



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE, INVESTIGAÇÃO ELETROQUÍMICA,
TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA E ESTUDOS
FARMACOLÓGICOS DO *trans*-DICLOROTETRAQUIS-
(3,5-DICARBOXIPYRIDINA) RUTÊNIO (II).

ILANA SEIFRIZ

DISSERTAÇÃO PROPOSTA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM QUÍMICA, ESPECIALIDADE QUÍMICA
INORGÂNICA.

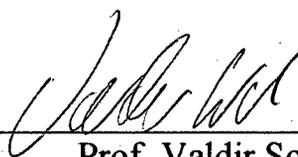
Florianópolis, março de 1999.

SÍNTESE, INVESTIGAÇÃO ELETROQUÍMICA, TITULAÇÃO
POTENCIOMÉTRICA E ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DO *trans*-
DICLOROTETRAQUIS-(3,5-DICARBOXIPIRIDINA) RÚTÊNIO (II).

ILANA SEIFRIZ

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de **Mestre em Química,**

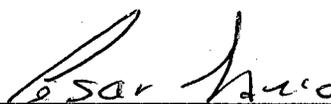
Especialidade em **Química Inorgânica**, e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca examinadora.



Prof. Valdir Soldi, Dr.

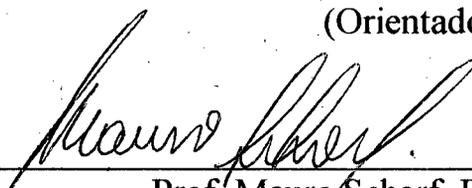
(Coordenador do Curso)

Banca Examinadora:

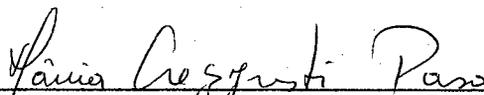


Prof. César Vitório Franco, PhD.

(Orientador)



Prof. Mauro Scharf, Dr.



Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dra.



Prof. Bruno Szpoganicz, PhD.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor César V. Franco pela ajuda e compreensão nas dificuldades encontradas nesta jornada de trabalho e pelo apoio ao meu crescimento profissional.

A CAPES, ao CNPq e a meus pais pelo suporte financeiro.

A meus pais pelo incentivo e apoio psicológico.

Ao colega Marlon Konzen, pela ajuda nas correções, pelo suporte psicológico e pelas madrugadas de trabalho.

Ao colega e amigo Marcos M. da Silva Paula, pelas orientações no laboratório e pela madrugadas de trabalho.

À colega Gledir, pelo apoio nas técnicas de titulação e pela paciência nas horas difíceis.

A todos os funcionários, professores e colegas do Depto. de Química pelo apoio científico e técnico, especialmente ao Dagoberto Tagliapietra e Vanilde de Farias Gerônimo.

A todos os colegas do Laboratório de Eletroquímica e Corrosão (LEC) e Laboratório de Síntese Inorgânica (LSI), em especial a Franci Daniele Procknow e Merlin C. E. Bandeira, com os quais compartilhei estes dois anos de muito trabalho e estudo.

**Sonhar, Caminhar,
lutar e acima de tudo acreditar.**

Autor desconhecido.

Trabalhar com amor é orar com as mãos.

Unidade.

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I- INTRODUÇÃO</i>	1
<i>1.0-QUÍMICA DO RUTÊNIO- COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO</i>	2
<i>1.1-DEFINIÇÕES: BIOQUÍMICA E RADICAIS LIVRES</i>	4
<i>1.2-QUÍMICA E REATIVIDADE DOS RADICAIS LIVRES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS</i>	5
<i>1.3-REAÇÕES CARACTERÍSTICAS DOS RADICAIS LIVRES</i>	6
<i>1.4-ORIGEM BIOLÓGICA DOS RADICAIS LIVRES</i>	6
<i>1.4.1- Química do oxigênio</i>	6
<i>1.4.2- O ânion superóxido</i>	8
<i>1.4.3- Peróxido de Hidrogênio</i>	9
<i>1.4.4- Radicais Hidroxila</i>	9
<i>1.4.5- Oxigênio singlete</i>	10
<i>1.4.6- Óxidos de Nitrogênio</i>	10
<i>1.5-ASPECTOS GERAIS DO RADICAL HIDROXILA</i>	11
<i>1.5.1- Aspectos Teóricos da Formação de Radicais Hidroxila em Sistemas Biológicos</i>	11
<i>1.5.2- Aspectos Práticos da Formação de Radicais Hidroxila em Sistemas Biológicos</i>	13
<i>1.5.3. Radical Hidroxila como Agente Tóxico</i>	14
<i>1.6-MONÓXIDO DE NITROGÊNIO</i>	15
<i>1.7- COMPLEXOS DE RUTÊNIO COMO CAPTADORES DE RADICAIS LIVRES</i>	16
<i>CAPÍTULO II- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	18
<i>2.1- Reagentes e solventes</i>	19

2.2- INSTRUMENTAÇÃO	20
2.2.1- <i>Análise Elementar</i>	20
2.2.2- <i>Medidas Espectroscópicas</i>	20
2.2.3- <i>Sínteses</i>	21
2.2.3.1- <i>Azul de Rutênio</i>	21
2.2.3.2- <i>Síntese do complexo trans-diclorotetraquis (3,5-dicarboxipiridina) rutênio (II)</i>	22
2.2.4- <i>Medidas eletroquímicas</i>	24
2.2.5- <i>Medidas Espectroeletroquímicas</i>	24
2.2.5.1- <i>Descrição Geral</i>	24
2.2.5.2- <i>Descrição da Célula</i>	25
2.2.6- <i>Titulação Potenciométrica</i>	27
3.0- PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	28
3.1- <i>Efeitos Antinociceptivos em Testes de Formalina</i>	28
3.2- <i>Produção e Detecção de Radicais Hidroxila (OH)</i>	29
3.3- <i>Teste de Citocixidade</i>	29
CAPÍTULO III- RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1- <i>Espectroscopia Eletrônica</i>	31
3.2- <i>Espectroscopia Vibracional</i>	33
3.3- <i>Espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C</i>	37
3.4- <i>Estudos Eletroquímicos</i>	40
3.5- <i>Estudos Espectroeletroquímicos</i>	42
3.6- <i>Titulação Potenciométrica</i>	45
4.0- <i>Propriedades Biológicas</i>	48
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Célula eletroquímica: suporte para o Eletrodo de Camada Delgada Opticamente Transparente. (A) Vista frontal do conjunto da célula (a) Tampa (b) copo (c) cavidade com a solução (d) eletrodo opticamente transparente de camada delgada (e) atadura com a fita de teflon (B) Vista superior da tampa (f) fenda para introdução do eletrodo de trabalho (g) entrada e saída de gás (h) orifício para a introdução do contra-eletrodo (i) orifício para a introdução do eletrodo auxiliar 26

Figura 2: Eletrodo Opticamente Transparente de Camada Delgada (A) Vista lateral (a) vidro condutor com dimensão diferenciada para o contacto elétrico (b) atadura de teflon (c) minitela de ouro (d) filme de óxido de índio dopado por estanho (e) espaçador de teflon (suporte de indicador de pH) 27

Figura 3: a. Espectro de RAMAN do complexo $\text{trans-[RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ freqüência de excitação de 632,8 nm, laser de He-Ne b. Espectro de Far-IR do complexo *trans* $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ disperso em parafina c. Espectro de MID-IR do complexo *trans* $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ em KCL. 36

Figura 4: Espectro de RMN de ^1H solvente água/acetona deuterado 1:1 38

Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C solvente água/acetona deuterado 1:1 39

Figura 6: Voltamogramas Cíclicos para o complexo *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] solvente água/acetona 1:1: eletrólito, 0,1 M LiClO₄; eletrodo de trabalho, carbono vítreo, $s_r = 100 \text{ m V.s}^{-1}$ 41

Figura 7: $E_{1/2}$ vs pH para o complexo *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] solvente água/acetona 1:1, eletrólito, 0,1 M LiClO₄ ; eletrodo de trabalho, carbono vítreo, $s_r = 100 \text{ m V.s}^{-1}$ 41

Figura 8: Curvas de Espectroeletróquímica para o complexo *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] 44

Figura 9: Gráfico de E_{aplicado} vs. $\log[O]/[R]$ para o complexo *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] 45

Figura 10: Curva de distribuição das espécies para o *trans*-diclorotetraquis(3,5-dicarboxipiridina) rutênio (II) em uma solução de CaCl₂ 0,00917 M. Solvente: água/acetona (1:1). 1) L⁻⁸, 2) HL⁷⁻, 3) H₂L⁶⁻, 4) H₃L⁵⁻, 5) H₄L⁴⁻, 6) H₅L³⁻, 7) H₆L²⁻, 8) H₇L⁻, 9) H₈L 10) Ca²⁺, 11) CaL⁶⁻, 12) CaHL⁵⁻, 13) CaH₂L⁴⁻, 14) CaH₃L³⁻ 15) Ca(OH)L⁷⁻ 48

Figura 11: Efeito do *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] como captador de radical hidroxila. Os resultados são mostrados como percentagem de máxima formação de [•]OH. (Em Absorbância, 100% = 1,04 ± 0,04) 50

Figura 12: Efeito do *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] aplicado intraperitonalmente contra a (A) primeira e (B) Segunda fase da dor induzida por formalina em ratos. Cada ponto representa a média ± desvio padrão médio de 5-10 animais. O asterisco denota os níveis de significância em relação ao grupo controle. 50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Eletroquímica, espectroscopia UV-Vis e parâmetros de equilíbrio para vários complexos de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄] 32

Tabela 2: Frequências Vibracionais do composto, com tentativa de atribuição. Os números de vibração de Wilson é dado entre os parênteses 33

Tabela 3: Dados de Voltametria cíclica para o primeiro processo de oxidação do complexo *trans*-RuCl₂(dinic)₄ (água/acetona 1:1, 25°C). Dados para vários valores de pH utilizando um eletrodo de Pt a 100mV.s⁻¹ de velocidade de varredura 43

Tabela 4: Constantes de protonação, porcentagem e pH máximos para as espécies geradas durante a titulação do *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] em presença de íons Ca⁺² em um sistema binário água acetona (1:1) 47

RESUMO

Este trabalho relata a síntese, a caracterização espectroscópica, a titulação potenciométrica, a investigação eletroquímica e o estudo das propriedades biológicas do complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic= ácido 3,5-piridinadicarboxílico). O complexo foi sintetizado utilizando-se uma solução de azul de rutênio como precursor da rota sintética. O composto foi caracterizado por análise elementar, espectroscopia eletrônica, espectroscopia FT-IR, espectroscopia Raman e de RMN de ¹H e ¹³C. Os resultados indicaram que o complexo apresenta geometria *trans* com simetria D_{4h}. Experimentos de Voltametria Cíclica foram conduzidas em uma solução binário água/acetona 1:1, revelando um processo *quasi*-reversível centrado no átomo de rutênio, bem como uma dependência do potencial redox (E_{1/2}) com o pH. O espectro eletrônico revelou a presença de uma banda de transferência de carga metal ligante (MLCT), a qual apresentou um deslocamento hipsocrômico com o aumento do pH. As análises espectroeletroquímicas indicaram que a banda na região do UV-Visível desapareceu progressivamente durante o processo de oxidação. Estudos potenciométricos revelaram a presença de 16 espécies em solução, cujas constantes de protonação foram determinadas. O composto exibiu ainda a habilidade de complexar íons cálcio. O complexo estudado não inibiu a atividade da enzima óxido nítrico sintase e também não atuou como captador de monóxido de nitrogênio. Entretanto, o complexo mostrou propriedades antinociceptivas e foi capaz de captar radicais hidroxilas.

ABSTRACT

This work reports the synthesis, spectroscopic characterization, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological studies performed on *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinedicarboxylic acid). The complex was synthesized using a ruthenium blue solution as the precursor of the synthetic route. Characterization took place by elemental analysis, electronic spectroscopy, vibrational FT-IR spectroscopy, Raman spectroscopy and ¹H e ¹³C NMR analysis. The results indicated that the complex depicts a *trans*- geometry with D_{4h} symmetry. Cyclic voltammetry experiments carried out in water:acetone 1:1 solution revealed a *quasi*-reversible process centered at the ruthenium atom, as well as a dependence of the redox potential (E_{1/2}) on the pH. The electronic spectra showed that the MLCT (metal ligand charge transfer) bands were also affected by the pH, undergoing a hypsochromic shift (blue shift) as the pH increased. The spectroelectrochemical measurements showed that the band in the visible region progressively faded out during the oxidation process. Potentiometric studies revealed the presence of sixteen species in solution, whose protonation constants were determined. The compound was also able to complex calcium ions. The complex did not inhibit the nitrogen monoxide synthase activity and also did not act as nitrogen monoxide scavenger. However the complex showed antinociceptive and hydroxyl radical scavenging properties.

OBJETIVOS

-Sintetizar e caracterizar quimicamente o complexo *trans*-[RuCl₂(dnic)₄];

-Determinar a potencialidade de utilização do complexo *trans*-[RuCl₂(dnic)₄] como captador de radicais livres;

-Determinar a relação entre o número e posição de grupos carboxílicos substituídos no anel piridínico e a sua atividade biológica.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.0- QUÍMICA DO RUTÊNIO-COMPLEXOS DE COORDENAÇÃO:

Os metais de transição possuem a singular característica de formar complexos com moléculas orgânicas neutras, chamadas comumente de ligantes, tais como: monóxido de carbono, aminas, fosfinas, bipyridinas, piridina e análogos. Estes ligantes normalmente apresentam orbitais π^* vazios, que contêm a particularidade de aceitar a densidade eletrônica do íon metálico formando um tipo de ligação π que suplementa a ligação σ provinda da doação do par eletrônico isolado. A consequência é a estabilização dos complexos metálicos, incluindo os de baixo estado de oxidação, por um processo chamado retrodoação π . A habilidade dos ligantes aceptores de densidade eletrônica em orbitais π^* de baixa energia é frequentemente referida como “acidez π ”, e os ligantes chamados de π -aceptores.

A química de coordenação teve início no final do século passado, quando o pesquisador Wagner¹ observou que sais de Fe(II) misturados com o ligante bipyridina formavam substâncias coloridas. Este foi o marco do início da pesquisa na síntese de compostos de coordenação utilizando como ligantes uma grande variedade de moléculas.

Os complexos de coordenação contendo rutênio (II) como centro metálico possuem uma rica química de coordenação², sendo exaustivamente estudados por pesquisadores no mundo inteiro. O primeiro complexo de rutênio³, $K_2[Ru(NO)Cl_5]$, foi sintetizado na metade do século XIX. Em 1959, Abel, Bennett e Wilkinson,⁴ sintetizaram os primeiros complexos de rutênio com geometria *trans* a partir norbornadienos hidrocarbonetos. Wilkinson⁵ e Taube⁶ investigaram complexos de rutênio coordenados a aminas, fosfinas, piridinas e ligantes correlatos. Wilkinson *et al.*^{4,5} mostraram que soluções de azul de rutênio podem ser muito efetivas na preparação de uma variedade

enorme de complexos com fórmula geral *trans*-[RuX₂(L)₄], onde X é um halogênio e L um ligante monodentado. A escolha apropriada do ligante permite que as propriedades do complexo sejam pré-determinadas com fins específicos.

