### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

#### ANA PAULA SEGANTIN GASPARI GIOVANINI

## Desenho racional de complexos rutênio-nitrosilos contendo ligantes polipiridínicos: estudos da relação estrutura-atividade e ensaios biológicos

Versão corrigida da Tese. O original se encontra disponível na Secretaria do DQ/FFCLRP/USP

> Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Ribeirão Preto - SP 2018

### FICHA CATALOGRÁFICA

Gaspari Giovanini, Ana Paula Segantin

Complexos rutênio-nitrosilos contendo ligantes polipiridínicos: estudos da relação estrutura-atividade e ensaios biológicos. Ribeirão Preto, 2018.

239 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Silva, Roberto Santana da

1. rutênio-nitrosilos. 2. ligantes polipiridínicos. 3. câncer. 4. Atividade tripanocida.



#### Universidade de São Paulo

#### ATA DE DEFESA

Aluno: 59138 - 7537721 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Ana Paula Segantin Gaspari Giovanini no Programa: Química, do(a) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 20 dias do mês de junho de 2018, no(a) Bloco 8 - sala 2 realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Ana Paula Segantin Gaspari Giovanini, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Design de complexos rutênio-nitrosilos contendo ligantes polipiridínicos: estudos da relação estrutura-atividade e ensaios biológicos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Roberto Santana da Silva	Presidente	FCFRP - USP	APROVAJA
Zeki Naal	Titular	FCFRP - USP	APTOVADA
Luiz Alberto Beraldo de Moraes	Titular	FFCLRP - USP	APROMADA
Pedro Ivo da Silva Maia	Titular	UFTM - Externo	APROVADA
Adelino Vieira de Godoy Netto	Suplente	UNESP - Externo	aprovada

Resultado Final: <u>APROVADA</u>

#### Parecer da Comissão Julgadora \*

Eu, Cesar Pereira Brites \_\_\_\_\_\_\_\_\_, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Proto, aos 20 dias do mês de junho de 2018.

Naal

do de Moraes INT

Adelino Godov

Roberto antaha da Silva

Presidente da Corrissão Julgadora \* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o prenentimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em  $\frac{29.06.2018}{6}$  e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Química.

Sian

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profa, Dra. Sonia Regina Pasian Presidente da Comissão de Pós-Graduação

#### AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir a conclusão de mais uma etapa em minha vida, sempre me dando forças para seguir em frente perante as dificuldades.

Aos meus pais, Alceu e Cláudia, pelo grande apoio que deram durante todo meu percurso. Por estarem ao meu lado nos momentos felizes, mas também nos difíceis, me incentivando a lutar por aquilo que sonho.

Ao meu marido, Diego, por todo o seu amor, carinho, atenção, apoio e pelo permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanhou meu trabalho. Não existem palavras o suficiente para expressar meu amor por você e minha alegria por ter te encontrado.

Ao meu orientador, Roberto Santana da Silva, pela confiança no meu trabalho, por me ensinar tanto nestes quatro anos, pela compreensão, pelos sábios conselhos, pelas oportunidades que me deu e por tanto contribuir em benefício do meu crescimento pessoal e profissional. Se hoje em dia me sinto preparada para esta nova etapa da minha vida, com certeza grande parte disso devo a ele.

À minha irmã, Fernanda, por ser a melhor amiga que alguém pode ter, que cresceu comigo, dividiu experiências inigualáveis, e deu a vida à pequena Ana Beatriz, que faz dos meus dias mais alegres e me mostra o quanto o amor é imensurável.

Às minhas avós Belinha (in memorian) e Maria (in memorian), que partiram deste mundo deixando imensa saudade. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me possibilitarem ser quem eu sou.

À Família Scarati (Marlene, Maria de Lourdes e Natasha), a qual hoje em dia tenho a honra de pertencer, por me receber de braços abertos, por sempre me ouvirem com paciência, por compartilhar experiências, pelo amor e carinho e por estarem sempre ao meu lado nas dificuldades.

À Família Giovanini (Ida Adele, Paulo, Paula, Waldete) por todos os momentos felizes que passamos juntos, pelo carinho, gentileza, apoio, amor e momentos inesquecíveis.

À minha querida amiga Nelissa Pacheco Vaz, pela amizade verdadeira, pelas palavras gentis e de consolo nos momentos que mais precisei, por me ouvir com paciência mesmo estando distante, pelo compartilhamento de experiências e por ser como uma irmã para mim.

À Iara Degani e Sandra Bin, pelos preciosos conselhos, auxilio no desenvolvimento do meu trabalho, contribuição para meu crescimento pessoal e profissional.

Às queridas amigas Zumira Carneiro e Carla Lopes, por me ensinarem tudo que sei acerca de experimentos biológicos envolvendo atividade tripanocida (*in vitro* e *in vivo*), pelas discussões experimentais, por permitirem que eu me envolvesse nos trabalhos do grupo, pela consideração, confiança e carinho que tiveram ao me receber no laboratório, por me ouvirem e ajudarem com palavras gentis, sempre me dando forças para continuar. Sem vocês, com certeza o caminho seria mais tortuoso e difícil.

À Profa. Ivone Carvalho, por me receber em seu laboratório e pelas discussões sobre Química Orgânica e mecanismos sintéticos, permitindo que eu desenvolvesse um projeto totalmente novo e aprendesse inúmeros conceitos que para mim eram novos, contribuindo de forma singular para este trabalho.

Ao Prof. Sérgio de Albuquerque, pela confiança em disponibilizar seu laboratório e reagentes para que eu pudesse conduzir os experimentos relacionados à testes biológicos.

Ao Prof. Pedro Ivo, pela confiança em meu trabalho e por proporcionar que eu participasse de projetos que auxiliaram no meu crescimento profissional. Também agradeço às alunas do seu laboratório Alice Borges e Ana Resende pelo empenho e colaboração.

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch por disponibilizar seu laboratório e tempo para auxiliar nos estudos fotoquímicos.

Aos professores Dr Antônio E. da Hora Machado e Dr. André L. B. Formiga, por disponibilizarem tão prontamente seu tempo e realizarem cálculos com tanto esmero e cuidado, proporcionando estudos incríveis para conhecimento dos sistemas apresentados neste trabalho.

Aos Profs. Dr. Elia Tfouni, Dra. Sofia Nikolaou, Dra Rose Naal, Dr. Zeki Naal, Dra. Joana de Jesus Andrade e Dr. Gilberto Ubida, pelos ensinamentos proporcionados desde o momento que cheguei em Ribeirão Preto até o presente momento, por acreditarem no meu trabalho e permitirem tantas oportunidades de intercâmbio de conhecimento.

Aos amigos do laboratório que estiveram comigo durante meu percurso nestes quatro anos de doutorado: Alexia Marques, Ana Cláudia Bordonal, Bruna Possato, Cassia Dias, Felipe Reis, Fernando Postalli, Jacqueline Alves, Jorge Nasser, Julia Oliveira, Juliana Uzuelly, Kelly Castro, Laena Pernomean, Laísa Negri, Leandro Máximo, Loyanne Ramos, Lilian Franco, Lucimara Ferreira, Mayara Luma, Miqueias Gomes, Mariete Moreira, Natacha Cacita, Natalia Levin, Pamela Gomes, Tassia Jói, Rafaella Rios e Renata da Silveira. Obrigada pelas discussões produtivas, companheirismo e por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e agradável.

Aos técnicos de laboratório Juliana, Júnior, Cristiana, Jorge e Marcelo, que sempre estiveram dispostos a ajudar no que precisasse para os objetivos serem alcançados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro.

A todos que participaram e contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho, que me incentivaram e torceram pela vitória, meus sinceros agradecimentos.

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazeres se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade".

(Paulo Freire)

#### **RESUMO**

Gaspari Giovanini, Ana P. S. **Design de complexos rutênio-nitrosilos contendo ligantes polipiridínicos: estudos da relação estrutura-atividade e ensaios biológicos.** 2018, 239 f. Tese (Doutorado em Ciências. Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

O comportamento do óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos vem sendo explorado desde a descoberta de sua importância em processos regulatórios, fisiológicos e em patologias. Atualmente há o grande interesse no desenvolvimento de compostos que possam liberar o NO de forma controlada em locais específicos nas células. Neste contexto, os complexos rutênionitrosilos têm se mostrado bastante promissores, visto que podem liberar NO no interior celular por processos redutimétricos, viabilizando sua utilização como agentes antitumorais e/ou tripanocida. Este estudo se baseia na premissa de que a liberação de NO pode ser direcionada para o interior celular através da modulação dos ligantes de forma a obter complexos biocompatíveis. Assim, o presente trabalho visou o delineamento de complexos rutênionitrosilos inéditos contendo ligantes polipiridínicos e/ou derivados de aminoácidos e, condução de experimentos a nível biológico. Os novos complexos rutênio-nitrosilos contendo os ligantes 3-etinilpiridina (3-etpy), derivado triazol de lisina e derivado imínico de triptofano foram sintetizados e purificados com êxito. Os ligantes foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN, HSQC e <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, espectrometria de massas e espectroscopia no infravermelho. Os complexos foram caracterizados por espectroscopia na região do UV-visível e FTIR, análise elementar, voltametria cíclica e espectrometria de massas. Os complexos foram testados frente a linhagens celulares B16-F10, MCF-7, MDA-MB231 e comparados com os testes em células de mama sadia MCF-10A. Além disso, os complexos foram aplicados a formas amastigotas de Trypanosoma cruzi. Os resultados de viabilidade celular mostraram que os complexos contendo derivado triazol de lisina ocasionam citotoxicidade às células MCF-7, MB-231 e B16-F10. O complexo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O (onde bpy = 2,2'-bipiridina) apresentou excelente resultado nos testes in vitro e in vivo frente a cepa Tulahuén LacZ e modelo murino, quando da sua associação ao benzonidazol. Os resultados obtidos sugerem possíveis relações existentes entre estrutura-atividade, abrindo novos caminhos para a pesquisa na busca pelo entendimento deste sistema, assim como o desenvolvimento de uma nova classe de compostos.

**Palavras-chave:** rutênio-nitrosilos, ligantes polipiridínicos, aminoácidos, câncer, *Trypanosoma cruzi* 

#### ABSTRACT

Gaspari Giovanini, Ana P. S. **Design of ruthenium-nitrosyl complexes containing polypyridines: studies of the structure-activity relationship and biological assays.** 2018, 239 f. Thesis (Doctorate in Sciences. Area: Chemistry – at Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP. 2018.

The behavior of nitric oxide (NO) in biological systems has been explored since the discovery of its importance in regulatory, physiological, and pathological processes. Currently, there is a great interest in the development of compounds that can release NO at specific sites inside cells in a controlled manner. In this context, the ruthenium-nitrosyl complexes have shown to be very promising, since they can release NO inside cells by reduction processes, turning possible its aplications as antitumor and/or trypanocides agents. This study is based on the premise that the release of NO can be directed to inside cells by modulating the ligands in order to obtain biocompatible complexes. In this way, the present work aimed at the design of new rutheniumnitrosyl complexes containing polypyridine ligands and/or amino acid derivatives, and tests of biological activity. The new ruthenium-nitrosyl complexes containing 3-ethynylpyridine, triazole lysine derivative, and tryptophan imino derivative were synthesized and purified successfully. Ligands were characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, HSQC, and COSY, mass spectrometry and infrared spectroscopy. The complexes were characterized by spectroscopy in the UV-visible region and FTIR, elemental analysis, cyclic voltammetry, and mass spectrometry. The complexes were tested against cell lines B16-F10, MCF-7, MDA-MB231 and the normal breast cell model MCF-10A. In addition, the complexes were tested against amastigote forms of Trypanosoma cruzi. Cell viability results showed that triazole derivativelysine complexes cause cytotoxicity to MCF-7, MB-231, and B16-F10 cells. The cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O (where bpy = 2,2'-bipyridine) complex presented excellent results in vitro and in vivo tests against the Tulahuén LacZ strain and the murine model, respectively, when it was associated with benzonidazole. The results suggest possible relationships between structure and activity, opening new prospectives in the search for understanding this system, as well as the development of a new class of compounds.

Keywords: ruthenium-nitrosyls, polypyridines, amino acids, Trypanosoma cruzi

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do Salvarsan.	33
Figura 2. Adutos Pt-DNA formados a partir da ligação da cisplatina	37
Figura 3. Estruturas moleculares dos complexos de platina(II)	39
Figura 4. Estrutura molecular do complexo trinuclear de platina BBR3463	40
Figura 5. Estrutura dos complexos [imH][ <i>trans</i> -RuCl <sub>4</sub> (dmso)(im)]	,
[indH][trans-RuCl <sub>4</sub> (ind) <sub>2</sub> ] e Na[trans-RuCl <sub>4</sub> (ind) <sub>2</sub> ], em que im = imidazol e ind =	:
indazol	43
<b>Figura 6.</b> Estrutura dos complexos $\Lambda$ -[Ru(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> e $\Delta$ -[Ru(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	46
Figura 7. Representações das estruturas dos isômeros mais comuns dos complexos	
[RuCl <sub>2</sub> (azpy)]	47
Figura 8. Diagrama de orbitais moleculares do monóxido de nitrogênio	49
Figura 9. Reação realizada pela NOS. Produção de monóxido de nitrogênio e La	
citrulina a partir de L-arginina	50
Figura 10. Correlação entre concentração de óxido nítrico em tumores e mecanismos	
biológicos de morte e proliferação celular	51
Figura 11. Exemplos de compostos doadores de NO	54
<b>Figura 12.</b> Voltamograma cíclico de uma solução de ferroceno 1,2 x $10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> em	L
acetonitrila. Eletrólito suporte TBAH 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Eletrodo de trabalho e auxiliar de	;
platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl	74
Figura 13. Esquema da célula espectroeletroquímica	75
Figura 14. Esquema dos equipamentos utilizados nos ensaios fotoquímicos	77
Figura 15. Fotos obtidas através de microscópio óptico para as células MCF-7 para	L
verificação de confluência	81
Figura 16. Representação da reação de redução do MTT a formazan por enzimas	1
mitocondriais	82
Figura 17. Representação da ligação do íon metálico Ru <sup>2+</sup> e um ligante 2,2'	
bpiridina	89
Figura 18. Rota sintética para obtenção dos complexos rutênio-nitrosilos	89
Figura 19. Espectro FTIR do complexo cis-[Ru Cl2(bpy)2] obtido em pastilha de	;
KBr	92
Figura 20. Modos de coordenação do NO a metais de transição	. 92

Figura 21. Esquema dos orbitais moleculares envolvidos na ligação de um metal com	
o ligante nitrosil	93
Figura 22. Espectro FTIR do complexo AR2 obtido em pastilhas de KBr	94
Figura 23. Esquema das possíveis transições para os complexos de rutênio	95
<b>Figura 24.</b> Espectros na região do Uv-visível dos complexos AR1 (67,0 µmol L <sup>-1</sup> ) em	
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> e AR2 (67,0 μmol L <sup>-1</sup> ) em água	97
Figura 25. Retas de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade	
molar do complexo AR1	97
Figura 26. Retas de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade	
molar do complexo AR2	98
Figura 27. Espectros de absorção eletrônica dos complexos AR1 e AR2 em diferentes	
pHs	99
Figura 28. Sigmóide obtida a partir da variação do pH em função da concentração do	
complexo AR1	100
Figura 29. Reta obtida com os valores de absorbância para os complexos AR1 e AR2	
em pH≅4,2	101
<b>Figura 30.</b> Voltamograma cíclico do complexo AR2 (1,10 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) obtido em	
acetonitrila e eletrólito suporte TBAH 0,10 mol L <sup>-1</sup> . Potencial de reversão: -1,20 V	
versus $Fc^+/Fc^0 e v = 100 mVs^{-1}$	103
Figura 31.Voltamograma cíclico do complexo AR2 (1,10 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) em	
acetonitrila. Eletrólito suporte TBAH 0,10 mol L <sup>-1</sup> . Potencial de reversão: 0,00 V	
versus Fc <sup>+</sup> /Fc <sup>0</sup>	104
Figura 32. Gráfico de $I_{pc}$ ou $I_{pa}$ versus $v^{1/2}$ do complexo AR2 em acetonitrila.	
Coeficiente de correlação da reta Ipa = 0,99617 e Ipc = 0,99353	106
<b>Figura 33.</b> Voltamograma cíclico do complexo AR2 (1,10 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) obtido em	
tampão HTFA/NaTFA pH~2,5. Potencial de reversão: -0,50 V versus Ag/AgCl; v =	
100, 200, 300 e 400 mV s <sup>-1</sup>	108
Figura 34. Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (1,00 x 10 <sup>-6</sup> mol	
L <sup>-1</sup> ), em solução HTFA/NaTFA pH ~2,5, obtidos durante a eletrólise a potencial	
controlado em -0,100 V vs Ag/AgCl, durante 30 minutos	109
Figura 35. Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (1,00 x 10 <sup>-6</sup> mol	
L <sup>-1</sup> ), em solução HTFA/NaTFA pH ~2,5, obtidos durante a eletrólise a potencial	
controlado em -0,45 V vs Ag/AgCl, durante 60 minutos	111

Figura 36. Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (1,00 x 10 <sup>-6</sup> mol	
L <sup>-1</sup> ), em solução HTFA/NaTFA pH ~2,5, obtidos durante a eletrólise a potencial	
controlado em -0,10 V vs Ag/AgCl, durante 60 minutos	111
Figura 37. Mecanismo de oxirredução eletroquímica para o complexo AR2	112
Figura 38. Estruturas envolvidas no cálculo de pka dos ligantes py e 3-etpy	113
Figura 39. Gráfico obtido a partir do pH versus absorbância em 260 nm para o ligante	
piridina	113
Figura 40. Gráfico obtido a partir do pH versus absorbância em 278 nm para o ligante	
3-etinilpiridina	114
Figura 41. Mecanismo da reação fotoquímica do complexo	
<i>cis</i> -[Ru <sup>II</sup> (bpy) <sub>2</sub> (py)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O ao ser irradiado em 350 nm	115
Figura 42. Espectros na região do Uv-visível para o complexo	
cis-[Ru <sup>II</sup> (bpy) <sub>2</sub> (py)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O (solução tampão pH = 2,5) ao ser irradiado em	
350 nm durante 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos	116
Figura 43. Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (solução tampão	
pH = 2,5) ao ser irradiado em 350 nm durante 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos	117
<b>Figura 44.</b> Estrutura do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)] <sup>3+</sup>	118
Figura 45. Exemplos de complexos de fórmula geral <i>mer</i> (Cl)-[Ru(NO)Cl <sub>3</sub> (AA)]	120
<b>Figura 46.</b> Exemplos de complexos organometálicos de rutênio de fórmula geral [ $(\eta^6$ -	
$p$ -cimeno)Ru(AA)] <sup>+</sup> e [( $\eta^6$ - $p$ -cimeno)Ru(AA)(OH <sub>2</sub> )] <sup>+</sup>	121
Figura 47. Exemplos de complexos organometálicos de rutênio de fórmula geral	
<i>cis</i> -[Ru(AA)(bpy)(dppb)] <sup>+</sup>	122
Figura 48. Quantidade de artigos publicados na área de complexos Ru-AA para fins	
farmacológicos	123
<b>Figura 49.</b> Reação de obtenção do complexo de [RuCl <sub>2</sub> (mac)] em que mac = ligante	
macrociclo tetradentado (Base de Schiff)	126
Figura 50. Mecanismo da reação de diazotransferência	128
Figura 51. Mecanismo reação de acoplamento azida-alcino catalisada por Cu(I)	130
Figura 52. Interação de um metálico com um alcino. A) Ligação $\sigma$ e B) Retrodoação	
$d_{\pi}(Metal) \rightarrow \pi^*$ do alcino	130
Figura 53. Três passos de síntese para obtenção do ligante derivado de aminoácido	
(pyLys)	131

Figura 54. Esquema da síntese entre 4-pyCHO e Trp para obtenção do composto	
pyTrp	132
Figura 55. Mecanismo da reação de síntese da Base de Schiff em solução etanólica e	
КОН	133
Figura 56. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o ligante pyLys em solvente deuterado	
(MeOD)	135
Figura 57. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de A) <sup>13</sup> C e B) DEPT 135	135
Figura 58. Estrutura ilustrativa do ligante pyLys com as respectivas enumerações	
utilizadas na atribuição dos espectros de <sup>13</sup> C RMN	136
Figura 59. Espectros correlacionais 2D HSQC <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H para o ligante pyLys obtidos em	
solvente deuterado (MeOD). Expansões das regiões A) alifática e B) aromática. Eixo	
das ordenadas: RMN de <sup>13</sup> C. Eixo das abcissas: RMN de <sup>1</sup> H	137
Figura 60. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o ligante pyTrp em solvente deuterado	
(DMSO)	139
Figura 61. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear para o ligante pyTrp em	
solvente deuterado (MeOD) A) DEPT 135 e B) $^{13}$ C	140
<b>Figura 62</b> . Espectro HSQC <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H para o ligante pyTrp obtido em solvente deuterado	
(DMSO)	141
<b>Figura 63</b> . Espectro COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H para o ligante pyTrp obtido em solvente deuterado	
(DMSO)	142
Figura 64. Espectro de massas (ESI) do composto pyLys obtido em modo negativo	145
Figura 65. Espectro de massas ESI do composto pyTrp obtido em modo negativo	147
Figura 66. Espectro na região do infravermelho do L-triptofano obtido em pastilhas de	
KBr	149
Figura 67. Espectro na região do infravermelho do precursor 4-pyCHO obtido em	
janela de KBr	151
Figura 68. Espectro na região do infravermelho do ligante pyTrp obtido em pastilhas	
de KBr	152
Figura 69. Espectro na região do infravermelho obtido para o ligante pyTrp após ser	
submetido à solução aquosa	153
<b>Figura 70.</b> Esquema da síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (pyLys)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> através	
da Rota A	154

Figura 71. Esquema da síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (pyLys)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> através	
da Rota B	155
<b>Figura 72.</b> Esquema da síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (pyTrp)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	156
Figura 73. Espectro de massas MALDI-MS/MS do íon $\{Ru^{II}(pyLysO^{-})(bpy)_{2}\}^{+}$	159
Figura 74. Espectro de massas MALDI-MS/MS do íon	
${[Ru^{II}(NO_2)(pyLysO^{})(bpy)_2]Na}^+$	160
Figura 75. Espectros de absorção eletrônica na região do Uv-visível para os complexos	
rutênio-pyLys. RuLysNO em HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> e RuLysNO <sub>2</sub> em meio aquoso	161
Figura 76. Espectros de absorção eletrônica na região do Uv-visível para os complexos	
rutênio-pyTrp. RuTrpNO em HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> e RuTrpNO <sub>2</sub> em meio aquoso	161
Figura 77. Espectros de absorção eletrônica na região do Uv-visível para o ligante	
pyTrp	162
Figura 78. Primeira derivada do espectro de absorção eletrônica na região do Uv-	
visível para o ligante pyTrp em meio aquoso	163
Figura 79. Espectro FTIR do complexo RupyLysNO em pastilha de KBr	164
Figura 80. Espectro FTIR do complexo RupyTrpNO em pastilha de KBr	164
Figura 81. Resumo da síntese do complexo RuTrpNO	166
Figura 82. Espectro de massas para o íon {RuCl <sub>3</sub> (triptofano)(NO)} <sup>-</sup>	167
Figura 83. Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo	
[N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ](RuCl <sub>3</sub> (NO)(Trp)] obtido em pastilhas de KBr	168
<b>Figura 84.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H para o complexo [N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ](RuCl <sub>3</sub> (NO)(Trp)]	
obtido em dmso deuterado	169
<b>Figura 85.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C para o complexo [N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ](RuCl <sub>3</sub> (NO)(Trp)]	
obtido em dmso deuterado	169
<b>Figura 86.</b> Espectro de EPR obtido para o complexo [N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ](RuCl <sub>3</sub> (NO)(Trp)]	
em fase sólida	170
Figura 87. Equilíbrio entre as estruturas possíveis do complexo	
[N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ](RuCl <sub>3</sub> (NO)(Trp)]	171
Figura 88. Estrutura do complexo [N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ](RuCl <sub>3</sub> (NO)(Trp)] prevista por	
cálculos DFT	172
Figura 89. Placa de Elisa	173
Figura 90. Células cancerígenas	174
Figura 91. Esquema da formação de metástases	175

Figura 92. Taxas de incidência de câncer estimadas em 2016 no Brasil	176
Figura 93. Curva dose-resposta para a citotoxicidade dos complexos 1, 2, 3 e 4 em	
células MCF-7	178
Figura 94. Curva dose-resposta para a citotoxicidade dos complexos 1, 2, 3 e 4 em	
células MCF- 10	178
Figura 95. Curva dose-resposta para a citotoxicidade dos complexos 1, 2, 3 e 4 em	
células MDA-MB231	179
Figura 96. Cronoamperograma obtido para o complexo	
cis-[Ru(NO)(pyLys)(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> na concentração de 0,010 mol L <sup>-1</sup> a partir da adição	
de 0,20 mL de solução de ácido ascórbico 0,10 mol $L^{-1}$ . Tampão fosfato pH ~7,4	180
Figura 97. Fotomicrografias de ensaio de lesão representativa para avaliação da	
proliferação celular em células B16-F10 após tratamento com complexos de rutênio	
AR1, AR2, AR3 e AR4 (24 horas de incubação; 50 µmol. L-1). Linhas tracejadas	
apresentam proliferação da condição de controle. Barras apresentam um tamanho.	
Controle representa a mesma condição experimental sem a aplicação dos complexos	182
Figura 98. Proliferação celular ocasionada pelos complexos AR1, AR2, AR3 e AR4	
aplicados a células B16-F10	183
Figura 99. Curva dose-resposta para a citotoxicidade do composto NONOate em	
células MCF-7, MDA-MB231 e MCF-10A	184
Figura 100. Gráfico dose-resposta para a aplicação do complexo AR2 frente a formas	
amastigotas de T. cruzi	188
Figura 101. Curvas dose-resposta para a aplicação do complexo AR2 frente a formas	
amastigotas de T. cruzi	189
Figura 102. Curvas de dose-resposta para a associação complexo + benzonidazol ou	
ligante + benzonidazol proposta neste trabalho	190
Figura 103. Gráfico dose-resposta para a associação complexo AR2 + benzonidazol	
(associação)	191
Figura 104. Número de parasitos contados a partir do sangue de camundongos em	
função dos dias de tratamento. Dose BZN = 10mg/Kg. Doze Associação AR2+BZN =	
5+5  mg/Kg. Dose $AR2 = 10  mg/Kg$	192

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de complexos rutênio-nitrosilos liberadores de NO e respectivas	
referências	55
Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados nas sínteses realizadas neste trabalho	63
Tabela 3. Dados obtidos experimentalmente (triplicatas) e calculados para a análise	
elementar do complexo AR1	91
<b>Tabela 4.</b> Tentativa de atribuição para os complexos AR1 e AR2 com base nas atribuições	
para o complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	94
Tabela 5. Coeficientes de absortividade (E) molar obtidos a partir de espectros na região	
do Uv-visível em meio aquoso para o complexo AR1 e HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> para o complexo	
AR2	98
<b>Tabela 6.</b> Valores de constante de equilíbrio para complexos do tipo $cis$ -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (L)] <sup>3+</sup>	101
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros eletroquímicos obtidos para o complexo AR2 (1,10 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> )	
em acetonitrila	105
Tabela 8. Dados eletroquímicos para o complexo AR2	108
Tabela 9. Principais valores de distâncias (Å) e ângulos (°) para o complexo AR2	118
<b>Tabela 10.</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e respectivas atribuições para o espectro de RMN	
de <sup>1</sup> H do ligante pyLys	138
Tabela 11. Tentativas de atribuição para os picos encontrados nos espectros de RMN de	
HSQC e COSY para ligante pyTrp	143
<b>Tabela 12.</b> Tentativa de atribuição para os picos de $m/z$ (calculado e experimental) para	
o composto pyLys	146
<b>Tabela 13.</b> Tentativa de atribuição para os picos de $m/z$ (calculado e experimental) para	
o composto pyTrp	148
<b>Tabela 14.</b> Atribuições das bandas do espectro FTIR $(450 - 4500 \text{ cm}^{-1})$ para o aminoácido	
L-triptofano	150
<b>Tabela 15.</b> Atribuições das bandas do espectro FTIR (450 – 4500 cm <sup>-1</sup> ) para o composto	
4-piridinacarboxaldeído	151
Tabela 16. Dados teóricos e experimentais de análise elementar para os complexos	
RupyLysNO e RupyTrpNO	157

<b>Tabela 17.</b> Tentativa de atribuição das bandas dos espectros de FTIR obtidos em pastilhas	
de KBr	165
Tabela 18. Atribuições das bandas do espectro de infravermelho do complexo	
$[N(CH_2CH_3)_4](RuCl_3(NO)(Trp)]^{-}$	168
Tabela 19. Valores de distâncias (Å) e ângulos de ligação (°) para a estrutura	
[(RuCl3(NO)(Trp)] <sup>-</sup>	171
<b>Tabela 20.</b> Atividade citotóxica de complexos de rutênio frente a células tumorais	179
Tabela 21. Valores obtidos a partir das curvas de dose-resposta para a associação	
complexo + benzonidazol ou ligante + benzonidazol	190

#### LISTA DE ABREVIATURAS

3-etpy	3-etinilpiridina
4-асру	4-acetilpiridina
4-pic	4-picolina
4-руСНО	4-piridinacarboxaldeído
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AA	Aminoácido
AR1	cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O
AR2	cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)](PF <sub>6</sub> ).2H <sub>2</sub> O
azpy	2-fenilazopiridina
BH4	Tetrahidrobiopterina
Вру	2,2'-bipiridina
BZN	Benzonidazol
cbdca-O'O	Ciclobutano-1,1-dicarboxilato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL	Transições de Campo Ligante
COSY	Espectroscopia Correlacional Homonuclear
CuAAC	Cicloadição Azida-alcino Catalisada por Cobre
DC	Doença de Chagas
DEPT	Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dppb	difenilfosfinabutano
EDTA	Etilenodiaminotetraacetato
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
ESI	Ionização por Spray Eletrostático
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
Fc	Ferroceno
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos

FMN	Flavina Mononucleotídeo
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
Gly	Glicina
HIF-1	Fator 1 Humano Induzível por Hipóxia
HMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações
номо	Orbital Molecular Ocupado de Alta Energia
HSQC	Espectroscopia Heteronuclear a uma Ligação de Distância (Simples
	Quantum)
HTFA/NaTFA	Solução Tampão de Ácido Trifluoracético/Trifluoracetato de Sódio
IC50	50% de Inibição
ICR	[imH][trans-RuCl <sub>4</sub> (im) <sub>2</sub> ]
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IL	Transições Internas do Ligante
im	Imidazol
in	Indazol
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
iNOS	Óxido Nitrico Sintase Induzível
KP1019	[indH][trans-RuCl <sub>4</sub> (ind) <sub>2</sub> ]
KP1339	Na[trans-RuCl4(ind)2]
Kyn	Quinurenina
L-Met	Metionina
LUMO	Orbital Molecular Ocupado de Baixa Energia
Lys	Lisina
MALDI	Adsorção Assistida por Matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NAMI-A	(ImH)[trans-RuCl4(DMSO)(im)]
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Monóxido de Nitrogênio
NONOate	Dietilamônio(Z)-1-(N,N-dietilamino)diazen-1-ium-1,2-diolato
NP	Nitroprussiato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS/OMS	Organização Pan Americana de Saúde/ Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)

phen	1,10-fenantrolina
ррт	Partes por Milhão
ру	Piridina
pyTrp	Ácido 2-(aminometil-4-piridinil)-3-(1H-indol-3-il)propanóico
REN	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
SI	Índice de Seletividade
ТВАН	Hexafluorfosfato de Tetrabultiamônio
TCML	Transferência de Carga do Metal para o Ligante
terpy	2,2':6'2"-terpiridina
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
TODO	Triptofano-2,3-dioxigenase
TPH-1	Triptofano Hidroxilase-1
Тгр	L-triptofano
UV-vis	Ultravioleta-visível
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
WHA	Ensaio do Reparo da Lesão

#### LISTA DE ESTRUTURAS





 $\textit{cis-}[Ru(NO_2)(bpy)_2(3\text{-}etpy)](PF_6).2H_2O$ 

AR1

cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>2+</sup>

AR2





cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(pyLys)]

AR3

*cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(pyLys)]<sup>3+</sup>

AR4



cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(pyTrp)]<sup>+</sup>

*cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(pyTrp)]<sup>3+</sup>

Clum, NO Clu

[RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup>

1.       INTRODUC, AO       29         2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA       32         2.1. Química Inorgânica Medicinal       32         2.1.1. Complexos de metais de transição e aplicações biológicas       34         2.1.1.1. Complexos de metais de transição e aplicações biológicas       34         2.1.1.1. Complexos de rutênio       41         2.2. Monóxido de Nitrogênio (NO)       48         2.3. Complexos rutênio-nitrosilos       52         3. HIPÓTESE       57         4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.3.1 Síntese dos complexos.       68         6.3.2 Síntese dos complexos.       68         6.3.3 Síntese dos complexos.       68         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO2)(bpy)2](L)[PF6.2H2O (L = py ou 3-etpy))       69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO2)(bpy)2].] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.9 Síntese dos Naglexo de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy)2].] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.9 Síntese do Nag[RuClsNO].6H2O       71         6.3.9 Síntese do Nag[RuClsNO].6H2O       71		20
2. REVISAO BIDLOGRAFICA322.1 Química Inorgânica Medicinal322.1.1 Complexos de metais de transição e aplicações biológicas342.1.1.1 Complexos de platina342.1.1.2 Complexos de tutênio412.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)482.3 Complexos rutênio-nitrosilos523. HIPÓTESE574. JUSTIFICATIVA585. OBJETIVOS615. OBJETIVOS616. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL636.1 Reagentes e Solventes636.2 Síntese dos ligantes656.3 Síntese dos complexos686.3.1 Síntese dos complexos686.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ]/H <sub>2</sub> O686.3.3 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](L)]PF6.2H <sub>2</sub> O (L = pyou 3-etpy)	1. INTRODUÇÃO	29
2.1 Quintica inorganica vientenial.       32         2.1.1 Complexos de metais de transição e aplicações biológicas       34         2.1.1.1 Complexos de platina       34         2.1.1.2 Complexos de rutênio       41         2.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)       48         2.3 Complexos rutênio-nitrosilos       52         3. HIPÓTESE       57         4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         5.1 Objetivos específicos       61         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese do cis-[RuCl2(bpy)2].H2O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy)2].H2O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy)2].H2O       68         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy)2(L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.4 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy)2)]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O)(bpy)2]]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(by)2L] <sup>31</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.9 Síntese do Na2[RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       73	2. REVISAO BIBLIOGRAFICA	32
2.1.1 Complexos de metars de transição e aplicações biológicas       34         2.1.1.1 Complexos de platina       34         2.1.1.2 Complexos de rutênio.       41         2.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)       48         2.3 Complexos rutênio-nitrosilos.       52         3. HIPÓTESE       57         4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         5.1 Objetivos específicos.       61         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese do cis-[Ru(Cl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O.       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O.       68         6.3.3 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> L)]PF <sub>6-</sub> 2H <sub>2</sub> O (L = py       9         0.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.5 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.9 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>3</sub> NO].6H <sub>2</sub> O.       71         6.3.9 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>3</sub> NO].6H <sub>2</sub> O.       71         6.3.9 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>3</sub> NO].6H <sub>2</sub> O.       71         6.3.9 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>3</sub> NO].6H <sub>2</sub> O.       71 <th>2.1 Química Inorganica Medicinal</th> <th></th>	2.1 Química Inorganica Medicinal	
2.1.1.1 Complexos de platna	2.1.1 Complexos de metais de transição e aplicações biológicas	34
2.1.1.2 Complexos de rutênio.       41         2.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)       48         2.3 Complexos rutênio-nitrosilos.       52         3. HIPÓTESE.       57         4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         5.1 Objetivos específicos       61         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O.       68         6.3.2 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O.       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O.       68         6.3.3 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py         0 a -etpy)	2.1.1.1 Complexos de platina	34
2.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)482.3 Complexos rutênio-nitrosilos523. HIPÓTESE574. JUSTIFICATIVA585. OBJETIVOS615.1 Objetivos específicos616. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL636.1 Reagentes e Solventes636.2 Síntese dos ligantes656.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)656.3 Síntese dos complexos686.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O686.3.2 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O686.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> )696.3.4 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = pyou 3-etpy)696.3.5 Síntese do complexos cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O'(bpy) <sub>2</sub> )]706.3.6 Síntese do scomplexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,pyLys e pyTrp716.3.9 Síntese do Ka][Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)726.3.10 Síntese do Ka][Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)726.4.1 Medidas de pH736.4.2 Análise Elementar736.4.2 Análise Elementar736.4.1 Medidas de pH736.4.2 Análise Elementar736.4.1 Me	2.1.1.2 Complexos de rutênio	41
2.3 Complexos rutênio-nitrosilos.       52         3. HIPÓTESE.       57         4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         5.1 Objetivos específicos       61         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> )       69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](DPF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O) (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O')(bpy) <sub>2</sub> ]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O')(bpy) <sub>2</sub> ]       70         6.3.7 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O')(bpy) <sub>2</sub> ]       71         6.3.8 Síntese do Xa <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do Xa <sub>1</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73	2.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)	48
3. HIPOTESE       57         4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         5.1 Objetivos específicos.       61         6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl2(bpy)2].H2O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO2)2(bpy)2].H2O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO2)2(bpy)2].H2O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO2)(bpy)2](PF6)2       69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO2)(bpy)2(L)]PF6.2H2O (L = py         ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO2)(pyTrp-O)(bpy)2)]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO2)(pyTrp-O)(bpy)2)]       70         6.3.7 Síntese do scomplexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy)2L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       pyLys e pyTrp         71       6.3.8 Síntese do Na2[RuClsNO].6H2O       71         6.3.9 Síntese do K3[Fe(C2O4)3].3H2O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73	2.3 Complexos rutênio-nitrosilos	52
4. JUSTIFICATIVA       58         5. OBJETIVOS       61         5. OBJETIVOS       61         6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[Ru(Cl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       90         ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> ]       70         6.3.7 Síntese do scomplexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub></sub>	3. HIPÓTESE	57
5. OBJETIVOS       61         5.1 Objetivos específicos       61         6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.4 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       90         0.3.4 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       69         6.3.5 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       70         6.3.6 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       71         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ]       70         6.3.6 Síntese do complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub>	4. JUSTIFICATIVA	58
5.1 Objetivos específicos       61         6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       69         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O')(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73	5. OBJETIVOS	61
6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL       63         6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl2(bpy)2].H2O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO2)2(bpy)2].H2O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO2)2(bpy)2].H2O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO2)2(bpy)2].H2O       69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO2)(bpy)2(L)]PF6.2H2O (L = py       69         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO2)(pyLys-O-)(bpy)2)]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO2)(pyTrp-O')(bpy)2)]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy)2L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.8 Síntese do Na2[RuCl3NO].6H2O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH2CH3)4)[Ru(NO)(Cl3)(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K3[Fe(C2O4)3].3H2O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73	5.1 Objetivos específicos	61
6.1 Reagentes e Solventes       63         6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py       9         0.3.4 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73	6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	63
6.2 Síntese dos ligantes       65         6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese do cis-[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Análise Elementar       73	6.1 Reagentes e Solventes	63
6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)       65         6.3 Síntese dos complexos       68         6.3.1 Síntese do cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexos cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo cis-[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Canaditas Elementar       73	6.2 Síntese dos ligantes	65
6.3 Síntese dos complexos	6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)	65
6.3.1 Síntese do <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.2 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexos <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4 Equipamentos e Métodos       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73	6.3 Síntese dos complexos	68
6.3.2 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O       68         6.3.3 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Fernetrecerric no Pacião do Lafraurmelho       72	6.3.1 Síntese do <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O	68
6.3.3 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> 69         6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.3 Expectraceopia no Porião do Infravermelho       72	6.3.2 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O	68
6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = py ou 3-etpy)       69         6.3.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4 Equipamentos e Métodos       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73	6.3.3 Síntese do <i>cis</i> -[Ru(NO)(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	69
6.3.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4 Equipamentos e Métodos       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Encestraçopenia no Bacião do Infravermelho       72	6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(bpy) <sub>2</sub> (L)]PF <sub>6</sub> .2H <sub>2</sub> O (L = ou 3-etpy)	= py 69
6.3.6 Síntese do complexo $cis$ -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]       70         6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral $cis$ -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4 Equipamentos e Métodos       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         73       73	6.3.5 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyLys-O-)(bpy) <sub>2</sub> )]	70
6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy,         pyLys e pyTrp       71         6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4 Equipamentos e Métodos       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         73       73	6.3.6 Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO <sub>2</sub> )(pyTrp-O <sup>-</sup> )(bpy) <sub>2</sub> )]	70
6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O       71         6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       72         6.3.10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       72         6.4 Equipamentos e Métodos       73         6.4.1 Medidas de pH       73         6.4.2 Análise Elementar       73         6.4.2 Equipamentos e Degião do Infravermento       72	6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral $cis$ -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> L] <sup>3+</sup> L = py, 3-etpy pvLvs e pvTrp	, 71
6.3.9 Síntese do (N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> )[Ru(NO)(Cl <sub>3</sub> )(Trp)]       .72 $6.3.10$ Síntese do K <sub>3</sub> [Fe(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ].3H <sub>2</sub> O (FeOx)       .72 $6.4$ Equipamentos e Métodos       .73 $6.4.1$ Medidas de pH       .73 $6.4.2$ Análise Elementar       .73 $6.4.2$ Equipamentos e Degião do Infravermelho       .72	6.3.8 Síntese do Na <sub>2</sub> [RuCl <sub>5</sub> NO].6H <sub>2</sub> O	71
$6.3.10 \text{ Síntese do K}_3[Fe(C_2O_4)_3].3H_2O (FeOx)$	6.3.9 Síntese do $(N(CH_2CH_3)_4)[Ru(NO)(Cl_3)(Trp)]$	72
6.4 Equipamentos e Métodos	6 3 10 Síntese do K <sub>3</sub> [Fe( $C_2O_4$ ) <sub>3</sub> ] 3H <sub>2</sub> O (FeOx)	72
<ul> <li>6.4.1 Medidas de pH</li></ul>	6.4 Equipamentos e Métodos	73
6.4.2 Análise Elementar	6 4 1 Medidas de pH	73
6.4.2 Espectroscopia no Decião do Infrovermolho	6 4 2 Análise Elementar	73
0.4.5 Espectroscopia na Região do infravermento	6.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho	73

6.4.4 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (Uv-visível)	73
6.4.5 Voltametria Cíclica	74
6.4.6 Espectroeletroquímica	75
6.4.7 Espectrometria de massas	75
6.4.8 Ressonância Magnética Nuclear	76
6.4.9 Equipamento de micro-ondas	76
6.4.10 Determinação amperométrica de NO liberado	76
6.4.11 Ensaios Fotoquímicos	76
6.5 Avaliação da atividade antitumoral	80
6.5.1 Meio de Cultivo	
6.5.2 Ensaios de citotoxicidade dos complexos de rutênio	
6.5.3 Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT	
6.6 Avaliação da Atividade Tripanocida	
6.6.1 Cepa de <i>T. cruzi</i>	
6.6.2 Ensaios de Citotoxicidade	
6.6.3 Avaliação da atividade tripanocida in vitro sobre as formas amastigotas	
6.6.4 Critério de inclusão dos fármacos nos testes in vivo	
6.6.5 Análise dos dados obtidos para os ensaios in vivo	
CAPÍTULO 1. COMPLEXOS <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> 2H <sub>2</sub> O <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)(NO <sub>2</sub> )](PF <sub>6</sub> ).2H <sub>2</sub> O (AR2)	(AR1) e
7.1 Introdução	
7.2 Síntese	
7.3 Análise Elementar	90
7.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)	
7.5 Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-visível (Uv-vis)	
7.5.1 Determinação da Constante de Equilíbrio	
7.6 Estudos Eletroquímicos	
7.6.1 Voltametria Cíclica	
7.6.2 Espectroeletroquímica	
7.7 Estudo da constante de equilíbrio de protonação dos ligantes py e 3-etpy	
7.8 Fotólise	
7.9 Considerações sobre a geometria do complexo AR2	
CAPÍTULO 2. DERIVADOS DE AMINOÁCIDO: SÍNTESE E CARACTE 8.1 Introdução	RIZAÇÃO 120

8.2 Parte A: Derivados de aminoácido (pyLys e pyTrp)	124
8.2.1 Cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC)	124
8.2.2 Bases de Schiff	125
8.3 Síntese	
8.3.1 Ligante pyLys	126
8.3.2 Ligante pyTrp	131
8.4 Caracterização	134
8.4.1 Ressonância Margnética Nuclear (RMN)	
8.4.1.1 Ligante pyLys	134
8.4.1.2 Ligante pyTrp	138
8.4.2 Espectrometria de Massas	143
8.4.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier	(FTIR) 149
8.5 Parte B: Complexos contendo os ligantes derivados de aminoácidos	
8.5.1 Síntese	
8.5.1.1 Complexo cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (pyLys)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> (RupyLysNO)	
8.5.1.2 Complexo cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (pyTrp)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> (RupyTrpNO)	156
8.5.2 Caracterização	157
8.6 Parte C: Complexo [N(CH2CH3)4](RuCl3(NO)(Trp)]	
8.6.1 Síntese	165
8.6.2 Caracterização	166
CAPÍTULO 3. ENSAIOS BIOLÓGICOS	
9.1 Câncer	174
9.2 Avaliação do potencial biológico dos complexos rutênio-nitrosilos frente tumorais	a células 177
9.3 Doença de Chagas	
9.4 Avaliação do potencial biológico dos complexos rutênio-nitrosilos frente Tulahuén LacZ de <i>T. cruzi</i>	a cepas 187
10. CONCLUSÕES	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS Erro! Indicador não	definido.
Anexo A. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos precursores do ligante pyLys	
Anexo B. Espectro <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C 2D HMQC para o ligante pyLys	
Anexo C. Espectro de <sup>1</sup> H RMN para o ligante 3-etinilpiridina em D <sub>2</sub> O	
Anexo D. Espectros de RMN para o ligante pyTrp em CD3OD	227
Anexo E. Borbulhamento de NO	

Anexo F. Purificação do complexo AR123	31
Anexo G. Dados da obtenção dos coeficientes angulares dos complexos AR1 e AR223	32
Anexo H. Espectro FTIR do complexo cis-[Ru(NO2)(bpy)2(py-CHO)](PF6)23	34
FTIR em pastilhas de KBr23	34
Tabela I. Atribuições das bandas do espectro FTIR para o complexo ci[Ru(NO2)(bpy)2(py-CHO)](PF6)	is- 34
Anexo J. Espectros Uv-vis para os complexos AR1, AR2 e <i>cis</i> -[Ru(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)(NO <sup>0</sup> )]	<sup>2+</sup> 35
Anexo K. Estudos de Internalização celular por FTIR em células	36
Anexo L. Viabilidade celular em células B16-F10 para os complexos AR2 e AR423	38
Anexo M. Espectro de MALDI do íon complexo {[Ru(NO2)(bpy)2(py-CHO)]}+23	39

# INTRODUÇÃO

#### 1. INTRODUÇÃO

A Química Inorgânica, ramo da química que estuda a síntese de compostos inorgânicos e organometálicos, tem dado contribuição significativa na modelagem e desenvolvimento de novos fármacos, tanto para tratamento quanto para diagnóstico de enfermidades. Nesta vertente, a Química Inorgânica Medicinal, área multidisciplinar que faz a ponte entre a Química Inorgânica e a Química Medicinal, estimulada pela descoberta acidental da atividade biológica da cisplatina (ROSENBERG; CAMP; KRIGAS, 1965), tem sido ferramenta essencial para o entendimento das propriedades dos compostos de coordenação e sua atuação nos sistemas biológicos.

