Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**“Investigação química de complexos de coordenação dos
antibióticos enrofloxacin e norfloxacin combinados ao íon Ru(III)
e suas interações com biomolécula alvo.”**

Felipe Costa Claro Reis

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área: **Química**

Orientadora: Profa. Dra. Sofia Nikolaou

RIBEIRÃO PRETO -SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Felipe Costa Claro

“Investigação química de complexos de coordenação dos antibióticos enrofloxacin e norfloxacin combinados ao íon Ru(III) e suas interações com biomolécula alvo” Ribeirão Preto, 2014.

108 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Nikolaou, Sofia.

1. Rutênio. 2. Enrofloxacin. 3. Norfloxacin. 4. Fluoroquinolonas. 5. Interação com HSA. 6. Stern-Volmer.

Nome: REIS, Felipe Costa Claro

Título: Investigação química de complexos de coordenação dos antibióticos enrofloxacin e norfloxacin combinados ao íon Ru(III) e suas interações com biomolécula alvo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências
e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Fernando e Marley por todo apoio e amor incondicional. Por mais clichê que seja, sem eles nada disso seria possível ou mesmo imaginável. Ao meu irmão Enzo. À minha família: Tio Oswaldo, Tio Pedro (in memorian), Tia Magda, Tia Márcia, Tia Zezé, e aos meus primos André, Livia, Marcos e Mateus.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Professora Dra. Sofia Nikolaou por me aceitar como aluno, pela orientação e dedicação ao longo destes dois anos. Sou muito grato pela oportunidade, lições, puxões de orelha, por todas as nossas conversas e por ajudar no meu processo de amadurecimento e formação científica.

Ao Professor Dr. Roberto Santana da Silva pelas discussões acadêmicas e pelo uso dos equipamentos do laboratório.

Ao Professor Dr. Amando Siuiti Ito pelo uso dos equipamentos do laboratório e ideias relacionadas ao trabalho.

Ao Wallance Moreira Pazin pela grande ajuda nas medidas de tempo de vida.

A Lucimara Perpetua Ferreira Aggarwal por toda ajuda e ensinamentos para a conclusão deste trabalho.

Aos técnicos Juliana e Clóvis, pela amizade, discussões acadêmicas e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos de laboratório Alexia, Ana, Bruna, Camila, Caroline, Jacqueline, Jorge, Joicy, Juliana, Laísa, Leandro, Lilian, Loyanne, Mariete, Natacha, Renata, Tássia pela ajuda, ensinamento, conversas e descontração.

A todos meus amigos de Jaboticabal e Ribeirão Preto pelas risadas e descontração nos momentos de desespero.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPESP e CNPq, pela bolsa de Mestrado e auxílios às nossas linhas de pesquisa.

“A ignorância afirma ou nega veementemente. A ciência duvida.”

Voltaire

*“Acho que fiz tudo do melhor jeito, meio torto, talvez, mas tenho tentado da
maneira mais bonita que sei.”*

Caio Fernando Abreu

Reis, Felipe Costa Claro. **Investigação química de complexos de coordenação dos antibióticos enrofloxacin e norfloxacin combinados ao íon Ru(III) e suas interações com biomolécula alvo**. 2014. 108p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Resumo

Este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar um novo complexo mononuclear de rutênio (III) e enrofloxacin (enro, fármaco antibacteriano da família das fluoroquinolonas), $[Ru(enro)_3].nH_2O$. Foram testadas várias rotas sintéticas e apenas a partir de uma delas obteve-se o composto desejado. O produto foi caracterizado pelas técnicas espectroscópicas de absorção na região do UV-visível e do infra-vermelho. Através desta última técnica foi possível determinar o modo pelo qual a enrofloxacin se coordena ao íon rutênio: a coordenação ocorre de modo bidentado através do oxigênio da piridona e do oxigênio do grupamento carboxilato.

Outro objetivo deste trabalho foi investigar a interação do complexo mononuclear de rutênio (III) e norfloxacin, $[Ru(nor)_3].nH_2O$, com a albumina de soro humano (HSA), através da técnica de luminescência. Mais especificamente pelo estudo da supressão da luminescência dos resíduos de triptofano, aplicando-se o modelo de tratamento da supressão bimolecular de Stern-Volmer. O estudo de supressão de fluorescência mostrou, por meio de espectros de emissão da HSA, que com o aumento da concentração do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ na solução de HSA, ocorre uma redução gradual da luminescência da HSA, devido a alterações da conformação da proteína, que sugerem alteração do microambiente próximos aos resíduos de triptofano. A partir do tratamento dos dados pode-se determinar tanto K_{sv} quanto a constante cinética do processo de supressão, que mostraram uma dependência com a temperatura sugerindo como mecanismo predominante de supressão o mecanismo dinâmico. Porém essa conclusão foi revista a partir da determinação dos tempos de vida do estado excitado da HSA, e pode-se concluir que o mecanismo predominante à temperatura ambiente é o mecanismo estático, porém com o aumento da temperatura ocorre a predominância do mecanismo do tipo dinâmico. Através da determinação dos

parâmetros termodinâmicos, concluiu-se que as interações entre a HSA e o complexo são espontâneas, e forças de van der Waals e ligações de hidrogênio estão envolvidas na ligação entre a HSA e o supressor.

Palavras chave: Rutênio, Enrofloxacin, Norfloxacin, Albumina Sérica Humana, Stern-Volmer.

Reis, Felipe Costa Claro. **Chemical Investigation of coordination compounds with enrofloxacin and norfloxacin antibiotics combined to Ru (III) ion and their interactions with target biomolecule.** 2014. 108p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Abstract

This work aims to synthesize and characterize a new mononuclear ruthenium (III) complex and enrofloxacin (enro, antibacterial drug of the fluoroquinolone family), $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Several synthetic routes were tested, but only from one of them it was obtained the desired compound. The product was characterized by spectroscopic techniques of absorption in UV-visible and infra-red regions. Through this last technique, it was possible to determine the coordination mode of enrofloxacin to the ruthenium ion: the coordination occurs in a bidentate way through the pyridone oxygen and the oxygen of the carboxylate group.

Another aim of this study was to investigate the interaction of mononuclear ruthenium (III) complex and the norfloxacin, $[\text{Ru}(\text{nor})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, with the human serum albumin (HSA), through the technique of luminescence. More specifically, by the study of the quenching of luminescence of tryptophan residues, by applying the Stern-Volmer's model of treatment of bimolecular suppression. The fluorescence quenching study showed, through the emission spectra of HSA, that increasing the complex concentration in HSA solution, there is a gradual reduction of the luminescence of HSA, due to the conformational changes of the protein that suggests the change of microenvironment near tryptophan residues. From the data processing it is possible to determine both K_{sv} and the kinetic constant of the suppression process, which showed temperature dependence, suggesting as the predominant mechanism of quenching the dynamic mechanism. However, this conclusion has been revised from the determination of the lifetimes of the excited state of HSA, and it can be concluded that the predominant mechanism at room temperature is the static mechanism, but with the temperature's increase, it occurs the predominance of the dynamic type mechanism. By determining the thermodynamic parameters, it was concluded that the

interactions between HSA and the complex are spontaneous, and Van der Waals forces and hydrogen bonds are involved in the binding between HSA and suppressor.

Keywords: Ruthenium, Enrofloxacin, Norfloxacin, Human Serum Albumin, Stern-Volmer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas dos complexos $[Ru(enro)_3].nH_2O$ (à esquerda) e $[Ru(nor)_3].nH_2O$ (à direita).	1
Figura 2: Estruturas do complexo $[Ru(cipro)_3].4H_2O$	2
Figura 3: Estrutura da primeira quinolona sintetizada, ácido nalidíxico, no ano de 1962.	6
Figura 4: Estrutura molecular da primeira fluorquinolona sintetizada, flumequina, 1973.	7
Figura 5: Estrutura molecular da enrofloxacin (à esquerda) e ciprofloxacin (à direita).	9
Figura 6: Estrutura da norfloxacin 9	9
Figura 7: Relação estrutura-atividade para as quinolonas (adaptado de VIEIRA, 2007).	10
Figura 8: Diferentes modos de coordenação de metais ao grupo carboxilato das quinolonas.	12
Figura 9: Estruturas de Raio-x para o complexo formado entre o íon $Ru(III)$ e o ácido nalidíxico (à esquerda) e o complexo formado entre o íon $Ru(III)$ e a cinoxacin.	15
Figura 10: Estrutura da HSA.	16
Figura 11: Diagrama de Jablonsnki.	17
Figura 12: Espectros eletrônicos: do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$, da enrofloxacin livre e do cloreto de rutênio em água.	35
Figura 13: Espectros eletrônicos do complexo impuro $[Ru(enro)_3].nH_2O$, do complexo purificado $[Ru(enro)_3].nH_2O$ e da enrofloxacin livre.	35
Figura 14: Forma zwitteriônica da enrofloxacin.	37

Figura 15: Espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre, do complexo impuro $[Ru(enro)_3].nH_2O$ e do complexo purificado $[Ru(enro)_3].nH_2O$	39
Figura 16: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 2.....	40
Figura 17: Espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 2.....	42
Figura 18: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 3.	43
Figura 19: Espectros vibracionais na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 3.....	45
Figura 20: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 4.	46
Figura 21: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 4.....	48
Figura 22: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 5.	49
Figura 23: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 5.....	50
Figura 24: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 6.....	51
Figura 25: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 6.....	53
Figura 26: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 7.....	54
Figura 27: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 7.....	55

Figura 28: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ a 25 °C, 30 °C e 35 °C; $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$; $[HSA]=1,0 \times 10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$ e $[complexo]=0,0\text{ mol.L}^{-1} - 2,6 \times 10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$.	59
Figura 29: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ a 25 °C, 30 °C e 35 °C; $\lambda_{exc}=295\text{ nm}$; $[HSA]=1,0 \times 10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$ e $[complexo]=0,0\text{ mol.L}^{-1} - 2,6 \times 10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$.	60
Figura 30: Curvas da intensidade da fluorescência (F/F_0) em função da razão molar $[supressor]/[HSA]$ para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{exc}=280$ e 295 nm), para as temperaturas de incubação de 25, 30 e 35 °C.	61
Figura 31: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ com $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$ e $\lambda_{em}=330\text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C).	63
Figura 32: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ para $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$ e $\lambda_{em}=330\text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C), levando-se em consideração o tempo de vida do estado excitado da HSA ($\tau_0=10^{-8}\text{ s}$).	64
Figura 33: Gráfico do $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log [supressor]$, para $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C).	66
Figura 34: Gráfico de van't Hoff, HSA ($10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$) e $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C).	70
Figura 35: Perfil de decaimento monoexponencial da fluorescência da HSA, $\lambda_{exc}=281\text{ nm}$ e $\lambda_{em}=337\text{ nm}$.	71
Figura 36: Perfil de decaimento monoexponencial da fluorescência da HSA, $\lambda_{exc}=281\text{ nm}$ e $\lambda_{em}=337\text{ nm}$.	72
Figura 37: Gráfico do tempo de vida da HSA em função da concentração do supressor para temperatura de 37 °C.	72

Figura 38: Espectros de emissão da HSA e de absorção do complexo supressor.....	74
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes.	32
Tabela 2: Resumo das rotas sintéticas.	33
Tabela 3: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre, complexo impuro $[Ru(enro)_3].nH_2O$ e complexo purificado $[Ru(enro)_3].nH_2O$	38
Tabela 4: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 2.	41
Tabela 5: Valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ e absortividades molares observados para a enrofloxacin livre e os compostos obtidos a partir das sínteses 1,2 e 3 - $[Ru(enro)_3].nH_2O$	44
Tabela 6: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 3.	45
Tabela 7: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 4.	47
Tabela 8: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 5.	50
Tabela 9: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 6.	52
Tabela 10: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 7.	55

Tabela 11: Valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ e absortividades molares observados para a enrofloxacina livre e os compostos obtidos a partir das s\nteses 6 e 7 $[Ru(enro)_3].nH_2O$.	56
Tabela 12: Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante de velocidade de supress\~ao bimolecular (k_q) para diferentes temperaturas de incubac\~ao.	64
Tabela 13: Constantes de ligac\~ao (K_b) e n\~umeros de s\~itios de ligac\~ao do supressor (n).	66
Tabela 14: Par\~ametros termodin\~amicos da interac\~ao entre o complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ e HSA, para $\lambda_{exc}=280$.	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A_{em}	Absorvância no comprimento de onda de emissão
A_{ex}	Absorvância no comprimento de onda de excitação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
enro	Enrofloxacina
F	Intensidade de fluorescência na presença de supressor
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência de supressor
$F_{corrigido}$	Intensidade de fluorescência corrigida
F_{obs}	Intensidade de fluorescência observada experimentalmente
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSA	Albumina de soro humano
IC	Conversão interna
ISC	Conversão inter-sistema
K_a	Constante de associação
K_b	Constante de ligação aparente do supressor à HSA
k_{dif}	Constante de difusão
k_q	Constante de velocidade de supressão bimolecular
K_{SV}	Constante de supressão bimolecular de Stern-Volmer
n	Número de potenciais sítios de ligação à HSA
nor	Norfloxacina
R	Constante dos gases ($8,31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

RV	Relaxação vibracional
T	Temperatura em
Trp-214	Resíduo de triptofano
UV	Ultra-violeta
ϵ	Absortividade molar
ν_{as}	Estiramento antissimétrico
ν_s	Estiramento simétrico
γ	Eficiência dos choques que promovem a supressão
η	Rendimento
τ	Tempo de vida médio do fluoróforo no estado excitado na presença de supressor
τ_0	Tempo de vida médio do fluoróforo no estado excitado na ausência de supressor
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda máximo
[Q]	Concentração do supressor
ΔG	Variação da energia livre
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação da entropia
sulin	Sulindaco
diclofen	Diclofenaco

Sumário

1	APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	1
2	INTRODUÇÃO	3
2.1	Metalofármacos	3
2.1.1	Metalofármacos de Rutênio	4
2.2	Quinolonas	6
2.2.1	Enrofloxacin	8
2.2.2	Norfloxacin	9
2.3	Modo de ação	10
2.4	Propriedades físico-químicas	11
2.4.1	Ionização	11
2.4.2	Complexação	12
2.5	Quinolonas combinadas a centros metálicos	13
2.6	Biomoléculas e suas interações com complexos de coordenação	15
2.7	Luminescência	17
2.7.1	Fluorescência	18
2.7.2	Fluorescência intrínseca para estudo de proteínas	18
2.8	Supressão de Fluorescência	19
3	OBJETIVOS	24
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
4.1	Rotas Sintéticas	25
4.1.1	Síntese 1: $\text{RuCl}_3 + \text{enrofloxacin (enro)} \rightarrow [\text{Ru(enro)}_3].\text{nH}_2\text{O}$	25
4.1.2	Síntese 2: $\text{RuCl}_3 + \text{enrofloxacin (enro)} + \text{KOH} \rightarrow [\text{Ru(enr)}_3].\text{nH}_2\text{O}$	26

4.1.3 Síntese 3: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow$ $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	26
4.1.4 Síntese 4: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow$ $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	27
4.1.5 Síntese 5: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow$ $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	27
4.1.6 Síntese 6: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) + KOH $\rightarrow$ $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	28
4.1.7 Síntese 7: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow [\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	28
4.2 Espectroscopia Eletrônica	29
4.3 Espectroscopia na região do Infravermelho	29
4.4 Espectroscopia de Luminescência	29
4.5 Medidas de tempo de vida	30
4.6 Materiais e Reagentes.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Sínteses	33
5.1.1 Síntese 1	33
5.1.2 Síntese 2	39
5.1.3 Síntese 3	42
5.1.4 Síntese 4	46
5.1.5 Síntese 5	48
5.1.6 Síntese 6	51
5.1.7 Síntese 7	53
5.2 Estudo da Fluorescência	57
5.2.1 Estudo da interação do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ com HSA.....	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
7 REFERÊNCIAS	77

1 APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação apresenta a tentativa de obtenção de um novo candidato a metalofármaco, o complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ (enro = enrofloxacin), e a investigação da interação do complexo análogo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ (nor = norfloxacin) com albumina do soro humana, HSA (Figura 1):

Figura 1: Estruturas dos complexos $[Ru(enro)_3].nH_2O$ (à esquerda) e $[Ru(nor)_3].nH_2O$ (à direita).

Como será descrito no decorrer deste texto, a pequena quantidade do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ isolado puro após o procedimento de cromatografia de exclusão, impediu que a investigação da interação deste complexo de enrofloxacin com HSA fosse realizada neste momento.

Optou-se então por realizar esta investigação com o complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$, cuja síntese, purificação e caracterização haviam sido objeto de estudo de um trabalho anterior orientado pela Professora Sofia Nikolaou e desenvolvido pela aluna Joana Stefani Viana Coelho.

É importante ressaltar, que complexos baseados em quinolonas e íons rutênio já estão sendo sintetizados e caracterizados há algum tempo em nosso grupo de pesquisa. A aluna Márcia Kiyoko Tanimoto, desenvolveu seu trabalho de mestrado a partir de um complexo baseado na fluoroquinolona

ciprofloxacina e o íon Ru^{3+} (figura 2), intitulado “A reatividade da fluoroquilona ciprofloxacina com o metal de transição rutênio.” A partir desse trabalho de mestrado, publicou-se o artigo intitulado “Tuning the reaction products of ruthenium and ciprofloxacin for studies of DNA interactions”, em 2012 (TANIMOTO et al., 2012).

