

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

“PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE
COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II): *trans*-[RuCl₂(nic)₄] E *trans*-[RuCl₂(i-
nic)₄]”

GLAUCO DAMIANI SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CRICIÚMA - SANTA CATARINA
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**“PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE
COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II): *trans*-[RuCl₂(nic)₄] E *trans*-[RuCl₂(i-
nic)₄]”**

Glauco Damiani Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula

Co-orientador:

Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA - SANTA CATARINA

2007

**“PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE
COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II): *trans*-[RuCl₂(nic)₄] E *trans*-[RuCl₂(i-
nic)₄]”**

Glauco Damiani Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade do Extremo Sul
Catarinense como requisito à obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula

Co-orientador:

Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA - SANTA CATARINA

2007

À minha esposa Graziela pela compreensão e por ter sempre me amparado nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais, Fernando e Elaine, por acreditarem e me apoiarem sempre.

À minha vó Gema e à meu vô Lady (*in memorian*).

“And in the end, the love you take is equal to the love you make”

“E no final, o amor que você leva é igual ao amor que você fez”

John Lennon /Paul McCartney

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à minha esposa Graziela por me dar a certeza de que mesmo em uma tormenta o sol brilha. Agradeço aos meus pais e avôs pela educação e apoio irrestrito em minha vida.

Agradeço ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Marcos (Bocão) por iluminar o caminho certo quando minha jornada parecia sem rumo. Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Quevedo por sanar minhas dúvidas.

Agradeço à Maria Cristina, minha colega nesta empreitada, pelo apoio e amizade.

Sincera gratidão a Danon e Maykon que mostraram-se incansáveis em me ajudar. À Angeles por não medir esforços em auxiliar-me.

Agradecimentos a Paulo e João por compreenderem minhas ausências nos meus horários.

RESUMO

Muitos efeitos biológicos são atribuídos aos complexos de rutênio A (*trans*-[RuCl₂(nic)₄]) e B (*trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]), onde nic: ácido piridina-3-carboxílico e i-nic: ácido piridina-4-carboxílico, incluindo a inibição da óxido nítrico sintetase. Neste estudo, nós avaliamos os efeitos farmacológicos destes complexos na ansiedade e na formação de memória, além de avaliarmos os efeitos pró e anti oxidantes dos mesmos. A memória foi avaliada com os testes da esQUIVA inibitória e habituação em campo aberto e a ansiedade foi testada com o labirinto elevado. Ratos Wistar machos adultos (230 a 321g) receberam injeções intraperitoneais do veículo, do complexo A (45.2, 90.4 ou 180.7 µmol/Kg), ou complexo B (0.08, 4.5 ou 13.6 µmol/Kg) 30 min antes do treinamento no campo aberto ou do teste do labirinto elevado e 30 min antes ou imediatamente após a sessão de treinamento. Nenhum efeito foi observado nos parâmetros de ansiedade e habituação em campo aberto. Os complexos de rutênio pioraram a retenção de memória quando comparados com o grupo controle na esQUIVA inibitória, quando os complexos foram administrados 30 min antes e imediatamente após o treino. A piora da retenção de memória induzida pelos complexos de rutênio deve estar associada com a capacidade destes complexos inibirem a óxido nítrico sintetase. Para avaliação de danos lipídicos utilizou-se a medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e danos a proteínas (CARBONIL). Para a determinação das defesas antioxidantes enzimáticas utilizou-se a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Ambos os complexos, A e B, danificaram lipídeos e proteínas e alteraram as defesas antioxidantes enzimáticas.

ABSTRACT

Many biological effects have been attributed to ruthenium complex A (*trans*-[RuCl₂(nic)₄]) and ruthenium complex B (*trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]) including nitric oxide synthase inhibition. In this study, we evaluated pharmacological effects of these complexes on anxiety and memory formation, and its pro and antioxidants effects. Memory was evaluated with inhibitory avoidance and habituation to an open-field and anxiety was tested with elevated plus-maze. Adult male rats Wistar (230 to 321g) received ip injections of vehicle, ruthenium complex I (45.2, 90.4 or 180.7 μmol/Kg), or ruthenium complex II (0.08, 4.5 or 13.6 μmol/Kg) 30 min prior open-field training or elevated plus-maze test and 30 min prior or immediately after the training session. No effects were observed in the anxiety parameters and habituation to an open-field. The ruthenium complexes impaired memory retention compared with vehicle group in the inhibitory avoidance, as when administrated 30 min prior as immediately after training. The memory impairment induced by ruthenium complexes may be due to their nitric oxide synthase inhibition capacity. For evaluation of lipids damages was use the measurement of thiobarbituric reactive species and carbonyl for protein damages. To determinate the enzymatic antioxidants defense was used the superoxide dismutases (SOD) and catalases (CAT). Both complexes, A and B, have caused a lipid and protein damages and changes the enzymatic antioxidants defense.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química geral proposta para os complexos de fórmula geral $trans-[RuCl_2(L)_4]$	22
Figura 2: Estruturas químicas gerais propostas para os complexos $trans-[RuCl_2(dinic)_4]$ (1) e $trans-[RuCl_2(idinic)_4]Cl$ (2).	23
Figura 3: Reação de Haber-Weiss.	24
Figura 4: Estrutura química proposta para o $trans-[RuCl_2(nic)_4]$	33
Figura 5: Estrutura química proposta para o $trans-[RuCl_2(i-nic)_4]$	33
Figura 6: Espectros eletrônicos para os complexos A e B em acetona.....	43
Figura 7: Voltamograma cíclico do complexo A obtido em pH 5,46.	45
Figura 8: Voltamograma cíclico do complexo B obtido em pH 6,25.	46
Figura 9: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Os animais receberam complexo A ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.....	47
Figura 10: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Os animais receberam complexo A ou veículo imediatamente após a sessão de treinamento.....	48
Figura 11: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Complexo B ou veículo injetado 30 minutos antes da sessão de treinamento.	49
Figura 12: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Complexo B ou veículo injetado imediatamente após a sessão de treinamento.....	49

Figura 13: Número de cruzamentos e “rearings” apresentados pelos animais. Os animais receberam o complexo A ou o veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.	50
Figura 14: Número de cruzamentos e “rearings” apresentados pelos animais. Os animais receberam o complexo B ou o veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.	51
Figura 15: Gráfico apresenta o número de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto elevado, assim como o número total de entradas em ambos os braços. Os animais receberam o complexo A ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.	52
Figura 16: Gráfico apresenta o tempo gasto, em segundos, pelos animais nos braços abertos e nos braços fechados. Os animais receberam complexo A ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.	52
Figura 17: Gráfico apresenta o número de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto elevado, assim como o número total de entradas em ambos os braços. Os animais receberam complexo B ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.	53
Figura 18: Gráfico apresenta o tempo gasto, em segundos, pelos animais nos braços abertos e nos braços fechados. Os animais receberam complexo B ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.	53
Figura 19: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no sistema nervoso central em presença do composto A.	54
Figura 20: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em órgãos na presença do composto A.....	55

Figura 21: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no sistema nervoso central em presença do composto B.	56
Figura 22: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em órgãos na presença do composto B.....	56
Figura 23: Quantidade de carbonil nas estruturas do SNC em presença do complexo A.	57
Figura 24: Quantidade de carbonil nos órgãos em presença do complexo A.	58
Figura 25: Quantidade de carbonil nas estruturas do SNC em presença do complexo B.	59
Figura 26: Quantidade de carbonil nos órgãos em presença do complexo B.	59
Figura 27: Atividade da SOD nas estruturas do SNC na presença do composto A.	60
Figura 28: Atividade da SOD nos órgãos na presença do composto A.....	61
Figura 29: Atividade da SOD nas estruturas do SNC na presença do composto B.	62
Figura 30: Atividade da SOD nos órgãos na presença do composto B.....	62
Figura 31: Atividade da catalase nas estruturas do SNC em presença do complexo A.....	63
Figura 32: Atividade da catalase nos órgãos em presença do complexo A.	64
Figura 33: Atividade da catalase nas estruturas do SNC em presença do complexo B.....	65
Figura 34: Atividade da catalase nos órgãos em presença do complexo B.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise Elementar de CHN para os complexos A e B.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

CAT – catalase

Cu/ZnSOD – cobre/zinco superóxido dismutase

DINIC - ácido piridina-3,5 dicarboxílico

DNA – ácido desoxirribonucléico

ecNOS – óxido nítrico sintetase endotelial constitutiva

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo

GPX – glutaciona peroxidase

GSH – glutaciona reduzida

GTP – guanosina trifosfato

IDINIC - ácido piridina-3-4 dicarboxílico

INIC – ácido piridina-4-carboxílico

iNOS – óxido nítrico sintetase induzida

ip – intraperitonal

LPO – lipoperoxidação

MDA – malondialdeído

MnSOD – manganês superóxido dismutase

NAC – N-acetilcisteína

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NIC – ácido piridina-3-carboxílico

nNOS – óxido nítrico sintetase neuronal

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintetase

O₂ – oxigênio molecular

O₂⁻ - superóxido

OH[•] – radical hidroxil

SNAP – S-nitroso-N-DL-penicilamina

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
PARTE I.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. COMPLEXOS METÁLICOS DE INTERESSE BIOLÓGICO.....	19
1.2. COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	20
1.2.1. COMPLEXOS DE RUTÊNIO E O ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	24
1.2.2. COMPLEXOS DE RUTÊNIO E OS RADICAIS LIVRES.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
PARTE II.....	29
CAPÍTULO I.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. REAGENTES.....	30
3.2. EQUIPAMENTOS.....	30

3.3. SÍNTESE DO trans-DICLORO TETRAQUIS ÁCIDO-3-PIRIDINA CARBOXÍLICO RUTÊNIO (II) (COMPLEXO A).....	31
3.4. SÍNTESE DO trans-DICLORO TETRAQUIS ÁCIDO-4-PIRIDINA CARBOXÍLICO RUTÊNIO (II) (COMPLEXO B).....	33
3.5. ANIMAIS.....	34
3.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS.....	35
3.6.1. ESQUIVA INIBITÓRIA.....	35
3.6.2. HABITUAÇÃO EM CAMPO ABERTO	35
3.6.3. TESTE DO LABIRINTO ELEVADO.....	36
3.7. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	37
3.7.1. MEDIDA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	38
3.7.2. MEDIDA DO DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS (CARBONIL) – OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
3.7.3. SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) – DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS.....	39
3.7.4. CATALASE (CAT) – DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS.....	40
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
CAPÍTULO II.....	42
4. RESULTADOS.....	42
Sínteses e caracterização espectroscópica:.....	42
Esquiva Inibitória:.....	47
Habituação em Campo Aberto:	50

Teste do Labirinto Elevado:	51
Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):	54
Medida do dano oxidativo em proteínas (carbonil):	57
Superóxido dismutase (SOD) – determinação das defesas antioxidantes enzimáticas:	60
Catalase (CAT) – determinação das defesas antioxidantes enzimáticas: ..	63
PARTE III	66
5. DISCUSSÃO	67
Caracterização Físico-Química:	67
Avaliação dos Efeitos Comportamentais e Avaliação do Estresse Oxidativo:	68
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXOS	82
8.1. ANEXO 1: Artigo publicado na revista Neurochemical Research.	82

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1. COMPLEXOS METÁLICOS DE INTERESSE BIOLÓGICO

Pesquisas sobre complexos de metais de transição têm sido o principal foco de vários grupos de pesquisa, com atenção especial no potencial terapêutico e ação biológica destes compostos (Beirith et al., 1999; Seifriz et al., 1999).

Complexos metálicos são usados comumente como medicamentos. O complexo de ouro $K[Au(CN)_2]$, por exemplo, foi introduzido na virada do século passado para o tratamento da tuberculose e logo após substituído pelos tiolatos de ouro (I), que foram usados no anos 30 para o tratamento da artrite reumatóide. Atualmente, várias formas de tiolatos de ouro (I), injetáveis ou orais, são utilizados clinicamente (Price e Sadler, 1996).

Outro exemplo é o nitroprussiato de sódio, usado especialmente em emergências de crise hipertensiva (vasodilatação), é um complexo metálico que carrega o ligante reativo, o óxido nítrico, ao seu sítio de ação (Stochel et. al., 1998).

Complexos de platina, como a cisplatina e a carboplatina, aumentaram o sucesso no tratamento de certos tipos de câncer, especialmente nos casos de câncer testicular (Price e Sadler, 1996).

Complexos metálicos que mimetizam a ação da superóxido dismutase (SOD) (Zhang e Lippard, 2003) demonstram a amplitude de atividades biológicas que esses complexos podem apresentar. Por exemplo, os complexos de vanádio

(IV) e zinco (II) que têm sido estudados para o tratamento de diabetes *mellitus*, por possuírem efeitos miméticos à insulina (Sakurai et al., 2002).

Além destes, os complexos metálicos apresentam outros usos como agentes de diagnósticos, por exemplo, o sulfato de bário insolúvel, usado como contraste para raio-X do trato gastro-intestinal (Price e Sadler, 1996; Stochel, 1998).

Diversos trabalhos (Sava et al., 1996; Carvalho et al., 1997; Sava et al., 1999; Seifriz, 1999) demonstram que alguns complexos de rutênio apresentam atividade biológica de interesse para aplicação farmacológica, como será visto no item seguinte.

1.2. COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

A química sintética dos complexos de rutênio está bem desenvolvida, principalmente a de ligantes piridínicos, o que indica a aproximação de inovadores metalofármacos. Devido a estabilização do campo ligante, os estados de oxidação mais comuns (Ru(II), Ru(III) e Ru(IV)) são normalmente octaédricos e freqüentemente inertes a substituição dos ligantes (Clarke, 2003).

Complexos de rutênio são de grande interesse, pois as propriedades destes compostos podem ser moduladas pela escolha do ligante, o que significa que estes complexos podem ser preparados visando uma vasta gama de aplicações (Beirith et al., 1999). As vantagens de se usar complexos de rutênio com ligantes piridínicos no desenvolvimento de drogas inclui: (1) possibilidade de sintetizar

complexos estáveis com previsibilidade de estruturas; (2) um conhecimento crescente sobre os efeitos biológicos dos complexos de rutênio (Clarke, 2003).

Têm-se atribuído aos complexos de rutênio a capacidade de redução de metástases de tumores pulmonares (Sava et al., 1996, 1999), e outros tipos de tumores (Alessio et al., 1989; Keppler et al., 1989). Alguns complexos de rutênio demonstraram ter um efeito similar às drogas de platina (II) já utilizadas no tratamento de tumores, porém apresentam uma toxicidade mais baixa (Brabec e Nováková, 2006). Ainda, atuam na excitação de neutrófilos humanos que penetram profundamente no tumor que está se proliferando e produzem moléculas tóxicas, como o ânion O_2^- .

É também atribuído a alguns complexos de rutênio, importantes atividades anticarcinogênicas associadas a uma alta seletividade pelas células cancerígenas (Carbalho et al., 1997); a inibição da proliferação de linhas de células cancerígenas no câncer de colo retal (Galeano et al., 1992); a ligação covalente entre moléculas, tais como a histidina ou o DNA (Heijden et al., 1993; Zhao et al., 1999) e a habilidade para interagir com proteínas como albumina (González-Vílchez et al., 1998; Trynda-Lemiesz et al., 1999) e apotransferrina (González-Vílchez et al., 1998).

