**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CARBOXILATOS DE Rh (II)
E SEUS ADUTOS COM METRONIDAZOL: ENSAIOS
BIOLÓGICOS COM VISTAS À ATIVIDADE
RADIOSENSIBILIZADORA DE TUMORES**

ANA CECILIA VALDERRAMA NEGRÓN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Área: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Renato Najjar

São Paulo

2000

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Valderrama Negrón, Ana Cecilia
V144s Síntese e caracterização de carboxilatos de Rh (II) e seus
adutos com metronidazol : ensaios biológicos com vistas à
atividade radiosensibilizadora de tumores / Ana Cecilia
Valderrama Negrón. -- São Paulo, 2000.
141p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Najjar, Renato

1. Composto inorgânico : Química 2. Química
bioinorgânica I. T. II. Najjar, Renato, orientador.

546 CDD

“Síntese e Caracterização de Carboxilatos de Rh(II) e seus Adutos com Metronidazol: Ensaio Biológico com Vistas à Atividade Radiossensibilizadora de Tumores”.

**ANA CECILIA VALDERRAMA
NEGRÓN**

Dissertação de mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Química Inorgânica

Aprovada por:

Prof Dr. RENATO NAJJAR
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
IQ - USP

Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO ROGERO
IPEN

SÃO PAULO
07 DE NOVEMBRO DE 2000.

*Aos meus pais, Dora e Jaime,
ao meu esposo Erich
e aos meus amados irmãos.*

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	9
 Capítulo I.- INTRODUÇÃO	 10
I.1 Metais em Medicina	10
I.2 Carboxilatos e Amidatos de Rh (II)	11
I.3 Efeito Radiossensibilizador	12
 Capítulo II.- OBJETIVOS	 15
 Capítulo III.- PARTE EXPERIMENTAL	 16
III.1 SÍNTESE	16
1. Carboxilatos de Rh (II)	16
1.1 Bis(aquo)tetrakis(propionato) de dirródio (II)	16
1.2 Bis(aquo)tetrakis(butirato) de dirródio (II)	16
1.3 Bis(aquo)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II)	17
1.4 Bis(aquo)tetrakis(citrato) de dirródio (II)	17
2. Amidato de Rh (II)	18
2.1 Bis(trifluoroacetamida)tetrakis(trifluoroacetamidato) de dirródio (II)	18
3. Adutos entre Carboxilatos de Rh (II) e Metronidazol	19
• <u>Via Etanólica</u>	
3.1 Bis(metronidazol)tetrakis(acetato) de dirródio (II)	19
3.2 Bis(metronidazol)tetrakis(propionato) de dirródio (II)	19
3.3 Bis(metronidazol)tetrakis(butirato) de dirródio (II)	20
3.4 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II)	20
3.5 Bis(metronidazol)tetrakis(citrato) de dirródio (II)	20
3.6 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetamidato) de dirródio (II)	21
• <u>Via Metanólica</u>	
3.7 Bis(metronidazol)tetrakis(acetato) de dirródio (II)	21
3.8 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II)	22
3.9 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetamidato) de dirródio (II)	22
4. Resultados e Discussões	22
4.1 Sínteses dos Carboxilatos	23
4.2 Sínteses dos Adutos de Carboxilatos e Amidato de Rh (II) com Metronidazol	26
III.2 Análises Elementares	29
III.3 Espectroscopia Eletrônica	31
1. Introdução	31

1.1 Estrutura Eletrônica	31
1.2 Formação de Adutos	33
1.3 Atribuição das Bandas dos Espectros Eletrônicos	34
2. Materiais e Métodos	35
3. Resultados e Discussões	35
III.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho	51
1. Introdução	51
1.1 Vibrações Associadas à Carboxila	51
1.2 Coordenação do Ligante Axial	53
1.3 Outras Vibrações dos Carboxilatos de Rh (II)	53
1.4 Vibrações nos Amidatos de Rh (II)	54
2. Materiais e Métodos	55
3. Resultados e Discussões	55
3.1 Carboxilatos e Amidatos de Rh (II)	63
3.2 Adutos de Carboxilatos e Amidato de Rh (II) com Metronidazol	63
III.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹ H)	66
1. Introdução	66
2. Materiais e Métodos	67
3. Resultados e Discussões	67
3.1 Em Acetona Deuterada	75
3.2 Em Água Deuterada	76
III.6 Ensaios Biológicos : Medidas do Efeito Radiossensibilizador	78
1. Introdução	78
1.1 Efeitos de Radiação	79
i. Efeitos Químicos	79
ii. Efeitos Biológicos	80
iii. Efeitos Bioquímicos	81
1.2 Modificação Química do Dano Produzido pela Radiação	86
i. Imitadores do Oxigênio e Afinidade Eletrônica	86
ii. Radiossensibilização por Diminuição de Tióis	87
1.3 Desenvolvimento de Complexos Metálicos com Nitroimidazóis como Ligantes	88
1.4 Processo de reparo celular	90
1.5 Importância dos Estudos de Radiossensibilização em Baixas Doses	90
2. Materiais e Métodos	91
2.1 Determinação da Citotoxicidade dos Complexos de Rh (II)	91
i. Preparação das Soluções dos Compostos	92
ii. Preparação das Placas de Cultura Celular	92
2.2 Determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀)	93
2.3 Determinação do Efeito Radiossensibilizador dos Complexos de Rh (II)	94
3. Resultados e Discussões	96
3.1 Determinação da Citotoxicidade dos Complexos de Rh (II)	96
3.2 Determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀)	102

3.3 Determinação do Efeito Radiossensibilizador dos Complexos de Rh (II)	104
III.7 Determinação das Constantes de Formação dos Adutos de Carboxilatos de Rh (II) e Metronidazol. Método das Relações Correspondentes de Bjerrum.	110
1. Introdução	110
2. Método das Soluções Correspondentes	114
2.1 Considerações Teóricas	114
2.2 Método de Bjerrum	115
2.3 Grau de Formação	117
2.4 Considerações para os Carboxilatos de Rh (II)	118
3. Materiais e Métodos	119
3.1 Determinação das Constantes de Formação do Aduto $Rh_2(ac)_4metro_2$	119
3.2 Determinação das Constantes de Formação do Aduto $Rh_2(cit)_4metro_2$	123
4. Resultados e Discussões	125
Capítulo IV.- CONCLUSÕES	131
Capítulo V.- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	132
GLOSÁRIO	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
CURRICULUM VITAE	139

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente ao Prof. Dr. Renato Najjar, por ter facilitado a minha vinda para o Brasil ao me convidar para participar de um estágio no seu grupo de pesquisa, pela orientação e pela amizade oferecida durante todo o tempo em que durou este trabalho de mestrado.

Aos companheiros do laboratório, Prof^a. Dr^a. Anna Maria Passos Felicíssimo, Neide, Adriana, Mônica, Marisa, pela sua amizade e ao Eric, Cido e Breno, que além da sua amizade, colaboraram com sugestões para a realização deste trabalho.

Às professoras Dra. Maria Encarnación Vasquez, Dra. Helena Ferraz, Dra. Elizabeth de Oliveira e ao Prof. Henrique Eisi Toma, pela disponibilidade, ajuda e orientações recebidas para a realização do meu trabalho de pesquisa.

Aos docentes do Instituto de Química, Denise de Oliveira Silva, Vera Leopoldo Constantino, Koiti Araki e Dra. Wanda de Oliveira, pelas suas orientações e a oportunidade de participar nas atividades didáticas.

Aos amigos do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), especialmente à Ms. Sizue Ota Rogero, pela sua amizade, ajuda, orientação e discussões sobre os testes biológicos. Aos amigos do Departamento de Radiobiologia, Dra. Olga Z. Higa, Miriam, Arlete, Daniela, Jonqueira, e aos amigos encarregados das irradiações, Beth e Carlos sempre colaboradores.

Aos funcionários do Instituto de Química, pessoal da Central Analítica, Biblioteca, técnicos e aos amigos operadores de xerox.

Ao meu esposo, Erich, pelo constante apoio e incentivo, aos meus pais, irmãos, sobrinhos e aos meus sogros pela confiança, compreensão e a vontade de aceitar estes anos longe de casa, ao seu amor imenso que me incentiva a perseverar em todos os momentos.

Finalmente, um grande agradecimento à CNPq pelo apoio econômico.

RESUMO

Radiossensibilizadores são definidos como agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células hipóxicas à radiação, visando o aumento da eficácia da radioterapia no tratamento do câncer.

Alguns Carboxilatos de Rh (II) e compostos nitroimidazólicos têm sido testados como radiossensibilizadores em doses elevadas de radiação, obtendo-se resultados significativos.

Neste trabalho, foram sintetizados vários carboxilatos e um amidato de Rh (II): propionato, butirato, trifluoroacetato, citrato e trifluoroacetamido, assim como os seus respectivos adutos com metronidazol, de fórmula geral: $[\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4\text{metro}_2]$ ($\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5$ e CF_3) para o caso dos carboxilatos e $[\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4\text{metro}_2]$ para o aduto de trifluoroacetamido.

Os compostos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia eletrônica, infravermelho e de ressonância magnética nuclear de próton.

O resultado desta caracterização permitiu estabelecer as rotas de síntese confirmando a formação dos carboxilatos tipo ponte e a presença do metronidazol nas posições axiais, numa relação 1:2.

O efeito radiossensibilizador desses complexos de Rh (II) foi testado *in vitro*, irradiando-se, em atmosfera hipóxica, células de ovário de hamster chinês (CHO k1), na presença dos complexos, utilizando-se raios gama provenientes de uma fonte de ^{60}Co , com doses de 2,7 e 4,3 Gy.

Foi realizado teste de citotoxicidade para determinar as concentrações atóxicas de cada composto, eliminando a possibilidade de morte celular devido ao efeito tóxico dos mesmos.

Na dose de 2,7 Gy não houve nenhum efeito interessante; já com a dose de 4,3 Gy o $[\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4]$ mostrou uma atividade radiossensibilizadora maior do que nos demais complexos. Os resultados foram semelhantes aos obtidos na literatura com doses de radiação até 10 vezes maiores.

Devido à ausência de mudanças significativas no efeito radiossensibilizador entre os carboxilatos e amidato e seus respectivos adutos com metronidazol, foi determinada a constante de formação destes últimos, demonstrando que os mesmos sofrem decomposição quando em solução aquosa diluída.

ABSTRACT

Radiosensitizers are chemical agents that enhance the radiation sensitivity of hypoxic tumor cells aiming to better radiotherapy efficacy in the treatment of cancer.

Some Rhodium (II) carboxylates and its adducts with nitroimidazole derivatives, have been tested as radiosensitizers in high doses of radiation, being obtained significant results.

In this work, several Rhodium carboxylates and one Rhodium amidate previously described were synthesized: propionate, trifluoroacetate, citrate and trifluoroacetamidate, as well as their respective adducts with nitroimidazole of general formula $[\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4\text{metro}_2]$ for the carboxylates and $[\text{Rh}_2(\text{CF}_3\text{CONH})_4\text{metro}_2]$ for the trifluoroacetamidate adduct.

The compositions were characterized by elementary analysis, electronic and infrared spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance.

The results of that characterization allowed us to establish the synthesis routes and confirm the bridge type structure of the Rhodium compounds, beyond the presence of the metronidazole at the axial positions in the proportions of 1:2.

The radiosensitizing effects of these Rh (II) complexes were tested *in vitro* by irradiation of Chinese hamster (CHO k1) cells under hypoxic atmosphere in the presence of the complexes, using gamma rays from a ^{60}Co source and doses of 2,7 and 4,3 Gy.

A cytotoxicity test has been performed to determinate the non-toxic concentrations of these compounds, in order to rule out the possibility of cellular death induced by the complexes' cytotoxicity.

A 2,7 Gy dose showed no interesting effects but under a 4,3 Gy dose, the complex $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$ showed a higher radiosensitizing effect than the other compounds and close to previously reported effects which required high radiation doses.

As there was not a significant change in the radiosensitizing effect between the carboxylate and the amidate and their respective metronidazole adducts it was performed the measurement of the formation constant of that adducts. The results of that measurements gave evidence of adduct decomposition when in dilute aqueous solution.

ABREVIATURAS

Rh₂(ac)₄	: Bis(aquo)tetrakis(acetato) de dirródio (II)
Rh₂(prop)₄	: Bis(aquo)tetrakis(propionato) de dirródio (II)
Rh₂(but)₄	: Bis(aquo)tetrakis(butirato) de dirródio (II)
Rh₂(cit)₄	: Bis(aquo)tetrakis(citrato) de dirródio (II) tetraidratado
Rh₂(tfa)₄	: Bis(aquo)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II)
Rh₂(tfc)₄	: Bis(trifluoroacetamida)tetrakis(trifluoroacetamidato) de dirródio (II)

metro : Metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol)

Rh₂(ac)₄metro₂	: Bis(metro)tetrakis(acetato) de dirródio (II)
Rh₂(prop)₄metro₂	: Bis(metro)tetrakis(propionato) de dirródio (II)
Rh₂(but)₄ metro₂	: Bis(metro)tetrakis(butirato) de dirródio (II)
Rh₂(cit)₄ metro₂	: Bis(metro)tetrakis(citrato) de dirródio (II) tetraidratado
Rh₂(tfa)₄ metro₂	: Bis(metro)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II)
Rh₂(tfc)₄metro₂	: Bis(metro)tetrakis(trifluoroacetamidato) de dirródio (II)

EtOH	: Etanol
MeOH	: Metanol
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DNA	: Ácido Desoxirribonucléico
RNA	: Ácido Ribonucléico
5'AMP	: Adenosina 5' monofosfato
5'ADP	: Adenosina 5' difosfato
5'ATP	: Adenosina 5' trifosfato
9-EtG	: 9 - Etil guanina (2-amino-9-etil-6-hidroxipurina)

PBS 7,4	: Tampão fosfato (pH=7,4)
MEM	: Minimal Eagle Medium
SFB	: Souro Fetal de Bovino
DMF	: Fator de Modificação da Dose
CHO k1	: Células de ovário de hamster chinês

TCLM	: Transferência de carga Ligante-Metal
OM	: Orbital Molecular

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1 Metais em Medicina

A Química Bioinorgânica é uma área que vem se desenvolvendo rapidamente e apresenta um potencial enorme para as aplicações em medicina, não só dos elementos essenciais, mas também dos não essenciais e ainda dos elementos radiativos.

A química inorgânica medicinal oferece possibilidades reais para a indústria farmacêutica (que tradicionalmente emprega produtos orgânicos), tentando descobrir novas drogas que sejam mais adequadas para o uso nesse campo. Esta área tem sido estimulada pelo sucesso da *cis*-platina, a droga anticancerígena mais vendida no mundo.

Complexos de platina com toxicidade reduzida, atividade por via oral e atividade contra tumores resistentes, estão atualmente sendo submetidas a ensaios clínicos. O complexo organometálico, dicloreto de titanoceno está sendo testado em pacientes e complexos de Ru (III) apresentam atividade antimetastática. Os complexos de Gd (III) são utilizados como agentes de contraste na ressonância magnética, derivados de ^{99m}Tc , são utilizados no diagnóstico clínico e de ^{186}Re na radioterapia [1].

Tem havido um recente progresso em entender a química de coordenação e a bioquímica de metalofármacos antigos, como os antiartríticos de ouro e antiulcígenos de bismuto, sendo que novos trabalhos têm sugerido um uso mais efetivo das mesmas.

Outras áreas de grande potencial clínico incluem miméticos de superóxido dismutase (SOD), insulina de vanádio, "scavengers" de óxido nítrico de rutênio e fotossensibilizadores derivados de lantanídeos [1].

O aumento no conhecimento da bioquímica dos metais permite o desenvolvimento de novas drogas, orgânicas ou inorgânicas, em outras áreas, como por exemplo, agentes neurofarmacêuticos e anti-infecciosos.

Os progressos na química medicinal de coordenação, dependem do entendimento, não só da termodinâmica (equilíbrio e estrutura) mas também da cinética (e mecanismos) de reação dos complexos metálicos, especialmente sob condições biológicas relevantes.

São numerosas as revisões na literatura no que se refere a este tema, sendo que, a mais recente, foi apresentada por Sadler [1], onde se descrevem amplamente as aplicações atuais dos metalofármacos mais importantes.

I.2 Carboxilatos e amidatos de Rh (II)

Antes dos anos sessenta, poucos trabalhos em relação à atividade antitumoral dos metais do grupo da platina tinham sido desenvolvidos.

A descoberta feita por Rosenberg e col. em 1965 [2], sobre o potencial da *cis*-platina como droga antitumoral, geraram pesquisas com outros complexos tanto de platina como de outros metais desse grupo, com a finalidade de determinar as suas atividades anti-carcinogênicas.

Uma classe promissora de compostos surgiu em 1972, quando Hughes e col. [3], reportaram que os carboxilatos de Rh (II), misturados com arabinosilcitosina, aumentavam o tempo de sobrevivência de camundongos que apresentavam tumor ascites L1210. Estudos posteriores demonstraram que estes carboxilatos eram também inibidores efetivos dos tumores ascíticos de Erlich e P388, em camundongos [4,5].

A figura I.1 mostra a estrutura em “gaiola” dos carboxilatos de ródio (II). Esses complexos apresentam dois átomos de Rh no estado de oxidação formal +2, unidos por quatro ligantes-ponte carboxilatos, nas posições equatoriais, e por uma ligação simples Rh-Rh. As posições axiais podem ser ocupadas por moléculas do solvente ou por outros ligantes L, geralmente através de átomos de N, O ou S, formando adutos de maneira reversível [4,5].

Figura I.1.- Estrutura genérica em gaiola do carboxilato de ródio (II)
L: Ligante (N, O, S) ou solvente

Um outro tipo de complexo dinuclear de Rh (II) é representado por amidatos de Rh (II) (figura I.2), onde, agora, as posições equatoriais estão ocupadas por ligantes-ponte amidatos (RCONH'), complexos que poderiam se ligar ao DNA formando pontes de hidrogênio através do grupo NH, de modo análogo ao postulado para a *cis*-platina [6].

Figura I.2.- Estrutura genérica em gaiola do amidato de ródio (II)
L: Ligante (N, O, S) ou solvente

Vários mecanismos de ação biológica dos carboxilatos de Rh (II), têm sido propostos. Um deles consiste no possível bloqueio de enzimas que possuam grupos SH livres, no sítio ativo, as quais são responsáveis pelos processos de replicação do DNA, como por exemplo, as DNA's e RNA's polimerases [5,7,8].

Uma outra possibilidade é a interação direta com o DNA, desde que o acetato de ródio (II) por exemplo, reage com adenosina, formando adutos do tipo $[Rh_2(CH_3COO)_4(adenosina)_2]$ [9], o que não ocorre com a guanina, que se liga nas posições equatoriais, formando complexos mistos de tipo $[Rh_2(CH_3COO)_2(9-EtG)_2]$ [10].

Foi observado, também, que a atividade antitumoral do acetato, propionato e butirato de ródio cresce na medida em que se aumenta o comprimento da cadeia R do ligante equatorial:

e que este efeito era, provavelmente, devido a que o butirato penetrava com maior facilidade na célula por apresentar uma cadeia R mais lipofílica [11].

I.3 Efeito Radiossensibilizador

Além do efeito quimioterapêutico de alguns complexos metálicos, foi determinado que os mesmos podem alterar os efeitos da radiação de várias formas, atuando especificamente como radiossensibilizadores.

Chamam-se radiosensibilizadores os agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células hipóxicas à radiação, visando o aumento da eficácia da radioterapia no tratamento do câncer.

Os mecanismos através dos quais um agente químico pode atuar como radiosensibilizador são: por interação com o DNA, diminuição de tióis intracelulares ou por afinidade eletrônica [12,13] (capítulo III.6).

Alguns carboxilatos de Rh (II) e compostos nitroimidazólicos têm sido testados como radiosensibilizadores, em doses elevadas de radiação, na faixa de 0 a 40 Gy, obtendo-se resultados significantes.

Chibber e col. (1985) verificaram que a eficiência radiosensibilizadora *in vitro*, dos carboxilatos: acetato, propionato e butirato, varia paralelamente com as suas ações antitumorais e atribuíram aquele efeito à capacidade dos carboxilatos de Rh (II), de se ligarem a compostos que apresentem átomos de enxofre doadores, como são os tióis intracelulares [14].

Com a finalidade de aumentar o efeito radiosensibilizador dos carboxilatos de Rh (II), foram sintetizados adutos de acetato de Rh (II) e nitroimidazóis [15] (figura I.3), sendo que os adutos de tipo $[\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{L}_2]$, onde L = misonidazol e desmetilmisonidazol, apresentam efeitos radiosensibilizadores maiores do que os produtos de origem isoladamente. Isto como consequência de um efeito sinérgico da ação do acetato de Rh (II) e do misonidazol, onde este radiosensibiliza pelo mecanismo de afinidade eletrônica, reduzindo-se, através do grupo nitro, na posição 2 do anel imidazólico.

Figura I.3.- Estrutura molecular do aduto $\{\text{Rh}(\text{CH}_3\text{COO})_2[1-(2\text{-hidroxy-3-metoxypropyl})- 2\text{-metil-5-nitroimidazol}]\}_2$ [15].

Em outros estudos, utilizaram ligantes-ponte carboxilatos substituídos, que apresentam um anel nitroimidazólico na cadeia carbonílica (R), os quais formam complexos com uma série de metais como Rh (II), Ru (II), Cu (II), Co (II) e Pt (II) [16].

Neste trabalho são descritas a síntese e caracterização de alguns carboxilatos: propionato ($\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$), butirato ($\text{R}=\text{C}_3\text{H}_7$), trifluoroacetato ($\text{R}=\text{CF}_3$), citrato ($\text{R}=\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_5$),

(figura I.1) e o amidato: trifluoroacetamidato ($R=CF_3$) (figura 1.2) de Rh (II), e de seus respectivos adutos com metronidazol (ligante axial (L)), que é um 5-nitroimidazol (figura III.10).

São descritos também os ensaios biológicos aos quais esses complexos foram submetidos, com a finalidade de determinar o possível efeito radiosensibilizador em baixas doses (2,71 e 4,33 Gy) de radiação ionizante.

Capítulo II

OBJETIVOS

O interesse nos carboxilatos de Rh (II) como radiosensibilizadores de tumores surgiu devido a que estes compostos apresentavam afinidade por células hipóxicas e alta reatividade com compostos intracelulares que possuem átomos de enxofre doadores nas suas estruturas, como a Glutathione, que se comporta como radioprotetor, diminuindo a ação da radioterapia no tratamento do câncer.

O objetivo de nosso trabalho foi sintetizar e caracterizar alguns carboxilatos e o trifluoroacetamido de Rh (II), e seus respectivos adutos com metronidazol, assim como determinar o possível efeito radiosensibilizador dos mesmos.

Desde que a atividade radiosensibilizadora do metronidazol é conhecida, a síntese dos adutos com este ligante teve como objetivo, produzir um efeito sinérgico na atividade radiosensibilizadora destes complexos, e comparar essa ação com aquela dos compostos de partida.

Outro objetivo importante foi de testar o possível efeito radiosensibilizador destes complexos em baixas doses de radiação (2,71 e 4,33 Gy), desde que os dados obtidos na literatura foram determinados em doses elevadas de radiação (até 40 Gy), fugindo da realidade do tratamento radioterápico, onde devem ser utilizadas baixas doses de radiação de aproximadamente 2 Gy.

Capítulo III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1 SÍNTESES

1. CARBOXILATOS DE Rh (II)

1.1 *Bis(aquo)tetrakis(propionato) de dirródio (II), $Rh_2(prop)_4$ [17,18]*

Uma mistura de cloreto de ródio (III) (0,2027 g; $7,7 \times 10^{-4}$ moles) e propionato de sódio (0,4057 g; $4,2 \times 10^{-3}$ moles), foi aquecida sob refluxo, por 30 minutos em 250 mL de EtOH, sob atmosfera de nitrogênio. Filtrou-se. O etanol foi removido do filtrado por evaporação a vácuo e se adicionou 100 mL de água. Transferiu-se a suspensão para um funil de separação de 500 mL e extraiu-se o complexo com diclorometano (200 mL), que também foi removido por evaporação a vácuo, sendo o complexo dissolvido em acetona e colocado num béquer de 50 mL. Ao se evaporar a acetona obteve-se o propionato de ródio, que foi secado em estufa a vácuo, a 60 °C, durante 6 horas.

O complexo é um sólido verde escuro.

1.2 *Bis(aquo)tetrakis(butirato) de dirródio (II), $Rh_2(but)_4$ [17,18]*

Uma mistura de cloreto de ródio (III) (0,20 g; $7,6 \times 10^{-4}$ moles) e butirato de sódio (0,46 g; $4,2 \times 10^{-3}$ moles), foi aquecida sob refluxo, por 30 minutos em 250 mL de EtOH, sob atmosfera de nitrogênio. Filtrou-se. O EtOH foi removido do filtrado por evaporação a vácuo e se adicionou 100 mL de água. Transferiu-se a suspensão para um funil de separação de 500 mL e extraiu-se o complexo com diclorometano (200 mL), que também foi removido por evaporação a vácuo, sendo o complexo dissolvido em acetona e colocado num béquer de 50 mL. Ao se evaporar a acetona obteve-se o butirato de ródio, que é secado em estufa a vácuo, a 60 °C, durante 6 horas.

O complexo é também um sólido verde escuro.

1.3 Bis(aquo)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II), $Rh_2(tfa)_4$ [19]

Foram dissolvidos sob aquecimento em 60 mL de EtOH, 5,5 g ($4,0 \times 10^{-2}$ moles) de trifluoroacetato de sódio e transferidos para um balão de 500 mL com 3 bocas esmerilhadas. Em uma das bocas, adaptou-se uma saída de nitrogênio, na segunda um condensador e na última um funil de adição de 50 mL. Ao funil de adição foi adicionada uma solução de 0,5014 g ($1,9 \times 10^{-3}$ moles) de tricloreto de ródio (III) triidratado, dissolvido em 40 mL de EtOH. Durante o refluxo, adicionou-se lentamente a solução etanólica de sal de ródio, completando-se esta adição após 20 minutos e deixou-se refluxar mais 10 minutos. Esfriou-se até temperatura ambiente. Filtrou-se. O etanol foi removido do filtrado por evaporação a vácuo. Ao resíduo adicionamos 70 mL de água destilada. Foi obtida uma solução azul intensa e após isso, transferiu-se a mesma para um funil de separação de 500 mL, sendo o complexo extraído com diclorometano (60 mL.; 6 extrações de 10 mL cada).

Todas estas frações foram misturadas num erlenmeyer, para depois serem filtradas em presença de $CaCl_2$. O diclorometano foi removido por evaporação a vácuo. O resíduo azul do balão foi dissolvido com acetona, transferindo-se a solução para um béquer e permitindo a evaporação da acetona. O sólido é secado a 60 °C sob vácuo por 4 horas.

Obteve-se um sólido verde que foi transferido para um funil de Büchner e lavado com água destilada gelada. O produto final foi secado em estufa a vácuo, a 60 °C, por duas horas.

O complexo é um sólido verde, que vai se tornando azul com o uso devido a que à presença de moléculas de água nas posições axiais.

