



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**EDINILTON MUNIZ CARVALHO**

**REATIVIDADE DO NITROSILO COMPLEXO DE FERRO**

*trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

**FORTALEZA**

**2015**

EDINILTON MUNIZ CARVALHO

REATIVIDADE DO NITROSILO COMPLEXO DE FERRO

*trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Inorgânica.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C322r Carvalho, Edinilton Muniz.  
REATIVIDADE DO NITROSILO COMPLEXO DE FERRO trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> / Edinilton  
Muniz Carvalho. – 2015.  
169 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação  
em Química, Fortaleza, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes.

Coorientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

1. Óxido nítrico. 2. Nitroxila. 3. Vasodilatação. 4. Atividade nuclease. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 540

---

EDINILTON MUNIZ CARVALHO

REATIVIDADE DO NITROSILO COMPLEXO DE FERRO

*trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Inorgânica.

Aprovado em 29/10/2015.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Cristiane Pinto Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, por ter me abençoado, dado força e iluminado durante esse percurso.

Aos meus pais Maria Veraleide da Masceno Muniz e José Nilton Gomes de Carvalho; pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes e Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa pela imensurável contribuição na minha formação pessoal e científica desde a graduação até agora, sempre com entusiasmo, incentivo e discussões positivas. Para mim são grandes exemplos de amor e paixão pela ciência.*

*Ao Prof. Dr. Douglas W. Franco da USP (São Carlos) pela disponibilidade dos laboratórios para execução dos ensaios de EPR e ao Thiago Abrahão Silva (USP - São Carlos) pelo grande auxílio na obtenção dos espectros de EPR.*

*Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho, instalado na Universidade Federal do Ceará e ao Prof. Dr. Tércio de Freitas Paulo pelos resultados computacionais e pelas discussões científicas a respeito dos mesmos, foram de grande ajuda.*

*Ao Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes da UFRN pelos dados de viabilidade celular.*

*Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e ao aluno de doutoramento Pedro Henrique por ter cedido os resultados de vasodilatação.*

*A todos os professores do Grupo de Bioinorgânica e do Curso de Pós-graduação em Química da UFC, por todo o conhecimento transmitido.*

*Aos amigos e colegas do Grupo de Bioinorgânica, em especial a Andre F. Fernandes, Amanda Lopes, Aurideia Possidonio, Carlos Daniel, Catherine Teles, Denise Sá, Dieric dos Santos, Elder Souza, Felipe Diógenes, Florêncio Júnior, Gilmara Vieira, Janise Rodrigues, Patrícia Rocha, Vivania Alves, Marcos Carvalho, Natanna Azevedo, Samuel Victor, Thiago dos Santos, Ticyano Souza e Walysson Gomes, os quais tenho apreço.*

*Ao aluno de iniciação científica Elder Souza pela ajuda nas sínteses dos compostos e no auxílio durante os experimentos.*

*Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, Valdeline Sousa e Pedro Henrique pela ajuda em algumas etapas de síntese dos compostos.*

*A Dra. Marta Sofia Carepo pelas enriquecedoras discussões científicas e pela imensurável ajuda e prestatividade nos experimentos de replicação de DNA e ensaio bactericida.*

*A Dra. Ana Cláudia e Wellinson Gadêlha pelo grande auxílio no experimento de ensaio bactericida.*

*A todos meus familiares e amigos que não fazem parte do meu ciclo acadêmico, pelo apoio, compreensão e companheirismo.*

*A Universidade Federal do Ceará (UFC) pela oportunidade e toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.*

*Aos funcionários do programa de pos-graduação em Química da UFC pelo auxílio na parte burocrática.*

*A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pela bolsa concedida e auxílio financeiro disponibilizado para esta pesquisa.*



“A mente que se abre a uma nova  
idéia jamais voltará ao seu  
tamanho original.”

(Albert Einstein)

## RESUMO

O óxido nítrico (NO), espécie produzida endogenamente, é responsável pela vasodilatação dos vasos sanguíneos entre outros processos fisiológicos. O íon nitroxila ( $\text{NO}^-$ ), espécie gerada por redução monoelétrica do NO, tem despertado o interesse da comunidade científica graças às suas atividades biológicas distintas do óxido nítrico. O nitroprussiato de sódio (SNP) faz parte de uma classe de compostos que liberam NO espontaneamente, sendo o único complexo metálico usado clinicamente, porém existem problemas associados ao seu uso, incluindo fotossensibilidade e liberação de cianeto. Desta forma, compostos alternativos a base de ferro tem sido estudados, tal como o *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>, cujos estudos de reatividade química, bem como de seu precursor (*trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)), foram investigados nesta dissertação. Adicionalmente, avaliou-se as potencialidades anticancerígenas e microbicidas destes complexos. O nitrosilo complexo exibiu a capacidade de liberar NO espontaneamente em condições fisiológicas e quando estimulado por luz. O NO liberado termicamente e fotoquimicamente reagiu com *traps* seletivos, em diferentes taxas de velocidade. Os valores de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para reação do nitrosilo complexo com cPTIO foram 115 ( $k = 0,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) e 385 ( $k = 3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) minutos para reação fotoquímica e térmica, respectivamente, sendo notório que a luz acelera o processo de liberação. O ensaio fotoquímico empregando mioglobina indicou liberação de NO, contudo não foi possível determinar a taxa de reação entre as espécies. A reação do complexo de NO com glutatona (GSH), monitorada por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), sugeriu a produção de HNO. Os resultados cinéticos para essa reação indicam que há a formação de um intermediário reativo com banda em 541 nm, referente ao aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup>. As constantes de velocidade indicaram que o primeiro intermediário se forma rapidamente ( $k_{\text{obs}} = 2,79 \text{ s}^{-1}$ ) e decai lentamente ( $k_{\text{obs}} = 7,17 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). A grande estabilidade desse intermediário pode estar relacionada a capacidade do mesmo apresentar interações intramoleculares que o estabilizam. Ensaio de vasodilatação, mostraram que o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> possui atividade vasodilatadora com  $\text{EC}_{50} = 910 \text{ nmol L}^{-1}$ . Também foi verificado que o nitrosilo complexo apresentou atividade sequestradora de íons  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , tendo assim potencial anti-oxidante. Experimentos de eletroforese, empregando DNA plasmidial e os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, mostraram atividade nucleasé estimulado por luz (350 e 460 nm), ou estimulado por agentes biologicamente relevantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSH). Todavia, ensaios de viabilidade celular com células cancerígenas indicaram que os dois complexos possuem baixa atividade citotóxica, os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>,

respectivamente, apresentaram valores de  $IC_{50}$  iguais a: 8,5 e 144,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  frente a linhagem de células B16-F10, e 130,4 e 142,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  frente a linhagem de células HUH-7. Adicionalmente, ensaios preliminares de atividade bactericida em cepas de *Escherichia coli* mostraram que os complexos foram eficientes na inibição do crescimento bacteriano. Estes estudos dão suporte a uma ação sinérgica como liberador de NO/HNO e ação vasodilatadora, anticancerígena e microbicida, os quais merecem posteriores investigações farmacológicas e reatividade bioquímica para uma melhor descrição dos mecanismos de ação dos complexos.

**Palavras-chave:** Óxido nítrico. Nitroxila. Vasodilatação. Atividade nucleasse. Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO), produced endogenously, is responsible for vasodilation of blood vessels and other physiological processes. The nitroxyl ion (NO<sup>-</sup>), a species generated by mono-electronic reduction of NO, has raised the interest of the scientific community due to its distinct biological activity of nitric oxide. Sodium nitroprusside (SNP) is part of a class of compounds that release NO, being the only metal complex used clinically, but there are problems associated with their use, including photosensitivity and release of cyanide. Therefore, alternative compounds including iron-based ones have been studied, such as *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>, whose studies of chemical reactivity as well as its precursor (*trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)), were investigated in this work. In addition, we evaluated the potential anticancer and microbicides these complexes. The nitrosyl complex showed the ability to release NO under physiological conditions and spontaneously when stimulated by light. The NO released by nitrosyl complex thermally and photochemically was probed by the reaction with selective traps at different. The half-life values ( $t_{1/2}$ ) for reaction of nitrosyl complex with cPTIO were 115 ( $k = 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) and 385 ( $k = 3.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) minutes to photochemical and thermal reactions, respectively, being well known that light accelerates the process of release. The photochemical test using myoglobin is indicated release of NO, however it was not possible to determine the rate of this reaction. The reaction of the complex with glutathione (GSH) was monitored by electron paramagnetic resonance (EPR) and suggested the production of HNO. Kinetic results for this reaction indicates that there is the formation of a reactive intermediate with band at 541 nm, likely the adduct *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup>. The rate constants indicate that the first intermediate rapidly forms ( $k_{\text{obs}} = 2.79 \text{ s}^{-1}$ ) and decays slowly ( $k_{\text{obs}} = 7.17 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). The high stability of this intermediate can be related to its ability to engage in intramolecular interactions. Vasodilation assay showed that complex *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> has vasodilating activity with EC<sub>50</sub> = 910 nmol L<sup>-1</sup>. It was also found that the nitrosyl complex presented scavenging activity toward O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ions, thus having antioxidant potential. Electrophoresis experiments employing plasmid DNA and the complex *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> and *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, showed nuclease activity stimulated by light (350 and 460 nm) or stimulated by biologically relevant agents (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and GSH). However, cell viability assays with cancer cells showed that both complexes have low cytotoxic activity, the complex *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> and *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, respectively, showed IC<sub>50</sub> values equal to: 8.5 and 144.2 μmol L<sup>-1</sup> against strain B16-F10 cells, and 130.4 and 142.9 μmol L<sup>-1</sup> against HUH-7 cell line. Additionally, preliminary tests

of bactericidal activity in *Escherichia coli* strains indicated that the compounds were effective at inhibiting bacterial growth. These studies support a synergistic action as releasing NO/HNO and vasodilating action, anticancer and microbicide, which deserve further pharmacological and biochemical investigations for a better description of the mechanisms of action.

**Keywords:** Nitric oxide. Nitroxyl. Vasodilation. Nuclease activity. Cytotoxicity.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 28 |
| <b>1.1. Aspectos Gerais Sobre o Óxido Nítrico</b> .....   | 28 |
| <b>1.2. Óxido Nítrico e Vasodilatação</b> .....   | 30 |
| <b>1.3. Nitrosilo Complexos</b> .....   | 32 |
| <b>1.4. Complexos Metálicos e Atividade Bactericida</b> .....   | 33 |
| <b>1.5. Complexos Metálicos como Medicamentos Antitumorais</b> .....  | 34 |
| <i>1.5.1. Estrutura do DNA</i> .....  | 35 |
| <i>1.5.2. DNA plasmidial</i> .....  | 37 |
| <i>1.5.3. Interação de Complexos Metálicos com DNA</i> .....  | 39 |
| <i>1.5.4. Clivagem das Fitos de DNA</i> .....   | 43 |
| <b>2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b> .....  | 49 |
| <b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....  | 51 |
| <b>3.1. Reagentes</b> .....   | 51 |
| <b>3.2. Soluções</b> .....  | 52 |
| <b>3.3. Complexos de Ferro</b> .....  | 52 |
| <i>3.3.1. Síntese do Complexo <math>trans-[Fe(cyclam)Cl_2](PF_6)</math></i> .....   | 53 |
| <i>3.3.2. Síntese do Complexo <math>trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl_2</math></i> .....   | 53 |
| <b>3.4. Técnicas Experimentais e Equipamentos</b> .....   | 55 |
| <i>3.4.1. Caracterização dos Complexos</i> .....  | 55 |
| <i>3.4.2. Cálculos Computacionais</i> .....   | 55 |
| <i>3.4.3. Ensaio de Fotoliberação NO/HNO do Complexo <math>trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl_2</math></i> .....                                | 56 |
| <i>3.4.4. Ensaio de Liberação Térmica de NO do Complexo <math>trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl_2</math></i> .....                             | 56 |
| <i>3.4.5. Estudo Reacional do Íon Complexo <math>trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]^{2+}</math> com Redutor Biológico Glutathione (GSH)</i> ..... | 57 |
| <i>3.4.6. Atividade Sequestradora de Superóxido (<math>O_2^-</math>)</i> .....  | 59 |
| <i>3.4.7. DNA Plasmidial e Eletroforese em Gel de Agarose</i> .....   | 60 |
| <i>3.4.8. Testes de Clivagem de DNA</i> .....   | 63 |
| <i>3.4.9. Testes de clivagem de DNA – Efeito da Luz</i> .....   | 64 |
| <i>3.4.10. Efeito da Adição de Glutathione</i> .....  | 64 |
| <i>3.4.11. Adição de Peróxido de Hidrogênio</i> .....   | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4.12. <i>Inibidores de Radicais Livres</i> .....   | 65  |
| 3.4.13. <i>Efeito da Força Iônica</i> .....  | 65  |
| 3.4.14. <i>Viabilidade Celular (Atividade Citotóxica)</i> .....  | 65  |
| 3.4.15. <i>Atividade Bactericida</i> .....   | 67  |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 68  |
| <b>4.1. Caracterização do Complexo <i>trans</i>-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)</b> .....                                       | 68  |
| 4.1.1. <i>Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho</i> .....  | 68  |
| 4.1.2. <i>Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)</i> .....  | 70  |
| 4.1.3. <i>Eletroquímica</i> .....  | 71  |
| <b>4.2. Caracterização do Complexo <i>trans</i>-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub></b> .....   | 73  |
| 4.2.1. <i>Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho</i> .....  | 73  |
| 4.2.2. <i>Eletroquímica</i> .....  | 75  |
| 4.2.3. <i>Cálculos Computacionais em Química Teórica</i> .....   | 77  |
| 4.2.3.1. <i>Otimização de estrutura</i> .....  | 77  |
| 4.2.3.2. <i>Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível</i> .....   | 79  |
| <b>4.3. Ensaio de Liberação Térmica de NO do Complexo <i>trans</i>-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub></b><br>.....                           | 81  |
| 4.3.1. <i>Monitoramento Utilizando Espectroscopia no UV-Vis e IV</i> .....   | 81  |
| 4.3.2. <i>Monitoramento Utilizando Scavengers Seletivos</i> .....  | 85  |
| <b>4.4. Ensaio de Fotoliberação NO/HNO do Complexo <i>trans</i>-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub></b> .....                                 | 92  |
| 4.4.1. <i>Mudança Espectral do Íon Complexo <i>trans</i>-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> Após Irradiação</i><br>.....                      | 92  |
| 4.4.2. <i>Detecção de NO/HNO Empregando cPTIO</i> .....  | 95  |
| 4.4.3. <i>Medições de HNO e NO Empregando met-Mioglobina (Fe<sup>III</sup>)</i> .....  | 98  |
| <b>4.5. Estudo Reacional do Íon Complexo <i>trans</i>-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com Redutor<br/>Biológico Glutationa (GSH)</b> ..... | 101 |
| 4.5.1. <i>Acompanhamento Via Refletância Total Atenuada (ATR) no Infravermelho</i> .....   | 101 |
| 4.5.2. <i>Acompanhamento Via Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR)</i> .....   | 103 |
| 4.5.3. <i>Acompanhamento Via Stopped-flow e Espectroscopia de Absorção na Região do<br/>Ultravioleta e Visível</i> .....                   | 106 |
| <b>4.6. Atividade Sequestradora de Íon Superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b> .....  | 116 |
| <b>4.7. Clivagem de DNA Plasmidial</b> .....   | 120 |
| 4.7.1. <i>Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Ausência e Presença de Luz</i> .....  | 121 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.7.2. <i>Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Presença de Glutathione</i> .....            | 127 |
| 4.7.3. <i>Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Presença de Peróxido</i> .....               | 129 |
| 4.7.4. <i>Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Presença de Inibidores de Radicais</i> ..... | 131 |
| 4.7.5. <i>Modo de Interação ao DNA</i> .....  | 134 |
| 4.8. <b>Ensaio Biológicos</b> .....   | 137 |
| 4.8.1. <i>Ensaio de Vasodilatação para o Complexo trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub></i> .....    | 137 |
| 4.8.2. <i>Atividade Citotóxica</i> .....  | 139 |
| 4.8.3. <i>Atividade Bactericida</i> .....   | 142 |
| 5. <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....   | 145 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 148 |
| <b>ANEXO I</b> .....  | 162 |
| <b>ANEXO II</b> .....   | 163 |
| <b>ANEXO III</b> .....  | 164 |
| <b>ANEXO IV</b> .....   | 167 |
| <b>ANEXO V</b> .....  | 167 |
| <b>ANEXO VI</b> .....   | 168 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - A - Diagrama do Orbital Molecular para o óxido nítrico, contendo o átomo de nitrogênio em diferentes estados de oxidação;  $\text{NO}^+$ , **NO** e  $\text{NO}^-$ . B – Modelos dos orbitais moleculares do **NO** ..... 29
- Figura 2 - Produção endógena de NO ..... 30
- Figura 3 - Ilustração da produção de cGMP via estimulação da Guanilato ciclase solúvel (sGC) pela molécula de NO ..... 31
- Figura 4 - Estrutura de complexos liberadores de óxido nítrico *in vitro* após fotoindução, em destaque (---) apenas o nitroprussiato como fármaco comercializado ..... 33
- Figura 5 - Quimioterápicos a base de platina disponíveis para o tratamento de tumores; cisplatina, carboplatina e oxaliplatina ..... 34
- Figura 6 - A – Estrutura em dupla hélice do DNA, onde G = Guanina, C = Citosina, T = Timina e A = Adenina. B – Estrutura de um nucleotídeo ..... 35
- Figura 7 - A - Orientação das bases Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C) interagindo por ligações de hidrogênio. B - Estrutura dos quatro nucleotídeos, as purinas são Adenina e Guanina e as pirimidinas são e Timina e Citosina ..... 36
- Figura 8 - Estrutura da ligação fosfodiéster (em vermelho) unindo os nucleotídeos do DNA ..... 37
- Figura 9 - Ilustração das três formas do DNA plasmidial (A) e a sua diferenciação após eletroforese em gel de Agarose (B) ..... 38
- Figura 10 - Diferentes formas que o DNA plasmidial pode apresentar após interagir com complexos metálicos. A) DNA ladder, B) plasmídeo na forma superenovelada, C) plasmídeo na forma circular aberta, D) plasmídeo na forma linear, E) adutos, F) degradação do plasmídeo em pedaços curtos. Os números à esquerda indicam o comprimento do DNA padrão (DNA ladder) em kilobases (Kb) e a massa (ng). A seta a direita indica o sentido de migração do DNA no gel quando o mesmo é submetido a uma diferença de potencial ..... 39

- Figura 11 - Formação de adutos envolvendo o complexo metálico e o DNA, resultando nas interações; covalente de esfera interna (A) e externa (B) ou interação não covalente de esfera externa (C) ..... 40
- Figura 12 - Possível mecanismo citotóxico da cisplatina frente a molécula de DNA. (A) A substituição do ligante cloreto por uma molécula de água, resulta na formação da espécie  $cis-[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ . Devido a grande diferença de concentração de íons cloreto dentro (3-20 mM) e fora da célula (~100 mM), esse processo ocorre com mais facilidade quando a cisplatina se encontra no meio intracelular. (B) Existe 4 diferentes modos de ligação da cisplatina ao DNA: R<sub>1</sub> = ligação cruzada intercadeias; R<sub>2</sub> = ligação ao DNA e proteínas adjacentes; R<sub>3</sub> = ligação cruzada intracadeia ligando-se a duas bases adjacentes G-G (60%); e R<sub>4</sub> = ligação intracadeia ligando-se a duas bases adjacentes a A-G (20%) ..... 41
- Figura 13 - Os três modos de interação entre o DNA e complexos metálicos com ligantes aromáticos: (A) Intercalação, (B) Interação por sulco, e (C) Inserção. Na parte superior estão representadas as diferentes geometrias dos complexos, e na parte inferior estão ilustradas as diferentes interações DNA-complexo ..... 42
- Figura 14 - Mecanismo de clivagem hidrolítica do DNA catalisada por um complexo metálico ML<sub>5</sub> ..... 44
- Figura 15 - Mecanismo de clivagem oxidativa envolvendo a desoxirribose do DNA e  $\cdot OH$ . A espécie reativa ( $\cdot OH$ ) pode ser produzida por meio da reação do complexo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após a formação da espécie  $\cdot OH$ , a mesma pode atacar o DNA retirando um átomo de hidrogênio da desoxirribose. Um segundo ataque de outra espécie reativa  $\cdot OH$  pode ocorrer, provocando a quebra da ligação fosfodiéster e formação dos fragmentos ..... 45
- Figura 16 - Mecanismo de clivagem oxidativa envolvendo a guanina do DNA e  $\cdot OH$ . (I) ligação do  $\cdot OH$  a base gerando adutos radiculares; (II) Retirada de um átomo de hidrogênio da desoxirribose; (III) Rearranjo; (IV) Segundo ataque da espécie reativa; (V) Quebra da ligação fosfodiéster e (VI) formação dos fragmentos ..... 46

|  |    |
|--|----|
| Figura 17 - Oxidação da guanina pelo $^1\text{O}_2$ gerando ácido cianúrico e 8-oxodG .....  | 47 |
| Figura 18 - Estruturas dos complexos <i>trans</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) e <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl <sub>2</sub> .....  | 53 |
| Figura 19 - Ilustração do sistema utilizado para produção de óxido nítrico gasoso .....  | 54 |
| Figura 20 - Estrutura da agarose. (A) Estrutura química da unidade de repetição da agarose; (B) Malha formada pelo gel polimerizado .....  | 61 |
| Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose. A matriz é solidificada deixando-se formar poços (I) nos quais as amostras de DNA serão depositadas (II) e submetidas a um campo elétrico (III). Os fragmentos apresentam uma migração diferencial de acordo com o tamanho ou forma (IV) .....   | 62 |
| Figura 22 - Estrutura da Glutathione (GSH) na forma reduzida .....   | 64 |
| Figura 23 - Conversão do MTT a formazan pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase (SDH) .....   | 66 |
| Figura 24 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) obtido em pastilha de KBr .....   | 68 |
| Figura 25 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo <i>cis</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ]Cl obtido em pastilha de KBr .....   | 69 |
| Figura 26 - Espectros de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) para os complexos <i>cis</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (1,6 x 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> ) e <i>trans</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> (1,3 x 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> ) em solução de HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> .....   | 71 |
| Figura 27 - Voltamogramas cíclicos dos complexos (A) <i>cis</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> e (B) <i>trans</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> obtidos em solução aquosa de 0,1 mol L <sup>-1</sup> de CF <sub>3</sub> COOH/CF <sub>3</sub> COONa, pH = 3,2. Temperatura Ambiente 25 °C. Potencial aplicado usando eletrodo de carbono vítreo como trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e Ag AgCl como referência. V = 100 mV s <sup>-1</sup> ..... | 72 |
| Figura 28 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl <sub>2</sub> obtido em pastilha de KBr. (A) - Região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> . (B) - Região de 910 a 750 cm <sup>-1</sup> .....  | 73 |

- Figura 29 - Voltamograma cíclico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> varrido de 0 a 1,0 V (A) e de -1,0 a 1,0 V (versus Ag|AgCl) (B) obtido em solução aquosa de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de CF<sub>3</sub>COOH/CF<sub>3</sub>COONa, pH = 3,2, temperatura ambiente de 25 °C. Potencial aplicado usando eletrodo de carbono vítreo como trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e Ag|AgCl como referência. V = 100 mV s<sup>-1</sup> ..... 75
- Figura 30 - Esquema reacional dos processos eletroquímicos e químico envolvidos, quando uma solução aquosa 0,1 mol L<sup>-1</sup> de CF<sub>3</sub>COOH/CF<sub>3</sub>COONa, pH = 3,2, contendo o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, é submetida a varredura de -1,0 a 1,0 V versus Ag|AgCl. Temperatura ambiente de 25 °C ..... 76
- Figura 31 - Estrutura otimizada por DFT (A) e representação ORTEP<sup>67</sup> (B) do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO<sup>+</sup>)Cl]<sup>2+</sup> ..... 77
- Figura 32 - Espectro de absorção na região do UV-Vis experimental (A) e teórico (B) para o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em água ..... 79
- Figura 33 - Comportamento térmico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> empregando espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Variação espectral para íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (100 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 37 °C acompanhada por 22 horas e 30 minutos. O *inset* mostra as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 235 nm (R<sup>2</sup> = 0,9996) e 212 (R<sup>2</sup> = 0,9999) nm, empregando equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais ..... 82
- Figura 34 - Comportamento térmico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> empregando espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Variação espectral para íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 37 °C acompanhada por 22 horas e 30 minutos. O *inset* mostra as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 320 nm (R<sup>2</sup> = 0,9914) e 300 nm (R<sup>2</sup> = 0,9961) empregando equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais ..... 83
- Figura 35 - Ensaio de estabilidade térmica por espectroscopia de absorção na região do infravermelho do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)(NO)]<sup>2+</sup> (10 mmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. Temperatura de 37 °C. Branco (—), Solução contendo o complexo antes (—) e após (—) 24 horas ..... 84

- Figura 36 - Acompanhamento da reação entre cPTIO e HNO gerado pelo sal de Angelis (AS). Variações espectrais na região do UV-Vis, da reação do AS ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com cPTIO ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os espectros foram registrados durante 1 hora a cada 2 minutos. O primeiro espectro (—) corresponde apenas a mistura cPTIO e DTPA, enquanto as demais curvas correspondem a mistura anterior com o AS. Em *inset*, curva cinética para o decaimento da banda em  $560 \text{ nm}$  correspondente ao cPTIO, empregando equação de decaimento de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais ( $R^2 = 0,9986$ ) ..... 86
- Figura 37 - Estudo de termoliberação de NO/HNO através, da reação do cPTIO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com íon complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})(\text{Cl})]^{2+}$  ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Temperatura  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , monitorando-se as variações espectrais na região do UV-Vis por 24 horas. Em *inset*, curva cinética correspondente à variação espectral da banda em  $560 \text{ nm}$ , para a reação do íon complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com cPTIO ..... 87
- Figura 38 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do cPTIO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sobe temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  monitorado por 24 horas, espectros registrados em intervalos de 30 minutos ..... 88
- Figura 39 - Ilustração das possíveis reações de formação do aduto NO-Mb( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$ ) ..... 89
- Figura 40 - Reação controle entre HNO e Mb- $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Variação espectral para uma mistura contendo Mb- $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e sal de Angelis (AS) ( $27 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , monitorado na região do UV-Vis, por 60 minutos a cada 2 minutos. O primeiro espectro (—) corresponde apenas a Mb- $\text{Fe}^{\text{III}}$ , os demais correspondem a mistura Mb- $\text{Fe}^{\text{III}}$  e AS. Em *inset* estão os espectros ampliados na faixa de  $450$  a  $700 \text{ nm}$  para melhor visualização das bandas Q, assim como as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em  $506$  e  $548 \text{ nm}$  para a reação em questão, empregando-se equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais  $R^2 = 0,9897$  ( $506 \text{ nm}$ ) e  $R^2 = 0,9777$  ( $548 \text{ nm}$ ) ..... 90

- Figura 41 - Estudo de termoliberação de NO/HNO através, da reação com Mb-Fe<sup>III</sup> (6,7 μmol L<sup>-1</sup>) com íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (134 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 na presença de DTPA (134 μmol L<sup>-1</sup>). Temperatura 37 °C, monitorando-se as variações espectrais na região do UV-Vis por 24 horas em intervalos de 30 minutos. O experimento ocorreu em atmosfera isenta de oxigênio ..... 91
- Figura 42 - Fotólise do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (72 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, antes da irradiação (—) e após de 6 horas e 30 minutos de irradiação (—). Também está presente o espectro do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100 μmol L<sup>-1</sup>) após 6 horas e meia de incubação (—) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. Os experimentos se processaram a temperatura de 25 °C ..... 93
- Figura 43 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para as estruturas *trans*-[Fe(cyclam)Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (—) e *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> (—) calculados por TD-DFT. Os cálculos foram realizados considerando água como solvente ..... 94
- Figura 44 - Variações espectrais na região do UV-Vis, da reação do cPTIO (100 μmol L<sup>-1</sup>) com íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (200 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 na presença de DTPA (100 μmol L<sup>-1</sup>). Reação estimulada por luz (350 nm). Temperatura ambiente 25 °C. Tempo de irradiação: (—) 0 min.; (—) 30 seg.; (—) 1 min. e 30 seg.; (—) 2 min. e 30 seg.; (—) 4 min. e 30 seg.; (—) 10 min.; (—) 20 min.; (—) 40 min.; 60 (—) min.; (—) 90 min.; (—) 120 min.; (—) 180 min.; (—) 240 min. e (—) 360 min. Em *inset* estão as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 440 e 560 nm, para a reação do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com cPTIO estimulada por luz em 350 nm, empregando equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais R<sup>2</sup> = 0,9978 (560 nm) e R<sup>2</sup> = 0,9845 (440 nm) ..... 95
- Figura 45 - Padrões espectrais dos possíveis produtos formados da reação do cPTIO com NO e HNO obtidos em tapão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 25 °C. Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis do cPTIO (50 μmol L<sup>-1</sup>) antes da reação (A), após reação com NO (solução saturada com gás NO) (B) e após reação com HNO (usando sal de Angelis) (C) ..... 97

- Figura 46 - Espectro de absorção na região do UV-Visível, do cPTIO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Antes (—) e após (—) 6 horas e 30 minutos de irradiação em 350 nm. Temperatura de  $25^\circ\text{C}$  ..... 98
- Figura 47 - Reação fotoquímica do íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  na presença da met-mioglobina. Variação espectral para uma mistura contendo Mb-Fe<sup>III</sup> ( $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $134,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DTPA ( $134,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, fotoirradiada em 350 nm e monitorado na região do UV-Vis, por 6 horas. Temperatura ambiente  $25^\circ\text{C}$ . Em *inset* estão os espectros de absorção na região do UV-Vis da mistura reacional no intervalo de 450 a 700 nm e as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 506 e 548 nm. Foi empregado equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais  $R^2 = 0,9975$  (506 nm) e  $R^2 = 0,9920$  (548 nm) ..... 99
- Figura 48 - Estudo reacional do complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com GSH ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 acompanhado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Temperatura ambiente  $25^\circ\text{C}$ . Branco (—), complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  (—), GSH (—), mistura contendo o complexo e GSH após 5 minutos de reação (—) ..... 102
- Figura 49 - Desenho esquemático da discriminação de NO e HNO por EPR, a partir de sequestradores seletivos (R-PTIO). O NO e HNO ao reagirem com R-PTIO resultam na formação de produtos diferentes, o R-PTI (paramagnética) e a hidroxilamina R-PTIO-H diamagnética, respectivamente. Os espectros de EPR ilustram a transformação do padrão espectral de cinco sinais do R-PTIO para o padrão espectral de sete sinais do R-PTI (Reação com NO), ou a diminuição dos sinais correspondente a formação do R-PTIO-H até seu total desaparecimento ..... 103
- Figura 50 - A - Reação do complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com GSH ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) via espectro de EPR do cPTIO ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A reação ocorreu na presença de DTPA ( $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). B - Espectro de EPR da mistura: GSH (4

mmol L<sup>-1</sup>), cPTIO (200 μmol L<sup>-1</sup>) e DTPA (400 μmol L<sup>-1</sup>). Os espectros foram registrados durante 18 minutos em intervalos de aproximadamente 10 segundos. Temperatura ambiente 25°C. Nas Figuras A e B estão ilustrados os espectros com tempo em 0 (—), 1,5 (—), 3,0 (—), 4,5 (—), 7,5 (—) e 18,0 (—) minutos. C - Curvas de Intensidade (%) do pico máximo em 2,02g vs tempo (18 minutos) para reação entre *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, GSH e cPTIO (—), curva da reação controle entre GSH e cPTIO (—) e curva da reação entre *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, GSH e cPTIO, corrigida por meio da subtração da curva controle (—) ..... 105

Figura 51 - Reação entre o íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e GSH acompanhada por stopped-flow. Variações espectrais na região do UV-Vis, da reação do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com glutathiona em tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH = 7,4 em condições aeróbicas sob temperatura de 37 °C monitorada por stopped-flow. O inset mostra a curva cinética correspondentes a variação espectral da banda em 541 nm (R<sup>2</sup> = 0,9936) ..... 107

Figura 52 - Estrutura tridimensional otimizada utilizando DFT para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (A) e do aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup> (B) com cada átomo numerado ..... 109

Figura 53 - Variação da k<sub>obs</sub> com a temperatura para a reação entre o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com glutathiona ..... 111

Figura 54 - Reação entre o íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e GSH acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. (A) Variações espectrais da reação do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com glutathiona em pH = 7,4 em condições aeróbicas sob temperatura de 37 °C. Para visualização das bandas de menor intensidade, em inset são mostradas as variações espectrais para reação em questão, em intervalos menores de abs (0 a 0,2) e comprimento de onda (350 a 650 nm). (B) Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 310, 415 e 541 nm ..... 113

Figura 55 - Proposta para o mecanismo de produção de HNO a partir da reação do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)(NO)]<sup>2+</sup> com GSH em condições de pseudo primeira ordem ..... 115

Figura 56 - Versão simplificada da ligação na molécula de oxigênio e seus derivados ..... 116

Figura 57 - Efeito dos complexos como possíveis sequestradores de  $O_2^{\cdot-}$ . Os resultados foram expressos em absorbância vs tempo (minutos), considerando a máxima formação de  $O_2^{\cdot-}$  em 550 nm, através da redução do Citocromo-c, comparados ao controle (ausência de complexo). As reações ocorreram num período de 60 minutos. (A) Reações na presença de 0 (●), 300 (■) e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (▲) do complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. (B) Reações na presença de 0 (●), 100 (■), 200 (▲), 300 (▼), 400 (◆) e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (●) do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>. As demais espécies utilizadas em todas as reações foram: Xantina Oxidase (0,13  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Hipoxantina (122  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), Catalase (0,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Citocromo-C (64 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Temperatura de 37 °C ..... 118

Figura 58 - Curva de atividade sequestradora de  $O_2^{\cdot-}$  para o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em diferentes concentrações. IC<sub>50</sub> = 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\pm$  1,05) ( $R^2 = 0,9725$ ) ..... 119

Figura 59 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) sob irradiação de luz (claro, 350 nm) e na ausência de luz (escuro) por 60 minutos. (A) Gráfico de barras do percentual de DNA clivado pelo complexo em questão em diferentes concentrações e estímulos (claro e escuro). (B) Curvas cinéticas de percentual de (%) DNA fotoclivado (F (I e II)) por concentração de complexo ..... 122

Figura 60 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no Claro (350 nm) e no Escuro por 60 minutos. (A) Gráfico de barras do percentual de DNA clivado pelo complexo em questão em diferentes concentrações e estímulos (claro e escuro). (B) Curvas de percentual de (%) DNA clivado (F (I e II)) por concentração de complexo ..... 123

Figura 61 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> em diferentes

- concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no Claro (460 nm) e no Escuro por 60 minutos ..... 125
- Figura 62 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no escuro e no claro (460 nm) por 60 minutos ..... 126
- Figura 63 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço), GSH (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> nas seguintes concentrações 30, 20, 10, 5, 2,5 e 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo. Reação ocorreu durante 90 minutos. (DNA ctrl - = somente DNA e DNA ctrl + = DNA com GSH) ..... 128
- Figura 64 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> nas seguintes concentrações 10, 5, 2,5, 1, 0,5 e 0,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Reação ocorreu durante 60 minutos na ausência de luz. (DNA ctrl - = somente DNA e DNA ctrl + = DNA mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ..... 130
- Figura 65 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço), GSH (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ), os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> na concentração 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e diferentes inibidores de radicais livres: Histidina (20  $\text{mmol L}^{-1}$ ), Manitol (20  $\text{mmol L}^{-1}$ ), SOD (4U/ $\mu\text{L}$ ), TEMPO (18,7  $\text{mmol L}^{-1}$ ), cPTIO (1,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Reação ocorreu durante 90 minutos ..... 132
- Figura 66 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço), GSH (10 $\text{mmol L}^{-1}$ ), os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> na concentração de 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e diferentes concentrações de NaCl (0, 25, 75, 150, 250  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Reação ocorreu por 90 minutos. DNA Ctrl1 = DNA, DNA Ctrl2 = DNA + GSH e DNA Ctrl3= DNA + GSH + NaCl (250  $\text{mmol L}^{-1}$ ) ..... 135
- Figura 67 - Ilustração do efeito da força iônica na clivagem do DNA pela reação entre o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e GSH ..... 137

- Figura 68 - Relaxamento induzido pelo complexo íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (—) e SNP (—) em anéis de aorta de ratos pré-contraído com fenilefrina (1,0 μmol L<sup>-1</sup>). As respostas de relaxamento são expressas em percentual de relaxamento versus concentração de composto ..... 138
- Figura 69 - Curvas de Viabilidade celular (%) vs concentração (μmol L<sup>-1</sup>) dos complexos (A) *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e (B) *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, para a linhagem de células B16-F10 (Melanoma de camundongo) ..... 140
- Figura 70 - Curvas de Viabilidade celular (%) vs concentração (μmol L<sup>-1</sup>) dos complexos (A) *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e (B) *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, para a linhagem de células HUH-7 (Hepatocarcinoma humano) ..... 141
- Figura 71 - Curvas de crescimento celular para a linhagem MC1061 da bactéria *Escherichia coli* na ausência (—) e na presença de 200 μmol L<sup>-1</sup> dos complexos (*trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (—) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (—)) e 2 mmol L<sup>-1</sup> isoniazida (—). As medidas de DO<sub>600nm</sub> foram realizadas em intervalos de uma hora durante oito horas ..... 143

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1 - Lista de reagentes com suas respectivas procedências e grau de pureza .....   | 51  |
| Tabela 2 - Frequências de absorção no infravermelho e tentativas de atribuição para o complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) .....  | 69  |
| Tabela 3 - Frequências de absorção no infravermelho e tentativas de atribuição para o complexo <i>cis</i> -[Fe(cyclam)Cl <sub>2</sub> ]Cl .....  | 70  |
| Tabela 4 - Frequências de absorção no infravermelho e tentativas de atribuição para o complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl <sub>2</sub> .....   | 74  |
| Tabela 5 - Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) do composto <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup> : experimentais e otimizados .....   | 78  |
| Tabela 6 - Transições teóricas mais relevantes com suas respectivas contribuições atômicas para o espectro de absorção na região do UV-Vis do íon complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup> em água .....                | 81  |
| Tabela 7 - Parâmetros estruturais e eletrônicos calculados por DFT para a porção Fe-NO do íon complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup> e aduto <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG] <sup>+</sup> .....                  | 109 |
| Tabela 8 - Dependência da temperatura para a reação entre o íon complexo <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup> e glutatona. k <sub>obs</sub> referentes ao surgimento da banda em 541 nm .....                                | 110 |
| Tabela 9 - As diferenças de energia (ΔE) entre produto e reagentes da reação entre <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup> e GSH, também estão contidos as Energias (eV) dos orbitais HOMO e LUMO das espécies envolvidas ..... | 112 |
| Tabela 10 - Percentual da forma II do DNA plasmidial, promovido por 100 μmol L <sup>-1</sup> de complexo e radiação em 350 e 460 nm .....  | 125 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                         |   |
|-------------------------|---|
| APF                     | 3'- ( <i>p</i> -aminofenil) fluoresceína                        |
| AS                      | Sal de Angelis  |
| ATR                     | Refletância Total Atenuada                                      |
| B16-F10                 | Melanoma de Camundongo  |
| CAT                     | Catalase  |
| cGMP                    | Guanosina-3',5'- monofosfato cíclica                            |
| Cit-c Fe <sup>III</sup> | Ferricitocromo c  |
| Cit-c Fe <sup>II</sup>  | Ferrocitocromo c  |
| cPTIO                   | 2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3óxido      |
| cyclam                  | 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano                               |
| DMEM                    | Meio Eagle Modificado por Dulbecco                              |
| DNA                     | Ácido desoxirribonucléico                                       |
| DO                      | Densidade ótica   |
| dppz                    | Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina                                 |
| DTPA                    | Ácido dietilenotriaminopentacético                              |
| <i>E. coli</i>          | <i>Escherichia coli</i>   |
| EDRF                    | Fator Relaxante Derivado do Endotélio                           |
| EDTA                    | Ácido etilenodiaminotetracético                                 |
| EPR                     | Ressonância Paramagnética de Elétrons                           |
| FBO                     | Fuzzy Bond Order  |
| GSH                     | Glutathiona   |
| GTP                     | Guanosina-5'-trifosfato   |
| HATR                    | Refletância Total Atenuada Horizontal                           |
| HUH-7                   | Hepatocarcinoma Humano  |
| IV                      | Infravermelho   |
| LLCT                    | Transferência de Carga Ligante-Ligante                          |
| LMCT                    | Transferência de Carga do Tipo Ligante Metal                    |
| Mb-FeIII                | Metamioglobina/ Mioglobina Fe (III)                             |
| MLCT                    | Transferência de Carga Metal Ligante                            |
| Mtb                     | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                               |
| MTT                     | 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-brometo de difenil-2H-tetrazólio |
| NADPH                   | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido             |

|        |  |
|--------|--|
| NBT    | Azul de Nitro-Tetrazólio                           |
| NOS    | Óxido Nítrico Sintase                              |
| POBN   | N-(4-piridilmetileno)-tert-butilamina-N,N'-dióxido |
| RBS    | Compostos Roussin's Black Salt                     |
| RNA    | Ácido ribonucléico                                 |
| RNS    | Espécies Reativas de Nitrogênio                    |
| ROS    | Espécies Reativas de Oxigênio                      |
| SDH    | Enzima Mitocondrial Succinato-Desidrogenase        |
| sGC    | Guanilato Ciclase Solúvel                          |
| SNP    | Nitroprussiato de Sódio                            |
| SOD    | Superóxido Dismutase                               |
| TEMPO  | 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo               |
| UV-Vis | Ultravioleta e Visível                             |
| XOD    | Enzima Xantina Oxidase                             |

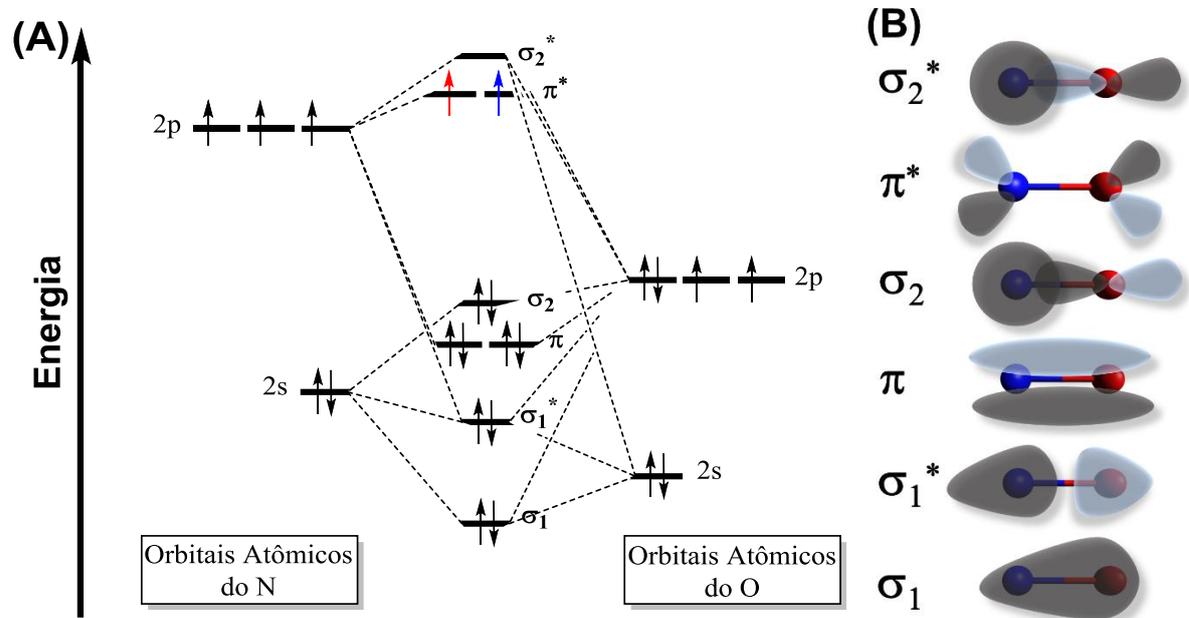
## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos de coordenação tem despertado o interesse da comunidade científica devido às suas diversas aplicações em áreas tal como a farmacologia.<sup>1</sup> Complexos metálicos fornecem uma gama de possibilidades para o desenho de novas drogas. Além dos vários metais disponíveis e seus distintos estados de oxidação, íons metálicos têm uma série de geometrias e números de coordenação que permitem o ajuste de sua reatividade química em termos de cinética (velocidade de troca de ligantes) e da termodinâmica (forças de ligações metal-ligante, potencial redox, etc.). Não só o metal, mas igualmente os ligantes também podem desempenhar um importante papel na atividade biológica do complexo preparado.<sup>2</sup>

### 1.1. Aspectos Gerais Sobre o Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás (P.E. = -151,7 °C) monomérico e incolor. Possui solubilidade máxima em água (25 °C e 1 atm) de aproximadamente 2 mmol L<sup>-1</sup>, maior do que a observada para o O<sub>2</sub> (0,25 mmol L<sup>-1</sup> a 25 °C e 1 atm). O NO é um radical livre, o diagrama de orbital molecular do NO (Figura 1) mostra que tal molécula possui um elétron desemparelhado num orbital  $\pi^*$ , com uma ordem de ligação de 2,5, o mesmo possui elevada reatividade, podendo ser oxidado resultando no íon nitrosônio (NO<sup>+</sup>), cuja ordem de ligação é 3.<sup>3</sup> Contudo, o NO facilmente reage com oxigênio gerando óxidos mais reativos, tornando a formação de nitrosônio menos factível.<sup>4</sup> O NO atua na relaxação muscular e vasodilatação por meio da estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel.<sup>5,6</sup> Há evidências que o NO também atue no sistema imunológico e como mensageiro no sistema nervoso central.<sup>7</sup>

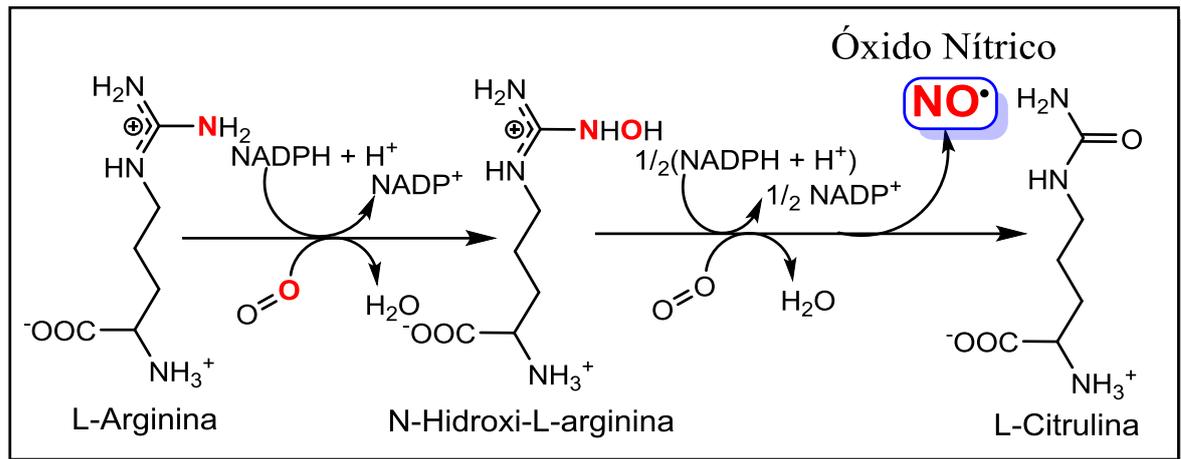
Figura 1 - A - Diagrama do Orbital Molecular para o óxido nítrico, contendo o átomo de nitrogênio em diferentes estados de oxidação;  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}$  e  $\text{NO}^-$ . B - Modelos dos orbitais moleculares do  $\text{NO}$ .



Fonte: Adaptado das referências 8 e 3.

O NO é produzido endogenamente via reação de oxidação do aminoácido L-arginina através da molécula de oxigênio catalisada por isoenzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) e com a participação do co-substrato Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (Figura 2).<sup>9</sup> Esta produção pode induzir diversos efeitos biológicos como já mencionado anteriormente, contudo o mesmo hoje divide o centro das atenções com outra molécula, pertencente também a classe de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e que é produto da redução do NO (Figura 1), o azanone (nomenclatura IUPAC), também comumente chamado pela comunidade científica de nitroxila ( $\text{NO}^-$ ). Em geral o azanone é representado como  $\text{HNO}$  (pKa 11,4) já que em condições fisiológicas estará na forma protonada.<sup>10,3</sup>

Figura 2 - Produção endógena de NO.



Fonte: Adaptado da referência 9.

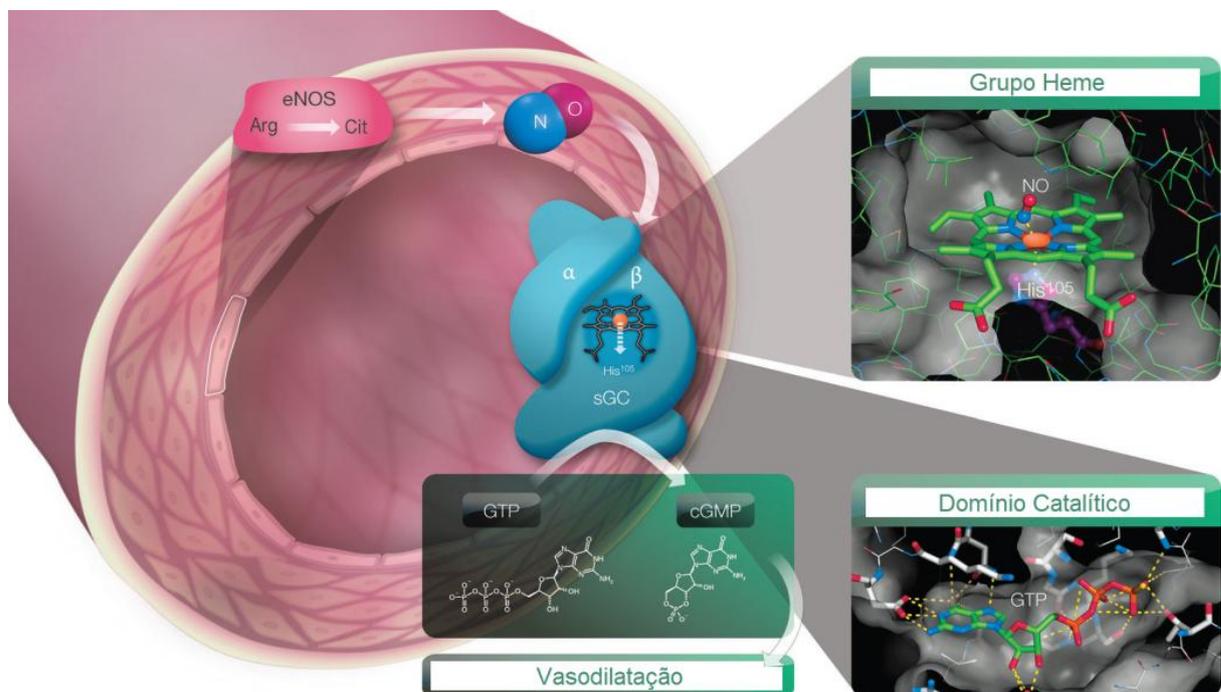
O HNO tem recebido atenção recente por suas respostas farmacológicas distintas às do NO. As propriedades farmacológicas do HNO incluem efeitos protetores contra danos de reperfusão para o tratamento de enfarte do miocárdio, a capacidade de melhorar a contractilidade do miocárdio no tratamento de insuficiência cardíaca, inibição da aldeído desidrogenase para o tratamento do alcoolismo e a inibição do crescimento de tumores e da angiogênese no tratamento de câncer.<sup>11</sup>

## 1.2. Óxido Nítrico e Vasodilatação

Em 1977 Ferid Murad descobriu que os nitratos orgânicos apresentam funcionalidade fisiológica quando eles são convertidos a óxido nítrico (NO), este gás, que também é classificado como um poluente ambiental, relaxa as células do músculo liso. Em 1978, Robert Furchgott (1916-2009) descobriu que uma substância no endotélio (parede interna do vaso) tem a propriedade de relaxar os vasos sanguíneos, o mesmo foi chamado de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). A natureza exata do EDRF era até este ponto desconhecida. Curiosamente, Louis Ignarro ao mesmo tempo e independentemente chegou a conclusões semelhantes, e ambos os investigadores apresentaram provas em conferências em 1986 demonstrando que o EDRF era na verdade o NO. Em 1998, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi atribuído conjuntamente a Murad, Ignarro, Furchgott pela descoberta do mecanismo de ação do NO no organismo. Eles receberam o prêmio de maior prestígio na ciência por provarem que uma substância produzida em explosões atua fisiologicamente no corpo humano.<sup>12</sup>

O NO atua como estimulador frente a guanilato ciclase solúvel (sGC), uma enzima com alta afinidade pelo NO. A sGC é um importante regulador do sistema cardiovascular presente em células do músculo liso dos vasos sanguíneos e em plaquetas. NO produzido no endotélio difunde-se rapidamente nas células musculares, estimulando a sGC (Figura 3). Isso resulta em um aumento intracelular da substância cGMP (guanosina-3',5'-monofosfato cíclica), provocando uma variedade de respostas fisiológicas, incluindo a dilatação de vasos (baixando a pressão do sangue) e uma melhora na circulação sanguínea. A patogênese de várias doenças, e particularmente do sistema cardiovascular, tem sido associada a uma deficiência na estimulação da sGC.<sup>12</sup>

Figura 3 - Ilustração da produção de cGMP via estimulação da Guanilato ciclase solúvel (sGC) pela molécula de NO.



Fonte: Adaptado da referência 12.

A sGC é uma proteína heterodimérica constituída de uma subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  com um grupo heme prostético localizado na subunidade  $\beta$ . O NO estimula a sGC ao se ligar ao  $\text{Fe}^{2+}$  do grupo heme, esta ligação provoca o rompimento da ligação entre o  $\text{Fe}^{2+}$ -histidina ( $\text{His}^{105}$ ) (Figura 3), levando a mudanças conformacionais que induz as subunidades catalíticas a converter GTP (guanosina-5'-trifosfato) a cGMP, aumentando a concentração desse último no organismo.<sup>12</sup>

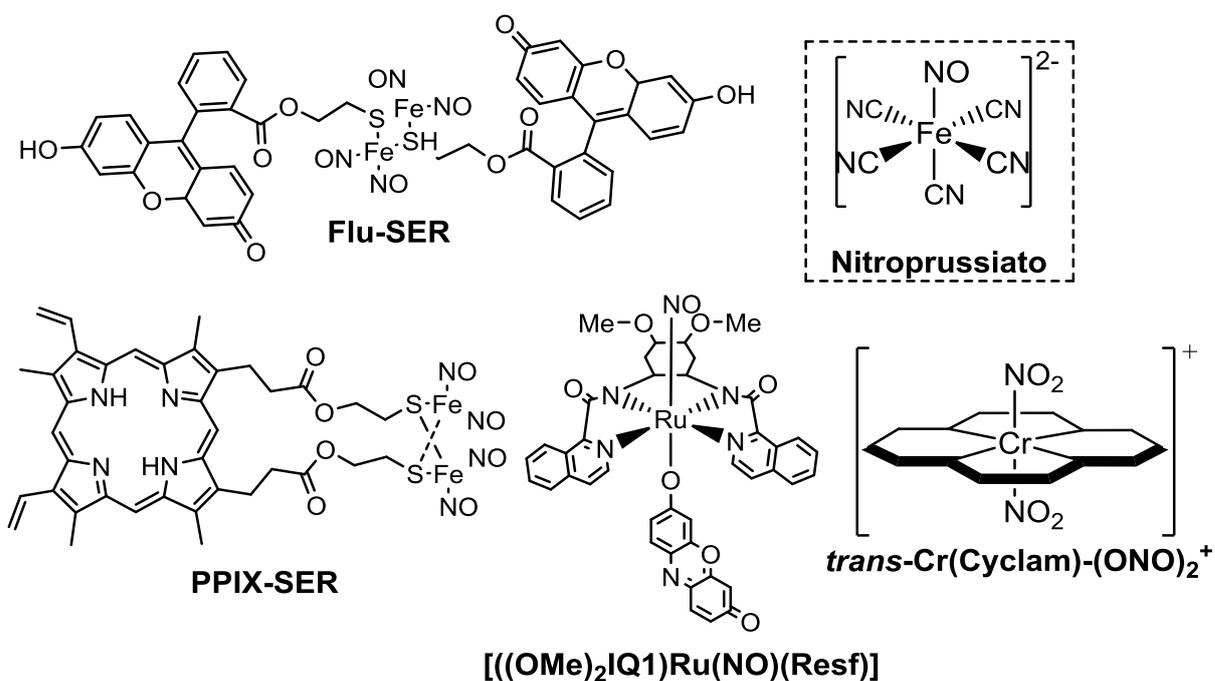
Um dos primeiros compostos de NO a ser utilizado no tratamento de crises hipertensivas, mesmo antes de se conhecer o seu mecanismo de ação, foi o nitroprussiato de sódio (SNP),  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ . Ele atua como um pró-fármaco reagindo com redutores fisiológicos (por exemplo cisteína e glutatona) liberando óxido nítrico, essa liberação causa vasodilatação rápida, reduzindo a pressão arterial. Ele é usado clinicamente em cirurgia cardíaca, em crises hipertensivas, insuficiência cardíaca, cirurgia vascular, cirurgia pediátrica, e outras aplicações hemodinâmicas agudas. Contudo se sabe que o nitroprussiato carrega também efeitos colaterais nocivos ao organismo vivo graças a liberação de cianeto, que pode ser minimizado com co-administração de tiosulfato de sódio. Apesar dos efeitos colaterais, o SNP continua a ser usado em muito dos tratamentos citados acima, devido às suas potentes propriedades vasodilatadoras e de ação rápida.<sup>13</sup>

### 1.3. Nitrosilo Complexos

Complexos de ferro contendo óxido nítrico têm sido intensamente investigados por apresentarem diversas potencialidades biológicas tais como, vasodilatadores, moduladores de neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária, anticarcinogênico, dentre outros.<sup>14</sup> Assim, tem-se que a química do óxido nítrico possui expressiva relevância farmacológica, além da sua importância ambiental e em processos tecnológicos. Todavia, o interesse nesta molécula foi despertado após comprovação de seu papel chave em processos fisiológicos e patológicos, desde então sendo intenso objeto de pesquisas.<sup>15</sup>

Estudos diversos relatam a capacidade efetiva de complexos nitrosilados, e não apenas de ferro, como por exemplo o nitroprussiato de sódio, Flu-SER e PPIX-SER,<sup>16,17,18</sup> mas também de rutênio e cromo (Figura 4),<sup>19,20</sup> de atuarem como doadores de óxido nítrico *in vitro*, bem como, quando incorporados em formulação farmacêutica e submetidos à fotoindução. Porém, até o momento existem poucos produtos sendo comercializados, tendo em destaque apenas o nitroprussiato de sódio.

