



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

FRANCISCA GILMARA DE MESQUITA VIEIRA

**NITROSILOCOMPLEXOS E ISONIAZIDA: REATIVIDADE E POTENCIAL
BIOLÓGICO**

FORTALEZA

2018

FRANCISCA GILMARA DE MESQUITA VIEIRA

NITROSILOCOMPLEXOS E ISONIAZIDA: REATIVIDADE E POTENCIAL
BIOLÓGICO

Tese submetida à Comissão do Curso de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

FORTALEZA

2018

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)

- V715n Vieira, Francisca Gilmara de Mesquita.
Nitrosilocomplexos e isoniazida: reatividade e potencial biológico. / Francisca Gilmara de Mesquita
Vieira. – 2018.
136 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
Coorientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes.
1. Nitrosilocomplexos. 2. Reatividade. 3. Isoniazida. 4. Terapia combinada.. I. Título.

CDD 540

FRANCISCA GILMARA DE MESQUITA VIEIRA

NITROSILOCOMPLEXOS E ISONIAZIDA: REATIVIDADE E POTENCIAL
BIOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 21/09/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jackson Rodrigues de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, José Hilmar e Maria Clara.

Aos meus irmãos, Augusto, Jaqueline e Vinícius.

À amiga Nayara Syndel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua bondade infinita e misericórdia, pela intercessão de Santa Terezinha do Menino Jesus e Maria Santíssima.

Aos meus pais, Maria Clara e José Hilmar, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida e aos meus irmãos, Augusto, Jaqueline e Vinícius, por todo auxílio, amor e dedicação.

Aos meus orientadores, professor Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa e professor Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes, pela generosa e brilhante orientação nesse trabalho, com toda paciência, zelo, dedicação, carinho e atenção. Por todos os ensinamentos valiosos a mim dispensados, contribuindo para meu crescimento profissional e também pessoal e, por acima de tudo, acreditarem no meu potencial e me permitirem alcançar um “voo” tão alto. Sou-lhes eternamente grata por tudo e encerro esse ciclo muito feliz e realizada e, ao mesmo tempo, com um aperto no coração pela despedida de um convívio de mais de nove anos.

A todos os professores do Grupo de Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao professor Dr. Jackson Rodrigues de Souza, por todo incentivo em meu ingresso em uma pós-graduação, atenção, receptividade no laboratório e pela alegria irradiada de sempre, o que tornou as lutas para realização desse trabalho mais leves.

Aos colaboradores que permitiram a concretização de grande parte desse trabalho: ao doutorando Edinilton Muniz Carvalho (Grupo de Bioinorgânica-UFC), a Thiago Abrahão Silva (USP-São Carlos) e ao professor Dr. Douglas Wagner Franco (*in memoriam*) da USP de São Carlos pelo ensaio de EPR; à aluna de mestrado Mayara Jane Campos de Medeiros, ao professor Dr. Francisco Ordelei Nascimento da Silva e ao Professor Dr. Daniel de Lima Pontes, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pela avaliação de atividade anticancerígena e suporte na interpretação dos dados; ao mestrando Iury Araújo Paz (Grupo de Bioinorgânica-UFC) e ao professor Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento (Departamento de Fisiologia e Biomedicina do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará), pela realização dos ensaios de vasodilatação dos compostos e auxílio na discussão dos resultados; à professora Dra. Dávila Zampieri (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica-UFC, em colaboração com o Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas da Universidade Estadual de Campinas, em São Paulo), pela obtenção dos espectros de massas, bem como o auxílio prestado nas discussões dos mesmos; ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da RMN (CENAUREM), em nome do professor

Dr. Edilberto Rocha Silveira e do operador Herbert de Sousa Magalhães; à Dra. Julie Laborde (Universidade de Toulouse, França) e à professora Dra. Vânia Bernardes-Génisson (Universidade de Toulouse, França), pela atenção e pelas discussões valiosas acerca desse trabalho; ao professor Dr. Tércio de Freitas Paulo (Bioinorgânica-UFC), por sua atenção e por valiosas sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará por todo o suporte concedido e oportunidade de crescimento profissional, bem como a todo o Corpo Docente que compõe o Programa. Nesse contexto, estendo meus agradecimentos a Célia e ao Orlando por todo o auxílio prestado na coordenação do curso durante esse período. Aos órgãos fomentadores, CAPES, FUNCAP e CNPq, pelo suporte financeiro concedido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço imensamente aos professores Dr. Adonay Rodrigues Loiola, Dra. Dávila de Souza Zampieri, Dr. Jackson Rodrigues de Sousa e Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine pelas contribuições valiosas na banca de minha defesa.

