phen)]	44,0 / 30,3	35,2
C3MTNZ 10 (CH_2Cl_2)	42,3 (s)	-
C3MTNZ 10 (DMSO-d_6)	43,5 / 40,4	34,6

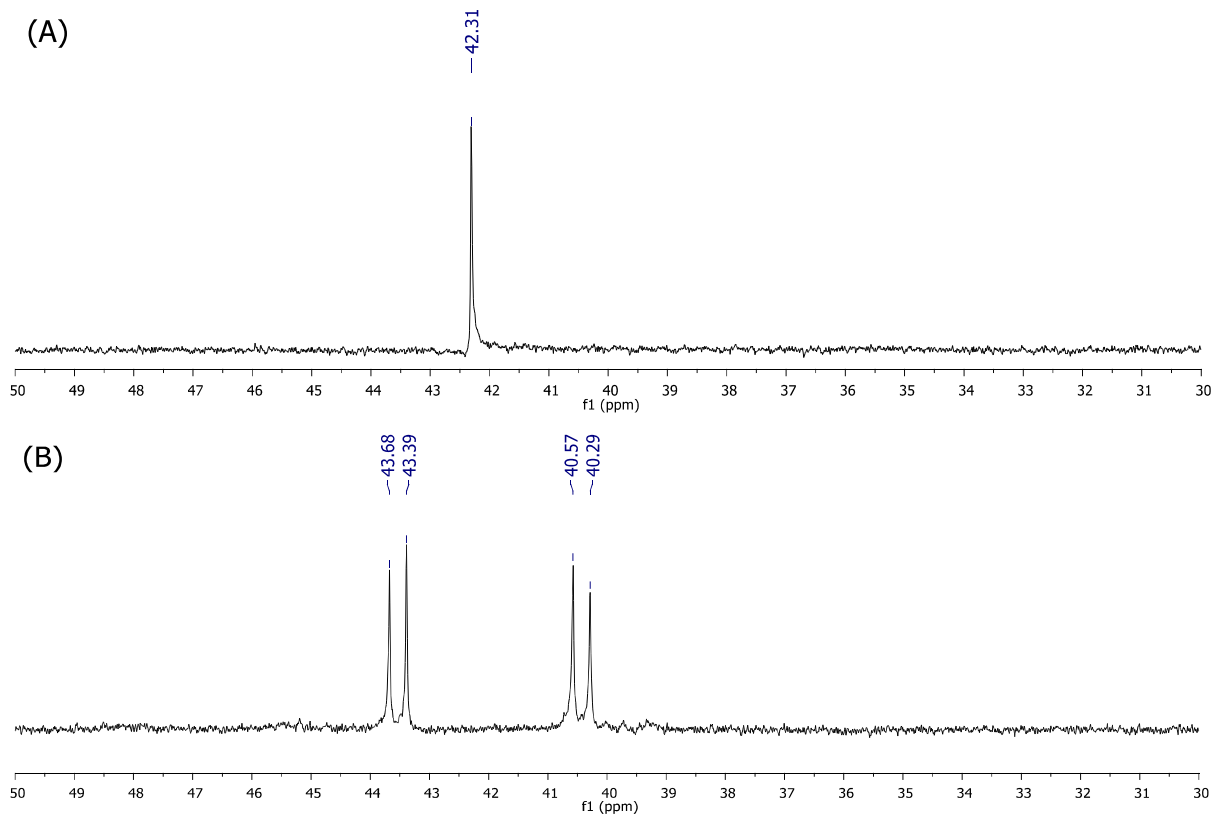
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O complexo C3MTNZ 10 apresentou no RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ um singlete em δ 42,3 ppm, (Figura 18), em virtude da coalescência dos sinais, fato observado em função da similaridade química e estrutural dos átomos de nitrogênio coordenados *trans* aos átomos de fósforo. Comportamento similar foi observado na literatura (DIAS *et al.*, 2018; VALLE *et al.*, 2008).

As mudanças de temperatura e solvente podem explicar este efeito observado, uma vez que são capazes de alterar as características físicas dos átomos de fósforo, como o ângulo de cone e a solvatação, modificando assim o tempo de relaxação de spin do fósforo (VALLE *et al.*, 2008). O que foi confirmado

quando este mesmo complexo foi submetido a análise de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em diferentes solventes, conforme Figura 18.

Figura 18 – RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 10 em diferentes solventes



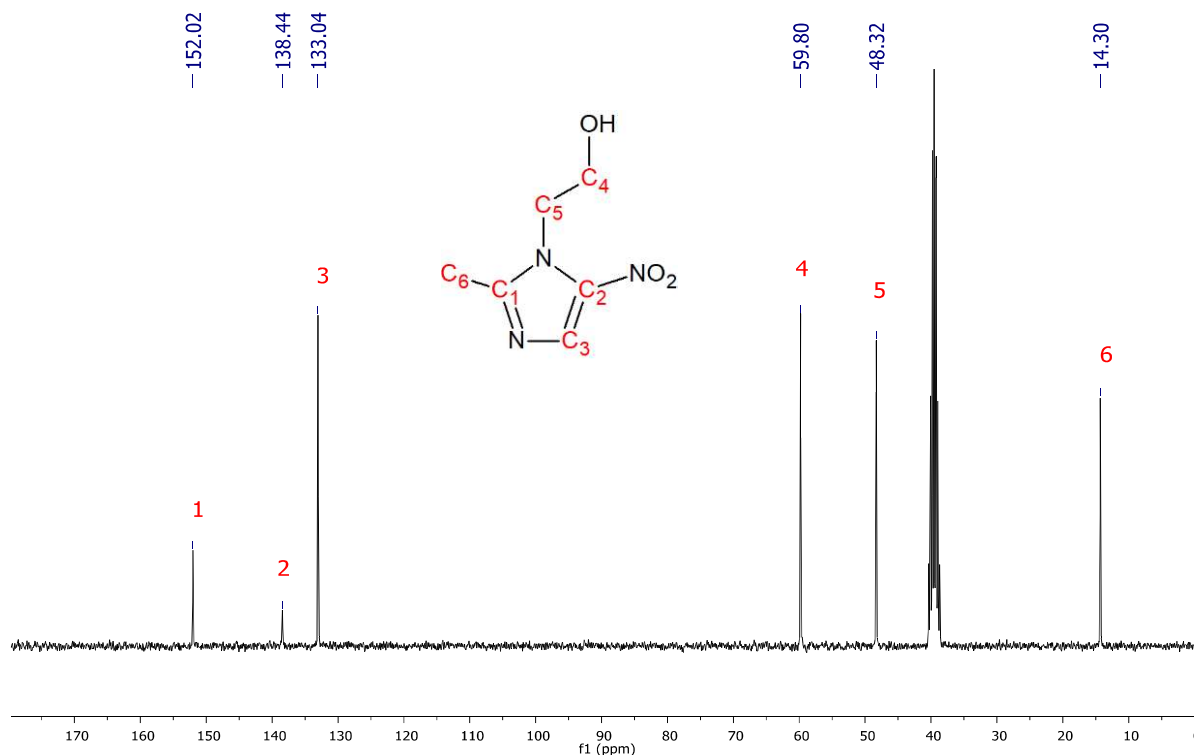
Fonte: do Autor

Legenda: (A) RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 10 em CH_2Cl_2
 (B) RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 10 em DMSO-d_6

5.3.2 Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dept 135

A atribuição dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos obtidos foi feita comparando-se os espectros do ligante metronidazol livre e complexos contendo o metronidazol (C3MTNZ 7, C3MTNZ 8, C3MTNZ 9 e C3MTNZ 10).

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante (MTNZ) encontra-se disposto na Figura 19. Em δ 152,02 ppm pode ser observado o carbono C1 que se refere ao carbono do fragmento N-C=N . Em δ 138,44, δ 133,04, δ 59,80 e δ 48,32 ppm são observados os átomos de carbonos C2 (C-NO_2), C3 (CH-N), C4 ($\text{CH}_2\text{-O}$) e C5 (N-CH_2) respectivamente, por fim, um singlete em δ 14,30 ppm referente ao grupo metila, referente ao C6 ($\text{CH}_3\text{-imid}$).

Figura 19 – RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante metronidazol, em DMSO-d_6 

Fonte: Do autor

Um espectro representativo de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos Ru-MTNZ está representado na Figura 20 (C3MTNZ 7) e uma tentativa de atribuição na Tabela 5, os demais espectros encontram-se em anexo (Figuras S4-S6). Analisando os deslocamentos químicos do espectro da Figura 21, observa-se que C1 e C3 apresentam deslocamento para região mais desblindada como esperado após a coordenação, Tabela 5, e uma blindagem do C6, como observado também no espectro de RMN ^1H . Em δ 14,01 ppm encontra-se o sinal do grupo metila CH_3 (C6) do metronidazol, seguido pelos deslocamentos entre δ 19,25 e δ 25,86 ppm referentes ao grupo CH_2 da dppb. E em δ 20,04 e 20,18 ppm os átomos de carbono do CH_3 do grupo metil da bipyridina. Os demais sinais são atribuídos ao ligante metronidazol, sendo o átomo de carbono C5 (N- CH_2) observado em δ 48,71 ppm e δ 60,20 ppm C4 (C-OH). Um *overlap* de sinais é encontrado entre δ 124,50 – 135,47 ppm referentes aos átomos de carbono aromáticos da dppb, 4,4-metil-bipy e o C2 do metronidazol. O sinal em δ 139,12 ppm pode ser atribuído ao átomo C3 do metronidazol e em δ 158,71 o C1 do metronidazol. Um *overlap* de sinais é encontrado entre δ 148,65 – 157,58 ppm referentes aos átomos de carbono

aromáticos da 4,4-metil-bipy.

Tabela 5. Deslocamentos químicos δ (ppm) de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para os Ru-MTNZ

Complexo	Carbono	δ (ppm) MTNZ	δ (ppm) Complexo	$\Delta \delta$ (ppm)
C3MTNZ 7	C1	152,02	158,71	6,69
	C3	133,04	139,12	6,08
	C4	59,80	60,20	0,40
	C5	48,32	48,71	0,39
	C6	14,30	14,01	0,29
C3MTNZ 8	C1	152,02	160,01	7,99
	C3	133,04	139,11	6,07
	C4	59,80	59,75	0,05
	C5	48,32	48,27	0,05
	C6	14,30	14,01	0,29
C3MTNZ 9	C1	152,02	155,39	3,37
	C3	133,04	-	-
	C4	59,80	59,73	0,07
	C5	48,32	48,25	0,07
	C6	14,30	14,16	0,14
C3MTNZ 10	C1	152,02	149,36	2,66
	C3	133,04	146,36	13,32
	C4	59,80	59,75	0,05
	C5	48,32	48,27	0,05
	C6	14,30	14,25	0,05

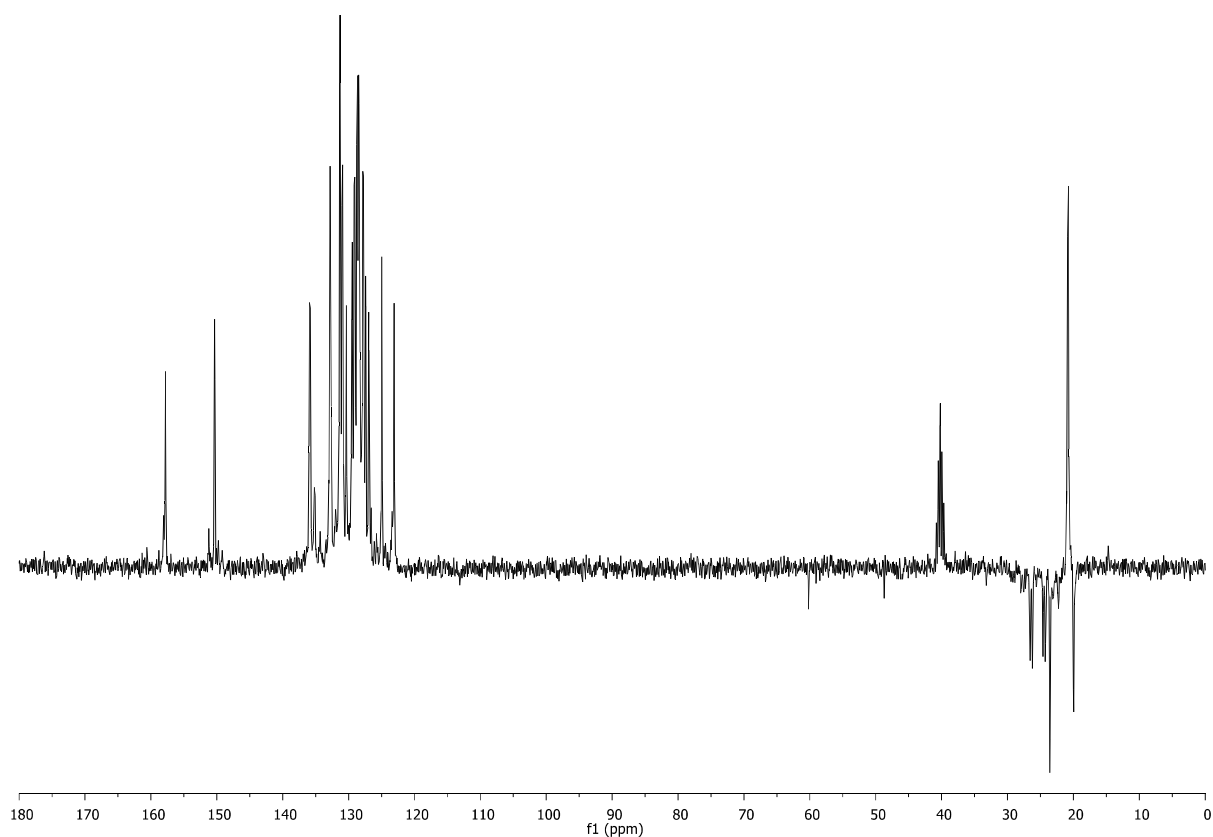
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

O experimento de dept 135 auxiliou na identificação dos carbonos dos complexos obtidos, visto que o sinal produzido possui fases diferentes, ou seja, carbonos com números ímpares de hidrogênio (CH ou CH₃) apresentam sinal em fase positiva e carbonos com dois hidrogênios (CH₂) apresentam sinal em fase

negativa. Para os carbonos sem hidrogênio, há a ausência deste sinal.

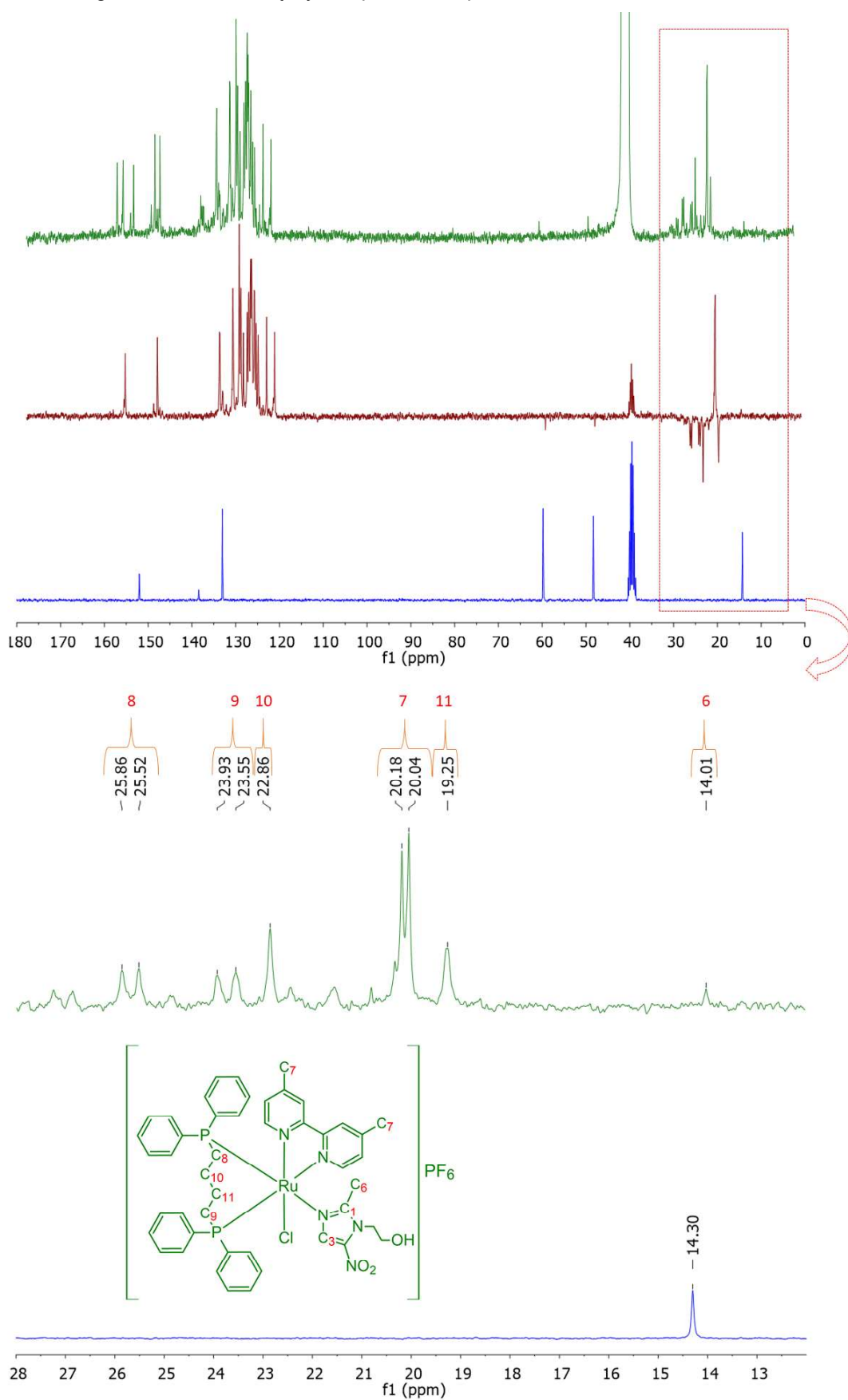
Para o complexo C3MTNZ 7, disposto na Figura 21, os demais em anexo, os sinais do ligante MTNZ C1 e C2 não foram visualizados no espectro de dept 135, uma vez que não apresentam hidrogênios ligados. Sendo possível identificá-los, mesmo estando em uma região com diversos sinais do espectro. Os sinais em fase negativa foram identificados e confirmados, sendo os átomos de carbono C4 e C5 do metronidazol e os C alifáticos da dppb.

Figura 20 – Espectro de RMN dept 135 do Complexo C3MTNZ 7, em DMSO-d₆



Fonte: do Autor

Um espectro comparativo apresentado na Figura 21 entre o ligante livre (MTNZ), e o complexo Ru-MTNZ (C3MTNZ 7) está disposto. É possível observar os deslocamentos dos sinais provenientes da coordenação do MTNZ ao centro metálico e também a identificação dos respectivos átomos de carbono.

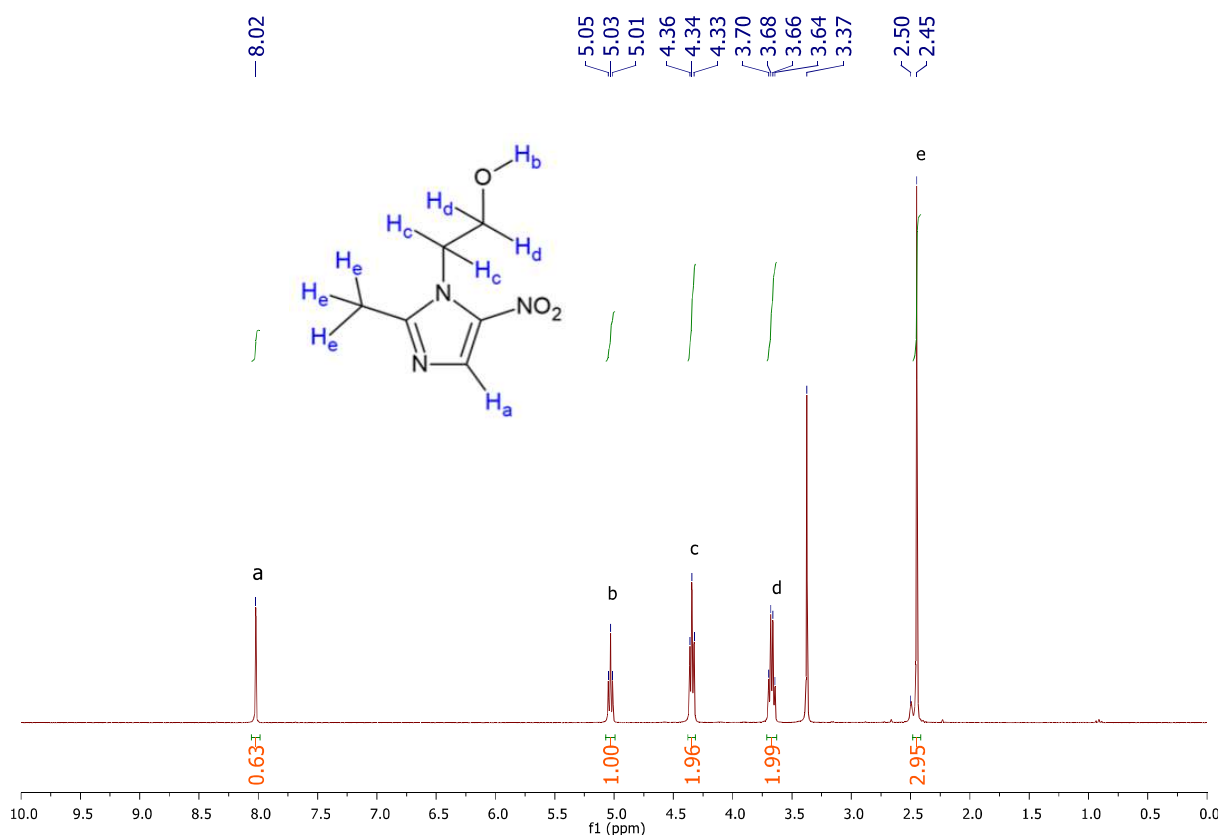
Figura 21 – RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e dept 135 comparativo entre MTNZ e C3MTNZ 7

Fonte: do Autor

5.3.3 Ressonância magnética nuclear de ^1H

A atribuição dos espectros de RMN de ^1H dos complexos obtidos foi feita comparando-se os espectros do ligante metronidazol livre e complexos contendo o metronidazol (C3MTNZ 7, C3MTNZ 8, C3MTNZ 9 e C3MTNZ 10). Na Figura 22 está apresentado o espectro do ligante livre, que apresenta um singlete em δ 8,02 ppm atribuído ao hidrogênio H_a , um tripleto em δ 5,03 ppm referente ao grupo OH (H_b), um tripleto e um quadrupeto em aproximadamente δ 4,34 e δ 3,67 ppm atribuídos aos hidrogênios H_c e H_d , respectivamente. Em δ 2,45 ppm são observados os hidrogênios do grupo metila, a Tabela 6 sumariza os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento para o metronidazol. Os deslocamentos químicos observados em δ 3,37 e δ 2,50 ppm são atribuídas aos sinais de água e solvente DMSO- d_6 respectivamente.