1.4 Bis(aquo)tetrakis(citrato) de dirródio (II) tetraidratado, $Rh_2(cit)_4$

O $Rh_2(tfa)_4$ (0,0503 g; $7,3 \times 10^{-5}$ moles) foi colocado num balão com tampa esmerilhada e dissolvido na menor quantidade de água possível, sob agitação magnética. Uma vez dissolvido este composto, adicionou-se ácido cítrico monoidratado (0,1058 g; 5×10^{-4} moles). A mistura foi deixada sob agitação durante 4 horas. Após este tempo, a água foi evaporada até a secura, utilizando-se banho-maria. O resíduo de cor verde foi dissolvido em 10 mL de dimetoxipropano e refluxado por 1 hora. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente para logo separar o resíduo insolúvel (carboxilato de Rh(II)). Deixou-se evaporar o dimetoxipropano ainda presente em proporções muito pequenas e o carboxilato foi dissolvido em EtOH e transferido para um béquer. O refluxo da fração de dimetoxipropano e o procedimento anterior foram repetidos por mais três vezes com a finalidade de obter a maior quantidade possível de carboxilato.

As frações etanólicas foram misturadas, o álcool foi evaporado a pressão ambiente e a seguir o produto formado foi secado a vácuo, por aproximadamente 10 horas.

O complexo é um sólido verde, muito higroscópico.

2. AMIDATO DE Rh (II)

2.1 *Bis(trifluoroacetamida)tetrakis(trifluoroacetamidato) de dirródio (II), Rh₂(tfc)₄* [19]

A trifluoroacetamida (aproximadamente 4 g; $35,4 \times 10^{-3}$ moles) foi seca em estufa a vácuo, a 60 °C, por 30 minutos. O acetato de ródio (II) (0,2016 g; $4,5 \times 10^{-4}$ moles) foi colocado num balão de 50 mL junto com uma barra de agitação magnética, e junto com a sua tampa esmerilhada, foi seco em estufa simples a 60 °C por 30 minutos. Uma vez secos, transferiu-se quantitativamente a trifluoroacetamida para o balão e este foi introduzido num banho de silicone previamente aquecido a 140 - 150 °C. O balão foi tampado e vedado com fita de teflon após compensação da pressão interna, o que ocorreu após alguns segundos. Ligou-se o agitador magnético para misturar os reagentes durante a reação.

Primeiro observou-se a sublimação da trifluoroacetamida e logo a formação de um líquido púrpura. O tempo da reação foi de 4 horas. Depois do balão ter se esfriado, os cristais foram transferidos para o sistema de Abderhalden (figura III.1) com vapor de acetona, a fim de purificar o produto por sublimação do excesso do ligante. O resíduo púrpura, uma vez livre do excesso de ligante, foi tirado do sistema e lavado com água gelada, removendo-se cuidadosamente com pipeta de Pasteur a solução amarelada. A lavagem foi repetida até que a solução aquosa de lavado se tornou púrpura, o que significa que o composto solubilizou-se. Em seguida, levou-se o produto para secagem a vácuo.

O produto é um sólido púrpura.

Figura III.1.- Sistema de sublimação Abderhalden

3. ADUTOS ENTRE CARBOXILATOS DE Rh (II) E METRONIDAZOL

*** VIA ETANÓLICA**

3.1 Bis(metronidazol)tetrakis(acetato) de dirródio (II), $Rh_2(ac)_4metro_2$ [15,20,21]

Em um balão de duas bocas esmerilhadas de 250 mL colocou-se o $Rh_2(ac)_4$ (0,0568 g; $1,2 \times 10^{-4}$ moles), dissolvido em 50 mL de EtOH. A esta solução, adicionou-se metronidazol (0,0484 g; $2,8 \times 10^{-4}$ moles) dissolvido em 50 mL de EtOH, obtendo-se uma solução de cor vermelha. A mistura foi refluxada sob atmosfera de nitrogênio por 30 minutos. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente, sendo que a solução torna-se marrom claro. O álcool foi removido por evaporação a vácuo até a terça parte do volume inicial, emseguida a solução foi transferida para um béquer de 50 mL e deixada na geladeira por 48 horas. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com uma solução água: EtOH (1:1) e secado em estufa a vácuo, a 60 °C, por 6 horas.

O produto é um sólido de cor vermelho escuro.

3.2 Bis(metronidazol)tetrakis(propionato) de dirródio (II), $Rh_2(prop)_4metro_2$ [20]

O procedimento para obter este composto é similar ao procedimento anterior. As quantidades de compostos utilizados foram:

- $Rh_2(prop)_4$: 0,0301 g; $5,6 \times 10^{-5}$ moles
- metronidazol: 0,0247 g; $1,4 \times 10^{-4}$ moles

A lavagem do produto foi feita com água destilada quente.

O produto é um sólido de cor marrom.

3.3 Bis(metronidazol)tetrakis(butirato) de dirródio (II), $Rh_2(but)_4metro_2$ [20]

O procedimento para obter este composto é similar ao procedimento anterior. As quantidades de compostos utilizados foram:

- $Rh_2(but)_4$: 0,0334 g; $5,7 \times 10^{-5}$ moles
- metronidazol: 0,0389 g; $2,3 \times 10^{-4}$ moles

A lavagem do produto foi feita com água destilada quente.

O produto é um sólido de cor marrom.

3.4 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II), $Rh_2(tfa)_4metro_2$ [20]

Em um balão de 100 mL, foi colocado o $Rh_2(tfa)_4$ (0,0692 g; 10^{-4} moles) dissolvido em 20 mL de etanol. A esta solução foi adicionado metronidazol (0,0340 g; 2×10^{-4} moles) dissolvido em 20 mL de etanol. A mistura, que é uma solução rósea, foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos e em seguida foi transferida para um béquer de 50 mL. O álcool foi evaporado a pressão ambiente até que a solução ficasse bastante concentrada. Deixou-se na geladeira por 48 horas. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada quente e logo secado em estufa a vácuo, a 60 °C, por 6 horas.

O produto é um sólido rosa.

3.5 Bis(metronidazol)tetrakis(citrato) de dirródio (II), $Rh_2(cit)_4metro_2$

Em um balão de duas bocas esmerilhadas de 100 mL foi colocado o $Rh_2(cit)_4$ (aproximadamente 0,0825g, $\sim 8,5 \times 10^{-5}$ moles) dissolvido em 20 mL de EtOH. A esta solução, adicionou-se metronidazol (0,030g, $1,8 \times 10^{-4}$ moles) dissolvido em 20 mL de EtOH, obtendo-se uma solução de cor laranja. Adicionou-se mais 10 mL de etanol e a mistura foi refluxada sob atmosfera de nitrogênio por 30 minutos. Durante o refluxo, a solução tornou-se verde. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente, retornando à cor laranja da solução inicial. O álcool foi removido por evaporação a vácuo até a terça parte do volume inicial, e em seguida a solução foi transferida para um béquer de 50 mL, deixando evaporar aproximadamente 50% do álcool.

Alíquotas de éter etílico foram adicionadas a esta solução* observando-se a precipitação de um sólido de cor marrom. A solução etérea foi extraída com pipeta Pasteur e o sólido foi lavado três vezes com éter etílico. Evaporado o éter, o produto foi secado a vácuo por aproximadamente 10 horas.

O produto é um sólido de cor marrom.

* O aduto em solução etanólica foi deixado também em geladeira até por uma semana, esperando a sua precipitação. Isto porém não ocorreu, e optamos pela extração com um solvente de polaridade diferente como é o éter etílico.

3.6 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetamidata) de dirródio (II), $Rh_2(tfc)_4metro_2$

Em um balão de duas bocas esmerilhadas de 100 mL foi colocado $Rh_2(tfc)_4$ (0,0658 g; $7,3 \times 10^{-5}$ moles), dissolvidos em 30 mL de EtOH. A esta solução, adicionou-se metronidazol (0,0350 g; 2×10^{-4} moles) dissolvido em 20 mL de EtOH, obtendo-se uma solução de cor laranja muito clara. A mistura foi refluxada sob atmosfera de nitrogênio por 1 hora. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente. O álcool foi removido por evaporação a vácuo até a terça parte do volume inicial, e a solução foi transferida para um béquer de 50 mL, deixando evaporar o álcool a pressão ambiente para concentrar a solução. Esta solução foi deixada na geladeira por 7 dias. O produto foi filtrado a vácuo imediatamente depois de ser removido da geladeira, sendo depois lavado com água gelada e secado em estufa a vácuo, a 60 °C, por 6 horas. Após esfriar, foi lavado novamente com 20 mL de água quente, secado novamente em estufa a vácuo, a 60 °C, por 6 horas.

O produto é um sólido de cor amarelo-laranja.

*** VIA METANÓLICA**

3.7 Bis(metronidazol)tetrakis(acetato) de dirródio (II), $Rh_2(ac)_4metro_2$ [22]

Em um balão de 100 mL foi colocado o $Rh_2(ac)_4$ (0,025 g; $5,2 \times 10^{-5}$ moles), dissolvido em 20 mL de MeOH. A esta solução, adicionou-se metronidazol (0,09 g; $5,2 \times 10^{-4}$ moles) dissolvido em 20 mL de EtOH, obtendo-se uma solução de cor vermelha. A mistura foi mantida sob agitação durante 3 horas. O álcool foi removido por evaporação a vácuo até a terça parte do volume inicial. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com MeOH e éter etílico e secado a vácuo por 6 horas.

O produto é um sólido de cor vermelho escuro.

3.8 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetato) de dirródio (II), $Rh_2(tfa)_4metro_2$

Em um balão de 100 mL foi colocado o $Rh_2(tfa)_4$ (0,0256 g; $3,7 \times 10^{-5}$ moles), dissolvido em 20 mL de MeOH. A esta solução, adicionou-se metronidazol (0,063 g; $3,7 \times 10^{-4}$ moles) dissolvido em 20 mL de MeOH, obtendo-se uma solução de cor rosa. A mistura foi mantida sob agitação durante 2 horas. O álcool foi removido por evaporação a vácuo até a terça parte do volume inicial. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada quente e secado a vácuo por 6 horas.

O produto é um sólido de cor rosa.

3.9 Bis(metronidazol)tetrakis(trifluoroacetamidata) de dirródio (II), $Rh_2(tfc)_4metro_2$

Em um balão de 100 mL foi colocado o $Rh_2(tfc)_4$ (0,025 g; $2,8 \times 10^{-5}$ moles), dissolvido em 20 mL de MeOH. A esta solução, adicionou-se metronidazol (0,048 g; $2,8 \times 10^{-4}$ moles) dissolvido em 20 mL de MeOH, obtendo-se uma solução de cor laranja. A mistura foi mantida sob agitação durante 3 horas. O álcool foi removido por evaporação a vácuo até a terça parte do volume inicial. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada quente e secado a vácuo por 6 horas.

O produto é um sólido de cor laranja.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela III.1, apresenta as porcentagens de rendimentos das sínteses dos carboxilatos e amidato de Rh (II) e de seus respectivos adutos com metronidazol.

Tabela III.1.- Porcentagens de rendimentos das sínteses dos carboxilatos e amidato de Rh (II) e de seus respectivos adutos com metronidazol nas vias etanólica (EtOH) e metanólica (MeOH).

Complexo de Rh(II)	%Rendimento
Rh ₂ (prop) ₄	43
Rh ₂ (but) ₄	40
Rh ₂ (tfa) ₄	45
Rh ₂ (cit) ₄	45
Rh ₂ (tfc) ₄	41
Rh ₂ (ac) ₄ metro ₂	58(EtOH), 75(MeOH)
Rh ₂ (prop) ₄ metro ₂	52
Rh ₂ (but) ₄ metro ₂	52
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂	69(EtOH)
Rh ₂ (tfa) ₄ metro ₂	48(EtOH), 45(MeOH)
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	20(EtOH), 80(MeOH)

4.1 Sínteses de carboxilatos e amidato de Rh (II)

O primeiro carboxilato sintetizado foi o formiato de Rh (II), obtido através do aquecimento da mistura de ácido clororródico H₃[RhCl₆] e ácido fórmico, porém Rh metálico foi também obtido devido a que o ácido fórmico é um forte agente redutor [5,23].

O acetato de Rh(II) foi obtido por um método análogo [24], e muitas variações do procedimento original são empregadas para sintetizar diversos carboxilatos de Rh (II), onde a escolha do método de obtenção do carboxilato está influenciado pelo valor do pKa do ácido carboxílico. Por exemplo, para o caso da síntese do acetato de Rh (II) é preciso o refluxo de RhCl₃ em uma mistura etanólica de ácido acético e acetato de sódio (pKa CH₃COOH = 4,78 [25-27], enquanto nas sínteses dos carboxilatos de Rh (II) provenientes de ácidos fortes como o ácido trifluoroacético (pKa = 0,5), não é necessária a presença do ácido e os carboxilatos são obtidos pelo refluxo da mistura etanólica de RhCl₃ e o sal sódico do ácido carboxílico correspondente [28,29].

As sínteses desenvolvidas neste trabalho seguiram os procedimentos mais utilizados na literatura [26,28-30] assim como as rotas de síntese já estabelecidas por outros membros do nosso grupo de pesquisa [17-19]. Isto principalmente na preparação dos carboxilatos e trifluoroacetamidato de Rh (II).

Para o caso da síntese dos carboxilatos: propionato, butirato e trifluoroacetato, aqueceu-se sob refluxo a mistura de RhCl₃ e o sal de sódio do ácido carboxílico correspondente (em excesso), em meio etanólico e sob atmosfera de nitrogênio.

A cor verde escuro da solução após o refluxo infere a formação do carboxilato de Rh (II), sendo também observada a formação de um resíduo preto que corresponde ao ródio metálico [31]. O tempo de refluxo foi de aproximadamente 30 minutos evitando-se que a temperatura de refluxo atingisse a temperatura de ebulição da solução, fatores que contribuem à formação de Rh^0 e à diminuição do rendimento da reação [17].

Como primeiro passo de purificação dos carboxilatos, o Rh^0 foi separado por filtração e o carboxilato em solução aquosa foi extraído com diclorometano. Para o caso do $Rh_2(tfa)_4$, o excesso de ligante foi eliminado com lavagens sucessivas de água destilada gelada, devido à alta solubilidade do trifluoroacetato de sódio neste solvente.

Para a síntese do $Rh_2(cit)_4$ foi utilizado um método alternativo àquele descrito por Najjar e col. [32], onde este carboxilato foi obtido por fusão do $Rh_2(ac)_4$ e ácido cítrico.

Nesta síntese não foi utilizado o clássico refluxo como nas outras sínteses de carboxilatos de Rh (II). O produto foi obtido da reação entre o $Rh_2(tfa)_4$ e ácido cítrico dissolvidos em água destilada, numa relação de aproximadamente 1:10 e mantidos em agitação durante 4 horas. O que facilita esta síntese, é a instabilidade do $Rh_2(tfa)_4$ em água, instabilidade que foi observada pela mudança de cor (do azul para o amarelo) das soluções aquosas deste carboxilato após alguns dias, e foi verificado pelo desaparecimento da banda característica da ligação Rh-Rh no seu espectro eletrônico, na região do visível [19].

Esta instabilidade tem sido observada só em soluções aquosas, e segundo explica Espósito [19], o produto formado poderia corresponder a um produto de oxidação do Rh (II) ou à uma solvatação de algumas posições de coordenação equatoriais. Este último fato facilitaria a entrada dos ânions citrato que estão presentes em grande excesso na solução. A instabilidade do $Rh_2(tfa)_4$ explica também o fato pelo qual este carboxilato tenha sido dissolvido inicialmente na mínima quantidade de água, do contrário diminuiria o rendimento da reação.

A evaporação da água é realizada em banho-maria e não diretamente na chapa elétrica, desde que, por experiência de sínteses anteriores, os carboxilatos de Rh (II), quando aquecidos por tempos prolongados, têm a sua solubilidade aquosa diminuída devido, provavelmente, a que podem adquirir estruturas poliméricas semelhantes à do formiato [33] e de outros n-alcanoatos [34] de Rh (II), (figura III.2).

O $Rh_2(cit)_4$ é um composto que, pelo fato de ser extremamente higroscópico, não pode ser obtido em forma de pó, similar aos outros carboxilatos. O refluxo em dimetoxipropano foi feito com a finalidade de extrair a maior quantidade de água possível e de purificar o carboxilato do excesso de ácido cítrico.

Figura III.2.- Estrutura polimérica do Formiato de Rh (II), $\{Rh(O_2CH)_2H_2O\}_2[Rh(O_2CH)_2]_2\}_\infty$, em que os ligantes H_2O foram omitidos [5].

O rendimento da reação foi obtido de forma aproximada. O $Rh_2(cit)_4$ sólido foi separado da fração de dimetoxipropano por decantação, dissolvido em álcool e esta solução colocada em um béquer. Evaporado o álcool e depois de secar ao vácuo, foi preparada uma solução etanólica de volume conhecido. A partir desta solução, foi separada uma alíquota de 1 mL, que foi colocada num frasco pequeno, deixando-se evaporar novamente o álcool, se seca ao vácuo e se prepara uma solução aquosa de $Rh_2(cit)_4$ de volume conhecido com a finalidade de determinar nesta solução, a concentração de Rh por espectrometria de emissão de plasma. Conhecendo a concentração de Rh, se fazem os cálculos tomando em consideração as respectivas diluições e a estequiometria que corresponde à formação do $Rh_2(cit)_4(H_2O)_6$, fórmula que está de acordo com os resultados de microanálises obtidos em trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa.

A síntese do $Rh_2(tfc)_4$ foi feita através da fusão do $Rh_2(ac)_4$ com excesso de trifluoroacetamida [19], método pelo qual também são obtidos outros tetra-amidatos de ródio (II) [35-40] e onde também são necessárias condições mais drásticas como a fusão, para facilitar a troca de ligantes carboxilatos pelos amidatos. A trifluoroacetamida, além de ligante, comporta-se também como solvente, facilitando a dissolução do $Rh_2(ac)_4$ após se atingir o seu ponto de fusão.

Para a purificação do amidato, utilizou-se a técnica de sublimação em um sistema Abderhalden (figura III.1). Este sistema apresenta a vantagem de permitir trabalhar a temperaturas controladas (temperatura do ponto de ebulição do solvente de escolha), evitando a decomposição ou polimerização do composto por excesso de calor. Observou-se que, após algumas horas, a quantidade do amidato diminuía e os pequenos cristais brilhantes na superfície do mesmo desapareciam gradativamente, cristalizando-se nas partes frias do sistema. Estes cristais de trifluoroacetamida foram recoletados novamente para serem usados em sínteses posteriores.

Foi verificado também que o aquecimento prolongado do amidato o torna insolúvel em água, o que pode ser atribuído, novamente, ao processo de polimerização do complexo, similar ao que ocorre com alguns carboxilatos.

Na literatura, são apresentados os quatro possíveis isômeros dos tetra-amidatos de Rh(II) [40], (figura III.3).

Figura III.3.- Possíveis isômeros geométricos para os amidatos de ródio (II) [40].

Bear e col. [37] separaram o amidato, produto da fusão, por HPLC acoplado a um espectrômetro de massa, obtendo 4 bandas de idêntica massa molecular, fato que comprovou a formação de isômeros geométricos, onde o isômero correspondente à III.3a, apresenta-se em porcentagens ao redor de 94% e corresponde ao isômero que apresenta as ligações Rh-N em posição *cis*.

A alta porcentagem deste isômero no produto de fusão, está de acordo com o mecanismo postulado por Bear e col. [40] onde a reação de fusão envolve troca de ligantes acetato por amidatos e, a entrada do primeiro, determina a orientação dos demais amidatos de forma que o nitrogênio do amidato que entra não pode se ligar em posição *trans* a outro nitrogênio no mesmo átomo de Rh.

Devido a que estas restrições são válidas para outros tipos de amidatos [37], assumimos que o amidato obtido neste trabalho corresponde ao isômero a da figura III.3 quando $R=CF_3$.

4.2 Sínteses de adutos de carboxilatos e amidato de Rh (II) com metronidazol

Os carboxilatos de Rh (II) possuem uma forte ligação simples Rh-Rh, são difíceis de se decompor e rapidamente formam adutos nos quais as posições axiais estão ocupadas por solventes doadores ou ligantes [40].

Quando se fala da síntese de carboxilatos de Rh(II) é entendido que as posições axiais não estão vazias, e sim ocupadas pelo solvente no qual foi feita a síntese ou pela água eventualmente presente no meio.

Para a síntese dos adutos com metronidazol, utilizamos como produtos de partida os carboxilatos e trifluoroacetamidato de Rh (II) descritos acima.

Na literatura, encontramos referências para a síntese dos adutos de carboxilatos de Rh (II) com vários tipos de nitroimidazóis as quais envolvem solventes alcoólicos como etanol e metanol [15,20-22].

Nós decidimos sintetizar os nossos adutos seguindo duas vias, a etanólica e a metanólica. Na via etanólica, procede-se a um refluxo da mistura do carboxilato ou amidato com o ligante, nosso caso o metronidazol, numa relação estequiométrica, ou seja de 1:2 respectivamente, durante 30 minutos. Após o refluxo, o etanol foi evaporado até aproximadamente a terça parte do volume inicial, com a finalidade de concentrar a solução e fazer precipitar o aduto após algumas horas em baixas temperaturas.

A via metanólica não precisa de refluxo mas, sim, de um maior tempo de reação, pelo menos três horas em agitação constante. O ligante, neste caso, deve estar em excesso, pelo menos numa relação molar de carboxilato ou amidato e metronidazol de 1:10. A precipitação do aduto não precisa de baixas temperaturas e aqui a precipitação é simultânea com a concentração da solução.

Como se pode observar, na descrição da síntese dos adutos, nem todos foram sintetizados pelas duas vias. Este é o caso do $\text{Rh}_2(\text{prop})_4\text{metro}_2$, $\text{Rh}_2(\text{but})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, isto devido a que, após os primeiros testes de citotoxicidade dos adutos, o $\text{Rh}_2(\text{prop})_4\text{metro}_2$ e o $\text{Rh}_2(\text{but})_4\text{metro}_2$, resultaram muito tóxicos para nossas células e foram excluídos dos testes de radiosensibilização, enquanto no caso do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, a porcentagem de rendimento da reação (tabela III.1) estava dentro dos valores aceitáveis nestas síntese e optamos por estabelecer a via etanólica como a mais apropriada.

O interesse de sintetizar os outros adutos: $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$, $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$ por via metanólica, era o de aumentar a porcentagem de rendimento, objetivo que foi conseguido e pode ser verificado comparando as porcentagens de rendimento das sínteses nas duas vias (tabela III.1). Por exemplo o rendimento da síntese do $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ aumentou de 58% (via etanólica) para 75% (via metanólica), o mesmo ocorrendo para o caso do $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$ que aumentou de 20% (via etanólica) para 80% (via metanólica).

No caso do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4\text{metro}_2$ não houve variação no rendimento.

O aumento de rendimento nas sínteses do $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$ é devido provavelmente a que estes adutos são mais solúveis em EtOH do que em MeOH e parte deles ficaria dissolvida em solução quando o EtOH é utilizado nas sínteses. No caso do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4\text{metro}_2$, o que foi observado tanto na via etanólica quanto na metanólica, foi uma mudança de cor da solução, de rosa para marrom, quando a solução era deixada por tempos prolongados, em baixas temperaturas (via etanólica) ou deixada em agitação por mais de duas horas (via metanólica). Podemos observar também que a síntese deste aduto pela via etanólica não inclui o processo de refluxo

devido a que, durante este processo, foi observado a mesma mudança de cor da solução, provocado provavelmente pelo aumento da temperatura. Esta mudança de cor foi posteriormente atribuída a uma possível decomposição do aduto quando em solução alcoólica.

III.2 ANÁLISES ELEMENTARES

Os complexos sintetizados foram analisados quanto ao seu conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogênio no Laboratório de Análise Elementar, Central Analítica, IQ-USP.

As tabelas III.2 e III.3, mostram os resultados das análises elementares para os carboxilatos e trifluoroacetamido de ródio (II) e seus respectivos adutos com metronidazol.

Tabela III.2.- Análises Elementares para carboxilatos e amidato de Rh (II)

Complexo de Rh (II)	Teórico			Experimental		
	C(%)	H(%)	N(%)	C(%)	H(%)	N(%)
Rh ₂ (prop) ₄	27,0	4,5		30,2	4,3	
Rh ₂ (but) ₄	32,6	5,5		34,6	5,4	
Rh ₂ (tfa) ₄	13,9	0,6		14,7	1,0	
Rh ₂ (cit) ₄	26,7	3,7		29,7	4,0	
Rh ₂ (tfc) ₄	16,1	1,1	9,4	16,0	1,2	9,0

Tabela III.3.- Análises Elementares para os adutos com metronidazol

Complexo de Rh (II)	Teórico			Experimental					
	C(%)	H(%)	N(%)	Via EtOH			Via MeOH		
	C(%)	H(%)	N(%)	C(%)	H(%)	N(%)	C(%)	H(%)	N(%)
Rh ₂ (ac) ₄ metro ₂	30,6	3,9	10,7	30,8	3,8	10,2	30,4	3,8	10,3
Rh ₂ (prop) ₄ metro ₂	34,3	4,6	10,0	34,4	4,5	9,7			
Rh ₂ (but) ₄ metro ₂	37,5	5,2	9,4	37,3	5,6	9,3			
Rh ₂ (tfa) ₄ metro ₂	24,0	1,8	8,4	24,7	1,9	7,6	26,3	2,3	8,1
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂	33,0	3,5	6,4	32,5	4,7	8,4			
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	24,1	2,2	14,1	25,1	2,8	13,5	25,1	2,4	14,1

A partir da tabela III.2 podemos observar que as microanálises dos carboxilatos Rh₂(prop)₄, Rh₂(but)₄ e Rh₂(cit)₄ mostram porcentagens de C e H um pouco diferentes aos valores teóricos, o que pode ser explicado pelo fato de que estes carboxilatos possuem nas suas posições axiais, ligantes do solvente no qual foram sintetizados, neste caso EtOH e água.

As possíveis fórmulas que batem com os resultados da análise elementar são as seguintes:

$\text{Rh}_2(\text{prop})_4$	: $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO})_4(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})(\text{H}_2\text{O})$ (%C = 30; %H = 4,8)
$\text{Rh}_2(\text{but})_4$	: $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO})_4(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})(\text{H}_2\text{O})$ (%C = 35; %H = 5,7)
$\text{Rh}_2(\text{cit})_4$	: $\text{Rh}_2(\text{COOHCH}_2\text{COHCOOHCH}_2\text{COO})_4(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ (%C = 28,3; %H = 3,9)

Para o caso dos adutos com metronidazol (tabela III.3), se observa que as análises elementares conferem com os valores teóricos a exceção do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, que, apesar de se ter insistido na purificação, ainda mantém restos de metronidazol e apresenta também uma certa umidade posto que este aduto é higroscópico.

Estes resultados de análise elementar mostram-se coerentes com os resultados teóricos tornando possível estabelecer as rotas de síntese para estes compostos.

Além das análises elementares, foram determinadas as solubilidades dos complexos sintetizados. Estes testes de solubilidade tiveram uma abordagem qualitativa, onde foram utilizadas aproximadamente 3 mg de amostra em 2 mL de solvente à temperatura ambiente [18].

De forma geral, pode-se dizer, que nem todos os carboxilatos apresentam a mesma solubilidade em água. Assim, o $\text{Rh}_2(\text{prop})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{but})_4$, que apresentam uma cadeia lateral maior do que o acetato, têm baixa solubilidade aquosa.

Quando a molécula apresenta átomos de flúor na sua estrutura, geralmente observa-se um aumento na solubilidade em água, assim o $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ apresentam-se solúveis. O $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ possui grupos hidroxila e carboxila, o que estaria favorecendo a sua solubilidade em água e conferindo a este composto a característica de ser muito higroscópico.

A introdução de metronidazol nas posições axiais diminui a solubilidade dos carboxilatos e amidato de Rh (II) em água e o $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4\text{metro}_2$ é insolúvel neste solvente.