Em geral, a atividade farmacológica de complexos metálicos é dependente do metal, do ligante e/ou da interação existente entre ambos. Em muitos casos, os mecanismos de ação oriundos da atuação dos complexos metálicos como fármacos (metalofármacos) não são bem conhecidos ou elucidados. Não obstante, um bom entendimento das características destes mecanismos pode proporcionar um aumento na eficiência do seu uso, além de propiciar a minimização de efeitos indesejados.

Uma das estratégias de pesquisadores, no que tange ao uso de metais na estrutura de um fármaco, é sua ligação a uma molécula que apresente atividade farmacológica e/ou mesmo a uma biomolécula. Nesta última alternativa, destaca-se a coordenação do monóxido de nitrogênio (NO) a um íon metálico, e seu uso farmacológico. Assim, conhecer as propriedades químicas e biológicas desta molécula pode direcionar a síntese e obtenção de compostos racionalmente úteis como pró-fármacos.

Neste contexto, os complexos rutênio-nitrosilos têm apresentado abrangência de aplicações, tais como: atividade antitumoral contra inúmeras linhagens celulares (*in vitro* e *in vivo*) e atividade tripanocida. Estes complexos podem apresentar características que podem ser exploradas para o entendimento de sua ação biológica, dentre elas: liberação de NO induzida por luz e/ou processos redutimétricos, mecanismos de internalização celular e interação com o DNA em função dos ligantes expectadores.

Tratando-se da liberação de NO, há situações em que pode ser desejável que o complexo esteja em solução e se reduza liberando NO no meio circundante. Exemplo disso, é o decréscimo da pressão arterial em ratos hipertensos obtido com a aplicação do complexos *trans*-[RuCl(cyclam)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (MARCONDES et al., 2002). Por outro lado, certamente há casos em que este processo redutimétrico instantâneo não é interessante, pois a liberação de NO

pode se dar antes do alvo ser atingido. Assim, para evitar esta redução prematura, uma alternativa é a incorporação de ligantes direcionadores ao complexo rutênio-nitrosilo, gerando um sistema de liberação controlada.

O estudo dos sistemas de liberação controlada de NO se atém ao fato de que normalmente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou de forma convencional, podem não conseguir atingir locais específicos em concentrações adequadas para o efeito terapêutico. Dentre as alternativas para controlar este obstáculo, podem ser citadas: a incorporação de matrizes e a coordenação de aminoácidos a estes complexos de forma a direciona-los para o interior celular através do seu transporte por canais proteicos.

Neste sentido, buscando entender sobre as características e propriedades dos complexos rutênio-nitrosilos, o presente trabalho visa contribuir com a discussão da relação estrutura-atividade de complexos de fórmula geral *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup>, em que L é um derivado de piridina ou de aminoácido. Além disso, como não existem relatos de complexos do tipo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> em que L é um derivado de aminoácido, este trabalho poderá contribuir de forma decisiva para a área da Química Inorgânica Medicinal.

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Química Inorgânica Medicinal

A Química Inorgânica Medicinal é pautada basicamente no estudo de íons metálicos em sistemas biológicos, buscando o entendimento da relação estrutura-atividade. O campo da Química Inorgânica Medicinal pode ser subdividido em duas classes principais de estudo: (i) a área de desenvolvimento de compostos orgânicos para finalidade de interação com metais livres ou coordenados a proteínas e, (ii) a área que visa o desenvolvimento de fármacos à base de metais (metalofármacos), os quais podem ser aplicados em diagnóstico por imagem e/ou terapia, em que o íon metálico é determinante para o mecanismo de ação (FARRELL, 2002).

Na literatura, há diversos relatos de metais e íons metálicos que foram utilizados com propósitos medicinais há mais de 5000 anos (ELLAHIOUI; PRASHAR; GÓMEZ-RUIZ, 2017). Os egípcios utilizavam o cobre para desinfecção da água (ELLAHIOUI; PRASHAR; GÓMEZ-RUIZ, 2017). Os chineses e indianos utilizavam o ouro para tratamento de varíola e ulcerações cutâneas desde épocas remotas (MATIJEVIĆ, 2012, p. 102). Os macedônios utilizavam a prata para melhorar a cicatrização, o que caracteriza uma das primeiras intervenções para prevenir ou mesmo tratar infecções (ALEXANDER, 2009). A utilização do ferro também data de tempos antigos, sendo as primeiras aplicações medicinais feitas por egípcios, hindus, gregos e romanos para tratamento da clorose, doença que geralmente causa anemia (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014). Não obstante, somente no último século que a atividade medicinal de compostos metálicos se tornou objeto de pesquisa (ELLAHIOUI; PRASHAR; GÓMEZ-RUIZ, 2017).

Alguns dos primeiros fármacos inorgânicos desenvolvidos com propósito medicinal são: o complexo Arsfenamina ou Salvarsan (Figura 1), utilizado em tratamento de Sífilis (MJOS; ORVIG, 2014) e o sal de ouro K[Au(CN)<sub>2</sub>], utilizado para tratamento de tuberculose (BERTINI, 2007; ELLAHIOUI; PRASHAR; GÓMEZ-RUIZ, 2017). Apesar disso, o crescimento do estudo e desenvolvimento de metalofármacos se iniciou na década de 1960, com a descoberta feita por Rosenberg e colaboradores (ROSENBERG; CAMP; KRIGAS, 1965). Através de experimentos com *Escherichia coli*, foi observado que a mitose bacteriana era inibida pelo agente químico cisplatina, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (ROSENBERG; CAMP; KRIGAS, 1965), o qual era formado *in situ* pela reação entre a platina desprendida do eletrodo por eletrólise e o cloreto de amônio do meio (ROSENBERG; CAMP; KRIGAS, 1965).

O complexos *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] foi sintetizado primeiramente por Peyrone em 1844 e elucidado por Werner no ano de 1893 (DE BIASI; VILLENA-VARGAS; ADUSUMILLI, 2014), porém somente após as observações de Rosenberg é que se iniciaram as pesquisas relacionadas à sua atividade biológica. Neste cenário, Rosenberg constatou a eficiência da cisplatina frente a células tumorais de sarcoma-180 e leucemia-L1210, criando uma nova classe de compostos e alavancando as pesquisas científicas nesta área (ROSENBERG et al., 1969).

Figura 1. Estrutura molecular do Salvarsan. A) Estrutura primeiramente proposta, B) e C) Estruturas atuais constituintes do Salvarsan, mistura de trímero e pentâmero.



Fonte: Adaptado de (LLOYD et al., 2005)

Atualmente a cisplatina ainda é um fármaco bastante utilizado contra diversos tipos de tumores, tais como: câncer de ovário, de testículo, de bexiga, de colo de útero, do esôfago, de vasos sanguíneos, ósseos (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014), entre outros. Apesar de ser o principal fármaco comercial à base de platina (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014), a cisplatina apresenta diversos efeitos colaterais, dentre os quais podem ser citados a toxicidade e aparecimento de resistência adquirida (BERALDO, 2011).

Em se tratando de fármacos para o combate ao câncer, compostos orgânicos ainda se sobressaem comercialmente quando comparados aos inorgânicos (MJOS; ORVIG, 2014). Este evento deve-se ao desenvolvimento da indústria farmacêutica embasada preferencialmente na síntese orgânica e em seu aprimoramento (MJOS; ORVIG, 2014). Os fármacos medicinais contendo metais são frequentemente estudados e desenvolvidos somente na academia e poucos são utilizados clinicamente. Provavelmente por falta de estudos mais aprofundados sobre as características destes compostos e/ou testes biológicos de elucidação de mecanismos de ação e

excreção insuficientes, e de investidores industriais que acreditem no potencial destes compostos para tratamento de doenças.

É justamente neste âmbito que a Química de Coordenação encontra seu propósito dentro da área da Química Medicinal, através do *design* molecular, síntese e caracterização de novos compostos que possuam atividade biológica e que interajam com moléculas-alvo, sendo conduzidas para um metabolismo específico e não tóxico.

Dentro da classe dos fármacos contendo metais, os de metais de transição têm sido os mais amplamente estudados (VAN RIJT; SADLER, 2009). As vantagens do desenvolvimento destes compostos são a: (i) a variedade de números de coordenação e geometrias, o que possibilita a modulação dos ligantes; (ii) números de oxidação acessíveis ao meio biológico; (iii) diferentes estruturas possíveis e (iv) termodinâmica e cinética de labilização de ligantes compatíveis (VAN RIJT; SADLER, 2009).

#### 2.1.1 Complexos de metais de transição e aplicações biológicas

Devido às suas características, os complexos de metais de transição são bastante promissores na busca por fármacos que atuem como agentes terapêuticos e/ou diagnósticos. A diversidade de estruturas possíveis destes compostos e de suas aplicações farmacológicas abrange, por exemplo, o tratamento de doenças tais como: cânceres, infecções, Chagas, leishmaniose, diabetes, entre outras. Assim, para o desenvolvimento de novos complexos metálicos que possam ser eficazes contra doenças é necessário o estudo dos seus respectivos mecanismos de ação farmacológica. Alguns dos complexos que foram e têm sido amplamente estudados são apresentados a seguir.

#### 2.1.1.1 Complexos de platina

O sucesso do complexo *cis*-diamindicloroplatina(II) como agente antineoplásico alavancou pesquisas nesta área (MJOS; ORVIG, 2014). Neste contexto, os cientistas buscaram entender quais eram as propriedades químicas que faziam com que um complexo de platina levasse as células cancerígenas ao processo de apoptose celular. Para tal investigação, foram sintetizados os complexos formados pelos eletrodos de platina durante o experimento de eletrólise realizado por Rosenberg e colaboradores (1965) – (NH4)<sub>2</sub>[PtCl<sub>6</sub>], (NH4)[PtCl<sub>5</sub>(NH<sub>3</sub>)], *cis*-[PtCl<sub>4</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] e [PtCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]Cl – e testes *in vivo* foram realizados.

Dentre estes complexos, foi identificado que, a *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] era a espécie mais ativa frente a camundongos portadores de sarcoma-180 e leucemia-L1210 (ROSENBERG; VAN CAMP, 1970). Além destes compostos, a *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] também foi testada para via de comparação, mas não apresentou citotoxicidade relevante (FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997).

Devido aos resultados favoráveis da cisplatina contra tumores, testes clínicos foram iniciados na década de 1970 e, em dezembro de 1978 foi aprovado seu uso, pela Administração de Alimentos e Fármacos (FDA) nos Estados Unidos, para tratamento de câncer de ovário e de testículo (RAJA et al., 2013). Este evento foi um marco na Química Inorgânica Medicinal, proporcionando vasto crescimento em pesquisas que buscassem compreender mecanismos de ação biológica dos complexos metálicos e posteriormente *design* racional de estruturas com maior eficácia.

Os mecanismos de ação da cisplatina foram projetados com base em estudos de sua estrutura-atividade. Sucessivas reações ácido-base e solvólise/hidrólise ocorrem no meio intracelular, sendo o íon cloro liberado e substituído pelo ligante aquo ou hidroxo (FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997). Estas reações são apresentadas nas Equações 1, 2 e 3

$$cis-[PtCl_2(NH_3)_2] + H_2O \xrightarrow{-Cl} cis-[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+ + H_2O \xrightarrow{-Cl} cis-[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$$
 (1)

$$cis-[PtCI(H_2O)(NH_3)_2]^* \underbrace{-H^*}_{+H^*} cis-[PtCI(OH)(NH_3)_2]$$
(2)

$$cis-[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+} \xrightarrow[+H^+]{-H^+} cis-[Pt(OH)(H_2O)(NH_3)_2]^{+} \xrightarrow[+H^+]{-H^+} cis-[Pt(OH)_2(NH_3)_2]$$
(3)

Através da separação e detecção de complexos de platina em amostras de sangue e plasma, Andersson e colaboradores (1996, apud (ESTEBAN-FERNÁNDEZ et al., 2010) determinaram através de técnicas cromatográficas sofisticadas que os íons complexos cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] e cis-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> estão presentes em fluidos fisiológico de pessoas tratadas com cisplatina a nível terapêutico ((ESTEBAN-FERNÁNDEZ et al., 2010).

Através de estudos em soluções aquosas de cisplatina, o dímero (Equação 4) e a espécie cis-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> foram detectados (ESTEBAN-FERNÁNDEZ et al., 2010; HEUDI; CAILLEUX; ALLAIN, 1997), não havendo evidências de outras espécies presentes em solução à temperatura ambiente. Por isso, apesar deste dímero existir em soluções de cisplatina, não existem relatos de sua detecção em meio biológico, assim, sua concentração não é considerada frente ensaios *in vivo* e *in vitro* (ESTEBAN-FERNÁNDEZ et al., 2010).

$$cis-[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+} \xrightarrow{-H^+} cis-[Pt(OH)(H_2O)(NH_3)_2]^+ \xrightarrow{} [\{cis-(\mu-OH)_n\}[Pt(NH_3)_2]^n + (4)$$

Estes estudos em conjunto comprovam a rápida conversão da cisplatina na espécie cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> e por conseguinte a manutenção do equilíbrio entre estes dois complexos pela concentração relativa de cloreto intracelular, como descrito na primeira etapa da Equação 1. A concentração de cloreto no plasma é de ~100 mmol L<sup>-1</sup> e no citoplasma ~4-12 mmol L<sup>-1</sup>(JUNG; LIPPARD, 2007), indicando que, por razão de efeitos de concentração, fora da célula a concentração de cisplatina é muito maior do que de cis-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> em comparação com o citoplasma (~26 vezes, (FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997).

Os mecanismos bioquímicos de internalização celular da cisplatina ainda não são completamente elucidados. O que se sabe é que moléculas catiônicas dificilmente perpassam a membrana lipídica. Portanto, dificilmente o complexo cis-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> será transportado para o exterior da célula antes de se ligar a biomoléculas, como o DNA, por exemplo (JUNG; LIPPARD, 2007).

A cisplatina pode interagir com uma gama de componentes celulares, tais como proteínas, membranas fosfolipídicas, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), e estruturas que contenham enxofre. Uma vez no núcleo celular, os complexos catiônicos formados a partir da hidrólise da cisplatina interagirão preferencialmente com o DNA em detrimento da alta concentração de nucleotídeos, de forma covalente e irreversível (JUNG; LIPPARD, 2007).

A priori a interação da cisplatina-DNA pode ocorrer por via de qualquer átomo que possua elétrons livres (Base de Lewis). Apesar disso, os derivados catiônicos se coordenam essencialmente pelos átomos de nitrogênio "N7" das bases purínicas guanina (G) e adenina (A), formando adutos. Estas bases são encontradas nos sulcos maiores do DNA e possuem caráter
nucleofílico mais intenso em comparação aos outros átomos da estrutura, os quais se encontram envolvidos em interações intra- e intermoleculares fortes para manutenção da estrutura alfa-hélice do DNA ou ligados à cadeia glicosídica.

Os adutos podem ser formados através da coordenação interfitas e intrafita (Figura 2). O aduto resultante da ligação 1,2-intrafita d(GpG) é o mais comum dentre os conhecidos (50% do total), originando a coordenação de duas guaninas de fitas adjacentes para formar o complexo *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)-d(GpG)]<sup>2+</sup>. É importante ressaltar que existem outros exemplos de adutos, porém estes são menos comuns, tais como: 1,2-intrafita d(ApG) formado pela coordenação de uma adenina e uma guanina adjancentes; 1,3-intrafita d(GpTpG) formado entre purinas separadas por uma ou mais bases entre elas; interfita formado entre purinas de fitas diferentes e ligações monofuncionais (TORIGOE et al., 2005).

**Figura 2.** Adutos Pt-DNA formados a partir da ligação da cisplatina (**A**) com duas fitas do tipo 1,2-d(GpG) (intrafita), (**B**) com duas fitas do tipo 1,2-d(ApG) (intrafita), (**C**) com duas fitas do tipo 1,3-d(GpTpG) (intrafita) e (**D**) com duas fitas do tipo interfitas (ligação cruzada).



Fonte: (TORIGOE et al., 2005).

A formação dos adutos gera alterações na estrutura da dupla hélice do DNA, causando desenovelamento da molécula e perda de sua conformação. Visto que o DNA é responsável pelas funções de replicação, transcrição e reparo (WOZNIAK; CZECHOWSKA; BLASIAK, 2004), modificações em sua estrutura tridimensional irão promover a ativação das vias de sinalização de celular. Justamente por este mecanismo de ação e eficácia em benefício do tratamentos de diversos tipos de câncer, é que a cisplatina foi amplamente utilizada (FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997; NEVES; VARGAS, 2011; TODD; LIPPARD, 2009; WOZNIAK; CZECHOWSKA; BLASIAK, 2004).

Contudo, mesmo que a concentração de íon cloreto no meio extracelular seja maior do que no meio intracelular, a reação de aquação da cisplatina ocorre. Como o cátion complexo formado é bastante reativo, ele pode se ligar a proteínas antes mesmo de perpassar a membrana lipídica e fazer com que o equilíbrio da reação de aquação (Equação 1) seja favorecido, diminuindo a disponibilidade da cisplatina. Cerca de apenas 1% da concentração total é incorporado pelas células (CORTE-RODRÍGUEZ et al., 2015).

Dentro da proporção de 1% de cisplatina que será internalizada, uma parte ainda irá interagir com outras biomoléculas, como a glutationa, por exemplo. Por isso, é necessária uma dose suficientemente alta para que o efeito de citotoxicidade seja alcançado. Em geral, esta alta dosagem causa efeitos colaterais severos aos pacientes, limitando os tratamentos. Dentre estes efeitos colaterais, os mais comuns são: nefrotoxicidade (toxicidade do sistema renal) (PINATO; MUSETTI; SISSI, 2014; WHEATE et al., 2010), neurotoxicidade (danos no sistema nervoso) (AMPTOULACH; TSAVARIS, 2011; NEVES; VARGAS, 2011; PAKEN et al., 2016), ototoxicidade (danos no sistema coclear e/ou vestibular) (PAKEN et al., 2016), hepatotoxicidade (toxicidade hepática) (CERSOSIMO, 1993) e mielosupressão (supressão da atividade da medula óssea) (WHEATE et al., 2010). Além disso, a cisplatina pode causar resistência pelas células cancerígenas (AEBI et al., 2011; SHEN et al., 2012). Estes motivos impulsionaram o desenvolvimento de novos complexos de platina assim como busca por novos complexos metálicos que fossem eficazes no tratamento do câncer, minimizassem os efeitos colaterais e fossem capazes de atuar em células resistentes a cisplatina.

Milhares de compostos de platina foram propostos, no entanto, somente aproximadamente 30 encontram-se em testes clínicos (TYLKOWSKI; JASTRZĄB; ODANI, 2018). Dentre estes, apenas dois destes complexos, carboplatina e oxaliplatina (Figura 3), foram aprovados pela FDA para utilização no tratamento de determinados tipos de câncer (PASETTO et al., 2006; TYLKOWSKI; JASTRZĄB; ODANI, 2018).



Figura 3. Estruturas moleculares dos complexos de platina(II).

Fonte: (WHEATE et al., 2010).

A carboplatina, *cis*-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato)platina(II) (cbdca-O'O), foi aprovada em 1989 com o nome Paraplatin (DI PASQUA; GOODISMAN; DABROWIAK, 2012). Sua estrutura é similar à da cisplatina, possuindo mecanismo de ação através da formação de adutos. A diferença entre os dois fármacos é que a carboplatina possui um ligante bidentado coordenado ao íon Pt<sup>2+</sup>, ao invés de dois cloretos. Esta modulação dos ligantes confere a propriedade deste ser um complexo mais inerte, sendo sua constante de aquação (Equação 5) (SOUSA; WLODARCZYK; MONTEIRO, 2014) da ordem de 10<sup>-8</sup> s<sup>-1</sup>, ou seja, 1000 vezes menor do que a constante de aquação da cisplatina (k<sub>cisplatina</sub> = 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>). Assim, a carboplatina pode ser administrada em doses bastante elevadas (300-450 mgm<sup>-2</sup>; cisplatina: 20-120 mgm<sup>-2</sup>) (WHEATE et al., 2010).

$$cis-[Pt(cbdca-O,O')(NH_3)_2] \xrightarrow{+H_2O} cis-[Pt(cbdca-O)(H_2O)(NH_3)_2]^+ \xrightarrow{+H_2O} cis-[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+} (5)$$

O carboxilato presente na estrutura da carboplatina confere um aumento de solubilidade em meio fisiológico e favorece a internalização celular do fármaco (PASETTO et al., 2006). Ademais, interage em menores proporções com biomoléculas e por isso os efeitos colaterais são reduzidos (TYLKOWSKI; JASTRZĄB; ODANI, 2018). Embora a carboplatina substitua a cisplatina na terapia de alguns tipos de câncer, como o de ovário, ela não é tão efetiva quanto a cisplatina em outros tipos de tumores, tendo sua aplicação um pouco restrita (NEVES; VARGAS, 2011).

Dentro da classe de compostos de platina de terceira geração, a oxaliplatina, oxalato de 1,2-diaminocicloexanoplatina(II), foi aprovada para uso primeiramente na França, em 1996

e posteriormente nos Estados Unidos (2002) e Japão (2005) (WHEATE et al., 2010), com o nome de Eloxatina® (Sanofi) (NEVES; VARGAS, 2011). Assim como a carboplatina, a oxaliplatina apresenta cinética de aquação distinta da cisplatina devido à modulação dos ligantes, visto que possui dois ligantes quelatos que formam anéis de cinco membros bastante estáveis.

A oxilaliplatina foi o primeiro fármaco a apresentar atividade frente a células cancerígenas em que a cisplatina apresenta resistencia. Seu mecanismo ainda não é completamente elucidado, mas pesquisas demonstraram (WHEATE et al., 2010) que ocorre a formação de adutos Pt-DNA do tipo GpG intrafita e interações hidrofóbicas entre o ligante 1,2-diaminocicloexano e o sulco principal do DNA. Estas interações hidrofóbicas bloqueiam a ligação das proteínas de reparo, levando a célula à morte. Este efeito ajuda a explicar o porquê deste fármaco ser eficaz contra câncer colorretal e a cisplatina e carboplatina não (JUNG; LIPPARD, 2007; PIZARRO; SADLER, 2009). Além disso, seu efeito ainda pode ser potencializado através da associação com outros fármacos (WHEATE et al., 2010).

Alguns complexos de platina, como a Nedaplatina, Lobaplatina e Heptaplatina (Figura 4) já são comercializados, mas encontram-se aprovados para utilização apenas no Japão, China e Coréia (PIZARRO; SADLER, 2009; WHEATE et al., 2010). Outros complexos, por terem citotoxicidades inferiores frente a células tumorais, comparando-se aos fármacos já em uso, devido a sérios efeitos colaterais ou mesmo por questões de cunho econômico, foram abandonados. Um exemplo disso, é o complexo conhecido pela siga BBR3464 (Figura 4).



Fonte: (Adaptado de MANZOTTI et al., 2000).

O BBR3464 é um complexo trinuclear de platina em que duas unidades *trans*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] são unidas por uma unidade *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. A carga total da espécie é +4, a qual é neutralizada por quatro contra-íons NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Sua internalização celular é mais eficiente e rápida em comparação com a cisplatina (WHEATE et al., 2010). O BBR3463 forma adutos Pt-DNA em maior extensão e mais flexíveis e interagem com o DNA através de fortes interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (KASPARKOVA et al., 2002; MANZOTTI et al., 2000).

Estudos clínicos demonstraram que a atividade citotóxica do complexo BBR3464 é pronunciada frente a tumores resistentes (WHEATE et al., 2010), interagindo com o DNA de forma que as enzimas de reparo por excisão de nucleotídeos (REN) não o reconheçam, levando à indução da via de apoptose independente da p53 (BIERSACK; SCHOBERT, 2016, p. 214), que é o gene mais comumente alterado e encontrado em 50% de todos os tumores (CAVALCANTI JUNIOR; KLUMB; MAIA, 2002). Apesar dos estudos mostrarem que o BBR3464 apresenta grande eficiência contra diversos tipos de tumores, seus estudos foram descontinuados a partir da fase II dos testes clínicos por apresentar os efeitos colaterais de toxicidade gastrointestinal e neutropenia (redução da contagem de neutrófilos no sangue) (PASETTO et al., 2006; WHEATE et al., 2010).

O desenvolvimento dos complexos derivados de platina continua sendo alvo de estudos, e mesmo que muitas pesquisas tenham sido descontinuadas, muito se construiu no entendimento dos mecanismos farmacológicos de ação destes compostos, abrindo assim novos caminhos para a busca de espécies que apresentem menos efeitos colaterais e sejam mais eficazes para o tratamento do câncer. Neste contexto, além dos complexos de platina que têm sido desenvolvidos (CULLINANE et al., 2018; HU et al., 2018; WLODARCZYK et al., 2018), complexos de outros metais de transição têm se mostrado promissores e alternativos para o tratamento de uma série de enfermidades. Dentre estes compostos, os de rutênio têm apresentado notória ênfase por suas características peculiares, como será descrito com o devido detalhamento na sequência.

#### 2.1.1.2 Complexos de rutênio

O rutênio é um elemento da segunda série de transição da Tabela Periódica e encontrase na mesma família do ferro. Possui configuração eletrônica [Kr] 4d<sup>7</sup>5s<sup>1</sup> e massa atômica 101,07 u. Na natureza são encontrados sete isótopos: <sup>96</sup>Ru, <sup>98</sup>Ru, <sup>99</sup>Ru, <sup>100</sup>Ru, <sup>101</sup>Ru, <sup>102</sup>Ru e <sup>104</sup>Ru, com abundância relativa de 5,54%, 1,83%, 12,8%, 12,5%, 17,1%, 31,6% e 18,6%, respectivamente (HOPP; FISCHER-GÖDDE; KLEINE, 2016).

O rutênio tem sido largamente estudado para aplicação em diversos campos ciência, tais como: catálise, células solares e fármacos. Sua vasta aplicação se deve à sua rica e bem estudada química de coordenação e organometálica. Os estados de oxidação mais comuns do rutênio em solução aquosa são +2, +3 e +4 (HOLDER et al., 2018). São reportados inúmeros complexos com números de coordenação de 4 a 6 e geometrias variados.

No caso da hexacoordenação, as duas posições a mais na esfera primária de coordenação do rutênio, quando comparadas aos complexos quadrado planares de platina, permitem uma melhor modulação de ligantes e um ambiente químico com maiores possibilidades.

Atualmente, as aplicações dos compostos de rutênio são muito abrangentes. Na área farmacológica busca-se principalmente compostos promissores para tratamento do câncer e de doenças negligenciadas, como Doença de Chagas e Leishmaniose. As vantagens que favorecem a pesquisa e aplicação destes complexos para este fim incluem (CLARKE, 2002):

• Possibilidade de obtenção de compostos com estruturas previsíveis em função da modulação dos ligantes;

• Presença de processos de transferência de elétrons e obtenção de compostos com número de oxidação II e III;

• Aumento no conhecimento da atividade biológica destes compostos.

Além disso, a baixa toxicidade deste metal frente a células de mamíferos se deve à sua semelhança química com o ferro, o qual se encontra na mesma família da Tabela Periódica.

Para melhor entendimento sobre estes complexos, eles serão divididos em duas classes: complexos de rutênio(III) e de rutênio(II).

2.1.1.3 Complexos de rutênio(III)

Em geral, para que ocorra o efeito citotóxico desejado, os complexos de rutênio(III) necessitam de etapas de ativação em meio biológico, em que o  $Ru^{3+}$  é reduzido ao  $Ru^{2+}$ . Esta redução ocorre em meios com as características de hipóxia, de pH ácido e em altos níveis de glutationa (ZENG et al., 2017).

Um dos primeiros estudos sobre as propriedades citotóxicas dos complexos de rutênio frente a células tumorais datam da década de 1980, com os compostos *fac*-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] e *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl (HENRY; GUISSANI, 1999). Em 1987 o composto [imH][*trans*-RuCl<sub>4</sub>(im)<sub>2</sub>] (ICR) relatado por Keppler e colaboradores apresentou atividade antitumoral contra células HeLa (câncer cervical), inspirando a síntese de compostos relacionados, como o [indH][*trans*-RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>] (ind = indazol), conhecido como KP1019 e o Na[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>], conhecido como KP1339 (Figura 5).





Fonte: (ZENG et al., 2017).

Desde sua obtenção, o complexo KP1019 tem apresentado resultados bastante interessantes. Testes *in vivo* demonstraram uma drástica regressão de 95% do volume dos tumores em ratos portadores de câncer de cólon. Nas condições experimentais destes testes não houve taxa de mortalidade (0%) e a perda de peso dos indivíduos foi ínfima (6%) (TRONDL et al., 2014).

Os complexos KP1019 e KP1339 possuem estruturas bastante similares, mas apresentaram diferentes distribuições intracelulares. O primeiro encontra-se basicamente no citoplasma (75%) e o segundo no núcleo celular (90%). Apesar disso, estudos sugerem que os mecanismos de citotoxicidade para eles são os mesmos ou bastante similares (STEVENS et al., 2013; TRONDL et al., 2014).

Hipóteses baseadas em estudos químicos e biológicos foram propostas para os mecanismos de ação dos complexos K1019 e K1339. Sua internalização celular demonstrou caminhos não triviais para perpassar a membrana lipídica. Um destes caminhos, chamado de "Cavalo de Tróia", comprovou através de dados experimentais que o complexo KP1019 é transportado para o interior celular via transferrina, seguido por endocitose através de receptores transferrina específicos (GROESSL et al., 2007; STEVENS et al., 2013). Sabendo-se que as células cancerosas possuem mais receptores de transferrina que as células sadias, a citotoxicidade específica ocorreria em decorrência deste efeito. Não obstante, não foram obtidos dados sobre como o fármaco é liberado dos endossomas para ter acesso aos alvos intracelulares, e por isso, outros estudos foram realizados na tentativa de se compreender mais sobre os entremeios envolvidos na ação destes compostos (STEVENS et al., 2013).

Estudos analíticos fundamentaram novas discussões acerca da internalização celular do KP1910 e KP1339. Embora o aduto formado entre o complexo e a transferrina seja cineticamente favorável, adutos formados com a albumina são termodinamicamente mais estáveis, o que é consistente com os experimentos de competição molecular (TRONDL et al., 2014). Outrossim, já é bem consolidado o papel da albumina frente a células cancerosas. Em consequência do estresse celular causado pelo crescimento desenfreado tumoral, a albumina é requerida por estas células para produção de aminoácidos e energia para sua manutenção. Da mesma forma que a transferrina, a albumina é internalizada através de endocitose (FREI, 2011).

Em ambos os casos, as pesquisas não deixaram evidente o mecanismo da citotoxicidade dos complexos. Também foram realizados estudos com DNA, mostrando que os complexos KP1910 e KP1339 provocam lesões que são distintas das causadas pela cisplatina. O mecanismo proposto envolve aumento da atividade antiproliferativa através do bloqueio irreversível dos mecanismos de reparo do DNA (MALINA et al., 2001).

Ainda nos últimos anos, pesquisas têm sido conduzidas para elucidação dos mecanismos de ação destes fármacos (BIJELIC et al., 2016). E apesar de apresentar efeitos colaterais mínimos, a dose terapêutica ainda não foi estabelecida devido problemas de solubilização do complexo e volume de infusão necessário para administração. Portanto, estes complexos ainda encontram-se em testes clínicos de fase II e aprimoramento estrutural (TRONDL et al., 2014)

Outro composto bastante estudado foi o (ImH)[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(im)] (DMSO = dimetilsulfóxido e im = imidazol), conhecido por NAMI-A (New Anti-tumor Metastasis Inhibitor), o qual foi o primeiro complexo de rutênio a ser testado em humanos (LEVINA; MITRA; LAY, 2009). Apesar de apresentar baixa atividade frente a células tumorais *in vitro*, apresentou efeito antimetastático bastante eficaz (ZENG et al., 2017).

O mecanismo de ação do NAMI-A envolve ligação ao DNA, RNA e ao resíduo de histidina que compõe a albumina do soro (ZENG et al., 2017). Pacor e colaboradores (2004) demonstraram que este complexo pode modular a expressão da glicoproteína transmembrana CD44, reduzindo a porcentagem de CD44<sup>+</sup>, a qual é uma molécula associada à adesão celular metastática de certos tipos de neoplasias malignas (PACOR, 2004). Além disso, estudos físico-químicos provaram que as etapas de aquação do complexo envolvem labilização de íons cloreto devido a parâmetros termodinâmicos ( $\Delta$ G) envolvidos neste processo (VARGIU et al., 2008).

Os equilíbrios de aquação do NAMI-A são apresentados nas Equações 6, 7 e 8. Como é possível observar, o DMSO não é labilizado nas duas primeiras etapas, fato este explicado pela forte ligação de hidrogênio formada após a coordenação do primeiro ligante aquo. No entanto, após a saída do segundo Cl<sup>-</sup>, a dissociação do DMSO se torna mais favorável energeticamente (VARGIU et al., 2008).

$$[trans-RuCl_4(DMSO)(im)]^{-} + H_2O = [trans-RuCl_3(DMSO)(H_2O)(im)] + Cl^{-}$$
(6)

$$[trans-RuCl_3(DMSO)(H_2O)(im)]^+ + H_2O \implies cis, trans-[RuCl_2(DMSO)(H_2O)_2(im)]^+ + Cl^-$$
(7)

$$cis, trans-[RuCl_2(DMSO)(H_2O)_2(im)]^+ + H_2O = [cis-RuCl_2(H_2O)_3(im)]^+ + DMSO$$
(8)

Apesar do NAMI-A apresentar efeito antimetastático pronunciado nas pesquisas iniciais, a Fase I dos testes clínicos demonstrou certa progressão da doença em alguns pacientes, e a Fase II demonstrou que vários pacientes adquiriram trombose venosa profunda. Por estas questões, os estudos clínicos para estes complexos foram descontinuados (LEIJEN et al., 2015).

Porém, além dos complexos de rutênio(III), outros compostos de rutênio têm sido elatados como potenciais fármacos: os complexos de rutênio(II).

#### 2.1.1.4 Complexos de rutênio(II)

Nesta classe encontram-se os complexos com ligantes heterocíclicos, tais como os derivados de piridina (py), 2,2'-bipiridina (bpy), fenantrolina (phen), 2-fenilazopiridina (azpy), 2,2':6'2"-terpiridina (terpy), entre outros. Estes complexos apresentam singular combinação de estabilidade química, modulação dos ligantes em ambiente octaédrico ou semi-octaédrico e processos de oxirredução e atividades fotoquímicas e fotofísicas (SIZOVA et al., 2003). Estas características conferem a eles uma extensa quantidade de aplicações, como em células solares (QIN; PENG, 2012; SHAHROOSVAND; ESKANDARI, 2018), catalisadores (DÉRIEN; MONNIER; DIXNEUF, 2004; DUAN et al., 2012), fármacos (ABID; SHAMSI; AZAM, 2016; GU et al., 2016; POPOLIN et al., 2017), antifúngicos (ANTHONYSAMY et al., 2008; DONNICI; ARAUJO; STOIANOFF, 2017; RAMESH; SIVAGAMASUNDARI, 2003) e antimicrobianos (KUMAR et al., 2016; LI; COLLINS; KEENE, 2015).

Inicialmente, muitos compostos desta classe foram reportados e extensivamente estudados devido sua aplicação como sondas para DNA. Os complexos do tipo  $[Ru(phen)_3]^{2+}$ , por exemplo, apresentam interações de três naturezas distintas: eletrostática, hidrofóbica através dos sulcos menores e, intercalação. Dentre os dois, o isômero  $\Delta$ - $[Ru(phen)_3]^{2+}$  (Figura

6) apresentou efeitos mais intensos de interação com DNA, quando comparado ao isômero  $\Lambda$ -[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2</sup> (Figura 6) (ERKKILA; ODOM; BARTON, 1999).



Figura 6. Estrutura dos complexos  $\Lambda$ -[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> e  $\Delta$ -[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>.

Fonte: autora.

As interações destes compostos com o DNA não são covalentes ou fortes o suficiente para ocasionarem morte celular através do desenovelamento ou mesmo perda da conformação da biomolécula, e por isso são utilizados apenas como sondas. No entanto, os esforços no entendimento de seus mecanismos de ação propiciaram o *design* de moléculas as quais pudessem aumentar a formação de adutos Ru-DNA, e gerassem os efeitos desejados em meio biológico.

Neste cenário, compostos análogos foram estudados. Testes *in vitro* contra células cancerígenas utilizando os complexos [RuCl(bpy)(terpy)]Cl, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] e *mer*-[RuCl<sub>3</sub>(terpy)] foram conduzidos por Nováková e colaboradores (1995), e demonstraram que apenas o complexo *mer*-[Ru(terpy)Cl<sub>3</sub>] apresentou atividade antitumoral contra células L1210 (leucemia murino) e células de carcinoma humano de colo do útero (HeLa). Seus ensaios com biomoléculas mostraram que a reatividade dos complexos com o DNA exibe mecanismos que sugerem significativa interação cruzada do tipo Ru-DNA interfitas (NOVAKOVA et al., 1995).

Em comparação com o complexo  $[Ru(phen)_3]^{2+}$ , uma explicação plausível para que a modificação dos ligantes gere atividade biológica para o *mer*- $[RuCl_3(terpy)]$ , é que este complexo possui ligantes lábeis em solução (cloretos), enquanto um ligante polipiridínico possui cinética inerte o suficiente para que não haja troca de ligantes com o meio. Assim, o complexo proposto por Nováková e colaboradores (NOVAKOVA et al., 1995), tem a

capacidade de interagir com o DNA covalentemente, bloqueando suas funções. Estes trabalhos estabeleceram a importância do desenvolvimento desta classe de compostos à base de rutênio-polipiridinas como potenciais fármacos para o tratamento do câncer.

O complexo de fórmula [RuCl<sub>2</sub>(azpy)<sub>2</sub>] apresenta cinco isômeros teóricos diferentes (KRAUSE; KRAUSE, 1980; MOTSWAINYANA; AJIBADE, 2015; VELDERS et al., 2004). Dentre estes cinco isômeros propostos, três deles foram sintetizados, testados *in vitro* e sua atividade biológica avaliada, sendo eles: o isômero  $\alpha$ , complexo na conformação *trans,cis,cis*, o isômero  $\beta$ , *cis,trans,cis* e o isômero  $\gamma$ , *trans,cis,cis* (Figura 7) em relação ao cloreto, a piridina e ao nitrogênio do grupo azo (MOTSWAINYANA; AJIBADE, 2015). Os ensaios demonstraram que as atividades anticancerígenas contra células MCF-7, EVSA-T, WIDR, IGROV, M19, A498 e H266 (HOTZE et al., 2004) são dependentes de suas estruturas.

Figura 7. Representações das estruturas dos isômeros mais comuns dos complexos [RuCl<sub>2</sub>(azpy)].



Fonte: Adaptado de (HOTZE et al., 2004).

O isômero  $\alpha$  apresentou citotoxicidade mais pronunciada do que o isômero  $\beta$ , enquanto o isômero  $\gamma$  se mostrou desprovido de qualquer efeito citotóxico (MOTSWAINYANA; AJIBADE, 2015). Além disso, os isômeros  $\alpha$  e  $\beta$  apresentaram melhores controle da proliferação tumoral e de metástases em modelos pré-clínicos comparando-se com a cisplatina (CHEN et al., 2005), o que os torna excelentes candidatos a metalofármacos. Cálculos utilizando a **T**eoria do **F**uncional da **D**ensidade (DFT) sugeriram que cada isômero apresenta diferenças na habilidade de intercalação com o DNA devido à fatores geométricos e eletrônicos, sendo consistentes com suas atividades biológicas (MOTSWAINYANA; AJIBADE, 2015).

Com o sucesso dos experimentos químicos e biológicos envolvendo complexos de rutênio(II), diversas classes destes complexos têm sido desenvolvidas e estudadas no âmbito da promissora aplicação farmacológica (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015;

LEVIN et al., 2016). Neste contexto, os complexos rutênio-nitrosilos têm se mostrado bastante promissores (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015). Os objetivos das pesquisas visam não somente a busca por novos fármacos, mas o entendimento de suas propriedades e possíveis mecanismos de ação. Assim, se tratando de complexos rutênio-nitrosilos, é essencial entender o porquê da escolha do NO como ligante destes complexos e da intensa busca pelo entendimento de seus mecanismos de ação.

#### 2.2 Monóxido de Nitrogênio (NO)

O monóxido de nitrogênio é um gás incolor à temperatura ambiente (P.E. = -151,7 °C) e possui baixa solubilidade em água (1,94 mmol L<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup> a 25°C) (ZACHARIA; DEEN, 2005). De fato, o NO é 10 vezes mais solúvel em estruturas hidrofóbicas do que hidrofílicas, sendo característica relevante para suas funções biológicas (THOMAS, 2015).