Figura 22 – Espectro de RMN ^1H do metronidazol, em DMSO- d_6



Fonte: do Autor

Tabela 6. Bandas atribuídas em RMN ^1H ao metronidazol

Hidrogênio	δ (ppm)	Multiplicidade	$J_{\text{H-H}}$ (Hz)
H _a	8,02	s	-
H _b	5,03	t	6,0
H _c	4,34	t	6,0
H _d	3,67	q	6,0
H _e	2,45	s	-

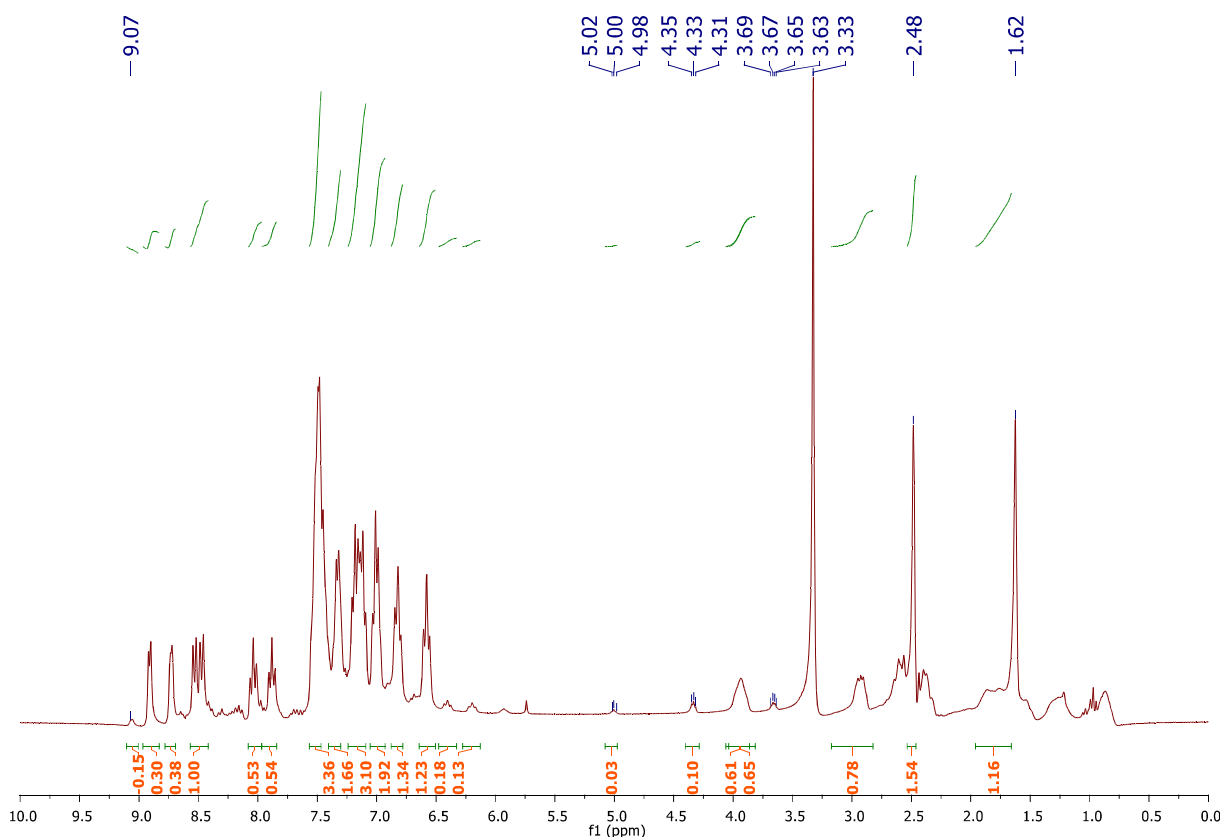
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: s = singlete

t = tripleto

q = quadrupeto

Os espectros de RMN de ^1H dos complexos Ru-MTNZ são similares, desta forma um espectro representativo do complexo C3MTNZ 9 está disposto na Figura 23, e os demais no anexo (Figuras S7-S9) e as tentativas de atribuição na Tabela 7.

Figura 23 – Espectro de RMN ^1H do complexo C3MTNZ 9, em DMSO- d_6 

Na região de δ 9,5 a δ 6,0 ppm são observados 29 átomos de hidrogênios referentes aos átomos dos anéis aromáticos da bifosfina, bipyridina e do átomo H_a (δ 9,07 ppm) do ligante metronidazol, que se encontra desblindado quando comparado ao ligante livre, como esperado.

Um tripleto em δ 5,02-4,98 ppm é atribuído ao grupo OH (H_b) do metronidazol, sugerindo que não foi coordenado nesse grupo funcional, de maneira semelhante ao reportado por Athar *et al.*, (2005), pois não há grandes deslocamentos e não houve mudança nas multiplicidades.

Em δ 4,35-4,31 ppm e δ 3,69-3,63 ppm encontram-se um tripleto e um quarteto, que são provenientes os átomos de hidrogênios H_c e H_d do ligante metronidazol respectivamente.

Na região de δ 1,0 a δ 4,0 ppm são observados os 8 átomos de hidrogênios alifáticos do grupo CH₂ da dppb. Em aproximadamente δ 1,6 ppm podem ser observados os átomos hidrogênios H_e, integrando 3 hidrogênios da metila do ligante coordenado, que blinda após a coordenação, de acordo com o comportamento observado por (BAIRD; SKOV; JAMES, 2019).

Em todos os complexos foi possível ver que o hidrogênio H_a do ligante metronidazol coordenado, deslocou-se para região mais desblindada, como esperado, Figura 23 e Tabela 7, além disso se mantêm na estrutura, comportamento semelhante quando há coordenação do 1-metil-imidazol ao centro metálico rutênio(II) (DIAS *et al.*, 2018) e também da piridina ao centro metálico Ru(II) (SILVA *et al.*, 2018).

Devido à proximidade da coordenação do metronidazol ao centro metálico, os hidrogênios metálicos (H_e) sofrem essa influência eletrônica, deslocando-se para regiões mais blindadas (BAIRD; SKOV; JAMES, 2019).

Portanto, devido aos comportamentos dos átomos dos hidrogênios do metronidazol supracitados, as análises de RMN de ¹H sugere a coordenação do metronidazol ao complexo de rutênio pelo nitrogênio imidazólico, corroborando com os dados de RMN de ¹³C{¹H}.

Tabela 7 - Deslocamentos químicos (ppm) de RMN de ^1H para os Ru-MTNZ, $\text{dms}\text{-d}_6$

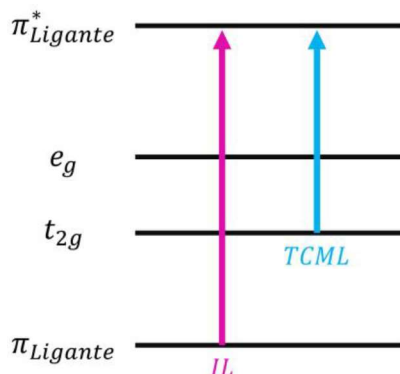
Complexo	Hidrogênio	δ (ppm) MTNZ	δ (ppm) Complexo	$\Delta \delta$ (ppm)
C3MTNZ 7	H _a	8,02	8,84	0,82
	H _b	5,03	5,01	0,02
	H _c	4,34	4,34	0,00
	H _d	3,67	3,66	0,01
	H _e	2,45	1,57	0,88
C3MTNZ 8	H _a	8,02	8,79	0,77
	H _b	5,03	5,01	0,02
	H _c	4,34	4,35	0,01
	H _d	3,67	3,66	0,01
	H _e	2,45	1,56	0,89
C3MTNZ 9	H _a	8,02	9,07	1,05
	H _b	5,03	5,00	0,03
	H _c	4,34	4,33	0,01
	H _d	3,67	3,66	0,01
	H _e	2,45	1,62	0,83
C3MTNZ 10	H _a	8,02	9,49	1,47
	H _b	5,03	5,00	0,03
	H _c	4,34	4,35	0,01
	H _d	3,67	3,66	0,01
	H _e	2,45	1,65	0,80

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS

As principais bandas observadas no espectro de absorção da região do ultravioleta e visível dos complexos precursores e complexos Ru-MTNZ são as bandas intra-ligantes (IL) e transferências de cargas metal ligante (TCML). Na Figura 24, uma representação esquemática das transições.

Figura 24 – Representação esquemática das transições



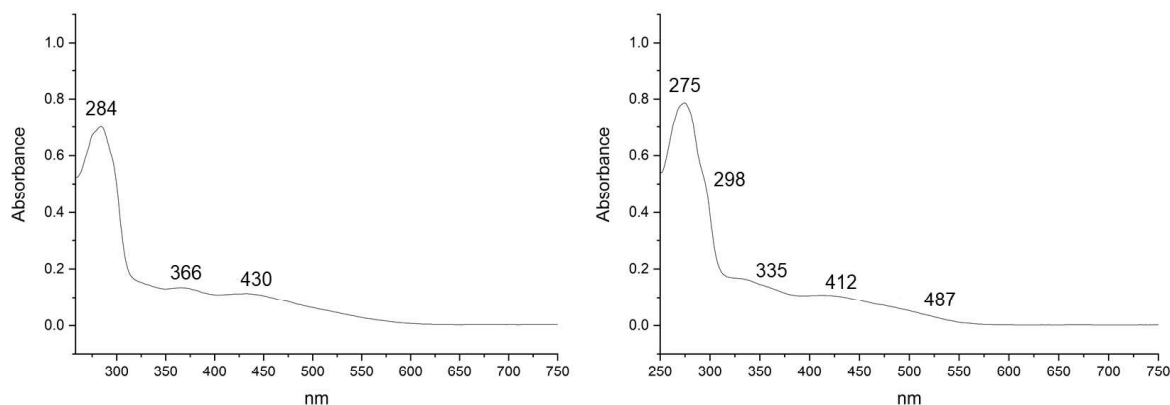
Fonte: do Autor

Legenda: IL = Transição intra-ligante

TCML = Transição de carga metal ligante

Os precursores utilizados neste trabalho apresentam espectro de UV-Vis semelhantes, desta forma, o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-metóxi-bipy)] foi utilizado como exemplo representativo na Figura 25. No espectro, na região do ultravioleta observa-se uma banda em aproximadamente 284 nm característica de transições intra-ligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ da bifosfina e 4,4'-metóxi-2,2'-bipy (KETLE, 1998). Já as bandas no intervalo de 366 e 430 nm são atribuídas a transferência de carga metal ligante (TCML) $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(4,4'\text{-metóxi-2,2'-bipy})$ (SANTIAGO, 2004; QUEIROZ *et al.*, 1998).

Figura 25 – Espectro de UV-Vis comparativo do precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-metóxi-bipy)] e complexo C3MTNZ 8, em CH₂Cl₂



Fonte: do Autor

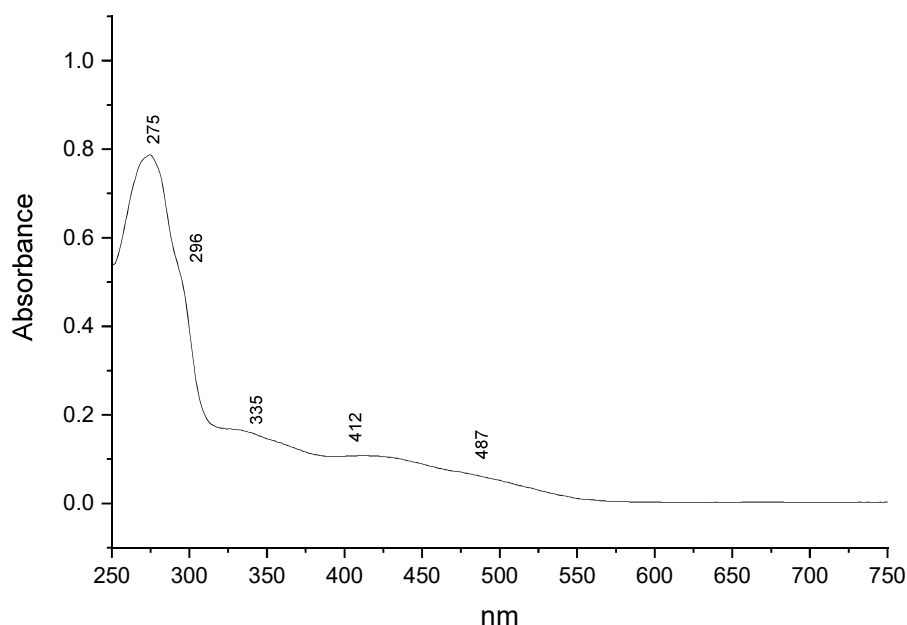
Legenda: (a) complexo precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(4,4'-metóxi-bipy)]

(b) complexo C3MTNZ 8

Após a substituição de um ligante cloreto pelo ligante metronidazol, o perfil do espectro modificou-se como esperado. Um exemplo representativo é demonstrado na Figura 26 para o complexo C3MTNZ 8, os demais apresentam-se em anexo.

O espectro do complexo $[\text{RuCl}(\text{MTNZ})(\text{dppb})(4,4\text{-metóxbipy})]\text{PF}_6$ (C3MTNZ 8) apresenta uma banda em 275 nm e um ombro em 296 nm que podem ser atribuídas às transições intra-ligantes $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bifosfina e 4,4'-metóxi-2,2'-bipy respectivamente. As bandas em 335 e 412 nm podem ser atribuídas à transições (TCML) $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (4,4'-metóxi-2,2'-bipy) e um ombro em 487 nm referente a transferência de carga metal ligante (TCML) $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{MTNZ})$.

Figura 26 – Espectro de UV-Vis do complexo C3MTNZ 8, em CH_2Cl_2



Fonte: do Autor

Os valores de absorvidade molar e as tentativas de atribuição das bandas e de todos os complexos estudados neste trabalho estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Coeficientes de absorvidade molar e atribuições das bandas dos complexos sintetizados

Complexo	Transições	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
C3MTNZ 7	$\pi \rightarrow \pi^*$ (dppb)	288	1,9 X 10 ⁴
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (4,4-metil-bipy)	300	Ombro
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (4,4-metil-bipy)	422	3,0 x 10 ³
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (MTNZ)	501	Ombro
C3MTNZ 8	$\pi \rightarrow \pi^*$ (dppb)	275	1,6 x 10 ⁴
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (4,4-metóxi-bipy)	296	Ombro
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (4,4-metóxi-bipy)	335	3,3 x 10 ³
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (4,4-metóxi-bipy)	412	2,1 x 10 ³
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (MTNZ)	487	Ombro
C3MTNZ 9	$\pi \rightarrow \pi^*$ (dppb)	292	1,4 x 10 ⁴
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (bipy)	304	1,3 x 10 ⁴
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (bipy)	434	2,3 x 10 ³
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (MTNZ)	510	Ombro
C3MTNZ 10	$\pi \rightarrow \pi^*$ (dppb)	269	1,8 x 10 ⁴
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (phen)	295	Ombro
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (phen)	318	2,0 x 10 ³
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (phen)	415	2,6 x 10 ³
	$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ (MTNZ)	506	Ombro

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

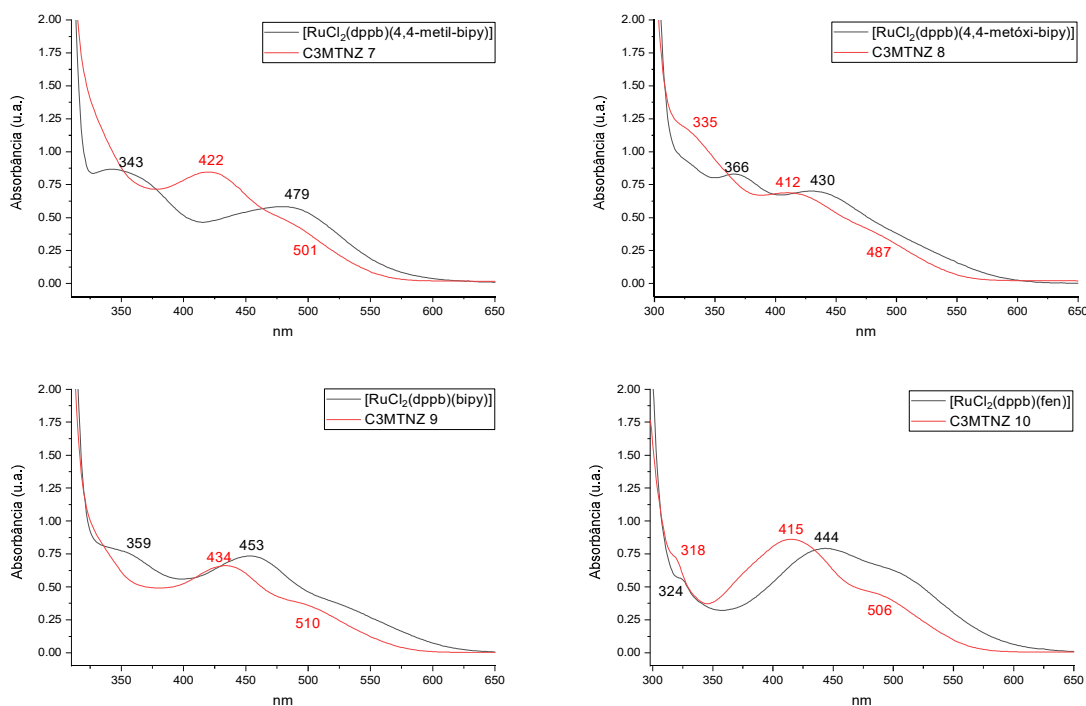
Legenda: $\pi \rightarrow \pi^*$ = Transição intra-ligante (IL) $\pi \rightarrow \pi^*$

$d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*$ = Transição de carga metal ligante (TCML)

Em geral, para cada novo complexo sintetizado, modificações no perfil espectral são esperados quando comparados aos precursores, já que novas ligações químicas são formadas e conseqüentemente as diferenças de energia entre orbitais moleculares são modificadas, implicando em energias diferentes para promover as transições eletrônicas (BARBOSA, 2007). A Figura 27, apresenta um comparativo dos espectros UV-Vis dos complexos precursores e seus respectivos complexos Ru-MTNZ obtidos, com enfoque nas TCML, é possível observar as

modificações espectrais dos complexos.

Figura 27 – Espectro comparativo de UV-Vis para os complexos obtidos e seus precursores, em CH_2Cl_2



Fonte: do Auto

Com isso, ao comparar os espectros de UV-Vis do precursor e dos complexos Ru-MTNZ, observasse que após a troca do cloreto pelo metronidazol, ocorreu um deslocamento para menor comprimento de onda (deslocamento hipsocrômico), como esperado, uma vez que o cloro é um ligante σ e π doador, comparado ao nitrogênio do metronidazol que é um ligante σ e π^* receptor.