Em outros solventes polares como o álcool e DMSO, tanto os carboxilatos e amidato de Rh (II) quanto os seus adutos com metronidazol, apresentam-se solúveis. Observamos que em DMSO, todos estes compostos formam soluções de cor laranja com exceção do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$, e de seu aduto com metronidazol, que formam soluções de cor verde.

Esta mudança da cor em DMSO, possivelmente deve-se a que o DMSO estaria ocupando as posições axiais, originando-se os respectivos adutos com esse solvente. A semelhança nas cores das soluções dos carboxilatos e amidato de Rh (II) e de seus adutos com metronidazol em DMSO, indica uma possível decomposição do aduto, onde o solvente deslocaria o metronidazol para ocupar as posições axiais.

III.3 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA

1. Introdução

1.1 Estrutura Eletrônica:

Os carboxilatos de Rh (II) representam uma importante classe de clusters dimetálicos (M-M), de fórmula geral M_2L_4 (simetria D_{4h}), onde M pode ser também W, Mo, Cr, Ru e Re.

Neste tipo de compostos, as ligações M-M podem variar desde simples até quádruplas, sendo que estas ligações ocorrem somente com metais de transição e são resultado da sobreposição dos orbitais d [41].

Na figura III.4 mostram-se as cinco possíveis sobreposições entre os conjuntos de orbitais d de dois átomos metálicos.

Figura III.4.- Sobreposições σ , π e δ entre dois conjuntos de orbitais d em átomos metálicos adjacentes, com o eixo z como eixo internuclear [41].

Estas interações permitem que dois átomos metálicos formem um orbital molecular σ , dois orbitais moleculares π e dois orbitais moleculares δ . As energias dos orbitais aumentam na ordem seguinte, começando com o mais estável (σ) :

$$\sigma < \pi < \delta < \delta^* < \pi^* < \sigma^*$$

Na figura III.5, os orbitais ligantes e antiligantes são mostrados na coluna denominada M_2 , e estão colocados na ordem de energia assinalada acima porém, a

ordem desses orbitais moleculares muda quando os átomos dos ligantes unem-se aos átomos metálicos.

Figura III.5.- Diagramas de níveis de energia mostrando as sobreposições dos orbitais d entre dois átomos metálicos (M_2) na presença de ligantes, originando a formação de ligações triplas em M_2L_6 , quádruplas em M_2L_8 e mais fracas nos $M_2L_8X_2$ [41].

Para sistemas d^4-d^4 , a ligação formada é uma ligação quádrupla, onde se precisa de oito elétrons para saturar o conjunto de orbitais de ligação, σ , π e δ formados pela sobreposição dos orbitais metálicos d numa molécula ou íon de tipo M_2X_8 ou $M_2(RCOO)_4$. Se há mais de oito elétrons, será necessário colocar os adicionais em orbitais antiligantes, por exemplo no δ^* , obtendo ligações M-M de ordem 3,5 ou 3,0 [41].

No caso dos compostos de di-rutênio com ponte carboxilato, o número de elétrons com os quais tem que ser preenchidos os orbitais ligantes e antiligantes é de onze. Portanto, com 8 elétrons ligantes e três antiligantes, a ordem de ligação deve ser de $5/2 = 2,5$. Isto está de acordo com as distâncias Ru-Ru, de aproximadamente 2,28 Å para esse tipo de moléculas. Contudo, de acordo com a ordem dos orbitais moleculares mostrada na figura III.5 (que é confirmado com cálculos quantitativos para compostos de Mo, Tc e Re), era esperada uma configuração: $\sigma^2\pi^4\delta^2\delta^{*2}\pi^*$, com um elétron não emparelhado. Por outro lado, os experimentos mostram que há três elétrons não emparelhados [41].

Um cálculo feito por CAC- $X\alpha$ -OD para a molécula de $Ru_2(HCOO)_4Cl$ [42] mostra que neste caso os orbitais π^* , estão colocados ligeiramente abaixo dos orbitais δ^* e a configuração $\sigma^2\pi^4\delta^2\pi^{*2}\delta^*$ mostrou-se de acordo com os dados experimentais.

Como podemos ver, os diagramas de orbitais moleculares calculados para sistemas d^4 - d^4 [35,43,44] não podem ser extrapolados para explicar o comportamento de sistemas d^7 - d^7 , como é o caso dos carboxilatos de Rh (II), (Rh (d^7); Rh-Rh:2,386 Å), embora nos permitam explicar a existência de ligações simples e diamagnetismo da molécula [42,43].

Similar aos estudos feitos com os carboxilatos de dirutênio e baseados em cálculos feitos por SCF- $X\alpha$ -SW para o $Rh_2(CH_3COO)_4(H_2O)_2$, Norman e Kolari [42] propuseram a configuração eletrônica $\sigma^2\pi^4\delta^2\pi^{*4}\delta^{*2}$. Esta configuração indica uma ligação simples Rh-Rh e a ordem dos orbitais parece ser completamente consistente com o espectro eletrônico experimental.

Rotov e col. [46] mostraram que os diagramas de OM dos amidatos são similares àqueles dos carboxilatos, por tanto apresentam as mesmas configurações eletrônicas, as quais permitem explicar os seus dados espectrais.

Hoje é amplamente aceito que os carboxilatos de Rh (II) apresentam uma ligação Rh-Rh simples [57], porém, esta conclusão não explica adequadamente a força e a curta distância da ligação. A explicação para esse encurtamento sugere que os ligantes ponte “forçariam” os dois átomos metálicos a se aproximarem [42] e a mistura extensiva dos orbitais destes ligantes ponte com os de Rh, aumentaria a força da ligação [47]. Estes mesmos autores propõem que para estes compostos carboxilatos, a ordem da ligação não reflete necessariamente a sua verdadeira natureza nestes compostos e provavelmente não é um indicador da interação metal-metal.

1.2 Formação de Adutos :

Os carboxilatos de Rh (II) apresentam grande reatividade nas posições axiais. Essas posições podem ser facilmente ocupadas por ligantes com átomos doadores de elétrons como O, S, P ou N. O contrário ocorre para a estrutura de gaiola que é bastante estável e onde a troca de ligantes equatoriais só se torna possível em condições mais drásticas.

Sabe-se, também, que a ligação Rh-Rh exerce uma considerável influência trans produzindo um aumento na distância das ligações Rh-L (L=ligante axial). A influência trans da ligação Rh-Rh se deve a que o par eletrônico do ligante doador vai se localizar no orbital σ^* Rh-Rh onde, se a energia competitiva entre os orbitais do doador e do receptor é pobre, origina ligações Rh-L fracas e ineficientes, que conduzem à formação de ligações longas Rh-L [42]. Este fato é característico de ligações metal-metal muito fortes, onde o orbital σ^* está aumentado em energia e desfavorece portanto à coordenação axial desse ligante. Quando os orbitais doadores dos ligantes aproximam-se do orbital σ^* Rh-Rh, resulta na estabilização e encurtamento da ligação Rh-L e na desestabilização da ligação Rh-Rh [47], isto devido a que a interação axial com sistemas básicos aumenta a população eletrônica nos orbitais moleculares antiligantes (σ^* Rh-Rh), enfraquecendo por tanto essa

ligação. Ou seja, temos dois processos competitivos de enfraquecimento mútuo das ligações metal-metal e metal-ligante axial [42].

Drago e col. [48-50] sustentaram que as interações π metal-metal induzem a uma retrodoação π^* . Uma avaliação da ligação π Rh-L em adutos de nitrogênios aromáticos doadores, foi sugerida pela tendência à estabilidade de adutos com $L =$ ácido iso-nicotínico $>$ piridina $\approx$ niacina, a qual é paralela à capacidade de ligação π destes ácidos [51].

Cotton [45] tem sido muito crítico à retrodoação π Rh-L proposta por Drago [48]. Os seus cálculos, feitos sobre espécies do tipo : $[\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4(\text{PR}_3)_2]$, estruturalmente caracterizadas, não admitem a presença de uma retrodoação. Ele indicou que os ligantes fosfinas axiais não têm introduzido novas interações, mas aceitou que as magnitudes das interações Rh-L tinham sido alteradas.

1.3 Atribuição das Bandas dos Espectros Eletrônicos :

A cor dos adutos de carboxilatos de Rh (II) varia com a natureza do ligante axial: azuis ou verdes para ligantes com oxigênio, rosa ou vermelho com nitrogênio, e laranja com enxofre ou fósforo [52]. Para os amidatos de ródio, esse padrão muda e temos, por exemplo, que os adutos de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ são avermelhados ou purpúreos para ligantes com oxigênio, alaranjados com CO e piridina e amarelos com DMSO ou R_3P [53].

Os espectros eletrônicos dos carboxilatos de Rh (II) consistem de duas bandas na região do visível, banda 1 (~ 600 nm) e banda 2 (~ 450 nm), e duas na região do ultravioleta, banda 3 (~ 250 nm (ombro)) e banda 4 (~ 220 nm) [44,54].

Enquanto a banda 2 permanece relativamente constante, alterando-se apenas com a substituição dos ligantes equatoriais [21], a banda 1 é fortemente influenciada pelas mudanças no ligante axial [44,55]. A força doadora crescente do ligante axial altera uniformemente a posição da banda 1 para regiões de maior energia (menor comprimento de onda) [21].

Norman e Kolari [42], atribuíram as bandas 1 e 2 no espectro visível às transições permitidas por dipolo elétrico :

$\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$ (banda 1) e $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$ (banda 2), com base na correspondência entre os valores de energia calculados e os experimentais, assim como nas observações de Dubicki e Martin [44] os quais observaram que a banda 1 é fortemente influenciada pelo ligante axial, enquanto a banda 2 permanece praticamente constante.

Posteriormente, Miskowski e col. [56] atribuíram as bandas 1 e 2 às seguintes transições:

$\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$ (banda 1) e $\pi^*_{\text{Rh-O}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$ (banda 2), sendo esta proposta retomada por Cotton [57], mostrando que os dados obtidos por Miskowski são consistentes com

os seus experimentos porém, são também consistentes com os resultados obtidos por Dubicki [44] e Norman [42].

Norman e Kolari [42], observaram que a banda 3 também sofre influência dos ligantes axiais, mais do que a banda 4 (deslocamento para menores energias, maiores comprimentos de onda), fato pelo qual os autores interpretaram que essa transição deveria corresponder a transições associadas a orbitais no eixo L-Rh-Rh-L e que os valores elevados da absorvidade molar da banda 4 correspondem a transições de transferência de carga $L \rightarrow M$ (TCLM) [17,42,58].

As seguintes são as atribuições compiladas por Souza [17]:

Transição

Banda 1 (~600 nm)	$\pi^*_{Rh-Rh} \rightarrow \sigma^*_{Rh-Rh}$
Banda 2 (~450 nm)	$\pi^*_{Rh-Rh} \rightarrow \sigma^*_{Rh-O}$
Banda 3 (~250 nm, ombro)	$\sigma_{Rh-Rh} \rightarrow \sigma^*_{Rh-Rh}$
Banda 4 (~220 nm)	$\sigma_{Rh-O} \rightarrow \sigma^*_{Rh-Rh}$

Os espectros eletrônicos dos carboxilatos e amidatos de Rh (II) são qualitativamente semelhantes [59] porém, alguns autores sugerem que não seria justificável uma atribuição análoga das transições, desde que, nos amidatos, a metade das ligações Rh-O é substituída por ligações Rh-N [35]. Kadish e col. [60] e outros autores [61] sugerem que a banda 1 é devida à transição $\pi^*_{Rh-Rh} \rightarrow \sigma^*_{Rh-Rh}$ e a banda 2 a algum tipo de transição $\pi^*_{Rh-Rh} \rightarrow \sigma^*_{Rh-O}$ OU σ^*_{Rh-N} .

2. Materiais e Métodos

Os espectros eletrônicos na região do UV-visível foram obtidos em espectrofotômetro Hitachi U-3000, com lâmpadas de tungstênio (visível) e deutério (UV), em cubetas de quartzo de 1 cm.

Todos os espectros foram obtidos em solução etanólica, a exceção do aduto $Rh_2(cit)_4metro_2$, cujo espectro foi obtido em solução aquosa.

3. Resultados e Discussões

Os espectros dos carboxilatos e amidato de Rh (II) e de seus respectivos adutos com metronidazol são apresentados a seguir.

A tabela III.4, apresenta os comprimentos de onda obtidos nos espectros dos carboxilatos e amidato de Rh (II), e seus respectivos adutos com metronidazol na região do UV- visível, assim como os valores de ϵ calculados para cada uma das bandas destes complexos.

$\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{prop})_4$, $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{prop})_4$, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{but})_4$, $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{but})_4$, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{cit})_4$, $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{cit})_4$, $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{but})_4\text{metro}_2$, $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

$\text{Rh}_2(\text{but})_4\text{metro}_2$, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Solvente: EtOH

Tabela III.4.- Resultados de espectroscopia eletrônica dos carboxilatos e amidoato de Rh (II) e seus respectivos adutos com metronidazol (λ / nm ; ϵ / M⁻¹cm⁻¹)

COMPOSTO	SOLVENTE	VISÍVEL				ULTRAVIOLETA			
		λ_1	ϵ_1	λ_2	ϵ_2	λ_3	ϵ_3	λ_4	ϵ_4
Rh ₂ (ac) ₄	EtOH	589,6	181,4	444,6	83,6	251,4°	3971	222,8	13395
Rh ₂ (prop) ₄	EtOH	593,1	180,0	449,0°	135,0	254,2°	4442	223,9	13905
Rh ₂ (but) ₄	EtOH	592,6	222,8	443,2	112,0	254,2°	5263	224,8	17676
Rh ₂ (cit) ₄	EtOH	589,4	179,9	454,2°	119,1	256,3°	9117	226,0	19143
Rh ₂ (tta) ₄	EtOH	577,2	171,4	467,0	67,4	262,7°	4899	230,2	14935
Rh ₂ (tfc) ₄	EtOH	546,2	192,5	--	--	230,6	20401	210,6	11389
Rh ₂ (ac) ₄ metro ₂	EtOH	558,2	170,0	--	--	310,0	17121	224,4	19706
Rh ₂ (prop) ₄ metro ₂	EtOH	562,0	205,0	--	--	310,4	18035	225,4	20204
Rh ₂ (but) ₄ metro ₂	EtOH	554,8	258,6	--	--	310,0	19377	226,0	22629
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂	Água	564,8	363,6	--	--	316,8	18495	225,7°	21394
Rh ₂ (tta) ₄ metro ₂	EtOH	552,8	198,9	471,0°	103,4	310,0	11616	230,6	13647
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	EtOH	524,0	172,4	--	--	310,6	19511	231,2	24451

° ombro

-- Não observado

Os espectros eletrônicos obtidos neste trabalho mostraram-se coerentes com as descrições apresentadas na introdução deste capítulo.

A banda 1 dos carboxilatos apresenta-se perto dos 590 nm com exceção do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ (~ 570 nm), isto devido a que o CF_3 , por ser um grupo eletroatraente, tira densidade eletrônica da ligação Rh-Rh, enfraquecendo-a e conduzindo à desestabilização dos orbitais $\sigma_{\text{Rh-Rh}}$, ou seja, aumentando a sua energia, deslocando a transição $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$ para menores comprimentos de onda. Da mesma forma, a presença do grupo CF_3 fortalece as ligações Rh-O, o que resulta na estabilização, ou seja, diminuindo a energia do orbital $\sigma_{\text{Rh-O}}$, originando que a transição $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-O}}$ (banda 2) seja deslocada para maiores comprimentos de onda em relação aos outros carboxilatos.

No espectro do $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$, se observa que a banda 1 (~ 550 nm), está deslocada para menores comprimentos de onda em relação aos carboxilatos. Este fato pode ser explicado utilizando o modelo apresentado por Rotov [46] onde os orbitais $\pi^*_{\text{Rh-Rh}}$ dos amidatos estão energeticamente mais estabilizados (menores energias) em relação aos orbitais $\pi^*_{\text{Rh-Rh}}$ dos carboxilatos. Logo a transição $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$ é mais energética e se desloca para menores comprimentos de onda. Além disso, a presença do grupo CF_3 no amidato, similar ao $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$, desestabiliza o orbital $\sigma_{\text{Rh-Rh}}$, tornando a transição $\pi^*_{\text{Rh-Rh}} \rightarrow \sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$ ainda mais energética e originando o deslocamento da banda 1 para comprimentos de onda ainda mais baixos.

Na formação de adutos com metronidazol, verifica-se a mudança de cor dos complexos, de verdes para vermelhos ou marrons, como são os casos do acetato, propionato, butirato e citrato; de azul para rosa, que é o caso do trifluoroacetato e de púrpura para laranja para o amidato. A cor dos adutos sugere a coordenação do metronidazol através do átomo de nitrogênio imidazólico.

Os espectros na região do visível apresentam um deslocamento para menores comprimentos de onda de aproximadamente 25 - 30 nm da banda originalmente situada próxima a 590 nm (tabela III.4). Este fato está de acordo com o mostrado na literatura [54,62] onde o deslocamento hipsocrômico provocado pelo átomo de nitrogênio é maior em relação ao do oxigênio, que é o átomo através do qual o EtOH (solvente) se liga ao Rh nas posições axiais. No metronidazol, o nitrogênio imidazólico é o σ doador mais efetivo e vai originar desestabilizações no OM $\sigma^*_{\text{Rh-Rh}}$ dos carboxilatos, quando se ligar ao Rh nas posições axiais, originando portanto o deslocamento hipsocrômico da banda 1 nos espectros dos adutos com metronidazol.

A banda 2, que se apresenta próxima aos 450 nm para os carboxilatos, apresenta-se em forma de ombro no espectro do trifluoroacetamidato, próxima aos 320 nm. Alguns autores [60,61] têm observado aquela banda em aproximadamente 390 nm para um isômero deste amidato.

Estas bandas já não são observadas nos espectros dos adutos com metronidazol, as quais, provavelmente, ficam encobertas pela intensa absorção do metronidazol em aproximadamente 311 nm. Este já não é o caso do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4\text{metro}_2$, onde esta banda aparece agora em forma de ombro e isto provavelmente ocorre pela presença do

grupo eletroatraente CF_3 , que estabiliza as ligações $\sigma_{\text{Rh-O}}^*$, originando o deslocamento desta banda para maiores comprimentos de onda, sem ficar totalmente encoberta pela forte absorção do metronidazol.

Na região do UV, os espectros dos carboxilatos e do amidato, mostram as duas bandas características 3 e 4 e, além delas, uma quinta banda que, em todos os casos, aparece como um ombro, aproximadamente entre 205 e 215 nm e, por ser este o limite de detecção do aparelho não é preciso lhe dar alguma importância.

O metronidazol apresenta três bandas nesta região, em 311 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 5\,000$), 224 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 2\,000$) e 200 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 4\,000$) [62].

Nos espectros dos adutos na região do UV, se pode observar muito bem a banda em aproximadamente 311 nm, correspondente ao metronidazol. A banda 3 dos carboxilatos e do amidato está ausente nestes espectros, devido provavelmente a que como esta se apresenta em forma de ombro, ficaria encoberta pela banda do metronidazol em 310 nm, similar ao que acontece com a banda 2.

A banda 4 ainda é observada nos espectros dos adutos nesta região, porém, a existência de uma banda do metronidazol em comprimentos de onda muito próximos a ela, não permite diferenciar se esta pertence ao carboxilato ou ao ligante. O mesmo acontece com a quinta banda, observada em forma de ombro, nos espectros dos carboxilatos nesta região, mas que, nos espectros dos adutos, aparece como uma banda muito bem definida, que provavelmente pertence ao metronidazol.

Os altos valores das absorvidades molares da banda 4, obtidos experimentalmente, sugerem as transições de tipo transferência de carga $\text{L} \rightarrow \text{M}$, citados na introdução.

III.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

1. Introdução

Os espectros vibracionais (infravermelho e Raman), são muito utilizados na caracterização de compostos de coordenação. Quando um ligante se coordena a um centro metálico, sua simetria é geralmente abaixada e muitas vibrações ativas no infravermelho e no Raman, degeneradas no espectro do ligante livre, são desdobradas no espectro do complexo, dando informações sobre a simetria e estrutura do complexo [17].

O espectro infravermelho origina-se da transição entre dois níveis vibracionais ν da molécula no estado eletrônico fundamental e, similar a outros tipos de absorção de energia, as moléculas são excitadas a estados de maior energia quando elas absorvem radiação infravermelha [63].

Existem dois tipos de vibrações moleculares: as deformações axiais e as deformações angulares. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, de forma a que a distância inter-atômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações de ângulos, seja internamente em um conjunto de átomos, seja deste grupo de átomos em relação à molécula como um todo. Somente as vibrações que resultam em uma alteração rítmica do momento dipolar da molécula são observadas no infravermelho convencional [64].

Qualquer vibração entre dois átomos ligados tem uma frequência que pode ser descrita pela relação derivada da lei de Hooke para transições vibracionais:

$$\nu \propto \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \dots(1)$$

onde:

k = constante de força da ligação (dinas/cm)

μ = massa reduzida = $m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)$, (m = gramas)

Daí decorre que, quanto mais pesados os átomos envolvidos na ligação ou quando houver diminuição na força da ligação, ocorrerá um deslocamento das bandas para menores frequências [18,19].

1.1 Vibrações Associadas à Carboxila

Uma série de estudos extensivos em espectros infravermelhos de complexos metálicos de ácidos carboxílicos têm sido feitos [65].

O íon carboxilato pode coordenar a um metal em quaisquer dos seguintes modos:

Deacon e Phillips [66] analisaram cuidadosamente espectros no infravermelho de muitos acetatos e trifluoroacetatos de estrutura cristalina conhecida e chegaram às seguintes conclusões:

1. Complexos unidentados exibem valores de $\Delta [v_{\text{ass}}(\text{CO}_2^-) - v_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)]$ maiores do que os complexos iônicos. As frequências $v_{\text{ass}}(\text{CO}_2^-)$ e $v_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ correspondem aos estiramentos assimétrico e simétrico da carboxila.
2. Complexos bidentados tipo quelato, exibem valores de Δ significativamente menores do que os valores iônicos.
3. Os valores de Δ para complexos bidentados tipo ponte, são maiores do que os de complexos bidentado tipo quelato e muito próximos aos valores iônicos.

Segundo Deacon e col. [21,66,67], os carboxilatos metálicos que exibem valores de $\Delta [v_{\text{ass}}(\text{CO}_2^-) - v_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)] > 200 \text{ cm}^{-1}$, devem funcionar como monodentados, enquanto valores de $\Delta < 200 \text{ cm}^{-1}$ sugerem uma coordenação bidentada tipo ponte ou tipo quelato.

1.2 Coordenação do Ligante Axial

O espectro na região do infravermelho, além do reconhecimento das frequências vibracionais de deformação axial ou angular dos principais grupos orgânicos, permite determinar, também, o átomo responsável pela coordenação dos ligantes ao metal.

- A coordenação axial de amino piridinas, amido piridinas e banzamida ao $Rh_2(ac)_4$ foi pesquisada por espectroscopia no infravermelho [5]. A coordenação através do grupo amino deve originar o deslocamento da $\nu_{ass}(NH_2)$ e $\nu_s(NH_2)$ para menores números de onda, mas, o deslocamento para números de onda mais altos é indicativo da ligação através do nitrogênio aromático da piridina.

Similarmente, a coordenação da benzamida através do oxigênio amídico é indicada tanto pelo pequeno deslocamento da $\nu(C-O)$ para menores número de onda quanto o deslocamento da $\nu(NH_2)$ para números de onda mais altos, em relação à benzamida livre [68,69].

Najjar e col. [30, 70] observaram ligeiros deslocamentos da $\nu_{ass}(CO_2^-)$ para números de onda mais elevados e da $\nu_s(CO_2^-)$ para números de onda menores como consequência da influência dos ligantes axiais, apesar de que Mazo e col. [71] tinham verificado de que a natureza dos ligantes axiais tem pouca influência sobre estas frequências vibracionais dos carboxilatos de ródio.

Os espectros nesta região nos permitem, da mesma forma, determinar as ligações metal - ligante. Cornilsen e Nakamoto [72], utilizando isótopos metálicos, atribuíram as vibrações de deformação axial M-N, para 16 complexos imidazólicos de Ni (II), Cu (II), Zn (II) e Co (II), na região de $325-210\text{ cm}^{-1}$. Segundo Crasciunescu e col. [73], a vibração de estiramento Rh-N deve ser detectada na faixa de $400 - 460\text{ cm}^{-1}$, mas em trabalhos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa [18,20] não foi possível constatar uma banda bem definida nessa região.

1.3 Outras Vibrações dos Carboxilatos de Rh (II)

As $\nu(M-M)$ aparecem na região do infravermelho de baixa frequência ($250-100\text{ cm}^{-1}$), devido a que as ligações M-M são relativamente fracas e as massas dos metais são relativamente elevadas. Porém, em alguns complexos, as $\nu(M-M)$ aparecem em números de onda mais altos e próximos aos 400 cm^{-1} , devido ao carácter múltiplo das ligações M-M [65]. Se o complexo dinuclear é centro-simétrico em relação à ligação M-M, a $\nu(M-M)$ é proibida no infravermelho, porém permitida no Raman, como é o caso da ligação Rh-Rh nos carboxilatos de Rh (II).

Os estiramentos simétrico e assimétrico da ligação Rh-O aparecem, também, em regiões do infravermelho de baixa frequência, embora no Raman seja também observada uma outra banda correspondente a um estiramento simétrico Rh-O, proibida no infravermelho [17].

A $\nu(\text{Rh-Rh})$ é praticamente independente do ligante equatorial, porém depende fortemente da natureza e influência dos ligantes axiais. No início, esta frequência foi atribuída a uma banda na região de 170 cm^{-1} [74], posteriormente Clark e col. [75] observaram uma banda em aproximadamente 289 cm^{-1} a qual não sofria deslocamento quando se realizava uma substituição isotópica de ^{16}O por ^{18}O no complexo $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4(\text{PPh}_3)_2$ (PPh_3 = trifenilfosfina), experiência na qual também foi observado o deslocamento de uma banda que aparecia próxima a $338 - 321\text{ cm}^{-1}$ e que foi atribuída à $\nu(\text{Rh-O})$. Estudos posteriores do mesmo autor [76] e de Miskowski e col. [77] confirmaram esses dados.

Souza [17], observou que, tanto a $\nu(\text{Rh-Rh})$ quanto a $\nu(\text{Rh-O})$ sofrem deslocamentos para regiões de menores números de onda quando está presente um ligante axial. Da mesma forma, observou que as $\nu(\text{Rh-Rh})$ e $\nu(\text{Rh-O})$ são sensíveis, tanto ao efeito de massa (no caso do cicloalcanocarboxilatos) quanto à indução eletrônica (no caso dos pares de complexos com grupo R de pK_a diferentes, porém com massas similares).

1.4 Vibrações nos Amidatos de Rh (II) [78]

Quando passamos de um carboxilato para um ligante do tipo amidato, as atribuições feitas anteriormente podem ser modificadas pelo fato de que a ligação Rh-Rh encontra-se agora num ambiente totalmente diferente.

O complexo $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CONH})_4$ [79] apresenta as seguintes bandas no espectro infravermelho: 3360 cm^{-1} ($\nu(\text{N-H})$), 1587 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O})$ ou $\nu(\text{C-N})$), 1214 e 1192 cm^{-1} ($\nu(\text{acetamida})$), 929 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$), 696 cm^{-1} ($\delta(\text{N-H})$), 606 e 587 cm^{-1} ($\delta(\text{NCO})$), 383 e 367 cm^{-1} ($\nu(\text{Rh-O})$ ou $\nu(\text{Rh-N})$).

As bandas da $\nu(\text{N-H})$ das benzamidas equatoriais (3360 cm^{-1}) e das benzamidas axiais (1635 cm^{-1} e 1650 cm^{-1}) foram atribuídas para o complexo $\text{Rh}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH})_4(\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH})_2$ [35], mas não foi determinado o átomo através do qual a benzamida estaria ligando-se ao Rh na posição axial.

