

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**METALOFÁRMACOS DE DIRUTÊNIO(II,III): SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS
E CICLODEXTRINA**

RODRIGO LUIS SILVA RIBEIRO SANTOS

Versão corrigida da tese conforme resolução CPG 5890.

A original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

SÃO PAULO

Data do Depósito na SPG:

28/02/2012

RODRIGO LUIS DA SILVA RIBEIRO DOS SANTOS

**METALOFÁRMACOS DE DIRUTÊNIO(II,III): SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS
E CICLODEXTRINA**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química

Orientadora: Profa. Dra Denise de Oliveira Silva

SÃO PAULO

2012

Ficha Catalográfica

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

S586m Santos, Rodrigo Luis da Silva Ribeiro dos
Metalofármacos de rutênio(II, III): síntese, caracterização
e interações com biomoléculas e ciclodextrina / Rodrigo Luis
da Silva Ribeiro dos Santos. -- São Paulo, 2012.
202p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Silva, Denise de Oliveira

1. Química bioinorgânica 2. Complexos de rutênio 3. Albumina :
Bioquímica 4. Aminoácido : Bioquímica 5. Composto macromolecular
I. T. II. Silva, Denise de Oliveira.

546.3 CDD



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA



40 ANOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

“Metalofármacos de dirutênio(II,III): síntese, caracterização e interações com biomoléculas e ciclodextrina”

**RODRIGO LUIS DA SILVA
RIBEIRO DOS SANTOS**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Henrique Eisi Toma
IQ - USP

Prof. Dr. Breno Pannia Espósito
IQ - USP

Profa. Dra. Sofia Nikolaou
FCFRP-USP

Prof. Dr. Geise Ribeiro
UNIFEI

SÃO PAULO
04 de abril de 2012

À minha mãe, Maria de Lourdes e minha avó, Thereza Rocha (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a minha orientadora, Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva, por me aceitar como seu aluno, por todos os ensinamentos e, principalmente, pela compreensão e ajuda nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Rudi van Eldik e a todos os seus alunos da Universidade de Erlangen-Nürnberg, em especial à Dra. Erika Ember, por me receber com todo carinho e atenção durante o meu período de estágio na Alemanha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado e à CAPES e *Deutscher Akademischer Austausch Dienst* (DAAD) por ter concedido a bolsa de doutorado-sanduiche.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização dos projetos em que o grupo estava inserido.

À Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, Profa. Dra Vera L. Constantino, Prof. Dr. Henrique E. Toma, Prof. Dr. Breno Pannia Espósito, Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito, Prof. Dr. Gianluca Camillo Azzellini, Profa. Dra. Márcia Laudelina Arruda Temperini, Prof. Dr. Koiti Araki e Profa Dra. Sofia Nikolaou pela ajuda, contribuição científica e até mesmo a autorização pelo uso de seus laboratórios.

Aos atuais amigos do laboratório (Douglas, Iguatinã, Rute, João, Marcus e Samara) e, também, aos antigos (Andrea, Renata, Claudia, Rachel, Alan, Carolina, Jaqueline e Débora) pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

Aos diversos amigos do Instituto, em especial: Vivian, Karina, Lucas, Ana Lucia, Vanessa, Gustavo, Alfredo, Ana Paula, Michele e Patrícia que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, além do meu aprimoramento profissional e pessoal.

Aos técnicos Adir (Escola Politécnica), Ricardo e Cida, sempre prestativos e dispostos ao apoio técnico, e também a toda equipe da Central Analítica do IQ-USP.

A toda a minha família pelo carinho e pela compreensão devido a minha ausência, principalmente nestes anos finais do doutorado.

Aos amigos Ronaldo, Karin Juliana e Iara pelo carinho e afeto desprendido durante anos de minha vida.

E meu sincero apreço ao querido e eterno amigo Rodrigo Soares pela sua paciência e respeito durante toda a realização deste Doutorado.

*"É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol
e a água ser constituída por dois gases
inflamáveis. A verdade científica é sempre um
paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana
que se agarra à aparência efêmera das coisas."*

Karl Marx

RESUMO

Santos, R. L. S. R. **Metalofármacos de dirutênio(II,III): síntese, caracterização e interações com biomoléculas e ciclodextrina.** 2012. (202p). Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os compostos de coordenação de rutênio têm recebido grande atenção para tratamento do câncer. Em particular, estudos do grupo mostraram que um metalofármaco de dirutênio(II,III) com o fármaco anti-inflamatório não-esteróide ibuprofeno apresenta boa atividade para tumor cerebral maligno. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo ampliar os estudos com a obtenção de novos complexos, investigar as interações dos metalofármacos com moléculas de interesse biológico e preparar materiais híbridos destes com ciclodextrina.

Desenvolveu-se metodologia sintética para a preparação de dois novos metalofármacos de dirutênio(II,III) de fórmula geral $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$, em que O_2CR = cetoprofenato (cet) ou fenbufenato, a partir do precursor $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$. Os novos complexos foram caracterizados principalmente por meio de técnicas espectroscópicas, difratometria de raios x e análise térmica.

Estudos de reatividade foram realizados para a espécie $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, obtida a partir do precursor $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$ em solução aquosa. Constantes de equilíbrio e parâmetros termodinâmicos para as reações de substituição axial água-cloreto, e também parâmetros cinéticos das reações deste complexo com os aminoácidos glicina, triptofano, cisteína e histidina, e com os agentes redutores glutatona e ácido ascórbico, foram determinados. Estudos sobre as interações com a proteína albumina do soro humano (HSA) foram efetuados para os complexos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{cet})_4\text{Cl}]$, e também para o derivado análogo de ibuprofenato (ibp), $[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$.

Novos materiais híbridos contendo os complexos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$ (O_2CR = ibuprofenato ou cetoprofenato) e hidroxipropil- β -ciclodextrina foram obtidos, usando-se a técnica de *spray-drying*, e caracterizados.

Palavras-chave: rutênio, anti-inflamatórios, ciclodextrinas, albumina, aminoácidos, agentes redutores

ABSTRACT

Santos, R. L. S. R. **Diruthenium(II,III) metallodrugs: synthesis, characterization and interactions with biomolecules and cyclodextrin.** 2012. (202p.). PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ruthenium compounds have received great attention for cancer therapy. In particular, studies from our research group have found that a metallodrug of diruthenium(II,III) with the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen, has good activity for malignant brain tumor. In this context, the main purposes of this work were to improve these studies, to investigate some interactions of these metallodrugs with biologically relevant molecules, and also to prepare hybrid materials of these complexes with cyclodextrin.

Synthetic methodologies were developed to prepare two novel diruthenium(II,III) metallodrugs, with the general formula $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$, where O_2CR = ketoprofen (ket) or fenbufen starting from the precursor $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$. The novel complexes were characterized mainly by spectroscopical techniques, X-rays diffractometry and thermal analysis.

Reactivity studies were performed for the species $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ obtained from the precursor $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$ in aqueous solution. Equilibrium constants and thermodynamic parameters for water-chloride axial substitutions, and also kinetic parameters for the reactions of this complex with the amino acids glycine, tryptophan, cysteine and histidine, and the reducing agents glutathione and ascorbic acid, were determined.

Studies on the interactions with the human serum albumin (HSA) protein were performed for the complexes $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$ and $[\text{Ru}_2(\text{ket})_4\text{Cl}]$, and also for the analogue derivative of the ibuprofen drug (ibp), $[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$.

Novel hybrid materials containing complexes $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$ (O_2CR = ibuprofenato or ketoprofenato) and β -hydroxypropyl-cyclodextrin were prepared by using spray-drying technique and characterized.

Keywords: ruthenium, anti-inflammatory drugs, cyclodextrins, albumin, amino acids, reducing agents

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β CD	β -ciclodextrina
aa	aminoácidos
acn	acetonitrila
act (OAc)	acetato
ala	aminoácido alanina
ar	agentes redutores
asp	aminoácido aspartato
CD	espectroscopia de dicroísmo circular
cet	fármaco cetoprofeno
CGS	sistema de unidades (centímetro-grama-segundo)
cis	aminoácido cisteína
COX	enzimas ciclooxigenase
CPD	deposição de partícula controlada
Cy	ciclohexanil
dic	fármaco diclofenaco
dmf	N,N-dimetilformamida
dmsO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DTG	termogravimetria diferencial (1ª derivada da curva TG)
edta	ácido tetra-acético etiledodiamino
EPR	espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica
et	etanol
FAINE	fármaco anti-inflamatório não-esteroidal
Fc	ferrocenil
fen	fármaco fenbufeno
FTIR	espectroscopia vibracional com transformada de <i>Fourier</i> na região do infravermelho
gli	aminoácido glicina
GSH	tripeptídeo glutathiona
H ₂ A	ácido ascórbico
his	aminoácido histida
HP β CD	hidroxipropil- β -ciclodextrina

HSA	proteína albumina de soro humano
I	insolúvel
ibp	fármaco ibuprofeno
ICP-AES	espectrometria de emissão atômica com plasma induzido
im	imidazol
ind	fármaco indometacina
KP1019	Hind[<i>trans</i> -[RuCl ₄ (ind) ₂]
KP1339	Na[<i>trans</i> -RuCl ₄ (Hind) ₂]
KP418	H ₂ im[<i>trans</i> -RuCl ₄ (Him) ₂]
L	ligante
M.B.	magnéton de Bohr
met	metanol
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
MS	espectrometria de massa
NAMI-A	Him[<i>trans</i> -RuCl ₄ (dms)im]
npx	fármaco naproxeno
phen	fenantrolina
pic	picolinato
pr	proprianato
pz	pirazina
RAPTA	complexos de rutênio(II) que contém ligantes arenos
RMN	espectroscopia de ressonância magnética nuclear
Ru ₂ -act	cloro <i>tetrakis</i> (acetato)dirutênio(II,III)
Ru ₂ -cet	cloro <i>tetrakis</i> (cetoprofenato)dirutênio(II,III)
Ru ₂ -fen	cloro <i>tetrakis</i> (fenbufenato)dirutênio(II,III)
Ru ₂ -ibp	cloro <i>tetrakis</i> (ibuprofenato)dirutênio(II,III)
Ru ₂ -npx	cloro <i>tetrakis</i> (naproxenato)dirutênio(II,III)
S	solvente ou solúvel
SD	<i>spray-drying</i>
TG	termogravimetria
THT	tiofeno
trp	aminoácido triptofano
UV-Vis	espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Compostos de Rutênio	14
1.2. Fármacos Anti-inflamatórios Não-Esteróides (FAINEs)	19
1.3. Tetracarboxilatos de Dirutênio(II,III) Complexados com FAINEs	20
1.4. Moléculas Biologicamente Relevantes	22
1.4.1. Os Aminoácidos e suas Interações com Complexos Metálicos	23
1.4.2. Os Agentes Redutores e suas Interações com Compostos de Rutênio	24
1.4.3. A Albumina de Soro Humano e suas Interações com Compostos de Rutênio	26
1.5. Ciclodextrinas	27
1.5.1. Interações das Ciclodextrinas com Compostos de Rutênio e com FAINEs	33
2. OBJETIVOS	36
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	37
3.1. Reagentes e Solventes	37
3.2. Materiais	38
3.3. Equipamentos	38
3.4. Técnicas e Aparelhos Utilizados	39
3.4.1. Análise Elementar e Espectroscopia de Emissão Atômica com plasma induzido (ICP-AES)	39
3.4.2. Espectroscopia Eletrônica em Solução	39
3.4.3. Espectroscopia Eletrônica no Estado Sólido	39
3.4.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	40
3.4.5. Espectroscopia Vibracional Raman	40
3.4.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	40
3.4.7. Espectroscopia de Dicroísmo Circular	40
3.4.8. Espectroscopia de Fluorescência	41
3.4.9. Condutância Molar	41
3.4.10. Susceptibilidade Magnética	41
3.4.11. Análises Térmicas	43

3.4.12. Difractometria de Raios X	43
3.4.13. Microscopia Eletrônica de Varredura	43
3.5. Sínteses dos Complexos Tetracarboxilatos de Dirutênio(II,III)	44
3.5.1. Síntese dos Complexos $[Ru_2(act)_4Cl]$ e $[Ru_2(ibp)_4Cl]$	44
3.5.2. Síntese do Complexo $[Ru_2(cet)_4Cl]$	44
3.5.3. Síntese do Complexo $[Ru_2(fen)_4Cl]$	44
3.6. Estudos Termodinâmicos da Reação de Substituição Axial para o Ru_2-act	45
3.7. Estudos de Interação com Aminoácidos e com Agentes Redutores	45
3.8. Estudos de Interação com a Proteína Albumina Humana (HSA)	47
3.8.1. Estudos de Espectroscopia Eletrônica	47
3.8.1.1. <i>Cinética da Reação entre Ru_2-act e HSA</i>	47
3.8.1.2. <i>Constante de Ligação da Reação entre Ru_2-act e HSA</i>	47
3.8.2. Estudos de Dicroísmo Circular	48
3.8.3. Estudos de Fluorescência	48
3.9. Estudos de Interação com Ciclodextrinas	49
3.9.1. Preparo e Caracterização dos Materiais Híbridos com $HP\beta CD$	49
3.9.2. Cálculo do Rendimento de Inclusão dos Materiais Híbridos	50
3.9.3. Solubilidade Aquosa dos Materiais Híbridos	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Síntese e Caracterização dos Complexos $[Ru_2(cet)_4Cl]$ e $[Ru_2(fen)_4Cl]$	52
4.1.1. Espectros de Absorção Eletrônica	53
4.1.2. Medidas de Condutância Molar	57
4.1.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética	58
4.1.4. Espectros Vibracionais FTIR e Raman	58
4.1.5. Difractogramas de Raios X	67
4.1.6. Análises Térmicas	68
4.1.7. Proposta das Fórmulas Estruturais para os Novos Ru_2 -FAINEs ..	77
4.2. Estudos Termodinâmicos da Reação de Substituição Axial para o Ru_2-act	75
4.3. Estudos de Interação com Aminoácidos: Cinética e Mecanismo	84
4.3.1. Reação do Ru_2-act com Glicina	87
4.3.2. Reação do Ru_2-act com Cisteína	92
4.3.3. Reação do Ru_2-act com Triptofano	98
4.3.4. Reação do Ru_2-act com Histidina	102
4.3.5. Sinopse dos Estudos de Interação com Aminoácidos.....	108

4.4. Estudos de Interação com Agentes Redutores: Cinética, Mecanismo e Parâmetros de Ativação	110
4.4.1. Reação do Ru ₂ -act com Glutathione	111
4.4.2. Reação do Ru ₂ -act com Ácido Ascórbico	117
4.4.3. Sinopse dos Estudos de Interação com Agentes Redutores	126
4.5. Estudos de Interação com a Proteína Albumina Humana (HSA)	127
4.5.1. Espectroscopia Eletrônica de Absorção no UV-Vis	127
4.5.2. Espectroscopia Eletrônica de Dicroísmo Circular	133
4.5.3. Espectroscopia Eletrônica de Fluorescência	137
4.6. Sinopse dos Estudos com Moléculas Biológicas.....	144
4.7. Estudos de Interação com Ciclodextrinas	145
4.7.1. Preparo e Caracterização dos Materiais Híbridos com HPβCD ..	146
4.7.1.1. Análises de Rutênio por ICP-AES	147
4.7.1.2. Espectros de Absorção Eletrônica	147
4.7.1.3. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear	148
4.7.1.4. Espectros Vibracionais na Região do Infravermelho	151
4.7.1.5. Análises Térmicas	155
4.7.1.6. Difrátogramas de Raios X	159
4.7.1.7. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura	160
4.7.2. Cálculo do Rendimento de Inclusão dos Materiais Híbridos	164
4.7.3. Solubilidade Aquosa dos Materiais Híbridos	167
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	171
6. APÊNDICES	173
6.1. Apêndice I: Constantes de Pascal	173
6.2. Apêndice II: Equações Utilizadas para Determinar as Constantes de Equilíbrio K ₁ e K ₂ no Complexo Ru ₂ -act	174
6.3. Apêndice III: Curvas de Calibração	176
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
ANEXO – SÚMULA CURRICULAR	198

1. INTRODUÇÃO

A medicina vem se beneficiando do uso de drogas terapêuticas e diagnósticas baseadas em compostos inorgânicos há milhares anos, mesmo que seja de forma empírica e muitas vezes sem conhecer seu mecanismo de ação [1].

Alguns elementos inorgânicos, como por exemplo: ferro, cobre e zinco, além de serem essenciais em muitas funções vitais, também podem modificar a ação de algumas drogas, alterando a sua ação farmacológica devido à geração de um complexo metálico que é formado no meio biológico. Os metais ditos “não-essenciais” também são largamente utilizados na medicina, tanto para diagnóstico como para terapia; como exemplo podem-se citar complexos de platina como agentes quimioterápicos, compostos de gadolínio como agentes de contraste utilizados para Ressonância Magnética, compostos de vanádio como miméticos da insulina, e diversos complexos de tecnécio-99m como agentes de radiodiagnóstico [2].

A importância dos metalofármacos – complexos de metais de transição que apresentam potencial terapêutico – foi reconhecida graças à descoberta, no final da década de 60, da *cisplatina*, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], que mesmo com seus graves efeitos tóxicos e colaterais, e resistência a alguns tumores, ainda é muito utilizada como agente quimioterápico [3].

Neste contexto, o grande desafio da química de coordenação com aplicação à *Química Medicinal* é a síntese de novos compostos ou drogas que apresentem pouco efeito colateral e que sejam capazes de interagir com biomoléculas possibilitando um metabolismo específico para um determinado alvo *in vivo*.

1.1. Compostos de Rutênio

Dentre inúmeros compostos metálicos investigados, os complexos contendo o metal rutênio apresentam-se como uma promissora alternativa para o tratamento do câncer. Apesar de ser “não-essencial” e não-endógeno, o rutênio pode mimetizar o ferro devido às suas propriedades químicas em comum – o Ru está localizado no mesmo grupo do Fe na Tabela Periódica e a semelhança entre esses dois metais pode explicar a capacidade do rutênio de ligar-se à transferrina além de ligar-se à albumina (HSA) [4].

Alguns artigos de revisão sobre diferentes compostos de rutênio que apresentam atividade antitumoral já foram publicados [2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20]. Dois complexos têm recebido grande destaque e já atingiram a fase de testes clínicos: o *NAMI-A* (Him[*trans*-RuCl₄(dmsO)im], im = imidazol, dmsO = dimetilsulfóxido) e o *KP1019* (HInd[*trans*-[RuCl₄(ind)₂], ind = indazol) [21] (Figura 1). O *NAMI-A* é particularmente eficiente contra metástase de tumores experimentais – exibe capacidade de inibir o crescimento e prevenir a formação de metástases, além de apresentar toxicidade menor que a cisplatina [22,23]. O *KP1019*, por outro lado, é um agente citotóxico e apresenta atividade anticancerígena para alguns tipos de tumores de pulmão e rins [24].

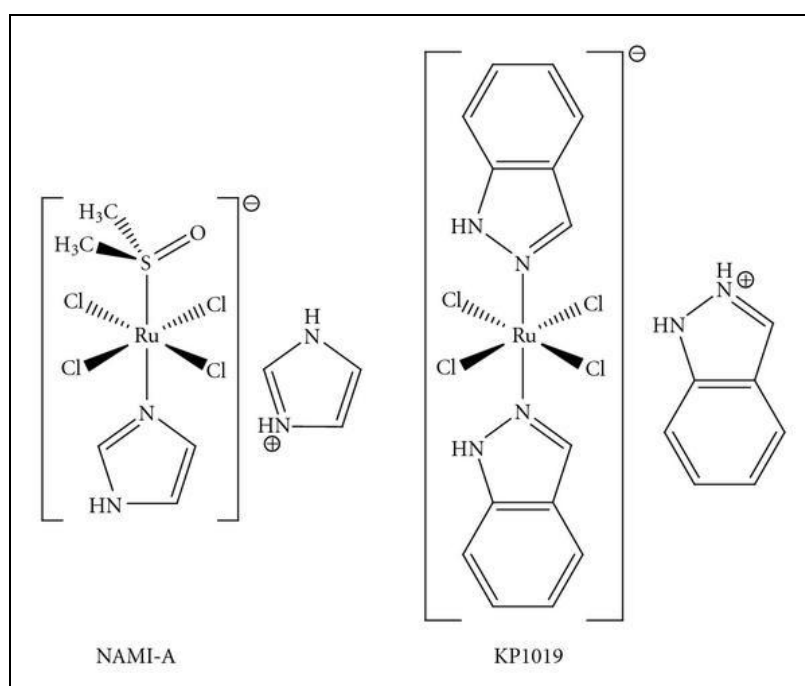


Figura 1 – Fórmulas estruturais dos compostos de rutênio(III): NAMI-A e KP1019.

Em contraste aos complexos monoméricos de rutênio, as propriedades biológicas de complexos diméricos contendo ligações metal-metal praticamente não foram exploradas. Os primeiros relatos dos compostos de rutênio com ligações metálicas múltiplas são encontrados nos trabalhos de Wilkinson [25] e Cotton [26].

A classe mais numerosa de complexos de dirutênio com ligações múltiplas é a dos tetracarboxilatos que são constituídos por unidades $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{L}_m]^{n+}$ (m e $n = 0, 1$ ou 2), em estruturas do tipo “gaiola” nas quais os quatro ligantes carboxilatos formam pontes equatoriais que estabilizam as

ligações metal-metal (Figura 2), já os ligantes (L) estão localizados nas posições axiais. Dependendo da natureza do ligante axial (normalmente uma base de Lewis e haleto) ou do contra-íon é possível a formação de pontes na direção axial, gerando cadeias poliméricas estendidas no estado sólido [27].

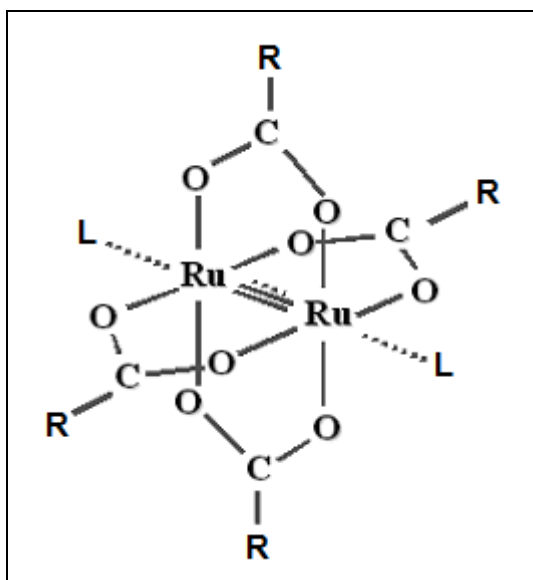


Figura 2 – Fórmula Estrutural do $[Ru_2(O_2CR)_4L_2]$

O metal rutênio é muito versátil com relação ao seu estado de oxidação, para os núcleos dimetalados $[Ru_2]$. Em termos de número de compostos já isolados, observa-se uma predominância decrescente de acordo com a seguinte ordem: $Ru_2(II,III) > Ru_2(II,II) >> Ru_2(III,III)$. Esta ordem pode ser explicada com base na estabilidade termodinâmica que é relativamente maior para as espécies que contêm núcleos de dirutênio do tipo $Ru_2(II,III)$ [1].

Os complexos de $Ru_2(II,III)$ são designados complexos de valência mista, porém quando as duas posições axiais estão ocupadas pelos mesmos ligantes, a carga formal é igualmente distribuída entre os dois centros metálicos; sendo assim a representação mais adequada para o núcleo dimetalado seria $Ru_2(II\frac{1}{2}, II\frac{1}{2})$ ou $[Ru_2]^{5+}$, em vez de $Ru_2(II,III)$ [1].

As propriedades magnéticas constituem uma característica bastante peculiar destes complexos de valência mista. Eles apresentam onze elétrons, e, portanto, com base na ordem de energia dos orbitais ($\sigma < \pi \ll \delta < \delta^* \ll \pi^* < \sigma^*$) (Figura 3), oito dos onze elétrons deveriam preencher todos os orbitais ligantes enquanto que os outros três deveriam preencher os orbitais antiligantes,

resultando em apenas um elétron desemparelhado. No entanto, observa-se experimentalmente, que tetracarboxilatos dimetalados do tipo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]^+$ possuem um momento magnético efetivo bastante incomum ($\mu_{\text{ef}} = 3,8$ a $4,4$ M.B.) compatível com a presença de três elétrons não-emparelhados. Para justificar este comportamento experimental, estudos teóricos [28,29] indicaram que, na verdade, a ordem de energia dos orbitais depende do estado de oxidação do núcleo dimetalado, do tipo de ligante em ponte equatorial, e do tipo e do número de ligantes axiais.

Além disso, vale lembrar que a proposta da ordem energética dos orbitais (Figura 3) não leva em consideração as interações que podem ocorrer entre orbitais dos metais e orbitais dos ligantes coordenantes. Para a maioria dos núcleos $\text{Ru}_2(\text{II,III})$, os níveis de energia dos orbitais δ^* e π^* são aproximadamente degenerados, e dessa forma, a configuração eletrônica no estado fundamental deve ser representada por: $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 (\delta^* \pi^*)^3$, confirmando assim a presença dos três elétrons desemparelhados. A exploração destas interessantes propriedades despertou grande interesse no desenvolvimento de novos materiais magnéticos. A ordem de ligação resultante dessa distribuição eletrônica é igual a 2,5 em coerência com valores de comprimentos de ligação Ru-Ru ($\sim 2,28$ Å) observados para complexos dessa classe [27].

São poucos os trabalhos de revisão bibliográfica sobre os diferentes tetracarboxilatos de dirutênio que estão disponíveis na literatura [1,30,31]. Neste sentido, vale a pena destacar os únicos artigos cujo foco de pesquisa foram as propriedades biológicas.

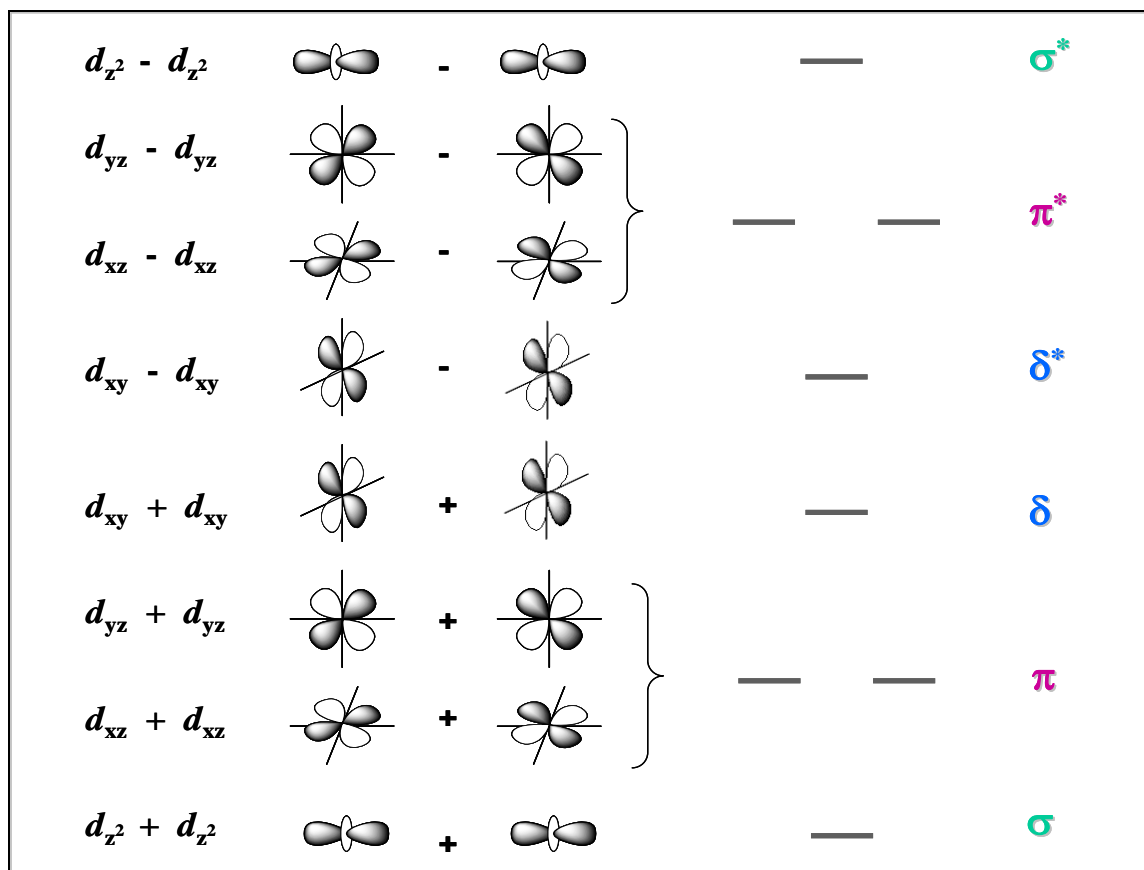


Figura 3 – Diagrama simplificado dos recobrimentos dos orbitais d e níveis de energia dos orbitais resultantes na formação de ligações metal-metal múltiplas do tipo X_4M-MX_4 [32].

O primeiro relato é de 1989 quando complexos do tipo $[Ru_2(O_2CR)_4L_2]PF_6$, sendo $R = -CH_3$ e $-CH_2CH_3$, foram investigados mostrando moderada atividade para células de leucemia P388 [33]. Em 2002, a série de complexos $[Ru_2(O_2CR)_4L_2]PF_6$, em que: $L =$ imidazol, 1-metilimidazol, H_2O , para $R = CH_3$; $L =$ etanol, para $R = Fc$ (ferrocenil) ou $Fc-CH=CH-$; e de compostos $M_3[Ru_2(O_2CR)_4(H_2O)_2]$, com $M = Na^+$ para $R = m-C_6H_4SO_3^-$ e $M = K^+$ para $R = p-C_6H_4SO_3^-$, foi testada quanto à citotoxicidade para HeLa e também quanto à atividade para células humanas cancerosas resistentes do tipo CoLo 320DM, sendo observado que a atividade anticancerígena aumenta significativamente para os compostos aniônicos, os quais são mais solúveis em água [34].

Levando em consideração que a atividade antitumoral dos complexos de rutênio pode estar relacionada à capacidade de ligação do metal às proteínas ou ao DNA, complexos de dirutênio(II,III) foram sintetizados com a base nitrogenada guanina [35] e sua análoga etil-guanina [36], porém nenhuma elucidação sobre o mecanismo de ação foi proposta.

Nosso grupo investigou a reatividade dos complexos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$, frente as bases adenina e adenosina [27]. Os resultados indicaram que a reação entre as espécies é dependente do solvente, e que os produtos isolados, partindo do $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$, mantêm a estrutura dimetálica, sendo que as bases nitrogenadas substituem axialmente as moléculas de água, formando pontes axiais entre duas unidades de dirutênio(II,III) no estado sólido.

Diferentes compostos do tipo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{L})_2]\text{PF}_6$, sendo L = metronidazol, nimorazol, secnidazol e tinidazol, também foram investigados em nosso grupo de pesquisa, mostrando-se eficazes contra células cancerígenas HeLa, sendo mais tóxicos para estas do que para células normais NCTC-clone L929. Além disso, também apresentaram atividade antifúngica [37].

1.2. Fármacos Anti-Inflamatórios Não-Esteróides (FAINEs)

Os FAINEs formam um grupo de medicamentos que é largamente utilizado pela população pelas propriedades popularmente conhecidas de controlar a inflamação, proporcionar analgesia e combater a hipertermia. A utilização desses fármacos também pode reduzir os riscos de mal de Alzheimer, artrites, doenças cardíacas e alguns tipos de câncer (mama, cólon, próstata e esôfago) [38,47]. Entretanto, o uso prolongado de FAINEs pode trazer sérios efeitos colaterais sendo um dos mais comuns a lesão sobre o trato gastrointestinal [39].

Alguns exemplos de medicamentos pertencentes à classe dos FAINEs (Figura 4) são os salicilatos (aspirina), os ácidos fenilalcanóicos, os ácidos antranílicos, os oxicans e as sulfonamidas [40].

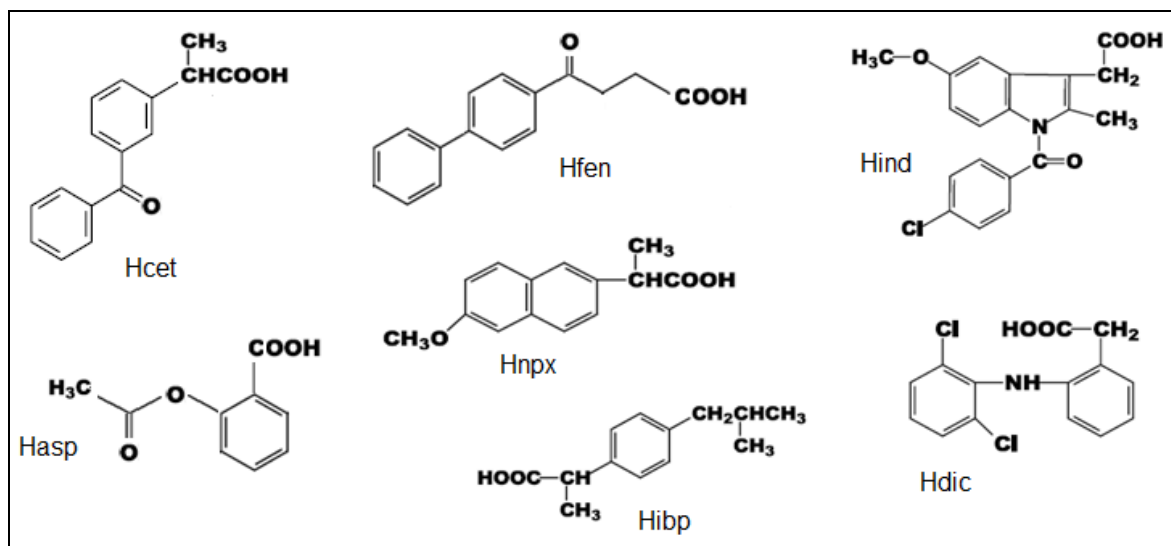


Figura 4 – Alguns exemplos de FAINES: cetoprofeno (Hcet), ibuprofeno (Hibp), fenbutafeno (Hfen), naproxeno (Hnpx), indometacina (Hind), aspirina (Hasp) e diclofenaco (Hdic)

Os efeitos clínicos dos FAINES são atribuídos principalmente às suas capacidades de inibirem a atividade catalítica de duas formas da enzima ciclooxigenase, COX-1 e COX-2, e, por isso, muitas vezes eles são chamados de inibidores de COX [40]. A ação anti-inflamatória dos FAINES é associada à inibição da COX-2, que está envolvida nos processos de inflamação. Já alguns efeitos adversos são atribuídos à inibição da COX-1, que é a forma da COX relacionada à proteção da mucosa estomacal. A inibição da COX-2 também pode estar relacionada com a ação preventiva dos FAINES com relação a alguns tipos de câncer [27,41].

1.3. Tetracarboxilatos de Dirutênio(II,III) Complexados com FAINES

O nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo há alguns anos, estudos sobre complexos de dirutênio com fármacos anti-inflamatórios não-esteróides. Os fármacos que possuem o grupamento R-COOH, podem atuar como ligantes para metais de transição via carboxilato (R-COO⁻) e estabilizar algumas estruturas dimetálicas em “gaiola” representadas por [M₂(RCOO)₄], sendo M = metal.

Excetuando-se os trabalhos de nosso grupo, existe um único artigo na literatura, publicado em 1989 [42], que reporta a reação entre acetato de dirutênio

e o FAINE aspirina, mas nenhuma menção sobre possíveis aplicações biológicas foi descrita.

O primeiro artigo do grupo [43], publicado em 2000, descreve a síntese e caracterização de um novo complexo de dirutênio(II,III) com o fármaco ibuprofeno, $[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$, e também um estudo da comparação de sua atividade anti-inflamatória e anti-ulcerogênica com o fármaco Hibp e um complexo análogo de cobre-ibuprofeno, $[\text{Cu}_2(\text{ibp})_4]$. Os resultados dos estudos biológicos mostraram que a atividade anti-inflamatória não depende do íon metálico (Ru ou Cu) uma vez que os efeitos inibitórios da inflamação foram similares para os dois complexos e o fármaco orgânico. Entretanto, a vantagem da complexação com os metais foi a redução da ulceração gástrica em comparação àquela causada pelo fármaco não complexado. Surpreendentemente, a administração oral *in vivo* do complexo de rutênio (um metal pesado) teve efeito similar ao do complexo de cobre.

A investigação da potencial atividade antitumoral dos complexos de dirutênio é um dos principais focos de estudo do nosso grupo de pesquisa e a escolha dos FAINEs deve-se ao fato de estes por si só já apresentarem algum tipo de ação preventiva para alguns tumores [41]. Neste sentido, novos compostos de dirutênio(II,III) complexados com os carboxilatos derivados dos fármacos aspirina (Hasp), naproxeno (Hnpx), e indometacina (Hind) foram sintetizados e caracterizados, e a atividade antitumoral investigada [44]. Os ensaios indicaram que os complexos $\text{Ru}_2\text{-ibp}$ e $\text{Ru}_2\text{-npx}$ não apresentaram efeitos significativos sobre dois tipos de tumores humanos: laringe (Hep2) e bexiga (T24/83). Em contraste, ambos apresentaram ação antiproliferativa sobre células de glioma de rato C6, *in vitro*. Além disso, foi observado também que esses complexos podem exercer efeitos similares aos exibidos pelo NAMI-A, abrindo perspectivas para a realização de estudos *in vivo* com glioma C6, que serve como modelo para glioblastoma multiforme, um tumor cerebral humano maligno (glioblastoma multiforme IV) de difícil prognóstico.

Em outro artigo do nosso grupo de pesquisa foi publicado a síntese e caracterização de um novo complexo dirutênio contendo um ácido graxo (ácido γ -linolêico, assim como vários ensaios biológicos com as células C6 de glioma de rato [45]. Os resultados indicaram que a inibição celular é dependente do tempo de incubação e da concentração do complexo, e que este novo complexo

apresenta propriedades antiproliferativas além de ser um potencial candidato para terapia de gliomas.

Trabalhos em colaboração, proporcionaram a realização de uma tese de doutorado no Instituto de Ciências Biomédicas da USP sobre a ação do complexo Ru₂-ibp sobre a expressão do mRNA e proteína da enzima COX-1 [46]. As modificações na expressão do ciclo celular e proteínas relacionadas à apoptose indicaram que o complexo tem alvos múltiplos, que se expressam na inibição de proliferação e indução da morte celular.

Em outra tese de doutorado [47], de nosso grupo de pesquisa, é descrita a síntese e caracterização de dois novos complexos dirutênio(II,III) com os fármacos diclofenaco e sulindaco. Ensaio de atividade biológicas destes complexos e também do Ru₂-ibp frente células K562 de leucemia mielóide humana, também foram executados, e os resultados sugerem que os complexos apresentam atividade antiproliferativa frente a esta linhagem celular.

Uma série de estudos biológicos de células C6 de glioma de rato com o complexo Ru₂-ibp também foram reportados em outro artigo recente [48]. Os ensaios consistiram em avaliar os efeitos da exposição do complexo sobre a distribuição celular, potencial da membrana mitocondrial, geração de espécies reativas, e expressão mRNA e proteínas (E2F1, cyclin D1, c-myc, pRb, p21, p27, p53, Ku70, Ku80, Bax, Bcl2, COX1 e COX2). Dentre todos os resultados apresentados, pôde-se concluir que o complexo se degrada no citoplasma liberando assim o fármaco ibuprofeno para inibir a atividade da COX-1, gerando uma resposta celular para a síntese de novas enzimas COX-1 para compensar a atividade inibitória da proteína.

1.4. Moléculas Biologicamente Relevantes

Investigar o comportamento bioquímico é essencial quando novos compostos são estudados visando à atividade farmacológica, assim como também é importante conhecer a espécie ativa do composto que será responsável pelos processos de biotransformação que antecedem a sua interação com as células cancerosas. Quando se trata de um composto de coordenação, a espécie ativa pode ser: o íon metálico, os ligantes, o próprio complexo intacto ou mesmo parte dele.

Muitos metalofármacos são chamados de “pró-drogas”, pois seus ligantes podem ser substituídos por outros presentes no meio biológico, em processos de hidrólise, reações com biomoléculas no sangue ou no interior da célula; ou até mesmo o metal sofrer reações de oxido-redução antes de alcançar seu alvo biológico [49].

Com relação aos possíveis alvos, embora o DNA seja o principal, existem evidências químicas e bioquímicas do envolvimento de outros. Como a administração intravenosa do medicamento deve seguir um longo caminho para alcançar a célula cancerosa, a sua interação com outros possíveis ligantes biológicos presentes no plasma sanguíneo, na membrana celular, ou no citoplasma precisam ser avaliados e investigados. Dentre as biomoléculas que podem ser alvos dos compostos destacam-se aminoácidos, agentes redutores, hormônios, peptídeos e proteínas [50].

1.4.1. Os Aminoácidos e suas Interações com Complexos Metálicos

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. Um α -aminoácido é constituído de um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupo R diferenciado, ligados a um átomo de carbono, que é chamado de carbono α por ser adjacente ao grupamento carboxila [51]. A presença dos grupamentos, $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$, faz com que eles sejam bons ligantes para complexos metálicos. As fórmulas estruturais dos aminoácidos investigados neste trabalho estão apresentadas na Figura 5.

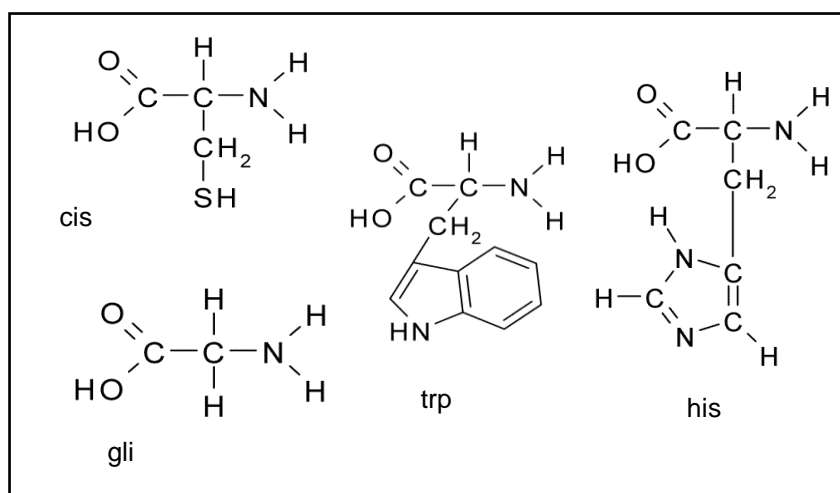


Figura 5 – Fórmulas estruturais dos aminoácidos: cisteína (cis), histidina (his), glicina (gli) e triptofano (trp)

Interessantes revisões bibliográficas são publicadas periodicamente com informações sobre síntese, cinética e reatividade, equilíbrio em solução e diferentes aplicações de compostos metálicos com aminoácidos [52]. Neste presente texto, os trabalhos mais relevantes sobre a cinética de complexos de rutênio e aminoácidos serão apresentados quando pertinente.

1.4.2. Os Agentes Redutores e suas Interações com Compostos de Rutênio

A investigação da interação de complexos metálicos com os principais agentes redutores que são encontrados no organismo é de fundamental importância para auxiliar o entendimento do mecanismo de atuação de um possível metalofármaco, uma vez que o íon metálico pode sofrer reações de oxido-redução quando é administrado ao paciente.

Os agentes redutores encontrados no organismo, também chamados de antioxidantes, podem ser produzidos pelo próprio corpo humano, como é o caso do tripeptídeo glutathiona, ou podem ser absorvidos pela dieta como é o caso do ácido ascórbico (vitamina-C) (Figura 6).

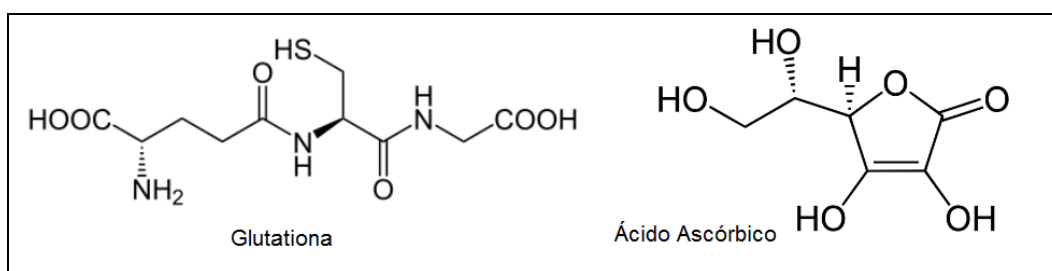


Figura 6 – Fórmulas estruturais da glutathiona e do ácido ascórbico

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo linear constituído por três aminoácidos (γ -ácido glutâmico, cisteína e glicina), sendo o grupamento tiol (-SH) o principal responsável pelas suas atividades biológicas. A GSH, peptídeo abundante de baixa massa molecular, é uma das principais fontes de tiol disponíveis no meio intracelular com concentrações que variam entre 0,1 e 10 mmol L⁻¹ [53].

O ácido ascórbico (H₂A) é comumente encontrado em nosso organismo na forma de íons ascorbato (HA⁻), e por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos ou no soro

sanguíneo, cujos níveis de concentração variam entre 10 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O íon ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo íons metálicos [como Fe(III) e Cu(II)] presentes nos sítios ativos das enzimas ou em outras formas no organismo [54,55].

Alguns trabalhos de revisão bibliográfica, já citados aqui, fazem referência às interações de diferentes complexos de rutênio com os agentes redutores glutatona e ácido ascórbico [6,7,15,20]. Abaixo são destacados alguns trabalhos relevantes sobre este tópico, que abordam principalmente sobre cinética e mecanismo de reação.

Estudos eletroquímicos do NAMI-A na presença da GSH foram realizados com foco no mecanismo da reação de transferência de elétrons, Ru(III)/Ru(II), e em reações de substituição de ligantes para tentar explicar sua atividade como “pró-droga” [56].

A cinética da reação de redução do NAMI-A com ácido ascórbico e com íons ascorbato (HA^- e A^{2-}) foi investigada em diferentes condições experimentais, incluindo as fisiológicas. Os resultados indicaram que o complexo é rapidamente reduzido, e em seguida ocorrem sucessivas reações de dissociação de seus ligantes cloreto; porém os ligantes axiais (dmsO e imidazol) permanecem coordenados ao complexo. Além disso, a formação do íon ascorbato (A^{2-}) é a etapa determinante da reação de redução; uma vez formado, este íon reage rapidamente com o NAMI-A ($1,4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, 10 °C), enquanto que a reação com HA^- é um pouco mais lenta ($2,5 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, 10 °C) [57]. A reação do NAMI-A com esse agente redutor, também foi investigada por espectroscopia de ressonância paramagnética, porém nenhum dado cinético adicional foi divulgado [58].

Estudos *in vitro* com células KB de metástase indicaram que a atividade do NAMI-A não sofre alteração na presença ou ausência dos agentes redutores GSH ou ácido ascórbico, porém resultados *in vivo*, em ratos com carcinoma mamário (MCa), mostrou que a presença desses agentes redutores, mesmo em quantidades equimolares, aumenta significativamente a ação do complexo [59]. Outro estudo similar, também foi publicado recentemente com o composto KP1019; os resultados foram bastante semelhantes aos observados

para o NAMI-A, ou seja, a presença do ácido ascórbico na solução do complexo aumenta a sua atividade citotóxica [60].

Um estudo sistemático sobre o comportamento redox de diferentes complexos de Ru(III) (KP1019, KP418: $(\text{H}_2\text{im})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Him})_2]$ e KP1339: $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{Hind})_2]$) foi realizado com a glutatona e o ácido ascórbico usando técnicas de RMN e voltametria de onda quadrada. Os estudos mostraram que esses agentes são capazes de reduzir os complexos em condições fisiológicas, porém nenhum parâmetro cinético de reação foi divulgado [61].

As interações do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ com o aminoácido cisteína e o agente redutor GSH foram investigadas por voltametria cíclica, UV-Vis, RMN e EPR. Os resultados sugerem que os grupamentos tiol presentes nos dois nucleófilos são os responsáveis pelas suas interações com o complexo, as quais envolvem reações reversíveis de cinética rápida e constante de equilíbrio cinético da ordem de $10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ [62].

A cinética e o mecanismo da reação do complexo $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{edta})(\text{pz})]^-$ com o aminoácido cisteína e o agente redutor GSH também foi investigado por UV-Vis usando a técnica de cinética rápida *stopped-flow*. Os resultados cinéticos ($k \approx 5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, 25°C) em conjunto com os parâmetros de ativação ($\Delta H^* \approx 50 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^* \approx -50 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e $\Delta V^* \approx +6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) sugerem que a reação de redução do complexo segue um mecanismo de esfera externa, ou seja, sem quebra ou formação intermediária de ligação química [63].

1.4.3. A Albumina de Soro Humano e suas Interações com Compostos de Rutênio

A albumina é a proteína mais abundante no organismo e a principal proteína solúvel constituinte do sistema circulatório. Em indivíduos normais, a albumina de soro humano (HSA) está presente em concentração da ordem de 40 mg mL^{-1} ($\sim 0,6 \text{ mmol L}^{-1}$). Esta proteína desempenha uma variedade muito grande de papéis no meio biológico; contribuindo com 80% da pressão osmótica sanguínea e sendo essencialmente responsável pela manutenção do pH do sangue. Uma notável propriedade desta proteína é a sua capacidade de ligar-se, reversivelmente, a uma incrível variedade de moléculas [64].

A estrutura primária da HSA é constituída de uma única cadeia polimérica que contém 585 resíduos de aminoácidos totalizando uma massa molar aproximada de 66 kD. Essa cadeia polimérica pode ser dividida em nove alças (L1 a L9) sendo separadas por três grandes domínios (I, II e III) que por sua vez são divididos em dois conjuntos de subdomínios (A e B), perfazendo os seis subdomínios IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB.

A sua estrutura secundária é constituída predominantemente por α -hélice (67%), com pequenas contribuições de β -folhas (23%) e randômica (10%). As α -hélices são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os oxigênios e nitrogênios das carbonilas e amins da mesma cadeia peptídica; as estruturas β -folhas também são estabilizadas por ligações de hidrogênio e nitrogênio, porém são formadas com os aminoácidos da outra cadeia peptídica. Já a estrutura terciária da HSA tem a forma semelhante à de um coração com medidas aproximadas a um triângulo equilátero com 80 Å de lados e 30 Å de largura [65].

A estrutura da HSA também pode ser dividida em seis regiões, chamadas de sítios de ligação, os quais estão separados de acordo com a afinidade de seus ligantes: sítio I (localizado no subdomínio IIA, tem preferência por ânions heterocíclicos pequenos); sítio II (localizado no subdomínio IIIA, tem preferência por ácidos carboxílicos aromáticos); sítios III e IV (afinidade por ácidos graxos de cadeia longa); sítio V (localizado no subdomínio IA, região onde está o aminoácido Cis34, tem preferência por íons metálicos moles como Au, Ag, Hg e Cd); e o sítio VI (também chamado de N-terminal, está localizado no início da cadeia polimérica e apresenta a sequência dos três aminoácidos (Asp-Ala-His) e que tem afinidade por íons metálicos como o Cu e Ni [47,50]. Para maiores detalhes sobre cada um desses sítios de ligação da HSA, um trabalho de revisão bibliográfica sobre a HSA foi publicado por Kragh-Hassen e col. em 2002 [66]. Na Figura 7 é apresentada a estrutura terciária da HSA assim como a localização dos seus respectivos subdomínios [67].

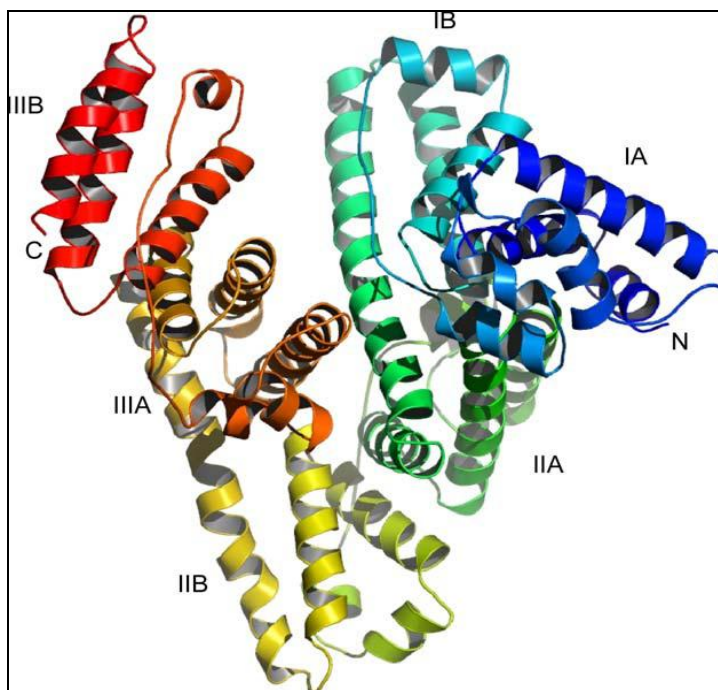


Figura 7 – Estruturas terciária e secundária (identificada pelas diferentes cores) da HSA. As letras N e C indicam a localização dos sítios terminais.

Alguns estudos, utilizando diferentes técnicas instrumentais, têm sido realizados com a finalidade de investigar as interações da albumina com diferentes complexos de rutênio [68,69,70,71,72]. Abaixo são destacados alguns trabalhos relevantes para este texto.

Em uma das teses de doutorado de nosso grupo de pesquisa, defendida em 2009 [47], verificou-se que compostos de dirutênio(II,III) complexados com os FAINES ibuprofeno, diclofenaco e sulindaco, além de um composto de rutênio(II) complexado com o FAINÉ meloxicam, possuem grande afinidade pela HSA. Estudos com uso das técnicas de fluorescência e de dicroísmo circular possibilitaram o cálculo das constantes de ligações e a análise das modificações causadas na estrutura secundária da proteína na presença dos complexos.

Estudos de voltametria cíclica com uma série de compostos antitumorais de rutênio(III), incluindo o NAMI-A e KP1019, indicaram que o núcleo metálico desses compostos permanecem com o mesmo número de oxidação após ligarem-se à HSA [73], mesmo na presença de agentes redutores como o ácido ascórbico [58]. Em outro estudo, verificou-se que a forma reduzida do NAMI-A também pode-se ligar à HSA formando adutos estáveis [74].

O comportamento de diferentes complexos de rutênio(III), incluindo o NAMI-A e o KP1019, na presença da HSA [58,75] também foi investigado pela técnica de EPR. Os resultados sugeriram três propostas para o NAMI-A quanto à ligação à HSA [58]. Na primeira, o ligante equatorial dmsO é substituído por uma molécula de água, que em seguida é trocada por um resíduo de histidina da HSA. Na segunda proposta, o ligante dmsO permanece na estrutura do complexo, enquanto que a substituição envolve um dos ligantes axiais cloreto. Já na terceira hipótese, o ligante dmsO é substituído diretamente pela molécula de HSA através da coordenação por um resíduo de cisteína. Apesar da reação entre o NAMI-A e HSA ter sido monitorada em função do tempo, nenhum parâmetro cinético foi divulgado. Estudos eletroquímicos para o aduto formado NAMI-A:HSA na presença do agente redutor ácido ascórbico mostraram que o núcleo metálico do complexo não é reduzido quando ele já está coordenado à HSA, confirmado os resultados obtidos anteriormente [73,74]

A interação de novos complexos de rutênio(II), coordenado com diferentes ligantes iminas, com a HSA foi investigada por espectroscopia de fluorescência. A partir dos resultados da supressão da fluorescência foi possível estimar a constante de ligação, cuja ordem de grandeza foi de $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ [76].

Um grande número de compostos organometálicos de rutênio(II) contendo em sua estrutura anéis benzênicos tem sido sintetizados e as suas atividades antitumoral e antimetastática investigadas [1,15]. Na Figura 8 encontram-se exemplos da típica estrutura desses complexos. Abaixo são descritos alguns dos trabalhos mais relevantes que focam na interação com a albumina do soro humano.

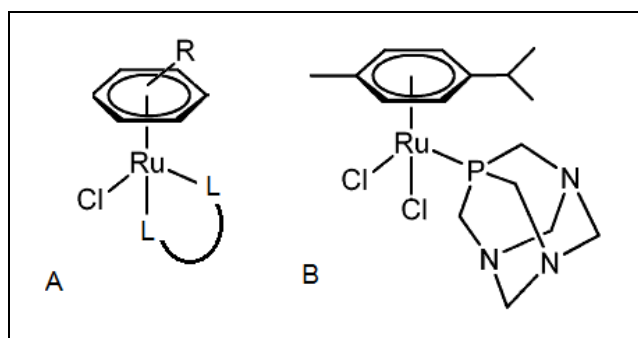


Figura 8 – Típica fórmula estrutural dos complexos areno de rutênio(II) (A) e do RAPTA-C (B)

As interações da HSA com de diferentes arenos de rutênio(II) contendo cloroquinona, difosfato e etilenodiamina foram investigadas utilizando técnicas de espectroscopia UV-Vis e de dicroísmo circular, além de titulações isotérmicas de calorimetria. Os resultados sugeriram que, em alguns casos, essa interação ocorre através de ligações coordenadas irreversíveis provocando grandes alterações na estrutura da proteína, e que para outros complexos a ligação pode ser reversível na presença de agentes quelantes [77].

Um artigo sobre a interação da HSA com três análogos de areno-rutênio(II) foi publicado recentemente (2011) e relata alguns estudos preliminares em eletroforese capilar sobre a velocidade e estabilidade desta interação. Nenhum parâmetro cinético foi divulgado [78].

A interação de complexos areno-rutênio(II) com a HSA foi examinada usando as técnicas de espectroscopia UV-Vis [79] e espectroscopia de fluorescência e infravermelho (FTIR) [80]. A partir dos resultados obtidos foi possível calcular diferentes parâmetros termodinâmicos e concluir que: i) a reação é espontânea ($\Delta G < 0$); ii) interações hidrofóbicas são as principais responsáveis pela interação do complexo com HSA; iii) dois principais mecanismos (dinâmico e estático) estão envolvidos no processo de supressão da fluorescência.

A ligação da HSA com o complexo RAPTA-T foi investigada por cromatografia líquida de exclusão de tamanho e comparada com a interação da HSA com a cisplatina. Os resultados indicaram que o complexo de rutênio é mais seletivo que a cisplatina [81].

Uma série de arenos de rutênio(II) contendo diferentes ligantes bidentados com HSA foram estudados por técnicas de espectroscopia (fluorescência e FTIR), eletroforese em gel e métodos hidrodinâmicos. Os resultados indicaram que todos esses complexos interagem rapidamente com a HSA com constantes de ligação na ordem de $10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ [82].

Um estudo da interação de dois arenos de rutênio(II) com diferentes peptídeos recombinantes da albumina humana, utilizando-se técnicas de espectrometria de massas e modelagem computacional, constatou-se que a ligação dos compostos a albumina humana podem envolver três diferentes resíduos de histidina (His128, His247 e His510), metionina (Met298), ou cisteína (Cys34). Além disso, foi constatado que a ligação desses complexos à albumina humana pelo resíduo His128 é favorecida cineticamente e termodinamicamente [83].

1.5. Ciclodextrinas

No que diz respeito à administração de drogas, principalmente por *via* oral, tem-se observado a busca por metodologias que possam eliminar ou minimizar problemas como, por exemplo, a decomposição do fármaco antes de atingir o alvo desejado no organismo; a baixa permeação através da membrana celular; a baixa solubilidade em meio aquoso; a alta absorção acarretando uma elevada concentração momentânea no sangue [84]. Uma maneira de contornar esses problemas é fazer encapsulamento ou inclusão da droga, visando aumentar a biodisponibilidade, o tempo de residência e a permeabilidade celular das substâncias bioativas [85].

O desenvolvimento de estratégias para aumentar a seletividade dos fármacos anticancerígenos pelo tumor também é bastante desejável. Alguns fármacos utilizados clinicamente, inclusive a cisplatina, são distribuídos tanto para o tecido saudável como para o canceroso. Como estes fármacos sofrem reações não seletivas com várias biomoléculas, efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, normalmente são observados [86]. Uma das maneiras de facilitar o transporte da droga e aumentar a sua seletividade e conseqüentemente melhorar a sua captação no tumor, é a formação de complexos de inclusão.

Um substrato que vem despertando grande interesse na comunidade científica e na química de macromoléculas nas últimas décadas é a ciclodextrina. Devido a sua cavidade hidrofóbica, a ciclodextrina pode formar compostos de inclusão do tipo hóspede-hospedeiro servindo como um ambiente único para reações químicas, as quais podem fazer com que as propriedades de suas moléculas “convidadas” sejam alteradas [87].

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, carboidratos complexos, formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações $\alpha(1,4)$ glicosídicas. Elas foram isoladas em pequenas quantidades em 1891 com o *Bacillus amylobacter*, sendo então produzidas industrialmente, atualmente, por ação de enzimas denominadas de ciclodextrinas glicosiltransferases (CGTases) sobre o amido [88].

As principais ciclodextrinas de ocorrência natural são as α -, β - e γ -ciclodextrinas, que possuem 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente

(Figura 9), no entanto, evidências indicam da existência de ciclodextrinas naturais com um número elevado de glicose, δ -, ϵ -, ζ - e η - (9-12 monômeros) [89].

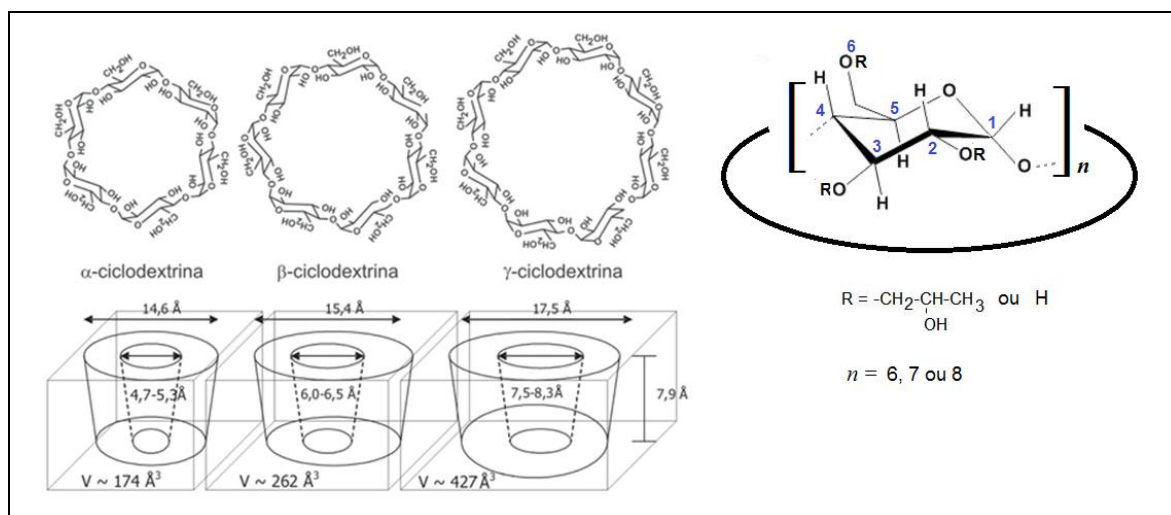


Figura 9 – Representação da estrutura das principais ciclodextrinas, e a sua unidade de repetição (glicose), onde R pode ser um próton (H) ou o grupamento hidroxipropil (HP).

A estrutura básica das ciclodextrinas tem formato de tronco cônico, no qual a cavidade interna é apolar (lipofílica) e a superfície externa polar (hidrofílica). Esta característica pode ser explicada devido à orientação do hidrogênio nas ligações glicosídicas (C-H) que estão direcionadas para a parte interna da cavidade, enquanto que as hidroxilas primárias e secundárias estão direcionadas para a parte externa, conferindo o seu caráter altamente polar [90].

As principais interações nos compostos de inclusão são forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, e são elas as responsáveis por proporcionar a melhora da solubilidade aquosa de drogas hidrofóbicas [91]. Em solução, a molécula “convidada” pode estar inteiramente ou parcialmente incluída na cavidade da ciclodextrina, sendo então o composto de inclusão solvatado ou rodeado por moléculas do solvente. No estado cristalino, a molécula “convidada” pode estar localizada, não somente dentro da cavidade da ciclodextrina, mas também nos espaços intersticiais na rede cristalina do sólido. As moléculas incluídas normalmente ficam orientadas de modo que se alcance o máximo contato entre a sua parte hidrofóbica e a cavidade da ciclodextrina de natureza apolar [91].

As possibilidades de uso farmacêutico das ciclodextrinas são numerosas. Entre elas podemos citar o aumento da estabilidade física e química,

eliminação de odores e sabores dos fármacos, e sem dúvida a principal vantagem dos compostos de inclusão é o aumento da solubilidade aquosa de fármacos poucos solúveis e o aumento da biodisponibilidade [90], que é o grau e velocidade de absorção de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica para dentro da circulação sanguínea. Os principais fatores físico-químicos que podem afetar a biodisponibilidade total de um fármaco são: solubilidade, estabilidade, tamanho da partícula, pK_a , pH e coeficiente de partição [92].

Muitos derivados de ciclodextrinas naturais têm sido sintetizados a partir da substituição da hidroxila secundária por diferentes grupamentos, como o metil, etil, propil e hidroxipropil. No caso particular, o derivado hidroxipropil- β -ciclodextrina possui uma solubilidade aquosa superior a do seu correspondente natural [93].

A maioria das ciclodextrinas é metabolizada no cólon pelas bactérias da flora intestinal sendo a água e dióxido de carbono os principais produtos de sua degradação. Estudos de toxicidade mostraram que as β -ciclodextrinas e alguns dos seus derivados são moléculas seguras, quando administradas oralmente, porém por via parenteral pode apresentar pequena toxicidade dependendo do seu derivado [94].

Levando-se em consideração todos esses benefícios e propriedades das ciclodextrinas, justifica-se a investigação da possibilidade de formação de compostos de inclusão com os complexos tetracarboxilatos de rutênio-FAINEs, os quais são insolúveis em meio aquoso.

1.5.1. Interações das Ciclodextrinas com Complexos de Rutênio e com FAINES.

As ciclodextrinas são utilizadas com uma grande diversidade de aplicações e em diferentes áreas de atuação [89,95,96,97,98], além da farmácia [90,99,100,101,102,103]. Porém são poucos os trabalhos encontrados na literatura sobre sua interação com complexos de rutênio para possível aplicação biológica. Abaixo são relatados os estudos encontrados sobre interações de complexos de rutênio com ciclodextrinas com foco na aplicação farmacêutica.

Levando em consideração os recentes avanços dos complexos metálicos de rutênio e as diferentes propriedades da β -ciclodextrina, um novo

material luminescente foi sintetizado. No caso, o complexo $[Ru^{II}(phen)_3]$ foi ancorado ou imobilizado nas extremidades da ciclodextrina, e os resultados indicaram que esta nova espécie pode interagir com o DNA modificando a sua conformação, além de ser um potencial inibidor enzimático de DNA [104]. Em outro trabalho, as propriedades citotóxicas deste mesmo complexo imobilizado, e também incluído, com β -ciclodextrina foram investigadas. Os resultados, bastantes promissores, indicaram que esses novos materiais inibem o crescimento de diferentes bactérias (*Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Enterococcus* e *Staphilococcus*) [105].

Por fim, outro trabalho relata o preparo de um novo material híbrido contendo um complexo de rutênio(II) coordenado com a glicina incluído em β -ciclodextrina natural e em mais três derivados sintéticos. Os quatro compostos de inclusão foram preparados com razão estequiométrica e as suas atividades citotóxicas e antiproliferativas foram investigadas em células humanas de osteosarcoma MG-63 [106].

Quanto aos compostos de inclusão de ciclodextrinas e FAINEs, são relatados a seguir alguns dos trabalhos relevantes com os fármacos Hibp e Hcet.

Existem diversos estudos, empregando variadas técnicas de preparo, que relatam compostos de inclusão de ibuprofeno e β -ciclodextrina com diferentes razões molares. Sólidos de estequiometria (1:1) (Hibp: β CD) que foram preparados em solução aquosa e depois isolados por eliminação do solvente por diferentes técnicas de secagem (fluxo de ar, *spray-drying* e liofilização) apresentaram distintos comportamentos nos estudos de liberação, em função das características das partículas, que são dependentes do método de preparo do material [107]. Já um composto de inclusão de 2:3 (Hibp: β CD) apresentou solubilidade 12 vezes maior do que o ibuprofeno original. Além disso, estudos de biodisponibilidade em ratos indicaram que o composto de inclusão apresentou o pico de concentração plasmática mais rápida que o fármaco isolado, apesar da absorção total do fármaco ser igual para os dois casos [108].

Compostos de inclusão entre ibuprofeno, cetoprofeno e naproxeno com a β -ciclodextrina natural e seus derivados sintéticos (metil, hidroxietil e hidroxipropil) foram preparados em solução e também no estado sólido (em razões equimolares) pela técnica de co-liofilização em solução aquosa de amônia.

Os diferentes materiais híbridos foram caracterizados por diferentes técnicas e o resultado do estudo da solubilidade determinou que a constante de associação do fármaco:ciclodextrina ($K_{1:1,ibp} > K_{1:1,npX} > K_{1:1,cet}$) está diretamente relacionada com a lipofilicidade da droga [109]. Outro trabalho sobre a inclusão dos fármacos ibuprofeno e cetoprofeno em β - e HP β - ciclodextrina confirmou também que a lipofilicidade do fármaco está diretamente relacionada à sua inclusão na cavidade da ciclodextrina. Os parâmetros termodinâmicos da reação apresentaram uma grande correlação com a lipofilicidade dos fármacos [110].

No caso do ibuprofeno, estudos sugerem que apenas a porção aromática deste fármaco fica incluída na cavidade da ciclodextrina, enquanto que o grupamento carboxílico fica localizado na parte externa da cavidade [111,112].

Compostos de inclusão do ibuprofeno com β - e metil- β - ciclodextrina no estado sólido foram isolados em proporções equimolares por diferentes técnicas (moagem, *kneading*, aquecimento fechado e co-liofilização). Estudos indicaram que a técnica pode influenciar as propriedades de dissolução, sendo que os materiais obtidos por co-liofilização e aquecimento fechado apresentaram as melhores propriedades [113].

Compostos de inclusão de ibuprofeno: β -ciclodextrina de razões molares 1:3 e 2:3 foram isolados pelas técnicas de co-precipitação (evaporação e centrifugação), liofilização e nebulização (*spray-drying*). Experimentos de dissolução em solução aquosa indicaram que a principal diferença das propriedades dos materiais, não está relacionada à razão molar empregada e sim ao método de preparado da amostra sólida. Entre os métodos utilizados, a liofilização, foi o que apresentou os melhores resultados para a dissolução do fármaco [114]. Outro composto de inclusão ibuprofeno: β -ciclodextrina (1:3) foi preparado por meio de técnicas convencionais (co-precipitação e liofilização) e também pela *deposição de partícula controlada (CPD)* por fluídos supercríticos. Apesar do baixo rendimento de inclusão (< 50%) para o material preparado pela técnica CPD, o resultado da dissolução do fármaco foi melhor em relação às outras técnicas empregadas [115].

2. OBJETIVOS

Com o advento da Química Medicinal, a química inorgânica tem exercido um papel cada vez mais relevante no âmbito da farmacologia e da medicina, principalmente no desenvolvimento de novos metalofármacos. Neste contexto, a meta deste trabalho foi gerar uma contribuição significativa na área da bioinorgânica, no que se refere ao desenvolvimento de novos complexos de dirutênio, com ligações metálicas múltiplas, e antiinflamatórios não-esteróides para possível aplicação como metalofármacos antitumorais.

Os *objetivos principais* foram: (i) sintetizar os metalofármacos de dirutênio(II,III) com FAINEs; (ii) investigar estabilidade, reatividade e interação destes complexos com moléculas de interesse biológico; e (iii) preparar novos materiais híbridos destes complexos com ciclodextrinas.

O trabalho teve os seguintes *objetivos específicos*: (i) síntese do complexo precursor $[Ru_2(O_2CCH_3)_4Cl]$ e do complexo de dirutênio(II,III) contendo o fármaco ibuprofeno; (ii) desenvolvimento de metodologias sintéticas para a obtenção de complexos inéditos, contendo os fármacos cetoprofeno e fenbufeno; (iii) caracterização de todos os complexos sintetizados utilizando diferentes técnicas instrumentais; (iv) avaliação de parâmetros termodinâmicos do equilíbrio entre os ligantes água e cloreto do complexo precursor; (v) avaliação da cinética e do mecanismo da reação entre o complexo precursor, aminoácidos (glicina, histidina, cisteína e triptofano) e agentes redutores (glutaciona e ácido ascórbico); (vi) investigação da interação dos complexos com a biomolécula albumina empregando-se diferentes técnicas instrumentais e (vii) desenvolvimento de novos materiais híbridos dos complexos dirutênio(II,III)-FAINEs com ciclodextrina utilizando o método de nebulização (*spray-drying*).