Figura 4 - Estrutura de complexos liberadores de óxido nítrico *in vitro* após fotoindução, em destaque (---) apenas o nitroprussiato como fármaco comercializado.



Fonte: Adaptado das referências 16, 17, 18, 19 e 20.

#### 1.4. Complexos Metálicos e Atividade Bactericida

Anualmente, milhões de pessoas morrem devido à infecções causadas por microorganismos resistentes aos antibióticos. Assim, tem-se procurado novos agentes antimicrobianos, particularmente eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes.<sup>21</sup> Dentre a ampla gama de potenciais aplicações na área biológica, a atividade bactericida de nitrosilo complexos também têm sido estudada pela comunidade científica.<sup>22,23</sup>

A utilização de NO e espécies derivadas para inibição do crescimento de microorganismos, tais como *Escherichia coli* (*E. coli*) tem se mostrado bastante eficientes, inclusive com atividade anti-biofilme.<sup>23</sup> A *E. coli* uma bactéria gram negativa, anaeróbica facultativa, que faz parte da flora intestinal normal humana, tem importante papel na manutenção da fisiologia intestinal, contudo, cepas de *E. coli* causadoras de diarreia, tanto em humanos e animais domésticos foram descritas entre as décadas de 40 e 50. Vários casos de cepas de *E. coli* hemorrágica também foram descritos nas últimas décadas, inclusive em países desenvolvidos como os EUA.<sup>24</sup> Todos os seres humanos são susceptíveis a infecções pela *E. coli*. Essas infecções podem ser limitadas às superfícies das mucosas ou podem se

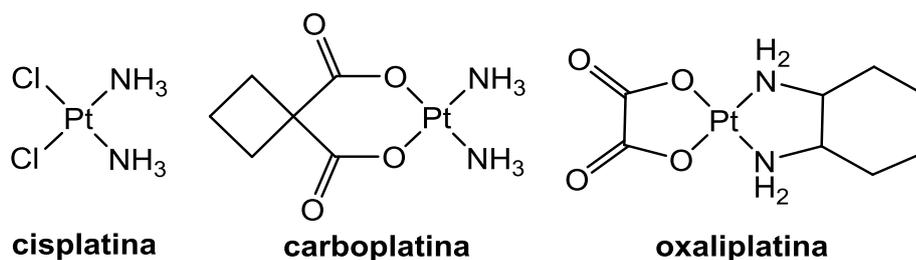
difundir por todo o corpo. Três síndromes clínicas gerais resultantes da infecção com cepas da *E. coli* são: (i) infecção urinária, (ii) sepse/meningite e (iii) doença entérica/diarreica.<sup>25</sup>

O efeito de inibição do crescimento bacteriano promovido pelo NO e derivados pode ser atribuído a capacidade dos mesmos em serem convertidos em compostos que são consideravelmente mais tóxicos a bactéria. Perigo e colaboradores,<sup>26</sup> relataram que o nitrito aumenta seu efeito bacteriostático quando aquecido no meio de crescimento celular. Dados da literatura reportam que os íons compostos Roussin's black salt (RBS)  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$  e Cisteína-Fe-NO, que são formados em meio de crescimento quando aquecido, são inibidores muito eficazes do crescimento dos esporos da bactéria *Clostridium botulinum* (*Clostridium*).<sup>27</sup> A *Clostridium* é um agente promotor do botulismo, uma enfermidade resultante da ação de uma potente neurotoxina de origem protéica, produzida pela bactéria. Normalmente o botulismo decorrente da ingestão de alimentos, em que a toxina foi previamente produzida.<sup>28,29</sup>

### 1.5. Complexos Metálicos como Medicamentos Antitumorais

Denomina-se como câncer, o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo ocasionando possível morte. Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, estima-se aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no ano de 2015.<sup>30</sup> Compostos antitumorais de platina, tais como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (Figura 5) estão dentro do grupo de quimioterápicos disponíveis para o tratamento de tumores.<sup>31</sup> Contudo, essas drogas a base de Pt (II) apresentam efeitos secundários graves,<sup>31</sup> além disso, com o tempo as células acabam por desenvolver resistência as drogas.<sup>32</sup>

Figura 5 - Quimioterápicos a base de platina disponíveis para o tratamento de tumores; cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.



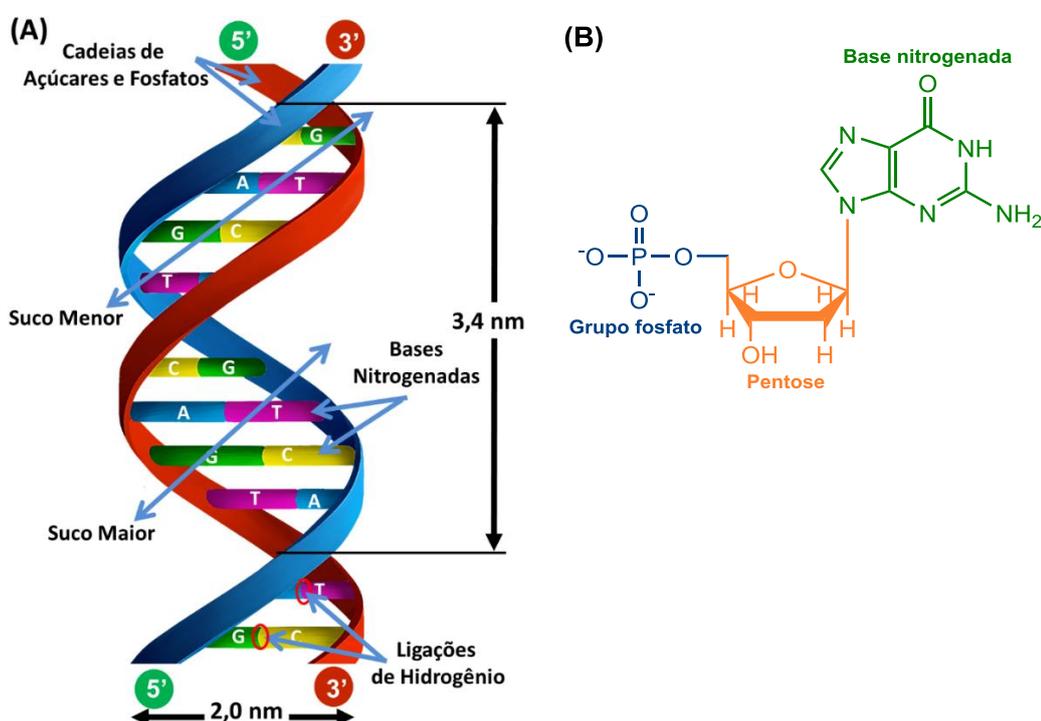
Fonte: Retirado da referência 31.

Diante disso, a comunidade científica tem realizado numerosas tentativas no desenvolvimento de novas drogas antitumorais objetivando superar esses inconvenientes. Na última década tem se destacado em pesquisa bioquímica a utilização de complexos metálicos, incluindo os de ferro, devido à capacidade de tais espécies apresentarem eficaz atividade nuclease<sup>33,34,35</sup> ou intercaladora<sup>36</sup> frente ao Ácido desoxirribonucléico (DNA), destacando-se como possíveis agentes anticancerígenos e microbianos.

### 1.5.1. Estrutura do DNA

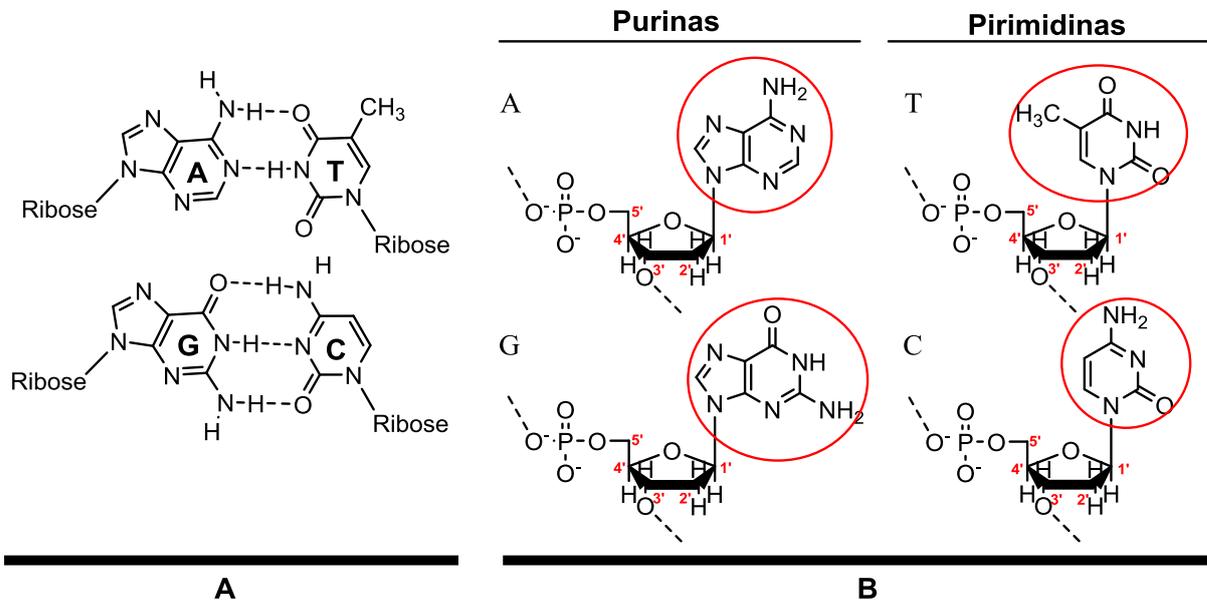
O DNA é uma macromolécula que contém as informações genéticas. É responsável pela manutenção da vida e formação das características físicas, além de conter as informações necessárias para a síntese de RNA (Ácido ribonucléico) e proteínas. A estrutura do DNA é formada por duas cadeias de polinucleotídeos enoveladas em torno de um eixo na forma de uma dupla hélice, conforme desvendada por James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins e Rosalind Franklin (1953) (Figura 6A). Estas duas cadeias são mantidas unidas através de ligações de hidrogênio entre as bases de cada fita, pareando-se uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (Figura 7A).<sup>37</sup>

Figura 6 - A – Estrutura em dupla hélice do DNA, onde G = Guanina, C = Citosina, T = Timina e A = Adenina. B – Estrutura de um nucleotídeo.



Fonte: Adaptado da referência 37 e 38.

Figura 7 - A - Orientação das bases Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C) interagindo por ligações de hidrogênio. B - Estrutura dos quatro nucleotídeos, as purinas são Adenina e Guanina e as pirimidinas são Timina e Citosina.



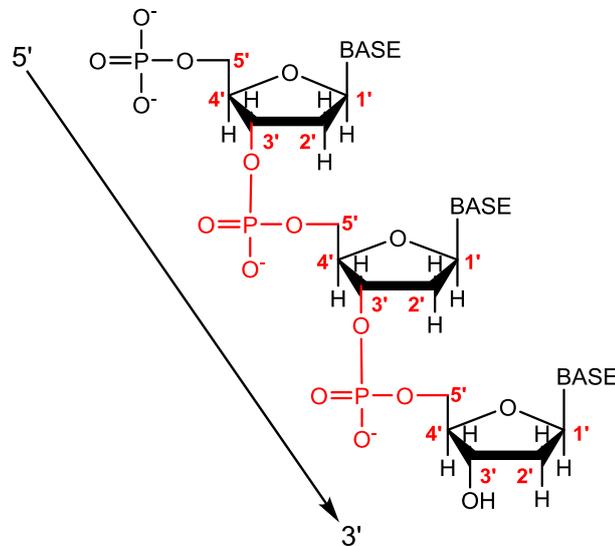
Fonte: Retirado da referência 38.

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada heterocíclica, uma pentose (açúcar) e um grupo fosfato (Figura 6B). As informações genéticas estão contidas nas sequências de bases, enquanto o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural. As bases nitrogenadas são derivadas de anéis de purinas e pirimidinas. No DNA, as purinas são Adenina (A) e Guanina (G) e as pirimidinas são Citosina (C) e Timina (T) (Figura 7B).<sup>37</sup>

As bases de purinas e pirimidinas estão ligadas por um átomo de nitrogênio do anel ao carbono 1 da pentose. Nas moléculas de RNA a pentose é a D-ribose, enquanto que nas moléculas de DNA a pentose é a desoxi-D-ribose. Os nucleotídeos que constituem as moléculas de DNA estão ligados covalentemente uns aos outros através dos grupos fosfato. Esta ligação é denominada de ligação fosfodiéster, ela é formada pela junção do grupo fosfato de um nucleotídeo com o grupo OH do carbono 3' de outro nucleotídeo (Figura 8). Desta forma, o esqueleto covalente do DNA é constituído por grupos fosfato e anéis de ribose ligados alternadamente. Todas as ligações fosfodiéster possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, dando a cada fita do ácido nucléico linear uma polaridade específica e diferentes terminais 3' e 5' (3'-OH e 5'-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Por convenção, as sequências de nucleotídeos nas moléculas de DNA e RNA são descritas no sentido da extremidade 5'-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> para a

extremidade 3'-OH ( $5' \rightarrow 3'$ ). Em pH fisiológico as moléculas de DNA estão negativamente carregadas, o que inibe a hidrólise das ligações fosfodiéster pelo ataque de nucleófilos.<sup>38</sup>

Figura 8 - Estrutura da ligação fosfodiéster (em vermelho) unindo os nucleotídeos do DNA.



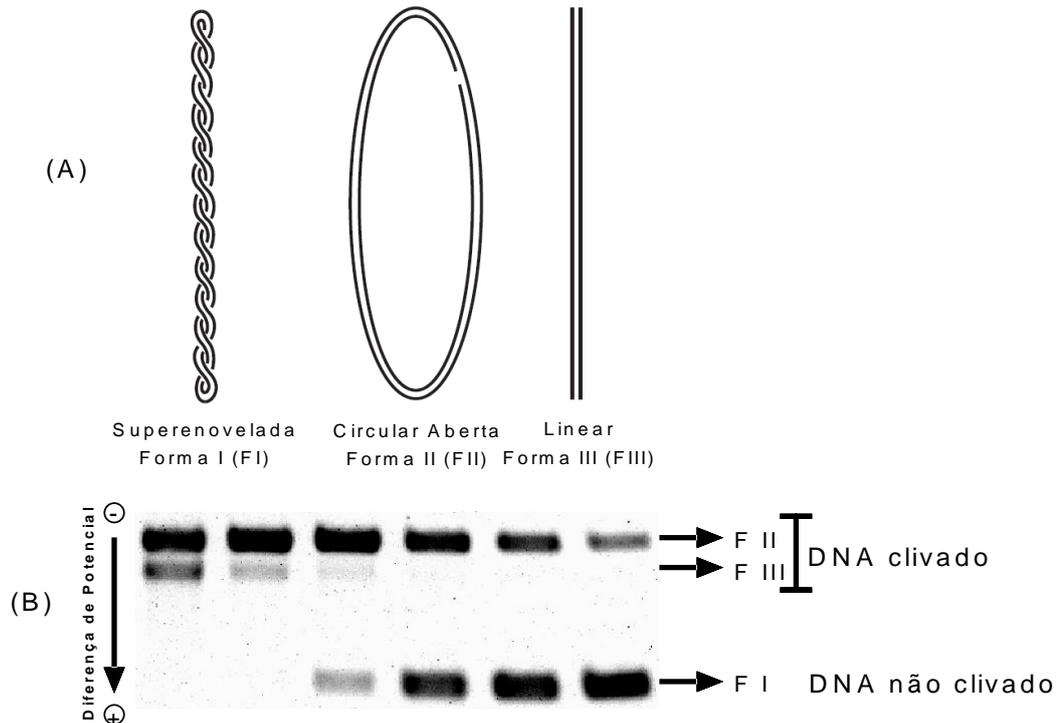
Fonte: Adaptado da referência 39.

### 1.5.2. DNA plasmidial

O DNA empregado na maioria dos ensaios de clivagem *in vitro* são plasmidiais. Esses plasmídeos são moléculas de DNA razoavelmente pequenas, formados por fita dupla extracromossomial, sendo encontradas em todas as espécies de bactérias. Os plasmídeos variam em estrutura, tamanho, modo e replicação, número de cópias por células e habilidade para propagarem-se em diferentes bactérias.<sup>40</sup>

Quando intactas, as fitas do DNA plasmidial estão altamente tensionadas, apresentando a forma superenovelada (forma I, ou FI) ou DNA fita dupla. Quando o plasmídeo superenovelado sofre uma ou mais quebras em uma das fitas há um relaxamento em sua estrutura “super helicoidal” convertendo o plasmídeo para sua forma circular aberta (forma II, ou FII). No entanto, caso ocorra uma quebra dupla ou duas quebras simples nas fitas de DNA, o plasmídeo assume uma forma linear (forma III, ou FIII)<sup>41</sup> (Figura 9A). A identificação dessas formas pode ser feita através da aplicação da técnica de eletroforese em gel devido as mesmas apresentarem mobilidade eletroforética diferente conforme apresentado na Figura 9B.

Figura 9 - Ilustração das três formas do DNA plasmidial (A) e a sua diferenciação após eletroforese em gel de Agarose (B).



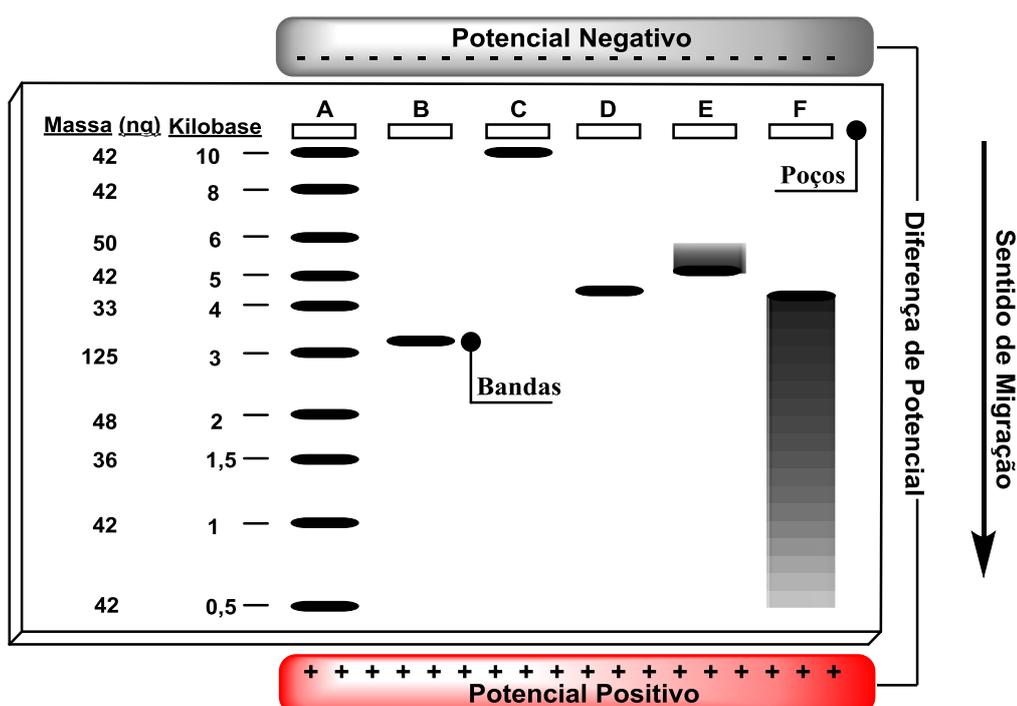
Fonte: Adaptada da referência 38.

Na FI o DNA está altamente enrolado de modo a formar uma estrutura muito compacta que migra através dos poros do gel de agarose a uma velocidade maior do que as outras formas. A FII devido ao seu grande diâmetro, caminha no gel de agarose a velocidade muito mais baixa do que a forma FI e FIII. A forma FIII apresenta velocidade de deslocamento intermediário entre a forma superenovelada - FI e a forma circular aberta - FII, a FIII é a única que apresenta velocidade de deslocamento comparável ao do padrão “linear DNA length standard” comumente chamado de “DNA ladder”, o DNA ladder é constituído de pedaços lineares de DNA com pesos moleculares diferentes.<sup>38</sup>

Se complexos metálicos interagirem covalentemente ou não com o plasmídeo, isto levará a uma redução da velocidade de deslocamento de qualquer uma das três formas devido ao aumento do peso molecular, redução da flexibilidade, e compensação de carga. Se um aduto em específico é gerado, a banda apenas apresenta diminuição da velocidade de deslocamento, porém a formação de adutos de estequiometria diferente levam a bandas com aparência de manchas. Em casos que ocorre clivagem sucessivas do plasmídeo, pequenos fragmentos com mobilidade diferente são formados, nesse caso a banda também apresentará

mancha, porém com maior comprimento. A Figura 10 ilustra os diferentes aspectos que o DNA plasmidial pode apresentar após interagir com complexos metálicos.<sup>38</sup>

Figura 10 - Diferentes formas que o DNA plasmidial pode apresentar após interagir com complexos metálicos. A) DNA ladder, B) plasmídeo na forma superenovelada, C) plasmídeo na forma circular aberta, D) plasmídeo na forma linear, E) adutos, F) degradação do plasmídeo em pedaços curtos. Os números à esquerda indicam o comprimento do DNA padrão (DNA ladder) em kilobases (Kb) e a massa (ng). A seta a direita indica o sentido de migração do DNA no gel quando o mesmo é submetido a uma diferença de potencial.



Fonte: Adaptado da referência 38.

### 1.5.3. Interação de Complexos Metálicos com DNA

A investigação da interação de complexos metálicos com DNA é uma área crescente desde a descoberta da cisplatina há 40 anos. A interação de metais de transição com DNA são classificadas como; covalente de esfera interna, covalente ou não de esfera externa, intercalação, interação por sulcos e clivagem das fitas de DNA.<sup>43</sup>

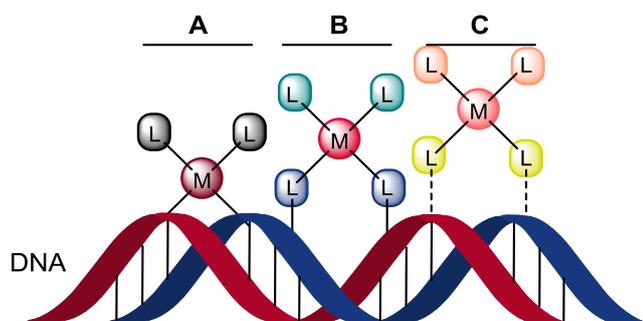
Uma característica dos complexos metálicos que os torna interessante, nos estudos de interação com o DNA é o fato do metal apresentar carga positiva, tornando-o susceptível ao ataque nucleofílico. Aminoácidos e ácidos nucléicos tornam-se potencialmente interessantes, pois devido à presença de pares de elétrons livres na sua estrutura permitem a

interação com o complexo metálico tornando-se uma das formas de interação entre o complexo metálico e o DNA.<sup>38</sup>

*i. Covalente de Esfera Interna e Covalente ou não de Esfera Externa*

O DNA pode interagir com complexos metálicos formando adutos. Quando o DNA se coordena diretamente ao metal, a interação é denominada de covalente de esfera interna (Figura 11A), no entanto quando a ligação ocorre sobre o ligante do complexo a interação é chamada de covalente de esfera externa (Figura 11B). A interação de esfera externa pode ocorrer pelo estabelecimento de ligação não covalente (Figura 11C) como ligações de hidrogênio entre o DNA e o ligante, não dependendo de reações de substituição nucleofílica.

Figura 11 - Formação de adutos envolvendo o complexo metálico e o DNA, resultando nas interações; covalente de esfera interna (A) e externa (B) ou interação não covalente de esfera externa (C).

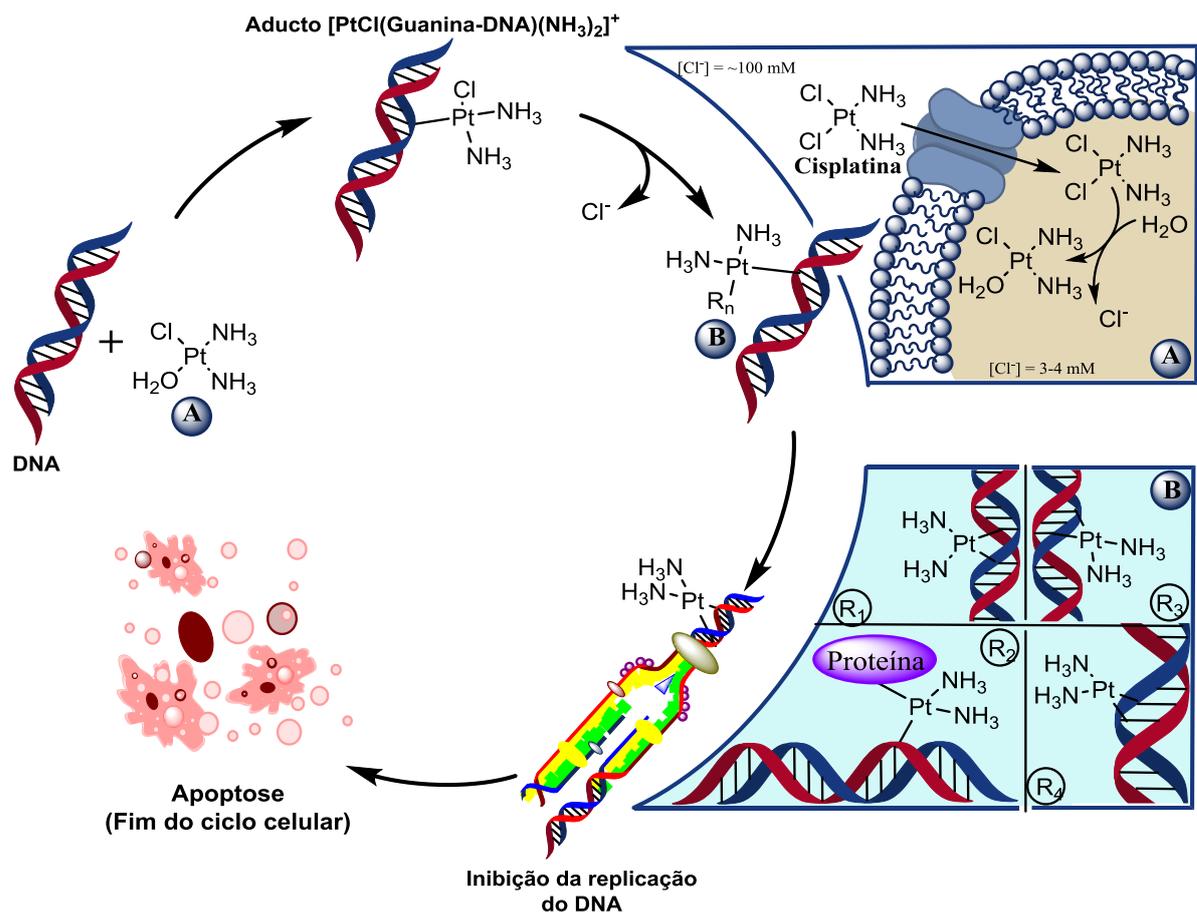


Fonte: Elaborado pelo autor.

O composto inorgânico *cis*-diaminodicloroplatina (II) ( $cis$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>]) comumente chamado como cisplatina, ou sal de Peyrone foi sintetizado por Michel Peyrone pela primeira vez em 1845, esse complexo foi o primeiro membro de uma classe de fármacos anticancerígenos contendo platina.<sup>44</sup> Atualmente, acredita-se que o seu modo de ação citotóxica seja majoritariamente mediado pela sua interação com o DNA formando adutos. Em solução, a cisplatina pode sofrer substituições dos ligantes cloretos por moléculas de água, podendo ser geradas as espécies  $cis$ -[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e  $cis$ -[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> que, por sua vez, podem reagir com o alvo celular, no caso o DNA. Esse processo de aquação ocorre mais facilmente quando o fármaco adentra a célula, uma vez que a concentração de íons cloreto no meio intracelular (3-20 mmol L<sup>-1</sup>) é significativamente menor comparado com a quantidade de íons cloreto no meio extracelular (~100 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 12). Este mecanismo de aquação possibilita ao complexo se ligar as bases nitrogenadas do DNA, preferencialmente a

bases de guanina formando a espécie  $[\text{PtCl}(\text{Guanina-DNA})(\text{NH}_3)_2]^+$ .<sup>45,46</sup> Com a saída de outro ligante cloreto, a cisplatina pode ligar-se a proteínas que estejam próximas ou a outro guanina na mesma molécula de DNA, essa ligação pode ser cruzada entre as duas fitas (intercadeias) ou na mesma fita de DNA (intracadeia). Após a ligação da cisplatina, a molécula de DNA se dobra cerca de  $30^\circ$ , promovendo danos ao DNA. Esses danos provocam a inibição da replicação e transcrição, parando o ciclo celular e por fim levando a morte celular (apoptose).<sup>46</sup>

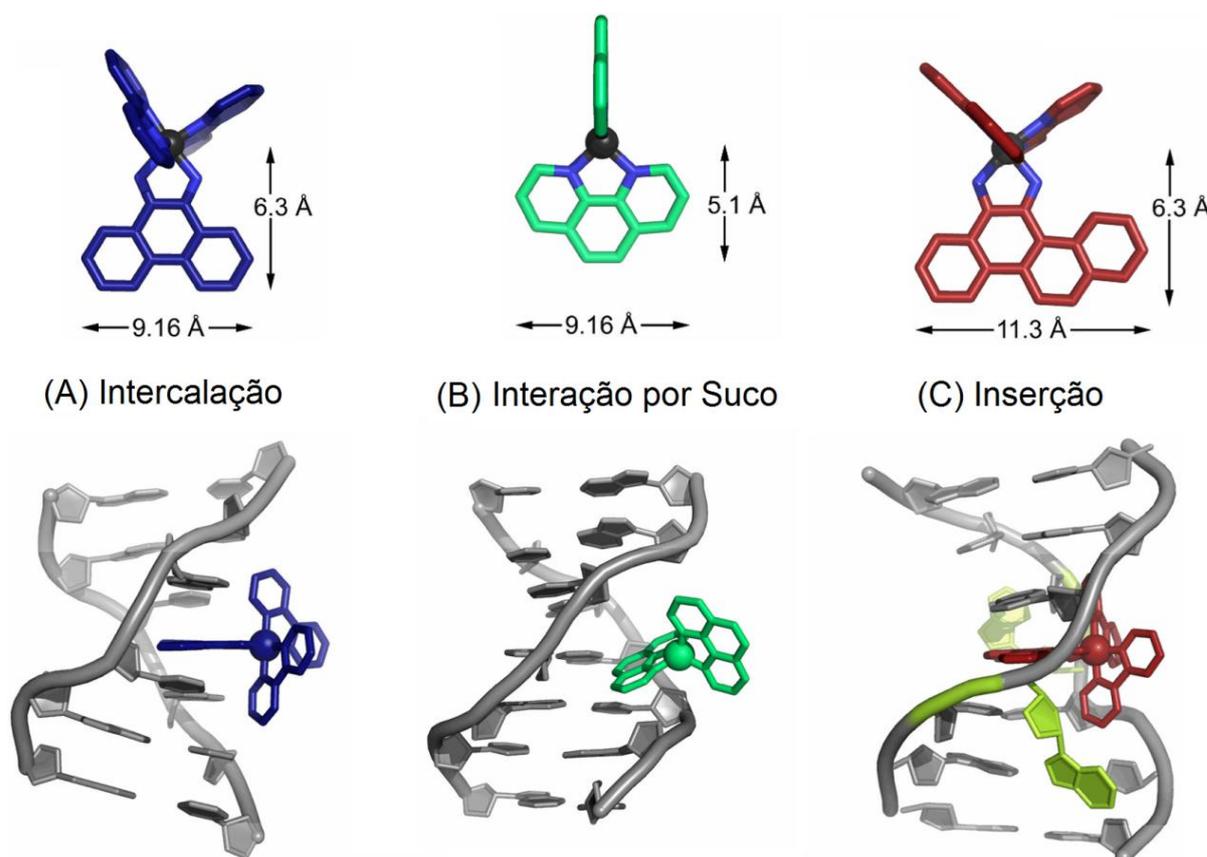
Figura 12 - Possível mecanismo citotóxico da cisplatina frente a molécula de DNA. (A) A substituição do ligante cloreto por uma molécula de água, resulta na formação da espécie *cis*- $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ . Devido a grande diferença de concentração de íons cloreto dentro (3-20 mM) e fora da célula ( $\sim 100$  mM), esse processo ocorre com mais facilidade quando a cisplatina se encontra no meio intracelular. (B) Existe 4 diferentes modos de ligação da cisplatina ao DNA:  $R_1$  = ligação cruzada intercadeias;  $R_2$  = ligação ao DNA e proteínas adjacentes;  $R_3$  = ligação cruzada intracadeia ligando-se a duas bases adjacentes G-G (60%); e  $R_4$  = ligação intracadeia ligando-se a duas bases adjacentes a A-G (20%).



ii. *Intercalação, Interação por Sulcos e Inserção*

Complexos metálicos com ligantes aromáticos planares tais como dipiridoquinoxalina ou dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) foram reportados como espécies capazes de interagir fortemente com DNA.<sup>47,46</sup> Essa interação se dá por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  stacking entre as bases nitrogenadas e o ligante aromático, o resto da molécula pode ficar posicionado nos sulcos maior ou menor (Figura 13A), esta interação é bastante forte podendo ainda ser reforçada por interações adicionais fracas como por exemplo ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, isso provoca a desestabilização da dupla hélice e consequente distorção. Foi verificado que quanto maior o prolongamento do ligante aromático maior será a afinidade do complexo pela molécula de DNA, e consequentemente maior a atividade antitumoral.<sup>46,48</sup>

Figura 13 - Os três modos de interação entre o DNA e complexos metálicos com ligantes aromáticos: (A) Intercalação, (B) Interação por sulco, e (C) Inserção. Na parte superior estão representadas as diferentes geometrias dos complexos, e na parte inferior estão ilustradas as diferentes interações DNA-complexo.



Fonte: Adaptado da referência 48.

Estudos indicaram que não é possível a intercalação por cada par de base, o que pode ocorrer no máximo é a interação entre pares de bases alternados, de acordo com o princípio da exclusão de moléculas adjacentes (*Neighbour exclusion principle*).<sup>49</sup> O princípio da exclusão indica que a interação de um composto em determinado local, provocará a alteração da conformação do DNA, diminuindo a interação nos sítios de ligações adjacentes.<sup>49</sup>

Complexos com ligantes menores podem interagir de forma não covalente com o DNA por meio dos sulcos (menor ou maior) (Figura 13B). Esse tipo de interação não exige alterações conformacionais significativas podendo ser comparado como o modelo enzima-substrato, contrariamente ao modo de intercalação que exige a formação de uma cavidade na dupla hélice. A ligação por sulcos ocorre através de interação eletrostática, hidrofóbicas e Van der Waals.<sup>48,50</sup>

Um processo semelhante a intercalação é o processo de inserção (Figura 13C). Nesse caso o complexo metálico provoca o afastamento do par de base para o exterior da dupla hélice e insere-se no espaço formado, com o ligante aromático planar fazendo a substituição das bases afastadas pelo empilhamento  $\pi$ - $\pi$ . Esse tipo de interação é interessante quando os pares de base estão termodinamicamente desestabilizados, resultantes de erros de emparelhamento.<sup>48</sup>

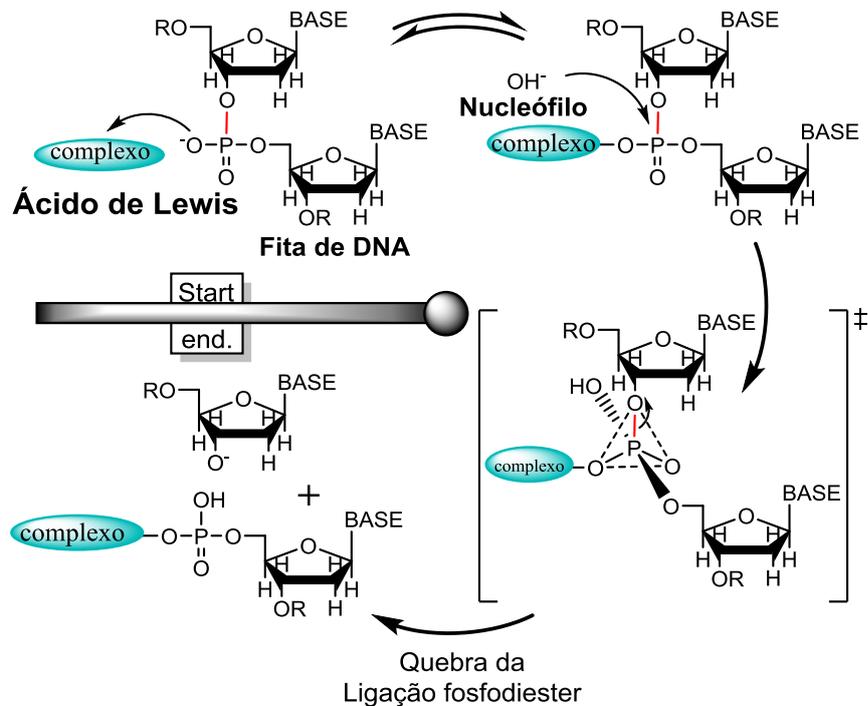
#### ***1.5.4. Clivagem das Fitas de DNA***

Compostos que possuem a capacidade de clivar o DNA são chamados de *nucleases sintéticas*. As nucleases são enzimas capazes de clivar, ou quebrar a ligação fosfodiéster da molécula de DNA.<sup>51</sup> A atividade de muitos fármacos anticancerígenos conta com a capacidade dos mesmos em induzir clivagem ao DNA das células afetadas, o que pode desencadear apoptose e morte celular. A clivagem do DNA pode ocorrer pela quebra de suas ligações fosfodiéster, ligações das bases nitrogenadas ou pela desoxirribose. Os danos na estrutura do DNA podem ocorrer principalmente pela oxidação da desoxirribose ou das bases, devido possuir vários locais susceptíveis ao ataque de espécies oxidativas. A hidrólise da ligação fosfodiéster é também um mecanismo de clivagem de DNA, provocado por nucleases biológicas.<sup>38</sup> Em geral, há três tipos diferentes de clivagem de DNA: hidrolítica, oxidativa e fotoquímica.<sup>46</sup> Ressalta-se que toda quebra não reversível não se caracteriza como atividade nucleasa típica, a qual implica quebra via hidrólise e não oxidativa.

O mecanismo de clivagem hidrolítica é definido como um método de quebrar as ligações fosfodiéster do DNA, gerando fragmentos que podem ser religados. Essa via é

facilitada pela presença de íons metálicos, que atuam como ácidos de Lewis (Figura 14). Estes ácidos de Lewis podem ativar o grupo fosfato o tornando suscetível a ataque nucleofílico de íons  $\text{OH}^-$ . Em seguida pode ocorrer a clivagem da porção 3'-PO (como visto na maioria das vezes em sistemas enzimáticos) ou da 5'-PO provocando a quebra da cadeia de DNA.<sup>46</sup>

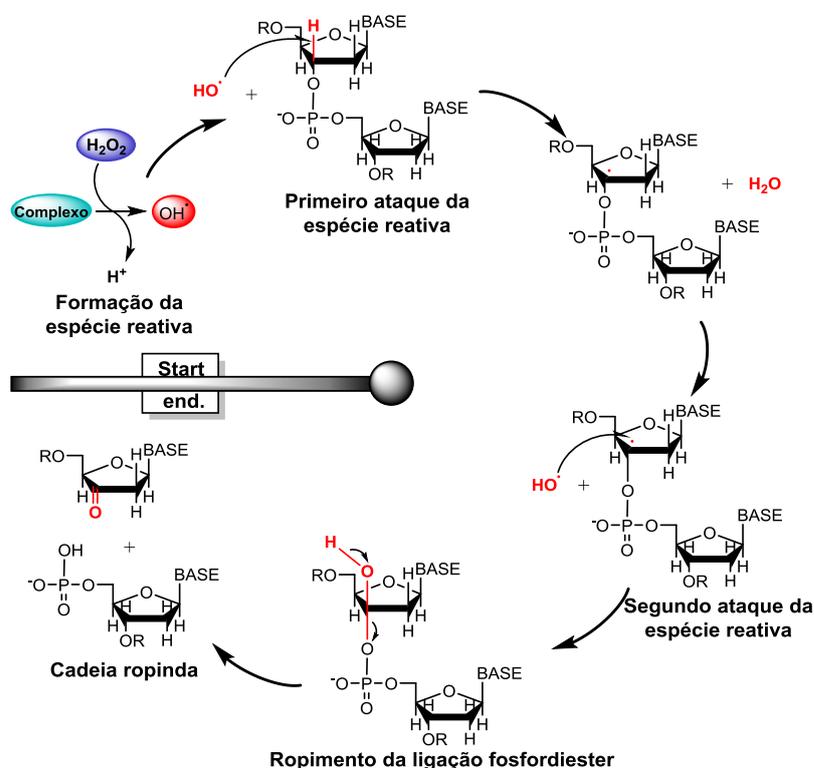
Figura 14 - Mecanismo de clivagem hidrolítica do DNA catalisada por um complexo metálico  $\text{ML}_5$ .



Fonte: Adaptado da referência 46.

No mecanismo oxidativo ocorre a formação de espécies radiculares a partir da reação entre o complexo metálico e espécies reativas (por exemplo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que podem ser fotoinduzidas ou desencadeadas pela atividade redox do metal.<sup>52</sup> As espécies reativas podem promover danos ao açúcar (pentose) ou as bases nitrogenadas. Geralmente espécies radiculares como radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) estão envolvidos neste tipo de mecanismo.<sup>53</sup> O rompimento da fita pode ocorrer pela retirada de um átomo de hidrogênio da desoxirribose a qual produz um radical centrado no carbono do açúcar que pode sofrer rearranjo ou ataque, conseqüentemente provocando o rompimento da fita de DNA (Figura 15), nesse caso os fragmentos de DNA não podem ser religados.<sup>46,38</sup>

Figura 15 - Mecanismo de clivagem oxidativa envolvendo a desoxirribose do DNA e  $\cdot\text{OH}$ . A espécie reativa ( $\cdot\text{OH}$ ) pode ser produzida por meio da reação do complexo com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após a formação da espécie  $\cdot\text{OH}$ , a mesma pode atacar o DNA retirando um átomo de hidrogênio da desoxirribose. Um segundo ataque de outra espécie reativa  $\cdot\text{OH}$  pode ocorrer, provocando a quebra da ligação fosfodiéster e formação dos fragmentos.



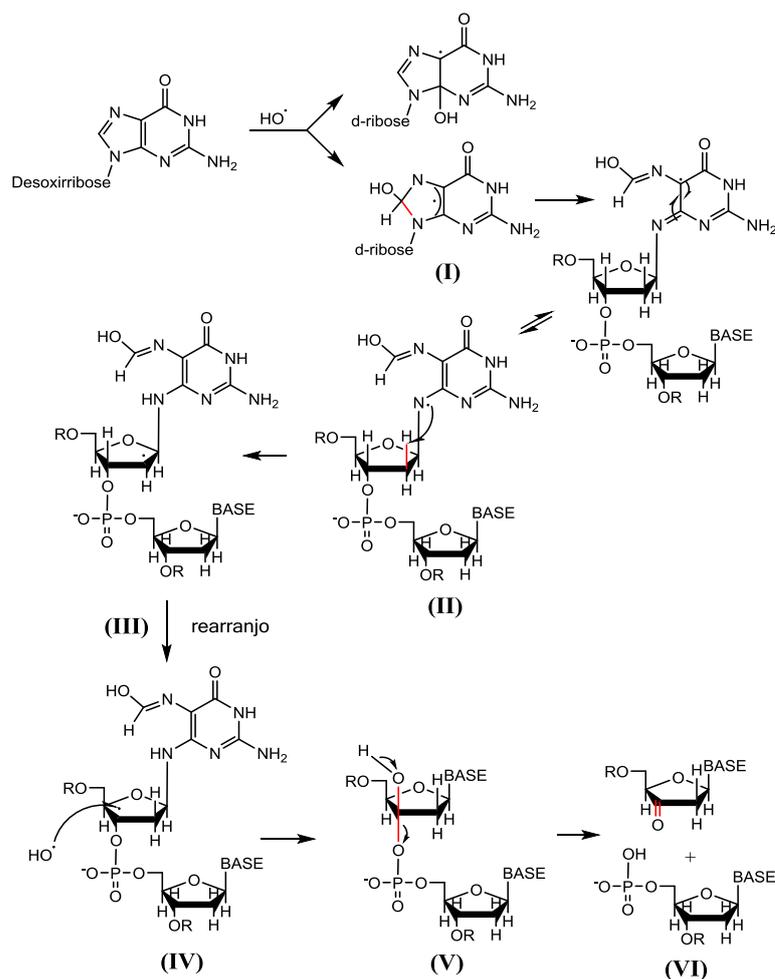
Fonte: Adaptado das referências 52, 46 e 38.

A luz pode ser usada para desencadear a atividade nucleásica. As nucleases que são ativadas pela luz visível ou UV-próximo podem ser utilizadas como potenciais agentes antitumorais. A fotoclivagem de DNA pode ocorrer por uma ampla variedade de mecanismos, tais como retirada do átomo de hidrogênio do açúcar por radicais fotoquimicamente gerados,<sup>54</sup> e ataque às bases nitrogenadas (normalmente guanina) por espécies radiculares e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), também fotoquimicamente gerados.<sup>54</sup> Desta forma, o dano fotoinduzido ao DNA pode ser dividido em dois tipos principais: tipo I, que consiste em um processo de transferência de um elétron do complexo metálico para outras espécies produzindo agentes reativos, e tipo II, processo esse que envolve a transferência de energia de espécies fotoexcitadas para  $\text{O}_2$  produzindo  $^1\text{O}_2$ .<sup>46</sup>

No processo tipo I, o agente de clivagem é excitado pela luz, em seguida o mesmo pode gerar sequencialmente radicais superóxidos ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) a partir do oxigênio molecular através

de transferência eletrônica.<sup>46</sup> O  $O_2^{\cdot-}$  é um fraco agente oxidante<sup>55</sup> podendo ser reduzido a  $H_2O_2$  e  $\cdot OH$  ou funcionar como um agente redutor.<sup>46</sup> Como mencionado anteriormente, nesse caso o dano ao DNA pode ocorrer na desoxirribose ou nas bases. Foi observado que essa via de oxidação ocorre principalmente na guanina, formando radicais centrados no carbono (Figura 16). Isto resulta na desestabilização da molécula de DNA levando ao rompimento da fita.<sup>54</sup> Em uma primeira etapa, o  $\cdot OH$  pode se ligar a base gerando adutos radiculares. Em uma segunda etapa, estes intermediários podem remover um hidrogênio da desoxirribose adjacente produzindo radicais centrados no açúcar, a partir desse ponto os danos causados na desoxirribose seguem o mesmo mecanismo oxidativo, tal como mencionado anteriormente (Figura 15).

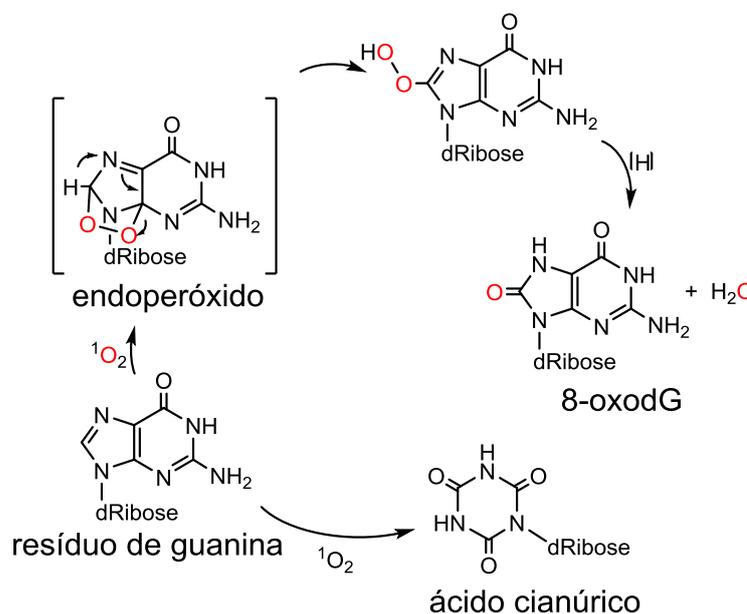
Figura 16 - Mecanismo de clivagem oxidativa envolvendo a guanina do DNA e  $\cdot OH$ . (I) ligação do  $\cdot OH$  a base gerando adutos radiculares; (II) Retirada de um átomo de hidrogênio da desoxirribose; (III) Rearranjo; (IV) Segundo ataque da espécie reativa; (V) Quebra da ligação fosfodiéster e (VI) formação dos fragmentos.



Fonte: Adaptado na referência 54.

O processo tipo II, consiste na formação de  $^1\text{O}_2$  por espécies fotoexcitadas. O  $^1\text{O}_2$  é capaz de reagir com a molécula de DNA preferencialmente no resíduo de guanina, podendo formar múltiplos produtos. Devido ao seus baixos potenciais redox, todas as quatro bases são susceptíveis a danos ocasionados por oxigênio singlete.<sup>56</sup> No entanto, devido ao potencial redox inferior da guanina, esta base é mais susceptível à oxidação.<sup>56</sup> A quebra do DNA induzida por  $^1\text{O}_2$  gera controvérsia devido as clivagens de cadeia simples não excederem 5% do dano total DNA.<sup>54</sup> Contudo se sabe que a reação do  $^1\text{O}_2$  com o resíduo de guanina no DNA acarreta na formação do 8-oxodG e ácido cianúrico.<sup>46</sup> O 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihidroguanina) é um dos produtos mais comuns derivado das quebras da cadeia de DNA, o mesmo pode surgir a partir de uma cicloadição 1-4 no anel imidazólico conduzindo a formação do produto instável endoperóxido (Figura 17).<sup>54,57,58</sup> Estes resíduos modificados além de possibilitarem a clivagem das fitas de DNA, também contribuem para a desestabilização da dupla-hélice.<sup>54</sup>

Figura 17 - Oxidação da guanina pelo  $^1\text{O}_2$  gerando ácido cianúrico e 8-oxodG.

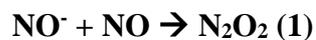


Fonte: Adaptado das referências 54 e 59.

O excesso de NO tem sido relatado como causador de diversas patologias, tais como inflamação, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer.<sup>60</sup> Estes efeitos prejudiciais do NO têm sido atribuídos a ERNs como por exemplo o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é formado pela reação do NO com íon  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . ERNs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, DNA e lipídios alterando assim as suas funções.<sup>60</sup> Ohshima e colaboradores,<sup>61</sup> reportaram que o HNO também pode causar danos oxidativos ao DNA *in*

*vitro* provocando a ruptura de suas fitas. Os autores atribuíram este efeito a alta reatividade do radical  $\cdot\text{OH}$  gerado a partir da reação do NO com  $\text{NO}^-$  (Reação 1 e 2).

Reação 1 e 2



O desenvolvimento de complexos metálicos capazes de interagir com DNA e proteínas é uma área de crescente interesse, os quais podem vir a se tornar ferramentas biológicas e terapêuticas. Em quimioterapia é necessário que esse complexo seja suficientemente inerte, para penetrar na célula e serem ativados apenas no alvo específico. Uma série de pesquisas sobre os efeitos de metalocompostos tem sido desencadeada e vários complexos têm sido sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antineoplásica devido a sua interação com DNA.<sup>62</sup> Por esta razão, cada vez mais se tem estudado e buscado o desenvolvimento de novos compostos modelo.

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O desenvolvimento de metalocompostos com atividade farmacológica vem continuamente buscando compostos menos tóxicos e mais bioativos para terapia de diversas patologias cardiovasculares, câncer e infecções bacterianas, sendo estes compostos dotados de propriedades complementares ou melhores que aquelas exibidas pelos fármacos já em uso, além de possível utilização em terapia fotodinâmica.<sup>63</sup>

A liberação de NO por foto-indução<sup>64</sup> ou através de redução eletroquímica do cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) coordenado são algumas das propostas para fins terapêuticos já relatados para nitrosilo complexos.<sup>65</sup> Atualmente, o NO vem dividindo a atenção com a espécie HNO, esta tem propriedades farmacológicas e químicas particulares, algumas inclusive até contrárias às do NO, por exemplo sua atuação como inotrópico cardíaco positivo. O HNO também tem se mostrado promissor no tratamento de insuficiência cardíaca levando a avanços nessa área.<sup>10</sup>

Outra característica relevante para a área farmacológica é a capacidade de nitrosilo complexos liberarem o ligante NO ou HNO, ocasionando muitas vezes, danos irreversíveis ao DNA e a estrutura celular. No entanto, há pouca descrição na literatura sobre o efeito de compostos doadores de NO/HNO sobre o DNA, apesar do crescente emprego desses tipos de compostos em ensaios biológicos e estudos de seu papel no controle do câncer.

Este trabalho objetiva sintetizar, com base na literatura,<sup>66,67</sup> os complexos de ferro *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> e avaliar:

- A liberação e detecção de NO e/ou HNO do nitrosilo complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> por meio de estímulo térmico, luminoso e químico (glutaciona) em condições fisiológicas;
- A via mecanística da reação do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> com o redutor biológico glutaciona em condições fisiológicas;
- A reatividade frente ao DNA plasmidial pBR322, empregando uma série de estímulos tais como luz, glutaciona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- O tipo de interação e possível mecanismo de clivagem promovida pelos dois complexos ao DNA;
- O efeito da força iônica sobre a clivagem de DNA, por meio da adição de diferentes concentrações de NaCl;

- A possível atividade citotóxica dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> frente a duas linhagem de células cancerígenas B16-F10 (melanoma de camundongo) e HUH-7 (hepatocarcinoma humano);
- A atividade bactericida dos compostos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> frente a linhagem MC1061 da bactéria *Escherichia coli*.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica e não sofreram qualquer purificação prévia. Os mesmos estão listados na Tabela 1 com sua respectiva procedência e grau de pureza.