Figura 2: Estruturas do complexo $[\text{Ru}(\text{cipro})_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Sendo assim, esta dissertação apresenta uma descrição das várias tentativas de síntese do complexo $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e sua caracterização preliminar após purificação. Apresenta ainda a discussão destas várias tentativas de síntese, ilustrando o uso das técnicas de espectroscopia de absorção na região do UV-visível e infravermelho no acompanhamento de síntese de compostos de coordenação e identificação dos produtos das mesmas.

Em uma segunda etapa do trabalho, descreve e discute a investigação da interação do complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ com a HSA, através do uso da técnica de espectroscopia de luminescência (medidas de espectros de fluorescência e de tempo de vida), e aplicação do modelo de Stern-Volmer no tratamento dos dados obtidos.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Metalofármacos

Metalofármacos são compostos metalados que apresentam propriedades farmacológicas. Neste tipo de composto, o íon metálico pode estar coordenado a fármacos orgânicos ou então a espécies que, quando não coordenadas, não possuem nenhuma ação farmacológica ou medicinal. O desenvolvimento desse tipo de composto é relativamente recente, mas de grande importância na ciência atual. Assim como citado em alguns trabalhos, complexos inorgânicos contendo os mais diversos íons metálicos têm sido sintetizados e investigados visando à exploração de suas potencialidades biológicas dentro de variados campos de atuação da química medicinal como, por exemplo, agentes antitumorais, antibacterianos, fungicidas, anti-inflamatórios e etc (WENZEL et al.,2011; MEIER et al., 2012; RENFREW et al.,2011; GROESSL et al.,2007).

Existem relatos de que há aproximadamente 5.000 anos o uso medicinal dos metais já era praticado (ORVIG; ABRAMS, 1999). Sua utilização na área medicinal esteve presente entre os egípcios, chineses e renascentistas europeus. Por exemplo: há aproximadamente 3.000 a.C. o cobre já era usado pelos egípcios na esterilização da água, e em 1.500 a.C., utilizavam-se medicamentos contendo ferro. Nesta mesma época, o ouro já era empregado pelos árabes e chineses em suas formulações terapêuticas. Atualmente, sabe-se que os metais de transição, além de serem essenciais em muitas funções vitais, também podem modificar a ação de muitos compostos orgânicos usados na medicina, sendo que muitos fármacos não apresentam um mecanismo de ação puramente orgânico, sendo ativados ou biotransformados por íons metálicos presentes no meio biológico. Por isso, o estudo de complexos metálicos que possam apresentar potencialidade biológica tornou-se alvo de grande interesse e estudo (SADLER; GUO, 1999). Mesmo com a grande importância da área bioinorgânica e a potencialidade dos metais para aumento da eficácia no tratamento comprovada, os metalofármacos ainda permanecem

como uma minoria dentre os fármacos existentes atualmente no mercado (HAMBLEY, 2007).

Complexos metálicos são relativamente fáceis de serem sintetizados e podem apresentar diversas estruturas, isso ocorre devido às diferentes possibilidades de ligações coordenadas entre os ligantes e os centros metálicos. Tais propriedades os tornam atraentes no que se refere ao desenvolvimento de novas espécies, quer sejam como fármacos ou como sinalizadores de sítios-alvo específicos (SMALLEY et al., 2007).

2.1.1 Metalofármacos de Rutênio

O desenvolvimento de complexos metálicos de rutênio apresenta-se com uma alternativa promissora para o tratamento do câncer. O rutênio destaca-se, entre os metais de transição, pela sua capacidade de formar complexos assumindo estados de oxidação de (-2) a (+7), exceto (-1) (SEDDON, 1984). Essa variedade de estado de oxidação, principalmente (+2) e (+3), confere ao rutênio uma química muito diversificada em que ocorre fácil interconversão entre as configurações eletrônicas d^6 - d^5 , estabilizando compostos penta e hexacoordenados, preferencialmente (de ARAÚJO, 2008). Como sabemos a baixa toxicidade do metal está relacionada com o seu estado de oxidação, então podemos afirmar que o rutênio possui uma baixa toxicidade devido a sua habilidade de atingir vários estados de oxidação (+2,+3 e +4) em meio fisiológico. Provavelmente isso ocorra devido às reações redox causadas pela enzima citocromo-c oxidase, pela glutatona ou pelo ascorbato (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Embora “não essencial” e não endógeno metalofármacos cujo centro metálico é o rutênio apresentam boa aplicação clínica, devido à baixa toxicidade (ALLARDYCE; DYSON, 2001) relacionada à habilidade deste elemento em “mimetizar” o ferro na ligação a várias biomoléculas, incluindo a transferrina e a albumina, uma vez que ambos encontram-se localizados no mesmo grupo da tabela periódica (SADLER; GUO, 1999). Em mamíferos, estas duas proteínas são responsáveis pela solubilização e transporte de ferro, reduzindo a toxicidade deste metal. Alguns autores acreditam que o

mecanismo de defesa contra a toxicidade do rutênio seja o mesmo (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Como descrito em trabalhos já publicados, complexos metálicos de rutênio podem ter aplicações como imunossupressor (BAILEY et al., 1997; BASTOS et al., 1998), antibiótico (HOSAHALLI, 2012), anticancerígeno (MORAIS et al., 2012; LUDWIG et al., 2012), antifúngico (MUTHUKUMAR; VISWANATHAMURTHI, 2010), intercalador de DNA (WEI, 2010) e como agente anti-HIV (MISHRA et al., 2001). Recentemente, foi verificado que complexos de rutênio(III), análogos da cisplatina, têm demonstrado atividade antitumoral sobre diversas linhagens tumorais *in vitro* e *in vivo* e também baixa citotoxicidade sistêmica quando comparados com compostos de platina(II). A atividade anticarcinogênica associada a uma alta seletividade pelas células cancerígenas tem sido atribuída a alguns complexos de rutênio (CARBALO et al., 1997) que são capazes de inibir a proliferação de linhas de células tumorais no câncer de colo retal (GALEANO et al., 1992).

Além disso, alguns complexos de rutênio têm mostrado habilidade de interferir com a via do óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos (FRICKER et al., 1997), o que sugere um potencial para emprego terapêutico, pois o óxido nítrico é uma molécula que desempenha importante papel nos processos biológicos, atuando como transmissor em comunicação celular, além de ser um importante segundo mensageiro que tem a habilidade de controlar o ambiente onde é produzido. Essa molécula também foi identificada como sendo um fator relaxante derivada do endotélio, onde desempenha um importante papel no controle do tônus vascular (BONAVENTURA et al., 2006) além de atuar em vários processos fisiológicos, como por exemplo, na neurotransmissão no sistema nervoso periférico.

Os primeiros complexos de rutênio a entrarem em fase de estudos clínicos contra o câncer são o NAMI-A ($\text{trans-[RuCl}_4\text{(DMSO)(Im)]ImH}$, onde Im=imidazolo) e KP1019 ($\text{trans-[RuCl}_4\text{(Ind)}_2\text{]IndH}$, onde Ind=imidazolo). Além de possíveis aplicações contra diferentes tipos de câncer, os complexos de rutênio tem demonstrado grande potencial no tratamento de tuberculose, quando comparados a drogas já utilizadas que apresentam efeitos colaterais

severos e a bactéria (*Mycobacterium tuberculosis*) responsável pela doença tem demonstrado resistência. (NASCIMENTO, et al., 2008; PAVAN et al., 2010, 2011; SANTOS, et al., 2013).

2.2 Quinolonas

O surgimento das quinolonas aconteceu acidentalmente, através do produto secundário da síntese de um agente antimalárico, de atividade antibacteriana conhecida e comprovada, a cloroquina. A substância foi descoberta por George Lesher em 1962 em uma destilação, durante a síntese da cloroquina. No entanto, viu-se que este produto secundário possuía atividade antimicrobiana, surgindo assim a primeira quinolona: o Ácido Nalidíxico (ANDRIOLE, 2000; HIGGINS et al., 2003). Estudos sistemáticos de modificação em sua molécula produziram compostos que aumentam a potência e o espectro de ação, ampliando as aplicações terapêuticas das quinolonas.

As quinolonas são agentes antimicrobianos usados no tratamento de infecção urinária (SMITHSON et al., 2011), prostatite, uretrite, cistite, faringite, gastroenterite e algumas podem ser usadas em casos de infecções sistêmicas (TAVARES, 1996; GILMAN, 1996). Essa classe de antimicrobiano apresenta reconhecida atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PATRICK, 2005; HUANG et al., 2012). Essa atividade se deve à capacidade que as quinolonas têm de interagir com enzimas topoisomerasas II (DNA-girase) e IV, as quais são responsáveis pelas modificações topológicas do DNA durante a síntese bacteriana (PATRICK, 2005).

Figura 3: Estrutura da primeira quinolona sintetizada, ácido nalidíxico, no ano de 1962.

O ácido nalidíxico é uma droga sintética derivada da 1,8-naftidrina e age contra muitas bactérias Gram-negativas. Foi introduzido na clínica médica em 1964, especialmente para o tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-negativas do trato urinário (ZANINI; OGA, 1985).

Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem das quinolonas por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil. As principais representantes deste grupo são a enrofloxacin usada exclusivamente na medicina veterinária (WESTROPP et al., 2012; BLONDEAU et al., 2011; GOVENDIR et al., 2011), norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin e a perfloxacin. Esta combinação levou a um maior espectro de ação, a um aumento da capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana levando, conseqüentemente, a uma melhor atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger algumas espécies Gram-positivas e atingiu um perfil farmacocinético melhor, chegando a ter uma atividade antibacteriana 1.000 vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico, seu antecessor (SOUSA, 2007). Existe, atualmente, um grande número de novas fluoroquinolonas e as modificações estruturais efetuadas permitiram que esta classe de antimicrobiano se desenvolvesse significativamente, desde os primeiros compostos sintetizados até aos novos compostos, cujo maior espectro de ação e farmacocinética permite uma única dosagem diária (SOUZA, 2005).

Figura 4: Estrutura molecular da primeira fluorquinolona sintetizada, flumequina, 1973.

As fluoroquinolonas, como já descrito acima, pertencem a uma classe de agentes antimicrobianos (CORNICK; BENTLEY, 2012) com um largo espectro de atividade contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos, assim como

micro-organismos anaeróbios, sendo a sua ação terapêutica fundamental, sobretudo em infecções causadas por micro-organismos resistentes a outras classes de fármacos (SOUZA, 2005).

Dentro da grande classe das quinolonas, vamos dar maior atenção a duas delas, a enrofloxacin e a norfloxacin, que serão objetos de estudo nesse trabalho.

2.2.1 Enrofloxacin

A enrofloxacin (ácido ciclopropil-7-(4etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-3-quinoleina carboxílico) é um antimicrobiano sintético da classe das fluoroquinolonas, de emprego exclusivo na medicina veterinária (CALSAVARA et al., 2011). Após administração o composto perde um grupo etila *in vivo* formando a ciprofloxacina. Cabe ressaltar que a ciprofloxacina é um antimicrobiano farmacologicamente ativo usado na medicina humana (OVANDO et al., 1999).

A enrofloxacin age diminuindo a atividade da DNA-girase, enzima importante na replicação do DNA, cuja inibição induz distúrbios funcionais com bloqueio de um número indeterminado de estágios da síntese do DNA, resultando na morte da bactéria (SCHEER, 1987).

A toxicidade aguda oral e parental da enrofloxacin é considerada baixa. A enrofloxacin foi amplamente investigada quanto a sua segurança de uso por Altreuther (1987), que avaliou a segurança de uso farmacológico, toxicidade aguda e subcrônica, embriotoxicidade, teratogênese e mutagênese. Efeitos adversos em animais de laboratório (ratos, macacos e porcos) somente apareceram quando a dose aplicada excedeu em 10 vezes a dose terapêutica recomendada. Estudos toxicológicos não indicam influência em parâmetros de sistemas vitais como no sistema nervoso central ou no cardiovascular. Além disso, estudos em ratos mostram que a enrofloxacin não é teratogênica ou mutagênica.

Figura 5: Estrutura molecular da enrofloxacin (à esquerda) e ciprofloxacina (à direita).

2.2.2 Norfloxacin

A norfloxacin (ácido metil-7-(1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-3-quinoleína carboxílico), é um agente antimicrobiano, que atua por inibição do DNA girase e topoisomerase IV, duas enzimas envolvidas na síntese do DNA bacteriano pertence à família das fluoroquinolonas (HIGGINS et al., 2003). É uma droga de amplo espectro utilizada no tratamento de infecções bacterianas do trato urinário, respiratório e da pele. Também é conhecida por ser eficaz no tratamento da diarreia e além disso pode tratar a conjuntiva quando administrada sob a forma de colírio. A norfloxacin porém, é ineficaz no tratamento de infecções que envolvem bactérias anaeróbias (REFAT, 2007).

Figura 6: Estrutura da norfloxacin

Após a descoberta da atividade antibacteriana da norfloxacin, inúmeros análogos foram sintetizados, identificando-se assim, posições e grupos farmacológicos e toxicológicos.

Figura 7: Relação estrutura-atividade para as quinolonas (adaptado de VIEIRA, 2007).

2.3 Modo de ação

As fluoroquinolonas atuam de modo a inibir duas enzimas essenciais a replicação do DNA bacteriano, DNA-girase e a topoisomerase IV. Ambas as enzimas são topoisomerases cuja função consiste no rompimento da ligação entre as fitas da dupla hélice de DNA, e posicionamento de outra fita dupla no local dessa ruptura (van BAMBEKE, 2005; BLONDEAU, 2004; SANDSTROM, 2003; VILLA, 2006; RAGAB; AMIN, 2004; EVSTIGNEEV, 2006).

A DNA-girase, é capaz de introduzir superespirais negativas (processo que ocorre na direção oposta à fita helicoidal de DNA) na molécula do DNA bacteriano, bem como manter o nível de espiralização, facilitar os movimentos dos complexos de replicação e transcrição, remover os “nós” que se formam no DNA bacteriano e ajudar a curvar e dobrar o mesmo (van BAMBEKE, 2005; BLONDEAU, 2004).

Já a topoisomerase IV é capaz de promover a separação do DNA-cromossômico replicado nas células-filhas respectivamente durante a divisão celular (COZZARELLI, 1980). Considerando que enquanto nos organismos Gram-negativos as fluoroquinolonas tem como foco de atuação a DNA-girase e

em organismos Gram-positivos atuam inicialmente sobre a topoisomerase IV (van BAMBEKE, 2005; REECE; MAXWELL, 1991).

As fluoroquinolonas interagem com o complexo DNA-girase/DNA-bacteriano ou com um complexo formado entre a topoisomerase IV/DNA-bacteriano para criar modificações conformacionais que inibem o processo de replicação do DNA. Dado que, essa ação é reversível quando utilizadas baixas concentrações do medicamento, e em altas concentrações resulta na morte da célula bacteriana (COURTRIGHT et al., 1998).

2.4 Propriedades físico-químicas

2.4.1 Ionização

O conhecimento das propriedades físico-químicas (propriedades ácido-base, o seu grau de ionização, o seu caráter hidro/lipofílico e a sua capacidade para complexar íons de metais) das quinolonas é de extrema importância para compreensão do modo de ação desses fármacos seja em *in vivo* como *in vitro* (DRAKOPOULOS; IOANNOU, 1997; MONTERO; FREIXAS; HERNÁNDEZ-BORRELL, 1997; PARK et al., 2002).

As fluoroquinolonas possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água, apresentam caráter anfotérico, devido à presença simultânea de um grupo carboxilato (no núcleo 4-quinolona) e um grupo amina (na posição 7 do grupo piperazina), o que possibilita a existência de mais de uma espécie em solução, em função do pH, devido à protonação/desprotonação dos grupos carboxilatos e amina, sendo possível encontrar as quinolonas em quatro formas distintas (aniônica, catiônica, zwitteriônicas e neutra) (BRIGHTY; GOOTZ, 2000; MONTERO; FREIXAS; HERNÁNDEZ-BORRELL, 1997). Os valores de pKa para estes grupos funcionais encontram-se na faixa 5,5-6,3 para o ácido carboxílico e 7,6-9,3 para o grupo amina (BRIGHTY; GOOTZ, 2000). Desta forma, quando em pH baixos, ambos os grupos encontram-se protonados, conferindo à molécula uma carga total positiva, enquanto em pH mais altos a amina se encontra sob a forma de base livre e o grupo carboxilato sob a forma de íon carboxilato, ou seja, carregado negativamente. Em extremos de pH

tendem a ser mais solúveis, enquanto no pH fisiológico (7,4) por estarem total ou parcialmente ionizadas apresentam baixa solubilidade, o que influencia diretamente na atividade biológica desses complexos (BRIGHTY; GOOTZ, 2000).

2.4.2 Complexação

Os grupos carboxilato e carbonil são sítios passíveis de complexação por diversos cátions metálicos, o que pode influenciar as propriedades farmacológicas e toxicológicas desses fármacos quando administrados sob a forma de complexo metálico (LOPÉZ-GRESA et al., 2002).

Quanto à complexação, o íon carboxilato geralmente coordena aos íons metálicos numa das seguintes formas (BEHRENS; DIAZ, 1986):

Figura 8: Diferentes modos de coordenação de metais ao grupo carboxilato das quinolonas.

O átomo de azoto na posição 4 do grupo piperazina, é facilmente ionizável, podendo também participar da complexação, no entanto a coordenação através do grupamento ácido carboxílico ou através da piridona tem maior facilidade de ocorrer (PARK et al., 2002).

A formação de complexos entre as quinolonas e íons metálicos divalentes (alcalino-terrosos e transição) tem um importante papel biológico. A capacidade de estes fármacos interagirem com alguns componentes celulares como proteínas, membranas, ácidos nucleicos, dentre outras biomoléculas também pode ser mediada através desta complexação (PARK et al., 2002; ARAYNE et al., 2009; SHAIKH et al., 2009).

