UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Interação anticorpo policlonal-complexo de rutênio como sistemas de liberação de óxido nítrico. Medida da especificidade e avaliação citotóxica

LOYANNE CARLA BARBOSA RAMOS

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Interação anticorpo policlonal-complexo de rutênio como sistemas de liberação de óxido nítrico. Medida da especificidade e avaliação citotóxica

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: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Ribeirão Preto
2012

<p>RAMOS, L.C.B.</p>	<p>Interação anticorpo policlonal-complexo de rutênio como sistemas de liberação de óxido nítrico. Medida da especificidade e avaliação citotóxica</p>		<p>MESTRADO FCFRPUSP 2012</p>
---------------------------------	---	--	---------------------------------------

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.

Ramos, Loyanne Carla Barbosa

Interação anticorpo policlonal-complexo de rutênio como sistemas de liberação de óxido nítrico. Medida da especificidade e avaliação citotóxica/ Loyanne Carla Barbosa Ramos; Roberto Santana da Silva, orientador. Ribeirão Preto, 2012.

135 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: da Silva, Roberto Santana

1. Complexos de rutênio
2. Anticorpo policlonal
3. Liberação de óxido nítrico
4. Especificidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Loyanne Carla Barbosa Ramos

Interação anticorpo policlonal-complexo de rutênio como sistemas de liberação de óxido nítrico. Medida da especificidade e avaliação citotóxica

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: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Professor Doutor _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Professor Doutor _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Doutor _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

À minha mãe, Carmen Lúcia

Ao meu pai, Antonio Carlos

Pela compreensão e apoio incondicional

Pelo que sou e por tudo que alcancei,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida; por me conduzir por caminhos de muita luz.

Aos meus pais, Antonio Carlos Maestrello Ramos e Carmen Lúcia Malta Barbosa Ramos. Pelo apoio, carinho e incentivo para enfrentar os desafios que me foram apresentados; que dedicaram suas vidas, muitas vezes sacrificando seus sonhos em favor dos meus. A vocês que me ensinaram agir com dignidade, respeito e honestidade. Como diante de tamanha prova de amor não posso ser somente grata, dedico a vocês essa conquista.

A toda minha família: Claudete Maestrello, Cléber Fagner, Ednaldo Silva, Juliana Barbosa, Fabio Barbosa, Ignês Maestrello, Irene Facirolli, João Gonçalves Ramos (*in memorian*), José Eduardo, Leonardo Silva, Manoel Marcos da Silva (*in memorian*), Regina Helena, Sonia Maria e Tânia Mara por estarem presentes em todos os momentos torcendo pelo meu crescimento pessoal e sucesso profissional.

Ao meu orientador Roberto Santana da Silva, que foi mestre e amigo, ajudou-me a superar limitações e me mostrou que existe sempre outro lado a ser considerado. Fez do seu conhecimento, plataforma para minha realização, esforçando-se ao máximo para desenvolver minha capacidade de raciocínio e de discernimento, tornando essa experiência tão enriquecedora. Que eu possa difundir os conhecimentos que me foram transmitidos, atualizá-los e aperfeiçoá-los, para que assim se sinta honrado e vivo, pois sei o quanto é grande sua paixão pelo que faz.

Aos meus companheiros de trabalho Andréa Junqueira, Clóvis Júnior, Deisy Bortolucci, Fabiana de Oliveira, Jacqueline Querino, Joana Coelho, Jorge Nasser, Juliana Biazotto, Lilian Franco, Maíta Santos, Natacha Cacita, Renata da Silveira, Simone Cicillini, Sthephanie Zoltay, Tassiele Heinrich; que me acompanharam diuturnamente, riram, aconselharam, dividiram, enfim compartilharam. Suas presenças, seus sorrisos, foram expressões de carinho e respeito; Obrigado por acreditarem em mim, mesmo quando eu achei difícil acreditar em mim mesma. Obrigado por dizerem, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir em vez do que eu queria que me dissessem. Compartilho minhas alegrias de

hoje também com vocês, pois suas palavras de conforto e de estímulo foram armas indispensáveis na realização desse trabalho.

Aos colegas que passaram pelo Laboratório de Química Inorgânica, Andréia Nogueira de Carvalho, Camila Leite Vieira, Carol Prazias, Elton de Oliveira, Gabriela de Campos Seuanes, Karina Dias, Laísa Bonafim Negri, Renata Lopes Rodrigues, Zumira Aparecida Carneiro, pelo breve convívio.

Às amigas tão queridas: Bruna Helena, Denise Gonçalves, Fabíola Prezotti e Laura Lucchini sempre tão presentes, mesmo distantes.

Aos amigos de longa data Fernanda Zampieri, Gisele Pavan, Pablo Lopes, Soraya Helena, Thiganá Bueno Delpian e ao meu melhor amigo Lucas Pagotto, que ouviram meus desabafos, presenciaram e respeitaram meu silêncio, brindaram minhas alegrias e acompanharam meu crescimento com tanto carinho e paciência. Essa é mais uma etapa vencida, futuras realizações estão por vir e é grande o conforto de saber que vocês estarão sempre ao meu lado.

Ao Prof. Doutor Carlos Curti, pela disponibilidade em utilizar a estrutura de seu laboratório para a realização de diversos experimentos, que não seriam possíveis sem a ajuda de seu aluno de doutorado Fernando Postalli, ao qual sou extremamente grata por todo o conhecimento que me foi transmitido, pela atenção e confiança.

Ao Prof. Doutor Marcelo Dias Baruffi e sua aluna de doutorado Lilian Cataldi Rodrigues, pela paciência e por todos os ensinamentos a mim transmitidos.

À Prof.^a Doutora Yara Maria Lucisano Valim, pela atenção dispensada, pela oportunidade e confiança de realizar experimentos em seu laboratório, com a supervisão de Ana Paula Landi Librandi e Ana Elisa Azzolini sempre tão atenciosas.

À Prof.^a Doutora Renata Galvão, por todo carinho, amizade e disponibilidade em me auxiliar no que fosse preciso.

À Prof.^a Doutora Rose Naal, sempre pronta a contribuir com seus conhecimentos, que em muito, enriqueceram esse trabalho.

À Prof.^a Doutora Sofia Nikolaou, por contribuir com seu conhecimento científico para o progresso deste trabalho.

Aos Técnicos de Laboratório, José Orestes Del Ciampo e José Carlos Tomaz pela grande ajuda e atenção.

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

À FAPESP, Capes e CNPq, pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma participaram e contribuíram de forma positiva para a realização desse trabalho, os meu mais sinceros agradecimentos.

“Ela acreditava em anjo e, porque acreditava, eles existiam”

(Clarice Lispector)

Resumo

RAMOS, L. C. B. **Interação anticorpo policlonal-complexo de rutênio como sistemas de liberação de óxido nítrico. Medida da especificidade e avaliação citotóxica.** 2012. 135p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro biológico que tem importância vital em muitos processos fisiológicos e apresenta uma multiplicidade de funções de regulação no corpo humano, tais como neurotransmissão, vasodilatação, participa nas respostas imunes e em vários processos associados com o desenvolvimento dos tumores. Vários estudos fornecem evidências sobre as propriedades tumorocidas do óxido nítrico e doadores de NO que podem ser usados para o tratamento de tumores malignos e são objetos de interesse na atualidade. Baseado nisto o objetivo deste trabalho foi de sintetizar e descrever aspectos estruturais dos compostos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})]$ (dcbpy = ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, bpy = 2,2'-bipyridina) $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dcbpy})_2]$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy})_2]$, *cis*- $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2\text{NO}(\text{L})]^{n+}$ (L = cloreto), $[\text{Ru}(\text{TERPY})(\text{dcbpy})\text{Cl}]$ (TERPY = 2,2': 6'', 2'' - terpiridina) and $[\text{Ru}(\text{TERPY})(\text{dcbpy})\text{NO}]$, além de ensaios de citotoxicidade *in vitro* para alguns dos complexos sintetizados. Ensaios de citotoxicidade com solução aquosa de complexos rutênio-nitrosilo em linhagem de células metastáticas B16-F10 mostrou resultados relativamente baixos. Medidas de viabilidade celular mostrou que estes decrescem cerca de 10 % em relação ao controle. Este resultado foi interpretado como sendo devido a baixa interação entre o complexo e a célula. Bioconjugação de rutênio-nitrosilo com anticorpo policlonal IgG foi obtido por interação covalente e mostrou maior especificidade com um alvo na célula. Cromatografia de exclusão foi utilizada para separar o bioconjugado $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG, que foi caracterizado por teste Western Blotting. Após a bioconjugação, o $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG foi submetido a estudos de citotoxicidade com células metastáticas e a viabilidade celular avaliada com ensaios MTT. Os resultados exibiram um incrível aumento na citotoxicidade de células B16-F10. Viabilidade celular foi determinada e valores de morte celular de cerca de 90 % obtida para uma das frações de $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG. Nossos resultados demonstraram que o bioconjugado $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG pode aumentar a resposta citotóxica e quiçá ser útil em terapia clínica.

Palavras Chaves: Rutênio, Óxido Nítrico, Anticorpo, Especificidade.

Abstract

RAMOS, L. C. B. **Interaction polyclonal antibody-ruthenium complex such as nitric oxide release systems. Specificity and cytotoxicity measurement.** 2012. 135p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a biological messenger that has vital importance in many physiological processes and shows a multitude of regulatory roles in the human body, such as neurotransmission, vasodilatation, immune responses and also participates in various processes associated with cancer development. Several studies provide evidences of the tumoricidal properties of NO donors that can be used for the treatment of malignant tumors and nowadays are objects of interest. Based on this the aim of this work was synthesize compounds that in a controlled manner can deliver NO in a biological process. The synthesis, structural aspects, and *in vitro* cytotoxic properties of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})]$ (dcbpy = 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid), 2'-bipyridine; bpy = 2,2'-bipyridine) $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dcbpy})_2]$, *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy})_2]$, *cis*- $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2\text{NO}(\text{L})]^{n+}$ (L = chloride), $[\text{Ru}(\text{TERPY})(\text{dcbpy})\text{Cl}]$ (TERPY = 2,2': 6'', 2'' - terpyridine) and $[\text{Ru}(\text{TERPY})(\text{dcbpy})\text{NO}]$ are described. Cytotoxicity assays with aqueous nitrosyl ruthenium complex in metastatic B16-F10 cells displayed very little effect. Cell viability measurement showed decrease around 10 % in comparison to the control. It was associated due to the low interaction between nitrosyl ruthenium specie and the cell. Bioconjugation of nitrosyl ruthenium specie with polyclonal antibody IgG was achieved by covalent interaction and showed more specific interaction between bioconjugated and target cell. Exclusion chromatography was used to isolate $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG conjugated, which was characterized by Western Blotting test. Following bioconjugation, the $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG was submitted to cytotoxic studies with metastatic cells and the viability evaluated by MTT assay. The results displayed incredible increase of cytotoxicity for B16F10 cells. Cell viability was achieved to decrease until to 90 % in comparison to the control when one fraction of $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG was used. Taken together, the present findings demonstrate that the $\{\text{Ru-NO}\}$ —IgG complex may elicit cytotoxicity responses that may find useful applications in clinical therapy.

Keywords: Ruthenium; Nitric oxide; Antibody; Specificity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Morte celular por Necrose (A) e Apoptose (B).	28
FIGURA 2. Características do processo de morte celular por apoptose e necrose.	30
FIGURA 3. Representação esquemática das etapas de um processo de apoptose.	32
FIGURA 4. Estrutura mitocondrial (A). Fotomicrografia eletrônica de mitocôndria (B).	34
FIGURA 5. Arquitetura molecular do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) e sua regulação.	36
FIGURA 6. Participação do NO em mecanismos genotóxicos.	37
FIGURA 7. Efeito tumorogênico e tumoricida do óxido nítrico.	38
FIGURA 8. Efeito dos doadores de NO 4-pic ($[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{terpy})(\text{NO})]^{3+}$ sobre a viabilidade celular em células B16-F10 e melan-a.	44
FIGURA 9. Foto ilustrativa da montagem utilizada para produção de óxido nítrico.	51
FIGURA 10. Ilustração dos parâmetros de um voltamograma cíclico completo.	57
FIGURA 11. Estruturas dos compostos (A) 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmbpy) e (B) ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.	59
FIGURA 12. Estruturas dos precursores <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ (A) e <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$ (B).	60
FIGURA 13. Estrutura dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ (A) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H}_2)(\text{bpy})](\text{PF}_6)_2$ (B).	61
FIGURA 14. Estrutura do composto $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})]$	62
FIGURA 15. Estruturas dos complexos <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (A) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63
FIGURA 16. Diagrama simplificado de orbitais moleculares e transições eletrônicas.	64
FIGURA 17. Espectros de absorção na região do UV-visível, em água, do ligante ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina $[4,92 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}]$ (A) e de complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ $[9,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}]$ (B).	65
FIGURA 18. Espectros de absorção na região do UV-vis, em água, dos complexos <i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$ $[1,50 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}]$ (A) e <i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $[1,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}]$ (B).	66

- FIGURA 19.** Espectros de absorção na região do UV-Visível, em água. (A) Precursor $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$ (—) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ (—). (B) Complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$67
- FIGURA 20.** Curva de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade molar do complexo $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})]$. A) Absorbância 308 nm. B) Absorbância 496 nm.68
- FIGURA 21.** Espectro de absorção no infravermelho do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, em pastilhas de KBr.70
- FIGURA 22.** Espectros na região do infravermelho, do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ (A) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})_2(\text{bpy})]$ (B), em pastilhas de KBr.71
- FIGURA 23.** Espectros de absorção na região do infravermelho dos compostos $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})]$ (—) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (—), em pastilhas de KBr.72
- FIGURA 24.** Espectros de absorção na região do infravermelho, dos complexos *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H})_2]$ (—) e *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})]$ 3. H_2O sem adição de hidróxido de amônio (—) e com adição de hidróxido de amônio (—), em pastilha de KBr.73
- FIGURA 25.** Espectro de massa do o ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.75
- FIGURA 26.** Espectro de massa do complexo $\{[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)\}^+$76
- FIGURA 27.** Espectro de massa do composto *cis*- $\{[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{dcbpy})(\text{NO})]\}^+$76
- FIGURA 28.** Espectro de massa do composto *cis*- $\{[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{dcbpy})(\text{NO})]\}^+$77
- FIGURA 29.** Espectro de massa do composto $\{[\text{Ru}(\text{dcbpy})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)\}^+$77
- FIGURA 30.** Espectro de massa do composto $\{[\text{Ru}(\text{dcbpy})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)\}^+$78
- FIGURA 31.** Variação espectral na região do UV-visível do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})]$ 3. H_2O , em solução aquosa, temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$), na presença de luz (A) e na ausência de luz (B). Durante 0 minutos (—), 18 minutos (—), 43 minutos (—), 70 minutos (—), 81 minutos (—), 105 minutos (—), 149 minutos (—), 179 minutos (—), 196 minutos (—) e 207 minutos (—).79
- FIGURA 32.** Espectros de absorção na região do UV-vis, em solução aquosa, do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})]$ 3. H_2O antes (—) e após a adição de hidróxido de amônio (—).80
- FIGURA 33.** Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em água, na temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$) e presença de luz.81

- FIGURA 34.** Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em solução aquosa, durante a fotólise. Tempo de irradiação de 0 a 240 segundos.81
- FIGURA 35.** Cronoamperograma do NO liberado para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em solução aquosa, irradiado em 447 nm durante 9 minutos.82
- FIGURA 36.** Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em água, na temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$) e ausência de luz.83
- FIGURA 37.** Voltamogramas cíclicos de varredura do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ nas velocidades de varredura de 0,20 V/s (—) e 0,50 V/s (—) em tampão pH= 2,0, utilizando como eletrólito suporte KCl 0,10 mol L⁻¹ e $T = 25^\circ\text{C}$84
- FIGURA 38.** Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (—) 0,02 V/s, (—) 0,05 V/s, (—) 0,10 V/s, (—) 0,20 V/s, (—) 0,30 V/s, (—) 0,40 V/s, (—) 0,50 V/s, do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, tampão pH= 2,0, utilizando como eletrólito suporte KCl 0,10 mol L⁻¹ e $T = 25^\circ\text{C}$85
- FIGURA 39.** Gráfico de relação entre ipa/ipc e velocidade de varredura, para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$85
- FIGURA 40.** Voltamogramas de Pulso Diferencial do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em tampão pH= 2,0, utilizando como eletrólito suporte KCl 0,10 mol L⁻¹ e $T = 25^\circ\text{C}$. Varredura de potencial de 0,00 V a 1,00V, durante (—) 0, (—) 30, (—) 60, (—) 90s, (—) 120s, (—) 150s, (—) 180s e (—) 240s.86
- FIGURA 41.** Reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais.92
- FIGURA 42.** Ligação de complexos de rutênio a proteínas.93
- FIGURA 43.** Disposição da membrana e do gel durante a transferência.96
- FIGURA 44.** A. Membrana de nitrocelulose em tampão de transferência. B. Suporte para transferência. C. Sistema “sanduiche” composto pelo gel de SDS-PAGE, membrana e filtros protetores.97
- FIGURA 45.** Imagens analisadas em Microscópio Biológico invertido binocular durante os experimentos de viabilidade celular. A. Células melanoma murino, linhagem B16-F10. B. Células fibroblasto murino, linhagem L929. C. Células melanoma, linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com MTT (formação de cristais de formazan de coloração púrpura).D. melanoma murino, linhagem B16-F10 após tripsinização.99

- FIGURA 46.** Efeito citotóxico dos complexos nitrosilos *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O e [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O em células L929. As células de fibroblasto murino foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata100
- FIGURA 47.** Efeito citotóxico dos complexos [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O e [Ru(dcbpy-H)(H₂O)(terpy)](PF₆) em células tumorais B16-F10. As células de melanoma murino foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 3 experimentos realizados em duplicata.101
- FIGURA 48.** Efeito citotóxico do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O em células HepG2 (A) e B16-F10 (B e C). As células foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.102
- FIGURA 49.** Efeito citotóxico do complexo [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O em células tumorais B16-F10. As células de melanoma murino foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação, o comprimento de onda utilizado para irradiação foi de 447 nm e dose de aproximadamente 1 J/cm². Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 1 experimento realizado em duplicata.103
- FIGURA 50.** Ilustração referente à formação do bioconjugado (complexos doador de NO-anticorpo) para atuação específica nas células tumorais.104
- FIGURA 51.** Etapas do protocolo de preparação do bioconjugado e separação das frações recolhidas para posterior análise por western blotting.105
- FIGURA 52.** Aparato de separação das frações após reação de formação do bioconjugado.....105
- FIGURA 53.** Detecção por quimioluminescência do “Western Blotting”.107
- FIGURA 54.** Espectros de absorção na região do UV-vis do anticorpo (anti-VDAC) em tampão carbonato pH = 8,3 (A) e de algumas das frações obtidas após filtração por cromatografia em gel da mistura reacional resultante do processo de formação do bioconjugado (B).108
- FIGURA 55.** Espectros de absorção na região do infravermelho do anticorpo anti-VDAC (A), do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3H₂O (—) e do resultante da ligação do composto ao VDAC (—) (B), em pastilhas de KBr.108
- FIGURA 56.** Detecção por western blotting da proteína mitocondrial anti-VDAC presente nas frações 9-17, obtidas por separação cromatográfica em gel Sephadex G-25.108
- FIGURA 57.** Viabilidade de células B16-F10 avaliada pelo ensaio de MTT. Os tratamentos descritos na legenda foram incubados por 24h. Controle = meio de cultura;VDAC = 0,15 µg/mL; *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O = 50 µM; Frações 14-17 = 1:1.109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resultados de análise elementar para os compostos sintetizados	49
TABELA 2 – Resultados de análise de espectros na região do UV-visível para os compostos em água	64
TABELA 3 – Atribuição das bandas de absorção na região do infravermelho para o ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina	68
TABELA 4 – Valores de m/z (experimental e calculado) para os compostos de rutênio	70
TABELA 5 – Energia do estiramento ν_{NO} para complexos rutênio-nitrosilo	72
TABELA 6 – Valores de m/z (experimental e calculado) para os compostos de rutênio	75
TABELA 7 – Potenciais eletroquímicos de complexos de rutênio, em solução aquosa, E (V vs Ag/AgCl)	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ε	Coeficiente de absorvidade molar ($\text{mol cm}^{-1} \text{L}^{-1}$)
λ	Comprimento de onda (nm)
ν_{NO}	Frequência da banda de estiramento da ligação N-O na região do infravermelho (cm^{-1})
bpy	2, 2'-bipiridina
dcbpy	Ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina
DMSO	Dimetil sulfóxido
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
Epa	Potencial de oxidação
Epc	Potencial de redução
ERONs	Espécies reativas de óxido de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Esp	Potencial de reversão
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
L	Ligante
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)
NOS	Óxido nítrico sintase
terpy	2,2': 6'', 2'' - terpiridina
TCML	Transferência de carga metal ligante
v	Velocidade de varredura (mV s^{-1})
vs	versus

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xx
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Câncer	27
1.2 Apoptose	29
1.3 Mitocôndrias: estrutura e função	33
1.4 Canais seletivos a ânions dependente de voltagem	34
1.5 NO como um inibidor do crescimento tumoral	36
1.6 Aplicações dos complexos metálicos	39
1.7 Anticorpo como molécula alvo	41
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivos Gerais	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4. ESTUDOS QUÍMICOS	49
4.1 Material e Métodos	49
4.1.1 Reagentes e solventes	49

4.1.2 Gás Argônio	50
4.1.3 Produção de óxido nítrico	50
4.1.4 Sínteses dos complexos de Rutênio	51
4.1.4.1 Síntese de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina	51
4.1.4.2 Síntese do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina	51
4.1.4.3 Síntese de <i>cis</i> -[RuCl ₂ (bpy) ₂]	52
4.1.4.4 Síntese de [Ru(bpy) ₂ (dcbpy-H ₂)](PF ₆) ₂	52
4.1.4.5 Síntese de <i>cis</i> -[RuCl ₂ (dcbpy-H ₂) ₂]	53
4.1.4.6 Síntese de [Ru(dcbpy-H) ₂ (bpy)]	53
4.1.4.7 Síntese de <i>cis</i> -[RuCl(dcbpy-H) ₂ (NO)] . 3 H ₂ O	53
4.1.4.8 Síntese de [RuCl(dcbpy-H)(terpy)]	54
4.1.4.9 Síntese de Síntese de [Ru(dcbpy-H)(terpy)NO](PF ₆) ₂ . 2H ₂ O	55
4.1.5 Medidas de Ph	55
4.1.6 Espectroscopia Eletrônica	56
4.1.7 Espectrometria de massa	56
4.1.8 Espectroscopia na região do infravermelho	56
4.1.9 Análise Elementar	56
4.1.10 Voltametria cíclica e de pulso diferencial	56
4.1.11 Análise Fotoquímica	57
4.1.12 Determinação amperométrica do NO liberado (NOmeter)	58
4.1.13 Irradiação dos complexos	58
4.2 Resultados e Discussão	58
4.2.1 Sínteses dos complexos de rutênio	58
4.2.1.1 Ligante	59
4.2.1.2 Precursores	60

4.2.1.3 Complexos Quelatos	61
4.2.1.4 Nitrosilos de rutênio	62
4.2.2 Análise elementar	63
4.2.3 Espectroscopia UV-visível	64
4.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	69
4.2.5 Espectrometria de massa	73
4.2.6 Estudo da estabilidade química dos compostos nitrosilos	78
4.2.7 Estudos Eletroquímicos	83
4.2.8 Pulso Diferencial	86
 5. ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	 89
5.1 Material e Métodos.....	89
5.1.1 Avaliação em linhagens celulares	89
5.1.1.1 Meios de Cultivo	89
5.1.1.2 Reagentes	90
5.1.1.3 Manutenção da cultura celular	90
5.1.1.4 Ensaios de citotoxicidade	91
5.1.1.5 Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT	91
5.1.1.6 Análise Estatística	92
5.1.2 Protocolo para ligação do anticorpo IgG (VDAC) complexo <i>cis</i> -[RuCl(dcbpy– H) ₂ (NO)] ₃ .H ₂ O	93
5.1.3 Detecção do anticorpo por Western Blotting	94
5.1.3.1 Tampões, soluções e reagentes	94
5.1.3.1.1 Gel de separação e gel de empilhamento	94
5.1.3.1.2 Tampão de corrida Tris/Glicina	94
5.1.3.1.3 Tampão de amostra	95

5.1.3.1.4 TBS-T	95
5.1.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	95
5.1.3.3 Avaliação por <i>Western Blotting</i> (imunoensaio)	96
5.1.3.4 Detecção por Eletroquimioluminescência	97
5.2 Resultados e Discussão	98
5.2.1 Citotoxicidade dos complexos de rutênio	98
5.2.2 Interação anticorpo-complexo de rutênio	104
6. CONCLUSÕES	111
7. REFERÊNCIAS	113
APÊNDICES	125
APÊNDICE A - Incorporação do composto nitrosilo <i>cis</i> -[RuCl(dcbpy-H) ₂ (NO)] . 3 H ₂ O em formulação lipossomal	125
APÊNDICE B - Diagrama de Pourbaix para o composto [Ru(dcbpy-H)(H ₂ O)(terpy)](PF ₆)	131
APÊNDICE C- Estabilidade química do complexo resultante da terceira etapa da síntese e [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF ₆) ₂ . 2 H ₂ O	132
APÊNDICE D - Reatividade de [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF ₆) ₂ . 2 H ₂ O encapsulado em sílica e filme semicondutor (FTO/nitrosilo complexo)	132

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

A palavra câncer tem origem no latim, cujo significado é caranguejo. Essa denominação está relacionada a capacidade das células cancerígenas de atacar e se infiltrar entre as células saudáveis de modo a se assemelhar a estrutura desses crustáceos. Esta doença tem um período de evolução duradouro, podendo, muitas vezes, levar anos para evoluir até ser descoberta. Atualmente, foram identificados mais de cem tipos desta doença, sendo que, uma proporção significativa dos cânceres pode ser curada especialmente se esses forem detectados precocemente e tratados de forma correta.