O NO possui 11 elétrons em sua camada de valência e sua configuração eletrônica é  $(\sigma_1 s)^2 (\sigma_1 s)^2 (\sigma_2 s)^2 (\sigma_2 s)^2 (\pi_2 p)^4 (\sigma_2 p)^2 (\pi_2 p)^1$ . Por apresentar um elétron desemparelhado, a molécula é paramagnética. Devido às diferentes eletronegatividades do nitrogênio e oxigênio, as contribuições para os orbitais moleculares (Figura 8) também são diferentes. As funções de onda do oxigênio contribuem mais efetivamente para os orbitais moleculares ligantes, enquanto os orbitais antiligantes são formados predominantemente por contribuições das funções de onda do nitrogênio. O elétron desemparelhado localizado no orbital  $\pi^*$ , que possui caráter predominante do nitrogênio, é o que confere a seletividade da ligação via átomo de nitrogênio ao reagir com metais ou radicais, como por exemplo O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup> (TOLEDO; AUGUSTO, 2012). Além disso, a maioria dos processos biológicos que envolvem esta molécula, ocorre via estabilização deste elétron desemparelhado (MCCLEVERTY, 2004).



Figura 8. Diagrama de orbitais moleculares do monóxido de nitrogênio.

Fonte: autora.

Até meados da década de 1980, o NO era considerado um poluente ambiental. A descoberta de que ele possui papel fundamental em sistemas biológicos (IGNARRO, 1996), tais como regulação da pressão sanguínea (HOUSTON; HAYS, 2014; REES; BEN-ISHAY; MONCADA, 1996), neurotransmissão (KURIYAMA; OHKUMA, 1995; VINCENT, 2010; VIZI, 2001), resposta imunológica (BOGDAN, 2001; MONCADA; HIGGS, 1991; WEI et al., 1995), reparação de tecidos (FRANK et al., 2002; ISENBERG et al., 2005; WITTE; BARBUL, 2002), inibição de agregação plaquetária (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991, p. 15; RIDDELL; OWEN, 1999), relaxamento de músculo liso (BLATTER; WIER, 1994; WANSTALL et al., 2001) e, patológicos, onde o NO exerce função relevante em doenças inflamatórias (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007; WALLACE, 2005), nefrites (BREMER et al., 1997; TRACHTMAN, 2004), diabetes (COHEN, 2005; KINGWELL et al., 2002), artrite (IALENTI; MONCADA; ROSA, 1993; MCCARTNEY-FRANCIS, 1993; STEFANOVIC-RACIC; STADLER; EVANS, 1993), arteriosclerose (MATTHYS; BULT, 1997; NAPOLI; IGNARRO, 2001), câncer (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; NATHAN; XIE, 1994; WINK; MITCHELL, 1998) e doenças neurodegenerativas (HANNIBAL, 2016; SCHULZ; MATTHEWS; BEAL, 1995; VIRARKAR et al., 2013), resultou em grande interesse em estudar seu comportamento e características.

O NO é um radical que reage rapidamente com moléculas biológicas, possuindo tempo de vida menor do que 2 segundos (THOMAS, 2015). A reação com o  $O_2^-$ , uma das mais importantes reações do NO em meio biológico, gera íons peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o qual é um forte oxidante e pode causar danos a biomoléculas, como ao DNA, onde podem ocorrer quebras

das fitas, oxidação de sítios proteicos e nitração de aminoácidos aromáticos (3-nitrosotirosina) (KNOTT; BOSSY-WETZEL, 2009; MCCLEVERTY, 2004; THOMAS, 2015).

No organismo humano o NO é produzido a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês Nitric Oxide Synthase), a qual possui três isoformas: a tipo I (óxido nítrico sintase neuronal, nNOS), tipo II (óxido nítrico sintase induzível, iNOS) e tipo III (óxido nítrico sintase endotelial, eNOS). Cada unidade monomérica desta enzima possui quatro cofatores responsáveis pela transferência de elétrons: uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), uma tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), uma flavina mononucleotídeo (FMN) e uma ferro protoporfirina IX (heme) (FEDOROV et al., 2004). Os substratos para estas enzimas são oxigênio e L-arginina, gerando NO e L-citrulina (Figura 9).





Fonte: autora.

As enzimas nNOS e eNOS, requerem o aumento na concentração de íons Ca<sup>2+</sup> intracelular e consequente ativação da calmodulina para produzirem NO. Portanto, sua regulação primária é dependente do influxo de cálcio e geração de baixos níveis de NO em pequenos intervalos de tempo. Já a iNOS, necessita ser induzida por citocinas e endotoxinas bacterianas em praticamente todos os tipos de células, gerando NO em altas concentrações por intervalos de tempo prolongados. Cada uma destas enzimas está envolvida em processos com funções singulares, por exemplo, a eNOS é responsável pelo tônus muscular, a nNOS está relacionada a AVC e enxaqueca, e a iNOS está envolvida em choque séptico, artrite e esclerose múltipla (FEDOROV et al., 2004).

Em consonância com o papel desempenhado pelo NO no organismo, há uma série de processos patológicos associados à sua sobre- ou subprodução (FEDOROV et al., 2004). Ao se tratar de tumores (Figura 10), em concentrações de NO entre 1 e 30 nM, estão relacionados os efeitos diretos, em que ocorre promoção da angiogênese e proliferação de células endoteliais. Em concentrações entre 30 e 100 nM, ocorre um aumento acentuado da proteína quinase Akt e a enzima ERK (quinase regulada por sinal extracelular) sinaliza uma resposta proliferativa e anti-apoptótica em células tumorais. Até ~500 nM, ocorre aumento da atividade metastática. O fator 1 humano induzível por hipóxia (HIF-1) é estabilizado aumentando assim o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), ocasionando proliferação celular. Assim, nestes três níveis de concentração de NO, observa-se proliferação e proteção das células tumorais, ao passo que acima de 300 nM ocorre inibição da cadeia transportadora de elétrons e, por conseguinte, a morte destas células por apoptose, ou ainda por estresse oxidativo (>500  $\mu$ M) (COULTER et al., 2008; MOCELLIN; BRONTE; NITTI, 2007; YEON et al., 2014).





Fonte: autora.

Outra reação amplamente estudada é a oxidação do NO para nitrito (NO<sub>2</sub>), reação a qual ocorre *in vivo* (FEELISCH et al., 2008). O NO<sub>2</sub> que antes era considerado apenas um subproduto metabólico inerte, encontra-se no plasma e tecidos na concentração de

50,0-500,0 nM e 0,50-25,0 μM, respectivamente, possuindo funções biológicas relevantes. Na última década, estudos demonstraram que biomoléculas, tais como clusters ferro-enxofre, redutases de molibdênio e proteínas contendo grupo heme, agem através de mecanismos cooperativos em ambientes de hipóxia para que a redução NO<sub>2</sub>/NO aconteça (FEELISCH et al., 2008).

São expressivas as evidencias da importância do NO em uma vasta gama de processos fisiológicos e patologias. Uma vez que a sua atividade intracelular é dependente de sua concentração, a busca e desenvolvimento de fármacos que possam modular sua liberação é eminente, tanto no aspecto de sua remoção em meio com excesso de NO, quanto na liberação para vias de morte tumoral. Compostos de rutênio têm sido os mais estudados para estes fins, e para compreensão dos mecanismos pelos quais o NO atua no organismo. A coordenação desta molécula ao íon rutênio e sua posterior liberação em um determinado sítio biológico sob estímulo químico, eletroquímico e fotoquímico, tornou-se objeto de estudo de muitos pesquisadores (HEINRICH et al., 2013; LEVIN et al., 2016; RODRIGUES et al., 2015).

#### 2.3 Complexos rutênio-nitrosilos

A partir de fins do século passado, vários doadores e capturadores de NO foram desenvolvidos. Um complexo que se apresenta como potencial e eficiente sequestrador de NO é o  $[Ru^{III}(EDTA)(H_2O)]^-$  em que o ligante EDTA (Etileno**D**iamino**T**etr**A**cetato) possui 5 sítios de coordenação, deixando uma posição disponível para substituição do ligante aquo pelo NO, formando o [Ru(HEDTA)(NO)], com constante de formação de 2,24x10<sup>7</sup> L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (ZANICHELLI et al., 2007).

Outro complexo bem conhecido é o K[Ru(HEDTA)Cl], que apresenta solubilidade em meio aquoso. O íon [Ru(HEDTA)Cl]<sup>-</sup> possui ligante Cl<sup>-</sup> lábil frente a reações de aquação mas não possui livre passagem pelas membranas lipídicas (SEDDON; SEDDON; CLARK, 2013, p. 198). Importante vantagem desta característica é que o complexo entra em contato somente com o NO produzido em excesso que se encontra na corrente sanguínea, e não, àquele encontrado em células endoteliais responsáveis pela regulação da pressão. De maneira geral, esta classe de compostos pode ser utilizada para tratamento de doenças que são decorrentes do excesso de NO. A partir do momento que o NO se coordenada ao íon Ru<sup>3+</sup>, a ligação Ru-NO se torna inerte suficiente para que não ocorra processos de oxirredução ou reações de

substituição (WANG; CAI; TANIGUCHI, 2005), sendo rapidamente excretado pela urina (LENTZ et al., 2009).

Tratando-se de doadores de NO, os primeiros conhecidos, embora não como tais, foram os nitratos orgânicos, como a nitroglicerina e, o complexo metálico nitroprussiato de sódio, que embora tenha sido descoberto no final século XIX, só foi aplicado à medicina na década de 1950 (LOCKWOOD et al., 2010).

O nitroprussiato de sódio (NP), de fórmula Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO], é um complexo de Fe<sup>2+</sup> hexacoordenado, contendo cinco íons cianeto e um nitrosil em sua esfera de coordenação primária. Possui solubilidade em meio aquoso e é geralmente utilizado em casos onde a redução imediata de pressão sanguínea arterial (hipertensão) e para indução de hipotensão durante cirurgias (BELANI et al., 2014; FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995). No entanto, há algumas limitações em seu uso. Dependendo da concentração de cianeto presente no sangue, podem ocorrer os seguintes sintomas: taquicardia e rubor (20,0-30,0  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup>), níveis reduzidos de consciência (48,0-65,0  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup>), coma (95,0-114,0  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup>) e morte (acima de 114  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup>) (LOCKWOOD et al., 2010). A exposição a altas doses ou uso contínuo pode acarretar em acúmulo de cianeto e seu metabólito tiocianato (ARNOLD; LONGNECKER; EPSTEIN, 1984; LOCKWOOD et al., 2010).

Para se contornar as dificuldades provenientes do uso do NP, alternativas podem ser utilizadas, tais como: administração de outros compostos tidos como antídotos, como hidroxocobalamina ou tiossulfato de sódio (ARNOLD; LONGNECKER; EPSTEIN, 1984; LOCKWOOD et al., 2010), ou o uso de outros doadores de NO.

Exemplos de doadores de NO são: N-hidroxiguanidinas (YOO; FUKUTO, 1995), nitratos e nitritos orgânicos (THATCHER et al., 2004), S-nitrosotióis (ARNELLE; STAMLER, 1995; SEABRA et al., 2010), nitritos inorgânicos (DEROSA; BU; FORD, 2005), diazeniodiolatos (KEEFER et al., 2001; LUO et al., 2017), N-nitrosaminas/Nhidroxinitrosaminas/nitrosiminas (WANG: CAI: TANIGUCHI. 2005), furoxanos ((TURNBULL et al., 2006; WANG et al., 2015); e nitrosilos de metais de transição (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015; LEVIN et al., 2016; TFOUNI et al., 2010). A Figura 11 apresenta um resumo dos doadores de NO mais conhecidos e suas estruturas. Destas classes, os complexos metálicos têm sido os mais amplamente estudados e podem ser vistos como bons candidatos a serem utilizados em terapia clínica como sistemas doadores de NO.



Figura 11. Exemplos de compostos doadores de NO.

Fonte: autora.

No contexto de nitrosilos de metais de transição como liberadores de NO, os complexos de rutênio mostraram-se bastante promissores (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015; LEVIN et al., 2016; TFOUNI et al., 2010), pois o rutênio forma mais nitrosilo complexos que qualquer outro elemento além de possuir características que podem ser desenvolvidas para aplicações farmacológicas. Exemplos de liberadores de NO são apresentados na Tabela 1.

Complexos	Referência	
[(Im) <sub>2</sub> H][ <i>trans</i> -Ru(NO)Cl <sub>4</sub> (Im)] [ <i>cis,mer</i> -Ru(NO)Cl <sub>2</sub> (py) <sub>3</sub> ][BF <sub>4</sub> ]	(SERLI et al., 2002)	
[Ru <sup>II</sup> (NO)(bpy)(4'-(2-fluorenyl)- 2,2':6',2"-terpyridine)][PF <sub>6</sub> ] <sub>3</sub>	(ENRIQUEZ-CABRERA et al., 2017)	
<i>trans</i> -[Ru(NO)(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> L] <sup>3+</sup> (L =4-pic, py, nic, pz, 4-acpy, PR <sub>3</sub> , diox-COO)	(SILVA et al., 2000; TFOUNI et al., 2010; TFOUNI et al., 2003; TOLEDO et al., 2004)	
$\begin{array}{l} PyH[RuNO(NO_2)_2(ONO)Py(OH)]\\ NH_4[Ru(NO)Py_3(\mu\text{-}O)]_2(PF_6)_3 \end{array}$	(KOSTIN et al., 2016)	
<i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (L)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> L = 4-pic, py, 3-etpy, 4-pyCHO, 4-acpy	(RODRIGUES et al., 2016; SAUAIA; SILVA, 2003); presente trabalho	
[Ru(NO)(bpy)(Me <sub>3</sub> [9]aneN <sub>3</sub> )](BF <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	(LEVIN et al., 2016)	
$[(N(CH_2CH_3)_4][Ru(NO)Cl_3(AA-H)]$	(RATHGEB et al., 2014); presente trabalho	

Tabela 1. Exemplos de complexos rutênio-nitrosilos liberadores de NO e respectivas referências.

Fonte: autora.

A possibilidade da liberação de NO modulada por complexos rutênio-nitrosilos é um campo que tem sido bastante desenvolvido por pesquisadores brasileiros, visto que estes complexos têm se apresentado como promissores metalo-fármacos (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015). Assim, o emprego destes complexos liberadores exógenos de NO a alvos celulares específicos é uma área bastante atrativa, visto que seu estudo pode levar a terapias alternativas e mais eficientes para o tratamento de inúmeras doenças.

Neste sentido, pesquisas buscando entender a relação estrutura-atividade de complexos rutênio-nitrosilos comprovaram que suas características são moduladas também pela influência dos co-ligantes (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015). Assim, este trabalho visa contribuir para tais estudos através do desenvolvimento de novos complexos rutênio-nitrosilos contendo ligantes polipiridínicos, assim como o estudo de suas propriedades físico-químicas e aplicações biológicas.

# HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

### 3. HIPÓTESE

O uso de metalofármacos como alternativa contra vários tipos de doenças vem há muito sendo discutida como possibilidade de aplicação clínica. Neste contexto, conhecer relação estrutura-atividade destes complexos é fundamental para que se possa ter aplicação terapêutica. Dentre as várias possibilidades, complexos de rutênio constitui-se uma classe a qual merece ser destacada face à baixa toxicidade exibida por estas espécies em meio biológico.

Sabe-se que alguns compostos de rutênio apresentam liberação de NO frente a estímulo luminoso e/ou redutimétrico, característica esta que pode ser utilizada em aplicações terapêuticas. No entanto, apesar desta aplicação ser de interesse farmacológico, muitos destes compostos não apresentam internalização celular suficiente para que a liberação do NO aconteça nos locais alvo (interior celular). Neste sentido, este trabalho propôs o desenho racional de compostos de rutênio os quais possuíssem ligantes direcionadores (aminoácidos), ou seja, ligantes que trouxessem ao complexo propriedades que o fizessem perpassar a membrana celular e liberar NO no interior das células cancerosas.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Como destacado, o NO é uma molécula responsável por funções fundamentais em sistemas biológicos. Assim, ele pode atuar no crescimento de tumores, através de efeitos próou anti-proliferativos, a partir de um mecanismo dose-dependente (CARNEIRO et al., 2011; RIDNOUR et al., 2006). Neste sentido, a busca por compostos que possam atuar como doadores de NO é alvo de muitas pesquisas (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015; LEVIN et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016).

Visto que o controle da liberação de NO pode ser alcançado através de processos redutimétricos no interior celular, estudar a relação estrutura-atividade de complexos rutênionitrosilos pode auxiliar no entendimento deste sistema, assim como criar oportunidades para o desenvolvimento de novos fármacos com características que podem ser exploradas para a melhoria de sua ação.

Além disso, atualmente existe uma busca por compostos que apresentem maior biocompatibilidade, ou seja, que possuam biomoléculas em sua estrutura, com características que as auxiliem na transposição da membrana celular, de forma a evitar a liberação precoce de NO. Desde que a membrana celular constitui uma barreira formidável, o desenho racional de estruturas com afinidade biológica pode direcionar os complexos rutênio-nitrosilos aos alvos de interesse, gerando a citotoxicidade à alvos específicos.

Para a obtenção do ligante derivado de aminoácido, existem várias alternativas na literatura, tais como bases de Schiff e *Click chemistry*. As bases de Schiff recebem este nome devido ao seu descobrimento por Hugo Schiff (KAJAL et al., 2013; QIN et al., 2013). Estes compostos são obtidos a partir da reação de condensação de aminas primárias com compostos carbonílicos em condições específicas. São também conhecidas como azometinas e possuem em sua estrutura grupos imina (C=N) e fórmula mínima R<sub>3</sub>R<sub>2</sub>C=NR<sub>1</sub> (QIN et al., 2013). Ademais, possuem alta afinidade por íons metálicos (KOSTOVA; SASO, 2013; PAREKH; MEHTA; PATEL, 2006; ROSA et al., 2018; YOUSIF et al., 2017), formando compostos de coordenação estáveis em diferentes estados de oxidação (COZZI, 2004). Suas aplicações são diversas, tais como atividade antifúngica (ABU-DIEF; MOHAMED, 2015; PAREKH; MEHTA; PATEL, 2006), sensores para metais pesados (ROSA et al., 2018), catálise (LIU et al., 2018), atividade antimicrobiana (IBRAHIM; MOHAMED; REFAT, 2014), antimalárica, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiviral e antipirética (AL ZOUBI et al., 2018).

Já no âmbito da *Click chemistry*, escolheu-se sintetizar os derivados de aminoácidos por adição azida-alcino. Estudada primeiramente por Huisgen (HUISGEN, 1963); (HURD, 1965) e aprimorada por Sharpless e colaboradores (KOLB; SHARPLESS, 2003; ROSTOVTSEV et al., 2002), a adição 1,3-dipolar envolve a reação entre azidas e acetilenos, catalisada por Cu(I), com formação regioespecífica de compostos 1,2,3-triazol-4-dissubstituídos, a qual é comumente chamada de CuAAC (*Copper-catalized Azide-Alkyne Cicloaddition*) (LIANG; ASTRUC, 2011). Esta reação tem sido bastante empregada em síntese orgânica, química medicinal, biologia molecular, polímeros e materiais (LI et al., 2010), visto que apresenta alta eficiência em função dos bons rendimentos sintéticos, versatilidade no âmbito de design molecular, regioseletividade, além de ser estável frente a processos de oxirredução e hidrólise (LI et al., 2010).

Baron et al. (2012) propuseram um dos primeiros trabalhos envolvendo compostos rutênio-polipiridínicos em que a *Click chemistry* foi empregada para o desenho racional de complexos de rutênio, através da síntese do [Ru(bpy)<sub>2</sub>(bpy-CCH)]<sup>2+</sup>. Este complexo apresentou atividade fotoquímica (BARON et al., 2012) e através de flash fotólise foi estudada a natureza da transferência de elétrons.

Apesar da *Click chemistry* ser uma alternativa bastante interessante e versátil, muito pouco é encontrado na literatura sobre a utilização do mecanismo CuAAC para a obtenção de compostos de coordenação de rutênio. Assim, utilizar esta técnica para síntese de novos compostos rutênio-nitrosilos parece ser uma alternativa inovadora e promissora para o desenvolvimento de fármacos. Haja vista que não são encontrados relatos de complexos rutênio-nitrosilos contendo ligantes monodentados derivados de aminoácidos, os quais possam ter sua ação citotóxica no interior da célula proporcionada pela biomolécula coordenada, seu desenvolvimento parece ser uma excelente proposta. É justamente nesta proposta que este trabalho se justifica: a síntese, caracterização e testes biológicos envolvendo complexos rutênio-nitrosilos contendo derivados de aminoácidos em sua estrutura.

# **OBJETIVOS**

# 5. OBJETIVOS

Com base nas considerações apresentadas, o presente projeto tem como objetivo o *design* de complexos rutênio-nitrosilos contendo biomoléculas como estratégia para aumento da internalização celular e avaliação da citotoxicidade frente a células tumorais e cepa Tulahuén LacZ de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

## 5.1 Objetivos específicos

- Síntese e purificação de ligantes derivados de aminoácidos e/ou moléculas com atividade biológica que possam ser coordenados a um centro metálico de rutênio(II);
- Caracterização dos ligantes obtidos por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H (e correlações, HSQC, HMBC e COSY), espectrometria de massas, espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível (Uv-vis) e infravermelho (FTIR);
- Síntese dos complexos de rutênio(II) de fórmula geral *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup>, em que é L é um ligante monodentado;
- Caracterização dos complexos obtidos através de técnicas de espectroscopia Uv-vis e FTIR, análise elementar, voltametria cíclica, espectroeletroquímica, atividade fotoquímica, entre outras;
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos complexos sintetizados neste trabalho em diversas linhagens de células cancerígenas, tais como melanoma murino (B16-F10) e câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB231).
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos complexos frente a linhagens de células sadias de câncer de mama (MCF-10) e fibroblasto murino (L929) para via de análise de viabilidade celular;
- Avaliação *in vitro* da potencial atividade tripanocida frente a cepa Tulahuén LacZ de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*);
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos complexos frente a linhagem de células primárias de rim de macaco (LLCMK2), modelo utilizado como células sadias para comparação com os ensaios contra *T. cruzi*.

# PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

# 6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## 6.1 Reagentes e Solventes

\_

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente e, quando necessário foram purificados. Na tabela abaixo (Tabela 2) encontra-se a lista de reagentes e solventes, utilizados nas sínteses e análises e suas respectivas pureza e procedência.

Reagente ou Solvente	Pureza (%)	Marca
1,10-fenantrolina (phen)	>99,5	Merck
2,2'-bipiridina (bpy)	99,0	Acrós Organics
3-etinilpiridina (3-etpy)	98,0	Aldrich
4-piridinacarboxaldeído	97,0	Aldrich
Acetato de etila	99,5	Vetec
Acetato de sódio	>99,0	Sigma-Aldrich
Acetona	99,5	Synth
Acetonitrila	99,9	Panreac
Ácido clorídrico	36,5-38,0 (em massa)	Synth
Ácido hexafluorfosfórico	~65,0	Sigma-Aldrich
Ácido nítrico	65,0% (em massa)	Synth
Ácido sulfúrico	95,0-98,0	J. T. Baker
Ácido trifluoracético	99,0	Acros
Anidrido trífluorometanosulfônico	≥99,0	Sigma-Aldrich
Argônio	99,9	White Martins
Ascorbato de sódio	98,0	Sigma-Aldrich
Azida de sódio	99,9	Merck
Benzonidazol	97,0	Aldrich
Bicarbonato de sódio	99,7	Sigma-Aldrich
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio	98,0	Sigma

Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados nas sínteses realizadas neste trabalho.

Cloreto de ferro(III) hexahidratado	97	Sigma-Aldrich
Cloreto de lítio	99,0	Sigma-Aldrich
Cloreto de potássio	99,0	Vetec
Cloreto de rutênio(III)	50-55 (em massa de Ru)	Aldrich
Cloreto de sódio	99,0	Vetec
Cloreto de tetrabultiamônio	97,0	Aldrich
Cloreto de tetraetilamônio	98,0	Sigma
Diclorometano	98,0	Dinâmica
Dimetilsulfóxido (DMSO)	99,7	Vetec
Etanol	99,5	Synth
Éter etílico	99,0	Vetec
Fmoc-Lys(Boc)-OH	>98,0	Sigma-Aldrich
Hexafluorofosfato de amônio	99,0	Strem
Hexafluorofosfato de hidrogênio	65,0	Sigma-Aldrich
Hexano	98,5	Dinâmica
Hidróxido de potássio	90,0	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	97,0	Vetec
L-triptofano (Trp)	99,0	Sigma
Metanol	99,0	Vetec
Monohidrogenofosfato de sódio	98,0	Synth
N,N-Dimetilformamida (DMF)	99,8	Dinãmica
Nitrito de sódio	99,4	J. T. Baker
Oxalato de potássio monoidratado	98,5	Sigma-Aldrich
Piridina (py)	99,8	Aldrich
Placas de alumina para CCD		J. T. Baker
Placas de sílica para CCD		Sigma-Aldrich
Sílica gel 60		Merck
Sulfato de cobre(II) pentaidratado	>98,0	Sigma-Aldrich

Sulfato de magnésio	≥99,5	Sigma-Aldrich
Easter autom		

Fonte: autora

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos comercialmente e, quando necessário foram purificados previamente conforme métodos padrão. A água destilada foi obtida a partir de um sistema MiliQ (Milipor Corp).

#### 6.2 Síntese dos ligantes

#### 6.2.1 Ligante derivado de lisina (pyLys)

6.2.1.1 Desproteção do Fmoc-Lys(Boc)-OH (Etapa 1)



A um balão de fundo redondo contendo 0,500 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,500 g, 0,10 mmol) foram adicionados 6,0 mL de diclorometano seco. O sistema foi resfriado a 0,0±0,1 °C e foram adicionados 5,0 mL de ácido trifluoracético. A mistura foi agitada durante um período de 3 horas e a reação foi monitorada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica, onde utilizou-se sílica como fase estacionária, e como fase móvel acetato de etila/hexano 4:1. Após o consumo de todo material de partida, o produto foi concentrado para retirar excesso dos solventes e passou-se diretamente para próxima etapa (Etapa 3).

#### 6.2.1.2 Síntese do triflato de azida (Etapa 2)



Pesou-se 0,620 g de NaN<sub>3</sub> (10,0 mmol) e adicionou-se a um balão de fundo redondo contendo uma mistura heterogênea de 3,0 mL de diclorometano e 4,0 mL de água destilada. Resfriou-se a solução a 5,0±0,1 °C e adicionou-se gota a gota anidrido trífluorometanosulfônico (anidrido tríflico, 0,35 mL, 20,0 mmol). Deixou-se sob agitação por 2,5 horas. Após verificação do fim da reação por CCD em placas de sílica, a mistura foi adicionada a um funil de separação onde a fase orgânica foi separada e a fase aquosa neutralizada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Foram realizadas extrações com 5,0 mL de diclorometano (3 vezes). As frações orgânicas foram reunidas e adicionadas a um balão de fundo redondo para utilização na próxima etapa (Etapa 3).

#### 6.2.1.3 Síntese da azido-lisina (Etapa 3)



O composto produzido na etapa 1 foi adicionado a um balão de fundo redondo juntamente à 7,0 mL de água destilada, 2,0 mL de metanol, NaHCO<sub>3</sub> (0,180 g, 0,20 mmol) e CuSO<sub>4</sub> (0,002 g, 12,0  $\mu$ mol). Posteriormente, com auxílio de um funil de adição, adicionou-se gota a gota a solução obtida na Etapa 2 à mistura reacional. Deixou-se reagir por 16 horas, acompanhando-se o fim da reação por CCD em placas de sílica. Ao final da reação, os solventes foram rotaevaporados até secura. À mistura de aspecto oleoso obtida foram adicionados 20,0 mL de água e acidificado a pH~ 2 com solução de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Extraiu-se com 3 porções de 10,0 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi tratada com NaHCO<sub>3</sub> saturado, seca com MgSO<sub>4</sub> e levada à secura por rotaevaporação. O produto conduzido diretamente para próxima etapa.

6.2.1.4 Síntese do derivado de lisina (pyLys) (Etapa 4)



Em um tubo de micro-ondas equipado com uma barra de agitação magnética adicionou-se a azidolisina (0,360 g 0,90 mmol), dissolvido em 0,75 mL de DMF. Após dissolução, adicionou-se 3-etinilpiridina (0,098 g, 0,95 mmol) juntamente a ascorbato de sódio (0,023 g, 0,12 mmol) e CuSO<sub>4</sub> (0,002 g, 12,0  $\mu$ mol). A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento durante 12 minutos a 80±0,1 °C (10 W) em micro-ondas. A reação foi seguida por CCD em placas de sílica, utilizando acetato de etila como eluente. Ao fim da reação, a mistura foi seca sob pressão reduzida. Adicionou-se 5,0 mL de H<sub>2</sub>O e extraiu-se com EtOAc (3 vezes de 5,0 mL). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e o produto foi purificado por Cromatografia Líquida Clássica (CLC) em coluna (acetato de etila/hexano, 3:2 e, em seguida, metanol) para se obter um produto oleoso de coloração vermelha. Rendimento 67,0%.

6.2.1.5 Ligante derivado de triptofano (pyTrp)



A um balão de 2 bocas de 100 mL, adicionou-se 30,0 mL de etanol juntamente a 1,90 g de L-triptofano (9,3 mmol). À suspensão formada, adicionou-se KOH lentamente até total solubilização do aminoácido. Então, adicionou-se 0,90 mL de 4-piridinacarboxaldeído (9,6 mmol) e 1,00 g de MgSO<sub>4</sub>. Deixou-se sob agitação constante e refluxo por 6 horas. Após o tempo da reação, a solução foi deixada reagir durante a noite. Realizou-se filtração e a solução foi rotaevaporada até mínimo volume. Adicionou-se éter etílico e obteve-se precipitado amarelo, o qual foi filtrado e recristalizado à quente com etanol. Rendimento: 79,8%.

#### 6.3 Síntese dos complexos

#### 6.3.1 Síntese do cis-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O



Esta síntese foi realizada conforme descrito por Dwyer e colaboradores (1963). Em um balão de 50,0 mL contendo 4,0 mL de dimetilformamida adicionou-se RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,510 g, 2,0 mmol), 2,2'-bipiridina (0,470 g, 3,0 mmol) de e 0,520 g de LiCl (12,0 mmol). Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento. Deixou-se sob refluxo (~130,0±0,1 °C) por 8 horas. Ao fim da reação, adicionou-se 30,0 mL de acetona e o balão foi deixado em refrigerador por 2 horas. A solução foi filtrada e o sólido roxo escuro foi lavado com porções de acetona (3 x 5,0 mL) e éter etílico (3 x 5,0 mL). Rendimento: 86,0 %.

#### 6.3.2 Síntese do cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O



Esta síntese foi realizada conforme descrito por Godwin e Meyer (1971). A um balão de 500,0 mL de 3 bocas adicionou-se 100,0 mL de água destilada e *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O (0,500 g, 1,0 mmol). Sob atmosfera de argônio e com auxílio de um condensador, aqueceu-se a mistura a  $80\pm0,1$  °C por 15 minutos. Realizou-se, após este tempo de reação, uma filtração a quente. Adicionou-se NaNO<sub>2</sub> (1,50 g, 22,0 mmol) dissolvido em um mínimo volume de água destilada desaerada através de uma canícula. Deixou-se reagir por 90 minutos e após a reação a suspensão obtida foi deixada em refrigerador por 2 horas. Obteve-se sólido vermelho e solução esverdeada. Filtrou-se o precipitado e lavou-se com etanol gelado (3 x 3,0 mL) e éter etílico (3 x 3,0 mL). Rendimento: 64,0%.

#### 6.3.3 Síntese do cis-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>



Esta síntese também foi realizada conforme procedimento descrito por Godwin e Meyer (1971). Suspendeu-se o complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O (0,130 g, 0,25 mmol), obtido na etapa anterior, em 25,0 mL de metanol. Sob agitação adicionou-se 1,8 mL de HPF<sub>6</sub> concentrado. Observou-se mudança instantânea de suspensão vermelha para solução amarela. Deixou-se reagir a temperatura ambiente por 30 minutos e ao final adicionou-se 25,0 mL de éter etílico. A suspensão obtida foi deixada em refrigerador por 2 horas. O sólido amarelo obtido foi filtrado e lavado com metanol (3 x 3,0 mL) e éter etílico (3 x 3,0 mL). Rendimento: 91,0%.

**6.3.4 Síntese dos complexos de fórmula geral** *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(L)]PF<sub>6</sub>.2H<sub>2</sub>O (L = py ou 3-etpy)



A um balão de 2 bocas de 100 mL adicionou-se 30,0 mL de acetona seca juntamente ao complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (0,075 g, 0,10 mmol) (preparado na etapa anterior). À solução amarela obtida, adicionou-se uma solução de NaN<sub>3</sub> (0,012 g, 0,20 mmol) em 5,0 mL de metanol. A mistura tornou-se vermelha instantaneamente, a qual foi agitada por 15 minutos. Adicionou-se o ligante 3-etpy (0,051 g, 0,50 mmol) ou py (40,0  $\mu$ L, 0,50 mmol) e deixou-se sob agitação por 48 horas à temperatura de 45±0,1 °C. Ao fim da reação, o volume foi minimizado, o precipitado avermelhado filtrado e lavado com éter etílico (3 x 3,0 mL). A purificação foi realizada por cromatografia líquida em coluna. Rendimento: 33,2% (py) e 40,0% (3-etpy).

#### 6.3.5 Síntese do complexo cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(pyLys-O-)(bpy)<sub>2</sub>)]

#### 6.3.5.1 Método A

A um tubo de microondas adicionou-se cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]PF<sub>6</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,100 g, 0,13 mmol) juntamente a 0,80 mL de DMF, azidolisina (0,098 g, 2,5 mmol, Item 6.2.1.3), ascorbato de sódio (0,023 g, 0,12 mmol) e CuSO<sub>4</sub> (0,002 g, 12,0 µmol). O tubo foi equipado com barra magnética e colocado em micro-ondas por 13 minutos a 80±0,1°C (10 W). Após o tempo de reação, submeteu-se à rotaevaporação até secura e adicionou-se 5,0 mL de água e 5,0 mL de acetato de etila. A fase aquosa foi extraída com 3 porções de 5,0 mL de acetato de etila. As frações orgânicas foram reunidas e submetidas à rotaevaporação, obtendo-se sólido vermelho. A recristalização foi feita solubilizando-se o complexo em 10,0 mL de etanol e adicionando-se 10,0 mL de éter etílico. Deixou-se em refrigerador por 10 horas, filtrou-se e secou-se o sólido sob vácuo. Rendimento: 38,0%.

#### 6.3.5.2 Método B

A um balão de 2 bocas de 100,0 mL adicionou-se 30,0 mL de acetona seca juntamente a 0,160 g do complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Item 6.4.3). À solução amarela obtida adicionou-se uma solução de 0,013 g de NaN<sub>3</sub> em 5,0 mL de metanol. A mistura tornou-se vermelha instantaneamente, a qual foi agitada por 15 minutos. Adicionou-se 0,500 g do ligante pyLys obtido no item 6.2.1.4 e deixou-se sob agitação por 48 horas à temperatura de 45±0,1 °C. Ao fim da reação, o volume foi minimizado, o precipitado vermelho claro foi filtrado e lavado com éter etílico (3 X 3,0 mL). A purificação foi realizada por CLC em sílica-C18. Rendimento: 46,2%.

#### 6.3.6 Síntese do complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(pyTrp-O<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>)]

A um balão de 2 bocas de 100,0 mL adicionou-se 30,0 mL de acetona seca juntamente ao complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (0,160 g, 0,20 mmol, Item 6.4.3). À solução amarela obtida adicionou-se uma solução de NaN<sub>3</sub> (0,013 g, 0,20 mmol) em 5,0 mL de metanol. A mistura tornou-se vermelha instantaneamente, a qual foi agitada por 15 minutos. Adicionouse 25,0 mL de éter etílico observando-se formação de sólido vermelho escuro. Filtrou-se e adicionou-se este sólido a um balão de 2 bocas de 50,0 mL. Adicionou-se 20,0 mL de etanol seco juntamente ao ligante pyTrp (0,500 g, 2,0 mmol) obtido no item 6.2.1.4. Deixou-se sob agitação por 48 horas à temperatura de 45±0,1 °C. Ao fim da reação, o volume foi minimizado, o precipitado vermelho claro foi filtrado e lavado com éter etílico (3 X 3,0 mL). A purificação foi realizada por CLC em óxido de alumínio neutro. Rendimento: 36,0%.

# 6.3.7 Síntese dos complexos de fórmula geral *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> L = py, 3-etpy, pyLys e pyTrp

#### 6.3.7.1 Método A

Um volume de 10,0 mL de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado a 0,050 g de cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(L)]PF<sub>6</sub>.2H<sub>2</sub>O. A solução inicialmente vermelha tornou-se amarelo brilhante. Em seguida, adicionou-se solução saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (1,0 mL) e um precipitado amarelo foi formado. O sólido foi filtrado, lavado com água fria e mantida sob vácuo. Rendimento: py (81,0%), 3-etpy (88,1%) e pyLys (64,1%).

#### 6.3.7.2 Método B

Um volume de 10,0 mL de acetonitrila foi adicionado a 0,050 g de cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(L)]PF<sub>6</sub>.2H<sub>2</sub>O. A esta solução adicionou-se 0,50 mL de ácido hexafluorfosfórico. A solução inicialmente vermelha tornou-se amarela. Em seguida, adicionou-se 30,0 mL de éter etílicos e um precipitado amarelo foi formado. O sólido foi filtrado, lavado com éter etílico e mantida sob vácuo. Rendimento: py (68,0%), 3-etpy (72,7%) e pyLys (65,0%).

#### 6.3.8 Síntese do Na<sub>2</sub>[RuCl<sub>5</sub>NO].6H<sub>2</sub>O

Esta síntese foi realizada conforme método proposto por Onodera e Ikegami (1979). Nitrito de sódio (0,320 g, 4,7 mmol) foi adicionado a uma solução de 15,0 mL de água quente contendo RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,100 g, 0,47 mmol). Deixou-se reagir por 1 hora. Após este período, adicionou-se HCl concentrado até obtenção de solução pH ~1,0. A solução resultante foi evaporada lentamente até minimização do volume e obtenção de precipitado. O sólido foi recolhido por filtração e recristalizado por co-precipitação em solução de HCl na concentração de 6 mol L<sup>-1</sup>. Rendimento: 94,7%.

#### 6.3.9 Síntese do (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>)[Ru(NO)(Cl<sub>3</sub>)(Trp)]



Esta síntese foi realizada a partir da síntese similar realizada por Rathgeb e colaboradores (2014), com a diferença de que, no lugar do butanol utilizou-se n-pentanol e no lugar dos aminoácidos glicina, alanina e outros, utilizou-se o L-triptofano.

Foram adicionados Na<sub>2</sub>[RuCl<sub>5</sub>(NO)] (0,180 g, 0,50 mmol), cloreto de tetraetilamônio (0,130 g, 0,50 mmol) e L-triptofano (0,160 g, 0,50 mmol) a um balão de duas bocas contendo 15,0 mL de pentanol. Deixou-se reagir sob agitação e refluxo por 3 horas. Observou-se mudança de coloração de castanho avermelhado para marrom. Deixou-se em refrigerador durante a noite obtendo-se sólido marrom, que foi filtrado. O sólido foi purificado através de solubilização em acetonitrila à quente e re-precipitação em refrigerador. Rendimento: 52,0%.

#### 6.3.10 Síntese do K<sub>3</sub>[Fe(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>].3H<sub>2</sub>O (FeOx)

Esta síntese foi realizada como reportado por Hatchard e Parker (1956). Sob condições de ausência radiação ultravioleta e visível incidente, o FeOx foi preparado pela mistura de solução de cloreto férrico 1,5 mol L<sup>-1</sup> com solução de oxalato de potássio 1,5 mol L<sup>-1</sup>, na proporção 1:3. Sua precipitação foi imediata. O sal complexo de tonalidade verde esmeralda foi recolhido em funil de Büchner e lavado com água quente ( $60\pm0,1$  °C). A recristalização foi realizada em água quente. Foi deixado secar em dessecador a vácuo, ao abrigo de luz.
#### 6.4 Equipamentos e Métodos

#### 6.4.1 Medidas de pH

As medidas de pH foram feitas em um pHmetro de bancada da Quimis Aparelhos Científicos, modelo Q400AS, faixa de medição de pH 0,00 a 14,0, variação de 94 a ~240 Volts, potência de 10 Watts e, sensor de temperatura Pt 100 operando na faixa de 0 a 100 °C. Sua calibração foi feita no dia da medida através de tampões pH 9,18, 6,86 e 4,01.

#### 6.4.2 Análise Elementar

As análises elementares dos complexos foram obtidas através da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi o Analisador Elementar Perkin Elmer 2400 series ii. Foi empregado o método de Pregl-Dumas, em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector de condutividade térmica.

#### 6.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram adquiridos no espectrômetro com transformada de Fourier Prestige-21 Shimadzu. As amostras foram analisadas na forma sólida em pastilhas de KBr.

#### 6.4.4 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (Uv-visível)

Os espectros eletrônicos de absorção no Uv-visível foram obtidos em um espectrofotômetro Uv-visível-NIR – modelo U3501 e Agilent – modelo 8453, com varredura na região de 200 a 800 nm. Foi utilizada nestes experimentos cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

#### 6.4.5 Voltametria Cíclica

Medidas de voltametria cíclica foram obtidos através de um potenciostatogalvanostato AUTOLAB® modelo PGSTAT 30, que consiste em uma célula de três eletrodos convencionais, com um eletrodo auxiliar de platina, um eletrodo de referência de Ag/AgCl, e eletrodo de trabalho de platina ou ouro. O eletrólito suporte utilizado foi KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em meio aquoso ou hexafluorfosfato de tetraetilamônio (TBAH) em solvente orgânico.

Os potenciais ( $E_{pa} e E_{pc}$ ) e as correntes de pico anódico e catódico (Ipa e Ipc) foram obtidos conforme Figura 12, sendo o primeiro relacionado ao potencial máximo do pico, e o segundo medido traçando-se uma reta a partir da linha de base do pico e outra reta perpendicular a esta a partir do topo do pico.

**Figura 12.** Voltamograma cíclico de uma solução de ferroceno  $1,2x10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> em acetonitrila. Eletrólito suporte TBAH 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Eletrodo de trabalho e auxiliar de platina. Eletrodo de referência: Ag/AgCl.



Fonte: autora.

Tratando-se de processos reversíveis, observa-se corrente de pico é diretamente relacionada à concentração da espécie eletroativa, segundo a equação de Randles-Sevcik (WILLIAMS; BRAVO, 2000) (Equação 6):

$$i_p = (2,69x10^5)n^{\frac{2}{3}}AD_0^{\frac{1}{2}}v^{\frac{1}{2}}C_0$$
(6)

em que  $i_p$  é a corrente de pico, n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm<sup>2</sup>), D<sub>0</sub> é o coeficiente de difusão (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), Co é a concentração da espécie em solução (mol cm<sup>-3</sup>) e v é a velocidade de varredura (V s<sup>-1</sup>).

#### 6.4.6 Espectroeletroquímica

O aparato utilizado para realização da espectroeletroquímica é composto por uma cela de quartzo de caminho ótico de 0,5 cm e um recipiente para acoplamento dos eletrodos. Como eletrodo de trabalho utilizou-se uma fina folha de ouro transparente, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo referência de Ag/AgCl. O esquema deste sistema é apresentado na Figura 13.



Figura 13. Esquema da célula espectroeletroquímica.

Fonte: Adaptado de (LIMA,, 2006, p. 83)

#### 6.4.7 Espectrometria de massas

Espectros de massas foram obtidos através da técnica de ionização por electrospray (ESI-MS) através do equipamento Thermo Finningan DecaXPplus, utilizando modos de ionização positivo e negativo.

Análises de MALDI foram realizadas num equipamento Ultraflextreme (Bruker Daltonics). A matriz utilizada foi de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), o qual foi preparado uma solução saturada em acetonitrila e água deionizada contendo 0,10 % de ácido trifluoroacético na proporção de 1:1 (v/v). Foi utilizado também a ácido 2,5-dihidroxibenzóico na concentração de 20,0 mg/mL em acetonitrilia e água deionizada contendo 0,10 % de ácido trifluoroacético na proporção de 3:7 (v/v). Os parâmetros utilizados para a obtenção dos

espectros foram: 500 *laser-shots* por espectro, PIE (*Pulsed ion extraction*) de 110 ns, modo positivo, frequência de laser de 1,0 x  $10^3$  Hz. A voltagem de IS1 (*ion source 1*) e IS2 (*ion source* 2) aplicadas foram de 25,0 kV e 23,1 kV, respectivamente. O modo refletor foi utilizado, sendo aplicadas as voltagens em RV1 (refletor) e RV2 de 26,6 kV e 13,3 kV, respectivamente. Para a calibração externa do equipamento foi utilizado uma mistura de peptídeos da Bruker. As amostras foram diluídas em metanol em metanol para vias de análise. Posteriormente, 1,0 µL de amostra foi misturada com 1 µL de matriz, e 1 µL da mistura foi aplicada na placa de MALDI para análise.