2.5 Quinolonas combinadas a centros metálicos

Conhecimentos prévios a respeito do modo de ação das quinolonas e da importância dos metais de transição na química medicinal levaram pesquisadores a estudos mais aprofundados sobre o modo de coordenação das quinolonas aos íons metálicos, envolvendo diversos aspectos que vão desde o entendimento das estruturas químicas, a participação desses íons metálicos no seu modo de ação, além de estudos das propriedades biológicas apresentadas pelos complexos metálicos (SERAFIM; STANCZAK, 2009; TUREL, 2002).

Como já sabemos, a coordenação de íons metálicos a moléculas que já apresentam atividade antimicrobiana pode ser utilizada como uma importante estratégia para aumentar sua eficácia contra os mais diversos mecanismos de resistência. As quinolonas mostram-se bastante promissoras neste aspecto, uma vez que possuem grande afinidade pelos íons metálicos, facilitando assim sua coordenação a esses íons (ROCHA et al., 2011).

Segundo o que está descrito na literatura, a natureza do ligante e sua capacidade em formar quelato com o metal, favorecem a atividade antimicrobiana de complexos metálicos. Os complexos catiônicos e os dinucleares seriam também mais eficazes. Além disto, a natureza do contra-íon parece interferir na atividade biológica de complexos (SERAFIM; STANCZAK, 2009; PSOMAS et al. 1998).

Pesquisadores estudaram o papel do íon magnésio na interação quinolona-DNA. Estudos preliminares sugeriram que o Mg^{2+} funcionaria como uma espécie de ponte entre a quinolona e o grupo fosfato da cadeia de DNA e que o complexo formado poderia ser estabilizado através de interações envolvendo os anéis da quinolona e as bases nitrogenadas do DNA. Em um estudo posterior confirmou-se que o Mg^{2+} é capaz de aumentar ou diminuir a afinidade entre o DNA e a quinolona, podendo assim clivar a DNA-girase permitindo a atividade antibacteriana (PALUMBO et al. 1993).

Outro exemplo de quinolonas combinadas a íons metálicos foi a síntese de complexos de Fe^{3+} e Zn^{2+} com a fluoroquinolona estudada desse trabalho, a norfloxacin. Os complexos sintetizados apresentam fórmula molecular $[\text{Fe}(\text{nor})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Zn}(\text{nor})_2]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e foram testados *in vitro* contra bactérias de *E.coli* e *Bacillus dysenteria*, ambas bactérias Gram-negativas. Resultados mostraram que a atividade antibacteriana desses complexos foi relativamente superior à atividade antibacteriana da norfloxacin livre (KUMAR; YADAV, 2009).

Encontra-se também na literatura estudos sobre síntese, estrutura e atividade antimicrobiana de complexos de quinolonas com vários íons metálicos. O complexo de Al(III) com a ciprofloxacina aumentou a inibição de *Escherichia coli*. O complexo formado entre a norfloxacin e a prata é utilizado como agente antibacteriano em queimaduras (MA, 1997).

Em nosso laboratório foi sintetizado pela aluna Márcia Kiyoko Tanimoto, um complexo baseado na fluoroquinolona ciprofloxacina combinado ao íon Ru^{3+} . Após investigação concluiu-se que se tratava de um complexo mononuclear ligado a três moléculas de ciprofloxacina onde cada molécula desta faz duas ligações com o íon metálico, como pode ser visto na figura 2 (TANIMOTO et al., 2012).

Na grande maioria dos complexos relatados, as fluoroquinolonas se coordenam aos íons metálicos como um ligante bidentado, através dos átomos de oxigênio do grupo carboxila e da carbonila do anel. Foram encontradas algumas exceções que envolvem o átomo de nitrogênio terminal da piperazina, como nos complexos de prata com pefloxacina e de zinco com norfloxacin (TARUSHI et al., 2011).

A figura abaixo mostra um complexo mononuclear de rutênio coordenado a uma molécula quinolônica de modo bidentado, através dos átomos de oxigênio do grupo carboxila e da carbonila do anel.

Figura 9: Estruturas de Raio-x para o complexo formado entre o íon Ru(III) e o ácido nalidixico (à esquerda) e o complexo formado entre o íon Ru(III) e a cinoxacina.

Considerando o que foi discutido nesta seção, acreditamos que muito ainda pode ser investigado com relação ao papel dos íons metálicos na atividade das fluoroquinolonas e no desenvolvimento de seus complexos metálicos, que poderão vir a apresentar importante atividade antimicrobiana, anticancerígena e anti-HIV.

2.6 Biomoléculas e suas interações com complexos de coordenação

É de grande importância ter a compreensão dos possíveis modos de ação dos candidatos à metalofármacos. Para tanto, deve-se entender suas interações com possíveis alvos biológicos, incluindo aminoácidos, hormônios, peptídeos e proteínas.

A albumina sérica humana (HSA), representada na figura 10 é a proteína mais abundante no plasma, além disso, desempenha diversas funções fisiológicas: contribui para a regulação da pressão osmótica sanguínea e é a maior responsável pelo controle do pH do sangue (ULRICH, 1990). A HSA tem a habilidade de se ligar reversivelmente a vários tipos de ligantes (SCHROEDER, 1958; KLOPFENSTEIN, 1969; UNGER, 1972). Devido a essas características é possível supor que qualquer metalofármaco administrado apresentará algum tipo de interação com esta macromolécula, o que fundamentalmente poderia determinar a sua biodisponibilidade e toxicologia. No entanto, relativamente poucos estudos mecanísticos detalhados têm sido

realizados sobre tais interações, em comparação com os estudos com o DNA e nucleobases (ESPÓSITO; NAJJAR, 2002).

A natureza e a intensidade das interações fármaco-albumina influenciam significativamente a farmacocinética dos medicamentos, e os parâmetros de ligação são úteis no estudo da ligação fármaco-proteína à medida que interferem grandemente na absorção, distribuição, metabolismo e excreção, propriedades típicas de drogas (ESPÓSITO; NAJJAR, 2002).

Figura 10: Estrutura da HSA.

Em termos de carboxilatos de rutênio, as interações dos complexos $[\text{Ru}_2(\text{sulin})_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{diclofen})_4\text{Cl}]$ com a HSA foram estudadas por meio de dicroísmo circular (CD) no qual verificou-se que em presença dos compostos, a HSA tem sua estrutura secundária modificada, com perda da contribuição de α -hélice, o que dá indícios de interação com a proteína (ESPÓSITO; NAJJAR, 2002).

Já em relação às interações com a molécula de DNA, vários trabalhos publicados propõem que o rutênio é um íon metálico dotado de uma alta afinidade de ligação com essa molécula: a intercalação com bases nucleotídicas e interações superficiais com o esqueleto de fosfato do DNA, que dependem, respectivamente, da natureza dos ligantes empregados e da arquitetura tridimensional dos complexos, já foram observados (ESPÓSITO; NAJJAR, 2002).

A maioria dos trabalhos com complexos de rutênio enfatiza as ligações intercaladas ao invés das ligações auxiliares aos poliaromáticos. Porém, alguns trabalhos privilegiaram o estudo do papel das ligações auxiliares, como por exemplo, o estudo do complexo de rutênio (II)-polipiridilpaládio e a interação do mesmo com o DNA. Quando estudamos as propriedades espectrais e também a interação dos complexos de rutênio com o DNA é fundamental a compreensão e interpretação dos ligantes auxiliares.

2.7 Luminescência

O fenômeno de luminescência ocorre em certas substâncias quando seus átomos são excitados ao receberem uma quantidade de energia. Com isso, os elétrons saltam de uma camada menos energética para uma mais energética. Ao retornarem para seu estado inicial de energia, eles emitem esta diferença de energia sob a forma de um fóton. O tempo decorrido entre a excitação dos elétrons e a emissão dos fótons varia: no processo de fosforescência, a emissão de radiação ocorre com tempo de vida da ordem de 10^{-4} a 10^1 s, significativamente maior que o da fluorescência (10^{-7} a 10^{-9} s) (LAKOWICZ, 2006).

Figura 11: Diagrama de Jablonski.

No atual trabalho, o foco principal será no fenômeno de fluorescência que será explicado mais detalhadamente em seguida.

2.7.1 Fluorescência

Fluorescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado, no qual o elétron excitado preserva a orientação de spin que tinha no estado fundamental, permanecendo desemparelhado. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente com a emissão de um fóton. O tempo de vida (τ) de um fluoróforo é a média do tempo que ele passa no seu estado excitado antes de retornar ao estado fundamental (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

Fluoróforos são unidades fluorescentes, compostos por moléculas pequenas ou proteínas que conferem à molécula na qual estão introduzidos, propriedades fluorescentes (LAVIS; RAINES, 2008). Quando são expostos a uma fonte de energia eletromagnética são capazes de absorver a energia de um determinado comprimento de onda e emitir em um comprimento de onda maior, porém, com menor energia (HOLLER et al., 2009.)

Podem ser divididos em fluoróforos intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos são aqueles já pertencentes à amostra e que emitem luz naturalmente, enquanto os fluoróforos extrínsecos são inseridos na amostra desempenhando assim, a função de sonda (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

2.7.2 Fluorescência intrínseca para estudo de proteínas

Nas proteínas, existem apenas três fluoróforos intrínsecos: o triptofano, a tirosina e a fenilalanina (aminoácidos aromáticos). A fluorescência entre os aminoácidos aromáticos pode ser distinguida pelo comprimento de onda de excitação e posteriormente observação do comprimento de onda de emissão. Para estudos práticos da fluorescência, o resíduo de triptofano é o mais estudado, uma vez que a fenilalanina apresenta um rendimento quântico muito baixo e a fluorescência da tirosina também apresenta uma baixa intensidade devido à supressão que ocorre quando esse resíduo se encontra ionizado, ou

próximo de um grupo amino, um grupo carboxil ou um triptofano (FREIFELDER, 1982).

Particularizando, a fluorescência intrínseca da HSA ocorre principalmente devido a presença do resíduo de triptofano (Trp-214) na cavidade hidrofóbica (ABOU-ZIED; AL-SHIHI, 2008). A fluorescência do Trp-214 pode mudar quando a HSA interage com outras moléculas, o que é uma consequência esperada de uma mudança conformacional, associação de subunidades ou ligação a um substrato (YAN et al., 2012).

A informação principal que se obtém a partir do estudo da fluorescência intrínseca de proteínas é sobre sua conformação. Isto porque a fluorescência do triptofano e da tirosina dependem diretamente do seu ambiente (por exemplo: solvente, pH, a presença de um inibidor, uma molécula pequena ou um grupo vizinho na proteína).

2.8 Supressão de Fluorescência

A diminuição da intensidade de fluorescência pode ocorrer através de diversos processos, devido ao fenômeno de supressão. Tais processos são: reações no estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia, supressão estática (onde ocorre a formação de complexos) e supressão colisional ou dinâmica. Para ocorrer supressão colisional e/ou estática é necessário que haja um encontro entre o fluoróforo e o agente supressor, como resultado consegue-se extrair informações importante a respeito dessa interação (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

O processo não radiativo mais simples de transferência de energia é a supressão colisional (ou dinâmica) de fluorescência, que ocorre quando o agente supressor difunde-se ao fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado. Após breve contato, o fluoróforo volta ao estado fundamental sem emissão de fóton. Via de regra, a supressão colisional ocorre sem nenhuma modificação permanente na molécula, isto é, sem nenhuma reação

fotoquímica. Em termos quantitativos, a supressão de fluorescência é dada pela seguinte equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{Equação 1}$$

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente; k_q é a constante bimolecular de supressão; τ_0 e τ é o tempo de vida do fluoróforo na ausência e na presença do supressor, respectivamente; $[Q]$ é a concentração de agente supressor e K_{sv} é constante de supressão bimolecular de Stern-Volmer. k_q informa a eficiência da supressão e a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

A constante bimolecular de supressão está relacionada com a constante difusional que limita o processo bimolecular, k_{dif} , e com a eficiência dos choques que promovem a supressão, γ , através da equação:

$$k_q = \gamma k_{dif} \quad \text{Equação 2}$$

Os valores típicos de k_{dif} para fluoróforos e supressores livres é aproximadamente $2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$. Se o fluoróforo está ligado à superfície de uma proteína, k_{dif} será aproximadamente metade deste valor devido superfície disponível ocupada pela proteína. Se o fluoróforo está no interior da proteína, o valor de k_{dif} será ainda menor, dependendo da acessibilidade do fluoróforo.

Para processos de supressão de fluorescência do tipo dinâmico, os valores de k_q serão obrigatoriamente mais baixos que os valores da constante difusional, visto que os valores de γ sempre serão menores que 1. Nesse caso tem-se que o tempo de contanto entre o fluoróforo e o supressor é muito curto para que o supressor se difunda ao fluoróforo e forme um complexo, ou seja, está ocorrendo apenas choques com transferência de energia entre supressor e fluoróforo, sem a formação de complexos.

Na supressão estática de fluorescência verifica-se a formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor. Quando este absorve luz,

rapidamente volta ao seu estado fundamental sem que haja a emissão de fóton. Nesse caso, a supressão de fluorescência ocorre devido à redução do número de moléculas fluorescentes no estado fundamental, contrariamente ao que ocorre no processo de supressão dinâmico.

A supressão de fluorescência estática ocorre da seguinte forma:

A partir da equação 3, tem-se que a constante de equilíbrio, K_{sv} , deste processo é:

$$K_{sv} = \frac{[(F-Q)]}{[F][Q]} \quad \text{Equação 5}$$

Considerando que a concentração total do fluoróforo seja:

$$[F]_0 = [F] + [(F - Q)] \quad \text{Equação 6}$$

Substituindo as concentrações pelas intensidades de fluorescência, pode-se rearranjar a equação da constante de equilíbrio, obtendo-se:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Equação 7}$$

Comparando-se a equação acima com a obtida para a supressão dinâmica conclui-se que a dependência com a concentração do supressor destes dois processos é igual, exceto que a constante de supressão (K_{sv}), para um mecanismo de supressão estático, corresponde à constante de associação (K_a) do complexo formado.

Nem sempre ocorre apenas um mecanismo de supressão de fluorescência, em alguns sistemas poderão coexistir os dois tipos de processos de supressão simultaneamente. Nesses casos a equação de supressão será:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{sv}[Q])(1 + K_a[Q]) =$$

$$1 + (K_{sv} + K_a)[Q] + K_{sv}K_a[Q]^2$$

Equação 8

É importante ressaltar que a existência dos dois tipos de mecanismos de supressão de fluorescência num sistema, resulta em um ajuste não linear e um desvio positivo da equação de Stern-Volmer (SHEEHAN, 2009).

A melhor forma de se fazer a distinção entre os mecanismos estático e dinâmico é através de medidas de tempo de vida: a supressão de fluorescência estática retira uma fração dos fluoróforos observados, uma vez que, os fluoróforos complexados não apresentam fluorescência, observando-se assim somente a fluorescência dos fluoróforos não complexados. A fração de fluoróforos não complexada não é perturbada, e o tempo de vida permanecerá constante e igual a τ_0 . Então para supressão estática temos: $\tau_0/\tau = 1$. Em contraste para a supressão dinâmica tem-se $\tau_0/\tau = F_0/F$ (SHEEHAN, 2009; LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

A distinção entre os dois processos de supressão também pode ser feita através da relação da dependência de K_{sv} em função da temperatura. O processo de supressão dinâmico depende da colisão entre o fluoróforo e o supressor resultando na diminuição de fluorescência do sistema. Este processo é controlado pela difusão, que aumenta com a temperatura. Por outro lado, no processo estático, tem-se a formação de um complexo entre o supressor e o fluoróforo, que tem sua formação desfavorecida com o aumento da temperatura, devido a menor estabilidade do complexo. Portanto, quando K_{sv} aumenta com a elevação da temperatura tem-se um processo de supressão de fluorescência predominantemente dinâmico, já quando ocorre diminuição nos valores da constante de K_{sv} com o aumento da temperatura tem-se um processo de supressão do tipo estático (SHEEHAN, 2009).

Outra forma de distinção entre a supressão estática e dinâmica envolve a análise dos espectros de absorção do fluoróforo e supressor. A supressão dinâmica tem influência apenas sobre os estados excitados dos fluoróforos, ou

seja, não se observa mudança alguma no espectro de absorção. Já no processo estático a formação do complexo no estado fundamental geralmente resulta em diferenças no espectro de absorção do fluoróforo (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

Outra característica que faz que o gráfico de Stern-Volmer desvie da linearidade acontece quando há duas ou mais classes de fluoróforos, cujas acessibilidades ao supressor não são iguais (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

3 OBJETIVOS

- ✓ Síntese do candidato a metalofármaco $[Ru(enro)_3].nH_2O$, a partir da combinação do íon rutênio(III) com a fluoroquinolona enrofloxacina;
- ✓ Purificação do composto obtido por cromatografia de exclusão;
- ✓ Caracterização estrutural do complexo;
- ✓ Investigar a interação do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ com a albumina humana (HSA), analisando esta interação através da técnica de luminescência, mais especificamente pelo estudo da supressão da luminescência dos resíduos de triptofano. Para tanto serão determinadas as constantes de formação dos complexos formados entre o supressor e a HSA e as constantes de velocidade (Stern-Volmer);
- ✓ Determinação do tipo de supressão de fluorescência através de medidas do tempo de vida do estado excitado da albumina sérica humana (HSA).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Rotas Sintéticas

4.1.1 Síntese 1: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow$ $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

A síntese retratada a seguir foi realizada segundo o procedimento descrito por Chatta e colaboradores: pesou-se 0,1034 g de RuCl_3 (0,4984 mmol) em um béquer e solubilizou-se em água. Em seguida, pesou-se 0,5407 g de enrofloxacin (1,504 mmol) e suspendeu-se também em água. A solução de cloreto de rutênio e a suspensão de enrofloxacin foram adicionadas a um balão de duas bocas de 50,0 ml e completou-se com água até um volume final de 25,0 ml. A mistura foi submetida à agitação magnética (velocidade mediana) e aquecida: a temperatura foi mantida em 100 °C e após início do refluxo foi mantida por três horas sob aquecimento. Após três horas de refluxo a solução foi resfriada e em seguida filtrada a vácuo, com papel de filtro quantitativo. O sólido retido no papel de filtro foi descartado. Em um erlemeyer contendo 300,0 ml de acetona gotejou-se o filtrado. Deixou-se em repouso na geladeira por uma noite. Após repouso, notou-se a formação de um precipitado escuro e fino. A parede do erlemeyer continha enrofloxacin cristalizada, mostrando que a reação não ocorreu como se esperava. Filtrou-se novamente, separou-se o sólido escuro deixando-o secar a massa constante por aproximadamente cinco dias sob vácuo em dessecador contendo sílica gel ($\eta = 23,80 \%$, equivalente a 0,1393 g) (CHATTAH, et al., 2007).