Tabela 1 - Lista de reagentes com suas respectivas procedências e grau de pureza.

| Reagente  | Procedência                | Pureza (%) |
|---|----------------------------|------------|
| Cloreto de Ferro (II) ( $\text{FeCl}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ )   | Sigma-Aldrich              | $\geq 99$  |
| 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (cyclam)                            | Aldrich (Chemistry)        | 98         |
| Hexafluorofosfato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{PF}_6$ )              | Aldrich (Chemistry)        | $\geq 95$  |
| 2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3-óxido (cPTIO)   | Santa Cruz Biotechnology   | $\geq 98$  |
| Sal de Angelis (AS), $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$                | Santa Cruz Biotechnology   | -          |
| Glutationa (GSH)  | Sigma-Aldrich              | 99         |
| Citocromo-c (músculo de coração de cavalo)                            | Fluka Analytical           | $\geq 90$  |
| Xantina Oxidase   | Serva                      | -          |
| Hipoxantina   | Sigma                      | $\geq 99$  |
| Fosfato de Potássio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )           | Sigma-Aldrich              | $\geq 99$  |
| Fosfato de Potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )             | Sigma-Aldrich              | $\geq 98$  |
| Agarose   | Sigma (Life Science)       | -          |
| Mioglobina (músculo de esqueleto do cavalo)                           | Sigma (Life Science)       | $\geq 95$  |
| Catalase  | Sigma (Life Science)       | -          |
| Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)                                | Reagan                     | $\geq 99$  |
| Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )                     | Merck                      | 30         |
| Tris-(hidroximetil)aminometano (Tris-Base)                            | Uniscience                 | $\geq 99$  |
| Ácido acético   | Synth                      | $\geq 99$  |
| Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA)                             | ChemCruz™ Biochemicals     | $\geq 98$  |
| plasmídeo pBR322 (DNA)  | New England Biolabs® Inc.  | -          |
| D-manitol   | Sigma-Aldrich              | 98         |
| L-Histidina   | Sigma-Aldrich              | 99         |
| Superóxido Dismutase (SOD)  | Sigma (Life Science)       | -          |
| 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO)                          | Aldrich (Chemistry)        | 99         |
| Ácido trifluoroacético  | TEDIA High Purity Solvents | 99         |
| 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-brometo de difenil-2H-tetrazólio (MTT) | Sigma-Aldrich              | 98         |

(-) = Não fornecido pelo fabricante.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2. Soluções

A água utilizada em todos os procedimentos foi obtida de um equipamento de ultrapurificação de água cuja resistividade  $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  (Direct Q® 3UV com bomba da MILLIPORE). As soluções 0,1 e 0,5 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de sódio foram preparadas e em seguida ajustado o pH de cada uma para 7,4, sendo preparadas no dia anterior às medidas, e estocadas sob refrigeração. A solução de ácido trifluoroacético 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi preparada e o pH foi ajustado para 3,2, sendo estocada a temperatura ambiente, para posterior uso como eletrólito suporte nas medidas eletroquímicas.

A solução estoque de sal de Angelis (AS), foi preparada em 10 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH, e a concentração de AS foi determinada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível usando a absorvidade molar  $\epsilon = 8,2 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em 248 nm.<sup>68</sup> As soluções de 2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3-óxido (cPTIO), mioglobina, glutationa e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram preparadas no mesmo dia do experimento utilizando tampão fosfato como solvente. Para o preparo de mioglobina em condições anaeróbicas, o tampão foi previamente deaerado dentro de câmara anaeróbica. A solução estoque de mioglobina deaerada teve sua concentração determinada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível usando a absorvidade molar  $\epsilon = 188 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para banda solet em 408 nm.<sup>69,70</sup>

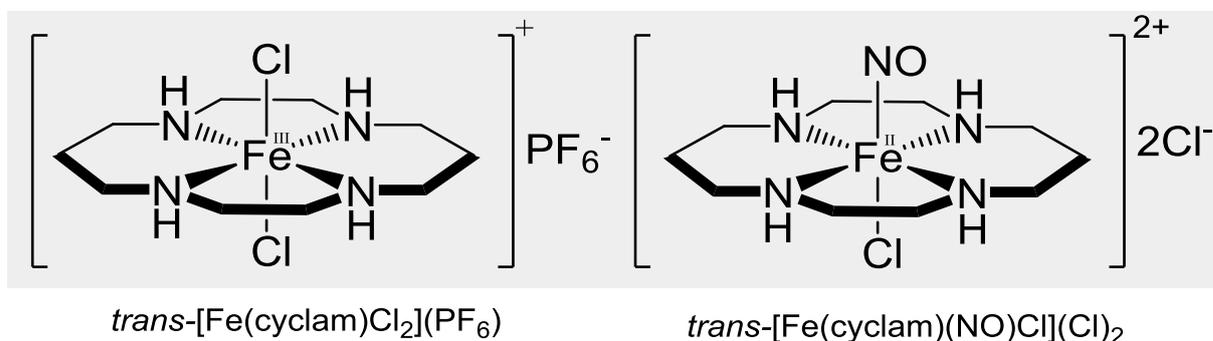
Nos ensaios de decomposição de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a concentração de citocromo-c (Fe<sup>3+</sup>) usada foi estabelecida empregando-se a absorvidade molar  $\epsilon = 8,9 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  correspondente ao máximo da banda em 550 nm.<sup>71</sup> As soluções dos complexos foram preparadas no dia do experimento em tampão fosfato pH 7,4. As concentrações foram determinadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível usando a absorvidade molar  $\epsilon = 7,5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ nm}$ )<sup>72</sup> para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e  $\epsilon = 1,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$ )<sup>67</sup> para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>. A solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão Tris - EDTA teve seu pH ajustado para 8,0, sendo posteriormente mantido sob refrigeração e usado no dia seguinte.

### 3.3. Complexos de Ferro

Os estudos foram realizados utilizando os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> (Figura 18). A escolha desses sistemas foi motivada devido

ao crescente estudo de reatividade biológica de nitrosilo complexos e o potencial farmacológico ainda pouco explorado para esses sistemas.

Figura 18 - Estruturas dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.3.1. Síntese do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)

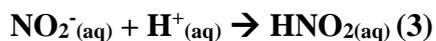
O complexo *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl foi preparado como precursor do isômero *trans*, através de metodologia descrita na literatura.<sup>66</sup> Em seguida empregou-se 100 mg (0,214 mmol) deste precursor (*cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl) solubilizados em 10 mL de uma solução 1:1 metanol/água, mantido sob agitação e aquecimento (80°C) por 30 minutos, tempo no qual a solução passou de amarelo para verde.<sup>66</sup> Após esse tempo, uma solução saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> foi adicionada lentamente ao balão, precipitando um sólido verde, o qual foi coletado em funil de placa porosa nº 3, lavado (metanol gelado) e seco a vácuo. Rendimento de 40%.

### 3.3.2. Síntese do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

O complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> foi sintetizado conforme descrito na literatura.<sup>67</sup> Brevemente, 100,0 mg (0,257 mmol) de *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl foram dissolvidos em 10 mL de água previamente deaerada, sendo a solução submetida à agitação e ao contínuo borbulhamento de gás NO por 60 minutos. A solução foi então concentrada por evaporação a baixa pressão e posteriormente adicionou-se uma mistura de solventes etanol/éter etílico (50%), promovendo a precipitação do composto. O sólido foi coletado por filtração em funil de placa porosa nº 3, lavado (etanol/éter etílico (50%) gelado) e seco a vácuo. Rendimento de 80%.

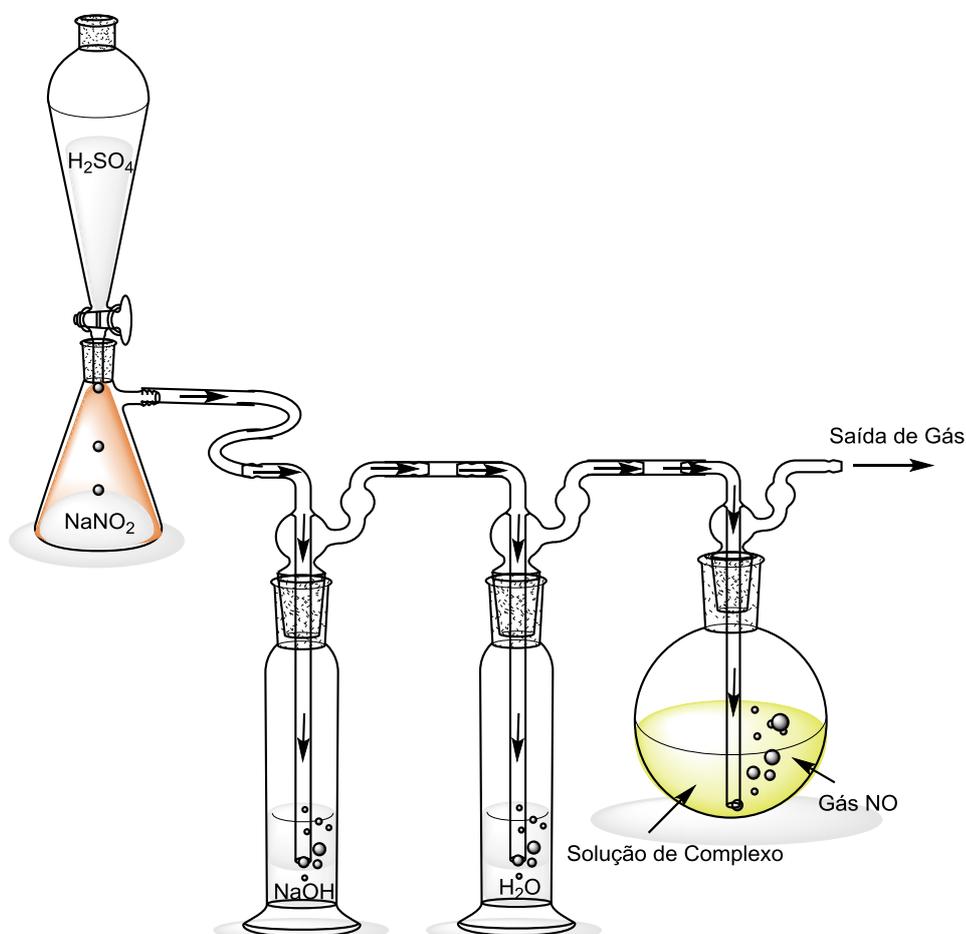
O óxido nítrico gasoso foi produzido por meio da adição de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ao sal nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), segundo as reações abaixo (Reação 3 e 4):

Reação 3 e 4



O gás gerado foi conduzido através de dois frascos lavadores de gases, o primeiro contendo uma solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ , para neutralização de traços ácidos, e o segundo contendo água destilada, antes de ser borbuhlado na solução contendo o complexo (Figura 19).

Figura 19 - Ilustração do sistema utilizado para produção de óxido nítrico gasoso.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.4. Técnicas Experimentais e Equipamentos

#### 3.4.1. Caracterização dos Complexos

Os complexos foram caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. Os espectros eletrônicos, nas regiões do ultravioleta e visível, foram obtidos em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 5000 UV/Vis-NIR. As amostras foram analisadas em solução utilizando cubeta de quartzo retangular de caminho ótico de 1,0 cm, já os espectros vibracionais, na região do infravermelho, foram obtidos em um espectrômetro ABB-BOMEN FTLA 2000-102 com janela espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram preparadas na forma de pastilhas, dispersas em brometo de potássio de grau espectroscópico.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema eletroquímico da BASi Epsilon-EC-Ver.2.00.71-USB, à temperatura ambiente 25 °C, usando-se uma solução de ácido trifluoroacético (NaTFA, 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 3,2), como eletrólito suporte, e uma célula convencional de três eletrodos: platina, carbono vítreo e prata-cloreto de prata (KCl 3,5 mol  $\text{L}^{-1}$  BAS), como eletrodos auxiliar, trabalho e referência, respectivamente.

#### 3.4.2. Cálculos Computacionais

Cálculos computacionais foram realizados por meio do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho, instalado na UFC, utilizando-se os *softwares* GaussView 5,<sup>73</sup> para o desenho das geometrias, e Gaussian 9<sup>74</sup> como plataforma de cálculo. As otimizações das geometrias moleculares dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e do aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup> foram efetuadas utilizando a Teoria do Funcional de Densidade<sup>75</sup> (do inglês, DFT: Density Functional Theory) através do método B3LYP.<sup>75</sup> O conjunto de bases utilizadas foram LANL2DZ<sup>76,77</sup> para o átomo de ferro, e para os demais átomos foi a base 6-31G(d).<sup>78,75</sup>

Os cálculos simulando solvente foram efetuados utilizando o modelo de solvatação contínua polarizada (do inglês, PCM: Polarizable Continuum Model)<sup>75,79</sup> sendo água como solvente. Os espectros eletrônicos teóricos foram calculados utilizando a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo<sup>75,80</sup> (do inglês TD-DFT; Time-Dependent Density Functional Theory). Os valores de energia e as contribuições percentuais dos orbitais envolvidos nas transições eletrônicas foram obtidos por meio da utilização do *software* GaussSum 3.0.<sup>81</sup> As ordens de ligação e composição atômica dos orbitais foram obtidos por

meio da utilização do *software* Multiwfn.<sup>82</sup> As ordens de ligações foram determinadas por meio da teoria Fuzzy Bond Order (FBO).<sup>83</sup> Os valores de densidade de carga sobre os átomos de Fe, N, O e S da porção Fe-NO das espécies *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup> foram obtidos por meio da análise de densidade de carga atômica de Mulliken.<sup>75</sup>

### **3.4.3. Ensaio de Fotoliberação NO/HNO do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>**

Os espectros eletrônicos para os ensaios de fotoliberação de NO/HNO do *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>, foram obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 por meio de um espectrofotômetro da Varian, modelo Cary 5000 UV/Vis-NIR. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm. As irradiações foram feitas utilizando um monocromador iluminador com lâmpada de xenônio da marca Newport Oriel Apex, modelo 74004. O mesmo foi ajustado para irradiar no comprimento de onda de 350 nm com potência de 150 W. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente 25 °C.

O ensaio de fotoliberação de NO/HNO do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> foi realizado empregando-se como controles positivos a reação do AS (liberador de HNO) com os *traps* cPTIO e mioglobina (Fe<sup>3+</sup>). A reação entre NO<sub>(g)</sub> e cPTIO também foi analisada para fins comparativos. Os *traps* foram submetidos a irradiação na ausência de complexo por 6 horas e 30 minutos com objetivo de se avaliar a estabilidade dos mesmos nas condições de fotólise. Para evitar possíveis interferências causadas por íons metálicos livres foi adicionado em todas as reações uma quantidade de agente quelante (Ácido dietilenotriaminopentacético - DTPA) na proporção de 1:1 em relação ao complexo.

### **3.4.4. Ensaio de Liberação Térmica de NO do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>**

O ensaio de liberação térmica de NO do nitrosilo complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> foi monitorado por técnicas espectroscópicas. Os espectros de absorção na região do UV-Vis, foram obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 por meio de um espectrofotômetro da Varian, modelo Cary 5000 UV/Vis-NIR, acoplado a um banho termostaticado. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm. Nesse

experimento foi empregado  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos íons complexos *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, este último foi usado como controle já que não liberará NO.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro ABB-BOMEN FTLA 2000-102 com janela espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  utilizando refletância total atenuada (ATR). Para isso foi utilizado uma cela de refletância total atenuada horizontal (HATR) da marca Pike Technologies modelo PN 022-19XX. As amostras foram preparadas em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4. Devido a sensibilidade da técnica ser baixa, a concentração empregada do nitrosilo complexo foi bastante elevada cerca de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . A temperatura empregada nos experimentos foi de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.4.5. Estudo Reacional do Íon Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com Redutor Biológico Glutaciona (GSH)

O acompanhamento da reação entre o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e a glutaciona ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, foi realizado utilizando um espectrômetro ABB-BOMEN FTLA 2000-102 com janela espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  utilizando refletância total atenuada (ATR). Para isso foi utilizado uma cela de refletância total atenuada horizontal (HATR) da marca Pike Technologies modelo PN 022-19XX. As amostras foram preparadas em tampão fosfato  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, o experimento foi conduzido a temperatura ambiente  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os espectros de ressonância paramagnética de elétrons (EPR) foram realizados em um espectrômetro Bruker, modelo EMXplus, acoplado a uma cavidade retangular, operando na banda X (9,81GHz). As amostras também foram preparadas em condições simulando o meio fisiológico, tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, e o experimento foi conduzido a temperatura ambiente  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . As concentrações usadas de cPTIO, *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, DTPA e GSH foram 0,2, 0,4, 0,4 e  $4 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente.

Os dados experimentais de EPR foram convertidos de gauss (G) para fator g anisotrópico utilizando a Equação 1;<sup>84</sup>

$$\Delta E = h\nu = g\beta H_0 \quad (1)$$

Onde:

$\Delta E$  é energia da transição em substâncias contendo um elétron não emparelhado;

$h$  é a constante de Planck ( $6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$ );

$\nu$  é a frequência em ciclos por segundos;

$g$  (fator- $g$ ) é uma constante de proporcionalidade, cujo valor é de propriedade do elétron em um determinado ambiente;

$\beta$  é o magneton de Bohr ( $9,27 \times 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$ );

$H_0$  é valor do Campo magnético em tesla (T).

O estudo cinético foi realizado empregando espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, para isso utilizou-se um equipamento de cinética rápida Stopped-flow modelo SX.18MV-R (Applied Photophysics) e um espectrofotômetro da Varian, modelo Cary 5000 UV/Vis-NIR, ambos acoplados a um banho termostaticado. No caso do espectrofotômetro foi utilizado uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm. Todas as amostras foram preparadas em tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. As reações ocorreram em diferentes temperaturas, 37, 25, 15, 10 e 5 °C.

Os dados experimentais de variação de absorbância em função do tempo para a reação em condições de pseudo-primeira ordem e as constantes de velocidade observadas foram calculadas através da Equação 2;<sup>85</sup>

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

Onde:

$A$  é a absorbância medida em cada tempo  $t$ ;

$A_0$  é a absorbância no início da reação;

e  $k$  a constante de velocidade.

Os parâmetros de ativação, também conhecidos como parâmetros de Arrhenius, foram avaliados graficamente com base na expressão derivada da teoria do estado de transição (Equação 3);<sup>85</sup>

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_b T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (3)$$

Aplicando-se o logaritmo natural ( $\ln(x)$ ) em ambos os lados da Equação 3 obtemos a mesma em uma forma mais operacional (Equação 4);<sup>85</sup>

$$\ln \frac{k_{\text{obs}}}{T} = \ln \frac{k_b}{h} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (4)$$

Onde:

$k_{\text{obs}}$  é a constante de velocidade;

T é a temperatura em Kelvin (K);

$k_b$  é a constante de Boltzmann ( $3,3 \times 10^{-24}$  cal K<sup>-1</sup>);

h é a constante de Planck ( $1,58 \times 10^{-34}$  cal s);

$\Delta H^\ddagger$  é a entalpia de ativação;

$\Delta S^\ddagger$  é a entropia de ativação;

R é a constantes dos gases ( $8,314$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>).

Por meio das medidas em várias temperaturas e das suas respectivas constantes de velocidade ( $k_{\text{obs}}$ ) foi gerado um gráfico de  $\ln(k_{\text{obs}}/T)$  versus  $1/T$ , deste gráfico foi obtido o coeficiente angular da reta que corresponde ao valor de  $-\Delta H^\ddagger/R$ . Uma vez determinado o valor de  $\Delta H^\ddagger$ , o mesmo foi aplicado na Equação 3 determinando-se o valor de  $\Delta S^\ddagger$ . A partir dos valores de  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta S^\ddagger$ , a energia livre de ativação,  $\Delta G^\ddagger$ , foi calculada diretamente por meio da Equação 5:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (5)$$

#### 3.4.6. Atividade Sequestradora de Superóxido ( $O_2^-$ )

O estudo cinético de atividade sequestradora de superóxido ( $O_2^-$ ) foi feito usando-se um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode-Array, acoplado a um banho termostaticado. As amostras foram analisadas em solução de tampão fosfato  $0,1$  mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 utilizando uma cubeta de plástico com caminho ótico de 1,0 cm.

Os testes foram realizados utilizando hipoxantina ( $122$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e xantina oxidase ( $0,13$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) para geração de  $O_2^-$ , citocromo-c ( $Fe^{3+}$ ) ( $64$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) para detecção do radical, e catalase ( $0,4$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) para eliminação de possíveis traços de  $H_2O_2$  formados, assim evitando a possível oxidação do citocromo-c ( $Fe^{2+}$ ). As concentrações de complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> utilizadas foram 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , já para o complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> foram empregadas as concentrações de 300 e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

<sup>1</sup>. Controles positivos foram obtidos na ausência dos complexos para fins comparativos. As reações foram monitoradas por 60 minutos a 37 °C.

Os dados estão expressos como curvas cinéticas de reação entre o  $O_2^-$  e o citocromo-c ( $Fe^{3+}$ ). A concentração mínima do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> necessária para apresentar 50% da atividade sequestradora de  $O_2^-$  (IC<sub>50</sub>) foi calculada a partir da curva sigmoideal da Abs<sub>max</sub> obtida em cada curva, versus o log da concentração de complexo.

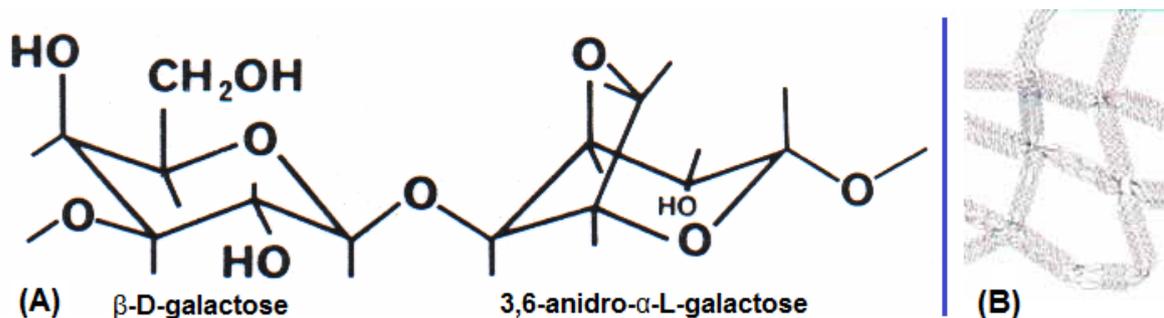
### 3.4.7. DNA Plasmidial e Eletroforese em Gel de Agarose

Para realização dos experimentos com DNA foi utilizado como modelo a molécula de DNA plasmidial pBR322, o mesmo apresenta 4.361 pares de bases, correspondente a massa molar de  $2,83 \times 10^6$  Dalton. O plasmídeo foi obtido comercialmente e posteriormente amplificado em bactéria *E. coli*, linhagem MC1061, e isolado utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep da QIAGEN seguindo protocolo padrão do fabricante.

A concentração e qualidade do DNA foram determinadas empregando-se espectroscopia na região do ultravioleta ( $1,0 (Abs_{260nm}) = 50 \text{ ng/mL}$ ) e corrida eletroforética em gel de agarose 1%. A verificação da presença de proteínas ou RNA na amostra foi feita por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta utilizando a razão  $A_{260}/A_{280}$ , como parâmetro, onde se obteve o valor de 1,85 indicando que a amostra apresentava-se livre de proteínas e RNA ( $1,8 < \text{razão} < 2,0$  indicam livre de proteínas e RNA).

O método padrão usado para separar, identificar, analisar, caracterizar e purificar fragmentos grandes de DNA é denominado eletroforese em gel de agarose.<sup>86</sup> A agarose é um polissacarídeo extraído de certas algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae*. Este polissacarídeo consiste na repetição do dissacarídeo formado entre os resíduos de  $\beta$ -D-galactose (ligado pelas posições 1,3) e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (ligado pelas posições 1,4), como representado na Figura 20A. Quando dissolvida em água fervente e depois resfriada, forma um gel com o aspecto representado na Figura 20B.<sup>86</sup>

Figura 20 - Estrutura da agarose. (A) Estrutura química da unidade de repetição da agarose; (B) Malha formada pelo gel polimerizado.



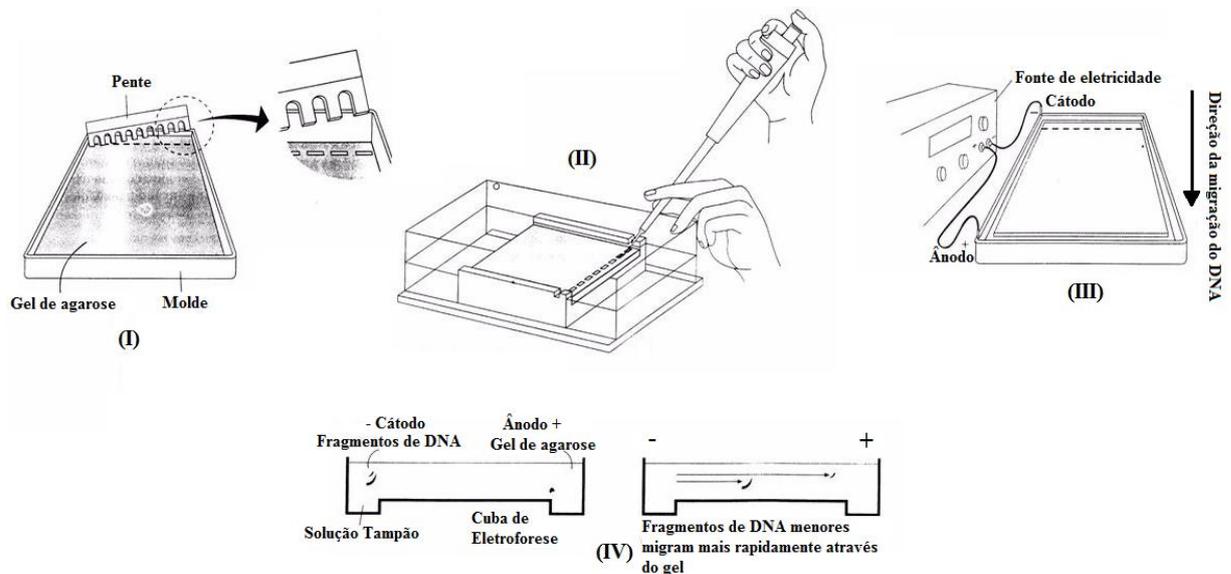
Fonte: Adaptado da referência 39.

As bandas no gel podem ser marcadas por corantes seletivos tais como brometo de etídio ou GelRed™ (Biotium) em baixa concentração. O DNA pode ser visualizado por exame do gel empregando luz ultravioleta, pois quando intercalados ao DNA esses corantes fluorescem. Neste trabalho foi utilizado GelRed™, ao invés do brometo de etídio por ser mais sensível a traços de DNA e bem menos tóxico. Para que a molécula de DNA seja analisada através desse método é necessário que ela seja submetida a um campo elétrico, onde migrará para o eletrodo na velocidade ou mobilidade eletroforética, proporcional a força do campo e a carga líquida da molécula.

Os géis de agarose foram preparados por meio da dissolução, sob aquecimento em forno de microondas, de 0,4 g de agarose, em tampão 50 mL de TAE 1X (Tris 89 mmol L<sup>-1</sup>, ácido acético 89 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmol L<sup>-1</sup> – pH 8,0), obtendo-se uma concentração final do gel de 0,8% (m/v).

A mistura ainda quente aproximadamente 50 °C, foi despejada no molde da cuba eletroforética (modelo Sub-Cell® GT, BioRad) e inserido o pente gerador dos poços, a cuba foi deixada em repouso para total solidificação por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente 25 °C. Em seguida foi retirado o pente gerador dos poços e adicionado o tampão TAE 1X na cuba Figura 21-I. O tampão utilizado na preparação do gel deverá ser o mesmo que será adicionado na cuba eletroforética.<sup>38</sup>

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose. A matriz é solidificada deixando-se formar poços (I) nos quais as amostras de DNA serão depositadas (II) e submetidas a um campo elétrico (III). Os fragmentos apresentam uma migração diferencial de acordo com o tamanho ou forma (IV).



Fonte: Adaptado da referência 39.

Os testes realizados, em diferentes condições, para verificar a eficiência de clivagem de DNA pelos complexos foram realizados através da incubação de diferentes concentrações do complexo, empregando-se cerca de 42 ng de DNA superenovelado (pBR322), num volume final de reação de 12  $\mu\text{L}$ , correspondendo a uma concentração de DNA de 3,5 ng/ $\mu\text{L}$  em cada poço, cerca de 5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pares de bases (pb).

As amostras foram preparadas conforme descrição da literatura,<sup>38</sup> sendo aplicadas cuidadosamente 12  $\mu\text{L}$  de cada amostra nos poços do gel (Figura 21-II). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose por aproximadamente 60 minutos, ou até que a frente de migração do *Gel Loading* atingisse o final do gel, sob tensão constante de 70V e corrente variável de 53-64 mA (Figura 21-III). Para esses experimentos foi utilizada a fonte de corrente contínua Apelex modelo PS 305.

As bandas de DNA (Figura 21-IV) foram visualizadas em gel de agarose 0,8% e analisadas após aproximadamente 1 hora e meia de incubação com GelRed™, empregando-se fotodocumentador Bio-Rad-GelDOC XR. O GelRed™ foi utilizado após a corrida pois a sua adição prévia causa o retardamento da corrida.<sup>87</sup> Foi utilizado marcador de fita linear, *Ladder*, marcador 1 Kb de DNA linear da Life Technologies, Invitrogen™. Este marcador

auxilia na determinação do tamanho dos pares de bases correspondentes ao tamanho da fita totalmente clivada, ou seja, FIII, para comparação com a possível clivagem do DNA pelos complexos metálicos utilizados. Seu emprego se torna importante para melhor identificação da formação da fita III, cujo tamanho deve ser de aproximadamente 4,4 kb (kilobases), discriminando inclusive outros tipos de interação com DNA e atividades exonucleases.

As frações de cada forma de DNA foram quantificadas por densitometria utilizando o Software Quantity One 4.6.9 Basic (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Em todos os ensaios empregou-se um ou mais controles negativos, essas amostras foram submetidas às mesmas condições das amostras sob análise, porém sem adição do complexo metálico.

#### **3.4.8. Testes de Clivagem de DNA**

Os testes realizados para verificar a eficiência de clivagem de DNA pelos complexos foram realizados através da incubação de diferentes concentrações do complexo variando de  $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$  até  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , empregando-se cerca de  $3,5 \text{ ng mL}^{-1}$  de DNA superenovelado (pBR322), num volume final de reação de  $12 \mu\text{L}$ .

Foram realizadas medidas de eletroforeses em gel de agarose com o objetivo de verificar os efeitos de interação do complexo com DNA sob diversas condições. Após o término da reação do complexo com DNA, foi adicionado  $4 \mu\text{L}$  de tampão de corrida *Loading Buffer 5X* concentrado (EDTA  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) e em seguida aplicada as amostras nos poços formados no gel. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose por aproximadamente 1 hora, sob tensão constante de 70V e corrente variável de 53-64 mA. O tampão de corrida contendo glicerol tem a função de aumentar a viscosidade da amostra, permitindo que a mesma permaneça no fundo do poço do gel, evitando sua mistura e difusão com o tampão da cuba quando a voltagem for aplicada ao sistema. Este tampão possui o corante azul de bromofenol que possibilita a visualização do andamento da corrida, permitindo garantir que o DNA está migrando no gel.

Os dados de clivagem foram expressos como percentuais das formas I, II e III versos a concentração de complexo utilizado. As concentrações necessárias para clivar 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) da forma I para forma II e III foram calculadas a partir das curvas exponenciais de percentual de clivagem vs concentração de complexo.

### 3.4.9. Testes de clivagem de DNA – Efeito da Luz

Os testes realizados para verificar a eficiência de clivagem de DNA pelos complexos com estímulo da luz, foram realizados através da incubação de diferentes concentrações, 100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

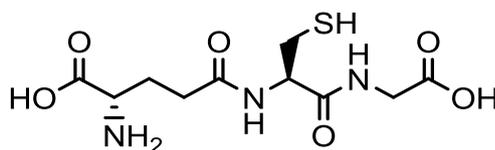
Foram realizadas eletroforeses comparando ausência e presença de irradiação por 1 hora, e os efeitos provocados devido à variação de concentração. Nos ensaios de irradiação foram utilizadas duas fontes luminescentes não monocromáticas, uma na região de 350 nm (RPR 350 nm, Ravonet Southern New England Ultraviolet Co, USA) com potência 14 W, e uma na região de 460 nm (Led azul Basetech) com potência de 1,7 W.

O sistema utilizado para a irradiação foi um Reator Fotoquímico UNT 001 da UNITEC-LAB. Antes de inserir as amostras no reator, as lâmpadas foram ligadas 30 minutos antes para que tivéssemos a estabilização do sistema. As análises das corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C.

### 3.4.10. Efeito da Adição de Glutathiona

Com o objetivo de verificar se os complexos apresentariam clivagem de DNA na presença de glutathiona (GSH) (Figura 22), foram incubados os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> nas concentrações de 30, 20, 10, 5, 2,5 e 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , juntamente com DNA e GSH (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) por 90 minutos. A concentração de GSH usada foi baseado em valores da literatura para os níveis encontrados em meio celular.<sup>32</sup>

Figura 22 - Estrutura da Glutathiona (GSH) na forma reduzida.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.4.11. Adição de Peróxido de Hidrogênio

Com o objetivo de verificar se os complexos apresentariam clivagem de DNA na presença de peróxido de hidrogênio, através da geração de radicais livres, foram incubados os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1, 0,5 e 0,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , juntamente com DNA e peróxido de hidrogênio (1  $\text{mmol L}^{-1}$

<sup>1)</sup> por 1 hora. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usada foi, baseada em valores empregados na literatura.<sup>33</sup>

#### **3.4.12. Inibidores de Radicais Livres**

Para tentar compreender o possível mecanismo de clivagem de DNA, foram realizados ensaios de clivagem, adicionando uma série de inibidores de radicais, conforme descritos na literatura.<sup>88</sup> Os ensaios foram realizados empregando os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>, na concentração de 30 μmol L<sup>-1</sup>, e inibidores de radicais livres (*scavenger*) em cada amostra:

- Histidina (20 mmol L<sup>-1</sup> empregado): Supressor de oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>);
- Manitol (20 mmol L<sup>-1</sup> empregado): Supressor de radicais hidroxila (\*OH);
- Superóxido Dismutase (SOD) (4U/mL empregado): Supressor de radicais ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>);
- TEMPO (N-oxil-2,2,6,6- tetrametilpiperidina) (18,7 mmol L<sup>-1</sup> empregado): Supressor de espécies reativas de oxigênio, radicais carbono e metalo-centrados;
- cPTIO (2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3-óxido) (1,1 mmol L<sup>-1</sup> empregado): Supressor de NO e HNO.

#### **3.4.13. Efeito da Força Iônica**

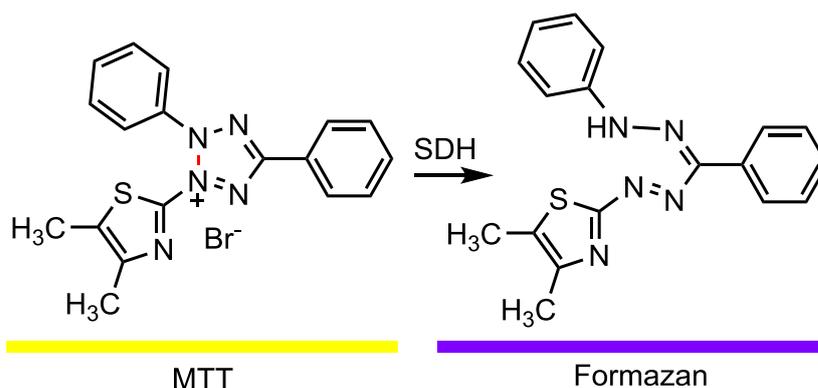
O efeito da força iônica na clivagem de DNA plasmidial pelo complexo foi investigado por meio da adição de concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl) (0, 25, 75, 150 e 250 mmol L<sup>-1</sup>). Com esse ensaio foi possível verificar a influência das interações eletrostáticas na interação/clivagem de DNA pelos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>.

#### **3.4.14. Viabilidade Celular (Atividade Citotóxica)**

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados por meio de colaboração com o Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). A citotoxicidade dos compostos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> foi avaliada frente as linhagens de células cancerígenas B16-F10 (melanoma de camundongo) e HUH-7 (hepatocarcinoma humano), para isso foi usado o ensaio colorimétrico de MTT (3-

(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-brometo de difenil-2H-tetrazólio). A viabilidade celular é quantificada pela redução do MTT (cor amarela e solúvel em água) a formazan (cor violeta e insolúvel em água) pela atividade da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase (SDH) (Figura 23).<sup>89,90</sup> Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

Figura 23 - Conversão do MTT a formazan pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase (SDH).



Fonte: Elaborado pelo autor.

As linhagens celulares foram multiplicadas em garrafas de cultura com área de 75 cm<sup>2</sup> até confluência de 70%, sendo coletadas utilizando tripsina e semeadas com meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> em volume.

Para os experimentos de MTT foram transferidos 100 µL de solução contendo as células para placas de 96 poços (densidade de 5 x 10<sup>3</sup> células/poço). As placas foram mantidas em pré-incubação por um período de 12 horas e após este período o meio contendo células não aderentes foi substituído por 100 µL/poço de meio DMEM isento de soro.

As amostras testes foram diluídas no meio suplementado, de modo a obter as concentrações de interesse. Aliquotas de 100 µL destas soluções foram adicionadas a cada poço, sendo cada concentração avaliada em triplicata. A pelo menos três poços por placa foram adicionados 100 µL de meio suplementado e mantidos sem adição de amostra teste, os quais foram utilizados para efeito de controle. Após 24 horas de incubação, a solução contendo células não viáveis foi removida, sendo substituída por 100 µL/poço de MTT dissolvido em DMEM isento de soro.

Após a exposição contínua durante 4 horas, o meio contendo o MTT que não reagiu foi eliminado, e os cristais de formazan obtidos foram dissolvidos em álcool etílico 95% (100 µL/poço). Os valores de absorbância foram obtidos em um leitor de microplacas, utilizando o comprimento de onda de 570 nm (referente ao MTT). A quantidade de células viáveis foi expressa como porcentagem em relação aos controles não tratados, e as concentrações necessárias para inibir 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) das linhagens em estudo foram calculadas a partir de curvas sigmoidais dose-resposta.

#### **3.4.15. Atividade Bactericida**

A bactéria utilizada nos ensaios foi a *Escherichia coli* (*E. coli*) linhagem MC1061. O crescimento bacteriano foi feito em agitador estilo shaker orbital a 230 rpm e a 37 °C. Para o crescimento foram preparados um pré-inóculo e um inóculo. O pré-inóculo foi feito mergulhando-se uma alça de platina estéril nas células após serem descongeladas, e em seguida mergulhou-se essa alça em 5 mL de meio de cultura bacteriano líquido, a mistura foi deixada crescer por 16 horas (overnight) a 37 °C sob agitação de 230 rpm.

Após o período de incubação/overnight 250 µL do pré-inóculo foram usados para inocular 25mL de meio de cultura fresco. Foram feitos três inóculos, um contendo apenas o meio de cultura fresco, essa mistura foi utilizada como controle do crescimento bacteriano, o segundo foi feito em um meio contendo 200 µmol L<sup>-1</sup> do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e o último inóculo foi realizado em um meio contendo o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> também na concentração de 200 µmol L<sup>-1</sup>. As misturas ficaram nas mesmas condições de incubação do pré-inóculo durante o experimento.

A densidade ótica verificada a 600nm (OD<sub>600nm</sub>) foi monitorada em intervalos de uma hora. Para isso utilizou-se um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode-Array, antes foi feito um branco com meio de cultura estéril. Quando os inóculos estavam prestes a atingir 0,7 de absorbância (Abs), as alíquotas removidas para análise eram diluídas e registradas absorbância. No final do experimento os valores de absorbância obtidos foram multiplicados pelos seus respectivos fatores de diluição. Por fim os dados foram expressos como curvas de crescimento bacteriano utilizando os valores de Abs<sub>600nm</sub> por tempo de medida. As curvas apresentaram um perfil sigmoidal característico.<sup>91</sup>

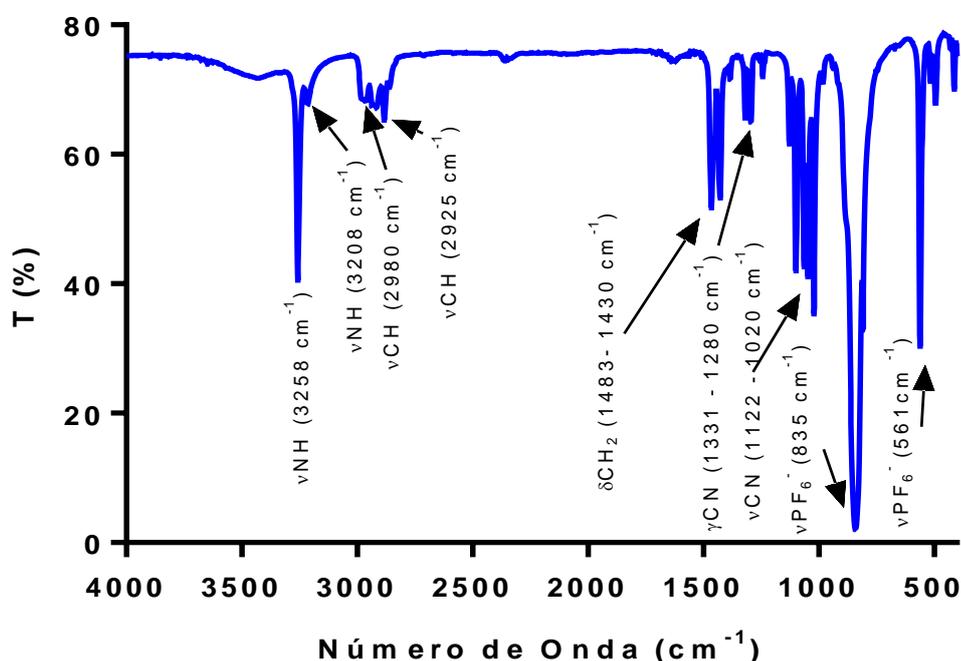
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)

#### 4.1.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A utilização da espectroscopia vibracional na região do infravermelho pode ser empregada com a finalidade de diferenciar os isômeros *cis* e *trans* do complexo formado pelo [Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>].<sup>66,92</sup> O espectro vibracional na região do infravermelho do complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) é mostrado na Figura 24, o mesmo apresenta bandas características do ligante cyclam, como por exemplo, as bandas de estiramento simétrico  $\nu(\text{NH})$  observadas na região de 3255 - 3208  $\text{cm}^{-1}$ , as bandas na região de 2980 - 2925  $\text{cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento simétrico  $\nu(\text{CH})$ , as bandas na região de 1483 - 1430  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a deformação angular simétrica no plano da porções  $\delta(\text{CH}_2)$ , as bandas em 1331 - 1280  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a deformação angular fora do plano  $\gamma(\text{CH}_2)$  e as bandas em 1122 - 1020  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento simétrico  $\nu(\text{CN})$ .<sup>66</sup> O espectro vibracional também apresentou bandas em 835 e 561  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos simétricos do contra-íon PF<sub>6</sub><sup>-</sup>. As principais frequências de absorção e tentativas de atribuição estão listadas na Tabela 2.

Figura 24 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) obtido em pastilha de KBr.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Frequências de absorção no infravermelho e tentativas de atribuição para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>).

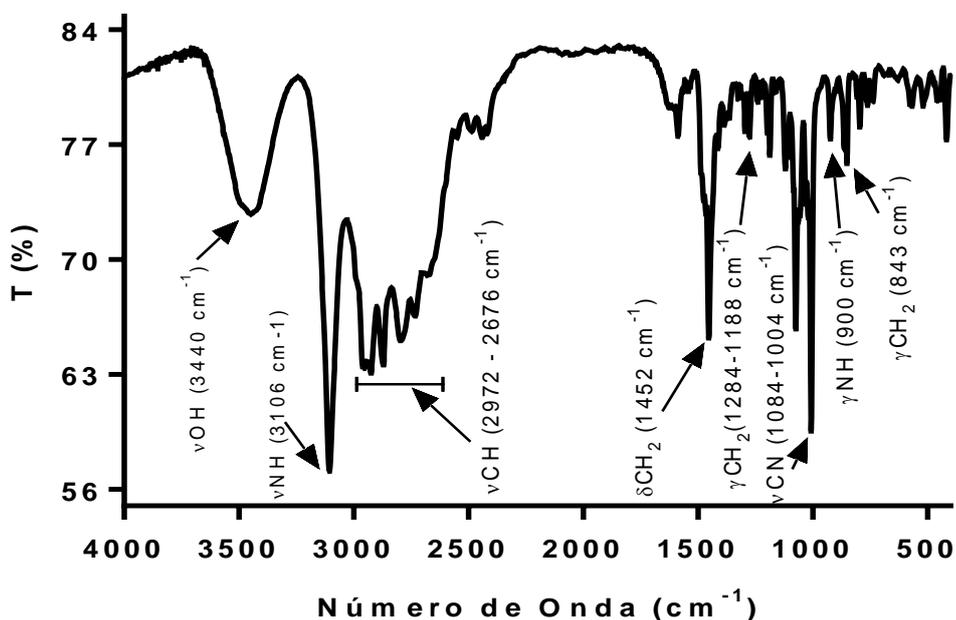
| Número de Onda (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuições                      |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 3255 - 3208                        | v(NH)                            |
| 2980 - 2925                        | v(CH)                            |
| 1483 - 1430                        | δ(CH <sub>2</sub> )              |
| 1331 - 1280                        | γ(CH <sub>2</sub> )              |
| 1122 - 1020                        | v(CN)                            |
| 835 e 561                          | v(PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ) |

(v = estiramento simétrico; δ = deformação angular simétrica no plano; γ = deformação angular fora do plano).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Complexos com isomeria *cis* apresentam normalmente 5 bandas na região entre 790 e 900 cm<sup>-1</sup>, sendo três bandas referentes a deformações γ(NH) e duas bandas atribuídas a deformação γ(CH<sub>2</sub>). Já complexos com simetria *trans* apresentam apenas três bandas nesta região, duas referentes as deformações γ(NH) e uma referente a γ(CH<sub>2</sub>).<sup>93</sup> Porém na Figura 24 nota-se um pico intenso nessa região (835 cm<sup>-1</sup>) atribuído a v(PF<sub>6</sub><sup>-</sup>), sobrepondo outros possíveis estiramentos, dificultando as atribuições nessa região. O espectro do complexo *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl, mostrado na Figura 25, apresenta bandas características do ligante macrocíclico.

Figura 25 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl obtido em pastilha de KBr.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As frequências e as tentativas de atribuição das principais bandas observadas no espectro de infravermelho do complexo *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequências de absorção no infravermelho e tentativas de atribuição para o complexo *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl.

| Número de Onda (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuições         |
|------------------------------------|---------------------|
| 3440                               | v(OH)               |
| 3106                               | v(NH)               |
| 2972 - 2676                        | v(CH)               |
| 1452                               | δ(CH <sub>2</sub> ) |
| 1284-1188                          | γ(CH <sub>2</sub> ) |
| 1084-1004                          | v(CN)               |
| 900                                | γ(NH)               |
| 843                                | γ(CH <sub>2</sub> ) |

(v = estiramento simétrico; δ = deformação angular simétrica no plano; γ = deformação angular fora do plano).

Fonte: Elaborado pelo autor.

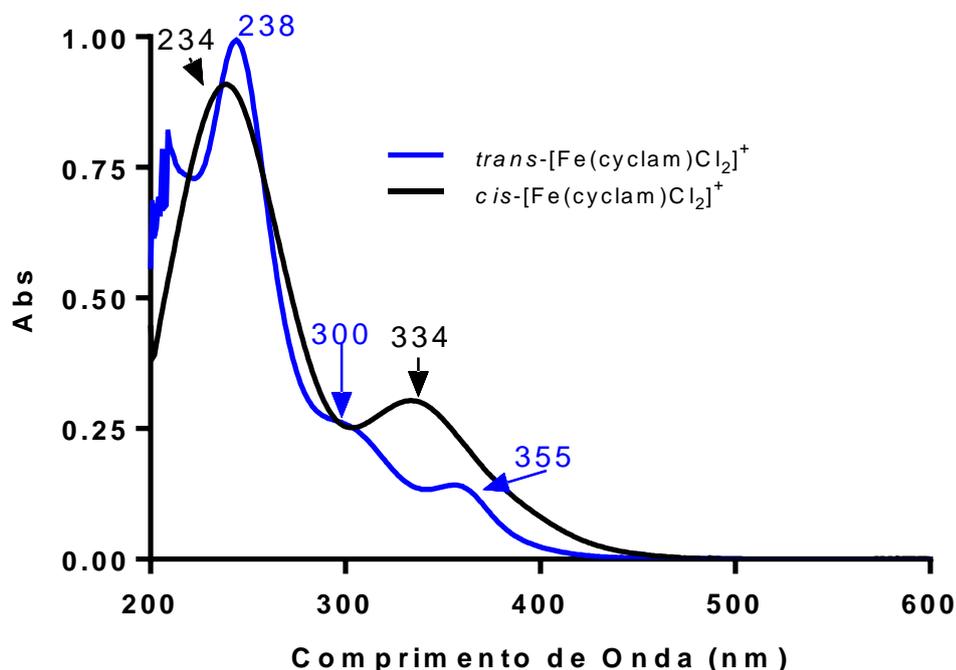
Quando comparamos o espectro do *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>) (Figura 24) com o do precursor *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]Cl (Figura 25), observamos um decréscimo no número de bandas, consistente com a simetria do complexo *trans*- em relação ao *cis*-. Isso se dá devido a mudança de uma geometria de baixa simetria C<sub>2v</sub> (*cis*) para uma de mais alta simetria C<sub>2h</sub> (*trans*).<sup>72,94</sup>

#### 4.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região do UV-Vis (em meio aquoso HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) dos complexos *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (—) e *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (—) são mostrados na Figura 26. O íon complexo *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> apresentou duas bandas de absorção, uma em 234 nm (ε = 5,5 x10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e a outra em 334 nm (ε = 1,8 x10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), ambas atribuídas a transferência de carga dos orbitais preenchidos com características pπ do cloreto para orbitais com características 3dπ do ferro, caracterizando assim uma transferência de carga ligante metal (LMCT). O complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> apresentou três bandas, sendo as bandas observadas em 238 nm (ε = 7,5 x10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e 300 nm (ε = 2,3 x10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) atribuídas a transferência de carga dos orbitais pπ do Cl<sup>-</sup> para orbitais 3dπ do

ferro, caracterizando assim uma transferência de carga LMCT. Adicionalmente a banda em 355 nm ( $\epsilon = 1,0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) é atribuída a uma transição do tipo “d-d”.<sup>72, 94</sup>

Figura 26 - Espectros de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) para os complexos *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ( $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ( $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

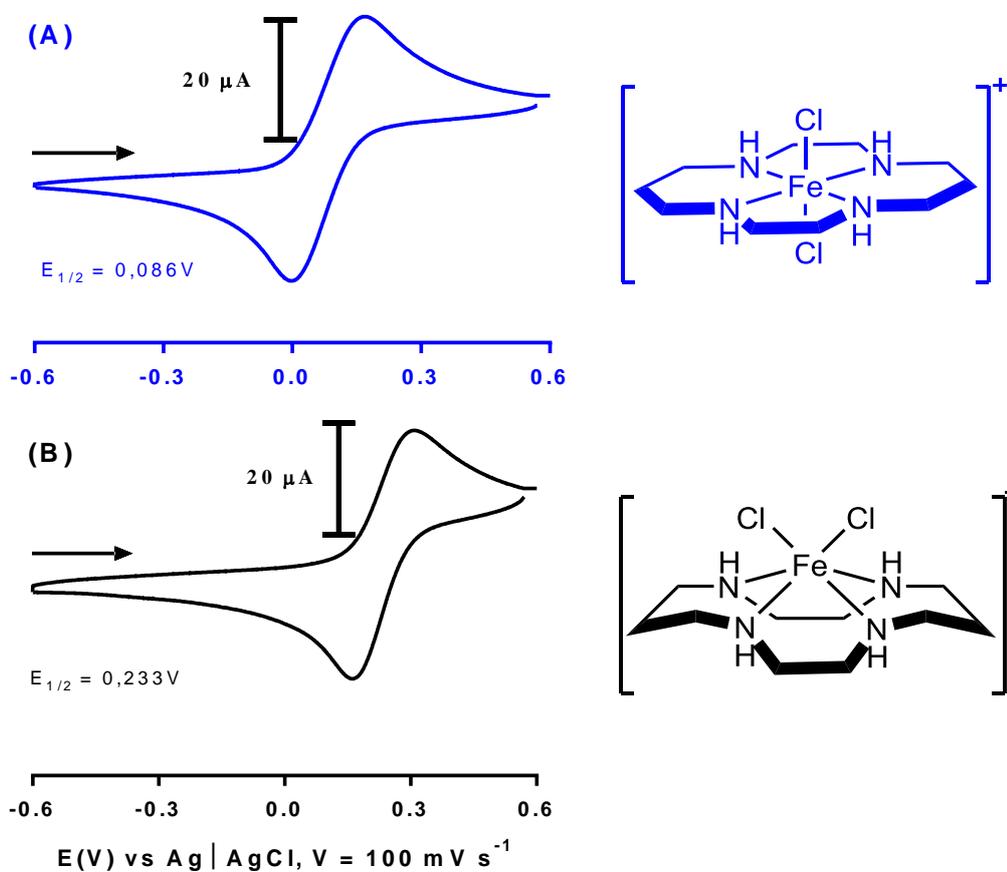


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.1.3. Eletroquímica

Os voltamogramas cíclicos dos complexos *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> estão ilustrados na Figura 27, os mesmos foram obtidos em solução aquosa de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido trifluoracético (CF<sub>3</sub>COOH/CF<sub>3</sub>COONa), pH = 3,2, aplicando-se potencial usando eletrodo de carbono vítreo como trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e Ag|AgCl como referência. A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV s<sup>-1</sup>. Os perfis voltamétricos de ambos os complexos relataram claras diferenças com relação ao potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ), sendo observado um processo de um elétron correspondente ao par Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> com  $E_{1/2} = 0,233$  e 0,086 V (versus Ag|AgCl) para o isômero *cis* e *trans*, respectivamente, assim como reportado na literatura.<sup>72</sup>

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos dos complexos (A) *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e (B) *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> obtidos em solução aquosa de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de CF<sub>3</sub>COOH/CF<sub>3</sub>COONa, pH = 3,2. Temperatura Ambiente 25 °C. Potencial aplicado usando eletrodo de carbono vítreo como trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e Ag|AgCl como referência.  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

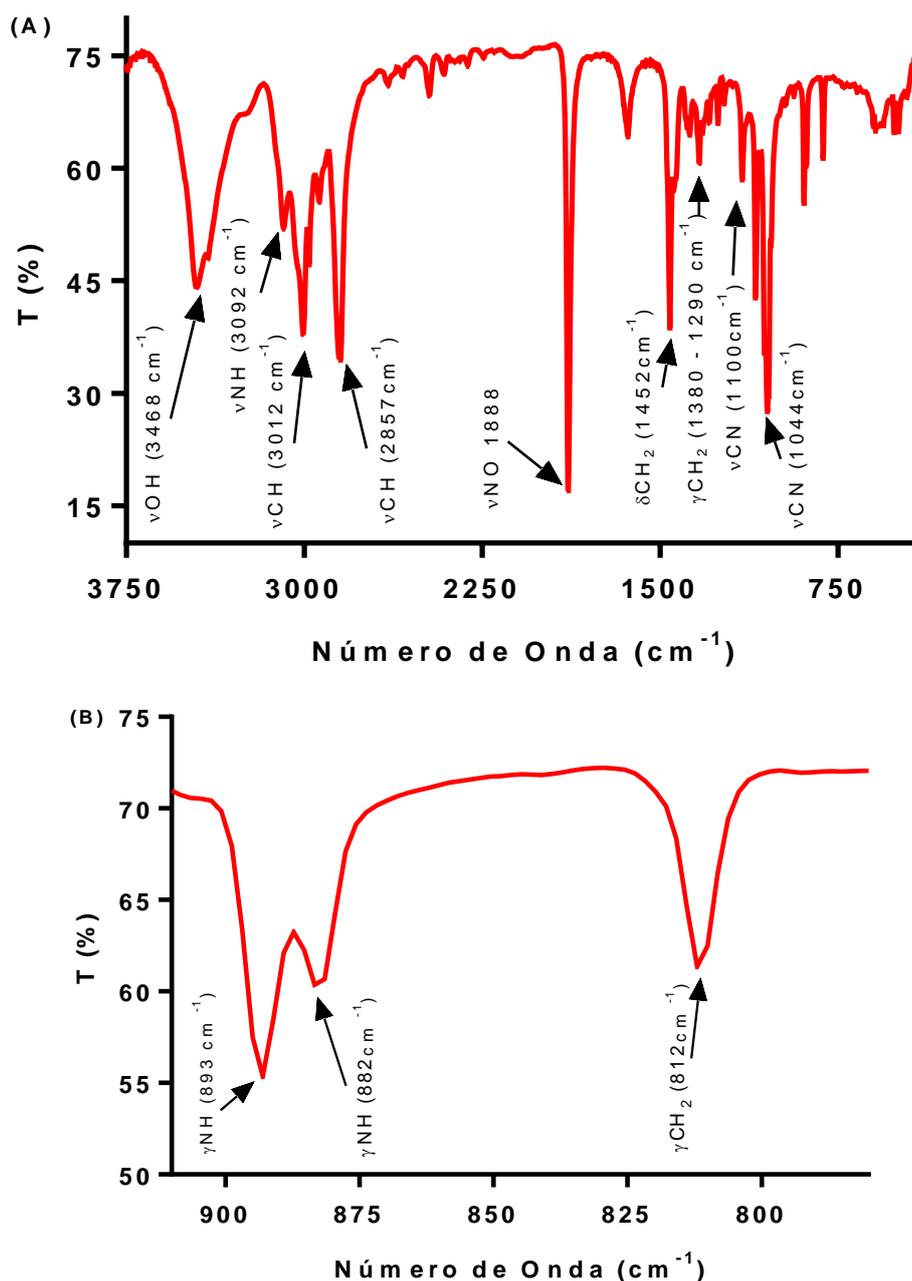
Ambos os voltamogramas cíclicos mostram um único par de processos. Os valores distintos observados para os potenciais redox dos isômeros *cis*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> são esperados já que apresentam diferente simetria ( $C_{2v}$  e  $C_{2h}$ , respectivamente), o que causa a variação na energia dos orbitais HOMO dos complexos.<sup>72,66</sup>

## 4.2. Caracterização do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

### 4.2.1. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

O espectro vibracional na região do infravermelho do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> é apresentado na Figura 28A.