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Reagentes e Solventes

- Acetona, grau de pureza p.a. – Synth
- Acetonitrila, grau de pureza p.a. – Synth
- Ácido α -metil-4-isobutil-fenil acético (ibuprofeno) – Natural Pharma Produtos Farmacêuticos Ltda.
- Ácido 2-(3-benzoilfenil)-propiónico (cetoprofeno) – Sigma Aldrich
- Ácido 3-(4-bifenilcarbonil)-propiónico (fenbufeno) – Sigma Aldrich
- Ácido acético, grau de pureza p.a. – Merck
- Água destilada (utilizada nos ensaios) – Purelab Máxima
- Água deuterada – ampola de 1mL, pureza 99,96% – Sigma Aldrich
- Albumina de soro humano, grau de pureza 96-99% – Sigma Aldrich
- Anidrido acético, grau de pureza p.a. – Merck
- Brometo de potássio, pureza espectroscópica, PIKE Tecnologia
- Cisteína, grau de pureza p.a. – Sigma Aldrich
- Cloreto de cálcio anidro, grau de pureza para dessecador, Synth
- Cloreto de lítio – grau de pureza 99% - Sigma Aldrich
- Cloreto de rutênio(III) hidratado – Sigma Aldrich
- Cloreto de sódio, grau de pureza p.a. – Synth
- Clorofórmio, grau de pureza p.a. – Merck
- Dimetilsulfóxido, grau de pureza p.a. – Synth
- Etanol, grau de pureza p.a. – Synth
- Éter dietílico, grau de pureza p.a. – Synth
- Fosfato dibásico de sódio anidro, grau de pureza p.a. – Synth
- Fosfato monobásico de sódio anidro, grau de pureza p.a. – Synth
- Gás nitrogênio, grau de pureza industrial – White Martins
- Gás oxigênio, grau de pureza medicinal – White Martins
- Glicina, grau de pureza p.a. – Sigma Aldrich
- Hidroxi-propil- β -ciclodextrina – grau de substituição 1 – Sigma Aldrich
- Histidina, grau de pureza p.a. – Sigma Aldrich
- Metanol, grau de pureza p.a. – Synth

- N,N-dimetilformamida, grau de pureza p.a. – Synth
- Pentóxido de fósforo – Vetec Química
- Solução de cloreto de potássio, padrão de condutividade 146,9 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e 1412 $\mu\text{S cm}^{-1}$ – Digimed
- Triptofano, grau de pureza p.a. – Sigma Aldrich

3.2. Materiais

- Almofariz de ágata;
- Cubeta de quartzo cilíndrica (QS), caminho óptico de 0,1 cm – Jasco
- Cubeta de quartzo cilíndrica (QS), caminho óptico de 1 cm – Jasco
- Cubeta de quartzo retangular (QS), caminho óptico 0,1 cm – Hellma
- Cubeta de quartzo retangular (QS), caminho óptico 1 cm – Hellma
- Filtros Millex® HV não estéril 33 mm, PVDF 0,22 e 0,45 μm – Millipore
- Pipetas automáticas de 10, 20, 100, 200, 1000 e 5000 μL – Pipetman, Gilson,
- Vidrarias em geral.

3.3. Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento, modelo 752A – Fisatom
- Aquecedor para rotaevaporador (banho de água), modelo B-481, Büchi
- Balança analítica, modelo A4420 – Shimadzu
- Bomba de vácuo, modelo B48, Weg
- Condutivímetro, modelo DM-31 – Digimed
- Estufa, modelo A-HT – Fanem
- Incubadora, modelo TE420 – Tecnal
- Medidor de pH, modelo DM-20 – Digimed
- Minispray-dryer, modelo B-290, Büchi
- Purificador de água MilliQ, Purelab Máxima – Elga
- Refrigerador, modelo Doublé DC440 – Eletrolux
- Rotaevaporador, modelo R-124 – Büchi
- Sonicador, modelo 8893, Cole-Parmer
- Vortex/Mixer, modelo KMC-1300V, Vision Scientific Co.

3.4. Técnicas e Aparelhos Utilizados

3.4.1. Análise Elementar e Espectroscopia de Emissão Atômica com plasma induzido (ICP-AES)

Os percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e cloro foram determinados por análise elementar no equipamento Elementar Analyzer CHN, modelo 2400 da Perkin-Elmer. O percentual de rutênio foi determinado por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) no equipamento Spectro Ciros CCD. As medidas foram realizadas no laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

3.4.2. Espectroscopia Eletrônica em Solução

Os espectros eletrônicos de absorção dos compostos em solução foram registrados em diferentes aparelhos de acordo com o ensaio realizado. A saber: (i) Shimadzu, UV-1650PC; (ii) Shimadzu, UV 250 e UV 2101 PC, ambos equipado com banho termostático; (iii) Shimadzu UV 2101 PC equipado com célula customizada para altas pressões, conforme descrito na literatura [116,117]. Esses equipamentos pertencem ao Departamento de Química e Farmácia da Friedrich-Alexander Universität Erlanger-Nürnberg (Alemanha), com exceção do primeiro espectrofotômetro que pertence ao nosso grupo de pesquisa. As cubetas utilizadas foram de quartzo retangular convencional com caminho óptico de 0,1 cm e 1,0 cm, de quartzo do tipo *Tandem* (com dois compartimentos para solventes e caminho óptico total de 1,0 cm), e/ou cubeta de quartzo do tipo *pill-box*, usada para altas pressões e caminho óptico de 1,6 cm.

Para os ensaios de cinética rápida foi utilizado o equipamento de *stopped-flow* SW 18.MV Applied Photophysics acoplado ao detector J&M de leitura rápida (*rapid scan*), ou equipado com uma célula customizada para altas pressões conforme descrito na literatura [118], ambos pertencentes ao Departamento de Química e Farmácia da Friedrich-Alexander Universität Erlanger-Nürnberg (Alemanha).

3.4.3. Espectroscopia Eletrônica no Estado Sólido

Os espectros eletrônicos de absorção dos compostos no estado sólido foram registrados em um espectrofotômetro ASD-Analytical Spectral Devices,

modelo FieldSpec 3 Spectroradiometres, equipado com fibra óptica. Os espectros foram registrados para o intervalo de 350 a 2500 nm. Estes espectros foram obtidos no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do IQ-USP.

3.4.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) foram registrados (transmitância) em um aparelho ABB Bomem – MB séries, modelo 120. As amostras, no estado sólido, foram maceradas e misturadas com brometo de potássio em almofariz de ágata, e depois introduzidas no porta-amostras.

3.4.5. Espectroscopia Vibracional Raman

Os espectros vibracionais Raman dos compostos no estado sólido foram registrados no intervalo de 150 a 3100 cm^{-1} em um equipamento Raman Renishaw, modelo 3000, com sistema de detector CCD refrigerado termoeletricamente (Wright 600 x 400 pixels) e microscópio metalúrgico (Olympus). Empregou-se a linha de excitação de 632,8 nm com fibra óptica 1 e potência de 24 mW. Os registros foram efetuados no Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQ-USP.

3.4.6. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros ^1H RMN dos produtos híbridos com ciclodextrinas foram obtidos em equipamento de alta resolução, modelo BrukerDRX 500 operado a 500 MHz, pertencente ao Laboratório da Central Analítica do IQ-USP. As suspensões das amostras foram preparadas em água deuterada, filtradas em filtros Millex® 0,22 μm e as medidas realizadas à temperatura de 298 K. Como referência interna usou-se o sinal de próton da água fixando-se o descolamento em 4,60 ppm.

3.4.7. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados em um Espectropolarímetro JASCO (Jasco Corporation, Japão), modelo J-720, capaz de cobrir a região de 190 a 650 nm, pertencente ao Laboratório da Central Analítica

do IQ-USP. As soluções das amostras foram colocadas em cubetas de quartzo cilíndricas de 0,1 e 1,0 cm de caminho óptico.

3.4.8. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados em um equipamento de marca SPEX, modelo Fluor log2 com dois monocromadores duplos, sendo a emissão do feixe em *front face* utilizando lâmpadas de Xe de 450 W. A fenda de emissão foi de 1 e a de excitação de 2, sem a utilização de filtros. As soluções foram colocadas em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e o espectro registrado com passo de 1 nm. O experimento foi realizado no Laboratório dos Elementos do Bloco-f do IQ-USP.

3.4.9. Condutância Molar

As medidas de condutância molar foram efetuadas em um condutímetro Digimed, modelo DM-31, utilizando-se solução padrão de cloreto de potássio, condutância específica de $146,9 \mu\text{S cm}^{-1}$, e uma célula de constante $\kappa = 0,1 \text{ cm}^{-1}$, como padrão de referência para o uso de solventes orgânicos. As amostras foram dissolvidas em acetonitrila, metanol, dmf ou dmsO com concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e as medidas realizadas em temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.4.10. Susceptibilidade Magnética

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas utilizando-se o método de *Faraday*, com auxílio de uma balança CAHN, modelo DTL 7500. Como padrão utilizou-se o tetra(tiociano) cobaltato de mercúrio(II), $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$, que apresenta o valor de susceptibilidade (χ_p) tabelado em $16,44 \times 10^{-6}$ unidades CGS/Gauss a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\theta = +10^\circ$. As medidas da amostra, do padrão e da porta-amostra foram efetuadas em triplicatas, na presença e ausência de campo magnético (1 Tesla) e na temperatura de 25°C .

Os valores de susceptibilidade magnética das amostras foram estipulados com base no procedimento [27] descrito abaixo:

A partir dos valores de massas (~ 20 mg) da amostra e do padrão, calculou-se a medida da susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra (χ_a) de acordo com a equação (1):

$$\chi_a = \chi_p \left(\frac{\Delta_a - \delta_a}{\Delta_p - \delta_p} \right) \left(\frac{m_p}{m_a} \right) \quad (1)$$

Onde:

χ_a e χ_p = susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra e do padrão, respectivamente;

m_a e m_p = massa da amostra e do padrão, respectivamente;

Δ_a e Δ_p = diferença entre as massas da amostra (a) e padrão (b) com campo magnético e sem campo magnético;

δ_a e δ_b = diferença entre as massas do porta-amostra da amostra (a) e do padrão (p) com campo magnético e sem campo magnético.

Em seguida, o valor da susceptibilidade magnética molar da amostra (χ_M) pôde ser calculado utilizando-se a equação (2), sendo MM a massa molar da amostra:

$$\chi_M = \chi_a \times MM \quad (2)$$

Na sequência determinou-se o valor susceptibilidade magnética molar corrigida da amostra (χ'_M), equação (3), ou seja, levando-se em consideração a contribuição diamagnética de íons e ligantes presentes na amostra, sendo que as correções diamagnéticas foram estimadas usando-se as constantes de *Pascal* (Apêndice I) [119,120].

$$\chi_M = \chi'_M + \text{CorreçõesDiamagnéticas} \quad (3)$$

O valor do momento magnético efetivo da amostra (μ_{ef}) foi calculado utilizando-se a equação (4), sendo T = temperatura em Kelvin.

$$\mu_{ef} = 2,84 \sqrt{\chi'_M \times T} \quad (4)$$

Por fim, o número de elétrons desemparelhados da amostra (n) pode ser estimado pela equação (5):

$$\mu_{ef} = \sqrt{n(n+2)} \quad (5)$$

3.4.11. Análises Térmicas

As análises termogravimétricas (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram executadas no equipamento TG/DSC modelo STA PC Luxx, marca Netzsch, acoplado a um espectrômetro de massas QMS 403C Aeolos e um injetor de gases PulseTA, ambos também da marca Netzsch. As curvas TG/DSC e os espectros de massa dos principais gases formados (H_2O e CO_2) foram registrados em atmosfera de ar sintético ou nitrogênio com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até a temperatura de $1000\text{ }^\circ\text{C}$. As massas das amostras ($\sim 8\text{ mg}$) foram pesadas em cadinho de alumina.

3.4.12. Difratometria de Raios X

Os difratogramas de raios X usando-se método do pó foram obtidos em um difratômetro Rigaku, modelo Mini Flex, com ânodo de cobre (radiação $K\alpha = 1,541\text{ \AA}$). As varreduras foram feitas no intervalo de 2θ de 2 a 70° , com passo de $0,02^\circ$ entre cada ponto. As amostras sólidas foram espalhadas em lâminas de vidro e compactadas com a ajuda de espátulas e lâminas de vidro.

3.4.13. Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens da morfologia dos materiais híbridos contendo ciclodextrina foram registradas em um equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo de alta resolução, Nova NanoSEM400, fabricante PET Company com tensão de aceleração de 200 V a 30.000 V , corrente de prova: $0,3\text{ }\mu\text{A} - 22\text{ nA}$, largura de campo $3,9\text{ mm}$ a 5 mm de distância de trabalho. As amostras foram recobertas com filmes de ouro usando o equipamento Sputter Coater, modelo 5150B, Edwards, sendo o tempo de processo de 3 min , pressão da câmara de $0,2\text{ Torr}$, corrente 40 mA , taxa de deposição $\sim 70\text{ \AA min}^{-1}$ e argônio como gás de processo. O registro das imagens foi realizado no Laboratório de Sistemas Integrados da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

3.5. Sínteses dos Complexos Tetracarboxilatos de Dirutênio(II,III)

3.5.1. Síntese dos Complexos $[Ru_2(act)_4Cl]$ e $[Ru_2(ibp)_4Cl]$

O complexo precursor cloro*tetrakis*(acetato)dirutênio(II,III), $[Ru_2(O_2CCH_3)_4Cl]$, ou $[Ru_2(act)_4Cl]$, e o cloro*tetrakis*(ibuprofenato)dirutênio(II,III), $[Ru_2(ibp)_4Cl]$, foram sintetizados e caracterizados conforme procedimentos já descritos na literatura por nosso grupo de pesquisa [27].

3.5.2. Síntese do Complexo $[Ru_2(cet)_4Cl]$

O complexo inédito cloro*tetrakis*(cetoprofenato)dirutênio(II,III), $[Ru_2(cet)_4Cl]$, foi sintetizado de acordo com o seguinte procedimento. Em um balão de reação foi adicionado 0,30 g (0,63 mmol) do complexo precursor $[Ru_2(act)_4Cl]$ e 200 mL de água, a suspensão foi submetida à agitação magnética durante 30 min e filtrada. O volume da solução filtrada foi reduzido a aproximadamente 40 mL com o auxílio de um rotaevaporador. Em seguida adicionou-se ao filtrado uma solução contendo 0,76 g (3,0 mmol) do fármaco cetoprofeno em 40 mL de etanol, e uma solução contendo excesso de LiCl (0,37 g em 5,0 mL de água). O sistema foi mantido sob agitação, atmosfera de nitrogênio e aquecimento em "banho-maria" à temperatura de 60 °C, durante 3h. Após este período, retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*. O precipitado pastoso aderido ao fundo do balão foi lavado com água e posteriormente dissolvido com pequena quantidade de etanol absoluto. A solução resultante foi transferida para um béquer e o solvente foi eliminado sob fluxo de gás nitrogênio, na capela. O sólido marrom escuro obtido foi secado sob vácuo em um dessecador contendo pentóxido de fósforo, cloreto de cálcio e sílica-gel. Rendimento: 66%.

3.5.3. Síntese do Complexo $[Ru_2(fen)_4Cl]$

O complexo inédito cloro*tetrakis*(fenbufenato)dirutênio(II,III), $[Ru_2(fen)_4Cl]$, foi sintetizado de acordo com o seguinte procedimento. Em um balão de reação foi adicionado 0,15 g (0,32 mmol) de $[Ru_2(act)_4Cl]$ e 150 mL de água, a suspensão foi submetida à agitação magnética durante 30 min e depois filtrada. O volume da solução filtrada foi reduzido a aproximadamente 100 mL com o auxílio de um rotaevaporador. Em seguida adicionou-se ao filtrado uma solução

contendo 0,33 g (1,3 mmol) de fenbufeno em 100 mL de etanol, e uma solução contendo excesso de LiCl (0,20 g em 5,0 mL de água). O sistema foi mantido sob agitação em atmosfera de nitrogênio e aquecimento em "banho-maria" à temperatura de 60 °C, durante 4 h. Após este período, o sólido marrom claro formado foi isolado por filtração a vácuo, lavado com uma mistura de água:etanol 40:60 (v:v) e secado em um dessecador sob vácuo, contendo pentóxido de fósforo, cloreto de cálcio e sílica-gel. Rendimento: 76%.

3.6. Estudos Termodinâmicos da Reação de Substituição Axial para o Ru₂-act

As constantes do primeiro e do segundo equilíbrios (K_1 e K_2) das reações de substituições dos ligantes axiais água e cloreto do complexo precursor foram determinadas à temperatura de 25 °C e pressão ambiente através do seguinte procedimento: i) soluções aquosas de NaCl (0,001 a 0,4 mol L⁻¹, pH 5,0) foram misturadas ao complexo catiônico, [Ru₂(act)₄(H₂O)₂]PF₆, preparado previamente em solução aquosa com adição equimolar de AgPF₆ ao [Ru₂(act)₄Cl] (1 mmol L⁻¹, pH 5,0), em uma cubeta do tipo *Tandem*, sendo que a constante de equilíbrio (K_1) foi determinada monitorando as mudanças espectrais em 440 nm; ii) a segunda constante de equilíbrio (K_2) foi determinada monitorando as mudanças espectrais em 455 nm, utilizando um procedimento similar ao anterior, porém com soluções aquosas de NaCl variando de 0,1 a 2,0 mol L⁻¹.

Os parâmetros termodinâmicos, variação de entalpia (ΔH°) e variação de entropia (ΔS°), foram calculados para duas misturas de complexo:NaCl, 1:100 (mmol L⁻¹) e 1:500 (mmol L⁻¹) através do monitoramento espectral em função da temperatura (10-49°C). O parâmetro termodinâmico, variação de volume (ΔV°), foi determinado para duas misturas de complexo:NaCl, 0,5:50 (mmol L⁻¹) e 0,5:250 (mmol L⁻¹) através do monitoramento espectral em função da pressão (5-150 MPa). Os valores das constantes de equilíbrio, para cada temperatura e pressão, foram calculados a partir das equações (II.16 e II.19) (Apêndice II) e das absorvidades molares (ϵ) em $\lambda = 430$ e 440 nm das espécies diaqua-, aqua/cloro-, e dicloro-complexos, Tabela III-1 (Apêndice III).

3.7. Estudos de Interação com Aminoácidos e com Agentes Redutores

O comportamento cinético do complexo precursor Ru₂-act foi investigado na presença de diferentes aminoácidos – glicina (gli), triptofano (trp),

cisteína (cis) e histidina (his), assim como na presença de dois agentes redutores – ácido ascórbico (H₂A) e glutathiona (GSH).

Primeiramente, ensaios exploratórios da interação do complexo com cada aminoácido ou agente redutor foram realizados para verificar as alterações espectrais (290 – 620 nm) a fim de se escolher as melhores condições cinéticas (λ , temperatura e tempo). Para as reações de cinética lenta (gli, trp, e his) os espectros foram registrados em espectrofotômetro logo após as soluções (1 mL de cada reagente) terem sido misturadas em uma cubeta do tipo *Tandem*. Já para as reações de cinética rápida (cis, H₂A e GSH), as soluções foram injetadas diretamente no equipamento *stopped-flow* e os espectros eletrônicos e/ou a curva cinética em um dado comprimento de onda foram registrados.

A solução do complexo e dos ligantes foram preparadas em tampão acetato (20 mmol L⁻¹), o pH ajustado para 5,0 [121,122] e a temperatura mantida constante em todos os experimentos. As condições para cada reação com os aminoácidos (aa) e agentes redutores (ar) estão descritas a seguir: *glicina*: a) espectro monitorado durante os intervalos de 0-1 h e 1-10 h, 7,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e 3,5×10⁻² mol L⁻¹ (aa), 25 °C; b) curvas cinéticas registradas em 545 nm, 4,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (8-32)×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; *cisteína*: a) espectro monitorado durante o intervalo de 0-1 s, 1-30 s e 40-500 s, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e 2,0×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; b) curvas cinéticas registradas em 354 nm, 1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (1,0-4,5)×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 10 °C; c) curvas cinéticas registradas também em 460 nm, 1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (2,0-20,0)×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; *triptofano*: a) espectros registrados durante o intervalo de 0-1 h, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e 10,0×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; b) curvas cinéticas registradas em 545 nm, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (2,0-16,0)×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; *histidina*: a) espectro monitorado durante o intervalo de 0-300 s, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e 8,0×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; b) curvas cinéticas registradas em 350 e 545 nm, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (5,0-20,0)×10⁻³ mol L⁻¹ (aa), 25 °C; *glutathiona*: a) espectro monitorado durante o intervalo de 0-0,06 s e 0,06-0,2 s, 1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ (ar), 10 °C; b) curvas cinéticas registradas em 350 nm, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (4,0-10,0)×10⁻³ mol L⁻¹ (ar), 10 °C; c) curvas cinéticas registradas também em 425 nm, 2,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e (2,0-75,0)×10⁻³ mol L⁻¹ (ar), 10 °C; *ácido ascórbico*: a) espectro monitorado durante o intervalo de 0-6 s, 4,0×10⁻⁴ mol L⁻¹

(Ru₂-act) e $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (ar), 10 °C; b) curvas cinéticas registradas em 425 nm, $6,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Ru₂-act) e $(12,0-60,0) \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (ar), 10 °C.

As constantes de velocidades de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram calculadas baseadas em uma média de três curvas cinéticas independentes, a partir do melhor ajuste às suas respectivas equações simples ou dupla de crescimento exponencial, calculados no software OriginPro8® (OriginLab Corporation). Os parâmetros de ativação das reações com os agentes redutores também foram determinadas, levando em consideração a variação de k_{obs} em função da temperatura (10-35 °C) e pressão (10-130 MPa).

3.8. Estudos de Interação com a Proteína Albumina Humana (HSA)

3.8.1. Estudos de Espectroscopia Eletrônica

3.8.1.1. Cinética da Reação entre Ru₂-act e HSA

A interação entre o complexo Ru₂-act ($8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e a HSA ($8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi investigada cineticamente monitorando as variações espectrais (300 – 800 nm) logo após as duas soluções (1 mL cada) terem sido misturadas em uma cubeta do tipo *Tandem*. O experimento foi realizado à temperatura de 25°C em pH 5,0 (tampão acetato 20 mmol L⁻¹) e, também, em pH 7,4 (tampão fisiológico: NaH₂PO₄ 4 mmol L⁻¹, NaHCO₃ 2,5 mmol L⁻¹, e NaCl 100 mmol L⁻¹ [123]).

3.8.1.2. Constante de Ligação da Reação entre Ru₂-act e HSA

Soluções de HSA e Ru₂-act contendo diferentes razões molares (1:1 a 1:3) de HSA:Ru₂-act foram preparadas em tampão fisiológico (pH 7,4), misturadas em tubos *Eppendorf*®, e deixadas em uma incubadora com temperatura controlada (37 °C) por 2 h. Após este período de incubação, os espectros eletrônicos de cada mistura obtida, e também das soluções de HSA e Ru₂-act, foram registrados. A constante de ligação foi calculada a partir de diferentes regressões lineares considerando-se a variação do valor da absorbância correspondente a formação do produto (545 nm) e descontando-se as absorbâncias dos reagentes neste mesmo comprimento de onda.

As soluções dos reagentes foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: a partir de uma solução-mãe de Ru₂-act ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas soluções diluídas ($8 - 2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em 1,0 mL de tampão fisiológico (pH 7,4) e misturadas a 1,0 mL de HSA ($8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

3.8.2. Estudos de Dicroísmo Circular

As alterações conformacionais e estruturais da HSA foi investigada na presença dos complexos Ru₂-act, Ru₂-ibp e Ru₂-cet, e também dos fármacos Hibp e Hcet, por meio da espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular, monitorando-se as regiões do ultravioleta (190-260 nm) e do visível (300-600 nm).

As soluções de HSA ($1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em tampão fisiológico pH 7,4 e as soluções-mãe dos complexos Ru₂-ibp e Ru₂-cet ($4,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e dos fármacos Hibp e Hcet ($1,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em etanol; no entanto a solução-mãe do Ru₂-act ($2,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada em água destilada.

A partir dessas soluções-mãe, retiraram-se alíquotas que misturadas a 3,0 mL de HSA ($1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) seriam diluídas às seguintes faixas de concentrações: $1,5 - 30,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (fármacos) e $1,5 - 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (complexos). Vale lembrar que a porcentagem de etanol final em cada solução foi $\leq 2\%$, evitando assim a desnaturação da proteína devido ao solvente orgânico. Após a mistura, a solução final obtida permaneceu em uma incubadora com temperatura controlada (37 °C) por 24 h. Após este período de incubação, os espectros eletrônicos de dicroísmo circular foram registrados e os dados foram tratados no *software* Espectra Analysis-Jasco. Para os cálculos de porcentagem da estrutura α -hélice, β -folha e randômica da proteína, utilizou-se o programa K2d[®], disponível em formato on-line [124].

3.8.3. Estudos de Fluorescência

A interação da HSA com os complexos Ru₂-act, Ru₂-ibp e Ru₂-cet, e com os fármacos Hibp e Hcet, também foi investigada por espectroscopia eletrônica de fluorescência.

As soluções de HSA ($4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em tampão fisiológico pH 7,4 e as soluções-mãe dos complexos Ru₂-ibp e Ru₂-cet ($1,7 \times 10^{-3}$

mol L⁻¹) e dos fármacos Hibp e Hcet (4,0 × 10⁻³ mol L⁻¹) foram preparadas em etanol; no entanto a solução-mãe do Ru₂-act (6,5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹) foi preparada em água destilada. A partir dessas soluções-mãe, retiraram-se alíquotas que misturadas a 3,0 mL de HSA (4,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹) seriam diluídas às seguintes faixas de concentrações: 4 - 80 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ (fármacos) e 2 - 20 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ (complexos). Vale lembrar que a porcentagem de etanol final em cada solução foi ≤ 2%, evitando assim a desnaturação da proteína devido ao solvente orgânico. Após a mistura, a solução final obtida permaneceu em uma incubadora com temperatura controlada (37 °C) por 24 h. Após este período de incubação, os espectros eletrônicos de emissão de fluorescência para cada amostra foi registrado para o intervalo entre 315 e 500 nm, sendo empregados dois comprimentos de onda de excitação (280 e 295 nm). Por fim, para a realização dos diferentes cálculos de regressão, a intensidade da fluorescência foi corrigida para os efeitos de reabsorção e filtro interno, usando a equação (6):

$$F_{cor} = F_{obs} \times \exp\left[\frac{A_{em} + A_{ex}}{2}\right] \quad (6)$$

sendo F_{cor} e F_{obs} , as intensidades de fluorescência corrigida e observada, respectivamente; A_{em} e A_{ex} , as absorvâncias das amostras (supressor e HSA) nos comprimentos de onda de emissão e excitação, respectivamente [125].

3.9. Estudos de Interação com Ciclodextrinas

3.9.1. Preparo e Caracterização dos Materiais Híbridos com HPβCD

Os diferentes materiais híbridos foram preparados misturando-se a solução de HPβCD (10 mL água deionizada) com as soluções de Ru₂-ibp, Ru₂-cet, Hibp ou Hcet (todas com 90 mL de metanol), de forma a se obter as seguintes razões molares: 1:2 (Hibp:HPβCD; 0,031 g / 0,462 g); 1:1 (Hcet:HPβCD; 0,076 g / 0,462 g); 1:5 (Ru₂-ibp:HPβCD; 0,107 g / 0,770 g); 1:4 (Ru₂-cet:HPβCD; 0,128 g / 0,616 g). À solução de HPβCD, sonicada previamente por 20 min, adicionou-se a solução do complexo ou do fármaco. Esta mistura permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 3 h. Posteriormente, procedeu-se à

eliminação do solvente por secagem em Mini Spray-Dryer, sob as seguintes condições: temperatura de entrada (inlet): 125 °C; temperatura de saída (outlet): 45 °C; aspirador: 100% e bomba: 20%. Após a eliminação do solvente, as amostras foram mantidas em dessecador contendo cloreto de cálcio e sílica-gel. Rendimento em massa: Hibp:HP β CD (65%); Hcet:HP β CD (55%); Ru₂-ibp:HP β CD (66%); Ru₂-cet:HP β CD (60%).

As amostras designadas neste texto por misturas-físicas (MF) foram preparadas no estado sólido, com a mesma proporção em massa dos materiais híbridos descritos acima, macerando-as em almofariz de ágata.

Os materiais híbridos foram caracterizados por ICP-AES, UV-Vis, FTIR, Raio X, TG/DSC/MS, MEV e RMN.

3.9.2. Cálculo do Rendimento de Inclusão dos Materiais Híbridos

Para determinar o rendimento de inclusão para os materiais híbridos obtidos por *spray-drying* utilizou-se o método da lavagem com *n*-hexano descrito por Hussein e col. (2007) [115], com pequenas modificações.

As amostras foram pesadas em tubos Eppendorf® aos quais foram adicionados *n*-hexano (HP β CD:Hibp) ou *n*-hexano:clorofórmio (1:1, v/v) (HP β CD:Hcet, HP β CD:Ru₂-ibp, HP β CD:Ru₂-cet). As suspensões de cada frasco foram agitadas em Vortex® por ~1 min e sonicada por mais ~5 min. Na sequência a suspensão foi centrifugada a velocidade de 10.000 rpm por 10 min, sendo então o sobrenadante retirado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta *Pasteur*. O espectro eletrônico deste sobrenadante foi registrado utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico e monitorou-se a absorbância em ~ 260 nm (Hibp e Hcet) ou ~ 450 nm (Ru₂-ibp e Ru₂-cet). O sólido isolado na centrifugação foi colocado no dessecador com P₂O₅ para secagem durante 24 h. Após este período o mesmo foi dissolvido com uma mistura de etanol:água (8:1, v/v) para o registro do espectro eletrônico (cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico). A concentração das amostras foi determinada utilizando as suas respectivas absorvidades molares (ϵ) calculadas a partir de curvas de calibração (Apêndice III), e o rendimento de inclusão (η) foi determinado segundo a equação (7).

$$\eta = \left[\frac{\textit{quantidade incluída}}{\textit{quantidade livre} + \textit{quantidade incluída}} \right] \times 100 \quad (7)$$

3.9.3. Solubilidade Aquosa dos Materiais Híbridos

A solubilidade aquosa dos materiais híbridos foi investigada utilizando um método modificado do diagrama de solubilidade de fases proposto de Higuchi e Connors [126]. Resumidamente, amostras dos materiais híbridos foram pesadas em tubos Eppendorf® e adicionadas a 0,5 mL de água deionizada (pH ≈ 6). A suspensão de cada frasco foi agitada em Vortex® por aproximadamente 1 min e sonicada por mais 20 min. Na sequência, as suspensões ficaram incubando por 3 h (27 °C). Após esse período de equilíbrio, elas foram novamente agitadas em Vortex® e em seguida centrifugada à velocidade de 10.000 rpm por 10 min, sendo então o sobrenadante retirado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, e diluído para o registro do espectro eletrônico em cubeta de quartzo de 0,1 ou 1,0 cm de caminho óptico. A concentração da molécula “convidada” foi determinada utilizando as suas respectivas absorvidades molares (ϵ) calculadas a partir das curvas de calibração (Apêndice III). A solubilidade aquosa máxima obtida para as moléculas “convidadas” foi estimada a partir da reta obtida no diagrama de fases.

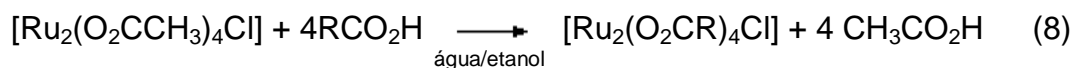
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mencionado na Introdução, os complexos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) são muito interessantes sob o ponto de vista estrutural em razão da variedade de arranjos que podem apresentar no estado sólido, e dos diferentes ligantes equatoriais e axiais que podem se coordenar ao núcleo dimetálico [166].

O complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$, $\text{Ru}_2\text{-act}$, está entre os principais materiais de partida para a síntese de novos compostos contendo unidades dimetálicas de $[\text{Ru}_2]$ de valência mista, seja pela troca dos ligantes equatoriais por outros carboxilatos, seja pela substituição dos ligantes axiais, no caso o cloreto, por outro haleto ou bases de Lewis. Neste trabalho, o $\text{Ru}_2\text{-act}$ foi utilizado como material de partida para os complexos derivados contendo FAINES.

4.1. Síntese e Caracterização dos Complexos $[\text{Ru}_2(\text{cet})_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{fen})_4\text{Cl}]$

Os resultados de análise elementar (C, H, Cl) e ICP-AES (Ru) para os novos complexos $\text{Ru}_2\text{-cet}$ e $\text{Ru}_2\text{-fen}$ são mostrados na Tabela 1. Esses dados são coerentes com a substituição dos quatro ligantes acetatos do complexo precursor pelos carboxilatos derivados dos FAINES, de acordo com a equação genérica (8) abaixo. No entanto, o resultado de %Ru para o complexo $\text{Ru}_2\text{-fen}$ sugere que a amostra possa conter impurezas de fármaco livre.



A quantidade de moléculas de água de hidratação, para esses dois complexos, foi estimada levando-se em consideração o melhor ajuste para os cálculos da análise elementar, e a sua confirmação foi obtida com o auxílio de técnicas termogravimétricas (conforme será relatado no item 4.1.6 a seguir).

Tabela 1 – Análises Elementares para os complexos $\text{Ru}_2\text{-cet}$ e $\text{Ru}_2\text{-fen}$.

Complexo	%C		%H		%Cl		%Ru	
	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
$[\text{Ru}_2(\text{cet})_4\text{Cl}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	59,5	59,7	4,4	4,4	3,2	2,8	14,5	15,7
$[\text{Ru}_2(\text{fen})_4\text{Cl}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	59,3	58,9	4,7	4,4	2,9	2,7	13,9	15,5

Testes qualitativos de solubilidade foram realizados em diferentes solventes orgânicos e água, e os resultados encontram-se na Tabela 2. Os dois complexos são insolúveis em água e o Ru₂-cet é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, enquanto que o Ru₂-fen é solúvel apenas em DMSO e DMF.

Tabela 2 – Testes de solubilidade dos novos complexos sintetizados

Solventes	Complexos	
	[Ru ₂ (cet) ₄ Cl]	[Ru ₂ (fen) ₄ Cl]
água	I	I
etanol e metanol	S	I
acetona	S	I
acetonitrila	S	I
clorofórmio	S	I
dmsso	S	S
dmf	S	S
propanol	P.S.	I
n-octanol	P.S.	I
éter etílico	P.S.	I
n-hexano	P.S.	I

(S) solúvel; (I) insolúvel; (P.S.) pouco solúvel

4.1.1. Espectros de Absorção Eletrônica

Os espectros eletrônicos dos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) são caracterizados principalmente por duas bandas: uma bem intensa na região do visível (~425-480 nm) que é atribuída à transição $\pi(\text{Ru-O,Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$, e outra banda, menos intensa, na região do infravermelho próximo (~960-1100 nm) atribuída à transição $\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$ [30].

Nos espectros eletrônicos dos complexos Ru₂-cet e Ru₂-fen no estado sólido (Figura 10) podem-se observar estas duas principais bandas, que fornecem fortes indícios da formação dos complexos propostos.

Os complexos do tipo [Ru₂(O₂CR)Cl] no estado sólido formam cadeias poliméricas, sendo o ligante axial (cloreto) o responsável pela ponte entre as duas unidades de [Ru₂]⁵⁺. No entanto, em solução a cadeia polimérica é quebrada e moléculas do solvente podem-se coordenar às posições axiais [1]. Em solventes não coordenantes, como o diclorometano, a principal banda do visível desloca-se para maior energia (~450 nm), se comparada com a do espectro no estado sólido, enquanto que em solventes coordenantes polares, como metanol, o deslocamento deste mesma banda é mais significativo (~430 nm). Em presença

de excesso de cloreto em solução, o espectro é semelhante aos dos sólidos (~470 nm). Com base nesses resultados, conclui-se que podem existir três cromóforos em solução, a espécie catiônica, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4(\text{S})_2]^+$, a neutra $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4(\text{S})\text{Cl}]$, e a aniônica, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}_2]^-$ [29].

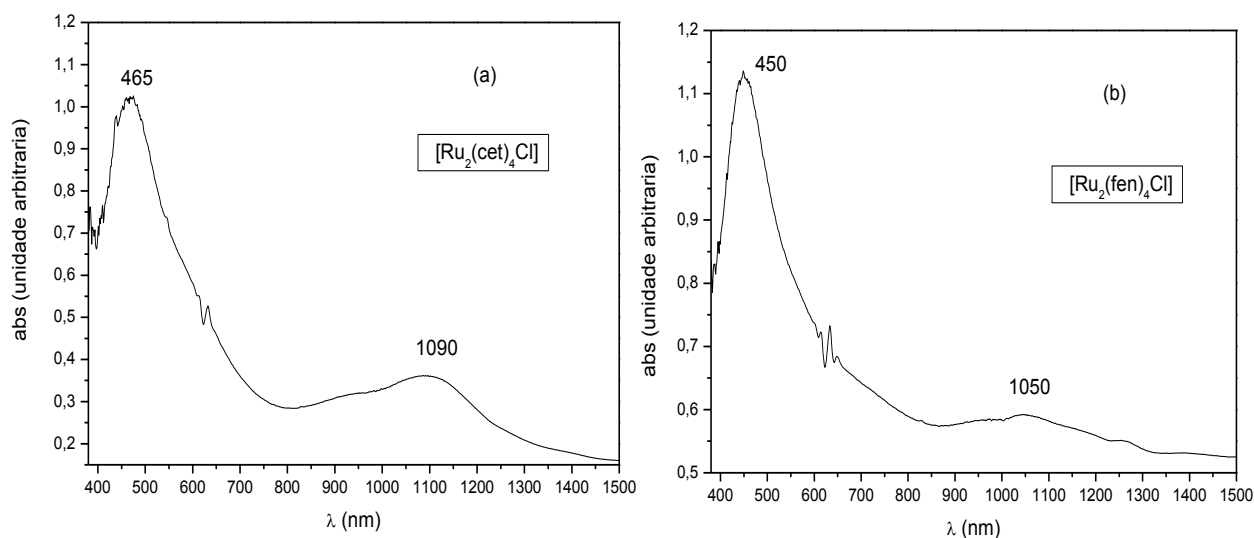


Figura 10 – Espectro Eletrônico dos complexos $[\text{Ru}_2(\text{cet})_4\text{Cl}]$ (a) e $[\text{Ru}_2(\text{fen})_4\text{Cl}]$ (b) no estado sólido

Os espectros eletrônicos do complexo Ru_2 -cet em solução de metanol (met) e acetonitrila (acn) (Figura 11), e do complexo Ru_2 -fen em dmsso e dmf (Figura 12), mostram que a banda do visível (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) é deslocada para menores comprimentos de onda, se comparada com os respectivos espectros no estado sólido (Figura 10); no entanto, em acetonitrila o deslocamento é muito menor se comparado com o espectro em metanol.

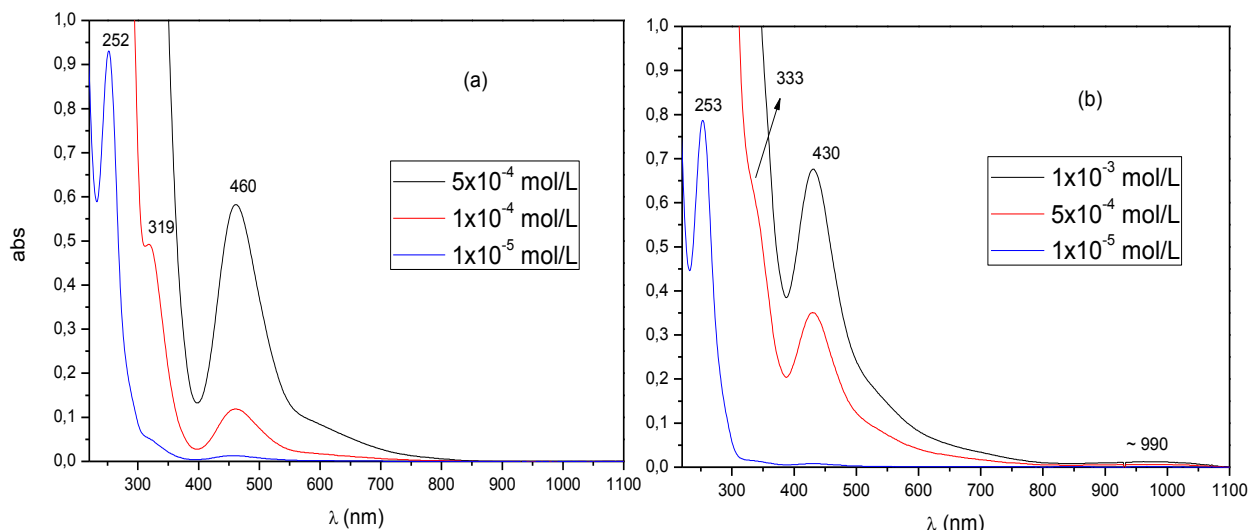


Figura 11 – Espectros Eletrônicos do complexo Ru₂-cet em acetonitrila (a) e metanol (b) em diferentes concentrações

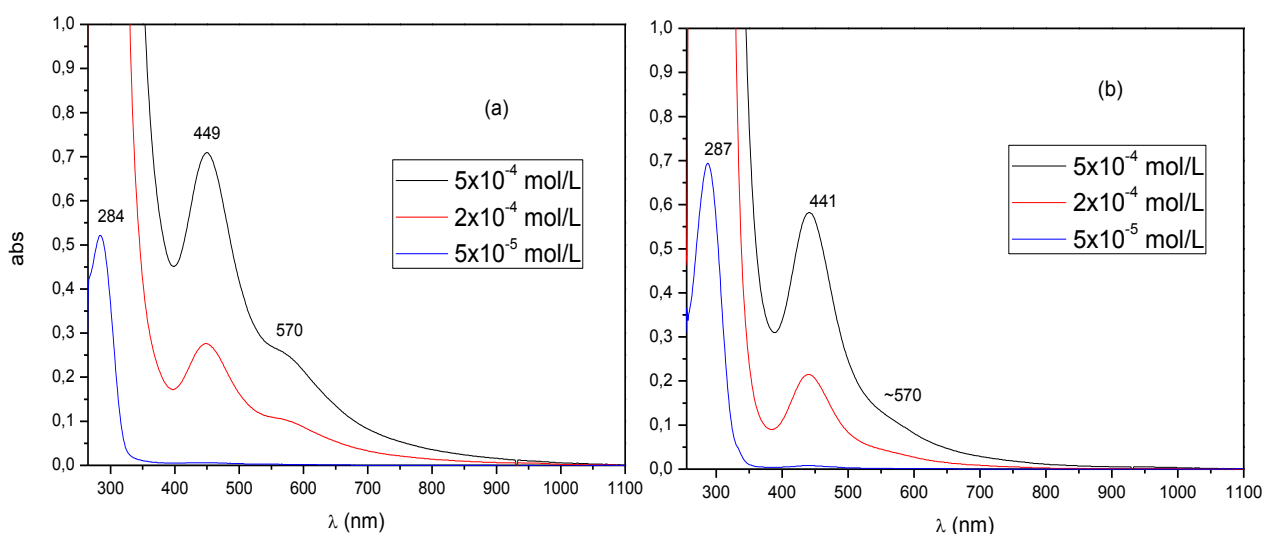


Figura 12 – Espectros Eletrônicos do complexo Ru₂-fen em dmf (A) e dmsO (B) em diferentes concentrações

Com base nestas observações, e as relatadas anteriormente, sugere-se a formação predominante da espécie neutra, monosubstituída, em acetonitrila, [Ru₂(cet)₄(acn)(Cl)], e de uma espécie catiônica, bisubstituída, [Ru₂(cet)₄(met)₂]⁺ em metanol. Já, no caso dos solventes dmsO e dmf, o cromóforo predominante nos dois casos deve ser a espécie neutra, monosubstituída, [Ru₂(fen)₄(S)Cl]. Foi observado, também, nestes espectros em solução, que a redução da intensidade da banda da região do infravermelho próximo (transição δ → δ*) é bastante significativa se comparada com seus respectivos espectros eletrônicos no estado sólido. Todas estas observações estão em concordância com estudos realizados pelo grupo com complexos análogos [27,47].

Além dessas duas principais bandas, cálculos teóricos [28,127] preveem um grande número de transições abaixo de 350 nm. Estas previsões estão em concordância com os dados experimentais aqui observados (Figura 11 e 12) que indicaram a presença de uma banda (ou de um ombro dependendo do solvente) com $\lambda_{\max} \sim 300$ nm. Estudos para o complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CPr})_4\text{Cl}]$ confirmaram que esta banda/ombro recebe forte contribuição dos ligantes axiais e pode ser atribuída a uma transição eletrônica de transferência de carga ligante-metal, $\pi(\text{Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$, porém uma possível contribuição da transição $\sigma(\text{Cl}) \rightarrow \sigma^*(\text{Ru}_2)$ também não pode ser descartada. A troca do ligante axial cloreto por íons brometo e iodeto provoca um significativo desvio do λ_{\max} desta banda para o vermelho [127]. Cálculos teóricos para os complexos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{X}_2]^-$, onde X = Cl, Br e I, foram divulgados recentemente e confirmaram essa atribuição [128].

Outra absorção, não menos importante, para os complexos dos tipos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]^+$ é aquela da região do visível (um ombro em ~ 550 nm), também observada aqui, para os complexos Ru_2 -cet (Figura 11) e Ru_2 -fen (Figura 12). A atribuição desta banda/ombro é um pouco mais difícil por se tratar de uma transição proibida [127], porém cálculos teóricos sugerem contribuição de duas transições eletrônicas: $\sigma(\text{Ru-Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ e $\delta^*(\text{Ru}_2) \rightarrow \sigma^*(\text{Ru-O})$ [30,128].

As atribuições das principais absorções observadas, para os dois complexos em solução e no estado sólido, estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Atribuição das transições eletrônicas observadas para os complexos Ru_2 -cet e Ru_2 -fen no estado sólido e em solução (acetonitrila e metanol)

λ (nm) / ϵ^{\ddagger} ($\text{cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$)		Atribuição	Ref.
$[\text{Ru}_2(\text{cet})_4\text{Cl}]$	$[\text{Ru}_2(\text{fen})_4\text{Cl}]$		
1090 / -.-	1050 / -.-	$\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$	27,30,128
~ 570 (acn) / 200 ~ 545 (met) / 160	570 (dmf) / 510 ~ 570 (dmsO) / 220	$\sigma(\text{Ru-Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ $\delta^*(\text{Ru}_2) \rightarrow \sigma^*(\text{Ru-O})$ $\pi^*(\text{Ru}_2) \rightarrow \sigma^*(\text{Ru-O})$	30,128
465 / -.- 460 (acn) / 1200 430 (met) / 680	450 / -.- 449 (dmf) / 1420 441 (dmsO) 1160	$\pi(\text{Ru-O}, \text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$	27,30,128
319 (acn) / 4900 ~ 333 (met) / 1300	não observado	$\pi(\text{Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ $\sigma(\text{Cl}) \rightarrow \sigma^*(\text{Ru}_2)$	27,128
252 (acn) / 93100 253 (met) / 78600	284 (dmf) / 10400 287 (dmsO) / 13900	transição intraligante	129,130

(\ddagger) absorptividade molar (valores aproximados)

4.1.2. Medidas de Condutância Molar

Os complexos do tipo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$ podem apresentar diferentes cromóforos em solução dependendo do solvente utilizado. Estudos reportados na literatura [28,127] indicaram que o complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ dissolvido em água, ou em metanol, se comporta como eletrólito do tipo 1:1, ou seja, as duas posições axiais do complexo são coordenadas por moléculas de solvente (S), gerando em soluções as espécies $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{S})_2]^+$ e Cl^- . Por outro lado, quando o complexo é dissolvido em acetonitrila, ou em diclorometano, apenas uma das posições é coordenada pelo solvente, gerando uma espécie monosubstituída, isto é, o não-eletrólito, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{S})\text{Cl}]$. Cabe lembrar que a presença desses diferentes cromóforos afeta a posição da principal banda do visível no espectro eletrônico.

As medidas de condutância molar (Tabela 4) confirmaram os cromóforos propostos anteriormente para os dois complexos sintetizados nos diferentes solventes estudados. Em solução, o complexo $\text{Ru}_2\text{-cet}$ se comporta como eletrólito 1:1 na presença de metanol, devido à formação da espécie $[\text{Ru}_2(\text{cet})_4(\text{met})_2]^+$, e não-eletrólito em acetonitrila, devido à formação de $[\text{Ru}_2(\text{cet})_4(\text{acn})\text{Cl}]$. Já o complexo $\text{Ru}_2\text{-fen}$, que é solúvel apenas nos solventes dmf e dmsO, se comporta como não-eletrólito nos dois solventes. Os valores de condutância obtidos foram comparados com os dados disponíveis na literatura [131,132] para eletrólitos do tipo 1:1.

Tabela 4 – Valores de condutância molar obtidos para os complexos e faixa esperada para eletrólitos 1:1 nos diferentes solventes orgânicos

Solventes	$\Delta M (\text{S.cm}^2 \text{mol}^{-1})$		
	$\text{Ru}_2\text{-cet}$	$\text{Ru}_2\text{-fen}$	Faixa para eletrólitos 1:1 [131,132]
metanol	73,9	Insolúvel	80-115
acetonitrila	3,1	Insolúvel	92-200
dmsO	*	12,2	50-70
dmf	*	8,2	65-90

(*) valor não obtido

4.1.3. Medidas de Susceptibilidade Magnética

O comportamento magnético dos complexos sintetizados foi investigado através das medidas de susceptibilidade magnética. O ensaio foi realizado em temperatura ambiente (25 °C) e a partir das massas das amostras, pesadas com e sem a influência de campo magnético, foi possível determinar os valores de susceptibilidade magnética molar (χ_M), momento magnético efetivo (μ_{ef}), e número de elétrons desemparelhados para os complexos Ru₂-cet e Ru₂-fen utilizando-se as equações (1-5).

Os dados obtidos (Tabela 5) para os dois complexos estão em concordância com os valores estabelecidos para complexos de dirutênio(II,III) (3,8 a 4,4 M.B.) [133] que indicam a presença dos três elétrons desemparelhados com a seguinte distribuição eletrônica: $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 (\pi^* \delta^*)^3$.

Tabela 5 – Valores obtidos para as medidas de susceptibilidade magnética dos complexos sintetizados

Complexo	m (mg)		Δ (mg)		δ (mg)		$\chi_M \times 10^{-3}$ (CGS/mol)	μ_{ef} (M.B.)
	a	p	a	p	a	P		
[Ru ₂ (cet) ₄ Cl]·2H ₂ O	20,1	20,4	1,3	2,2	0,9	0,9	6,7	4,0
[Ru ₂ (fen) ₄ Cl]·3H ₂ O	20,8	22,3	1,3	2,5	0,9	0,9	5,9	3,8

(m) massa na ausência do campo magnético; (a) amostra; (p) padrão

4.1.4. Espectros Vibracionais FTIR e Raman

Os espectros FTIR e Raman dos complexos sintetizados e dos seus respectivos fármacos isolados estão disponíveis nas Figuras 13-16, e uma atribuição tentativa baseada na literatura, está disponível na Tabela 6.

As principais bandas dos fármacos, exceto aquelas que envolvem o grupamento ácido carboxílico, foram observadas, sem deslocamentos significativos de frequências, nos espectros FTIR e Raman dos seus respectivos complexos de dirutênio. A desprotonação do fármaco e a sua coordenação ao núcleo dimetálico é confirmada pelo desaparecimento das principais bandas relativas ao grupamento ácido carboxílico, a saber: estiramento (C=O); deformação no plano e fora do plano (COH); e deformação (C-COH) (Tabela 6).

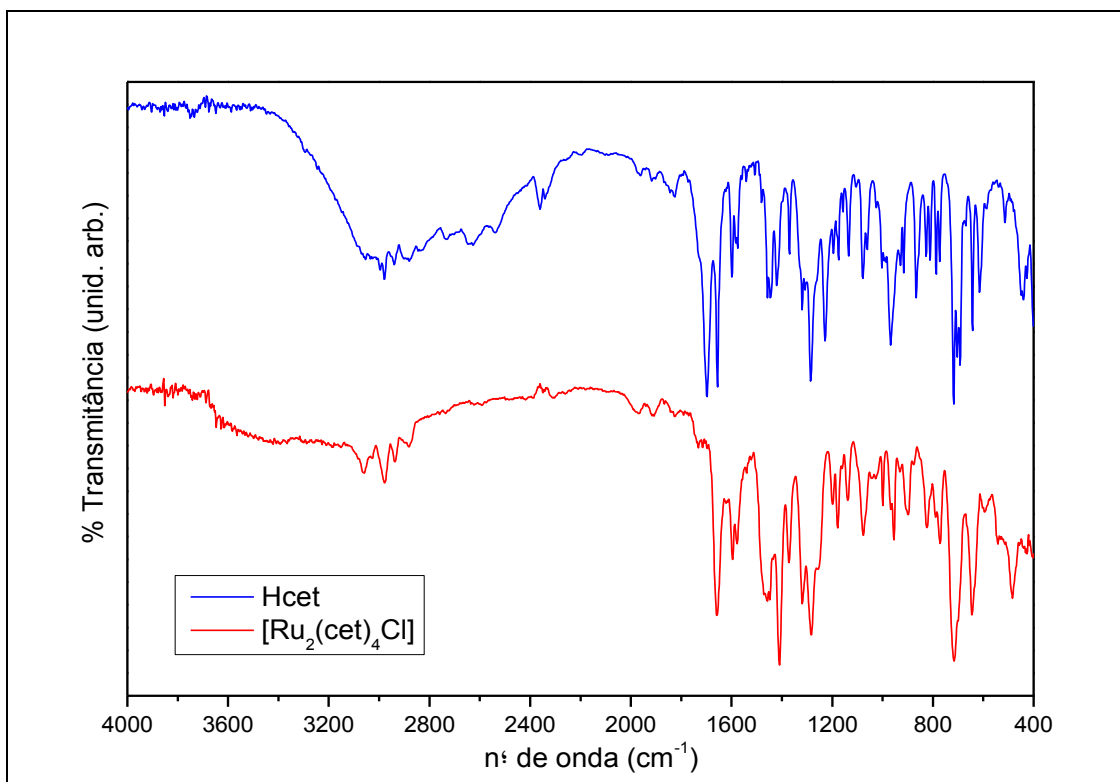


Figura 13 – Espectros Vibracionais na Região do Infravermelho do Hcet e Ru₂-cet

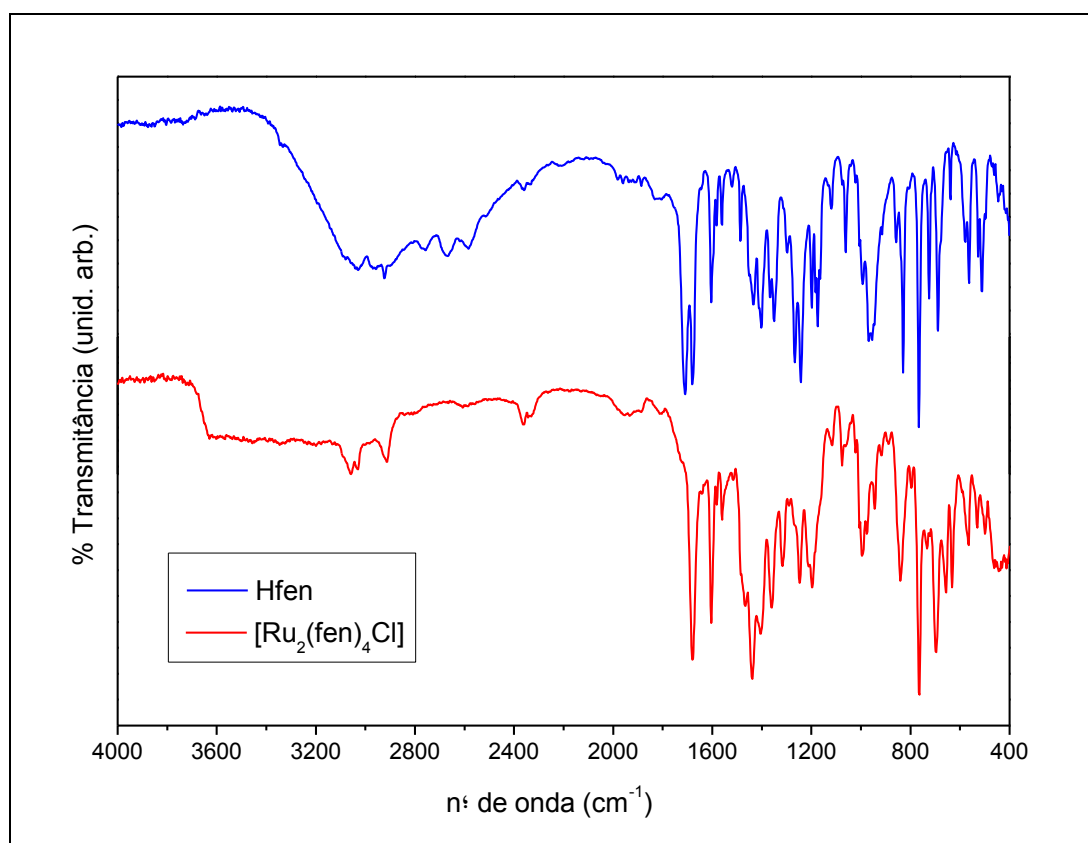


Figura 14 - Espectros Vibracionais na Região do Infravermelho do Hfen e Ru₂-fen

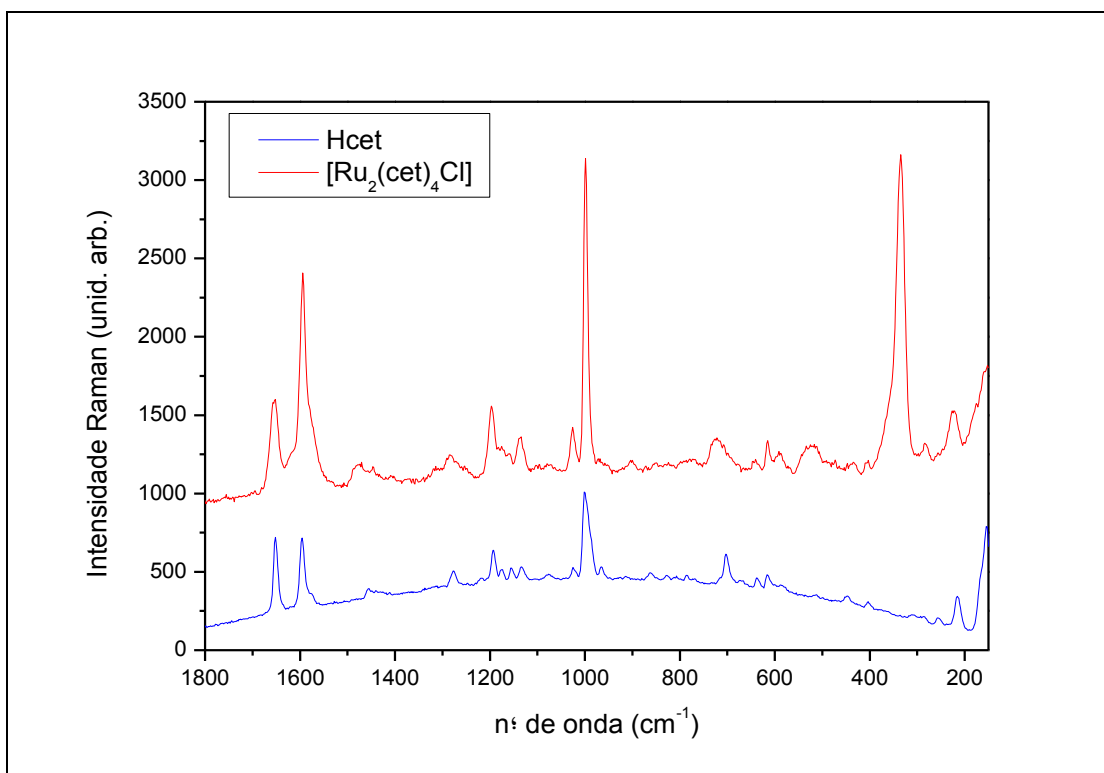


Figura 15 – Espectros Vibracionais Raman do Hcet e Ru₂-cet

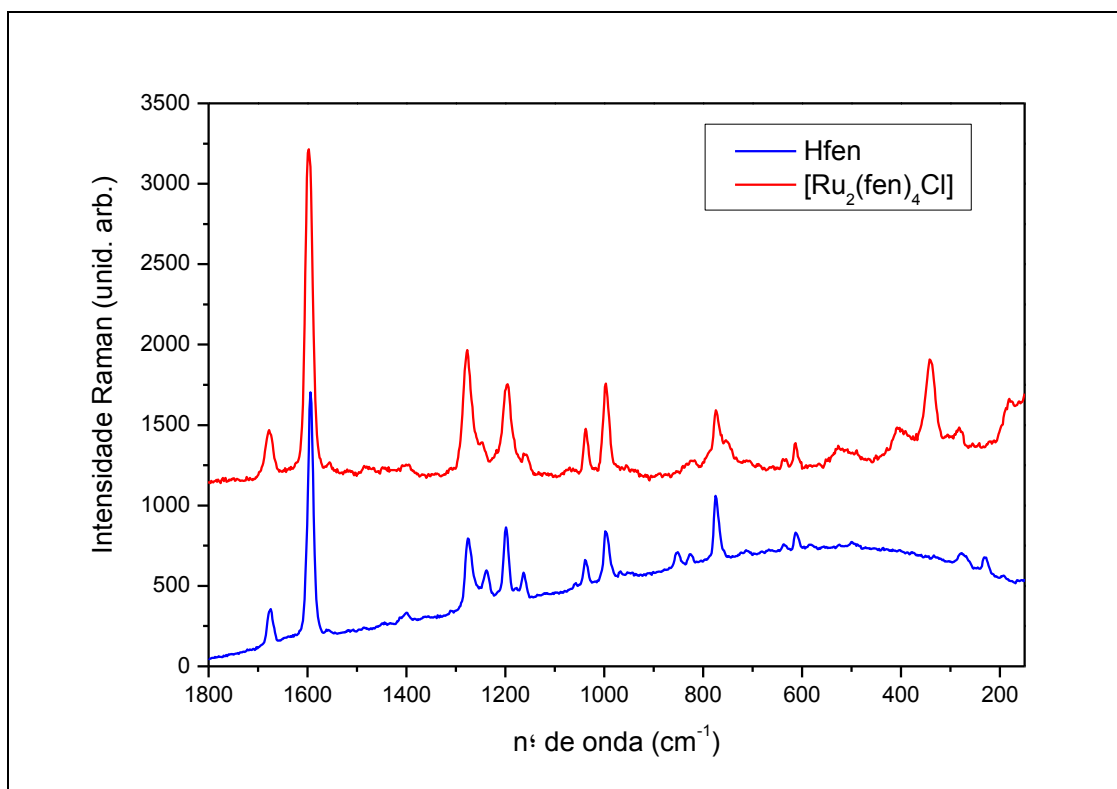


Figura 16 – Espectros Vibracionais Raman do Hfen e Ru₂-fen

Um dos principais modos vibracionais para a caracterização dos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) são os estiramentos simétricos (ν_s) e antisimétricos (ν_a) do grupamento carboxilato (COO^-), que devem ocorrer na faixa de $1330\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ e $1440\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, e os estiramentos que envolvem o rutênio e os ligantes, ν (Ru-O) e ν (Ru-Cl), que costumam estar localizados na região de baixa frequência ($500\text{-}140\text{ cm}^{-1}$) [127,134]. Esses principais modos vibracionais para os dois complexos sintetizados são observados nas Figuras 13-16 e suas atribuições encontram-se na Tabela 6. No entanto, uma avaliação minuciosa dos espectros FTIR e Raman do complexo $\text{Ru}_2\text{-fen}$ sugere uma pequena contaminação da amostra com o seu respectivo fármaco livre (Hfen), pois é observado um ombro na região de 1700 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ (Figura 15) e uma banda de pequena intensidade em 613 cm^{-1} , $\delta(\text{COH})$ (Figura 16), as quais não deveriam aparecer nos espectros do complexo.

O grupamento carboxilato é um ligante que pode se coordenar a íons metálicos por três modos diferentes: monodentado, bidentado quelato e bidentado ponte. No caso particular dos complexos de dirutênio, a coordenação ocorre *via ponte bidentada*. A geometria dos átomos no R-COO^- é tal que permite com que os dois átomos de oxigênio do ânion se coordenem simultaneamente aos dois íons metálicos, formando uma ponte entre eles, e estabilizando as múltiplas ligações rutênio-rutênio. Este modo de coordenação pôde ser confirmado para os dois complexos sintetizados, pois a diferença ($\Delta\nu$) entre as frequências dos modos vibracionais dos estiramentos simétricos (ν_s) e antisimétricos (ν_a) do grupamento carboxilato (COO^-) estão dentro da faixa esperada para esse tipo de coordenação ($51\text{ a }75\text{ cm}^{-1}$) [30,135], sendo $\Delta\nu = 65$ e 62 cm^{-1} o valor obtido para $\text{Ru}_2\text{-cet}$ e $\text{Ru}_2\text{-fen}$, respectivamente.

Tabela 6 – Atribuição tentativa das principais bandas observadas (abaixo de 1700 cm⁻¹) nos espectros do infravermelho FTIR e Raman para o Ru₂-cet, Hcet, Ru₂-fen e Hfen

Bandas Vibracionais	Ru₂-cet (cm⁻¹)		Hcet (cm⁻¹) (Ref. 136)		Ru₂-fen (cm⁻¹)		Hfen (cm⁻¹) (Ref. 137)	
	<i>FTIR</i>	<i>Raman</i>	<i>FTIR</i>	<i>Raman</i>	<i>FTIR</i>	<i>Raman</i>	<i>FTIR</i>	<i>Raman</i>
v(C=O) (ácido)	-----	-----	1698 vs (1697)	-----	1709 sh	-----	1709 vs (1709)	-----
v(C=O) (cetona)	1657 s	1656 m	1657 vs (1655)	1652 s (1657)	1680 vs	1677 m	1680 vs (1678)	1674 m (1680)
v(C-C, C=O)					1605 vs 1581 mw		1605 ms (1604) 1583 mw (1583)	
v(C-C anel)	1596 m 1578 m	1594 s 1580 sh	1598 m (1599) 1583 sh (1584) 1576 m (1576)	1596 s (1601) 1577 sh (1588)	1560 w 1516 vw	1598 vs	1560 w (1563) 1537 vw (1543)	1594 vs (1597)
v(C-C anel), δ(CH₃)	1482 sh	1483 sh	1480 w (1481)	1483 w (1484)	1485 sh	1486 vw	1487 mw (1487)	1487 vw (1489)
v_a(COO⁻)	1472 s	1476 w	-----	-----	1468 w		-----	
δ(CH₃)	1458 s	1457 sh	1458 m (1457)	1455 vw (1462)				
δ(CH₂), τ(C₂H₂, OCCH)					1439 s	1450 vw	1452 vw (1451) 1435 s (1434)	1450 vw (1453)
v(C-C anel)	1447 s, 1436 sh	1446 w	1445 m (1444)	1441 vw (1434)				
v(C-C anel) δ(C_φ-C-H)	<i>sobreposto</i>	1419 vw	1419 m (1421)	----- (-----)			1412 sh (----)	
v_s(COO⁻)	1407 vs	1408 w	-----	-----	1406 ms		-----	
δ(CH₂, C-OH), v(C-C)					<i>Sobreposto</i>	1400 vw	1402 s (1403)	1400 vw (1401)
δ(CH₃)	1382 sh	-----	1381 sh (1382)	----- (1382)				
δ(C_{carboxila}-C-H)	1372 m	-----	1370 m	----- (-----)				

(1370)								
$\delta(\text{C-CH, C-OH})$					1359 s			1366 mw (1366) 1350 mw (1350)
$\delta(\text{C-H anel}), \nu(\text{C-C anel})$	1322 s	~ 1309 sh	1322 m (1320) 1306 sh (1309)	1319 vw (1321) 1301 vw (1306)	1317 s			
$\delta(\text{CH}_2, \text{CCC})$					1292 vw			1298 vw (1298)
$\delta(\text{C anel}), \nu(\text{C}\phi\text{-C(cetona)-C}\phi)$	1285 s	1283 w	1282 s (1285)	1284 vw (1281)	-----	-----	-----	-----
$\delta(\text{CH anel})$	<i>sobreposto</i>	1265 vw	1262 sh (1260)	1256 w (1262)				
$\nu(\text{CC})$	-----	-----	-----	-----	-----	1277 s	-----	1275 s (1279)
$\delta(\text{CCH})$								1267 s (1267)
$\delta(\text{C-O-M})$	1254 s	1255 sh	-----	-----	1246 s			-----
$\delta(\text{COH})$	-----	-----	1226 m (1228)	1218 vw (1223)	-----	-----	1242 s (1242)	1239 mw (1242)
$\delta(\text{C anel}, \text{C}\phi\text{-C(cetona)}, \text{C}\phi\text{-CH})$	1198 m	1196 m	1196 w (1196)	1191 m (1198)	1198 mw		1198 mw (1198)	1199 vs (1201)
$\delta(\text{C anel-CH})$	1178 m	1175 w	1180 sh (1182) 1175 w (1175)	1176 w (1180)		1158 w	1182 w (1182) 1174 mw (1774)	1178 vw (1182) 1163 w (1165)
$\delta(\text{CH anel})$	1160 sh	1160 w	1156 vw (1158)	1154 w (1160)				1165 vw (--)
$\nu(\text{C anel})$	1139 m	1137 mw	1135 w (1135)	1133 w (1138)				
$\delta(\text{CCH}), \nu(\text{CC})$					1117 vw			1119 vw (1119)
$\delta(\text{CH anel})$	1102 sh	1102 vw	1106 vw (1106)	1105 vw (1108)				
$\rho(\text{CH}_3); \nu(\text{C-CH}_3) \delta(\text{CCH})$	1076 m	1077 vw	1076 m	1077 vw	1076 vw			1076 vw

			(1078)	(1081)			(1076)	
$\rho(\text{CH}_3)$	1066 sh, 1041 w	-----	1060 m (1061)	----- (1066)	1061 mw		1061 mw (1061)	1059 w (1061)
$\delta(\text{CCC}, \text{CCH})$					1039 vw	1038 ms	1040 w (1038)	1039 w (1041)
$\delta(\text{CCC}), \nu(\text{CC}, \text{C-O})$					1022 vw		1022 vw (1022)	
$\delta(\text{CH anel})$	1026 w	1024 m	1025 vw (1026)	1025 w (1028)				
$\delta(\text{C anel});$ $\rho(\text{CH}_3)$	1015 sh 999 m	998 vs	1004 m (1003)	1000 s (1005)	1007 vw 995 w	997 s	1007 vw (----) 992 w (992)	998 s (998)
$\rho(\text{CH}_3); \delta(\text{C anel})$	969 m	970 vw	967 s (968)	967 vw (970)	978 w			
$\tau(\text{HCCH}); \nu(\text{CC})$	955 m	954 sh					955 s (955); 897 sh (892)	
$\delta(\text{C anel})$	932 w 908 sh, 899 m	926 vw 901 w	928 m (929) 916 m (916)	927 vw (934) 915 vw (918)	945 w 916 vw		945 vw (----) 914 vw (----)	
$\rho(\text{CH}_3)$	876 vw, 869 sh, 851 sh	853 w			841 vs		858 vw (856)	853 w (856)
$\delta(\text{COH}); \tau(\text{COOH})$	-----	-----	865 m (866)	862 w (867)	-----	-----	968 s (968)	967 (vw) 970
$\tau(\text{CCCH}); \delta(\text{CH}_2)$					766 vs	775 s	829 s (829) 766 vs (766)	826 w (828) 773 s (766)
$\delta(\text{CH anel})$	824 m	826 w	827 m (827)	825 w (832)				
$\omega(\text{CH anel})$	810 sh	-----	812 m (811)	810 w (814)			804 sh (---)	
$\rho(\text{CH}_3); \omega(\text{CH anel})$	789 m 771 m	790 w 775 w	788 m (787) 773 m (773)	787 w (790) 772 w (776)				
$\tau(\text{CCCC}); \delta(\text{CH}_2)$					723 w		725 m (725)	
$\delta(\text{CH anel})$	<i>sobreposto</i> 700 sh	722 m 707 sh, 704 sh	718 vs (717) 704 s (703)	722 w (718) 702 m (708)			713 sh (----)	
$\delta_s(\text{COO}^-); \omega(\text{COO}^-)$	715 vs 665 sh	-----	-----	-----	696 s			
$\delta(\text{COH}); \tau(\text{COOH})$	-----	-----	690 s (691)	690 sh (696)	-----	-----	688 m (689) 676 sh (663)	

							579 m (579)	
$\delta(\text{C anel})$	645 s	643 vw	642 s (642)	637 w (642)	656 s 633 s	638 w	638 s (--)	637 w (--)
$\delta(\text{COH})$	-----	-----	614 m (614)	614 w (621)		613 w	615 vw (----)	613 w (615)
$\delta(\text{C anel}); \delta(\text{C anel-C(carboxila)})$	609sh,602sh, 594 w, 590 sh, 584 sh 523 w,519 w	614 mw 590 w 521 m,br	608 sh (608) 587 vw (588)	609 sh (608) 586 w (593)			607 vw (----) 563mw (563)	
$\delta(\text{COH})$	-----	-----	513 w (514)	516 w (518)			511 mw (511)	499 vw (505)
$\rho(\text{COO})$	573sh, 569sh, 558 sh, 547 sh, 542 w, 532 w, 507sh, 498sh,490 sh	541 sh, 533 sh	-----	-----	592 sh, 574 sh,565 w,544 sh,530 w, 507 sh		-----	-----
$\nu(\text{Ru-O})$	485 s	-----	-----	-----	484 m			
$\rho(\text{COO})$	478sh, 469 sh, 457vw, 453sh	-----	-----	-----	sobrepostas			
$\delta(\text{C anel})$	446 w, 440 w, 433 w, 425 w 423sh, 417 w	438 vw	449 m (450) 440 m (441)	449 w (453) 435 w (-----)	444 vw 438 vw 430 vw		445 vw (----) 438 vw (----) 430 vw (----)	
$\tau(\text{CCCH, CCCC, CCC})$					463 vw 418 vw		463 vw (458) 415 vw (418)	
$\delta(\text{C-C-OH})$	-----	-----	426 w (427) ----- (-----)	426 w (430) 403 w (408)				
$\delta(\text{COO})$	-----	365 sh	-----	-----				
$\nu(\text{Ru-Ru})$	-----	335 vs	-----	-----		342 vs		
$\delta(\text{CH}_3\text{-C anel}); \tau(\text{O=C anel})$	-----	284 w	-----	284 w (290)		282 vw		279 vw (--)
$\delta(\text{CH}_3\text{-C-C=O})$	-----	-----	-----	256 w (259)				231 vw (--)
$\delta(\text{C(cetona)-C(anel)-C(CH}_3\text{)})$	-----	226 w	-----	214 m (220)	-----	-----	-----	-----
$\nu(\text{Ru-Cl})$	-----	176 w	-----	-----		181 w		

br = larga; m = media; sh = ombro; s = forte; v = muito; w = fraca

As duas bandas intensas, 1254 cm^{-1} ($\text{Ru}_2\text{-cet}$) e 1246 cm^{-1} ($\text{Ru}_2\text{-fen}$), observadas apenas nos espectros FTIR dos dois complexos podem estar relacionadas a algum modo vibracional relativo ao C-O-Ru, uma vez que a deformação no plano do C-O-H do Hcet e Hfen aparecem em 1226 cm^{-1} e 1242 cm^{-1} respectivamente, e a substituição do hidrogênio pelo metal desloca essa banda para maiores frequências.