Os exemplos acima demonstram o potencial terapêutico de metalofármacos a base de rutênio. Contudo, um dos fatores limitantes para a utilização clínica de diversos complexos, deve-se a baixa solubilidade em meio fisiológico (aquoso) para a maioria deles. Isto dificulta e até mesmo impede que os complexos possam ser testados *in vitro* e *in vivo* (modelos animais) em sistemas simulando condições fisiológicas. No sentido de contornar este obstáculo, nosso grupo de pesquisa tem

sintetizado novos complexos de rutênio de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄] (Figura 1), dando especial atenção a seleção adequada dos ligantes coordenados. A estratégia tem sido empregar ligantes contendo um ou mais grupos substituintes, que possam conferir solubilidade em água ao complexo. Temos obtido sucesso com o uso de ligantes derivados de ácidos piridínicos carboxílicos, isto é, contendo um ou mais grupos carboxílicos por unidade de ligante.

Dois complexos são objeto de estudo desta dissertação, a saber: *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (A) e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (B) onde nic = ácido piridina-3-carboxílico e i-nic = ácido piridina-4-carboxílico.

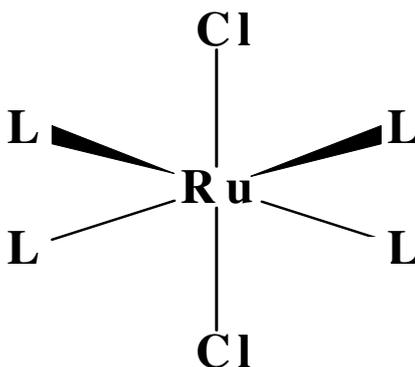


Figura 1: Estrutura química geral proposta para os complexos de fórmula geral *trans*-[RuCl₂(L)₄].

A escolha destes complexos foi feita com base em estudos anteriores, os quais demonstraram interessantes efeitos em sistemas biológicos, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (Fricker et al., 1997; Seifriz, 1999; Creczynski-Pasa et al., 2001).

Além dos complexos A e B, os complexos *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] e o *trans*-[RuCl₂(idinic)₄]Cl (Figura 2), onde dinic = ácido piridina-3,5-dicarboxílico e idinic =

ácido piridina-3,4-dicarboxílico, também foram sintetizados pelo nosso grupo, a partir de soluções de azul de rutênio como precursor. Diferente dos complexos A e B, estes complexos possuem dois grupos carboxílicos por ligante.

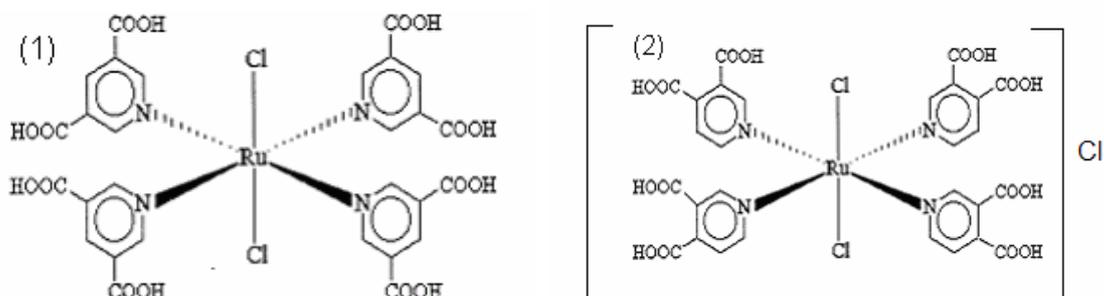


Figura 2: Estruturas químicas gerais propostas para os complexos *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (1) e *trans*-[RuCl₂(idinic)₄]Cl (2).

O complexo *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] não apresenta citotoxicidade, pelo menos em macrófagos, e não afeta significativamente a resposta motora de animais quando avaliados em teste de rota-rod, nem aumenta a latência da resposta em ensaio de placa quente (hot-plate). Ele não tem ação considerável sobre a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) ou sobre a óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), porém é capaz de capturar radicais hidroxila, sendo esta uma importante propriedade, pois esta espécie reativa de oxigênio é uma das mais agressivas em processos biológicos. Este radical é o principal produto da alta energia de ionização da água, e sua mais importante fonte é a reação de Haber-Weiss envolvendo o ânion O₂⁻ e H₂O₂ (Figura 3). Estas propriedades tornam o complexo um possível agente antioxidante com provável ação protetora do DNA (Seifriz, 1999).



Figura 3: Reação de Haber-Weiss.

O complexo *trans*-[RuCl₂(idinic)₄]Cl foi recentemente sintetizado e caracterizado pelo nosso grupo e sua atividade biológica está sendo alvo de uma dissertação de mestrado junto ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

Outros dois complexos foram sintetizados recentemente, a saber: *trans*-[RuCl₂(pyami)₄] e o *trans*-[RuCl₂(pycarb)₄] onde pyami = isonicotinamida e pycarb = piridina-4-carboxialdeído.

1.2.1. COMPLEXOS DE RUTÊNIO E O ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Os complexos de rutênio são de potencial valor terapêutico por sua habilidade de interferir com a via do óxido nítrico (NO) em sistemas biológicos (Abrams, 1996; Fricker et al., 1997).

O NO 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. Foi identificado como sendo um fator relaxante derivado 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 (Belvisi et al., 1992). Os efeitos fisiológicos do NO são atribuídos ao seu pequeno tamanho, ao

grande potencial de difusão, aliada a potente ação como radical livre (para revisão, veja Kerwin et al., 1995; Quinn et al., 1995; Christopherson e Bredt, 1997).

Em experimentos anteriores, sugeriu-se que o NO atua nos processos de memória no hipocampo (Fin et al., 1995). Como descrito anteriormente, os complexos A e B interferem na rota do NO, podendo conseqüentemente, interferir também na memória e aprendizado dos animais.

Do ponto de vista bioquímico, denomina-se óxido nítrico sintetases (NOS), uma família de enzimas complexas que catalisam a oxidação da L-arginina, formando o óxido nítrico e a L-citrulina. As três formas humanas de NOS identificadas até agora foram: óxido nítrico sintetase endotelial constitutiva (ecNOS), óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS). Estas enzimas são encontradas nos cromossomos humanos 7, 12 e 17, respectivamente, e assim foram nomeadas, com base nos tecidos dos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas (Rees et al., 1989; Cooke e Dzau, 1997).

Ficou demonstrado que os complexos A e B, sendo este último mais ativo, previnem notoriamente a atividade da óxido nítrico sintetase (NOS), e têm um pequeno tropismo pela óxido nítrico sintetase neuronal (Creczynski-Pasa et al., 2001).

Trabalhos anteriores (Seifriz et al., 1999) demonstraram que o complexo B exibe ação analgésica, além de inibir a atividade da óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e constitutiva (ecNOS). O efeito analgésico foi quase completamente revertido pelo uso da L-arginina, um conhecido precursor do NO.

Isto confirma que há mediação através da via do NO. Finalmente, não foi observada ação analgésica para o complexo A.

Quando incubados com S-nitroso-N-DL-penicilamina (SNAP), um doador de NO, os complexos A e B demonstraram um comportamento diferente. Enquanto o complexo A (em concentração maior que 100 μ M) induziu um efeito muito fraco de liberação de NO em resposta ao SNAP, o complexo B demonstrou um forte efeito em concentrações relativamente pequenas (Creczynski-Pasa et al., 2001).

Alguns complexos de rutênio são sugeridos como seqüestradores de NO por causarem um decréscimo na formação de nitrogênio pelos macrófagos (Fricker et al., 1997).

1.2.2. COMPLEXOS DE RUTÊNIO E OS RADICAIS LIVRES

A habilidade dos complexos A e B em atuarem como seqüestradores de radicais livres já foi reportada em Creczynski-Pasa et al., 2001. Ambos compostos parecem atuar como sequestradores do radical ânion superóxido e do radical hidroxila (Paula et al., 2005).

Os complexos demonstraram potencial antioxidante a partir de baixas concentrações (0,1 - 10 μ M). Os resultados ainda sugerem que o complexo A tem um poder antioxidante mais acentuado, quando comparado ao complexo B. Ambos, em altas doses (acima de 200 μ M) são genotóxicos (Paula et al., 2005).

Tendo em vista o efeito genotóxico apresentado, é razoável supor que estes complexos interagem com o DNA nas células, direta ou indiretamente. Pela via indireta, supõe-se que haja a formação de radicais livres, que por sua vez,

atuarão no DNA. Pela via direta, o complexo atua diretamente sobre proteínas que tenham função de proteção ou reparação do DNA (Amboni, 2003). Entretanto, até o momento, não foi possível estabelecer o mecanismo de ação destes complexos sobre o DNA.

Com base nos resultados apresentados acima, pode-se então justificar o interesse em dar continuidade aos estudos, ampliando e aprofundando o conhecimento da ação destes complexos sobre sistemas biológicos.

Ressalta-se que tanto o complexo A quanto o complexo B já são conhecidos da literatura (Creczynski-Pasa et al., 2001; Paula et al., 2005), porém esta será a primeira dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde a abordar estudos acerca destes complexos.

Finalmente, pretende-se gerar novos conhecimentos e aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de ação destes complexos, contribuindo para o avanço nesta área de conhecimento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade biológica *in vivo* e *in vitro* dos complexos polipiridínicos de Ru (II), a saber: *trans*-[RuCl₂(nic)₄] (A) e *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] (B), onde: nic = ácido piridina-3-carboxílico e i-nic = ácido piridina-4-carboxílico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar os complexos A e B empregando as técnicas espectroscópicas de: UV-vis, infravermelho (FTIR), RMN de ¹H e ¹³C.
- Caracterizar a atividade redox dos complexos A e B empregando a técnica de voltametria cíclica.
- Avaliar as atividades pró e antioxidantes dos complexos A e B.
- Avaliar o efeito comportamental dos complexos A e B com relação à ansiedade, formação e retenção de memória em modelos animais.

PARTE II

CAPÍTULO I

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

Os complexos A (*trans*-[RuCl₂(nic)₄]) e B (*trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]) foram sintetizados e purificados em nosso laboratório.

O RuCl₃·3H₂O (Aldrich, EUA) e os ligantes (Aldrich, 99%) foram usados sem purificação prévia. Solventes comercialmente disponíveis (F. Maia, Vetec) de grau analítico também foram empregados ao longo deste trabalho. Argônio ultra puro (White Martins) forneceu uma atmosfera inerte para as sínteses.

Nas análises espectroscópicas e eletroquímicas, foram utilizados solventes de grau espectroscópicos e cromatográficos, respectivamente. E nos estudos bioquímicos foram utilizados, em grande parte, reagentes da Sigma Companhia Química (St. Louis, MO, EUA).

3.2. EQUIPAMENTOS

Medidas de análise elementar de CHN foram realizadas em um Analisador Elementar da Perkin-Elmer, modelo 2400. Os espectros de infravermelhos foram obtidos em pastilhas de brometo de potássio (KBr) em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1GPC FTR-IR. Os espectros eletrônicos foram obtidos num espectrofotômetro UV-Vis da Carl Zeiss, modelo M500.

Espectros de RMN ^1H foram obtidos em um equipamento da Bruker AC200F, sendo que as amostras foram dissolvidas em solvente deuterado apropriado.

As técnicas mais usadas na caracterização eletroquímica dos compostos foram a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial, sendo realizadas em um Potenciostato/Galvanostato da Princeton Applied Research (PARC), modelo 273A, interfaceado a um microcomputador PC, via cartão de interface GPIB da National Instruments Co. Os dados obtidos foram tratados com o “software Analysis M270”, versão 4.0, também da PARC. Todos os experimentos foram conduzidos utilizando-se compensador de iR para minimização da queda ôhmica. A célula eletroquímica utilizada nos experimentos é convencional, com capacidade máxima para 20cm³, consistindo de três eletrodos a saber: o eletrodo de trabalho de platina (área geométrica de 0,115 cm²); o eletrodo auxiliar, que consistiu de um fio de platina e, finalmente, o eletrodo de referência, um fio de prata imerso em uma solução 0,10 mol.dm⁻³ de nitrato de prata em acetonitrila, isolado por uma membrana de Vycor[®]. As medidas foram conduzidas à temperatura ambiente.

3.3. SÍNTESE DO *trans*-DICLORO TETRAQUIS ÁCIDO-3-PIRIDINA CARBOXÍLICO RUTÊNIO (II) (COMPLEXO A)

Os passos gerais seguidos na preparação do *trans*-[RuCl₂(nic)₄] podem ser encontrados na literatura (Paula et al., 1999), entretanto foram efetuadas algumas alterações no procedimento original, como descritas a seguir. Uma solução de

azul de rutênio preparada a partir da dissolução de 260 mg (1.0 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em etanol/água (2:1 v/v), seguida de refluxo em atmosfera inerte de argônio durante aproximadamente 3 h, ou até a solução adquirir coloração azul intensa. Um indicativo da formação do intermediário “azul de rutênio” é a deposição de um “espelho metálico” nas paredes do balão, devido a formação de *clusters* de rutênio. A seguir, adicionou-se 98 mg (8.0 mmol) de ácido piridina-3-carboxílico foi adicionado. O sistema foi refluxado por aproximadamente 40 minutos, mantido sob atmosfera de argônio e vigorosa agitação. O progresso da reação foi monitorado por TLC e espectroscopia de UV-vis. O meio reacional foi resfriado por 12 horas e filtrado a vácuo para eliminar o excesso de ligante. Após, a fração líquida foi coletada e transferida para um funil de separação, a qual foi acrescentado éter etílico e água até formação de duas fases. Um volume pequeno de acetona também foi adicionado para aumentar a solubilidade do complexo na fase etérea, melhorando assim, a eficiência da extração. O sistema foi agitado vigorosamente e o complexo transferido para a fase etérea. Subseqüentemente, a fase etérea foi coletada e os passos da extração foram repetidos com a fase aquosa, até a extração total. Finalmente, a fase orgânica (etérea) foi concentrada à vácuo e o complexo A, obtido na forma de um pó amorfo. Sempre que necessário, o produto foi redissolvido em acetona e água para outra extração. O rendimento foi de 49.6% baseado na massa inicial de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

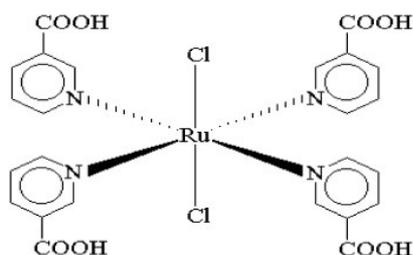


Figura 4: Estrutura química proposta para o $trans$ -[RuCl₂(nic)₄].

3.4. SÍNTESE DO $trans$ -DICLORO TETRAQUIS ÁCIDO-4-PIRIDINA CARBOXÍLICO RUTÊNIO (II) (COMPLEXO B)

O complexo B foi preparado e purificado de um modo semelhante ao complexo A, porém, o ligante usado foi o ácido piridina-4-carboxílico. Para este composto, na maioria das vezes, foi necessário dissolver o produto novamente em água e proceder a uma segunda extração com éter etílico. A fase orgânica foi evaporada e o produto final coletado. Este procedimento foi repetido até se obter um sólido de cor vermelha. Rendimento de 43.5% baseado no valor inicial de RuCl₃.3H₂O.

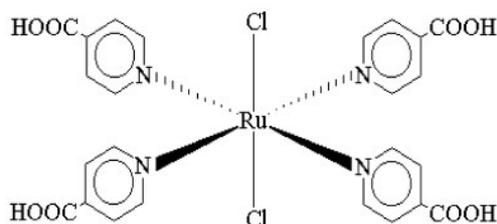


Figura 5: Estrutura química proposta para o $trans$ -[RuCl₂(i-nic)₄].