A mudança de cor dos complexos precursores (avermelhados) para os complexos Ru-MTNZ sintetizados (alaranjados) se dá pela diferença das transições eletrônicas do campo cristalino dos complexos, uma vez que a substituição do cloreto – de campo mais fraco na série espectroquímica – pelo nitrogênio imidazólico do metronidazol – apresenta uma basicidade maior, gerando um campo mais forte na série espectroquímica. Essas mudanças no campo cristalino, faz com que o desdobramento dos orbitais do centro metálico fique maior, sendo necessário maior energia para promoção dos elétrons, observando assim, a mudança de coloração.

Grupos eletronegativos que atuam sobre a bipyridina, fazem com que haja diminuição da densidade eletrônica do anel, favorecendo à retrodoação Ru(II)-bipy (BARBOSA, 2007). Por consequência, uma diminuição energética das transições de transferência de carga metal-ligante (SANTIAGO, 2004). Como observado nos complexos sintetizados, quanto menor o pKa das bipyridinas, menor será a energia de retrodoação, e por consequência a transição de transferência de carga metal ligante será em maiores comprimentos de onda (energia é inversamente proporcional a comprimento de onda), conforme os dados na Tabela 9. Esta informação vai de encontro ao observado nos dados de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ e voltametria cíclica, que será abordada no próximo tópico.

Tabela 9 - Valores de pKa das bipyridinas e o comprimento de onda atribuído à transição de transferência de carga metal ligante dos complexos sintetizados.

Complexo	bipyridina	pKa	λ (nm)
C3MTNZ 9	bipy	4,44	434
C3MTNZ 7	4,4-metil-bipy	4,92	422
C3MTNZ 8	4,4-metóxi-bipy	5,74	412

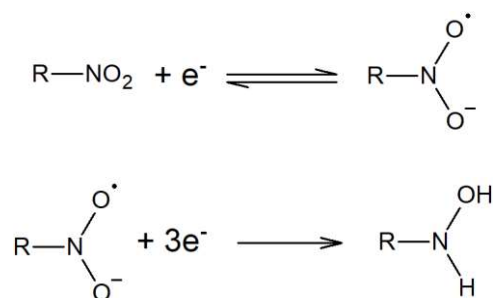
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.5 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica consiste na investigação de processos de oxidação e redução das substâncias analisadas (ELGRISHI *et al.*, 2018). Além do mais, as análises de voltametria cíclica são úteis para comparar a mudança da densidade eletrônica do centro metálico, em função da variação dos ligantes coordenados (CAVARZAN, 2010).

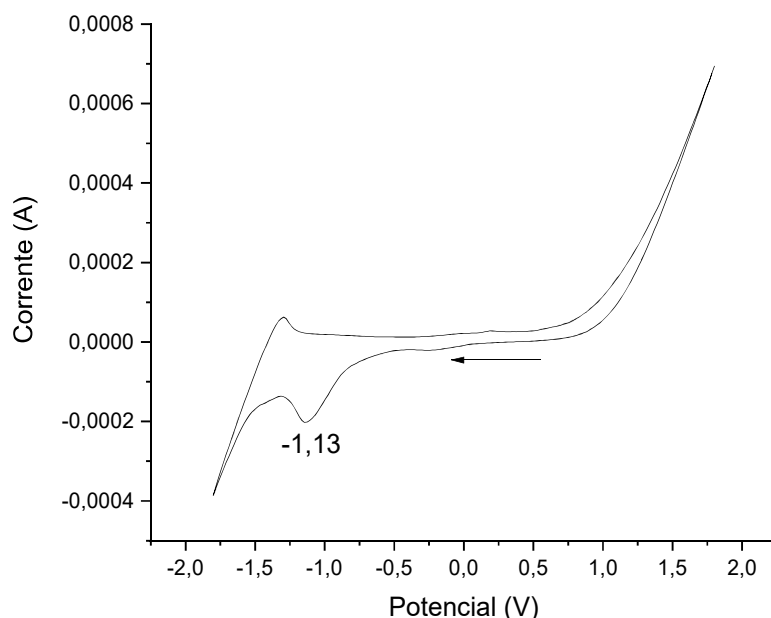
O voltamograma cíclico para o ligante metronidazol está representado na Figura 29. Este ligante apresenta um processo em -1,13 V, atribuído à redução do grupo nitro presente em sua estrutura, (ZHU *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2017; BARETY *et al.*, 1984; LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999), redução está representada na Figura 29.

Figura 28 – Mecanismo de redução do grupo nitro do metronidazol



Fonte: do autor

Figura 29 – Voltametria cíclica do metronidazol; eletrólito PTBA 0,1 mol.L⁻¹ em DMSO vs Ag/AgCl



Fonte: do Autor

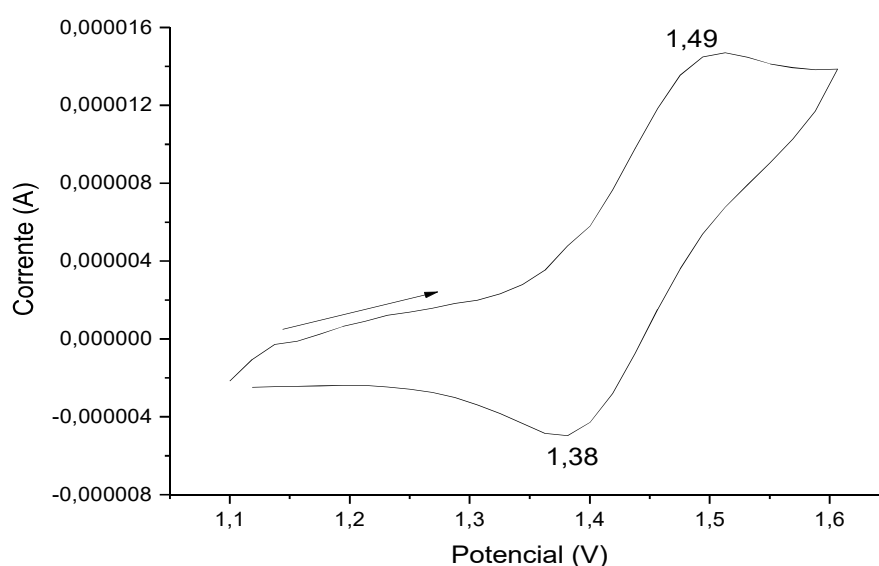
Os precursores utilizados neste trabalho apresentam potenciais anódicos próximos de 0,6 V (SANTIAGO, 2004; BARBOSA, 2007). Após a coordenação do ligante MTNZ estes valores variam entre 1,26 a 1,50 V, dados na Tabela 10, tais resultados evidenciam a troca do átomo de cloro (π doador) na esfera de coordenação por um forte ligante π receptor fazendo com que a oxidação do Ru^(II) a Ru^(III) seja dificultada refletindo em um potencial de oxidação mais elevado. Além do mais, foram observados processos na região de -1,24 V a -1,11 V, dispostos na Tabela 10), irreversíveis, atribuídos a redução do grupo nitro do ligante metronidazol coordenado (KENNEDY *et al.*, 2006).

Tabela 10 - Potenciais de oxidação e redução dos complexos sintetizados

Compostos	E (V)	E (V)	E (V)
	$Ru^{II} \rightarrow Ru^{III}$	$Ru^{III} \rightarrow Ru^{II}$	$R-NO_2 \rightarrow R-NHOH$
C3MTNZ 7	1,46	1,34	-1,24
C3MTNZ 8	1,32	1,19	-1,16
C3MTNZ 9	1,53	1,44	-1,11
C3MTNZ 10	1,49	1,38	-1,18

Fonte: Elaborada pelo autor (2022)

Figura 30 – Voltametria cíclica do complexo C3MTNZ 10; eletrólito PTBA 0,1 mol.L⁻¹ em DMSO vs Ag/AgCl



Fonte: do Autor

Um aspecto interessante e que pode ser correlacionado nesta técnica consiste nos potenciais de oxidação e basicidade dos ligantes bipyridínicos, presentes na Tabela 11. Como mencionado anteriormente, quanto mais básico o substituinte na posição 4 do ligante bipyridínico (pKa mais elevado) menor o potencial de oxidação, uma vez que ele favorece a doação de densidade eletrônica para o centro metálico facilitando o processo $Ru^{(II)}/Ru^{(III)}$ (BARBOSA, 2007; SANTIAGO, 2004).

Na Tabela 11, pode-se observar que o complexo com a bipyridina com o menor valor de pKa, apresenta o maior potencial de oxidação para os complexos, como esperado, uma vez que a menor contribuição desta ao centro metálico, faz

com que tenhamos uma aumento no potencial para oxidar o Ru(II) a (III).

Além do mais, os compostos mais citotóxicos (C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9), apresentam o maior potência redox Ru(II)/Ru(III), podendo assim estar relacionar as suas melhores atividades, visto que o complexo permaneça intacto até atinja o alvo desejado.

Tabela 11 - Correlação entre os valores de $E_{1/2}$ dos complexos e os pKas de seus respectivos ligantes bipyridínicos

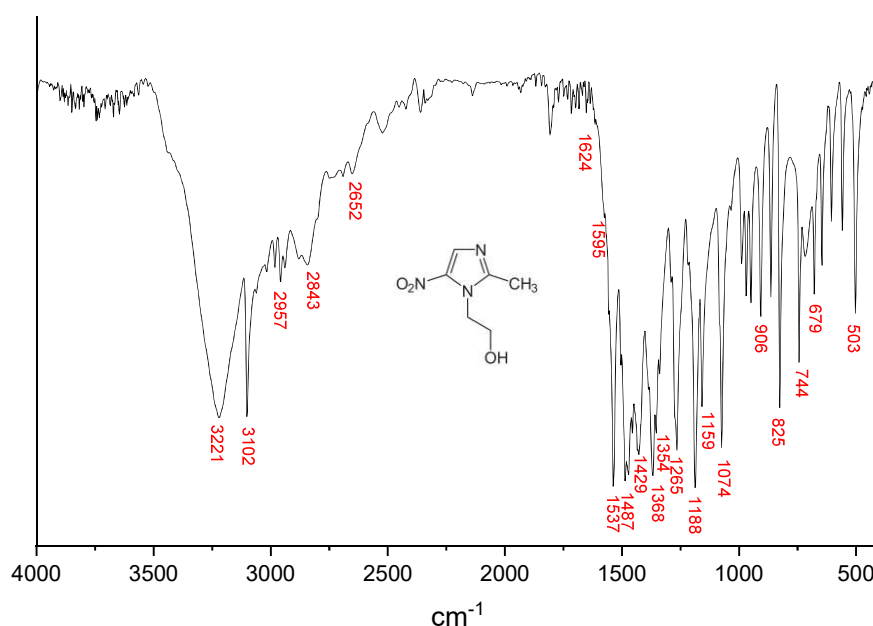
Complexo	pKa*	$E_{1/2}$ (V)
C3MTNZ 9	4,44	1,50
C3MTNZ 7	4,92	1,40
C3MTNZ 8	5,74	1,26

Fonte: Elaborada pelo autor (2022)

5.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

O espectro de infravermelho do fármaco metronidazol encontra-se disposto na Figura 31, o qual apresentou perfil semelhante ao encontrado na literatura (RAMUKUTTY; RAMACHANDRAN, 2012; CHAMUNDEESWARI; SAMUEL; SUNDARAGANESAN, 2011).

Figura 31 – Espectro de infravermelho do metronidazol, em KBr

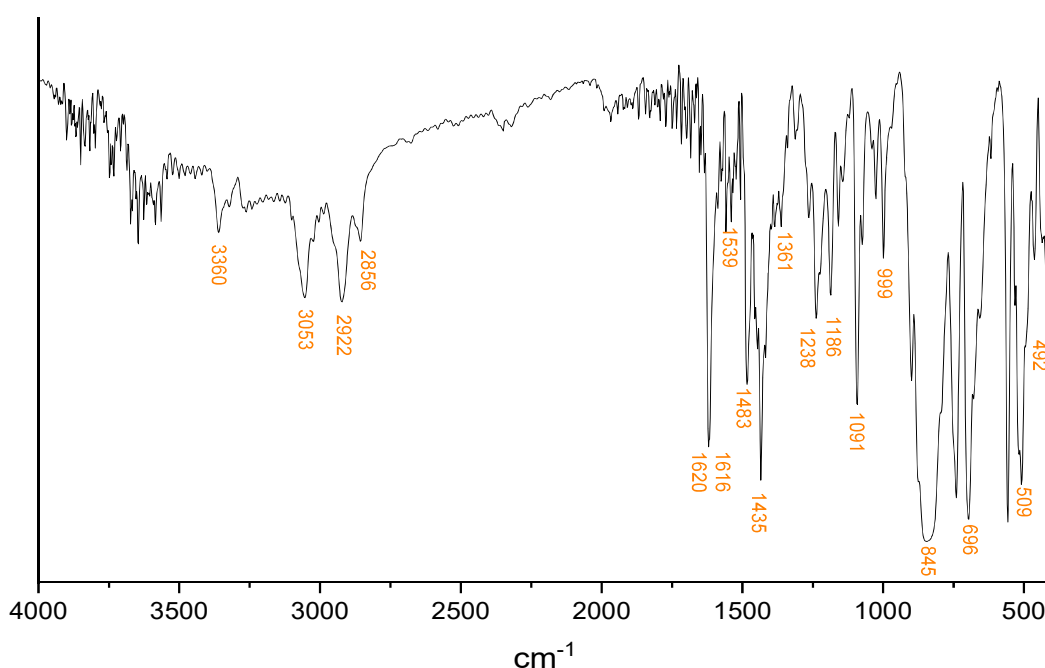


Fonte: do Autor

As atribuições das bandas estão organizadas de acordo com as similaridades de sua composição. As frequências em 3221 cm^{-1} e 2652 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico do $\nu\text{O-H}$, respectivamente, e em 1265 cm^{-1} deformação no plano O-H. Os estiramentos do grupo metil (CH_3) em $\nu_{\text{as}} 2957\text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{s}} 2853\text{ cm}^{-1}$. Em 1537 cm^{-1} e 1368 cm^{-1} são bandas foram atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico do N-O do grupo nitro (NO_2), respectivamente. Os estiramentos C=N em 1624 cm^{-1} e C-N em 1429 cm^{-1} e 1074 cm^{-1} , assim como a deformação angular de amida terciárias (C-N-C) em 503 cm^{-1} são identificadas. A banda intensa em 1487 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=C aromático. As bandas da ligação C-H geram estiramentos em 3102 cm^{-1} e 679 cm^{-1} e bandas de deformação no plano (1074 cm^{-1}) e fora do plano (906 cm^{-1}), bem como o estiramento *rocking* (balanço) (CH_2)₂ em 744 cm^{-1} . Em 1188 cm^{-1} e 1159 cm^{-1} atribui-se ao estiramento C-O.

Algumas bandas observadas no espectro de infravermelho do ligante metronidazol que auxiliaram na confirmação da coordenação do fármaco estão dispostas na Tabela 12. Um espectro de infravermelho representativo para esta série é disposto na Figura 32 (C3MTNZ 7), os demais em anexo.

Figura 32 – Espectro de infravermelho do complexo C3MTNZ 7, em KBr

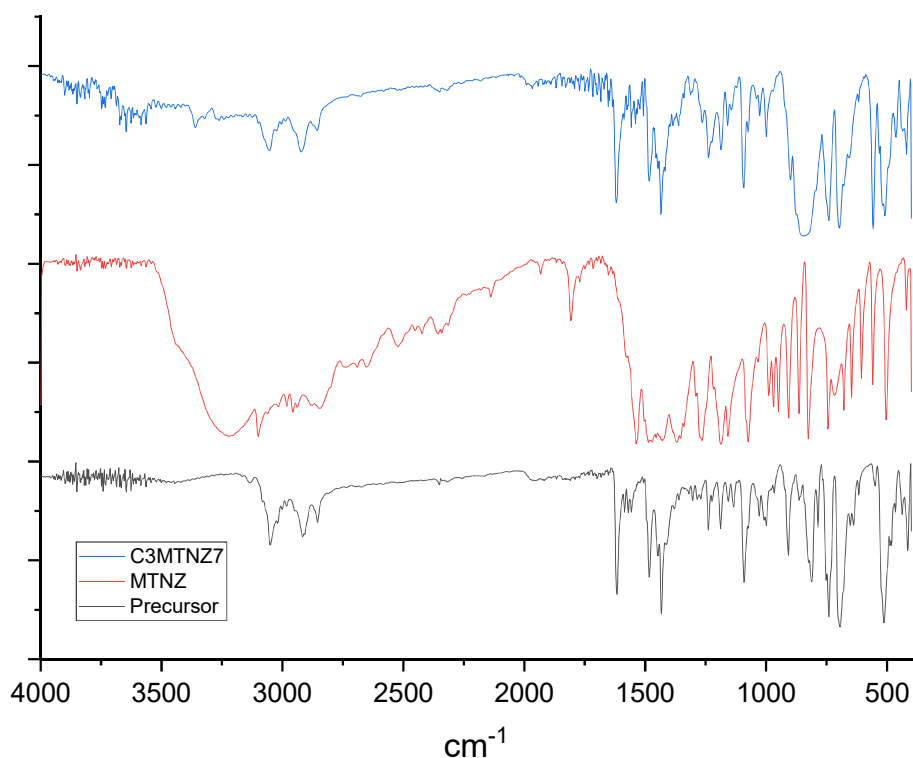


Fonte: do Autor

O estiramento C=N em 1616 cm^{-1} é observado em menor número de onda quando comparado ao estiramento do MTNZ livre (1624 cm^{-1}), após coordenação pelo nitrogênio imidazólico, como esperado. A banda intensa em 1487 cm^{-1} atribuída ao estiramento C=C sofre um deslocamento para menor número de onda quando comparada ao estiramento para o ligante livre 1487 cm^{-1} , este enfraquecimento da ligação é esperado, pois a ligação C=C está próxima ao nitrogênio imidazólico que coordenou-se ao centro metálico, comportamento semelhante reportado na literatura (OBALEYE; LAWAL, 2007). Ademais, outras bandas podem ser atribuídas (tabela 12) do complexo C3MTNZ 7, bem como, as bandas em 3053 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} e 696 cm^{-1} para o estiramento C-H, em 2856 cm^{-1} a banda ao estiramento do grupo metila (CH_3) substituinte da bipyridina, e os estiramentos C=N e C-N, da bipyridina, em 1435 cm^{-1} e 1238 cm^{-1} respectivamente e em 1091 cm^{-1} a banda P-C referente ao ligante dppb.

A figura 33, apresenta o comparativo dos espectros de infravermelho do ligante metronidazol, do complexo precursor e do complexo Ru-MTNZ (C3MTNZ 7), onde é possível observar as mudanças e deslocamento das bandas dos compostos.

Figura 33 – Espectro de infravermelho comparativo



Fonte: do Autor

Tabela 12 - Comparativo das principais bandas de infravermelho do ligante metronidazol e complexos sintetizados

	MTNZ	C3MTNZ 7	C3MTNZ 8	C3MTNZ 9	C3MTNZ 10
v O-H	Overlap	3360 (f)	3362 (f)	3360 (f)	3358 (f)
v C=N	1624 (f)	1616 (F)	1616 (F)	1603 (F)	1601 (F)
v N-O	1537 (F)	1539 (m)	1541 (m)	1541 (m)	1541 (m)
v C=C	1487 (F)	1483 (m)	1489 (m)	1483 (m)	1483 (m)
v NO ₂ (s)	1368 (F)	1361 (f)	1362 (f)	1364 (f)	1362 (f)
v C-O (s)	1188 (F)	1186 (m)	1184 (m)	1188 (m)	1184 (m)
v P-F	-	845 (F)	841 (F)	839 (F)	839 (F)
v Ru-P	-	509 (m)	509 (m)	509 (m)	509 (m)
v Ru-N	-	492 (m)	492 (m)	490 (m)	493 (m)

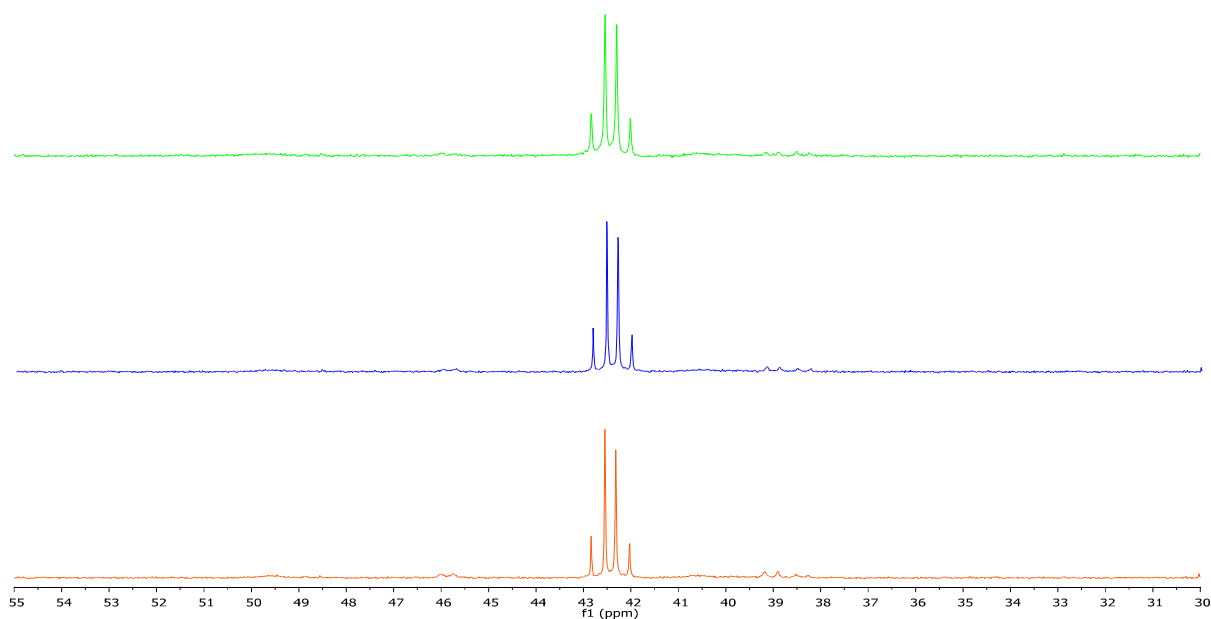
Fonte: Elaborada pelo autor (2022)

Legenda: (F) = forte
(m) = média
(f) = fraco

5.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO POR RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

Os compostos foram avaliados quanto à estabilidade frente ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO), uma vez que os experimentos biológicos são realizados com este solvente. Assim, os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido e acompanhados por ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ nos tempos 0, 24 e 48 horas. Os espectros dos complexos estão dispostos nas Figuras 34 e S11-S13. Este experimento mostra que os complexos são estáveis quando solubilizados em DMSO no intervalo de 0 a 48 horas, indicando a estabilidade dos compostos na realização dos ensaios.