Dentro desse contexto, nosso grupo relatou recentemente a síntese de complexos de rutênio contendo quatro ligantes piridínicos substituídos por sítios eletropolimerizáveis. O complexo *trans*-[RuCl₂(vpy)₄](vpy= 4-vinilpiridina)⁷ sofre eletropolimerização redutiva sobre substratos metálicos inertes e ativos, de forma que os filmes são gerados na região de potencial de proteção catódica dos substratos.

O potencial uso terapêutico de complexos de rutênio como captadores de radicais livres, especialmente monóxido de nitrogênio, vem sendo amplamente estudada pela comunidade bioquímica, uma vez que esta molécula aparentemente simples está intimamente ligada a uma grande variedade de funções endógenas. A participação no sistema imunológico, a transmissão de impulsos nervosos e também o controle da pressão sanguínea são apenas algumas destas funções⁸.

Reedijk *et al.*⁹ estudaram as propriedades anti-tumorais dos complexos *trans*-[RuCl₂(dmsO)₄](dmsO = dimetilsulfóxido) e [Him][*trans*-RuCl₄(Him)₂](Him = imidazol). Visando dar uma contribuição nesta área, e tendo em mente nossa experiência na preparação de complexos de coordenação,^{7,10,11,12,13} o Laboratório de Eletroquímica e Corrosão (LEC) e o Laboratório de Síntese Inorgânica (LSI) prepararam novos complexos de rutênio com ligantes derivados do ácido nicotínico, testando sua atividade em sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*^{13,14,15}.

Pela relevância do assunto torna-se necessária uma breve revisão bibliográfica de modo a permitir ao leitor que não possuem formação bioquímica o entendimento de alguns tópicos fundamentais para a compreensão deste trabalho.

1.1- DEFINIÇÃO- RADICAIS LIVRES:

Os radicais livres são definidos como qualquer molécula orgânica ou inorgânica reativa com um número ímpar de elétrons resultando em espécies com um elétron desemparelhado. O oxigênio molecular com dois elétrons desemparelhados e os metais de transição e seus complexos com um ou mais elétrons desemparelhados são aqui excluídos baseado em suas estabilidades¹⁶. Radicais são normalmente gerados em muitos processos metabólicos. Alguns destes radicais podem existir na forma livre e interagir subsequente com vários componentes dos tecidos do organismo resultando ou não em muitas disfunções¹⁷. Estas disfunções podem ser : inflamações, artrites reumáticas, arteriosclerose, câncer, diabetes, impotência sexual e muitas outras. Devemos ter em mente que os radicais livres podem iniciar uma série de eventos bioquímicos danosos, mas eles não são necessariamente responsáveis diretamente por estas disfunções. Radicais livres também podem ser conceituados como espécies químicas independentes com um ou mais elétrons desemparelhados. A literatura inclui neste grupo oxiradicais, radicais livres de oxigênio e várias combinações destas palavras. O termo espécie oxigênio reativa (ROS) é usado geralmente para designar todas as espécies derivadas do oxigênio ou de grupos funcionais contendo oxigênio reativo. Dentre eles podemos citar: oxigênio, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e peróxido, hidroperóxido e epóxidos. Mas eles não são radicais e não possuem necessariamente interações com tecidos através de reações radicalares. No caso, do peróxido de hidrogênio e do ácido hipocloroso eles reagem com os tecidos. Radicais centrados no carbono, nitrogênio e enxofre podem também ocorrer em sistemas biológicos e são importantes como iniciadores e/ou propagadores de vários tipos de danos ao organismo.

O termo radical livre, em toxicologia, refere-se à existência dos mesmos no estado livre ou não combinado, sendo capazes de interagir com vários componentes dos tecidos. Um radical pode interagir com um tecido fazendo com que muitas mudanças ocorram. Estas mudanças podem ser definidas em termos de danos ou outras respostas mais gerais do organismo.

Condições químicas severas não são sempre necessárias para formação de radicais livres. De fato, muitas classes de radicais livres são formadas como um resultado do metabolismo de substâncias químicas.

1.2- QUÍMICA E REATIVIDADE DOS RADICAIS LIVRES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS:

A química das reações dos radicais livres é extremamente complexa e seus detalhes não serão expostos aqui^{18,19}. A complexidade destas reações é intensificada por suas interações com moléculas biológicas resultando em dificuldades de concluir a ligação de radicais livres com os seus danos ou doenças.

A existência de oxigênio em todos os sistemas biológicos faz com que os radicais centrados no oxigênio sejam o tipo mais comum encontrado. Contudo, conforme citado anteriormente moléculas orgânicas contendo outros átomos também podem existir como radicais podendo danificar os tecidos. Os íons metálicos de transição também são importantes na produção de espécies radicalares. Estes possuem a habilidade de mover seus elétrons, o que é a base para a formação e propagação da maioria das reações radicalares tóxicas¹⁷. A melhor fonte biológica reconhecida de radicais livres são células fagócitas ativadas. Quando ativas estas células exibem um aumento marcante no consumo de oxigênio. Existem muitas outras fontes intracelulares, mas a importância de cada fonte e a sua desordem específica ainda é desconhecida.

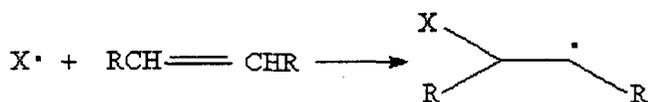
1.3- REAÇÕES CARACTERÍSTICAS DOS RADICAIS LIVRES:

Existem cinco reações básicas características dos radicais livres.

São elas:



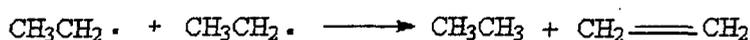
3. ADIÇÃO



4. TERMINAÇÃO



5. DISPROPORCIONAMENTO



Estas reações envolvem moléculas biológicas como o DNA, proteínas e lipídeos e parecem ocorrer constantemente como uma consequência do ambiente aeróbico no qual nós vivemos. As células desenvolveram uma bateria de defesas para prevenir e reparar os danos associados a mudanças oxidativas para o DNA, proteínas e lipídeos.

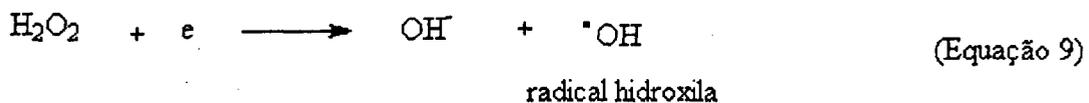
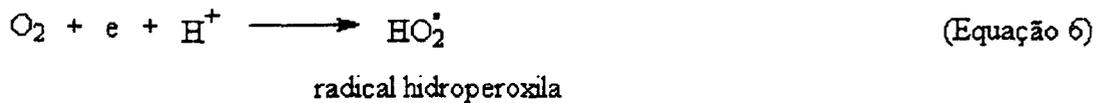
1.4- ORIGEM BIOLÓGICA DOS RADICAIS LIVRES:

1.4.1-Química do oxigênio:

O elemento oxigênio (O) existe no ar como uma molécula (O₂) conhecida por dioxigênio ou oxigênio molecular. Foi isolado e caracterizado entre anos de 1772 e 1774 por Priestley, Lavoisier e Scheele. O oxigênio molecular apareceu em quantidades significantes na superfície terrestre a

muito tempo atrás, cerca de $2,5 \times 10^9$ anos. Evidências geológicas sugerem que seu surgimento foi devido a atividade foto-sintética de micro-organismos (algas azuis e verdes) através da ação constante de radiação ultravioleta do sol. Sob estas condições as reações químicas começaram a produzir biomoléculas. O aumento lento e gradual da concentração de oxigênio foi acompanhado pela formação da camada de ozônio na Estratosfera. No Universo existe predominantemente hidrogênio e hélio e a Terra é o único centro conhecido de oxidação em um Universo redutor²⁰.

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera (78%) e o oxigênio é o segundo (21%). Entretanto, a quantidade de oxigênio no ar é negligenciável quando comparada a sua ocorrência nas moléculas de água dos oceanos, lagos e rios e como parte da reserva mineral da crosta terrestre, onde ele é sem dúvida o elemento mais abundante. Quando a atmosfera da Terra mudou de um estado altamente redutor para um estado rico em oxigênio, como nós conhecemos hoje, fez-se necessário à evolução de antioxidantes especializados contra as propriedades tóxicas do oxigênio. A vida aeróbica usa o oxigênio para oxidar substratos ricos em carbono e hidrogênio (comida) obtendo desta forma energia química e calor essencial para a vida. Infelizmente quando oxidamos moléculas com oxigênio, a molécula de oxigênio em si mesmo se torna reduzida e formas intermediárias aparecem; três das quais são radicais livres (equação 6-10):



Quando oxigênio é reduzido pelas etapas de adição de elétrons (equação 6-9) três radicais livres (radical hidroperoxila, radical hidroxila e superóxido) são formados juntos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No pH fisiológico (7,4), o radical hidroperoxido (HO_2^\bullet) se dissocia dando um radical ânion superóxido (O_2^-)²⁰, segundo equação 7.

1.4.2- O ânion superóxido:

A química dos superóxidos depende do meio ambiente em solução. Em soluções aquosas O_2^- é um fraco agente oxidante capaz de oxidar moléculas tais como ácido ascórbico e tióis. É um ânion radicalar formado quando um elétron entra em um dos dois orbitais $2p^*$ do oxigênio. Mas, O_2^- é um agente redutor muito forte capaz de reduzir vários complexos de ferro tal como citocromo C e EDTA-férrico. Os superóxidos desaparecem rapidamente do organismo devido a reação de dismutação (equação 11) onde o peróxido de

hidrogênio e oxigênio são formados. Esta reação é catalisada por uma enzima chamada superóxido dismutase (SOD).



1.4.3- Peróxido de Hidrogênio:

Muitas enzimas produzem H_2O_2 diretamente pela transferência de dois elétrons para o dióxigênio. Peróxido de Hidrogênio é um agente oxidante fraco e um fraco redutor, relativamente estável na ausência de íons metálicos de transição. Rapidamente se mistura com a água e difunde-se através das membranas celulares. A decomposição do H_2O_2 , catalisada por íons metálicos e outras reações, levam à formação de radicais livres HO_2^\bullet e $^\bullet\text{OH}$, os quais são os mais importantes.

1.4.4- Radicais Hidroxila:

O radical hidroxila é o maior produto resultante da reação de ionização de alta energia da água. (equação.12)



O radical $^\bullet\text{OH}$ é um oxidante extremamente agressivo que pode atacar a maioria das moléculas biológicas numa velocidade controlada por difusão.

1.4.5- Oxigênio singlete:

O oxigênio singlete não é um radical livre, pois não contém elétrons desemparelhados. A formação de oxigênio singlete é extremamente importante quando consideramos reações fotoquímicas.

1.4.6- Óxidos de Nitrogênio:

O monóxido de nitrogênio (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO₂) possuem número ímpar de elétrons e são considerados radicais livres, entretanto, o óxido nitroso (N₂O) não é. O dióxido de nitrogênio é um gás denso e venenoso e um forte agente oxidante. Já o NO é um gás incolor e um fraco agente redutor. Recentemente, o interesse por este óxido cresceu devido a ele estar envolvido em muitos processos biológicos²¹. O NO pode reagir com outros radicais livres, como o radical superóxido, produzindo um intermediário reativo, o peróxi-nitrito (ONOO⁻)²⁰, segundo a equação 13.



O peróxi-nitrito é um poderoso agente oxidante, capaz de danificar muitas moléculas biológicas e pode decompor-se para liberar radical hidroxila independente da catálise metálica, como pode ser observado na equação 13. O N₂O é um gás incolor usado como anestésico (“gás do riso”).

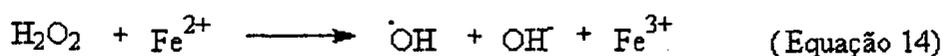
1.5- ASPECTOS GERAIS DO RADICAL HIDROXILA:

Os radicais hidroxila estão implicados na maioria dos fenômenos biológicos do ponto de vista de suas ações citóxicas (toxicidade celular). Podemos listar como ações citotóxicas a danificação celular por radiação ionizante e a destruição de microorganismos por fagócitos. Do ponto de vista benéfico ele é intermediário na biossíntese da prostaglantina. Indiretamente, é um agente protetor contra a peroxidação de lipídeos mediada por superóxidos.

1.5.1- Aspectos Teóricos da Formação de Radicais Hidroxilas em Sistemas Biológicos:

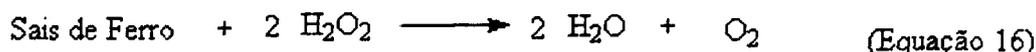
A alta reatividade da maioria dos radicais livres faz com que os mesmos sejam muito difíceis de se detectar. Os radicais hidroxila não são observados diretamente em sistemas biológicos. Geralmente, são inferidos a partir de certas propriedades oxidativas e da ação bloqueadora de captadores de radical hidroxila. A presença de H_2O_2 parece ser uma condição necessária para a formação de radicais hidroxila *in vitro*²².

O mecanismo de formação de radicais hidroxila em sistemas biológicos é assunto de muita controvérsia. Para isso é importante uma maior discussão. Um mecanismo que alcançou grande aceitação foi descrito nos anos de 1890, por um químico de Cambridge, é a Reação de Fenton^{22,23,24}, onde o peróxido de hidrogênio reage com sais de Fe^{+2} causando prejuízos oxidativos para moléculas orgânicas, tais como ácido tartárico. Esta reação é geralmente representada como segue abaixo. (equação 14)

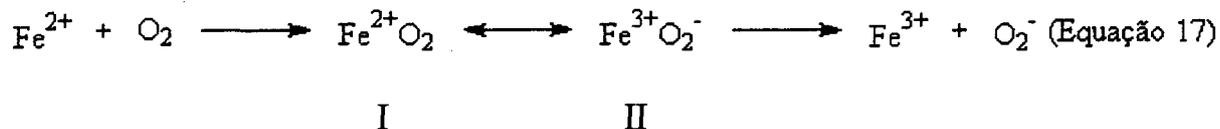




Reação Global:

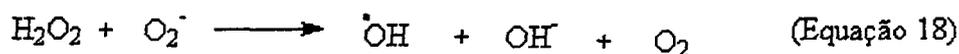


As reações 14 e 15 são simplificações grosseiras da química envolvida, particularmente quando tais reações são consideradas em sistemas biológicos. No pH fisiológico (7,4) íons ferroso, Fe (II) na presença de oxigênio e de íons fosfato, PO_4^{2-} , existem somente transitoriamente antes de se auto-oxidarem ao estado férrico, Fe (III). Neste processo de mudança do estado ferroso para o estado férrico um elétron é transferido do ferro para o oxigênio de modo que sejam produzidos superóxidos (equação 17).



