UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**TETRAAMINAS DE RUTÊNIO (II) COMO TRANSPORTADORAS DE ÓXIDO
NÍTRICO E BENZNIDAZOL E SUA AÇÃO SOBRE O *TRYPANOSOMA CRUZI***

Jean Jerley Nogueira da Silva

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Ciências área de concentração Química
Analítica

Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

São Carlos

2008

Silva, Jean Jerley Nogueira

Tetraaminas de rutênio (II) como transportadoras de óxido nítrico e benznidazol e sua ação sobre o *Trypanosoma cruzi*/Jean Jerley Nogueira da Silva.--São Carlos, 2008.

183 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Rutênio 3. Óxido Nítrico I. Título

Ao Senhor Jesus

À Krazy

Dele companheirismo, por acreditar e investir em mim

"A perseverança é o caminho para o êxito"

Charles Chaplin

"Pequenas oportunidades podem ser o início de grandes empreendimentos"

Demóstenes

AGRADECIMENTOS

- A Deus, o sentido de tudo;
- À Krezy pelo apoio nesta jornada e por sempre acreditar que eu iria conseguir chegar até o fim;
- À minha mãe (Lúcia) por ter me ensinado a sempre fazer o que é certo;
- Às minhas irmãs Glis, Kel e Rafa pelo carinho;
- À minha sogra e sogro Francisca e Flaviano pelo apoio e pela motivação;
- Aos amigos de Fortaleza Joseli, Dorelland, Aldernir e Jean Carlos pela amizade e apoio;
- Ao Professor Douglas por me dar a oportunidade de trabalhar em seu Grupo, pela orientação e por sempre ser exigente com os dados científicos;
- Ao Professor João Santana pela competente co-orientação nos experimentos com o *T. cruzi* na FMRP – USP;
- Aos colaboradores e amigos Wander Pavanelli, Wander Cosmi, Ana Lúcia, Paulo, Flávia, Fredy e Tiago pelas dicas e pelas boas discussões;
- Ao amigo Chicão pelo empenho nos cálculos quânticos e discussões;
- Ao Professor Benedito por sempre me receber bem, dando-me maior conceito que o merecido;
- Aos professores Bira (IQSC), Schultz (UFRJ), Rose (UFSCar) e Daniel (IQSC);
- Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Química Analítica Benedito dos Santos Lima Neto, Emanuel Carrilho e Ana Maria de Guzzi Plepis pela reserva técnica concedida, a qual foi fundamental para a execução deste trabalho;

- Ao Instituto de Química de São Carlos/USP, pelo apoio institucional;
- Ao amigo Clayston pelas sempre empolgantes discussões;
- Ao Rahuo e Milton pela amizade;
- Ao Gustavo por se mostrar um potencial e pela amizade;
- Aos amigos Zé, Magão, Simone, Mariana, Tatiana, Heloísa, Renata, Evânia, André, Baiano, Olívia, Roni, Wendel, Murilo, Carlos, Itapira, Eduardo e Baixinho pelo coleguismo;
- Às secretárias e bibliotecárias Veroneide, Ivonete, Cláudia, Sílvia, Andréia, Karina, Sandra, Eliana e Vitória pelo bom serviço e apoio;
- Aos técnicos Mário e Silvana (CAQI) e Romano (Financeiro);
- Aos Pastores Nivaldo, Eliana, Jean e Joel pelo direcionamento e lições de vida;
- A todo corpo de amigos, alunos, levitas e colegas de seminário da Igreja do Nazareno de São Carlos pelo abrigo proporcionado;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Vi
LISTA DE TABELAS	Xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	Xviii
RESUMO	Xxi
ABSTRACT	Xxiii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças negligenciadas	1
1.2 Doença de Chagas	2
1.3 Terapêutica da doença de Chagas	4
1.4 Compostos metálicos como agente quimioterápico contra <i>Trypanosoma</i>	8
1.5 Funções patofisiológicas do óxido nítrico	10
1.6 Óxido nítrico e <i>T. cruzi</i>	11
1.7 Possíveis alvos farmacológicos do NO sobre o <i>T. cruzi</i>	13
1.8 Complexos de rutênio contendo o ligante nitrosilo	16
1.9 Descrição do problema de estudo	23
II. JUSTIFICATIVAS	26
III. OBJETIVOS	28
IV. EXPERIMENTAL	29
4.1 Reagentes	29

4.2	Instrumentação	30
4.2.1	Análise elementar	30
4.2.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	30
4.2.3	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível	31
4.2.4	Espectroscopia de absorção atômica	31
4.2.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	32
4.2.6	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	32
4.2.7	Experimentos eletroquímicos	32
4.2.8	Determinação dos valores de pK_a das espécies <i>trans</i> - $[Ru(Bz)(NH_3)_4S(IV)]^{n+}$, $S(IV) = SO_2$, HSO_3^- ou SO_3^{2-} (titulação com NaOH)	32
4.2.9	Medidas de solubilidade	33
4.3	Preparação dos complexos	33
4.3.1	Preparação dos complexos de rutênio	33
4.3.2	Preparação do complexo <i>trans</i> - $[Ru(Bz)(NH_3)_4S(IV)](TFMS)_n$, $S(IV) = SO_2$, HSO_3^- ou SO_3^{2-} (RuBz)	34
4.4	Cálculos quânticos	35
4.4.1	Otimização das geometrias	35
4.4.2	Descritores moleculares	36
4.5	Ensaio biológicos	37
4.5.1	Solução de PBS	37

4.5.2	Ensaios de citotoxicidade não específica	37
4.5.3	Ensaios de toxicidade aguda	38
4.5.4	Amostras de <i>T. cruzi</i>	38
4.5.5	Animais para experimentação	39
4.5.6	Avaliação da atividade anti-proliferativa e tripanocida <i>in vitro</i> contra epimastigotas dos complexos <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ L(SO ₄)]Cl, L = pz, L-his, imN, py, isn ou nic, <i>trans</i> -[Ru(H ₂ O)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃](PF ₆) ₂ , <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L]X ₃ , L = pz, L-his, imN, P(OEt) ₃ , py, isn ou nic e X = BF ₄ ⁻ ou PF ₆ ⁻ , <i>trans</i> -[Ru(Bz)(NH ₃) ₄ SO ₂](CF ₃ HSO ₃) ₂ , K[Ru(Hedta)Cl], [Ru(Hedta)(NO)] e <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ L](PF ₆) _n , L = imN, 1-miN ou SO ₃ ²⁻	40
4.5.7	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra tripomastigotas dos complexos <i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ L(SO ₄)]Cl, L = pz, L-his, imN, py, isn, nic, ou 4-pic, <i>trans</i> -[Ru(H ₂ O)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃](PF ₆) ₂ , <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L]X ₃ , L = pz, L-his, imN, imC, SO ₃ ²⁻ , P(OEt) ₃ , py, isn, nic ou 4-pic e X = BF ₄ ⁻ ou PF ₆ ⁻ , <i>trans</i> -[Ru(Bz)(NH ₃) ₄ SO ₂](CF ₃ HSO ₃) ₂ , K[Ru(Hedta)Cl], [Ru(Hedta)(NO)] e <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ L](PF ₆) _n , L = imN, 1-miN ou SO ₃ ²⁻	41
4.5.8	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra amastigotas dos complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L](BF ₄) ₃ , L = isn ou imN, <i>trans</i> -[Ru(Bz)(NH ₃) ₄ SO ₂](CF ₃ HSO ₃) ₂ , e <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ L](PF ₆) _n L = imN ou SO ₃ ²⁻	42
4.5.9	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vivo</i> dos complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L](BF ₄) ₃ , imN ou isn, <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ L](PF ₆) _n L = imN ou SO ₃ ²⁻ e <i>trans</i> -[Ru(Bz)(NH ₃) ₄ SO ₂](CF ₃ HSO ₃) ₂ usando um modelo murino agudo	43

4.5.10	Análise histológica	44
4.5.11	Análise estatística	44
4.6	Ensaio de cinética enzimática	45
4.6.1	Ensaio de inibição da atividade catalítica da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> (gGAPDH)	45
V.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Tetraaminas como transportadoras de óxido nítrico e sua ação sobre o <i>T. cruzi</i>	47
5.1.1	Atividade anti-proliferativa <i>in vitro</i> sobre as formas epimastigotas	47
5.1.2	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> sobre as formas epimastigotas	50
5.1.3	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> sobre as formas tripomastigotas	52
5.1.4	Determinação da janela terapêutica para os complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ⁿ⁺ , L = pz, isn, imN, py, SO ₃ ²⁻ , L-his ou P(OEt) ₃	58
5.1.5	Determinação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> para os complexos <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn](BF ₄) ₃ , <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃ , <i>trans</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃ , <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ imN](PF ₆) ₃ e <i>cis</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ SO ₃]PF ₆	62
5.1.6	Experimentos <i>in vivo</i> (modelos agudos de infecção)	63
5.1.7	Inibição da gGAPDH	89
5.2	Tetraaminas como transportadoras de benznidazol e sua ação sobre o <i>T. cruzi</i>	92
5.2.1	Síntese do complexo RuBz	92

5.2.2	Análise estrutural	94
5.2.3	Análise dos OMs	97
5.2.4	Espectroscopia eletrônica	99
5.2.5	Espectroscopia vibracional	101
5.2.6	Ressonância magnética nuclear	103
5.2.7	Voltametria cíclica	105
5.2.8	Determinação dos valores de pK_a das espécies <i>trans</i> - $[Ru(Bz)(NH_3)_4(SO_2)]^{2+}$, <i>trans</i> - $[Ru(Bz)(NH_3)_4(HSO_3)]^+$ e <i>trans</i> - $[Ru(Bz)(NH_3)_4(SO_3)]$	106
5.2.9	Propriedades hidrofílicas e eletrônicas	108
5.2.10	Estudos de toxicidade aguda	110
5.2.11	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> <i>in vitro</i>	112
5.2.12	Atividade anti- <i>T. cruzi</i> <i>in vivo</i>	116
VI.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
6.1	Tetraaminas como transportadoras de NO	130
6.2	Tetraaminas como transportadoras de benznidazol	131
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura dos fármacos nifurtimox (Nfx), benznidazol (Bz) e do agente quimioprolifático violeta de genciana (Vg). 06
- Figura 2.** Representação estrutural da cruzipaína destacando os principais resíduos do sítio ativo. PDB 1ME3. 15
- Figura 3.** Representação estrutural da gGAPDH destacando o sítio ativo contendo os resíduos Cys¹⁶⁶, His¹⁹⁴, Thr¹⁹⁹ e Arg. PDB 1K3T. 16
- Figura 4.** Ciclo catalítico de conversão de nitrito a óxido nítrico promovido pelos complexos de rutênio. 22
- Figura 5.** Estruturas para os complexos (A) *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imC]³⁺ ($E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0} = -0,320 \text{ V vs. ENH}$ e $k_{\text{NO}} = 4 \text{ s}^{-1}$) e (B) *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺ ($E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0} = -0,118 \text{ V vs. ENH}$ e $k_{\text{NO}} = 0,16 \text{ s}^{-1}$). 57
- Figura 6.** Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com os complexos *t*-Ru(NO)isn, *t*-Ru(NO)py, *t*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)imN ou *c*-Ru(NO)SO₃. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, 1,0 x 10³ tripomastigotas por camundongo) e tratados por via oral com a dose de 100 nmol de *t*-Ru(NO)isn (▼), *t*-Ru(NO)py (●), *t*-Ru(NO)imN (▲), *c*-Ru(NO)imN (■) ou *c*-Ru(NO)imN (✱) por quilograma de massa corpórea durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de camundongos infectados recebeu somente PBS (■) ou Bz na dose de 100 nmol kg⁻¹ (◆). Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 10. As setas indicam o período de tratamento. 66
- Figura 7.** Níveis de parasitemia no pico parasitêmico (11º dia após a infecção) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com o 67

complexo *t*-Ru(NO)isn ou *t*-Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas por camundongo) e tratados por via intraperitoneal com diferentes doses de (10, 50, 100, 400, 1000 e 3000 nmol kg⁻¹) de cada complexo durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de camundongos recebeu somente PBS (controle). Os níveis de parasitemia para o *t*-Ru(NO)isn são mostrados em (a) e para o *t*-Ru(NO)imN em (b). Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6.

Figura 8. Curvas de sobrevida de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com o *t*-Ru(NO)isn ou *t*-Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas por camundongo) e tratados intraperitonealmente com doses de 10 (a), 50 (b), 100 (c), 400 (d), 1000 (e) e 3000 nmol kg⁻¹ (f) de *t*-Ru(NO)isn (♦) ou Ru(NO)imN (▲). Um outro grupo de animais recebeu somente PBS (controle, ■). Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6. As setas indicam o período de tratamento. 68

Figura 9. Regulação da produção de NO produzido por macrófagos infectados com o *T. cruzi*. A infecção de macrófagos por *T. cruzi* pode resultar na produção de quimiocinas e IL-12. Esta última induz a produção de INF- γ e TNF- α pelas células NK. Adicionalmente, IL-12 favorece a diferenciação das células Th1, resultando na produção de INF- γ adicional. Juntos, INF- γ e TNF- α induz a ativação da iNOS e a produção de NO por macrófagos ativados, mediando à morte do *T. cruzi*, mas também modulando a resposta imune através da apoptose de células T. Por outro lado, a infecção de macrófagos por *T. cruzi* também pode resultar na produção de TGF- β , o qual é um regulador negativo da ativação de macrófagos e da produção de NO. Por fim, a produção de NO também pode ser indiretamente inibida pela produção da citocina IL-10, a qual é produzida na diferenciação de células Th2. Linhas 70

contínuas = indução, linhas pontilhadas = inibição.

- Figura 10.** Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com os complexos Ru(NO)isn ou Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com doses de 100 nmol de *t*-Ru(NO)isn (▲) ou *t*-Ru(NO)imN (◆) por quilograma de massa corpórea durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de camundongos recebeu somente PBS (quadrado). Os dados são representativos de três experimentos diferentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento. Um outro grupo de animais foi tratado com Bz na dose de 100 nmol kg^{-1} ($26 \mu\text{g kg}^{-1}$), mas nenhum efeitos de proteção contra morte foi observado (dados não mostrados) 72
- Figura 11.** Histologias de seções dos corações de camundongos infectados com o *T. cruzi* ($1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com (A) PBS, (B) *t*-Ru(NO)isn ou (C) *t*-Ru(NO)imN durante 15 dias consecutivos ou (D) camundongos não infectados. No 15º dia após a infecção, os animais foram eutanizados e seus corações processados para a análise de H&E. Note a intensidade do processo inflamatório com células mononucleares e necrose na seção A, mas não nas seções C ou D. As setas pretas indicam os ninhos de amastigotas e as azuis indicam o infiltrado inflamatório. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x. 73
- Figura 12.** Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Balb/c infectados com o *T. cruzi* e tratados com o *c*-Ru(NO)imN (▼), *c*-Ru(NO)SO₃ (▲), *t*-Ru(NO)imN (●) ou não tratados (controle, ■). Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com cada composto na dose de 385 nmol kg^{-1} durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de animais infectados foi 76

tratado com o Bz (♦) na mesma dose. Os complexos nitrosilo foram administrados neste experimento por via oral em 100 µl de PBS enquanto que o Bz em 200 µl de PBS. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento

- Figura 13.** Histologias de seções do tecido miocárdio de camundongos infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com (A) PBS ou com (B) *c*-Ru(NO)imN, (C) *c*-Ru(NO)SO₃ ou (D) *t*-Ru(NO)imN na dose de 385 nmol kg⁻¹ durante 15 dias consecutivos. No 15º dia após a infecção, os camundongos foram eutanizados e seus corações processados para a análise de H&E. Note a intensidade do processo inflamatório como células mononucleares e necrose na seção A, mas não nas seções B, C ou D. As setas indicam os ninhos de amastigotas e os círculos o processo inflamatório. As fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x. 77
- Figura 14.** Processo inflamatório quantificado através da contagem do número de núcleos no tecido miocárdio de camundongos Balb/c infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com PBS (controle) ou com os compostos Bz, *t*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)SO₃ na dose de 385 nmol kg⁻¹ durante 15 dias consecutivos. No 15º dia após a infecção, os camundongos foram sacrificados e seus corações processados para a análise de H&E. As fotomicrografias foram então analisadas usando o programa ImaginJ através da contagem de núcleos em 50 µm² de tecido miocárdio. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. $n = 6$. 78
- Figura 15.** Células Vero infectadas com o *T. cruzi*. As células foram cultivadas em meio DMEM, infectadas com tripomastigotas e lavadas com PBS. As culturas foram então incubadas por 24 h ($t = 37^\circ\text{C}$, 5% CO₂) sem adição de qualquer composto (A) ou na presença dos compostos Bz (B), 80

c-Ru(NO)imN (C) ou *t*-Ru(NO)imN (D) todos na concentração de 1 mmol L⁻¹. Em seguida foram coradas e analisadas em microscópio eletrônico. As setas indicam as amastigotas viáveis dentro das células (seta azul = núcleo, seta verde = citoplasma). Note a vacuolização e a ausência de parasitos viáveis no interior das células. As fotomicrografias são representativas de 2 experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 400x.

- Figura 16.** Porcentagem de células Vero infectadas com amastigotas e tratadas com os compostos Bz, *t*-Ru(NO)imN ou *c*-Ru(NO)imN (d) na concentração de 1 mmol L⁻¹ ou não tratadas (controle). Quantificação feita a partir dos dados da Figura 15. 81
- Figura 17.** Esquema proposto para os eventos seguidos à fagocitose do *T. cruzi* por macrófagos ativados, bem como pela ação do NO produzido endogenamente ou liberado pelos complexos nitrosilo estudados neste trabalho. O esquema foi baseado na proposta feita por Denicola e colaboradores para a ação do ONOO⁻ sobre epimastigotas. 84
- Figura 18.** Estruturas dos tióis exclusivos de tripanosomatídeos. Tripanotiona, T(SH)₂ (a), homotripanotiona, hT(SH)₂ (b), glutatona, GSH (c) e ovotiol, imCSH (d). 86
- Figura 19.** Curvas de sobrevivência de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com o *t*-Ru(NO)isn ou *t*-Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, 1,0 x 10² parasitos por animal) e tratados com doses de 100 nmol de *t*-Ru(NO)imN (♦) ou *t*-Ru(NO)isn (▲) por kg de massa corpórea seguindo o protocolo descrito na Tabela 6. a) grupo 1, b) grupo 2 e c) grupo 3. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6. As setas indicam o período de tratamento. 88
- Figura 20.** Curva dose resposta para a inibição da atividade catalítica da gGAPDH 91

de *T. cruzi*. Inibidor = *c*-Ru(NO)imN.

- Figura 21.** Esquema de síntese para o íon complexo RuBz. 93
- Figura 22.** Estruturas ORTEP para os compostos Bz e RuBz otimizadas usando-se cálculos de DFT na fase aquosa. 95
- Figura 23.** Espectro UV-vis do RuBz em água, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaTFA, 25 °C e pH = 3,0. 100
- Figura 24.** Espectro vibracional para o complexo RuBz registrado em pastilha de KBr. 102
- Figura 25.** Espectro de RMN de ^1H para o complexo RuBz. Deslocamentos químicos em ppm vs. TMS. Espectro obtido em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. 103
- Figura 26.** Espectro de RMN de ^{13}C para o complexo RuBz. Deslocamentos químicos em ppm vs. TMS. Espectro obtido em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. 104
- Figura 27.** Ciclovoltamogramas para os compostos RuBz e Bz em solução aquosa de NaTFA, $\mu = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $t = 25 \text{ °C}$, $\text{pH} = 2,2$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $[\text{Ru}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$. 106
- Figura 28.** Distribuição das espécies (a) *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_2)]^{2+}$ (—), *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{HSO}_3)]^+$ (—) e *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_3)]^-$ (—) em função do pH e curva de titulação com NaOH a 25 °C. 108
- Figura 29.** Comparação da Atividade tripanocida *in vitro* entre o RuBz e Bz. Ambos os compostos foram incubados com $1,0 \times 10^6$ tripomastigotas mL^{-1} a 37 °C e 5% CO_2 e a atividade tripanocida determinada após 1 hora de incubação. $n = 3$. 115
- Figura 30.** Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com os compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ 117

parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz na dose de 100 nmol kg⁻¹ durante 15 dias consecutivos (protocolo A, ●) ou somente nos dias 5, 6 e 7 (protocolo B, ▲). Outros grupos de camundongos infectados receberam somente PBS (controle, ■) ou Bz na dose de 100 nmol kg⁻¹ (◆). Ambos os compostos foram injetados em 100 µL de PBS por via intraperitoneal. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6. As setas indicam o período de tratamento.

Figura 31. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevida (b) de camundongos 119

Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados durante 15 dias consecutivos com os compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; 1,0 x 10³ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz nas doses de 100 nmol kg⁻¹ (●) e 385 nmol kg⁻¹ (▲). Outros grupos de camundongos infectados receberam somente PBS (controle, ■) ou Bz na dose 385 µmol kg⁻¹ (◆). O RuBz foi injetado em 100 µL de PBS e o Bz em 200 µL, ambos por via intraperitoneal. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6. As setas indicam o período de tratamento.

Figura 32. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevida (b) de camundongos 120

Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com uma única dose dos compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; 1,0 x 10³ parasitos por camundongo) e tratados com uma única dose de RuBz (▲) ou Bz (◆) ambos a 385 µmol kg⁻¹. Outro grupo de camundongos infectados recebeu somente PBS (controle, ■). O RuBz foi injetado em 100 µL de PBS e o Bz em 200 µL, ambos por via intraperitoneal. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares, n = 6. As setas indicam o período de tratamento.

Figura 33. Histologias de seções dos corações (em cima) e músculos esqueléticos 122

(em baixo) de camundongos infectados com o *T. cruzi* e tratados durante 15 dias consecutivos com os compostos Bz e RuBz de acordo com o protocolo A (15 dias consecutivos). Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz na dose de 100 nmol kg^{-1} . Outro grupo de camundongos infectados recebeu somente PBS (controle). Os animais foram eutanizados no 15º dia após a infecção e seus órgãos foram processados para a análise por H&E. Note a intensidade do processo inflamatório com células mononucleares e necrose nas seções de controle, mas não nas seções RuBz. As setas indicam os ninhos de amastigotas e os círculos indicam a inflamação. As histologias do grupo tratado com o Bz na dose de 100 nmol kg^{-1} revelaram ninhos de amastigotas e volume de inflamação similar ao grupo de controle. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Figura 34. Histologias de seções dos corações de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados oralmente durante 15 dias consecutivos com os compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz nas doses de 100 e 385 nmol kg^{-1} . Outros grupos de camundongos infectados recebeu somente PBS ou Bz na dose de $385 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$. Os animais foram eutanizados no 15º dia após a infecção e seus órgãos foram processados para a análise por H&E. Note que existem ninhos de amastigotas e inflamação na seção de controle, mas não nas seções RuBz ou Bz. As setas indicam os ninhos de amastigotas e o círculo indica a inflamação. As fotomicrografias são representativas de três

123

experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Figura 35. Histologias de seções dos fígados de camundongos infectados com o *T. cruzi* (1,0 x 10³ parasitos por camundongo) e não tratados (A) ou tratados com o RuBz com a dose de 385 nmol kg⁻¹ (B) ou com o Bz na dose de 385 μmol kg⁻¹ (C). O Paine (D) representa a seção de um fígado de um animal não infectado. O RuBz foi administrado oralmente em 100 μL de PBS e o Bz em 200 μL. No 15º dia após a infecção, os animais foram eutanizados e seus fígados processados para a análise histológica. Os círculos indicam o infiltrado inflamatório. As microfotografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6. Ampliação final: 200x. 124

Figura 36. Células Vero infectadas com o *T. cruzi*. As células foram cultivadas em meio DMEM, infectadas com tripomastigotas e lavadas com PBS. As culturas foram então incubadas por 24 h (t = 37 °C, 5% CO₂) sem adição de qualquer composto (A) ou na presença dos compostos RuBz (B), Bz (C) ou *t*-Ru(NO)imN (D) na concentração de 100 μmol L⁻¹. Em seguida foram coradas e analisadas em microscópio eletrônico. As setas vermelhas indicam as amastigotas viáveis dentro das células (seta verde = citoplasma, seta azul núcleo). Note a vacuolização e a ausência de parasitos viáveis no interior das células. As fotomicrografias são representativas de 2 experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x. 126

Figura 37. Porcentagem de células Vero infectadas com amastigotas e não tratadas 127
(a) ou tratadas com os compostos RuBz (b), Bz (c) ou *t*-Ru(NO)imN.
Quantificação feita a partir dos dados da Figura 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Citotoxicidade, dose letal e propriedades químicas dos doadores de NO $trans$ -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ³⁺ , [Ru(NO)(Hedta)] e SNP	24
Tabela 2.	Atividade anti-proliferativa dos compostos $trans$ -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ⁿ⁺ , [Ru(NO)(Hedta)], cis -[Ru(NO)(bpy) ₂ L] ⁿ⁺ , SNP e Bz sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação	48
Tabela 3.	Atividade tripanocida dos compostos $trans$ -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ⁿ⁺ e SNP sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações após 48 h de incubação	51
Tabela 4.	Atividade tripanocida dos compostos $trans$ -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ⁿ⁺ , [Ru(NO)(Hedta)], cis -[Ru(NO)(bpy) ₂ L] ⁿ⁺ e SNP e Bz sobre as formas tripomastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação	54
Tabela 5.	Tendência de correlação entre a atividade anti-proliferativa, o potencial de redução do par $E_{(Ru^{II}NO^+/Ru^{II}NO^0)}$ e a constante de velocidade específica (k_{NO}) para os complexos do tipo $trans$ -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ³⁺ e [Ru(NO)(Hedta)]	56
Tabela 6.	Valores de IC ₅₀ sobre células V-79 e sobre o <i>T. cruzi</i> e janelas terapêuticas para os íons complexos $trans$ -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L] ³⁺ L = pz, L-his, imN, isn, py, SO ₃ ²⁻ e P(OEt) ₃ e SNP	60
Tabela 7.	Cronograma de tratamento, de monitoração da parasitemia e da infecção de camundongos Swiss tratados com os complexos t -Ru(NO)imN e t -Ru(NO)isn	86
Tabela 8.	Distâncias interatômicas e ângulos de ligação para o RuBz otimizados usando-se métodos DFT (base LANL2DZ). Os dados foram comparados com a estrutura de raios-X relatada para o complexo $trans$ -[Ru(NH ₃) ₄ SO ₂ Cl]Cl	94

Tabela 9.	Caráter, energia e superfície de contorno dos orbitais moleculares de fronteira para o complexo RuBz calculados por DFT	96
Tabela 10.	Dados de UV-visível para os compostos RuBz e Bz em diferentes solventes.	98
Tabela 11.	Frequências vibracionais mais importantes para os compostos RuBz e Bz. As frequências vibracionais para o complexo $\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4 \cdot 2\text{Bz}$ foram usadas como referência	100
Tabela 12.	Dados de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C NMR para os átomos hidrogênio e carbono localizados na vizinhança do nitrogênio coordenado	102
Tabela 13.	Diferenças entre as propriedades eletrônicas (LUMO, cargas NBO e GAP) e entre os descritores hidrofílicos (energia de solvatação, energia total em fase aquosa, hidrosolubilidade e E_{pc}) para os compostos Bz e RuBz.	108
Tabela 14.	Porcentagem de proliferação de esplenócitos proveniente da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c na presença do complexo RuBz	109
Tabela 15.	Atividade anti-proliferativa dos compostos <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}](\text{BF}_4)_3$, Bz e RuBz sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação	111
Tabela 16.	Atividade tripanocida dos compostos <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}](\text{BF}_4)_3$, Bz e RuBz sobre as formas tripomastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação	112

LISTA DE ABREVIATURAS

% AA - porcentagem de atividade anti-proliferativa;

% AT - porcentagem de atividade tripanocida;

BF_4^- - íon tetrafluorborato;

Bz - benznidazol;

DFT - teoria do funcional da densidade;

DTN - doenças tropicais negligenciadas;

E_{aq} - energia total na fase aquosa;

ECS - eletrodo de calomelano saturado;

ENH - eletrodo normal de hidrogênio;

E_{pc} - potencial de pico catódico;

$E_{(\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0)}$ - potencial de redução para o par redox $\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0$;

E_{s} - energia de solvatação;

$\text{GAP} = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$;

% GI - porcentagem de inibição do crescimento das formas epimastigotas;

% $\text{GI}_{1\text{h}}$ - porcentagem de inibição do crescimento das formas epimastigotas após 1h de incubação;

$\text{IC}_{50\text{epi}}$ - concentração inibitória sobre as formas epimastigotas;

$\text{IC}_{50\text{tri}}$ - concentração inibitória sobre as formas tripomastigotas;

$\text{IC}_{50\text{V79}}$ - concentração inibitória sobre as células V-79;

$\text{IL-1}\beta$ - interleucina-1beta;

imC - imidazol coordenado pelo carbono C2;

imN - imidazol coordenado pelo nitrogênio N3;

INF- γ - interferon gama;

isn - isonicotinamida;

JT - janela terapêutica;

k_{NO} - constante de velocidade específica para a liberação de NO;

L - ligante *trans*;

L-his - L-histidina;

NBO - cargas NBO (Natural Bond Orbital);

Nfx - nifurtimox;

1-miN - 1-metilimidazol;

nic - nicotinamida;

NO - óxido nítrico;

OM - orbital molecular;

PBS - phosphate-buffered saline;

PF_6^- - íon hexafluorofosfato;

4-pic - 4-picolina;

$[P(OEt)_3]$ - trietilfosfito;

protocolo A - tratamento durante 15 dias consecutivos;

protocolo B - tratamento somente nos dias 5, 6 e 7 após a infecção;

py - piridina;

pz - pirazina;

c-Ru(NO)imN - *cis*-[Ru(NO)bpy)₂imN](PF₆)₃;

c-Ru(NO)1-miN - *cis*-[Ru(NO)bpy)₂1-miN](PF₆)₃;

c-Ru(NO)SO₃ - *cis*-[Ru(NO)bpy)₂SO₃](PF₆)₃;

t-Ru(NO)imN - *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃;

t -Ru(NO)isn - *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃;

t -Ru(NO)py - *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃;

S_{aq} - solubilidade em água;

SNAP - S-nitroso-acetil-penicilamina;

SNP - nitroprussiato de sódio;

SO₃²⁻ - íon sulfito;

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*;

TDDFT - teoria do funcional da densidade dependente do tempo;

Vg - violeta de genciana.

RESUMO

Uma nova e promissora alternativa quimioterápica para o tratamento da doença de Chagas usando tetraaminas de rutênio (II) como transportadoras de óxido nítrico (NO) ou Benznidazol (Bz) são apresentados aqui. Os resultados mostraram que os complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺ são mais eficientes para tratar casos agudos da doença (modelo murino) que o Bz livre. Os nitrosilos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆)₃ são capazes de eliminar *in vivo* as formas extracelulares e intracelulares do *T. cruzi* tanto na corrente sanguínea quanto no tecido miocárdio, assegurando a sobrevivência de 60-100% dos animais infectados em doses de 900 (400 nmol kg⁻¹) até 3.850 vezes menores (100 nmol kg⁻¹) que a dose considerada ótima para o Bz (385 µmol kg⁻¹ = 100 mg kg⁻¹). Além disso, uma concentração de *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ ou *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ dez vezes menor que a recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tratar sangue infectado com o violeta de genciana (Vg) é capaz de eliminar 100% dos parasitos após 1 hora de incubação a 37 °C. Os experimentos conduzidos *in vitro* demonstraram que o NO liberado após redução ou reativos intermediários do NO são os responsáveis pelo efeito anti-proliferativo ou tripanocida. O nitrosilo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ (IC_{50epi} = 67 µmol L⁻¹) foi mais ativo que o nitroprussiato de sódio (SNP) (IC_{50epi} = 244 µmol L⁻¹) e o *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ e o *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ (IC_{50tri} = 52 e 58 µmol L⁻¹, respectivamente) foram mais eficientes que o Vg (IC_{50tri} = 536 µmol L⁻¹).

O transportador do Bz, *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄S(IV)]ⁿ⁺, S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻ (RuBz), é mais hidrossolúvel e mais ativo (IC_{50tri/1h} = 79 ± 3 µmol L⁻¹) que o Bz livre

($IC_{50tri/1h} = 4,800 \pm 70 \mu\text{mol L}^{-1}$). Este complexo exibiu baixa citotoxicidade *in vitro* ($IC_{50esplenócitos} > 1 \text{ mmol L}^{-1}$) e *in vivo* ($400 \mu\text{mol kg}^{-1} < LD_{50} < 600 \mu\text{mol kg}^{-1}$) e a formação do derivado hidroxilamínico é mais favorável no RuBz que no Bz em $9,6 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Em diversos modelos murinos de infecção aguda, o RuBz também foi mais ativo que o Bz ainda quando somente uma dose foi administrada. Analogamente, o RuBz a uma dose 1.000 vezes que a dose ótima para o Bz provou ser suficiente para proteger todos os animais infectados, eliminando os ninhos de amastigotas nos seus corações, fígados e músculos esqueléticos.