Pesquisas recentes demonstram que, no decorrer dos últimos anos, o câncer se tornou a mais devastadora doença no mundo, com mais de 10 milhões de novos casos a cada ano, superando outras enfermidades como as doenças cardiovasculares e as infecciosas. Estudos do Centro Internacional de Pesquisas contra o Câncer da OMS (Organização Mundial de Saúde) relatam que os casos de câncer dobraram entre 1975 e 2000, e devem duplicar novamente entre 2000 e 2020. Esses estudos estimam que em 2030, o câncer poderá matar 17 milhões de pessoas, contra os 7,6 milhões de óbitos que provocou em 2007 (STEWART, 2003).

Os tumores aparecem no organismo quando as células começam a proliferar de forma desorganizada apresentando crescimento autônomo e perda da diferenciação celular em função de um problema nos genes, o que é conhecido por neoplasia. Este tipo de célula evolui independentemente dos mecanismos que, normalmente, controlam a proliferação e a diferenciação celular, transformando o organismo em uma espécie de hospedeiro de células neoplásicas. Os agentes causadores das neoplasias podem ser físicos, químicos ou biológicos (FILHO, 1994).

A causa dessa mutação pode ter três origens: genes que provocam alterações na sequência do DNA; radiações que quebram os cromossomos e alguns vírus que introduzem nas células DNAs estranhos. Na maioria das situações, as células saudáveis do organismo impedem que estes DNAs passem adiante as informações.

O tumor desenvolve um conjunto de rede de vasos sanguíneos para se manter. Através da corrente sanguínea ou linfática, as células malignas chegam a outros órgãos, desenvolvendo a doença nestas regiões. Esse processo de irradiação da doença é conhecido como metástase. Esta doença é tão perigosa, pois possui capacidade eficiente de reprodução

dentro das células e também porque se reproduz e coloniza facilmente áreas reservadas a outras células.

O desenvolvimento do tumor, sua vascularização e seu potencial invasivo estão relacionados a reduzidas concentrações de óxido nítrico produzidas pelas células tumorais (JENKINS et al., 1995). Em lesões pré-malignas e em tumores de intestino grosso, a síntese de óxido nítrico está reduzida ou ausente. Correlação inversa entre o potencial metastático de tumores e a produção NO foi observada por muitos pesquisadores (ALI, 2003; AZIZZADEH et al., 2001; GOMES et al., 2002).

A capacidade de se induzir a apoptose em células malignas é desejada em especial em tumores associados ao sistema nervoso central. Esses tumores são em geral fatais, apesar dos esforços atuais nas áreas de neurocirurgia, quimioterapia e radioterapia. Os tumores da glia, ou gliomas são os principais tumores cerebrais levando a morte de pacientes em média de 6-12 meses (HOLLAND et al., 2000; TYSNES et al., 1999). O óxido nítrico atua como um potente vasodilatador de vasos cerebrais, e a inibição da NOS mostrou prevenir a resposta vasodilatadora de CO₂. O NO cerebral é sintetizado nos vasos cerebrais, nas células endoteliais e neurônios e difunde-se rapidamente em todas as direções. O uso de NO exógeno pode ativar a enzima guanilato ciclase solúvel, catalisando a formação de GMPc que desencadeia uma série de respostas celulares, incluindo relaxamento do músculo liso vascular e vasodilatação cerebral. Assim, um processo de vasodilatação mediado pelo aumento de NO leva uma maior oxigenação do tumor facilitando a ação de quimioterápicos e radiação (AI WAILI., 2007).

Os tratamentos clássicos utilizados no combate às neoplasias são a quimioterapia, a radioterapia e a remoção cirúrgica. A quimioterapia é um tratamento a base de fármacos citotóxicos que impedem a proliferação celular, principalmente das células tumorais que possuem uma alta velocidade de crescimento. Entretanto, a quimioterapia também afeta células normais desencadeando uma série de efeitos adversos como diarreia, dores abdominais, úlceras e queda de cabelo.

A radioterapia induz morte celular por ação de radiações ionizantes, que pode ser eletromagnética, raios X ou gama, e a particulada, partículas α e β , prótons e nêutrons, que eliminam o tecido neoplásico. Entretanto, a radiação atinge os tecidos normais causando reação inflamatória local como cistite, dermatite e retinite.

A cirurgia é utilizada para a retirada de tecidos neoplásicos localizados, e não é indicada para casos de metástase. Esses tratamentos clássicos são demorados e causam desgaste e sofrimento ao paciente (OCHSNER, 1997).

Com base nessas considerações fica evidente a necessidade do desenvolvimento de processos que permitam uma ação direcionada às células tumorais de modo que os tecidos normais não sejam acometidos, diminuindo assim a incidência de efeitos adversos e proporcionando melhores condições de tratamento ao paciente.

1.2. Apoptose

A morte celular pode ocorrer por meio de dois mecanismos distintos: necrose e apoptose (Figura 1). A necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, é caracterizada pela perda da homeostase iônica, que ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas como hipertermia, hipoxia, que danificando a membrana plasmática, pode acarretar o aumento do volume celular, extravasamento de material citosólico e ruptura da membrana plasmática. Nesse tipo de morte celular, o teor de Ca^{2+} aumenta no citosol por falência dos mecanismos que promovem a retirada desse íon, ocorrendo assim um processo generalizado de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) o que faz com que a membrana mitocondrial interna torne-se permeável a prótons, íons e pequenas proteínas, ocasionando falta de ATP, o que resulta em morte celular (KOWALTOWSKI, 2001).

Figura 1. Morte celular por Necrose (A) e Apoptose (B) (GODOY, 2009).

A morte celular apoptótica, ou morte celular programada, é um processo regulado por mecanismos de eliminação seletiva de células, dependente de energia, que ocorre sob condições fisiológicas normais. É um processo essencial para o desenvolvimento normal e manutenção da homeostase tissular, pois elimina células desnecessárias ou disfuncionais, (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

A morte celular programada caracteriza-se por uma série de alterações celulares morfológicas e bioquímicas como alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, quebra do DNA nuclear e fagocitose, sem que haja perda da integridade membranar ou resposta inflamatória (VAN CRUCHTEN, YASUHARA et al., 2003) (Figura 2). Pode ser desencadeada por vários estímulos endógenos ou exógenos, como por exemplo, pela ligação de moléculas a receptores na superfície celular, pelo dano ao DNA, pelo tratamento com agentes citotóxicos ou irradiação, pela falta de sinais anti-apoptóticos, por sinais desordenados do ciclo celular ou pelo desenvolvimento de sinais pró-apoptóticos. Estes sinais que induzem a morte, vindos de formas diferentes, parecem ativar uma via comum de mecanismo celular que leva à morte celular.

Figura 2. Características do processo de morte celular por apoptose e necrose (Modificada de GRIVICICH et al., 2007).

O organismo usufrui da apoptose em diferentes momentos, fisiológicos e patológicos, sendo que o desequilíbrio entre fatores pró e anti-apoptóticos contribui para o agravamento de várias doenças, como é o caso do câncer (MILLER e MARX, 1998). O equilíbrio entre estes fatores é de grande importância para que o organismo possa se desenvolver e se defender em situações desfavoráveis.

Múltiplos sinais modulam a proliferação, sobrevivência e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência. Entretanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, levando ao desenvolvimento de tumores. Assim, aumenta a cada dia a busca por novas drogas que possam regular ou levar à morte celular programada das células tumorais.

A apoptose é um processo ativo que necessita de síntese protéica e ativação das vias intracelulares. É uma morte programada geneticamente que de uma maneira geral, pode desencadear respostas celulares por duas vias: a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é desencadeada por sinais advindos de dentro das células ou por um estresse ao qual a célula foi submetida, como no caso de dano ao DNA. A via extrínseca é ativada quando ligantes pró-apoptóticos se ligam a “receptores de morte” na superfície das células (HAJRA e LIU, 2004), essas duas vias convergem numa via comum de ativação de caspases.

A execução do programa apoptótico e o conseqüente aparecimento de mudanças morfológicas peculiares a apoptose dependem da família das caspases e das mitocôndrias. As mitocôndrias possuem uma função essencial na iniciação da morte celular, estando intimamente relacionadas às vias intrínsecas que sinalizam a morte celular por necrose e apoptose, pois atuam como reservatório para múltiplas proteínas apoptogênicas, como o citocromo *c*, Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein), AIF (apoptosis inducing factor), endonucleases G e procaspases 2, 3, 8 e 9 (PARONE et al., 2002),

As caspases são cisteína-proteases clivadoras de resíduos de aspartato, inicialmente inativas (pró-caspases) só são ativadas após remoção dos pró-domínios carboxi-terminal e N-terminal. Os ligantes de morte (receptores celulares CD-95, TNFR1, APO-1 e Fas) são promotores de apoptose que ativam o complexo sinalizador da indução da morte (DISC), resultando no recrutamento das caspases indutoras 2, 8, 9 e 12. Estas clivam e ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7 que, por sua vez, executam apoptose pela degradação de centenas de proteínas reguladoras e pela ativação de endonucleases e proteases 5. Quando estimulados, os receptores CD95 e TNFR1 também ativam a produção da enzima esfingomielinase, que atua na síntese de ceramidas, potentes indutoras da apoptose.

Através da ligação com os receptores de morte, os sinais apoptóticos desencadeados em resposta a diferentes estímulos apoptóticos como drogas citotóxicas, raios ultravioleta, gama e glicocorticóides são transmitidos para o meio intracelular ocasionando a formação do apoptossoma, constituído de Apaf-1 (Fator 1 de ativação de apoptose), citocromo *c* mitocondrial (cit *c*) e pró-caspase 9. O citocromo *c* do espaço mitocondrial intermembrana é liberado para o citoplasma, unindo-se com o Apaf-1, que sofre uma mudança conformacional.

O Apaf-1, então, associa-se à pró-caspase 9, que se torna ativa e inicia a cascata proteolítica através da ativação das caspases efetoras, somente as moléculas de caspase-9 que estão ligadas ao apoptossoma são capazes de clivar e ativar caspases efetoras, como caspase-3, tornando-as hábeis em clivar macromoléculas celulares desencadeando a apoptose

(KROEMER, 2003). Por uma via distinta, a Smac/DIABLO também atua ativando a caspase-3. O efeito AIF, entretanto, parece ser independente da ativação de caspases efetoras: uma vez liberado no citosol, é conduzido ao núcleo onde promove fragmentação parcial do DNA e condensação da cromatina. Entre os mecanismos que promovem a liberação dessas proteínas da mitocôndria inclui-se a transição de permeabilidade mitocondrial.

Devido à ação proteolítica, há retração celular, agrupamento de cromatina, quebra intranuclear de DNA e formação de corpos apoptóticos. Um importante sinal apoptótico intracelular é a disfunção oxidativa da mitocôndria, que gera maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tóxicas para as células. Entre duas a seis horas antes da apoptose ocorre diminuição do potencial de membrana mitocondrial o que leva à abertura dos poros da membrana e aumento da permeabilidade mitocondrial, causando a morte celular.

A morte celular pode ser prevenida por membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, os quais são capazes de prevenir a liberação de citocromo c por interação com membros pró-apoptóticos da mesma família. Duas subfamílias de proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas foram identificadas: Bax (Bax, Bok e Bak) e BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa e PUMA). Membros pró-apoptóticos da subfamília Bax oligomerizam-se na membrana mitocondrial externa formando canais pelos quais as proteínas moduladoras da apoptose são liberadas (GROSS et al., 1999). As vias descritas acima podem ainda sofrer regulação pelo gene supressor de tumores, p53, capaz de promover apoptose via ativação direta da Bax (KROEMER, 2003) (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática das etapas envolvidas em um processo de apoptose (KROEMER, 2003).

Com base no exposto, é de grande interesse a pesquisa por compostos que demonstrem atividades citotóxicas (*in vitro*), antitumorais (*in vivo*) e que possam desencadear uma resposta de morte celular das células neoplásicas. Essas investigações levam a crer que complexos metálicos doadores de NO possam ser futuros agentes usados, pelo menos na terapia antitumoral.

Nesse contexto, é importante compreender processos que possam ocasionar disfunções mitocondriais que culminem em morte celular para que de acordo com os nossos interesses possamos modulá-los. Os estudos da regulação mitocondrial envolvidos nos processos de apoptose e necrose possibilitam a elaboração de estratégias mais adequadas para estimular ou prevenir a morte celular. Nesse sentido a escolha do anticorpo IgG (VDAC) será interessante nos estudos futuros envolvendo esses processos.

1.3 Mitocôndrias: estrutura e função

As mitocôndrias são organelas presentes nas células eucarióticas que desempenham diversas funções relacionadas à produção de energia e manutenção da vida celular. Essas organelas possuem um papel muito importante tanto na fisiologia normal quanto na disfunção celular, pois alterações nos padrões normais de produção e degeneração dos componentes mitocondriais podem ocasionar disfunções nessas organelas e conseqüentemente desencadear doenças como o câncer, Alzheimer e diabetes e ainda acarretar em morte celular. Dessa forma, fica clara a importância da manutenção da homeostase mitocondrial para a sobrevivência celular.

Essas organelas participam ativamente na manutenção das funções celulares atuando, por exemplo, na produção de ATP, indispensável na manutenção de atividades celulares dependentes de energia, nas vias de biossíntese e degradação uma vez que suas proteínas estão intimamente envolvidas nesses processos e também nos processos de morte celular por meio da propagação de cascatas de sinalização envolvidas tanto na apoptose quanto necrose (GREEN; REED, 1998).

As mitocôndrias são constituídas principalmente por lipídios e proteínas, são organelas que apresentam DNA próprio e que podem variar em relação ao formato, tamanho, quantidade e localização (GODOY, 2009).

Quanto à estrutura são divididas basicamente em quatro segmentos: membrana externa, membrana interna, espaço intermembranas e matriz (Figura 4). A membrana externa

faz a interface entre o citosol e o espaço mitocondrial separando a organela do ambiente e atuando de maneira seletiva na entrada e saída de metabólitos, sendo permeável à maior parte dos íons e moléculas pequenas ($PM < 1500$ Da), sendo nessa membrana que se encontram os canais aniônicos voltagem-dependentes (COLOMBINI, 2004).

A membrana interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares e apresenta canais iônicos, proteínas carreadoras e complexos protéicos de transferência de elétrons envolvidos na fosforilação oxidativa, síntese protéica e metabolismo lipídico. Essas membranas são separadas pelo espaço intermembranas no qual se encontram proteínas relacionadas ao processo de morte celular por apoptose como o citocromo *c*. Nessas estruturas podem ser observadas inúmeras invaginações (cristas mitocondriais) da membrana interna que se estendem para a matriz, em que estão presentes o genoma mitocondrial, as enzimas do ciclo do ácido cítrico, da via da β -oxidação dos ácidos graxos e das vias de oxidação dos aminoácidos e o complexo da piruvato desidrogenase, bem como outras enzimas e intermediários químicos envolvidos no metabolismo bioenergético (KOWALTOWSKI et al., 2001).

Figura 4. A. Estrutura clássica mitocondrial (DORTA, 2007).

B. Fotomicrografia eletrônica de mitocôndria.

Fonte: <http://cientistaonline.wordpress.com/2008/03/01/organelas-i/>

1.4 Canais seletivos a ânions dependente de voltagem

Os canais seletivos a ânions dependente de voltagem, conhecidos como VDACs, são proteínas que podem ser encontradas na membrana mitocondrial externa (MME) das células eucariotas, apresentam alta permeabilidade iônica e baixo peso molecular (30-35 kDa). Os VDACs estão relacionados à formação estruturas de poros hidrofílicos em membranas e

desempenham funções de extrema importância no metabolismo celular. Nas mitocôndrias de mamíferos, foram identificadas três isoformas de VDACs (VDAC1, 2 e 3) (SAMPSON et al., 1996), bastante semelhantes em relação à sequência de aminoácidos que as compõem, contudo muitas questões sobre as funções fisiológicas desempenhadas por cada uma das isoformas ainda precisam ser elucidadas.

Essas proteínas desempenham um importante papel na regulação da passagem para dentro e fora da mitocôndria, atuando no controle da permeabilidade regulando dessa forma, o fluxo de ânions e de uma série de metabólitos, dentre os quais estão o cálcio (Ca^{2+}) e nucleotídeos adenílicos com destaque para a adenosina 5'tri-fosfato (ATP) responsável pelo armazenamento da energia advinda da respiração celular e essencial para a manutenção de atividades celulares dependentes de energia (BENZ, 1988; GINCEL et al., 2001). Atuam também como sítio de ligação para quinases, hexoquinases e participam da sinalização envolvida nos processos de apoptose celular (KROEMER et al., 1997).

Os VDACs estão relacionados com o início da fase mitocondrial de apoptose e o envolvimento nesse mecanismo de morte celular ocorre, pois essas estruturas podem promover o transporte de proteínas apoptogênicas para o citosol e ainda atuar como sítio de ligação para as quinases (VANDER HEIDEN et al., 2001; SHOSHAN-BARMATZ, 2003), enzimas relacionadas ao processo de fosforilação, uma das formas mais importantes de regulação na célula eucariótica.

Os VDACs podem interagir com os reguladores de apoptose, membros anti- e pró-apoptóticos da família Bcl-2, composta por membros anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-x_L), membros pró-apoptóticos (Bax e Bak) e proteínas pró-apoptóticas (BID, Bik e Bin) (ADAMS, 1998). Esses canais também participam como componentes do PTP (poro de transição de permeabilidade mitocondrial), um complexo protéico presente nas mitocôndrias das células eucarióticas constituído por VDAC, translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) e ciclofilina-D (CyD), que aberto induz a liberação do citocromo c da mitocôndria desencadeando a cascata de sinalização da morte celular programada (CROMPTON, 1998).

Quando associada à membrana mitocondrial externa, a hexoquinase, atua na regulação da síntese de ATP e previne o processo apoptótico e em associação aos VDACs participa da integração da glicólise com o metabolismo de energia mitocondrial (PASTORINO, 2003) Figura 5.

Figura 5. Arquitetura molecular do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) e sua regulação (POLETI, 2008).

1.5. NO como um inibidor do crescimento tumoral

O óxido nítrico (NO) apresenta surpreendente onipresença em seres vivos. É a única molécula endógena conhecida que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível e de agente citotóxico. Essa molécula participa ativamente na regulação da pressão sanguínea, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (CULOTTA, E.; KOSHLAND DE, JR, 1992; RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992; FELDMAN et al., 1993; AINSCOUGH & BRODIE, 1995; WINK et al., 1996; IGNARRO, 2000).

Em tumores humanos o papel do NO ainda não é bem estabelecido, mas já se sabe que o óxido nítrico produz múltiplos efeitos que influenciam tanto na diminuição do crescimento tumoral quanto no processo metastático (Figura 6). Esta molécula atua na regulação da vasodilatação (IGNARRO et al., 1987), o que afeta o tumor devido ao processo de vascularização. A ação do NO endógeno está associada a apoptose em células tumorais (XU et al., 2002). A citotoxicidade é resultado de uma formação substancial de NO que é estabelecida como iniciador de processo apoptótico, caracterizado por uma super regulação da expressão do supressor do tumor p53, alterando a expressão pro- e anti apoptótica das famílias da Bcl-2 e citocromo. Assim, existe um grande interesse em compostos químicos que possam

servir de pró-drogas para a liberação controlada do óxido nítrico nos sistemas biológicos (WORKS et al., 2002).

Figura 6. Participação do NO em mecanismos genotóxicos (WINK et al., 1998).