A todos os colegas do Grupo de Bioinorgânica, em especial, Ana Cláudia, Adolfo, André Luís, Catherine, Edinaira, Fernando, Gian, Josiane, Patrícia e Thiago. A Florêncio, Walysson, Dieric, Felipe, Sérgio, Denise e Ricardo, o meu muito obrigada por todo o suporte em inúmeros momentos e compartilhamento de conhecimentos, além da amizade. Ao Carlos Daniel, além da alegria contagiante da Bahia e amizade sincera, por toda força, estímulo e generoso compartilhamento de conhecimentos. Ao Marquinhos (José Marcos), por todo apoio e carinho desde o início dessa trajetória, não se abstendo de repassar seu elevado grau de conhecimento. A Edinilton, além do auxílio em diversos experimentos, pela força, carinho e motivação que me ajudaram a superar diversos desafios. A Auridéia, Vivânia, Amanda, Mikael e Welinson, por toda amizade, auxílio e companheirismo durante toda essa longa trajetória. À Danielle Queiroz, pela presença e auxílio constantes e valorosa amizade, minha eterna gratidão. À Nayara Syndel, que ingressou junto comigo nessa jornada, mas trilhou novos caminhos, agradeço pela companhia, amizade e auxílio em diversos momentos dessa trajetória. Ao aluno de iniciação científica Everton Diógenes, pelo auxílio em diversos momentos e pela oportunidade de crescimento mútuo. À Elis Cristina, além da amizade, grande incentivadora do início das minhas atividades em um laboratório de pesquisa (Grupo de Bioinorgânica-UFC), o que me possibilitou trilhar todo esse caminho, a minha sincera gratidão.

Ao Sr. Gildenor Monteiro, que além das atribuições inerentes a sua função, sempre se mostrou muito solícito a ajudar a resolver problemas no laboratório.

A minha amiga Lúcia Bezerra, por toda força, amizade e oração durante essa jornada.

Aos amigos do Projeto Palavra Viva, em especial Claudina, Galdino, Malu, Tânia e Tarcísio, pelo apoio, pelas orações e por me aproximarem mais de Deus.

Aos amigos e colegas de doutorado Carolina Moura e José Roberto, pelo companheirismo, pela força e pelo compartilhamento de conhecimentos.

Às amigas Cristina, Manuela e Tatianna Beserra, pela torcida, pelo apoio e pela longa amizade que temos.

As colegas de trabalho Meire e Cristiana, pela motivação, apoio, amizade e suporte, principalmente quando as lutas tentaram me abater.

A toda minha família, em especial as minhas tias Helena Mesquita, Hilma, Rosa Helena, Isabel, Marleide e Terezinha de Jesus, ao meus tios Luís Antônio e Aldemir, a minha prima Ana Paula, a meu cunhado José Wilson, as minhas cunhadas Veruska e Luciane, pela motivação de sempre, pelas orações, pelo apoio, por acreditarem no meu potencial e por vibrarem com as minhas conquistas.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu superasse todas as dificuldades e seguisse em frente até a concretização desse trabalho: MINHA ETERNA GRATIDÃO!

“Fé é assim: Primeiro você coloca o pé, depois Deus coloca o chão.”

Alexsandra Zulpo

RESUMO

O uso combinado de compostos bioativos, bem como os efeitos positivos ou negativos decorrentes de suas reatividades, tem sido relatado na literatura, incluindo um efeito sinérgico entre óxido nítrico e medicamentos antituberculose, como a isoniazida, potencializando a atividade bactericida. Neste trabalho investigou-se a reatividade de nitrosilocomplexos, $cis\text{-[Ru(bpy)}_2\text{(L)(NO)]}^{n+}$, sendo L= imidazol, 1-metilimidazol, tiouréia e sulfito, e $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$, com isoniazida, de forma a tentar elucidar os produtos desta reação e espécies reativas geradas, bem como avaliar possíveis atividades biológicas melhoradas. Neste estudo, empregaram-se técnicas cromatográficas, espectroscópicas e eletroquímicas para o monitoramento dessas reações, tendo sido evidenciado a redução do grupo nitrosil e sua labilização do centro metálico, com posterior formação de um aquacomplexo correspondente. Além disso, observou-se a formação de outros complexos de bipyridina de rutênio no meio reacional, contendo isoniazida e ácido isonicotínico, reforçando a oxidação da isoniazida. Medidas de espectrometria de massas foram adicionalmente empregadas na identificação de produtos desta reação, tal como amônia e o ácido isonicotínico. Adicionalmente, observou-se que a reatividade dos nitrosilocomplexos frente à isoniazida seguia o caráter eletrofílico do NO^+ coordenado. As medidas realizadas por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) comprovaram a liberação de HNO durante a reação envolvendo $cis\text{-[Ru(bpy)}_2\text{SO}_3\text{NO)]}^+$ com isoniazida. Ensaio biológicos preliminares sustentaram que essa combinação promove melhoria de atividades anticancerígena e vasodilatadora. Desta forma, este trabalho torna evidente a capacidade redutora da isoniazida frente aos nitrosilocomplexos estudados, originando espécies biologicamente relevantes, sustentando uma possível aplicação da combinação terapêutica de isoniazida e metalonitrosilos.