#### 6.4.8 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registados em um equipamento JEOL Lambda 400 MHz. RMN de <sup>1</sup>H foram registados em equipamento de 400 MHz e espectros de <sup>13</sup>C foram registados em equipamento de 100 MHz.

#### 6.4.9 Equipamento de micro-ondas

As reações as quais foi necessária a utilização de microondas foram realizadas num sistema Biotage Initiator, empregando tubos selados.

#### 6.4.10 Determinação amperométrica de NO liberado

A liberação de NO gasoso foi acompanhada a partir de um sensor amperométrico ISO-NOP, desenvolvido pelo World Precision Instruments (NOmeter). Este sensor possui um eletrodo envolto por uma membrana semipermeável e tem sensibilidade na faixa de 1,0 nmol  $L^{-1}$  a 20 µmol  $L^{-1}$ , com tempo de resposta relativamente curto, compatível com a detecção de NO em solução.

#### 6.4.11 Ensaios Fotoquímicos

Os ensaios fotoquímicos foram efetuados em um trem óptico da Oriel, com lâmpada de xenônio de pressão média de 150 e 200 Watts. O sistema possuía compartimento para manter

a cela termostatizada e sob agitação constante. Um esquema deste sistema é apresentado na Figura 14.



Figura 14. Esquema dos equipamentos utilizados nos ensaios fotoquímicos.

Fonte: Adaptado de (GASPARI, 2013).

As atribuições para cada componente do sistema utilizado são listadas a seguir:

1 – Fonte Universal Oriel.

2 – Caixa contendo lâmpada de xenônio provida de (3) lente acoplada juntamente com filtro de infravermelho (IV) na saída da luz.

4 – "Shutter", utilizado para bloqueio da luz incidente.

- 5 Lente colimadora.
- 6 Suporte para filtro ótico.
- 7 Compartimento para amostras com tampa acoplado com agitador magnético
- 8 Trilho para adaptação e sustentação dos equipamentos.

6.4.11.1 Filtros de Interferência

Antes da utilização de cada filtro de interferência, foram obtidos espectros Uv-vis de cada um e comparados aos espectros fornecidos pelo fabricante com a finalidade de ver se estavam bons para serem utilizados.

6.4.11.2 Medidas da Intensidade da luz incidente

A determinação da intensidade da luz é fundamental para se calcular o rendimento quântico dos sistemas estudados neste trabalho. A intensidade da luz foi calculada através de actinometria.

Um actinômetro químico é um sistema que sofre uma reação induzida pela luz (a um determinado comprimento de onda,  $\lambda$ ) no qual o rendimento quântico,  $\Phi$  ( $\lambda$ ), é conhecido com precisão (KUHN; BRASLAVSKY; SCHMIDT, 2004).

Em princípio, um bom actinômetro deve satisfazer as seguintes características: não ser muito sensível à variação de concentração dos reagentes, temperatura, intensidade de luz, comprimento de onda de excitação, vestígios de impurezas e oxigênio (MONTALTI; MUROV, 2006, p. 601). Muitos actinômetros são baseados em reações redox de compostos de coordenação, tais como o ferrioxalato de potássio e o sal de Reinecke. O ferrioxalato de potássio, por exemplo, em soluções ácidas, é muito sensível no intervalo de 250 a 500. Já o sal de Reinecke, é excelente para comprimentos de onda maiores, no intervalo de 316 a 750 nm (KUHN; BRASLAVSKY; SCHMIDT, 2004).

6.4.11.3 Actinometria com ferrioxalato de potássio

Em 200-500 nm, o ferrioxalato de potássio possui atividade fotoquímica, ocorrendo a reação apresentada pela Equação 7. Os íons  $Fe^{2+}$  podem ser determinados espectrofotometricamente dispondo-se da utilização de um reagente bastante seletivo, a 1,10-fenantrolina (phen), que em meio ácido forma um complexo de cor avermelhada com o  $Fe^{2+}$  (Equação 8), cuja formação pode ser acompanhada por Uv-visível, pois o complexo [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> tem absortividade molar ( $\epsilon$ ) alta (1,11 x 10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em 510 nm).

$$[Fe^{III}(C_2O_4)_3]^{3-} \longrightarrow [(C_2O_4)_2Fe^{II} - OCO - COO]^{3-} \longrightarrow Fe^{2+} + 2CO_2 + 3C_2O_4^{2-}$$
(7)

$$\operatorname{Fe}^{2+}_{(aq)} + 3 \operatorname{phen}_{(aq)} \xrightarrow{} [\operatorname{Fe}(\operatorname{phen})_3]^{2+}_{(aq)} \tag{8}$$

Portanto, este actinômetro foi utilizado para medir a intensidade da luz nos comprimentos de onda de 350 nm. Foram preparadas as seguintes soluções:

Solução A: Ferrioxalato de potássio K<sub>3</sub>[Fe(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O 6x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>;

<u>Solução B</u>: Preparada pela mistura de 600 mL de solução de acetato de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> e 360 mL de  $H_2SO_4$  1 mol L<sup>-1</sup>, e diluída para 1 L.

<u>Solução C:</u> 1,10-fenantrolina 0,1% (m/v): dissolveu-se 0,1 g de 1,10-fenantrolina em 100 mL de água destilada à quente ( $\sim$ 70,0±0,1 °C).

Somente luz vermelha foi mantida acesa no local onde a actinometria e as irradiações foram realizadas. Foram transferidos 3,0 mL (V<sub>1</sub>) da solução **A** para uma cela de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm e, 2,0 mL para um balão volumétrico de 10,0 mL (controle). A solução da cubeta foi irradiada (com agitação) durante determinado tempo, no comprimento de onda em que foram irradiadas as amostras. Desta solução irradiada, foram transferidos 2,0 mL (V<sub>2</sub>) para um balão volumétrico de 10,0 mL (V<sub>3</sub>). À solução irradiada, assim como ao controle foram adicionados 2,5 mL de solução **B** e 1,0 mL da solução **C**. Os volumes dos balões foram completados com água deionizada para 10,0 mL. As soluções foram agitadas e mantidas em escuro por uma hora. Mediu-se a absorbância da solução irradiada e do controle em 510 nm.

A intensidade da luz emitida pela lâmpada utilizada foi calculada pela Equação 9 (MONTALTI; MUROV, 2006):

$$I = \frac{(6.10^{23}) V_1 V_3 \Delta A}{\phi_{\text{Fe}} t V_2 l \varepsilon_{\text{Fe}} (1 - 10^{-\text{Abs}})}$$
(9)

Em que V<sub>1</sub> é o volume da solução de actinômetro irradiada (mL), V<sub>2</sub> é o volume de solução da alíquota irradiada na análise (mL), V<sub>3</sub> é o volume do balão volumétrico no qual V<sub>2</sub> foi diluído (mL),  $\Delta A$  é a diferença da absorbância em 510 nm entre o controle e a solução irradiada,  $Ø_{Fe}$  é o rendimento quântico de formação de Fe<sup>2+</sup> no comprimento de luz irradiada, t é o tempo de irradiação (s), *l* é o caminho ótico da cela fotolisada (cm),  $\varepsilon_{Fe}$  é o coeficiente de absortividade molar do íon complexo [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> a 510 nm (1,11 x 10<sup>4</sup> L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) e I é a intensidade da luz incidente (einstein s<sup>-1</sup>).

#### 6.4.11.4 Avaliação do rendimento quântico de liberação de NO

Com o valor da intensidade da luz incidente (I) calculada por actinometria, calculouse a partir da Equação 10 o rendimento quântico ( $\phi$ ) da liberação de NO para os complexos irradiados em 350 nm. Esses valores foram plotados em um gráfico em função do tempo. O valor extrapolado para o tempo zero por regressão linear foi admitido como sendo o do rendimento quântico de liberação de NO ( $\phi_{NO}$ ). Isso foi feito com o intuito de eliminar o efeito de possíveis fotólises secundárias. Ou seja, a partir de um certo tempo de irradiação pode ocorrer fotodegradação dos produtos, e o rendimento quântico calculado passa a não corresponder à reação de interesse (LIMA, 2006).

$$\phi_{\rm NO} = \frac{n_L}{I \, x \, t \, x \, (1 - 10^{-abs})} \tag{10}$$

Em que:  $n_L$  = número de mols de NO liberados pela reação fotoquímica, I = luz incidente, t = tempo de fotólise (s), abs = valor da absorbância da amostra no comprimento de onda da análise.

#### 6.5 Avaliação da atividade antitumoral

As células MCF-7, MB-MDA231, B16-F10 e MCF-10 foram adquiridas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 6.5.1 Meio de Cultivo

Para o cultivo das células MCF-7, MDA-MB231 e MCF-10 usou-se o meio de Cultura RPMI-1640 (Sigma-aldrich® com 25,0 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio). O meio foi preparado em cerca de 0,90 L de água, onde foi adicionado o conteúdo do envelope e acrescentados 4,502 g de glicose e 1,501 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, o pH da solução foi ajustado a 7,4, acrescentados penicilina (10.000 Ui) e estreptomicina (0,010 g/mL) como antibióticos, anfotericina B (Gibco, USA) como antimicótico (25,0 µg/mL) e 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco, USA), e o volume completado para 1,00 L. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 mm filtro e recolhido em frasco estéril. Para verificação de eventuais contaminações, foram reservadas duas alíquotas de 5,0 mL as quais permaneceram incubadas por 48 horas em estufa (5% CO<sub>2</sub>) a 37,0±0,1 °C.

As células da linhagem celulares foram cultivadas em garrafas de cultura, em meio RPMI e mantidas em atmosfera úmida com concentração controlada de 5% CO<sub>2</sub>, com troca de meio em média a cada 2 dias.

#### 6.5.2 Ensaios de citotoxicidade dos complexos de rutênio

Ao atingir aproximadamente 90% de confluência nas garrafas de cultura, o meio foi removido e as células foram soltas através do seguinte procedimento: adição de 5,0 mL de solução de Tripsina/EDTA (0,13% de tripsina e 0,020% EDTA, Gibco, USA) e incubação por 5 minutos em estufa a 37,0±0,1 °C. A suspensão celular obtida foi recolhida e centrifugada com quantidade equivalente de meio RMPI completo, por 10 minutos a 1000 r. p. m. Posteriormente, o meio foi removido e adicionado novamente 10,0 mL de meio RPMI completo. As células foram contadas a partir da câmara de Neubauer e de um microscópio óptico.

As células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços de forma que em cada poço contivesse ~2,0 x  $10^4$  células e um volume de 0,10 mL. Após 24 horas de incubação em estufa, atmosfera de 5,0% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37,0±0,1 °C, foi verificada a confluência das células, como no exemplo da Figura 15, em que se pode observar a confluência da célula MCF-7. Então, foram adicionados os tratamentos com diferentes complexos de rutênio, nas concentrações de 0,20 a 5,0 x  $10^2 \mu$ M (diluição seriada), para o ensaio de viabilidade celular a partir do teste do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)].



Figura 15. Fotos obtidas através de microscópio óptico das células MCF-7 para verificação de confluência.

Fonte: autora.

Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada complexo e posteriormente foi analisada sua resposta citotóxica pela análise da viabilidade celular.

#### 6.5.3 Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico comumente usado como medida de capacidade de enzimas mitocondriais reduzirem o sal de tetrazolio ( $\lambda_{máx} = 400$  nm, cor amarelada) à formazan ( $\lambda_{máx} = 570$  nm), um produto de coloração roxa, como apresentado na Figura 16. O princípio deste método consiste no fato de que células vivas, em crescimento, possuem mitocôndrias que promovem a respiração celular, portanto irão converter o MTT no produto corado roxo. Já as células mortas, ou em processo de morte celular, essa função mitocondrial encontra-se comprometida, não havendo, portanto, conversão do MTT no produto corado. sendo esse um ensaio de medida de viabilidade celular diretamente proporcional, cuja intensidade da cor permite a determinação da quantidade de células viáveis partindo da quantidade de enzimas presentes nas mitocôndrias das células vivas, capazes de realizarem a reação (MOSMANN, 1983).





Fonte: autora.

Após a adição do MTT na concentração de 0,005 g mL<sup>-1</sup>, as células foram incubadas em estufa, nas mesmas condições já descritas, por mais 3 horas. Em seguida, o conteúdo líquido foi removido das placas, sendo adicionados posteriormente 0,10 mL de DMSO para solubilizar o precipitado formado pela redução do sal. As absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA) ou leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) e, a partir destes dados, a porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da Equação 11.

$$Viabilidade \ celular \ (\%) = \frac{(Absorbância \ das \ células \ tratadas)}{(Absorbância \ do \ controle \ negativo) \ x \ 100}$$
(11)

Para a interpretação dos resultados, as médias de viabilidade celular obtidas foram subtraídas do valor médio de absorbância do grupo controle, no qual não foi adicionado o complexo e sim quantidade equivalente de solvente (DMSO), o mesmo utilizado para solubilizar os complexos. Os valores foram expressos em percentuais e comparados com o grupo controle não tratado (somente células com meio de cultivo). Quando a absorbância é menor do que a obtida para o grupo controle tem-se um indicativo de proliferação celular reduzida ou morte celular.

O valor que inibe 50% o crescimento celular foi determinado por meio do gráfico de dose-resposta, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### 6.6 Avaliação da Atividade Tripanocida

Os experimentos *in vitro* para verificação de atividade tripanocida, foram realizados no Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, no Laboratório de Parasitologia, sob orientação do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, Profa. Dra. Zumira Aparecida Carneiro e Dra. Carla Duque Lopes.

#### 6.6.1 Cepa de T. cruzi

Para os testes biológicos de atividade tripanocida *in vitro* foi utilizada a cepa Tulahuén LacZ (forma amastigota), que expressa constitutivamente a enzima  $\beta$ -galactosidase oriunda da bactéria *Escherichia coli*. A viabilidade dessa cepa de *T. cruzi* é observada ao adicionar o substrato da  $\beta$ -galactosidase em cultura.

#### 6.6.2 Ensaios de Citotoxicidade

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos complexos foi utilizado o teste MTT. Para o teste, 1,0 x  $10^5$  células da linhagem LLC-MK2 (célula epitelial de rim de macaco) foram distribuídas em microplacas de 96 poços na presença dos complexos nas concentrações de 0,20 a 5,0 x  $10^2$  µM, e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. O composto Benzonidazol (BZN) foi utilizado como controle positivo, assim como o solvente utilizado para

diluição dos complexos (DMSO) foi utilizado como controle negativo. Ao final do período de incubação, foi realizado o teste de viabilidade celular nas mesmas condições reportadas no Item 6.4.3.

#### 6.6.3 Avaliação da atividade tripanocida in vitro sobre as formas amastigotas

Para a avaliação da citotoxicidade dos complexos, foram cultivadas células LLC-MK2  $(1,0 \times 10^5 \text{ células/poço})$  em placas de 96 poços. Após 4 horas, cepas Tulahuén LacZ foram adicionadas em uma razão de 10:1 e incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas a 37,0±0,1°C. Após este período de incubação, as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante foram retiradas por lavagens sucessivas e permaneceram somente as formas amastigotas.

Os complexos foram adicionados em diferentes concentrações através de diluição seriada e permaneceram em cultura por 48 horas. Ao final deste período, foram adicionados 10,0  $\mu$ L do substrato CPRG (chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranoside, 400  $\mu$ M em 0,30% Triton X-100, pH 7.4). Após 6 horas de re-incubação nas mesmas condições, as absorbâncias foram obtidas no comprimento de onda de 570 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da Equação 13. O valor que inibe 50% o crescimento celular foi determinado por meio do gráfico de dose-resposta, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### 6.6.4 Critério de inclusão dos fármacos nos testes in vivo

A atividade tripanocida foi expressa neste trabalho por meio dos valores de IC<sub>50amastigota</sub> os quais representam a concentração inibitória mínima para que ocorra a morte de 50% dos parasitos (forma amastigota) *in vitro*. E a citotoxicidade foi avaliada sob as células LLCMK<sub>2</sub> (fibroblasto de rim de macaco), sendo expressa por meio dos valores de CC<sub>50LLCMK2</sub>. Desta forma, com intuito de selecionar candidatos para os estudos *in vivo*, o índice de seletividade foi calculado (SI = CC<sub>50LLCMK2</sub>/IC<sub>50amastigota</sub>).

De acordo com a estratégia de avaliação de novos fármacos recomendados pela Organização de Iniciativas de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi- *Drugs for*  *Negelcted Diseases Iniciative*), quando um composto apresenta um SI maior que 10 é considerado promissor para desenvolvimento de um novo fármaco (NAVARRO et al., 2010).

#### 6.6.5 Análise dos dados obtidos para os ensaios in vivo

Para análise estatística dos dados obtidos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o método de Tukey-Kramer para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais, utilizando um p<0.05. Esses testes serão realizados pelo programa estatístico INSTAT (Graph Pad®). Para avaliar a sobrevida foi utilizado o método de Kaplan Meyer.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 7. CAPÍTULO 1

# **COMPLEXOS** cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>2H<sub>2</sub>O (**AR1**) e cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>).2H<sub>2</sub>O (**AR2**)

#### 7.1 Introdução

Complexos de rutênio(II) contendo ligante nitrito/nitrosilo têm sido relatados como potenciais agentes liberadores de óxido nítrico. Esta liberação pode ocorrer por reações de transferência de oxigênio (CICILLINI et al., 2009), redução (TFOUNI et al., 2010) e/ou processos fotoquímicos (BORGES et al., 1998; SAUAIA; SILVA, 2003; TOGNIOLO; DA SILVA; TEDESCO, 2001). Complexos nitrosilos de rutênio(II) são capazes de liberar NO em meio biológico e por conseguinte, eles podem ser utilizados como fármacos ou como uma ferramenta para avaliar o efeito causado por diferentes concentrações de NO produzido. Apesar de ser reportado um grande número de complexos nitrosilos de rutênio contendo bipiridínas (Ru-bpy), a relação estrutura-atividade destes compostos ainda não é bem estabelecida.

Neste contexto, desenvolver complexos Ru-bpy que possuam uma melhor biocompatibilidade, permitiria acrescentar o entendimento da relação estrutura-atividade destas espécies e porventura sua aplicação como possível metalo-fármaco. Por isso, buscou-se sintetizar complexos do tipo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>n+</sup> e *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>(n-1)+</sup> (L=3-etinilpiridina ou derivado de aminoácido). Nestes compostos o íon rutênio possui seis sítios de coordenação gerando espécies pseudo-octaédricas. Variações de suas propriedades, tais como estabilidade cinética e termodinâmica, reatividade fotoquímica, capacidade de interação com biomoléculas, entre outras, são estudos que devem ser conduzidos no âmbito de aplicação bioinorgânica. Neste trabalho optou-se por utilizar complexos contendo 2,2'-bipiridina, o qual age como um quelato (OMAE, 2004), proporcionando estabilidade aos complexos de rutênio(II) assim formados, permitindo relacionar labilidade de outros sítios ligantes à atividade biológica observada.

A estabilidade da ligação envolvendo ligantes aromáticos contendo nitrogênio como heteroátomo (iminas) e o centro metálico de Ru(II) é explicada através da natureza desta ligação. A basicidade do ligante bpy faz com que interaja fortemente com o íon metálico Ru<sup>2+</sup> (ácido de Lewis) através da ligação  $\sigma$ , o que de certa forma, gera instabilidade à ligação face a um aumento de densidade eletrônica sobre o íon metálico. No entanto, a estabilidade verificada é explicada pelo processo denominado de retrodoação envolvendo a interação d<sub>π</sub>(Ru<sup>II</sup>)- $\pi^*$ (bpy) (JURIS et al., 1988) (Figura 17). Figura 17. Representação da ligação do íon metálico Ru<sup>2+</sup> e um ligante 2,2'-bpiridina.



Fonte: autora.

#### 7.2 Síntese

As sínteses dos complexos rutênio-nitrosilos foram conduzidas conforme rota descrita no item 6.3 dos Materiais e Métodos, e está sumarizada no fluxograma apresentado na Figura 18.

Figura 18. Rota sintética para obtenção dos complexos rutênio-nitrosilos.



Fonte: autora.

Em resumo, primeiramente foi substituído o ligante cloreto do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] pelo ligante nitrito para formação do complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]. Posteriormente, foi realizada a síntese do complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, a qual pode ser tratada como um equilíbrio ácido-base, em que a formação do complexo nitrosilo é reversível e dependente do pH. Assim, em pH ácido e presença do contra-íon  $PF_6^-$  pôde ser obtido o complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, com rendimento de 91,0%.

A reação de NaN<sub>3</sub> com o complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, à temperatura ambiente, produz o complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(solvente)]<sup>+</sup> em quantidade estequiométrica, como relatado para complexos similares (METZKER; CARDOSO; FRANCO, 2013). A azida de sódio reduz o NO<sup>+</sup> coordenado Ru(II) para NO<sup>0</sup>. O passo fundamental desta reação é a baixa afinidade do Ru(II) pelo NO<sup>0</sup>, fazendo com que ocorra a quebra da coordenação ao centro metálico e liberação de NO.

A adição de ligante 3-etpy ao meio reacional contendo cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(solvente)]<sup>+</sup> gera o complexo cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>+</sup> que é precipitado como sal de hexafluorfosfato por adição de solução aquosa de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. Este complexo foi purificado por cromatografia em coluna, visto que através da recristalização não foi possível isolar o produto. A alumina neutra foi utilizada como fase estacionária e etanol como eluente. A separação da mistura de complexos ocorreu devido à interação complexo-fase móvel e complexo-fase estacionária.

O complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>3+</sup> foi obtido pela adição de HPF<sub>6</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> ao complexo *cis*-[Ru<sup>II</sup>(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>+</sup>. Esta síntese consistiu basicamente em adicionar ácido à espécie *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>+</sup>, que assim como o complexo *cis*-[Ru(NO)(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, apresenta reversibilidade e é dependente do pH do meio, tratando-se de um equilíbrio ácido-base (SAUAIA; SILVA, 2003). Visto que esta reação provém conversão total do complexo *cis*-[Ru<sup>II</sup>(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)](PF<sub>6</sub>) (AR1) em *cis*-[Ru<sup>II</sup>(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (AR2), não houve necessidade de mais um passo de purificação.

Os complexos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia de absorção no infravermelho e ultravioleta-visível (Uv-vis), voltametria cíclica, espectroeletroquímica, fotoquímica e cálculos DFT.

#### 7.3 Análise Elementar

Conforme abordado no item 7.2, a reação de obtenção do complexo AR2 provém a conversão total do complexo AR1 em AR2. Assim, estando o complexo AR1 puro, a síntese do complexo AR2 gerará complexo com alto grau de pureza. Portanto, optou-se por realizar

experimento de análise elementar somente para o complexo AR1 sem a necessidade do mesmo experimento para o complexo AR2. Os dados obtidos (Tabela 3) demonstraram que o complexo AR1 se encontrava puro após purificação por coluna cromatográfica.

Amostra	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
Replicata experimental I	43,63	3,38	11,1
Replicata experimental II	43,24	3,53	11,1
Calculado	43,61	3,39	11,3
Erro (%)	0,40	1,90	1,86

Tabela 3. Dados obtidos experimentalmente (triplicatas) e calculados para a análise elementar do complexo AR1.

Fonte: autora.

#### 7.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)

Os espectros FTIR foram obtidos para a maioria dos compostos sintetizados neste trabalho, com a finalidade de caracterizar as estruturas obtidas e as ligações envolvidas. O espectro para o precursor *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(Figura 19) apresenta bandas entre 1300 - 1600 cm<sup>-1</sup> e 3000 - 3100 cm<sup>-1</sup> que são atribuídas aos estiramentos v(C-C) e v(C-N) dos ligantes 2,2'-bipiridina (bpy) (SOCRATES, 1995). Bandas de vibrações de deformação da ligação C-H no plano do anel são observadas entre 1000 e 1300 cm<sup>-1</sup>, enquanto bandas de deformação da ligação da ligação C-H fora do plano são observadas entre 600 a 880 cm<sup>-1</sup>. Em geral, estes complexos apresentam água de cristalização (HESEK et al., 1999), e por isso em ~3490 cm<sup>-1</sup> é possível observar uma banda larga referente ao estiramento da hidroxila.



Figura 19. Espectro FTIR do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] obtido em pastilha de KBr.

Fonte: autora.

Existem muitas formas do NO se coordenar a metais de transição (Figura 20) (DE LA CRUZ; SHEPPARD, 2011). Os complexos Ru-bpy contendo o ligante NO são descritos como Ru<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>, e em geral, apresentam bandas na região de 1800 a 1970 cm<sup>-1</sup> (BOTTOMLEY, 1978). Desde que a variação na frequência de estiramento de NO é dependente da natureza do metal, do estado de oxidação do ligante e sua estereoquímica, a técnica de FTIR é muito importante para se avaliar a natureza desta ligação.





Fonte: Andaptado de (DE LA CRUZ; SHEPPARD, 2011).

Tratando-se da estereoquímica do ligante, o NO coordenado ao rutênio pode apresentar duas geometrias quando coordenado, linear ou angular (*bent*). Estas geometrias refletem as interações envolvidas na ligação Ru-NO.

A geometria linear é observada para complexos com configuração Ru-NO<sup>+</sup> ou Ru-NO<sup>0</sup>, ambos com hibridização sp, em que os orbitais  $\pi^*$  encontram-se aptos a receber densidade eletrônica do metal. Neste caso, os comprimentos de ligação Ru-N encontram-se na faixa de ~1,60 a 1,75 Å e frequências de estiramento na faixa de 1650-1975 cm<sup>-1</sup> (FORTNEY, 2007; MICHAEL; MINGOS; SHERMAN, 1989). Já a geometria angular é observada quando ocorre a coordenação do NO a um íon metálico rico em elétrons, induzindo o NO a se comportar como íon nitroxil (NO<sup>-</sup>), possuindo hibridização sp<sup>2</sup>. Em decorrência desta característica, os comprimentos de ligação Ru-N são maiores, estando na faixa de 1,80 a 1,95 Å e frequências de estiramento menores, no intervalo de 1525-1750 cm<sup>-1</sup> (FORTNEY, 2007; MICHAEL; MINGOS; SHERMAN, 1989)

Para os complexos rutênio-nitrosilos sintetizados, as bandas atribuídas ao estiramento da ligação N-O encontram-se na região entre 1800 a 2000 cm<sup>-1</sup>. A ligação Ru-NO é caracterizada pela doação de densidade eletrônica do NO, através de orbitais de caráter predominante do nitrogênio, para o metal através de uma ligação  $\sigma$  e, posterior retrodoação de densidade eletrônica dos orbitais d $\pi$  do rutênio para os orbitais  $\pi^*$  do NO (Figura 21). Quanto maior for a intensidade desta retrodoação em função da combinação dos orbitais, menor será o comprimento da ligação Ru-N(O). No entanto, maior será o comprimento da ligação N-O em virtude da repulsão eletrônica gerada pela retrodoação d $_{\pi} \rightarrow \pi^*$ . Procurando entender a natureza desta ligação, a utilização da técnica de FTIR pôde fornecer informações essenciais para o entendimento acerca das estruturas propostas neste trabalho. p





Ligação σ



Retrodoação  $\pi$ 

Fonte: autora.

O espectro FTIR para o complexo AR2 está apresentado na Figura 22. São observadas inúmeras bandas na região entre 1000 e 3500 cm<sup>-1</sup>. As bandas observadas em 558 e 837 cm<sup>-1</sup> são associadas aos estiramentos da ligação P-F existente no contra-íon  $PF_6^-$ . A banda fina e intensa observada em 1945 cm<sup>-1</sup> corresponde ao v(NO). Outras bandas estão apresentadas na Tabela 4.



Fonte: autora.

 Tabela 4. Tentativa de atribuição para os complexos AR1 e AR2 com base nas atribuições para o complexo precursor cis-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]

Complexo	bpy	v(NO)	<b>v</b> ( <b>NO</b> <sub>2</sub> )	v(C≡C)	v(PF)
cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ]	657, 729, 765, 1017, 1264, 1309, 1419, 1444, 1463, 1600, 3089, 3098, 3490				
AR1	731 763, 1273, 1313, 1423, 1446, 1468, 1604, 3100, 3137, 3450		v <sub>ass</sub> (NO <sub>2</sub> ) 1446 v <sub>s</sub> (NO <sub>2</sub> ) 1338	2246	558, 844
AR2	725, 765, 1029, 1253, 1320, 1453, 1473, 1607, 3100, 3137, 3450	1945		2247	558, 837

Fonte: autora.

#### 7.5 Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-visível (Uv-vis)

Tanto os precursores quanto os complexos inéditos sintetizados neste trabalho apresentam ligantes polipiridínicos na esfera de coordenação. Lever (1984) demonstrou que os espectros eletrônicos na região do Uv-visível para estes complexos apresentam bandas referentes a transições de campo ligante (CL), transições de transferência de carga do metal para o ligante (TCML) e transições internas dos ligantes (IL) (Figura 23).

Figura 23. Esquema das possíveis transições para os complexos de rutênio.



Fonte: (Adaptado de Lima, 2006, p. 90)

De acordo com a Teoria do Campo Ligante, as transições de campo ligante (CL) são decorrentes dos níveis energéticos do metal. Estas bandas ocorrem de transições eletrônicas do orbital com configuração  $t_{2g}^6$  para o orbital  $e_g$  do  $Ru^{2+}$ , considerando que os complexos estão em campo octaédrico. Portanto, estas transições são do tipo d-d.

As transições do tipo TCML são observadas quando se tem complexos de rutênio coordenados a ligantes que possuem orbitais  $\pi^*$  de baixa energia, como os ligantes aromáticos. Esta transição ocorre em virtude dos orbitais d estarem próximo o suficiente em energia dos orbitais vazios do ligante, aparecendo em regiões do visível do espectro eletrônico caso o metal se encontre em estado de oxidação baixo. Além disso, estas bandas possuem coeficiente de absortividade molar acima de 10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Visto que os elétrons de valência encontram-se em orbitais do tipo  $\pi$  e admitindo-se que os ligantes possuem orbitais desocupados  $\pi$  para receber densidade eletrônica, a transição mais pertinente que ocorre para estes complexos é Ru 4d<sub> $\pi$ </sub>  $\rightarrow \pi^*(L)$  (KROENER; HEEG; DEUTSCH, 1988).

Além da transição TCML, nos espectros dos complexos Ru-bpy também são observadas bandas intraligante (IL),  $n \rightarrow \pi^* e \pi \rightarrow \pi^*$  (KROENER; HEEG; DEUTSCH, 1988). Estas bandas possuem semelhança com as bandas observadas nos ligantes livres. As bandas que envolvem elétrons livres (n) aparecem em regiões de menor energia do que as bandas de transição eletrônica  $L\pi \rightarrow L\pi^*$ , além de serem relativamente fracas.

Nos complexos relatados neste trabalho, não foram possíveis observar as bandas d-d. Sugere-se que estão bandas estejam localizadas em regiões de alta energia do espectro eletrônico, e por possuírem baixa intensidade, são encobertas pelas bandas IL.

Na Figura 24 são possíveis observar os espectros na região do Uv-visível para os complexos AR1 e AR2 na concentração de 67,0 µmol L<sup>-1</sup> e temperatura de 25,0±0,1 °C. Haja vista que a manutenção do complexo AR2 é dependente do pH devido ao equilíbrio ácido-base já mencionado anteriormente, foi obtido espectro em meio ácido, enquanto do complexo AR1 foi obtido em meio aquoso. Para o complexo AR1, as bandas observadas em 200, 242 e 283 nm são atribuídas a transições IL do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  relativas aos ligantes insaturados (bpy e 3-etpy), visto que são bandas também observadas nos espectros dos ligantes livres e do complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] (Tabela 5). Já a banda centrada em 407 nm pode ser atribuída à transição de TCML, evolvendo transições Ru 4d<sub> $\pi</sub> \rightarrow \pi^*$ (bpy, NO<sub>2</sub>) (SAUAIA; SILVA, 2003).</sub>

Da mesma forma que o complexo AR1, o complexo AR2 possui bandas em 300 e 200 nm atribuídas a transições IL do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . No entanto, o efeito da alteração do ligante nitrito pelo ligante nitrosil confere diferenças significantes ao se comparar os espectros destes dois complexos. O desaparecimento da banda na região do visível em 407 nm (AR1) e aparecimento de um ombro em 330 nm (AR2) corrobora com esta premissa. A mudança da banda localizada em regiões de maior energia é explicada pela forte retrodoação existente entre o rutênio e o ligante nitrosil, resultando em estabilização adicional dos orbitais d $\pi$ , o que aumenta o desdobramento destes orbitais e altera a transição TCML para a região do ultravioleta.

**Figura 24.** Espectros na região do Uv-visível dos complexos AR1 (67,0 μmol L<sup>-1</sup>) em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e AR2 (67,0 μmol L<sup>-1</sup>) em água.



Fonte: autora.

Os coeficientes de absortividade molar foram obtidos a partir da Equação de Lambert-Beer. Através do coeficiente angular da reta gerada do gráfico de absorbância *versus* concentração (Figuras 25 e 26) foram possíveis obter os coeficientes de absortividade molar (ɛ).

Figura 25. Retas de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade molar do complexo AR1.



Fonte: autora.



Figura 26. Retas de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade molar do complexo AR2.

Fonte: autora.

Esta análise gráfica realizada a partir da construção do gráfico de dispersão entre as variáveis, demonstrou a relação existente entre os pontos, gerando uma reta com um coeficiente de correlação linear (r) próximo de 1. O resumo das absortividades molares encontra-se apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes de absortividade (E) molar obtidos a partir de espectros na região do U	Jv-visível em meio
aquoso para o complexo AR1 e HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> para o complexo AR2.	

Complexo	Comprimento de onda (log E)
AR1	242 nm (3,79)
	283 nm (4,17)
	405 nm (3,44)
AR2	217 nm (4,35)
	300 nm (3,89)
	330 nm (3,54)

Fonte: autora.

#### 7.5.1 Determinação da Constante de Equilíbrio

Sabe-se que o óxido nítrico participa de inúmeros processos fisiológicos e possui atuação importante em processos inflamatórios. Neste sentido, para viabilizar a utilização de

complexos rutênio-nitrosilos como metalofármacos, é necessário conhecer mais sobre seu comportamento químico e mecanismo de ação em sistemas biológicos. Para isso, o conhecimento e descrição das propriedades físico-químicas são necessárias.

Foi realizado estudo da constante de equilíbrio ( $K_{eq}$ ) entre as espécies Ru-NO<sup>+</sup> e Ru-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de forma a entender o comportamento ácido-base destes complexos em solução. A interconversão entre nitrosilo-nitrito para os complexos AR1 e AR2 (Equação 12) foi determinada através da avaliação do equilíbrio ácido-base. A determinação do pH de interconversão foi realizada por espectrofotometria a 25,0±0,1 °C através de leituras de absorbância de soluções de mesma concentração do complexo AR1 (4,10 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) em soluções de tampão fosfato com diferentes valores de pH (Figura 27). A força iônica foi mantida em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. As soluções foram mantidas em condições de escuro durante 3 horas, uma vez que foi observado que este equilíbrio é um processo lento, o qual é semelhante a compostos relatados anteriormente (SAUAIA; SILVA, 2003).

$$cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NO)]^{3+}_{(aq)} + 2 OH^{-}_{(aq)} \implies cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NO_{2})]^{+}_{(aq)} + H_{2}O_{1}$$
 (12)



Figura 27. Espectros de absorção eletrônica dos complexos AR1 e AR2 em diferentes pHs.  $C = 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}.$ 

Fonte: autora.

Dois pontos isosbésticos foram observados em 300 e 345 nm, consistente com duas espécies em solução. Plotando-se os dados obtidos de pH *versus* concentração do complexo AR1, observou-se uma sigmoide centrada característica de soluções com característica ácido-

base (Figura 28). Através do cálculo da primeira derivada desta sigmoide, obteve-se o valor de pH = 3,9, o que corresponde a concentrações equivalentes dos complexos AR1 e AR2 em solução.



Figura 28. Sigmóide obtida a partir da variação do pH em função da concentração do complexo AR1.

Fonte: autora.

De posse destes dados experimentais, foi possível calcular a  $K_{eq}$  para a interconversão Ru-NO/Ru-NO<sub>2</sub> (Equação 13) utilizando-se do artifício do cálculo do coeficiente angular do gráfico de 1/(absorbância em 416 nm) *versus* 1/[OH<sup>-</sup>]<sup>2</sup> no ponto em que a concentração de Ru-NO é igual à concentração de Ru-NO<sub>2</sub>.

$$K_{eq} = \frac{[cis - [Ru^{II}(NO_2)(bpy)_2(3 - etpy)]^-}{[cis - [Ru^{II}(NO^+)(bpy)_2(3 - etpy)]^{3+} + [OH^-]^2}$$
(13)

O perfil espectral mostra que em pH acima de 3,9, o complexo AR1 está presente em quantidades significativas na solução. No gráfico apresentado na Figura 29 é possível inferir que a linearidade da reta prediz que o processo global de conversão AR1 em AR2 é um processo que envolve dois prótons



Figura 29. Reta obtida com os valores de absorbância para os complexos AR1 e AR2 em pH≅4,2.

Fonte: autora.

Através da equação da reta (Figura 29), a K<sub>eq</sub> medida para a reação ácido-base descrita na Equação 12 foi de 1,52 x  $10^{21}$  L<sup>2</sup> mol<sup>-2</sup>, o qual é bastante similar a espécies de fórmula geral *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(L)]<sup>3+</sup> (SAUAIA; SILVA, 2003; TFOUNI et al., 2003). Este dado fornece informações sobre a eletrofilicidade relativa dos diferentes compostos rutênio-nitrosilos. Alguns exemplos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de constante de equilíbrio para complexos do tipo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(L)]<sup>3+</sup>.

Complexo	$\mathbf{K}_{eq}$ ( $\mathbf{L}^2$ mol <sup>-2</sup> )	Referência
cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (4-pic)] <sup>3+</sup>	3,80 x 10 <sup>20</sup>	SAUAIA & daSILVA, 2003
cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (3-etpy)] <sup>3+</sup>	1,52 x 10 <sup>21</sup>	Presente trabalho
cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (py)] <sup>3+</sup>	$1.60 \ge 10^{21}$	SAUAIA & daSILVA, 2003
cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (4-acpy)] <sup>3+</sup>	$3.20 \ge 10^{21}$	SAUAIA & daSILVA, 2003

\*4-pic = 4-picolina, py = piridina e 4-acpy = 4-acetilpiridina. Fonte: autora.

Observa-se que ocorre o aumento nos valores de K<sub>eq</sub> de acordo com a seguinte ordem 4-pic <3-etpy <py <4-acpy. Este aumento na  $K_{eq}$  é coerente com o aumento do caráter  $\pi$ -receptor dos ligantes "L" nos complexos de fórmula geral *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(L)]<sup>3+</sup>.

O caráter  $\pi$ -receptor está diretamente relacionado à capacidade do ligante em acomodar nos orbitais  $\pi^*$  a densidade eletrônica provinda dos orbitais  $d\pi$  do metal. Assim, a constante de equilíbrio reflete informações sobre a reatividade do ligante nitrosil frente ao ataque nucleofílico ocasionado pela hidroxila. No caso do ligante contendo o grupo alcino em sua estrutura (3-etpy), a reatividade do complexo AR2 se mostra poucas unidas menor do que a reatividade do complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>3+</sup>, sugerindo que este ligante apresenta um caráter  $\pi$ -receptor ligeiramente menor do que a py, mas maior do que a 4-picolina, por exemplo.

Ademais, Gorelsky e Lever (2001) estudaram a influência do ligante expectador "L" na ligação Ru-NO de complexos tetraamínicos de fórmula geral [Ru(NO)(NH<sub>3</sub>)4L]<sup>n+</sup> através de cálculos DFT. De fato, estes estudos apontaram para a participação do ligante NO<sup>+</sup> nos orbitais LUMO e LUMO+1, mas ressaltaram que estes orbitais possuem também características metálicas (4d<sub>xy,yz</sub> Ru), mesmo que em menor quantidade (até 33%), quando o ligante coordenado é  $\pi$ -doador (GORELSKY; LEVER, 2001). Assim, o povoamento dos orbitais LUMO e LUMO+1 será dependente também da natureza dos ligantes expectadores, e consequentemente irá influenciar na reatividade do ligante NO. Portanto, quanto maior for a deficiência eletrônica sobre o ligante NO<sup>+</sup> em virtude da acidez do íon metálico (Ru<sup>2+</sup>) que é modulada pelos ligantes, maior será a energia necessária para que a reação entre o NO<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> ocorra (TFOUNI et al., 2003).

#### 7.6 Estudos Eletroquímicos

Como tentativa de se estudar os processos eletroquímicos que envolvem a redução do ligante nitrosil e sua possível reversibilidade, realizaram-se ensaios de voltametria cíclica, espectroeletroquímica, bem como eletrólise a potencial controlado.

#### 7.6.1 Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico do complexo AR2 foi avaliado por voltametria cíclica. A princípio, dado o caráter eletroativo do ligante nitrosilo (NAGAO et al., 1989), as análises foram desenvolvidas no sentido de obter valores e interpretação dos processos eletroquímicos condizentes com os processos de oxirredução apresentados na Equação 14 e reações acopladas.

$$Ru^{\parallel}-NO^{+} + e^{-} \implies Ru^{\parallel}-NO^{0} + e^{-} \implies Ru^{\parallel}-NO^{-}$$
(14)

Os experimentos foram conduzidos em solução de acetonitrila contendo eletrólito suporte hexafluorfosfato de tetrabultiamônio (TBAH) 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Foi utilizado eletrodo de platina como eletrodo de trabalho, o qual não possui processos de oxirredução na faixa de -1,00 a +1,00 V *versus*  $Fc^+/Fc^0$  em acetonitrila (SATO; MORINAGA; ISHIZUK, 2013), possuindo a capacidade de detecção de substâncias neste intervalo de potenciais sem interferência do solvente.

O comportamento do complexo AR2 foi estudado inicialmente na concentração de  $1,10 \ge 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> (Figura 30). A varredura iniciouse no sentido catódico, visto que o complexo se encontra inicialmente com o fragmento "Ru-NO<sup>+</sup>".





Fonte: autora.

Na região entre -1,00 a +1,00 V *vs*  $Fc^+/Fc^0$  foram observados três picos catódicos (1c, 2c e 3c) e três picos anódicos (1a, 2a e 4a). O pico (1c) encontra-se na região de potencial +0,13 V *vs*  $Fc^+/Fc^0$  e possui pico anódico correspondente na varredura inversa. Estudos realizados para complexos similares (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015), demonstraram que estes picos, em geral, são relacionados ao processo de oxirredução do ligante

nitrosil, de Ru<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup> para Ru<sup>II</sup>-NO<sup>0</sup>. Para o complexo AR2, este processo é apresentado na Equação 15.

$$cis-[\operatorname{Ru}^{II}(\operatorname{bpy})_{2}(3\operatorname{-etpy})(\operatorname{NO})]^{3+} \xrightarrow{+e^{-}} cis-[\operatorname{Ru}^{II}(\operatorname{bpy})_{2}(3\operatorname{-etpy})(\operatorname{NO})]^{2+}$$
(15)

Para melhor compreensão da natureza deste processo, o qual pode ocorrer *in vivo* (FORTNEY, 2007) além de ser base do entendimento de metalofármacos liberadores de NO, foi avaliada a sua reversibilidade em diferentes velocidades de varredura (Figura 31). Os voltamogramas cíclicos obtidos foram iniciados em +0,60 V *vs* Fc<sup>+</sup>/Fc<sup>0</sup>, conduzidos para potenciais negativos, invertidos em 0,00 V *vs* Fc<sup>+</sup>/Fc<sup>0</sup> e novamente conduzidos para potenciais positivos até +0,60 V *vs* Fc<sup>+</sup>/Fc<sup>0</sup>. Os processos envolvidos neste intervalo de potenciais foram estudados através do diagnóstico e reversibilidade.

**Figura 31**.Voltamograma cíclico do complexo AR2 (1,10 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) em acetonitrila. Eletrólito suporte TBAH 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Potencial de inversão: 0,00 V *versus* Fc<sup>+</sup>/Fc<sup>0</sup>.