Para purificação do complexo fez-se cromatografia por exclusão. Usou-se a água como fase móvel e a Sephadex G-10 como fase estacionária. A Sephadex G-10 foi escolhida por reter moléculas de até $700 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Assim, as moléculas de enrofloxacin ($\text{MM} = 359,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) que não reagiram ficaram retidas na coluna e o complexo que tem massa molecular de $1.174 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ foi eluído. Depois de finalizada a cromatografia, notou-se que algumas frações recolhidas possuíam precipitado marrom ao fundo. Então, retirou-se o máximo de eluente possível com o auxílio de uma pipeta, em seguida juntou-se todo o

sólido obtido em um único balão e posteriormente realizou-se a rotaevaporação ($\eta = 3,00 \%$, equivalente a 0,0176 g).

4.1.2 Síntese 2: $\text{RuCl}_3 + \text{enrofloxacin} (\text{enro}) + \text{KOH} \rightarrow [\text{Ru}(\text{enr})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Esta síntese foi baseada em um procedimento descrito por Efthimiadou e colaboradores. Fizeram-se duas soluções: Solução 1 $\rightarrow$ Pesou-se 0,2160 g (0,6009 mmol) de enrofloxacin e 0,0340 g (0,6060 mmol) de KOH, e solubilizou-se com 10,0 ml de metanol. Solução 2 $\rightarrow$ Pesou-se 0,0415 g (0,2001 mmol) de RuCl_3 e também solubilizou-se em 10,0 ml de metanol. As duas soluções foram adicionadas a um balão volumétrico de 50,0 ml e iniciou-se o aquecimento e agitação. A temperatura foi mantida em aproximadamente 80°C . Após início do refluxo manteve-se a reação sob aquecimento e agitação por quatro horas. Resfriou-se e transferiu-se o conteúdo para um béquer para que o excesso de metanol evaporasse. Houve formação de um precipitado amarelo (EFTHIMIADOU, et al., 2008).

Fez-se a filtração a vácuo e lavou-se o precipitado retido no papel de filtro com metanol. Deixou-se secar a massa constante por dois dias sob vácuo em dessecador contendo sílica gel ($\eta = 66,23 \%$ equivalente a 0,1556 g).

4.1.3 Síntese 3: $\text{RuCl}_3 + \text{enrofloxacin} (\text{enro}) \rightarrow [\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Esta síntese foi feita seguindo o procedimento experimental adaptado por Efthimiadou e colaboradores. Pesou-se 0,2704 g (0,7523 mmol) de enrofloxacin e 0,0517 g (0,2492 mmol) de cloreto de rutênio. Os reagentes foram transferidos para um balão de 100,0 ml e adicionou-se 25,0 ml de etanol. Com o balão vedado e sem aquecimento, iniciou-se a agitação vigorosa por três horas. Notou-se a formação de um precipitado marrom escuro. Fez-se a filtração dessa solução e posteriormente lavagem do precipitado com excesso de etanol. O composto ficou secando por quatro dias sob vácuo em um dessecador contendo sílica gel, o composto final possui coloração marrom claro ($\eta = 55,17 \%$ equivalente a 0,1614 g).

4.1.4 Síntese 4: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow$ $[\text{Ru(enro)}_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Essa síntese foi realizada segundo adaptações da rota reportada anteriormente por Chattah e colaboradores onde se pesou 0,1037 g (0,4999 mmol) de cloreto de rutênio e 0,5390 g (1,499 mmol) de enrofloxacin. Em um balão de duas bocas adicionou-se os reagentes anteriormente pesados e acrescentou-se 25,0 ml de água. Iniciou-se a agitação e o aquecimento foi iniciado até atingir uma temperatura de aproximadamente 100 °C. Após início do refluxo, a reação ficou por mais seis horas sob tais condições. Após cessar o aquecimento, o balão foi resfriado e a solução foi filtrada. Nessa etapa percebeu-se que nenhuma partícula ficou retida no papel de filtro. O filtrado foi então gotejado em 100,0ml de acetona, ficando em repouso por uma noite (CHATTAH, et al.,2007).

Na manhã seguinte, realizou-se novamente a filtração e não houve retenção de nenhum sólido. Por esse motivo, decidiu-se rotavaporar a solução. Após todo o solvente ter sido evaporado, notou-se um sólido aderido na parede do balão. O balão foi mantido em um dessecador contendo sílica gel sob pressão reduzida por cinco dias, até secagem completa do sólido. Por fim, despreendeu-se o sólido da parede do balão com o auxílio de uma espátula (η =61,71 % equivalente a 0,3622 g).

Assim como na síntese 1, realizou-se a cromatografia por exclusão, usando-se a água como fase móvel e a Sephadex G-10 como fase estacionária, em seguida retirou-se espectros de infravermelho que mostraram que o produto final continuava apresentando impurezas.

4.1.5 Síntese 5: RuCl_3 + enrofloxacin (enro) $\rightarrow$ $[\text{Ru(enro)}_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Para esta síntese seguiu-se o procedimento descrito por Martins, primeiramente pesou-se 0,0642 g (0,3095 mmol) de RuCl_3 e 0,1112 g (0,3094 mmol) de enrofloxacin. Ambos foram solubilizados em 20,0 ml de acetona e transferidos para um balão. O balão, devidamente vedado, foi mantido em

”banho-maria” a 45 °C e sob agitação por 24 horas. Filtrou-se a vácuo e lavou-se o sólido retido no papel de filtro com éter etílico. Deixou-se secar a massa constante sob vácuo em dessecador contendo sílica gel ($\eta=55,03$ % equivalente a 0,1999 g) (MARTINS, 2011).

4.1.6 Síntese 6: $\text{RuCl}_3 + \text{enrofloxacin} (\text{enro}) + \text{KOH} \rightarrow [\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$.

A síntese descrita a seguir foi realizada adaptando-se a rota sintética já descrita por Efthimiadou e colaboradores: pesou-se 0,2156 g (0,5998 mmol) de enrofloxacin e 0,0336 g (0,5989 mmol) de KOH. Adicionou-se 20,0 ml de água e agitou-se por dois minutos. Após esse tempo formou-se uma suspensão. Em seguida adicionou-se 0,0413 g (0,1991 mmol) de cloreto de rutênio a suspensão previamente preparada e transferiu-a para o balão onde ocorreu a reação. A reação foi mantida sob agitação e aquecimento em 70 °C por seis horas. O aquecimento foi encerrado e a solução foi mantida em repouso e em refrigeração por uma noite. No dia seguinte, adicionou-se mais 0,0348 g (0,6203 mmol) de KOH e o aquecimento foi novamente ligado, mas agora com uma temperatura de 100 °C. Após duas horas encerrou-se o aquecimento (EFTHIMIADOU, et al., 2008).

A solução foi filtrada, e uma grande quantidade de um sólido acinzentado bem claro ficou retida no papel de filtro. O filtrado apresentou uma cor castanha, provavelmente continha RuCl_3 que não reagiu. Gotejou-se o filtrado em acetona, porém não houve a formação de precipitado. O sólido retido no papel de filtro foi seco a massa constante ($\eta=57,07$ % equivalente a 0,1334 g).

4.1.7 Síntese 7: $\text{RuCl}_3 + \text{enrofloxacin} (\text{enro}) \rightarrow [\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$.

A síntese retratada a seguir foi realizada seguindo o procedimento descrito por Uivarosi e colaboradores. Em um béquer adicionou-se 10,0 ml de água, 0,2904 g (0,8079 mmol) de enrofloxacin e 0,0938 g (0,4522 mmol) de cloreto de rutênio. O béquer foi colocado em “banho-maria”, controlando a

temperatura em aproximadamente 100 °C, até que o volume reduzisse em 5 vezes. Após essa etapa, adicionou-se a mesma quantidade de etanol (aproximadamente 6,0 ml), deixando em repouso por duas horas (UIVAROSI, et al.,2011).

Filtrou-se e lavou-se o sólido com excesso de etanol. Houve formação de um precipitado marrom escuro ($\eta=36,36\%$ equivalente a 0,1930 g).

4.2 Espectroscopia Eletrônica

Os espectros eletrônicos foram registrados em um espectrofotômetro Agilent 8453 com resolução de ± 1 nm, na região de 190 a 1100 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1 cm, todos os espectros foram obtidos utilizando-se a água como solvente. Os máximos de absorção foram determinados diretamente nos espectros obtidos e utilizados para calcular o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) obtidos a partir da Lei de Beer-Lambert.

4.3 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com Espectrofotômetro Prestige-21 Shimadzu 02190, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram feitas no estado sólido utilizando-se pastilha de brometo de potássio (KBr). Foram pesadas aproximadamente 3 mg dos complexos para 200 mg de KBr.

4.4 Espectroscopia de Luminescência

Primeiramente, para realização das medidas de espectroscopia de luminescência, foi feita uma solução estoque de albumina sérica humana em tampão fosfato (pH=7,3), com concentração final 1×10^{-4} mol L^{-1} . Pesou-se 0,0665 g de HSA e adicionou-se a massa pesada a um balão volumétrico de 10,0ml. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, adicionou-se a solução tampão gota a gota, com o máximo de cuidado para evitar agitação da solução. Esperou-se até que toda HSA fosse solubilizada e completou-se o volume até o

menisco. Posteriormente, transferiu-se 0,05ml da solução estoque para um balão volumétrico de 5,0ml e completou-se com solução tampão, resultando em uma concentração final de HSA de 1×10^{-6} mol L⁻¹.

Os espectros de luminescência foram obtidos a partir de um espectrofluorofotômetro da marca Shimadzu. 3,0 ml da solução de HSA (1×10^{-6} mol L⁻¹) foram adicionados a cubeta, onde posteriormente adicionou-se sucessivas alíquotas de uma solução (1×10^{-6} mol L⁻¹) contendo o complexo (supressor), também em tampão fosfato. Medidas foram feitas em três temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C) a fim de se entender como se dá o mecanismo de supressão desse sistema. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 280 nm e em 295 nm e as leituras de emissão de fluorescência foram realizadas na faixa entre 300 e 550 nm. O primeiro espectro foi retirado apenas com a solução de albumina, com o tempo de incubação de 1 hora, após isso, adicionaram-se sucessivas alíquotas de 2,00 µml de complexo com tempo de incubação de 20 minutos. A largura das fendas de excitação e emissão utilizadas foi de 5 nm.

Para o estudo da supressão de luminescência fez-se necessário à correção das leituras da intensidade de fluorescência devido ao efeito filtro. A fórmula abaixo foi utilizada:

$$F_{\text{corrigido}} = F_{\text{obs}} \cdot e^{\frac{(A_{\text{emissão}} + A_{\text{excitação}})}{2}} \quad \text{Equação 9}$$

onde, $F_{\text{observado}}$ é a fluorescência obtida experimentalmente para dada concentração, $A_{\text{emissão}}$ é a absorvância no valor de comprimento de onda máximo de fluorescência e $A_{\text{excitação}}$ é a absorvância para o valor de excitação do sistema (280 nm ou 295 nm) (LAKOWICZ, 2006).

4.5 Medidas de tempo de vida

O sistema utilizado para excitação consiste na utilização de um conjunto de lasers: no início do processo, um laser de diodo, com dois feixes emitindo em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de estado sólido (Nd:YVO₄ - Millenia Xs - Spectra Physics) que emite em 1064 nm. Em

seguida o feixe passa por um cristal dobrador de frequências e o feixe final, com potência máxima de 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics). O cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída. Passando por um sistema selecionador de frequências, esses pulsos de laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequências entre 0,01 e 8 MHz, que são mais adequadas ao método de contagem de fótons únicos.

Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundos e terceiros harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação de nossas amostras, 281 nm. O sinal detectado como pulso de excitação, chamado IRF (*instrument response function*), possui largura total a meia altura igual a 60 ps.

Foi utilizada uma cubeta de quartzo, fez-se uma solução estoque de HSA em tampão fosfato (pH= 7,3) de concentração conhecida, onde se adicionou alíquotas de uma solução contendo o complexo (supressor), também em tampão fosfato.

4.6 Materiais e Reagentes

Os reagentes, em grau analítico, foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia. Os reagentes e sua procedência são mostrados abaixo:

Tabela 1: Reagentes.

Reagente	Procedência
Acetona	Aldrich
Acetonitrila	J.T. Baker
Ácido Clorídrico	Aldrich
Ácido Nítrico	NEON
Albumina humana (HSA)	Sigma
Ciprofloxacina	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	NEON
Dihidrogenofosfato de potássio	Sigma
Enrofloxacina	Sigma-Aldrich
Etanol	NEON
Éter etílico	NEON
Hidróxido de potássio	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	Sigma-Aldrich
Metanol	NEON
Norfloxacina	Sigma-Aldrich
$\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Aldrich
Sephadex G-100	Sigma

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sínteses

Neste item serão apresentados os dados obtidos, a partir da espectroscopia eletrônica e vibracional, para os sólidos obtidos nas diversas tentativas de síntese. Estes dados foram utilizados para inferir a obtenção ou não do produto desejado, bem como sua pureza.

Para efeito de clareza a Tabela 2 resume as várias tentativas de síntese realizadas.

Tabela 2: *Resumo das rotas sintéticas.*

Síntese	RuCl ₃ (mmol)	Enrofloxacin (mmol)	Solvente	Temperatura (°C)	KOH (mmol)	Rendimento
1	0,4984	1,504	Água	100	-----	23,80%
	Após realização da cromatografia					3,00%
2	0,2001	0,6009	Metanol	80	0,6060	66,23%
3	0,2492	0,7523	Etanol	Ambiente	-----	55,17%
4	0,4999	1,499	Água	100	-----	61,71%
5	0,3095	0,3094	Acetona	45	-----	55,03%
6	0,1991	0,5998	Água	70/100	0,5989	57,07%
7	0,4522	0,8079	Água/ Etanol	100	-----	36,36%

5.1.1 Síntese 1

5.1.1.1 *Espectroscopia eletrônica*

Os espectros de UV-vís para as quinolonas mostram uma banda de absorção característica entre 300 e 380 nm. Um segundo máximo é observado

entre 240 e 300 nm (transições $\pi\text{-}\pi^*$), devido à absorção do anel aromático (NEUGEBAUERA et al.,2005).

Entre 300 e 380 nm a banda ocorre devido a uma transição eletrônica $n\rightarrow\pi^*$ (HOMO-LUMO) e consiste em dois picos, um quando a quinolona forma uma ligação de hidrogênio intermolecular com a molécula de água (solvente), e o outro quando a quinolona forma uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupamento ceto e o grupamento ácido carboxílico (NEUGEBAUERA et al.,2005).

O espectro eletrônico do possível complexo sintetizado $[Ru(enro)_3].nH_2O$ em água (figura 12), apresenta as bandas do ligante na região do UV em 276 nm, 316 nm e 329 nm, compatíveis com as bandas observadas para a enrofloxacin livre. A banda em 276 nm é atribuída à transições $\pi\text{-}\pi^*$, e as bandas 316 nm e 329 nm são atribuídas à transição eletrônica $n\rightarrow\pi^*$. Como não há mais sal de rutênio neste sistema não se observa bandas características na região do visível. No entanto, agora se tem um complexo de coordenação que deveria apresentar transições d-d na região do visível. Entretanto essas transições não são observadas, provavelmente estão encobertas pela absorção residual de baixa energia dos ligantes. Conclui-se, então, que essas bandas possuam um ϵ bastante baixo, muito difícil de ser calculado.

A análise do espectro eletrônico nos sugere que a reação não ocorreu como o esperado, uma vez que os espectros do possível composto sintetizado e do fármaco puro são muito parecidos.

Figura 12: Espectros eletrônicos: do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$, da enrofloxacin livre e do cloreto de rutênio em água.

Após a cromatografia fez-se outro espectro eletrônico, mostrado na figura abaixo. Observa-se que para a enrofloxacin livre e também para o complexo purificado uma banda na região de 330 nm, devido à formação de ligação de hidrogênio intermolecular entre a fluoroquinolona e moléculas de água. A banda em 316 nm não é mais observada para o complexo purificado, pois a enrofloxacin agora se encontra coordenada ao íon Ru^{3+} através do grupamento do ácido carboxílico, impossibilitando assim que haja uma ligação de hidrogênio intramolecular entre os grupamentos ceto e ácido carboxílico. Este fato é uma forte evidência de que o complexo foi realmente formado.