Os modos vibracionais referentes aos núcleos dimetálicos, $\nu(\text{Ru-Ru})$, dos complexos $\text{Ru}_2\text{-cet}$ e $\text{Ru}_2\text{-fen}$ podem ser observados nos espectros Raman em 335 e 342 cm^{-1} , respectivamente. Já os modos vibracionais $\nu(\text{Ru-O})$ podem ser atribuídos às bandas em 485 cm^{-1} ($\text{Ru}_2\text{-cet}$) e 484 cm^{-1} ($\text{Ru}_2\text{-fen}$), e as bandas de baixa intensidade 176 cm^{-1} ($\text{Ru}_2\text{-cet}$) e 181 cm^{-1} ($\text{Ru}_2\text{-fen}$), presentes nos espectros Raman, podem ser atribuídas aos modos vibracionais $\nu(\text{Ru-Cl})$.

4.1.5. Difratogramas de Raios X

O complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]$ pertence ao sistema monoclinico, com os seguintes parâmetros de célula unitária: $a = 8,207\text{ \AA}$, $b = 7,440\text{ \AA}$, $c = 11,320\text{ \AA}$ e $\beta = 95,46^\circ$, conforme estrutura do monocristal [138,139,140]. O difratograma de raios X do pó, relatado pelo nosso grupo mostra a existência de picos intensos e finos que evidenciam a natureza cristalina do material obtido em nossas sínteses. O pico mais intenso está localizado em $13,02^\circ$ que corresponde a uma distância interplanar de $6,8\text{ \AA}$, valor que está muito próximo ao calculado ($7,3\text{ \AA}$) com base nos comprimentos das ligações de Ru-Cl ($2,5\text{ \AA}$) e Ru-Ru ($2,3\text{ \AA}$) [27].

Nas Figuras 17 e 18 são apresentados os difratogramas de raio X dos complexos $\text{Ru}_2\text{-cet}$ e $\text{Ru}_2\text{-fen}$, assim como os de seus respectivos fármacos de origem.

O difratograma do $[\text{Ru}_2\text{-cet}]$ (Figura 17) é característico de material não-cristalino, diferentemente do seu fármaco de partida (Hcet) que apresenta difratograma característico de material cristalino. A ausência de picos característicos do Hcet no difratograma do complexo indica que o produto formado não contém impurezas de cetoprofeno.

Já o difratograma do complexo $\text{Ru}_2\text{-fen}$ (Figura 18) apresenta certo grau de cristalinidade e as posições destes picos coincidem com os picos do

fármaco Hfen em sua forma pura, sugerindo que o produto formado possa estar contaminado com o seu fármaco de origem.

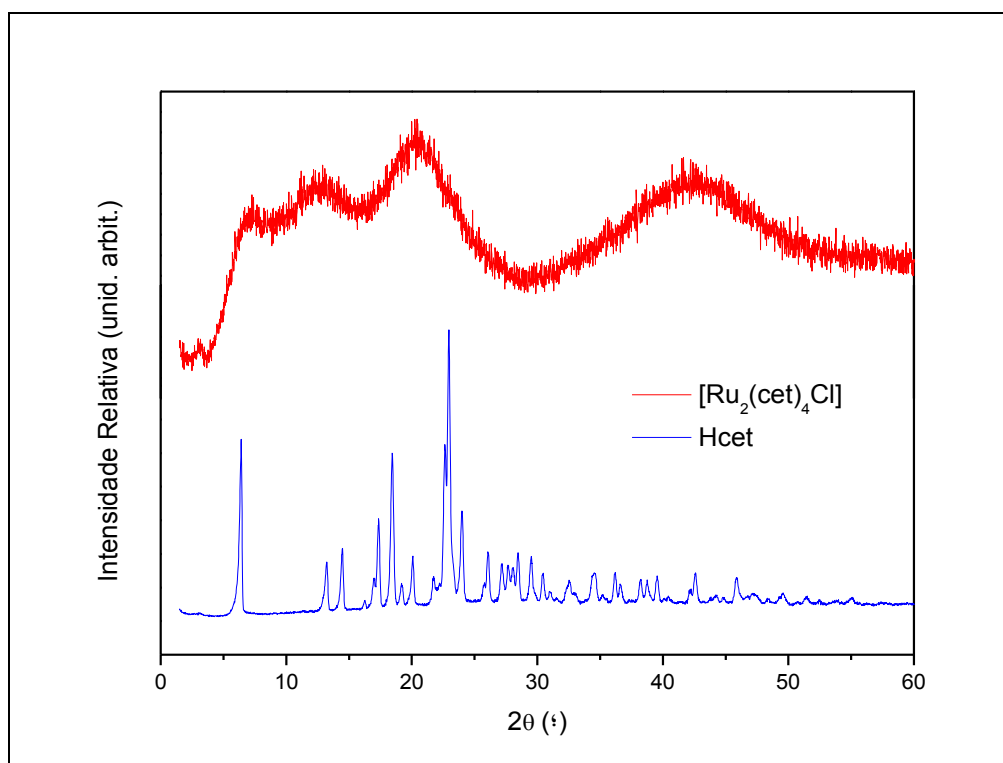


Figura 17 - Difratoograma de raio X de pó do $[Ru_2(cet)_4Cl]$ e do cetoprofeno

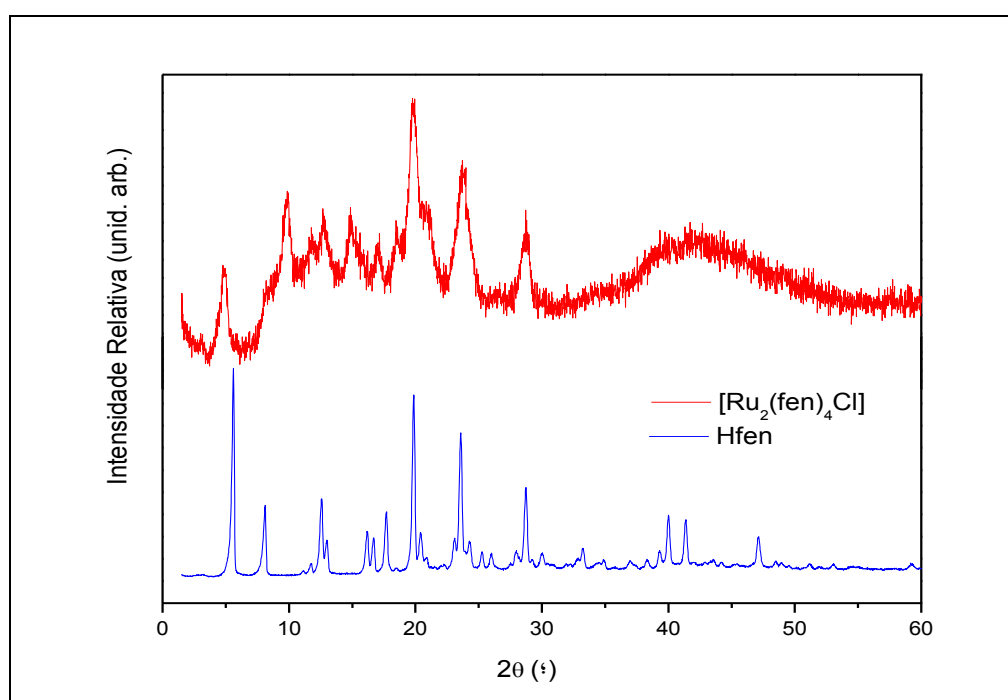


Figura 18 - Difratoograma de raio X de pó do $[Ru_2(fen)_4Cl]$ e do fenbufeno

4.1.6. Análises Térmicas

Não existe uma grande quantidade de trabalhos na literatura sobre a estabilidade térmica dos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$, e mesmo com os poucos trabalhos disponíveis [27,47,141,142] ainda não se pôde propor um mecanismo único para o processo de decomposição térmica desses complexos, no entanto sugere-se que a primeira etapa de decomposição deva estar relacionada a quebra dos ligantes equatoriais.

Os resíduos resultantes da decomposição térmica de diferentes complexos $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$, inclusive contendo FAINEs, foram investigados pelo nosso grupo [27,47] e concluiu-se que o resíduo metálico formado está relacionado basicamente com a temperatura e a atmosfera da combustão, podendo haver formação de óxido de rutênio (IV) ou rutênio metálico.

A decomposição térmica dos dois novos complexos sintetizados ($\text{Ru}_2\text{-cet}$ e $\text{Ru}_2\text{-fen}$), assim como dos seus respectivos fármacos (Hcet e Hfen), foi investigada por TG/DSC/MS em atmosfera inerte de nitrogênio, e as suas respectivas curvas de análise térmica estão disponíveis nas imagens a seguir (Figuras 19-26).

Analisando inicialmente as curvas TG, DTG e DSC do fármaco Hcet (Figura 19) pôde-se observar que a sua decomposição térmica ocorre em duas etapas, sendo a primeira observada no intervalo entre 200 e 310 °C, com pico DTG em 301 °C; e a segunda etapa ocorre entre 310 e 1000 °C. É na primeira etapa, que se observa a maior perda de massa (82%) a qual correspondente a um evento endotérmico (285 J g^{-1}) atribuído à decomposição do fármaco, vide a liberação de gases (água e gás carbônico) durante esta mesma faixa de temperatura (Figura 20). Na segunda etapa ocorre perda de 12% de massa sendo que a perda de massa global de todo o processo corresponde a aproximadamente 94%. O evento endotérmico observado em 94 °C da curva DSC corresponde ao processo de fusão do fármaco [143,144] e o valor da variação de entalpia de fusão (ΔH_f) obtido experimentalmente (70 J g^{-1}) está próximo do valor encontrado na literatura ($84 \pm 6 \text{ J g}^{-1}$) [145].

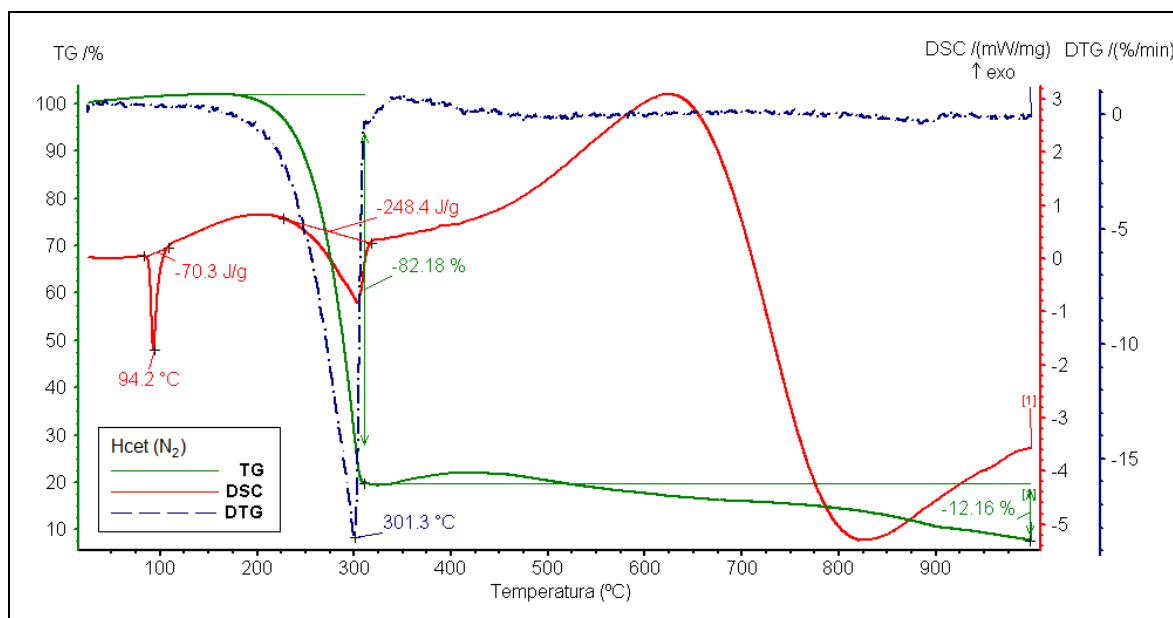


Figura 19 – Curvas TG/DTG/DSC do complexo Hcet em atmosfera de N₂

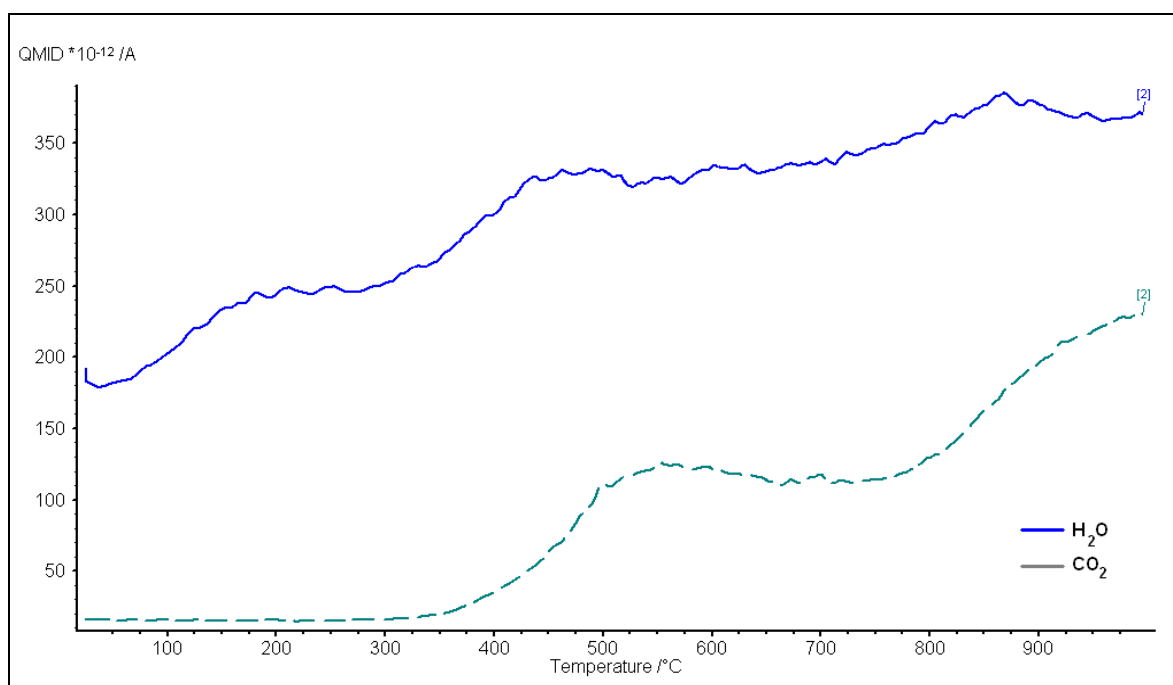


Figura 20 – Espectros de massa dos fragmentos m/z 18 (H₂O) e 44 (CO₂) obtidos durante a análise térmica do Hcet em N₂.

O resultado da análise térmica (Figura 21) do fármaco Hfen mostrou que a sua decomposição em atmosfera inerte não é completa uma vez que a perda de massa global foi de apenas 84%. Este fármaco, assim como o Hcet, apresenta também duas etapas de decomposição: a primeira, observada entre 200 e 320 °C (pico DTG em 317 °C), com perda de massa de 65%; e a segunda

com início após 320 °C e término em aproximadamente 600 °C com perda de massa de 19%. Nota-se ainda que o primeiro evento endotérmico em 190 °C corresponde ao processo de fusão do fármaco com valor de $\Delta H_f = 147 \text{ J g}^{-1}$ [145,146] e o segundo evento endotérmico de 409 J g^{-1} corresponde à primeira etapa de decomposição do fármaco, com emissão de gás carbônico e água (Figura 22).

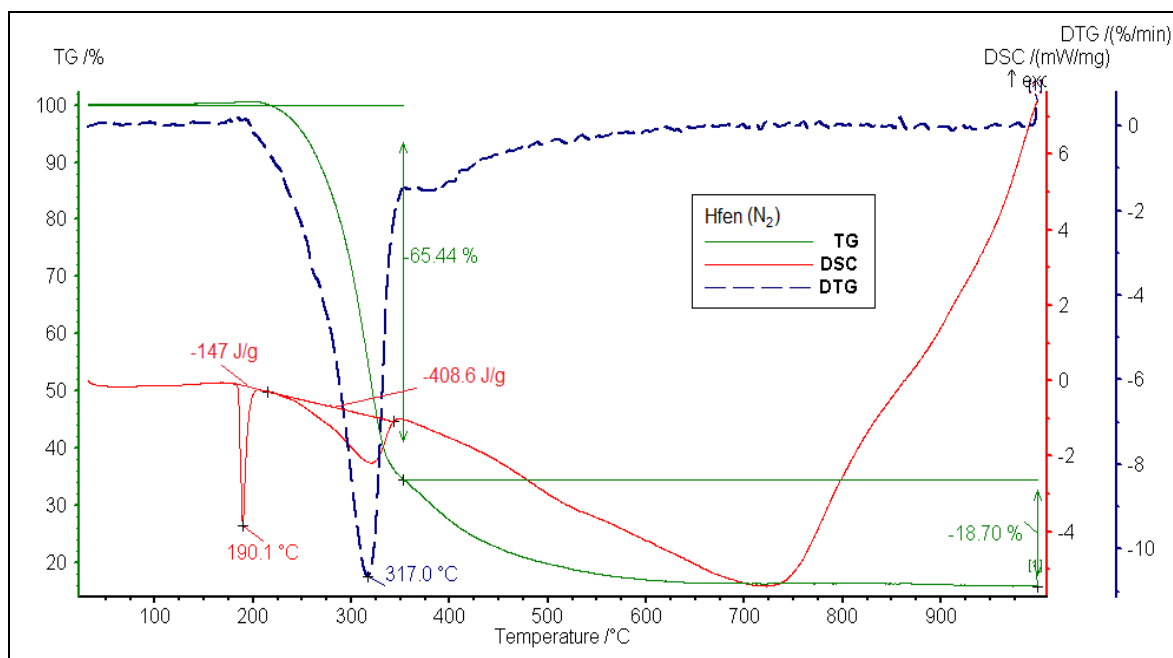


Figura 21 – Curvas TG/DTG/DSC do fármaco Hfen em atmosfera de N₂

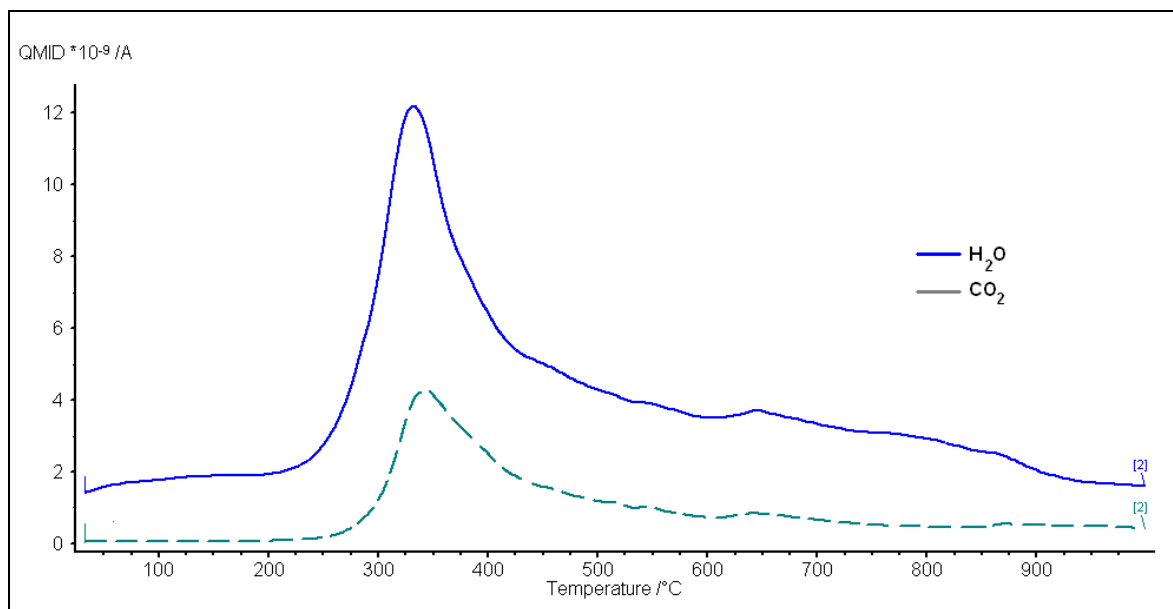


Figura 22 – Espectros de massa dos fragmentos m/z 18 (H₂O) e 44 (CO₂) obtidos durante a análise térmica do Hfen em N₂.

Já as curvas de análises térmicas (Figura 23) do complexo Ru₂-cet indicaram que a sua decomposição em atmosfera inerte de nitrogênio ocorre em três etapas. A primeira (até 200 °C) é associada à perda das duas moléculas de água de hidratação (4%), cujo valor está próximo ao valor calculado teoricamente (3%). A segunda etapa corresponde ao processo de decomposição térmica do complexo, provavelmente relacionado à decomposição dos ligantes equatoriais. Nesta etapa, que ocorre entre 200 e 310 °C (com pico máximo em 291 °C) observa-se uma perda de massa adicional de 54% e um evento endotérmico de 181 J g⁻¹. Por fim, na terceira é observada uma perda de massa adicional de 12%, totalizando o valor de 70% de perda de massa para o processo global.

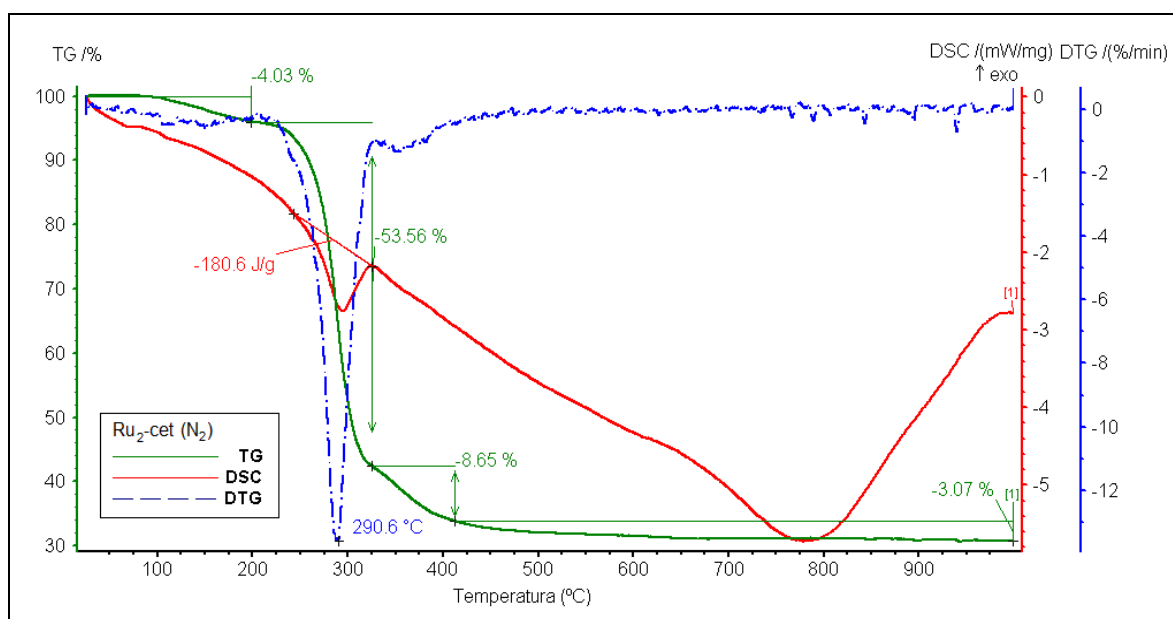


Figura 23 – Curvas TG/DTG/DSC do complexo Ru₂-cet em atmosfera de N₂

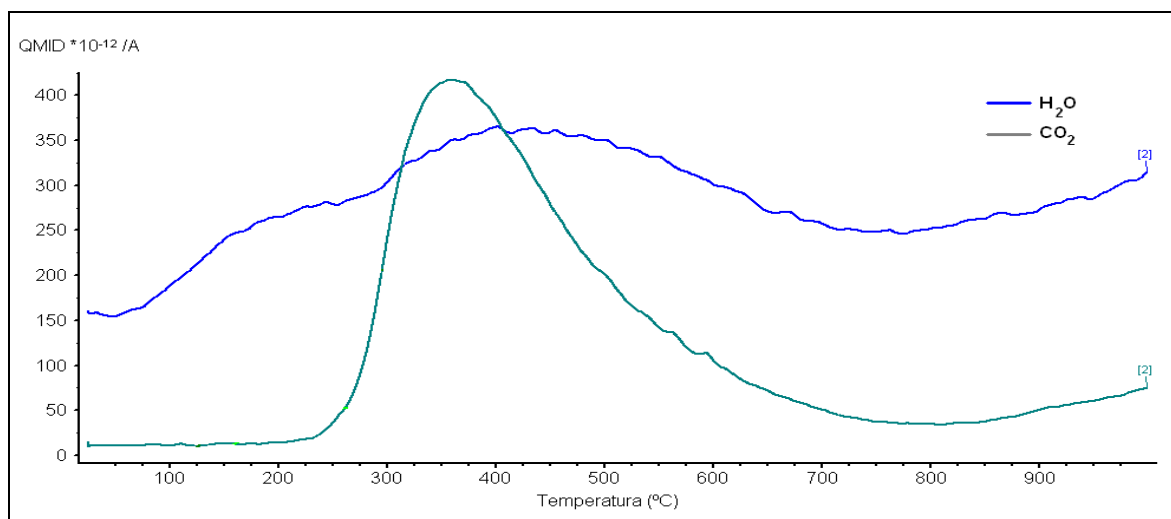


Figura 24 – Espectros de massa dos fragmentos m/z 18 (H₂O) e 44 (CO₂) obtidos durante a análise térmica do Ru₂-cet em N₂.

Finalmente, para o complexo Ru₂-fen, as curvas de análise térmicas (Figura 25) sugerem, também, três etapas da decomposição térmica do complexo. Sendo que a primeira etapa, com perda de 4% em massa (até 200 °C), corresponde à eliminação de três moléculas de água de hidratação (4,1%). A segunda etapa (200 e 320 °C) corresponde a um processo endotérmico equivalente a 609 J g⁻¹ o qual pode ser atribuído ao processo inicial de decomposição do complexo (perda de 44% em massa). A terceira, e ultima etapa, que ocorre a partir de 325 °C pode estar associada ao processo de decomposição dos resíduos, sendo observada uma perda adicional de 18% em massa, perfazendo a perda de toda análise térmica em aproximadamente 67%.

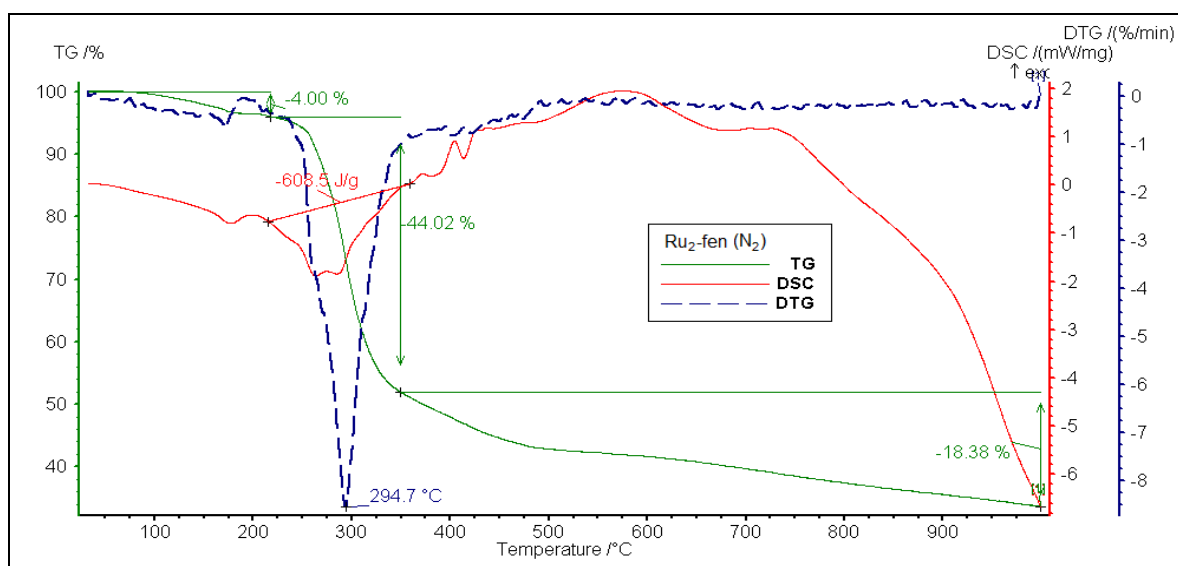


Figura 25 – Curvas TG/DTG/DSC do complexo Ru₂-fen em atmosfera de N₂

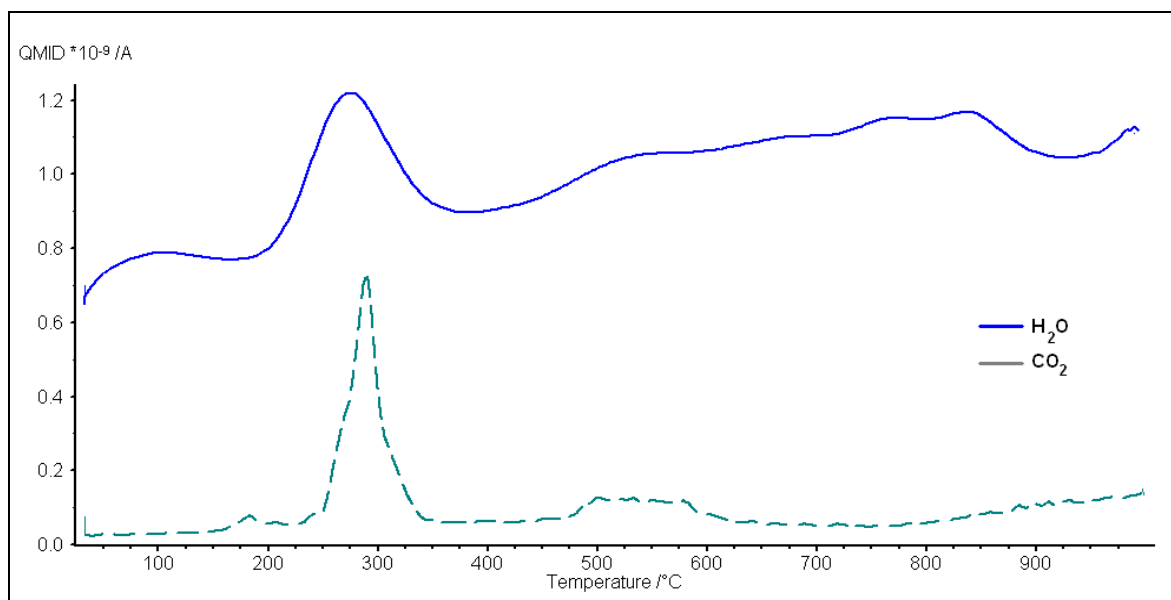
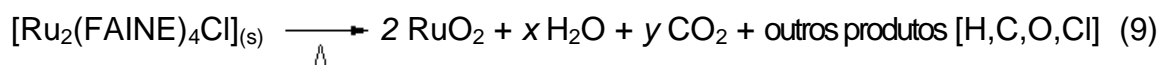


Figura 26 – Espectros de massa dos fragmentos m/z 18 (H_2O) e 44 (CO_2) obtidos durante a análise térmica do Ru_2 -fen em N_2 .

Nota-se também (Figura 25) que é observado um pequeno evento endotérmico em aproximadamente 190 °C, o qual pode estar associado à fusão do Hfen. Este evento fornece grandes indícios de que a amostra do Ru_2 -fen pode estar contaminada com traços de Hfen em sua forma pura, confirmando assim as evidências que foram apresentadas ao longo da caracterização deste complexo.

Levando em consideração os estudos anteriores em nosso grupo [27,47] que confirmaram que os complexos do tipo Ru_2 -FAINEs tendem a formar RuO_2 como resíduo final após sua decomposição completa, calculou-se o valor total correspondente a perda de massa para os complexos Ru_2 -cet (79,3%) e Ru_2 -fen (79,6%) considerando-se a reação genérica (9) abaixo:



Os valores obtidos experimentalmente estão um pouco acima dos valores calculados. Essa pequena diferença pode ser justificada pelo fato da análise térmica não ter sido realizada em atmosfera oxidante a qual favorece a decomposição e combustão do material.

4.1.7. Proposta das Fórmulas Estruturais para os Novos Ru₂-FAINEs

De acordo com os dados de caracterização dos complexos Ru₂-cet e Ru₂-fen, relatados anteriormente, a Figura 27 corresponde às suas propostas de formulas estruturais, e a Figura 28 correspondem às suas estruturas otimizadas com o auxílio do software HyperChem® versão 7.51 para Windows. Na Tabela 7 são apresentadas as fórmulas abreviadas, fórmulas moleculares e massas molares desses mesmos complexos e também dos outros dois complexos que foram estudados ao longo desta tese de doutorado.

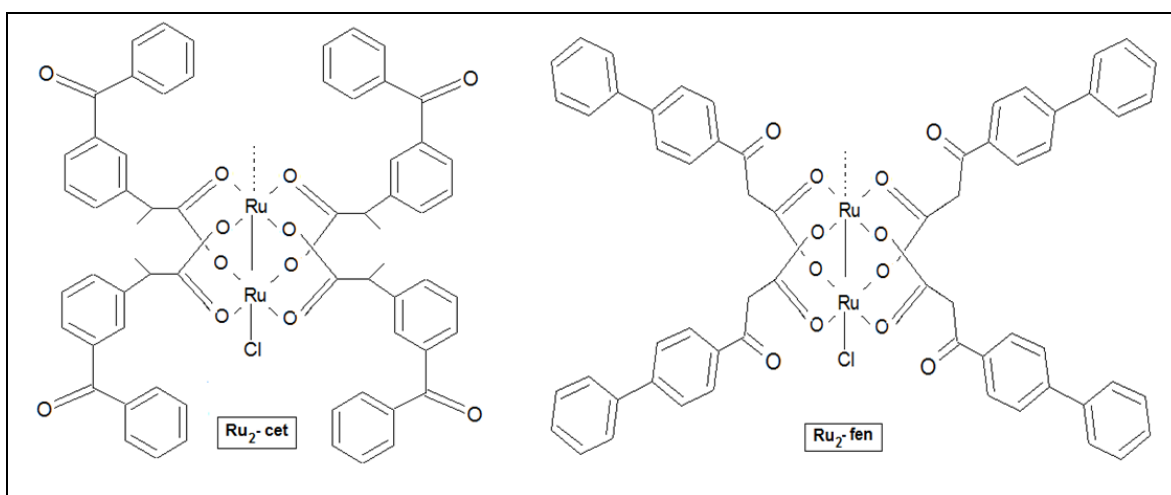


Figura 27 – Fórmulas Estruturais dos Complexos Ru₂-cet e Ru₂-fen

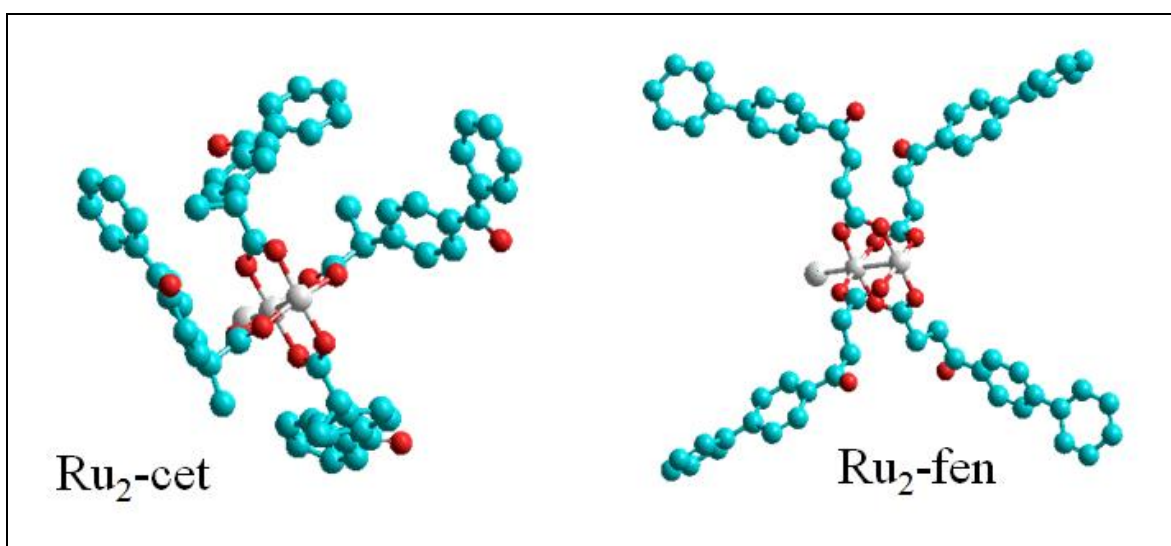


Figura 28 – Fórmulas estruturais dos complexos Ru₂-cet e Ru₂-fen otimizadas pelo software HyperChem®. Cores: branco (Ru), cinza (Cl), azul (C) e vermelho (O)

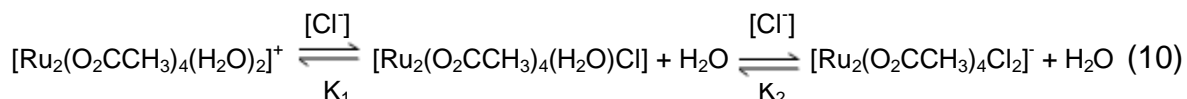
Tabela 7 – Fórmulas e massas molares dos complexos tetracarboxilatos de dirutênio(II,II) estudadas nesta tese de doutorado

Complexos Tetracarboxilatos de Dirutênio (II,III)			
	<i>Fórmulas Abreviadas</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>Massa Molar (g/mol)</i>
Ru ₂ -cet	[Ru ₂ (cet) ₄ Cl]•2H ₂ O	[Ru ₂ (C ₁₆ H ₁₃ O ₃) ₄ Cl]•2H ₂ O	1286,7
Ru ₂ -fen	[Ru ₂ (fen) ₄ Cl]•3H ₂ O	[Ru ₂ (C ₁₆ H ₁₃ O ₃) ₄ Cl]•3H ₂ O	1304,7
Ru ₂ -ibp	[Ru ₂ (ibp) ₄ Cl]•½H ₂ O	[Ru ₂ (C ₁₃ H ₁₈ O ₂) ₄ Cl]•½H ₂ O	1067,7
Ru ₂ -act	[Ru ₂ (act) ₄ Cl]	[Ru ₂ (C ₂ H ₃ O ₂) ₄ Cl]	473,5

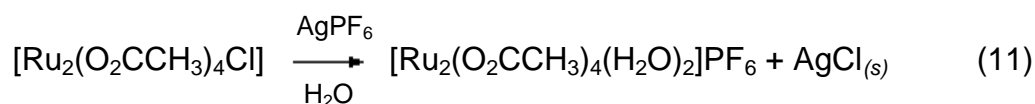
4.2. Estudos Termodinâmicos da Reação de Substituição Axial para o Ru₂-act

Uma vez que um fármaco é administrado ao paciente, ele está susceptível às diversas reações químicas, e no caso dos compostos de coordenação que podem apresentar ligantes lábeis, as substituições dos ligantes, são as principais reações que podem ocorrer. Sabe-se que a concentração de cloreto na corrente sanguínea é relativamente alta (~ 100 mmol L⁻¹) se comparada àquela do interior celular (3-20 mmol L⁻¹) [147], desta forma, diferentes reações de substituição entre os ligantes *água* e *cloreto* podem ocorrer no organismo. Sendo assim, o estudo do equilíbrio da substituição dos ligantes axiais (água e cloreto) no complexo precursor é de grande importância e serve como parâmetro para os diferentes complexos de dirutênio(II,III) coordenados com os FAINES.

A primeira etapa dos estudos termodinâmicos foi de investigar as duas reações sucessivas de equilíbrio, equação (10), sendo que as constantes de equilíbrio (K_{eq}) foram determinadas para a primeira (K₁) e segunda (K₂) substituição axial do [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]⁺ na presença de íons cloreto.



Inicialmente, as mudanças espectrais foram monitoradas partindo do complexo precursor na forma catiônica, [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]⁺, sendo que o ligante cloreto, presente no complexo [Ru₂(O₂CCH₃)₄Cl] foi precipitado de acordo com a reação (11), assegurando a coordenação das duas posições axiais por moléculas de solvente, no caso, a água.



Conforme já era esperado, à medida que são adicionados íons cloreto à solução do complexo catiônico, a sua principal banda da região do visível sofre um deslocamento de 425 nm para 435 nm (Figura 29). Esse deslocamento para menores energias sugere a substituição de uma molécula de água pelo ligante cloreto, dando origem a espécie neutra monossubstituída, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]$. A presença de dois pontos isobésticos em 359 e 428 nm, observados para o intervalo de razão molar $[\text{Ru}_2]:\text{Cl}$ entre 1:0 e 1:90, indicam o primeiro equilíbrio (K_1) entre as duas espécies em solução: a catiônica e a neutra.

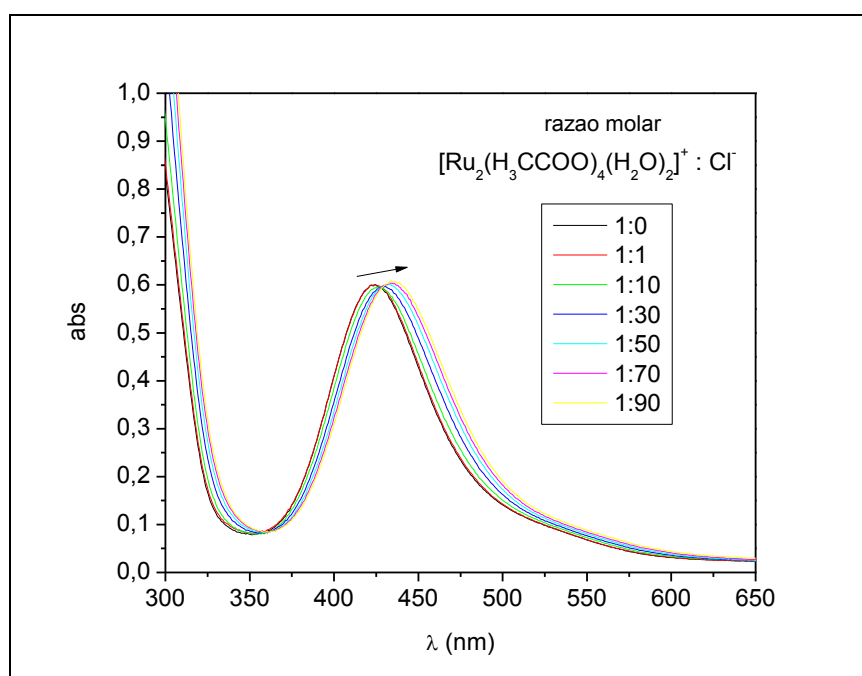


Figura 29 – Espectros eletrônicos do $[\text{Ru}_2\text{-act}]$ (1 mmol L^{-1}) em solução aquosa ($\text{pH} \sim 5$) na presença de diferentes concentrações de NaCl ($0\text{-}90 \text{ mmol L}^{-1}$)

Na medida em que mais íons cloreto eram adicionados à solução, a principal banda do complexo continuou sofrendo um deslocamento para menores energias, até 443 nm (Figura 30), sugerindo a formação do segundo cromóforo, a espécie aniônica, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}_2]^-$. A seleção de alguns espectros eletrônicos para o intervalo de razão molar $[\text{Ru}_2]:\text{Cl}$ entre 1:50 e 1:300, evidencia a formação

de dois novos pontos isobésticos (375 e 431 nm) confirmando o segundo equilíbrio (K_2) entre os cromóforos neutros e aniônicos.

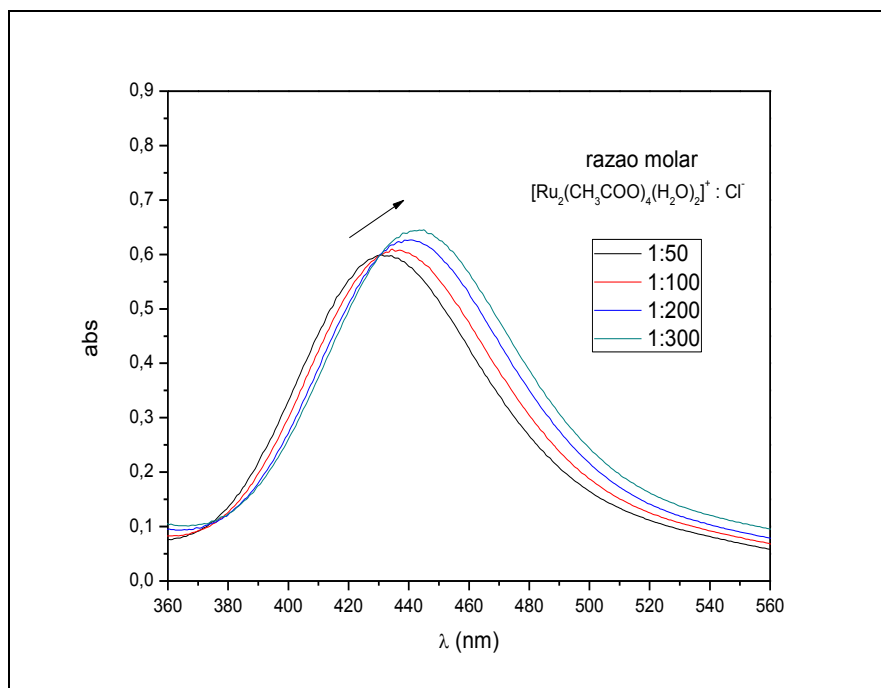


Figura 30 – Espectros eletrônicos do $[Ru_2\text{-act}]$ (1 mmol) em solução aquosa (pH ~ 5) na presença de diferentes concentrações de NaCl (50-300 mmol L^{-1})

Nas Figuras 31 e 32 encontram-se as curvas da variação da absorbância em função da concentração de cloreto. As constantes de equilíbrio K_1 e K_2 foram calculadas usando a equação (12) para os comprimentos de onda 440 e 455 nm, respectivamente, onde Δ_{abs} = variação de absorbância em um dado λ , $(\Delta_{abs})_T$ é a variação de absorbância total em um dado λ , ou seja, ao atingir a saturação.

$$\Delta_{abs} = \frac{(\Delta_{abs})_T K[Cl^-]}{1 + K[Cl^-]} \quad (12)$$

Os valores encontrados para o K_1 ($18 \pm 1 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) e para o K_2 ($3,5 \pm 0,2 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) indicaram que a constante do primeiro equilíbrio é cinco vezes maior que a segunda, ou seja, a substituição axial da primeira molécula de água pelo ligante cloreto é muito mais favorável que a segunda substituição axial. Nenhuma

alteração espectral significativa é observada para concentrações superiores a 2 mol L⁻¹ de íons cloreto.

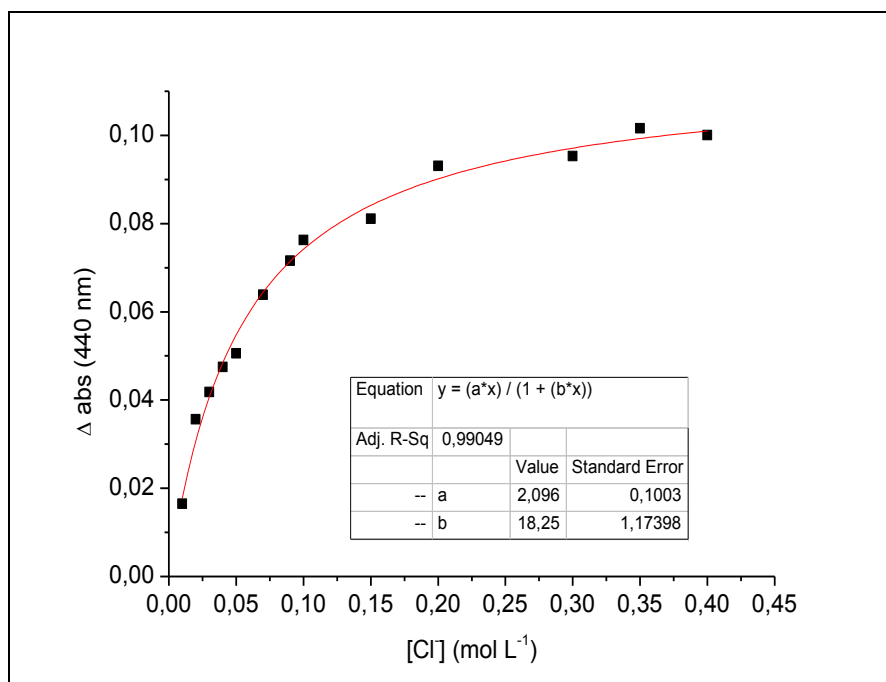


Figura 31 – Curva da variação da absorvância (440 nm) do Ru₂-act (1 mmol L⁻¹) em solução aquosa (pH ~ 5) em função da concentração de NaCl (0-0,4 mol L⁻¹)

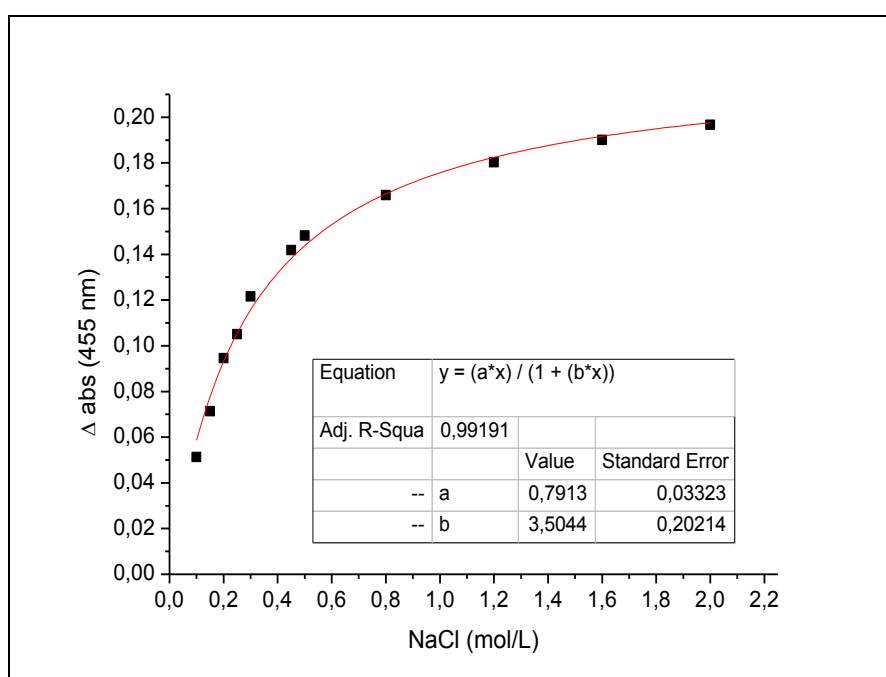


Figura 32 - Curva da variação da absorvância (455 nm) do Ru₂-act (1 mmol L⁻¹) em solução aquosa (pH ~ 5) em função da concentração de NaCl (0,1-2,0 mol L⁻¹)

Apenas um trabalho, publicado em 1989 [148], foi encontrado na literatura sobre estudos de equilíbrio da substituição axial para o complexo precursor Ru₂-act. Neste trabalho, os autores determinaram as constantes de equilíbrio K₁ (15,0 mol⁻¹ L) e K₂ (3,7 mol⁻¹ L) na substituição dos mesmos ligantes axiais. Os cálculos foram realizados utilizando um método dos mínimos quadrados não-lineares a partir da variação na absorbância em 290 nm em função da concentração de íons cloreto em solução. Apesar do procedimento experimental realizado deste trabalho ser diferente do encontrado na literatura, os valores obtidos estão bastante próximos.

Esforços também foram feitos na tentativa de estudar a cinética da reação entre a troca desses ligantes axiais. No entanto, os estudos indicaram que a reação apresenta uma cinética muito rápida para ser mensurada, até mesmo usando baixas temperaturas (5 °C) e a técnica de *stopped-flow*, praticamente, toda a reação já havia sido terminada em menos de 5 ms. Esse mesmo comportamento foi reportado na literatura [148].

A determinação dos três parâmetros termodinâmicos foi baseada nas reações de equilíbrio entre as substituições axiais em função da temperatura, para a variação de entalpia (ΔH°) e variação de entropia (ΔS°), e em função da pressão para a variação de volume (ΔV°) [149].

A variação da absorbância, para as duas soluções contendo diferentes razões molares de [Ru₂-act]:[NaCl] (1:100 e 1:500), foi monitorada em função da temperatura (10-49 °C) (Figuras 33A e 34A), e os valores de ΔH° e ΔS° , para as duas reações de substituição dos ligantes axiais (K₁ e K₂), foram calculados (Figuras 33B e 34B) baseados no coeficiente angular (ΔH°) e linear (ΔS°) da equação (13), conhecida também por equação de Gibbs-Helmholtz, onde R = 8,314 J K⁻¹ mol⁻¹.

$$R \ln K = -\Delta H^\circ \frac{1}{T} + \Delta S^\circ \quad (13)$$

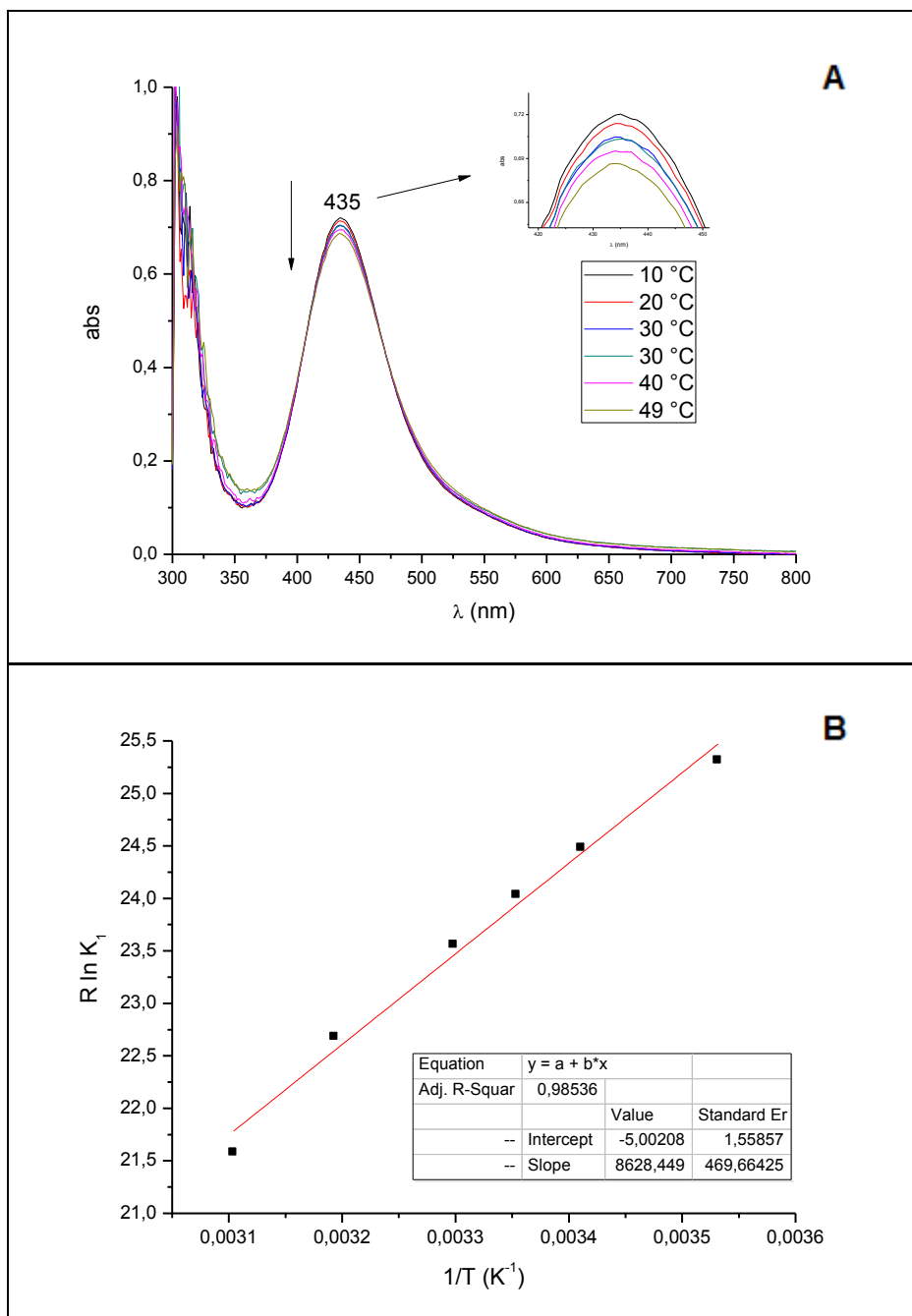


Figura 33 – Dependência da temperatura (10-49 °C) no primeiro equilíbrio (K_1) de $[Ru_2\text{-act}]:[NaCl]$: espectros eletrônicos do $Ru_2\text{-act}$ (1 mmol L^{-1}) em solução aquosa (pH ~ 5) na presença de NaCl (100 mmol L^{-1}) (A); curva de Gibbs-Helmholtz (B)

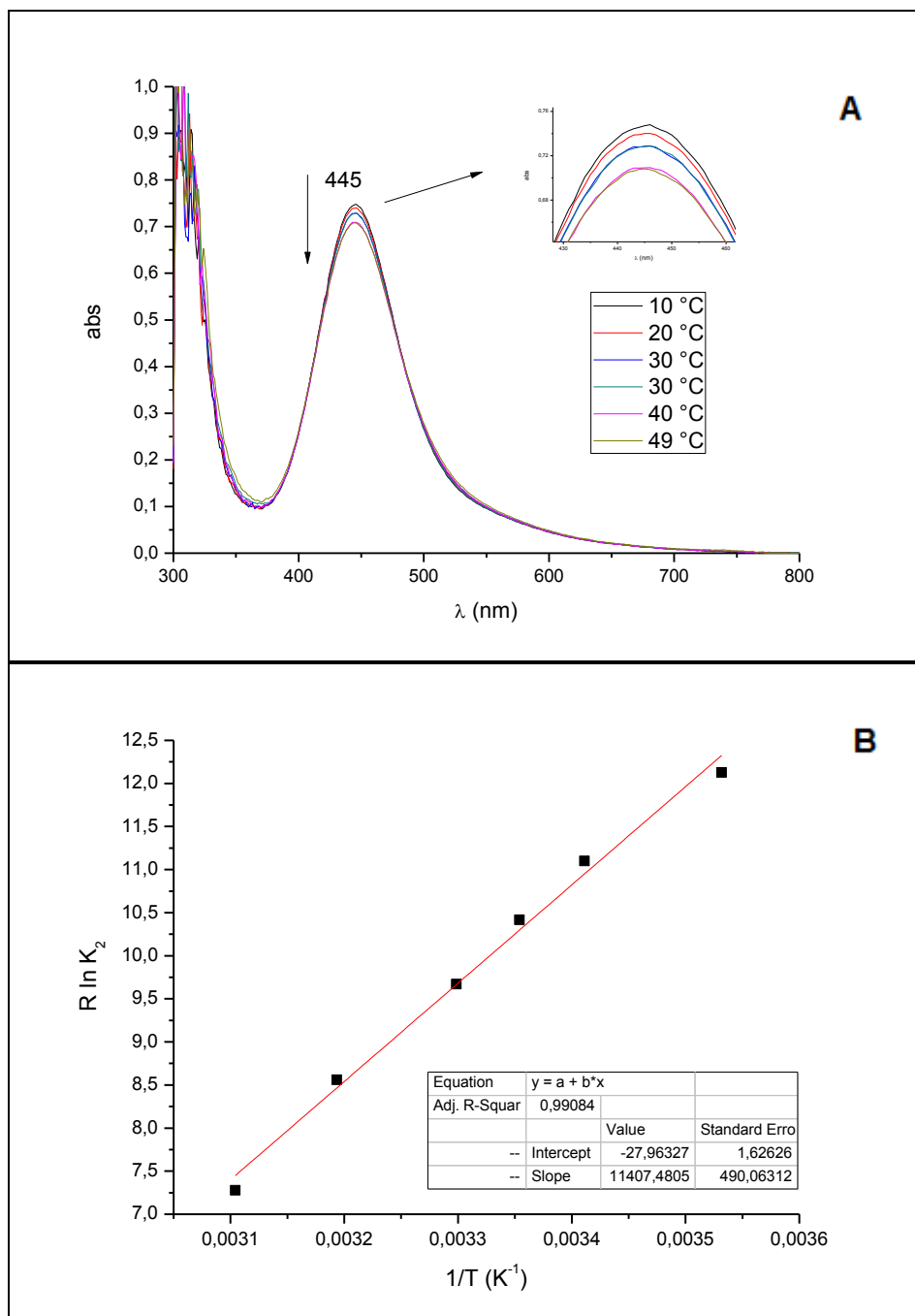


Figura 34 – Dependência da temperatura (10-49 °C) no segundo equilíbrio (K_2) de $[\text{Ru}_2\text{-act}]:[\text{NaCl}]$: espectros eletrônicos do $\text{Ru}_2\text{-act}$ (1 mmol L^{-1}) em solução aquosa ($\text{pH} \sim 5$) na presença de NaCl (500 mmol L^{-1}) (A); curva de Gibbs-Helmholtz (B)

A variação da absorvância para as duas soluções com diferentes razões molares de $[\text{Ru}_2\text{-act}]:[\text{NaCl}]$ (1:100 e 1:500) também foi monitorada em função da pressão (5-150 MPa) à temperatura constante de 28 °C (Figuras 35A e 36A), e os valores de ΔV° , para as duas reações de substituição dos ligantes axiais (K_1 e K_2), foram calculados (Figuras 35B e 36B) a partir do coeficiente

angular da equação (14), sendo $R = 8,314 \text{ cm}^3 \text{ MPa K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Os valores dos três parâmetros termodinâmicos calculados para as duas reações de equilíbrio de substituição dos ligantes axiais estão disponíveis na Tabela 8.

$$RT \ln K = -P\Delta V^\circ + \text{constante} \quad (14)$$

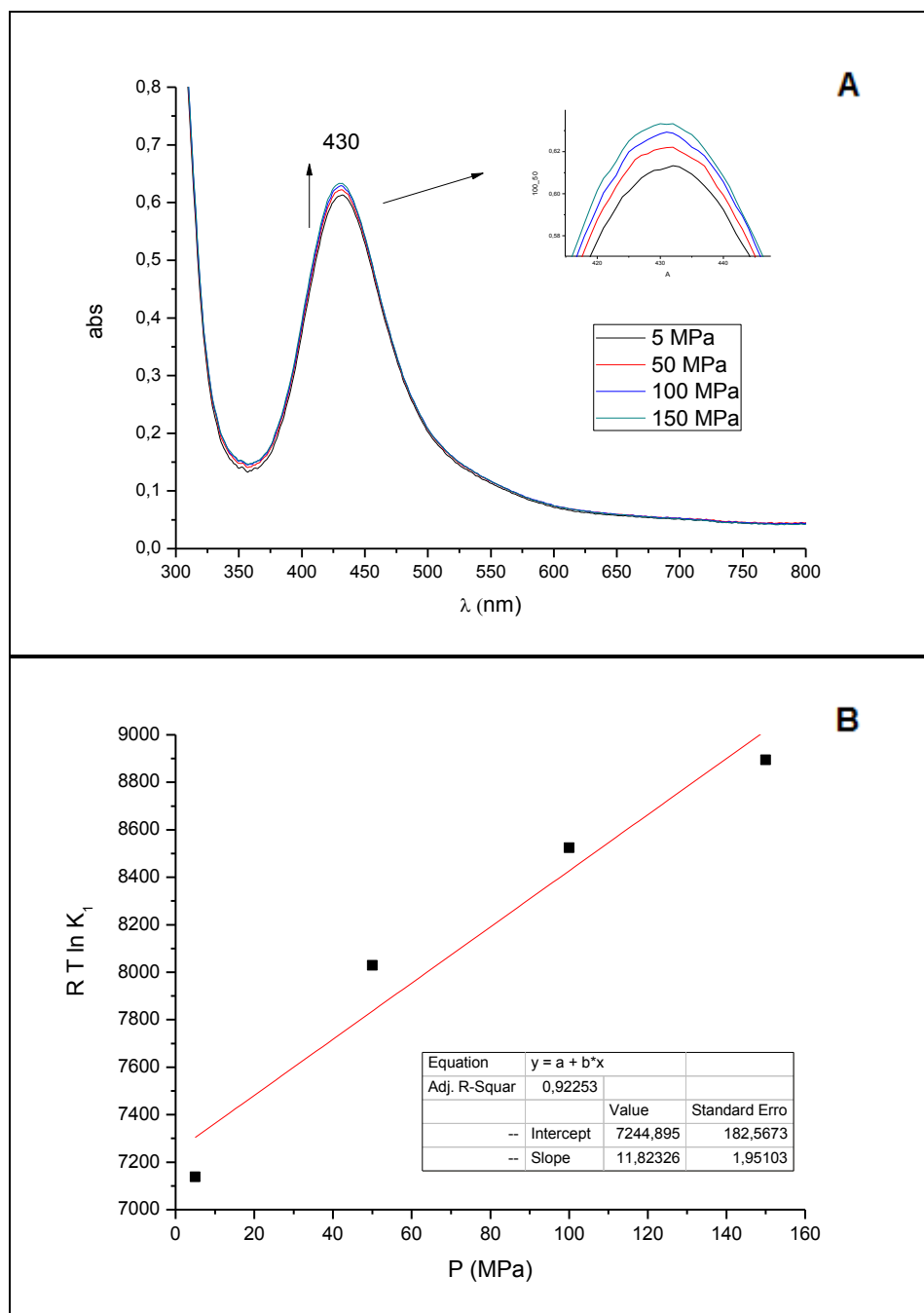


Figura 35 – Dependência da pressão (5-150 MPa) no primeiro equilíbrio (K_1) de $[\text{Ru}_2\text{-act}]:[\text{NaCl}]$: espectros eletrônicos do $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução aquosa ($\text{pH} \sim 5$) na presença de NaCl (50 mmol L^{-1}) (A); curva de $RT \ln K$ em função da pressão (B).

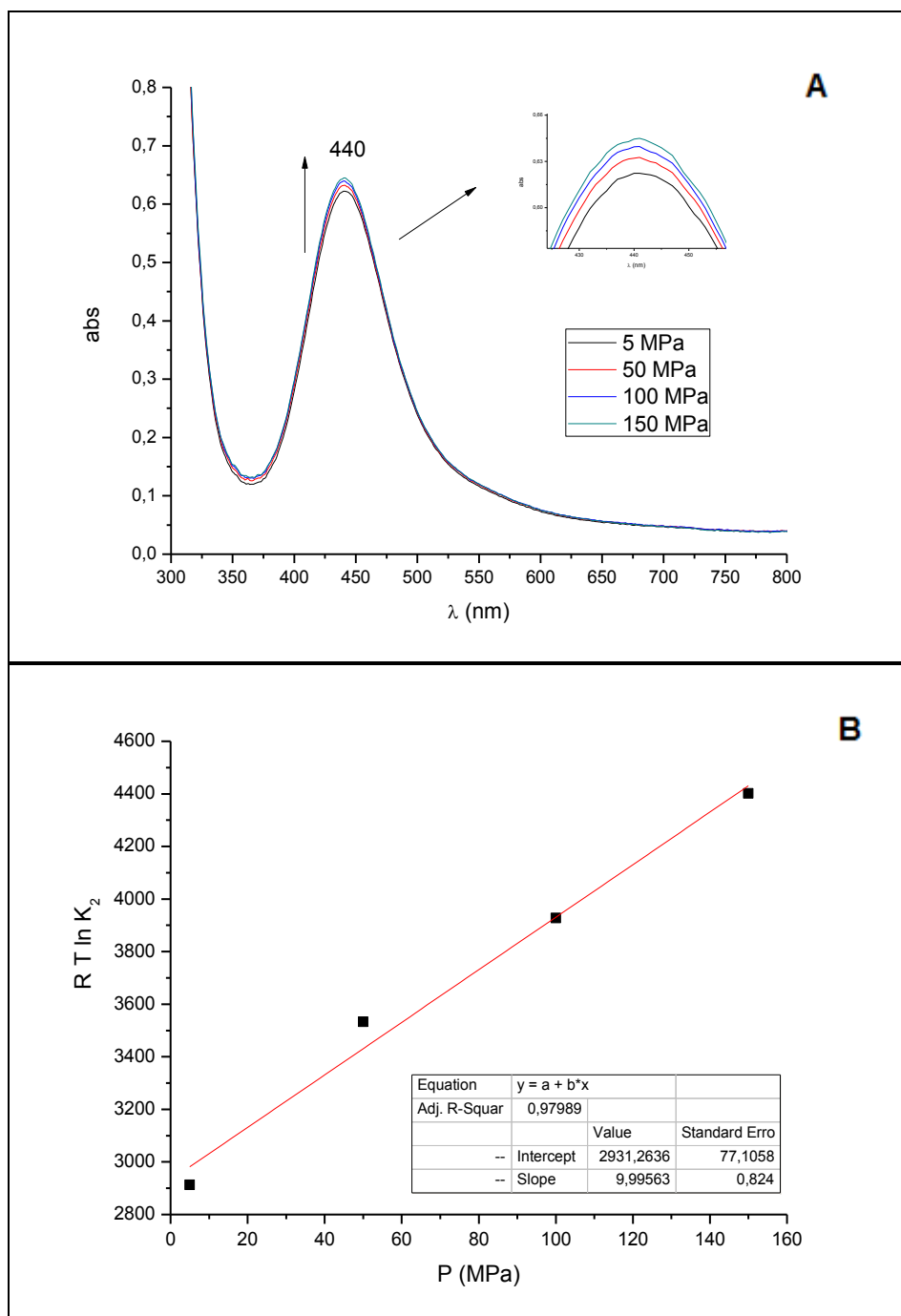


Figura 36 – Dependência da pressão (5-150 MPa) no segundo equilíbrio (K_2) de $[Ru_2\text{-act}]:[NaCl]$: espectros eletrônicos do $Ru_2\text{-act}$ ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução aquosa ($pH \sim 5$) na presença de $NaCl$ (250 mmol L^{-1}) (A); curva de $RT \ln K$ em função da pressão (B).

Tabela 8 – Valores experimentais dos parâmetros termodinâmicos dos dois equilíbrios (K_1 e K_2) da reação de substituição dos ligantes axiais

<i>Parâmetros</i>	<i>Primeiro Equilíbrio (K_1)</i>	<i>Segundo Equilíbrio (K_2)</i>
ΔH° (kJ mol ⁻¹)	-8,7 ± 0,5	-11,4 ± 0,5
ΔS° (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	-5,0 ± 1,6	-28,0 ± 1,6
ΔV° (cm ³ mol ⁻¹)	-11,8 ± 1,9	-10,0 ± 0,8

Os valores das constantes de equilíbrio (K_1 e K_2), para cada temperatura e usados nas Figuras 33B e 34B, foram calculados a partir das equações disponíveis no Apêndice II levando em consideração as absorvidades molares (ϵ) em 430 e 440 nm para os três cromóforos do complexo em solução aquosa: catiônico, neutro e aniônico (Tabela III-1, Apêndice III).

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que a temperatura e a pressão apresentam efeitos opostos no equilíbrio das reações de substituição dos ligantes axiais (K_1 e K_2). O aumento da temperatura desloca o equilíbrio no sentido dos reagentes, ou seja, a formação de espécies aqua-substituídas. Por outro lado, o aumento da pressão, desloca o equilíbrio no sentido direto da reação, ou seja, a formação de espécies cloro-substituídas.

Baseados nos parâmetros termodinâmicos calculados e resumidos na Tabela 8 é possível concluir que os equilíbrios são deslocados para a reação inversa com o aumento da temperatura, o que é esperado para reações exotérmicas ($\Delta H^\circ < 0$). Observa-se também que a reação do segundo equilíbrio é entalpicamente mais favorecida que a do primeiro equilíbrio, o que é condizente com a formação de ligações axiais no cloro-rutênio se comparadas com as ligações aqua-rutênio. O valor de $\Delta S^\circ < 0$ sugere que os dois equilíbrios não são entropicamente favorecidos. O deslocamento do equilíbrio no sentido dos produtos, com o aumento da pressão, pode ser explicado com a diminuição do volume molar parcial ($\Delta V^\circ < 0$) dos produtos à medida que ocorre a substituição axial das moléculas de água por cloreto.

4.3. Estudos de Interação com Aminoácidos: Cinética e Mecanismo

Os complexos metálicos podem sofrer diferentes reações, sendo a substituição de ligantes, uma das principais reações que ocorrem no organismo. O papel da atividade biológica nesses complexos metálicos vai depender dos

vários fatores termodinâmicos e das suas propriedades cinéticas, sendo assim, investigar a reatividade de novos candidatos à metalofármacos, com moléculas presentes no meio biológico, é de fundamental importância para compreender o seu comportamento biológico *in vitro* e até mesmo *in vivo* [150].

Alguns trabalhos já foram relatados na literatura confirmando a possibilidade da substituição axial dos complexos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) por ligantes de interesse biológico que contêm diferentes átomos doadores de elétrons (N-, S-, O-, P-) como por exemplo dmsO [151], tiofeno (THT) [152], diferentes análogos de piridina [153], uréia [154], imidazol, indol e cafeína [155] e fosfanos [156].

O único estudo sobre a cinética da reação de substituição dos ligantes axiais foi realizado para o complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4]^+$ em acetonitrila com diferentes ligantes fosfanos, PCy_3 e PCy_2Ph , onde Cy = ciclohexanil e Ph = fenil. O mecanismo dissociativo para a reação de substituição dos dois ligantes axiais foi proposto e as constantes de velocidades de segunda ordem para a primeira reação de substituição ($10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$) assim como os parâmetros de ativação também foram calculados [157].

A cinética da reação de substituição dos ligantes equatoriais acetatos [158] ou propionatos [159] por íons oxalatos também foi investigada para complexos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III). Os resultados indicaram que a reação ocorre em três etapas, sendo a primeira (rápida) e a segunda (lenta) atribuída à substituição do primeiro e segundo ligante, e a terceira etapa atribuída à decomposição do produto formado [159].