Nos amidatos, a ligação Rh-Rh aumenta aproximadamente em $0,4\text{ nm}$, por tanto a $\nu(\text{Rh-Rh})$ diminui, isto, provavelmente, devido tanto a fatores estéricos quanto a fatores eletrônicos. Estéricos, porque nos amidatos o ângulo de mordedura O-C-N é ligeiramente maior do que o ângulo O-C-O dos carboxilatos, e eletrônicos, porque os amidatos são melhores π receptores que os carboxilatos, removendo elétrons da ligação Rh-Rh, que se torna mais fraca [59,80].

Estes autores, comprovaram que a ligação Rh-Rh nos amidatos, similar ao que acontece com os carboxilatos, é influenciada pelos ligantes axiais. Estes mesmos autores fizeram estudos da influência da habilidade σ doadora e π receptora do ligante-ponte sobre os potenciais de oxidação, estrutura e estiramento Rh-Rh para os complexos $\text{Rh}_2(\text{ponte})_4(\text{L})_2$, onde ponte = acetato, acetamidato ou trifluoroacetamidato e L = AsPh_3 , SbPh_3 ou PPh_3 .

Tanto nos amidatos quanto nos carboxilatos, a doação σ aumenta a densidade eletrônica em orbitais σ^* do fragmento Rh-Rh, enquanto a π aceitação remove densidade eletrônica dos orbitais π^* , ambos os efeitos fortalecendo a ligação Rh-Rh.

Os adutos de SbPh_3 sendo este o pior σ doador, apresentam ligações Rh-Rh mais fortes, enquanto a PPh_3 , o melhor σ doador, torna as ligações Rh-Rh mais fracas.

O que também é observado por estes autores é que, mantendo constante o ligante axial, as vibrações $\nu(\text{Rh-Rh})$ para o amidato (CH_3CONH) e trifluoroacetamido (CF_3CONH) não apresentam diferenças significativas, isto devido provavelmente, à influência do grupo CF_3 sobre as propriedades σ doadoras do ligante equatorial [59].

Chakravarty e col. [35] estabeleceram que, nos amidatos, se tem um complexo jogo de efeitos eletrônicos e estéricos, que determinam as características estruturais dos mesmos, efeitos que ainda não são completamente elucidados.

2. Materiais e Métodos

Todos os espectros na região do infravermelho foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química da USP, em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 1750, processados pelo Grams.32/1700, com exceção do $\text{Rh}_2(\text{prop})_4$, que foi obtido em espectrofotômetro FTIR Nicolet modelo 510 e processado em OMNIC versão 3.0.

Em todos os casos, os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr.

3. Resultados e Discussões

Os espectros na região do infravermelho dos carboxilatos e amidato de Rh (II) e de seus respectivos adutos com metronidazol são apresentados a seguir.

A tabela III.5 apresenta as frequências vibracionais dos complexos de Rh (II) em estudo.

Metronidazol
KBr

Rh₂(ac)₄metro₂
KBr

$\text{Rh}_2(\text{but})_4$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{but})_4\text{metro}_2$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{tfa})_4\text{metro}_2$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{cit})_4$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$
KBr

$\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$
KBr

Tabela III.5.- Bandas vibracionais no infravermelho dos complexos de Rh(II) e seus adutos com metronidazol (ν/cm^{-1})

Composto	$\nu_{\text{ass}}(\text{C}=\text{O})$ lig. equat.	$\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$ lig. equat.	$\Delta\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$ lig. axial	$\nu(\text{N-H})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{C-F})$	$\nu_{\text{s}}(\text{C-F})$	$\nu(\text{O-H})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{N-O})$	$\nu_{\text{s}}(\text{N-O})$	$\nu_{\text{ass}}(\text{C}=\text{C})/$ $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{C-N})$	$\nu(\text{C-H})$	$\nu(\text{C}=\text{C-H})$
Rh ₂ (prop) ₄	1567	1422	145					3449						2975, 2940, 2879	
Rh ₂ (but) ₄	1572	1426	146					3432						2963, 2875	
Rh ₂ (tfa) ₄	1663	1464	199			1189	786	3484						2559	
Rh ₂ (cit) ₄ *	1599*	1409	190					3451						2559	
Rh ₂ (tfc) ₄	1656	1438	218	1706	3334	1270, 1202	733								
Rh ₂ (ac) ₄ metro ₂	1593	1426	167					3447	1545	1368		1083	828	2911, 2878	3147
Rh ₂ (prop) ₄ metro ₂	1586	1422	164					3443	1544	1370		1082	827	2980, 2894	3154
Rh ₂ (but) ₄ metro ₂	1587	1421	166					3433	1542	1367		1073	829	2965, 2935, 2876	3103
Rh ₂ (tfa) ₄ metro ₂	1666	1483	183			1270, 1192	741	3437	1552	1366		1068	832	2889	3153
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂ *	1605*	1427	178					3444	1541	1369		1072	829	2934	3100
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	1663	1430	233		3400	1267, 1191	730	3450	1546	1370		1066	829	2925, 2855	
Metronidazol								3218	1536	1370	1431	1076	826	3100, 2957	3100

* Apresenta-se uma banda a 1730 cm^{-1} atribuída aos grupos carboxila de ácido cítrico não ligados ao Rh (II)

3.1 Carboxilatos e Amidato de Rh (II)

Em relação aos carboxilatos de Rh (II), se pode observar na tabela III.5, que os valores de $\Delta [v_{\text{ass}}(\text{CO}_2^-) - v_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)]$ são $< 200 \text{ cm}^{-1}$, confirmando-se a ligação bidentada tipo ponte. Estes valores, embora sejam $< 200 \text{ cm}^{-1}$ para o $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ e $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ (199 e 190 cm^{-1} respectivamente), são valores altos em relação aos obtidos nos outros carboxilatos, isto provavelmente devido à influência do grupo eletroatraente CF_3 , para o caso do $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$, que retira elétrons do íon Rh^{2+} , diminuindo a polaridade da ligação Rh-O, aumentando o seu carácter iônico. No $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$, este valor de Δ apresenta-se alto devido, provavelmente, ao efeito de massa do citrato em relação aos outros carboxilatos, originando um deslocamento das bandas de $v_{\text{ass}}(\text{CO}_2^-)$ e $v_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ para maiores e menores números de onda respectivamente, portanto se afastando uma em relação à outra, o que origina um aumento no valor de Δ .

Na tabela III.5, podemos observar, também, que o valor de Δ para o $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ é $> 200 \text{ cm}^{-1}$. Neste caso, logicamente, já não se cumprem as observações feitas por Deacon e Phillips [66] devido a que o ligante ponte é uma amida e não um carboxilato.

Nos espectros, podemos observar a banda correspondente aos grupos OH, na região próxima aos 3450 cm^{-1} , que se apresentam como bandas largas, de baixa intensidade. Estas bandas devem ser provenientes das moléculas de água ou EtOH, localizadas nas posições axiais dos carboxilatos. No espectro do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$, esta banda apresenta-se muito intensa, isto devido à presença dos grupos OH provenientes do ligante ponte (citrato), dos ligantes axiais (etanol) e das águas de hidratação presentes neste complexo.

No $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$, esta banda apresenta-se como uma banda larga, mas com um pico bem resolvido, correspondendo à deformação N-H da trifluoroacetamida e à molécula de água de hidratação.

Outras vibrações observadas nestes espectros, são as correspondentes às $v_{\text{ass}}(\text{C-F})$ e $v_{\text{s}}(\text{C-F})$ na região de 1189 e 786 cm^{-1} respectivamente, para o complexos $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ e em 1200 e 730 cm^{-1} para o $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$. Bandas correspondentes às deformações C-H dos carboxilatos são igualmente observadas nestes espectros e são apresentadas na tabela III.5.

3.2 Adutos de Carboxilatos e Amidato de Rh (II) com Metronidazol

Na tabela III.5 se pode observar que as bandas correspondentes ao $v_{\text{ass}}(\text{CO}_2^-)$, apresentam-se deslocadas para números de onda mais altos, tanto nos adutos de carboxilatos quanto no amidato de Rh (II). Isto é provavelmente, devido à presença do metronidazol como ligante axial, similar ao já observado por Najjar e col. [30, 70].

O metronidazol apresenta dois sítios possíveis de coordenação : o nitrogênio não substituído no anel imidazólico (a) e o oxigênio etanólico da cadeia lateral sobre N1 (b).

Para determinar através de que átomo é produzida a ligação metal - ligante, os autores têm feito estudos com uma série de derivados imidazólicos na região de baixa frequência do infravermelho [72,81], determinando que a ligação se produz através de (a), atribuindo-se a vibração ν (M-N) na região de 325-210 cm^{-1} .

Um estudo de difração de raios-X do complexo: $\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4$ [1-(hidroxi-3-metoxipropil)-2-metil-5-nitromidazol]₂ [15] determinou que o ligante imidazólico se coordenava ao Rh através do nitrogênio (a), observando-se o mesmo para os complexos: $\text{Rh}_2(\text{ac})_4(\text{metro})_2$ [82], *trans*- $\text{PtCl}_2(\text{metro})_2$, *cis*- $\text{PtCl}_2(\text{metro})_2$ [83] e $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{metro})_2$ [84].

Em nosso trabalho não se fizeram estudos na região de baixa frequência do infravermelho para verificar a ligação M-L através do nitrogênio, devido a que os dados bibliográficos apontavam esse tipo de ligação para os nossos adutos, além das cores características dos adutos de carboxilatos de Rh (II) quando as ligações axiais são realizadas através do átomo de nitrogênio do ligante. Além disso, os resultados obtidos na espectroscopia eletrônica também corroboram esses dados.

O que na verdade foi observado é que se a ligação tivesse acontecido através do oxigênio etanólico (b), fora do anel, não teriam sido observadas mudanças nas frequências correspondentes às vibrações de deformação axial do anel imidazólico, ($\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{N})$) na região de 1600 - 1430 cm^{-1} (similar ao anel piridínico [64]), mudanças que podem ser observadas na tabela III.5, onde a frequência em 1431 cm^{-1} , que é uma banda bem definida no metronidazol isolado, já não aparece nos espectros dos adutos, o qual poderia indicar que a ligação do metronidazol com o Rh compromete algum átomo que conforma o anel imidazólico como é o nitrogênio (a). A ausência desta banda corresponderia a uma diminuição na densidade eletrônica do anel, quando é produzida a ligação através do nitrogênio imidazólico.

Nos espectros dos adutos com metronidazol, se pode observar, também, que a banda correspondente à $\nu(\text{O}-\text{H})$ apresenta-se deslocada para números de onda mais altos em relação ao metronidazol. Isto pode ser devido, provavelmente, a que as moléculas de metronidazol, no caso do metronidazol isolado, estariam formando pontes de hidrogênio através do OH etanólico, mas quando este ligante forma adutos com os carboxilatos ou amidato de Rh (II), essas interações são rompidas e a vibração O-H torna-se mais energética e por tanto desloca-se para números de onda

mais altos, fato que estaria descartando a possível ligação através do oxigênio etanólico (b).

Em todos os adutos, são observadas as $\nu_{\text{ass}}(\text{N-O})$ e $\nu_{\text{s}}(\text{N-O})$, correspondentes ao grupo NO_2 , na posição 5 do anel imidazólico.

Outras vibrações que podem ser observadas, são as correspondentes às $\nu(\text{C-H})$, provenientes da ligação $\text{C}=\text{C-H}$ no anel imidazólico e as $\nu(\text{C-O})$ correspondentes à ligação C-O-H , provenientes do substituinte etanólico no N1, as quais praticamente não sofrem deslocamento, o que nos poderia indicar também que a ligação Rh - metronidazol não ocorre via átomo de oxigênio (b).

O espectro do $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ mostra uma banda $\nu(\text{C-O})$, correspondente à trifluoroacetamida, que se encontra também como ligante axial neste amidato. Esta banda, já não está presente no espectro do aduto de $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ com metronidazol, comprovando que, agora, é este o ligante que ocupa as posições axiais.

Os espectros não cobrem a região abaixo de 500 cm^{-1} , onde aparecem os picos atribuídos a vibrações de estiramento Rh-O. Essas vibrações podem aparecer em 340 e 380 cm^{-1} (acetato e trifluoroacetato) e 335 e 356 cm^{-1} (propionato) [21].

III.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN¹H)

1. Introdução

Embora a técnica de RMN¹H seja uma ferramenta muito útil para o estudo dos carboxilatos de Rh (II) e muitos de seus adutos, são poucos os trabalhos publicados a respeito [85-90] e a maior parte deles objetivando elucidar a coordenação de ligantes axiais aos átomos metálicos [5].

Utilizando esta técnica, Winkhaus [28] demonstrou a ligação de duas moléculas de etanol ao di- e ao tricloroacetato de Rh (II) e, no mesmo ano (1967), Cenini e col. [91] propuseram estruturas para acetato-betadiacetonatos de Rh (II).

Bear e col. caracterizaram adutos de carboxilatos de Rh (II) com aminoácidos [92]. Posteriormente, adutos de nucleosídeos e nucleotídeos [69,93] foram também caracterizados sendo que a técnica de RMN¹H foi utilizada para identificar qual dos dois átomos de nitrogênio, presentes nestes compostos, ligava-se ao Rh. Foi observado que, para o caso do aduto com adenosina, a ligação se realizava através do N(7), isto devido a que o próton adjacente a este nitrogênio, sofria um deslocamento para campo baixo em relação ao ligante livre [94].

Em um estudo similar, Pneumatikakis e Hadjiliadis [62] propuseram inicialmente uma estrutura polimérica para os adutos de carboxilatos de Rh (II) e adenosina, onde tanto o N(7) quanto o N(1) ligavam-se a átomos de Rh de moléculas diferentes:

Entretanto, os resultados dos estudos de RMN¹H de adutos de carboxilatos de Rh (II) e tetraacetiladenosina demonstraram que estes estavam numa relação estequiométrica de 1:2, respectivamente, e não formavam tais polímeros.

Nothenberg [20,21], caracterizou os adutos Rh₂(prop)₄metronidazol₂ e Rh₂(prop)₄benznidazol₂, determinando que a ligação entre o Rh e estes ligantes imidazólicos, era produzida através do nitrogênio imidazólico (N(3)), devido a que, no espectro do aduto, o próton ligado ao carbono adjacente a este nitrogênio era deslocado para campo baixo em relação ao ligante livre. Da mesma forma, observou que os prótons do propionato não eram afetados pela presença de ligantes axiais.

Estudos de RMN¹H e de ¹⁹⁵Pt, em complexos de platina, onde alguns dos ligantes são compostos nitroimidazólicos, demonstraram também que as ligações Pt-(NO₂)imidazol se realizavam através do nitrogênio imidazólico N(3) [84], similar ao que tinha sido observado por Dyson e col. para o aduto Rh₂(ac)₄metro₂ [82], onde o espectro de RMN¹H demonstrou também uma relação estequiométrica Rh-metronidazol, 1:2, respectivamente.

Pruchnick e col. [89], utilizaram a técnica de RMN¹H para caracterizar complexos de Rh (II) com 1,10 fenantrolina de fórmula geral $[Rh_2(OOCR)_2(N-N)_2(H_2O)_2]^{2+}(RCOO)_2^{2-}$, observando que os deslocamentos químicos dos prótons dos carboxilatos, apareciam em campos mais altos em relação aos prótons dos carboxilatos não coordenados (ânions) e aos prótons dos grupos RCOO dos complexos de tipo $Rh_2(OOCR)_4(H_2O)_2$.

Mais recentemente, Nothenberg e col. [90] têm sintetizado e caracterizado sulfosalicilatos de Rh (II), tanto por RMN¹H quanto por RMN¹³C.

A RMN¹H foi utilizada também para elucidar os mecanismos de reação dos carboxilatos de Rh (II), como no caso do intercâmbio de acetato por trifluoroacetato. Nesse caso, os intermediários foram identificados por espectrometria de massas [95,96].

Neste trabalho, foram obtidos os espectros de RMN¹H dos adutos de carboxilatos e amidato de Rh (II) com a finalidade de confirmar a estequiometria destes complexos, assim como determinar o átomo através do qual o metronidazol liga-se ao Rh nos adutos, desde que, a natureza do substituinte R nos carboxilatos e amidato de fórmulas gerais $Rh_2(RCOO)_4$ e $Rh_2(RCONH)_4$ respectivamente, pode modificar o carácter ácido mole-duro do Rh, e, dependendo disso, tanto o átomo de nitrogênio imidazólico quanto o oxigênio na cadeia lateral sobre N1 no metronidazol, poderiam atuar como átomos doadores.

2. Materiais e Métodos

Os espectros de RMN¹H foram registrados em espectrômetro Bruker da série Avance de 300 MHz da Central Analítica do Instituto de Química da USP.

As amostras foram preparadas em acetona e água deuteradas, com tetrametil silano como referência interna.

3. Resultados e Discussões

Os espectros de RMN¹H dos adutos de carboxilatos e amidato de Rh (II) com metronidazol são apresentados a seguir.

A tabela III.6, apresenta os deslocamentos químicos dos adutos de carboxilatos e amidato de Rh (II) em estudo.

$\text{Rh}_2(\text{ffa})_4\text{metro}_2$
Solvente: acetona deuterada

$\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$
Solvente: acetona deuterada

Metronidazol
Solvente: água deuterada

$Rh_2(cit)_4$
Solvente: água deuterada

Union Data Parameters

NAME	HB
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 Acquisition Parameters

Date_	5/03/00
Time	18:27
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm BBO 13
PULPROG	zg30
TD	65536
SF	500
WDW	EM
SSB	0
LB	32
GB	0
PC	1.00

III and Data Parameters

CH	22.00
F40	9.000
F3	2.0117
F20	0.500
F2	0.35007
PHI0	0.43182
HZ	129.80161

F2 Processing Parameters

SI	32768
SF	300.1300794
WDW	EM
SSB	0
LB	0.50
GB	0
PC	1.00

Figura III.6.- Estruturas químicas dos compostos analisados por RMN¹H**Tabela III.6.- Deslocamentos químicos de próton para os adutos de carboxilatos e amidato de Rh (II) com metronidazol.**

COMPOSTO	SOLVENTE (deuterado)	δ ppm
Metronidazol	Acetona	2,497 (s, 3H, Ha); 3,872 (q, 2H, Hc); 4,34 (t, 1H, Hd); 4,48 (t, 2H, Hb); 7,87 (s, 1H, He).
Rh ₂ (tfa) ₄ metro ₂	Acetona	2,98 (s, 6H, Ha); 4,18 (q, 4H, Hc); 4,65 (t, 2H, Hd); 4,90 (t, 4H, Hb); 8,39 (s, 2H, He).
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	Acetona	2,79 (s, 6H, Ha); 4,00 (q, 4H, Hc); 4,46 (t, 2H, Hd); 4,67 (t, 4H, Hb); 6,58 (s, 4H, Hf); 8,21 (s, 2H, He).
Metronidazol	Água	2,31 (s, 3H, Ha); 3,72 (t, 2H, Hc); 4,32 (t, 2H, Hb); 7,86 (s, 1H, He).
Rh ₂ (cit) ₄	Água	2,68 (d, 1H, Hk', J=15,77); 2,86 (d, 1H, Hk'', J=15,74)
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂	Água	2,43 (s, 3H, Ha); 2,63 (d, 2H, Hk'); 2,79 (d, 2H, Hk''); 3,78 (t, 2H, Hc); 4,43 (t, 2H, Hb); 8,03 (s, 1H, He).

Segundo os resultados na tabela III.6, os espectros de RMN¹H do metronidazol mostram-se diferentes, dependendo do solvente deuterado utilizado. Assim, em acetona deuterada, observa-se que o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral ligada ao nitrogênio N1, acopla-se com os hidrogênios adjacentes, originando um tripleto, sinal que não foi relatado em artigos já publicados sobre este composto [97,98].

Em água deuterada, este tripleto não é mais observado e o sinal correspondente à hidroxila fica encoberto pelo sinal correspondente a este solvente, que se apresenta em 4,60 ppm.

3.1 Em acetona deuterada

A partir dos resultados em acetona deuterada, podemos observar que todos os deslocamentos químicos correspondentes ao metronidazol nos adutos, aparecem em campos mais baixos, em relação ao metronidazol livre. Este deslocamento era esperado, devido a que, quando se produz a ligação Rh-metronidazol, o anel imidazólico perde densidade eletrônica, desprotegendo todos os prótons que formam esta molécula.

Se compararmos os deslocamentos químicos de todos os prótons do metronidazol no aduto, em relação ao metronidazol livre, observamos que o próton He, ligado ao C(4) do anel imidazólico (figura III.6), é o que apresenta uma maior desproteção, de 7,87 para 8,39 no caso do Rh₂(tfa)₄metro₂ e para 8,21 no caso do Rh₂(tfc)₄metro₂.

Esta maior desproteção indicaria que a ligação Rh – metronidazol estaria ocorrendo através do N(3) no anel imidazólico, desde que o He no C(4) é adjacente ao N(3) (figura III.6) e estaria sendo desprotegido em maior proporção do que os outros prótons, quando ocorre a ligação Rh – N.

Outra observação interessante é que, os deslocamentos químicos no aduto, Rh₂(tfa)₄metro₂, aparecem em campos mais baixos, em relação ao Rh₂(tfc)₄metro₂, indicando que, no primeiro caso, as desproteções podem estar influenciadas pela presença do grupo eletroatraente CF₃ no carboxilato.

No aduto com amidato, o grupo CF₃ está também presente na molécula mas, neste caso, a ponte que liga os dois átomos de Rh apresenta um átomo de nitrogênio, que é menos eletronegativo do que o oxigênio, diminuindo a ação eletroatraente do grupo CF₃. Isto pode ser comprovado pela comparação entre o deslocamento químico observado para o próton amídico no amidato livre Rh₂(tfc)₄ (6,71 ppm, [37]), em relação ao aduto (6,58 ppm). Este deslocamento para campos mais altos indicaria uma proteção do hidrogênio amídico, que por se encontrar adjacente à ligação Rh – N imidazólico, é favorecido pela doação da densidade eletrônica do metronidazol apesar da presença do grupo CF₃.

Devido a que o carboxilato Rh₂(tfa)₄ não apresenta prótons na sua estrutura, não conseguimos determinar a relação carboxilato : metronidazol, mas inferimos, pelos

resultados da análise elementar, que estes estariam numa relação de 1:2 respectivamente.

No caso do $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$, os valores das integrações deixaram a dúvida se o aduto apresentava-se numa relação 1:1 ou 1:2. Baseados nas análises elementares, o aduto apresenta-se numa relação 1:2, mas, possivelmente, quando altamente diluído em acetona deuterada, este solvente estaria ocupando uma das posições axiais do amidato.

3.2 Em água deuterada

Os espectros do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ e de seu aduto com metronidazol, $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, foram obtidos em água deuterada, devido à sua baixa solubilidade em acetona.

No espectro do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$, são observados dois dupletos, sinais correspondentes a um sistema AB, produzidos pelos prótons (h, k) na cadeia do citrato (figura III.6). Os sinais dos prótons das carboxilas e hidroxilas do citrato, ficam encobertos pelo sinal da água deuterada em 4,60 ppm.

No espectro de RMN^1H do ácido cítrico, observa-se um singlete em 2,7 ppm, devido a que os prótons Hh e Hk são equivalentes nesta molécula simétrica. Quando o ácido cítrico forma o respectivo carboxilato, os prótons Hh e Hk deixam de ser equivalentes, desde que, no ambiente químico dos Hk, estão agora presentes os átomos de Rh, o que não acontece com os Hh (figura III.6).

Desde que os Hh e Hk deixam de ser equivalentes, os sinais correspondentes a estes prótons devem se apresentar também com diferentes deslocamentos químicos no espectro de RMN^1H , o que não foi observado nos espectros correspondentes.

Como se pode observar na figura III.6, a molécula de ácido cítrico apresenta um grupo carboxílico terminal, que poderia formar outra ligação carboxilato ponte. Se isto acontecesse, os prótons Hh e Hk, voltariam a ser novamente equivalentes e, no espectro de RMN^1H , deveria de ser observado um sinal que correspondesse a estes 4 prótons, como foi observado experimentalmente.

O sistema AB observado seria então produzido pelo acoplamento do próton Hk' com Hk'', originando um duplete. Da mesma forma, Hk'' acopla com Hk' originando o segundo duplete. Logicamente, estes sinais também seriam produzidos pelos acoplamentos dos prótons Hh, equivalentes.

Estes acoplamentos entre hidrogênios no mesmo carbono, é devido a que os ambientes químicos deles tornam-se diferentes quando o citrato forma um anel cíclico, ao se ligar aos átomos de Rh, através do grupo carboxílico terminal (figura III.7). Hk' poderia estar em posição cis ao grupo OH do carbono adjacente, enquanto Hk'' estaria em posição trans ou vice-versa.

Figura III.7.- Possível estrutura do citrato de Rh (II)

Neste caso, teríamos a relação Rh-carboxilato 1:1, conclusão que não é coerente com os nossos resultados da análise elementar, que mostram uma relação 1:2.

As técnicas utilizadas neste trabalho não permitiram confirmar esta estrutura, motivo pelo qual sugerimos que no futuro, com ajuda de alguma outra técnica, como difração de raios-X por exemplo, pode-se determinar a estrutura deste composto.

Nós, apesar dos resultados obtidos por RMN¹H, seguiremos considerando ainda um complexo de fórmula geral Rh₂(RCOO)₄.

No espectro correspondente ao seu aduto com metronidazol, Rh₂(cit)₄metro₂, as observações são similares ao observado com os outros adutos. O He ligado ao C(4) no anel imidazólico apresenta um deslocamento químico para campo mais baixo, em relação ao metronidazol livre, indicando que a ligação ocorre através do N(3) no anel imidazólico.

Aqui também não são observados os sinais dos grupos hidroxila e carboxila do citrato, que estariam encobertos pelo sinal da água deuterada.

Os sinais correspondentes ao Rh₂(cit)₄ (sistema AB), não sofrem deslocamentos devido à presença dos ligantes axiais, similar ao observado por Nothenberg [21] para o caso do aduto Rh₂(prop)₄metro₂.

III.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS: MEDIDAS DO EFEITO RADIOSENSIBILIZADOR

“Radiossensibilizadores são agentes químicos que aumentam a sensibilidade das células hipóxicas à radiação, visando o aumento da eficácia da radioterapia no tratamento do câncer” [15].

Este é o conceito geral de *radiossensibilizador*, mas, para entendermos a sua atividade como tal, devemos conhecer primeiro quais são os efeitos da radiação sobre as células e de que forma um agente químico pode aumentar esses efeitos com fins terapêuticos.

1. Introdução

Os três métodos que funcionam como padrões para o tratamento do câncer são, a radioterapia, cirurgia e a quimioterapia. A quimioterapia é utilizada quando a neoplasia sofreu metástase, enquanto que a radioterapia e a cirurgia são utilizadas isoladamente ou combinadas para o tratamento de tumores localizados.

Combinando a cirurgia e a radioterapia, é possível controlar localmente o tumor. A radioterapia pode destruir células cancerígenas alojadas nos gânglios linfáticos e nos tecidos vizinhos, reduzir tumores maiores e diminuir a probabilidade de uma metástase. Esse recurso pode ser combinado com a quimioterapia ou a imunoterapia para um tratamento mais efetivo em pacientes onde, o câncer, propagou-se ou naqueles que apresentam o risco de desenvolver um tumor recorrente no sítio, ou sítios, onde se desenvolveu inicialmente.