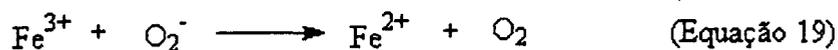
Os intermediários I e II são conhecidos como íons perferril, no qual o ferro possui estado de oxidação V.

Uma segunda reação para a formação de radicais $\bullet\text{OH}$ foi sugerida por Haber e Weiss em 1934, a partir da interação dos radicais superóxido (O_2^-) com peróxido de hidrogênio, segundo a equação 18.



Esta última reação gerou muitas controvérsias²⁵⁻³¹ devido a sua baixa velocidade medida por vários cientistas da área. Contudo, um caminho para acomodar uma velocidade relativamente lenta para a equação 18 seria considerar o efeito catalítico do ferro. Quelatos férricos e íons férricos são

reduzidos para suas formas ferrosas por superóxidos em uma reação mais rápida, conforme a equação 19.

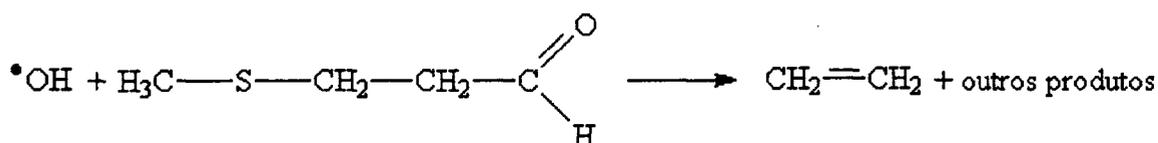


Walling observou que a geração de radicais hidroxila pela reação de Haber-Weiss pode ser acelerada pela presença de ferro ou quelatos de ferro em sistema *in vitro*^{23,24} ou pela presença de proteínas heme ou outras formas de ferro nos tecidos. A consideração da atividade catalítica do ferro também está de acordo com a reação de Fenton, pois se pode observar que da soma das equações 14 e 19 resulta a equação 18. O resultado global é a decomposição de H₂O₂ catalisada por ferros presentes nos tecidos e por radicais superóxido produzindo radicais hidroxila.

1.5.2- Aspectos Práticos da Formação de Radicais Hidroxila em Sistemas Biológicos:

Vários experimentos comprovam o envolvimento de radicais hidroxila em processos biológicos. Como a presença de [•]OH não pode ser constatada diretamente no organismo desenvolveram-se métodos indiretos para a identificação dos mesmos. Os principais são:

Geração de etileno a partir do metional (CH₃-S-CH₂-CH₂-CHO): Este método consiste na avaliação da quantidade de etileno formada a partir da equação 20.



(Equação 20)

A participação do $\cdot\text{OH}$ na reação foi comprovado por Bors^{22,32} em 1976. Esta reação é freqüentemente utilizada para verificar a eficiência de captador de radical hidroxila. Quanto maior a eficiência do captador, menor a quantidade de eteno formada no processo²².

Oxidação da desoxiribose: O método é baseado na oxidação da desoxiribose pelo radical $\cdot\text{OH}$ produzido a partir da reação de H_2O_2 com Fe(III)-NTA(ácido nitril acético).

1.5.3. Radical Hidroxila como Agente Tóxico:

Rerup³³, em 1970, provou que a droga aloxano, produto da oxidação do ácido dialúrico, destrói as células beta produtoras de insulina do pâncreas, resultando numa forma experimental de diabetes e comprovou a participação do $\cdot\text{OH}$ como agente tóxico na diabete induzida por aloxano e outras drogas capazes de reagir com ferro. A eficácia de captadores de radical hidroxila como agentes antidiabéticos em ratos foi estudada por Cohen³⁴ *et al* em 1975 e Heikkila^{35,36} *et al.* em 1974. Podemos citar como captadores de radicais hidroxila: álcoois alifáticos, dimetilsulfóxido, tiuréia e seus análogos, catalase, superóxido dismutase.

Cohen também estudou a participação do $\cdot\text{OH}$ como agente citotóxico nos processos neurodegenerativos induzidos pela 6-hidroxi-dopamina e 6-aminodopamina²². Resultados de estudos com captadores de radical hidroxila tanto *in vitro* como *in vivo* comprovaram a participação do radical no processo neurodegenerativo, através da atuação nos terminais nervosos catecolamina no sistema nervoso periférico.

1.6-MONÓXIDO DE NITROGÊNIO:

O monóxido de nitrogênio, NO é um dos compostos mais nocivos da atmosfera. É emitido pelos escapamentos dos carros sendo um poluente ambiental extremamente tóxico. Muitos avanços na área de química de coordenação dos metais do grupo platina devem-se ao estudo desta molécula com a finalidade de desenvolver conversores catalíticos de automóveis. Há uma década atrás o NO era considerado apenas mais uma molécula tóxica, destruidora da camada de ozônio, suspeita de ser carcinogênica e precursora da chuva ácida. Mas nos últimos 5 anos, diversas linhas de pesquisa estabeleceram a importância crucial do NO no corpo humano. O NO é sintetizado e secretado por um grande número de células mamíferas^{37,38}, e esta pequena molécula, em pequenas doses, é benéfica para o ser humano. Em 1992, muitos cientistas sondaram a atividade do NO no cérebro, nas artérias, no sistema imunológico, fígado, pâncreas, útero, nervos periféricos e pulmões. Constataram que a molécula é essencial para o bom funcionamento de todos estes órgãos, fato este que fez com que o gás fosse eleito pela revista Science a molécula do ano²¹, em 1992. O NO ajuda ainda a manter a pressão arterial pela dilatação dos vasos sanguíneos, é utilizada pelos fagócitos para oxidar corpos estranhos, é provavelmente o maior mediador bioquímico na ereção peniana, estando intimamente ligado a várias funções das células. Uma característica importante da molécula é sua labilidade que lhe permite passar através das membranas celulares por simples difusão.

O NO é também um componente essencial em muitos processos fisiológicos, tais como regulação de funções cardiovasculares, comunicação entre o sistema nervoso central e periférico, mediação da defesa contra microorganismos, e da aprendizagem e memória de longa duração. A atividade biológica do NO parece estar relacionada a nitrosilação de proteínas contendo centros metálicos ferro³.

O NO é um gás incolor solúvel em água a temperatura ambiente possuindo um par de elétrons desemparelhados sendo formalmente um radical livre, o qual reage avidamente com outras moléculas. Na presença de oxigênio, o NO pode desaparecer em poucos segundos depois de se formar, embora o tempo de meia vida no corpo humano seja desconhecido.

O monóxido de nitrogênio é sintetizado no organismo por uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS), através da oxidação da L-Arginina^{3,816,17}. Existem diversas isoformas da NOS, que são usualmente classificadas em dois grupos principais. A óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) é sintetizada pelas células endoteliais e neuronais. Esta enzima é dependente da concentração intracelular de cálcio, e produz NO em pequenas quantidades, para funções delicadas como a neurotransmissão. A óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é sintetizada por células como os macrófagos em resposta a estímulos externos, produzindo NO em quantidades relativamente maiores para funções como a defesa celular²¹. O desenvolvimento de drogas capazes de inibir seletivamente a iNOS é um dos campos de trabalho mais desafiadores para a química medicinal³, e um grande avanço nesta área foi recentemente relatado pelo Grupo Biomédico da Johnson Matthey o qual é responsável por uma das maiores contribuições na pesquisa e desenvolvimento de drogas baseada em metais, no campo de drogas inibidor i-NOS^{39,40}.

1.7- COMPLEXOS DE RUTÊNIO COMO CAPTADORES DE RADICAIS LIVRES:

A utilização crescente de complexos de rutênio, solúveis em água, como captadores de NO em sistemas biológicos vem sendo estudada amplamente pela comunidade científica. Estes complexos demonstraram um valor terapêutico potencial o qual foi estabelecido recentemente^{13,14,15}.

A descoberta que o NO está envolvido em muitas doenças e disfunções têm proporcionado um novo foco para pesquisa farmacêutica. Muitos pesquisadores estão engajados na investigação do uso de inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida, mas até o momento com pouco sucesso.

O Laboratório de Eletroquímica e Corrosão(LEC) e o Laboratório de Síntese Inorgânica(LSI) da UFSC, sintetizou dois novos complexos de rutênio usando como ligantes ácido 3-piridinacarboxílico (nic, runic) e ácido 4-piridinacarboxílico(i-nic, ruiso)¹². A presença de grupos carboxílicos aumenta significativamente a solubilidade destes complexos em água, facilitando a entrada dos mesmos no organismo humano. Resultados iniciais dos dois novos complexos *trans*-[RuCl₂(nic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] constataram que os mesmos, principalmente o *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄], foram capazes de inibir as óxido nítrico sintases e constitutivas induzida com uma pequena seletividade em favor da constitutiva. Ambos os complexos mostraram-se possuidores de propriedades analgésicas, antiinflamatórias e também não variavam a pressão sanguínea quando injetados em ratos^{13,14,15}.

Este trabalho está centrado na síntese e caracterização de um novo complexo desta família com a finalidade de estabelecer uma relação entre a posição e o número de grupos substituintes no anel piridínico e atividade de captação de radicais livres.

CAPÍTULO II

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1- Reagentes e solventes :

Os reagentes e solventes empregados nas sínteses foram de grau de pureza analítico. Os principais reagentes foram: cloreto de rutênio trihidratado (Aldrich); o ligante piridínico carboxilato, ácido 3,5-piridína dicarboxílico (Aldrich); os solventes, acetona e éter etílico (Grupo Química, Vetec e Quimex). Nas sínteses onde houve necessidade de atmosfera inerte foi utilizado argônio comercial (White Martins), e as medidas eletroquímicas e espectroeletroquímicas foram conduzidas em atmosfera inerte com o auxílio de argônio ultrapuro, de mesma procedência.

Nas medidas espectroscópicas os solventes utilizados foram de grau espectroscópico e usados sem purificação prévia. Os solventes utilizados nas medidas eletroquímicas e espectroeletroquímicas foram de grau cromatográfico e, quando necessário, purificados de acordo com métodos descritos na literatura⁴¹. Os eletrólitos suportes usados nos experimentos eletroquímicos foram utilizados sem purificação prévia, apenas foram mantidos em dessecador durante 24 horas antes de serem empregados. O eletrólito suporte utilizado para permitir a condutividade iônica foi perclorato de lítio, LiClO₄.

Nas titulações potenciométricas os solventes utilizados nas soluções foram acetona (Grupo Química, Quimex e Vetec), HCl (Quimex) e KOH (Titrisol- Carlo Erba).

2.2- INSTRUMENTAÇÃO:

2.2.1- Análise Elementar:

As medidas de análise elementar de CHN foram realizadas em um Analisador Elementar da Perkin-Elmer, modelo 2400.

2.2.2- Medidas Espectroscópicas:

Os espectros eletrônicos foram obtidos a vários pHs utilizando uma solução de água/acetona 1:1. Os meios ácidos foram preparados utilizando HCl 0,1 M e os meios básicos utilizando KOH 0,1 M. Os pHs das soluções foram medidos utilizando um pHmetro, modelo Cole-Palmer 5986-60 e os dados coletados por um espectrofotômetro HP, modelo 8452A, em cubetas de caminho ótico de 1,0 cm. Os espectros de Infra-Vermelho foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de IR-FAR, modelo Bomem DA3.16. Para o estudo da região de infravermelho médio, a amostra foi finamente compactada em KCl e colocada em um conector de reflectância difusa (COLLETOR, Spectra-Tech Inc.). Os resultados do espectro foram normalizados com relação a KCl puro. Para a região de Infra-Vermelho afastado, a amostra foi dispersa em parafina e colocada em um suporte de alumínio. A resolução do espectro foi ajustada para 4 cm^{-1} . O espectro de RAMAN ressonante foi obtido com o auxílio de um Renishaw Raman Microscope System 3000 usando uma linha de excitação de $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ com um laser de Neônio-Hélio, modelo Spectra-Physics Model 127 com uma potência constante de 5 mW feitas no Instituto de Química da USP, pelo professor Norberto Gonçalves Sanches. A amostra pulverizada foi colocada em uma lâmina de microscópio e levemente pressionada.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em um equipamento da Bruker AC 200 F, onde as amostras foram dissolvidas em acetona deuterada.

2.2.3- Sínteses:

2.2.3.1- Azul de Rutênio:

Relatos anteriores ^{4,5,6} mostraram que o azul de rutênio é um excelente precursor e de fácil preparação na síntese de compostos de fórmula geral *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{L})_4]$. A solução de azul de rutênio foi preparada de acordo com a literatura ^{6,10,11,12,42,43,44} com pequenas modificações. Utilizaram-se 260 mg (1.0 mmol) de $\text{RuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 7,0 mL de etanol e 5,0 mL de água, sob refluxo brando e agitação constante em atmosfera inerte de argônio durante aproximadamente 4 horas. A reação, inicialmente apresentava coloração amarela, passando pelo verde após algum tempo, e finalmente obtendo uma coloração intensa azul no final da reação. A formação de um espelho nas paredes do balão, devido a deposição de “clusters” e óxidos de rutênio, foi um forte indício que a reação ocorreu com sucesso. A solução de azul de rutênio possui pH ácido (1,0 a 2,0) e torna-se insolúvel à medida que o pH da solução aumenta (acima de pH 7,0). A solução deve ser usada logo após o seu preparo, mas também pode ser armazenada por várias horas, sob refrigeração e atmosfera inerte de argônio. As soluções foram empregadas logo que preparadas.

2.2.3.2- Síntese do complexo *trans*-diclorotetraquis (3,5-dicarboxipiridina) rutênio (II):

Logo após a formação do azul de rutênio foi adicionada a esta solução 984mg (8m.mol) de ácido 3,5- dicarboxílico piridina e o sistema de reação mantido sob atmosfera inerte de argônio, sob forte agitação magnética durante cerca de 60 minutos. O progresso da reação foi monitorado por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Espectroscopia de UV-Vis. A solução, inicialmente azul, após 10 minutos de reação, apresentou uma coloração verde até o aparecimento de uma coloração amarela alaranjada. Após esta etapa da reação, o meio reacional foi resfriado por 12 horas sob atmosfera inerte e depois filtrado para eliminar o excesso de ligante. O filtrado foi então rinsado duas vezes com 5 mL de acetona. Subseqüentemente, foi transferido para um funil de separação e extraído com éter etílico. A solubilidade do complexo pode ser aumentada na fase etérea adicionando-se 10 mL de acetona, aumentando desta maneira a eficiência da extração. Foram adicionadas também, algumas gotas de metanol (2 mL) na primeira etapa da extração. A fase orgânica foi concentrada sob vácuo com auxílio de um rota-evaporador e um sólido amarelo alaranjado foi obtido. O complexo foi recristalizado em água/acetona 1:1,5 (25,0 mL), incluindo 2mL de metanol. O sólido obtido é solúvel em acetona e éter etílico. O rendimento da reação é cerca de 57,2% baseado no composto de partida $\text{RuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Anal. (calc. %) para o composto: C% 40.0 (39.86), H: 2.40 % (2.96), N: 6.66 % (6.20).