Figura 28 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> obtido em pastilha de KBr. (A) - Região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. (B) - Região de 910 a 750 cm<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor

O espectro apresentou bandas características do ligante cyclam na região de 3092  $\text{cm}^{-1}$  atribuída aos estiramentos simétricos  $\nu(\text{NH})$ , na região de 3012 - 2857  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos simétricos  $\nu(\text{CH})$ , a banda em 1452  $\text{cm}^{-1}$  referente a deformação angular simétrica das porções  $\delta(\text{CH}_2)$ , as bandas na região de 1380 - 1290  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas as deformações angulares fora do plano  $\gamma(\text{CH}_2)$  e as bandas na região de 1100 - 1044  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos simétricos  $\nu(\text{CN})$ . O espectro vibracional apresentou uma banda em 3468  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento simétrico  $\nu(\text{OH})$  pertencente a moléculas de água de hidratação. O composto também, apresentou uma banda bem intensa em 1888  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento simétrico  $\nu(\text{NO})$ , que corresponde a um grupo linear Fe-NO indicando que o óxido nítrico se encontra coordenado ao centro metálico na forma de  $\text{NO}^+$ , tal valor é compatível tanto com dados da literatura para o presente composto,<sup>67</sup> quanto para complexos similares, por exemplo, o *trans*-[Ru(cyclam)( $\text{NO}^+$ )Cl]<sup>2+</sup>  $\nu(\text{NO}) = 1875 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>95</sup> As principais frequências de absorção e tentativas de atribuição estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequências de absorção no infravermelho e tentativas de atribuição para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>.

| Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Atribuições           |
|-------------------------------------|-----------------------|
| 3468                                | $\nu(\text{OH})$      |
| 3092                                | $\nu(\text{NH})$      |
| 3012 - 2857                         | $\nu(\text{CH})$      |
| 1888                                | $\nu(\text{NO})$      |
| 1452                                | $\delta(\text{CH}_2)$ |
| 1380 - 1290                         | $\gamma(\text{CH}_2)$ |
| 1100 - 1044                         | $\nu(\text{CN})$      |
| 893 e 885                           | $\gamma(\text{NH})$   |
| 812                                 | $\gamma(\text{CH}_2)$ |

( $\nu$  = estiramento simétrico;  $\delta$  = deformação angular simétrica no plano;  $\gamma$  = deformação angular fora do plano).

Fonte: Elaborado pelo autor.

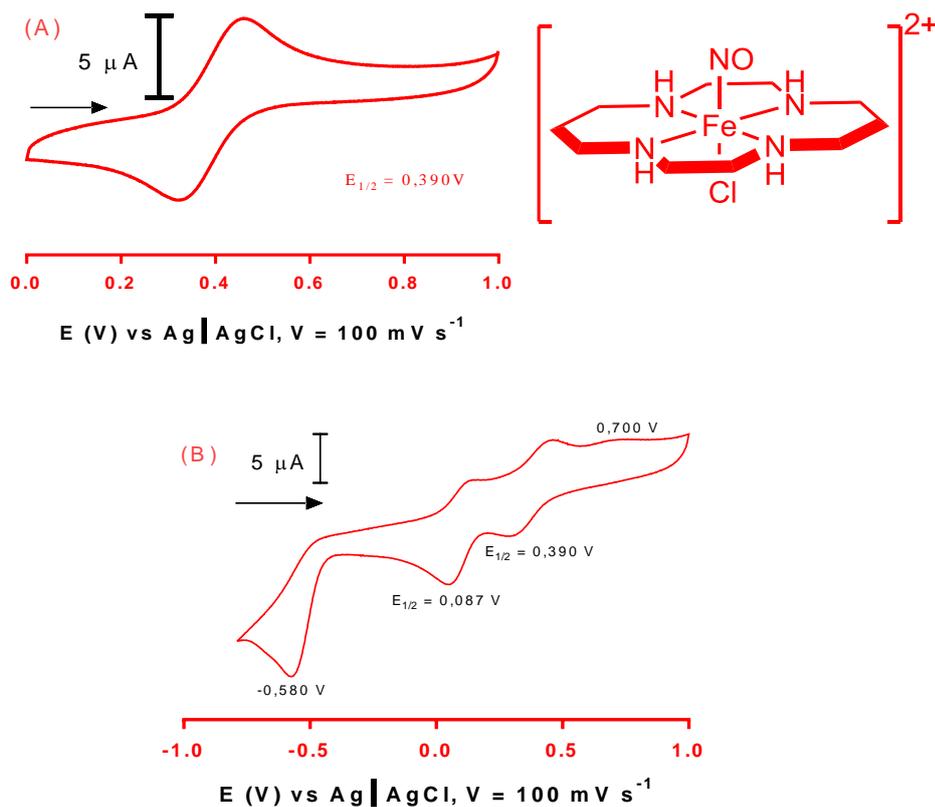
Assim como citado anteriormente, a literatura reporta que complexos hexacoordenados com ligante cyclam no plano equatorial, podem apresentar os outros dois ligantes em posição *cis* ou *trans* e a identificação da configuração geométrica pode ser feita pela análise do espectro vibracional na região do infravermelho da espécie, verificando as bandas na região do espectro entre 790-900  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>66,92</sup> O nitrosilo complexo apresentou 3 bandas nessa faixa do espectro, 893, 882 e 812  $\text{cm}^{-1}$ , as duas primeiras atribuídas as deformações angulares fora do plano da ligação NH, e a última referente as deformações

angulares fora do plano da porção CH<sub>2</sub> (Figura 28B). Assim, sugerindo que o complexo apresenta os ligantes NO e Cl em posição *trans*.

#### 4.2.2. Eletroquímica

O voltamograma cíclico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> está apresentado na Figura 29, o mesmo foi obtido em solução aquosa de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de CF<sub>3</sub>COOH/CF<sub>3</sub>COONa, pH = 3,2, aplicando-se potencial usando eletrodo de carbono vítreo como trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e Ag|AgCl como referência. Observa-se a existência de um único par de processos reversível, com valor de potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) igual a 0,390 V (versus Ag|AgCl), referente ao par redox Fe<sup>II</sup>-NO<sup>+</sup>/ Fe<sup>II</sup>-NO<sup>0</sup>.

Figura 29 - Voltamograma cíclico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> varrido de 0 a 1,0 V (A) e de -1,0 a 1,0 V (versus Ag|AgCl) (B) obtido em solução aquosa de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de CF<sub>3</sub>COOH/CF<sub>3</sub>COONa, pH = 3,2, temperatura ambiente de 25 °C. Potencial aplicado usando eletrodo de carbono vítreo como trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e Ag|AgCl como referência.  $V = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

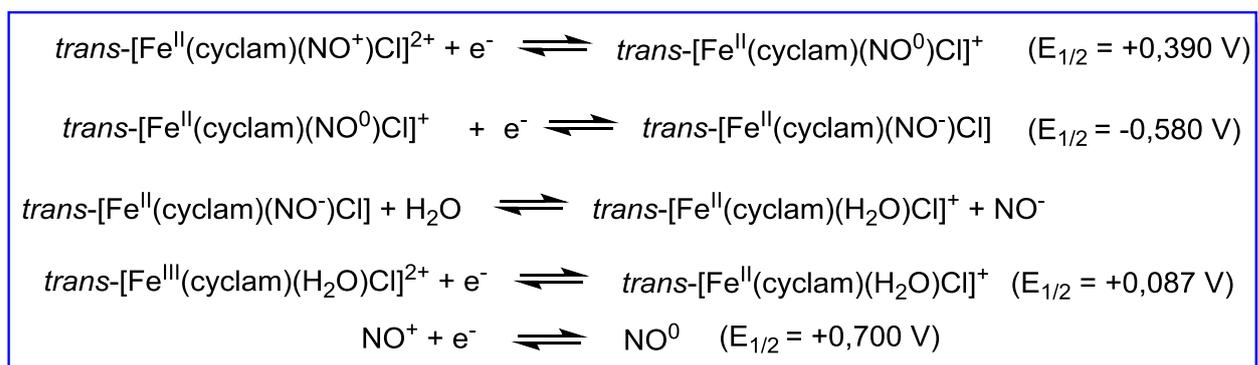


Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao expandir a janela de potencial no intervalo de -1,0 a 1,0 V (Figura 29B), é possível observar, além do par de processos  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^+/\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^0$ , um outro par de processos com  $E_{1/2} = 0,087$  V (versus  $\text{Ag|AgCl}$ ), um processo de oxidação em 0,700 V (versus  $\text{Ag|AgCl}$ ) e um processo de redução em -0,580 V (versus  $\text{Ag|AgCl}$ ). O processo com  $E_{1/2} = 0,087$  V é atribuído ao par  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  do aquocomplexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  que é gerado após a saída do ligante óxido nítrico da esfera de coordenação do íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO}^+)\text{Cl}]$ . A espécie  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO}^0)\text{Cl}]^+$ , formada por meio da primeira redução, sofre um segundo processo de redução  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^0/\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^-$ , correspondente ao potencial de -0,580 V, tal reação levaria à liberação de niroxila  $\text{NO}^-$ , como citado anteriormente. O processo de oxidação em 0,700 V pode ser atribuído a oxidação do óxido nítrico livre em solução ( $\text{NO}^{0/+}$ ).<sup>67</sup> Tal hipótese pode ser confirmada ao verificarmos o voltamograma do complexo quando a varredura aplicada foi de 0 a 1 V (Figura 29A), impossibilitando a redução da espécie  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^0/\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^-$ , e por consequência a saída do ligante NO da esfera de coordenação, outro fator a se observar é a não existência do par de processos referentes ao aquocomplexo, espécie formada após a liberação do NO.

O esquema reacional ilustrado na Figura 30 elucida os diversos processos, eletroquímicos e químicos envolvidos com o nitrosilo complexo em questão, quando submetido a varredura de -1,0 a 1,0 V. Tais resultados estão de acordo com os dados da literatura.<sup>67</sup> Dessa forma, os dados de eletroquímica corroboram com os demais resultados apresentados anteriormente, evidenciando que o complexo em questão foi sintetizado com êxito.

Figura 30 - Esquema reacional dos processos eletroquímicos e químico envolvidos, quando uma solução aquosa 0,1 mol L<sup>-1</sup> de  $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CF}_3\text{COONa}$ , pH = 3,2, contendo o íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , é submetida a varredura de -1,0 a 1,0 V versus  $\text{Ag|AgCl}$ . Temperatura ambiente de 25 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

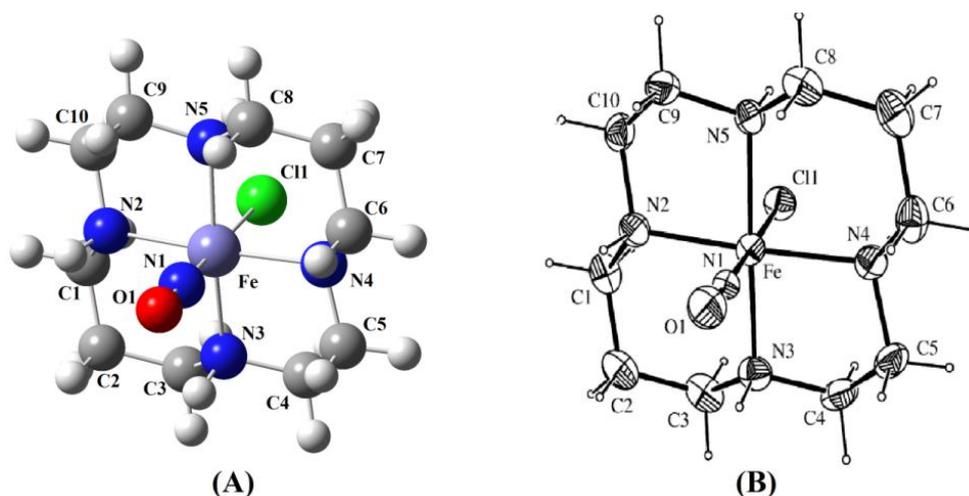
### 4.2.3. Cálculos Computacionais em Química Teórica

Cálculos computacionais tem sido utilizados com bastante frequência em química inorgânica e bioinorgânica com o objetivo de auxiliar no entendimento da estrutura e das propriedades eletrônicas de complexos metálicos, servindo assim de ferramenta complementar na caracterização de tais sistemas.<sup>96,97</sup> Estudos de teoria do funcional de densidade (DFT) foram realizados com o objetivo de comparar e complementar os resultados experimentais já descritos na literatura para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>.<sup>67</sup> Inicialmente, a estrutura do complexo foi otimizada, sendo possível obter os parâmetros geométricos da estrutura (distâncias (Å) e ângulos de ligação (°)) e os contornos de probabilidade que satisfizessem a situação em que a transição eletrônica ocorra entre o conjunto de orbitais envolvidos, em seguida, por meio de cálculos empregando a teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT) foram obtidos cálculos otimizados das transições eletrônicas, estados de energias bem como o espectro de absorção teórico.

#### 4.2.3.1. Otimização de estrutura

A estrutura otimizada e a geometria proposta experimentalmente por cristalografia<sup>67</sup> para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> são mostrados na Figura 31. Os parâmetros geométricos otimizados por DFT estão reunidos na Tabela 5, para comparação, bem como as distâncias e ângulos de ligação experimentais.

Figura 31 - Estrutura otimizada por DFT (A) e representação ORTEP<sup>67</sup> (B) do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO<sup>+</sup>)Cl]<sup>2+</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) do composto *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>: experimentais e otimizados.

|                             | Experimental | Otimizado |                 | Experimental | Otimizado |
|-----------------------------|--------------|-----------|-----------------|--------------|-----------|
| <i>Distância de Ligação</i> |              |           |                 |              |           |
| Fe–N(1)                     | 1.682(3)     | 1.648     | N(4)–C(6)       | 1.485(5)     | 1.491     |
| Fe–N(2)                     | 2.012(3)     | 2.057     | N(4)–C(5)       | 1.491(5)     | 1.492     |
| Fe–N(3)                     | 2.009(3)     | 2.058     | N(5)–C(9)       | 1.476(5)     | 1.492     |
| Fe–N(4)                     | 1.999(3)     | 2.029     | N(5)–C(8)       | 1.484(5)     | 1.491     |
| Fe–N(5)                     | 2.006(3)     | 2.029     | C(1)–C(2)       | 1.516(6)     | 1.527     |
| Fe–Cl(1)                    | 2.248(1)     | 2.305     | C(2)–C(3)       | 1.522(6)     | 1.527     |
| O(1)–N(1)                   | 1.091(4)     | 1.135     | C(4)–C(5)       | 1.493(6)     | 1.519     |
| N(2)–C(1)                   | 1.482(5)     | 1.495     | C(6)–C(7)       | 1.519(6)     | 1.528     |
| N(2)–C(10)                  | 1.487(5)     | 1.495     | C(7)–C(8)       | 1.510(6)     | 1.528     |
| N(3)–C(3)                   | 1.484(5)     | 1.495     | C(9)–C(10)      | 1.498(5)     | 1.519     |
| N(3)–C(4)                   | 1.487(5)     | 1.495     |                 |              |           |
| <i>Ângulo de Ligação</i>    |              |           |                 |              |           |
| N(1)–Fe–Cl(1)               | 178.63(11)   | 178.44    | N(1)–Fe–N(3)    | 93.43(14)    | 92.44     |
| N(1)–Fe–N(2)                | 91.53(13)    | 92.45     | N(1)–Fe–N(4)    | 93.51(13)    | 93.31     |
| N(1)–Fe–N(5)                | 91.40(14)    | 93.42     | C(3)–N(3)–C(4)  | 112.7(3)     | 112.7     |
| N(2)–Fe–Cl(1)               | 88.44(9)     | 88.62     | C(5)–N(4)–Fe    | 107.8(2)     | 107.8     |
| N(3)–Fe–Cl(1)               | 87.94(10)    | 88.60     | C(6)–N(4)–Fe    | 117.4(2)     | 117.8     |
| N(3)–Fe–N(2)                | 95.36(13)    | 95.08     | C(6)–N(4)–C(5)  | 112.5(3)     | 113.6     |
| N(4)–Fe–Cl(1)               | 86.50(10)    | 85.61     | C(8)–N(5)–Fe    | 117.2(2)     | 117.9     |
| N(4)–Fe–N(2)                | 174.80(12)   | 174.19    | C(9)–N(5)–Fe    | 107.9(2)     | 107.7     |
| N(4)–Fe–N(3)                | 85.61(13)    | 85.45     | C(9)–N(5)–C(8)  | 112.9(3)     | 113.5     |
| N(4)–Fe–N(5)                | 93.41(13)    | 93.38     | N(2)–C(1)–C(2)  | 112.0(3)     | 112.4     |
| N(5)–Fe–N(3)                | 175.13(13)   | 174.08    | C(1)–C(2)–C(3)  | 113.8(3)     | 114.5     |
| N(5)–Fe–N(2)                | 85.20(12)    | 85.50     | N(3)–C(3)–C(2)  | 112.8(3)     | 112.7     |
| N(5)–Fe–Cl(1)               | 87.24(9)     | 85.52     | N(3)–C(4)–C(5)  | 108.0(3)     | 108.6     |
| O(1)–N(1)–Fe                | 177.4(3)     | 179.3     | N(4)–C(5)–C(4)  | 108.0(3)     | 108.2     |
| C(1)–N(2)–Fe                | 118.9(3)     | 117.6     | N(4)–C(6)–C(7)  | 111.3(3)     | 112.4     |
| C(10)–N(2)–Fe               | 107.6(2)     | 107.2     | C(8)–C(7)–C(6)  | 115.0(3)     | 115.4     |
| C(1)–N(2)–C(10)             | 112.5(3)     | 112.6     | N(5)–C(8)–C(7)  | 112.6(3)     | 112.6     |
| C(3)–N(3)–Fe                | 119.0(3)     | 117.7     | N(5)–C(9)–C(10) | 107.7(3)     | 108.2     |
| C(4)–N(3)–Fe                | 107.7(2)     | 107.1     | N(2)–C(10)–C(9) | 107.7(3)     | 108.8     |

Fonte: Elaborado pelo autor.

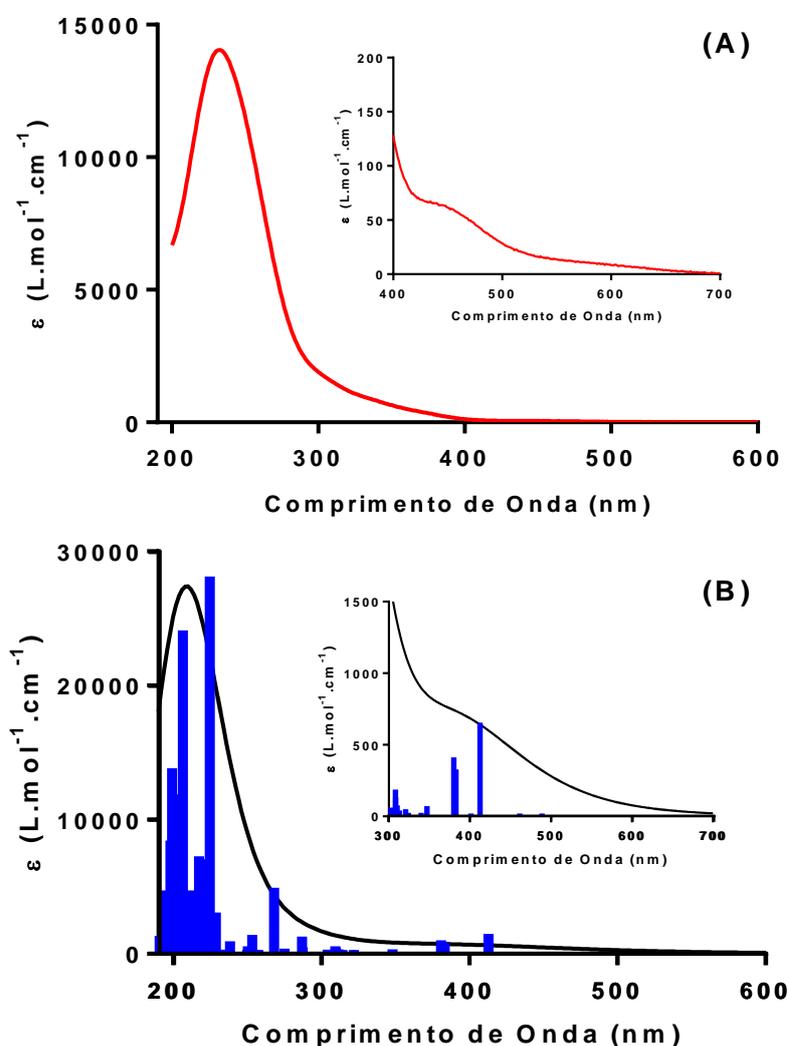
Verificou-se que a geometria otimizada apresentou uma grande similaridade com a geometria experimental. Os dados de distância e ângulos de ligação observados experimentalmente foram reproduzidos de forma eficiente pelo cálculo, indicando que a estrutura calculada possui uma excelente concordância com a estrutural experimental. O ângulo Fe–N–O (179,3°) teórico está dentro do intervalo 170° - 180° consistente com o experimental em 177,4°,<sup>98</sup> indicando que o ligante nitrosil encontra-se coordenado na forma

de  $\text{NO}^+$ . Os ângulos formados pela coordenação do ligante cyclam ao centro metálico apresentam leves torções, indicando que a conformação estrutural do complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{Cl})(\text{NO}^+)]^{2+}$  sofre influência de interações intramoleculares entre os hidrogênios N-H do ligante cyclam e os ligantes na posição *trans* (NO e Cl).

#### 4.2.3.2. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

Por meio dos resultados teóricos foi possível analisar e comparar quais orbitais estão envolvidos nas transições eletrônicas, e quais são as suas respectivas composições. Os espectros eletrônicos (experimental e teórico) obtidos em água são mostrados na Figura 32.

Figura 32 - Espectro de absorção na região do UV-Vis experimental (A) e teórico (B) para o íon complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  em água.



O espectro teórico (B) apresentou um deslocamento hipsocrômico no máximo da banda de transição eletrônica de 20 nm em relação ao experimental (A), que se encontra dentro do intervalo aceito para incerteza de cálculos TD-DFT.<sup>99</sup> Os perfis espectrais de ambos apresentaram alta semelhança, com a presença de duas bandas, uma de maior intensidade e outra de baixa intensidade, indicando novamente que a estrutura calculada possui uma excelente concordância com a estrutural experimental.

O espectro eletrônico teórico para o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> apresentou uma série de transições com força do oscilador diferentes de zero, contudo foi analisado apenas as transições na faixa de 250 a 450 nm que apresentaram força do oscilador superiores a 0,008, e as transições presentes na faixa de 250 a 200 nm que mostraram força do oscilador superiores a 0,2. Assim as principais transições presentes no espectro foram observadas com máximos em 413, 286, 268, 253, 224 e 206 nm. Com respeito a todas essas transições, os orbitais moleculares envolvidos e as suas respectivas forças de oscilador estão apresentadas no ANEXO I.

Para adicional visualização dos resultados, os ANEXOS I, II e III contém, respectivamente, a estrutura tridimensional do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)(NO)]<sup>2+</sup> com cada átomo numerado, os percentuais das contribuições atômicas mais significativas para os orbitais envolvidos em cada transição e as superfícies de contorno dos orbitais envolvidos.

As contribuições atômicas percentuais mais significativas para os orbitais envolvidos na transição estão ilustradas na Tabela 6. A transição que ocorre em 413 nm, no espectro teórico, e em 433 nm no experimental, pode ser considerada como uma transferência de carga ligante-ligante (LLCT) do ligante cloreto para o ligante NO, com certo caráter de transferência de carga metal ligante (MLCT). Já a transição com máximo em 286 nm (teórico)/306 nm (experimental) apresentou um caráter de transferência de carga do tipo ligante metal (LMCT) do átomo de Cl para o Fe. Isso sustenta a hipótese de que o caráter de Fe<sup>III</sup> é muito expressivo num complexo de NO<sup>+</sup>. As transições com máximos em 268, 253 e 224 nm (teórico)/288, 273 e 244 nm (experimental) apresentaram caráter de transferência de carga do tipo LMCT do ligante cyclam para o Fe.

Analisando os percentuais atômicos para a transição em 206 nm (teórico)/226 nm (experimental), verificou-se que a mesma apresentou caráter de transferência do tipo LMCT do ligante cyclam para o Fe, contudo ressalta-se que existe uma pequena parcela de contribuição de uma transferência de carga do Fe para o ligante NO, logo a transição em questão apresenta um leve caráter de transferência de carga metal ligante (MLCT).

Em resumo, as transições de baixa intensidade que ocorre em 413 e 286 nm foram designadas como sendo do tipo transferência de carga LLCT do ligante Cl para o NO e transferência de carga do tipo LMCT, do Cl para o centro metálico, respectivamente. As transições que ocorrem no intervalo de 268 – 206 nm onde existe uma banda intensa com comprimento de onda máximo em 230 nm, foi designada como sendo transferência de carga do tipo LMCT do ligante cyclam para o centro metálico (Tabela 6).

Tabela 6 - Transições teóricas mais relevantes com suas respectivas contribuições atômicas para o espectro de absorção na região do UV-Vis do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em água.

| Transição |     | Orbitais envolvidos de maior percentual (%)          | Contribuição atômica  | Atribuição |
|-----------|-----|--|---|------------|
| (nm)      |     |  |   |            |
| T         | E   |  |   |            |
| 413       | 433 | H-1 → LUMO (52%), HOMO → L+1 (42%)                   | Cl (79%) e Fe(5%) → Fe-NO (95%)                             | LLCT       |
| 286       | 306 | H-1 → L+3 (52%)                                      | Cl (79%) e Fe(5%) → Fe(62%)                                 | LMCT       |
| 268       | 288 | H-2 → L+2 (88%)                                      | Cyclam (83%) → Fe (59%)                                     | LMCT       |
| 253       | 273 | H-4 → L+2 (77%)                                      | Cyclam (86%) → Fe(59%)                                      | LMCT       |
| 224       | 244 | H-2 → L+3 (66%)                                      | Cyclam (83%) → Fe (62%)                                     | LMCT       |
| 206       | 226 | H-17 → LUMO (13%), H-10 → L+2 (40%), H-4 → L+3 (32%) | Cyclam (88%), (86%) e (91%) → Fe-NO (95%), Fe (86%) e (91%) | LMCT       |

T = Teórico / E = Experimental.

Fonte: Elaborado pelo autor.

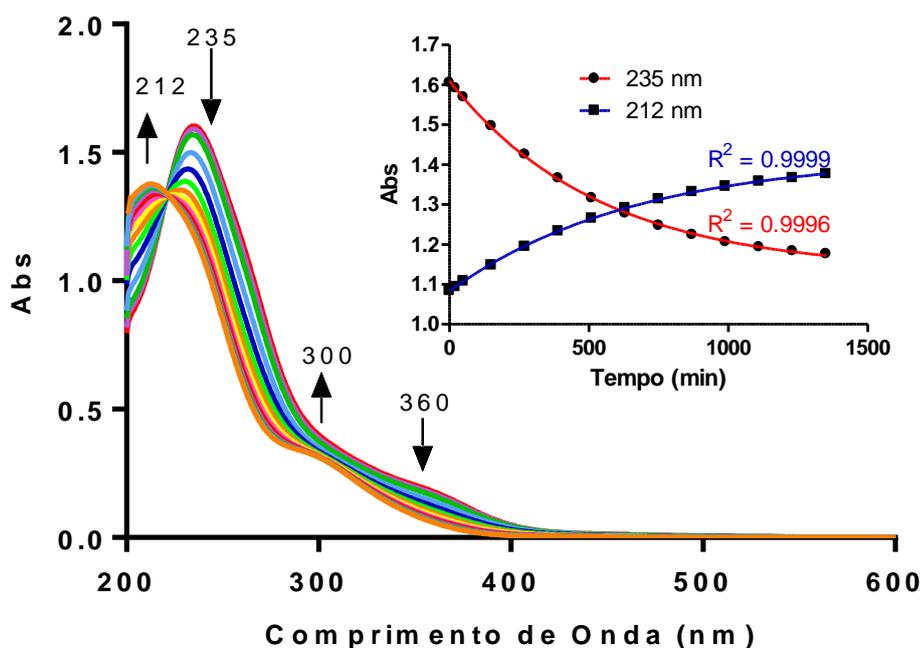
### 4.3. Ensaio de Liberação Térmica de NO do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

#### 4.3.1. Monitoramento Utilizando Espectroscopia no UV-Vis e IV

Com o intuito de verificar se o composto *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> poderia estar liberando NO por estímulo térmico, em condições fisiológicas, vários ensaios foram realizados. O primeiro ensaio ocorreu por meio da utilização da técnica de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Neste ensaio foram empregadas soluções dos íons complexos *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (100 μmol L<sup>-1</sup>) e *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, que foram monitoradas por cerca de 22 horas a 37 °C.

Observa-se na Figura 33, alterações espectroscópicas do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>. As bandas com máximos em 235 e 360 nm diminuiram a medida que duas novas bandas surgiram em 212 e 300 nm, verificou-se ainda um ponto isobéstico em 224 nm, tais resultados indicam que o complexo sofre alterações nestas condições experimentais. Na Figura 33 também estão contidas as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 235 e 212 nm, o ajuste das curvas foi feito por meio de equação exponencial de primeira ordem, o tempo de meia – vida ( $t_{1/2}$ ) para o decaimento da banda em 235 nm foi de 327 minutos.

Figura 33 - Comportamento térmico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> empregando espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Variação espectral para íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 37 °C acompanhada por 22 horas e 30 minutos. O *inset* mostra as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 235 nm ( $R^2 = 0,9996$ ) e 212 ( $R^2 = 0,9999$ ) nm, empregando equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais.

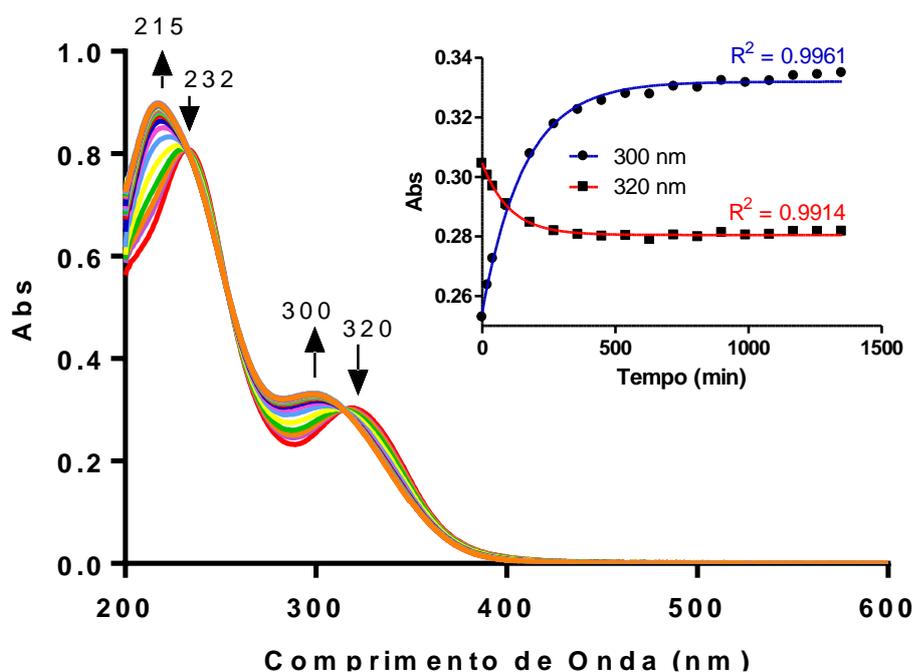


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para fins comparativos o mesmo estudo foi realizado empregando o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> na concentração de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , as medidas realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 37 °C são mostradas na Figura 34. O espectro do íon complexo

$trans$ -[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> também apresentou mudanças no intervalo de tempo empregado, cuja banda em aproximadamente 220 nm sofreu deslocamento para 215 nm, e a banda em 320 nm diminuiu enquanto que uma nova banda em 300 nm surgiu, sendo observado dois pontos isosbéticos em 234 e 315 nm, indicando processo de reação elementar. O ajuste das curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 320 e 300 nm, foi feito por meio de equação exponencial de primeira ordem, o  $t_{1/2}$  para o decaimento da banda em 320 nm foi de 90 minutos. Como já mencionado o complexo  $trans$ -[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> em solução aquosa pode sofrer reação de troca com o solvente, logo as mudanças espectrais para o complexo em questão podem ser atribuídas a possível troca dos ligantes cloreto por moléculas de água.

Figura 34 - Comportamento térmico do íon complexo  $trans$ -[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> empregando espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Variação espectral para íon complexo  $trans$ -[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 37 °C acompanhada por 22 horas e 30 minutos. O *inset* mostra as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 320 nm ( $R^2 = 0,9914$ ) e 300 nm ( $R^2 = 0,9961$ ) empregando equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais.



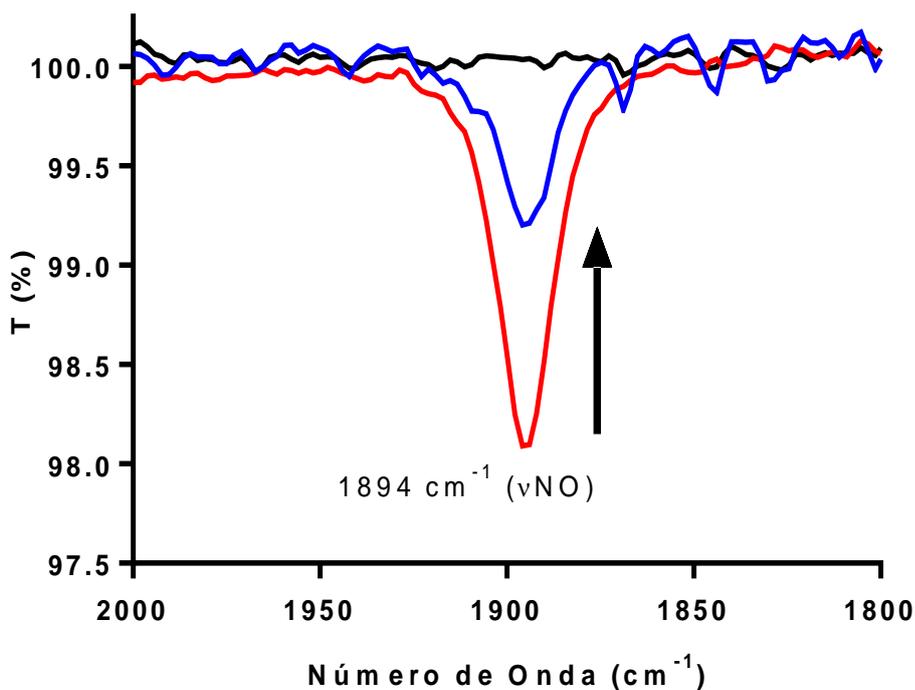
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao comparar o perfil dos últimos espectros das Figuras 33 e 34, verificou-se que ambos apresentam uma grande semelhança, indicando que as possíveis mudanças no espectro

do íon  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  podem estar relacionadas com a saída do ligante NO e/ou cloreto da esfera de coordenação. Ressalta-se que este resultado não possibilita a obtenção de conclusões a respeito de qual estado redox (NO ou HNO) o ligante nitrosil está sendo liberado, porém ilustra claramente que íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  sofre alterações estruturais espontaneamente em condições fisiológicas provenientes possivelmente da saída do NO da esfera de coordenação.

O segundo ensaio ocorreu por meio da utilização da técnica de refletância total atenuada (ATR) na região do infravermelho. Para isso uma solução do complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi preparada em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4. Em seguida foram registrados espectros antes e após 24 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 35). Nestas condições experimentais, foi possível avaliar o comportamento da banda em  $1894 \text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento simétrico do ligante  $\text{NO}^+$  do complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ .

Figura 35 - Ensaio de estabilidade térmica por espectroscopia de absorção na região do infravermelho do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{Cl})(\text{NO})]^{2+}$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4. Temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Branco (—), Solução contendo o complexo antes (—) e após (—) 24 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

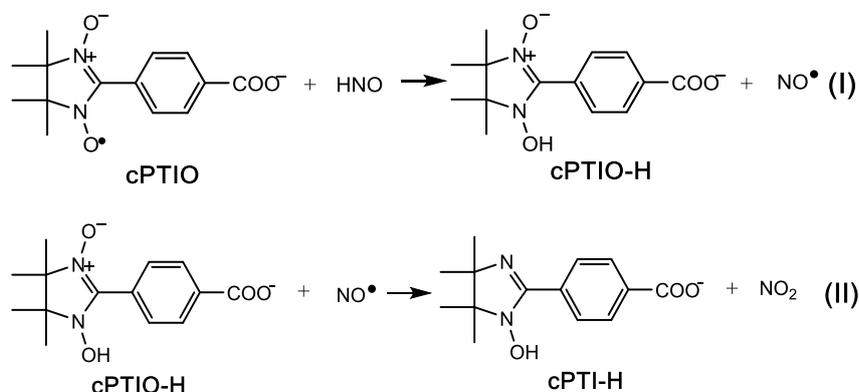
Na Figura 35, após cerca de 24 horas a 37 °C, observa-se uma redução em mais de 50% da banda referente ao ligante NO, indicando que o mesmo pode estar sendo liberado ou sendo convertido a outra espécie ainda na esfera de coordenação.

#### 4.3.2. Monitoramento Utilizando Scavengers Seletivos

Uma abordagem utilizada para detectar de forma direta e distinguir entre o NO livre e coordenado se trata em usar *scavengers* seletivos, moléculas que reagem estequiometricamente e seletivamente com NO. O sal 2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-óxido-3-óxido de potássio (cPTIO) e a mioglobina(Fe<sup>III</sup>) são exemplos de *scavengers* seletivos,<sup>69,100</sup> essas espécies tem sido largamente utilizadas pela comunidade científica para detecção de NO e HNO. O mecanismo da reação desses *scavengers* com NO/HNO tem sido bastante estudado e os produtos da reação claramente identificados.<sup>101,69,100</sup> Logo, por meio desses agentes seletivos, pode-se detectar diretamente óxido nítrico.

O cPTIO é uma das espécies seletivas para óxido nítrico que vem sendo bastante utilizada, sendo sua reação extremamente rápida e estequiométrica. O mesmo tem a capacidade de detectar duas espécies reativas de nitrogênio, o NO e NO<sup>-</sup> (HNO). Ao reagir com alguma dessas espécies (Reação 3), o cPTIO apresenta mudanças espectrais características, cujo comportamento descrito mostra a diminuição das bandas com máximos em 360 e 560 nm.<sup>102,69</sup>

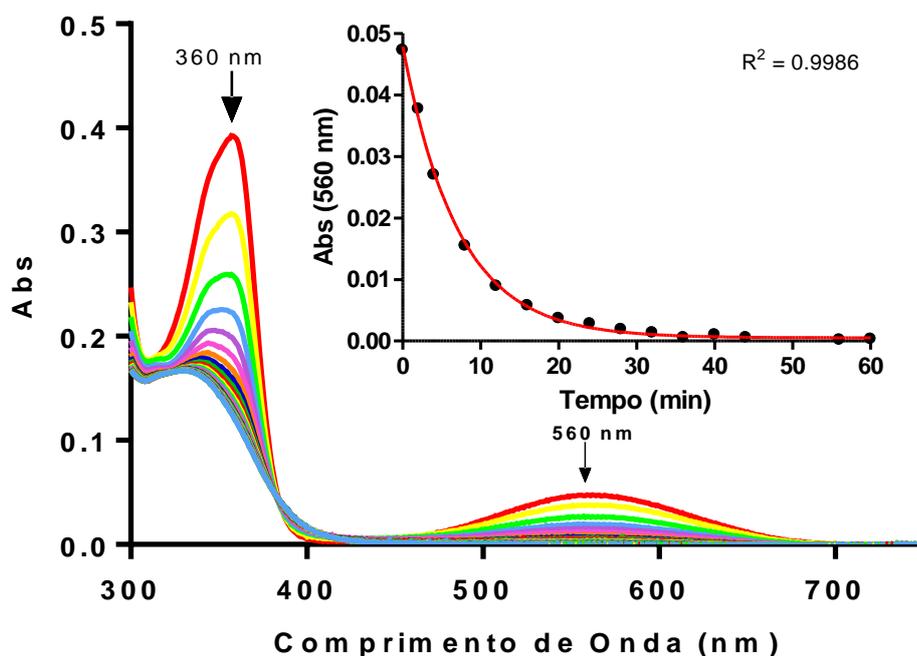
#### Reação 3



Para fins comparativos, foi realizado um acompanhamento da reação do cPTIO com HNO por UV-Vis, para isso, utilizou-se uma mistura contendo 50 μmol L<sup>-1</sup> de cPTIO, 100 μmol L<sup>-1</sup> de DTPA e 100 μmol L<sup>-1</sup> de sal de Angelis (AS), um doador direto de HNO,<sup>100</sup>

em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. O monitoramento desta reação foi realizado por cerca de 1 hora empregando-se espectroscopia de absorção no UV-Vis (Figura 36). Observou-se com o progresso da reação mudanças espectrais características, relacionadas à conversão da espécie cPTIO em cPTI-H.<sup>69,101</sup> O decaimento da banda em 560 nm correspondente ao cPTIO (Figura 36), obedeceu uma cinética de primeira ordem com constante de velocidade (k) de  $1,6 \pm 0,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  e  $t_{1/2}$  de 7,2 minutos.

Figura 36 - Acompanhamento da reação entre cPTIO e HNO gerado pelo sal de Angelis (AS). Variações espectrais na região do UV-Vis, da reação do AS (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com cPTIO (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 na presença de DTPA (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Temperatura de 37 °C. Os espectros foram registrados durante 1 hora a cada 2 minutos. O primeiro espectro (—) corresponde apenas a mistura cPTIO e DTPA, enquanto as demais curvas correspondem a mistura anterior com o AS. Em *inset*, curva cinética para o decaimento da banda em 560 nm correspondente ao cPTIO, empregando equação de decaimento de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais ( $R^2 = 0.9986$ ).

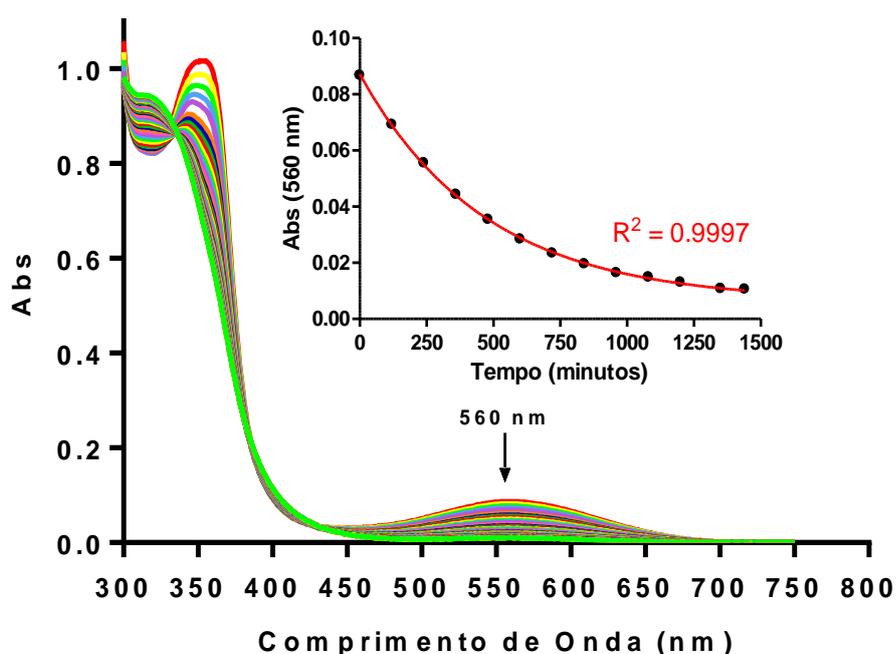


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para comprovar a hipótese de liberação térmica de NO ou HNO pelo complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, em condições fisiológicas, empregou-se o *scavenger* cPTIO, monitorando por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível. Para isso uma mistura contendo o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e cPTIO (100  $\mu\text{mol}$

L<sup>-1</sup>), em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 foi preparada e acompanhada por UV-Vis num período de 24 horas (Figura 37).

Figura 37 - Estudo de termoliberação de NO/HNO através, da reação do cPTIO (100 μmol L<sup>-1</sup>) com íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)(Cl)]<sup>2+</sup> (200 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 na presença de DTPA (200 μmol L<sup>-1</sup>). Temperatura 37 °C, monitorando-se as variações espectrais na região do UV-Vis por 24 horas. Em *inset*, curva cinética correspondente à variação espectral da banda em 560 nm, para a reação do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com cPTIO.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 37 é apresentado a curva cinética da reação entre o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e o cPTIO. Observou-se no intervalo de tempo estudado uma diminuição da banda característica do cPTIO tratando-se de uma evidência de reação entre o cPTIO e as espécies reativas de nitrogênio NO/HNO. O decaimento da banda em 560 nm, obedeceu uma cinética de primeira ordem com constante de velocidade (*k*) de  $2,8 \pm 0,05 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , o *t*<sub>1/2</sub> estimado para essa reação foi de 385 minutos ou aproximadamente 6,4 horas.

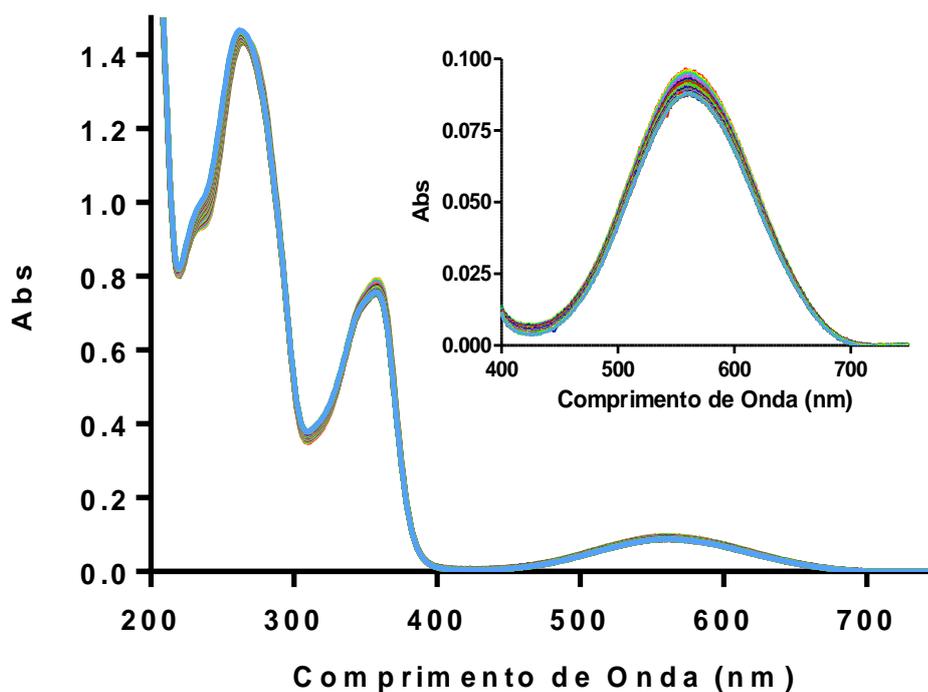
Ressalta-se, como relatado anteriormente, que o *scavenger* pode reagir tanto com o óxido nítrico na forma radicalar (<sup>•</sup>NO) ou reduzida (NO<sup>-</sup>), assim este resultado não possibilita a obtenção de conclusões mais diretas a respeito de qual espécie (NO ou HNO)

está sendo gerada majoritariamente, porém ilustra claramente que o ligante nitrosil está sendo liberado em uma das duas formas.

No presente experimento a razão cPTIO: complexo é de 1:2 em mol, verificamos que em 24 horas a banda em 560 nm, correspondente a espécie cPTIO, tinha diminuído mais de 80% do seu valor inicial (0,087 de Abs inicial e 0,010 de Abs no final do experimento), indicando que nesse intervalo de tempo o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)(Cl)]<sup>2+</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 tem a capacidade de liberar óxido nítrico na forma de NO/NO<sup>-</sup> em mais de 50%, sustentando inclusive as medidas feitas com ATR no infravermelho.

Para verificar se o *scavenger* se manteria estável nas condições de tempo e na temperatura empregadas, uma solução 100 μmol L<sup>-1</sup> de cPTIO em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 mantida sob a temperatura de 37 °C, foi monitorada por 24 horas, sendo registrados espectros no intervalo de 30 minutos. Os espectros eletrônicos são mostrados na Figura 38. Nenhuma mudança espectral significativa foi observada, o que descarta qualquer influência das condições experimentais sob o espectro do cPTIO.

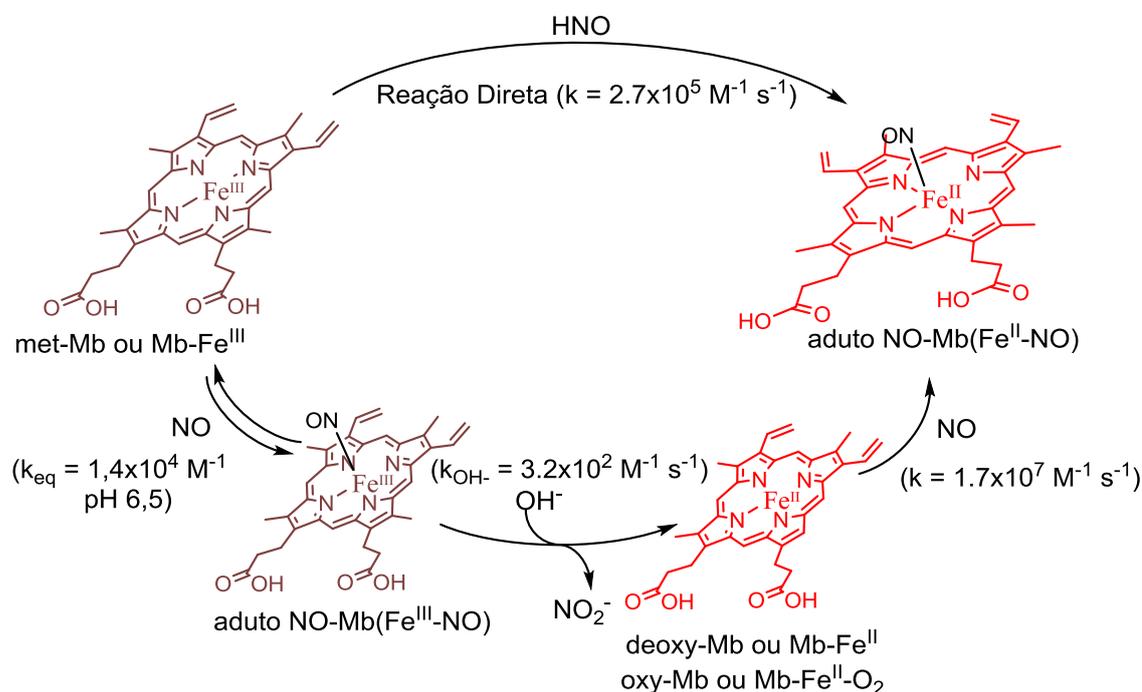
Figura 38 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do cPTIO (100 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 na presença de DTPA (200 μmol L<sup>-1</sup>), sobe temperatura de 37 °C monitorado por 24 horas, espectros registrados em intervalos de 30 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor

As espécies HNO e NO também podem ser detectadas por meio de suas reações com a mioglobina. O NO e HNO podem reagir com a metamioglobina (met-Mb ou Mb-Fe<sup>III</sup>), a forma oxidada da mioglobina, gerando o mesmo aduto NO-MbFe<sup>II</sup>, porém com cinéticas bem diferentes e vias mecanísticas distintas. A reação da Mb-Fe<sup>III</sup> com HNO gera diretamente o aduto NO-MbFe<sup>II</sup> (Figura 39).<sup>100</sup> Todavia, a reação do NO com a Mb-Fe<sup>III</sup> gera o produto NO-MbFe<sup>II</sup> por meio de três etapas de reação; (i) ocorre a formação do aduto NO-MbFe<sup>III</sup>, (ii) o produto NO-MbFe<sup>III</sup> reage com OH<sup>-</sup> do meio formando nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e Mb-Fe<sup>II</sup>, (iii) por fim a mioglobina reduzida (Mb-Fe<sup>II</sup>) reage com outra molécula de NO formando o aduto NO-MbFe<sup>II</sup> (Figura 39).<sup>103,104</sup> A reação da Mb-Fe<sup>III</sup> com sal de Angelis (AS), um doador de HNO, em meio fisiológico induz a mudanças espectrais características nas bandas de absorção Soret e Q da proteína, mudanças essas que indicam a conversão direta de Mb-Fe<sup>III</sup> a NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO).<sup>100</sup>

Figura 39 - Ilustração das possíveis reações de formação do aduto NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO).

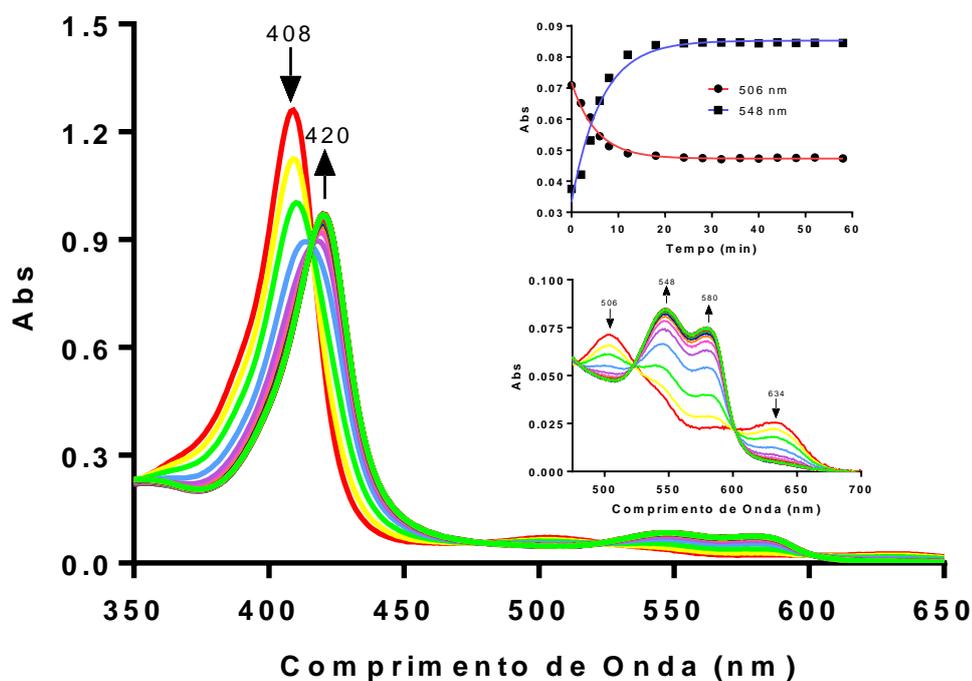


Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante disso realizou-se o ensaio térmico com o íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> empregando mioglobina, sob condições fisiológicas de pH. Para isso foi preparado uma solução contendo Mb-Fe<sup>III</sup> (6,7 μmol L<sup>-1</sup>) e o íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (134,0 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato pH 7,4 na temperatura de 37 °C. Para comparar o resultado obtido com o experimento anterior, foi obtido um controle positivo por meio da reação entre o padrão de

liberação de HNO (sal de Angelis) e a met-mioglobina (Figura 40). Como forma de evitar a oxidação do centro metálico por meio do  $O_2$ , todas as reações foram realizadas em condições anaeróbicas. Esta reação provocou mudanças características nas bandas Soret (entre 405 – 425 nm) e bandas Q (entre 480 – 700 nm), indicando a conversão de Mb-Fe<sup>III</sup> para NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO), tal como descrito na literatura.<sup>100</sup> As curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 506 e 548 nm para a reação entre Mb-Fe<sup>III</sup> e AS estão apresentadas na Figura 40. O tempo de reação necessário para converter 50% da forma Mb-Fe<sup>III</sup> a NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO) ( $t_{1/2}$ ) foi de 3,7 minutos.