Figura 13: Espectros eletrônicos do complexo impuro $[Ru(enro)_3].nH_2O$, do complexo purificado $[Ru(enro)_3].nH_2O$ e da enrofloxacin livre.

5.1.1.2 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho*

As quinolonas e fluoroquinolonas apresentam espectros complexos na região do infravermelho por apresentarem vários grupos funcionais em suas moléculas. Por isso, sua análise deve ser feita com muita atenção. Dentre esses vários grupos, os mais estudados são os estiramentos das carbonilas, da piridona $\nu(\text{C=O})_p$ em torno de 1630 cm^{-1} e do ácido carboxílico $\nu(\text{COOH})$ em torno de 1725 cm^{-1} . Além desses modos vibracionais, estudam-se também os estiramentos antissimétrico e simétrico do carboxilato: $\nu(\text{O-C-O})_a$ entre $1650\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ e $\nu(\text{O-C-O})_s$ entre $1400\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (TUREL, 2002).

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é especialmente importante na caracterização de quinolonas complexadas a um ou mais íons metálicos, por evidenciar as vibrações típicas desses compostos.

A banda em 1725 cm^{-1} , referente ao estiramento $\nu(\text{COOH})$ do ácido carboxílico, tende a desaparecer em complexos metálicos com quinolonas, pois se entende que para ocorrer coordenação da quinolona a um íon metálico o grupamento carboxílico (COOH) precisa estar desprotonado, como na forma zwitteriônica de uma quinolona (COO^-). Essa ideia é fortalecida através do estudo da cristalografia por raio-X de alguns complexos metálicos de quinolonas, nos quais verifica-se que a maioria desses complexos tem a quinolona coordenada ao íon metálico através do oxigênio da carbonila da piridona e outro oxigênio da carbonila do carboxilato (TUREL, et al., 1997a). Nestes casos, o estiramento do grupo carboxílico está ausente no espectro infravermelho. Em contrapartida, em alguns casos esse estiramento é observado devido à interferência da água, o que será explicado posteriormente (TUREL, 2002; TUREL et al., 1997b; TUREL et al., 1996; TUREL; BUKOVEC, 1996).

Figura 14: Forma zwitteriônica da enrofloxacin.

A partir do que foi descrito anteriormente, analisou-se primeiramente a existência ou não da banda em torno de 1725 cm^{-1} .

A partir do espectro da enrofloxacin (figura 15(a)), observa-se uma banda forte em 1737 cm^{-1} atribuída ao estiramento do ácido carboxílico $\nu(\text{COOH})$. Esperava-se não encontrá-la no espectro do composto sintetizado (figura 15(b)), porém em 1735 cm^{-1} encontra-se uma banda forte atribuída ao estiramento $\nu(\text{COOH})$, sugerindo que o complexo encontra-se contaminado pelo ligante livre.

Por esse motivo realizou-se a cromatografia de exclusão para purificação do complexo. O espectro de infravermelho do composto após a cromatografia (figura 15(c)), não mostra nenhuma banda na região de 1725 cm^{-1} , evidenciando a eficiência do processo de purificação. O estiramento do ácido carboxílico não foi encontrado, nos permitindo afirmar que houve coordenação da enrofloxacin ao íon rutênio.

Outra importante informação retirada dos espectros de infravermelho diz respeito ao modo de coordenação da enrofloxacin ao íon rutênio. Complexos de metais de transição com ligantes carboxílicos apresentam modos vibracionais de estiramentos simétricos (ν_s) e antissimétricos (ν_a) dos ligantes carboxilatos (WEBER et al., 2002). Esses ligantes podem coordenar-se a um íon metálico de modo monodentado ou bidentado. O modo de coordenação do carboxilato ao metal pode ser identificado pela diferença entre as frequências

dos modos vibracionais dos estiramentos antissimétricos e simétricos dos grupos R-COO^- , $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)} = [\nu_{(\text{COO}^-)_a} - \nu_{(\text{COO}^-)_s}]$ (TRINCHEIRO, et al., 2004).

De acordo com NAKAMOTO, quando $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)}$ for consideravelmente maior que 164 cm^{-1} têm-se carboxilatos monodentados, já os carboxilatos bidentados quelantes apresentam $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)}$ substancialmente menor que 164 cm^{-1} . Os carboxilatos iônicos e os ligados em ponte apresentam $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)}$ em torno de 164 cm^{-1} .

A partir dos valores de $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)}$ mostrados na tabela 3, nota-se que a coordenação entre a enrofloxacin e o íon rutênio ocorre pelo grupamento do ácido carboxílico na forma desprotonada, de modo monodentado e pelo sítio ativo da piridona $\nu(\text{C=O})_p$, portanto a coordenação da enrofloxacin ao metal ocorre de modo bidentado.

Tabela 3: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre, complexo impuro $[\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$ e complexo purificado $[\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacin livre	Complexo	Complexo purificado
$\nu(\text{O-H})$	3445	3441	3431
$\nu(\text{=CH})$ e Ar-H	2969	2967	2972
$\nu(\text{COOH})$	1737	1735	—
$\nu(\text{C=O})_p$	1628	1628	1628
$\nu(\text{COO}^-)_a$	1612	1611	1584
$\nu(\text{COO}^-)_s$	1381	1383	1389
$\Delta \nu_{(\text{COO}^-)}$	231	228	272

Figura 15: Espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre, do complexo impuro $[Ru(enro)_3].nH_2O$ e do complexo purificado $[Ru(enro)_3].nH_2O$.

Porém, o rendimento do complexo purificado foi baixíssimo, obteve-se apenas 17,56 mg de complexo ($\eta=3,00\%$), tornando assim essa rota sintética inviável. A pequena quantidade de complexo formado impossibilitou fazer outras análises. Portanto, outras rotas sintéticas foram testadas, na tentativa de obtenção de complexo puro, para evitar o uso da coluna cromatográfica.

5.1.2 Síntese 2

Para essa síntese utilizou-se o hidróxido de sódio, uma base forte utilizada para desprotonar o grupamento ácido carboxílico (COOH) da enrofloxacin. A forma desprotonada é o grupo carboxi (COO⁻), que apresenta uma maior afinidade pelo metal Ru^{3+} que a forma protonada, assim espera-se que a reação aconteça mais facilmente.

5.1.2.1 Espectroscopia eletrônica

A partir dos espectros eletrônicos mostrados na figura abaixo, nota-se pequenas diferenças entre eles. A enrofloxacin livre apresenta um máximo

relativo às transições $\pi\text{-}\pi^*$ em 276nm; já o complexo obtido a partir da síntese 2 apresenta o máximo em 279nm

No entanto, essas diferenças não dão maiores informações a cerca dos complexos sintetizados, mesmo com essas diferenças eles apresentam perfis semelhantes entre si.

Figura 16: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$ – síntese 2.

5.1.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O espectro vibracional na região do infravermelho do complexo 2 (figura 17 (b)) apresenta uma grande semelhança com o espectro da enrofloxacin livre (figura 17(a)), provavelmente devido a contaminação desse pela enrofloxacin. Essa contaminação dificulta a análise comparativa entre esses dois espectros, no entanto, algumas ressalvas devem ser feitas: tanto para o complexo quanto para a enrofloxacin livre, vê-se claramente o estiramento do ácido carboxílico $\nu(\text{COOH})$ em 1731 cm^{-1} e 1737 cm^{-1} , respectivamente. Esse fato pode indicar duas coisas: 1) há uma grande quantidade de enrofloxacin livre no complexo ou 2) existem moléculas de água no complexo, promovendo a formação de ligações de hidrogênio entre o oxigênio do grupo carboxílico e o hidrogênio das moléculas de água. Portanto, se houver moléculas de água ligada ao grupamento carboxílico da quinolona, o estiramento $\nu(\text{COOH})$ pode aparecer no espectro vibracional. Por fim, a banda que aparece em 3405-3420

cm^{-1} é atribuída ao estiramento $\nu(\text{O-H})$ de moléculas de água coordenadas a um complexo quinolônico (EFTHIMIADOU et al., 2008).

Nota-se também, a partir dos valores de $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)}$ mostrados na tabela 4, que o modo de coordenação entre o íon rutênio e o carboxilato da enrofloxacin é monodentada. A coordenação com a piridona também é monodentada. Então a molécula de enrofloxacin se coordena ao metal de modo bidentado.

Tabela 4: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$ – síntese 2.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacin livre	Complexo – Síntese 2
$\nu(\text{O-H})$	3445	3444
$\nu(\text{=CH})$ e Ar-H	2969	2978
$\nu(\text{COOH})$	1737	1731
$\nu(\text{C=O})_{\text{p}}$	1628	1632
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{a}}$	1612	1613
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{s}}$	1381	1393
$\Delta \nu_{(\text{COO}^-)}$	231	220

Figura 17: Espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 2.

5.1.3 Síntese 3

Após estudos, verificou-se na literatura que Efthimiadou e colaboradores propuseram uma nova rota sintética com a utilização de solvente orgânico (etanol) ao invés de água. No artigo no qual esta rota está descrita, os autores obtiveram sucesso na obtenção do produto final, contudo esta mesma adaptação não se mostrou eficaz para a obtenção do produto final purificado.

A mudança do solvente melhorou a solubilidade da enrofloxacin (ligante). Além disso, o ponto de ebulição do etanol é mais baixo que o da água e, diante de uma possível dificuldade para se isolar o precipitado, esse fato, facilitaria secagem do meio reacional. Porém a síntese não se mostrou eficaz.

5.1.3.1 Espectroscopia eletrônica

A partir dos espectros eletrônicos mostrados na figura 18, nota-se uma pequena diferença entre eles. A enrofloxacin livre apresenta um máximo de transmitância em 276 nm já o complexo apresenta um máximo em 283 nm.

A partir da análise dos espectros eletrônicos abaixo não podemos fazer afirmações a cerca do sucesso da reação, uma vez que os espectros não apresentam grandes diferenças entre si.

Figura 18: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 3.

5.1.3.2 Cálculo do coeficiente de absortividade molar (ϵ).

Nos espectros eletrônicos mostrados anteriormente, vê-se pequenos deslocamentos entre os máximos de banda da enrofloxacin livre e os complexos sintetizados. Por esse motivo, fez-se o cálculo da absortividade molar (ϵ) - capacidade que um mol de uma determinada substância tem em absorver luz em um dado comprimento de onda - para os compostos citados acima.

A tabela abaixo apresenta os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ obtidos experimentalmente.

Tabela 5: Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e absorvidades molares observados para a enrofloxacin livre e os compostos obtidos a partir das sínteses 1,2 e 3 - $[\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$.

Complexo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Enrofloxacin livre	274	80.000
	320	28.000
	331	26.000
Síntese 1 (após cromatografia)	274	107.000
	329	41.000
Síntese 2	276	165.000
	317	50.000
	329	45.000
Síntese 3	276	111.000
	316	33.000
	329	30.000

A comparação entre o ϵ da enrofloxacin livre e dos demais complexos, evidência um aumento na absorvidade dos complexos em relação à enrofloxacin livre. A partir desse fato, pode-se inferir que a reação de fato ocorreu, formando-se um novo produto, porém, há uma grande contaminação desses complexos com a enrofloxacin livre, como mostra os espectros de infravermelho.

5.1.3.3 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho*

O espectro vibracional na região do infravermelho do complexo 3 (figura 19 (b)) pouco muda em relação aos espectros discutidos anteriormente. A partir do valor de $\Delta \nu_{(\text{COO}^-)}$ (231 cm^{-1}) para o complexo 3, temos que o grupamento carboxilato da enrofloxacin se coordena de modo monodentado ao metal rutênio e a piridona também se coordenada de modo monodentando, tendo assim uma coordenação bidentada entre a enrofloxacin e o íon rutênio.

Tabela 6: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 3.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacin livre	Complexo – Síntese 3
$\nu(O-H)$	3445	3446
$\nu(=CH)$ e Ar-H	2969	2973
$\nu(COOH)$	1737	1731
$\nu(C=O)_p$	1628	1629
$\nu(COO^-)_a$	1612	1614
$\nu(COO^-)_s$	1381	1393
$\Delta \nu(COO^-)$	231	221

Figura 19: Espectros vibracionais na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 3.

A mudança do solvente não ocasionou grandes mudanças no decorrer da reação. O espectro no infravermelho acima mostra que ainda temos uma grande contaminação no fármaco livre no complexo em estudo.

5.1.4 Síntese 4

A síntese 4 foi baseada na rota sintética descrita por Chattah e colaboradores, porém com o intuito de melhorar o rendimento do produto final optou-se por aumentar o tempo de refluxo, totalizando seis horas.

5.1.4.1 Espectroscopia eletrônica

A partir dos espectros eletrônicos mostrados na figura 20, nota-se uma diferença de apenas 4 nm entre os máximos de transmitância da enrofloxacin livre e do novo complexo sintetizado. A enrofloxacin livre apresenta um máximo em 276 nm, já o complexo apresenta um máximo em 272 nm.

O espectro eletrônico abaixo (figura 20) pouco nos informa sobre o sucesso ou não da síntese.

Figura 20: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 4.

5.1.4.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O espectro no infravermelho apresentado na figura 21 mostra claramente o estiramento do ácido carboxílico $\nu(COOH)$ em 1730 cm^{-1} , porém

como já foi mencionado anteriormente esse estiramento pode indicar a presença de água ligada ao grupamento carboxílico da quinolona ou a contaminação do complexo com o fármaco livre. Além disso, através de $\Delta \nu_{(\text{COO}^-)}$ mostrado na tabela 7, tem-se que o grupamento carboxilato da enrofloxacinina se coordena de modo monodentando ao rutênio, assim como a piridona, portanto a enrofloxacinina está ligada ao metal de modo bidentado.

Mesmo após a cromatografia o espectro manteve-se idêntico, o que indica que não houve purificação do composto.

Tabela 7: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacinina livre e do complexo $[\text{Ru}(\text{enro})_3].n\text{H}_2\text{O}$ – síntese 4.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacinina livre	Complexo – Síntese 4
$\nu(\text{O-H})$	3445	3446
$\nu(\text{=CH})$ e Ar-H	2969	2978
$\nu(\text{COOH})$	1737	1730
$\nu(\text{C=O})_{\text{p}}$	1628	1630
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{a}}$	1612	1615
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{s}}$	1381	1394
$\Delta \nu_{(\text{COO}^-)}$	231	221

Figura 21: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 4.

5.1.5 Síntese 5

Após estudos optou-se por seguir a rota sintética descrita por Martins, onde foi utilizado como solvente a acetona que é um solvente aprótico e não coordenante. O meio reacional foi aquecido através de um banho de água a 45 °C durante 24 horas. Além disso, a acetona se trata de um solvente com ponto de ebulição relativamente baixo, o que facilitaria sua retirada do meio reacional por meio de uma possível rota evaporação, caso necessário.

5.1.5.1 Espectroscopia eletrônica

O perfil do espectro eletrônico da enrofloxacin e do complexo – síntese 5, assim como para a maioria das outras sínteses, pouco consegue nos informar a respeito da reação. O perfil do complexo e da enrofloxacin são muito parecidos. Neste caso em especial, ocorre sobreposição dos máximos em 276 nm. Os máximos relativos às transições $n \rightarrow \pi^*$ também estão apresentados no mesmo comprimento de onda para a enrofloxacin livre e o complexo sintetizado.

Figura 22: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 5.

5.1.5.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O espectro de infravermelho mostra uma banda em 1728 cm^{-1} característica do estiramento do ácido carboxílico. Apesar da banda relativa ao ácido carboxílico estar presente, nota-se claramente que ela apresenta uma intensidade menor em relação às sínteses mostradas anteriormente. Esse fato pode ser explicado devido à relação estequiométrica entre rutênio e a enrofloxacin, que nesse caso foi de 1:1, nos demais casos a relação usada foi de três mols de fármaco para um mol de rutênio.

Para este complexo não conseguimos determinar qual o método de coordenação do grupamento carboxilato da enrofloxacin ao íon rutênio, uma vez que não foi possível obter-se o número de onda referente ao estiramento assimétrico do ácido carboxílico.

Tabela 8: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 5.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacin livre	Complexo – Síntese 5
$\nu(O-H)$	3445	3439
$\nu(=CH)$ e Ar-H	2969	2978
$\nu(COOH)$	1737	1728
$\nu(C=O)_p$	1628	1629
$\nu(COO^-)_a$	1612	—
$\nu(COO^-)_s$	1381	1393
$\Delta \nu(COO^-)$	231	—

Figura 23: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 5.

5.1.6 Síntese 6

Nesta síntese também foi usado o hidróxido de sódio, com intuito de desprotonar o grupamento do ácido carboxílico (COOH) da enrofloxacin e assim facilitar a coordenação ao metal Ru^{3+} . Além disso, optou-se por usar uma temperatura menor que a necessária para a ebulição da água durante 6 horas e, posteriormente, a temperatura foi elevada a 100 °C, observando-se, deste modo, refluxo.

5.1.6.1 Espectroscopia eletrônica

A figura 24 compara o complexo sintetizado a partir rota sintética 6 e a enrofloxacin livre. Para o complexo ocorre um máximo em 272 nm e para a enrofloxacin nota-se um pequeno deslocamento para 276 nm.

Para o complexo obtido da síntese 6, nota-se que os dois picos relacionados a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ (HOMO-LUMO) estão sobrepostos, diferentemente do que ocorre para a enrofloxacin livre.

Figura 24: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ – síntese 6.