2.2.4- Medidas eletroquímicas:

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato da EG&G-PAR, modelo 273A, com interface para um microcomputador IBM-PC/AT-486, via cartão de interface General Purposes Interface Board (GPIB) da National Instruments Co. Os resultados obtidos foram tratados com o auxílio do "Programa Computacional M 270" da PAR versão 4,0. A célula eletroquímica usada foi do tipo convencional, com capacidade de 20 mL, constituída de três eletrodos. O primeiro, o eletrodo de trabalho de carbono vítreo (área geométrica de $0,115 \text{ cm}^2$); o segundo, como eletrodo auxiliar, foi utilizado uma placa de platina; e o terceiro, como eletrodo de referência, um fio de prata imerso em uma solução 0,1 M de nitrato de prata em acetonitrila, isolado por uma membrana de "Vycor". Todos os dados foram obtidos à temperatura ambiente.

As medidas eletroquímicas foram feitas empregando uma mistura de solvente água/acetona 1:1 (v/v) e perclorato de lítio como eletrólito suporte. Os meios ácidos foram preparados utilizando-se HClO_4 , enquanto os meios básicos foram preparados com KOH. Os pHs foram ajustados a partir de um eletrodo previamente calibrado, acoplado a um pHmetro, modelo Analyser pH 500, inserido na célula eletroquímica até a sua estabilização. O pH do sistema foi rigorosamente controlado, e variações do mesmo no decorrer do experimento foram compensadas através da adição de soluções ácidas e básicas.

2.2.5- Medidas Espectroeletróquímicas:

2.2.5.1-Descrição Geral:

Foi desenvolvido em nosso laboratório um sistema com a finalidade de coletar dados das medidas espectroeletróquímicas constituído de dois módulos⁴⁵. O primeiro conjunto é formado por um eletrodo de camada delgada, formada por um vidro revestido por óxido de índio dopado por estanho e uma minitela de ouro, de fácil limpeza e que permite contacto eléctrico firme e seguro com o potenciostato. O segundo constituído por uma célula eletróquímica tipo monobloco de teflon, de fácil encaixe no porta cubetas de um espectrofotômetro que também serve de suporte para o primeiro conjunto, o eletrodo de camada delgada transparente. O sistema foi desenvolvido para um espectrofotômetro da Hewlett Packard, modelo 8452A, mas também pode ser facilmente adaptado a qualquer outro modelo.

As minitelas de ouro (500 linhas por polegada) foram obtidas na empresa Buckbee Mears Co., St. Paul, Minesota. Estas foram lavadas previamente, segundo processo de lavagem descrito a seguir. As minitelas foram imersas 24 horas em uma solução de HCl 0,1 M. Logo após foram deixadas em água de grau ultra puro (Milipore) por 1,0 hora, lavadas com acetona P.A. e secas no secador com corrente de ar quente.

As lâminas de vidro condutor foram lavadas por imersão durante 24 horas em solução detergente Extran MA2 neutro da Merk (5 %) e enxaguadas com água destilada. Subseqüentemente, foram colocadas no ultrassom durante 5 minutos de molho em água de grau ultrapuro (Milipore), e após também foram deixadas de molho em acetona P.A. (5 minutos) e secas no secador sob corrente de ar quente. Estes vidros possuem uma das faces revestidas com óxido de índio e dopadas por estanho adquirido da Donely

Corporation. Tanto as lâminas de vidro quanto as minitelas de vidro foram manuseadas com luvas cirúrgicas após o processo de lavagem.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro HP 8452A. Os potenciais foram gerados por um bipotenciostato da Pine Instrument Company, modelo RDE4, escolhido pela facilidade de manuseio. Foi utilizado como eletrodo auxiliar uma placa de platina, o eletrodo de referência, Ag/AgNO₃ e eletrólito suporte, perclorato de lítio 0,1 M.

2.2.5.2- Descrição da Célula:

A Figura 1 mostra a célula eletroquímica de teflon seccionada transversalmente. A finalidade desta parte do sistema é servir como suporte do eletrodo de camada delgada opticamente transparente. A tampa de teflon possui orifícios para a colocação do eletrodo auxiliar, do eletrodo de referência, para a entrada e saída de gás e o orifício para o eletrodo de camada delgada transparente. Possui formato cilíndrico, o qual encaixa-se sobre uma base, também de teflon, adaptável ao porta cubetas do espectrofotômetro, tendo capacidade de 20 mL. A Figura 2 mostra o esquema do eletrodo de camada delgada opticamente transparente, vista transversal (A) e vista frontal (B). A utilização da minitela de ouro é opcional. Seu uso dependerá da finalidade entre a espécie eletroativa e a superfície do eletrodo. No caso de termos uma substância eletroativa com boa interação com a superfície do eletrodo, a utilização da minitela de ouro não se faz necessária. Se a espécie eletroativa não apresentar interação com o vidro condutor revestido, com uma das faces revestidas com óxido de índio e dopadas por estanho, é fundamental o uso da minitela de ouro. Deve ser feito um teste com a finalidade de determinar a necessidade de seu uso ou não. Se for empregada, deve ser recortada e colocada sobre a face condutora de uma das placas na altura do

feixe ótico do espectrofotômetro. Então, as lâminas de vidro condutor devem ser sobrepostas uma sobre a outra, na forma de “sanduíche”, com as duas faces condutoras voltadas para o interior. Utilizou-se como espaçador entre as lâminas, duas tiras do papel indicador (Merck) colocadas nas extremidades. Com o auxílio de uma fita de teflon (marca Vedarosca) as duas placas do vidro condutor foram pressionadas e amarradas. Esta operação é executada de forma mais segura se for realizada com a ajuda de outra pessoa. Na montagem deste sistema é recomendado o uso de luvas cirúrgicas. Primeiramente, coloca-se o eletrodo de camada delgada opticamente transparente na fenda apropriada, logo após coloca-se a solução o qual subirá lentamente por capilaridade a um nível superior ao do feixe ótico. O potenciostato é acoplado ao sistema através de uma garra em uma das placas de vidro condutor o qual é aproximadamente 50 mm mais alta que a outra.

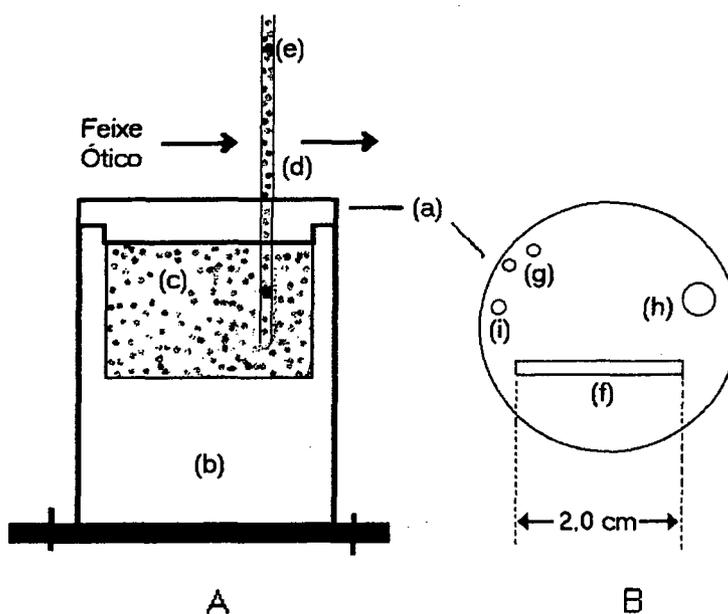


Figura 1: Célula eletroquímica: suporte para o Eletrodo de Camada Delgada Opticamente Transparente. (A) Vista frontal do conjunto da célula (a) Tampa (b) copo (c) cavidade com a solução (d) eletrodo opticamente transparente de camada delgada (e) atadura com a fita de teflon (B) Vista superior da tampa (f) fenda para introdução do eletrodo de trabalho (g) entrada e saída de gás (h) orifício para a introdução do contra-eletrodo (i) orifício para a introdução de o eletrodo auxiliar.

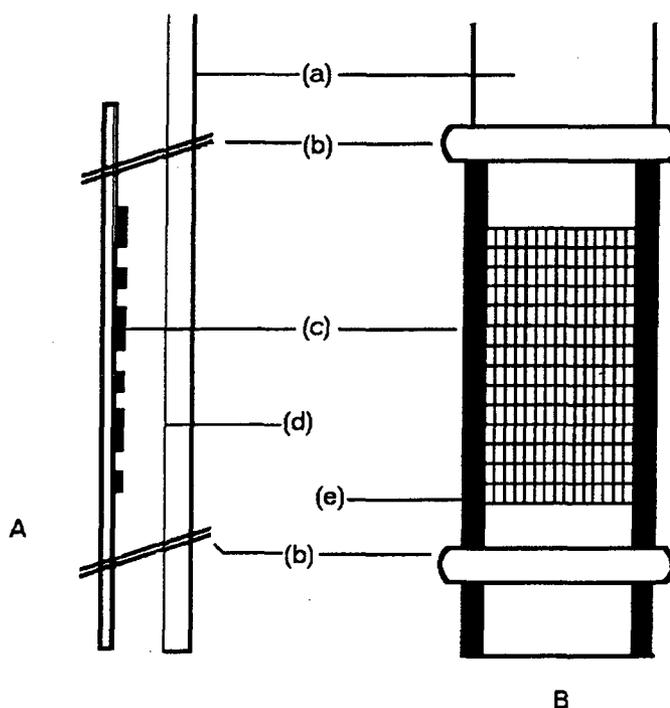


Figura 2: Eletrodo Opticamente Transparente de Camada Delgada (A) Vista lateral (a) vidro condutor com dimensão diferenciada para o contacto elétrico (b) atadura de teflon (c) minitela de ouro (d) filme de óxido de índio dopado por estanho (e) espaçador de teflon (suporte de indicador de pH)

2.2.6- Titulação Potenciométrica:

Os experimentos de titulação potenciométrica foram conduzidos numa célula convencional termostaticada a 25°C, acoplada a um eletrodo de vidro e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. A célula foi mantida sob atmosfera inerte de nitrogênio purificado com uma solução de KOH para remover traços de CO₂⁻². As medidas de pH foram efetuadas em um pHmetro Analyser pH 500. A bureta foi do tipo pistão, com capacidade de 10 mL. Os eletrodos foram calibrados com soluções padrões de HCl e KOH, através da leitura direta de $-\log[H^+]$. A amostra de 0,05 mmol do complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] foi diluída em 50 mL de uma solução água/acetona 1:1 diretamente na célula termostaticada. A solução foi mantida com força iônica de 0,1 M pela adição de KCl. A solução experimental foi titulada com uma solução de KOH 0,0953 M, isenta de carbonatos, previamente padronizada a

partir do padrão primário ftalato ácido de potássio. A quantidade de carbonato foi determinada experimentalmente através de metodologia descrita na literatura⁴⁶ para quatro titulações ácido-base uma vez que o sistema deve ser isento de carbonato (sistemas aquosos, máximo aceito ~ 2,0 %).

As diferentes constantes de protonação das diversas espécies possíveis do complexo foram determinadas com o auxílio do algoritmo computacional BEST 7.

Experimentos também foram realizados na tentativa de determinar a possibilidade de coordenação do complexo estudado a íons Ca^{2+} através dos grupos carboxilato. A amostra de 0,05mmol do complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ foi diluída em 50 mL de uma solução água/acetona 1:1 diretamente na célula termostaticada, à qual foram adicionados 5 mL de uma solução 0,00917 M de CaCl_2 , também em água/acetona 1:1, de forma que a proporção complexo/metal fosse 1:1. Adicionou-se também ao sistema 5 mL de HCl 0,1013 M, de forma a garantir a total protonação dos grupos carboxilato no início do experimento.

2.3- PROPRIEDADES BIOLÓGICAS:

2.3.1- Efeitos Antinociceptivos em Testes de Formalina:

Este teste foi descrito previamente na literatura por Beirith⁴⁷ et al. e Vaz⁴⁸ et al.. Basicamente, uma solução de formalina 2,5 % feita em solução de tampão fosfato, foi injetada subcutaneamente (s.c.) sobre a superfície da pata dianteira direita do animal. Após 30 min. os animais (ratos) foram tratados com o complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ (11,9-71,4 $\mu\text{mol.Kg}^{-1}$, i.p.= intraperitonealmente). A primeira fase de resposta nociceptiva da formalina induzida normalmente apareceu 0-5 min. depois da injeção da

formalina e a última fase 15-30 min. depois da formalina representando a resposta de dor neurogênica e inflamatória, respectivamente.

2.3.2- Produção e Detecção de Radicais Hidroxila (OH):

Este método é baseado na oxidação da desoxirribose pela produção de OH[•] a partir da reação do peróxido de hidrogênio com Fe (III)-NTA(ácido nitril acético). O método foi adaptado por Gutteridge e Halliwell⁴⁹, em 1988 e Nishida⁵⁰ *et al.* em 1991.

2.3.3- Teste de Citotoxicidade:

Magrófagos, foram incubados por 2 horas com o complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] acima de 500 μM realizados por Beirith *et al.* em 1998. A viabilidade da célula foi checada, observando a respiração da célula para redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] para formazan⁵¹.

Todos os testes biológicos foram realizados pelo Departamento de Ciências Fisiológicas - Biofísica da UFSC o qual participam a professora Tânia Beatriz Creczynki-Pasa e o aluno Vilson Ramon Bonetti e pelo Departamento de Farmacologia da UFSC o qual participam o professor João Batista Calixto e a aluna Alessandra Beirith.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Espectroscopia Eletrônica:

O complexo obtido, *trans*-[RuCl₂(dinic)₄], de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄], faz parte de uma série onde o nosso grupo de pesquisa estuda profundamente todas as propriedades e características destes complexos.

O comportamento espectral deste complexo é semelhante a compostos de fórmulas similares existentes na literatura, tais como *trans*-[RuCl₂(py)₄]⁶, *trans*-[RuCl₂(pmp)₄]^{10,11}, *trans*-[RuCl₂(vpy)₄]⁷ e *trans*-[RuCl₂(L)₄]¹², onde L= 3-ácido piridina carboxílico e 4-piridina carboxílico. Observou-se uma interdependência similar entre os valores $\lambda_{\text{máx}}$ e pH para os complexos *trans*-[RuCl₂(nic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]¹². O complexo estudado *trans*-[RuCl₂(dinic)₄]¹³ apresentou apenas uma banda na região do visível no sistema binário água/acetona (1:1). Poddar⁵² observou estas bandas em compostos correlatos como *trans*-[RuCl₂(py)₄], apesar das diferenças do solvente empregado. As transições eletrônicas são do mesmo tipo, $^1A_{1g} \rightarrow ^1T_{2g}$ e $^1A_{1g} \rightarrow ^1T_{1g}$ que correspondem a uma banda de transferência de carga metal ligante (banda MLCT). Poddar⁵² ainda relatou mais duas transições situadas no intervalo entre 600 e 700 nm o qual não foram observadas para este complexo, mesmo em espectros realizados em outros solventes e em diversas concentrações.