Palavras-chave: Nitrosilocomplexos. Reatividade. Isoniazida. Terapia combinada.

ABSTRACT

The combined use of bioactive compounds, as well as the positive or negative effects of their reactivities, has been reported in the literature, including a synergistic effect between nitric oxide and antituberculosis drugs, such as isoniazid, potentiating bactericidal activity. In this work we investigated the reactivity of nitrosyl complexes, $cis-[Ru(bpy)_2(L)(NO)]^{n+}$, where L = imidazole, 1-methylimidazole, thiourea and sulfite, and $[Fe(CN)_5NO]^{2-}$, with isoniazid, in order to try to elucidate the products of this reaction and generated reactive species, as well as to evaluate possible biological activities improved. In this study, chromatographic, spectroscopic and electrochemical techniques were used to monitor these reactions, showing a reduction of the nitrosyl group and its labilization of the metallic center, with the subsequent formation of a corresponding aquacomplex. In addition, the formation of other ruthenium bipyridine complexes in the reaction medium containing isoniazid and isonicotinic acid was observed, reinforcing the oxidation of isoniazid. Measurements of mass spectrometry were further employed in the identification of products of this reaction, such as ammonia and isonicotinic acid. Additionally, it was observed that the reactivity of the nitrosyl complexes to the isoniazid followed the electrophilic character of the coordinated NO^+ . The measurements performed by electronic paramagnetic resonance (EPR) confirmed the release of HNO during the reaction involving $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ with isoniazid. Preliminary biological assays have argued that this combination promotes improved anticancer and vasodilatory activities. Thus, this work demonstrates the reduction capacity of isoniazid against the studied nitrosyl complexes, originating biologically relevant species, sustaining a possible application of the therapeutic combination of isoniazid and metalonitrosilos.

Keywords: Nitrosyl complexes. Reactivity. Isoniazid. Mechanism. Combination therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Diagrama de orbital molecular para a molécula de óxido nítrico (NO°)....	23
Figura 2-	Reação química de formação de NO.....	24
Figura 3-	Estrutura química do íon complexo nitroprussiato.....	26
Figura 4-	Estrutura da isoniazida e suas propriedades químicas.....	29
Figura 5-	Mecanismo de produção de óxido nítrico a partir da ativação de izd.....	30
Figura 6-	O mais consensual mecanismo de ação da isoniazida na formação do aduto: NAD-IZD.....	30
Figura 7-	Fórmula estrutural dos complexos cis-[Ru(bpy) ₂ L(NO)] ^{nt+} onde L= sulfito, imidazol, metil-imidazol e tiouréia.....	36
Figura 8-	Conversão de MTT a formazano, pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase (SDH).....	48
Figura 9-	Variações espectrais referentes às reações do íon complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ , em A, na proporção de 1:1(complexo:izd), em B, na proporção de 1:10 (excesso molar de izd) e em C, utilizando-se 30x em excesso molar de isoniazida.....	51
Figura 10-	Dependência da temperatura na reação entre o íon complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ e isoniazida (10x em excesso molar), em diferentes temperaturas: 20, 25, 30, 37, 43 e 50°C e em pH 7,4.....	53
Figura 11-	Variação de k com a temperatura para a reação entre o complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ com isoniazida. Equação da reta: y= 9,96 + 3414x. R ² = 0,9999.....	54
Figura 12-	Gráfico obtido de constantes de velocidade observadas em função do pH para a reação entre -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ e isoniazida, a 37°C.....	57
Figura 13-	Aplicação do método de Job para reação entre para a reação entre cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ e isoniazida.....	58
Figura 14-	Estruturas dos compostos isoniazida (IZD), JL127, JL130 e JL131.....	59
Figura 15-	Variações espectrais referentes às reações do íon complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com os compostos JL131 (A), JL127 (B), JL130 (C), isoniazida (D), na proporção de 1:10 (complexo:ligante), em tampão fosfato pH= 7,4, a 37°C. Em E, resumo das curvas cinéticas (abs x tempo) referentes às reações do complexo com os ligantes JL131 (em preto), JL127 (em vermelho), JL130 (em azul), isoniazida (em verde).....	61

