UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e
medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi***

Maíta Santos

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e
medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e
sintéticos

Orientada: Maíta Santos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santos, Maíta

Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2012.

112 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e sintéticos.

Orientador: Silva, Roberto Santana.

1. Complexo de rutênio.
2. Doença de Chagas.
3. Óxido Nítrico.
4. Benznidazol.
5. Aminoglicosídeos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maíta Santos

Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e sintéticos.

Orientador: Roberto Santana da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais.

*Ao Bruno Rodrigues Silva, pelo carinho, compreensão, ajuda e apoio
ao longo deste percurso.*

*Ao Prof. Roberto Santana da Silva, pela oportunidade, orientação,
apoio e confiança.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força, proteção e por me permitir concretizar esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Ariovaldo dos Santos e Calízia Teresinha da Cunha Santos, por todo amor, dedicação, compreensão e apoio incondicionais ao longo de toda minha vida.

À minha irmã, Raíssa Santos, pelo carinho, confiança, e respeito.

Aos meus familiares, pelo carinho e incentivo.

Ao meu namorado, Bruno Rodrigues Silva, por todo amor e dedicação ao longo desses anos.

Ao Professor Dr. Roberto Santana da Silva pela orientação, amizade e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao técnico Luís Otávio Zamonier, pela atenção dispensada e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela oportunidade de colaboração na realização deste trabalho, bem como à Renata Sesti Costa e Zumira Ap. Carneiro pela disposição e atenção dirigida à execução deste trabalho.

Às minhas amigas, Gabriela Campos Seuanez, Marcela Davoni, Renata Goto e Andressa Duarte pelo apoio, atenção e excelente convívio.

Aos colegas de trabalho Andréa Junqueira, Andréia Nogueira de Carvalho, Clóvis Júnior, Deisy Bortolucci, Elton de Oliveira, Fabiana De Oliveira, Jacqueline Querino, Joana Coelho, Jorge Nasser, Juliana Biazotto, Karina Dias, Laila Aparecida Deliberto, Laísa Bonafim Negri, Lilian Franco, Loyanne B. Ramos, Natacha Cacita, Renata da Silveira, Simone

Cicillini, Stephanie Zoltay, Tassiele Heinrich pela amizade, excelente convívio e apoio profissional.

À Profa. Dra. Sofia Nikolaou, pela amizade e por contribuir com seu conhecimento científico para o progresso do trabalho.

Ao Técnico de laboratório José Carlos Tomaz, pela atenção e suporte técnico.

Aos profissionais da Seção de Pós-Graduação, pela paciência e atenção.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

*À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho,
o meu mais sincero obrigado.*

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se
atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.”*

Charlie Chaplin

Resumo

Resumo

SANTOS, M. **Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi***. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças tropicais endêmicas encontradas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina. Nos últimos 25 anos, apenas 1% de todos os medicamentos desenvolvidos no mundo foram destinados ao tratamento de doenças tropicais, como a doença de Chagas. A doença de Chagas é causada por um protozoário intracelular, o *Trypanosoma cruzi*, e atualmente apenas dois compostos tem sido empregados para tratamento etiológico da doença de Chagas: nifurtimox e benznidazol. Entretanto, ambos os compostos apresentam considerável toxicidade sistêmica. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver complexos híbridos de rutênio, com potencial atividade tripanocida, que possam atuar com maior eficácia em sítios biológicos específicos do *Trypanosoma cruzi* e com reduzida toxicidade sistêmica. Para tal efeito, moléculas com conhecida atividade microbica como derivados aminoglicosídeos, óxido nítrico e benznidazol foram coordenados a complexos de rutênio originando as espécies Ru(desoxiestreptamina), Ru(neamina), *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆. Os complexos foram caracterizados por espectroscopia de absorção no UV-vis e FTIR, espectrometria de massa, análise elementar, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. Nossos estudos sugerem que os complexos Ru(desoxiestreptamina), Ru(neamina), *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ apresentam propriedades químicas que suportam o sucesso da coordenação dos ligantes ao íon metálico rutênio(II) ou (III). Dentre todos os compostos estudados, *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆, apresentou maior potência tripanocida desprovida de citotoxicidade, a julgar pelos estudos *in vitro*. IC₅₀ foi ao redor de 0,24 µmol.L⁻¹, o que é 47 vezes menor do que a droga comumente usada em tratamento de Doença de Chagas. Isto determinou avaliação *in vivo*, no que foi observado aumento da sobrevida dos animais infectados com tripomastigotas, para 60 dias. Os estudos desenvolvidos com complexos de rutênio no presente trabalho reafirmam o sucesso na obtenção de tais complexos inicialmente propostos, implementando importantes informações e perspectivas no que diz respeito a complexos nitrosilos de rutênio e seus potenciais terapêuticos na doença de Chagas.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, complexo de rutênio, aminoglicosídeos, óxido nítrico, benznidazol.

Abstract

Abstract

SANTOS, M. **Synthesis and characterization of hybrid complexes of ruthenium and measurement of biological activity against *Trypanosoma cruzi***. 2012. 112f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

According to World Health Organization (WHO), more than a billion people are infected with one or more endemic tropical diseases found especially among the poor countries in Africa, Asia and Latin America. Over the past 25 years, only 1% of all drugs developed worldwide were used for treating tropical diseases such as Chagas disease. The Chagas disease is caused by an intracellular protozoan, *Trypanosoma cruzi*, and currently only two compounds have been used for etiological treatment of Chagas disease: nifurtimox and benznidazole. However, both compounds have significant systemic toxicity. In this context, the aim of this work was developing hybrid ruthenium complexes with potential trypanocidal activity that can act more effectively in specific biological sites of *Trypanosoma cruzi* with reduced systemic toxicity. For this purpose, molecules with known microbicidal activity as aminoglycoside derivatives, nitric oxide and benznidazole were coordinated to ruthenium to produce Ru(desoxiestreptamina), Ru(neamina), *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ and *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ complexes. The compounds were characterized by UV-vis absorption spectroscopy, FTIR, mass spectrometry, elemental analysis, and cyclic voltammetry and differential pulse voltammogram. The chemical characterization presented in this work gave evidence that support the coordination of biological ligand in ruthenium ion such as in Ru(desoxiestreptamina), Ru(neamina), *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ and *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ complexes. Subsequently, *in vitro* and *in vivo* studies have been conducted evaluating the cytotoxicity and trypanocidal activity of the ligands and ruthenium complexes. *In vitro* analysis suggested us that ruthenium complexes are greatly effective against *T. cruzi*. Among all complexes synthesized *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ showed higher *in vitro* trypanocidal activity, which has determined the *in vivo* assays with this compound. IC₅₀ was around 0,24 μmol.L⁻¹, which is 47 times less than usual drugs used in Chagas diseases treatment. This was performed using animals infected with *T. cruzi* in trypomastigote form, animal survivals until 60 days. The studies developed for ruthenium complexes reaffirm the success in obtaining of the complexes originally proposed, implementing important information and perspectives regarding the nitrosyl ruthenium complex and its therapeutic potential in Chagas disease.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, ruthenium complexes, aminoglycoside, nitric oxide, benznidazole.

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 2. Mecanismo de ação dos compostos benznidazol e nifurtimox	33
Figura 3. Estrutura espacial octaédrica do rutênio	36
Figura 4. Representação dos orbitais moleculares envolvidos na ligação de um metal com o ligante nitrosilo	37
Figura 5. Estrutura química da neamina e 2-desoxiestreptamina	40
Figura 6. Perfil isotópico do rutênio	48
Figura 7. Ilustração dos parâmetros de um voltamograma cíclico completo	49
Figura 8. Espectro UV-vis do benznidazol	58
Figura 9. Cromatograma do benznidazol - fase móvel de 50 % água e 50 % ACN	59
Figura 10. Estrutura química dos complexos <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ e <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	60
Figura 11. Diagrama simplificado de orbitais moleculares de complexos octaédricos	62
Figura 12. Espectro UV-vis dos complexos <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆ e <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	64
Figura 13. Espectro na região do infravermelho do benznidazol e estrutura química	65
Figura 14. Espectro na região do infravermelho dos complexos <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ e <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	66
Figura 15. Voltamograma cíclico do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ , potencial de reversão de -0,7 V (vs Ag/AgCl)	68
Figura 16. Voltamograma cíclico do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ , potencial de reversão de 1 V (vs Ag/AgCl)	70
Figura 17. Cromatograma do benznidazol – fase móvel 60 % água e 40 % ACN	71
Figura 18. Cromatograma do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ em pH = 7,0	72
Figura 19. Cromatograma do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ em pH = 3,0	73
Figura 20. Cromatograma do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	74
Figura 21. Percentual de citotoxicidade dos compostos Benznidazol e do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	75

Figura 22. Percentual de atividade tripanocida induzida pelo composto Benznidazol e pelo complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	76
Figura 23. Percentual de atividade tripanocida induzida pelo complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	77
Figura 24. Sobrevida e parasitemia de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com PBS, benznidazol e o complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	79
Figura 25. Espectro UV-vis do complexo [RuCl(NH ₃) ₅]Cl ₂	81
Figura 26. Espectro UV-vis dos ligantes neamina e 2-desoxiestreptamina	82
Figura 27. Espectro UV-vis dos complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	82
Figura 28. Voltamograma cíclico do complexo [RuCl(NH ₃) ₅] ⁺²	84
Figura 29. Voltamograma cíclico comparativo dos complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ⁺² e Ru(desoxiestreptamina)	85
Figura 30. Voltamograma cíclico comparativo dos complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ⁺² e Ru(neamina)	86
Figura 31. Voltamogramas de pulso diferencial (potencial de redução) dos complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ²⁺ , Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)	87
Figura 32. Voltamogramas de pulso diferencial (potencial de oxidação) dos complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ²⁺ , Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)	87
Figura 33. Estrutura química proposta para os complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	88
Figura 34. Espectro na região do infravermelho do complexo [RuCl(NH ₃) ₅]Cl ₂	89
Figura 35. Espectro na região do infravermelho do ligante desoxi-estreptamina e do complexo Ru(desoxiestreptamina)	91
Figura 36. Espectro na região do infravermelho do ligante neamina e do complexo Ru(neamina)	91
Figura 37. Perfil isotópico do rutênio referente ao íon molecular do complexo Ru(desoxiestreptamina) detectado no espectro de massas	93
Figura 38. Percentual de citotoxicidade dos compostos Benznidazol, neamina, desoxiestreptamina, [RuCl(NH ₃) ₅] ²⁺ , Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	94
Figura 39. Percentual de atividade tripanocida induzida pelo composto Benznidazol, pelo ligante neamina e complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ²⁺ e Ru(neamina)	95
Figura 40. Percentual de atividade tripanocida induzida pelo composto Benznidazol, pelo ligante desoxiestreptamina e complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ²⁺ e Ru(desoxiestreptamina)	96

Lista de Esquemas

Esquema 1. Rota sintética do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	52
Esquema 2. Etapas reacionais do processo de redução do NO ⁺ e coordenação do ligante benznidazol (L) ao complexo de rutênio	60
Esquema 3. Processos eletroquímicos centrados no ligante nitrosilo para o complexo <i>cis</i> -[RuL(bpy) ₂ (NO)] ³⁺ , onde L= benznidazol	69
Esquema 4. Reação química acoplada ao processo eletroquímico do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	69
Esquema 5. Ciclo do potencial catalítico para a conversão do nitrito para óxido nítrico por complexos de rutênio	77
Esquema 6. Rota sintética dos complexos de rutênio Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	80
Esquema 7. Processo eletroquímico do complexo [RuCl(NH ₃) ₅] ²⁺	84

Lista de Quadros

Quadro 1. Distribuição percentual dos isótopos do rutênio em função da massa atômica	48
Quadro 2. Energia vibracional ν_{NO} para complexos de rutênio	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Porcentagem de pureza e procedência dos reagentes utilizados durante as sínteses e a caracterização dos complexos	45
Tabela 2 - Análise elementar de carbono, nitrogênio e hidrogênio do benznidazol	58
Tabela 3 - Análise elementar de carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ .2Bz e <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆ .4H ₂ O	61
Tabela 4 - Análise espectroscópica, na região do UV-vis, dos complexos de rutênio <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ e <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	64
Tabela 5 - Potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) para o complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	69
Tabela 6 - Resultados de análises espectroscópicas na região UV-vis para os complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	83
Tabela 7 - Análise elementar percentual de carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	83
Tabela 8 - Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para o complexo [RuCl(NH ₃) ₅]Cl ₂	89
Tabela 9 - Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para os ligantes 2-desoxiestreptamina e neamina	90
Tabela 10 - Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para os complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)	91
Tabela 11 - Fragmento e relação m/z do íon molecular do complexo Ru(desoxiestreptamina) detectado no espectro de massas	93
Tabela 12 - Fragmento e relação m/z do íon molecular do complexo Ru(neamina) detectado no espectro de massas	93
Tabela 13 - Valores de IC ₅₀ e efeito tripanocida máximo percentual induzido pelo composto benznidazol, pelo ligante neamina e complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ⁺² e Ru(neamina)	95
Tabela 14 - Valores de IC ₅₀ e efeito tripanocida máximo percentual induzido pelo composto benznidazol, pelo ligante desoxiestreptamina e complexos [RuCl(NH ₃) ₅] ⁺² e Ru(desoxiestreptamina)	97

Lista de Abreviaturas e Siglas

ϵ	Coeficiente de absortividade molar ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)
λ	Comprimento de onda (nm)
ν	Estiramento da ligação na região do infravermelho (cm^{-1})
ν_{as}	Estiramento assimétrico
ν_{s}	Estiramento simétrico
ACN	Acetonitrila
ANG	Angiogenina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Bpy	2, 2'-bipiridina
Bz	Benznidazol
CL	Campo ligante
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPRG	Clorofenol β -D-galactopyranoside
DNA	Ácido desoxiribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
eg	Orbitais “d” degenerados de maior energia
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
E _{max}	Efeito máximo
E_{pa}	Potencial de oxidação
E_{pc}	Potencial de redução
EPM	Erro padrão da média

ESI-MS	Espetrometria de massas com ionização por eletrospray
E _{sp}	Potencial de reversão
F _c	Ferroceno
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GAPDH	Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTFA	Ácido trifluoroacético
IC ₅₀	Concentração que inibe em 50 % a viabilidade dos parasitas
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Intraligante
I _{pa}	Corrente máxima de oxidação
I _{pc}	Corrente máxima de redução
I _{sp}	Corrente de reversão
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
L	Ligante genérico
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco
LIT	Liver infusion- tryptose
LLCMK ₂	Linhagem de fibroblastos de rim de macaco
M	Metal
mAU	Micro unidades arbitrárias
Min	Minuto
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em sua forma reduzida

Nf	Nifurtimox
NO^-	Íon nitroxil
NO^+	Íon nitrozônico
NO^0	Óxido nítrico
NO_2^-	Íon nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS _e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS _i	Óxido nítrico sintase induzível
NOS _n	Óxido nítrico sintase neural
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Ânion Superóxido
OH^-	Íon hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO^-	Íon peroxinitrito
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
Ru	Rutênio
Ru(desoxiestreptamina)	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{desoxiestreptamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}_2$
Ru(neamina)	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{neamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}_2$
T	Temperatura
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
t_{2g}	Orbitais “d” degenerados de menor energia
TBAH	Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio
TCML	Transferência de carga metal ligante

tRNA	RNA transportador
UV-vis	Região do ultravioleta e visível
V	Velocidade de varredura (mV s^{-1})
Vs	Versus
WB	Western Blot
δ_a	Deformação degenerada assimétrica na região do infravermelho
δ_s	Deformação degenerada simétrica na região do infravermelho
ρ_r	Vibração rocking na região do infravermelho

Sumário

Sumário

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Esquemas	xv
Lista de Quadros	xvi
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xviii
1. Introdução	26
1.1 Doença de Chagas	27
1.2 Tratamento da doença de Chagas	32
1.3 Aplicações farmacêuticas de complexos metálicos	35
1.4 Importância biológica do óxido nítrico	38
1.5 Complexos híbridos como agentes anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
2 Objetivos	42
3 Material	44
4 Métodos	46
4.1 Medidas de pH	47
4.2 Análise Elementar	47
4.3 Espectrometria de Massa	47
4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	48
4.5 Espectroscopia eletrônica na região do UV-vis	48
4.6 Espectroscopia na região do infravermelho	48

4.7	Voltametria cíclica e de pulso diferencial	48
4.8	Experimentos biológicos	49
4.8.1	Cultura de células	49
4.8.2	Cepa de <i>T. cruzi</i>	49
4.8.3	Ensaio de citotoxicidade	50
4.8.4	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i>	51
4.8.5	Teste <i>in vivo</i> : Inoculação nos animais e tratamento	51
4.9	Síntese dos complexos de rutênio	52
4.9.1	Obtenção dos complexos de rutênio <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆ e <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	52
4.9.1.1	Extração do benznidazol	52
4.9.1.2	Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	52
4.9.1.3	Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	54
4.9.2	Obtenção dos complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)	54
4.9.2.1	Obtenção dos ligantes neamina e 2-desoxiestreptamina	54
4.9.2.2	Obtenção do composto bromidrato de 2-desoxiestreptamina	54
4.9.2.3	Obtenção da neamina base livre	55
4.9.2.4	Síntese dos complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)	55
4.10	Análise estatística	56
5	Resultados e Discussão	57
5.1	Parte 1	58
5.1.1	Extração do benznidazol	58
5.1.2	Síntese dos complexos <i>cis</i> - [Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ e <i>cis</i> - [Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	59

5.1.3	Análise elementar	61
5.1.4	Espectroscopia na região do UV-vis	61
5.1.5	Espectroscopia na região do infravermelho	64
5.1.6	Voltametria Cíclica	67
5.1.7	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	71
5.1.8	Ensaio de citotoxicidade e atividade tripanocida	75
5.2	Parte 2	80
5.2.1	Sínteses dos complexos de rutênio Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)	80
5.2.2	Espectroscopia na região do UV-vis	81
5.2.3	Análise Elementar	83
5.2.4	Voltametria cíclica e pulso diferencial	83
5.2.5	Espectroscopia na região do infravermelho	88
5.2.6	Espectrometria de Massa	92
5.2.7	Ensaio de citotoxicidade e atividade tripanocida	94
6	Conclusões	98
7	Referências	101

Introdução

1. Introdução

1.1 Doença de Chagas

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) doenças negligenciadas é um conjunto de doenças associadas à situação de pobreza, às precárias condições de vida e às iniquidades em saúde. Mais de um bilhão de pessoas estão infectados com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial¹. As doenças negligenciadas são endêmicas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina. Em geral, essas são doenças tropicais infecciosas como leishmaniose, doença do sono, dengue, esquistossomose, malária, doença de Chagas, entre outras.

Nos últimos 25 anos, apenas 1 % de todos os medicamentos desenvolvidos no mundo foram para tratar as chamadas doenças tropicais e a cada dia, cerca de três mil pessoas no mundo morrem vítimas destas doenças². Um dos motivos para esse número elevado de óbitos é a falta de ferramentas adequadas para o diagnóstico e tratamento destas doenças, uma vez que os medicamentos disponíveis têm sido pouco efetivos terapeuticamente, visto que essas doenças afetam principalmente as populações mais empobrecidas nos países menos desenvolvidos do mundo e não constituem um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas.

O maior exemplo dessas doenças tropicais é a doença de Chagas que é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Ela foi primeiramente descrita em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas. O agente etiológico da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, é transmitido para o homem pela picada de insetos triatomíneos, membros da subfamília Triatominae, que são insetos hematófagos. Dentro desta subfamília, o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são os principais vetores da doença. Eles vivem nas frestas e fendas de casas mal construídas de lama e palha e emergem à noite para se alimentarem.

A doença de Chagas é uma doença endêmica nos países da América Latina e aproximadamente 8 a 10 milhões de pessoas são infectadas³ tornando-se a doença parasitária mais prevalente no continente americano e a primeira causa de doença cardíaca e morte cardíaca entre populações pobres na América Latina (ENGELS & SAVIOLI, 2006).