Este complexo apresentou espectros eletrônicos semelhantes entre os demais da série e entre os complexos de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄]^{7,10,11,12,13}. O complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] apresentou uma banda localizada em $415 \pm 1,0$ nm ($\epsilon = 7143,50 \pm 1,0$ L.mol⁻¹) em pH 3,00. Quando o pH foi aumentado para pH 6,00, houve um gradual deslocamento hipsocrômico, com $\lambda_{\text{máx}}$ em $404,50 \pm 1,0$ nm ($\epsilon = 7749,50 \pm 1,0$ L.mol⁻¹) até

alcançar um deslocamento máximo em pH 12,00, com $\lambda_{\text{máx}}$ em $401,50 \pm 1,0$ nm ($\epsilon = 7749,50 \pm 1,0$ L.mol⁻¹). A principal observação feita para os complexos apresentando grupos carboxilatos como ligante foi a interdependência entre o $\lambda_{\text{máx}}$ e a variação do pH foi o deslocamento que as bandas sofreram em virtude da mudança destes. Esta interdependência pode ser explicada em termos de desprotonação dos grupos carboxílicos e do efeito da densidade eletrônica do anel piridínico. O desprotonamento dos grupos carboxilato induz uma maior carga residual negativa no átomo de nitrogênio piridínico, e conseqüentemente aumento da energia de estabilização do campo cristalino do centro metálico, dificultando a transferência de carga metal ligante (MLCT) levando a ocorrer em maior energia. Na tabela 1 são mostrados espectros eletrônicos UV-VIS para vários complexos sintetizados em nosso grupo de trabalho.

Tabela 1: Eletroquímica, espectroscopia UV-Vis e parâmetros de equilíbrio para vários complexos de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄]^a.

COMPLEXO	E _{1/2} (mV) ^b	ΔE _p (mV)	pK _a (Ligante)	K _a (Ligante)	λ _{max} (nm)	Ref.
<i>trans</i> -RuCl ₂ (nic) ₄	50.3 ^c	84.4	4.85	1.4x10 ⁻⁵	399.7 ^d	12
<i>trans</i> -RuCl ₂ (i-nic) ₄	66.2 ^c	83.0	4.96	1.1x10 ⁻⁵	445.5 ^d	12
<i>trans</i> -RuCl ₂ (dinic) ₄	66.4 ^c	134.18	2.80	1.6x10 ⁻³	415.5 ^d	13
<i>trans</i> -RuCl ₂ (vpy) ₄	-103.5	84.61	-	-	446.0	7
<i>trans</i> -RuCl ₂ (pmp) ₄	308.0	-	-	-	404.0	10,11

a) x= ligantes derivados da piridina b) vs. Ag/AgCl at 100 mV.s⁻¹; c) at pH = 4.42; d) at pH = 3.0

3.2- Espectroscopia Vibracional:

As frequências vibracionais do complexo estudado são mostrados na tabela 1 na tentativa de atribuir o tipo de simetria possível para

este composto. Os espectros de Infravermelho e Raman (figura 3) mostraram muitas bandas atribuídas ao ligante coordenado^{53,54,55}. As suas regiões de baixa frequência são similares a compostos já existentes na literatura como *trans*-[RuCl₂(py)₄]⁶, o qual é indicativo que parte do ligante assume estereoquímica *trans*. Os modos vibracionais devido à ligação Ru-py e Ru-Cl são esperados na região de baixa frequência⁶. De outro lado, os ligantes volumosos meta-substituídos poderiam impor um significativo impedimento estérico o qual reduziria a simetria efetiva de D_{4h} para D₄, sendo que a regra de exclusão mútua não seria aplicada. Mas, uma inspeção muito cuidadosa do espectro Raman e do Infravermelho mostrou que isto não é verdade, desde que muito poucas bandas coincidentes foram vistas, devido a um fraco acoplamento entre as unidades do ligante.

Tabela 2: Frequências Vibracionais do composto, com tentativa de atribuição. Os números de vibração de Wilson é dado entre os parenteses.

RAMAN	IR	ASSIGNMENT
115(f)	---	modo de vibração angular do esqueleto
---	134(f)	modo de vibração angular do esqueleto
---	169(m)	modo de vibração angular do esqueleto
---	179(o)	modo de vibração angular do esqueleto
181(f)	---	modo de vibração angular do esqueleto
---	214(m)	modo de vibração angular do esqueleto
231(m)	---	estiramento .Ru-py
265(m)	---	estiramento .Ru-py
288(f)	---	estiramento .Ru-Cl
---	292(m)	estiramento .Ru-py
---	316(f)	estiramento .Ru-Cl
---	482(f)	deformação do anel py f.a..
492(m.f.)	---	deformação do anel py f.a..
---	513(m)	deformação do anel py f.a..

---	578(m)	deformação do anel py f.a..
657(f)	---	py δ (CH)
---	663(F)	py δ (CH)
677(m)	---	py δ (CH)
---	682(F)	py δ (CH)
---	750(F)	py δ (CH)
783(m)	---	py δ (CH)
---	795(o)	py δ (CH)
---	903(f)	δ (OH) f.a.
---	926(m)	δ (OH) f.a.
---	956(f)	δ (OH) f.a..
958(f)	---	δ (OH) f.a.
1031(F)	---	respiração anel py
---	1032(m)	respiração anel py
---	1107(F)	respiração anel py
1116(F)	---	respiração anel py
---	1172(o)	ν (C-O)
1186(m)	---	ν (C-O)
---	1225(F,a)	ν (C-O)
1253(m.f.)	---	ν (C-O)+ δ (OH)
1294(f)	---	ν (C-O)+ δ (OH)
---	1303(m)	ν (C-O)+ δ (OH)
1372(f)	---	ν (C-O)+ δ (OH)
---	1385(F)	ν (C-O)+ δ (OH)
---	1436(m)	ν (C-O)+ δ (OH)
1446(f)	---	ν (C-O)+ δ (OH)
---	1595(m)	estiramento ν (C=C)anel py
1599(F)	---	py ring ν (C=C) estiramento
1720(f)	---	ν (C=O)
---	1727(m.F.)	ν (C=O)

Abreviações: n.p. = no plano; f.a. = fora do plano; f = fraco; F = forte; m.f. = muito fraco; m. = médio; o = ombro; a = alargamento, m.F. = muito forte.

Analisando o espectro de Infravermelho médio, as bandas mais evidentes são devido aos grupos carboxílicos existentes no complexo e a deformação CH do anel piridínico. Considerando apenas o caroço central MX, o esquema 1 retrata uma previsão do número de modos e suas atividades:

Esquema 1: Raman e IR - Previsões possíveis para três tipos de simetria

		O _h	D _{4h}	C _{2v}
v ₁	v(MXY)	A _{1g} (R)	A _{1g} (R)	A ₁ (R,IR)
v ₂	v(MXY)	E _g (R)	A _{1g} (R)+B _{1g} (R)	2 A ₁ (R,IR)
v ₃	v(MXY)	F _{1u} (IR)	A _{2u} (IR)+E _u (IR)	A ₁ (R,IR)+B ₁ (R,IR)+B ₂ (R,IR)
v ₄	δ(MXY)	F _{1u} (IR)	A _{2u} (IR)+E _u (IR)	A ₁ (R,IR)+B ₁ (R,IR)+B ₂ (R,IR)
v ₅	δ(MXY)	F _{2g} (R)	B _{2g} (R)+E _g (R)	A ₂ (R)+B ₁ (R,IR)+B ₂ (R,IR)
v ₆	δ(MXY)	F _{2u} (R)	B _{2u} (in)+E _u (IR)	A ₁ (R,IR)+B ₁ (R,IR)+B ₂ (R,IR)

Sumarizando o esquema número 1, teremos:

Esquema 2- Previsão das bandas de IR e RAMAN:

estiramento: Raman	2	3	6
IR	1	2	6
pêndulo: Raman	2	2	9
IR	1	3	8
total : Raman	4	5	15
IR	2	5	14

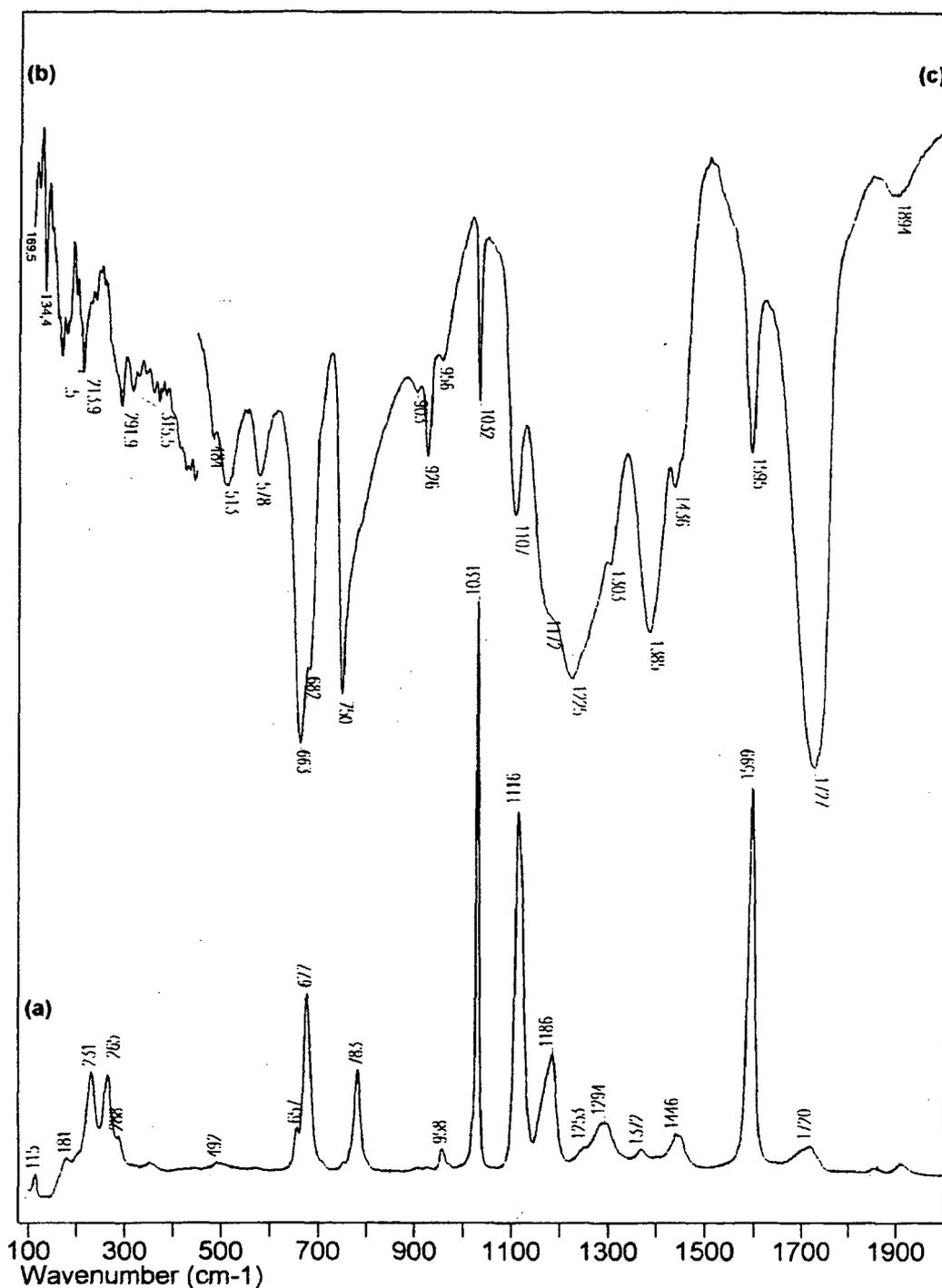


Figura 3: a. Espectro de RAMAN do complexo $\text{trans-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ b. Espectro de IR-FAR do ligante livre c. Espectro de IR- MID do ligante livre

De acordo com o esquema 2, a geometria do complexo é *trans* (D_{4h}), uma vez que existe um número reduzido de bandas aliada a ausência de

bandas coincidentes, quando comparadas a um grande número de bandas largas requeridas para satisfazer a geometria *cis* (C_{2v}).

3.3- Espectroscopia de RMN de 1H e ^{13}C :

O espectro de RMN 1H do complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (figura 4) apresentou os seguintes picos característicos. A integração relativa dos picos revela a presença de um próton na posição γ do anel piridínico, com δ 8,8 ppm (1H, t) junto com os prótons na posição 1 e 6, com δ 9,5 ppm (2H, d). Nenhuma mudança significativa ocorre nas posições dos picos de RMN de 1H após a coordenação ao rutênio. Além do mais, o pico correspondente ao átomo de hidrogênio nas vizinhanças do heteroátomo, o nitrogênio, não sofre desdobramento. Esta característica é típica de geometria *trans*-, ao invés de geometria *cis*-^{6,10}. O aspecto do perfil do RMN de 1H , com dois sinais de proporção de intensidade 2:1, poderia também ser um argumento para explicar a geometria do complexo.

O espectro de ^{13}C (figura 5) retrata quatro sinais distintos, o primeiro em 127,9 ppm, o segundo em 137,3 ppm, o terceiro em 162,5 e o quarto em 164,7 ppm.

Ambos os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C confirmam os resultados obtidos pela espectroscopia Raman e FT-IR, garantindo uma indicação mais evidente da geometria *trans*- do complexo estudado.