Figura 34 – Análise de estabilidade por espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo C3MTNZ 7, em DMSO



Fonte: do Autor 2022

Legenda: verde = 0h
azul = 24h
laranja = 48 h

5.8 TESTES BIOLÓGICOS

5.8.1 Ensaio de citotoxicidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Os complexos Ru-MTNZ, o composto utilizado como ligante metronidazol e os precursores utilizados nas sínteses desse trabalho foram submetidos a um *screening* inicial frente a forma promastigota de *Leishmania amazonenses*, sob o método colorimétrico Alamar Blue, nome comercial do corante resazurin (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3,10-óxido), utilizando-se a Anfotericina B, um medicamento de referência para o tratamento da *leishmaniose*, como controle positivo.

Os complexos Ru-MTNZ não apresentaram satisfatória atividade leishmanicida na linhagem testada (forma promastigotas), conforme dados apresentados na Tabela 13, sendo então desta forma os ensaios foram descontinuados.

Tabela 13. Valores de IC₅₀ dos complexos Ru-MTNZ frente *Leishmania amazonensis*

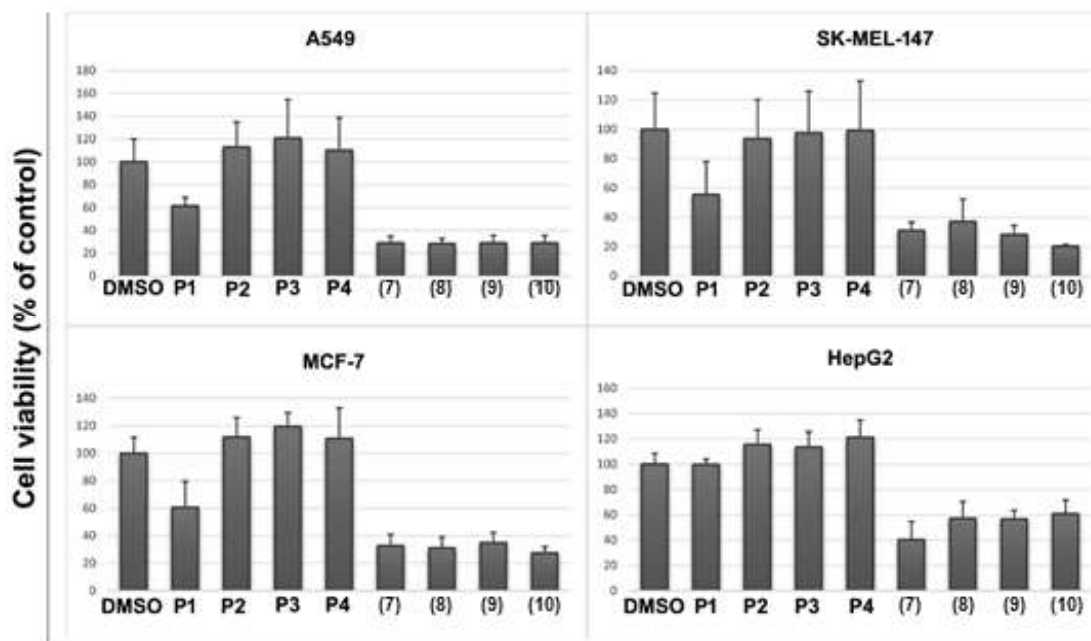
Compostos	IC ₅₀ (μM) ± D.P.
C3MTNZ 7	29,387 ± 3,099
C3MTNZ 8	34,003 ± 2,442
C3MTNZ 9	56,777 ± 13,037
C3MTNZ 10	> 50
MTNZ	32,060 ± 1,577
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-metilbipy)]	10,610 ± 0,670
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4'-metóxibipy)]	6,813 ± 0,119
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	27,510 ± 1,594
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(fen)]	43,790 ± 1,507
Anfotericina B	0,108 ± 0,001

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

5.8.2 Ensaio de citotoxicidade nas linhagens celulares de câncer

Ensaio de viabilidade celular foram realizados para avaliar a atividade dos complexos metálicos e de seus precursores sobre diferentes linhagens celulares derivadas de tumores humanos. Nessa abordagem experimental, todas as substâncias foram testadas na concentração de 40 μM. Os dados mostraram que os complexos metálicos foram mais ativos que os precursores, Figura 35. Na sequência, os complexos metálicos foram testados em diferentes concentrações (0,2; 2,0; 20,0; 100,0 e 200,0 μM) nas linhagens tumorais e na linhagem CCD-1059Sk (célula normal), a qual foi utilizada no presente estudo. Considerando os resultados obtidos nas curvas dose-resposta, os valores de IC₅₀ foram determinados e apresentados na Tabela 14. Os menores valores de IC₅₀ foram observados para os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 frente a linhagem MCF-7. De forma interessante, o perfil citotóxico desses complexos foi menor na linhagem normal (CCD-1059Sk) quando comparado à linhagem tumoral derivada de mama (MCF-7).

Figura 35 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de sulforrodamina B (SRB) após 48 horas de tratamento com os diferentes complexos e seus precursores na concentração de 40 μ M.



Fonte: do Autor

Tabela 14. Valores de IC₅₀ (μ M) determinados após 48 horas de tratamento.

	A549	MCF-7	SK-MEL-147	HepG2	CCD-1059Sk
C (7)	20,91 \pm 2,06	17,47 \pm 1,14	28,23 \pm 2,12	63,67 \pm 6,45	47,11 \pm 5,24
C (8)	48,90 \pm 3,44	31,99 \pm 1,72	32,63 \pm 6,03	74,82 \pm 5,12	37,61 \pm 3,05
C (9)	25,09 \pm 1,12	16,88 \pm 0,97	24,73 \pm 3,91	63,86 \pm 6,47	48,96 \pm 2,90
C (10)	37,29 \pm 2,98	25,69 \pm 1,65	37,15 \pm 4,16	74,43 \pm 3,19	29,45 \pm 1,63
MTNZ	-	> 250	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Legenda: C (7) = C3MTNZ 7
 C (8) = C3MTNZ 8
 C (9) = C3MTNZ 9
 C (10) = C3MTNZ 10

Os valores de índice de seletividade (IS), determinados por meio da razão entre o IC₅₀ obtido para a linhagem normal e o IC₅₀ para linhagem tumoral, demonstraram boa seletividade dos complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 para as linhagens de MCF-7, dados apresentado na Tabela 15. Os índices de seletividade

obtidos foram 2,7 e 2,9, respectivamente. Cabe ressaltar, que índices maiores que dois indicam boa seletividade (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Ademais, os compostos supracitados apresentam valores de seletividade 10X maior que o da *cis*-platina (GRAMINHA, *et al.*, 2021).

Tabela 15 - Valores de Índice de Seletividade determinados após tratamento por 48 h

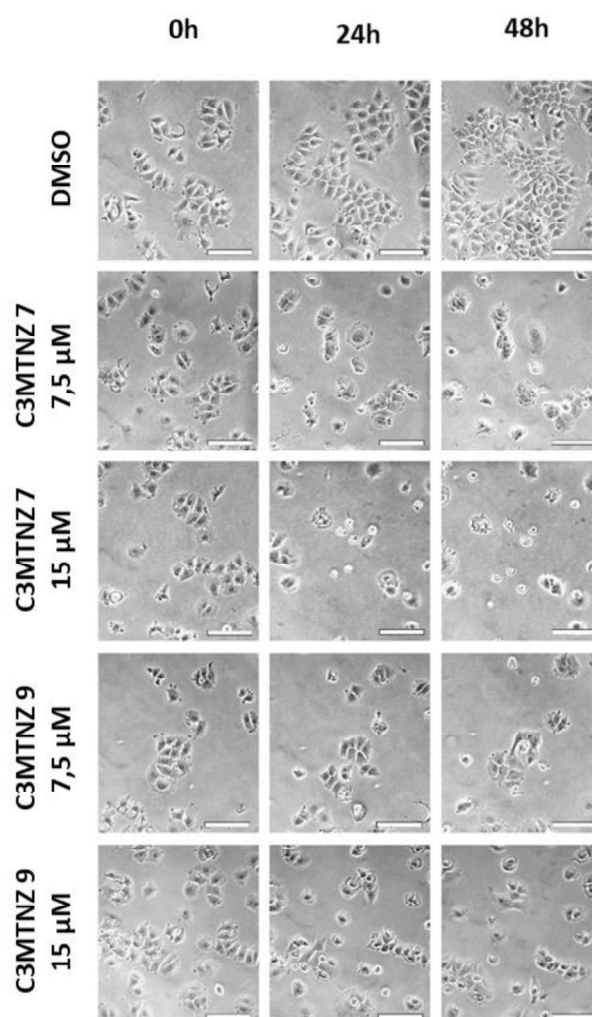
Compostos	MCF-7	CCD-1059Sk	IS
C3MTNZ 7	17,47 ± 1,14	47,11 ± 5,24	2,7
C3MTNZ 9	16,88 ± 0,97	48,96 ± 2,90	2,9
<i>cis</i> -platina*	8,58 ± 1,77	-	0,3

Fonte: Elaborada pelo autor (2022) e * Graminha *et al.*, 2021.

Na sequência, considerando os dados preliminares referentes aos ensaios de viabilidade, os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 e a linhagem MCF-7 foram selecionados para ensaios subsequentes com o objetivo de investigar os eventos relacionados a capacidade desses complexos metálicos em reduzir a viabilidade de células MCF-7, uma vez que esses complexos apresentarem uma baixa concentração inibitória média e também causando menores danos à linhagem celular sadia.

A Figura 36 mostra o aspecto morfológico das culturas ao longo do período de tratamento. É possível observar que no grupo controle (DMSO) as células exibem aspecto morfológico poligonal e a densidade celular aumenta ao longo do período em cultura. Nas culturas tratadas com os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9, é possível observar redução na densidade celular e alterações morfológicas, especialmente, nas células dos grupos tratados por 48 com os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 na concentração de 15 µM. As células tornam-se arredondadas e ficam parcialmente aderidas ao substrato, um indicativo de citotoxicidade.

Figura 36 – Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase.

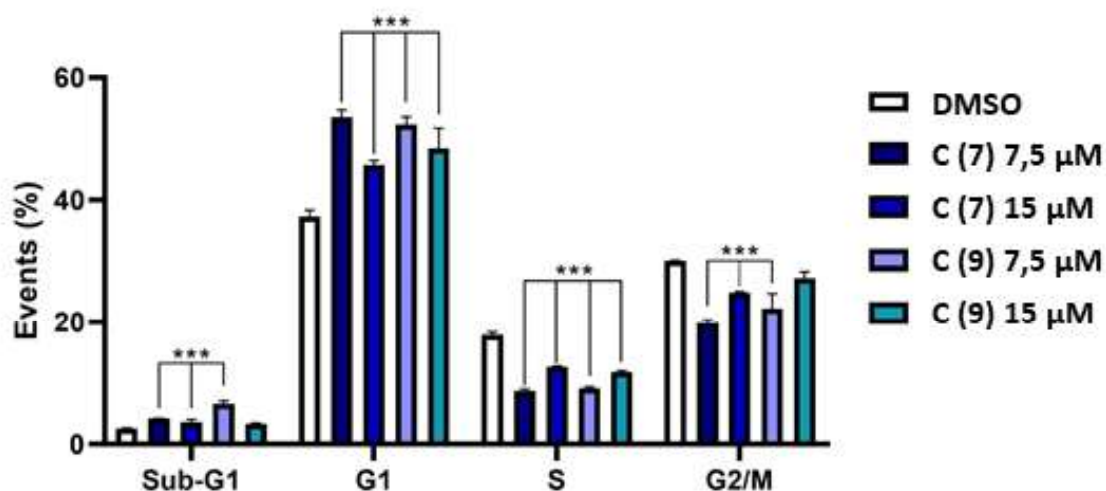


Fonte: do Autor
Legenda: (Barra = 100 μm)

5.8.3 Análise da progressão do ciclo celular

A análise de progressão do ciclo celular mostrou que o tratamento com os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 induziu aumento significativo na população G1 com concomitante redução nas populações S e G2/M, indicando que os complexos metálicos alteram a dinâmica de progressão do ciclo celular e causam bloqueio do ciclo na transição G1/S conforme Figura 37.

Figura 37 – Análise de Progressão do ciclo celular



Fonte: do Autor

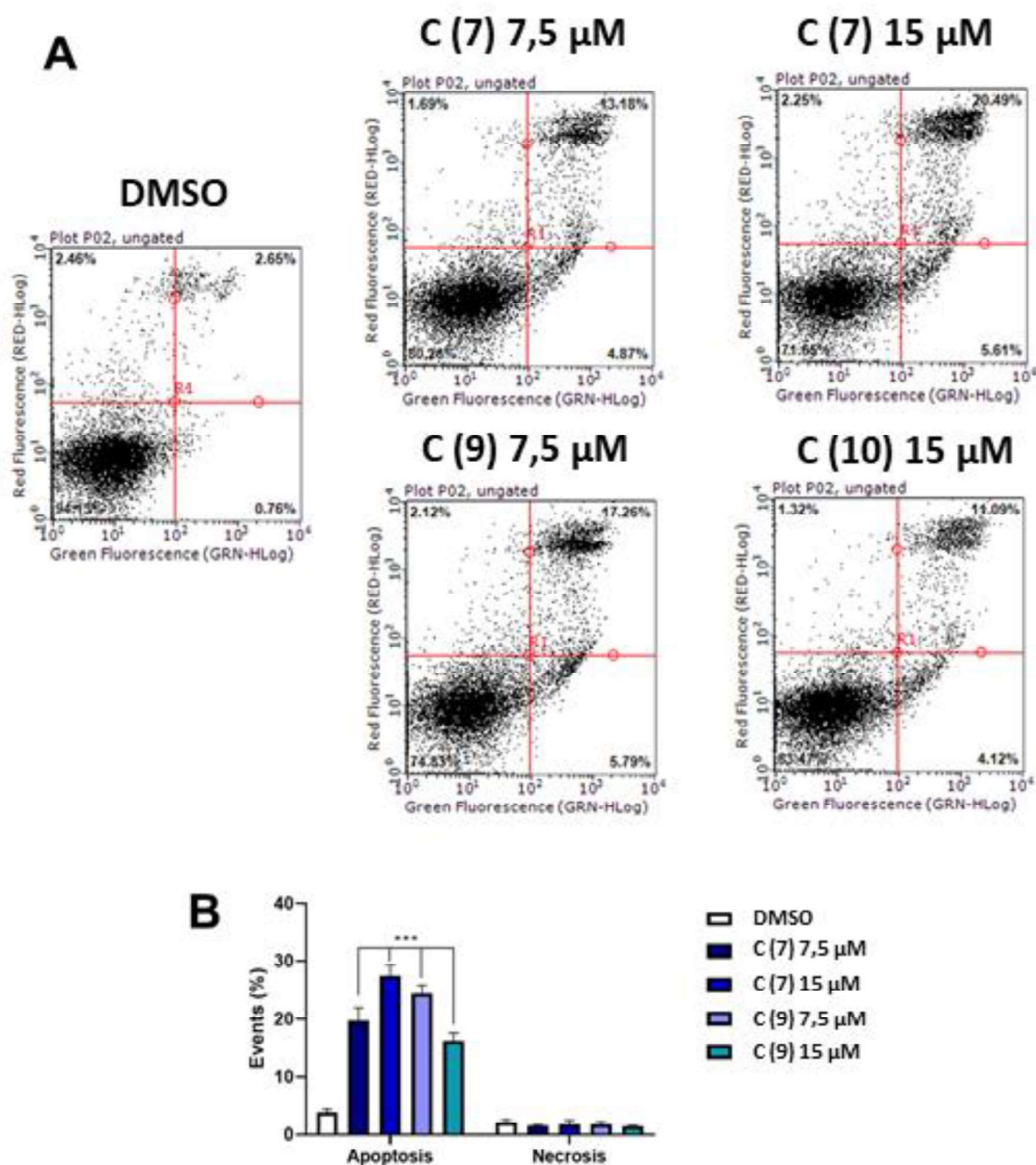
Legenda: *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

O aumento da população Sub-G1 também foi observada na análise de progressão do ciclo celular. Assim, novas abordagens experimentais foram realizadas (ensaio de anexina V) para avaliar se o aumento dessa população está associado à atividade pró-apoptótica desses complexos metálicos sobre células MCF-7.

5.8.4 Ensaio de anexina V

Os ensaios de anexina V foram realizados após 48h de tratamento e os dados mostraram que houve aumento significativo na população positiva para anexina V em culturas tratadas com os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9, indicando que esses complexos são capazes de induzir apoptose em células MCF-7. Não foram observados aumentos significativos da população de células necróticas em amostras tratadas com os complexos metálicos em relação aos grupos controle, conforme observado na Figura 38.

Figura 38 – Ensaio de Anexina V



Fonte: do Autor.

Legenda: (A) Dot plots representativos obtidos por citometria de fluxo
(B) Análise dos dados.

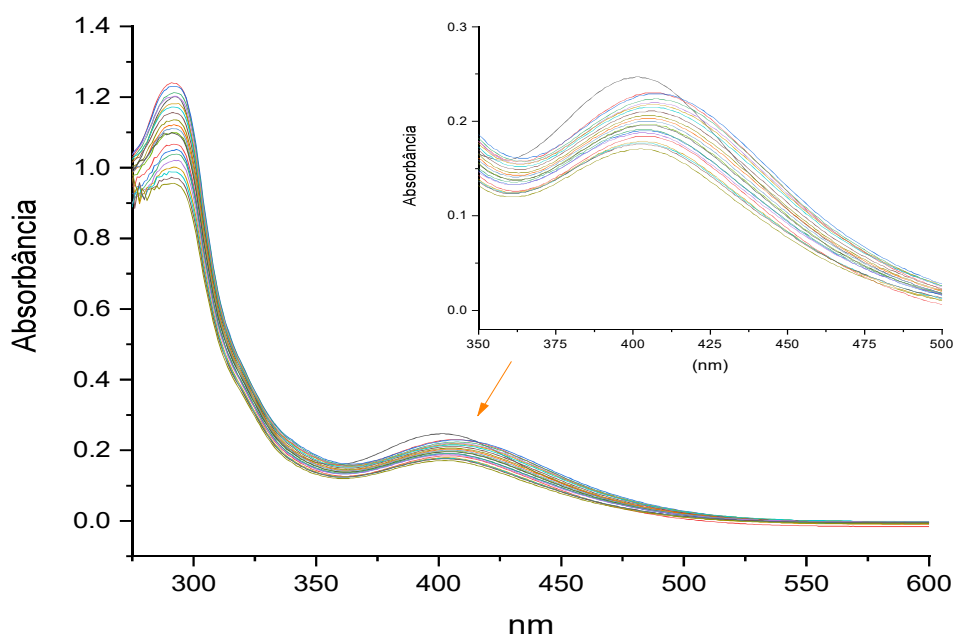
A presença dos complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 na linhagem celular MCF-7, faz com que haja a morte celular programada nas células, visto que este ensaio baseasse na ligação entre a anexina V, com os grupos fosfatidilserina – que são constituintes das membranas celulares que se soltam quando há a morte celular via apoptose.

5.9 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA

Os estudos de atividade citotóxica demonstraram resultados promissores para os complexos obtidos, frente a linhagem celular MCF-7, sendo assim, o estudo da interação dos complexos com DNA foi avaliado, pois a interação dos complexos com DNA é um possível alvo terapêutico contra o câncer (GILL; THOMAS, 2012).