Em sua tese de doutorado, Ribeiro [27] conseguiu isolar um novo tetracarboxilato de dirutênio(II,III) com as posições axiais coordenadas com bases nitrogenadas (adenina e adenosina) partindo do complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ em meio alcoólico, assegurando a integridade da estrutura em gaiola e também das ligações metálicas múltiplas. No entanto, tentativas de isolar, esses mesmos compostos em soluções aquosas, não foram bem sucedidas; na ocasião não foi possível caracterizar os sólidos formados que possuíam uma coloração violeta.

Alguns estudos sobre os tetracarboxilatos de dirutênio(II,III), incluindo o primeiro trabalho publicado por Stephenson em 1966 [25] relatam a possibilidade

de que o núcleo metálico pode sofrer grandes alterações dependendo das condições de reação e do poder coordenante dos novos ligantes axiais, N-, O- ou P-doadores de elétrons [160,161,162,163,164,165,166,167]. Uma das possibilidades é a quebra da estrutura em gaiola e das ligações metálicas dando origem a compostos monoméricos de Ru(II), ou a reação de desproporcionamento em que os principais produtos são complexos diméricos do tipo μ -oxo Ru₂(III,III) e monoméricos Ru₂(II) [157].

Estudos preliminares, sobre a síntese de um novo complexo contendo este tipo de núcleo metálico (μ -oxo) com dois ligantes equatoriais acetatos (fármacos ibuprofeno e cetoprofeno) e seis ligantes axiais piridinas, foram divulgados em recentes comunicações de congressos e simpósios [168,169,170].

Levando-se em consideração todas essas possibilidades que podem ocorrer com os tetracarboxilatos de dirutênio(II,III), as reações de substituição de ligantes axiais entre o complexo precursor e os aminoácidos, relatadas a seguir, são apenas hipóteses de mecanismos. Esforços, sem sucesso, foram feitos na tentativa de isolar um sólido e caracterizá-lo para confirmar os mecanismos propostos entre a reação do complexo precursor e os aminoácidos.

O comportamento cinético da reação do Ru₂-act com os diferentes aminoácidos investigados (Figura 5) foram realizados em solução de tampão acetato 20 mmol L⁻¹ em pH 5,0. Estudos prévios indicaram que o complexo apresenta uma boa estabilidade por um longo período em solução ácida (dados não apresentados). Na Tabela 9 encontra-se os valores dos pK_a dos aminoácidos.

Tabela 9 – Valores dos pK_a dos aminoácidos estudados [171,172]

<i>Aminoácidos</i>	<i>pK_a</i>		
	Ácido	Amino	cadeia
Glicina	2,35	9,78	-
Triptofano	2,38	9,39	-
Histidina	1,77	9,18	6,1
Cisteína	2,05	10,25	8,0

4.3.1. Reação do Ru₂-act com Glicina

Inicialmente foi investigado o acompanhamento das alterações espectrais entre a reação do complexo [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]⁺ e o aminoácido glicina, em função do tempo (25 °C e pH 5,0) com uma razão molar de 1:50 (Ru₂:gli). Durante as primeiras horas de reação (Figura 37) foi possível observar significativas mudanças espectrais ao longo da faixa de 300 e 700 nm. Entre as mudanças observadas pode-se destacar: i) a redução da intensidade da principal banda do visível seguido de um deslocamento gradual para maiores comprimentos de onda (440 nm); ii) o lento surgimento de uma nova banda em 545 nm; e iii) o aparecimento de um ponto isobéstico, apesar de não muito bem definido, em ~ 400 nm.

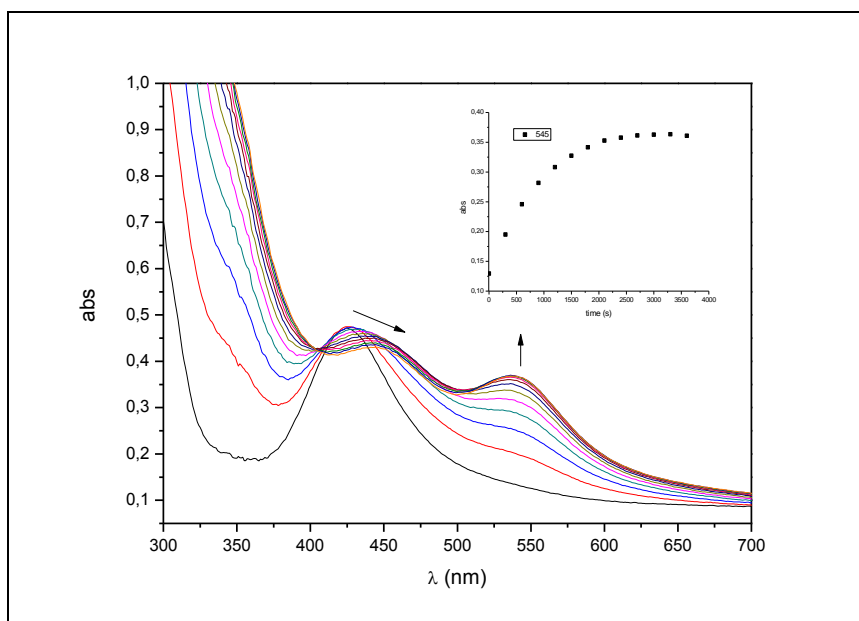


Figura 37 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,7 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de glicina (35 mmol L⁻¹) para o período de até 1 h de reação. Inserção: curva cinética em λ = 545 nm.

Após 1 h de reação (Figura 38) é observada uma redução lenta e gradual da intensidade das bandas de 440 e 545 nm até se estabilizarem após aproximadamente 10 h de reação.

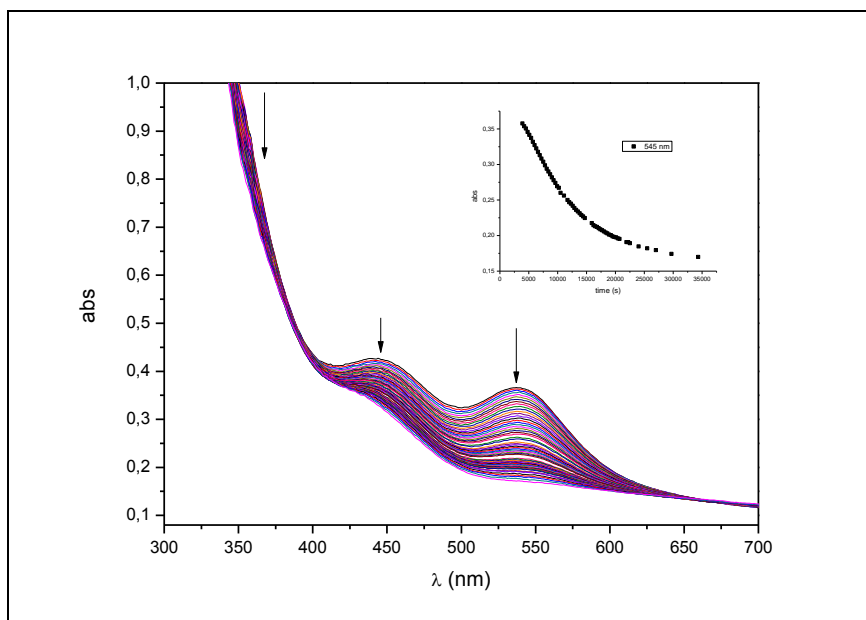


Figura 38 - Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,7 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de glicina (35 mmol L⁻¹) para o período entre 1 e 10 h de reação. Inserção: curva cinética em $\lambda = 545$ nm.

Uma vez definida as melhores condições cinéticas da primeira etapa, o crescimento da banda em 545 nm foi monitorado registrando as suas curvas cinéticas, com diferentes razões molares de [Ru₂]:[gli], em um espectrofotômetro UV-Vis usando uma cubeta do tipo *Tandem*. As constantes de velocidades observadas (k_{obs}) foram determinadas ajustando os pontos das curvas cinéticas a uma equação simples de crescimento exponencial.

Os resultados indicaram que o valor da absorvância final (Figura 39) e a k_{obs} (Figura 40) aumentam linearmente com o aumento da concentração do aminoácido, sugerindo uma reação que tende ao equilíbrio. O significativo coeficiente linear da equação da reta, obtido entre o k_{obs} e [gli] (Figura 40) confirmou o equilíbrio entre reagentes e produto, sugerindo uma reação reversível. O comportamento cinético observado, para este mecanismo proposto, segue a lei de velocidade expressa pela equação (15).

$$k_{obs} = k_1[gli] + k_{-1} \quad (15)$$

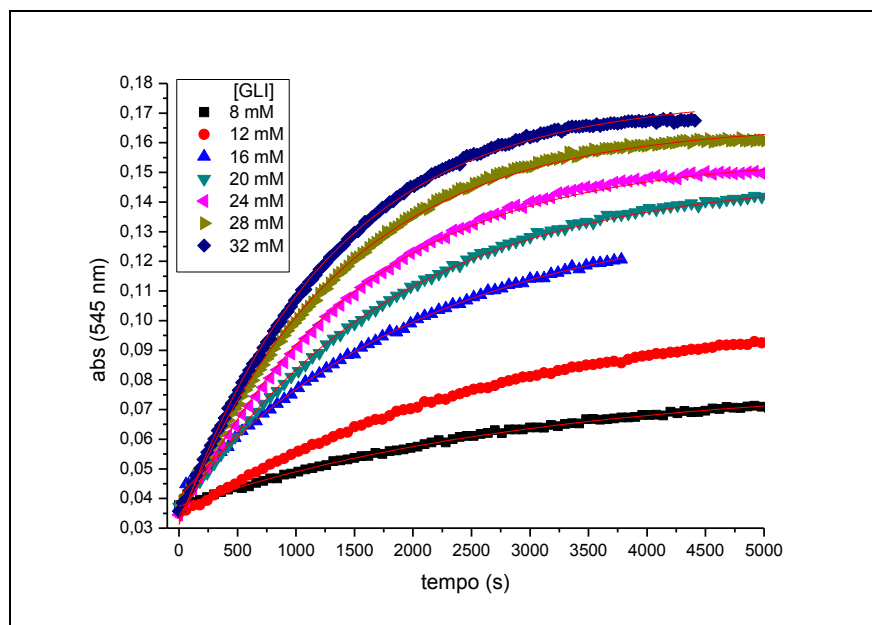


Figura 39 – Curvas cinéticas ($\lambda = 545 \text{ nm}$) registradas para a reação entre o $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) com diferentes concentrações de gli em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,0$

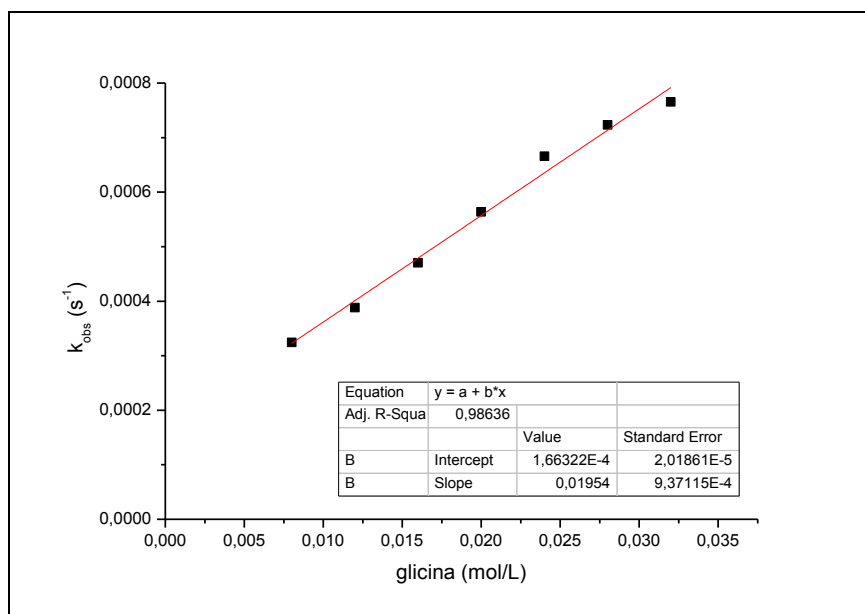


Figura 40 – Curva k_{obs} em função da concentração de [gli] para a reação com $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\lambda = 545 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,0$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

A curva linear obtida entre a k_{obs} em função da [gli] em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,0$ (Figura 40) permitiu calcular a constante de velocidade de segunda ordem para a reação direta ($k_1 = (1,95 \pm 0,09) \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$) a partir do coeficiente angular da reta, e a constante de velocidade de primeira ordem para reação inversa ($k_{-1} =$

$(1,7 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) a partir do coeficiente linear da reta, levando-se em consideração a lei de velocidade proposta na equação (15). A constante de equilíbrio cinético (K_1) entre as duas reações, também, pôde ser calculada ($K_1 = k_1/k_{-1} = 115 \pm 20 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

Baseado em todos esses resultados reportados acima, e também na deconvolução (Figura 41) do ultimo espectro eletrônico da Figura 37, pode-se propor que o aminoácido glicina reage com o complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ em duas lentas etapas subsequentes. A primeira etapa, que ocorre dentro do período de 1 h, pode estar relacionada à substituição de uma das moléculas de água coordenada axialmente ao núcleo metálico por uma molécula de glicina, e o produto mono-substituído obtido, possui pelo menos três bandas que absorvem na região do visível, 465, 545 e 642 nm (Figura 41). Ainda neste espectro observa-se a presença de uma banda em 423 nm que está relacionada ao complexo precursor que não reagiu com a glicina, confirmando a presença da reação inversa e o equilíbrio químico da reação (K_1).

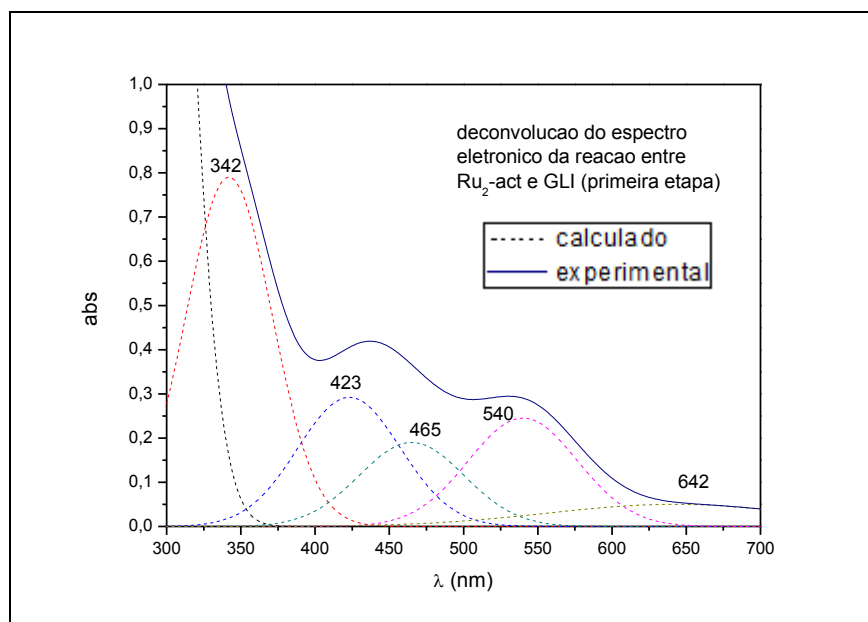


Figura 41 – Deconvolução do ultimo espectro eletrônico da primeira etapa da reação entre o $\text{Ru}_2\text{-act}$ e gli, registrado na Figura 37. Linha cheia = dado experimental; Linhas tracejadas = dados calculados

A segunda etapa, muito mais lenta que a primeira (a reação se estabiliza apenas após 10 h), sugere a decomposição das espécies presentes em

solução, uma vez que as três bandas da região do visível sofrem redução de intensidade (Figura 42).

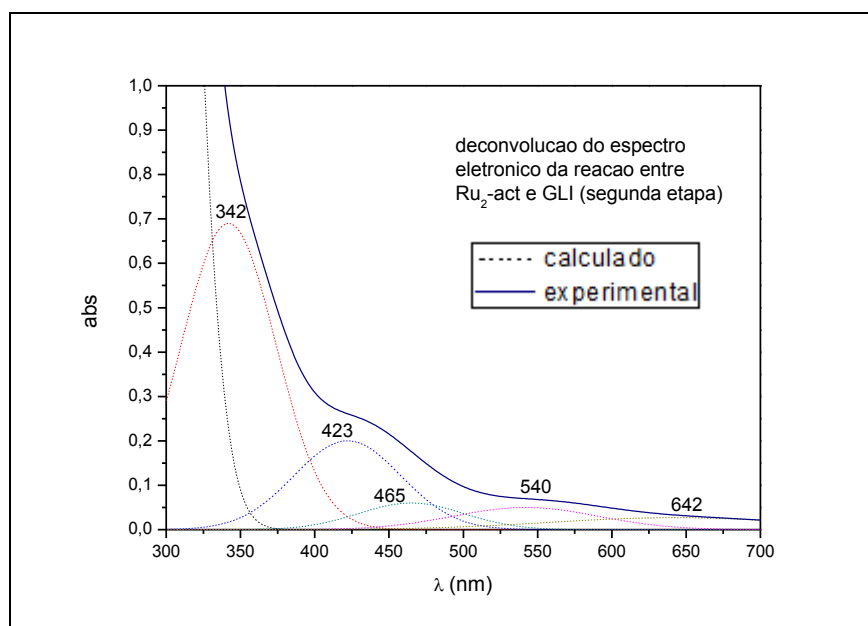


Figura 42 – Deconvolução do último espectro eletrônico da segunda etapa da reação entre o Ru₂-act e gli, registrado na Figura 38. Linha cheia = dado experimental; Linhas tracejadas = dados calculados

O aminoácido glicina tem apenas dois possíveis sítios de coordenação com metais de transição, o grupamento ácido carboxílico e o grupamento amino. Nas condições experimentais empregadas (pH 5,0), o grupamento ácido carboxílico está completamente desprotonado e o grupamento amino protonado (vide pK_a dos aminoácidos na Tabela 9). A partir dos resultados obtidos, propõem-se que uma das moléculas de água, coordenadas axialmente ao complexo [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]⁺, é substituída por uma molécula de glicina coordenada através do grupamento carboxilato, uma vez que já se encontra desprotonado, conforme equação (16a), sendo Hgli = ⁺H₃N-CH₂-COO⁻. No entanto, uma vez que a glicina está coordenada ao núcleo metálico Ru(II,III), reações de reorganização estrutural (com cinética muito rápida) podem ocorrer, já que o pK_a do grupamento NH₃⁺ é reduzido no ato de sua coordenação, abrindo a possibilidade da coordenação *via* amino, seguida de sua desprotonação (NH₂) com liberação de H⁺, conforme proposto na equação (16b), e justificando o aparecimento da nova banda na região do visível (~ 540 nm) no espectro eletrônico. A formação do íon hidrônio, nesta equação (16b), pôde ser confirmado através do monitoramento da

redução do pH em experimentos com soluções não tamponadas (Figura 43). Uma vez que a etapa determinante da lei da velocidade é a reação lenta, equação (16a), a reação rápida, equação (16b), não contribui para o cálculo da lei de velocidade [173].

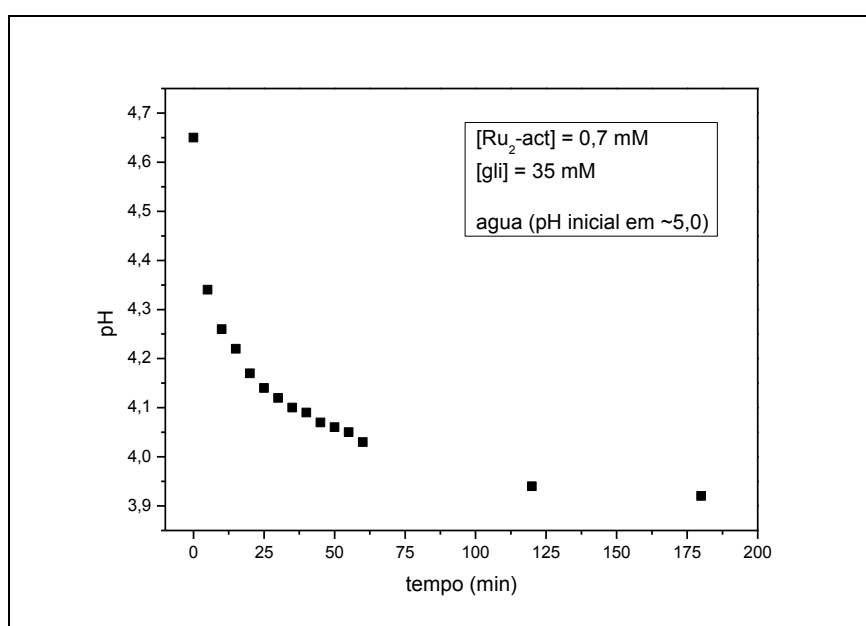
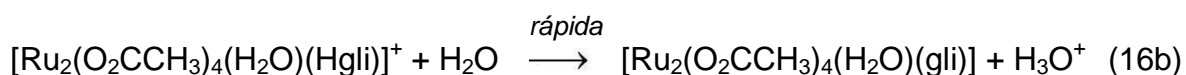
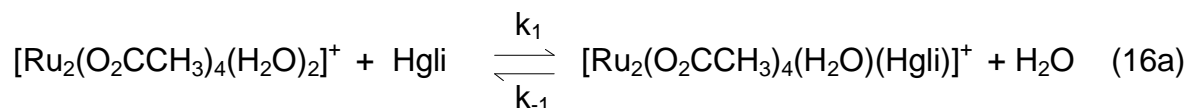


Figura 43 – Variação do pH durante a primeira etapa da reação do Ru₂-act (0,7 mmol L⁻¹) e gli (35 mmol L⁻¹) em água a temperatura ambiente

4.3.2. Reação do Ru₂-act com Cisteína

Em contraste com a glicina, a reação do $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ com o aminoácido cisteína apresenta três etapas de cinética muito rápida. Na primeira (Figura 44), que ocorre em até 1 s, pode-se observar a formação de duas novas bandas (350 e 470 nm). Já na segunda etapa (Figura 45), que ocorre durante o intervalo de 1 e 30 s, a banda de 470 nm é levemente deslocada para níveis de maior energia, ao mesmo tempo que, um leve aumento na intensidade da banda em 350 nm é também observado. Por fim, na terceira etapa (Figura 46),

registrada para o intervalo de 40-500 s, ocorre a redução da banda em 470 nm acompanhada de um ponto isosbético em 450 nm.

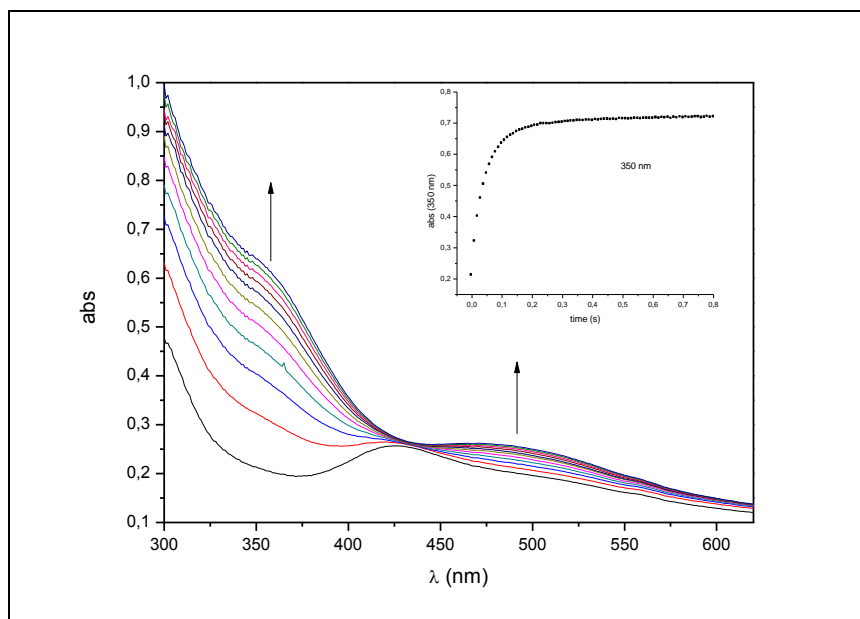


Figura 44 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de cisteína (2 mmol L⁻¹) para o período de até 1 s de reação. Inserção: curva cinética em $\lambda = 354$ nm

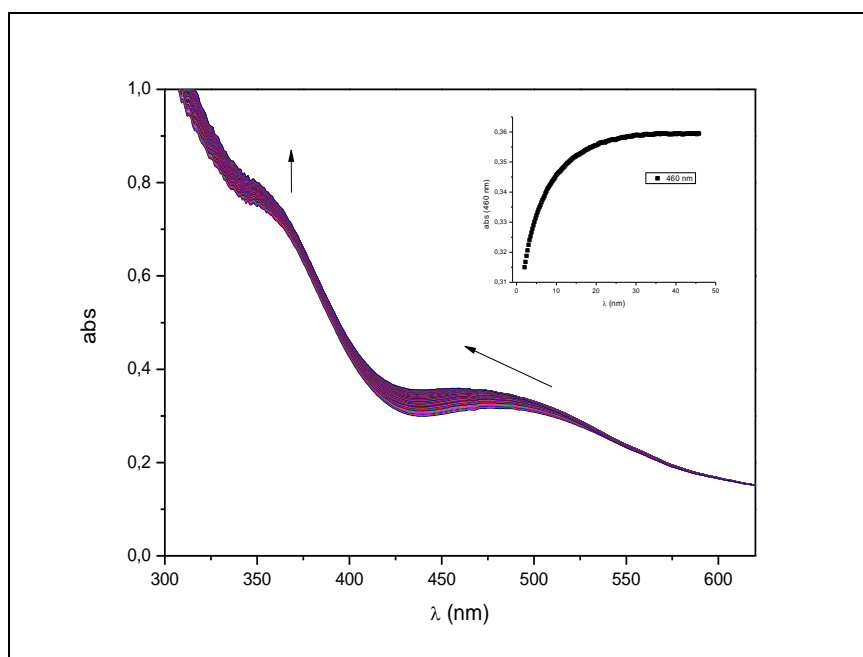


Figura 45 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de cisteína (2 mmol L⁻¹) para o período entre 1 e 30 s de reação. Inserção: curva cinética em $\lambda = 460$ nm

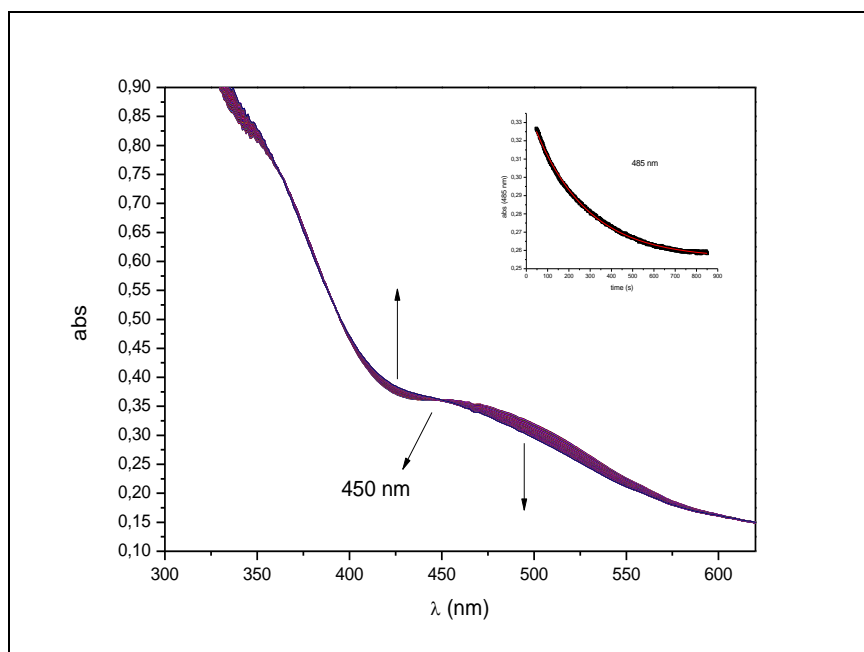


Figura 46 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de cisteína (2 mmol L⁻¹) para o período entre 40 e 500 s de reação. Inserção: curva cinética em λ = 485 nm

A cinética das duas primeiras etapas foi investigada pela técnica de *stopped-flow* usando condições de pseudo-primeira ordem, ou seja, com excesso de pelo menos dez vezes de cisteína em relação à concentração do complexo.

Para a primeira etapa, as constantes de velocidade observada (k_{obs}) foram determinadas para diferentes razões molares de [Ru₂]:[cis], ajustando os pontos da curva cinética (λ = 354 nm) a uma equação dupla de crescimento exponencial, conforme pode ser observado na Figura 47, indicando também uma dependência linear em função da concentração da cisteína (Figura 48).

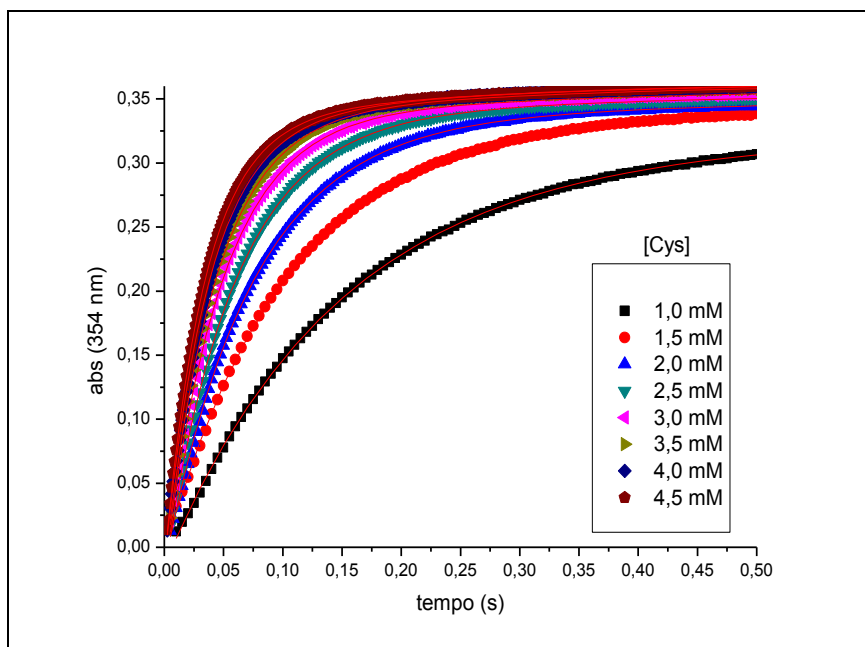


Figura 47 – Curvas cinéticas ($\lambda = 354 \text{ nm}$) registradas para a primeira etapa da reação do $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com diferentes concentrações de cis (10°C e $\text{pH } 5,0$)

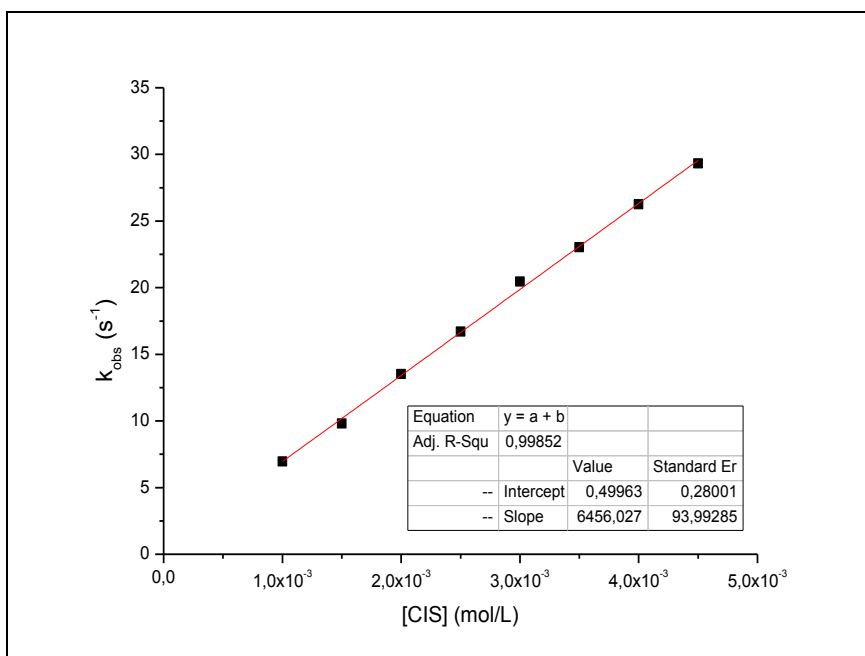


Figura 48 – Curva k_{obs} em função da concentração de [cis] para a reação com $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\lambda = 354 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,0$ e 10°C)

A pequena variação de absorvância total em função da concentração de cis (Figura 47) e os dados cinéticos (Figura 48) sugerem uma reação quase irreversível representada pela lei de velocidade expressa na equação (17). Os valores das constantes de velocidades foram calculados a 10°C a partir do

coeficiente angular ($k_1 = (6,5 \pm 0,1) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e coeficiente linear ($k_{-1} = 0,5 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$) da reta (Figura 48). O elevado valor obtido para a constante de equilíbrio ($K_1 = k_1/k_{-1} = (1,3 \pm 0,5) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), desta primeira etapa da reação, sugere que se trata de um mecanismo praticamente irreversível.

$$k_{obs} = k_1[cis] + k_{-1} \quad (17)$$

Por outro lado, as curvas cinéticas registradas para a segunda etapa da reação (Figura 49) sugerem claramente um equilíbrio não favorável devido ao significativo aumento da absorbância final, à medida que a concentração da cisteína é elevada. Os valores de k_{obs} , para esta segunda etapa da reação, foram determinados a partir do ajuste dos pontos das curvas cinéticas em $\lambda = 460 \text{ nm}$, a uma equação dupla de crescimento exponencial, sendo que os valores utilizados foram os referentes ao segundo tempo da equação.

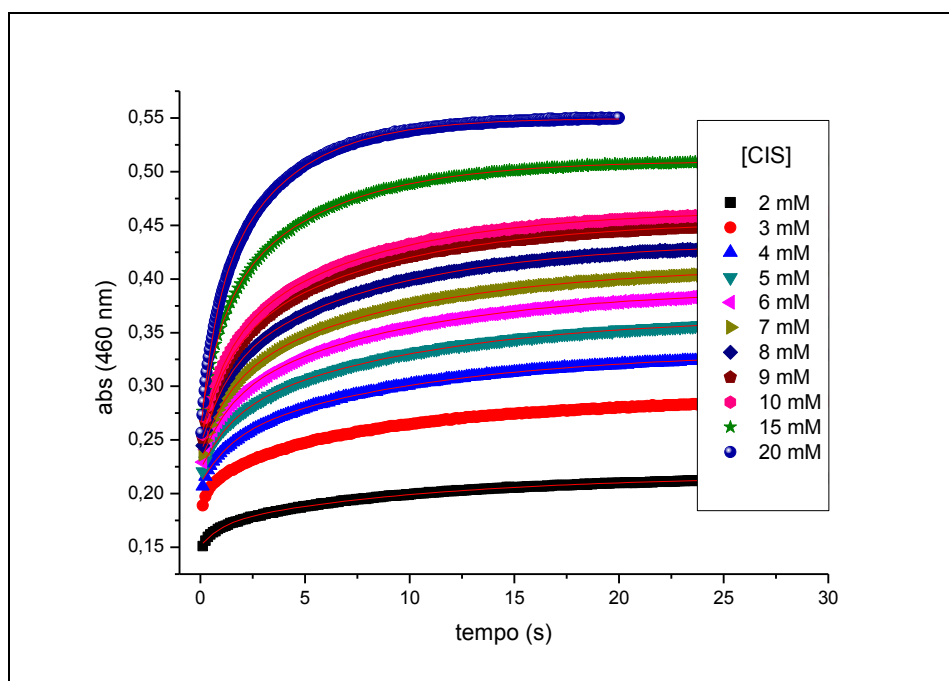


Figura 49 – Curvas cinéticas ($\lambda = 460 \text{ nm}$) registradas para a segunda etapa da reação do Ru_2act ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) com diferentes concentrações de cis (25°C e $\text{pH } 5,0$)

Surpreendentemente, os valores k_{obs} para esta segunda etapa apresentaram uma dependência quadrática em função da concentração da cisteína, e os dados experimentais puderam ser ajustados à lei de velocidade

expressa na equação (18). A partir do coeficiente angular e linear da equação da reta (Figura 50b) foi possível calcular as constantes de velocidades da reação direta ($k_{on} = (4,63 \pm 0,05) \times 10^2 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-2}$) e inversa ($k_{off} (8,92 \pm 0,01) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), respectivamente, concluindo-se que esta segunda etapa da reação é significativamente mais lenta que a primeira, até mesmo usando-se temperaturas elevadas.

$$k_{obs} = k_{on} [cis]^2 + k_{off} \quad (18)$$

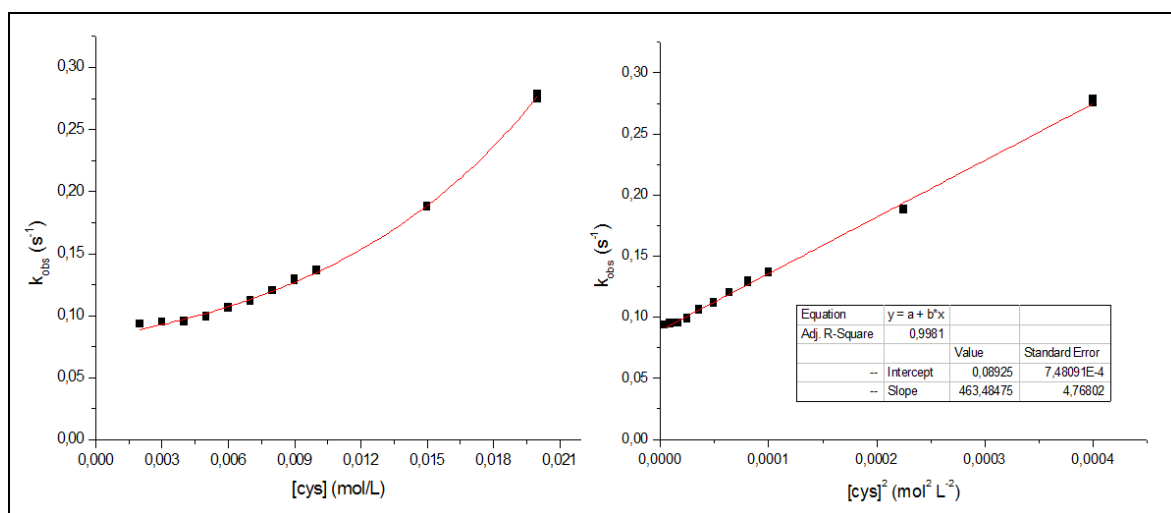
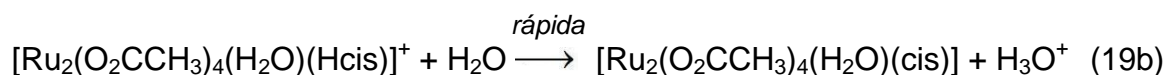
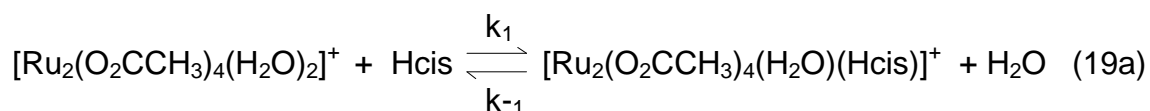
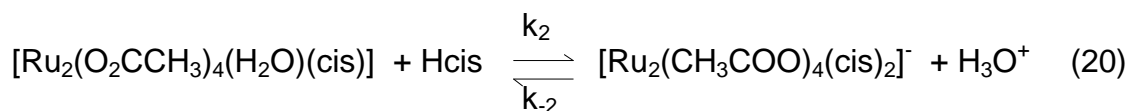


Figura 50 – Curva k_{obs} em função da concentração de cis para a reação com $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\lambda = 460 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,0$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

Uma análise global dos resultados indica a primeira etapa pode ser atribuída à substituição axial de uma molécula de água no complexo diaqua- Ru_2 por uma molécula de cisteína; e que a segunda reação pode estar associada à substituição da segunda molécula de água. Sendo assim, foi possível propor o seguinte mecanismo de reação, representado pelas equações (19) e (20), onde $\text{Hcis} = \text{HS-CH}_2\text{-CH(NH}_3^+\text{)-COO}^-$.





A lei de velocidade para a segunda etapa, baseada na formação do intermediário 1:1 da primeira etapa, está representada na equação (21).

$$k_{obs} = \frac{k_1 k_2 [\text{cis}]^2 + k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2 [\text{cis}]} \quad (21)$$

No entanto, se for considerado que $k_2[\text{cis}] \ll k_{-1}$, a equação acima pode ser simplificada na equação (22) permitindo a substituição do k_{on} e k_{off} da lei de velocidade observada, equação (18).

$$k_{obs} = K_1 k_2 [\text{cis}]^2 + k_{-2} \quad (22)$$

Sendo assim, $K_1 k_2 = k_{on} = (4,63 \pm 0,05) \times 10^2 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-2}$, e o $k_{-2} = k_{off} = (8,92 \pm 0,01) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O aminoácido cisteína é um ligante que possui três possíveis sítios de ligação com complexos metálicos, o grupamento carboxilato, o amino e o *tiol*. Este último, embora esteja totalmente protonado ($\text{pK}_a = 8,0$) nas condições experimentais utilizadas, os resultados cinéticos sugerem que a rápida reação entre a cisteína e $\text{Ru}_2\text{-act}$ esteja relacionada a este grupamento, uma vez que ele apresenta um forte poder coordenante. No entanto, da mesma forma que ocorre com a glicina, acredita-se que em um primeiro momento, a coordenação da cisteína ao centro metálico, ocorra através do grupamento carboxilato seguida do abaixamento do pK_a do *tiol*, possibilitando uma rápida reorganização estrutural e a sua coordenação ao rutênio. Desta forma, é possível justificar o aparecimento das novas absorções no espectro eletrônico, com o perfil diferente do da glicina.

4.3.3. Reação do $\text{Ru}_2\text{-act}$ com Triptofano

A reação do $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ com o aminoácido trp foi acompanhada espectroscopicamente em função do tempo (25 °C e pH 5,0), e os estudos indicaram duas etapas de reação, ambas com cinéticas lentas. A primeira

ocorre em um período aproximado de 1 h (Figura 51), sendo observado o surgimento de um ombro (345 nm) e duas bandas (450 e 540 nm). Já na segunda etapa, é observada uma redução gradual nas intensidades dessas absorções (durante o tempo investigado, 22h, a reação não tinha atingido a estabilidade), sugerindo uma lenta decomposição de todas as espécies presentes (dados não apresentados).

Na Figura 52 pode ser observado a deconvolução do ultimo espectro registrado para a primeira etapa. Os cálculos indicaram a presença de uma banda em 422 nm sugerindo que parte do complexo precursor ainda está presente no meio reacional, e a presença das bandas (465, 538 e 630 nm) podem ser relacionadas ao produto formado. Esse mesmo perfil foi encontrado na reação com a glicina (Figura 41).

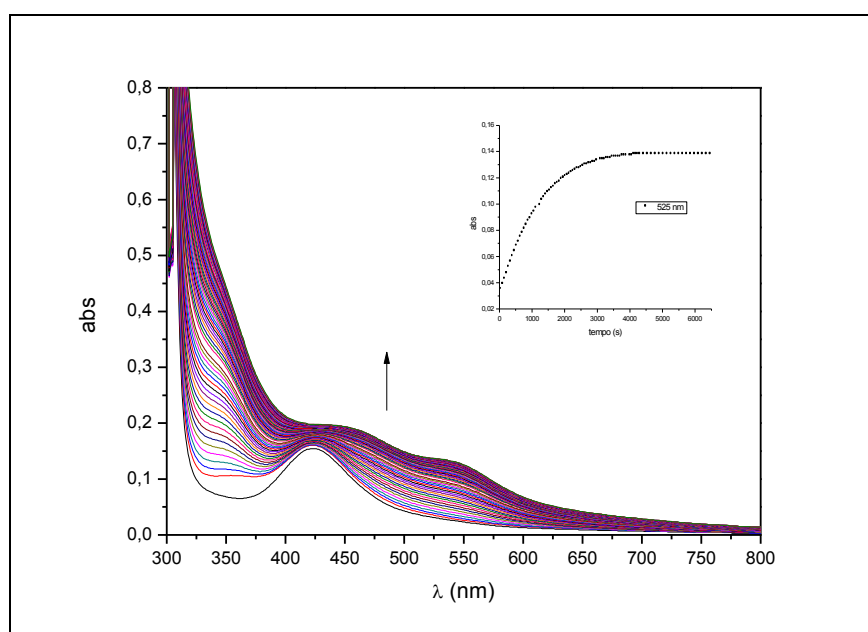


Figura 51 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de triptofano (10 mmol L⁻¹) para o período aproximado em 1 h de reação. Inserção: curva cinética em λ = 525 nm.

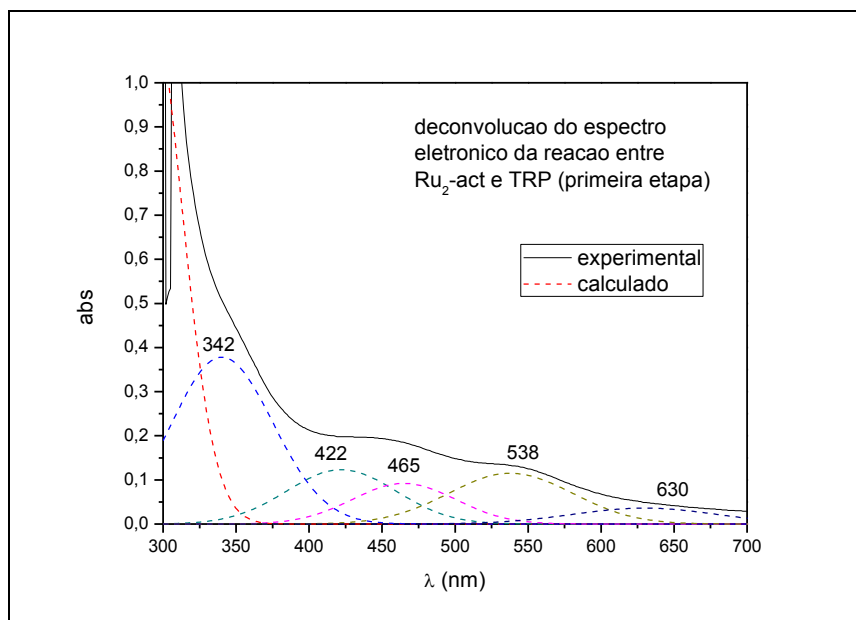


Figura 52 – Deconvolução do ultimo espectro eletrônico da primeira etapa da reação entre o Ru₂-act e trp, registrado na Figura 51 . Linha cheia = dado experimental; Linhas tracejadas = dados calculados

A cinética da primeira etapa foi investigada através do monitoramento da curva cinética da banda em 525 nm em diferentes razões molares de [Ru₂]:[trp], em um espectrofotômetro UV-Vis usando uma cubeta do tipo *Tandem*. As constantes de velocidades observadas (k_{obs}) foram determinadas ajustando os pontos das curvas cinéticas a uma equação simples de crescimento exponencial.

O aumento da absorbância final em função da concentração de trp (Figura 53), e a curva linear de k_{obs} (Figura 54) que não passa pela origem dos eixos sugerem que a reação tende ao equilíbrio, indicando uma reação reversível. O mecanismo proposto segue a lei de velocidade expressa pela equação (23), e a partir de seu coeficiente angular e linear foi possível calcular as constantes de velocidades para a reação direta ($k_1 = (4,9 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$) e inversa ($k_{-1} = (3,4 \pm 0,2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), respectivamente. A constante de equilíbrio cinético (K_1) entre as duas reações também pôde ser calculada ($K_1 = k_1/k_{-1} = 144 \pm 14 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

$$k_{obs} = k_1[trp] + k_{-1} \quad (23)$$

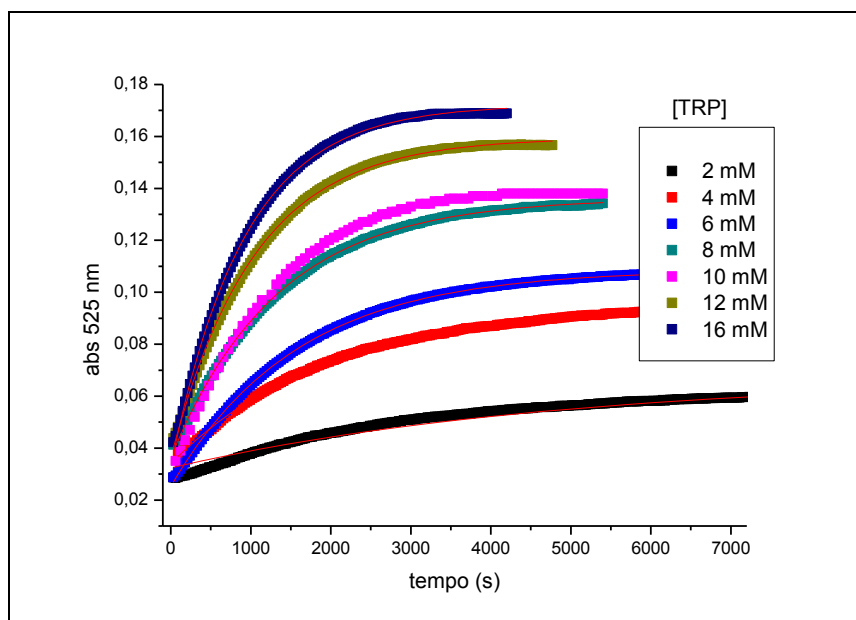


Figura 53 – Curvas cinéticas ($\lambda = 525 \text{ nm}$) registradas para a reação entre o $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) com diferentes concentrações de trp em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,0$

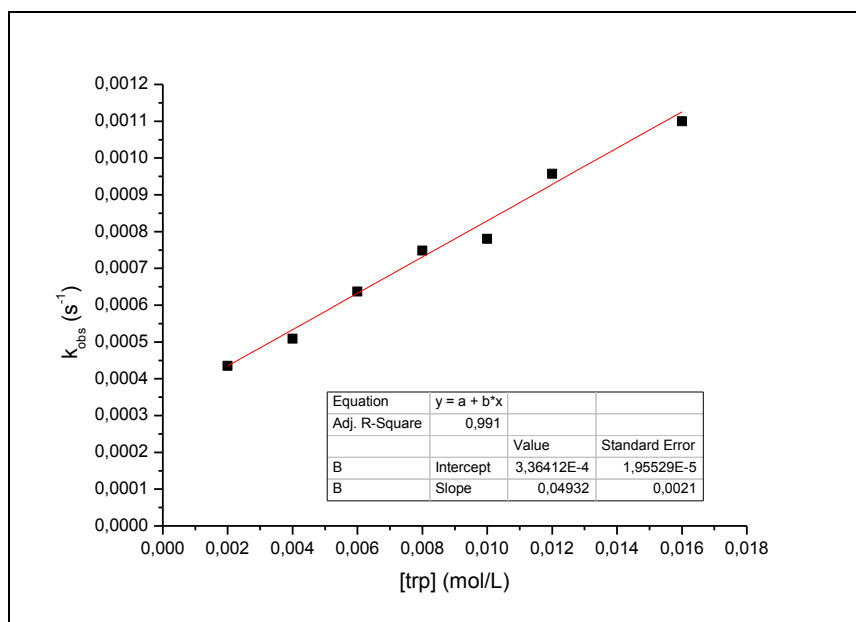
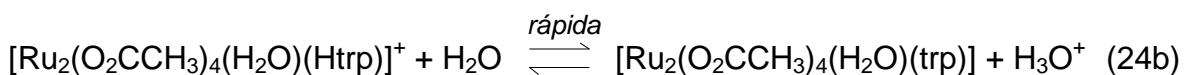
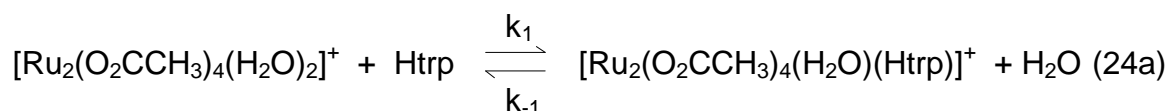


Figura 54 – Curva k_{obs} em função da concentração de [trp] para a reação com $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\lambda = 525 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,0$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

Baseado em todos esses resultados relatados acima, foi possível propor que a primeira etapa da reação, que apresenta uma cinética lenta com reação reversível, está relacionada à substituição de uma das moléculas de água coordenada axialmente por uma molécula de triptofano; e que na segunda etapa,

muito mais lenta que a anterior, está relacionada à decomposição das espécies presentes no meio reacional.

O aminoácido trp, além de possuir os mesmos sítios de coordenação da glicina, possui o grupamento indol que apresenta um átomo de nitrogênio aromático permitido a sua coordenação a diferentes metais [209]. No entanto, acredita-se que em um primeiro momento, a coordenação do trp ao centro dimetálico tenha ocorrido *via* carboxilato, equação (24a) onde $\text{Htrp} = {}^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}_2\text{H}_4(\text{C}_8\text{H}_5\text{NH})-\text{COO}^-$. E que após sua coordenação, reações intramoleculares podem ocorrer alterando o modo de coordenação para o grupamento indol ou amino, equação (24b), justificando o aparecimento das novas bandas da região do visível. Esta hipótese está fundamenta nos resultados cinéticos que são muito semelhantes aos observados com a glicina.



4.3.4. Reação do $\text{Ru}_2\text{-act}$ com Histidina

A reação do $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ com o aminoácido his foi inicialmente investigada em um equipamento de *stopped-flow* acoplado a um detector de leitura rápida (*rapid-scan*) o qual possibilitou o acompanhamento das alterações espectrais em função do tempo (Figura 55).

No decorrer desta reação foi possível acompanhar significativas alterações espectrais: i) a formação de duas novas bandas na região de 350 e 545 nm; ii) a formação de um ombro na região de 475 nm; iii) a redução da principal banda do visível do complexo precursor (425 nm); iv) a formação de pontos “isobéstico” (~410 e ~450 nm) mesmo que não muito bem definidos; e v) um período de indução de aproximadamente 10 s que é observado na curva cinética de 545 nm (Figura 56).

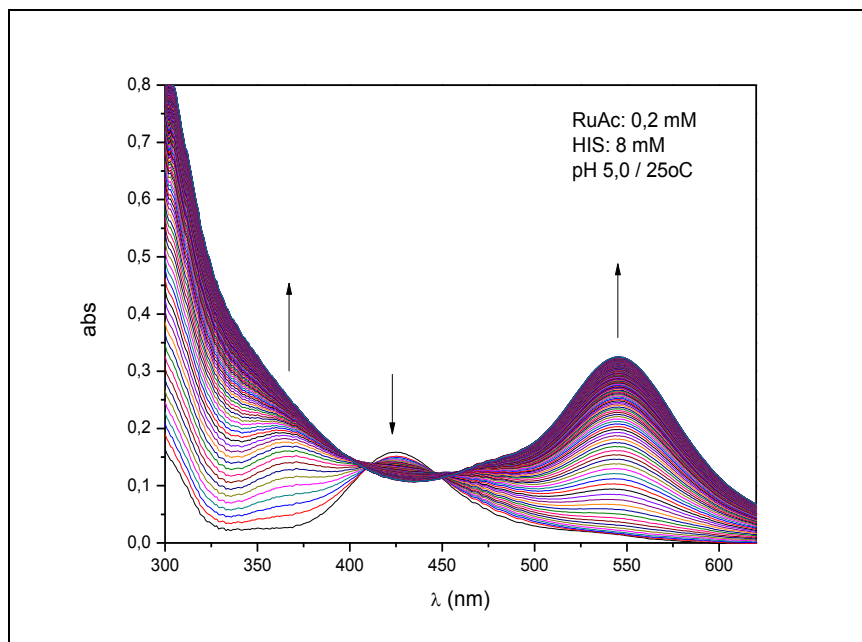


Figura 55 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C) após a adição de excesso de his (8 mmol L⁻¹) para o período de até 300 s

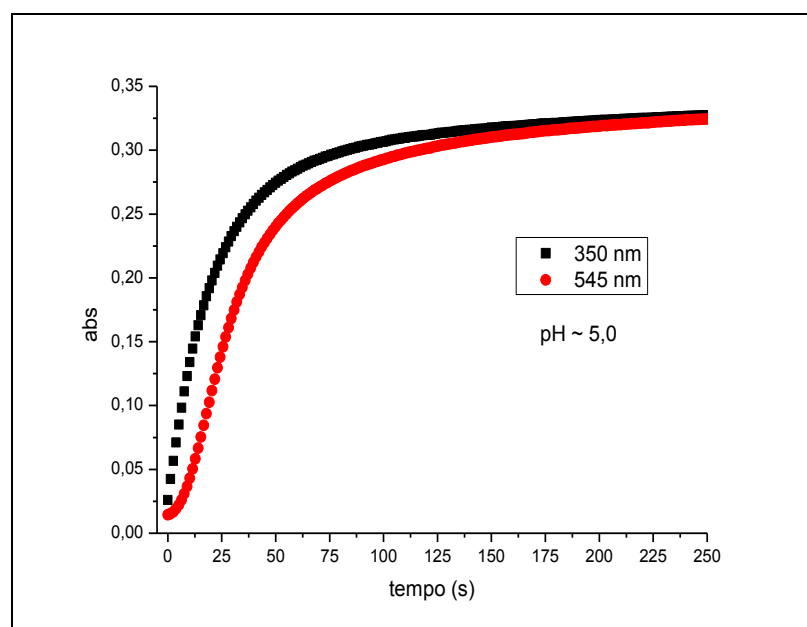


Figura 56 – Curvas cinéticas (350 e 545 nm) para a reação de Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) com his (8 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (25 °C)

Sabe-se que a presença de períodos de indução em uma curva cinética, e pontos isobésticos não bem definidos em espectros eletrônicos, são indicativos de que mais de uma reação pode estar ocorrendo durante a mesma escala de tempo. Neste sentido, resolveu-se investigar o comportamento dos

espectros eletrônicos durante apenas os 10 s da reação, o qual se refere ao período de indução (Figura 57).

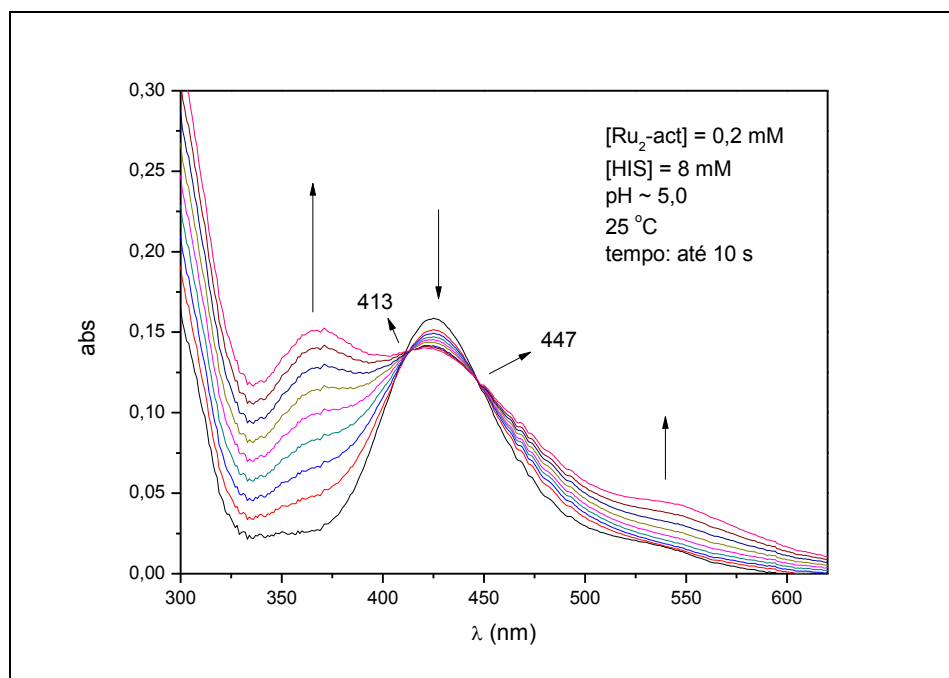


Figura 57 – Espectros eletrônicos do $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) em tampão acetato pH 5,0 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) após a adição de excesso de his (8 mmol L^{-1}) para o período de até 10 s

Surpreendentemente, verificou-se a formação de dois pontos isobésticos (413 e 417 nm) muito claros e bem definidos, confirmado assim o equilíbrio das espécies presentes. Observa-se também que durante este período inicial da reação, a nova banda em 350 nm já está praticamente formada, enquanto que a outra banda em 545 nm ainda estava se formando lentamente. Sendo assim, a cinética da primeira etapa – reação rápida de formação da banda em 350 nm – foi investigada com diferentes razões molares ($\text{Ru}_2\text{-act}:\text{his}$) em um equipamento de *stopped-flow*, enquanto que para a segunda etapa – reação lenta de formação da banda em 545 nm – foi investigada com as mesmas razões molares porém usando um espectrômetro UV-Vis com cubeta do tipo *Tandem*. As constantes de velocidades observadas (k_{obs}), para os dois casos, foram determinadas ajustando os pontos das curvas cinéticas a uma função dupla de crescimento exponencial com a finalidade de separar as duas etapas das reações.

A curva de k_{obs} em função da concentração de histidina, obtida para a primeira etapa observada (Figura 58), mostrou uma dependência quadrática com um intercepto muito pequeno. Aplicando a lei de velocidade expressa na equação (25), foi possível calcular as constantes de velocidade para a reação direta, $k_{on} = (2,5 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ L}^2 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e inversa, $k_{off} = (2,86 \pm 0,01) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a partir do coeficiente angular e linear da equação da reta de k_{obs} em função de $[\text{his}]^2$, respectivamente (Figura 58B).

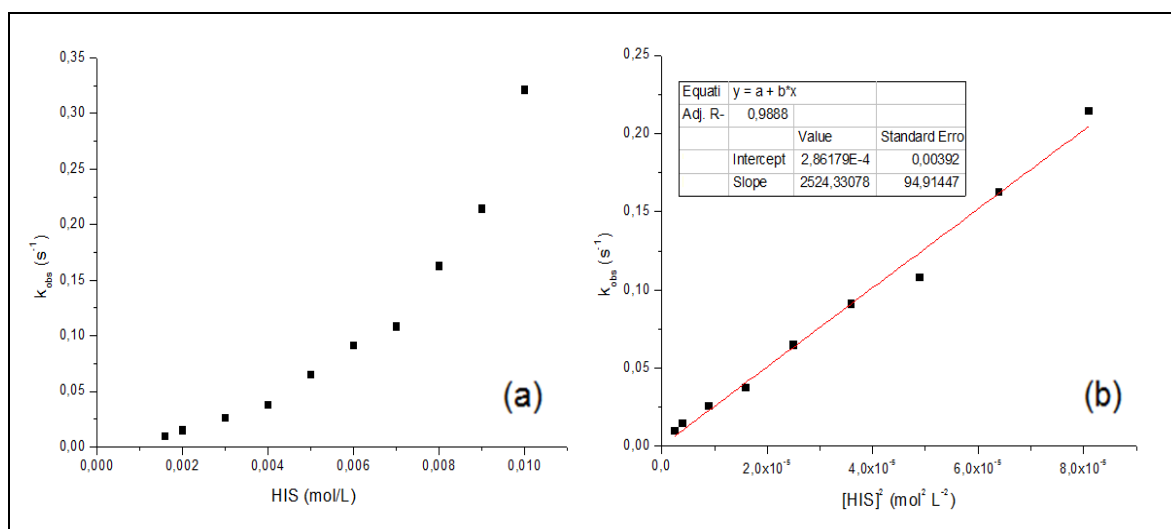


Figura 58 – Curva k_{obs} em função da concentração de his para a reação rápida com $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\lambda = 350 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,0$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

$$k_{obs} = k_{on}[\text{his}]^2 + k_{off} \quad (25)$$

A deconvolução do espectro eletrônico registrado após 10 s da reação (primeira etapa observada) (Figura 59) indicou a presença das mesmas bandas que são observadas para as reações entre os aminoácidos glicina e triptofano, porém com pequeno deslocamento em seu comprimento de onda. Apesar da significativa redução da banda de 422 nm, os cálculos da deconvolução indicaram que ela ainda está presente no meio reacional, sugerindo que a espécie diaqua- Ru_2 ainda está presente em solução.

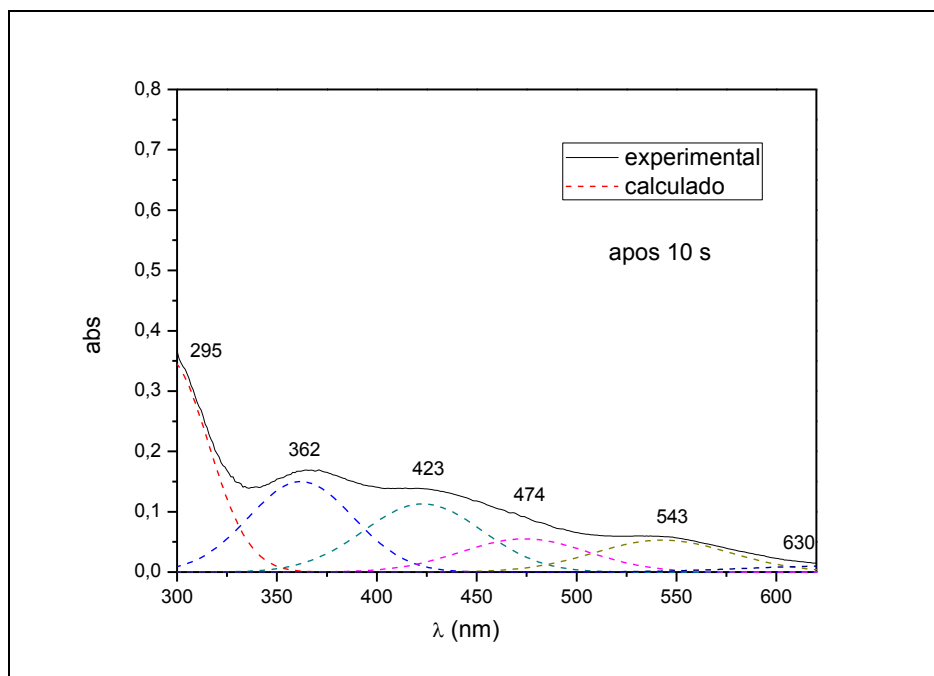
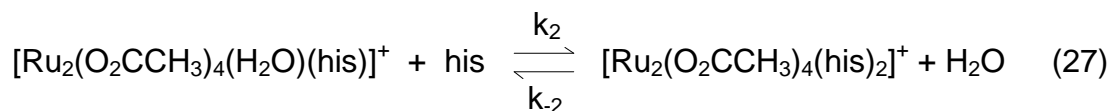
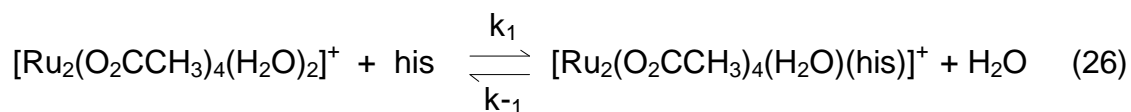


Figura 59 – Deconvolução do espectro eletrônico para a reação entre o Ru₂-act e his após 10 s da reação. Linha cheia = dado experimental; Linhas tracejadas = dados calculados

O aminoácido his tem três possíveis sítios de ligação a metais, o grupamento ácido carboxílico, o amino, e o anel imidazol. Uma vez que este último apresenta um forte caráter nucleofílico, o grupamento imidazol é provavelmente o principal sítio de coordenação ao rutênio. Além disso, o seu pK_a (Tabela 9) está bem próximo das condições empregadas e portanto praticamente desprotonado. Sendo assim, acredita-se que esta primeira etapa, mais rápida, pode ser atribuída à substituição das duas moléculas de água coordenada por duas moléculas de histidina *via* anel imidazol. O mecanismo dessas duas reações, (26) e (27), onde his = (H₃N₂C₃)-CH₂-CH(NH₃⁺)-COO⁻, pode ser expresso em termos da lei de velocidade (28), e portanto os valores de k_{on} e k_{off} da equação (25), podem ser substituídos respectivamente por K₁k₂ e k₋₂ na equação (28).



$$k_{obs} = K_1 k_2 [his]^2 + k_{-2} \quad (28)$$

O estudo cinético da segunda etapa observada (reação lenta) mostrou que a absorvância final da banda em 545 nm diminui de intensidade à medida que a concentração da histidina é elevada (Figura 60) ao mesmo tempo em que o k_{obs} aumenta linearmente (Figura 61), possibilitando o cálculo da constante de velocidade, $k_3 = 4,7 \pm 0,1 \text{ L}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a partir do coeficiente angular da equação (29). Essa etapa da reação pode ser atribuída a uma etapa subsequente de decomposição a qual um grupamento acetato pode estar sendo substituído por uma molécula de histidina.

$$k_{obs} = k_3 [his] \quad (29)$$

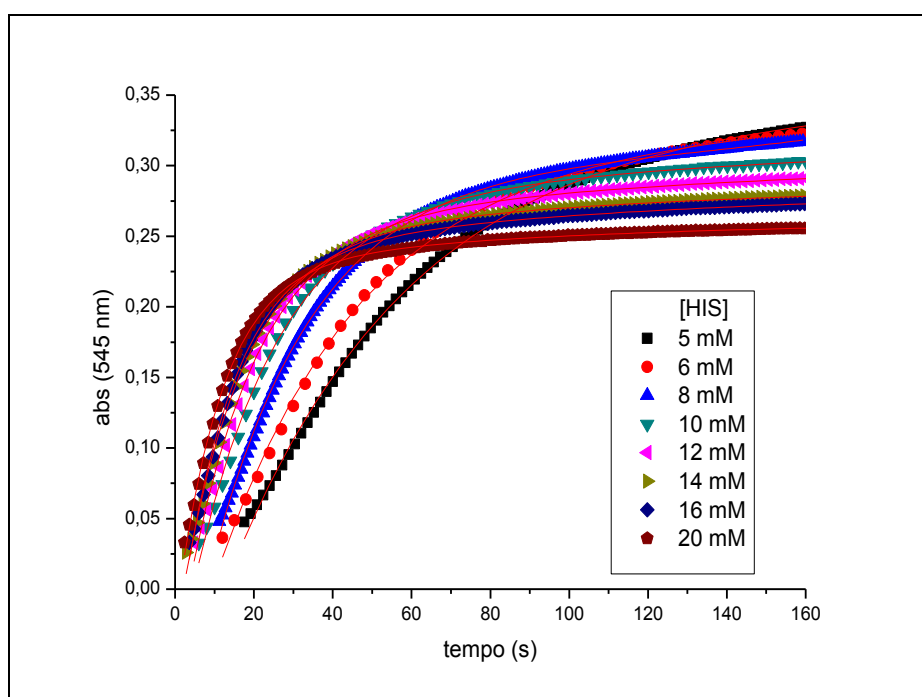


Figura 60 – Curvas cinéticas ($\lambda = 545 \text{ nm}$) registradas para a reação rápida entre o $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) com diferentes concentrações de his em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,0$

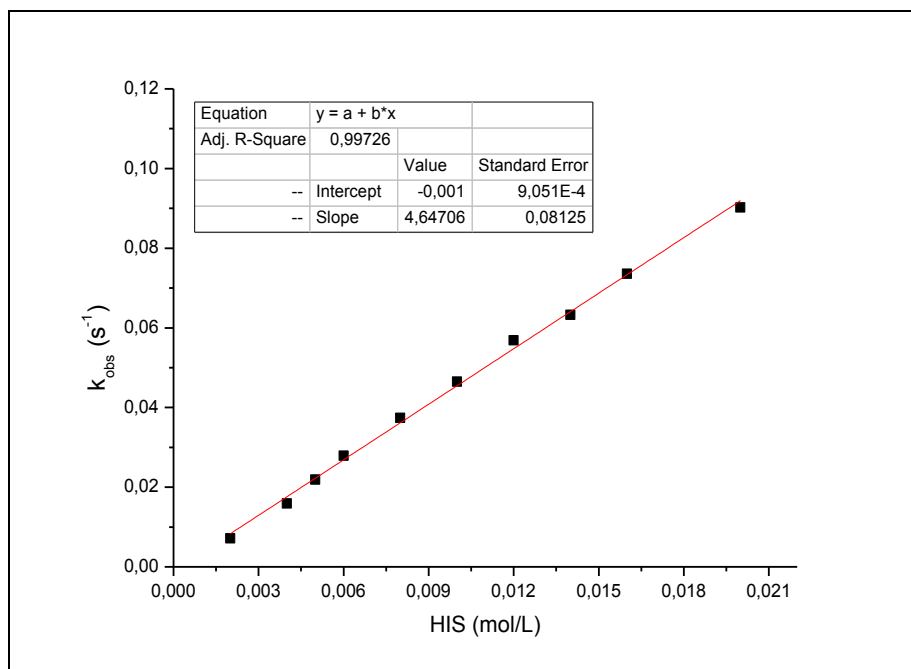


Figura 61 - Curva k_{obs} em função da concentração de his para a reação lenta com Ru_2 -act (0,2 mmol L^{-1}) ($\lambda = 545$ nm, pH 5,0 e 25 °C)

4.3.5. Sinopse dos Estudos de Interação com os Aminoácidos

A Tabela 10 traz um resumo dos resultados cinéticos obtidos para a reação do Ru_2 -act com os quatro aminoácidos estudados.

Tabela 10 – Dados cinéticos para a reação de substituição do Ru_2 -act com diferentes aminoácidos em tampão acetato (20 mmol L^{-1}) em pH 5,0.