Os raios-X, gerados por aceleradores lineares e os raios gama, originados por isótopos radiativos que ocorrem naturalmente, são os tipos de radiações usualmente utilizados contra o câncer na radioterapia [99].

Os raios-X e gama atravessam os tecidos do corpo e são denominados Radiações Ionizantes, porque têm energia suficiente para remover elétrons do átomo [100].

A radiação ionizante começou a ser empregada em procedimentos médicos no início da década de 30, com a utilização de rádio natural como fonte de energia letal para o câncer. Inicialmente, o tratamento consistia no implante de rádio diretamente dentro do tumor ou cavidade corporal, utilizando uma fórmula especial para calcular a dose antitumor. A quantidade de rádio empregada, dosada em miligramas ou gramas, aumentou, à medida que as normas de segurança da equipe foram sendo implementadas.

Outros isótopos foram viabilizados na década de 50, tais como ^{60}Co e ^{137}Cs que emitem radiações eletromagnéticas com alto poder de penetração e energia de 1,17 e 1,33 MeV, respectivamente.

Com o progresso da engenharia, as técnicas rotacionais passaram a ser utilizadas; a fonte de irradiação movia-se em torno do paciente, concentrando o feixe de tratamento para não provocar danos às estruturas circunvizinhas normais e sensíveis.

Com a sofisticação da tecnologia da irradiação, foi viabilizado o uso de feixes eletromagnéticos de alta energia, em que, através de geradores eletrostáticos, eram criados os pulsos de elétrons necessários para gerar o fóton com efeito letal. Atualmente, os canhões de elétrons, com ondas direcionadas, são utilizados em aceleradores lineares de baixa, média e alta energia.

Na década de 80, os equipamentos de cobalto-terapia foram pouco a pouco sendo substituídos em diversos centros de radioterapia. O melhor e mais atualizado tratamento de radioterapia é realizado principalmente com aceleradores de alta energia, com feixes variáveis, de fótons de 5 a 18 MeV, e inclui feixes de elétrons de 4 a 22 MeV ou com braquiterapia, através de implantes localizados de ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{125}I ou ^{192}Ir , que são fontes flexíveis e podem ser ajustadas conforme o volume do tumor. Essa última modalidade está se tornando mais popular, devido à necessidade de tratamentos mais radicais e localizados com técnicas intracavitárias e intersticiais.

Desde 1980, a dose de radiação recebida pelo paciente é medida em *Grays* (Gy) que é a dose de radiação absorvida; um Gy equivale a 1J/kg de dose absorvida. Antes do Gray, a unidade utilizada era o *rad*, onde 100 rad equivalem a 1Gy.

A radioterapia é convencionalmente administrada em 15 - 35 frações: uma fração por dia e 3 - 5 frações por semana. O tratamento total dura 3 - 7 semanas [101].

Com os progressos obtidos na sobrevivência do paciente por novas técnicas de radioterapia e quimioterapia, a redução dos danos causados ao tecido normal tornou-se um importante objetivo do tratamento radioterapêutico, assim como a diminuição do tempo de exposição dos pacientes à radiação.

1.1 Efeitos da Radiação

A radiação destrói as células cancerígenas por danos ao DNA, provocando a quebra das hélices, interferindo principalmente na divisão celular. Na ação da radiação estão envolvidos mecanismos associados a aspectos físicos, químicos, e bioquímicos em células e tecidos.

i. Efeitos Químicos [100]

As células apresentam 70-85 % de água, 10-20 % de proteínas, 10 % de carboidratos e 2-3 % de lipídios. Uma vez que o principal componente das células é a água, as mudanças químicas produzidas pela radiação ionizante sobre a água são importantes para entender os processos biológicos.

As mudanças iniciais produzidas pela radiação na água, são a criação de moléculas ionizadas e excitadas: H_2O^+ , H_2O^* , e elétrons sub-excitados livres nas regiões próximas ao caminho da radiação.

Uma molécula de água ionizada reage com uma molécula vizinha formando um íon hidrônio e um radical hidroxila :

As moléculas de água excitadas conseguem liberar a sua energia, seja pela perda de um elétron, formando um íon que segue o processo da reação 1, ou por dissociação molecular, segundo a seguinte reação:

Os elétrons sub-excitados migram, perdendo energia pela excitação vibracional e rotacional das moléculas de água. Além disso, os elétrons orientam os momentos dipolares das moléculas de água vizinhas, formando um elétron hidratado:

Das espécies formadas, o H_2 não reage mais e o O^* rapidamente forma peróxido de hidrogênio:

Que, junto a outras espécies ativas de oxigênio como o oxigênio no estado “singleto” e o radical superóxido, O_2^- , constituem espécies químicas extremamente difusíveis e reativas que podem atingir as moléculas biologicamente ativas, e desse modo, danificá-las [125].

Este conjunto de reações recebe o nome de Reação de Radiólise da água e pode ser escrito da seguinte forma:

ii. Efeitos Biológicos [100]

Dependendo da dose, do tipo de radiação e do ponto final observado, os efeitos biológicos da radiação sobre as células, podem se diferenciar amplamente. Alguns ocorrem de forma relativamente rápida, enquanto outros podem levar anos para se tornarem evidentes.

Durante a ionização, são removidos elétrons, rompem-se ligações e a constituição química do sistema pode ser alterada. Provavelmente, ao redor de 10^{-3} s, os radicais

livres produzidos pela radiação reagem totalmente no seu caminho pelo sistema biológico.

Alguns processos bioquímicos são alterados quase imediatamente e a divisão celular pode ser afetada em horas.

Os efeitos biológicos podem ser diretos ou indiretos:

Efeitos diretos, são aqueles produzidos pela ação inicial da mesma radiação e efeitos indiretos, são os produzidos pela ação tardia dos radicais livres e outros produtos da radiação. Um exemplo de efeito direto é a quebra de uma das hélices do DNA originada pela ionização na própria molécula. Um exemplo de efeito indireto é a quebra de uma das hélices do DNA, quando um radical $\text{OH}^\bullet$ ataca um açúcar do DNA algum tempo depois.

Estes efeitos originam uma diminuição de algumas funções celulares, como a mitose, onde a célula não vai ser capaz de se reproduzir e morre. Ocorre também mutação, alterando os cromossomos no DNA.

iii. Efeitos Bioquímicos [99]

Nos tecidos, os radicais livres interagem com compostos orgânicos, como DNA, RNA, enzimas e outras proteínas, para produzir radicais orgânicos:

Em ácidos nucleicos, o dano pode ser produzido pela interação dos radicais com as bases pirimidina e purina, gerando radicais adicionais (bio-radicais) ou pela interação com os fosfatos ligados ao açúcar, gerando quebra nas hélices simples ou dupla.

A ionização direta das moléculas orgânicas ocorre, mais freqüentemente, com uma radiação ionizante particulada (prótons e nêutrons) do que com raios-X.

A reação que ocorre é similar à reação da água :

Os radicais orgânicos podem abstrair hidrogênios, reagir com grupos hidroxila para formar compostos mais estáveis ou também podem reagir com o oxigênio formando $\text{RO}_2^\bullet$. Estes peróxidos orgânicos são radicais muito reativos e impedem a restauração da estrutura inicial da molécula orgânica, ou seja fixam o dano provocado pela radiação.

Na ausência do oxigênio, isto não ocorre e muitas moléculas orgânicas ionizadas podem voltar à sua estrutura inicial. Infelizmente, algumas células cancerígenas apresentam uma concentração de oxigênio menor em relação às células normais, e como resultado, são relativamente resistentes à radiação.

Temos então que, tanto o e^-_{aq} quanto o $H^\bullet$, reagem com o oxigênio, formando superóxidos

e, o radical hidroxil, é o produto mais reativo e mais danoso, proveniente da radiólise da água.

O dano indireto pode ocorrer pela remoção do e^-_{aq} e do $H^\bullet$ (evitando a sua reação com o oxigênio, que agora poderia reagir com os radicais orgânicos, impossibilitando que os mesmos se regenerem) ou ainda, pela adição de radicais $OH^\bullet$.

O dano direto da molécula-alvo implica que o alvo sofreu uma polarização localizada através da perda de um elétron por reação química, produzindo um dano permanente (R^+).

Há muita evidência de que o DNA é o alvo primário da radiação:

T_i pode ser considerado o alvo não danificado, T_i^+ o alvo com algum dano inicial pela radiação e T_f o alvo com o dano fixado através da transferência de um elétron para uma molécula receptora.

Agentes químicos podem modificar os efeitos biológicos da radiação pela proteção dos tecidos normais (radioprotetores) ou pela sensibilização de células tumorais (radiossensibilizadores).

A eficiência da morte celular por radiação, *in vivo* ou *in vitro*, é medida pela curva de sobrevivência celular ou curva de sobrevivência à dose. Na figura III.8 estão representadas as curvas típicas para células expostas a radiação sob N_2 ou O_2 [13].

Nesta curva, está representada a fração de sobrevivência celular *versus* a dose de irradiação (Gy), e é muito importante notar que a dose requerida para obter o mesmo efeito, por exemplo a morte celular, é aproximadamente três vezes maior em células hipóxicas (deoxigenadas), do que em células aeróbicas normais.

Figura III.8.- Curva de Sobrevivência típica para células HeLa irradiadas com raios-X [13].

A relação entre as doses de radiação requeridas para provocar o mesmo efeito em ambiente hipóxico e com oxigênio é denominada Oxygen Enhancement Ratio (OER). Esta relação varia com o tipo de radiação e independe do nível de sobrevivência.

$$\text{OER} = \frac{\text{Dose em N}_2}{\text{Dose em O}_2} \quad \dots\dots(12)$$

Nos tecidos normais a concentração de oxigênio é de 2-5%. A concentração de oxigênio requerida para uma sensibilização total é de aproximadamente 2% ($30\mu\text{mol L}^{-1}$), portanto, os tecidos normais apresentam oxigênio suficiente para que os efeitos da radiação sejam totalmente observados. Para agentes diferentes do oxigênio, o termo OER, muda para ER (Enhancement Ratio) ou Fator de Modificação da Dose (DMF), o qual é utilizado para descrever o efeito dos agentes diferentes ao oxigênio *versus* o nitrogênio [13]:

$$\text{ER ou DMF} = \frac{\text{Dose em N}_2 \text{ (agente químico ausente)}}{\text{Dose na presença do agente químico}} \quad \dots\dots(13)$$

Quando um agente químico apresenta efeito radiosensibilizador, a dose que este requer deve ser menor do que a dose necessária para causar a mesma porcentagem de sobrevivência celular quando ausente. Portanto; um agente radiosensibilizador deve apresentar um ER ou DMF > 1.

O fato das células tumorais apresentarem uma sensibilidade diminuída à radiação na ausência de oxigênio já é conhecido há algum tempo, e a importância deste efeito físico-químico na radioterapia foi demonstrado nos estudos clássicos de Gray e col. [102,103], indicando que o tumor apresentava áreas necróticas com concentração de oxigênio diminuída, usualmente separadas por alguma distância do sistema vascular (150 - 200 μm).

Esta situação é mostrada na figura III.9, e é explicada pelo fato de que a natureza desordenada da replicação celular e as sucessivas demandas de oxigênio no metabolismo, produzem um gradiente na concentração do mesmo, deixando as células hipóxicas afastadas dos capilares. A importância clínica é que, devido aos efeitos do oxigênio, estas células, que podem representar mais do que 30% da massa total do tumor, podem ser radio-resistentes e, ao fim do tratamento, podem tornar-se aeróbicas, reiniciando o crescimento do tumor. Daí a importância de que os testes de radiosensibilização *in vitro* sejam feitos em meio hipóxico.

Figura III.9.- Difusão do oxigênio desde os vasos capilares através da massa tumoral. Com o aumento da distância, a $[\text{O}_2]$ diminui, originando células hipóxicas e, eventualmente necróticas [13].

O oxigênio é considerado um clássico agente modificador da dose ou sensibilizador, e pode estar presente durante o desenvolvimento da irradiação, exercendo tal efeito. Se considera que este atua por um mecanismo receptor dos elétrons provenientes dos radicais gerados pela radiação:

Os radicais $\text{R}^{\bullet}$ apresentam um tempo de vida curto e podem sofrer mudanças químicas. A sua reação com oxigênio, para formar peróxidos orgânicos não é reversível, produzindo danos biológicos pela fixação de uma lesão letal sobre o alvo,

por exemplo o DNA. Na ausência de oxigênio, pequenas quantidades de peróxidos são formadas e, portanto, as lesões são reparadas.

A habilidade radioprotetora dos tióis é conhecida há algum tempo, e acredita-se que exerçam este efeito radioprotetor por eliminação dos radicais livres (incluindo os produzidos por eles mesmos (reações 15 e 16)), através da doação de um átomo de hidrogênio ao bio-radical, reparando o dano e competindo, assim, com a fixação do oxigênio no sítio danificado:

Com relação às lesões moleculares induzidas pela radiação, estas são classificadas como:

- a) Quebra da dupla hélice do DNA
- b) Quebra de uma das hélices do DNA
- c) Dano a uma das bases
- d) Cross-linking

O radical hidroxila origina quebras nas hélices do DNA, das quais a quebra da dupla hélice é considerada a lesão mais difícil de se reparar e está relacionada à morte celular.

Dada a complexidade dos eventos envolvidos entre a absorção inicial da energia da radiação e a manifestação biológica, vários fatores podem modular a expressão final do dano da radiação. A dose e a taxa de dose são alguns desses fatores.

De modo geral, à medida que aumenta a dose de radiação, há um aumento no dano biológico. Esta relação nem sempre é verdadeira porque outros parâmetros como a taxa de dose, fracionamento da dose e a natureza da radiação podem modificar a extensão do dano biológico.

Em geral, o efeito produzido por uma dada dose de radiação diminui com o decréscimo da taxa de dose. O termo taxa de dose é definido como a quantidade de radiação liberada ao sistema por unidade de tempo (Gy/min). Geralmente, a radiação liberada numa taxa rápida é mais eficiente do que quando dada vagarosamente numa baixa taxa de dose.

Este efeito da taxa de dose é interpretado com base no reparo do dano subletal da radiação. Se uma certa quantidade de lesões se acumula para expressar um certo efeito e, se a recuperação se inicia tão logo a lesão é produzida, muitos dos danos iniciais serão reparados antes do efeito letal ser produzida. Assim sendo, quanto maior o tempo de exposição, maior o tempo disponível para qualquer mecanismo de reparo biológico atuar, embora a energia total transferida ao sistema seja a mesma.

1.2 Modificação Química do Dano produzido pela Radiação [13]

Os principais mecanismos de radiosensibilização incluem o uso de:

- Sensibilizadores eletro-atraentes, os quais atuam como miméticos do oxigênio.
- Agentes que se ligam aos tióis, aumentando a concentração efetiva do oxigênio através de suas reações competitivas com os tióis intracelulares redutores e
- Agentes que se ligam ao DNA, alterando a atividade do mesmo, seja por incorporação ou pela inibição do processo de reparo.

i. Imitadores do oxigênio e afinidade eletrônica

O uso da afinidade eletrônica começou em 1963, quando Adams e Dewey [104] argumentaram que o dano em sistemas biológicos, num lugar específico, poderia ser dependente da competição com processos não lesivos e, para o caso do elétron hidratado, a magnitude da resposta biológica poderia depender do seu próprio tempo de vida, do seu limite de difusão e da distribuição de centros eletrofílicos através do sistema. A moderação desta resposta poderia ocorrer com agentes químicos, através da aceitação de elétrons, com a estabilização do íon radical transitório. Deste modo, aumentava-se a probabilidade do dano naquele lugar.

Moléculas orgânicas contendo sistemas conjugados foram consideradas como candidatas adequadas e estudos iniciais confirmaram a validade desta hipótese, sendo observada a sensibilização para compostos como a benzofenona e diacetila.

O posterior desenvolvimento da teoria de afinidade eletrônica resultou em muitas moléculas com atividade sensibilizadora. A introdução do grupo nitro em compostos como a *para*-nitroacetofenona [105,106] permitiu estudos em nitrofuranos [107] e nitroimidazóis [108,109].

As espécies de interesse clínico são os nitroimidazóis substituídos nas posições 2 ou 5, sendo os de maior importância o misonidazol e o metronidazol (Fig. III.10).

Ensaio clínico demonstraram que os nitroimidazóis apresentam efeitos tóxicos, especialmente neurotoxicidade, nas doses clinicamente requeridas para a radiosensibilização.

Figura III.10.- Estruturas do misonidazol e metronidazol [13]

Uma evidente demanda para um radiosensibilizador eficiente é uma boa afinidade eletrônica e tendência em se reduzir. Um radiosensibilizador deve ser não-tóxico para células aeróbicas (normais), e deve ser seletivo para regiões hipóxicas. Os parâmetros farmacocinéticos, tais como a velocidade do metabolismo e habilidade de alcançar concentrações suficientemente altas, decretam uma eficácia total.

Assim, os complexos metálicos, se apresentam como candidatos ideais para este tipo de compostos.

ii. Radiossensibilização por diminuição de Tióis

As propriedades radioprotetoras de tióis e aminotióis são conhecidas, sendo geralmente atribuídas ao seu efeito de extinguir os radicais induzidos pela radiação, tais como os $O_2^{\cdot -}$. Os compostos que removem os tióis endógenos aumentam o tempo de vida dos radicais e podem apresentar propriedades sensibilizadoras. Em outras palavras, estes compostos devem evitar a reação (15):

Estudos de Chibber e col. [14], mostraram que os carboxilatos de Rh (II) apresentavam ação sensibilizadora *in vitro* e que estes tinham capacidade de se ligar aos tióis intracelulares. Isto ocorria devido à sua conhecida afinidade pelos constituintes celulares que contêm enxofre.

A eficiência sensibilizadora dos carboxilatos *in vitro* segue a seguinte ordem:

que é paralela ao seu efeito antitumor e está relacionada com a absorção intracelular dos respectivos compostos.

Os complexos metálicos podem alterar os efeitos da radiação por diferentes mecanismos. Os diferentes mecanismos pelos quais estes compostos sensibilizam, podem ser tomados como uma vantagem. Não é inconcebível que um complexo possa radiosensibilizar por vários mecanismos (ligando-se ao DNA, diminuindo tióis,

ou por afinidade eletrônica), desde que isto tem sido proposto para certos compostos orgânicos, como o misonidazol [12].

É possível, também, que um complexo possa sensibilizar algumas células (ex. hipóxicas), enquanto protege outras (ex. aeróbicas), uma vez que já se demonstrou que há complexos que sensibilizam e outros que protegem, dependendo das condições [110,111].

No passado, as pesquisas por novos radiosensibilizadores tinham-se concentrado na afinidade eletrônica dos compostos, sendo que o uso de nitroimidazóis, como toxinas hipóxicas e/ou como quimiossensibilizadores, foi muito comum [112].

Os complexos metálicos também oferecem estas possibilidades, seja isolados ou contendo nitroimidazóis como ligantes [16,113,114] e, devido aos seus diferentes mecanismos, é possível que estes sejam mais efetivos do que os nitroimidazóis.

1.3 Desenvolvimento de Complexos Metálicos com Nitroimidazóis como Ligantes.

A modalidade do tratamento combinado é uma alternativa muito comum nos procedimentos terapêuticos.

Uma das combinações que apresentou um resultado clínico e experimental considerável, foi o uso de radiação com *cis*-platina. No tratamento de tumores em roedores, esta combinação apresentou melhores efeitos, comparado com o tratamento de cada um deles em separado [115].

Baseados em estudos *in vitro*, alguns mecanismos diferentes têm sido propostos para a interação entre a radiação e a *cis*-platina. Isto inclui: sensibilização de células hipóxicas resistentes à radiação; inibição do processo de reparo celular e a interação com tióis celulares [115].

A grande estabilidade da ligação da platina e outros metais platínicos a purinas e pirimidinas, formando complexos, sugeriu que o átomo metálico poderia transportar o ambiente redutor, neste caso o nitroimidazol, ao sítio específico de ação [13].

Em um esforço para melhorar e otimizar as propriedades radiosensibilizadoras dos complexos de platina em células hipóxicas, vários grupos têm sintetizado compostos contendo ligantes nitroimidazólicos eletroatraentes: *cis*-Pt(metronidazol)₂Cl₂ [83, 119]; *cis*-PtCl₂(NH₃)(NO₂Im) [84]; [Rh₂(CH₃COO)₄misonidazol₂] [120-122].

Estas pesquisas, estimularam o estudo das propriedades radiosensibilizadoras de outros complexos de metais de transição/nitroimidazóis [16,83,84,114,122-124].

Foi descrita a síntese de um complexo nitroimidazólico de Rh (II) [120], mais eficiente na radiosensibilização *in vitro* de células hipóxicas de mamíferos do que os complexos de platina e os ligantes nitroimidazólicos isolados.

Em um outro trabalho [14], foram testadas uma série de carboxilatos de Rh (II) e uma série de complexos derivados da cisplatina, isolados ou misturados com misonidazol, comprovando-se uma resposta sinérgica na radiosensibilização *in vitro*, de células hipóxicas de mamíferos (V79-379A): células de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês, em ambiente de N₂.

Os complexos de *cis*-platina mostram baixos níveis de sensibilização com fatores de modificação da dose (DMF) de 1,2. Por outro lado, os complexos de Rh(II) podem apresentar DMFs de até 2,0, em altas doses de radiação.

Foi demonstrado também que estes complexos apresentam potenciais de redução menores do que o metronidazol, e que em nenhum desses casos ocorre uma reação de transferência de elétrons ou de formação de adutos na interação com os radicais derivados das bases do DNA. Assim, estes complexos inorgânicos não operam pelo mecanismo de afinidade eletrônica ou sensibilização de radicais livres estáveis.

É muito provável que os complexos de Rh(II) sensibilizem pela sua habilidade de diminuir tióis intracelulares, sendo que a eficiência radiosensibilizadora depende da natureza do ligante carboxilato, como foi mencionado anteriormente.

Goodgame e col., reportaram a síntese, caracterização e ação radiosensibilizadora de adutos de acetato de Rh(II) com uma série de nitroimidazóis [15].

Para os complexos [Rh₂(CH₃COO)₄L₂], a eficiência sensibilizadora é maior para L= misonidazol e desmetilmisonidazol, comparada à observada para L= Roll-3696. Estes três adutos são mais eficientes do que os ligantes isolados, onde também o ligante misonidazol é mais eficiente do que o Roll-3696, o que pode ser atribuído à diferença dos potenciais redox entre o 2 e 5-nitroimidazóis.

O aumento na eficiência da sensibilidade obtida para os adutos de acetato de Rh(II) pode ser devido também a um aumento nos potenciais redox dos mesmos, comparados com os dos ligantes.

Algo muito interessante é que, segundo Chibber e col. [14], a combinação de 100 µmol L⁻¹ de acetato de Rh(II) com 50 µmol L⁻¹ de misonidazol produz um DMF de 1,8, porém, Goodgame e col. [15], reportaram que uma concentração de 20 µmol L⁻¹ do aduto [Rh₂(CH₃COO)₄misonidazol₂] produz um DMF similar, isto é, que o aduto opera mais eficientemente do que a combinação do acetato de ródio com misonidazol, o que é muito importante no que se refere a índices de citotoxicidade.

1.4 Processo de Reparo Celular [125]

Enquanto que a formação de radicais livres e a ação de “scavenger” de radicais ocorrem dentro de um tempo extremamente pequeno, após a interação da radiação com a matéria, os processos de reparo celular podem levar várias horas para a sua expressão.

Todos os processos enzimáticos associados com a detecção e remoção de dano de DNA, ressíntese, ligação das fitas quebradas do DNA, fazem parte do reparo.

Os mecanismos de reparo enzimático são particularmente importantes para uma molécula como o DNA, que ocorre em uma única cópia. Pelo fato da informação genética estar codificada no DNA, sua integridade estrutural e funcional é de suma importância para manter o seu potencial replicativo.

Admite-se que a ampla variação de radiosensibilidade intrínseca observada em células humanas *in vitro* seja predominantemente uma consequência de diferentes níveis de indução de lesão de DNA e da eficiência de reparo de várias células. No entanto, para as células não proliferativas, até que ponto a indução de lesão no DNA e o reparo estão envolvidos na expressão do dano da radiação ainda não estão esclarecidos.

1.5 Importância dos Estudos de Radiossensibilização em Baixas Doses de Radiação.

As curvas de sobrevivência de células de mamíferos, são geralmente apresentadas como a mostrada na figura III.8, onde a dose é representada na escala linear e fração de sobrevivência na escala logarítmica.

As radiações como raios-X ou raios gama, geralmente apresentam essa forma característica: um “ombro” nas doses baixas, e à medida que aumenta a dose de radiação, tende a uma exponencial.

Alguns autores atribuem a presença do “ombro” ao processo de reparo das células, e que o aumento da letalidade, com o incremento da dose de radiação, seria em virtude de uma menor eficiência do reparo [125,126].

Os estudos *in vitro* de radiossensibilização, são geralmente realizados com altas doses de radiação, de aproximadamente 6-35 Gy, para produzirem altos níveis de inativação celular. Os ensaios para determinar os DMF, são avaliados em níveis de sobrevivência de 10% e 1%. Porém, na radioterapia, as doses diárias utilizadas estão usualmente na faixa de 1-3 Gy. Em cultura celular, tais doses produzem níveis de sobrevivência de 95% e 40%, dependendo da linhagem celular e das condições de irradiação [127].

Nos procedimentos radioterapêuticos, baixas doses de radiação (1-3 Gy) são aplicadas em várias sessões durante um período de algumas semanas. Há dúvidas sobre a validade da extrapolação das curvas de sobrevivência determinadas em altas doses para esta região de baixas doses [128].

Como a tendência da radioterapia clínica é utilizar pequenas doses em cada fração, é importante conhecer bem a forma inicial das curvas de sobrevivência e se a magnitude dos OER e DMF são dependentes das doses de radiação [128]. A maioria dos compostos eletroatraentes, incluindo o oxigênio [129-131,135] e nitroimidazóis [127,128,132,135] são menos efetivos em baixas doses do que em altas doses, embora existam algumas exceções [133-135]. Por outro lado os complexos de Pt (II), mostram DMFs maiores em baixas doses [116-118,135].

Portanto, é importante fazer medidas cuidadosas da resposta da radiação na região de baixas doses, principalmente no processo de seleção e de teste de novos radiosensibilizadores para aplicações clínicas.

É importante, também, entender o que ocorre na região do ombro da curva de sobrevivência e a interação das drogas com a radiação nesta região de baixas doses.

Todos os testes de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Cultura Celular da Radiobiologia - Coordenadoria de Bioengenharia do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), com a colaboração da M.Sc. Sizue Ota Rogero.

As irradiações das células foram realizadas no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN, com a colaboração de Elizabeth S.R. Somessari, operadora da fonte de ^{60}Co .

2. Materiais e Métodos

Os ensaios biológicos dividem-se em três etapas:

2.1 Determinação da citotoxicidade dos complexos de ródio (II).

2.2 Determinação da dose letal 50%, DL_{50} .

2.3 Determinação do Efeito radiosensibilizador dos complexos de Rh (II).

2.1 Determinação da citotoxicidade dos complexos de Rh (II) [136,137]:

Este teste foi feito com a finalidade de verificar a toxicidade destes complexos em cultura celular, uma vez que o estudo do efeito radiosensibilizador foi realizado também *in vitro*, em cultura celular.

Utilizou-se cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO k1), da American Type Culture Collection.

Estas células foram adotadas para os nossos testes biológicos devido a que os fatores de cultura e de crescimento das mesmas, já tinham sido padronizados no laboratório de cultura celular de Radiobiologia pela Ms. Sizue O. Rogero, facilitando os testes de citotoxicidade e radiosensibilização.