Figura 16-	Em A, imagens das amostras de solução referentes aos compostos livres, cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ (1), IZD (2), JL131 (3), JL127 (4), JL130 (5). Em B, imagens das amostras referentes às reações do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com os ligantes JL131 (3), JL127 (4), JL130 (5) e izd (6), após 12h de reação, e para reação com IZD, 1h de reação.....	63
Figura 17-	Variações espectrais referentes às reações do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)](PF ₆) ₃ com isoniazida, na proporção de 1:2, excesso de isoniazida, em A, 10x de excesso em B e 20x de excesso em C, Experimento realizado em tampão fosfato pH= 3,0, a 37°C.....	66
Figura 18-	Variações espectrais para a reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ (MetImN)(NO)](PF ₆) ₃ com isoniazida, na proporção de 1: 2, em A, 1: 10 em B, excesso de isoniazida. Experimento realizado em tampão fosfato pH= 3,0, a 37°C.....	68
Figura 19-	Variações espectrais para a reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ TU(NO)](PF ₆) ₃ com isoniazida, na proporção de 1/2, excesso de isoniazida, em A, e 20x de excesso em B, Experimento realizado em tampão fosfato pH= 3,0, a 37°C.....	70
Figura 20-	Curvas cinéticas referentes às reações dos complexos do tipo cis-[Ru(bpy) ₂ (L)(NO)] ⁿ⁺ , em que L= imidazol (em preto), metilimidazol (em vermelho), tioureia (em azul) e sulfito (em verde). Experimentos realizados a 37°C, em pH 3,0 e isoniazida com 10x de excesso.....	73
Figura 21-	Estudo da interação do complexo [Fe(CN) ₅ (NO)] ²⁻ com isoniazida, na proporção de 1/2, excesso de isoniazida, em A, e 10x de excesso em B, por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível. Acompanhamento do surgimento da banda em 440nm. Experimentos realizados a 37°C, em pH 9,4.....	74
Figura 22-	Variações espectrais referentes à reação do íon complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ e hidrazina, na proporção de 1:1(complexo:hidrazina).....	76
Figura 23-	Variações espectrais referentes à reação do íon complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ e azida de sódio, na proporção de	

	1:1(complexo:azida).....	77
Figura 24-	Cromatogramas da reação entre complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3(NO)](PF_6)$, $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e isoniazida, $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, monitorada a reação nos intervalos de tempo de oxidação do tempo zero até 48 horas. Fase móvel: 20% acetonitrila:água (pH= 3,5), fluxo de 0,8mL/min, $\lambda_{\text{analítico}} = 260\text{nm}$. 1= ácido isonicotínico, 2= isoniazida e 3= complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3(NO)](PF_6)$, 4 e 5= novos complexos de rutênio formados.....	80
Figura 25-	Espectros eletrônicos referentes aos picos cromatográficos da reação anterior (figura 24): espectro (A), pico com $t_R = 3,5\text{min}$, espectro (B), referente à espécie com $t_R = 4,0\text{min}$, espectro C, pico com $t_R = 4,5\text{min}$, espectro D, pico com $t_R = 5,7\text{min}$ e espectro E, referente ao pico com $t_R = 7,2\text{min}$	80
Figura 26-	Gráfico relacionando área do ácido isonicotínico e proporção de complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3(NO)](PF_6)$ utilizado nas reações com isoniazida, após o intervalo de tempo de 1 hora.....	82
Figura 27-	Cromatogramas obtidos para a reação do complexo $cis-[Ru(bpy)_2(SO_3)(NO)]^+$ (2) e o ligante JL127 (3). O código 1 indica o ácido isonicotínico. Fase móvel: gradiente 0 - 7,5min 10% metanol, de 7,5 - 10,50min 10-40% metanol, de 10,50 - 30min 40% metanol, de 30 - 35min 10% metanol:água(pH= 3,5), fluxo de 0,75mL/min, $\lambda_{\text{analítico}} = 260\text{nm}$	83
Figura 28-	Cromatogramas obtidos para a reação do complexo $cis-[Ru(bpy)_2(SO_3)(NO)]^+$ e os ligantes JL130 (em vermelho), JL131 (em azul), JL127 (em preto) e isoniazida (em verde). O número 1 representa o ácido isonicotínico.....	84
Figura 29-	Possíveis rotas para a oxidação da isoniazida.....	85
Figura 30-	Mecanismo de decomposição do sal de Angeli.....	87
Figura 31-	Estrutura do dietilamina NONOate (DEA/NO).....	88
Figura 32-	Monitoramento por CLAE para formação de ácido isonicotínico com o tempo de reação entre isoniazida $0,5\text{mmol L}^{-1}$ com sal de Angeli 1mmol L^{-1} (em azul) ou DEA/NO 1mmol L^{-1} (em vermelho). Fase móvel: 10% metanol:água(pH= 3,5), fluxo de 1,0mL/min, $\lambda_{\text{analítico}} = 260\text{nm}$	89