Um espectro representativo do ensaio de titulação com ct-DNA é apresentado na Figura 39. O espectro inicial do complexo é representado em preto, e após a adição do ct-DNA na solução observou-se hipocromismo e batocromismo, aspectos estes, indicativos da interação do complexo com DNA, por intercalação (BARRA; NETTO, 2015).

Figura 39 – Espectro de UV-Vis das titulações do complexo C3MTNZ 7 em DNA



Fonte: do Autor

Este fenômeno ocorre quando a interação do complexo é por intercalação, uma vez que, o orbital π^* do complexo pode interagir com o orbital π das biomoléculas (pares de bases do DNA), diminuindo a energia da transição $\pi-\pi^*$, sendo assim aumentando o comprimento de onda (BARRA; NETTO, 2015). Essa interação dos orbitais faz com que o orbital π fique parcialmente ocupado com elétrons, reduzindo a probabilidade de transições eletrônicas, gerando o hipocromismo (BARRA; NETTO, 2015).

Baseado nos dados coletados pelo experimento de titulação, calculou-se a constante intrínseca de ligação (K_b) pela equação de *Neighbor Exclusion* e a porcentagem de hipocromismo (%H) do complexo é reportada na Tabela 16, a partir da região espectral referente a transferência de carga metal ligante.

Tabela 16 - Valores de K_b e %H dos complexos Ru-MTNZ

Complexo	λ (nm)	K_b ($10^6 M^{-1}$)	%H
C3MTNZ 7	402	1,21	11,94
C3MTNZ 8	398	1,52	4,66
C3MTNZ 9	412	2,56	11,53
C3MTNZ 10	397	0,62	2,36

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Os valores encontrados para a constante K_b estão em mesma ordem de grandeza do clássico intercalador de DNA brometo de etídio ($K_b \geq 10^6 M^{-1}$) (WARING, 1965). Sendo assim os complexos (C3MTNZ 7, C3MTNZ 8, C3MTNZ 9 e C3MTNZ 10) apresentam alta afinidade pelo DNA. Além do mais, os complexos obtidos também se encontram na mesma ordem de grandeza de outros complexos de rutênio que possuem a capacidade de interação com o DNA (SHILPA *et al.*, 2011; GILL *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2019).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sintetizados quatro novos compostos de rutênio contendo metronidazol, ligantes bipyridínicos ou fenantrolina e bifosfina e caracterizados. Os dados de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram importantes para o acompanhamento das sínteses e determinação estrutural assim como para a determinação da estabilidade nas condições relatadas.

As demais técnicas de caracterização espectroscópica confirmam a coordenação do metronidazol ao centro metálico e evidenciam às estruturas propostas, com a coordenação do metronidazol via átomo do nitrogênio imidazólico, descartando também outras possíveis vias de coordenação grupo enólico e/ou nitro. Bem como, os dados de condutividade molar e análise elementar confirmam a formação de compostos monocatiônicos.

Com relação aos grupos substituintes das bipyridinas utilizadas, observa-se uma correlação entre os seus valores de pKa e deslocamentos nos espectros de RMN e UV-Vis, no voltamograma cíclico e também relação direta com a atividade citotóxica dos complexos.

Abordagens de alguns mecanismos de ação destes compostos foram avaliadas, e observou-se que os complexos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 possuem a capacidade de alterar a dinâmica de progressão do ciclo celular e causam bloqueio do ciclo celular na transição na fase G1/S, assim como, mostraram-se capazes de induzir apoptose em células MCF-7.

No estudo de interação com o *ct*-DNA, analisando os valores de K_b encontrados para os complexos observou-se que os valores apresentam-se na ordem de grandeza de 10^6 mol.L^{-1} , valor este, igual ao K_b reportado para o brometo de etídio (10^6 mol.L^{-1}), uma clássica molécula intercaladora. Desta forma, sugere-se que a interação dos complexos com o DNA é forte e a interação ocorre por intercalação.

Baseados nas informações supracitadas, os compostos C3MTNZ 7 e C3MTNZ 9 que apresentam promissora atividade citotóxica frente a linhagem MCF-7 (câncer de mama estrogênio positivo) e no futuro podem ser considerados novos testes, *in vivo*, para continuidade dos estudos bioativos destes compostos.

REFERÊNCIAS

- AJIBOLA, A. A. *et al.* Structural, spectroscopic, insights, and antimicrobial properties of mononuclear and dinuclear metal(II) carboxylate derivatives with metronidazole. **Polyhedron**, v. 195, p.114931, 2021.
- AL-KHODIR, F. A. I.; REFAT, M. S. Investigations of coordination ability of Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), and Cu(II) with Metronidazole, the antiprotozoal drug, in alkaline media: synthesis and spectroscopic studies. **Russ. J. Gen. Chem.**, v. 87, n. 4, p. 873-879, 2017.
- ALDOSSARY, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. **Biomed. & Pharmacol. J.**, v. 12, n. 1, p. 7-15, 2019.
- 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**, v. 24, p. 1955, 2019.
- ALGHAMDI, S. S. *et al.* Imidazole as promising medicinal scaffold: current Status and future direction. **Drug Des. Dev. Ther.**, v. 15, p. 3289-3312, 2021.
- ANG, C. W. *et al.* Nitroimidazoles: molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. **J. Med. Chem.**, v. 60, p. 7636-7657, 2017.
- ATHAR, F. *et al.* Synthesis and anti-amoebic activity of Gold(I), Ruthenium(II), and Copper(II) complexes of Metronidazole. **Chem. Biodivers.**, v. 2, p. 1320-1330, 2005.
- BAIRD, I. R.; SKOV, K. A.; JAMES, B. R. Syntheses of new Ruthenium (II and III)-nitroimidazole complexes. **Inorg. Chim. Acta**, v. 489, p. 100-107, 2019.
- BAIRD, I. R. *et al.* Ruthenium (III and II) β -diketonate complexes containing imidazoles. **Inorg. Chim. Acta**, v. 466, p. 565-577, 2017.
- BALES, J. R.; MAZID, M. A.; SADLER, P. J. Platinum(II) complexes of nitroimidazoles: synthesis, characterisation, and X-ray crystal structure of *cis*-dichlorobis[1-(2'-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole]platinum(II) and *trans*-dichlorobis-[1-(2'-hydroxy-3'-methoxypropyl)-2-nitroimidazole]platinum(II). **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, v. 4, p. 795-802, 1985.
- BARBOSA, Marília Imaculada Frazão. **Complexos carbonílicos de Rutênio: de um gás tóxico a uma droga com potencial agente citotóxico**. 2007. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2007.
- BARETY, D. *et al.* eletrochemical behaviour of nitroimidazole derivatives in dimethylsulphoxide. **J. Eletroanal. Chem.**, v. 162, p. 335-341, 1984.

- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análise: um enfoque nos metalintercaladores. **Rev. Virtual Quím.**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015.
- BENITE, A. M. C. *et al.*, Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Quím. Nova**, v. 30, n. 8, 2007.
- BERALDO, H. Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal. **Quím. Nova na Esc.**, n. 6, 2005.
- BRESSAN, M.; RIGO, P. 5-Coordinate Complexes of ruthenium(II) with di(tertiary phosphines). **Inorg. Chem.**, v. 14, n. 9, p. 1-3, 1975.
- CAVARZAN, Deividi Alexandre. **Síntese, caracterização e atividade catalítica de complexos de rutênio (II) com carbonilos, fosfinas, aminas, iminas e hidretos**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.
- CERUELOS, A. H. *et al.* Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 397-401, 2019.
- CHAMBERLAIN, S. *et al.* TLD1433-mediated photodynamic therapy with an optical surface applicator in the treatment of lung cancer cells *in vitro*. **Pharmaceuticals**, v. 13, p. 137, 2020.
- CHAMUNDEESWARI, S. P. V.; SAMUEL, E. R. J. J.; SUNDARAGANESAN, N. Theoretical and experimental studies on 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol. **Eur. J. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 136-145, 2011.
- CHAN, P. K. L. *et al.* A new ruthenium radiosensitizer: RuCl₂(DMSO)₂(4-nitroimidazole)₂. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 12, p. 1059-1062, 1986.
- CHEIN, Y. W.; LAMBERT, H. J.; SANVORDEKER, D. R. Interaction of Metronidazole with Metallic Ions of Biological Importance. **J. Pharm. Sci.**, v. 64, n. 6, p. 957-960, 1975
- CHEN, Q. *et al.* TLD1433 Photosensitizer inhibits conjunctival melanoma cell in zebrafish ectopic and orthotopic tumor models. **Cancers**, v. 12, p. 587, 2020.
- CHEN, L. *et al.* The induction of autophagy against mitochondria-mediated apoptosis in lung cancer cells by a ruthenium (II) imidazole complex. **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80716-80734, 2016.
- COLES, C. E. *et al.* The Lancet breast cancer commission: tackling a global health, gender, and equity challenge. **The lancet**, v. 399, p. 1101-1103, 2022.
- COSTA, M. S. *et al.* Ruthenium (II) complex *cis*-[Ru^{II}(η²-O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆-hmxhato induces ROS-mediated apoptosis in lung tumor cells producing selective cytotoxicity. **Sci. Rep.**, v. 10, p. 15410, 2020.

- DALE, L. D. *et al.* Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bioreducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound. **Anticancer Drug Desing**, v. 7, p. 3-14, 1992.
- DIAS, J. S. M. *et al.* Novel ruthenium(II) complexes with cimetidine: DFT calculations and *in vitro* cytotoxic activities against glioblastoma cell lines. **Inorg. Chim. Acta**, v. 506, p. 119501, 2020.
- DIAS, J. S. M. *et al.* Pro-apoptotic activity of ruthenium 1-methylimidazole complex on non-small cell lung cancer. **J. Inorg. Biochem.**, v. 187, p. 1-13, 2018.
- DINGSDAG, S. A.; HUNTER, N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 73, p. 265-279, 2018.
- DOMINGUES, B. *et al.* Melanoma treatment in review. **Immuno Targets Ther.**, v. 7, p. 35-49, 2018.
- DORCIER, A. *et al.*, Binding of organometallic Ruthenium(II) and Osmium(II) complexes to an oligonucleotide: a combined mass spectrometric and theoretical study, **Organometallics**, v. 24, p. 2114-2123, 2005.
- ECHEVERRI, M. *et al.* Using phosphine ligands with a biological role to modulate reactivity in novel platinum complexes. **R. Soc. Open Sci.**, v. 5, p. 171340, 2018.
- ELGRISHI, N. *et al.* A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **J. Chem. Educ.**, v. 96, p. 197-206, 2018.
- FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third Millennium. **Front. Pharmacol.**, v. 9, p. 1330, 2018.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **Int. J. Cancer**, v. 1 p. 1-12, 2021.
- FERREIRA-SILVA, G. A. *et al.* [Ru(pipe)(dppb)(bipy)]PF₆: A novel ruthenium complex that effectively inhibits ERK activation and cyclin D1 expression in A549 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 44, p. 382-391, 2017.
- GEARY, W. J.; The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination Compounds. **Coord. Chem. Rev.**, v. 7, p. 81-122, 1971.
- GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine**. Chichester: Wiley, 2005.
- GILL, M. R. *et al.* A ruthenium polypyridyl intercalator stalls DNA replication forks, radiosensitizes human cancer cells and is enhanced by Chk1 inhibition. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 31973, 2016.

GIIL, M. R.; THOMAS, J. A. Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA-from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 3179-3192, 2012.

GOODGAME, D. M. L. *et al.* Synthesis, characterisation and radiosensitizing properties of some nitroimidazole adducts of Rhodium(II) carboxylates: X-ray structure of $\{\text{Rh}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{-}[1\text{-}(2\text{-hydroxy-3-methoxypropyl})\text{-}2\text{-methyl-5-nitroimidazole}]\}_2$. **Inorg. Chim. Acta**, v. 125, p. 143-149, 1986.

GRAMINHA, A. E. *et al.*, A novel ruthenium(II) gallic acid complex disrupts the actin cytoskeleton and inhibits migration, invasion and adhesion of triple negative breast tumor cells. **Dalton Trans.**, v. 50, p. 323-335, 2021.

GRAWE, G. F. *et al.* Ruthenium(II)-diphosphine complexes containing acylthiourea ligands are effective against lung and breast cancers. **Dalton Trans.**, v. 51, p. 1489, 2022.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Tipos de Câncer**. Rio de Janeiro, RJ, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 26 jun. 2022.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ, 2020.

JIA, F. *et al.* Recent developments in the interactions of classic intercalated Ruthenium compounds: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ with a DNA Molecule. **Molecules**, v. 24, p. 769, 2019.

JURCA, T. *et al.*, **Metal complexes of pharmaceutical substances**. In SHARMIN, E. **Spectroscopic analyses – developments and applications**. Londre: Intech Open, 2017, cap. 7.

KENNEDY, D. C. *et al.* Ruthenium(III) maltolato-nitroimidazole complexes: Synthesis and biological activity. **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, p. 1974-1982, 2006.

KEPPLER, B. K.; RUPP, W. Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachloro ruthenate (III). **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 111, p. 166-168, 1986.

KETLE, S. F. A. **Physical Inorganic Chemistry: a coordination chemistry approach**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

LAMP, K. C. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole Antimicrobials. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 36, n. 5, p. 353-373, 1999.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Voltammetric behaviour of Metronidazole at Mercury Electrodes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 2, p. 127-135, 1999

LAU, A. H. *et al.* Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 23, n. 5, p. 328-364, 1992.

LEE, S. Y.; KIM, C. Y.; NAM, T. G. Ruthenium complexes as anticancer agents: a brief history and perspectives. **Drug Des. Dev. Ther.**, v. 14, p. 5375-5392, 2020.

LEIJEN, S. *et al.*, Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest. New Drugs**, v. 33, p. 201-214, 2015.

LEITE, C. M. *et al.* On the cytotoxicity of chiral Ruthenium complexes containing sulfur amino acids against breast tumor cells (MDA-231 and MCF-7). **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 21, p. 1172-1182, 2021.

LENIS-ROJAS, O. A. *et al.* Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* efficacy of Ruthenium polypyridyl compounds against Breast Cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 8916, 2021.

LIN, K. *et al.* Applications of Ruthenium complex in tumor diagnosis and therapy. **Front. Pharmacol.**, v. 9, p. 1323, 2018.

LIU, K.; ZHU, H. L. Nitroimidazoles as anti-tumor agents. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 11, p. 687-691, 2011.

LLOVET, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. **Nat. Rev. Dis. Primers.**, v. 7, p. 6, 2021.

McCLEVERTY, J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. **Chem. Rev.**, v. 104, p. 403-418, 2004.

MENDES, Luiza Barbosa Petersen *et al.* Determinação eletroquímica de metronidazol por voltametria cíclica. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO DE CIÊNCIAS, 2., 2017, Campina Grande. **Anais [...]** Campina Grande, CEMEP, 2017.

MJOS, K. D.; ORVIG, C.; Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry, **Chem. Rev.**, v. 114, p. 4540-4563, 2014.

MONRO, S. *et al.* Transition metal complexes and photodynamic therapy from a tumor-centered approach: challenges, opportunities, and highlights from the development of TLD1433. **Chem. Rev.**, v. 119, p. 797-828, 2019.

MORAES, F. T. *et al.* Synthesis, characterization, and evaluation of antitumor potential in MCF-7 Cells of Ruthenium-Derived Compounds. **Adv. Biol. Chem.**, v. 10, p. 86-98, 2020.

MORETH, M. *et al.* Nitroimidazóis – uma promissora classe de substâncias para o tratamento da tuberculose. **Rev. Virtual Quím.**, v. 2, n.2, p. 105-117, 2010.

MUSHTAQUE, M. *et al.* Azole-based compounds as antiamebic agents: A perspective using theoretical calculations. **RSC Advances**, v. 6, p. 815-824, 2016.

MUTHNÁ, D. *et al.* *in-vitro* and *in-vivo* evaluation of the anticancer activity of diruthenium-2, a new trithiolato arene ruthenium complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{Pr}^i)_2\text{Ru}_2(\mu\text{-S-}p\text{-C}_6\text{H}_4\text{OH})_3]\text{Cl}$. **Anticancer Drugs**, v. 27, n. 7, p. 643-650, 2016.

NEGRETI, A. A. *et al.* Ruthenium(II) complex containing cinnamic acid derivative inhibits cell cycle progression at G0/G1 and induces apoptosis in melanoma cells. **New J. Chem.**, v. 46, p. 3325-3337, 2022.

NIKOLAOU, S.; SILVA, C. F. N. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio. **Quím. Nova**, v. 41, n. 7, p. 833-838, 2018.

OBALEYE, J.; LAWAL, A. Synthesis, characterization and antifungal studies of some Metronidazole complexes. **J. Appl. Environ. Manage.**, v. 11, n. 2, p. 15-18, 2007.

OLIVEIRA, K. M. *et al.* Lapachol in the design of a new Ruthenium(II)-diphosphine complex as a promising anticancer metallodrug. **J. Inorg. Biochem.**, v. 214, p. 111289, 2021.

OLIVEIRA, Kátia Mara de. **Complexos de Rutênio Contendo Lapachol e Lausona: Síntese, caracterização e suas propriedades quimioterapêuticas**. 2014. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2014.

PAL, M.; NANDI, U.; MUKHERJEE, D. Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 150, p. 419-445, 2018.

PUJANTE-GALIÁN, M. A. *et al.* *p*-Cymene complexes of Ruthenium(II) as antitumor agents. **Molecules**, v. 25, p. 5063, 2020.

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

RADEMAKER-LAKHAI, J. M. *et al.*, A phase I and pharmacological study with imidazolium-*trans*-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel Ruthenium anticancer agent, **Clin. Cancer Res.**, v. 10, p. 3717-3727, 2004.

RADKO, L. *et al.* Silver(I) complexes of the pharmaceutical agents Metronidazole and 4-Hydroxymethylpyridine: comparison of cytotoxic profile for potential clinical application. **Molecules**, v. 24, p. 1949, 2019.

RAMUKUTTY, S.; RAMACHANDRAN, E. Crystal growth by solvent evaporation and characterization of metronidazole. **J. Cryst. Growth**, v. 351, p. 47-50, 2012.

RECK, M. *et al.* Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. **The Lancet**, v. 382, p. 709-719, 2013.

RICE, A. M.; LONG, Y.; KING, S. B. Nitroaromatic antibiotics as nitrogen oxide sources. **Biomolecules**, v. 11, p. 267, 2021.

ROCHA, D. P. *et al.*, Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana, **Quím. Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

SADOWSKA, A. *et al.* Metronidazole affects breast cancer cell lines. **Adv. Med. Sci.**, v. 58, n. 1, p. 90-95, 2013 (a).

SADOWSKA, A. *et al.* Metronidazole decreases viability of DLD-1 colorectal cancer cell line. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 28, n. 8, 615-622, 2013 (b).

SALES, D. K. S. *et al.* A bis-indazolic ruthenium(II) complex: Reactivity and biological studies on cancer cells. **Inorg. Chim. Acta**, v. 516, p. 120125, 2021.

SANTIAGO, Marcelo Oliveira. **Síntese, caracterização e estudos cinéticos da isomerização de compostos de Ru(II) contendo ligantes (x-bipy) (X= -H, -NO₂, -Me, -COOH, -SMe, O=SMe, -Cl, -OMe)**. 2004. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

SASAHARA, G. L. *et al.* Nitro-imidazole-based ruthenium complexes with antioxidant and anti-inflammatory activities. **J. Inorg. Biochem.**, v. 206, p. 111048, 2020.

SCHADENDORF, D. *et al.*, Melanoma. **Nature Reviews**, v. 1, p. 15003, 2015.

SCOLARO, C. *et al.*, In Vitro and In Vivo evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA complexes, **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 4161-4171, 2005.

SERRA, K. P. *et al.* Nova classificação dos carcinomas de mama: procurando o luminal A. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 36, n. 12, p. 575-580, 2014.

SHAMLE, N. J. *et al.* Synthesis, characterization, electrochemistry, antioxidant, and toxicological studies of Co(II), Ni(II) and Ag(I) complexes of mefenamic acid/tolfenamic acid bearing metronidazole. **J. Coord. Chem.**, v. 74, p. 1255-1271, 2021.

SHARMA, P. *et al.* Imidazoles as potential anticancer agents: an update on recent studies. **Molecules**, v. 26, p. 4213, 2021.

SHILPA, M. *et al.* DNA-interactions of ruthenium(II) & cobalt(III) phenanthroline and bipyridine complexes with a planar aromatic ligand 2-(2-fluoronyl)1H-imidazol[4,5-f][1,10-Phenanthroline]. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 70, p. 187-195, 2011.

SHIVA, S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. **Redox Biology**, v. 1, p. 40-44, 2013.

SILVA, M. M. *et al.* Ruthenium(II) diphosphine complexes with mercapto ligands that inhibit topoisomerase IB and suppress tumor growth *in vivo*. **Inorg. Chem.**, v. 60, p. 14174-14189, 2021.

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

SILVA, P. A.; RIUL, S. S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 64, n. 6, p. 1016-1021, 2011.

SKEHAN, P. *et al.*, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SOARES, G. M. S. *et al.* Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 20, n. 3, p. 295-309, 2012.