5.1.6.2 Espectroscopia eletrônica na região do infravermelho

A partir dos dados mostrados na tabela abaixo, nota-se que as bandas são muito parecidas entre si, sugerindo que o complexo esteja contaminado

com a enrofloxacină livre. Através do valor de $\Delta\nu_{(\text{COO}^-)}$ chega-se a conclusão que o rutênio está coordenado ao grupamento carboxilato de forma monodentada, assim como nos demais complexos.

A tabela abaixo mostra os principais estiramentos para o complexo 6 em comparação com a enrofloxacină livre.

Tabela 9: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacină livre e do complexo $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ - síntese 6.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacină livre	Complexo – Síntese 6
$\nu(\text{O-H})$	3445	3441
$\nu(\text{=CH})$ e Ar-H	2969	2967
$\nu(\text{COOH})$	1737	1736
$\nu(\text{C=O})_{\text{p}}$	1628	1628
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{a}}$	1612	1611
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{s}}$	1381	1392
$\Delta \nu_{(\text{COO}^-)}$	231	219

Figura 25: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 6.

5.1.7 Síntese 7

Seguindo-se o que foi descrito por Uivarosi e colaboradores, realizou-se a rota sintética 7 utilizando-se primeiramente a água como solvente e após redução do volume para 1/5 adicionou-se etanol e a reação foi mantida sob aquecimento, porém não observou-se a formação do sólido desejado.

5.1.7.1 Espectroscopia eletrônica

Assim como para as sínteses anteriores, o espectro eletrônico apresentou ligeiras mudanças nos máximos, porém o perfil espectral foi bastante parecido com a da enrofloxacin livre. Sendo assim, qualquer afirmação além fica impossível de ser feita a partir dos espectros com tamanha semelhança.

Figura 26: Espectros eletrônicos da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 7.

5.1.7.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A partir dos dados apresentados na tabela abaixo, que foram retirados da figura 27, fica claro que o composto apresentasse impuro. O estiramento referente ao ácido carboxílico aparece em 1732 cm^{-1} , e apresenta uma intensidade consideravelmente alta.

Outra informação importante retirada dos dados baixo diz respeito ao modo de coordenação da enrofloxacin ao íon rutênio: o valor de $\Delta \nu_{(COO^-)}$ é 218 cm^{-1} , o que de acordo com Nakamoto indica que o grupamento carboxilato da enrofloxacin se coordena de modo monodentado ao metal rutênio. Sabe-se também que a piridona se coordenada de modo monodentando, tendo assim uma coordenação bidentada entre a enrofloxacin e o íon rutênio.

Tabela 10: Análise comparativa e atribuição tentativa das principais bandas observadas nos espectros vibracionais na região do infravermelho da enrofloxacin livre e do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ - síntese 7.

Unidade (cm^{-1})	Enrofloxacin livre	Complexo – Síntese 7
$\nu(O-H)$	3445	3441
$\nu(=CH)$ e Ar-H	2969	2974
$\nu(COOH)$	1737	1732
$\nu(C=O)_p$	1628	1632
$\nu(COO^-)_a$	1612	1612
$\nu(COO^-)_s$	1381	1394
$\Delta \nu(COO^-)$	231	218

Figura 27: Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ – síntese 7.

5.1.7.3 Cálculo da absorvidade molar

A tabela abaixo apresenta os valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ e ϵ obtidos experimentalmente para os complexos obtidos a partir da síntese 6 e 7.

Tabela 11: Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e absorvidades molares observados para a enrofloxacina livre e os compostos obtidos a partir das sínteses 6 e 7 $[\text{Ru}(\text{enro})_3] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Complexo	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{mol}^{-1}\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Enrofloxacina livre	274	80.000
	320	27.000
	331	26.000
Síntese 6	273	165.000
	322	54.000
	333	50.00
Síntese 7	273	89.000
	316	28.000
	330	25.000

A comparação entre o ϵ da enrofloxacina livre e o da síntese 6, mostra que a absorvidade molar do complexo é cerca de duas vezes maior que da enrofloxacina livre. Pelo fato de ter-se adicionado KOH nessa síntese pode-se ter ajudado a formação de um novo complexo. Já para a síntese 7 tem-se aproximadamente a mesma absorvidade molar que para a enrofloxacina livre, sugerindo que o complexo está contaminado com excesso de enrofloxacina livre.

Porém, a partir do efeito aditivo dos valores de ϵ , que se trata de um método qualitativo, não se deve inferir muito mais a respeito da estequiometria dos complexos em estudo.

Como mostrado nesse tópico, a partir das diversas sínteses retratadas acima apenas a partir da síntese 1 observa-se a formação de um complexo purificado, porém apresenta-se com um rendimento extremamente baixo. A síntese 1 foi repetida por diversas vezes porém nas demais tentativas não foi possível a obtenção de um composto puro. Por esse motivo, para realização do estudo da supressão de fluorescência com a albumina sérica humana

utilizou-se um composto análogo já sintetizado em nosso laboratório pela aluna Joana Stefani Viana Coelho.

5.2 Estudo da Fluorescência

5.2.1 Estudo da interação do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ com HSA

A técnica de espectroscopia de fluorescência é largamente utilizada para se entender como e por onde ocorre a interação entre proteína e determinada molécula. A HSA apresenta três resíduos de aminoácidos que absorvem na região do UV e emitem fluorescência, são eles: fenilalanina, tirosina e triptofano. A supressão de fluorescência está relacionada a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma amostra. (EFTINK, 1991; HU et al., 2004).

Comumente, o resíduo de triptofano (Trp-214) é o mais estudado quando se deseja entender o processo de supressão de fluorescência, pelo fato de estar localizado em uma região da HSA com características tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas. Quando a HSA é excitada em 280 nm observa-se a emissão dos resíduos de triptofano e tirosina, já quando a excitação ocorre em 295 nm a fluorescência emitida refere-se somente ao resíduo Trp-214, para os dois comprimentos de onda de excitação a emissão de fluorescência ocorre em aproximadamente 340 nm (PETERS, 1996).

Neste trabalho, fez-se estudos de interação entre o complexo de norfloxacin $[Ru(nor)_3].nH_2O$, já sintetizado pelo grupo e a HSA, com o objetivo de verificar a existência de interações e tentar compreender a natureza e a intensidade das mesmas.

A figura 28 mostra os espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo em diferentes concentrações e temperaturas, e excitação da HSA em 280 nm. Observam-se variações de intensidade de fluorescência durante a adição sucessiva de alíquotas da solução do complexo supressor. O espectro inicial (em preto) refere-se à HSA livre na ausência do

complexo (em tampão fosfato, pH= 7,24), apresentando uma intensidade máxima de fluorescência na região de 330 nm.

Com adição sucessiva de alíquotas do complexo à solução de HSA, nota-se uma diminuição gradativa da fluorescência, essa supressão ocorre devido às mudanças conformacionais do microambiente proteico próximo aos resíduos de aminoácidos, sobretudo no fragmento Trp-214. A supressão de fluorescência da HSA é uma evidência de que está havendo algum tipo de interação entre o supressor e a macromolécula de albumina.

Em contrapartida, observa-se um aumento de luminescência na região de 420 nm. Em trabalho anterior do grupo, no qual foi realizada a síntese e a caracterização do complexo em questão, mostrou-se que o complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ apresenta luminescência com máximo em 429 nm quando excitado em 344 nm, em solução de tampão fosfato pH = 7,4. Portanto, o sinal de luminescência crescente em 420 nm foi atribuído à luminescência intrínseca do complexo.

Figura 28: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ a 25 °C, 30 °C e 35 °C; $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$; $[HSA]=1,0\times10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$ e $[complexo]= 0,0\text{ mol.L}^{-1} - 2,6\times10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$.

Como observado na figura 29, para excitação em 295 nm não é possível a observação de uma linearidade da supressão de fluorescência da HSA com o aumento da concentração do complexo supressor, observam-se pequenas variações na intensidade de fluorescência, que por serem tão pequenas pode-se considerar a intensidade de fluorescência constante para todas as concentrações. Já em 420 nm nota-se um aumento gradual da fluorescência, devido à emissão do complexo.

Como já foi dito anteriormente, quando a excitação ocorre em 295 nm apenas o resíduo Trp-214 está sendo excitado. Não se observa supressão de fluorescência provavelmente pelo fato dos resíduos de Trp-214 de todas as moléculas de HSA não estarem igualmente acessíveis ao supressor. Devido ao

grande tamanho da molécula de HSA e dependendo da sua conformação ocorre favorecimento ou desfavorecimento na interação entre o fluoróforo e o supressor, a conformação da HSA está diretamente ligada à temperatura em que o sistema está sendo submetido.

Figura 29: Espectros de supressão de fluorescência da HSA na presença do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ a 25 °C, 30 °C e 35 °C; $\lambda_{exc}=295\text{ nm}$; $[HSA]=1,0 \times 10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$ e $[complexo]= 0,0\text{ mol.L}^{-1} - 2,6 \times 10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$.

A partir dos espectros de fluorescências mostrados acima, obtém-se informações importantes a respeito do comportamento do sistema HSA-complexo.

Primeiramente, através da comparação entre os gráficos de F/F_0 versus $[supressor] / [HSA]$ para os comprimentos de onda de excitação de 280 nm e 295 nm (faz-se isso para as três temperaturas de incubação), pode-se verificar

se o supressor está interagindo em apenas uma região da HSA ou em mais regiões (figura 30). Quando há sobreposição entre as curvas da intensidade de fluorescência para 280 nm e 295 nm significa que o supressor está se ligando apenas à região do triptofano (resíduo Trp-214); ao contrário, quando as curvas não se sobrepõem, o supressor pode estar interagindo em outras regiões além daquela onde está situado o triptofano (GUO et al., 2009).

Porém, como foi descrito anteriormente e mostrado nos espectros da figura 29, não se observa supressão de fluorescência quando a excitação ocorre em 295 nm, por esse motivo espera-se que não haja sobreposição das retas para os gráficos F/F_0 versus $[supressor] / [HSA]$.

Figura 30: Curvas da intensidade da fluorescência (F/F_0) em função da razão molar $[supressor]/[HSA]$ para os dois comprimentos de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ e 295 nm), para as temperaturas de incubação de 25, 30 e 35 °C.

De um modo geral, não se observa sobreposição das curvas entre os dois comprimentos de onda de excitação para cada temperatura. De acordo

com GUO et al., essa característica nos permite afirmar que o supressor pode estar interagindo em outras regiões além daquela onde está situado o triptofano.

Pelos espectros mostrados anteriormente, verifica-se a ocorrência da supressão de fluorescência, ou seja, está ocorrendo interação entre o supressor e a HSA, principalmente para excitação em 280 nm. Agora, tem-se que determinar por qual mecanismo esse efeito acontece: mecanismo estático ou dinâmico.

Para isso, os dados foram ajustados usando-se a equação de Stern-Volmer,

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Equação 10}$$

onde, F_0 corresponde à intensidade de fluorescência na ausência do complexo; F é a intensidade de fluorescência na presença do complexo; $[Q]$ é a concentração do complexo; k_q é a constante bimolecular de supressão; τ_0 é o tempo de vida médio das biomoléculas na ausência do supressor (10^{-8} s) e K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006).

A partir desse ponto, não trabalharemos mais com o comprimento de onda de excitação em 295 nm pelo fato de não se observar supressão de fluorescência considerável para as três temperaturas analisadas. Os problemas encontrados para obtenção dos dados em 295 nm refletem o fato de que, ao contrário do comportamento racionalizado pelo modelo de Stern-Volmer, os valores de F obtidos do gráfico não estão diminuindo com a adição do supressor. Entretanto, essa observação experimental provavelmente não deriva do fato de que, com excitação em 295 nm *não* ocorra a supressão. Ao contrário, o fenômeno de supressão presumivelmente é mantido. Porém, como o complexo supressor também apresenta luminescência na região (cuja intensidade deve ser aumentada pela transferência de energia de excitação através da interação com a proteína), ocorre uma sobreposição severa das bandas de emissão da proteína e do supressor, comprometendo a análise das intensidades de emissão da proteína apenas.

Dito isso, a figura abaixo mostra as curvas de Stern-Volmer somente para o comprimento de onda de excitação de 280 nm.

Figura 31: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ com $\lambda_{exc}=280nm$ e $\lambda_{em}=330nm$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C)

O gráfico da figura 31 apresenta perfil linear, portanto as retas se ajustam à equação de Stern-Volmer, indicando que pode estar ocorrendo tanto um mecanismo estático quanto um mecanismo dinâmico de supressão de fluorescência da HSA.

A partir do gráfico mostrado acima, mas agora se levando em consideração também o tempo de vida no estado excitado da HSA ($\tau_0 = 10^{-8}s$) (EFTINIK, 1991), pode-se calcular a constante de velocidade de supressão bimolecular para cada temperatura, plotando-se o gráfico de F_0/F versus $\tau_0 x [Supressor]$, temos:

Figura 32: Curvas de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da HSA para diferentes concentrações do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ para $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$ e $\lambda_{em}=330\text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35 °C), levando-se em consideração o tempo de vida do estado excitado da HSA ($\tau_0=10^{-8}\text{ s}$).

Tabela 12: Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) para diferentes temperaturas de incubação.

	$K_{sv}(10^4)$	$k_q(10^6) (\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1})$	
Temp. (°C)	280nm	280nm	R
25	1,68	4,81	0,995
30	2,49	7,69	0,997
35	5,20	15,6	0,973

R* é o coeficiente de correlação;

A magnitude da constante de K_{sv} concorda com os dados da literatura para compostos semelhantes (TUREL, et al., 1997a), sugerindo que a presença do complexo não causa grandes alterações na estrutura secundária da HSA. A partir da tabela acima, nota-se que os valores de K_{sv} crescem com o aumento da temperatura e quanto maior os valores de K_{sv} maior será a eficiência do processo de supressão de fluorescência. Provavelmente para a temperatura de 35 °C tem-se uma conformação da macromolécula de HSA

mais favorável à interação com o complexo supressor do que para temperaturas mais baixas, ou seja, em 35 °C os resíduos de triptofano e/ou tirosina podem estar mais expostos e suscetíveis a interação com o supressor.

Além disso, o aumento da constante de Stern-Volmer devido ao aumento da temperatura sugere um mecanismo de supressão de fluorescência dinâmico. Esse aumento no valor das constantes pode ser explicado pela maior difusão do supressor quando em altas temperaturas e consequentemente ocorrerá um maior número de choques entre o supressor e a HSA (HOU, et al., 2008).

A partir da comparação da constante de velocidade de supressão bimolecular com a constante difusional ($k_{dif} = 2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) que limita o processo bimolecular (LAKOWICZ, 2006), também podemos inferir por qual mecanismo a supressão de fluorescência está ocorrendo. No sistema em estudo, observa-se que os valores da constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q) são significativamente menores que o valor da constante de difusão (k_{dif}). Isso mostra que o processo dinâmico é predominante na supressão da fluorescência da HSA pelo complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$. Como mostrado na equação 2, quando o processo de supressão é do tipo dinâmico a constante de velocidade de supressão bimolecular apresenta-se menor que a constante difusional, pois multiplicamos k_{dif} pela eficiência de choques efetivos que promovem a supressão e este valor sempre será menor que 1 (o valor 1 corresponderia a 100% de eficiência de supressão).

O choque entre as moléculas é extremamente rápido, possibilitando apenas a transferência de energia entre fluoróforo e supressor, essa característica sugere, portanto, que o processo de supressão de fluorescência é do tipo dinâmico.

Quando as moléculas se ligam de forma independente a um conjunto de sítios equivalentes em uma macromolécula, o equilíbrio entre as moléculas livres e as moléculas ligadas é dado pela equação:

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação 11}$$

onde, F e F_0 são as intensidades de fluorescência na presença e na ausência do supressor, respectivamente; K_b é a constante de ligação aparente do supressor à HSA; n é o numero de potenciais sítios de ligação à HSA e $[Q]$ é a concentração do supressor.

Figura 33: Gráfico do $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log [\text{supressor}]$, para $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C).

Tabela 13: Constantes de ligação (K_b) e números de sítios de ligação do supressor (n).

Temp. (°C)	$K_b(\text{M}^{-1})$	R^*	SD^{**}	N	SD^{***}
25	$4,20 \times 10^4$	0,999	$0,14 \times 10^4$	1,30	0,029
30	$1,20 \times 10^4$	0,998	$0,23 \times 10^4$	1,15	0,045
35	$0,14 \times 10^4$	0,999	$0,04 \times 10^4$	0,91	0,007

R^* é o coeficiente de correlação; SD^{**} é o desvio padrão para os valores de K_b ; SD^{***} é o desvio padrão para os valores de n .

Segundo a literatura, os valores de k_b para sistemas em que a HSA está presente variam entre 10^4 M^{-1} e 10^6 M^{-1} (OLSON; CHRIST, 1996), porém frequentemente esse valor encontra-se mais próximos de 10^4 M^{-1} . Com base nos valores mostrados na tabela acima, nota-se que os resultados obtidos estão de acordo com o relatado.

A partir desses valores mostrados na tabela 13, nota-se que k_b decresce com o aumento da temperatura. Esse fato corrobora com o que foi dito até agora. Em outras palavras, para a temperatura de 35 °C temos uma constante de ligação baixa, então a afinidade de ligação entre supressor e HSA é diminuída, e consequentemente a formação de complexos prejudicada. O aumento da temperatura eleva o número de choques entre supressor e proteína, portanto, com o aumento da temperatura há predominância de um mecanismo de supressão dinâmico (GUO, et al., 2009; HOU, et al., 2008).