Figura 33-	Estudo da reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)](PF ₆) (1mmol L ⁻¹) com isoniazida, na proporção de 1/2, excesso molar de isoniazida, monitorado por voltametria de onda quadrada, com velocidade de varredura de 60mV/s. Experimento realizado em tampão fosfato pH 7,4, sob frequente desaeração com argônio. Em preto, voltamograma para o complexo padrão (SO ₃ NO), sem isoniazida (controle).....	91
Figura 34-	Estudo da reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)](PF ₆) (1mmol L ⁻¹) com isoniazida, na proporção de 1:0,25 (complexo:izd) em mols, por voltametria de onda quadrada, velocidade de varredura igual a 8mV/s. Experimento realizado em tampão fosfato pH 7,4.....	92
Figura 35-	Estudo de controle do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)](PF ₆) por voltametria de onda quadrada, velocidade de varredura de 8mV/s. Experimento realizado em tampão fosfato pH 7,4, pH 7,4, sob atmosfera de argônio.....	92
Figura 36-	Estudo controle da reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)](PF ₆) com azida de sódio, na proporção molar de 1/1 e 1/2 (excesso de azida), por voltametria de onda quadrada, com velocidade de varredura de 60mV/s. Experimento realizado em tampão fosfato pH 7,4.....	94
Figura 37-	Estudo da reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)](PF ₆) ₃ (1mmol L ⁻¹) com isoniazida, na proporção molar de 1/2, de isoniazida, por voltametria de onda quadrada, com velocidade de varredura de 60mV/s. Experimento realizado em NaCOOH/ Na(COOCH ₃) 0,1 mol L ⁻¹ pH 3,0.....	95
Figura 38-	Variações espectrais na região do infravermelho, para a reação do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (6,9x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) com isoniazida (13,8x 10 ⁻³ mol L ⁻¹). Experimento realizado em tampão pH= 7,4, em D ₂ O, em temperatura ambiente (25 °C).....	97
Figura 39-	Perfis espectrais obtidos das reações de R-PTIO com NO ou HNO. R= (-H), (-COO-) e (-N+(CH ₃) ₃).....	99
Figura 40-	(A) Reação entre cis-[Ru(bpy) ₂ (NO)(SO ₃)] ⁺ (200 μmol L ⁻¹), Isoniazida (1600 μmol L ⁻¹) e cPTIO (200 μmol L ⁻¹) monitorada por EPR durante 60	