¹ Revista Saúde Pública, 2010, 44(1):200-202.

² <http://pt.wikipedia.org/wiki/DNDi>

³ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>

Conforme a OMS mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e em 2008 estima-se que 10.000 morreram devido à doença.

O *Trypanosoma cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes (Figura 1). No hospedeiro invertebrado (Triatomíneo), as formas epimastigotas se multiplicam no lúmen do intestino e se diferenciam para tripomastigotas metacíclicos, na porção final do intestino. O ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando este é picado pelo inseto infectado (1), o qual defeca ao redor da picada. O parasita presente nas fezes penetra pela pele lesionada ou mucosa chegando à corrente sanguínea (2). Após adesão e penetração da forma tripomastigota metacíclica nas células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas que se multiplicam dentro das células (3-4). Quando as células estão cheias de formas amastigotas, o parasita se transforma em tripomastigota pelo crescimento do flagelo, provocando a lise das células liberando a forma tripomastigota, que se espalha através do sistema linfático e da corrente sanguínea invadindo tecidos adjacentes (5). O ciclo é completo quando um inseto triatomíneo ingere o sangue de uma pessoa contaminada (6) (FRANCO-PAREDES *et al.*, 2009).

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/1160/basics/pathophysiology.html>

Uma contribuição para o aumento da disseminação da doença e manutenção de áreas endêmicas são os reservatórios naturais que são animais infectados com o protozoário, porém

não manifestam a doença. São mais de 150 espécies de animais que são reservatórios naturais da doença de Chagas, entre eles, gato, cães, porcos, roedores, marsupiais e tatus.

A transmissão vetorial é confinada ao continente Americano, no entanto a transmissão da doença pode ocorrer por outras maneiras como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transplante de medula óssea, infecção congênita, ingestão de alimentos contaminados, acidente em laboratório (PARKER & SETHI, 2011).

Devido ao constante fluxo de imigrantes de áreas endêmicas para países não endêmicos como a Austrália, Canadá, Espanha, Estados Unidos e partes da Europa, a doença de Chagas está se tornando um problema de saúde pública, pois tem sido identificado um aumento no número de indivíduos infectados (SCHMUNIS, 2007; RASSI *et al.*, 2010). Uma estimativa revela que 300.000 pessoas infectadas vivem nos Estados Unidos, a maioria imigrante da América Latina (BUCKNER & URBINA, 2012).

O American Red Cross publicou em 2007 um estudo mostrando que 1 em cada 4655 doadores de sangue nos Estados Unidos foi confirmado como positivo para anticorpos *T. cruzi*⁴. Esses dados apontam para a necessidade de programas de controle da doença de Chagas com programas de controle ao vetor, fiscalização dos bancos de sangue, melhora das condições sócio-econômicas, cuidados eficientes com reservatórios naturais, intervenções terapêuticas ou profilaxia confiável (DUTRA *et al.*, 2009).

As seguintes diretrizes gerais da OMS são recomendadas para o controle e prevenção da doença de Chagas: aplicação de inseticidas em torno das casas, melhoria das casas para reduzir infestações de triatomíneos, utilização de mosquiteiros, preparo e armazenagem dos alimentos de forma adequada, triagem para todos os doadores de sangue e tecidos, e rastreio de recém-nascidos de pais infectados.

Como resultado de uma iniciativa multinacional coordenada pelos países do Cone Sul da América do Sul, o número de novas infecções de Chagas foi reduzido em 70 % do ano de 1983 a 2000 (MONCAYO, 2003). Esta redução tem sido alcançada interrompendo a transmissão por vetores e a transmissão transfusional de *T. cruzi* através de controle químico, melhorias habitacionais, educação, e de triagem de doadores de sangue. Devido ao sucesso desta iniciativa, programas similares estão sendo desenvolvidos e implementados em muitas regiões da América Latina (PARKER & SETHI, 2011). Consequentemente, o sucesso da

⁴ Centers for Disease Control and Prevention. Blood Donor Screening for Chagas Disease – United States **2006-2007**. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report 2007, 56, 141-143.

continuação destes programas implicará em uma mudança significativa na epidemiologia atual da doença de Chagas.

Quando a transmissão é através do vetor ocorre uma manifestação característica da doença de Chagas que é uma reação inflamatória no local da inoculação do *T. cruzi*. Se a inoculação for através da pele observa-se o aparecimento de um nódulo furuncular com discreto edema central, conhecido como chagoma. Se a inoculação ocorre através da mucosa conjuntiva, o paciente desenvolve um edema unilateral, bipalpebral e conjuntiva com linfadenopatia regional ipsilateral, referido como sinal de Romana (PARKER & SETHI, 2011).

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda que se inicia imediatamente após a infecção e dura cerca de dois meses. Durante a fase inicial aguda o ciclo do parasita intercala entre a replicação intracelular (amastigotas) e a não replicação – fase sanguínea (trypomastigotas), caracterizada pelo alto número de parasitas na corrente sanguínea.

A fase aguda pode ser assintomática, 60 a 70 % dos casos, ou sintomática associada com febre, mal estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, conjuntivite e mais raramente meningoencefalite. Os sinais e sintomas da fase aguda são na maioria não específicos dificultando a detecção da doença precocemente. Raramente as pessoas são diagnosticadas ou tratadas nessa fase da doença. Estes sintomas resultam em uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10 % (CLAYTON, 2010).

A transição da fase aguda para a fase crônica é acompanhada por uma diminuição acentuada na parasitemia, devido à eficaz resposta imune, o que mantém os níveis do parasita abaixo dos níveis detectáveis no hospedeiro durante toda a fase crônica da doença. Apesar dos níveis baixos de parasitas, é durante a fase crônica que os pacientes podem desenvolver as formas mais graves da doença (DUTRA *et al.*, 2009).

Dos pacientes que se encontram na fase crônica da doença, aproximadamente 30-40 % desenvolvem a forma cardíaca (cardiomegalia) e/ou digestiva (megaesôfago e megacólon), enquanto que aproximadamente 70 % dos pacientes infectados não apresentam sintomas clínicos durante muitos anos após a infecção inicial, que geralmente se manifestam 10-30 anos após a infecção inicial (RASSI *et al.*, 2010).

A forma digestiva é caracterizada por disfunção gastrointestinal, megaesôfago e/ou megacólon, devido à destruição das fibras musculares e neuronais no sistema digestivo o que em muitos casos graves conduz a dilatação da estrutura digestiva e perda da motilidade do

esôfago e intestino (DUTRA *et al.*, 2009). Dos pacientes infectados que apresentam a fase crônica da doença 10-15 % desenvolvem a forma digestiva da doença (RASSI *et al.*, 2010).

O megaesôfago causa disfagia (dificuldade ao engolir) com odinofagia (dor ao engolir), combinada com dor epigástrica, regurgitação, ptialismo (hipersalivação), e instituído em casos graves (RASSI *et al.*, 2010).

Megacólon frequentemente afeta o segmento sigmóide, reto, ou cólon descendente ou uma combinação, e causa uma severa constipação intestinal, distensão abdominal, e ocasionalmente uma obstrução intestinal devido ao fecaloma ou volvo de sigmóide (RASSI *et al.*, 2010).

Pacientes com megaesôfago tem uma maior prevalência de câncer de esôfago. Por outro lado, não tem sido relatado um aumento da frequência de câncer em pacientes chagásicos crônicos com megacólon (RASSI *et al.*, 2010).

A forma cardíaca é a forma mais grave e freqüente da fase crônica da doença de Chagas atingindo 20-30 % dos pacientes. Provoca um aumento global do coração e um aumento da ação do sistema imunológico devido ao parasitismo, alterando as fibras do tecido cardíaco conduzindo a insuficiência cardíaca (CLAYTON, 2010). O dano mediado pela resposta imune associado com grande número de formas amastigotas nos miócitos cardíacos degenera as fibras cardíacas conduzindo a alterações como perda da função contrátil, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita, entre outros. Nos estágios avançados desenvolve distúrbios de condução, disautonomia, cardiomegalia, fibrose, afinamento da parede ventricular e danos microvasculares (HIDRON *et al.*, 2010). A lesão cardíaca na doença de Chagas crônica é considerada a principal responsável pela morbidade e a mortalidade nesta fase (MONCAYO & SILVEIRA, 2009; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2009; CLAYTON, 2010).

O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda devido à alta parasitemia é feita por microscopia, com identificação das formas tripomastigotas em esfregaço de sangue periférico, teste de concentração micro-hematócrito ou Strout. No entanto na fase crônica da doença com o declínio da parasitemia a detecção da doença por microscopia torna-se ineficiente. Para o diagnóstico da fase crônica devem ser realizados 2 testes sorológicos para confirmar a presença de anticorpos IgG anti *-T. cruzi*, através dos testes sorológicos como ensaio imunoenzimático (ELISA), hemaglutinação indireta ou imunofluorescência indireta (PARKER & SETHI, 2011).

Nenhum desses testes tem suficiente sensibilidade ou especificidade para ser usado sozinho, portanto 2 métodos diferentes devem ser utilizados para aumentar a precisão do

diagnóstico. Além disso, métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) acoplado à hibridização com sondas moleculares e o Western blot (WB) têm apresentado resultados promissores e poderão ser utilizados como teste confirmatório tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Estes métodos são baseados no emprego de oligonucleotídeos sintéticos que amplificam seqüências de DNA específicas do patógeno-alvo e podem fornecer um diagnóstico definitivo da doença de Chagas durante a fase aguda e crônica da doença (PARKER & SETHI, 2011).

Exames clínicos refinados como Ecocardiograma com Doppler e de monitoramento Holter 24 h são utilizados para diagnóstico de pacientes com a forma cardíaca da doença (RASSI *et al.*, 2010).

No entanto, é imprescindível a busca de ensaios sorológicos, parasitológicos e moleculares eficientes e rápidos para o diagnóstico de pacientes em fase aguda e crônica da doença e a implementação de um ensaio quantitativo capaz de estimar precisamente a carga parasitária para se obter um indicador da resposta à quimioterapia específica anti- *T. cruzi* para se avaliar a eficácia terapêutica.

1.2 Tratamento da doença de Chagas

Embora desenvolvidos há mais de 40 anos, atualmente encontra-se disponível para o tratamento da doença de Chagas apenas 2 fármacos o benznidazol (Rochagan®, Rodanil® - Roche; LAFEPE-Benzimidazol – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida, e o nifurtimox (Lampit® - Bayer®), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido.

Ambos medicamentos possuem o grupo nitro (-NO₂) o qual é reduzido ao grupo amino (-NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase leva a formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO₂[•]) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH) (MAYA *et al.*, 2007; DESSOY *et al.*, 2009).

O efeito tripanocida do benznidazol se deve a ligações covalentes entre o radical nitro formado com macromoléculas do *T. cruzi* (DNA e citocromo P450). No caso do nifurtimox o radical reduz o oxigênio molecular formando o íon superóxido e regenerando o grupo -NO₂ num processo conhecido como ciclo redox. O íon superóxido é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio que através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III}, forma radical hidroxila. A esta espécie tem sido atribuído o efeito

triptanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi* (MAYA *et al.*, 2007; DESSOY *et al.*, 2009) (Figura 2).

Os metabólitos (eletrofílicos) formados através do mecanismo de ação desses medicamentos podem atuar também em outros sistemas, especialmente do hospedeiro humano, devido a sua alta reatividade. Esta baixa especificidade de ação contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes.

Figura 2: Mecanismo de ação dos compostos benznidazol e nifurtimox. Fonte: Dessoy *et al.*, 2009.

Os efeitos colaterais mais comuns para o nifurtimox são perda de peso, sonolência, manifestações digestivas como náuseas, vômito e cólicas intestinais. Já para o benznidazol os efeitos colaterais podem ser agrupados em três formas: 1) manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea, edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares; 2) depressão da medula óssea, incluindo neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica; 3) polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite.

Esses medicamentos quando utilizados durante a infecção aguda, curam até 80 % das infecções, mas a grande maioria dos pacientes não é diagnosticada até que eles se encontram na fase crônica a qual, infelizmente, as taxas de cura parasitológica com as drogas, como avaliado pela sorologia convencional, são menos de 20 % (BUCKNER & URBINA, 2012).

Ambos, nifurtimox (Nf) e benznidazol (Bz), são amplamente criticados devido à sua toxicidade sistêmica, com sérios efeitos colaterais, incluindo anorexia, vômito, dor de cabeça, vertigem, entre outros (COSTA, *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 2006), resultando na interrupção do tratamento em 20-30 % dos casos (ISSA & BOCCHI, 2010). Contudo, não há drogas para a sua substituição e a principal razão para tal fato é devido a Chagas pertencer a um grupo de infecções tropicais, especialmente endêmica (estimada em 1,4 %) em populações

de baixa renda, de regiões em desenvolvimento da África, Ásia e das Américas (CLAYTON, 2010).

Como mencionado acima, as opções terapêuticas atualmente disponíveis são limitadas e a maioria das medidas terapêuticas destina-se ao tratamento das conseqüências da doença de Chagas (GUTIERREZ, 2009).

Nesse contexto, torna-se inevitável perceber a necessidade do desenvolvimento de fármacos que atuem tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas, com destaque para o sequenciamento do genoma do *T.cruzi* que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes no parasita e não no homem, alvos moleculares específicos do parasita, apresentando novas possibilidades para o desenvolvimento de fármacos seletivos (EL-SAYEDE *et al.*, 2005).

Alguns desses alvos moleculares são mais interessantes para o processo de desenvolvimento de novos fármacos, dentre eles estão enzimas como as proteases, proteínas quinases, trans-sialidase, DNA-topoisomerase, e vias importantes do parasita como a biossíntese de esteróis, via glicolítica, biossíntese de lipídeos, entre outros.

As proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasita pelo sistema imune do hospedeiro. Dentre elas podemos selecionar como exemplo a cruzaina, da classe das cisteíno proteases, que estão diretamente envolvidas na sobrevivência e replicação do parasita (DESSOY *et al.*, 2009).

Outra estratégia para o planejamento de novos fármacos é a via glicolítica que é responsável pela produção de energia do parasita, pois as formas tripomastigotas são desprovidas do ciclo do ácido tricarboxílico e são altamente dependentes da via glicolítica para produção de ATP. Dentre as enzimas da via glicolítica a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) é uma enzima que tem sido alvo de muitos estudos em química medicinal (DESSOY *et al.*, 2009).

Vários inibidores têm sido descobertos especialmente nas últimas décadas com os avanços da biologia molecular, bem como da química medicinal e computacional, da síntese orgânica planejada e dos ensaios biológicos em larga escala. Muitos estudos vem sendo conduzidos e culminando na descoberta de moléculas bioativas candidatas a fármacos, tendo em vista alvos específicos do parasita para que se obtenha uma eficácia no tratamento devido à alta seletividade e redução dos efeitos colaterais. Dentre os inibidores destas enzimas destacam-se os complexos nitrosilos de rutênio e ferro, doadores de óxido nítrico (SILVA *et al.*, 2010; SILVA, *et al.*, 2009).

1.3 Aplicações farmacêuticas de complexos metálicos

A diversidade de compostos inorgânicos e suas aplicações na medicina abrangem as principais classes de medicamentos por apresentarem os mais distintos mecanismos de ação. Como por exemplo, os complexos de platina, utilizados no tratamento de câncer, assim como os complexos de ouro no tratamento de artrite, os complexos de prata usados como agentes antimicrobianos, o complexo de arsênio usado para o tratamento de sífilis, e os complexos de mercúrio utilizados como diuréticos (BERNERS-PRICE & SADLER, 1996; BAKHTIAR & OCHIAI, 1999; ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Alguns complexos nitrosilos com aplicação médica são também conhecidos desde o século XIX e muitos deles continuam sendo utilizados (SZCZEPURA & TAKEUCHI, 1990). O nitroprussiato de sódio, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, vasodilatador útil no controle da pressão arterial, especialmente em casos de emergência é um exemplo de complexo metálico que carrega um ligante ativo (óxido nítrico) (MONCADA *et al.*, 1991; STOCHEL *et al.*, 1998).

Neste contexto, os complexos de rutênio têm recebido considerável atenção no tratamento de câncer devido ao seu comportamento cinético e mecanismo de ação ser semelhante à cisplatina. O composto de rutênio NAMI-A inibe a formação e crescimento de metástases, encontrando-se na fase II de ensaios clínicos, e o composto de rutênio KP-1019 induz apoptose em células de carcinoma colorretal, atualmente em fase I dos ensaios clínicos. É importante ressaltar a reduzida toxicidade desses compostos se comparados com a cisplatina (TFOUNI *et al.*, 2012).

Estas propriedades foram atribuídas à similaridade no metabolismo entre os compostos de rutênio e ferro, a qual se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste metal com as do ferro. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados por um excesso de ferro através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina. Alguns autores acreditam que o mecanismo de proteção contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo (ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Os primeiros relatos na literatura do uso de metais de transição na quimioterapia da doença de Chagas são referentes ao uso de sais de ouro, cobre e zinco. A partir da década de 80 muitos esforços foram direcionados na avaliação da ação anti-*trypanosoma cruzi* de uma variedade de complexos com atividade antitumoral, devido principalmente às semelhanças bioquímicas em termos de metabolismo e recursos de sistemas de proteção entre os tripanosomatídeos e algumas células tumorais (LOPEZ *et al.*, 2007).

Recentemente têm sido relatados complexos nitrosilos de rutênio com atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*, os quais são eficientes na redução tanto da parasitemia quanto da inflamação cardíaca e conduzem a uma total sobrevivência de ratos infectados que foram tratados com os complexos (SILVA *et al.*, 2007).

De acordo com a composição da sua esfera de coordenação o rutênio tem vários estados de oxidação: Ru(II), Ru(III) e Ru(IV). A maioria destes estados de oxidação é acessível em condições fisiológicas. Complexos de rutênio são desenvolvidos particularmente com ligantes de relevância biológica, e o estado de oxidação mais comum é o Ru(II) e Ru(III) em solução aquosa (Figura 3). Complexos com Ru(III) podem servir como precursor para a obtenção de complexos Ru(II) através da redução que pode ocorrer também *in vivo* por redutores biológicos, tais como glutatona e ácido ascórbico. Os centros de Ru(II) são mais reativos que Ru(III) em reações de substituição e são capazes de coordenar rapidamente com átomos de nitrogênio e enxofre disponíveis em biomoléculas (TFOUNI *et al.*, 2012).

Tetraaminarutênio(III) e (II) constitui uma classe muito interessante de compostos para a química medicinal, pois possui solubilidade e estabilidade em água além de baixa toxicidade. As aminas, as quais são orientadas ao longo dos eixos X e Y dos complexos octaédricos, são ligantes inertes que permitem reações de substituição. Dependendo da natureza dos ligantes e o estado de oxidação a reatividade fotoquímica pode diferir (TFOUNI *et al.*, 2012).

Figura 3: Estrutura espacial octaédrica do rutênio.

Uma abordagem alternativa para a descoberta de novos metalofármacos envolve a ligação de um composto orgânico de conhecido valor terapêutico a um fragmento contendo metal; isto resulta em um sinergismo de metal-fármaco em que o metal atua como um transportador e estabilizador para a droga atingir o seu alvo, enquanto que a droga orgânica

carrega e protege o metal e impede reações secundárias no seu trânsito para um segundo alvo da ação biológica.

Compostos doadores de óxido nítrico (NO) tem recentemente emergido como uma interessante e importante alternativa para o tratamento das infecções com *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 2007). Esses compostos apresentam baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo* e estabilidade em meio aquoso e na presença de oxigênio, além de serem capazes de liberar NO por redução pelos agentes redutores presentes no meio (ZANICHELLI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007). O NO liberado por esses compostos no sítio de ação pode ser controlado através da seleção criteriosa dos ligantes presentes no complexo (TOLEDO *et al.*, 2005).

O grupo de Silva (GUEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2003) descreve complexos nitrosilos de rutênio potencialmente ativos contra *T. cruzi* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. A justificativa dos autores para a atividade tripanocida dos complexos foi atribuída à capacidade tripanocida do NO (MACHADO *et al.*, 2010).