Para que possam desempenhar essa função esses compostos devem apresentar algumas características tais como ser de fácil preparação em uma forma pura e estável, de preferência hidrossolúveis, gerar NO quantitativamente, e os produtos de saída do NO devem ser compostos inertes e atóxicos (ROY et al., 1994). Dessa forma o desenvolvimento de compostos que podem agir como doadores de NO num organismo biológico é de interesse para a clínica médica, haja vista a possibilidade de se controlar a liberação do óxido nítrico por reações fotoquímicas e/ou redutimétricas. Talvez de todas as classes de agentes doadores de NO exógenos, são os complexos metálicos amplamente estudados e podem ser vistos como bons candidatos a serem utilizados em terapia clínica como sistemas doadores de NO.

Estudos demonstram que a atuação do NO em carcinogênese, progressão tumoral e terapia do câncer depende de uma variedade de condições no meio intracelular (WELLER, 2003; CHIANG et al., 2005). Sabe-se que o NO possui tanto efeito tumorigênico quanto tumoricida. Este último favorecido quando existe elevada concentração de óxido nítrico no meio celular (Figura 7).

Figura 7. Efeito tumorigênico e tumorocida do óxido nítrico (WINK et al., 2008).

A atividade antitumoral do NO inclui inibição da proliferação, da promoção e da diferenciação de células tumorais. A ação apoptótica do NO é modulada por interações diretas e indiretas, sendo dose-dependentes e tipo celular específicas. (IGNARRO, 2000; WINK et al., 2008). No entanto, ao mesmo tempo em que altas concentrações de NO promovem o efeito tumorocida (morte celular), mecanismos de proteção celular antiapoptóticos (efeito tumorigênico) mediado pelo NO vêm sendo estudados, embora ainda não completamente elucidados, como a fosforilação de ERK, proteína regulada por sinais extracelulares mediada pelo aumento de GMPc em concentrações inferiores a 50 nM de NO (RIDNOUR et al., 2008, THOMAS et al., 2008).

Sob influência citotóxica do NO, as células tumorais podem morrer por apoptose ou necrose dependendo do tipo de célula (KRÖNCKE et al., 1997). Dentre as hipóteses para elucidação dos mecanismos que envolvem o processo de apoptose ocasionado pelo NO destacam-se: indução da expressão de Bcl-2 que é um inibidor do processo de ativação das caspases, inativação de enzimas que reparam o DNA (LAVAL et al., 1997; WINK e LAVAL, 1994) e indução do fator de transcrição p53 (THOMAS et al., 2004; HOFSETH et al., 2003). Sendo assim, em algumas células o NO pode promover a apoptose enquanto em outros tipos celulares, pode inibir o processo de morte celular programada (CHUNG et al., 2001).

1.6 Aplicações dos complexos metálicos

Os complexos metálicos, conhecidos também como compostos de coordenação, são aqueles que apresentam um (ou mais) metal (is) de transição, assim como um (ou mais) ligante (s) e normalmente estão ligados ao metal por meio de uma ligação covalente coordenada, doando um par de elétrons livre para um orbital vazio do metal. A grande vantagem de trabalhar com esses complexos está relacionada com possibilidade de associá-los aos mais diferentes ligantes, possibilitando assim a obtenção de diferentes estruturas que podem ser utilizadas para as mais diversas finalidades e desempenhar diferentes atividades biológicas, tais como atividades citotóxicas, apoptóticas, antiinflamatórias e bactericidas.

Dependendo da estrutura química resultante da união do ligante ao centro metálico, diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas ao complexo formado, sendo estas dependentes do tipo de metal e da natureza química do ligante.

O uso terapêutico dos metais não é recente, os mesmos vêm sendo utilizados desde a antiguidade, o cobre, por exemplo, era utilizado no processo de esterilização das águas desde a era Antes de Cristo, pelos egípcios. Árabes e chineses há mais de 3.500 anos usavam o ouro para tratamento de certas patologias por acreditarem que por ser um metal precioso, traria benefícios para a saúde. O ferro já era usado como remédio no Egito, em 1.500 A.C., e o zinco para o tratamento de feridas (ORVIG & ABRAMS, 1999).

Nos dias de hoje já está comprovada a importância dos complexos metálicos no organismo e o uso desses na terapia clínica, no entanto ainda é bastante limitado em comparação aos compostos orgânicos. Dentre os metais que tem recebido destaque nesse sentido estão àqueles relacionados à atuação em células tumorais (SCHWIETERT, 1999), embora o desenvolvimento e o estudo de metalo-drogas não seja uma área tão difundida, na medicina existem vários exemplos de complexos metálicos farmacologicamente ativos, o que demonstra a potencialidade de uso desses compostos (COMBA, 1999).

A modelagem molecular desses complexos para fins terapêuticos que possibilitam a absorção da droga pelo organismo envolve o delineamento de algumas etapas: hidrólise do composto, ligação em sítio protéico, transporte pela membrana celular e interação com alvos moleculares. (SCHWIETERT, 1999). O desenvolvimento dessas etapas possibilitou aplicação farmacológica, e entre outros exemplos, podem-se citar a cisplatina [*cis*-diclorodiaminaplatina(II)], descoberta por Rosenberg em 1965, e outros compostos derivados de modificações estruturais da mesma com a finalidade diminuir os efeitos adversos como, por exemplo, a carboplatina, utilizados atualmente no tratamento de câncer, (ANG &

DYSON, 2006), bem como os compostos de ouro no tratamento de artrite reumatóide, os compostos de prata usados como agentes antimicrobianos e os compostos de mercúrio utilizados como diuréticos (BERNERS, 1996; BAKHTIAR, 1999; ALLARDYCE, 2006; COHEN, 2007).

A atividade farmacológica dos complexos metálicos de maneira geral depende ou do metal, ou do ligante ou ainda da interação de ambos e deve-se a interação entre esses íons metálicos exógenos e os ligantes naturais presentes no organismo que desempenham diferentes funções dentre as quais estão o transporte, o armazenamento e a modulação de processos metabólicos diversos (STOCHEL et al., 1998). A estabilidade termodinâmica e o grau de seletividade são fatores de extrema importância para a modelagem de complexos metálicos para uso na terapia clínica. Em muitos casos, o mecanismo de ação de certas metalo-drogas não é bem conhecido, um bom entendimento destes mecanismos pode propiciar um aumento na eficiência das metalo-drogas e uma diminuição de seus efeitos indesejados.

Alguns complexos nitrosilos com aplicação médica são conhecidos desde o século XIX e muitos deles continuam sendo utilizados hoje em dia como 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 nitrosil, (SZCZEPURA, 1990; MONCADA et al., 1991; STOCHEL et al., 1998).

O uso destes compostos encontra, às vezes, limitação devido às reações secundárias àquela de interesse. No caso dos compostos nitrosilos, a reação desejada é a liberação de óxido nítrico. Algumas alternativas para o controle da liberação seletiva de NO a partir de compostos 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, isso mostra que a fotoquímica e os processos eletroquímicos podem ser utilizados para modelar diferentes processos bioquímicos.

As metalo-drogas, cujo centro metálico é o rutênio, possuem boa aplicação clínica, principalmente por ser baixa a toxicidade do metal. Isto se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste metal com as do ferro, o que possibilita que os complexos de rutênio mimetizem ligações do ferro à moléculas de importância biológica. 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 seja o mesmo

(ALLARDYCE, 2006). Lembrando que a toxicidade do metal também está relacionada com o seu estado de oxidação, pode-se afirmar que outro fator da baixa toxicidade do rutênio é sua habilidade de atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico. Provavelmente, isto ocorra devido as reações redox causadas pela enzima citocromo oxidase, ou pela glutadiona ou pelo ascorbato (ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Dentre os exemplos de aplicações clínicas envolvendo complexos de rutênio como imunossupressores (BASTOS et al., 1998), antifúngicos (DE LIMA et al., 2003), anticancerígenos (SAVA et al., 1995) dentre outros. As características desses complexos nitrosilos de rutênio e a vasta literatura a eles referente (SEDDON & SEDDON, 1984; AU & WONG, 1997) os tornam propícios no sentido de se buscar de novas substâncias que atuem como agentes liberadores de NO. Dentro deste contexto, têm sido estudadas as propriedades químicas e biológicas de complexos de rutênio, que possuem em sua esfera de coordenação o NO (LUNARDI et al., 2009; TFOUNI et al., 2010).

Para viabilizar a utilização destes complexos como metalo-drogas, é necessário compreender mais sobre o comportamento químico e o mecanismo de ação dos mesmos em sistemas biológicos. Sendo assim esse projeto visa contribuir para o conhecimento e a descrição das propriedades físico-químicas de complexos nitrosilos de rutênio. Considerando que o grupo já possui um bom conhecimento sobre os processos de controle da liberação de óxido nítrico utilizando complexos nitrosilos de rutênio, é interessante neste momento estudar e compreender mecanismos que possibilitem tornar essa liberação mais específica, dentre os quais está à utilização de anticorpos juntamente com esses complexos.

1.7. Anticorpo como molécula alvo

A interação antígeno-anticorpo é caracterizada pela alta especificidade e afinidade, propriedades fundamentais para o sucesso de anticorpos como parte da resposta imune de vertebrados e como um elemento de reconhecimento em ensaios de importância clínica.

Dentre algumas das forças envolvidas na ligação de um antígeno com resíduo de aminoácido de um anticorpo estão a interação eletrostática, as forças de Van der Waals e a ligação de hidrogênio.

Um dos desafios iminentes está em quantificar este grau de interação e, normalmente, sondas luminescentes são usadas como procedimento analítico. A ligação de anticorpo a moléculas luminescentes pode resultar em diminuição ou aumento de fluorescência e, portanto, constitui-se um método sensível para avaliar sítios de ligação anticorpo-antígeno

(WATT, 1977; CHIEN, 1975; PARKER et al., 1967; IWAKI et al., 1993). Além disto provém um método conveniente para avaliar o uso de diferentes anticorpos no processo relacionado à resposta imune (NARGESSI, 1979; O'NEAL, 1985).

Alguns exemplos de moléculas fluorescentes que foram usados como marcadores biológicos são a fluoresceína (WATT, 1977), 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonamide (DNS) (PARKER et al. 1967) e compostos de coordenação que apresentem fluorescência (ORTMANS et al., 1999; MOUCHERON et al., TERPETSCHNIG et al., 1995; DURKOP et al., 2002; YOUN et al., 1995; DEMAS, 1991; DEMAS, 1997), tal como compostos consistindo de ligação rutênio-polipiridinas.

O complexo de coordenação tem se mostrado como sendo um agente efetivo e versátil como marcador biológico (MOUCHERON et al., 1997; WALSH et al., 1996; KANG et al., 2002; TERPETSCHNIG et al., 1995; DURKOP et al., 2002; YOUN et al., 1995; DEMAS, 1997). O tempo de vida do estado excitado geralmente é longo, o que permite fácil identificação desta espécie utilizando-se de suas propriedades fluorescentes (DEMAS, 1991; DEMAS, 1997) e, entre outras aplicações, servem para monitorar trocas estruturais (WALSH, 1996) e movimentos rotacionais de proteínas (KANG et al., 2002).

A sensibilidade destas espécies estende para interações de proteínas ligadas covalentemente com outras moléculas de proteínas, como nas interações antígeno-anticorpo (TERPETSCHNIG et al. 1995; DURKOP et al., 2002; YOUN et al. 1995). A estabilidade destas espécies permite com que ensaios biológicos, como nos imunoensaios relacionados à detecção de soro albuminas, utilize-se da capacidade fluorescente destes compostos e a sensibilidade desta propriedade com a transferência de energia para se analisar a interação. Isto ilustra o quão interessante poderá ser o uso das propriedades espectroscópicas destes compostos na interação com anticorpos policlonais.

Neste trabalho, estudos relativos à interação específica de compostos de rutênio com anticorpos policlonais serão descritos. A produção de anticorpos policlonais provém um conveniente caminho de exploração inicial de efeitos de anticorpos ligados a complexos polipiridínicos de Ru(II). As características da população de anticorpos produzem uma média da constante de equilíbrio relacionado à ligação Ru-anticorpo e, certamente, refletirá as propriedades desta interação.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A pesquisa desenvolvida em nossos laboratórios envolve estudos químicos, fotoquímicos, cinéticos, farmacológicos e citotóxicos de compostos doadores de NO. Dos resultados obtidos publicamos o primeiro artigo, referente a compostos doadores de NO por irradiação luminosa na região do ultravioleta, em 2001 (TOGNIOLO et al, 2001) e desde então cerca de 45 artigos relacionados a este tema, oriundos de nosso laboratório, foram publicados. Quase que na sua totalidade estes artigos relacionam propriedades químicas e biológicas relativas a compostos doadores de NO. Com relação as propriedades anticancerígenas destes compostos, nos parece ser estas espécies passíveis de serem utilizadas como metalo drogas. Uma destas espécies estudadas tem fórmula geral $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{terpy})(\text{NO})]^{3+}$. Ensaio preliminares com estes compostos mostraram que podem exercer ação anticancerígena (Figura 8).

Figura 8. Efeito dos doadores de NO 4-pic $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{terpy})(\text{NO})]^{3+}$ sobre a viabilidade celular em células B16-F10 e melan-a.

Aparentemente a pouca especificidade do composto pode concorrer com a necessidade de se usar concentrações altas para melhorar sua atividade anticancerígena. Neste contexto o projeto desenvolvido e aqui apresentado como dissertação de mestrado é *sui generis*. Neste agrega-se a atuação citotóxica desta espécie com maior especificidade, haja vista que interação antígeno-anticorpo--- $[\text{Ru}(\text{bpy-R})\text{LNO}]^{3+}$ é esperada e o acúmulo do composto em células B16/F10 deve concorrer com aumento de atividade, quando comparado ao composto nitrosilo livre. Cabe ressaltar que esse estudo possibilitará um maior entendimento dos efeitos desses complexos doadores de NO na ação citotóxica.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Óxido nítrico (NO) é uma potente e bem conhecida molécula sinalizadora celular em sistemas mamalianos. Algumas propriedades químicas e biológicas do NO são conhecidas e descritas e muitas outras ainda carecem de melhores explicações, cuja limitação dos estudos está centrada principalmente no curto tempo de vida do NO. O corpo humano utiliza NO como agente antimicrobiano, vasodilatador, anticancerígeno e como sinalização para diferenciação neuronal, entre outras funções. Devido estas propriedades biológicas é que há grande interesse farmacológico em desenvolver compostos que possam liberar NO por estímulo externo de forma controlada.

Visando utilizar a potencialidade anticancerígena do NO, este projeto tem como objetivo geral sintetizar espécies que possam atuar como agentes doadores de NO por processo redutimétrico e que tenham atuação citotóxica mais específica, e que seja obtida por meio da interação antígeno-anticorpo---[Ru(bpy-R)LNO]³⁺ e pelo acúmulo do bioconjugado formado em células metastáticas.

3.2. Objetivos Específicos

- Síntese dos compostos que serão utilizados neste trabalho.

- a) Ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina (dcbpy)
- b) [Ru(bpy)₂(dcbpy-H₂)](PF₆)₂ (bpy = 2,2'-bipiridina)
- c) [Ru(dcbpy-H)₂(bpy)]
- d) *cis*-[RuCl₂(dcbpy-H₂)₂]
- e) *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O
- f) [RuCl(dcbpy-H)(terpy)] (terpy = terpiridina)
- g) [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O

- Caracterização química e cinética dos compostos obtidos por meio de técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas.

- Preparação do conjugado complexo nitrosilo de rutênio-anticorpo

- Avaliação da efetividade do processo de acoplamento antígeno-anticorpo---{Ru-NO}
- Avaliar a atividade citotóxica e antitumoral dos complexos nitrosilos de rutênio por meio de ensaios citotóxicos *in vitro* utilizando-se os complexos livres e conjugados com o anticorpo em células metastáticas.

Estudos Químicos

4. ESTUDOS QUÍMICOS

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Reagentes e solventes

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

Tabela 1 – Procedência dos reagentes utilizados durante as sínteses e a caracterização dos complexos.

Reagente	Procedência
Acetona	J.T.Baker
Acetonitrila	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich
Ácido hexafluorofosfórico	Aldrich
Ácido nítrico	Synth
Ácido Sulfúrico	Sigma- Aldrich
Benzeno	Cinética Química
Cloreto de Lítio	Sigma- Aldrich
Cloreto de Rutênio	Sigma- Aldrich
Dimetilformamida	Synth
Dimetilsulfóxido	Aldrich Cinética
Éter	Cinética
Glicerina	Sigma- Aldrich
Hidróxido de Sódio	Sigma- Aldrich
Metanol	J.T.Baker
Nitrito de sódio	Cinética

Tabela 1 – Procedência dos reagentes utilizados durante as sínteses e a caracterização dos complexos.

conclusão	
Reagente	Procedência
Paládio	Cinética
Pentano	Merck
Pentanol	Aldrich
Permanganato de Potássio	Synth
4-Picolina	Sigma- Aldrich
Terpiridina	Aldrich
Trietanolamina	Synth

4.1.2 Gás Argônio

O gás argônio utilizado foi borbulhado em uma solução de crômio(II), contida em um frasco lavador, para retenção de traços de oxigênio eventualmente presentes no encanamento.

As soluções de Cr(II) são obtidas por redução do correspondente sal de Cr(III) por amálgama de zinco. A troca de cor azul {Cr(II)} para verde {Cr(III)} indica a presença de oxigênio. A solução redutora é mantida em contato permanente com zinco amalgamado para sua constante regeneração. Em seguida o argônio passa por um frasco lavador contendo água destilada para lavagem e saturação do gás com vapor d'água.

4.1.3 Produção de óxido nítrico

Um sistema de três balões devidamente conectados e sem interferentes externos foram acoplados entre si. O argônio passou por uma “linha” de purificação que era composto por frascos lavadores com solução de Cr(II). No primeiro balão, foram adicionados 20,0 mL de HNO₃ 50,0 % (v/v) e, diretamente conectado a este, um segundo balão que continha 20,0 mL solução de NaOH concentrado. Por fim, o balão com a amostra.

Primeiramente borbulhou-se argônio por 30 minutos no primeiro balão que, por estar conectado a um sistema fechado, induziu a passagem do gás aos outros recipientes. A posterior adição dos fragmentos de cobre no primeiro balão produziu NO (Figura 9).

Figura 9. Foto ilustrativa da montagem utilizada para produção de óxido nítrico.

4.1.4 Sínteses dos complexos de Rutênio

4.1.4.1 Síntese de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina

Em um balão volumétrico foram adicionados 200,0 mL de 4-picolina (recém destilada), 5,000 g de paládio (10,0 %) e carvão ativo. A mistura foi mantida sob refluxo por 5 dias. Em seguida foram adicionados cuidadosamente 100,0 mL de benzeno (à quente) e o refluxo foi estendido por meia hora. A mistura foi filtrada, à quente, e o benzeno eliminado por rotaevaporação. O precipitado formado foi lavado com pentano e posteriormente seco em dessecador sob vácuo. O rendimento apresentado foi de 3,9 %.

4.1.4.2 Síntese do ácido 4,4'-dicarboxílico-2,2'-bipiridina

Método A. Em 168,0 mL de água destilada foram adicionadas 3,000 g de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, 15,000 g de permanganato de potássio e a solução foi aquecida durante 12 horas ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$). *O permanganato de potássio foi dividido em 4 alíquotas e adicionado aos poucos até a permanência da cor púrpura. A solução foi filtrada sob vácuo e foram adicionados 12,0 mL de ácido clorídrico concentrado. A solução resultante foi filtrada e o precipitado formado lavado com água destilada, sendo seco em dessecador sob vácuo. O rendimento apresentado foi de 44,0 %.

Método B. A síntese do composto 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, foi realizada segundo Sprintschnik (1977). Em um balão de reação adicionou-se 8,000 g do composto 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina e 100,0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. A solução obtida foi resfriada (T = 0 °C), em um banho de gelo e água, e 26,000 g óxido de cromo VI (CrO₃) foram adicionados em pequenas quantidades, sob agitação. Após a adição de todo CrO₃, a agitação foi mantida por mais 4 horas em temperatura ambiente (T = 25 °C). Em seguida, a temperatura foi elevada gradativamente até 75 °C e a mistura mantida sob agitação por 4 horas nesta temperatura e, posteriormente, por 10 horas em temperatura ambiente (T = 25 °C).

A mistura foi colocada num banho de gelo, obtendo-se um precipitado verde, que foi centrifugado e lavado várias vezes com água para retirar o excesso de CrO₃. Após a lavagem, o precipitado foi suspenso em água e adicionou-se solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH), agitando-se vigorosamente até o pH da mistura tornar-se básico (coloração verde). A solução foi filtrada e à mesma foi adicionado ácido clorídrico (HCl) 1,0 M concentrado, resultando na formação de um precipitado branco, 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, que foi lavado com água, metanol e éter. O rendimento apresentado foi de 84,0 %.

4.1.4.3 Síntese de *cis*-[RuCl₂(bpy)₂]

A síntese do precursor *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] foi realizada segundo procedimento descrito por Dwyer et al. (1963). Em um balão de 50,0 mL foram adicionados 8,0 mL de dimetilformamida. Adicionou-se 1,000 g de cloreto de rutênio (III) (RuCl₃·nH₂O) e 1,200 g de 2, 2'-bipiridina (bpy). Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento em banho de glicerina. A solução foi mantida em refluxo (T = 130 °C) durante 8 horas. Após o resfriamento, foram adicionados 50,0 mL de acetona. O balão foi levado à geladeira por 1 hora. Em seguida a solução foi filtrada e o precipitado formado lavado com éter e seco em dessecador sob vácuo. O rendimento apresentado foi de 68,7 %.

4.1.4.4 Síntese de [Ru(bpy)₂(dcbpy-H₂)](PF₆)₂

A síntese do composto [Ru(bpy)₂(dcbpy-H₂)](PF₆)₂ foi realizada segundo procedimento descrito por Dwyer et al. (1963). Em balão contendo 50,0 mL de água destilada e 10,0 mL de etanol foram adicionados 0,200 g de *cis*-[RuCl₂(bpy)₂], a solução foi mantida sob refluxo (T = 80 °C) com borbulhamento de argônio. Foi realizada filtração sob vácuo e o

filtrado, $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2^{2+}$, foi recolhido em um balão no qual foi borbulhado argônio por 10 minutos.

Separadamente em um béquer foram adicionados 0,156 g do ligante dcbpy em 10,0 mL de etanol e acrescentado hidróxido de amônio até total solubilização do composto. A solução foi mantida sob refluxo ($T = 80\text{ }^\circ\text{C}$) por 12 horas. Após resfriado até a temperatura ambiente ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$) foram adicionados 2,0 mL de ácido hexafluorofosfórico (HPF_6). A solução foi levada à geladeira por 24 horas para formação do precipitado. Foi realizada a filtração sob vácuo, o precipitado foi recolhido e lavado com alíquotas de etanol e água destilada. O rendimento apresentado foi de 52,4 %.

4.1.4.5 Síntese de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$

A síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$ foi realizada segundo procedimento descrito por Dwyer et al. (1963). Em um balão contendo 15,0 mL de dimetilformamida, adicionou-se 0,300 g de cloreto de rutênio (III) ($\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), 0,560 g do ligante (dcbpy) e 0,330 g de cloreto de lítio (LiCl). Acoplou-se um condensador ao balão que foi submetido a aquecimento por banho de glicerina. O refluxo foi mantido ($T = 130\text{ }^\circ\text{C}$) por 5 horas.