	minutos. Temperatura ambiente, 25°C. (B) Curvas de Intensidade (%) do pico máximo em 3479 G vs tempo (60 minutos).....	99
Figura 41-	Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H para a reação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$ com isoniazida, obtidos em em solução de fosfato salino monobásico e dibásico (0,05M), pH 7,4 preparado em D_2O . Em A, espectro para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$, em B, reação monitorada no início, em C, após 24h e em D, após 72h de reação. Experimento realizado com isoniazida com concentração equimolar ao do complexo, $6,9\text{mol L}^{-1}$	113
Figura 42-	Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H para a reação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$ com isoniazida, obtidos em em solução de fosfato salino monobásico e dibásico (0,05M), pH 7,4 preparado em D_2O . Em A, espectro para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$, em B, reação monitorada no início, em C, após 24h e em D, após 72h de reação. Experimento realizado com isoniazida com concentração equivalente a 2x, em mol, em relação ao complexo, $13,8\text{mmol L}^{-1}$	104
Figura 43-	Espectro de massa ESI(+) para o complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$. Íons detectados: m/z 444,0393 e 523,9960.....	107
Figura 44-	Espectros teóricos de massas para os complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NO-})]^+$ (em A) e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ (em B).....	108
Figura 45-	Espectro de massa ESI(+) para a reação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$ com isoniazida, 1:2 (complexo:izd), após 30min. Íons detectados: m/z 600, 0316, 617,0581 e 641,0581.....	109
Figura 46-	Espectros teóricos de massa para os complexos $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NCCH}_3)(\text{PF}_6)]^+(\text{A})$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NCCH}_3)(\text{NH}_3)]\text{PF}_6\}^+(\text{B})$ e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NCCH}_3)_2]\text{PF}_6\}^+(\text{C})$	110
Figura 47-	Espectro de massa ESI(+) para a reação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]\text{PF}_6$ com isoniazida, 1:2 (complexo:izd), após 60min. Íons detectados: m/z 472,0702, 512,0320, 536,0319, 600,0316, 617,0579 e 641,0581.....	111
Figura 48-	Espectros teóricos de massa para os complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{CH}_3\text{CN})(\text{OH}^-)]^+$	

)] ⁺ (A), [Ru(bpy) ₂ SO ₃ H(NH ₃)] ⁺ (B) e [Ru(bpy) ₂ (NCCH ₃)(SO ₃ H)] ⁺ (C).....	112
Figura 49-	Possível rota de oxidação da isoniazida.....	114
Figura 50-	Curva de dose-resposta do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (SO ₃ NO), isolado e combinado com isoniazida (IZD), em ensaios de vasodilatação de aortas de rato. Entre colchetes, quantidade utilizada de anéis de aorta e os asteriscos indicam as diferenças estatísticas.....	116
Figura 51-	Curva de dose-resposta do complexo cis-[Ru(bpy) ₂ TUNO]PF ₆ (TUNO), isolado e combinado com isoniazida (IZD), em ensaios de vasodilatação de aortas de rato. Entre colchetes, quantidade utilizada de anéis de aorta e os asteriscos indicam as diferenças estatísticas.....	117
Figura 52-	Gráficos dose-resposta do tratamento das células SiHa (carcinoma de útero) com o complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ , em A, com isoniazida, em B e para a combinação de complexo e isoniazida, em C. Os dados mostram a média ± desvio padrão da média de três experimentos independentes.....	119
Figura 53-	Tabela com valores de IC ₅₀ para as células tumorais 786-0, B16-F10 e SiHa, calculados a partir das curvas sigmoidais dose-resposta para isoniazida, complexo cis-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (RuNOSO ₃) e para a combinação dos dois compostos (isoniazida 100μM+RuNOSO ₃).....	120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Possível mecanismo de formação de aduto para a reação de <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ e isoniazida.....	55
Esquema 2-	Representação da reação do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com os ligantes isoniazida (IZD), JL127, JL130 e JL131.....	65
Esquema 3-	Ordem ilustrativa do efeito de maior caráter NO^+ para os nitrosilocomplexos, com os ligantes imidazol, metilimidazol, sulfito e tioureia.....	72
Esquema 4-	Equação da reação do complexo nitroprussiato de sódio com isoniazida, em água.....	75
Esquema 5-	Proposta de mecanismo de reação do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ e isoniazida.....	76
Esquema 6-	Proposta de mecanismo redox envolvendo o complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SO}_3)(\text{NO})]^+$ e isoniazida.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Reagentes/solventes e suas procedências.....	37
Tabela 2-	Constantes de velocidade observadas (kobs) em função da temperatura referentes às reações do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com isoniazida a 20, 25, 30, 37, 43 e 50°C.....	53
Tabela 3-	Constantes de velocidade em função da temperatura referentes às reações do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com isoniazida, em diferentes temperaturas: 20, 25, 37, 43°C.....	54
Tabela 4-	Constantes de velocidade em função do pH referentes às reações do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com isoniazida, a 37°C.....	56
Tabela 5-	Valores de m/z e respectivos erros e atribuições para o compostos identificados.....	113
Tabela 6-	Dados de potência e eficácia dos complexos isolados e em combinação com isoniazida.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	Reflectância Total Atenuada
Bpy	2,2' – bipyridina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cPTIO	2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxi-3óxido
DEA/NO	Dietilamina NONOate
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
IZD	Isoniazida
ImN	Imidazol
JL127	N'-(propan-2-il)piridina-4-carbohidrazida
JL130	N-metilpiridina-4-carbohidrazida
JL131	N',N'-dimetilpiridina-4-carbohidrazida
MetImN	Metilimidazol
NaTFA	Trifluoracetato de sódio
NO	Óxido nítrico
NO ⁺	Íon nitrosônio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SO ₃ NO	<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO]PF ₆
TB	Tuberculose
TU	Tioureia
UV-vis	Ultravioleta-visível
TUNO	<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ TUNO]PF ₆