Complexos de rutênio podem ser usados como doadores de óxido nítrico devido às suas propriedades químicas que favorecem a ligação estável entre o metal e a molécula de óxido nítrico, pois existe uma doação de densidade eletrônica dos orbitais σ do NO para o metal. Além da ligação σ , há uma doação de densidade eletrônica dos orbitais d do metal para o orbital π^* do NO, denominada de retrodoação (Figura 4).

Figura 4: Representação dos orbitais moleculares envolvidos na ligação de um metal com o ligante nitrosilo.

A molécula de NO pode ligar-se ao metal (M) tanto pelo átomo de nitrogênio (M—NO) como pelo átomo de oxigênio (M—ON), originando as formas nitrosilo ou isonitrosil, respectivamente. A forma nitrosilo é a mais comum, sendo que a forma isonitrosil deve ocorrer com metais mais eletropositivos, como lítio e sódio (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

Algumas alternativas para o controle da liberação de NO a partir de complexos de coordenação são viáveis clinicamente, como a indução luminosa e a redução eletroquímica do

NO^+ coordenado. Ambas as técnicas levam em consideração a baixa afinidade observada entre o ligante NO^0 e alguns íons metálicos. Consequentemente o NO^0 é liberado com constante de velocidade dependendo do efeito *trans* promovido pelo ligante. Isso mostra que a fotoquímica e os processos eletroquímicos podem ser utilizados para modelar diferentes processos bioquímicos.

1.4 Importância biológica do Óxido nítrico

O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, incolor, e é a menor molécula classificada como mensageiro nos processos biológicos e não é dependente de transportadores específicos nem de canais de passagem intracelulares. Uma das funções fisiológicas do NO foi descoberta por Furchgott e Zawadzki, 1980, que constataram que o fator de relaxamento derivado do endotélio, potente vasodilatador, era o NO produzido pela enzima NO-sintase nas células endoteliais da aorta de coelhos. O NO também atua em carcinogênese, progressão tumoral e na terapia do câncer dependendo da variedade de condições no meio intracelular, como tipo de célula alvo, concentração de NO e a presença de outras espécies radicalares (WELLER, 2003; CHIANG, *et al.*, 2005).

O NO é um produto da oxidação da L-arginina a L-citrulina por uma família de enzimas dependentes de NADPH, conhecidas coletivamente como NO sintases (NOS). Existem três isoformas da NOS, uma é induzida pelo estímulo imunológico (iNOS) e duas delas são constitutivas, a NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) (MONCADA *et al.*, 1991).

A produção de NO por NOS induzível (iNOS) tem ações antimicrobianas, dependendo da sua concentração, e pode também interferir com proliferação celular e morte por apoptose. Na infecção experimental aguda por *T. cruzi* as citocinas, interferon gama, fator de necrose tumoral e moléculas que provocam quimiotaxia são produzidas e consideradas relevantes para a indução da iNOS e morte do *T. cruzi* dependente de NO (MACHADO *et al.*, 2000; GUTIERREZ *et al.*, 2009). Essa resposta imune também pode causar disfunção miocárdica (SILVA *et al.*, 2003).

O controle da infecção de *T. cruzi* em hospedeiros vertebrados é dependente da ativação de macrófagos e produção de NO, o qual está envolvido na destruição intracelular do parasita (SILVA *et al.*, 2003). Assim, a modulação farmacológica dos níveis de NO tem ganhado interesse como um potencial alvo quimioterápico.

Entretanto, por ser uma espécie radicalar, o NO reage rapidamente com outras moléculas, como o oxigênio (O_2) e o ânion superóxido (O_2^-). Quando reage com o O_2 , o NO

forma dióxido de nitrogênio (NO_2), porém quando reage com o O_2^- , ocorre a formação de peroxinitrito (ONOO^-) que é um potente oxidante, o qual subsequentemente reage com alvos biológicos (ISCHIROPOULOS & AL-MEHDI, 1995).

Estas descobertas recentes têm estimulado o interesse na química e bioquímica do NO levando ao desenvolvimento de novas drogas para a medicina (IGNARRO, 2000; IGNARRO *et al.*, 1999, TOGNIOLO *et al.*, 2001; SAUAIA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; BONAVENTURA *et al.*, 2004; SAUAIA *et al.*, 2005; DE LIMA *et al.*, 2005). Devido à extrema instabilidade da molécula de NO em meio biológico e seu curto tempo de meia vida (aproximadamente 5 segundos), torna-se difícil o estudo de seus efeitos fisiológicos. Assim existe um grande interesse em complexos químicos que possam servir de pró-drogas para a liberação controlada do NO nos sistemas biológicos (WORKS *et al.*, 2001). Esses complexos devem apresentar algumas propriedades características como ser de fácil síntese em uma forma pura e estável, de preferência hidrossolúveis, gerar NO quantitativamente, e os subprodutos obtidos após liberação do NO devem ser inertes e atóxicos. Dessa forma, o desenvolvimento de complexos que podem agir como doadores de NO, num organismo biológico, é de interesse para a clínica médica, haja visto a possibilidade de se controlar a liberação do óxido nítrico por reações fotoquímicas e/ou redutimétricas.

1.5 Complexos híbridos como agentes anti-*Trypanosoma cruzi*

Baseando-se na estratégia de desenvolver complexos que apresentem sinergismo no mecanismo de ação, a proposta do presente trabalho foi coordenar ligantes ativos a complexos nitrosilos de rutênio, tendo como escolha o benznidazol com o objetivo de melhorar a eficácia, reduzir a toxicidade e aumentar a hidrossolubilidade. Sua coordenação ao complexo de rutênio tem sido explorada como tentativa de reduzir a toxicidade do benznidazol e amplificar sua eficácia terapêutica (SILVA *et al.*, 2008). Considerando que o mecanismo de ação do benznidazol envolve a redução do grupo nitro, o ancoramento desse fármaco num complexo de rutênio poderia facilitar o processo de nitrorredução, e assim melhorar sua potência e eficácia. Além disso, a liberação do NO no sítio de ação provocaria um efeito sinérgico com a ação do benznidazol contra o *T. cruzi*.

Outra estratégia proposta nesse trabalho foi a coordenação de aminoglicosídeos ao complexo de rutênio, visto que aminoglicosídeos têm sido muito utilizados como antibióticos de amplo espectro para o tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbicas Gram-negativas e Gram-positivas, vírus e alguns protozoários. Estudos mostram que os

aminoglicosídeos podem se ligar a subunidades do RNA, como rRNA, tRNA e mRNA, causando erros na decodificação e translocação e inibem a reciclagem do ribossomo, interferindo na biossíntese de proteínas. A neomicina é um dos mais estudados aminoglicosídeos e interage com o rRNA por interações de hidrogênio e ligação eletrostática devido às funcionalidades amino e hidroxila que são carregados positivamente, em condição de pH neutro (WU *et al.*, 2010).

No entanto, os aminoglicosídeos possuem efeitos adversos causados pela falta de seletividade para alvos diferentes de RNA e provocam principalmente nefro e ototoxicidade (MORRIS & WILMOT, 1997). Portanto, muitos esforços têm sido feitos para sintetizar novos ligantes de RNA específicos, que podem ter potencial atividade contra microorganismos, com menor toxicidade (XU *et al.*, 2009; MEI *et al.*, 2008; BAUSSANNE *et al.*, 2010). Existem alguns exemplos de pequenas moléculas que reconhecem especificamente certas estruturas secundárias de determinado RNA. A neamina (Figura 5 - A), porção farmacofórica da neomicina, é capaz de interagir com alvos específicos do rRNA e possui menor toxicidade que a neomicina. Ela é constituída por um anel aminociclitol, 2-desoxiestreptamina (Figura 5 - B), ligado a um aminoaçúcar através da ligação glicosídica. O aminociclitol é crucial para o reconhecimento e interação com o rRNA bacteriano (LIANG *et al.*, 2005). Além disso, a 2-desoxiestreptamina é prontamente disponível por degradação química de alguns aminoglicosídeos (VOURLLOUMIS *et al.*, 2002).

Figura 5: Estrutura química da neamina (A) e 2-desoxiestreptamina (B).

Estudos recentes mostram atividade da neamina em inibir o crescimento do câncer de próstata por suprimir a transcrição da angiogenina mediada pelo rRNA. Angiogenina (ANG) desempenha um importante papel na progressão do câncer de próstata por estimulação da transcrição rRNA de células endoteliais e cancerosas. Inibidores da ANG têm tanto o benefício da quimioterapia quanto da terapia antiangiogenesis (IBARAGI *et al.*, 2008).

Além disso, suas propriedades contra microorganismos estão sendo muito exploradas devido à alternativa de se conseguir derivados que sejam mais específicos na inibição, como derivados de neamina que são capazes de inibir a ligação de proteínas regulatórias do HIV pela interação com o RNA viral (YAJIMA *et al.*, 2006).

A coordenação de derivados aminoglicosídeos ao complexo de rutênio se tornou sugestivo pelo fato de serem compostos muito ativos. A perspectiva deste trabalho é que com a coordenação ao complexo de rutênio o aminoglicosídeo neamina, e seu derivado 2-desoxiestreptamina se tornem menos tóxicos e possivelmente mais eficazes.

Enfim, um marco interessante destes estudos refere-se ao fato da baixa toxicidade de tais complexos associada a uma eficácia equiparável ou superior à de medicamentos atualmente empregados na clínica. A proposta desses novos compostos têm se mostrado promissora e representa grandes perspectivas no avanço da terapêutica da doença de Chagas. Este trabalho apresenta a síntese e caracterização destes complexos de rutênio coordenados a esses ligantes e suas perspectivas em estudos envolvendo ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* com potencial ação tripanocida.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Desenvolver complexos híbridos de rutênio que possam atuar em sítios biológicos específicos como agentes tripanocida.

- Obter os ligantes neamina e 2-desoxiestreptamina pela clivagem da neomicina.
- Sintetizar o complexo de rutênio precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$ e coordená-lo aos ligantes neamina e 2-desoxiestreptamina.
- Sintetizar os complexos de rutênio: *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$.
- Caracterizar os complexos obtidos por espectroscopia de absorção no UV-vis e no infravermelho, espectrometria de massa, análise elementar, voltametria cíclica e pulso diferencial.
- Avaliar a citotoxicidade dos complexos.
- Avaliar a atividade tripanocida dos complexos.
- Avaliar a sobrevida e parasitemia dos animais tratados com o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$.

Material

3. Material

A Tabela 1 resume a procedência dos reagentes e solventes utilizados para procedimentos experimentais.

Tabela 1. Porcentagem (%) de pureza e procedência dos reagentes utilizados durante as sínteses e a caracterização dos complexos.

Reagentes	% de pureza	Procedência
2, 2'-bipiridina	99,0	Aldrich Chemicals
Acetonitrila	99,9	Mallinckrodt
Ácido bromídrico	48,0	Merck
Ácido clorídrico	36,5~38,0	Quimex
Ácido hexafluorofosfórico	98,0	Aldrich Chemicals
Ácido trifluoracético	98,0	Merck
Azida de sódio	-	Merck
Benznidazol	97,0	Sigma-Aldrich
Cloreto de hexaaminrutênio(III)	95,0	Aldrich Chemicals
Cloreto de lítio	99,0	Aldrich Chemicals
Cloreto de rutênio(III)	99,9	Scream Chemicals
Dimetilformamida	99,0	Merck
Hexafluorofosfato de amônio	95,0	Aldrich Chemicals
Hidrazina Hidrato	25,0	Vetec
Hidróxido de amônio	98,0	Synth
Metanol	99,5	Merck
Neomicina	-	Sigma-Aldrich
Nitrito de sódio	99,0	Merck

Métodos

4. Métodos

4.1 Medidas de pH

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se o pHmetro Digimed modelo DM-20.

4.2 Análise Elementar

As análises elementares (C, H e N) foram realizadas utilizando um equipamento marca Perkin Elmer CHN 2400, realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.3 Espectrometria de Massa

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de Massas Modelo: ultrOTOFG – ESI-TOF Mass Spectrometer. Fabricante: Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA. Nas seguintes condições experimentais: bomba de infusão 300 µl/h; fase móvel para a solubilização foi água: metanol, modo de detecção positivo. Realizados no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Para análise dos espectros foi verificado a existência do perfil isotópico do rutênio (Figura 6).

Figura 6: Perfil isotópico do rutênio.

Quadro 1: Distribuição percentual dos isótopos do rutênio em função da massa atômica.

Massa atômica do isótopo (g)	Porcentagem (%) dos isótopos do rutênio
96	17.6
97	0.0
98	5.9
99	40.4
100	39.9
101	54.1
102	100.0
103	0.0
104	59.0

4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas foram obtidos utilizando equipamento Shimadzu, constituído por bomba LC-20AT, detector UV-vis SPD- M20A com a interface CBM-10A. Foi utilizada coluna CLC-ODS (5 μm ; 250 mm x 4,6 mm i.d.; Shimadzu). As amostras para análise foram dissolvidas na fase móvel e foram injetados 20 μL .

4.5 Espectroscopia Eletrônica na região do UV-vis

Todas as medidas foram realizadas a 25,0 °C. Os espectros de absorção na região do UV-vis foram obtidos em espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 Diode Array, usando cubeta de quartzo de 1.0 cm de caminho óptico, comprimento de onda de 200-900 nm. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar (ϵ).

4.6 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos com Espectrofotômetro Prestige-21 Shimadzu. As amostras foram feitas no estado sólido utilizando pastilha de brometo de potássio (KBr).

4.7 Voltametria cíclica e de pulso diferencial

Medidas de voltametria cíclica e de pulso diferencial foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato AUTOLAB[®], modelo PGSTAT 30.

Os voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial foram obtidos em meio aquoso e em meio de acetonitrila, à temperatura ambiente com borbulhamento de gás argônio. Em meio aquoso utilizou-se solução tampão fosfato pH 7.0 como eletrólito suporte e como eletrodo de trabalho carbono vítreo. Em acetonitrila o eletrólito suporte utilizado foi o TBAH 0,1 mol.L⁻¹ e eletrodo de trabalho de platina. Utilizou-se eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência de Ag/AgCl. Para corrigir os potenciais utilizou como padrão interno o cloreto de hexaaminrutênio(III) para soluções aquosas e ferroceno para meio não aquoso.

A Figura 7 representa um processo reversível onde pode ser visto os potenciais, as correntes de picos anódico e catódico (E_{pa} , E_{pc} , I_{pa} , I_{pc}), o potencial de meia onda de um processo redox ($E_{1/2}$), o potencial e a corrente de inversão de varredura (E_{sp} , I_{sp}).

Figura 7. Ilustração dos parâmetros de um voltamograma cíclico completo.

4.8 Experimentos biológicos

Os experimentos biológicos foram padronizados e realizados no laboratório do Prof^o Dr. João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.8.1 Cultura de células

Para o cultivo das células da linhagem LLCMK₂ (linhagem de fibroblastos de rim de macaco) utilizou-se o meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-aldrich® com 25 mmol.L⁻¹ de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio). O meio foi preparado e o pH da solução foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado através de filtro estéril 0,22 µmol.L⁻¹ e acrescentado a ele penicilina (10.000 Ui) e estreptomicina (0,01 g/mL) como antibióticos, anfotericina B como antimicótico (25 µg/mL) e 5 % de soro fetal bovino. As células da linhagem LLCMK₂ foram mantidas em estufa a 37,0 °C e atmosfera úmida com concentração controlada de 5 % CO₂.

4.8.2 Cepa de *T. cruzi*

Para os experimentos biológicos foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi*. A cepa Y foi isolada de um indivíduo na fase aguda, Freitas em 1950, e posteriormente estudada e descrita por Silva & Nussenzweig em 1953. Tal cepa foi utilizada nos ensaios *in vivo* por ser considerada parcialmente sensível (50 %) à quimioterapia com Bz durante a fase aguda da infecção.

A cepa Tulahuen-lacZ foi gentilmente cedida pelo Dr. Jean J. Silva na forma epimastigota, a qual expressa de maneira estável o gene da β -galactosidase de *E. coli*, esta enzima é capaz de catalisar a reação colorimétrica utilizando o vermelho de clorofenol β -D-galactopyranoside (CPRG) como substrato e transformando o meio de amarelo para vermelho (BUCKNER, et al., 1996). A viabilidade dessa cepa de *T. cruzi* é observada ao adicionar o substrato da β -galactosidase em cultura. Tal cepa foi inoculada em camundongos deficientes de IFN- γ . Os camundongos apresentaram os tripomastigotas no sangue, o qual foi utilizado para manter a cepa em novos camundongos ou para infectar garrafas de cultura de LLCMK₂.

A forma epimastigota das duas cepas de *T. cruzi* utilizadas foi mantida a 28,0 °C em meio LIT (do inglês, liver infusion-tryptose) contendo 10 % de soro fetal bovino. Tripomastigotas sanguíneos foram mantidos em camundongos Swiss por passagem de sangue infectado para camundongo naïve. As formas tripomastigotas sanguíneas foram utilizadas para infecção dos camundongos para avaliação do efeito *in vivo* dos compostos avaliados. Células LLCMK₂ foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos e os tripomastigotas derivados da cultura foram utilizados nos ensaios *in vitro*.

4.8.3 Ensaio de citotoxicidade

Células do baço de camundongos C57BL6 foram isoladas macerando-se o tecido em meio RPMI 1640 (Gibco) sobre um filtro com poro de 100 μ m. As células isoladas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e as hemáceas foram lisadas com tampão de lise por 5 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas, contadas e ressuspensas a $6,5 \times 10^6$ /mL em RPMI contendo 10 % de soro fetal bovino. Em uma placa de 96 poços, as células do baço foram plaqueadas em triplicata e incubadas por 24 horas com os ligantes (2-desoxiestreptamina e neamina) e com os compostos estudados (Benznidazol, Ru(desoxiestreptamina), Ru(neamina), $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$) em diferentes concentrações ($3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a 1 mmol.L^{-1}) em PBS (preparado com NaCl $0,14 \text{ mmol.L}^{-1}$, KCl $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,88 \text{ mmol.L}^{-1}$ e Na_2PO_4 $6,4 \text{ mmol.L}^{-1}$). O Bz foi utilizado como droga de referência e Tween-20 foi utilizado como controle positivo para mortalidade das células. Após o período de incubação, as células foram lavadas e incubadas com iodeto de propídio na concentração de 10×10^{-6} g/mL. A aquisição das células foi realizada dentro de 15 minutos utilizando-se um citômetro de fluxo (FACSCantoII – BD) e a análise dos dados foi feita através do programa FlowJo (Tree Star).

4.8.4 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro*

Foi avaliada a atividade tripanocida *in vitro* dos diferentes compostos contra a cepa Tulahuen lacZ. Células LLCMK₂ foram ressuspensas em meio RPMI sem vermelho de fenol (Gibco) contendo 10 % de soro bovino fetal e antibióticos a uma concentração de 2×10^3 células/poço e foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas. As células foram infectadas com 1×10^4 tripomastigotas da cepa Tulahuen lacZ e, após 24 horas as células foram incubadas, em triplicatas, com os compostos benznidazol, Ru(desoxiestreptamina), Ru(neamina), $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ em diluições seriadas ($1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $2,4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).

O Bz foi utilizado como controle positivo e apenas o meio de cultura como controle negativo. Após cinco dias foi adicionado 50,0 μL de PBS contendo 0,5 % de Triton X-100, para lise das células e $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CPRG (do inglês, Chlorophenol Red- β -D-galactoside), como substrato para a β -galactosidase. As placas foram incubadas a $37,0 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 4 h e a absorbância foi lida a 570 nm. Quanto mais parasitos nos poços de cultura, maior a conversão da CPRG pela β -galactosidase e, conseqüentemente, maior a leitura no espectrofotômetro. A quantificação da atividade da β -galactosidase no poço é diretamente proporcional ao número de parasitas, e esta é quantificada no leitor de Elisa.