Fonte: autora.

A corrente de pico, neste caso, é dada pela Equação de Randles-Sevcik (Item 6.4.3). Esta equação estabelece alguns princípios para o diagnóstico de reversibilidade de reações eletroquímicas. Assim, caso a reação seja reversível ela irá perfazer os seguintes critérios:

• A razão da corrente de pico anódico e catódico  $(I_{pA}/I_{pC})$  é igual ou próxima à unidade, independente da velocidade (v);

• A diferença entre  $E_{pA}$  e  $E_{pC}$  ( $\Delta E_p$ ) é constante, e não varia com a velocidade de varredura;

• A corrente de pico é diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura.

No caso dos picos observados na Figura 31, foram calculados os valores apresentados na Tabela 7. Os picos 1c e 1a satisfazem dois dos critérios de reversibilidade. A razão  $I_{pA}/I_{pC}$  é bem próxima da unidade no intervalo de velocidades de varredura estudado, além da corrente de pico ser diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura como demonstrado no gráfico de v<sup>1/2</sup> *versus* i (Figura 32), o qual apresenta linearidade. Não obstante, a diferença entre os máximos de potencial entre os picos 1c e 1a não foi constante com a variação da velocidade de varredura, o que caracteriza este processo como um possível processo quase-reversível (NICHOLSON; SHAIN, 1965).

V (mV s <sup>-1</sup> )	E <sub>pA</sub> (V vs Fc <sup>+</sup> /Fc <sup>0</sup> )	E <sub>pC</sub> (V <i>vs</i> Fc <sup>+</sup> /Fc <sup>0</sup> )	I <sub>PA</sub> (µA)	Ipc (µA)	I <sub>pA</sub> /I <sub>pC</sub>	ΔE <sub>p</sub> (V vs Fc <sup>+</sup> /Fc <sup>0</sup> )
25	+0,13	+0,21	1,63	1,70	1,0	+0,073
50	+0,13	+0,21	2,14	2,31	1,1	+0,075
100	+0,14	+0,21	2,88	3,17	1,1	+0,073
200	+0,13	+0,21	3,36	4,47	1,2	+0,076
300	+0,13	+0,21	5,41	5,68	1,0	+0,078
400	+0,13	+0,21	6,30	6,82	1,0	+0,088
500	+0,13	+0,21	7,20	7,66	1,0	+0,088

Tabela 7. Parâmetros eletroquímicos obtidos para o complexo AR2 (1,10 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) em acetonitrila.

Fonte: autora.

**Figura 32**. Gráfico de I<sub>pc</sub> ou I<sub>pa</sub> versus v<sup>1/2</sup> do complexo AR2 em acetonitrila. Coeficiente de correlação da reta Ipa = 0,99617 e Ipc = 0,99353.



Fonte: autora.

O segundo processo catódico para o complexo AR2 (2c) centrado em -0,75 vs Fc<sup>+</sup>/Fc não apresentou pico na varredura inversa, sendo característico de um processo em que ocorre transferência de carga irreversível. Em analogia a complexos similares reportados (CALLAHAN; MEYER, 1977; SAUAIA, 2003), pode-se considerar que em potencial -0,75 vs Fc<sup>+</sup>/Fc ocorre redução no NO coordenado (Equação 16), formação do complexo *cis*-[Ru(NO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>+</sup>, seguida por uma rápida reação química, visto que até mesmo em velocidade alta de varredura, como de 500 mV s<sup>-1</sup>, não é possível observar o pico anódico correspondente. Acredita-se que o complexo formado seja proveniente da reação com oxigênio (ou mesmo superóxido) para geração de um novo complexo (Equação 17), o *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>+</sup>.

$$cis-[\operatorname{Ru}^{II}(\operatorname{bpy})_{2}(3-\operatorname{etpy})(\operatorname{NO}^{0})]^{2+} \xrightarrow[-e]{} cis-[\operatorname{Ru}^{II}(\operatorname{NO}^{-})(\operatorname{bpy})_{2}(3-\operatorname{etpy})]^{2+}$$
(16)

 $cis-[Ru^{II}(NO^{-})(bpy)_{2}(3-etpy)]_{(aq)} + 1/2 O_{2(aq)} \longrightarrow cis-[Ru^{II}(NO_{2})(bpy)_{2}(3-etpy)]^{2+}$  (17)

Este complexo formado por via eletroquímica, é então oxidado a partir da inversão do potencial, gerando o pico observado em +0,42 V *vs* Fc<sup>+</sup>/Fc, que é resultante da reação apresentada na Equação 18.

$$cis-[\operatorname{Ru}^{II}(\operatorname{bpy})_{2}(3-\operatorname{etpy})(\operatorname{NO}_{2})]^{+}$$
  $\stackrel{+e^{-}}{\underbrace{-e^{-}}}$   $cis-[\operatorname{Ru}^{III}(\operatorname{bpy})_{2}(3-\operatorname{etpy})(\operatorname{NO}_{2})]^{2+}$  (18)

Como um dos objetivos deste trabalho é realizar avaliação da atividade biológica do complexo AR2, é relevante entender seu comportamento em meio aquoso também. Para este estudo foram utilizados eletrodo de trabalho de ouro, solução tampão de ácido trifluoracético/trifluoracetato de sódio (HTFA/NaTFA) pH~2,50 e eletrodo de referência Ag/AgCl. O tampão HTFA/NaTFA foi utilizado para manutenção das espécies contendo NO em solução, pois como foi visto anteriormente, a conversão do complexo AR2 em AR1 é dependente do pH.

Primeiramente, no âmbito de averiguar os potenciais envolvidos nos processos de oxirredução do complexo AR2 em meio aquoso, assim como sua dependência com a velocidade de varredura, foi conduzido experimento de voltametria cíclica nas velocidades 25, 50, 100, 200, 300 e 400 mV s<sup>-1</sup>. Dentre os voltamogramas obtidos, somente aqueles conduzidos nas velocidades de 100, 200, 300 e 400 mV s<sup>-1</sup> foram considerados (Figura 33), pois nas outras velocidades de varredura não são observados os picos dos processos de oxirredução do complexo AR2.

O comportamento do complexo AR2 foi estudado na concentração de  $1,10x10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Os voltamogramas cíclicos obtidos foram iniciados em +0,50 V *vs* Ag/AgCl, conduzidos para potenciais negativos, revertidos em -0,50 V *vs* Ag/AgCl e novamente conduzidos para potenciais positivos até +0,50 V *vs* Ag/AgCl.

**Figura 33.** Voltamograma cíclico do complexo AR2 (1,10 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) obtido em tampão HTFA/NaTFA pH~2,5. Potencial de reversão: -0,50 V *versus* Ag/AgCl; v = 100, 200, 300 e 400 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: autora.

Na região entre -0,50 a +0,50 V vs Ag/AgCl, (Figura 33), foram observados dois picos catódicos (1c e 2c) e dois picos anódicos (1a e 4a). O resumo dos potenciais obtidos para o complexo AR2 em meio aquoso, bem como em meio orgânico para via de comparação são resumidos na Tabela 8.

Solvente	ENO <sup>+</sup> /NO <sup>0</sup> (V vs Ag/AgCl)	ENO <sup>0</sup> /NO <sup>-</sup> (V vs Ag/AgCl)
HTFA/NaTFA <sub>(aq)</sub>	+0,15	-0,25
Acetonitrila	+0,13	-0,75

Fonte: autora.

Similarmente, os picos 1c e 2c são atribuídos aos processos centrados no ligante nitrosil, assim como para os processos eletroquímicos observados em acetonitrila. Já os outros picos são relacionados a processos um pouco diferentes, os quais serão abordados a seguir.

#### 7.6.2 Espectroeletroquímica

Com base nos potenciais obtidos a partir da voltametria cíclica em meio aquoso para o complexo AR2, estudou-se o comportamento espectroscópico promovido pela eletrólise a
potencial controlado em -0,10 V *vs* Ag/AgCl. Este valor de potencial foi escolhido visto que é o potencial em que se presume que ocorra a liberação de NO<sup>0</sup>. Este estudo viabiliza o entendimento do sistema de liberação de NO, o que é essencial para se ponderar sua aplicabilidade a sistemas biológicos e seus mecanismos de ação por processos redutimétricos.

Com intuito de analisar o perfil espectral de cada espécie gerada *in situ*, aplicou-se potencial -0,10 V *vs* Ag/AgCl a uma solução de AR2 na concentração de 1,00 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. Concomitantemente, foram obtidos espectros eletrônicos na região do Uv-visível a cada 30 segundos durante 30 minutos. A variação espectral (Figura 34), neste período, demonstra surgimento de um ombro na região de 380 nm, e de duas bandas em 249 e 309 nm, assim como o desaparecimento da banda localizada em 330 nm. Esta banda é atribuída à transição TCML d $\pi \rightarrow \pi^*$  (NO<sup>+</sup>), e em consequência, é de se esperar que ela não esteja presente no espectro do complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sup>0</sup>)]<sup>2+</sup> devido à perda do caráter da ligação Ru-NO<sup>+</sup>. Diferentemente de outros complexos relatados (SAUAIA et al., 2005), a aplicação de -0,10 V *vs* Ag/AgCl ao complexo AR2 não acarreta na liberação de NO<sup>0</sup> (Equação 19) ao meio em quantidades significantes.





Fonte: autora.

$$cis-[Ru^{II}(NO^{+})(bpy)_{2}(3-etpy)]^{3+} \xrightarrow{+e^{-}} cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NO^{0})]^{2+} \xrightarrow{-NO^{0}} cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(H_{2}O)]^{2+}$$
(19)

Uma explicação plausível para a estabilidade da ligação  $Ru^{II}$ -NO<sup>0</sup> no complexo AR2 é que o ligante 3-etpy possui um caráter  $\pi$ -receptor menos pronunciado em comparação com a piridina por exemplo, acarretando em menor retrodoação dos orbitais  $d\pi$  do metal para os orbitais  $\pi^*$  da 3-etpy. Assim, o íon de rutênio(II) não apresenta repulsão eletrônica tão com a mesma intensidade que os complexos já reportados quando da redução do ligante nitrosilo, mantendo a ligação  $Ru^{II}$ -NO<sup>0</sup>, e apresentando total conversão do complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sup>0</sup>)]<sup>2+</sup> em AR2 quando aplicado potencial em +0,40 V *vs* Ag/AgCl.

As características espectrais do complexo formado no segundo processo catódico do voltamograma cíclico em solução HTFA/NaTFA pH~2,5 do complexo AR2 (Figura 33) também foram analisadas. Os espectros na região do Uv-visível foram obtidos de forma similar aos obtidos para verificar a obtenção do complexo Ru<sup>II</sup>-NO<sup>0</sup>, com a diferença de que o potencial aplicado este experimento foi de -0,45 V *vs* Ag/AgCl.

A literatura relata (GORELSKY; LEVER, 2000) que os complexos do tipo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(L)]<sup>3+</sup> apresentam banda em ~500 nm relacionada ao complexo cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(L)]<sup>2+</sup> formado a partir da liberação de NO decorrente da eletrólise. Entretanto, para o complexo AR2, observa-se que a banda formada em 480 nm (Figura 35) pela aplicação de potencial em -0,45 V *vs* Ag/AgCl retorna em grande parte ao seu estado inicial quando re-oxidado a cis-[Ru(NO<sup>+</sup>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>3+</sup> (Figura 36). Para esta banda retornar ao seu estado inicial sem que ocorra a liberação do NO, é preciso que a segunda etapa da reação da Equação 19 não ocorra de fato.

**Figura 35.** Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (1,00 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>), em solução HTFA/NaTFA pH ~2,5, obtidos durante a eletrólise a potencial controlado em -0,45 V *vs* Ag/AgCl, durante 60 minutos.



Fonte: autora.

**Figura 36.** Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (1,00 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>), em solução HTFA/NaTFA pH ~2,5, obtidos durante a eletrólise a potencial controlado em -0,10 V *vs* Ag/AgCl, durante 60 minutos.



Fonte: autora.

No mecanismo mais próximo para a reação eletroquímica do complexo AR2, ocorre a formação do complexo *cis*-[Ru(NO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>+</sup> ao aplicar potenciais por volta de -0,45 V *vs* Ag/AgCl com posterior formação do complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)L]<sup>2+</sup> em virtude da re-oxidação do complexo pela aplicação de potenciais acima de 0,00 V *vs* Ag/AgCl (SAUAIA et al., 2005). Para o complexo AR2, portanto, o mecanismo é apresentado na Figura 37.

Figura 37. Mecanismo de oxirredução eletroquímica para o complexo AR2.

$$cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NO^{+})]^{3+} \xrightarrow{+e^{-}}_{-e^{-}} cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NO^{0})]^{2+} \\ -e^{-} / | +e^{-} \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NO^{-})]^{+} \\ 5 H^{+} + H_{2}O / - NO^{0} \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(NH_{3})]^{2+} + H_{2}O \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(H_{2}O)]^{2+} \\ + H_{2}O / - NO^{0} \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(H_{2}O)]^{2+} + H_{2}O \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(3-etpy)(H_{2}O)]^{2+} \\ + H_{2}O / - NO^{0} \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(A-b)]^{2+} \\ + H_{2}O / - NO^{0} \\ cis-[Ru^{II}(bpy)_{2}(A-b)]^{2+} \\ + H_{2$$

Fonte: autora.

Este caminho eletroquímico é consistente com a presença do pico (1a) observado na Figura 33, o qual é resultante da oxidação do complexo cis-[Ru(NO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>+</sup> na superfície do eletrodo. Mediante os dados experimentais obtidos, outros experimentos foram conduzidos de maneira a viabilizar o entendimento do sistema em questão, tais como: estudo do pka dos ligantes, atividade fotoquímica e cálculos DFT relacionados à estrutura do complexo.

## 7.7 Estudo da constante de equilíbrio de protonação dos ligantes py e 3-etpy

O Complexo AR2 possui similaridades (Espectro Uv-visível, voltamograma cíclico e espectro FTIR) com o complexo *cis*-[Ru<sup>II</sup>(bpy)<sub>2</sub>(py)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O, apresentando como única diferença o grupo -C=C- do ligante 3-etpy. No entanto, na espectroeletroquímica observase que ao aplicar potencial de -0,10 V *vs* Ag/AgCl ocorre redução do NO<sup>+</sup> para NO<sup>0</sup>, sem sua liberação, o que é incomum.

Para se entender um pouco melhor a influência do ligante 3-etpy coordenado ao fragmento RuNO<sup>+</sup>, realizou-se experimento de obtenção da constante de equilíbrio de protonação de cada ligante (Figura 38), de forma a analisar seu caráter ácido-base e, por conseguinte, sua capacidade de atuar como ligante  $\sigma$ -doador, o qual irá influenciar diretamente na afinidade do rutênio pelo ligante nitrosilo.





Fonte: autora.

Trinta soluções em diversos pHs entre no intervalo de 1,0 a 7,4 foram preparadas e adicionadas quantidades equimolares do ligante (py ou 3-etpy) na concentração de 1,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. Foram obtidos espectros na região do Uv-visível e a partir deles, construiu-se o gráfico de pH *versus* absorbância em 260 nm (Figuras 39 e 40). Através da Equação de obtenção da constante de equilíbrio foi obtido o valor de pKa para cada ligante (Equação 20).

$$pKa = pH + \log \frac{[HL^+]}{[L]}, \text{ quando } [HL^+] = [L], \text{ então: } pKa = pH$$
(20)



Figura 39. Gráfico obtido a partir do pH versus absorbância em 260 nm para o ligante piridina.

Fonte: autora.



Figura 40. Gráfico obtido a partir do pH versus absorbância em 278 nm para o ligante 3-etinilpiridina.

Fonte: autora.

Embora o pKa não seja uma medida direta do caráter doador ou receptor de densidade eletrônica, em geral, maiores valores de pKa revelam a capacidade do par de elétrons livres do nitrogênio do anel piridínico estar disponível para interagir com o centro metálico de rutênio, estando comprometido em menor proporção com a conjugação  $\pi$  existente no anel aromático (MOREIRA, 2016).

Comparando os valores de pKa do ligante py (pKa = 5,28) e 3-etpy (pKa = 3,54) podese concluir que o par de elétrons do nitrogênio da 3-etpy se encontra mais comprometido com a conjugação  $\pi$  do anel aromático do que o da piridina, o que torna menos intensa a doação de densidade eletrônica para o centro metálico. Assim, a população eletrônica sobre os orbitais de caráter predominante do metal se torna menor, gerando menor efeito de repulsão eletrônica e, portanto, um possível menor o comprimento de ligação Ru-NO. Este fato pode ser responsável por não ocorrer a liberação de NO ao formar o complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sup>0</sup>)]<sup>2+</sup> através da redução eletroquímica.

# 7.8 Fotólise

Considerando os dados eletroquímicos e espectroscópicos obtidos para os ligantes e complexos, é factível supor que a reatividade dos compostos AR2 e cis-[Ru(NO<sup>+</sup>)(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>3+</sup> induzida por luz deve ser semelhante. Os complexos do tipo cis-[Ru(NO<sup>+</sup>)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>3+</sup> (DE

LIMA et al., 2006; SAUAIA et al., 2003; SAUAIA; SILVA, 2003), liberam NO ao serem irradiados na banda de transição de TCML, que se encontra por volta de 330 nm (Ru  $4d_{\pi} \rightarrow \pi^{*}(NO^{+})$ ).

A energia envolvida na transição TCML é dependente da densidade eletrônica no fragmento [Ru(bpy)<sub>2</sub>(L)]. Desde que o orbital LUMO apresenta grande contribuição dos orbitais  $\pi^*$  do NO, sugere-se que o ligante aquo se coordene ao metal quando o NO<sup>0</sup> é liberado por irradiação, o que é observado para vários complexos da classe rutênio-bipiridinas (DA SILVA; DE LIMA; DE PAULA MACHADO, 2015).

Os estudos de atividade fotoquímica foram realizados através da irradiação de luz de comprimento de onda de 350 nm. A escolha deste comprimento de onda foi feita com base nos espectros Uv-vis dos complexos estudados. Além disso, foram empregadas soluções ácidas HTFA/NaTFA pH ~2,5 para evitar o ataque nucleofílico do íon OH<sup>-</sup> ao NO<sup>+</sup> e formação de nitrito.

A partir da irradiação utilizando filtro de interferência de 350 nm, observou-se que o complexo cis-[Ru(NO<sup>+</sup>)(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>3+</sup>, utilizado como referência, apresentou o comportamento esperado, conforme mecanismo apresentado na Figura 41. Esta espécie foi capaz de liberar NO gasoso em solução e a interpretação dos mecanismos desta liberação foram evidenciados pelos espectros na região do Uv-visível (Figura 42).





Fonte: autora.

**Figura 42.** Espectros na região do Uv-visível para o complexo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O (solução tampão pH = 2,5) ao ser irradiado em 350 nm durante 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.



Fonte: autora

Uma nova banda surgiu em 480 nm, correspondente à formação do complexo cis-[Ru<sup>II</sup>(bpy)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)(py)]<sup>2+</sup>, com rendimento quântico  $\Phi_{NO} = 0,21$  Einstein mol<sup>-1</sup>, o qual foi calculado segundo Item 6.4.11.

A fotólise do complexo AR2 foi realizada nas mesmas condições experimentais. Não obstante, foi verificada baixa atividade fotoquímica através da irradiação em 350 nm (Figura 43). O rendimento quântico de liberação de NO para este complexo foi de  $\Phi_{NO} = 0,012$ Einstein mol<sup>-1</sup>.

**Figura 43.** Espectros na região do Uv-visível para o complexo AR2 (solução tampão pH = 2,5) ao ser irradiado em 350 nm durante 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.



Fonte: autora.

Presume-se, que a grande diferença nos rendimentos quânticos de produção de NO entre os complexos AR2 e *cis*- $[Ru(NO)(bpy)_2(py)]^{3+}$ , se deve, aparentemente, a diferenças relacionadas à natureza do estado excitado destas espécies. Neste sentido, realizar cálculos teóricos para entendimento deste sistema parece ser uma alternativa esclarecedora.

# 7.9 Considerações sobre a geometria do complexo AR2

Cálculos da geometria mais provável para o complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>3+</sup> foram realizados pelo Prof. Dr. André L. B. Formiga, do Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). A estrutura do complexo AR2 e os principais comprimentos de ligação calculados estão apresentados na Figura 44 e dispostos na Tabela 9.



Figura 44. Estrutura do complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>3+</sup>.

Fonte: estrutura concedida pelo Prof. Dr. André L. B. Formiga.

de cálculos DFT.		
Ligações	Comprimento de ligação (Å)	
N-O	1,12	
Ru-N(O)	1,74	
Ru-N(etpy)	2,15	
Ru-N(bpy)	2,08 e 2,09	

**Tabela 9.** Principais distâncias (Å) e ângulos (°) obtidos para o complexo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)]<sup>3+</sup> a partir

Fonte: dados concedidos pelo Prof. Dr. André L. B. Formiga.

Observa-se que dentre as ligações "Ru-N" realizadas pelo íon de rutênio(II), a ligação com ligante nitrosilo é a menor, seguida pela ligação com o ligante 3-etpy. Estes comprimentos de ligação refletem a natureza da interação existente entre os orbitais moleculares d $\pi$  do metal e  $\pi$ \* do NO, que possuem o caráter de ligação sigma seguida de retrodoação.

O ligante nitrosilo apresenta uma geometria praticamente linear, com ângulo de ligação "Ru-N-O" de 175°. Esse fato, juntamente com o dado de frequência de estiramento de NO em 1944 cm<sup>-1</sup>, fornecem evidencias da ligação Ru<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>.

**CAPÍTULO 2** 

# DERIVADOS DE AMINOÁCIDO: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

# 8.1 Introdução

O interesse no desenvolvimento de complexos rutênio-nitrosilos para aplicações farmacológicas tem sido bastante crescente. No entanto, sabe-se que complexos polipiridínicos de metal de transição não perpassam facilmente a membrana celular de células vivas , principalmente devido à sua polaridade e carga (SCORSATO; TELLES, 2011).

Para se contornar este problema, podem ser incluídas concentrações baixas de solvente orgânico, como o dmso, ou de detergentes, como o Triton X ao meio de cultura celular em testes *in vitro*, aumentando a permeabilidade através da membrana lipídica. Entretanto, o solvente ou detergente causam a degradação mesmo que parcial da membrana celular (SCORSATO; TELLES, 2011). Desta forma, compostos contendo biomoléculas em sua constituição, as quais aumentem a sua internalização celular são uma boa estratégia. Complexos de rutênio contendo aminoácidos, por exemplo, podem ser uma alternativa viável para transposição da membrana celular através de transporte pelos canais proteicos.

Poucos complexos de rutênio foram reportados. A série de complexos rutênionitrosilos de fórmula geral *mer*-(Cl)-[Ru(NO)Cl<sub>3</sub>(AA–H)], em que AA = glicina (Gly), alanina (Ala), L-valina (L-Val), L-prolina (L-Pro), D-prolina (D-Pro), L-serina (L-Ser), L-treonina (L-Thr) e L-tirosina (L-Tyr) (Figura 45) (RATHGEB et al., 2014), foi descrita por Rathgeb e colaboradores (2014). Estes complexos apresentaram atividade antitumoral pronunciada contra a linhagem de carcinoma de ovário CH1, com valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 7,5–27,0 µmol L<sup>-1</sup>.

Figura 45. Exemplos de complexos de fórmula geral mer(Cl)-[Ru(NO)Cl<sub>3</sub>(AA)].



Fonte: Adaptado de RATHGEB et al., 2014

Alguns compostos organometálicos também foram desenvolvidos na tentativa do entendimento dos mecanismos citotóxicos de complexos de rutênio. Os complexos de fórmula geral  $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(AA)]^+$  ou  $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(AA)(OH_2)]^+$ , em que o aminoácido pode

estar coordenado de forma bi ou tridentada (Figura 46), são internalizados intactos pelas células (EGBEWANDE et al., 2014). Mediante estudos de cinética, de interação com biomoléculas (DNA) e de citotoxicidade, foi constatado que estes compostos apresentaram excelente atividade contra linhagens celulares de câncer de ovário A2780 e células mutadas A2780cisR (resistentes a cisplatina), com valores de IC<sub>50</sub> no intervalo de 0,21 a 2,7 µmol L<sup>-1</sup> (EGBEWANDE et al., 2014). Visto que a cisplatina gera uma grande quantidade de efeitos colaterais, como a resistência adquirida ao fármaco, estes complexos se apresentam uma alternativa viável para testes clínicos.

**Figura 46.** Exemplos de complexos organometálicos de rutênio de fórmula geral  $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(AA)]^+ e$  $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(AA)(OH_2)]^+.$ 



 $[(\eta^6-p\text{-cimeno})Ru(His)]^+$ 

 $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(Ala)(OH_2)]^+$ 

Fonte: Adaptado de EGBEWANDE et al., 2014.

Outros complexos rutênio-aminoácido (Ru-AA) foram desenvolvidos, como por exemplo, os de fórmula geral [Ru(AA)(bpy)(dppb)](PF<sub>6</sub>), em que dppb = difenilfosfinabutano (Figura 47) (DOS SANTOS et al., 2018; LIMA et al., 2014). Dentre estes, a aplicação do complexo [Ru(Gly)(bpy)(dppb)](PF<sub>6</sub>) foi avaliada frente a células tumorais de sarcoma-180 murino (S180) proporcionando um aumento de células em fase G0/G1 acompanhada por redução de células em fase S e G2/M, que é indicativo de morte celular ocasionada por danos irreversíveis no DNA. Além disso, estes estudos mostraram que o mecanismo de morte celular é independente da ação da proteína p53, prevenindo a divisão celular e levando a célula à apoptose (LIMA et al., 2014).



Figura 47. Exemplos de complexos organometálicos de rutênio de fórmula geral cis-[Ru(AA)(bpy)(dppb)]<sup>+</sup>.

Fonte: autora.

Os estudos envolvendo complexos Ru-AA têm se demonstrado bastante promissores tanto no âmbito do desenvolvimento de compostos que possam ser utilizados em terapias contra o câncer, quanto no âmbito do entendimento dos mecanismos citotóxicos de complexos de rutênio. No entanto, poucos artigos estão disponíveis na literatura, sendo o marco da evolução destas pesquisas o ano de 2011 (Figura 48), o que prova o quão nova é esta vertente, alavancando novos estudos e pesquisas envolvendo esta área. Além disso, complexos Ru-AA contendo polipiridinas e o ligante nitrosil ainda não foram reportados. Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho é desenvolver complexos que se enquadrem nesta classe e possam atuar como agentes anticancerígenos.



Figura 48. Quantidade de artigos publicados na área de complexos Ru-AA para fins farmacológicos.

Fonte: Quantidade de artigos totais encontrados para as palavras-chave que correlacionam "ruthenium" e "amino acids" no site https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed. Selecionados os artigos que estudam complexos Ru-AA.

Buscou-se sintetizar complexos do tipo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>n+</sup> e cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>(n-1)+</sup> (L=3-etinilpiridina ou derivado de aminoácido). Estes compostos octaédricos possuem seis sítios de coordenação, os quais podem ser ocupados por ligantes que conferem características específicas, tais como estabilidade, atividade fotoquímica, capacidade de interação com biomoléculas, entre outras. Neste trabalho optou-se por utilizar complexos contendo 2,2'-bipiridina, os quais são ligantes que proporcionam estabilidade ao complexo de rutênio(II), não sendo liberados em ambiente biológico.

Biomoléculas foram utilizadas como ligantes para se estudar as características químicas destes complexos e suas atividades frente a células tumorais. Dentre as biomoléculas escolhidas para estudo, os aminoácidos foram os primeiros a serem utilizados para vias de síntese. Os aminoácidos correspondem a uma classe de nutrientes indispensáveis para sobrevivência e manutenção de todas as células. Tratando-se de células tumorais, a sua demanda por aminoácidos é notoriamente maior quando comparada com células sadias em função de sua maior necessidade por nutrientes para sua proliferação excepcionalmente alta (BHUTIA et al., 2015). Estes aminoácidos apresentam canais específicos na membrana celular para sua internalização. Assim, aminoácidos coordenados a complexos rutênio-nitrosilos podem conferir uma melhor internalização, fazendo com que estes compostos possam ser fármacos alternativos para tratamento do câncer e/ou doenças negligenciadas.

Para se obter um complexo de fórmula cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>n+</sup> e cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>(n-1)+</sup> em que o aminoácido se coordene ao centro metálico apenas por um

sítio de coordenação, foi necessária a modificação do ligante através de rotas sintéticas, visto que aminoácidos são quelatos e deslocariam um dos ligantes da estrutura cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>L]<sup>(n-1)+</sup>, que neste caso seria o ligante nitrosil.

O ligante derivado de lisina foi obtido por cicloadição azida-alcino catalisada por cobre, de forma a se ligar um derivado de piridina a um aminoácido, visto que a piridina é um ligante com afinidade alta pelo íon complexo contendo Ru<sup>2+</sup> (OMAE, 2004), não ocasionando o deslocamento de outros ligantes pelo efeito quelato. De forma alternativa, o ligante derivado de triptofano (pyTrp) foi sintetizado através da síntese de obtenção de Bases de Schiff.

8.2 Parte A: Derivados de aminoácido (pyLys e pyTrp)

#### 8.2.1 Cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC)

As reações envolvidas na reação CuAAC são explicadas pela união da Química Orgânica e Química de Coordenação. As diferenças em termos energéticos entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO de alcinos e azidas são pequenas, possuindo magnitudes similares. Por isso, os mecanismos reacionais dipolo-HOMO e dipolo-LUMO ocorrem de forma simultânea produzindo misturas regioisoméricas de 1,4 e 1,3-triazóis (FREITAS et al., 2011), o que torna essencial a presença do catalisador.

O catalisador (Cu<sup>I</sup>) orienta a reação regioespecífica através de intermediários polares cujas energias definem a velocidade da reação. Embora existam mecanismos que simplificam as etapas envolvendo a formação de 1,3-triazóis, a reação não é trivial, envolvendo complexação de íons Cu<sup>+</sup> e formação de complexos organometálicos. O grande obstáculo no estabelecimento das estruturas dos intermediários de reação envolvidos assim como da ordem global, provém da facilidade com que o cobre apresenta de formar complexos polinucleares variados neste sistema. Estudos sugerem que múltiplas espécies se encontram em rápido equilíbrio, dificultando a precisão mecanística. Apesar disso, sabe-se que o cobre influencia diretamente no percurso da reação, e independente do caminho ao qual se estende, o produto é o mesmo. As condições sintéticas se demonstraram adaptáveis a diferentes solventes (FREITAS et al., 2011), o que facilita sua aplicação.

A *Click Chemistry* para o fim de sintetizar ligantes derivados de aminoácidos é um procedimento químico versátil e conveniente, o qual é amplamente utilizado em química orgânica, especialmente na descoberta de medicamentos. Estender esta área para a Química de

Coordenação pode abrir novos caminhos na preparação de complexos com aplicação biológica. Exemplo de composto sintetizado a partir da *click chemistry* é o complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(pyLys-O<sup>-</sup>)] desenvolvido neste trabalho. Este complexo é um bom candidato para alcançar o objetivo de se ter um complexo rutênio-nitrosilo contendo biomolécula em sua estrutura. Além disso, este tipo de composto pode atuar como intercalador de DNA, possibilitando sua utilização para fins farmacológicos.

## 8.2.2 Bases de Schiff

O ligante ácido 2-(aminometil-4-piridinil)-3-(1H-indol-3-il)propanóico (pyTrp) foi obtido através de reações de obtenção de Base de Schiff. As Bases de Schiff recebem este nome devido ao seu descobrimento por Hugo Schiff (KAJAL et al., 2013; QIN et al., 2013). Estes compostos são obtidos a partir da reação de condensação de aminas primárias com compostos carbonílicos em condições específicas. São também conhecidas como azometinas e possuem em sua estrutura grupos imina (C=N) e fórmula mínima R<sub>3</sub>R<sub>2</sub>C=NR<sub>1</sub> (QIN et al., 2013). Ademais, possuem alta afinidade por íons metálicos (KOSTOVA; SASO, 2013; PAREKH; MEHTA; PATEL, 2006; ROSA et al., 2018; YOUSIF et al., 2017), formando compostos de coordenação estáveis em diferentes estados de oxidação (COZZI, 2004). Suas aplicações são diversas, tais como atividade antifúngica (ABU-DIEF; MOHAMED, 2015; PAREKH; MEHTA; PATEL, 2006), sensores para metais pesados (ROSA et al., 2018), catálise (LIU et al., 2018), atividade antimicrobiana (IBRAHIM; MOHAMED; REFAT, 2014), antimalárica, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiviral e antipirética (AL ZOUBI et al., 2018).

As Bases de Schiff são amplamente estudados em virtude da sua facilidade de obtenção e diversidade. Suas propriedades podem ser moduladas de acordo com os substituintes e características desejadas. Diversos compostos de coordenação contendo ligantes imínicos e metais de transição ou lantanídeos (M-C=N) foram reportados (ESMADI et al., 2016; KAJAL et al., 2013; ZOUBI, 2013). A alta afinidade destes ligantes pelos íons metálicos é oriunda da formação de quelatos, o que é fator de grande quantidade de estudos que visam sua aplicação biológica (ESMADI et al., 2016; KAJAL et al., 2013; ZOUBI, 2016; KAJAL et al., 2013; ZOUBI, 2013).

O mecanismo de ação biológica dos complexos M-C=N (ESMADI et al., 2016; KAJAL et al., 2013; ZOUBI, 2013) em muitos casos envolve a ação combinada entre o ligante e metal, que juntos desempenham atividades peculiares. Em alguns casos, o complexo apresenta melhores condições de seletividade do que os ligantes livres, diminuindo efeitos colaterais e

aumentando a ação do fármaco. Um exemplo interessante, é o produto da reação entre o complexo *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] com ligantes macrociclos derivados de bases de Schiff (Figura 49). Os macrociclos possuem grupos doadores de densidade eletrônica, gerando estabilidade cinética para o íon metálico através do deslocamento dos ligantes dmso. Estes complexos apresentam expressiva atividade biológica contra bactérias Gram(+) (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*) e Gram(-) (*Escherichia coli, Klebsiella pneumonia*) quando comparados com os fármacos comerciais estreptomicina e ampicilina.

**Figura 49.** Reação de obtenção do complexo de [RuCl<sub>2</sub>(mac)] em que mac = ligante macrociclo tetradentado (Base de Schiff).



Fonte: autora.

Em função da grande aplicabilidade dos complexos M-C=N, existe grande interesse no desenvolvimento de compostos dessa classe. Por isso, neste trabalho buscou-se a síntese de derivados de aminoácido a partir da reação de obtenção de Bases de Schiff assim como dos complexos rutênio-nitrosilos coordenados a eles e suas respectivas caracterizações e avaliação da atividade biológica.

## 8.3 Síntese

#### 8.3.1 Ligante pyLys

Dentre os aminoácidos essenciais: tirosina, metionina, fenilalanina, valina, isoleucina, leucina e lisina, a lisina foi o primeiro a ser utilizado em síntese. A L-lisina é um aminoácido de caráter básico e contém uma cadeia lateral alifática possuindo quatro carbonos e um grupo amino terminal. Sua função é participar da produção biológica de proteínas e de carnitina, a qual é um nutriente responsável pela conversão de ácidos graxos em energia, ou seja, desempenha uma importante papel na  $\beta$ -oxidação (BOS; TOMÉ, 2007).

Primeiramente, o aminoácido lisina estava protegido pelo grupo terc-butilcarbonil (Boc) de forma a ser estocado sólido, para que não ocorresse degradação. Este grupamento foi removido da estrutura do precursor Fmoc-Lys(Boc)-OH para que o grupamento amino terminal fosse exposto para sua utilização na segunda etapa da reação. Para desproteção da amina terminal, utilizou-se ácido trifluoracético, visando a desproteção ácida, na qual tem-se como produto da reação amina, dióxido de carbono e terc-butil, sendo estes dois últimos facilmente eliminados do meio reacional visto que são gasosos à temperatura ambiente.

No segundo passo da reação, a etapa de diazotransferência, a amina terminal obtida a partir da etapa anterior reagiu com o anidrido trifluormetanosulfônico (Tf<sub>2</sub>O), água e CuSO<sub>4</sub> para formar ácido 2-((9H-fluoren-9-il)metilcarbamato)-6-azido-hexanóico (azidolisina) através da reação de diazotransferência. O mecanismo de diazotransferência foi elucidado por Fisher e Anselme no ano de 1967. Nesta reação, um intermediário tetrazeno dianiônico era formado, sendo estabilizado por dois íons sódio. Nyffeler e colaboradores (NYFFELER et al., 2002) extrapolaram este mecanismo proposto por Fisher e Anselme (1967) ao utilizar um íon de metal de transição. Adicionando-se uma quantidade catalítica de um sal de metal de transição, tal como cobre ou zinco, é possível obter compostos como apresentado na Figura 50.

O mecanismo envolve a geração do triflato de azida (TfN<sub>3</sub>) a partir da reação entre azida de sódio e anidrido tríflico. O triflato de azida é adicionado à lisina protegida pelo grupo Fmoc previamente coordenada ao íon metálico  $Cu^{2+}$  (**A**). Ocorre ataque eletrofílico do nitrogênio do grupamento amina da lisina ao nitrogênio do triflato de azida, formando um complexo (**B**). A perda de um ligante pelo complexo de cobre (C e **D**) e conseguinte desprotonação do nitrogênio coordenado leva à formação do anel tetrazeno estabilizado pelo íon  $Cu^{2+}$  (**E**). Por fim, ocorre a quebra do anel tetrazol a partir de rearranjo, formando o produto de interesse com grupo azido (**E**) e o imino complexo de cobre-triflil (**F**).



Figura 50. Mecanismo da reação de diazotransferência.

Fonte: autora.

Na sequência, no terceiro passo, 3-etpy reagiu com a azidolisina em uma reação de acoplamento azida-alcino na presença de Cu(I) como catalisador (CARVALHO et al., 2010). O cobre apresenta papel essencial para a eficiência desta reação, aumentando em sete vezes sua velocidade quando comparada à ausência de catalisador (YANG; LI; CHEN, 2014). A reação

não catalisada apresenta uma barreira de ativação com energia de 25,7 kcal mol<sup>-1</sup>, enquanto a reação na presença de Cu(I) apresenta 14,9 kcal mol<sup>-1</sup> (YANG; LI; CHEN, 2014). Esta reação consiste na ligação de um alcino terminal à uma azida orgânica através da cicloadição 1,3-dipolar catalisada pelo íon metálico de Cu<sup>+</sup>. Os produtos obtidos são 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituídos, os quais são regioespecíficos. O mecanismo envolve a formação do complexo organometálico acetileto de cobre *in situ*, através da reação do Cu(I) – obtido pela redução do Cu(II) com ascorbato de sódio – com o alcino terminal do ligante 3-etpy.

Sharpless e colaboradores (ROSTOVTSEV et al., 2002) propuseram que um intermediário organometálico mononuclear de cobre era formado durante a reação. No entanto, ao estudar parâmetros cinéticos de reação através da utilização de calorímetros e espectrometria de massas, Hein & Fokin (HEIN; FOKIN, 2010) demonstraram que o acetileto de cobre(I) formado é inerte até o momento em que um segundo íon metálico é coordenado através da ligação tripla do acetileto (HEIN; FOKIN, 2010; YANG; LI; CHEN, 2014).

O íon cobre se coordena à tripla ligação da 3-etpy (Figura 51A) como descrito pelo modelo de Dewar-Chatt-Duncanson (SHRIVER; ATKINS, 2008) através da doação de dois elétrons da tripla ligação de orbitais  $\pi$  preenchidos do ligante para orbitais d vazios do metal, formando uma ligação  $\sigma$  (Figura 52A). Em paralelo com esta interação, orbitais d do metal doam densidade eletrônica para os orbitais  $\pi^*$  do alcino através da retrodoação (Figura 52B). Esta ligação torna o hidrogênio ligado ao carbono em hibridização *sp* mais ácido em função da retrodoação de densidade eletrônica da tripla ligação para o íon metálico, permitindo que outro íon cobre se coordene ao carbono acetilênico (HEIN; FOKIN, 2010), através de uma ligação  $\eta^1$ -alquinil (SHRIVER; ATKINS, 2008).

Na etapa seguinte, o íon cobre se coordena ao nitrogênio da azida favorecendo o ataque do carbono  $\beta$ -vinílico ao nitrogênio eletrofílico, formando a primeira ligação covalente C-N do anel triazol (Figura 51B) (YANG; LI; CHEN, 2014). Estas ligações geram um metalociclo instável (Figura 51C) o qual sofre contração para adquirir maior estabilidade gerando o anel 1,2,3-triazol (Figura 51D) que posteriormente é protonado gerando o produto desejado (Figura 51E) e restabelecendo o catalisador para o meio reacional. O rendimento da formação do produto é da ordem de 67,0%, o que torna esta síntese viável para obtenção do ligante contendo a lisina. O resumo das etapas de síntese é apresentado na Figura 53.



Figura 51. Mecanismo reação de acoplamento azida-alcino catalisada por Cu(I).

Fonte: Adaptado de YANG et al., 2014.

**Figura 52.** Interação de um metálico com um alcino. A) Ligação  $\sigma \in \mathbf{B}$ ) Retrodoação d<sub> $\pi$ </sub> (Metal)  $\rightarrow \pi^*$  do alcino.



Fonte: Adaptado de SHRIVER & ATKINS, 2008.



Figura 53. Três passos de síntese para obtenção do ligante derivado de aminoácido (pyLys).

Fonte: autora.

A separação do composto obtido (pyLys) dos outros componentes do meio reacional foi feita por extração líquido-líquido. A mistura obtida na síntese foi rotaevaporada até secura, ressolubilizada em água destilada e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio e concentrada. A purificação foi feita através de separação por coluna cromatográfica com fase estacionária sílica flash, obtendo-se produto com alto grau de pureza. Foram empregadas as seguintes fases móveis: hexano, acetato de etila:hexano 1:1 e acetato de etila, nesta ordem, utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel para acompanhamento de eluição. Após eluição, as frações iguais foram rotaevaporadas até secura. O composto pyLys apresentou coloração vermelha. A estrutura deste ligante inédito foi confirmada por ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT-135, espectros de RMN 2D (HSQC e HMBC) e espectrometria de massas.

## 8.3.2 Ligante pyTrp

Em função de sua versatilidade e da possibilidade de obtenção de um ligante derivado de aminoácido ao qual possa ser coordenar ao centro metálico por apenas um sítio de coordenação, buscou-se sintetizar o ligante pyTrp através da síntese de obtenção de bases de

Schiff. Assim, optou-se por realizar a reação entre o triptofano (Trp) e a 4-piridinacarboxaldeído (Figura 54), de forma a ter um ligante contendo o grupo piridina e o aminoácido. Desta forma, o ligante não interage com o metal na forma de quelato mas apenas pelo nitrogênio da piridina, havendo a possibilidade de ter na esfera de coordenação primária do  $Ru^{2+}$ , duas bipiridinas, um NO<sup>+</sup> e um derivado de Trp.

Figura 54. Esquema da síntese entre 4-pyCHO e Trp para obtenção do composto pyTrp.



Fonte: autora.

O L-triptofano (Trp) é um aminoácido essencial requisitado pelos organismos em uma taxa de aproximadamente 5 mg/kg/dia (KESZTHELYI; TROOST; MASCLEE, 2009), estando presente em aspectos nutricionais e metabolismo humano (KESZTHELYI; TROOST; MASCLEE, 2009). A função do Trp no organismo é basicamente síntese protéica (RICHARD et al., 2009). Ele participa de duas vias metabólicas essenciais, a síntese da quinurenina (Kyn) e da serotonina. Tratando-se de ambiente tumoral, o Trp é relacionado à regulação da tolerância e resposta imune (ANANIEVA, 2015). Sua degradação é condicionada à via da Kyn em que enzimas são responsáveis pela catálise da reação: a indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano-2,3-dioxigenase (TDO), as quais transformam Trp em Kyn, e triptofano hidroxilase-1 (TPH-1), a qual converte Trp em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (ANANIEVA, 2015). Esta via metabólica cria um meio imunossupressor em tumores e em linfonodos gerando apoptose de células T através da depleção de triptofano e acumulação de substâncias catabólicas imunossupressores de triptofano (PLATTEN; WICK; VAN DEN EYNDE, 2012). Devido a estas vantagens, optou-se por sintetizar um ligante derivado de triptofano para possíveis aplicações biológicas.