Após o término do tempo de reação e resfriamento da mesma, foram adicionados 50,0 mL de acetona. O balão foi levado à geladeira por 12 horas. O resultante foi filtrado e o sólido escuro recuperado lavado com éter. O rendimento apresentado foi de 98,6 %.

4.1.4.6 Síntese de $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{bpy})]$

Foram dissolvidos 0,050 g de bipyridina em 50,0 mL de etanol anidro, saturado com argônio por 10 minutos. À solução formada foram adicionados 0,200 g de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$. O refluxo foi mantido por 12 horas. Após o resfriamento ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$) foram adicionadas 2,0 mL gotas de ácido hexafluorofosfórico. Realizou-se a filtração a vácuo e o precipitado formado foi recolhido. O rendimento apresentado foi de 48,3 %.

4.1.4.7 Síntese de *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

A síntese do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foi realizada segundo procedimento descrito em Cicillini et al. (2009). Em um balão foram adicionados 0,100 g de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$ dissolvidos em 40,0 mL de água destilada. Borbulhou-se argônio

durante 30 minutos a fim de remover todo o oxigênio presente no meio. O gás NO foi gerado por meio de uma reação entre solução de ácido nítrico 50,0 %, e pedaços de cobre metálico.

Antes de borbulhar na solução do complexo de rutênio, o gás passou por uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), para remover possíveis traços de NO₂ presentes na mistura gasosa. O óxido nítrico gasoso foi borbuhlado na solução do complexo durante 40 minutos, o balão de reação foi então tirado do sistema, fechado e a mistura mantida sob agitação, ainda sob atmosfera de NO, por 1 hora. Observou-se a formação de precipitado. O balão foi recolocado no sistema e foi borbuhlado NO por mais 30 minutos. Retirou-se novamente o balão do sistema; este foi mantido fechado e sob agitação por 12 horas. A mistura foi filtrada e o precipitado obtido lavado com acetona e éter e seco sob vácuo. O rendimento apresentado foi de 59,0 %.

4.1.4.8 Síntese de [RuCl(dcbpy-H)(terpy)]

Etapa 1 – Síntese do [RuCl₃(terpy)]: Esse procedimento foi realizado conforme descrito por Sullivan et al. (1980). Em um balão adicionou-se 0,326 g de cloreto de rutênio e 0,291 g do ligante terpiridina previamente dissolvido em 40,0 mL de metanol. A mistura foi mantida em refluxo (T = 65 °C) por 3 horas e por mais 1 hora em temperatura ambiente (T = 25 °C). Obteve-se o sólido, o qual foi posteriormente filtrado e foi lavado com éter etílico. O rendimento apresentado foi de 72,0 %.

Etapa 2 – Síntese do [RuCl(dcbpy-H)(terpy)]: Esse procedimento foi realizado com base em Takeuchi et al. (1984). Em um balão adicionou-se 0,300 g de [RuCl₃(terpy)], 0,103 g de ligante (dcbpy) em 60,0 mL de etanol, 20,0 mL de água e 0,5 mL de trietanolamina. A mistura foi mantida em refluxo (80 °C) por 4 horas e após esse período foram adicionados 2,0 mL de KCl (1,0 M). Em seguida, foi realizada rotaevaporação para redução do volume final e ao mesmo adicionou-se 1,000 g de NH₄PF₆. O resultante foi mantido sob refrigeração por 12 horas sendo possível observar a formação de precipitado. Posteriormente realizou-se a filtração à vácuo. O rendimento apresentado foi de 92,3 %.

4.1.4.9 Síntese de $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Etapa 1 – Síntese do $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$: Esse procedimento foi realizado conforme descrito por Sullivan et al. (1980). Em um balão adicionou-se 0,326 g de cloreto de rutênio $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (1,57 mmol) e 0,291 g do ligante terpiridina (1,25 mmol) previamente dissolvido em 40,0 mL de metanol. A mistura foi mantida sob refluxo ($T = 65^\circ\text{C}$) por 3 horas e por mais 1 hora à temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$). Obteve-se o precipitado por filtração, o qual foi lavado com 4,0 mL de éter etílico e seco à vácuo. O rendimento apresentado foi de 70,0 %.

Etapa 2 – Síntese do $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$: Esse procedimento foi realizado com base em Takeuchi et al. (1984). Em um balão adicionou-se 0,300 g de $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$, 0,103 g de ligante (dcbpy) em 60,0 mL de etanol, 20,0 mL de água e 0,5 mL de trietanolamina. A mistura foi mantida em refluxo ($T = 80^\circ\text{C}$) por 4 horas. Ao final da reação, após a mistura atingir a temperatura ambiente, reduziu-se o volume do solvente até cerca de 10,0 mL por rotaevaporação e adicionou-se 1,000 g de NH_4PF_6 , previamente dissolvido em 1,0 mL de água. A solução foi mantida sob refrigeração por 24 horas. Em seguida, o resultante foi filtrado e o sólido obtido lavado com 5,0 mL de éter etílico e seco à vácuo. O rendimento apresentado foi de 90,5 %.

Etapa 3 – Síntese do $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Esse procedimento foi realizado com base em Murphy et al. (1986). Em um balão adicionou-se 0,200 g de $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ e 70,0 mL de água. Borbulhou-se argônio por 15 minutos e em seguida adicionou-se 0,087 g de nitrito de sódio (NaNO_2). O refluxo foi mantido por 1 hora sob argônio, após ter sido atingida a temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$) adicionou-se 2,0 mL de HPPF_6 à mistura e esta foi mantida sob refrigeração por 48 horas. A solução foi filtrada e o sólido lavado com água e éter etílico. O rendimento apresentado foi de 43,7 %.

Etapa 4 – A partir do sólido obtido anteriormente repetiu-se a etapa 3. O rendimento apresentado foi de 38,7 %.

4.1.5 Medidas de pH

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

4.1.6 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos apresentados foram obtidos em um espectrofotômetro UV-visível-NIR – modelo U-3501 e Agilent – modelo 8453, com varredura na região de 200 nm a 800 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absortividade molar (ϵ).

4.1.7 Espectrometria de massa

Os espectros foram obtidos por espectrometria em espectrômetro de massas modelo: ultrOTOFG - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics), presente no NPPNS (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos), do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Condições experimentais: bomba de infusão (MODELO: COLE PARMER) 300 μ l/h; End Plate: 4000 Volts; Capillary: 4500 Volts; Capillary Exit: 300 Volts; modo de detecção positivo.

4.1.8 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com Espectrofotômetro Prestige-21 Shimadzu 02190. As amostras foram feitas no estado sólido utilizando pastilha de brometo de potássio (KBr).

4.1.9 Análise Elementar

Os resultados de análise elementar dos complexos foram obtidos em um aparelho Elemental Analyzers CE Instruments Carlo Erba modelo 1110 CHNS-O, instalado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

4.1.10 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, para os complexos $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ e *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, foram obtidos em meio aquoso, contendo cloreto de potássio (KCl) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ como eletrólito suporte, à temperatura ambiente. O eletrodo de trabalho foi de carbono vítreo, o eletrodo auxiliar foi de platina e o eletrodo de referência foi de Ag/AgCl. Para um processo reversível, os potenciais e as correntes de picos anódico e catódico (E_{pa} , E_{pc} , I_{pa} , I_{pc}), o potencial de meia onda de um processo redox ($E_{1/2}$) e o potencial e a corrente de inversão de varredura (E_{sp} , I_{sp}) podem ser obtidos (Figura 10).

Figura 10. Ilustração dos parâmetros de um voltamograma cíclico completo.

Caso o sistema não apresente linha de base catódica definida na redução (ou anódica na oxidação), utiliza-se o método empírico de Nicholson & Shain (1965) que determina a razão I_{pa}/I_{pc} pela Equação 1.

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = \frac{I_{pa(0)}}{I_{pc}} + 0,485 \times \left(\frac{I_{sp(0)}}{I_{pc}} \right) + 0,086 \quad (1)$$

4.1.11 Análise Fotoquímica

No experimento de fotólise foi utilizado laser de diodo marca Colibri QuantumTech[®]. As soluções preparadas dos diferentes complexos foram adicionadas em cubetas de quartzo (alíquotas de 2,00 mL) e mantidas sob agitação magnética. A incidência de luz foi feita a uma distância de 5 cm da fenda do laser. A potência de luz (em mW) é dada pelo próprio software (Colibri, QuantumTech[®]) utilizado para a irradiação no comprimento de onda escolhido,

sendo que também foi determinada, durante o conjunto de pulsos, através de um equipamento medidor de potência de laser/energia FieldMastII-TOP (Coherent[®]) utilizando-se uma cabeça para detecção, posicionada pelo menos 5 cm de distância da luz incidente.

4.1.12 Determinação amperométrica do NO liberado (NOmeter)

A liberação fotoinduzida de NO gasoso foi detectada diretamente por um sensor amperométrico (ISO-NOP), desenvolvido pela World Precision Instruments. Este sensor possui uma membrana seletiva de NO gasoso, com sensibilidade na faixa de 1 nM a 20 μ M, e com tempo de resposta relativamente curto, compatível com o sistema pulsado de irradiação proposto. O sinal analógico do ISO-NO é digitalizado e registrado temporalmente utilizando um sistema de detecção CR-7 da Shimadzu e convertido ao PC pelo programa DUO.18 v 1.1.

4.1.13 Irradiação dos complexos

Foram realizados dois tipos diferentes de experimentos de fotólise: um com acompanhamento da variação espectroscópica na região UV-visível e o outro com registro amperométrico *in situ* da liberação de NO gasoso (ISO-NO). A fotólise com acompanhamento da variação do espectro na região do UV-visível foi realizada segundo o protocolo: Prepararam-se as amostras dos complexos em solução tampão, com concentrações próximas a 1×10^{-4} mol L⁻¹. Foi realizado um espectro UV-visível inicial, antes da irradiação. A seguir a amostra foi irradiada durante certo período de tempo (t) e foi realizado um novo espectro na região do UV-visível. Esse procedimento foi repetido até que não houvesse mais variação no espectro da amostra. A fotólise com acompanhamento *in situ* da liberação de NO gasoso foi realizada pelo acoplamento do eletrodo seletivo para NO (NOmeter) na cubeta a ser irradiada, o procedimento de preparo da amostra foi repetido da mesma forma descrita anteriormente.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Sínteses dos complexos de rutênio

A obtenção dos compostos de rutênio, em que o íon metálico encontra-se coordenado ao ligante nitrosilo, obedeceu um laborioso esquema de preparação que inicia-se com a

síntese do ligante e culmina com a obtenção do complexo contendo o fragmento $\{\text{Ru-NO}\}^{3+}$, além destas espécies, outras se fizeram necessárias preparar para que pudéssemos ter resultados que nos permitissem a interpretação abalizada de todo o processo. Em todas as sínteses, os processos de caracterização procederam a obtenção desses.

4.2.1.1 Ligante

- **Ácido 4,4'-dicarboxílico-2,2'-bipiridina (dcbpy)**

Para a realização da síntese do ligante ácido 4,4'-dicarboxílico-2,2'-bipiridina, previamente foi sintetizado o precursor 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmbpy), o qual foi posteriormente oxidado a (dcbpy) utilizando como agente oxidante o KMnO_4 (Figura 11).

Figura 11. Estruturas dos compostos (A) 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (dmbpy) e (B) ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.

A síntese do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina descrita anteriormente no item 4.4.2, não proporcionou um resultado satisfatório, uma vez que o produto obtido não possuía as características referentes ao composto desejado.

Foi feito então uma análise para avaliar o que poderia ter resultado no insucesso da síntese e concluímos que algumas hipóteses seriam plausíveis. Dentre elas, a de que poderia ter ocorrido formação de um álcool, um aldeído ou ainda de apenas uma carboxila e não de duas como era o desejado. Isso posto, optamos por utilizar outra rota sintética descrita na reação abaixo (SPRINTSCHNIK, 1977).

Esquema 1. Reação de síntese do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.

4.2.1.2 Precursores

- *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$

Os precursores *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ (Figura 12 A) e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$ (Figura 12 B) foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita por Dwyer et al., (1963) e ambos foram caracterizados por espectroscopia na região UV-visível e infravermelho.

A comparação à literatura (DRAKE et al., 1985; DWYER et al., 1963; TOGNILOLO, 2001), nos direcionou no uso desses compostos em etapas posteriores.

Figura 12. Estruturas dos precursores *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ (A) e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$ (B).

4.2.1.3 Complexos Quelatos

- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{bpy})]$

As sínteses dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ (Figura 13 A) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{bpy})]$ (Figura 13 B) foram realizadas utilizando-se como precursores os compostos *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)_2]$ respectivamente.

Figura 13. Estrutura dos complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ (A) e $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dcbpy}-\text{H})_2]$ (B).

Inicialmente, sintetizou-se o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ utilizando-se como solvente o etanol. Para este procedimento o rendimento obtido foi de 52,4 %. Num segundo processo sintético, optou-se por realizar a síntese numa mistura de solvente água/etanol (1:1), na expectativa que o processo de hidrólise do precursor fosse a etapa determinante para a coordenação do ligante (dcbpy) (Esquema 2). De fato a expectativa foi obedecida e o rendimento da reação nessa condição foi de 74,0 %.

Esquema 2. Síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ a partir do precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$

- **[RuCl(dcbpy-H)(terpy)]**

A síntese do composto [RuCl(dcbpy-H)(terpy)] (Figura 14) foi realizada com base em procedimentos previamente relatado (SULLIVAN et al., 1980; TAKEUCHI et al., 1984). A comparação com dados UV-visível dos relatos da literatura, nos permitiram inferir a estrutura molecular proposta.

Figura 14. Estrutura do composto [RuCl(dcbpy-H)(terpy)].

4.2.1.4 Nitrosilos de rutênio

Complexos de rutênio, em que existe o ligante NO na esfera de coordenação do metal, são geralmente descritos como Ru(II) e o ligante como NO⁺ (GUENGERICH & SCHUG, 1978; BOTTOMLEY, 1978; WALSH et al., 1980; BORGES et al., 1998). A síntese destas espécies pode ser obtida de três maneiras:

- Borbulhamento do óxido nítrico gasoso em um precursor que contenha o fragmento Ru^{II}-H₂O ou o Ru^{III}-H₂O (CHENEY & ARMOR, 1977; NAGAO et al., 1989).

- Adição de nitrito de sódio a uma solução ácida de um complexo que contenha o fragmento Ru^{II}-H₂O (GODWIN & MEYER, 1971a; WALSH & DURHAM, 1982; TOGANO et al., 1992).

- Oxidação do ligante amina (NH₃) coordenado ao íon metálico Ru (II) (MURPHY et al., 1982, 1986; ASSEFA & STANBURY, 1997).

Das três possibilidades de sínteses descritas acima, utilizamos as duas primeiras como métodos de preparação dos complexos nitrosilos descritos neste trabalho. A eficiência, pureza e rendimento nos nortearam na repetição da síntese e do método a ser reproduzido, quando necessário. Neste contexto o método aqui descrito consiste naquele que apresentou os melhores resultados efetivos.

• ***cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O e [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O**

Para a obtenção do composto *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O (Figura 15 A) foi realizada uma síntese partindo-se do precursor *cis*-[RuCl₂(dcbpy-H₂)₂] e utilizando-se borbulhamento de NO gasoso, com posterior isolamento do complexo por adição de HPF₆.

Já no processo sintético realizado para obtenção do complexo [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O (Figura 15 B) utilizou-se a técnica de adição de nitrito de sódio.

As espécies assim obtidas foram caracterizadas por vários processos físico-químicos, descritos a seguir.

Figura 15. Estruturas dos complexos *cis*-[Ru(dcbpy-H)₂(Cl)(NO)] . 3 H₂O (A) e [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ . 2 H₂O (B).

4.2.2 Análise elementar

Os compostos sintetizados foram caracterizados por análise elementar (C,N,H). Os resultados sugerem as fórmulas descritas na tabela 2 e corroboram com a análise de sucesso na metodologia de síntese.

Tabela 2 – Resultados de análise elementar para os compostos sintetizados.

Compostos	%C		%H		%N	
	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.
Ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina	57,81	59,02	3,12	3,30	11,31	11,47
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$	33,74	35,93	2,59	2,07	10,48	7,85
$[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})]$	50,12	52,90	3,11	2,95	10,82	11,42
$[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	31,99	30,66	2,28	2,09	7,33	7,94
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	39,31	40,77	2,80	2,85	9,31	9,90

4.2.3 Espectroscopia UV-visível

Espectros na região do UV-visível de complexos de rutênio, com ligantes insaturados coordenados apresentam, geralmente, bandas na região do visível, atribuídas a transições de campo ligante e a transferência de carga, e bandas na região do ultravioleta, atribuídas a transições internas do ligante (LEVER, 1984). Essas transições podem ser observadas no diagrama ilustrado na Figura 16.

Figura 16. Diagrama simplificado de orbitais moleculares e transições eletrônicas.

Modificado (RICHTER-ADDO & LEGZDINS, 1992).

- Transições de campo ligante são observadas entre níveis energéticos localizados no metal. As bandas são originadas pela quebra da degenerescência dos orbitais d (transições $d \rightarrow d$), que num campo octaédrico podem ser designados por t_{2g} e e_g .

- Compostos com rutênio com ligantes insaturados (FORD, et al., 1968; TFOUNI & FORD, 1980) são caracterizados por uma ligação π característica de transições de transferência de carga ou elétron do metal para o ligante (TCML). Estas transições apresentam coeficiente de máxima absortividade molar (ϵ) da ordem de $10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e normalmente localizam-se na região do visível, dado que a ocorrência dessas bandas depende da existência de orbitais de simetria apropriadas no metal e ligante.

- As transições internas do ligante (IL) são semelhantes às transições observadas nos ligantes insaturados não coordenados. Como exemplo, temos os ligantes aromáticos n-heterocíclicos livres, ou não coordenados, que 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, já as transições envolvendo os elétrons π são bastante intensas.

Alguns dos espectros representativos dos compostos sintetizados neste trabalho estão representados nas Figuras 17 a 19.

Figura 17. Espectros de absorção na região do UV-visível, em água, do ligante ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina [$4,92 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$] (A) e de complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}-\text{H}_2)](\text{PF}_6)_2$ [$9,69 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$] (B).

As bandas na região do visível para os complexos $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})_2(\text{bpy})]$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy-H}_2)](\text{PF}_6)_2$ foram atribuídas como sendo de transferência de carga metal-ligante (TCML), em analogia à espécie $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]$ e aquelas observadas na região do ultravioleta como intra-ligante, devido a transição $\pi-\pi^*$.

Figura 18. Espectros de absorção na região do UV-vis, em água, dos complexos *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$ $[1,50 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}]$ (A) e *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ $[1,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}]$ (B).

Os espectros das espécies *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$ foram comparados aos dos complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Cl})(\text{NO})]$ e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$. O comportamento destes dois últimos foi estudado por Meyer e colaboradores (BRADDOCK & MEYER, 1973), cuja descrição serviu de base para caracterização das espécies nitrosilo neste trabalho. As bandas em 510 e 372 nm no espectro do composto *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$ foram atribuídas à TCML e as bandas na região do ultravioleta, à IL (Figura 18 A).

O espectro do composto *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ (Figura 18 B), apresenta uma banda em 304 nm e um ombro em 325 nm. A banda em 304 nm foi atribuída à transição ($\pi \rightarrow \pi^*$), que também é observada no ligante livre, assim como no espectro de seu precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$ (Figura 18 A). O ombro na região de 325 nm foi atribuído à transferência de carga metal ligante (TCML) devido à transição $d_\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$ e/ou $d_\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{dcbpy})$.

No espectro do complexo $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$ (Figura 19) pode ser observado duas bandas intensas, uma em 225 nm e outra em 262 nm. As bandas na região do ultravioleta foram

atribuídas à transição interna $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes insaturados, decorrente da ligação da terpiridina ao metal. As bandas na região do visível são, provavelmente, de campo ligante com provável contribuição de banda de transferência de carga ligante-metal (TCLM), do ligante insaturado para orbitais $d\pi$ do íon metálico.

Na segunda etapa da síntese, a partir do $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$ (vermelho) obteve-se o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ (Figura 19 A - preto). Neste espectro pode-se observar o aparecimento de uma banda na região do visível (464 nm) característica de uma banda de transferência de carga metal-ligante (TCML), provavelmente devido à transição $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{dcbpy})$. A terceira etapa, consiste na substituição da molécula de H_2O pela molécula de NO, através da ligação do NO com o metal. Após o término da terceira etapa de síntese, apesar de já ter sido adicionado o ligante NO, o espectro continuou apresentar uma banda em 464 nm, característica do complexo na forma aquo, o que provavelmente ocorreu, pois nem todo o NO tinha se ligado ao complexo. Após a quarta etapa da síntese foi possível observar o desaparecimento da banda em 464 nm e o aparecimento de uma banda intensa em 323 nm, o que nos permite inferir que de fato o NO encontra-se coordenado ao Ru(II) no complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Ombros em 323 e 345 nm são também observados e consistem com espécies contendo a ligação Ru-NO (CICILLINI, 2009; DE LIMA, 2006; SAUAIA, 2003).

Figura 19. Espectros de absorção na região do UV-Visível, em água. (A) Precursor $[\text{RuCl}_3(\text{terpy})]$ (—) e $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ (—) B) Complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

Baseado nos espectros eletrônicos determinou-se o coeficiente de absortividade molar para as espécies sintetizadas, tal qual aquele descrito para $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})]$ como modelo das espécies sintetizadas (Figura 20), os quais estão descritos na Tabela 3.

Figura 20. Curva de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade molar do complexo $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})]$. A) Absorbância 308 nm. B) Absorbância 496 nm.

Tabela 3 – Resultados de análise de espectros na região do UV-visível para os compostos em água.

Composto	λ (nm), (log ϵ)
Ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina	296, (4,05); 238, (4,07)
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy-H}_2)](\text{PF}_6)_2$	240, (4,46); 288, (4,89); 346, (4,03); 478, (4,07)
$[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})_2(\text{bpy})]$	244, (4,43); 306, (4,53); 373, (4,00); 496, (3,98)
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy-H}_2)_2]$	248 (4,44); 304 (4,64); 372 (4,00); 510 (3,97)
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	304 (4,65); 325 (4,13)

Tabela 3 – Resultados de análise de espectros na região do UV-visível para os compostos em água.

Composto	conclusão	
	λ (nm), (log ϵ)	
[RuCl(dcbpy-H)(terpy)]	225, (3,76); 272, (3,58); 308, (3,83); 363, (3,12); 496, (3,23)	
[Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF ₆) ₂ . 2 H ₂ O	323, (4,13); 306, (4,43)	
[Ru(dcbpy-H)(H ₂ O)(terpy)](PF ₆)	469, (3,78); 352, (3,95); 306, (4,48)	

4.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros FTIR foram obtidos para todos os compostos sintetizados neste trabalho, os mesmos serviram principalmente de base para qualificar a coordenação do ligante óxido de nitrogênio ao íon metálico Ru(II). Alguns destes espectros, como representativos para todas as espécies descritas neste trabalho, podem ser observados nas Figuras 21 a 24.