Aminoácido	Lei da Velocidade	Constante de Velocidade / Constante de Equilíbrio
Glicina	$k_{obs} = k_1[gli] + k_{-1}$ (25 °C)	$k_1 = (1,95 \pm 0,09) \times 10^{-2} L mol^{-1} s^{-1}$ $k_{-1} = (1,7 \pm 0,2) \times 10^{-4} s^{-1}$
	$K_1 = k_1/k_{-1}$	$K_1 = (1,1 \pm 0,2) \times 10^2 L mol^{-1}$
Triptofano	$k_{obs} = k_1[trp] + k_{-1}$ (25 °C)	$k_1 = (4,9 \pm 0,2) \times 10^{-2} L mol^{-1} s^{-1}$ $k_{-1} = (3,4 \pm 0,2) \times 10^{-4} s^{-1}$
	$K_1 = k_1/k_{-1}$	$K_1 = (1,4 \pm 0,1) \times 10^2 L mol^{-1}$
Cisteína	$k_{obs} = k_1[cis] + k_{-1}$ (10 °C)	$k_1 = (6,5 \pm 0,1) \times 10^3 L mol^{-1} s^{-1}$ $k_{-1} = 0,5 \pm 0,2 s^{-1}$
	$K_1 = k_1/k_{-1}$	$K_1 = (1,3 \pm 0,5) \times 10^4 L mol^{-1}$
	$k_{obs} = K_1 k_2 [cis]^2 + k_{-2}$ (25 °C)	$K_1 k_2 = (4,6 \pm 0,5) \times 10^2 L^2 mol^{-2} s^{-1}$ $k_{-2} = (8,92 \pm 0,01) \times 10^{-2} s^{-1}$
	$K_1 K_2 = K_1 k_2 / k_{-2}$	$K_1 K_2 = (5,1 \pm 0,9) \times 10^3 L^2 mol^{-2}$
Histidina	$k_{obs} = K_1 k_2 [his]^2 + k_{-2}$ (25 °C)	$K_1 k_2 = (2,5 \pm 0,1) \times 10^3 L^2 mol^{-2} s^{-1}$ $k_{-2} = (2,86 \pm 0,01) \times 10^{-4} s^{-1}$
	$K_1 K_2 = K_1 k_2 / k_{-2}$	$K_1 K_2 = (8,7 \pm 0,4) \times 10^6 L^2 mol^{-2}$
	$k_{obs} = k_3 [his]$ (25 °C)	$k_3 = 4,7 \pm 0,1 L mol^{-1} s^{-1}$

A primeira etapa da reação com a glicina e o triptofano apresentou uma lei de velocidade com reações reversíveis, que puderam ser atribuídas à substituição axial de uma molécula de água do complexo precursor, por uma molécula de seus respectivos aminoácidos. As constantes de velocidades e a constante de equilíbrio cinético para esses dois aminoácidos foram muito próximas, e sugerem que, em ambos os casos, a coordenação do centro metálico ao aminoácido, seja através do grupamento carboxilato seguida por uma rápida reação intramolecular de isomerização, alterando o seu modo de coordenação para o grupamento amino e justificando o aparecimento da banda em ~ 540 nm. A etapa seguinte, não investigada, pode estar relacionada à decomposição das espécies formadas uma vez que uma lenta redução da intensidade das absorções é observada.

Apesar do triptofano possuir o grupamento indol, os resultados cinéticos não mostraram grandes evidências de que ele representa um fator importante para alterar a cinética da reação. A velocidade da primeira etapa da reação foi de apenas 2,5 vezes superior à velocidade da primeira etapa com o aminoácido glicina.

A reação com a cisteína apresentou uma cinética muito mais rápida (10^5 vezes) em relação à glicina, a qual pode ser justificada devido ao forte caráter nucleofílico do grupamento tiol presente neste aminoácido. A primeira etapa desta reação apresentou uma lei de velocidade com reação quase irreversível que pôde ser atribuída à substituição de uma das moléculas de água do complexo por uma molécula da cisteína, coordenada *via* carboxilato e seguida por uma reação intramolecular de isomerização alterando o modo de coordenação para o grupamento tiol. Já a segunda etapa da reação, apresentou uma lei de velocidade com reação reversível e função quadrática em relação à concentração, que pode ser atribuída à substituição da segunda molécula de água do complexo que está em equilíbrio com a reação de substituição da primeira molécula de água.

Finalmente, o estudo cinético com a histidina, demonstrou que diferentes reações em paralelo podem ocorrer na mesma escala de tempo nas condições experimentais estudadas, provavelmente devido às diferentes formas de equilíbrio do anel imidazol. A primeira etapa observada, que apresenta uma lei

de velocidade com dependência quadrática em função da concentração, pôde ser atribuída à substituição das duas moléculas de água por moléculas de histidina coordenadas pelo grupamento imidazol. A etapa seguinte pode estar relacionada à decomposição/substituição de um ligante acetato por outra molécula de histidina.

Com base em todos esses resultados, é possível concluir que o triptofano e a glicina apresentaram praticamente a mesma velocidade de reação, e que os grupamentos imidazol e tiol, presentes na histidina e cisteína, respectivamente, proporcionaram um significativo aumento na velocidade da reação de substituição axial do complexo precursor. Desta forma, é possível presumir que esses aminoácidos apresentam a seguinte ordem crescente de reatividade frente aos complexos tetracarboxilatos de dirutenio(II,III): gli < trp << cis. A partir das constantes de equilíbrio (K_1K_2) determinadas para a primeira e segunda etapa das reações com a cisteína e histidina é possível prever que a reatividade do complexo frente à histidina é bem maior se comparada com a cisteína, provavelmente devido ao forte caráter nucleofílico do grupamento imidazol além de estar praticamente desprotonado favorecendo a cinética da reação. É importante mencionar também, que em todos os casos, uma quantidade significativa da espécie de partida, diaqua-Ru₂, ainda pode estar presente no meio reacional.

4.4. Estudos de Interação com Agentes Redutores: Cinética, Mecanismo e Parâmetros de Ativação

Outro aspecto importante que deve ser investigado no estudo de potenciais metalofármacos é a sua interação com os agentes redutores que são encontrados no organismo. Conforme já foi relatado anteriormente estudos demonstraram que a glutathiona (GSH) e o ácido ascórbico (H₂A) são capazes de reduzir eficazmente diferentes complexos de rutênio. Neste sentido, resolveu-se investigar a interação do complexo Ru₂-act na presença desses agentes redutores. Na Tabela 11 encontram-se os valores de pK_a para esses dois agentes redutores.

Tabela 11 – Valores dos pK_a dos agentes redutores [174,175]

<i>Agente Redutor</i>	<i>pK_a</i>			
Glutationa	2,1 (COOH)	3,4 (COOH)	8,6 (SH)	9,4 (NH ₃ ⁺)
Ácido Ascórbico	4,2 (OH _(anel))	11,6 (OH _(anel))		

4.4.1. Reação do Ru₂-act com Glutationa

A reação do $[Ru_2(O_2CCH_3)_4(H_2O)_2]^+$ com a GSH apresentou um comportamento bem semelhante ao da reação da cisteína. O monitoramento do espectro eletrônico ao longo da reação indicou que esta ocorre em pelo menos duas etapas, com cinética muito rápida (Figuras 62 e 63).

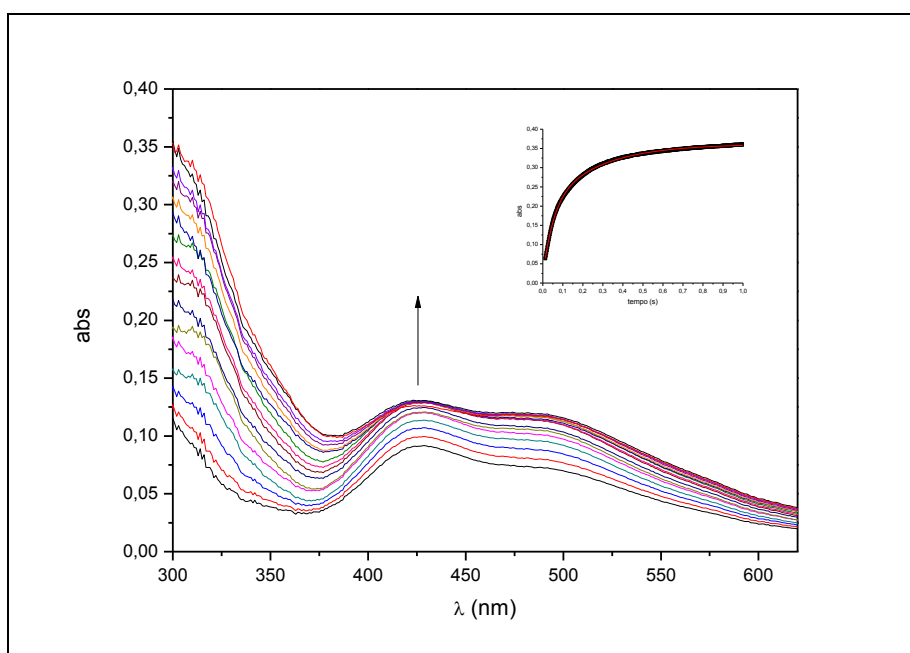


Figura 62 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,1 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (10 °C) após a adição de excesso de GSH (1 mmol L⁻¹) para o período de até 0,06 s de reação. Inserção: curva cinética em $\lambda = 350$ nm

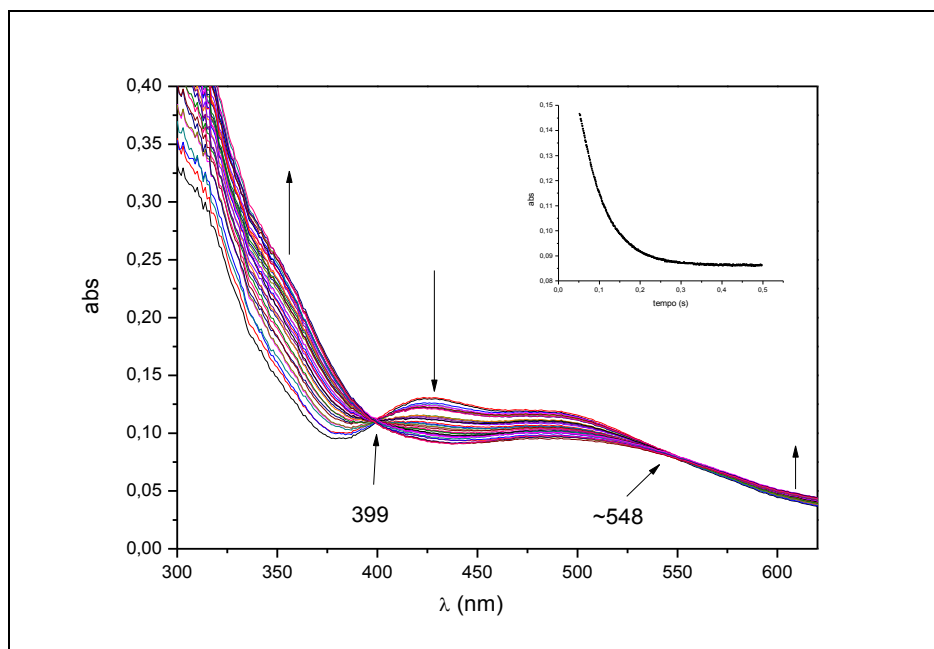


Figura 63 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,1 mmol L⁻¹) em tampão acetato pH 5,0 (10 °C) após a adição de excesso de GSH (1 mmol L⁻¹) para o período entre 0,06 e 0,2 s da reação. Inserção: curva cinética em λ = 425 nm

Na primeira etapa da reação (Figura 62) ocorre a formação de duas novas absorções, um ombro em ~ 350 nm e uma banda em ~ 490 nm, enquanto que a banda de 425 nm sofre um pequeno aumento em sua intensidade. Já na segunda etapa (Figura 63), ocorre a redução das bandas em 425 e 490 nm, ao mesmo tempo em que a intensidade do ombro de 350 nm continua aumentando, dando origem a dois pontos isobésticos (~ 400 e 550 nm).

A cinética desta reação foi investigada usando a técnica de *stopped-flow* em condições de pseudo-primeira ordem, com pelo menos, dez vezes de excesso de glutatona em relação à concentração do complexo precursor em tampão acetato (20 mmol L⁻¹), pH 5,0 e 10 °C.

Os valores de k_{obs} em diferentes concentrações de GSH foram obtidos inicialmente para a curva cinética em 350 nm usando uma equação dupla de crescimento exponencial (Figura 64). A partir da curva de k_{obs} em função da concentração de GSH (Figura 65) foi possível determinar as constantes de velocidade, $k_1 = (2,27 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{-1} = 0,66 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, usando a seguinte lei de velocidade (30) e a constante de equilíbrio $K_1 = k_1/k_{-1} = (3,4 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$.

$$k_{obs} = k_1[GSH] + k_{-1} \quad (30)$$

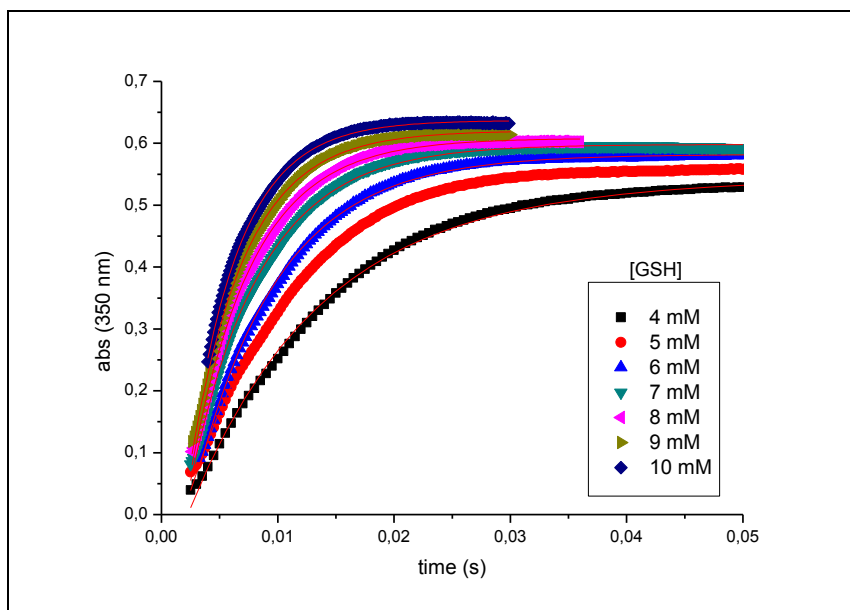


Figura 64 – Curvas cinéticas ($\lambda = 350 \text{ nm}$) registradas para a reação entre o Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) com diferentes concentrações de GSH em 10 °C e pH 5,0

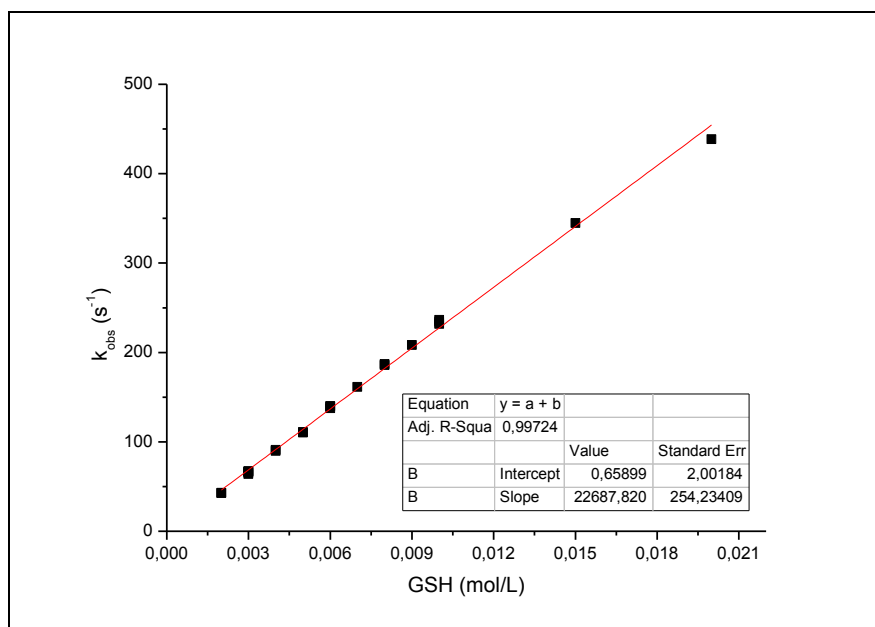


Figura 65 – Curva k_{obs} em função da concentração de [GSH] para a primeira etapa da reação com Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) ($\lambda = 350 \text{ nm}$, pH 5,0 e 10 °C)

O acompanhamento cinético para segunda etapa da reação também foi investigado e os valores de k_{obs} foram obtidos a partir das curvas cinéticas em 425

nm usando uma equação dupla de decaimento exponencial (Figura 66). A curva de k_{obs} em função da concentração GSH (Figura 67) mostra uma típica curva de saturação cinética, ou seja, um valor limite de k_{obs} é obtido quando altas concentrações de GSH são empregadas. Os dados cinéticos foram então determinados ajustando os pontos desta curva a uma equação não linear que corresponde à lei de velocidade expressa na equação (31), os dados obtidos foram: $K_1 = (2,0 \pm 0,6) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ e $k_2 = 62 \pm 3 \text{ s}^{-1}$.

$$k_{obs} = \frac{k_2 K_1 [GSH]}{1 + K_1 [GSH]} \quad (31)$$

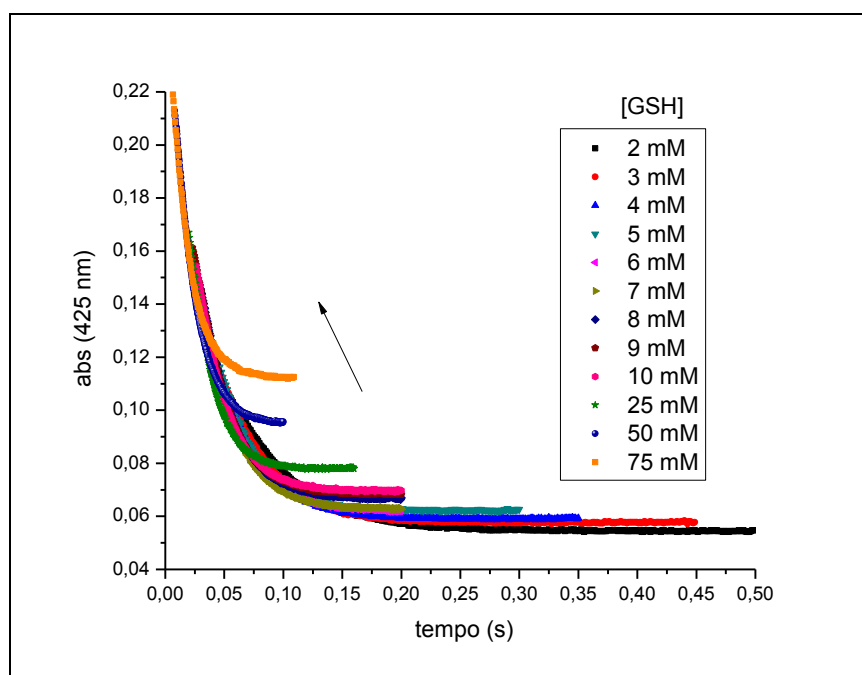


Figura 66 – Curvas cinéticas ($\lambda = 425 \text{ nm}$) registradas para a reação entre o $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) com diferentes concentrações de GSH em $10 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 5,0$

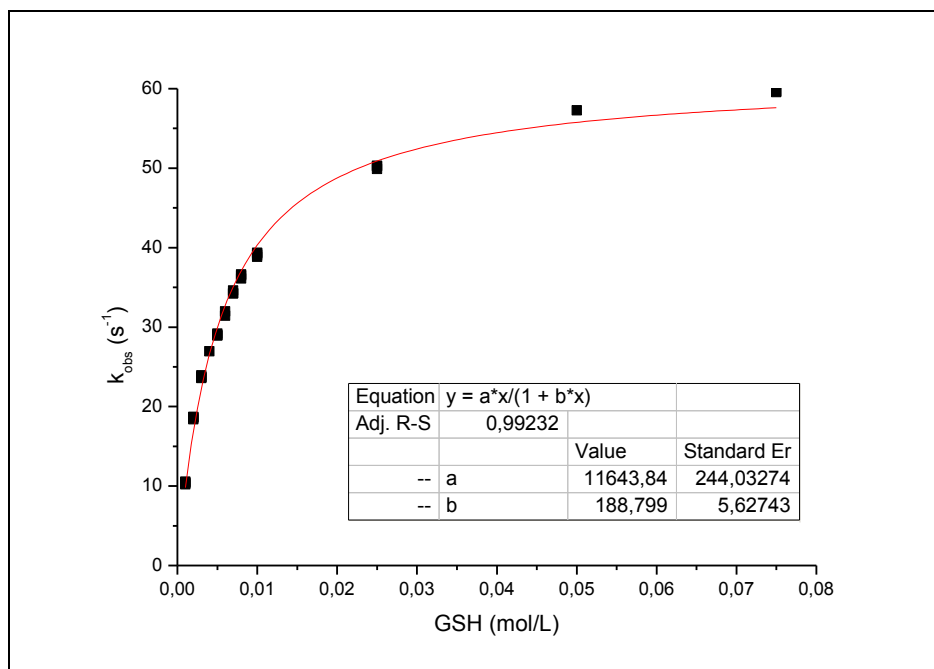
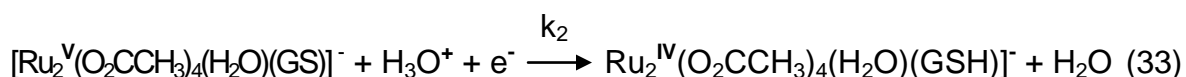
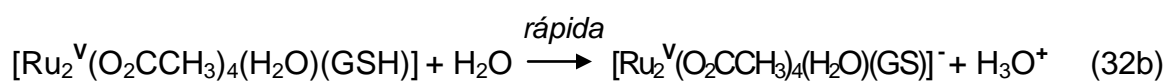
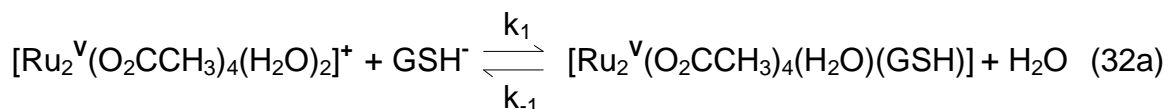


Figura 67 – Curva k_{obs} em função da concentração de [GSH] para a segunda etapa da reação com $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) ($\lambda = 425 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,0$ e $10 \text{ }^\circ\text{C}$)

A molécula de GSH é um ligante polidentado, ou seja, possui diferentes sítios para coordenação a metais (Figura 6). Nas condições experimentais utilizadas ($\text{pH } 5,0$) os dois grupamentos ácidos da GSH encontram-se desprotonados (Tabela 11) e portanto disponíveis para uma possível substituição com as moléculas de água coordenadas axialmente no complexo.

Assim, como ocorre com a *cis*, acredita-se que, nesta primeira etapa da reação com a GSH, a coordenação seja feita primeiramente *via* carboxilato, seguida de uma rápida reorganização estrutural, alterando o modo de coordenação para o grupamento tiol. Os resultados obtidos indicaram que a cinética da primeira etapa possui a mesma lei de velocidade que a reação com a cisteína, e inclusive com constantes de velocidades com valores na mesma ordem de grandeza. Já, os resultados obtidos para a segunda etapa, sugerem uma reação intramolecular de transferência de elétrons, na qual o núcleo metálico Ru_2^{5+} do complexo é reduzido a Ru_2^{4+} logo após a sua coordenação com a molécula de GSH.

As propostas de mecanismos para a primeira e segunda etapas observadas estão representadas nas reações (32) e (33), onde $\text{GSH}^- = \text{OCC-CH}(\text{NH}_3^+)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2(\text{CH}_2-\text{SH})-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.



Com base nos resultados apresentados para a segunda etapa, é possível concluir que com baixas concentrações de glutathione, k_{obs} é aproximadamente equivalente à $k_2K_1[\text{GSH}]$ (porção linear da curva, Figura 67), e que para altas concentrações de glutathione, $k_{\text{obs}} \sim k_2$ (porção saturada da curva, Figura 67).

Os parâmetros de ativação, entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*), para a reação de Ru₂-act e GSH foram determinados apenas para a primeira etapa da reação, cuja lei de velocidade é uma equação linear. Para tanto, as curvas cinéticas ($\lambda = 350 \text{ nm}$) para a reação entre Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) e GSH (10 mmol L⁻¹) em pH 5,0 foram investigadas em diferentes temperaturas (5-30 °C) e os valores de k_{obs} foram calculados a partir do ajuste à equação de crescimento duplo exponencial.

Os parâmetros de ativação foram calculados de acordo com a equação (34) que é conhecida como equação de Eyring [176].

$$R \ln \frac{kh}{k_B T} = \frac{-\Delta H^*}{T} + \Delta S^* \quad (34)$$

onde k_B = constante de Boltzmann, h = constante de Planck, R = constante de gás ideal, k = constante da velocidade de segunda ordem ($k = k_{\text{obs}}/[\text{GSH}]$).

A entalpia de ativação ($\Delta H^* = 61 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$) e a entropia de ativação ($\Delta S^* = +56 \pm 5 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) foram obtidas a partir do coeficiente angular e linear da equação da reta obtida na Figura 68, respectivamente.

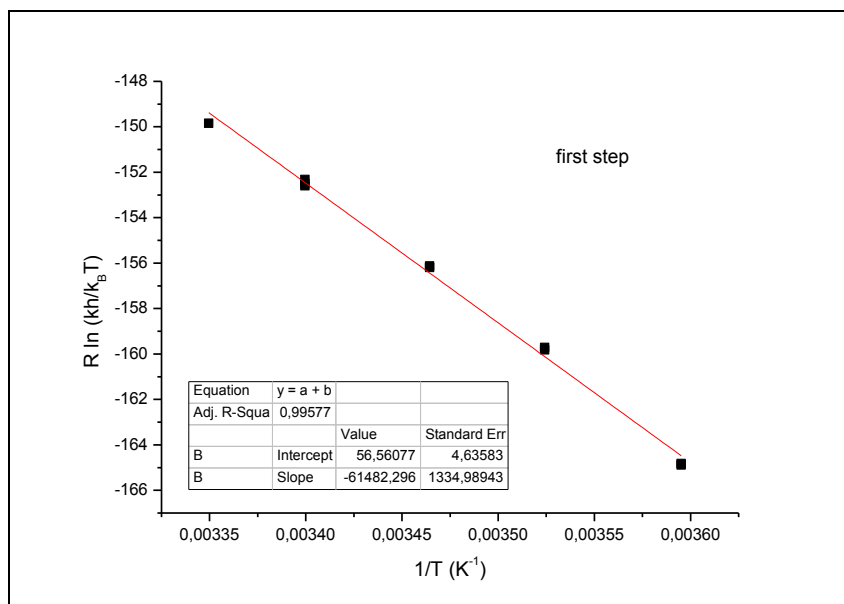


Figura 68 – Curva da dependência da temperatura (5-30 °C) (equação de Eyring) para a reação entre Ru₂-act (0,2 mmol L⁻¹) e GSH (10 mmol L⁻¹) em pH 5,0 ($\lambda = 350$ nm)

O significativo valor positivo da entropia de ativação sugere que a ligação de GSH ao Ru₂-act sofre um mecanismo dissociativo, ou seja, a reação é controlada pela cinética que envolve a liberação da molécula de água coordenada axialmente ao complexo [177,178], no entanto, esse mecanismo não pôde ser confirmado devido a impossibilidade de calcular o volume de ativação, pois a velocidade da reação era muito rápida para a detecção no equipamento de *stopped-flow* de altas pressões. Por fim, acredita-se também que a reação de transferência de elétrons, equação (33), é conduzida através de um mecanismo de esfera interna, uma vez que ela é precedida pela formação de um intermediário [179].

4.4.2. Reação do Ru₂-act com Ácido Ascórbico

A reação do [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]⁺ (0,8 mmol L⁻¹) com o H₂A (8 mmol L⁻¹) foi realizada em tampão acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 5,0) em temperatura controlada de 10 °C, e as mudanças espectrais (300-620 nm) foram acompanhadas em função do tempo em um equipamento de *stopped-flow* com detector de leitura rápida (*rapid-scan*). Os espectros eletrônicos para esta reação (Figura 69) indicaram uma redução e um deslocamento da banda do complexo, além da formação de vários pontos isobésticos, sugerindo equilíbrio de espécies. Após

está rápida etapa da reação não foi observada nenhuma alteração significativa nos espectros eletrônicos para o período investigado (~ 2 h).

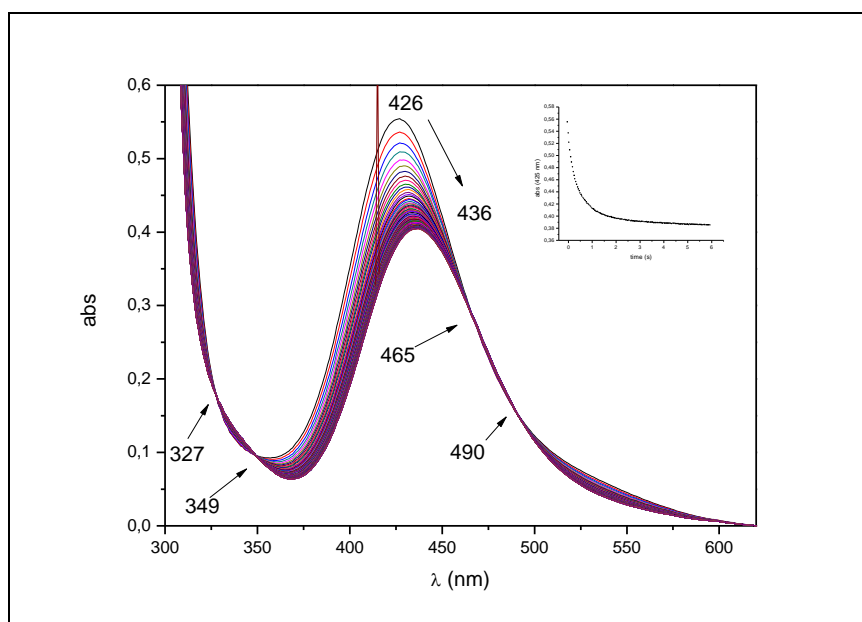


Figura 69 – Espectros eletrônicos do $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$) em tampão acetato pH 5,0 ($10 \text{ }^\circ\text{C}$) após a adição de excesso de H_2A (8 mmol L^{-1}) para o período aproximado em 6 s de reação. Inserção: curva cinética em $\lambda = 425 \text{ nm}$.

A redução do centro metálico ($\text{Ru}_2^{5+} \rightarrow \text{Ru}_2^{4+}$) no complexo precursor pela GSH, equação (33), ocorre após a rápida reação de substituição de uma molécula de água, equação (32). Uma reação similar poderia ocorrer com o agente redutor H_2A , ou seja, primeiramente ocorrendo a substituição de uma molécula de água pela molécula de H_2A e somente depois a reação de transferência de elétrons (redução do centro metálico). No entanto, conforme observado a partir dos espectros (Figura 69) e do perfil da curva cinética em 425 nm, as duas etapas desta reação podem estar ocorrendo na mesma escala de tempo, impossibilitando o seu monitoramento individual.

Neste sentido, a cinética da primeira e segunda etapa foi investigada usando a técnica de *stopped-flow* em condições de pseudo-primeira. Os valores de k_{obs} para ambas as etapas foram determinados ajustando os pontos da curva cinética em 425 nm a uma equação dupla de decaimento exponencial (Figura 70). A partir das curvas de k_{obs} em função da concentração de H_2A (Figura 71) foi possível determinar as constantes de velocidades para a primeira e segunda

etapa, usando as seguintes leis de velocidades, equação (34) e (35), respectivamente.

$$k_{obs} = k_1[H_2A] + k_{-1} \quad (35)$$

$$k_{obs} = k_2K_1[H_2A] \quad (36)$$

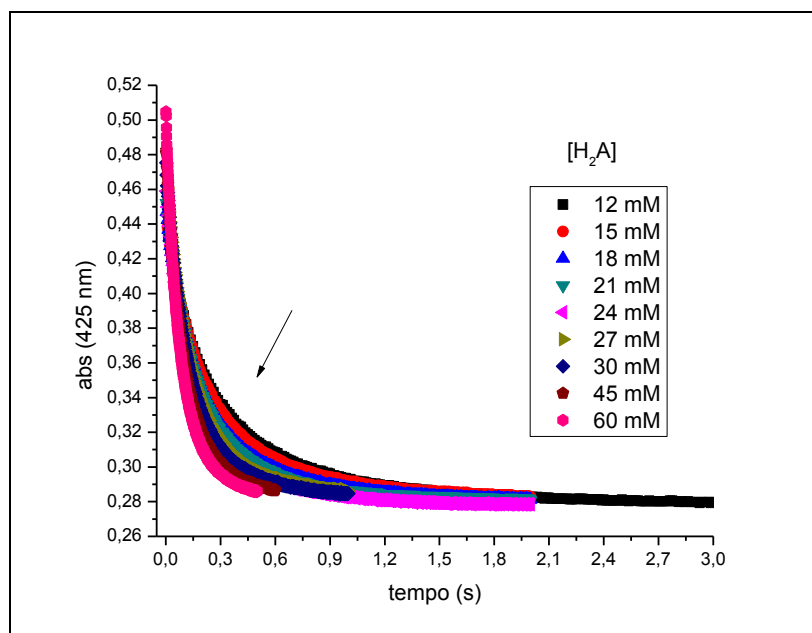


Figura 70 – Curvas cinéticas ($\lambda = 425 \text{ nm}$) registradas para a reação entre o Ru₂-act (0,6 mmol L⁻¹) com diferentes concentrações de H₂A em 10 °C e pH 5,0

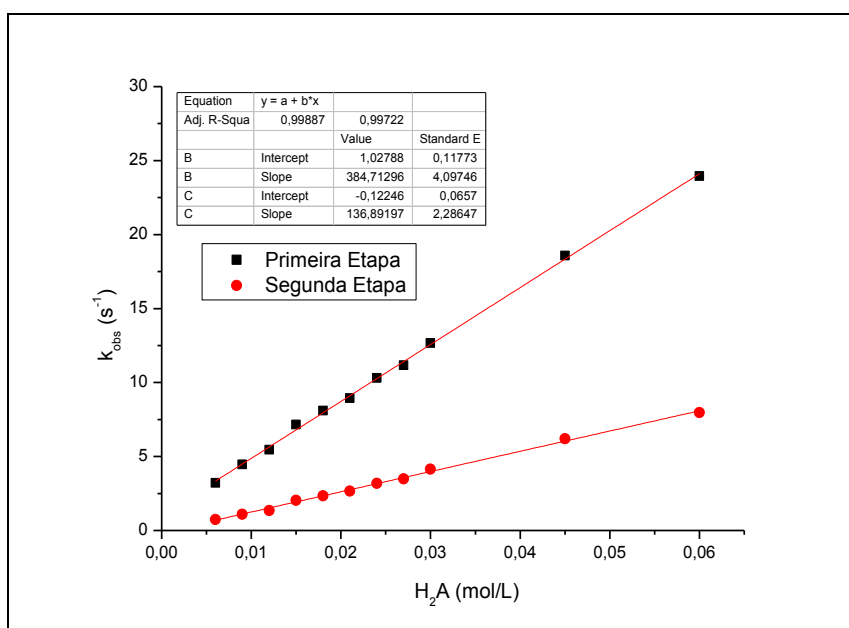
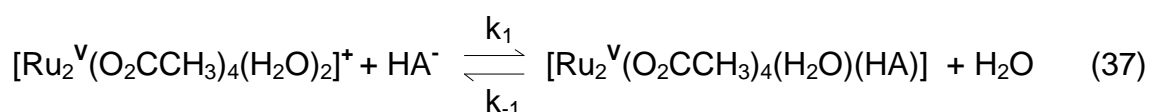


Figura 71 – Curva de k_{obs} em função da concentração de [H₂A] para a primeira e segunda etapa da reação com Ru₂-act (0,6 mmol L⁻¹) ($\lambda = 425 \text{ nm}$, pH 5,0 e 10 °C)

Com base nas leis de velocidades propostas acima, equações (35) e (36), foi possível calcular as constantes de velocidades para a reação direta na primeira ($k_1 = 384 \pm 4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e segunda etapa ($k_2 = 137 \pm 2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a partir dos coeficientes angulares da equação da reta (Figura 71), e também a constante de velocidade para a reação inversa da primeira etapa ($k_{-1} = 1,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$) a partir do coeficiente linear da equação da reta (Figura 71).

Sabe-se que nas condições experimentais usadas (pH 5,0) o íon ascorbato (HA^-) é a principal espécie presente em solução (vide pK_a na Tabela 11) e também um agente redutor mais forte que sua própria forma protonada (ácido ascórbico) [57]. Com base nessas informações e nos dados cinéticos obtidos acima, é possível propor que a primeira etapa esteja relacionada a uma reação quase irreversível de substituição axial de uma molécula de água no complexo, por uma molécula de ascorbato ($\text{HA}^- = \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2\text{OHO}^-$), reação (37). Após o rápido equilíbrio desta reação de substituição ($K_1 = k_1/k_{-1} = 3,8 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$) acredita-se que a segunda etapa, reação (38), esteja relacionada à transferência de elétrons, ou seja, a redução do núcleo metálico Ru_2^{5+} para Ru_2^{4+} , sendo que o valor da constante de velocidade desta reação é controlada pelo equilíbrio da primeira etapa (k_2K_1).



Os dados cinéticos da reação entre $\text{Ru}_2\text{-act}$ ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) e H_2A (30 mmol L^{-1}) em pH 5,0, também foram investigados em função da temperatura ($5\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$), permitindo determinar os parâmetros de ativação a partir da equação da reta (Figura 72) usando a equação de Eyring (34). Os valores obtidos para a entalpia de ativação e entropia de ativação, para a primeira e segunda etapa da reação, estão apresentados na Tabela 12.

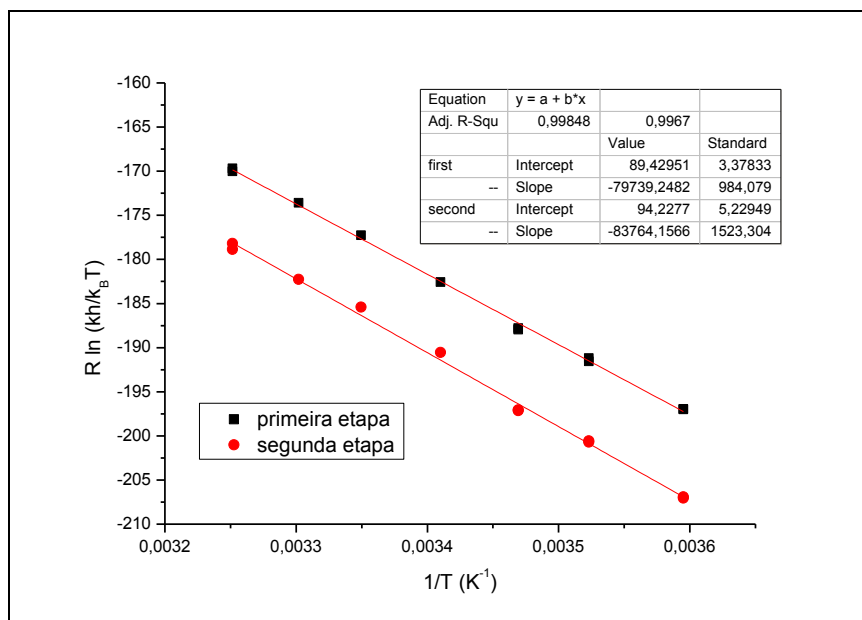


Figura 72 – Curva de dependência da temperatura (5-35 °C) (equação de Eyring) para a reação entre Ru₂-act (0,6 mmol L⁻¹) e H₂A (30 mmol L⁻¹) em pH 5,0 (λ = 425 nm)

A influência da pressão (10-130 MPa), sobre a cinética da reação entre Ru₂-act (0,6 mmol L⁻¹) e H₂A (18 mmol L⁻¹) em pH 5,0, também foi investigada, permitindo o cálculo do volume de ativação (ΔV*) a partir do coeficiente angular da equação da reta (Figura 73) obtida por RTlnk_{obs} em função da pressão (P), usando a equação (39) [178,180]:

$$RT \ln k_{obs} = -\Delta V^* P \quad (39)$$

onde, R = constante de gás de ideal, T = temperatura, e k_{obs} = constante de velocidade observada. Os valores de volume de ativação (ΔV*) obtidos para a primeira e segunda etapa da reação estão apresentados na Tabela 12.

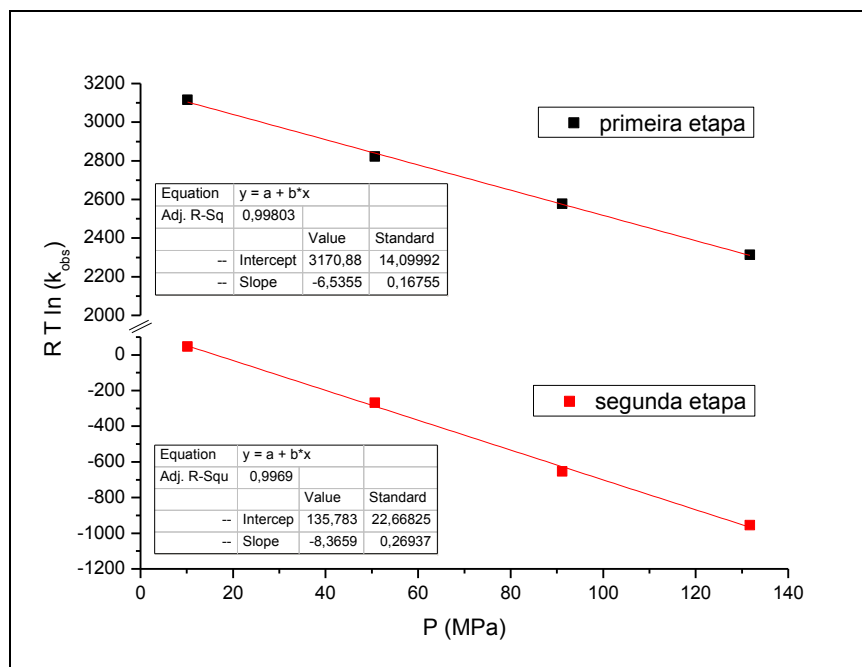


Figura 73 – Curva de dependência da pressão (10-130 MPa) para a reação entre Ru₂-act (0,6 mmol L⁻¹) e H₂A (18 mmol L⁻¹) em pH 5,0 ($\lambda = 425$ nm) e 5 °C

Tabela 12 - Parâmetros de ativação para a reação entre [Ru₂(Ac)₄(H₂O)₂]⁺ e ácido ascórbico em pH 5,0

Parâmetros	Primeira Etapa	Segunda Etapa
ΔH^* (kJ mol ⁻¹)	80 ± 1	84 ± 1
ΔS^* (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	+89 ± 3	+94 ± 5
ΔV^* (cm ³ mol ⁻¹)	+6,5 ± 0.2	+8,4 ± 0.3

Os significativos valores positivos que foram obtidos para a entropia e volume de ativação, na reação de substituição de ligante (primeira etapa), sugerem um mecanismo dissociativo, ou seja, a coordenação do ascorbato ao núcleo metálico ocorre somente após a formação de uma espécie intermediária, já sem a presença da molécula de água coordenada ao núcleo metálico. Este mesmo mecanismo, também foi proposto para a reação de substituição com a GSH. Por outro lado, os valores positivos para a entropia e volume de ativação da segunda etapa devem estar associados à redução formal no número de oxidação do centro metálico de Ru₂⁵⁺ para Ru₂⁴⁺, acreditando causar um aumento no volume parcial do complexo dimetálico. Da mesma forma que ocorre com a GSH, sugere-se que a reação de transferência de elétrons ocorra através de um mecanismo de esfera interna, pois ela é precedida por uma reação de substituição de ligantes.

Sabendo-se que os complexos de tetracarboxilatos de dirutênio(II,III) podem apresentar diferentes cromóforos em solução, os quais dependem do solvente e da concentrações de íons cloreto em solução (e que já foram discutidos anteriormente nos estudos termodinâmicos), resolveu-se investigar, também, a influência dos íons cloreto sobre o mecanismo da reação de transferência de elétrons do Ru₂-act (1 mmol L⁻¹) com o H₂A (18 mmol L⁻¹) em tampão acetato de 20 mmol L⁻¹ e pH 5,0 com temperatura controlada em 10 °C. As curvas cinéticas foram registradas em função do tempo em λ = 425 nm (dados não apresentados).

Conforme já era esperado, os resultados indicaram que, com o aumento da concentração de íons cloreto na solução do complexo Ru₂-act, ocorre uma diminuição na velocidade da reação com o H₂A, ou seja, o valor de k_{obs} para esta reação diminui. A partir dos valores obtidos para a primeira e segunda etapa da reação, duas curvas de k_{obs} em função da concentração de íons cloreto foram construídas, sugerindo um típico perfil de saturação cinética. Sendo que, para a primeira (Figura 74) e segunda (Figura 75) etapa da reação, os pontos foram ajustados as leis de velocidade, cujas equações não-lineares estão representadas em (40) e (41), respectivamente, e que foram baseadas a partir do mecanismo proposto (Figura 76) que leva em consideração o equilíbrio dos cromóforos de Ru₂-act na presença de íons cloreto. Os valores das constantes de velocidades e constantes de equilíbrio calculados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Constantes de equilíbrios e dados cinéticos obtidos para a reação entre Ru₂-act e H₂A na presença de íons cloreto de acordo com a proposta de mecanismo representada na Figura 76.

<i>Etapa da Reação Observada</i>	<i>Parâmetros (unid.)</i>	<i>Valores</i>
Primeira Etapa	K _{Cl(1)} (L mol ⁻¹)	15,5 ± 1,4
	k ₁ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	542 ± 8
	k ₃ (s ⁻¹)	24 ± 12
Segunda Etapa	K _{Cl(1)} (L mol ⁻¹)	17,6 ± 2,4
	k ₂ K ₁ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	149 ± 4
	k ₄ K ₃ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	2 ± 5

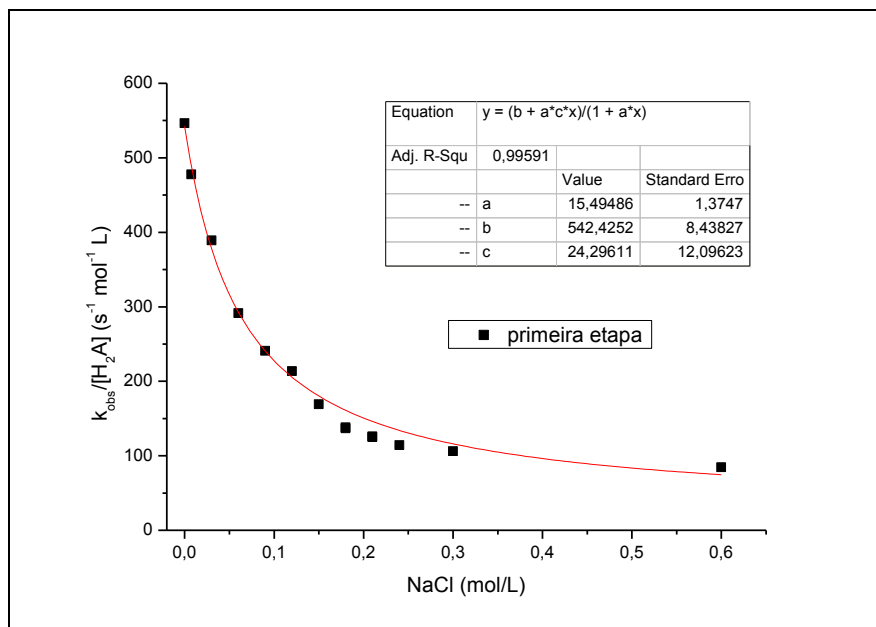


Figura 74 – Variação do k_{obs} para a primeira etapa da reação entre Ru_2 -act ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) e H_2A (18 mmol L^{-1}) em pH 5,0 e $10 \text{ }^\circ\text{C}$ em função da concentração de NaCl ($\lambda = 425 \text{ nm}$)

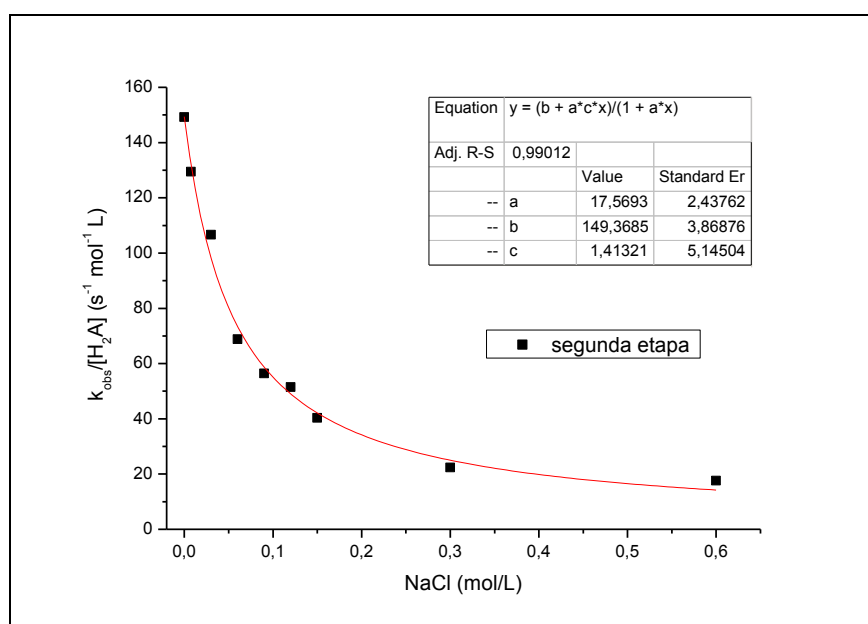


Figura 75 – Variação do k_{obs} para a segunda etapa da reação entre Ru_2 -act ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) e H_2A (18 mmol L^{-1}) em pH 5,0 e $10 \text{ }^\circ\text{C}$ em função da concentração de NaCl ($\lambda = 425 \text{ nm}$)

$$k_{obs(1)} = \left\{ \frac{k_1 + k_3 K_{Cl(1)} [Cl]}{1 + K_{Cl(1)} [Cl]} \right\} [H_2A] \quad (40)$$

$$k_{obs(2)} = \left\{ \frac{k_2 K_1 + k_4 K_3 K_{Cl(1)} [Cl]}{1 + K_{Cl(1)} [Cl]} \right\} [H_2A] \quad (41)$$

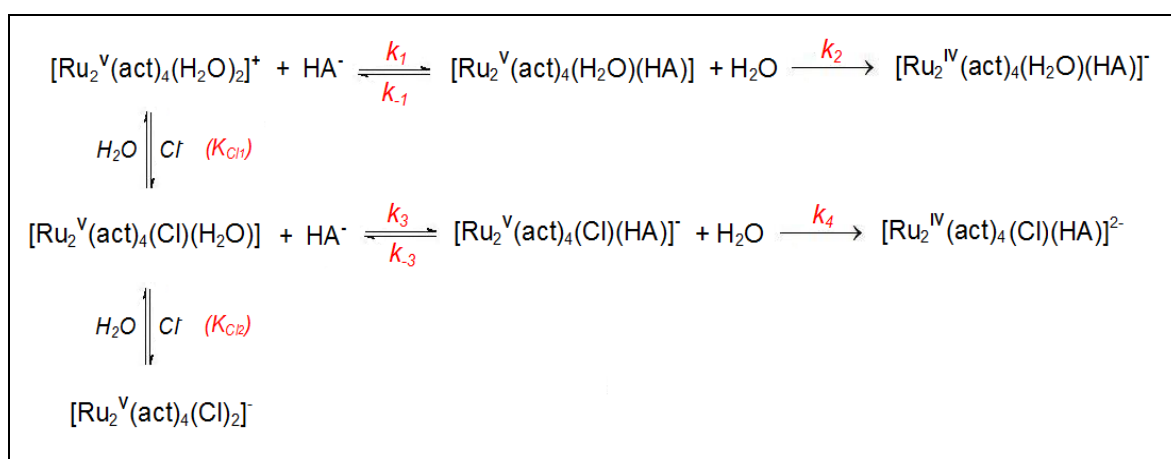


Figura 76 – Mecanismo proposto para a reação entre o Ru₂-act e H₂A na presença de íons cloreto em pH 5,0

De acordo com o mecanismo proposto na Figura 76, a reação de equilíbrio entre os ligantes *aqua/monocloro* ($K_{Cl(1)}$) no complexo precursor é responsável pelas duas etapas da reação entre o complexo e o ascorbato. Sendo que a primeira etapa (substituição de ligantes) é controlada pelas constantes da reação direta (k_1 e k_3) e inversa (k_{-1} e k_{-3}), enquanto a segunda etapa (transferência de elétrons), onde o núcleo metálico é reduzido de Ru₂⁵⁺ a Ru₂⁴⁺, é controlada pelas constantes k_2 e k_4 . Os valores determinados para a constante de equilíbrio *aqua/monocloro* ($K_{Cl(1)}$) e as constantes de velocidades (k_1 e k_2K_1) (Tabela 13) estão em concordância com os valores obtidos anteriormente (item 4.2). Isto é, a constante de equilíbrio $K_{Cl(1)}$ apresenta, praticamente, o mesmo valor daquele calculado através dos estudos termodinâmicos (Figura 29), e as constantes de velocidades (k_1 , k_2K_1) possuem a mesma ordem de grandeza daquelas calculadas para a reação entre o complexo precursor e o ácido ascórbico (Figura 71). Além disso, esses resultados suportam a idéia de que os

íons cloreto praticamente bloqueiam a reação redox, ou seja, os íons ascorbato não competem com as altas concentrações de íons cloreto presentes no dicloro-complexo.

4.4.3. Sinopse dos Estudos de Interação com os Agentes Redutores

A Tabela 14 traz um resumo dos resultados cinéticos obtidos para a reação do Ru₂-act com os dois agentes redutores estudados.

Tabela 14 – Dados cinéticos para a reação de substituição de ligantes seguida da reação de transferência de elétrons do Ru₂-act com diferentes agentes redutores em tampão acetato (20 mmol L⁻¹) em pH 5,0 e temperatura de 10 °C

<i>Agente Redutor</i>	<i>Lei da Velocidade</i>	<i>Constante de Velocidade</i>
Glutaciona	$k_{obs} = k_1[\text{GSH}] + k_{-1}$ (10 °C)	$k_1 = (2,27 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{-1} = 0,66 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$
	$K_1 = k_1/k_{-1}$	$K_1 = (3,4 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$
	$k_{obs} = \{(k_2 K_1 [\text{GSH}]) / (1 + K_1 [\text{GSH}])\}$ (10 °C)	$K_1 = (2,0 \pm 0,6) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$ $k_2 = 62 \pm 3 \text{ s}^{-1}$
Ácido Ascórbico	$k_{obs} = k_1[\text{H}_2\text{A}] + k_{-1}$ (10 °C)	$k_1 = (3,8 \pm 0,4) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{-1} = 1,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$
	$K_1 = k_1/k_{-1}$	$K_1 = (3,8 \pm 0,4) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$
	$k_{obs} = k_2 K_1 [\text{H}_2\text{A}]$ (10 °C)	$k_2 K_1 = (1,4 \pm 0,4) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Ácido Ascórbico e Cloreto	$k_{obs} = \{(k_1 + k_3 K_{Cl} [\text{Cl}]) / (1 + K_1 [\text{Cl}])\} [\text{H}_2\text{A}]$ (10 °C)	$K_{Cl} = 15,5 \pm 1,4 \text{ L mol}^{-1}$ $k_1 = (5,4 \pm 0,8) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_3 = 24 \pm 12 \text{ s}^{-1}$
	$k_{obs} = \{(k_2 K_1 + k_4 K_3 K_{Cl} [\text{Cl}]) / (1 + K_{Cl} [\text{Cl}])\} [\text{H}_2\text{A}]$ (10 °C)	$K_{Cl} = 17,6 \pm 2,4 \text{ L mol}^{-1}$ $k_2 K_1 = (1,5 \pm 0,4) \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_4 K_3 = 2 \pm 5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$

A reação de transferência de elétron do complexo precursor na presença dos dois agentes redutores investigados é precedida por reações de substituições de ligantes (primeira etapa).

Os resultados dos estudos cinéticos, para esta primeira etapa, apresentaram uma lei de velocidade com reações reversíveis para ambos agentes redutores. No entanto a reação com a glutaciona apresentou uma cinética mais rápida (~ 90 vezes) em relação ao ácido ascórbico, provavelmente devido ao grupamento tiol da glutaciona que favorece a coordenação ao núcleo metálico.

A segunda etapa, que envolve a redução do núcleo dirutênio, apresentou uma lei de velocidade que tende a saturação quando altas

concentrações de glutathione são utilizadas, e que é linear quando baixas concentrações são empregadas. Já a reação com o ácido ascórbico apresentou uma cinética com lei de velocidade linear. Uma vez que a reação redox é controlada pela reação de substituição de ligantes, a sua cinética apresentou uma velocidade mais rápida para a glutathione em relação ao ácido ascórbico.

Foi possível propor, também, um mecanismo para reação de substituição de ligantes seguida pela reação de transferência de elétron na presença de íons cloreto e o ácido ascórbico. Os resultados indicaram que a lei de velocidade, neste caso, é uma função da concentração de íons cloreto, e que a velocidade da reação redox é muito mais lenta para o monoclora-complexo do que para o diaqua-complexo.

4.5. Estudos de Interação com a Proteína Albumina Humana (HSA)

A albumina é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo e, conforme já foi discutido, diferentes íons metálicos, incluindo o rutênio em seus diversos estados de oxidação, podem interagir com essa proteína. A seguir são relatados os resultados obtidos sobre a interação da HSA com alguns dos complexos estudados em nosso grupo, usando diferentes metodologias e técnicas experimentais.

4.5.1. Espectroscopia Eletrônica de Absorção no UV-Vis

A espectroscopia eletrônica de absorção no UV-Vis é uma técnica acessível e de fácil utilização que traz informações imediatas das possíveis interações dos complexos com a HSA [181,182,183]. Usando esta técnica foi possível estudar a cinética da reação e determinar a constante de ligação do Ru₂-act com a HSA. Estudos semelhantes não foram possíveis para os compostos de dirutênio(II,III) complexados com os FAINEs, uma vez que os mesmos não são solúveis em meio aquoso.

A cinética da reação do Ru₂-act com a HSA foi monitorada a 25 °C em tampão acetato, pH 5,0 (Figura 77) e em tampão fisiológico, pH 7,4 (Figura 78). A partir do perfil desses espectros eletrônicos é possível pressupor que a reação entre o Ru₂-act e a HSA acontece em duas etapas: sendo a primeira reação muito rápida e a segunda com uma cinética mais lenta. Esta hipótese está

baseada no fato de que o registro do primeiro espectro eletrônico, logo após o início da reação, já apresentou um perfil diferente daquele antes da mistura, além disso, a curva cinética de 545 nm é melhor ajustada a uma equação dupla de crescimento exponencial, a qual possibilitou estimar as constantes de velocidades observadas para a primeira e segunda etapa, respectivamente: em pH 5,0 ($k_{\text{obs}} = 3 \times 10^{-3}$ e $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), e em pH 7,4 ($k_{\text{obs}} = 3 \times 10^{-2}$ e $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

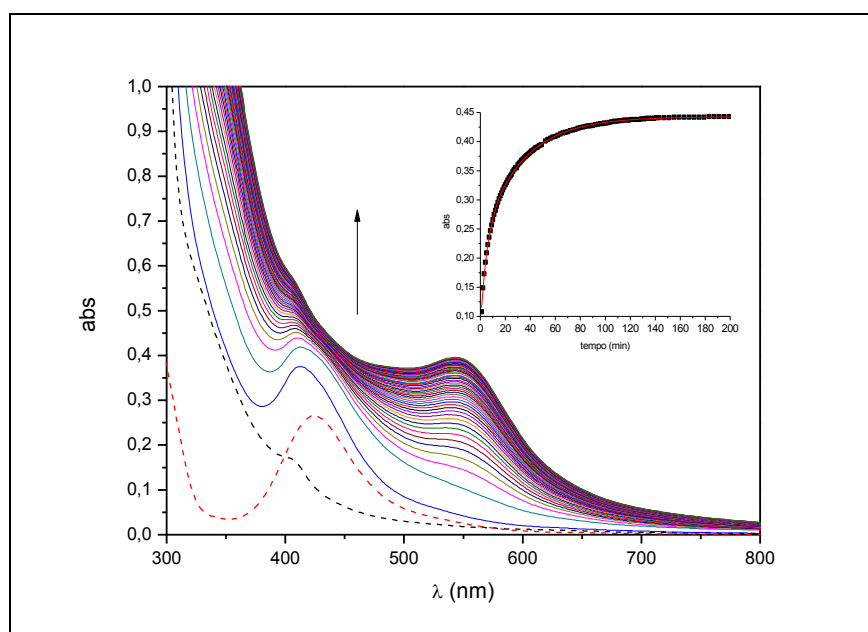


Figura 77 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,4 mmol L⁻¹) após a adição equimolar de HSA (25 °C) em tampão acetato pH 5,0 para o período aproximado de 3 h (espectros tracejados correspondem ao complexo e a HSA registrados isoladamente, enquanto que o primeiro espectro de linha contínua corresponde ao espectro antes da mistura desses dois reagentes). Inserção: curva cinética em $\lambda = 545 \text{ nm}$

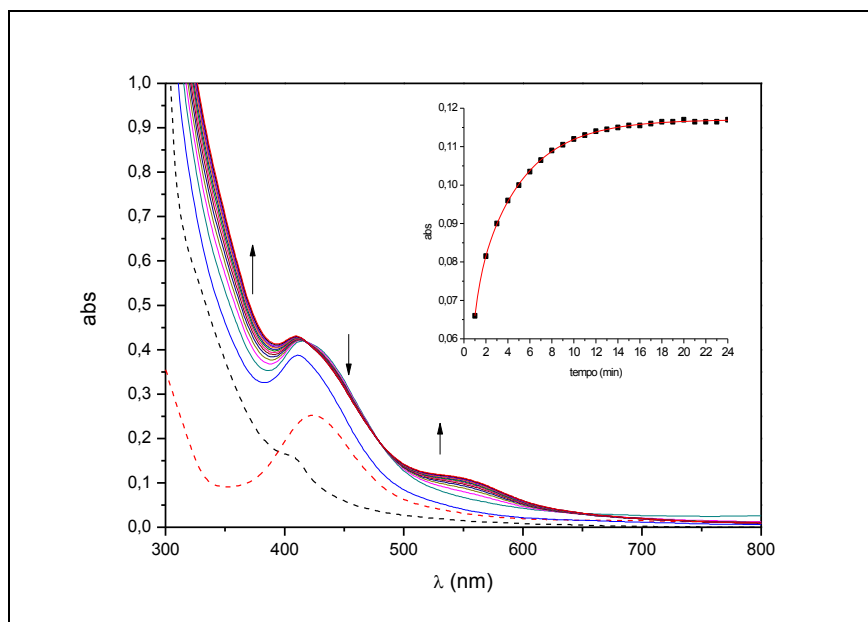


Figura 78 – Espectros eletrônicos do Ru₂-act (0,4 mmol L⁻¹) após a adição equimolar de HSA (25 °C) em tampão fisiológico (pH 7,4) para o período aproximado de 20 min (espectros tracejados correspondem ao complexo e a HSA registrados isoladamente, enquanto que o primeiro espectro de linha contínua corresponde ao espectro antes da mistura desses dois reagentes). Inserção: curva cinética em $\lambda = 545$ nm

Algumas diferenças podem ser observadas para as duas condições de pH investigadas: (i) a banda em 545 nm apresentou uma intensidade maior em pH 5,0; (ii) a reação que ocorre com formação da banda em 545 nm foi aproximadamente dez vezes mais rápida em pH 7,4 se comparada com a reação em pH 5,0; e (iii) em pH 7,4 pode-se observar a formação de dois pontos isobésticos muito bem definidos, em 418 e 480 nm, o que não acontece em pH 5,0.

Sabe-se, a partir de estudos prévios, que o Ru₂-act é estável em tampão acetato (pH 5,0) e que em tampão fisiológico (pH 7,4) o complexo pode apresentar diferentes cromóforos devido ao excesso de íons cloreto ou à presença de outros íons coordenantes como o fosfato. Neste sentido, acredita-se que: (i) a baixa intensidade da banda de 545 nm, para a reação em pH 7,4, esteja relacionada à pequena concentração do cromóforo catiônico, [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]⁺, uma vez que nas condições experimentais utilizadas, a principal espécie presente é a neutra monossobstituída, [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)Cl], que por sua vez é menos reativa, além disso, sabe-se que íons cloreto pode ligar-se à HSA modificando a sua carga global [184]; (ii) a reação de formação da banda em 545 nm apresentou uma cinética mais rápida em pH 7,4, uma vez que nessas

condições, os sítios ativos da HSA estão desprotonados e portanto mais disponíveis para a reação com o complexo; (iii) o aparecimento dos pontos isobésticos, apenas na reação em pH 7,4, pode estar relacionado ao equilíbrio das espécies catiônicas e neutras do Ru₂-act durante a reação com a HSA, já que neste pH a HSA apresenta elevada carga negativa [184].

Conforme já discutido anteriormente, são poucos os trabalhos de tetracarboxilatos de rutênio(II,III) com foco em aplicação biológica, sendo assim não foi encontrado nenhum estudo cinético sobre a sua interação com proteínas, porém alguns trabalhos com diferentes complexos de rutênio, incluindo o KP1019 (Figura 1) estão disponíveis na literatura [79,80,185]. O diferente valor obtido para a constante de velocidade observada ($k_{\text{obs}} = 3,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) para a reação do KP1019 com a HSA pode ser justificado devido às diferentes condições experimentais empregadas: eletroforese capilar, tampão PBS (pH 7,4) e 37 °C [185].

A Figura 79 mostra o acompanhamento do espectro eletrônico do produto formado entre a HSA (0,4 mmol L⁻¹) e o Ru₂-act, em função da variação da concentração do complexo (0,4-1,2 mmol L⁻¹) após 2 h de reação (37 °C) em tampão fisiológico (pH 7,4).

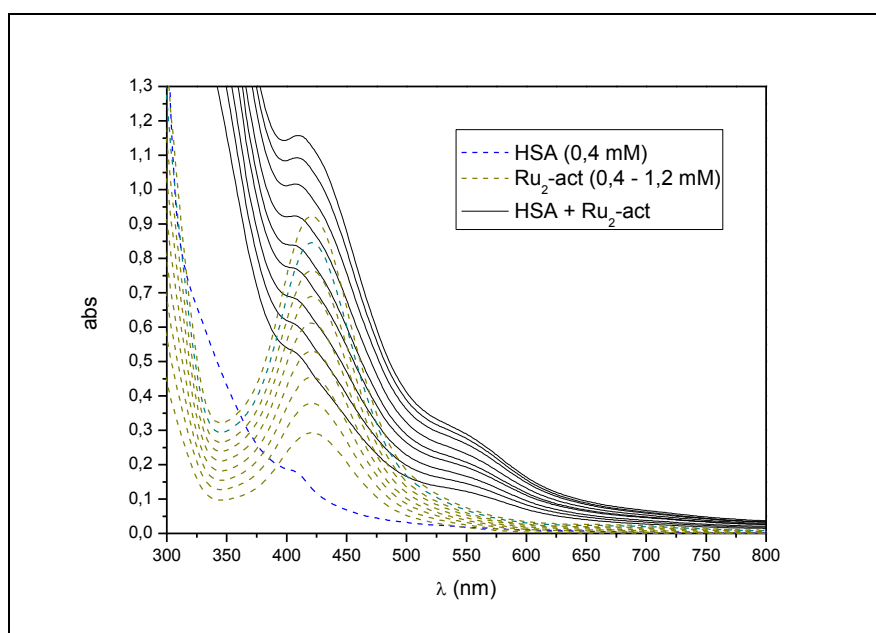
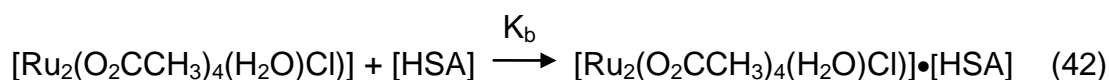


Figura 79 – Espectros eletrônicos dos reagentes [HSA] = 0,4 mmol L⁻¹ e [Ru₂-act] = 0,4-1,2 mmol L⁻¹ e dos produtos [HSA-Ru₂-act] após 2 h de reação (37°C) em tampão fisiológico pH 7,4

Assumindo que existe apenas um tipo de interação entre o complexo e a albumina, e que a reação (42) entre eles possui uma estequiometria de 1:1, a constante de ligação (K_b) pode ser representada de acordo com a equação (43).



$$K_b = \frac{[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}] \bullet [\text{HSA}]}{[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}][\text{HSA}]} \quad (43)$$

A constante de ligação pode ser calculada usando regressão linear em função da variação de algum parâmetro espectrofotométrico [186]. Dentre os vários modelos matemáticos disponíveis na literatura, podem-se destacar a equação de Benesi-Hildebrand (44) e a sua versão modificada (45), a equação de Scott (46), e a equação de Scatchard (47), que se aplica à espectroscopia eletrônica.

$$\frac{1}{\Delta_{abs}} = \frac{1}{[S][L]\epsilon_{1:1}K_b} + \frac{1}{[S]\epsilon_{1:1}} \quad (44)$$

$$[S] + [L] = \frac{\epsilon_{1:1}[S][L]}{\Delta_{abs}} - \frac{1}{K_b} \quad (45)$$

$$\frac{[L]}{\Delta_{abs}} = \frac{[L]}{[S]\epsilon_{1:1}} + \frac{1}{[S]\epsilon_{1:1}K_b} \quad (46)$$

$$\frac{\Delta_{abs}}{[L]} = -K_b\Delta_{abs} + [S]\epsilon_{1:1}K_b \quad (47)$$

em que: Δ_{abs} = variação da absorvância em algum comprimento de onda; $[L]$ = concentração do ligante (complexo); $[S]$ = concentração do substrato (HSA); e $\epsilon_{1:1}$ = absorvância molar do produto formado.

Sendo assim, a partir dos dados experimentais (valor da absorvância em 545 nm de cada solução, Figura 79) e das equações apresentadas acima, foi

possível determinar a constante de ligação (K_b) e o valor da absorvidade molar ($\epsilon_{1:1}$) do produto $[Ru_2\text{-act}/\text{HSA}]$ formado para uma estequiometria do tipo 1:1, utilizando os coeficientes angulares e lineares das equações da reta mostrados na Figura 80 (Tabela 15).

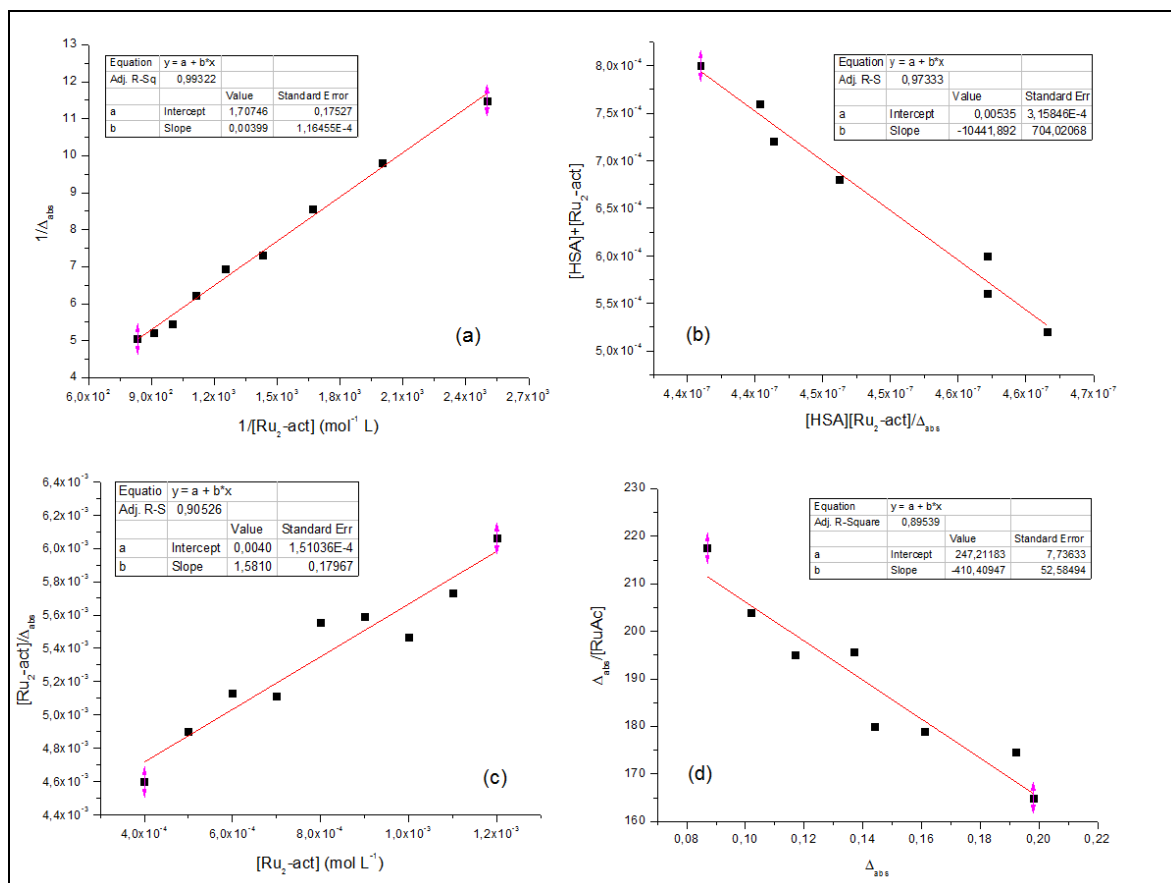


Figura 80 – Equações de regressão linear para a reação de HSA (0,4 mmol L⁻¹) e Ru₂-act (0,4-1,2 mmol L⁻¹) em tampão fisiológico (pH 7,4, 37°C, 2 h, $\lambda = 545$ nm): Benesi-Hildebrand (a); Benesi-Hildebrand modificada (b); Scott (c); e Scatchard (d)

Tabela 15 – Constantes de ligação (K_b), absorvidades molares ($\epsilon_{1:1}$) e índice de correlação da equação da reta (R) para o produto Ru₂-act/HSA usando diferentes regressões lineares

K_b (mol ⁻¹ L)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)	R	Equação
$(4,3 \pm 0,6) \times 10^2$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^4$	0,993	(44)
$(1,9 \pm 0,1) \times 10^2$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^4$	0,973	(45)
$(4,0 \pm 0,6) \times 10^2$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^4$	0,905	(46)
$(4,1 \pm 0,6) \times 10^2$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^4$	0,895	(47)

Alguns trabalhos disponíveis na literatura relatam problemas que são observados quando a equação de Benesi-Hildebrand [187] é utilizada, como por

exemplo, valores de coeficiente linear muito próximo de zero ou até mesmo negativos, impossibilitando desta forma o cálculo de K_b . Para contornar esses problemas, dois procedimentos podem ser empregados: o primeiro, que diz respeito ao método experimental, baseia-se em usar concentração do ligante, [L], pelo menos, dez vezes superior à concentração do substrato, [S]; o segundo refere-se ao rearranjo desta equação para calcular os valores de K_b e $\varepsilon_{1:1}$ de forma independente, permitindo assim o uso de concentrações equimolares para o ligante e o substrato [188,189,190]. Mesmo utilizando este segundo procedimento, os valores de K_b e $\varepsilon_{1:1}$ aqui obtidos apresentaram resultados com a mesma ordem de grandeza, sugerindo uma correlação entre as quatro equações empregadas.