3.5. ANIMAIS

Foram empregados ratos Wistar adultos machos (230-321 g) obtidos de nossa colônia de procriação, dispostos cinco animais por gaiola com comida e água *ad libitum*, mantidos em um ciclo de luz/escuro de 12 horas (luzes às 7:00 da manhã).

Os procedimentos efetuados estiveram de acordo com um protocolo previamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os procedimentos comportamentais foram feitos entre 10:00 e 16:30 e os experimentais executados conforme o guia do Instituto Nacional de Saúde (NIH) para o cuidado e uso de animais de laboratório e as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) para cuidado de animais.

Os animais tratados foram sacrificados com uma *overdose* de Fenobarbital, posteriormente guilhotinados e seus cérebros e órgãos foram removidos. Isolou-se do sistema nervoso central o pré-frontal, o hipocampo, o córtex, o estriado e o cerebelo, também foram removidos o fígado, o rim, o pulmão, o quadríceps e o coração. As estruturas foram mantidas à -80°C até a mensuração dos parâmetros de estresse oxidativo.

Com base em estudos prévios para ter uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias, calculou-se uma amostra de 5 ratos por grupo, para obter um poder de 80%, com uma margem de erro $\alpha = 0,05$.

3.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS

3.6.1. ESQUIVA INIBITÓRIA

O aparato da esQUIVA inibitória foi uma caixa acrílica de 50x25x25cm cujo chão consiste em barras de aço paralelas (1mm de diâmetro) espaçadas de 1cm. Uma plataforma de 7cm de largura e 2,5cm de altura foi colocada no chão da caixa contra a parede esquerda. Foram colocados animais na plataforma e um dispositivo automático mediu o tempo de permanência em que os animais ficaram com todas as quatro patas na grade. Imediatamente depois de pisar abaixo da grade, nas sessões de treinamento, os animais receberam um choque de 0,4mA por 2 segundos. Na sessão de teste não foi administrado nenhum choque e a permanência (máxima 180s) era usada como uma medida de retenção (Fin et al., 1994; Jerusalinsky, 1994; Izquierdo et al., 1995; Roesler et al., 1998). O intervalo entre treinamento e teste foi de 24 horas. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de veículo, complexo A ou B 30 minutos anterior ou imediatamente após a sessão de treinamento.

3.6.2. HABITUAÇÃO EM CAMPO ABERTO

A habituação em campo aberto foi feita em um campo aberto de 40x60cm cercado por paredes de 50cm de altura feitas de madeira compensada marrom com uma parede de vidro fronteira. O chão do campo aberto foi dividido em 12 retângulos iguais através de linhas pretas. Os animais foram colocados suavemente no quadrante esquerdo da parte anterior, e deixados para explorar a

arena por 5 minutos (sessão de treinamento). Imediatamente após a exploração da arena, os animais foram levados de volta às suas gaiolas e depois de 24 h foram submetidos a uma nova sessão em campo aberto (sessão de teste). Foram contados os cruzamentos através das linhas pretas e os “rearings” (movimento exploratório em que o animal fica ereto sobre as patas traseiras) executados em ambas as sessões. Para a medição da habituação foi levada em conta a diminuição no número de cruzamentos e “rearings” entre as duas sessões (Vianna et al., 2000; 2001; Picada et al., 2002). O intervalo entre o treinamento e o teste foi de 24 h. Os animais receberam uma injeção ip de veículo, complexo A ou B 30 min antes de sessão de treinamento.

3.6.3. TESTE DO LABIRINTO ELEVADO

O aparato do teste do labirinto elevado consiste em dois braços abertos (50x10cm) e dois braços inclusos (50x10x40cm) separados por uma plataforma central (5x5cm). Os dois braços de cada tipo são opostos a um ao outro. A altura do labirinto é 50cm e os testes foram administrados sobre uma suave luz vermelha. Os animais foram deixados 5 minutos em exposição à luz vermelha em suas próprias gaiolas antes do procedimento. Logo, eles foram colocados individualmente na plataforma central do labirinto elevado que possui um braço aberto. Durante um período de teste de 5 minutos, o número de entradas nos braços abertos e fechados e o número total de entradas nos braços foram registrados (Roesler et al., 1999; 2004).

3.7. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi definido em 1991 como um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de uma diminuição dos antioxidantes e/ou da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO)/espécies reativas de nitrogênio (ERN). A diminuição dos antioxidantes pode ser causada pela diminuição da atividade das enzimas de defesa antioxidante [cobre-zinco superóxido dismutase (Cu/ZnSOD), manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GSH-Px)] ou pela deficiência nutricional de antioxidantes e/ou outros constituintes dietéticos essenciais (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutaciona, ou riboflavina, necessária para a produção de FAD, um cofator da glutaciona redutase). A produção aumentada de ERO/ERN pode ser causada pela exposição elevada de oxigênio, pela presença de toxinas que são metabolizadas para produzir ERO/ERN, ou pela excessiva ativação de sistemas “naturais” de produção de ERO/ERN (ativação inapropriada de células fagocíticas em doenças inflamatórias crônicas, como na artrite reumatóide e colite ulcerativa) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O desequilíbrio pró-oxidante pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios).

Para avaliar os possíveis danos oxidativos causados pelos complexos A e B foram utilizados os seguintes métodos: método de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dano oxidativo das proteínas através do grupo carbonil, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Os reagentes utilizados foram da marca Sigma St. Louis, MO. Glicina fornecido pela Nuclear, Diadema, SP, Brasil.

3.7.1. MEDIDA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Método utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formada durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. MDA reage com TBA gerando um produto colorido róseo.

Mediu-se a quantidade de TBARS plasmático durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Dal-Pizzol et al., 2000). As amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm.

3.7.2. MEDIDA DO DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS (CARBONIL) – OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS

Método utilizado para dosagem de oxidação de proteínas, baseia-se no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos como o carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazine.

O dano oxidativo em proteínas plasmáticas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito (Levine et al., 1990). As amostras foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370nm.

3.7.3. SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) – DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

A SOD constitui a primeira linha de defesa do organismo contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ (Hollander et al., 2000). Está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (Cu/Zn-SOD) e no meio extracelular. O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. Uma unidade de enzima é definida pela quantidade transformada em 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi estimada pela auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm) conforme previamente descrito (Lissi et al., 1995). A adrenalina é oxidada pelo $O_2^{\cdot-}$ para formar um produto róseo, adrenocromo.

3.7.4. CATALASE (CAT) – DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 . Na reação uma das moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada à oxigênio molecular e a outra é reduzida à água. Está localizada, principalmente no peroxissoma, entretanto, outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT. A catálise do H_2O_2 é importante, pois, na presença de Fe^{+2} , leva a formação do radical hidroxil ($HO\cdot$) (reação de Fenton), altamente reativo e danoso às biomoléculas. O método mede a atividade da enzima produzida pelas células e organelas em resposta a quantidade de peróxido de hidrogênio, medido espectrofotometricamente (240nm).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do teste do labirinto elevado e do campo aberto reportados foram analisadas pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste Duncan. No campo aberto, as diferenças entre as sessões de treinamento e de teste foram analisadas pelo teste t de Student. As análises dos dados obtidos no teste da esQUIVA inibitória não foram paramétricas porque o procedimento envolveu corte de resultados. Os dados foram reportados como medianas (interquartil ranges) e foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney quando necessário. As diferenças entre as sessões de

teste e treinamento foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

A diferença entre os grupos, para a avaliação de estresse oxidativo, foi avaliada pela análise de variância de uma via (ANOVA). Para os valores de F significativos, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Newman-Keuls, método da diferença mínima significativa (LSD). A diferença entre grupos foi avaliada com diferença de $P < 0,05$.

CAPÍTULO II

4. RESULTADOS

Sínteses e caracterização espectroscópica:

Os complexos A e B foram sintetizados via rota do azul de rutênio com bons rendimentos, isto é, 49,6% para o complexo A e 43,5% para o complexo B. Os rendimentos apresentados correspondem a uma média de três sínteses, e foram calculados com base na massa inicial de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Espectros eletrônicos registrados em diversos pH's (sistema binário água / acetona 1:1 vol) mostraram valores semelhantes ao reportado anteriormente por Paula e colaboradores, 1999. Em acetona pura, o complexo A apresentou uma banda intensa em 410 nm e outra menos intensa, em forma de ombro, sobreposta a primeira, em 466 nm. O complexo B apresentou características espectrais similares às do complexo A, com o $\lambda_{\text{máx}}$ em 466 nm, e uma segunda banda em forma de ombro, em 540 nm (Figura 6). Detalhes acerca da influência do pH nos espectros eletrônicos podem ser obtidos na literatura (Paula et al., 1999).

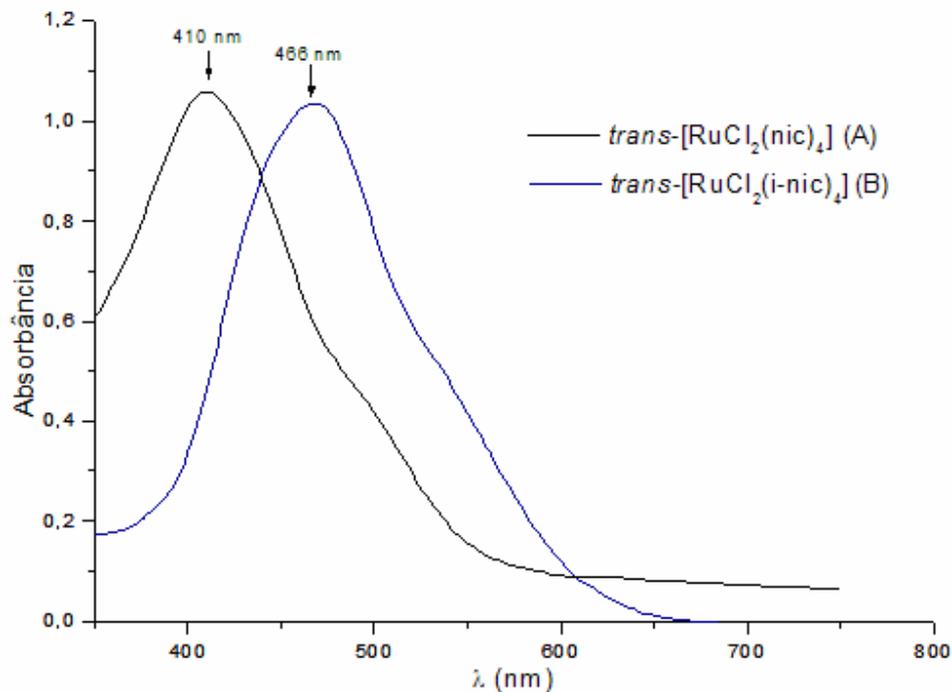


Figura 6: Espectros eletrônicos para os complexos A e B em acetona.

Os espectros de infravermelho foram registrados em pastilhas de KBr e as principais bandas que caracterizam a presença dos ligantes são descritas a seguir:

O espectro do complexo A apresenta banda correspondente a deformação angular fora do plano de C-H em 752 cm^{-1} e deformação axial de C-H aromático em 3070 cm^{-1} . A deformação axial das ligações C-C e C-N do anel piridínico está situada em 1604 cm^{-1} . A deformação angular fora do plano para o grupo OH, aparece em 934 cm^{-1} . A banda característica de deformação angular no plano do C-O-H aparece em 1420 cm^{-1} . A deformação axial do grupamento carbonílico, está situada em 1712 cm^{-1} e finalmente, a deformação axial O-H aparece na região de 3520 cm^{-1} .

O complexo B apresenta banda correspondente a deformação angular fora do plano de C-H em 768 cm^{-1} . A deformação axial de ligação C-H aromático está situada em 3074 cm^{-1} , enquanto que a deformação angular fora do plano para o OH aparece em 914 cm^{-1} . a banda de deformação angular no plano C-O-H aparece em 1416 cm^{-1} . A deformação correspondente ao grupamento carbonílico está situada em 1712 cm^{-1} e finalmente, a deformação axial de O-H, situada em 3588 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H do complexo A apresenta os seguintes picos característicos: a integração dos picos do espectro revela a presença de (1H,m) em $\delta 7,4$ referente ao próton da posição 5 do anel; em $\delta 8,3$ aparece outro próton (1H,d) localizado na posição 4 do anel. Em $\delta 8,8$ tem-se mais um próton (1H,d). Bem próximos, em $\delta 9,0$ (1H,d) e $9,2$ (1H,d) temos os prótons correspondentes ao hidrogênio ácido e posição 1 do anel, respectivamente.

O espectro de RMN ^1H do complexo B apresenta os seguintes picos característicos: a integração dos picos do espectro revela a presença de 2 prótons em $\delta 7,8$ (2H,d) correspondentes as posições 3 e 5 do anel piridínico e mais 2 prótons em $\delta 8,8$ (2H,d) referentes as posições 1 e 6 do anel. Cabe ressaltar, que embora estes complexos já tenham sido caracterizados anteriormente, fez-se necessária a repetição destas análises, para confirmar a pureza das amostras a serem empregadas.

A figura 7 ilustra um voltamograma cíclico típico do complexo A, em sistema binário água/acetona 1:1 v/v, empregando eletrodo de platina, registrado a uma velocidade de variação de potencial de $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Verificou-se somente um

processo redox centrado no metal, com $E_{1/2}$ de -15,8 mV e ΔE_p 85,7 mV, no intervalo de potencial de -0,2 a 0,3 V vs. Ag/Ag⁺. A razão entre as cargas anódicas e catódicas, obtida pela integração das respectivas ondas voltamétricas, revelam valores próximos a unidade em toda a faixa de velocidade estudada (25 a 500 mV.s⁻¹); o mesmo é observado para a relação i_c/i_a , demonstrando que o complexo é quimicamente reversível.

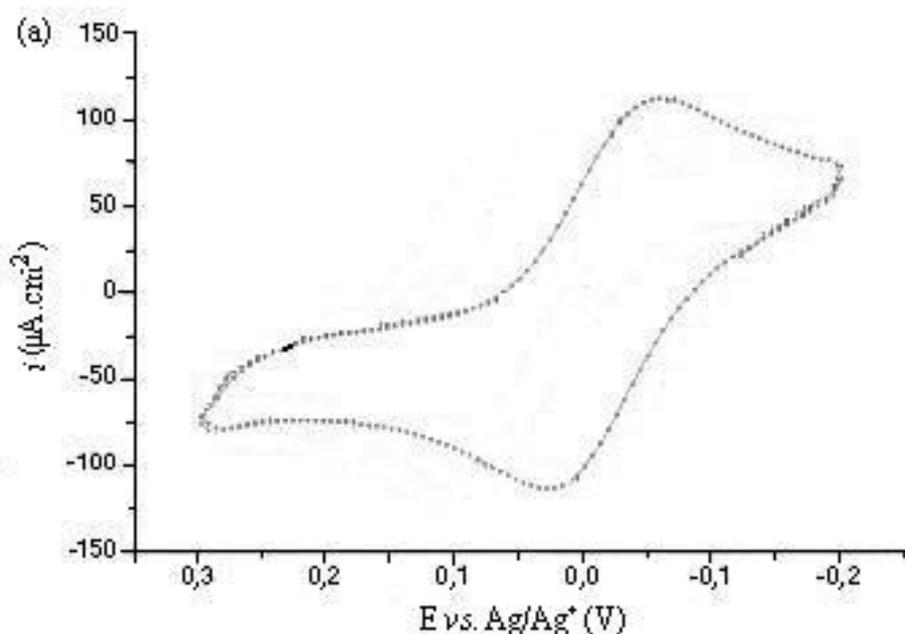


Figura 7: Voltamograma cíclico do complexo A obtido em pH 5,46.