Em experimentos conduzidos com células Vero, os nitrosilos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e o RuBz foram capazes de eliminar as formas intracelulares do *T. cruzi* e reduzir a porcentagem de células infectadas. Portanto, todos os dados observados sugerem a maior solubilidade em água somada à acessibilidade do potencial de redução do par NO₂/NO₂^{•-} no RuBz são os responsáveis pela maiores atividades anti-proliferativa e tripanocida com respeito ao Bz ou Vg. Adicionalmente, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂1-miN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆)₃ provaram ser capazes de inibir a atividade catalítica da gGAPDH de 89-97% a uma concentração de $260 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto os complexos da série *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, os precursores *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO₂)]ⁿ⁺, *cis*-[Ru(H₂O)(bpy)₂L]ⁿ⁺ bem como os complexos RuBz, *cis*-[Ru(NO)(NH₃)₄(NO₂)]Cl₂ não exibiram atividade inibitória significativa.

ABSTRACT

A novel and promising chemotherapeutic alternatives for the treatment of Chagas' disease by use of ruthenium tetraammnine complexes as a carrier of nitric oxide (NO) or Benznidazole (Bz) are presented herein. The results showed that the *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ and *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺ compounds are more efficient in the treatment of acute cases of the disease (mouse model) than free Bz. The *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃, and *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆)₃ are able to eliminate, *in vivo*, extracelullar as well as intracellular forms of *T. cruzi* in the bloodstream and myocardium tissue and to assure the survival of 60-100% of infected mice at doses of 900 (400 nmol kg⁻¹) up to 3,850 fold smaller (100 nmol kg⁻¹) than that considered the optimal dose for Bz (385 μmol kg⁻¹ = 100 mg kg⁻¹). Furthermore, a dose of *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ or *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ ten-fold smaller than that recommended by World Health Organization (WHO) for gentian violet, Vg, a phenyl methane currently recommended by WHO in the treatment of blood banks in endemic and non-endemic areas to prevent the transmission of Chagas' disease by blood transfusion, is able to lyses 100% of the parasites after 1 hour of incubation. The tests conducted *in vitro* demonstrated that the NO liberated upon reduction of these nitrosyls is responsible for the observed antiproliferative and trypanocidal activities. The *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ (IC_{50epi} = 67 μmol L⁻¹) was found to be more efficient than the classic NO-donor, sodium nitroprusside (SNP) (IC_{50epi} = 244 μmol L⁻¹) and *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ and *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ (IC_{50try} = 52 and 58 μmol L⁻¹, respectively) were more efficient than the gentian violet (IC_{50try} = 536 μmol L⁻¹).

The Bz carrier, *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄S(IV)]ⁿ⁺, S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ or SO₃²⁻ (RuBz), is more hydrosoluble and more active (IC_{50try/1h} = 79 ± 3 μmol L⁻¹) than free Bz (IC_{50try/1h} = 4,800 ± 70 μmol L⁻¹). This complex exhibits low acute cytotoxicity *in vitro* (IC_{50splenocytes} > 1 mmol L⁻¹) and *in vivo* (400 μmol kg⁻¹ < LD₅₀ < 600 μmol kg⁻¹) and the formation of hydroxylamine is more favorable in RuBz than in Bz by 9.6 Kcal mol⁻¹. In murine acute models of Chagas' disease, RuBz also was more active than Bz even when only one dose was administrated. Moreover, RuBz at a thousand-fold smaller concentration than the considered optimal dose for Bz proved to be sufficient to protect all infected mice, eliminating the amastigotes nests in their hearts, livers, and skeletal muscles as observed in H&E micrographics.

Experiments conducted with infected Vero cells, the *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃, and RuBz are able to eliminate the intracellular forms of *T. cruzi* and to reduce the percentage of infected cells. In all, the observed data strongly suggest that the higher solubility in water and accessibility for reduction of NO₂/NO₂^{•-} couple in RuBz are responsible for higher antiproliferative and trypanocidal activities regarding to Bz or Vg. Additionally, the *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂1-miN](PF₆)₃, and *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆)₃ proved to be able to inhibit the catalytic activity of gGAPDH of 89-97% at a concentration of 260 μmol L⁻¹, whereas their precursors *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO₂)]ⁿ⁺ and *cis*-[Ru(H₂O)(bpy)₂L]ⁿ⁺ and the *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ and *cis*-[Ru(NO)(NH₃)₄(NO₂)]Cl₂ nitrosyls and RuBz complex do not exhibited significative inhibition.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças negligenciadas

Doenças infecciosas causadas por parasitos, vírus ou bactérias tais como malária, AIDS, tuberculose, tripanossomíases, leishmaniose, dengue e schistosomíase são responsáveis por desabilitar anualmente (DALY)* até dois terços da população de países em desenvolvimento ^[1]. Mais de 90% dos 14 milhões de pessoas que morrem por ano devido a estas doenças vivem nos países situados abaixo da Linha do Equador ^[1]. Com exceção à AIDS, apenas 10% dos fomentos globais empregados em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias, profilaxias, vacinas, diagnósticos ou novos fármacos são direcionados para estas doenças ^[1, 2]. Além disso, tais doenças não dispõem de tratamentos adequados e por isso são comumente chamadas de “doenças negligenciadas”, “doenças órfãs”, “doenças tropicais”, “doenças endêmicas” ou “doenças de pobres” ^[2].

Uma vez que as indústrias farmacêuticas constituem um setor altamente monopolizado e lucrativo, que necessita de grande investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D), os altos investimentos são geralmente direcionados para a produção de fármacos que ofereçam maior segurança de retorno financeiro ^[1]. De fato, algumas estatísticas sobre a produção de medicamentos pela indústria farmacêutica mundial mostram que as grandes empresas não apenas estão concentradas em países desenvolvidos, mas também vendem e produzem basicamente para esses países ^[3]. Os maiores produtores mundiais de medicamentos são respectivamente América do Norte (50%), Europa (24%) e Japão (13%) ^[3]. Toda América Latina é responsável por apenas 5%

* Disability-Adjusted Life Years (DALY) é a forma que a Organização Mundial de Saúde (OMS) encontrou para medir a desabilidade de anos saudáveis perdidos por um indivíduo que prematuramente contraiu uma doença. São levados em consideração nesta medida não somente o tempo perdido devido à morte prematura, mas também o tempo vivido em inaptidão devido à doença.

dos medicamentos produzidos e comercializados no mundo. Por outro lado, 80% da população mundial é responsável pelo consumo de cerca de somente 20% dos remédios produzidos em todo o mundo ^[3].

A Tripanossomíase americana ou doença de Chagas é um bom exemplo deste tipo de moléstia afetando cerca de 20 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, com outros 120 milhões de indivíduos (25% da população latino americana) expostos à contaminação, 700 mil DALYs e 300 mil novos casos por ano, chegando a matar mais que a AIDS na América Latina ^[4, 5].

1.2 Doença de Chagas

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* da ordem Kinetoplastida, família Trypanomatidae e gênero Trypanosoma ^[6, 7] é o agente infectante da doença de Chagas. Este parasito que *in vivo* replica-se exclusivamente de maneira intracelular apresenta um complexo ciclo biológico, o qual envolve um hospedeiro invertebrado, um hospedeiro vertebrado e três formas distintas do parasito: epimastigota (forma presente no vetor e em cultura axênica), tripomastigota (forma sanguínea circulante e infectante) e amastigota (forma de replicação intracelular) ^[7].

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda, que dura em média dois meses. Segue-se a esta, uma fase crônica que se prolonga por toda a vida do hospedeiro. Na maioria dos casos, a fase aguda da doença de Chagas é assintomática, ainda que possa eventualmente manifestar-se com febre e outros sinais tais como miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia ^[8]. A fase aguda sintomática é encontrada principalmente em crianças, podendo levar a morte devido à meningoencefalite e a insuficiência cardíaca ^[8]. De 60-70% dos pacientes chagásicos crônicos permanecem

assintomáticos por um longo período, o que caracteriza a forma indeterminada da doença. Destes, 8-10% desenvolvem a forma digestiva e 10-20% desenvolvem a forma cardíaca, que leva a um aumento global do coração em função da insuficiência cardíaca e alterações de fibras do tecido miocárdio ^[9].

Além disso, quando os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda declinam, uma miocardite focal de baixa intensidade se instala durante a fase indeterminada da doença ^[10]. Em cerca de 30-50% da população infectada, a miocardite inicialmente focal e discreta evolui incessantemente em intensidade e abrangência espacial, com destruição coalescente de fibras cardíacas e marcante fibrose tissular reparativa ^[11]. Evidências experimentais são compatíveis com duas hipóteses não inteiramente excludentes sobre a patogênese da cardiopatia chagásica crônica. Na primeira, a infecção pelo *T. cruzi* induz respostas imunológicas contra constituintes tissulares normais, e que seriam pelo menos parcialmente independentes da presença parasitária, sob a chamada teoria da autoimunidade na doença de Chagas ^[12]. Na segunda hipótese, o parasitismo tissular persistente é diretamente responsável pelas reações inflamatórias e acarreta no dano miocárdico irreversível ^[13, 14].

Dos pacientes infectados, cerca de 20% evoluirão com cardiomiopatia ^[15, 16, 17] e assim a doença de Chagas constitui a quarta mais importante forma de doença tropical, sendo a cardiopatia chagásica crônica a forma mais comum de doença miocárdica de etiologia não-isquêmica ^[18]. Portanto, a doença de Chagas permanece como relevante problema de saúde pública em muitos países latino-americanos, pois embora esforços de controle de transmissão vetorial tenham sido parcialmente bem sucedidos em vários desses países, as

medidas empregadas com essa iniciativa não afetam os portadores da infecção nem os pacientes chagásicos com manifestações clínicas da doença ^[17, 19, 20].

1.3 Terapêutica da doença de Chagas

A história da terapêutica específica da doença de Chagas pode ser dividida em três fases ^[21, 22, 23]. A primeira compreende da descoberta da doença em abril de 1909 até 1935 com o lançamento do “Manual de Doenças Tropicais e Infectuosas”. A segunda fase corresponde ao período entre 1936 e 1960, quando numerosas drogas foram experimentadas empiricamente com resultados controversos. A terceira fase inicia-se a partir de 1961, quando Brener e colaboradores demonstraram claramente a atividade da nitrofurazona na cura da infecção experimental de camundongos inoculados com o *T. cruzi* ^[21, 22, 23].

Até o fim da primeira fase apenas dois trabalhos haviam sido publicados sobre terapêutica experimental da doença de Chagas. O primeiro em 1912 sobre Atoxil (ácido arsênico, As_4O_{10}), a fucsina ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{Cl}$) e o tártaro emético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) ^[24], e o segundo publicado em 1914 sobre o emprego do cloreto de mercúrio (HgCl_2) ^[25]. Em ambos os casos os resultados não foram satisfatórios. Na segunda fase, Brener ^[21, 26, 27, 28] relata sobre 23 outros quimioterápicos e mais de 30 antibióticos utilizados de 1936 a 1962, dos quais apenas alguns tiveram efeito supressivo sobre a infecção pelo *T. cruzi*: a bisquinaldina, a fenantridinas, a 8-aminoquinoleínas, os arsenicais trivalentes e spirotripan, acromicina ou stilomcina e o flagil (acetamida-5nitroiazol imidazol) e, particularmente, os nitrofuramos ^[26, 28].

Entre os agentes quimioterápicos empregados de 1936 a 1962 como tentativa de tratamento da doença de Chagas, destacam-se os derivados de quinoleínas e vários outros

antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsenicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre e de zinco, o iodeto de sódio, as aminopterinas, o ácido para-aminosalicílico, a hidrazida do ácido nicotínico, as sulfonamidas, os anhistamínicos, o ACTH e a cortisona, os derivados da estilomicilina, a anfotericina B, alguns nitrofuranos com resultados negativos ou discutíveis e o violeta de genciana, que até hoje vem sendo utilizado como agente quimioprolático nos bancos de sangue (Figura 1) [21, 22, 29, 30].

A partir de 1961 quando Brener e Packchian [26, 29, 31, 32, 33, 34] demonstraram que a nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) em esquema terapêutico de prolongada duração (em média 53 dias) [26, 34] na dose diária de 100 mg kg^{-1} curava mais de 95% dos camundongos cronicamente infectados, abriu-se uma nova era na terapêutica da doença de Chagas. Logo depois Ferreira e colaboradores [35, 36, 37, 38] trataram também 10 casos agudos da doença com nitrofurazona, com bons resultados e poucos efeitos colaterais, mas em seguida verificaram que cinco deles voltaram a apresentar xenodiagnóstico positivo.

No final da década de 1960 e início de 1970 [39, 40] duas novas substâncias surgiram com melhores perspectivas para o tratamento da doença de Chagas tanto pelo potencial curativo, particularmente para a fase aguda, como pela tolerância: o nifurtimox (Nfx) um nitrofurano: 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido comercializado como nome de Lampit e o benznidazol (Bz) (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida, comercializado com o nome de Rochagan® no Brasil e Radanil® na Argentina ou ainda Ragonil® em outros países da América do Sul (Figura 2) [41, 42, 43]. Os resultados obtidos com ambos os compostos variaram de acordo com a fase da doença, com a duração do tratamento, com a idade dos pacientes, e com a área geográfica de sua origem. Os melhores resultados foram obtidos na fase aguda da doença, em crianças e pacientes com infecção recente, usando-se Nfx na dose de 8 a 10 mg kg^{-1} ($\approx 35 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$) ou Bz na dose

de 5 a 7,5 mg kg⁻¹ ($\approx 29 \mu\text{mol kg}^{-1}$) durante 60 a 90 dias [22]. Na fase crônica e em pacientes adultos os melhores resultados foram obtidos no sul do Brasil, na Argentina e no Chile, portanto no Cone Sul da América do Sul, provavelmente devido ao tipo de cepa do *T. cruzi* peculiar a esta região [22]. Em síntese pode-se dizer que ambos os compostos apresentam percentual de cura de 50 a 70% na fase aguda e de 10 a 20% na fase crônica [22].

Figura 2. Estrutura dos fármacos nifurtimox (Nfx), benznidazol (Bz) e do agente quimioprolático violeta de genciana (Vg).

Bz e Nfx atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólicos eletrofílicos [44, 45]. O grupo nitro de ambas as moléculas é reduzido a um amino grupo através da ação de enzimas do tipo nitroredutases que atuam especificamente sobre o grupo nitro de moléculas R-NO₂. Este processo seria iniciado pela reação catalisada pela enzima NADPH-citocromo P₄₅₀, a qual é específica para este tipo de molécula, formando um intermediário nitro radicalar (R-NO₂[•]) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH) [46]. No caso do Nfx, este nitro radical reduz o oxigênio molecular (O₂) formando o íon superóxido (O₂^{•-}) e regenerando o grupo nitro num processo conhecido como “redox cycling” [47]. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido

dismutase (SOD) gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2)^[48], que através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Este último tem sido atribuído como o responsável pelo efeito tripanocida por ligar-se a lipídeos, proteínas e DNA do *T. cruzi*^[49]. Docampo e colaboradores descreveram um sinal paramagnético característico correspondente à formação do nitro radical $\text{NO}_2^{\bullet-}$ quando Nfx é adicionado *in vitro* em culturas de formas epimastigotas^[50, 51]. Por outro lado, o Bz reconhecidamente não atua através de “redox cycling” como no caso do Nfx^[44, 50] e, portanto, não deve depender de compostos reativos intermediários do oxigênio (RIO)^[50]. O nitro radical formado no Bz estaria envolvido no efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* tais como o DNA do parasito ou o citocromo P_{450} ^[44, 45]. Também tem sido reportado que o Bz aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$)^[52] e inibe o crescimento do *T. cruzi* bloqueando a enzima NADH-fumarato redutase^[53].

Uma vez que o mecanismo de ação de ambas as drogas ocorre por vias não específicas do parasito, estes metabólicos eletrofílicos formados podem também atuar sobre biomoléculas do hospedeiro. De fato, ambas as drogas além de serem mal toleradas pelo hospedeiro, possuem baixa eficácia e apresentam sérios efeitos colaterais^[54]. Os mais freqüentes com o Nfx são a anorexia, a perda de peso, a excitabilidade psíquica ou sonolência e manifestações digestivas como náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais^[54]. Os efeitos colaterais com o Bz podem ser classificados em três tipos: (i) manifestações de hipersensibilidade como dermatite com erupção cutânea (usualmente aparecendo entre o 7º e 10º dia de tratamento), edema peri-orbital ou generalizado, febre, linfadenopatia e dores musculares e articulares; (ii) depressão da medula óssea, entre as

quais neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopêmica; (iii) polineuropatia periférica representado por parestesias e polineurite ^[54].

1.4 Compostos metálicos como agente quimioterápico contra *Trypanosoma*

Os primeiro relatos na literatura científica tratando do uso de metais de transição na quimioterapia da doença de Chagas são os trabalhos mencionados por Brener ^[21, 26, 27, 28] quanto ao uso de sais de ouro, cobre e zinco durante os ensaios empíricos empregados no período correspondente à fase II. Contudo, a partir dos anos de 1980, esforços foram direcionados para o uso de complexos antitumorais como tripanocidas ^[55]. Este novo direcionamento ocorreu devido às semelhanças bioquímicas em termos de metabolismo e recursos de proteção de proteínas como catalase e peroxidases entre os tripanosomas e algumas células tumorais ^[55]. Os primeiros trabalhos foram publicados por Farrell e Williamson ^[56] mostrando uma boa correlação entre as propriedades antitumorais e tripanostáticas (*Trypanosoma rhodesiensis*) de compostos de platina tais como cisplatina e carboplatina ^[56]. Dentre os compostos de platina (II) mais promissores podemos destacar derivados terpiridínicos (2,2':6'2''-terpiridina) e pentamidínicos os quais foram efetivos *in vitro* contra as formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. Os mesmos autores ^[55, 56] demonstraram naquele período a atividade tripanocida de uma série de amino e dimetilsulfóxido complexos de rutênio, entre eles os complexos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, $[\text{Ru}_3\text{H}_{42}\text{N}_{14}\text{O}_2\text{Cl}_6]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (vermelho de rutênio), $[\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2]$, $[\text{Ru}(\text{DMSO})_2\text{en}]$ e $[\text{Ru}(\text{dac})_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}_2$. Este é, portanto, o primeiro relato na literatura do uso de compostos de rutênio como agente tripanocida. Embora menos tóxicos que os compostos de platina, estes demonstraram ser também menos ativos contra *T. cruzi* que aqueles compostos ^[56]. A partir de então, diversos compostos de metais de transição tais

como platina (II e IV), rutênio (II e III), ródio (I e II) e irídio (I e II) foram usados empiricamente contra o *T. cruzi* ^[57]. Em 1996 foi relatada a atividade anti-*T. cruzi* de 10 compostos de ósmio (III), que atuam em sinergismo com ligantes nitroimidazólicos inclusive o Bz ^[57]. Estes complexos induziram alta porcentagem de inibição do crescimento das formas epimastigotas, mas foram tóxicos contra macrófagos e células Vero ^[57]. Segundo os autores, estes compostos atuam através da inibição da síntese de proteínas parasitárias, incluindo o DNA e RNA ou inibindo a atividade das enzimas succinato desidrogenase, malato desidrogenase e piruvato quinase ^[57].

A partir da década de 1990, uma outra estratégia de desenvolvimento de complexos anti-*T. cruzi* foi empregada por grupos de pesquisadores uruguaios e venezuelanos ^[55, 58]. Estes grupos passaram a usar de sinergismo entre metais de transição (o rutênio e outros metais) e inibidores da biosíntese de esteróis do *T. cruzi*. Relatou-se que inibidores da enzima citocromo P₄₅₀ 14 α -dimetilase tais como o cetoconazol (Ktz) e o clotrimazol (Ctz) são mais ativos quando ligado a metais de transição. Deste então, uma série de trabalhos tem sido publicada por Sánchez-Delgado e colaboradores ^[55, 58] demonstrando que a atividade destes inibidores é aumentada em até 10 vezes quando coordenados ao rutênio (II/III) ^[58]. Os complexos de rutênio de fórmula geral [RuCl_nL], [Ru(H₂O)Cl_nL] e Ru(DMSO)_nL], onde L = Ctz ou Ktz também foram mais ativos e menos tóxicos que os respectivos complexos de rênio, ouro, platina e cobre ^[55, 59]. Esta menor toxicidade e maior atividade foram atribuídas à similaridade no metabolismo entre os compostos de rutênio e ferro, a qual tem sido reivindicada como responsável pela baixa toxicidade destes compostos quando usados como agentes anticancerosos ^[60, 61].

1.5 Funções patofisiológicas do óxido nítrico

A descoberta por Furchgott, Zawadzki, Moncada, Ignarro e Murad que o óxido nítrico (NO), produzido enzimaticamente no endotélio, era o responsável direto pelo controle da pressão arterial desencadeou o renascimento da química do NO e suas implicações bioquímicas e biológicas ^[62, 63]. De fato, a regulação e a síntese de NO por células mamárias tem sido o foco de muitos artigos de revisão e somente no PubMed mais 80 mil referências envolvendo NO estão listadas. Atualmente o NO está relacionado com variadas e importantes funções fisiológicas e patológicas, tais como controle da pressão sanguínea e ereção peniana ^[64], neurotransmissão ^[65, 66, 67], sinalizador do sistema imunológico, ^[68, 69] bem como nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões ^[70]. Além disso, tem sido reportado que a produção enzimática de NO é, provavelmente, a principal forma de defesa do sistema imunológico do hospedeiro para controlar as infecções causadas por parasitos tais como *Trypanosoma* ^[71], *Toxoplasma* ^[72], *Plasmodium* ^[73] e *Leishmania* ^[74]. O aumento da concentração de NO também é observado durante as infecções causadas por vírus e bactérias como é o caso da Herpes ^[75] e da Tuberculose ^[76].

O vasto espectro de ações fisiológicas, farmacológicas e patológicas do NO *in vivo* é resultado de suas propriedades físico-químicas peculiares. O NO é uma molécula paramagnética e sob condições normais de pressão e temperatura é um gás incolor e termodinamicamente instável quando comparado aos gases N₂ e O₂. Sua elevada constante difusional ($3,5 \pm 0,3 \times 10^3 \mu\text{m s}^{-1}$) ^[77, 78, 79] somada à sua liposolubilidade e hidrosolubilidade ($2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) ^[80] confere a esta molécula habilidade de difundir-se livremente no meio fisiológico, cruzar membranas sem canais ou receptores e, também, a facilidade em formar complexos com centros metálicos [Fe (II e III)] presentes em várias proteínas ^[70, 81]. Embora tenha sido reportado que o NO tem um tempo de meia vida em meio biológico menor que 1

segundo ^[70], esta molécula pode colidir aproximadamente 10 bilhões de vezes neste intervalo de tempo e mover-se rapidamente entre células num raio de até 25 μm , ocupando um volume de até 65 mm^3 . ^[70] É importante ressaltar que um glóbulo vermelho tem aproximadamente 7 μm de diâmetro e que nenhuma outra molécula biológica pode percorrer a mesma distância que o NO dentro de seus estimados tempos de meia vida ^[70]. Por exemplo, a constante de difusão do radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) é 10 mil vezes menor que as constantes de outras moléculas de interesse biológico tais como o íon superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o íon peroxinitrito (ONOO^-) ^[70]. Por sua vez, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e ONOO^- possuem velocidades difusionais 10 vezes menores que a do NO ^[70].

1.6 Óxido nítrico e *T. cruzi*

Apesar da relevância patofisiológica da ativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos por citocinas e quimiocinas, esta ainda é relativamente pouco conhecida, principalmente quanto aos eventos que ocorrem no nível bioquímico ^[70]. Até o fim da década de 1980, os enfoques estavam praticamente restritos a apenas quatro sistemas bioquímicos antimicrobianos ^[82]: o primeiro são os reativos intermediários do oxigênio (RIO) produzidos em consequência do aumento de consumo de oxigênio (comumente chamada de explosão respiratória), consumo de íon $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , que podem ser convertidos para formar o radical $\text{OH}^\bullet$ e O_2 ^[83]; o segundo sistema é acidez dos fagossomas ^[83, 84]; o terceiro é a diminuição dos receptores de transferrina e do ferro livre induzida pelo $\text{IFN-}\gamma$ e o quarto são as enzimas lisossomais ^[84]. Todavia, estes sistemas não eram capazes de explicar, de forma completa e satisfatória, muitas das atividades antimicrobianas e antitumorais, especialmente no que diz respeito a macrófagos ativados. No entanto, recentemente, o NO foi identificado como um

novo sistema antimicrobiano de macrófagos ativados ^[85, 86]. Este sistema é o principal mediador da atividade tripanocida de macrófagos ^[84, 87].

Surpreendentemente, o NO, uma molécula que há uma década e meia era apenas mais uma, numa longa lista de poluentes ambientais, foi capaz de unir a neurociência, a fisiologia e a imunologia de forma a alterar os conhecimentos na comunidade científica a respeito da comunicação celular e de como estas células se defendem ^[70, 82, 84]. Nos últimos anos, tem-se demonstrado interesse crescente pelo estudo da produção de intermediários reativos do nitrogênio (IRN). Dentre estes, tem-se sugerido que muitas das ações dos macrófagos contra certos fungos ^[88, 89, 90] bactérias ^[76, 91], protozoários extracelulares ^[92] e intracelulares ^[72, 73, 74], células transformadas por vírus ^[93] e células tumorais ^[94] são mediadas pelos IRN.

Os nitritos e nitratos não podem por si só reproduzir a atividade citotóxica de macrófagos ^[95, 96], exceto em condições de hipoxia, ambiente no qual o NO é gerado a partir de nitritos ^[97]. Entretanto, o NO é capaz de mimetizar o padrão de citotoxicidade mediado por macrófagos ativados ^[98, 99], e compostos que inibem liberação de NO endógena também bloqueiam o efeito citostático. Alguns agentes farmacológicos podem promover ou antagonizar a produção de NO ^[98]. Os agentes que mimetizam a liberação de NO pelas células, chamados de doadores de NO, incluem os nitratos, nitroglicerina, nitroprussiato de sódio, sidnoniminas, nitrosotióis e complexos nitrosilo ^[100].

Objetivando avaliar o papel do NO *in vivo* durante a infecção por *T. cruzi*, Silva e colaboradores ^[71] infectaram camundongos e os submeteram a tratamento com os inibidores da iNOS: NG-nitro-L-arginina (NOARG) e NG-nitro-L-arginia metil ester (L-NMMA). Verificou-se que os animais tratados tornaram-se mais suscetíveis à infecção, apresentando maiores níveis de parasitemia e mortalidade ^[71]. Em seguida, foi mostrado que a atividade tripanocida de macrófagos ativados é dependente dos intermediários reativos do nitrogênio

[101, 102]. Por último, o mesmo Grupo de pesquisadores demonstrou a atividade tripanocida de um doador de NO, o SNAP (S-nitroso-acetil-penicilamina) em um sistema livre de macrófagos [71]. A adição desta molécula aos tripomastigotas resultou em morte dos parasitos, de maneira dose e tempo dependentes. Penicilamina, um análogo do SNAP que não libera NO, em todas as doses testadas não alterou a viabilidade dos parasitos [71]. Com base nestes resultados, foi sugerido que formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* são lisadas no interior de macrófagos por um mecanismo dependente de NO. Atualmente, a modulação farmacológica da resposta imune hospedeira através do controle dos níveis de NO tem sido recentemente reivindicada como alvo terapêutico para tratar doença de Chagas [45].

1.7 Possíveis alvos farmacológicos do NO sobre o *T. cruzi*

Nos últimos anos, a possibilidade de se desenvolver vacinas e fármacos mais eficazes e seguros contra a doença de Chagas vem aumentando consideravelmente. O conhecimento dos mecanismos moleculares do parasito é fundamental para a descoberta de protótipos capazes de agir seletivamente sobre um alvo específico [103]. O seqüenciamento do genoma do parasito tem conduzido a uma melhor compreensão da relação estrutura-função de proteínas e a exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, diversidade antigênica, interação parasito-hospedeiro e patologia da doença [2, 22, 104].

A identificação de processos bioquímicos únicos e preferenciais do parasito e a caracterização de antígenos de superfície têm contribuído enormemente no planejamento racional de novos fármacos [2]. Diversos alvos já foram identificados e têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos tripanocidas. Entre eles, as enzimas relacionadas a seguir merecem destaque especial: *trans*-sialidase [105], tripanotiona redutase [106], C14Δ-

esterol metiltransferase ^[107], gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) ^[108], cruzipaína ^[109], diidrofolato redutase ^[110], DNA topoisomerase ^[22], farnesilpirofosfato sintase ^[22], prolil endopeptidase ^[111] e hipoxantina-fosforribosiltransferase ^[107], além dos receptores do fator de agregação plaquetária (PAF) ^[112].

Nos últimos anos foi sugerido que, além de participar da modulação do sistema imune hospedeiro ^[45], um outro possível mecanismo para explicar a ação tripanocida do NO seria através da inibição da atividade catalítica da enzima cruzipaína ^[113, 114]. A inibição da cruzipaína leva a morte do parasito uma vez que esta enzima exerce papel essencial em todo o ciclo de vida do *T. cruzi* ^[114]. Dentre outras, cruzipaína está envolvida no suprimento de amino ácidos para o anabolismo, na inativação de células durante a diferenciação e transformação do *T. cruzi*, no processo de nutrição das formas epimastigotas, no processo de penetração das formas tripomastigotas e até no mecanismo de escape da formas amastigotas ^[113, 114]. A região catalítica desta enzima é composta de um polipeptídio de 215 amino ácidos dividido em dois domínios. O primeiro é formado por uma α -hélice enquanto que o segundo consiste de uma β -folha antiparalela ^[115]. O sítio ativo da enzima está localizado entre os dois domínios e é composto de uma cisteína (Cys²⁵) e uma L-histidina (His¹⁵⁹) (Figura 2) ^[115]. Tem sido reportado que doadores de NO tais como GSNO, NOR-3, SIN-1, SNAP e SNP são capazes de inibir a cruzipaína através de S-nitrosilação do resíduo R-SH da cisteína (Cys²⁵) no sítio ativo ^[113, 114].

Formas tripomastigotas não possuem mitocôndrias e também são desprovidas do ciclo do ácido tricarboxílico ^[103]. Uma vez que estas formas de *T. cruzi* são altamente dependentes da via glicolítica como fonte de energia através da produção de ATP ^[103, 116], esta via torna-se, portanto, um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para a doença de Chagas ^[116]. Nesta via metabólica existem pelo menos

três enzimas as quais estão presentes em tripanosomatídeos, mas não em células mamárias, sendo a gGAPDH uma delas (Figura 3). Esta enzima catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico ^[117] e exibe sítios (R-SH) em potencial para reações com o NO. De fato, GAPDH de coelho também tem sido indicada como um possível alvo da ação farmacológica do NO através da nitrosilação do resíduo R-SH da cisteína (Cys^{166}) no sítio ativo ^[118]. Além disso, tem sido reportado que o peroxinitrito (ONOO^-), o qual é um produto da reação entre NO e $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou nitroxil (HNO/NO^-) e O_2 pode também mediar inativação da GAPDH através de modificações covalentes sobre o cofator NAD(H) ^[119, 120].

Figura 2. Representação estrutural da cruzipaina destacando os principais resíduos do sítio ativo ^[115]. PDB 1ME3 ^[121].

Figura 3. Representação estrutural da gGAPDH destacando o sítio ativo contendo os resíduos Cys¹⁶⁶, His¹⁹⁴, Thr¹⁹⁹ e Arg²⁴⁹ [108]. PDB 1K3T [122].

1.8 Complexos de rutênio contendo o ligante nitrosilo

A modelagem de inibidores da enzima NO-sintetase induzível (iNOS ou NOS2) é, portanto, hoje em dia uma estratégia utilizada para controlar as concentrações de NO *in vivo* [123]. Todavia, é importante frisar que estes inibidores necessariamente precisam ser específicos para aquela isoforma da enzima, uma vez que a falta de especificidade destes inibidores poderia causar efeitos deletérios decorrentes da inibição das enzimas NO-sintetase neural (nNOS ou NOS1) e/ou endotelial (eNOS ou NOS3) [100].

Pode-se inferir, portanto, que a utilização de doadores exógenos de NO seria uma interessante estratégia alternativa para o controle da disfunção da produção de NO no organismo [100].

Complexos metálicos ^[124, 125] são eficientes transportadores de NO. Da interação do ligante NO com íons Fe(III) presentes em proteínas tais como ferrohemoproteínas, hemoglobina e mioglobina ou ferropoteínas como citocromo c, citocromo oxidase, guanilato ciclase, oxihemoglobina (HbFe(II)-O₂), decorrem muitos processos fisiológicos que estão diretamente associados a essa molécula ^[126, 127, 128]. Entre essas, uma das reações mais importantes é a reação com a enzima guanilato ciclase. Uma vez coordenado a esta ferropoteína o NO desloca a molécula de histidina *trans* posicionada, formando um complexo pentacoordenado ^[100, 123]. Esta alteração pode induzir a uma mudança conformacional na estrutura da enzima, que favorece em cerca de 100 vezes a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP) ^[125]. A produção de cGMP intracelular tem implicações em vários tecidos, particularmente na musculatura lisa vascular, onde promove a vasodilatação, fator fundamental no controle da pressão arterial ^[123].