A constante K_b também foi determinada para diferentes arenos complexos de rutênio, sendo que os valores obtidos apresentaram a ordem de grandeza de $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$, sugerindo uma alta afinidade destes complexos pela HSA [80,82,185,191]. Embora a constante K_b obtida para o complexo Ru₂-act tenha sido menor que a desses complexos de rutênio, o valor da constante da cisplatina ($K_b = 8,5 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), determinada também pelo método espectroscópico, apresentou a mesma ordem de grandeza [192].

Sendo assim, acredita-se que o valor obtido para o Ru₂-act pode ser mais interessante, uma vez que a afinidade de uma droga pela proteína HSA deve ser elevada o suficiente para fazer com ela seja transportada ao longo de todo o sistema circulatório, porém baixa o suficiente para permitir a sua liberação às células-alvo [50].

4.5.2. Espectroscopia Eletrônica de Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica que depende da assimetria estrutural da molécula, e pode ser definida como a interação entre a diferença de absorção de luz polarizada à esquerda com a luz polarizada à direita com uma molécula opticamente ativa, produzindo assim um espectro característico. Esta técnica é muito empregada no estudo de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, e interações de ligantes com proteínas [193,194].

Os espectros obtidos na espectroscopia CD apresentam a unidade de *mdeg*, a qual corresponde a sua unidade de dicroísmo circular. Essa unidade pode ser convertida em elipticidade molar (θ), *deg cm² d mol⁻¹*, a qual leva em consideração a concentração molar da proteína, o número de resíduos de aminoácidos (no caso da HSA = 585) e a distância do caminho óptico da cubeta utilizada no ensaio. Esta conversão de unidades é necessária para que seja feita uma correta comparação entre as amostras, e neste caso, foi realizada diretamente no *software* disponível no próprio equipamento.

A estrutura secundária da HSA, que é constituída predominantemente por α -hélice (67%), β -folhas (23%) e uma porção randômica (10%), pode ser caracterizada pelo espectro eletrônico CD. A partir desse espectro, que possui duas bandas negativas na região do ultravioleta (~210 e 220 nm), é possível quantificar as modificações causadas na estrutura da proteína utilizando cálculos de deconvolução espectral.

As alterações causadas na estrutura secundária HSA foram investigadas para os complexos Ru₂-act, Ru₂-ibp e Ru₂-cet, e também para os fármacos Hibp e Hcet.

Na Figura 81 estão disponíveis os espectros eletrônicos CD da HSA ($1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) na presença de diferentes concentrações de Ru₂-act (0,75 - $7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) após 24 h de reação (37 °C) em tampão fisiológico (pH 7,4). De um modo geral, pode-se observar que com o aumento da concentração do complexo à solução da HSA, a banda negativa (~210 nm) sofre uma pequena redução em sua intensidade, sugerindo que o composto está reagindo com a proteína. Comportamento semelhante foi observado para a interação com os outros complexos (Ru₂-ibp e Ru₂-cet) e fármacos isolados (Hibp e Hcet).

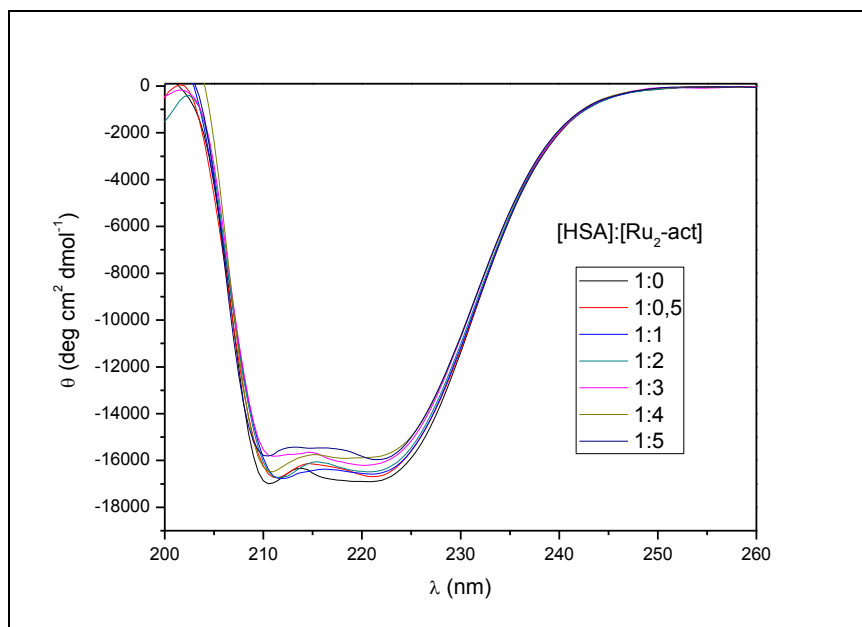


Figura 81 – Espectros eletrônicos CD da HSA ($1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) na presença de diferentes concentrações de Ru₂-act ($0,75 - 7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) após o período de incubação (24 h, 37 °C).

A partir dos espectros CD da HSA foi possível estimar o percentual remanescente das contribuições das estruturas α -hélice, β -folhas e randômica da HSA após o período de incubação com cada complexo estudado, para as diferentes razões molares. Os resultados estão resumidos na Tabela 16 e de um modo geral, pode-se notar que a porcentagem da α -hélice diminuiu e a porcentagem da β -folha aumentou, à medida que maiores concentrações do complexo ou do fármaco foram utilizadas. No entanto, a parcela randômica da proteína ficou praticamente inalterada em todas as razões molares estudadas. Nota-se, também, que ao se analisar a razão molar de 1:5 para os três complexos, a deformação da HSA (diminuição da α -hélice) é menor para o Ru₂-act, sugerindo que a presença dos fármacos nos outros dois complexos (Ru₂-ibp e Ru₂-cet) esteja contribuindo para a modificação na estrutura da proteína. Por fim, é possível verificar que os fármacos isolados, também, proporcionaram significativas deformações à proteína.

Tabela 16 – Valor calculado dos percentuais das estruturas secundárias da HSA após o período de incubação com diferentes complexos e fármacos

<i>Razão Molar</i> (HSA:Ru ₂)	<i>Ru₂-act</i>		
	<i>α-hélice</i>	<i>β-folha</i>	<i>randômica</i>
1:0	59 %	7 %	34 %
1:0,5	58 %	8 %	34 %
1:1	58 %	8 %	33 %
1:2	56 %	10 %	34 %
1:3	50 %	17 %	33 %
1:4	51 %	17 %	32 %
1:5	50 %	18 %	32 %

<i>Razão Molar</i> (HSA:Ru ₂)	<i>Ru₂-ibp</i>			<i>Ru₂-cet</i>		
	<i>α-hélice</i>	<i>β-folha</i>	<i>randômica</i>	<i>α-hélice</i>	<i>β-folha</i>	<i>randômica</i>
1:0	59 %	7 %	34 %	59 %	7 %	34 %
1:0,5	57 %	9 %	34 %	58 %	8 %	34 %
1:1	57 %	9 %	34 %	47 %	21 %	32 %
1:2	48 %	21 %	31 %	47 %	21 %	32 %
1:3	48 %	21 %	31 %	46 %	23 %	31 %
1:4	46 %	22 %	32 %	46 %	23 %	31 %
1:5	46 %	22 %	32 %	45 %	23 %	32 %

<i>Razão Molar</i> (HSA:FAINE)	<i>Hibp</i>			<i>Hcet</i>		
	<i>α-hélice</i>	<i>β-folha</i>	<i>randômica</i>	<i>α-hélice</i>	<i>β-folha</i>	<i>randômica</i>
1:0	59 %	8 %	33 %	59 %	8 %	33 %
1:1	58 %	8 %	34 %	58 %	8 %	34 %
1:2	57 %	9 %	33 %	57 %	9 %	34 %
1:4	58 %	8 %	34 %	57 %	10 %	33 %
1:8	58 %	9 %	33 %	51 %	16 %	33 %
1:12	53 %	14 %	33 %	47 %	21 %	32 %
1:16	52 %	16 %	32 %	47 %	21 %	31 %
1:20	50 %	18 %	32 %	45 %	23 %	32 %

Os resultados deste estudo estão em concordância com os outros complexos de dirutênio(II,III), incluindo o Ru₂-ibp e também o metalofármaco cisplatina, que foram investigados em diferentes condições experimentais (ausência de incubação do complexo e temperatura ambiente) [47,48].

A faixa de 300-600 nm do espectro eletrônico CD é uma importante região para monitorar o sítio de ligação VI da HSA (N-terminal) que apresenta a sequência dos aminoácidos Asp-Ala-His. Esta região do espectro sofre grandes alterações quando íons metálicos, principalmente o cobre, se ligam à proteína [195]. Experimentos exploratórios com a HSA (0,6 mmol L⁻¹) na presença de diferentes concentrações de Ru₂-act (0,12-1,2 mmol L⁻¹) foram realizados e

nenhuma alteração significativa nesta região do espectro (300-600 nm) foi observada, sugerindo que a interação dos complexos de dirutênio(II,III) e a HSA não deve ocorrer através do sítio N-terminal.

4.5.3. Espectroscopia Eletrônica de Fluorescência

A técnica de espectroscopia de fluorescência é uma importante ferramenta para o estudo de interação com proteínas. Em particular, a proteína HSA, possui três aminoácidos que absorvem fortemente na região do UV e emitem fluorescência: fenilalanina, tirosina e triptofano. A intensidade da fluorescência pode ser descrita por uma variedade muito grande de processos, sendo que a sua diminuição é chamada de supressão da fluorescência. O perfil da redução da fluorescência pode trazer evidências da região em que tais modificações ou interações estão ocorrendo, possibilitando até mesmo prever o mecanismo envolvido neste processo [196,197].

O resíduo de triptofano é o mais frequentemente estudado entre os três fluoróforos da HSA, justamente por ele estar localizado em uma região que possui características hidrofóbicas e hidrofílicas. Quando a HSA é excitada em 295 nm, ocorre a emissão da fluorescência em 340 nm devida apenas ao fluoróforo triptofano, no entanto, quando a excitação é feita em 280 nm, a fluorescência emitida em 330 nm é referente aos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina [198]. O único resíduo de triptofano da HSA está localizado no sítio I (subdomínio IIA), enquanto que os resíduos de tirosina estão localizados ao longo dos três domínios da HSA [184].

Com a finalidade de investigar a influência desses dois resíduos de aminoácidos na interação dos complexos com a HSA investigou-se a supressão da fluorescência utilizando os dois comprimentos de onda de excitação (280 e 295 nm). Os agentes supressores investigados foram os complexos Ru₂-act, Ru₂-ibp e Ru₂-cet, e também os fármacos Hibp e Hcet.

Na Figura 82 são apresentados os espectros de emissão de fluorescência da HSA na presença de diferentes concentrações do complexo Ru₂-cet para os dois comprimentos de onda. A partir desses espectros observa-se claramente a redução da intensidade da fluorescência da HSA à medida que se aumenta a concentração do Ru₂-cet. Uma possível explicação para a supressão

da fluorescência é que, neste caso, o complexo torna o ambiente ao redor do triptofano e/ou tirosina mais hidrofílico devido a sua possível interação com a HSA na região hidrofóbica próxima a esses aminoácidos [47]. Ainda é possível observar que o perfil dos espectros de emissão da HSA é diferente quando o comprimento de onda de excitação é alterado. Isso já era esperado, pois conforme relatado, em 280 nm existe contribuição da emissão de fluorescência para os dois cromóforos (triptofano e tirosina), enquanto que em 295 nm apenas o cromóforo triptofano emite fluorescência [199].

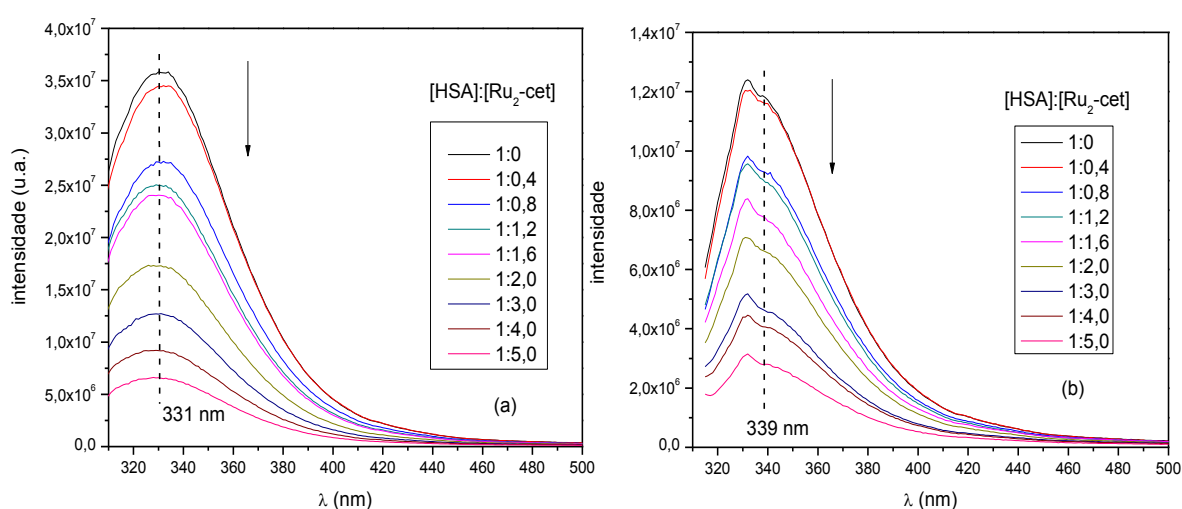


Figura 82 – Espectros de emissão de fluorescência da HSA em tampão fisiológico pH 7,4 ($4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) na presença do complexo Ru₂-cet ($1,6 - 20 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em diferentes razões molares após o período de incubação (24 h, 37 °C) para: (a) $\lambda_{exc} = 280$ nm; (b) $\lambda_{exc} = 295$ nm.

O mesmo perfil de supressão da fluorescência da HSA também foi observado na presença dos complexos Ru₂-act e Ru₂-ibp e do fármaco Hcet, com exceção do fármaco Hibp. Sabe-se que este fármaco também emite fluorescência [200] e não se liga à HSA na região onde o triptofano está localizado [201]. O Hibp liga-se ao sítio II da HSA, região do subdomínio IIIA [202,203].

Embora o perfil dos espectros de emissão de fluorescência da HSA, na presença dos supressores estudados, seja diferente quando os dois comprimentos de onda de excitação foram utilizados, as retas de F/F_0 versus [supressor]/[HSA] para os complexos Ru₂-act (Figura 80a) e Ru₂-ibp (Figura 80b) são coincidentes, indicando que esses compostos podem estar se ligando apenas

na região do triptofano, já que nenhuma supressão adicional, por parte do fluoróforo tirosina, foi observado. O mesmo não foi observado para os supressores Ru₂-cet (Figura 80c) e Hcet (Figura 80d), indicando que eles podem também estar interagindo em outras regiões da HSA, além daquela onde está localizado o triptofano [204].

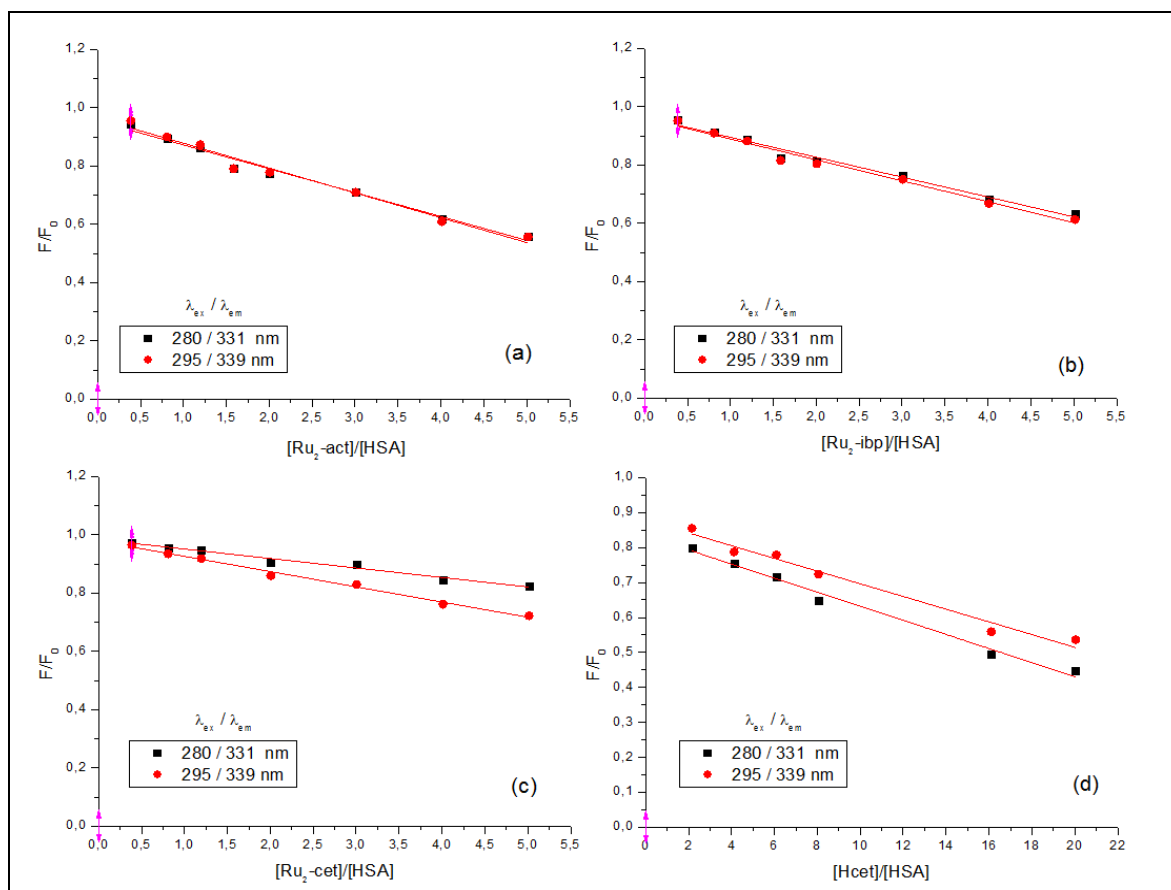


Figura 83 – Reta da intensidade de fluorescência (F/F_0) em função da razão molar (supressor/HSA) para dois λ_{em} e λ_{ex} : Ru₂-act (a); Ru₂-ibp (b); Ru₂-cet (c); e Hcet (d).

Em geral, os principais processos de supressão de fluorescência são classificados em estático e dinâmico. Na supressão dinâmica, o supressor se difunde até o fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado e em contato com o fluoróforo retorna ao estado fundamental, sem emissão de fóton. No mecanismo estático, ocorre a formação de uma espécie intermediária que se encontra no estado fundamental antes do fluoróforo ser excitado [205].

Os processos estático e dinâmico são muito bem descritos pela equação de Stern-Volmer (48):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_S \tau_0 [S] = 1 + K_{SV} [S] \quad (48)$$

onde, F_0 e F = intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente; $[S]$ = concentração do supressor; τ_0 = tempo de vida no estado excitado do fluoróforo; k_S = constante de velocidade de supressão biomolecular; e K_{SV} = constante de Stern-Volmer, que é a constante relacionada ao processo dinâmico [196].

A partir dos dados experimentais é possível construir uma curva da intensidade de fluorescência (F_0/F), em um dado λ , em função da concentração do supressor (S). Se os pontos desta curva, se ajustarem à equação linear de Stern-Volmer é possível determinar a K_{SV} a partir de seu coeficiente angular.

Na Figura 84 são apresentadas as retas de F_0/F em função da concentração de diferentes supressores (Ru_2 -act, Ru_2 -ibp e Ru_2 -cet) para os dois comprimentos de onda de excitação. Pode-se observar que essas retas são ajustadas à equação de Stern-Volmer, sugerindo que um dos mecanismos (dinâmico ou estático) estão envolvidos no processo de supressão da HSA [206]. Os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), calculados a partir do coeficiente angular, estão resumidos na Tabela 17, assim como as constantes de velocidade de supressão bimolecular (k_S), calculadas levando em consideração o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) [204].

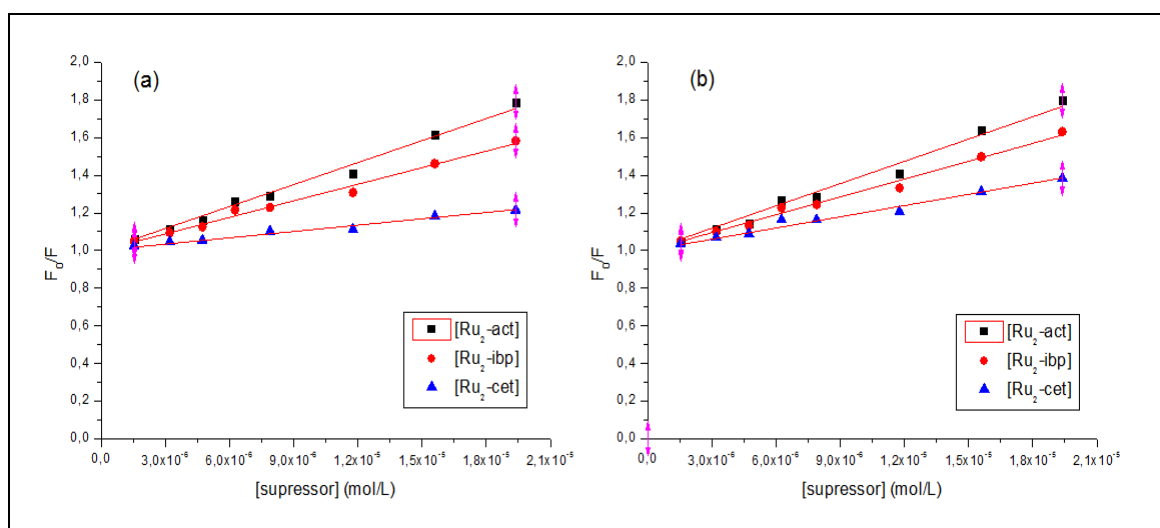


Figura 84 – Curvas de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da HSA para diferentes supressores para: (a) $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/331$ nm; e (b) $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 295/339$ nm

Tabela 17 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e constante de velocidade de supressão bimolecular (k_S)

Amostra	K_{SV}		k_S ($\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$)	
	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm
Ru ₂ -act	$(3,89 \pm 0,09) \times 10^4$	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^4$	$3,9 \times 10^{12}$	$4,0 \times 10^{12}$
Ru ₂ -ibp	$(2,93 \pm 0,07) \times 10^4$	$(3,16 \pm 0,07) \times 10^4$	$2,9 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{12}$
Ru ₂ -cet	$(1,12 \pm 0,04) \times 10^4$	$(1,99 \pm 0,06) \times 10^4$	$1,1 \times 10^{12}$	$2,0 \times 10^{12}$
Hcet	$(1,60 \pm 0,06) \times 10^4$	$(1,19 \pm 0,05) \times 10^4$	$1,6 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{12}$

Índice de correlação da equação (R) $\geq 0,998$

Analisando os resultados apresentados na Tabela 17, observa-se grande semelhança nos valores de K_{SV} para os dois comprimentos de onda de excitação para os complexos Ru₂-act e Ru₂-ibp, confirmando a hipótese de que eles estão interagindo apenas na região onde está localizado o resíduo de triptofano, uma vez que não existem diferenças significativas na supressão quando se leva em conta a tirosina. Já para o complexo Ru₂-cet observa-se um valor de aproximadamente duas vezes maior na K_{SV} para 295 nm, sugerindo que a região onde está localizado o triptofano é um pouco mais afetada que a região onde está localizado o resíduo de tirosina. Para o fármaco Hcet, a supressão da fluorescência foi um pouco maior na excitação feita em 280 nm, confirmando que a interação deste fármaco não ocorre preferencialmente na região onde está localizado o triptofano. Por fim, nota-se que a eficiência supressora foi mais pronunciada para os complexos de Ru₂-act e Ru₂-ibp uma vez que as suas constantes apresentaram valores maiores do que o do complexo Ru₂-cet.

A característica hidrofóbica/hidrofílica dos complexos parece não ser o único fator de contribuição para a interação dos mesmos com a HSA, pois resultados preliminares sobre o coeficiente de partição para os complexos indicaram a seguinte ordem crescente de lipofilicidade: Ru₂-act \ll Ru₂-cet $<$ Ru₂-ibp [207].

No presente trabalho, verificou-se que os valores obtidos para as constantes de velocidade de supressão bimolecular, k_S , (Tabela 17), são bem maiores do que o da própria constante de velocidade de difusão da HSA ($k_{\text{dif}} = 2,0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$, T = 20 °C) [206]. Isso sugere que a supressão da HSA não é iniciada por uma colisão dinâmica e sim pela formação de uma espécie intermediária [204,208].

Assumindo então que supressão da fluorescência da HSA se inicia por um processo estático, ou seja, pela formação de uma espécie intermediária antes do fluoróforo ser excitado, o equilíbrio entre os reagentes (HSA e supressor) e o produto (HSA:supressor) pode ser representado em função da intensidade da fluorescência de acordo com equação (49) [205]:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[S] \quad (49)$$

onde, F_0 e F são respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, K_b é a constante de ligação aparente do supressor à HSA, n é o número de potenciais sítios de ligação do supressor à HSA, e $[S]$ a concentração do supressor.

Com os dados experimentais obtidos construiu-se um gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ em função do $\log[S]$ (Figura 85) para os diferentes sistemas (HSA:supressor) estudados e efetuou-se o cálculo da constante de ligação entre o supressor e HSA (K_b), a partir do coeficiente linear da equação da reta. O número de sítios de ligação do supressor (n), também pôde ser calculado a partir do coeficiente angular desta mesma equação da reta.

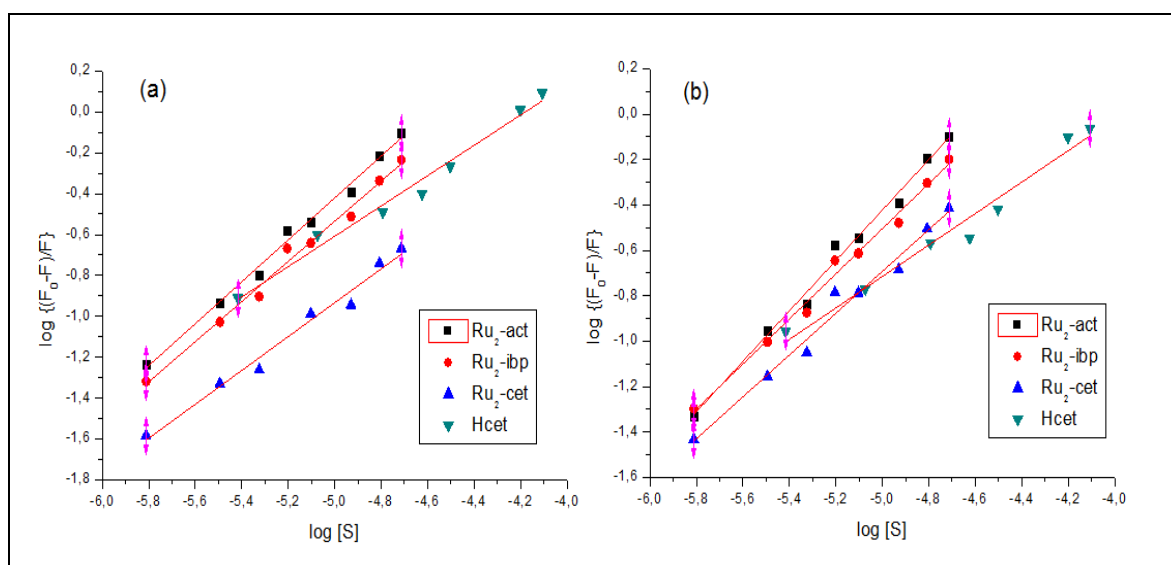


Figura 85 – Equação logarítmica (49) da supressão da fluorescência da HSA na presença de diferentes agentes supressores para: (a) $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/331$ nm; e (b) $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 295/339$ nm

Pôde-se observar, a partir dos resultados apresentados na Tabela 18, que os valores das constantes de ligação (K_b) para o Ru₂-act e Ru₂-ibp, excitados em 295 nm, apresentam praticamente a mesma ordem de grandeza, se comparados com a excitação feita em 280 nm. Esses resultados corroboram com a hipótese de que os dois complexos estão interagindo com a HSA em uma única e mesma região da HSA, ou seja, o sítio de ligação I, localizado no subdomínio IIA próximo ao resíduo de triptofano. O valor de K_b para o Ru₂-cet é praticamente cinco vezes maior em 295 nm se comparado com o 280 nm, sugerindo a sua preferência pelo sítio de ligação I. Para o fármaco Hcet observa-se que K_b é aproximadamente duas vezes maior quando a excitação é feita em 280 nm, o que já era de se esperar, pois sabe-se que este fármaco tem preferência por ligar-se ao sítio II (subdomínio IIIA) da HSA, região onde não está localizado o único aminoácido triptofano da HSA [202].

Tabela 18 – Constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação do supressor (n) e índice de correlação da equação da reta (R)

Amostra	K_b ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)		n		R	
	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm	280 nm	295 nm
Ru ₂ -act	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^5$	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	0,991	0,989
Ru ₂ -ibp	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^4$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	0,988	0,989
Ru ₂ -cet	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^3$	$(8,1 \pm 0,6) \times 10^3$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	0,979	0,977
Hcet	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^3$	$(5,6 \pm 0,5) \times 10^2$	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	0,979	0,967

O número de sítios de ligação (n), dos quatros supressores investigados, à HSA (Tabela 18) foi próximo de 1, indicando a formação de um possível aduto intermediário com estequiometria 1:1 (supressor:HSA).

Estudos da supressão de fluorescência da HSA também foram realizados com diferentes complexos de dirutênio(II,III), incluindo o Ru₂-act e o Ru₂-ibp, por nosso grupo de pesquisa [47]. Na ocasião, os ensaios foram realizados em temperatura ambiente e o comprimento de onda de excitação escolhido foi apenas o de 295 nm. Os valores de K_{SV} , obtidos para o Ru₂-act ($5,8 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{L}$) e Ru₂-ibp ($1,4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{L}$), estão próximos aos valores aqui obtidos, assim como os seus respectivos valores de K_b ($6,3 \times 10^4$ e $2,0 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{L}$) e número de sítios de ligação (n) que também foi 1.

4.6. Sinopse dos Estudos com as Moléculas Biológicas

Fundamentado em todos os resultados, já apresentados e discutidos, das interações dos complexos de $Ru_2(II,III)$ com os diferentes aminoácidos e a proteína albumina humana, foi possível estabelecer algumas correlações e resumir outras importantes conclusões.

Os princípios fundamentais da afinidade de biomoléculas por íons metálicos são conhecidos desde o início do século passado. Esta afinidade resulta em diferentes ligações químicas, incluindo a coordenação entre um íon metálico quelatado e certos resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas, tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína, e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico, atuando como base de Lewis [209].

O par de elétrons presente no nitrogênio do anel imidazol da histidina, e o grupamento tiol da cisteína, podem ser os principais contribuintes na interação da proteína HSA com os complexos tetracarboxilatos de dirutênio(II,III). Apesar do grupamento indol do triptofano ser considerado um possível ligante a complexos metálicos, os resultados cinéticos da sua reação com o complexo precursor sugerem que este grupamento não apresentou um papel importante na velocidade da reação.

A HSA possui 35 resíduos de cisteína, sendo que apenas um deles (Cis34) possui o grupamento tiol disponível para a coordenação com diferentes espécies, pois todos os outros são responsáveis pelas ligações de sulfeto que ocorrem na estrutura terciária da proteína. O resíduo Cis34 está localizado na região do sítio V (subdomínio IA) [64].

Os espectros eletrônicos do produto formado ($Ru_2:HSA$) apresentaram absorções na mesma região que os espectros dos complexos com os aminoácidos, principalmente com a histidina e cisteína, sugerindo que suas interações com a HSA estão ocorrendo através da coordenação com os resíduos de aminoácidos. No entanto, apenas com esses resultados não é possível assegurar e garantir que a estrutura em “gaiola” do complexo está mantida e que a coordenação com os aminoácidos ou HSA seja apenas através de reações de substituição dos ligantes axiais do complexo. Possíveis interações hidrofóbicas, entre o complexo e a HSA, também devem ser levadas em consideração.

Os resultados da supressão da fluorescência indicaram que as interações dos complexos ocorrem preferencialmente em região próxima ao resíduo de triptofano, ou seja, no sítio I (subdomínio IIA). Adicionalmente, os resultados de dicroísmo circular sugeriram que essas interações não ocorrem através do sítio VI (N-terminal).

Por fim, concluiu-se que a interação dos complexos dirutênio(II,III) com a proteína albumina pode estar ocorrendo preferencialmente através de ligações de coordenação com os aminoácidos histidina e cisteína que estão localizados nos sítios I e V da HSA. Esses dois sítios estão geometricamente próximos um dos outros (subdomínio IIA e IA) e são neles que se encontram os dois importantes aminoácidos, Trp214 e Cis34.

4.7. Estudos de Interação com Ciclodextrinas

O principal método para se obter compostos de inclusão com ciclodextrinas é através de procedimentos em solução, onde os reagentes são totalmente dissolvidos em água, misturados e submetidos à agitação constante por um período pré estabelecido [210]. A utilização de solventes orgânicos deve ser evitada, pois as moléculas desses solventes podem ficar retidas na cavidade da ciclodextrina dando origem a outros compostos de inclusão [211].

A interação dos complexos Ru₂-ibp e Ru₂-cet com β-CD e HPβCD foi inicialmente investigada em solução aquosa (sem a adição de solventes orgânicos), porém como esses complexos são insolúveis em água não foi possível obter resultados satisfatórios e conclusivos sobre um possível composto de inclusão em solução aquosa.

Vários estudos relatam a utilização de co-solventes orgânicos para facilitar a dissolução de moléculas “convidadas” em solução; porém, neste caso, os solventes orgânicos devem ser eliminados completamente dando origem a um novo material híbrido no estado sólido [212,213,214,215,216]. Dentre os vários métodos para a obtenção de compostos de inclusão no estado sólido, podem-se destacar os métodos de secagem por *spray-drying*.

A secagem que utiliza o equipamento *spray-dryer* consiste na nebulização de materiais no estado fluido (solução, emulsão ou pasta) dentro de uma câmara submetida a uma corrente controlada de ar quente. O contato das

gotículas produzidas com o ar quente promove a evaporação do solvente, obtendo-se o material em pó. Esta técnica tem sido utilizada em diversos segmentos industriais devido à rápida e eficiente secagem de produtos farmacêuticos e alimentícios. Além do processo de desidratação é amplamente usada para microencapsulação de produtos farmacêuticos aplicados em sistemas de liberação controlada de drogas. A técnica oferece diversas vantagens, tais como baixo custo de operação, alta qualidade das micropartículas produzidas, capacidade de processar diversas matérias-primas, produção de micropartículas com elevada área superficial, processo de etapa única e apresenta flexibilidade na formulação do material empregado [217]. Um esquema representativo do funcionamento de um equipamento *spray-dryer* pode ser visto na Figura 86.

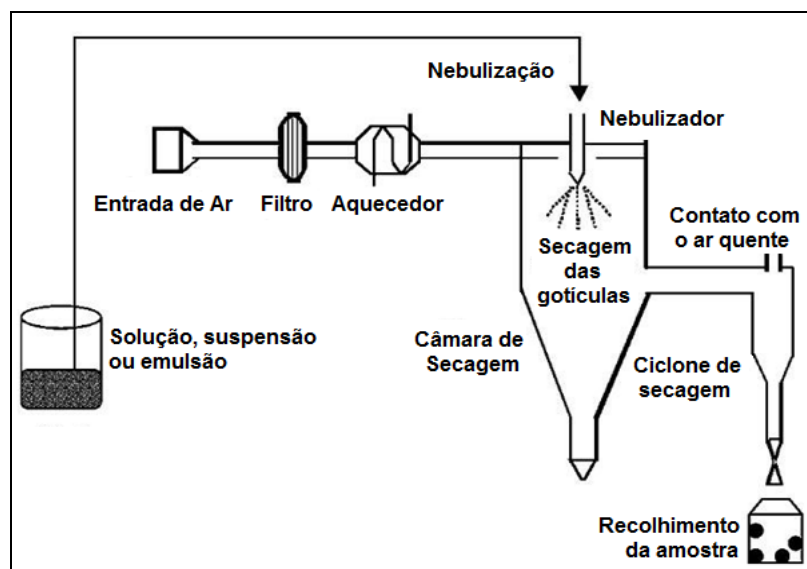


Figura 86 – Representação esquemática de um equipamento *spray-dryer* [218]

4.7.1. Preparo e Caracterização dos Materiais Híbridos com HP β CD

Os diferentes materiais híbridos, obtidos por *spray-drying*, foram preparados levando em consideração as razões molares que foram encontradas na literatura para a formação do composto de inclusão entre o fármaco e a ciclodextrina: Hibp:HP β CD (1:2), Hcet:HP β CD (1:1), Ru₂-ibp:HP β CD (1:5), Ru₂-cet:HP β CD (1:4). A escolha do metanol como co-solvente está relacionada ao fato dele ser o álcool com a menor cadeia carbônica e, também, por apresentar uma baixa constante de associação com a β CD [211,219]. Já o tempo da reação (agitação) de 3 h foi determinado a partir de ensaios exploratórios de cinética que

indicaram que o equilíbrio da mistura foi obtido durante este intervalo de tempo (nenhuma alteração espectral foi observada).

4.7.1.1. Análises de Rutênio por ICP-AES

Os percentuais de rutênio presente nas amostras dos materiais híbridos (Ru_2 -FAINEs:complexo) estão disponíveis na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados dos teores de rutênio nas amostras de material híbrido calculado e obtido experimentalmente por ICP-AES.

Material Híbrido	%Ru	
	Experimental	Calculado
Ru_2 -ibp:HP β CD (1:5)	2,0	2,3
Ru_2 -cet:HP β CD (1:4)	2,5	2,7

Os valores experimentais obtidos para os dois novos materiais híbridos contendo HP β CD e os complexos de Ru_2 -ibp e Ru_2 -cet estão em concordância com os valores calculados para as razões molares propostas.

4.7.1.2. Espectros de Absorção Eletrônica

Os espectros eletrônicos dos materiais híbridos obtidos por *spray-drying* (SD) e suas respectivas misturas-físicas (MF) em solução e no estado sólido podem ser observados, respectivamente, nas Figuras 87 e 88.

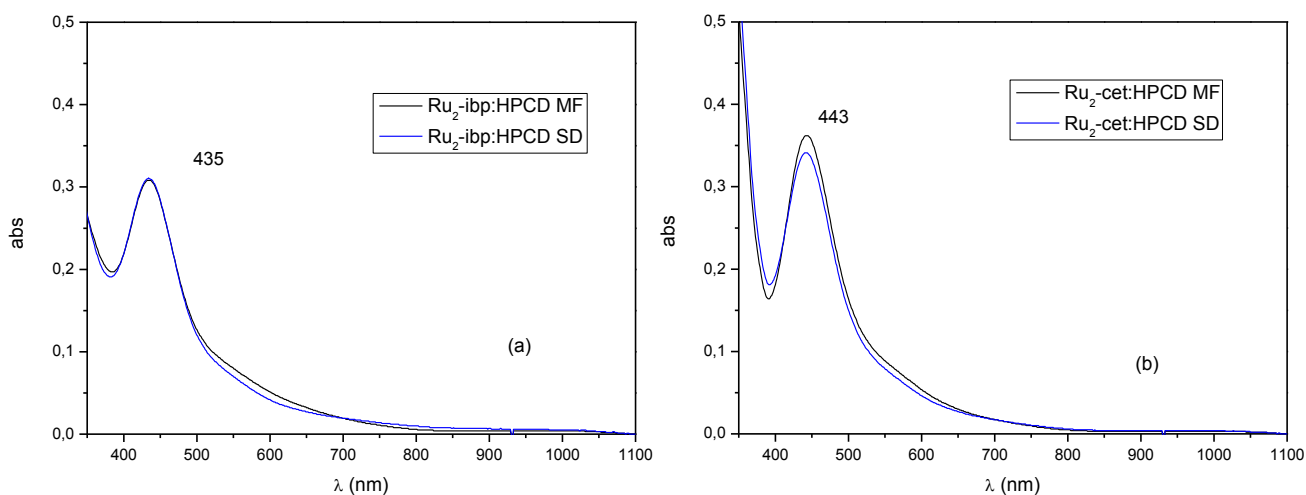


Figura 87 – Espectros eletrônicos em solução dos materiais híbridos (SD) e suas respectivas misturas-físicas (MF) obtidos em etanol em cubetas com 0,1 cm de caminho óptico: Ru_2 -ibp:HP β CD (40 mg/L) (a) e Ru_2 -cet:HP β CD (40 mg/L) (b)

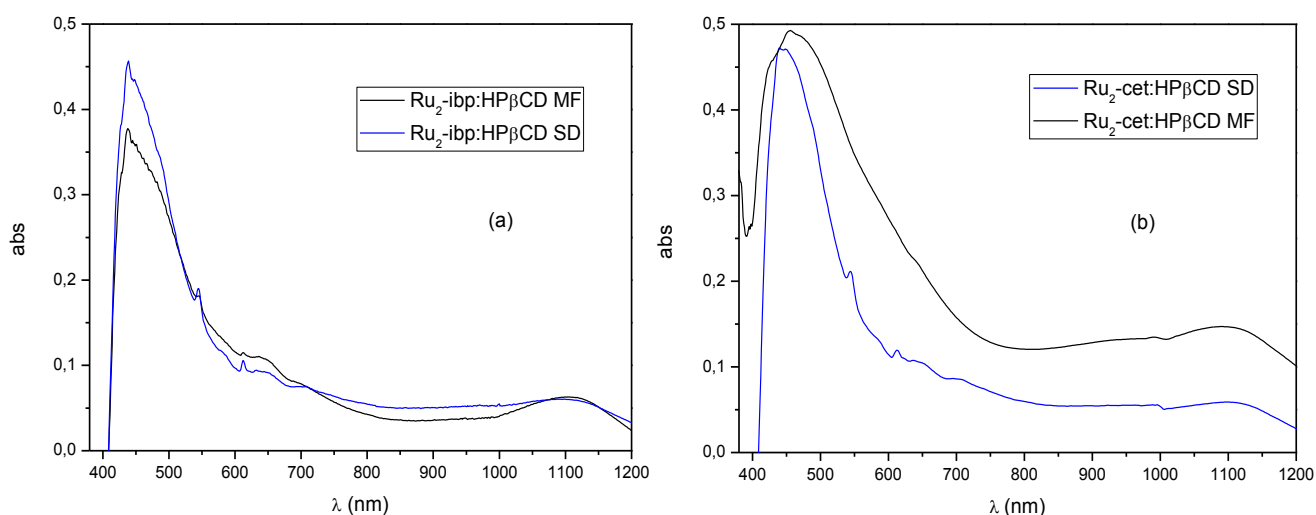


Figura 88 – Espectros eletrônicos no estado sólido dos materiais híbridos (SD) e suas respectivas misturas físicas (MF): Ru₂-ibp:HPβCD (a) e Ru₂-cet:HPβCD (b)

A partir dos espectros eletrônicos no estado sólido (Figura 88) é possível observar a presença das duas principais bandas dos complexos na região do visível e do infravermelho próximo (~1100 nm) que são atribuídas às transições $\pi(\text{Ru-O,Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ e $\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$, respectivamente, confirmando assim a integridade do complexo nas amostras obtidas pelo processo de secagem. Além disso, observa-se que os espectros em solução (Figura 87) das misturas-físicas são praticamente idênticos aos dos materiais híbridos, indicando que não houve quebra da estrutura dos complexos durante o processo da reação de inclusão em solução ou secagem por *spray-drying*.

4.7.1.3. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas para o estudo em solução com ciclodextrinas, pois fornece evidências diretas da formação dos compostos de inclusão. A razão para isso é que a presença da molécula “convidada”, quando inserida na cavidade interna das ciclodextrinas, causa mudanças no ambiente químico dos hidrogênios internos, mas não nos hidrogênios externos [220], causando, inclusive, uma variação no deslocamento químico dos prótons da molécula hospedeira [221]. Por outro lado, quando os prótons externos também sofrem variação diz-se que um composto de associação também pode estar presente na solução [222]. O deslocamento dos prótons

internos é provavelmente devido ao efeito não isotrópico diamagnético produzido pelos grupos ricos em elétrons π pertencentes à molécula “convidada” [223].

Os prótons H3 e H5 da ciclodextrina estão localizados na cavidade interna da ciclodextrina, sendo que os H3 estão próximos da cavidade maior e os H5 estão próximos à cavidade menor. Os H1, H2, H4 estão localizados na região externa da ciclodextrina, enquanto que os H6 estão localizados na superfície do lado da cavidade menor. A magnitude do deslocamento químico ($\Delta\delta$) para os prótons H3 e H5 e a razão entre o $\Delta\delta_{H5}:\Delta\delta_{H3}$ podem ser usadas, respectivamente, como medida da estabilidade do complexo e da profundidade da molécula “convidada” na cavidade da ciclodextrina [224].

Nas Figuras 89-91 podem-se observar os espectros RMN de ^1H das amostras HP β CD, HP β CD:Hibp MF, HP β CD:Hibp SD e na Tabela 20, encontra-se a atribuição e deslocamento químico dos ^1H dessas mesmas amostras.

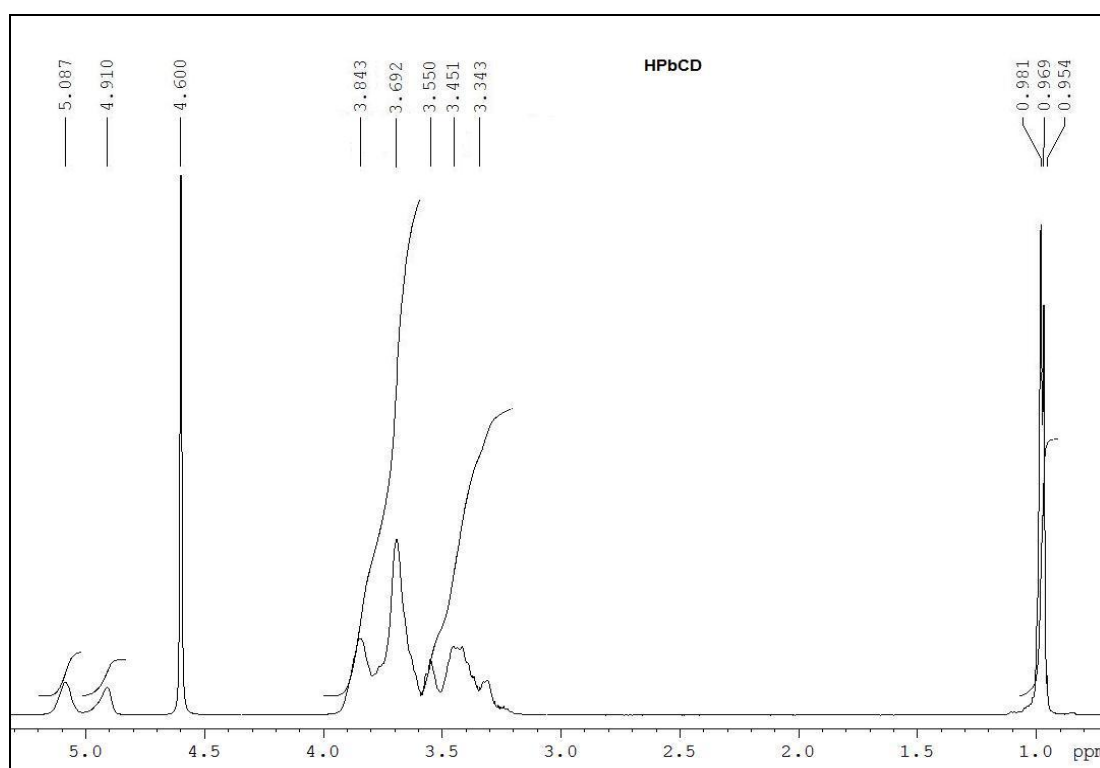


Figura 89 – Espectro monodimensional de ^1H -RMN de HP β CD (23 mg/mL) em D_2O , 25 °C

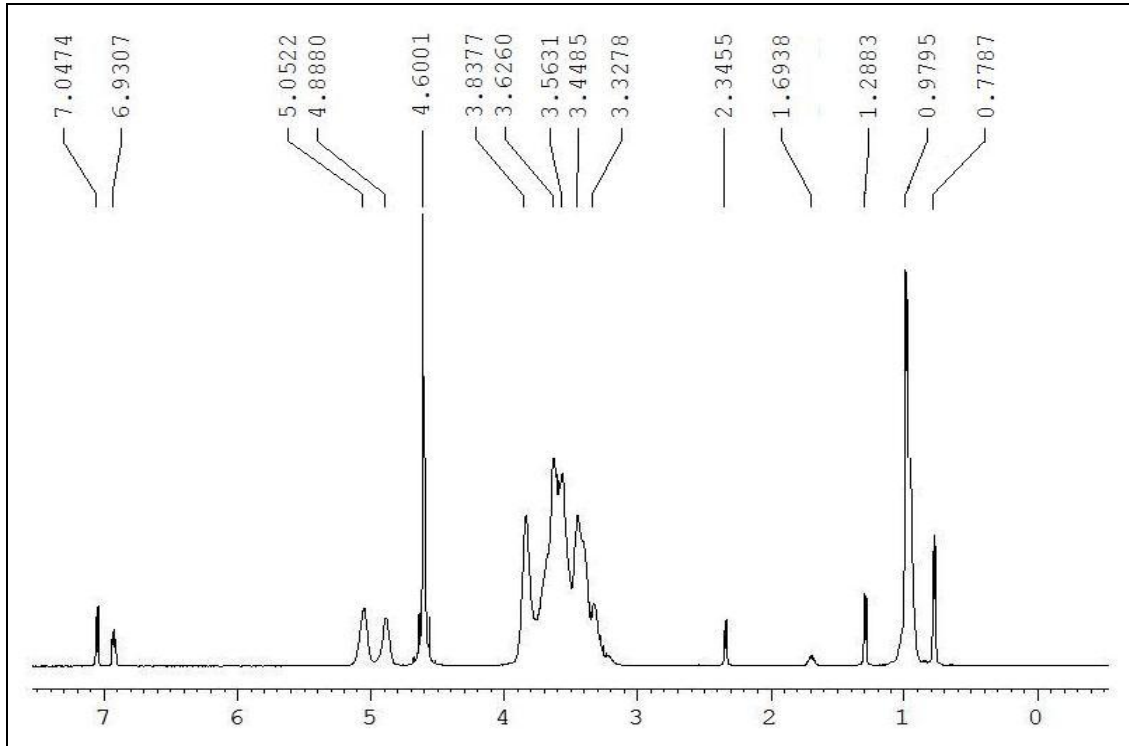


Figura 90 – Espectro monodimensional de ^1H -RMN da amostra HP β CD:Hibp MF em D_2O , 25 $^\circ\text{C}$

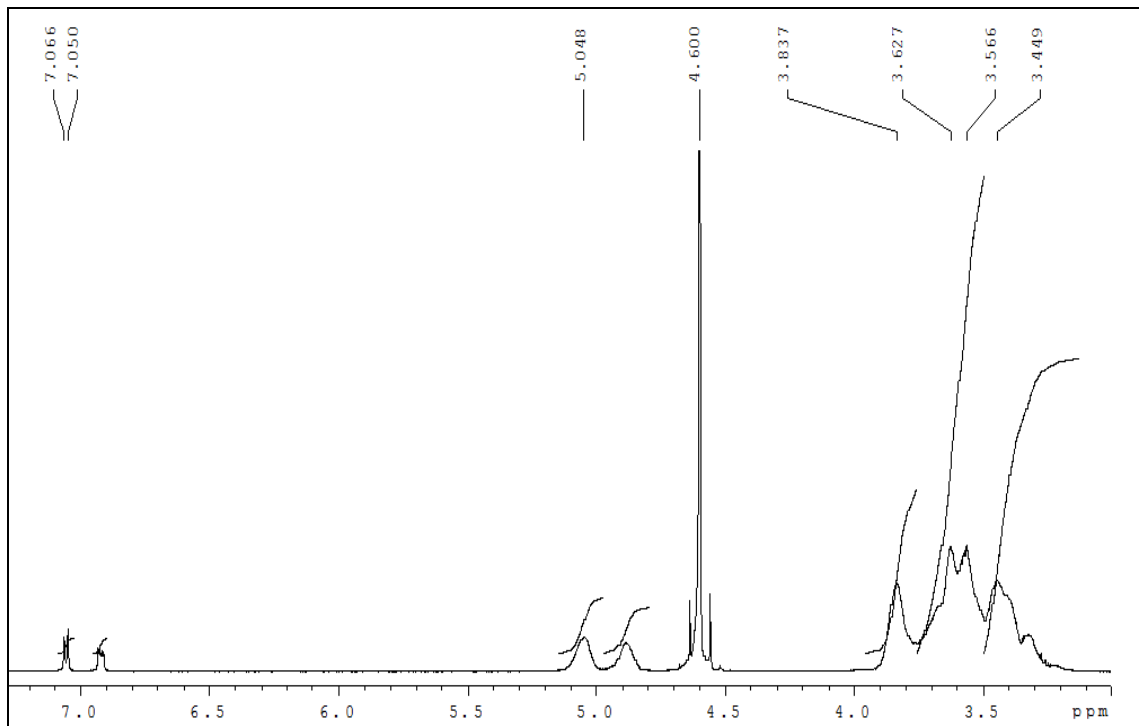


Figura 91 – Espectro monodimensional de ^1H -RMN da amostra HP β CD:Hibp SD em D_2O , 25 $^\circ\text{C}$

Tabela 20 – Atribuição, deslocamento químico (δ) e variação do deslocamento químico ($\Delta\delta$) dos prótons da HP β CD e das amostras

Próton	Deslocamento Químico, $\Delta\delta^1H$ (ppm)				
	HP β CD δ^1H	HP β CD:Hibp SD δ^1H	HP β CD:Hibp MF δ^1H	HP β CD:Hibp SD $\Delta\delta^1H$	HP β CD:Hibp MF $\Delta\delta^1H$
H1	5,087	5,048	5,052	-0,035	-0,039
H2	3,451	3,449	3,448	-0,003	-0,002
H3	3,843	3,837	3,838	-0,005	-0,006
H4	3,343	3,333	3,328	-0,015	-0,010
H5	3,550	3,566	3,563	0,013	0,016
H6	3,692	3,627	3,626	-0,066	-0,065

$$\Delta\delta = \delta_{\text{amostra}} - \delta_{\text{HP}\beta\text{CD}}$$

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 20) observa-se que a maior variação no deslocamento dos prótons ocorreu tanto para os prótons internos (H5) quanto para os prótons externos (H1, H4 e H6), sugerindo que em solução o composto formado pode ser tanto de inclusão quanto de associação. Essas modificações são observadas para os materiais híbridos e também para as misturas-físicas, indicando que em solução as duas amostras estão apresentando o mesmo comportamento.

O registro dos espectros RMN para as amostras com o fármaco Hcet e para os complexos Ru₂-ibp e Ru₂-cet não foram realizados. Esses complexos de rutênio(II,III) são paramagnéticos, impossibilitando a utilização desta técnica.

4.7.1.4. Espectros Vibracionais na Região do Infravermelho

Nas Figuras 92-95 encontram-se os espectros FTIR dos materiais híbridos e dos seus respectivos reagentes de partida. Analisando primeiramente os materiais híbridos obtidos com os fármacos orgânicos, é possível verificar, que a principal alteração espectral está relacionada à banda atribuída ao estiramento da carbonila do grupamento ácido dos fármacos Hibp (1720 cm⁻¹) e Hcet (1700 cm⁻¹). O deslocamento e/ou a redução da intensidade dessas bandas é indicativo de que o fármaco está interagindo com as moléculas de ciclodextrina [108,109, 114,115,215,216,225,226,227]. Apesar da pequena redução da intensidade destas bandas nas misturas-físicas para as amostras de Hibp (Figura 92) e Hcet (Figura 93), não é verificado o seu deslocamento. No entanto, para os materiais híbridos, além do deslocamento para maiores números de onda, é observada também a redução e um pequeno alargamento da banda. Uma possível

explicação para essas modificações seria a quebra das ligações de hidrogênio (intermoleculares) associadas às moléculas dos fármacos e a formação de novas ligações com as moléculas de HP β CD [108].

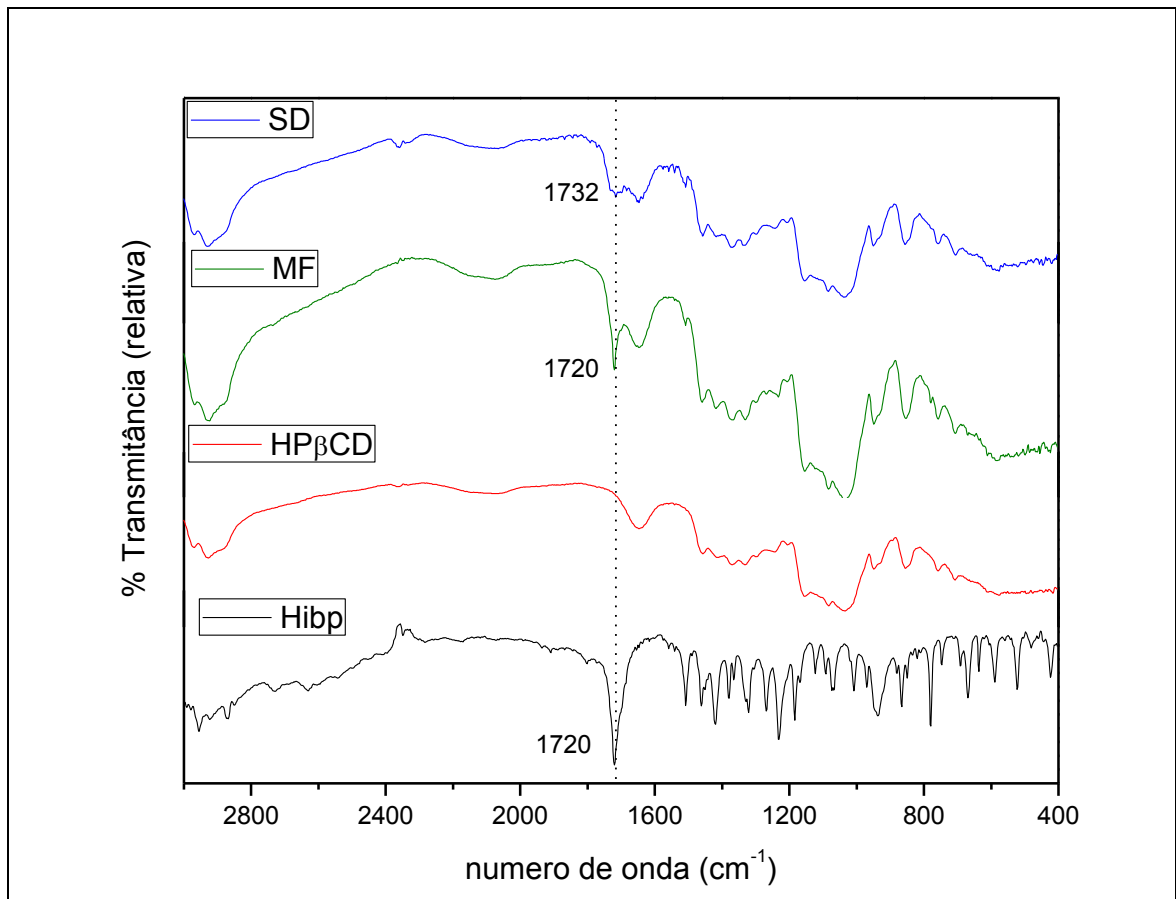


Figura 92 – Espectros FTIR do Hibp, HP β CD, Hibp:HP β CD MF, Hibp:HP β CD SD

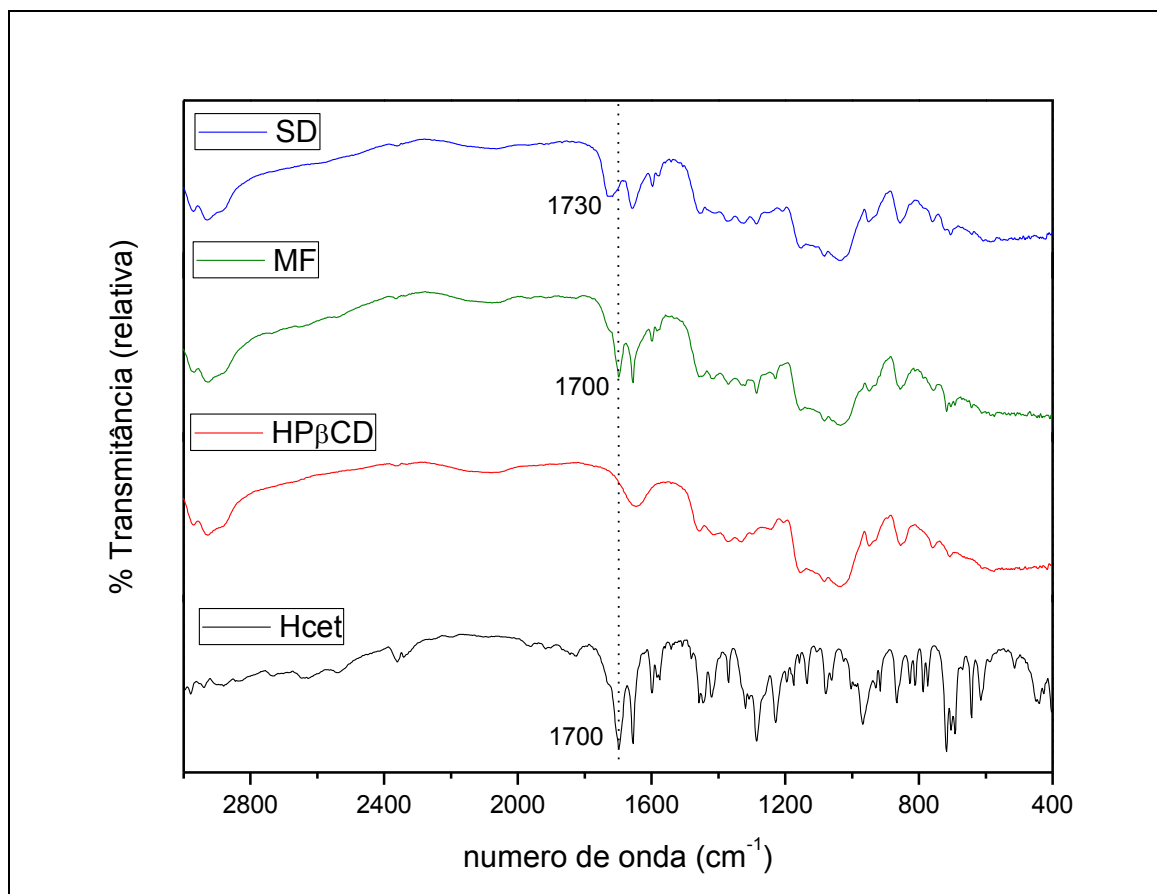


Figura 93 – Espectros FTIR do Hcet, HP β CD, Hcet:HP β CD MF, Hcet:HP β CD SD

Os espectros FTIR da misturas-física e do material híbrido com o complexo Ru₂-ibp (Figura 94) são bastante semelhantes entre si. O Ru₂-ibp apresenta bandas que se sobrepõem às bandas da HP β CD e desta forma é difícil identificar as bandas do complexo no material híbrido. No entanto, as bandas em 1514 e 1541 cm⁻¹, que estão fora da região de absorção da HP β CD, podem ser identificadas tanto no material híbrido quanto na mistura-física. Além disso, a banda que aparece em 1514 cm⁻¹ (atribuída ao $\nu_{C=C(\text{anel})}$ [27]) no espectro do Ru₂-ibp e na mistura física, se desdobra em 1508 e 1516 cm⁻¹ no espectro do material híbrido SD, o que pode indicar alguma interação do complexo com HP β CD envolvendo o anel aromático do fármaco ibuprofeno. Já para os espectros FTIR com o complexo Ru₂-cet (Figura 95) não foi observado nenhuma alteração significativa.

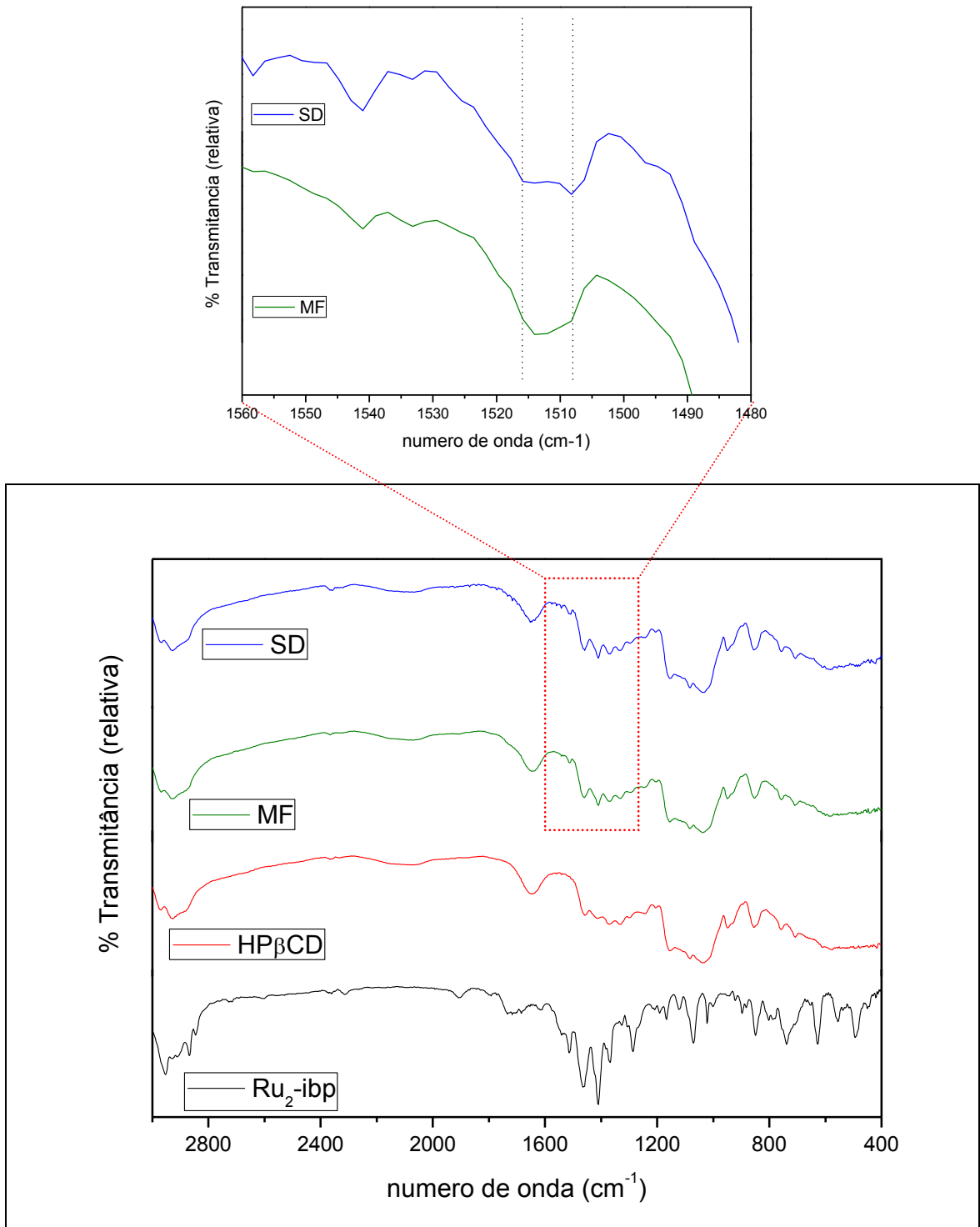


Figura 94 – Espectros FTIR do Ru₂-ibp, HPβCD, Ru₂-ibp:HPβCD MF, Ru₂-ibp:HPβCD SD

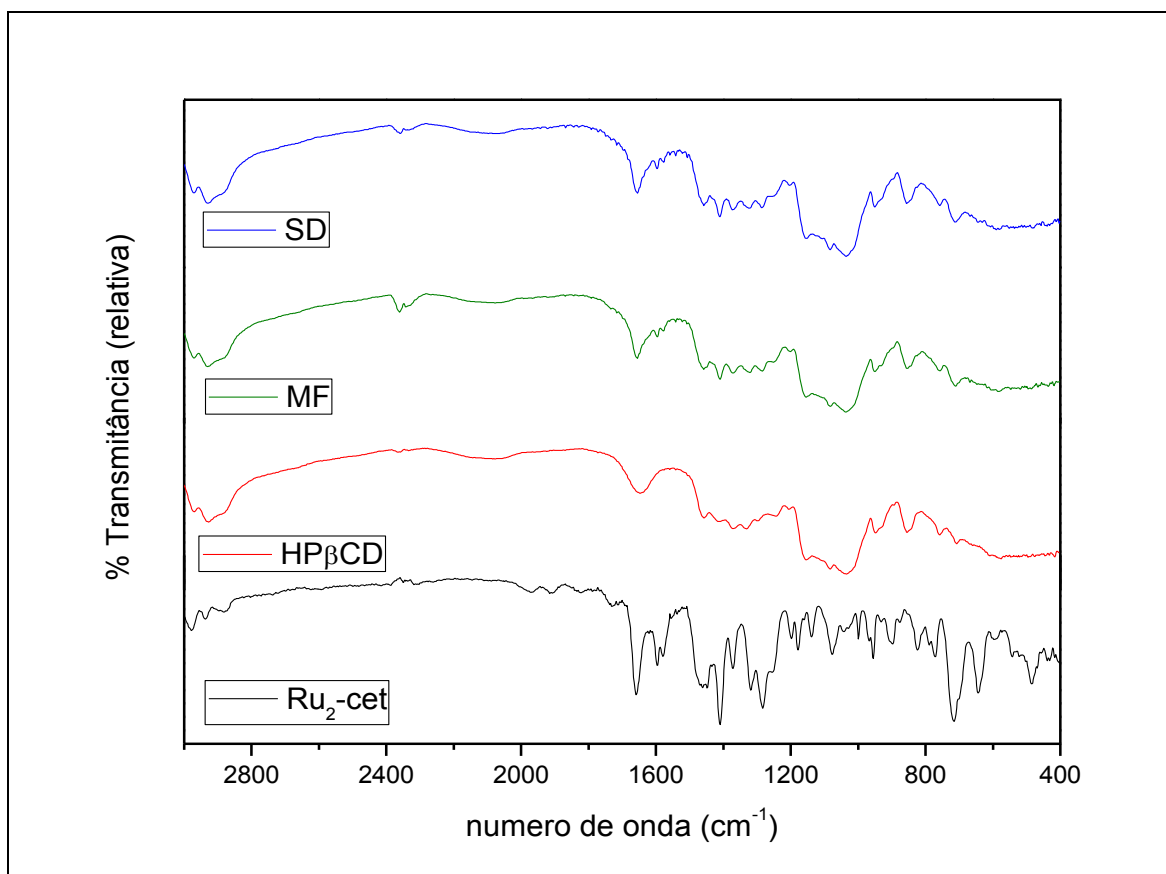


Figura 95 – Espectros FTIR do Ru₂-cet, HPβCD, Ru₂-cet:HPβCD MF, Ru₂-cet:HPβCD SD

4.7.1.5. Análises Térmicas

O comportamento térmico dos materiais híbridos foi analisado em atmosfera de gás nitrogênio por TG e DSC, e os fragmentos analisados por espectrometria de massas (MS). Na Figura 96 são apresentadas as curvas DSC dos quatros materiais híbridos, misturas físicas e de seus materiais de partida.

Os fármacos Hibp e Hcet apresentam dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro relacionado aos seus respectivos pontos de fusão (~75 °C e ~95 °C) e o segundo que pode ser atribuído às suas decomposições (~230 e ~300 °C).

O desaparecimento do pico de fusão nos materiais híbridos indica a ausência de fármaco livre, ou seja, o fármaco, presente na amostra obtida por *spray-drying* está interagindo de alguma forma com as moléculas de HPβCD. Ao contrário nas amostras de misturas-físicas é observada a presença do pico de fusão.