A figura 8 ilustra um voltamograma cíclico típico, do complexo B, em sistema binário água/acetona 1:1 v/v, empregando eletrodo de platina, registrado a uma velocidade de variação de potencial de 100 mV.s⁻¹. Verificou-se somente um processo redox centrado no metal, com $E_{1/2}$ de -24,6 mV e ΔE_p 83,5 mV, no intervalo de potencial de -0,2 a 0,3 V vs. Ag/Ag⁺. A razão entre as cargas anódicas e catódicas, obtida pela integração das respectivas ondas voltamétricas,

revelam valores próximos a unidade em toda a faixa de velocidade estudada (25 a 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$); o mesmo é observado para a relação i_c/i_a , demonstrando que o complexo é quimicamente reversível.

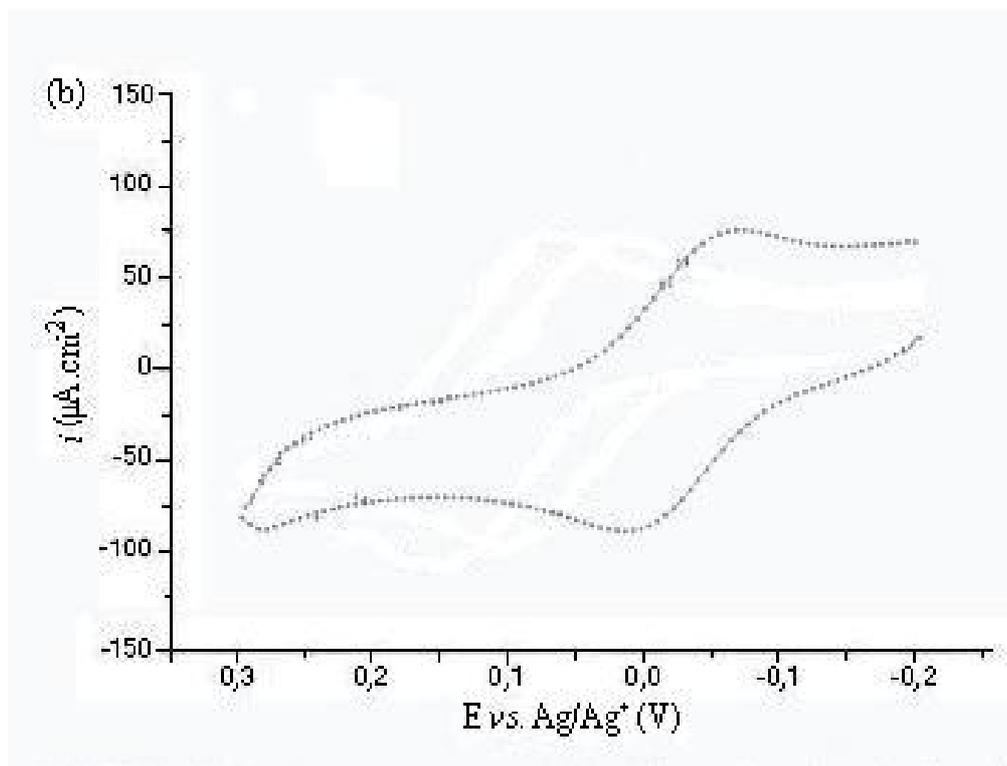


Figura 8: Voltamograma cíclico do complexo B obtido em pH 6,25.

Os resultados da análise elementar de CHN para os complexos A e B são apresentados na tabela 1.

Composto	Fórmula molecular	teórico % (experimental %)		
		C	H	N
A	$\text{RuCl}_2\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$	43,38 (45,02)	3,03 (3,84)	8,43 (8,42)
B	$\text{RuCl}_2\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$	43,38 (44,19)	3,03 (3,12)	8,43 (7,53)

Tabela 1: Análise Elementar de CHN para os complexos A e B.

Esquiva Inibitória:

Complexo A: Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos na esquiva inibitória na sessão de treino. Na sessão de teste, todos os grupos foram tratados com o complexo A (45,2, 90,4 ou 180,7 μ mol/Kg) 30 minutos antes (Figura 9) ou imediatamente depois do treino (Figura 10), as doses usadas foram baseadas em estudos prévios (Beirith et al., 1999). Os resultados mostraram uma diminuição significativa no tempo de permanência na plataforma quando comparados ao grupo controle. Estes resultados indicam um prejuízo de memória, possivelmente causado por esta droga.

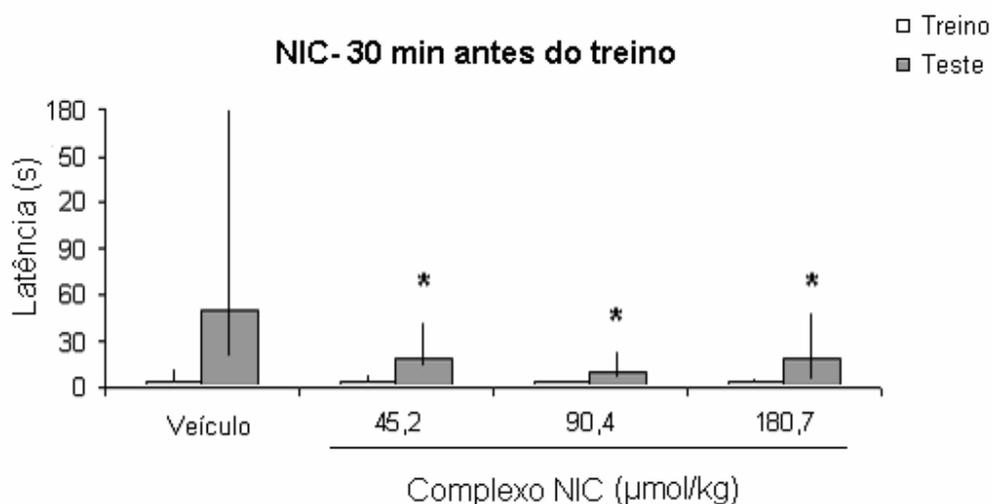


Figura 9: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Os animais receberam complexo A ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

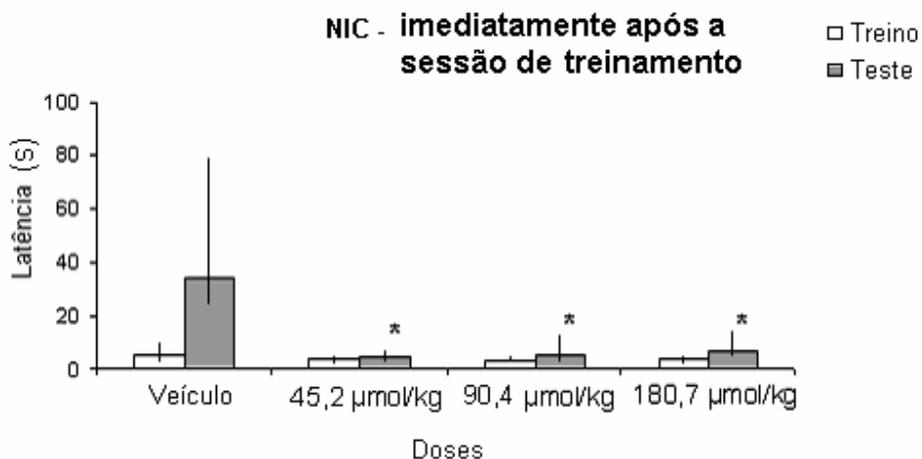


Figura 10: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Os animais receberam complexo A ou veículo imediatamente após a sessão de treinamento.

Complexo B: O mesmo comportamento observado para o complexo A foi observado para os animais injetados com o complexo B. Na sessão de teste, todos os grupos foram tratados com o complexo B (0,08, 4,5, ou 13,6 µmol/Kg) 30 minutos antes (Figura 11) ou imediatamente depois do treinamento (Figura 12), doses baseadas em estudos prévios (Beirith et al., 1999). Obteve-se resultados que mostraram uma diminuição significativa no tempo de permanência na plataforma quando comparados ao grupo controle. Estes resultados mostram um prejuízo de memória, possivelmente induzido por esta droga.

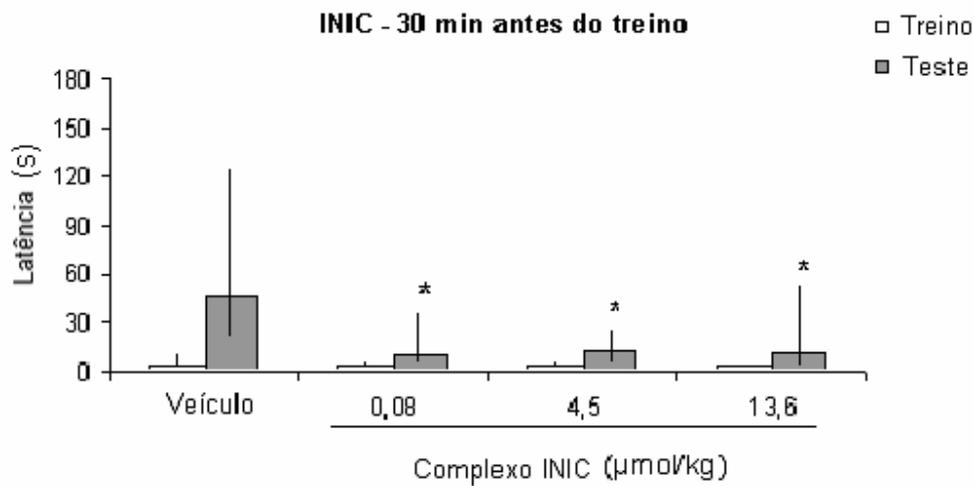


Figura 11: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Complexo B ou veículo injetado 30 minutos antes da sessão de treinamento.

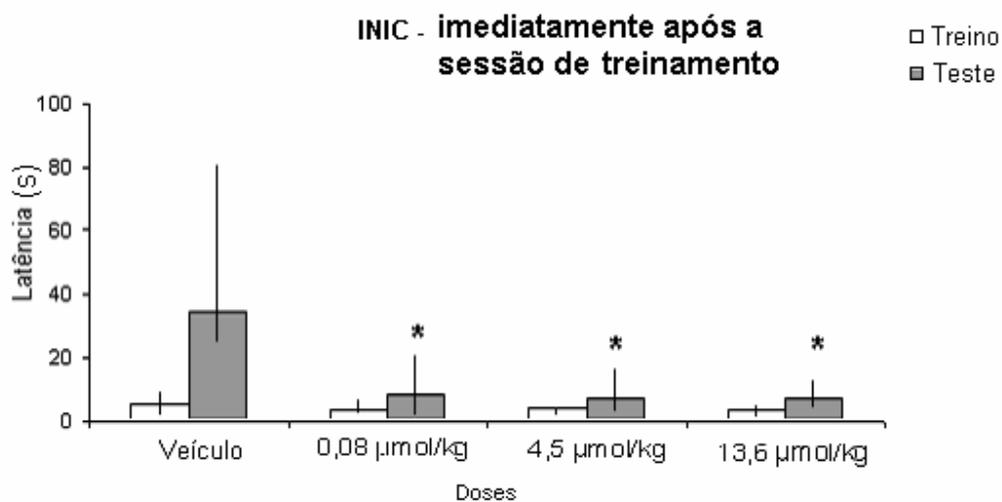


Figura 12: Tempo de latência (s) em que os animais permaneceram com todas as patas acima da grade. Complexo B ou veículo injetado imediatamente após a sessão de treinamento.

Habituação em Campo Aberto:

O complexo A (Figura 13) e o complexo B (Figura 14) não afetaram a locomoção ou comportamento exploratório durante a habituação do campo aberto, observou-se a falta de diferença significativa entre os grupos, tanto no número de cruzamentos quanto no número de “rearings” feitos no teste ou no treinamento. Na sessão de teste, nenhuma diferença foi observada no número de cruzamentos e rearings entre os grupos. Todos os grupos mostraram diferença significativa entre a sessão de teste-treinamento, enquanto demonstraram habituação em campo aberto (medido pela diminuição no número de rearings e cruzamentos executados entre os treinos e os testes).

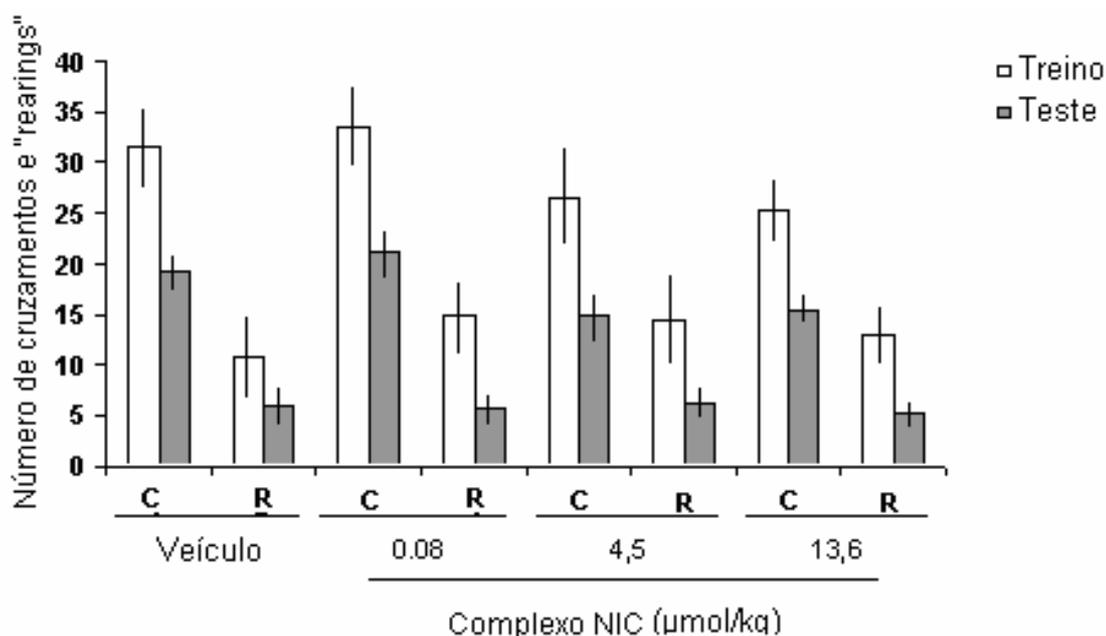


Figura 13: Número de cruzamentos e “rearings” apresentados pelos animais. Os animais receberam o complexo A ou o veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

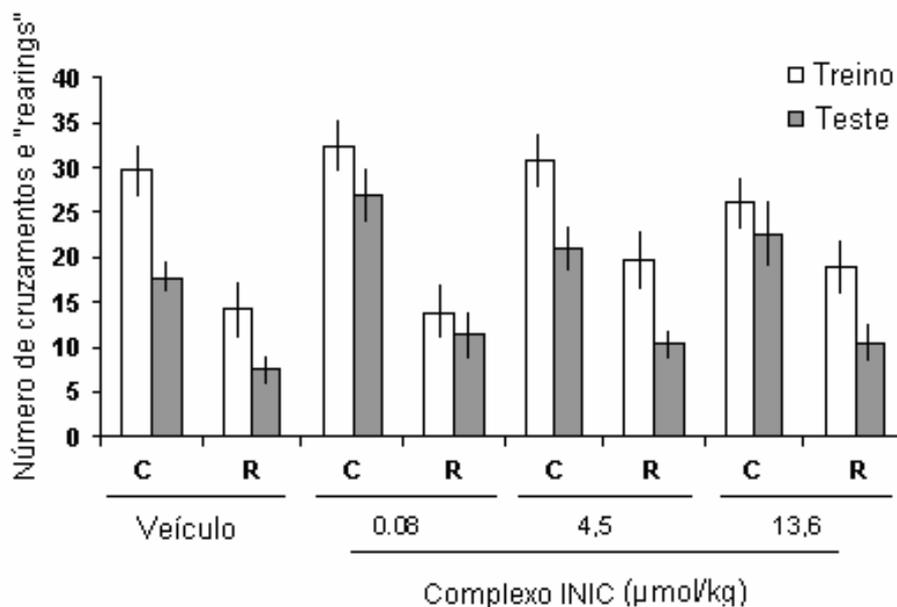


Figura 14: Número de cruzamentos e “rearings” apresentados pelos animais. Os animais receberam o complexo B ou o veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

Teste do Labirinto Elevado:

O número de entradas nos braços abertos e fechados não foram afetados pelo complexo A (Figura 15) e do complexo B (Figura 16) no labirinto elevado.