Os complexos testados foram: $Rh_2(ac)_4$, $Rh_2(ac)_4metro_2$, $Rh_2(prop)_4$, $Rh_2(prop)_4metro_2$, $Rh_2(but)_4$, $Rh_2(but)_4metro_2$, $Rh_2(tfa)_4$, $Rh_2(cit)_4$, $Rh_2(cit)_4metro_2$, $Rh_2(tfc)_4$ e $Rh_2(tfc)_4metro_2$ assim como o metronidazol. O complexo $Rh_2(tfa)_4metro_2$ foi descartado dos ensaios biológicos devido à sua insolubilidade em água.

O teste de citotoxicidade consta de duas etapas:

- i. Preparação das soluções dos compostos a serem testados
- ii. Preparação das placas de cultura celular

i. Preparação das soluções dos compostos

Foram preparadas soluções mães dos compostos em tampão fosfato salino (pH=7,4; PBS) nas concentrações aproximadas de $200 \mu mol L^{-1}$. Estas soluções foram esterilizadas passando-as por membranas de poros medindo $0,22 \mu m$.

A partir de estas soluções mãe foram preparadas as soluções consideradas 100%, diluindo-as em meio de cultura MEM-SFB (MEM contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de penicilina e estreptomicina). Das soluções 100% foram feitas diluições seriadas para 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, em meio MEM-SFB.

Na tabela III.7 são apresentadas as concentrações consideradas 100%. Essas concentrações foram determinadas por espectrometria de emissão de plasma sob orientação da Professora Elizabeth de Oliveira, da área de Química Analítica do Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da USP.

ii. Preparação das placas de cultura celular

Foi preparada uma suspensão de 100 células/mL de CHO k1, após o desprendimento das células (com tripsina 0,25%), cultivadas em garrafa de cultura.

Dois mililitros desta suspensão foram distribuídos em cada placa de Petri (placa para cultura celular) de 15 x 60 mm e incubadas por 4 horas em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 a $37^\circ C$ para a adesão das células nas placas.

Após esse período o meio de cultura foi removido e, nessas placas, foram adicionados 5 mL de cada diluição do complexo de ródio (II) (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%). Os ensaios foram feitos em triplicata para cada uma destas diluições e as placas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO_2 e $37^\circ C$ por 7 dias.

Tabela III.7.- Concentrações 100% para os complexos de Rh (II) e metronidazol

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO 100% ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Rh ₂ (ac) ₄	18,5
Rh ₂ (ac) ₄ metro ₂	18,0
Rh ₂ (prop) ₄	20,0
Rh ₂ (prop) ₄ metro ₂	20,0
Rh ₂ (but) ₄	20,0
Rh ₂ (but) ₄ metro ₂	20,0
Rh ₂ (tfa) ₄	61,5
Rh ₂ (cit) ₄	81,0
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂	10,7
Rh ₂ (tfc) ₄	103,5
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	22,3
Metronidazol	100,0

Utilizou-se no ensaio, como controle positivo (citotóxico), C⁺, uma solução de fenol 0,02%; como controle negativo (não citotóxico), C⁻, o extracto de Al₂O₃ e um controle de células CHO k1, no qual foram adicionados 5 mL do meio de cultura MEM-SFB, na ausência de complexo. As soluções dos controles negativo e positivo também sofreram diluições como as amostras.

Decorridos os 7 dias, o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas em formol 10% (diluído em solução salina 0,9%), e coradas com corante Giemsa.

As colônias em cada placa foram contadas e comparadas com o número de colônias da placa controle de CHO k1. O potencial citotóxico dos complexos de ródio foi avaliado de acordo com o índice de citotoxicidade (IC₅₀%), que é a concentração do complexo que suprime em 50% a formação de colônias em relação ao controle. O IC₅₀ é obtido na curva projetada com a porcentagem do número de colônias *versus* a concentração do complexo testado.

2.2 Determinação da dose letal 50% (DL₅₀) [14, 15].

A DL₅₀ é a dose de radiação que mata a metade da população celular.

A determinação da DL₅₀ em células CHO k1 foi realizada com a finalidade de obter a dose de radiação que, em ambiente hipóxico, resultasse ideal para ser utilizada no teste de radiosensibilização dos complexos em estudo.

O ambiente hipóxico foi necessário para simular o ambiente necrótico dos tumores.

Foi semeado em cada placa de Petri de 15 x 60 mm, 2 mL de uma suspensão celular contendo 100 células/mL, obtidas do cultivo de CHO k1 em garrafa de cultura com meio MEM-SFB. Estas placas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, por cerca de 3 horas para adesão das células.

Após esse período, o meio de cultura foi removido e nessas placas foi adicionado 1,0 mL de PBS, pH=7,4.

As placas de Petri foram acondicionadas em sacos plásticos e purgadas com N₂ por 30 minutos, seladas e imediatamente levadas ao irradiador.

As células CHO k1 foram submetidas a 4 doses de radiação gama proveniente de uma fonte de ⁶⁰Co tipo panorâmica, com uma taxa de dose de 1,083 Gy/min, durante tempos de 1; 3; 5 e 10 minutos, sendo utilizadas três placas para cada uma das doses de radiação.

Para que as placas recebessem dose homogênea, foi utilizado um dispositivo giratório durante a irradiação.

Após irradiação, o PBS foi removido das placas e foram adicionados 5 mL de MEM-SFB. As placas foram incubadas durante 7 dias, em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37 °C.

Decorrido este tempo, as colônias formadas foram fixadas em formol 10% (diluído em solução salina 0,9%) e coradas com corante Giemsa.

A porcentagem do número de células sobreviventes foi calculada através do número de colônias em cada placa comparada com o controle de células CHO k1(células não irradiadas).

A DL₅₀ foi calculada projetando-se em gráfico, a porcentagem de células sobreviventes em escala logarítmica (S) *versus* a dose de radiação (Gy).

2.3 Determinação do efeito radiosensibilizador dos complexos de ródio (II) [14, 15].

Este ensaio foi realizado seguindo a mesma metodologia para determinação da DL₅₀. As células CHO k1 foram distribuídas em placas de Petri e, após a adesão das células nas placas, o meio de cultura foi substituído por 1 mL da solução do complexo de ródio em PBS, na concentração atóxica, determinada no ensaio de citotoxicidade. Cada composto foi testado em triplicata. A irradiação das células foi efetuada utilizando-se raios gama provenientes de uma fonte de panorâmica de ⁶⁰Co, com taxa de dose de 1,083 Gy/min durante 2½, e 4 minutos, num dispositivo giratório, para assegurar uma irradiação uniforme. Após a irradiação, a solução do complexo testado foi removida e substituída por 5 mL de meio de cultura MEM-SFB sendo as placas incubadas durante 7 dias, em estufa úmida, com 5% de CO₂ a 37 °C.

Utilizou-se como parâmetro de comparação, um “controle” de células CHO k1, não irradiadas e nas mesmas condições das irradiadas.

Após 7 dias, as colônias das células formadas, foram fixadas, coradas e contadas, seguindo o procedimento já descrito (ii).

A figura III.11 apresenta um esquema da metodologia utilizada para a determinação do efeito radiosensibilizador.

Figura III.11.- Esquema mostrando a metodologia para a determinação do Efeito Radiossensibilizador [16].

3. Resultados e Discussões**3.1 Determinação da citotoxicidade dos complexos de Rh (II)**

Na tabela III.8, são apresentados o número de colônias contadas em cada placa de Petri com a média e desvio padrão, assim como a porcentagem do número de colônias em relação à placa controle de células, para cada diluição.

	[diluição]	C-	C+	Rh2(ac)4	Rh2(ac)4metro2	Rh2(tri)4	Rh2(prop)4	Rh2(prop)4metro2	Rh2(but)4	Rh2(but)4metro2
Média desvio %colônias	100%	116 135 154 135 16 77	2 2 3 2 0 1	103 84 98 95 8 72	85 92 83 87 4 68	121 112 98 110 9 61	2 3 2 2 0 1	2 6 5 4 2 2	0 0 3 1 1 0	1 2 2 2 0 1
Média desvio %colônias	50%	155 144 162 154 7 88	51 35 38 41 7 23	107 136 142 128 15 97	115 131 128 124 7 94	124 137 118 123 8 70	2 0 1 1 1 1	1 3 4 3 1 2	1 1 2 1 0 0	3 2 2 2 0 1
Média desvio %colônias	25%	168 170 167 168 1 96	83 91 98 91 6 52	129 133 147 136 8 103	147 135 139 140 5 106	190 188 186 188 2 104	1 1 2 1 0 1	0 0 3 1 1 1	1 2 2 2 0 1	0 0 0 0 0 0
Média desvio %colônias	12,50%	176 178 180 178 2 100	122 118 103 114 8 65	147 133 138 139 6 105	119 122 141 127 10 96	180 204 184 189 10 105	7 4 7 6 1 3	7 4 5 5 1 3	1 0 1 1 0 0	1 1 1 1 0 0
Média desvio %colônias	6,25%	186 174 175 178 5 100	133 126 137 132 5 75	120 113 129 121 7 92	109 134 143 129 14 98	190 210 189 196 10 109	91 101 102 98 5 54	76 91 85 84 6 46	1 3 2 2 1 1	1 0 0 0 0 0
Média desvio %colônias	CHO controle	179 172 174 175 3 100%	179 172 174 175 3 100%	128 130 138 132 4 100%	128 130 138 132 4 100%	174 186 180 180 5 100%	174 180 193 182 8 100%	174 180 193 182 8 100%	174 180 193 182 8 100%	174 180 193 182 8 100%

	[diluição]	C-	C+	Rh2(cit)4	Rh2(cit)4metroz	Rh2(tfc)4	Rh2(tfc)4metroz	metronidazol
Média desvio %colônias	100%	116 135 154 135 16 77	2 2 3 2 0 1	103 119 108 110 7 63	125 137 144 135 8 89	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	149 160 135 148 10 98
Média desvio %colônias	50%	155 144 162 154 7 88	51 35 38 41 7 23	135 119 124 126 7 72	130 155 141 142 10 93	0 0 0 0 0 0	61 70 74 68 5 45	156 160 144 153 7 101
Média desvio %colônias	25%	168 170 167 168 1 96	83 91 98 91 6 52	135 140 137 137 2 78	157 132 140 143 10 94	25 30 28 28 2 16	145 131 124 133 9 88	137 122 143 134 9 89
Média desvio %colônias	12,50%	176 178 180 178 2 100	122 118 103 114 8 65	156 125 143 141 13 81	124 138 140 134 7 88	125 117 140 127 10 73	131 160 146 146 12 97	148 132 135 138 7 91
Média desvio %colônias	6,25%	186 174 175 178 5 100	133 126 137 132 5 75	137 167 131 145 16 83	150 130 135 138 8 91	145 163 156 155 7 90	151 138 161 150 9 99	138 132 150 140 7 93
Média desvio %colônias	CHO controle	179 172 174 175 3 100%	179 172 174 175 3 100%	179 172 174 175 3 100%	159 151 143 151 7 100%	179 172 174 175 3 100%	159 151 143 151 7 100%	159 151 143 151 7 100%

As curvas para a determinação da citotoxicidade dos complexos de Rh (II) foram obtidas pela projeção dos dados da tabela III.8 em gráfico e são apresentadas nas Figuras III.12 até a Figura III.17.

Figura III.12.- Citotoxicidade do $Rh_2(ac)_4$ e seu aduto com metronidazol.

Figura III.13.- Citotoxicidade do $Rh_2(tfa)_4$ e metronidazol.

Figura III.14.- Citotoxicidade do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ e seu aduto com metronidazol

Figura III.15.- Citotoxicidade do $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4$ e seu aduto com metronidazol.

Figura III.16.- Citotoxicidade do Rh₂(prop)₄ e seu aduto com metronidazol.

Figura III.17.- Citotoxicidade do Rh₂(but)₄ e seu aduto com metronidazol.

Em todas as figuras mostradas, aparece uma linha denominada IC₅₀, que é o índice de citotoxicidade 50%, ou seja, é a concentração de complexo que provoca a morte de 50% da população celular. Para os testes de radiosensibilização foram utilizadas as concentrações acima do IC₅₀, o que representa não toxicidade.

Segundo estas considerações, podemos observar nas figuras III.16 e III.17, que tanto o propionato e butirato quanto os seus adutos com metronidazol, apresentaram-se muito tóxicos para as células CHO k1, provocando morte em praticamente todas as células mesmo na menor diluição, fato pelo qual foram descartados do teste de radiosensibilização.

Nas figuras III.12-III.14, podemos observar que os carboxilatos de Rh (II) não apresentaram citotoxicidade nas concentrações submetidas ao teste, mas o amidato (figura III.15), apresentou certa toxicidade, maior que os carboxilatos.

Os resultados das concentrações atóxicas dos carboxilatos de Rh (II) para células CHO k1, são apresentados na tabela III.9.

Tabela III.9.- Concentrações atóxicas dos complexos de Rh (II) e metronidazol.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO ATÓXICA (μ mol L ⁻¹)
Rh ₂ (ac) ₄	18,5
Rh ₂ (ac) ₄ metro ₂	18,0
Rh ₂ (tfa) ₄	61,5
Rh ₂ (cit) ₄	81,0
Rh ₂ (cit) ₄ metro ₂	10,7
Rh ₂ (tfc) ₄	6,4
Rh ₂ (tfc) ₄ metro ₂	2,8
Metronidazol	100,0

3.2 Determinação da dose letal 50% (DL₅₀)

A tabela III.10 mostra o número de células que sobreviveram quando expostas a várias doses de radiação. Este número também é apresentado em porcentagem, em relação às células controle. Os dados da tabela III.10 estão representados na figura III.18.

Tabela III.10.- Número e porcentagem de células sobreviventes a várias doses de radiação gama. (Taxa de dose = 1,083 Gy/min).

Tempo de irradiação (min)	Dose de radiação (Gy)	Número de colônias de CHO k1	% de colônias de CHO k1
0	0	151	100
1	1,083	116	77
3	3,249	64	42
5	5,415	37	25
10	10,83	4	3

Figura III.18.- Determinação da DL₅₀ para CHO k1, utilizando fonte de ⁶⁰Co com taxa de dose de 1,083 Gy/min.

Como se pode observar na figura III.18, a dose de radiação que mata a metade da população celular (DL₅₀) corresponde a 2,77 Gy. Também foi determinada a dose que mata 70% da população celular (DL₇₀) e que corresponde a 4,67 Gy.

Desde que a taxa de dose de radiação da fonte de ⁶⁰Co era de 1,083 Gy/min, foram estabelecidos os tempos de irradiação que forneceriam as doses correspondentes à DL₅₀ e DL₇₀, os quais resultaram em 2½ e 4 minutos respectivamente.

Estes foram os tempos de irradiação aos quais foram expostas as células na presença dos complexos de Rh (II) para determinar o possível efeito radiosensibilizador.

3.3 Determinação do efeito radiosensibilizador dos complexos de ródio (II).

Para determinar o possível efeito radiosensibilizador dos complexos de Rh (II), as células foram expostas a doses de radiação de 2,71 e 4,33 Gy, correspondentes aos tempos de irradiação de 2½ e 4 minutos respectivamente.

Estas doses foram utilizadas para determinar o possível efeito radiosensibilizador dos complexos: Rh₂(tfa)₄, Rh₂(tfc)₄metro₂, Rh₂(cit)₄ e Rh₂(cit)₄metro₂ e do metronidazol (Fig. III.19).

O possível efeito radiosensibilizador dos compostos: Rh₂(ac)₄, Rh₂(ac)₄metro₂, Rh₂(tfc)₄ e a mistura de Rh₂(ac)₄ e metronidazol foi determinado, irradiando durante 2' 40" e 4' 13" (Fig. III.20), isto com a finalidade de manter constante a dose de irradiação nos dois testes de radiosensibilização, desde que, devido ao decaimento da fonte de ⁶⁰Co, a taxa de dose tinha diminuído de 1,083 Gy/min no primeiro teste para 1,03 Gy/min no segundo teste.

Os resultados do efeito radiosensibilizador são mostrados nas figuras III.19 e III.20, onde os dados de sobrevivência (S) foram ajustados ao modelo linear quadrático (LQ) [138]:

$$\ln S = -\alpha D - \beta D^2 \text{ onde} \quad \dots(16)$$

S é a fração de sobrevivência (número de células sobreviventes a uma determinada dose de radiação/número de células sobreviventes na dose = zero).

D a dose de radiação

α e β , constantes que definem eventos simples e duplos produzidos pela radiação, respectivamente.

Este modelo linear quadrático é o modelo matemático que descreve melhor os eventos que originam a morte celular devida à radiação e tem sido utilizado por muitos autores para explicar o efeito radiosensibilizador.

Figura III.19.- Curvas de sobrevivência das células CHO k1 irradiadas na presença de complexos de Rh (II) em ambiente hipóxico.

* Células CHO k1 irradiadas na ausência de complexos de Rh (II)

Figura III.20.- Curvas de sobrevivência das células CHO k1 irradiadas na presença de complexos de Rh (II) em ambiente hipóxico.

* Células CHO k1 irradiadas na ausência de complexos de Rh (II).

Na figura III.20, são apresentados os resultados correspondentes a alguns dos complexos de Rh (II) e a uma mistura de $Rh_2(ac)_4$ e metronidazol, esta última com a finalidade de efetuar comparações com os resultados encontrados por Chibber [14] com altas doses de radiação onde o referido autor relata um bom efeito radiosensibilizador de tal mistura.

Na tabela III.11 são apresentadas as doses de radiação que provocaram 50% ($S=0,5$) e 40% ($S=0,4$) de sobrevivência das células CHO k1 quando na ausência e na presença de complexos de Rh (II), obtidos a partir das figuras III.19 e III.20.

Podemos observar que as doses de radiação necessárias para produzir uma sobrevivência de 50% e 40% nas células CHO k1, quando irradiadas na presença dos complexos de Rh (II) e metronidazol, são próximas ou maiores do que a dose requerida para causar o mesmo efeito nas células em ausência desses compostos (controle), com exceção do $Rh_2(ac)_4$ e a sua mistura com metronidazol.

Estes resultados poderiam sugerir a hipótese de que a maioria dos compostos estariam atuando como radioprotetores, mas, o mais provável é que, nestas baixas doses de radiação, as células ativam o processo de reparo ao dano provocado pela radiação, muito comum nestas faixas de doses. Este é o motivo pelo qual os tratamentos radioterapêuticos utilizam doses fracionadas de radiação, para impedir o reparo do dano, pois a dose recebida é cumulativa.

É bom destacar que os complexos de Rh (II) submetidos a estes testes de radiosensibilização atravessam a membrana celular e em relação aos carboxilatos, a absorção intracelular aumenta conforme cresce a cadeia carbônica [11]. Esse fato é demonstrado pelos coeficientes de partição destes complexos e pelos estudos feitos em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa [78].

Tabela III.11.- Dose de radiação para 50% e 40% de sobrevivência de células CHO k1, na presença de complexos de Rh (II).

COMPOSTO	Dose (Gy) ($S=0,5$)	Dose (Gy) ($S=0,4$)
CHO k1 controle	3,19	4,08
$Rh_2(ac)_4$	2,30	2,98
$Rh_2(ac)_4$ metro ₂	2,86	3,40
$Rh_2(tfa)_4$	3,52	4,22
$Rh_2(cit)_4$	3,88	4,40
$Rh_2(cit)_4$ metro ₂	3,61	4,28
$Rh_2(tfc)_4$	3,30	3,79
$Rh_2(tfc)_4$ metro ₂	3,28	3,90
Metronidazol	3,93	--
$Rh_2(ac)_4$ + metro	1,83	2,45

A ação dos radiosensibilizadores é medida pelo valor de ER (enhancement ratio) ou DMF (Fator de Modificação à Dose), que é a relação das doses de radiação que provocam o mesmo efeito na ausência e presença do radiosensibilizador, em ambiente hipóxico. Valores de ER ou DMF > 1 indicam um efeito radiosensibilizador significativo.

A partir das curvas de sobrevivência (figuras III.19 e III.20), foram obtidos os DMFs de cada um dos compostos para frações de sobrevivência de 50% ($S=0,5$) e 40% ($S=0,4$), apresentados na tabela III.12.

Nesta tabela, também são apresentadas as concentrações dos complexos de Rh (II) e metronidazol utilizadas para o teste de radiosensibilização, concentrações nas quais a porcentagem de morte celular não ultrapassou 20%; lembrando que estas concentrações foram obtidas a partir do teste de citotoxicidade, para assegurar que a morte celular fosse devida à ação conjunta, droga e radiação e não ao efeito tóxico do complexo.

Segundo a figura III.19 e os resultados dos DMFs da tabela III.12, os complexos de Rh (II) testados não apresentam efeitos significantes nesta faixa de dose de radiação.

O carboxilato $Rh_2(tfa)_4$, como se pode observar na tabela III.12, apesar de ter sido testado em concentração maior do que aquela determinada no teste de citotoxicidade (tabela III.9), não apresentou efeito significativo. Atribuímos uma provável decomposição deste carboxilato à alta diluição dos complexos, necessária para os ensaios, e que, no caso do $Rh_2(tfa)_4$ é desfavorável, como já foi indicado no capítulo III.1 deste trabalho.

Tabela III.12.- DMFs dos complexos de Rh (II) e metronidazol para frações de sobrevivência $S=0,5$ e $S=0,4$ em baixas doses.

COMPOSTO	CONC. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	DMF _{0,5}	DMF _{0,4}
$Rh_2(ac)_4$	11	1,13	1,12
$Rh_2(ac)_4\text{metro}_2$	12	0,89	0,98
$Rh_2(tfa)_4$	112	0,91	0,96
$Rh_2(cit)_4$	84	0,83	0,94
$Rh_2(cit)_4\text{metro}_2$	12	0,90	0,98
$Rh_2(tfc)_4$	2	0,78	0,89
$Rh_2(tfc)_4\text{metro}_2$	4	1,00	1,06
Metronidazol	100	0,62	—
$Rh_2(ac)_4$ + metro	14 + 23	1,41	1,37

Como ressaltamos anteriormente, a inatividade observada para estes complexos é, provavelmente, devida ao efeito de reparo celular que não pode ser superado pela ação destes complexos de Rh (II).

Na figura III.20, o $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$, na concentração de $11 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou um DMF = 1,13, que não é um valor significativo. Porém, em mistura com o metronidazol, apresentou um efeito radiosensibilizador muito melhor (DMF=1,41), provavelmente, devido ao aumento da sua concentração para $14 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Essa ação, provavelmente, independe da presença do metronidazol, pois, em trabalhos anteriores [145], demonstrou-se que este complexo apresenta efeito radiosensibilizador em baixas doses de radiação, quando está presente em concentrações de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. No presente trabalho, foi observado que o metronidazol, em concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, também não apresentou efeito radiosensibilizador.

O efeito radiosensibilizador observado para o $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ ($14 \mu\text{mol L}^{-1}$) é semelhante ao demonstrado por Chibber [14] com a vantagem de se utilizar doses de radiação significativamente menores.

Este efeito radiosensibilizador do $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ é, provavelmente, devido à sua reação com os tióis intracelulares, afetando o processo de reparo do dano produzido pela radiação. Assim, seria diminuída a radiorresistência que está presente em baixas doses, sendo este um dos mecanismos citados nos estudos de Skov nestas faixas de radiação [135].

Ao se medir o efeito radiosensibilizador dos adutos com metronidazol, verificou-se que não havia mudança significativa dos DMFs em relação ao carboxilato de Rh (II) livre. Em função disso, aventamos a hipótese de que os adutos poderiam estar sofrendo uma decomposição, quando em soluções aquosas muito diluídas, isto é, o ligante metronidazol poderia estar saindo das posições axiais sendo então substituídos pelas moléculas de água.

Com a finalidade de verificar esta hipótese, foram medidas as constantes de formação dos adutos com metronidazol. A metodologia e os resultados são mostrados no capítulo seguinte.

Como foi sugerido no exame de qualificação, verificamos que o meio de cultura MEM-SFB não alterava a estrutura de gaiola dos carboxilatos e amidato de Rh (II), o qual poderia ter ocorrido pela ação de alguns aminoácidos que contém átomos de enxofre [55] na sua estrutura e que compõem o meio de cultura.

Da mesma forma, soluções de concentração conhecidas dos carboxilatos e amidato de Rh (II) e seus adutos com metronidazol, foram irradiadas nas mesmas condições em que se realizaram os testes de radiosensibilização, observando-se que a radiação gama também não produz alteração na estrutura de gaiola desses complexos.

Ambas as verificações foram feitas comparando os espectros eletrônicos dos complexos antes e depois de adicionar o MEM-SFB ou irradiar com raios gama, respectivamente.

III.7 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE FORMAÇÃO DOS ADUTOS DE CARBOXILATOS DE Rh (II) E METRONIDAZOL. MÉTODO DAS RELAÇÕES CORRESPONDENTES DE BJERRUM.

1. Introdução

Os carboxilatos de Rh (II) possuem uma estrutura em forma de gaiola (vide figura 1.1), em que a ligação simples Rh-Rh é bastante estável, porém, as ligações nas posições axiais são relativamente lábeis, ocupadas por solventes ou outros ligantes, cujos átomos doadores são geralmente N, O ou S.

Tem se realizado alguns estudos sobre a natureza das ligações Rh-Ligante axial, determinando-se as constantes de formação, de estabilidade e da velocidade de formação de adutos de carboxilatos de Rh (II) com ligantes de interesse biológico.

Assim, foram determinadas as constantes de formação dos adutos com ligantes 5'AMP, 5'ADP e 5'ATP [139], onde o propósito daquele estudo foi determinar se a estabilidade termodinâmica daqueles adutos tinha correlação com a sua atividade biológica.

A correlação determinada em ordem da estabilidade foi: propionato > acetato > metoxiacetato, concluindo-se que a maior estabilidade dos adutos com propionato, em relação aos outros carboxilatos, poderia explicar, em parte, as diferenças na atividade biológica desses compostos.

Em termos de efeitos eletrônicos, foi muito difícil interpretar esses resultados desde que, o íon metoxiacetato, menos básico do que o acetato e propionato, produziria uma diminuição na densidade eletrônica do metal, favorecendo uma forte interação com os ligantes axiais, contrariamente ao que se tinha observado experimentalmente.

Para entender esta correlação, foram medidas as entalpias e entropias de formação dos adutos de metoxiacetato, acetato e propionato com imidazol, utilizando a técnica de titulação entrópica, em solução aquosa e pH fisiológico [140].

As constantes de formação determinadas para esses complexos mostraram uma tendência similar àquela achada para os adutos com 5'AMP: propionato > acetato > metoxiacetato [139], porém, a diferença foi muito pequena entre estas três constantes e, como era esperado, as constantes com imidazol resultaram maiores do que aquelas com 5'AMP devido ao átomo de nitrogênio mais básico no ligante imidazólico.

A tendência observada foi explicada em termos do efeito dessolvatante do grupo R no ligante carboxilato ponte, em relação aos ligantes axiais. Devido a isto, o ambiente mais lipofílico nas posições axiais no propionato, por exemplo, produz uma interação

muito fraca com moléculas de água, nessas posições, e estas são facilmente deslocadas pelo ligante imidazólico, mais básico e mais lipossolúvel.

Posteriormente, estes mesmos autores, determinaram alguns parâmetros cinéticos e termodinâmicos de reações de formação de adutos de acetato, propionato e metoxiacetato com ligantes, 5'AMP, histidina, imidazol e piridina. Essas medidas foram feitas com a finalidade de determinar se a ordem de estabilidade: propionato > acetato > metoxiacetato, era mantida para uma variedade de ligantes, e observar se a velocidade de formação desses adutos também era maior para o aduto de propionato [141].