Primeiramente, o Trp foi solubilizado em etanol através da adição de hidróxido de potássio com constante agitação, para formação do 2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoato, ou seja, do compostos gerado após desprotonação do hidrogênio do grupo ácido carboxílico. O mecanismo reacional é apresentado na Figura 55. O nitrogênio da amina atua como um nucleófilo, atacando o carbono carbonílico de aldeídos ou cetonas (Figura 6), seguido pela transferência de um próton (prototropismo) da amina para o oxiânion (ERDTMAN et al., 2011), o qual remove um hidrogênio da amina, formando uma carbinolamina. Posteriormente, a base (OH<sup>-</sup>), que é um nucleófilo forte, remove o próton da amina gerando uma molécula de água e fazendo concomitantemente com que os elétrons do nitrogênio se acomodem em uma ligação dupla com o carbono adjacente, e com que o -OH do intermediário (carbinolamina) atue como um grupo de saída, reestabelecendo o catalisador (XAVIER; SRIVIDHYA, 2014).





Fonte: autora.

A maioria das bases de Schiff derivadas de aminoácidos é bastante instável e gerada *in situ* (ANTONY et al., 2016). No entanto, algumas condições de síntese podem ser adaptadas para obtenção destes compostos de forma que o equilíbrio da reação seja estendido para a formação dos produtos. Removendo-se a água ocorre favorecimento da formação do produto (pyTrp). Para isso, adicionou-se sulfato de magnésio ao meio reacional. Após as 8 horas de refluxo, a solução de coloração amarela foi filtrada e o solvente rotaevaporado, obtendo-se cristais amarelos. A purificação foi realizada por meio de recristalização a quente utilizando etanol como solvente.

# 8.4 Caracterização

## 8.4.1 Ressonância Margnética Nuclear (RMN)

## 8.4.1.1 Ligante pyLys

Cada etapa de síntese para obtenção do ligante pyLys foi acompanhada por <sup>1</sup>H RMN (ANEXO A). A estrutura do ligante pyLys foi confirmada por espectrometria de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT-135 e espectros de RMN 2D HSQC e HMBC.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H foram possíveis observar sinais referentes a hidrogênios em região aromática e alifática (Figura C56). Na região alifática encontram-se multipletos que perfazem integral para 12 hidrogênios, referentes a hidrogênios ligados a carbonos em cadeia alifática da lisina e do grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). Na região de aromáticos podese observar multipletos na região de 7,10–7,70 ppm, dois dubletos 7,69 e 8,13 ppm com valores de constante de acoplamento  ${}^{3}J = 7,5$  Hz e  ${}^{3}J = 7,6$ , respectivamente, além de dois singletos em 8,39 e 8,89 ppm, totalizando integral para 11 hidrogênios, atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos em região de compostos contendo anéis aromáticos ou grupos N-H presentes na estrutura da molécula.



Figura 56. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o ligante pyLys em solvente deuterado (MeOD).

\* em 3,22 e 4,77 ppm são correspondentes ao metanol e a água provenientes do solvente deuterado utilizado na análise. Fonte: autora.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 57A) foram possíveis observar sinais de -CH<sub>2</sub>. Dentre estes sinais, observa-se que um dos sinais se encontra encoberto pelo solvente em 49,0 ppm ao se comparar com o espectro de DEPT-135 (Figura 57B). Para respectivas atribuições dos sinais, técnicas correlacionais 2D (HSQC e HMBC) foram conduzidas.







Fonte: autora.

Haja vista a complexidade da estrutura do ligante pyLys (Figura 58), os sinais nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H não puderam ser atribuídos com precisão. Assim, optou-se por realizar outras análises para melhor entendimento acerca da estrutura do composto. A partir das análises dos espectros correlacionais 2D HSQC (Figura 59) atribuiu-se os sinais de hidrogênios aos respectivos carbonos. Todos os sinais observados nos espectros de RMN foram atribuídos através das multiplicidades e fenômenos de blindagem/desblindagem dos sinais.





Fonte: autora.





Fonte: autora.

Através do espectro da Figura 59 é possível inferir que o carbono  $C_{11}$  (-CH<sub>2</sub>), o qual encontra-se em região alifática, apresenta dois sinais correlacionais no espectro 2D HSQC. Este fenômeno ocorre em função da não equivalência magnética dos hidrogênios ligados ao  $C_{11}$ , ou seja, estes hidrogênios encontram-se em ambientes químicos diferentes mesmo ligados ao mesmo carbono. Embora a simetria faça com que os deslocamentos químicos dos prótons  $H_a$  e  $H_a$ ' sejam os mesmos (ou muito próximos), o próton  $H_a$  apresenta acoplamento com  $H_b$  diferente do acoplamento do acoplamento com  $H_a$ '. Assim,  $H_a$  e  $H_a$ ' não são equivalentes, possuindo sinais diferentes entre si. Desta forma, é possível afirmar que  $H_a$  e  $H_a$ ' são diastereotópicos, além de serem quimicamente e magneticamente não equivalentes mesmo com a falta de qualquer ambiente quiral. O resumo das respectivas atribuições encontra-se na Tabela 10.

δ/ppm (multiplicidade)	Atribuição	Constante de Acoplamento (J <sub>H-H</sub> )
1,15 - 1,45 (m)	H-C <sub>10</sub>	
1,54 - 1,71 (m)	H-C <sub>11</sub>	
1,75 - 1,97 (m)	H-C <sub>9</sub>	
4,14 - 4,22 (m)	H-C <sub>22</sub> e H-C <sub>12</sub>	
4,28 (m)	H-C <sub>15</sub>	
4,49 (m)	H-C <sub>8</sub>	
7,27 (m)	H-C <sub>18</sub>	
7,27 (m)	H-C <sub>19</sub>	
7,69 (d)	H-C <sub>20</sub>	7,50 Hz
8,13 (d)	H-C <sub>5</sub>	7,60 Hz

**Tabela 10.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e respectivas atribuições para o espectro de HSQC do ligante pyLys.

Fonte: autora.

## 8.4.1.2 Ligante pyTrp

No RMN de <sup>1</sup>H do ligante pyTrp (Figura 60) foram possíveis observar sinais referentes a hidrogênios em região aromática e alifática. Na região alifática são possíveis observar multipletos na região entre 3,15 – 3,70 ppm e 3,86 – 4,02 ppm que perfazem integrais para 2 hidrogênios, correspondentes aos hidrogênios ligados a carbonos em cadeia alifática do triptofano. Sinais em 3,22 e 4,77 ppm são correspondentes ao metanol e água provenientes do solvente deuterado utilizado na análise. Na região de aromáticos pode-se observar multipletos na região entre 6,83 – 7,02; 7,46 – 7,63; 7,79 – 7,85 e 8,87 – 8,92 ppm, um dubleto em 7,25 ppm ( $J_{H-H} = 8,00$  Hz) e um singleto em 8,00 ppm (H-C=N), totalizando integrais para 12 hidrogênios, além de dois singletos em 10,1 e 10,7 ppm, correspondentes aos hidrogênios do fragmento hidroxila (-OH) e à amina (-NH).



Figura 60. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o ligante pyTrp em solvente deuterado (DMSO).

Fonte: autora.

No espectro de DEPT-135 (Figura 61A), observa-se um sinal correspondente ao -CH<sub>2</sub> (C7) em 30,0 ppm. Os sinais para os carbonos em deslocamentos químicos 144,0; 136,6; 127,4; 111,3 e 178,46 ppm no RMN <sup>13</sup>C (Figura 61B) não podem ser observados no espectro de DEPT-135, sendo atribuídos aos carbonos C3, C8, C10, C10' e à carbonila. Observou-se também um sinal em deslocamento químico na região de 159,3 ppm atribuído ao carbono da imina.





Fonte: autora.

Haja vista a complexidade da estrutura do ligante pyTrp, da mesma forma que o ligante pyLys, os sinais nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 60) e <sup>13</sup>C (Figura 61B) não puderam ser atribuídos com precisão apenas analisando estes dados. Portanto, experimentos 2D correlacionais, HSQC e COSY, foram realizados para melhor entendimento acerca da estrutura do composto. Todos os sinais observados nos espectros de RMN foram atribuídos através das multiplicidades e fenômenos de blindagem/desblindagem dos sinais.

No espectro 2D HSQC <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (Figura 62) realizado utilizando-se como solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>), foram possíveis observar os seguintes sinais correlacionais C/H (ppm): 30,6/3,10; 30,6/3,38; 79,1/3,92; 118,9/6,89; 124,1/6,98; 121,1/7,01; 112,0/7,27; 119,3/7,53; 116,3/7,56; 122,5/7,57; 158,3/8,00 e 150,7/8,57. A partir destes dados e dos sinais obtidos no espectro de DEPT 135, pode-se inferir que os sinais observados em C/H (ppm): 30,6/3,10; 30,6/3,38 e 79,1/3,92 são atribuídos à C<sub>7</sub>, C<sub>7</sub>, e C<sub>5</sub>. Os outros sinais não puderam ser atribuídos com precisão e por isso, experimento correlacional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY foi conduzido.





Fonte: autora.

Com a técnica de COSY é possível estabelecer as correlações entre hidrogênios vicinais e geminais os quais se encontram acoplados por constantes  ${}^{2}J_{H-H}$  ou  ${}^{3}J_{H-H}$  (KAISER, 2000). Observa-se no espectro de COSY (Figura 63) para o ligante pyTrp que ocorrem acoplamentos entre os seguintes hidrogênios H/H (ppm): 6,86/7,50; 6,96/7,23; 6,97/10,7; 7,56/8,56. Estes sinais puderam ser atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos C<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> e C<sub>12</sub>. Os sinais correlacionais observados em 7,56 e 8,56 ppm são atribuídos aos hidrogênios vizinhos ligados aos carbonos C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> e C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>, (carbonos do anel piridínico) visto que as áreas dos picos são proporcionais a dois hidrogênios cada e que estes

sinais não se correlacionam a nenhum outro sinal. A integral para o dubleto em 7,23 ppm ( $J_{H-H}$  = 8,00 Hz) é proporcional a um hidrogênio e pode ser atribuída aos hidrogênios ligados aos carbonos C<sub>11</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> e C<sub>12</sub>. Dentre estes, os únicos sinais que são representados por dubletos são hidrogênios ligados ao C<sub>11</sub>, e C<sub>11</sub>. Em função do hidrogênio ligado ao C<sub>11</sub>, ser mais o blindado entre os dois, atribui-se a ele o sinal centrado em 7,23 ppm. Sabendo-se que o H-C<sub>11</sub>, pode apresentar acoplamento com o H-C<sub>12</sub>, e não com os outros dois, atribui-se o sinal em 6,96 ppm ao H-C<sub>12</sub>, e portanto, os sinais em 6,90 e 7,50 ppm aos sinais dos H-C<sub>12</sub> e H-C<sub>11</sub>. O sinal em 6,97 ppm apresenta acoplamento com um sinal em 10,7 ppm, sendo atribuído ao H-C<sub>9</sub> e N-H (amina), respectivamente. O resumo dos dados obtidos a partir dos espectros de ressonância magnética é apresentado na Tabela 11.



Figura 63. Espectro COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H para o ligante pyTrp obtido em solvente deuterado (DMSO).

Fonte: autora.

<sup>1</sup> H/ppm (multiplicidade)	<sup>13</sup> C/ppm	Atribuição
3,10 (m)	30,04	H-C <sub>7</sub>
3,92 (m)	79,09	H-C <sub>5</sub>
6,89 (m)	118,9	H-C <sub>12</sub>
6,98 (m)	124,1	H-C <sub>9</sub>
7,01 (m)	121,1	H-C <sub>12</sub> '
7,27 (d)	112,0	H-C <sub>11</sub> '
7,53 (m)	119,3	H-C <sub>11</sub>
7,57 (m)	122,5; 122,5	H-C <sub>2</sub> ; H-C <sub>2</sub> ,
8,00 (s)	158,3	C <sub>4</sub> (C=N)
8,57 (d)	150,7; 150,7	$H-C_1$ ; $H-C_1$ ,
10,7 (s)		N-H
10,1 (s)		О-Н
	128,3	C <sub>10</sub>
	135,5	C <sub>10</sub> ,
	163,0	$C_6$

Tabela 11. Tentativas de atribuição para os picos encontrados nos espectros de RMN de HSQC e COSY para oligante pyTrp.

Fonte: autora.

Os sinais no RMN de <sup>13</sup>C para os carbonos C<sub>3</sub> e C<sub>8</sub> não puderam ser atribuídos com base nos espectros obtidos em dmso devido à resolução dos dados obtidos nesta condição. Não obstante, os mesmos experimentos, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H, COSY e HSQC RMN foram realizados também em metanol deuterado e foi possível fazer esta atribuição (ANEXO).

### 8.4.2 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma importante ferramenta analítica utilizada para identificar compostos e elucidar estruturas. Esta técnica é embasada na utilização de energia ionizante para conversão de amostras em íons gasosos, com ou sem fragmentação, as quais são analisadas e caracterizadas através de suas proporções de massa e carga (m/z) e abundância.

Existem inúmeros tipos de espectrômetros de massas, no entanto, o princípio de todos é o mesmo, sendo constituídos basicamente por cinco componentes: unidade de entrada de amostra, fonte de ionização, acelerador de íons, analisador de massas e um detector. Todo sistema encontra-se sob condições de alto vácuo (PAVIA et al., 2010).

O avanço desta técnica é evidenciado pelo advento da ionização por *spray* eletrostático (ESI), em que primeiro ocorre a ionização da amostra e na sequencia sua vaporização. Visto que são formados íons, a detecção pode avaliar a formação de íons positivos e negativos. O tipo de íons formado (cátions ou ânions) dependerá da natureza da estrutura e da energia aplicada na fonte do equipamento utilizado (PAVIA et al., 2010).

Em um espectro de massas é possível observar picos com padrões característicos de intensidade que é relacionada à abundância dos isótopos do elemento químico que compõe a estrutura. Esta distribuição isotópica define qual a carga do fragmento obtido através do cálculo da diferença de massa entre os picos ( $\Delta$ m) dividida pela carga (*z*).

Nas análises por espectrometria de massas realizadas neste trabalho, optou-se por utilizar metanol ou acetonitrila como solventes visto que os compostos estudados possuem alta solubilidade. Ademais, o ponto de ebulição (P.E.) destes solventes é compatível com as condições experimentais, podendo ser removidos durante o processo ESI de forma que para isso não seja necessária uma temperatura muito elevada.

Para confirmação da obtenção dos ligantes orgânicos, buscou-se determinar a fórmula molecular baseada na relação *m/z*. Os espectros de massas obtidos em modo negativo apresentaram quatro fragmentos proeminentes para o ligante pyLys (Figura 64), e sete para o pyTrp (Figura 65). Os picos e suas atribuições estão reunidos nas Tabela 12 e 13. A fim de comparação, o espectro de massas teórico também foi obtido através do *site* "http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm" e os valores também se encontram apresentados nas Tabela C12 e C13. O espectro simulado e o espectro experimental apresentam grande semelhança, concluindo que os compostos de interesse foram de fato obtidos.


Figura 64. Espectro de massas (ESI) do composto pyLys obtido em modo negativo.

Íon Proposto	Experimental	Calculado
$\{C_{13}H_{16}N_5O_2\}^{\cdot} (A)$	274,1314	274,1304
$\{C_{14}H_{14}N_5O_3\}^{-}(B)$	300,1106	300,1097
$\{C_{28}H_{26}N_5O_4\}^{-}(C)$	~496,1978	496,1985
$\{C_{56}H_{53}N_{10}O_8\}^-$ (D)		
Dímero	993,4052	993,4048

**Tabela 12.** Tentativa de atribuição para os picos de m/z (calculado e experimental) para o composto pyLys.



Figura 65. Espectro de massas ESI do composto pyTrp obtido em modo negativo.

\_

\_\_\_\_

Íon Proposto	Experimental	Calculado
$\{C_8H_6N\}^-(A)$	116,0548	116,0502
{C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N} <sup>-</sup> (B)	142,0692	142,0657
$\{C_{10}H_8N\}^-$ (C)	163,0566	163,0508
$\{C_{12}H_{13}NO_3\}^{-}(D)$	219,0983	219,0900
$(C/H/N_2)$ (E)	221,1116	221,1900
$\{C_{16}H_{14}N_3\}^{-}(F)$	248,1127	248,1188
${C_{16}H_{14}N_3}^-(G)$	292,1157	292,1100

**Tabela 13.** Tentativa de atribuição para os picos de m/z (calculado e experimental) para o composto pyTrp.

## 8.4.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

# 8.4.3.1 Ligante pyTrp

O espectro de absorção no infravermelho do aminoácido Trp é apresentado na Figura 66. Observa-se banda fina e intensa na região de 3400 cm<sup>-1</sup> a qual é atribuída ao estiramento v(N-H) do anel pirrol. Bandas referentes ao estiramento  $v_{ass}(CO_2^-)$  e  $v_s(CO_2^-)$  são observadas em 1667 e 1357 cm<sup>-1</sup>, respectivamente (CAO; FISCHER, 1999). Também foi observada banda intensa em 745 cm<sup>-1</sup> referente à deformação angular dos hidrogênios do anel benzênico (CAO; FISCHER, 1999). O resumo das respectivas atribuições é apresentado na Tabela 14.



Fonte: autora.

Atribuição	Bandas (cm <sup>-1</sup> ) (intensidade)	Referência
β(CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	509 (m)	a
δNH(r) fora do plano	626 (w), 683 (w)	a
$\beta$ H(R)	745 (s), 864 (w)	a
$\beta( ext{CH}_2)$	921 (w), 1008 (w)	a
$\beta$ H(R) e $\beta$ H(r)	1100 (w)	a
vCC	1158 (w)	a
$\beta C(\mathbf{R})$ e vR	1232 (w)	a
$\beta C(H)$	1357 (s)	a
v <sub>s</sub> (CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1414 (s)	a
ν(r)	1457 (m)	a
$\beta$ s(NH <sub>2</sub> )	1590 (s)	b
v <sub>ass</sub> (CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1667 (s)	a
v(C=C)	2081 (w)	b
v(C-H)	2362 (m); 2724 (w); 3035 (s)	a, b
v(C=N)	2565 (w)	b
v(CH <sub>2</sub> )	2854 (w)	a
vNH(r)	3400 (s)	а

**Tabela 14.** Atribuições das bandas do espectro FTIR (450 – 4500 cm<sup>-1</sup>) para o aminoácido L-triptofano.

 $R = anel benzênico, r = anel pirrol, \beta = deformação angular, s = forte, m = média, w = fraca.$ a. (CAO; FISCHER, 1999)

b. (PAVIA et al., 2010)

O espectro FTIR do precursor 4-pyCHO é apresentado na Figura 67. Observa-se banda fina e intensa na região de 1715 cm<sup>-1</sup> a qual é atribuída à frequência de estiramento da carbonila do grupo aldeído presente na estrutura da 4-pyCHO (OHNO et al., 2006). Bandas intensas também são observadas na região entre 640 - 1570 cm<sup>-1</sup>. As respectivas atribuições são apresentadas na Tabela 15.





<b>Tabela 15.</b> Atribuições das bandas do espectro FTIR (450 – 4500 cm <sup>-1</sup> ) para o composto	ıbel	Га
4-piridinacarboxaldeído.		

Frequências de vibração	Bandas (cm <sup>-1</sup> ) (intensidade)	Referência
Ligação de hidrogênio	3400	a
2 v(CHO)	2748 (w)	b
v(CO)	1715 (vs)	b
Deformações vibracionais no anel piridínico	1670 (w), 1566 (s), 1225 (m), 1414 (s), 1192 (s), 991 (w), 665 (w), 648 (s)	a, b
v(CHO)	1390 (m)	b
v(CH)	3040 (w), 2847 (w), 1323 (s), 1059 (w)	b
v(CC)	837 (m)	b
v(CH) fora do plano	808 (s)	b

 $*\beta$  = deformação angular, vs = muito intensa, s = intensa, m = média, w = fraca.

a. (PAVIA et al., 2010).

b (OHNO et al., 2006).

Observa-se que a banda relacionada ao estiramento do -NH do indol foi deslocada de  $3400 \text{ cm}^{-1}$  para  $3250 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 68) devido à interação intermolecular existente entre o indol e os anéis piridínicos no composto formado (MALAKYAN et al., 2016). Além disso, uma banda larga e intensa é observada em 1600 cm<sup>-1</sup>, a qual é atribuída ao estiramento da ligação C=N (MALAKYAN et al., 2016). As bandas encontradas em 1416 e 1324 cm<sup>-1</sup> são relacionadas

à deformação angular do grupo -OH e à deformação axial da ligação C-O, existentes no grupo ácido carboxílico. Já as bandas em 1100, 1065, 1002 e 818 cm<sup>-1</sup> são atribuídas a v(C-O), v(C-N), v(C-C) (MALAKYAN et al., 2016) e à deformação angular dos hidrogênios do anel monossubstituído (anel piridínico) (PAVIA et al., 2010).

A síntese de iminas envolve ataque nucleofílico da amina no carbono da carbonila com posterior eliminação de água. O equilíbrio desta reação é bastante sensível à formação da água, podendo ser deslocado para a direção dos reagentes (QIN et al., 2013). Na síntese do ligante pyTrp utilizou-se agente secante (MgSO<sub>4</sub>) buscando manter o equilíbrio na formação do produto, o que funcionou de forma eficaz. No entanto, em reações posteriores, para formação dos complexos contendo este ligante, seria necessário o emprego de meio aquoso. Neste contexto, buscou-se verificar a influência da água na ligação imínica. A um béquer adicionou-se uma amostra de 2 mg juntamente a 4 mL de água destilada e deixou-se sob agitação por 1,5 hora. Após este período, secou-se o solvente através de rotaevaporação e deixou-se o solido secar em dessecador. Novamente realizou-se análise por FTIR (Figura 69).



Figura 68. Espectro na região do infravermelho do ligante pyTrp obtido em pastilhas de KBr.



Figura 69. Espectro na região do infravermelho obtido para o ligante pyTrp após ser submetido à solução aquosa.

Através dos espectros FTIR apresentados na Figura 69, é possível concluir que não houve alterações nas bandas observadas para o ligante pyTrp mesmo quando submetido à ambiente aquoso. Este resultado foi de relevante importância para o prosseguimento da rota sintética e síntese dos complexos.

# 8.5 Parte B: Complexos contendo os ligantes derivados de aminoácidos

# 8.5.1 Síntese

# 8.5.1.1 Complexo cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(pyLys)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (RupyLysNO)

O complexo RupyLysNO foi sintetizado através de duas rotas diferentes, A (Figura 70) e B (Figura 71).



Figura 70. Esquema da síntese do complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(pyLys)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> através da Rota A.

Fonte: autora.

A rota sintética A foi a primeira a ser utilizada para a síntese do complexo RupyLysNO. No entanto, observou-se que o rendimento desta síntese se apresentou baixo, da ordem de 38,0%. Por isso, a rota sintética B (Figura 71) foi realizada com êxito, com rendimento de 46,2%.



Figura 71. Esquema da síntese do complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(pyLys)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> através da Rota A.

Fonte: autora.

Foi realizada a purificação do complexo RupyLysNO<sub>2</sub> ao invés do complexo nitrosilo (RupyLysNO). Os complexos nitrosilos podem ser reduzidos na manipulação e por isso a purificação em coluna é inviável. Utilizou-se sílica-C18 como fase estacionária em coluna cromatográfica e eluição dos solventes diclorometano, acetonitrila e etanol, nesta ordem. O complexo RupyLysNO foi caracterizado por análise elementar, espectrometria de massas, espectroscopia de absorção eletrônica no Uv-visível e vibracional no infravermelho.

# 8.5.1.2 Complexo cis-[Ru(NO)(bpy)2(pyTrp)](PF6)3 (RupyTrpNO)

O complexo RupyTrpNO foi sintetizado através da rota apresentada na Figura 72.



Figura 72. Esquema da síntese do complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(pyTrp)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.

Fonte: autora.

Da mesma forma que o complexo RupyLysNO, o complexo RupyTrpNO não pode ser purificado por coluna, assim, optou-se por realizar a purificação do complexo RupyTrpNO<sub>2</sub>. Utilizou-se cromatografia clássica em coluna com a fase estacionária alumina neutra, e fase móvel acetonitrila/diclorometano 1:1 e posteriormente, etanol. O complexo RupyTrpNO foi caracterizado por análise elementar, espectroscopia de absorção eletrônica no Uv-visível e vibracional no infravermelho.

#### 8.5.2 Caracterização

#### 8.5.2.1 Análise Elementar

Os dados de análise elementar demonstraram que os complexos RupyLysNO e RupyTrpNO se encontravam puros. Os valores calculados e experimentais são apresentados na Tabela 16.

Complexo	% Cal	culada (Exper	imental)
cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> (pyTrp)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	C: 36,74 (36,99)	H: 3,88 (4,01)	N: 9,26 (9,44)
cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> (pyLys)(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	C: 41,90 (43,01)	H: 3,15 (3,28)	N: 24,85 (25,67)

Tabela 16. Dados teóricos e	experimentais de aná	lise elementar para	os complexos R	upyLysNO e	e RupyTrpNO.
	1	1	1		12 1

Fonte: autora.

#### 8.5.2.2 Espectrometria de Massas

Os complexos de metais de transição apresentam características que propiciam analises por espectrometria de massas, tais como serem espécies carregadas e possuírem elevada abundância isotópica. Tratando-se de complexos de rutênio, o padrão isotópico resulta basicamente de sete isótopos naturais principais com as seguintes abundâncias: <sup>104</sup>Ru (18,62%), <sup>102</sup>Ru (31,55%), <sup>101</sup>Ru (17,06%), <sup>100</sup>Ru (12,60%), <sup>99</sup>Ru (12,76%), <sup>98</sup>Ru (1,83%) e <sup>96</sup>Ru (5,54%) (HOPP; FISCHER-GÖDDE; KLEINE, 2016).

Alguns compostos apresentam fragmentações que não podem ser identificadas no espectro de massas ESI em função da alta energia de ionização empregada na análise. Nestes casos, utilizou-se a técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI).

Inicialmente, a espectrometria de massas MALDI foi desenvolvida para analisar moléculas com altos pesos moleculares, tais como biomoléculas e macromoléculas sintéticas. Tratando-se de metais de transição, existem poucos trabalhos na literatura que reportam esta técnica como estratégia de caracterização principalmente devido à possibilidade de sobreposição de sinais dos complexos e da matrix (BHASKAR et al., 2007).

A técnica de MALDI possui a característica de utilizar energias de ionização mais brandas e fenômenos de dessorção. Na dessorção, uma substância é adsorvida/absorvida em uma determinada matriz com propriedades conhecidas – em geral, ácidos orgânicos – promovendo protonação da espécie analisada. Sequencialmente, o solvente é evaporado formando uma mistura sólida que é adicionada a uma superfície que será exposta à laser operando na faixa do ultravioleta. Esta exposição leva à volatilização da amostra e matriz gerando um gás de moléculas ionizadas as quais podem ser analisadas por espectrometria de massas.

Nas análises MALDI-MS para os complexos de rutênio, a co-cristalização foi realizada utilizando ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinâmico como matriz e os experimentos conduzidos no equipamento MALDI-TOF UltrafleXtreme da Bruker. No espectro são possíveis observar dois conjuntos de picos proeminentes. Estes picos possuem o padrão isotópico do rutênio e são centrados em *m/z* 910,203 (calc. 910,240) e *m/z* 979,034 (calc. 979,028). O íon monovalente centrado em *m/z* 910,203 ( $\Delta$ m/z = 1,0) (Figura 74) corresponde ao íon positivo {Ru<sup>II</sup>(pyLysO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>}<sup>+</sup>, ou seja, o íon obtido após a perda do ligante nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Este ligante foi liberado no meio em decorrência da aplicação de energia (25 kV) e portanto, o íon {Ru<sup>II</sup>(pyLysO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>}<sup>+</sup> pôde ser detectado. O outro íon observado, em *m/z* 979,034 ( $\Delta$ m/z = 1,0) (Figura 73) é consistente com o íon molecular do complexo, o {[Ru<sup>II</sup>(NO<sub>2</sub>)(pyLysO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>]Na}<sup>+</sup>.



Figura 73. Espectro de massas MALDI-MS do íon {Ru<sup>II</sup>(pyLysO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>}<sup>+</sup>.



Figura 74. Espectro de massas MALDI-MS/MS do íon {[Ru<sup>II</sup>(NO<sub>2</sub>)(pyLysO<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>]Na}<sup>+</sup>.

8.5.2.3 Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-visível

O espectro de absorção eletrônica no Uv-visível do complexo RupyLysNO é apresentado na Figura 75. As bandas observadas em regiões do ultravioleta (< 300 nm) são atribuídas a transições IL do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  relativas aos ligantes insaturados (bpy e pyLys). A bandas em 325 nm é considerada de transição de TCML, envolvendo a transição Ru 4d<sub> $\pi$ </sub>  $\rightarrow \pi^*$ (NO<sup>+</sup>). Em meio aquoso, é possível observar entre 400 e 450 nm a banda de transição de transição de TCML Ru 4d<sub> $\pi$ </sub>  $\rightarrow \pi^*$ (bpy) consistente com a formação do complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(pyLys-O<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>], similar ao complexo AR1 reportado no Capítulo 1.

Para o complexo RupyTrpNO (Figura 76), as bandas observadas em regiões do ultravioleta (< 300 nm) também são atribuídas a transições IL dos ligantes insaturados (bpy e pyTrp). A banda em 336 nm (meio ácido) é consistente com o complexo nitrosilo, enquanto em meio aquoso a banda em 415 nm é considerada do tipo TCML, envolvendo a transição

Ru  $4d_{\pi} \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ . No entanto, em meio ácido, observa-se aparecimento de um "ombro" em 457 nm, fenômeno incomum para esta classe de compostos, visto que, em geral, em soluções ácidas dos complexos Ru-bpy não são observada bandas na região do visível ((RODRIGUES et al., 2016; SAUAIA; SILVA, 2003)). Para buscar entendimento da proveniência desta banda, realizou-se estudo preliminar do espectro na região do Uv-visível do ligante pyTrp.





Fonte: autora.





Primeiramente analisou-se duas soluções do ligante pyTrp em pH ácido e básico (Figura 77). É possível observar que em meio ácido, o pyTrp apresenta banda em 438 nm, enquanto em meio básico apresenta banda em 347 nm. Este fenômeno causa dificuldade na atribuição de bandas dos complexos RupyTrpNO e RupyTrpNO<sub>2</sub>, em virtude da sobreposição de bandas. Assim, sugere-se que as bandas localizadas no espectro Uv-visível do complexo RupyTrpNO e RupyTrpNO e RupyTrpNO e RupyTrpNO a partir da mistura dos orbitais do metal e dos ligantes envolvidos.





Fonte: autora.

Para melhor entendimento acerca da quantidade de bandas existentes na região do ultravioleta para o ligante (Figura 78), foi calculada a primeira derivada do espectro do ligante pyTrp. Esta técnica auxilia na separação das bandas espectrais sobrepostas além de torná-las mais finas (DONATO et al., 2010). Através da primeira derivada do espectro do ligante pyTrp é possível inferir que existem pelo menos seis bandas na região do ultravioleta, com máximos de absorção em 203, 225, 260, 267, 283 e 292 nm.

De posse destes dados experimentais, pressupõe-se que a intensidade das bandas no ultravioleta para os complexos RupyTrpNO e RupyTrpNO<sub>2</sub> é maior do que complexos similares devido à natureza da contribuição dos ligantes para os orbitais moleculares.





#### 8.5.2.4 Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)

Os espectros FTIR dos complexos RuLysNO e RuTrpNO são apresentados nas Figuras 79 e 80. Para o complexo RupyLysNO, é observado pico em 3360 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento do grupo -OH presente na estrutura do aminoácido. Na região de 1753 e 1690 cm<sup>-1</sup> são observadas duas bandas intensas, referentes ao estiramento da carbonila da lisina e do carbamato (Fmoc), respectivamente. Outras bandas encontram-se atribuídas na Tabela 17.



Para o complexo RuTrpNO é possível observar uma banda em 1610 cm<sup>-1</sup>, a qual é similar à banda observada no espectro FTIR do ligante pyTrp livre, correspondente ao estiramento da ligação C=N. No entanto, esta banda aparece ligeiramente deslocada, o que é consistente com a sua coordenação ao íon Ru<sup>2+</sup>. As respectivas tentativas de atribuições são resumidas na Tabela 17.



Figura 80. Espectro FTIR do complexo RupyLysNO em pastilha de KBr.

Complexo	bpy	v(NO)	v(PF)
cis-[RuCl <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ]	657, 729, 765, 1017, 1264, 1309, 1419, 1444, 1463, 1600, 3089, 3098, 3490		
AR2	725, 765, 1029, 1253, 1320, 1453, 1473, 1607, 3100, 3137, 3450	1945	558, 837
RupyLysNO	734, 758, 1036, 1251, 1450, 2970, 3391	1941	560, 840
RupyTrpNO	668, 741, 1016, 1250, 1452, 2928, 3089, 3426	1939	561, 845

**Tabela 17.** Tentativa de atribuição das bandas dos espectros de FTIR obtidos em pastilhas de KBr.

# 8.6 Parte C: Complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]

#### 8.6.1 Síntese

Aminoácidos são as unidades que compõem as proteínas e são também os ligantes biológicos de baixo peso molecular mais importantes. As reações que envolvem aminoácidos no meio biológico em geral são regidas por formação de compostos metálicos. Assim, entender as reações que ocorrem no meio biológico ao se administrar complexos metálicos pode ajudar a elucidar como ocorrem os mecanismos de citotoxicidade e entendimento de mecanismos de metabolização (RATHGEB et al., 2014). Um exemplo disso é o complexo [Pt(L-Met)<sub>2</sub>], o qual foi isolado de amostras de urina de pacientes tratados com cisplatina (RATHGEB et al., 2014).

Assim, buscando entender a respeito das propriedades físico-químicas de complexos rutêno-nitrosilos contendo aminoácidos e mecanismos estrutura-atividade, neste trabalho foi sintetizado e caracterizado o complexo inédito [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]. Sua síntese foi feita a partir do complexo Na<sub>2</sub>[RuCl<sub>5</sub>NO]. Este complexo foi obtido através da reação entre RuCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O (tricloreto de rutênio hidratado) com NaNO<sub>2</sub> em solução de HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup>, ou pela reação do RuCl<sub>3</sub>.3 H<sub>2</sub>O com NO gasoso, gerado a partir da técnica de borbulhamento de NO (ANEXO).

O aminoácido triptofano foi adicionado na proporção 1:1 a uma solução do complexo Na<sub>2</sub>[RuCl<sub>5</sub>NO] em pentanol (Figura 81). Esta solução de coloração avermelhada foi deixada sob refluxo por 4 horas. Após o tempo de reação, adicionou-se cloreto de tetrabutilamônio na proporção 2:1 do complexo e observou-se precipitado castanho.



Figura 81. Resumo da síntese do complexo RuTrpNO.

Fonte: autora.

A purificação foi realizada através de recristalização à quente em acetonitrila. O complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)] foi caracterizado por espectrometria de massas, RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, espectroscopia paramagnética eletrônica (EPR), espectroscopia de absorção no Uv-visível e FTIR e cálculos estruturais.

#### 8.6.2 Caracterização

8.6.2.1 Espectrometria de Massas

O espectro de massas do complexo  $[N(CH_2CH_3)_4](RuCl_3(NO)(Trp)]$  (Figura 82) apresentou um fragmento proeminente com carga negativa (modo negativo) com razão *m/z*: 439,891, contendo o padrão isotópico do rutênio, correspondente ao íon {RuC<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>3</sub>}<sup>-</sup>. Este íon é exatamente o complexo na ausência do contra íon tetraetilamônio.



Figura 82. Espectro de massas para o íon {RuCl<sub>3</sub>(triptofano)(NO)}<sup>-</sup>.

#### 8.6.2.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Observa-se que a maioria das bandas encontradas no espectro FTIR do triptofano livre é encontrada no espectro do complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)] (Figura 83), com a diferença de que no complexo a banda correspondente ao estiramento simétrico da carbonila e a banda corresponde ao estiramento do N-H do pirrol são ausentes. Além disso, uma banda intensa é observada para o complexo em 1867 cm<sup>-1</sup> correspondente ao ligante nitrosil ( $\nu$ NO) coordenado ao íon metálico Ru<sup>2+</sup>. Um resumo dos principais estiramentos encontrados no espectro de infravermelho do triptofano estão resumidos na Tabela 18. Além dos valores experimentais, para melhor atribuição das bandas do espectro FTIR, foram realizados cálculos DFT em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Eduardo da Hora Machado.



Figura 83. Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo  $[N(CH_2CH_3)_4](RuCl_3(NO)(Trp)]$  obtido em pastilhas de KBr.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
IR Experimental	IR Teórico	
3346	3577.37	vNH (pirrol)
3016-3250	3250.99 (pirrol); 3185.40 (benzeno - sim); 3173.08 (benzeno - assim)	vCH (pirrol e benzeno)
1864	1994.08	vNO
1667	1513,65 e 1555,50	$v_{s}CO_{2}$ e $v_{ass}CO_{2}$
1392	1390.8	$\beta CH_2$
747	742.48 (H benzeno fora do plano)	$\beta$ H (benzeno)

Tabela 18. Atribuições das bandas do espectro de infravermelho do complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup>.

Fonte: autora.

#### 8.6.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Apesar do complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)] apresentar a banda do estiramento do ligante nitrosil em 1864 cm<sup>-1</sup> e íon molecular (espectrometria de massas em modo negativo) compatível com o fragmento Ru<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>, possuindo portanto comportamento

diamagnético, observou-se que os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 84) e de <sup>13</sup>C (Figura 85), apresentam características de um complexo paramagnético, tais como: mesmo em alta concentração de complexo (10,0 mg em 0,50 mL de solvente deuterado) os sinais aparecerem pouco resolvidos (alargados), e os sinais dos carbonos não aparecerem nos deslocamentos químicos esperados (região de carbonos em ambiente aromático).

**Figura 84.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)] obtido em DMSO deuterado.



**Figura 85.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para o complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)] obtido em DMSO deuterado.



Fonte: autora.

Os sinais referentes aos carbonos em região aromática não aparecem nos deslocamentos químicos entre 100 e 160 ppm do espectro de RMN de <sup>13</sup>C. Este comportamento foi observado em complexos de rutênio contendo ligantes semiquinonas que apresentam características paramagnéticas (BISWAS et al., 2012), os quais são ligantes tidos como "não

inocentes". Não obstante, para complexos nitrosilos de rutênio, este comportamento nunca fora observado antes. Para confirmar tal hipótese, foi conduzido experimento de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) utilizando o complexo em fase sólida.

#### 8.6.2.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica

O gráfico obtido (Figura 86) demonstra um sinal com constante g = 2,0005, a qual descreve o comportamento deste complexo como paramagnético correspondendo ao sinal de um radical. Assim, pressupõe-se que este sinal é relativo ao comportamento de uma estrutura Ru<sup>III</sup>-NO<sup>0</sup>.



Figura 86. Espectro de EPR obtido para o complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)] em fase sólida.

Fonte: autora.

#### 8.6.2.4 Considerações sobre a estrutura do complexo [RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup>

Cálculos da geometria mais provável para o complexo [RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup> foram realizados pelo Prof. Dr. Antônio E. da Hora Machado, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A estrutura do complexo (Figura 87) e os principais comprimentos de ligação calculados estão apresentados na Tabela 19.

Os cálculos de otimização e frequências vibracionais foram feitos usando o funcional DFT m06 e o conjunto de bases atômicas TZP-DKH. Foi empregado o modelo SCRF IEFPCM.

Aparentemente, considerando as cargas de Mulliken, a melhor descrição é um complexo de  $Ru^{III} - NO^0$ , nos três casos estudados (isolada, em metanol e em DMSO). A carga líquida é -1, e a estrutura eletrônica é de camada fechada.

**Figura 87**. Estrutura do complexo (RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup> obtida a partir de cálculos DFT para a estrutura energeticamente favorável.



Fonte: figura concedida pelo Prof. Dr. Antônio E. da Hora Machado.

Os principais valores de distâncias (Å) e ângulos (°) encontram-se na Tabela 19.

Fragmento	Comprimento de ligação, Å	Fragmento	Ângulo de ligação, º	
N-O	1,131	Ru-N-O	179,4	
Ru-N(NO)	1,724	Cl(1)RuCl(2)	89,93	
Ru-N	2,130	Cl(2)RuCl(3)	90,51	
Ru-O	2,061	Cl(1)RuCl(3)	169,27	
Ru-Cl(1)	2,408	Cl(1)RuN(NH <sub>2</sub> )	85,24 e 84,06	
Ru-Cl(2)	2,397	Cl(1)RuO	90,20	
Ru-Cl(3)	2,411	RuOC	118,00	
		RuN(NH <sub>2</sub> )C	108,0	

Tabela 19. Valores de distâncias (Å) e ângulos de ligação (°) para a estrutura [(RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup>.

Fonte: dados concedidos pelo Prof. Dr. Antônio E. da Hora Machado.

Ao se analisar os dados de comprimento de ligação e frequência de estiramento do NO (1864 cm<sup>-1</sup>) para o complexo [RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)]<sup>-</sup>, supõe-se, através da comparação com outros complexos similares (RATHGEB et al., 2014), que seja um complexo do tipo Ru<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>. Ademais, os dados de espectrometria de massas corroboram a obtenção de um complexo com carga -1.

No entanto, ao se obter espectro de EPR e tentar realizar espectro de RMN, são observados sinais coerentes com a espécie Ru<sup>III</sup>-NO<sup>0</sup>. Apesar de existirem dados relacionados ao experimento de difração de Raios-X e atividade citotóxica de complexos similares (RATHGEB et al., 2014), nada foi reportado sobre seus espectros de RMN e EPR, o que provavelmente se deve à dificuldade em se analisar este sistema.

Como existem indícios da presença dos dois complexos em um mesmo sistema, acredita-se que exista o um equilíbrio termodinâmico entre os isômeros A e B (Figura 88), os quais serão melhor explicados através de cálculos DFT.

Figura 88. Equilíbrio entre as estruturas possíveis do complexo [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](RuCl<sub>3</sub>(NO)(Trp)].



# 9. CAPÍTULO 3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

# Figura 89 - Placas de Elisa.



# 9.1 Câncer

A palavra câncer tem origem no grego, *karkinos*, cujo significado é caranguejo. Tem este nome pois as células doentes se infiltram nas células sadias como se fossem os tentáculos de um caranguejo (Figura 90). A utilização desta palavra foi feita primeiramente por Hipócrates (460-377 a. C.) e existem relatos de detecção desta enfermidade em múmias egípcias de mais de 3000 mil anos antes de Cristo, o que demonstra esta não é uma doença nova. Apesar disso, atualmente foram identificados mais de cem tipos desta doença, sendo que cada um é classificado de acordo com o tipo de célula que é inicialmente afetada (INCA, 2017).



Figura 90. Células cancerígenas.

Fonte: http://www.telomero.com.br

Em ambientes tumorais o crescimento celular não é igual ao de células normais. As células cancerosas se dividem incontrolavelmente formando outras células anormais e espalhando-se para outras regiões do corpo. É esta característica, do poder de invasão de outras estruturas do organismo, que diferencia um tumor maligno e um benigno. A malignidade se dá pela colonização de regiões destinadas a outros tipos de células, acarretando em transtornos funcionais. Neste contexto é que surgem os tumores (INCA, 2017).

Os tumores aparecem no organismo em função de um problema nos genes. As causas dessa modificação nos genes podem ser externas ou internas ao organismo, estando correlacionadas. As causas externas em geral abrangem o meio ambiente e os hábitos de cada indivíduo. Já as causas internas (geneticamente pré-determinadas) estão relacionadas à capacidade do organismo em se defender de influências externas. Estes fatores podem causar

mutações, aumentando as possibilidades de aparecimento de transformações malignas em células normais (INCA, 2017).

As transformações malignas são chamadas tumores malignos, os quais podem ser invasivos ou não-invasivos. O câncer não invasivo é o estágio primário em que as células cancerosas ainda se encontram no tecido ao qual se desenvolveram. Tratando-se do câncer invasivo, as células cancerosas migram para a corrente sanguínea ou linfática, invadindo outros órgãos. Após migrarem, as regiões aonde estas células se instalam são chamadas metástases (Figura 91).





Fonte: INCA, 2017.