O tempo gasto nos braços abertos e nos braços fechados não foram diferentes entre os grupos tratados com ambos os complexos A (Figura 17) e B (Figura 18).

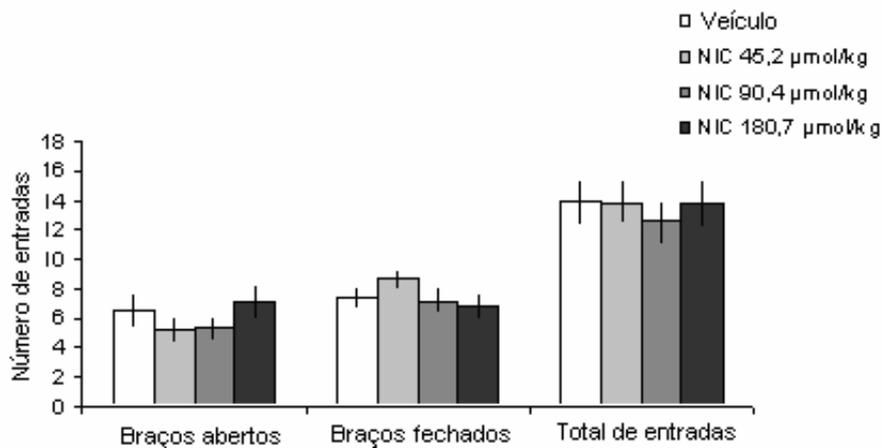


Figura 15: Gráfico apresenta o número de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto elevado, assim como o número total de entradas em ambos os braços. Os animais receberam o complexo A ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

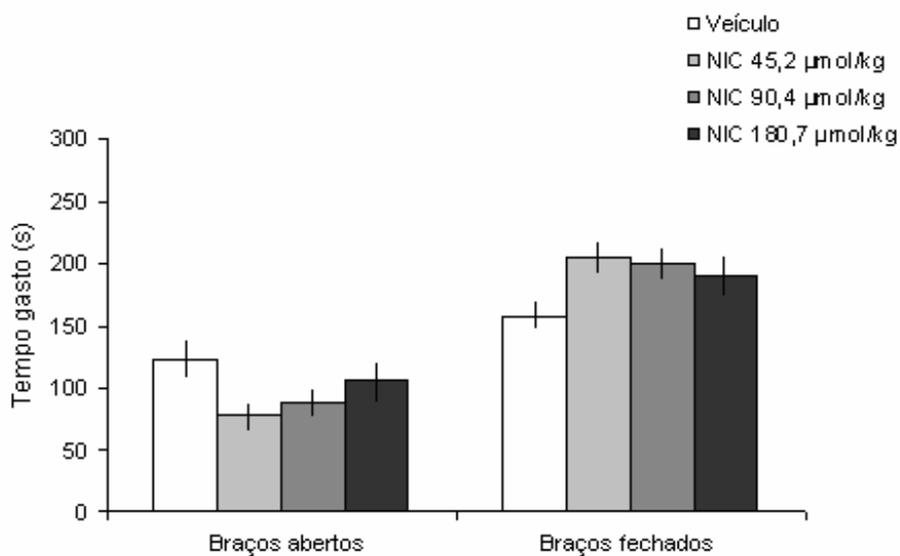


Figura 16: Gráfico apresenta o tempo gasto, em segundos, pelos animais nos braços abertos e nos braços fechados. Os animais receberam complexo A ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

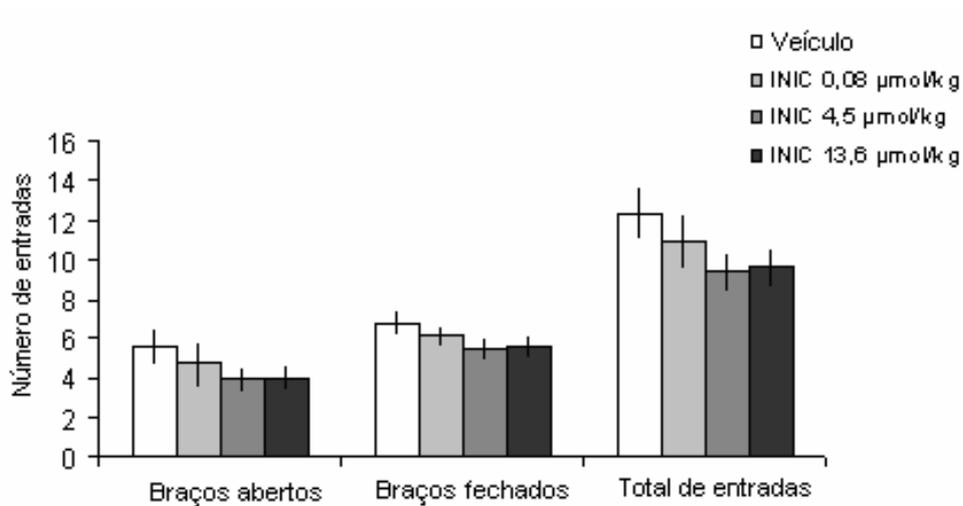


Figura 17: Gráfico apresenta o número de entradas dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto elevado, assim como o número total de entradas em ambos os braços. Os animais receberam complexo B ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

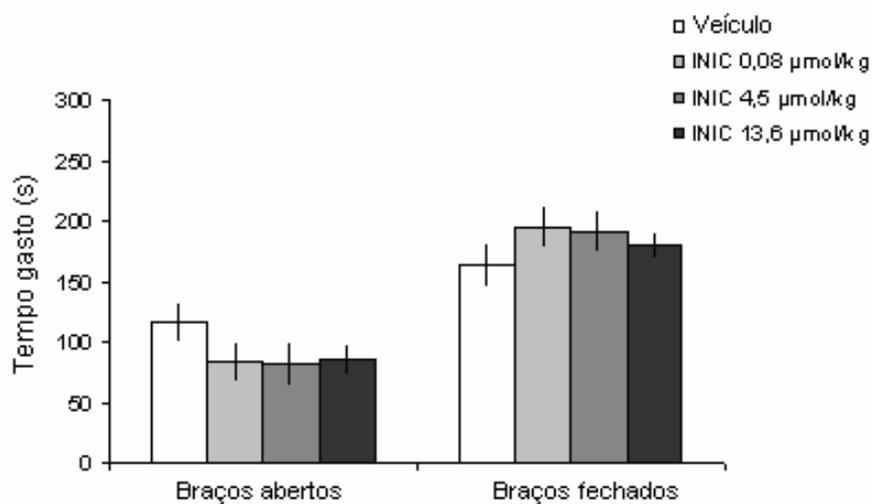


Figura 18: Gráfico apresenta o tempo gasto, em segundos, pelos animais nos braços abertos e nos braços fechados. Os animais receberam complexo B ou veículo 30 minutos antes da sessão de treinamento.

Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Na concentração de 45,2 $\mu\text{mol/Kg}$, para as medidas nas estruturas do SNC, o composto A causou peroxidação lipídica no cerebelo, hipocampo e córtex. Na concentração de 90,4 $\mu\text{mol/Kg}$, observou-se dano nas seguintes estruturas: cerebelo, hipocampo, estriado e córtex. Já na concentração mais alta, ou seja, 180,7 $\mu\text{mol/Kg}$, o complexo A mostrou peroxidação lipídica no cerebelo, no pré-frontal, e no córtex (Figura 19). Nas medidas em órgãos, a concentração de 45,2 $\mu\text{mol/Kg}$ foi a que mostrou poder de causar danos. Nas demais concentrações não houve significância (Figura 20).

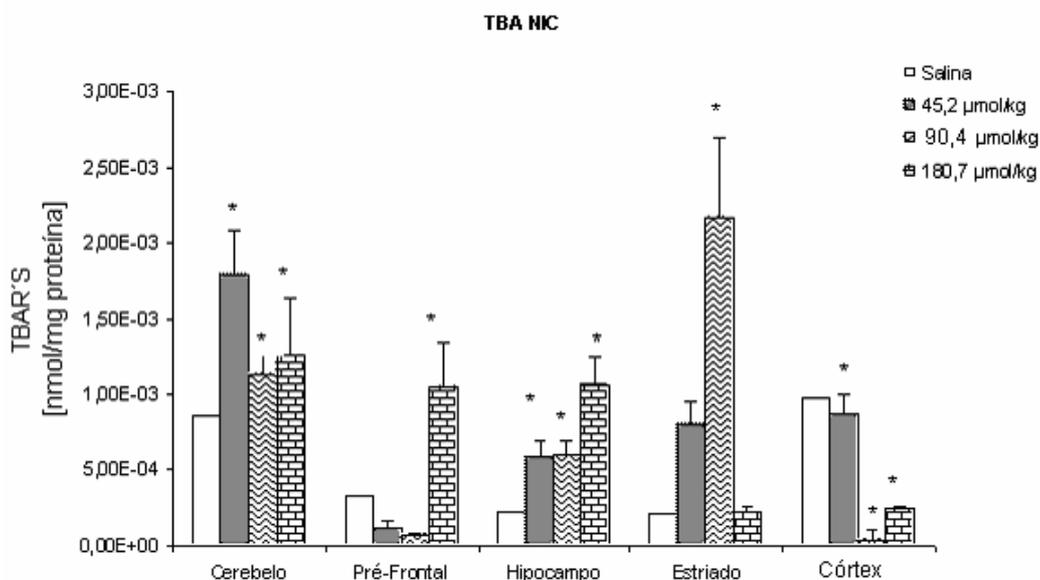


Figura 19: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no sistema nervoso central em presença do composto A.

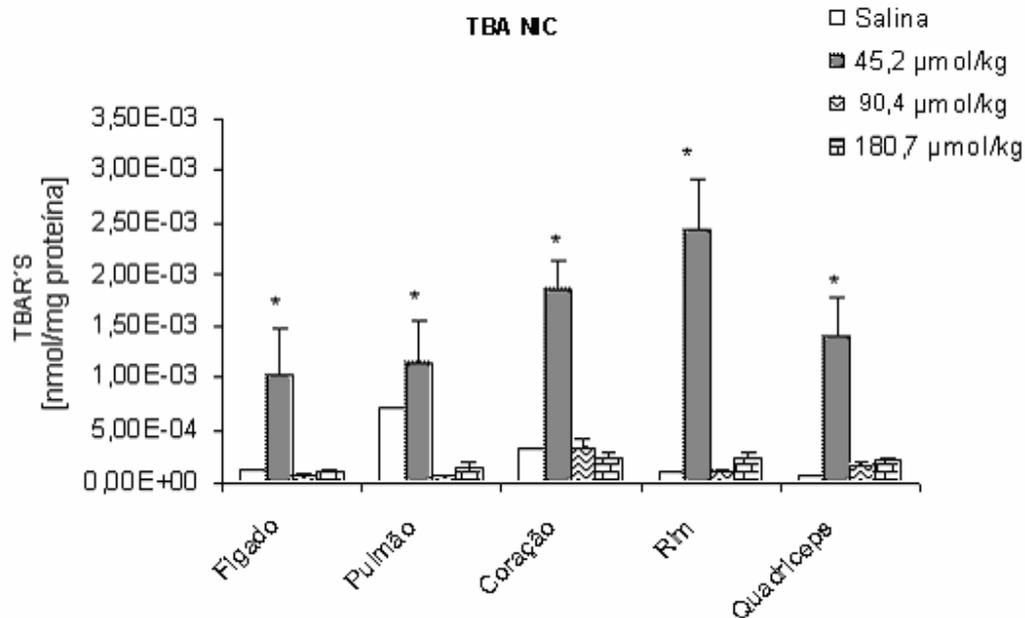


Figura 20: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em órgãos na presença do composto A.

Para o composto B, no SNC, observou-se peroxidação lipídica na concentração de 0,08 µmol/Kg no cerebelo, pré-frontal e hipocampo; na concentração de 4,5 µmol/Kg observou-se danos significativos no cerebelo, pré-frontal, hipocampo e estriado e a concentração de 13,6 µmol/Kg mostrou causar peroxidação lipídica no pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex (Figura 21). Nas medidas dos órgãos, o fígado apresentou dano significativo em todas as concentrações do composto B, o coração teve o mesmo comportamento, enquanto no pulmão e rim somente a concentração de 0,08 µmol/Kg danificou tais órgãos, finalmente no quadríceps, danos significativos foram causados pelas concentrações de 0,08 e 4,5 µmol/Kg (Figura 22).

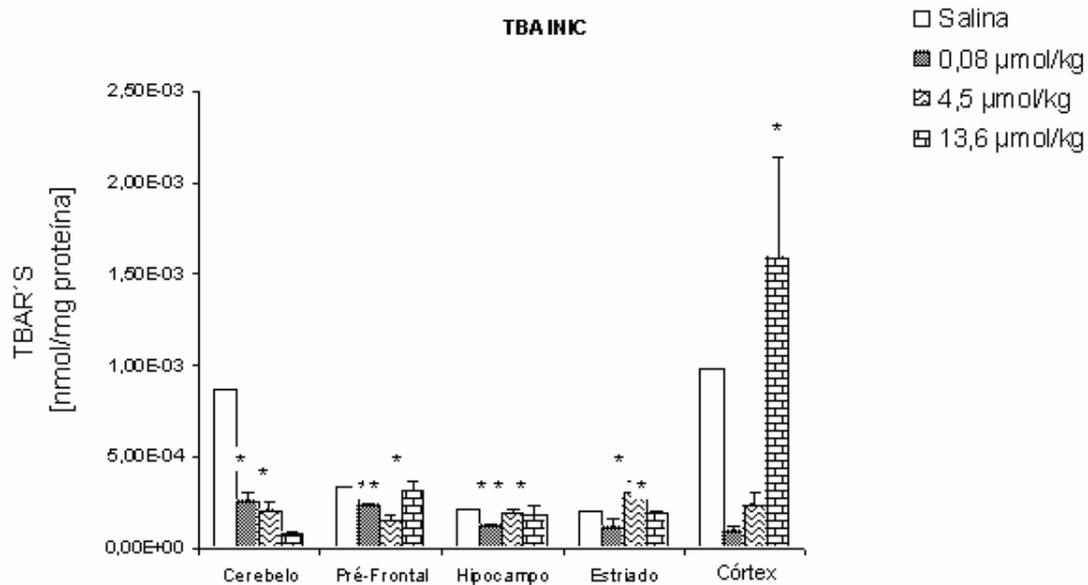


Figura 21: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no sistema nervoso central em presença do composto B.