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Óxido nítrico (NO).....	23
1.1.1	<i>Nitroxila (HNO).....</i>	25
1.2	Nitrosilocomplexos.....	26
1.3	Tuberculose.....	27
1.3.1	<i>Isoniazida.....</i>	28
1.3.2	<i>Óxido nítrico e Tuberculose.....</i>	30
1.4	Terapia Combinada de Fármacos.....	31
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	35
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.1	Reagentes e Solventes.....	37
3.2	Equipamentos e técnicas experimentais.....	38
3.2.1	<i>Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.....</i>	38
3.2.2	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	38
3.2.3	<i>Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho.....</i>	38
3.2.4	<i>Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....</i>	39
3.2.5	<i>Eletroquímica.....</i>	39
3.2.6	<i>Ressonância Magnética Nuclear.....</i>	39
3.2.7	<i>Espectrometria de Massas.....</i>	39
3.3	Síntese dos complexos.....	40
3.3.1	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂Cl₂].....</i>	40
3.3.2	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆).....</i>	40
3.3.3	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂(L)NO](PF₆)₃, onde L= Imidazol e 1-metilimidazol.....</i>	41
3.3.4	<i>Síntese do complexo cis-[Ru(bpy)₂(TU)NO](PF₆)₃.....</i>	41
3.3.5	<i>Complexo Na₂[Fe(CN)₅(NO)].2H₂O.....</i>	42
3.4	Investigação da reatividade.....	42
3.4.1	<i>Monitoramento espectrofotométrico da Reação dos Nitrosilocomplexos com Isoniazida.....</i>	42
3.4.2	<i>Reações do cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ com redutores (hidrazina e azida de sódio).....</i>	44

3.4.3	<i>Determinação da estequiometria de reação.....</i>	44
3.4.4	<i>Ensaio de Reação Monitorado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	44
3.4.5	<i>Testes realizados com doadores de NO e HNO.....</i>	45
3.4.6	<i>Reações do cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ com análogos de isoniazida.....</i>	45
3.4.7	<i>Estudos de Reatividade Empregando Técnicas Eletroquímicas.....</i>	46
3.4.8	<i>Estudo de reatividade do complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ com isoniazida, empregando ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....</i>	46
3.4.9	<i>Estudo da reatividade do complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ com isoniazida, através da técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR).....</i>	47
3.4.10	<i>Estudo de reatividade do complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ com isoniazida, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H).....</i>	47
3.4.11	<i>Espectrometria de Massas.....</i>	47
3.5	Aplicação Biológica.....	48
3.5.1	<i>Ensaio de Citotoxicidade.....</i>	48
3.5.2	<i>Atividade vasodilatadora.....</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Monitoramento espectrofotométrico da Reação dos Nitrosilo Complexos com Isoniazida.....	50
4.1.1	<i>Reação da Isoniazida com o complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO]PF₆.....</i>	50
4.1.1.1	<i>Efeito da concentração.....</i>	50
4.1.1.2	<i>Efeito da temperatura.....</i>	52
4.1.1.3	<i>Efeito do pH.....</i>	56
4.1.1.4	<i>Determinação da estequiometria de reação.....</i>	57
4.1.2	<i>Reação de análogos da Isoniazida com o complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO]PF₆.....</i>	58
4.1.3	<i>Reação da Isoniazida com o complexo cis-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃.....</i>	65
4.1.4	<i>Reação da Isoniazida com o complexo cis-[Ru(bpy)₂(MetImN)(NO)](PF₆)₃.....</i>	68
4.1.5	<i>Reação da Isoniazida com o complexo cis-[Ru(bpy)₂(TU)(NO)](PF₆)₃.....</i>	69
4.1.6	<i>Reatividade do complexo [Fe(CN)₅NO]²⁻ com isoniazida.....</i>	73