Além dos centros de Fe(III) d⁵ de baixo spin, o ligante NO reage com uma variedade de metais de transição, como níquel, molibdênio, crômio, irídio, ósmio e rutênio, gerando complexos nitrosilo ^[129]. Dentre esses, íons do metal rutênio formam diversos compostos contendo o nitrosilo, e segundo as citações e volume de publicações, em quantia superior a de qualquer outro metal de transição. Assim, esta classe de complexos ocupa um lugar de destaque na química do NO ^[130, 131, 132]. Além disso, compostos de Ru(II) e Ru(III) têm propriedades similares quanto à cinética dos processos de troca de ligantes quando comparados com outros compostos de metais de transição ^[133]. A substituição de ligantes é importante na determinação da atividade biológica, pois muitas vezes é necessário interações com macromoléculas, proteínas ou pequenos grupos S-doadores para induzir as propriedades terapêuticas desejadas para estes complexos, o que

não acontece com a maioria dos outros compostos metálicos, inertes com respeito à reação de substituição ^[133]. Também tem sido reportado que o rutênio é um dos poucos metais em que todos os seus estados de oxidação (II, III e IV) são acessíveis às condições fisiológicas ^[133]. Nestes estados de oxidação o rutênio é predominantemente hexacoordenado com geometria essencialmente octaédrica ou derivada sendo o Ru(III) o mais inerte que os outros dois estados de oxidação ^[133]. Além disso, os potenciais de oxirredução podem ser modificados pela variação dos ligantes na esfera de coordenação de forma a se tornarem acessíveis aos redutores presente em meio biológico ^[123]. Por exemplo: em meio biológico glutathione, ascorbato ou proteínas mitocondriais e microssomais são capazes para reduzir o Ru(III) e o Ru(IV), enquanto que oxigênio molecular e as enzimas citocromo oxidase podem oxidar o Ru(II) ^[133].

A ligação do NO ao centro metálico envolve o orbital π^* do NO e os orbitais $4d\pi$ do metal, resultando em uma doação σ do tipo $M \leftarrow NO$, seguida de retrodoação π , $M \rightarrow NO$, o que fortalece a ligação M-NO, fazendo com que o fragmento [M-NO] praticamente defina as propriedades apresentadas pelo complexo ^[131, 132].

De acordo com o formalismo de Enemark e Feltham ^[134], os complexos nitrosilo podem ser descritos como $\{M(NO)\}^n$, onde n corresponde ao número de elétrons d do metal mais os elétrons π do NO. Em geral o LUMO de complexos nitrosilo de metais d^6 , como o Ru (II), possui acentuado caráter π^* do grupo NO ^[130,135,136]. Ambas as formas, $[M(NO)]^6$ e $[M(NO)]^7$, são interconvertíveis pela redução ou oxidação do complexo por um elétron. A redução ocorre predominantemente sobre o grupo NO, motivo pelo qual este ligante pode assumir diferentes estados de oxidação ^[135, 137, 138]

Devido à variedade de estados de oxidação do nitrogênio em compostos de NO, nitrosonium (NO^+), óxido nítrico (NO^0) e nitroxil (NO^-), três tipos de complexos metálicos

são possíveis: linear, onde o ligante NO está coordenado como nitrosonium; angular, com ângulo de ligação entre 120-140°, onde o ligante NO está coordenado como nitroxil e por fim, ponte^[137, 139].

Uma classe interessante de compostos nitrosilo são as tetraaminas de rutênio (II) e (III). Estes compostos são modelos interessantes para estudos aplicados devido às propriedades conferidas pelas configurações eletrônicas (d^5 e d^6 de baixo spin) do íon metálico e devido à energia e a extensão radial dos orbitais 4d^[140, 141, 142]. Além disso, a conversão Ru(II)/Ru(III) é geralmente rápida e não é acompanhada de alterações da estrutura geométrica ou da composição da esfera de coordenação^[140, 141, 142, 143].

Ao longo dos últimos 15 anos, o Grupo de Química Inorgânica e Analítica do Instituto de Química de São Carlos vem se dedicando à preparação e caracterização de nitrosilotetraaminas de Ru (II), do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺, e ao estudo de suas propriedades, reatividade e aplicações biológicas^[144, 145, 146, 147, 148, 149].

Os íons complexos *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄L]²⁺ reagem com NO gasoso ou com íons nitrito em meio ácido produzindo complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺^[148]. A espécie com estado de oxidação mais elevado pode ser formalmente descrita como sendo Ru^{II}NO⁺ ou {RuNO}⁶^[148]. Cálculos da composição de orbitais moleculares feitos por Teoria do Funcional da Densidade (DFT) para os compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₃L]³⁺ onde L = piridina (py) e pirazina (pz), indicam que o LUMO correspondente ao fragmento Ru^{II}NO⁺ possui aproximadamente 70% de caráter π^* do NO^[150]. Portanto sua redução monoelétrica produz o composto análogo reduzido Ru^{II}NO⁰^[147], que por sua vez sofre reação de substituição em meio aquoso, gerando o aquo complexo e NO⁰ livre (equações 1 e 2).

Estudos empregando as tetraaminas de rutênio, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ (L = N-Heterocíclicos, H₂O, SO₃²⁻, P(OEt)₃), têm demonstrado que o ligante L *trans*-posicionado ao ligante NO, exerce papel importante na sua reatividade ^[144, 145, 148], atuando sobretudo no potencial redox do fragmento Ru^{II}NO⁺ (E_(Ru^{II}NO⁺/Ru^{II}NO⁰)) e na constante de velocidade específica para a liberação de NO (k_{NO}) após sua redução monoeletrônica ^[147].

Para os compostos supracitados, o valor de k_{NO} varia de 0,043 s⁻¹ (L = isn) a 0,98 s⁻¹ (L = P(OEt)₃) a 25⁰C, aumentando conforme a seqüência: isn ~ pic ~ nic ~ H₂O ~ py ~ pz < L-His ~ imN < P(OEt)₃ ^[147] enquanto que os valores de E_(Ru^{II}NO⁺/Ru^{II}NO⁰) cresce na seqüência SO₃²⁻ < imN ~ L-his < 4-pic < py, isn < nic < pz < P(OEt)₃ (Tabela 1).

A liberação de NO por estes compostos também pode ser obtida por irradiação da banda de transferência de carga metal-ligante (MLCT), atribuída principalmente ao fragmento Ru^{II} → NO⁺ (equações 3 e 4), ou pela irradiação da banda MLCT do fragmento Ru^{II} → NO₂ em nitro complexos ^[151].

Como a maioria dos complexos contendo o ligante nitrosilo em sua esfera de coordenação, os compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ (L = N-Heterocíclicos, H₂O, SO₃²⁻, P(OEt)₃ reagem com íons hidróxido em meio aquoso produzindo os seus análogos *trans*-[Ru^{II}(NH₃)₄(L)(NO₂)]⁺ [144, 145, 149]. Esta reação ocorre em três etapas distintas as quais podem ser resumidas conforme ilustradas nas equações 5, 6 e 7.

Os valores de k_{OH^-} , obtidos segundo a equação $k_{\text{OH}^-} = k_{\text{ip}}k_1$, para os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ variaram de $7,6 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (L = L-Hist) até $8,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (L = pz). Esta reação é reversível e, assim, os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ e seus correspondentes nitro compostos coexistem em equilíbrio em meio aquoso, sendo a razão entre suas concentrações ($[\text{Ru}^\text{II}\text{NO}^+]/[\text{Ru}^\text{II}\text{NO}_2^-]$) dependente do pH do meio. Para os complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺, o valor da constante de equilíbrio (K_{eq}) para esta reação varia de $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-2}$ (L = py) a $6,0 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$ (L = pz) [144, 145 149].

Neste ponto é importante comentar que estes compostos, devido às propriedades acima descritas, podem ser capazes de catalisar a conversão de íons nitrito a óxido nítrico *in vivo*. Na presença de um redutor apropriado, a espécie $[\text{Ru}^\text{II}\text{NO}^+]^{3+}$ é reduzida gerando a espécie $[\text{Ru}^\text{II}\text{NO}^0]^{2+}$. O ligante NO é então aquado e a espécie $[\text{Ru}^\text{II}\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ é formada. Uma vez que a concentração de NO₂⁻ presente no plasma pode atingir a concentração de até $0,5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [152] e a reação entre o íons NO₂⁻ e o rutênio é relativamente rápida [153, 154, 155],

então a espécie $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}_2^-]^+$ pode ser formada *in vivo*. Quando a concentração hidrogeniônica for maior que 10 nmol L^{-1} , como é o caso da corrente sanguínea, a conversão de nitrito a óxido nítrico pode ocorrer seguindo o ciclo catalítico representado na Figura 4. O potencial catalítico desta série de complexos de rutênio, capazes de ativar NO_2^- (N^{III}) para redução a NO (N^{II}), poderia ser uma fonte adicional de NO em meio biológico e, portanto, seria um incentivo adicional para investigarmos suas propriedades tripanocidas.

Figura 4- Ciclo catalítico de conversão de nitrito a óxido nítrico promovido pelos complexos de rutênio ^[153, 154].

Uma segunda geração de compostos liberadores de NO do tipo *cis* e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{L}]^{3+}$ tem sido desenvolvida por outros Laboratórios. Estes compostos contêm no plano equatorial os ligantes 2,2'-bipirida (bpy) em substituição às amônias nos complexos da série *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{L})]^{3+}$ ^[156] e permitem a modelagem em uma faixa mais ampla dos potenciais de redução do fragmento nitrosilo. Isto se dá devido ao fato de os ligantes bipyridínicos possuírem acentuado caráter π receptores o que não ocorre com as amônias as

quais são tipicamente doadoras σ ^[148]. Uma vez que estes ligantes bipyridínicos são capazes de fazer retroação com o centro de rutênio (II), é então estabelecida uma competição π ao longo da esfera de coordenação, dificultando a retrodoação $\text{Ru}^{\text{II}} \rightarrow \text{NO}^+$ e conseqüentemente deixando os potenciais de redução $E_{(\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0)}$ mais positivos quando comparados com a série *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+}$ ^[156].

1.9 Descrição do problema de estudo

Neste contexto, o emprego de compostos tetramínicos de rutênio transportadores de NO, que possam liberar essa molécula de maneira controlada, constitui uma interessante ferramenta para a investigação de possíveis tratamentos terapêuticos e quimioprolifáticos de doenças infecciosas tais como a doença Chagas. Uma vez que estes compostos podem atuar como doadores de NO (equações 1 e 2) e o ligante L atua como ferramenta de modulação do $E_{(\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0)}$ e de k_{NO} , estes compostos constituem, portanto, bons modelos para a investigação da atividade biológica em ambientes onde a concentração de NO precisa ser controlada como é o caso das infecções causadas por *T. cruzi* ^[71, 147, 148]. Além disso, nos compostos supracitados a redução do ligante NO^+ coordenado ocorre a valores de potencial acessíveis aos redutores presente em meio biológico tais como NADPH ^[147] e grupos sulfidril (R-SH) (Tabela 1) ^[149]. Motivação extra é adicionada pelo fato destes nitrosilos de rutênio serem resistentes à oxidação em solução aquosa na presença de oxigênio dissolvido, estáveis quanto a reações de substituição e hidrossolúveis. Além disso, estes compostos apresentam baixa citotoxicidade *in vitro* e podem ser classificados como moderadamente tóxicos ^[157] *in vivo* (Tabela 1). Adicionalmente, tais compostos podem ser obtidos por rotas de síntese bem estabelecidas.

Tabela 1. Citotoxicidade, dose letal e propriedades químicas dos doadores de NO *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺, [Ru(NO)(Hedta)] e SNP

Compostos	IC ₅₀ V79		LD ₅₀	Propriedades	
	(μmol L ⁻¹)		(μmol kg ⁻¹)	Químicas	
	NAC ^[158]	MTT ^[158]	Camundongos	E _(Ru^{II}NO⁺/Ru^{II}NO⁰) vs. ENH (V) ^[148]	k _{NO} (s ⁻¹) ^[148]
SNP	51	57	15 ^[159]	-0,195	ND
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pz] ³⁺	120	ND	ND	0,112	0,070
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	414	ND	125 < LD ₅₀ < 250*	-0,108	0,140
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	646	845	125 < LD ₅₀ < 250*	-0,118	0,160
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic] ³⁺	654	ND	125 < LD ₅₀ < 250*	0,072	0,025
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	743	ND	125 < LD ₅₀ < 250*	0,052	0,043
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	930	ND	125 < LD ₅₀ < 250*	0,012	0,060
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃] ⁺	>1000	>1000	ND	-0,138	ND
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	2260	2800	257,5 ^[159]	0,132	0,980
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ 4-pic] ³⁺	ND	ND	125 < LD ₅₀ < 250	-0,008	0,070
[Ru(NO)(Hedta)]	ND	ND	> 90 ^[160]	-0,068	0,002
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ ina] ³⁺	ND	ND	ND	ND	ND

SNP - nitroprussiato de sódio; ND - não determinado; IC₅₀V79 - concentração que lisa 50% das células V-79; E_(Ru^{II}NO⁺/Ru^{II}NO⁰) - potencial de redução do par Ru^{II}NO⁺/Ru^{II}NO⁰, t = 25 °C; ENH - eletrodo normal de hidrogênio; k_{NO} - constante de velocidade específica para a liberação de óxido nítrico, t = 25 °C. *Este trabalho. NAC - IC₅₀ determinado através da contagem do conteúdo de ácidos nucleicos; MTT, IC₅₀ determinado pelo método do MTT.

As possibilidades de exploração deste modelo para o desenvolvimento de compostos com atividade tripanocida não estão restritos somente ao emprego da base $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+]$ como transportadora de óxido nítrico. Devido à elevada e seletiva afinidade do centro de Ru(II) por nitrogênios imidazólicos e piridínicos ^[144, 155] compostos do tipo $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Bz}]$, onde Bz = benznidazol, podem ser preparados. Estes compostos poderiam ter em posição *trans* ao ligante Bz, os ligantes SO_2 ou NO^+ ^[144, 161]. Considerando o ligante nitrosilo como ligante *trans*, ocorreria a combinação dos efeitos do NO e do fármaco Bz, os quais seriam liberados pelo centro metálico após a redução e dissociação do NO. Caso o ligante em posição *trans* seja o SO_2 , o complexo atuaria como transportador do fármaco ^[161]. Em ambos os casos, teríamos um aumento da hidrosolubilidade do Bz uma vez que o centro metálico altera significativamente a distribuição eletrônica do ligante coordenado ^[144, 161, 162].

II. JUSTIFICATIVAS

Embora existam relatos de que o *T. cruzi* está no continente americano há mais de nove milênios ^[163] e à quase um século a doença de Chagas tenha sido descoberta ^[22], relativamente pouca atenção tem sido dada para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para esta doença apesar de esta estar entre os seis maiores problemas de saúde pública dos países tropicais e subtropicais ^[4, 164]. De 1556 novas drogas desenvolvidas entre 1975 e 2004 e registradas no Food and Drug Administration - USA (FDA/CDER), apenas 18 (~1%) estavam associadas com doenças negligenciadas das quais nenhuma delas relacionadas à doença de Chagas ^[164]. De fato este não é um problema recente. Em uma análise sobre as tentativas terapêuticas da doença de Chagas nos primeiros 50 anos desde a sua descoberta (1909-1959), Cançado ^[21] apresenta os seguintes números que confirmam este problema: de 96 trabalhos apresentados ao Congresso Internacional sobre a Doença de Chagas, realizado no Rio de Janeiro em julho de 1959, somente quatro se referem à terapêutica da doença e destes apenas um à terapêutica clínica. Ainda, de 1.369 trabalhos sobre doença de Chagas identificados pelo Instituto Brasileiro de Bibliografia e Documentação (IBBD), no mesmo período (1909-1959), havia somente 69 sobre tratamento, sendo 43 de terapêutica experimental e 26 de terapêutica clínica. Finalmente, esta base bibliográfica menciona que nenhum dos 64 trabalhos de Carlos Chagas citados pelo IBBB se dedica ao tratamento da doença ^[21].

Os fármacos disponíveis para os tratamentos da doença de Chagas, conforme anteriormente mencionado, além de serem muito pouco específicos, são altamente tóxicos, pouco toleráveis e bastante limitados ^[103, 165]. Existe também grande dificuldade no desenvolvimento de vacinas para o *T. cruzi*, uma vez que ele possui mecanismos de evasão

do sistema imune hospedeiro ainda não completamente conhecidos, além da doença de Chagas possuir um caráter autoimune ^[12, 103].

Adicionalmente a produção de Nfx a partir da década de 1980, vem sendo descontinuada, inicialmente no Brasil e depois na Argentina, Chile e Uruguai ^[22] e a produção do Bz no Brasil foi repassada pela Roche para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). O crescente desinteresse da indústria farmacêutica na produção de medicamentos para a doença de Chagas, considerados como “medicamentos sociais”, está ligado à baixa demanda para população de baixa renda e, portanto, com pequena margem de lucro ^[2]. Agravantemente, esse desinteresse também está ligado à baixa eficácia destas drogas para tratar pacientes chagásicos ^[22, 164].

Assim, a busca por novos fármacos, quimioprofiláticos e terapias para a doença de Chagas são, ainda hoje, uma urgente necessidade e justifica o empenho empregado neste trabalho.

III. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é, portanto, investigar a ação de complexos de rutênio do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]³⁺ sobre o parasito *T. cruzi* usando a cepa Y do parasito. Ainda, pretende-se coordenar o Bz ao fragmento [Ru(NH₃)₄SO₂]ⁿ⁺ objetivando obter um derivado inorgânico desta molécula que seja mais solúvel em água, menos tóxico para o hospedeiro e mais ativo contra o *T. cruzi*.

Para tanto se pretende: estudar a ação *in vitro* de complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]³⁺ sobre as formas intracelulares e extracelulares do parasito; conhecer a ação quimioterápica dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]³⁺ sobre o *T. cruzi* usando modelos agudos de infecção *in vivo*; estudar da ação quimioprolática dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ (L = imN, isn, 4-pic, nic, P(OEt)₃, pz, py e L-his) para o tratamento de sangue infectado com *T. cruzi*; verificar a capacidade das tetraaminas de rutênio agirem como transportadoras de benznidazol. Para tanto, sintetizaremos, caracterizaremos e estudaremos da ação tripanocida *in vitro* e *in vivo* do íon complexo *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄SO₂]²⁺; realizar estudos de toxicidade aguda para os íons complexos que melhor apresentarem relação dose-resposta *in vitro*; verificar da capacidade inibitória dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]³⁺ sobre a atividade catalítica da gGAPDH.

IV. EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Água deionizada (Milli-Q_{plus} de procedência Millipore com resistividade de 18 MΩ cm) foi usada na preparação dos meios biológicos enquanto que água destilada foi usada nos demais experimentos.

Tricloreto de rutênio hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) de procedência Aldrich foi usado como material de partida para a síntese de todos os complexos de rutênio descritos nesta tese.

Ácido trifluoracético (HTFA, CF_3COOH , $d = 1,535 \text{ g cm}^{-3}$) de procedência Mallinckrodt (99%) foi usado sem prévia purificação nas sínteses de diversos complexos nitrosilo, bem como na preparação de eletrólitos suporte e de soluções de controle de força iônica.

Trifluoroacetato de sódio (NaTFA, NaCF_3COO) gerado em solução pela reação entre ácido trifluoracético e hidróxido de sódio em proporção estequiométrica, foi usado para controlar a força iônica em diversos experimentos, em algumas sínteses e também como eletrólito suporte para as medidas eletroquímicas.

Ácido trifluormetanosulfônico (HTFMS, CF_3HSO_3 , $d = 1,7 \text{ g cm}^{-3}$) de procedência Aldrich (99%) foi usado nas sínteses dos complexos *trans*- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2](\text{TFMS})_2$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{S(IV)}](\text{TFMS})_n$, $\text{S(IV)} = \text{SO}_2$, HSO_3^- ou SO_3^{2-} .

Cloreto de hexaaminrutênio (III), $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, de procedência Stream, foi utilizado na preparação das soluções da curva padrão para análise do teor de rutênio por absorção atômica^[166].

Os ligantes pirazina (pz), L-histidina (L-his), imidazol (imN quando coordenado pelo nitrogênio ou imC quando coordenado pelo carbono C2), trietilfosfito ($\text{P}(\text{OEt})_3$), piridina (py), isonicotinamida (isn), nicotinamida (nic), 4-picolina (4-pic) todos de procedência Aldrich foram usados sem prévia purificação tendo como base o alto grau de pureza analítica descrita pelo fabricante. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e metabisulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), de procedência JT Baker, também foram usados sem prévia purificação.

Utilizou-se argônio de procedência da White Martins (99,9%), nos experimentos em atmosfera inerte. Para remoção de traços residuais de oxigênio, borbulhou-se o gás em uma solução de 0,3 M de $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em meio levemente ácido ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e na presença de amálgama de zinco contida em dois frascos lavadores.

Solventes, em geral, foram purificados previamente antes de sua utilização, conforme procedimentos descritos na literatura ^[167].

4.2 Instrumentação

4.2.1 Análise elementar

As análises elementares de C, N, H e S foram realizadas no Centro de Análises Químicas e Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos, utilizando Analisador Elementar da Ceinstruments, modelo EA 1110.

4.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro BOMEM FTIR MB-102 na região de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. As amostras foram preparadas sob

forma de pastilhas de KBr em concentrações próximas a 1% ^[168]. Os experimentos em solução foram realizados utilizando uma cela constituída de janela de Silício.

4.2.3 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

As medidas de espectroscopia de ultravioleta-visível foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi modelo U-3501, utilizando-se cela de quartzo de caminho ótico de 1,0 cm. Foram preparadas soluções de concentrações definidas, que obedecessem à faixa linear da Lei de Lambert-Beer ^[169] para cada complexo sintetizado, e submetidas à análise em célula termostatzada fazendo-se a correção dos respectivos solventes.

4.2.4 Espectroscopia de absorção atômica

Para as determinações de rutênio foi utilizado o Espectrofotômetro de Absorção Atômica Polarizado - Hitachi, modelo Z-8100, com lâmpada de cátodo oco de rutênio (Hitachi), 12 mA, comprimento de onda 349,9 nm.

Os teores de rutênio dos complexos investigados foram determinados de acordo com o método proposto por Clarke ^[166]. As soluções de cloreto de hexaaminrutênio(III) entre 5 a 25 ppm foram utilizadas na construção da curva padrão de rutênio. Estas soluções continham 5% de uma solução 0,39 mol L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O e 0,22 mol L⁻¹ de CdSO₄.8H₂O, com o objetivo de suprimir interferentes e aumentar o sinal analítico ^[166]. As soluções das amostras foram preparadas em condições similares às utilizadas nas soluções padrões.

4.2.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram efetuados em um espectrômetro BRUCKER AC-200, utilizando D_2O ou $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ como solventes e TMS ou o sinal do próton da água na acetona como padrão interno.

4.2.6 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

As medidas de RPE foram efetuadas em um espectrômetro BRUCKER ESR 300E, fonte de microondas de banda-X ER 041 XK, controlador de temperatura modelo Eurotherm B-VT 200 acoplado a uma cavidade padrão de ressonância. As amostras sólidas foram registradas a temperatura do nitrogênio líquido. Os espectros de RPE adquiridos no espectrofotômetro foram convertidos para o programa *WinEPR*.

4.2.7 Experimentos eletroquímicos

Os experimentos de voltametria cíclica foram efetuados no sistema eletroquímico PAR modelo 264A e em um Autolab potenciostato/galvanostato PGSTAT30. Utilizou-se uma célula eletroquímica constituída por três eletrodos. Eletrodo de trabalho: carbono vítreo; eletrodo de referência: calomelano saturado (ECS, 0,246 vs. ENH) e eletrodo auxiliar: placa de platina. Todos os experimentos foram realizados a $25 \pm 0,1$ °C e na ausência de oxigênio.

4.2.8 Determinação dos valores de pK_a das espécies *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{S}(\text{IV})]^{n+}$, $\text{S}(\text{IV}) = \text{SO}_2$, HSO_3^- ou SO_3^{2-} (titulação com NaOH)

Essas medidas foram efetuadas titulando-se 25,0 mL de uma solução $9,6 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} do complexo com solução de NaOH (1,0 mol L^{-1}) o qual foi previamente padronizada

com ácido oxálico. As determinações de pH foram efetuadas através de um eletrodo num pHmetro/potenciômetro da MeterLabTM, modelo PHM250, utilizando um eletrodo combinado de vidro com uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹ saturada com AgCl. O pHmetro, antes das análises, foi calibrado com solução tampão de pH igual $4,01 \pm 0,01$; $7,01 \pm 0,01$ e $10,00 \pm 0,05$.

4.2.9 Medidas de solubilidade

As medidas de solubilidade foram determinadas simulando-se condições fisiológicas com pH variando entre 6,5 e 7,4 e $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este meio foi preparado de acordo com procedimentos descritos na literatura ^[170, 171]. Uma conhecida massa do composto foi suspensa em 5 mL do meio e após 24 horas sob atmosfera de argônio a solução foi filtrada em um filtro de 0,45 μm . A solução filtrada foi então diluída e concentração final determinada por UV-vis em 323 nm ($\epsilon = 4,5 \times 10^3\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

4.3 Preparação dos complexos

4.3.1 Preparação dos complexos de rutênio

A preparação e a caracterização dos complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄L(SO₄)]Cl, L = pz, L-his, imN, py, isn, nic e 4-pic, *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₂, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]X₃, L = pz, L-his, imN, imC, SO₃²⁻, P(OEt)₃, py, isn, nic e 4-pic e X = BF₄⁻ ou PF₆⁻, K[Ru(Hedta)Cl], [Ru(Hedta)(NO)], *cis*-[Ru(H₂O)(bpy)₂L](PF₆)_n, L = imN ou SO₃²⁻, *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO₂)](PF₆)_n, L = imN ou SO₃²⁻, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L](PF₆)_n, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻, *trans*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆), [Ru(NH₃)₅Cl]Cl₂ e *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl obedeceram a procedimentos descritos na literatura ^[144, 155, 156, 160, 172, 173, 174, 175].

Para estes complexos o controle da pureza foi efetuado através da comparação dos respectivos coeficientes de absorvidades molares de seus espectros de UV-Vis, através das bandas características nos espectros de IV e através dos potenciais de oxirredução dos voltamogramas reportados na literatura.

O complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄SO₂](TFMS)₂ foi preparado de acordo com o método descrito por Isied e Taube ^[161]. Uma solução de 4 mL de NaHCO₃ 0,4 mol L⁻¹ foi desaerada por no mínimo meia hora e logo após adicionou-se 100 mg (0,33 mmol) de *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl. Em seguida adicionou-se 4 mL de uma solução 6 mol L⁻¹ de HTFMS previamente desaerada. Com passar do tempo observou-se a formação de um precipitado marrom claro que após duas horas de reação foi coletado por filtração a vácuo e lavado três vezes com etanol gelado e desaerado. O sólido foi então secado e estocado a vácuo por no máximo duas semanas antes de sua utilização na síntese do complexo *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄S(IV)](TFMS)_n, S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻.

4.3.2 Preparação do complexo *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄S(IV)](TFMS)_n, S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻ (RuBz)

35 mg (64 µmol) de *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄SO₂](TFMS)₂ foram dissolvidos em 9 mL de acetona previamente desaerada por no mínimo 45 minutos contendo 40 mg (0,15 mmol) de Bz. Deixou-se a reação prosseguir por 2 horas sob agitação constante e na ausência da luz. Após este tempo de reação adicionou-se hexanos 65% desaerado e observou-se a formação de um precipitado amarelo pálido. Este foi lavado exaustivamente com hexanos 65% até completa remoção dos traços de Bz que não reagiu. Em seguida o sólido foi secado e estocado sob vácuo. Análise elementar: Teórico: C, 24,03; H 3,53; N,

13,19; S 11,32 e Ru 11,90. Experimental: C, 24,78; H, 3,36; N, 13,32; S, 11,06 e Ru, 11,83.

4.4 Cálculos quânticos

Os cálculos de composição dos orbitais moleculares bem como os descritores moleculares para o complexo *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄S(IV)]ⁿ⁺ (RuBz) onde S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻ e para a molécula Bz foram realizados pelo doutorando Francisco das Chagas Alves Lima usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) em colaboração com o Grupo de Química Quântica do Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). Em todos os cálculos empregou-se o programa Gaussian 03 ^[176].

4.4.1 Otimização das geometrias

As geometrias otimizadas para o RuBz e Bz foram obtidas no vácuo usando como base os três parâmetros híbridos de Becke, com a correlação de troca de função conhecida como B3LYP ^[177, 178]. Além desta, usou-se também um outro conjunto de bases pseudopotenciais ^[177]. Para os átomos de hidrogênio, carbono, enxofre e oxigênio usou-se a base padrão 6-31G(d) e para o átomo de rutênio a base LANL2DZ ^[177]. Nenhuma condição de simetria foi imposta nestes cálculos. A base B3LYP inclui a funcional desenvolvida por Becke ^[177], a qual combina o gradiente de Becke, a mudança funcional de Lee Yang-Parr ^[179, 180] e a correlação funcional de Vosko-Wilk-Nusair com partes da teoria Hartree-Fock ^[178]. Todos os mínimos de energia foram encontrados por cálculos de frequência, os quais representam mais precisamente as reais frequências. Energias Zero-point vibracionais foram adicionadas sobre os cálculos de frequência da base B3LYP para

otimização das geometrias na fase aquosa. As estruturas eletrônicas para o RuBz e Bz foram examinadas por análises de NBO (Natural Bond Orbital) ^[181], implementadas no programa Gaussian 03. Uma pesquisa detalhada de conformação para o RuBz e Bz foi feita usando DFT objetivando encontrar as estruturas de menor energia e o isômero de maior abundância conformacional. Em seguida esta geometria foi otimizada na fase aquosa aplicando também métodos DFT.

Os fragmentos $\{\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\}$, $\{\text{SO}_2\}$, $\{\text{HSO}_3^-\}$, $\{\text{SO}_3^{2-}\}$ e $\{\text{Bz}\}$ foram usados para analisar as energias de interação ligante-metal e a composição dos orbitais moleculares (OM). Assim, os OM são expandidos na conversão de um orbital molecular ou orbital atômico desses fragmentos. A população de Mülliken de um fragmento do orbital no orbital molecular foi usada para dar a porcentagem do caráter do fragmento do orbital de cada orbital molecular. A diferença entre a energia de um elétron de um orbital molecular virtual e ocupado foi usada como uma primeira aproximação para a energia de excitação. A composição do orbital molecular e a sobreposição da população entre os fragmentos moleculares foram calculadas usando-se o programa AOMix ^[182]. Cargas atômicas foram calculadas usando-se análise de NBO.

A Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TDDFT) ^[183, 184] foi usada para calcular as energias e intensidades das transições eletrônicas para os complexos, que foram transformadas usando-se o programa Swizard ^[185].

4.4.2 Descritores moleculares

Uma vez que os estudos de pK_a mostraram que a forma ácido-base predominante do RuBz em pH fisiológico é a espécie *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_3]$, todos os cálculos de descritores moleculares foram realizados considerando $\text{L} = \text{SO}_3^{2-}$, exceto quando

mencionado no texto. Energias de solvatação foram calculadas usando o método PCM (Polarizable Continuum Model) ^[186, 187]. Este método considera os descritores dos solvente como um meio macroscópico contínuo contendo propriedades apropriadas tais como constante dielétrica e coeficiente de expansão térmica. Neste procedimento, o soluto é embebecido numa cavidade do solvente com constante dielétrica definida conforme descrito acima. As interações soluto-solvente são descritas em termos de campo reacional devido à presença do meio dielétrico, o qual atua como um perturbador da função Hamiltoniana do soluto através do seu potencial de reação. A constante dielétrica (ϵ) usada foi igual a 78,39 para as reações do RuBz e Bz em água. Frequências vibracionais foram calculadas a partir da análise da segunda derivada objetivando encontrar a menor energia potencial de superfície.

4.5 Ensaios biológicos

Todos os experimentos biológicos foram realizados nos Laboratórios do Prof. Dr. João Santana da Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

4.5.1 Solução de PBS

As soluções de tampão fosfato, phosphate-buffered saline (PBS), foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo: Para 100 mL de água destilada dissolveram-se 8,0 g de NaCl; 0,20 g de KCl; 0,20 KH₂PO₄ e 1,382 g de Na₂HPO₄.2H₂O.