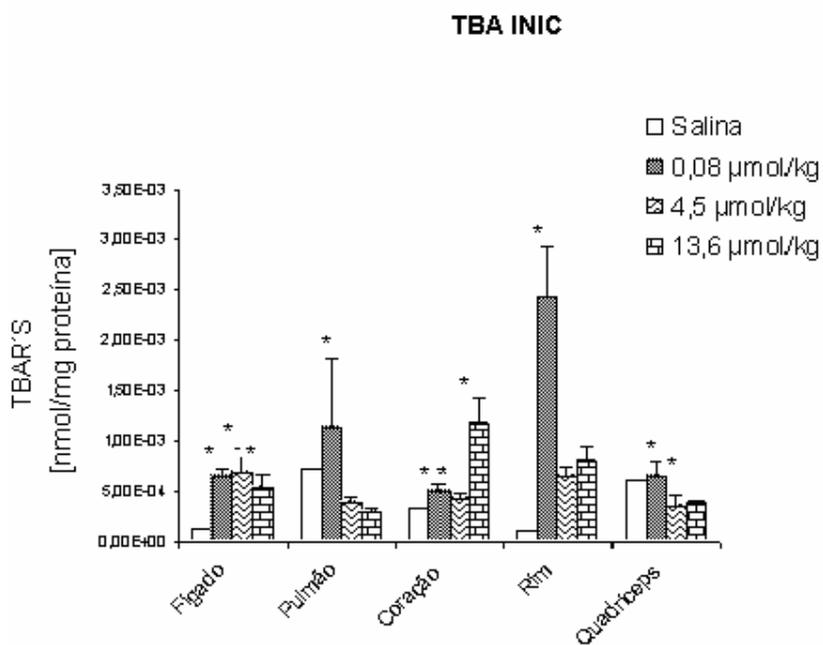


Figura 22: Quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em órgãos na presença do composto B.

Medida do dano oxidativo em proteínas (carbonil):

O composto A, nas medidas de dano oxidativo em proteínas das estruturas do SNC, mostrou danos significativos na concentração de 45,2 $\mu\text{mol/Kg}$ nas seguintes estruturas: cerebelo e pré-frontal, e na concentração de 90,4 $\mu\text{mol/Kg}$ no cerebelo e córtex. Nas demais estruturas e concentrações os danos não foram significativos (Figura 23).

Nas medidas feitas nos órgãos, o coração, nas concentrações de 45,2 e 90,2 $\mu\text{mol/Kg}$ e o rim na concentração de 90,4 $\mu\text{mol/Kg}$, foram os únicos a sofrerem dano oxidativo significativo em proteína (Figura 24).

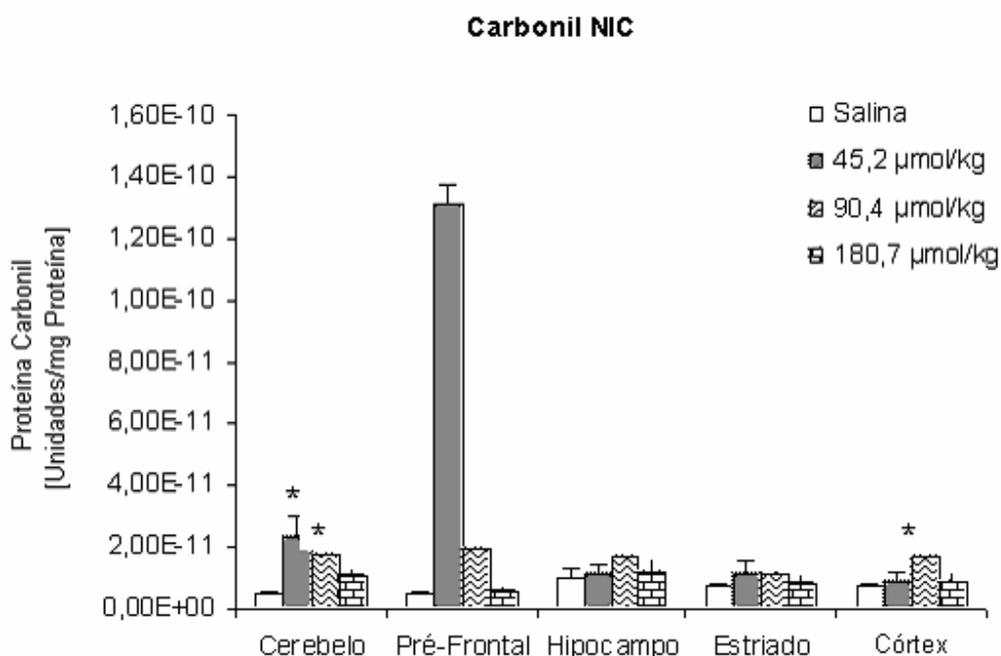


Figura 23: Quantidade de carbonil nas estruturas do SNC em presença do complexo A.

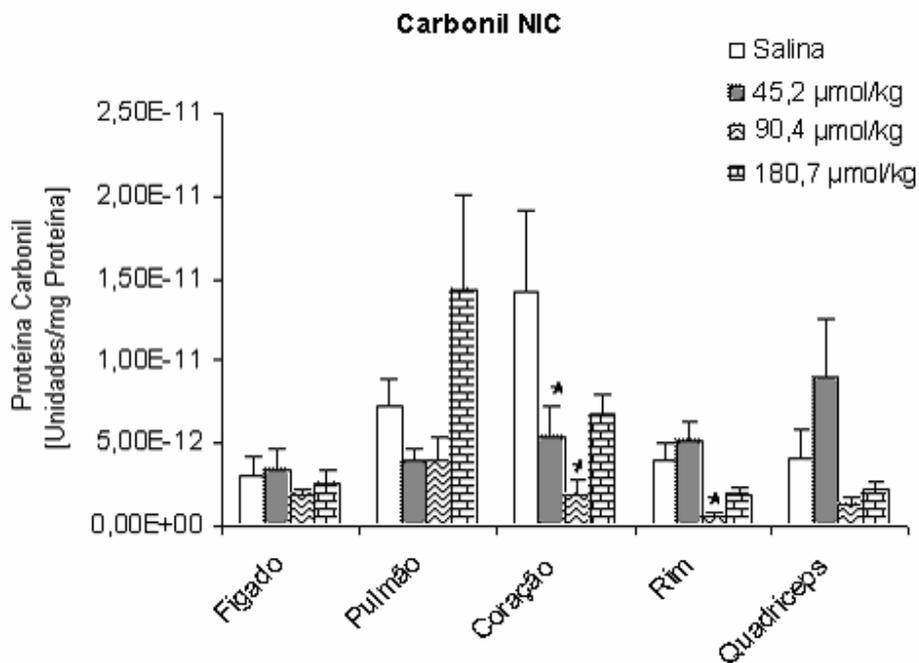


Figura 24: Quantidade de carbonil nos órgãos em presença do complexo A.

Quando as medidas foram feitas utilizando-se o composto B, nas estruturas do SNC, a concentração de 13,6 µmol/Kg foi a que causou danos em todas elas. No cerebelo a concentração de 0,08 µmol/Kg também mostrou-se danosa, já as demais concentrações não demonstraram significância (Figura 25).

Nos órgãos, o fígado mostrou danos em todas as concentrações, no pulmão e quadríceps a concentração que apresentou danos significativos foi a de 4,5 µmol/Kg, a qual também mostrou-se danosa no quadríceps, enquanto no rim o dano ocorreu na concentração de 0,08 µmol/Kg; o coração não sofreu nenhum dano significativo (Figura 26).

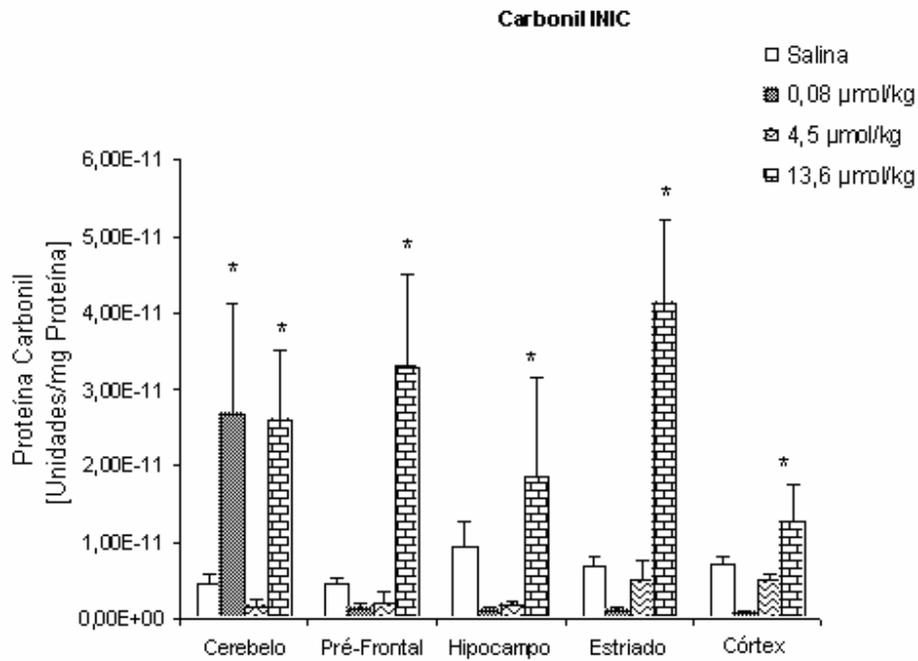


Figura 25: Quantidade de carbonil nas estruturas do SNC em presença do complexo B.

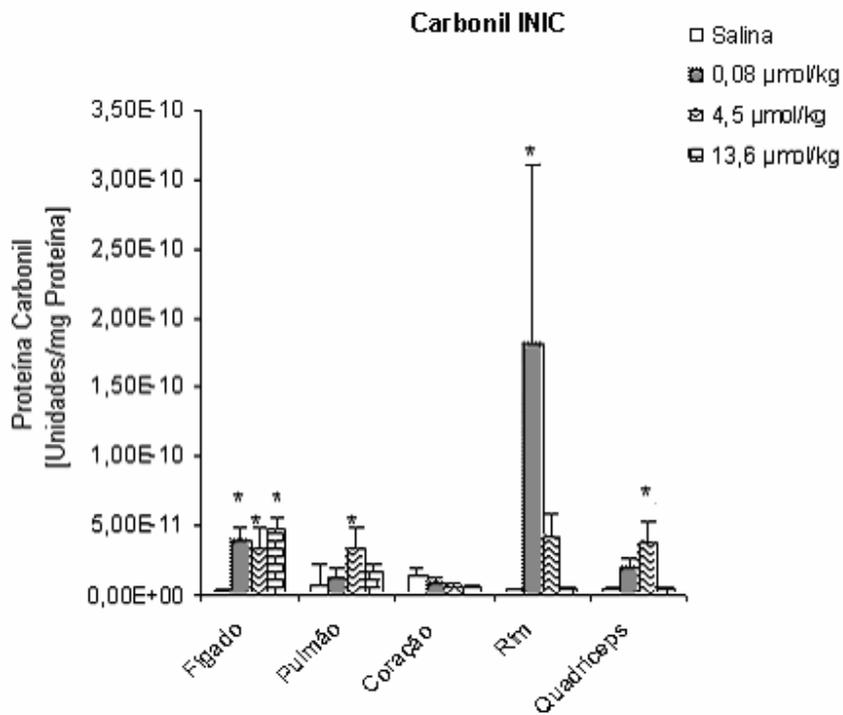


Figura 26: Quantidade de carbonil nos órgãos em presença do complexo B.

Superóxido dismutase (SOD) – determinação das defesas antioxidantes

enzimáticas:

O cerebello foi o que mais sofreu oxidação quando em presença do composto A, principalmente na concentração de 180,7 $\mu\text{mol/Kg}$ (Figura 27).

A concentração de 90,4 $\mu\text{mol/Kg}$, nas medidas em órgãos, foi a que afetou o rim significativamente (Figura 28).

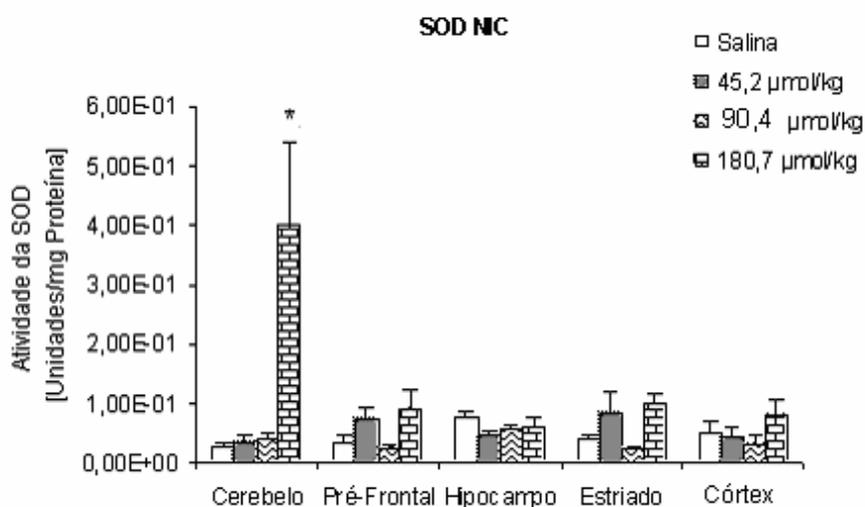


Figura 27: Atividade da SOD nas estruturas do SNC na presença do composto A.

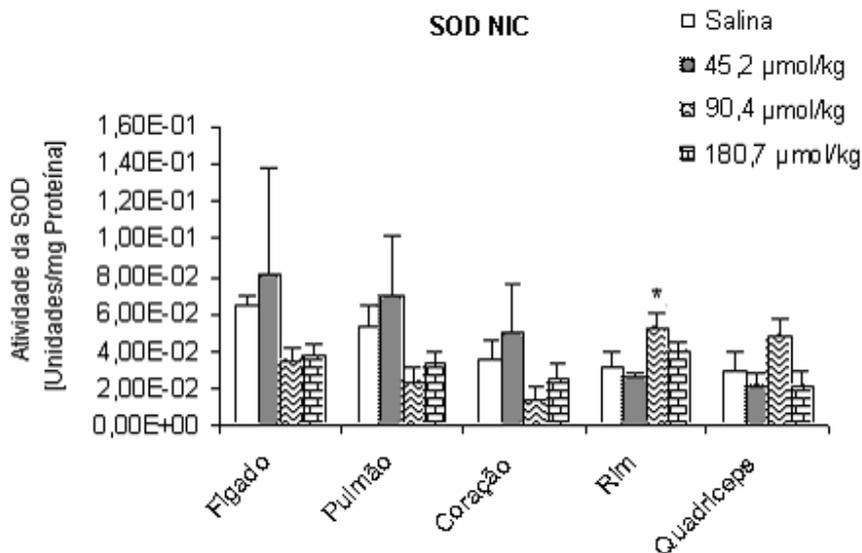


Figura 28: Atividade da SOD nos órgãos na presença do composto A.

Houve danos significativos somente no hipocampo e no estriado e estes se deram em todas as concentrações do composto B (Figura 29).