STEPHENSON, T. A.; WILKINSON, G. New complexes of ruthenium (II) and (III) with triphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, v. 28, p. 945-956, 1966.

STORR, T. **Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry**. Chichester: Wiley, 2014.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. London: Academic Press, 1990. p. 71–133.

THAI, A. A. *et al.* Lung cancer. **Lancet**, v. 398, p. 535-554, 2021.

THOTA, S. *et al.* Ru(II) Compounds: Next-generation anticancer metallotherapeutics? **J. Med. Chem.**, v. 61, p. 5805-5821, 2018.

TRIVEDI, M. K. *et al.* Spectroscopic characterization of biofield treatment Metronidazole and Tinidazole. **Med. Chem.**, v. 5, n. 7, p. 340-344, 2015.

VALLE, E. M. A. *et al.* Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de ³¹P{¹H} em complexos difosfínicos de rutênio. **Quím. Nova**, v. 31, n. 4, p. 807-812, 2008.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112-1116, 2006.

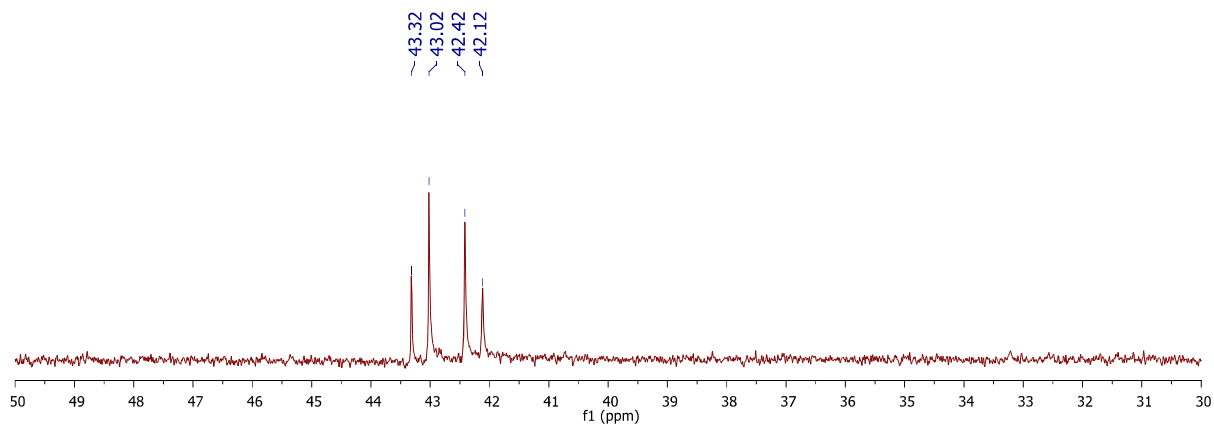
WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, p. 269-282, 1965.

WU, A. *et al.* Ruthenium(II) sulfoxide-maltolato and -nitroimidazole complexes: synthesis and MTT Assay. **Inorg. Chem.**, v. 42, p. 7579-7586, 2003.

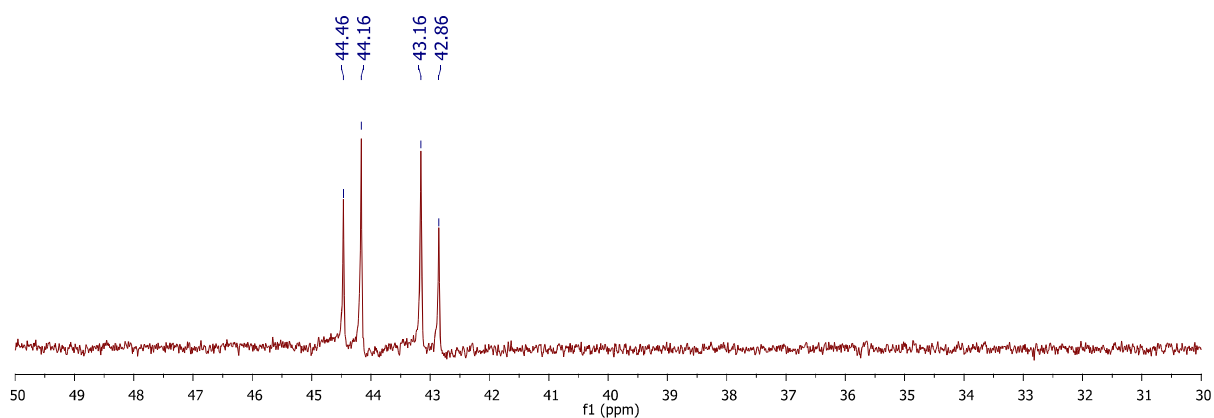
YANG, Y.; LIAO, G.; FU, C. Recent advances on octahedral polypyridy Ruthenium(II) complexes as antimicrobial agents. **Polymers**, v. 10, p. 650, 2018.

ZAMBONI, M. Epidemiologia do câncer do pulmão. **J. Pneumol.**, v. 28, n. 1, p. 41-47, 2002.

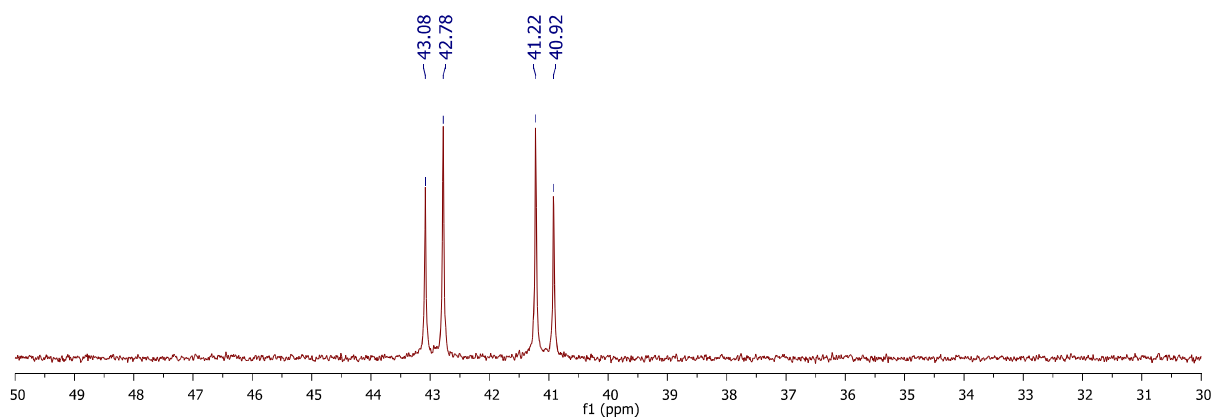
ZHU, M. *et al.* Differential pulse stripping voltammetric determination of Metronidazole with graphene-sodium dodecyl sulfate modified carbon paste electrode. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 13, p. 4100-4114, 2018.

ANEXO A – Material SuplementarFigura S1 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 7, em CH_2Cl_2 

Fonte: do autor

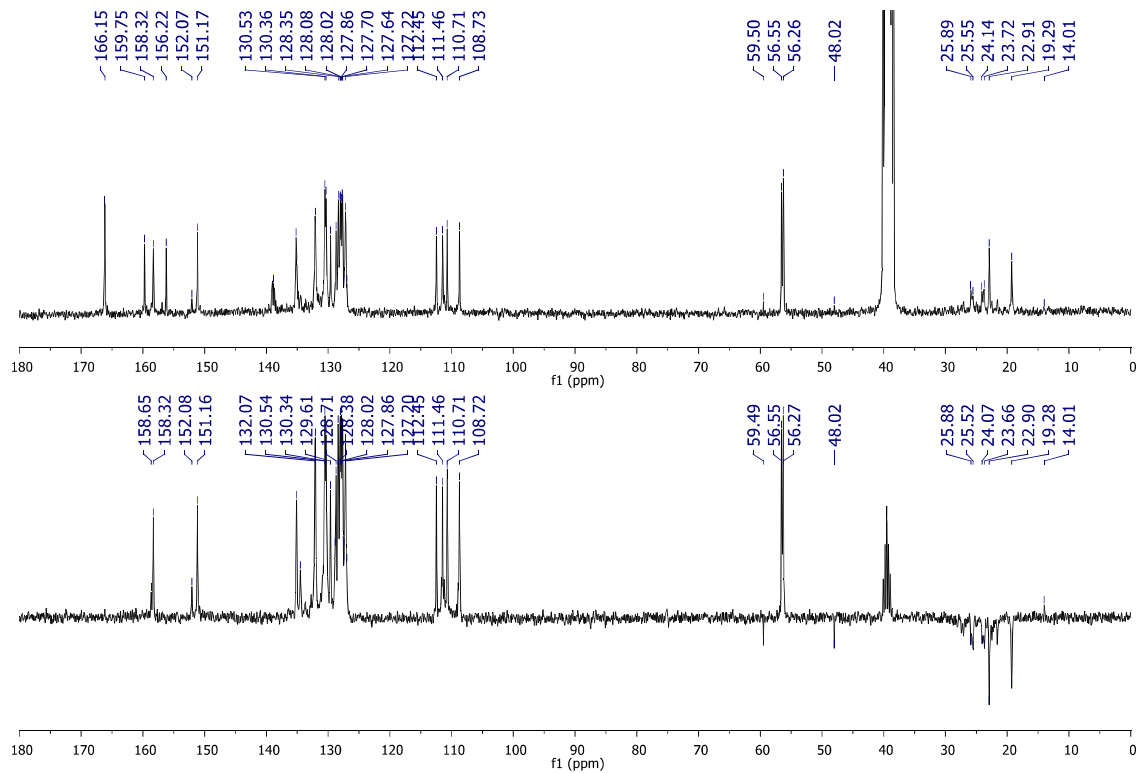
Figura S2 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 8, em CH_2Cl_2 

Fonte: do autor

Figura S3 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo C3MTNZ 9, em CH_2Cl_2 

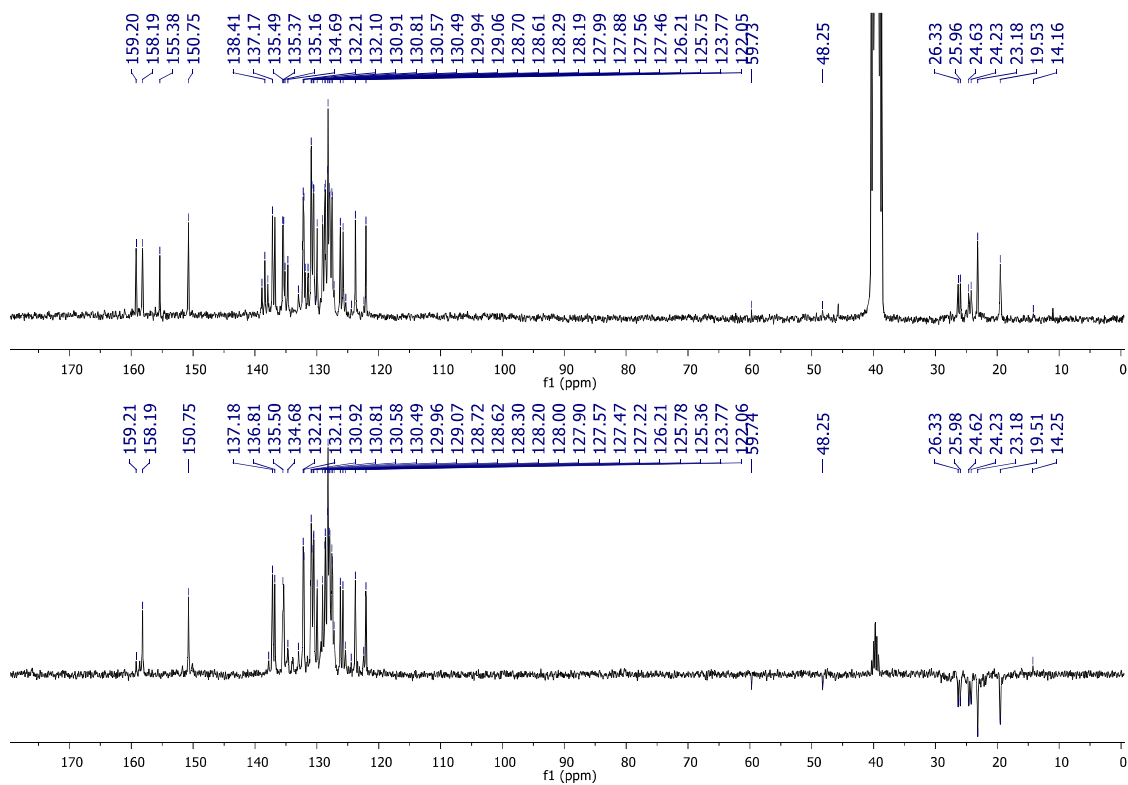
Fonte: do autor

Figura S5 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Dept 135 do complexo C3MTNZ 8, em DMSO- d_6



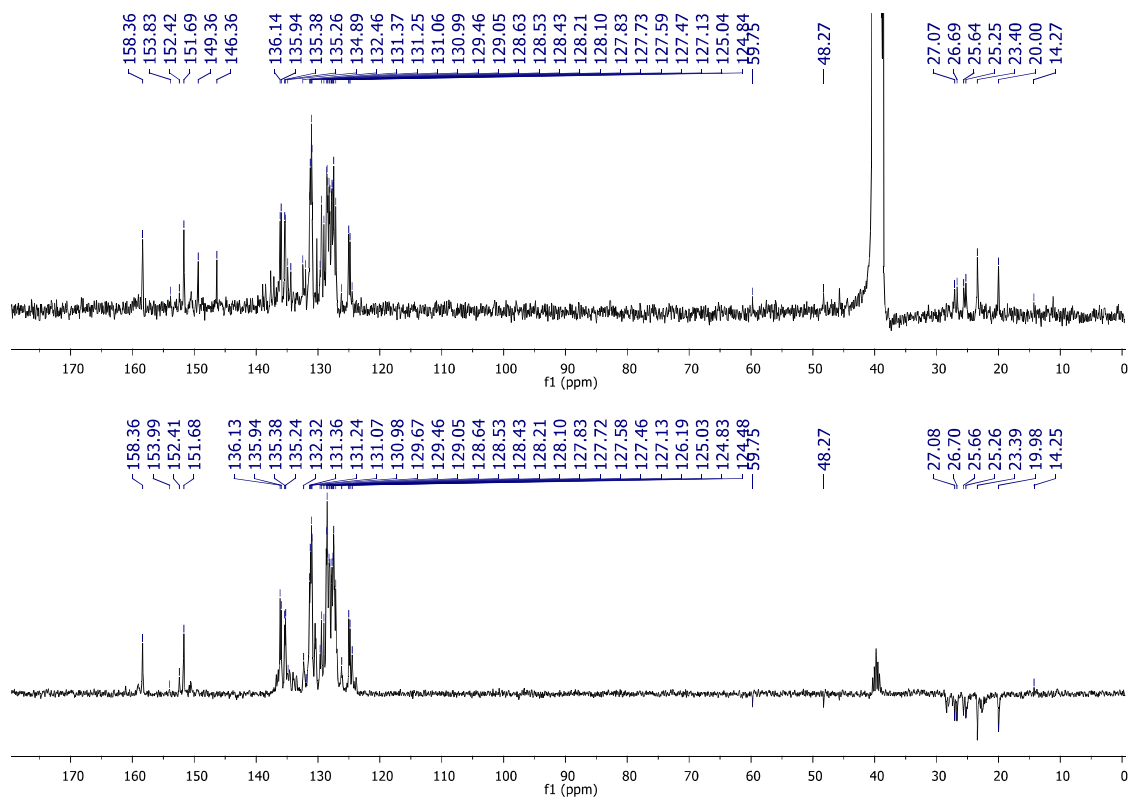
Fonte: do autor

Figura S6 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Dept 135 do complexo C3MTNZ 9, em DMSO- d_6

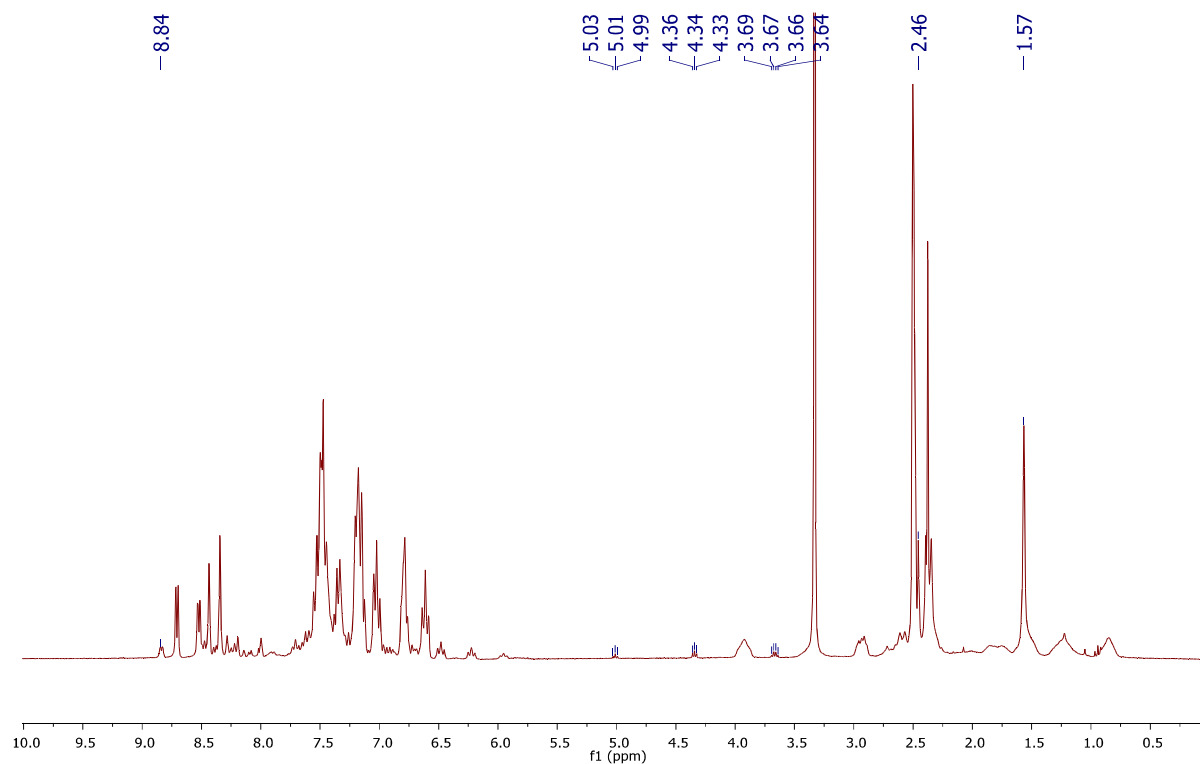


Fonte: do autor

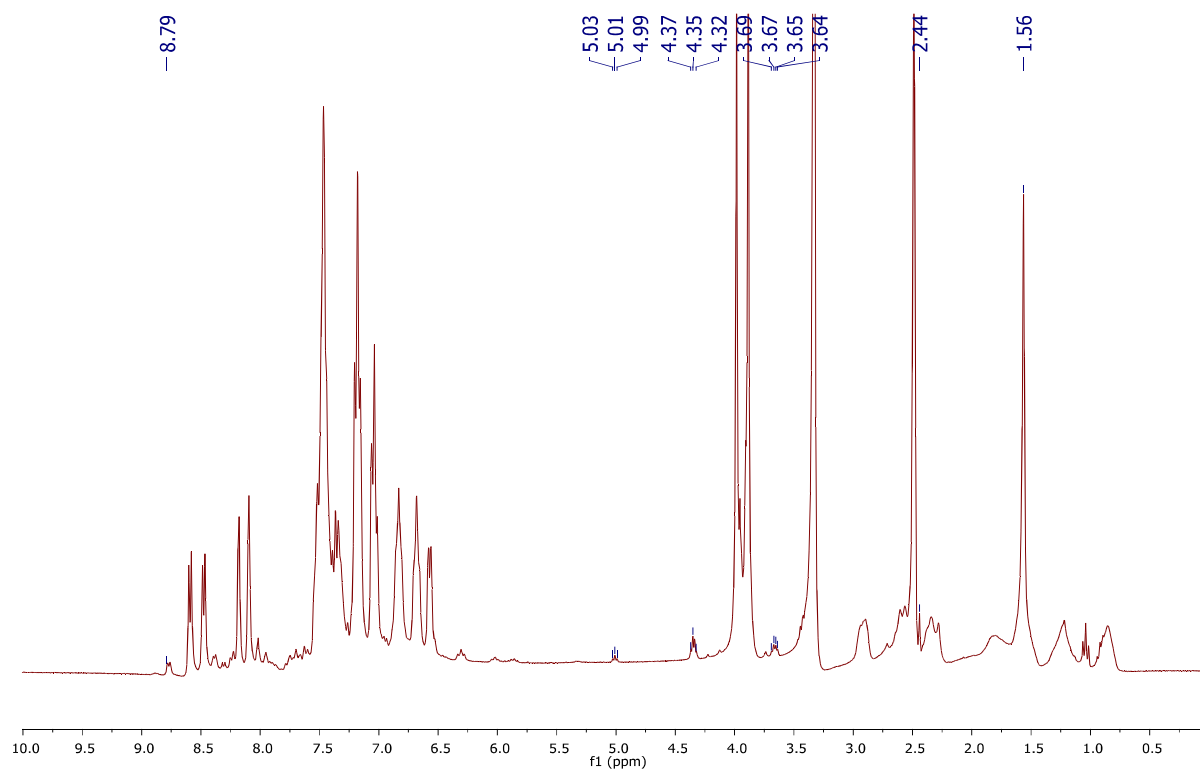
Figura S7 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e Dept 135 do complexo C3MTNZ 10, em DMSO- d_6