O espectro de absorção no infravermelho do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, (Figura 21) apresenta bandas relativas à deformação angular do anel piridínico entre 730 e 830 cm⁻¹ e bandas entre 1400 e 1600 cm⁻¹ referente ao estiramento simétrico da ligação C=C comprovam a presença desse anel. A banda larga na região entre 3400 cm⁻¹ é atribuída a estiramentos do grupo O-H e a banda em 1690 cm⁻¹ é referente ao estiramento C=O, confirmando a formação do ácido carboxílico (PAVIA et al., 1996).

As principais bandas observadas para esse ligante e suas atribuições são apresentadas na Tabela 4.

Figura 21. Espectro de absorção no infravermelho do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina, em pastilhas de KBr.

Tabela 4 – Atribuição de algumas das bandas de absorção na região do infravermelho para o ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.

Tentativa de Atribuição	Estiramento	ν (cm ⁻¹)
Anéis piridínicos	C=C	1400-1600
	C=N	1554
	C=C	730-790
Ácido carboxílico	C=O	1690
	O-H	3400-2400

Os espectros na região do infravermelho dos complexos *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] (Figura 22 A) e [Ru(bpy)₂(dcbpy-H₂)](PF₆)₂ bem como o do [Ru(dcbpy-H)₂(bpy)] (Figura 22 B) apresentam características semelhantes aos ligantes piridínicos coordenados (região de 1600-1200 cm⁻¹).

Figura 22. Espectros na região do infravermelho, do precursor *cis*-[RuCl₂(bpy)₂] (A) e [Ru](dcbpy-H)₂(bpy)] (B), em pastilhas de KBr.

No estudo de complexos nitrosilos, a espectroscopia na região do infravermelho é muito útil para verificar a coordenação de NO⁺ ao íon metálico rutênio(II). Os complexos de rutênio, em que existem o ligante nitrosil na esfera de coordenação do metal, são geralmente descritos como Ru(II) e o ligante como NO⁺ (GUENGERICH & SCHUG, 1978; BOTTOMLEY, 1978; WALSH et al., 1980; BORGES et al., 1998).

Assim, o espectro do complexo deve apresentar uma banda intensa no intervalo de 1800 cm⁻¹ a 1970 cm⁻¹ diferentemente do precursor. No entanto é interessante destacar que a frequência de estiramento ν_{NO} em compostos de coordenação pode variar, uma vez que essa é dependente do metal, em estado de oxidação do ligante nitrosil, co-ligantes e da estereoquímica do ligante NO (SCHRÖDER & STEPHENSON, 1987; BATISTA et al., 1997; FORD et al., 1998). Para o complexo [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ · 2 H₂O, observa-se uma banda em 1944 cm⁻¹, que não está presente em seu precursor (Figura 23). Este valor é similar a uma série de compostos rutênio-nitrosilo (Tabela 5), o que nos permite inferir que a retro-doação Ru(II)-NO⁺, para todos esses complexos, é similar.

Figura 23. Espectros de absorção na região do infravermelho dos compostos $[\text{RuCl(dcbpy-H)(terpy)}]$ (—) e $[\text{Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (—), em pastilhas de KBr.

Tabela 5 – Energia do estiramento ν_{NO} para complexos rutênio-nitrosilo.

Complexo	$\nu_{\text{NO}} (\text{cm}^{-1})$	Referência
$[\text{Ru(bdqi)(terpy)NO}^+](\text{PF}_6)_3$	1945	DE LIMA, 2006
$[\text{Ru(bdqi-COOH)(terpy)(NO)}](\text{PF}_6)_3$	1888	DE LIMA, 2006
$[\text{Ru(bdcat-COOH)(terpy)(NO)}](\text{PF}_6)_3$	1874	DE LIMA, 2006
<i>trans</i> - $[\text{RuCl(bpy)}_2\text{NO}](\text{PF}_6)_2$	1913	BERTOLINI, 2004
<i>cis</i> - $[\text{RuCl(bpy)}_2\text{NO}](\text{PF}_6)_2$	1930	BERTOLINI, 2004
$[\text{Ru(NO)(NO}_2\text{)pc}]$	1910	CARNEIRO, 2011
<i>trans</i> - $[\text{RuCl(cyclam)NO}](\text{PF}_6)_2$	1853	MARCHESI, 2008
$[\text{Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1944	este trabalho
<i>cis</i> - $[\text{RuCl(dcbpy-H)}_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	1942	este trabalho

No sentido de visualizar a conversão do NO^+ em NO_2^- (equação 2) foi realizado um experimento com o composto *cis*- $[\text{RuCl(dcbpy-H)}_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, ao qual foi adicionado hidróxido de amônio. Como resultado dessa adição observa-se que a banda característica do

NO^+ (1944 nm) desaparece por completo e surgem bandas como as em 1394 nm e em 830 nm (Figura 24) que devem ser referentes ao estiramento do grupo nitro (EL-SAYED & RAGSDALE, 1967).

Figura 24. Espectros de absorção na região do infravermelho, dos complexos *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] · 3 H₂O sem adição de hidróxido de amônio (—) e com adição de hidróxido de amônio (—), em pastilha de KBr.

O ligante nitrosilo é susceptível ao ataque nucleofílico, notadamente OH^- e forma NO_2^- (ligante nitro) – equação 2.

Assim o isolamento da espécie contendo $\{\text{Ru-NO}_2\}^-$ (equação 2) e FTIR deste, no qual não se observa mais a banda na região de 1950 cm^{-1} , é uma prova indubitável da atribuição da banda ν_{NO} no complexo nitrosilo.

4.2.5 Espectrometria de massa

A espectrometria de massas (MS) é uma importante ferramenta para caracterização estrutural (COLNAGO et al., 2002), e dessa forma a mesma foi utilizada como uma das técnicas de caracterização de alguns dos compostos sintetizados neste trabalho.

São inúmeros os espectrômetros de massa existentes, mas o princípio de funcionamento entre esses é bastante semelhante e envolve gaseificação, ionização da

amostra, aceleração da molécula carregada por um campo elétrico, dispersão dos íons de acordo com a razão massa/carga (razão m/z), detecção dos íons e registro do sinal.

O grande avanço nesta área ocorreu com o desenvolvimento da técnica de ionização por *spray* eletrostático (ESI), em que primeiro ioniza-se a amostra para depois levá-la a fase gasosa. O tempo que cada íon leva para atingir o detector depende das sua massa molecular (m) e carga (z), sendo proporcional à razão m/z ; portanto, é possível determinar a massa molecular do composto. A detecção positiva utilizada nesses experimentos mede a abundância dos cátions, enquanto a detecção negativa avalia a presença de ânions formados.

Um espectro de massa separa individualmente os íons de forma que um íon de um composto elementar contém um ou mais isótopos deste elemento químico que fornecerão um número de picos isótopos. Estes picos apresentam um padrão característico de intensidade e espaçamento de acordo com a massa dos isótopos e a sua abundância no meio. A distribuição isotópica além de indicar qual o principal elemento que o fragmento contém através de seu perfil fornece também a carga do íon, sendo possível definir a carga do fragmento através da diferença de massa/carga ($\Delta m/z$) entre os isótopos.

No processo de análise das amostras preparadas optou-se pela utilização do solvente metanol, que dentro de suas características físicas, apresenta um ponto de ebulição moderado, podendo então ser removido a partir das microgotas carregadas, produzidas durante o processo ESI, sem que para isso haja a necessidade da utilização de altas temperaturas.

Com relação ao ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina essencialmente buscou-se determinar a fórmula molecular baseada na relação massa/carga (m/z) (Figura 25). O valor $m/z = 245,06$ é consistente com a composição da espécie ($\{C_{12}N_2O_4H_8\}^+$), cujo resultado teórico é de $m/z = 245,0563$ (www.sisweb.com/mstools/isotope.htm).

Para os compostos de rutênio a característica típica do espectro de massa é o aparecimento de 7 picos relativos aos isótopos deste íon metálico (HENDERSON & McINDOLE, 2005).

Os valores de massa/carga experimental foram então calculados, e os resultados associados aos compostos sintetizados encontram-se descritos na Tabela 6.

Nas Figuras 26 a 30 podem ser observados alguns dos espectros de massa relativos a esses compostos.

Figura 25. Espectro de massa do o ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina.

Tabela 6 – Valores de m/z (experimental e calculado) para os compostos de rutênio.

Compostos	Experimental m/z	Calculado* m/z
$\{\text{Ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-bipiridina-H}\}^+$	245.06	245.056
$\{[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)\}^+$	803.0816	803.054
$\{[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{bpy})(\text{dcbpy})]\}^+$	748,09	748,07
$\text{cis-}\{[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{dcbpy})(\text{NO})]\}^+$	652.9705	652.95
$[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})]$	613,9340	613,01
$\{[\text{Ru}(\text{dcbpy})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)\}^+$	755.0331	755.01

*www.sisweb.com/mstools/isotope.htm.

Figura 26. Espectro de massa do complexo $[Ru(dcbpy-H)(bpy)_2](PF_6)^+$.

Figura 27. Espectro de massa do composto $cis-[RuCl(dcbpy-H)(dcbpy)(NO)]^+$.

Figura 28. Espectro de massa do composto $cis-[[RuCl(dcbpy-H)(dcbpy)(NO)]]^+$ obtido em www.sisweb.com/mstools/isotope.htm.

Figura 29. Espectro de massa do composto $[Ru(dcbpy)(terpy)(NO)](PF_6)^+$.

Figura 30. Espectro de massa do composto $\{[\text{Ru}(\text{dcbpy})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)\}^+$ obtido em www.sisweb.com/mstools/isotope.htm.

4.2.6 Estudo da estabilidade química dos compostos nitrosilos

Um dos objetivos iminentes deste trabalho é a avaliação citotóxica de complexos rutênio-nitrosilo, assim sendo, a avaliação da estabilidade desses torna-se imprescindível.

Os complexos nitrosilos de rutênio com co-ligantes piridínicos têm sido estudados desde o início da década de setenta (GODWIN & MEYER, 1971; CALLAHAN & MEYER, 1977). A partir dessa data, vários compostos contendo esses ligantes foram sintetizados e suas propriedades químicas e fotoquímicas descritas (TOMA et al., 2000; DURHAM et al., 1980; ADAMSON & FILEISCHAWER et al., 1975).

Alguns autores mostraram que a reatividade do grupamento nitrosil depende das características de co-ligantes como 2,2'-bipiridina e piridina (OOYAMA et al., 1995). Em diferentes trabalhos (TOGNILOLO et al., 2001 e SAUAIA et al., 2003c) para uma série de compostos nitrosilos foi verificado que o provável caminho fotoquímico para liberação do NO está relacionado com a irradiação da banda TCML tipo $d_\pi \text{ Ru(II)} \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$ e consequentemente foto-labilização do ligante nitrosil, demonstrando a possibilidade de utilização desses como doadores de NO mediante estímulo fotoquímico, ressaltando que o

comprimento de onda, intensidade e o local de irradiação podem ser modulados no sentido de promover essa liberação controlada do NO em um alvos biológicos específicos.

Complexos rutênio-nitrosilo podem apresentar reatividade em função da irradiação luminosa e ou pH do meio (CICILLINI et al., 2009; DA ROCHA et al., 2008; DE LIMA, 2006). No intuito de se observar a estabilidade de complexos nitrosilos, utilizamos o *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O como protótipo desta avaliação.

Para tanto foi dissolvida uma massa do composto em água e conduziu-se o experimento de estabilidade. A solução aquosa espectrofotométrica ($[] \cong 10^{-4}$ M) foi dividida em duas frações, uma permaneceu exposta à luz ambiente e a outra na ausência de qualquer luminosidade. As alterações no perfil espectrofotométrico na presença e ausência de luminosidade na região do UV-visível estão representadas na Figura 31.

Figura 31. Variação espectral na região do UV-visível do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O, em solução aquosa, temperatura ambiente ($T = 25$ °C), na presença de luz (A) e na ausência de luz (B).

Embora tênues, as pequenas diferenças entre os espectros em função da irradiação luminosa e sem esta, foram observadas. A definição do ponto isobéstico na região de 350 nm, nos parece a mais visível (Figura 31 A).

Se considerarmos a influência da luz sob o espectro eletrônico de espécies similares (TOGNIOLO et al., 2001 e SAUAIA et al., 2003c; DA ROCHA et al., 2008; DE LIMA, 2006), de fato, poderíamos concluir que a região e a intensidade da luz, neste experimento,

afeta pouco a reatividade do composto, uma vez que haveria baixa absorção de luz na região do visível. Em relação ao experimento no escuro, pequenas alterações observadas, devem ser fruto do ataque nucleofílico de OH^- , proveniente da ionização da água. Neste caso, o efeito da adição de base catalisa a reação no sentido de formação do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (Equação 2), nos permitindo concluir que semelhante reação à adição de base no complexo nitrosilo (Figura 32), ocorre também em água. Dados de FTIR (Figura 24) mostram o desaparecimento da banda ν_{NO} (1944 cm^{-1}), o que corrobora com a reação descrita na equação 2.

Figura 32. Espectros de absorção na região do UV-vis, em solução aquosa, do complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ antes (—) e após a adição de hidróxido de amônio (—).

A instabilidade observada quando do experimento conduzido na presença de luz (Figura 31 A), nos remeteu a desenvolver ensaios em condições de luminosidade controlada, para os complexos nitrosilos. Por exemplo, a instabilidade do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ na presença de luz (Figura 33) foi avaliada. O resultado nos sugere reatividade fotoquímica com irradiação de luz visível. Isto posto avaliamos este aspecto utilizando irradiação em 447 nm, através de fotólise em tempos definidos (Figura 34) e acompanhamento fotoquímico, na presença de sensor de NO (Figura 35).

Figura 33. Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em água, na temperatura ambiente ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) e presença de luz.

Figura 34. Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em solução aquosa, durante a fotólise. Tempo de irradiação de 0 a 240 segundos.

Figura 35. Cronoamperograma do NO liberado para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em solução aquosa, irradiado em 447 nm durante 9 minutos.

Os dados de variação espectroscópica e cronoamperométricos nos levaram a considerar, por similaridade a literatura (DE LIMA, 2006; SAUAIA, 2003c), sobre o mecanismo fotoquímico abaixo descrito (Esquema 3). Esta reatividade pode ser extrapolada a outras espécies.

Esquema 3. Sugestão de mecanismo de fotólise em 447 nm para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

Cabe ressaltar que na ausência de luz não houve alteração significativa no espectro eletrônico, o que nos leva a concluir que a espécie é estável, pelo ponto de vista espectroscópico, no escuro (Figura 36).

Figura 36. Variação espectral na região do UV-visível do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em água, na temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$) e ausência de luz.

4.2.7 Estudos Eletroquímicos

A avaliação da reversibilidade dos processos referentes ao ligante nitrosil ($\text{NO}^{+/0}$; $\text{NO}^{0/-}$), em nosso trabalho, foi realizada utilizando voltametria cíclica, sendo esta também utilizada na investigação da existência de processo químico seguido do processo eletroquímico, por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. O estudo para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ foi realizado utilizando como eletrólito suporte $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão $\text{pH} = 2,0$, já o estudo para o complexo *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ foi realizado em solução aquosa utilizando como eletrólito suporte $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O registro dos voltamogramas foi realizado nas mesmas condições tanto para as soluções contendo os complexos bem como para o eletrólito suporte, após os experimentos foi feito um tratamento matemático para subtrair a corrente capacitiva do branco a fim de obterem-se gráficos mais definidos. No intuito de visualizar todos os processos envolvidos, os voltamogramas cíclicos foram feitos na janela de potencial de 1,00 a -0,70 V (E vs Ag/AgCl, KCl saturado), em seguida a janela de potencial foi reduzida para observação do processo referente ao par redox $\text{NO}^{+/0}$. No voltamograma cíclico para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Figura 37) a varredura teve início em +0,50 V vs Ag/AgCl,

conduzido para potencial negativo, revertido em -0,70 V vs Ag/AgCl, conduzido para potencial positivo até atingir, novamente, +0,50 V vs Ag/AgCl.

Figura 37. Voltamogramas cíclicos de varredura do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ nas velocidades de varredura de 0,20 V/s (—) e 0,50 V/s (—) em tampão pH= 2,0, utilizando como eletrólito suporte KCl 0,10 mol L⁻¹ e T = 25 °C.

Como esperado (SAUAIA, 2003), o complexo nitrosilo estudado apresentou comportamento eletroquímico semelhante e as curvas referentes aos processos apresentados nos voltamogramas são descritos no Esquema 4.

Esquema 4: Possíveis processos redox ao qual o óxido nítrico está suscetível.

As curvas exibem uma onda catódica (1c), juntamente com uma onda anódica (1a) na varredura reversa, este processo pode ser atribuído como sendo a oxi-redução do grupo nitrosil ($\text{NO}^{+/0}$), conforme indicado no Esquema 4. A onda 2c é atribuída à redução do NO^0 coordenado a NO^- também coordenado, enquanto que a onda 3c é referente à redução catalítica do NO^- a NH_3 (ambos coordenados), sendo que todas essas etapas envolvem a transferência de elétrons (MURPHY, 1982; MURPHY, 1985; THOMPSON, 1981).

Para estudar a reversibilidade do processo eletroquímico $\text{NO}^{+/0}$ foram feitos vários voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades para o composto. A figura 38 ilustra o ciclo voltamograma em que a janela de potencial foi reduzida ao processo de interesse para que não houvesse perda de sinal significativa, devido outras possíveis reações acopladas como as representadas no Esquema 4.

Figura 38. Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (—) 0,02 V/s, (—) 0,05 V/s, (—) 0,10 V/s, (—) 0,20 V/s, (—) 0,30 V/s, (—) 0,40 V/s, (—) 0,50 V/s, do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em tampão pH= 2,0, utilizando como eletrólito suporte KCl 0,10 mol L⁻¹ e T = 25 °C.

O gráfico mostrando a relação i_{pa}/i_{pc} (equação 1) vs velocidade de varredura, indica que, por esta técnica eletroquímica, o processo deve ser considerado reversível.

Figura 39. Gráfico de relação entre i_{pa}/i_{pc} e velocidade de varredura, para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

4.2.8 Pulso Diferencial

A técnica de voltametria de pulso diferencial, foi utilizada por ser mais sensível que a voltametria cíclica e permitir explorar mais a reatividade química acoplada ao processo eletroquímico. A Figura 40 mostra o pulso diferencial para o composto $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. A varredura foi iniciada em 0,00 V até o potencial positivo 1,00 V, foi feito o acompanhamento durante 240 segundos. O pico em 0,30 V vs Ag/AgCl atribuído ao processo $\{\text{Ru}^{\text{II}}-\text{NO}\}^{3+/2+}$, diminui em função da eletrólise, já o pico em 0,75 V vs Ag/AgCl aumenta proporcionalmente à diminuição daquele em 0,30 V. Isto é consistente com o reação descrita na equação 3.

Figura 40. Voltamogramas de Pulso Diferencial do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em tampão pH= 2,0, utilizando como eletrólito suporte KCl 0,10 mol L⁻¹ e T = 25 °C. Varredura de potencial de 0,00 V a 1,00V, durante (—) 0, (—) 30, (—) 60, (—) 90s, (—) 120s, (—) 150s, (—) 180s e (—) 240s .

Este resultado mostra que a cinética de liberação de NO, após processo de redução, é lenta, porém consistente. A reversibilidade observada na voltametria cíclica foi inerente a

velocidade de varredura. No pulso diferencial explorou-se a eletrólise precedendo o início da varredura. Como a difusão da espécie que está na superfície do eletrodo, para a solução é lenta, foi possível observar que, de fato, o processo de redução química acoplada.

Em relação aos complexos estudados neste trabalho, dados de potenciais eletroquímicos dos mesmos e de outros sintetizados pelo grupo podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Potenciais eletroquímicos de complexos de rutênio, em solução aquosa, E (V vs Ag/AgCl).

Complexo	$E_{\text{Ru}}^{\text{III/II}}$	$E_{(\text{NO}^+/\text{NO}^0)}$	$E_{(\text{NO}^0/\text{NO}^-)}$
$[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	—	0,34	-0,12
<i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{py})(\text{bpy})_2(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$	—	0,34	-0,24
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	—	0,10	-0,50
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy-H}_2)](\text{PF}_6)_2$	0,71	—	—
<i>trans</i> - $[\text{RuCl}([15]\text{aneN}_4)(\text{NO})](\text{PF}_6)_2$	—	0,28	—
<i>trans</i> - $[\text{RuCl}([15]\text{aneN}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{PF}_6)_2$	-0,15	—	—

Estudos *in vitro*

5 ESTUDOS *IN VITRO*

5.1 Material e Métodos

5.1.1 Avaliação em linhagens celulares

Nesse estudo foram utilizadas as linhagens celulares B16-F10, L929 adquiridas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e HepG2 (American Type Culture Collection, N° HB 8065).

5.1.1.1 Meios de Cultivo

Para o cultivo das células de melanoma da linhagem B16-F10 usou-se o meio de Cultura RPMI-1640 (Sigma-aldrich® com 25 mM de HEPES, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio). O meio foi preparado em cerca de 900,0 mL de água, onde foi adicionado o conteúdo do envelope e acrescentados 4,500 g de glicose e 1,500 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, o pH da solução foi ajustado a 7,40 e o volume completado para 1,0 L. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e recolhido em frasco estéril. Para verificação de eventuais contaminações, foram reservadas duas alíquotas de 5,0 mL as quais permaneceram incubadas por 48 horas em estufa (5 % CO₂) a 37 °C. Antes do meio ser utilizado no cultivo das células foram acrescentados penicilina (10.000 Ui) e estreptomicina (10,0 mg/mL) como antibióticos, anfotericina B (Gibco, USA) como antimicótico (25,0 µg/mL) e 5 % de soro fetal bovino (SFB-Gibco, USA), previamente esterilizado. As células da linhagem B16-F10, melanoma murino, foram cultivadas em garrafas de cultura, em meio RPMI e mantidas em atmosfera úmida com concentração controlada de 5 % CO₂, com troca de meio em média a cada 2 dias.

O procedimento para cultivo das células de fibroblasto murino (L929) e HepG2 foi o mesmo adotado para a linhagem de melanoma murino (B16/F10). O meio utilizado para o cultivo foi o Dulbecco Modificado (DMEM ou Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone, Logan, Utah, USA), tamponado com bicarbonato de sódio, sendo pH = 7,4, esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, suplementado com 10 % de soro fetal

bovino (SFB-Gibco, USA), 100 UI /ml de penicilina G, 100,0 mg/ml de estreptomicina e 1,0 g/ml de anfotericina (Gibco, USA).