Assim, foi observado que os adutos de propionato com 5'AMP, imidazol e histidina, resultaram mais estáveis do que os respectivos adutos de acetato, porém o metoxiacetato não apresentou a mesma tendência. Os seus adutos com 5'AMP e imidazol são os menos estáveis, acontecendo o contrário com o aduto de histidina.

Duas possíveis explicações surgiram a partir destes resultados sendo uma baseada na capacidade π receptora dos ligantes e outra, nas possíveis interações envolvendo o ambiente de alanina da histidina com o grupo R do carboxilato ponte.

Para comprovar um possível efeito π receptor dos ligantes, foram determinados parâmetros termodinâmicos do aduto de metoxiacetato com piridina, desde que este ligante apresentava um efeito π receptor maior do que a histidina, imidazol e 5'AMP [141]. Esperava-se, assim, que esse aduto resultasse mais estável ainda do que o complexo imidazólico, apesar de que este último apresentava maior basicidade no átomo de nitrogênio doador.

Os resultados foram os esperados e o fato de que o aduto de metoxiacetato com piridina era mais estável do que o respectivo aduto com imidazol, mais básico, sugeriam uma influência da ligação π .

Desde que a ligação π deveria influenciar da mesma forma nos adutos dos três carboxilatos de Rh (II) com o mesmo ligante, a estabilidade relativa dos adutos de propionato, deve ser provavelmente devida à natureza lipofílica do grupo R do carboxilato ponte.

As velocidades das reações de formação de adutos com todos os ligantes apresentaram novamente a ordem já determinada nos trabalhos anteriores [139, 140]: propionato > acetato > metoxiacetato, sendo sugerido pelos autores que as moléculas de água nas posições axiais se labilizam devido a um ligeiro aumento na basicidade dos carboxilatos ponte ou às interações repulsivas entre as moléculas de água e o grupo R mais lipofílico no propionato. Devido a isto, as velocidades de formação dos monoadutos deste carboxilato, eram maiores em relação aos outros dois carboxilatos.

Com os dados anteriormente mencionados, Bear e col. [51], mediram as estabilidades termodinâmicas e cinéticas de adutos de acetato, propionato e metoxiacetato com ligantes piridina, ácido picolínico, niacina e ácido isonicotínico.

A tendência da estabilidade dos adutos observada experimentalmente é a seguinte: ácido isonicotínico > piridina $\approx$ niacina.

Desde que as basicidades dos ligantes isolados não apresentam a mesma tendência, os autores concluíram que este não seria o único fator que controlaria a formação do complexo.

O efeito eletroatraente do substituinte carboxilato na posição pára do anel piridínico origina uma maior diminuição de energia do orbital π^* , do que aquele em posição meta. Portanto, a habilidade π receptora poderia apresentar a seguinte ordem: ácido isonicotínico > niacina > piridina.

Segundo os resultados relatados neste artigo [51], o ácido isonicotínico forma complexos significativamente mais estáveis do que os últimos dois ligantes. A semelhança nas estabilidades dos complexos de niacina e piridina, sugeriu que a diminuída capacidade π receptora da piridina estaria compensada pelo aumento na habilidade σ doadora deste ligante.

Um outro fato que evidencia a ligação π metal-ligante, é que a constante de formação (K_1) do monoaduto ML , é, em todos os casos, consideravelmente maior do que a constante de formação K_2 do di-aduto ML_2 , sendo que a relação $K_1/k_2 \approx 30$.

Isto, segundo explicam os autores, é devido a que uma ligação π foi produzida entre o metal e o primeiro ligante axial, originando uma diminuição da densidade eletrônica nos orbitais π^* do segundo átomo de Rh, o que não permitiria a formação de uma segunda ligação π metal-ligante. Por tanto, a estabilidade termodinâmica das espécies ML_2 estaria determinada principalmente, pela basicidade do átomo doador no segundo ligante axial.

Drago e col. [49] têm medido as constantes de equilíbrio e as entalpias de coordenação de adutos de butirato de Rh (II) com vários ligantes axiais em benzeno e diclorometano. Dennis e col. [142], têm determinado as constantes de formação dos adutos de acetato de Rh (II) com di e tripeptídeos, piridinas substituídas e ligantes imidazólicos, verificando que a interação entre os dímeros de Rh (II) e as bases nitrogenadas não é uma simples interação ácido-base, na qual a estabilidade só depende da basicidade do nitrogênio doador, mas sim, da capacidade de retrodoação π dos centros de Rh (II). Portanto, ligantes que possam receber densidade eletrônica π dos orbitais π^* do dímero formariam complexos mais estáveis do que aqueles que formam unicamente ligações σ .

A tabela III.13 mostra os resultados obtidos por vários autores para as constantes de formação de alguns adutos de carboxilatos de Rh (II) com imidazol (Im).

Tabela III.13.- Constantes de Formação para $[Rh_2(RCOO)_4(lm)_n]$ ($n=1, 2$) em solução aquosa, pH = 7,4 [15].

COMPOSTO	K_1 (log K_1) ^a	K_2 (log K_2) ^a
$[Rh_2((OMe)CH_2COO)_4(lm)_2]$	8776 ± 500 6791 ± 241 (3,94 ± 0,03)	250 ± 22 120 ± 15 (2,40 ± 0,04)
$[Rh_2(MeCOO)_4(lm)_2]$	10500 ± 300 6826 ± 265 14210 ± 610 (4,02 ± 0,07)	300 ± 64 171 ± 15 249 ± 12 (2,48 ± 0,08)
$[Rh_2(EtCOO)_4(lm)_2]$	11660 ± 400 7792 ± 267 (4,07 ± 0,03)	447 ± 52 156 ± 17 (2,65 ± 0,07)

^a Dados entre parênteses, expressados em forma logarítmica

A literatura mostra resultados positivos de atividade biológica de alguns adutos de carboxilatos de Rh (II) com ligantes nitroimidazólicos [15,22], onde as concentrações dos mesmos aparecem na ordem de micromolar.

Os autores não mencionam alguma possível decomposição dos adutos em tais concentrações, em meio aquoso (pH ~ 7,1 – 7,4) e, especificamente, no caso do aduto $[Rh_2(CH_3COO)_4metro_2]$, propõe-se que em concentrações entre 3 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, não era produzida uma decomposição significativa do complexo [22].

Devido às semelhanças nos resultados referentes à atividade biológica dos carboxilatos e seus respectivos adutos com metronidazol, obtidos neste trabalho, pensou-se na possibilidade de que estes adutos estariam se decompondo, quando em soluções aquosas muito diluídas.

Portanto, optamos por determinar as constantes de formação desses adutos, em meio aquoso, (pH = 7,4 em PBS), dados que, além de nos fornecerem as concentrações nas quais os compostos estariam se decompondo, poderia nos indicar, também qual das três espécies: $[Rh_2(RCOO)_4]$, $[Rh_2(RCOO)_4metro]$ ou $[Rh_2(RCOO)_4metro_2]$, é a dominante, nessas concentrações.

Neste trabalho, foram determinadas as constantes de formação dos complexos: $Rh_2(ac)_4metro_2$ e $Rh_2(cit)_4metro_2$ fazendo uso do método das soluções correspondentes de Bjerrum.

2. Método das soluções correspondentes [143]

2.1 Considerações teóricas

Na formação de espécies tipo ML_n , os complexos são formados em etapas sucessivas conforme apresentado a seguir:

•

•

•

•

Considerando que o produto das constantes de estabilidades individuais fornece a constante global, o sistema pode também ser representado da seguinte forma:

•

•

•

•

As concentrações analíticas do metal, C_M , e do ligante, C_L , podem ser representadas como sendo a soma de todas as formas (balanço de massas) sob as quais estas espécies podem estar presentes no sistema e são descritas como:

$$C_M = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots + [ML_n]$$

$$C_M = \sum_{i=0}^n [ML_i] \quad \dots(7)$$

$$C_L = [L] + [ML] + 2[ML_2] + \dots + n[ML_n]$$

$$C_L = [L] + \sum_{i=1}^n i[ML_i] \quad \dots(8)$$

Combinando as equações de 4 a 6 com as equações 7 e 8, pode-se relacionar as concentrações analíticas do metal, C_M , e do ligante, C_L , com as constantes de estabilidade global, β_n do sistema, de acordo com as equações:

$$C_M = [M] + \beta_1 [M][L] + \beta_2 [M][L]^2 + \dots + \beta_n [M][L]^n$$

$$C_M = [M] \sum_{i=0}^n \beta_i [L]^i \quad \dots(9)$$

$$C_L = [L] + \beta_1 [M][L] + 2\beta_2 [M][L]^2 + \dots + n\beta_n [M][L]^n$$

$$C_L = [L] + [M] \sum_{i=1}^n i\beta_i [L]^i \quad \dots(10)$$

A função de formação, introduzida por Bjerrum, descrita por Suárez-Iha [144], corresponde ao número médio de ligantes, $\bar{n}$, coordenados ao íon metálico central.

$$\bar{n} = \frac{C_L - [L]}{C_M} = \frac{[L]_{\text{coordenado}}}{C_M} \quad \dots(11)$$

onde $[L]$ representa a concentração de ligante livre em equilíbrio.

Portanto, o número médio de ligantes, $\bar{n}$, é função apenas da concentração de ligante livre $[L]$.

2.2 Método de Bjerrum

O método das soluções correspondentes, desenvolvido por Bjerrum, fornece diretamente o número médio de ligantes, $\bar{n}$, e a concentração de ligante livre, $[L]$, sem que se conheça o número de espécies complexas, nem as suas absorvidades molares. O que se conhece é a absorvidade molar média, $\bar{\epsilon}$.

O nome de soluções correspondentes é devido a que estas soluções apresentam concentrações analíticas do metal, C_M , e do ligante, C_L , diferentes, mas a concentração do ligante livre, $[L]$, e o número médio de ligantes, $\bar{n}$, são iguais para cada absorvidade molar média, $\bar{\epsilon}$.

O método de Bjerrum permite conhecer os valores das constantes de estabilidade individuais sucessivas, K_n , e globais, β_n , além de calcular os valores das absorvidades molares, ϵ_n , das espécies existentes no sistema estudado.

Este método consiste em preparar pelo menos três soluções, nas quais se mantém constante a concentração do metal e varia-se a concentração do ligante. Obtidos os valores de absorvância de cada solução, calculam-se as absorvidades molares médias, $\bar{\epsilon}$, segundo a equação:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{A^\lambda}{C_M} \quad \dots(12)$$

onde A^λ representa a absorvância da espécie no comprimento de onda escolhido.

Com os valores de $\bar{\varepsilon}$, constrói-se então uma curva de $\bar{\varepsilon}$ versus C_L para as concentrações do metal escolhidas, cujo formato está representado na figura III.21.

Figura III.21.- Curva $\bar{\varepsilon}$ versus C_L para concentrações de metal diferentes.

Como está indicado na figura III.21, as soluções correspondentes 1, 2 e 3 contendo concentrações analíticas do ligante e do metal $C_{L(1)}$, $C_{M(1)}$; $C_{L(2)}$, $C_{M(2)}$ e $C_{L(3)}$, $C_{M(3)}$ respetivamente, podem ser representadas pelo mesmo número médio de ligantes:

$$\bar{n} = \frac{C_{L(1)} - [L]}{C_{M(1)}} = \frac{C_{L(2)} - [L]}{C_{M(2)}} = \frac{C_{L(3)} - [L]}{C_{M(3)}} \quad \dots(13)$$

As curvas de $\bar{\varepsilon}$ versus C_L construídas, fornecem para um mesmo valor de $\bar{\varepsilon}$, um valor de C_L relativo a cada uma das três concentrações do íon metálico utilizadas.

As curvas de $\bar{\varepsilon}$ versus C_L são ajustadas segundo equações empíricas e escolhe-se um intervalo de C_L , de preferência a partir de pontos um pouco afastados da origem e também do final da curva, com a finalidade de minimizar os erros, gerando para cada $\bar{\varepsilon}$ escolhido, os três pares de pontos (C_L e C_M), conforme foi representado na figura III.21.

Se representarmos graficamente os pares de valores de C_L e C_M para cada uma das soluções correspondentes, (figura III.22), obtém-se uma reta cujos coeficientes linear e angular, segundo a equação 11, representam a concentração do ligante livre, $[L]$, e o número médio de ligantes, $\bar{n}$, respetivamente.

Figura III.22.- Curva C_L versus C_M com valores relativos a uma determinada absorvidade molar média, $\bar{\epsilon}$. A tangente do ângulo δ representa o número médio de ligantes, $\bar{n}$.

*** Relação entre $\bar{n}$ e as constantes de estabilidade globais, β_n**

As constantes de estabilidade globais, β_n , podem ser calculadas a partir do conhecimento de $\bar{n}$ e $[L]$ utilizando-se a equação seguinte:

$$\bar{n} = \frac{\beta_1[L] + 2\beta_2[L]^2 + \dots + n\beta_n[L]^n}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \dots + \beta_n[L]^n} \quad \dots(14)$$

2.3 Grau de formação, α_i

Bjerrum introduz o conceito de grau de formação, α_i que permite construir diagramas de distribuição de cada espécie formada a partir da condição onde só existe o metal livre, até a formação da espécie de número de coordenação mais alto e visualizar qual é a espécie predominante no sistema.

O grau de formação do complexo, α_i dado pela equação 15,

$$\alpha_i = \frac{[ML_i]}{C_M} \quad \text{.....(15)}$$

Com $0 \leq i \leq n$, onde n é o número de coordenação máximo do íon metálico, e:

$$\alpha_0 + \alpha_1 + \alpha_2 + \dots + \alpha_n = 1 \quad \text{.....(16)}$$

O grau de formação, α_0 , é a fração de metal livre:

$$\alpha_0 = \frac{[M]}{C_M} \quad \text{.....(17)}$$

Rescrevendo a equação 15 em função de β_i , $[M]$, $[L]$ e α_0 , obtêm-se:

$$\alpha_i = \alpha_0 \cdot \beta_i \cdot [L]^i \quad \text{.....(18)}$$

Combinando as equações 9, 17 e 18; a equação que fornece o grau de formação, α_i pode ser rescrita como:

$$\alpha_i = \frac{\beta_i [L]^i}{1 + \beta_1 [L] + \beta_2 [L]^2 + \dots + \beta_n [L]^n} \quad \text{.....(19)}$$

2.4 Considerações para os carboxilatos de Rh (II)

Para a determinação das constantes de formação dos adutos de carboxilatos de Rh (II) com metronidazol devemos ter em consideração o seguinte:

1.- O dímero de fórmula geral $[Rh_2(RCOO)_4]$ deve ser considerado como similar ao metal M, desde que este composto formará os complexos (adutos) com ligantes L (metronidazol).

2.- Devido a que os carboxilatos de Rh (II) apresentam duas posições axiais disponíveis para a formação de adutos, o número máximo de ligantes coordenantes deve ser 2, por tanto, $n=2$ (equação 7, 8, 9 e 10).

3.- Em função das considerações 1 e 2, devem ser determinadas:

- * Constantes de Equilíbrio : K_1 e K_2 (equações 1 e 2),
- * Constantes de formação do mono aduto e do di-aduto : β_1 e β_2 (equações 4 e 5) e
- * Graus de formação das 3 espécies, carboxilato de Rh (II), mono aduto e do di-aduto: α_0 , α_1 e α_2 (equação 19).

4.- Portanto temos que:

metronidazol = L

$Rh_2(RCOO)_4\text{metro} = ML$

$Rh_2(RCOO)_4\text{metro}_2 = ML_2$

$\bar{n}$ = número médio de ligantes

[L] = concentração do ligante livre = [metro]

C_M = concentração analítica do carboxilato = $C_{Rh_2(RCOO)_4}$

C_L = concentração analítica do ligante = $C_{\text{metronidazol}}$

5.- As medidas das absorbâncias serão feitas nos comprimentos de onda de absorção dos carboxilatos de Rh (II), absorbâncias que vão diminuir a medida que se adiciona o ligante.

Desde que a diminuição da absorbância indica o consumo do carboxilato, essa diferença corresponderia à “formação dos adutos”. Assim, as absorvidades médias correspondentes aos adutos serão fornecidas pela equação 12 modificada:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta A^\lambda}{C_M} \quad \dots\dots(20)$$

Note-se que, agora, a absorbância A, foi substituída pelo ΔA , onde:

$$\Delta A^\lambda = (A^\lambda_{\text{carboxilato de Rh (II) inicial}} - A^\lambda_{\text{carboxilato de Rh(II) após adição de x mL de ligante}})$$

3. Materiais e Métodos

A determinação das constantes de formação dos complexos $Rh_2(ac)_4\text{metro}_2$ e $Rh_2(cit)_4\text{metro}_2$, foi realizado sob assessoramento da Professora Maria Encarnación Vasquez Iha, da área de Química Analítica do Departamento de Química Fundamental, IQ – USP.

3.1 Determinação das Constantes de Formação do Aduto $Rh_2(ac)_4\text{metro}_2$

Para se determinar as constantes de formação deste aduto, foram preparadas três séries de soluções aquosas, com pH mantido em 7,4 (tampão fosfato, PBS), onde fixaram-se as concentrações do $Rh_2(ac)_4$ em $1,96 \times 10^{-3}$; $2,49 \times 10^{-3}$ e $3,02 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e todas elas foram tituladas com metronidazol $4,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

As absorbâncias foram lidas em 586,5 nm e usadas no cálculo das absorptividades molares médias, $\bar{\epsilon}$ com a equação 20.

Com os valores obtidos, foram construídas curvas de $\bar{\epsilon}$ versus $C_{\text{metronidazol}}$ (concentração analítica do ligante em cada ponto da titulação), para cada uma das soluções de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ e que são mostradas na figura III.23. Este gráfico forneceu, para cada valor $\bar{\epsilon}$ escolhido, um valor de $C_{\text{metronidazol}}$ relativo a cada uma das concentrações de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ utilizadas.

As curvas obtidas foram ajustadas no intervalo de $1,77 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $C_{\text{metronidazol}}$, segundo equações de 4ª ordens para cada uma das soluções de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$.

A partir destas equações de 4ª ordem, geraram-se valores de $C_{\text{metronidazol}}$, em intervalos de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, relativos a um mesmo valor de $\bar{\epsilon}$.

Assim, escolheram-se 50 valores de $\bar{\epsilon}$ entre 94,29 e 185,59 e a eles foram relacionados 50 valores de $C_{\text{metronidazol}}$ relativos a cada uma das concentrações de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ ($C_{\text{Rh}_2(\text{ac})_4}$).

Figura III.23.- Absortividade molar média, $\bar{\epsilon}$ versus concentração analítica do metronidazol em meio aquoso, PBS 7,4.

Os valores da concentração de ligante livre [metro] e do número médio de ligantes, $\bar{n}$ (figura III.22), não foram determinadas graficamente, mas sim, através de um programa computadorizado de quadrados mínimos baseado nos dados da $C_{\text{metronidazol}}$ relativa a cada $C_{\text{Rh}_2(\text{ac})_4}$.

Fazendo $\bar{n}$ versus [metro], construiu-se a curva de formação das espécies apresentada na figura III.24.

Em um sistema bem comportado quando a $[\text{metro}]$ for igual a zero, o $\bar{n}$ também deve ser igual a zero, fazendo com que a curva de formação extrapolada passe pela origem.

Como se observa na figura III.24, a formação do di-aduto $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ não é um sistema bem comportado, portanto, resolveu-se trabalhar no intervalo de $0,71 \leq \bar{n} \leq 0,92$ que corresponde a um intervalo de $[\text{metro}]$ de $1,54 \times 10^{-3}$ a $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, desprezando os pontos que não se comportaram da maneira esperada.

Figura III.24.- Curva de formação do di-aduto $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ em meio aquoso (pH=7,4, PBS).

Com esta faixa de pontos, contruiu-se uma nova curva de formação do di-aduto $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$, a qual foi ajustada segundo uma equação de 2ª ordem, $y = a + bx + cx^2$, que forneceu os parâmetros $a = -0,046$, $b = 666,17$ e $c = -1,09 \times 10^{-5}$.

Com os valores de a , b e c , geraram-se novos valores de $\bar{n}$ no intervalo de $C_{\text{metronidazol}}$ de 0 a $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e construiu-se a curva de $\bar{n}$ versus $[\text{metro}]$ apresentada na figura III.25, mostrando o possível comportamento do di-aduto no intervalo de $0 \leq \bar{n} \leq 0,71$.

Devido a que o número máximo de ligantes para os carboxilatos de Rh (II) é 2, a equação 14 pode ser restrita a β_1 e β_2 , como foi descrito já nas considerações para carboxilatos de Rh (II).

Estas constantes podem ser determinadas empregando-se o software Sigma Plot, onde os dados foram ajustados agora com a seguinte equação :

$$\bar{n} = \frac{\beta_1[L] + 2\beta_2[L]^2}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2} \quad \text{.....(21)}$$

onde [L] = [metro].

Desta forma, foram obtidos os valores de β_1 e β_2 do $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$.

Figura III.25.- Dados experimentais de $\bar{n}$ versus [metro] e curva de formação para o di-aduto $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$, em meio aquoso (pH=7,4, PBS), ajustada segundo a equação de 2ª ordem.

Os diagramas de distribuição de espécies foram determinados utilizando a fórmula 19 para cada uma das espécies:

$$\alpha_0 = \frac{1}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2}, \text{ para o } \text{Rh}_2(\text{ac})_4 \quad \text{.....(22)}$$

$$\alpha_1 = \frac{\beta_1[L]}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2}, \text{ para o } \text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro} \quad \text{.....(23)}$$

$$\alpha_2 = \frac{\beta_2[L]^2}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2}, \text{ para o } \text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2 \quad \text{.....(24)}$$

3.2 Determinação das Constantes de Formação do Aduto $Rh_2(cit)_4metro_2$

A determinação das constantes de formação para este complexo seguiu o procedimento experimental similar ao utilizado para o complexo $Rh_2(ac)_4metro_2$. Neste caso, só mencionaremos os parâmetros utilizados na determinação de tais constantes.

1. Foram preparadas três séries de soluções aquosas de $Rh_2(cit)_4$, com pH mantido em 7,4 (tampão fostato, PBS), onde fixaram-se as concentrações do $Rh_2(cit)_4$ em $5,83 \times 10^{-4}$, $1,458 \times 10^{-3}$ e $2,495 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e todas elas foram tituladas com metronidazol $4,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

2. As absorbâncias foram lidas em 586,1 nm e usadas no cálculo das absorptividades molares médias, $\bar{\epsilon}$ com a equação 20.

3. Com os valores obtidos, foram construídas curvas de $\bar{\epsilon}$ versus $C_{metronidazol}$, para cada uma das soluções de $Rh_2(cit)_4$, as quais são mostradas na figura III.26. Este gráfico forneceu, para cada valor $\bar{\epsilon}$ escolhido, um valor de $C_{metronidazol}$ relativo a cada uma das concentrações de $Rh_2(cit)_4$ utilizadas.

Figura III.26. Absorptividade molar média, $\bar{\epsilon}$ versus concentração analítica do metronidazol em meio aquoso, PBS 7,4.

4. As curvas obtidas foram ajustadas no intervalo de $8,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,87 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $C_{metronidazol}$ segundo equações de 3ª, 4ª e 4ª ordens para cada uma das soluções de $Rh_2(cit)_4$ respectivamente.

5. A partir destas equações de 3ª e 4ª ordem, geraram-se valores de $C_{metronidazol}$, em intervalos de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, relativos a um mesmo valor de $\bar{\epsilon}$.

6. Escolheram-se, também, 50 valores de $\bar{\epsilon}$ entre 30,12 e 131,12 e a eles foram relacionados 50 valores de $C_{\text{metronidazol}}$ relativos a cada uma das concentrações de $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ ($C_{\text{Rh}_2(\text{cit})_4}$).
7. Os valores da concentração de ligante livre [metro] e do número médio de ligantes, $\bar{n}$, foram determinados através do mesmo programa computadorizado de quadrados mínimos baseado nos dados da $C_{\text{metronidazol}}$ relativa a cada $C_{\text{Rh}_2(\text{cit})_4}$.
8. Em forma similar ao $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$, a formação do di-aduto $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$ não resultou um sistema bem comportado. Assim, resolveu-se trabalhar no intervalo de $0,47 \leq \bar{n} \leq 0,83$, que corresponde a um intervalo de [metro] de $6,05 \times 10^{-4}$ a $3,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, desprezando-se os pontos que não se comportaram da maneira esperada.
9. Com esta faixa de pontos, contruiu-se uma nova curva de formação do aduto $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, a qual foi ajustada segundo uma equação de 3ª ordem, $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, que forneceu os parâmetros $a = 0,22$, $b = 479,69$, $c = -1,26 \times 10^{-5}$ e $d = 1,14 \times 10^7$.
10. Com os valores de a , b , c e d , geraram-se novos valores de $\bar{n}$ no intervalo de $C_{\text{metronidazol}}$ de 0 a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e construiu-se a curva de $\bar{n}$ versus [metro] apresentada na figura III.27, mostrando o possível comportamento do di-aduto no intervalo de $0 \leq \bar{n} \leq 0,47$.
11. Os valores de β_1 e β_2 para o $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$ foram determinados empregando-se o software Sigma Plot, onde os dados foram ajustados à equação 21.
12. Os diagramas de distribuição de espécies foram determinados utilizando as fórmulas 22, 23 e 24, para cada uma das espécies: $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$, $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}$ e $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$.

Figura III.27.- Dados experimentais de $\bar{n}$ versus $[\text{metro}]$ e curva de formação para o di-aduto $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, em meio aquoso (pH=7,4, PBS), ajustada segundo a equação de 3ª ordem.

4. Resultados e Discussões

Na tabela III.14, apresentam-se os valores das constantes de formação, β_1 e β_2 para os complexos: $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$.

Tabela III.14.- Constantes de Formação para os complexos $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$, obtidos através do método das soluções correspondentes de Bjerrum.

COMPOSTO	$\beta_1 (\text{mol}^{-1} / \text{L}^{-1})$	$\beta_2 (\text{mol}^{-2} / \text{L}^{-2})$
$\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$	$8,02 \times 10^2 \pm 17$	$1,275 \times 10^5 \pm 1368$
$\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$	$1,432 \times 10^3 \pm 29$	$1,493 \times 10^4 \pm 2630$

As constantes de equilíbrio correspondentes a cada um destes dois sistemas são mostradas na tabela III.15.

Tabela III.15.- Constantes de Equilíbrio para os sistemas $Rh_2(ac)_4metro_2$ e $Rh_2(cit)_4metro_2$.

COMPOSTO	K_1 (mol^{-1}/L^{-1})	K_2 (mol^{-1}/L^{-1})
$Rh_2(ac)_4metro_2$	$8,019 \times 10^2$	$1,59 \times 10^2$
$Rh_2(cit)_4metro_2$	$1,432 \times 10^3$	10,43

Como é observado, tanto as constantes de formação como as constantes de equilíbrio de ambos os sistemas, são menores em relação aos valores apresentados na literatura, para a formação de adutos com ligante imidazol [5].

O fato de que estes valores estariam baixos em relação aos obtidos com imidazol, poderia ser possivelmente devido a dois efeitos:

- Primeiro, aos impedimentos estéricos, originados pela presença do grupo metila que se encontra adjacente ao nitrogênio N(3), átomo através do qual o metronidazol realiza as suas ligações, lembrando que este grupo não está presente na estrutura química do imidazol e,
- Segundo, à presença do grupo nitro, que também não está presente no imidazol, e que, por ser um grupo eletroatraente, tira densidade eletrônica do anel imidazólico, impedindo que o nitrogênio N(3) se comporte como um bom doador e forme ligações com o Rh com a mesma intensidade.