4.8.5 Teste *in vivo*: Inoculação nos animais e tratamento

Camundongos Swiss fêmeas de 6 a 8 semanas foram infectados intraperitonealmente com 2000 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y diluídas em 0,2 mL de PBS. Os camundongos, de 25,0 a 30,0 g, foram divididos em 3 grupos e tratados por gavagem, a partir do 5º dia de infecção durante 10 dias consecutivos, com PBS ou 400 μmol /dia de Bz que é equivalente a 0,10 g/dia ou 0,4 μmol /dia que é equivalente a $4,0 \times 10^{-4}$ g/dia do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$. A sobrevivência foi acompanhada e a parasitemia foi observada em sangue coletado da ponta da cauda e examinado ao microscópio (400 $\times$) para a contagem dos parasitos. A parasitemia foi determinada em dias alternados (7, 9, 11 e 13º) após o quinto dia de infecção nos três grupos ($n=7$), até que os animais controlassem a parasitemia ou morressem. Foram coletados 5,0 μL de sangue de um pequeno corte na cauda e colocados sobre uma lâmina, recobrimo com lamínula de 22x22 mm. A preparação foi levada ao microscópio óptico com contraste de fase onde a contagem do número de parasitas foi feita em 100 campos, com um aumento final de 400 $\times$, como previamente descrito (MELO & BRENER, 1978).

4.9 Síntese dos complexos de rutênio

4.9.1 Obtenção dos complexos de rutênio *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ e *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃

4.9.1.1 Extração do benznidazol

Para obtenção do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ o ativo benznidazol foi extraído de comprimidos, produzidos pela LAFEPE.

Em um cadinho macerou-se 10 comprimidos cada um contendo 0,10 g de benznidazol. O pó foi adicionado a um béquer e acrescentou-se 50,0 mL de acetonitrila, a fim de solubilizar apenas o princípio ativo. Em seguida, filtrou-se a solução, o filtrado foi rotoevaporado e o sólido foi obtido. A massa obtida foi de 0,95 g representando um rendimento de 95 %.

4.9.1.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃

A rota sintética do complexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ é formada por quatro etapas (Esquema 1).

Esquema 1: Rota sintética do complexo de rutênio *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.

Etapa 1: *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O (DWYER *et al.*, 1963)

Em um balão de 50,0 mL contendo 8,0 mL de dimetilformamida, adicionou-se 1,00 g de cloreto de rutênio(III) (RuCl₃.3H₂O), 1,20 g de 2, 2'-bipiridina (bpy) e 1,10 g de cloreto de lítio (LiCl). Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento por banho de glicerina. A solução atingiu o refluxo a uma temperatura de 130,0 °C e permitiu a reação por um tempo de 8 horas. Ao término do tempo de reação, desligou-se o aquecimento e a seguir, o balão foi levado à geladeira por 1 hora. A solução foi filtrada e o sólido escuro recuperado foi lavado com várias porções de éter. A massa obtida do composto *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O foi de 1,45 g. Rendimento de 73 %.

Etapa 2: *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O (GODWIN & MEYER, 1971)

Um volume de 60,0 mL de água destilada, contida em um balão de 250,0 mL de 2 bocas, foi submetido a borbulhamento de argônio por um período de 15 min para retirada de oxigênio. Foram dissolvidos, neste balão, 0,20 g do composto *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O (obtido na etapa 1), o qual foi submetido a aquecimento a 80,0 °C. Após 15 min, a solução quente foi filtrada e ao filtrado adicionou-se 0,90 g de NaNO₂ previamente dissolvido em água destilada e desaerada. Deixou-se reagindo durante 90 min. Colocou-se o balão sob refrigeração por 1 hora, filtrou-se e obteve-se um sólido vermelho intenso, o qual foi lavado com várias porções de éter. A massa obtida do composto *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O foi de 0,20 g. Rendimento de 90 %.

Etapa 3: *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)](PF₆)₂ (GODWIN & MEYER, 1971)

Suspendeu-se em 24,0 mL de metanol uma massa de 0,20 g do composto *cis*-[Ru(NO₂)₂(bpy)₂].H₂O (obtido na etapa 2). Sem aquecimento e sob agitação, gotejou-se 1,6 mL de HPF₆ concentrado. Após 15 min, filtrou-se a solução e o sólido amarelo retido foi lavado com metanol e éter. A massa obtida do composto *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)](PF₆)₂ foi de 0,23 g. Rendimento de 85 %.

Etapa 4: *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃

Uma massa de 0,23 g ($2,93 \times 10^{-4}$ moles) do composto *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)](PF₆)₂ (obtido na etapa 3) foi dissolvida em cerca de 15,0 mL de acetona. Gotejou-se uma solução de 0,02 g ($2,93 \times 10^{-4}$ moles) de azida de sódio (NaN₃) dissolvida em 5,0 mL de metanol. Após 10 min acrescentou-se uma massa de 0,25 g ($9,6 \times 10^{-4}$ moles) do ligante benznidazol previamente dissolvido em 15,0 mL de acetona e deixou-se reagir sob agitação e temperatura de 50,0 °C durante 24 horas. Ao término do tempo da

reação, acrescentou-se éter em excesso e colocou-se o balão no congelador por 1 hora, filtrou-se o sólido retido no filtro e posteriormente lavou-o com porções de éter, ressuspensando-o em 20,0 ml de acetonitrila. A esta solução adicionou-se 1,0 mL de HPF_6 concentrado, deixando reagir por 15 min. Adicionou-se éter em excesso e após o balão ficar 1 hora no congelador a solução foi filtrada. O sólido retido no filtro (*cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$) foi pesado e a massa foi de 0,16 g. Rendimento de 70 %.

4.9.1.3 Síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$

Dissolveu-se 0,20 g de *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{NO})]\text{PF}_6$ em 15,0 mL de acetona com agitação e temperatura de 50,0 °C, gotejou-se uma solução de azida de sódio ($1,50 \times 10^{-2}$ g) previamente dissolvida em metanol. Em seguida, adicionou-se o benznidazol (0,12 g) previamente solubilizado em 5,0 mL de acetona. A reação ocorreu durante 12 horas. Ao término da reação acrescentou-se NH_4PF_6 para precipitar e deixou na geladeira overnight. O sólido obtido foi centrifugado e lavado com etanol. Massa obtida foi de 0,15 g. Rendimento de 70 %.

4.9.2 Obtenção dos complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)

4.9.2.1 Obtenção dos ligantes neamina e 2-desoxiestreptamina

As estruturas dos ligantes neamina e 2-desoxiestreptamina podem ser visualizadas na Figura 5.

4.9.2.2 Obtenção do composto bromidrato de 2-desoxiestreptamina (LEACH & TEETERS, 1952)

Sulfato de neomicina comercial (5,00 g) foi dissolvido em 50,0 mL de ácido bromídrico (HBr 48 %) e submetido a uma temperatura de aproximadamente 100,0 °C (refluxo) permanecendo sob agitação durante 5 dias. O meio reacional foi seco em rotoevaporador, sendo tratado com água e rotoevaporado 3 vezes a 60,0 °C. O resíduo preto pastoso que ficou grudado no balão foi então tratado com água (aproximadamente 30,0 mL) e carvão ativo durante duas horas sob agitação em temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se a filtração do material em celite com funil de placa de vidro sinterizado de média porosidade, e lavado com água (aproximadamente 20,0 mL). O filtrado foi seco e formou um sólido avermelhado, o qual foi concentrado em alto vácuo para retirar o máximo possível de água e então lavado com metanol e filtrado em funil de placa sinterizada para maior

clarificação do produto, fornecendo 1,60 g de bromidrato de 2-desoxiestreptamina (rendimento 89 %).

4.9.2.3 Obtenção da neamina base livre (LEACH & TEETERS, 1951)

Metanol (250,0 mL) foi saturado com gás de ácido clorídrico (gerado pelo gotejamento de ácido sulfúrico concentrado sobre cloreto de sódio analítico e seco em “trap” com sílica azul) até verificação de $\text{pH} < 1$, avaliado em papel de tornassol.

Sulfato de neomicina (1,00 g) foi dissolvido no metanol ácido e este sistema foi submetido a refluxo, em temperatura média de 80,0 °C, por 3 horas. Em seguida, o meio reacional foi resfriado a 0,0 °C e tratado com éter etílico (40,0 mL) para formar um precipitado branco floculento que foi separado por filtração e lavado várias vezes com éter etílico. O produto (cloridrato de neamina bruto) foi seco em alto vácuo e gerou 0,40 g.

Cloridrato de neamina bruto foi purificado pelo método de Botton e Coxon que consiste em sua dissolução em metanol (0,20 g/mL) seguida pela “titulação” da solução obtida com éter etílico até a verificação da turvação da solução. A fração insolúvel foi removida através da filtração em filtro com placa de vidro sinterizado de média porosidade, sob pressão de N_2 . A pureza da solução foi monitorada através de cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel empregando metanol - acetona 2:1 como fase móvel. O procedimento de purificação foi repetido até a remoção do hexacloridrato de neomicina (R_f 0,05). Através deste método o cloridrato de neamina (0,40 g) (R_f 0,40) foi obtido com ótimo grau de pureza. O rendimento após a purificação variou entre valores de 70 a 80 %. Para obtenção de neamina na forma de base livre foi empregado uma coluna de troca iônica Dowex $\text{Cl}^- \leftrightarrow \text{OH}^-$. A solução foi rotoevaporada e seca em alto vácuo por 2 dias.

4.9.2.4 Síntese dos Complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina)

A rota sintética dos complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina) envolve 2 etapas.

Etapa 1: Síntese do precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$ (ALLEN & SENOFF, 1967)

Foram dissolvidos 5,00 g de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 60,0 mL de água destilada em um balão de 500,0 mL de duas bocas. Utilizando um funil de adição, gotejou-se lentamente 180,0 mL de hidrazina 25 % ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) durante 2 h e 30 min e deixou-se a solução sob vigorosa agitação por mais 1 h e 30 min. O balão foi resfriado em um banho de gelo. Gotejou-se lentamente, através do funil de adição, 160,0 mL de HCl concentrado durante

aproximadamente 1 hora. Retirou-se o banho de gelo e iniciou-se o aquecimento. Após o refluxo ser atingido ($\approx 100,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) deixou-se a reação ocorrer por mais 3 horas. Desligou-se o aquecimento e após seu resfriamento, levou-se o balão à geladeira por 2 horas. Filtrou-se a solução e o sólido amarelo foi lavado com porções de etanol e porções geladas de HCl $0,1\text{ mol.L}^{-1}$. Após a sua secagem a vácuo, o sólido foi pesado. A massa obtida foi de 3,10 g. Rendimento de 56 %.

Etapa 2: síntese dos complexos

Em 1995, da Silva e colaboradores desenvolveram a síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{diox-COO})]$, semelhante ao desenvolvido neste trabalho. No entanto, os ligantes catecólicos descritos foram substituídos neste trabalho pelos ligantes 2-desoxiestreptamina e neamina.

$[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$ (0,50 g; $1,7\text{ mmol.L}^{-1}$) foi dissolvido em 20,0 mL de NH_4OH (28 %), sob atmosfera de argônio, com agitação e refluxo a $55,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Em seguida, pesou-se o ligante (bromidrato de 2-desoxiestreptamina ou neamina base livre; $3,4\text{ mmol.L}^{-1}$) e solubilizou-se em 20,0 mL de NH_4OH (28 %), posteriormente adicionou-se à solução do complexo de rutênio. A mistura permaneceu a $60,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h e 30 min, sob atmosfera de argônio, refluxo e agitação. Após resfriamento adicionou-se éter à solução reacional, para evitar a adesão do complexo na parede do balão. Escolheu-se o éter porque ele não provoca a precipitação, formando assim um sistema bifásico. Adicionou-se 15,0 mL de acetona na fase aquosa a fim de induzir a precipitação do complexo formado, por não ocorrer precipitação adicionou-se metanol. Armazenou-se no freezer overnight. O precipitado foi filtrado a vácuo. Rendimento de 46% para o complexo $\text{Ru}(\text{desoxiestreptamina})$ e 53% para o complexo $\text{Ru}(\text{neamina})$.

4.10 Análise estatística

As determinações da IC_{50} (concentração que inibe em 50% a viabilidade dos parasitas) foram realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS *et al.*, 1989) utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00,2000). A análise estatística utilizada para comparação entre os valores de IC_{50} foi a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Newman-keuls pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.00,2000). Valores com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

5 Resultados e Discussão

5.1 Parte 1

5.1.1 Extração do benznidazol

A extração do benznidazol foi realizada utilizando acetonitrila para solubilizar o ativo e não os excipientes contidos no comprimido, além de ser de fácil evaporação.

Foram realizadas análises espectroscópicas de UV-vis e infravermelho, CLAE e análise elementar, com o objetivo de caracterizar e determinar a pureza do sólido obtido pelo método de extração; os valores foram comparados com o Bz padrão, comprado da Sigma Aldrich. A Tabela 2 contém os dados referentes à análise elementar de C, H e N do benznidazol extraído.

Tabela 2: Análise elementar percentual teórica (Teor) e experimental (Exp) de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

Composto	%C		%N		%H	
	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.
Benznidazol	55,38	55,11	21,52	21,51	4,64	4,66

Na Figura 8 está representado o espectro de UV-vis do benznidazol, o qual apresenta uma banda intensa em 320 nm que é caracterizada como transição interna do ligante. Não se verificou diferença entre os espectros de benznidazol padrão e daquele obtido pela extração do comprimido.

Figura 8: Espectro na região do UV-vis do benznidazol, $2,4 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, em acetonitrila.

A Figura 9 apresenta o cromatograma do benznidazol extraído, obtido por CLAE, utilizando-se uma fase móvel de 50 % água e 50 % ACN, sob fluxo de 1 mL/min. Comparou-se os espectros de UV-vis e os tempos de retenção do benznidazol padrão e daquele extraído. Não houve diferença entre os parâmetros comparados e devido a existência de apenas um pico no cromatograma, confirmou-se a pureza do benznidazol extraído.

Figura 9: Cromatograma do benznidazol em micro unidades arbitrárias (mAU) por minuto (min) e leitura em 320 nm. Painel superior direito: espectro de UV-vis do benznidazol.

5.1.2 Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆

As sínteses destes complexos foram baseadas na rota descrita por SAUAIA & da SILVA (2003). Complexos nitrosilos de rutênio são geralmente descritos como Ru(II) e o ligante como NO⁺ (GUENGERICH & SCHUG, 1978; BOTTOMLEY, 1978; WALSH *et al.*, 1980; BORGES *et al.*, 1998). Neste trabalho, o complexo nitrosilo (Figura 10 - A) foi obtido a partir da acidificação do precursor que contém íon nitrito (NO₂⁻) coordenado ao Ru(II) (Figura 10 - B). Essa reação é reversível e depende do pH. Por isso é tratada por muitos autores como um equilíbrio ácido-base (GODWIN & MEYER, 1971; KEENE *et al.*, 1977; CALLAHAN & MEYER, 1977; PIPES & MEYER, 1984; TOGANO *et al.*, 1992; ASSEFA & STANBURY, 1997; BIGNOZZI *et al.*, 1993; NAGAO *et al.*, 1999).

Na obtenção do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ (Figura 10 - A) a inserção do ligante benznidazol na esfera de coordenação do íon metálico Ru(II), descrita no item 4.9.1.2 – etapa 4 - de Materiais e Métodos, ocorre após reação de redução do ligante NO⁺ da espécie *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(NO)]²⁺ com azida de sódio. O ataque nucleofílico do íon azoteto é esperado em complexos nitrosilo de rutênio em que o ligante nitrosilo possui forte caráter

eletrofílico (WALSH *et al.*, 1980; DEB *et al.*, 1988; BORGES *et al.*, 1998). Posteriormente após a redução do NO^+ ocorre a formação do NO^0 que é liberado, possibilitando a coordenação da molécula de solvente (S), como podemos observar no Esquema 2 abaixo:

Esquema 2: Etapas reacionais do processo de redução do NO^+ e coordenação do ligante benzimidazol (L) ao complexo de rutênio.

Para a obtenção do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ (Figura 10 - B) algumas modificações foram realizadas em relação à síntese descrita por SAUAIA & da SILVA (2003), como por exemplo, a forma de precipitar o complexo, resultando em maior rendimento e conferindo ao complexo melhor solubilidade em água.

Figura 10: Estrutura química dos complexos $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ em **A** e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ em **B**.

5.1.3 Análise elementar

Os resultados de microanálise para os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆, apresentados na Tabela 3, possibilitam inferir que a fórmula proposta é coerente com a descrição molecular dos complexos. Os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ evidenciam a existência de 2 moléculas de benznidazol, possivelmente solvatando o complexo de rutênio. Para o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆, a análise elementar levou a consideração da presença de 4 moléculas de água. Uma forma de confirmar tal hipótese foi avaliando o complexo por CLAE, como pode ser observado no item 5.1.7 – Figura 18.

Tabela 3: Análise elementar percentual teórica (Teor) e experimental (Exp) de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

Complexo	%C		%N		%H	
	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃ .2Bz	40,54	42,81	14,35	15,79	3,16	3,63
<i>cis</i> - [Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆ .4H ₂ O	41,03	39,25	13,45	12,88	3,87	3,07

5.1.4 Espectroscopia na região do UV-vis

Os espectros de absorção na região do UV-vis de complexos de rutênio(II) com ligantes insaturados coordenados apresentam bandas na região do visível atribuídas a transições de campo ligante (CL), transferência de carga metal ligante (TCML) e bandas na região do ultravioleta que são atribuídas a transições interna dos ligantes insaturados (IL) (LEVER, 1984). A Figura 11 ilustra o diagrama de orbitais moleculares de um complexo de rutênio(II) e suas possíveis transições eletrônicas.

Figura 11: Diagrama simplificado de orbitais moleculares para representar os tipos de transições eletrônicas em complexos octaédricos. As linhas tracejadas ligam o orbital molecular ao orbital atômico que melhor o caracteriza (BALZANI & CARASSITE, 1970). (*) esse orbital pode ser ligante, não ligante ou antiligante, segundo o composto formado.

- (1): transição de campo ligante (CL) - é observada entre níveis energéticos localizados no metal. As bandas são originadas pelo desdobramento das energias dos orbitais d (transições $d \rightarrow d$), que num campo octaédrico podem ser designados por t_{2g} e e_g .
- (2a, 2b, 2c, 2d): transição de transferência de carga ou elétron do ligante para o metal (TCLM) – esse tipo de transferência é comum acontecer com íons metálicos mais oxidados, como por exemplo Ru^{III} . Essa transição origina bandas observadas na região do ultravioleta e do visível.
- (2e, 2f): transição de transferência de carga ou elétron do metal para o ligante (TCML) - caracteriza-se por uma ligação π verificada nos compostos de rutênio com ligantes insaturados.
- (3): transição interna do ligante (IL) - é semelhante às transições observadas nos ligantes insaturados não coordenados. Por exemplo, os ligantes aromáticos N-heterocíclicos livres ou coordenados, geralmente apresentam na região do ultravioleta próximo e médio bandas de transição eletrônica atribuídas a $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. As transições envolvendo os elétrons livres (n) ocorrem em regiões de maior comprimento de onda e são relativamente fracas. As transições envolvendo os elétrons π são bastante intensas e semelhantes às observadas para os hidrocarbonetos aromáticos correspondentes.

O rutênio(II) tem configuração $(t_{2g})^6$ e comporta-se como um íon metálico π -doador e

tem preferência por ligantes insaturados como as bipyridinas. O benznidazol, cujo nome de acordo com a IUPAC é N-benzyl-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamida, possui nitrogênio insaturado que facilita sua coordenação ao rutênio(II), apresentando uma banda em 320 nm referente a transições interna do ligante.

Em complexos metálicos a molécula de NO se liga ao centro metálico através do nitrogênio e essa ligação envolve a doação de densidade eletrônica dos orbitais π^* do nitrosilo e os orbitais $d\pi$ (t_{2g}) e σ^* (eg) do metal. O NO pode existir em 3 estados de oxidação diferentes: NO^+ , NO^0 , NO^- . Complexos octaédricos com 6 elétrons associados com os orbitais “d” do metal são descritos como ligados ao cátion nitrosilo (NO^+).