5.1.1.2 Reagentes

- Tripsina-EDTA (0,125% de tripsina e 0,02% de EDTA Gibco, USA).
- MTT - [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline (PBS): Para preparação do PBS são necessários 2,00 g de KH_2PO_4 ; 17,80 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,00 g de KCL; 80,00 g de NaCl – q.s.p. 1,0 L de H_2O destilada.

5.1.1.3 Manutenção da cultura celular

Os procedimentos abaixo descritos foram realizados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (Pachane®, Pa 300), devidamente limpa com álcool 70%, foi também utilizada luz ultravioleta por 30 minutos antes do uso, de forma a garantir a esterilidade do ambiente.

Antes do início do processo de passagem o Meio de Cultivo, o PBS e a Tripsina devem ser mantidos em banho-maria a 37 °C, as garrafas de cultura retiradas da estufa e analisadas no microscópio biológico invertido binocular (QUIMIS® APARELHO CIENTÍFICOS LTDA) para que possa ser verificada qualquer eventual alteração na cultura, a partir de uma garrafa de cultura de 25,0 mL contendo monocamada de células confluentes, outras garrafas foram preparadas com a retirada do meio.

Para tanto, retira-se o meio da garrafa, adiciona-se 4,0 ml de PBS para lavagem realizando movimentos leves. Retira-se o PBS e adiciona-se 4,0 ml de solução de Tripsina à garrafa. Em seguida a garrafa foi levada à estufa, na qual permaneceu por tempo padronizado de 8 minutos. Após esse tempo é avaliado em microscópio se as células foram “soltas”, sendo possível observar turvação do meio referente ao desprendimento das células que se encontravam aderidas.

A suspensão celular obtida foi recolhida em tubo falcon de 15,0 mL contendo 3,0 mL de meio RPMI completo e centrifugada por 2 minutos a 1000 r.p.m. a fim de colher-se um pellet de células que deve ser preservado, descartando-se todo o sobrenadante. O precipitado de células que formam o pellet deve ser ressuspensionado em meio RPMI. Por fim, transfere-se alíquotas da suspensão celular para garrafas de cultura contendo o meio cultura. Os cultivos celulares foram mantidos em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂. Estas condições foram padronizadas para o cultivo das células durante todos os ensaios. As garrafas foram supervisionadas diariamente em microscópio e a troca do meio de cultura realizada a cada 2 dias. O número de garrafas de cultura preparadas variou de acordo com o tipo e concomitância dos experimentos realizados.

5.1.1.4 Ensaios de citotoxicidade

Ao atingir aproximadamente 90 % de confluência nas garrafas de cultura, as células foram soltas utilizando-se solução de Tripsina/EDTA e 2×10^4 células/poço foram plaqueadas em placas contendo 96 poços, valor mantido como referência durante toda a pesquisa. As placas foram em seguida incubadas em estufa com controle de temperatura, umidade e CO₂ e ao completar 24 horas para a adesão das mesmas às placas, o meio de cultura foi trocado e foram adicionadas as soluções do veículo (água) e dos compostos. As células tratadas foram mantidas em estufa por diferentes períodos de incubação.

5.1.1.5 Análise da viabilidade celular pelo ensaio do MTT

Após o período de incubação, foi retirado o meio e adicionados 180,00 µL do mesmo meio, sem o indicador vermelho de fenol, a cada um dos poços também foram adicionados 20,00 µL de solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio].

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico comumente usado como medida de capacidade das enzimas mitocondriais reduzirem o sal de tetrazolio MTT ($\lambda_{MAX} = 600\text{nm}$; cor amarelada) a formazan, produto de coloração violácea ($\lambda_{MAX} = 470\text{nm}$). O princípio deste método consiste no fato de que células vivas, em crescimento têm mitocôndrias competentes (promovendo a respiração celular), portanto irão converter o MTT no produto corado violeta, nas células mortas, ou em processo de morte celular essa função mitocondrial encontra-se comprometida, não havendo conversão do MTT no produto corado, sendo esse um ensaio de medida de viabilidade celular diretamente proporcional, cuja intensidade da cor permite a

determinação da quantidade de células viáveis partindo da quantidade de enzimas presentes nas mitocôndrias das células vivas, capazes de realizarem a reação.

Após a adição do MTT, as células foram incubadas em estufa, nas mesmas condições já descritas, por mais 3 horas (MOSMANN, 1983). Em seguida o conteúdo de cada poço foi removido sendo adicionados 200 µL de DMSO para solubilizar o precipitado formado pela redução do sal. As absorbâncias foram obtidas 570 nm em leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) valor esse considerando o espectro de absorção do composto e também do reagente utilizado no ensaio sendo a porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{D.O. experimento} / \text{D.O. controle}) \times 100\%$$

Para a interpretação dos resultados, as médias de viabilidade celular obtidas foram subtraídas do valor médio de absorbância do grupo “branco”, no qual não foi adicionado o complexo e sim quantidade equivalente de água mili-Q, a mesma utilizada para solubilizar os complexos. Os valores foram expressos em percentuais e comparados com o grupo controle não tratado (somente células com meio de cultivo).

Quando a absorbância é menor do que a obtida para o grupo controle tem-se um indicativo de proliferação celular reduzida ou morte celular.

Figura 41. Reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais.

5.1.1.6 Análise Estatística

Os dados de absorbância (correspondente à viabilidade celular) foram obtidos em quadruplicata e estão representados como médias $\pm$ valores de desvio padrão (DV). Os dados

foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.1.2 Protocolo para ligação do anticorpo IgG (VDAC) ao complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] · 3 H₂O

O protocolo utilizado para ligação da proteína IgG ao complexo nitrosilo de rutênio foi baseado no procedimento já descrito por Terpetschnig et al., 1995 (Figura 42).

Para a formação do bioconjugado 0,230 g de diciclo-hexil-carbodiimida (DCC) e 0,119 g N-hidroxisuccinamida (NHS) foram dissolvidos em 3,0 mL de dimetilformamida (DMF) com agitação e sob resfriamento em banho de gelo. Posteriormente 0,200 g do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] · 3 H₂O foram adicionados e a mistura mantida sob agitação por 2 horas. O precipitado formado foi removido por filtro de seringa (Millipore – Millex, Poro = 0,22 µM) e o filtrado (600 µL), contendo o composto ativado, foi utilizado para a marcação com a proteína. Parte do filtrado (500 µL) foi adicionado a uma solução de 1,00 mL de tampão carbonato (pH = 8,3) contendo o anticorpo IgG (VDAC 1/2/3, FL-238, Rabbit polyclonal IgG, 200,0 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology, Lote: I2910) a 1%.

Figura 42. Ligação de complexos de rutênio a proteínas (TERPETSCHNIG et al., 1995).

A mistura foi mantida sob agitação constante por 12 horas e, em seguida, eluída em coluna de cromatografia em gel Sephadex G-25 (1 cm x 30 cm) equilibrada com tampão fosfato (PBS - 0,1 M, pH 7,2) acoplada a uma bomba peristáltica (GILSON, modelo: MINIPLUS 3) para controle do fluxo 1 mL/min. A matriz utilizada neste experimento Sephadex-G25 (Sephadex-G25 Fina, INLAB, Lote: 50188). Foram coletadas 60 frações de 600 µL cada (coletor de frações LKB, BROMA).

5.1.3 Detecção do anticorpo por Western Blotting

5.1.3.1 Tampões, soluções e reagentes

5.1.3.1.1 Gel de separação e gel de empilhamento

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel de corrida (10%)
Acrilamida 30,0% / bis-acrilamida 0,8%	170 µL	1.333 µL
Tampão TRIS - HCl 1,5 mol/L pH 8,8	-----	1500 µL
Tampão TRIS - HCl 0,5 mol/L pH 6,8	500 µL	-----
H ₂ O deionizada	550 µL	1047 µL
SDS 10%	20 µL	80 µL
TEMED 10%	5 µL	20 µL
Persulfato de amônio 10%	5 µL	20 µL

5.1.3.1.2 Tampão de corrida Tris/Glicina

Tris-HCl pH8,3	25 Mm
Glicina	250 Mm
SDS	0,1 % (p/v)

5.1.3.1.3 Tampão de amostra

DTT	100 Mm
Tris-HCl pH6,8	80 mM
Glicerol	15 % (v/v)
SDS	2 % (p/v)
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1,0 L

5.1.3.1.4 TBS-T

TBS-T	
Tris-HCl 1 mol/L pH7,6.....	20,0 mL
NaCl.....	8,000 g
Tween 20	2,0 mL
H ₂ O deionizada q.s.p.....	1,0 L

5.1.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, aplicando-se no gel, 20 µL das frações recolhidas após separação em coluna cromatográfica. O procedimento para a eletroforese em gel de poliacrilamida foi baseado na técnica descrita por Laemmli et al., (1970). O gel de separação foi preparado para uma concentração final de acrilamida de 10 g% e o gel de empilhamento para uma concentração final de acrilamida de 5 g%.

A corrida eletroforética foi realizada em cuba Mini-Protean III-Bio-Rad[®]. Duas placas de vidro com espaçadores laterais de 0,75 mm foram acomodadas no aparato específico para polimerização do gel. O gel de resolução (SDS a 10 %) foi preparado e imediatamente aplicado entre as placas de vidro. Depois de verificada a polimerização, o gel de armazenamento foi preparado e acomodado sobre o gel de resolução e o pente (de 0,75 mm de espessura e 10 canaletas) devidamente colocado. Após a polimerização o conjunto de placas de vidro e gel foi cuidadosamente retirado e colocado em cuba eletroforética contendo tampão de corrida. As amostras foram diluídas em tampão de amostra, aquecidas com agitação durante 5 minutos a 95 °C e pipetadas nas canaletas correspondentes.

A voltagem da fonte Power Pac 200/Bio Rad[®], foi de 100 V até o final da corrida. A cuba foi mantida durante toda a corrida em recipiente com gelo e a corrida foi encerrada quando a linha azul correspondente ao corante presente nas amostras atingiu a borda inferior do gel. O gel foi retirado da placa e em seguida foi colocado em contato com uma membrana de nitrocelulose (HybondTM-ECL Nitrocelulose Membrane, Amersham Biosciences) para onde as proteínas foram transferidas.

5.1.3.3 Avaliação por *Western Blotting* (imunoensaio)

essa transferência foi baseada na técnica descrita por Towbin et al., 1979 utilizando-se para tanto um sistema (Bio-Rad), no qual o gel de SDS-PAGE e a membrana foram posicionados entre filtros protetores formando-se assim um sistema tipo “sanduiche” (Figura 43).

Imediatamente após a corrida, o gel foi lavado rapidamente em tampão de transferência junto com a membrana hidratada em H₂O destilada e equilibrada no tampão de transferência pelo menos 15 minutos antes do uso (Figura 44 A). Folhas de papel de filtro, nas dimensões do gel a ser transferido, foram também incubadas em tampão de transferência. Em seguida, o sistema de transferência foi montado de acordo com as instruções do fabricante (Figura 44 B e C). A transferência foi realizada em cuba eletroforética posicionada sobre agitador magnético contendo tampão de transferência a 4 °C, durante a corrida que teve duração de 1 hora, aplicou-se uma corrente de 350 mA por 60 minutos.

Figura 43. Disposição da membrana e do gel durante a transferência.

Figura 44. A. Membrana de nitrocelulose em tampão de transferência. B. Suporte para transferência. C. Sistema “sanduiche” composto pelo gel de SDS-PAGE, membrana e filtros protetores.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas aderidas foi incubada com tampão TBS-T contendo 5 g% de leite desnatado (para bloqueio da ligação de sítios não específicos) por 12 horas a 4 °C. Passado esse período, a membrana foi lavada rapidamente com tampão TBS-T e incubada por 2 horas, sob agitação suave com o anticorpo secundário (anti-VDAC, ECLTM Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase – Linked, Whole antibody from donkey, 1mL, GE Healthcare, armazenar a 4 °C, Lote: 387719) 1:5000 solução TBS-T). Em seguida, as membranas foram lavadas da seguinte maneira: 2 vezes rapidamente, 1 vez por 15 minutos e mais 3 vezes por 5 minutos com o mesmo tampão a uma razão de 4,0 mL por cm² de membrana.

5.1.3.4 Detecção por Eletroquimioluminescência

A imunodeteção foi promovida pela reação quimioluminescente do sistema ECL para western blotting. Para realização do procedimento de detecção previamente foi retirado o excesso de tampão das membranas que em seguida foram dispostas com a proteína voltada para cima em uma placa. Foi preparada uma mistura de reagentes de detecção, a solução de substrato de quimioluminescência para peroxidase foi preparada, como recomendado pelo fabricante (“ECL plus Western Blotting Detection System” - GE Healthcare/Amersham Biosciences) e aplicada sobre as membranas - quantidade suficiente para cobrir as membranas (0,12 mL/cm²), com agitação e proteção da luz.

As membranas foram incubadas com essa mistura por 1 minuto a temperatura ambiente. O excesso do reagente foi então retirado cuidadosamente com papel absorvente das

membranas que foram envolvidas por papel filme e colocadas em um cassete de autoradiografia (HypercassetteTM, Amersham Biosciences, RPN 11642, Batch N^o. 0510). O cassete foi fechado e exposto por 1 a 3 minutos para obtenção de uma imagem autorradiográfica adequada, a revelação foi feita em sala escura, em filme Raios-X (Kodak).

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Citotoxicidade dos complexos de rutênio

As células L929 constituem uma linhagem celular de fibroblastos obtida de tecido subcutâneo de camundongos. Esse tipo celular apresenta relativa resistência, facilidade de manipulação e estas células tendem a um fácil crescimento em meios de cultura, desse modo optamos por utilizá-las em nosso estudo como modelos de células sadias para avaliar a ação dos complexos de rutênio.

Foram utilizadas também as células da linhagem B16-F10 como modelo de células tumorais, essa linhagem constitui um modelo biológico muito útil no estudo do melanoma, cujas células podem ser cultivadas facilmente *in vitro* e injetadas por diferentes vias *in vivo*. Por apresentar a capacidade de invadir a circulação e induzir metástases, essa linhagem celular é considerada um modelo muito interessante para que se possa acompanhar a evolução e estudar alternativas para o tratamento do melanoma maligno metastático.

A utilização de linhagens celulares de origem hepática, como as células HepG2 é interessante uma vez que o fígado é um órgão que tem participação crucial no metabolismo de diversas drogas, além disso, o uso de uma linhagem humana diminui as variáveis que seriam decorrentes das diferenças entre as espécies, o que facilita a compreensão dos mecanismos que envolvem os possíveis efeitos citotóxicos de uma determinada droga (KNASMULLER et al., 1998). As células HepG2 são capazes de sintetizar e secretar proteínas características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998), expressam diversos marcadores hepáticos e apresentam enzimas importantes para a ativação e destoxificação de pró-carcinogênicos, sendo utilizadas frequentemente como modelo de cultivo de hepatócitos para estudos metabólicos e como modelo *in vitro* para estudos humanos de biotransformação (WILKENING et al., 2003), essa linhagem apresenta uma quantidade consideravelmente grande de mitocôndrias, sendo bastante interessantes nos estudos que envolvem citotoxicidade mitocondrial.

Durante a realização dos experimentos de citotoxicidade dos complexos de rutênio através do método de MTT, acompanhamos por meio de fotografia as diferentes etapas envolvidas no cultivo celular (Figura 45). Na figura abaixo podem ser observadas as células B16-F10 e L929 durante o cultivo celular, ensaio de MTT e quando soltas por meio da ação da tripsina. Esse acompanhamento é de extrema importância uma vez que possibilita a visualização de quaisquer alterações no meio de cultura, no cultivo ou ainda eventuais contaminações.

Figura 45. Imagens analisadas em Microscópio Biológico invertido binocular durante os experimentos de viabilidade celular. A. Células melanoma murino, linhagem B16-F10.

B. Células fibroblasto murino, linhagem L929. C. Células melanoma, linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com MTT (formação de cristais de formazan de coloração púrpura).

D. melanoma murino, linhagem B16-F10 após serem soltas.

Testes de citotoxicidade foram realizados para os complexos nitrosilos $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ e $\text{cis}-[\text{RuCl}(\text{dcbpy}-\text{H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ em células de fibroblasto (L929) (Figura 46) e melanoma murino (B16-F10).

Figura 46. Efeito citotóxico dos complexos nitrosilos $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em células L929. As células de fibroblasto murino foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação. Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Nestes experimentos, solução aquosa dos complexos, nas concentrações indicadas nos gráficos, foram submetidas a diferentes tempos de incubação. Os resultados sugeriram inatividade citotóxica e, conseqüentemente, nos permite extrapolar que os complexos usados não tendem a apresentar toxicidade a células ditas “sadias”.

Semelhantes experimentos foram desenvolvidos para a linhagem B16-F10. Concentrações do complexo de 2 a 200 μM foram testadas e a citotoxicidade avaliada (Figura 47). A título de se observar um possível efeito do NO, ocasionado pela liberação do

complexo, foi estudado também o aquo-complexo da espécie que dantes continha o ligante nitrosilo (Figura 47).

Figura 47. Efeito citotóxico dos complexos $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ em células tumorais B16-F10. As células de melanoma murino foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação. Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 3 experimento realizados em duplicata.

Embora os resultados com o composto na forma aquo sejam resultantes de apenas dois experimentos, é possível observar que o composto $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ tem uma tendência a apresentar uma maior atividade citotóxica quando comparado ao composto nitrosilo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, diminuindo em mais de 30 % da viabilidade celular na concentração de 200 μM . Para o composto *cis*- $[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, avaliou-se também o efeito nas linhagens B16-F10 e HepG2. Os resultados estão mostrados na figura 48.

Figura 48. Efeito citotóxico do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] · 3 H₂O em células HepG2 (A) e B16-F10 (B e C). As células foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação. Os dados apresentados representam as médias ± S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

Tanto quanto o experimento nos permitiu avaliar (Figura 48), não houve diminuição da viabilidade celular e consequentemente pode-se concluir não ser, nas concentrações estudadas, o complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] · 3 H₂O citotóxico àquelas linhagens.

Sabe-se que há liberação de NO quando o complexo [Ru(dcbpy-H)(terpy)(NO)](PF₆)₂ · 2 H₂O é irradiado (Figura 34), nesse sentido foi realizado um experimento para avaliar a atividade citotóxica do complexo nitrosilo quando irradiado.

Para realização desse experimento as células foram plaqueadas, lavadas com PBS, a fim de retirar a porção do composto que não entrou nas células, e adicionou-se novamente o meio RPMI, em seguida, uma das placas de cultura foi irradiada em 447 nm, durante 6 minutos com potência de aproximadamente 40 mW, utilizando o laser (Colibri –

QuantumTech), enquanto a outra placa permaneceu nas mesmas condições, porém protegida da irradiação. Após esse procedimento, as placas ficaram novamente incubadas na estufa durante mais 24 horas. Posteriormente, foi analisada a resposta citotóxica do composto pela análise da viabilidade celular.

Figura 49. Efeito citotóxico do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em células tumorais B16-F10. As células de melanoma murino foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação, o comprimento de onda utilizado para irradiação foi de 447 nm e dose de aproximadamente 1 J/cm^2 . Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 1 experimento realizado em duplicata.

A partir dos resultados obtidos, comparando-se o tratamento com e sem irradiação para este composto, não há diferença significativa quanto à atividade citotóxica.

5.2.2 Interação anticorpo-complexo de rutênio

Os estudos de coordenação do anticorpo ao complexo nitrosilo de rutênio foram conduzidos no sentido de direcionar a ação do composto a sítios específicos/alvos teciduais associado à possibilidade de localizá-lo por meio de técnicas imunocitoquímicas. Essa estratégia aumentaria o espectro de aplicação desses complexos doadores de NO, direcionando-os, via anticorpo, para sítios alvo específicos como as células tumorais.

A realização dessa nova estratégia é justificada uma vez que o efeito do NO está diretamente relacionado à sua concentração e ao tempo de exposição no sítio de ação; ainda mais, sua liberação direcionada nestes sítios específicos celulares mediante a ajuda de anticorpos, pode tornar esses doadores potencialmente mais eficazes na indução de apoptose (Figura 50).

Esses estudos compreendem diferentes etapas dentre as quais estão: ligação do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O ao anticorpo de interesse (IgG), confirmação da interação por meio de análises químicas e de biologia molecular, detecção do anticorpo e, por último, a associação do anticorpo aos efeitos da liberação de NO no sítio específico.

Figura 50. Ilustração referente à formação do bioconjugado (complexos doador de NO-anticorpo) para atuação específica nas células tumorais.

Após a realização das etapas de formação do conjugado complexo nitrosilo de rutênio-anticorpo IgG (Figura 51), foi realizada filtração em coluna de cromatografia em gel Sephadex G-25, a partir da qual foram coletadas 60 frações de 600 µL cada (Figura 52).

Figura 51. Etapas do protocolo de preparação do bioconjugado e separação das frações recolhidas para posterior análise por western blotting.

Figura 52. Aparato de separação das frações após reação de formação do bioconjugado.

Após a coleta, as frações foram analisadas por “Western blotting”. Por definição o “Western blotting” trata-se de uma técnica usada para identificar e localizar proteínas com base na capacidade das mesmas de ligarem-se a anticorpos específicos. Por meio dessa análise é possível analisar uma amostra de proteína a partir de células ou tecidos ou até mesmo proteínas recombinantes sintetizados *in vitro*, bem como detectar uma dada proteína de interesse em uma mistura de um grande número de proteínas.

Essa técnica é utilizada nas mais diferentes áreas dentre as quais estão a biologia molecular, genética, bioquímica dentre outras em que o objetivo seja a obtenção de informações sobre o tamanho de uma proteína específica (comparação com um marcador de tamanho ou uma escada em kDa), sobre a expressão da proteína (comparação com um

controle como amostra não tratada ou outro tipo de célula ou tecido), bem como sobre a quantidade de determinada proteína numa dada amostra e comparar com os valores de outras amostras.

Para realização dessa técnica primeiramente as frações foram submetidas a uma eletroforese na qual as proteínas são separadas com base no tamanho do polipeptídeo. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com Soulié et al. (1996). Os géis de SDS-PAGE são matrizes utilizadas para separação de proteínas por dimensão, na presença de corrente elétrica. O gel de poliacrilamida-SDS foi produzido segundo Laemmli (1970).

Para que a carga da proteína não interfira nesse processo as amostras são submetidas à fervura em solução tampão, contendo corante, um composto sulfuroso e o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Esse procedimento resulta na desnaturação da proteína, o SDS então cerca essa proteína, deixando-a coberta por uma carga negativa, o enxofre impede a formação de pontes de dissulfeto na proteína permitindo a separação por tamanho e não pela carga.

A fim de possibilitar à detecção com o anticorpo, as proteínas separadas eletroforéticamente foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979). A membrana foi colocada face-a-face com o gel e a corrente elétrica aplicada de tal forma que a proteína fosse transferida do gel para a membrana mantendo a mesma disposição observado no mesmo. Para impedir a ocorrência de interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo foi feito o bloqueio da ligação não específica por meio da exposição da membrana ao leite (conforme descrito em 6.3.3).