O número de sítios de ligação (n) para as três temperaturas de incubação estão próximos de 1, o que sugere que o complexo está se ligando à HSA na proporção de 1:1. Ao que tudo indica a supressão de fluorescência esta ocorrendo apenas na região dos resíduos de triptofano. A pequena flutuação de valores observados para o número de sítios de ligação pode ser explicada pela mudança de conformação da albumina que modifica o modo de interação entre o fluoróforo e o supressor. O supressor pode não penetrar o interior hidrofóbico da proteína, e somente os fluoróforos localizados na superfície da proteína terão sua fluorescência suprimida.

Em geral, quatro tipos de forças são responsáveis por unir uma molécula a uma proteína, são elas: forças eletrostáticas, forças de van der Waals, forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (HOU, et al., 2008; YU, et al., 2012; KALAMUR, et al., 2010). O estudo de fluorescência em diferentes temperaturas permite o cálculo dos parâmetros termodinâmicos, como a variação de energia livre (ΔG), variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS). ΔG descreve a espontaneidade do processo, enquanto ΔH e ΔS caracterizam as forças ou tipos de ligações que estão sendo formadas (HU, et al., 2009). Valores de ΔH e $\Delta S > 0$ indicam forças hidrofóbicas, ΔH e $\Delta S < 0$ sugerem forças de van der Waals e ligações de hidrogênio e $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ refletem forças eletrostáticas (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981).

Conforme descrito no parágrafo acima, as Interações Hidrofóbicas ocorrem quando ΔH e $\Delta S > 0$. Quando $\Delta H > 0$ temos um processo endotérmico, ou seja, a somatória da energia da quebra das ligações é maior que a somatória da energia necessária para formação das mesmas. Valores

positivos de ΔS indicam um aumento da “desordem” do sistema em estudo. Quando uma molécula hidrofóbica é inserida em um meio aquoso, ocorre quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Em seguida as moléculas de água irão se ligar novamente para formar uma esfera de solvatação ao redor da molécula hidrofóbica. Quando essa esfera de solvatação é formada ocorre um rearranjo entre as moléculas de H_2O , que aumenta a organização desse sistema, portanto, diminui a “desordem” do sistema ($\Delta S < 0$).

A mudança de entalpia do sistema poderá ser positiva, negativa ou igual a zero, porém esta mudança é insignificante para determinação das espontaneidade da ligação, visto que o valor de ΔS é grande, então $\Delta G > 0$.

Porém, para que haja interação entre duas moléculas hidrofóbicas é necessário que as esferas de solvatação dessas duas moléculas sejam desfeitas, ou seja, ocorrerá a quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água que as formam. A aproximação entre duas moléculas hidrofóbicas promove o colapso da estrutura organizada da esfera de solvatação, permitindo assim a interação entre elas. O colapso da esfera de solvatação aumenta a desordem do sistema, portanto, $\Delta S > 0$.

A soma da entalpia da quebra das ligações entre as moléculas de água é maior que a soma das entalpias da interação entre as moléculas hidrofóbicas, então temos, $\Delta H > 0$ (o valor de ΔH é maior que zero, porém apresenta valor baixo).

No caso das ligações de hidrogênio e forças de van der Waals a formação das ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$), entre as moléculas de água e também entre moléculas de água e outras moléculas, diminuem a entalpia do sistema, pois a formação dessas ligações é um processo exotérmico. Ao mesmo tempo está ocorrendo uma organização entre as moléculas que estão se ligando, diminuindo assim a entropia do sistema, temos $\Delta S < 0$.

O mesmo ocorre com as interações de van der Waals, a aproximação/interação entre moléculas polarizadas é entalpicamente negativa, pois se trata um processo exotérmico. A aproximação/interação entre essas

moléculas, de certa forma, organiza o sistema, diminuindo assim a desordem do mesmo.

Por fim, para ocorrer interação eletrostática é necessário que ocorra a quebra da esfera de solvatação dos íons (cátions e/ou ânions), o que provoca uma desorganização das moléculas de água que constituíam essa esfera e consequentemente ΔS será positivo. A entalpia terá valores negativos (processo exotérmico), pois a somatória das interações/ligações formadas entre as espécies carregadas é maior que a somatória das ligações rompidas entre as moléculas de água da esfera de solvatação.

Para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos, usou-se a equação de van't Hoff, descrita abaixo:

$$\ln k_b = -\frac{\Delta H^\theta}{RT} + \frac{\Delta S^\theta}{R} \quad \text{Equação 12}$$

onde K_b é a constante de ligação; T é a temperatura em Kelvin; R é a constante dos gases ($8,31447 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$); ΔH é a variação de entalpia e ΔS a variação de entropia do sistema.

A partir desta equação, construiu-se o gráfico de van't Hoff (figura 34). Por meio de seus coeficientes angular e linear foram obtidos os parâmetros termodinâmicos. A variação de energia livre foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad \text{Equação 13}$$

onde T é a temperatura em Kelvin, R a constante dos gases e K é a constante de ligação.

Figura 34: Gráfico de van't Hoff, HSA ($10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e $\lambda_{\text{exc}}=280 \text{ nm}$ em diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 35°C).

Tabela 14: Parâmetros termodinâmicos da interação entre o complexo $[\text{Ru}(\text{nor})_3].n\text{H}_2\text{O}$ e HSA, para $\lambda_{\text{exc}}=280$.

Temperatura	$\Delta H \text{ (KJmol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S \text{ (Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}\text{)}$	$\Delta G \text{ (KJmol}^{-1}\text{)}$
25°C			-26,37
30°C	-259,2	-779,9	-23,66
35°C			-18,55

Os valores dos parâmetros termodinâmicos mostrados acima são todos menores que zero, mostrando que o processo de ligação entre a HSA e o complexo é espontâneo ($\Delta G < 0$) e que o caráter das forças de ligação envolvidas é de van der Waals e ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio são formadas entre os átomos eletronegativos do ligante (flúor e oxigênio) e a HSA. Já as ligações de van der Waals são formadas entre os grupos etil e propil e a HSA.

Os tratamentos matemáticos baseados no modelo de Stern-Volmer indicam que o processo predominante de supressão de fluorescência é o dinâmico, porém a melhor maneira de fazer a distinção entre os mecanismos estático e dinâmico é através de medidas de tempo de vida.

Como foi dito anteriormente, com o aumento da temperatura, há um aumento nos valores de k_q , em outras palavras, a temperaturas mais elevadas, há maior eficiência na extinção de fluorescência, devido à dificuldade de formação um complexo não-fluorescente no estado fundamental. Baixas temperaturas favorecem a formação de um complexo no estado fundamental e o tempo de vida nesses casos não se altera como pode ser observado na figura abaixo.

Figura 35: Perfil de decaimento monoexponencial da fluorescência da HSA, $\lambda_{exc} = 281$ nm e $\lambda_{em} = 337$ nm

Como mostrado, para a temperatura de 25 °C não se observa mudanças no perfil de decaimento da fluorescência da HSA, o que caracteriza um processo de supressão de fluorescência estático. Quando ocorre a predominância do mecanismo estático há formação de complexos não fluorescentes entre o supressor e os resíduos de Trp-214, os restantes desses resíduos estão sendo excitados, porém não estão interagindo com o supressor, consequentemente o tempo de vida do estado excitado na HSA não decai.

Já para temperaturas mais elevadas, como mostrado na figura abaixo, devido à mudanças na conformação da macromolécula de HSA e a menor estabilidade dos complexos, ocorre predominantemente choques rápidos e com transferência de energia entre o supressor e a HSA. A transferência de energia do fluoróforo para o supressor diminui o tempo de vida do estado

excitado da HSA, caracterizando assim a predominância do mecanismo dinâmico.

Figura 36: Perfil de decaimento monoexponencial da fluorescência da HSA, $\lambda_{exc} = 281$ nm e $\lambda_{em} = 337$ nm

A partir do gráfico abaixo, vemos claramente a diminuição do tempo de vida do estado excitado da HSA com o aumento da concentração do supressor.

Figura 37: Gráfico do tempo de vida da HSA em função da concentração do supressor para temperatura de 37 °C.

Então, de acordo com os dados obtidos pelas curvas do tempo de vida tem-se a predominância do mecanismo de supressão estática para temperaturas menores e com o aumento da temperatura predomina o

mecanismo de supressão dinâmico. A conclusão, a partir dos dados de tempo de vida da HSA, de que os dois mecanismos de supressão ocorrem para o sistema em estudo aparentemente contradiz a conclusão de que apenas o mecanismo dinâmico ocorre, conforme foi demonstrado anteriormente.

Essa aparente contradição nos mostra as limitações do tratamento convencional de Stern-Volmer para sistemas onde a molécula supressora também apresenta luminescência intrínseca. No nosso caso, não observamos desvio da linearidade nos gráficos de Stern-Volmer (figura 31) para excitação em 280 nm, que sinalizassem dependência quadrática com a concentração de supressor. Se esse fosse o caso, seria possível inferir a ocorrência dos dois mecanismos. A análise da dependência de K_{sv} com a temperatura e a comparação da constante de supressão com k_{dif} também sugerem a ocorrência exclusiva do mecanismo de supressão dinâmico.

Entretanto, embora tenhamos conseguido fazer um ajuste relativamente bom dos dados experimentais pelo tratamento convencional de Stern-Volmer, em alguns casos (como na temperatura de 30 °C para excitação em 280 nm), para conseguirmos tal ajuste utilizou-se um número pequeno de pontos experimentais. Isso se deve, provavelmente, à grande sobreposição observada entre os espectros de emissão da proteína e supressor, que faz com que a curva de fluorescência da albumina apresente uma diminuição de intensidade de fluorescência aparente menor do que realmente deveria ser. Esse efeito é tão severo para a excitação em 295 nm (comprimento de onda mais próximo do próprio comprimento de onda de excitação do complexo supressor) que nem sequer foi possível levar adiante a análise de Stern-Volmer para os dados coletados neste comprimento de onda de excitação.

Além deste fato, há também no presente caso, uma grande sobreposição entre o espectro de absorção UV-Vis do complexo e o espectro de emissão de fluorescência da HSA, como mostrado na figura abaixo. Embora essa sobreposição seja um pré-requisito para os processos de transferência de energia, ela também pode implicar em efeito filtro severo, comprometendo a obtenção de valores realistas de intensidade de emissão a partir dos dados

experimentais, mesmo utilizando-se a fórmula de correção apresentada no item de materiais e métodos.

Figura 38: Espectros de emissão da HSA e de absorção do complexo supressor.

Feitas as devidas ressalvas, acredita-se que as medidas de tempo de vida estejam menos sujeitas a desvios decorrentes da influência da luminescência do próprio complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ e, portanto, os resultados obtidos através destes experimentos são mais confiáveis. Isso leva à conclusão de que ambos os mecanismos de supressão, estático e dinâmico, ocorrem e que a predominância de um ou de outro é dependente da temperatura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síntese do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ foi realizada com sucesso pela rota 1, porém a purificação se fez necessária para se obter um complexo livre de contaminantes e/ou moléculas de fármaco livres. Através dos espectros de infravermelho conseguimos entender o modo pelo qual a enrofloxacin se coordena ao íon rutênio, tem-se um complexo mononuclear, onde se tem três moléculas de enrofloxacin ligadas de modo bidentado ao metal.

Entretanto, a pequena quantidade do complexo $[Ru(enro)_3].nH_2O$ isolado puro após o procedimento cromatografia de exclusão, impediu que a investigação da interação deste complexo de enrofloxacin com HSA fosse realizada neste momento. Optou-se então por realizar esta investigação com o complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ (nor = norfloxacin), cuja síntese, purificação e caracterização haviam sido objeto de estudo de um trabalho anterior orientado pela professora Sofia Nikolaou e desenvolvido pela aluna Joana Stefani Viana Coelho.

O estudo de supressão de fluorescência mostrou, por meio de espectros de emissão da HSA, que com a adição sucessiva de alíquotas do complexo $[Ru(nor)_3].nH_2O$ à solução de HSA, há uma redução gradual da luminescência da HSA, devido a alterações da conformação do microambiente da proteína próximas aos resíduos de aminoácido. As análises só puderam ser feitas de modo confiável para excitação em 280 nm, uma vez que para 295 nm a intensidade de luminescência do próprio complexo se mostra alta, promovendo uma sobreposição significativa das bandas de emissão da proteína e do complexo.

Com o aumento da temperatura há um aumento nos valores de K_{SV} , indicando que o mecanismo de supressão predominante é o dinâmico. A análise dos valores das constantes de velocidade de supressão bimolecular (k_q) corrobora com o fato do mecanismo de supressão de fluorescência ser dinâmico, pois k_q é menor que o valor da constante de difusão (k_{dif}). E após a determinação dos tempos de vida, pode-se concluir que o mecanismo de supressão predominante é o dinâmico a temperaturas maiores.

A magnitude da constante de K_{SV} concorda com os dados da literatura para compostos semelhantes (TUREL, et al., 1997a), sugerindo que a presença do complexo não causa grandes alterações na estrutura secundária da HSA.

Pelos parâmetros termodinâmicos obtidos experimentalmente, conclui-se que as interações entre a HSA e o complexo é espontânea, e forças de van der Waals e ligações de hidrogênio estão envolvidas na ligação HSA-complexo.

7 REFERÊNCIAS

ABOU-ZIED, O.K.; AL-SHIHI, O.I.K. **Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded and refolded states using small molecular probes.** Journal of American Chemical Society, v.130, p.10793-10801, 2008.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. **Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects.** Platinum Metals Review, v.45, p.62-69, 2001.

ALTREUTHER, P. **Data on chemistry and toxicology of baytril.** Veterinary Medicine Review, v.2, p.87-89, 1987.

ANDRIOLE, V.T. **The quinolones.** 3^oed. Maryland Hights: Elsevier, 2000.

ARAYNE, S.; SULTANA, N.; HAROON, U.; MESAİK, M.A. **Synthesis, characterization, antibacterial and anti-inflammatory activities of enoxacin metal complexes.** Bioinorganic Chemistry and Applications, p.1-6, 2009.

de ARAÚJO, A.S. **Síntese e caracterização de complexos de rutênio com ligantes fenólicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, Brasil, 2008.

BAILEY, V. M. R.; GALANG, J. L. C.; DOAN, P. E.; CLARKE, M. J. **¹H and ³¹P NMR and EPR of pentaammineruthenium(III) complexes of endocyclically coordinated nucleotides, nucleosides, and related heterocyclic bases. autoxidation of [(GuoN₇)(NH₃)₅Ru(III)] (Guo = Guanosine). crystal structure of [MeGuoN₉(NH₃)₅Ru]Cl₃·3H₂O.** Inorganic Chemistry, v.36, p.1873-1883, 1997.

BASTOS, C. M.; GORDON, K. A.; OCAIN, T. D. **Synthesis and immunosuppressive activity of ruthenium complexes.** Bioorganic Medicine Chemistry Letters, v.8, p.147-150, 1998.

BEHRENS, N.B.; DIAZ, G.M.; GOODGAME, D.M.L. **Metal complexes of the antibiotic nalidixic acid.** Inorganica Chimica Acta, v.125, p.21-26, 1986.

BLONDEAU, J.M.; BORSOS, S.; BLONDEAU, L.D.; BLONDEAU, B.J. **In vitro killing of escherichia coli, staphylococcus pseudintermedius and pseudomonas aeruginosa by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat.** Veterinary Microbiology, v.155, p.284-290, 2012.

BLONDEAU, JM. **Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance.** Survey of Ophthalmology, v.49, p.S73-S78, 2004.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; LUNARDI, C. N.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. **Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex.** Nitric Oxide, v.15, p.387-394, 2006.

BRIGHTY, K.E.; GOOTZ, T.D. **Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials, in the quinolones.** 3^o ed. T.A. Vincent, 2000.

van BAMBEKE, F.; MICHOT, J.M.; van ELDERE, J.; TULKENS, P.M. **Quinolones in 2005: an update.** Clinical Microbiology and Infection, v.11, p.256-280, 2005.

CALSAVARA, L.P.V.; ZANIN, G.M.; de MORAES, F.F. **Enrofloxacin inclusion complexes with cyclodextrins.** Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v.73, p.219-224, 2012.

CARBALO, M.; VILAPLANA, R.; MARQUEZ, G.; CONDE, M.; BEDOYA, F. J.; G ONZALEZ-VILCHEZ, F.; SOBRINO, F. **A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumor activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils.** Biochemical Journal, v.328, p.559-564, 1997.

CHATTAH, A.K.; LINCK, Y.G.; MONTI, G.A.; LEVSTEIN, P.R.; BREDÁ, S.A. MANZO, R.H.; OLIVERA, M.E. **NMR and IR characterization of the aluminium complexes of norfloxacin and ciprofloxacin fluoroquinolones.** Magnetic Resonance in Chemistry, v.45, p.850-859, 2007.

CORNICK, J.E.; BENTLEY, S.D. **Streptococcus pneumoniae: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides**. Microbes and Infection, v.14, p.573-583, 2012.

COZZARELLI, N.R. **DNA gyrase and the supercoiling of DNA**. Science, v.207, p.953-960, 1980.

DRAKOPOULOS, A.I.; IOANNOU, P.C. **Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution**. Analytica Chimica Acta, v.354, p.197-204, 1997.

EFTHIMIADOU, E.K.; KARALIOTA, A.; PSOMAS, G. **Mononuclear metal complexes of the second-generation quinolone antibacterial agent enrofloxacin: Synthesis, structure, antibacterial activity and interaction with DNA**. Polyhedron, v.27, p.1729-1738, 2008.

EFTNIK, M. R. **Fluorescence quenching reactions: probing biological macromolecular structures**. Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy, p.1-41, 1991.

ESPÓSITO, B. P.; NAJJAR, R. **Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin**. Coordination Chemistry Reviews, v.232, p.137-149, 2002.