4.5.2 Ensaios de citotoxicidade não específica

Esplenócitos de camundongos Balb/c foram cultivados com diferentes concentrações do composto RuBz (10 nmol L⁻¹ até 1 mmol L⁻¹) ou somente na presença do

meio e após 6, 12 e 24 horas de incubação a percentagem de células viáveis foi determinada em um hamacitômetro usando azul de tripan o qual marca as células lisadas^[188]. Em um outro experimento, os esplenócitos foram marcados com CFSE (Sigma 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cultivado por 72 h em placas de 96 poços (Nunc, $5,0 \times 10^5$ células poço⁻¹), sob as mesmas concentrações de RuBz ou meio. Um grupo de poços foi também adicionado ConA (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para a indução de proliferação não específica. Em seguida as células foram suspendidas e analisadas usando um software Cellquest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems Inc., San Jose, CA).^[189]

4.5.3 Ensaios de toxicidade aguda

Camundongos Balb/c fêmeas (5-6 semanas de idade) foram tratadas com os compostos RuBz, *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{3+}$ L = L-his, imN, nic, isn, py, P(OEt)₃ e 4-pic e *cis*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{L}]^{n+}$ L = imN, 1-miN e SO_3^{2-} dissolvidos em PBS e seguindo o teste *up-and-down* para avaliar a toxicidade aguda.^[190] Os compostos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) em dose única usando um único animal e este foi observado por até sete dias. Se o animal morresse, outro animal seria tratado com uma dose três vezes menor, caso contrário com uma dose três vezes maior^[190]. Nestes estudos a dose inicial foi 100 $\mu\text{mol kg}^{-1}$.

4.5.4 Amostras de *T. cruzi*

Em todos os experimentos biológicos utilizamos o parasito *T. cruzi* da Cepa Y. Esta cepa foi isolada em 1950 pelo Prof. Pedreira Freitas (FMRP)^[191] de um caso agudo de doença de Chagas procedente da cidade de Marília no estado de São Paulo e suas características morfológicas foram estudadas por Silva e Nussenzweig em 1953^[192].

Optamos por esta cepa do *T. cruzi* uma vez que ela tem sido caracterizada como parcialmente resistente aos fármacos Bz e Nfx. ^[193]. Além disso, dentre as cepas do *T. cruzi* descritas, a Y é a mais bem estudada em relação aos aspectos bioquímicos, genéticos e imunológicos e também em relação à interação parasito-hospedeiro em diversos modelos experimentais (camundongo, em diversas linhagens WT e KO, cão, coelho, hamster, etc) e isto é atestado pelo elevado número de publicações com respeito a esta cepa. A interação parasito-hospedeiro é responsável pela evolução natural da doença de Chagas, proporcionando as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, e manifestando em diferentes hospedeiros as diferentes formas clínicas da doença tais como a forma indeterminada e a forma cardíaca com a presença da cardiopatia chagásica crônica fibrosante e difusa peculiar à doença de Chagas humana. Ademais, cães infectados com esta cepa apresentaram diferente sintomatologia atribuída à doença de Chagas, tais como: cardiomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, hepatomegalia, morte súbita, parasitemia patente e alterações eletrocardiográficas, superponíveis àquelas apresentadas por humanos ^[193, 194, 195].

4.5.5 Animais para experimentação

Foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c e não isogênicos Swiss, de 6 a 8 semanas de idade. Estes animais foram colocados em caixas de polipropileno, mantidos em condições controladas de temperatura e com livre acesso a comida e ração *ad libitum*. Os animais foram previamente criados no biotério de camundongos do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – USP. Ademais, todos os experimentos usando animais descritos nesta tese

foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP – USP (Protocolo N: 004/2007).

4.5.6 Avaliação da atividade anti-proliferativa e tripanocida *in vitro* contra epimastigotas dos complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄L(SO₄)]Cl, L = pz, L-his, imN, py, isn ou nic, *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₂, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]X₃, L = pz, L-his, imN, P(OEt)₃, py, isn ou nic e X = BF₄⁻ ou PF₆⁻, *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄SO₂](CF₃HSO₃)₂, K[Ru(Hedta)Cl], [Ru(Hedta)(NO)] e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L](PF₆)_n, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻

Formas epimastigotas foram crescidas em meio Schneider, suplementadas com 20% de soro bovino fetal, coletadas durante a fase exponencial de crescimento, lavadas com PBS e ressuspendidas de forma que a concentração final fosse de 1,0 x 10⁶ parasitos mL⁻¹. Em seguida, um volume de 200 µL de parasitos foi plaqueado em triplicata em placas de 96 poços e incubados a 37 °C, ± 5% CO₂ na presença ou não dos compostos de rutênio dissolvidos diretamente em PBS. Bz e o Nitroprussiato de Sódio (SNP) foram usados como controle positivo. A viabilidade do parasito foi subsequentemente determinada pela contagem do número de formas móveis no poço com a ajuda de um hemacitômetro seguindo o método descrito por Brener ^[196]. A porcentagem da atividade tripanostática ou antiproliferativa (%AA) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\%AA = \{ 1 - [(L_{Dt} - L_{Dto}) / (L_{Ct} - L_{Cto})] \} \times 100 \quad (8)$$

Onde L_{Dt} é a média do número de formas móveis no poço contendo o complexo de rutênio no tempo t = 1, 4 ou 24 h de incubação, L_{Dto} é a média do número de formas móveis no

poço contendo o complexo de rutênio no tempo $t = \text{zero}$, L_{Ct} é a média do número de formas móveis no poço na ausência de qualquer composto no tempo $t = 1, 4$ ou 24 h de incubação e L_{Cto} é a média do número de formas móveis no poço na ausência de qualquer composto no tempo $t = 0$. A concentração correspondente a 50% de atividade anti-proliferativa após 24 h de incubação foi expressa como $IG_{50\text{epi}}$ (growth inhibition). Contudo, quando o valor de L_{Dt} foi menor que o valor de L_{Dto} , atividade tripanocida foi constatada e assim a concentração correspondente a 50% de atividade tripanocida sobre epimastigotas (AT_{epi}) após 48 h de incubação foi expressa como $IC_{50\text{epi}}$.

4.5.7 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* contra tripomastigotas dos complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{SO}_4)]\text{Cl}$, $\text{L} = \text{pz}$, L-his , imN , py , isn , nic ou 4-pic , $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3](\text{PF}_6)_2$, $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L}]\text{X}_3$, $\text{L} = \text{pz}$, L-his , imN , imC , SO_3^{2-} , $\text{P}(\text{OEt})_3$, py , isn , nic ou 4-pic e $\text{X} = \text{BF}_4^-$ ou PF_6^- , $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2](\text{CF}_3\text{HSO}_3)_2$, $\text{K}[\text{Ru}(\text{Hedta})\text{Cl}]$, $[\text{Ru}(\text{Hedta})(\text{NO})]$ e $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2\text{L}](\text{PF}_6)_n$ $\text{L} = \text{imN}$, 1-miN ou SO_3^{2-}

Formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas de camundongos infectados, extraídas no pico parasitário e ressuspensas a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ parasitos mL^{-1} . Em seguida, um volume de $200 \mu\text{L}$ de parasitos foi plaqueado em triplicata em placas de 96 poços e incubados a 37°C , $\pm 5\%$ CO_2 na presença ou não dos compostos de rutênio dissolvidos diretamente em PBS. Novamente, Bz e SNP foram usados como controle positivo. A viabilidade do parasito foi subsequentemente determinada pela contagem do número de formas móveis no poço com a ajuda de um hemacitômetro seguindo métodos previamente descritos ^[197]. A porcentagem da atividade tripanocida (%TA) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\%TA = [1 - (L_{Dt} / L_{Ct})] \times 100 \quad (9)$$

Onde L_{Dt} é a média do número de formas móveis no poço contendo o complexo de rutênio no tempo $t = 1, 4$ ou 24 h de incubação e L_{Ct} é a média do número de formas móveis no poço na ausência de qualquer composto no tempo $t = 1, 4$ ou 24 h de incubação. A concentração correspondente a 50% de atividade tripanocida sobre tripomastigotas foi expressa como IC_{50tri} .

4.5.8 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* contra amastigotas dos complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L](BF₄)₃, L = isn ou imN, *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄SO₂](CF₃HSO₃)₂, e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L](PF₆)_n, L = imN ou SO₃²⁻

Os experimentos foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita na literatura ^[194]. As células Vero (American Type Culture Collection CLL-81, $1,25 \times 10^4$ células mL⁻¹) foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO, Grand Island, New York, US), suplementadas com 5% de soro bovino fetal (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil; inativado a 56°C por 30 min); 2,5% HEPES 1 mol L⁻¹, pH 7,2; 1% de glutamina 2 mmol L⁻¹; 0,1% de mercaptoetanol 50 mmol L⁻¹ e 0,2% de garamicina 200 g mL⁻¹ (Shering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil). O cultivo foi feito em câmara de slide (chamber slide, Nunc Inc. Illinois, US). As células foram então incubadas a 37 °C em atmosfera humificada com 5% CO₂ na presença dos compostos Bz, RuBz, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃. Em seguida as células foram infectadas com formas tripomastigotas da cepa Y ($12,5 \times 10^4$ parasitos poço⁻¹) por 24 horas a 37 °C na mesma atmosfera. Após este tempo, as câmaras foram lavadas com PBS gelado

para retirar as células não aderidas, bem como as formas tripomastigotas não fagocitadas e então re-incubadas em meio DMEM suplementadas com 1% soro bovino fetal a 37 °C. O meio foi removido após 24 horas de incubação e as células foram fixadas com Bouina por 15 minutos, lavadas com a menor quantidade de água MilliQ e coradas com Giemsa por 16-18 h. Após este tempo os slides foram diferenciados em etanol 70%, lavados com acetona e xileno (3:7 e 7:3 respectivamente), e montados em resina sintética (Entellan, Merck). A porcentagem de células infectadas foi examinada em microscópio óptico em resolução de 200-400 x.

4.5.9 Avaliação da atividade tripanocida *in vivo* dos complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L](BF₄)₃, imN ou isn, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L](PF₆)_n, L = imN ou SO₃²⁻ e *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄SO₂](CF₃HSO₃)₂ usando um modelo murino agudo

Grupo de 5-6 camundongos fêmeas Swiss ou Balb/c foram infectadas por via intraperitoneal com $1,0 \times 10^2$ ou $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas por camundongo. Durante os ensaios os animais foram mantidos em temperatura controlada (22-25 °C) com livre acesso a água e ração *ad libitum*. Os compostos de rutênio foram administrados por via oral ou intraperitoneal em 100 µL de PBS e Bz, o qual foi usado como droga de referência (controle positivo), foi administrado por via oral dissolvido em PBS contendo goma arábica. O curso da infecção foi acompanhado pela contagem do número de formas móveis em 5 µL de sangue retirados da veia caudal de acordo com o método descrito por Brener [196, 197].

4.5.10 Análise histológica

Análises histológicas foram conduzidas nos corações, músculos esqueléticos e fígados dos camundongos tratados ou não com os compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆), *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄SO₂](CF₃HSO₃)₂. Os camundongos infectados e tratados com os compostos de rutênio foram eutanizados no 15º dia após o inoculo e seus órgãos fixados em solução 10% de formaldeído em PBS embebecido em parafina. Os blocos de parafina contendo os órgãos foram então seccionados, corados com hematoxina-eosina (H&E) e examinados em microscópio.

4.5.11 Análise estatística

Todos os resultados apresentados nesta tese foram considerados significativamente estatísticos com $P < 0,05$ a não ser quando mencionado no texto. Os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram usados para determinar as diferença estatísticas e também na comparação entre os grupos. Os valores de IC₅₀ foram obtidos das curvas sigmóides dose-resposta usando o programa Prisma 4.0.

4.6 Ensaios de cinética enzimática

Todos os experimentos cinético-enzimáticos descritos nesta tese foram realizados nos Laboratórios do Prof. Dr. Glaucius Oliva do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

4.6.1 Ensaios de inibição da atividade catalítica da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (gGAPDH)

A gGAPDH usada nos experimentos de inibição enzimática é uma enzima recombinante obtida de um sistema de expressão da *Escherichia coli*. A preparação e purificação da enzima foi realizada de acordo com o procedimento descrito previamente [116]. A atividade da enzima tem sido determinada de acordo com uma modificação do protocolo previamente descrito na literatura [198] através da medida espectrofotométrica da formação de NADH a 340 nm em 30s ou TNADH a 400 nm em 6 minutos

A mistura reacional contém de 50-100 mmol L⁻¹ de tampão trietanolamina pH 7,5 com 1 mmol L⁻¹ de EDTA e 1mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol; 30 mmol L⁻¹ de arseniato de sódio (Na₃AsO₃); 2,5 mmol L⁻¹ de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo (β-NAD⁺) ou 400 μmol L⁻¹ de tionicotinamida adenina dinucleotídeo (TNAD⁺); 0,6 mmol L⁻¹ de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e 30 nmol L⁻¹ da enzima. A reação é iniciada pela adição do substrato G3P e acompanhada espectrofotometricamente em 340 ou 400 nm obtendo-se a diferença de absorbâncias entre os tempos t = 0 e 30 s para a formação de NADH ou t = 0 e 6 minutos para a formação de TNADH. Em todos os experimentos manteve-se a temperatura controlada a 25 °C. A atividade específica da enzima (U) é calculada segundo a equação 12:

$$U/mg = \{[(\Delta_{\text{Absorbância}} / \Delta_t) \times V_a] / (\epsilon_{\text{NADH}} \times V_b \times C_{\text{ez}})\} \quad (10)$$

Onde $\Delta_t = 0,5$ minutos; V_a = volume da cubeta = 1 mL; $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; V_b = volume da enzima = 5 μL e C_{ez} = concentração da enzima em mg mL^{-1} .

Para os ensaios na presença dos compostos de rutênio, soluções foram preparadas inicialmente na concentração de 320 mmol L^{-1} . Após os primeiros experimentos, os compostos que mostraram atividade acima de 50% foram ensaiados em concentrações que variaram entre 10 a $620 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Para as reações na presença de ácido ascórbico e cisteína, um branco foi feita sem adição dos compostos, mas na presença destes redutores. A atividade inibitória (AI) foi calculada através da equação 13:

$$\% \text{ AI} = 100 - (U/mg \text{ na presença do inibidor} / U/mg \text{ controle}) \times 100 \quad (11)$$

As concentrações correspondentes a 50% de inibição da gGAPDH foram expressas como $\text{IC}_{50\text{GAPDH}}$ e foram obtidos a partir das curvas sigmóides de atividade vs. concentração do inibidor.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tetraaminas como transportadoras de óxido nítrico e sua ação sobre o *T. cruzi*

5.1.1 Atividade anti-proliferativa *in vitro* sobre as formas epimastigotas

Os primeiros experimentos objetivando avaliar a atividade anti-*T. cruzi* dos complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, [Ru(NO)(Hedta)] e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺ foram realizados com as formas epimastigotas. O principal objetivo aqui foi avaliar a atividade cistostática destes complexos sobre formas replicativas do parasito. A Tabela 2 resume estes dados expressados como a porcentagem de inibição do crescimento (% GI). Como pode ser observado nesta Tabela, os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺, onde L = pz (IG_{50epi} = 56 μmol L⁻¹), isn (IG_{50epi} = 67 μmol L⁻¹), L-his (IG_{50epi} = 78 μmol L⁻¹), imN (IG_{50epi} = 86 μmol L⁻¹), py (IG_{50epi} = 90 μmol L⁻¹) ou nic (IG_{50epi} = 136 μmol L⁻¹), bem como os íons complexos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, onde L = imN (IG_{50epi} = 106 μmol L⁻¹), 1-miN (IG_{50epi} = 117 μmol L⁻¹) ou SO₃²⁻ (IG_{50epi} = 121 μmol L⁻¹) exibiram maior atividade anti-proliferativa que o SNP (IG_{50epi} = 244 μmol L⁻¹). Além disso, todos os demais complexos nitrosilo testados, exibiram maior atividade anti-proliferativa que o Bz (IG_{50epi} = 2300 μmol L⁻¹). Estes dados também indicam que o *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄pz](BF₄)₃ apresentou a melhor atividade citostática inibindo em até 100 % o crescimento das formas epimastigotas a 1 mmol L⁻¹ logo na primeira hora de incubação. Contudo, de acordo estudos anteriores ^[158], este complexo apresenta maior citotoxicidade sobre células V-79 (IC_{50V79} = 120 μmol L⁻¹) que os demais complexos nitrosilo (IC_{50V79} variando de 410 a 2260 μmol L⁻¹) ^[158].

Tabela 2. Atividade anti-proliferativa dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, [Ru(NO)(Hedta)], *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, SNP e Bz sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade anti-proliferativa sobre epimastigotas (% AA)					
	t = 1 h			t = 4 h		
	Concentrações (μmol L ⁻¹)					
	100	500	1000	100	500	1000
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pZ] ³⁺	30 ± 4	66 ± 5	87 ± 3	73 ± 4	85 ± 3	90 ± 9
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	15 ± 4	19 ± 3	70 ± 6	27 ± 5	55 ± 4	72 ± 2
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	31 ± 3	49 ± 3	57 ± 7	36 ± 2	60 ± 8	62 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	16 ± 6	37 ± 4	54 ± 3	35±5	39±2	65 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	12 ± 9	55 ± 5	62 ± 6	26 ± 4	47 ± 3	65 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃] ⁺	22 ± 8	51 ± 5	65 ± 4	69 ± 3	79 ± 4	88 ± 8
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ imN] ³⁺	28 ± 7	69 ± 3	76 ± 3	37 ± 2	68 ± 6	88 ± 6
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ (1-miN)] ³⁺	25 ± 3	59 ± 6	66 ± 4	31 ± 2	57 ± 4	81 ± 6
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ SO ₃] ⁺	27 ± 4	58 ± 9	61 ± 3	32 ± 3	55 ± 4	68 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic] ³⁺	25 ± 5	63 ± 3	72 ± 4	39 ± 2	61 ± 6	89 ± 8
SNP	19 ± 5	35 ± 2	51 ± 4	22 ± 5	56 ± 4	65 ± 3
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ -pic] ³⁺	29 ± 6	55 ± 5	59 ± 8	27 ± 6	58 ± 5	66 ± 8
[Ru(NO)(Hedta)]	28 ± 4	50 ± 4	56 ± 8	20 ± 3	50 ± 4	56 ± 5
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	57 ± 4	68 ± 9	51 ± 3	12 ± 3	35 ± 4	58 ± 4
Bz	0	0	7 ± 3	11 ± 3	15 ± 4	24 ± 2
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imC] ³⁺	0	0	0	5 ± 1	7 ± 2	15 ± 4

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-6, *P* < 0,05. A atividade anti-proliferativa (AA) está expressa como a porcentagem de inibição do crescimento nos tempos e concentrações definidas. Íons complexos na forma de tetrafluorboratos ou hexafluorofosfatos.

Tabela 2 (continuação). Atividade anti-proliferativa dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, [Ru(NO)(Hedta)], *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, SNP e Bz sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade anti-proliferativa sobre epimastigotas (% AA)			
	t = 24 h			
	Concentrações (μmol L ⁻¹)			
	100	500	1000	IG _{50epi}
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pz] ³⁺	89 ± 4	92 ± 5	100	56 ± 3
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	75 ± 2	86 ± 4	91 ± 7	67 ± 5
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	68 ± 5	71 ± 4	77 ± 5	78 ± 5
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	58 ± 4	65 ± 4	78 ± 4	86 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	56 ± 6	78 ± 4	85 ± 4	90 ± 7
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃] ⁺	79 ± 6	82 ± 5	98 ± 5	97 ± 11
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ imN] ³⁺	49 ± 4	88 ± 8	94 ± 6	106 ± 8
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ (1-miN)] ³⁺	45 ± 6	87 ± 3	91 ± 5	117 ± 5
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ SO ₃] ⁺	35 ± 2	69 ± 6	84 ± 4	121 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic] ³⁺	47 ± 5	81 ± 4	89 ± 6	136 ± 8
SNP	41 ± 4	66 ± 6	74 ± 4	244 ± 7
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ 4-pic] ³⁺	44 ± 5	69 ± 9	79 ± 5	233 ± 5
[Ru(NO)(Hedta)]	33 ± 2	72 ± 7	89 ± 4	275 ± 9
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	25 ± 4	69 ± 6	74 ± 5	328 ± 6
Bz	15 ± 4	26 ± 4	31 ± 5	2300 ± 40
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imC] ³⁺	5 ± 4	17 ± 4	22 ± 4	≈ 3600

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-6, *P* < 0,05. A atividade anti-proliferativa (AA) está expressa como a porcentagem de inibição do crescimento nos tempos e concentrações definidas. Íons complexos na forma de tetrafluorboratos ou hexafluorofosfatos. Os valores de IG_{50epi} correspondem a 50% de atividade anti-proliferativa após 24 h de incubação.

5.1.2 Atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas epimastigotas

Os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = pz, L-his, imN, isn, py ou SO₃²⁻ que apresentaram valores de IG_{50epi} < 100 µmol L⁻¹, bem como o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃, o qual possui propriedades vasodilatadoras similares à do SNP, ^[159] foram incubados por 48 h com as formas epimastigotas a 37 °C e 5% de CO₂. Nestes experimentos, objetivou-se avaliar a atividade tripanocida sobre formas replicativas do *T. cruzi* usando o SNP, reconhecido doador de NO, como referência. Após este tempo de incubação, observou-se que o número de epimastigotas móveis no tempo de leitura (L_{Dt}) foi inferior aos respectivos valores no tempo t = zero (L_{Dt0}), constatando-se desta forma atividade tripanocida sobre epimastigotas. Assim, as concentrações correspondentes a 50% de atividade tripanocida após 48 h de incubação foram expressas como IC_{50epi}. Como pode ser visto na Tabela 3, os íons complexos onde L = pz, isn, py, L-his ou imN exibiram valores de IC_{50epi} inferiores ao respectivo valor para o SNP. Somente os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄pz](BF₄)₃ apresentaram valores de IC_{50epi} ≤ 100 µmol L⁻¹.

Tabela 3. Atividade tripanocida dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ e SNP sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações após 48 h de incubação

Compostos	Atividade tripanocida sobre epimastigotas			
	(% AT _{epi})			
	Concentrações (μmol L ⁻¹)			
	100	500	1000	IC _{50epi}
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pz] ³⁺	91 ± 4	100	100	76 ± 5
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	89 ± 6	100	100	85 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	78 ± 4	84 ± 3	100	97 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	76 ± 4	80 ± 3	100	100 ± 7
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	70 ± 2	77 ± 8	97 ± 4	134 ± 6
SNP	35 ± 6	76 ± 5	87 ± 4	284 ± 6
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃] ⁺	39 ± 4	59 ± 5	89 ± 4	300 ± 10
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	10 ± 2	45 ± 5	88 ± 3	423 ± 12

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 3-5, *P* < 0,05. A atividade tripanocida está expressa como a porcentagem de formas epimastigotas lisadas nas concentrações definidas. Íons complexos na forma de tetrafluorboratos ou hexafluorofosfatos. Os valores de IC_{50epi} correspondem a 50% de atividade tripanocida após 48 h de incubação.

5.1.3 Atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas tripomastigotas

A Tabela 4 reúne os resultados da atividade tripanocida em função do tempo e da concentração para os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, [Ru(NO)(Hedta)] e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺. Os compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄pz](BF₄)₃ (IC_{50tri} = 50 μmol L⁻¹), *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L-his](BF₄)₃ (IC_{50tri} = 51 μmol L⁻¹), *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ (IC_{50tri} = 52 μmol L⁻¹), *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄SO₃]Cl (IC_{50tri} = 59 μmol L⁻¹), *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ (IC_{50tri} = 59 μmol L⁻¹) e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ (IC_{50tri} = 60 μmol L⁻¹) foram tão eficientes quanto o SNP (IC_{50tri} = 52 μmol L⁻¹) na lise de tripomastigotas quando incubados sob as mesmas condições. Tem sido reportado ^[158] que o SNP apresenta citotoxicidade sobre células V-79 com o valor de IC_{V79} = 51 μmol L⁻¹, o qual é menor que a respectiva atividade tripanocida sobre tripomastigotas. Assim, a janela terapêutica *in vitro* (JT), definida como a razão entre os valores de toxicidade e a respectiva atividade (JT = IC_{50V79} / IC_{50tri}), para este composto é menor que 1 e, portanto seu uso como um possível agente anti-séptico seria desencorajado. Por outro lado, os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄pz](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L-his](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄SO₃]Cl, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₂ exibiram em média dez vezes maior atividade tripanocida que o Vg (IC_{50tri} = 536 μmol L⁻¹) ^[199]. Embora até hoje o Vg venha sendo recomendado pela OMS para tratar sangue infectado de pacientes originários das áreas endêmicas, este composto tem restrições ao uso e não é eficiente nas primeiras horas de incubação, limitando o tratamento de sangue infectado em transfusões emergenciais. Em contraste com o Vg, os compostos de rutênio doadores de NO *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = L-his, imN, SO₃²⁻, P(OEt)₃, py, 4-pic ou isn e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou

SO₃²⁻ apresentam de 80 a 100 % de atividade tripanocida, mesmo quando incubados por apenas 1 hora. Enquanto que o Bz tem uma baixíssima atividade nas primeiras 4 horas de incubação, o número de formas tripomastigotas lisadas após 1 hora de incubação (37 °C e 5 % de CO₂) aumenta de 67 a 100% na seqüência: *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn]³⁺ < *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄nic]³⁺ < [Ru(NO)(Hedta)] ~ *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py]³⁺ < *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃]³⁺ ~ *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄SO₃]⁺ = *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂(1-miN)]³⁺ ~ *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L-his]³⁺ < SNP = *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄-pic]³⁺ = *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN]³⁺ < *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN]³⁺ = *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]⁺ < *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄pz]³⁺. Adicionalmente, os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = imN, SO₃²⁻, pz, L-his, nic ou P(OEt)₃ e o *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN]³⁺, bem como o SNP foram capazes de lisar 100 % das formas tripomastigotas na concentração de 1 mmol L⁻¹ quando incubados por 24 horas.

Tabela 4. Atividade tripanocida dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, [Ru(NO)(Hedta)], *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺ e SNP e Bz sobre as formas tripomastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade tripanocida sobre tripomastigotas (%AT _{tri})					
	t = 1 h			t = 4 h		
	Concentrações (μmol L ⁻¹)					
	100	500	1000	100	500	1000
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pz] ³⁺	30 ± 4	66 ± 5	100	85 ± 4	100	100
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	36 ± 4	86 ± 4	88 ± 4	58 ± 4	79 ± 4	83 ± 5
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	87 ± 6	91 ± 5	92 ± 4	68 ± 4	97 ± 3	100
SNP	56 ± 7	78 ± 3	90 ± 4	75 ± 4	89 ± 7	92 ± 4
Bz	0	7 ± 6	12 ± 4	15 ± 5	21 ± 5	37 ± 7
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃] ⁺	40 ± 5	80 ± 2	88 ± 4	47 ± 7	74 ± 6	86 ± 4
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ imN] ³⁺	86 ± 7	88 ± 3	90 ± 6	78 ± 3	88 ± 6	92 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	57 ± 3	68 ± 2	86 ± 4	62 ± 4	90 ± 4	92 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	60 ± 2	79 ± 4	83 ± 3	49 ± 6	76 ± 4	80 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	90 ± 4	81 ± 5	81 ± 7	59 ± 4	55 ± 5	52 ± 7
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ SO ₃] ⁺	75 ± 6	79 ± 3	92 ± 4	75 ± 5	81 ± 5	87 ± 7
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ (1-miN)] ³⁺	69 ± 8	71 ± 5	88 ± 4	67 ± 5	80 ± 4	83 ± 6
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic] ³⁺	36 ± 6	60 ± 4	67 ± 5	38 ± 2	63 ± 4	93 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ -pic] ³⁺	48 ± 4	77 ± 3	90 ± 5	35 ± 3	50 ± 4	78 ± 4
[Ru(NO)(Hedta)]	12 ± 7	15 ± 6	82 ± 4	20 ± 3	50 ± 4	56 ± 3
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imC] ³⁺	5 ± 4	8 ± 3	14 ± 8	11 ± 7	12 ± 7	18 ± 4

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-8, *P* < 0,05. A atividade tripanocida está expressa como a porcentagem de formas tripomastigotas lisadas nos tempos e concentrações definidas. Íons complexos na forma de tetrafluorboratos ou hexafluorofosfatos.

Tabela 4 (continuação). Atividade tripanocida dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, [Ru(NO)(Hedta)], *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺ e SNP e Bz sobre as formas tripomastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade tripanocida sobre tripomastigotas (%AT _{tri})			
	t = 24 h			
	Concentrações (μmol L ⁻¹)			
	100	500	1000	IC _{50tri}
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pZ] ³⁺	100	100	100	50 ± 2
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	98 ± 4	100	100	51 ± 1
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	97 ± 4	100	100	52 ± 4
SNP	97 ± 4	98 ± 5	100	52 ± 3
Bz	89 ± 8	92 ± 5	100	53 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃] ⁺	85 ± 4	88 ± 4	100	59 ± 5
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ imN] ³⁺	92 ± 4	97 ± 4	100	59 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	84 ± 4	92 ± 8	100	60 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	67 ± 4	91 ± 6	92 ± 5	75 ± 3
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	65 ± 7	83 ± 4	97 ± 4	77 ± 3
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ SO ₃] ⁺	74 ± 8	82 ± 5	89 ± 8	85 ± 5
<i>c</i> -[Ru(NO)(bpy) ₂ (1-miN)] ³⁺	71 ± 5	79 ± 7	92 ± 4	88 ± 3
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic] ³⁺	44 ± 5	86 ± 4	100	158 ± 4
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ 4-pic] ³⁺	44 ± 5	76 ± 4	95 ± 3	177 ± 6
[Ru(NO)(Hedta)]	33 ± 3	72 ± 2	89 ± 2	275 ± 7
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imC] ³⁺	15 ± 5	21 ± 5	26 ± 4	≈ 3400

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-8, *P* < 0,05. A atividade tripanocida está expressa como a porcentagem de formas tripomastigotas lisadas nos tempos e concentrações definidas. Íons complexos na forma de tetrafluorboratos ou hexafluorofosfatos. Os valores de IC_{50tri} correspondem a 50% de atividade tripanocida após 24 h de incubação.

Experimentos similares aos anteriores foram conduzidos para avaliar as atividades tripanocida e anti-proliferativa dos complexos precursores *trans*-[Ru(NH₃)₄L(SO₄)]Cl, L = isn, imN, nic, py, L-his ou 4-pic, *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₂ e K[Ru(Hedta)Cl], os quais não são capazes de liberar NO. Nenhum destes complexos exibiu atividade tripanocida ou anti-proliferativa significativa quando incubados por até 24 horas. Assim, os dados das Tabelas 2, 3 e 4 sugerem fortemente que o NO liberado pelos complexos nitrosilo após redução, desempenha papel essencial nos mecanismos das atividades tripanocida e anti-proliferativa. De fato, foi observado uma tendência de correlação entre a atividade anti-proliferativa na primeira hora de incubação (% GI_{1h}) e o potencial de redução do fragmento Ru^{II}NO⁺/Ru^{II}NO⁰ (Tabela 5).

Tabela 5. Tendência de correlação entre a atividade anti-proliferativa, o potencial de redução do par E_(Ru^{II}NO⁺/NO⁰) e a constante de velocidade específica (k_{NO}) para os complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ e [Ru(NO)(Hedta)]

Compostos	% GI _{1h}	E _(Ru^{II}NO⁺/NO⁰) vs. ENH (V) ^[148]	k _{NO} (s ⁻¹) ^[148]
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pz] ³⁺	87 ± 3	0,112	0,070
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ nic] ³⁺	72 ± 4	0,072	0,025
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn] ³⁺	70 ± 6	0,052	0,043
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py] ³⁺	62 ± 6	0,012	0,060
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his] ³⁺	57 ± 7	-0,108	0,140
[Ru(NO)(Hedta)]	56 ± 8	-0,098	0,002
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN] ³⁺	54 ± 3	-0,118	0,160
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃] ³⁺	51 ± 3	0,132	0,987
SNP	51 ± 4	-0,195	ND
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (H ₂ O)] ³⁺	ND	-0,148	0,040

% GI_{1h}, representa a porcentagem de inibição sobre as formas epimastigotas após 1 hora de incubação e [Ru] = 1 mmol L⁻¹. Íons complexos na forma de tetrafluorboratos ou hexafluorofosfatos. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. ND = Não determinado.

De acordo com estes valores, à medida que o potencial de redução do par redox $\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0$ torna-se mais positivo, e, portanto, mais acessível aos redutores biológicos, os valores de % GI aumentam proporcionalmente. Esta tendência seria coerente com a menor atividade observada para os complexos $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{Hedta})]$, *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{L-his}](\text{BF}_4)_3$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}](\text{BF}_4)_3$ uma vez que para estes complexos, os potenciais de redução do fragmento $\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0$ são mais negativos que os respectivos potenciais dos demais nitrosilos. Em acordo com estes argumentos, o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imC}]^{3+}$, o qual difere estruturalmente do complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}]^{3+}$ somente pela posição de coordenação do ligante imidazol (Figura 5), apesar de seu elevado valor de k_{NO} (4 s^{-1}), exibe uma baixíssima atividade anti-proliferativa e tripanocida (Tabela 2 e 4) mesmo quando incubado em concentrações de até 1 mmol L^{-1} . Isto certamente ocorre devido ao fato deste complexo possuir potencial redução ($-0,32 \text{ V vs. ENH}$) pouco acessível a redutores presente em meio biológico ^[155].

Figura 5. Estruturas para os complexos (A) *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imC}]^{3+}$ ($E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0} = -0,320 \text{ V vs. ENH}$ e $k_{\text{NO}} = 4 \text{ s}^{-1}$) e (B) *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4\text{imN}]^{3+}$ ($E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0} = -0,118 \text{ V vs. ENH}$ e $k_{\text{NO}} = 0,16 \text{ s}^{-1}$).