Comparando os valores de β_1 e β_2 em ambos sistemas, observamos que a formação do mono aduto é, aproximadamente, duas vezes mais favorável para o $Rh_2(cit)_4metro_2$ do que para o $Rh_2(ac)_4metro_2$. Isto, possivelmente, devido à presença de grupos OH na estrutura do citrato ponte que estaria dando origem à formação de forças intermoleculares entre este carboxilato e o metronidazol, como as pontes de hidrogênio por exemplo, entre os grupos hidroxilas e o grupo etanólico da cadeia lateral sobre N(1) na estrutura do metronidazol. Esse fato manteria o metronidazol mais perto do $Rh_2(cit)_4$ do que do acetato, contribuindo para a coordenação axial.

Como era esperado, os valores de β_2 , que correspondem à formação dos di-adutos, $Rh_2(ac)_4metro_2$ e $Rh_2(cit)_4metro_2$, resultaram menores em relação a β_1 , para ambos os compostos.

Os valores de β_2 podem ser explicados pela possível retrodoação π metal-ligante, onde a ligação ao primeiro metronidazol estaria sendo favorecida por uma doação de densidade eletrônica dos orbitais π^*_{Rh-Rh} aos orbitais π^* do anel imidazólico, fazendo desta uma ligação bastante forte e que está favorecida pela presença do grupo nitro no anel imidazólico, grupo este que tira densidade eletrônica do anel, deixando-o com maior capacidade π receptora.

Com a entrada do primeiro ligante axial, os orbitais π^*_{Rh-Rh} , ficam com a densidade eletrônica diminuída, fazendo com que a entrada do segundo ligante seja desfavorável, o que se verifica pelos valores de β_2 menores em relação a β_1 .

Esta posição do segundo ligante axial, ficaria favorável para algum ligante com maior capacidade doadora σ , como a água por exemplo.

Se pode observar, também, que o di-aduto $Rh_2(cit)_4metro_2$ apresenta um valor de β_2 bastante baixo, o que nos indicaria que a formação do mono aduto é predominante.

Com estes valores de β_1 e β_2 , obtivemos os diagramas de distribuição de espécies para cada um dos sistemas, com a finalidade de determinar se estes adutos estavam sofrendo decomposição, quando em soluções aquosas diluídas, apesar de que os valores das constantes de formação obtidos mostraram que esses compostos estariam-se decompondo.

As Figuras III.28 e III.29 mostram os diagramas de distribuição de espécies para cada um dos sistemas.

Figura III.28.- Diagrama de distribuição de espécies para o complexo $Rh_2(ac)_4metro_2$.

Figura III.29.- Diagrama de distribuição de espécies para o complexo $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$.

Como se pode observar nestes diagramas, em soluções muito diluídas dos complexos, se produz uma decomposição do mesmo, predominando o carboxilato isolado e o mono aduto, em ambos sistemas.

Com os valores das constantes de formação e utilizando as equações 11, 21-24, determinou-se a composição de uma solução de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$, $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. O mesmo foi feito para uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$. Os resultados são mostrados na tabela III.16.

Tabela III.16.- Composição (em porcentagem) para soluções $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$.

ESPÉCIE	$\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$ (%)	$\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$ (%)
M	77,06	67,5
ML	21,73	32,4
ML ₂	1,21	0,1

Com os resultados mostrados na tabela III.16 se pode observar, claramente, que, em soluções muito diluídas, ocorre decomposição dos adutos, onde a espécie mais abundante é o carboxilato isolado e o di-aduto praticamente não existe, mas o mono aduto ainda apresenta uma porcentagem considerável.

Portanto, em ambos os casos, o que na realidade temos é uma mistura de espécies. As baixas constantes de formação para ambos os adutos explicam a instabilidade destes complexos, quando em solução aquosa, instabilidade que é aumentada pela alta diluição, onde as moléculas de água competem com o metronidazol pelas ligações axiais.

Nós pudemos comprovar que, em excesso de metronidazol, os adutos não sofrem decomposição. Isto foi observado comparando os espectros eletrônicos dos mesmos em soluções aquosas (pH=7,4, PBS) e os espectros de soluções aquosas contendo altas concentrações do metronidazol. Assim, os comprimentos de onda máximos obtidos em ambos os casos, são mostrados na tabela III.17.

Tabela III.17.- Comparação entre os comprimentos de onda máximos obtidos em solução aquosa dos adutos sem e com excesso de metronidazol.

COMPOSTO (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}(\text{nm})$	
	Sem metronidazol	Com metronidazol
$\text{Rh}_2(\text{ac})_4\text{metro}_2$	582,2	570,2
$\text{Rh}_2(\text{cit})_4\text{metro}_2$	581,4	551,5

Os valores dos comprimentos de onda obtidos para soluções aquosas 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ destes dois complexos em excesso de metronidazol, apresentam um deslocamento hipsocrômico em relação aos comprimentos de onda dos carboxilatos isolados, o qual indica a ligação do metronidazol nas posições axiais.

O contrário acontece com os espectros das soluções aquosas dos adutos (sem excesso de metronidazol), onde os comprimentos de onda obtidos são similares aos comprimentos de onda correspondentes aos dos carboxilatos isolados na mesma concentração.

Este não é o caso do aduto $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$, que, para soluções aquosas 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (pH=7,4, PBS), apresenta um comprimento de onda de 533 nm, diferente do apresentado pelo amidato isolado, na mesma concentração ($\lambda_{\text{máx}} = 542 \text{ nm}$).

Nós não conseguimos determinar as constantes de formação para o complexo $\text{Rh}_2(\text{tfc})_4\text{metro}_2$, porém, assumimos que, em soluções muito diluídas, uma decomposição similar à observada para os adutos de acetato e citrato esteja ocorrendo mas não na mesma intensidade. Isto porque, provavelmente, nos amidatos, a densidade eletrônica da ligação Rh-Rh esteja aumentada em relação aos carboxilatos, favorecendo à retrodoação π metal-ligante para o segundo ligante axial, o que originaria provavelmente um complexo mais estável.

Com estes resultados, trabalhos futuros poderiam determinar o efeito radiosensibilizador dos adutos em soluções que apresentem excesso de metronidazol, de modo tal que este ligante se mantenha ocupando as posições axiais, sempre que tais concentrações de metronidazol não resultem tóxicas para a linhagem celular com a que se está trabalhando.

O fato pelo qual não foi possível determinar as constantes de formação do complexo, $Rh_2(tfc)_4metro_2$, foi devido à sua diminuída solubilidade em água e onde a concentração máxima obtida para este composto é de 1 mM.

Desde que o método das soluções correspondentes de Bjerrum, exige de pelo menos três soluções de concentrações diferentes, tentamos trabalhar com concentrações menores que 1 mM, mas, as curvas obtidas, não apresentavam o formato característico. Provavelmente, por se tratar de soluções muito diluídas, o limite de detecção do aparelho gerava muito erro nas medidas.

Capítulo IV

CONCLUSÕES

- ◆ Os resultados da análise elementar tornam possível o estabelecimento das rotas de síntese tanto para os carboxilatos e amidato de Rh (II) quanto para seus adutos com metronidazol.
- ◆ A caracterização dos complexos de Rh (II) confirmou as estruturas $Rh_2(RCOO)_4$ e $Rh_2(CF_3CONH)_4$ para os carboxilatos e trifluoroacetamido e seus respectivos adutos com metronidazol: $Rh_2(RCOO)_4metro_2$, $Rh_2(CF_3CONH)_4metro_2$.
- ◆ A partir dos estudos de espectroscopia vibracional, na região do infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H), observou-se que o metronidazol se liga aos carboxilatos e amidato de Rh (II) através do N(3), no anel imidazólico.
- ◆ Ensaios da atividade radiosensibilizadora mostraram que somente o $Rh_2(ac)_4$ apresentou efeito radiosensibilizador, provavelmente, devido a sua reação com os tióis intracelulares, diminuindo desse modo, a capacidade de reparo das lesões celulares provocadas pela radiação.
- ◆ Apesar de que o efeito radiosensibilizador do $Rh_2(ac)_4$ já tivesse sido relatado na literatura, aqueles estudos foram efetuados utilizando altas doses de radiação. Em nosso trabalho, nós mostramos que esse carboxilato de ródio pode exibir o mesmo efeito radiosensibilizador, porém, utilizando-se doses de radiação bem mais baixas e, portanto, clinicamente toleráveis.
- ◆ As constantes de formação dos adutos com metronidazol e os diagramas de distribuição de espécies dos mesmos, confirmaram que soluções muito diluídas destes compostos apresentam uma mistura de espécies, predominando o carboxilato livre e o monoaduto.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ♦ Determinar a estrutura do $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ através de estudos de Raios-X, com a finalidade de fazer comparações com os resultados apresentados neste trabalho para esse composto, principalmente no que se refere aos dados de RMN^1H .
- ♦ Verificar se existe alguma relação entre o efeito radiosensibilizador do $\text{Rh}_2(\text{ac})_4$ e a concentração do mesmo em baixas doses de radiação.
- ♦ Testar o efeito radiosensibilizador dos adutos de formula geral $\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4\text{metro}_2$ e $\text{Rh}_2(\text{RCONH})_4\text{metro}_2$, em soluções contendo excesso de metronidazol (em concentração atóxica), com a finalidade de evitar a decomposição do mesmo.

GLOSÁRIO

Definição de alguns termos utilizados nos ensaios biológicos:

IC₅₀ : Índice de citotoxicidade 50%. Concentração do complexo que mata 50% da população celular.

DL₅₀ : Dose Letal 50%. Dose de radiação que mata a metade da população celular.

DL₇₀ : Dose Letal 70%. Dose de radiação que mata 70% da população celular.

S : Fração de Sobrevivência. Número de células sobreviventes a uma determinada dose de radiação / número de células sobreviventes na dose = zero.

Gy : Unidade de radiação. Dose de radiação absorvida. Um Gy equivale a 1J/kg de dose absorvida. 1Gy = 100 rad.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guo, Z.; Sadler, P.J.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1512.
2. Rosemberg, B.; Van Camp, L. e Krigas, T.; *Nature*, **1965**, 205, 698.
3. Hughes, R.G.; Bear, J.L.; Kimball, A.P.; *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **1972**, 13, 120.
4. Felthouse, T.R.; *Prog. Inorg. Chem.*, **1982**, 29, 73.
5. Boyar, E.B.; Robinson, S.D.; *Coord. Chem. Rev.*, **1983**, 30, 109.
6. Bear, J.L.; *Precious Met. Proc. Int. Precious Met. Inst. Conf. 9th*, **1986**, 9, 337.
7. Schelokov, R.N. e col.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1984**, 29 (5), 1335.
8. Pruchnik, F.; Dus, D.; *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 61, 55.
9. Waysburt, D.; Tarien, E.; Eicchorn, G.L.; *Inorg. Chem.*, **1993**, 32 (22), 4774.
10. Dunbar, K.R. e col.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116 (5), 2201.
11. Howard, R.A.; Sherwood, E.; Erck, A.; Kimball, A.P.; Bear, J.L.; *J. Med. Chem.*, **1977**, 20, 943.
12. Skov, K.; *Radiation Research*, **1987**, 112, 217.
13. Farrell, N.; Transition Metal Complexes as Drugs and Chemoterapeutic Agents, Cap. 8, Klumer Academic Publishers, London, **1984**.
14. Chibber, R.; Stratford, J.; O'Neill, P.; Sheldom, P.W.; Ahmed, I.; Lee, B.; *Int. J. Radiat. Biol.*, **1985**, 48 (4), 513.
15. Goodgame, D.M.L.; Lawrence, A.S.; Slawin, A.M.Z.; Williams, D.J.; *Inorgânica Chimica Acta*, **1986**, 125, 143.
16. Goodgame, D.M.L.; Page, C.J.; Williams D.J.; Stratford, I.J.; *Polyhedron*, **1992**, 11 (19), 2507.
17. Souza, A.R.; Cicloalcano carboxilatos de Ródio (II). Síntese, Estudos Espectroscópicos e Avaliação do Potencial Antitumor. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, **1995**.
18. Couto, L.G.; Síntese, Caracterização e Estudos por Espectrometria de Massas de Carboxilatos de Ródio (II) e seus Adutos com Derivados Sulfonamídicos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, USP, **1996**.
19. Espósito, B.P.; Estudos dos Produtos da Reação entre Carboxilatos de Ródio (II) e Amidas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Químico, USP, **1997**.
20. Nothenberg, M.S.; Adutos de Carboxilato de Ródio com Nitroimidazóis. Síntese, Caracterização e Avaliação de Potencial Antichaagásico. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, **1989**.
21. Nothenberg, M.S.; Takeda, G.K.F.; Najjar, R.; *J. Inorg. Bioch.*, **1991**, 42, 217.
22. Dale, L.D.; Dyson, T.M.; Tocher, D.A.; Tocher, J.M.; Edwards, D.I.; *Anti-cancer Drug Design*, **1989**, 4, 295.

23. Chernyaev, I.I.; Schenderetskaya, E.V.; Karyogina, A.A.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1960**, 5, 559.
24. Nazarova, L.A.; Chernyaev, I.I.; Mozorova, A.S.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1966**, 11, 1387.
25. Legzdins, P.; Mitchell, R.W.; Rempel, G.L.; Ruddick, J.D.; Williamson, G. J.; *Chem. Soc.*, **1970**, A, 3322.
26. Rempel, G.A.; Legzdins, P.; Smith, H.; Wilkinson, G.; *Inorg. Sym.*, **1972**, 13, 90.
27. Dean, J.A.; Handbook of Organic Chemistry. McGraw-Hill (New York), **1987**.
28. Winkhaus, G.; Ziegel, P. Z.; *Anorg. Allg. Chem.*, **1967**, 350, 51.
29. Kitchens, J.; Bear, J.L.; *Termochem. Acta*, **1970**, 1, 537.
30. Najjar, R.; Netto, E.R.; Takamo, Y.; *Inorg. Chim. Acta*, **1984**, 89, 53.
31. Tang, R.; Diamond, S.C.; Neary, N.; Mares, J. J.; *Chem. Comm.*, **1978**, 562.
32. Najjar, R.; Santos, F.S.; Seidel, W.; *An. Acad. Brasil. Cienc.*, **1987**, 59, 13.
33. Antsykova, A.S.; *Acta Crystallogr.*, **1966**, Section A, 21, 135.
34. Poizat, O.; Strommen, D.P.; Maldivi, P.; Giroud-Godquin, A.M.; Merchon, J.C.; *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 4851.
35. Chakravarty, A.R. e col.; *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, 101 (3), 185.
36. Dennis, A.M. e col.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1982**, 399.
37. Dennis, A.M. e col.; *Inorg. Chem.*, **1983**, 22 (10), 1522.
38. Duncan, J. e col.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104 (20), 5507.
39. Lifsey, R.S. e col.; *Inorg. Chem.*, **1987**, 26 (6), 830.
40. Ashan, M.Q.; Bernal, Y.; Bear, J.L.; *Inorg. Chem.*, **1986**, 25, 260.
41. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; Química Inorgânica Avanzada, 4ª Ed., LIMUSA, México, D.F., **1990**.
42. Norman, J.G.; Kolari, H.G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100 (3), 791.
43. Cotton, F.A.; Walton, R.A.; Multiple Bonds Between Metal Atoms, Jhon Willey & Sons, New York, **1982**.
44. Dubicki, L.; Martin, R.L.; *Inorg. Chem.*, **1970**, 9 (3), 673.
45. Bursten, B.E.; Cotton, F.A.; *Inorg. Chem.*, **1981**, 20, 3042.
46. Rotov, A.V.; Ugolkova, E.A.; Rakitin, Y.V.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1991**, 36 (7), 1026.
47. Christoph, G.G.; Koh, Y.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 1422.
48. Drago, R.S.; Tanner, S.P.; Richman, R.M.; Long, J.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 2897.
49. Drago, R.S.; Long, J.R.; Cosmano, R.; *Inorg. Chem.*, **1981**, 20, 2920.
50. Drago, R.S.; *Inorg. Chem.*, **1982**, 21, 1697.
51. Bear, J.L.; Howard, R.A.; Korn, J.E.; *Inorg. Chim. Acta*, **1979**, 32, 123.
52. Johnson, S.A.; Hunt, H.R.; Neumann, H.M.; *Inorg. Chem.*, **1963**, 2, 960.
53. Bear, J.L. e col.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 399.
54. Kitchens, J.; Bear, J.L.; *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1969**, 31, 2415.
55. Pneumatikakis, G.; Psaroulis, P.; *Inorg. Chim. Acta*, **1980**, 46, 97.
56. Miskowski, V.M.; Schaefer, W.P.; Sadeghi, B.; Santarsiero, B.D.; Gray, H.B.; *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 1154.
57. Cotton, F.A.; Trexler, J.W.; *Inorg. Chem.*, **1988**, 27 (19), 3265.
58. Stranger, R. e col.; *Inorg. Chem.*, **1996**, 35 (8), 2268.
59. Best, S.P. e col.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1989**, 581.

60. Kadish K.M.; Lanson, D.; Dennis, A.M.; Bear, J.L.; *Inorg. Chem.*, **1982**, 21, 2987.
61. Zorodu, M.A.; Dallochio, R.; *Trans. Met. Chem.*, **1989**, 14, 267.
62. Pneumatikakis, G.; Hadjiliadis, N.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1979**, 4, 596.
63. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; *Introduction to Spectroscopy*, 2ª Ed., Saunders College Publishing, Washington, **1996**.
64. Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5ª Ed., John Wiley & Sons, New York, **1991**.
65. Nakamoto, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5ª Ed., John Wiley & Sons, New York, **1997**.
66. Deacon, G.B.; Phillips, R.J.; *Coord. Chem.*, **1980**, 33, 227.
67. Deacon, G.B.; Huber, F.; Phillips, R.J.; *Inorg. Chim Acta*, **1985**, 104, 41.
68. Mal'kova, T.A.; Shafranskii, V.N.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1975**, 20, 735.
69. Mal'kova, T.A.; Shafranskii, V.N.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1974**, 19, 2501.
70. Najjar, R. e col.; *Polyhedron*, **1989**, 8, 1157.
71. Mazo, G.Y.; Baranosvskii, I.B.; Schelonov, R.N.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1979**, 24, 1855.
72. Cornilsen, B.; Nakamoto, K.; *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1974, 36, 2467.
73. Craciunescu, D.G. e col.; *An. Real Acad. Farm.*, **1991**, 57 (1), 15.
74. San Filippo, J.; Sniadoch, H.T.; *Inorg. Chem.*, **1973**, 12, 2326.
75. Clarck, R.J.H.; Hempleman, A.J.; Flint, C.D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 518.
76. Clarck, R.J.H.; Hempleman, A.J.; *Inorg. Chem.*, **1989**, 28, 746.
77. Miskowski, V.M. e col.; *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 2127.
78. Espósito, B.P.; *Interações de Complexos de Ródio (II) com Albumina Humana*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, **2000**.
79. Baranovskii, I.B.; Sevast'yanova, R.E.; *Russ. J. Inorg. Chem.*, **1984**, 29 (7), 1025.
80. Best, S.P.; Clarck, R.J.H.; Nigthingale, A.J.; *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 1383.
81. Hodgson, J.B.; Percy, G.C.; Thornton, D.A.; *J. Mol. Struct.*, **1980**, 66, 81.
82. Dyson, T.M.; Morrison, E.C.; Tocher, D.A.; Dale, L.D.; Edwards, D.I.; *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, 169, 127.
83. Bales, J.R. e col.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1983**, Comm. (092), 432.
84. Rochon, D.F.; Pi-Chang Kong; Melanson, R.; Skov, K.A.; Farrell, N.; *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 4531.
85. Boyar, E.B.; Robinson, S.D.; *Inorg. Chim. Acta*; **1982**, 64, 193.
86. Man, B.E.; *NMR Newly Accessible Nuclei*, **1993**, 2, 301.
87. Man, B.E.; *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **1991**, 23, 141.
88. Parish, R.V.; *NMR, NQR, EPR and Mössbauer Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, Ellis Horwood, New York, **1995**, Cap. 2, 27.
89. Pruchnik, F.P.; Kluczevska, G.; Wilczok, A.; Mazurek, U.; Wilczok, T.; *J. Inorg. Bioch.*, **1997**, 65, 25.
90. Nothemberg, M.S.; Souza, A.R.; Matos, J.R.; *Polyhedron*, **2000**, 19, 1305.
91. Cenini, S. e col.; *Inorg. Chim. Acta*, **1967**, 1, 443.
92. Bear, J.L. e col.; *Inorg. Chim. Acta*, **1979**, 37, L561.
93. Farrell, N.P.; *J. Inorg. Bioch.*; **1981**, 136, 1.
94. Aoki, K.; Yamazaki, H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1980**, 186.

95. Bear, J.L.; Kitchens, J.; Willcott, M.R.; *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1971**, 33, 3479.
96. Bear, J.L.; Gray, H.B.Jr.; Rainen, L.; Chang, I.M.; Howard, R.; Serio, G.; Kimball, A.P.; *Cancer Chemoter. Rep.*, **1975**, 59, 611.
97. Huther, H. e col.; *J. Mol. Structure*, **1969**, 4, 108.
98. Wearley, L.L.; Anthony, G.D.; *Analytical Profiles of Drug Substances*, **1976**, 5, 327.
99. Am. Chem. Soc. (ed); Cancer: The outlaw cell, Cap 13, 2ª Ed, Richard E. La Fond Editors, **1988**.
100. Turnes, J.; Atoms, radiation and radiation protection; Pergamonn Press Editors, **1986**.
101. Donder, B. A. J.; Waring, M.; The science of cancer treatment, Cap 2, Kluwer Academic Publishers, London, **1990**.
102. Gray, L.H.; Conger, A.D.; Ebert, M.; Hornsey, S.; Scott, O.C.A.; *Brit. J. Radiol.*, **1953**, 26, 638.
103. Thomlinson, R.H.; Gray, L.H.; *Br. J. Cancer*, **1955**, 9, 539.
104. Adams, G.E.; Dewey, D.L.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1963**, 12, 473.
105. Chapman, J.D.; Webb, R.G.; Borsa, J.; *Inter. J. Radiat. Biol.*, **1971**, 19, 561.
106. Adams, G.E.; Asquit, J.C.; Dewey, D.L.; Fuster, J.L.; Michael, B.D.; Wilson, R.L.; *Int. Jour. Radiat. Biol.*, **1971**, 19, 575.
107. Chapman, J.D.; Revvers, A. P.; Borsa, J.; *Br. Radiol.*, **1973**, 46, 423.
108. Foster, J.L.; Wilson, R.L.; *Br. J. Radiol.*, **1973**, 46, 423.
109. Chapman, J.D.; Revvers, A.P.; Borsa, J.; Henderson, J.S.; Miglieve, R.D.; *Cancer Chemoter. Rep.*, Part 1, **1974**, 58, 559.
110. Kirschner, I.; Citri, N.; Levitzki, A.; Ambar, M.; *Int. J. Radiat. Biol.*, **1970**, 7, 81.
111. Kiortsis, M.; *Int. J. Radiat. Biol.*, **1977**, 32, 583.
112. Brown, J.M.; *Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1982**, 8, 675.
113. Skov, K.A.; Farrell, N.P.; Adomat, H.; *Rad. Research*, **1987**, 112, 273.
114. Roy, M.B.; Mandal, P.C.; Bhattacharyya, S.N.; *Int. J. Radiat. Biol.*, **1996**, 69 (4), 471.
115. Double, E.B.; Richmond, R.C. ; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1979**, 5, 1369.
116. Skov, K.A.; Korbelik, M.; Palcic, B.; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1989**, 16, 1281.
117. Korbelik, M.; Skov, K.A.; *Radiat. Res.*, **1989**, 119, 145.
118. Skov, K.A.; MacPhail, S.; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1991**, 20, 221.
119. Bales, J.R.; Sadler, P.J.; Coulson, C.J.; Laverick, M.; Nias, A.H.W.; *British J. of Cancer*, **1982**, 46, 701.
120. Chibber, R.; Stratford, I.J.; Ahmed, I.; Robbins, A.B.; Goodgame, D.; Lee, B.; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1984**, 10, 1213.
121. Double, E.B.; Richmond, R.C.; Logan, M.E.; *Journal of Clinical Hematology and Oncology*, **1977**, 7, 585.
122. Farrell, N.; Gomes Carneiro, T.M.; *Inorg. Chim. Acta*, **1984**, 92, 61.
123. Barbabehrens, N.; Mutiroco, A.M.; Joseph Nathan, P. e col.; *Polyhedron*, **1991**, 10 (12), 1333.
124. Ratajczak-Sitarz, M.; Katrusiak, A.; Wojakowska, H. e col.; *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 26 (2), 326.

-
125. Okazaki, K.; Efeito de Radiação Ionizantes em Células. Noções Básicas; IPEN – Pub – 399, **1995**.
 126. Hall, E.J.; Radiobiology for the Radiobiologist; 4th Ed.; J. B. Lippincott Company. Philadelphia, **1994**.
 127. Skarsgard, L.D.; Harrison, I.; Durand, R.E.; Palcic, B.; *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **1986**, 12, 1075.
 128. Watts, M.E.; Hodgkiss, R.J.; Jones, N.R.; Fowler, J.F.; *Int. J. Radiat. Biol.*, **1986**, 50 (6), 1009.
 129. Palcic, B.; Brosing, J.W.; Skarsgard, L.D.; *Br. J. Cancer*, **1982**, 46, 980.
 130. Palcic, B.; Skarsgard, L.D.; *Radiat. Res.*, **1984**, 100, 328.
 131. Skarsgard, L.D.; Harrison, L.D.; *Radiat. Res.*, **1991**, 127, 243.
 132. Palcic, B.; Faddegon, B.; Skarsgard, L.D.; *Radiat. Res.*, **1984**, 100, 340.
 133. Watts, M.E.; Woodcock, M.; *Br. J. Radiol.*, **1991**, 64, 971.
 134. Taylor, Y.C.; Brown, J.M.; *Radiat. Res.*, **1987**, 112, 134.
 135. Skov, K.; Mac Phail, S.R.; Marples, B.; *Radiat Res.*, **1994**, 138, S113.
 136. *International Standard Biological Evaluation of Medical devices - Part 5: Test for cytotoxicity: in vitro methods*. ISSO 10 993-5, **1992**.
 137. Campos, V.E.; Rogero, S.; Higa, O.Z.; Guedes, S.M.L.; *Proceeding of the 5th Latin American and 3rd Ibero American Polymer Symposium*, **1996**, 289.
 138. Chapman, J.D.; Gillespie, C.J.; Reuvers, A.P.; Dugle, D.L.; *Radiat. Res.*, **1975**, 64, 365.
 139. Rainen, L.; Howard, R.A.; Kimball, A.P.; Bear, J.L.; *Inorg. Chem.*, **1975**, 14, 2752.
 140. Das, K.; Bear, J.L.; *Inorg. Chem.*, **1976**, 15 (9), 2093.
 141. Das, K.; Simmons, E.L.; Bear, J.L.; *Inorg. Chem.*, **1977**, 16 (6), 1268.
 142. Dennis, A.M.; Howard, R.A.; Bear, J.L.; *Inorg. Chim. Acta*, **1982**, 66, L31.
 143. Carneiro da Cunha, A.M.; Estudos sobre a Formação de Complexos de Fe (II) e Fe (III) com di-2-piridil cetona saliciloilhirazona (DPKSH) e sua Aplicação no Desenvolvimento de Métodos Analíticos, Tese de Doutorado, Instituto de Química –USP, São Paulo, **1998**.
 144. Suárez-Iha, M.E.V.; Estudos de Equilíbrio nos Sistemas Cobalto (II)/azoteto e Níquel (II)/azoteto. Desenvolvimento de Métodos para Cálculo de Constantes de Equilíbrio para Complexos Polinucleares, Tese de Doutorado, Instituto de Química-USP, São Paulo, **1983**.