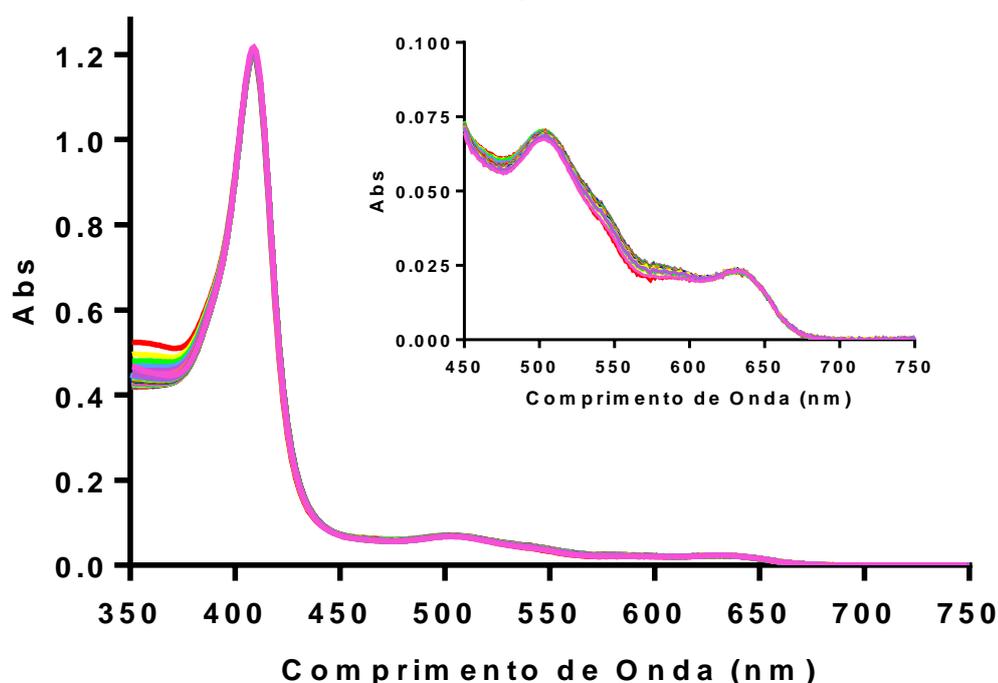
Figura 40 - Reação controle entre HNO e Mb-Fe<sup>III</sup>. Variação espectral para uma mistura contendo Mb-Fe<sup>III</sup> ( $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e sal de Angelis (AS) ( $27 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , monitorado na região do UV-Vis, por 60 minutos a cada 2 minutos. O primeiro espectro (—) corresponde apenas a Mb-Fe<sup>III</sup>, os demais correspondem a mistura Mb-Fe<sup>III</sup> e AS. Em *inset* estão os espectros ampliados na faixa de 450 a 700 nm para melhor visualização das bandas Q, assim como as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 506 e 548 nm para a reação em questão, empregando-se equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais  $R^2 = 0,9897$  (506 nm) e  $R^2 = 0,9777$  (548 nm).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A solução contendo o íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  e  $\text{Mb-Fe}^{\text{III}}$ , sob condições fisiológicas de pH, foi monitorada por UV-Vis durante 24 horas sob condições anaeróbicas, o comportamento espectral da mistura está ilustrado na Figura 41. Não foi observado nenhuma mudança significativa no espectro da  $\text{Mb-Fe}^{\text{III}}$  durante o tempo de estudo empregado, uma vez que a reação da  $\text{Mb-Fe}^{\text{III}}$  com NO é cerca de 1000 vezes mais lenta comparada a sua reação com HNO, tais resultados indicam possível liberação térmica de NO pelo nitrosilo complexo em condições fisiológicas, corroborando com os resultados obtidos por ATR e cPTIO. Diante disso pode-se concluir que o íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , em condições fisiológicas, apresenta a capacidade de liberar espontaneamente NO em taxas bastante lentas ( $t_{1/2} = 6,4$  horas).

Figura 41 - Estudo de termoliberação de NO/HNO através, da reação com  $\text{Mb-Fe}^{\text{III}}$  ( $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $134 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $134 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Temperatura  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , monitorando-se as variações espectrais na região do UV-Vis por 24 horas em intervalos de 30 minutos. O experimento ocorreu em atmosfera isenta de oxigênio.

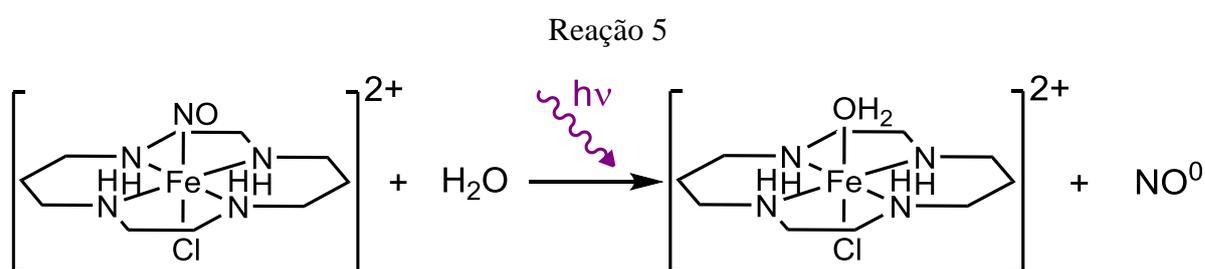


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4. Ensaio de Fotoliberação NO/HNO do Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>

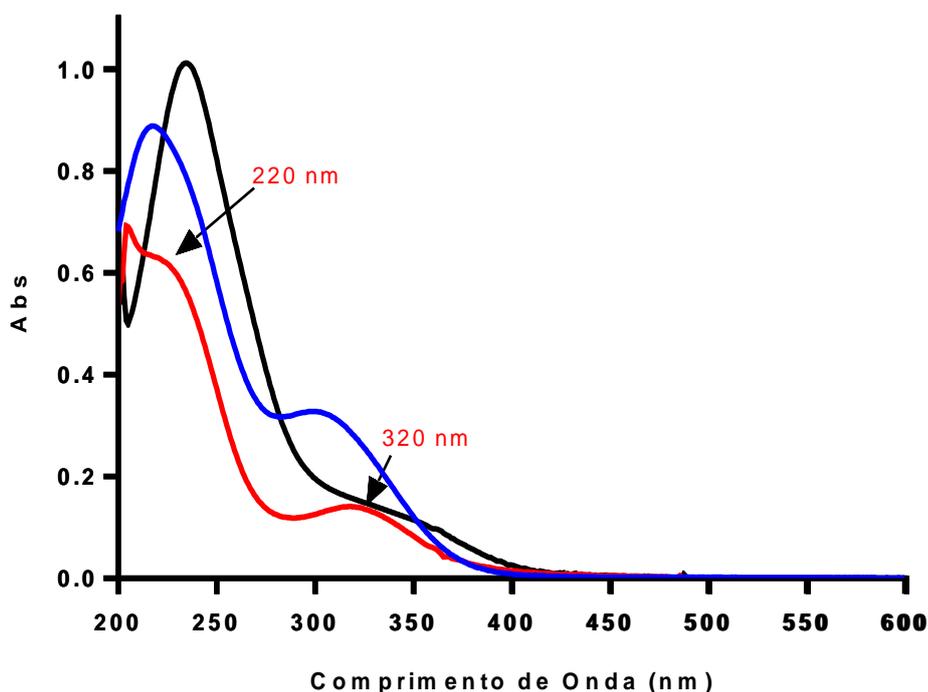
##### 4.4.1. Mudança Espectral do Íon Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> Após Irradiação

Holanda e colaboradores<sup>67,95</sup> reportam que o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> ao ser irradiado em meio aquoso tamponado pH 3,4 no comprimento de onda de 330 nm libera o ligante NO levando a formação do aquocomplexo de Fe<sup>3+</sup> (Reação 5). Esse comportamento foi evidenciado por acompanhamento eletroquímico e por espectroscopia de absorção do UV-Vis. Apesar deste estudo indicar qualitativamente a fotoliberação de NO, ele não garante inclusive a natureza da espécie liberada.



Nesta dissertação, a fotólise em 350 nm do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO<sup>+</sup>)Cl]<sup>2+</sup> (72 μmol L<sup>-1</sup>) em condições fisiológicas tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 foi realizada e registrada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis após 6 horas e 30 minutos de irradiação. Este procedimento foi realizado com o objetivo de verificar se o aquo produto *trans*-[Fe(cyclam)Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> também seria formado após a irradiação em 350 nm em condições fisiológicas. Os espectros antes e após irradiação são mostrados na figura abaixo (Figura 42).

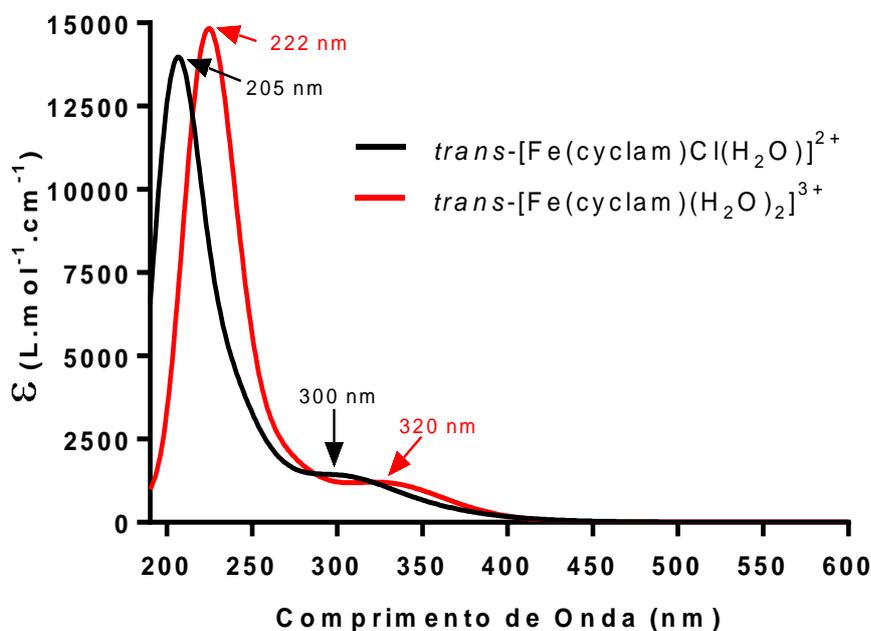
Figura 42 - Fotólise do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $72 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, antes da irradiação (—) e após de 6 horas e 30 minutos de irradiação (—). Também está presente o espectro do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) após 6 horas e meia de incubação (—) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4. Os experimentos se processaram a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro eletrônico do produto formado após irradiação apresentou duas bandas em 230 nm e 320 nm. O espectro eletrônico do composto  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  obtido nas mesmas condições fisiológicas após 6 horas e 30 minutos de incubação, apresentou perfil espectral similar ao do produto da fotólise do  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  (Figura 42) porém com um leve deslocamento para maior energia. A literatura relata que o composto  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ , quando dissolvido em água, apresenta rápida troca dos ligantes cloreto por moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ ,<sup>105</sup> o que torna duvidoso a natureza do complexo após fotólise ( $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ). Seria então possível este composto monoaquo se manter estável em solução ou reagiria com o meio, sendo obtido no final o complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ . Com o objetivo de esclarecer tal questão, cálculos de TD-DFT para os dois possíveis produtos foram realizados. Os espectros eletrônicos teóricos para os complexos  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  e  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$  são mostrados na Figura 43.

Figura 43 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para as estruturas *trans*-[Fe(cyclam)Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (—) e *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> (—) calculados por TD-DFT. Os cálculos foram realizados considerando água como solvente.



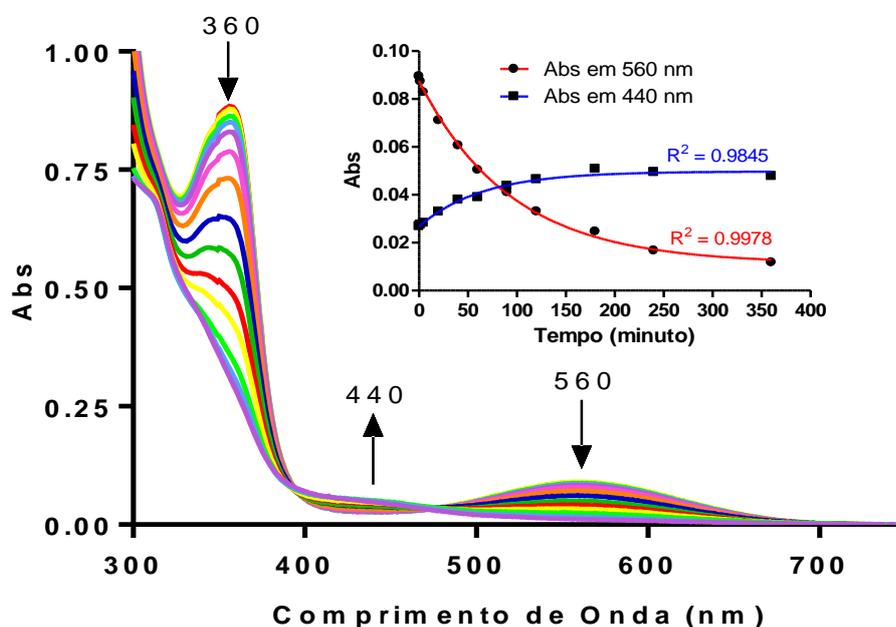
Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro previsto para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> apresentou duas bandas, uma de maior intensidade em 222 nm e outra de menor intensidade em 320 nm, da mesma forma, o espectro para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> também apresentou duas bandas de diferentes intensidades em 205 nm e 300 nm. O perfil espectral teórico de ambas espécies *trans*-[Fe(cyclam)Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> são muito similares e estão dentro da faixa de erro largamente aceito para cálculos TD-DFT<sup>99</sup>, contudo o espectro teórico do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> apresentou um deslocamento para menor energia, diferença essa também observada nos espectros experimentais dos íons *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> após fotólise (Figura 42). Diante dessas informações fica sugestivo que o nitrosilo complexo, após irradiação, sofre mudanças estruturais com fotoliberação do ligante óxido nítrico. Além disso tais resultados indicam que o produto *trans*-[Fe(cyclam)Cl(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> formado após fotólise, sofre reação de aquação sendo formado o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>, corroborando assim com os estudos de Poon e Andrew,<sup>105</sup> sobre o mecanismo de coordenação do complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Ressalta-se que embora os resultados teóricos e experimentais indiquem a formação do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>, é necessária a realização de outros experimentos, como por exemplo condutividade, afim de confirmar tal hipótese.

#### 4.4.2. Detecção de NO/HNO Empregando cPTIO

O estudo de fotoliberação de NO/HNO também foi realizado na presença do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  e do *scavenger* cPTIO em solução. Foram empregados uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4,  $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  do cPTIO,  $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  de DTPA e  $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  do complexo. A mistura foi submetida a irradiações sucessivas, no comprimento de onda de 350 nm, por um tempo total de 6 horas. Os espectros eletrônicos registrados (Figura 44) indicaram reação entre o complexo e o cPTIO a medida que a mistura era irradiada, as bandas em 360 e 560 nm diminuíam, enquanto surgia uma banda em 440 nm.

Figura 44 - Variações espectrais na região do UV-Vis, da reação do cPTIO ( $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ) com íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Reação estimulada por luz (350 nm). Temperatura ambiente  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tempo de irradiação: (—) 0 min; (—) 30 seg.; (—) 1 min. e 30 seg.; (—) 2 min. e 30 seg.; (—) 4 min. e 30 seg.; (—) 10 min.; (—) 20 min.; (—) 40 min.; 60 (—) min.; (—) 90 min.; (—) 120 min.; (—) 180 min.; (—) 240 min. e (—) 360 min. Em *inset* estão as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 440 e 560 nm, para a reação do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com cPTIO estimulada por luz em 350 nm, empregando equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais  $R^2 = 0,9978$  (560 nm) e  $R^2 = 0,9845$  (440 nm).

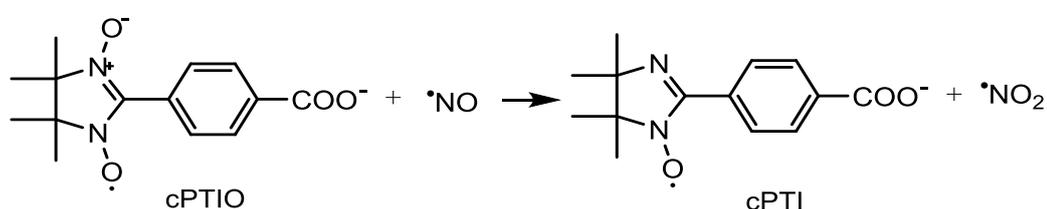


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 44 são apresentadas as curvas cinéticas da reação entre o complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com o cPTIO estimulada pela luz, cujo decaimento da banda em 560 nm corresponde à conversão da espécie cPTIO às possíveis formas cPTI, cPTI-H e cPTIO-H,<sup>69</sup> esse comportamento se deve ao complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  liberar o ligante nitrosil com o estímulo da luz, possibilitando sua reação com cPTIO. O decaimento da banda em 560 nm, obedeceu uma cinética de primeira ordem com constante de velocidade (k) de  $1,0 \pm 0,06 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , o  $t_{1/2}$  estimado para essa reação foi 115,5 minutos. Assim, conclui-se que a fotólise acelera em pelo menos 3 vezes a liberação do ligante nitrosil com respeito a liberação térmica.

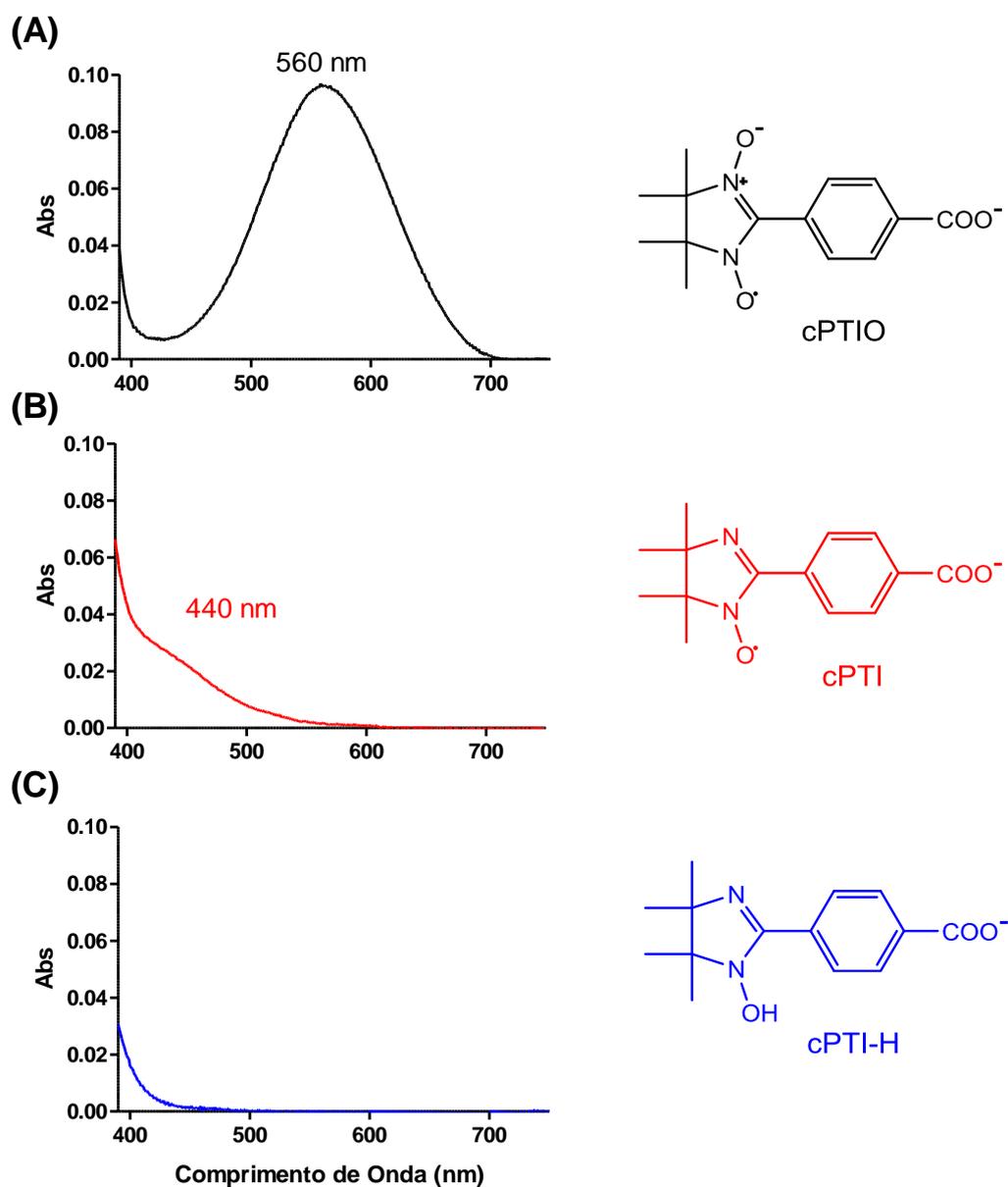
O *scavenger* cPTIO pode reagir tanto com o óxido nítrico na forma radicalar ( $\cdot\text{NO}$ ) ou reduzido ( $\text{NO}^-$ ).<sup>101,69</sup> Porém quando o cPTIO reage com NO, além da diminuição das bandas em 360 e 560 nm, ocorre o surgimento de uma banda próxima a 440 nm, característico da espécie cPTI (Reação 6).<sup>69</sup> Tal comportamento foi observado para reação do nitrosilo complexo com cPTIO estimulada por luz, mostrado na Figura 44. A medida em que a reação ocorreu, a banda em 560 nm diminui e uma banda em 440 nm surge. Assim, além de ilustrar claramente que o íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  em condições fisiológicas libera o ligante nitrosil induzido por luz, quando comparamos os tempos de meia vida da reação controle (7,2 min) e reação com complexo estimulada por luz (115,5 min), verificamos que esta última ocorre lentamente.

Reação 6



Adicionalmente, para fins comparativos, foi realizado um acompanhamento da reação do cPTIO com NO por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, para isso, utilizou-se uma mistura contendo  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cPTIO,  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DTPA e  $158 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NO, as reações ocorreram em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A solução aquosa contendo NO foi preparada por meio de borbulhamento de gás NO a uma solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a concentração da solução estoque saturada com NO foi estimada através da literatura.<sup>106</sup> A Figura 45 ilustra o padrão espectral dos possíveis produtos formados da reação do cPTIO com NO e HNO.

Figura 45 - Padrões espectrais dos possíveis produtos formados da reação do cPTIO com NO e HNO obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 25 °C. Espectro de absorção eletrônica no UV-Vis do cPTIO (50 μmol L<sup>-1</sup>) antes da reação (A), após reação com NO (solução saturada com gás NO) (B) e após reação com HNO (usando sal de Angelis) (C).

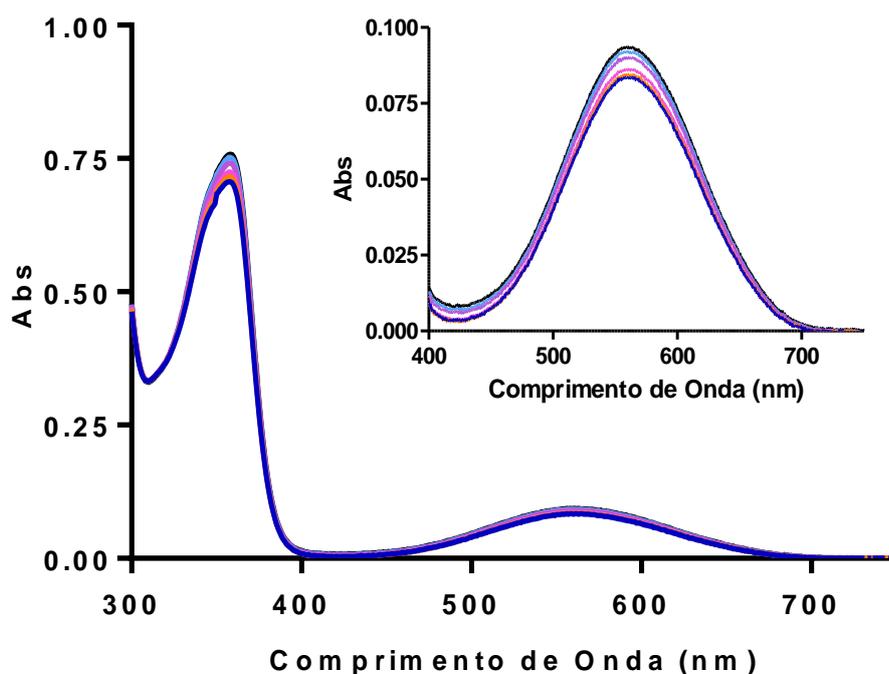


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para verificar uma possível influência da luz sobre o cPTIO, uma solução 100 μmol L<sup>-1</sup> de cPTIO em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 na presença de DTPA (200 μmol L<sup>-1</sup>), foi exposta a radiação ultravioleta (350 nm) durante 6 horas e 30 minutos, sendo tomados espectros desta amostra em intervalos de 30 minutos (Figura 46). O espectro de absorção em preto mostra a solução de cPTIO antes da irradiação, e em azul após 6 horas e 30 minutos de

irradiação. Observou-se que ocorreu uma leve diminuição nas bandas em 360 e 560 nm, porém tais mudanças não são significativas quando comparadas ao efeito provocado pelo complexo com cPTIO ao ser irradiado, descartando assim qualquer influência relevante da irradiação no espectro do cPTIO.

Figura 46 - Espectro de absorção na região do UV-Visível, do cPTIO ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 na presença de DTPA ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Antes (—) e após (—) 6 horas e 30 minutos de irradiação em 350 nm. Temperatura de  $25^\circ\text{C}$ .



Fonte: Elaborada pelo autor.

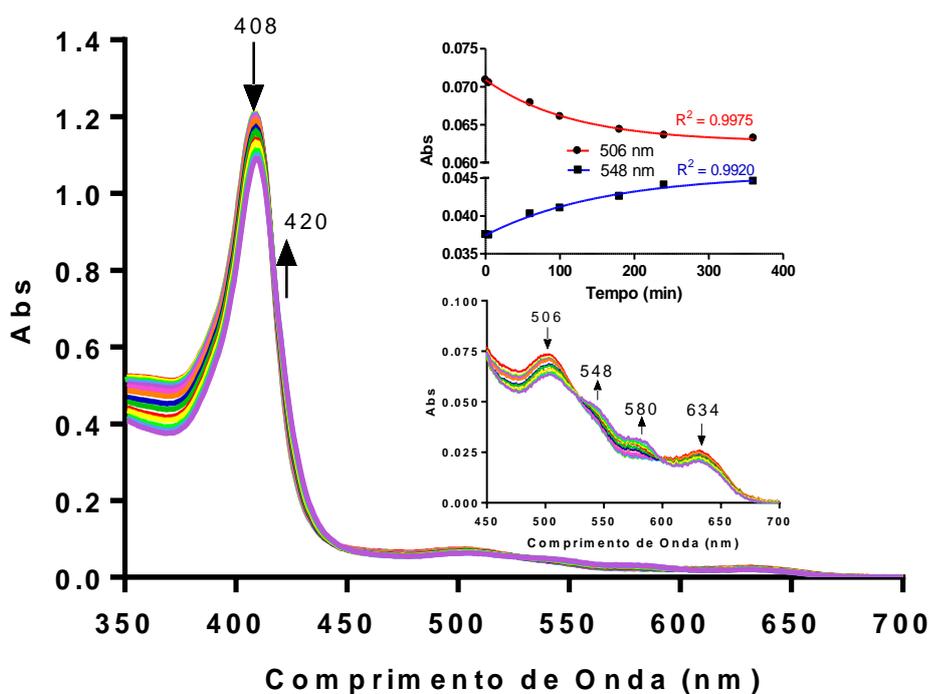
Tais resultados possibilitam concluir que o óxido nítrico está sendo liberado lentamente pelo complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  também quando estimulado por luz na região de 350 nm, com surgimento de uma banda típica em 440 nm indicando presença de  $\text{NO}^0$ , contudo, vale ressaltar que a diminuição da banda em 560 nm é indicativo da reação do cPTIO tanto com NO quanto HNO, dessa forma, não é possível descartar a hipótese de haver também qualquer fotoliberação de HNO por essa metodologia.

#### 4.4.3. Medições de HNO e NO Empregando met-Mioglobina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ )

O estudo de fotoliberação do composto  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  também foi realizado empregando-se condições fisiológicas e Mb- $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Foi preparada uma solução

contendo Mb-Fe<sup>III</sup> (6,7 μmol L<sup>-1</sup>) e o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (134,0 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. A solução foi irradiada em 350 nm por 6 horas e monitorada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (Figura 47). Na Figura 47 também estão ilustradas as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 506 e 548 nm, para a reação fotoquímica do complexo na presença da met-mioglobina.

Figura 47 - Reação fotoquímica do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> na presença da met-mioglobina. Variação espectral para uma mistura contendo Mb-Fe<sup>III</sup> (6,7 μmol L<sup>-1</sup>), complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (134,0 μmol L<sup>-1</sup>) e DTPA (134,0 μmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, fotoirradiada em 350 nm e monitorado na região do UV-Vis, por 6 horas. Temperatura ambiente 25 °C. Em *inset* estão os espectros de absorção na região do UV-Vis da mistura reacional no intervalo de 450 a 700 nm e as curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 506 e 548 nm. Foi empregado equação exponencial de primeira ordem para ajuste dos pontos experimentais  $R^2 = 0,9975$  (506 nm) e  $R^2 = 0,9920$  (548 nm).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Observou-se que o espectro da Mb-Fe<sup>III</sup> sofreu pequenas alterações, principalmente na região das bandas Q, enquanto a banda Soret mostrou um leve deslocamento para maior comprimento de onda, tais mudanças espectrais são sugestivas de

interação da Mb-Fe<sup>III</sup> com NO ou HNO. Ao comparar os dados da reação controle utilizando AS com os da reação de interesse, chegou-se a duas hipóteses, a primeira é que a liberação de NO/HNO por meio do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e luz ocorre de forma significativamente lenta, sendo notável que o tempo de irradiação não foi nem mesmo suficiente para levar 50% da espécie Mb-Fe<sup>III</sup> para a forma NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO) (Figura 47). A segunda hipótese, assumindo que o complexo nestas condições libera majoritariamente óxido nítrico na forma de NO<sup>0</sup>, e uma vez que sua reação com met-mioglobina é bem mais lenta que a reação com HNO, teríamos um comportamento onde a converção Mb-Fe<sup>III</sup> para NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO), na presença do complexo e luz, ocorreria de forma muito lenta. A reação com cPTIO evidenciou produção expressiva de NO ou HNO no tempo de 6 horas, o fato de não termos observado grande conversão da met-mioglobina neste mesmo tempo, sugere que a espécie majoritariamente fotoliberada é NO, caso fosse HNO, sua reação com Mb-Fe<sup>III</sup> seria muito mais rápida, apresentando expressivas mudanças espectrais.

Uma vez observado as mudanças no espectro da mioglobina, que sugerem a interação da proteína majoritariamente com NO, pode-se concluir que o composto *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> fotoquimicamente, em condições fisiológicas, libera majoritariamente NO. Ressalta-se que o produto formado, NO-Mb(Fe<sup>II</sup>-NO), pode ser obtido da reação da Mb-Fe<sup>III</sup> com NO ou HNO, porém com cinéticas bem distintas, sugerindo que a espécie majoritariamente liberada deva ser NO para o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em condições fisiológicas. Contudo, não se pode excluir que uma pequena fração de HNO seja gerada quando induzido por luz.

Holanda e colaboradores,<sup>67</sup> observaram mudanças no espectro de absorção na região do infravermelho do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> características de fotoliberação de HNO (ANEXO V). Os autores verificaram que ao submeter este complexo a irradiação no comprimento de onda de 330 nm, o estiramento em 1888 cm<sup>-1</sup>, atribuído ao ligante NO<sup>+</sup> na esfera de coordenação, acabava por diminuir, concomitantemente com o surgimento de um estiramento em 2229 cm<sup>-1</sup>. Os autores atribuíram essa última banda ao ligante NO<sup>+</sup> livre, porém este valor de estiramento no infravermelho é característico da molécula de N<sub>2</sub>O, que se trata do produto da rápida dimerização de HNO,<sup>100</sup> indicando assim uma possível liberação de HNO fotoinduzida, observada indiretamente por meio da geração de N<sub>2</sub>O.

Estes resultados, juntamente com os resultados de fotoliberação utilizando os *scavenger* cPTIO e Mb-Fe<sup>III</sup>, indicam que o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, quando estimulado por luz na região de 350 nm, apresenta a capacidade de liberar majoritariamente o

ligante nitrosil na forma de NO, e possivelmente pequena quantidade na forma de HNO. Na via que ocorre a liberação de NO, possivelmente temos um mecanismo onde o NO<sup>+</sup> na esfera de coordenação é reduzido a NO<sup>0</sup> via oxidação do centro metálico, que vai de Fe (II) para Fe (III), já na hipótese mecanística de fotoliberação de HNO, o ligante nitrosilo na forma NO<sup>+</sup> deveria receber 2 elétrons para a produção de NO<sup>-</sup>. Considerando que este processo acarretaria na formação de um complexo no estado Fe (IV), esta via mecanística se caracteriza como uma via mais restrita. Logo a hipótese de liberação de NO majoritariamente é mais faquível. Contudo as evidências de liberação de HNO motivam novos estudos objetivando a elucidação do possível mecanismo de fotoliberação de HNO pelo íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>.

#### 4.5. Estudo Reacional do Íon Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com Redutor Biológico Glutaciona (GSH)

O nitroprussiato de sódio (SNP), Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]·2H<sub>2</sub>O, trata-se de um dos compostos que se enquadram dentro da classe de espécies que liberam NO espontaneamente, sendo o único metalonitrosilo complexo utilizado clinicamente.<sup>107</sup> Nos últimos anos, a reação do SNP com espécies tiólicas RSH, por exemplo, H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>, glutaciona (GSH), cisteína, entre outros tióis, tem atraído a atenção da comunidade científica. A reação com tióis forma um aduto genérico tipo [Fe(CN)<sub>5</sub>N(O)SR]<sup>(n+2)-</sup>, (n = número de elétrons envolvidos na reação), sendo o primeiro produto formado e, dependendo do pH e da quantidade de O<sub>2</sub> no meio, pode gerar NO e HNO, entre outras espécies como produtos finais.<sup>108</sup>

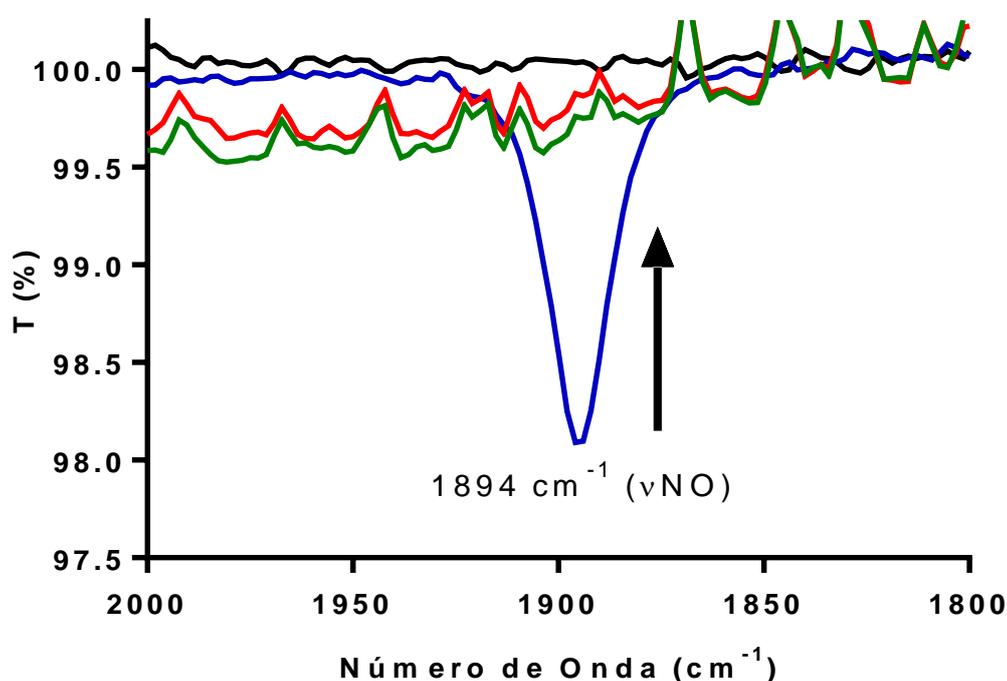
Tendo em vista a possível produção de NO e HNO por meio da reação do SNP com redutores biológicos, similar processo poderia ocorrer com outros complexos, sendo de suma importância o estudo das reações de nitrosilo complexos com tióis. Assim, a reação em condições fisiológicas do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)(Cl)]<sup>2+</sup> com o redutor GSH foi estudada por diferentes técnicas, objetivando-se verificar a formação de NO e/ou HNO.

##### 4.5.1. Acompanhamento Via Refletância Total Atenuada (ATR) no Infravermelho

Através da técnica de ATR, foi possível estudar o efeito da adição de GSH a solução do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, através do monitoramento da banda em 1894 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento ν(NO) do nitrosilo complexo. No presente estudo empregou-se cerca de 10 mmol L<sup>-1</sup> do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e 100 mmol L<sup>-1</sup>

de GSH, mantendo a reação em solução tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. A Figura 48 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho antes da adição do complexo (—), tampão contendo GSH (—), complexo antes (—) e após 5 minutos da adição de glutatona ao meio (—). A reação ocorreu em meio aeróbico a temperatura ambiente.

Figura 48 - Estudo reacional do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (10 mmol L<sup>-1</sup>) com GSH (100 mmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 acompanhado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Temperatura ambiente 25 °C. Branco (—), complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (—), GSH (—), mistura contendo o complexo e GSH após 5 minutos de reação (—).



Fonte: Elaborado pelo autor.

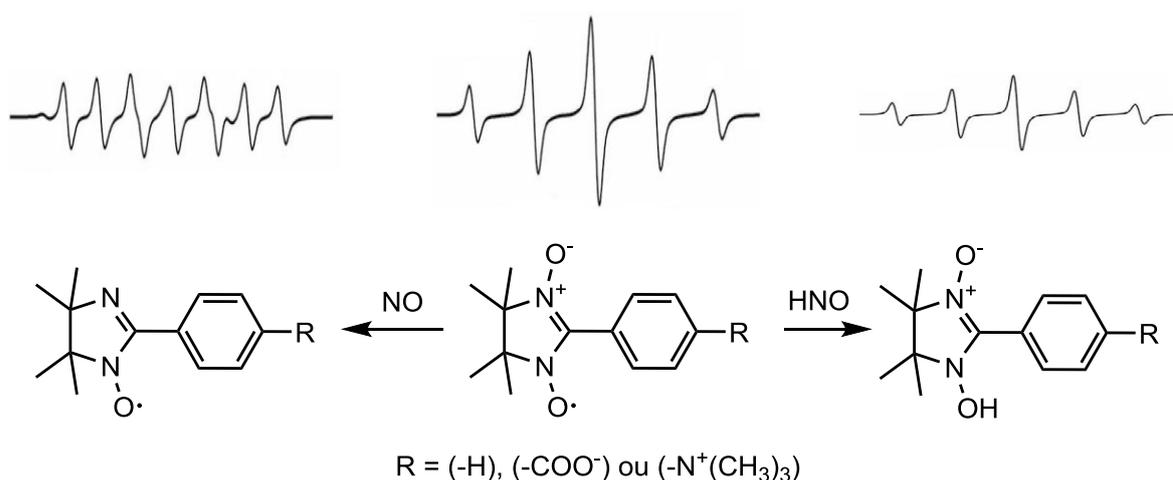
Observou-se que após 5 minutos da adição de glutatona, o estiramento em 1894 cm<sup>-1</sup> desapareceu completamente, indicando claramente que nessas condições a GSH apresenta rápida reação e forte influência sobre o fragmento Fe-NO do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>. O espectro foi analisado como um todo na faixa de 3000 a 1000 cm<sup>-1</sup> com o objetivo de acompanhar a formação de produtos reacionais (NO<sup>0</sup>, HNO e N<sub>2</sub>O), contudo devido ao excesso de glutatona a única mudança que foi notada foi o desaparecimento do estiramento em 1894 cm<sup>-1</sup>, uma vez que o espectro do tiol não apresenta nenhum estiramento característico nessa região (ANEXO VI).

#### 4.5.2. Acompanhamento Via Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR)

Como já mencionado anteriormente, com o objetivo de distinguir entre NO e HNO ( $\text{NO}^-$ ), tem sido empregado os *spin-traps* PTIO e cPTIO, que são radicais com um elétron desemparelhado em um anel de cinco membros contendo dois átomos de nitrogênio (Reação 3). Por ressonância, o elétron desemparelhado é igualmente distribuído em ambos os nitrogênios, logo esse elétron torna-se sensível a qualquer mudança que ocorra nesse sistema conjugado<sup>109</sup>, possibilitando o emprego da técnica de EPR para tais estudos.<sup>101</sup>

A reação entre o NO e o cPTIO, por exemplo, ocorre na porção zwitteriônica do *spin-trap*, sendo produzido  $\text{NO}_2$  e cPTI. O cPTI também é uma molécula paramagnética, contudo apresenta perfil espectral diferente do cPTIO.<sup>69</sup> Já na reação entre HNO e o cPTIO é gerado NO e a espécie cPTIO-H, por sua vez o NO produzido reage com cPTIO-H, gerando cPTI-H e  $\text{NO}_2$ , ambas as espécies cPTIO-H e cPTI-H são diamagnéticas, não apresentando sinal no EPR.<sup>101</sup> A Figura 49 ilustra os dois padrões espectrais dos produtos formados quando uma espécie R-PTIO reage com NO ou HNO, onde R pode ser igual a  $-\text{H}$ ,  $-\text{COO}^-$  e  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ .

Figura 49 - Desenho esquemático da discriminação de NO e HNO por EPR, a partir de sequestradores seletivos (R-PTIO). O NO e HNO ao reagirem com R-PTIO resultam na formação de produtos diferentes, o R-PTI (paramagnética) e a hidroxilamina R-PTIO-H diamagnética, respectivamente. Os espectros de EPR ilustram a transformação do padrão espectral de cinco sinais do R-PTIO para o padrão espectral de sete sinais do R-PTI (Reação com NO), ou a diminuição dos sinais correspondente a formação do R-PTIO-H até seu total desaparecimento.



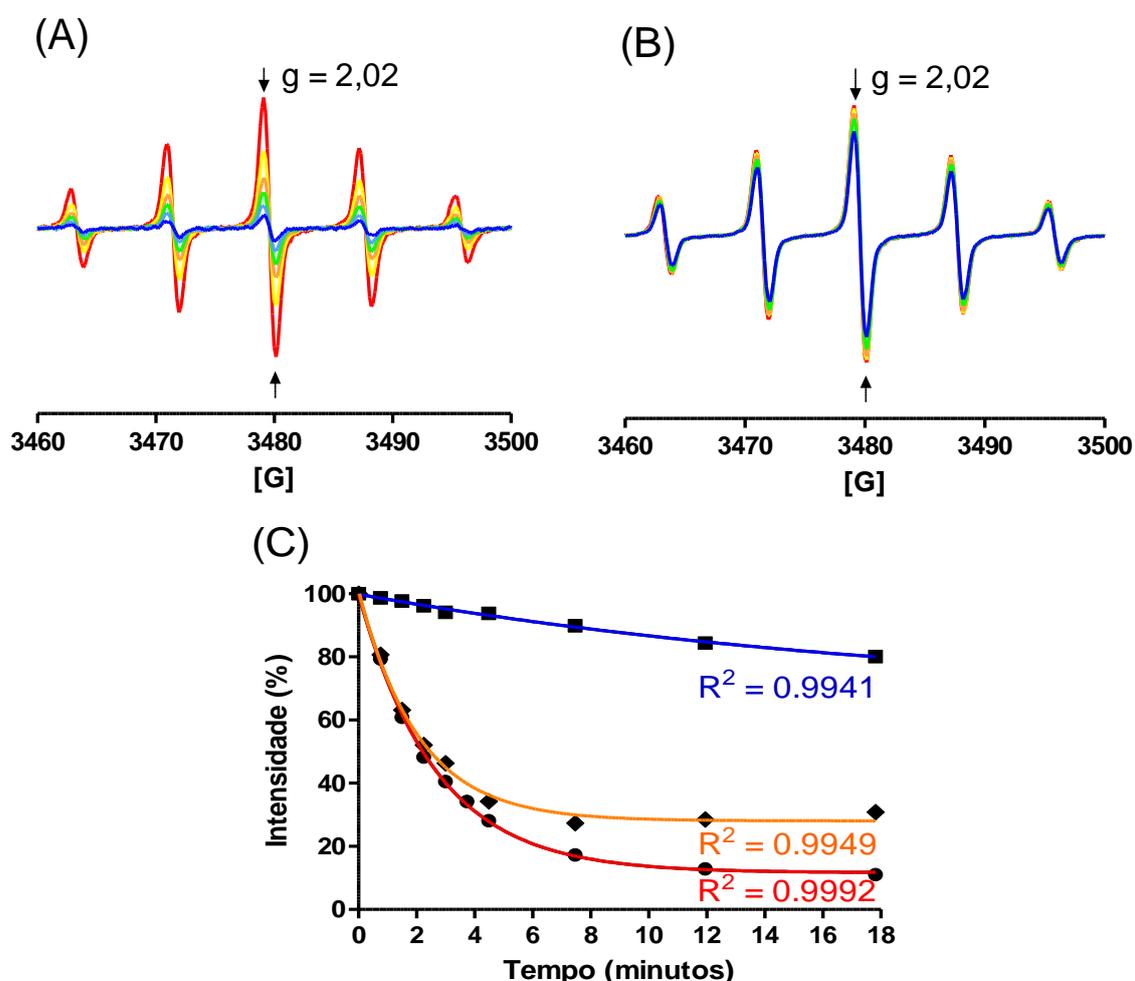
Fonte: Adaptado da referência 101.

O ensaio anterior, utilizando ATR, nos indicou que no intervalo de tempo investigado a glutathiona ao reagir com o íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  acaba por provocar o desaparecimento do estiramento característico de  $\text{NO}^+$  coordenado, contudo não nos fornece informações sobre seu destino, se estaria sendo liberado na forma de  $\text{NO}$  ou  $\text{HNO}$  ou sofrendo outro tipo de conversão. Uma forma bastante eficiente de distinguir se o complexo está liberando óxido nítrico na forma de  $\text{NO}^0$  ou  $\text{NO}^-$  é por meio da técnica de EPR utilizando *spin-traps*, por exemplo, o cPTIO.

Para isso, foi preparada uma mistura em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 contendo cPTIO ( $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), o complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), GSH ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e DTPA ( $400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A solução foi monitorada por EPR durante 18 minutos, sendo os espectros registrados em intervalos de aproximadamente 10 segundos. Na Figura 50A estão registrados os espectros de EPR da mistura contendo o *spin-trap*, o complexo e o redutor biológico. Registrou-se ainda espectros de um controle do cPTIO na ausência do complexo, nas mesmas condições experimentais,  $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de cPTIO e  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  de GSH em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, foi monitorada por 18 minutos, cujos espectros encontram-se na Figura 50B.

A Figura 50A mostra que a medida em que a reação entre o complexo e a GSH ocorre há o desaparecimento do padrão espectral de cinco sinais do cPTIO, sem que haja surgimento de outros sinais, o que, segundo a literatura,<sup>101</sup> indica reação do cPTIO com  $\text{HNO}$ , gerando a espécie diamagnética cPTIO-H. Adicionalmente, o controle com cPTIO e glutathiona provocou modesta diminuição dos sinais do espectro do cPTIO, possivelmente decorrente da redução do *spin-trap* pela glutathiona, todavia, sem comprometimento cinético da reação do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , como ilustrado na Figura 50 (B e C). Com isso, pode-se sustentar que, nas condições utilizadas, a reação do complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com glutathiona gera predominantemente  $\text{HNO}$ .

Figura 50 - A - Reação do complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  ( $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com GSH ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) via espectro de EPR do cPTIO ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A reação ocorreu na presença de DTPA ( $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). B - Espectro de EPR da mistura: GSH ( $4 \text{ mmol L}^{-1}$ ), cPTIO ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e DTPA ( $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os espectros foram registrados durante 18 minutos em intervalos de aproximadamente 10 segundos. Temperatura ambiente  $25^\circ\text{C}$ . Nas Figuras A e B estão ilustrados os espectros com tempo em 0 (—), 1,5 (—), 3,0 (—), 4,5 (—), 7,5 (—) e 18,0 (—) minutos. C - Curvas de Intensidade (%) do pico máximo em  $2,02g$  vs tempo (18 minutos) para reação entre  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , GSH e cPTIO (—), curva da reação controle entre GSH e cPTIO (—) e curva da reação entre  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , GSH e cPTIO, corrigida por meio da subtração da curva controle (—).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A literatura reporta que sob condições fisiológicas (aeróbicas, a pH 7,4) a molécula de HNO é o produto direto da reação entre  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  (NP) e excesso de  $\text{H}_2\text{S}$ .<sup>108</sup> O mecanismo proposto sugere que, neste caso, ocorre primeiro a formação do aduto

$[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SH}]^{3-}$ , em seguida outra molécula de  $\text{HS}^-$  reage com o aduto gerando HNO. O HNO é liberado ocorrendo a dimerização do mesmo com uma constante de velocidade de  $8,0 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , produzindo no final  $\text{N}_2\text{O}$  (Reação 7).<sup>11,108</sup>

Reação 7



Reações redox de nitrosilo complexos de rutênio, tais como  $[(\text{L})_5\text{Ru}(\text{NO})]^n$ , com tióis (cisteína e glutatona) também são descritos como uma sequência de adições de tióis desprotonados ( $\text{RS}^-$ ) ao ligante nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ). Assim como proposto para reação entre o SNP e tióis, o nitrosilo complexo de rutênio reage primeiro com uma molécula  $\text{RS}^-$  formando o aduto  $[\text{RuN}(\text{O})\text{SR}]^n$ , em seguida reage novamente com  $\text{RS}^-$  e por fim gera HNO, glutatona oxidada e o aquo complexo.<sup>108</sup> Logo, tendo como base a literatura e os resultados de EPR, a liberação de HNO pelo complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , se deve provavelmente a uma redução de dois elétrons provenientes de duas moléculas de GSH.

#### 4.5.3. Acompanhamento Via Stopped-flow e Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta e Visível

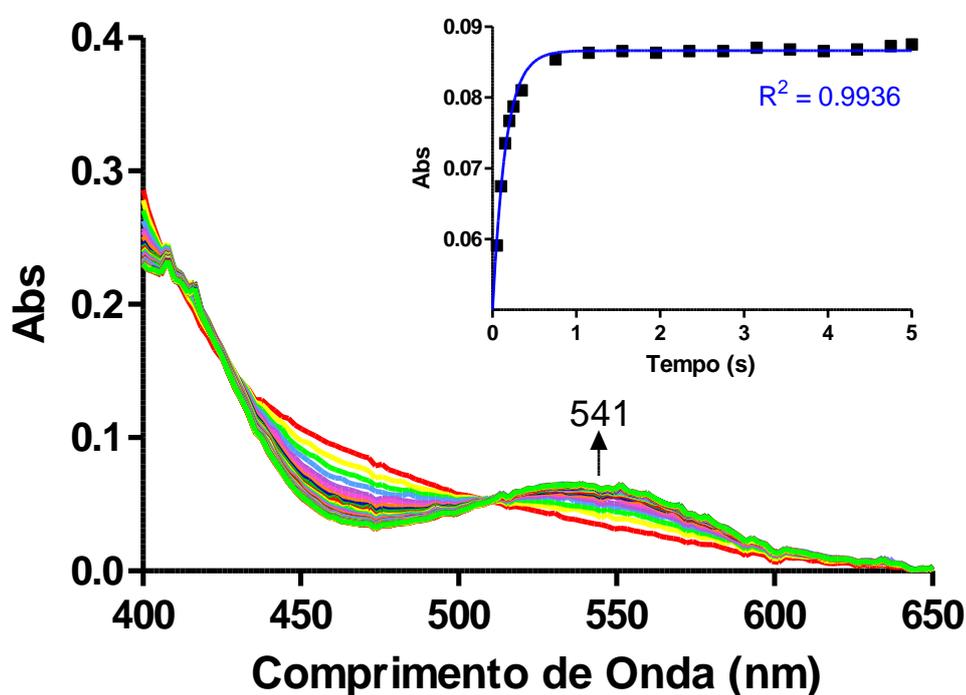
Com base em estudos cinéticos e computacionais a literatura reporta que o intermediário  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SH}]^{3-}$ , formado por meio da reação do SNP com  $\text{H}_2\text{S}$ , é responsável pelo surgimento de uma banda de absorção com valor máximo de 535 nm, em pH 7,4. Por meio de um segundo ataque nucleofílico de uma molécula de  $\text{H}_2\text{S}$ , um segundo intermediário  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})(\text{SH})_2]^{4-}$  é formado, sendo o mesmo rapidamente convertido em  $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{HNO})]^{3-}$  e  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_{5-x}(\text{SCN})_x(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$  correspondendo as bandas em 440 e 720 nm, respectivamente.<sup>110</sup> A análise cinética da reação entre o SNP e  $\text{Na}_2\text{S}$  em condições fisiológicas (aeróbias), foi monitorada pelos autores usando espectroscopia de absorção na região do UV-Vis resolvida no tempo acoplado a um dispositivo de stopped-flow (os espectros foram medidos no tempo de 2,6 s, em intervalos de 2,6 ms). Dados de espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa (GC-MS) e ressonância magnética nuclear de nitrogênio ( $^{14}\text{N}$  NMR) dão suporte a essas evidências.<sup>110</sup>

Sendo assim, com o objetivo de detectar possíveis espécies intermediárias na reação entre o íon complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  e a glutatona em condições fisiológicas e, conseqüentemente, elucidar o mecanismo reacional, a reação em questão foi

estudada por meio da técnica de stopped-flow e espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.

A reação foi monitorada por 5 segundos utilizando a técnica de stopped-flow. Para isso foi empregado uma mistura contendo o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup>) e GSH (150 mmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 a 37 °C. A reação foi realizada sob condições aeróbicas e de pseudo-primeira ordem. A Figura 51 mostra as variações espectrais referente à reação do nitrosilo complexo com o tiol medidas através da técnica de stopped-flow.

Figura 51 - Reação entre o íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e GSH acompanhada por stopped-flow. Variações espectrais na região do UV-Vis, da reação do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com glutatona em tampão fosfato 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH = 7,4 em condições aeróbicas sob temperatura de 37 °C monitorada por stopped-flow. O *inset* mostra a curva cinética correspondentes a variação espectral da banda em 541 nm ( $R^2 = 0,9936$ ).



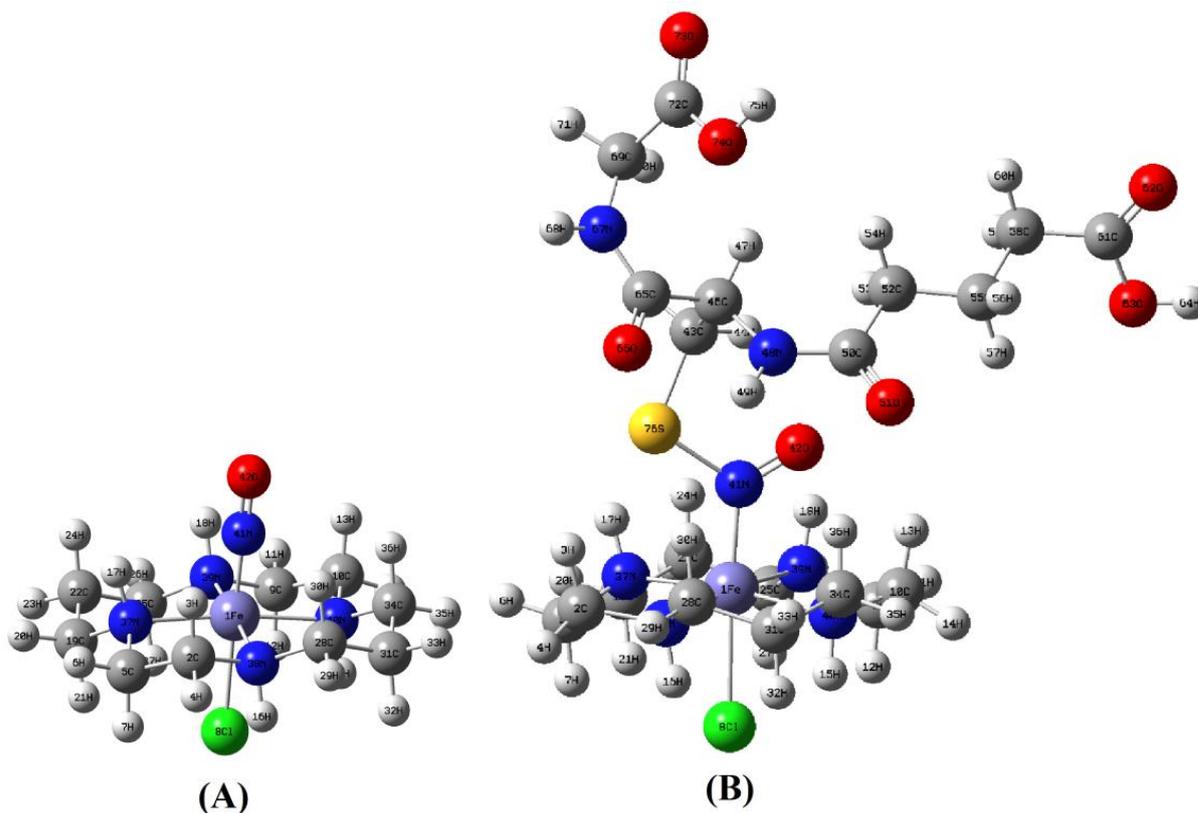
Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observado que logo após adição do tiol ocorre o aparecimento do primeiro intermediário com uma banda de absorção em torno de 541 nm, que pode ser atribuída a transição MLCT do Fe<sup>II</sup> → NO<sup>0</sup> do aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup>. Tal atribuição foi baseada em resultados reportados por Roncaroli e Olabe<sup>111</sup> para reação do SNP com cisteína. Durante a reação observou-se a existência de um ponto isobésticos em 505 nm, o qual

permaneceu inalterado durante todo o processo, sustentando processo elementar. Ainda na Figura 51 é apresentada a curva cinética para a formação do primeiro aduto em 541 nm. A formação do primeiro intermediário com banda em 541 nm depende da reação do complexo precursor com a GSH, sendo um processo ajustável a uma equação de crescimento exponencial de primeira ordem. O valor obtido de  $k_{\text{obs}}$  para o surgimento da banda em 541 foi  $4,720 \pm 0,130 \text{ s}^{-1}$ .