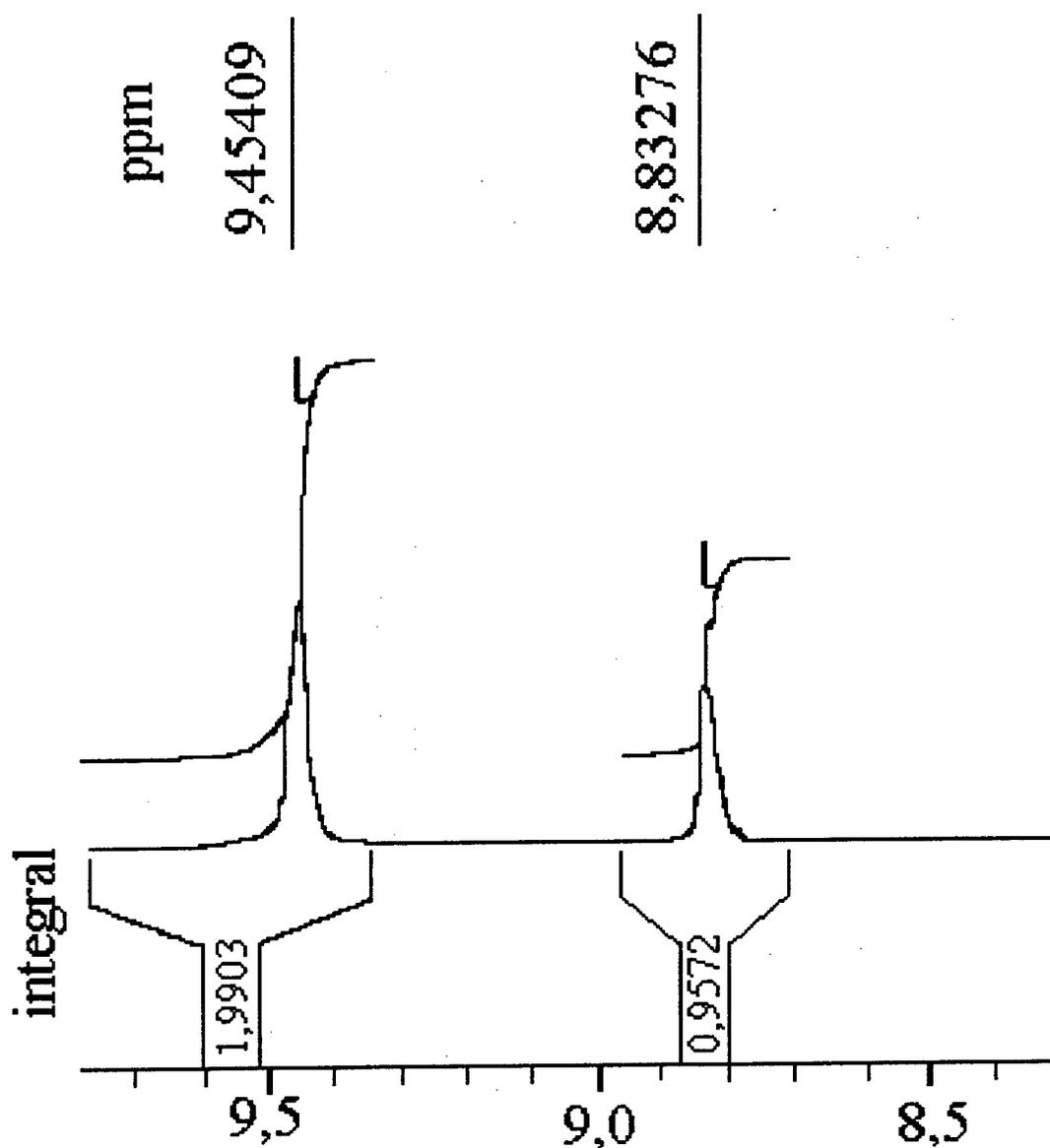


Figura 4: Espectro de RMN de ^1H

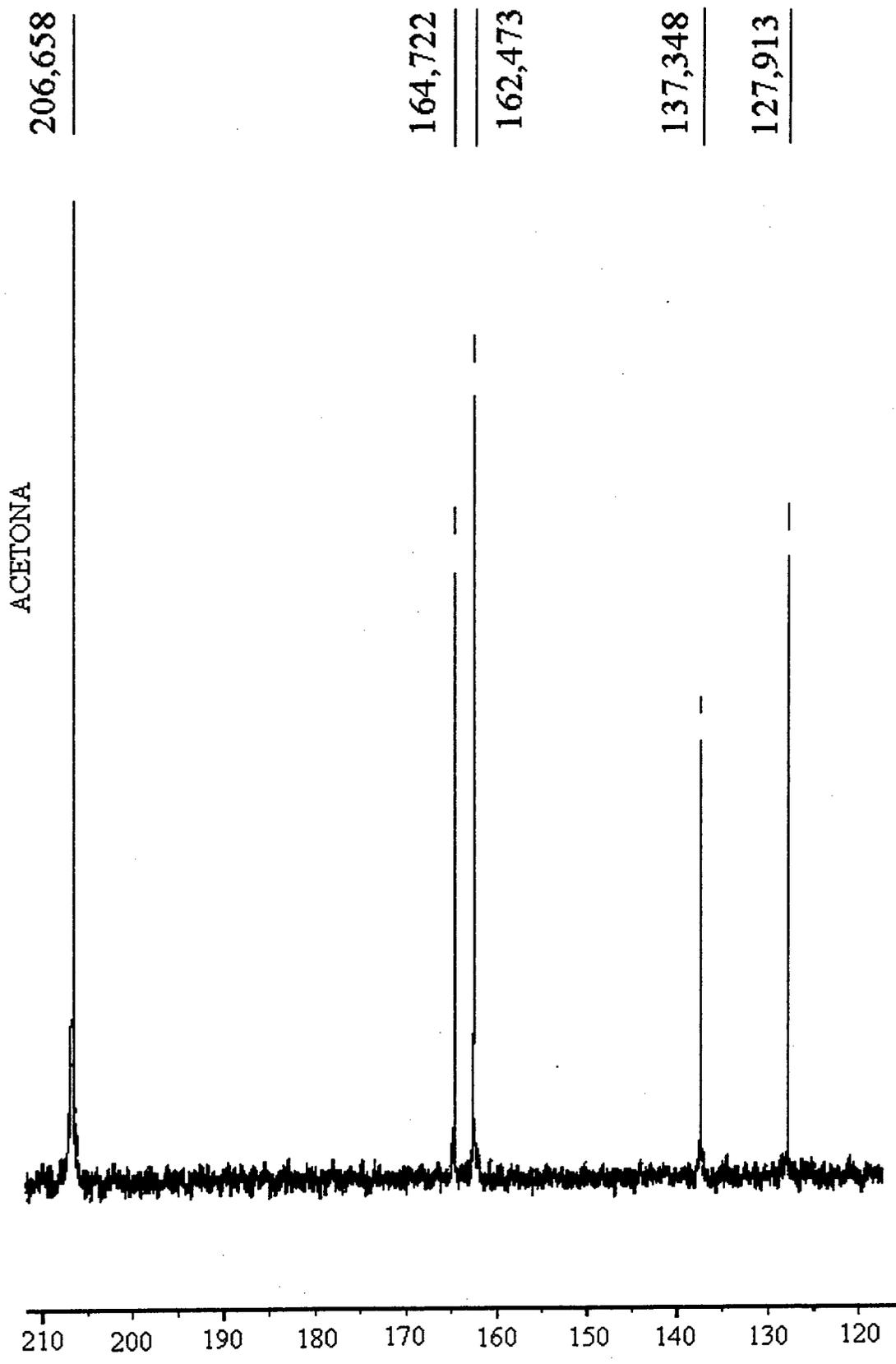


Figura 5: Espectro de RMN de ¹³C

3.4- Estudos Eletroquímicos:

O complexo estudado *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] foi submetido a um estudo eletroquímico a 3 valores de pH distintos. As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando como solvente uma mistura de acetona/água 1:1 v/v. Como eletrólito suporte foi empregado perclorato de lítio. Os meios ácidos foram preparados usando ácido perclórico e os meios básicos foram preparados com hidróxido de potássio. Os valores de pH foram obtidos a partir de eletrodos previamente calibrados inseridos numa célula eletroquímica. Voltamogramas típicos foram coletados a uma velocidade de 100mV.s⁻¹ a vários pHs (figura 6) revelando a presença de somente um processo redox, centrado no átomo de rutênio, associado a transferência de um único elétron entre os estados reduzidos e oxidados do complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄]^{3+/2+}. Este resultado está de acordo com o gráfico de distribuição das espécies realizado pela técnica de titulação potenciométrica a ser descrito posteriormente, uma vez que somente uma espécie foi encontrada em solução na variação de pH trabalhado.

Observa-se a partir da figura 7 que E_{1/2} do complexo desloca-se para potenciais catódicos à medida que o pH do meio aumenta. Isto pode ser o resultado da mudança da energia de estabilização do campo cristalino do centro metálico do complexo em função do aumento de carga residual negativa nos grupos carboxilato devido à desprotonação dos mesmos.

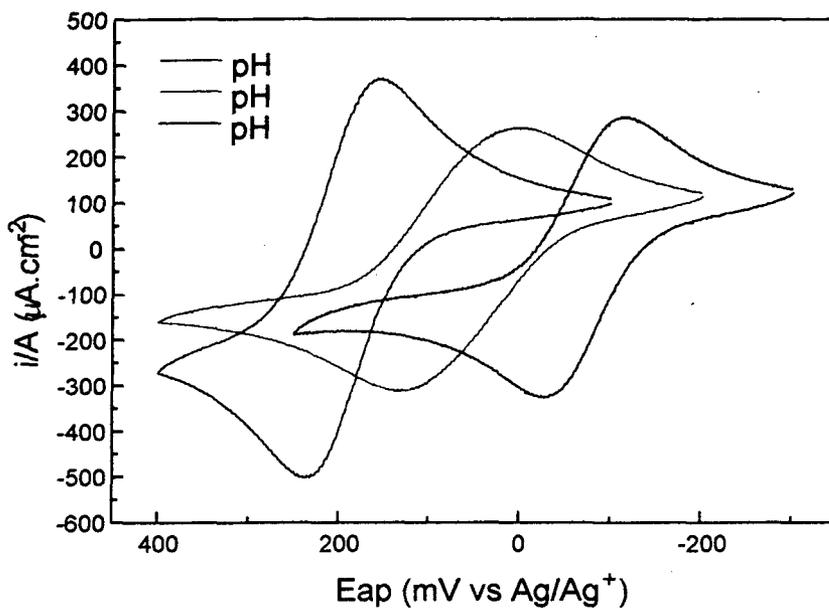


Figura 6: Voltamogramas Cíclicos para o complexo $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$

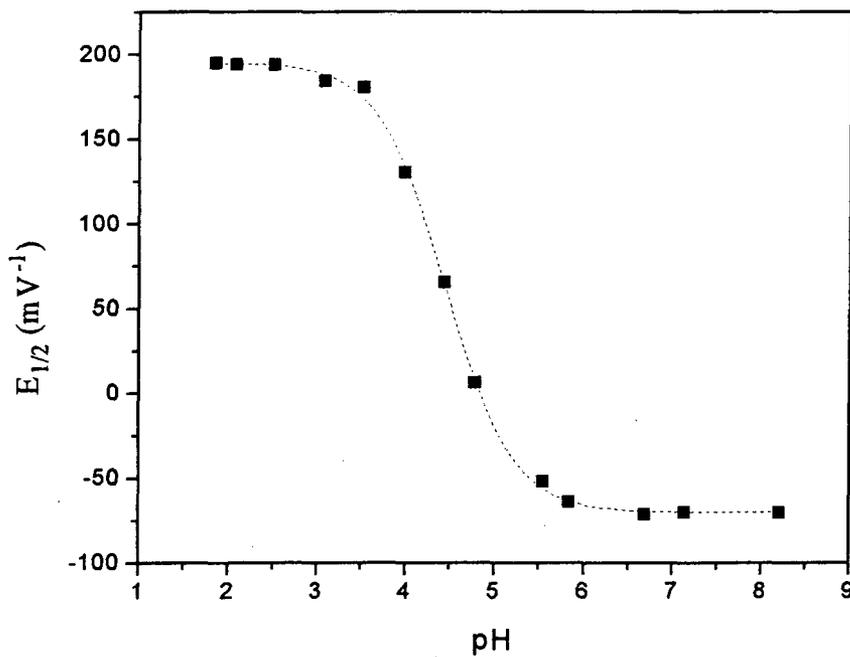


Figura 7: $E_{1/2}$ vs pH para o complexo $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ solvente água/acetona 1:1; eletrólito, 0,1 M LiClO_4 ; eletrodo de trabalho, carbono vítreo; $s.r=100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

À medida que aumentamos o pH, a curva de i_a vs (velocidade de varredura)^{1/2} não foi muito linear, desde que muitas espécies, cada uma influenciada pelo seu próprio coeficiente linear começou a afetar o processo. O gráfico de ΔE_p vs pH retratou um formato de sino, o qual pode ser atribuído a variação de condutividade do meio reacional com o número de espécies presentes em solução aumenta. Esta hipótese foi confirmada pelo fato de que a valores menores que 3,5 de pH e a valores maiores que 6,0, onde apenas uma espécie está presente, o valor de ΔE_p não foi influenciado pelo pH. O pH não afetou apenas somente o espectro eletrônico, mas também $E_{1/2}$ (figura 7), o qual deslocou para potenciais catódicos (potenciais negativos) à medida que o pH foi aumentado. Este fato também está de acordo com a comportamento previamente reportado para os complexos *trans*-[RuCl₂(nic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]¹².

Os dados eletroquímicos desta família de complexos são sumarizados na tabela 3. Na tabela 1 também mostramos os potenciais redox correspondendo a complexos similares sintetizados em nosso grupo de pesquisa.

3.5- Estudos Espectroeletróquímicos:

O complexo foi submetido a análise espectroeletróquímica a 3 valores distintos de pH. Independentemente do valor de pH trabalhado, notou-se que a banda de absorção desapareceu completamente após processo de oxidação. Entretanto, nenhuma outra banda apareceu, como era esperado, a partir de complexos previamente analisados¹². O desaparecimento da banda é condizente com a sua natureza MLCT, confirmada pela espectroscopia eletrônica, já que após a oxidação a transição M→L não é mais possível. Na figura 8 ilustramos o processo de oxidação a um valor de pH de 5,61.