4.2	Reatividade de cis-[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(NO)] ⁺ e Hidrazina.....	75
4.3	Reatividade entre o cis-[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(NO)] ⁺ com azida (N ₃ ⁻).....	77
4.4	Investigação de produtos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	78
4.4.1	<i>Reação da Isoniazida com o complexo cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)NO]PF₆.....</i>	78
4.4.2	<i>Reações entre cis-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ e isoniazida modificada (análogos de isoniazida).....</i>	82
4.4.3	<i>Testes realizados com doadores de NO e HNO.....</i>	87
4.5	Estudos por Técnicas Eletroquímicas.....	90
4.5.1	<i>Para o complexo cis-[Ru(bpy)₂SO₃NO]PF₆.....</i>	90
4.5.2	<i>Para o íon complexo cis-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]³⁺.....</i>	94
4.6	Estudo realizado por Reflectância Total Atenuada (ATR) na Região do Infravermelho.....	96
4.7	Investigação da liberação de NO e/ou HNO, por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	97
4.8	Monitoramento por Ressonância Magnética Nuclear.....	101
4.9	Espectrometria de Massas.....	106
4.10	Ensaio Biológicos.....	114
4.10.1	<i>Vasodilatação.....</i>	114
4.10.2	<i>Ensaio de Atividade de Citotoxicidade.....</i>	117
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
	REFERÊNCIAS.....	123
	APÊNDICE A- ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H PARA A REAÇÃO DO COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (6,9MMOL L ⁻¹), COM ISONIAZIDA, (6,9MMOL L ⁻¹), APÓS 10MIN, 24H E 72 H DE REAÇÃO.....	131
	APÊNDICE B- ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H PARA A REAÇÃO DO COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (6,9MMOL L ⁻¹), COM ISONIAZIDA, (13,8MMOL L ⁻¹), APÓS 10MIN, 24H E 72 H DE REAÇÃO.....	131
	APÊNDICE C -ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H PARA A ISONIAZIDA (A) E ÁCIDO ISONICOTÍNICO (B), EM SOLUÇÃO DE FOSFATO SALINO	

MONOBÁSICO E DIBÁSICO (0,05M), PH 7,4 PREPARADO EM D ₂ O.....	132
APÊNDICE D- REAÇÃO ENTRE ISONIAZIDA (1600 MMOL L ⁻¹) E CPTIO (200 MMOL L ⁻¹) MONITORADA POR EPR DURANTE 60 MINUTOS. TEMPERATURA AMBIENTE. (CONTROLE REACIONAL).....	133
APÊNDICE E- REAÇÃO ENTRE CIS-[RU(BPY) ₂ (NO)(SO ₃) ⁺] (200MMOL L ⁻¹) E CPTIO (200 MMOL L ⁻¹) MONITORADA POR EPR DURANTE 60 MINUTOS. TEMPERATURA AMBIENTE. (CONTROLE REACIONAL).....	133
APÊNDICE F- VARIAÇÃO DE K OBS COM A VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ISONIAZIDA PARA A REAÇÃO ENTRE O COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ COM ISONIAZIDA, A 20°C. R ² = 0,9877.....	134
APÊNDICE G-VARIAÇÃO DE K OBS COM A VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ISONIAZIDA PARA A REAÇÃO ENTRE O COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ COM ISONIAZIDA, A 25°C. R ² = 0,9994.....	134
APÊNDICE H - VARIAÇÃO DE K OBS COM A VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ISONIAZIDA PARA A REAÇÃO ENTRE O COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ COM ISONIAZIDA, A 37°C. R ² = 0,9991.....	135
APÊNDICE I-VARIAÇÃO DE K OBS COM A VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ISONIAZIDA PARA A REAÇÃO ENTRE O COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ COM ISONIAZIDA, A 43°C. R ² = 0,9945.....	135
APÊNDICE J – REGISTRO ORIGINAL DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA DO COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (SO ₃ NO) ISOLADO (EM AZUL) E EM LILÁS, COM A PRESENÇA DE ISONIAZIDA, SEGUIDA DA ADIÇÃO GRADATIVA DO COMPLEXO CIS-[RU(BPY) ₂ SO ₃ NO]PF ₆ (SO ₃ NO) DE 10 ⁻¹² MOL L ⁻¹ A 10 ⁻⁴ MOL L ⁻¹ , EM ENSAIOS DE VASODILATAÇÃO DE AORTAS DE RATO.....	136