Pode-se observar, na Figura 12, em preto, o espectro de absorção na região de UV-vis do complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆, com bandas na região do ultravioleta, 242 nm e 284 nm, que foram atribuídas à transição interna $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes insaturados (bpy, Bz). Este espectro está em concordância com o espectro de seu precursor, *cis*-[RuCl₂(bpy)₂].2H₂O, cujo comportamento espectroscópico foi estudado por Meyer e colaboradores (BRADDOCK & MEYER, 1973; JOHNSON *et al.*, 1978). A banda na região do visível, com λ_{max} em 450 nm, é atribuída à TCML e devido às transições $d_{\pi}(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2)$, ou $d_{\pi}(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ e ou $d_{\pi}(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{Bz})$.

Na Figura 12, em vermelho, o espectro do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃, apresenta uma banda na região do ultravioleta em 290 nm, que é atribuída à transição interna $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes insaturados, e um ombro em 325 nm, pode ser atribuído à transferência de carga metal ligante TCML devido a transição $d_{\pi}(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$ ou $d_{\pi}(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ e ou $d_{\pi}(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{Bz})$, em comparação a espécies similares (SAUAIA, 2003).

O deslocamento da banda de 450 nm (NO_2^-) para um menor comprimento de onda, identificado pelo ombro em 325 nm (NO^+), com a redução do pH, ocorre devido a estabilização dos orbitais moleculares do complexo pelo NO, dado à forte retrodoação existente entre o metal e o NO (Figura 4). Este comportamento é coerente àqueles publicados anteriormente para espécies similares (SAUAIA, 2003).

Figura 12: Espectro de absorção na região do UV-vis dos complexos *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ (em preto), $4,86 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, e *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ (em vermelho), $6,16 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato (pH= 7,4).

Os dados espectrofotométricos dos complexos na região do ultravioleta e visível estão relatados na Tabela 4.

Tabela 4: Análise espectrofotométrica, na região do UV-vis, dos complexos de rutênio.

Complexo	λ , nm (log ϵ , mol.cm ⁻¹)
<i>cis</i> -[Ru(NO ₂)(bpy) ₂ (Bz)]PF ₆	242, 285 (4,55), 451 (3,79)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (Bz)(NO)](PF ₆) ₃	292(4,49) e 320 (4,21)

Legenda: λ = comprimento de onda; ϵ = absorvidade molar.

5.1.5 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foi utilizada principalmente, na caracterização relativa a coordenação dos ligantes insaturados ao íon metálico Ru(II).

Na Figura 13 - A está representado o espectro na região do infravermelho do benznidazol, o qual confere com o descrito na literatura (LIMA, Á. A.N *et al.*, 2011), apresentando fortes bandas referentes ao anel aromático $\nu(\text{C-H})$ de $3150 \text{ cm}^{-1} - 3050 \text{ cm}^{-1}$ e estiramento fora do plano de $900 - 690 \text{ cm}^{-1}$. Os estiramentos (C=C) do anel aromático aparecem na região de $1600-1475 \text{ cm}^{-1}$. Forte absorção é observada no espectro FTIR em

1660 cm^{-1} , que foi atribuída como devido à vibração da carbonila, que normalmente aparece na região de 1680 cm^{-1} (NAKAMOTO, 1986).

O estiramento de $\nu(\text{NO}_2)$ para o benznidazol foi observado em 1400 cm^{-1} e 1556 cm^{-1} , e o estiramento $\nu(\text{NH})$ em 3275 cm^{-1} , os quais seguem as características de substâncias descritas para espécies contendo estes grupamentos (NAKAMOTO, 1986).

Figura 13: (A) Espectro do benznidazol na região do infravermelho, em pastilha de KBr. (B) Estrutura química do benznidazol.

Nos estudos envolvendo complexos nitrosilos, a técnica de absorção na região do infravermelho ganha significância ainda maior, pois permite a caracterização do estado de oxidação do ligante óxido de nitrogênio, bem como permite avaliar os efeitos derivados da coordenação de co-ligantes ao íon Ru(II) , sob a densidade eletrônica do NO. A energia da banda vibracional deste ligante está diretamente relacionado ao caráter eletrofílico do complexo, o que também nos permite inferir sob a estabilidade do complexo em função do pH. Para complexos contendo o fragmento $\{\text{Ru-NO}\}^{3+}$, a presença da coordenação do NO^+ ao íon Ru(II) é caracterizado pela existência de banda vibracional na região de $1800 - 1970\text{ cm}^{-1}$ (TFOUNI *et al.*, 2003). A variação da frequência de estiramento $\nu(\text{NO})$ em compostos de coordenação depende do metal, dos co-ligantes e da estereoquímica do ligante NO (SCHRÖDER & STEPHENSON, 1987; BATISTA *et al.*, 1997; FORD *et al.*, 1998).

Na Figura 14, em vermelho, o FTIR do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ apresenta estiramento do ligante NO⁺ coordenado em 1942 cm⁻¹. A forte banda referente à função carbonila do ligante benznidazol coordenado apresenta estiramento em 1664 cm⁻¹.

Em comparação ao ligante Bz livre, houve um deslocamento de 4 cm⁻¹ para maior energia. Isto é consistente com a coordenação do ligante Bz ao íon Ru(II). A ligação sigma Bz-Ru(II), tem efeito retirador de densidade eletrônica do ligante e, consequentemente, fortalece as ligações internas do ligante. A análise desconsidera efeito de alteração estrutural do ligante Bz, o que, seguramente, também contribui para o efeito observado.

Em relação à vibração pertinente ao grupamento R-NO₂, ocorre semelhança de energias vibracionais $\nu(\text{NO}_2)$ que praticamente não se alteram e são observadas em 1557 cm⁻¹ e 1405 cm⁻¹. Em princípio, o efeito de coordenação do grupamento pirazínico ao rutênio(II), embora próximo ao grupamento NO₂, tem pouca influência na densidade eletrônica deste substituinte.

Semelhante análise foi realizada para o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ (Figura 14 - em preto), o qual apresenta bandas referente ao estiramento $\nu(\text{NO}_2)$ assimétrico em 1551 cm⁻¹ e estiramento simétrico em 1408 cm⁻¹. O estiramento referente à função carbonila do benznidazol coordenado foi observado em 1660 cm⁻¹.

Figura 14: Espectro na região do infravermelho dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ (em vermelho) e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ (em preto), em pastilha de KBr.

Os dados de infravermelho e o caráter mole do ligante Bz do sítio pirazínico, nos permite inferir que o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})]^{3+}$ deve apresentar a estrutura conforme Figura 10 – A.

A energia vibracional do ligante nitrosilo é semelhante às espécies $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})]^{3+}$, Quadro 2, que mostra que os co-ligantes coordenados ao Ru(II) influenciam de maneira semelhante a retrodoação para NO^+ . Isto posto, pode-se inferir um forte caráter eletrofílico do ligante NO^+ coordenado em $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})]^{3+}$.

Quadro 2: Energia vibracional ν_{NO} para complexos de rutênio.

Complexo	$\nu_{\text{NO}} (\text{cm}^{-1})$ em KBr
^a $cis\text{-}[\text{Ru}(4\text{-pic})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	1944
^a $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	1947
^a $cis\text{-}[\text{Ru}(4\text{-acpy})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	1943

a) SAUAIA & da SILVA, 2003.

5.1.6 Voltametria Cíclica

O comportamento voltamétrico para os complexos $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ e $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ foram estudados em acetonitrila contendo hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAH) como eletrólito suporte. Com base em alguns estudos realizados anteriormente (SAUAIA & da SILVA, 2003; DEB *et al.*, 1988; NAGAO *et al.*, 1989), espera-se que o complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ apresente um comportamento eletroquímico, na janela de potencial do solvente, centrado no ligante nitrosilo.

Na Figura 15 está representado o voltamograma cíclico do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$, o qual apresentou 2 processos redox. Os processos eletroquímicos envolvidos foram semelhantes ao do complexo $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{2+}$ (SAUAIA, 2003).

O voltamograma cíclico do complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ foi iniciado em +0,5 V (vs Ag/AgCl) conduzido para potencial negativo, revertido em -0,7 V (vs Ag/AgCl) e conduzido novamente para potencial positivo até atingir +0,7 V (vs Ag/AgCl), utilizando velocidade de varredura de 0,1 V/s.

Figura 15: Voltamograma cíclico do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ em acetonitrila. Eletrólito suporte: TBAH 0,1 mol.L⁻¹. Potencial de reversão: -0,7 V (vs Ag/AgCl). [complexo]= 1.10⁻³ mol.L⁻¹.

O voltamograma cíclico exibiu uma onda catódica (1c), em torno de 0,2 V (vs Ag/AgCl), juntamente com uma onda anódica (1a) na varredura reversa, em torno de 0,37 V (vs Ag/AgCl). Esse processo ocorreu conforme o esperado e, por analogia com outras espécies (SAUAIA & SILVA, 2003; NAGAO *et al.*, 1989; DEB *et al.*, 1988), pode ser atribuído ao processo eletroquímico centrado no grupo nitrosilo (NO⁺/NO⁰). Com relação ao segundo processo eletroquímico 2c/2a (NO⁰/NO⁻) pode - se inferir que ocorre uma reação química acoplada, devido ao processo ser não reversível (Esquema 3).

Os potenciais de meia onda para os processos eletroquímicos centrados no ligante nitrosilo são dados na Tabela 5. Comparação às espécies similares e coerente com a análise do FTIR, mostra que os processos redox centrado no ligante nitrosilo, sofre o mesmo efeito relativo a retrodoação Ru(II)-NO.

Esquema 3: Processos eletroquímicos centrados no ligante nitrosilo para o complexo $\text{cis-}[\text{RuL}(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{3+}$, onde L = benzimidazol.

Tabela 5: Potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) em volts (V) para os processos eletroquímicos centrados no grupo nitrosilo.

Complexo	$E_{1/2} (\text{NO}^{+/0})$	$E_{1/2} (\text{NO}^{0/-})$
$\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	0,288 V	-0,454 V

De acordo com a literatura (CALLAHAN & MEYER, 1977; KEENE, *et al.*, 1979; NAGAO *et al.*, 1994) é possível que tenha ocorrido a formação do complexo com nitrito coordenado após o processo de redução do ligante NO^0 , em meio não aquoso, conforme a reação química representada no Esquema 4. Para ocorrer esta reação, necessita-se de uma fonte de oxigênio, que pode ser um átomo presente no grupo nitrosilo de uma outra molécula do composto ou traços de O_2 existentes em solução.

Esquema 4: reação química acoplada ao processo eletroquímico do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$.

O voltamograma cíclico da Figura 16 - A confirmou a existência de uma reação eletroquímica acoplada, formando possivelmente o complexo com nitrito coordenado. Iniciando o voltamograma cíclico em 0,6 V (vs Ag/AgCl), conduzindo para um potencial positivo, revertendo em 1 V (vs Ag/AgCl) e conduzindo novamente para potencial negativo até atingir -1 V (vs Ag/AgCl), utilizando-se velocidade de varredura de 0,1 V/s, nota-se o par de picos 3c/3a que é atribuído ao processo de oxidação do NO^-/NO_2 (Esquema 4).

A Figura 16 – B apresenta o voltamograma cíclico iniciando em -0,5 V (vs Ag/AgCl) conduzindo para um potencial positivo, revertido em 1 V (vs Ag/AgCl) e conduzindo novamente para potencial negativo até atingir -0,6 V (vs Ag/AgCl), utilizando-se velocidade de varredura de 0,1 V/s, evidencia-se a formação de um par de picos 4a/4c, que possui um potencial de oxidação em +0,78 V (vs Ag/AgCl). Esse pico pode ser atribuído à oxidação do Ru(II) para Ru(III). Acredita-se, porém, que esta reação seja muito lenta para o tempo do grupo nitrosilo. Isso explica o aparecimento, mesmo em lentas velocidades de varredura, dos picos anódicos denominados de 2a e 1a que são referentes à oxidação do ligante $\text{NO}^{-/0}$ e $\text{NO}^{0/+}$, respectivamente.

Figura 16: Voltamograma cíclico do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ em acetonitrila. Eletrólito suporte: TBAH 0,1 mol.L⁻¹. Potencial de reversão: 1 V (vs Ag/AgCl). [complexo]= 1.10⁻³ mol.L⁻¹.

5.1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Um dos objetivos iminentes deste trabalho é relativo a ensaios biológicos dos complexos contendo Bz coordenado. Assim sendo, fez-se necessário utilizar técnicas sensíveis de análise, a fim de se verificar a qualidade da solução oriunda da dissolução dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)]³⁺ e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]⁺. Desta forma o ligante Bz e os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆.4H₂O foram analisados por CLAE a fim de verificar a pureza dos mesmos.

A Figura 17 representa o cromatograma do benznidazol eluído em fase móvel constituída de 40 % de ACN e 60 % de água contendo 0,1 % de HTFA, pH = 7,0, sob um fluxo de 1,0 mL/min e leitura em $\lambda = 320$ nm. Observou-se no cromatograma que o tempo de retenção foi de 6,47 minutos, apresentando apenas 1 pico e confirmando a pureza do ligante.

Figura 17: Cromatograma do benznidazol em micro unidades arbitrárias (mAU) por minuto (min) e leitura em 320 nm. Painel superior esquerdo: espectro de UV-vis do benznidazol.

A Figura 18 - A representa o cromatograma do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz eluído nas mesmas condições que o ligante benznidazol. Observou-se que o tempo de retenção do complexo foi de 4,58 minutos e a identidade do complexo foi confirmada pelo espectro de UV-vis (Figura 18 – painel B). É válido ressaltar que, conforme a análise elementar do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz, identificamos a existência de benznidazol solvatando o complexo, representado na fórmula molecular pelo 2Bz. Essa hipótese pode ser confirmada pela CLAE devido à presença do pico no tempo de retenção de 6,58 min referente ao benznidazol confirmado pelo espectro de UV-vis.

Observou-se, no cromatograma, a existência de um pico no tempo de retenção de 3,2 min que pode ser resquícios do complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O complexo de rutênio precursor $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi analisado por CLAE, apresentando um tempo de retenção de 3,1 minutos, nas mesmas condições acima citadas (dados não mostrados).

Pode-se confirmar que em pH 7,0 o complexo se encontra em maior proporção na forma de $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})]^{3+}$ representado pelo pico de maior amplitude em 4,58 minutos. Os outros picos observados na Figura 18 - A possivelmente correspondem a equilíbrios químicos dependentes do pH. Pode-se inferir a partir dos espectros de UV-vis que existe a formação da espécie $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]^+$, em menor proporção, cujo tempo de retenção é de 3,8 min. O pico com o tempo de retenção de 5,6 min provavelmente refere-se à espécie $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{NO})]^{+2}$, confirmado pelo espectro de UV-vis (dados não mostrados).

Figura 18: Cromatograma do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3 \cdot 2\text{Bz}$ em micro unidades arbitrárias (mAU) por minuto (min) (painel A). Fase móvel de 40:60 (ACN: água) contendo 0,1 % de HTFA, pH = 7,0. Leitura em 305 nm. O pico com o tempo de retenção em 3,29 min corresponde ao precursor $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O pico com o tempo de retenção em 3,88 min corresponde ao complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]^+$. O pico com o tempo de retenção em 4,58 min corresponde ao complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})]^{3+}$ cujo espectro UV-vis encontra-se no painel B. O pico com o tempo de retenção em 6,52 min corresponde ao benznidazol.

A Figura 19 - A representa o cromatograma do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz eluído em fase móvel de 40 % de ACN e 60 % de água contendo 0,1 % de HTFA, pH = 3,0. Observou-se, nesta nova condição de pH, o desaparecimento do pico referente à espécie *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]⁺. O tempo de retenção do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz, confirmado pelo espectro de UV-vis (Figura 19 – B) passou de 4,58 minutos para 2,8 minutos. Essa diferença no tempo de retenção se deve à alteração do pH da solução. Por outro lado, independente do pH o ligante benznidazol apresenta o mesmo tempo de retenção de 6,51 minutos, confirmado pelo espectro de UV-vis (Figura 19 – C). A presença dos picos menores refere-se ao equilíbrio químico da espécie precursora remanescente.

Figura 19: Cromatograma do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz em micro unidades arbitrárias (mAU) por minuto (min) (painel A). Fase móvel de 40:60 (ACN: água) contendo 0,1 % de HTFA, pH = 3,0. Leitura em 305 nm. O pico com o tempo de retenção em 2,8 min corresponde ao complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ cujo espectro UV-vis encontra-se no painel B. O pico com o tempo de retenção em 6,51 min corresponde ao benznidazol cujo espectro UV-vis encontra-se no painel C.

A Figura 20 - A refere-se ao cromatograma do complexo *cis*- [Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ que foi eluído em fase móvel de 50 % metanol e 50 % água, com HTFA 0,1 % (pH 7,1), sob fluxo de 1 mL/min. Em contraste com a fase móvel ACN: água essa nova fase móvel proporcionou uma melhor visualização dos picos. Observou-se que o tempo de retenção do complexo foi de 4,17 min e sua identidade química pode ser confirmada pelo espectro UV-vis (Figura 20 – B).

Figura 20: Cromatograma do complexo *cis*- [Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ (painel **A**) em micro unidades arbitrárias (mAU) por minuto (min). Fase móvel de 50:50 (metanol: água) contendo 0,1 % de HTFA, pH = 7,1. Leitura em 465 nm. O pico com o tempo de retenção em 4,17 min corresponde ao complexo *cis*- [Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ cujo espectro UV-vis encontra-se no painel **B**.

Ao compararmos os cromatogramas do Bz, *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz e *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ os tempos de retenção podem ser discutidos conforme a polaridade das espécies, ou seja, complexos com NO₂ são mais polares que complexos que possuem o NO na sua esfera de coordenação. O ligante benznidazol fica mais tempo retido na coluna devido a sua menor polaridade comparada à dos complexos anteriormente citados. Essa técnica foi eficiente para caracterização das espécies existentes.

5.1.8 Ensaio de citotoxicidade e atividade tripanocida

Foram realizados estudos de citotoxicidade a fim de verificar se os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz, *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ e benznidazol apresentam toxicidade para as células esplênicas.

É interessante para a terapêutica da doença de Chagas a descoberta de compostos que não possuam toxicidade para as células do indivíduo a ser tratado, representadas no estudo pelas células esplênicas, e que apresentem atividade exclusivamente tripanocida.

Os estudos em células esplênicas apresentados na Figura 21 indicaram que o benznidazol não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas. Por outro lado, o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz apresentou citotoxicidade nas maiores concentrações (250 µmol.L⁻¹ e 500 µmol.L⁻¹). É válido ressaltar que menores concentrações do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz não apresentaram citotoxicidade e que a condição experimental foi validada com a utilização de um controle negativo, representado pelo meio, e um controle positivo, representado pelo Tween.

Figura 21: Percentual de citotoxicidade do Benznidazol e do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz nas concentrações de 500 µmol.L⁻¹ a 3,5 µmol.L⁻¹. Tween representa o controle positivo de morte celular (lisa as células) e o meio de cultura representa o controle negativo (integridade celular).

Em contrapartida, na Figura 22 estudos da atividade tripanocida *in vitro* utilizando-se a cepa Tulahuen lacZ evidenciaram que o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz apresentou atividade tripanocida extremamente alta, com IC₅₀ menor que 3,5 µmol.L⁻¹.

O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz apresentou-se mais potente que o benznidazol, uma vez que produziu maior efeito tripanocida nas baixas concentrações de 31,25 µmol.L⁻¹, 15,62 µmol.L⁻¹, 7,81 µmol.L⁻¹ e 3,50 µmol.L⁻¹, quando comparado com tais valores para benznidazol. Tal resultado mostra que a coordenação do benznidazol ao complexo de rutênio potencializou a atividade tripanocida, possivelmente devido ao sinergismo entre o mecanismo de ação do benznidazol e do óxido nítrico liberado.