Tabela 3: Dados de Voltametria cíclica para o primeiro processo de oxidação do complexo *trans*-RuCl₂(dinic)₄ (água/acetona 1:1, 25°C). Dados para vários valores de pH utilizando um eletrodo de Pt a 100mV.s⁻¹ de velocidade de varredura.

pH	E _{1/2} (mV) ^a	ΔE _p (mV)	I _{pa} /I _{pc}
1.85	193.85	80.10	0.959
2.08	193.65	82.90	0.957
2.51	193.40	83.40	1.05
3.08	184.65	86.70	0.965
3.52	181.15	86.90	0.934
3.99	130.07	109.87	1.01
4.44	66.40	134.18	0.992
4.78	7.56	142.95	1.01
5.55	50.09	143.83	-
5.84	-62.65	98.50	-
6.69	-68.90	95.80	-
7.14	-70.00	105.00	1.02
8.21	-71.00	92.60	0.981

a – Eletrodo de referência Ag/Ag⁺ at 100 mV.s⁻¹

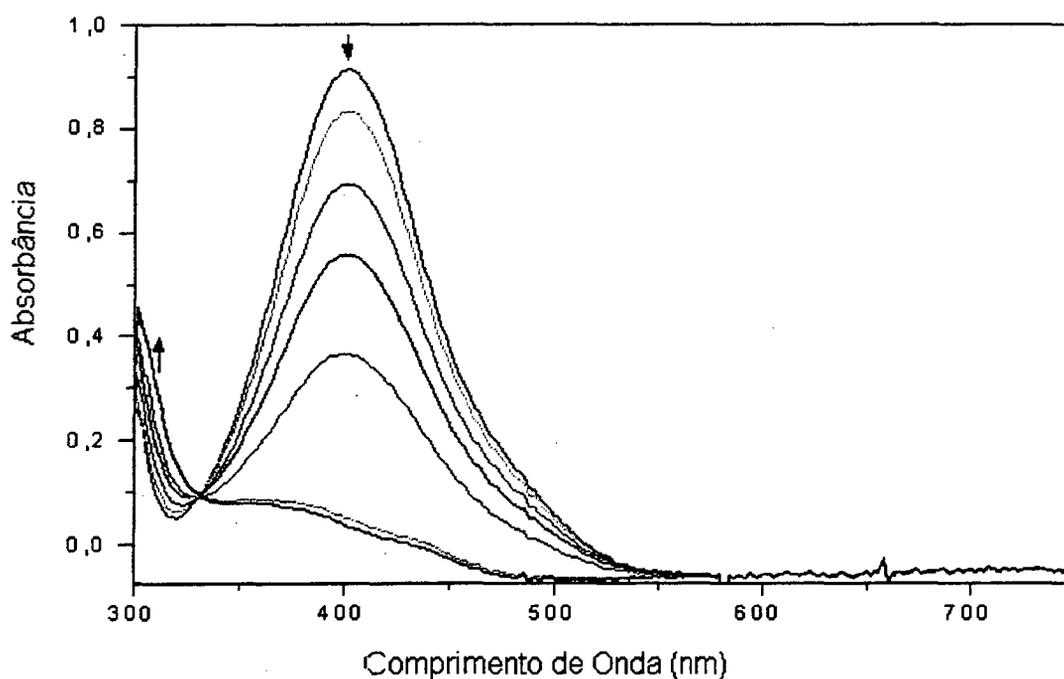


Figura 8: Curvas de Espectroeletróquímica para o complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄]

A presença de um ponto isobéstico a 330 nm sugere a ausência de qualquer espécie intermediária entre $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]^0$ e $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]^+$. Este comportamento é similar a outros complexos sintetizados em nosso laboratório, o complexo $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4]^7$, o complexo $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{pmp})_4]^{10,11}$, o complexo $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{nic})_4]$ e o $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{i-nic})_4]^{12}$.

Os espectros foram obtidos quando o potencial aplicado variou de $-0,60$ a $0,4$ V vs. Ag/Ag^+ , utilizando um sistema binário de água/acetona 1:1 v/v como solvente e perclorato de lítio como eletrólito suporte. O complexo revelou um alto grau de reversibilidade e estabilidade, já que o espectro das espécies reduzidas foi completamente restaurado a $-0,60$ V vs. Ag/Ag^+ quando aplicado ao sistema. A curva E_{ap} vs. $\log[\text{O}]/[\text{R}]$ retratou um aspecto sigmoidal (figura 9) e suas inclinações ajustadas dependem do pH estudado. Complexos previamente estudados¹² em nosso grupo de pesquisa não revelaram tal comportamento. Este aspecto sigmoidal da curva está provavelmente associado a presença de várias espécies em solução, que estão de acordo com a curva de distribuição das espécies (figura 8). Cada espécie envolvida teria o seu próprio grau de protonação e seu próprio coeficiente de difusão. Os valores de $E_{1/2}$, foram calculados a partir de pontos de intersecção da curva, compatíveis com os resultados obtidos por voltametria cíclica.

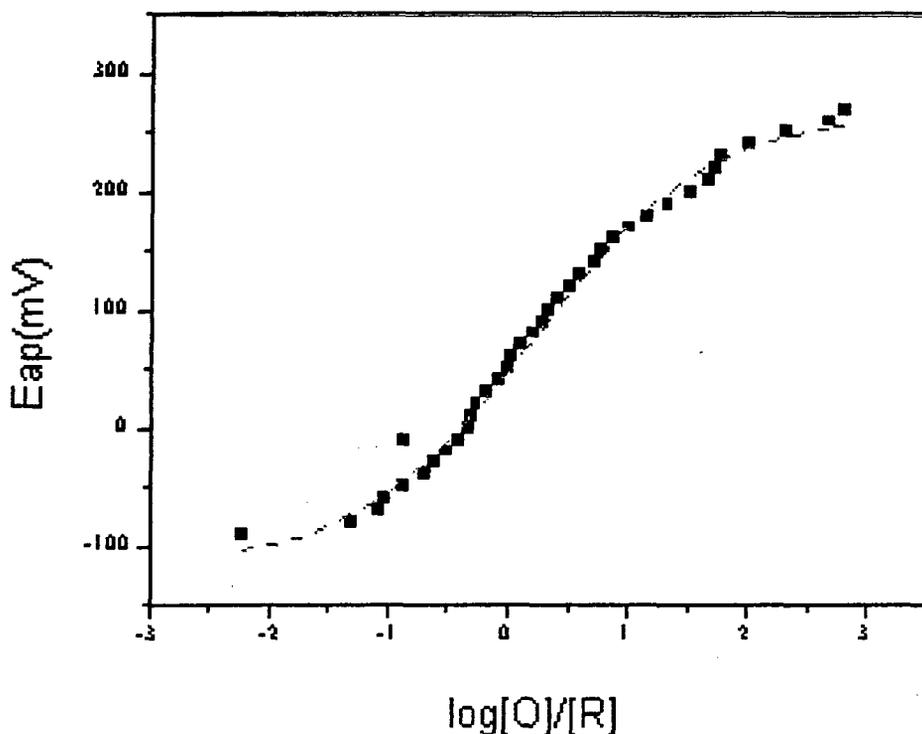
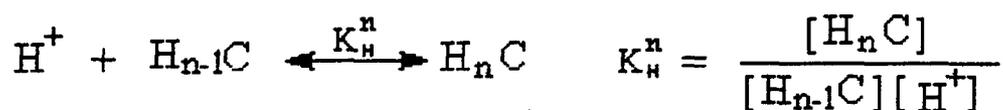


Figura 9: Gráfico de $E_{aplicado}$ vs. $\text{Log}[O]/[R]$ para o complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$

3.6- Titulação Potenciométrica:

A titulação potenciométrica do complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ foi realizada em um sistema binário água/acetona 1:1 empregando-se uma solução de KOH 0,1M como agente titulante. Utilizando este mesmo sistema foi também calculado o $\text{p}K_w = +15,36$, uma vez que o sistema empregado foi binário água/acetona 1:1, através de um programa computacional⁵⁷ BEST 7 empregando linguagem FORTRAN. Este programa possui a finalidade de minimizar os desvios padrões do ajuste entre todos os valores de pH observados e calculados na curva de titulação potenciométrica. A equação 21 representa as protonações do complexo, onde L^{-8} representa o *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]^{8-}$ (L^{-8}).



(Equação 21)

Os valores das constantes de protonação e de estabilidade das possíveis espécies formadas no meio, na presença de íons Ca^{+2} são listadas na tabela 4.

A curva de distribuição das espécies do complexo trans- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ na presença de íons cálcio está ilustrado na figura 10.

Considerando-se o ligante na ausência de Ca^{2+} , fomos capazes de detectar a formação de oito espécies diferentes distribuídas conforme a tabela 4 e a figura 10. Em pH 2,0 existe apenas a espécie octaprotonada com % máxima de 97,7. Entre o pH 2,0 e 8,7 existem diversas espécies coexistindo em equilíbrio na solução. A espécie heptaprotonada tem um máximo de 28,3 % no pH de 5,7. A espécie hexaprotonada tem um máximo de 13,2 % no pH de 5,2. A espécie pentaprotonada tem um máximo de 18,3 % no pH de 4,8. A espécie tetraprotonada tem um máximo de 24,1 % no pH de 4,5. A espécie triprotonada tem um máximo de 25,5 % no pH de 4,2. A espécie diprotonada tem um máximo de 37,2 % no pH de 4,0. E a espécie monoprotionada tem um máximo de 34,5 % no pH de 3,6. Estes resultados estão de acordo com o aspecto sigmoidal encontrado nas curvas de E_{apli} vs. $\log[\text{O}]/[\text{R}]$ dos experimentos espectroeletróquímicos. Podemos observar que região entre 3 e 6 (tabela 4 e figura 10), existem, em cada pH, ao menos quatro espécies com diferentes graus de protonação, e conseqüentemente, com coeficientes difusionais distintos. Assim, estas espécies difundir-se-ão até o eletrodo de trabalho com diferentes velocidades, e isto pode ser uma das causas dos desvios de linearidade observados na figura 9.

Tabela 4: Constantes de protonação, porcentagem e pH máximos para as espécies geradas durante a titulação do *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] em presença de íons Ca⁺² em um sistema binário água acetona (1:1).

K	log K _H ⁿ	% _{máx.}	pH _{máx}
L ⁻⁸	0.000	26,5	8,7
HL ⁻⁷ /H ⁺ L ⁻⁸	6,31	28,3	5,7
H ₂ L ⁻⁶ /H ⁺ .H.L ⁻⁷	5,08	13,2	5,2
H ₃ L ⁻⁵ /H ⁺ .H ₂ L ⁻⁶	5,13	18,3	4,8
H ₄ L ⁻⁴ /H ⁺ .H ₃ L ⁻⁵	4,78	24,1	4,5
H ₅ L ⁻³ /H ⁺ .H ₄ L ⁻⁴	4,40	25,5	4,2
H ₆ L ⁻² /H ⁺ .H ₅ L ⁻³	4,28	37,2	4,0
H ₇ L ⁻¹ /H ⁺ .H ₆ L ⁻²	3,78	34,5	3,6
H ₈ L/H ⁺ .H ₇ L ⁻¹	3,62	97,6	2,0
Ca ⁺²	0.000	99,9	2,0
CaL ⁻⁶ /Ca ⁺² .L ⁻⁸	4,00	66,1	8,4
CaHL ⁻⁵ /H ⁺ .CaL ⁻⁶	5,56	18,4	5,6
CaH ₂ L ⁻⁴ /H ⁺ .CaHL ⁻⁵	5,46	23,2	5,1
CaH ₃ L ⁻³ /H ⁺ .CaH ₂ L ⁻⁴	4,84	19,8	4,7
Ca(OH)L ⁻⁷ .H ⁺ /CaL ⁻⁶	11,85	45,6	12,0

As espécies complexadas com íons cálcio formaram-se a partir do pH ≈ 4,0 (tabela 4, figura 10), sendo elas: CaL⁻⁶ (66,1 %, pH 8,4); CaHL⁻⁵ (18,4 %, pH 5,6) CaH₂L⁻⁴ (23,2 %, pH 5,1), CaH₃L⁻³ (19,8 %, pH 4,7) Ca(OH)L⁻⁷ (45,6 %, pH 12,0). A espécie CaOH⁺ não foi observada para o sistema em questão, sendo possivelmente substituída pela espécie Ca(OH)L⁻⁷. A confirmação da coordenação dos grupos carboxilato do complexo a íons cálcio é de grande interesse no estudo do mecanismo de reações de transferência de elétrons fotoinduzidos.

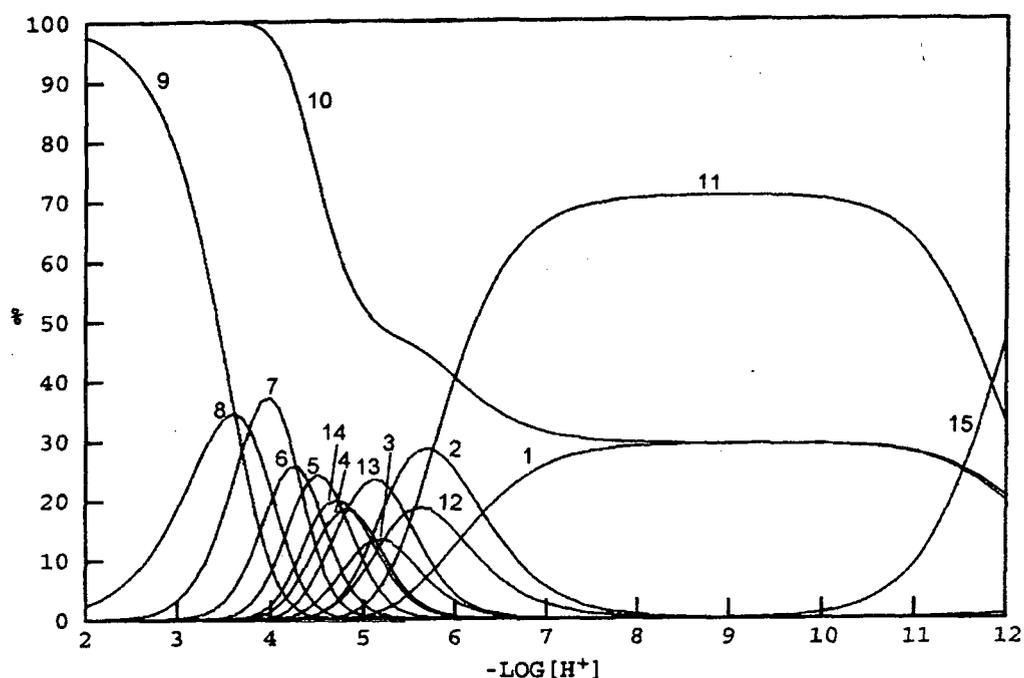


Figura 10: Curva de distribuição das espécies para o *trans*-diclorotetraquis(3,5-dicarboxipiridina) rutênio (II) em uma solução de CaCl_2 0,00917 M. Solvente: água/acetona (1:1). 1) L^{-8} , 2) HL^{-7} , 3) H_2L^{-6} , 4) H_3L^{-5} , 5) H_4L^{-4} , 6) H_5L^{-3} , 7) H_6L^{-2} , 8) H_7L^{-1} , 9) H_8L 10) Ca^{2+} , 11) CaL^{6-} , 12) CaHL^{5-} , 13) $\text{CaH}_2\text{L}^{4-}$, 14) $\text{CaH}_3\text{L}^{3-}$ 15) $\text{Ca}(\text{OH})\text{L}^{7-}$.

3.7- Propriedades Biológicas:

O complexo estudado não apresentou citotoxicidade, isto é, não atacou os tecidos e a membrana celular. Também não afetou significativamente a resposta motora dos animais (ratos) quando colocados em teste "rota-rod", e nem afetou a resposta de latência em ensaios de "hot-plate"^{14,47}.

Comparando as propriedades biológicas dos complexos da mesma série, seus análogos *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{nic})_4]$ e *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{i-nic})_4]$ ^{13,14,15,47} somente o complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{i-nic})_4]$ foi capaz de inibir a atividade da óxido nítrico sintase (NOS), enquanto o complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$

não¹⁵. O complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] também não mostrou ser capaz de captar óxido nítrico e ânion superóxido, •O₂⁻ (resultados não mostrados), embora seus compostos análogos *trans*-[RuCl₂(nic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] apresentem estas propriedades^{13,14,15}.

O complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] foi capaz de capturar radicais hidroxila (OH[•]) (figura 11), embora com menor potência (IC₅₀= 10 ± 0,1 μM) que seus análogos *trans*-[RuCl₂(nic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]^{13,14,15}. Esta é uma propriedade muito importante, uma vez que o radical hidroxila é um dos oxidantes mais agressivos capaz de atacar moléculas biológicas. As radicais hidroxilas são o maior produto surgido da ionização de alta energia da água e a fonte mais importante é a reação de Haber-Weiss²⁰ envolvendo radicais •O₂⁻ e H₂O₂.