As membranas foram analisadas com a diluição apropriada do anticorpo e reveladas por quimioluminescência, método de detecção que requer a incubação com um substrato que fluoresce quando exposto à enzima reveladora no anticorpo secundário, sendo a luz então detectada por um filme fotográfico.

Para tanto utilizou-se o ECL-Quimioluminescent kit (Amershan). O sistema ECL Western Blotting usa peroxidase Horseradish - HRP (*rábano* silvestre) conjugada a anti-anticorpos para a detecção baseada em luminol. Esse processo consiste na incubação dos Blots com anticorpos primários juntamente com o conjugado HRP-anticorpo secundário com posterior adição de reagentes de detecção ECL, o que resulta em um sinal quimioluminescente (Figura 53).

Figura 53. Detecção por quimioluminescência do “Western Blotting”, modificada. Fonte: <http://www.uniscience.com.br/cell-signalling/phototope-hrp-western-blot-detection-system-anti-rabbit-igg-hrp-linked-antibody-7071>

Paralelamente a análise por “western blotting” foi realizado o acompanhamento por espectroscopia UV-visível e infravermelho de todas as etapas reacionais, para verificar a efetividade da reação de ligação. Na figura 54 estão os espectros de absorção na região do UV-vis de algumas das frações obtidas na eluição por coluna Sephadex G-25. Nos espectros é possível observar uma banda em torno de 280 nm referente à proteína e também as bandas referentes ao composto nitrosilo (ao redor de 300 nm), mais evidente para as frações 9-17.

Para a detecção das proteínas nas frações foi realizada uma análise de western blotting das frações mais relevantes, os resultados demonstram claramente a presença da proteína IgG nas frações 9 a 17, sendo essa ausente nas frações seguintes (18-40) (Figura 56). Estes dados nos levam a concluir que houve de fato a ligação entre o composto e a proteína, que juntos possuem um alto peso molecular e por isso tendem a eluir primeiro pela coluna.

As mudanças nos espectros de absorção das frações comparadas ao espectro do composto (Figura 15 A), a presença da proteína IgG (VDAC 1/2/3, Santa Cruz Biotechnology) detectada por Western blotting a partir de alíquotas das frações 9-17 e a presença de bandas características de formação de amida ($\nu = 1707 \text{ cm}^{-1}$) observadas no espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 55) corroboram com o sucesso da ligação.

Figura 54. Espectros de absorção na região do UV-vis do anticorpo IgG (VDAC 1/2/3) em tampão carbonato pH = 8,3 (A) e de algumas das frações obtidas após filtração por cromatografia em gel da mistura reacional resultante do processo de formação do bioconjugado $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O} + \text{IgG}$ (B).

Figura 55. Espectros de absorção na região do infravermelho do anticorpo IgG (VDAC 1/2/3) (A), do complexo $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{dcbpy-H})_2(\text{NO})] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (—) e do resultante da ligação do composto ao anticorpo (—) (B), em pastilhas de KBr.

Figura 56. Detecção por western blotting da proteína mitocondrial (VDAC 1/2/3) nas frações 1-40, obtidas após reação de associação entre o anticorpo e o complexo nitrosilo de rutênio e posteriormente separadas por cromatográfica em gel Sephadex G-25.

A separação do composto por cromatografia de exclusão nos permitiu conduzir testes de citotoxicidade na linhagem celular B16-F10. Os resultados foram fascinantes (Figura 57). A viabilidade celular diminuiu para cerca de 15% para a fração 17 contendo o bioconjugado quando comparada à mesma análise conduzida para uma solução aquosa do complexo (Figura 48) nos permitiu avaliar o efeito ocasionado pela interação completo de rutênio–anticorpo policlonal. Enquanto o complexo em meio aquoso não apresenta citotoxicidade, na forma de bioconjugado se mostrou bastante efetiva. A concentração do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O na formação do bioconjugado complexo de rutênio–IgG, foi de 50 µM. A julgar, o processo de bioconjugação um processo cinético, a concentração do complexo no bioconjugado (Frações 9-17) é muito menor que o valor inicialmente utilizado (50 µM). Isto nos permite concluir a potencialidade do resultado obtido e direciona os estudos de citotoxicidade com compostos nitrosilos, doravante serem conduzidos na forma de biocunjugação com anticorpo.

Esses resultados foram avaliados com anticorpo policlonal e, cabe resaltar, que características relevantes concernentes ao nosso experimento com anticorpos monoclonais devem ser em menor concentração de complexo e maior especificidade de reação.

Figura 57. Viabilidade de células B16-F10 avaliada pelo ensaio de MTT. Os tratamentos descritos na legenda foram incubados por 24h. Controle = meio de cultura; VDAC = 0,15 µg/mL; *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O = 50 µM; Frações 14-17 = 1:1.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os complexos de rutênio foram sintetizados e caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, a pureza desses foi confirmada por microanálise e espectrometria de massas e os mesmos foram analisados quanto à ação citotóxica.

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de ligação entre o complexo nitrosilo de rutênio e o anticorpo observada por alterações nos espectros de absorção das frações obtidas quando comparadas as do composto isolado e espectroscopia de absorção no infravermelho, dados confirmados pela presença do anticorpo nas frações recolhidas e analisadas por western blotting.

Os estudos de citotoxicidade apresentados neste trabalho mostram de forma indubitável que é possível aumentar a especificidade de compostos doadores de NO, naquilo que tange a ação anticancerígena por meio da utilização de anticorpos. A citotoxicidade concernente a bioconjugação complexo de rutênio-IgG mostrou ser uma boa estratégia para direcionamento celular, diminuição da concentração da droga e aumento de citotoxicidade. O mecanismo biológico observado neste sistema poderá ser posteriormente avaliado a fim de que se defina o efeito responsável pela ação citotóxica. A possibilidade de ser o NO, ou ainda ação sinérgica entre NO e fragmento complexo, permitirão descrever a potencialidade de se usar compostos dessa natureza como metalo-droga.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein-family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, p. 1322-1326, 1988.
- ADAMSON, A. W.; FILEISCHAWER, P. D. **Concepts of Inorganic Photochemistry**, Wiley Interscience, p. 81, 1975.
- AINSCOUGH, E. W.; BRODIE, A. M. Nitric Oxide – some old and new perspectives. **Journal of Chemical Education**, v. 72, p. 686-92, 1995.
- AL WAILI, N. S. and BUTLER, G. J. A combination of radiotherapy, nitric oxide and a hyperoxygenation sensitizing protocol for brain malignant tumor treatment. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 528-537, 2007.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, p. 62-9, 2001.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Medicinal Properties of Organometallic Compounds. **Bioorganometallic Chemistry**, v. 17, p. 177-210, 2006.
- ALI, S. M; OLIVO, M. Nitric oxide mediated photo-induced cell death in human malignant cells. **Internatonal Journal of Oncology**, v.22, p. 751-756, 2003.
- ASSEFA, Z.; STANBURY, D. M. Oxidation of coordinated ammonia to nitrosyl in the reaction of aqueous chlorine with $cis\text{-(Ru(bpy)}_2\text{(NH}_3\text{)}_2\text{)}^{2+}$, **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 521-30, 1997.
- AU, Y. K.; WONG, W. T.; Ruthenium 1994. **Coordination Chemical. Reviews**, v. 162, p. 417-75, 1997.
- AZIZZADEH, B., YIP, H. T., BLACKWELL, K. E., HORVATH, S., CALCATERRA, T. C., BUGA, G. M., IGNARRO, L. J., and WANG, M. B. Nitric oxide improves cisplatin cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 111, p. 1896-1900, 2001.
- BAKHTIAR, R.; OCHIAI, E. I.; Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, v. 32, p. 525-540, 1999.
- BANGHAM, A. D.; HILL, M. W.; MILLER, N. G. A. In: KORN, E. D. (Ed.). **Methods in membrane Biology**. New York: Plenum Press, 1965, p. 1-68.
- BASTOS, C. M.; GORDON, K. A.; OCAIN, T. D. Synthesis and immunosuppressive activity of ruthenium complexes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 147, 1998.
- BATISTA, A. A.; PEREIRA, C.; QUEIROZ, S. L.; DE OLIVEIRA, L. A. A.; SANTOS, R. H. D.; GAMBARDELLA, M. T. D. Nitrosyl ruthenium complexes with general formula $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{P-P})]$ (P-P = $\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}$, $n = 1-3$ and $\{\text{PPh}_2\text{-CH}=\text{CH-PPh}_2\}$). X-ray structure of $[\text{RuCl}_3(\text{NO})\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2\}]$. **Polyhedron**, v. 16, p. 927-31, 1997.

BENZ, R.; WOJTCZAK, L.; BOSCH, W.; BRDICZKA, D. Inhibition of adenine nucleotide transport through the mitochondrial porin by a synthetic polyanion. **FEBS Letters**, v. 231, p. 75-80, 1988.

BERNERS-PRICE, S. J.; BARNHAM, K. J.; FREY, U.; SADLER, P. J. Kinetic analysis of the stepwise platination of single- and double-stranded GG oligonucleotides with cisplatin and $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$. **Chemistry - A European Journal**, v. 2, p. 1283, 1996.

BERTOLINI, W. L. H. M. **Complexos de rutênio com nitrosil como agentes doadores de óxido nítrico. Aspectos químicos e físico-químicos de suas aplicações como agentes terapêuticos. 2004. 118f. Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2004.

BORGES, S. S. S.; DAVANZO, C. U.; CASTELLANO, E. E.; SCHPECTOR, J. Z. Ruthenium nitrosyl complexes with n-heterocyclic ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, p. 2670-2677, 1998.

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

BRADDOCK, J. N.; MEYER, T. J.. Kinetics of the oxidation of bis(π -cyclopentadienylcarbonyl)iron by $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}^{2+}$ and by $[\pi\text{-C}_5\text{H}_5]\text{Fe}(\text{CO})^{4+}$. **Inorganic Chemistry**, v.12, p.723-7, 1973.

CALLAHAN, R. W.; MEYER, T. J. Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 16, p. 574-581, 1977.

CARNEIRO, Z. A. Fotocitotoxicidade proveniente do sinergismo de oxigênio singlete e óxido nítrico gerado pelo complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{ONO})(\text{ftalocianina})]$, 2011. 132 Folhas. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.

CHENEY, R. P.; ARMOR, J. N. Reactivity of coordinated nitrosyls: preparation, and reduction nitrosylpentaquaoruthenium(3+) and reduction of various ruthenium ammine nitrosyls. **Inorganic Chemistry**, v. 16, p. 3338-3344, 1977.

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 Research**, v. 15, p. 3-6, 2005.

CHIEN, Y. H.; LEVINE, L. Fluorescence quenching of adriamycin by specific antibodies. **Immunochemistry**, v. 12, p. 291–296, 1975.

CHUNG, H. T.; PAE, H. O.; CHOI, B. M.; BILLIAR, T. R.; KIM, Y. M.; Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1075-1079, 2001.

- CICILLINI, S. A.; PRAZIAS, A. C. L.; TEDESCO, A. C.; SERRA, O. A.; da SILVA, R. S. Nitric Oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, p. 2766-2770, 2009.
- COHEN, S. M. Review New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Current Opinion in chemical biology**, v. 11, p. 115-20, 2007.
- COLOMBINI, M. VDAC:The channel at the interface between mitochondrial and the citosol. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256/257, p. 107-115.
- COMBA, P. Metal ion selectivity and molecular modeling. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 185-185, p. 81, 1999.
- COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A.P. Espectrometria de massas e RMN multidimensional e multinuclear: Revolução no estudo de macromoléculas biológicas. **Atualidades em Química**. v. 16 Nov, 2002.
- CROMPTON, M.; VIRJI, S.; WARD, J. M. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. **Europe Journal of Biochemistry**, v. 258, p. 729-735, 1998.
- CULOTTA, E.; KOSHLAND JR, D. E. NO news is good news. **Science**, v. 258, p. 1862-1865, 1992.
- DORTA, D. J. Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutura atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose. 2007. 134f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2007. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/.../2007_tese__daniel_junqueira_dorta.pdf. Acesso em: 20 Mar. 2012.
- DEMAS, J. N.; DEGRAFF, B. A. Design and Applications of Highly Luminescent Transition Metal Complexes. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 829–837, 1991.
- DEMAS, J. N.; DEGRAFF, B. A. Applications of luminescent transition metal complexes to sensor technology and molecular probes. **Journal of Chemical Education**, v. 74, p. 690–695, 1997.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 324-330, 1998.
- DURHAN, B.; WALSH, J. L.; CARTER, C. L.; MEYER, T. J. Synthetic applications of photosubstitution reactions of poly(pyridyl) complexes of ruthenium(II). **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 860-865, 1980a.
- DURKOP, A.; LEHMANN, F.; WOLFBEIS, O. S. Polarization immunoassays using reactive ruthenium metal-ligand complexes as luminescent labels. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, V. 372, p. 688-694, 2002.

- DWYER, F. P.; GOODWIN, H. A.; GYARFAS, E. C. Mono and bis(2,2'-bipyridine) and bivalent, trivalent, and quadrivalent ruthenium. **Australian Journal of Chemistry**, v. 16, p. 42, 1963.
- EL-SAYED, L.; RAGSDALE, R. O. Studies of some nickel(II) nitrite complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 6, p. 1940, 1967.
- FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. The surprising life of nitric oxide. **Chemical & Engineering News**, v. 20, p. 2-33, 1993.
- FILHO, G. B. **Distúrbios do crescimento e diferenciação celular**. 5 ed., Belo Horizonte: Guanabara-Koogan S.A, 1994. Cap. 8, p. 144-186.
- FORD, P. C.; Synthesis and properties of pentaamminepyridine ruthenium (II) and related pentaamineruthenium complexes of aromatic nitrogen heterocycles. **Journal of the American Chemical Society**, v.90, p. 1187-1194, 1968.
- FORD, P. C. et al.; Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 171, p. 185-202, 1998.
- FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. F. G.; DEMICHE, C. Lipossomas propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.
- GINCEL, D.; ZAID, H.; SHOSHAN- BARMATZ, V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. **Biochemical Journal**, v. 358, p. 147-155, 2001.
- GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. Nitrosyl-nitrite interconversion in ruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 24, p. 2150-2153, 1971a.
- GODWIN, J. B.; MEYER, T. J. Nitrosyl-nitrite interconversion in ruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 24, p. 2150-2153, 1971b.
- GODOY, F. A.; CREPALDI, S. C. Cross-Talk das Vias de Sinalização Mitocondrial: implicações na atrofia muscular. **Saúde em Revista**, v. 11, p. 57-70, 2009.
- GOMES, E. R., ALMEIDA, R. D., CARVALHO, A. P., and DUARTE, C. B. Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 423-430, 2002.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312.
- GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E. Liposomes as carrier of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. **Biochemical Journal**, v. 124, p. 58, 1971.
- GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**. 3rd ed. London: CRC Press, v. 2, 2007, p. 1-388.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.

GROSS, A.; YIN, X. M.; WANG, K.; WEI, M. C.; JOCKEL, J.; MILLIMAN, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; KORSMEYER, S. J. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 1156-1163, 1999.

GUENGERICH, C. P.; SCHUG, K. Reaction of nitrosylpentaammineruthenium (II) with ethylamine, methylamine, and hexaammineruthenium(III) ion to produce dinitrogen complexes. **Inorganic chemistry**, v. 17, p.1378-1379, 1978.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, p. 691-704, 2004.

HENDERSON, W.; McINDOLE, J. S.; **Mass Spectrometry of Inorganic and organometallic compounds**. John Wiley & Sons, 2005.

HOFSETH, L. J.; SAITO, S.; HUSSAIN, S. P.; ESPEY, M. G.; MIRANDA, K. M.; ARAKI, Y.; JHAPPAN, C.; HIGASHIMOTO, Y.; HE, P.; LINKE, S. P.; QUEZADO, M. M.; ZURER, I.; ROTTER, V.; WINK, D. A.; APPELLA, E.; HARRIS, C. C. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 143-148, 2003.

HOLLAND, E. C., CELESTINO, J., DAI, C. K., SCHAEFER, L., SAWAYA, R. E., and FULLER, G. N. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. **Nature Genetics**, v. 25, p. 55-57, 2000.

IGNARRO, L.; **Nitric Oxide: Biology and Photobiology**. 1st ed. San Diego, California, USA: Academic Press, 2000.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

IWAKI, T.; TORIGOE, C.; NOJI, M. NAKANISHI, M. 1993. Antibodies for fluorescent molecular rotors. **Biochemistry**, v. 32, P. 7589-92. 1993.

JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, I.I. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 4392-4396, 1995.

KANG, J. S., PISZCZEK, G.; LAKOWICZ, J. R., Corrigendum to "High-molecular-weight protein hydrodynamics studied with a long-lifetime metal-ligand complex". **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1597, p. 221-228, 2002.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma

cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 185-202, 1998.

KOWALTOWSKI, A. J., CASTILHO, R. F., VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, p. 12-15, 2001.

KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 433-435, 2003.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis, **Immunology Today**, v. 18, p. 44-51, 1997.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection. How, why, when, and where?, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, p. 107, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAVAL, F.; WINK, D. A.; LAVAL, J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 131, p. 175-91, 1997.

LEVER, A. B. P. Inorganic electronic spectroscopy. 2nd ed. New york: Elsevier, 1984.

DE LIMA, R. G. **Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo $[Ru(terpy)(L)NO]^{n+}$** . 2006. 259f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

DE LIMA, R. G.; LEVER, A. B. P.; ITO, I. Y.; DA SILVA, R. S. Antifungal activity of novel catecholamine ruthenium(III) complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 28, p.272-275, 2003.

LUNARDI, C. N.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 87-93, 2009.

MARANHO, D. S.; DE LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from ZnPc liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: Synergistic effects in photodynamic therapy application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 705-713, 2009.

MARCHESI, M. S. P. **Aspectos químicos e fotoquímicos de liberação controlada de óxido nítrico a partir de complexos nitrosilos de rutênio: ensaios farmacológicos e de citotoxicidade**. 2008. 196f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008.

MILLER, L.J.; MARX, J. Apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1301-1304, 1998.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E.A.; Nitric Oxide: physiology,

pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-120, 1991.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOUCHERON, C.; KIRSCH-DE MESMAEKER, A.; KELLY, J. M. Photoreactions of ruthenium (II) and osmium (II) complexes with deoxyribonucleic acid (DNA). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, p. 91-106, 1997.

MURPHY, W. R.; TAKEUCHI, K. J.; MEYER, T. J. Interconversion of nitrite and ammonia: progress toward a model for nitrite reductase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 5817-5819, 1982.

MURPHY, W. R.; TAKEUCHI, K. J.; BARLEY, M. H.; MEYER, T. J.; Mechanism of reduction of bound nitrite to ammonia. **Inorganic Chemistry**, v. 25, p. 1041-1053, 1986.

NAGAO H.; NISHIMURA, H.; FUNATO, H.; ICHIKAWA, Y.; HOWELL, F. S.; MUKAIDA M.; KAKIHANA, H. Synthesis, properties and molecular-structure of trans-chloronitrosylbis(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+): trans and cis isomer characteristics compared. **Inorganic Chemistry**, v. 28, p. 3955-3959, 1989.

NARGESSI, R. D.; LANDON, J.; SMITH, D. S. Use of antibodies against the label in non-separation non-isotopic immunoassay; 'indirect quenching' fluoroimmunoassay of protein. **Journal of Immunological Methods**, v. 26, p. 307-313, 1979.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography for a chemical reaction coupled between two charge transfers. **Analytical Chemistry**, v. 37, p. 178-190, 1965.

OCHSNER, M.; Photophysical and photobiological properties in photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 39, p. 1-18, 1997.

OKU, N. Anticancer therapy using glucuronate modified long-circulating liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 40, p. 63-73, 1999.

O'NEAL, J. S.; SCHULMAN, S. G. Double-antibody homogeneous fluorescence immunoassay of phenytoin. **Analytica Chimica Acta**, v. 170, p. 143-148, 1985.

OOYAMA, D. Synthesis, characterization, structure and redox behavior of cis-(Ru(NO)X(bpy)(py)₂)_z (X=monodentate) type complexes of nitrosylruthenium(II) and their related complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 237, p. 47-55, 1995.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2201-2204, 1999.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; Kriz, G. S.; in: Introduction to Spectroscopy. A Guide for students of Organic Chemistry, 2 nd ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1996.

- PARKER, C. W.; YOO, T. J.; JOHNSON, M. C.; GODT, S. M. Fluorescent probes for the study of the antibody-hapten reaction. I. Binding of the 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonamido group by homologous rabbit antibody. **Biochemistry**, v. 6, p. 3408-3416, 1967.
- PARONE, P. A., JAMES, D., MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, v. 84, p. 105-111, 2002.
- PASTORINO, J. G.; HOEK, J. B. Hexokinase II: The integration of energy metabolism and control of apoptosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1535-1551, 2003.
- POLETI, M. D. **Estudo proteômico para determinação da expressão relativa das isoformas de VDAC e caracterização dos sítios de ligação da hexoquinase em mitocôndrias cerebrais de rato, boi e ave**. 2008. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2008. Disponível em www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-17022009-093241/. Acesso em: 25 fev. 2012.
- RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. **Metal nitrosyls**. New York: Oxford University Press, 1992.
- RIDNOUR, L. A.; THOMAS, D. D.; SWITZER, C.; FLORES-SANTANA, W.; ISENBERG, J. S.; AMBS, S.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A.; Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, p.73-76, 2008.
- DA ROCHA, Z. N.; DE LIMA, R. G.; DORO, F. G., TFOUNI, E.; DA SILVA, R. Photochemical production of nitric oxide from a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex by irradiation with light in the phototherapeutic window. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, p. 737-740. 2008.
- ROY, B.; DHARDEMARE, A. D.; FONTECAVE, M. New thionitrites – synthesis, stability, and nitric-oxide generation. **Journal of organic chemistry**, v. 59, p. 7019-7026, 1994.
- SAMPSON, M. J.; LOVELL, R. S.; CRAIGEN, W. J. Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. **Genomics**, v. 33, p. 277-284, 1996.
- SAPRA, P.; TYAGI, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. **Current Drug Delivery**, v. 2, p. 369-381, 2005.
- SAUAIA, M. G.; de LIMA R.G.; TEDESCO, A. C.; da SILVA, R. S. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazi-bridged nitrosyl ruthenium complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 14718-9, 2003b.
- 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. **Inorganica Chimica Acta**, v. 355, p.191-196, 2003c.
- SAVA, G.; PACOR, S.; BERGAMO, A. Effects of ruthenium complexes on experimental tumours: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. **Chemico-biological Interactions**, v. 95, p. 109-126, 1995.