O composto *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃, apesar de sua bem conhecida propriedade valorelaxante ^[159], apresenta uma pequena atividade tripanocida quando comprado com os demais doadores de NO estudados neste trabalho. Apesar de o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ possuir valores de $E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0}$ e k_{NO} bastante favoráveis, este complexo é pouco estável nas concentrações hidrogeniônicas comuns em condições fisiológicas ($\text{CH}_3\text{O}^- < 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) gerando os produtos *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄P(OEt)₃]²⁺ e *trans*-[Ru(NO)(H₂O)(NH₃)₄]³⁺ ^{*1}(Em fase de elaboração). O primeiro produto, o qual não é capaz de liberar NO, não apresentou atividade tripanocida quando testado e o segundo não possui potencial de redução ($E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0} = -0,148 \text{ V vs. ENH}$) adequado para que ocorra redução nas condições testadas.

5.1.4 Determinação da janela terapêutica para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = pz, isn, imN, py, SO₃²⁻, L-his ou P(OEt)₃

Antes de realizar os experimentos *in vivo*, calculou-se para os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ as respectivas janelas terapêuticas (JT) (Tabela 6), objetivando uma orientação na utilização de doses ainda mais seguras nos diversos experimentos *in vivo*. De acordo com esses dados, observou-se que os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄pz](BF₄)₃ e SNP, os quais exibiram uma excelente atividade após 24 horas de incubação a 37 °C ($\text{IC}_{50\text{tri}} = 52$ e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente), não seria os mais indicados na quimioterapia chagásica pois seus respectivos valores de JT *in vitro* são 1 e 2, respectivamente. Isto significa que a concentração necessária para lisa 50% dos parasitos é igual ou muito próxima à concentração que lisa 50% das células V-79. Os complexos

^{*1} TOLEDO, J. C.; METZKER, G.; OSTI, R. Z.; MAGALHÃES, A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Hydrolysis of coordinated phosphorous esters (P(OR)₃) on ruthenium tetraamines: nítric oxide as an activation agent for nucleophilic attack. Em fase de elaboração.

trans-[Ru(NO)(NH₃)₄SO₃]Cl e o *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ também exibiram excelentes atividades contra as formas infectivas do *T. cruzi* (IC_{50tri} = 59 e 60 μmol L⁻¹, respectivamente). Todavia, estes dois compostos foram pouco ativos contra as formas replicativas (IC_{50epi} ≥ 300 μmol L⁻¹). Assim, apesar destes compostos terem apresentado bons valores de JT (17 e 38, respectivamente), decidiu-se não usá-los nos experimentos *in vivo* no presente estudo devido à sua baixa eficácia contra as formas epimastigotas.

Por outro lado, os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺, L = imN, py ou isn e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻ foram os únicos doadores de NO que mostraram boa atividade contra formas epimastigotas e tripomastigotas com valores de IC_{50epi/tri} ≤ 125 μmol L⁻¹ e, assim, foram selecionados para os experimentos *in vivo*. Os compostos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻ foram incubados por até 24 horas na presença de células Vero, as quais são um tipo celular altamente susceptível, e não se observou efeitos tóxicos para estas células em concentrações de até 1 mmol L⁻¹. Portanto, é razoável assumir que tais compostos apresentam valores de toxicidade sobre células Vero com IC_{50vero} > 1 mmol L⁻¹. Assim, dentre todos os compostos de rutênio testados neste estudo com atividade contra tripomastigotas e epimastigotas com valores de IC₅₀ menores que 125 μmol L⁻¹, os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺, L = imN, py ou isn e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻ foram os únicos que exibiram valores de JT ≥ 10 (Tabela 6). O complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂1-miN](PF₆)₃, apesar de sua excelente atividade contra epimastigotas e tripomastigotas (IC_{50epi/tri} ≤ 125 μmol L⁻¹), não foi usado nos experimentos *in vivo* de toxicidade e atividade devido às semelhanças quanto às propriedades químicas com o complexo *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃.

Tabela 6. Valores de IC₅₀ sobre células V-79 e sobre o *T. cruzi* e janelas terapêuticas para os íon complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ L = pz, L-his, imN, isn, py, SO₃²⁻ e P(OEt)₃ e SNP

Compostos	Citotoxicidade ^[158]	Atividade Tripanocida		JT <i>in vitro</i>
	IC _{50V79} (μmol L ⁻¹)	IC _{50tri} (μmol L ⁻¹)	IC _{50epi} (μmol L ⁻¹)	IC _{50V79} /IC _{50tri}
SNP	51	52	284	1
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ pz](BF ₄) ₃	120	50	76	2
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ L-his](BF ₄) ₃	414	51	134	8
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	646	52	97	12
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ isn](BF ₄) ₃	743	77	85	10
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ py](BF ₄) ₃	930	75	100	12
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ SO ₃](Cl)	1000	59	300	17
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ P(OEt) ₃](PF ₆) ₃	2260	60	423	38

IC_{50V79} – concentração correspondente a 50% de inibição do conteúdo de ácidos nucleicos de células V-79; IC_{50epi/tri} – concentração correspondente a 50% de atividade tripanocida após 24 h (tripomastigotas) e 48 h (epimastigotas) de incubação; JT *in vitro* – definido como a razão IC_{50V79}/IC_{50tri};

Conforme Tabela 6, a metade da concentração inibitória sobre as células V-79 (IC_{50V79}) para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃ varia entre 646 a 930 μmol L⁻¹ ^[158]. A metade da dose letal (LD₅₀) para o complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ é 257,5 μmol kg⁻¹, sendo, portanto, 17 vezes menos tóxico *in vivo* que o SNP (LD₅₀ = 15 μmol kg⁻¹) (Tabela 1) ^[159]. Além disso, de acordo com o teste *up-and-down* realizado com o [Ru(NO)(Hedta)], nenhuma morte foi observada para camundongos tratados com doses de até 90 μmol kg⁻¹ ^[160].

Por outro lado, nenhum valor de toxicidade aguda *in vivo* para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃](PF₆)₃

havia sido determinados. Assim, antes dos estudos *in vivo*, decidiu-se avaliar a toxicidade aguda *in vivo* para estes complexos objetivando orientar a administração de doses para os animais conforme determinações do parecer de ética 004/2007 (FMRP – USP).

5.1.5 Determinação da toxicidade aguda *in vivo* para os complexos *trans*-

[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆

Usando o método *up-and-down* ^[190], alternativo ao convencional protocolo utilizado para determinar doses letais (LD₅₀), a toxicidade aguda para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ foi avaliada. Os animais tratados intraperitonealmente com a dose de 125 µmol kg⁻¹ para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ ou 250 µmol kg⁻¹ para os complexos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ não apresentaram qualquer sintoma de toxicidade aguda, quando acompanhados por até sete dias. Porém, quando doses de 200 µmol kg⁻¹ para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ ou 350 µmol kg⁻¹ para os complexos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ foram administradas, hiperventilação, tremores e sintomas de sede foram observados. Quando os animais foram tratados com a dose de 250 µmol kg⁻¹ para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ ou 500 µmol kg⁻¹ para os complexos *cis*-

[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ os camundongos morreram entre o segundo e o quarto dia. Portanto, é razoável assumir que os reais valores de LD₅₀ para os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃ e *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃ estejam entre 125 e 250 μmol kg⁻¹, enquanto que para os complexos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ estejam entre 250 e 500 μmol kg⁻¹. Considerando estes valores e tomando como base o método de classificação de toxicidade aguda (Acute Toxic Class, ATC) ^[200], todos estes complexos podem ser alocados na classe 3 para toxicidade aguda, ou seja, compostos com moderada toxicidade.

5.1.6 Experimentos *in vivo* (modelos agudos de infecção)

À luz do observado acima e considerando as justificativas levantadas no item 5.1.4, os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄py](BF₄)₃, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄isn](BF₄)₃, *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂imN](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ foram então administrados *in vivo* em diversos protocolos quimioterápicos de infecção aguda. De agora em diante, para simplicidade, estes complexos serão denominados como *t*-Ru(NO)imN, *t*-Ru(NO)py, *t*-Ru(NO)isn, *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃, respectivamente.

No primeiro protocolo, os animais foram inoculados com 1,0 x 10³ tripomastigotas por camundongo e tratados com doses diárias únicas de cada complexo durante 15 dias consecutivos. Neste protocolo, todas as doses foram injetadas oralmente em 100 μL de PBS, iniciando-se com a dose de 100 nmol kg⁻¹ dia⁻¹, a qual, de acordo com resultados anteriormente publicados ^[159, 201], não exibiu efeitos vasodilatador significativo. De fato, camundongos hipertensos tratados com a dose de 100 nmol kg⁻¹ do complexo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄P(OEt)₃](PF₆)₃ apresenta efeito vasorelaxante abrupto somente nos primeiros 15 minutos ^[159]. Ainda, anéis de aorta sem endotélio, pré-contraídos com

noradrenalina ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e tratados com o $t\text{-Ru(NO)imN}$ na concentração de $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ não exibiram efeitos de vasodilatação nos primeiros 15 minutos e após uma hora seu efeito foi de apenas 12 % ^[201]. Portanto, é razoável assumir que doses de até $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ (150 nmol kg^{-1}) de cada complexo não causem efeitos de relaxação significativos ^[201, 202]. De acordo com a Figura 6a os animais tratados com os complexos $t\text{-Ru(NO)imN}$, $t\text{-Ru(NO)py}$, $t\text{-Ru(NO)isn}$, $c\text{-Ru(NO)imN}$ e $c\text{-Ru(NO)SO}_3$ na dose 100 nmol kg^{-1} apresentaram menores níveis de parasitemia, com diminuição de 40-60% do pico parasitêmico, com relação ao grupo não tratado ou mesmo o grupo tratado com o Bz na mesma dose ($100 \text{ nmol kg}^{-1} = 26 \mu\text{g kg}^{-1}$). Como consequência, 40-60 % dos animais tratados sobreviveram por mais de 60 dias (Figura 6b). O complexo $t\text{-Ru(NO)py}$, apesar de ter apresentado uma boa atividade contra tripomastigotas *in vitro* e *in vivo*, não foi usado nos demais experimentos *in vivo* devido às similaridades apresentadas em seus valores de $k_{\text{NO}} = 6,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $E_{(\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+)} = 0,012 \text{ V vs. ENH}$) e atividades tripanocida *in vitro* e *in vivo* ($\text{IC}_{50\text{tri}} = 75 \mu\text{mol L}^{-1}$ e % de sobrevida = 60%) considerando o complexo $t\text{-Ru(NO)isn}$ ($k_{\text{NO}} = 4,3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $E_{\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+} = 0,052 \text{ V vs. ENH}$, $\text{IC}_{50\text{tri}} = 77 \mu\text{mol L}^{-1}$ e % de sobrevida = 60%). Neste ponto, é importante lembrar que uma tendência de correlação entre a atividade e o potencial de redução $E_{(\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^0/\text{Ru}^{\text{II}}\text{NO}^+)}$ foi observado (Tabela 5), justificando assim a exclusão do complexo $t\text{-Ru(NO)py}$ dos demais experimentos *in vivo*.

No segundo protocolo os complexos $t\text{-Ru(NO)isn}$ e $t\text{-Ru(NO)imN}$, os quais exibem diferentes valores de $E_{\text{NO}^+/ \text{NO}^0}$ e k_{NO} , foram testados *in vivo* usando diferentes doses. Neste modelo, as doses de 10, 50, 100, 400, 1000 e 3000 nmol kg^{-1} de cada complexo foram administradas por rota intraperitoneal durante 15 dias consecutivos. Estes dois compostos foram capazes de reduzir a parasitemia durante todo o curso da infecção. Como um exemplo, a Figura 7 mostra os dados somente no pico de parasitemia (11º dia após

infecção). De acordo com estes dados, a parasitemia foi reduzida quando os complexos foram administrados em concentrações da ordem de nanomolar, com dose ideal próxima a 400 nmol kg^{-1} . Por outro lado, em concentrações acima de $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, ambos os complexos *t*-Ru(NO)isn e *t*-Ru(NO)imN exibiram um efeito oposto aumentando em algumas doses (e.g.: $3000 \text{ nmol kg}^{-1}$) o número de parasitas por mililitro de sangue com relação àqueles tratados somente com PBS. Como consequência, as porcentagens final de sobrevivência depois de 60 dias variaram entre 0 e 100% para ambos os complexos estudados (Figura 8). A partir dos dados desta Figura, foram calculados as doses efetiva média (ED_{50}) para os complexos *t*-Ru(NO)isn e *t*-Ru(NO)imN, os quais apresentaram os valores de 86 e 190 nmol kg^{-1} , respectivamente. Adicionalmente, camundongos infectados e tratados com a dose de 400 nmol kg^{-1} ($104 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) de Bz não exibiram qualquer efeito de proteção contra morte (dados não apresentados).

Figura 6. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com os complexos *t*-Ru(NO)isn, *t*-Ru(NO)py, *t*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)imN ou *c*-Ru(NO)SO₃. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas por camundongo) e tratados por via oral com a dose de 100 nmol de *t*-Ru(NO)isn (∇), *t*-Ru(NO)py ($\bullet$), *t*-Ru(NO)imN ($\triangle$), *c*-Ru(NO)imN ($\blacksquare$) ou *c*-Ru(NO)imN ($*$) por quilograma de massa corpórea durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de camundongos infectados recebeu somente PBS ($\blacksquare$) ou Bz na dose de 100 nmol kg^{-1} ($\blacklozenge$). Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 10$. As setas indicam o período de tratamento.

Figura 7. Níveis de parasitemia no pico parasitêmico (11^o dia após a infecção) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com o complexo *t*-Ru(NO)isn ou *t*-Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas por camundongo) e tratados por via intraperitoneal com diferentes doses de (10, 50, 100, 400, 1000 e 3000 nmol kg⁻¹) de cada complexo durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de camundongos recebeu somente PBS (controle). Os níveis de parasitemia para o *t*-Ru(NO)isn são mostrados em (a) e para o *t*-Ru(NO)imN em (b). Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6.

Figura 8. Curvas de sobrevivência de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com o *t*-Ru(NO)isn ou *t*-Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ tripomastigotas por camundongo) e tratados intraperitonealmente com doses de 10 (a), 50 (b), 100 (c), 400 (d), 1000 (e) e 3000 nmol kg⁻¹ (f) de *t*-Ru(NO)isn (♦) ou Ru(NO)imN (▲). Um outro grupo de animais recebeu somente PBS (controle, ■). Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, n = 6.

Este efeito antagônico do NO, ora controlando a infecção por *T. cruzi in vivo* ora ajudando o parasito a replicar, pode a princípio soar contraditório. Entretanto, conforme anteriormente mencionado ^[70], as propriedades físico-químicas peculiares do NO lhe conferem habilidades que ao mesmo tempo podem ser benéficas ou deletérias. Tem sido reportado que a produção endógena de NO exerce efeitos citostáticos e citotóxicos para o *T. cruzi* ^[203]. Contudo, esta produção requer um rígido controle de sua concentração *in vivo* de forma a limitar os danos citotóxicos causados às células do hospedeiro, uma vez que o NO livre tem múltiplas funções, além de ser muito pouco específico ^[81, 94]. Frequentemente, os efeitos de proteção e os efeitos tóxicos do NO são observados durante as infecções causadas por parasitos tais como o *T. cruzi* e *T. brucei* ^[203, 204]. Quando as formas tripomastigotas invadem o citosol de macrófagos elas se transformam em amastigotas e sobre estas circunstâncias a infecção dispara uma moderada produção de interleucina-12 (IL-12) ^[205, 206] e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) ^[101]. Estas citocinas levam à síntese de interferon gama (INF- γ) ^[101, 205] e conseqüentemente à ativação da iNOS ^[207]. Desta forma, NO é sintetizado e sua produção tem sido atribuída como responsável pela atividade tripanocida de macrófagos ativados ^[71]. Contudo, nesta fase da infecção o parasito também dispara a produção do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) ^[208] e interleucina-10 (IL-10) os quais são reguladores negativos da produção de NO e assim inibem a ativação de macrófagos outrora ativados por INF- γ ^[207]. Além disso, a produção de TGF- β , a qual tem sido descrita como uma importante resposta inflamatória, geralmente agrava a infecção promovida pelo *T. cruzi* ^[209]. Adicionalmente, tem sido reportado que a produção desregulada de NO durante a fase aguda da infecção chagásica também desempenha importante papel que facilita a evasão do parasito do sistema imunológico hospedeiro ^[45]. Por fim, o NO também pode suprimir a

resposta imunológica hospedeira através da indução de apoptose das células T ^[210] (Figura 9). Portanto, estas evidências experimentais dão suporte à idéia de que a modulação da produção de NO *in vivo* pode controlar a infecção causada pelo *T. cruzi* ^[71] e assim dão suporte à interpretação dos resultados deste trabalho.

Figura 9. Regulação da produção de NO produzido por macrófagos infectados com o *T. cruzi*. A infecção de macrófagos por *T. cruzi* pode resultar na produção de quimiocinas e IL-12. Esta última induz a produção de INF- γ e TNF- α pelas células NK. Adicionalmente, IL-12 favorece a diferenciação das células Th1, resultando na produção de INF- γ adicional. Juntos, INF- γ e TNF- α induz a ativação da iNOS e a produção de NO por macrófagos ativados, mediando a morte do *T. cruzi*, mas também modulando a resposta imune através da apoptose de células T. Por outro lado, a infecção de macrófagos por *T. cruzi* também pode resultar na produção de TGF- β , o qual é um regulador negativo da ativação de macrófagos e da produção de NO. Por fim, a produção de NO também pode ser indiretamente inibida pela produção da citocina IL-10, a qual é produzida na diferenciação de células Th2. Linhas contínuas = indução, linhas pontilhadas = inibição [225].

Diante destes fatos, resolveu-se explorar um terceiro e quarto protocolos, nos quais os complexos *t*-Ru(NO)imN, *t*-Ru(NO)isn, *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ foram administrados em doses abaixo de 400 nmol kg⁻¹ para evitar possíveis efeitos indesejáveis causados por um excesso de NO livre. No terceiro modelo, os animais foram inoculados com 1,0 x 10³ parasitos por animal e tratados intraperitonealmente com as doses de 100 nmol kg⁻¹ de *t*-Ru(NO)imN (52,8 µg kg⁻¹), *t*-Ru(NO)isn (58,2 µg kg⁻¹), *c*-Ru(NO)imN (94,6 µg kg⁻¹) e *c*-Ru(NO)SO₃ (66,8 µg kg⁻¹) durante 15 dias consecutivos. Como ilustrado na Figura 10, os animais tratados por esta via também exibiram parasitemia aproximadamente 40% inferior àquela do grupo tratado somente com PBS. Além disso, 60% dos animais tratados com o *t*-Ru(NO)isn e 40% daqueles tratados com o *t*-Ru(NO)imN sobreviveram pelo menos 120 dias.

Em experimentos similares, os camundongos infectados foram tratados com os compostos *t*-Ru(NO)isn e *t*-Ru(NO)imN e os animais sobreviventes dos grupos tratado e não tratados foram eutanizados no 15º dia após a infecção e seus corações foram analisados por H&E. A análise histológica do tecido miocárdio revelou que os corações do grupo controle (tratado somente com PBS) apresentam diversos ninhos de amastigotas, enquanto que nenhum ninho foi observado nos corações dos animais tratados com os complexos *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)isn (Figura 11). Além disso, estas fotomicrografias revelaram que a quimioterapia com estes compostos reduz a ocorrência de miocardite, uma vez que, principalmente para o composto *t*-Ru(NO)imN, o número de células inflamatórias foi menor que a observada para o grupo controle.

Figura 10. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com os complexos Ru(NO)isn ou Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com doses de 100 nmol de *t*-Ru(NO)isn (▲) ou *t*-Ru(NO)imN (◆) por quilograma de massa corpórea durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de camundongos recebeu somente PBS (■). Os dados são representativos de três experimentos diferentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento. Um outro grupo de animais foi tratado com Bz na dose de 100 nmol kg^{-1} ($26 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), mas nenhum efeitos de proteção contra morte foi observado (dados não mostrados)

Figura 11. Histologias de seções dos corações de camundongos infectados com o *T. cruzi* ($1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com (A) PBS, (B) *t*-Ru(NO)isn ou (C) *t*-Ru(NO)imN durante 15 dias consecutivos ou (D) camundongos não infectados. No 15º dia após a infecção, os animais foram eutanizados e seus corações processados para a análise de H&E. Note a intensidade do processo inflamatório com células mononucleares e necrose na seção A, mas não nas seções C ou D. As setas pretas indicam os ninhos de amastigotas e as azuis indicam o infiltrado inflamatório. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Ainda neste terceiro protocolo, outros grupos de animais semelhantemente infectados foram tratados oralmente com doses diárias de 385 nmol kg^{-1} durante 15 dias consecutivos com os compostos *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃. Esta dose está mil vezes abaixo da dose usada para o Bz ($100 \text{ mg kg}^{-1} = 385 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$) para tratar pacientes infetados. Neste experimento o Bz e o *t*-Ru(NO)imN foram usados como compostos de referência. A Figura 12 mostra que os complexos *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ também foram capazes de controlar a parasitemia, porém não tão eficientemente quanto o *c*-Ru(NO)imN. Enquanto que os nitrosilos *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ reduziram o pico parasitêmico em 35-50%, o *c*-Ru(NO)imN reduziu em 80%. Como consequência, 33% dos animais tratados com o *c*-Ru(NO)SO₃, 67% dos animais tratados com o *c*-Ru(NO)imN e 100% dos animais tratados com o *c*-Ru(NO)imN sobreviveram à infecção aguda por um período superior a 35 dias. Novamente, num experimento similar, os camundongos infectados foram tratados com os nitrosilos *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ e aqueles sobreviventes dos grupos tratado e não tratados foram eutanizados no 15º dia após a infecção e seus corações analisados por H&E. Os resultados desta análise mostraram que os corações do grupo tratado somente com PBS apresentam diversos ninhos de amastigotas, fato este não observado nos corações dos animais tratados com os nitrosilos (Figura 13). Além disso, os camundongos tratados com os compostos Bz, *t*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ apresentaram 55, 49, 42 e 35% menor inflamação que os animais do grupo infectado e não tratado (Figura 14). Assim, através da análise histológica neste e nos experimentos com os complexos *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)isn, torna-se evidente que a quimioterapia com os complexos nitrosilo é capaz de eliminar as formas intracelulares do *T. cruzi* no tecido miocárdio quando os complexos são administrados por via oral ou intraperitoneal. De fato, mesmo o nitrosilo *c*-Ru(NO)SO₃, o qual reduziu a

parasitemia no pico em 35% garantido a sobrevivência de apenas 33% dos animais infectados, foi capaz de eliminar os ninhos de amastigotas dos corações dos animais infectados e reduzir o processo inflamatório neste órgão em 35% (Figura 14).

Figura 12. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Balb/c infectados com o *T. cruzi* e tratados com o *c*-Ru(NO)imN (▼), *c*-Ru(NO)SO₃ (▲), *t*-Ru(NO)imN (●) ou não tratados (controle, ■). Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com cada composto na dose de 385 nmol kg^{-1} durante 15 dias consecutivos. Um outro grupo de animais infectados foi tratado com o Bz (◆) na mesma dose. Os complexos nitrosilo foram administrados neste experimento por via oral em $100 \mu\text{l}$ de PBS enquanto que o Bz em $200 \mu\text{l}$ de PBS. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento.

Figura 13. Histologias de seções do tecido miocárdio de camundongos infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com (A) PBS ou com (B) *c*-Ru(NO)imN, (C) *c*-Ru(NO)SO₃ ou (D) *t*-Ru(NO)imN na dose de 385 nmol kg^{-1} durante 15 dias consecutivos. No 15º dia após a infecção, os camundongos foram eutanizados e seus corações processados para a análise de H&E. Note a intensidade do processo inflamatório como células mononucleares e necrose na seção A, mas não nas seções B, C ou D. As setas indicam os ninhos de amastigotas e os círculos o processo inflamatório. As fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Figura 14. Processo inflamatório quantificado através da contagem do número de núcleos no tecido miocárdio de camundongos Balb/c infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com PBS (controle) ou com os compostos, Bz, *t*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)SO₃ na dose de 385 nmol kg^{-1} durante 15 dias consecutivos. No 15º dia após a infecção, os camundongos foram sacrificados e seus corações processados para a análise de H&E. As fotomicrografias foram então analisadas usando o programa ImaginJ através da contagem de núcleos em $50 \mu\text{m}^2$ de tecido miocárdio. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. $n = 6$.

Freqüentemente, na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, uma intensa miocardite é detectada ^[211]. Tem sido observado que os cardiomiócitos produzem NO em resposta ao estímulo por TNF- α , interleucina-1 β e expressão da iNOS ^[207]. Além disso, tais citocinas têm sido observadas nos corações de ratos infectados com o *T. cruzi* ^[212]. Desta forma, estas evidências são indicativas de que a produção endógena de NO é essencial não somente para inibir o desenvolvimento do parasito no tecido miocárdio, mas também para controlar a cardiomiopatia típica da doença de Chagas. Assim, o fato dos complexos *t*-Ru(NO)isn, *t*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ serem eficientes na eliminação de amastigotas no tecido miocárdio, bem como na diminuição da inflamação *in vivo* é uma forte evidência das propriedades anti-chagásicas destes complexos.

Para certificar que estes complexos são capazes de eliminar formas intracelulares do *T. cruzi*, experimentos foram conduzidos com células Vero infectadas com amastigotas. Nestes experimentos, os complexos *t*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)imN foram incubados na concentração de 1 mmol L⁻¹ (24 horas, t = 37 °C) na presença das células infectadas e livre de tripomastigotas e Bz foi usado como composto de referência. De acordo com a Figura 15, tais complexos são capazes de reduzir o número de células infectadas, bem como eliminar as formas intracelulares do *T. cruzi*. Também, através da Figura 16, pode-se observar que os complexos *t*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)imN são capazes de reduzir a infecção de células Vero em 45 e 73%, respectivamente, enquanto que o Bz reduz a mesma infecção em 75%.

Figura 15. Células Vero infectadas com o *T. cruzi*. As células foram cultivadas em meio DMEM, infectadas com tripomastigotas e lavadas com PBS. As culturas foram então incubadas por 24 h ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) sem adição de qualquer composto (A) ou na presença dos compostos Bz (B), *c*-Ru(NO)imN (C) ou *t*-Ru(NO)imN (D) todos na concentração de 1 mmol L^{-1} . Em seguida foram coradas e analisadas em microscópio eletrônico. As setas indicam as amastigotas viáveis dentro das células (seta azul = núcleo, seta verde = citoplasma). Note a vacuolização e a ausência de parasitos viáveis no interior das células. As fotomicrografias são representativas de 2 experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 400x.

Figura 16. Porcentagem de células Vero infectadas com amastigotas e tratadas com os compostos Bz, *t*-Ru(NO)imN ou *c*-Ru(NO)imN na concentração de 1 mmol L⁻¹ ou não tratadas (controle). Quantificação feita a partir dos dados da Figura 15.

Tem sido reportado que captadores de NO tais como o K[Ru(Hedta)Cl] apresentam dificuldades para cruzar membranas celulares ^[213]. Contudo, ainda que os nitrosilos aqui estudados possam encontrar dificuldades para cruzar estas membranas devido à sua carga, o NO liberado extracelularmente pode fazê-lo facilmente explicando os resultados obtidos através da análise histológica por H&E. De fato, a difusão celular do NO em meio biológico, bem como seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$) também são importantes fatores a serem considerados para melhor entender sua atividade tripanocida. A constante de difusão desta molécula calculada através da lei de Stokes é $D = 3,36 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ a 37 °C ^[77], e está em bom acordo com o valor calculado em água; $D = 3,30 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ^[78] e no cérebro; $D = 3,81 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ^[79]. Portanto, o valor de $D = 3,5 \pm 0,3 \times 10^3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ é uma boa estimativa para a difusão do NO na corrente sanguínea, meio no qual foram conduzidos a maioria dos experimentos

descritos neste trabalho. Embora, tenha sido reportado que a meia vida do NO na presença de células vermelhas é inferior a 1 segundo ^[70], ainda assim, é razoável supor que 50% das moléculas sobrevivam tempo suficiente para percorrer uma distância de até 65 mm³ dentro de suas primeiras meia vida ^[70]. Desta forma, é provável que as moléculas de NO liberadas pelos nitrosilos estudados neste trabalho não atuem somente no local onde o NO é liberado, mas atuem também a uma considerável distância deste.

Infecções parasitárias tais como as causadas pelo *T. cruzi* são geralmente acompanhadas por um excesso da produção de íons $O_2^{\bullet-}$ ^[214]. Os íons superóxido são produtos normais do metabolismo celular aeróbico, sendo produzido principalmente pela enzima xantine oxidase ^[215] ou através da autooxidação de agentes redutores comuns em meio biológico como é o caso do ascorbato, NADH, e GSH ^[216]. Ainda, quando o *T. cruzi* invade macrófagos, as células do sistema imune hospedeiro são acionadas e nestas células estão presentes enzimas do tipo NADPH oxidase ^[217]. Tais enzimas, sob estímulos apropriados, também disparam a produção de íons $O_2^{\bullet-}$ num processo conhecido como explosão respiratória ^[218]. Adicionalmente, a ativação de macrófagos, a qual é uma etapa chave do mecanismo de defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi* ^[204, 207, 210], dispara a produção de $INF-\gamma$ que em sinergismo com $TNF\alpha$ e interleucinas ativa a produção de NO e $O_2^{\bullet-}$ ^[204, 214]. Depois de formado, os íons $O_2^{\bullet-}$ podem reagir com alvos biomoleculares ou dismutar espontânea ou enzimaticamente a H_2O_2 ^[70]. Uma vez que a reatividade do íon superóxido é lenta, comparada com outros radicais de interesse biológico ^[70], em condições onde a concentração de NO está em excesso os íons $O_2^{\bullet-}$ podem reagir com o NO formado o $ONOO^-$ ^[219]. De fato, íons $O_2^{\bullet-}$ e NO reagem rapidamente à temperatura e pH fisiológicos ($k = 3,7 \times 10^7 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^[220] formando íons $ONOO^-$ os quais têm sido detectados em diversas células, inclusive macrófagos ativados ^[221]. Em pH fisiológico, o peroxinitrito está

protonado ($pK_a = 6,8$) ^[222] e decai rapidamente para formar os radicais $\cdot OH$ e $\cdot NO_2$ (equação 12), os quais são fortes agentes oxidantes.

Tem sido reportado ^[223] que a tanto o $ONOO^-$ quanto seus produtos de decomposição em pH fisiológico ($\cdot OH$ e $\cdot NO_2$) são tóxicos para o *T. cruzi* e também capazes de lisar formas epimastigotas *in vitro* (Figura 17). O $ONOO^-$ é capaz de oxidar proteínas com grupos sulfidril, tais como a tripanotona, sem a participação de metais de transição ^[223, 224]. Assim, além da toxicidade direta do NO sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas relatadas neste trabalho, uma outra possível ação do NO seria através da formação de peroxinitrito, conforme esquema ilustrado na Figura 17.

Figura 17. Esquema proposto para os eventos seguidos à fagocitose do *T. cruzi* por macrófagos ativados, bem como pela ação do NO produzido endogenamente ou liberado pelos complexos nitrosilo estudados neste trabalho. O esquema foi baseado na proposta feita por Denicola e colaboradores ^[223] para a ação do ONOO^- sobre epimastigotas.

Adicionalmente, tem sido reportado que o principal mecanismo de defesa do *T. cruzi* contra o estresse oxidativo são os tióis tripanotiona, (T(SH)₂); glutathiona (GSH); homotripanotiona (hT(SH)₂) e ovotiol imCSH (Figura 18), exclusivos de organismos tripanosomatídeos [45, 225]. Tal hipótese é baseada no fato de que nenhuma catalase ou glutathiona peroxidase tem sido encontrada no parasito e a atividade da superóxido dismutase (SOD) é muito reduzida [226]. Além disso, não existe nenhuma evidência publicada da existência de α -tocoferol ou β -caroteno no *T. cruzi*, ao contrário das células mamárias, as quais se defendem eficientemente sozinhas de radicais livres através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos [227]. Desta forma, é possível depreciar de 80 a 90% da síntese de GSH em células mamárias sem causar efeitos deletérios para estas células [45], o que não ocorre no *T. cruzi*, sendo o parasito deficiente de mecanismos de defesa contra radicais livres quando comparado com as células mamárias [45]. Assim, uma vez reduzido os níveis de tióis do *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, o parasito estaria altamente susceptível aos efeitos de radicais livres tais como o NO e ONOO⁻ [223, 225]. Foi observado [228, 229] que tanto os nitrosilos *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)isn quanto os *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃ oxidam tióis, através de um mecanismo dependente de NO. No caso dos complexos *c*-Ru(NO)imN e *c*-Ru(NO)SO₃, glutathiona tem sido oxidada seguida da liberação de NO, enquanto que para os complexos *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)isn há a formação de espécies mais estáveis. Portanto, uma vez que estes complexos reagem eficientemente com tióis tais como glutathiona e cisteína e glutathiona é o precursor das sínteses de tripanotiona e homotripanotiona, é razoável supor que um dos possíveis mecanismos de ação destes compostos seria interferindo no metabolismo de tióis do parasito. Além disso, os complexos *trans*-[Ru(NH₃)₄L(SO₄)]⁺ and *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄P(OEt)₃]²⁺ os quais não apresentaram atividades tripanocida ou anti-

proliferativa reagem com tióis, mas não são capazes de liberar radicais ou gerar estresse oxidativo.