Pode-se observar, nas medidas feitas em órgãos, que o fígado e o coração sofreram oxidação na presença do complexo B, o fígado em todas as concentrações, porém o coração somente na concentração de 0,08 µmol/Kg, os demais órgãos não apresentaram danos significativos (Figura 30).

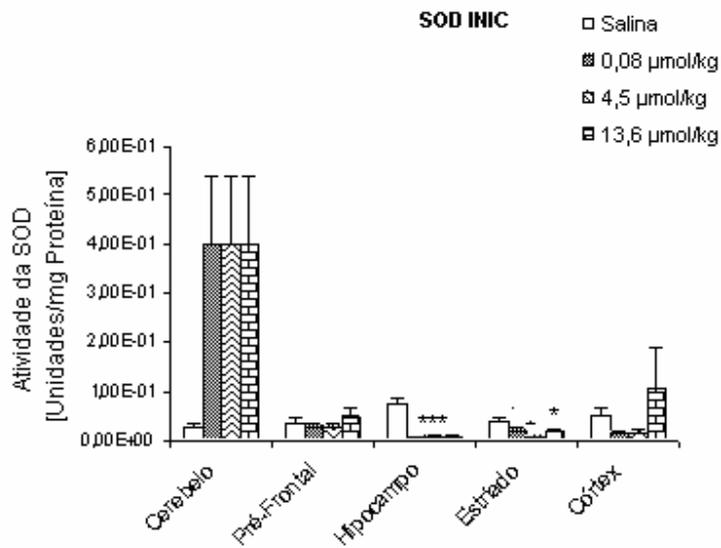


Figura 29: Atividade da SOD nas estruturas do SNC na presença do composto B.

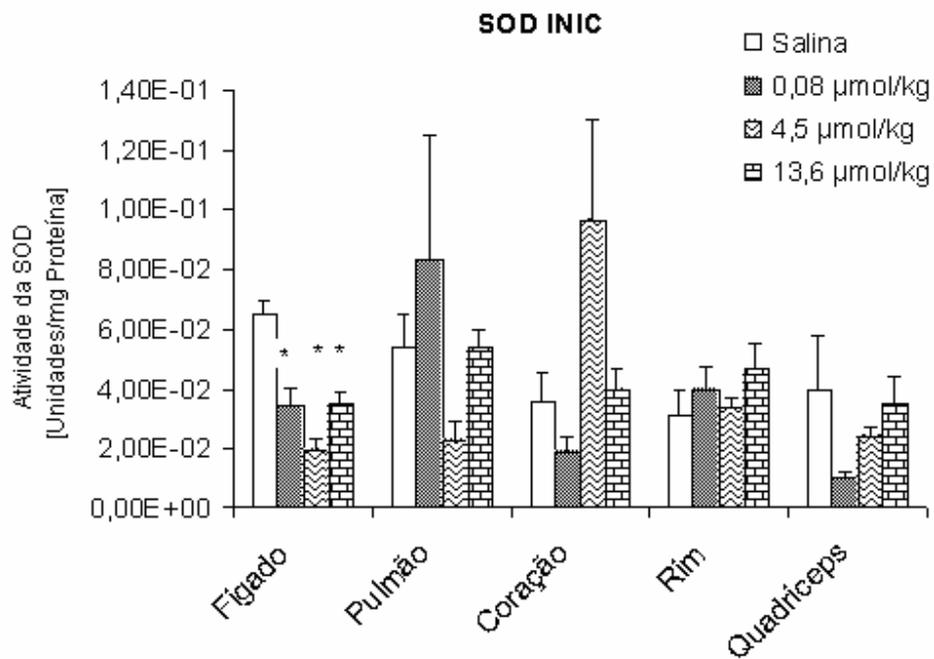


Figura 30: Atividade da SOD nos órgãos na presença do composto B.

Catalase (CAT) – determinação das defesas antioxidantes enzimáticas:

Nas medidas para determinação das defesas antioxidantes enzimáticas, o complexo A, nas estruturas do SNC, não mostrou efeito significativo em nenhuma estrutura independente da concentração utilizada (Figura 31). Já nos órgãos, na concentração de 45,2 $\mu\text{mol/Kg}$, o fígado demonstrou efeito, enquanto nas demais concentrações em todos os outros órgãos, não observou-se alterações (Figura 32).

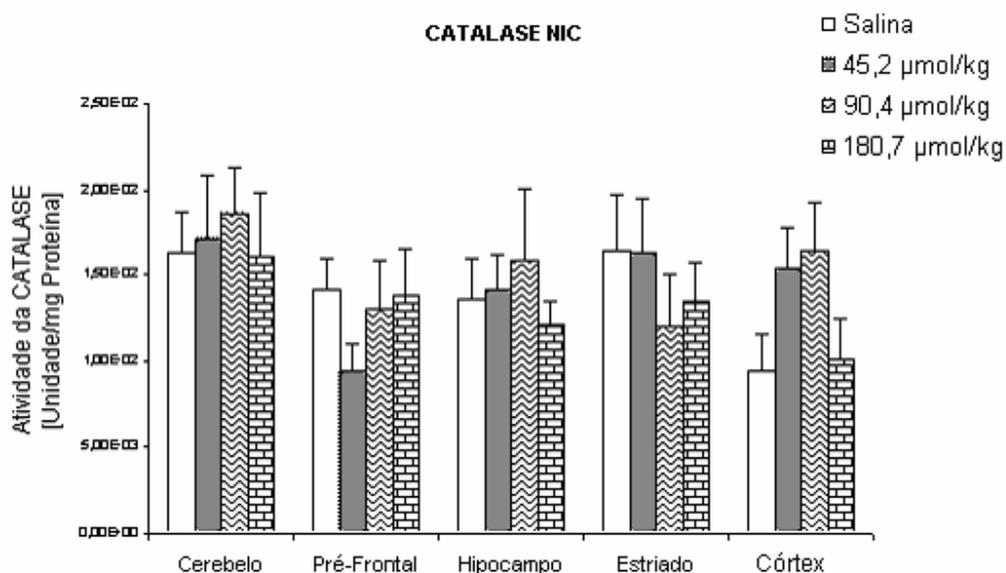


Figura 31: Atividade da catalase nas estruturas do SNC em presença do complexo A.

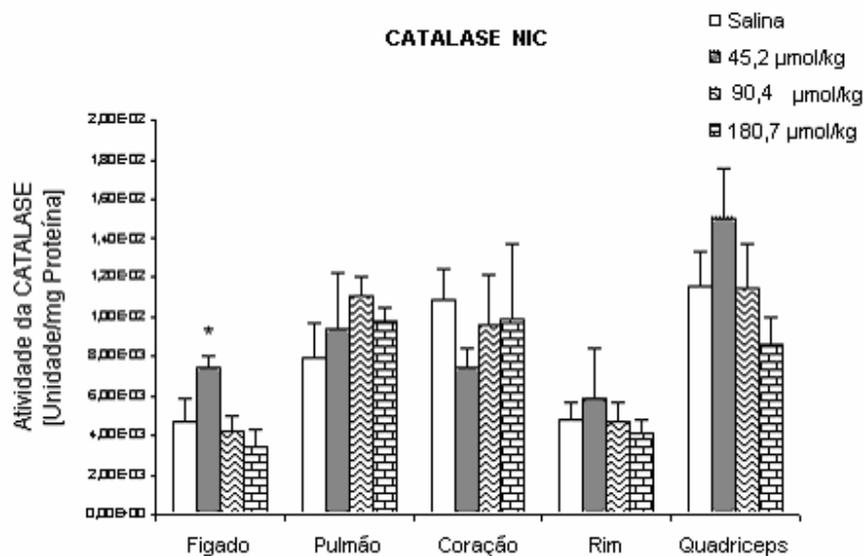


Figura 32: Atividade da catalase nos órgãos em presença do complexo A.

O complexo B mostrou ter mais efeito sobre a catalase quando comparado aos resultados obtidos pelo complexo A. Na figura 33 observa-se que apenas o cerebelo sofreu a ação do complexo B nas seguintes concentrações: 4,5 µmol/Kg e 13,6 µmol/Kg, porém as demais estruturas do SNC não apresentaram significância em nenhuma dosagem.

Nos órgãos; o fígado, o pulmão e o rim, tiveram uma atividade da catalase significativa em todas as concentrações. Os demais órgãos não demonstraram alterações significativas em presença do complexo B em nenhuma das concentrações (Figura 34).

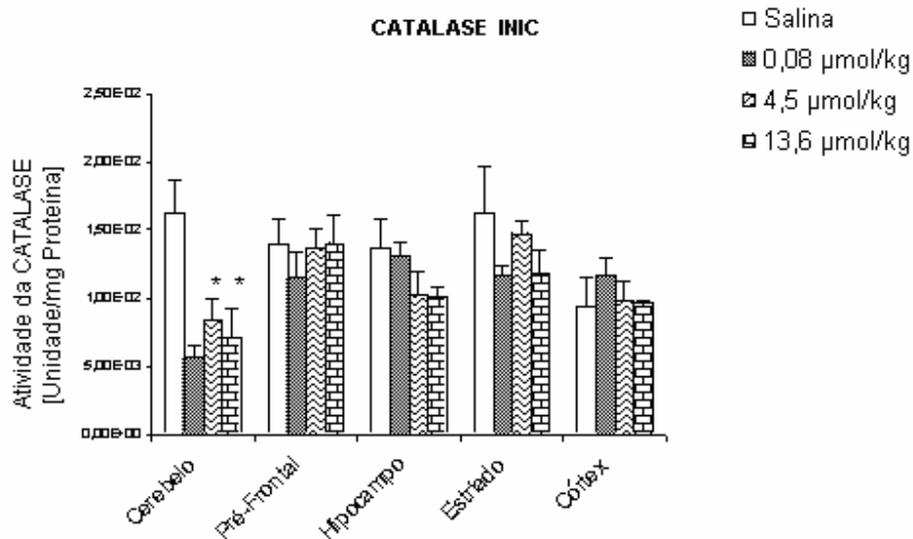


Figura 33: Atividade da catalase nas estruturas do SNC em presença do complexo B.

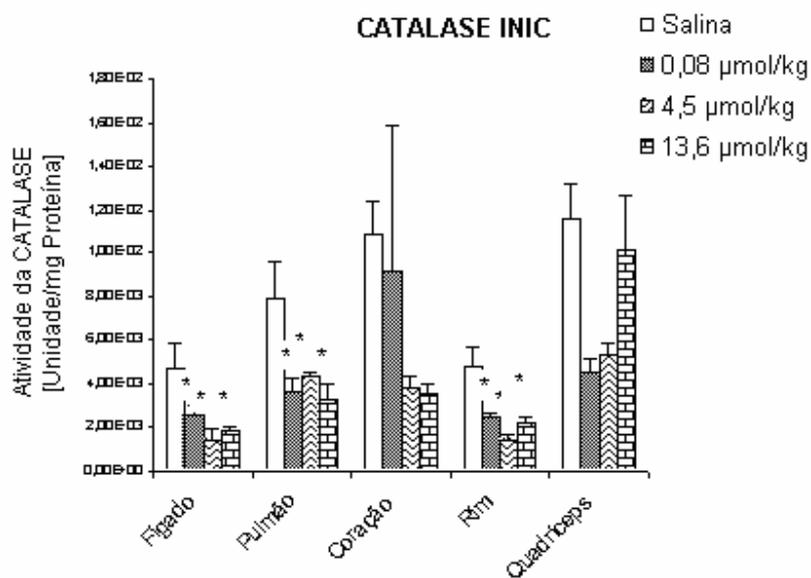


Figura 34: Atividade da catalase nos órgãos em presença do complexo B.

PARTE III

5. DISCUSSÃO

Caracterização Físico-Química:

As sínteses tiveram um bom rendimento quando comparadas aos rendimentos apresentados na literatura (Paula et al., 1999).

Em relação aos espectros UV-vis, foi observado um desvio batocrômico para o complexo B, que pode ser atribuído a presença do grupo carboxílico na posição 4 do anel piridínico. Isto altera a densidade eletrônica do átomo de nitrogênio e, conseqüentemente, afeta a interação metal-ligante.

Ainda sobre o espectro eletrônico, com o aumento do pH, houve um desvio nas bandas de absorção dos complexos, que foi mais acentuado no complexo B. Pode-se deduzir, então, que as transições eletrônicas foram influenciadas não apenas pela posição, mas também pelo grau de protonação do grupo presente no anel piridínico. Tal comportamento pode ser racionalizado com base na teoria do campo cristalino. O grau de protonação e a posição do grupo carboxílico afeta a intensidade da energia de ligação entre o nitrogênio do anel piridínico e o centro metálico de rutênio.

A análise dos voltamogramas em várias velocidades do complexo A, demonstra que a separação de pico-a-pico (ΔE_p) não varia substancialmente, mantendo-se constante em torno de 80 mV, com o aumento da velocidade de variação de potencial, tendo apenas uma suave ascensão em $250 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A separação de pico-a-pico (ΔE_p) do complexo B, a exemplo do complexo anterior, não varia significativamente em função do aumento da variação de

potencial, sendo 72 mV para velocidades de varredura 25 mV.s⁻¹ e atingindo 88 mV para velocidades de 500 mV.s⁻¹.

Avaliação dos Efeitos Comportamentais e Avaliação do Estresse Oxidativo:

Os resultados demonstraram que os complexos de rutênio A e B prejudicaram a retenção de memória na esQUIVA inibitória em animais tratados 30 minutos antes ou imediatamente após o treinamento. Porém, nenhum efeito foi observado nos testes de campo aberto e labirinto elevado.

Estudos prévios demonstraram que ambos os complexos, A e B, podem inibir a óxido nítrico sintetase (Beirith et al, 1999). Vários estudos demonstraram a importância da NO sintetase (Misko et al., 1993; Sessa et al., 1993) no processo de formação de memória (Marleta, 1994). Quevedo et al. (1997) demonstraram que o inibidor da NO sintetase, N-nitroarginina (NO-arg), infuso no hipocampo imediatamente após o treino prejudica a retenção de memória, o que pode confirmar a ação prejudicial dos complexos A e B neste processo.

Recentes pesquisas indicam que tanto a aplicação subcutânea periférica quanto a administração intracerebroventricular de L-arg, um conhecido precursor do NO (Fiorucci et al., 1995; Greaves et al., 1998), prolonga significativamente o tempo de latência no teste de esQUIVA passiva. O que significa que a L-arg melhora a consolidação da memória e aprendizado (Plech et al., 2003).

Estas duas afirmações demonstram que a quantidade de NO é determinante para a consolidação da retenção de memória, como os complexos A e B reduzem a liberação de NO, por inibirem a óxido nítrico sintetase, reduzem

também a quantidade de NO intracerebral, interferindo de forma prejudicial na retenção da memória.

Há evidências consideráveis de que a via do óxido nítrico desempenha um papel de modulador na transmissão da dor, tanto no sistema nervoso central como no periférico (Moore et al., 1991; Meller e Gebbart, 1993).

Injeções pré-treinamento de nitro-L-arginina, intracerebrais ou intraperitonias, competem com a L-arginina inibindo a liberação do NO pela enzima óxido nítrico sintetase, o que produz uma amnésia profunda no teste de esQUIVA passiva em pintos sem qualquer outro efeito observável no comportamento destes (Holscher e Rosa, 1993). É possível que o NO e outras substâncias que agem como mensageiros nas sinapses possam ter um papel coordenado na memória (Fin et al., 1995).