- SCHRÖDER, M.; STEPHENSON, T. A. Ruthenium. In: WILKINSON, G. (ed.). **Comprehensive Coordination Chemistry. The synthesis, reactions e applications of coordination compounds**. 1st ed. Nova Iorque: Pergamon Press, 1987. v. 4, cap. 45, p. 279-518.
- SCHWIERT, C.W.; MCCUE, J.P. Coordination compounds in medicinal chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 184, p. 67-89, 1999.
- SEDDON, E. A.; SEDDON, K. R. The chemistry of ruthenium. Nova Iorque, Elsevier, 1984.
- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 507-517, 1999.
- SHOSHAN-BARMATZ, V.; GINCEL, D. The Voltage-Dependent Anion Channel; Characterization, Modulation and Role in mitochondrial function in cell life and death. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, p. 279-292, 2003.
- SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 121, p. 51-75, 2006.
- SOFOU, S. Surface-active liposomes for targeted cancer therapy. **Nanomedicine**, v. 2, p. 711-724, 2007.
- SOULIÉ, S.; MOLLER, J. V.; FALSON, P.; LE MAIRE, M.; Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 236, p. 363-364, 1996.
- STOCHEL, G.; WANAT, A.; KULIS, E.; STASICKA, Z. Light and Metal Complexes in Medicine, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 171, p. 203-220, 1998.
- SPRINTSCHNIK, G.; SPRINTSCHNIK, H. W.; KIRSCH, P. P; WHITTEN, D. G. Preparation and photochemical reactivity of surfactant ruthenium(II) complexes in monolayer assemblies and at water- solid interfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 4947-4954, 1977.
- STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. (Eds): World Cancer Report. IARCPress. Lyon 2003. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/2350813/World-Cancer-Report-2003-Stuart-e-Kleihues-WHO-e-IARC>. Acesso em: 25 Jun. 2010.
- SULLIVAN, B. P.; CALVERT, J. M.; MEYER, T. J. Cis-Trans isomerism in (trpy)(PPh₃)RuCl₂. Comparasions between the chemical and physical properties of a cis-trans isomeric pair. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 1404-07, 1980.
- SZCZEPURA, L. F.; TAKEUCHI, K. J.; Synthesis and characterization of novel (cyclopentadienyl)nitroruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 29, p. 1772-1777, 1990.
- TAKEUCHI, K. J.; THOMPSON, M. S.; PIPES, D. W.; MEYER, T. J. Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in aqueous media. **Inorganic Chemistry**, v. 23, p. 1845-1851, 1984.

TERPETSCHNIG, E.; SZMACINSKI, H.; MALAK, H.; LAKOWICZ, J.R.. Metal-ligand complexes as a new class of long-lived fluorophores for protein hydrodynamics. **Biophysical Journal**, v. 68, p. 342-50, 1995.

TFOUNI E.; FORD, P.C.; Thermal and photochemical properties of some trans-disubstituted tetraammineruthenium(II) complexes of aromatic nitrogen heterocycles, trans-Ru(NH₃)₄LL'ⁿ⁺. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 72-76, 1980.

TFOUNI, E.; DORO, F. G.; GOMES, A. J.; SILVA, R.S.; METZKER, G.; BENINI, P. G. Z.; FRANCO, D. W. Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 355-371, 2010.

THOMAS, D. D.; ESPEY, M. G.; RIDNOUR, L. A.; HOFSETH, L. J.; MANCARDI, D.; HARRIS, C. C.; WINK, D. A. Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 8894-8899, 2004.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C.H.; DONZELLI, S.; PERWEZ, HUSSAIN, VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 1-31, 2008.

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. **Inorganica Chimica Acta**, v. 196, p. 57-63, 1992.

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

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

THOMPSON, M. S.; MEYER, T. J. Oxidation of coordinated ammonia to nitrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 5577-9, 1981.

TOMA, H. E.; SERRASQUEIRO, R. M.; ROCHA, R. C.; DEMETS, G. J. F.; WINNICHOFER, H.; ARAKI, K.; RIBEIRO, P. E. A.; DONNICI, C. L. Photophysical and photoelectrochemical properties of the bis(2,2'-bipyridine)(4,4'-dimethylthio-2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 135, p. 185-191, 2000.

TYSNES, B. B.; MAHESPARAN, R.; THORSEN, F.; Haugland, H. K.; PORWOL, T.; ENGER, P. O.; LUND-JOHANSEN, M.; and BJERKVIG, R. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, p. 531–539, 1999.

VAN CRUCHTEN, S. VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomia, Histologia, Embryologia Journal**, v. 4, p. 214–23, 2002.

VANDER HEIDEN, M. G.; LI, X. X.; GOTTLEIB, E.; HILL, R. B.; THOMPSON, C. B.; COLOMBINI, M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 19414–19419, 2001.

XU, W. M.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, v. 12, p. 311–320, 2002.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, p. 873–885, 2003.

WALSH, J. L.; BULLOCK, R. M.; MEYER, T. J. Alkyl nitrite complexes of ruthenium prepared by acid-base chemistry at the bound nitrosyl group. **Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 865–869, 1980.

WALSH, J. L.; DURHAM, B. Trans isomers of ruthenium(II) complexes containing two bipyridine ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 21, p. 329–332, 1982.

WATT, R. M.; VOSS, W. V. Mechanism of quenching of fluorescein by anti-fluorescein IgG antibodies. **Immunochemistry**, v. 14, p. 533–541, 1977.

WELLER, R. Nitric Oxide: A Key Mediator In Cutaneous Physiology. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, p. 511–514, 2003.

WINK, D. A.; GRISHAM, M. B.; MITCHELL, J. B.; FORD, P. C. **Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology**. In: PACKER, L. (ed.) Nitric Oxide. Part A: sources and detection of NO; NO synthase. Methods in Enzymology. Califórnia: Academic Press, v. 268, 1996. Cap. 3, p. 12–31.

WINK, D. A.; LAVAL, J. The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 2125–2129, 1994.

WINK, D. A.; RIDNOUR, L. A.; HUSSAIN, Harris, C. C. The reemergence of nitric oxide and cancer. **Nitric Oxide**. v. 19, p. 65–67, 2008.

WINK, D. A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W.; MITCHELL, J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 711–721, 1998.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 1035–1042, 2003.

WOLFBAUER, G.; BOND A. M.; DEACON, G. B.; MacFARLANE, D. R.; SPICCIA, L. Experimental and theoretical investigations of the effect of deprotonation on electronic spectra and reversible potentials of photovoltaic sensitizers: Deprotonation of *cis*-L₂RuX₂ (L = 2,2'-Bipyridine-4,4'-dicarboxylic Acid; X = CN⁻, NCS⁻) by electrochemical reduction at platinum electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 130-142, 2000.

WORKS, C.F.; JOCHER, C.J.; BART, G.D.; BU, X.H.; FORD, P.C. Photochemical nitric oxide precursors: synthesis, photochemistry, and ligand substitution kinetics of ruthenium salen nitrosyl and ruthenium salophen nitrosyl complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 3728-3739, 2002.

YOUN, H. J.; TERPETSCHNIG, E.; SZMACINSKI, H.; LAKOWICZ, J. R. Fluorescence energy transfer immunoassay based on a long-lifetime luminescent metal-ligand complex. **Analytical Biochemistry**, v. 232, p. 24-30, 1995.

ZUCKER, D.; MARCUS, D.; BARENHOLZ, Y.; GOLDBLUM, A. Liposome drugs loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 139, p. 73-80, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Incorporação do composto nitrosilo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O em formulação lipossomal.

Atualmente estão sendo estudadas diferentes formulações farmacêuticas que atuam como sistemas carreadores de drogas, tais quais as ciclodextrinas, lipossomas, emulsões e microemulsões. Sistemas esses que podem promover um aumento no tempo de circulação do fármaco dentro do organismo e ainda favorecer a incorporação desses nas membranas biológicas de modo a promover um aumento na atividade citotóxica e da concentração intracelular. Dessa forma optamos por incorporar o composto nitrosilo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O em uma dessas formulações, os lipossomas, mas para verificarmos se de fato haveria algum ganho significativo nesse sentido é interessante compreender melhor as particularidades dessas estruturas.

Os lipossomas foram descobertos no início dos anos 60 pelo cientista inglês Alec D. Bangham e colaboradores durante um estudo sobre a difusão de íons através de um sistema de vesículas fosfolipídicas artificiais (BANGHAM et al., 1965). O nome lipossomas passou então a ser utilizado para definir agregados esféricos formados de maneira espontânea por meio da adição de água em filmes lipídicos secos. Esses lipídios são como compostos anfifílicos caracterizados por possuir em sua estrutura uma região polar capaz de interagir com a água e uma região apolar que tende a proteger-se do contato com a água. Uma vez em contato com determinada quantidade de água, esses lipídios tendem a se unir formando vesículas fechadas o que resulta na internalização da região lipofílica formando assim um compartimento aquoso em seu interior (SEGOTA e TEZAK, 2006).

Os lipossomas podem ser constituídos por uma ou mais bicamadas, separadas por fases aquosas, englobando um compartimento aquoso interno sendo denominadas uni e multilamelares respectivamente (Figura 1). Essas bicamadas lipídicas que circundam o núcleo aquoso por sua vez, podem ser constituídas de compostos naturais ou sintéticos, sendo que quando constituídos por fosfolipídios naturais os lipossomas, apresentam baixa toxicidade intrínseca, e são considerados biologicamente inertes e fracamente imunogênicos. Esses aspectos, associados à possibilidade de biodegradação, os tornam estruturas bastante atrativas para utilização nos mais diversos segmentos, incluindo a área da saúde.

Figura 1: Estrutura de lipossomas unilamelar (A) e multilamelar (B). Fonte: http://www.encapsula.com/products_01.html.

Em 1971, foi proposta a utilização de lipossomas como sistemas de transporte de fármacos (GREGORIADIS e RYMAN, 1971). Atualmente os lipossomas tornaram-se ferramentas importantíssimas na medicina, bioquímica, biofísicas e biologia dentre tantas outras áreas, sendo utilizados com frequência nas indústrias cosmética e farmacêutica.

Os lipossomas podem ser classificados com base no tamanho, lamelaridade e método de preparação. Atualmente são várias as técnicas envolvidas na preparação dessas vesículas e durante o processo de preparação é possível controlar parâmetros como o tamanho e morfologia dessas estruturas (SANTOS et al., 2002). Esses parâmetros entre outros, tais como a carga superficial e a composição, são de extrema importância, visto que influenciam diretamente nas propriedades dos lipossomas em relação a fluidez, estabilidade e permeabilidade, que constituem fatores os quais podem ser modulados de forma a atender a necessidades específicas de acordo com o trabalho que está sendo desenvolvido (SOFOU, 2007; SHARMAN et al., 1999; FRÉZARD, et al 2005).

As vantagens de uso dos lipossomas são inúmeras e estão intimamente relacionadas à estrutura dos mesmos. A estrutura em bicamada semelhante a das membranas celulares presentes em nosso organismo, faz com que essas vesículas fosfolipídicas sejam capazes de interagir profundamente com essas estruturas e essa similaridade os torna bastante seguros e eficazes para aplicação terapêutica. Os lipossomas podem ainda atuar como agentes protetores contra a degradação enzimática na qual o fármaco está sujeito, aumentar a concentração do fármaco no local de ação, modular o tempo de circulação do mesmo na circulação (OKU, 1999), proporcionar um possível direcionamento e uma liberação controlada para sítios específicos (GREGORIADIS, 2007; ZUCKER et al., 2009).

Os lipossomas têm sido intensamente explorados no tratamento do câncer, isso porque com o uso de fármacos quimioterápicos convencionais muitas vezes não se consegue atingir a concentração terapêutica do fármaco nos tecidos alvo ou ainda pela ocorrência de efeitos tóxicos acentuados nos tecidos saudáveis. A utilização dos lipossomas possibilita que o princípio ativo seja direcionado ao local da ação, proporcionando diminuição da incidência dos efeitos secundários observados nas terapias convencionais. Dessa forma, é possível então administrar doses superiores de medicamento, aumentando a eficácia do tratamento (SAPRA, minimizando os efeitos da administração desses fármacos que comumente apresentam um elevado grau de toxicidade de modo 2005).

Outra possibilidade é trabalhar com fármacos que possuem diferentes mecanismos de ação, promovendo um efeito sinérgico, ou ainda adicionar ligantes específicos na superfície dos lipossomas direcionando-os para receptores específicos nas células tumorais de forma que o fármaco seja direcionado somente para aqueles tecidos que apresentarem esse tipo de células, possibilidade essa bastante condizente com o objetivo desse projeto. Existem algumas limitações quanto à utilização dos complexos nitrosilos de rutênio, muitas vezes relacionadas à instabilidade desses compostos em pH fisiológico e/ou presença de substâncias redutoras que interfiram no processo de liberação do NO. Dessa forma o desenvolvimento de sistemas que ofereçam estabilidade para esses complexos tipo $\text{Ru}^{\text{II}} \rightarrow \text{NO}^+$ e possibilitem uma liberação controlada dos mesmos são de grande interesse. Nesse sentido estudos envolvendo complexos nitrosilos de rutênio e lipossomas para o emprego na terapia fotodinâmica estão sendo desenvolvidos com sucesso (MARANHO et al.; 2009) demonstrando a potencialidade do uso desses sistemas para os complexos metálicos.

Atualmente são crescentes os progressos envolvendo essa tecnologia relacionada aos lipossomas e diversas formulações para o tratamento de diferentes doenças estão disponíveis comercialmente ou em ensaios clínicos avançados, apresentando resultados promissores (GREGORIADIS, 2007). Como é cada vez maior o interesse nessa área e a cada dia surgem novas tendências de uso e aplicações clínicas que estão demonstrando a potencialidade dessa técnica, acreditamos que seria bastante proveitoso explorar mesmo que de uma forma bastante preliminar a utilização dessas estruturas.

Preparação lipossomal

A preparação lipossomal a base de lipídeos, foi preparada em solução etanólica (360,00 μL) contendo L- α -fosfatidilcolina de ovo (2,140 mg) e colesterol (0,230 mg). A

solução foi aspirada em uma seringa de 400,00 μL conectada a uma jaqueta de vidro termostatzada, na qual foram adicionados 5,00 mL de uma solução tampão fosfato pH 7,4. A injeção etanólica foi conduzida por uma bomba peristáltica (World Precision Instruments (WPI modelo SP 100i) de adição controlada (Figura 2). As injeções foram realizadas a 56 °C sob agitação magnética constante, na ausência de luz em velocidade de 300 μLh^{-1} .

Figura 2: Ilustração do aparato para confecção dos lipossomas.

Determinação do tamanho e potencial de superfície (Zeta) da formulação lipossomal

A determinação do tamanho e polidispersividade das vesículas lipossomais foi realizada no laboratório da Dra. Maria Vitória Badra Bentley, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por meio de técnica de medidas de espalhamento dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasisizer Nano System ZS (Malvern-UK). As amostras foram colocadas em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4.0 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por “backscatter optics” (NIBS). As medidas foram realizadas em um ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento.

A carga de superfície (potencial Zeta) foi determinada pela mobilidade eletroforética da formulação utilizando o mesmo sistema descrito acima, sendo encontrado o valor de -22.2 mV. Na Figura 3, o resultado da preparação em lipossomas apontou o tamanho de 89,7 nm e polidispersividade das vesículas lipossomais de 0,291. Enquanto para o lipossoma vazio o potencial Zeta determinado foi de -22.3 e o tamanho de 78,7 nm.

Figura 3: determinação do tamanho e potencial de superfície (Zeta) da formulação lipossomal.

Foram realizados ensaios preliminares com complexos nitrosilos de rutênio inseridos em lipossomas, os resultados obtidos forneceram informações importantes que permitiram analisar se de fato a incorporação nesse tipo de sistema promove um aumento na atividade citotóxica e da concentração intracelular desses compostos. Resultados iniciais para o composto *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] · 3 H₂O, demonstram a potencialidade desse sistemas no possível direcionamento para sítios específicos de células (GREGORIADIS, 2007) (Figura 4).

Figura 4. Efeito citotóxico do complexo *cis*-[RuCl(dcbpy-H)₂(NO)] . 3 H₂O em linhagem de células HepG2 (A) e células tumorais B16-F10 (B e C), incorporado ou não em lipossoma. As células foram tratadas nas concentrações finais descritas e em diferentes tempos de incubação.

Os dados apresentados representam as médias $\pm$ S.E.M. de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

Experimentos de viabilidade celular para verificar o efeito citotóxico em linhagem de células tumorais B16-F10 e HepG2 foram realizados também com o lipossoma vazio, ou seja, sem a incorporação do complexo com o intuito de verificar se a formulação lipossomal era atóxica. Foram testadas concentrações de 25, 50, 75 e 100% de lipossoma vazio por poço Figura 5. Embora preliminares, os resultados obtidos demonstram que não há uma tendência significativa de citotoxicidade para essas formulações na condição de 1:1 de lipossoma/meio de cultura.

Figura 5: A. Viabilidade de células B16-F10 avaliada por ensaio de MTT após tratamento com lipossoma (vazio). B. Viabilidade de células HepG2 avaliada por ensaio de MTT após tratamento com lipossoma (vazio). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (2×10^4 células/poço) por 3 e 20 horas respectivamente com lipossoma/meio de cultura. Os experimentos foram realizados 2 vezes de forma independente e expresso como média e desvio padrão.

Apesar de preliminares os resultados de incorporação do complexo nitrosilo de rutênio demonstram-se bastante promissores. Com base nos mesmo fica evidente que seria interessante avaliar a possibilidade de incorporar o conjugado ao lipossoma bem como verificar os efeitos do conjugado formado e incorporado nesse sistema em outras linhagens celulares.

APÊNDICE B – Diagrama de Pourbaix para o composto $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$

Uma solução do complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ foi analisada por técnica de voltametria cíclica e a dependência dos valores de potencial $E_{1/2}$ com o pH foi determinada através do Diagrama de Pourbaix (Figura 1). O processo observado corresponde a um equilíbrio ácido-base referente à desprotonação/protonação dos carboxilatos da bipyridina (WOLFBAUER et al, 2000). O Diagrama de Pourbaix (Figura apresentou uma inclinação de -60 mV/pH, o que indica que este processo envolve apenas um elétron/um próton, ou seja, apenas uma das carboxilas sofre desprotonação/protonação durante a análise.

O pK_a determinado para o complexo através do diagrama de Pourbaix foi de 6,6. Claramente observa-se uma série de processos envolvendo protonação e ataque nucleofílico da hidroxila para os vários complexos que podem ser originados por estes processos.

Figura 1: Diagrama Pourbaix para o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$.

APÊNDICE C – Estabilidade química do complexo resultante da terceira etapa da síntese de $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{dcbpy-H})\text{NO}](\text{PF}_6) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Figura 1. Variação espectral na região do UV-visível do complexo resultante da terceira etapa da síntese de $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{dcbpy-H})\text{NO}](\text{PF}_6) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em solução aquosa, temperatura ambiente ($T = 25^\circ\text{C}$), na presença de luz (A) e na ausência de luz (B).

APÊNDICE D – Reatividade de $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ encapsulado em sílica e filme semicondutor (FTO/nitrosilo complexo)

O complexo foi encapsulado na matriz de SiO_2 através do processo sol-gel empregando-se o método não hidrolítico. Misturou-se a 1 mg do complexo nitrosilo 50 μL de DMSO. Em seguida, adicionou-se 150 μL de acetonitrila, 500 μL de isopropanol, 350 μL de

tetraetoxissilano (TEOS), 150 μL de polidimetilsilano (PDMS) e 50 μL de catalisador de estanho. A mistura foi submetida à agitação magnética por 30 minutos ao abrigo da luz. Após este tempo, a mistura foi mantida em repouso até um ponto em que a viscosidade da amostra apresentou um aumento (cerca de 2 horas) e a mesma com um aspecto sol-gel. Neste ponto um volume da mistura foi colocado no substrato constituído de SnO_2 depositado em vidro, logo o semicondutor FTO.

Os gel obtido foi depositado no substrato vidro/ SnO_2F , previamente limpo, através do uso da técnica de spin-coating. A quantidade do gel a ser depositada sobre os substratos retangulares de vidro foi na faixa de 100,00 μl – 200,00 μl . Após deposição o FTO com o filme depositado foi mantida na estufa, por 24 horas a 80 $^\circ\text{C}$. Um branco foi produzido nas mesmas condições, porém, sem adição do complexo nitrosilo.

A mistura restante foi mantida em repouso até total solidificação e após formação da matriz a amostra foi triturada e avaliada através de voltametria diferencial de pulso. O mesmo foi efetuado para o FTO com complexo nitrosilo depositado.

O procedimento descrito foi também aplicado no sentido de encapsular e modificar a superfície do substrato de SnO_2 com o complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{H}_2\text{O})(\text{terpy})](\text{PF}_6)$ e o comportamento eletroquímico foi comparado ao do complexo nitrosilo.

Medidas de voltametria de pulso:

Na figura 1 verifica-se o perfil da curva corrente- potencial para o complexo nitrosilo encapsulado em sílica (curva b), o qual mostra na varredura catódica sinais de potenciais de picos com valores semelhantes aos já descritos em solução (curva a). Na faixa de potencial de 0 a -300 mV, enquanto em solução há dois sinais catódicos bem definidos, no eletrodo modificado grafite - nitrosilo complexo encapsulado, há um sinal largo o que provavelmente se deve a superposição dos dois sinais. Por outro lado na varredura anódica (Figura 2) a curva b mostra certa modificação se comparada com o perfil da curva a. Provavelmente, isso é resultante das interações entre o nitrosilo complexo e a matriz da sílica, a qual parece interferir na cinética das reações que ocorrem após o processo de redução $\{\text{RuNO}\}^6/\{\text{RuNO}\}^7$.

Figura 1. Voltamograma de pulso diferencial: a- Voltamograma diferencial de pulso $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $7,07 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão pH=3. b: eletrodo modificado com nitrosilo complexo em solução tampão pH=3. $V = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 2. Voltamograma de pulso diferencial: a- Voltamograma diferencial de pulso $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $7,07 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão pH=3. b: eletrodo modificado com nitrosilo complexo em solução tampão pH = 3. $V = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Como já apresentado em solução aquosa paralelo a redução $\{\text{RuNO}\}^6/\{\text{RuNO}\}^7$ há reações subsequentes, as quais parecem ser desfavorecidas no filme. Desde modo, a reatividade do íon complexo $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ pode ser alterada no sentido de ser um possível doador de NO. Na figura 3 encontram-se ilustradas as curvas de corrente x potencial para o eletrodo SnO_2 com filme $[\text{Ru}(\text{dcbpy-H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ modificado com sílica. Em comparação com o perfil dos VPD para o complexo em

solução pode-se afirmar que os processos redox centrados no NO coordenado apresenta uma alteração significativa.

Figure 3. Voltamograma de pulso diferencial: Voltamograma diferencial de pulso $[\text{Ru}(\text{dcbpy}-\text{H})(\text{terpy})(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $7,07 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão $\text{pH} = 3$. b: eletrodo FTO-filme nitrosilo complexo em solução tampão $\text{pH} = 3$. $V = 100 \text{ mV s}^{-1}$.