EVSTIGNEEV, M.P.; RYBAKOVA, K.A.; DAVIES, P.B. **Complexation of norfloxacin with DNA in the presence of caffeine**. Biophysical Chemistry, v.121, p.84–95, 2006.

FREIFELDER, D.M. **Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology**, 1982.

FRICKER, S. P.; SLADE, E.; POWELL, N. A.; VAUGHAN, O. J.; HENDERSON, G.R.; MURRER, B. A.; MEGSON, I. L.; BISLAND, S. K.; FLITNEY, F. W. **Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: a potential therapeutic approach to nitric oxide mediated diseases**. British Journal of Pharmacology, v.122, p.1441-1449, 1997.

GALEANO, A.; BERGER, M. R.; KEPPLER, B. K. **Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines in vitro.** Arzneimittel-Forschung, v.42, p.821-824, 1992.

GILMAN, A.G.A. **Quimioterapia das doenças microbianas. As bases farmacológicas da terapêutica**, 9ª. ed., McGraw-Hill, p.783-789, 1996.

GOVENDIR, M.; HANSEN, T.; KIMBLE, B.; NORRIS, J.M.; BARAL, R.M.; WIGNEY, D.I.; GOTTLIEB, S.; MALIK, R. **Susceptibility of rapidly growing mycobacteria isolated from cats and dogs, to ciprofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin.** Veterinary Microbiology, v.147, p.113-118, 2011.

GROESSL, M.; REISNER, E.; HARTINGER, C. G.; EICHINGER, R.; SEMENOVA, O.; TIMERBAEV, A. R.; JAKUPEC, M. A.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K. J. **Structure-activity relationships for NAMI-A-type complexes (HL) [*trans*-RuCl₄L(S-dmso)] (L = Imidazole, Indazole, 1,2,4-Triazole, 4-Amino-1,2,4-triazole, and 1-Methyl-1,2,4-triazole): Aquation, redox properties, protein binding, and antiproliferative activity.** Medicinal Chemistry, v.50, p.2185-2193, 2007.

GUO, X.; ZHANG, L.; SUN, X.; HAN, X.; GUO, C.; KANG, P. **Spectroscopic studies on the interaction between sodium ozagrel and bovine serum albumin.** Journal of Molecular Structure, v. 928, p.114-120, 2009

HAMBLEY, T.W. **Metal-based therapeutics.** Science, v.318, p.1392-1393, 2007.

HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. **Fluoroquinolones: structure and target sites.** Current Drug Targets, v.4, p.181-190, 2003.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A. AND CROUCH, S. R. **Princípio de Análise Instrumental**, 6ª ed., 2009.

HOSAHALLI, R.V.; BYADAGI, K.S.; NANDIBEWOR, S.T.; CHIMATADAR, S.A. **Kinetics and mechanism of ruthenium(iii) catalyzed oxidation of chloromphenicol—an antibiotic drug by diperiodatocuprate(III) in aqueous alkaline medium.** Kinetics and Catalysis, v.53, p.65-74, 2012.

HOU, H.N.; QI, Z.D.; OUYANG, Y.W.; LIAO, F.L.; ZHANG, Y.; LIU, C. **Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 47, p.134-139, 2008.

HU, Y.J.; LIU, YI; WANG, J.-B.; XIAO, X.H.; QU, S.S. **Study of the interaction between monoammonium glycyrrhizinate and bovine serum albumin.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.36, p.915–919, 2004

HU, Y.; XU, S.; ZHU, X.; GONG, A. **Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v.74, p.526-531, 2009.

HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYENTAYEV, T.; TANAKA, M.; HAMBLIM, M.R. **Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria.** Lasers in Surgery and Medicine, v.44, p.490-499, 2012.

KALANUR, S. S.; SEETHARAMAPPA, J.; KALALBANDI, V. K. A. **Characterization of interaction and the effect of carbamazepine on the structure of human serum albumin.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.53, p.660–666, 2010.

KLOPFENSTEIN, W.E. **Enthalpy change of binding lysolecithin to serum albumin.** Biochimica Biophysica Acta, v.181, p. 323-325, 1969.

KUMAR, A.; YADAV, D.S. **Metal complexes with the fluoroquinolone antibacterial agent norfloxacin: synthesis, structure and bioactivity.** International Journal of Chemistry, v.7, p.19-27, 2009.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 3^o ed, 2006.

LAVIS, L.D.; RAINES, R.T. **Bright ideas for chemical biology,** ACS Chemical Biology, v.3, p.142-155, 2008.

LÓPEZ-GRESA, M.P.; ORTIZ, R; PERELLÓ, L.; LATORRE, J.; LIU-GONZÁLEZ, M.; GARCIA-GRANDA, S.; PÉREZ-PRIEDE, M.; CANTÓN, E. **Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents**

(cinoxacin and ciprofloxacin): spectroscopic and x-ray structural characterization. antibacterial studies. Journal of Inorganic Biochemistry, v.92, p.65-74, 2002.

LUDWIG, G.; KALUDEROVIC, G.N.; BETTE, M.; BLOCK, M.; PASCHKE, R.; STEINBORN, D. **Highly active neutral ruthenium(ii) arene complexes: synthesis, characterization, and investigation of their anticancer properties.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.113, p.77-82, 2012.

MARTINS, D.A. **Complexos de Cu(II) de algumas fluorquinolonas: sínteses, atividade anti-*T.cruzi* e investigação do mecanismo de ação.** Dissertação (Mestrado em Química, Área: Química Inorgânica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2011.

MEIER, S.M.; HANIF, M.; KANDIOLLER, W.; KEPPLER, B.K.; HARTINGER, C.G. **Biomolecule binding vs. anticancer activity: Reactions of Ru(arene)[(thio)pyr-(id)one] compounds with amino acids and proteins.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.108, p.91-95, 2012.

MISHRA, L.; SINHA, R.; ITOKAWA, H.; BASTOW, K.F.; TACHIBANA, Y.; NAKANISHI, Y.; KILGORE, N.; LEE, K.H. **Anti-HIV and cytotoxic activities of Ru(II)/Ru(III) polypyridyl complexes containing 2,6-(2'-benzimidazolyl)-pyridine/chalcone as co-ligand.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.9, p.1667-1671, 2001.

MORAIS, T.S.; SILVA, T.J.L.; MARQUES, F.; ROBALO, M.P.; AVECILLA, F.; MADEIRA, P.J.A.; MENDES, P.J.G.; SANTOS, I.; GARCIA, M.H. **Synthesis of organometallic ruthenium(ii) complexes with strong activity against several human cancer cell lines.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.114, p.65-74, 2012.

MUTHUKUMAR, M.; VISWANATHAMURTHI, P. **Spectral, catalytic, and antifungal studies of ruthenium(ii) chalcone complexes.** Journal of Coordination Chemistry, v.63, p.1263-1272, 2010.

do NASCIMENTO, F.B.; von POELHSITZ, G.; PAVAN, F.R. **Synthesis, characterization, X-ray structure and in vitro antimycobacterial and**

antitumoral activities of Ru(III) phosphine/diimine complexes containing the “SpymMe₂” ligand, SpymMe₂=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine.

Journal of Inorganic Biochemistry, v.102, p.1783-1789, 2008.

NEUGEBAUERA, U.; SZEGHALMIB, A.; SCHMITT, M.; KIEFER, W.; POPP, J.; HOLZGRABE, U. **Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones.** Spectrochimica Acta Part A, v.61, p.1505-1517, 2005.

OLSON, R. E.; CHRIST, D. D. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v.31, p.327-336, 1996.

ORVIG, C.; ABRAMS, M.J. **Medicinal inorganic chemistry: Introduction.** Chemical Reviews, v.90, p.2201-2204, 1999.

OVANDO, H.G.; GORLA, N.; LURDES, C.; POLONI, G.; ERRECALDE, C.; PRIETO, G.; PUELLES, I. **Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens.** Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v.22, p.209-212, 1999.

PALUMBO, M.; GATTO, B.; ZAGOTTO, G.; PALÚ, G. **On the mechanism of action of quinolone drugs.** Trends Microbiological, v.6, p.232-235, 1993.

PARK, H.R.; KIM, T.H.; BARK, K.M. **Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments.** European Journal of Medicinal Chemistry, v.37, p.443-460, 2002.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**, Oxford University Press: New York, cap.16, 2005.

PAVAN, F.R.; von POELHSITZ, G.; BARBOSA, M.I.F. **Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agent against tuberculosis.** European Journal of Medicinal Chemistry, v.46, p.5099-5017, 2011.

PAVAN, F.R.; von POELHSITZ, G.; do NASCIMENTO, F.B. **Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes as antimycobacterial agents.** European Journal of Medicinal Chemistry, v.45, p.598-601, 2010.

PETERS, T. J. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. San Diego: Academic Press, 1996.

PSOMAS, G. **Mononuclear metal complexes with ciprofloxacin: synthesis, characterization and DNA-binding properties**. Journal of Inorganic Biochemistry, v.102, p.1798-811, 2008.

PSOMAS, G.; DENDRINO-SAMARA, C.; ALEXIOU, M.; RAPTOPOULOU, C.P.; TERZIS, A.; KESSISSOGLU, D.P. **The First fused dimer metallacrown $\text{NiI}_2(\text{mcpa})_2(\text{CH}_3\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})[\text{12-MCNi(II)N(shi)}_2(\text{pko})_{2-4}]$ [12-MCNi(II)N(shi) $_3$ (pko) $_{-4}$]**. Inorganic Chemistry, v.37, p.6556-6557, 1998.

RAGAB, G.H.; AMIN, A.S. **Atomic absorption spectroscopic, conductometric and colorimetric methods for determination of fluoroquinolone antibiotics using ammonium reineckate ion-pair complex formation**. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v.60, p.973-978, 2004.

REECE, R.J.; MAXWELL, A. **DNA gyrase: structure and function**. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v.26, p.335-375, 1991.

REFAT, M. S. **Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): Spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity**. Spectrochimica Acta Part A, v.68, p.1393-1405, 2007.

RENFREW, A.N.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; DYSON, P.J. **Adding diversity to ruthenium(II)arene anticancer (RAPTA) compounds via click chemistry: The influence of hydrophobic chains**. Journal of Organometallic Chemistry, v.696, p.772-779, 2011.

ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; de OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W. **Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana**. Química Nova, v. 34, p.111-118, 2011.

ROSS, P.D.; SUBRAMANIAN, S. **Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability**. Biochemistry, v.20, p.3096-3102, 1981.

SADLER, Z.; GUO, P.J. **Metals in medicine**. 38: Angewandte Chemie International Edition, v.38, p.1512-1531, 1999.

SANDSTROM, K.; WARMLANDER, S.; LEIJON, M.; GRASLUND, A. **¹H NMR studies of selective interactions of norfloxacin with double-stranded DNA**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.304, p.55-59, 2003.

SANTOS, R. L. S. R. **Metalofármacos de rutênio (II,III): síntese, caracterização e interação com biomoléculas e ciclodextrinas**. Tese (Doutorado em Química, Área: Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012.

SCHEER, K.S.M.; HAZAN, R.; RASKA, I.; HANSMANN, P.; FALK, H.; SPIESS, E.; FRANKE, W. **High sensitivity immunolocalization of double and single stranded DNA by a monoclonal antibody**. European Journal Cell Biology, v.43, p.358-371, 1987.

SEDDON, E. A.; SEDDON, K. R. **The chemistry of ruthenium**. Elsevier, Amsterdam, 1984.

SERAFIN, A.; STANCZAK, A. **The complexes of metal ions with fluoroquinolones**. Russian Journal of Coordination Chemistry, v.35, p.81-95, 2009.

SHAIKH, A.; GIRIDHAR, R.; MEGRAUD, F.; YADAV, M.R. **Metalloantibiotics: synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of bismuth-fluoroquinolone complexes against helicobacter pylori**. Acta Pharmaceutica, v.59, p.259-271, 2009.

SMALLEY, K.S.M.; CONTRACTOR, R.; HAASS, N.K.; KULP, N.A.; ATILLAGOKCUMEN, G.E.; WILLIAMS, D.S.; BREGMAN, H.; FLAHERTY, K.T.; SOENGAS, M.S.; MEGGERS, E.; HERLVN, M. **An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells**. Cancer Research, v.67, p.209-217, 2007.

SMITHSON, A.; CHICO, C.; RAMOS, J.; NETTO, C.; SANCHEZ, M.; RUIZ, J.; PORRON, R.; BASTIDA, M.T. **Prevalence and risk factors for quinolone**

resistance among Escherichia coli strains isolated from males with community febrile urinary tract infection. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, v.31, p.423-430, 2012.

SOUSA, I.C. **Interacção da enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar, Área: Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal, 2007.

SOUZA, M.V.N. **New fluoroquinolones: A class of potent antibiotics.** Minireviews in Medicinal Chemistry, v.5, p.1019-1017, 2005.

dos SANTOS, E.R.; MONDELI, M.A.; POZZI, L.V. **New ruthenium(II)/phosphines/diimines complexes: Promising antitumor (human breast cancer) and mycobacterium tuberculosis fighting agents.** Polyhedron, v.51, p.292-297, 2013.

TANIMOTO, M. K.; DIAS, K.; DOVIDAUSKUS, S.; NIKOLAOU, S. **Tuning the reaction products of ruthenium and ciprofloxacin for studies of DNA interactions.** Journal of Coordination Chemistry, v.65, p.1504-1517, 2012.

TARUSHI, A.; POLATOGLU, E.; KLJUN, J.; TUREL, I.; PSOMAS, G.; KESSISSOGLU, D.P. **Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: Structure and biological evaluation.** Dalton Trans., v.40, p.9461-9473, 2011.

TAVARES, W.; **Quinolonas in: manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos.** 2ª ed., São Paulo, Atheneu, p.684-713, 1996.

TRINCHEIRO, A.; BARBOSA, S.; FINI, A. **Spectroscopic behavior of copper complexes of non steroidal anti-inflammatory drugs.** Biopolymers, v.74, p.273-282, 1994.

TUREL, I.; BUKOVEC, P. **Comparison of the thermal stability of ciprofloxacin and its compounds.** Thermochimica Acta, v.287, p.311-318, 1996.

TUREL, I.; LEBAN, I.; BUKOVEC, P. **Synthesis, crystal structure, and characterization oh three novel compounds of the quinolone family member (norfloxacin).** Journal of Inorganic Biochemistry, v.61, p.197-212, 1996.

TUREL, I.; BUKOVEC, P.; QUIRÓS, M. **Crystal structure of ciprofloxacin hexahydrate and its characterization.** International Journal of Pharmaceutics, v.152, p.59-65, 1997. (a)

TUREL, I.; LEBAN, I.; BUKOVEC, N. **Crystal structure and characterization of the bismuth (III) compound with the quinolone family member.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.66, p.241-245, 1997. (b)

TUREL, I. **The interactions of metal íons with quinolone antibacterial agents.** Coordination Chemistry Reviews, v.232, p.27-47, 2002.

UIVAROSI, V.; BADEA, M.; OLAR, R.; MARINESCU, D.; NICOLESCU, T.O. **Thermal degradation behavior of some ruthenium complexes with fluoroquinolone derivatives as potential antitumor agents.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v.105, p.645-650, 2011.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications.** 1^o ed., 2001.

VIEIRA, L. M. M. **Síntese e caracterização de complexos de paládio (II), platina (II), zinco (II) e cobre (II) com ligantes do grupo das fluorquinolonas.** Dissertação (Mestrado em Química, Área: Química Inorgânica) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil, 2007.

VILA, J.; SANCHEZ-CESPEDES, J.; SIERRA, J.M.; PIQUERAS, M.; NICOLÁS, E.; FREIXAS, J.; GIRALT, E. **Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bactéria.** International Journal of Antimicrobial Agents, v.28, p. 19-24, 2006.

ZANINI, A. C., OGA, S. **Farmacologia aplicada.** 3^o ed. São Paulo: Atheneu Editora, p.449-487, 1985.

WEDER, J.E.; DILLON, C.T.; HAMBLEY, T.W.; KINNEDY, B.J. LAY, P.A.; BIFFIN, J.R.; REGTOP, H.L.; DAVIES, N.M. **Cooper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized.** Coordination Chemistry Reviews, v.232, p.95-125, 2002.

WEI, M.Y.; GUO, L.H.; FAMOURI, P. **DNA biosensors based on metallo-intercalator probes and electrocatalytic amplification.** Microchimica Acta, v.172, p. 247-260, 2010.

WENZEL, M.; BERTRAND, B. EYMIN, M.; COMTE, V.; HARVEY, J.A.; RICHARD, P.; GROESSL, M.; ZAVA, O.; AMROUCHE, H.; HARVEY, P.D.; GENDRE, P.; PICQUET, M.; CASINI, A. **Multinuclear cytotoxic metallodrugs: physicochemical characterization and biological properties of novel heteronuclear gold-titanium complexes.** Inorganic Chemistry, v.50, p.9472-9480, 2011.

WESTROPP, J.L.; SYKES, J.E.; IROM, S.; DANIELS, J.B.; SMITH, A.; KEIL, D.; SETTJE, T.; WANG, T.; CHEW, D.J. **Evaluation of the efficacy and safety of high dose short duration enrofloxacin treatment regimen for uncomplicated urinary tract infections in dogs.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v.26, p.506-512, 2012.

YAN, L.; WANG, X.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; GUO, Z. **Cytotoxic palladium(II) complexes of 8-aminoquinoline derivatives and the interaction with human serum albumin.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.106, p.46-51, 2012.

YU, X.; LU, S.; YANG, Y.; LI, X.; Y, P. **Study on the interaction between NCP-(4-hydroxycoumarins) and bovine serum albumin by spectroscopic techniques.** Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v.91, p.113-117, 2012.