Entretanto, o complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] também mostrou ação antinociceptiva, no modelo da formalina, embora com menor potência que seus análogos^{14,47}. A média dos valores encontrados, relatado no gráfico da figura 12 mostrou ID₅₀= 41,8 μ.mol.Kg⁻¹ (27,9-62,6 μ.mol.Kg⁻¹) e 30,6 μ.mol.Kg⁻¹ (22,7-41,2 μ.mol.Kg⁻¹) para a primeira e última fase do teste, respectivamente. A inibição máxima observada para estes efeitos foi 51 ± 2 e 66 ± 11, respectivamente.

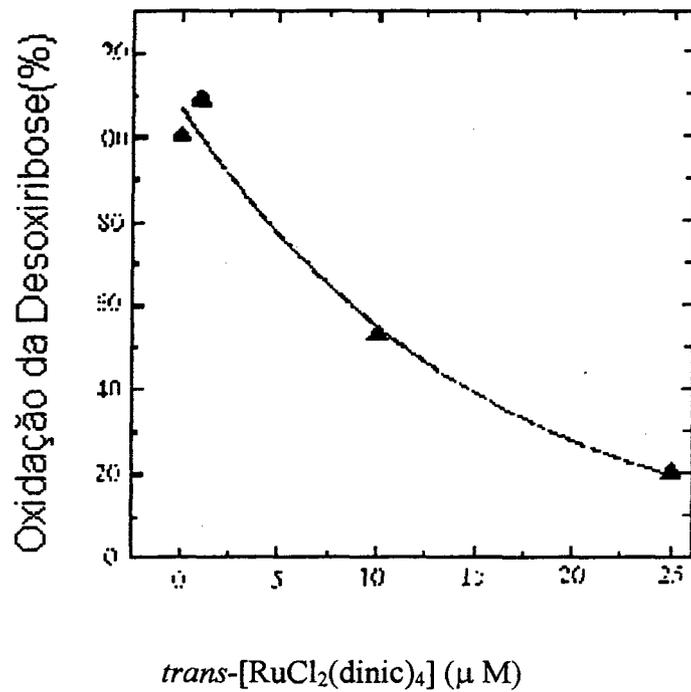


Figura 11: Efeito do $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ como captador de radical hidroxila. Os resultados são mostrados como percentagem de máxima formação de $\cdot\text{OH}$. (Em Absorbância, 100% = $1,04 \pm 0,04$)

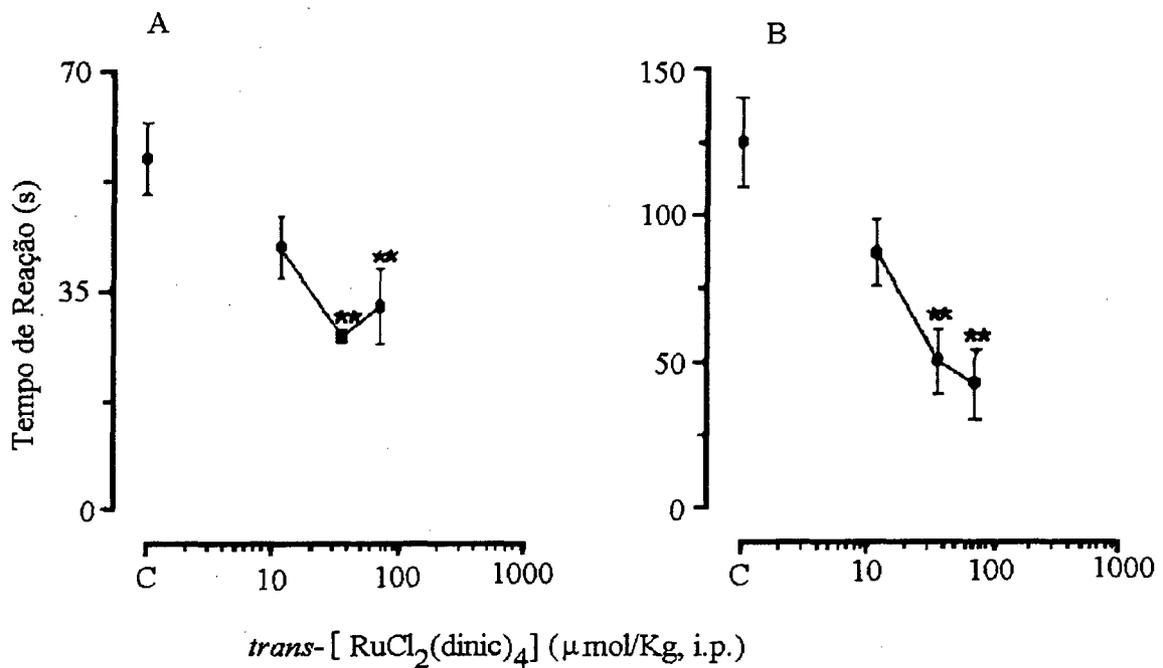


Figura 12: Efeito do $trans\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{dinic})_4]$ aplicado intraperitonealmente contra a (A) primeira e (B) Segunda fase da dor induzida por formalina em ratos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão médio de 5-10 animais. O asterisco denota os níveis de significância em relação ao grupo controle.

O gráfico da figura 12 foi realizado da seguinte maneira. Os animais foram tratados com o complexo ($11,9-71,4 \mu\text{mol.Kg}^{-1}$, intraperitonealmente) 30 min antes da injeção de formalina. O tempo total gasto na lambida da pata foi medido na primeira fase (A) e depois da injeção subplantar da formalina (B). Cada ponto representou a média \pm desvio padrão médio de 5-10 animais. O asterisco denota os níveis de significância quando comparada ao grupo controle.

Esta família de complexos de rutênio estudada pelo nosso grupo provavelmente atua como antinociceptivos por outro mecanismo que não a etapa de óxido nítrico, uma vez que somente um dos complexos, o *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{i-nic})_4]$, foi capaz de inibir a óxido nítrico sintase (constitutiva e induzida). Possivelmente, este complexo mostrou menor potência como antinociceptivo desde que o mecanismo de ação não envolve a etapa do óxido nítrico. Também foi possível relatar a sua ação antinociceptiva pela propriedade de captação de radicais livres uma vez que, radicais livres são moléculas altamente reativas e estão frequentemente presentes em processos patológicos. Para esclarecer o mecanismo de ação destes complexos serão necessárias maiores investigações.

Assim sendo, podemos concluir que o incremento de um grupo carboxílico não aumentou a atividade biológica do composto estudado, em relação aos seus análogos *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{i-nic})_4]$ e *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{nic})_4]$ ¹². Estes resultados, comparados com os observados para os complexos análogos previamente estudados¹⁴, indicam que a substituição na posição 4 do anel piridínico parece ser fundamental para a atuação do complexo sobre a NOS.

CONCLUSÃO

O complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] foi sintetizado e caracterizado por análise elementar de CHN, espectroscopia UV-Vis, IR-FAR, Raman, RMN ¹H e ¹³C, voltametria cíclica, potenciometria e propriedades biológicas. Os resultados mostraram um comportamento espectroscópico similar aos complexos *trans*-[RuCl₂(nic)₄] e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]¹², onde λ_{máx} variou com o grau de protonação dos grupos carboxílicos ligados ao anel piridínico. Os resultados de voltametria cíclica mostraram basicamente uma dependência do pH, retratando uma forte correlação com a curva de distribuição das espécies. A comparação entre as propriedades biológicas do complexo estudado e seus análogos fornece indícios de que a substituição na posição 4 do anel piridínico deve ser fundamental para a atuação destes complexos sobre a NOS.

REFERÊNCIAS

1. Blau, F.; *Berichte*, 1888; **21**, 1077; *Monatsch. Chem.*, 1898, **19**, 647.
2. Seddon, E.A.; Seddon, K.R.; "The Chemistry of Ruthenium", Elsevier, Amsterdam, 1984.
3. Fricker, S.P.; *Platinum Metals Rev.*, 1995, **39**, (4), 150-159.
4. Abel, E.W.; Bennett, M.A.; Wilkison, G.; *J. Chem. Soc.*, 1959, 3178.
5. Gilbert, J.D.; Rose, D.; Wilkinson, G.; *J. Chem. Soc. A*, 1970, 2765.
6. Raichart, D.W.; Taube, H.; *Inorg. Chem.*, 1972, **11**, 999.
7. Franco, C.V.; Moraes Jr., V.N.; Mocellin, F.; Paula, M.M.S, *J. of Materials Chem.*, 1998, **8**(9), 2049-2054.
8. Aoki, E.; Taleuchi, I.K.; Shoji, S.; *Acta Histochem Cytochem.*, 1995, **28**(2), 97-106.
9. Heijden, M.; van Vliet, P.M.; Haasnoot, J.G; Reedijk., J.; *J. Chem. Soc. Dalton Tans.*, 1991, 3675.
10. Paula, M.M.M; Franco, C.V.; *J. Coord. Chem.*, 1996, **40**, 71-82.
11. Franco, C.V.; Paula, M.M.S.; Prates, B.P.; de Moraes, V.N.Jr.; *Synthetic Metals*, 1997, 3-7.
12. Paula, M.M.M; Meier, M.; Spoganicz, B.; Franco, C.V.; *J. Coord. Chem.*, 1999, **46**, 491-504.
13. Seifriz, I.; Konzen, M.; Paula, M.M.S.; Sanches, N.G.; Spoganicz, B.; Creczynsky-Pasa, T.B.; Bonetti, V.R.; Beirith, A.; Franco, C.V.; "Synthesis, Characterization, Potenciometric Titration, Electrochemical Investigation and Biological Properties of *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-piridinecarboxylic acid)", *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **76**, 153-163.

14. Beirith, A.; Creczinsky-Pasa, T.B.; Bonetti, V.R.; Konzen, M.; Seifriz, I.; Paula, M.M.S.; Franco, C.V.; Calixto, J.B.; Antinoceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. *European J. Pharmacol*, 1999, **369**, 289-297.
15. Crecziynky-Pasa, T.B.; Bonetti, V.R.; Beirith, A.; Ckless, K.; Konzen, M.; Seifriz, I.; Paula, M.M.S.; Franco, C.V.; Calixto, J.B. "Properties of new ruthenium complexes as free radical scavengers", *in prepare*.
16. Minisci, F., in "Free Radicals in Biology and Environment", Kluwer Academic Publisher, 1997, 1-27.
17. Kehrer, J.P.; *Critical Reviews in Toxicology*, 1993, **23**(1)21-48.
18. Kehrer, J.P., Oxigen in "Handbook on the Toxicity of Inorganic Compounds", Sigel, H. and Sieler, H., Eds., Marcel Dekker, New York, 1987, 505.
19. Halliwell, B. ; Gutteridge, J.M.C.; "Free Radicals in Biology and Medicine", 2nd ed., Oxford University Press, New York, NY, 1989.
20. Gutteridge, J.M.C.; *Chemico-Biological Interations*, 1994, **91**, 133-140.
21. Koshland, D.E.Jr.; *Science* , 1992, **258**, 1861-1865.
22. Cohen, G.; *Photochemistry and Photobiology*, 1978, **28**, 669-675.
23. Walling, C.; *Accts. Chem. Res.*, 1975, **8**, 125-131.
24. Walling, C., Partch, R.E.; Weil, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, **72**, 140-142.
25. Agar, J.N.; Dainton; F.S.; *Disc Faraday Soc.*, 1947, **2**, 218-219
26. George P., *Disc. Faraday Soc.*, 1947, **2**, 196-205 and 219-221.

27. Weiss, J.; *Disc. Faraday Soc.*, 1947, **2**, 217-218.
28. Beuachamp, C.; Fridovich, I.; *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 4641-4646.
29. Halliwell, B.; *FEBS Lett.*, 1976, **72**, 8-10.
30. Cohn, G.; In "Superoxide and Superoxide Dismutases", Academic Press London, 1977, 317-321.
31. Fee, J.A.; Valentine, J.S.; In "Superoxide and Superoxide Dismutases", Academic Press London, 1977, 19-60.
32. Bors, W.; Lengfelder, E.; Saran, M.; Fuchs, C.; Michel, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, **70**, 81-87.
33. Rerup, C.C.; *Pharmac. Revs.*, 1970, **22**, 485-518.
34. Cohen, G.; Allis, B.; Winston, B.; Mytilineou, C.; Heikkila, R.E.; *Eur. J. Pharmac.*, 1975, **23**, 217-221.
35. Heikkila, R.E.; Winston, B.; Cohen, G.; Barden; *Biochem. Pharmac.*, 1976, **25**, 1085-1092.
36. Cohen, G.; Heikkila, R.E.; *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 2447-2452.
37. Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E.A.; *Pharmac. Rev.*, 1991, **43**, 109
38. Nathan, C.; *FASEB J.*, 1993, **6**, 3051.
39. Barnard, C. F. J.; *Platinum Metals Rev.*, 1989, **33**, (4)162.
40. Abrams, M. J.; Murrer, B. A.; *Science*, 1993, **261**, 725.
41. Dwyer, F.P.; Goodwin, H.A.; Gyarfás, E.C.; 1963, *Aust. J. Chem.*, **16**, 544.
42. Bottomley, F. and M. Mukaida, 1982, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1933.
43. Aoyagi, K.; Yukama, Y.; Shimizu, K.; Mukaida, M.; Takuchi, T., Kakiana, H.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1986, **59**, 1493.
44. Bottomley, F.; White, P.S.; Mukaida, M.; Shimura, K.; Kakiana, H.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1988, 2965.

45. Paula, M. M. S.; Franco, C.V.; 1994, *Química Nova*, **17**(5).
46. A.E. Martell and R.J. Motekaitis; 1992, 2nd Ed., VCH Publishers, Inc., 22.
47. Beirith A.; Santos, A.R.S; Rodrigues, A.L.S.; Creczynski, Pasa, T.B.; Calixto, J.B.; 1998, *Eur. J. Pharmacol.*, **345**, 233-245.
48. Vaz, Z.R., Cechinel, Filho V.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B.; 1996, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**: 304-312.
49. Nishida Y.; Yoshizawa, K.; Akamatsu ;1991, *Chemistry Letters*, pp1521-1524.
50. Gutteridge, J.M.C., *Biochemical J.*, 1988, **253**, 931-933.
51. Szabó, C.; Southan, G. J.; Thiemermann, C.; Vane, J. R.; 1994; *Br.J.Pharmacol.*; **123**; 757-766.
52. Sullivan, B.P.; Salmon, D.J.; Meyer, T.J., *Inorg. Chem.*, 1978, **17**, 3334.
53. Bellamy, C.J.; *Advances in Infrared and Raman Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London, 1960
54. Nakamoto, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 4th edn., 1986.
55. Dollish, F.R.; Fateley, W. G.; Bentley, F.F.; *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1973.
56. Mabrouk, P.A.; Wrighton, M.S.; *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 526.