Estudos realizados com o nitroprussiato de sódio em condições de pH 10,<sup>111,112,113</sup> mostraram que ocorre a formação de um aduto entre o íon complexo e a cisteína, este aduto é responsável pelo surgimento de uma banda de absorção com valor máximo em 520 nm. Além disso, o mecanismo proposto para esta reação revela a existência de um processo de oxiredução onde a cisteína é oxidada e o  $\text{NO}^+$  é reduzido, sem a formação de um nitrosotiol. A estrutura eletrônica de um aduto genérico  $[(\text{X})_5\text{MN}(\text{O})\text{L}]$ , onde L é um nucleófilo, pode ser proposto com base em evidências experimentais e teóricas.<sup>111</sup> Em geral, os processos de adição envolvem uma mudança na geometria, de uma forma linear  $[(\text{X})_5\text{M}(\text{NO}^+)]$  para angular  $[(\text{X})_5\text{MN}(\text{O})\text{L}]$  do óxido nítrico na esfera de coordenação, tal evidência para esta conversão de linear para angular pode ser obtida por cálculos de DFT e espectroscopia de absorção na região do infravermelho.<sup>114</sup> As geometrias otimizadas para o íon complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  e o aduto *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{Cl})\text{N}(\text{O})\text{SG}]^+$  são mostrados na Figura 52. Os parâmetros geométricos para os átomos mais importantes envolvidos na reação (FeNO e FeNOSR) são apresentados na Tabela 7.

Figura 52 - Estrutura tridimensional otimizada utilizando DFT para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (A) e do aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup> (B) com cada átomo numerado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Parâmetros estruturais e eletrônicos calculados por DFT para a porção Fe-NO do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup>.

| Complexo  | Distância (Å) |      | Ângulo (°) | Carga Atômica de Mulliken ( <i>q</i> ) |       |       |      | Estiramento (cm <sup>-1</sup> ) | Ordem de ligação |
|---|---------------|------|------------|--|-------|-------|------|---------------------------------|------------------|
|   | Fe-N          | N-O  | FeNO       | N(41)                                  | O(42) | Fe    | S    | $\nu$ NO                        | NO               |
| <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup>    | 1,65          | 1,13 | 179,3      | 0,22                                   | 0,0   | 0,10  | -    | 1843 (T)<br>1894 (E)            | 2,28             |
| <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG] <sup>+</sup> | 1,87          | 1,22 | 123,0      | -0,14                                  | -0,22 | -0,08 | 0,31 | 1503 (T)                        | 1,85             |

(T) = Teórico e (E) = Experimental

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a formação do aduto, as distâncias interatômicas entre o metal e o nitrogênio do ligante NO aumentaram, assim como a distância e a ordem de ligação entre os átomos de

N e O, também foi evidenciado que o ângulo de ligação Fe-N-O diminuiu, os valores de carga indicam que o aduto apresenta uma densidade eletrônica sobre o ligante NO superior ao do óxido nítrico no íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>. Tais evidências caracterizam uma possível redução do óxido nítrico na esfera de coordenação de NO<sup>+</sup> para NO<sup>0</sup> por meio da reação com a glutatona. A mudança do valor teórico do estiramento  $\nu(\text{NO})$  para menor número de onda também indica a redução do ligante NO. Em relação aos dados experimentais de ATR, esperava-se ver durante a reação do nitrosilo complexo com a glutatona, o surgimento de um estiramento característico de NO<sup>0</sup> coordenado, contudo devido a alta concentração de tiol empregada, a região de 1600 a 1000 cm<sup>-1</sup> foi encoberta pelos estiramentos característicos do redutor biológico, impossibilitando ver qualquer evidência experimental da formação de NO<sup>0</sup> na esfera de coordenação do nitrosilo complexo (ANEXO VI).

O orbital LUMO (ANEXO III e IV) do nitrosilo complexo apresenta uma grande contribuição do orbital  $\pi^*$  do NO, e uma pequena parcela de contribuição do centro metálico. A ligação do NO em nitrosilo complexos do tipo MX<sub>5</sub>NO é estabilizada através da interação  $\pi$ -backbond entre os orbitais  $\pi^*$  do NO e orbitais d do metal. Esta interação é responsável por determinar a carga sobre o NO e as distâncias interatômicas na porção M-NO,<sup>114</sup> dessa forma tem-se que o efeito  $\pi$ -backbond entre o Fe e o ligante NO também é afetado com a formação do aduto.

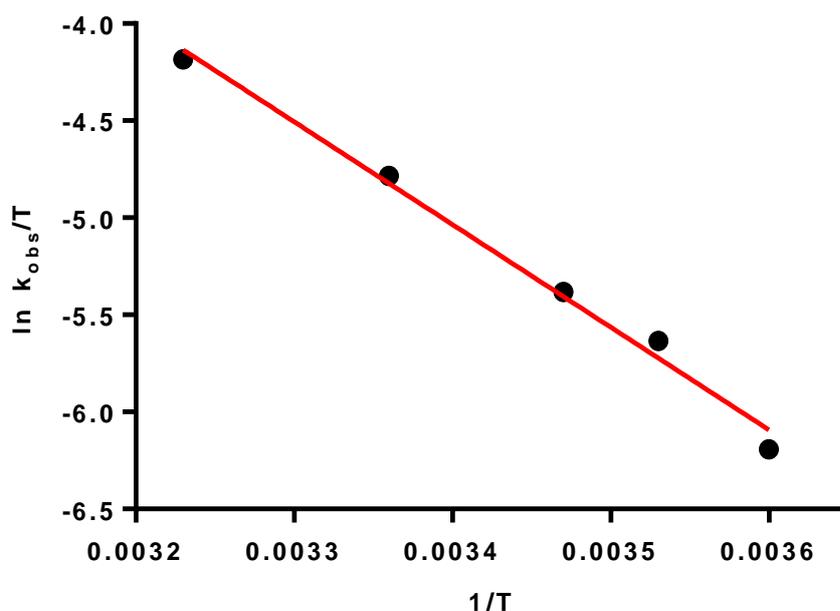
O efeito da temperatura nesta reação foi verificado em condições de pseudo-primeira ordem. Os resultados do estudo da reação encontram-se na Tabela 8, e a análise gráfica encontra-se na Figura 53.

Tabela 8 - Dependência da temperatura para a reação entre o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e glutatona.  $k_{\text{obs}}$  referentes ao surgimento da banda em 541 nm.

| Temperatura (K) | $k_{\text{obs}}$ (s <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|-------------------------------------|
|                 | 541 nm                              |
| 310             | 4,72                                |
| 298             | 2,49                                |
| 288             | 1,32                                |
| 283             | 1,01                                |
| 278             | 0,57                                |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 53 - Variação da  $k_{obs}$  com a temperatura para a reação entre o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> com glutatona.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros de ativação foram obtidos através deste estudo com valores aparentes de  $\Delta H^\ddagger = 43,97 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $\Delta S^\ddagger = -90,46 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . O valor de energia livre obtido foi de  $\Delta G^\ddagger = 28,09 \text{ kJ mol}^{-1}$ . O valor negativo para a variação de entropia pode estar relacionado com a associação das espécies GSH e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> o que indica a formação do aduto.

As energias dos orbitais HOMO e LUMO envolvidos neste tipo de reação são importantes para verificação da estabilidade dos produtos gerados (ou neste caso do aduto formado).<sup>114</sup> Por meio dos cálculos de DFT foi possível analisar e estimar os dados de energia envolvidos na reação entre o nitrosilo complexo e GSH. Os valores de variação de energia ( $\Delta E = \text{Energia dos produtos} - \text{Energia dos reagentes}$ ) e as energias dos orbitais HOMO e LUMO do íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e do aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup> estão contidos na Tabela 9. Os valores positivos de  $\Delta E$  indicam que o produto formado, em comparação ao reagente, é uma espécie instável, consistente com as condições de intermediário.

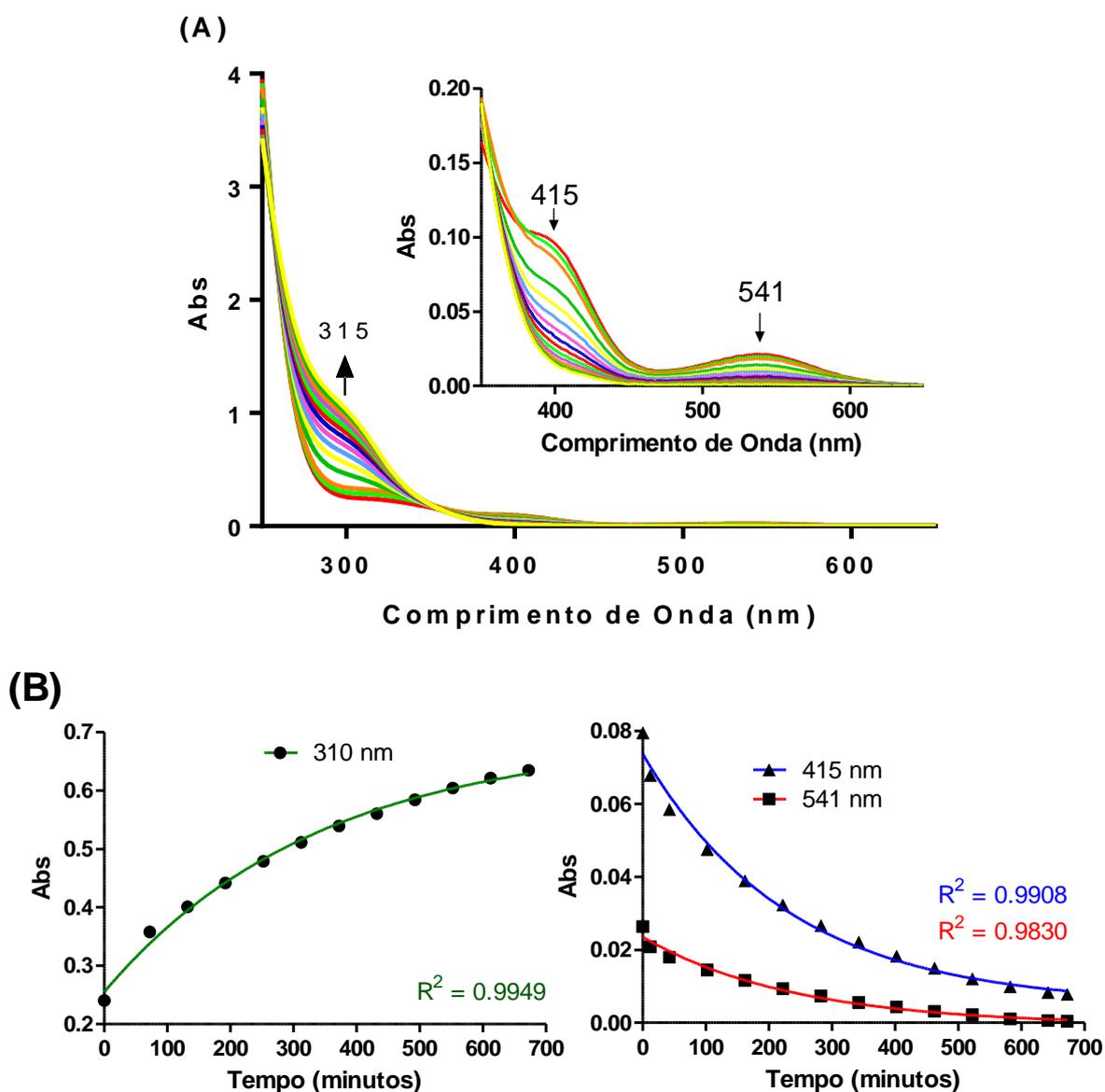
Tabela 9 - As diferenças de energia ( $\Delta E$ ) entre produto e reagentes da reação entre *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e GSH, também estão contidos as Energias (eV) dos orbitais HOMO e LUMO das espécies envolvidas.

| Complexos   | E (eV)                   |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|
|   | HOMO                     | LUMO                     |
| <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(NO)Cl] <sup>2+</sup>    | -8,29                    | -4,64                    |
| <i>trans</i> -[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG] <sup>+</sup> | -6.69                    | -3.15                    |
| $\Delta E$ (eV)                                   |                          |                          |
|   | $\Delta E_{\text{HOMO}}$ | $\Delta E_{\text{LUMO}}$ |
|   | 1,60                     | 1,49                     |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o intuito de estudar o decaimento do primeiro intermediário *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup>, e a possível formação do segundo aduto ou de outros produtos, a reação entre o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e a glutathiona foi monitorada por 12 horas através da técnica de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. Para isso foi empregado uma mistura contendo o nitrosilo complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e GSH (9  $\text{mmol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  pH 7,4 a 37 °C. A Figura 54A mostra as variações espectrais desta reação monitoradas por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. Pode-se observar na Figura 54A que o perfil do primeiro espectro é semelhante ao do espectro final do estudo realizado por stopped-flow (Figura 51), isso indica que a velocidade de reação é muito rápida, não sendo possível nessas condições acompanhar a formação do primeiro aduto através da técnica de espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. Durante a reação as bandas em 415 e 541 nm, atribuídas ao aduto *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)N(O)SG]<sup>+</sup>, decaíram lentamente com o tempo de reação a medida em que uma nova banda em 310 nm surgiu, também foi observado um ponto isosbético em 350 nm. Após o aparecimento da banda em 310 nm não foi verificado nenhuma mudança espectral que indicasse a formação de outras espécies. O ajuste das curvas cinéticas (Figura 54B) foi feito utilizando uma equação exponencial de primeira ordem, os valores de  $k_{\text{obs}}$  obtidos para as três bandas 310, 415 e 541 nm foram  $4,95 \pm 0,27 \times 10^{-5}$ ,  $5,65 \pm 0,06 \times 10^{-5}$  e  $7,17 \pm 0,13 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 54 - Reação entre o íon  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  e GSH acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis. (A) Variações espectrais da reação do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com glutatona em pH = 7,4 em condições aeróbicas sob temperatura de 37 °C. Para visualização das bandas de menor intensidade, em inset são mostradas as variações espectrais para reação em questão, em intervalos menores de abs (0 a 0,2) e comprimento de onda (350 a 650 nm). (B) Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 310, 415 e 541 nm.



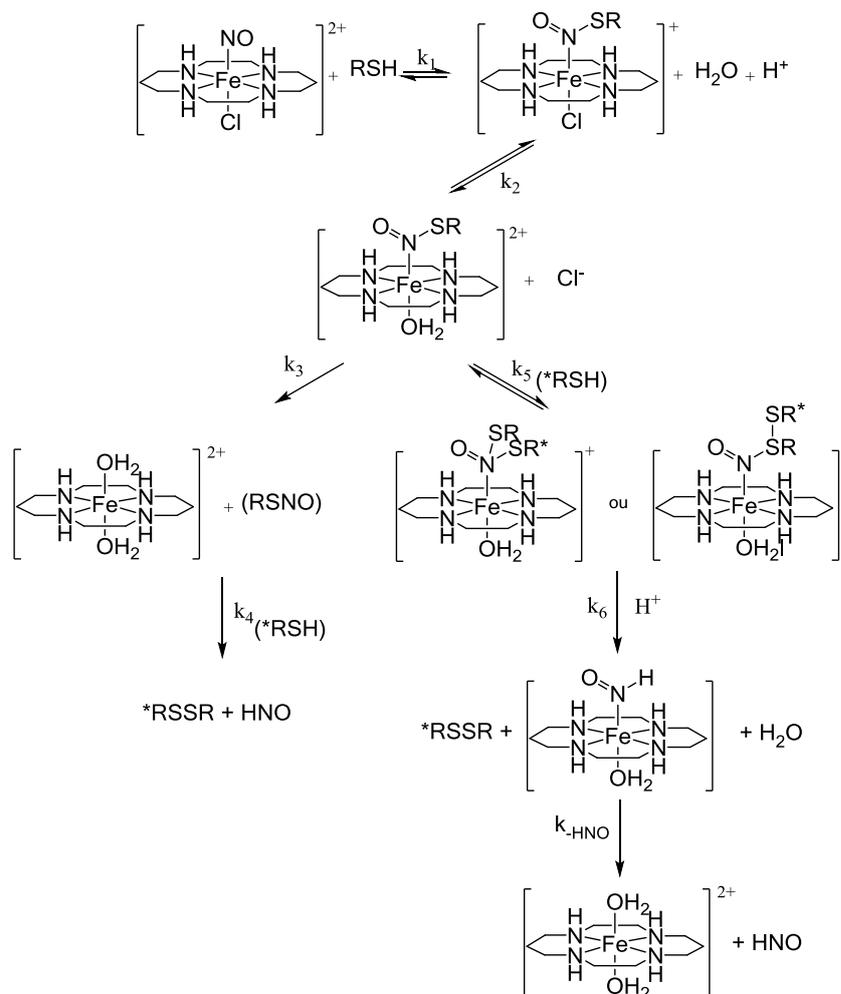
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores de constante de velocidade observável ( $k_{\text{obs}}$ ) encontrados para as bandas em 310 e 415 nm não foram significativamente diferentes, já o valor de  $k_{\text{obs}}$  encontrado para o decaimento da banda em 541 nm apresentou notável diferença quando

comparado com os valores de  $k_{\text{obs}}$  das bandas mencionadas anteriormente, o que pode indicar que a cinética de decomposição esteja sendo influenciada por outras reações, como por exemplo a saída do ligante  $\text{Cl}^-$  da esfera de coordenação após a redução do ligante  $\text{NO}^+/\text{NO}^0$  pela glutathiona. Lang e colaboradores,<sup>115</sup> reportam que a redução de  $\text{NO}^+$  coordenado ao  $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{cyclam})(\text{NO}^+)\text{Cl}]^{2+}$  resulta na formação do  $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{cyclam})(\text{NO}^0)\text{Cl}]^+$ , que apresenta uma labilização do ligante cloreto relativamente rápida ( $k = 1,5 \text{ s}^{-1}$  a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) resultando no  $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{cyclam})(\text{NO}^0)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ . Os autores determinaram a constante de labilização do ligante cloreto no composto  $\text{trans-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{cyclam})(\text{NO}^0)\text{Cl}]^+$  por voltametria cíclica e de onda quadrado, utilizando solução aquosa de trifluoroacetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4.

Os resultados de EPR indicaram que o HNO é um dos produtos gerados da reação do nitrosilo complexo com GSH em condições de pseudo primeira ordem, esse produto é um indicativo da possível formação de um segundo aduto  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})\text{N}(\text{O})(\text{SG})_2]$  ou de um nitrosotiol (GSNO).<sup>116</sup> Diante disso temos duas possíveis hipóteses para produção de HNO a partir da reação do complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com GSH, a primeira é a reação do 1º aduto com outra molécula de GSH formando o 2º aduto  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})\text{N}(\text{O})(\text{SG})_2]$  extremamente instável que se decompõe gerando HNO, glutathiona oxidada (GSSG) e o aquocomplexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ . A segunda hipótese é a possível decomposição do 1º aduto em  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  e GSNO, o nitrosotiol pode reagir com outra molécula de GSH gerando HNO e GSSG (Figura 55). Ressalta-se que nas condições empregadas neste trabalho, estas outras etapas intermediárias não puderam ser identificadas inequivocamente.

Figura 55 - Proposta para o mecanismo de produção de HNO a partir da reação do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{Cl})(\text{NO})]^{2+}$  com GSH em condições de pseudo primeira ordem.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudo da reação do SNP com espécies RSH, por exemplo,  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ , glutatona (GSH), cisteína e outros tióis, têm revelado que a formação do aduto  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{(n+2)-}$  produto primário da reação, é a fonte de várias espécies reativas, como por exemplo, dissulfeto (RSSR),  $\text{RS}^*$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ , HNO e NO. Os mecanismos de formação e a natureza química destas espécies são altamente dependentes do pH, de  $\text{O}_2$  e da estrutura do tiol.<sup>108</sup> Diante disso e do mecanismo mencionado na Figura 55, é notório, que para entender a reação do íon complexo  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  com tióis de forma mais completa, é necessário um estudo mais detalhado, afim de verificar a influência de diferentes tipos de tióis e do pH, além da relevante determinação da taxa de liberação do ligante cloreto na formação do 1º aduto, identificando também outros possíveis produtos (glutatona oxidada (RSSR)), o 2º aduto  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{H}_2\text{O})\text{N}(\text{O})(\text{SG})_2]$  e  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{HNO})\text{H}_2\text{O}]$ . Contudo, os

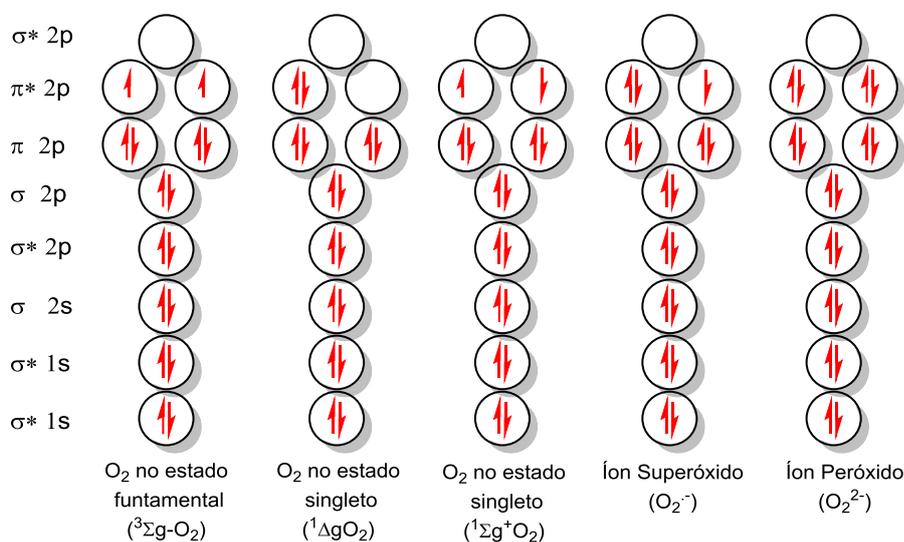
resultados apresentados no presente trabalho fornecem importantes elementos para o entendimento da reação do nitrosilo complexo com GSH em condições fisiológicas. Além disso este complexo se mostra como promissor agente liberador de HNO, em meio fisiológico contendo o redutor GSH.

#### 4.6. Atividade Sequestradora de Íon Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

Espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), podem ser geradas endogenamente como no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, ou por meio de agentes exógenos, tais como compostos xenobióticos.<sup>117</sup> Quando ROS sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante celular, ocorre o estresse oxidativo. O estresse oxidativo resulta em danos a ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, e tem sido apontado como agente promotor de doenças como Alzheimer, doença de Parkinson e praticamente todas doenças cardiovasculares.<sup>117,118</sup>

O radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é gerado pela redução de oxigênio molecular, por meio da adição de um elétron ao orbital  $\pi^*2p$  da molécula (Figura 56).<sup>119</sup> Apesar de ser um fraco oxidante,<sup>55</sup> o  $O_2^{\cdot-}$  pode ocasionar sérios danos em biomoléculas, quando associado com outras espécies radiculares, o mesmo atua como redutor em reações contendo metais de transição, geralmente  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ , e também na produção de fortes oxidantes denominados de radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), a partir da reação com o NO (Reação 8).<sup>120,121</sup>

Figura 56 - Versão simplificada da ligação na molécula de oxigênio e seus derivados.



Fonte: Adaptado da referência 119.

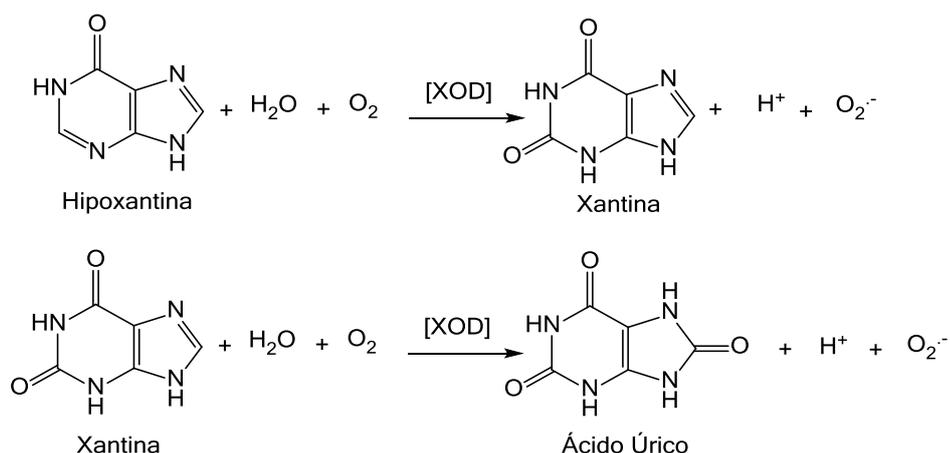
## Reação 8



Desta forma, a reação do NO com  $\text{O}_2^{\bullet-}$  leva a efeitos pró-oxidantes, induzindo ao stress oxidativo. Contudo, de uma perspectiva antioxidante, o NO coordenado, particularmente na forma de  $\text{NO}^+$ , pode desviar a reatividade do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  frente a uma molécula-alvo ou inibir reações particularmente citotóxicas. Em baixas concentrações,  $\text{ONOO}^-$  pode atuar como uma molécula de sinalização, que explica os efeitos citoprotetores que têm sido relatados em ambos os sistemas vasculares e plaquetários.<sup>120</sup>

A produção do radical ânion superóxido pode ser mediada através da enzima xantina oxidase (XOD) e a hipoxantina, uma vez que enzima cataliza a oxidação do substrato hipoxantina usando oxigênio e levando-a a xantina, em etapas posteriores a enzima oxida o produto xantina a ácido úrico, somando estas duas etapas temos a produção de dois equivalentes do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Reação 9).<sup>119</sup>

## Reação 9



Ensaio *in vitro* têm demonstrado a redução do ferricitocromo c ( $\text{Cit-c Fe}^{\text{III}}$ ) pela espécie química  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , a redução do citocromo c pelo íon superóxido é bastante seletiva e acarreta no surgimento de uma banda característica em 550 nm, correspondente ao estado de oxidação  $\text{Fe}^{2+}$  do grupo heme ( $\text{Cit-c Fe}^{\text{II}}$ ). Uma vez que essa espécie pode causar danos aos sistemas biológicos, como citado anteriormente, é promissora a utilização de tal metodologia para a investigação de agentes que possam funcionar como sequestradores de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .<sup>122</sup>

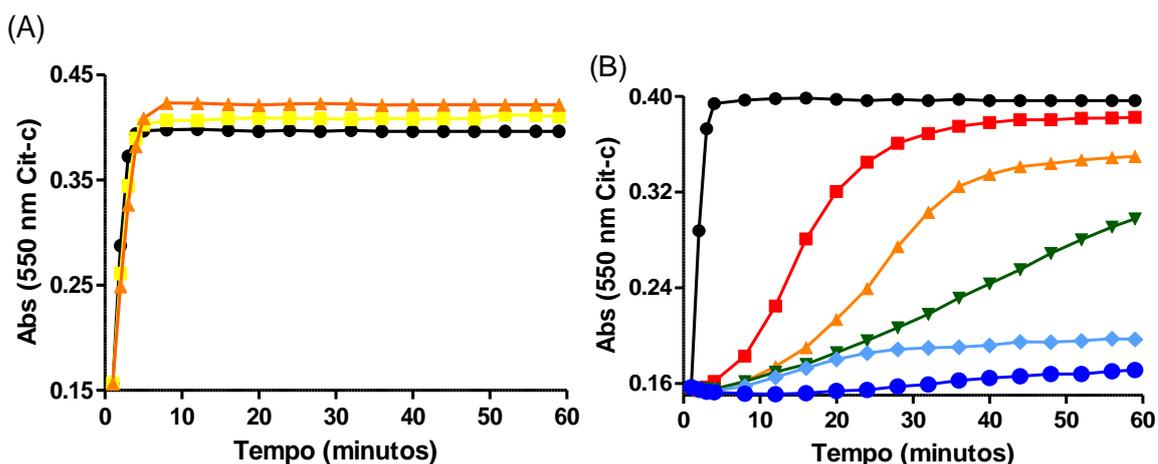
Com o objetivo de verificar se o complexo precursor  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  e o complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  possuem algum efeito sequestrante de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , foram realizados ensaios *in vitro*, via redução do Citocromo-c. Catalase (CAT) também foi utilizada

para eliminação de possíveis traços de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que eventualmente são gerados durante a reação enzimática. As medidas cinéticas foram realizadas através do monitoramento da banda em 550 nm, correspondente ao surgimento do produto Cit-c  $\text{Fe}^{\text{II}}$  quando em reação com superóxido.

A ação sequestradora de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dos complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  e *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  foi avaliada por meio da utilização de uma mistura contendo xantina oxidase ( $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e hipoxantina ( $122 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), para produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , catalase ( $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para eliminação de traços de  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerados, e citocromo c ( $64 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). As reações foram realizadas em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 60 minutos. Foram realizados controles reacionais onde a mistura acima descrita foi empregada na ausência dos complexos metálicos.

Os ensaios com o íon complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  foram realizados utilizando  $300$  e  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos nas formas de curvas cinéticas da  $\text{Abs}_{\text{max}}$  em 550 nm versus o tempo de reação (Figura 57).

Figura 57 - Efeito dos complexos como possíveis sequestradores de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Os resultados foram expressos em absorbância vs tempo (minutos), considerando a máxima formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em 550 nm, através da redução do Citocromo-c, comparados ao controle (ausência de complexo). As reações ocorreram num período de 60 minutos. (A) Reações na presença de  $0$  ( $\bullet$ ),  $300$  ( $\blacksquare$ ) e  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) do complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ . (B) Reações na presença de  $0$  ( $\bullet$ ),  $100$  ( $\blacksquare$ ),  $200$  ( $\blacktriangle$ ),  $300$  ( $\blacktriangledown$ ),  $400$  ( $\blacklozenge$ ) e  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\bullet$ ) do complexo *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ . As demais espécies utilizadas em todas as reações foram: Xantina Oxidase ( $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Hipoxantina ( $122 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Catalase ( $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Citocromo-C ( $64 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

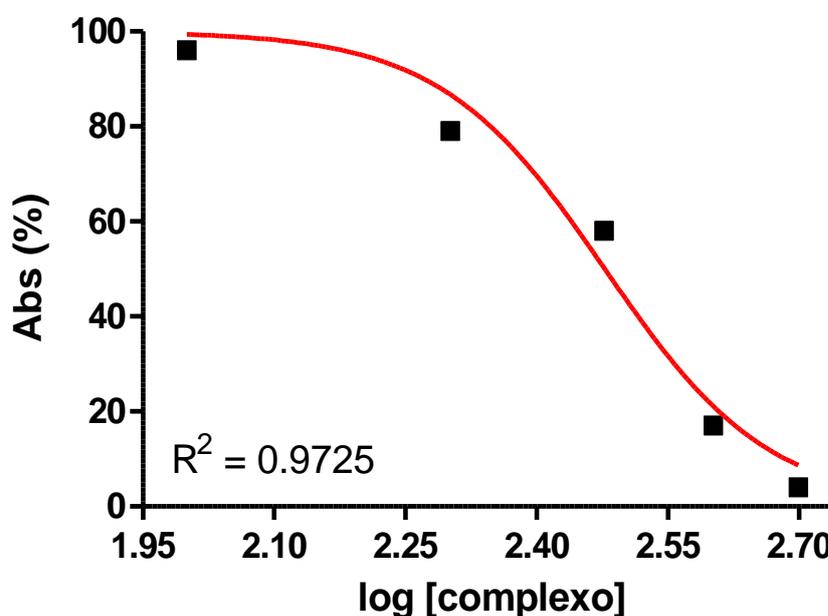


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 57A, observou-se idêntico perfil das curvas cinéticas de detecção de superóxido, sugerindo que o complexo  $trans\text{-[Fe(cyclam)Cl}_2\text{]}^+$ , mesmo na máxima concentração de  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , não apresentou qualquer efeito frente ao íon superóxido.

A atividade sequestradora de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  promovida pelo íon  $trans\text{-[Fe(cyclam)(NO)Cl]}^{2+}$ , foi avaliada utilizando 100, 200, 300, 400 e  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo. A Figura 57B exibe as curvas cinéticas obtidas ( $\text{Abs}_{\text{max}}$  em 550 nm versus o tempo) para cada concentração de nitrosilo complexo, o que pode ser comparado ao da reação na ausência do complexo. Com o aumento de concentração do complexo no meio, observou-se um incremento da ação supressora do sistema superóxido/citocromo c. A concentração mínima do complexo  $trans\text{-[Fe(cyclam)(NO)Cl]}^{2+}$  necessária para reduzir em 50% a concentração máxima de geração de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), que foi calculada a partir da curva sigmoideal do percentual da  $\text{Abs}_{\text{max}}$  em 550 nm versus o logaritmo decimal da concentração de complexo (Figura 58), foi  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\pm 1,05$ ) ( $R^2 = 0,9725$ ). Neste caso como o complexo apresentou efeito sobre o sistema superóxido/citocromo c, seria necessário a realização do experimento na ausência de citocromo c para excluir qualquer atividade de inibição da enzima xantina oxidase ou reação com a hipoxantina.

Figura 58 - Curva de atividade sequestradora de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para o íon complexo  $trans\text{-[Fe(cyclam)(NO)Cl]}^{2+}$  em diferentes concentrações.  $\text{IC}_{50} = 300 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\pm 1,05$ ) ( $R^2 = 0,9725$ ).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A marcante diferença de reatividade entre o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, pode ser atribuída a presença do ligante NO<sup>+</sup> coordenado, que por sua vez pode reagir com o ânion radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, consumindo-o e assim bloqueando sua reação com o Cit-c Fe<sup>III</sup>. Tais resultados revelam que o nitrosilo complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em condições fisiológicas pode atuar como possível agente antioxidante.

#### 4.7. Clivagem de DNA Plasmidial

As nucleases são enzimas capazes de clivar, ou quebrar a ligação fosfodiéster da molécula de DNA.<sup>51</sup> Existe interesse significativo no desenvolvimento de nucleases artificiais como ferramentas em biotecnologia bem como para fins farmacológicos, tal como agentes com potencial atividade antitumoral. Diversos estudos relatam atividade DNA nuclease promovida por compostos metálicos, muitas vezes ocasionada por estímulo luminescente<sup>123</sup> ou agentes biológicos, como por exemplo o peróxido de hidrogênio,<sup>33</sup> o que torna tais compostos candidatos no combate ao câncer bem como potenciais microbicidas. Além das medidas de atividade clivadora de DNA, tem-se também buscado a elucidação mecanística destes processos.

Com o intuito de avaliar tais propriedades, estudou-se a capacidade dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em provocarem clivagem do DNA plasmidial através de vários estímulos: térmico, luminoso, nos comprimentos de onda de 350 e 460 nm, presença de glutathione, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem como o efeito de inibidores de radicais livres e força iônica na tentativa de elucidação mecanística.

A análise dos possíveis mecanismos de clivagem do DNA plasmidial foi realizada via ensaios de eletroforese em gel de agarose. As diferentes formas que a molécula de DNA plasmidial pode se apresentar confere mobilidade eletroforética distinta, possibilitando assim sua separação e quantificação em gel de agarose, tal como discutido anteriormente.<sup>38,39</sup>

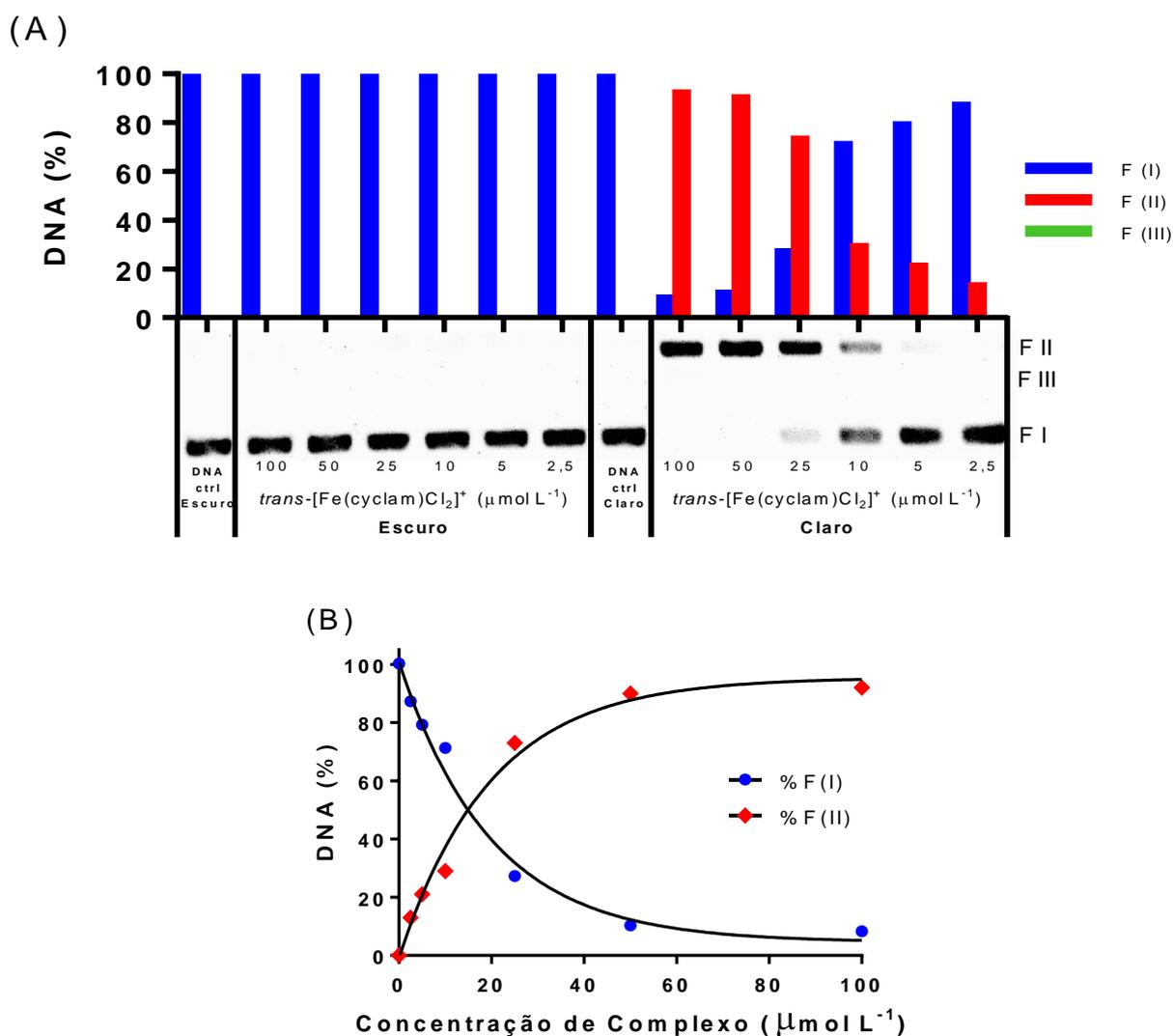
A distância que a banda ou fragmento percorre a partir do ponto de aplicação no gel é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel, sendo possível identificar fragmentação e outras interações. Para isso utiliza-se no gel vários controles bem como um marcador de DNA linear, chamado DNA *ladder*, que possui diversos tamanhos de fitas lineares de DNA e que pode auxiliar a identificar as diferentes formas do DNA e tamanhos.<sup>38</sup>

#### 4.7.1. *Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Ausência e Presença de Luz*

Para verificar possíveis efeitos de clivagem provocado pelos complexos no DNA, ocasionados pela luz, inicialmente foram preparadas misturas de DNA plasmidial em concentrações decrescentes dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> nas concentrações de 100, 50, 25, 10, 5 e 2,5 μmol L<sup>-1</sup>. Em seguida foram avaliadas possíveis interações após 60 minutos de incubação na ausência e na presença de irradiação de luz em 350 nm.

Nessas condições foi possível observar que para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (Figura 59-A), apenas a Forma I (FI) é observada na ausência de luz, similar ao DNA controle (DNA ctrl), onde o complexo esteve ausente. Todavia, sob irradiação de luz (350 nm) por 60 minutos, foi possível observar a redução da quantidade de FI e o surgimento da FII, o que indica claramente clivagem do DNA, com corte em uma fita originando a espécie de DNA circular relaxado. À medida que a concentração de complexo diminuiu observa-se a concomitante intensificação da FI, indicando que a mesma permaneceu inalterada, enquanto há desaparecimento da FII, reforçando uma dose dependente da concentração do complexo, observado na Figura 59B. Assim temos que o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> estimulado pela luz promove clivagem, uma vez que o DNA controle mesmo quando irradiado, nas mesmas condições, não apresentou qualquer indício de clivagem.

Figura 59 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) sob irradiação de luz (claro, 350 nm) e na ausência de luz (escuro) por 60 minutos. (A) Gráfico de barras do percentual de DNA clivado pelo complexo em questão em diferentes concentrações e estímulos (claro e escuro). (B) Curvas cinéticas de percentual de (%) DNA fotoclivado (F (I e II)) por concentração de complexo.

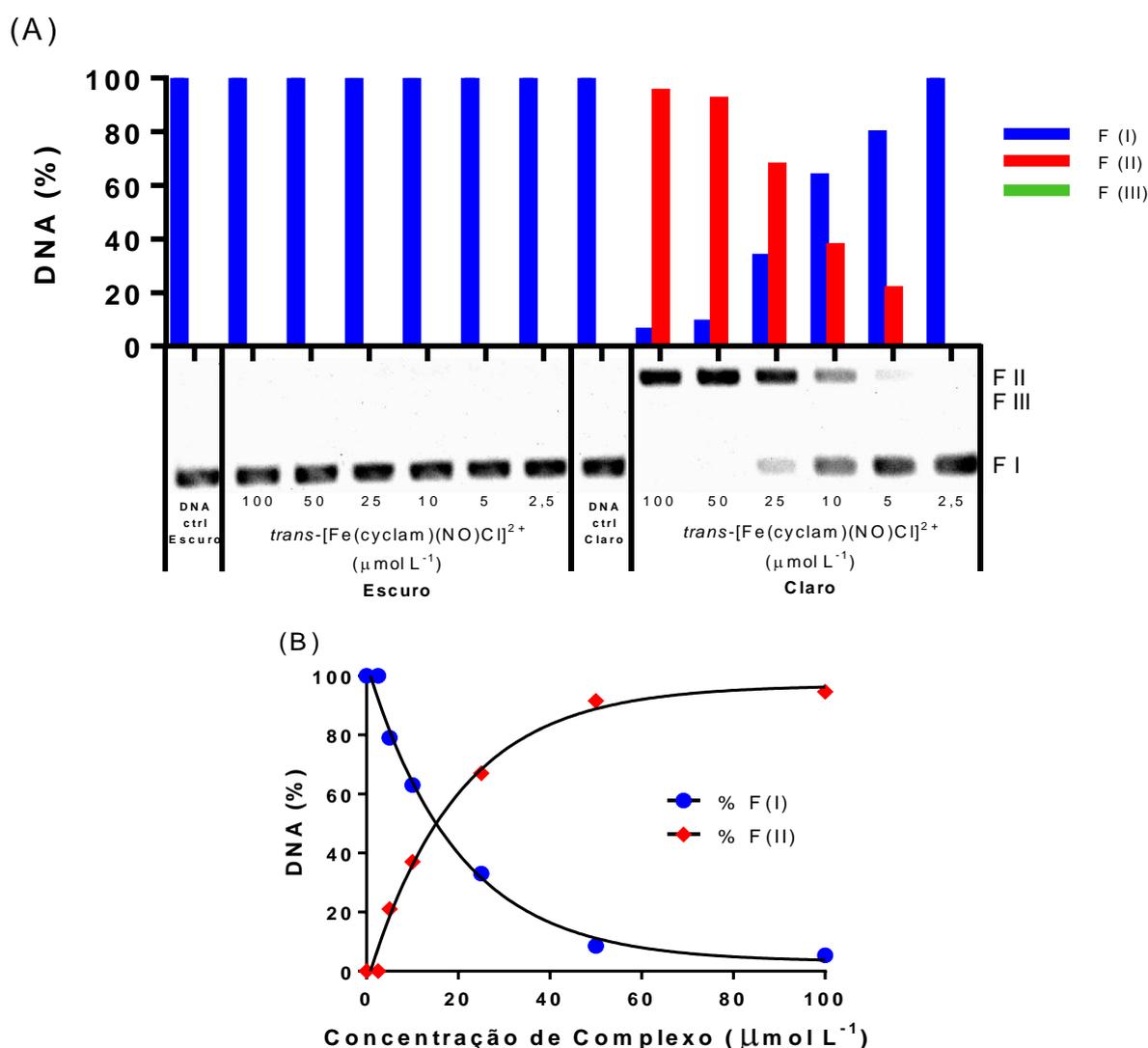


Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação ao complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  (Figura 60A), nas mesmas condições que as empregadas para o complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ , também foi possível verificar que sem estímulo luminoso não há qualquer dano ao DNA, na escala de tempo do experimento. Porém, quando a mistura foi exposta a irradiação luminosa foi observada a

clivagem do DNA com a formação da FII, que se mostrou dependente da concentração do complexo (Figura 60B).

Figura 60 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no Claro (350 nm) e no Escuro por 60 minutos. (A) Gráfico de barras do percentual de DNA clivado pelo complexo em questão em diferentes concentrações e estímulos (claro e escuro). (B) Curvas de percentual de (%) DNA clivado (F (I e II)) por concentração de complexo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

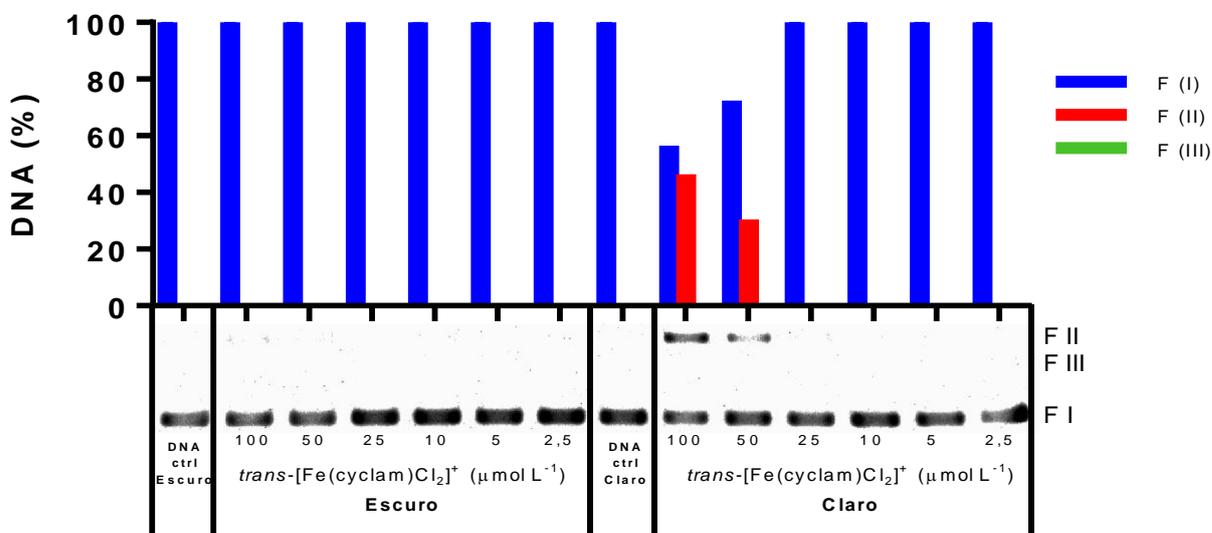
Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para conversão de FI para FII foram de  $22,8 \pm 5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9804$ ) e  $23,0 \pm 6,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9759$ ) para os complexos  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  e

*trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, respectivamente. Com base nos dados de IC<sub>50</sub>, a atividade nuclease de ambos complexos nessas condições fora idêntica estando dentro do erro experimental. Inicialmente, esperávamos atividade nuclease apenas do composto *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, já que, como mencionado anteriormente, a fotoindução possibilita a produção de NO que é um radical, espécie reportada como promotora de danos ao DNA, apesar de ser uma dos agentes menos eficientes para esse fim.<sup>102</sup> Entretanto, ambos os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> atuaram clivando o DNA por meio de excitação em 350 nm.

Como verificado anteriormente, o aquo complexo *trans*-[Fe<sup>III</sup>(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> é um dos produtos da fotoliberação do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>,<sup>67</sup> logo levantou-se a hipótese do complexo *trans*-[Fe<sup>III</sup>(cyclam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>, que também é um dos possíveis produtos do sistema *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> em solução aquosa,<sup>95</sup> estar promovendo a fotoclivagem. Tal hipótese motiva posteriores estudos, objetivando a elucidação da possível via mecanística promotora da clivagem. O fato dos dois complexos exibirem atividade nuclease idêntica dentro do erro experimental, indica que o NO apresenta baixa atividade nuclease.<sup>60</sup>

Da mesma forma como no experimento anterior, foram preparadas misturas de DNA plasmidial com concentrações decrescentes dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, nas concentrações de 100, 50, 25, 10, 5 e 2,5 μmol L<sup>-1</sup>, os quais foram incubadas no escuro e na presença de luz em 460 nm por 60 minutos, sendo avaliadas possíveis interações e dano ao DNA. A Figura 61 ilustra estes resultados, em que foi possível observar clivagem somente sob ação da luz, neste caso em 460 nm, para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (Figura 61). Todavia, a eficiência deste comprimento de onda é bem reduzida sendo somente possível observar clivagem nas concentrações de 100 a 50 μmol L<sup>-1</sup> do complexo.

Figura 61 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço) e o íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no Claro (460 nm) e no Escuro por 60 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

À medida que a concentração de complexo foi reduzida, a FI permaneceu intacta enquanto a FII foi gradualmente menos gerada, tal como no experimento anterior onde foi empregado o comprimento de onda de 350 nm, contudo a eficiência de clivagem foi bem inferior, quando comparamos os percentuais da FII para  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) nos diferentes comprimentos de onda (Tabela 10). Todavia, devido não termos realizado medidas de rendimento quântico, o que corrigiria diferenças de potências de lâmpadas, não podemos atribuir tal efeito menos pronunciado a menor eficiência do comprimento de onda, ainda que as bandas de transição eletrônica desses complexos estejam mais próximos de 350 nm do que 460 nm.

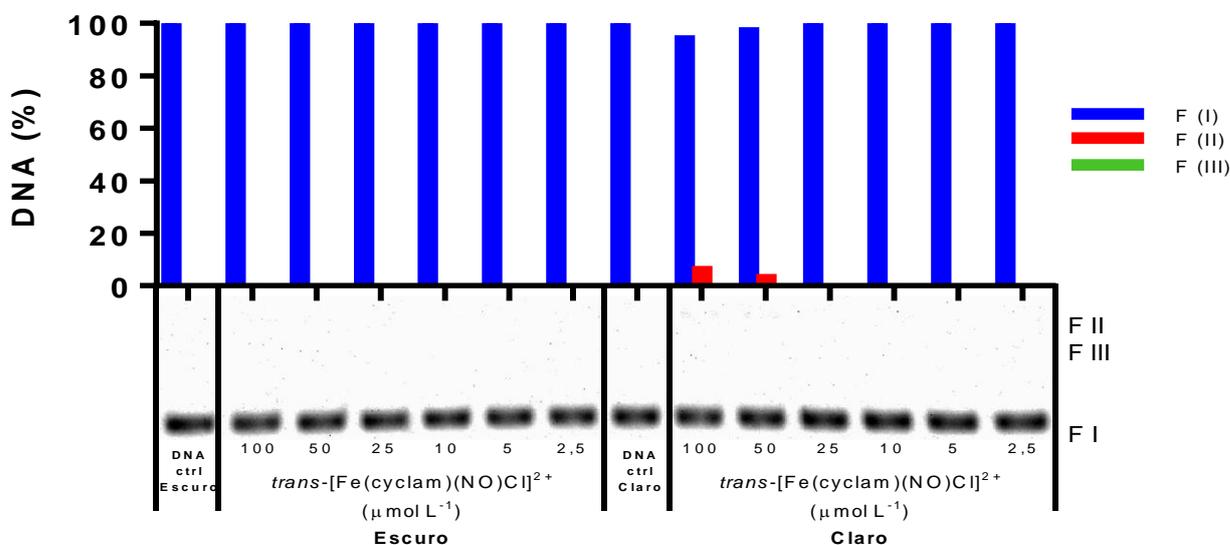
Tabela 10 - Percentual da forma II do DNA plasmidial, promovido por 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo e radiação em 350 e 460 nm.

| $\lambda$ aplicado (nm) | Percentagem de Clivagem (Fita II) com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de |  |
|-------------------------|---|--|
|                         | $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$              | $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ |
| 350                     | 98%   | 95%  |
| 460                     | 45%   | 6%   |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (Figura 62), nas mesmas condições empregadas para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, verificou-se que as únicas condições onde ocorreu o surgimento da FII foi na presença de luz e nas concentrações de 100 a 25 μmol L<sup>-1</sup>, porém a clivagem não foi tão efetiva, já que mesmo a maior concentração de *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> empregada (100 μmol L<sup>-1</sup>) só foi capaz de clivar cerca de 6% do DNA (Tabela 10).

Figura 62 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4 μmol L<sup>-1</sup> em cada poço) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> em diferentes concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 2,5 μmol L<sup>-1</sup>) no escuro e no claro (460 nm) por 60 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de IC<sub>50</sub> para conversão da forma I em forma II usando os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, nas condições anteriormente descritas, não foram obtidas já que a concentração máxima empregada de 100 μmol L<sup>-1</sup> não promoveu clivagem acima de 50% (Tabela 10).

Ambos os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> atuaram como fracos fotoclivadores do DNA por meio de excitação em 460 nm, porém o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> promoveu maior clivagem do DNA comparado ao complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>. Este comportamento não era esperado para os complexos já que a literatura reporta que os mesmos não apresentam bandas de absorção no espectro eletrônico

na região de 460 nm, que possibilitaria estímulo eletrônico e por seguinte a atividade nuclease. Estudos preliminares já estão em andamento tendo como objetivo desvendar tal via mecanística.

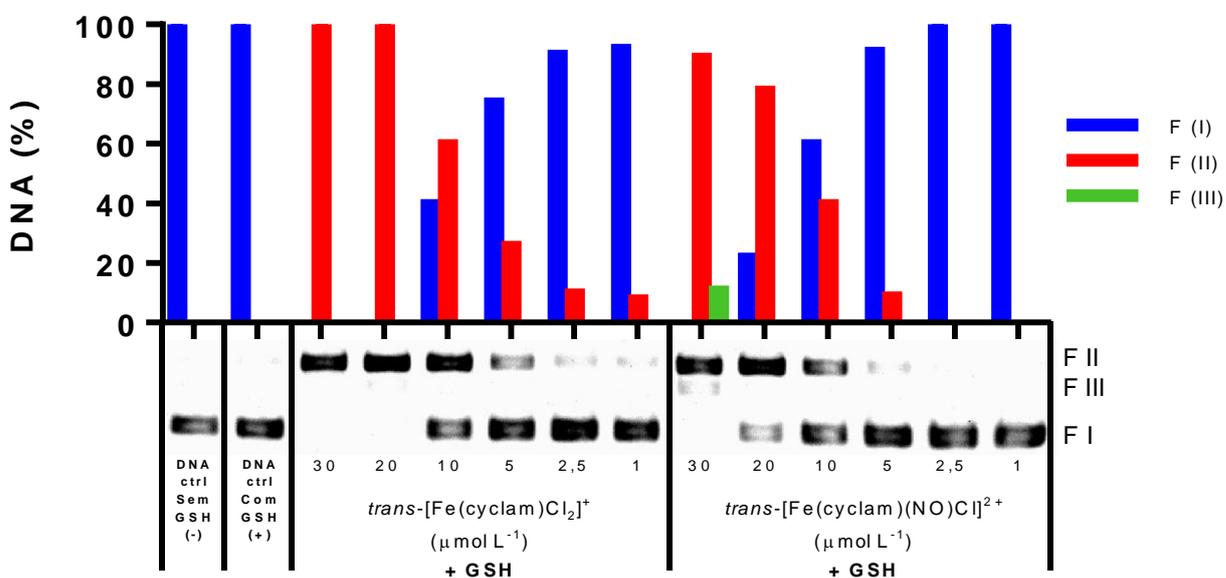
#### **4.7.2. Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Presença de Glutathione**

A glutathione (GSH) está presente no citosol das células numa faixa de concentração de 0,1 - 10 mmol L<sup>-1</sup>. A GSH ajuda a proteger as células dos intermediários reativos de oxigênio, danos causados pela radiação UV, e metais pesados com características tóxicas, isso devido à sua facilidade em ser oxidada gerando a espécie dissulfeto (GSSG, °E' = -0,246 V vs NHE em tampão fosfato pH 7,4).<sup>32</sup> Diante do fato que esses complexos encontrarão em meio fisiológico glutathione reduzida em quantidades expressivas, torna de significativa relevância realizar estudo com eles e DNA na presença de glutathione. Adicionalmente, os estudos de reatividade química provocados pela glutathione foram descritos nesta dissertação, cabendo aqui avaliar possíveis efeitos frente a biomoléculas, como DNA.