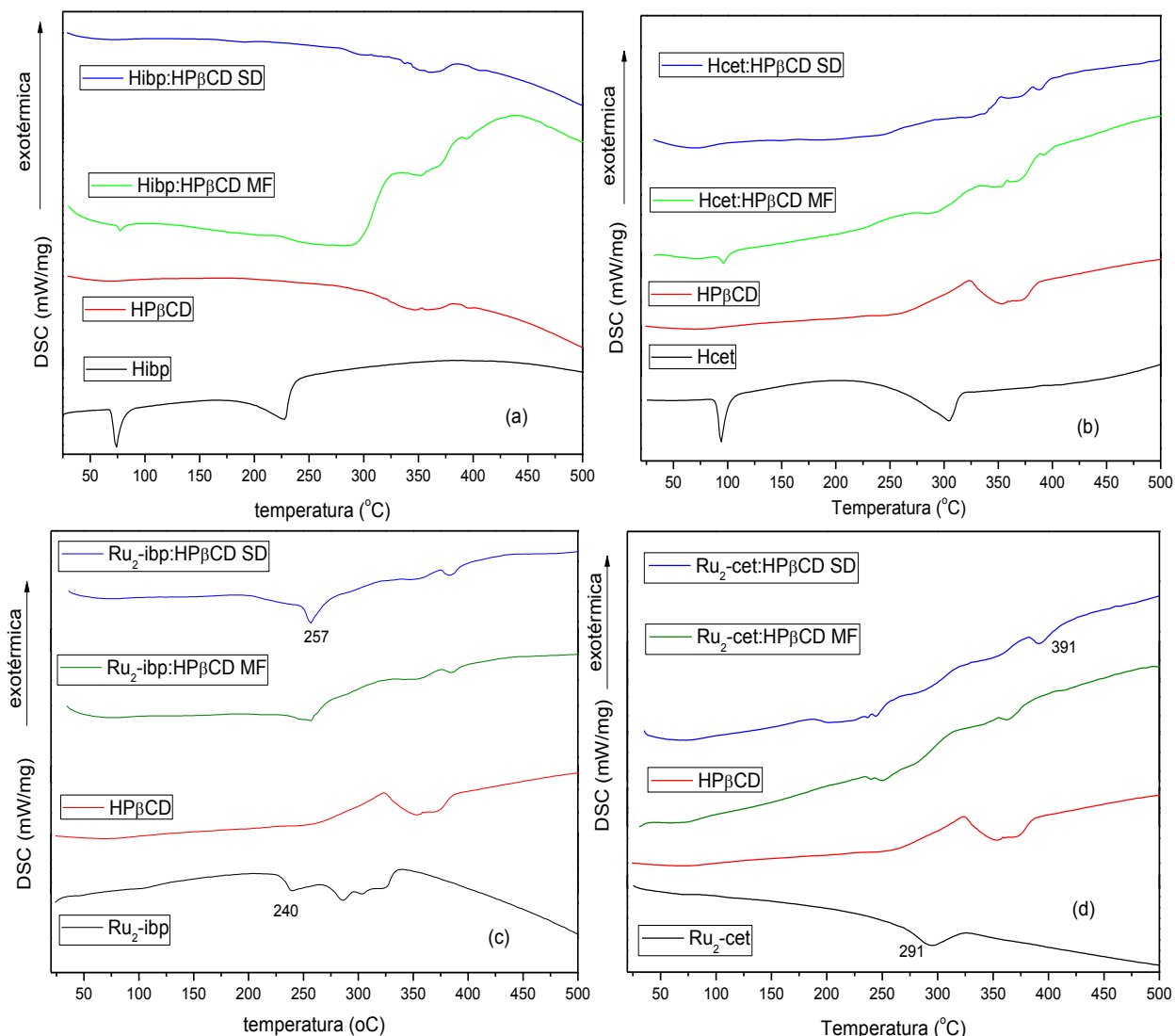


Figura 96 – Curvas DSC em atmosfera de (N₂) dos materiais híbridos: Hibp:HPβCD (1:2) (a); Hcet:HPβCD (1:1) (b); Ru₂-ibp:HPβCD (1:5) (c); Ru₂-cet:HPβCD (1:4) (d)

Já as curvas DSC para os materiais híbridos com os complexos Ru₂-ibp e Ru₂-cet, não apresentaram grandes diferença em relação as suas respectivas misturas-físicas.

A partir dos dados obtidos das curvas TG/DTG (Tabela 21) de todas as amostras foi possível extrair algumas informações: i) a perda de massa referente à primeira etapa de todas as amostras, exceto para os fármacos Hibp e Hcet, corresponde à eliminação de moléculas de água de hidratação; ii) as amostras de HPβCD que contêm os fármacos orgânicos apresentaram duas etapas de decomposição, sendo que a perda de massa total foi de aproximadamente 90% com pico DTG em ~350 °C; iii) as amostras de HPβCD que contêm os complexos

de Ru₂-FAINEs apresentaram três etapas de decomposição, sendo que a perda de massa total foi de aproximadamente 90% (Ru₂-ibp) e 97% (Ru₂-cet), com pico DTG em ~265 e ~350 °C; e iv) não observou-se nenhuma diferença significativa entre dos dados TG/DTG entre os materiais híbridos e as misturas-físicas.

Tabela 21 – Dados termogravimétricos (TG/DTG) em atmosfera de nitrogênio para análise até 1000 °C

<i>Amostra</i>	<i>Etapa</i>	<i>Perda de massa (%)</i>	<i>Temperatura da etapa (°C)</i>	<i>Pico DTG (°C)</i>
Hibp	1ª etapa	-99%	300	227
Hcet	1ª etapa	-82%	320	301
	2ª etapa	-12%	1000	
Ru ₂ -ibp	1ª etapa	-3%	200	
	2ª etapa	-24%	280	240
	3ª etapa	-48%	350	283
Ru ₂ -cet	1ª etapa	-4%	200	
	2ª etapa	-54%	310	291
	3ª etapa	-12%	600	
HPβCD	1ª etapa	-2%	275	
	2ª etapa	-87%	400	350
	3ª etapa	-3%	500	
Hibp:HPβCD MF	1ª etapa	-5%	200	
	2ª etapa	-86%	400	356
	3ª etapa	-3%	1000	
Hibp:HPβCD SD	1ª etapa	-2%	200	
	2ª etapa	-86%	400	360
	3ª etapa	-4%	1000	
Hcet:HPβCD MF	1ª etapa	-3%	250	
	2ª etapa	-84%	400	364
	3ª etapa	-6%	1000	
Hcet:HPβCD SD	1ª etapa	-1%	200	
	2ª etapa	-82%	450	350
	3ª etapa	-5%	1000	
Ru ₂ -ibp:HPβCD MF	1ª etapa	-3%	250	
	2ª etapa	-40%	300	263
	3ª etapa	-45%	450	353
	4ª etapa	-6%	1000	
Ru ₂ -ibp:HPβCD SD	1ª etapa	-1%	260	
	2ª etapa	-40%	300	262
	3ª etapa	-39%	450	347
	4ª etapa	-5%	1000	
Ru ₂ -cet:HPβCD MF	1ª etapa	-1%	220	
	2ª etapa	-40%	310	277
	3ª etapa	-42%	400	350
	4ª etapa	-14%	1000	

Ru ₂ -cet:HPβCD SD	1 ^a etapa	-2%	220	
	2 ^a etapa	-60%	320	278
	3 ^a etapa	-23%	420	334
	4 ^a etapa	-13%	1000	

Na Figura 97 pode-se observar os espectros de massa (MS) obtidos para os principais fragmentos (massa/carga) relacionados às moléculas de água (m/z 18), gás carbônico (m/z 44) e metanol (m/z 31) para as amostras dos quatro materiais híbridos. Nota-se que ocorre a liberação de água de hidratação nas quatro amostras, e que não foi liberado metanol antes do início de sua decomposição, indicando que este solvente orgânico, utilizado para o preparado dos materiais híbridos, foi completamente eliminado no processo de secagem por *spray-drying*.

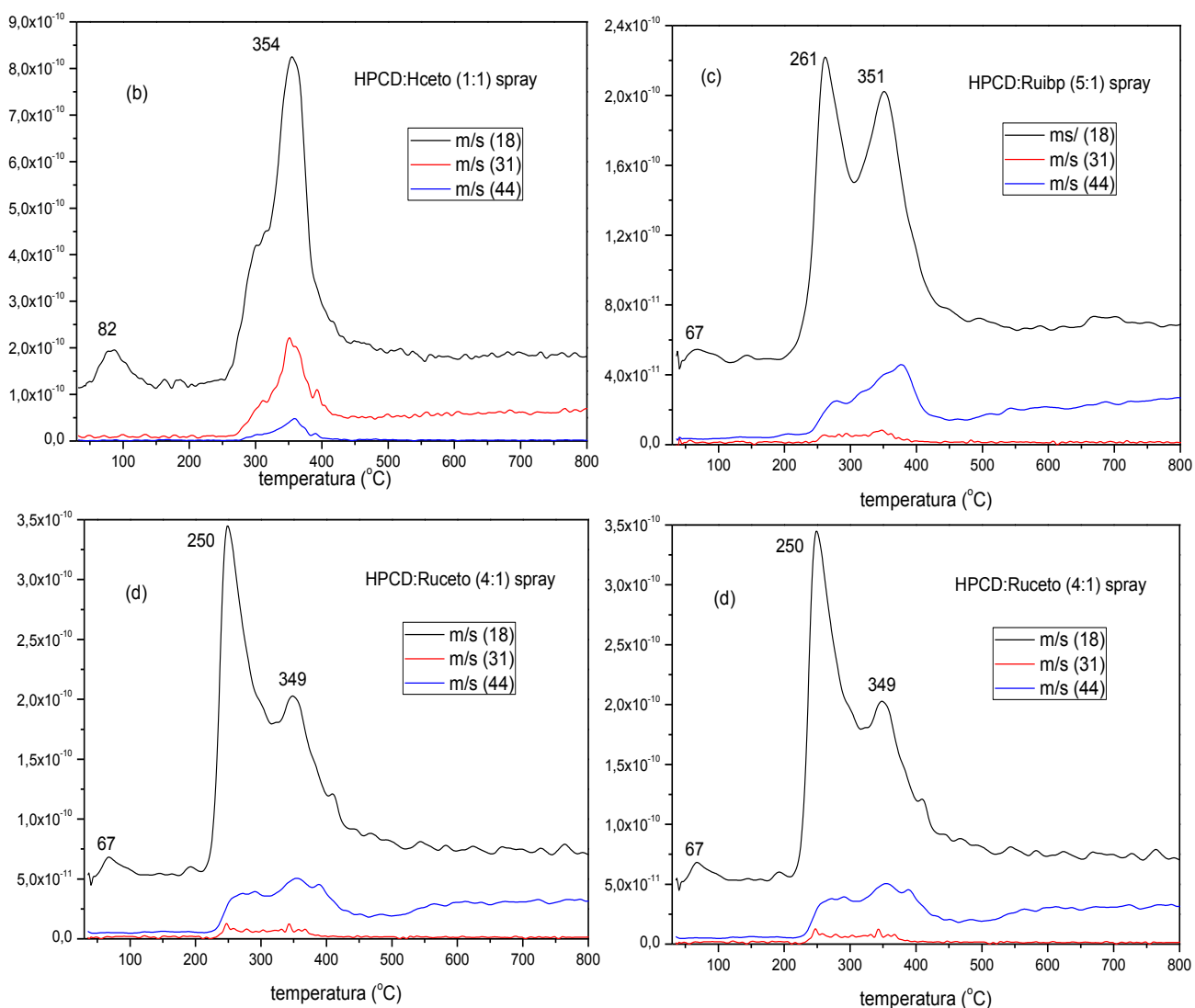


Figura 97 – Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos durante a análise térmica em N₂ dos materiais híbridos obtidos por *spray-drying*.

4.7.1.6. Difractogramas de Raios X

Os difratogramas de raio X das amostras podem ser observados na Figura 98. A HP β CD é um sólido amorfo, ao contrário dos fármacos Hibp e Hcet que apresentam perfis de sólidos cristalinos. Nos difratogramas das misturas-físicas desses fármacos, verifica-se a presença de picos intensos que sugerem a presença dos fármacos livres em suas formas cristalinas. Estes não aparecem nos difratogramas dos materiais híbridos SD, sendo então, uma evidência de que as moléculas dos fármacos estão interagindo com as moléculas de ciclodextrina. No entanto, não foi possível encontrar nenhuma evidência da interação dos complexos de diRu-FAINEs com a HP β CD uma vez que esses complexos apresentaram perfis de sólidos amorfos.

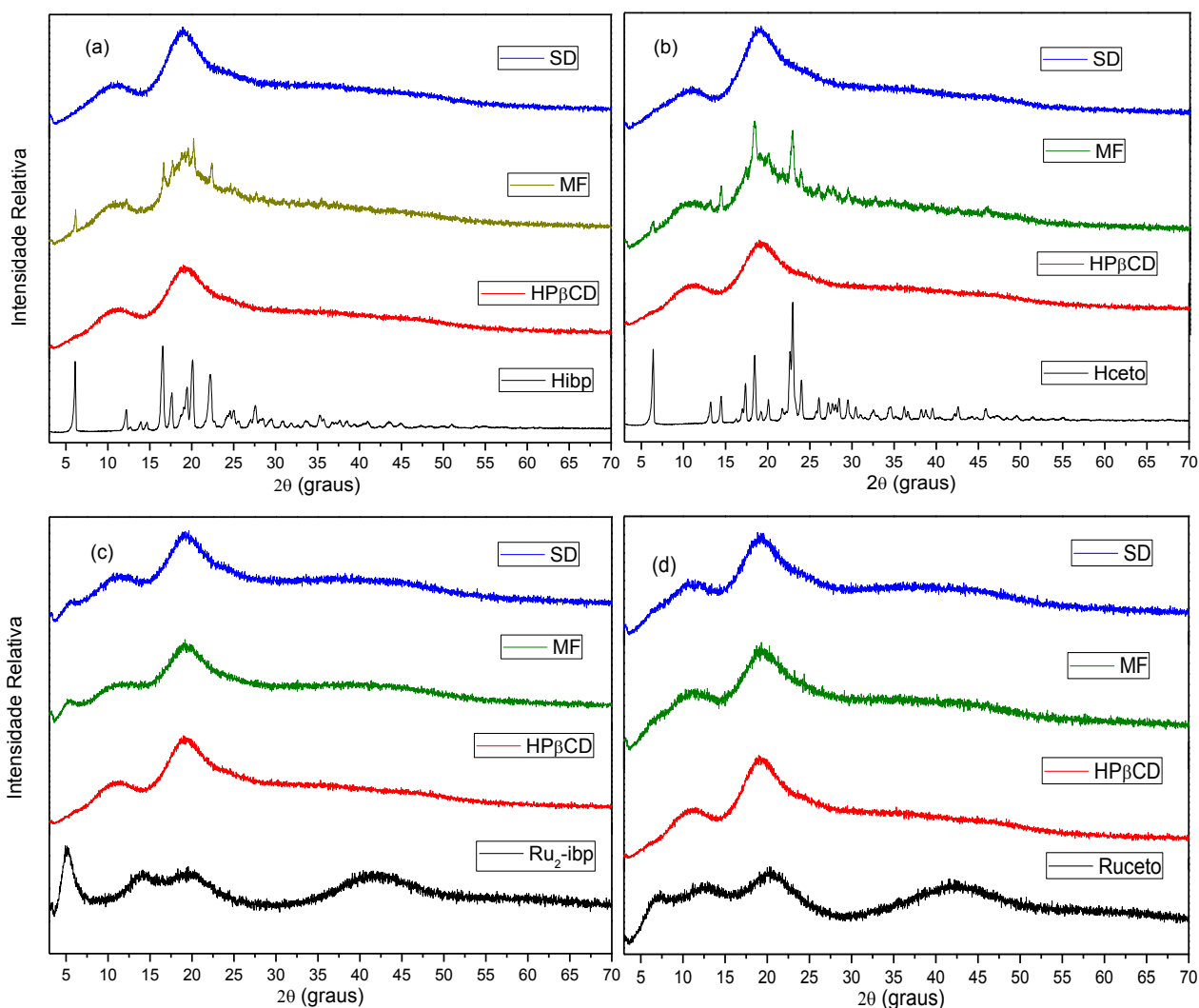


Figura 98 – Difractogramas de Raio X dos materiais híbridos: Hibp:HP β CD (1:2) (a); Hcet:HP β CD (1:1) (b); Ru₂-ibp:HP β CD (1:5) (c); Ru₂-cet:HP β CD (1:4) (d)

4.7.1.7. *Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura*

As mudanças morfológicas e o tamanho das partículas das amostras foram investigados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 99 são apresentadas as imagens dos materiais de partida em sua forma original, enquanto nas Figuras 100-103 são apresentadas as imagens dos diferentes materiais contendo a ciclodextrina.

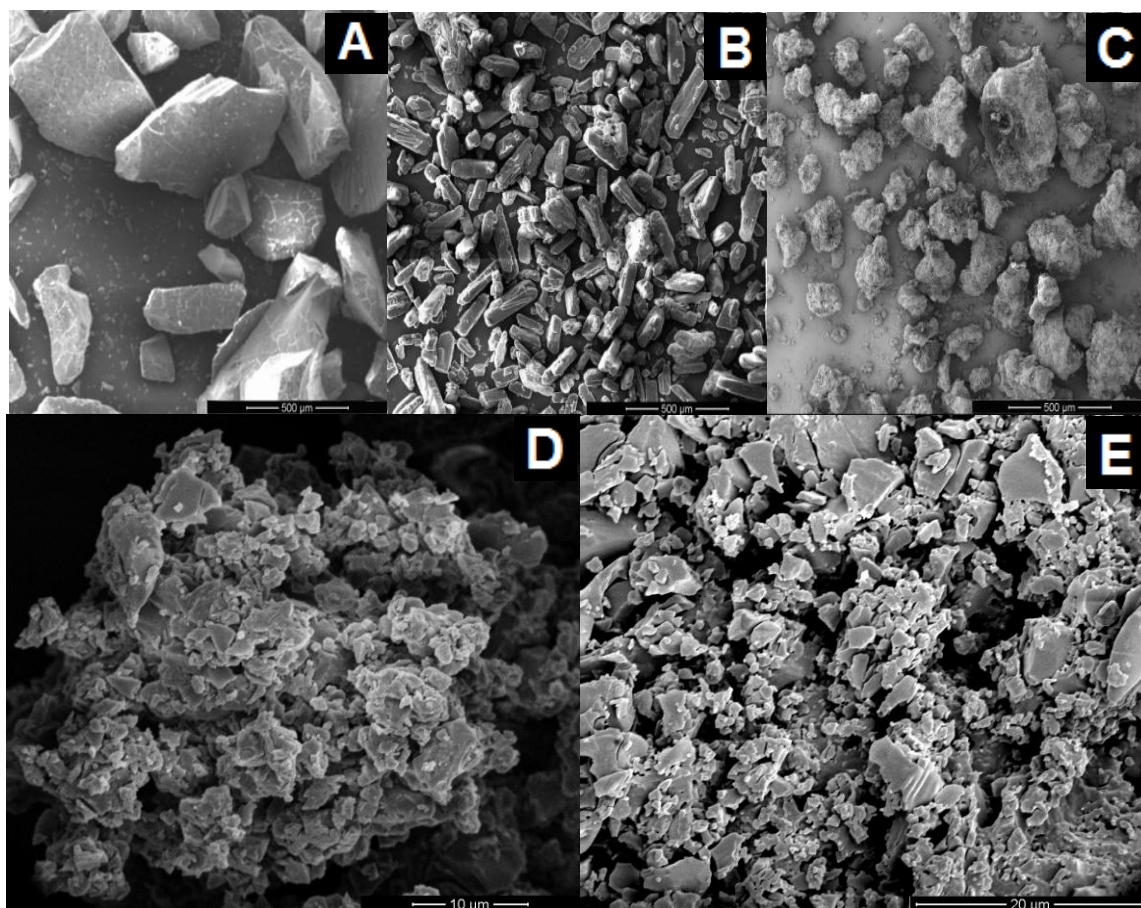


Figura 99 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras em seus estados originais: HP β CD (A); Hibp (B); Hcet (C); Ru₂-ibp (D); Ru₂-cet (E)

As partículas de HP β CD (Figura 99A) apresentam diversos tamanhos, porém com um formato de faces retilíneas. As partículas do fármaco Hibp (Figura 99B) apresentam o formato de grandes bastões com faces irregulares [115, 216,226]. As partículas do fármaco Hcet (Figura 99C) apresentam faces arredondadas e formatos irregulares. Já as partículas dos complexos Ru₂-ibp (Figura 99D) e Ru₂-cet (Figura 99E) apresentam um formato que se assemelha a lamelas sobrepostas de diferentes tamanhos.

De uma forma geral, pode-se observar a partir das imagens obtidas que existem diferenças em relação ao tamanho e à morfologia das partículas produzidas por *spray-drying* em comparação com as partículas das amostras das misturas-físicas ou as amostras originais.

A amostra HP β CD:Hibp SD (Figura 100) apresenta partículas com formatos esféricos e com tamanho relativamente regulares e pequenos (<1 μ m). Diferentemente das partículas oriundas da amostra HP β CD:Hibp MF que são irregulares e de tamanho variados, bem semelhante às partículas das amostras originais (Hibp e HP β CD).

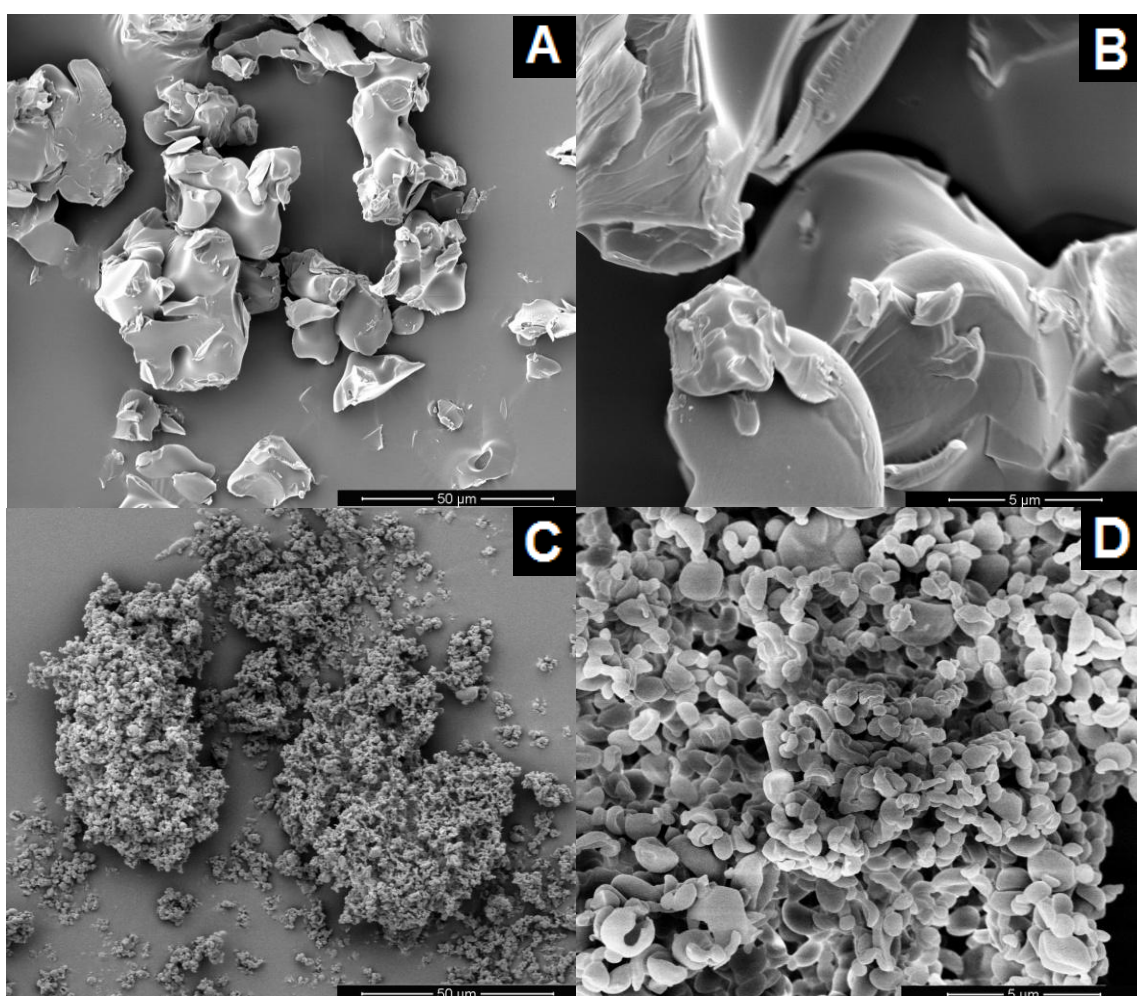


Figura 100 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras HP β CD:Hibp MF (A e B) e HP β CD:Hibp SD (C e D)

Já para as amostras com Hcet (Figura 101) é possível verificar que as partículas da amostra obtidas pelo *spray-dryer* também são menores em relação à amostra de mistura-física. Em ambos os casos, as partículas apresentam

formato e tamanhos irregulares, porém na amostra HP β CD:Hcet SD foi possível verificar a formação de partículas esféricas (Figura 101D).

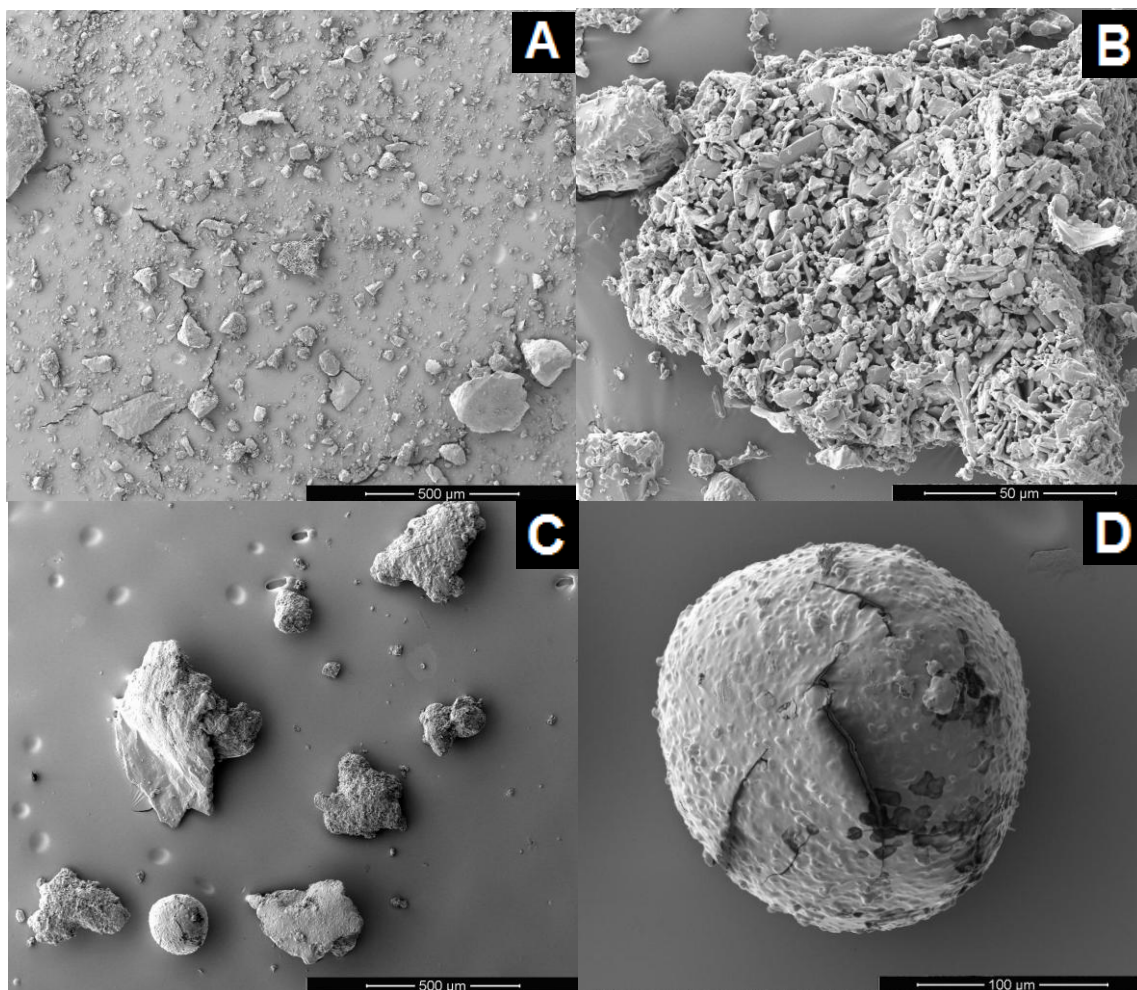


Figura 101 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras HP β CD:Hcet MF (A e B) e HP β CD:Hcet SD (C e D)

Por fim, as partículas dos materiais híbridos HP β CD:Ru₂-ibp SD (Figura 102) e HP β CD:Ru₂-cet SD (Figura 103) apresentam o formato de disco e esférico, respectivamente, e com tamanhos relativamente uniformes (<1 μm) para os dois casos.

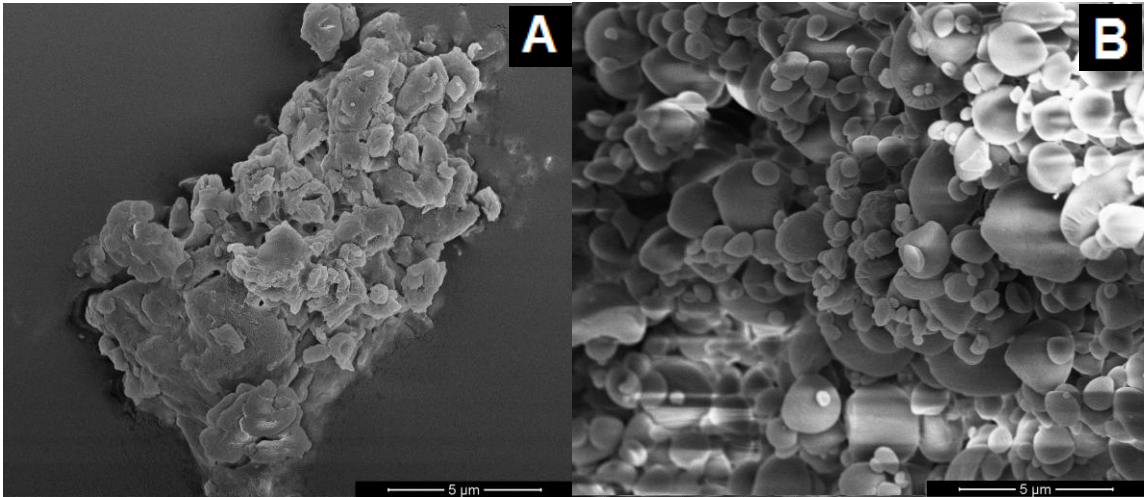


Figura 102 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras HPβCD:Ru₂-ibp MF (A) e HPβCD:Ru₂-ibp SD (B)

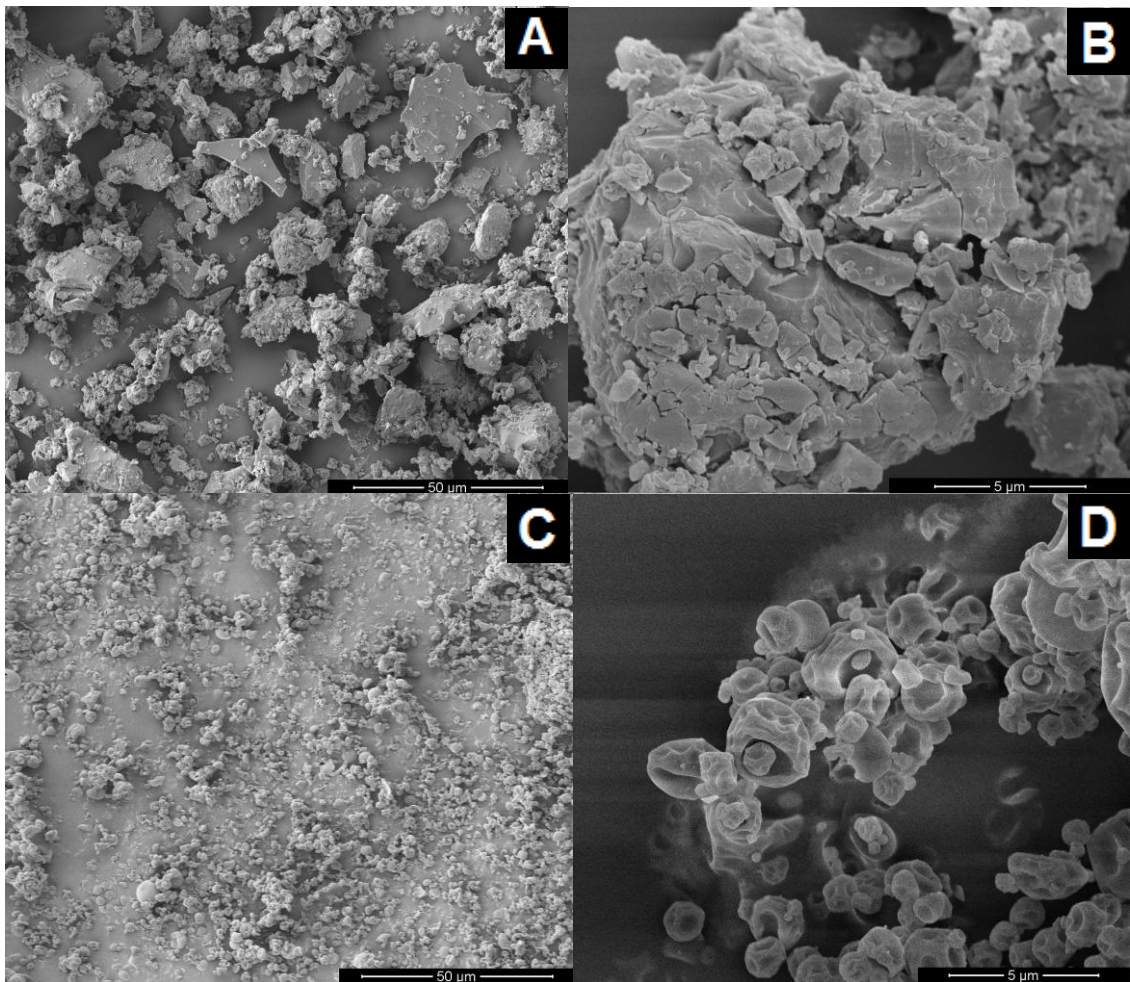


Figura 103 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras HPβCD:Ru₂-cet MF (A e B) e HPβCD:Ru₂-cet SD (C e D)

4.7.2. Cálculo do Rendimento de Inclusão dos Materiais Híbridos

O ensaio baseia-se no fato da ciclodextrina e seu composto de inclusão ou associação serem insolúveis no *n*-hexano, enquanto que a molécula “convidada” (livre) é solúvel. Este procedimento foi executado tanto para os materiais híbridos, que foram obtidos pela secagem por *spray-drying*, quanto para as misturas-físicas.

Os espectros eletrônicos da solução resultante após a “lavagem” das amostras com *n*-hexano ou mistura de *n*-hexano:clorofórmio (1:1, v/v), assim como os espectros eletrônicos dos seus respectivos resíduos dissolvidos na mistura de etanol:água (8:2, v/v), estão apresentados nas Figuras 104-107.

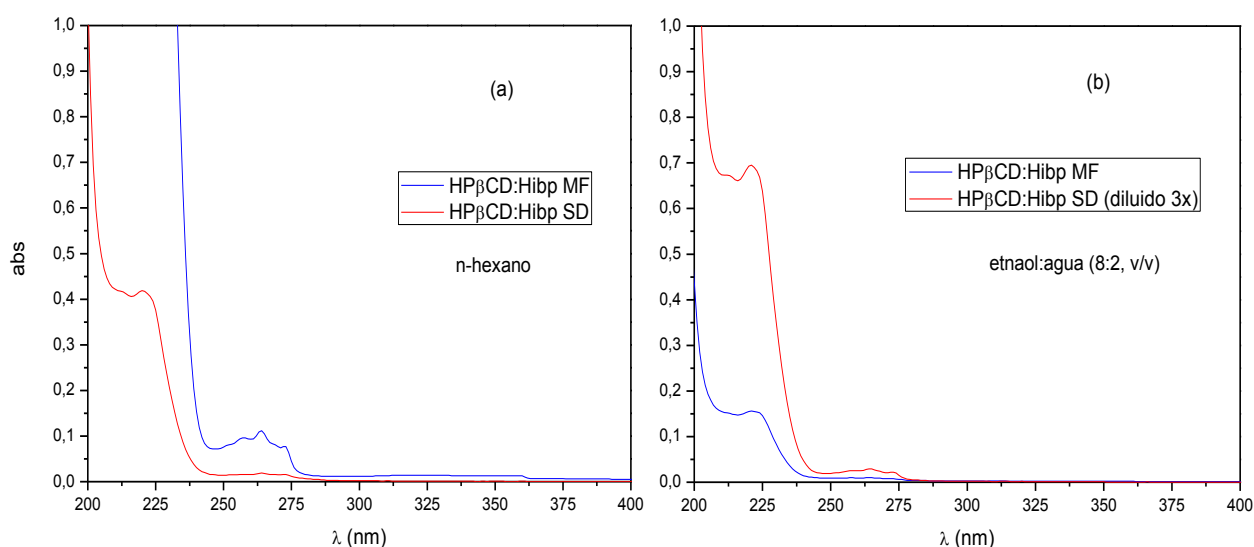


Figura 104 – Espectros eletrônicos das amostras HPβCD:Hibp MF e SD registrados em cubetas de 0,1 cm de caminho óptico: (A) sobrenadante da suspensão em *n*-hexano; (B) resíduo da suspensão dissolvido em etanol:água (8:2, v/v)

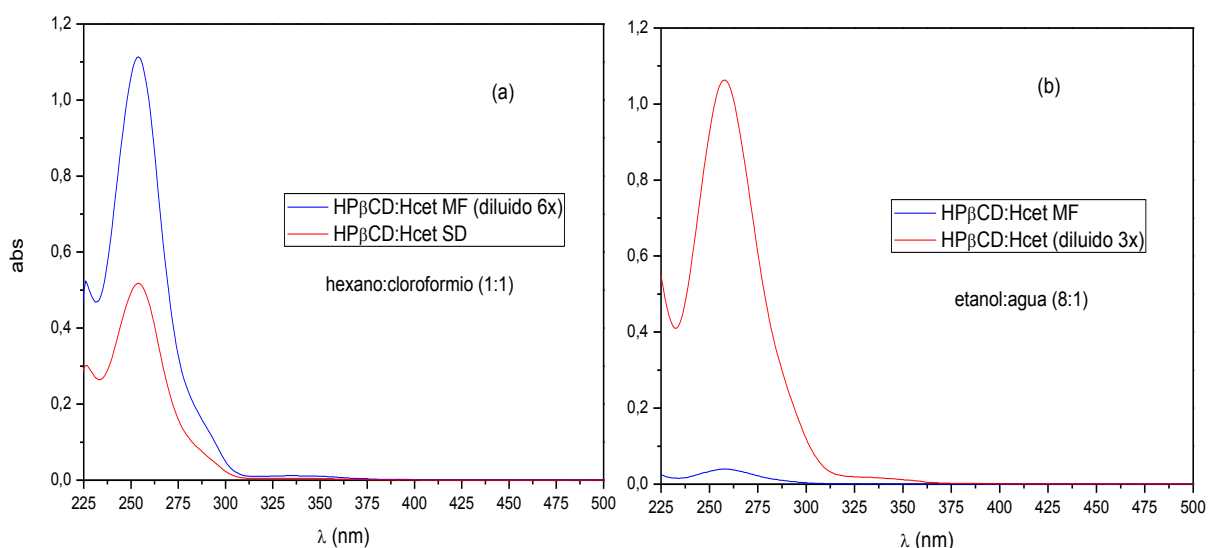


Figura 105 – Espectros eletrônicos das amostras HP β CD:Hcet MF e SD registrados em cubetas de 0,1 cm de caminho óptico: (A) sobrenadante da suspensão em *n*-hexano:cloroformio (1:1); (B) resíduo da suspensão dissolvido em etanol:água (8:2, v/v)

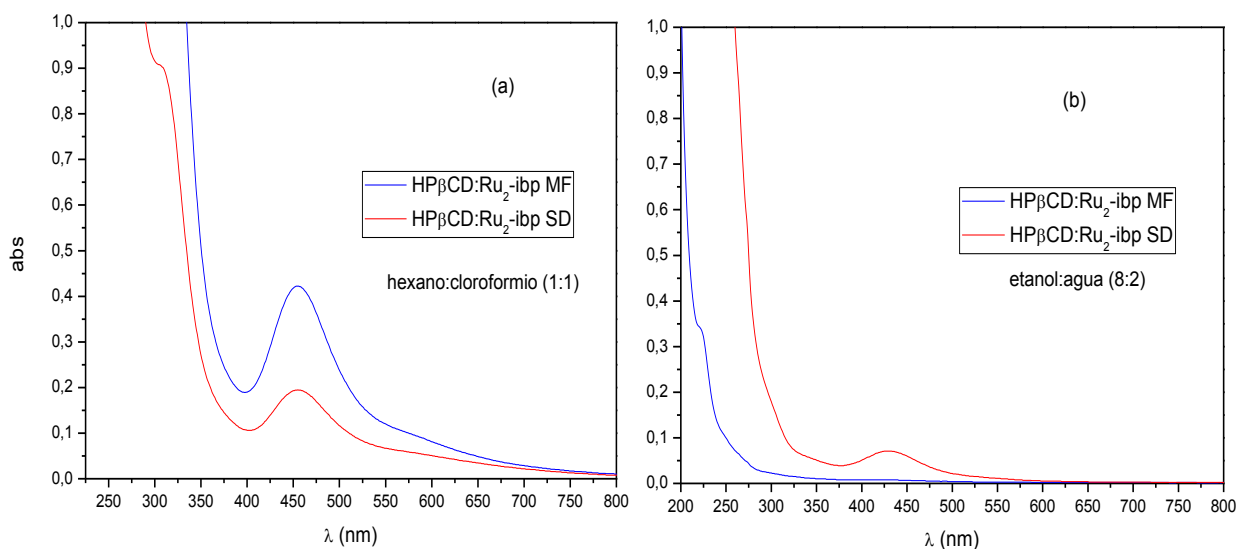


Figura 106 – Espectros eletrônicos das amostras HP β CD:Ru₂-ibp MF e SD registrados em cubetas de 0,1 cm de caminho óptico: (A) sobrenadante da suspensão em *n*-hexano:cloroformio (1:1); (B) resíduo da suspensão dissolvido em etanol:água (8:2, v/v)

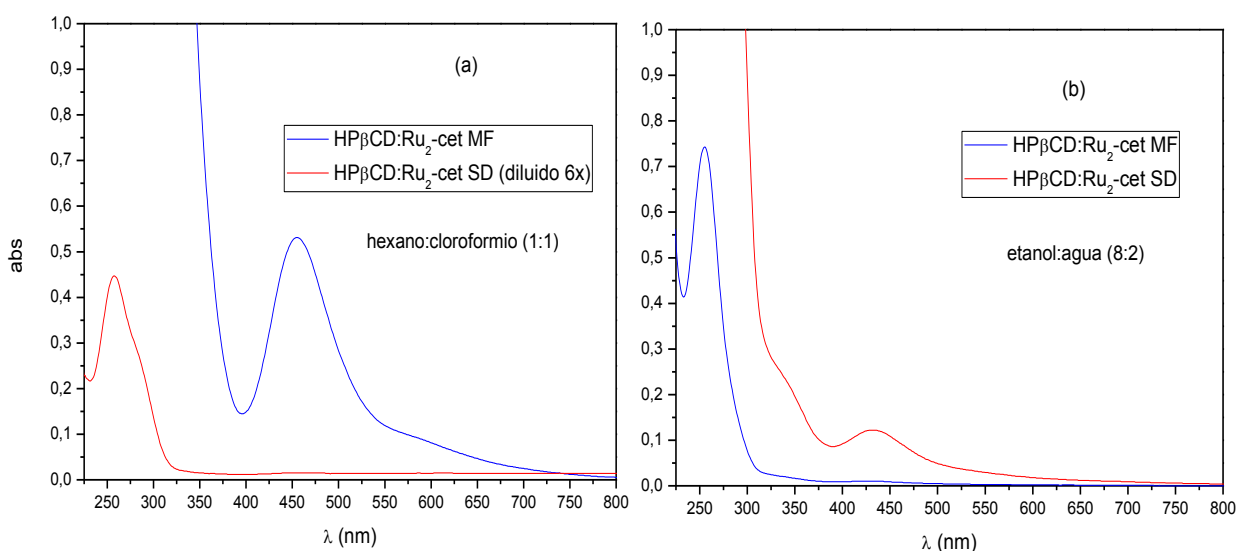


Figura 107 – Espectros eletrônicos das amostras HPβCD:Ru₂-cet MF e SD registrados em cubetas de 0,1 cm de caminho óptico: (A) sobrenadante da suspensão em *n*-hexano:clorofórmio (1:1); (B) resíduo da suspensão dissolvido em etanol:água (8:2, v/v)

A partir dos espectros eletrônicos apresentados acima (Figuras 104a-107a), é possível observar que uma grande quantidade dos fármacos contidos nas amostras misturas-físicas (MF) foi dissolvida no solvente *n*-hexano (HPβCD:Hibp) ou na mistura de *n*-hexano:clorofórmio (1:1) (HPβCD:Hcet, HPβCD:Ru₂-ibp, HPβCD:Ru₂-cet). Já no caso das amostras dos materiais híbridos SD apenas uma pequena parte do fármaco (ou complexo) foi dissolvido. Estes resultados sugerem que as moléculas “convidadas” (Hibp, Hcet, Ru₂-ibp e Ru₂-cet) apresentam algum tipo de interação com as moléculas de HPβCD nas amostras dos materiais híbridos SD.

Além disso, nota-se também que o resíduo não dissolvido na “lavagem” com hexano e, agora, dissolvido completamente com etanol:água (8:2, v/v) (Figura 104b-107b) apresentou uma concentração de fármaco (ou complexo) significativamente maior nas amostras dos materiais híbridos em relação às amostras das misturas físicas. A baixa concentração de fármaco (ou complexo) na solução de etanol:água da mistura-física confirma que essas moléculas não estão interagindo com a HPβCD uma vez que foram eliminadas na lavagem prévia com o solvente hexano.

A concentração das moléculas “convidadas”, em todas as amostras, foi calculada a partir de curvas de calibração usando as absorvidades molares (ϵ) em determinados comprimentos de onda (Tabela III-2, Apêndice III). O rendimento de inclusão nos materiais híbridos (Tabela 22) foi determinado utilizando a equação (7), sendo que a quantidade da molécula livre foi determinada a partir da lavagem com hexano e a quantidade incluída a partir do resíduo dissolvido em etanol:água.

Tabela 22 – Rendimentos para os materiais híbridos, comparados aos valores obtidos para as respectivas misturas-físicas

Amostra	Rendimento (η)	
	Material Híbrido (SD)	Mistura Física (MF)
Hibp:HP β CD	81,0%	3,8%
Hcet:HP β CD	95,3%	1,5%
Ru ₂ -ibp:HP β CD	50,4%	2,6%
Ru ₂ -cet:HP β CD	96,9%	3,1%

O alto teor de moléculas “convidadas” em seus respectivos materiais híbridos confirmou a eficiência do método de secagem por *spray-drying* utilizado para o preparado desses materiais no estado sólido. Uma possível justificativa do menor rendimento para do material híbrido Ru₂-ibp:HP β CD pode estar relacionada à razão molar empregada (1:5), sugerindo que a quantidade de HP β CD utilizada não foi suficiente para promover a completa interação com as moléculas do complexo.

4.7.3. Solubilidade Aquosa dos Materiais Híbridos

O objetivo deste ensaio foi de investigar qualitativamente a solubilidade aquosa dos materiais híbridos obtidos utilizando-se um método modificado da solubilidade de fases. Este consiste em pesar diferentes massas da amostra, adicionar o mesmo volume do solvente e determinar a quantidade da amostra que foi dissolvida na solução.

Como ilustração qualitativa do aumento da solubilidade aquosa dos materiais híbridos, na Figura 108 são mostrados alguns dos espectros eletrônicos dessas amostras dissolvidas em água deionizada (pH ~ 5,0), assim como os espectros dos seus respectivos materiais de partida (fármaco ou complexo livre). As principais bandas atribuídas aos fármacos e complexos aparecem nos seus

respectivos espectros eletrônicos confirmando que os materiais híbridos promovem um aumento na solubilidade aquosa dos fármacos e complexos.

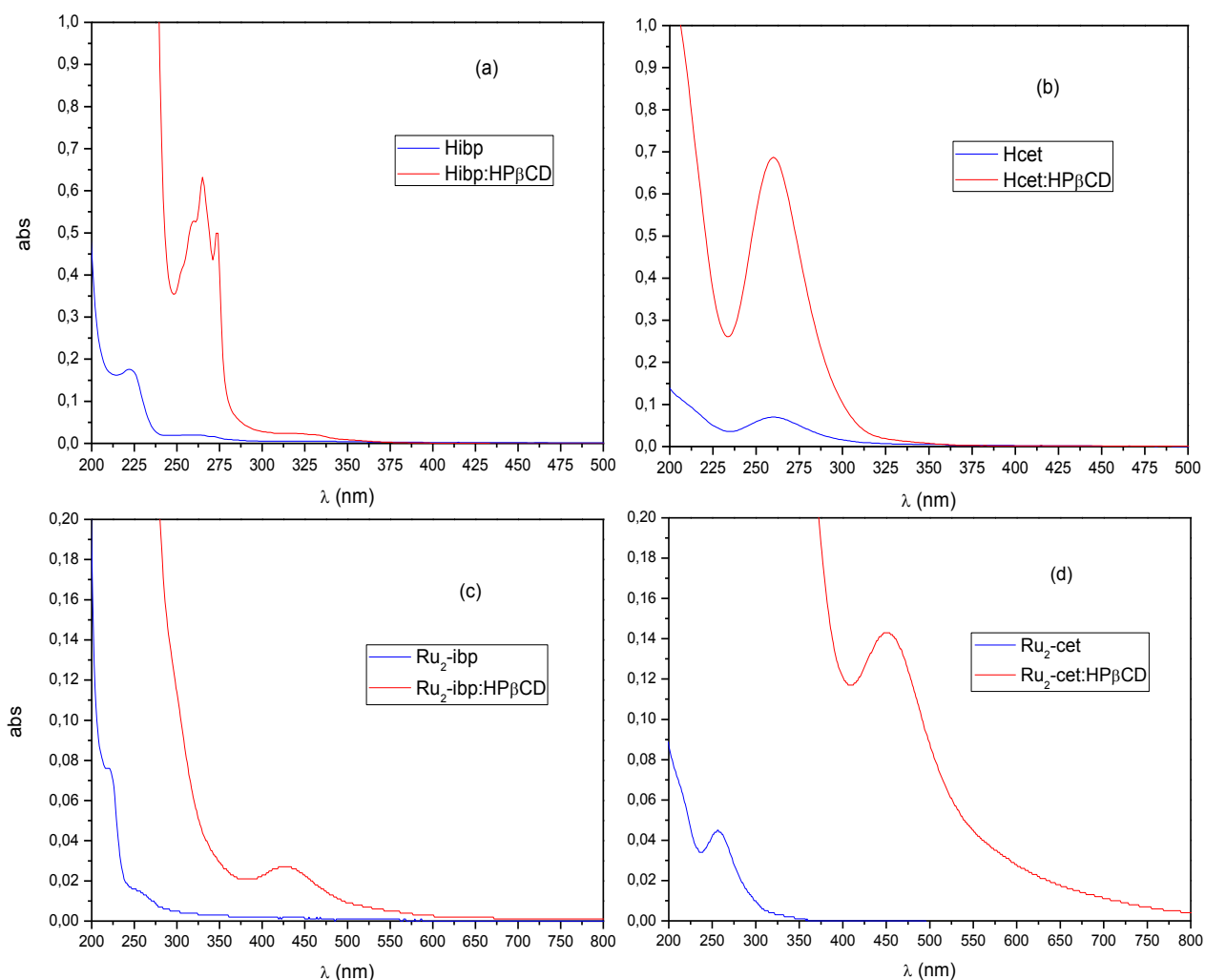


Figura 108 – Espectros eletrônicos dos resíduos das amostras dissolvidos em 0,5 mL de água (pH ~ 5,0) e diluídos apropriadamente: (a) Hibp: 10,2 mg, Hibp:HP β CD SD: 41,6 mg, diluição de 10 vezes, cubeta 1,0 cm; (b) Hcet: 10,2 mg, Hibp:HP β CD SD: 20,0 mg, diluição de 300 vezes cubeta 1,0 cm; (c) Ru₂-ibp: 8,2 mg, Ru₂-ibp:HP β CD SD: 48,1 mg, diluição de 6 vezes, cubeta 0,1 cm; (d) Ru₂-cet: 8,2 mg, Ru₂-cet:HP β CD SD: 21,8 mg, diluição de 6 vezes, cubeta 0,1 cm.

A partir dos dados mostrados (Figura 109) foi possível estimar a solubilidade em água dos fármacos (Hibp e Hcet) e dos complexos (Ru₂-ibp e Ru₂-cet) livres. Já a solubilidade dos materiais híbridos (Tabela 23) foi estimada a partir de um gráfico da massa da amostra pesada em função da concentração encontrada na solução (Figura 110). Os valores de absorvidades molares utilizados para determinar a concentração dos fármacos ou complexos estão apresentados na Tabela III-2 (Apêndice II).

Tabela 23 – Valores aproximados para a solubilidade aquosa das moléculas “convidadas” em suas formas livres e nos materiais híbridos

Amostra	Experimental		Literatura
	Solubilidade* (mg/mL)	%dissolvida**	Solubilidade (mg/mL)
Hibp	0,04	0,2	0,04 [228]; 0,08 [108]; 0,37 [229]
Hcet	0,13	0,6	0,10 [216]; 0,13 [136]; 0,28 [230]
Ru ₂ -ibp	0,02	0,1	-
Ru ₂ -cet	0,01	< 0,1	-
Hibp:HPβCD SD	5,7	91,4±5,9	-
Hcet:HPβCD SD	7,4	70,1±8,5	-
Ru ₂ -ibp:HPβCD SD	1,2	7,3±1,7	-
Ru ₂ -cet:HPβCD SD	1,8	31,4±9,5	-

(*) solubilidade obtida experimentalmente

(**) em relação à massa total pesada; média ± desvio-padrão (n≥5)

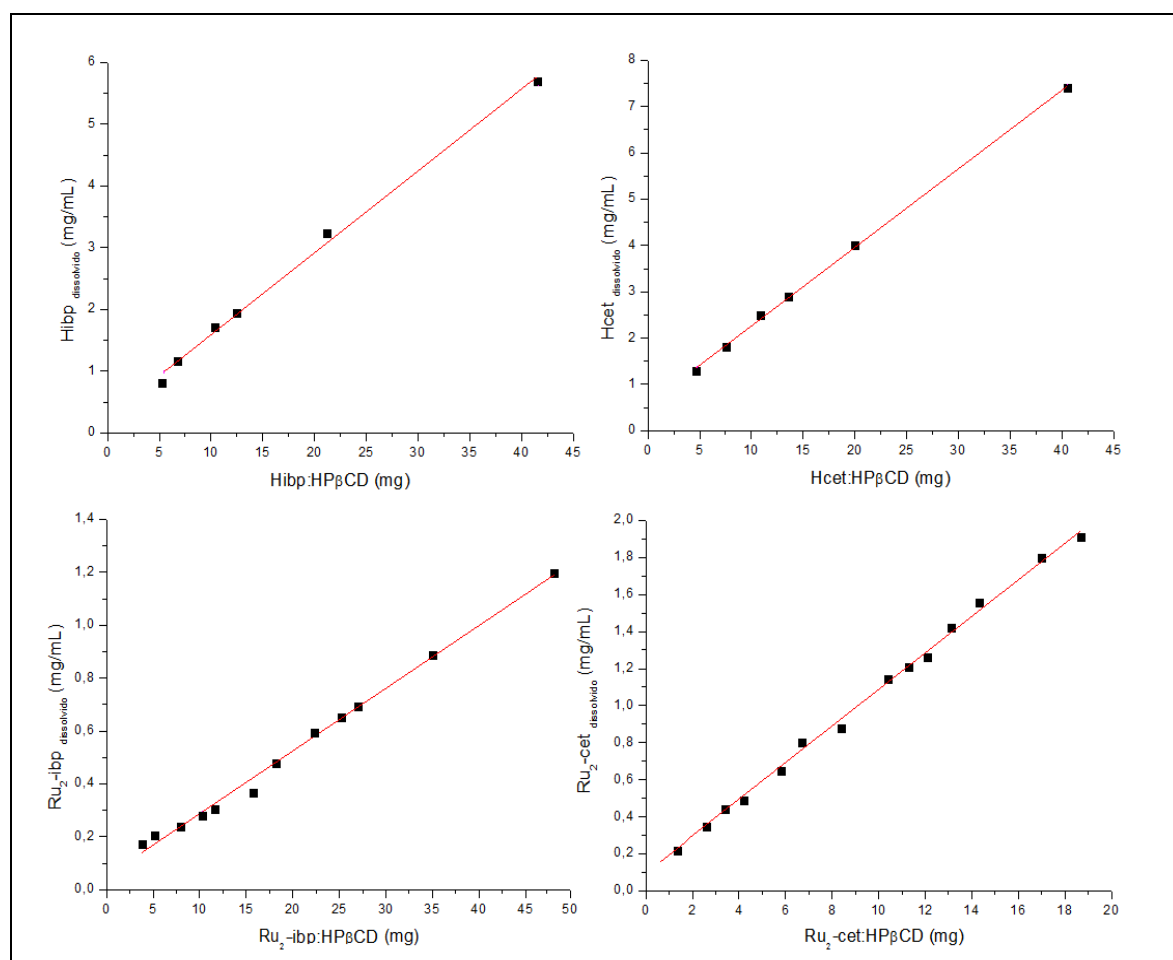


Figura 109 – Diagrama de solubilidade de fases dos materiais híbridos. Valor pesado dividido pelo volume adicionado (mg/mL) em função da concentração (mg/mL) da molécula “convidada” encontrada na solução aquosa

Os valores de solubilidade aquosa para o Hibp e Hcet aqui obtidos são próximos de valores descritos na literatura (Tabela 23), embora esta também relate valores diferentes que dependem do método utilizado.

A partir das curvas de solubilidade (Figura 109) observa-se que a saturação das moléculas “convidadas” não foi atingida. Este resultado já era esperado, pois à medida que se aumentava a massa do material híbrido, a concentração das moléculas “convidadas” seria também aumentada na mesma proporção. Observa-se, também, que a quantidade das moléculas “convidadas” que foram dissolvidas (%) em meio aquoso é significativamente maior nos materiais híbridos do que nas suas respectivas amostras em seus estados naturais (Tabela 23), sendo que as solubilidades aquosas do Hibp, Hcet, Ru₂-ibp, Ru₂-cet nos materiais híbridos sofreram incrementos respectivos de aproximadamente 91%, 69%, 7% e 31%. Esses resultados sugerem que o método de preparo para esses materiais híbridos pode ser utilizado para o objetivo proposto, ou seja, aumentar solubilidade aquosa dos fármacos e dos complexos. O baixo incremento na solubilidade do complexo Ru₂-ibp pode ser justificado provavelmente devido à baixa quantidade de HPβCD utilizada no preparado deste material híbrido.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento da linha de pesquisa do grupo, em especial no que se refere aos complexos de dirutênio(II,III) que apresentam ligações metal-metal múltiplas com ligantes anti-inflamatórios não-esteróides coordenados equatorialmente.

A síntese do complexo precursor, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$, e do análogo contendo o fármaco ibuprofeno (ibp), $[\text{Ru}_2(\text{ibp})_4\text{Cl}]$, foi realizada de acordo com procedimentos já estabelecidos. No entanto, desenvolveu-se metodologias sintéticas para a preparação de dois novos complexos de dirutênio(II,III), com os fármacos cetoprofeno (cet) e fenbufeno (fen). A caracterização desses novos complexos foi executada por diferentes técnicas instrumentais, as quais trouxeram evidências da manutenção da estrutura em “gaiola” contendo o núcleo de dirutênio(II,III) que possui ligação metal-metal múltipla, e possibilitaram prever, também, as suas fórmulas moleculares: $[\text{Ru}_2(\text{cet})_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{fen})_4\text{Cl}]$.

Estudos termodinâmicos foram realizados para o complexo precursor $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4\text{Cl}]$ e indicaram que o principal cromóforo presente em solução aquosa é a espécie diaqua-substituída $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$. A partir desta espécie, as duas sucessivas reações de substituição axial água-cloreto foram monitoradas e as constantes de equilíbrio determinadas. Os parâmetros termodinâmicos para essas duas reações de substituição também foram calculados, e os resultados indicaram que as reações são termodinamicamente favoráveis ($\Delta H^\circ < 0$) e entropicamente desfavoráveis ($\Delta S^\circ > 0$). Adicionalmente, observou-se que a temperatura e a pressão apresentam efeitos opostos no equilíbrio destas reações.

A reatividade da espécie $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ foi investigada na presença dos aminoácidos glicina, triptofano, cisteína e histidina, sendo que os parâmetros cinéticos obtidos para essas reações indicaram a seguinte ordem de reatividade: $\text{gli} < \text{trp} \ll \text{cis} < \text{his}$. Esta ordem pode ser atribuída ao forte caráter nucleofílico dos grupamentos tiol e imidazol, presentes na cisteína e histidina, respectivamente. Uma possível proposta de mecanismo para essas reações é a substituição axial de uma molécula de água do complexo por uma molécula de aminoácido, dando origem a uma espécie substituída aqua(aminoácido).

O comportamento cinético da reatividade deste complexo também foi investigado na presença dos agentes redutores glutatona e ácido ascórbico. Os parâmetros cinéticos obtidos indicaram que a reação com a glutatona é muito mais rápida que a reação com o ácido ascórbico, provavelmente devido à presença do grupamento tiol na glutatona. Uma das propostas de mecanismo de reação seria a redução do núcleo dimetálico(II,III), que por sua vez é controlada cineticamente pela reação de substituição axial água/agente redutor e, também, pela concentração de íons cloreto do sistema.

Diferentes técnicas espectroscópicas foram utilizadas para investigar a interação dos complexos $[Ru_2(O_2CH_3)_4Cl]$, $[Ru_2(ibp)_4Cl]$ e $[Ru_2(cet)_4Cl]$ com a proteína albumina (HSA). Os espectros de dicroísmo circular da HSA confirmaram que a sua estrutura terciária é modificada na presença dos complexos e também na presença dos fármacos orgânicos não-coordenados. Os espectros eletrônicos do produto formado (Ru_2 -HSA) apresentaram absorções na mesma região que o produto complexo-aminoácido – principalmente com a histidina e cisteína – sugerindo que as interações dos complexos e HSA possam estar ocorrendo através desses resíduos de aminoácidos. A partir dos estudos de supressão da fluorescência da albumina foi possível propor que a interação dos complexos ocorre com uma razão molar de 1:1 (Ru_2 :HSA) e, preferencialmente, na região onde estão localizados os resíduos de aminoácidos Trp214 e Cis34 (sítios I e V).

Utilizando-se a técnica de *spray-drying*, foram preparados materiais híbridos dos complexos $[Ru_2(ibp)_4Cl]$ e $[Ru_2(cet)_4Cl]$, e de seus respectivos fármacos livres, incluídos em hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). A caracterização destes novos materiais mostrou evidências de forte interação dos complexos e/ou fármacos com a HP β CD, sugerindo a formação de compostos de inclusão no estado sólido. Verificou-se ainda que a formação deste materiais promove aumento da solubilidade aquosa dos metalofármacos de dirutênio(II,III) e dos seus correspondentes fármacos orgânicos.

6. APÊNDICES

6.1 Apêndice I: Constantes de Pascal

Tabela I-1 – Contribuição magnética dos íons e átomos em 10^{-6} unidades CGS

<i>Cátions</i>	<i>CP (10^{-6} unid. CGS)</i>	<i>Ânions</i>	<i>CP (10^{-6} unid. CGS)</i>
Ag ⁺	-28	F ⁻	-9
Li ⁺	-1,0	Cl ⁻	-23
Na ⁺	-6,8	Br ⁻	-35
K ⁺	-14,9	I ⁻	51
Rb ⁺	-22,5	NO ₃ ⁻	-19
Cs ⁺	-35,0	ClO ₃ ⁻	-30,2
Tl ⁺	-35,7	ClO ₄ ⁻	-32
NH ₄ ⁺	-13,3	CN ⁻	-13
Hg ²⁺	-40,0	NCS ⁻	-31
Mg ²⁺	-5,0	OH ⁻	-12
Zn ²⁺	-15,0	SO ₄ ²⁻	-40
Pb ²⁺	-32,0	O ²⁻	-12,0
Ca ²⁺	-10,4	S ₂ O ₃ ²⁻	-49
Mn ²⁺	-14		
Fe ²⁺	-13	<i>Constituintes</i>	<i>CP (10^{-6} unid. CGS)</i>
Fe ³⁺	-10	C=C	+5,5
Co ²⁺	-12	C=C	+0,8
Co ³⁺	-10	C=C-C=C	+10,6
Cu ²⁺	-11	C (anel benzênico)	+0,24
Mn ³⁺	-10	N=N	+1,8
Cr ³⁺	-10	C-Cl	+3,1
Ru ²⁺	-23	C-Br	+4,1
<i>Átomos Neutros</i>	<i>CP (10^{-6} unid. CGS)</i>	<i>Alguns Ligantes</i>	<i>CP (10^{-6} unid. CGS)</i>
H	-2,93	H ₂ O	-13
C	-6,00	NH ₃	-18
N (anel)	-4,61	C ₂ H ₄	-15
N (imida)	-2,11	CH ₃ COO ⁻	-30
O (éter ou álcool)	-4,61	NH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ (en)	-46
O (aldeído ou cetona)	+1,73	C ₂ O ₄ ²⁻	-25
O (carboxílico)	-3,36	Acetilacetato (acac ⁻)	-52
P	-26,3	Piridina (py)	-49
F	-6,3	Bipiridina (bipy)	-105
Cl	-20,1	o-fenantrolina (phen)	-128
Br	-30,6	C ₁₃ H ₁₇ O ₂ (ibp)	-86,57
I	-44,6	C ₁₆ H ₁₃ O ₃ (cet)	-40,23
S	-15,0	C ₁₆ H ₁₃ O ₃ (fen)	-52,23

6.2 Apêndice II: Equações Utilizadas para Determinar as Constantes de Equilíbrio K_1 e K_2 no Complexo Ru_2 -act

Supondo o equilíbrio entre reagente [R], ligante [L] e produto [RL] na equação (II.1), a constante de equilíbrio é representada pela equação (II.2).



$$K_{eq} = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (II.2)$$

Em determinado comprimento de onda (λ) a absorvância (A) lida é a somatória das absorvâncias de R, L e RL. Supondo que a absorvância de L é desprezível temos:

$$A = A_R + A_{RL} \quad (II.3)$$

$$A = \{\epsilon_R \cdot b \cdot [R]\} + \{\epsilon_{RL} \cdot b \cdot [RL]\} \quad (II.4)$$

Assumindo que a temperatura e a pressão influencia na absorvância lida, devido ao deslocamento do equilíbrio da reação, e conseqüentemente no aumento ou diminuição da concentração de R e RL, a nova absorvância lida (A^*) também pode ser representada pela equação (II.5):

$$A^* = \{\epsilon_R \cdot b \cdot [R^*]\} + \{\epsilon_{RL} \cdot b \cdot [RL^*]\} \quad (II.5)$$

Supondo que a nova concentração dos reagentes $[R^*]$ e dos produtos $[RL^*]$, obtidas devido à influência da temperatura ou pressão, sofre alteração com o mesmo valor numérico (y), pode-se dizer que:

$$[R^*] = [R] - y \quad (II.6)$$

$$[RL^*] = [RL] + y \quad (II.7)$$

portanto, subtraindo a equação (II.5) da (II.4) temos:

$$A^* - A = \{\epsilon_R \cdot b \cdot [R^*]\} + \{\epsilon_{RL} \cdot b \cdot [RL^*]\} - \{\epsilon_R \cdot b \cdot [R]\} + \{\epsilon_{RL} \cdot b \cdot [RL]\} \quad (II.8)$$

$$A^* - A = b \{\epsilon_R \cdot [R^*]\} + \{\epsilon_{RL} \cdot [RL^*]\} - \{\epsilon_R \cdot [R]\} + \{\epsilon_{RL} \cdot [RL]\} \quad (II.9)$$

$$A^* - A = b \{\epsilon_R ([R^*] - [R]) + \epsilon_{RL} ([RL^*] - [RL])\} \quad (II.10)$$

substituindo as equações (II.6) e (II.7) na equação (II.10) temos:

$$A^* - A = b \{ \epsilon_R ([R]-y - [R]) + \epsilon_{RL} ([RL]+y - [RL]) \} \quad (II.11)$$

$$A^* - A = b \{ \varepsilon_R (-y) + \varepsilon_{RL} (+y) \} \quad (II.12)$$

$$A^* - A = b \{ y (\varepsilon_{RL} - \varepsilon_R) \} \quad (II.13)$$

$$(A^* - A)/b = y (\varepsilon_{RL} - \varepsilon_R) \quad (II.14)$$

$$y = \{(A^* - A)/b\} / (\varepsilon_{RL} - \varepsilon_R) \quad (II.15)$$

$$y = \frac{A^* - A}{b(\varepsilon_{RL} - \varepsilon_R)} \quad (II.16)$$

A nova constante de equilíbrio (K_{eq}^*), influenciada sobre a temperatura ou pressão, pode ser calculada com base nas equações (II.17) e (II.18):

$$K_{eq}^* = \frac{[RL^*]}{[R^*][L]} \quad (II.17)$$

$$K_{eq}^* = \frac{[RL] + y}{([R] - y)[L]} \quad (II.18)$$

e rearranjando a equação (II.2) em função de [RL] e substituindo na equação (II.18), a nova constante de equilíbrio pode ser determinada a partir da equação (II.19):

$$K_{eq}^* = \frac{(K_{eq} [L][R]) + y}{([R] - y)[L]} \quad (II.19)$$

6.3 Apêndice III: Curvas de Calibração

Tabela III-1 – Valores das absorvidades molares (ϵ) para os três cromóforos do Ru_2 -act em água (pH ~ 5 e ~ 25 °C) para diferentes comprimentos de onda (λ) determinados a partir das curvas de calibração abaixo.