Figura 22: Percentual de atividade tripanocida, dependente de concentração, induzida pelo composto Benznidazol e pelo complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz nas concentrações de 500 µmol.L⁻¹ a 3,5 µmol.L⁻¹. Os pontos representam a média ± EPM do percentual de atividade tripanocida para um “n” amostral de 3 a 9, experimentos realizados em duplicata. (*) indica diferença entre complexo e Bz (p<0,001).

A correlação entre a atividade tripanocida e o potencial de redução eletroquímico do fragmento RuNO⁺/RuNO⁰ com consequente liberação de óxido nítrico foi observado por Silva e colaboradores em 2007. O potencial de redução nos valores mais positivos do par de picos NO⁺/ NO⁰, apresentado na Tabela 5, está relacionado com uma maior atividade tripanocida devido à facilidade do complexo de ser reduzido por agentes biológicos. Quanto mais positivo o potencial, mais facilmente é reduzido e melhor a atividade tripanocida. A redução do complexo *in vitro* ou *in vivo* pode ser atribuída a agentes redutores biológicos como NADPH, grupos sulfidril ou proteínas de transferência eletrônica.

Nossos resultados evidenciam que a coordenação do benznidazol ao complexo nitrosilo de rutênio formando o *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz pode ser um promissor quimioterápico para o tratamento da infecção da doença de Chagas.

Conforme Silva e cols., em 2007, tem sido proposto que complexos de rutênio coordenados a NO₂ também possuem uma alta atividade tripanocida, visto que o NO₂ pode ser convertido a NO por mecanismos redox (Esquema 5).

Esquema 5: Ciclo do potencial catalítico para a conversão do nitrito para óxido nítrico por complexos de rutênio. Fonte: Silva *et al.*, 2007.

Dessa forma, realizamos testes de atividade tripanocida para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ (Figura 23) utilizando menores concentrações do que para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3 \cdot 2\text{Bz}$, uma vez que essas concentrações já produziam um efeito superior às do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$.

Observou-se que o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ apresenta IC_{50} próximo de $0,24 \mu\text{mol.L}^{-1}$, enquanto que o complexo que possui NO apresenta IC_{50} próximo de $3,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Logo, o complexo Ru-NO_2 possui ação mais potente que o complexo Ru-NO , uma vez que necessita de uma menor concentração para induzir morte de 50 % dos parasitas.

Figura 23: Percentual de atividade tripanocida, dependente de concentração, induzida pelo complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ nas concentrações de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $2,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do percentual de atividade tripanocida para um “n” amostral de 3 a 9 experimentos realizados em duplicata.

A maior potência tripanocida do complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ quando comparado com o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃ se deve provavelmente pela conversão do NO₂ a NO ([Ru^{II}NO₂] gera [Ru^{II}NO⁺]) visualizada no Esquema 5. O complexo [Ru^{II}NO⁺] é reduzido e o NO é liberado, enquanto uma molécula de água se coordena ao complexo formando [RuH₂O]⁺². O NO₂⁻ presente no plasma pode chegar a concentrações de 0,5 µmol.L⁻¹.h⁻¹ e a reação entre NO₂⁻ e espécies de rutênio são rápidas e podem ocorrer *in vitro* ou *in vivo*. Logo, espécies de rutênio podem representar reservatórios biológicos de reciclagem de nitrito a óxido nítrico. Quando a concentração do íon hidrogênio é maior que 10 ηmol.L⁻¹ (concentração presente na corrente sanguínea) a conversão de nitrito em NO pode ocorrer conforme proposto por Silva e cols, em 2007. Tal fenômeno pode justificar a melhor atividade tripanocida de complexos de rutênio que possuem NO₂ comparados a complexos que possuem NO.

Dado a superior eficiência tripanocida do complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ sobre o benznidazol e sobre o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃, o mesmo foi selecionado para os estudos *in vivo* (Figura 24).

Foram avaliados o percentual de sobrevida e a parasitemia dos animais quando tratados com o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ (0,4 µmol.dia⁻¹) e benznidazol (400 µmol.dia⁻¹) comparados a animais controle tratados com PBS.

Observa-se na Figura 24 - A que todos os animais tratados com o complexo e com o benznidazol sobreviveram por 60 dias enquanto que os animais tratados com PBS morreram após 18 dias. É interessante ressaltar que o complexo é mais potente que o Bz, pois a concentração utilizada foi 1000 vezes menor que a do Bz e garante os mesmos padrões de sobrevida.

Quando comparado ao grupo controle, tratado com PBS, nenhuma alteração na parasitemia foi desencadeada pelo tratamento com o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ (Figura 24 - B), embora tenha sido observado uma significativa melhora na sobrevida dos animais (Figura 24 - A). Por outro lado, o Bz reduziu a parasitemia, uma vez que sua concentração é 1000 vezes maior que a utilizada para o complexo.

Esses resultados sugerem que os benefícios obtidos com o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆ *in vivo* provavelmente não se deva a redução da parasitemia (forma tripomastigota) mas sim a uma redução da forma amastigota por um mecanismo de proteção de órgãos alvos.

Figura 24: Sobrevida (A) e parasitemia (B) de camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com PBS, benznidazol e o complexo *cis*-[Ru(NO₂)(bpy)₂(Bz)]PF₆. A curva de sobrevida é mostrada em **A** e os níveis de parasitemia são mostrados **B**. Os pontos representam a média $\pm$ EPM em 3 experimentos independentes com n=6.

Enfim, os complexos de rutênio doadores de NO têm se mostrado muito promissores. Sua baixa toxicidade, solubilidade em água e estabilidade em meio aquoso possibilitam a liberação do NO de forma controlada no sítio de ação. Assim, os complexos sintetizados possivelmente combinam a atividade tripanocida do benznidazol e a do NO.

5.2 Parte 2

5.2.1 Sínteses dos complexos de rutênio Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)

A síntese dos complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) foi baseada na rota descrita por Silva e colaboradores em 1994, que descreve a coordenação de um catecol com o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$, através dos átomos de oxigênio.

A formação dos complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) é fortemente dependente do pH. Em meio ácido os ligantes encontram-se em sua forma protonada, não ocorrendo reação com o fragmento $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$. Com o aumento do pH ($\text{pH} > 7.0$) há aparecimento de uma banda na região do visível caracterizada como a formação dos complexos.

Provavelmente, a síntese dos complexos acontece inicialmente com a coordenação de um dos sítios dos derivados de aminociclitol (neamina e 2-desoxiestreptamina) ao fragmento $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{3+}$ com a saída dos ligantes NH_3 para a formação do complexo (Esquema 6). Os complexos assim obtidos são solúveis em meio aquoso e insolúveis em meio não aquoso, sendo assim acetona foi usada como precipitante.

Esquema 6: Rota sintética dos complexos de rutênio Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina).

5.2.2 Espectroscopia na região do UV-vis

Primeiramente analisou-se o comportamento espectroscópico do precursor, o complexo $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$ (Figura 25), o qual apresentou banda de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM), $\{\pi\text{P}(\text{Cl}) \rightarrow \text{eg}(\text{Ru})\}$, observada em 330nm (MARCHANT *et al.*, 1977).

Figura 25: Espectro qualitativo do complexo $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$, em água, na região do UV-vis.

O rutênio(III) é um sistema d^5 e comporta-se normalmente como um íon metálico π -receptor. O complexo de Ru(III) apresenta-se com baixo spin, hexacoordenado, octaédrico e de caráter ácido duro. Desse modo, o rutênio(III) tem preferência por átomos ou grupamentos doadores que agem como base dura, tais como: OH^- , Cl^- , NH_3 .

O ligante 2-desoxiestreptamina é um ciclohexitol que contém 3 hidroxilas e conserva a funcionalidade dos grupamentos 1,3 diamino. A neamina base livre é classificada como aminoglicosídeo, pois é constituída pela 2-desoxiestreptamina ligada a um aminoaçúcar através de ligação glicosídica. Esses ligantes tem caráter básico, fortemente polares e positivamente carregados em pH fisiológico devido aos grupamentos amino e hidroxila que se coordenam ao rutênio.

Os espectros da região do UV-vis dos ligantes neamina (Figura 26 – A) e 2-desoxiestreptamina (Figura 26 – B) apresentam bandas situadas na região do ultravioleta em 224 nm com ombro em 273 nm para a neamina e em 253 nm e 291 nm para o composto 2-desoxiestreptamina. Estas bandas foram caracterizadas como transições intra-ligante.

Figura 26: Espectro qualitativo dos ligantes neamina (A) e 2-desoxiestreptamina (B), em água, na região do UV-vis.

Os ligantes provavelmente se coordenam ao rutênio pelos grupamentos hidroxila e amino. Essa coordenação é responsável pelo surgimento de bandas na região do visível (400 a 800 nm) caracterizadas como bandas de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM). Enquanto que as bandas situadas na região do ultravioleta (200 nm a 400 nm) atribuem-se como bandas centradas no ligante. A Figura 27 representa o espectro de UV-vis dos complexos obtidos Ru(neamina) (Figura 27 – A) e Ru(desoxiestreptamina) (Figura 27 – B). Os dados espectrofotométricos dos complexos obtidos e do complexo precursor estão relatados na Tabela 6.

Figura 27: Espectro UV-vis qualitativo dos complexos Ru(neamina) (A) e Ru(desoxiestreptamina) (B), em solução aquosa.

Tabela 6: Resultados de análises de espectros na região UV-vis para os complexos de rutênio, derivados do precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$, denominados simplificadaamente como Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)

Complexo	λ , nm (log ϵ , mol.cm ⁻¹)
$[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$	328 (3,28) nm
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{desoxiestreptamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}_2$	256 nm; 344 nm (3,48); 534 nm (3,66)
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{neamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}_2$	263 nm (3,48); 305 nm; 335nm; 543 nm (3,31)

5.2.3 Análise Elementar

Os resultados de microanálise de carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos de rutênio Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) estão apresentados na Tabela 7. Observa-se que o percentual de carbono, nitrogênio e hidrogênio para os dois complexos apresentados correspondem a estrutura química de um binuclear.

Tabela 7: Análise elementar percentual teórica (Teor) e experimental (Exp) de carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos de rutênio denominados simplificadaamente como Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina).

Complexo	%C		%H		%N	
	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{desoxiestreptamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}_2$	12,66	12,56	5,43	5,62	13,26	14,60
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{neamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}_2$	19,97	19,67	6,21	5,87	15,22	15,29

5.2.4 Voltametria cíclica e pulso diferencial

O comportamento voltamétrico dos complexos sintetizados no presente trabalho foi estudado em solução aquosa de tampão fosfato pH 7,0 como eletrólito suporte. Os resultados eletroquímicos sugerem a formação do complexo binuclear.

A varredura dos voltamogramas cíclicos inicia-se em +0,1 V (vs Ag/AgCl) conduzido para potencial negativo, revertido em -0,6 V (vs Ag/AgCl) e conduzido novamente para potencial positivo até atingir +0,2 V (vs Ag/AgCl) com velocidade de varredura de 0,1 V/s.

A Figura 29 apresenta o voltamograma cíclico do complexo Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho) que exibe uma onda catódica (2c), em torno de -0,44 V (vs Ag/AgCl), juntamente com uma onda anódica (2a) na varredura reversa, em torno de -0,36 V (vs Ag/AgCl). Esse par de picos se deve ao processo centrado no metal $\text{Ru}^{\text{III/II}}$ conforme voltamograma do seu precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto). O voltamograma do complexo não apresenta o par de picos (1a/1c), pois o ligante está coordenado e não possui o processo de aquação conforme descrito para o seu precursor o complexo $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto). Entretanto, ocorre o surgimento de um par de picos (3c/3a), exibindo uma onda catódica (3c), em torno de -0,17 V (vs Ag/AgCl), juntamente com uma onda anódica (3a), em torno de -0,14 V (vs Ag/AgCl). Tal par de picos é característico do 2º núcleo de rutênio que provavelmente encontra - se como Ru^{II} confirmando a estrutura binuclear e provavelmente atribuído ao processo centrado no metal.

Figura 29: voltamograma cíclico dos complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{+2}$ (em preto), Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho). $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{+2} = 2,46 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{complexo}] = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, velocidade de varredura de 0,1 V/s.

Na Figura 30 está representado o voltamograma cíclico do complexo Ru(neamina) (em azul) que exibe uma onda catódica (2c), em torno de -0,44 V (vs Ag/AgCl), juntamente com uma onda anódica (2a) na varredura reversa, em torno de -0,36 V (vs Ag/AgCl), conforme voltamograma do seu precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto). Esse par de picos se deve ao processo centrado no metal $\text{Ru}^{\text{III/II}}$. O voltamograma do complexo apresenta o par de picos (1a/1c) que corresponde ao $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})^{3+/2+}$ formado pela aquação do $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ sugerindo que o complexo Ru(neamina) possui resquícios do seu precursor. Pode - se observar o par de picos (3c/3a), sugerindo a formação do complexo binuclear. Entretanto, devido a baixa definição do par de picos (3c/3a), para a confirmação das espécies

formadas propusemos a realização do voltamograma de pulso diferencial (Figuras 31 e 32) para melhor evidenciar os picos existentes nos complexos formados.

Figura 30: voltamograma cíclico do complexo $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto), Ru(neamina) (em azul). $[[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}] = 2,46 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{complexo}] = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, velocidade de varredura de $0,1 \text{ V/s}$.

O voltamograma de pulso diferencial apresentado na Figura 31 evidencia os picos anódicos dos complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto), Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho) e Ru(neamina) (em azul). Pode-se confirmar a presença de 2 picos anódicos para o precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto) que referem aos processos eletroquímicos discutidos anteriormente na voltametria cíclica. Observa-se para os complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) a presença do pico anódico 3a que se refere ao 2º núcleo de rutênio do complexo. Porém, pode se confirmar que o complexo Ru(neamina) apresenta o pico anódico 1a sugerindo que o complexo está contaminado pelo precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$.

Figura 31: voltamogramas de pulso diferencial dos complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto), Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho) e Ru(neamina) (em azul). Curva que representa a redução.

O voltamograma de pulso diferencial apresentado na Figura 32 evidencia os picos catódicos dos complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto), Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho) e Ru(neamina) (em azul). Pode-se confirmar a presença de 2 picos catódicos para o precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto) que referem aos processos eletroquímicos discutidos anteriormente na voltametria cíclica e observa-se no voltamograma de pulso diferencial dos complexos Ru(neamina) (em azul) e Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho) a presença do pico catódico 3c referente a estrutura binuclear do complexo. Porém, o complexo Ru(neamina) também apresenta o pico catódico 1c sugerindo que o complexo está contaminado pelo precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$.

Figura 32: voltamogramas de pulso diferencial dos complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ (em preto), Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho) e Ru(neamina) (em azul). Curva que representa a oxidação.

Os dados voltamétricos sugerem que houve a formação dos complexos binucleares propostos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina) devido ao surgimento de 2 processos eletroquímicos centrados no rutênio observados nos voltamogramas cíclicos dos respectivos complexos, Figuras 29 e 30, visto que foi realizada análise voltamétrica dos ligantes livres 2-desoxiestreptamina e neamina e não foram observadas espécies eletroativas quando realizada voltametria cíclica e de pulso diferencial (dados não mostrados).

Esses dados sugerem ainda que o estado de oxidação dos centros de rutênio são diferentes, ou seja, um núcleo apresenta o Ru(III) e o outro núcleo Ru(II) (Figura 33). Tal diferença pode ser explicada pelo número de elétrons envolvidos nos processos eletroquímicos.

Figura 33: Estrutura química dos complexos denominados simplificadaamente como Ru(neamina) em **A** Ru(desoxiestreptamina) em **B**.

O complexo Ru(neamina) que apresentou resquícios do seu precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ foi purificado, a fim de se obter o complexo puro. Posteriormente foram realizadas novas análises voltamétricas e não se observou os picos referentes ao complexo precursor (dados não mostrados).

5.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro vibracional dos complexos metálicos de aminas tem sido extensamente estudado. Na Figura 34 bandas de aminas coordenadas a rutênio podem ser observadas no espectro de infravermelho do complexo precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$. As bandas de NH_3 são caracterizadas como estiramento assimétrico $\nu_a(\text{NH}_3)$ e estiramento simétrico $\nu_s(\text{NH}_3)$, deformação degenerada assimétrica $\delta_a(\text{NH}_3)$, deformação degenerada simétrica $\delta_s(\text{NH}_3)$, e rocking $\rho_r(\text{NH}_3)$ e aparecem na região de 3400-3000, 1650-1550, 1370-1000, e 950-590 cm^{-1} , respectivamente (NAKAMOTO, 1986). A força da ligação M-N pode ser medida pela pelas frequências de estiramento de NH_3 . A vibração rocking é frequentemente usada para comparar a força da ligação entre M-N.

A densidade eletrônica ao redor do íon metálico determina quão forte é a interação rutênio-amina. A análise pode ser fundamentada diretamente na vibração metal-ligante como, indiretamente, nas vibrações rocking e deformação simétrica NH_3 (SHIMANOUCHI & NAKAGAWA, 1964).

As principais bandas do complexo precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$ e suas atribuições são apresentadas na Tabela 8.

Figura 34: Espectro na região do infravermelho do complexo $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$, em pastilha de KBr.

Tabela 8: Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para complexo $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$.

Atribuições (cm^{-1})	$[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{+2}$
$\nu_a(\text{NH}_3) / \nu_s(\text{NH}_3)$	3288/3152
$\delta_s(\text{NH}_3)$	1300
$\rho_r(\text{NH}_3)$	798

No espectro de infravermelho do ligante 2-desoxiestreptamina (Figura 35 – em preto) e neamina (Figura 36 – em preto) observam-se bandas na região entre $2950 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ que correspondem a vibrações de deformação axial de grupamentos CH_2 ($\nu(\text{CH})$).

Bandas da deformação axial de (O-H) e de (C-O) características de álcoois são observadas nos espectros dos ligantes. Essas vibrações são sensíveis à formação de ligação de hidrogênio. Os modos de deformação axial de (C-O) e de deformação angular de (O-H) não são independentes e se acoplam com as vibrações de grupos adjacentes. Normalmente a mais importante é a banda $\nu(\text{OH})$ na região $3400 \text{ a } 3200 \text{ cm}^{-1}$, que é caracterizada pela ligação de

hidrogênio. A intensidade da banda $\nu(\text{CO})$ é maior que a banda $\nu(\text{OH})$ e aparece na região de 1200-1000 cm^{-1} . Foi observada a vibração de deformação angular no plano de (O-H) na região entre 1420-1330 cm^{-1} para os ligantes 2-desoxiestreptamina e neamina.

As aminas primárias presentes nos ligantes apresentam bandas de média intensidade na região entre 3460-3280 cm^{-1} , estiramento (N-H). A banda correspondente à deformação de ($-\text{NH}_2$) é observada em 1650-1580 cm^{-1} e possui intensidade de média a forte. Quando o composto está associado, a banda desloca-se para frequências ligeiramente mais altas. (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). As principais bandas dos ligantes 2-desoxiestreptamina e neamina e suas atribuições podem ser observadas na Tabela 9.

Tabela 9: Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para os compostos 2-desoxiestreptamina e neamina, em pastilha de KBr.

Atribuições (cm^{-1})	2-desoxiestreptamina	Neamina
$\nu(\text{C-H})$	2920	2912
$\nu(\text{N-H})$	1602/1573	1602
$\nu(\text{C-O})$	1100	1010
$\nu(\text{O-H})$	3350	3373
$\delta(\text{O-H})$	1395	1364

Em complexos de aminas com metais de transição os estiramentos simétrico e assimétrico de NH_3 deslocam para menor energia em comparação com os ligantes livres enquanto que a deformação degenerada, deformação simétrica e vibração rocking da amônia coordenada deslocam para maior energia. As frequências de estiramento de (N-H) dos complexos aminas de rutênio podem ser usadas para medir a força da ligação Ru-N. O modo rocking é mais sensível para coordenação e pode ser usado para comparar a força da ligação Ru-N nos complexos, quanto maior energia da vibração rocking mais forte é a ligação Ru- NH_3 (SILVA, *et al.*, 2000).