Na literatura, é relatado que a glutathione atua como supressora de espécies reativas de oxigênio (ROS),<sup>32</sup> espécies essas que podem promover a quebra do DNA.<sup>124</sup> A GSH também desempenha um papel na redução de alguns íons metálicos, tais como a Pt(IV). Por outro lado, a GSH pode ligar-se a Pt(II), inibindo a ligação do complexo ao DNA assim contribuindo para a resistência à cisplatina em células tumorais.<sup>32</sup> Além disso, glutathione pode ser cataliticamente oxidada por complexos de cobre gerando espécies reativas de oxigênio, similarmente ao descrito para ácido ascórbico com metais de transição.<sup>125,33</sup>

Com o intuito de avaliar os efeitos citados acima, foi realizada a medida de eletroforese em gel de agarose usando DNA. Foram empregados 10 mmol L<sup>-1</sup> de GSH e os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> nas concentrações de 30, 20, 10, 5, 2,5 e 1 μmol L<sup>-1</sup>. As misturas foram encubadas por 90 minutos protegidas da luz (Figura 63).

Figura 63 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço), GSH (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e o íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  e  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  nas seguintes concentrações 30, 20, 10, 5, 2,5 e 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de complexo. Reação ocorreu durante 90 minutos. (DNA ctrl - = somente DNA e DNA ctrl + = DNA com GSH).



Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor de  $\text{IC}_{50}$  para conversão da forma I em forma II, nessas condições, foi de  $24,7 \pm 11,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9704$ ) para o composto  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ , enquanto que o valor de  $\text{IC}_{50}$  para  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  não foi determinado uma vez que os valores experimentais não se ajustaram a curva teórica. Contudo, por meio dos valores apresentados pelos gráficos de barras na Figura 63, pode-se estimar que o valor da concentração de complexo que provoca cerca de 50% de clivagem está entre 20 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , valor este muito próximo ao obtido para o complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ .

A Figura 63 ilustra o efeito provocado pela presença de GSH frente ao DNA, tendo sido utilizados 2 controles com DNA plasmidial, um contendo (+) GSH e outro sem (-) GSH. Nos controles não foi observado qualquer alteração na migração ou intensidade do DNA, sustentando que na ausência do complexo GSH não apresenta influência alguma sobre a clivagem do DNA nessas condições.

Os ensaios contendo o complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ , na presença de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de GSH, ilustraram a total conversão da FI em FII na concentração mais alta de complexo

empregado. Similar comportamento foi observado para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, todavia para esse complexo, na concentração de 30 μmol L<sup>-1</sup>, a forma III foi observada, o que indica dupla clivagem da molécula de DNA e sua linearização.

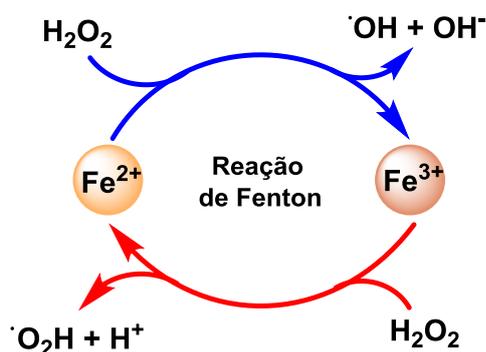
Essa aparente atividade melhorada para o complexo nitrosila pode ser devido à presença do ligante NO, já que a literatura reporta que por meio da reação de nitrosilo complexos com GSH poderia ocorrer a liberação NO e ou HNO,<sup>107,108</sup> que podem atuar como clivadores adicionais de DNA. Nesta dissertação foi observado que o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> ao reagir com GSH libera HNO, a literatura reporta que o HNO apresenta a capacidade de provocar danos ao DNA com maior eficiência que o NO,<sup>60</sup> logo podemos atribuir a maior capacidade de clivagem do nitrosilo complexo graças a sua capacidade de liberar HNO ao reagir com GSH.

Considerando a concentração de GSH nas células e seu papel como um agente que impede possíveis danos ao DNA,<sup>32,126</sup> estes resultados se mostram bastante promissores, indicando esses compostos como potenciais agentes antitumorais ou microbicidas, o que requer estudos *in vivo* para validação dessas propriedades. Adicionalmente, estudos em atmosfera anaeróbica serão realizados com o objetivo de avaliar o papel que os ROS têm nesse processo.

#### 4.7.3. Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Presença de Peróxido

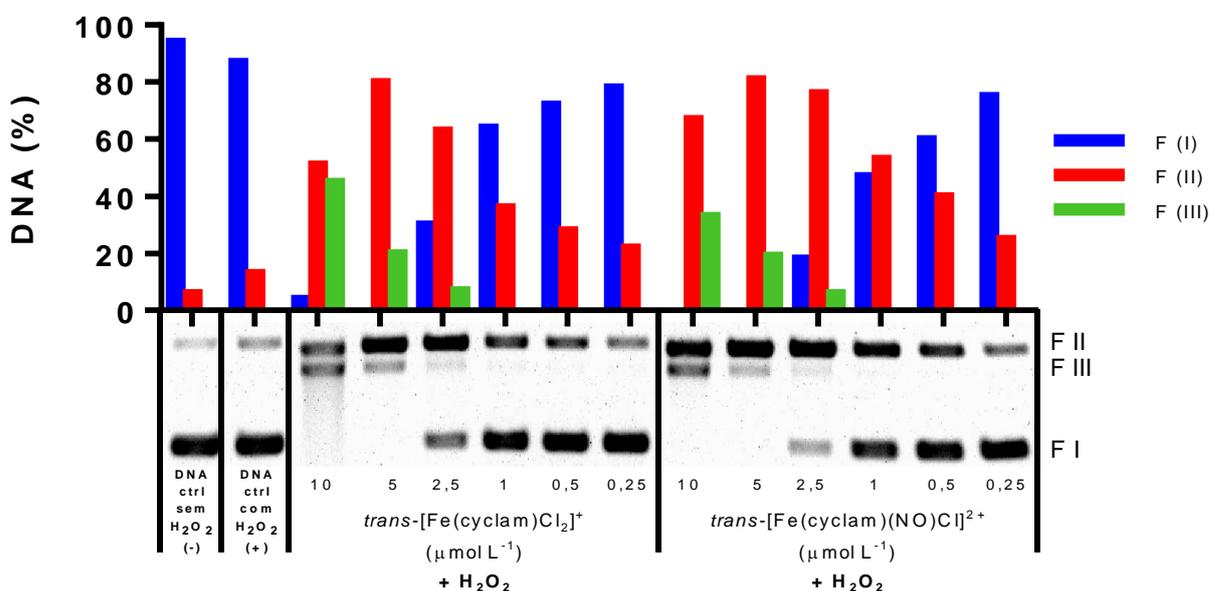
Além da luz, agentes biologicamente relevantes como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) podem promover a clivagem de DNA através da geração induzida de radicais livres.<sup>127</sup> O peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição pode induzir a formação do radical <sup>•</sup>OH, onde o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atuará como agente oxidante mudando o estado de oxidação do metal, numa reação também conhecido como reação de Fenton (Reação 10),<sup>128</sup> correspondendo a um mecanismo de clivagem por via oxidativa.

Reação 10



Desta forma, avaliou-se o efeito que o peróxido de hidrogênio apresentaria em conjunto com os complexos metálicos no período de 1 hora na ausência de luz. Para isso as amostras foram preparadas por meio da mistura de DNA plasmidial (3,5 ng/μL em cada poço) com concentrações decrescentes dos complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> variando de 10 a 0,25 μmol L<sup>-1</sup>, mais peróxido de hidrogênio na concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup>. Controles foram preparados na ausência dos complexos, contendo somente DNA e outro contendo DNA e 1 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos deste experimento estão ilustrados na Figura 64.

Figura 64 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4 μmol L<sup>-1</sup> em cada poço), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mmol L<sup>-1</sup>) e o íon complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> nas seguintes concentrações 10, 5, 2,5, 1, 0,5 e 0,25 μmol L<sup>-1</sup>. Reação ocorreu durante 60 minutos na ausência de luz. (DNA ctrl - = somente DNA e DNA ctrl + = DNA mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os controles DNA ctrl - e DNA ctrl + respectivamente apresentaram cerca de 6 e 13% de conversão da FI para FII, possivelmente ocasionado do próprio manuseio das amostras durante a realização do experimento, já que esse comportamento ocorreu nos dois controles, mesmo um deles não contendo peróxido de hidrogênio. Na análise semi-quantitativa realizada para as demais amostras, esse percentual de clivagem da fita II foi subtraído, assim obtendo-se apenas os percentuais de modificação ocasionados pelos complexos.

Ao analisar as bandas correspondentes a mistura contendo o DNA, o peróxido e os complexos em diferentes concentrações, observou-se a presença das FII e FIII (fita linear validada pelo DNA *Ladder*). Quando analisamos a região do gel onde foi empregado  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do íon complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ , observou-se um arraste, tal comportamento é atribuído a alta atividade nuclease do complexo nesta concentração juntamente com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , levando a clivagem sucessiva da molécula de DNA em pedaços menores.<sup>129</sup> À medida que a concentração de ambos os complexos diminuiu, a FI se mostra preservada, indicando assim que os complexos metálicos juntamente com  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram atividade nuclease. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para conversão da forma I em forma II do DNA na presença dos complexos e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi de  $1,7 \pm 0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9739$ ) e  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9933$ ) para o composto  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  e  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$  respectivamente, indicando que nessas condições o nitrosilo complexo apresentou uma atividade clivadora um pouco melhor que o complexo  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ .

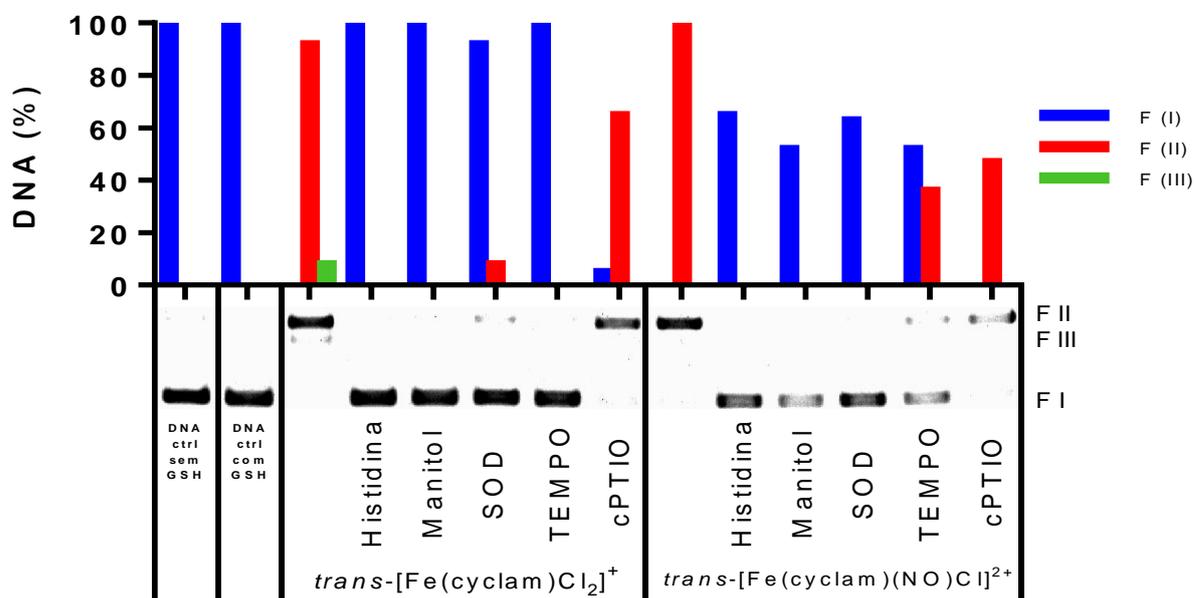
Cowan e colaboradores,<sup>33</sup> empregaram uma série extensa de complexos com estruturas semelhantes ao composto  $\text{trans-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$ , e foi relatado que complexos metálicos de Fe na presença de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  promovem clivagem de DNA, isso devido a capacidade desses complexos em variar o estado de oxidação, promovendo assim formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de reação redox com moléculas tais como  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . A decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por  $\text{Fe}^{3+}$  gera a espécie reduzida  $\text{Fe}^{2+}$ , que também reage com  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerando radical hidroxilo (Reação 10).<sup>128</sup> Logo a atividade clivadora que os complexos estudados nesta dissertação apresentaram na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pode estar relacionada a capacidade de tais espécies em gerar radicais  $\cdot\text{OH}$ , indicando que nessas condições os complexos clivam o DNA por via oxidativa.

#### ***4.7.4. Investigação da Interação e Clivagem de DNA na Presença de Inibidores de Radicais***

Com o objetivo de investigar particularmente o mecanismo de clivagem de DNA mediado pelos complexos metálicos e GSH, empregou-se uma série de padrões de inibidores de radicais livres, os quais foram adicionados na concentração de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  (Histidina e Manitol),  $4 \text{ U/mL}$  (superóxido dismutase – SOD),  $18,7 \text{ mmol L}^{-1}$  (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina – TEMPO) e  $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$  (2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3-oxidi – cPTIO), juntamente com  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos complexos metálicos e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de GSH, mantendo a reação por 90 minutos.

Na Figura 65 pode-se observar o efeito provocado pela adição desses inibidores de radicais livres no perfil de clivagem de DNA. Para os dois complexos foram utilizados controles que consistiam em não adicionar os inibidores de radicais livres, servindo como comparativo aos efeitos provocados pela adição dos inibidores. Conforme relatado em experimentos anteriores, nessa faixa de concentração ocorre clivagem do DNA por meio do complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> induzida pela GSH, o que gerou a total conversão da forma I em forma II e III (Figura 65).

Figura 65 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4 μmol L<sup>-1</sup> em cada poço), GSH (10 mmol L<sup>-1</sup>), os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sub>2</sub><sup>2+</sup> na concentração 30 μmol L<sup>-1</sup> e diferentes inibidores de radicais livres: Histidina (20 mmol L<sup>-1</sup>), Manitol (20 mmol L<sup>-1</sup>), SOD (4U/μL), TEMPO (18,7 mmol L<sup>-1</sup>), cPTIO (1,1 mmol L<sup>-1</sup>). Reação ocorreu durante 90 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A adição de histidina que é supressor de oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (<sup>•</sup>OH),<sup>130,131</sup> inibiu de forma pronunciada a formação da FII, indicando que possivelmente a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e/ou <sup>•</sup>OH pode estar relacionada com a clivagem do DNA na presença do complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Contudo, vale ressaltar que nestas condições, onde a concentração de histidina é relativamente elevada, a mesma pode se coordenar ao complexo alterando seu perfil de reatividade frente ao DNA. Para identificar a possível formação de radical hidroxila foi utilizado o manitol, empregado comumente como inibidor específico

desse radical livre.<sup>132</sup> A adição desse supressor também inibiu a formação da FII, indicando que a clivagem do DNA também pode ser promovida pela formação de radical hidroxila.

Adicionalmente, foi utilizada a enzima superóxido dismutase (SOD) que é conhecida como inibidor da formação de ânion superóxido,<sup>133</sup> sendo que o superóxido se converte espontaneamente em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A adição de SOD inibiu a formação da fita FII, contudo de forma um pouco menos eficiente que a histidina e manitol, as quais bloqueiam as espécies reativas  $^1\text{O}_2$  e  $\cdot\text{OH}$ . Logo, temos que há inibição de clivagem ocasionada pelo SOD, indicando que a clivagem também pode estar sendo promovida pela geração de superóxido, contudo em menor escala quando comparado com a atuação dos outros inibidores anteriormente citados. É importante mencionar que o íon superóxido pode gerar radical  $\cdot\text{OH}$ ,<sup>119</sup> logo podemos estar avaliando o efeito indireto de geração deste radical que surge pela formação de superóxido. Além disso, a própria enzima também poderia estar atuando como alvo de oxidações.

A utilização do TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), conhecido por inibir a formação de radical metalo e carbono centrado,<sup>134,135</sup> também inibiu significativamente a clivagem de DNA evidenciado pela baixa formação da FII, sugerindo que a formação desses tipos de radicais também seriam candidatos na clivagem do DNA. Vale ressaltar que o próprio radical superóxido possa está sendo gerado através da formação inicial desses radicais, tal como a formação transiente de  $\text{Fe-O}_2^-$ .<sup>136,137</sup>

O cPTIO age por meio da reação direta com espécies nitrosilas livres como NO e HNO.<sup>69</sup> Quando utilizado nas condições que o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> foi empregado, verificou-se uma negligenciável atuação na inibição da clivagem do DNA, sugerindo que tais espécies não são responsáveis pelo mecanismo de clivagem, o que se antecipava devido a ausência de precursores nitrosilas na estrutura.

Estudos similares foram realizados para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, baseado nas evidências anteriores de que há clivagem do DNA por meio da reação com GSH, sendo empregado similares supressores de radicais como ilustrado na (Figura 65). Inesperadamente as intensidades de algumas bandas com complexo de nitrosila foram afetadas, apresentado a soma das diferentes formas inferior a 100%. Tal comportamento pode ser atribuído a uma possível competição entre o GelRed<sup>TM</sup> (marcador utilizado para visualização das bandas no gel) e alguma outra espécie produzida durante a reação. Apesar de tal resultado, uma análise semi-quantitativa foi realizada.

A adição de histidina apresentou também inibição de clivagem e manteve razoavelmente intacto o DNA na forma da FI, o que novamente indica a atuação de oxigênio

singlete e ou hidroxila. Para identificar apenas a possível formação de radical hidroxila, foi utilizado o manitol. A adição desse supressor também inibiu a formação da FII, porém com uma leve diferença do supressor histidina, isso indicou que a clivagem do DNA pode estar sendo promovida por radicais hidroxilas.

O emprego da enzima SOD, inibidor do ânion superóxido, provocou forte inibição da clivagem de DNA pelo bloqueio à formação da FII. A reação entre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e NO gera peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Reação 8), um forte clivador de DNA. Uma vez a enzima SOD inibindo o agente  $O_2^{\cdot-}$  não existe a possibilidade de produção do peroxinitrito. Logo, o peroxinitrito também pode estar atuando como clivador nessas condições, o que será posteriormente estudado. A utilização do TEMPO na reação entre a GSH e o complexo *trans*- $[Fe(cyclam)(NO)Cl]^{2+}$  não foi tão eficiente na inibição da FII, sugerindo que os radicais metalo e carbono centrado podem ter participação no ataque ao ácido nucléico, porém em menor escala.

Curiosamente, o emprego de cPTIO não provocou supressão na clivagem de DNA, apesar de termos mostrado anteriormente que HNO é produzido rapidamente e teria potencial clivador. Contudo vale ressaltar que GSH em excesso pode eventualmente consumir o cPTIO, diminuindo a sua capacidade de suprimir os radicais HNO ou NO. Todavia, esse resultado confirma que ambos os complexos atuam de forma muito similar e que a nitrosila coordenada não tem papel relevante neste fenômeno de clivagem, sendo possivelmente sua saída que proporciona a plena atividade clivadora do DNA. Adicionalmente, outro aspecto a ser destacado é o fato da GSH também estar atuando como inibidor juntamente com as outras espécies utilizadas, uma vez que a mesma tem função anti-oxidante em sistemas biológicos, mas que neste caso auxilia a disparar a formação de espécies reativas.

#### ***4.7.5. Modo de Interação ao DNA***

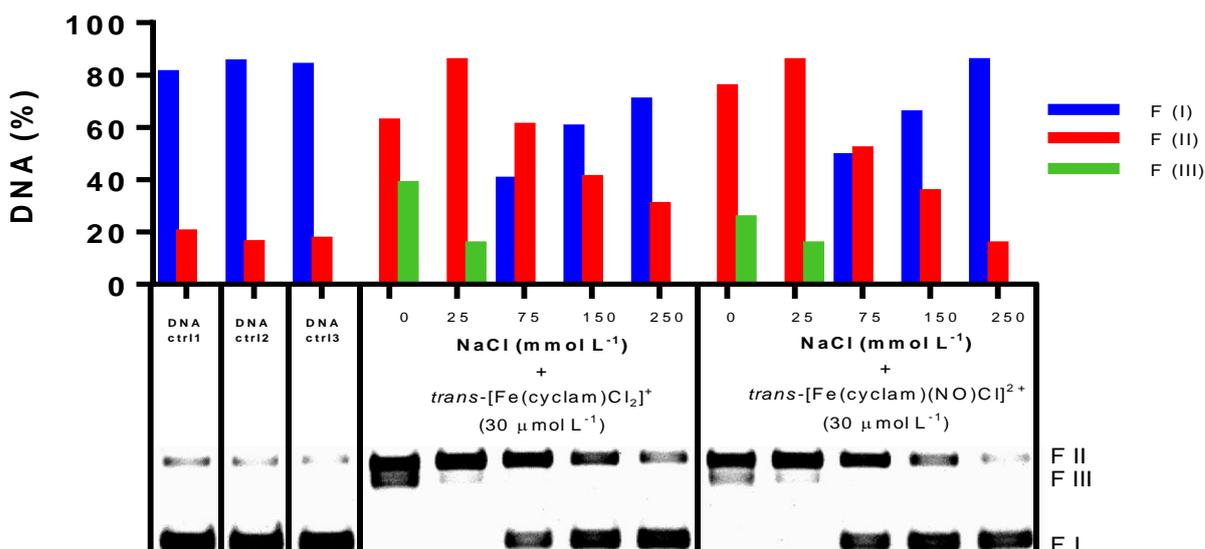
A interação de complexos metálicos ao DNA pode ocorrer por interação eletrostática, modificação covalente, interação por sulcos ou intercalação, bem como uma combinação destes modos de interação.<sup>38</sup> O uso de NaCl em concentrações crescentes aumentando a força iônica da solução, provoca uma redução na interação eletrostática entre o DNA e o complexo metálico catiônico, o que auxilia na definição da rota de interação.

Neste experimento de clivagem de DNA empregou-se cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações de 0, 25, 75, 150 e 250 mmol L<sup>-1</sup>, juntamente com 10 mmol L<sup>-1</sup> de GSH e 30 μmol L<sup>-1</sup> dos complexos *trans*- $[Fe(cyclam)Cl_2]^+$  ou *trans*- $[Fe(cyclam)(NO)Cl]^{2+}$ , mantendo-se

sob incubação com DNA por 90 minutos. Empregou-se ainda três controles neste experimento, consistindo no DNA Ctrl1, que continha apenas DNA, DNA Ctrl2 representando o DNA juntamente com GSH, e por último o DNA Ctrl3 que constituiu a mistura do DNA, GSH e 250 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl.

Os dados obtidos estão apresentados na Figura 66. Os três controles apresentaram uma conversão de cerca de 18% da FI em FII, essa clivagem pode ter ocorrido do próprio manuseio do DNA estoque durante a realização do experimento, já que esse comportamento se reproduziu em todos os controles. Na análise das demais amostras, esse percentual de clivagem na forma FII foi subtraída de forma que apenas os percentuais de modificação ocasionados pelos complexos pudessem ser avaliados, assim evitando falsos positivos.

Figura 66 - Estudo de clivagem de DNA (F(I, II e III)) empregando-se DNA plasmidial (5,4 μmol L<sup>-1</sup> em cada poço), GSH (10 mmol L<sup>-1</sup>), os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sub>2</sub><sup>2+</sup> na concentração de 30 μmol L<sup>-1</sup> e diferentes concentrações de NaCl (0, 25, 75, 150, 250 mmol L<sup>-1</sup>). Reação ocorreu por 90 minutos. DNA Ctrl1 = DNA, DNA Ctrl2 = DNA + GSH e DNA Ctrl3 = DNA + GSH + NaCl (250 mmol L<sup>-1</sup>).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados de clivagem em gel foram usados de forma semi-quantitativa para obter a concentração de 50% de bloqueio de clivagem (IC<sub>50</sub>) ocasionado pelo NaCl, que foi de 111 mmol L<sup>-1</sup> (± 48,0 × 10<sup>-3</sup>) (R<sup>2</sup> = 0,9703) para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Não foi possível determinar tal valor para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sub>2</sub><sup>2+</sup> devido ao ajuste

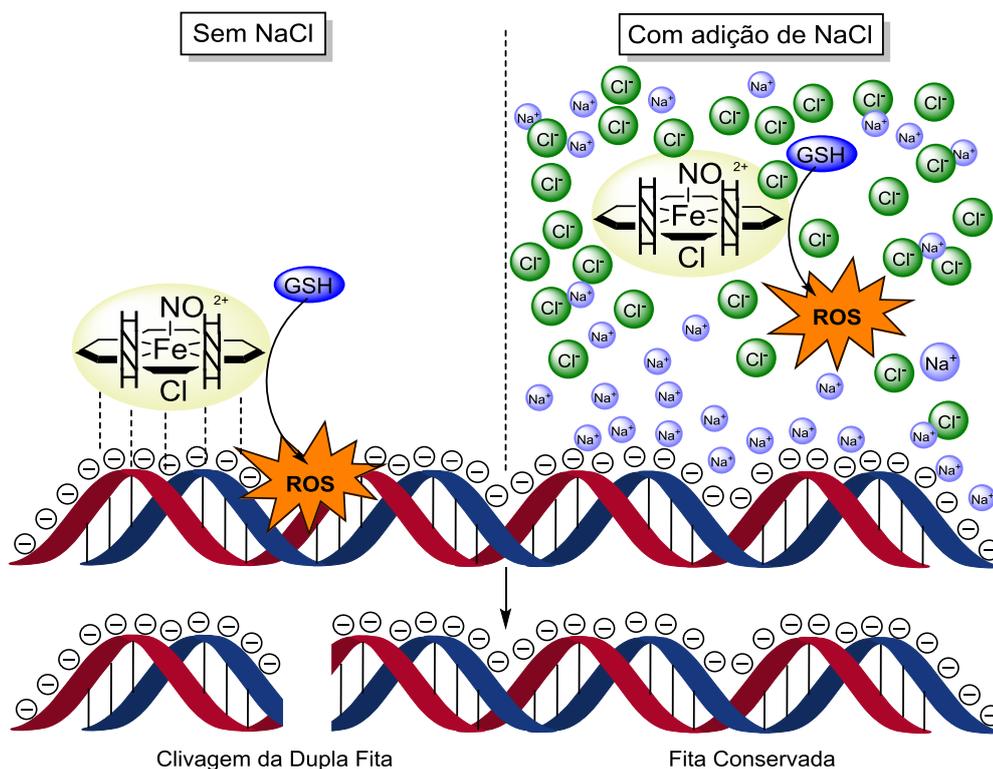
inadequado da curva teórica aos dados experimentais, contudo os dados dos gráficos de barras da (Figura 66) indicam que o valor de  $IC_{50}$  está entre 150 e 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Tais estudos evidenciaram que o processo de clivagem é fortemente sensível à variação da força iônica. Para ambos os complexos, a força iônica baixa (concentração de NaCl de 0 a 25  $\text{mmol L}^{-1}$ ) teve quase nenhum efeito sobre a clivagem de DNA, em comparação com a força iônica de 75 a 250  $\text{mmol L}^{-1}$ , cuja extensão da clivagem do DNA tornou-se expressivamente reduzida.

Esse comportamento pode decorrer do fato do DNA em condições fisiológicas apresentar carga negativa, provenientes dos grupos fosfato, o que atrai contraíons tais como os complexos catiônicos sob estudo, mas que na presença de excesso dos íons  $\text{Na}^+$  estes competem por minimizar a carga do DNA, mantendo-se na sua proximidade estabilizando-o,<sup>138</sup> por consequência reduzindo a interação dos complexos ao DNA, desta forma a geração de espécies clivadoras instáveis, tais como radicais livres, geradas distante do DNA perdem sua eficácia clivadora. Adicionalmente, não podemos desprezar o próprio efeito da força iônica na reação entre os complexos e GSH, que poderia ser afetada tornando-a mais lenta na geração de espécies clivadoras de DNA.

A inibição da atividade nuclease, a medida que a concentração de sal aumenta, e o aumento da atividade nuclease quando a concentração de sal diminui, sugere que possivelmente está ocorrendo interação eletrostática entre os complexos e o DNA, as quais poderiam ser facilmente rompidas. Assim, quanto mais próximos os complexos estão do ácido nucléico, mais efetiva é a clivagem (Figura 67). Outros autores também verificaram comportamento similar de seus sistemas de trabalho, quando estudaram a interação com DNA nas mesmas condições.<sup>139</sup> Dessa forma ficou evidente que a eficiência da clivagem do DNA, necessita que os complexos estejam interagindo eletrostaticamente com o DNA.

Figura 67 - Ilustração do efeito da força iônica na clivagem do DNA pela reação entre o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> e GSH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

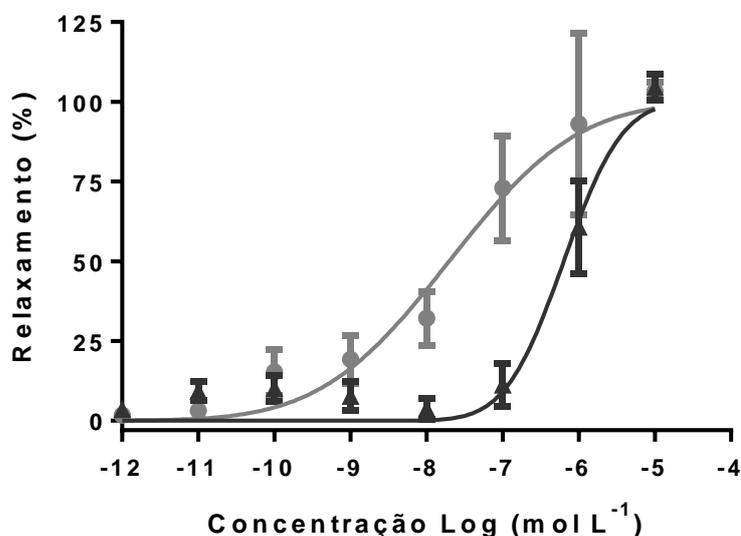
## 4.8. Ensaios Biológicos

### 4.8.1. Ensaio de Vasodilatação para o Complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sub>2</sub>

Um dos primeiros compostos a ser utilizado no tratamento de crises hipertensivas, mesmo antes de se conhecer o seu mecanismo de ação, foi o nitroprussiato de sódio Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]. Este composto libera NO através de transferência eletrônica, possivelmente do Fe<sup>2+</sup> para o íon nitrosênio (NO<sup>+</sup>) coordenado, ou por meio de reação com redutores biológicos (cisteína, glutatona, N-acetilcisteína, entre outros), o que fornece imediato alívio da alta pressão sanguínea, por relaxamento da musculatura vascular constricta.<sup>140</sup> Contudo, sabe-se que o nitroprussiato também provoca significativos efeitos colaterais nocivos ao organismo vivo devido a concomitante liberação de cianeto durante produção de NO.<sup>141</sup> Logo, existe um significativo interesse em espécies alternativas, que em meio fisiológico liberem NO de forma tão eficiente quanto SNP, mas que não apresentem efeitos nocivos ao paciente.

Com o intuito de verificar a atividade vasodilatadora do complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> ensaios de vasodilatação foram realizados por meio de colaboração com o Prof. Dr Nilberto Nascimento e Pedro Henrique (Doutorando) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). O potencial vasodilatador do nitrosilo complexo em questão foi investigado frente a anéis de aorta de ratos pré-contraídos com 1,0 μmol L<sup>-1</sup> de fenilefrina, o ensaio foi realizado por meio de medições de dose-resposta, utilizando o nitroprussiato de sódio (SNP) como controle. O ensaio foi realizado através de 7 medidas independentes preparadas a partir de diferentes animais para obtenção de dados estatisticamente confiáveis. As curvas de relaxação são mostradas na Figura 68.

Figura 68 - Relaxamento induzido pelo complexo íon *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (●) e SNP (▲) em anéis de aorta de ratos pré-contraído com fenilefrina (1,0 μmol L<sup>-1</sup>). As respostas de relaxamento são expressas em percentual de relaxamento versus concentração de composto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de EC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração mínima de complexo necessária para provocar 50% de vasodilatação, para o SNP foi de 24 nmol L<sup>-1</sup> e para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> foi de 910 nmol L<sup>-1</sup>. Tais resultados evidenciaram que nessas condições, o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> tem atividade vasodilatadora menor que do SNP, entretanto os valores de EC<sub>50</sub> não se mostraram excessivamente distintos. Isso indica que o nitrosilo complexo mostra a capacidade de liberar NO de forma mais moderada que o SNP. Como mencionado anteriormente o SNP apresenta efeitos colaterais devido a liberação do cianeto que está na posição *trans* ao ligante NO, porém o ligante que está nessa posição no

complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> é um cloreto, que mesmo liberado não provocaria efeitos tóxicos expressivos, assim tornando este complexo um possível agente vasodilatador com menores efeitos colaterais comparado ao SNP. Tais observações indicam o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> como um promissor anti-hipertensivo, possivelmente com baixos efeitos colaterais e menos bruscos efeitos anti-hipertensivos.

#### 4.8.2. Atividade Citotóxica

Compostos a base de platina com propriedades antitumorais tais como cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina (II)), carboplatina e oxaliplatina são importantes agentes quimioterapêuticos disponíveis para o tratamento de tumores.<sup>31</sup> Contudo, apesar da ampla aplicabilidade destes fármacos, estão associados a eles alta toxicidade, que leva a graves efeitos colaterais e resistência adquirida à droga.<sup>142</sup>

Assim como os derivados de platina, o óxido nítrico apresenta atividade anticancerígena, dependendo da concentração empregada. Em geral, concentrações altas de NO levam à inibição do crescimento celular e induzem a morte celular por apoptose, enquanto que baixas concentrações promovem o crescimento celular.<sup>143</sup> No entanto, o mecanismo antineoplásico do óxido nítrico é bastante complexo e ainda sob intensos estudos. Devido a sua função antitumoral, além de diversas outras, a comunidade científica está cada vez mais interessada em compostos que são capazes de gerar óxido nítrico *in situ*.<sup>31</sup>

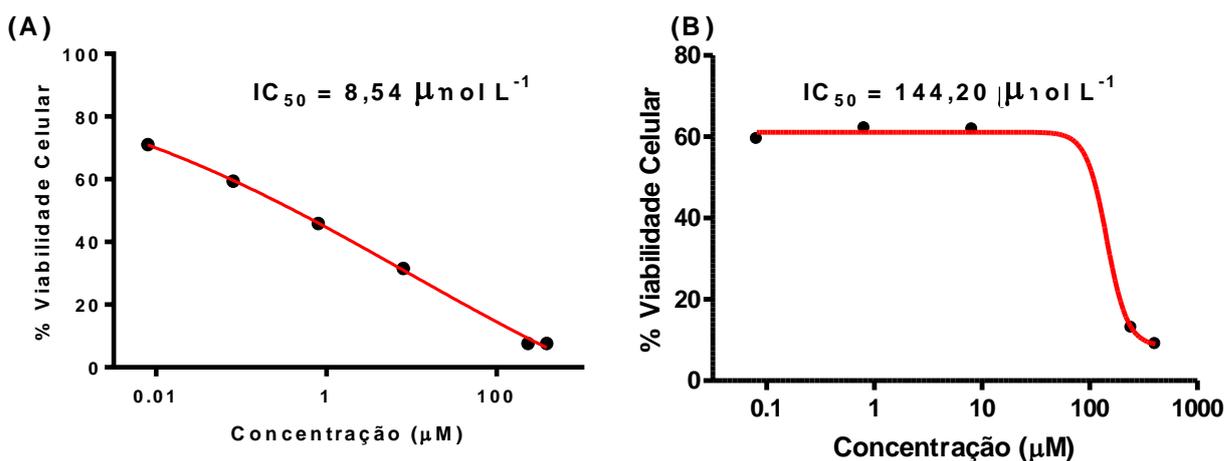
Como já mencionado, complexos metálicos a base de ferro tem sido desenvolvidos e estudados com a finalidade de atuarem como possíveis agentes antineoplásicos.<sup>34,36,144</sup> Um método bastante usado em ensaios clínicos utiliza a combinação de complexos metálicos com outros medicamentos ativos para aumentar a sensibilidade à droga e diminuir os seus efeitos colaterais; algumas destas abordagens alcançaram bons resultados, tal como com o *cis*-[Pt<sup>II</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(malSAHAH<sub>2</sub>)],<sup>145</sup> ethacraplatin<sup>146</sup> e [Fe(CN)<sub>5</sub>(isoniazid)]<sup>3-</sup> (IQG-607).<sup>147,31</sup> Diante disso, é interessante o desenvolvimento e o estudo de compostos a base de ferro liberadores de NO, assim obtendo medicamentos que possam atuar em sinergismo frente a célula tumorais.

A investigação de compostos com potencial atividade anti-câncer inicia com ensaios de citotoxicidade de células tumorais. Um dos ensaios amplamente usado em medições de proliferação celular e citotoxicidade é denominado ensaio colorimétrico de MTT,<sup>89</sup> o mesmo foi descrito por Mosmann em 1983.<sup>148</sup> O ensaio de MTT baseia-se na clivagem do sal de

tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-brometo de difenil-2H-tetrazólio) de cor amarela, num formazan de cor azul pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase.<sup>89</sup> A vantagem deste ensaio celular é que esta reação só ocorre em células vivas com mitocôndrias funcionais. A quantidade de formazan produzido durante um determinado período de exposição é diretamente proporcional ao número de células viáveis, sendo assim mensurável a citotoxicidade de compostos.

Por meio de colaboração com o Prof. Dr. Daniel de Lima Pontes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) essa metodologia foi empregada para avaliar a atividade citotóxica dos compostos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, frente as linhagens de células tumorais B16-F10<sup>149</sup> (melanoma de camundongo) e HUH-7<sup>150</sup> (hepatocarcinoma humano) por meio do ensaio colorimétrico de MTT. A Figura 69 exhibe os resultados de viabilidade celular para célula B16-F10 em função das concentrações dos complexos empregados.

Figura 69 - Curvas de Viabilidade celular (%) vs concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) dos complexos (A) *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e (B) *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup>, para a linhagem de células B16-F10 (Melanoma de camundongo).



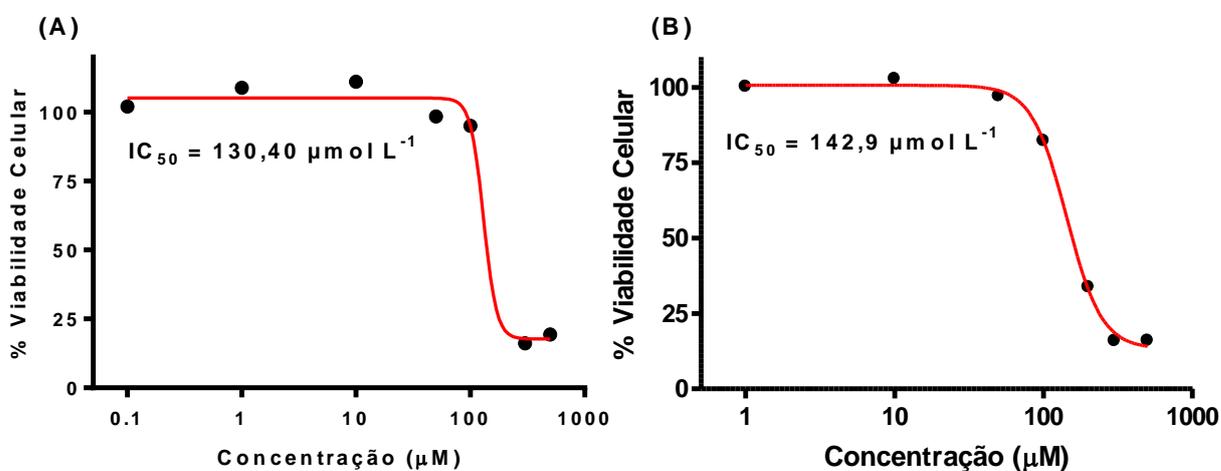
Fonte: Elaborado pelo autor.

A frequência de células mortas aumenta com o aumento da concentração dos compostos numa dose resposta dependente da concentração. As concentrações necessárias para inibir 50% da viabilidade celular ( $\text{IC}_{50}$ ) das linhagens celulares em estudo foram calculadas a partir de curvas sigmoidais dose-resposta (Figura 69), em que obtivemos para o *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> maior citotoxicidade com  $\text{IC}_{50} = 8,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto o complexo

$trans$ -[Fe(cyclam)(NO)Cl] $^{2+}$  apresentou  $IC_{50} = 144 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Contudo os resultados de  $IC_{50}$  apresentaram um desvio elevado sendo necessário repetir o experimento.

A Figura 70 exibe os resultados dos ensaios de viabilidade celular em células HUH-7 em função das concentrações dos complexos. Similarmente aos ensaios anteriores, observou-se uma dose resposta dependente. Curiosamente, ambos os complexos mostraram efeito citotóxico muito similares frente a linhagem celular HUH-7. As curvas sigmoidais dose-resposta utilizadas para obtenção dos  $IC_{50}$  estão inslustradas na Figura 70. Os valores de  $IC_{50}$  obtidos para os complexos  $trans$ -[Fe(cyclam)Cl $_2$ ] $^{+}$  e  $trans$ -[Fe(cyclam)(NO)Cl] $^{2+}$  foram 130,40 e 142,90  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 70 - Curvas de Viabilidade celular (%) vs concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) dos complexos (A)  $trans$ -[Fe(cyclam)Cl $_2$ ] $^{+}$  e (B)  $trans$ -[Fe(cyclam)(NO)Cl] $^{2+}$ , para a linhagem de células HUH-7 (Hepatocarcinoma humano).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com está linhagem celular, observamos similar valor de citotoxicidade para ambos os complexos. Brito e colaboradores,<sup>151</sup> reportaram valor de  $IC_{50}$  para cisplatina frente a linhagem HUH-7 de 58,77  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o que sugere que os dois complexos de ferro sob estudo não apresentaram atividade significativa, mostrando-se bem menos eficientes que a cisplatina nesta linhagem. Nas duas linhagens de células cancerígenas empregadas no estudo, o complexo  $trans$ -[Fe(cyclam)(NO)Cl] $^{2+}$  não apresentou efeito citotóxico expressivo, sugerindo que o mesmo por estes ensaios não é tóxico.

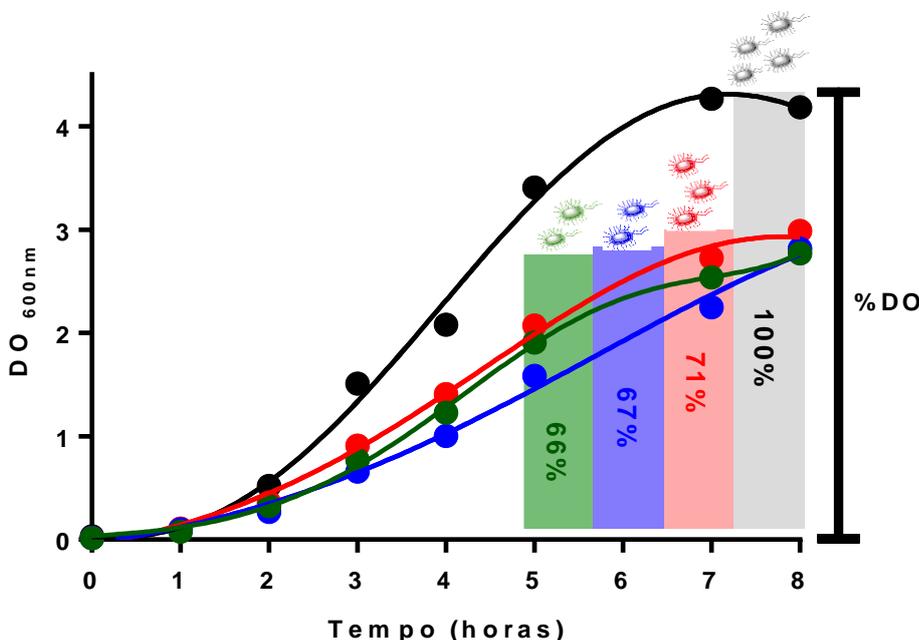
### 4.8.3. Atividade Bactericida

Complexos metálicos contendo o ligante NO e derivados na sua esfera de coordenação, se mostraram como eficientes inibidores do crescimento de microorganismos, tais como *Escherichia coli* (*E. coli*),<sup>23</sup> *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*),<sup>152</sup> *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)<sup>152</sup> e *Clostridium difficile* (*C. difficile*).<sup>153</sup> Esse efeito bactericida do NO e seus derivados, foi atribuído a capacidade dos mesmos em serem convertidos em espécies mais tóxicas a bactéria, como por exemplo peroxinitrito. Essas espécies reativas de nitrogênio podem agir inibindo determinadas enzimas vitais para a bactéria, por exemplo, a inibição da citocromo c oxidase e oxidases terminais, que fazem parte da cadeia respiratória da bactéria.<sup>23</sup>

A fim de avaliar a atividade bactericida dos compostos  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]^+$  e  $trans\text{-}[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ , estudos preliminares foram realizados empregando a linhagem MC1061 da bactéria *Escherichia coli*, uma estirpe recombinante gram-positiva muito utilizada em clonagem e amplificação de DNA plasmidial. No ensaio foi empregado  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos complexos de ferro e  $(2 \text{ mmol L}^{-1})$  de isoniazida. A isoniazida é uma pró-droga utilizada no tratamento da tuberculose, doença infectocontagiosa e endêmica, provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).<sup>147,154</sup> A mesma foi utilizado como um comparativo positivo.

O estudo foi realizado por meio da avaliação das curvas de crescimento bacteriano. As medidas de crescimento bacteriano foram feitas por pseudo-turbidimetria (medida indireta), através do registro da densidade ótica no comprimento de onda de 600nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ), as medidas foram realizadas em intervalos de uma hora durante oito horas a 37 °C. As misturas ficaram nas mesmas condições experimentais de incubação do pré-inóculo durante todo o experimento, exceto nos momentos em que as densidades óticas ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) foram medidas. A Figura 71 mostra as curvas de crescimento celular para a linhagem MC1061 da bactéria *Escherichia coli* na ausência (ctrl) e na presença de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada complexo e  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de isoniazida.

Figura 71 - Curvas de crescimento celular para a linhagem MC1061 da bactéria *Escherichia coli* na ausência (—) e na presença de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dos complexos (*trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (—) e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> (—)) e 2 mmol L<sup>-1</sup> isoniazida (—). As medidas de DO<sub>600nm</sub> foram realizadas em intervalos de uma hora durante oito horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido, as bactérias apresentam uma curva de crescimento padrão, composta por quatro fases distintas: fase de arranque (fase lag), fase exponencial de crescimento (fase log), fase estacionária e fase de declínio.<sup>91</sup> Foi observado que os dois complexos e a isoniazida afetaram o crescimento das células. É preciso mencionar que o método utilizado para medição do crescimento celular é indireto, tanto as células vivas quanto as células mortas contribuem para a turvação, porém, apesar disso, é notório que a presença dos complexos e da isoniazida no meio acarretou na diminuição do crescimento celular.

Considerando o valor de DO<sub>600nm</sub> no final do experimento, foi possível obter uma estimativa percentual do crescimento da bactéria. Nota-se que os complexos foram eficientes no que diz respeito a diminuição do número de bactérias no final do experimento. Isso pode ser atribuído a capacidade dos complexos em gerar espécies tóxicas para as bactérias, como por exemplo ROS, afirmação essa sustentada pelos resultados de eletroforese.

O nitrosilo complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> se mostrou um pouco mais eficiente que o complexo *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, se comparando a isoniazida, essa pequena diferença de reatividade pode ser atribuída a capacidade do nitrosilo complexo em liberar o ligante NO,

que é considerado uma espécie com atividade bactericida, graças a sua capacidade de reagir com outros compostos formando produtos mais tóxicos.<sup>23</sup> Diante disso os complexos em questão se mostraram promissores para futuros ensaios microbicidas, tendo destaque o complexo de NO. Estudos mais completos já estão em andamento, objetivando a reprodução deste experimento e obtenção de IC<sub>50</sub> para os dois complexos.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os estudos de estabilidade térmica e de fotoliberação para o complexo *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> indicaram inequivocamente que o composto espontaneamente ou sob irradiação de luz em 350 nm, em condições fisiológicas, possui a capacidade de liberar majoritariamente óxido nítrico (NO). Todavia, indícios de pequenas quantidades de HNO também surgiram nos ensaios com mioglobina oxidada e espectroscopia vibracional no infravermelho em pastilhas. Os valores das cinéticas de liberação térmica a 37 °C e fotoquímica foram bastante distintas com meias vidas de 385 e 115 minutos, respectivamente. Tais valores sugerem lenta liberação térmica de NO, o que é bastante interessante, haja visto que diversas propriedades fisiológicas do NO exigem níveis baixos na faixa de nanomolar. Todavia, a ação bactericida de NO exige quantidades mais elevadas, o que poderia ser alcançado por tratamento com luz, ciente ainda das limitações do baixo comprimento de onda.

O nitrosilo composto exibiu ainda interessante reatividade frente ao importante redutor biológico glutatona (GSH). Considerando que este redutor encontra-se em abundância em meios fisiológicos, em concentrações de até 10 mmol L<sup>-1</sup>, é fundamental avaliar seu papel com respeito a administração destes complexos metálicos. Ressalta-se que outros tióis como cisteína e H<sub>2</sub>S, apesar de estarem presentes em sistemas biológicos em intervalos de concentração inferior, podem ter relevante reação com o nitrosilo complexo, dependendo da sua reatividade.

Neste trabalho foi proposto um mecanismo de reação entre o nitrosilo complexo e a GSH com base em evidências cinéticas, computacionais e uso de *traps* seletivos, sendo sugerido a formação de um aduto com glutatona e formação do aquo complexo como produto final. Os ensaios com o trap cPTIO acompanhados por EPR, sustentam que o nitrosilo complexo em reação com GSH libera HNO, abrindo novas potenciais aplicações para esse composto. Apesar disso, mais estudos são necessários para completa elucidação do mecanismo de reação entre o complexo e a GSH, como por exemplo entender a influência de diferentes tipos de tióis e do pH, determinação da taxa de liberação do ligante cloreto na formação do 1º aduto e identificação de outros possíveis produtos (glutatona oxidada (RSSR)), o 2º aduto *trans*-[Fe(cyclam)(H<sub>2</sub>O)N(O)(SG)<sub>2</sub>] e *trans*-[Fe(cyclam)(HNO)H<sub>2</sub>O]).

As investigações de possíveis alvos e danos biológicos foram realizados com DNA, não sendo observado qualquer evidência de dano ao DNA por via térmica. Todavia, o emprego de outros estímulos como luz e agentes biologicamente relevantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSH, mostraram que ambos os complexos podem promover eficiente atividade de clivagem

de DNA por meio da geração de ROS. Ressalta-se que no momento não se conhece a via mecanística de clivagem que ambos os complexos provocam por meio fotoquímico. Restando a ser realizado outros experimentos que possibilitem a elucidação dessa possível via, como por exemplo estudos cinéticos utilizando os *scavengers* Azul de nitro-tetrazólio (NBT) para detecção de íon  $O_2^{\cdot-}$  e 3'- (*p*-aminofenil) fluoresceína (APF) para detecção de  $\cdot OH$ ,  $ONOO^{\cdot-}$  e  $^1O_2$ . Entretanto, estes estudos revelaram que os dois complexos possuem atividade nuclease bastante similar, sustentando que o ligante NO não apresenta efeito na clivagem de DNA. Adicionalmente, através do estudo de variação da força iônica, observamos que os dois complexos devem interagir com o DNA através de interação eletrostática, sendo possível bloquear a clivagem do DNA sob elevadas concentrações de NaCl. Porém, apesar da eficiência frente à clivagem de DNA, os ensaios de viabilidade celular preliminares revelaram que os complexos apresentam baixa citotoxicidade (por valores de  $IC_{50}$ ), quando comparados à cisplatina.

Os estudos de atividade microbicida indicaram que ambos os complexos estudados possuem capacidade de inibir o crescimento da bactéria *E. coli*. Diante disso, apesar de terem demonstrado baixa citotoxicidade frente a células cancerígenas, os complexos em questão se mostram promissores agentes microbicidas, tendo destaque o complexo contendo NO. A baixa citotoxicidade do complexo  $trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]^{2+}$ , apesar de desestimular investigações como anticancerígeno, indicam, ainda que preliminarmente, que pode-se administrar mais elevadas doses do complexo sem provocar significativa toxicidade, tornando-o interessante para outras aplicações tais como microbicida ou vasodilatador. O resultado de atividade vasodilatadora para o complexo de NO, mostrou que o mesmo apresenta atividade inferior ao do conhecido agente cardiovascular nitroprussiato de sódio (SNP), atualmente em uso clínico, com valor de  $EC_{50}$  de  $910 \text{ nmol L}^{-1}$ . Contudo, em comparação ao SNP, o nitrosilo complexo  $trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]^{2+}$  apresenta uma vantagem estrutural, que é a capacidade do mesmo em não liberar cianeto. Além disso, o nitrosilo complexo apresentou uma promissora atividade antioxidante frente ao radical superóxido, indicando que tal complexo poderia ainda, frente a espécies ROS produzidas durante distúrbios cardiovasculares, atuar como moderador.

Estes estudos abriram outras interessantes perspectivas, tal como o estudo do mecanismo da reação do  $trans-[Fe(cyclam)(NO)(Cl)]^{2+}$  e glutathiona em diferentes condições de pH, por stopped-flow, investigação dos produtos de hidrólise dos complexos em meio tamponado, e ensaios de eletroforese empregando GSH em meio anaeróbico, com o intuito de avaliar o possível efeito do  $O_2$  no mecanismo de clivagem.

Além disso, será interessante determinar, de forma precisa, os produtos radicalares gerados quando empregado os complexos *trans*-[Fe(cyclam)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> e *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]<sup>2+</sup> na presença de luz, glutatona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica (EPR), utilizando espécies seletivas para cada radical (*spin traps* e probes fluorescentes). Por fim, tem-se como objetivos futuros também, reavaliar os ensaios de atividade microbica dos complexos, objetivando a reprodução da metodologia empregada no presente trabalho e obtenção de IC<sub>50</sub> para os dois complexos, bem como para outras bactérias.

## REFERÊNCIAS

1. CANÇADO, R. D.; LOBO, C.; FRIEDRICH, J. R. Tratamento da anemia ferropriva com ferro por via oral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 55, p. 114–120, jun. 2010.
2. ROMERO-CANELÓN, I.; SADLER, P. J. Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 12276–12291, jul. 2013.
3. HUGHES, M. N. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 263–272, maio.1999.
4. MCCLEVERTY, J. A. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. **Chemical reviews**, v. 104, n. 2, p. 403–418, jan. 2004.
5. FRICKER, S. P. A quarterly survey of research on the platinum metals and of developments in their application in industry. **Platinum Metals Review**, v. 39, n. 4, p. 150–191, 1995.
6. SELEMIDIS, S.; COCKS, T. M. Nitroergic relaxation of the mouse gastric fundus is mediated by cyclic GMP-dependent and ryanodine-sensitive mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 7, p. 1315–1322, abr. 2000.
7. SILVA, F. O. N. **Síntese, caracterização e reatividade de novos nitrosilo complexos de rutênio, tendo como ligante auxiliar a 2,2'-bipiridina**. 2004. 121f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
8. MIESSLER, Gary L.; FISCHER, Paul J.; TARR, Donald A. **Química Inorgânica**. 5. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014.649 p.
9. KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochemical Journal**, v. 258, p. 249–258, mar. 1994.
10. KEMP-HARPER, B. K. Nitroxyl (HNO): A Novel Redox Signaling Molecule. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 9, p. 1609–1613, maio. 2011.
11. JOHNSON, G. M.; CHOZINSKI, T. J.; SALMON, D. J.; MOGHADDAM, A. D.; CHEN, H. C.; MIRANDA, K. M. Quantitative detection of nitroxyl upon trapping with glutathione and labeling with a specific fluorogenic reagent. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 63, p. 476–484, maio. 2013.
12. FOLLMANN, M.; GRIEBENOW, N.; HAHN, M. G.; HARTUNG, I.; MAIS, F.; MITTENDORF, J.; SCHAFER, M.; SCHIROK, H.; STASCH, J.; STOLL, F.; STRAUB, A. The Chemistry and Biology of Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. **Angewandte Reviews**, v. 52, p. 9442–9462, ago. 2013.