Figura 18. Estruturas dos tióis exclusivos de tripanosomatídeos. Tripanotiona, T(SH)₂ (a), homotripanotiona, hT(SH)₂ (b), glutathione, GSH (c) e ovotiol, imCSH (d).

Para propósitos de comparação e objetivando aumentar o tempo de sobrevida dos animais controle, um quarto e último protocolo experimental agudo foi estudado usando os complexos *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)isn. Neste caso, a administração dos complexos foi dividida em três tratamentos diferentes, os quais podem ser resumidos conforme descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Cronograma de tratamento, de monitoração da parasitemia e da infecção de camundongos Swiss tratados com os complexos *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)isn

Experimento	Infecção ^a	Tratamento ^b	Parasitemia
Grupo controle	$1,0 \times 10^2$	15 dias consecutivos com PBS	5º, 10º e 15º dias
Grupo 1	$1,0 \times 10^2$	15 dias consecutivos com <i>t</i> -Ru(NO)imN e <i>t</i> -Ru(NO)isn	5º, 10º e 15º dias
Grupo 2	$1,0 \times 10^2$	Somente nos dias* 5, 6 e 7 com o <i>t</i> -Ru(NO)imN e o <i>t</i> -Ru(NO)isn	10º dia
Grupo 3	$1,0 \times 10^2$	Somente nos dias ^c -1, 3, 6 e 9 com o <i>t</i> -Ru(NO)imN e <i>t</i> -Ru(NO)isn	10º dia

^aEm unidades de tripomastigotas por camundongo;

^bPor via intraperitoneal. Doses de $100 \text{ nmol kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$;

^cDias críticos que precedem o pico de parasitemia.

De acordo com a Figura 19, a porcentagem de sobrevida do grupo infectado com $1,0 \times 10^2$ parasitos por camundongo e tratado com doses diárias de 100 nmol kg^{-1} do complexo *t*-Ru(NO)imN durante 15 dias consecutivos (grupo 1) foi similar à sobrevida do grupo tratado somente nos três dias que precedem o pico parasitêmico (grupo 2). Esta sobrevida foi 80% por período de até 60 dias (Figura 19a e b). Contudo, quando o tratamento foi conduzido com o complexo *t*-Ru(NO)isn na mesma dose, a sobrevida foi 66% para o grupo 1 e 80% para o grupo 2 (Figuras 19a e b). Por outro lado, a sobrevida dos animais tratados de acordo com o protocolo descrito para o grupo 3, foi 50% para o complexo *t*-Ru(NO)imN e 66% para complexo o *t*-Ru(NO)isn (Figura 19c).

Figura 19. Curvas de sobrevivência de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com o *t*-Ru(NO)isn ou *t*-Ru(NO)imN. Os animais foram infectados com o *T. cruzi* (cepa Y, $1,0 \times 10^2$ parasitos por animal) e tratados com doses de 100 nmol de *t*-Ru(NO)imN (♦) ou *t*-Ru(NO)isn (▲) por kg de massa corpórea seguindo o protocolo descrito na Tabela 6. a) grupo 1, b) grupo 2 e c) grupo 3. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento.

5.1.7 Inibição da gGAPDH

Conforme anteriormente comentado e diferentemente das células mamárias, formas tripomastigotas são altamente dependentes da via glicolítica como fonte de energia através da síntese de ATP ^[103, 116]. Assim, as enzimas glicolíticas são alvos interessantes para o desenvolvimento de novas drogas para a tripanossomíase Americana e Africana ^[103]. Uma destas enzimas, a gGAPDH, exibe sítios potencialmente interessantes comparada com a homóloga humana, e desta forma o desenvolvimento de inibidores da gGAPDH têm sido levado à cabo ^[103]. O fragmento Cys¹⁶⁶ do sítio ativo da enzima gGAPDH é o resíduo mais ativo ^[116] e assim é um alvo seletivo para reações enzimáticas com doadores de NO ^[118, 119] (Figura 3). Objetivando avaliar um dos possíveis mecanismos de ação dos complexos nitrosilo estudados neste trabalhos, diversos experimentos de inibição da gGAPDH foram realizados.

Os primeiros ensaios foram realizados com os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]X_n, L = N-heterocíclicos, H₂O, SO₃²⁻ ou P(OEt)₃, e X = PF₆⁻, BF₄⁻ ou Cl⁻, com os seus precursores *trans*-[Ru(L₁)(NH₃)₄L₂]ⁿ⁺ L₁ = N-heterocíclicos, H₂O, SO₃²⁻ ou P(OEt)₃, e L₂ = Cl⁻, SO₄²⁻ ou H₂O e com o RuBz. Todavia, nenhum destes complexos mostrou inibição enzimática maior que 40% em concentrações de até 320 µmol L⁻¹, nem mesmo na presença de agentes redutores tais como cisteína ou ácido ascórbico. Por outro lado, os complexos *c*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)SO₃ e *c*-Ru(NO)1-miN exibiram atividade inibitória de 85-97% a uma concentração de 260 µmol L⁻¹. A Figura 20 ilustra uma curva dose-resposta típica para o complexo *c*-Ru(NO)imN. De acordo com os dados extraídos destas curvas, as concentrações que inibem 50% da atividade catalítica da gGAPDH (IC_{50gGAPDH}) são 89, 97 e 153 µmol L⁻¹ para os complexos *c*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)1-miN e *c*-Ru(NO)SO₃, respectivamente. Além disso, os complexos precursores *cis*-

[Ru(bpy)₂(H₂O)SO₃], *cis*-Na[Ru(bpy)₂(NO₂)SO₃], *cis*-[Ru(bpy)₂imN(NO₂)]PF₆ e *cis*-[Ru(bpy)₂(H₂O)imN](PF₆)₂, os quais não são capazes de liberar NO, inibiram a atividade catalítica da gGAPDH em apenas 5% a 320 μmol L⁻¹. De forma ainda mais interessante, o isômero *trans*-[Ru(NO)(bpy)₂SO₃]PF₆ bem como a tetraamina *cis*-[Ru(NO)(NH₃)₄NO₂]Cl₂ não exibiram qualquer atividade inibidora. Estes dados sugerem que a posição *cis* dos ligantes bipyridínicos, bem como a molécula de NO coordenada podem desempenhar papel essencial nos mecanismos de ação sobre a gGAPDH. É conhecido que tanto o NO quanto o ONOO⁻ são capazes de oxidar a cisteína no sítio ativo da GAPDH de diversos mamíferos [118, 119]. De fato, experimentos preliminares, têm sugerido que a inibição da atividade catalítica da gGAPDH ocorre em mais de uma etapa e provavelmente através da nitrosilação do cisteína, uma vez que uma banda característica na região do visível tem sido observada [118]. Ainda, estudos teóricos, têm apontado para uma possível interação dos ligantes bipyridínicos com o sítio ativo, direcionando os grupos nitrosilo dos complexos *c*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)1-miN e *c*-Ru(NO)SO₃ para o sítio Cys¹⁶⁶. Adicionalmente, é provável que o aquo complexo formado após dissociação do NO coordene-se ao fragmento His¹⁹⁴ do sítio ativo (Figura 3), proporcionando adicional inibição da gGAPDH.

Figura 20. Curva dose resposta para a inibição da atividade catalítica da gGAPDH de *T. cruzi*. Inibidor = *c*-Ru(NO)imN

5.2 Tetraaminas como transportadoras de benznidazol e sua ação sobre o *T. cruzi*

5.2.1 Síntese do complexo RuBz

As primeiras tentativas de coordenação do Bz em complexos de rutênio foram realizadas com o íon complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$. Contudo, conforme previsto pelos potenciais de oxidação da espécie $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ [230] e o potencial de redução do grupo nitro do ligante Bz [231], uma reação redox indesejada ocorreu levando a redução do ligante e a oxidação do centro metálico.

Boa parte da reatividade química dos compostos de rutênio tem sido atribuída à sua habilidade de formar compostos robustos com ligantes insaturados através da formação de ligações π com o centro de rutênio [161, Erro! Indicador não definido., 232]. Devido a acidez π do átomo de enxofre nos ligantes SO_2 , HSO_3^- e SO_3^{2-} , o centro metálico no íon complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4\text{S}(\text{IV})]^{2+/+0}$, $\text{S}(\text{IV}) = \text{SO}_2$, HSO_3^- ou SO_3^{2-} torna-se mais estável com respeito à oxidação [161, 175] quando comparado ao íon complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$. É bem conhecido que pela substituição do ligante NH_3 axial por $\text{S}(\text{IV})$ na espécie $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ obtém-se o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{S}(\text{IV})\text{L}]$, o qual é uma espécie mais robusta e um agente redutor mais fraco que o íon complexo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5]^{2+}$ [161, 162, 232]. Além disso, o efeito- e a influência-*trans* labilizante do ligante $\text{S}(\text{IV})$ aumenta a labilidade do ligante H_2O *trans*-posicionado na espécie *trans*- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2]^{2+}$ facilitando sua substituição e a entrada de ligantes N-heterocíclicos tais como o Bz [233]. Adicionalmente o efeito *cis*-deslabilizante do ligante SO_2 , deixa os ligantes NH_3 ainda mais inertes com respeito às reações de substituição [161, 234]. Uma vez que o Bz é praticamente insolúvel em água, a reação entre o Bz e o íon complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2]^{2+}$ foi feita em acetona, originando como produto o complexo *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2 \cdot \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$

(Figura 21). Este complexo foi caracterizado por técnicas espectroscópicas (UV-vis, Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C), ciclovotametrias (CV) e termogravimetrias (TG e DSC). O rendimento da síntese foi sempre melhor que 55%.

Figura 21. Esquema de síntese para o íon complexo RuBz ^[161, 175].

5.2.2 Análise estrutural

Não foi possível obter até o presente momento um bom cristal do complexo RuBz para um estudo por difração de raios-X. Assim, uma análise estrutural foi realizada usando-se a base LANL2DZ^[176, 177] e métodos DFT^[176]. Com o objetivo de certificar a eficiência da base LANL2DZ, uma análise dos comprimentos e ângulos de ligações foram realizados para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl e comparados com sua estrutura de raios-X^[235]. Conforme pode ser visto na Tabela 8, uma boa correlação entre dados teóricos e de difração de raios-X foi observado. Em seguida, uma estrutura foi otimizada para os compostos RuBz e Bz (Figura 22) e os comprimentos e ângulos de ligação foram analisados. Os cálculos obtidos para o complexo RuBz foram comparados com os dados da estrutura de raios-X para o complexo similar *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl^[175]. A Tabela 8 mostra as distâncias interatômicas para as ligações Ru-NH₃, Ru-N(Bz) e Ru-S(IV) bem como os ângulos de ligação H₃-N-Ru-NH₃, N(Bz)-Ru-S(IV) e O-S-O quando S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻. Os principais resultados da análise estrutural podem ser assim resumidos: primeiro, as distâncias interatômicas para as ligações Ru-N das amônias equatoriais não mudam significativamente quando S(IV) = SO₂ (2,182 Å), HSO₃⁻ (2,194 Å) ou SO₃²⁻ (2,201 Å). Quando comparamos os comprimentos da ligação Ru-N(Bz), observa-se que estes variam de 2,151, 2,106, 2,072 Å para S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻, respectivamente. Assim, um fortalecimento da ligação Ru-N(Bz) é observado na sequência S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻, respectivamente. Estes dados de distância de ligação Ru-N(Bz) estão coerentes com o esperado enfraquecimento da ligação Ru-S quando S(IV) = SO₂, HSO₃⁻ ou SO₃²⁻, respectivamente, refletindo o caráter bifílico do ligante S(IV)^[161]. Os cálculos para as distâncias de ligação Ru-NH₃ bem como para os ângulos de ligação H₃N-Ru-NH₃ (90,1

$\pm 1,2$) e O-S-O ($116,6 \pm 2,5$) são aproximadamente os mesmos obtidos através da estrutura de raios-X para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl^[175].

Figura 22. Estruturas ORTEP para os compostos Bz e RuBz otimizadas usando-se cálculos de DFT na fase aquosa

Tabela 8. Distâncias interatômicas e ângulos de ligação para o RuBz otimizados usando-se métodos DFT (base LANL2DZ). Os dados foram comparados com a estrutura de raios-X relatada para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl^[175].

Distâncias (Å)	Dados de raios-X ^[175]	Geometria otimizada para o RuBz		
	<i>trans</i> -[Ru(NH ₃) ₄ SO ₂ Cl]Cl	S(IV) = SO ₂	S(IV) = HSO ₃ ⁻	S(IV) = SO ₃ ²⁻
Ru- ^{eq} N(NH ₃)	2,127(6) [1,962]	2,182	2,194	2,201
Ru- ^{ax} N(Bz)	-	2,151	2,106	2,072
Ru- ^{ax} Cl	2,415(3) [2,262]	-	-	-
Ru- ^{ax} S	2,072(3) [2,291]	2,181	2,375	2,401
S-O	1,462(1) [1,479]	1,433 {1,430}	1,472	1,491
Ângulos (deg)				
^{eq} N(NH ₃)-Ru- ^{eq} N(NH ₃)	90,1(2) [91,3]	93,3	91,3	89,6
^{ax} N(Bz)-Ru- ^{ax} S(IV)	-	174,3	177,0	176,5
O-S-O	113,8(6) [114,3] ^[235]	118,5 {119,5}	116,6	112,2

Os dados entre colchetes representam os ângulos e distâncias de ligação teóricos calculados para o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl usando-se a base LANL2DZ. Os dados entre chaves representam os ângulos e distâncias de ligação para o SO₂ livre^[236]. Os dados entre parêntesis representam os desvios padrão.

eq: equatorial, ax: axial.

5.2.3 Análise dos OMs

Análises de composição de orbitais moleculares foram realizadas considerando $S(IV) = SO_2$ o qual representa a espécie isolada (Tabela 9). De acordo com estas análises, os orbitais moleculares desocupados de mais baixa energia LUMO, LUMO+2 e LUMO+3 têm uma combinação dos orbitais ligantes do SO_2 (20-40%), dos orbitais anti-ligantes do Bz (11-55%) e dos orbitais $d\sigma$ do centro de Ru(II) (16-49%). Por outro lado, o LUMO+1 tem 100% de caráter anti-ligante do Bz o qual está centrado no grupamento imN- NO_2 . De forma semelhante, ao invés de um único orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO), as análises revelaram três HOMOs. Estes orbitais moleculares têm uma combinação de caracteres dos orbitais ligantes do Ru(II) (3%), anti-ligante do SO_2 (10%) e ligante do Bz (87%) para o HOMO e 100% de caráter ligante do Bz, centrado no grupo fenil, para os orbitais HOMO-1 e HOMO-2. Entretanto, o HOMO-3 tem 100% de caráter $d\pi$ do Ru(II). A energia deste último está 2,7 eV abaixo da energia dos orbitais π^* do anel imidazólico do Bz. Assim, em adição à esperada transição eletrônica centrada no ligante ($n \rightarrow \pi^*$), a qual deve ocorrer na região do ultravioleta ^[237], uma transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) na região entre 470 e 550 nm (~2,5 eV) é também prevista ocorrer. Objetivando analisar a simetria dos orbitais, bem como obter uma melhor exatidão da energia experimental envolvida nesta transição, uma análise da MLCT foi realizada usando-se cálculos de TDDFT. De acordo com esta análise, os orbitais atômicos envolvidos nesta transição são os orbitais ligante do rutênio d_{yz} e o anti-ligante do Bz π^*_{px} . A análise de TDDFT também revelou que esta transição deve ocorrer experimentalmente em aproximadamente 530 nm (~2,3 eV) e que além de ser proibida por simetria, tem uma força do oscilador baixa, o que refletiria em uma absortividade molar inferior a $2 \times 10^2 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabela 9. Caráter, energia e superfície de contorno dos orbitais moleculares de fronteira para o complexo RuBz calculados por DFT

Orbital	Caráter	Energia, eV	Superfície
LUMO+3	16% Ru $d_{x^2-y^2}$; 20% SO ₂ sp _z , 9% imN sp _x ; 55% CO p _y π^*	-7,70
LUMO+2	49% Ru $d_{x^2-y^2}$; 40% SO ₂ sp _y ; 11% CO p _y π^*	-7,92
LUMO+1	100% imN-NO ₂ π^*	-10,23
LUMO	25% Ru $d_{x^2-y^2}$; 65% SO ₂ p _y π ; 10% fen p _z π^*	-10,61
HOMO	3% Ru d_{z^2} ; 10% SO ₂ p _y π^* ; 87% fen p _z π	-10,88
HOMO-1	100% fen p _z π	-11,24
HOMO-2	100% fen p _z π	-11,62
HOMO-3	100% Ru d_{yz}	-12,95

d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} representam os orbitais não-ligantes do RuBz enquanto que $d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2} representam os orbitais antiligantes do RuBz

5.2.4 Espectroscopia eletrônica

Os espectros UV-vis do RuBz e Bz foram registrados em água, etanol e acetona. Os espectros eletrônicos do Bz em etanol e em água apresentam respectivamente uma transição intraligante em 314 nm com $\epsilon = 8,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e em 323 nm com $\epsilon = 8,0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a qual tem sido atribuída como uma transição $n \rightarrow \pi^*$ centrada no ligante (LC) ^[237]. Quando coordenado ao rutênio, esta mesma transição no Bz ocorre em 323 nm, $\epsilon = 8,1 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e 322 nm, $\epsilon = 4,5 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ etanol e água, respectivamente (Tabela 10). Além disso, os espectros eletrônicos do RuBz em acetona, etanol e água exibem uma segunda transição na região do visível em 477 nm ($\epsilon = 71 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), em 507 nm ($\epsilon = 89 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e em 530 nm ($\epsilon = 84 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente. Conforme antecipado pela análise de TDDFT, esta segunda absorção pode ser atribuída em grande parte a uma transição MLCT. De fato, de acordo com os cálculos de composição dos orbitais moleculares para o RuBz, o HOMO-3 tem 100% de caráter ligante $\text{Ru}_{\text{d}_{yz}}$, enquanto que o LUMO+1 tem 100% de caráter antiligante $\text{imN-NO}_{2\text{px}} \pi^*$ e assim essa transição é também teoricamente esperada (Tabela 9). Embora esta transição possua baixos valores de absorvidade molar, provavelmente devido a assimetria dos orbitais envolvidos, ela apresentou solvatocroísmo ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, $\lambda_{\text{abs}} = 477 \text{ nm}$; $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, $\lambda_{\text{abs}} = 507 \text{ nm}$; H_2O , $\lambda_{\text{abs}} = 530 \text{ nm}$) sugerindo um caráter de transições de transferência de carga ^[238].

Figura 23. Espectro UV-vis do RuBz em água, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaTFA, 25°C e $\text{pH} = 3,0$

Tabela 10. Dados de UV-visível para os compostos RuBz e Bz em diferentes solventes.

Dados de UV-vis			
Compostos	Solventes	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
RuBz	Etanol	323	$(\pi \rightarrow \pi^*)$
		507	89 (MLCT) ^a
RuBz	Água	322	4504 $(\pi \rightarrow \pi^*)$
		530	84 (MLCT) ^a
RuBz	Acetona	477	71 (MLCT) ^a
Bz	Etanol	314	8180 $(\pi \rightarrow \pi^*)$ ^[237]
		203	16660 $(\pi \rightarrow \pi^*)$ ^[237]

^aAtribuída com ajuda de DFT.

5.2.5 Espectroscopia vibracional

O espectro na região do infravermelho para o complexo RuBz é mostrado na Figura 24. As frequências vibracionais para as bandas νNO_2 , 1371 cm^{-1} ; νCN , 1523 cm^{-1} e νCO , 1633 cm^{-1} são coerentes com a coordenação do Bz ao centro de Ru(II) através do átomo de nitrogênio não substituído N₂₃ conforme ilustrado na estrutura otimizada (Figura 22). Após a coordenação, estas frequências foram deslocadas para menores valores de menor energia com relação ao ligante livre. Como anteriormente mencionado, os cálculos de DFT sugerem que a retrodoação Ru(II)→N(Bz) envolve os orbitais d_{yz} do Ru(II) (100% Ru_{dyz}, HOMO-3) e o orbitais π^* do anel imidazólico do fármaco Bz (100% imN-NO_{2px} π^* , LUMO+1). Portanto, é esperado que, após a coordenação, as ligações π no anel imidazólico apresentem um enfraquecimento e, conseqüentemente, as frequências νNO_2 e νCN são deslocadas para menores valores de número de onda. Como esperado, as frequências $\nu\text{SO}_{2\text{sym}} = 1107\text{ cm}^{-1}$ e $\nu\text{SO}_{2\text{asym}} = 1281$ e 1249 cm^{-1} são consistentes com a coordenação do ligante SO₂ através do átomo de enxofre como é o caso do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄SO₂Cl]Cl^[175] (Tabela 11).

Figura 24. Espectro vibracional para o complexo RuBz registrado em pastilha de KBr

Tabela 11. Frequências vibracionais mais importantes para os compostos RuBz e Bz. As frequências vibracionais para o complexo $\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4 \cdot 2\text{Bz}$ foram usados como referência.

Dados de infravermelho (cm^{-1})					
Compostos	νCO	$\nu\text{C}=\text{N}$	νNO_2	$\nu\text{SO}_2_{\text{sim}}$	$\nu\text{SO}_2_{\text{asim}}$
RuBz	1660, F*	1523, f	1371, m	1100, F	1284, m
	(1697)	(1506)	(1424)	(811)	(954)
Bz	1663, F	1588, f	1380, m	-	-
	(1700)	(1517)	(1428)		
$\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4 \cdot 2\text{Bz}$ ^[237]	1658, F	1570, f	1374, m	-	-

*F = forte, m = médio e f = franco. sim = simétrico e asim assimétrico. Os dados entre parêntesis representam as respectivas frequências vibracionais calculadas por DFT

5.2.6 Ressonância magnética nuclear

O complexo RuBz também foi caracterizado por RMN de próton e de carbono (Figuras 25 e 26). Um pequeno deslocamento de ^1H com respeito ao ligante livre foi observado para os hidrogênios H_{21} ($\Delta\delta = 0,09$) e H_{19} ($\Delta\delta = 0,05$) localizados na vizinhança do nitrogênio coordenado. Analogamente, um pequeno deslocamento de ^{13}C com respeito ao ligante livre foi observado para os átomos C_{20} ($\Delta\delta = 0,73$) e C_{21} ($\Delta\delta = 0,34$) conforme esperado considerando-se a ligação Ru-N(Bz) ^[237] (Tabela 12). Todos os demais prótons e carbonos apresentaram valores de deslocamento menores que 0,1 ppm. Adicionalmente, o grupo carbonil do ligante Bz coordenado ao centro de rutênio foi detectado por RMN de ^{13}C em 167,3 ppm, e os ligantes NH_3 bem como o grupamento N-H do ligante Bz coordenado foram observados por RMN de prótons em 3,1 e 7,9 ppm, respectivamente.

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H para o complexo RuBz. Deslocamentos químicos em ppm vs. TMS. Espectro obtido em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C para o complexo RuBz. Deslocamentos químicos em ppm vs. TMS. Espectro obtido em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Tabela 12. Dados de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C NMR para os átomos hidrogênio e carbono localizados na vizinhança do nitrogênio coordenado

Compostos	δ (ppm)		
	^1H	^{13}C	$\Delta\delta^a$
RuBz	7,50 (s, $1\text{H}_{19}\text{-imN}$) ^{a,b}	149,48 (s, $\text{C}_{20}\text{-imN}$)	0,05 ($\Delta\delta_{\text{H}_{19}/\text{H}_2}$)
	7,21 (s, $1\text{H}_{21}\text{-imN}$)	137,31 (s, $\text{C}_{21}\text{-imN}$)	0,09 ($\Delta\delta_{\text{H}_{21}/\text{H}_4}$)
Bz	7,45 (s, $1\text{H}_2\text{-imN}$)	148,75 (s, $\text{C}_3\text{-imN}$)	0,73 ($\Delta\delta_{\text{C}_{20}/\text{C}_3}$)
	7,12 (s, $1\text{H}_4\text{-imN}$)	136,97 (s, $\text{C}_4\text{-imN}$)	0,34 ($\Delta\delta_{\text{C}_{21}/\text{C}_4}$)

^a $\Delta\delta = \delta_{\text{coordenado}} - \delta_{\text{não-coordenado}}$; s = singlete

^bPara a numeração do átomos veja a Figura 22.

5.2.7 Voltametria cíclica

Experimentos de voltametria cíclica foram realizados em meio aquoso objetivando observar a formação do derivado hidroxilamínico, o qual é o produto estável da redução eletroquímica do grupo nitro dos compostos Bz e seus derivados ^[231]. De acordo com o ciclovoltagem apresentado na Figura 27, o Bz apresenta uma onda catódica em $-0,475$ V *vs.* ECS atribuída a transferência de quatro prótons e quatro elétrons para formar o derivado hidroxilamínico conforme ilustrado na equação 13 ^[231].

Depois de coordenado, sob a mesmas condições, esta onda de redução foi deslocada para $0,371$ V *vs.* ECS ($\Delta E = +0,104$ V), beneficiando a formação do nitro radical e subsequentemente a formação do derivado hidroxilamínico em $9,6$ Kcal mol⁻¹. Além disso, um processo redox reversível com $E_{1/2} = 0,273$ V *vs.* ECS foi também observado e atribuído ao par redox Ru(III)/Ru(II) do complexo RuBz.

Figura 27. Ciclovoltamogramas para os compostos RuBz e Bz em solução aquosa de NaTFA, $\mu = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2,2$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $[\text{Ru}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$.

5.2.8 Determinação do valores de pK_a das espécies *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_2)]^{2+}$, *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{HSO}_3)]^+$ e *trans*- $[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_3)]$

O ligante SO_2 pode atuar como base ou ácido de Lewis quando coordenado ao centro de rutênio. Seu forte caráter π receptor é comprovado pelos potenciais de oxidação apresentados pelos complexos formados, comparativamente aos análogos precursores, o que confere uma alta estabilidade ao centro metálico no seu estado de oxidação ^[161]. Em solução aquosa o dióxido de enxofre pode existir em três diferentes formas, resultado do equilíbrio ácido-base conforme equações 14 e 15.

Quando coordenado ao centro metálico, este equilíbrio também ocorre:

Estes prótons podem ser titulados com uma solução de NaOH, por exemplo, e os valores de pK_a das espécies determinados ^[161]

Desta forma uma titulação com NaOH foi realizada com o complexo RuBz objetivando determinar os valores de pK_a para o SO_2 coordenado no RuBz. A Figura 28 ilustra esta curva de titulação, bem como a distribuição das espécies *trans*- $[Ru(Bz)(NH_3)_4(SO_2)]^{2+}$, *trans*- $[Ru(Bz)(NH_3)_4(HSO_3)]^+$ e *trans*- $[Ru(Bz)(NH_3)_4(SO_3)]$ em função da concentração hidrogeniônica. A partir dos gráficos pH vs. C_{NaOH} , os valores de pK_a correspondentes aos equilíbrios abaixo foram calculados:

Estes valores de pK_a são inferiores aos correspondentes valores reportados para as espécies *trans*- $[Ru(H_2O)(NH_3)_4(SO_2)]^{2+}$ e *trans*- $[Ru(H_2O)(NH_3)_4(HSO_3)]^+$, os quais são 2,1 e 5,0, respectivamente ^[161]. Isto está coerente com a maior basicidade do ligante Bz em relação ao H_2O e conseqüentemente com o aumento da densidade eletrônica ao longo do eixo Ru-S(IV), conforme antecipado pelos cálculos quânticos.

Como pode ser observado na Figura 28, em concentrações hidrogeniônicas menores que 10^{-7} mol L⁻¹, 100 % do complexo metálico encontra-se na forma de *trans*-

$[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4\text{SO}_3]$, o qual é a forma predominante do complexo RuBz em condições onde o $\text{pH} \approx 7$.

Figura 28. Distribuição das espécies (a) $\text{trans}-[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_2)]^{2+}$ (—), $\text{trans}-[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{HSO}_3)]^+$ (—) e $\text{trans}-[\text{Ru}(\text{Bz})(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_3)]^-$ (—) em função do pH e curva de titulação com NaOH a 25 °C

5.2.9 Propriedades hidrofílicas e eletrônicas

Diferenças entre as propriedades hidrofílicas e eletrônicas para os compostos Bz e RuBz foram analisadas por DFT objetivando correlacionar tais propriedades com suas respectivas atividades contra *T. cruzi*. Em todos os cálculos realizados aqui se considerou $\text{S(IV)} = \text{SO}_3^{2-}$, a espécie predominante em meio fisiológico e, portanto, responsável pela a atividade biológica. As propriedades determinadas e examinadas neste estudo foram as

energias dos orbitais LUMO, o GAP ($E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$) de energia entre os orbitais de fronteira, a energia total em fase aquosa (E_{aq}), a energia de solvatação em água (E_s) e as cargas atômicas obtidas usando-se métodos de NBO ^[239, 240]. A Tabela 13 resume as principais diferenças hidrofílicas e eletrônicas observadas para os compostos Bz e RuBz. Como já sugerido ^[231], a redução eletroquímica ocorre sobre o grupo nitro da molécula Bz, uma vez que este grupo é a parte da molécula mais susceptível a ataque nucleofílico. Estes dados estão em acordo com as cargas NBO calculadas, as quais indicam que o grupo NO₂ é mais eletrofílico no complexo RuBz (N₄₅, 0,43; O_{46/47}, -0,32) que na molécula de Bz (N₂₅, 0,42; O_{26/27}, -0,37). De fato, quando o Bz é coordenado ao centro de rutênio (II), devido ao caráter π do ligante S(IV), um deslocamento da densidade eletrônica ocorre no sentido Bz→Ru→SO₂ tornando o grupamento nitro mais eletropositivo. Além disso, de acordo com as energias dos orbitais LUMO, bem como o GAP de energia entre os orbitais de fronteira, a afinidade eletrônica do grupo nitro é maior no RuBz (GAP_{RuBz} = 1,85 eV) que no Bz (GAP_{Bz} = 2,54 eV) (Tabela 13).

Em concordância com os dados experimentais de hidrosolubilidade, a energia de solvatação e energia total em fase aquosa indicam que o complexo RuBz é mais solúvel em água que o Bz livre. Enquanto que o Bz é muito pouco solúvel em água (0,4 mg mL⁻¹ = 0,2 $\mu\text{mol mL}^{-1}$, t = 37 °C) ^[241], a solubilidade em água para o complexo RuBz determinada experimentalmente nas mesmas condições é 3,7 mg mL⁻¹ = 4,4 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (Tabela 14). Considerando somente o ligante Bz, a solubilidade é aumentada para 14,4 $\mu\text{mol mL}^{-1}$, ou seja, um aumento da solubilidade do Bz de 36 vezes.

Tabela 13. Diferenças entre as propriedades eletrônicas (LUMO, cargas NBO e GAP) e entre os descritores hidrofílicos (energia de solvatação, energia total em fase aquosa, hidrosolubilidade e E_{pc}) para os compostos Bz e RuBz.

Compostos	LUMO (eV)	GAP ^a (eV)	NBO ^b	E_{pc} (V) ^c	E_{aq} (Kcal mol ⁻¹) ^d	E_s (Kcal/mol) ^e	S_{aq} (mg mL ⁻¹) ^f
RuBz	-3,19	1,85	N ₄₅ (0,43), O _{46/47} (-0,32)	-0,371	-1,61 x 10 ⁶	-306,69	3,7
Bz	-3,94	2,54	N ₂₅ (0,42), O _{26/27} (-0,37)	-0,475	-5,70 x 10 ⁵	-8,21	0,4 ^[241]

^a GAP = $E_{LUMO} - E_{HOMO}$. Dados otimizados por DFT em fase aquosa considerando S(IV) = SO₃²⁻;

^b NBO – cargas sobre o grupo nitro. As cargas sobre o átomos de oxigênio são a média entre aqueles do grupo nitro;

^c E_{pc} – potencial de redução de acordo com a seguinte reação $Bz-NO_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow Bz-NHOH + H_2O$, pH = 2,2, $\mu = 0,1$ M de NaCF₃COO, Potencial vs. ECS;

^d E_{aq} – energia total em fase aquosa considerando S(IV) = SO₃²⁻;

^e E_s – energia de solvatação considerando S(IV) = SO₃²⁻;

^f S_{aq} – solubilidade em água (pH = 6,5 e t = 37 °C).

5.2.10 Estudos de toxicidade aguda

Conforme anteriormente mencionado, a metade da concentração inibitória sobre células V79 (IC_{50V79}) para os íons complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ variam de 120 (L = pz) a 2260 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (L = P(OEt)₃) (Tabela 5) ^[158]. Contudo, nenhum valor de citotoxicidade para o complexo RuBz havia sido determinado. Assim, previamente aos estudos *in vivo*, avaliou-se a toxicidade aguda *in vitro* e *in vivo* para o RuBz objetivando administrar doses mais seguras para o animais conforme determinações do parecer de ética 004/2007 (FMRP – USP).