O câncer pode aparecer em qualquer região do corpo. No entanto, alguns órgãos são mais afetados, sendo o tumor mais ou menos agressivo. Os variados tipos de tumor são classificados de acordo com o local em que se inicia o processo neoplásico.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2018), em 2012 foram previstos mais de 14,1 milhões de casos de câncer no mundo para as duas décadas seguintes. Já em 2015, foram registradas 8,8 milhões de mortes, sendo o câncer a segunda principal causa de morte no ranking mundial (OMS, 2018).

É possível observar que os números de casos dos mais variados tipos de cânceres vêm crescendo exponencialmente, o que gera um grande impacto na economia mundial, com a estimativa de um custo aproximado de R\$3,74 trilhões no ano de 2010 (OMS, 2018). Ressaltase que segundo a OMS (2018), do total de números de cânceres registrados, entre 30-50% podem ser evitados através de hábitos saudáveis e preservando-se dos fatores de risco, tais como exposição prolongada ao sol ou tabagismo.

No Brasil, O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima quase 600.000 novos casos para o ano de 2017. Como é possível observar na Figura 92, os tipos de câncer mais incidentes em 2016/2017, são para homens: câncer de próstata, traqueia, brônquios e pulmão e cólon e reto, e para mulheres: mama, colo do útero, cólon e reto (INCA 2017).



Figura 92. Taxas de incidência de câncer estimadas em 2016 no Brasil.

Fonte: INCA, 2017.

Enquanto as taxas de mortalidade por doenças infecto parasitárias diminuíram drasticamente no Brasil, a mortalidade por neoplasias vem crescendo de forma alarmante no decorrer das últimas décadas (INCA, 2017). Neste contexto, a busca por políticas públicas de prevenção assim como a busca de novos fármacos que possam atuar frente ao tratamento desta enfermidade são de relevante importância. Dentre os fármacos estudados e que têm se apresentado promissores, encontram-se os complexos rutênio-nitrosilos.

Tratando-se de tumores, sabe-se atualmente, que o monóxido de nitrogênio (NO) é a molécula que rege sua progressão ou regressão, modulando diversos eventos relacionados ao câncer, tais como angiogênese, apoptose e metástase. No entanto, como esta molécula irá atuar dependerá de sua concentração no interior das células (RIDNOUR et al., 2008). Visto que os

complexos rutênio-nitrosilos podem liberar NO em meio biológico, suas propriedades podem ser exploradas para o tratamento do câncer.

Em virtude do que foi exposto, este trabalho visa avaliar a citotoxicidade dos complexos sintetizados e avaliar propriedades da relação estrutura-atividade.

# 9.2 Avaliação do potencial biológico dos complexos rutênio-nitrosilos frente a células tumorais

Como citado anteriormente, um dos objetivos deste trabalho é poder contribuir com a ampliação dos estudos *in vitro* frente a células cancerígenas e das aplicações dos complexos rutênio-nitrosilos na área biológica, considerando que os complexos sintetizados são inéditos e que a literatura nesta área é escassa.

Assim sendo, este capítulo visa apresentar resultados da avaliação *in vitro* da citotoxicidade de complexos rutênio-nitrosilos, conforme metodologia descrita no item 6.5 do Procedimento Experimental. As linhagens celulares submetidas aos testes foram: MCF-7, B16-F10 e MDA-MB231. Para via de obtenção do índice de seletividade destes complexos, foi analisada a viabilidade celular também em modelo de células sadias MCF-10A. As análises foram conduzidas por meio do teste de MTT.

Os ensaios avaliaram a influência de diferentes concentrações dos complexos cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O (AR1), cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (AR2), cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(pyLys-O<sup>-</sup>)(bpy)<sub>2</sub>] (AR3) e cis-[Ru(NO)(pyLys)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (AR4), variando de 250,0 a 1,95 µmol L<sup>-1</sup>. Como a cisplatina é um quimioterápico encontrado comercialmente e largamente empregado na clínica, além de ser um complexo metálico, ela foi utilizada como controle positivo para avaliar os modelos experimentais desenvolvidos neste trabalho.

Os complexos e a cisplatina foram encubados durante 24 horas e os resultados obtidos foram analisados pelos modelos estatísticos ANOVA one-way-Tukey e Bonferroni, como testes de confirmação.

Conforme pode ser observado na Figura 93, após tratamento por 24 horas, não foi possível observar citotoxicidade gerada pelos complexos 1, 2 e 3. No entanto, para o complexo 4 foi observada diferença significativa na taxa de proliferação celular quando comparada com o controle negativo. Houve redução da viabilidade celular para menos de 50% nos tratamentos a partir de ~21,4  $\mu$ M. Interessantemente, este valor é menor do que o IC<sub>50</sub> (concentração

inibitória de 50%) da cisplatina (38,2  $\mu$ M), sugerindo que este seja um complexo alternativo à cisplatina frente a células MCF-7.





Fonte: autora.

Ensaios para se verificar se os complexos estudados apresentavam citotoxicidade frente ao modelo de células sadias MCF-10A e MDA-MB231 foram conduzidos.

Tratando-se de células MDA-MB231, a análise estatística dos resultados obtidos revelou que os complexos 1, 2 e 3 não apresentaram atividade citotóxica após tratamento de 24 horas, ao e comparar com o controle negativo. O complexo 4 apresentou efeito citotóxico superior à cisplatina nas mesmas condições experimentais (Figura 94). Além disso, a viabilidade de células sadias após a aplicação dos complexos comprovou que nenhum deles apresenta atividade considerável na linhagem celular MCF-10A (Figura 95), demonstrando que existe alguma seletividade em sua aplicação.



. Figura 94. Curva dose-resposta para a citotoxicidade dos complexos 1, 2, 3 e 4 em células MDA-MB231.



Figura 95. Curva dose-resposta para a citotoxicidade dos complexos 1, 2, 3 e 4 em células MCF-10A.

Fonte: autora.

Mesmo que o índice de Seletividade (SI) não seja um parâmetro reconhecido para seu uso na investigação da seletividade dos compostos por células tumorais, ele pode ser uma estimativa palpável para comparação entre os complexos estudados. Na Tabela 20 são apresentados os valores obtidos de IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e o SI calculado. Observa-se que o complexo 4 possui o melhor resultado, apresentando seletividade pelas células tumorais tanto da linhagem MCF-7, quanto da linhagem MDA-MB231.

Compostos	IC50MCF-7	IC50MDA-MB-231	CC50MCF-10A	SI
Cisplatina	38,24	55,46	34,53	0,9/0,6
1		>200		
2	165,60	>200	196,01	1,2/
3	118,30	62,67	139,20	1,2/2,2
4	21,39	23,59	104,00	4,9/4,4

Tabela 20. Atividade citotóxica de complexos de rutênio frente a células tumorais.

Fonte: autora.

O complexo 2 e o 4 possuem NO em sua estrutura. Este ligante apresenta grande importância em sistemas biológicos desde que é responsável por processos de replicação celular, mas também de apoptose. Assim, para entender um pouco sobre a ação destes complexos frente às células tumorais, realizou-se experimento qualitativo de cronoamperometria para os complexos 2 e 4 no intuito de observar a possível liberação de NO em meio fisiológico. Para tal experimento, foi preparada solução aquosa de ácido ascórbico na

concentração 0,010 mol L<sup>-1</sup> e solução dos complexos em tampão fosfato pH~7,4 na concentração 0,10 mol L<sup>-1</sup>. O gráfico obtido para o complexo 4 é apresentado na Figura 96. O mesmo gráfico foi obtido para o complexo AR2, o qual apresentou atividade bastante similar (ANEXO).

**Figura 96.** Cronoamperograma obtido para o complexo *cis*-[Ru(NO)(pyLys)(bpy)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> na concentração de 0,010 mol L<sup>-1</sup> a partir da adição de 0,20 mL de solução de ácido ascórbico 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Tampão fosfato pH ~7.4.



Fonte: autora.

O ácido L-ascórbico foi escolhido por estar presente nas células em geral e apresentar como uma de suas principais características o poder redutor (FORNARO; COICHEV, 1998). Assim, espera-se que ele reduza o NO<sup>+</sup> coordenado ao íon de rutênio(II) para NO<sup>0</sup>. Visto que o NO<sup>0</sup> possui baixa afinidade pelo íon metálico de Ru<sup>2+</sup>, ele é liberado para o meio em um mecanismo parecido ao que foi observado para processos de oxirredução estudados no Capítulo 1.

Apesar dos complexos 2 e 4 apresentarem liberação de NO pela adição de ácido ascórbico, somente o complexo 4 apresentou de fato atividade citotóxica frente as células MCF-7 e MDA-MB231. Este resultado faz com que se acredite que além da liberação de NO no interior celular, pode estar ocorrendo algum outro processo. Neste sentido, através de pesquisas bibliográficas, se buscou o entendimento qualitativo deste sistema.

O transporte dos aminoácidos nas células ocorre via processos mediados por transportadores específicos. Visto que o complexo que apresentou atividade citotóxica frente a células de câncer de mama estudado neste trabalho, possui um derivado de aminoácido (lisina) em sua estrutura, sugere-se que ele esteja sendo internalizado pelos mesmos mecanismos que
os próprios aminoácidos, diferentemente dos complexos 1 e 2 que não possuem derivados de aminoácido em sua estrutura.

As células tumorais possuem alta demanda de aminoácidos e glicose em função de seu rápido crescimento. A internalização dos aminoácidos através da membrana celular ocorre via uma variedade de transportadores. Neste sentido, as células cancerosas regulam um ou mais destes tipos de transportadores para modificar seu funcionamento em benefício de seu metabolismo. Segundo estudos (BHUTIA et al., 2014), entre os transportadores de aminoácidos existentes, o transportador de solutos SLC6A14 (do inglês, *SoLute Carrier*) se destaca com características funcionais específicas adequadas para suprir a necessidade de aminoácidos pelos tumores. Ademais, este transportador apresenta-se em grande quantidade em tumores dos tipos epitelial, incluindo câncer de cólon, câncer cervical, câncer de mama, melanoma e câncer pancreático (BHUTIA et al., 2014). Assim, uma das hipóteses levantadas, é de que o complexo contendo o aminoácido pode estar sendo internalizado via transportadores de membrana em maiores quantidades do que os complexos 1 e 2.

Outra hipótese, é de que o complexo pode estar causando alterações nas histonas presentes na carcinogênese (LIM et al., 2010). Estudos demonstraram que a desmetilase 1 específica de lisina (LSD1) é fundamental na regulação da expressão gênica, estando envolvida diretamente no intrínseco processo da carcinogênese. Assim, compostos que possam inibir esta enzima através da similaridade com seu sítio regulatório podem frear a proliferação tumoral (LIM et al., 2010). Lim e colaboradores (2010) sugeriram que a partir destes estudos, desenvolver compostos que possam atuar nesta via pode ser uma alternativa bastante promissora para se cessar o crescimento de tumores e torna-los mais sensíveis aos fármacos anticancerígenos. Neste ponto de vista, os complexos contendo lisina em sua estrutura podem estar interagindo com as enzimas citadas e bloqueando a regulação da expressão supracitada.

De posse destas informações, supõe-se que os complexos 3 e 4 estejam sendo internalizados através da membrana celular e bloqueando biomoléculas responsáveis pela proliferação, mas somente o complexo 4 apresenta citotoxicidade por ter a capacidade de liberar NO. Para comprovar a hipótese do possível efeito antiproliferativo, o experimento de recuperação da lesão (traduzido do inglês, *wound healing assay*, WHA) foi realizado, em colaboração com Dra. Laena Pernomean, do Departamento de Bioquímica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Como as células da linhagem B16-F10 (melanoma murinho) são referência como modelo biológico muito útil no estudo do melanoma, e se enquadram também na classe de tumores epiteliais, optou-se por avaliar também a atividade citotóxica dos complexos 1, 2, 3 e 4 frente à esta linhagem celular. Resultados similares dos obtidos para as células MCF-7 foram observados, e são possíveis observar através do experimento de WHA conduzido.

O ensaio de WHA se baseia em cultivar as células cancerosas em placas de cultura de seis poços, de forma a poder monitorar a sua recuperação (proliferação) através de microfotografias obtidas a partir de microscopia confocal. Na Figura 97 são apresentadas as microfotografias obtidas neste experimento.

Figura 97. Fotomicrografias de ensaio de lesão representativa para avaliação da proliferação celular em células B16-F10 após tratamento com complexos de rutênio AR1, AR2, AR3 e AR4 (24 horas de incubação; 50 μmol L<sup>-1</sup>). Linhas tracejadas apresentam proliferação da condição de controle. Barras apresentam um tamanho. Controle representa a mesma condição experimental sem a aplicação dos complexos.



Fonte: fotomicrografias concedidas pela Dra. Laena Pernomian.

Através do cálculo da área de proliferação celular comparada ao controle (JONKMAN et al., 2014), foi possível obter o gráfico da Figura 98. Observa-se que o controle apresentou certa proliferação celular após 24 horas da lesão. Para o complexo 2 e 3 a proliferação foi cessada, enquanto para o complexo 4 não foi possível observar nenhum efeito, visto que este complexo gera citotoxicidade na concentração de 50  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e, por conseguinte, a morte celular. Estes resultados revelam que os complexos inibem a proliferação celular, mas somente o complexo 4 provavelmente iniba e concomitantemente libere o NO nos alvos intracelulares

específicos, ocasionando um possível efeito sinergético, e uma morte celular mais acentuada frente a células tumorais.





Fonte: autora.

Para vias de comparação relacionadas à liberação intracelular de NO, foram realizados ensaios de viabilidade celular utilizando-se um doador de NO conhecido e encontrado comercialmente, o NONOate (Dietilamônio(*Z*)-1-(*N*,*N*-dietilamino)diazen-1-ium-1,2-diolato). Este composto dissocia-se espontaneamente em um processo de primeira ordem, liberando NO no interior celular em pH ~7,4 com uma meia-vida de 2-16 minutos a 37±0,1 °C (dados obtidos da Sigma-Aldrich). Os resultados permitiram inferir que a liberação de NO pelo composto NONOate provoca alta citotoxicidade frente às linhagens celulares B16-F10, MCF-7 e MDA-MB231, o que corrobora com a falta de especificidade por células tumorais, mas provém dados que auxiliam no entendimento de sistemas liberados de NO.





Fonte: autora.

Ressalta-se que estes experimentos não são definidores e tampouco elucidam os mecanismos pelos quais os complexos estudados atuam. No entanto, sugerem possíveis relações existentes entre estrutura-atividade, abrindo novos caminhos para a pesquisa na busca pelo entendimento deste sistema, assim como desenvolvimento desta nova classe de compostos.

#### 9.3 Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas) é uma enfermidade parasitária intracelular causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* (PETHERICK, 2010). A Doença de Chagas (DC) caracteriza-se como uma antropozoonose endêmica negligenciada da América Latina, uma vez que tal localidade apresenta 15 gêneros de vetores capazes de transmitir a infecção para humanos (STEVERDING, 2014). Dentre esses vetores, destacam-se principalmente os pertencentes à subfamília Triatominae como *Triatoma infestans, Panstrongylus megistus* e *Rhodnius proxilus*, que se encontram presentes em ambientes cujas condições estruturais de moradia são precárias (STEVERDING, 2014). No entanto, progressivamente, em decorrência da globalização que proporciona o intenso fluxo de pessoas para as mais diversas localidades do globo terrestre – destacando-se a migração de áreas endêmicas para países não endêmicos – denota-se que esta contribuiu para que a DC se tornasse um problema de saúde pública mundial (RASSI et al. 2010).

Durante as últimas décadas observou-se uma diminuição dos casos de contaminação da população via vetor, no entanto, a DC continua um problema de saúde pública. Mesmo após 108 anos de descobertas da doença, essa ressurge em um cenário não habitual visto que casos de contaminação oral têm sido relatados especialmente no que tange à forma de transmissão. A transmissão para seres humanos ocorre: (i) por meio das fezes de insetos vetores hematófagos contaminados, os triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros; (ii) transfusão de sangue; (iii) transmissão congênita; (iv) transplante de órgãos infectados; (v) acidente laboratorial; (vi) oral, e (vii) sexual (ARAUJO et al., 2017; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Como resposta às estratégias profiláticas, em 2006 o Brasil recebeu certificação relativa à eliminação da transmissão da Doença de Chagas pelo vetor (*Triatoma infestans*) e pela via transfusional, concedida pela OPAS/OMS (Organização Pan Americana de Saúde/ Organização Mundial de Saúde) (EICKHOFF et al., 2013). Contudo, o modo de transmissão de maior destaque atualmente é o oral, uma vez que traz a lume algo que anteriormente era descrito pela literatura como a forma menos comum de contaminação. Nos últimos anos, a proporção de pessoas infectadas oralmente apresentou aumento significativo tal que, quando analisada a Amazônia brasileira, depois que a Organização Pan-Americana da Saúde declarou a interrupção da transmissão vetorial nesta área (EICKHOFF et al., 2013). observa-se que a

taxa de transmissão oral aumentou, entre 2000-2010, atingindo 70% dos casos relatados (EICKHOFF et al., 2013). Ademais, o problema se intensifica, pois, as taxas de mortalidade em pacientes infectados oralmente são superiores (8-35%) quando comparadas com a transmissão vetorial clássica (<5-10%) (EICKHOFF et al., 2013). Em contrapartida, há uma polêmica sobre essas taxas, tendo em vista que a transmissão oral ganhou maior notoriedade após os índices elevados no decorrer dos anos.

Segundo estudos, os tripomastigotas metacíclicos são mais infecciosos por via oral do que cutâneo, enfatizando a maior gravidade da infecção oral (EICKHOFF et al., 2013). Sobretudo, experimentos realizados recentemente, indicam que o local inicial da entrada do parasita influencia criticamente na resposta imune do hospedeiro e no desfecho desta moléstia (EICKHOFF et al., 2013). Estima-se que mais de 10.000 pessoas morrem anualmente de manifestações clínicas da doença de Chagas e mais de 25 milhões corram o risco de adquirir a doença (EICKHOFF et al., 2013; ARAUJO et al., 2017; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010). À tal problema é possível identificar que o custo anual, globalmente, com a DC é de R\$23,6 bilhões e tem uma oneração de vida de R\$91.357,2 por pessoa infectada (ARAUJO et al., 2017; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Em 2015, estudos mostraram que pacientes com cardiopatia instalada, o uso do benzonidazol (BZN) não reduziu significativamente a deterioração clínica cardíaca, porem reduziu a detecção do parasita (DIAS et al., 2016). Sendo assim, fica evidente a urgência de novas perspectivas no tratamento de tal moléstia, tal como o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados para o tratamento desta doença de forma a reduzir os efeitos colaterais e gerar fármacos alternativos para esta proposição. Neste cenário, os metalofármacos têm se mostrado alternativas bastante interessantes em função de suas características e atividade tripanocida.

Compostos de transição têm sido extensivamente usados em estudos relacionados à atividade biológica. Aparentemente, o modo de ação destes compostos não está totalmente estabelecido, porém a relação com atividade anticancerígena tem sido demonstrada (BLACKIE; CHIBALE, 2018). A julgar que muitos dos compostos de coordenação com ação anticancerígena são fundamentados na interação específica em sítios do DNA, é possível que a mesma explicação possa servir de base para atividade tripanocida (BLACKIE; CHIBALE, 2018).

Assim, vários complexos metálicos têm sido testados em ensaios *in vitro* e *in vivo* a fim de controlar a replicação do *T. cruzi*. Dentre estes, os complexos de rutênio doadores de óxido nítrico, podem ser uma excelente alternativa na terapêutica experimental do *T. cruzi*. Resultados promissores têm sido observados neste projeto, o que torna esta classe de compostos uma alternativa promitente para o tratamento desta enfermidade.

# 9.4 Avaliação do potencial biológico dos complexos rutênio-nitrosilos frente a cepas Tulahuén LacZ de *T. cruzi*

A atividade tripanocida dos complexos AR1 e AR2 foi avaliada frente a forma amastigota da cepa Tulahuén *LacZ* e expressa por meio dos valores de IC<sub>50amastigota</sub>, os quais representam a concentração inibitória mínima para que ocorra a morte de 50% dos parasitos (forma amastigota) *in vitro*. A citotoxicidade frente a células sadias foi avaliada frente as células LLCMK2 (fibroblasto de rim de macaco), sendo expressa por meio dos valores de CC<sub>50LLCMK2</sub>. Desta forma, com intuito de selecionar candidatos para os estudos *in vivo*, o índice de seletividade foi calculado como descrito no Procedimento Experimental Item 6.6.

Os complexos AR1 e AR2 apresentam valores de IC<sub>50amastigota</sub> muito mais altos do que o observado para o fármaco de referência (BZN), 195,0 e 85,1  $\mu$ M, respectivamente. A Figura 100 apresenta o gráfico dose-resposta da atividade tripanocida do complexo AR2 em comparação com o BZN. O gráfico para o complexo AR1 não será aqui apresentado, pois não foi possível alcançar o valor de IC<sub>50amastigota</sub>. Estes dados demonstram que os complexos não possuem atividade tripanocida frente à ensaios *in vitro*.



Figura 100. Gráfico dose-resposta para a aplicação do complexo AR2 frente a formas amastigotas de T. cruzi.

\*BZ = BZN Fonte: autora.

A princípio, a eliminação do *T. cruzi* é, em grande parte, dependente da produção de óxido nítrico e seus radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio. Um provável mecanismo biológico relativo a esta atividade relaciona-se com envolvimento de citocinas próinflamatórias, como IL-12, IFN- $\gamma$ - e TNF- $\alpha$  (resposta Th1), que atuam na ativação de macrófagos e que levam a morte dos parasitas através da produção de tais radicais (BLACKIE; CHIBALE, 2018). Neste trabalho, os compostos de rutênio doadores de NO mostraram, *in vitro*, baixa toxicidade e baixa atividade tripanocida. Sugere-se que este fenômeno esteja ocorrendo devido a concentração que está sendo liberada de NO no interior celular e a falta de interação com moléculas alvo do parasita. No entanto, como a informação de que a liberação de NO atua diretamente no sistema imune do hospedeiro, buscou-se utilizar desta característica para estudo de terapias alternativas.

Dentre as pesquisas realizadas a respeito de alternativas terapêuticas e busca de novos fármacos para tratamento de doenças negligenciadas, surgiu o conceito de associação terapêutica. Sua premissa se baseia no potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais medicamentos para melhorar a eficácia terapêutica, além de evitar o desenvolvimento de resistência aos componentes individuais da associação (INDi, 2018).

Neste certame, foram realizados experimentos *in vitro* no intuito de observar o potencial tripanocida dos complexos AR1 e AR2 associados ao BZN com duas variáveis retidas na concentração amostral do fármaco controle (BZN) e complexos (Figura 101).



Figura 101. Curvas dose-resposta para a aplicação do complexo AR2 frente a formas amastigotas de T. cruzi.

Fonte: autora.

Foram obtidos os valores de IC<sub>50amastigota</sub> para os complexos associados ao BZN nas seguintes concentrações:

1 e 2) Complexo + BZN (1:1): ambos iniciando na concentração 250 μmol L<sup>-1</sup> e realização da diluição seriada (Associação 1: AR1+ BZN e Associação 2: AR2 + BZN).

1' e 2') Diluição seriada do BZN a partir de 250 μmol L<sup>-1</sup> e manutenção da concentração de 50 μmol L<sup>-1</sup> para os complexos (Associação 1': AR1+ BZN e Associação 2': AR2 + BZN).

Observa-se que ao se testas as associações 1' e 2', foi possível observar que ocorreu morte de 85% do total de parasitos medidos pelo teste do CPRG, enquanto que sem esta associação, o BZN sozinho mataria 50% na mesma concentração. Para fins de comparação, foram realizados os mesmos testes de associação com o complexo similar ao AR2, o *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, haja vista a única diferença entre ambos é o ligante expectador py e 3-etpy, e o ligante 3-etpy. As curvas de dose-resposta são observadas na Figura 102. Os valores de IC<sub>50amastigota</sub> e SI são apresentados na Tabela 21.





Fonte: autora.

. Tabela 21	. Valores	obtidos a pa	artir das c	urvas de	dose-r	resposta	para a	associação	complexo	+ benzor	idazol ou
				ligante	e + ben	izonidaz	ol.				

Compostos	IC50amastigota	CC50amastigota	SI
BZN	3,954	142,0	36,0
AR1	>250	>250	
AR2	248,2	>250	
cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (py)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	>250	>250	
3-etpy	>250	138	
Associação 1	5,859	7,03	1,20
Associação 2	3,17	15,2	4,80
Associação 1'	0,583	0,816	1,40
Associação 2'	0,0140	0,124	8,90
Associação 3 (cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (py)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> + BZN)	6,29	8,18	1,30
Associação 4 (3-etpy + BZN)	1,24	0,954	0,77
Associação 3' (cis-[Ru(NO)(bpy) <sub>2</sub> (py)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> + BZN)	3,78	10,9	2,90

Associação 1, 2, 3 e 4: Adição de fármaco e BZN na concentração inicial de 250 µmol L<sup>-1</sup> (cada) e realização da diluição seriada.

Associação 1' e 2': Adição de BZN na concentração de 250 µmol L<sup>-1</sup>, realização da diluição seriada e adição de complexo para obtenção de concentração de 50 µmol L<sup>-1</sup> no poço de cultivo celular.

A partir dos dados de SI, observa-se que dentre as associações realizadas, a Associação 2' apresentou-se como melhor opção, sugerindo que o complexo AR2 é um potencial candidato para estudos *in vivo*. Assim, buscou-se obtenção da curva dose-resposta para esta associação específica em um intervalo maior de concentrações (Figura 103). O valor de IC<sub>50associação</sub> foi de 0,225  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, ou seja, na concentração de 0,225  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de BZN + 0,2250  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> do complexo AR2, ocorre morte de 50% do total de parasitas.

Figura 103. Gráfico dose-resposta para a associação complexo AR2 + benzonidazol (associação).



Fonte: autora.

O potencial da associação relatada frente a formas amastigotas de *T. cruzi* trouxe novos dados a respeito dos complexos desenvolvidos neste trabalho e incentivou testar seu efeito tripanocida *in vivo* em modelo experimental murino de infecção por *T. cruzi* (fase aguda).

O tratamento de camundongos Swiss infectados com 10.000 formas da cepa Y de *T*. *cruzi* se iniciou no 5° dia de infecção e se prolongou por 10 dias consecutivos. A dose utilizada foi de 2,5 mg/kg do complexo AR2 em suspensão juntamente a 2,5 mg/kg do BZN, diariamente, por gavagem (via oral). É importante frisar, que este valor de dose/dia foi escolhido através da dose clínica já determinada para estes ensaios (CASTRO et al., 2011).

Após o início do tratamento, a parasitemia foi avaliada (nos dias 7, 9, 11 e 13 após a infecção). Este dado é um parâmetro importante para o estudo da doença de Chagas, pois nos permite diferenciar a fase aguda e crônica da infecção (CASTRO el al., 2011). O gráfico destas correlações é apresentado na figura 104.

2500 Th 2000-1500-1000-500-5 10 15 Dias após a infecção

**Figura 104.** Número de parasitos contados a partir do sangue de camundongos em função dos dias de tratamento. Dose BZN = 10mg/Kg. Doze Associação AR2+BZN = 5+5 mg/Kg. Dose AR2 = 10 mg/Kg.

Fonte: autora.

Os resultados obtidos neste teste preliminar *in vivo* demonstraram que a associação pode de fato ser eficaz em reduzir a parasitemia nos animais infectados com o *T. cruzi* e tratados.

Pesquisas atuais têm sido devotadas no sentido de entender a ação biológica destas espécies. Além da liberação intracelular de NO e possível atividade frente ao sistema imunológico do hospedeiro, aparentemente compostos doadores de óxido nítrico (nitrosotióis) também foram descritos por agir em um alvo específico do parasita, a cruzaína (WIGGERS et al., 2013). A cruzaína é a proteína mais abundante da família das cisteínas protease do *T. cruzi*, responsável pela invasão células e o pelo escape do parasita do sistema imune do hospedeiro. A cruzaína tem sido muito explorada levando à descoberta de vários inibidores potentes e seletivos. Assim, as hipóteses da ação do complexo AR2 é que pode estar ocorrendo fragilização do parasita por duas vias, a de interação com cruzaína e o fortalecimento do sistema imunológico, ambos em detrimento da liberação de NO. Assim, uma quantidade mais amena de BZN pode ser administrada, obtendo-se potencialização deste fármaco.

Em adendo, observou-se também, que além da liberação de NO, a estrutura do complexo AR2 pode estar de alguma forma influenciando na parasitemia, visto que foram testados ambos ligante 3-etpy e complexo similar *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> *in vitro* e não foi observada a mesma atividade ou SI.

Apesar dos estudos aqui relatados ainda serem preliminares e não elucidarem mecanismos diretos de ação farmacológica ou biológica, sugere-se que a modulação do ligante pode modificar a ação de determinado composto. Desta maneira, é possível inferir que novas perspectivas podem ser exploradas para a busca de fármacos que possam atuar frente às doenças negligenciadas, tal como a proposição de uma terapia alternativa associativa com chances de ser promissora.

### CONCLUSÕES

### 10. CONCLUSÕES

Os ligantes derivados de aminoácido pyLys e pyTrp foram sintizados através de rotas de obtenção de anéis triazol e bases de Schiff, respectivamente. Ambos foram purificados por cromatografia em coluna e caracterizados quanto às propriedades físico-químicas. Os resultados de espectrometria de massas, juntamente às análises de espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear confirmam a pureza dos ligantes obtidos.

Os resultados obtidos por técnicas de caracterização, dentre elas: análise elementar, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia eletrônica, voltametria cíclica e ressonância magnética nuclear confirmaram a obtenção dos complexos de interesse. Além disso, foram realizados experimentos de espectroeletroquímica, fotólise e cronoamperometria de liberação de NO para entendimento dos sistemas estudados.

A constante de equilíbrio obtida para o complexo AR2 está de acordo com o reportado para ligantes da mesma classe. A constante de equilíbrio calculada para este complexo apresenta algumas similaridades com o complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>3+</sup>. A comparação do complexo AR2 com o *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>3+</sup>, oportunizou informações importantes acerca das propriedades observadas durante os experimentos.

Os cálculos DFT permitiram compreender mais a respeito das estruturas tanto do complexo AR2, quanto do complexo RuTrpNO. Os ângulos da ligação Ru-N-O são da ordem de 179,4 Å para o RuTrpNO ([C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>N][RuCl<sub>3</sub>(Trp)(NO)]) e 175,0 Å para o AR2, diferenças estas correspondentes à modulação dos ligantes expectadores na esfera de coordenação. Ao passo que, para o RuTrpNO os ligantes expectadores são cloretos, os quais não são capazes de receber doação de densidade eletrônica através de orbitais  $\pi^*$ , para o complexo AR2 são polipiridinas, as quais recebem densidade eletrônica do metal através de retrodoação dos orbitais d do metal para os orbitais  $\pi^*$  do ligante. Os espectros FTIR corroboram a influencia desta modulação de ligantes, visto que para o AR2 o estiramento da ligação NO é observada em ~1940 cm<sup>-1</sup> enquanto para o complexo RuTrpNO, a mesma banda é observada em ~1860 cm<sup>-1</sup>.

O complexo RuTrpNO demonstrou possuir características físico-químicas bastante interessantes, os quais têm sido exploradas para entendimento deste sistema, tal como apresentar sinal no EPR que é condizente com um complexo Ru<sup>III</sup>-NO<sup>0</sup>, e no entanto apresentar banda no infravermelho na região de 1890 cm<sup>-1</sup>, que é condizente com um complexo Ru<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>.

Estas análises revelam a deslocalização eletrônica existente nestes complexos, a qual tem sido estudada através de cálculos da Teoria Funcional da Densidade (TFD).

Os resultados de citotoxicidade frente as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB231, B16-F10 e MCF-10 mostraram que os complexos AR1, AR2 e AR3 não apresentam citotoxicidade considerável. No entanto, o complexo AR4 se mostrou bastante promissor, apresentando uma atividade citotóxica bastante pronunciada, que aliás é mais efetiva do que o fármaco padrão (cisplatina) nas condições experimentais *in vitro* relatas neste trabalho. Provavelmente este efeito esteja acontecendo em função de sua estrutura, que contém um ligante nitrosilo, o qual pode liberar NO no interior celular e um derivado de aminoácido, o qual pode ocasionar interações compatíveis com proteínas e canais de membrana, e porconseguinte, ocasionar a morte celular. Todos estes dados indicam que a inserção de um derivado de aminoácido à estrutura fornece uma melhor internalização do complexo pelas células. E apesar destes estudos relatados neste trabalho não elucidarem mecanismos diretos de ação farmacológica, sugere-se que a modulação do ligante pode ser direcionada em benefício da ação de determinado composto, o que é consistente com a proposição da relação estruturaatividade. Além disso, abre novos horizontes para a busca por compostos que possuam uma ação mais efetiva contra esta doença (o câncer) que vem alarmantemente crescendo.

Os resultados obtidos pela aplicação dos complexos AR1, AR2 e cis-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>(py)]<sup>3+</sup> contra *T. cruzi* permitiram inferir a potencialidade dos complexos nitrosilos de rutênio frente à sua possível aplicação associada ao benzonidazol, o que é de fato um achado bastante interessante e que pode ser estudado mais intensamente para busca de uma nova terapia contra a Doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on Iron and Its Importance for Human Health. Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences, v. 19, n. 2, p. 164–174, fev. 2014.

ABID, M.; SHAMSI, F.; AZAM, A. Ruthenium Complexes: An Emerging Ground to the Development of Metallopharmaceuticals for Cancer Therapy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 772–786, 2016. Disponível em: <a href="http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=16&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=article&issue=10&spage=772>.extractlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre=articlesselect.com/openurl/content.php?genre

ABU-DIEF, A. M.; MOHAMED, I. M. A. A Review on Versatile Applications of Transition Metal Complexes Incorporating Schiff Bases. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 119–133, jun. 2015.

AEBI, S et al. Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. **Cancer Research**, v. 56, n. 13, p. 3087–3090, 1996. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674066">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674066</a>>.

AL ZOUBI, W. et al. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Schiff Bases Metal Complexes. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 31, n. 2, p. e3752, 2018. Disponível em: <a href="http://doi.wiley.com/10.1002/poc.3752">http://doi.wiley.com/10.1002/poc.3752</a>>.

ALEXANDER, J W. History of the Medical Use of Silver. Surgical Infections, v. 10, n. 3, p.289–292,2009.Oisponívelem:<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/sur.2008.9941>.

AMPTOULACH, S.; TSAVARIS, N.. Neurotoxicity Caused by the Treatment with Platinum Analogues. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2011, p. 1–5, 2011. Disponível em: <a href="https://www.hindawi.com/archive/2011/843019/>">https://www.hindawi.com/archive/2011/843019/></a>.

ANANIEVA, E. Targeting Amino Acid Metabolism in Cancer Growth and Anti-Tumor Immune Response. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 281, 2015.

ANDREWS, P A; HOWELL, S B. Cellular Pharmacology of Cisplatin: Perspectives on Mechanisms of Acquired Resistance. **Cancer Cells (Cold Spring Harbor, N.Y.: 1989)**, v. 2, n. 2, p. 35–43, 1990. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204382">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204382</a>>.

ANTHONYSAMY, A. et al. Synthesis, Characterization and Electrochemistry of 4'-

Functionalized 2,2':6',2"-Terpyridine Ruthenium(II) Complexes and Their Biological Activity.

**Dalton Transactions**, v. 0, n. 16, p. 2136–2143, 2008. Disponível em: <a href="http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/dt/b716011a">http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/dt/b716011a</a>.

ANTONY, A. et al. Amino Acid Based Schiff Bases and Its Zn (II) Complexes. **Research & Reviews: Journal of Chemistry**, v. 5, p. 37–44, jul. 2016.

ARAUJO, P. F. et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 437–446, jun. 2017.

ARNELLE, D R; STAMLER, J S. NO+, NO, and NO- Donation by S-Nitrosothiols: Implications for Regulation of Physiological Functions by S-Nitrosylation and Acceleration of Disulfide Formation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 2, p. 279–285, 1995. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7733655">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7733655</a>>.

ARNOLD, W P; LONGNECKER, D E; EPSTEIN, R M. Photodegradation of Sodium Nitroprusside: Biologic Activity and Cyanide Release. **Anesthesiology**, v. 61, n. 3, p. 254–260, 1984. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6089613">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6089613</a>>.

BARON, A. et al. Click Chemistry on a Ruthenium Polypyridine Complex. An Efficient and Versatile Synthetic Route for the Synthesis of Photoactive Modular Assemblies. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 5985–5987, 4 jun. 2012. Disponível em: <a href="http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ic300227j">http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ic300227j</a>>.

BELANI, K. et al. Sodium Nitroprusside in 2014: A Clinical Concepts Review. Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology, v. 30, n. 4, p. 462, 2014.

BERALDO, H. Tendências atuais e as perspectivas futuras da química inorgânica. **Ciência e Cultura**, 1. v. 63, p. 29–32, 2011.

BERTINI, I. (Org.). **Biological inorganic chemistry: structure and reactivity**. Sausalito, Calif: University Science Books, 2007.

BHASKAR, G. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Studies on Transition Metal Complexes of Benzimidazole Thiosemicarbazones. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 13, n. 2, p. 135–145, abr. 2007.

BHUTIA, Y. D. et al. Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to "Glutamine

Addiction": Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs. **Cancer Research**, v. 75, n. 9, p. 1782–1788, maio 2015.

BHUTIA, Y. D. et al. The amino acid transporter SLC6A14 in cancer and its potential use in chemotherapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 293–303, 2014. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087614000221">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087614000221</a>.

BIERSACK, B.; SCHOBERT, R. Current State of Metal-Based Drugs for the Efficient Therapy of Lung Cancers and Lung Metastases. In: AHMAD, Aamir; GADGEEL, Shirish (Org.).
Lung Cancer Pers. Med. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 893. p. 211–224.

BIJELIC, A. et al. X-Ray Structure Analysis of Indazolium Trans- [Tetrachlorobis(1 H - Indazole)Ruthenate(III)] (KP1019) Bound to Human Serum Albumin Reveals Two Ruthenium Binding Sites and Provides Insights into the Drug Binding Mechanism. Journal of Medicinal Chemistry, v. 59, n. 12, p. 5894–5903, 2016. Disponível em: <a href="http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.6b00600">http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.6b00600</a>>.

BLATTER, L A; WIER, W G. Nitric Oxide Decreases [Ca2+]i in Vascular Smooth Muscle by Inhibition of the Calcium Current. **Cell Calcium**, v. 15, n. 2, p. 122–131, 1994. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8149412">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8149412</a>>.

BOGDAN, C. Nitric Oxide and the Immune Response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577346">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577346</a>>.

BORGES, S. S. et al. Ruthenium Nitrosyl Complexes with N-Heterocyclic Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2670–2677, 1998. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1021/ic951563s">https://doi.org/10.1021/ic951563s</a>>.

BOS, C.; TOMÉ, D. Lysine Requirement through the Human Life Cycle. **The Journal of Nutrition**, v. 137 (6), p. 599S–1601S, jun. 2007.

BOTTOMLEY, F. Nitrosyl Complexes of Ruthenium.Coordination Chemistry Reviews, v.26,n.1,p.7–32,1978.Disponívelem:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854500820639>.

BREMER, V. et al. Role of Nitric Oxide in Rat Nephrotoxic Nephritis: Comparison between Inducible and Constitutive Nitric Oxide Synthase. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, v. 8, n. 11, p. 1712–1721, nov. 1997.

CALLAHAN, R W; MEYER, T J. Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 574–581, 1977. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1021/ic50169a015">https://doi.org/10.1021/ic50169a015</a>>.

CAO, X.; FISCHER, G. Infrared Spectral, Structural, and Conformational Studies of Zwitterionic 1-Tryptophan. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 48, p. 9995–10003, dez. 1999.

CARLIN, R. L. Inorganic electronic spectroscopy (Lever, A. B. P.). Journal of Chemical Education, v. 46, n. 9, p. A628, set. 1969. Disponível em: <a href="http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed046pA628.1">http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed046pA628.1</a>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

CARNEIRO, Z. A. et al. Photocytotoxic Activity of a Nitrosyl Phthalocyanine Ruthenium Complex — A System Capable of Producing Nitric Oxide and Singlet Oxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 8, p. 1035–1043, ago. 2011.

CARVALHO, I. et al. "Click Chemistry" Synthesis of a Library of 1,2,3-Triazole-Substituted Galactose Derivatives and Their Evaluation against Trypanosoma Cruzi and Its Cell Surface Trans-Sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2412–2427, 2010. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335038">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335038</a>>.

CAVALCANTI JUNIOR, G. B.; KLUMB, Claudete Esteves; MAIA, Raquel C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48 (3), p. 419–427, 2002.

CERSOSIMO, R. J. Hepatotoxicity Associated with Cisplatin Chemotherapy. Annals of Pharmacotherapy, v. 27, n. 4, p. 438–441, abr. 1993.

CHEN, J C et al. Electronic structures and SARs of the isomeric complexes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -[Ru(mazpy)2Cl2] with different antitumor activities. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 728, n. 1, p. 93–101, 2005. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166128005004331">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166128005004331</a>>.

CICILLINI, S. A. et al. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, n. 13, p. 2766–2770, 2009. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538709003349">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538709003349</a>>.

CLARKE, Michael J. Ruthenium metallopharmaceuticals. Coordination Chemistry Reviews,

v. 232, n. 1, p. 69–93, 2002. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854502000255">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854502000255</a>>.

COHEN, R. A. Role of Nitric Oxide in Diabetic Complications. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 499–502, 2005. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280643">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280643</a>>.

CORTE-RODRÍGUEZ, M. et al. Quantitative Evaluation of Cellular Uptake, DNA Incorporation and Adduct Formation in Cisplatin Sensitive and Resistant Cell Lines: Comparison of Different Pt-Containing Drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 1, p. 69–77, 2015. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352094">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352094</a>>.

COULTER, J. A. et al. Nitric Oxide—A Novel Therapeutic for Cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 192–198, set. 2008.

COZZI, P. G. Metal–Salen Schiff Base Complexes in Catalysis: Practical Aspects. Chemical Society Reviews, v. 33, n. 7, p. 410–421, set. 2004.

CULLINANE, C. et al. Synthesis and Antiproliferative Activity of a Series of New Platinum and Palladium Diphosphane Complexes. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 6, p. 1918–1932, 2018. Disponível em: <a href="http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/dt/c7dt04615d">http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/dt/c7dt04615d</a>>.

DA SILVA, R. S.; DE LIMA, R. G.; DE PAULA MACHADO, Sérgio. Design, Reactivity, and Biological Activity of Ruthenium Nitrosyl Complexes. **Adv. Inorg. Chem.** [S.l.]: Elsevier, 2015. v. 67. p. 265–294. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898883814000099>.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. European Journal of Pharmacology, v. 740, p. 364–378, out. 2014.

DE BIASI, A. R.; VILLENA-VARGAS, J.; ADUSUMILLI, P. S. Cisplatin-Induced Antitumor Immunomodulation: A Review of Preclinical and Clinical Evidence. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 21, p. 5384–5391, nov. 2014.

DE LA CRUZ, C.; SHEPPARD, N.. A Structure-Based Analysis of the Vibrational Spectra of Nitrosyl Ligands in Transition-Metal Coordination Complexes and Clusters. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 1, p. 7–28, 2011. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142510003781">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142510003781</a>>.

DE LIMA, R. G. et al. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]3+ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 8, p. 2543–2549, 2006. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169306001277">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169306001277</a>>.

DÉRIEN, S.; MONNIER, F.; DIXNEUF, P. H. Ruthenium-Catalyzed C–C Bond Formation. In: BRUNEAU, Christian; DIXNEUF, Pierre H. (Org.). . **Ruthenium Catal. Fine Chem.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. v. 11. p. 1–44.

DEROSA, F.; BU, X.; FORD, P. C. Chromium(III) Complexes for Photochemical Nitric Oxide Generation from Coordinated Nitrite: Synthesis and Photochemistry of Macrocyclic Complexes with Pendant Chromophores, Trans -[Cr(L)(ONO) 2 ]BF 4. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 4157–4165, 2005. Disponível em: <a href="http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic0483110">http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic0483110</a>>.

DI PASQUA, A. J; GOODISMAN, J.; DABROWIAK, J. C. Understanding how the platinum anticancer drug carboplatin works: From the bottle to the cell. **Inorganica Chimica Acta**, v. 389, p. 29–35, 2012. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169312000291">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169312000291</a>>.