Os complexos A e B, afetaram notoriamente a retenção de memória no teste de esQUIVA. Os resultados também demonstraram prejuízos na memorização e efeitos amnésicos independente da dose. Supõe-se que isto deve-se a habilidade dos complexos em interferir na via do NO.

Em resumo, nossos resultados evidenciam que complexos de rutênio agem na modulação da memória em tarefas de comportamento incentivada pelo medo, como comprovado no teste de esQUIVA inibitória. Entretanto não demonstram ação em tarefas de memória espacial, como no teste de habituação em campo aberto ou em tarefas de ansiedade, como no teste do labirinto elevado.

Os testes de avaliação do estresse oxidativo mostraram que os dois complexos causam dano oxidativo em lipídeos e proteínas na maioria das estruturas do SNC, bem como nos demais órgãos estudados.

O mesmo foi verificado nas medidas das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Para o complexo A, o maior índice de dano foi observado no cerebelo e no hipocampo. Em relação aos demais órgãos, rim e coração sofreram maior índice de dano, sendo que a menor concentração foi a mais danosa, não encontrou-se uma explicação plausível para este fato.

Com o complexo B, os resultados demonstraram-se semelhantes. O hipocampo, juntamente com o pré-frontal, foram as estruturas que apresentaram maior índice de dano. Todas as concentrações mostraram-se significativas para estas duas estruturas. O cerebelo e o estriado sofreram danos nas concentrações de 0,08 e 4,5 $\mu\text{mol/Kg}$ e, finalmente, o córtex apresentou índice de dano significativo apenas na maior concentração (13,6 $\mu\text{mol/Kg}$). Nos demais órgãos, o fígado e o coração sofreram danos em todas as concentrações (0,08, 4,5 e 13,6 $\mu\text{mol/Kg}$). Pulmão e rim apenas na dose mais baixa (0,08 $\mu\text{mol/Kg}$), o quadríceps na dose mais baixa e na mediana (0,08 e 4,5 $\mu\text{mol/Kg}$).

É possível supor que o dano causado pelos complexos A e B no hipocampo, região do cérebro responsável pela memória, possa estar causando um prejuízo na retenção de memória, o que, associado com a capacidade de ambos os complexos em interferirem na rota do NO, venha a causar o efeito amnésico apresentado nos testes da esquiva inibitória.

Através dos resultados encontrados podemos dizer que os complexos A e B, por serem neutros, são lipossolúveis, o que facilita a passagem dos mesmos pela barreira lipídica, conferindo-os assim, um alto poder oxidante.

Na medida do dano oxidativo em proteínas, a lipossolubilidade dos complexos pode estar danificando proteínas lipossolúveis.

Tanto nas medidas da atividade da SOD quanto para CAT, os complexos demonstraram aumentar a atividade destas duas defesas antioxidantes, o que demonstra que estes complexos têm um efeito pró-oxidante.

6. CONCLUSÃO

Os complexos de rutênio apresentaram resultados que comprovam seus efeitos na via do NO em sistemas biológicos, o que provê várias possibilidades de aplicações.

Entretanto, os resultados no teste da esquiva inibitória, demonstraram que ambos os complexos atuaram de forma negativa na retenção da memória e causaram amnésia nos ratos, o que contrapõe a evidência anterior.

Nos testes de habituação em campo aberto e labirinto elevado, relacionados a atividades de memória espacial e ansiedade, respectivamente, os complexos A e B não obtiveram resultados significativamente diferentes dos apresentados pelos grupos controle.

Ambos os complexos A e B causaram danos tanto em lipídeos quanto em proteínas e interferiram na defesa antioxidante enzimática o que não é uma boa perspectiva para aplicações futuras como fármaco.

Ambos complexos danificaram o hipocampo, área do cérebro responsável pela retenção de memória, o que pode estar causando o efeito amnésico descrito anteriormente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, M.J. **31 st International Conference on Coordination Chemistry**, Abstract 1 st, (1996) 18-23, Vancouver.
- ALESSIO, E.; XU, Y.; CAUCI, S.; MESTRONI, G.; QUADRIFOGLIO, F.; VIGLINO, P.; MARZILLI, L.G. **Novel diastereomers with opposite chirality at ruthenium formed by N7, α -PO₄ chelation of 5'-dGMP to the antimetastatic agent *trans*-RuCl₂(DMSO)₄: NMR and CD evidence**. J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 7068-71.
- AMBONI, J.A. **Avaliação dos efeitos Genéticos dos Complexos *trans*-diclorotetraquis ácido-3-piridina carboxílico rutênio (*trans*-[RuCl₂(nic)₄]) e *trans*-dicloro tetraquis ácido-4-piridina carboxílico rutênio (*trans*-[RuCl₂(i-nic)₄]) que influenciam no metabolismo de NO**. 2003. 72f Monografia (trabalho de conclusão do Curso de Farmácia) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2003.
- BEIRITH, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.M.S.; FRANCO, C.V.; CALIXTO, J.B. **Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes**. Eur. J. Pharmacol. 369 (1999). p. 289-297.
- BELVISI, M.G.; STRETTON, C.D.; YACOUB, M.; and BARNES P.J. **Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans**. Eur. J. Pharmacol. 210 (1992) 221-222.

- BERGER, M.R.; GARZON, F.T.; KEPPLER, B.K.; SCHMAHL D. **Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats.** Anticancer Res. 9 (1989) 761-5.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; e BENDHACK L.M. **Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex.** Nitric Oxide, In Press, Corrected Proof, Available online 4 May 2006
- BRABEK, V. e NOVÁKOVÁ O. **DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity.** Drug Resistance Updates, Volume 9, Issue 3, Junho 2006, Páginas 111-122
- CARBALLO, M.; VILAPLANA, R.; MÁRQUEZ, G.; CONDE, M.; BEDOYA, F.J.; GONZALEZ-VÍLCHEZ, F.; SOBRINO F. **A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumor activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils.** J. Biochem. 328 (1997) 559-64.
- CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDET, D.S. **Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease.** J. Clin. Invest. 100 (1997) 2424–2429.
- CLARKE, M.J. **Ruthenium metallopharmaceuticals.** Coordination Chemistry Reviews. 236 (2003) 209-233.
- COOKE, J.P.; DZAU, V.J. **Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease.** Annu. Rev Med 1997; 48: 489-509.
- CRECZYNSKI-PASSA, T. B.; BEIRITH, A.; BONETTI, V. R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M. M. S.; FRANCO, C. V.; CALIXTO, J. B. **Complexes**

***trans*-[RuCl₂(nic)₄] and *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] as free radical scavengers.**

Journal of Inorganic Biochemistry. 86 (2001) 587-594.

DAL PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M. M. R.; SCHRODER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M. S.; MOREIRA, J. C. F.; WALZ, R. **Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or Kainic acid in Wistar rats.** Neurosci Lett 291 (2000) 179 – 182.

FIN, C.; DA CUNHA, C.; BROMBERG, E.; SCHMITZ, P.K.; BIANCHIN, M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO I. **Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes.** Neurobiol Learn Mem. 63(2) (1995) 113-5.

FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E.; QUINTIERI, A. I.; SARPI, L.; SPIRCHEZ, Z.; BULLA, N.; MORELLI, A. **L-arginine/nitric oxide pathway modulates gastric motility and gallbladder emptying induced by erythromycin and liquid meal in humans.** Dis. And Science. 40 (1995) 1365-71.

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.** Br. J. Pharmacol. 122 (1997) 1441-9.

GALEANO, A.; BERGER, M.R.; KEPPLER, B.K. **Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines *in vitro*.** Arzhenim.- Fosch. 42 (1992) 821-24

- GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F.; VILAPLANA, R.; BLASCO, G.; MESSORI L. **Solution studies of the antitumor complex dichloro 1,2-propylendiaminetetraacetate ruthenium (III) and of its interactions with proteins.** J. Biol. Biochem. 71 (1998) 45.
- GREAVES, R.; MILLER, J.; O' DONNEL, L.; MCLEAN, A.; FARTHING, M.J. **Effect of the nitric oxide donor, glyceryl trinitrate, on human gallbladder motility.** Gut. 42 (1998) 410-3.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3ª edição, Oxford, London, 1999.
- HEIJDEN, M.; VAN VLIET, P.M.; HAASNOOT, G.; REEDIJK, J. **Synthesis and characterization of *cis*-(2,2'-Bipyridine) (2,2'-Biquinoline) dichlororuthenium (II) and its co-ordination chemistry with imidazole derivatives.** J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1993) 375.
- HOLSCHER, C.; ROSE S.P. **Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick.** Brain Res. 13,619(1-2) (1993) 189-94.
- IZQUIERDO, I.; FIN, C.; SCHMITZ, P.K.; DA SILVA, R.C.; JERUSALINSKY, D.; QUILLFELDT, J.A.; FERREIRA, M.B.C.; MEDINA J.H.; BAZÁN N.G. **Memory enhancement by intrahippocampal, intraamygdala, or intraentorhinal infusion of platelet-activating factor measured in an inhibitory avoidance task.** Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A. 23; 92(11) (1995) 5047-51.
- JERUSALINSKY D., FIN C., QUILLFELDT J.A., FERREIRA M.B., SCHMITZ P.K., DA SILVA R.C., WALZ R., BAZAN N.G., MEDINA J.H., IZQUIERDO I., **Effect**

- of antagonists of platelet-activating factor receptors on memory of inhibitory avoidance in rats.** Behav Neural Biol. 62(1) (1994) 1-3.
- KERWIN, J.F.; LANCASTER, J.R.; FELDMAN, P.L. **Nitric oxide: a paradigm for second messengers.** J. Med. Chem. 38 (1995) 4343–4362.
- LEPERRE, A.; MILLART, A.; PREVOST, T.; TRENQUE T.; KANTELIP J.P.; KEPPLER B.K. **Compared effects of ruthenium red and cis[Ru(NH₃)₄Cl₂]Cl on the isolated ischaemic-reperfused rat heart.** Clin. Pharmacol. 9 (1995) 545-53.
- LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** Methods Enzimol. 186 (1990) 464-78.
- LISSE, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO M.D. **Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity for luminal-enhanced chemiluminescence measurements.** Free Radic. Biol. Med. (1995), 18 de fevereiro (2); 153-8.
- MARLETTA, M.A. **Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalasys.** Cell 78 (1994) 927-930.
- MELLER, S.T.; GEBHART G.F. **Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord.** Pain. 52 (1993) 127-136.
- MISKO, T.P.; MOORE, W.M.; KATEN, T.P.; NICKOLS, G.A.; COBERT, J.A.; TILTON, R.G.; MCDANIEL, M.L.; WILLAMSON, J.R.; CURRIE, M.G. **Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine.** Eur. J. Pharmacol. 223 (1993) 119-125.

- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P., HART S.L. **L-NG arginine methyl ester exhibits antinoceptive active in the mouse.** Br. J. Pharmacol.. 102 (1991) 198-202.
- PAULA, M.M.S. **Síntese, caracterização e estudos eletroquímicos de complexos polipiridínicos de rutênio (II), metaloporfirinas e seus aductos moleculares.** Dissertação de Mestrado. Florianópolis: UFSC, 1994. 99 p.
- PAULA, M.M.S.; MEIER, M.M.; SZPOGANICZ, B.; and FRANCO C.V. **Synthesis, eletrochemical, characterization and potentiometric titration of *trans*-[RuCl₂(L)₄] complexes (L = pyridine derived ligands: 3-pyridinecarboxylic acid and 4-pyridinecarboxilic acid).** J. Coord. Chem. 46 (1999) 491-504.
- PAULA, M.M.S.; PICH, C.T.; PETRONILHO, F.; DREI, L.B.; RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M.R.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, J.A.P.; FRANCO, C.V.; DAL PIZZOL, F. **Antioxidant activity of new ruthenium compounds.** Redox Report. Vol. 10, nº. 3 (2005) 139-143(5).
- PICADA, J.N.; SCHRODER, N.; IZQUIERDO, I.; HENRIQUES, J.A.; ROESLER R. **Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats.** Eur. J. Pharmacol. 443 (2002) 105-11.
- PLECH, A.; KLIMKIEWICZ, T.; MAKSYM, B. **Effect of L-arginine on memory in rats.** Pol. J. Pharmacol. 55 (2003) 987-992.
- QUEVEDO, J.; VIANNA, M.; ZANATTA, M.S.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; JERUSALINKY, D.; QUILLFELD, J.A. **Involvement of mechanisms**

- dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory.** Behav. Pharmacol. 8(8) (1997) 713-717.
- QUINN, A.C.; PETROS, A.J.; WALLACE, P. **Nitric oxide: an endogenous gas.** Br. J. Anaest. 74 (1995) 443-451.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA S. **Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure.** Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3375-8.
- ROESLER, R.; LESSA, D.; VENTURELLA, R.; LUFT, T.; HENRIQUES, J.A.P.; SCHWARTSMANN, G. **Hippocampal bombesin/gastrin-releasing peptide receptors are involved in fear-motivated memory but not in innate fear.** FENS Abstr. 2 (2004) 114-115.
- ROESLER, R.; VIANNA, M.; SANT'ANNA, M.K.; KUYVEN, C.R.; KRUEL, A.V.S.; QUEVEDO, J.; and FERREIRA M.B.C. **Intrahippocampal Infusion of the NMDA Receptor Antagonist AP5 Impairs Retention of an Inhibitory Avoidance Task: Protection from Impairment by Pretraining or Preexposure to the Task Apparatus.** Neurobiol Learn Mem. 69 (1998) 87-91.
- ROESLER, R.; WALZ, R.; QUEVEDO, J.; DE-PARIS, F.; ZANATA, S.M.; GRANER E. et al. **Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP^C.** Mol. Brain Res; 71 (1999) 349-53.
- SAVA, G.; CAPOZZI, I.; BERGAMO, A.; GAGLIARDI, R.; COCCHIETO, M.; MASIERO, L.; ONISTO, M.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; GARBISA, S.

- Down-regulation of tumour gelatinase/inhibitor balance and preservation of tumour endothelium by an anti-metastatic ruthenium complex.** *Int. J. Cancer* 27 (1996) 60-66.
- SAVA, G.; CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCHIETO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; PARBELINI A. **Reduction of lung metastasis by ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors.** *Anticancer Drugs*. 10 (1999) 129-138.
- SEIFRIZ, I.; KONZEN, M.; PAULA M.M.S.; et al., **Synthesis, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological properties of *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinics3,5-pyridinecarboxylic acid).** *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 153-163.
- SESSA, W.C.; HARRISSON, J.K.; LUTHIN, D.R.; POLLOCK, J.S.; LYNCH, K.R. **Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase.** *Hypertension* 21 (1993) 934-938.
- TRYNDA-LEMIEZ, L.; KEPLER, B.K.; KOSTOWISKI H. **Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [*trans*-tetrachlorobis (imidazol) ruthenate (III)].** *J. Inorg. Biochem.* 73 (1999) 123-28.
- VIANNA, M.R.; ALONSO, M.; VIOLA, H.; QUEVEDO, J.; DE PARIS, F.; FURMAN, M. **Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat.** *Learn and Mem.* 7 (2000) 333-40.

VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M.K.; et al. **Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning.** Braz. J. Med. Biol. Res. 34 (2001) 233-40.

ZHAO, M.; CLARKE M.J. ***trans*-pyridine tetraammine complexes of Ru (II) and Ru (III) with N7-coordinated purine nucleosides.** J. Biol. Inorg. Chem. 4 (1999) 318-24.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1: Artigo publicado na revista *Neurochemical Research*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)