Os primeiros ensaios de citotoxicidade foram realizados com esplenócitos proveniente da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c. Este tipo celular é altamente susceptível e sua viabilidade depende da interação com macrófagos viáveis. Portanto, concentrações que não afetam a viabilidade e a proliferação de esplenócitos, podem ser consideradas concentrações que não inviabilizam macrófagos ^[242]. Desta forma, estas células foram cultivadas na presença ou não do complexo RuBz em concentrações que

variaram de 10 nmol L^{-1} a 1 mmol L^{-1} . De acordo com a Tabela 14, o complexo RuBz não afetou a proliferação de esplenócitos em concentrações de até 1 mM . Semelhantemente, o complexo RuBz não afetou a viabilidade dos esplenócitos quando estes foram incubados na presença do RuBz por até 48 horas (dados não mostrados). Assim, é bastante provável que a metade da concentração que inviabiliza macrófagos ($\text{IC}_{50\text{macrófagos}}$) para o RuBz esteja acima de 1 mmol L^{-1} ($\text{IC}_{50\text{macrófagos}} > 1 \text{ mmol L}^{-1}$).

Tabela 14. Porcentagem de proliferação de esplenócitos proveniente da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c na presença do complexo RuBz

Concentração de RuBz ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% de proliferação
1000	93
100	95
10	96
1	96
0,1	97
0,01	98
0,001	100
0	100

Analogamente aos complexos *c*-Ru(NO)L e *t*-Ru(NO)L, testes de toxicidade aguda *in vivo* foram realizados usando o método *up-and-down* ^[190]. Nenhum efeito tóxico foi observado para o complexo RuBz quando doses de $400 \mu\text{mol kg}^{-1}$ foram administradas, mas nas doses de $600 \mu\text{mol kg}^{-1}$ os animais morreram. Assim, pode-se concluir que o real valor de LD_{50} para este composto está entre 400 e $600 \mu\text{mol kg}^{-1}$.

5.2.11 Atividade anti-*T. cruzi* in vitro

Conhecendo-se as concentrações de RuBz a qual não se observou toxicidade aguda, experimentos de atividade anti-proliferativa e tripanocida para os compostos Bz e RuBz foram realizados com a cepa Y. O objetivo aqui foi comparar a eficácia do RuBz frente ao Bz livre. As Tabelas 15 e 16 resumem estas atividades sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas e os dados estão expressos como a porcentagem de inibição do crescimento (%GI) das formas epimastigotas (Tabela 15) e porcentagem de atividade tripanocida (%AT) sobre tripomastigotas (Tabela 16). Como pode ser visto na Tabela 16, o RuBz ($IG_{50\text{epi}} = 127 \pm 8 \mu\text{mol L}^{-1}$) exibiu maior atividade anti-proliferativa que o Bz ($IG_{50\text{epi}} = 244 \pm 7 \mu\text{mol L}^{-1}$) em todas as condições testadas. Entretanto, sua atividade foi menor que a do complexo *t*-Ru(NO)imN ($IG_{50\text{epi}} = 86 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$) nas mesmas condições. Por outro lado, a atividade tripanocida sobre tripomastigotas para os compostos Bz, RuBz e *t*-Ru(NO)imN após 24 horas de incubação são as mesmas dentro do erro experimental ($IC_{50\text{tri}} = 55 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$), mas em média 10 vezes menor que o respectivo valor para o Vg ($IC_{50\text{tri}} = 536 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 16) ^[199]. Todavia, quando comparamos a atividade dos compostos Bz e RuBz nas primeiras horas de incubação, podemos observar que o RuBz é até 60 vezes mais ativo que o Bz. De fato, a Figura 29 mostra que o RuBz é bastante eficiente na lise de tripomastigotas na primeira hora de incubação, enquanto que o Bz praticamente não exibe atividade nestes tempos de incubação.

Tabela 15. Atividade anti-proliferativa dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, Bz e RuBz sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade anti-proliferativa sobre epimastigotas (% AA)					
	t = 1 h			t = 4 h		
	Concentrações (μmol L ⁻¹)					
	100	500	1000	100	500	1000
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	16 ± 6	37 ± 4	54 ± 3	35±5	39±2	65 ± 4
RuBz	33 ± 5	56 ± 4	67 ± 3	63 ± 4	75 ± 4	80 ± 6
Bz	0	0	7 ± 3	11 ± 3	15 ± 4	24 ± 2

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-6, *P* < 0,05. A atividade anti-proliferativa está expressa como a porcentagem de inibição do crescimento nos tempos e concentrações definidas.

Tabela 15 (continuação). Atividade anti-proliferativa dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃, Bz e RuBz sobre as formas epimastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade anti-proliferativa sobre epimastigotas (%AA)			
	t = 24 h			
	Concentrações (μmol L ⁻¹)			
	100	500	1000	IG _{50epi}
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	58 ± 4	65 ± 4	78 ± 4	86 ± 4
RuBz	69 ± 6	79 ± 5	92 ± 3	127 ± 8
Bz	15 ± 4	26 ± 4	31 ± 5	2300 ± 40

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-6, *P* < 0,05. A atividade anti-proliferativa está expressa como a porcentagem de inibição do crescimento nos tempos e concentrações definidas. Os valores de IG_{50epi} correspondem a 50% de atividade anti-proliferativa após 24 h de incubação.

Tabela 16. Atividade tripanocida dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L](BF₄)₃, Bz e RuBz sobre as formas tripomastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade anti-proliferativa sobre epimastigotas (% AA)					
	t = 1 h			t = 4 h		
	Concentrações (μmol L ⁻¹)					
	100	500	1000	100	500	1000
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	87 ± 6	91 ± 5	92 ± 4	68 ± 4	97 ± 3	100
Bz	0	7 ± 6	12 ± 4	15 ± 5	21 ± 5	37 ± 7
RuBz	40 ± 5	80 ± 2	88 ± 4	47 ± 7	74 ± 6	86 ± 4

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-8, *P* < 0,05. A atividade tripanocida está expressa como a porcentagem de formas tripomastigotas lisadas nos tempos e concentrações definidas.

Tabela 16 (continuação). Atividade tripanocida dos compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L](BF₄)₃, Bz e RuBz sobre as formas tripomastigotas em diferentes concentrações e tempos de incubação

Compostos	Atividade tripanocida sobre tripomastigotas (%AT)			
	T = 24 h			
	Concentrações (μmol L ⁻¹)			
	100	500	1000	IG _{50epi}
<i>t</i> -[Ru(NO)(NH ₃) ₄ imN](BF ₄) ₃	97 ± 4	100	100	52 ± 4
Bz	89 ± 8	92 ± 5	100	53 ± 4
RuBz	85 ± 4	88 ± 4	100	58 ± 4

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 4-8, *P* < 0,05. A atividade tripanocida está expressa como a porcentagem de formas tripomastigotas lisadas nos tempos e concentrações definidas. Os valores de IC_{50tri} correspondem a 50% de atividade tripanocida após 24 h de incubação.

Figura 29. Comparação da Atividade tripanocida *in vitro* entre o RuBz e Bz. Ambos os compostos foram incubados com $1,0 \times 10^6$ tripomastigotas mL⁻¹ a 37 °C e 5% CO₂ e a atividade tripanocida determinada após 1 hora de incubação. n = 3.

5.2.12 Atividade anti-*T. cruzi* *in vivo*

A atividade *in vivo* do complexo *trans*-[Ru(H₂O)(NH₃)₄SO₂](CF₃HSO₃)₂, o qual é o precursor da síntese do RuBz (Figura 21), foi conduzida usando-se um modelo agudo de infecção. Contudo, nenhuma atividade foi observada para este composto de coordenação quando camundongos Swiss infectados foram tratados com doses diárias de até 350 µmol kg⁻¹ durante 15 dias consecutivos. Em seguida, diferentes protocolos quimioterápicos foram usados para comparar as atividades anti-*T. cruzi* *in vivo* dos compostos Bz e RuBz usando-se modelos agudos de infecção.

No primeiro modelo, grupos de camundongos Swiss foram inoculados com 1,0 x 10³ tripomastigotas por animal e intraperitonealmente tratados com doses de 100 nmol de cada composto durante 15 dias consecutivos (protocolo A) ou somente nos três dias (5^o, 6^o e 7^o dias) que precedem o pico parasitêmico (protocolo B). Como pode ser observado na Figura 30b, o RuBz em doses de 100 nmol kg⁻¹ assegurou a sobrevida de 60% dos animais quando estes foram tratados de acordo com o protocolo A, enquanto nenhuma sobrevida foi observada para o grupo não tratado ou para aquele tratado com o Bz na mesma dose (100 nmol kg⁻¹) e protocolo (15 dias consecutivos). Além disso, os níveis de parasitemia foram significativamente menores ($P < 0,05$) para os camundongos tratados com o RuBz do que para o grupo controle, mesmo quando os animais foram tratados de acordo com o protocolo A (Figura 30a).

Figura 30. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com os compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz na dose de 100 nmol kg^{-1} durante 15 dias consecutivos (protocolo A, ●) ou somente nos dias 5, 6 e 7 (protocolo B, ▲). Outros grupos de camundongos infectados receberam somente PBS (controle, ■) ou Bz na dose de 100 nmol kg^{-1} (◆). Ambos os compostos foram injetados em $100 \mu\text{L}$ de PBS por via intraperitoneal. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento

No segundo modelo, os animais infectados com $1,0 \times 10^3$ parasitos por animal foram tratados oralmente com doses de 100 e 385 nmol kg⁻¹ de RuBz e 385 µmol kg⁻¹ de Bz durante 15 dias consecutivos. Neste ponto, é importante mais uma vez lembrar que a dose de RuBz de 385 nmol kg⁻¹ é uma dose mil vezes menor que a dose considerada ótima para o Bz (385 µmol kg⁻¹ = 100 mg kg⁻¹) [243, 244]. A Figura 31a indica que, similarmente ao grupo tratado intraperitonealmente com o RuBz na dose de 100 nmol kg⁻¹, o tratamento oral também diminuiu o pico de parasitemia em 65-70%. Como consequência, esta dose assegurou 60% de sobrevivência dos animais infectados (Figura 31b). Quando os animais infectados foram tratados com a dose de 385 nmol kg⁻¹ de RuBz ou 385 µmol kg⁻¹ de Bz, 100% de sobrevivência foi observado com significativa diminuição ($P < 0,001$) do pico parasitêmico para ambos os compostos (Figura 31a).

No terceiro modelo experimental, os camundongos foram inoculados com $1,0 \times 10^3$ parasitos por animal e oralmente tratados com uma única dose de 385 µmol kg⁻¹ de Bz ou RuBz somente no primeiro dia após a infecção. Através deste experimento, pode-se comprovar a melhor eficácia do RuBz frente ao Bz. Enquanto que o RuBz foi capaz de proteger contra a morte 60% dos animais infectados, o Bz só protegeu 20% dos animais (Figura 32b). Além disso, a redução do pico parasitêmico foi maior para o RuBz que para o Bz (Figura 32a).

Figura 31. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados durante 15 dias consecutivos com os compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz nas doses de 100 nmol kg^{-1} (●) e 385 nmol kg^{-1} (▲). Outros grupos de camundongos infectados receberam somente PBS (controle, ■) ou Bz na dose 385 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (◆). O RuBz foi injetado em 100 μL de PBS e o Bz em 200 μL , ambos por via intraperitoneal. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento.

Figura 32. Níveis de parasitemia (a) e curvas de sobrevivência (b) de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados com uma única dose dos compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com uma única dose de RuBz (▲) ou Bz (◆) ambos a $385 \mu\text{mol kg}^{-1}$. Outro grupo de camundongos infectados recebeu somente PBS (controle, ■). O RuBz foi injetado em 100 μL de PBS e o Bz em 200 μL , ambos por via intraperitoneal. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. As setas indicam o período de tratamento.

Experimentos similares foram conduzidos para realizar análise histológica sobre os corações, músculos esqueléticos e fígados dos animais tratados com o RuBz ou Bz. Os camundongos Swiss infectados ($1,0 \times 10^3$ parasitos por animal) e tratados com o RuBz e Bz em diferentes doses durante 15 dias consecutivos foram eutanizados no 15º dia após infecção. Grupos de animais não infectados foram também eutanizados e seus órgãos processados para comparação. A Figura 33 mostra que os corações e os músculos esqueléticos dos animais tratados intraperitonealmente com o RuBz na dose de 100 nmol kg^{-1} não apresentaram nenhum ninho de amastigota, enquanto que os corações dos animais não tratados ou tratados com o Bz na mesma dose apresentaram diversos ninhos de amastigotas bem como maior intensidade de inflamação. Interessantemente, o processo inflamatório nos corações e músculos esqueléticos dos animais tratados com o RuBz neste modelo foi praticamente suprimido. Quando, os animais infectados foram tratados oralmente com o RuBz na dose de 100 ou 385 nmol kg^{-1} , a análise histológica (Figura 34) revelou resultados similares àqueles mostrados na Figura 33. Adicionalmente, a Figura 35 revelou que o grupo tratado oralmente com o RuBz na dose de 385 nmol kg^{-1} , além de não apresentar ninhos de amastigotas, mostrou menor número de células inflamatórias nos fígados destes animais que os respectivos órgãos dos animais tratados com o Bz na dose de $385 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$. Por fim, a análise histológica dos fígados sugere que nenhum sinal evidente de toxicidade foi observado nos animais tratados com doses de 385 nmol kg^{-1} de RuBz durante 15 dias consecutivos.

Figura 33. Histologias de seções dos corações (em cima) e músculos esqueléticos (em baixo) de camundongos infectados com o *T. cruzi* e tratados durante 15 dias consecutivos com os compostos Bz e RuBz de acordo com o protocolo A (15 dias consecutivos). Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz na dose de 100 nmol kg^{-1} . Outro grupo de camundongos infectados recebeu somente PBS (controle). Os animais foram eutanizados no 15º dia após a infecção e seus órgãos foram processados para a análise por H&E. Note a intensidade do processo inflamatório com células mononucleares e necrose nas seções de controle, mas não nas seções RuBz. As setas indicam os ninhos de amastigotas e os círculos indicam a inflamação. As histologias do grupo tratado com o Bz na dose de 100 nmol kg^{-1} revelaram ninhos de amastigotas e volume de inflamação similar ao grupo de controle. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Figura 34. Histologias de seções dos corações de camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* e tratados oralmente durante 15 dias consecutivos com os compostos Bz e RuBz. Os animais foram inoculados com o *T. cruzi* (cepa Y; $1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e tratados com o RuBz nas doses de 100 e 385 nmol kg^{-1} . Outros grupos de camundongos infectados recebeu somente PBS ou Bz na dose de 385 μmol kg^{-1} . Os animais foram eutanizados no 15º dia após a infecção e seus órgãos foram processados para a análise por H&E. Note que existem ninhos de amastigotas e inflamação na seção de controle, mas não nas seções RuBz ou Bz. As setas indicam os ninhos de amastigotas e o círculo indica a inflamação. As fotomicrografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Figura 35. Histologias de seções dos fígados de camundongos infectados com o *T. cruzi* ($1,0 \times 10^3$ parasitos por camundongo) e não tratados (A) ou tratados com o RuBz com a dose de 385 nmol kg^{-1} (B) ou com o Bz na dose de 385 μmol kg^{-1} (C). O Painei (D) representa a seção de um fígado de um animal não infectado. O RuBz foi administrado oralmente em 100 μL de PBS e o Bz em 200 μL . No 15º dia após a infecção, os animais foram eutanizados e seus fígados processados para a análise histológica. Os círculos indicam o infiltrado inflamatório. As microfotografias são representativas de três experimentos independentes com resultados similares, $n = 6$. Ampliação final: 200x.

De forma semelhante ao observado para os complexos *c*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)imN, os quais foram capazes de eliminar amastigotas no tecido miocárdio de animais infectados por *T. cruzi*, o RuBz também apresentou esta mesma propriedade, eliminando amastigotas não somente nos corações, mas também em outros órgãos infectados tais como nos músculos esqueléticos e fígados de camundongos. Experimentos similares àqueles conduzidos com os complexos *c*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)imN foram realizados com células Vero infectadas. De acordo com as Figuras 36 e 37, o RuBz foi capaz não somente de reduzir o número de células Vero infectadas em 60% (Figura 37), mas também foi capaz de eliminar amastigotas no interior destas células (Figura 36). É conhecido que o centro de rutênio (II) possui elevada afinidade pelo nitrogênio N₃ de anéis imidazólicos [166, 232, 233]. Portanto, com base no conhecimento acumulado com respeito a reatividade de amina de rutênio e ligantes imidazólicos [166, 232, 233], a associação Ru(II)-N(Bz) seria estável em meio fisiológico e a integridade do complexo RuBz mantida. Assim, é provável que o RuBz atravessasse as membranas das células Vero, uma vez que este complexo foi capaz de eliminar formas intracelulares do *T. cruzi* e o mecanismo de ação do Bz ocorre através da blindagem do nitro radical em biomacromoléculas do *T. cruzi* [44, 45]. Além disso, de acordo com os valores de pK_a, o RuBz em condições fisiológicas apresenta-se 100% na forma de *trans*-[Ru(Bz)(NH₃)₄SO₃] (Figura 28). Como uma espécie neutra, seu movimento através de ambientes lipofílicos estaria em muito facilitado.

Figura 36. Células Vero infectadas com o *T. cruzi*. As células foram cultivadas em meio DMEM, infectadas com tripomastigotas e lavadas com PBS. As culturas foram então incubadas por 24 h ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) sem adição de qualquer composto (A) ou na presença dos compostos RuBz (B), Bz (C) ou *t*-Ru(NO)imN (D) na concentração de $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Em seguida foram coradas e analisadas em microscópio eletrônico. As setas vermelhas indicam as amastigotas viáveis dentro das células (seta verde = citoplasma, seta azul núcleo). Note a vacuolização e a ausência de parasitos viáveis no interior das células. As fotomicrografias são representativas de 2 experimentos independentes com resultados similares. Ampliação final: 200x.

Figura 37. Porcentagem de células Vero infectadas com amastigotas e não tratadas (a) ou tratadas com os compostos RuBz (b), Bz (c) ou *t*-Ru(NO)imN. Quantificação feita a partir dos dados da Figura 37.

Trabalhos anteriores ^[245, 246] têm demonstrado que alguns compostos de rutênio transportando drogas fungicidas ou semicarbazonas são mais ativas contra o *T. cruzi* que os respectivos ligantes livres. Contudo, a baixa solubilidade destes compostos em água impõe limites ao seu potencial farmacológico. Tem sido reportado ^[247] que o etanidazol (N-(2-hidroxi-2-nitro-1-imidazolacetamida), um 2-nitroimidazol usado clinicamente como radio sintetizador de células com hipoxia, apresenta atividade tripanocida sobre tripomastigotas e amastigotas sem afetar a viabilidade das células do hospedeiro. Embora sua atividade não seja completamente equivalente à do Bz, o etanidazol apresenta vantagens pois exerce sua atividade anti-*T. cruzi* por longos períodos sem apresentar nenhum efeito tóxico, como aqueles registrados em pacientes tratados com o Bz ^[22]. De acordo com este estudo ^[247], os menores efeitos tóxicos observados para o etanidazol foram atribuídos à sua maior hidrosolubilidade frente ao Bz. Semelhantemente, os compostos derivados do 2*H*-benzimidazol 1,3 dióxido que apresentam maior hidrosolubilidade,

eletrofilicidade, sendo também mais facilmente reduzíveis são mais ativos contra o *T. cruzi* que aqueles que não apresentam estas propriedades ^[239]. Assim, os mais frequentes efeitos tóxicos dos compostos anti-*T. cruzi* parecem estar geralmente associados com sua insolubilidade em água, enquanto que hidrosolubilidade e acessibilidade do potencial de redução do grupo nitro parecem estar associados com suas maiores atividades ^[239]. Este inconveniente tem sido driblado no RuBz, pois a presença dos ligantes NH₃ e SO₂ deixam o complexo mais solúvel em água que o Bz livre ^[161, 162].

Atualmente, é bem aceito que o mecanismo de ação do Bz ocorre a través da formação do nitro radical ^[45]. Os intermediários reduzidos não sofrem “redox cycling”, mas atuam covalentemente modificando biomacromoléculas tais como o DNA ou citocromo P₄₅₀ do parasito. Após a coordenação do Bz ao Ru (II), é provável que a formação do nitro radical seja favorecido e esteja mais acessível as enzimas do tipo nitroredutases, uma vez que a onda de redução correspondente à formação do derivado hidroxilamínico foi deslocada para -0,371 V vs. ECS. Portanto, a coordenação do Bz ao fragmento [Ru(NH₃)₄SO₂]²⁺ ativou o grupo NO₂ para a redução em + 0,104 V, favorecendo a formação do subsequente derivado hidroxilamínico em 9,6 Kcal mol⁻¹ em termos de energia livre. Em acordo com essa discussão, a energia molecular de potencial eletrostático (MEP) e as cargas NBO mostram que o grupo nitro no RuBz (N₄₅, 0,43; O_{46/47}, -0,32) está mais eletrofílico que no Bz (N₂₅, 0,42; O_{26/27}, -0,37) e conseqüentemente mais susceptível a ataque nucleofílico após a coordenação ao centro de Ru(II) (Tabela 13).

Adicionalmente, tem sido reportado que a diferença de energia entre os orbitais de fronteira (GAP = $E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$) está associada com a atividade tripanocida em compostos derivados do pirazolo-piridina e 5-etenilbenzofuroxano ^[248, 249]. De acordo com essas publicações, quanto menor for os valores de GAP, maior é a afinidade eletrônica dos

grupos eletrofílicos, como é o caso do grupamento NO_2 , e conseqüentemente mais ativos são os compostos ^[248, 249]. O valor de GAP otimizado através de DFT na fase aquosa para o RuBz é 1,85 eV, enquanto que para o Bz o GAP é 2,54 eV. Esta diminuição de energia está em acordo com a maior afinidade eletrônica do grupo NO_2 no RuBz relativamente ao Bz; e, portanto, com a maior acessibilidade do potencial de redução do grupo nitro ($\text{NO}_2/\text{NO}_2^{\bullet-}$) pelas nitroredutases do *T. cruzi* (Figura 27, Tabela 13) ^[45]. Assim, a melhor atividade *in vitro* e *in vivo* do RuBz considerando o Bz pode ser conseqüência da maior acessibilidade do potencial de redução do grupo nitro somada a maior solubilidade em água deste composto frente ao Bz.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Tetraaminas como transportadoras de NO

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = N-heterocíclicos, H₂O, SO₃²⁻ ou P(OEt)₃ e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻ são potentes agentes tripanocidas e tripanostáticos, capazes de lisar epimastigotas e tripomastigotas *in vitro* e *in vivo*. Contudo, somente os compostos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = P(OEt)₃, SO₃²⁻, py, imN ou isn e *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻ mostraram janelas terapêuticas maior que 10. Os complexos *t*-Ru(NO)py e *t*-Ru(NO)isn bem como os *c*-Ru(NO)1-miN e *c*-Ru(NO)imN exibiram atividade tripanocida *in vivo* semelhante e isto foi atribuído à similaridade de suas propriedades químicas. De acordo com nossos experimentos, os valores de LD₅₀ para os compostos *t*-Ru(NO)isn, *t*-Ru(NO)imN e *t*-Ru(NO)py estão entre 125 e 250 μmol kg⁻¹, enquanto que para os complexos *c*-Ru(NO)imN, *c*-Ru(NO)1-miN e *c*-Ru(NO)SO₃ estes valores estariam entre 250 e 500 μmol kg⁻¹. A dose ótima para os complexos *t*-Ru(NO)isn e *t*-Ru(NO)imN para o tratamento da infecção aguda por *T. cruzi* em camundongos é de 400 nmol kg⁻¹ e seus valores de ED₅₀ são 86 e 190 nmol kg⁻¹, respectivamente. Assim, as janelas terapêuticas *in vivo* são 1.453 para o *t*-Ru(NO)isn e 658 para *t*-Ru(NO)imN. O tratamento quimioterápico nos três dias que precedem o pico parasitêmico para o composto *t*-Ru(NO)imN resultou na mesma sobrevida que quando este foi administrado durante 15 dias consecutivos. Desta forma, a administração somente nos dias que precedem o pico parasitêmico parece ser um bom protocolo quimioterápico para o tratamento da doença de Chagas no modelo murino usando o *t*-Ru(NO)imN. Adicionalmente, estes compostos mostraram-se capazes de eliminar as formas

intracelulares do parasito no tecido miocárdio e em células Vero. Embora os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺, L = N-heterocíclicos, H₂O, SO₃²⁻ ou P(OEt)₃ tenham apresentado excelente atividade tempo e concentração dependentes de NO, eles não atuam através da via da gGAPDH, ao contrário dos compostos *cis*-[Ru(NO)(bpy)₂L]ⁿ⁺, L = imN, 1-miN ou SO₃²⁻. Por fim, diversos experimentos sugerem fortemente que o NO ou os produtos derivados desta molécula, como por exemplo o ONOO⁻, são os responsáveis pela atividade tripanocida e anti-proliferativa aqui observados.

Ao longo deste trabalho atribuiu-se a ação dos complexos nitrosilos à sua capacidade de após redução monoeletrônica liberar NO. Deve-se, entretanto, ficar esclarecido que embora as evidências até então obtidas apontem nesta direção, os mecanismos de ação pelos quais o efeito ocorre não está de forma alguma completamente esclarecido e certamente demandará investigações que transcorrem o escopo deste trabalho. Porém, está evidente a importância do íon nitrosônio (NO⁺) coordenado no composto que demonstra atividade. Assim, até o presente momento não nos é possível estabelecer se a atividade anti-*T. cruzi* dos complexos nitrosilo se deve simplesmente aos efeitos do NO liberado ou em função do poder oxidante das espécies *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]³⁺ ou ainda a uma somatória destes efeitos.

6.2 Tetraaminas como transportadoras de benznidazol

O RuBz administrado em doses de 385 nmol kg⁻¹ exibe 100% de proteção contra morte quando os animais infectados são tratados durante 15 dias consecutivos. Esta dose está mil vezes abaixo da dose do Bz (385 μmol/kg = 100 mg/kg) recomendada para tratar pacientes e comumente usada em experimentos pré-clínicos [243]. Os dados apresentados aqui para o Bz estão em acordo com os previamente reportados [243], mostrando que o Bz

exibe 100% de sobrevida quando camundongos infectados são tratados com a dose de 385 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ durante 20 dias consecutivos. Contudo, demonstramos aqui que quando os camundongos infetados são tratados com o Bz na dose de 100 ou 400 nmol kg^{-1} , nenhuma sobrevida foi detectada, enquanto que 60 e 100% dos animais que receberam o RuBz nas doses de 100 ou 385 nmol kg^{-1} , respectivamente, sobreviveram por mais de 120 dias. Isto indica que o RuBz é mais ativo que o Bz em concentrações pelo menos mil vezes menores que seu estimado valor de LD_{50} . Adicionalmente, o RuBz foi também mais ativo que o Bz mesmo quando somente uma dose foi administrada.

Na América Latina, a fase crônica da doença de Chagas é uma das principais causas de morte devido à falência miocárdica ^[250]. Além de ser extremamente tóxico, o Bz apresenta uma baixíssima eficácia no tratamento de pacientes cronicamente infectados com o *T. cruzi* ^[250, 251]. Também tem sido recentemente reportado que o tratamento de camundongos com o Bz na dose de 385 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ previne cardiomiopatia, mas não leva à completa erradicação do parasito ^[250]. Por outro lado, o RuBz nas dose de 100 e 385 nmol kg^{-1} foi capaz de eliminar as amastigotas no tecido miocárdio e nos músculos esqueléticos, diminuindo inclusive a inflamação em animais agudamente infectados. Assim, pode-se concluir que este novo derivado inorgânico do Bz apresenta-se como um promissor composto anti-*T. cruzi* sendo eficiente na eliminação *in vitro* e *in vivo* não somente das formas infectivas, mas também das formas replicativas do parasito.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 1 KETTER, H.; MARJANOVIC, S. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. **Nature Reviews**, v. 3, p. 171-176, 2004.
 - 2 NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews**, v. 2, p. 919-928, 2003.
 - 3 KOLA, I. The state of innovation in drug development. **Molecular Therapy**, v. 83, p. 227-30, 2008.
 - 4 ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 363-366, 2006.
 - 5 GELB, M. H.; HOL, W. G. Drugs to combat tropical protozoan parasites. **Science**, v. 297, p. 343-344, 2002.
 - 6 HORAE, C. A. **The trypanosomes of mammals**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 60-80.
 - 7 HORAE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385-1386, 1966.
 - 8 BOAINAIN, E.; RASSI, A. Etiologic therapy of Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 32, p. 395-399, 1979.
 - 9 DIAS, J. C. Chagas' disease and its control in Latin America: an analysis of possibilities. **Cadernos de Saúde Pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 9, p. 201-209, 1993.
 - 10 MARIN-NETO, J. A. Etiology and pathogenesis of Chagas' disease. In: ROSE, B. D.; PODRID, P. J.; GERSH, B. J. (Ed). **Uptodate cardiovascular medicine: up to date in medicine**, a CD-ROM textbook, v. 6. Wellesley, MA, USA, Inc., February, 1998.
 - 11 ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 30, p. 335-340, 1991.
 - 12 KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in chagas' disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? **Parasitology Today**, v. 12, p. 396-399, 1996.

-
- 13 BELLOTTI, G.; BOCCHI, E. A.; DE MORAES, A. V.; HIGUCHI, M. L.; BARBERO-MARCIAL, M.; SOSA, E.; ET AL. *In vivo* detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. **American Heart Journal**, v. 131, p. 301-307, 1996.
- 14 LEVIN, M. J. In chronic Chagas disease, don't forget the parasite. **Parasitology Today**, v. 12, p. 415-416, 1996.
- 15 HAYES, R.; SCHOFIELD, C. J. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones y parasitosis crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. **Bolivian Official Sanitary Panam**, v. 108, p. 308-316, 1990.
- 16 UNDP/World Bank/WHO. Tenth Programmer Report. Chagas disease. **Geneva**: special programmer for research and training in tropical disease. 1991.
- 17 WHO. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organization Tech Rep Ser**, v. 811, p. 1-95, 1991.
- 18 WANDERLEY, D. M.; CORREA, F. M. Epidemiology of Chagas' heart disease. **São Paulo Medicinal Journal**, v. 113, p. 742-749, 1995.
- 19 DIAS, J. C. P. Situación actual de la enfermedad de Chagas en las Américas. Buenos Aires: **Congreso Nacional de Medicina**, 1993.
- 20 DIAS, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, p. 336-341, 1995.
- 21 CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. Terapêutica. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. (Ed). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. p. 362-424.
- 22 COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.
- 23 DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropical**, v. 53, p. 83-98, 1993.
- 24 MAYER, M.; ROCHA LIMA, H. Zur Entwicklung von *Schizotrypanum cruzi* in Saengatieren. **Archiv für Schiffs- und Tropen-Hygiene**, v. 16, p. 90-94, 1912.
- 25 MAYER, M.; ROCHA LIMA, H. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmblutern und Arthropoden. **Archiv für Schiffs- und Tropen-Hygiene**, v. 5 p. 101-136, 1914.

26 BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeído- semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, p. 43-49, 1961.

27 BRENER, Z. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: CANÇADO, J. R. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, 1968, p. 510-516.

28 BRENER, Z.; CANÇADO, J. R.; GALVÃO, L. M.; DA LUZ, Z. M.; FILARDI, L. S.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, L. M.; CANÇADO, C. B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 149-153, 1993.

29 CANÇADO, J. R.; MARRA, U. D.; BRENER, Z. Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 12-16, 1964.

30 COURA, J. R.; SILVA, J. R. Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 51, p. 283-290, 1961.

31 PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurán compounds. **Journal of Parasitology**, v. 38, p. 30-40, 1952.

32 PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurán compounds. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 7, p. 13-23, 1957.

33 CANÇADO, J. R.; MARRA, U. D.; BRENER, Z. Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (Nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 12-16, 1964.

34 RASSI, A.; FERREIRA, H. O. Tentativas de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nitrofuranos em esquemas de duração prolongada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, p. 235- 262, 1971.

35 COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; SILVA, J. R. Experiências com nitrofurazona na fase crônica da doença de Chagas. **O Hospital**, v. 62, p. 957-964, 1962.

36 FERREIRA, H. O. Forma aguda da doença de Chagas tratada pela nitrofurazona. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, p. 287-289, 1961.

37 FERREIRA, H. O. Fase aguda da doença de Chagas. **O Hospital**, v. 61, p. 307-311, 1962.

38 FERREIRA, H. O.; PRATA, A.; RASSI, A. Administração prolongada de nitrofurazona no tratamento da doença de Chagas aguda. **O Hospital**, v. 63, p. 131-139, 1963.

39 RUBIO, M.; DONOSO, F. Enfermedad de Chagas en niños y tratamiento con Bay 2502. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 24, p. 43-48, 1969.