DONATO, E. M. et al. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 125–130, jun. 2010.

DONNICI, C. L.; ARAUJO, M. H.; STOIANOFF, M. A. R. Ruthenium Complexes as Antifungal Agents. In: BROWNE, Wesley R et al. (Org.). . **Ruthenium Complexes**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. p. 293–318.

DOS SANTOS, E. R et al. Cytotoxic Activity and Structural Features of Ru(II)/Phosphine/Amino Acid Complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, p. 48–60, 2018. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016201341730510X">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016201341730510X</a>>.

DUAN, L. et al. Highly Efficient and Robust Molecular Ruthenium Catalysts for Water Oxidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. 15584–15588, set. 2012.

EGBEWANDE, F. A. et al. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of ( $\eta^6 - p - Cymene$ )Ruthenium(II) Complexes of  $\alpha$ -Amino Acids: ( $\eta^6 - p$  -Cymene)Ruthenium(II) Complexes of  $\alpha$ -Amino Acids. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2014, n. 7, p.

1174–1184, mar. 2014.

ELLAHIOUI, Y.; PRASHAR, S.; GÓMEZ-RUIZ, S.. Anticancer Applications and Recent Investigations of Metallodrugs Based on Gallium, Tin and Titanium. **Inorganics**, v. 5, n. 1, p. 4, 2017. Disponível em: <a href="http://www.mdpi.com/2304-6740/5/1/4">http://www.mdpi.com/2304-6740/5/1/4</a>>.

ENRIQUEZ-CABRERA, A. et al. Replacing Two Chlorido Ligands by a Bipyridine Ligand in Ruthenium Nitrosyl Complexes with NO-Release Capabilities: A Comparative Study: Replacing Two Chlorido Ligands by a Bipyridine Ligand in Ruthenium Nitrosyl Complexes with NO-Release Capabilities: A . **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2017, n. 11, p. 1446–1456, mar. 2017.

ERDTMAN, E. et al. Computational Studies on Schiff-Base Formation: Implications for the Catalytic Mechanism of Porphobilinogen Synthase. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 963, n. 2–3, p. 479–489, fev. 2011.

ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2777–2796, set. 1999.

ESMADI, F. T et al. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Some Unsymmetrical Schiff Base Transition Metal Complexes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 41–47, 2016. Disponível em: <a href="http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01480545.2015.1017882">http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01480545.2015.1017882</a>>.

ESTEBAN-FERNÁNDEZ, D. et al. Analytical Methodologies for Metallomics Studies of Antitumor Pt-Containing Drugs. **Metallomics: Integrated Biometal Science**, v. 2, n. 1, p. 19–38, 2010. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072372">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072372</a>>.

FARRELL, N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1, p. 1–4, 2002. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854502001005">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854502001005</a>>.

FEDOROV, R. et al. Structures of Nitric Oxide Synthase Isoforms Complexed with the Inhibitor AR-R17477 Suggest a Rational Basis for Specificity and Inhibitor Design. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 16, p. 5892–5897, abr. 2004.

FEELISCH, M. et al. Tissue Processing of Nitrite in Hypoxia: An Intricate Interplay of Nitric Oxide-Generating and -Scavenging Systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n.

49, p. 33927-33934, 2008. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18835812">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18835812</a>>.

FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G. de; NADER, L. de A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 398–406, 1997. Disponível em: <a href="http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_abstract&pid=S0100--0421997000400010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_abstract&pid=S0100--0421997000400010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt</a>.

FORNARO, A.; COICHEV, N. Ácido L-Ascórbico: Reações de Complexação e de Óxido-Redução Com Alguns Íons Metálicos de Transição. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 642–650, 1998. Disponível em: <a href="http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0100-">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0100-</a>

40421998000500017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

FORTNEY, C. F. Ligands Designed for Ruthenium Nitrosyl Transport. 2007. University of Pittsburgh, 2007.

FRANK, S. et al. Nitric Oxide Drives Skin Repair: Novel Functions of an Established Mediator.
Kidney International, v. 61, n. 3, p. 882–888, 2002. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849442">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849442</a>>.

FREI, E. Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. Diabetology
& Metabolic Syndrome, v. 3, p. 11, 2011. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3133998/>">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3133998/</a>

FRIEDERICH, J A; BUTTERWORTH, J F. Sodium Nitroprusside: Twenty Years and Counting. Anesthesia and Analgesia, v. 81, n. 1, p. 152–162, 1995. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7598246">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7598246</a>>.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. Chagas Disease in Spain, the United States and Other Non-Endemic Countries. Acta Tropica, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, jul. 2010.

GASPARI, A. P. S. **Considerações sobre a liberação fotoquímica de óxido nítrico, sensibilizada por corantes**. 2013. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo., Ribeirão Preto/SP, 2013. GORELSKY, S I; LEVER, A B P. Electronic Structure and Spectra of Ruthenium Diimine Complexes by Density Functional Theory and INDO/S. Comparison of the Two Methods. Journal of Organometallic Chemistry, v. 635, n. 1–2, p. 187–196, 2001. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022328X01010798>.

GROESSL, M. et al. Structure–Activity Relationships for NAMI-A-Type Complexes (HL)[ Trans -RuCl 4 L( S -Dmso)Ruthenate(III)] (L = Imidazole, Indazole, 1,2,4-Triazole, 4-Amino-1,2,4-Triazole, and 1-Methyl-1,2,4-Triazole): Aquation, Redox Properties, Protein Binding, and Anti. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2185–2193, 2007. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm061081y>.

GU, L. et al. Antimetastatic Activity of Novel Ruthenium (III) Pyridine Complexes. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 2850–2860, 2016. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605356">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605356</a>>.

HANNIBAL, L. Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 2, p. 135–149, 2016. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391043">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391043</a>>.

HEIN, J. E; FOKIN, V. V. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) and beyond: New Reactivity of Copper(I) Acetylides. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 4, p. 1302–1315, 2010. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309487">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309487</a>>.

HEINRICH, T. A. et al. Biological Nitric Oxide Signalling: Chemistry and Terminology: NO Chemical Biology and Terminology. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 7, p. 1417–1429, ago. 2013.

HENRY, Y.; GUISSANI, A. Interactions of Nitric Oxide with Hemoproteins: Roles of Nitric Oxide in Mitochondria. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 55, n. 8–9, p. 1003–1014, jul. 1999.

HESEK, D. et al. Preparation and Structural Elucidation of Novel Cis Ruthenium(II) Bis(Bipyridine) Sulfoxide Complexes<sup>†</sup>. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, v. 0, n. 21, p. 3701–3709, jan. 1999.

HEUDI, O.; CAILLEUX, A.; ALLAIN, P. Interactions between Cisplatin Derivatives and Mobile Phase during Chromatographic Separation. **Chromatographia**, v. 44, n. 1–2, p. 19–24, jan. 1997.

HOLDER, A. A et al. **Ruthenium Complexes**. [S.l.]: Wiley VCH, 2018. Disponível em: <a href="https://www.amazon.co.uk/Ruthenium-Complexes-Photochemical-Biomedical-Applications/dp/3527339574">https://www.amazon.co.uk/Ruthenium-Complexes-Photochemical-Biomedical-Applications/dp/3527339574</a>>.

HOPP, T.; FISCHER-GÖDDE, M.; KLEINE, T. Ruthenium Stable Isotope Measurements by Double Spike MC-ICPMS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 31, n. 7, p. 1515–1526, jun. 2016.

HOTZE, A. C. G. et al. Structure-Dependent in Vitro Cytotoxicity of the Isomeric Complexes [Ru(L)2Cl2] (L=o-Tolylazopyridine and 4-Methyl-2-Phenylazopyridine) in Comparison to [Ru(Azpy)2Cl2]. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 354–364, abr. 2004.

HOUSTON, M.; HAYS, L. Acute Effects of an Oral Nitric Oxide Supplement on Blood Pressure, Endothelial Function, and Vascular Compliance in Hypertensive Patients. **The Journal of Clinical Hypertension**, p. n/a-n/a, jun. 2014.

HU, W. et al. A Study on Platinum( IV ) Species Containing an Estrogen Receptor Modulator to Reverse Tamoxifen Resistance of Breast Cancer. **Metallomics**, v. 10, n. 2, p. 346–359, 2018.

HUISGEN, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. Angewandte Chemie International Edition in English, v. 2, n. 11, p. 633–645, nov. 1963.

HURD, C. D. The Chemistry of Alkenes. Saul Patai, Ed. Interscience (Wiley), New York, 1964. x + 1315 Pp. Illus. \$37. **Science**, v. 148, n. 3673, p. 1079–1079, maio 1965.

IALENTI, A.; MONCADA, S.; ROSA, M. Modulation of Adjuvant Arthritis by Endogenous Nitric Oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 701–706, out. 1993.

IBRAHIM, O. B.; MOHAMED, M. A.; REFAT, M. S. Nano Sized Schiff Base Complexes with Mn(II), Co(II), Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Metals : Synthesis, Spectroscopic and Medicinal Studies. **Canadian Chemical Transactions**, p. 108–121, abr. 2014.

IGNARRO, L J. Physiology and Pathophysiology of Nitric Oxide. **Kidney International. Supplement**, v. 55, p. S2-5, 1996. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743501">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743501</a>>.

ISENBERG, J. S. et al. Nitric Oxide in Wound-Healing. **Microsurgery**, v. 25, n. 5, p. 442–451, 2005.

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 5, p. 1387–1407, maio 2007.

JURIS, A. et al. Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, eletrochemistry, and chemiluminescence. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 84, p. 85–277, 1988. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0010854588800328">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0010854588800328</a>>.

KAJAL, A. et al. Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore. **Journal of Catalysts**, v. 2013, p. 1–14, 2013. Disponível em: <a href="https://www.hindawi.com/archive/2013/893512/">https://www.hindawi.com/archive/2013/893512/</a>.

KASPARKOVA, J. et al. DNA Interstrand Cross-Links of the Novel Antitumor Trinuclear Platinum Complex BBR3464: CONFORMATION, RECOGNITION BY HIGH MOBILITY GROUP DOMAIN PROTEINS, AND NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR. Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 50, p. 48076–48086, dez. 2002.

KEEFER, L. K. et al. Chemistry of the Diazeniumdiolates I. Structural and Spectral Characteristics of the [N(O)NO]– Functional Group. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 4, p. 377–394, ago. 2001.

KESZTHELYI, D.; TROOST, F. J.; MASCLEE, A. M. Understanding the Role of Tryptophan and Serotonin Metabolism in Gastrointestinal Function. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 21, n. 12, p. 1239–1249, dez. 2009.

KINGWELL, B. A. et al. Nitric Oxide Synthase Inhibition Reduces Glucose Uptake During Exercise in Individuals With Type 2 Diabetes More Than in Control Subjects. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2572–2580, ago. 2002.

KNOTT, A. B.; BOSSY-WETZEL, E. Nitric Oxide in Health and Disease of the Nervous System. Antioxidants & Redox Signaling, v. 11, n. 3, p. 541–553, mar. 2009.

KOLB, H. C; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1128–1137, dez. 2003.

KOSTIN, G. A. et al. Reaction of  $[RuNO(NO_2)_4 OH]^{2-}$  with Sulfamic Acid as a Pathway to Mixed Nitro Pyridine Ruthenium Nitrosyl Complexes: Reaction of  $[RuNO(NO_2)_4 OH]^{2-}$  with Sulfamic Acid as a Pathway To . **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2016, n. 25, p. 4045–4053, set. 2016.

KOSTOVA, I.; SASO, L. Advances in Research of Schiff-Base Metal Complexes as Potent

Antioxidants. Current Medicinal Chemistry, v. 20, n. 36, p. 4609–4632, nov. 2013.

KRAUSE, R. A.; KRAUSE, K. Chemistry of Bipyridyl-like Ligands. Isomeric Complexes of Ruthenium(II) with 2-(Phenylazo)Pyridine. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2600–2603, set. 1980.

KROENER, R.; HEEG, M. J.; DEUTSCH, E. Synthesis and Characterization of Polypyridine Ruthenium(II) Complexes Containing S-Bonded Thioether Ligands. X-Ray Crystal Structures of Cis- and Trans-Bis(2,2'-Bipyridine)Bis(Phenothiazine-S)Ruthenium(II) Hexafluorophosphates. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 558–566, fev. 1988.

KUHN, H. J.; BRASLAVSKY, S. E.; SCHMIDT, R. Chemical Actinometry (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 12, p. 2105–2146, 2004.

KUMAR, S. V. et al. Antimicrobial Properties of Tris(Homoleptic) Ruthenium(II) 2-Pyridyl-1,2,3-Triazole "Click" Complexes against Pathogenic Bacteria, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 9767–9777, out. 2016.

KURIYAMA, K.; OHKUMA, S. Role of Nitric Oxide in Central Synaptic Transmission: Effects on Neurotransmitter Release. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 1–8, set. 1995.

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. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 201–214, fev. 2015.

LENTZ, F. et al. Pharmacokinetics of a Novel Anticancer Ruthenium Complex (KP1019, FFC14A) in a Phase I Dose-Escalation Study. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, n. 2, p. 97–103, fev. 2009.

LEVER, A B P. **Inorganic electronic spectroscopy**. [S.l.]: Elsevier, 1984. Disponível em: <a href="https://books.google.com.br/books?id=bvvvAAAAMAAJ>">https://books.google.com.br/books?id=bvvvAAAAMAAJ></a>. (Studies in physical and theoretical chemistry).

LEVIN, N. et al. Structural, Spectroscopic, and Photochemical Investigation of an Octahedral NO-Releasing {RuNO} <sup>7</sup> Species. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 7808–7810, ago. 2016.

LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P. A. Recent Developments in Ruthenium Anticancer Drugs. **Metallomics**, v. 1, n. 6, p. 458, 2009.

LI, C. et al. Click Chemistry to Fluorescent Amino Esters: Synthesis and Spectroscopic Studies. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, n. 12, p. 2395–2405, 2010. Disponível em: <a href="http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.201000042">http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.201000042</a>>.

LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Ruthenium Complexes as Antimicrobial Agents. Chemical Society Reviews. [S.l: s.n.]., 2015

LIANG, L.; ASTRUC, D. The Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) "Click" Reaction and Its Applications. An Overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 23–24, p. 2933–2945, dez. 2011.

LIM, S. et al. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Is Highly Expressed in ER-Negative Breast Cancers and a Biomarker Predicting Aggressive Biology. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 512–520, 2010. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042638">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042638</a>>.

LIMA, A. P. et al. Cytoxicity and Apoptotic Mechanism of Ruthenium(II) Amino Acid Complexes in Sarcoma-180 Tumor Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014. Disponível em: <a href="http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105865">http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105865</a>>.

LIMA, R. G; de. **Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo [Ru(terpy)(L)NO]n+**. 2006. 289 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo., Ribeirão Preto/SP, 2006.

LIU, X. et al. Multidentate unsymmetrically-substituted Schiff bases and their metal complexes: Synthesis, functional materials properties, and applications to catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 357, p. 144–172, fev. 2018.

LLOYD, N. C. et al. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 44, n. 6, p. 941–944, jan. 2005.

LOCKWOOD, A. et al. Sodium Nitroprusside-Associated Cyanide Toxicity in Adult Patients – Fact or Fiction? A Critical Review of the Evidence and Clinical Relevance.

LUO, X. et al. Synthesis and Evaluation of Novel O2-Derived Diazeniumdiolates as Photochemical and Real-Time Monitoring Nitric Oxide Delivery Agents. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 4, n. 12, p. 2445–2449, nov. 2017.

MALAKYAN, M. et al. Synthesis, Characterization and Toxicity Studies of Pyridinecarboxaldehydes and L-Tryptophan Derived Schiff Bases and Corresponding Copper (II) Complexes. **F1000Research**, v. 5, p. 1921, ago. 2016.

MALINA, J. et al. Biophysical Analysis of Natural, Double-Helical DNA Modified by Anticancer Heterocyclic Complexes of Ruthenium(III) in Cell-Free Media. Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry, v. 6, n. 4, p. 435–445, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372202>.

MANZOTTI, C. et al. BBR 3464: A Novel Triplatinum Complex, Exhibiting a Preclinical Profile of Antitumor Efficacy Different from Cisplatin. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2626–2634, jul. 2000.

MARCONDES, F. G et al. In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. Life Sciences, v. 70, n. 23, p. 2735–2752, 2002. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432050201528X">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432050201528X</a>>.

MATIJEVIĆ, E. (Org.). Fine particles in medicine and pharmacy. New York: Springer, 2012.

MATTHYS, K. E.; BULT, H. Nitric Oxide Function in Atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n. 1, p. 3–21, 1997.

MCCARTNEY-FRANCIS, N. Suppression of Arthritis by an Inhibitor of Nitric Oxide Synthase. Journal of Experimental Medicine, v. 178, n. 2, p. 749–754, ago. 1993.

MCCLEVERTY, J. A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 403–418, 2004. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1021/cr020623q">https://doi.org/10.1021/cr020623q</a>>.

METZKER, G.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Reaction of ruthenium nitrosyl complexes with superoxide. **Polyhedron**, v. 50, n. 1, p. 328–332, 2013. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538712008509">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538712008509</a>>.

MICHAEL, D.; MINGOS, P.; SHERMAN, D. J. Transition Metal Nitrosyl Complexes. In: SYKES, A G (Org.). . Adv. Inorg. Chem. [S.l.]: Academic Press, 1989. v. 34. p. 293–377. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898883808600197">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898883808600197</a>>.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, abr. 2014.

MOCELLIN, S.; BRONTE, V.; NITTI, D. Nitric Oxide, a Double Edged Sword in Cancer Biology: Searching for Therapeutic Opportunities. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 3, p. 317–352, 2007. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16991100">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16991100</a>>.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, jun. 1991.

MONCADA, S; HIGGS, E A. Endogenous Nitric Oxide: Physiology, Pathology and Clinical Relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, n. 4, p. 361–374, 1991. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718757">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718757</a>>.

MONTALTI, M.; MUROV, S. L. (Org.). **Handbook of photochemistry**. 3rd ed ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006.

MOREIRA, M. M. Complexos Trinucleares de Rutênio com ponte μ-oxo contendo ligantes N-heterocíclicos e Monóxido de Carbono: Síntese, Caracterização e Estudo de Interação com Biomoléculas". 2016. 134 f. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOTSWAINYANA, W. M.; AJIBADE, P. A. Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes. Advances in Chemistry, v. 2015, p. 1–21, 2015.

NAGAO, H. et al. **Synthesis, Properties, and Molecular Structure Of**. Disponível em: <a href="https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic00320a006">https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic00320a006</a>>.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric Oxide and Atherosclerosis. Nitric Oxide, v. 5, n. 2, p. 88–97, abr. 2001.

NATHAN, C; XIE, Q W. Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls, and Controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915–918, 1994. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522969">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522969</a>>.

NAVARRO, M. et al. Metal-Based Drugs for Malaria, Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Recent Achievements and Perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23–24, p. 1070– 1078, dez. 2010.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Platinum(II) Complexes in Cancer Therapy. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, 2011.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I.. Theory of Stationary Electrode Polarography for a Chemical Reaction Coupled between Two Charge Transfers. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 178–190, fev. 1965.

NOVAKOVA, O. et al. Correlation between Cytotoxicity and DNA Binding of Polypyridyl Ruthenium Complexes. **Biochemistry**, v. 34, n. 38, p. 12369–12378, set. 1995.

NYFFELER, P. T. et al. The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. Journal of the American Chemical Society, v. 124, n. 36, p. 10773–10778, set. 2002.

OHNO, K. et al. Matrix-isolation infrared spectra of 2-, 3- and 4-pyridinecarboxaldehyde before and after UV irradiation. **Journal of Molecular Structure**, v. 825, n. 1, p. 143–150, dez. 2006.

OMAE, I. Intramolecular Five-Membered Ring Compounds and Their Applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, n. 11–12, p. 995–1023, jun. 2004.

ONODERA, S.; IKEGAMI, Y. Far-Infrared Spectra of Ammonium, Potassium, Rubidium, and Cesium Metavanadates. **Inorganic Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 466–468, fev. 1979.

PACOR, S. Intratumoral NAMI-A Treatment Triggers Metastasis Reduction, Which Correlates to CD44 Regulation and Tumor Infiltrating Lymphocyte Recruitment. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 310, n. 2, p. 737–744, abr. 2004.

PAKEN, J. et al. Cisplatin-Associated Ototoxicity: A Review for the Health Professional. **Journal of Toxicology**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

PAREKH, H. M.; MEHTA, S. R.; PATEL, M. N. Synthesis, Structural Characterization, and Antifungal Activity of Schiff Bases and Their Transition Metal Mixed-Ligand Complexes. **Russian Journal of Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 67–72, jan. 2006.

PARKER, R J et al. Acquired Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cells Is Associated with Enhanced Repair of Cisplatin-DNA Lesions and Reduced Drug Accumulation. Journal of Clinical Investigation, v. 87, n. 3, p. 772–777, mar. 1991. PASETTO, L. M. et al. The Development of Platinum Compounds and Their Possible Combination. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 60, n. 1, p. 59–75, out. 2006.

PAVIA, D. L et al. Introdução à espectroscopia. [S.l: s.n.], 2010.

PETHERICK, A. Chagas disease in the Chaco. Nature, v. 465, n. n7301\_supp, p. S18–S20, jun. 2010.

PINATO, O.; MUSETTI, C.; SISSI, C. Pt-Based Drugs: The Spotlight Will Be on Proteins. **Metallomics**, v. 6, n. 3, p. 380–395, 2014.

PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA Binding Modes for Metal Anticancer Complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198–1211, out. 2009.

PLATTEN, M; WICK, W; VAN DEN EYNDE, B J. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5435–5440, 2012. Disponível em: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-0569">http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-0569</a>>.

POPOLIN, C. P. et al. Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple Negative Breast Cancer Cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0183275, set. 2017.

QIN, W. et al. Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. Molecules. [S.l: s.n.]., out. 2013

QIN, Y.; PENG, Q. Ruthenium Sensitizers and Their Applications in Dye-Sensitized Solar Cells. International Journal of Photoenergy. [S.l: s.n.]., 2012

RAJA, W. et al. Cisplatin Induced Paroxysmal Supraventricular Tachycardia. **Indian Journal** of Medical and Paediatric Oncology, v. 34, n. 4, p. 330, 2013.

RAMESH, R.; SIVAGAMASUNDARI, M. Synthesis, Spectral and Antifungal Activity of Ru(II) Mixed-Ligand Complexes. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 899–910, jan. 2003.

RATHGEB, A. et al. Ruthenium-Nitrosyl Complexes with Glycine, L -Alanine, L -Valine, L -Proline, <span style="font-variant:small-caps;">. Inorganic Chemistry, v. 53, n. 5, p. 2718– 2729, mar. 2014.

REES, D.; BEN-ISHAY, D.; MONCADA, S. Nitric Oxide and the Regulation of Blood Pressure in the Hypertension-Prone and Hypertension-Resistant Sabra Rat. **Hypertension**, v.

28, n. 3, p. 367-371, set. 1996.

REN, J. et al. Acquired Cisplatin Resistance in Human Lung Adenocarcinoma Cells Is Associated with Enhanced Autophagy. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 25, n. 1, p. 75–80, fev. 2010. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/cbr.2009.0701>.

RHO, J. K. et al. The Effect of Acquired Cisplatin Resistance on Sensitivity to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR Mutant Lung Cancer Cells. **Oncology Research**, v. 19, n. 10–11, p. 471–478, 2011.

RICHARD, D. M. et al. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **International Journal of Tryptophan Research : IJTR**, v. 2, p. 45– 60, mar. 2009.

RIDDELL, D. R.; OWEN, J. S. Nitric Oxide and Platelet Aggregation. Vitamins and Hormones, v. 57, p. 25–48, 1999.

RIDNOUR, L. A. et al. The Biphasic Nature of Nitric Oxide Responses in Tumor Biology. Antioxidants & Redox Signaling, v. 8, n. 7–8, p. 1329–1337, 2006. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910780">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910780</a>>.

RODRIGUES, F. P. et al. Incorporation of a ruthenium nitrosyl complex into liposomes, the nitric oxide released from these liposomes and HepG2 cell death mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, A Volume in Honor of Peter Ford. v. 306, p. 701–707, jan. 2016.

RODRIGUES, G. J. et al. Pharmacological Characterization of the Vasodilating Effect Induced by the Ruthenium Complex Cis-[Ru(NO)(NO2)(Bpy)2].(PF6)2. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 168–175, nov. 2015.

ROSA, V. et al. Imine Ligands Based on Ferrocene: Synthesis, Structural and Mössbauer Characterization and Evaluation as Chromogenic and Electrochemical Sensors for Hg <sup>+2</sup>. **New Journal of Chemistry**, 2018.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds. **Cancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1799–1802, jun. 1970.

ROSENBERG, B. et al. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. Nature, v. 222, n. 5191, p. 385–386, 1969. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/222385a0>.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1965. Disponível em: <a href="https://www.nature.com/articles/205698a0">https://www.nature.com/articles/205698a0</a>>.

ROSTOVTSEV, V. V. et al. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. **Angewandte Chemie** (**International Ed. in English**), v. 41, n. 14, p. 2596–2599, 2002. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203546">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203546</a>>.

SATO, T.; MORINAGA, T.; ISHIZUK, T. Preparation, Physicochemical Properties and Battery Applications of a Novel Poly(Ionic Liquid). In: KADOKAWA, Jun-ichi (Org.). . Ion. Liq. - New Asp. Futur. [S.l.]: InTech, 2013. .

SAUAIA, M. G et al. Photoinduced NO Release by Visible Light Irradiation from Pyrazine-Bridged Nitrosyl Ruthenium Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14718–14719, 2003. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1021/ja0376801">https://doi.org/10.1021/ja0376801</a>>.

SAUAIA, M. G.; SILVA, Roberto Santana da. The Reactivity of Nitrosyl Ruthenium Complexes Containing Polypyridyl Ligands. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 254–259, 2003. Disponível em: <a href="https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022964510682">https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022964510682</a>>.

SAUAIA, M. G. et al. Syntheses, Characterization and Photochemical Properties of New NO–ruthenium(II) Complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 8, n. 4, p. 347–349, 2005. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387700305000201">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387700305000201</a>.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas Disease: A Latin American Health Problem Becoming a World Health Problem. Acta Tropica, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, jul. 2010.

SCHULZ, J. B.; MATTHEWS, R. T.; BEAL, M. F. Role of Nitric Oxide in Neurodegenerative Diseases. **Current Opinion in Neurology**, v. 8, n. 6, p. 480–486, dez. 1995.

SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q. Fatores Que Interferem Na Qualidade Do DNA Extraído de Amostras Biológicas Armazenadas Em Blocos de Parafina. Jornal Brasileiro de Patologia

e Medicina Laboratorial, v. 47, n. 5, p. 541–548, 2011. Disponível em: <a href="http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1676-">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1676-</a>

24442011000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.
SEABRA, A. B. et al. Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Polyester for the Coating of Blood-Contacting Artificial Materials. **Artificial Organs**, v. 34, n. 7, p. E204-214, jul. 2010.

SEDDON, E. A.; SEDDON, K. R.; CLARK, R. J. H. **The Chemistry of Ruthenium**. [S.l.]: Elsevier Science, 2013.

SERLI, B. et al. Synthesis and Structural, Spectroscopic, and Electrochemical Characterization of New Ruthenium Dimethyl Sulfoxide Nitrosyls. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 15, p. 4033–4043, jul. 2002.

SHAHROOSVAND, H.; ESKANDARI, M. Ultrafast Interfacial Charge Transfer from the LUMO+1 in Ruthenium( II ) Polypyridyl Quinoxaline-Sensitized Solar Cells. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 2, p. 561–576, 2018.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of Nitric Oxide in Inflammatory Diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252–259, dez. 2007.

SHEN, D.-W. et al. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 706–721, jul. 2012.

SHRIVER, D F; ATKINS, P W. Química inorgânica. Porto Alegre (RS): Bookman, 2008.

SILVA, R. S. et al. Synthesis, Spectral and Redox Properties of Tetraammine Dioxolene Ruthenium Complexes. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 0, n. 22, p. 4078–4088, jan. 2000.

SIZOVA, O. V. et al. Chemistry of Ruthenium Polypyridine Complexes: VIII. Electronic Structure and Reactivity of Cis-[Ru(2,2'-Bpy)<sub>2</sub> (L)Cl] <sup>+</sup> Complexes in Excited States. **Russian** Journal of General Chemistry, v. 73, n. 12, p. 1846–1856, dez. 2003.

SOCRATES, G. Infrared Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts. **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 4, p. A93, 1995. Disponível em: <a href="http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed072pA93.5">http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed072pA93.5</a>>.

SOUSA, G. F. de; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 693–701, dez. 2014.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C. H. Nitric Oxide and Arthritis. Arthritis & Rheumatism, v. 36, n. 8, p. 1036–1044, set. 1993.

STEVENS, S. K. et al. The Anticancer Ruthenium Complex KP1019 Induces DNA Damage, Leading to Cell Cycle Delay and Cell Death in Saccharomyces Cerevisiae. **Molecular Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 225–234, jan. 2013. Disponível em: <a href="http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.112.079657">http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.112.079657</a>>.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. Parasites & Vectors, v. 7, p. 317, jul. 2014.

TFOUNI, E. et al. Tailoring NO Donors Metallopharmaceuticals: Ruthenium Nitrosyl Ammines and Aliphatic Tetraazamacrocycles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 31, p. 3643–3657, 2010. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846113">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846113</a>>.

TFOUNI, E. et al. Structure, Chemical and Photochemical Reactivity and Biological Activity of Some Ruthenium Amine Nitrosyl Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1–2, p. 57–69, jan. 2003.

THATCHER, G. R. J. et al. Nitrates and No Release: Contemporary Aspects in Biological and Medicinal Chemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1122–1143, out. 2004.

THOMAS, D. D. Breathing New Life into Nitric Oxide Signaling: A Brief Overview of the Interplay between Oxygen and Nitric Oxide. **Redox Biology**, v. 5, p. 225–233, 2015. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26056766">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26056766</a>>.

TODD, R. C.; LIPPARD, Stephen J. Inhibition of Transcription by Platinum Antitumor Compounds. **Metallomics**, v. 1, n. 4, p. 280, 2009.

TOGNIOLO, V.; SANTANA DA SILVA, R.; TEDESCO, A. C. Photo-induced nitric oxide release from chlorobis(2,2'-bipyridine)nitrosylruthenium(II) in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v. 316, n. 1, p. 7–12, 2001. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002016930100370X">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002016930100370X</a>>.

TOLEDO, J. C. et al. Ruthenium Tetraammines as a Model of Nitric Oxide Donor Compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2004, n. 9, p. 1879–1885, maio 2004.

TOLEDO, J. C.; AUGUSTO, O. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. Chemical Research in Toxicology. [S.l: s.n.]., maio 2012

TORIGOE, T. et al. Cisplatin Resistance and Transcription Factors. Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents, v. 5, n. 1, p. 15–27, jan. 2005.

TRACHTMAN, H. Nitric Oxide and Glomerulonephritis. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 4, p. 324–332, jul. 2004.

TRONDL, R. et al. NKP-1339, the First Ruthenium-Based Anticancer Drug on the Edge to Clinical Application. **Chem. Sci.**, v. 5, n. 8, p. 2925–2932, abr. 2014.

TURNBULL, C. M. et al. Mechanism of Action of Novel NO-Releasing Furoxan Derivatives of Aspirin in Human Platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 517–526, 2006. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702997">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702997</a>>.

TYLKOWSKI, B.; JASTRZĄB, R.; ODANI, A. Developments in platinum anticancer drugs. **Physical Sciences Reviews**, v. 3, n. 1, jan. 2018.

VAN RIJT, S. H.; SADLER, P. J. Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23–24, p. 1089–1097, dez. 2009.

VARGIU, A. V. et al. The Hydrolysis Mechanism of the Anticancer Ruthenium Drugs NAMI-A and ICR Investigated by DFT–PCM Calculations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 14, p. 4401–4409, abr. 2008.

VELDERS, A. H. et al. Dichlorobis(2-Phenylazopyridine)Ruthenium( II ) Complexes: Characterisation, Spectroscopic and Structural Properties of Four Isomers. **Dalton Trans.**, n. 3, p. 448–455, 2004.

VINCENT, S. R. Nitric Oxide Neurons and Neurotransmission. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 2, p. 246–255, fev. 2010.

VIRARKAR, M. et al. L-Arginine and Nitric Oxide in CNS Function and Neurodegenerative Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 11, p. 1157–1167, jan. 2013.

VIZI, E.S. Nitric Oxide in Neurotransmission. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 11, p. 595, nov. 2001.

WALLACE, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. Memórias do

Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. suppl 1, p. 5–9, mar. 2005.

WANG, P. G.; CAI, T. B.; TANIGUCHI, N. Nitric Oxide Donors: For Pharmaceutical and Biological Applications. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005.

WANG, T. et al. Nitric Oxide-Releasing Polymeric Furoxan Conjugates. Polymer Chemistry,
v. 6, n. 44, p. 7737–7748, 2015. Disponível em:
<a href="https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/py/c5py01335f">https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/py/c5py01335f</a>>.

WANSTALL, J. C. et al. Vascular Smooth Muscle Relaxation Mediated by Nitric Oxide Donors: A Comparison with Acetylcholine, Nitric Oxide Andnitroxyl Ion. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 463–472, out. 2001.

WEI, X. et al. Altered Immune Responses in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase.
Nature, v. 375, n. 6530, p. 408–411, jun. 1995. Disponível em: <a href="http://www.nature.com/doifinder/10.1038/375408a0">http://www.nature.com/doifinder/10.1038/375408a0</a>>.

WHEATE, N. J. et al. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113, 2010.

WILLIAMS, K. R; BRAVO, R. Micelles in the Physical Chemistry Laboratory: Diffusion Coefficients and Half-Wave Potentials of Ferrocene. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 3, p. 392, 1 mar. 2000. Disponível em: <a href="https://doi.org/10.1021/ed077p392">https://doi.org/10.1021/ed077p392</a>>.

WINK, D A; MITCHELL, J B. Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into Regulatory, Cytotoxic, and Cytoprotective Mechanisms of Nitric Oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 4–5, p. 434–456, 1998. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741580">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741580</a>>.

WITTE, M. B; BARBUL, A. Role of Nitric Oxide in Wound Repair. American Journal of Surgery, v. 183, n. 4, p. 406–412, 2002. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975928">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975928</a>>.

WLODARCZYK, M. T. et al. Platinum(II) Complex-Nuclear Localization Sequence Peptide Hybrid for Overcoming Platinum Resistance in Cancer Therapy. **ACS Biomaterials Science** & Engineering, v. 4, n. 2, p. 463–467, fev. 2018.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. Chemico-Biological Interactions, v. 147, n. 3, p. 309–318, abr. 2004.

XAVIER, A; SRIVIDHYA, N. Synthesis and Study of Schiff base Ligands. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 06-15, 2014.

YANG, M.; LI, J.; CHEN, P. R. Transition Metal-Mediated Bioorthogonal Protein Chemistry in Living Cells. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 18, p. 6511–6526, 2014. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867400">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867400</a>>.

YEON, L. S. et al. A novel liposomal nanomedicine for nitric oxide delivery and breast cancer treatment. **Bio-Medical Materials and Engineering**, n. 1, p. 61–67, 2014.

YOO, J.; FUKUTO, J. M. Oxidation of N-Hydroxyguanidine by Nitric Oxide and the Possible Generation of Vasoactive Species. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 12, p. 1995–2000, dez. 1995.

YOUSIF, E. et al. Metal Complexes of Schiff Base: Preparation, Characterization and Antibacterial Activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1639–S1644, maio 2017.

ZACHARIA, I. G.; DEEN, W. M. Diffusivity and Solubility of Nitric Oxide in Water and Saline. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 214–222, fev. 2005.

ZANICHELLI, P.G. et al. The Effects of Ruthenium Tetraammine Compounds on Vascular Smooth Muscle. **Nitric Oxide**, v. 16, n. 2, p. 189–196, mar. 2007.

ZENG, L. et al. The Development of Anticancer Ruthenium(II) Complexes: From Single Molecule Compounds to Nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 19, p. 5771–5804, 2017.

ZOUBI, W. A. Biological Activities of Schiff Bases and Their Complexes: A Review of Recent Works. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 03, n. 03, p. 73–95, 2013.

# ANEXOS

### **Anexo A.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos precursores do ligante pyLys

Espectro de <sup>1</sup>H RMN para o composto Boc-Fmoc-Lys.



Fonte: autora

Espectro de <sup>1</sup>H RMN para o composto Fmoc-Lys.



#### CONTINUAÇÃO DO ANEXO A

Espectro de <sup>1</sup>H RMN para o composto "azidolisina".



# Anexo B. Espectro <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 2D HMQC para o ligante pyLys

Espectro correlacional  ${}^{1}\text{H}{}^{-13}\text{C}$  2D HMQC para o ligante pyLys obtido em CD<sub>3</sub>OD. Ampliações das regiões **A**) Alifática e **B**) Aromárica.



# **Anexo C.** Espectro de <sup>1</sup>H RMN para o ligante 3-etinilpiridina em $D_2O$ .



# Anexo D. Espectros de RMN para o ligante pyTrp em CD<sub>3</sub>OD.





Fonte: autora

#### CONTINUAÇÃO DO ANEXO D

## 2D HSQC <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H



# CONTINUAÇÃO DO ANEXO D

#### <sup>2</sup>D COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H



#### Anexo E. Borbulhamento de NO

O aparato para geração de NO é apresentado na Figura E e consiste em 3 balões de duas bocas contendo: no balão (**A**) uma solução de HNO<sub>3</sub> 50% e pastilhas de cobre, no (**B**) uma solução saturada de NaOH, no (**C**) a solução da amostra a ser borbulhada com NO e, em (**D**) encontra-se o escape para o gás remanescente. O NO é gerado pela reação entre o cobre metálico e o ácido nítrico. O gás formado passa por uma solução de NaOH saturada, visando remover o NO<sub>2</sub> formado na presença de resquícios de O<sub>2</sub>.



Figura E. Esquema do aparato utilizado para geração de gás NO.

#### Anexo F. Purificação do complexo AR1

Primeiramente, foi testada a solubilidade do complexo AR1 em diversos solventes. Os solventes em que o complexo se apresentou solúvel foram: acetona, acetonitrila, etanol, metanol e água (parcialmente). Estes solventes foram utilizados frente a quatro mini-colunas contendo as fases estacionárias: sílica, alumina neutra, alumina básica e alumina ácida para verificação de possível separação da mistura reacional.

A alumina neutra se apresentou como melhor fase estacionária em comparação com a sílica, a alumina básica e a alumina ácida. A alumina ácida foi descartada por gerar reações indesejadas, formando inúmeros subprodutos, de forma que o nitrito coordenado ao complexo se converteu parcialmente a nitrosilo devido ao meio levemente ácido. Não ocorreu eluição quando a fase estacionária utilizada foi a sílica, pois o complexo se aderiu completamente à fase estacionária. Após a eluição, as frações coletadas foram submetidas a rotaevaporação e analisadas por espectroscopia Uv-vis.

Figura F. Coluna cromatográfica utilizada para purificação do complexo AR1





# Anexo G. Dados da obtenção dos coeficientes angulares dos complexos AR1 e AR2.



Figura G1. Espectros de absorção eletrônica do complexo AR1 em solução aquosa.

Fonte: autora.

Tabela G1. Dados obtidos através dos espectros eletrônicos para o complexo AR1.

Estoque (µL)	Concentração (10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> )	A283	A405
250	1,345	0,2150	0,03905
500	2,690	0,3791	0,06879
750	4,035	0,5955	0,1085
1000	5,380	0,8014	0,1482
1250	6,725	0,9813	0,1826
1500	8,070	1,171	0,2180
1750	9,415	1,371	0,2594
2000	0,1076	1,572	0,2994

# CONTINUAÇÃO ANEXO G



Figura G2. Espectros de absorção eletrônica do complexo AR2 em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Fonte: autora.

Tabela C4. Dados obtidos através	dos espectros eletrônicos	para o complexo AR2
----------------------------------	---------------------------	---------------------

Estoque (µL)	Concentração (10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> )	A300	A330
250	1,345	0,1079	0,05056
500	2,690	0,2119	0,09741
750	4,035	0,3155	0,1428
1000	5,380	0,4167	0,1880
1250	6,725	0,5277	0,2378
1290	8,070	0,6318	0,2848
1750	9,415	0,7255	0,3258
2000	0,1076	0,8295	0,3720

#### Anexo H. Espectro FTIR do complexo *cis*-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(py-CHO)](PF<sub>6</sub>)



#### FTIR em pastilhas de KBr

Fonte: autora.

Tabela H. Atribuições das bandas do espectro FTIR para o complexo cis-[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(py-CHO)](PF<sub>6</sub>)

AR5	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
v(P-F)	557 (F); 846 (F)	
ν(C-H)	648 (f); 731 (m); 1065 (w); 1192 (m); 1560 (f)	
v(C-H) fora do plano	764 (F); 1424 (F); 1466 (F)	
v(C-C)	1123 (m); 1159 (m);	
$v_{s}(NO_{2})$	1294 (F)	
$v_{ass}(NO_2)$	1338 (F)	
	1446 (F)	
	1602 (F)	
v(C=O)	1711 (F)	
v(C-H)	3080 (m)	
ν(О-Н)	3414 (m)	

Denotações: F - forte, m - média, f - fraca

**Anexo I.** Espectros Uv-vis para os complexos AR1, AR2 e cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sup>0</sup>)]<sup>2+</sup>



#### Anexo J. Estudos de Internalização celular por FTIR em células

Colaboração com o Dr. Fernando Postalli (pós-doutorando) e Prof. Dr. Fábio Zobi (Suíça) – Espectroscopia de infravermelho a nível celular.

Os estudos bioquímicos/biológicos de complexos metálicos incluem eventos específicos, tais como (i) a absorção de fármacos pelas células, (ii) a interação com biomoléculas (iii) a localização, (iv) estabilidade dos complexos, (v) A estabilidade dos lípidos. Alguns desses eventos podem ser monitorados usando o Espectrocopia de infravermelho a nível celular (FTIR - Fourier Transform Infrared spectromicroscopy). Esta alta sensibilidade e especificidade técnica especial, é uma alternativa moderna para o trabalho livre de marcadores químicos, além de não ser destrutivo para as células e tecidos.

Um resultado preliminar indica que o complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-Etpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> aplicado a linhagem celular A549 (câncer de pulmão humano) (Figura J1), encontra-se no interior das células. Estudos do tempo ao qual este complexo se mantém internalizado serão conduzidos no próximo período.

Figura J1. Incubação do complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> em A549, células de câncer de pulmão. A) Imagem de A549 (células #1) no campo cinza; os quadrados coloridos (ao lado do campo cinza) estão demonstrando as imagens FTIR em 2872, 2009 e 1940 cm<sup>-1</sup>, detectando lipídios, ligações triplas e a frequência da coordenação de rutênio ao ligante nitrosil (Ru-NO), respectivamente. B) espectro de absorção no infravermelho do complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-Etpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> dentro da célula escolhida via imagem.



Fonte: figuras concedidas pelo Dr. Fernando Postalli Rodrigues.

Apesar do complexo *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> apresentar-se na forma de *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sub>2</sub>)](PF<sub>6</sub>) em pHs acima de 5,0, observou-se que em meio de cultura celular RPMI branco (pH ~7,0) existe uma mistura dos dois complexos (Figura J2), o que ocasiona a observação da banda respectiva ao estiramento de Ru-NO<sup>+</sup> no espectro de absorção de infravermelho . A banda observada em 2009 cm<sup>-1</sup>, respectiva à tripla ligação entre carbonos do ligante 3-etinilpiridina, é observada em maior intensidade do que o normal, em virtude de dois complexos estarem contribuindo para sua intensidade: [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO)]<sup>3+</sup> e [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>.

**Figura J2.** Espectro de absorção eletrônica na região do Uv-visível para o complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO)]<sup>3+</sup> em meio de cultura celular RPMI branco (pH ~7). Observa-se a banda característica do complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO)]<sup>3+</sup> em forma de ombro em 330 nm e, a banda característica para o complexo [Ru(bpy)<sub>2</sub>(3-etpy)(NO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> em 405 nm.



#### Anexo K. Viabilidade celular em células B16-F10 para os complexos AR2 e AR4.







24 horas

20

0

p < 0.0001



Anexo L. Espectro de MALDI do íon complexo {[Ru(NO<sub>2</sub>)(bpy)<sub>2</sub>(py-CHO)]}<sup>+</sup>