Nas Figuras 35 e 36 estão representados os espectros de infravermelho dos complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina) (em vermelho) e dos seus respectivos ligantes 2-desoxiestreptamina e neamina (em preto). As atribuições foram feitas considerando-se o espectro de infravermelho dos ligantes livres e o espectro de infravermelho do complexo precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$. As principais bandas observadas e suas atribuições são apresentadas na Tabela 10.

Figura 35: Espectro de infravermelho do ligante 2-desoxiestreptamina (em preto) e do complexo Ru(desoxiestreptamina) (em vermelho), em pastilha de KBr.

Figura 36: Espectro de infravermelho do ligante neamina (em preto) e do complexo Ru(neamina) (em vermelho), em pastilha de KBr.

Tabela 10: Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para os complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina), em pastilha de KBr.

Atribuições (cm^{-1})	Ru(desoxiestreptamina)	Ru(neamina)
$\nu(\text{C-O})$	1092	1040
$\nu(\text{N-H})$	1629	1629
$\delta(\text{OH})$	-	-
$\nu(\text{O-H})$	3440	3464
$\nu_{\text{a/s}}(\text{NH}_3)$	3328	3267
$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3)$	1296	1296
$\rho_{\text{r}}(\text{NH}_3)$	798	798

Contudo pode-se presumir que esses ligantes se coordenam ao $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4]^{3+}$ através dos átomos de oxigênio, devido à ausência no espectro de infravermelho dos complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) a vibração de deformação angular no plano de (O-H), a qual nos ligantes livres ocorre na região entre $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$. E devido a mudança do espectro de infravermelho dos complexos na região de $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{CO})$.

Os estiramentos de NH_3 e vibração rocking foram observados. As vibrações rocking as quais são uma medida da interação metal- NH_3 foi observada para os complexos na região próximo de 800 cm^{-1} .

5.2.6 Espectrometria de Massa

Para analisar uma amostra através do ESI-MS deve-se utilizar um solvente polar ou de polaridade intermediária para formar uma solução diluída da substância. O solvente utilizado para análise dos complexos foi uma mistura de água e metanol (9:1) que é comumente usada por apresentarem pontos de ebulição moderados ($<100,0\text{ }^\circ\text{C}$), de forma que não precisam de altas temperaturas para serem removidos das microgotas carregadas produzidas no processo de ionização por eletrospray. No entanto, nem sempre todas as moléculas de solventes são eliminadas, e, por isso, é importante que durante a interpretação dos espectros seja considerada a possibilidade de formação de íons que apresentem aductos com moléculas do solvente na fase gasosa.

A ampliação dos picos mostra a distribuição isotópica característica da presença do rutênio (^{104}Ru , ^{102}Ru , ^{101}Ru , ^{100}Ru , ^{99}Ru , ^{98}Ru , e ^{96}Ru).

Pode-se concluir qual é a carga do fragmento através da diferença de massa/carga ($\Delta m/z$) entre os isótopos, sendo que quando $\Delta m/z = 1$, carga dos fragmentos = +1; $\Delta m/z = 0.5$, carga dos fragmentos = +2; $\Delta m/z = 0.33$, carga dos fragmentos = +3; $\Delta m/z = 0.25$, carga dos fragmentos = +4.

A identificação do íon molecular é muito importante para a elucidação e confirmação da estrutura química do complexo através da relação m/z .

A Figura 37 apresenta o perfil isotópico do rutênio referente ao íon molecular do complexo Ru(desoxiestreptamina). A Tabela 11 mostra os dados da relação m/z do íon molecular do complexo.

Figura 37: Perfil isotópico do rutênio referente ao íon molecular do complexo Ru(desoxiestreptamina) detectado no espectro de massas em fase gasosa.

Tabela 11: Fragmento detectado no espectro de massas em fase gasosa do complexo Ru(desoxiestreptamina) e a relação m/z.

Fragmento	m/z
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{desoxiestreptamina})\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]\text{Cl}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$	556

O espectro de massas do complexo Ru(neamina) apresentou o fragmento referente ao íon molecular do complexo, elucidando a presença do perfil isotópico do rutênio (dado não mostrado). Na Tabela 12 está representado os dados da relação m/z do fragmento do complexo Ru(neamina).

Tabela 12: Fragmento detectado no espectro de massas em fase gasosa do complexo Ru(neamina) e a relação m/z

Fragmento	m/z
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2(\text{neamina})]^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$	509

5.2.7 Ensaio de citotoxicidade e atividade tripanocida

Observa-se no estudo de citotoxicidade contra células esplênicas (Figura 38) que o complexo precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ apresenta citotoxicidade de forma concentração-dependente, cuja concentração máxima de 1 mmol.L^{-1} é tão tóxica quanto o controle positivo Tween. Por outro lado, tanto os ligantes (2-desoxiestreptamina e neamina) quanto os compostos estudados (benznidazol, Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina)) apresentaram-se praticamente isentos de citotoxicidade, equiparando-se aos níveis do controle negativo, representado pelo meio de cultura celular.

Figura 38: Percentual de citotoxicidade dos compostos benznidazol, neamina, 2-desoxiestreptamina, $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina), nas concentrações de 1 mmol.L^{-1} a $7,8 \text{ µmol.L}^{-1}$. Tween representa o controle positivo de morte celular (lisa as células) e o meio de cultura representa o controle negativo (integridade celular).

Os complexos Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) apresentaram apreciável atividade tripanocida, ambos de forma concentração dependente e com atividade tripanocida com magnitudes equiparáveis próximas de 85 %. Entretanto, o complexo Ru(neamina) apresentou maior potência tripanocida do que o Ru(desoxiestreptamina), visto que o Ru(neamina) necessitou de uma menor concentração ($54,2 \pm 0,1 \text{ µmol.L}^{-1}$) do que o Ru(desoxiestreptamina) ($61,4 \pm 0,1 \text{ µmol.L}^{-1}$) para promover a morte de 50 % das formas tripomastigotas (Tabela 13 e 14).

Observa-se na Figura 39 e Tabela 13 que o precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ e o ligante neamina apresentam em suas formas livres semelhante atividade tripanocida máxima ($85,1 \pm 5,2 \%$ e $78,5 \pm 8,0 \%$; respectivamente), porém o precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ apresenta maior potência tripanocida ($84,1 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) comparada ao ligante neamina ($173,4 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Surpreendentemente, a coordenação do ligante neamina ao precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ confere superior potência tripanocida ao complexo formado Ru(Neamina) ($54,2 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, concomitantemente, reduz a citotoxicidade do precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, como já observado na Figura 38.

É importante salientar que, embora o complexo Ru(neamina) apresente menor potência tripanocida que o Benznidazol ($54,2 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $11,3 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$; respectivamente), o complexo Ru(neamina) apresenta maior atividade tripanocida máxima que o Benznidazol ($84,7 \pm 6,1 \%$ e $61,9 \pm 9,2 \%$; respectivamente) (Figura 39 e Tabela 13).

Figura 39: Percentual de atividade tripanocida, dependente de concentração, induzida pelo composto Benznidazol, pelo ligante neamina e complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ e Ru(neamina). Os pontos representam a média $\pm$ EPM do percentual de atividade tripanocida para um “n” amostral de 3 a 9 experimentos realizados em duplicata.

Tabela 13: Representa os valores de $\text{IC}_{50\%}$ (concentração necessária para morte de 50% dos parasitas, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e efeito tripanocida máximo percentual (%) induzido pelo composto Benznidazol, pelo ligante neamina e complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ e Ru(neamina).

Compostos	$\text{IC}_{50\%}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% Efeito tripanocida máximo
Benznidazol	$11,3 \pm 0,4$	$61,9 \pm 9,2$
$[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{+2}$	$84,1 \pm 0,1$	$85,1 \pm 5,2$
Neamina	$173,4 \pm 0,1$	$78,5 \pm 8,0$
Ru(neamina)	$54,2 \pm 0,1$	$84,7 \pm 6,1$

Assim como observado para a neamina, percebe-se na Figura 40 e Tabela 14 que o precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ e o ligante 2-desoxiestreptamina apresentam em suas formas livres semelhante atividade tripanocida máxima ($85,1 \pm 5,2 \%$ e $85,9 \pm 6,2 \%$; respectivamente), porém o precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ apresenta maior potência tripanocida ($84,1 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) comparada ao ligante 2-desoxiestreptamina ($418,8 \pm 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Da mesma forma que para a neamina, a coordenação do ligante desoxiestreptamina ao precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ confere superior potência tripanocida ao complexo Ru(desoxiestreptamina) formado ($61,4 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, concomitantemente, reduz a citotoxicidade do precursor $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, como já enfatizado na Figura 38.

É válido também salientar que, embora o complexo Ru(desoxiestreptamina) apresente menor potência tripanocida que o Benznidazol ($61,4 \pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $11,3 \pm 0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$; respectivamente), o complexo Ru(desoxiestreptamina) apresenta maior atividade tripanocida máxima que o Benznidazol ($86,6 \pm 5,2 \%$ e $61,9 \pm 9,2 \%$; respectivamente) (Figura 40 e Tabela 14).

Figura 40: Percentual de atividade tripanocida, dependente de concentração, induzida pelo composto Benznidazol, pelo ligante desoxiestreptamina e complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ e Ru(desoxiestreptamina). Os pontos representam a média $\pm$ EPM do percentual de atividade tripanocida para um “n” amostral de 3 a 9 experimentos realizados em duplicata.

Tabela 14: Representa os valores de IC_{50%} (concentração necessária para morte de 50 % dos parasitas, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e efeito tripanocida máximo percentual (%) induzido pelo composto Benznidazol, pelo ligante desoxiestreptamina e complexos $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{+2}$ e Ru(desoxiestreptamina).

Compostos	IC _{50%} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	% Efeito tripanocida máximo
Benznidazol	$11,3 \pm 0,4$	$61,9 \pm 9,2$
$[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]^{+2}$	$84,1 \pm 0,1$	$85,1 \pm 5,2$
desoxiestreptamina	$418,8 \pm 0,2$	$85,9 \pm 6,2$
Ru(desoxiestreptamina)	$61,4 \pm 0,1$	$86,6 \pm 5,2$

Tais resultados permitem sugerir que a coordenação dos ligantes com o complexo precursor foi eficiente devido a melhor atividade dos complexos obtidos em relação ao complexo precursor. O mecanismo pelo qual os complexos de rutênio Ru(neamina) e Ru(desoxiestreptamina) desempenham suas atividades tripanocidas é independente de citotoxicidade e possivelmente desencadeiam seus efeitos sobre sistemas enzimáticos específicos existentes na forma tripomastigota (DESSOY *et al.*, 2009). O maior efeito tripanocida máximo do complexo Ru(neamina) sobre o Ru(desoxiestreptamina) provavelmente se deva a maior atividade microbica da neamina, uma vez que essa representa a porção farmacofórica íntegra da neomicina. Em conjunto, esses resultados expressam um clássico exemplo de que a efetividade microbica de um composto pode estar desvinculada de citotoxicidade celular, representando um salto no diz respeito a perspectivas terapêuticas no tratamento da Doença de Chagas.

Conclusões

6. Conclusões

Ao longo do presente trabalho, incessantemente ressaltamos a importância da obtenção de novos complexos de rutênio que possam corroborar na terapêutica da doença de Chagas, a fim de aumentar a possibilidade da utilização dessas metalo-drogas. Para tal efeito, é importante que a obtenção destes complexos seja realizada de forma estruturada para que haja reprodutibilidade em sua obtenção. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta minuciosos cuidados quanto à caracterização química dos complexos obtidos, inclusive de ligantes intermediários, no intuito que o produto final apresentasse sempre o mesmo padrão de qualidade.

Assim, descrevemos a caracterização dos complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina) por espectroscopia de UV-vis e observamos a coordenação dos ligantes derivados de aminoglicosídeos com o complexo de rutênio precursor devido ao surgimento de bandas na região do visível, que caracteriza a transferência de carga ligante – metal.

Através da caracterização por espectroscopia no infravermelho observamos a coordenação dos ligantes com o complexo de rutênio precursor pela modificação do espectro, principalmente, na região que compreende a deformação angular no plano de (O-H) e estiramento (C-O) através da ausência da banda no espectro dos complexos, sugerindo que esses ligantes se coordenam ao $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4^{3+}$ através dos átomos de oxigênio.

Na caracterização por voltametria cíclica e de pulso diferencial observamos o surgimento de processos redox sugerindo a formação de complexos binucleares. Tal hipótese pode ser confirmada através da análise elementar e espectrometria de massa.

De acordo com a caracterização descrita e discutida ao longo do trabalho, os complexos Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina) apresentam propriedades químicas que suportam o sucesso na coordenação dos ligantes derivados de aminoglicosídeos com o complexo de rutênio precursor.

Os resultados do estudo de atividade tripanocida sugerem que o mecanismo pelo qual os complexos de rutênio Ru(desoxiestreptamina) e Ru(neamina) desempenham suas atividades tripanocidas é independente de citotoxicidade e que possivelmente desencadeiam seus efeitos sobre sistemas enzimáticos específicos existentes na forma tripomastigota. Tal fato evidencia a importância da coordenação dos ligantes aminoglicosídeos com o rutênio para potencialização da atividade tripanocida.

Para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂(Bz)(NO)](PF₆)₃.2Bz, a caracterização por espectroscopia na região do UV-vis evidencia bandas na região do ultravioleta que são

atribuídas à transição interna $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes insaturados (bpy, bz) e o ombro em 320 nm pode ser atribuído a transferência de carga metal ligante TCML devido a transição $d_\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$ ou $d_\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ e ou $d_\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{Bz})$, as quais condizem com complexos semelhantes já descritos na literatura.

Através da caracterização por espectroscopia de infravermelho observamos a coordenação do benznidazol ao complexo de rutênio devido ao estiramento de $\nu(\text{NO}_2)$ em 1365 cm^{-1} , $\nu(\text{CN})$ em 1550 cm^{-1} e $\nu(\text{CO})$ em 1664 cm^{-1} , os quais são coerentes com a coordenação axial do benzonidazol com o centro $\text{Ru}(\text{II})$ através do átomo de nitrogênio insaturado.

Os resultados da análise elementar complementam a análise por cromatografia líquida de alta eficiência e sugerem que a estrutura do complexo possui 2 moléculas de benznidazol solvatando o complexo de rutênio.

O resultado da atividade tripanocida para o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Bz})(\text{NO})](\text{PF}_6)_3 \cdot 2\text{Bz}$ sugere que o mesmo apresentou maior efeito tripanocida em menores concentrações, quando comparado com o benznidazol. Tal resultado pode ser atribuído ao sinergismo entre o mecanismo de ação do benznidazol e o do óxido nítrico presentes no complexo.

Dentre todos os complexos obtidos observamos que o *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ foi aquele que apresentou maior potência tripanocida desprovida de citotoxicidade em estudos *in vitro*. Logo, tal complexo foi selecionado para prosseguirmos com estudos biológicos *in vivo*. Interessantemente, o complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ aumentou a sobrevida dos animais infectados com tripomastigotas, assim como o benznidazol. Entretanto, contrário ao observado para o benznidazol, o referido complexo não reduziu a parasitemia nos animais infectados. Em conjunto, esses resultados sugerem que a melhora da sobrevida dos animais infectados tratados com *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO}_2)(\text{bpy})_2(\text{Bz})]\text{PF}_6$ se deva a mecanismos que dificultem a instalação do parasita em órgãos alvos, como coração, esôfago e intestino.

Enfim, a caracterização dos efeitos biológicos dos complexos de rutênio desenvolvidos no presente trabalho reafirmam o sucesso na obtenção de tais complexos inicialmente propostos, implementando importantes informações e perspectivas no que diz respeito a complexos nitrosilos de rutênio e seus potenciais terapêuticos na doença de Chagas.

Referências

7. Referências

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Rev.*, v. 45, p. 62-9, 2001.

ALLEN, A. D; SENOFF, C. V. Preparation and infrared spectra of some aminecomplexes of ruthenium(II) and ruthenium (III). *Can. J. Chem.*, v. 45, p. 1337-41, 1967.

ASSEFA, Z.; STANBURY, D. M. Oxidation of coordinated ammonia to nitrosyl in the reaction of aqueous chlorine with *cis*-[Ru(bpy)₂(NH₃)₂]²⁺. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 119, p. 521-30, 1997.

BAKHTIAR , R.; OCHIAI, E. I. Pharmacological applications of inorganic complexes. *Gen. Pharmacol.*, v.32, p. 525-40, 1999.

BALZANI, V.; CARASSITE, V. **Photochemistry of Coordination Compounds**. Academic Press, Nova Iorque, 1970, Cap. 1, p. 1-78.

BATISTA, A. A; PEREIRA, C.; QUEIROZ, S.L.; DEOLIVEIRA, L. A. A.; SANTOS, R. H. D; GAMBARDELLA, M. T. D. Nitrosyl ruthenium complexes with general formula [Ru₃(NO)(P-P)] (P-P={PPh₂(CH₂)₃PPh₂}, n=1-3 and {PPh₂-CH=CH-PPh₂}).X-ray structure of [RuCl₃(NO){PPh₂(CH₂)₃PPh₂}. *Polyhedron.*, v. 16, p. 927-31, 1997.

BAUSSANNE, I., BUSSIÈRE, A., HALDER, S., GANEM-ELBAZ, C., OUBERAI, M., RIOU, M., PARIS, J. M., ENNIFAR, E., MINGEOT-LECLERCQ, M. P., DÉCOUT, J. L. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Amphiphilic Neamine Derivatives. *J. Med. Chem.*, v.53, p. 119–27, 2010.

BERNERS-PRICE, S. J.; SADLER, P. Coordination chemistry of metalodrugs: Insights into biological speciation from NMR spectroscopy. *J. Coord. Chem. Rev.*, v. 151, p.1-40, 1996.

BIGNOZZI, C. A.; CHIORBOLI, C.; MURTAZA, Z.; JONES, W. E.; MEYER, T. J. Photophysical and photochemical behavior of nitro complexes of ruthenium(II). *Inorg.Chem.*, v. 32, p.1036-8, 1993.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. D.; TOGNIOLO, V.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aort relaxation. *Nitric oxide Biol. Chem.*, v.10, p. 83-91, 2004.

BORGES, S.D.S.; DAVANZO, C.U.; CASTELLANO, E.E.; Z-SCHPECTOR, J.; SILVA, S.C.; FRANCO, D.W. Ruthenium nitrosyl complexes with n-heterocyclic ligands. *Inorg. Chem.*, v. 37, p. 2670-7, 1998.

BOTTO, R. E.; COXON, B. Nitrogen -15 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 105. p. 1021-28, 1983.

BOTTOMLEY, F. Nitrosyl complexes of ruthenium. *Coordination Chem. Reviews.*, v. 26, p. 7-32, 1978.

BRADDOCK, J. N., MEYER, T. J. Kinetics of the oxidation of bis(π -cyclopentadienylcarbonyliron) by $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2^+$ and by $[(\pi\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})]_4^+$. *Inorg. Chem.*, v. 12, p. 723-7, 1973.

BRADDOCK, J. N.; MEYER, T. J.; Kinetics of the oxidation of bis (π -cyclopentadienylcarbonyliron) by $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2^+$ and by $[(\pi\text{-C}_2\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})]_4^+$. *Inorg. Chem.*, v.12, p.723-7, 1973.

BUCKNER, F. S., URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *Inter. J. parasitology: Drugs and drug resistance. In press.* 2012.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; FLAMME, A. C. L.; VOORHIS, W. C. V. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, p. 2592-97, 1996.

CALLAHAN, R. W.; MEYER, T. J. Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes. *Inorg. Chem.*, v. 16, p. 574-81, 1977.

CASTRO, J.A.; MECA, M.M.; BAREL, L.C. Toxic side effect of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human. Exp. Toxicol.*, v. 25, p.471-9, 2006.

CHIANG, T.M.; SAYRE, R.M.; DOWDY, J.C.; WILKIN, N.K.; ROSENBERG, E.W. Sunscreen ingredients inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS): a possible biochemical explanation for the sunscreen melanoma controversy. *Melanoma Res.*, v. 15, p. 3-6, 2005.