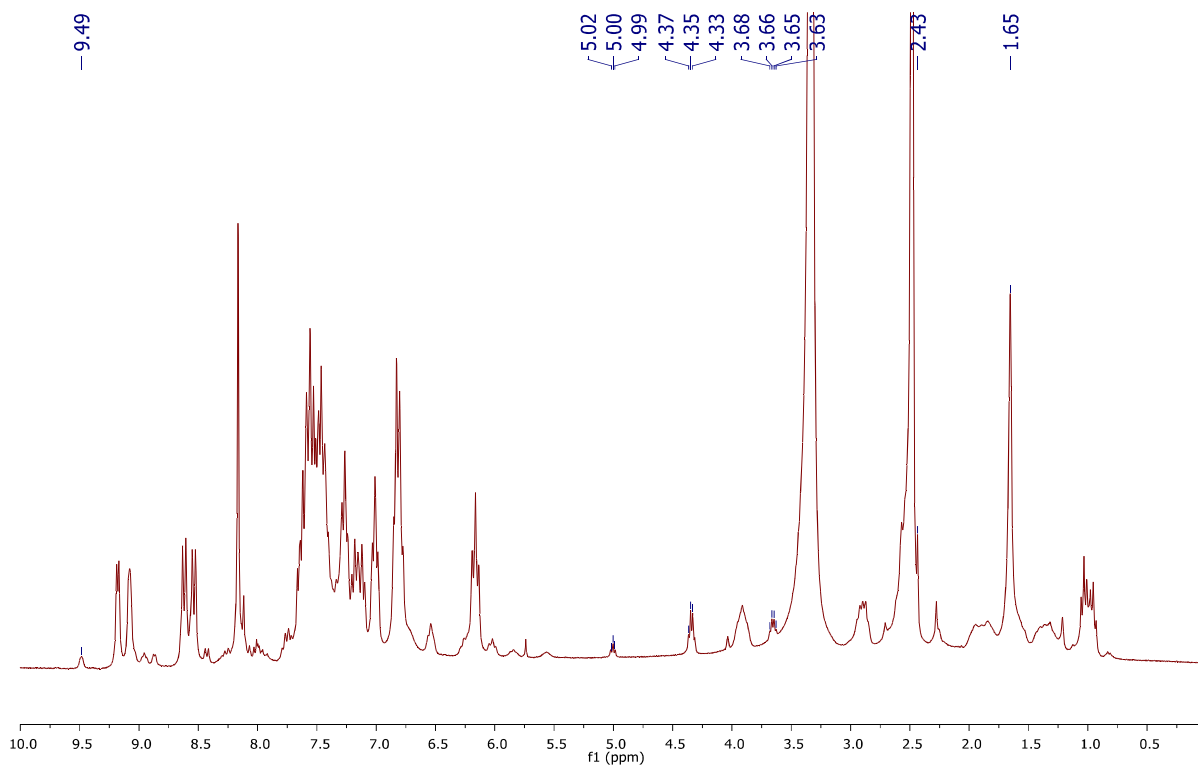
Fonte: do autor

Figura S8 – Espectro de RMN ^1H do complexo C3MTNZ 7, em DMSO- d_6 

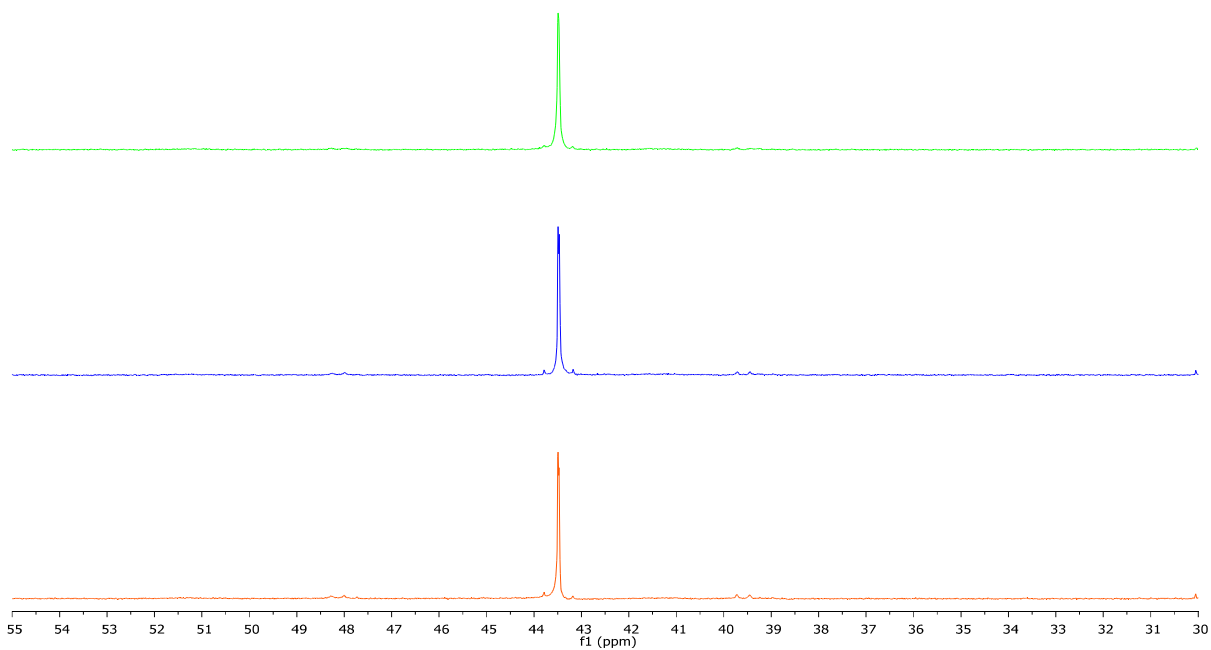
Fonte: do autor

Figura S9 – Espectro de RMN ^1H do complexo C3MTNZ 8, em DMSO- d_6 

Fonte: do autor

Figura S10 – Espectro de RMN ^1H do complexo C3MTNZ 10, em DMSO- d_6 

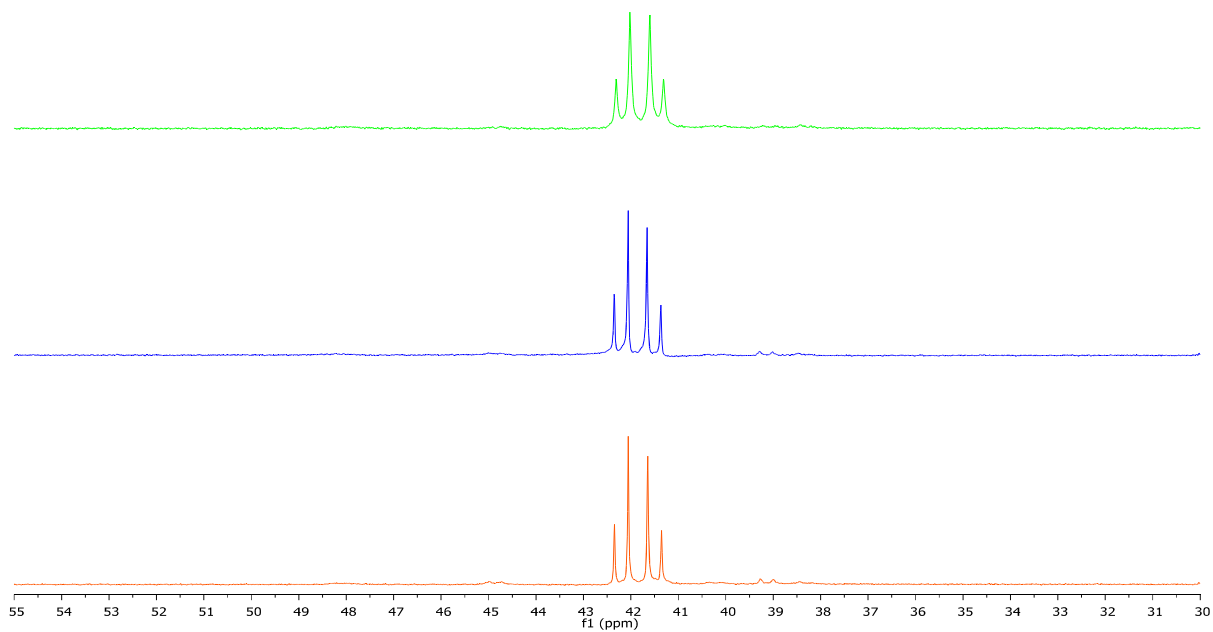
Fonte: do autor

Figura S11 – Análise de estabilidade por espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo C3MTNZ 8, em DMSO

Fonte: do autor

Legenda: verde = 0h; azul = 24h; laranja = 48 h

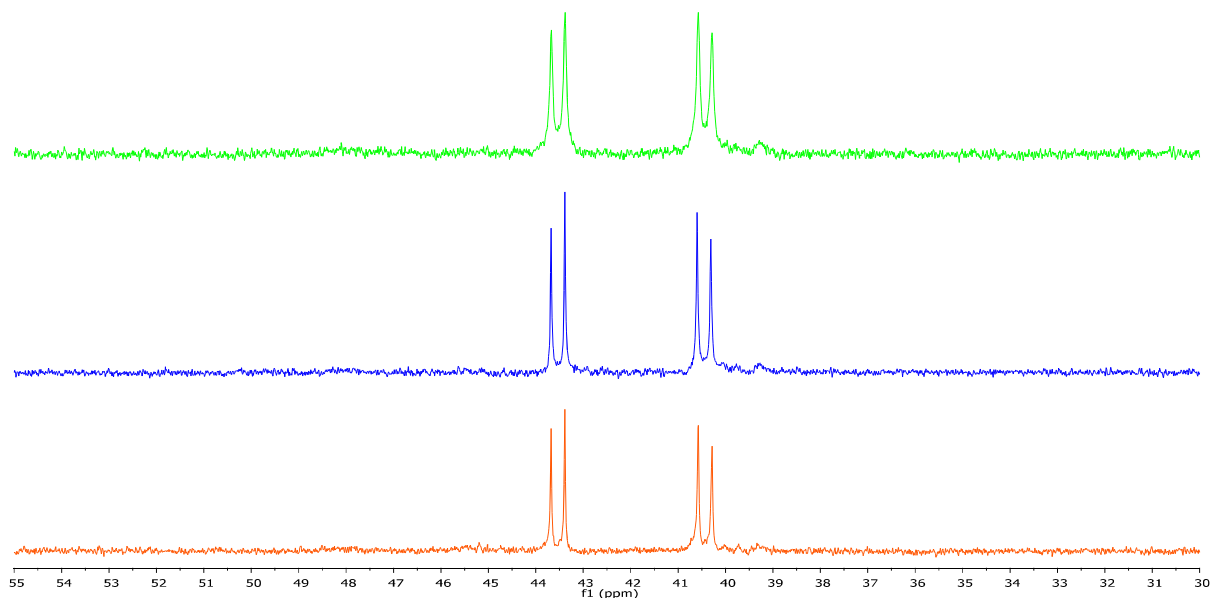
Figura S12 – Análise de estabilidade por espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo C3MTNZ 9, em DMSO



Fonte: do autor

Legenda: verde = 0h; azul = 24h; laranja = 48 h

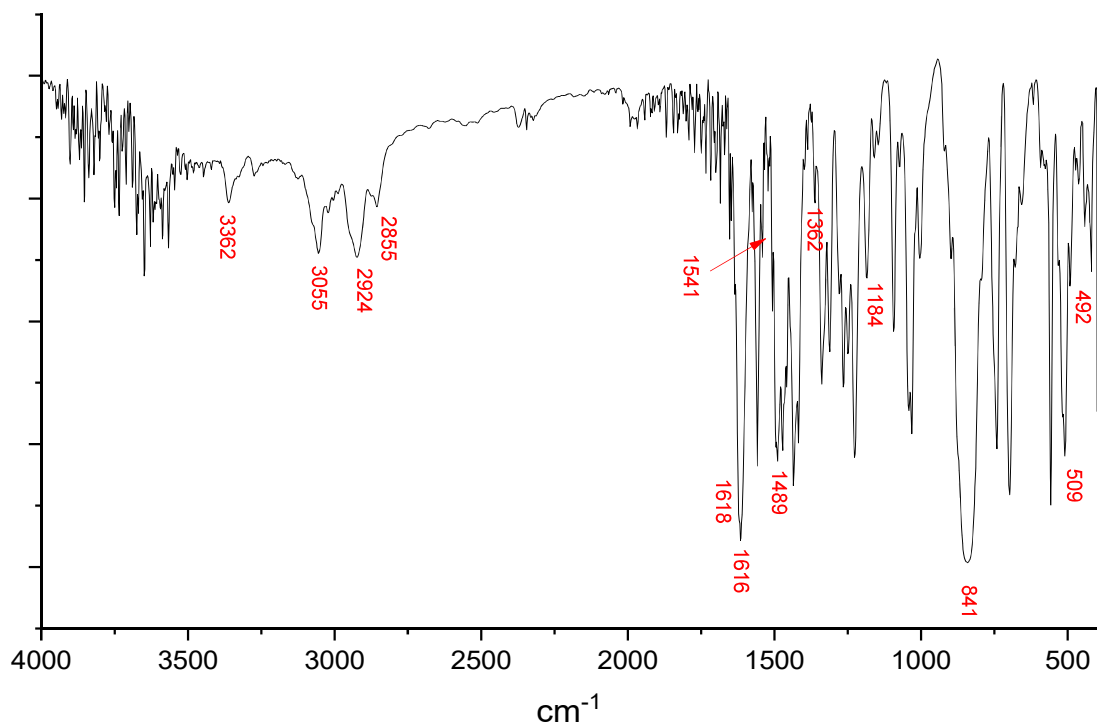
Figura S13 – Análise de estabilidade por espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo C3MTNZ 10, em DMSO



Fonte: do autor

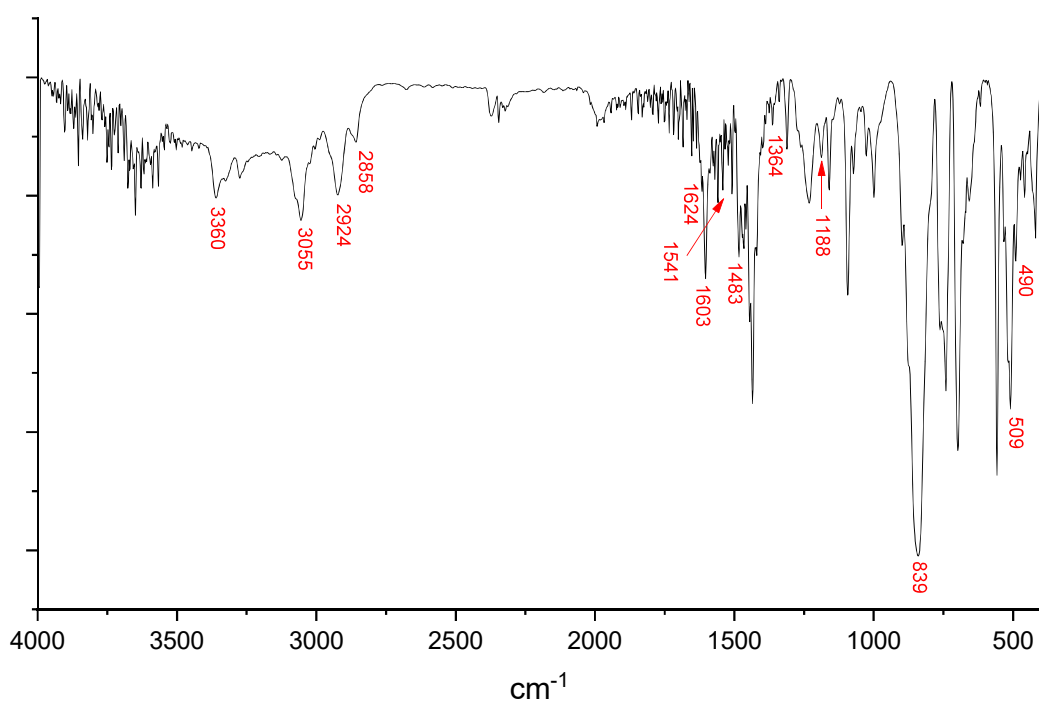
Legenda: verde = 0h; azul = 24h; laranja = 48 h

Figura S14 – Espectro de infravermelho do complexo C3MTNZ 8, em KBr



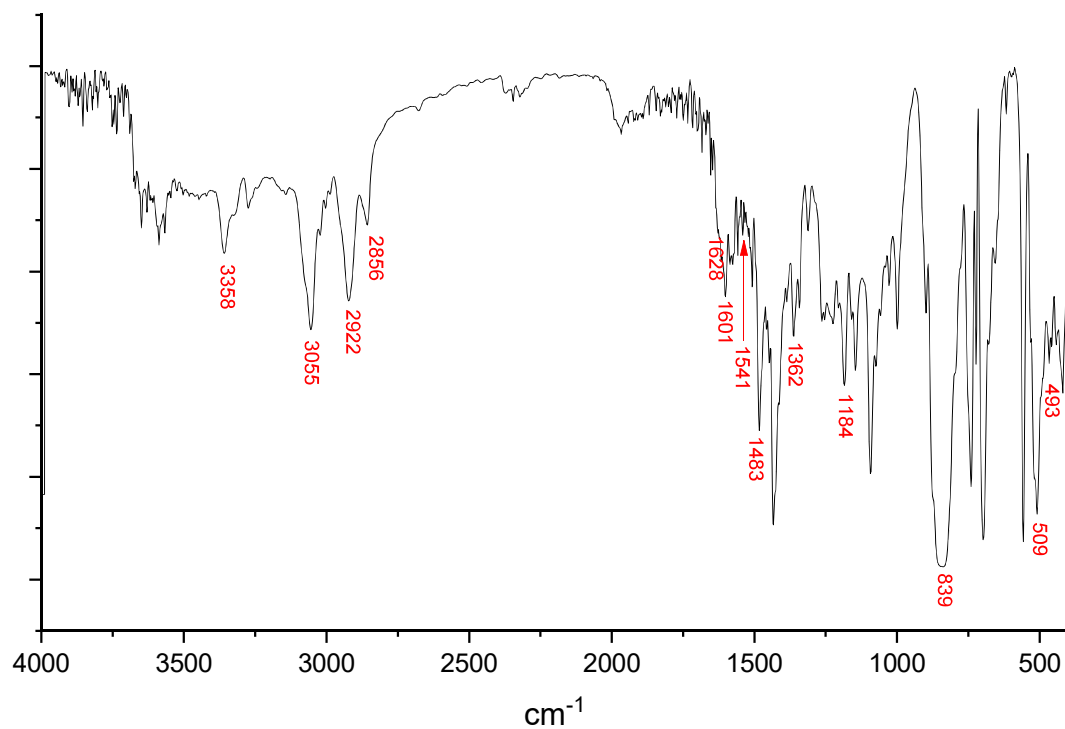
Fonte: do autor

Figura S15 – Espectro de infravermelho do complexo C3MTNZ 9, em KBr

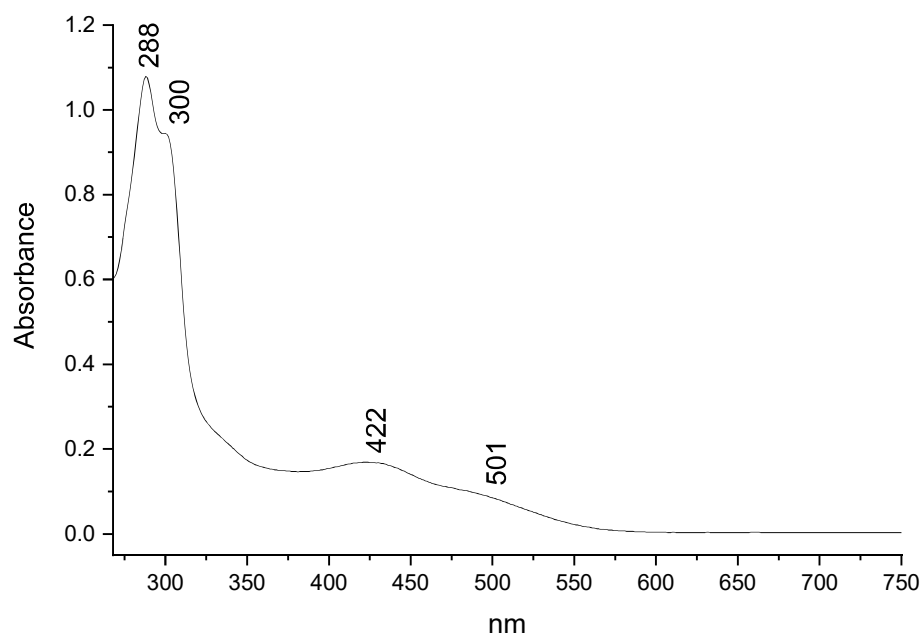


Fonte: do autor

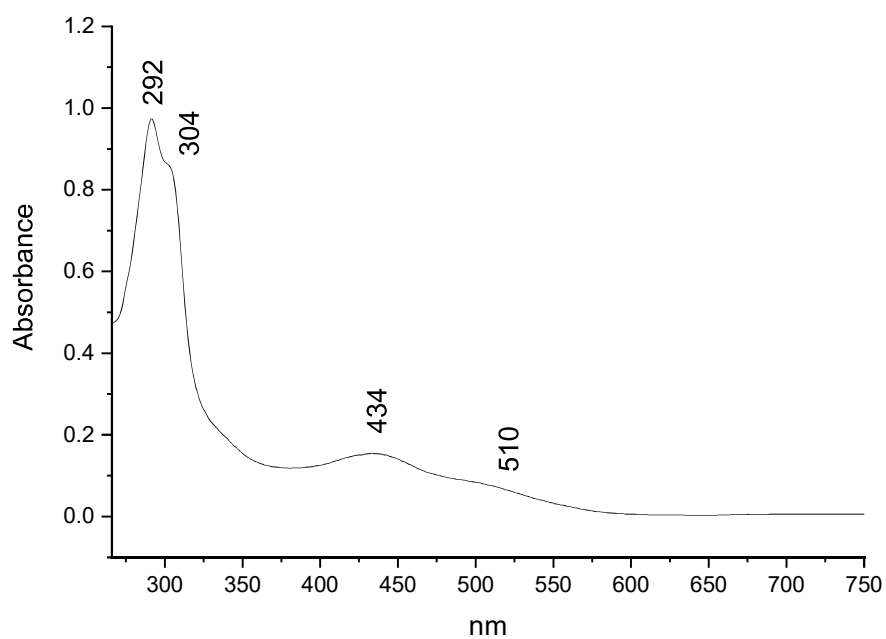
Figura S16 – Espectro de infravermelho do complexo C3MTNZ 10, em KBr