40 SCHENONE, H.; CONCHA, L.; ARANDA, R.; ROJAS, A.; ALFARO, E. Experiência terapêutica con el Bayer 2502 en la infección chagásica crónica del adulto. Importancia del uso adecuado del xenodiagnóstico. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 24, p. 66-69, 1969.

41 SCHENONE, H.; CONCHA, L.; ARANDA, R.; ROJAS, A.; ALFARO, E.; KNIERIN, E.; ROJO, M. Atividade quimioterápica de um derivado nitroimidazolacetarnida na infecção chagásica crônica. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 30, p. 91-93, 1975.

42 SCHENONE, H.; CONCHA, L.; ARANDA, R.; ROJAS, A.; KNIERIM, F.; ROJO, M. Treatment of chronic Chagas infection with Lampit. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 27, p. 11-14, 1972.

43 SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B. M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p. 526-529, 1998.

44 MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 999-1006, 2003.

45 MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 146, p. 601-620, 2007.

46 MORENO, S. N.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEÓN, W.; STOPPANI, A. O. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 218, p. 585-591, 1982.

47 MASON, R. P.; HOLTZMAN, J. L. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 1267-1274, 1975.

48 TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 96, p. 167-176, 1998.

- 49 DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, p. 880-881, 1988.
- 50 DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. 223-238, 1984.
- 51 DOCAMPO, R.; MORENO, S. N.; STOPPANI, A. O.; LEÓN, W.; CRUZ, F. S.; VILLALTA, F.; MUÑOZ, R. F. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, p. 1947-1951, 1981.
- 52 ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 823-828, 2002.
- 53 TURRENS, J. F.; WATTS Jr., B. P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives, **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, p. 125-129, 1996.
- 54 CASTRO, J. A.; MECA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effect of drugs used to treat chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.
- 55 SANCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 23-30, 2004.
- 56 FARRELL, N. P.; WILLIAMSON, J.; MCLAREN, D. J. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, p. 961-71, 1984.
- 57 CASRTILLA, J. J.; MESA-VALLE, C. M.; SANCHEZ-MORENO, M.; ARNEDO, T.; ROSALES, M. J.; MASCARO, C.; CRACIUNESCU, D.; OSUNA, A. *In vitro* activity and biochemical effectiveness of new organometallic complexes of osmium (III) against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. **Ärztliche-Forschung / Drug Research**, v. 46, p. 990-996, 1996.
- 58 NAVARRO, M.; LAHMANN, T.; CISNEROS-FAJARDO E. J.; FUENTES A.; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; SILVA, P.; URBINA, J. A. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. Part 5. synthesis and characterization of new Ru(II) and Ru(III) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. **Polyhedron**, v. 19, p. 2319-2325, 2000.

59 OTERO, L.; VIEITES, M.; BIOANI, L.; DENICOLA, A.; RIGOL, C.; OPAZO, L.; OLEA-AZAR, C.; MAYA, J. D.; MORELLO, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; CERECETTO, H. Novel antitypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3322-3331, 2006.

60 CLARKE, M. J. **Ruthenium and other non-platinum metal complexes in cancer chemotherapy**. Heidelberg: Springer-Verlag, Germany, 1989.

61 FRASCA, D.; CIAMPA, J.; EMERSON, J.; UMANS, R. S.; CLARKE, M. J. Effects of hypoxia and transferrin on toxicity and DNA binding of ruthenium antitumor agents in HeLa cells. **Metal-Based Drugs**, v. 3, p. 197-209, 1996.

62 MONCADA, S., HERMAN, A. G., VANHOUTTE, P. Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 8, p. 365-368, 1987.

63 PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.

64 IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric-oxide - actions and properties. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, p. 31-36, 1989.

65 BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, p. 768-770, 1990.

66 GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 14, p. 60-67, 1991.

67 GARTHWAITE, J. Neural nitric-oxide signaling. **Trends in Neurosciences**, v. 18, p. 51-52, 1995.

68 HIBBS Jr., J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophages effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, p. 87-94, 1988.

69 MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHONOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite an nitrate: Nitric Oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p. 8706-8711, 1988.

70 PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and peroxynitrite in health and disease, **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007

-
- 71 VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q. and SILVA J. S., Nitric Oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in Vitro, **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5177-5182, 1994.
- 72 LUDER, C. G. K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROB, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages, **Internal Journal of Parasitology**, v. 33, p. 833-844, 2003.
- 73 GARNICA M. R.; SILVA J. S.; JUNIOR, A. Stromal cell-derived factor-1 production by spleen cells is affected by nitric oxide in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* CR in C57BL/6j mice. **Immunology letters**, v. 89, p. 133-142, 2003.
- 74 SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A., VENTURINI, G.; GRADONI, L. and ASCENZI, P. NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1545, p. 357-366, 2001.
- 75 FUJI, S.; AKAIKE, T. and MAEDA, H. Role of Nitric oxide in pathogenesis of Herpes simplex virus encephalitis in rats. **Virology**, v. 256, p. 203-212, 1999.
- 76 COOPER, A. M.; ADAMS, L. B.; DALTON, D. K.; APPELBERG, R.; S. EHLERS, IFN-gamma and NO in micobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 221-226, 2002.
- 77 LANCASTER Jr, J. R. The physiological properties of nitric oxide. Determinants of the dynamics of NO in tissue. In: IGNARRO, L. (Ed). **Nitric oxide**. NovaYork: Academic Press:, 2000, p. 209-223.
- 78 MALINSK, T.; TAHA, Z.; GRUNFELD. S.; PATTON, S.; KAPTUREZAK, M.; TMBOLIAN, P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored *in situ* by porphyrine microsenors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, p. 1076-1082, 1993.
- 79 MEULEMANS, A. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. **Neuroscience Letters**, v. 171, p. 89-93, 1994.
- 80 MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standartdisation by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. **The Analyst**, v. 125, p. 1629-1632, 2000.
- 81 LANCASTER Jr., R. J. Diffusion of free nitric oxide. In: Packer, L. (Ed). **Methods in Enzimology: nitric oxide, sources and detection of NO; NO synthase**. New York: Academic Press, 1996, v. 268, p-31-50.

-
- 82 MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-42, 1991.
- 83 REED, S. G.; NATHAN, C. F.; PIHL, D. L.; RODRICKS, P.; SHANEBECK, K.; CONLON, P. J.; GRABSTEIN, K. H. Recobinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 166, p. 1734-1746, 1987.
- 84 MACMINCKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.
- 85 NATHAN, C. F. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, p. 3051-64, 1992.
- 86 NATHAN C. F.; HIBBS Jr., J. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion in Immunology**, v. 3, p. 65-70, 1991.
- 87 PAVETO, C.; PEREIRA, C.; ESPINOSA, J.; MONTAGNA, A. E.; FARBER, M.; ESTEVA, M.; FLAWIA, M. M.; TORRES, H. N. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 16576-79, 1995.
- 88 CENCI, E.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; SCHIAFFELLA, E.; PUCETTI, P.; ET AL. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 1034-1038, 1993.
- 89 GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B. Jr.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 264-73, 1990.
- 90 DJEU, J. Y.; BLANCHARD, D. K.; HALKIAS, D.; FRIEDMAN, H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 2980-2984, 1986.
- 91 FISCHER-STENGER, K.; MARCIANO-CABRAL, F. The arginine-dependent cytolytic mechanism plays a role in destruction of *Naegleria fowleri amoebae* by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 5126-5131, 1992.
- 92 JAMES, S. L.; GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 4208-4212, 1989.

-
- 93 DUERKSEN-HUGHES, P. J.; DAY, D. B.; LASTER, S. M.; ZACHARIADES, N. A.; AQUINO, L.; GOODING, L. R. Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 2114-2122, 1992.
- 94 ISOBE, K.; NAKASHIMA, I. Abundant production of nitric oxide from murine macrophages by direct stimulation of tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 192, p. 499-504, 1993.
- [95] HIBBS Jr., J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.
- [96] IYENGAR, R.; STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 6369-6373, 1987.
- 97 STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 1543-1555, 1989.
- 98 HIBBS Jr., J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 157, p. 87-94, 1988.
- 99 MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p. 8706-8711, 1988.
- 100 NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 97-123, 2003.
- 101 CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: the role of NK cell. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 128-134, 1996.
- 102 SILVA, J. S.; VESPA, G. N. R.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. TNF- α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4862-4867, 1995.

103 VERLINE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FATHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 4, p. 1-14, 2001.

104 DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini Review in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1108-1119, 2007.

105 HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P. R.; TURNBULL, W. B.; SCHEUERL, S. L.; NAISMITH, J. H.; SCHENKMAN, S. R.; FIELD, A. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase towards neuAc-a-2,3-Gal-b-O-PNP, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 141-144, 2001.

106 HILLEBRAND, H.; SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 6809-6815, 2003.

107 STTOPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina**, v. 59, p. 147-165, 1999.

108 PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, p. 13-17, 2002.

109 HUANG, L.; ELLMAN, J. General solid-phase method to prepare novel cyclic ketone inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 2993-2996, 2002.

110 GILBERT, I. H. Inhibitors of dihydrofolate reductase in *Leishmania* and *Trypanosomes*. **Biochimical et Biophysical Acta**, v. 1587, p. 249-257, 2002.

111 VENDEVILLE, S.; BOUREL, L.; DAVIOUD-CHARVET, E.; GRELLIER, P.; DEPREZ, B.; SHERGHERAERT, C. Automated parallel synthesis of a tetrahydroisoquinolin-based library: potential prolyl endopeptidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 437-442, 1999.

112 RODRIGUES, C. O.; DUTRA, P. M. L.; BARROS, F. S.; SOUTO-PADRÓN, T.; MEYER-FERNANDES, J. R.; LOPES, A. H. C. S. Platelet-activating factor induction of secreted phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 266, p. 36-42, 1999.

-
- 113 BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 315, p. 710-718, 2004.
- 114 ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; GRADONI, L. The anti-parasitic effects of nitric oxide. **IUBMB Life**, v. 55, p. 573-578, 2003.
- 115 MCGRATH, M. E.; EAKIN, ^a E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 251-259, 1995.
- 116 SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, p. 131-135, 1998.
- 117 YUM, M.; PARK, C. G.; KIM, J. Y.; PARK, H. W. Structural analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: direct evidence of substrate binding and cofactor-induced conformational changes. **Biochemistry**, v. 39, p. 10702-10710, 2000.
- 118 ISHII, T.; SUNAMI, O.; NAKAJIMA, H.; NISHIO, H.; TAKEUCHI, T.; HATA, F. Critical role of sulfenic acid formation of thiols in inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 133-143, 1999.
- 119 SOUZA, J. M.; RADI, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 187-194, 1998.
- 120 LOPEZ, B. E.; WINK, D. A.; FUKUTO, J. M. The inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitroxyl (HNO). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 465, p. 430-436, 2007.
- 121 PROTEIN DATA BANK. Disponível em:
<<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structuredId=1ME3>>. Acesso em: 29-jan-2008.
- 122 PROTEIN DATA BANK. Disponível em:
<<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structuredId=1K3T>>. Acesso em 29-jan-2008.
- 123 ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- 124 CLARKE M. J.; GAUL J.B.; Chemistry relevant to the biological effects of nitric oxide and metallonitrosyls. **Structure and Bonding**, v. 81, p. 147, 1993.

-
- 125 FRICKER, S. P. Ruthenium, nitric oxide and disease: a novel inorganic chemistry approach to drug design. **Platinum Metals Reviews**, v. 39, p. 150-159, 1995.
- 126 ROSE, E. J. and HOFFMAN, M. Nitric oxide ferrohememes: Kinetics of formation and photodissociation quantum yields. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 105, p. 2866-2873, 1983.
- 127 SALERMO, J. C. Nitric oxide of metalloproteins: an introductory overview. In: LANCASTER Jr., J. R. (Ed). **Nitric Oxide: principles and actions**. Boca Raton: Academic Press, 1996. p. 83-110.
- 128 COOPER, C. E. Nitric oxide and iron proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 290-309, 1999.
- 129 FONTECAVE, M. and PIERRE, J. L. The basic chemistry of nitric oxide and its possible biological reactions, **Bulletin de la Société Chimique de France**, v. 131, p. 620-631, 1994.
- 130 MCCLEVERTY, J.A. Reaction of nitric oxide coordinated to transition metals. **Chemical Reviews**, v. 79, p. 53-76, 1979.
- 131 BOTTOMLEY, F. Nitrosyl complexes of ruthenium. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 26, p. 7-32, 1978.
- 132 CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, p. 69-93, 2002.
- 133 ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metal Reviews**, v. 45, p. 62-69, 2001.
- 134 ENEMARK, J. H.; FELTHAM, R. D. Stereochemical control of Valence. 2. The behavior of the $\{MNO\}^n$ groups in ligand fields. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 96, p. 5002-5004, 1974.
- 135 RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. **Metal Nitrosyl**. New York: Oxford University Press, 1992, p. 693.
- 136 SCHREINER, A. F.; LIN, S. W.; HAUSER, P. J.; HOPCUS, E. A.; HAMM, D. J.; GUNTER, J. D. Chemistry and Optical Properties of 4d and 5d transition metals. III. Chemistry and Electronic Structures of Ruthenium acidonitrisylammines, $[Ru(NH_3)_4(NO)(L)]^{n+}$, **Inorganic Chemistry**, v. 11, p. 880-887, 1972.
- 137 LEBRERO, M. C. G.; SCHERLIS, D. A.; ESTIU, G. L.; OLABE, J. A.; ESTRIN, D. A. Theoretical investigation on the structure of pentacyano(L)ferrate(II) complexes with NO^+ , NO, and NO^- Ligands. Redox interconversion, protonation, and cyanide-releasing reactions. **Inorganic Chemistry**, v. 40, p. 4127-4133, 2000.

-
- 138 WINK, D.A.; MITHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanism of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, p. 434-456, 1998.
- 139 MIRANDA, K. M. The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 433-455, 2005.
- 140 TAUBE, H. In: SCOTT, A. F. (Ed), **Survey of progress in chemistry**, New York: Academic Press, 1973.
- 141 TAUBE, H. Substitution reactions of ruthenium ammines. **Comments on Inorganic Chemistry**, v. 1, p. 17, 1981.
- 142 FORD, P. C. Properties and reactions of ruthenium(II) amine complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 5, p. 75-88, 1970.
- 143 SEDDON, E. A.; SEDDON, K. R. **The chemistry of ruthenium**. Amsterdam: Elsevier, 1984, p. 1335.
- 144 BORGES, S. S.; DAVANZO, C. V.; CASTELANO, E. E., K-SCHEPECTOR, J.; SILVA, S. L.; FRANCO, D. W. Ruthenium nitrosyl complexes with N-heterocyclic ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 37, p. 2670-2677, 1998.
- 145 GOMES, M. G.; DAVANZO, C. V.; SILVA, S. C.; LOPES, L. G. F.; SANTOS, R. S. and FRANCO, D. W. *Cis* and *trans* nitrosyltetraamineruthenium(II). Spectral and electrochemistry properties and reactivity. **Journal of the Chemical Society Dalton Transitions**, v. 37, p. 601-607, 1998.
- 146 BEZERRA, C. W .B.; SILVA, S. C.; GAMBARDELLA, M. T. P.; SANTOS, R. H. A.; PLICAS, L. M. A.; TFOUNI, E. and FRANCO, D. W. Water π donation in *trans* tetraamineruthenium(II): Effect on coordinated water properties induced by NO *trans* ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 38, p. 5660-5667, 1999.
- 147 TOLEDO, J. C.; SILVA, H. A. S.; SCARPELLINI, M.; MORI, V.; CAMARGO, A. J.; BERTOTTI, M. and FRANCO, D.W. Ruthenium tetraamines as a model of nitric oxide donor compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 9, p. 1879-1885, 2004.
- 148 TFOUNI, E.; KRIEGER, M. H.; MCGARVEY, B. R.; FRANCO, D. W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine Nitrosyl complexes, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, p. 57-69, 2003.
- 149 RONCAROLI, F.; RUGGIERO, M. E.; FRANCO, D. W.; ESTIÚ, G. L. and OLABE, J. A. Kinetic, mechanistic, and DFT study of the electrophilic reactions of nitrosyl complexes with hydroxide. **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 5760-5769, 2002.

150 GORELSKY, S. I.; SILVA, S. C.; LEVER, A. B. P.; FRANCO, D. W. Electronic spectra of *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(NO)]^{3+/2+} complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 302, p. 698-708, 2000.

151 CARLOS, R. M.; FERRO, A. A.; SILVA, H. A. S.; GOMES, M. G.; BORGES, S. S. S.; FORD, P. C.; TFOUNI, E.; FRANCO, D. W. Photochemical reactions of *trans*-[Ru(NH₃)₄L(NO)]³⁺ complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, p. 1381-1388, 2004.

152 HIMENO, M.; ISHIBASHI, T.; NAKANO, S.; FURUYA, K.; YOSHIDA, J.; KIGASHI, T.; UCHIDA, K.; NISHIO, M. Implication of steady state concentrations of nitrite and nitrate metabolites of nitric oxide in plasma and whole blood in healthy human subjects. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 31, p. 591-596, 2004.

153 ZANICHELLI, P. G.; SERNAGLIA, R. L.; FRANCO, D. W. Immobilization of the Ru^{II}(edtaNO⁺) ion on surface of functionalized sílica gel. **Langmuir**, v. 22, p. 203-208, 2006.

154 OSTI, R. Z.; FRANCO, D. W. Aspects of nitrite association with *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(H₂O)]²⁺. **Polyhedron**, v. 26, p. 4746-4750, 2007.

155 LOPES, L. G. F.; WIERASZKO, A.; EL-SHERIF, Y.; CLARKE, M. The *trans*-labilization of nitric oxide in Ru-II- complexes by C-bound imidazoles. **Inorganica Chimica Acta**, v. 312, p. 15-22, 2001.

156 DA SILVA, F. O. N.; ARAÚJO, S. X. B.; HOLANDA, A. K. M.; MEYER, E.; SALES, F. A. M.; DIÓGENES, I. C. N.; CARVALHO, I. M. M.; MOREIRA, I. S.; LOPES, L. G. F. Synthesis, characterization and NO release study of *cis*- and *trans*-[Ru(Bpy)₂(SO₃)NO]⁺ complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2006, p. 2020-2026, 2006.

157 SCHLEDE, E.; GENSCHOW, E.; SPIELMANN, H.; STROPP, G.; KAYSER, D. Oral acute toxic class: a successful alternative to the oral LD₅₀ test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 15-23, 2005.

158 RODRIGUEZ, J. A.; SOUZA-TORSONI, A.; FRANCO, D. W.; HAUN, M. Cytotoxic evaluation of new synthesized ruthenium nitrosyl compounds. In: *Renião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBQ*, 26, 1997, Caxambu, **Livro de resumo**, 1997, S-32.

159 TORSONI, A. S.; BARROS, B. F.; TOLEDO, J. C.; HAUN, M.; KRIEGER, M. H.; TFOUNI, E.; FRANCO, D. W. Hypotensive properties and acute toxicity of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃, a new nitric oxide donor. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 6, p. 247-354, 2002.

- 160 ZANICHELLI, P. G.; MIOTTO, A. M.; ESTRELA, H. F. G.; SOARES, F. R.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; CASTELLANO, E. E.; RONCAROLI, F.; PARISE, A. R.; OLABE, J. O.; BRITO, R. M. S.; FRANCO, D. W. The $[\text{Ru}(\text{Hedta})\text{NO}]^{0,1-}$ system: structure, chemical and biological assays. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1921-1932, 2004.
- 161 ISIED, S. S.; TAUBE, H. Effects of sulfur dioxide, bisulfite(1-), and sulfite(2-) as auxiliary ligands on the reactivity of ammineruthenium(II)-ligand bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 1545-1551, 1974.
- 162 TOLEDO, J. C.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. F. Mutual effects in the chemical properties of the ruthenium metal center and ancillary ligands upon coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 419-431, 2005.
- 163 AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS Jr., L. E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2034-2039, 2004.
- 164 RENSLO, R.; MCKERROW, J. H. Drugs discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, v. 2 p. 701-709, 2006.
- 165 CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1187-1213, 2002.
- 166 CLARKE, M. J. Electrochemistry, synthesis, and spectra of pentaamineruthenium(III) complexes of cyridine, adenosine, and related ligands. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 100, p. 5068-5075, 1978.
- 167 PERRIN, D. D.; ALMAREGE, W. L.; PERRIN, D. P. **Purification of laboratory chemicals**. New York: Pergamon Press, 1983.
- 168 NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds**, 5a. Ed., New York: John Wiley & Sons, 1979.
- 169 LEVER, A. B. P., **Inorganic electronic spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1968.
- 170 GALIA E.; NICOLAIDES E.; HORTER, D.; LOBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 698-705, 1998.

171 KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGIGER, H. E.; STAVCHANSKY S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, p. 85-96, 2004.

172 SILVA, H. A. S.; MCGARVEY, B. R.; SANTOS, R. H. A.; BERTOTTI, M.; MORI, V. FRANCO, D. W. Sulfate as a ligand in ruthenium(II) and (III) ammines. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 79, p. 679-687, 2001.

173 LOPES, L. G. F.; CASTELLANO, E. E.; FERREIRA, A. G.; DAVANZO, C. U.; CLARKE, M. J.; FRANCO, D. W.; Reactivity of *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃NO]X₃, (X = PF₆⁻, CF₃COO⁻): modulation of the release of NO by the *trans*-effect. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 2883-2890, 2004.

174. HOLANDA, A. K. M.; PONTES, D. L.; DIÓGENES, I. C. N.; MOREIRA, I. S. LOPES, L. G. F. Synthesis, characterization and NO release study of *cis*- and *trans*-[Ru(Bpy)₂(SO₃)NO]⁺ complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 29, p. 430-436, 2004.

175 VOGT, L. H.; KATZ, J. L.; WIBERLEY, S. E. The crystal and molecular structure of ruthenium-sulfur dioxide coordination compounds. I. Chlorotetraammine(sulfur dioxide)ruthenium(II) chloride. **Inorganic Chemistry**, v. 4, p. 1157-1163, 1965.

176 FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, JR., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; AND POPL, J. A. **Gaussian 03**: revision C.02. Wallingford: Gaussian, 2004. Programa de computador.

177 BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

-
- 178 BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.
- 179 FARKAS, O.; SCHLEGEL, H. B. Methods for optimizing large molecules. II. Quadratic search. **Journal of Chemical Physics**, v. 111, p. 10806-10814, 1999.
- 180 BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, p. 3098-3100, 1988.
- 181 GLENDENING, E. D.; BADEMHOOP, J. K.; REED, A. E.; CARPENTER, J. E.; BOHMANN, J. A.; MORAES, C. M.; WEINHOLD, F. **NBO 3.0 Theoretical Chemistry Institute**. Madison: WI, 1998.
- 182 GORELSKI, S. L. **AOMix**: program for molecular orbital analysis. Toronto: York University, 1997
- 183 CASIDA, M. E.; Time dependent density functional response theory for molecules. In: CHONG, D.P. (Ed.). **Recent advances in density functional methods**. Singapore: World Scientific, 1995. p. 155-193.
- 184 STRATMANN, R. E.; SCUSERIA, G. E.; FRISCH, M. J. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 109, p. 8218-8224, 1998.
- 185 GORELSKY, S. I. **Swizard**, Toronto: Department of Chemistry, 1999. Disponível em: < <http://www.sg-chem.net> >. Acesso em 10-out-2006.
- 186 CANCES, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. A New integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **Journal of Chemical Physics**, v. 107, p. 3032-3041, 1997.
- 187 MIERTUS, S.; SCROCCO, E.; TOMASI, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of *ab initio* molecular potentials for the prevision of solvent effects. **Chemical Physics**, v. 55, p. 117-129, 1981.
- 188 FRESHNEY, R. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. New York: Alan R. Liss, 1987, p. 117.
- 189 LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 171, p. 131-137, 1994.
- 190 BRUCE, R. D. An *up-and-down* procedure for acute toxicity testing. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, p. 151-157, 1985.

- 191 FREITAS, J. L. P.; BIANCALANA, A.; AMATO-NETO, V.; NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BARRETO, G. Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. **Revista Paulista de Medicina**, v. 40, p. 36-40, 1952.
- 192 SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v. 20, p. 191-208, 1953.
- 193 MARTINEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 53-59, 2001.
- 194 GUEDES, P. M.; URBINA, J. A.; DE LANA, M.; AFONSO, L. C.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 4286-4292, 2004.
- 195 MURTA, S. M.; GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 203-214, 1998.
- 196 BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.
- 197 BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 63, p. 215-220, 1969.
- 198 BARBOSA VM, NAKANO M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas sp.* 1. Purification and properties of the enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 88, p. 563-568, 1987.
- 199 SILVA, R. S. F.; COSTA, E. M.; TRINDADE, U. L. T.; TEIXEIRA, D. V.; PINTO, M. C. F. R.; SANTOS, G. L.; MALTA, V. R. S.; DE SIMONE, C. A.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 526-530, 2006.
- 200 SCHLEDE, E.; GENSCHOW, E.; SPIELMANN, H.; STROPP, G.; KAYSER, D. Oral acute toxic class: A successful alternative to the oral LD₅₀ test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 15-23, 2005.
- 201 ZANICHELLI, P. G.; ESTRELA, H. F. G.; SPADARI-BRATFISC, R. C.; GRASSE-KASSISSE, D. M.; FRANCO, D. W. The effects of ruthenium compounds on vascular smooth muscle. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 16, p. 189-196, 2007.

202 SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v. 152 p. 112-121, 2007.

203 COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 9, p. 131-134, 2002.

204 SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas' disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. s314-325, 2003.

205 ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. beta Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4819-4826, 1999.

206 ALIBERTI, J. S.; CARDOSO, M. G.A.; MARTINS, G. A. XXX. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1961-1967, 1996.

207 MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L. A. C.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, p. 3003-3008, 2000.

208 SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGF-beta). **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 539-545, 1991.

209 WAGHABI, M. C.; KERAMIDAS, M.; FEIGE, J. J.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BAILLY, S.. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 511-517, 2005.

210 MARTINS, G. A.; CARDOSO, A. G.; ALIBERTI, J. C. S.; SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunology Letters**, v. 63, p. 113-120, 1998.

211 ROSSI, M. A.; BESTELLI, R. B. The challenge of Chagas' disease cardiomyopathy: the pathogenic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. **Cardiology**, v. 86, p. 1-7, 1995.

-
- 212 CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; COLSTON, J. T.; FREEMAN, G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 152, p. 925-934, 1998.
- 213 FRICKER, S. P. Ruthenium, nitric oxide and disease. **Platinum Metal Reviews**, v. 59, p. 150-159, 1995.
- 214 HIBBS, J.; TAINTOR, R. HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 157, p. 87-94, 1988.
- 215 LINK, E.; RILEY, P. Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system. **Biochemical Journal**, v. 249, p. 391-399, 1988.
- 216 BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v. 128, p. 617-630, 1972.
- 217 GABIG, T. G.; BABIOR, B. M.; The $O_2(-)$ -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 9070-9074, 1979.
- 218 MARKERT, M.; GLASS, G. A.; BABIOR, B. M. Respiratory burst oxidase from human neutrophils: purification and some properties **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 3144-3148, 1985.
- 219 KOPPENOL, W. H.; MORENO, J. J.; PRYOR, W. A.; ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. **Chemical Research Toxicology**, v. 5, p. 834-842, 1992.
- 220 SARAN, M.; MICHAEL, C.; BORS, W. Reaction of NO with $O_2^{\bullet-}$. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Free Radical Research Communications**, v. 10, p. 221-226, 1990.
- 221 ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; BECKMAN, J. S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 298, p. 446-451, 1992.
- 222 RADI, R.; BECKMAN, J.; BUSH, K.; FREEMAN, B. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 4244-4250, 1991.
- 223 DENICOLA, A.; RUBBO, H.; RODRÍGUEZ, D.; RADI, R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 304, p. 279-286, 1993.

- 224 JOCHERS-SCHERUBL, J. C.; SCHIRMER, R. H.; KRAUTH-SIEGET, R. L. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 180, p. 267-272, 1989.
- 225 WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. How does *Trypanosoma cruzi* survive the toxic effects of reactive oxygen species. In: KELLY, J. M. (Ed). **Molecular mechanisms of pathogenesis in Chagas disease**. London: Landes Bioscience, v. 12, p. 56-71, 2003.
- 226 TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211-220, 2004.
- 227 GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.
- 228 RONCAROLI, F.; OLABE, J. A. The reactions of nitrosyl complexes with cysteine. **Inorganic Chemistry**, v. 44, p. 4719-4727, 2005.
- 229 DA SILVA, F. O. N. Estudo cinético da reação dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆) com redutores biológicos. 2007. p. 156. **Tese (Doutorado)** – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.
- 230 MATSUBARA, T.; FORD, P. Some applications of cyclic voltammetry to the reactions and properties of ruthenium ammine complexes. Reduction potentials and rate studies. **Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 1107-1110, 1975.
- 231 BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; BONTÁ, M.; CHAUVIERE, G.; PÉRIÉ, J.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megazol and some related nitroimidazole derivatives. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 511, p. 46-54, 2001.
- 232 BROWN, G. M.; SUTTON, J. E.; TAUBE, H. Binding of a tetraammineruthenium complex to imidazole and purine derivatives under equilibrium conditions. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 26, p. 2767-2774, 1978.
- 233 CLARKE, M. J.; TAUBE, H. Pentaammineruthenium-guanine Complexes. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 96, p. 5413-5419, 1974.
- 234 FRANCO, D. W.; TAUBE, H. Triethyl phosphite as a ligand on ruthenium (II). **Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 571-578, 1978.

- 235 KOVALEVSKY, A. Y.; BAGLEY, K. A.; COPPENS, P. The first photocrystallographic evidence for light-induced metastable linkage isomers of ruthenium sulfur dioxide complexes. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9241-9248, 2002.
- 236 POST, B.; SCHWARTZ, R. S.; FANKUCHEN. The crystal structure of sulfur dioxide. **Acta Crystallographica**, v. 5, p. 372-374, 1952.
- 237 NOTHENBERG, M. S.; TAKEDA, G. K. F.; NAJJAR, R. Adducts of nitroimidazoles derivatives with rhodium (II) carboxylates: synthesis, characterization, and evaluation of antischistosomal activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 42, p. 217-229, 1991.
- 238 LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**, 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- 239 BOIANI, M.; BOIANI, L.; DENICOLA, A.; DE ORTIZ, S. T.; SERNA, E.; DE BILBAO, N. V.; SANABRIA, L.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; DE ARIAS A. R.; VEJA, C.; ROLAN, M.; GOMEZ-BARRIO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: A new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3215-3224, 2006.
- 240 BUSCHINI, A.; GIORDANI, F.; ALBUQUERQUE, C. N.; PELLACANI, C.; PELOSI, G.; ROSSI, C.; ZUCCHI, T. M.; POLI, P. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: relationships among chemical structure and genotoxic activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1537-1547, 2007.
- 241 LAMAS, M. C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, C. J. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benzimidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 239-243, 2006.
- 242 SILVA, I. A.; GRABER, J.; NYLAND, J. F.; SILBERGELD, E. K. In vitro HgCl₂ exposure of immune cells at different stages of maturation: effects on phenotype and function. **Environmental Research**, v. 98, p. 341-348, 2005.
- 243 MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. Activity of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) Against Drug-resistant Strains of the Protozoan Parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 150-155, 2000.
- 244 FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease is Less Dependent on Gamma Interferon Than That of Benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1359-1364, ²⁰⁰⁷.

-
- 245 SANCHEZ-DELGADO, R.; NAVARRO, M.; LAZARDI, K.; ATENCIO, R.; CAPPARELLI, M.; VARGAS, F.; URBINA, J. A.; BOUILLEZ, A.; NOELS, A. F.; MAIS, D. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical disease 4. Synthesis and characterization of a new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 275-276, p. 528-540, 1998.
- 246 OTERO, L.; NOBIA, P.; GAMBINO, D.; CRECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ELLENA, J. A.; PIRO, O. E. synthesis and characterization of new ruthenium complexes with active ligands against chagas' disease. **Inorganica Chimica Acta**, v. 344, p. 85-94, 2003.
- 247 PETRAY, P. B.; MORILLA, M. J.; CORRAL, R. S.; ROMERO, E. L. *In vitro* activity of etanidazole against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 233-235, 2004.
- 248 DIAS, L. R. S.; SANTO, M. B.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO, H. C.; SOUZA, A. M. T.; FREITAS, A. C. C.; DIVAIO, M. A. V.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R. Synthesis, *in vitro* evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine series. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, p. 211-219, 2007.
- 249 PORCAL, W.; PAOLA, H.; AGUIRE, G.; BIOANI, L.; BIOANI, M.; MERLINO, A.; FERREIRA, A.; DI MAIO, R.; CASTRO, A.; GONZÁLEZ, M.; CEREETTO, H. Second generation of 5-ethenylbenzofuroxan derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Syntehsis, biological evaluation, and structure-activity relationships. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, p. 2768-2781, 2007.
- 250 MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Phatogenesis of chronic chagas' heart disease. **Circulation**, v. 115, p. 1109-1123, 2007.
- 251 GARCIA, S.; RAMOS, C. O.; SENRA, J. F.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M. M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1521-1528, 2005.