Amostra	λ (nm)	Solvente	ϵ ($mol^{-1} L cm^{-1}$)
$[Ru_2(O_2CCH_3)_4(H_2O)_2]^+$	430	Água (pH ~ 5,0)	$(7,48 \pm 0,09) \times 10^2$
$[Ru_2(O_2CCH_3)_4(H_2O)_2]^+$	440	Água (pH ~ 5,0)	$(6,59 \pm 0,07) \times 10^2$
$[Ru_2(O_2CCH_3)_4(H_2O)Cl]$	430	Água (pH ~ 5,0)	$(6,35 \pm 0,03) \times 10^2$
$[Ru_2(O_2CCH_3)_4(H_2O)Cl]$	440	Água (pH ~ 5,0)	$(7,11 \pm 0,04) \times 10^2$
$[Ru_2(O_2CCH_3)_4Cl_2]$	430	Água (pH ~ 5,0)	$(4,85 \pm 0,09) \times 10^2$
$[Ru_2(O_2CCH_3)_4Cl_2]$	440	Água (pH ~ 5,0)	$(6,08 \pm 0,09) \times 10^2$

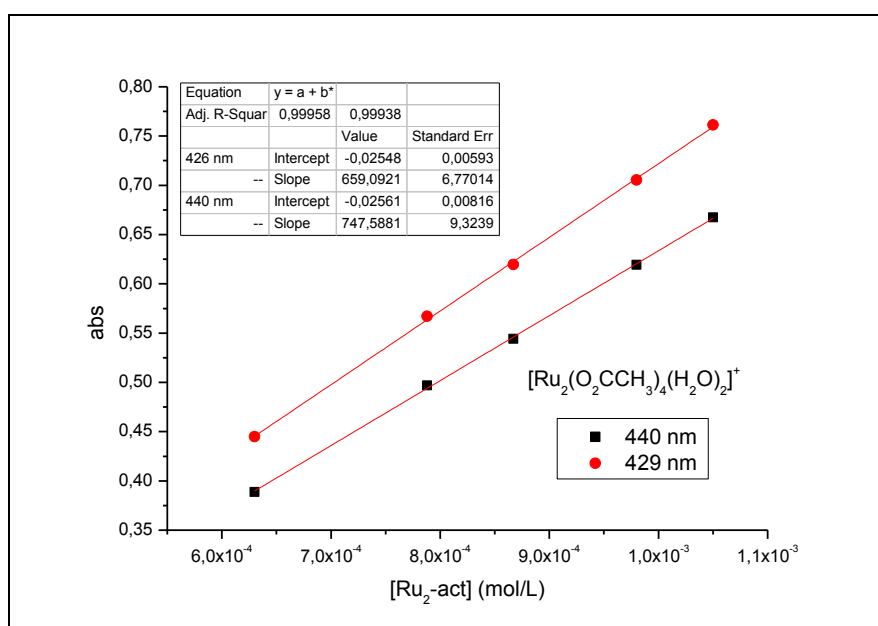


Figura AIII-1 – Curvas de calibração do cromóforo $[Ru_2(act)_4(H_2O)_2]^+$ em água deionizada nos comprimentos de onda 429 e 440 nm

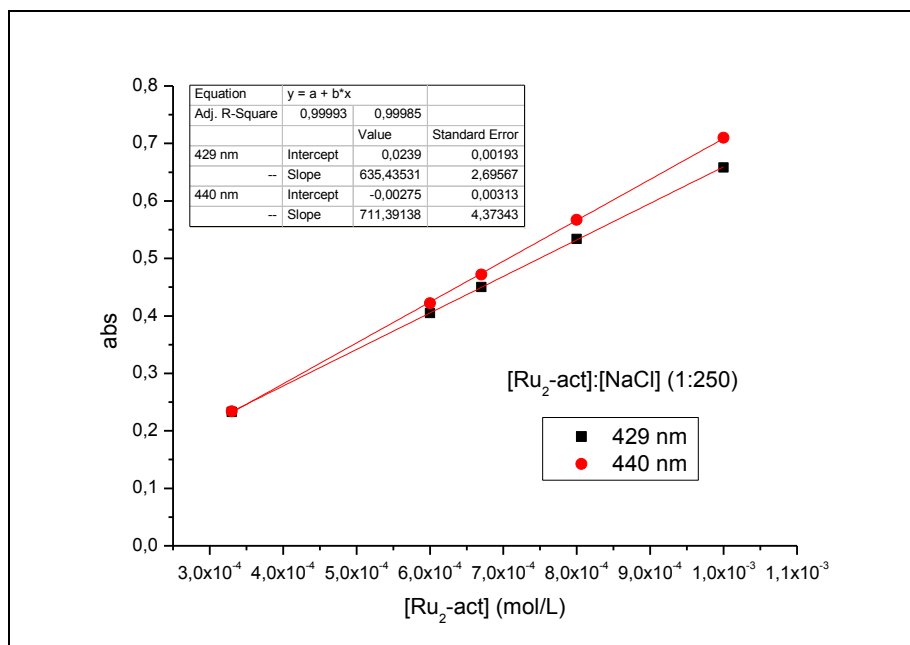


Figura AIII-2 – Curvas de calibração do cromóforo $[Ru_2(act)_4(H_2O)Cl]$ em água deionizada nos comprimentos de onda 429 e 440 nm

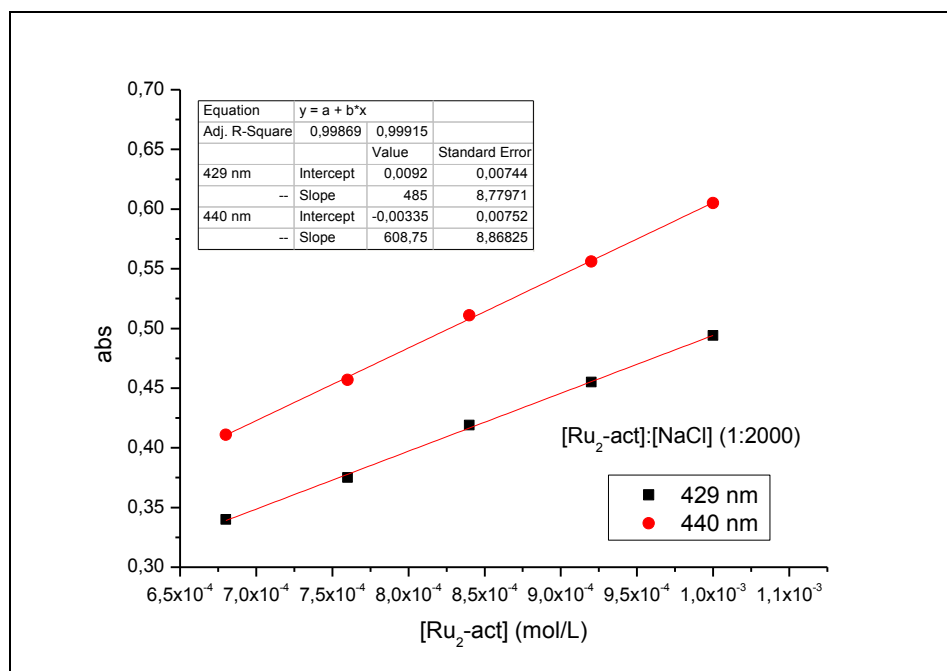


Figura AIII-3 – Curva de calibração do cromóforo $[Ru_2(act)_4(Cl)_2]^-$ em água deionizada nos comprimentos de onda 429 e 440 nm

Tabela III-2 – Valores da absorvidade (ϵ) para as diferentes moléculas em diferentes solventes e comprimentos de onda ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$)

Amostra	$\lambda(\text{nm})$	Solvente	$\epsilon (\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1})$	$\epsilon (\text{g}^{-1} \text{L cm}^{-1})$
Hibp	221	etanol:água (8:2)	$(8,7\pm 0,1)\times 10^3$	$42,2\pm 0,5$
Hibp	264	etanol:água (8:2)	$(2,9\pm 0,1)\times 10^2$	$1,41\pm 0,05$
Hibp	221	hexano	$(7,4\pm 0,1)\times 10^3$	$35,9\pm 0,5$
Hibp	264	hexano	$(2,4\pm 0,2)\times 10^2$	$1,16\pm 0,10$
Hcet	255	etanol:água (8:2)	$(1,3\pm 0,1)\times 10^4$	$51,1\pm 3,9$
Hcet	255	hexano:clorofórmio (1:1)	$(1,9\pm 0,2)\times 10^4$	$74,7\pm 7,9$
Ru ₂ -ibp	221	etanol:água (8:2)	$(4,3\pm 0,1)\times 10^4$	$40,3\pm 0,9$
Ru ₂ -ibp	245	etanol:água (8:2)	$(1,7\pm 0,1)\times 10^4$	$15,9\pm 0,9$
Ru ₂ -ibp	435	etanol:água (8:2)	$(8,3\pm 0,3)\times 10^2$	$0,78\pm 0,03$
Ru ₂ -ibp	455	hexano:clorofórmio (1:1)	$(8,1\pm 0,3)\times 10^2$	$0,76\pm 0,03$
Ru ₂ -cet	255	etanol:água (8:2)	$(6,7\pm 0,1)\times 10^4$	$52,1\pm 0,8$
Ru ₂ -cet	435	etanol:água (8:2)	$(7,4\pm 0,2)\times 10^2$	$0,58\pm 0,02$
Ru ₂ -cet	255	hexano:clorofórmio (1:1)	$(1,7\pm 0,1)\times 10^5$	$132,2\pm 7,8$
Ru ₂ -cet	455	hexano:clorofórmio (1:1)	$(5,1\pm 0,1)\times 10^2$	$0,40\pm 0,01$

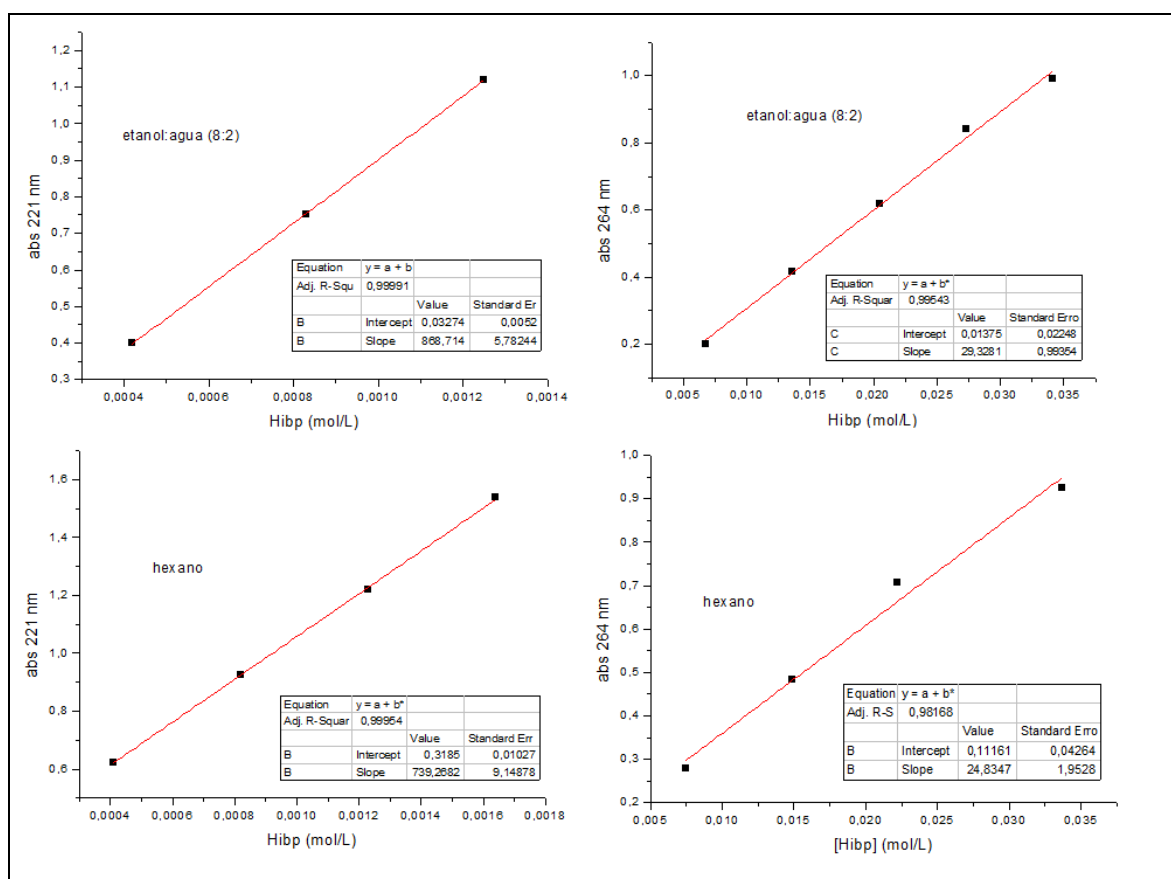


Figura AIII-4 – Curvas de calibração do fármaco Hibp em diferentes solventes e comprimentos de onda

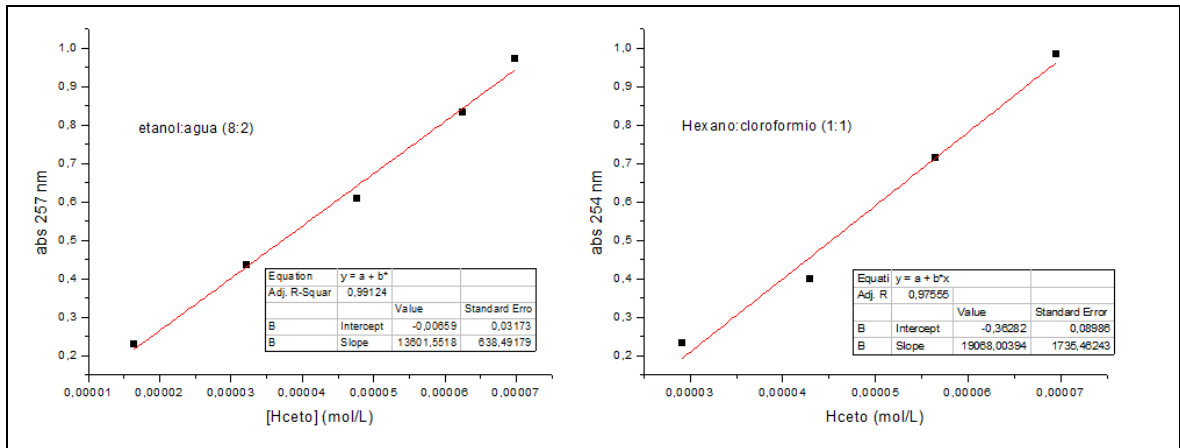


Figura AIII-5 – Curvas de calibração do fármaco Hcet em diferentes solventes e comprimentos de onda

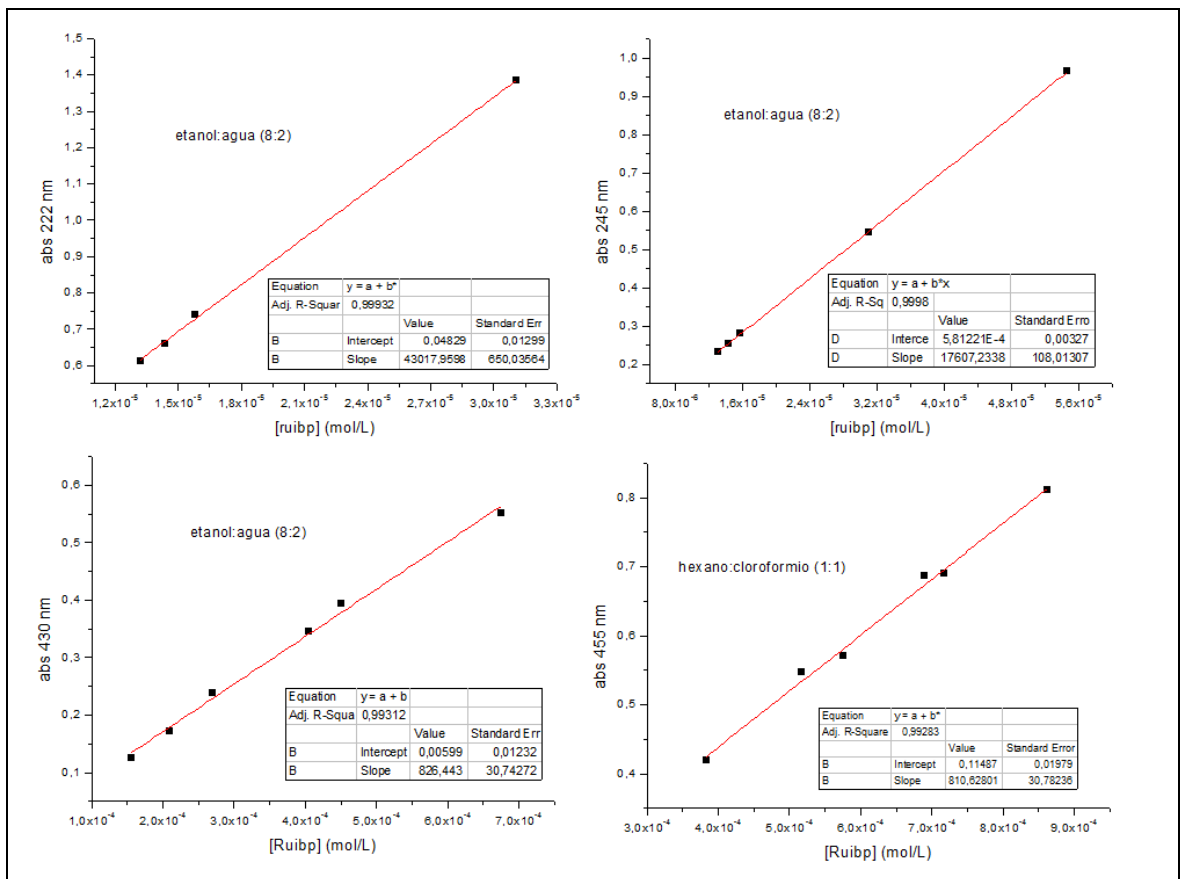


Figura AIII-6 – Curvas de calibração do fármaco Ru₂-ibp em diferentes solventes e comprimentos de onda

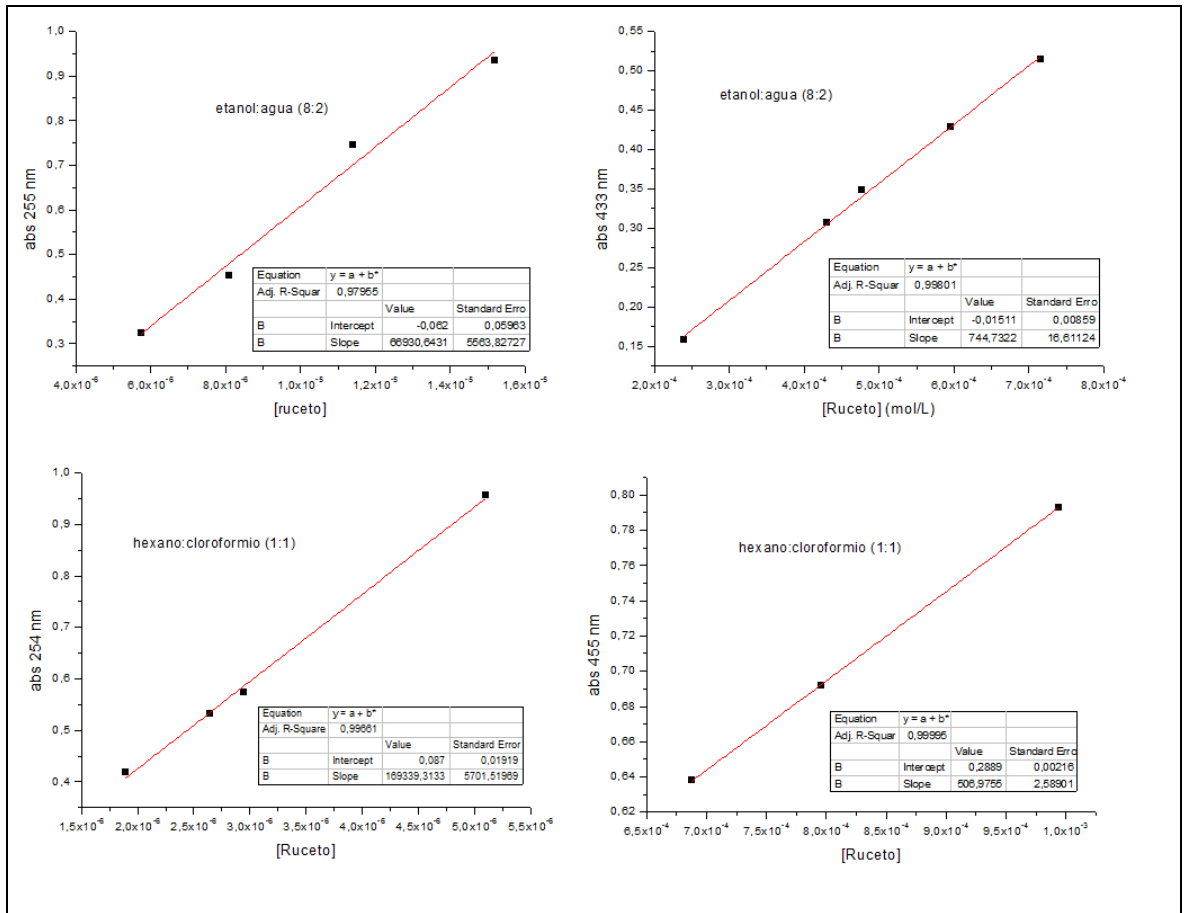


Figura AIII-7 – Curvas de calibração do fármaco Ru₂-cet em diferentes solventes e comprimentos de onda

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] de Oliveira Silva, D. Perspectives for Novel Mixed Diruthenium-Organic Drugs Metallopharmaceuticals in Cancer Therapy. ***Anti-Cancer Agents in Medical Chem.***, v. 10, p. 312-23, 2010.
- [2] Ronconi, L.; Sadler, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. ***Coord. Chem. Rev.***, v. 251, p. 1633-1648, 2007.
- [3] Dyson, P. J.; Sava, G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. ***Dalton Trans.***, p. 1929-1933, 2006.
- [4] Guo, Z.; Sadler, P. J. Metals in Medicine, ***Angew. Chem. Int. Ed.***, v. 38, p. 1512-1531, 1999.
- [5] Zhang, C. X.; Lippard, S. J. New metal complexes as potencial therapeutics. ***Curr. Opinion Chem. Biol.***, v. 7, p. 481-489, 2003.
- [6] Clarke, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. ***Coord. Chem. Rev.***, v., 236, p. 209-233, 2003.
- [7] Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. ***Chem. Commun.***, p. 4764-4776, 2005.
- [8] Kostova, I. Ruthenium complexes as anticancer agents. ***Curr. Med. Chem.***, v. 13, 1085, 2006.
- [9] Ang, W.H.; Dyson, P. J. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy. ***Eur. J. Inorg. Chem.***, p. 4003-4018, 2006.
- [10] Bratsos, I.; Jedner, S.; Gianferrara, T.; Alessio, E. Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. ***Chimia***, v. 61, p. 692-697, 2007.
- [11] Sun, R. W. Y; Ma, D.L., Wong, E. L. M.; Che, C. M. Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. ***Dalton Trans.***, p. 4884-4892, 2007.
- [12] Jacupek, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. Antitumor metal compounds: more than theme and variations. ***Dalton Trans.***, p. 183-194, 2008.
- [13] Sanchez-Cano, C.; Hannon, M. J. Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. ***Dalton Trans.***, p. 10702-10711, 2009.
- [14] van Rijt, S. H.; Sadler, P. J. Current applications and future potencial for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. ***Drug Disc. Today.***, v. 14, p. 1089-1097, 2009.
- [15] Süss-Fink, G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. ***Dalton Trans.***, p. 1673-1688, 2010.
- [16] Antonarakis, E. S.; Emadi, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? ***Cancer Chem. Pharm.***, v. 66, p. 1-9, 2010.
- [17] Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. Organometallic Anticancer Compounds. ***J. Med. Chem.***, v. 54, p. 3-25, 2011.

-
- [18] Ang, W. H.; Casini, A.; Sava, G.; Dyson, P. J. Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. **J. Organomet. Chem.**, v. 696, p. 989-998, 2011.
- [19] Wu, B.; Ong, M. S.; Groessel, M.; Adhireksam, Z.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. A Ruthenium Antimetastasis Agent Forms Specific Histone Protein Adducts in the Nucleosome Core. **Chem. Eur. J.**, v. 17, p. 3562-3566, 2011.
- [20] Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics**, v. 1, p. 458-470, 2009.
- [21] Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. Bioorganometallic chemistry – from teaching paradigms to medicinal applications. **Chem. Soc. Rev.** v. 38, p. 391, 2009.
- [22] Sava, G.; Alessio, E.; Bergamo, A.; Mestroni, G. Sulfoxido ruthenium complexes. **Top. Biol. Inorg. Chem.**, v. 1, p. 143-169, 1999.
- [23] Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M. R.; Zarbucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; DiGiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Garbisa, S. Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 1898-1905, 2003.
- [24] Pieper, T.; Borsky, K.; Keppler, B. K. Non-platinum antitumor compounds. **Top. Biol. Inorg. Chem.**, v. 1, p. 171-179, 1999.
- [25] Stephenson, T. A.; Wilkinson, G. New Ruthenium Carboxylate Complexes. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, v. 28, p. 2285-2291, 1966.
- [26] Bennett, M. J.; Caulton, K. G.; Cotton, F. A. Structure of tetra-n-butyratodiruthenium chloride, a compound with a strong metalmetal bond. **Inorg. Chem.**, v. 8, p. 1, 1969.
- [27] Ribeiro, G. **Complexos de dirutênio com os fármacos ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno, indometacina, e com ácido γ -linolêncio: Síntese, caracterização, avaliação da ação antiproliferativa sobre células tumorais e estudo da interação da unidade dimetálica com adenina e adenosina.** 2006. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [28] Norman, J. G.; Renzoni, G. E.; Case, D. A. Electronic structure of $Ru_2(O_2CR)_4^+$ and $Rh_2(O_2CR)_4^+$ complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 101, p. 5256-5267, 1979.
- [29] Estiú, G.; Cukiernik, F. D.; Maldivi, P.; Poizat, O. Electronic, Magnetic, and Spectroscopic Properties of Binuclear Diruthenium Tetracarboxylates: A Theoretical and Experimental Study. **Inorg. Chem.**, v. 38, p. 3030-3039, 1999.
- [30] Aquino, M. A. S. Diruthenium and diosmium tetracarboxylates: synthesis, physical properties and applications. **Coord. Chem. Rev.**, v. 170, p. 141-202, 1998.
- [31] Aquino, M. A. S. Recent developments in the synthesis and properties of diruthenium tetracarboxylates. **Coord. Chem. Rev.** v. 248, p. 1025-1045, 2004.

-
- [32] de Oliveira Silva, D. **Tetracarboxilatos dimetalados: Síntese, caracterização, propriedades e estudo de suas potencialidades para as áreas de metalofármacos e materiais.** 2009. Tese (Livre Docência) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- [33] Strickey, R. G.; Miller, M. J. S.; McNeill, H.; Westlin, W. F.; Carroll, M. A.; McGiff, J. C. Exaggerated Renal Thromboxane and Prostaglandin Release by Angiotensin II in Suprarenal Aortic Coarctation Hypertension. *Pharm. Res.* v. 21, p. 201-210, 1989.
- [34] van Rensburg, C. E. J.; Kreft, E.; Swarts, J. C.; Dalrymple, S. R.; Macdonald, D. M.; Cooke, M. W.; Aquino, M. A. S.; Cytotoxicity of a series of water-soluble mixed valent diruthenium tetracarboxylates. *Anticancer Res.*, v. 22, p. 889-892, 2002.
- [35] Dunbar, K. R.; Matonic, J. H.; Saharan, V. P.; Crawford, C. A.; Christou, G. Structural evidence for a new metal-binding mode for guanine bases: implications for the binding of dinuclear antitumor agents to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 116, p. 2201- 2202, 1994.
- [36] Crawford, C. A.; Day, E. F.; Saharan, V. P.; Folting, K.; Huffman, J. C.; Dunbar, K. R.; Christou G. N-7,O-6 bridging 9-ethylguanine (9-EtGH) groups in dinuclear metal-metal bonded complexes with bond orders of one, two or four. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 1113-1114, 1996.
- [37] Negrón, A. C. V; **Síntese, caracterização e investigação da potencialidade biológica de carboxilatos dinucleares de Ru, Rh e Cu com nitroimidazóis.** 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [38] Thun, M. J.; Henley, S. J.; Patrono, C. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues, *J. Nat. Cancer Inst.*, v. 94, p. 252-266, 2002.
- [39] Gordijo, C. R. **Estudo de Metalofármacos Anti-inflamatórios de Cobre e dos Materiais Híbridos Resultantes de suas Imobilizações no Hidroximo Duplo Lamelar Hidrotalcita: Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Farmacológica.** 2007. Tese (Doutorado)- Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [40] Foye, W. O.; Lemke, T. L. ; Williams, D.A. **Principles of Medicinal Chemistry.** New York: Lippincott Williams & Wilkins, 4^a. Ed, 1995, p. 535-580.
- [41] Rigas, B.; Shiff, S. J. Is inhibition of cyclooxygenase required for the chemopreventive effect of NSAIDs in colon cancer? A model reconciling the current contradiction. *Med. Hypotheses*, v. 54, p. 210-215. 2000.
- [42] Carvill, A.; Higgins, P.; McCann, M.; Ryan, H.; Shiels, A. Synthesis, spectroscopic, electrochemical, and magnetic properties of dimolybdenum(II,II), diruthenium-(II,III) and -(II,II) complexes containing bridging aspirinate (2-acetoxybenzoate) ligands. *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, v. 1989, 2435-2441, 1989.
- [43] Andrade, A.; Namora, S. F.; Woisky, R.G.; Wiesel, G.; Najjar, R.; Sertié, J. A. A.; De Oliveira Silva, D. Synthesis and characterization of a diruthenium-

ibuprofenato complex Comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)-ibuprofenato complex. **J. Inorg. Biochem.**, v. 81, 23-27, 2000.

[44] Ribeiro, G.; Benadiba, M.; Colquhoun, A.; de Oliveira Silva, D. Diruthenium (II,III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin nonsteroidal anti-inflammatory drugs: synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. **Polyhedron**, v. 27, 1131-1137, 2008.

[45] Ribeiro, G.; Benadiba, M.; de Oliveira Silva, D.; Colquhoun, A. The novel ruthenium- γ -linolenic complex $[Ru_2(aGLA)_4Cl]$ inhibits C6 rat glioma cell proliferation and induces changes in mitochondrial membrane potential, increased reactive oxygen species generation and apoptosis in vitro. **Cell Biochem. Funct.**, v. 28, 15-23, 2010.

[46] Benadiba, M. **Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 in vitro e in vivo, após tratamento com o ácido gama-linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo ibuprofeno (Ru-ibp)**. 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

[47] dos Santos, R. R. P. **Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente à linhagem celular K562 e estudos de interação com albumina do soro humana (HSA)**. 2009. Tese (Doutorado Direto) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.

[48] Benadiba, M.; dos Santos, R. R. P.; de Oliveira Silva, D.; Colquhoun, A. Inhibition of C6 rat glioma proliferation by $[Ru_2Cl(Ibp)_4]$ depends on changes in p21, p27, Bax/Bcl2 ratio and mitochondrial membrane potential. **J. Inorg. Bioch.**, v. 104, 928-935, 2010.

[49] Schwieter, C. W.; McCue, J. P.; Coordination compounds in medicinal chemistry. **Coord. Chem. Rev.**, v. 184, p. 67-89, 1999.

[50] Espósito, B. P. **Interações de Complexos de Ródio(II) com Albumina Humana**. 2000. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

[51] Strayer, L. **Bioquímica**. 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara-Koogan, 1996, p.14.

[52] Farkas, E.; Sóvágó, I. Metal complexes of amino acids and peptides. **Amino Acids, Peptides and Proteins**, v. 36, p. 287-346, 2007.

[53] Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin. Chim. Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

[54] Rumsey, S. C.; Levine, M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. **J. Nut. Bioch.**, v. 9, p. 116-130, 1998.

[55] Halliwell, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, p. 255-259, 1999.

[56] Ravera, M.; Barraco, S.; Cassino, C.; Zanello, P.; Osella, D. Appraisal of the redox behaviour of the antimetastatic ruthenium(III) complex $[ImH][RuCl_4(DMSO)(Im)]$, NAMI-A. **Dalton Trans.**, p. 2347-2351, 2004.

- [57] Brindell, M.; Piotrowska, D.; Shoukry, A. A.; Stochel, G.; van Eldik, R. Kinetics and mechanism of the reduction of (ImH)[trans-RuCl₄(dmsO)(Im)] by ascorbic acid in acidic aqueous solution. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 12, p. 809-818, 2007.
- [58] Webb, M. I.; Walsby, C. J. Control of ligand-exchange processes and the oxidation state of the antimetastatic Ru(III) complex NAMI-A by interactions with human serum albumin. **Dalton Trans.**, v. 40, p. 1322-1331, 2011.
- [59] Sava, G.; Bergamo, A.; Zorzet, S.; Gava, B.; Casarsa, C.; Cocchiello, M.; Furlani, A.; Scarcia, V.; Serli, B.; Iengo, E.; Alessio, E.; Mestroni, G. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. **Eur. J. Cancer**, v. 38, p. 427-435, 2002.
- [60] Bartel, C.; Egger, A. E.; Jakupec, M. A.; Heffeter, P.; Galanski, M.; Berger, W.; Keppler, B. K. Influence of ascorbic acid on the activity of the investigational anticancer drug KP1019. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 16, p. 1-11, 2011.
- [61] Schulga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. **Dalton Trans.**, p. 1796-1802, 2006.
- [62] O. Filho, J. R.; Silva, W. C.; Pereira, J. C. M.; Franco, D. W. Binding of cysteine and glutathione to Ru(II) and Ru(III) centers: Formation and products reactivities. **Inorg. Chim. Acta**, v. 359, p. 2888-2895, 2006.
- [63] Chatterjee, D.; Pal, U.; Ghosh, S.; van Eldik, R. Redox reactions of a Ru(III)-edta complex with thioamino acids. Kinetic and mechanistic studies. **Dalton Trans.**, v. 40, p. 1302-1306, 2011.
- [64] Kragh-Hansen, U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. **Pharmacological Rev.**, v. 33, p. 17-53, 1981.
- [65] Carter, D. C.; Ho, J. X., Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry.**, v. 45, 153-203, 1994.
- [66] Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 695-704, 2002.
- [67] Artali, R.; Bombieri, G.; Calabi, L.; Del Pra, A. A molecular dynamics study of human serum albumin binding sites. **Il Farmaco**, v. 60, p. 485-495, 2005.
- [68] Keppler, B. K.; Lipponer, K. G.; Stenzel, B.; Kratz, F. New tumor-inhibiting ruthenium complexes. *In Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, B.K. Keppler, ed. VCH, 187-220 (1993).
- [69] Espósito, B. P.; Najjar, R. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. **Coord. Chem. Rev.**, v. 232, p. 137-149, 2002.
- [70] Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 2224-2248, 2006.

- [71] Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.*, v. 100, p. 891-904, 2006.
- [72] Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessel, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. KP1019, A new redox-active anticancer – Preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem. Biodiversity*, v. 5, p. 2140-2154, 2008.
- [73] Ravera, M.; Gabano, E.; Baracco, S.; Sardi, M.; Osella, D. Electrochemical studies of a series of antitumorigenic mono- and di-ruthenium complexes [Na][trans-Ru^{III}Cl₄(DMSO)(L)] and [Na]₂[{trans-Ru^{III}Cl₄(DMSO)}₂(μL)] (L = N-donor heterocyclic bridging ligand). *Inorg. Chim. Acta*, v. 361, p. 2879-2886, 2008.
- [74] Brindell, M.; Stawoska, I.; Supel, J.; Skoczowski, A.; Stochel, G.; van Eldik, R. The reduction of (ImH)[trans-Ru^{III}Cl₄(dmsO)(Im)] under physiological conditions: preferential reaction of the reduced complex with human serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, v. 13, p. 909-918, 2008.
- [75] Cetinbas, N.; Webb, M. I.; Dubland, J. A.; Walsby, C. J. Serum-protein interactions with anticancer Ru(III) complexes KP1019 and KP418 characterized by EPR. *J. Biol. Inorg. Chem.*, v. 15, p. 131-145, 2010.
- [76] Beckford, F.; Thessing, J.; Shaloski Jr., M.; Canisius Mbarushimana, P.; Brock, A.; Didion, J.; Woods, J.; Gonzalez-Sarrías, A.; Seeram, N. P. Synthesis and characterization of mixed-ligand diimine-piperonal thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): Biophysical investigations and biological evaluation as anticancer and antibacterial agents. *J. Mol. Struct.*, v. 992, p. 39-47, 2011.
- [77] Martínez, A.; Suárez, J.; Shand, T.; Magliozzo, R. S.; Sánchez-Delgado, R. A. Interactions of arene-Ru(II)-chloroquine complexes of known antimalarial and antitumor activity with serum albumin (HSA) and transferrin. *J. Inorg. Biochem.*, v. 105, p. 39-45, 2011.
- [78] Kljun, J.; Bytzek, A. K.; Kandioller, W.; Bartel, C.; Jakupec, M. A.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Turel, I. Physicochemical Studies and Anticancer Potency of Ruthenium η⁶-p-Cymene Complexes Containing Antibacterial Quinolones. *Organometallics*, v. 30, p. 2506-2512, 2011.
- [79] Berger, I.; Hanif, M.; Nazarov, A. A.; Hartinger, C.G.; John, R. O.; Kuznetsov, M. L.; Groessel, M.; Schimitt, F.; Zava, O.; Biba, F.; Arion, V. B.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. In vitro anticancer activity and biologically relevant metabolism of organometallic ruthenium complexes with carbohydrate-based ligands. *Chem. Eur. J.*, v. 14, p. 9046-9057, 2008.
- [80] Beckford, F. Reaction of the anticancer organometallic ruthenium compound, [η⁶-p-cymene)Ru(ATSC)Cl]PF₆ with human serum albumin. *Int. J. Inorg. Chem.*, p. 1-7, 2010.
- [81] Groessel, M.; Terenghi, M.; Casini, A.; Elviri, L.; Lobinski, R.; Dyson, P. J. Reactivity of anticancer metallodrugs with serum proteins: new insights from size

- exclusion chromatography-ICP-MS and ESI-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 25, p. 305-313, 2010.
- [82] Beckford, F.; Dourth, D.; Shaloski Jr., M.; Didion, J.; Thessing, J.; Woods, J.; Crowell, V.; Gerasimchuk, N.; Gonzalz-Sarrías, A.; Seeram, N. P. Half-sandwich ruthenium–arene complexes with thiosemicarbazones: Synthesis and biological evaluation of $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Ru}(\text{piperonal thiosemicarbazones})\text{Cl}]\text{Cl}$ complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, p. 1019-1029, 2011.
- [83] Hu, W.; Luo, Q.; Ma, X.; Wu, K.; Liu, J.; Chen, Y., Xiong, S.; Wang, J.; Sadler, P. J., Wang, F. Arene Control over Thiolate to Sulfinate Oxidation in Albumin by Organometallic Ruthenium Anticancer Complexes. **Chem. Eur. J.**, v. 15, p. 6586-6594, 2009.
- [84] Christie, R.J.; Grainger, D.W. Design strategies to improve soluble macromolecular delivery constructs. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 55, p. 421-437, 2003.
- [85] Strickely, R. G.; Miller, M. J. S.; McNeill, H.; Westlin, W. F.; Carroll, M. A.; MCGIFF, J. C. Exaggerated Renal Thromboxane and Prostaglandin Release by Angiotensin II in Suprarenal Aortic Coarctation Hypertension. **Pharm. Res.** v. 21, p. 201-210, 1989.
- [86] Zutphein, S. V.; Reedijk, J. Targeting platinum anti-tumour drugs: Overview of strategies employed to reduce systemic toxicity. **Coord. Chem. Rev.**, v. 249, p. 2845-2853, 2005.
- [87] Venturini, C. G. ; Nicolini, J.; Machado, C.; Machado, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quim. Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.
- [88] Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.
- [89] Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Bioch.**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.
- [90] Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **Pharm. Sci. Tech.**, v. 6, p. E329-E357, 2005.
- [91] Szejtli, J. Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins. In: Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F. (Ed.) **Comprehensive Supramolecular Chemistry**. Pergamon, 1996. v. 3, p. 5-40.
- [92] Uekama, K.; Otagir, M. Cyclodextrins in Drug Carrier Systems., **Critical ReviewTM in Therapeutic Drug Carrier System**, v.3, p.1-40, 1987.
- [93] Saltao, R.; Veiga, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapeuticos. **Rev. Bras. Ciências Farm.**, v. 37, p. 1-17, 2001.
- [94] Gould, S. Scott, R. C. 2-Hydroxypropyl-b-cyclodextrin (HP-b-CD): A toxicology review. **Food Chem. Tox.**, v. 43, p. 1451-1459, 2005.
- [95] Hedges, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.
- [96] Carrier, R.; Miller, L. A.; Ahmed, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **J. Controll. Release**, v. 123, p. 78-99, 2007.

-
- [97] Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure Appl. Chem.**, v. 76, p. 1825-1845, 2004.
- [98] Song, L. X.; Bai, L.; Xu, X. M.; He, J.; Pan, S. Z. Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry. **Coord. Chem. Rev.**, v. 253, p. 1276-1284, 2009.
- [99] Szente, L.; Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 36, p. 17-28, 1999.
- [100] Loftsson, T.; Brewster, M. E.; Másson, M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. **Am. J. Drug Deliv.**, v. 2, p. 1-15, 2004.
- [101] Shimpi, S.; Chauhan, B.; Shimpi, P. Cyclodextrin: application in different routes of drug administration. **Acta Pharm.**, v. 55, p. 139-156, 2005.
- [102] Brewster, M. E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Deliv.**, v. 59, p. 645-666, 2007.
- [103] Vyas, A.; Saraf, S.; Saraf, S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 62, p. 23-42, 2008.
- [104] Liu, Y.; Chen, Y.; Duan, Z.-Y.; Feng, X.-Z.; Hou, S.; Wang, C.; Wang, R. A Luminescent-Cyclodextrin-Based Ru(phen)₃ Complex as DNA Compactor, Enzyme Inhibitor, and Translocation Tracer. **Amer. Chem. Soc. Nano.**, v. 1, p. 313-318, 2007.
- [105] Marques, J.; Braga, T. M.; Paz, F. A. A.; Santos, T. M.; Lopes, M. F. S.; Braga, S. S. Cyclodextrins improve the antimicrobial activity of the chloride salt of Ruthenium(II) chloro-phenanthroline-trithiacyclononane. **Biomaterials**, v. 22, p. 541-556, 2009.
- [106] Marques, J.; Santos, T. M.; Marques, M. P.; Braga, S. S. A glycine ruthenium trithiacyclononane complex and its molecular encapsulation using cyclodextrins. **Dalton Trans.**, 9812-9819, 2009.
- [107] Salústio, P. J.; Cabral-Marques, H. M.; Costa, P. C.; Pinto, J. F. Comparison of ibuprofen release from minitables and capsules containing ibuprofen: β -cyclodextrin complex. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 78, p. 58-66, 2011.
- [108] Chow, D. D.; Karara, A. H. Characterization, dissolution and bioavailability in rats of ibuprofen- β -cyclodextrin complex system. **Int. J. Pharm.**, v. 28, p. 95-101, 1986.
- [109] Mura, P.; Bettinetti, G. P.; Manderioli, A.; Faucci, M. T.; Bramanti, G.; Sorrenti, M. Interactions of ketoprofen and ibuprofen with β -cyclodextrins in solution and in the solid state. **Int. J. Pharm.**, v. 166, p. 189-203, 1998.
- [110] Waters, L. J.; Bedford, S.; Parkes, G. M. B.; Mitchell, J. C. Influence of lipophilicity on drug-cyclodextrin interactions: A calorimetric study. **Thermochimica Acta**, v. 511, p. 102-106, 2010.
- [111] Oh, I.; Lee, M. Y.; Lee, Y. B.; Shin, S. C.; Park, I. Spectroscopic characterization of ibuprofen/2-dihydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Int. J. Pharm.**, v. 175, p. 215-223, 1998.

-
- [112] Hergert, L. A.; Escandar, G. M. Spectrofluorimetric study of the β -cyclodextrin/ibuprofen complex and determination of ibuprofen in pharmaceutical preparations and serum. *Talanta*, v. 60, p. 235-246, 2003.
- [113] Mura, P.; Faucci, M. T.; Parrini, P. L.; Furlanetto, S.; Pinzauti, S. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen–cyclodextrin binary systems. *Int. J. Pharm.*, v. 179, p. 117-128, 1999.
- [114] Khan, G. M.; Wazir, F.; Zhu, J.-bi, Ibuprofen- β -cyclodextrin inclusion complexes: Evaluation of different complexation methods. *The Sciences*, v. 1, p. 193-199, 2001.
- [115] Hussein, K.; Türk, M.; Wahl, M. A. Comparative Evaluation of Ibuprofen/ β -Cyclodextrin Complexes Obtained by Supercritical Carbon Dioxide and Other Conventional Methods. *Pharm. Res.*, v. 24, p. 585-592, 2007.
- [116] Spitzer, M.; Gartig, F.; van Eldik, R. Compact, transportable, and multipurpose high-pressure unit for UV–VIS spectroscopic measurements at pressures up to 200 Mpa. *Rev. Sci. Instrum.*, v. 59, p. 2092-2094, 1988.
- [117] le Noble, W. J.; Schlott, R. All quartz optical cell of constant diameter for use in high pressure studies. *Rev. Sci. Instrum.*, v. 47, p. 770-772, 1976.
- [118] van Eldik, R.; Gaede, W.; Wieland, S.; Kraft, J.; Spitzer, M.; Palmer, D. A. Spectrophotometric stopped-flow apparatus suitable for high-pressure experiments to 200 Mpa. *Rev. Sci. Instrum.*, v. 64, p. 1355-1358, 1993.
- [119] Figgis, B. M.; Lewis, J. Technique of Inorganic Chemistry, *Interscience*, v. 4, p. 137, 1965.
- [120] Peresie, H. J.; Stanko, J. A.; Mulay, L. N. Magnetic susceptibility of ruthenium(III) in tris-ethylenediamine salts. Effects of outer sphere ligands. *Chem. Phys. Lett.*, v. 31, p. 392-394, 1975.
- [121] Morita, T. *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização-preparação-purificação*. São Paulo: Edgard Blucher (1981).
- [122] Snyder, L. R.; Kirkland, J.J.; Glich, J.L. *Practical HPLC Method Development*, 2ª edição, New York: Wiley Interscience Pub. (1997).
- [123] Trynda-Lemiesz, L.; Keppler, B. K.; Koztowski, H. Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis(imidazol) ruthenate (III)]. *J. Inorg. Biochem.*, v. 73, p. 123-128, 1999.
- [124] Neural Network – K2d; Disponível em <<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d>> Acesso em 4 de outubro de 2011.
- [125] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3ª ed., Springer, New York, 2006.
- [126] Higuchi, T.; Connors, K. A. Phase-Solubility Techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, v. 4, p. 117-211, 1965.
- [127] Miskowski, V. M.; Gray, H. B. Electronic Spectra of $\text{Ru}_2(\text{carboxylate})_4^+$ Complexes. Higher Energy Electronic Excited States. *Inorg. Chem.*, v. 27, p. 2501-2506, 1988.

- [128] Castro, M. A.; Roitberg, A. E.; Cukiernik, F. D. Theoretical and Experimental Studies of Diruthenium Tetracarboxylates Structure, Spectroscopy, and Electrochemistry. **Inorg. Chem.**, v. 47, p. 4682-4690, 2008.
- [129] Liversidge, G. G. Ketoprofen. **Anal. Prof. Drug Sub.**, v. 10, p. 443-471, 1981.
- [130] Sortino, S.; Martinez, L. J. Marconi, G. On the photophysical and photochemical behavior of fenbufen: a study in homogeneous media and micellar environments. **New J. Chem.**, v. 25, p. 975-980, 2001.
- [131] Geary, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coord. Chem. Rev.**, v. 7, p. 81-122, 1971.
- [132] Greenwood, N N.; Straughan, B P.; Wdson, A E. Behaviour of Tellurium(Iv) Chloride, Bromide, and Iodide in Organic Solvents and the Structures of the Species Present. **J. Chem. Soc. A.**, v. 1968, p. 2209-2212, 1968.
- [133] Cotton, F. A.; Pedersen, E., Magnetic and electrochemical properties of transition metal complexes with multiple metal-to-metal bonds. II. $[\text{Ru}_2(\text{C}_3\text{H}_7\text{COO})_4]^{n+}$ with $n = 0$ and 1 . **Inorg. Chem.** v. 14, 388-391, 1975.
- [134] Miskowski, V. M., Loehr, T. M. e Gray, H. B.; Electronic and vibrational spectra of $\text{Ru}_2(\text{carboxylate})_4$ + complexes. Characterization of a high-spin metal-metal ground state. **Inorg. Chem.**, v. 26, p. 1098-1108, 1987.
- [135] Deacon, G. B.; Phillips, R. J. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. **Coord. Chem. Rev.**, v. 33, p. 227-250, 1980.
- [136] Vueba, M. L.; Pina, M.E.; Veiga, F.; Sousa, J.J.; Batista de Carvalho, L.A.E. Conformational study of ketoprofen by combined DFT calculations and Raman spectroscopy. **Int. J. Pharm.** v. 307, 56-65, 2006.
- [137] Bayari, S. H.; Sagdinc, S. Molecular structure and vibrational spectra of γ -oxo [1,1'-biphenyl]-4-butanoic acid (fenbufen) and its interaction with ofloxacin. **Struct. Chem.**, v. 19, p. 381-390, 2008.
- [138] Cukiernik, F. D.; Ibn-Elhaj, M.; Chaia, Z. D.; Marchon, J. C.; Giroud-Godquin, A. M.; Guillon, D.; Skoulios, A.; Maldivi, P. Mixed-Valent Diruthenium (II,III) Long-Chain Carboxylates. 1. Molecular Design of Columnar Liquid-Crystalline Order. **Chem. Mat.**, v. 10, p. 83-91, 1998.
- [139] Caplan, J. F.; Murphy, C. A.; Swansburg, S.; Lemieux, R. P.; Cameron, T. S.; Aquino, M. A. S.; Evidence for Room Temperature Mesomorphism in a Mixed-Valent Diruthenium (II,III) Quintapalmitoleate Polymer. **Can. J. Chem.**, v. 76, p. 1520-1523, 1988.
- [140] Martin, D. S.; Newman, R. A.; Vlasnik, L. M. al structure and polarized electronic spectra for diruthenium tetraacetate chloride. **Inorg. Chem.**, v. 19, 3404-3407, 1980.
- [141] Rusjan, M.; Sileo, E. E.; Cukiernik, F. D. Thermal decomposition of mixed-valent diruthenium pentakis(alkanoates) enhanced by their liquid crystalline state. **Solid State Ionics**, v. 124, p. 143-147, 1999.

- [142] Rusjan, M.; Sileo, E. E.; Cukiernik, F. D. Thermal stability of mixed-valent diruthenium (II,III) carboxylates. ***Solid State Ionics***, v. 159, 389-396, 2003.
- [143] Vueba, M. L.; Veiga, F.; Sousa, J. J.; Pina, M. E. Compatibility Studies Between Ibuprofen or Ketoprofen with Cellulose Ether Polymer Mixtures Using Thermal Analysis. ***Drug Develop. Ind. Pharm.***, v. 31, p. 943-949, 2005.
- [144] Mura, P.; Manderioli, A.; Bramanti, G.; Furlanetto, S.; Pinzauti, S. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. ***Int. J. Pharm.***, v. 119, p. 71-90, 1995.
- [145] Gashi, Z.; Cenzi, R.; Malaj, L.; Gobetto, R.; Mozzicafreddo, M.; Angeletti, M.; Masic, A.; Di Martino, P. Differences in the Interaction between Aryl Propionic Acid Derivatives and Poly(Vinylpyrrolidone) K30: A Multi-Methodological Approach. ***J. Pharm. Sci.***, v. 98, 4216-4228, 2009.
- [146] Li, B.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X. Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system-intercalation and in vitro release of fenbufen. ***App. Clay Sci.***, v.27, p. 199-207, 2004.
- [147] Soldatovic, T.; Bugarcic, Z. D.; van Eldik, R. Influence of the chloride concentration on ligand substitution reactions of [Pt(SMC)Cl₂] with biologically relevant nucleophiles. ***Dalton Trans.***, v. 23, 4526-4531, 2009.
- [148] Dema, A. C.; Bose, R. N. Titanium(III) reduction of axially substituted metal-metal-bonded diruthenium. ***Inorg. Chem.***, v. 28, p. 2711-2713, 1989.
- [149] Schmeisser, M.; van Eldik, R. Thermodynamic and Kinet Studies on Reactions of Fe^{III}(meso-[tetra-3-sulfonatomesityl]porphin) with NO in an Ionic Liquid. Trace Impurities Can Change the Mechanism! ***Inorg. Chem.***, v. 48, p. 7466-7475, 2009.
- [150] Wang, F.; Chen, H.; Parkinson, J. A.; Murdoch, P. S.; Sadler, P. Reactions of a Ruthenium(II) Arene Antitumor Complex with Cysteine and Methionine. ***Inorg. Chem.***, v. 41, p. 4509-4523, 2002.
- [151] Drysdale, K. D.; Beck, E. J.; Cameron, T. S.; Robertson, K. N.; Aquino, M. A. S. Crystal structures and physico-chemical properties of a series of [Ru₂(O₂CCH₃)₄L₂](PF₆) adducts (L = H₂O, DMF, DMSO). ***Inorg. Chim. Acta***, v. 256, p. 243-252, 1997.
- [152] Gilfoy, H. J.; Robertson, K. N.; Cameron, T. S.; Aquino, M. A. S. Synthesis and structure of the first sulfur-donor adduct of a diruthenium tetracarboxylate. ***Inorg. Chim. Acta.***, v. 331, p. 330-335, 2002.
- [153] Vamvounis, G.; Caplan, J. F.; Cameron, T. S.; Robertson, K. N.; Aquino, M. A. S. Synthesis, structure and electrochemistry of nitrogen base adducts of tetraacetatodiruthenium(II,III): dependence of redox potential and Ru-Ru bond length on axial ligand donor strength. ***Inorg. Chim. Acta***, v. 304, p. 87-98, 2000.
- [154] Cooke, M. W.; Murphy, C. A.; Cameron, T. S.; Beck, E. J.; Vamvounis, G.; Aquino, M. A. S. Synthesis and crystal structures of urea and thiourea derivatives of diruthenium(II,III) tetraacetate. ***Polyhedron***, v. 21, p. 1235-1244, 2002.
- [155] Bland, B. R. A.; Gilfoy, H. J.; Vamvounis, G.; Robertson, K. N.; Cameron, T. S.; Aquino, M. A. S. Hydrogen bonding in diruthenium(II,III) tetraacetate

complexes with biologically relevant axial ligands. *Inorg. Chim. Acta*, v. 358, p. 3927-3926, 2005.

[156] Briand, G. G.; Cooke, M. W.; Cameron, T. S.; Farrell, H. M. Burchell, T. J.; Aquino, M. A. S. An Axial Phosphine Diadduct of Diruthenium(II,III) Tetraacetate. *Inorg. Chem.*, v. 40, p. 3267-3268, 2001.

[157] Burchell, T. J.; Cameron, T. S.; Macartney, D. H.; Thompson, L. K.; Aquino, M. A. S. Kinetics and Magnetism of Phosphane Diadducts of Diruthenium(II,III) Tetraacetate. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4021-4027, 2007.

[158] Bose, R. N.; Wagner, P. A.; Earley, J. E. Kinetics of the reaction of the bis(μ -oxalato)bis(μ -acetato)diaquodiruthenium(II,III) anion with $\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. *Inorg. Chem.*, v. 23, p. 1132-1134, 1984.

[159] Everhart, M.; Earley, J. E. Kinetics of replacement of bridging ligands in a diruthenium(II,III) cation. *Polyhedron*, v. 7, p. 1393-1396, 1988.

[160] Sudha, C.; Mandal, S. K.; Chakravarty, A. R. Electrochemical Evidence for a Two-Electron Reduction Process in a (μ -Oxo)bis(μ -acetato)diruthenium(III) Complex Containing Terminal 1-Methylimidazole Ligands. *Inorg. Chem.*, v. 32, p. 3801-3802, 1993.

[161] Sudha, C.; Mandal, S. K.; Charkravarty, A. R. Edge-Sharing Bioctahedral Diruthenium(III) Complexes Containing Methoxy and Carboxylate Bridges: X-ray Structures, Redox Behavior, and Core Stability. *Inorg. Chem.*, v. 33, p. 4878-4884, 1994.

[162] Sudha, C.; Mandal, S. K.; Charkravarty, A. R. Synthesis, X-ray Structures, and Spectroscopic and Electrochemical Properties of (μ -Oxo)bis(μ -carboxylato)diruthenium Complexes Having Six Imidazole Bases as Terminal Ligands. *Inorg. Chem.*, v. 37, p. 270-278, 1998.

[163] Barral, M. C.; Jiménez-Aparicio, R.; Royer, E. C.; Urbanos, F. A. Reaction of diruthenium(II,III) acetate with triphenylphosphine. *Polyhedron*, v. 10, p. 113-130, 1991.

[164] Wyman, I. W.; Burchell, T. J.; Robertson, K.; Cameron, T. S.; Aquino, M. A. S. Structure and Electrochemistry of Heterobimetallic Ferrocenecarboxylato ruthenium(II) Complexes. *Organometallics*, v. 23, p. 5353-5364, 2004.

[165] Tanase, T.; Takeshita, N.; Inoue, C.; Kato, M.; Yano, S.; Sato, K. Diruthenium complexes with hydrotris(1-pyrazolyl)borate facecapping ligands involving $\{\text{Ru}_2(\mu\text{-O or } \mu\text{-OH})(\mu\text{-carboxylato})_2\}$ cores. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, p. 2293-2302, 2001.

[166] Cotton, F. A. Walton, R. A. *Multiple Bonds between Metal Atoms*, Oxford University Press, New York. 1993, p. 390.

[167] Cotton, F.A.; Datta, T.; Labella, L.; Shang, M. Stabilizing of the Ru_2^{6+} core. Use of highly charged ligands such as sulfate and phosphate. *Inorg. Chim. Acta*, v. 203, p. 55-60, 1993.

[168] Seuanes, G. C.; Nikolaou, S. Study of a novel ruthenium-carboxylate with potential biological activity. *In: 7th International Congress of Pharmaceutical*

Chemistry (CFARP), 06-09/set/09, Ribeirao Preto (SP), **Resumos...** Brasil: 2009, CD-Rom.

[169] Seuanes, G. C.; de Oliveira, A. R. M.; Nikolaou, S. Estudo da estabilidade dos complexos rutênio-ibuprofeno e rutênio-cetoprofeno, através da técnica de espectroscopia eletrônica. *In*: 18^o Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 16-19/nov/10, Ribeirao Preto (S), **Resumos...** Brasil: 2010, 2875, 2010.

[170] Seuanes, G. C.; Nikolaou, S. Estudo do complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{ibp})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$, um complexo inédito com potencial aplicação como metalofármaco. *In*: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 28-31/mai/2010, Águas de Lindóia (SP), **Resumos...** Brasil: INO-022, 2010.

[171] Metzler, D. E. **Biochemistry – The Chemical Reactions of Living Cells**, v. 1, Harcourt Science and Technology Company, p. 52, 2001.

[172] Calvo, J. C. Disponível em:
<<http://www.calvo.qb.fcen.uba.ar/Tabla%20pKa.html>> Acesso em 10 de abril de 2010.

[173] Espenson, J. H.; **Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms**. 2^o ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995.

[174] Al-Meshal, I.; Hassan, M. M. A. Ascorbic Acid, **Analytical Profiles of Drug Substances**, v. 11, p. 45-78, 1982.

[175] Chatterjee, D.; Pal, U.; Ghosh, S.; van Eldik, R. Redox Reactions of Ru(III)-edta complex with thioamino acids. Kinetic and mechanistic studies. **Dalton Trans.**, v. 40, p. 1302-1306, 2011.

[176] Eyring, H. The activated complex in chemical reactions. **J. Chem. Physics**, v. 3, p. 107-115. 1935.

[177] van Eldik. Pressure as a kinetic parameters in mechanistic studies of chemical reaction by flash photolysis and pulse radiolysis. **Pure & Appl. Chem.**, v. 65, p. 2603-2611. 1993.

[178] van Eldik, R.; Asano, T.; Le Noble, W. J. Activation and Reaction Volumes in Solution 2. **Chem. Rev.**, v. 89, p. 549-688, 1989.

[179] Rocha, R. C.; Toma, H. E. Transferência de elétrons em sistemas inorgânicos de valência mista. **Quim. Nova**, v. 25, p. 624-683, 2002.

[180] Viana, C. A. N.; Reis, J. C. R. Pressure dependence of rate and equilibrium constants in solution. A guide to analytical equations., **Pure & Appl. Chem.**, v. 68, p. 1541-1551. 1996.

[181] Kandagal, P.B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Vani, V.; Shaitkh, S.M.T. Study of the interaction between doxepin and human serum albumin by spectroscopic methods. **J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry**, v. 179, p. 161-166, 2006.

[182] He, W.; Li, Y.; Xue, C.; Hu, Z.; Chen, X.; Sheng, F. Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 1837-1845, 2005.

-
- [183] Lu, Z.; Zhag, Y.; Liu, H.; Yuan, J.; Zheng, Z.; Zou, G. Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum human albumin and hemoglobin. **J. Fluoresc.**, v. 17, p. 580-587, 2007.
- [184] Peters, T., Jr. **All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications**. Academic Press, San Diego and London. 1996.
- [185] Timerbaev, A. R.; Rudnev, A. V.; Semenova, O. Hartinger, C. G., Keppler, B. K. Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis. **Anal. Biochem.**, v. 341, p. 326, 2005.
- [186] Connors, K. A. **Binding Constants – The Measurement of Molecular Complex Stability**. New York: John Wiley-Sons. 1987.
- [187] Benesi, H.; Hildebrand, J. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 2703-2707, 1949.
- [188] Scott, R. Some comments on the benesi-hildebrand equation. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 75, p. 787-789, 1956.
- [189] Seal, B. K.; Sil, H.; Mukherjee, D. C. Independent determination of equilibrium constant and molar extinction coefficient of molecular complexes from spectrophotometric data by a graphical method. **Spectrochim. Acta A**, v. 38, p. 289-292, 1982.
- [190] Qureshi, P. M.; Varshney, R. K.; Singh, S. B. Evaluation of ϵ for the p-dinitrobenzene-aniline complexes by the Scott equation. Failure of the Benesi-Hildebrand equation. **Spectrochim. Acta A**, v. 50, p. 1789-1790, 1994.
- [191] Polec-Pawlak, K.; Abramski, J. K.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K.; Jarosz, M. Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis – inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins. **Electrophoresis**, v. 27, p. 1128, 2006.
- [192] Neault, J. F.; Tajmir-Riahi, H. A. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1384, p. 153-159, 1998.
- [193] Rodger, A.; Noiden, B. **Circular Dichroism and Linear Dichroism**, Oxford University Press, Oxford, 1997
- [194] Greenfield, N. J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. **Anal. Biochem.**, v. 235, p. 1-10, 1996.
- [195] Silveira, V. C.; Caramori, G. F.; Abbott, M. P.; Goncalves, M. B. Petrilli, H. M.; Ferreira, A. M. C. Oxindole-Schiff base copper(II) complexes interactions with human serum albumin: spectroscopic, oxidative damage, and computational studies. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, p. 1331-1341, 2009.
- [196] Eftink, M. R. Fluorescence Quenching Reactions: Probing Biological Macromolecular Structures. In: Dewey, T. G. (Ed.). **Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Press, EUA, 1991, p. 1-41.

- [197] Hu, Y. J.; Liu, Y.; Wang, J. B.; Xiao, X. H.; Qu, S. S. Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 36, p. 915-919, 2004.
- [198] Xie, M. X.; Xu, X. Y.; Wang, Y. D. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1724, p. 215-224, 2005.
- [199] Bi, S.; Song, D.; Tian, Y.; Zhou, X.; Liu, Z.; Zhang, H. Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 61, p. 626-636, 2005.
- [200] Sotomayor, M. D. P. T.; Dias, I. L. T. D.; Lanza, M. R. V.; Moreira, A. B.; Kubota, L. T. Aplicações e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1755-1774, 2008
- [201] Wanwilmolruk, S.; Birkertt, D. J.; Brooks, P. M. Structural Requirements for Drug Binding to Site II on Human Serum Albumin. **Mol. Pharmacology**, v. 24, p. 458-463, 1983.
- [202] Chuang, V. T. G.; Kuniyasu, A.; Nakayama, H.; Matsushita, Y.; Hirono, S.; Otagiri, M. Helix 6 of subdomain III A of human serum albumin is the region primarily photolabeled by ketoprofen, an arylpropionic acid NSAID containing a benzophenone moiety. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1434, p. 18-30, 1999.
- [203] Bocedi, A.; Notaril, S.; Narciso, P.; Bolli, A.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Binding of Anti-HIV drugs to human serum albumin. **IUBMB Life**, v. 56, p. 609-614, 2004.
- [204] Guo, X.; Zhang, L.; Sun, X.; Han, X.; Guo, C.; Kang, P. Spectroscopic studies on the interaction between sodium ozagrel and bovine serum albumin. **J. Mol. Struct.**, v. 928, p. 114-120, 2009.
- [205] Min, J., Meng-Xia, X.; Dong, Z.; Yuan, L.; Xiao-Yu, L.; Xing, C. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. **J. Mol. Struct.**, v. 692, p. 71-80, 2004.
- [206] Hou, H. N. Qi, Z. D.; Ouyang, Y. E.; Liao, F. L.; Zhang, Y.; Liu, Y. Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 47, p. 134-139, 2008.
- [207] Costa, I. de M. ; De Oliveira Silva, D. . Determinação do coeficiente de partição de metalofármacos de dirutênio(II,III) e anti-inflamatórios não esteróides. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23-26/mai/2011, Florianópolis (SC), **Resumos...** Brasil: INO-192, 2011.
- [208] An, W.; Jiao, Y.; Dong, C.; Yang, C.; Inoue, Y.; Shuang, S. Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum albumin. **Dyes Pigments**, v. 81, p. 1-9, 2009.
- [209] Bresolin, I. T. L.; Miranda, E. A.; Bueno, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas, **Quim. Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.
- [210] Szente, L. Preparation of Cyclodextrin Complexes. In: Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F. (Ed.) **Comprehensive Supramolecular Chemistry**. Pergamon, 1996. v. 3, p. 243-252.

- [211] Matsui, Y.; Mochida, K. Binding forces contributing to the association of cyclodextrin with alcohol in an aqueous solution. **Bull. Chem. Soc. Japan**, v. 52, p. 2808-2814, 1979.
- [212] Pitha, J.; Hoshino, T. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange. **Int. J. Pharm.**, v. 80, p. 243-251, 1992.
- [213] Pitha, J.; Hoshino, T.; Torres-Labandeira, J.; Irie, T. Preparation of drug: hydroxypropylcyclodextrin complexes by a method using ethanol or aqueous ammonium hydroxide as co-solubilizers. **Int. J. Pharm.**, v. 80, p. 253-258, 1992.
- [214] Ni, N.; Tesconi, M.; Tabibi, S. E.; Gupta, S.; Yalkowsky, S. H. Use of pure t-butanol as a solvent for freeze-drying: a case study. **Int. J. Pharm.**, v. 226, p. 39-46, 2001.
- [215] Wang, Z.; Deng, W., Zhang, X. The novel application of tertiary butyl alcohol in the preparation of hydrophobic drug-HP β CD complex. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, p. 409-414, 2006.
- [216] Wang, Z.; Zhang, X.; Deng, Y.; Wang, T. Complexation of hydrophobic drugs with hydroxypropyl- β -cyclodextrin by lyophilization using a tertiary butyl alcohol system. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v. 57, p. 349-354, 2007.
- [217] de Oliveira, I. R. W. Z.; Fatibello-Filho, O.; Fernandes, S. C.; Vieira, I.C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores, **Quim. Nova**, v. 32, p. 1195-1201, 2009.
- [218] Santos, A. C. P. **Preparação e caracterização de materiais híbridos bioinorgânico-orgânicos contendo metalofármacos de cobre-naproxeno e de cobre-sulindaco em acetato de celulose**. 2011. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [219] Meo, P. L.; D'Anna, F.; Riela, S.; Gruttadauria, M.; Noto, R. Binding equilibria between β -cyclodextrin and *p*-nitro-aniline derivatives: the first systematic study in mixed water-methanol solvent systems. **Tetrahedron**, v. 65, p. 2037-2042, 2009
- [220] Demarco, P. V.; Thakkar, A. Cyclohepta-amylose Inclusion Complexes. A proton Magnetic Resonance Study. **Chem. Comm.**, p. 2-4, 1970.
- [221] Fraceto, F. F; Goncalves, M. M.; Moraes, M. M.; Araújo, D. R.; Zanella, L.; Paula, E.; Pertinhez, T. A. Caracterização do Complexo de Inclusão Ropivacaína: β -ciclodextrina. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1203-1207, 2007.
- [222] Li, S.; Purdy, W. C. Circular Dichroism, Ultraviolet, and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Studies of the Chiral Recognition Mechanism of β -Cyclodextrin. **Anal. Chem.**, v. 64, p. 1405-1412, 1992.
- [223] Garnero, C.; Longhi, M. Study of ascorbic acid interaction with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triethanolamine, separately and in combination. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 45, p. 536-545, 2007.
- [224] Rekharsky, M. V.; Goldberg, R. N.; Schwarz, F. P.; Tewari, Y. B.; ROSS, P. D.; Y. Yamashoji; Y. Inoue. Thermodynamic and Nuclear Magnetic Resonance Study of the Interactions of α - and β -Cyclodextrin with Model Substances:

Phenethylamine, Ephedrines, and Related Substances. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 8830-8840, 1995.

[225] Jadhav, G. S.; Vavia, P. R. Physicochemical, in silico and in vivo evaluation of a danazol- β -cyclodextrin complex. **Int. J. Pharm.**, v. 352, p. 5-16, 2008.

[226] Salústio, P. J.; Feio, G.; Figueirinhas, J. L.; Pinto, J. F.; Cabral Marques, H. M. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a β -cyclodextrin cavity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, p. 377-386, 2009.

[227] Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H.; Pertinhez, T. A.; Oyama Jr., S.; de Paula, E. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 39, p. 956-963, 2005.

[228] Loftsson, T.; Olafsdottir, B. J.; Fridriksdottir, H.; Jonsdottir, S. Cyclodextrin complexation of NSAIDs: physicochemical characteristics. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 1, p. 95-101, 1993.

[229] Gavrilin, M. V.; Lukashova, L. A.; Fat'yanova, E. A.; Ziep, C. V.; Kompantseva, E. V. Study of the interaction of ibuprofen with various polymers. **Pharm. Chem. J.**, v. 33, p. 604-606, 1999.

[230] Sheng, J.; Kasim, N. A.; Chandrasekharan, R.; Amidon, G. A. Solubilization and dissolution of insoluble weak acid, ketoprofen: Effects of pH combined with surfactant. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 29, p. 306-314, 2006.

ANEXO

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Rodrigo Luis da Silva Ribeiro dos Santos

Nascimento: São Paulo, 27 de abril de 1977.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Doutorado: Química Inorgânica, Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), período: ago/2007-mar/2012.

Mestrado: Ciências (Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), período: jul/2004-abr/2007.

Bacharelado: Química com 13 Atribuições Tecnológicas, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo (SP), período: fev/1999-jun/2003.

Licenciatura: Plena em Química com Prática de Ensino em Física, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo (SP), período: fev/1999-dez/2003.

3. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E ATIVIDADES CIENTÍFICAS:

agosto/2007 – março/2012

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SP) – Laboratório de Química Inorgânica, Sintética e Estrutural e Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador – Bolsista de doutorado (CAPES)

- Execução do projeto de doutorado intitulado “Estudos de Metalofármacos Dimetálicos de Rutênio e de suas Interações com Ciclodextrinas”;
- Auxílio na orientação de um aluno de iniciação científica.

maio/2010 – setembro/2010

Departamento de Química e Farmácia - Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Alemanha)

Pesquisador – Estágio complementar referente ao doutorado

- Execução do projeto referente ao doutorado *sandwich* “Reactivity Studies of Diruthenium Metallodrugs” sob orientação do Prof. Dr. Rudi van Eldik e bolsista do Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD);

agosto/2004-abril/2007

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo (SP)
– Centro de Radiofarmácia

Pesquisador – Bolsista de mestrado (CNPq) – abril/2005-abril/2007

- Execução do projeto de mestrado intitulado “Marcação de Análogo da Timidina com Complexo Organometálico de Tecnécio-99m para Diagnóstico de Câncer: Avaliação Radioquímica e Biológica”;

4. BOLSAS DE ESTUDOS:

- *2010*: Bolsa de Doutorado Sanduiche - Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) – Alemanha;
- *2007-2011*: Bolsa de Doutorado – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- *2008*: Bolsa de Monitoria/Estagiário – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) – Universidade de São Paulo (USP);
- *2005-2007*: Bolsa de Mestrado – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- *2007*: Bolsa de Monitoria/Estagiário – Faculdade de Ciência Exatas e Experimentais – Universidade Presbiteriana Mackenzie;

5. PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS:

(para todas vide Currículo Lattes:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4746990T8>)

Artigos Completos Publicados em Periódicos

- SANTOS, R.L.S.R.; BERGAMO, A.; SAVA, G.; SILVA, D. O. Synthesis and spectroscopical characterization of a diruthenium(II,III)-ketoprofen novel compound. Effects of diruthenium-ketoprofen, -ibuprofen and -naproxen metallopharmaceuticals on colon carcinoma model. *Polyedron*, artigo submetido em fev/2012, processo POLY-S-12-00138, **2012**.
- SANTOS, R.L.S.R.; VAN ELDIK, R.; SILVA, D. O.; Thermodynamics of axial substitution and kinetics of reactions with amino acids for the paddlewheel complex tetrakis(acetato)chloridodiruthenium(II,III). *Inorg. Chem.*, artigo submetido em jan/2012, processo ic-2012-00168t, **2012**.
- SANTOS, R.L.S.R.; FAINTUCH, B.L.; TEODORO, R. Estudos in vitro e in vivo de análogo da timidina marcada com complexo organometálico de tecnécio-^{99m}Tc para potencial uso em diagnóstico tumoral. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, p. 85-95, **2008**.
- FAINTUCH, B.L.; SANTOS, R.L.S.R.; SOUZA, A.L.F.M.; HOFFMAN, T.J.; GREELEY, M.; SMITH, C.J. ^{99m}Tc-HYNIC-Bombesin(7-14)NH₂: Radiochemical Evaluation With Co-ligands EDDA (EDDA = Ethylenediamine-N,N-diacetic Acid), Tricine, and Nicotinic Acid. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, v. 35, p. 43-51, **2005**.

Trabalhos Completos Publicados em Anais de Congressos

- FAINTUCH, B.L.; SANTOS, R.L.S.R.; TEODORO, R.; MURAMOTO, E.; MORGANTI, L. Radiolabeling angiogenic and apoptotic agent with different technetium-99m techniques. *In: 3rd Research Co-ordination Meeting (RCM) on Development of ^{99m}Tc – Labelling of Small Biomolecules Using Novel Technetium-99m cores*, maio/2006, Budapeste (Hungria), Agência Internacional de Energia Atômica (IEAE), Technical Reports Series N° 459, Capítulo 3, p. 55-73, **2006**.
- FAINTUCH, B.L.; STOIANOV, V.; SANTOS, R.L.S.R.; DUATTI, A.; SMITH, C.J. Labeling of bombesin analogue by asymmetrical technetium-99m nitrido core. *In: International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals*, nov/2005, Viena (Áustria), Book of Extend Synopses - IAEA-CN-130/121P, p. 220, **2005**.
- FAINTUCH, B. L.; SANTOS, R.L.S.R.; PINHEIRO, A.; BORGES, V.; DANTAS, T. Preparation of the precursor ^{99m}Tc-carbonyl for labeling biomolecules: optimization and radiochemical evaluation. *In: Internacional Nuclear Atlantic Conference*, ago/2005, Santos (Brasil), Associação Brasileira de Energia Nuclear-ABEN (ISBN: 85-99141-01-5) CD-ROM, **2005**.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

- SANTOS, R.L.S.R.; VAN ELDIK; R.; DE OLIVEIRA SILVA; D. Parâmetros termodinâmicos da substituição axial de água por cloreto para o complexo tetrakis(acetato)bis(aqua)dirutênio(II,III). *In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, mai/2011, Florianópolis (SC). CD-ROM, **2011**.
- SANTOS, R. L. S. R.; COSTA, I. M. ; SILVA, D. O. Thermal analysis (TG/DSC/MS) of mixed compounds of Ruthenium and Arylpropionic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *In: 10th European Symposium on Thermal Analysis and Calorimetry (ESTAC10)*, set/2010, Rotterdam (Amsterdam), Abstract Book, **2010**.

-
- SANTOS, R.L.S.R.; DE OLIVEIRA SILVA, D. An ibuprofen/ hydroxypropyl-cyclodextrin hybrid material obtained by spray-drying organic solutions. *In: 11th International Conference on Advanced Materials (ICAM)*, set/2009, Rio de Janeiro (Brasil), Scientific Program, H537, p. 87, CD-ROM, **2009**.
 - SANTOS, R. L. S. R.; DE OLIVEIRA SILVA, D. A novel potential antitumor metallodrug of ruthenium-fenbufen: characterization and reactivity with amino acids. *In: VII International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP)*, set/2009, Ribeirão Preto (Brasil), **2009**.
 - SANTOS, R.L.S.R.; SANTOS, R.R.P.; SILVA, D.O. Interactions of metal-metal bonded diruthenium-NSAID anit-tumor metallodrugs with amino acids. *In: XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry*, set/2008, Foz do Iguaçu (Brasil), Book of Abstract, v. 1. p. 419, **2008**.
 - SANTOS, R.L.S.R.; SANTOS, R.R.P.; SILVA, D.O. Síntese e caracterização de um complexo de dirutênio com o fármaco cetoprofeno e estudos preliminares de interação com albumina humana. *In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, maio/2008, Águas de Lindóia (SP). CD-Rom, **2008**.
 - SANTOS, R.L.S.R.; FAINTUCH, B.; TEODORO, R.; MURAMOTO, E.; NUNES, I.V.S. Invasive evaluation of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -thymidine analog in a lung cancer model. *In: XXIII Congresso Brasileiro de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular*, out/2006, Brasília (DF), *Radiol. Bras.*, v. 36, s. 2, p. 93-94, **2006**.
 - SANTOS, R.L.S.R.; FAINTUCH, B.L.; SCHIBLI, R. Optimization and stability studies of thymidine analog complex with organometallic core. *In: 53nd Annual Meeting The Society of Nuclear Medicine*, maio/2006, San Diego (EUA), *J. Nucl. Med. Meeting Abstract*, v. 47, p. 526P-527P, **2006**.
 - FAINTUCH, B. L.; SANTOS, R.L.S.R.; MURAMOTO, E.; NASCIMENTO, N.; Cyclic RGD peptide labeling using ^{99m}Tc -carbonyl and ^{99m}Tc -HYNIC. *In: 52nd Annual Meeting – The Society of Nuclear Medicine*, maio/2005, Toronto (Canadá), *J. Nucl. Med. Meeting Abstract*, v. 46; s. 2; p. 358P; **2005**.