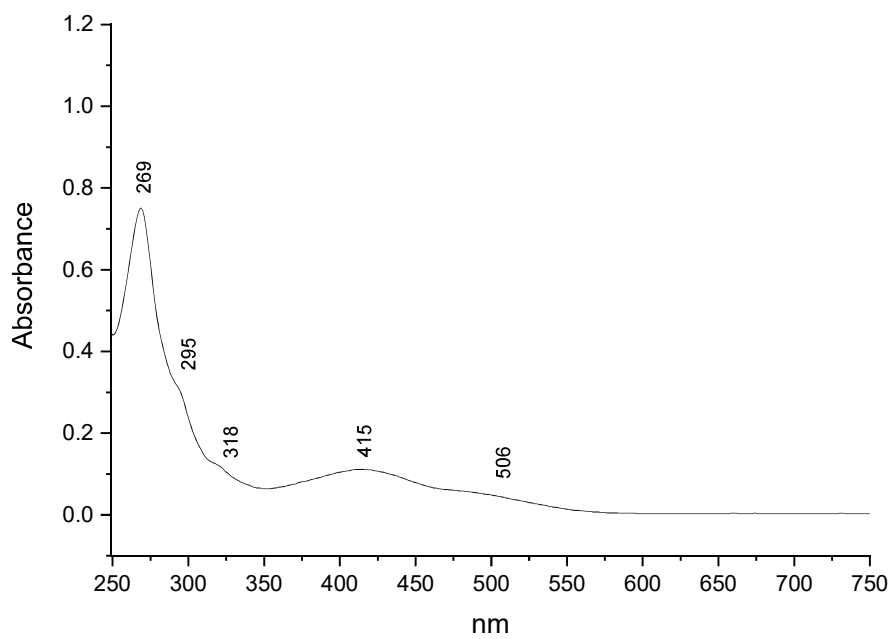
Fonte: do autor

Figura S17 – Espectro de UV-Vis do complexo C3MTNZ 7, em CH_2Cl_2 

Fonte: do autor

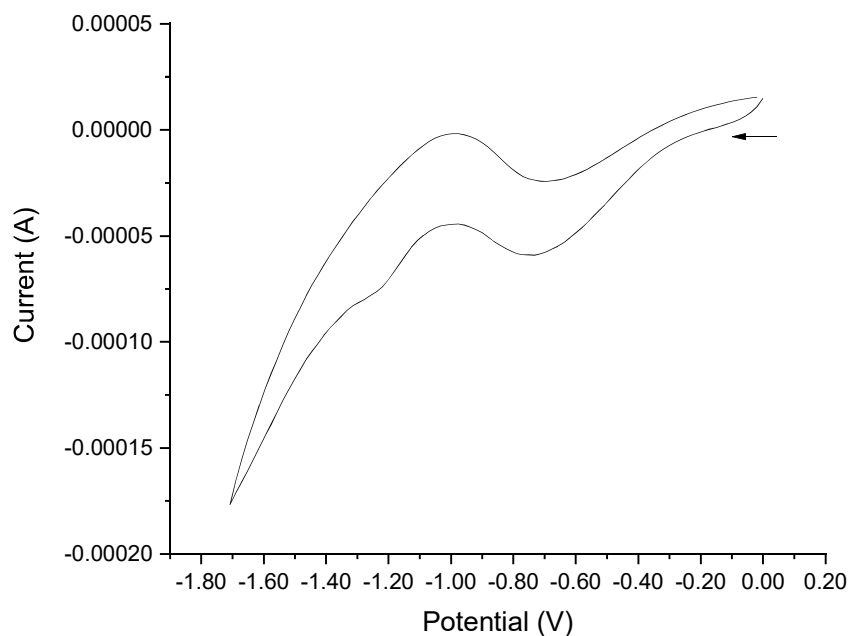
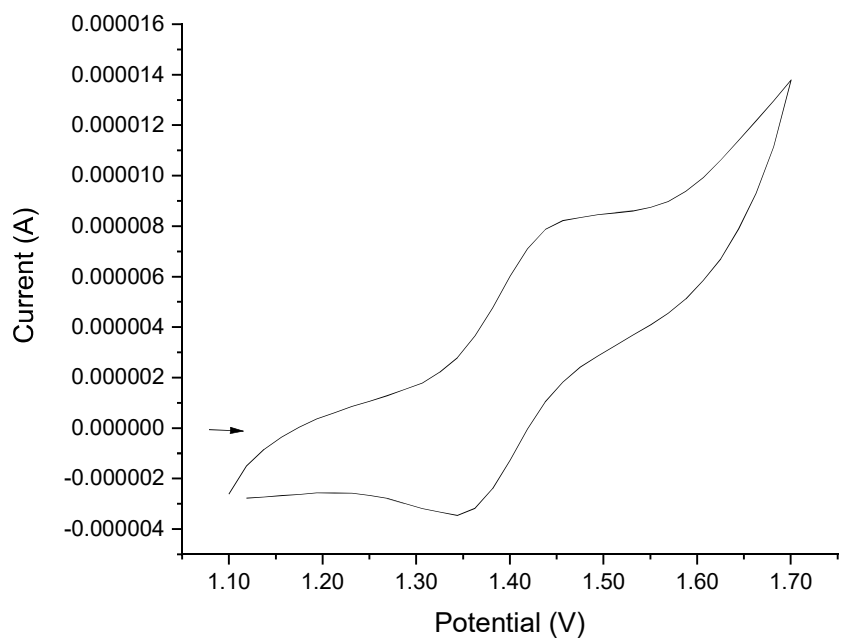
Figura S18 – Espectro de UV-Vis do complexo C3MTNZ 9, em CH₂Cl₂

Fonte: do autor

Figura S19 – Espectro de UV-Vis do complexo C3MTNZ 10, em CH₂Cl₂

Fonte: do autor

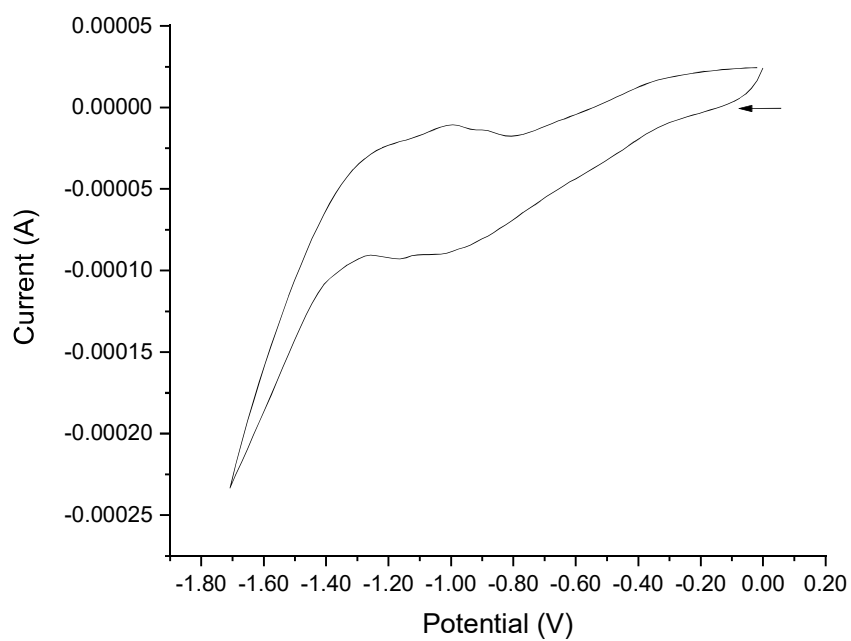
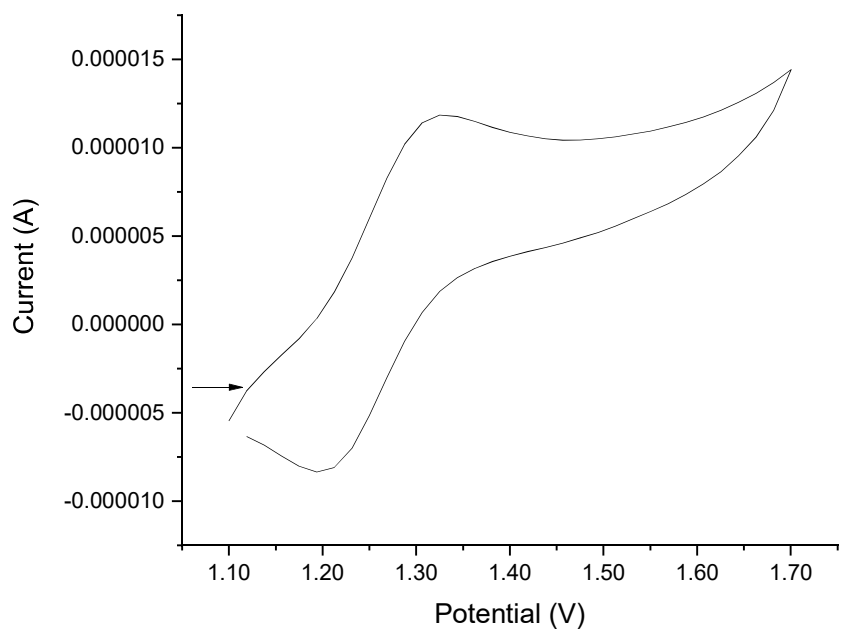
Figura S20 – Voltametria cíclica do complexo C3MTNZ 7; eletrólito PTBA 0,1 mol.L⁻¹ em DMSO vs Ag/AgCl



Fonte: do autor

Legenda: (a) processo quis-reversível do par redox Ru^{II}/Ru^{III}
(b) processo redução do NO₂ do metronidazol

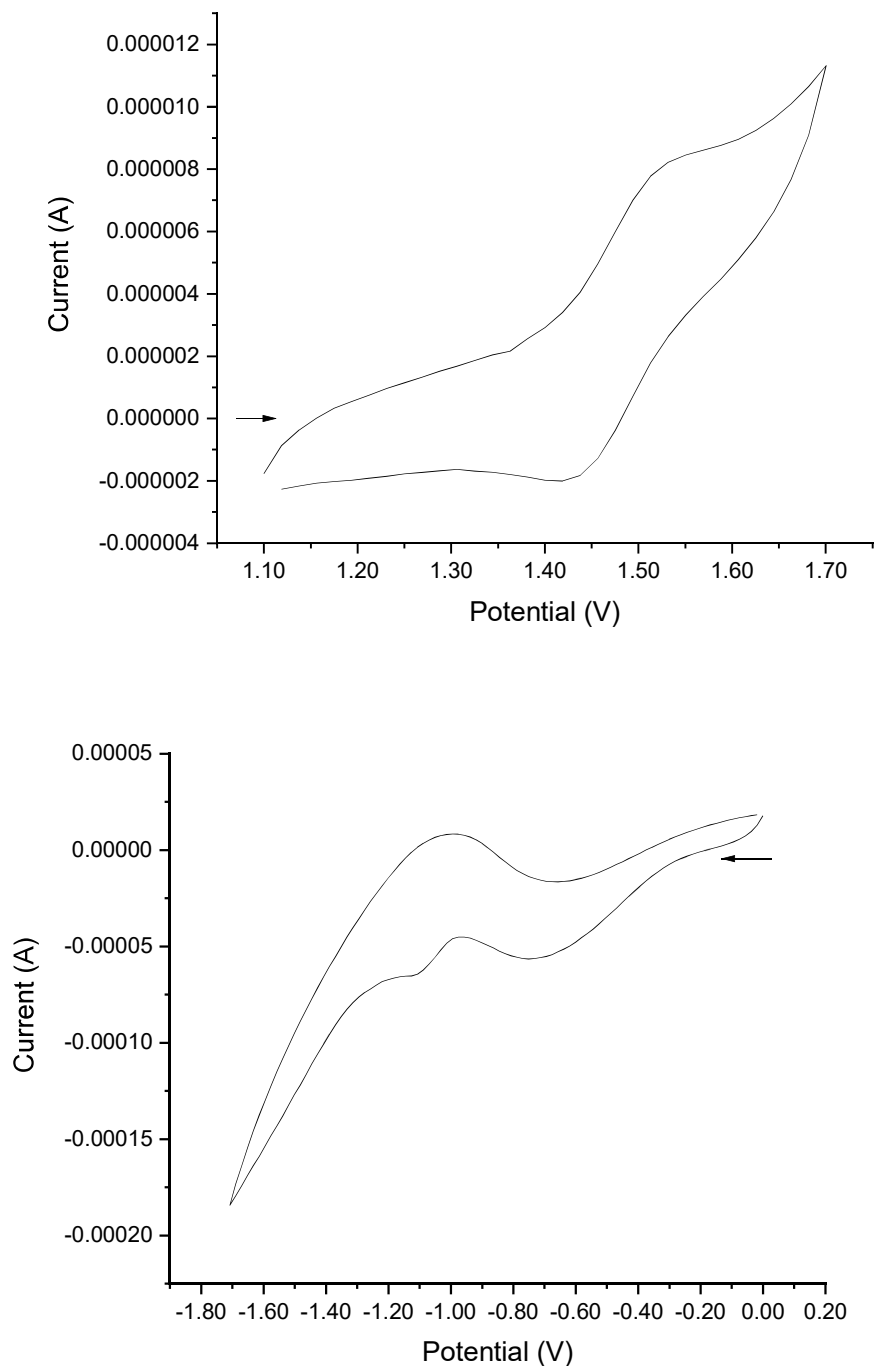
Figura S21 – Voltametria cíclica do complexo C3MTNZ 8; eletrólito PTBA 0,1 mol.L⁻¹ em DMSO vs Ag/AgCl



Fonte: do autor

Legenda: (a) processo quis-reversível do par redox Ru^{II}/Ru^{III}
(b) processo redução do NO₂ do metronidazol

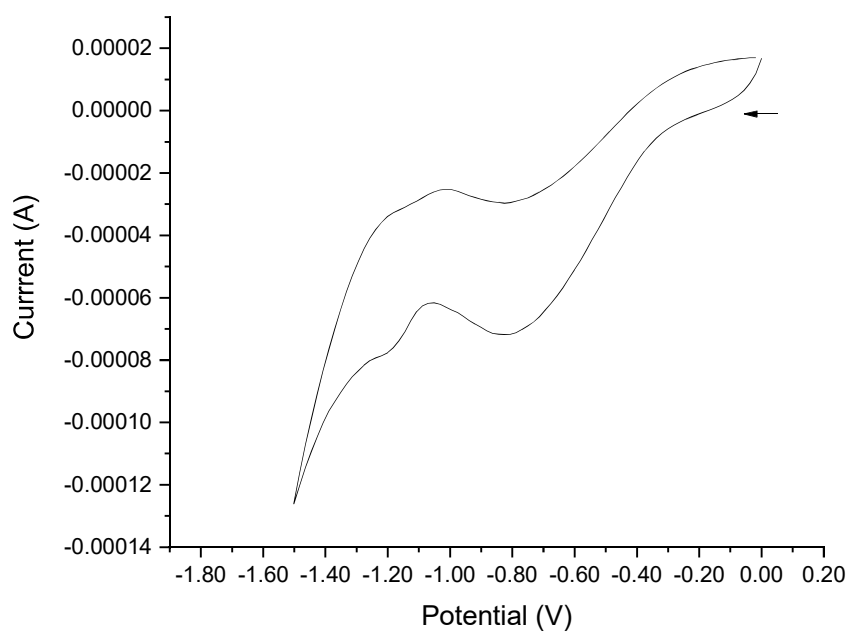
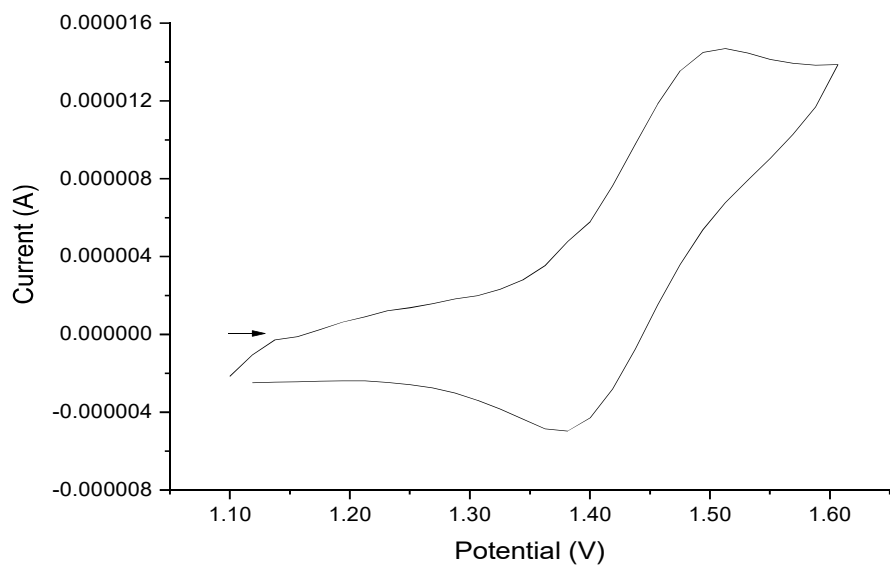
Figura S22 – Voltametria cíclica do complexo C3MTNZ 9; eletrólito PTBA 0,1 mol.L⁻¹ em DMSO vs Ag/AgCl



Fonte: do autor

Legenda: (a) processo quis-reversível do par redox Ru^{II}/Ru^{III}
(b) processo redução do NO₂ do metronidazol

Figura S23 – Voltametria cíclica do complexo C3MTNZ 9; eletrólito PTBA 0,1 mol.L⁻¹ em DMSO vs Ag/AgCl



Fonte: do autor

Legenda: (a) processo quis-reversível do par redox Ru^{II}/Ru^{III}
(b) processo redução do NO₂ do metronidazol

APÊNDICE A – Permissões



RightsLink



Home



Help ▾



Live Chat



Sign in



Create Account

Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases



Author: Chee Wei Ang, Angie M. Jarrad, Matthew A. Cooper, et al

Publication: Journal of Medicinal Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Sep 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 27, 2022

This Agreement between University Federal of Alfebas -- Caio Candido ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	5397090718055
License date	Sep 27, 2022
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Licensed Content Title	Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms
Licensed Content Author	Dingsdag, Simon A; Hunter, Neil
Licensed Content Date	Oct 25, 2017
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO METRONIDAZOL: INVESTIGAÇÃO CITOTÓXICA E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA
Publisher of your work	University Federal of Alfenas
Expected publication date	Oct 2022
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
Total	0.00 USD
Title	NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) CONTENDO METRONIDAZOL: INVESTIGAÇÃO CITOTÓXICA E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O DNA
Institution name	University Federal of Alfenas
Expected presentation date	Oct 2022
Portions	Figure 2
Requestor Location	University Federal of Alfenas Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas, MG 37130-001 Brazil Attn: University Federal of Alfenas
Publisher Tax ID	GB125506730
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being

published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.

6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com

7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.

8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