13. HOTTINGER, D. G.; BEEBE, D. S.; KOZHIMANNIL, D. T. S. B.; PRIELIPP, R. C.; BELANI, K. G. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 462–471, out. 2014.
14. HARROP, T. C.; SONG, D.; LIPPARD, S. J. Reactivity pathways for nitric oxide and nitrosonium with iron complexes in biologically relevant sulfur coordination spheres. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 11–12, p. 1730–1738, nov. 2007.
15. MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of The Royal Society of Medicine**, v. 92, n. 4, April, p. 164–169, abr. 1999.
16. NAKAGAWA, H. Photocontrollable nitric oxide (NO) and nitroxyl (HNO) donors and their release mechanisms. **Nitric oxide**, v. 25, n. 2, p. 195–200, dez. 2011.
17. WECKSLER, S.; MIKHAILOVSKY, A.; FORD, P. C. Photochemical Production of Nitric Oxide via Two-Photon Excitation with NIR Light. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 42, p. 13566–13567, out. 2004.
18. WECKSLER, S. R.; MIKHAILOVSKY, A.; KORYSTOV, D.; FORD, P. C. A Two-Photon Antenna for Photochemical Delivery of Nitric Oxide from a Water-Soluble, Dye-Derivatized Iron Nitrosyl Complex Using NIR Light. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 11, p. 3831–3837, mar. 2006.
19. FRY, N. L.; HEILMAN, B. J.; MASCHARAK, P. K. Dye-tethered ruthenium nitrosyls containing planar dicarboxamide tetradentate N4 ligands: effects of in-plane ligand twist on NO photolability. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 317–324, nov. 2011.
20. OSTROWSKI, A. D.; DEAKIN, S. J.; AZHAR, B.; MILLER, T. W.; FRANCO, N.; CHERNEY, M. M.; LEE, A. J.; BURSTYN, J. N.; FUKUTO, J. M.; MEGSON, I. L.; FORD, P. C. Nitric oxide photogeneration from *trans*-Cr(cyclam)(ONO)<sub>2</sub><sup>+</sup> in a reducing environment. activation of soluble guanylyl cyclase and arterial vasorelaxation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 715–722, dez. 2010.
21. SANTOS, A. F.; BROTTTO, D. F.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; ANDRADE, G. R.; BATISTOTE, M.; CAVALHEIRO, A. A.; NEVES, A.; RODRIGUES, D. C. M.; ANJOS, A. Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 309–315, maio. 2014.
22. JOANNOU, C. L.; CUI, X. Y.; ROGERS, N.; VIELOTTE, N.; TORRES M. C. L.; VUGMAN, N. V.; HUGHES, M. N.; CAMMACK, R. Characterization of the Bactericidal Effects of Sodium Nitroprusside and Other Pentacyanonitrosyl Complexes on the Food Spoilage Bacterium *Clostridium sporogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3195–3201, set. 1998.
23. CAMMACK, R.; JOANNOU, C. L.; CUI, X. Y.; MARTINEZ, T. C.; MARAJ, S. R.; HUGHES, M. N. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 475–488, maio. 1999.

24. LIM, J.Y.; YOON, J.; HOVDE, C. J. A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–10, jan. 2010.
25. NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998.
26. PERIGO, J. A; WHITING, E.; BASHFORD, T. E. Observations on the inhibition of vegetative cells of Clostridium sporogenes by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of sub-lethally processed cured meats. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 2, n. 4, p. 377–397, dez. 1967.
27. MORAN, D.M.; TANNENBAUM, S.R.; MICHAEL C. A. Inhibitor of Clostridium perfringens formed by heating sodium nitrite in a chemically defined medium. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 838–843, nov. 1975.
28. ASHWORTH, J.; DIDCOCK, A.; LINDA L. HARGREAVES.; JARVIS, B.; WALTERS, C. L.; LARKWOREHY, L. F. Chemical and microbiological comparisons of inhibitors derived thermally from nitrite with an iron thionitrosyl (Roussin black salt). **Journal of General Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 403–408, out. 1974.
29. CERESER, N. D.; COSTA, F. M. R.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 280–287, jan/fev. 2008.
30. BRASIL, P. **Ministério da Saúde, 2015** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/02/brasil-estima-576-mil-novos-casos-de-cancer-em-2015>> Acesso em 27 ago. 2015.
31. ZHAO, JIAN.; GOU, SHAOHUA.; SUN, YANYAN.; YIN, RUNTING.; WANG, ZHIMEI. Nitric Oxide Donor-Based Platinum Complexes as Potential Anticancer Agents. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 18, n. 45, p. 14276–14281, set. 2012.
32. CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 69–93, out. 2002.
33. JOYNER, J.; REICHFELD, J.; COWAN, J. A. Factors Influencing the DNA Nuclease Activity of Iron, Cobalt, Nickel, and Copper Chelates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 39, p. 15613–15626, ago. 2011.
34. WONG, Y.; MAK, C.; KWAN, HOI S.; LEE, H. K. Mononuclear iron(III) complexes supported by tripodal N<sub>3</sub>O ligands: Synthesis, structure and reactivity towards DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, n. 6, p. 1246–1253, abr. 2010.
35. GHOSH, K.; KUMAR, P.; MOHAN, V.; SINGH, U. P. Self-activated DNA cleavage

and nitric oxide reactivity studies on mononuclear copper complexes derived from tetradentate ligands. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 15, p. 56–60, jan. 2012.

36. MUDASIR.; YOSHIOKA, N.; INOUE, H. DNA binding of iron (II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 77, n. 3-4, p. 239–247, nov. 1999.
37. NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1220 p.
38. METZLER-NOLTE, Nils; SCHATZSCHNEIDER, Ulrich. **Bioinorganic Chemistry: A Practical Course**. Berlin/ New York: Walter de Gruyter, 2009. 138 p.
39. OLIVEIRA, M. C. B. **NUCLEASES SINTÉTICAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE DNA**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
40. CASTRO, L.S. **“Clonagem e Expressão dos Domínios 2 e 3 do Receptor KDR (VEGFR-2) Humano”**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
41. NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; ARRIECHE, D.; MARCHAN, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of  $[Cu(dppz)_2]BF_4$ . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 364–369, dez. 2003.
42. ALMEIDA, W. B. **ATIVIDADE NUCLEÁSICA DO COMPLEXO *trans*-[Ru(II)Cl<sub>2</sub>(nic)<sub>4</sub>] SOBRE O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO “IN VITRO” E “IN VIVO”**. 2006. 92f. Monografia (Bacharel em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2006.
43. THEOPHANIDES, T.; ANASTASSOPOULOU, J.; DEMUNNO, G. METAL-DNA INTERACTIONS. **Kluwer Academic Publishers**, v. 116, p. 285–300, 2003.
44. DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, jul. 2014.
45. KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T.W. Platinum Drug Distribution in Cancer Cells and Tumors. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4911–4920, out. 2009.
46. GOWDA K. R. S.; MATHEW, B. B.; SUHAMANI, C. N.; NAIK, H. S. B. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2014.

47. FRIEDMAN, A. E.; CHAMBRON, J. C.; SAUVAGE, J. P.; TURRO, N. J.; BARTON, J. K. Molecular "Light Switch" for DNA: Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)<sup>2+</sup>. **Journal American Chemical Society**, v. 112, n. 12, p. 4960–4962, jun. 1990.
48. ZEGLIS, B.M.; PIERRE, V.C.; BARTON, J. K. Metallointercalators and Metalloinsertors. **Chemical Communications**, v. 44 p. 4565–4579, set. 2007.
49. AVENDAÑO, Carmen; MENÉNDEZ, J.Carlos. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier B. V., 2008, 199 p.
50. NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. **Natural product reports**, v. 18, n. 3, p. 291–309, maio. 2001.
51. SIGMAN, D. S.; CHEN, C. B. CHEMICAL NUCLEASES: NEW REAGENTS IN MOLECULAR BIOLOGY. **Annual Reviews Biochemical**, v. 59, p. 207–236, jul. 1990.
52. PITIE, M.; PRATVIEL, G. Activation of DNA Carbon - Hydrogen Bonds by Metal Complexes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 2, p. 1018–1059, jan. 2010.
53. TAN, J.; WANG, B.; ZHU, L. DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 727–739, jun. 2009.
54. PAILLOUS, N.; VICENDO, P. Mechanisms of photosensitized DNA cleavage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 20, n. 2–3, p. 203–209, out. 1993.
55. SHIMADA, K.; JONG, C. J.; TAKAHASHI, K.; SCHAFFER, S. W. Role of ROS Production and Turnover in the Antioxidant Activity of Taurine. **Taurine** **9**. v. 803, p. 581–596, 2015.
56. SHINDE, S. S.; MAROZ, A.; HAY, M. P.; ANDERSON, R. F. One-Electron Reduction Potential of the Neutral Guanyl Radical in the GC Base Pair of Duplex DNA. **Journal American Chemical Society**, v. 131, n. 14, p. 5203–5207, mar. 2009.
57. SIES, H.; MENCK, C. F. M. Singlet oxygen induced DNA damage. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3-6, p. 367–375, set. 1992.
58. AGNEZ-LIMA, L. F.; MELO, J. T. A.; SILVA, A. E.; OLIVEIRA, A. H. S.; TIMOTEO, A. R. S.; LIMA-BESSA, K. M.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P.; GALHARDO, R. S.; MENCK, C. F. M. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 1, p. 15–28, set. 2012.
59. NEELEY, W. L.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n.

4, p. 491–505, mar. 2006.

60. CHAZOTTE-AUBERT, L.; OIKAWA, S.; GILIBERT, I.; BIANCHINI, F.; KAWANISHI, S.; OHSHIMA, H. Cytotoxicity and Site-specific DNA Damage Induced by Nitroxyl Anion ( $\text{NO}^-$ ) in the Presence of Hydrogen Peroxide. IMPLICATIONS FOR VARIOUS PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 30, p. 20909–20915, jul. 1999.
61. OHCHIMA, H.; GILIBERT, I.; BIANCHINI, F. Induction of Dna Strand Breakage and Base Oxidation By Nitroxyl Anion Through Hydroxyl Radical Production. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1305–1313, maio. 1999.
62. WHITTAKER, J.; MCFADYEN, W.D.; WICKHAM, G.; WAKELIN, L. P. G.; MURRAY, V. The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 17, p. 3933–3939, set. 1998.
63. BUTLER, A. R.; GLIDEWELL, C.; MCINTOSH, A. S.; REED, D.; SADLER, I. H. Carbon-13 NMR Study of the Binding of Nitroprusside and Hexacyanoferrate(II) to Aquocobalamin, Vitamin B<sub>12a</sub>. **American Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 970–973, mar. 1986.
64. TOGNILO, V.; SANTANA, R.; TEDESCO, A. C. Photo-induced nitric oxide release from chlorobis (2,2'-bipyridine) nitrosylruthenium (II) in aqueous solution. **Inorganic Chimica Acta**, v. 316, n. 1-2, p. 7–12, maio. 2001.
65. LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; BENDHACK, L. M.; SILVA, R. S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 9, p. 2643–2650, jun. 2005.
66. CHAN, P.; POON, C. Structural and Mechanistic Studies of Co-ordination Compounds. Part XII. Syntheses and Characterization of Some Dianionic (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)-manganese(III), -iron(III), and -nickel(III) Salts. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, p. 858–862, 1976.
67. HOLANDA, A. K. M.; SILVA, F. O. N.; CARVALHO, I. M. M.; BATISTA, A. A.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E. Crystal structure, electrochemical and photochemical studies of the *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> complex (cyclam = 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane). **Polyhedron**, v. 26, n. 16, p. 4653–4658, out. 2007.
68. DUMOND, J. F.; KING, S. B. The Chemistry of Nitroxyl-Releasing Compounds. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 9, p. 1637–1648, abr. 2011.
69. SAMUNI, U.; SAMUNI, Y.; GOLDSTEIN, S. On the Distinction between Nitroxyl and Nitric Oxide Using Nitronyl Nitroxides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 12, p. 8428–8432, maio. 2010.
70. CASTRO-FORERO, A.; JIMÉNEZ, D.; LÓPEZ-GARRIGA, J.; TORRES-LUGO, M. Immobilization of Myoglobin from Horse Skeletal Muscle in Hydrophilic Polymer

Networks. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 2, p. 881–890, jan. 2008.

71. VANDEWALLE, P. L.; PETERSEN, N. O. Oxidation of reduced cytochrome c by hydrogen peroxide. Implications for superoxide assays. **FEBS letters**, v. 210, n. 2, p. 195–198, jan. 1987.
72. VASCONCELLOS, L. C.; OLIVEIRA, C. P.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J.; MOREIRA, Í. S. Structure and properties of iron–cyclam complex of 2-aminophenol. **Polyhedron**, v. 20, n. 6, p. 493–499, mar. 2001.
73. DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. GaussView, Version 5. Semichem Inc., Shawnee Mission. 2009.
74. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A.; JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; 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.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian 09, Revision A.02. **Wallingford CT**, 2009.
75. JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry** 2. ed. Nova Jéršia: John Wiley, 2007. 599 p.
76. WADT, W. R.; HAY, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitais. **The Journal of Chemical Physics**, v. 82, n. 1, p. 299–310, jan. 1985.
77. WADT, W. R.; HAY, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. **The Journal of Chemical Physics**, v. 82, n. 1, p. 284–298, jan. 1985.
78. FRENKING, G.; KOCH, W. A Mo/ller–Plesset study of the electron affinities of the diatomic hydrides XH (X = Li, B, Be, C, N, O). **The Journal of Chemical Physics**, v. 84, n. 6, p. 3224–3229, mar. 1986.
79. MENNUCCI, B.; CANCE, E.; TOMASI, J. Evaluation of Solvent Effects in Isotropic and Anisotropic Dielectrics and in Ionic Solutions with a Unified Integral Equation Method : Theoretical Bases , Computational Implementation , and Numerical Applications. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, n. 49, p. 10506–10517, dez.

1997.

80. MARQUES, Miguel, A. L.; MAITRA, Neepa. T.; NOGUEIRA, Fernando. M. S.; GROSS, E. K. U.; RUBIO, Angel. **Fundamentals of Time-Dependent Density Functional Theory**. Berlin: Springer, 2012.
81. O'BOYLE, N. M.; TENDERHOLT, A. L.; LANGNER, K. M. cclib: A library for package-independent computational chemistry algorithms. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 5, p. 839–845, abr. 2008.
82. LU, T.; CHEN, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 580–592, fev. 2012.
83. LU, T.; CHEN, F. Bond order analysis based on the laplacian of electron density in fuzzy overlap space. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, n. 14, p. 3100–3108, mar. 2013.
84. YADAV, L.D.S. Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy. **Organic Spectroscopy**. Netherlands: Springer Science+Business Media Dordrecht, 2005.
85. WILKINS, Ralph, G. **Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002, p. 454.
86. WESTERMEIER, Reiner. **Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations**. 4. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, p. 406.
87. HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Copper(II) Macrocycles Cleave Single-Stranded and Double-Stranded DNA under Both Aerobic and Anaerobic Conditions. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 26, p. 7474–7481, dez. 1996.
88. ROSSI, L. M.; NE, A.; HORNER, R.; TERENCEZI, H.; SZPOGANICZ, B.; SUGAI, J. Hydrolytic activity of a dinuclear copper (II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 337, p. 366–370, set. 2002.
89. SATYANARAYANAJOIS, Seetharama D. **Drug Design and Discovery: Methods and Protocols**. New Delhi: Springer Science+Business Media, LLC, 2011, p. 88.
90. ABE, K.; SAITO, H. Amyloid protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. **Neuroscience Research**, v. 31, n. 4, p. 295–305, ago. 1998.
91. ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; RIET, K. V. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, jun. 1990.
92. POON, C. K. The Infrared Spectra of Some Cis- and Trans- Cobalt (III) Complexes

Secondary Amine\*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 5, p. 322–324, mar. 1971.

93. PONTES, D. D. L. **Estudo de Complexos de Ferro-Cyclam com Ligantes Carboxilados e Polinitrilados**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
94. OLIVEIRA, C.P. **ESTUDO DO SISTEMA [Fe(cyclam)XY]<sup>n+</sup>, onde X = Cl<sup>-</sup> e Y= Cl<sup>-</sup> ou NO**. 2000. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
95. HOLANDA, A.K.M. **Síntese , caracterização e estudo da liberação fotoquímica de óxido nítrico por nitrosilo complexos de Ru e Fe e pelo composto [cyclam(NO)<sub>4</sub>]**. 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
96. MACHURA, B.; JAWORSKA, M.; KRUSZYNSKI, R. The synthesis, spectroscopic characterisation, crystal and molecular structure of the [ReCl<sub>3</sub>(NO)(OPPh<sub>3</sub>)(pyz)] complex. DFT calculations for [ReCl<sub>3</sub>(NO)(OPPh<sub>3</sub>)(pyz)] and [ReCl<sub>3</sub>(NO)(OPPh<sub>3</sub>)(PPh<sub>3</sub>)]. **Polyhedron**, v. 24, n. 2, p. 267–279, jan. 2005.
97. PAULAT, F.; LEHNERT, N. Electronic Structure of Ferric Heme Nitrosyl Complexes with Thiolate Coordination. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1547–1549, fev. 2007.
98. DZIEGIELEWSKI, J. O.; MACHURA, B.; MAREK, J. THE X-RAY CRYSTAL STRUCTURE [Re(NO)(Ph)Br<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>) COMPLEX. **Polyhedron**, v. 15, n. 21, p. 3713–3716, ago. 1996.
99. AKL, J.; SASAKI, I.; LACROIX, P. G.; MALFANT, I.; MALLET-LADEIRA, S.; VICENDO, P.; FARFÁN, N.; SANTILLAN, R. Comparative photo-release of nitric oxide from isomers of substituted terpyridinenitrosylruthenium(II) complexes: experimental and computational investigations. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 12721–12733, jun. 2014.
100. ZAPATA, A. L.; KUMAR, M. R.; PERVITSKY, D.; FARMER, P. A singular value decomposition approach for kinetic analysis of reactions of HNO with myoglobin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 118, p. 171–178, jan. 2013.
101. BOBKO, A. A; IVANOV, A.; KHRAMTSOV, V. V. Discriminative EPR detection of NO and HNO by encapsulated nitronyl nitroxides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 74–81, nov. 2013.
102. GOLDSTEIN, S.; RUSSO, A.; SAMUNI, A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with •NO, •NO<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub>•\*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 50949–50955, dez. 2003.

103. DORO, F. G.; PEPE, I. M.; GALEMBECK, S. E.; CARLOS, R. M.; ROCHA, Z. N.; BERTOTTI, M.; TFOUNI, E. Reactivity, photolability, and computational studies of the ruthenium nitrosyl complex with a substituted cyclam *fac*-[Ru(NO)Cl<sub>2</sub>(κ<sup>3</sup>N<sup>4</sup>,N<sup>8</sup>,N<sup>11</sup>(1-carboxypropyl)cyclam)]Cl·H<sub>2</sub>O. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 40, n. 24, p. 6420–6432, jun. 2011.
104. HOSHINO, M.; MAEDA, M.; KONISHI, R.; SEKI, H.; FORD, P. C. Studies on the Reaction Mechanism for Reductive Nitrosylation of Ferrihemoproteins in Buffer Solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 24, p. 5702–5707, jun. 1996.
105. POON, C. K.; ANDREW, M. W. Structural and Mechanistic Studies of Coordination Compounds. 23. Evidence for Dissociative Substitution Reactions of Some trans-Acido(isothiocyanato)(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)iron(III) Complexes, *trans*-[Fe(cyclam)(NCS)X]<sup>+</sup>, X<sup>-</sup> = NCS<sup>-</sup>, CH<sub>2</sub>ClCOO<sup>-</sup>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> and Br<sup>-</sup>. **Inorganic Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1277–1283, 1979.
106. AGA, R. G.; HUGHES, M. N. The Preparation and Purification of NO Gas and the Use of NO Releasers: The Application of NO Donors and Other Agents of Nitrosative Stress in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 436, p. 35–48, 2008.
107. SILVA, F. O. N.; CÂNDIDO, M.C.L.; HOLANDA, A. K. M. DIÓGENES, I. C. N.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F. Mechanism and biological implications of the NO release of *cis*-[Ru(bpy)<sub>2</sub>L(NO)]<sup>n+</sup> complexes: A key role of physiological thiols. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 624–629, maio. 2011.
108. SOUZA, M. L.; ROVEDA, A. C.; PEREIRAB, J. C. M.; FRANCO, D. W. New perspectives on the reactions of metal nitrosyls with thiolates as nucleophiles. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 306, p. 615-627, jan. 2015.
109. AKAIKE, T.; YOSHIDA, M.; MIYAMOTO, Y.; SATO, K.; KOHNO, M.; SASAMOTO, K.; MIYAZAKI, K.; UEDA, S.; MAEDA, H. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.bul.NO (nitric oxide) through a radical reaction. **Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 827–832, jan. 1993.
110. FILIPOVIC, M. R.; EBERHARDT, M.; PROKOPOVIC, V.; MIJUSKOVIC, A.; ORESCANIN-DUSIC, Z.; REEH, P.; IVANOVIC-BURMAZOVIC, I. Beyond H<sub>2</sub>S and NO interplay: Hydrogen sulfide and nitroprusside react directly to give nitroxyl (HNO). A new pharmacological source of HNO. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1499–1508, fev. 2013.
111. RONCAROLI, F.; OLABE, J. A. The Reactions of Nitrosyl Complexes with Cysteine. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 4719–4727, maio. 2005.
112. BAKHTIAR, R.; OCHIAI, E. I. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, v. 32, n. 5, p. 525–540, maio. 1999.
113. BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA JR, R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the

- nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. Supplement 1, p. S157–S165, dez. 1991.
114. RONCAROLI, F.; RUGGIERO, M. E.; FRANCO, D. W.; ESTIÚ, G. L.; OLABE, J. A. Kinetic, Mechanistic, and DFT Study of the Electrophilic Reactions of Nitrosyl Complexes with Hydroxide. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 22, p. 5760–5769, out. 2002.
115. LANG, D. R.; DAVIS, J. A.; LOPES, L. G. F.; FERRO, A. A.; VASCONCELLOS, L. C. G.; FRANCO, D. W.; TFOUNI, E.; WIERASZKO, A.; CLARKE, M. J. A Controlled NO-Releasing Compound: Synthesis, Molecular Structure, Spectroscopy, Electrochemistry, and Chemical Reactivity of *R,R,S,S-trans*-[RuCl(NO)(cyclam)]<sup>2+</sup> (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane). **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2294–2300, maio. 2000.
116. WONG, P. S. Y.; HYUN, J.; FUKUTO, J. M.; SHIROTA, F. N.; DEMASTER, E. G.; SHOEMAN, D. W.; NAGASAWA, H. T. Reaction between S-Nitrosothiols and thiols: Generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. **Biochemistry**, v. 37, n. 16, p. 5362–5371, mar. 1998.
117. RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, maio. 2012.
118. BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER JR, F. J.; KRAUSE, K. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, p. 1–14, ago. 2012.
119. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press. 2007, 851 p.
120. ESPEY, M. G.; THOMAS, D. D.; MIRANDA, K. M.; WINK, D. A. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11127–11132, mar. 2002.
121. BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 4, p. 1620–1624, fev. 1990.
122. TRUJILLO, M.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; FREEMAN, B. A.; RADI, R. Xanthine Oxidase-mediated Decomposition of S-nitrosothiols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 7828–7834, abr. 1998.
123. FU, P. K. L.; BRADLEY, P. M.; TURRO, C. DNA Cleavage by Photogenerated Rh<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>+</sup>. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2476 – 2477, abr. 2001.
124. LIU, J.; OUYANG, M.; JIANG, J.; MU, P.; WU, J.; YANG, Q.; ZHANG, C.; XU, W.; WANG, L.; HUEN, M. S. Y.; DENG, Y. Mequindox induced cellular DNA damage via

- generation of reactive oxygen species. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 741, n. 1–2, p. 70–75, jan. 2012.
125. REED, C. J.; DOUGLAS, K. T. Chemical cleavage of plasmid DNA by glutathione in the presence of Cu(II) ions. The Cu(II)-thiol system for DNA strand scission. **The Biochemical Journal**, v. 275, p. 601–608, maio. 1991.
  126. HEPEL, M.; STOBIECKA, M.; PEACHEY, J.; MILLER, J. Intervention of glutathione in pre-mutagenic catechol-mediated DNA damage in the presence of copper(II) ions. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 735, n. 1–2, p. 1–11, jul. 2012.
  127. CAULFIELD, J. L. **The Chemistry of Nitric Oxide-Induced Deamination and Cross-Linking of DNA**; 1997, 153f. Thesis (Doctor of physiology) – Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, 1997.
  128. LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, p. 371–384, maio. 2013.
  129. SISSI, C.; MANCIN, F.; GATOS, M.; PALUMBO, M.; TECILLA, P.; TONELLATO, U. Efficient Plasmid DNA Cleavage by a Mononuclear Copper (II) Complex. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 2310–2317, mar. 2005.
  130. OBATA, T.; KUBOTA, S.; YAMANAKA, Y. Protective effect of histidine on paronylphenol-enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) in rat striatum. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1568, n. 2, p. 171-175, dez. 2001.
  131. RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A. Determinação do mecanismo de destruição de células mediado octaetilporfirina de vanadil e luz visível. **Eclética Química**, v. 30, p. 7–13, 2005.
  132. SILVESTRE, C.; SANTOS, J.; LIMA, J.; ZAGATTO, E. Single reaction interface flow system for chemiluminescent monitoring of mannitol based on its hydroxyl radical scavenger activity. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 518–521, dez. 2008.
  133. SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício : mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico\*. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 9, p. 308–313, ago. 2004.
  134. SOUZA, B.; XAVIER, F. R.; PERALTA, R. A.; BORTOLUZZI, A. J.; CONTE, G.; GALLARDO, H.; FISCHER, F. L.; BUSSI, G.; TERENCEZI, H.; NEVES, A. Oxygen-independent photonuclease activity of a new iron(II) complex. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 46, n. 19, p. 3375–3377, mar. 2010.
  135. GAMBERINI, M.; LEITE, L. C. C. Carbon-centered free radical formation during the metabolism of hydrazine derivatives by neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v.

- 45, n. 9, p. 1913–1919, maio. 1993.
136. RAY, K.; FELIX, F.; WANG, B.; NAM, W. Status of Reactive Non-Heme Metal – Oxygen Intermediates in Chemical and Enzymatic Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 40, p. 13942-13958, set. 2014.
137. CHO, J.; JEON, S.; WILSON, S. A.; LIU, L. V.; KANG, E. A.; BRAYMER, J. J.; LIM, M. H.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; VALENTINE, J. S.; SOLOMON, E. I.; NAM, W. Structure and reactivity of a mononuclear non-haem iron(III)–peroxo complex. **Nature**, v. 478, p. 502–505, out. 2011.
138. HAGERMAN, P. FLEXIBILITY OF DNA. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 17, n. 1, p. 265–286, 1988.
139. SONG, Y. M.; WU, Q.; YANG, P. J.; LUAN, N. N.; WANG, L. F.; LIU, Y. M. DNA Binding and cleavage activity of Ni(II) complex with all-trans retinoic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 10, p. 1685–1691, out. 2006.
140. BUTLER, A. R.; GLIDEWELL, C. Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. **Chemical Society Reviews**, v. 16, p. 361–380, 1987.
141. IKEDA, S.; SCHWEISS, J. F.; FRANK, P. A. B. A.; HOMAN, S. M. In Vitro Cyanide Release from Sodium Nitroprusside. **Anesthesiology**, v. 66, p. 381–385, 1987.
142. GUPTA, R. K.; PANDEY, R.; SHARMA, G.; PRASAD, R.; KOCH, B.; SRIKRISHNA, S.; LI, P.-Z.; XU, Q.; PANDEY, D. S. DNA binding and anti-cancer activity of redox-active heteroleptic piano-stool Ru(II), Rh(III), and Ir(III) complexes containing 4-(2-methoxypyridyl)phenyldipyromethene. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 3687–3698, mar. 2013.
143. HUERTA, S.; CHILKA, S.; BONAVIDA, B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 5, p. 909–927, nov. 2008.
144. HABER, A.; AVIRAM, M.; GROSS, Z. Variables that influence cellular uptake and cytotoxic/cytoprotective effects of macrocyclic iron complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 28–30, dez. 2012.
145. GRIFFITH, D.; MORGAN, M. P.; MARMION, C. J. A novel anti-cancer bifunctional platinum drug candidate with dual DNA binding and histone deacetylase inhibitory activity. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 44, p. 6735–6737, out. 2009.
146. WEE, H. A.; KHALAILA, I.; ALLARDYCE, C. S.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; DYSON, P. J. Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 5, p. 1382–383, jan. 2005.

147. HENRIQUE, E.; SOUSA, S.; GILMARA, F.; VIEIRA, D. M.; BUTLER, J. S.; AUGUSTO, L.; SANTIAGO, D. S.; DIÓGENES, I. C. N.; GONZAGA, L.; LOPES, D. F.; SADLER, P. J.  $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{isoniazid})]^{3-}$ : An iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 236–244, nov. 2014.
148. GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1–2, p. 57–63, nov. 1986.
149. OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols in Immunology**, p. 1–33, 2001.
150. LU, H.; LIAO, F. Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 6, p. 3264–3276, set. 2013.
151. BRITO, A. F.; ABRANTES, A. M.; PINTO-COSTA, C.; GOMES, A. R.; MAMEDE, A. C.; CASALTA-LOPES, J.; GONÇALVES, A. C.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: The role of p53. **Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 381–386, jan. 2013.
152. GHAFFARI, A.; NEIL, D. H.; ARDAKANI, A.; ROAD, J.; GHAHARY, A.; MILLER, C. C. A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. **Nitric Oxide**, v. 12, n. 3, p. 129–140, maio. 2005.
153. FOX, S.; WILKINSON, T. S.; WHEATLEY, P. S.; XIAO, B.; MORRIS, R. E.; SUTHERLAND, A.; SIMPSON, A. J.; BARLOW, P. G.; BUTLER, A. R.; MEGSON, I. L. NO-loaded  $\text{Zn}^{2+}$ -exchanged zeolite materials: A potential bifunctional anti-bacterial strategy. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1515–1521, 2010.
154. FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 527–531, set. 2015.

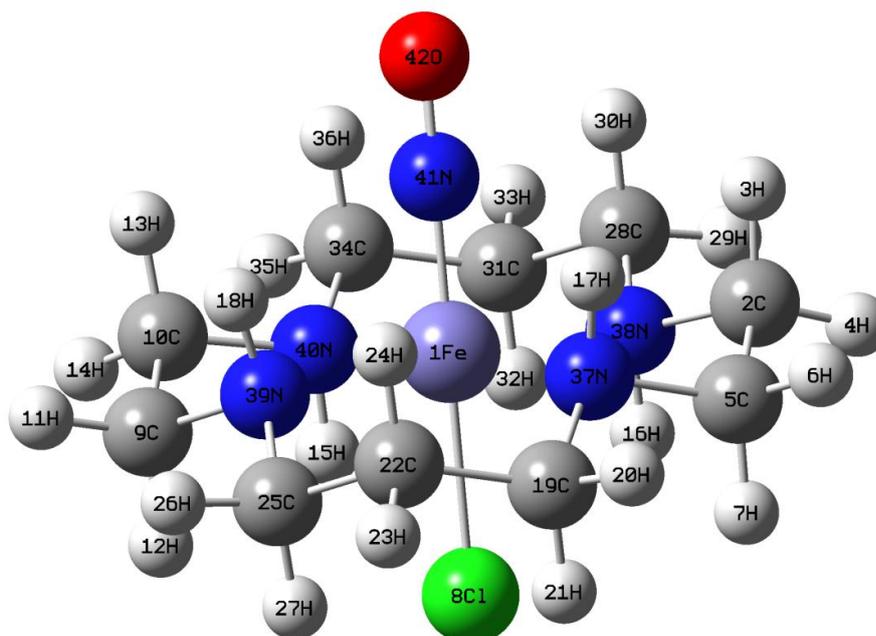
**ANEXO I – TRANSIÇÕES, ORBITAIS MOLECULARES ENVOLVIDOS E SUAS  
RESPECTIVAS FORÇA DE OSCILADOR.**

| <b>Transição<br/>(nm)</b> | <b>Força do<br/>Oscilador</b> | <b>Orbitais Envolvidos</b>   |
|---------------------------|-------------------------------|--|
| 494                       | 0                             | H-7->LUMO (13%), H-1->L+1 (26%), HOMO->LUMO (49%)  |
| 489                       | 1E-4                          | H-3->L+2 (20%), H-1->LUMO (30%), HOMO->L+1 (29%)   |
| 466                       | 0                             | H-3->L+1 (89%)   |
| 463                       | 0                             | H-1->L+1 (51%), HOMO->LUMO (31%)   |
| 461                       | 1E-4                          | H-3->LUMO (82%)  |
| 437                       | 0                             | H-3->L+3 (88%)   |
| 413                       | 0,0127                        | H-1->LUMO (52%), HOMO->L+1 (42%)   |
| 402                       | 1E-4                          | H-3->L+2 (42%), H-1->LUMO (15%), HOMO->L+1 (25%)   |
| 383                       | 0,0062                        | H-7->L+2 (33%), HOMO->L+2 (57%)  |
| 380                       | 0,0079                        | H-8->L+2 (33%), H-1->L+2 (58%)   |
| 368                       | 0                             | H-8->L+1 (23%), H-7->LUMO (32%), H-2->L+1 (20%),<br>HOMO->LUMO (11%)                                 |
| 352                       | 0                             | H-7->LUMO (33%), H-2->L+1 (55%)  |
| 348                       | 0,0011                        | H-2->LUMO (86%)  |
| 345                       | 2E-4                          | H-8->L+1 (49%), H-7->LUMO (11%), H-2->L+1 (24%)  |
| 325                       | 2E-4                          | H-4->LUMO (96%)  |
| 321                       | 7E-4                          | H-4->L+1 (83%)   |
| 314                       | 5E-4                          | H-7->L+1 (11%), H-6->LUMO (14%), H-5->L+1 (13%), H-3-><br>L+2 (12%), H-1->L+3 (14%), HOMO->L+2 (10%) |
| 312                       | 3E-4                          | H-7->L+3 (13%), H-6->L+1 (18%), H-5->LUMO (15%), H-1-><br>L+2 (12%), HOMO->L+3 (27%)                 |
| 311                       | 0,0012                        | H-8->LUMO (17%), H-7->L+1 (18%), H-7->L+2 (12%), H-3-><br>L+2 (15%), HOMO->L+2 (13%)                 |
| 309                       | 0,0023                        | H-6->L+1 (32%), H-5->LUMO (55%)  |
| 309                       | 0,0034                        | H-6->LUMO (50%), H-5->L+1 (30%)  |
| 305                       | 6E-4                          | H-7->L+2 (19%), H-6->LUMO (11%), H-5->L+1 (42%),<br>HOMO->L+2 (14%)                                  |
| 304                       | 9E-4                          | H-8->L+2 (27%), H-6->L+1 (24%), H-5->LUMO (19%), H-1->   |
| 287                       | 0,0027                        | H-8->L+2 (19%), H-6->L+1 (13%), HOMO->L+3 (49%)  |
| 286                       | 0,0105                        | H-7->L+2 (12%), H-6->LUMO (14%), H-1->L+3 (52%) (Cl -->  |
| 275                       | 0,0016                        | H-9->LUMO (80%)  |
| 273                       | 2E-4                          | H-9->L+1 (80%)   |
| 267                       | 0,0472                        | H-2->L+2 (88%)   |
| 257                       | 7E-4                          | H-10->LUMO (98%)   |
| 256                       | 0                             | H-10->L+1 (98%)  |
| 253                       | 0,0119                        | H-4->L+2 (77%), H-2->L+3 (13%)   |
| 252                       | 0,0029                        | H-11->L+1 (83%)  |
| 252                       | 2E-4                          | H-11->LUMO (92%)   |
| 250                       | 1E-4                          | H-12->LUMO (91%)   |
| 250                       | 0,0034                        | H-12->L+1 (88%)  |
| 249                       | 6E-4                          | H-7->L+3 (47%), H-6->L+2 (23%), HOMO->L+3 (10%)  |
| 247                       | 1E-4                          | H-7->L+3 (18%), H-6->L+2 (56%)   |
| 244                       | 2E-4                          | H-8->L+3 (65%), H-1->L+3 (11%)   |
| 238                       | 0,0071                        | H-14->L+1 (26%), H-13->L+1 (56%)   |

|     |        |  |
|-----|--------|--|
| 237 | 0      | H-14->LUMO (19%), H-13->LUMO (77%)                                   |
| 232 | 9E-4   | H-14->LUMO (38%), H-14->L+1 (27%), H-13->LUMO (11%), H-13->L+1 (19%) |
| 232 | 9E-4   | H-14->LUMO (36%), H-14->L+1 (30%), H-13->LUMO (10%), H-13->L+1 (19%) |
| 228 | 0,0286 | H-15->LUMO (79%)   |
| 225 | 2E-4   | H-15->L+1 (95%)  |
| 224 | 0,2797 | H-4->L+2 (10%), H-2->L+3 (66%)                                       |
| 224 | 1E-3   | H-5->L+3 (80%)   |
| 222 | 0,0683 | H-15->LUMO (10%), H-9->L+2 (46%), H-6->L+3 (19%)                     |
| 219 | 0,0292 | H-16->LUMO (18%), H-9->L+2 (17%), H-6->L+3 (13%), H-5->L+2 (34%)     |
| 217 | 0,0706 | H-16->LUMO (60%), H-5->L+2 (16%)                                     |
| 216 | 0,0306 | H-17->LUMO (12%), H-16->L+1 (58%), H-4->L+3 (19%)                    |
| 214 | 0,0383 | H-17->LUMO (46%), H-16->L+1 (33%), H-4->L+3 (16%)                    |
| 212 | 0,0452 | H-17->L+1 (84%)  |
| 211 | 0,044  | H-17->LUMO (26%), H-10->L+2 (53%), H-4->L+3 (13%)                    |
| 207 | 0,0101 | H-11->L+2 (89%)  |
| 206 | 0,2394 | H-17->LUMO (13%), H-10->L+2 (40%), H-4->L+3 (32%)                    |
| 205 | 0,1169 | H-18->LUMO (54%)   |
| 203 | 0,0116 | H-12->L+2 (88%)  |
| 201 | 0,0503 | H-18->L+1 (92%)  |
| 201 | 3E-4   | H-9->L+3 (79%)   |

Fonte: Elaborado pelo autor.

## ANEXO II - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL OTIMIZADA DO COMPLEXO *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)(NO)]<sup>2+</sup> COM CADA ÁTOMO NUMERADO.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**ANEXO III - PORCENTAGENS DAS CONTRIBUIÇÕES MAIS SIGNIFICATIVAS  
PARA OS ORBITAIS DO COMPLEXO *trans*-[Fe(cyclam)(Cl)(NO)]<sup>2+</sup> ENVOLVIDOS  
NAS TRANSIÇÕES EM 413, 286, 268, 253, 224 E 206 nm.**

**Tabela 1** - Porcentagem de contribuições atômicas para os orbitais HOMO-1, HOMO, LUMO e LUMO+1.

|              | HOMO-1 | LUMO   | HOMO   | LUMO+1 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Átomo</i> |        |        |        |        |
| 1 (Fe)       | 4,894  | 22,520 | 4,643  | 23,425 |
| 5 (C)        | 1,057  | -      | -      | -      |
| 8 (Cl)       | 78,575 | 0,786  | 79,780 | 0,843  |
| 9 (C)        | 1,010  | -      | -      | -      |
| 25 (C)       | -      | -      | 1,497  | -      |
| 37 (N)       | 1,990  | 0,706  | 1,105  | 0,667  |
| 38 (N)       | 1,774  | 0,706  | 1,557  | 0,726  |
| 39 (N)       | 1,806  | 0,753  | 1,255  | 0,639  |
| 40 (N)       | 1,989  | 0,712  | 1,374  | 0,745  |
| 41 (N)       | 0,843  | 45,334 | 1,181  | 45,064 |
| 42 (O)       | 0,998  | 27,284 | 1,340  | 26,852 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 2** - Porcentagem de contribuições atômicas para os orbitais HOMO-7, HOMO-6, HOMO-1, LUMO, LUMO+1 e LUMO+3.

|              | HOMO-7 | LUMO+2 | HOMO-6 | LUMO   | HOMO-1 | LUMO+3 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Átomo</i> |        |        |        |        |        |        |
| 1 (Fe)       | 57,797 | 59,271 | 22,147 | 22,520 | 4,894  | 61,734 |
| 2 (C)        | 0,950  | -      | 1,769  | -      | -      | -      |
| 3 (H)        | 0,569  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 4 (H)        | -      | -      | 1,343  | -      | -      | -      |
| 5 (C)        | 1,088  | -      | 0,941  | -      | 1,057  | -      |
| 6 (H)        | -      | -      | 0,647  | -      | -      | -      |
| 7 (H)        | 0,720  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 8 (Cl)       | 4,021  | 14,596 | 0,786  | 0,786  | 78,575 | -      |
| 9 (C)        | 1,108  | -      | 0,913  | -      | 1,010  | -      |
| 10 (C)       | 0,952  | -      | 1,783  | -      | -      | -      |
| 11 (H)       | -      | -      | 0,607  | -      | -      | -      |
| 12 (H)       | 0,742  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 13 (H)       | 0,571  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 14 (H)       | -      | -      | 1,357  | -      | -      | -      |
| 17 (H)       | 0,507  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 18 (H)       | 0,527  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 19 (C)       | 0,673  | -      | 6,083  | 0,021  | 1,356  | -      |
| 20 (H)       | -      | -      | 3,497  | -      | -      | -      |
| 21 (H)       | -      | -      | 0,118  | -      | -      | -      |
| 22 (C)       | 1,042  | -      | 5,187  | -      | -      | -      |
| 23 (H)       | 0,654  | -      | -      | -      | -      | -      |
| 25 (C)       | 0,704  | -      | 6,022  | 0,020  | 1,497  | -      |
| 26 (H)       | -      | -      | 3,436  | -      | -      | -      |
| 28 (C)       | 0,528  | -      | 6,809  | -      | -      | -      |
| 29 (H)       | -      | -      | 4,397  | -      | -      | 0,552  |
| 31 (C)       | -      | -      | 4,651  | -      | -      | -      |
| 34 (H)       | 0,523  | -      | 6,780  | -      | -      | -      |
| 35 (H)       | -      | -      | 4,327  | -      | -      | 0,551  |

|        |        |       |       |        |       |       |
|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| 37 (N) | 1,115  | 3,254 | 2,607 | 0,706  | 1,990 | 7,532 |
| 38 (N) | 1,267  | 3,393 | 5,122 | 0,706  | 1,774 | 8,243 |
| 39 (N) | 1,188  | 3,170 | 2,460 | 0,753  | 1,806 | 7,608 |
| 40 (N) | 1,276  | 3,441 | 5,040 | 0,712  | 1,989 | 8,184 |
| 41 (N) | 6,363  | 8,308 | -     | 45,334 | 0,843 | -     |
| 42 (O) | 13,040 | 0,852 | 0,662 | 27,284 | 0,998 | -     |

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 3** Porcentagem de contribuições atômicas para os orbitais HOMO-4, HOMO-2, LUMO+2 e LUMO+3.

|              | HOMO-4 | HOMO-2 | LUMO+2 | LUMO+3 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Átomo</i> |        |        |        |        |
| 1 (Fe)       | 7,698  | 5,315  | 59,271 | 61,734 |
| 2 (C)        | 1,129  | 1,744  | -      | -      |
| 4 (H)        | 0,993  | 1,208  | -      | -      |
| 5 (C)        | 0,978  | 2,211  | -      | -      |
| 6 (H)        | 0,996  | 1,722  | -      | -      |
| 8 (Cl)       | 2,463  | 5,272  | 14,596 | -      |
| 9 (C)        | 0,992  | 2,231  | -      | -      |
| 10 (C)       | 1,144  | 1,775  | -      | -      |
| 11 (H)       | 1,015  | 1,713  | -      | -      |
| 14 (H)       | 1,00   | 1,230  | -      | -      |
| 15 (H)       | 0,784  | -      | -      | -      |
| 16 (H)       | 0,788  | -      | -      | -      |
| 19 (C)       | 2,842  | 5,060  | -      | -      |
| 20 (H)       | 2,180  | 3,851  | -      | -      |
| 21 (H)       | 0,791  | -      | -      | -      |
| 22 (C)       | -      | 2,383  | -      | -      |
| 25 (C)       | 2,945  | 5,053  | -      | -      |
| 26 (H)       | 2,228  | 3,850  | -      | -      |
| 27 (H)       | 0,850  | 0,425  | -      | -      |
| 28 (C)       | 2,959  | 2,684  | -      | -      |
| 29 (H)       | 2,205  | 2,091  | -      | 0,552  |
| 30 (H)       | 1,202  | 0,386  | -      | -      |
| 31 (C)       | -      | 0,891  | -      | -      |
| 34 (C)       | 2,985  | 2,701  | -      | -      |
| 35 (H)       | 2,289  | 2,100  | -      | 0,551  |
| 36 (H)       | 1,177  | 0,390  | -      | -      |
| 37 (N)       | 12,312 | 10,385 | 3,254  | 7,532  |
| 38 (N)       | 13,084 | 8,646  | 3,393  | 8,243  |
| 39 (N)       | 12,521 | 10,386 | 3,170  | 7,608  |
| 40 (N)       | 13,142 | 8,735  | 3,441  | 8,184  |
| 41 (N)       | -      | 1,041  | 8,308  | -      |
| 42 (O)       | 0,626  | 1,685  | 0,852  | -      |

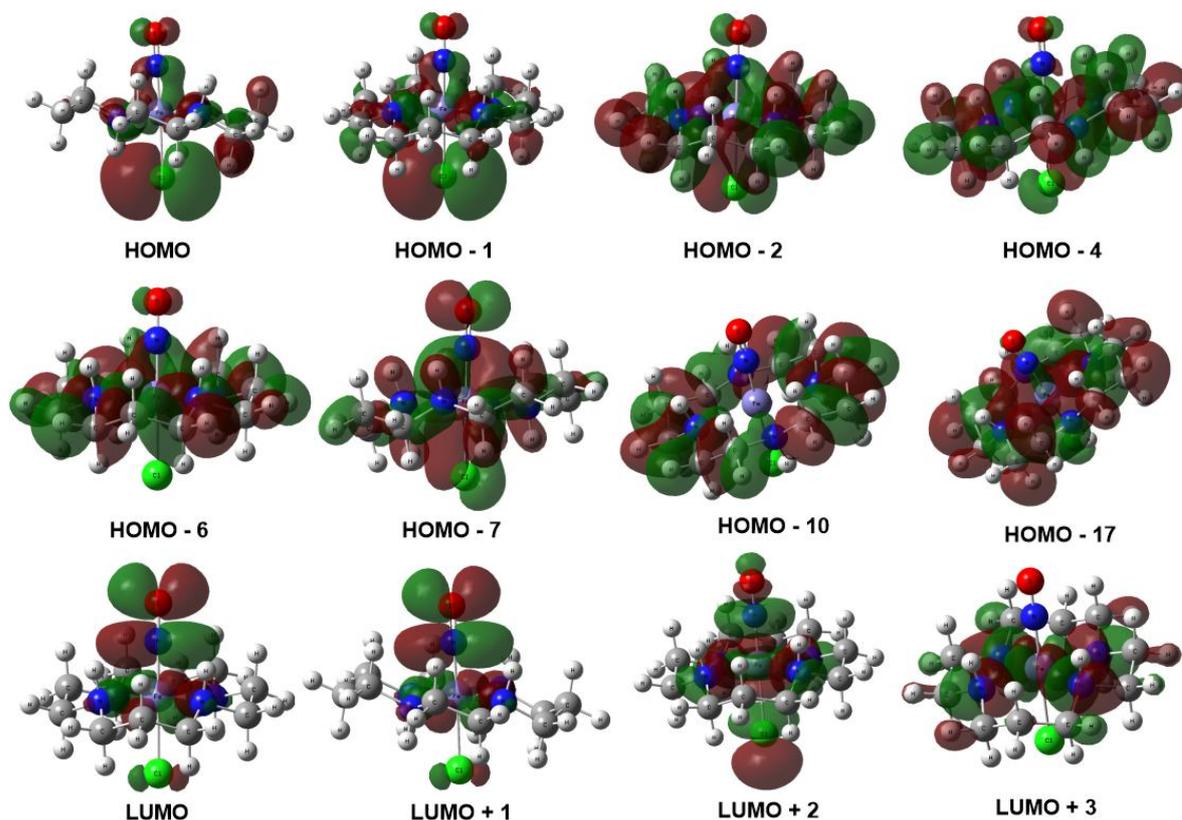
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 4** - Porcentagem de contribuições atômicas para os orbitais HOMO-4, HOMO-2, LUMO+2 e LUMO+3.

|              | HOMO-17 | HOMO-10 | HOMO-4 | LUMO   | LUMO+2 | LUMO+3 |
|--------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Átomo</i> |         |         |        |        |        |        |
| 1 (Fe)       | 10,058  | -       | 7,698  | 22,520 | 59,271 | 61,734 |
| 2 (C)        | 4,537   | 7,020   | 1,129  | -      | -      | -      |
| 4 (H)        | -       | 1,821   | 0,993  | -      | -      | -      |
| 5 (C)        | 5,861   | 7,102   | 0,978  | -      | -      | -      |
| 6 (H)        | -       | 2,168   | 0,996  | -      | -      | -      |
| 7 (H)        | 3,178   | -       | -      | -      | -      | -      |
| 8 (Cl)       | 1,210   | -       | 2,463  | 0,786  | 14,596 | -      |
| 9 (C)        | 5,932   | 7,256   | 0,992  | -      | -      | -      |
| 10 (C)       | 4,380   | 7,183   | 1,144  | -      | -      | -      |
| 11 (H)       | -       | 2,232   | 1,015  | -      | -      | -      |
| 12 (H)       | 3,224   | -       | -      | -      | -      | -      |
| 13 (H)       | 2,138   | -       | -      | -      | -      | -      |
| 14 (H)       | -       | 1,891   | 1,00   | -      | -      | -      |
| 15 (H)       | -       | -       | 0,784  | -      | -      | -      |
| 16 (H)       | -       | -       | 0,788  | -      | -      | -      |
| 19 (C)       | 2,158   | 6,736   | 2,842  | 0,021  | -      | -      |
| 20 (H)       | 0,571   | 1,104   | 2,180  | -      | -      | -      |
| 21 (H)       | -       | -       | 0,791  | -      | -      | -      |
| 22 (C)       | 7,755   | 8,878   | -      | -      | -      | -      |
| 23 (H)       | 3,930   | -       | -      | -      | -      | -      |
| 25 (C)       | 2,181   | 6,549   | 2,945  | 0,020  | -      | -      |
| 26 (H)       | 0,567   | 1,140   | 2,228  | -      | -      | -      |
| 27 (H)       | -       | -       | 0,850  | -      | -      | -      |
| 28 (C)       | 2,770   | 7,572   | 2,959  | -      | -      | -      |
| 29 (H)       | 0,547   | 1,677   | 2,205  | -      | -      | 0,552  |
| 30 (H)       | -       | -       | 1,202  | -      | -      | -      |
| 31 (C)       | 8,764   | 9,280   | -      | -      | -      | -      |
| 33 (H)       | 3,416   | -       | -      | -      | -      | -      |
| 34 (H)       | 2,660   | 7,630   | 2,985  | -      | -      | -      |
| 35 (H)       | 0,547   | 1,617   | 2,289  | -      | -      | 0,551  |
| 36 (H)       | -       | -       | 1,177  | -      | -      | -      |
| 37 (N)       | 4,751   | 2,610   | 12,312 | 0,706  | 3,254  | 7,532  |
| 38 (N)       | 5,442   | 2,024   | 13,084 | 0,706  | 3,393  | 8,243  |
| 39 (N)       | 4,812   | 2,695   | 12,521 | 0,753  | 3,170  | 7,608  |
| 40 (N)       | 5,417   | 2,081   | 13,142 | 0,712  | 3,441  | 8,184  |
| 41 (N)       | -       | -       | -      | 45,334 | 8,308  | -      |
| 42 (O)       | -       | -       | 0,626  | 27,284 | 0,852  | -      |

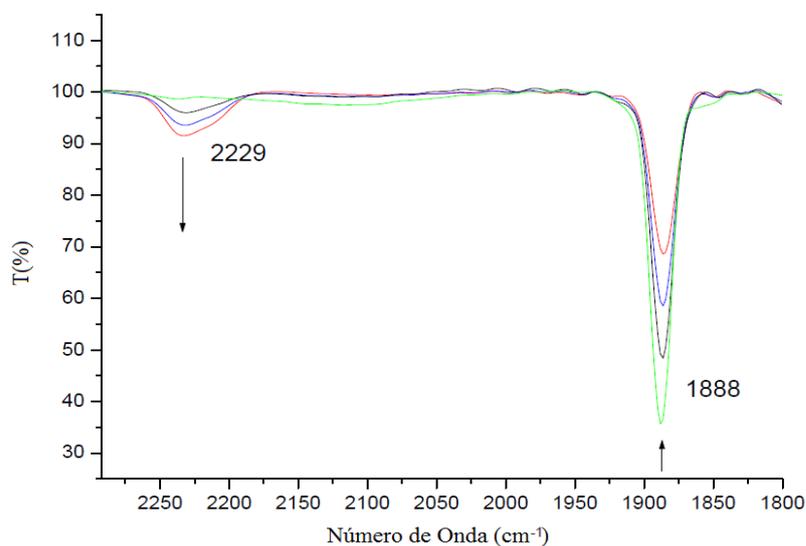
Fonte: Elaborado pelo autor.

**ANEXO IV - SUPERFÍCIES DE CONTORNO PARA OS ORBITAIS ENVOLVIDOS  
NAS TRANSIÇÕES EM 413, 286, 268, 253, 224 E 206 nm.**



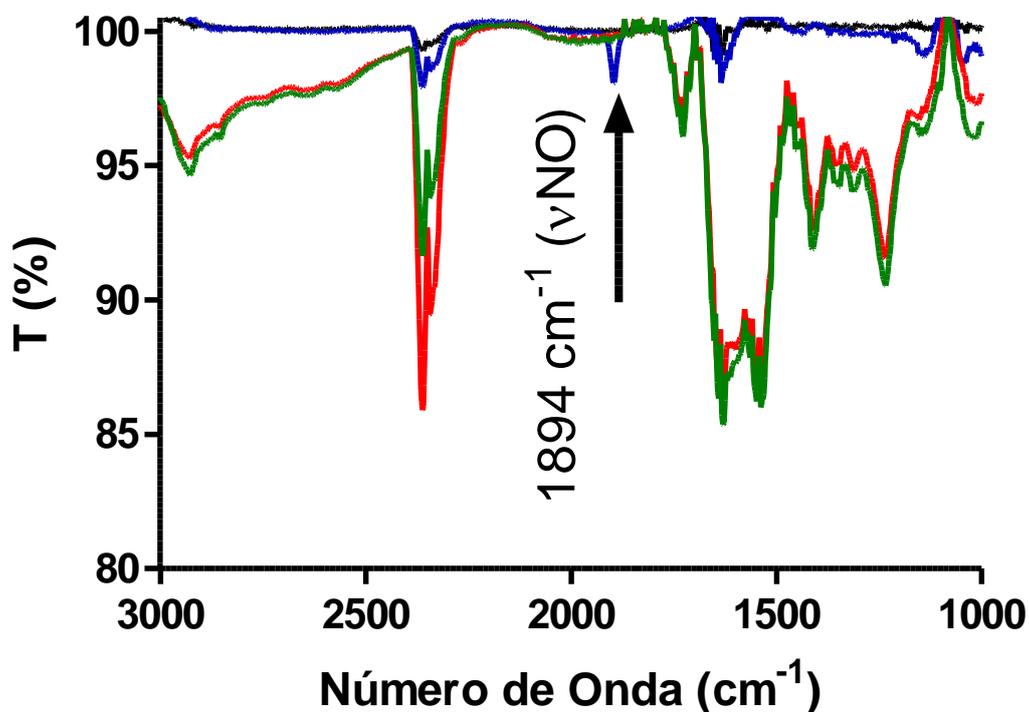
Fonte: Elaborado pelo autor.

**ANEXO V - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO  
PARA O COMPLEX *trans*-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub> EM PASTILHA DE KBr ANTES E  
APÓS IRRADIAÇÃO EM 330 nm.**



Fonte: Retirado da referência 67.

ANEXO VI - ESTUDO REACIONAL DO COMPLEXO *trans*-[Fe(cyclam)(NO)(Cl)]<sup>2+</sup> (10 mmol L<sup>-1</sup>) COM GSH (100 mmol L<sup>-1</sup>) EM TAMPÃO FOSFATO 0,5 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 ACOMPANHADO POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO. TEMPERATURA AMBIENTE 25 °C. BRANCO (—), COMPLEXO *trans*-[Fe(cyclam)(NO)(Cl)]<sup>2+</sup> (—), GSH (—), MISTURA CONTENDO O COMPLEXO E GSH APÓS 5 MINUTOS DE REAÇÃO (—).



Fonte: Elaborado pelo autor.