CLAYTON, J. Chagas Disease 101. *Nature.*, v. 465, p. s4 – s5, 2010.

COSTA V.M., TORRES K.C., MENDONÇA R.Z., GRESSER I, GOLLOB K.J. and DIAS J.C. [Chagas' disease and its control in Latin America: an analysis of possibilities]. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. Apr-Jun;9(2):201-9*, 1993.

DEB, A. K.; PAUL, P. C.; GOSWAMI, S. Synthesis, characterization, and reactivity of new mononitrosyl complexes of ruthenium containing 2-(aryloxy)pyridines: examples of strongly electrophilic nitrosyls. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, v. 8, p. 2051-4, 1988.

DESSOY, A. M.; DIAS, L. C.; SILVA, J. J. N.; THIEMAM, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nova*, vol. 32. Nº9, 2444-57, 2009.

DUTRA, W. O., MENEZES, C. A. S., VILLANI, F. N. A., COSTA, G. C., SILVEIRA, A. B. M., REIS, D. A., GOLLOB, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune response in human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 104(Suppl.I): 208-18, 2009.

DWYER, F. P.; GOODWIN, H. A.; GYARFAS, E. C. Mono and bis(2, 2' -bipyridine) and (1, 10-phenanthroline)chelates of ruthenium and osmium. 1. Monochelates of bivalent, trivalent, and quadrivalent ruthenium. *Aust. J. Chem.*, v. 16, p. 42, 1963.

ENGELS, D., SAVIOLI L, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical disease. *Trends in Parasit.*, v. 22. p. 363-6, 2006.

FORD, P.C.; BOURASSA, J.; MIRANDA, K.; LEE,B.; LORKOVIC, I.; BOGGS, S.; KUDO, S.; LAVERMAN, L. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. *Coord. Chem. Reviews.*, v. 171, p. 185-202, 1998.

FRANCO-PAREDES, C., BOTTAZZI, M.E., HOTEZ, P.J. The Unfinished Public Health Agenda of Chagas Disease in the Era of Globalization. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, v.3, p.470, 2009.

FREITAS, J., LION, M. F., TARTARI, J. T. A. Resultados de uma investigação sobre moléstia de Chagas realizada no município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. *Rev. Hosp. Clin. São Paulo.*, v. 8, p.81-92, 1953.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADDZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288. p. 373-6, 1980.

GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. Preparation Of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine And 1,10-Phenanthroline. *Inorg. Chem.*, v. 3, p. 10, 1971.

GOMES M. G.; DAVANZO C. U.; SILVA S. C.; LOPES L. G. F.; SANTOS P. S.; FRANCO D. W. Cis- and trans- nitrosyltetraammineruthenium(II). Spectral and electrochemical properties and reactivity. *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, v. 4, p. 601-7, 1998.

GUEDES, P. M. M., OLIVEIRA, F. S., GUTIERREZ, F. R. S., da SILVA, G. K., RODRIGUES, G. J., BENDHACK, L. M., FRANCO, D. W., MATTA, M. A. D., ZAMBONI, D. S., da SILVA, R. S., SILVA, J. S. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN4)NO]²⁺ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. *British. J. Pharm.*, v.160, p. 270–82, 2010.

GUENGERICH, C. P.; SCHUG, K. Reaction of nitrosylpentaamminruthenium (II) with ethylamine, methylamine, and hexaammineruthenium (III) iron to produce dinitrogen complexes. *Inorg. Chem.*, v. 17, p.1378-9, 1978.

GUTIERREZ, F. R. S., GUEDES, P. M. M., GAZZINELLI, R. T., SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Paras. Immunol.*, v. 31, p. 673-85, 2009.

HIDRON, A., VOGENTHALER, N., SANTOS-PRECIADO, J. I., RODRIGUEZ-MORALES, A. J., FRANCO-PAREDES, C., RASSI, A. Jr. Cardiac Involvement with parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.23, p.324-49, 2010.

HUI MEI, LEI XING, LI CAI, HONG-WEI JIN, PENG ZHAO, ZHEN-JUN YANG, LIANG-REN ZHANG, LI-HE ZHANG. Studies on the synthesis of neamine-dinucleosides and neamine-PNA conjugates and their interaction with RNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 15, p. 5355-8, 2008.

IGNARRO, L. J., CIRINO, G., CASINI, A. AND NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 34, p. 879-86, 1999.

IGNARRO, L. **Nitric oxide: Biology and photobiology**. San Diego, California, USA. 1 Ed. Academia Press, 2000.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.*, 364(3), p.279-82, 1995.

ISSA, S. V., BOCCHI, A. E. Antitrypanosomal agents: treatment or threat? *The Lancet.*, v. 376, p.768, 2010.

JOHNSON, E. C., SULLIVAN, B. P., SALMON, D. J., ADEYEMI, S. A., MEYER, T. J. Synthesis and properties of the chloro-bridged dimer [(bpy)₂RuCl]₂²⁺ and its transient 3+ mixed-valence ion. *Inorg. Chem.*, v. 17 (8), p 2211–15, 1978.

KEENE, F. R.; SALMON, D. J.; MEYER, T. J. Nitro complexes of ruthenium (III) as oxidation catalysts. Chemically catalyzed, net electrochemical oxidation of triphenylphosphine. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 99, p. 4821-2, 1977.

LEACH, B. E.; TEETERS, C. M. Neamine, an antibacterial degradation product of neomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 73(6), p. 2794-97, 1951.

LEACH, B. E.; TEETERS, C. M. The identity of neamine and neomycin A. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 74(12), p. 3187-88, 1952.

LEVER, A. B. P. Electrochemical parametrization of metal complex redox potentials, using the ruthenium(III)/ruthenium(II) couple to generate a ligand electrochemical series. *Inorg. Chem.*, v. 29, p. 1271-85, 1990.

LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**. 2.ed. Nova Iorque, Elsevier, 1984.

LIANG, C. H., ROMERO, A., RABUKA, D., SGARBI, P. W., MARBY, K. A., DUFFIELD, J., YAO, S., CHENG, M. L., ICHIKAWA, Y., SEARS, P., HU C., HWANG, S. B., SHUE, Y. K., SUCHECK, S. J. Structure–activity relationships of bivalent aminoglycosides and evaluation of their microbiological activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 15, p. 2123–28, 2005.

LIMA, Á. A.N., SOARES-SOBRINHO, J. L., SILVA, J. L., CORRÊA-JÚNIOR, R. A.C., LYRA, M. A.M., SANTOS, F. L.A., OLIVEIRA, B. G., HERNANDES, M. Z., ROLIM, L. A. AND ROLIM-NETO, P. J. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzimidazole solubility. *J. Pharm. Sci.*, v. 100, p. 2443–51, 2011.

DE LIMA, R. G., LEVER, A. B. P., ITO, I. Y., SILVA, R. S. Antifungal activity of novel catecholamine ruthenium(III) complexes. *Transit. Met. Chem.*, v. 28, p. 272-5, 2003.

DE LIMA, R. G., SAUAIA, M. G., BONAVENTURA, D., TEDESCO, A. C., LOPEZ, R. F. V., BENDHACK, L. M., DA SILVA, R. S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. *Inorg. Chim. Acta.*, v. 358, p. 2643-50, 2005.

LOPEZ, B. E., WINK, D. A., FUKUTO, J. M. The inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitroxyl (HNO). *Arch. Biochemistry Biophys.*, v. 465, p. 430, 2007.

MACHADO, F. S., TANOWITZ, H. B., TEIXEIRA, M. M. New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. *Brit. J. Pharm.*, v. 160, p. 258-9, 2010.

MACHADO, F.S., MARTINS, G. A., ALIBERTI, J. C., MESTRINER, F. L., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. v. 102, p. 3003-8, 2000.

MARCHANT, J. A., MATSUBARA, T., FORD, P. C. Syntheses and properties of Ruthenium(III) complexes *cis*- and *trans*- $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})\text{X}^{+2}$. Application of Cyclic Voltammetry to study Cis and Trans effects on substitution reactions of ruthenium(II) analogues. *Inorg. Chem.*, vol.16(9), 1977.

MAYA, D. J., CASSELS, B. K., VÁSQUEZ-ITURRIAGA, P., FERREIRA, J., FAÚNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO A. Mode and action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. biochem. Physiol.*, v.146, p. 601-20, 2007.

MEDDINGS, J. B., SCOTT, R. B., FICK, G. H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. *Am. J. Physiol.*, v. 257, 1989.

MELO, R. C., BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, v. 64, p. 475-82, 1978.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac. Reviews.*, v.43, p. 109-20, 1991.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.98, p. 577-91, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current Epidemiological Trends For Chagas Disease In Latin America And Future Challenges In Epidemiology, Surveillance And Health Policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.104 (Supl. 1), p.17-30, 2009.

MORRIS, J. C., MENSA-WILMOT, K. Role of 2,6-Dideoxy-2,6-diaminoglucose in Activation of a Eukaryotic Phospholipase C by Aminoglycoside Antibiotics. *J. Biolog. Chem.*, v. 272, p. 29554–59, 1997.

NAGAO H.; ITO, K.; TSUBOYA, N.; OYAMA, D.; NAGAO, N.; HOWELL, F. S.; MUKAIDA M. Evidence for a new nitrosyl-to-nitro reaction and an acetamide formation in the $\{\text{Ru-NO}\}_6$ -type complex, *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{CH}_3\text{CN})(\text{bpy})_2]^{3+}$. *Inorg. Chim. Acta.*, v. 290, p. 113-9, 1999.

NAJIB M. EL-SAYED, PETER J. MYLER, DANIELLA C. BARTHOLOMEU, DANIEL NILSSON, GAUTAM AGGARWAL, ANH-NHI TRAN, ELODIE GHEDIN, ELIZABETH A. WORTHEY, ARTHUR L. DELCHER, GAËLLE BLANDIN, SCOTT J. WESTENBERGER, ELISABET CALER, GUSTAVO C. CERQUEIRA, CAROLE BRANCHE, BRIAN HAAS, ATASHI ANUPAMA, ERIK ARNER, LENA ÅSLUND, PHILIP ATTIPOE, ESTEBAN BONTEMPI, FRÉDÉRIC BRINGAUD, PETER BURTON, EITHON CADAG, DAVID A. CAMPBELL, MARK CARRINGTON, JONATHAN CRABTREE, HAMID DARBAN, JOSE FRANCO DA SILVEIRA, PIETER DE JONG,

KIMBERLY EDWARDS, PAUL T. ENGLUND, GHOLAM FAZELINA, TAMARA FELDBLYUM, MARCELA FERELLA, ALBERTO CARLOS FRASCH, KEITH GULL, DAVID HORN, LIHUA HOU, YITING HUANG, ELLEN KINDLUND, MICHELE KLINGBEIL, SINDY KLUGE, HEAN KOO, DANIELA LACERDA, MARIANO J. LEVIN, HERNAN LORENZI, TIN LOUIE, CARLOS RENATO MACHADO, RICHARD MCCULLOCH, ALAN MCKENNA, YUMI MIZUNO, JEREMY C. MOTTRAM, SIRI NELSON, STEPHEN OCHAYA, KAZUTOYO OSOEGAWA, GRACE PAI, MARILYN PARSONS, MARTIN PENTONY, ULF PETTERSSON, MIHAI POP, JOSE LUIS RAMIREZ, JOEL RINTA, LAURA ROBERTSON, STEVEN L. SALZBERG, DANIEL O. SANCHEZ, AMBER SEYLER, REUBEN SHARMA, JYOTI SHETTY, ANJANA J. SIMPSON, ELLEN SISK, MARTTI T. TAMMI, RICK TARLETON, SANTUZA TEIXEIRA, SUSAN VAN AKEN, CHRISTY VOGT, PAULINE N. WARD, BILL WICKSTEAD, JENNIFER WORTMAN, OWEN WHITE, CLAIRE M. FRASER, KENNETH D. STUART, AND BJÖRN ANDERSSON. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*. V.309. p. 409-415. 2005.

NAKAMOTO, K. **IR and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.** Part B: Application in Coordination, Organo-metallic and Bioinorganic Chemistry, 5th Edition, p.59-62, 1986.

OLIVEIRA, F. D., TOGNIOLO, V., PUPO, T. T., TEDESCO, A. C., DA SILVA, R. S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. *Inorg. Chem. Com.*, v. 7, p.160-4, 2004.

PARKER, E. R., SETHI, A. Chagas disease: Coming to a place near you. *Dermatol Clin.*, v.29, p. 53-62, 2011.

PIPES, D. W.; MEYER, T. J. Comparisons between nitrosyl complexes of osmium(II) e ruthenium(II). *Inorg. Chem.*, v. 23, p. 2466-72, 1984.

RASSI, A. Jr., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet*. v. 375. p. 1388-1402, 2010.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. **Metal nitrosyls.** Nova Iorque, Oxford University Press, Inc., 1992.

SAKI YAJIMA, HIROHITO SHIONOYA, TAKASHI AKAGI AND KEITA HAMASAKI. Neamine derivatives having a nucleobase with a lysine or an arginine as a linker, their synthesis and evaluation as potential inhibitors for HIV TAR-Tat. *Bioorg. Medic. Chem.*, v. 14, p. 2799-2809, 2006.

SAUAIA, M. G., DE LIMA, R. G., TEDESCO, A. C., DA SILVA, R. S. Nitric oxide production by visible light irradiation of aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. *Inorg. Chem.*, v. 44, p. 9946-51, 2005.

SAUAIA, M. G., OLIVEIRA, F. S., TEDESCO, A. C., DA SILVA, R. S. Control of NO release by light irradiation from nitrosyl- ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. *Inorg. Chim. Acta.*, v. 355, p. 191-6, 2003.

SAUAIA, M. G.; DE LIMA, R. G.; TEDESCO, A. C.; SILVA, R. S. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazi-bridged nitrosyl ruthenium complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 125(48), p. 14718-19, 2003.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.102 Suppl 1, p. 75-85, 2007.

SCHRÖDER, M.; STEPHENSON, T. A. Ruthenium. In: WILKINSON, G. (ed.) **Comprehensive Coordination Chemistry**. The synthesis, reactions e applications of coordination compounds. 1.ed. Nova Iorque, Pergamon Press, v. 4, cap. 45, p. 279-518. 1987.

SHAN WU, YUNSHA FU, RIBAI YAN, YANFEN WU, XIAOPING LEI, XIN-SHAN YE. Synthesis of neamine–carboline conjugates for RNA binding and their antibacterial activities. *Tetrahedron*. v. 66, p 3433–40, 2010.

SHIMANOUCHI, T. and NAKAGAWA, I. Infrared spectra p force constants of ammine complexes. *Inorg. Chem.*, v.3, p. 1805, 1964.

SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. *Brit. J. Pharm.*, v.152, p. 112-21, 2007.

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R. S.; LIMA, F. C. A.; DA SILVA, A. B. F.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Complexation of the anti-Trypanosoma cruzi drug benznidazole improves solubility and efficacy. *J. Med. Chem.*, v. 51, p. 4104-14, 2008.

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; PEREIRA, J. C. M., SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Experimental chemotherapy against Trypanosoma cruzi infection using ruthenium nitric oxide donors. *Antim. Ag. Chem.*, p.4414-21, 2009.

SILVA, J. J., GUEDES, P. M., ZOTTIS, A., BALLIANO, T. L., SILVA, F. O. N., LOPES, L. G. F., ELLENA, J., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A. D., FRANCO, D. W., SILVA, J. S. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. *Brit. J. Pharm.*, v.160, p. 260-9, 2010.

SILVA, J. S., MACHADO, F. S., MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front. Biosci.*, p. 314–25, 2003.

SILVA, L. H. P., NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol.*, v. 20, p. 191-203, 1953.

Da SILVA, GORELSKY, S. I., DODSWORTH, E. S., R. S., Tfouni, E., LEVER, A. B. P. Synthesis, spectral and redox properties of tetraamine dioxolene ruthenium complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* p 4078-4088, 2000.

Da SILVA, R. S., TFOUNI, E., LEVER, A. B. P. A new procedure to synthesize *cis*-[Ru(NH₃)₄L₂]⁺ⁿ species containing ruthenium(II) or ruthenium (III) using tetrammino (3,4-diolatobenzoato)ruthenium (II) as precursor. *Inorg. Chim. Acta.*, v. 235, 427-30, 1995.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SOICHIRO IBARAGI, NORIEYOSHIOKA, SHUPING LI, MIAOFEN G. HU, SAORI HIRUKAWA, PETERM. SADOW, AND GUO-FU HU. Neamine Inhibits Prostate Cancer Growthby Suppressing Angiogenin-Mediated rRNA Transcription. *Clin. Cancer. Res.*, v. 15, p. 1981-8, 2009.

STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and metal complexes in medicine, *Coordin. Chem. Rev.*, v. 171, p. 203-20, 1998.

SZCZEPURA, L. F.; TAKEUCHI, K. J. Synthesis and characterization of novelcyclopentadienylnitrorutheniumcomplexes. *Inorg. Chem.*, v.29, p.1772-7, 1990.

TFOUNI, E., TRUZZI, D. R., TAVARES, A., GOMES, A. J., FIGUEIREDO, L.E. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. *Nit. oxide.*, v. 26, p. 38-53, 2012.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. *Coordin. Chem. Rev.*, v. 236, p. 57-69, 2003.

TOGANO, T.; KURODA, H.; NAGAO, N.; MAEKAWA, Y.; NISHIMURA, H.; HOWELL, F.S.; MUKAIDA, M. Synthesis, properties and molecular structure of *trans*-hydroxobis (2,2'-bipyridine)nitrosylruthenium(2+): influence of axial ligand on characteristics of nitrosyl moiety in *trans*-[Ru(NO)XL₄]ⁿ⁺ (X = OH-, Cl-; L = py, 1/2(bpy)) type complexes. *Inorg.Chim. Acta.*, v. 196, p. 57-63, 1992.

TOGNIOLO, V., TEDESCO, A. C., DA SILVA, R. S. Photo – induced nitric oxide release from chlorobis(2,2'-bipyridine)nitrosylruthenium(II) in aqueous solution. *Inorg. Chim. Acta.*, v. 316, p. 7-12, 2001.

TOLEDO, J. C., LIMA NETO, B. S., FRANCO, D. W. Mutual effects in the chemical properties of the ruthenium metal center and ancillary ligands upon coordination. *Coord. Chem. Rev.*, v. 249, p. 419–31, 2005.

VOURLLOUMIS, D., TAKAHASHI, M., WINTERS, G. C., SIMONSEN, K. B., AYIDA, B. K., BARLUENGA, S., QAMAR, S., SHANDRICK, S., ZHAO, Q., HERMANN, T. Novel 2,5-Dideoxystreptamine Derivatives Targeting the Ribosomal Decoding Site RNA. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, v.12, p. 3367–72, 2002.

WALSH, J. L.; BULLOCK, R. M.; MEYER, T. J. Alkyl nitrite complexes of ruthenium prepared by acid-base chemistry at the bound nitrosyl group. *Inorg. Chem.*, v. 19, p. 865-9, 1980.

WELLER, R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. *Clin. Exp. Derm.*, v. 28, p.511-14, 2003.

WORKS, C. F., JOCHER, C., FORD, P. C. Synthesis, characterization and photophysical studies of some ruthenium salen nitrosyl compounds: Potencial NO delivery agents and mechanistic insights in catalytic behavior. *Abstr. Pap. Am. Chem.*, v. 221, p.745, 2001.

YANLI XU, HONGWEI JIN, ZHENJUN YANG, LIANGREN ZHANG, LIHE ZHANG. Synthesis and biological evaluation of novel neamine–nucleoside conjugates potentially targeting to RNAs. *Tetrahedron*. v. 65, p. 5228-39, 2009.

ZANICHELLI, P. G., SERNAGLIA, R. L., FRANCO, D. W. Immobilization of the [RuII(edta)NO⁺] ion on the surface of functionalized silica gel. *Langmuir* . v. 22, p. 203–8, 2006.